(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년07월03일
(11) 등록번호 10-2828164
(24) 등록일자 2025년06월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/785 (2006.01) *C07K 1/18* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)
C12N 9/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/785 (2013.01)
C07K 1/18 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7009735
(22) 출원일자(국제) 2018년09월04일
심사청구일자 2021년09월03일
(85) 번역문제출일자 2020년04월03일
(65) 공개번호 10-2020-0044118
(43) 공개일자 2020년04월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/049391
(87) 국제공개번호 WO 2019/050857
국제공개일자 2019년03월14일
(30) 우선권주장
62/554,825 2017년09월06일 미국(US)
62/614,758 2018년01월08일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JP2009514958 A*
KR1020090077911 A*
KR1020150126730 A*
NCBI 서열검색 결과, GenBank: EAW80421.1 (2015.3.23)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
에어웨이 테라퓨틱스, 아이엔씨.
미국 조지아 30068 마리에타 스위트 300 존슨 페리 로드 1200
글리코토페 게엠베하
독일 베를린 로버트-로슬레 슈트라쎄 10 (우:13125)
(72) 발명자
로젠바움, 얀 수잔
미국 오하이오주 45249 신시내티 11804 콘리 로드 스위트 넘버 175 에어웨이 테라퓨틱스, 엘엘씨 내
쿠아스트, 프레데릭 갸폰
독일 베를린 13125 로버트-로슬레-슈트라쎄 10 글리코토페 게엠베하 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 무한

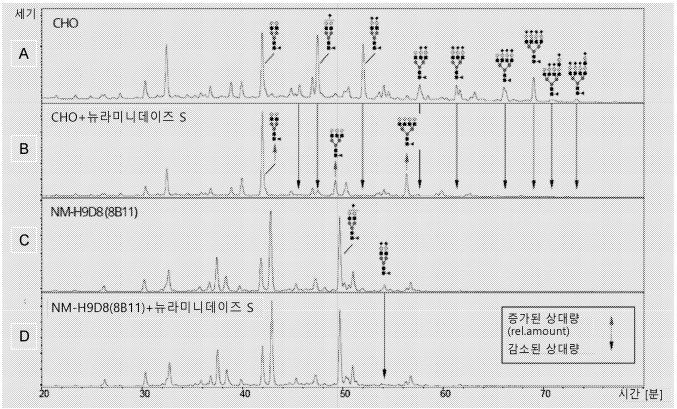
전체 청구항 수 : 총 16 항 심사관 : 김상준

(54) 발명의 명칭 **계면활성제 단백질 D (SP-D)를 제조하는 방법, 조성물 및 세포**

(57) 요 약

본원에 제시된 방법 및 조성물의 몇몇 양태는 계면활성제 단백질-D (SP-D)의 제조에 관한 것이다. 몇몇 양태는 특정 세포주에서의 인간 SP-D의 발현 및 이러한 세포주로부터 인간 SP-D의 정제를 포함한다. 몇몇 양태는 인간 SP-D의 특정한 올리고머 형태의 제조를 포함한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C07K 14/7051 (2013.01)
C12N 15/85 (2013.01)
C12N 9/003 (2013.01)
C12Y 105/01003 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)
(72) 발명자
카우프, 마티아스
독일 베를린 13125 로버트-로슬레-슈트라쎄 10 글리코토페 게엠베하 내
스토클, 랄스
독일 베를린 13125 로버트-로슬레-슈트라쎄 10 글리코토페 게엠베하 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 계면활성제 단백질 D (surfactant protein D, SP-D) 폴리펩티드 조성물을 생산하는 방법으로서, 상기 방법은 하기 단계들:

(a) 인간 SP-D 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 NM-H9D8 인간 세포에 도입하는 단계;

(b) 상기 SP-D 폴리펩티드가 발현되는 조건하에서, 상기 세포를 배양하는 단계; 및

(c) 발현된 SP-D 폴리펩티드를 상기 세포로부터 분리하는 단계로서, 상기 발현된 SP-D 폴리펩티드는 자연적으로 존재하는 인간 SP-D의 당화 패턴(glycosylation pattern)과 밀접하게 닮은 당화 패턴을 포함하며, 여기서 밀접하게 닮았다는 것은 글리칸 구조체가 N-당화 프로파일에서 아스파라긴 잔기에 부착되고, 글리칸 구조체가 O-당화 프로파일에서 세린, 트레오닌, 히드록시-라이신 또는 히드록시-프롤린 잔기에 부착되어 있는 것을 의미하는 것인, 단계;

를 포함하고,

상기 발현된 SP-D 폴리펩티드 및 자연적으로 존재하는 인간 SP-D 각각은 (i) 3개의 시알산을 갖는 글리칸, (ii) 단일 안테나(monoantennary) 글리칸, (iii) 사중 안테나(tetraantennary) 글리칸, (iv) 하이브리드형 글리칸, 및 (v) 고-만노오스형 글리칸을 포함하는 탄수화물 구조체의 동일한 백분율을 포함하고, 이때 상기 백분율은 발현된 SP-D 폴리펩티드 중 탄수화물 구조체의 총량 100%에 대한 상대적인 비율인 것인, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 발현된 SP-D 폴리펩티드는 190 내지 208 범위 내의 안테나리티 수(antennarity number: A 수)를 갖는 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 야생형 SP-D 폴리펩티드 선도 서열(leader sequence) 또는 야생형 T-세포 수용체(T-cell receptor, TCR) 폴리펩티드 선도 서열을 포함하는 선도 폴리펩티드를 추가로 인코딩하는 것인, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 선도 폴리펩티드는 서열번호 05 또는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 04의 위치 21 내지 375의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 것인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 04 또는 서열번호 09의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 것인, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 SP-D 폴리펩티드는 성숙(mature) SP-D 폴리펩티드의 다형성 위치(polymorphic position)에 대응하는 위치의 잔기를 포함하고, 상기 잔기는 다음을 포함하는 군으로부터 선택된 것인, 방법:

Met11 또는 선도 폴리펩티드를 포함하는 Met31; Thr160 또는 선도 폴리펩티드를 포함하는 Thr180; Ser270 또는 선도 폴리펩티드를 포함하는 Ser290; 및 Ala286 또는 선도 폴리펩티드를 포함하는 Ala306.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 디하이드로엽산 환원효소 폴리펩티드(dihydrofolate reductase polypeptide)를 추가로 인코딩하는 것인, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 세포를 배양하는 단계는 상기 세포를 항-엽산제(antifolate)와 접촉시키는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 SP-D 폴리펩티드의 발현은 상기 항-엽산제의 농도를 증가시킴으로써 증가되는 것인, 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 항-엽산제는 메토트렉세이트(methotrexate)를 포함하는 것인, 방법.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 세포는 관류 생물반응기(perfusion bioreactor)에서 배양되는 것인, 방법.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 세포는 연속배양(continuous culture)으로 배양되는 것인, 방법.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 세포를 배양하는 단계는 pH 7.2를 갖는 성장 배지, 40% 내지 20%의 범위 내의 용존 산소, 및 37° C의 온도를 유지하는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 용존 산소는 20% 내지 35% 미만의 범위, 또는 20% 내지 30% 미만의 범위인 것인, 방법.

청구항 18

제1항에 있어서,

상기 발현된 SP-D 폴리펩티드를 상기 세포로부터 분리하는 단계는 상기 세포를 함유하는 배양 배지로부터 세포 상청액을 제조하는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련출원의 상호참조**

[0002] 본 출원은 "계면활성제 단백질 D (SP-D)를 제조하는 방법, 조성물 및 세포"라는 명칭의 2018년 1월 8일자 미국 가출원 제62/614758호 및 "계면활성제 단백질 D (SP-D)를 제조하는 방법, 조성물 및 세포"라는 명칭의 2017년 9월 6일자 미국 가출원 제62/554825호를 우선권으로 주장하며, 이들의 전체 기재내용은 각각 본원에 참고로 포함된다.

[0003] **서열목록의 참조**

[0004] 본 출원은 전자형식의 서열목록과 함께 제출되었다. 상기 서열목록은 2018년 8월 31자에 생성된 AIRWY007WOSEQ라는 명칭의 파일로 제공되며, 이의 크기는 약 13 Kb이다. 상기 전자형식의 서열목록의 정보는 이의 전체 기재내용이 본원에 참고로 포함된다.

[0005] **기술분야**

[0006] 본원에 제시된 방법 및 조성물의 몇몇 양태는 계면활성제 단백질-D (SP-D)의 제조에 관한 것이다. 몇몇 양태는

특정한 세포주에서의 인간 SP-D의 발현 및 이러한 세포주로부터 인간 SP-D의 정제를 포함한다. 몇몇 양태는 인간 SP-D의 특정한 올리고머 형태의 제조를 포함한다.

배 경 기 술

[0007] 포유류 폐 계면활성제(mammalian pulmonary surfactant)는 단백질 (10%)과 주요 지질 성분인 디팔미토일포스파티딜콜린(dipalmitoylphosphatidylcholine)을 포함하는 지질 (90%)의 혼합물이다 (Zuo YY, *외*, Biochim Biophys Acta (2008) 1778:1947-77). 폐 계면활성제의 주요 기능은 폐 내부에서 최소의 표면장력을 확보하여, 호흡 동안에 허탈(collapse)을 막는 것이다. 또한, 흡입된 병원체와 상호작용함으로써, 폐 계면활성제는 숙주 방어에 또한 참여한다 (Clements JA. Am Rev Respir Dis (1977) 115:67-71). 그러므로, 폐 계면활성제 결핍은 천식(asthma), 모세기관지염(bronchiolitis), 호흡 곤란 증후군(respiratory distress syndrome, RDS), 낭포성 섬유증(cystic fibrosis), 및 폐렴과 같은 폐 질병과 관련 있다 (Griese M. Eur Respir J (1999) 13:1455-76). 계면활성제 제제(surfactant formulation)는 매년 전 세계적으로 ~150만 명의 미숙아에 영향을 끼치는 RDS의 치료에 권고된다. 호흡 곤란 증후군은 미숙아에서 폐의 구조 미성숙(structural immaturity)으로 인한 주요한 폐 계면활성제 결핍 질병으로, 숨쉬기 어렵게 만들고, 가스 교환을 억제하며, 폐포 허탈(alveolar collapse)을 촉진시킨다 (Notter RH. Lung Surfactants. Basic Science and Clinical Applications. New York, NY: Marcel Dekker Inc.). 그러나, 현재의 계면활성제 제제는 계면활성제 단백질 D (SP-D)가 결핍되어 있기 때문에, 폐가 감염되거나 또는 염증성 합병증 또는 산화 합병증(oxidative complication)이 존재하는 경우에, 치료는 더욱 어려워진다. 그러므로, 복합 폐 질병(complex pulmonary disease)의 성공적인 치료는 조성물이 천연 폐 계면활성제와 가능한 한 밀접하게 일치하는 계면활성제 제제의 생산을 필요로 한다 (Robertson B, 외, Biochim Biophys Acta (1998) 1408:346-61).

[0008] SP-D는 천식, 낭포성 섬유증, 및 흡연-유도 폐기종(smoking-induced emphysema)과 같은 만성 폐 질병을 다루는 항-염증 및 항-마이크로박테리아 활성을 제공함으로써, 폐 선천성 면역계(pulmonary innate immune system)에서 역할을 갖는다 (Clark H, 외, Immunobiology (2002) 205:619-31). 미숙한 갓 태어난 양(premature newborn lamb)에 기초한 데이터는 100 mg/kg의 서반타®(Survanta®) (미국에서 이용가능한 천연 계면활성제)와 병용된 ~2-3mg/kg의 재조합 인간 SP-D의 투여가 서반타®의 단독 이용보다, 내독소 쇼크(endotoxin shock)의 예방 및 환기(ventilation)로 인한 폐 염증의 감소에 더욱 효과적이라는 것을 제시한다 (Ikegami M, 외, Am J Respir Crit Care Med (2006) 173:1342-7; Sato A, 외, Am J Respir Crit Care Med (2010) 181:1098-105).

[0009] 전통적으로, SP-D는 기관지 폐포 세척술(bronchoalveolar lavage) 또는 양수(amniotic fluid)의 상청액으로부터 분리해왔으나, 부분적으로는, SP-D의 친수성 특성으로 인해 대부분의 SP-D가 정제하는 동안에 손실된다 (Dodagatta-Marri E, 외, Methods Mol Biol (2014) 100:273-90). 내인성 계면활성제의 고차 다합체화(higher-order multimerization)가 병원체 표면상에 있는 탄수화물 리간드에 대한 SP-D-결합 부위 - 잠재적인 박테리아 및 바이러스 응집 효과(agglutination effect)를 달성하는 - 의 수를 증가시키기 때문에, 폐 계면활성제 제제를 보충하기 위한 천연 SP-D의 이용은 치료학적 효능을 확보할 수 있다 (White M, 외, J Immunol (2008) 181:7936-43). 또한, 적합한 올리고머화(oligomerization) 상태가 숙주 면역 반응의 변형을 위한 (Yamoze M 외, J Biol Chem (2008) 283:35878-35888) 및 계면활성제 항상성(surfactant homeostasis)의 유지를 위한 (Zhang L 외, J Biol Chem (2001) 276:19214-19219) 수용체 인식 및 수용체-매개된 신호 전달(receptor-mediated signal transduction)에 필요하다.

[0010] 낮은 SP-D 수율 및 가변적인 올리고머화 상태는 천연 공급원을 약제학적 SP-D의 생산에 이용하는 것을 어렵게 만든다 (Strong P, 외, J Immunol Methods (1998) 220:139-49). 이들 한계점의 일부를 극복하기 위해, 균질한 (homogeneous) 재조합 SP-D 제제의 생산을 위한 대규모 플랫폼(large-scale platform)을 잠재적으로 제공하는 미생물 또는 포유류 세포주에서 재조합 SP-D가 생산될 수 있다. 그러나, 통상적으로 이용되는 포유류 세포주에서 상업적 캠페인(commercial campaign)에 충분한 수준으로 재조합 인간 SP-D(recombinant human SP-D, rhSP-D)를 발현하는 것은 도전적인데, 이는 상기 단백질이 효율적으로 합성되지 않고, 수율이 통상적으로, 리터 당 2 mg 미만의 정제된 단백질이기 때문이다. 수율은 비-포유류 시스템에서 더 높은 경향이 있지만, 단지 SP-D의 절단 변이체(truncated variant)의 발현은 단백질의 당화된 형태를 생산하지 않거나, 또는 인간 당화 패턴을 갖는 단백질을 생산하지 않는 불리한 점을 갖는 효모 또는 박테리아와 같은 시스템에서 시도되었다 (Salgado D, 외, Front Immunol (2014) 5:623, doi: 10.3389/fimmu.2014.00623). 더욱이, 재조합 및 천연 인간 SP-D로 보인 올리고머화 상태의 가변성을 제어하는 것은 지금까지 불가능하다. 발현 시스템이 천연 SP-D에서 관찰된 지속적으로 안정한 수준의 고차 다합체화 상태를 갖는 rhSP-D를 재현가능하게(reproducibly) 생산하지 않는 한, 이러

한 제제의 감소된 효능에 대한 가능성이 존재한다.

발명의 내용

[0011] 본원에 제시된 방법 및 조성물의 몇몇 양태는 다음의 단계들을 포함하는 인간 계면활성제 단백질 D (surfactant protein D, SP-D) 폴리펩티드 조성물을 생산하는 방법을 포함한다: (a) 인간 SP-D 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 인간 포유류 세포(mammalian cell)에 도입하는 단계; (b) 상기 SP-D 폴리펩티드가 발현되는 조건하에서, 상기 세포를 배양하는 단계; 및 (c) 발현된 SP-D 폴리펩티드를 상기 세포로부터 분리하는 단계.

[0012] 몇몇 양태에서, 상기 세포는 인간 골수성 백혈병 세포(myeloid leukemia cell)로부터 유래된다. 몇몇 양태에서, 상기 세포는 NM-H9D8, NM-H9D8-E6Q12, 및 NM-F9로 이루어진 군으로부터 선택된다. 몇몇 양태에서, 상기 세포는 NM-H9D8 세포이다.

[0013] 몇몇 양태에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 야생형 SP-D 폴리펩티드 선도 서열(leader sequence)을 인코딩한다.

[0014] 몇몇 양태에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 03을 포함한다.

[0015] 몇몇 양태에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 02를 포함한다.

[0016] 몇몇 양태에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 05를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 인코딩한다.

[0017] 몇몇 양태에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 04를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 인코딩한다.

[0018] 몇몇 양태에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 야생형 T-세포 수용체(T-cell receptor, TCR) 폴리펩티드 선도 서열을 인코딩한다.

[0019] 몇몇 양태에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 08을 포함한다.

[0020] 몇몇 양태에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 07을 포함한다.

[0021] 몇몇 양태에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 10을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 인코딩한다.

[0022] 몇몇 양태에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 09를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 인코딩한다.

[0023] 몇몇 양태에서, 상기 SP-D 폴리펩티드는 다형성 위치(polymorphic position)에 있는 잔기를 포함하고, 상기 잔기는 Met11/31, Thr160/180, Ser 270/290, 및 Ala 286/306으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 몇몇 양태에서, 상기 SP-D 폴리펩티드는 Met11/31을 포함한다. 몇몇 양태에서, 상기 SP-D 폴리펩티드는 Met11/31, Thr160/180, Ser 270/290, 및 Ala 286/306을 포함한다.

[0024] 또한, 몇몇 양태는 상기 발현된 SP-D 폴리펩티드의 집단(population)을 분리하는 것을 포함하고, 발현된 SP-D 폴리펩티드 각각은 N-당화 부위(N-glycosylation site)에서 부착된 복합형 탄수화물(complex-type carbohydrate)을 포함하며, 상기 집단은 다음의 특징들을 포함하는 당화 패턴(glycosylation pattern)을 갖는다: (i) 상기 복합형 탄수화물의 적어도 70%는 코어 푸코오스(core fucose)를 포함함; (ii) 상기 복합형 탄수화물의 적어도 10%는 적어도 하나의 시알산(sialic acid) 잔기를 포함함; (iii) 상기 복합형 탄수화물의 적어도 50%는 적어도 이중 안테나 탄수화물 구조체(biantennary carbohydrate structure)를 포함함; (iv) 상기 복합형 탄수화물의 적어도 10%는 바이섹팅 N-아세틸글루코사민(bisecting N-acetylglucosamine)을 포함함; (v) 상기 탄수화물의 10% 미만은 고-만노오스형 구조체(high-mannose type structure)임; 및 (vi) 검출가능한 양의 α2,6-커플링된 시알산(α2,6-coupled sialic acid) 잔기.

[0025] 몇몇 양태에서, 상기 집단은 다음의 특징들 중 하나 이상을 포함하는 당화 패턴을 갖는다: (i) 상기 복합형 탄수화물의 적어도 20%는 바이섹팅 N-아세틸글루코사민을 포함함; 및 (ii) 상기 복합형 탄수화물의 적어도 85%는 코어 푸코오스를 포함함.

[0026] 몇몇 양태에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 디하이드로엽산 환원효소(dihydrofolate reductase) 폴리펩티드를 인코딩한다. 몇몇 양태에서, 상기 세포를 배양하는 단계는 상기 세포를 항-엽산제(antifolate)와 접촉시키는 것을 포함한다. 몇몇 양태에서, 상기 SP-D 폴리펩티드의 발현은 상기 항-엽산제의 농도를 증가시킴으로써 증가된

다. 몇몇 양태에서, 상기 항-엽산제는 메토트렉세이트(methotrexate)를 포함한다.

[0027] 몇몇 양태에서, 상기 세포는 관류 생물반응기(perfusion bioreactor)에서 배양된다.

[0028] 몇몇 양태에서, 상기 세포는 연속배양(continuous culture)으로 배양된다.

[0029] 몇몇 양태에서, 상기 세포를 배양하는 단계는 pH 7.2를 갖는 성장 배지, 40% 및/또는 20%의 용존 산소, 및 37°C의 온도를 유지하는 것을 포함한다. 몇몇 양태에서, 상기 용존 산소는 35%, 바람직하게는 30% 미만이다.

[0030] 몇몇 양태에서, 상기 발현된 SP-D 폴리펩티드를 상기 세포로부터 분리하는 단계는 상기 세포를 함유하는 배양 배지로부터 세포 상청액을 제조하는 것을 포함한다.

[0031] 본원에 제시된 방법 및 조성물의 몇몇 양태는 선도 폴리펩티드, 인간 계면활성제 단백질 D (SP-D) 폴리펩티드, 및 디하이드로엽산 환원효소 (dihydrofolate reductase)를 인코딩하는 발현 벡터를 포함한다.

[0032] 몇몇 양태에서, 상기 선도 폴리펩티드는 야생형 SP-D 폴리펩티드 선도 서열이다. 몇몇 양태에서, 상기 선도 폴리펩티드는 서열번호 05를 포함한다.

[0033] 몇몇 양태에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 04를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 인코딩한다.

[0034] 몇몇 양태에서, 상기 선도 폴리펩티드는 야생형 T-세포 수용체 (TCR) 폴리펩티드 선도 서열이다. 몇몇 양태에서, 상기 선도 폴리펩티드는 서열번호 10을 포함한다.

[0035] 몇몇 양태에서, 상기 벡터는 서열번호 02 및 07로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0036] 몇몇 양태에서, 상기 벡터는 서열번호 04 및 09로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 인코딩한다.

[0037] 본원에 제시된 방법 및 조성물의 몇몇 양태는 발현 벡터에 관련된 상기 기재된 양태들 중 임의의 한 양태의 발현 벡터를 포함하는 불멸화 인간 세포를 포함한다. 몇몇 양태에서, 상기 세포는 인간 골수성 백혈병 세포로부터 유래된다. 몇몇 양태에서, 상기 세포는 NM-H9D8, NM-H9D8-E6Q12, 및 NM-F9로 이루어진 군으로부터 선택된다. 몇몇 양태에서, 상기 세포는 NM-H9D8 세포이다. 몇몇 양태에서, 상기 세포는 NM-H9D8(8B11) 세포이다.

[0038] 본원에 제시된 방법 및 조성물의 몇몇 양태는 인간 계면활성제 단백질 D (SP-D) 폴리펩티드를 인코딩하는 발현 벡터를 포함하는 불멸화 인간 세포를 포함하고, 상기 세포는 인간 백혈병 세포로부터 유래된다.

[0039] 몇몇 양태에서, 상기 발현 벡터는 선도 폴리펩티드를 더 인코딩한다. 몇몇 양태에서, 상기 선도 폴리펩티드는 야생형 SP-D 폴리펩티드 선도 서열이다. 몇몇 양태에서, 상기 폴리펩티드는 서열번호 05의 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 양태에서, 상기 선도 폴리펩티드는 야생형 T-세포 수용체 (TCR) 폴리펩티드 선도 서열이다. 몇몇 양태에서, 상기 선도 폴리펩티드는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함한다.

[0040] 몇몇 양태에서, 상기 인간 계면활성제 단백질 D (SP-D) 폴리펩티드는 서열번호 04의 위치 22 내지 376의 아미노산 서열을 포함한다.

[0041] 몇몇 양태에서, 상기 발현 벡터는 디하이드로엽산 환원효소를 더 인코딩한다.

[0042] 몇몇 양태에서, 상기 세포는 NM-H9D8, NM-H9D8-E6Q12, 및 NM-F9로 이루어진 군으로부터 선택된다. 몇몇 양태에서, 상기 세포는 NM-H9D8 세포이다. 몇몇 양태에서, 상기 세포는 NM-H9D8(8B11) 세포이다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 SP-D 삼량체(trimer)의 형성 및 SP-D 삼량체의 구조적 특징을 묘사하는 개략도이다.

도 2a는 인간 SP-D, 인간 SP-D 선도 서열, 및 디하이드로엽산 환원효소(dihydrofolate reductase, DHFR)를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 발현 벡터 pHBG1Ddhfr_WT_SP-D (7228 bp)의 맵이다.

도 2b는 인간 SP-D, 인간 T-세포 수용체 (T-cell receptor, TCR) 선도 서열, 및 디하이드로엽산 환원효소(DHFR)를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 발현 벡터 pHBG1Ddhfr_TCR_SP-D (7231 bp)의 맵이다.

도 2c는 인간 SP-D, 인간 SP-D 선도 서열, 및 디하이드로엽산 환원효소(DHFR)를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를

함유하는 발현 벡터 pHBG1Ddhfr_SFTPD (7228 bp)의 맵이다.

도 3은 다양한 메토트렉세이트 (methotrexate, MTX) 농도로 배양된 풀에 대한 특이 생산율(specific production rate)을 나타내는 막대 그래프이다. 세포주 풀은 각각 인간 SP-D 선도 서열을 함유하는 인간 SP-D 발현 벡터로 각각 형질주입된 F9 세포, H9D8-E6Q12 세포, 및 H9D8 세포인 'rhSP-D-F9', 'rhSP-D-Fuc(-)', 'rhSP-D-H9D8'; 및 인간 TCR 선도 서열을 함유하는 인간 SP-D 발현 벡터로 형질주입된 H9D8인 'rhSP-D-TCR-H9D8';을 포함했다.

도 4는 클론 H9D8-P1315-2A5에 대한, 생물반응기 가동(bioreactor run)으로부터 시간에 따른 배양 조건의 변화를 나타내는 일련의 그래프이고, 다음을 포함한다: 생세포 농도(패널 A); 글루코스 농도 (패널 B); 세포 생존도 (패널 C); 락테이트 농도 (패널 D).

도 5는 발현 세포로부터 rhSP-D 정제의 다양한 단계에서의 단백질을 나타내는, 쿠마시 블루(Coomassie blue)로 염색된 SDS-PAGE 겔의 사진이다.

도 6은 박테리아가 클론 H9D8-P1315-2A5로부터 정제된 다양한 농도의 rhSP-D로 처리된 박테리아 응집 검정(bacterial aggregation assay)에 대한 선 그래프로서, SP-D 처리가 시간에 따른 박테리아 응집에 어떻게 영향을 끼쳤는지를 나타낸다.

도 7은 TLR4 수용체 경로 검정(TLR4 receptor pathway assay)에서, 클론 H9D8-P1315-2A5로부터 정제된 rhSP-D의 농도의 증가에 따른 억제 활성을 나타내는 선 그래프이다.

도 8은 상이한 공급원의 정제된 rhSP-D로부터 방출되고, 형광 검출을 수반한 친수성 상호작용 초고성능 크로마토그래피(hydrophilic interaction ultra-performance chromatography)가 수행된, 형광 태그된 N-글리칸(fluorescence tagged N-glycan)의 크로마토그램이다.

도 9는 상이한 공급원의 SP-D로부터 방출되고, 형광 검출을 수반한 친수성 상호작용 초고성능 크로마토그래피가 수행된, 형광 태그된 O-글리칸(fluorescence tagged O-glycan)의 크로마토그램이다.

도 10은 CHO (패널 A 및 B) 및 NM-H9D8(8B11) (패널 C 및 D)에서 생산된 SP-D로부터 방출 - (패널 A 및 C)는 뉴라미니데이즈 S(neuraminidase S)로 처리하지 않았고, (채널 B 및 D)는 뉴라미니데이즈 S로 처리함 - 되고, 형광 검출을 수반한 친수성 상호작용 초고성능 크로마토그래피가 수행된, 형광 태그된 N-글리칸의 크로마토그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 계면활성제 단백질 D (SP-D)는 다음의 4개의 도메인을 포함하는 C형 (Ca^{2+}-의존성) 렉틴이다: 분자간 이황화 결합의 형성에 필요한 시스테인-결합 N-말단 영역(cysteine-linked N-terminal region), 삼중-나선 콜라겐 영역(triple-helical collagen region), α-나선-코일드-코일 삼량체화 넥 펩티드(α-helical-coiled-coil trimerizing neck peptide), 및 C-말단 칼슘-의존성 탄수화물-인식 도메인(C-terminal calcium-dependent carbohydrate-recognition domain, CRD) (Crouch E. 외. (1994) J Biol Chem, 269:17311-9). 단량체는 콜라겐 영역이 삼중 나선으로 되는 폴딩(folding) 및 넥 영역(neck region)에서의 α-나선의 코일드-코일 다발(coiled-coil bundle)의 조립(assembly)을 통해서 삼량체를 형성한다 (도 1). 이들 삼량체는 시스테인-풍부 N-말단 도메인(cysteine-rich N-terminal domain)에서 2개의 이황화 결합에 의해 안정화된다. SP-D 삼량체는 3개의 동일한 43-kDa 폴리펩티드 사슬을 포함하는 129kDa의 총 분자량을 가진다. SP-D 삼량체는 크기와 형태(conformation)가 다른 고차 올리고머화 상태(higher order oligomerization state)를 형성할 수 있다. 고차 올리고머화 상태는 SP-D 기능에 중요할 수 있다 (Hakansson K, 외, Protein Sci (2000) 9:1607-17; Crouch E. Respir Res (2000) 1:93-108; Crouch E. 외. (2006) J Biol Chem, 281:18008-14). 고차 올리고머화 상태로의 SP-D 삼량체의 회합(association)은 정제 및 보관하는 동안의 환경적인 요인과 조건에 민감하다. SP-D의 큰 올리고머의 형성에 관여한 상호작용의 경로 및 유형은 이전에 밝혀지지 않았다. 본원에 제시된 방법 및 조성물의 몇몇 양태는 특정한 유형의 SP-D 올리고머의 제조 및 정제에 관한 것이다.

[0045] 포유류 차이니즈 햄스터 난소(Chinese hamster ovary, CHO) 세포에서 생산된 인간 SP-D는 원자력 현미경(atomic force microscopy, AFM) 및 전기영동(electrophoresis)에 의해 특성화되었다. rhSP-D의 용액은 삼량체; 육량체(hexamer); 십이량체(dodecamer); 및 4개 초과의 삼량체를 포함하는 "퍼지 볼(fuzzy ball)"로 확인된 더 큰 올리고머 종(oligomeric species);을 포함하는 상이한 SP-D 올리고머 형태의 다양한 집단을 포함할 수

있다. 본 발명의 몇몇 양태에서, 특히 본원에 기재된 벡터 및/또는 숙주 세포 및/또는 정제 방법을 이용하는 본원에 기재된 SP-D의 생산이 CHO 세포에서의 SP-D의 생산에 비해서, SP-D 단백질의 더 높은 수율 및 SP-D 십이량체의 더 많은 양 및 더 큰 올리고머 종의 더 적은 양을 야기한다는 것이 입증되었다. 본 발명의 몇몇 양태에서, 특히 본원에 기재된 벡터 및/또는 숙주 세포 및/또는 정제 방법을 이용하는 본원에 기재된 SP-D의 생산이 CHO 세포에서의 rhSP-D의 생산에 비해서, SP-D 단백질의 더 높은 수율 및 SP-D 십이량체의 더 많은 상대량(relative amount) 및 더 큰 올리고머 종의 더 적은 상대량을 야기한다는 것이 입증되었다. 예를 들어, 수율은 약 5-15배까지 증가될 수 있었고, SEC HPLC에 의해 측정된 정제된 rhSP-D 조성물 중 SP-D 십이량체의 상대량은 약 30% 이상 향상될 수 있었으며, 더 큰 올리고머 종의 상대량은 약 30% 이상 감소될 수 있었다. Q-세파로오스(Q-Sepharose) 및 수퍼덱스 75 컬럼(Superdex 75 column)을 통한 세포 배양 상청액의 정제는 더 큰 올리고머 종(피지 볼과 같은)에 대한 십이량체의 비율을 변화시키지 않는다. 그러므로, 정제된 SP-D 조성물 중 십이량체 및 더 큰 올리고머 종의 상대량은 세포 배양 상청액의 상대량을 나타낸다.

[0046] **특정한 발현 벡터 및 세포**

[0047] 한 측면에서, 인간 SP-D 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터가 제시된다. 몇몇 양태는 인간 SP-D 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터의 정제를 포함한다. 인간 SP-D 폴리펩티드에서의 다형성(polymorphism)은 잔기 11, ATG (Met) -> ACG (Thr); 잔기 25, AGT (Ser) -> AGC (Ser); 잔기 160, ACA (Thr) -> GCA (Ala); 잔기 270, TCT (Ser) -> ACT (Thr); 및 잔기 286, GCT (Ala) -> GCC (Ala);을 포함할 수 있고, 위치들은 성숙 SP-D 폴리펩티드에서의 위치에 관한 것이다. 몇몇 양태에서, SP-D 폴리펩티드는 다형성 위치에 있는 특정한 잔기를 포함하고, 상기 잔기는 Met11/31, Thr160/180, Ser 270/290, 및 Ala 286/306으로부터 선택되며, 잔기 위치는 성숙 SP-D 폴리펩티드에서의 위치 및 이의 선도 폴리펩티드 (leader polypeptide)를 갖는 SP-D 폴리펩티드에서의 위치에 관한 것이다. 몇몇 양태에서, SP-D 폴리펩티드는 Met11/31을 포함한다. 몇몇 양태에서, SP-D 폴리펩티드는 Met11/31, Thr160/180, Ser 270/290, 및 Ala 286/306을 포함한다. 이러한 서열의 예시는 표 1에서 제시된다. 몇몇 양태에서, SP-D는 적어도 약 80%, 90%, 95%, 99% 및 100% 또는 상기 수들 중 임의의 수 사이의 임의의 범위의 일치도 (identity) - 폴리뉴클레오티드의 전체 길이에 대한 서열번호 02 및 서열번호 07로부터 선택된 폴리뉴클레오티드와의 - 를 갖는 핵산에 의해 인코딩된다. 몇몇 양태에서, SP-D 폴리펩티드는 적어도 약 80%, 90%, 95%, 99% 및 100%, 또는 상기 수들 중 임의의 수 사이의 임의의 범위의 상동성(homology) - 폴리뉴클레오티드 전체 길이에 대한 서열번호 04 및 서열번호 09로부터 선택된 폴리펩티드와의 - 을 갖는다. 몇몇 양태에서, SP-D 폴리펩티드는 서열번호 04의 위치 22 내지 376의 아미노산 서열, 또는 참조 서열의 전체 길이에 대해서 상기 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0048] 몇몇 양태에서, 발현 벡터는 SP-D 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 5'에 위치한 선도 폴리펩티드를 인코딩한다. 몇몇 양태에서, 선도 서열은 야생형 T 세포 수용체 (TCR) 선도 서열 또는 야생형 SP-D 선도 서열이다. 이러한 서열의 예시는 표 1에서 제시된다. 몇몇 양태에서, 선도 폴리펩티드는 적어도 약 80%, 90%, 95%, 99% 및 100%, 또는 상기 수들 중 임의의 수 사이의 임의의 범위의 일치도 - 폴리뉴클레오티드의 전체 길이에 대해서 서열번호 03 및 서열번호 08로부터 선택된 폴리뉴클레오티드와의 - 를 갖는 핵산에 의해 인코딩된다. 몇몇 양태에서, 선도 폴리펩티드는 적어도 약 80%, 90%, 95%, 99% 및 100%, 또는 상기 수들 중 임의의 수 사이의 임의의 범위의 상동성 - 폴리뉴클레오티드의 전체 길이에 대해서 서열번호 05 및 서열번호 10으로부터 선택된 폴리펩티드와의 - 을 가진다.

[0049] 몇몇 양태에서, 발현 벡터는 선별 유전자(selection gene)를 갖는 포유류 세포의 선별에 유용한 선별 유전자를 포함한다. 이러한 유전자의 예시는 메토트렉세이트와 같은 항-엽산제 화합물에 대한 저항성을 제공하는 디하이드로엽산 환원효소와 같은 단백질을 인코딩하는 유전자를 포함한다.

[0050] 한 측면에서, 인간 SP-D 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 중 하나 이상을 포함하는 세포가 제시된다. 몇몇 양태는 본원에 기재된 발현 백터들 중 하나 이상을 포함하는 세포를 포함한다. 이러한 세포의 예시는 발현된 SP-D 폴리펩티드의 활성 및/또는 안정성을 강화시키는 당화 패턴으로, 발현된 SP-D 폴리펩티드를 변형할 수 있는 포유류 세포를 포함한다. 이러한 세포는 인간 골수성 백혈병으로부터 유래된 세포를 비롯한, 불멸화된 인간 혈구(immortalized human blood cell)를 포함한다. 이러한 세포의 예시는 브라운슈바이크(Braunschweig) (독일) 소재의 "독일 생물자원 센터(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ)"와 공인된 ACC 코드하에 기탁된 NM-H9D8 (DSM ACC 2806); NM-H9D8-E6Q12 (DSM ACC 2856); 및 NM-F9 (DSM ACC 2606);를 포함한다. NM-F9는 베를린 (독일) 13125, 로버트-쾨즐-에스티알.

10(Robert-Rössle-Str. 10) 소재의 Nemod Biotherapeutics GmbH & Co. KG에 의해 2003년 8월 14일자에 기탁되었고, NM-H9D8은 베를린 (독일) 13125, 로버트-뢔즐-에스티알. 10 소재의 Glycotope GmbH에 의해 2006년 9월 15일자에 기탁되었으며, NM-H9D8-E6Q12는 베를린 (독일) 13125, 로버트-뢔즐-에스티알. 10 소재의 Glycotope GmbH에 의해 2007년 8월 8일자에 기탁되었다. 유용한 세포주의 더 많은 예시는 미국 특허 제9,051,356호에서 찾을 수 있으며, 이의 전체 기재내용이 본원에 참고로 포함된다. 몇몇 양태에서, 인간 SP-D 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 중 하나 이상을 포함하는 세포는 세포주 NM-H9D8의 세포이다.

[0051] **인간 SP-D를 생산하는 특정한 방법**

[0052] 한 측면에서, 인간 SP-D 폴리펩티드 조성물을 생산하는 방법이 제시된다. 몇몇 양태는 (a) 인간 SP-D 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 인간 포유류 세포(mammalian cell)에 도입하고; (b) 상기 SP-D 폴리펩티드가 발현되는 조건하에서 상기 세포를 배양하며; (c) 발현된 SP-D 폴리펩티드를 상기 세포로부터 분리함으로써, 인간 SP-D 폴리펩티드 조성물을 생산하는 방법을 포함한다. SP-D 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포유류 세포에 도입하는 방법은 당해분야에 주지되어 있고, 전기천공(electroporation); 양이온성 지질(cationic lipid), 칼슘 포스페이트, DEAE-덱스트란을 이용한 형질주입; 또는 아데노바이러스 또는 레트로바이러스 또는 이들의 조합과 같은 바이러스 입자에 의한 감염;을 포함한다. 몇몇 이러한 방법은 본원에 제시된 발현 벡터를 선형화하는 것(linearizing)과 선형화된 벡터를 세포로 형질주입하는 것을 포함한다. 몇몇 양태에서, 본원에 기재된 세포 및/또는 발현 벡터가 인간 SP-D 폴리펩티드 조성물을 생산하는 방법에 이용된다. 몇몇 양태에서, SP-D 폴리펩티드는 포유류 세포에 의해 분비된다. 이들 양태에서, 발현된 SP-D 폴리펩티드는 세포 배양에 이용된 세포 배양 배지로부터 분리될 수 있다. 몇몇 양태에서, 발현된 SP-D 폴리펩티드를 분리하는 것은 본원에 기재된 대로 수행된다.

[0053] 몇몇 양태에서, 세포는 NM-H9D8, NM-H9D8-E6Q12, 및 NM-F9 세포주와 같은 인간 골수성 백혈병 세포로부터 유래된다.

[0054] 몇몇 양태는 발현 벡터를 포함하는 세포를 선별하는 방법을 포함한다. 몇몇 이러한 양태는 메토트렉세이트와 같은 항-엽산제와 세포를 배양시키는 것을 포함할 수 있다. 형질주입물(transfactant)은 서브클로닝(subcloning)과 같은 방법에 의해 분리될 수 있고, SP-D를 발현하는 세포는 ELISA, 웨스턴 블랏, 및 닷-블랏(dot-blot)과 함께, SP-D에 대한 항체를 이용하는 면역학적 방법과 같은 당해분야에 주지된 방법에 의해 용이하게 확인될 수 있다.

[0055] 몇몇 양태에서, SP-D를 증가된 농도로 발현하는 형질주입된 세포는 배양 배지에서 메토트렉세이트와 같은 항-엽산제의 농도를 증가시킴으로써 선별될 수 있다.

[0056] 몇몇 양태는 관류 생물반응기에서 SP-D를 발현하는 세포를 배양시키는 것을 포함한다. 몇몇 이러한 양태는 연속 발효(continuous fermentation)에 의해 세포를 배양시키는 것을 포함할 수 있다. 관류 모드(perfusion mode)에서, 새로운 배지가 계속해서 공급될 수 있고, 세포가 발효기에서 저지되는(held back) 동안에, 무세포 상청액(cell-free supernatant)이 생물반응기로부터 수집될 수 있다. 세포는 상이한 기법을 적용함으로써 저지될 수 있다. 예를 들어, 여과, 원심분리 또는 침강(sedimentation)이 이용될 수 있다. 예시 방법은 미국 특허 제9,359,427호에서 찾을 수 있고, 이의 전체 기재내용이 본원에 참고로 포함된다.

[0057] **배양 배지로부터 SP-D를 분리하는 특정한 방법**

[0058] 한 측면에서, 인간 SP-D 폴리펩티드를 분리하는 방법이 제시된다. 몇몇 양태는 발현된 SP-D 폴리펩티드를 배양 배지로부터 분리하는 것을 포함한다. 한 양태에서, 분리는 크로마토그래피를 이용하는 것에 의한다. 크로마토그래피법의 예시는 단백질 A, 단백질 G, 항-SP-D 항체, 렉틴 크로마토그래피(lectin chromatography), HIS-태그 또는 myc-태그와 같은 SP-D 폴리펩티드에 도입된 특정한 태그에 대한 항체, 또는 항원과 같은, 친화성 물질(affinity material)을 이용하는 친화도 크로마토그래피(affinity chromatography), 또는 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography), 혼합-모드 크로마토그래피(mixed-mode chromatography), 또는 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)와 같은 기타 그로마토그래피 매체(chromatography media)를 포함한다.

[0059] 몇몇 양태에서, 세포 상청액이 SP-D 발현 세포를 포함하는 배양 배지로부터 제조된다. 상청액은 필터-멸균될 수 있다(filter-sterilized). 몇몇 양태에서, SP-D 폴리펩티드를 포함하는 세포 상청액을 컬럼에 넣을 수 있고, 생성되는 용출액은 제2 컬럼에 넣을 수 있다. 몇몇 양태에서, 음이온 교환 크로마토그래피를 이용한 후

에, 친화도 크로마토그래피를 이용하여, SP-D 폴리펩티드가 분리된다. 몇몇 양태에서, Q-세파로오스와 같은 강한 음이온 교환 크로마토그래피 기질(strong anion exchange chromatography matrix)이 음이온 교환 크로마토그래피에 이용된다. 몇몇 양태에서, 수퍼덱스 75 기질과 같은 겔 여과 크로마토그래피 기질이 친화도 크로마토그래피에 이용된다. 몇몇 양태에서, 세포 상청액을 Q-세파로오스 컬럼에 20 mM TRIS, 50 mM NaCl을 포함하는 pH 7.4의 평형화 및 러닝 버퍼(equilibration and running buffer)와 넣는다. SP-D는 20 mM Tris, 600 mM NaCl을 포함하는 pH 7.4의 용출 버퍼를 이용하여 컬럼으로부터 용출될 수 있다. 몇몇 이러한 양태에서, Q-세파로오스 컬럼 용출액은 약 0.2 내지 약 0.8 mg/ml의 SP-D를 포함한다.

[0060] 몇몇 양태는 SP-D를 포함하는 Q-세파로오스 컬럼 용출액의 분획을 수퍼덱스 75 컬럼과 같은 제2 컬럼에 넣는 것을 포함한다. 몇몇 양태에서, Q-세파로오스 컬럼 용출액을 동일한 부피의, 10 mM $CaCl_2$를 함유하는 pH 7.4의 20mM Tris 버퍼로 희석하여, 수퍼덱스 75 컬럼에 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$를 포함하는 pH 7.4의 평형화 및 러닝 버퍼와 넣는다. SP-D는 20 mM Tris, 10 mM EDTA 300 mM NaCl을 포함하는 pH 7.4의 용출 버퍼를 이용하여 컬럼으로부터 용출될 수 있다. 몇몇 이러한 양태에서, 용출액은 약 0.5 내지 약 2 mg/mL의 SP-D를 포함한다. 몇몇 이러한 양태에서, 용출액은 약 90%를 초과하는 순도를 갖는 SP-D를 포함한다. 또한, 몇몇 양태는 보관 및 분석 전에, 용출액을 200 mM NaCl, 1 mM EDTA를 함유하는 pH 7.0의 5 mM 히스티딘 버퍼중으로 투석하는 것(dialyzing)을 포함한다.

[0061] **SP-D의 번역 후 변형(Posttranslational modification)**

[0062] 한 양태는 번역 후 변형의 특정한 패턴을 갖는 인간 SP-D 폴리펩티드를 포함한다. 몇몇 양태는 당화된, 특히 N-당화된 인간 SP-D 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 포함한다. 몇몇 양태에서, 당화된 인간 SP-D 폴리펩티드는 서열번호 4 또는 9의 Asn90에 대응하는 아스파라긴에 탄수화물 구조체를 지닌다. N-당화 부위에 있는 탄수화물 구조체는 2개의 N-아세틸글루코사민 (N-actelyglucosamine, GlcNAc) 잔기 및 3개의 만노오스 잔기의 코어 구조체를 포함할 수 있는데, 첫번째 GlcNAc는 폴리펩티드 골격에 부찰되고, 두번째 GlcNAc는 상기 첫번째 GlcNAc에 부착되며, 첫번째 만노오스는 상기 두번째 GlcNAc에 부착되고, 두번째 및 세번째 만노오스는 상기 첫번째 만노오스에 각각 부착된다. 추가의 단당류 단위체가 상기 코어 구조체에 부착될 수 있다. 몇몇 양태에서, 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 있는 탄수화물 구조체의 적어도 60%, 특히 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 또는 특히 적어도 90%는 복합형 탄수화물 구조체이다. 복합형 탄수화물 구조체는 상기 두번째 또는 세번째 만노오스 잔기에 부착된 적어도 하나의 추가의 GlcNAc 잔기를 포함하나, 임의의 추가의 만노오스 잔기를 포함하지 않는다.

[0063] 몇몇 양태에서, 조성물 중 인간 SP-D 폴리펩티드는 하기 특징들 중 하나 이상을 포함하는 N-당화 부위에서의 당화 패턴을 가진다:

[0064] (i) 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 복합형 탄수화물 구조체의 총량의 적어도 70%인, 코어 푸코오스를 지니는 탄수화물 구조체의 상대량; 및/또는

[0065] (ii) 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 복합형 탄수화물 구조체의 총량의 적어도 10%인, 적어도 하나의 시알산 잔기를 지니는 탄수화물 구조체의 상대량; 및/또는

[0066] (iii) 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 복합형 탄수화물 구조체의 총량의 적어도 50%인, 적어도 이중 안테나 탄수화물 구조체의 상대량.

[0067] 몇몇 양태에서, 코어 푸코오스를 지니는 탄수화물 구조체의 상대량은 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 복합형 탄수화물 구조체의 총량의 적어도 75% 또는 적어도 80%이다. 코어 푸코오스 잔기는 코어 구조체의 첫번째 GlcNAc 잔기에 부착된다. 본 발명에 따른 "탄수화물 구조체의 상대량"은 조성물 중 SP-D에 부착된 탄수화물 구조체의 특정한 백분율 또는 백분율 범위를 의미한다. 특히, 탄수화물 구조체의 상대량은 조성물 중 SP-D 폴리펩티드 사슬에 부착된 모든 탄수화물 구조체의 특정한 백분율 또는 백분율 범위를 의미한다. 몇몇 양태에서, SP-D의 N-당화 부위에 부착된 탄수화물 구조체만 고려된다.

[0068] 몇몇 양태에서, 적어도 하나의 시알산 잔기를 지니는 탄수화물 구조체의 상대량은 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 복합형 탄수화물 구조체의 총량의 적어도 15%, 적어도 20% 또는 적어도 25%이다. 적어도 하나의 시알산 잔기를 지니는 탄수화물 구조체의 상대량은 10% 내지 80%, 15% 내지 75% 또는 20% 내지 70%의 범위 내에 있을 수 있다. 몇몇 양태에서, 조성물 중 인간 SP-D 폴리펩티드의 당화 패턴은 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 복합형 탄수화물 구조체의 총량의 적어도 0.5%, 예를 들어, 적어도 1% 또는 적어도 2%인, 2개의 시알

산 잔기를 지니는 탄수화물 구조체의 상대량을 포함한다. 적어도 2개의 시알산 잔기를 지니는 탄수화물 구조체의 상대량은 0.5% 내지 30%, 1% 내지 20% 또는 1.5% 내지 15%의 범위 내에 있을 수 있다. 용어 "시알산"은 특히, 뉴라민산(neuraminic acid)의 임의의 N- 또는 O-치환 유도체를 의미한다. 이는 5-N-아세틸뉴라민산(5-N-acetylneuraminic acid)과 5-N-글리콜릴뉴라민산(5-N-glycolylneuraminic acid) 모두를 의미할 수 있으나, 바람직하게는 단지, 5-N-아세틸뉴라민산을 의미한다. 시알산, 특히 5-N-아세틸뉴라민산은 바람직하게는, 2,3- 또는 2,6-결합을 통해서 탄수화물 사슬에 부착된다. 바람직하게는, 본원에 기재된 SP-D의 당화 패턴에서, 2,3- 및 2,6-커플링된 시알산 모두가 제시된다.

[0069] 몇몇 양태에서, 적어도 이중 안테나 탄수화물 구조체의 상대량은 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 복합형 탄수화물 구조체의 총량의 적어도 60% 또는 적어도 70%이다. 몇몇 양태에서, 조성물 중 인간 SP-D 폴리펩티드의 당화 패턴은 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 복합형 탄수화물 구조체의 총량의 적어도 2%, 예를 들어, 적어도 3% 또는 적어도 4%인, 적어도 삼중 안테나 탄수화물 구조체(triantennary carbohydrate structure)의 상대량을 포함한다. 안테나(antennae)는 코어 구조체의 말단 (즉, 두번째 또는 세번째) 만노오스 잔기에 부착된 분지(branch) 또는 하나 이상의 단당류 단위체이다. 복합형 탄수화물 구조체에서, 안테나는 대체로, 갈락토오스 잔기 및 임의적으로, 시알산 잔기를 더 지닐 수 있는 GlcNAc 잔기를 포함한다. 이중 안테나 복합형 탄수화물 구조체는 2개의 안테나를 포함한다. 즉, 코어 구조체의 2개의 말단 만노오스 잔기 각각에 적어도 GlcNAc 잔기가 부착된다. 삼중 안테나 복합형 탄수화물 구조체(triantennary complex-type carbohydrate structure)에서, 하나의 말단 만노오스는 2개의 안테나를 지니고, 다른 말단 만노오스는 하나의 안테나를 지닌다. 사중 안테나 복합형 탄수화물 구조체(tetraantennary complex-type carbohydrate structure)에서, 두 말단 만노오스 모두는 각각 2개의 안테나를 지닌다. 용어 "적어도 이중 안테나(at least biantennary)"는 이중 안테나 탄수화물 구조체, 삼중 안테나 탄수화물 구조체 및 사중 안테나 탄수화물 구조체를 포함하는 반면에, 용어 "적어도 삼중 안테나(at least triantennary)"는 삼중 안테나 탄수화물 구조체 및 사중 안테나 탄수화물 구조체를 포함한다.

[0070] 당화에서 A-수(A-number)는 당화 패턴에서 글리칸 구조체의 안테나리티(antennarity)에 대한 참조 번호(reference number)이다. A-수는 특정한 안테나리티의 상대량과 이의 안테나의 수를 곱하고, 각 안테나리티에 대한 획득된 수를 더함으로써 계산된다. 특히, 단일 안테나 글리칸(monoantennary glycan)의 상대량은 1로 곱하고, 이중 안테나 글리칸의 상대량은 2로 곱하며, 삼중 안테나 글리칸의 상대량은 3으로 곱하고, 사중 안테나 글리칸의 상대량은 4로 곱한다. 이들 수의 합계는 A-수를 야기한다. 몇몇 양태에서, 조성물 중 인간 SP-D 폴리펩티드는 적어도 185, 예를 들어, 적어도 190의 A-수를 갖는 N-당화 부위에서의 당화 패턴을 가진다.

[0071] 몇몇 양태에서, 조성물 중 인간 SP-D 폴리펩티드는 하기 특징들 중 하나 이상을 포함하는 N-당화 부위에서의 당화 패턴을 가진다:

[0072] (i) 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 복합형 탄수화물 구조체의 총량의 적어도 2%, 예를 들어, 적어도 5% 또는 적어도 8%인, 바이섹팅 N-아세틸글루코사민(bisecting N-acetylglucosamine, bisGlcNAc)을 지니는 탄수화물 구조체의 상대량; 및/또는

[0073] (ii) 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 복합형 탄수화물 구조체의 총량의 적어도 40%, 예를 들어, 적어도 45% 또는 적어도 50%인, 적어도 하나의 갈락토오스 잔기를 지니는 탄수화물 구조체의 상대량; 및/또는

[0074] (iii) 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 복합형 탄수화물 구조체의 총량의 적어도 15%, 예를 들어, 적어도 20% 또는 적어도 25%인, 적어도 2개의 갈락토오스 잔기를 지니는 탄수화물 구조체의 상대량; 및/또는

[0075] (iv) 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 복합형 탄수화물 구조체의 총량의 30% 이하, 예를 들어, 20% 이하 또는 15% 이하인, N-아세틸갈락토오스 잔기를 지니는 탄수화물 구조체의 상대량; 및/또는

[0076] (v) 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 탄수화물 구조체의 총량의 30% 이하, 예를 들어, 25% 이하, 또는 20% 이하인, 하이브리드형 탄수화물 구조체(hybrid-type carbohydrate structure)의 상대량; 및/또는

[0077] (vi) 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 탄수화물 구조체의 총량의 25% 이하, 예를 들어, 20% 이하 또는 15% 이하인, 고-만노오스형 탄수화물 구조체(high-mannose-type carbohydrate structure)의 상대량.

[0078] 바이섹팅 N-아세틸글루코사민 또는 bisGlcNAc 잔기는 탄수화물 구조체의 코어 구조체의 중심 (즉, 첫번째) 만노오스 잔기에 부착된 GlcNAc 잔기이다. 몇몇 양태에서, bisGlcNAc를 지니는 탄수화물 구조체의 상대량은 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 복합형 탄수화물 구조체의 총량의 2% 내지 50%, 예를 들어, 5% 내지 40% 또는 8% 내지 35%의 범위 내에 있다. "고-만노오스형 탄수화물 구조체(high-mannose-type carbohydrate

structure)"는 코어 구조체의 말단 만노오스에 부착된 만노오스 잔기만 포함한다. "하이브리드형 탄수화물 구조체(hybrid-type carbohydrate structure)"는 코어 구조체의 한 말단 만노오스에 부착된 만노오스 잔기와 코어 구조체의 다른 말단 만노오스에 부착된 복합형 탄수화물 구조체에 대해서 기재된 안테나를 포함한다.

[0079] 몇몇 양태에서, SP-D의 N-당화 부위에서 부착된 복합형 탄수화물을 갖는 SP-D 폴리펩티드의 집단은 다음의 특징들 중 하나 이상을 포함하는 당화 패턴을 가질 수 있다:

[0080] (i) 복합형 탄수화물의 적어도 20%가 바이섹팅 N-아세틸글루코사민을 포함함;

[0081] (ii) 복합형 탄수화물의 적어도 25%가 적어도 하나의 시알산 잔기를 포함함;

[0082] (iii) 복합형 탄수화물의 적어도 85%가 이중 안테나 탄수화물 구조체를 포함함;

[0083] (iv) 복합형 탄수화물의 적어도 0.5%가 적어도 하나의 GalNAc을 포함함;

[0084] (v) 복합형 탄수화물의 2% 미만이 3개의 갈락토오스를 포함함; 및

[0085] (vi) 복합형 탄수화물의 2% 미만이 삼중 안테나 탄수화물 구조체를 포함함.

[0086] 몇몇 양태에서, SP-D의 N-당화 부위에서 부착된 복합형 탄수화물을 갖는 SP-D 폴리펩티드의 집단은 다음의 특징들 중 임의의 특징을 포함하는 당화 패턴을 가질 수 있다. 몇몇 양태에서, 상기 집단의 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 탄수화물 구조체의 복합형 탄수화물의 적어도 15%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 38%, 40%, 45%, 또는 상기 백분율들 중 임의의 백분율 사이의 범위에 있는 백분율은 바이섹팅 N-아세틸글루코사민을 포함한다. 몇몇 양태에서, 상기 집단의 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 탄수화물 구조체의 복합형 탄수화물의 적어도 75%, 80%, 82%, 85%, 90%, 95%, 또는 상기 백분율들 중 임의의 백분율 사이의 범위에 있는 백분율은 이중 안테나 탄수화물 구조체를 포함한다. 몇몇 양태에서, 상기 집단의 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 탄수화물 구조체의 복합형 탄수화물의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 15%, 또는 상기 백분율들 중 임의의 백분율 사이의 범위에 있는 백분율은 적어도 하나의 GalNAc을 포함한다. 몇몇 양태에서, 상기 집단의 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 탄수화물 구조체의 복합형 탄수화물의 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만, 또는 상기 백분율들 중 임의의 백분율 사이의 범위에 있는 백분율은 3개의 갈락토오스 잔기를 포함한다. 몇몇 양태에서, 상기 집단의 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 탄수화물 구조체의 복합형 탄수화물의 15%, 13%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만, 또는 상기 백분율들 중 임의의 백분율 사이의 범위에 있는 백분율은 삼중 안테나 탄수화물 구조체를 포함한다.

[0087] 몇몇 양태에서, 조성물 중 인간 SP-D 폴리펩티드는 다음의 특징들을 포함하는 N-당화 부위에서의 당화 패턴을 가진다:

[0088] (i) 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 복합형 탄수화물 구조체의 총량의 적어도 10%인, 바이섹팅 GlcNAc를 지니는 탄수화물 구조체의 상대량;

[0089] (ii) 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 탄수화물 구조체의 총량의 10% 이하인, 고-만노오스형 탄수화물 구조체의 상대량; 및

[0090] (iii) 검출가능한 양의 α2,6-커플링된 시알산 잔기를 지니는 복합형 탄수화물 구조체.

[0091] 추가의 양태에서, 조성물 중 인간 SP-D 폴리펩티드는 하기 특징들을 포함하는 N-당화 부위에서의 당화 패턴을 가진다:

[0092] (i) 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 복합형 탄수화물 구조체의 총량의 적어도 85%인, 코어 푸코오스를 지니는 탄수화물 구조체의 상대량;

[0093] (ii) 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 복합형 탄수화물 구조체의 총량의 적어도 20%인, 바이섹팅 GlcNAc를 지니는 탄수화물 구조체의 상대량;

[0094] (iii) 조성물 중 SP-D의 N-당화 부위에 부착된 탄수화물 구조체의 총량의 10% 이하인, 고-만노오스형 탄수화물 구조체의 상대량; 및

[0095] (iv) 검출가능한 양의 α2,6-커플링된 시알산 잔기를 지니는 복합형 탄수화물 구조체.

[0096] **SP-D의 올리고머 종의 확인**

[0097] 한 측면에서, 인간 SP-D 폴리펩티드의 올리고머 종을 확인하는 방법이 제시된다. 몇몇 양태는 삼량체, 십이량

체, 및 4개 초과의 삼량체를 함유하는 올리고머 구조체와 같은 SP-D의 올리고머 종을 확인하는 방법을 포함한다. 이러한 방법은 대부분 십이량체 형태와 같은, 특정한 올리고머 형태의 특정한 양을 갖는 SP-D의 제제를 제조하기 위한 조건 및 성분을 확인하는 데 유용할 수 있다. 몇몇 양태에서, 인간 SP-D 폴리펩티드의 올리고머 종을 확인하는 방법은 SP-D의 샘플에 대해서 다각도 광산란을 수반한 비대칭 흐름 장-흐름 분획화 (AF4-MALS) 분석을 수행하는 것을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 방법은 크기 배제 크로마토그래프 HPLC (size exclusion chromatograph HPLC, SEC HPLC)를 수행하여, 인간 SP-D 폴리펩티드의 올리고머 종을 확인하는 것을 포함할 수 있다. SEC HPLC에 대한 예시 조건들은 다음을 포함한다: UHPLC: Dionex UltiMate 3000; 컬럼: TSKgel G6000PWXL, 상(phase): 히드록실화 메타크릴레이트(hydroxylated methacrylate); L X I.D.: 30 cm X 7.8 mm, 13 μm의 입자 크기 (# 0008024, Tosoh); 컬럼 오븐 온도(column oven temperature): 30 ° C; 샘플러(sampler) 온도: 4 ° C; 압력 상한: 31 bar; UV 검출: 280 nm; 용출제: TBS, 10 mM EDTA, pH 7,4 (10xTBS Roti-Stock #1060.1, Carl Roth, EDTA # 8040.2, Carl Roth로부터); 흐름(flow): 0.25 mL/분; 샘플 주입: 20 μg 또는 30 μL의 고정 부피(fix volume); 적분 한계(integration limit): HOO 25.0 - 30.0 분, 십이량체 30.0 - 34.5 분, LOO 34.5 - 44.0 분.

[0098] 몇몇 양태에서, SP-D의 올리고머 종을 확인하는 방법은 SP-D의 샘플에 대해서 원자력 현미경 (AFM)을 수행하는 것, AFM 이미지에서 SP-D의 올리고머 종을 확인 및/또는 정량하는 것을 포함할 수 있다. 몇몇 이러한 양태에서, 상기 방법은 SP-D의 올리고머 종의 혼합물을 크기에 의해 분해하는 것(resolving)을 포함할 수 있다. 몇몇 이러한 방법은 SP-D의 샘플을 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate, SDS)와 같은 음이온 세제(anionic detergent)와 접촉시키는 것; 상기 샘플을 1% 글루타르디알데히드(glutardialdehyde, GA)와 같은 가교 시약(crosslinking reagent)과 접촉시키는 것; 및 크기에 의해 SP-D의 종을, 예를 들어, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)을 수행함으로써 분해하는 것을 포함한다. 몇몇 양태에서, SP-D의 샘플은 가교 시약과 접촉하기 전에, 음이온 세제(anionic detergent)와 접촉된다. 다른 양태에서, SP-D의 샘플은 음이온 세제와 접촉하기 전에, 가교 시약과 접촉된다. 몇몇 양태에서, 상기 샘플은 약 1% GA의 용액과 접촉된다. 몇몇 양태에서, 상기 샘플은 약 1분 내지 약 30분 사이의 기간 동안에 가교 시약과 접촉된다. 몇몇 양태에서, PAGE는 소듐 도데실 설페이트가 존재한다 (PAGE-SDS). 다른 양태에서, PAGE는 네이티브 PAGE(native PAGE)이다. 몇몇 양태에서, PAGE는 구배 겔(gradient gel)을 포함한다. 몇몇 양태에서, 구배 겔은 4 - 15 %의 폴리아크릴아미드 구배 트리스-글리신 겔(polyacrylamide gradient tris-glycine gel)이다. 몇몇 양태에서, PAGE는 환원제 없이 수행된다. 몇몇 양태에서, 환원제는 β-머캅토에탄올을 포함한다. 또한, 몇몇 양태는 SP-D의 종을 확인하는 것, 예를 들어 웨스턴 블랏을 수행하는 것을 포함한다.

[0099] **SP-D를 포함하는 특정한 조성물**

[0100] 몇몇 양태는 SP-D의 올리고머 형태의 특정한 분포를 갖는 rhSP-D 폴리펩티드의 집단을 포함하는 용액을 포함한다. 몇몇 양태에서, 상기 용액은 SP-D의 올리고머 형태를 포함할 수 있으며, 상기 올리고머 형태의 약 30%, 40%, 50%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 70% 초과 또는 상기 수들 사이의 임의의 범위는 SP-D의 십이량체를 포함한다. 몇몇 양태에서, SP-D의 올리고머 형태의 분포는 다각도 광산란을 수반한 비대칭 흐름 장-흐름 분획화 (AF4-MALS) 분석과 같은 본원에 제시된 방법에 의해 측정될 수 있다. 몇몇 양태에서, rhSP-D 폴리펩티드의 용액은 본원에 제시된 방법에 의해 제조된다. 몇몇 양태에서, 본원에 기재된 인간 SP-D 폴리펩티드 조성물을 생산하는 방법은 본원에 기재된 rhSP-D 폴리펩티드의 집단을 포함하는 용액을 생산한다. 몇몇 양태에서, 본원에 기재된 인간 SP-D 폴리펩티드를 분리하는 방법은 본원에 기재된 rhSP-D 폴리펩티드의 집단을 포함하는 용액을 생산한다. 본원에 기재된 인간 SP-D 폴리펩티드 조성물을 생산하는 방법의 몇몇 양태에서, 발현된 SP-D 폴리펩티드는 대부분 십이량체 형태이다. 본원에 기재된 인간 SP-D 폴리펩티드를 분리하는 방법의 몇몇 양태에서, 분리된 SP-D 폴리펩티드는 대부분 십이량체 형태이다. 이러한 점에서 "대부분(predominantly)"은 특히, 조성물 중 모든 SP-D 폴리펩티드의 적어도 30%의 상대량, 예를 들어, 조성물 중 모든 SP-D 폴리펩티드의 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50% 또는 적어도 55%를 의미할 수 있다. 몇몇 양태에서, "대부분"은 조성물 중 모든 SP-D 폴리펩티드의 50%를 초과하는 상대량을 의미한다.

[0101] **[실시예]**

[0102] **[실시예 1: SP-D 발현 벡터의 제작]**

[0103] 2개의 발현 벡터를 인간 포유류 세포에서 인간 SP-D의 발현에 대해서 개발했다. 하나의 벡터는 야생형 인간 SP-D 선도/신호 서열을 포함했고; 다른 벡터는 인간 T-세포 수용체 (TCR) 선도/신호 서열을 포함했다. TCR 선도 서열을 갖는 단백질을 높은 효율로 분비할 것으로 예상되는 인간 골수성 백혈병 세포에서 단백질을 발현시킬

것이기 때문에, TCR 선도 서열을 발현 벡터들 중 하나에 대해서 선택했다.

[0104] 인간 SP-D 폴리펩티드를 인코딩하고, 야생형 인간 SP-D 선도/신호 서열 또는 인간 T-세포 수용체 (TCR) 선도/신호 서열 중 하나를 포함하는 폴리뉴클레오티드는 GENEART (ThermoFisher Scientific)에 의해 합성되었다. 각 폴리뉴클레오티드는 클로닝 목적을 위한 Hind III (5' 말단) 및 Xba I (3' 말단) 제한효소 자리 및 코작 공통 서열(Kozak consensus sequence)을 포함했다. Hind III/Xba I 제한효소에 의해 각 폴리뉴클레오티드를 GENEART (ThermoFisher Scientific) 전달 벡터로부터 절제했고, 클로닝 벡터인 pHBG1Ddhfr (독일 소재, Glycotope GmbH)로 라이게이션하여(ligating), 발현 벡터인 pHBG1Ddhfr_WT_SP-D (7228 bp)와 pHBG1Ddhfr_TCR_SP-D (7231 bp)를 수득하였다. 도 2a 및 도 2b를 참고한다. 추가의 예시 발현 벡터는 도 2c에 도시된다. 발현 벡터를 시퀀싱했고(sequencing), 제한효소 자리를 매핑하여(mapping) 정확한 서열을 확인하였다. 표 1은 특정한 서열을 나열한다.

[0105] **[표 1]**

서열번호	서열
서열번호 01 SP-D 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드와 내인성 SP-D 선도 서열, 코작 서열 (밑줄침), 및 Hind III (5' 말단) 및 Xba I (3' 말단) 제한효소 자리.	aagcttgccaccatgctgctgtttctgctgagcgccctggtgctgctgacacagcctctgggc tatctggaagccgagatgaagacctacagccaccggaccatgcccagcgcctgtaccctcg tgatgtgcagcagcgtggaaagcggcctgcctggcagagatggcagggatggaagagag ggccccagaggcgagaagggcgatcctggactgcctggcgctgcagggcaggctggaat gcctggacaggctggacctgtgggccccaagggcgataatggctctgtgggagagcctgg ccctaaggggatacaggcccttctggacctcctggaccacctggcgtgccaggacctgct ggaagagaaggacctctgggcaagcagggcaacatcggccctcagggaaagccaggac caaagggcgaggccggacccaaaggcgaagtgggagcacctggcatgcagggaagtgc cggcgctagaggactggctggcccaaaaggcgaaaggggagtgcctggcgaaagaggc gtgcccggaaatactggcgccgctggatctgctggcgccatgggacctcagggatctccag gcgcaagaggccctccaggcctgaaaggcgacaaaggcatccccggcgataagggcgc taagggcgaatccggcctgccagatgtggccagcctgagacagcaggtggaagctctcca gggccaggtgcagcatctccaggctgccttcagccagtacaagaaggtggaactgttcccc aacggccagagcgtgggcgagaagatctttaagaccgccggcttcgtgaagcccttcacc gaggctcagctgctgtgtacccaggctggcggacagctggcctctcctagatctgccgccg aaaatgccgctctccagcagctggtggtggccaagaatgaggccgccttcctgagcatgac cgacagcaagaccgagggcaagttcacctaccccaccggcgagtccctggtgtacagcaa ttgggccctggcgagcccaacgatgatggcggctctgaggactgcgtggaaatcttcacc aacggcaagtggaacgaccgggcctgtggcgagaaaagactggtcgtgtgcgagttctga agggtctaga

[0106] 삭제

[0107]

서열번호 02 SP-D 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드와 내인성 SP-D 선도 서열.	gccaccatgctgctgtttctgctgagcgccctggtgctgctgacacagcctctgggctatctg gaagccgagatgaagacctacagccaccggaccatgcccagcgcctgtaccctcgtgatg tgcagcagcgtggaaagcggcctgcctggcagagatggcagggatggaagagagggcc ccagaggcgagaagggcgatcctggactgcctggcgctgcagggcaggctggaatgcct ggacaggctggacctgtgggccccaagggcgataatggctctgtgggagagcctggccct aaggggatacaggcccttctggacctcctggaccacctggcgtgccaggacctgctgga agagaaggacctctgggcaagcagggcaacatcggccctcagggaaagccaggaccaa agggcgaggccggacccaaaggcgaagtgggagcacctggcatgcagggaagtgccg gcgctagaggactggctggcccaaaaggcgaaaggggagtgcctggcgaaagaggcgt gcccggaaatactggcgccgctggatctgctggcgccatgggacctcagggatctccagg cgcaagaggccctccaggcctgaaaggcgacaaaggcatccccggcgataagggcgcta agggcgaatccggcctgccagatgtggccagcctgagacagcaggtggaagctctccag ggccaggtgcagcatctccaggctgccttcagccagtacaagaaggtggaactgttcccca acggccagagcgtgggcgagaagatctttaagaccgccggcttcgtgaagcccttcaccg aggctcagctgctgtgtacccaggctggcggacagctggcctctcctagatctgccgccga aaatgccgctctccagcagctggtggtggccaagaatgaggccgccttcctgagcatgacc gacagcaagaccgagggcaagttcacctaccccaccggcgagtccctggtgtacagcaat tgggccctggcgagcccaacgatgatggcggctctgaggactgcgtggaaatcttcacca acggcaagtggaacgaccgggcctgtggcgagaaaagactggtcgtgtgcgagttctgaa ggg
서열번호 03 서열번호 01 의 내인성 선도 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.	atgctgctgtttctgctgagcgccctggtgctgctgacacagcctctgggctatctggaa

서열번호 04 선도 서열 (밑줄침)을 포함하는 서열번호 01 에 의해 인코딩된 SP-D 폴리펩티드 및 Met11/31, Thr160/180, Ser 270/290, Ala 286/306 에서의 다형성 (밑줄침).	MLLFLLSALVLLTQPL GYLEAEMKTYSHRTMPSACTLV MCSSVESGLPGRDGRDGREGPRGEKGDPGLPGAAGQAG MPGQAGPVGPKGDNGSVGEPGPKGDTGPSGPPGPPGVPG PAGREGPLGKQGNIGPQGKPGPKGEAGPKGEVGAPGMQG SAGARGLAGPKGERGVPGERGVPGNTGAAGSAGAMGPQ GSPGARGPPGLKGDKGIPGDKGAKGESGLPDVASLRQQV EALQGQVQHLQAAFSQYKKVELFPNGQSVGEKIFKTAGF VKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSAAENAALQQLVVAKNE AAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESLVYSNWAPGEPNDDGGS EDCVEIFTNGKWNDRACGEKRLVVCEF
서열번호 05 서열번호 04 의 선도 서열.	MLLFLLSALVLLTQPL GYLE

서열번호 06 SP-D 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드와 TCR 선도 서열, 코작 서열 (밑줄침), 및Hind III (5' 말단) 및 Xba I (3' 말단) 제한효소 자리.	aagcttgccaccatggcctgccccggatttctgtgggccctcgtgatcagcacctgtctggaa ttcagcatggccgccgagatgaagacctacagccaccggacaatgcccagcgcctgcacc ctcgtgatgtgcagctctgtggaaagcggcctgcccggcagagatggcagggatggaaga gagggacccagaggcgagaagggcgatcctggactgcctggcgctgcagggcaggctg gaatgcctggacaggctggacctgtgggccccaagggcgataatggctctgtgggagagc ctggccctaagggggatacaggcccttctggacctcctggaccacctggcgtgccaggac ctgctggaagagaaggacctctgggcaagcagggcaacatcggccctcagggaaagcca ggaccaaagggcgaggccggacccaaaggcgaagtgggagcacctggcatgcaggga agtgccggcgctagaggactggctggcccaaaaggcgaaaggggagtgcctggcgaaa gaggcgtgcccggaaatactggcgccgctggatctgctggcgccatgggacctcagggat ctccaggcgcaagaggccctccaggcctgaaaggcgacaaaggcatccccggcgataag ggcgctaagggcgaatccggcctgccagatgtggccagcctgagacagcaggtggaagc tctccagggccaggtgcagcatctccaggctgccttcagccagtacaagaaggtggaactg ttccccaacggccagagcgtgggcgagaagatctttaagaccgccggcttcgtgaagccct tcaccgaggctcagctgctgtgtacccaggctggcggacagctggcctctcctagatctgcc gccgaaaatgccgctctccagcagctggtggtggccaagaatgaggccgccttcctgagc atgaccgacagcaagaccgagggcaagttcacctaccccaccggcgagtccctggtgtac agcaattgggcccctggcgagcccaacgatgatggcggctctgaggactgcgtggaaatct tcaccaacggcaagtggaacgaccgggcctgtggcgagaaaagactggtcgtgtgcgagt tctgaagggtctaga
서열번호 07 SP-D 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드와 TCR 선도 서열.	gccaccatggcctgccccggatttctgtgggccctcgtgatcagcacctgtctggaattcagc atggccgccgagatgaagacctacagccaccggacaatgcccagcgcctgcaccctcgtg atgtgcagctctgtggaaagcggcctgcccggcagagatggcagggatggaagagaggg acccagaggcgagaagggcgatcctggactgcctggcgctgcagggcaggctggaatgc ctggacaggctggacctgtgggccccaagggcgataatggctctgtgggagagcctggcc ctaaggggatacaggcccttctggacctcctggaccacctggcgtgccaggacctgctgg aagagaaggacctctgggcaagcagggcaacatcggccctcagggaaagccaggacca aagggcgaggccggacccaaaggcgaagtgggagcacctggcatgcagggaagtgcc ggcgctagaggactggctggcccaaaaggcgaaaggggagtgcctggcgaaagaggcg tgcccggaaatactggcgccgctggatctgctggcgccatgggacctcagggatctccagg cgcaagaggccctccaggcctgaaaggcgacaaaggcatccccggcgataagggcgcta agggcgaatccggcctgccagatgtggccagcctgagacagcaggtggaagctctccag ggccaggtgcagcatctccaggctgccttcagccagtacaagaaggtggaactgttcccca acggccagagcgtgggcgagaagatctttaagaccgccggcttcgtgaagcccttcaccg aggctcagctgctgtgtacccaggctggcggacagctggcctctcctagatctgccgccga aaatgccgctctccagcagctggtggtggccaagaatgaggccgccttcctgagcatgacc gacagcaagaccgagggcaagttcacctaccccaccggcgagtccctggtgtacagcaat tgggcccctggcgagcccaacgatgatggcggctctgaggactgcgtggaaatcttcacca acggcaagtggaacgaccgggcctgtggcgagaaaagactggtcgtgtgcgagttctgaa ggg

[0108]

서열번호 08 서열번호 06 의 선도서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.	atggcctgccccggatttctgtgggccctcgtgatcagcacctgtctggaattcagcatggcc
서열번호 09 TCR 선도 서열 (밑줄침)을 포함하는 서열번호 06 에 의해 인코딩된 SP-D 폴리펩티드 및 Met11/31, Thr160/180, Ser 270/290, Ala 286/306 에서의 다형성 (밑줄침).	MACPGFLWALVISTCLEFSMAAEMKTYSHRTMPSACTLV MCSSVESGLPGRDGRDGREGPRGEKGDPGLPGAAGQAG MPGQAGPVGPKGDNGSVGEPGPKGDTGPSGPPGPPGVPG PAGREGPLGKQGNIGPQGKPGPKGEAGPKGEVGAPGMQG SAGARGLAGPKGERGVPGERGVPGNTGAAGSAGAMGPQ GSPGARGPPGLKGDKGIPGDKGAKGESGLPDVASLRQQV EALQGQVQHLQAAFSQYKKVELFPNGQSVGEKIFKTAGF VKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSAAENAALQQLVVAKNE AAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESLVYSNWAPGEPNDDGGS EDCVEIFTNGKWNDRACGEKRLVVCEF
서열번호 10 서열번호 09 의 선도 서열.	MACPGFLWALVISTCLEFSMA

[0109]

[0110] [실시예 2: 포유류 세포주에서 SP-D의 발현]

[0111] 형질주입 전에, 발현 벡터를 Pvu I으로 선형화시켰고(linearizing), 페놀/클로로포름 및 트리클로르메탄(trichlormethan)/클로로포름으로 정제했다. 제조사 [독일, 쾰른 소재, 론자(Lonza); AMAXA NUCLEOFECTOR TECHNOLOGY]의 설명서에 따라서 NUCLEOFECTION을 이용하여, 세포주를 7-8 μg의 선형화된 발현 벡터로 형질주입했다. 다음의 세포주를 발현 벡터로 형질주입했다: NM-H9D8 (DSM ACC 2806); NM-H9D8-E6Q12 (DSM ACC 2856); 및 NM-F9 (DSM ACC2606).

[0112] SP-D를 발현하는 세포의 풀을 25 nM 메토트렉세이트 (MTX)를 이용하고, 농도를 50 nM MTX로 증가시켜 선별했다. SP-D 발현의 증가한 레벨을 갖는 세포를 수득하기 위해, MTX의 농도를 100 nM 내지 200 nM 내지 400 nM MTX의 단계로 증가시켰다. SP-D 생산 세포의 생산성을 SP-D 특이 ELISA (독일 소재, BioVendor GmbH, Cat# RD194059101)에 의해 제조사의 설명서에 따라서, 및/또는 SP-D 특이 항체를 이용하는 닷-블랏 분석(오하이오주, 신시내티 소재, Seven Hills Bioreagents, Cat# WMAB-2D12A88 및 Cat# WMAB-1A10A9)에 의해 측정했다. 특이 생산율 (specific production rate, SPR)을 하기 식 1을 이용하여 계산했다:

[0113] **[식 1]**

$$SPR = \frac{\text{전체 단백질 질량}}{\text{적분 세포 영역 (integral cell area, ICA)}}$$

$$ICA = \frac{(\text{최종 세포 수} - \text{초기 세포 수}) \times \text{배양일 수}}{\log_e(\text{최종 세포 수} / \text{초기 세포 수})}$$

[0114]

[0115] 배가 시간(doubling time)을 하기 식 2에 의해 계산했다:

[0116] **[식 2]**

[0117] g = log 2 x (배양 시간) / log (최종 세포 수 / 초기 세포 수)

[0118] ClonePix (Molecular Devices) 기술에 의해 SP-D 발현 클론을 세포 풀로부터 분리했고, 생산성에 대해서 평가했다. 선별된 클론을 추가로 서브 클로닝하여(sub cloing) 최종 클론을 수득하였다. 100 피코그램/세포/일(picogram/cell/day, pcd)을 초과하는 생산성을 지닌 클론을 수득하였다. 도 3은 다양한 MTX 농도로 배양된 상이한 SP-D 생산 세포 풀에 대한 특이 생산율을 도시한다. 세포 풀은 인간 SP-D 선도 서열을 함유하는 인간 SP-D 발현 벡터로 각각 형질주입된 H9D8-E6Q12 세포, H9D8 세포 및 F9 세포, 및 인간 TCR 선도 서열을 함유하는 인간 SP-D 발현 벡터로 형질주입된 H9D8 세포를 포함했다.

[0119] **[실시예 3: SP-D 발현 세포주의 배양]**

[0120] 세포를 무혈청 화학적 한정(serum-free chemically defined) 유전자 치료 배지(gene therapy medium, GTM) (독일 소재, Glycotope GmbH) 중에 배양시켰다. 예를 들어, 미국 특허 제9,359,427호를 참고하고, GTM 배양 배지의 설명에 대한 이의 전체 기재내용이 본원에 참고로 포함된다. 관류 공정 배양(perfusion process culture)을 1 X GTM으로 개시한 후에, 2 X GTM으로 변경했다. 세포를 2 내지 3일마다, $1x10^5$ 내지 $3x10^5$ 세포/mL의 세포 농도로 T 플라스크 (독일 소재, TPP, 25 cm^2 , 3 내지 6 mL 현탁 부피)에 나눔으로써(splitting), 지수 증식기(exponential growth phase)로 유지시켰고, 37° C, 98%의 습도 및 8%의 CO_2에서 배양시켰다 (스위스 소재, Integra Biosciences IBS, Biosafe plus; 또는 독일 소재, Thermo/Heraeus BBD 6220). T 플라스크 (75 cm^2 , 12 내지 30 mL의 부피; 150 cm^2 , 50 내지 150 mL) 및 스피너 플라스크(Spinner flask) (스위스 소재, Integra Biosciences IBS, Cellspin, 100 mL 내지 1000 mL)를 이용하여, 세포 증식(cell expansion)을 수행했다.

[0121] 전반적 배양 파라미터: $2.0x10^5$ 세포/mL을 배지에 접종했다. 0.5 V/d의 관류 속도(perfusion rate)에서, 1 X GTM를 공급함으로써(대개, 4-5일차), 연속적인 가동(continuous operation)이 가능했고, 세포 성장 및 영양 요구(nutrient requirement)에 따라서, 일일(per day) 2 반응기 부피(two reactor volumes)의 최대 관류 속도로 증가시켰다. 1 X GTM으로 최대 관류가 달성된 경우에, 공급 배지(feed media)를 변형된 2 X GTM으로 교체했다. 0.5 M NaOH를 추가하거나 또는 CO_2로 스파징함으로써(sparging), 배지를 pH 7.2에 유지시켰다. 용존 산소를 40%로 설정했고, 온도는 37° C로 설정했다. 40% 미만의 용존 산소를, 예를 들어, 20%의 용존 산소로 낮추는 것 또한 가능하다. 후자의 경우에, 십이량체의 함량이 40% 미만의 용존 산소에서의 배양에 비해서, 약간 증가될

수 있다.

[0122] 1 L 관류 생물반응기: Sartorius Biostat B-DCU 2l Quad 시스템 또는 2L BBI Quad 시스템에서, 실험실 1L 규모 배양(Laboratory 1 L scale cultivation)을 수행했다. 용존 산소 및 pH를 표준 전극(standard electrode) (각각, 스위스 소재의 Mettler Torledo의 Mettler Torledo InPro 6800 및 Mettler-Torledo 405-DPAS-SC-K8S)에 의해 측정했다. 3-날 세그먼트 임펠러 (3-blade segment impeller)에 의해, 300 내지 400 rpm의 스터링 속도(stirring rate)로 교반(agitation)을 수행했다. ATF2 모듈과 60 cm PES 막 [미국 소재, Spectrum, 0.2 μm의 공극 크기(pore size) 및 0.15 m^2의 막 영역] 및 0.9 L/분의 유속(flow rate)을 이용하여 관류를 수행했다. 공정 제어: 트리판 블루 배제 원리(trypan blue exclusion principle)를 이용하는 Cedex HiRes (스위스 소재, 로슈)에 의해 세포 농도 및 생존도를 측정했다. 글루코스/락테이트 및 글루타민/글루타메이트를 YSI2700 또는 YSI2900 Select Biochemical 분석기 (미국 소재, Yellow Springs Instruments)에 의해 측정했다.

[0123] 도 4는 클론 H9D8-P1315-2A5에 대한 생물반응기 가동으로부터 시간에 따른 배양 조건의 변화를 도시하고, 다음을 포함한다: 생세포 농도(패널 A); 글루코스 농도 (패널 B); 세포 생존도 (패널 C); 락테이트 농도 (패널 D).

[0124] **[실시예 4: 포유류 세포주로부터 SP-D의 정제]**

[0125] SP-D는 발현세포에서 분비되는 것으로 밝혀졌다. SP-D 생산 세포로부터 세포 상청액을 생물반응기 가동 또는 다른 배양으로부터 수집하여, 결합 및 용출 모드의 Q-세파로오스 크로마토그래피 가동 (Q-세파로오스 FF; GE Healthcare)을 이용한 후에, 결합 및 용출 모드로 수행되는 수퍼덱스 75 크로마토그래피 가동 (수퍼덱스 75; GE Healthcare)을 이용하여 정제했다. 크로마토그래피를 GE의 FPLC 시스템에서 수행했다 (Äkta Explorer, Äkta Avant, Äkta Pure).

[0126] Q-세파로오스 크로마토그래피: 상청액을 멸균 여과했고, 동일한 부피의 20 mM TRIS, 10 mM EDTA, pH 7.4의 용액으로 희석시켰으며, Q-세파로오스 컬럼에 로딩하였고, 600 mM NaCl로 단계 용출(step elution)에 의해 용출시켰다. 크로마토그래피를 표 2에 제시된 설정으로 수행했다.

[0127] **[표 2]**

파라미터	설정
평형화 및 러닝 버퍼	20 mM TRIS, 50 mM NaCl, pH 7.4
용출 버퍼	20 mM Tris, 600 mM NaCl, pH 7.4
컬럼 부피 / 길이	240 mL / 11.5 cm 24000 mL
컬럼 부피 1mL 당 로드 (Load per mL Col. Vol.)	100 mL
전체 로드 (Total load)	24000 ml (1:2 희석)
유속 (ml/분)	55 mL/분
동적 유속(Dynamic flow rate) (cm/분)	2.6 cm/분
접촉 시간	4.4 분
용출액 중 SP-D 농도	0.2 – 2 mg/ml

[0128]

[0129] 수퍼덱스 75 크로마토그래피: 용출액을 동일한 부피의 10 mM $CaCl_2$를 함유하는 pH 7.4의 20 mM Tris 버퍼로 희석시켜, 수퍼덱스 75 컬럼으로 로딩하였고, 10 mM EDTA로 단계 용출에 의해 용출시켰다. 크로마토그래피를 표 3에 제시된 설정으로 수행했다.

[0130] [표 3]

파라미터	설정
평형화 및 러닝 버퍼	20 mM Tris, 300 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, pH 7.4
용출 버퍼	20 mM Tris, 10 mM EDTA 300 mM NaCl, pH 7.4
전체 로드	2228 mL
컬럼 부피 / 길이	106 mL / 21.5 cm
컬럼 부피 1mL 당 로드	21 mL (1:2 희석)
유속 (ml/분)	5 mL/분
동적 유속 (cm/분)	1.01 cm/분
접촉 시간	21.2 분
용출 농도	0.5-3 mg/mL

[0131]

[0132] 수퍼덱스 용출액은 90%를 초과하는 순도의 SP-D를 함유했는데, 이는 비-환원(non-reducing) SDS-PAGE에 의해, 쿠마시 블루 염색 후에 측정되었다 (도 5). 도 5에서, 150 kD을 초과하는 밴드는 SP-D로부터의 고차 올리고머를 포함한다. 수퍼덱스 컬럼으로부터 수득된 용출액을 보관 및 분석 전에, 200 mM NaCl 및 1mM EDTA를 함유하는 5 mM 히스티딘 pH 7.0 버퍼에 대해서 4° C에서 투석시켰다.

[0133] **[실시예 5: 박테리아 응집 검정에서의 SP-D의 활성]**

[0134] 클론 H9D8-P1315-2A5로부터 정제된 SP-D의 활성을 박테리아 응집 검정에서 테스트했다. 다음의 방법과 실질적으로 유사한 방법에 의해 박테리아 응집 검정을 수행했다. E. *콜라이* (ATCC: Y1088)를 박테리아 아가 플레이트 (bacterial agar plate) 상으로 스트리킹하여(streaking), 37° C에서 밤새 배양시켰다. 단일 콜로니를 선별하여, 밤새 배양시킨 배양물의 접종에 이용했고, 37° C에서 밤새 진탕시켰다(shaking). 1 mL의 박테리아 배양물을 4개의 1.5 mL 원심분리 튜브에 피페팅했고(pipetting), 4,000 rpm에서 5분 동안 원심분리시켰다. 상청액을 버렸고, 펠렛은 1 mL의 버퍼(150 mM HEPES, 20 mM NaCl pH 7.4) 중에 재현탁시켰다. 상기 튜브를 4,000 rpm에서 5분 동안 원심분리시켰고, 펠렛을 7 mL의 버퍼 중에 재현탁시켰다. 박테리아 현탁액의 흡광도를 분광계에서, 700 nm로 측정했다. 박테리아 현탁액을 조정하여, 1.0000 내지 1.1000의 범위 내 흡광도를 획득했다. 1 M $CaCl_2$를 현탁액에 추가하여, 5 mM $CaCl_2$의 최종 농도를 획득하였다. 플라시보 버퍼(placebo buffer) 중 rhSP-D 희석액 (각 희석액 당 15 μl의 전체 부피)을 다음의 농도로 제조했고: 5, 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0 μg/ml, 20 μL의 HEPES-NaCl 버퍼를 각각 함유하는 큐벳에 추가했다. 이어서, 600 μL의 박테리아 현탁액을 큐벳에 추가했고, 흡광도를 각 큐벳별로 2.5분 마다 700 nm에서, 총 120분 동안 측정했다.

[0135] 응집 검정에서, 활성 SP-D는 박테리아 세포를 응집시키고, 흡광도를 감소시키며 / 박테리아 현탁액을 통한 투과를 증가시킨다. 도 6은 클론인, H9D8-P1315-2A5로부터 정제된 rhSP-D가 박테리아 응집 검정에서 활성을 갖는 것으로 측정되었다는 것을 도시한다. 실험을 2회 추가로 반복하였고, 유사한 결과를 획득하였다.

[0136] 또한, 상기 실시예 2에 기재된 대로 생산된 H9D8의 추가의 클론에서 재조합적으로 발현된 인간 SP-D를 이의 활성에 대해서 분석했다. 테스트된 모든 최종 선별된 클론으로부터 수득된 SP-D는 비슷한 높은 활성을 가졌다. 하나의 예시적으로 분리된 클론은 NM-H9D8(8B11)인데, 이를 후속적인 분석에서 또한 이용했다. NM-H9D8(8B11)은 브라운슈바이크(Braunschweig) (독일) 소재의 "독일 생물자원 센터(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ)"와 "AT100-rhSP-D-H9D8-P20011-8B11"로, 미국, 오하이오주, 신시내티 소재, 에어웨이 테라퓨틱스 엘엘씨(Airway Therapeutics LLC)에 의해 2018년 9월 4일자에 기탁되었고, 상기 일자로부터 기탁된 클론은 용이하게 동정될 수 있고(identifying), 수탁 번호 하에서 용이하게 획득할 수 있다.

[0137] **[실시예 6: TLR4 억제 검정에서의 SP-D의 활성]**

[0138] SP-D의 올리고머 형태는 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)가 톨-유사 수용체 4(Toll-like receptor 4, TLR4)에 결합하는 것/이를 활성화시키는 것을 방지함으로써, 지질다당류-유도된 염증 세포 반응을 억제한다. 예를 들어, Yamazoe M. *외*, (2008) J. Biological Chem. 283:35878-35888을 참고하고, 이의 전체 기재내용이 본원에 참고로 포함된다.

[0139] LPS에 의한 TLR4 경로의 활성을 억제하는 것에 대한 클론 H9D8-P1315-2A5로부터 정제된 rhSP-D의 활성을 테스트했다. HEK-Blue™ hTLR4 세포 (미국, 캘리포니아, 샌디에고 소재, InvivoGen)를 384-웰 플레이트에 ~20000 세포/웰의 밀도로 플레이팅했고(plating), 다양한 농도의 SP-D와 함께, 2시간 동안 37° C, 5% CO_2에서 배양시켰다. EC_{80} 농도의 LPS (*에스체리치아 콜라이(Escherichia coli)* 026:B6, L5543 Sigma Aldrich)를 각 웰에 추가했고, 세포를 22시간 더, 37° C, 5% CO_2에서 배양시켰다. 웰로부터 세포를 분리시키고(detaching), 현탁된 세포를 세척하여, 상기 세포를 PBS 중에 재현탁시키고, 임의의 클럼프(clump)를 조심스러운 피펫팅에 의해 제거함으로써 TLR4 활성을 측정했다. 세척된 세포를 $20e10^3$ 세포/웰의 밀도로, 5 mM $CaCl_2$ 및 1% (v/v) BSA를 함유하는 무-내독소 수(endotoxin-free water) 중에 만들어진 HEK blue 검출 배지(미국, 캘리포니아, 샌디에고 소재, InvivoGen)를 함유하는 384-웰 플레이트로 옮겼다. 세포를 37℃, 5% CO_2에서 24시간 동안 배양시켰고, 분광계를 이용하여 655nm에서 분비형 배아 알칼리성 인산분해효소(secreted embryonic alkaline phosphatase, SEAP) 리포터 유전자의 활성을 측정함으로써 TLR4의 활성을 측정했다. idbs (www.idbs.com)의 XLfit로, 데이터를 4-파라미터 로지스틱 방정식(four-parameter logistics equation)에 피팅함으로써(fitting), 비-선형 회귀 분석(nonlinear regression analysis)을 이용하여 SP-D에 대한 IC_{50} 값을 측정했다. 도 7은 클론인 H9D8-P1315-2A5로부터 정제된 SP-D가 0.00294 mg/ml의 IC_{50}으로, LPS에 의한 TLR4 경로의 활성화를 억제하는 활성을 갖는 것으로 측정되었다는 것을 제시하고, SP-D가 이러한 활성을 위한 활성 올리고머 형태(active oligomeric form)였다는 것을 확인했다. IC_{50} 값의 대수(logarithm)만 정규분포를 보이기 때문에, 일련의 실험으로부터 획득된 수를 평균내기 위해, $-Log_{10}$ (IC_{50})으로 정의된 pIC_{50} 값을 이용했다. 실험을 2회 추가로 반복했고, 0.00468 mg/ml의 평균 IC_{50}에 대응하는 2.33 ± 0.10 mg/ml의 평균 pIC_{50} (N=3)을 산출하는 유사한 결과를 획득했다. 또한, TLR-4 검정에서, 상기 실시예 2에 기재된 대로 생산된 H9D8의 추가의 클론에서 재조합적으로 발현된 인간 SP-D를 이의 활성에 대해서 분석했다. 테스트된 최종 선택된 클론 모두로부터 수득된 SP-D는 유사한 높은 활성을 가졌다. 하나의 예시적인 분리된 클론은 NM-H9D8(8B11)이며, 이는 후속적인 분석에서 또한 이용되었다.

[0140] **[실시예 7: 다양한 공급원으로부터 수득된 SP-D의 안정성]**

[0141] 다양한 공급원으로부터 수득된 rhSP-D의 안정성을 측정하였다. 상기 공급원은 H9D8 세포에서 야생형 SP-D 선도 폴리펩티드와 발현된 rhSP-D ("rhSP-D:WT"), 및 H9D8 세포에서 TCR 선도 폴리펩티드와 발현된 rhSP-D ("rhSP-D:TCR")를 포함했다. 다양한 버퍼(버퍼: 1, 2, 3, 또는 4) 중 rhSP-D:WT 또는 rhSP-D:TCR의 용액을 5° C에서 몇 주 동안 배양시켰다. rhSP-D 삼량체/육량체, 십이량체, 고차 올리고머인 "퍼지 볼", 및 초고차 올리고머/응집체(very high order oligomer/aggregate)를 포함하는 rhSP-D 올리고머 형태의 상대분포(relative distribution)를 측정함으로써, 다양한 버퍼 중 rhSP-D:WT 또는 rhSP-D:TCR의 안정성을 측정했다. 실시예 8에 제시된 방법과 실질적으로 동일한 방법을 이용한 다각도 광산란을 수반한 비대칭 흐름 장-흐름 분획화(AF4-MALS) 분석에 의해 rhSP-D 올리고머 형태의 상대 분포를 측정했다. 트리플리케이트 측정(triplicate determination)으로부터 평균 결과를 측정했고, +/- 표준편차를 측정했다. 결과는 표 4에 요약된다.

[0142] [표 4]

SP-D 공급원 (버퍼)	5°C 에서의 시간 (주(week))	올리고머 형태의 상대분포 (%)			
		삼량체/ 육량체	십이량체	'퍼지 볼'로의 전이(transition)	초고차 올리고머
rhSP-D: TCR (1)	0	17.30 ± 0.61	53.56 ± 2.23	24.19 ± 1.16	5.06 ± 0.63
	2	15.69 ± 0.75	58.09 ± 0.22	11.83 ± 0.47	14.89 ± 0.54
	4	15.92 ± 3.68	42.82 ± 2.62	14.96 ± 1.13	26.29 ± 1.21
	8	11.45 ± 0.55	51.57 ± 0.27	21.38 ± 1.39	15.79 ± 1.09
rhSP-D: TCR (2)	0	13.71 ± 1.42	58.48 ± 0.90	16.06 ± 1.12	11.75 ± 0.60
	2	14.05 ± 1.99	61.01 ± 1.12	12.05 ± 1.23	12.88 ± 0.76
	4	16.39 ± 1.68	32.28 ± 0.27	24.72 ± 0.35	26.51 ± 1.69
	8	8.04 ± 0.83	47.40 ± 2.19	13.35 ± 1.54	31.21 ± 1.30
rhSP-D: TCR (3)	0	14.46 ± 0.90	64.06 ± 2.30	15.17 ± 0.90	6.31 ± 2.32
	2	13.57 ± 1.81	63.91 ± 0.54	11.11 ± 0.76	11.41 ± 0.68
	4	9.41 ± 0.70	56.74 ± 2.49	15.77 ± 3.56	18.08 ± 2.30
	8	18.22 ± 3.48	59.07 ± 2.45	11.71 ± 1.85	11.06 ± 1.26
rhSP-D: TCR (4)	0	12.49 ± 0.45	60.76 ± 0.58	13.92 ± 0.21	12.83 ± 0.33
	2	6.53 ± 1.16	60.60 ± 0.44	13.48 ± 0.30	19.38 ± 1.16
	4	9.15 ± 0.67	46.93 ± 0.33	12.45 ± 0.31	31.47 ± 0.53
	8	13.48 ± 0.32	52.32 ± 0.70	13.33 ± 0.40	20.87 ± 0.72
rhSP-D: WT (1)	0	10.21 ± 2.34	49.54 ± 7.07	16.75 ± 6.40	23.50 ± 5.60
	2	10.61 ± 0.95	62.05 ± 0.14	21.24 ± 0.84	6.10 ± 0.64
	4	9.50 ± 0.60	60.11 ± 0.29	21.37 ± 0.54	9.01 ± 0.14
	8	13.80 ± 0.48	59.05 ± 1.49	20.15 ± 1.56	7.00 ± 0.38

[0143]

rhSP-D: WT (2)	0	9.12 ± 1.72	65.67 ± 5.02	18.25 ± 3.12	6.95 ± 3.58
	2	9.05 ± 0.85	69.20 ± 0.64	16.31 ± 1.00	5.44 ± 0.67
	4	9.79 ± 0.71	62.43 ± 0.88	19.91 ± 0.96	7.87 ± 0.56
	8	9.73 ± 1.23	67.58 ± 1.31	16.58 ± 1.86	5.70 ± 0.51
rhSP-D: WT (3)	0	8.81 ± 2.06	69.36 ± 2.27	17.18 ± 0.23	4.65 ± 0.17
	2	7.62 ± 0.76	69.28 ± 1.54	19.41 ± 1.67	3.69 ± 0.64
	4	9.21 ± 0.58	65.79 ± 1.56	19.96 ± 1.22	5.04 ± 0.93
	8	12.00 ± 0.82	66.32 ± 0.32	17.39 ± 0.92	4.30 ± 0.21
rhSP-D: WT (4)	0	8.58 ± 0.51	63.43 ±1.26	20.48 ± 0.69	7.51 ± 0.07
	2	5.15 ± 0.61	61.56 ± 0.57	22.21 ± 0.48	11.07 ± 0.14
	4	9.57 ± 0.43	62.52 ± 0.58	18.82 ± 0.56	9.13 ± 0.42
	8	13.84 ± 0.02	63.01 ± 0.33	14.16 ± 0.03	9.00 ± 0.32

[0144]

[0145] 표 4는 rhSP-D:WT 및 rhSP-D:TCR을 함유하는 상이한 용액 중 다양한 올리고머 형태의 상대적인 안정성의 차이를 도시한다. 예를 들어, SP-D의 초고차 올리고머 형태에 대해서, rhSP-D:WT의 용액은 대체로, rhSP-D:TCR의 대응하는 용액보다 낮은 백분율의 이러한 올리고머를 가졌다. 또한, rhSP-D:WT의 용액에 대한 초고차 올리고머의 백분율은 rhSP-D:TCR의 대응하는 용액에 비해서, 적어도 0주차 내지 2주차 사이에서 실질적으로 증가하지 않았

다. rhSP-D의 십이량체 올리고머 형태에 대해서, rhSP-D:WT의 용액 중 이러한 올리고머의 백분율은 0주차 내지 8주차 사이에 대체로 안정했으나; 대조적으로, rhSP-D:TCR의 용액 중 이러한 올리고머의 백분율은 대응하는 용액에서 0주차 내지 8주차 사이에 감소했다.

[0146] rhSP-D:WT 및 rhSP-D:TCR의 용액 사이의 이러한 차이점들은 두 SP-D 폴리펩티드 모두 동일한 아미노산 서열을 가지고, H9D8 세포에 의해 각각 생성되기 때문에 주목할 만했다. rhSP-D:WT는 야생형 인간 SP-D 단백질의 선도/신호 폴리펩티드와 부합하는 선도/신호 폴리펩티드와 초기에 발현되고, rhSP-D:TCR은 인간 TCR 단백질의 선도/신호 폴리펩티드와 부합하는 선도/신호 폴리펩티드와 초기에 발현된다. 전위(translocation) 직후 또는 전위 동안에, 각 선도/신호 서열은 대응하는 단백질로부터 절단되었을 것이다. 이 발견은 다양한 폐 질환의 치료를 위한 인간 SP-D의 안정한 용액, 특히 SP-D의 더욱 활성인 십이량체 올리고머 형태를 갖는 용액의 생산 및 개발에 부분적으로 이로울 수 있다.

[0147] **[실시예 8; AF4-MALS 분석]**

[0148] 다각도 광산란을 수반한 비대칭 흐름 장-흐름 분획화 (AF4-MALS) 분석을 이용하여 용액 중 SP-D의 상이한 올리고머 형태의 상대분포를 측정하였다. AF4-MALS는 장 흐름 분획화(field flow fractionation, FFF)에 관련된 분리 기법이다. FFF와 달리, AF4-MALS는 크로스-흐름 (cross-flow)이 캐리어 용액(carrier liquid)에 의해서만 야기되도록, 단일 투과성 벽을 포함한다. 크로스-흐름은 채널의 하부(bottom) 상의 반-투과성 벽을 거쳐서 지속적으로 존재하는 캐리어 용액에 의해 유도된다.

[0149] 샘플을 AF4-MALS 시스템 (캘리포니아, 산타 바바라 소재, Wyatt Technology Corp., Eclipse Dual Tec)을 이용한 후에, UV (캘리포니아, 서니베일 소재, Dionex Corporation, Ultimate 3000 가변파장 검출기) 및 MALS 분석 (캘리포니아, 산타 바바라 소재, Wyatt Technology Corp., Dawn Heleos II 검출기)을 이용하여 분석하였다. Dionex Ultimate 3000 HPLC 시스템 (캘리포니아, 서니베일 소재 Dionex Corporation)을 이용하여 샘플을 주입하였고, 이동상을 AF4 시스템으로 전달하였다. AF4 구성은 350 μm 두께의 스페이서(spacer)를 갖는 단채널(short channel) (캘리포니아, 산타 바바라 소재, Wyatt Technology Corp.)을 이용했다. Chromeleon (캘리포니아, 서니베일 소재, Dionex Corporation) 및 Astra (캘리포니아, 산타 바바라 소재, Wyatt Technology Corp.) 소프트웨어를 이용하여 데이터의 분석 및 계산을 수행했다. 샘플은 rhSP-D 및 야생형 SP-D 선도 폴리펩티드를 인코딩하는 발현 벡터 (pHBG1Ddhfr_WT_SP-D)로 형질주입된 H9D8 또는 F9 세포 중 하나; 및 rhSP-D 및 야생형 TCR 선도 폴리펩티드를 인코딩하는 발현 벡터(pHBG1Ddhfr_TCR_SP-D)로 형질주입된 H9D8 세포;로부터 정제된 rhSP-D를 포함했다. 이용된 샘플은 표 5에서 나열된다. rhSP-D와 AF4-MALS 시스템에 대한 파라미터는 표 6에서 제시된다.

[0150] **[표 5]**

[0151]

배치(Batch)	모세포주(Parent cell line)	발현 제작물	부피 (mL)
S729	H9D8	pHBG1Ddhfr_TCR_SP-D	0.25
S730	F9	pHBG1Ddhfr_WT_SP-D	0.25
S731	H9D8	pHBG1Ddhfr_WT_SP-D	0.25

[0152] [표 6]

단계	시작 시간 (분)	종료 시간 (분)	지속 (분)	모드 (Mode)	X 흐름 시작 (ml/분)	X 흐름 종료 (ml/분)
1	0	1	1	포커스 (focus)		
2	1	2	1	포커스 + 주입		
3	2	3.5	1.5	포커스		
4	3.5	3.7	0.2	용출	0.5	3
5	3.7	6.7	3	용출	3	3
6	6.7	16.7	10	용출	3	0.18
7	16.7	26.7	10	용출	0.18	0.18
8	26.7	41.7	15	용출	0.18	0
9	41.7	51.7	10	용출	0	0
10	51.7	56.7	5	용출 + 주입	0	0
11	56.7	57	0.3	용출	0	0
검출기 흐름(Detector Flow): 0.5 ml/분 주입 흐름(Injection Flow): 0.2 ml/분 포커스 흐름(Focus Flow): 0.5 ml/min 주입량: 5 μg 이동상: 20 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.4 채널: 단채널 (145 mm) 스페이서: 350 μM 멤브레인: 10 kD PES						

[0153]

[0154] AF4-MALS를 이용한 데이터를 UV 검출기 및 다각도 광산란 검출기(multi-angle light-scattering detector)를 이용하여 수집했고, 분석하여 용출하는 동안 특정한 시간에서의 SP-D의 절대 몰질량(absolute molar mass) 및 크기를 측정했다. 질량에 대한 크기의 비율은 SP-D의 형태를 나타낸다. 질량에 대한 크기 비율로부터, 용출의 초기 단계 (0-34 분)에서, SP-D 분자가 선형 또는 로드형을 가졌다는 것이 측정되었다. 로드 모델 계산의 경우, 소프트웨어는 로드-형태 입자의 두께가 이의 길이에 비해서 유의하지 않다고 (0.0 nm) 가정했다. 두께가 유의한 경우에, nm 단위의 이의 두께 또는 대략적인 두께가 이용되었다. 로드 두께는 원자력 현미경 (atomic force microscopy, AFM) 데이터로부터 추정되었고, 로드 길이는 136 ± 8.1 nm의 AFM 치수와 일치하는 것으로 측정되었다 (R. Arroyo 외, J Mol Biol (2018) 430: 1495-1509). SP-D에 대한 용출의 후기 단계 (34-45분)는 더욱 컴팩트한 구조체가 관찰되고 있다는 것을 나타냈다. 2차 디바이 모델(second order Debye model)을 용출의 이들 단계의 분석에 활용했다. 2차 디바이 모델은 매우 큰 것 (~10e6 달톤 또는 ~50 nm RMS 반경을 초과)을 포함하는 몰질량의 더 넓은 범위를 넘는, 더 나은 결과를 제시했다. SP-D의 십이량체 올리고머 형태의 경우, 분자량이 520.09 +/- 4.61 kDa (N=72 측정)인 것으로 측정되었다.

[0155] 용출 프로파일의 제1 피크 (피크 1)는 로드 모델에 따른 질량 계산에 기초하여 SP-D 삼량체와 육량체를 함유했다. 용출 프로파일의 제2 피크 (피크 2)는 SP-D 십이량체를 함유했다. 용출 프로파일의 제3 피크 (피크 3)는 로드 모델에 의해 측정된 중간 MW에 기초한 SP-D 십이량체 내지 SP-D '퍼지 볼' 사이의 중간 종(intermediate species)을 함유했다. 용출 프로파일의 제4 피크 (피크 4)는 약 70 nm의 일정한 RMS 반경을 지닌 SP-D 올리고머의 비균질한 덩어리(heterogeneous mass)를 함유했는데, 이는 퍼지 볼 종(fuzzy ball species)에 대한 AFM 측정에 의해 관찰된 것과 일치한다. 36분을 넘으면, 용출 프로파일에서 RMS 반경이 증가하는데, 이는 응집체 종(aggregate species)을 나타낸다.

[0156] **[실시예 9: N-글리칸 프로파일링(N-glycan profiling)]**

[0157] NM-H9D8 세포에서 생산된 SP-D(rhSP-D)의 N-당화 패턴과 인간 양수(human amniotic fluid)로부터 수득된 SP-

D(hSP-D)의 당화패턴을 비교했다. 정제된 SP-D 단백질을 변성 및 환원시켰다. N-글리칸은 N-글리카나제 F(N-glycanase F)의 작용에 의해 방출된다. 환원 말단(reducing end)에서, 유리 N-글리칸 (free N-glycan)을 형광단(fluorophore)으로 태그한 후에, 고체상 추출(solid phase extraction)을 이용하는 정제 단계를 수행했다. 정제된 형광 태그된 N-글리칸의 혼합물을 전기분무 이온화 사중극자 비행시간형 텐덤 질량분석기 (electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, ESI-Q-TOF MS/MS)에 커플링된 형광 검출을 수반한 친수성 상호작용 초고성능 크로마토그래피(hydrophilic interaction ultra-performance chromatography with fluorescence detection, HILIC-UPLC-FLD)에 적용했다. 글리칸을 형광 피크 영역 (fluorescence peak area)에 의해 정량했고, 단편 분석(fragment analysis)과 함께 분자량에 의해 확인했다.

[0158] 형광 추적(fluorescence trace)은 모든 N-글리칸에 대해서 일정한 머무름 시간 범위(retention time range)를 나타냈다. 모든 샘플 통틀어, 일정한 신호로 인해, 신뢰할 수 있는 구조 할당(structure assignment)을 MS/MS 실험을 통해서 수행했다. 비교된 SP-D 단백질의 당화 패턴은 표 7에 제시된다.

[0159] **[표 7]**

[0160]

N-글리칸	N-글리칸을 포함하는 탄수화물 구조체의 백분율	
	hSP-D	rhSP-D
푸코실화 글리칸 (fucosylated glycan)	91	99
바이섹팅 N-아세틸글루코사민을 지닌 글리칸	18	38
적어도 하나의 시알산을 지닌 글리칸	52	58
1개의 시알산을 지닌 글리칸	45	50
2개의 시알산을 지닌 글리칸	7	8
3개의 시알산을 지닌 글리칸	0	0
적어도 하나의 갈락토오스를 지닌 글리칸	93	92
1개의 갈락토오스를 지닌 글리칸	19	22
2개의 갈락토오스를 지닌 글리칸	64	66
3개의 갈락토오스를 지닌 글리칸	10	4
단일 안테나 글리칸	1	1
이중 안테나 글리칸	82	90
삼중 안테나 글리칸	13	5
사중 안테나 글리칸	1	1
적어도 하나의 GalNAc 를 지닌 글리칸	1	11
하이브리드형 글리칸	2	2
고-만노오스형 글리칸	2	2

[0161]

[0162] 상이한 안테나리티(antennarity)의 양으로부터, A-수는 식 "1 x 백분율 단일 안테나 글리칸 + 2 x 백분율 이중 안테나 글리칸 + 3 x 백분율 삼중 안테나 글리칸 + 4 x 백분율 사중 안테나 글리칸 = A-수"를 이용하여, 전체 안테나리티의 척도로서 계산될 수 있다. rhSP-D의 A-수와 hSP-D의 A-수는 매우 유사한데, rhSP-D는 200의 A-수를 갖고, hSP-D는 208의 A-수를 갖는다.

[0163] 몇몇 측면에서, hSP-D의 N-당화 프로파일과 rhSP-D의 N-당화 프로파일은 유사했다. 예를 들어, hSP-D와 rhSP-D 모두에 대해서, 3개의 시알산을 지니는 글리칸, 단일 안테나 글리칸, 사중 안테나 글리칸, 하이브리드형 글리칸, 또는 고-만노오스형 글리칸을 포함하는 탄수화물 구조체의 백분율은 동일했다. 그러나, 몇몇

측면에서, hSP-D의 N-당화 프로파일과 rhSP-D의 N-당화 프로파일은 유사하지 않았다. 예를 들어, 바이섹팅 N-아세틸글루코사민을 지니는 글리칸, 1개의 시알산을 지니는 글리칸, 3개의 갈락토오스를 지니는 글리칸, 삼중 안테나 글리칸, 또는 적어도 하나의 GalNA를 지니는 글리칸을 포함하는 탄수화물 구조체의 백분율은 hSP-D와 SP-D 간에 상이했다.

[0164] 추가의 분석에서, NM-H9D8(8B11) 클론으로부터의 두 개의 상이한 정제 배치(purification batch)를 포함하는 NM-H9D8 세포의 상이한 클론에서 생산된 재조합 인간 SP-D(rhSP-D)의 글리코프로파일(glycoprofile), CHO 세포의 상이한 클론에서 생산된 재조합 인간 SP-D(CHO-SP-D)의 글리코프로파일, 및 인간 양수로부터 수득된 고유의(native) SP-D (hSP-D)의 글리코프로파일을 비교했다. 도 8에 도시된 대로, rhSP-D의 N-당화 프로파일과 hSP-D의 N-당화 프로파일은 매우 비슷한 반면에, CHO-SP-D는 비-인간 세포주에서의 생산으로 인해 주목할만한 차이를 나타낸다. 도 9는 또한, NM-H9D8-유래 rhSP-D의 O-당화 프로파일과 CHO-유래 CHO-SP-D의 O-당화 프로파일이 유의하게 상이하다는 것을 추가로 입증한다. 인간 양수로부터 수득된 SP-D의 O-당화는 이 분석에 필요한 단백질의 높은 양으로 인해 측정될 수 없었다. N-당화 프로파일은 SP-D의 폴리펩티드 사슬의 아스파라긴 잔기에 부착된 모든 글리칸 구조체를 포함하는 반면에, O-당화 프로파일은 세린, 트레오닌, 히드록시-리신 및 히드록시-프롤린 잔기에 부착된 글리칸 구조체를 나타낸다. 결론적으로, NM-H9D8 세포의 클론에서 생산된 rhSP-D는 자연적으로 존재하는 hSP-D의 당화와 밀접하게 닮은 인간 당화 패턴을 갖는다.

[0165] 또한, SP-D의 글리칸 구조체에서의 시알산들 (N-아세틸뉴라민산; NANA)의 결합을 분석했다. NANA는 대체로, α2,3 또는 α2,6 형태에서 말단 갈락토오스 잔기에 결합될 수 있다. 인간 당화에서, α2,3-결합 NANA 및 α2,6-결합 NANA의 혼합물이 발견되는 반면에, CHO와 같은 햄스터 세포는 α2,6-결합 NANA를 생산하지 않는다. CHO 및 NM-H9D8에 의해 생산된 인간 SP-D를 정제했고, 변성 및 환원시켰다. N-글리카나제 F와 배양되는 동안에, N-글리칸이 방출되었다. 유리 N-글리칸을 형광단 (RapiFluor, Waters)으로 표지한 후에, HILIC 고체상 추출을 이용한 정제 단계를 수행했다. 뉴라미니데이즈 처리의 경우에, 정제된 N-글리칸을 뉴라미니데이즈 S (NEB)로 1시간 동안 37° C에서 절단시켰다(digesting). 뉴라미니데이즈 S는 α2,3-결합 NANA를 특이적으로 제거하는 반면, α2,6-결합 NANA를 절단하여 제거(cleave off) 할 수 없다. 상기 효소는 반복된 HILIC 고체상 추출을 통해 제거된다. 형광 검출을 수반한 I-클래스 시스템(I-class system with fluorescence detection) (Waters)을 HILIC-UPLC에 이용했다. 정제된 형광 태그된 N-글리칸의 혼합물을 60° C에서, 0.5 mL/분의 유속으로 Acquity UPLC BEH 글리칸 컬럼 (150x2.1mm, 1.7u, Waters) 상에서 분리했다. 100% 아세토니트릴 (A) 및 100mM 암모늄 포르미에이트 (ammoniumformiate), pH4.5를 용출제 시스템 (eluent system)으로 이용했고, 22%B 내지 44%B의 구배를 82분에서 적용했다. 형광 파장 설정은 λ_{ex} 265nm 및 λ_{em} 425nm였다. 커플링된 Bruker Impact HD ESI-Q-TOF-MS(MS)를 양이온 모드(positive ion mode)에서 N-글리칸 확인에 이용했다. N-글리칸을 단편 분석과 함께 분자량에 따라서 확인했다.

[0166] 상기 분석은 CHO로부터 수득된 SP-D가 20 및 70분 RT 사이에서 비균질한 N-글리칸 프로파일을 나타낸다는 것을 보였다. 0개 (S0), 1개 (S1) 및 2개 (S2)의 NANA를 지닌 이중 안테나 N-글리칸을 포함하는 3개의 주요 피크 외, 4개 이하의 NANA를 지닌 더 높은 안테나 구조체(higher antennary structure)가 53-70분 사이에서 검출된다. 56분 RT 후, 이중 안테나 S1과 S2 구조체 및 대부분의 더 높은 안테나 구조체는 2,3-결합 NANA의 존재를 제공하는 뉴라미데이즈 S 처리에 의해 영향을 받는다. 전체 시알산화(sialylation)는 강하게 감소되었는데, 이는 CHO-생산 SP-D에서 주로 α2,3-결합 NANA가 존재하는 것을 나타낸다 (도 10, 패널 A 및 B를 참고). NM-H9D8(8B11) 세포로부터 수득된 SP-D에서, N-당화 프로파일의 단지 약간의 변화만 뉴라미니데이즈 처리 후에 검출되었다. RT 50분에서의 단일 시알산화 피크(monosialylated peak)는 뉴라미데이즈 S 처리에 의해 영향을 받지 않는다. RT 54분에서 NM-H9D8로부터 수득된 SP-D 중 S2 N-글리칸을 포함하는 단 하나의 경미한 피크 변화가 관찰되었다. 전체 시알산화는 뉴라미데이즈 S에 의해 단지 약간 감소되었는데, 이는 NM-H9D8(8B11)에서 생산된 SP-D가 주로 α2,6-결합 NANA를 포함하고, α2,3-결합 NANA의 단지 경미한 양을 포함한다는 것을 나타낸다 (도 10, 패널 C및 D를 참고).

[0167] 본원에서 이용된 용어 "포함하는(comprising)"은 "포함하는(including)", "함유하는(containing)", 또는 "특징으로 하는(characterized by)"과 동의어이고, 포괄적이거나 또는 개방형이며, 추가의 인용되지 않은 요소 또는 방법 단계를 제외하지 않는다.

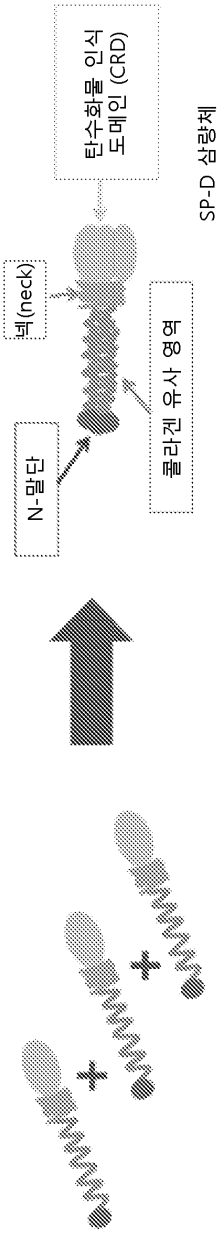
[0168] 상기 상세한 설명은 본 발명의 몇몇 방법 및 재료를 개시한다. 본 발명은 방법 및 재료의 변형, 및 재조 방법 및 장치의 변경을 허용한다. 이러한 변형들은 본 개시내용의 고려 또는 본원에 개시된 본 발명의 실시로부터 통상의 기술자에게 명백해질 것이다. 따라서, 본 발명은 본원에 개시된 특정한 양태에 제한되는 것으로 의도되

지 않으나, 본 발명의 진정한 범위 및 사상 내에서 비롯된 모든 변형 및 대안을 다루는 것으로 의도된다.

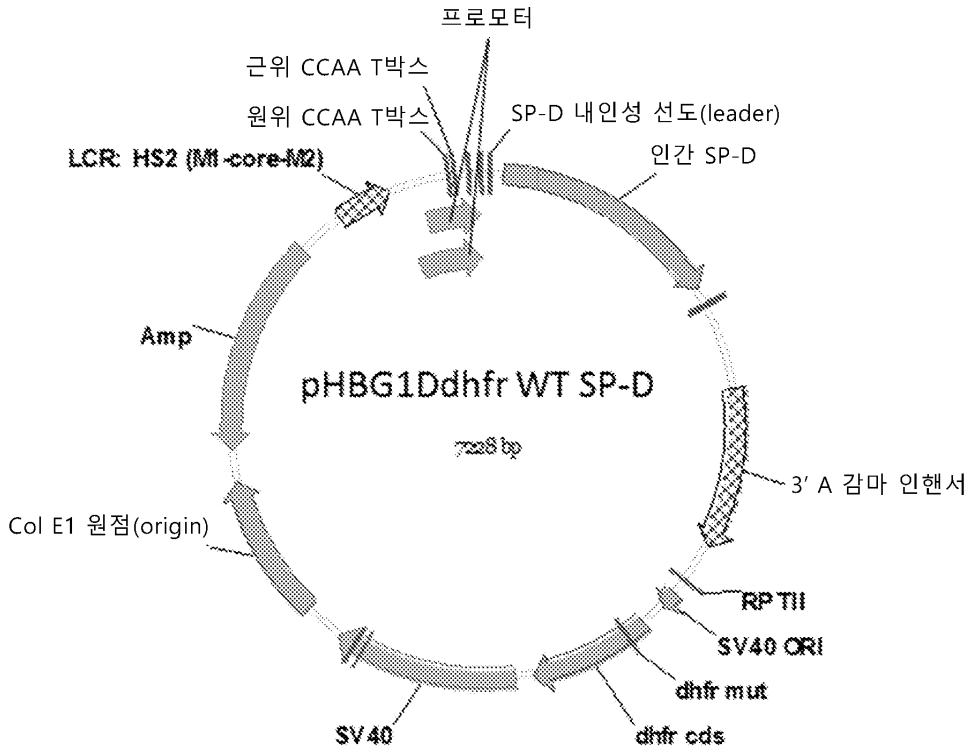
[0169] 공개 및 미공개된 출원, 특허, 및 참조 문헌을 포함하나, 이들에 한정되는 것은 아닌 본원에 인용된 모든 참고 문헌들은 이들의 전체 기재내용이 본원에 참고로 포함되며, 이로써 본 명세서의 일부를 구성한다. 본 명세서에 함유된 본 개시내용에 모순되는, 참고로 포함된 간행물 및 특허 또는 특허 출원의 범위에 대해서, 본 명세서는 임의의 이러한 모순되는 자료를 대체하고/하거나 이들에 대해서 우선권을 갖는 것으로 의도된다.

도면

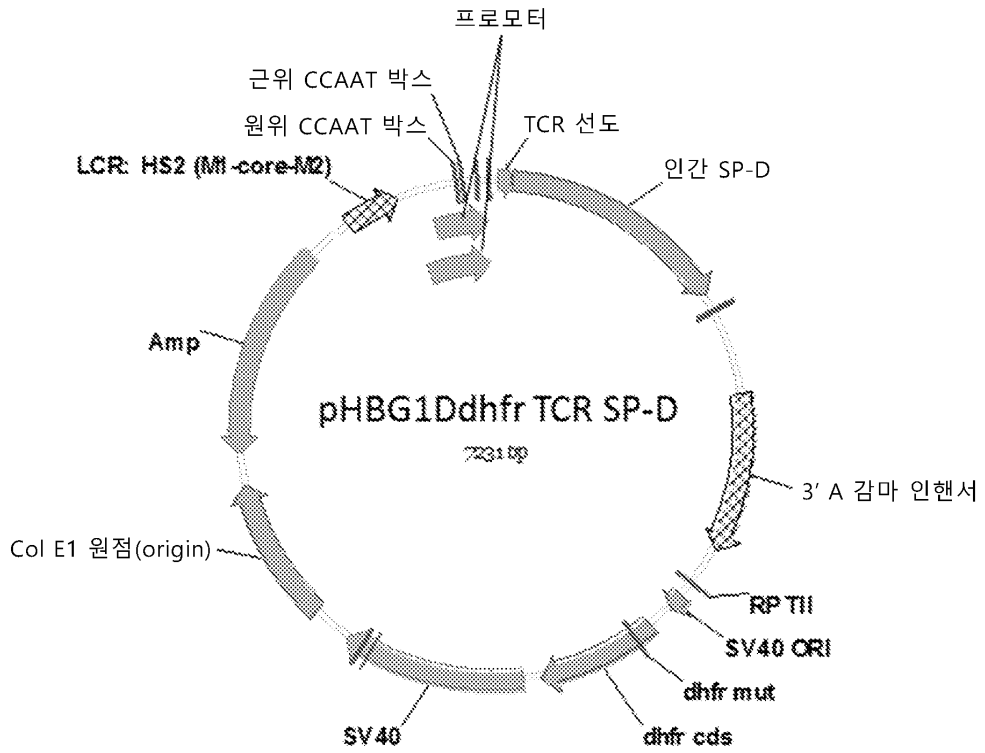
도면1



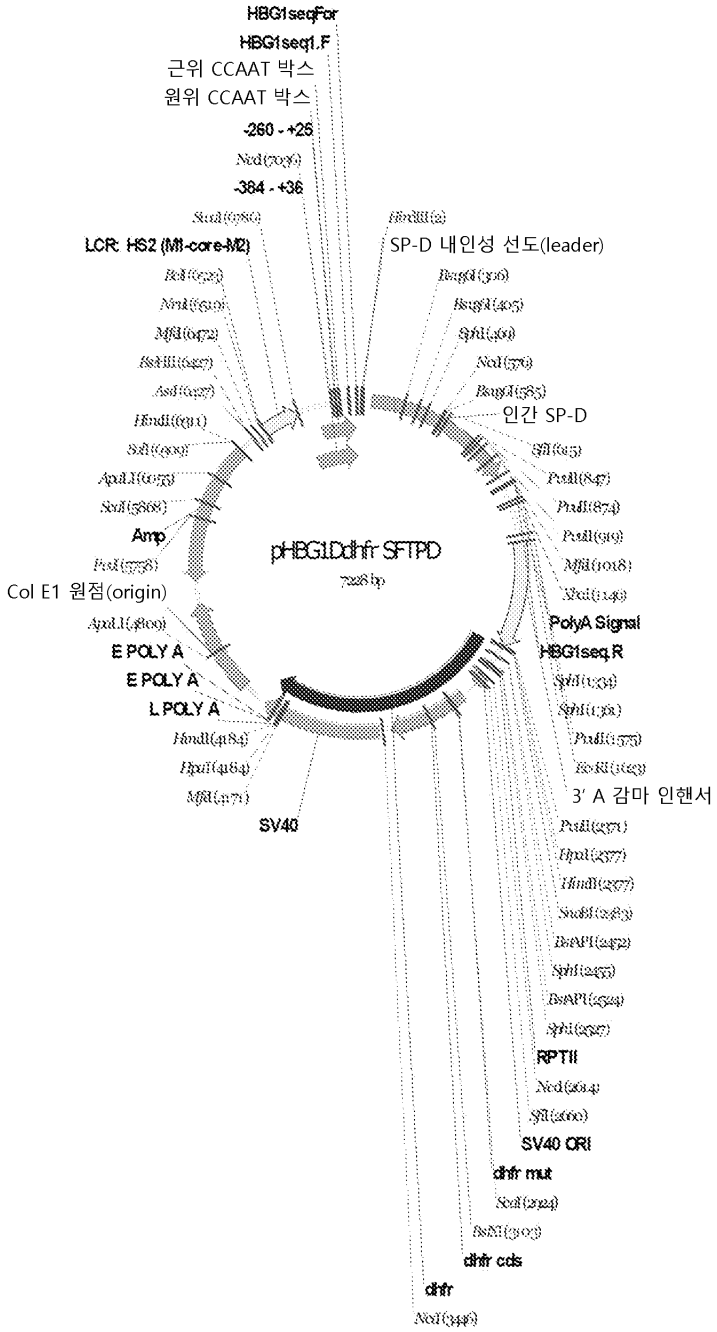
도면2a


프로모터
근위 CCAA T박스
원위 CCAA T박스
SP-D 내인성 선도(leader)
LCR: HS2 (M1-core-M2)
인간 SP-D
Amp
pHBG1Ddhfr WT SP-D
3' A 감마 인핸서
Col E1 원점(origin)
RP TII
SV40 ORI
dhfr mut
SV40
dhfr cds

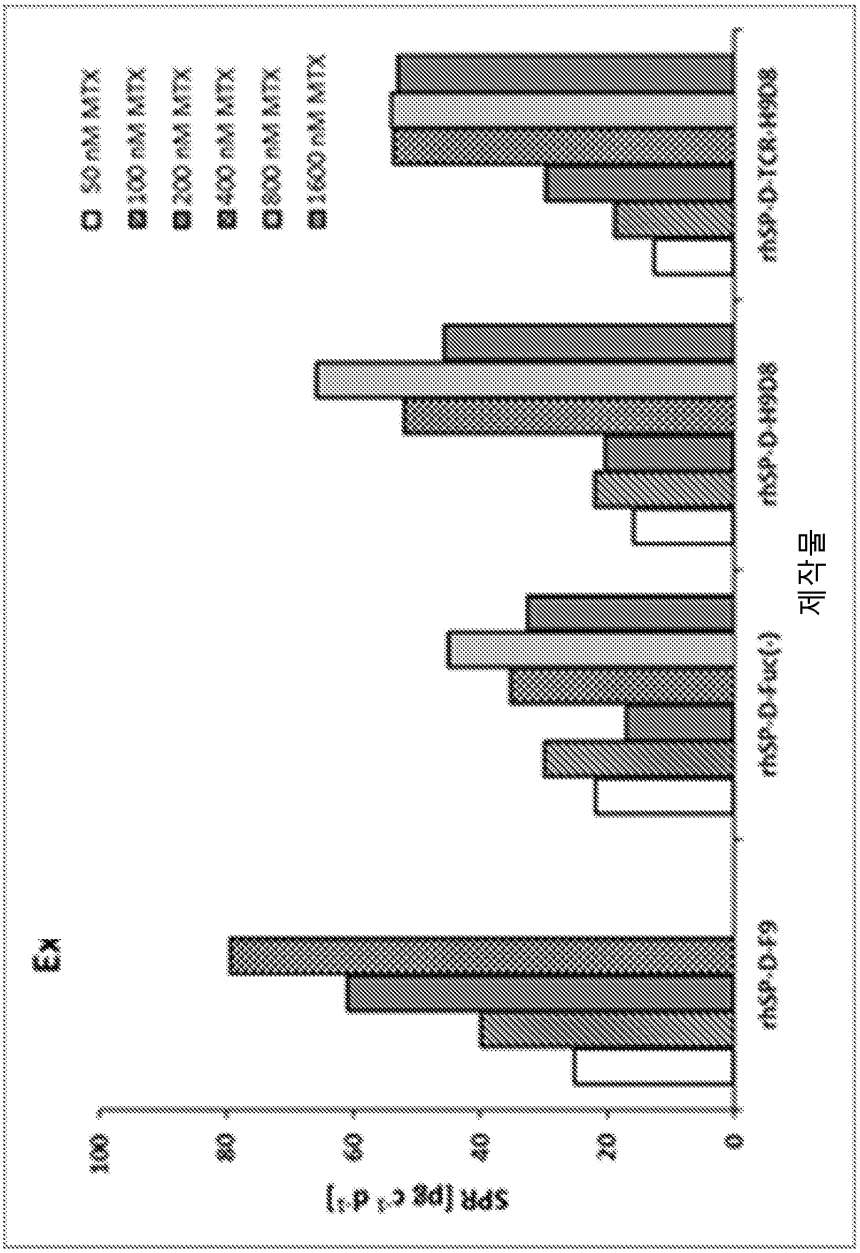
도면2b


프로모터
근위 CCAAT 박스
원위 CCAAT 박스
TCR 선도
LCR: HS2 (M1-core-M2)
인간 SP-D
Amp
pHBG1Ddhfr TCR SP-D
3' A 감마 인핸서
Col E1 원점(origin)
RP TII
SV40 ORI
dhfr mut
SV40
dhfr cds

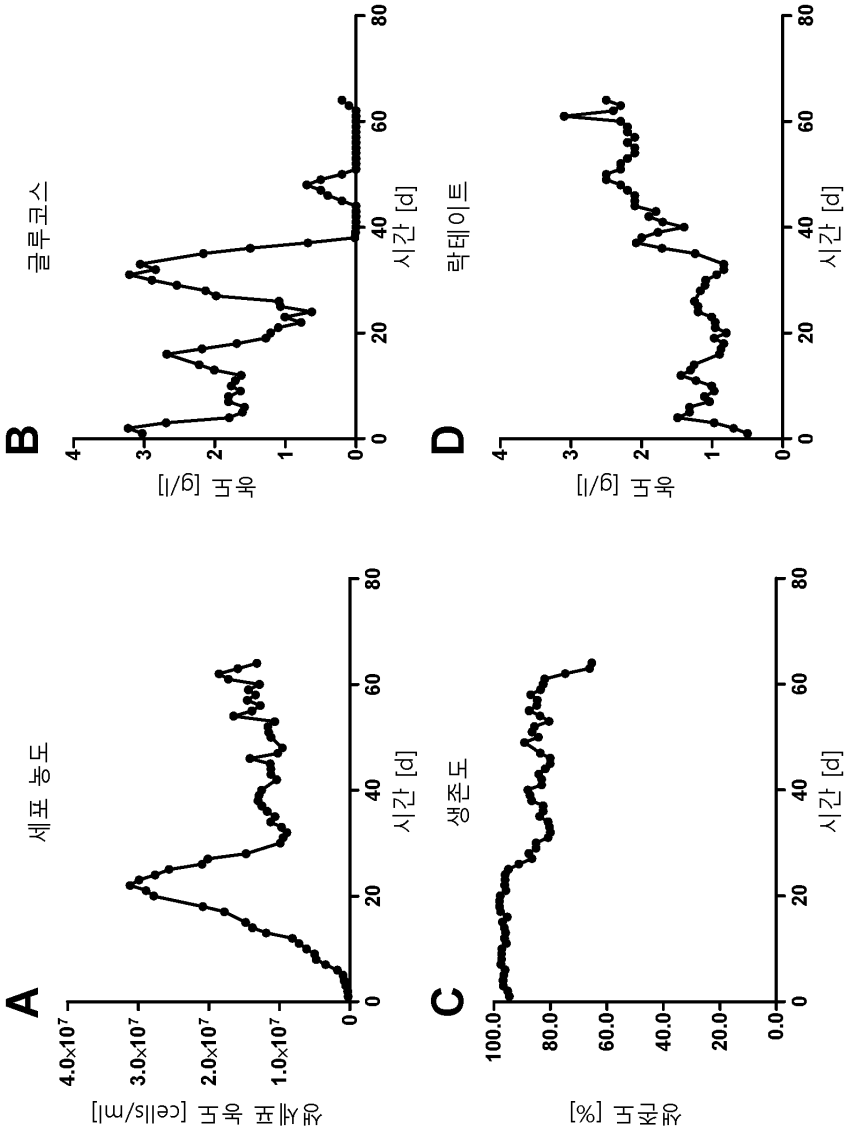
도면2c


HBG1seqFor
HBG1seq1.F
근위 CCAAT 박스
원위 CCAAT 박스
-260 - +25
-384 - +36
LCR: HS2 (Mt-core-M2)
SP-D 내인성 선도(leader)
인간 SP-D
pHBG1Ddhfr SFTPD
7226 bp
Amp
Col E1 원점(origin)
E POLY A
E POLY A
L POLY A
SV40
PolyA Signal
HBG1seq.R
3' A 감마 인핸서
RPTII
SV40 ORI
dhfr mut
dhfr cds
dhfr

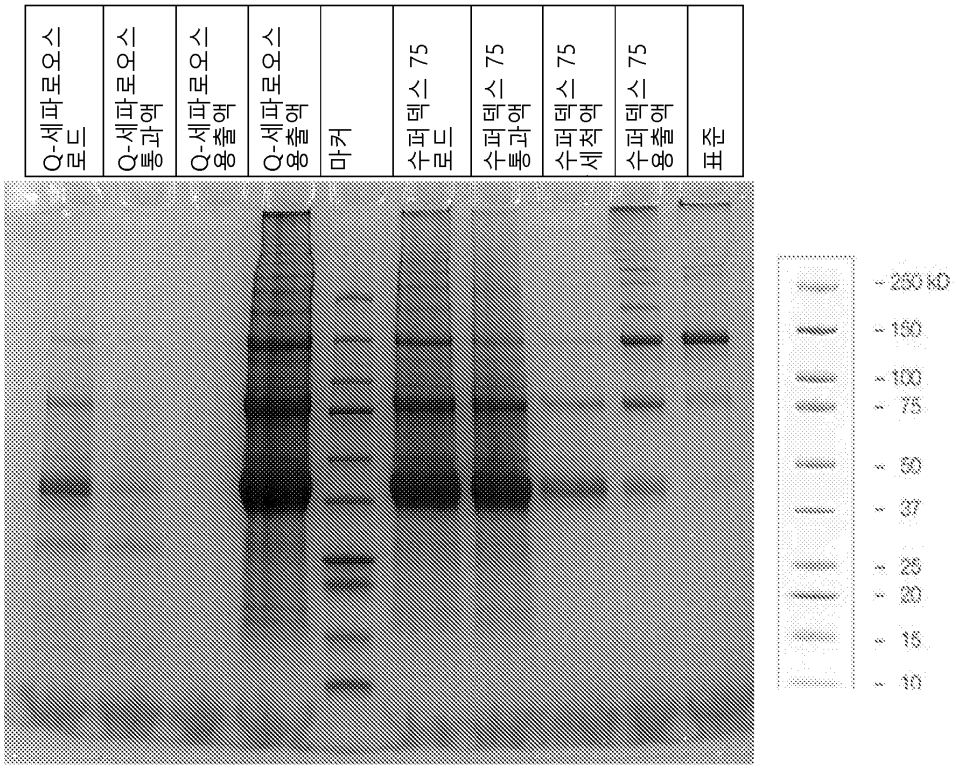
도면3


Ex
50 nM MTX
100 nM MTX
200 nM MTX
400 nM MTX
800 nM MTX
1600 nM MTX
SPR [pg c⁻¹ d⁻¹]
0
20
40
60
80
100
mSP-D-F9
mSP-D-Fuc(-)
mSP-D-H9D8
mSP-D-1(CR-H9D8
제작물

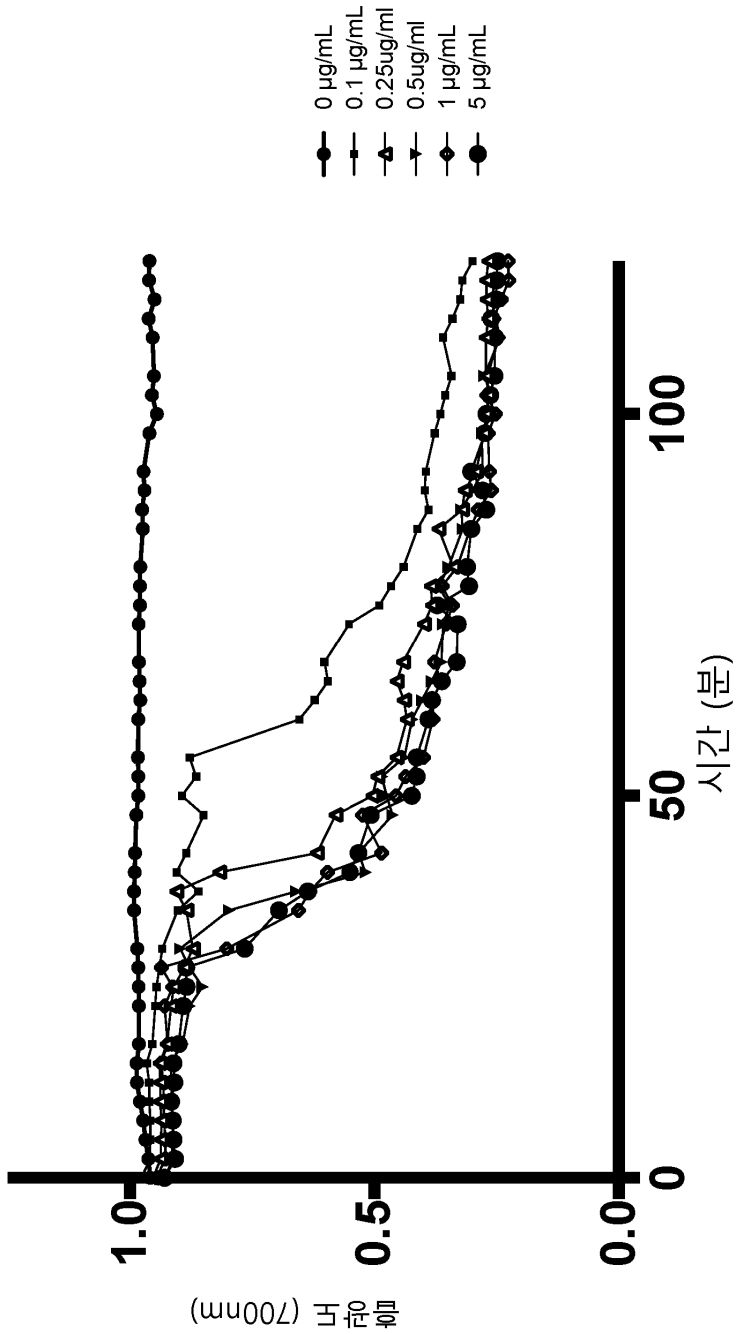
도면4


A
세포 농도
생세포 농도 [cells/ml]
4.0x10^7
3.0x10^7
2.0x10^7
1.0x10^7
0
0
20
40
60
80
시간 [d]
B
글루코스
농도 [g/l]
4
3
2
1
0
0
20
40
60
80
시간 [d]
C
생존도
생존도 [%]
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
0
20
40
60
80
시간 [d]
D
락테이트
농도 [g/l]
4
3
2
1
0
0
20
40
60
80
시간 [d]

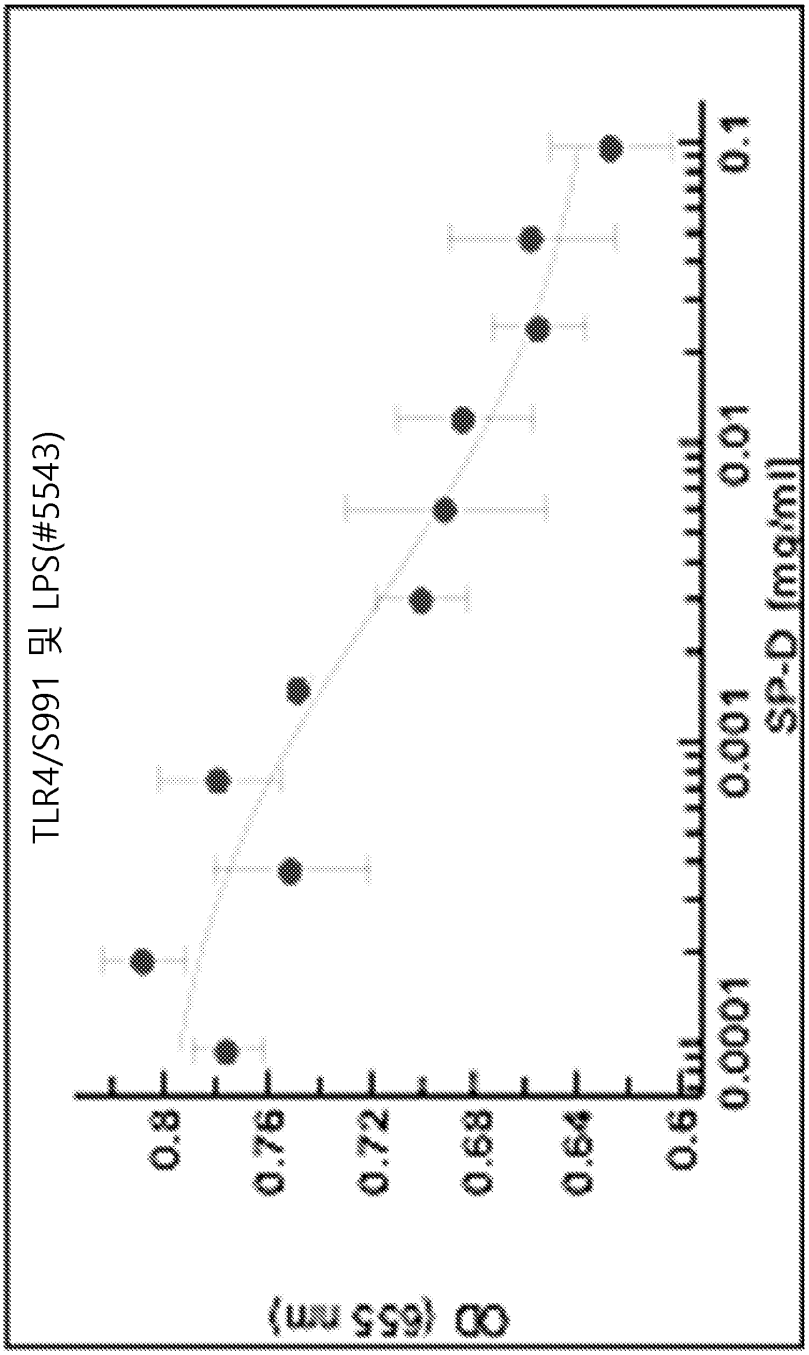
도면5


Q-세파로오스 로드
Q-세파로오스 통과
Q-세파로오스 용출
Q-세파로오스 용출
마커
수퍼덱스 75 로드
수퍼덱스 75 통과
수퍼덱스 75 세척
수퍼덱스 75 용출
표준
250 kD
150
100
75
50
37
25
20
15
10

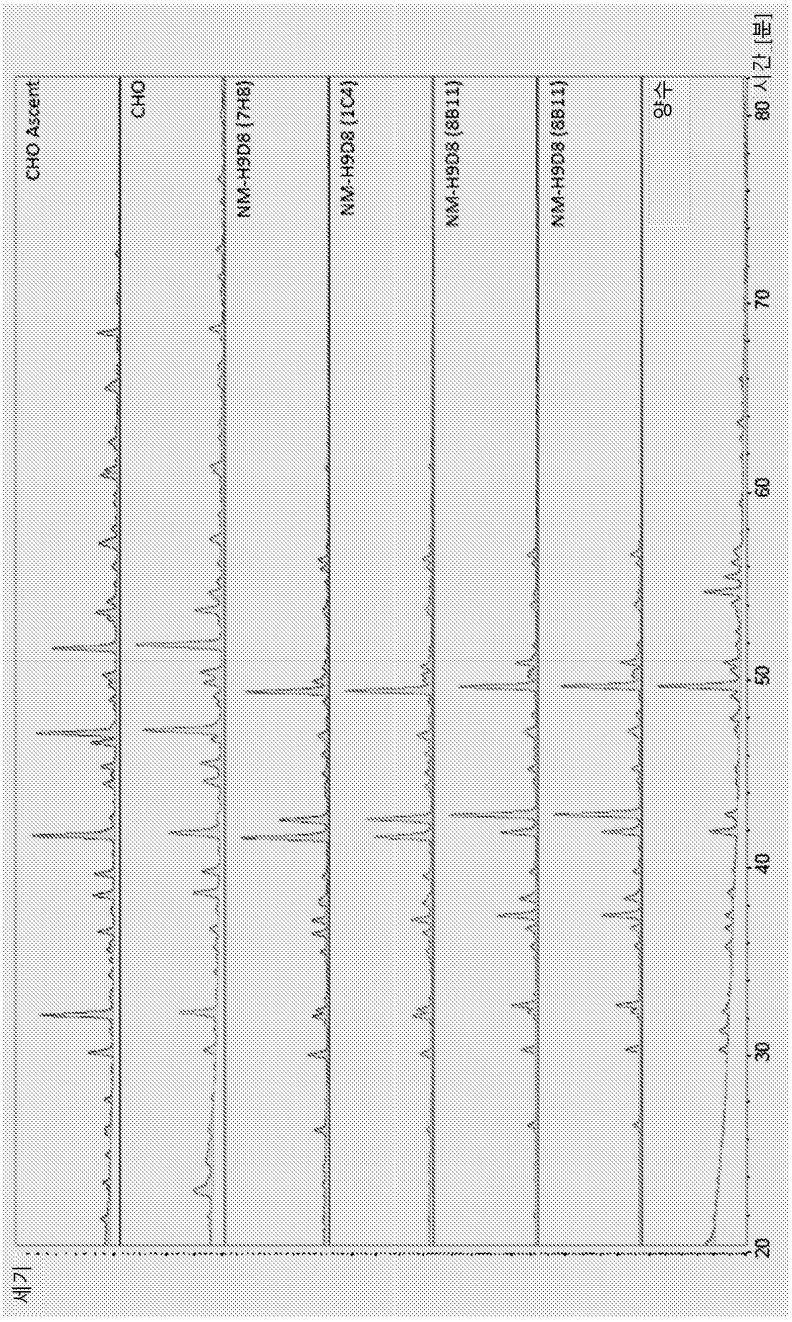
도면6


0 μg/mL
0.1 μg/mL
0.25ug/ml
0.5ug/ml
1 μg/mL
5 μg/mL
흡광도 (700nm)
1.0
0.5
0.0
0
50
100
시간 (분)

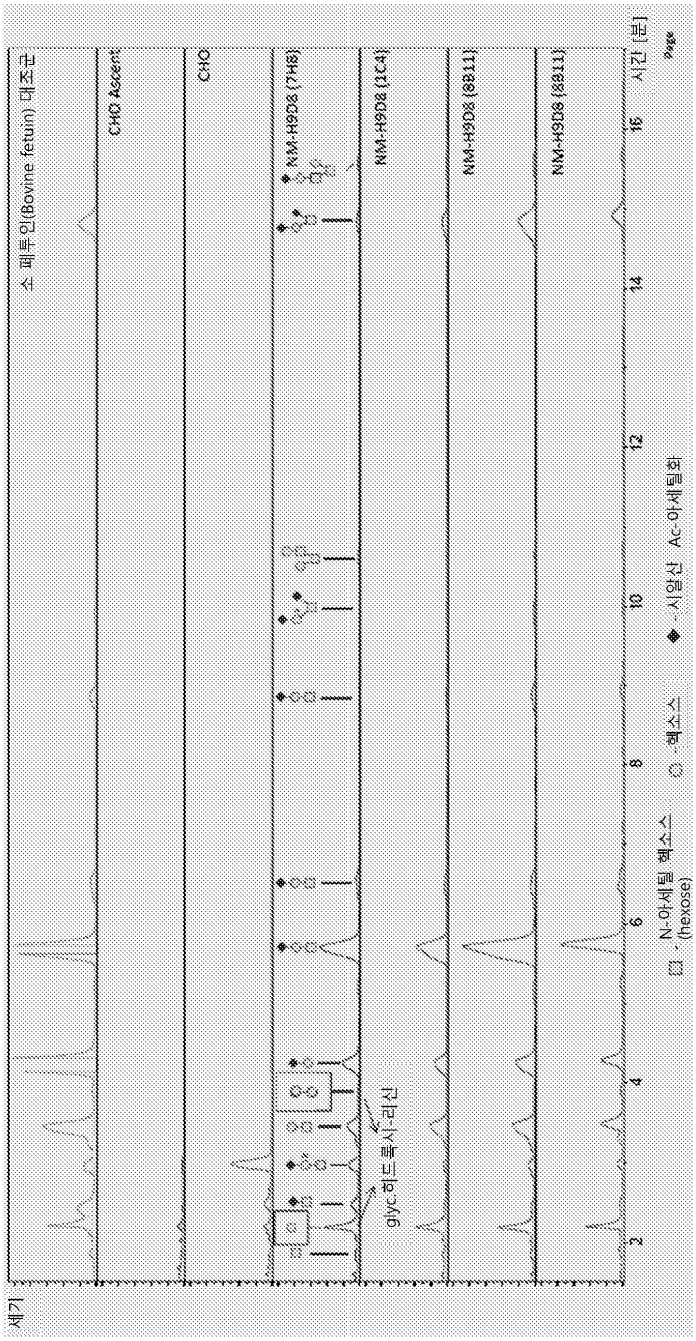
도면7


TLR4/S991 및 LPS(#5543)
OD (655 nm)
0.8
0.76
0.72
0.68
0.64
0.6
0.0001
0.001
0.01
0.1
SP-D (mg/ml)

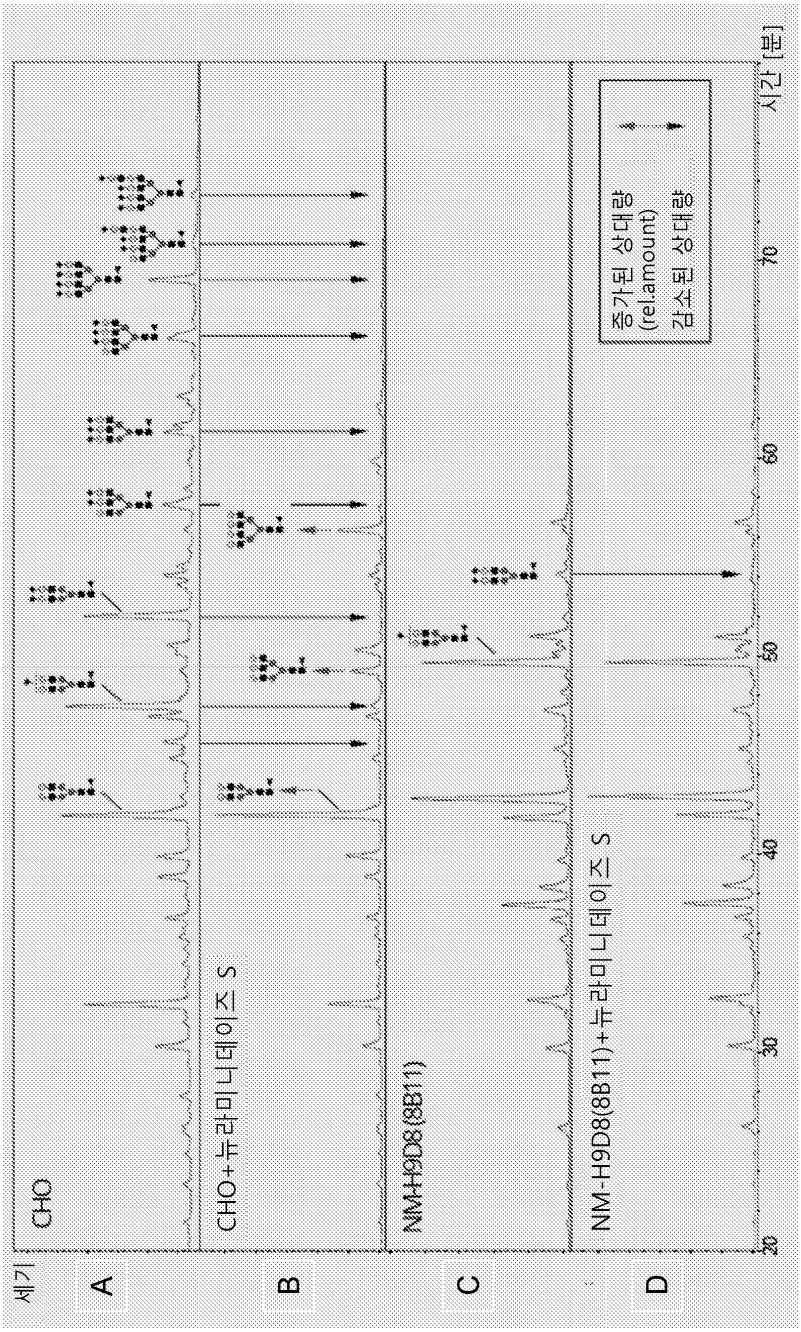
도면8


CHO Ascent
CHO
NM-H9D8 (7H8)
NM-H9D8 (1C4)
NM-H9D8 (8B11)
NM-H9D8 (8B11)
왕수
세기
20
30
40
50
60
70
80 시간 [분]

도면9


세기
소 페투인(Bovine fetuin) 대조군
CHO Accent
CHO
NM-H9D8 (7H6)
NM-H9D8 (1C4)
glyc하드롤사리신
NM-H9D8 (8B11)
NM-H9D8 (8B11)
시간 [분]
16
14
12
10
8
6
4
2
: N-아세틸 헥소스 (hexose)
: 헥소스
: 시알산
: O-아세틸화

도면10



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Jan Susan Rosenbaum

Frederick Gyapon Quast

Matthias Kaup

Lars Stockl

<120> METHODS, COMPOSITIONS AND CELLS FOR

PREPARING SURFACTANT PROTEIN D (SP-D)

<130> AIRWY.007WO

<150> 62/554825

<151> 2017-09-06

<150> 62/614758

<151> 2018-01-08

<160> 10

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1150

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 1

aagcttgcca ccatgctgct gtttctgctg agcgccctgg tgctgctgac acagcctctg 60

ggctatctgg aagccgagat gaagacctac agccaccgga ccatgcccag cgcctgtacc 120

ctcgtgatgt gcagcagcgt ggaaagcggc ctgcctggca gagatggcag ggatggaaga 180

gagggcccca gaggcgagaa gggcgatcct ggactgcctg gcgctgcagg gcaggctgga 240

atgcctggac aggctggacc tgtgggcccc aagggcgata atggctctgt gggagagcct 300

ggccctaagg gggatacagg cccttctgga cctcctggac cacctggcgt gccaggacct 360

gctggaagag aaggacctct gggcaagcag ggcaacatcg gccctcaggg aaagccagga 420

ccaaagggcg aggccggacc caaaggcgaa gtgggagcac ctggcatgca gggaagtgcc 480

ggcgctagag gactggctgg cccaaaaggc gaaaggggag tgcctggcga aagaggcgtg 540

cccggaaata ctggcgccgc tggatctgct ggcgccatgg gacctcaggg atctccaggc 600

gcaagaggcc ctccaggcct gaaaggcgac aaaggcatcc ccggcgataa gggcgctaag 660

ggcgaatccg gcctgccaga tgtggccagc ctgagacagc aggtggaagc tctccagggc 720

caggtgcagc atctccaggc tgccttcagc cagtacaaga aggtggaact gttccccaac 780

ggccagagcg tgggcgagaa gatctttaag accgccggct tcgtgaagcc cttcaccgag 840

gctcagctgc tgtgtaccca ggctggcgga cagctggcct ctcctagatc tgccgccgaa 900

aatgccgctc tccagcagct ggtggtggcc aagaatgagg ccgccttcct gagcatgacc 960

gacagcaaga ccgagggcaa gttcacctac cccaccggcg agtccctggt gtacagcaat 1020

tgggcccctg gcgagcccaa cgatgatggc ggctctgagg actgcgtgga aatcttcacc 1080

aacggcaagt ggaacgaccg ggcctgtggc gagaaaagac tggtcgtgtg cgagttctga 1140

agggtctaga 1150

<210> 2

<211> 1138

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 2

gccaccatgc tgctgtttct gctgagcgcc ctggtgctgc tgacacagcc tctgggctat 60

ctggaagccg agatgaagac ctacagccac cggaccatgc ccagcgcctg taccctcgtg 120

atgtgcagca gcgtggaaag cggcctgcct ggcagagatg gcagggatgg aagagagggc 180

cccagaggcg agaagggcga tcctggactg cctggcgctg cagggcaggc tggaatgcct 240

ggacaggctg gacctgtggg ccccaagggc gataatggct ctgtgggaga gcctggccct 300

aaggggggata caggcccttc tggacctcct ggaccacctg gcgtgccagg acctgctgga 360

agagaaggac ctctgggcaa gcagggcaac atcggccctc agggaaagcc aggaccaaag 420

ggcgaggccg gacccaaagg cgaagtggga gcacctggca tgcagggaag tgccggcgct 480

agaggactgg ctggcccaaa aggcgaaagg ggagtgcctg gcgaaagagg cgtgcccgga 540

aatactggcg ccgctggatc tgctggcgcc atgggacctc agggatctcc aggcgcaaga 600

ggccctccag gcctgaaagg cgacaaaggc atccccggcg ataagggcgc taagggcgaa 660

tccggcctgc cagatgtggc cagcctgaga cagcaggtgg aagctctcca gggccaggtg 720

cagcatctcc aggctgcctt cagccagtac aagaaggtgg aactgttccc caacggccag 780

agcgtgggcg agaagatctt taagaccgcc ggcttcgtga agcccttcac cgaggctcag 840

ctgctgtgta cccaggctgg cggacagctg gcctctccta gatctgccgc cgaaaatgcc 900

gctctccagc agctggtggt ggccaagaat gaggccgcct tcctgagcat gaccgacagc 960

aagaccgagg gcaagttcac ctaccccacc ggcgagtccc tggtgtacag caattgggcc 1020

cctggcgagc ccaacgatga tggcggctct gaggactgcg tggaaatctt caccaacggc 1080

aagtggaacg accgggcctg tggcgagaaa agactggtcg tgtgcgagtt ctgaaggg 1138

<210> 3

<211> 60

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 3

atgctgctgt ttctgctgag cgccctggtg ctgctgacac agcctctggg ctatctggaa 60

<210> 4

<211> 376

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

Met Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Leu Val Leu Leu Thr Gln Pro Leu
1 5 10 15

Leu Gly Tyr Leu Glu Ala Glu Met Lys Thr Tyr Ser His Arg Thr Met
20 25 30

Pro Ser Ala Cys Thr Leu Val Met Cys Ser Ser Val Glu Ser Gly Leu
35 40 45

Pro Gly Arg Asp Gly Arg Asp Gly Arg Glu Gly Pro Arg Gly Glu Lys
50 55 60

Gly Asp Pro Gly Leu Pro Gly Ala Ala Gly Gln Ala Gly Met Pro Gly
65 70 75 80

Gln Ala Gly Pro Val Gly Pro Lys Gly Asp Asn Gly Ser Val Gly Glu
85 90 95

Pro Gly Pro Lys Gly Asp Thr Gly Pro Ser Gly Pro Pro Gly Pro Pro
100 105 110

Gly Val Pro Gly Pro Ala Gly Arg Glu Gly Pro Leu Gly Lys Gln Gly
115 120 125

Asn Ile Gly Pro Gln Gly Lys Pro Gly Pro Lys Gly Glu Ala Gly Pro
130 135 140

Lys Gly Glu Val Gly Ala Pro Gly Met Gln Gly Ser Ala Gly Ala Arg
145 150 155 160

Gly Leu Ala Gly Pro Lys Gly Glu Arg Gly Val Pro Gly Glu Arg Gly
165 170 175

Val Pro Gly Asn Thr Gly Ala Ala Gly Ser Ala Gly Ala Met Gly Pro
180 185 190

Gln Gly Ser Pro Gly Ala Arg Gly Pro Pro Gly Leu Lys Gly Asp Lys
195 200 205

Gly Ile Pro Gly Asp Lys Gly Ala Lys Gly Glu Ser Gly Leu Pro Asp
210 215 220

Val Ala Ser Leu Arg Gln Gln Val Glu Ala Leu Gln Gly Gln Val Gln

225 230 235 240

His Leu Gln Ala Ala Phe Ser Gln Tyr Lys Lys Val Glu Leu Phe Pro

245 250 255

Asn Gly Gln Ser Val Gly Glu Lys Ile Phe Lys Thr Ala Gly Phe Val

260 265 270

Lys Pro Phe Thr Glu Ala Gln Leu Leu Cys Thr Gln Ala Gly Gly Gln

275 280 285

Leu Ala Ser Pro Arg Ser Ala Ala Glu Asn Ala Ala Leu Gln Gln Leu

290 295 300

Val Val Ala Lys Asn Glu Ala Ala Phe Leu Ser Met Thr Asp Ser Lys

305 310 315 320

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

325 330 335

Asn Trp Ala Pro Gly Glu Pro Asn Asp Asp Gly Gly Ser Glu Asp Cys

340 345 350

Val Glu Ile Phe Thr Asn Gly Lys Trp Asn Asp Arg Ala Cys Gly Glu

355 360 365

Lys Arg Leu Val Val Cys Glu Phe

370 375

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 5

Met Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Leu Val Leu Leu Thr Gln Pro Leu

1 5 10 15

Leu Gly Tyr Leu Glu

20

<210> 6

<211> 1153

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 6

aagcttgcca ccatggcctg ccccggattt ctgtgggccc tcgtgatcag cacctgtctg 60

gaattcagca tggccgccga gatgaagacc tacagccacc ggacaatgcc cagcgcctgc 120

accctcgtga tgtgcagctc tgtggaaagc ggcctgcccg gcagagatgg cagggatgga 180

agagagggac ccagaggcga gaagggcgat cctggactgc ctggcgctgc agggcaggct 240

ggaatgcctg gacaggctgg acctgtgggc cccaagggcg ataatggctc tgtgggagag 300

cctggcccta agggggatac aggcccttct ggacctcctg gaccacctgg cgtgccagga 360

cctgctggaa gagaaggacc tctgggcaag cagggcaaca tcggccctca gggaaagcca 420

ggaccaaagg gcgaggccgg acccaaaggc gaagtgggag cacctggcat gcagggaagt 480

gccggcgcta gaggactggc tggcccaaaa ggcgaaaggg gagtgcctgg cgaaagaggc 540

gtgcccggaa atactggcgc cgctggatct gctggcgcca tgggacctca gggatctcca 600

ggcgcaagag gccctccagg cctgaaaggc gacaaaggca tccccggcga taagggcgct 660

aagggcgaat ccggcctgcc agatgtggcc agcctgagac agcaggtgga agctctccag 720

ggccaggtgc agcatctcca ggctgccttc agccagtaca agaaggtgga actgttcccc 780

aacggccaga gcgtgggcga gaagatcttt aagaccgccg gcttcgtgaa gcccttcacc 840

gaggctcagc tgctgtgtac ccaggctggc ggacagctgg cctctcctag atctgccgcc 900

gaaaatgccg ctctccagca gctggtggtg gccaagaatg aggccgcctt cctgagcatg 960

accgacagca agaccgaggg caagttcacc taccccaccg gcgagtccct ggtgtacagc 1020

aattgggccc ctggcgagcc caacgatgat ggcggctctg aggactgcgt ggaaatcttc 1080

accaacggca agtggaacga ccgggcctgt ggcgagaaaa gactggtcgt gtgcgagttc 1140

tgaagggtct aga 1153

<210> 7

<211> 1141

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 7

gccaccatgg cctgccccgg atttctgtgg gccctcgtga tcagcacctg tctggaattc 60

agcatggccg ccgagatgaa gacctacagc caccggacaa tgcccagcgc ctgcaccctc 120

gtgatgtgca gctctgtgga aagcggcctg cccggcagag atggcaggga tggaagagag 180

ggacccagag gcgagaaggg cgatcctgga ctgcctggcg ctgcagggca ggctggaatg 240

cctggacagg ctggacctgt gggccccaag ggcgataatg gctctgtggg agagcctggc 300

cctaaggggg atacaggccc ttctggacct cctggaccac ctggcgtgcc aggacctgct 360

ggaagagaag gacctctggg caagcagggc aacatcggcc ctcagggaaa gccaggacca 420

aagggcgagg ccggacccaa aggcgaagtg ggagcacctg gcatgcaggg aagtgccggc 480

gctagaggac tggctggccc aaaaggcgaa aggggagtgc ctggcgaaag aggcgtgccc 540

ggaaatactg gcgccgctgg atctgctggc gccatgggac ctcagggatc tccaggcgca 600

agaggccctc caggcctgaa aggcgacaaa ggcatccccg gcgataaggg cgctaagggc 660

gaatccggcc tgccagatgt ggccagcctg agacagcagg tggaagctct ccagggccag 720

gtgcagcatc tccaggctgc cttcagccag tacaagaagg tggaactgtt ccccaacggc 780

cagagcgtgg gcgagaagat ctttaagacc gccggcttcg tgaagccctt caccgaggct 840

cagctgctgt gtacccaggc tggcggacag ctggcctctc ctagatctgc cgccgaaaat 900

gccgctctcc agcagctggt ggtggccaag aatgaggccg ccttcctgag catgaccgac 960

agcaagaccg agggcaagtt cacctacccc accggcgagt ccctggtgta cagcaattgg 1020

gcccctggcg agcccaacga tgatggcggc tctgaggact gcgtggaaat cttcaccaac 1080

ggcaagtgga acgaccgggc ctgtggcgag aaaagactgg tcgtgtgcga gttctgaagg 1140

g 1141

<210> 8

<211> 63

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 8

atggcctgcc ccggatttct gtgggccctc gtgatcagca cctgtctgga attcagcatg 60

gcc 63

<210> 9

<211> 376

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 9

Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu

1 5 10 15

Glu Phe Ser Met Ala Ala Glu Met Lys Thr Tyr Ser His Arg Thr Met

20 25 30

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

Pro Gly Pro Lys Gly Asp Thr Gly Pro Ser Gly Pro Pro Gly Pro Pro
100 105 110
Gly Val Pro Gly Pro Ala Gly Arg Glu Gly Pro Leu Gly Lys Gln Gly
115 120 125
Asn Ile Gly Pro Gln Gly Lys Pro Gly Pro Lys Gly Glu Ala Gly Pro
130 135 140
Lys Gly Glu Val Gly Ala Pro Gly Met Gln Gly Ser Ala Gly Ala Arg
145 150 155 160

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

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

275 280 285

Leu Ala Ser Pro Arg Ser Ala Ala Glu Asn Ala Ala Leu Gln Gln Leu
290 295 300
Val Val Ala Lys Asn Glu Ala Ala Phe Leu Ser Met Thr Asp Ser Lys
305 310 315 320
Thr Glu Gly Lys Phe Thr Tyr Pro Thr Gly Glu Ser Leu Val Tyr Ser
325 330 335
Asn Trp Ala Pro Gly Glu Pro Asn Asp Asp Gly Gly Ser Glu Asp Cys
340 345 350

Val Glu Ile Phe Thr Asn Gly Lys Trp Asn Asp Arg Ala Cys Gly Glu
355 360 365
Lys Arg Leu Val Val Cys Glu Phe
370 375

<210> 10
<211> 21
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 10
Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu
1 5 10 15
Glu Phe Ser Met Ala
20