



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월09일

(11) 등록번호 10-2262012

(24) 등록일자 2021년06월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2887 (2013.01)
C12N 5/163 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-0122869
(22) 출원일자 2019년10월04일
심사청구일자 2019년10월04일
(65) 공개번호 10-2020-0042403
(43) 공개일자 2020년04월23일
(30) 우선권주장
1020180122775 2018년10월15일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
Glycobiology Vol. 19 No. 2 pp. 144-152, 2009*
Scientific Reports, 8, 13208(2018)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자
김주영
경기도 고양시 일산서구 일산로 808 장성마을3단지아파트 303동 402호
이진우
인천광역시 연수구 송도문화로28번길 28, 103동 702호
김혜연
서울특별시 서대문구 연대동문길 113, 메이즈 502호
- (74) 대리인
파도특허법인(유한), 이재영

전체 청구항 수 : 총 25 항

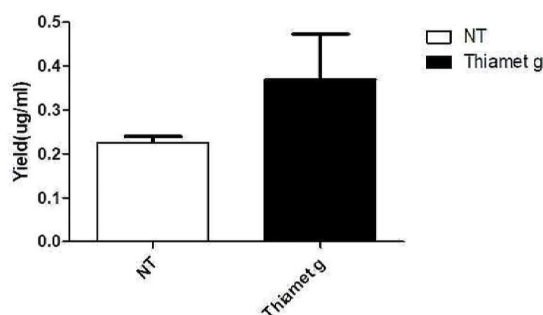
심사관 : 박정민

(54) 발명의 명칭 생산성이 향상된 항체 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 생산성이 향상된 항체의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 항체의 경쇄에 포함된 하나 이상의 하이드록시아미노산을 O-글리코실화(O-linked glycosylation)함으로써 상기 항체의 역가는 유지하되 생산성을 현저히 향상시킬 수 있는 방법에 관한 것입니다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/41 (2013.01)

C12N 2501/73 (2013.01)

C12N 2510/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2017R1A2B4010319
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	오비누투주맵의 CD20단백 결합만으로도 일어나는 B세포 사멸기전규명
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2018.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

경쇄에 포함된 하나 이상의 하이드록시아미노산(hydroxyamino acid)이 O-GlcNAcase 억제제(O-GlcNAcase inhibitor; OGA inhibitor)의 첨가에 의해 O-결합 글리코실화(O-linked glycosylation)된 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항체는 경쇄의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째, 14번째, 26번째, 51번째, 55번째, 62번째, 101번째, 155번째 및 181번째 중 적어도 하나에 하이드록시아미노산 잔기를 포함하는 것인, 항체.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 항체는 경쇄의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나에 하이드록시아미노산 잔기를 포함하는 것인, 항체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 하이드록시아미노산은 세린(Serine), 트레오닌(Threonine, Thr) 또는 티로신(Tyrosine, Tyr) 잔기인, 항체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 O-결합 글리코실화는 상기 경쇄에 포함된 하나 이상의 하이드록시아미노산에 N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine)이 결합된 것인, 항체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 항체는 항-CD20 항체 또는 항-PD-1 항체인, 항체.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 항-CD20 항체는 리툭시맵(Rituximab)인, 항체.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 항체는 리툭시맵의 경쇄의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째, 14번째, 26번째, 51번째, 55번째, 62번째, 101번째, 155번째 및 181번째 중 적어도 하나의 하이드록시아미노산 잔기가 글리코실화된 것인, 항체.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 항체는 리툭시맵의 경쇄의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째, 14번째, 26번째, 51번째, 55번째, 62번째, 101

번째, 155번째 및 181번째 중 적어도 하나의 세린(Ser) 잔기에 N-아세틸글루코사민이 O-결합된 것인, 항체.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 항-PD-1 항체는 니볼루맵(Nivolumab), 펌브롤리주맵(Pembrolizumab) 또는 피딜리주맵(Pidilizumab)인, 항체.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 항체는 상기 니볼루맵, 펌브롤리주맵 또는 피딜리주맵의 경쇄의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나의 하이드록시아미노산 잔기가 글리코실화된 것인, 항체.

청구항 12

항체의 경쇄에 포함된 하나 이상의 하이드록시아미노산(hydroxyamino acid)을 O-결합 글리코실화(O-linked glycosylation)하는 단계를 포함하고,

상기 O-결합 글리코실화하는 단계는 O-GlcNAcase 억제제(O-GlcNAcase inhibitor; OGA inhibitor)를 첨가하여 얻어지는 것인, 항체를 제조하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 방법은 항체를 준비하는 단계를 더 포함하는, 항체를 제조하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 항체는 경쇄의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째, 14번째, 26번째, 51번째, 55번째, 62번째, 101번째, 155번째 및 181번째 중 적어도 하나에 하이드록시아미노산 잔기를 포함하는 것인, 항체를 제조하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 항체는 경쇄의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나에 하이드록시아미노산 잔기를 포함하는 것인, 항체를 제조하는 방법.

청구항 16

제13항에 있어서,

상기 항체는 항-CD20 항체 또는 항-PD-1 항체인, 항체를 제조하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 항-CD20 항체는 리투시맵(Rituximab)인, 항체를 제조하는 방법.

청구항 18

제16항에 있어서,

상기 항-PD-1 항체는 니볼루맵(Nivolumab), 펌브롤리주맵(Pembrolizumab) 또는 피딜리주맵(pidilizumab)인, 항체를 제조하는 방법.

청구항 19

제13항에 있어서,

상기 항체를 준비하는 단계는 항체를 코딩하는 일 이상의 재조합 핵산 분자로 형질 전환된 숙주 세포를 준비하고 배양하며 수행되는 것인, 항체를 제조하는 방법.

청구항 20

삭제

청구항 21

제12항에 있어서,

상기 O-GlcNAcase 억제제는 티아멧-G (Thiamet-G), 스트렙토조토신(streptozotocin; STZ), PUGNAc, NAG-티아졸린(NAG-thiazoline), NButGT, (2R,3S)-이미노시클리톨((2R,3S)-iminocyclitol), PUGNAc-이미다졸 하이브리드(PUGNAc-imidazole hybrid) 및 GlcNAc스타틴 C(GlcNAcstatin C)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 항체를 제조하는 방법.

청구항 22

제12항에 있어서,

상기 하이드록시아미노산은 세린(Serine), 트레오닌(Threonine, Thr) 또는 티로신(Tyrosine, Tyr) 잔기인, 항체를 제조하는 방법.

청구항 23

제12항에 있어서,

상기 O-결합 글리코실화하는 단계는 상기 경쇄에 포함된 하나 이상의 하이드록시아미노산에 N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine; GlcNAc)이 결합되는 것인, 항체를 제조하는 방법.

청구항 24

제17항에 있어서,

상기 O-결합 글리코실화하는 단계는 상기 리톡시맵의 경쇄의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째, 14번째, 26번째, 51번째, 55번째, 62번째, 101번째, 155번째 및 181번째 중 적어도 하나의 하이드록시아미노산 잔기를 글리코실화하는 것인, 항체를 제조하는 방법.

청구항 25

제18항에 있어서,

상기 O-결합 글리코실화하는 단계는 상기 니블루맵, 웹브롤리주맵 또는 피딜리주맵의 경쇄의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나에 하이드록시아미노산 잔기를 글리코실화하는 것인, 항체를 제조하는 방법.

청구항 26

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 항체를 유효 성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생산성이 향상된 항체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] CD20 항원 (인간 B-림프구-제한된 분화 항원, Bp35로도 불림)은 분자량이 대략 35 kD인 프리-B 및 성숙한 B 림프구 상에 위치하는 소수성 횡막 단백질이다 (Valentine et al. J. Biol. Chem. 264 (19): 11282-11287

(1989); 및 Einfeld et al. EMBO J. 7 (3): 711-717 (1988)). 상기 항원은 또한 B 세포 비-호지킨 림프종(NHL)의 90% 초과에서 발견되나 (Anderson et al. Blood 63 (6): 1424-1433 (1984)), 조혈 줄기 세포, 예비-B 세포, 정상 형질 세포 또는 기타 정상 조직에서는 발견되지 않는다 (Tedder et al. J. Immunol. 135 (2): 973-979 (1985)). CD20은 세포 주기 개시 및 분화를 위한 활성화 과정에서 초기 단계(들)을 조절하고 (Tedder et al., 상기 문헌), 가능하게는 칼슘 이온 채널로서 작용하는 것으로 생각된다 (Tedder et al. J. Cell. Biochem. 14D: 195 (1990)).

[0003] B 세포 림프종에서 CD20이 발현되어, 이 항원은 상기 림프종을 치료하는데 유용한 치료적 표적이 되어 왔다. 미국에서 300,000명 이상이 B-세포 NHL을 앓고 있으며, 매년 56,000건 이상의 새로운 경우가 진단된다. 예를 들어, 인간 CD20 항원에 대한 유전자 조작된 키메라 무린/인간 모노클로날 항체인 리툽시맵 (리툽산 (RITUXAN)®) 항체 (제넨테크 인크. (Genentech, Inc.)로부터 구입가능함, South San Francisco, California, U.S.)는 재발성 또는 불응성 저등급 또는 난포성 CD20 양성, B 세포 비-호지킨 림프종을 앓고 있는 환자의 치료를 위해 사용된다. 리툽시맵은 1998년 4월 9일에 허여된 미국 특허 제5,736,137호 (Anderson et al.), 및 미국 특허 제5,776,456호에서는 "C2B8"로 언급된 항체이다. 시험관 내에서 메카니즘 연구를 수행한 결과, 리툽산®이 인간 보체와 결합하여 림프구 B 세포주를 보체-의존성 세포 독성 (CDC)을 통해 용해한다는 것을 입증하였다 (Reff et al., Blood 83 (2): 435-445 (1994)). 추가로, 이는 항체-의존성 세포매개 세포독성 (ADCC)에 대한 검정법에서 유의한 활성을 가진다. 생체 전임상 연구는 리툽산®이 아마도 보체 및 세포로 매개된 방법을 통해 시노몰거스 (Cynomolgus) 원숭이의 말초 혈액, 림프절 및 골수로부터 B 세포를 고갈한다는 것을 보여주었다 (Reff et al., Blood 83 (2): 435-445 (1994)).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 일 목적은 글리코실화(glycosylation)를 통해 다양한 항체의 생산성을 향상시키는 방법에 관한 것이다.

[0005] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 경쇄에 포함된 하나 이상의 하이드록시아미노산(hydroxyamino acid)이 글리코실화된 항체에 관한 것이다.

[0007] **항체**

[0008] 본 발명에서 상기 항체는 경쇄, 바람직하게는 경쇄 가변 영역에 하나 이상의 하이드록시아미노산(hydroxyamino acid)을 포함하는 것이라면, 제한없이 포함될 수 있다.

[0009] 본 발명의 항체에 있어서 글리코실화되는 하이드록시아미노산은 분자 내에 수산기를 갖는 아미노산으로, 세린(Serine, Ser), 트레오닌(Threonine, Thr) 또는 티로신(Tyrosine, Tyr)일 수 있으나, 바람직하게는 세린(Ser)이나 트레오닌(Thr) 잔기일 수 있다.

[0010] 본 발명에서 상기 항체는 경쇄, 바람직하게는 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째, 14번째, 26번째, 51번째, 55번째, 62번째, 101번째, 155번째 및 181번째 중 적어도 하나에 하이드록시아미노산 잔기를 포함하는 것일 수 있다. 이때 상기 아미노산 위치 넘버링(numbering)은 카바트(Kabat)의 EU 인덱스(index)에 의한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0011] 본 발명에서 상기 항체는 경쇄, 바람직하게는 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나에 하이드록시아미노산 잔기를 포함하는 것일 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명에서 상기 항체는 항-CD20 항체 또는 항-PD-1 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명에서 상기 "항-CD20 항체"는 CD20 항원에 특이적으로 결합하는 항체이다. 항-CD20 항체의 CD20 항원으로의 결합 특성 및 생물학적 활성에 따라서 항-CD20 항체의 두 유형(유형 I 및 유형 II 항-CD20 항체)은 문헌 [Cragg, M.S., et al., Blood 103 (2004) 2738-2743]; 및 문헌 [Cragg, M.S., et al., Blood 101 (2003) 1045-1052]에 따라 구분될 수 있다.

- [0014] 본 발명에서 상기 항-CD20 항체는 유형 I 항-CD20 항체일 수 있고, 그 예로는 리투시맵(Rituximab), HI47 IgG3(ECACC, 하이브리도마), 2C6 IgG1(국제 특허출원공개 제2005/103081호에 개시됨), 2F2 IgG1(국제 특허출원공개 제2004/035607호 및 국제 특허출원공개 제2005/103081호에 개시됨) 또는 2H7 IgG1(국제 특허출원공개 제2004/056312호에 개시됨)을 포함하지만, 바람직하게는 리투시맵(Rituximab)일 수 있다.
- [0015] 본 발명에서 상기 "리투시맵(Rituximab)" 항체는 인간 CD20 항원에 대해 유도된, 유전자 조작된 키메라 인간 감마 1 무린 불변 영역 함유 단클론성 항체이다. 상기 키메라 항체는 서열번호 1로 표시되는 인간 면역글로불린 감마 1 중쇄 불변 영역(human immunoglobulin G1 (IgG1) heavy chain constant region); 서열번호 2로 표시되는 인간 카파 경쇄 불변 영역(human kappa light chain constant region); 서열번호 3으로 표시되는 생쥐 유래 중쇄 가변 영역(murine heavy chain variable region) 및 서열번호 4로 표시되는 생쥐 유래 경쇄 가변 영역(murine light chain variable region)을 포함할 수 있으며, 즉 서열번호 5로 표시되는 중쇄 2개와 서열번호 6으로 표시되는 경쇄 2개로 이루어질 수 있다. 상기 리투시맵은 EP2000149B1 호(앤더슨 등, 예를 들면, 도 4 및 5 참조)에서 "C2B8"이란 명칭으로 확인된다. 리투시맵은 재발 또는 굴절 저등급 또는 여포성, CD20 양성, B 세포 비-호지킨 림프종을 갖는 환자의 치료에 승인된다. 작용 연구의 시험관 내 메카니즘은 리투시맵이 인간 보체-의존성 세포독성(CDC)을 나타냄을 밝혔다(문헌[Reff et al., Blood 83(2):435-445 (1994)]). 또한, 리투시맵은 항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC)을 측정하는 분석에서 상당한 활성을 나타낸다.
- [0016] 본 발명에서 상기 "항-PD-L1 항체"는 항체가 PD-L1를 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료제로서 유용하도록 충분한 친화도를 가지고 PD-L1에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. PD-L1 (프로그램된 사멸 리간드 1)은 또한 본 분야에서 "프로그램된 세포 사멸 1 리간드 1", "PDCD1LG1", "CD274", "B7-H" 및 "PDL1" 로 지칭된다. 예시적 인간 PD-L1는 UniProtKB/Swiss-Prot 수탁번호 Q9NZQ7.1에 나타난다.
- [0017] 본 발명에서 상기 항-PD-1 항체는 니볼루맵(Nivolumab), 펌브롤리주맵(Pembrolizumab), 피딜리주맵(pidilizumab), AMP 514(Amplimmune), PDR-001(Novartis), MEDI-0690(또한 AMP-514로도 공지됨)(MedImmune LLC), SHR-1210(Incyte Corp.), REGN-2810(Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), PF-06801591(Pfizer), TSR-042(또한, ANB011으로도 공지됨)(Tesaro, Inc.), BGB-A317(BeiGene, Ltd.) 또는 JS001(Shanghai Junshi Bioscience Co., Ltd.)일 수 있으나, 바람직하게는 니볼루맵, 펌브롤리주맵 또는 피딜리주맵일 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 상기 "니볼루맵 (상표명 OPDIVO®; 앞서 표시된 5C4, BMS-936558, MDX-1106, 또는 ONO-4538)"은 PD-1 리간드 (PD-L1 및 PD-L2)와의 상호작용을 선택적으로 방지하며, 그렇게 함으로써 항종양 T-세포 기능의 하향 조절을 차단하는 완전 인간화된 IgG4 (S228P) PD-1 항체이다 (미국 특허 번호 8,008,449; WO2006/121168; 문헌[Wang 등, Cancer Immunol Res. 2:846-56 (2014); Topalian, S.L. 등, N Engl J Med 366:2443-2454 (2012); Topalian, S.L. 등, Current Opinion in Immunology 24:207-212 (2012); Topalian, S.L. 등, J Clin Oncol 31 (suppl):3002(2013)]). 상기 니볼루맵 항체는 서열번호 7로 표시되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8로 표시되는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있고, 또는 서열번호 9로 표시되는 중쇄와 서열번호 10으로 표시되는 경쇄로 이루어질 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 상기 "펌브롤리주맵 (상표명 KEYTRUDA®; 람브롤리주맵 및 MK-3475로도 공지됨)"은 PD-1에 대해 유도된 것으로, S228P Fc 돌연변이를 포함하는 인간화된 단클론성 IgG4 카파 항체이다. 문헌[Hamid, O. 등, N Engl J Med 369:134-144 (2013)]. 상기 펌브롤리주맵 항체는 서열번호 11로 표시되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 12로 표시되는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있고, 또는 서열번호 13으로 표시되는 중쇄와 서열번호 14로 표시되는 경쇄로 이루어질 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 상기 "피딜리주맵 (또한 CT-011 및 MDV9300로도 공지됨)"은 PD-1에 결합하는 인간화된 IgG1 카파 단클론성 항체이다. 피딜리주맵은 암 및 감염성 질환의 치료를 위해 메디베이션에 의해 개발 중에 있다. 피딜리주맵은 예를 들어 미국 특허 제8,686,119 B2호, WO 2013/014668 A1, WO2009/101611, 문헌[Berger, R. 등, Clinical Cancer Research 14:3044-3051 (2008), and Armand, P. 등, J Clin Oncol 31:4199-4206 (2013)]에 기재되어 있다. 상기 피딜리주맵 항체는 서열번호 15로 표시되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 16으로 표시되는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있고, 또는 서열번호 17로 표시되는 중쇄와 서열번호 18로 표시되는 경쇄로 이루어질 수 있다.
- [0021] **글리코실화된 항체**
- [0022] 본 발명의 항체는 경쇄, 바람직하게는 경쇄 가변 영역에 포함되는 하나 이상의 하이드록시아미노산으로 세린(Ser), 트레오닌(Thr) 또는 티로신(Tyr) 잔기가 글리코실화된 것일 수 있고, 보다 바람직하게는 경쇄 가변 영역

에 포함되는 하나 이상의 세린(Ser)이나 트레오닌(Thr) 잔기가 글리코실화된 것일 수 있다.

- [0023] 또한, 본 발명의 항체는 경쇄의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째, 14번째, 26번째, 51번째, 55번째, 62번째, 101번째, 155번째 및 181번째 중 적어도 하나의 하이드록시아미노산 잔기, 바람직하게는 상기 항체의 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째, 14번째, 26번째 및 62번째 중 적어도 하나의 하이드록시아미노산 잔기, 보다 바람직하게는 상기 항체의 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나의 하이드록시아미노산 잔기가 글리코실화된 것일 수 있다. 이때 상기 아미노산 위치 넘버링(numbering)은 카바트(Kabat)의 EU 인덱스(index)에 의한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 항체는 경쇄의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나, 바람직하게는 7번째, 12번째 및 14번째에 하이드록시아미노산 잔기로 예를 들면 세린(Ser), 트레오닌(Thr) 또는 티로신(Tyr) 잔기, 바람직하게는 세린(Ser)이나 트레오닌(Thr) 잔기, 보다 바람직하게는 세린(Ser) 잔기가 글리코실화된 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 항체는 항-CD20 항체 또는 항-PD-1 항체의 경쇄에 포함된 하나 이상의 하이드록시아미노산, 바람직하게는 경쇄 가변 영역에 포함되는 하나 이상의 하이드록시아미노산, 보다 바람직하게는 경쇄 가변 영역에 하나 이상의 세린(Ser)이나 트레오닌(Thr) 잔기가 글리코실화된 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 항체는 리투시맵(Rituximab)의 경쇄에 포함된 하나 이상의 하이드록시아미노산, 바람직하게는 경쇄 가변 영역에 포함되는 하나 이상의 하이드록시아미노산, 보다 바람직하게는 경쇄 가변 영역에 포함되는 하나 이상의 세린(Ser)이나 트레오닌(Thr) 잔기가 글리코실화된 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 항체는 상기 리투시맵에 있어서 서열번호 6으로 표시되는 경쇄, 바람직하게는 서열번호 4로 표시되는 경쇄 가변 영역에 포함되는 하나 이상의 하이드록시아미노산(hydroxyamino acid)이 글리코실화된 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 항체는 상기 리투시맵의 경쇄의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째, 14번째, 26번째, 51번째, 55번째, 62번째, 101번째, 155번째 및 181번째 중 적어도 하나의 하이드록시아미노산 잔기, 보다 바람직하게는 상기 리투시맵의 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째, 14번째, 26번째 및 62번째 중 적어도 하나의 세린(Ser) 잔기, 보다 바람직하게는 상기 항체의 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나의 세린(Ser) 잔기가 글리코실화된 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 항체는 니볼루맵(Nivolumab)의 경쇄에 포함된 하나 이상의 하이드록시아미노산, 바람직하게는 경쇄 가변 영역에 포함되는 하나 이상의 하이드록시아미노산, 보다 바람직하게는 경쇄 가변 영역에 포함되는 하나 이상의 세린(Ser)이나 트레오닌(Thr) 잔기가 글리코실화된 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 항체는 상기 니볼루맵에 있어서 서열번호 10으로 표시되는 경쇄, 바람직하게는 서열번호 8로 표시되는 경쇄 가변 영역에 포함되는 하나 이상의 하이드록시아미노산이 글리코실화된 것일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 항체는 상기 니볼루맵에 있어서, 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나의 세린(Ser) 잔기가 글리코실화된 것일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 항체는 펄브롤리주맵(Pembrolizumab)의 경쇄에 포함된 하나 이상의 하이드록시아미노산, 바람직하게는 경쇄 가변 영역에 포함되는 하나 이상의 하이드록시아미노산, 보다 바람직하게는 경쇄 가변 영역에 포함되는 하나 이상의 세린(Ser)이나 트레오닌(Thr) 잔기가 글리코실화된 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 항체는 상기 펄브롤리주맵에 있어서 서열번호 14로 표시되는 경쇄, 바람직하게는 서열번호 12로 표시되는 경쇄 가변 영역에 포함되는 하나 이상의 하이드록시아미노산이 글리코실화된 것일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 항체는 상기 펄브롤리주맵에 있어서 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나의 세린(Ser) 잔기가 글리코실화된 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 항체는 피딜리주맵(Pidilizumab)의 경쇄에 포함된 하나 이상의 하이드록시아미노산, 바람직하게는 경쇄 가변 영역에 포함되는 하나 이상의 하이드록시아미노산, 보다 바람직하게는 경쇄 가변 영역에 포함되는 하나 이상의 세린(Ser)이나 트레오닌(Thr) 잔기가 글리코실화된 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 항체는 상기 피딜리주맵에 있어서 서열번호 18로 표시되는 경쇄, 바람직하게는 서열번호 16으로 표시되는 경쇄 가변 영역에 포함되는 하나 이상의 하이드록시아미노산이 글리코실화된 것일 수 있다.
- [0037] 본 발명의 항체는 상기 피딜리주맵에 있어서 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나의 세린(Ser) 잔기가 글리코실화된 것일 수 있다.

- [0038] 본 발명에서 상기 글리코실화(glycosylation)는 O-결합 글리코실화(O-linked glycosylation)인 것이 바람직하고, 본 발명에서 상기 항-CD20 항체 또는 항-PD-1 항체는 경쇄, 또는 경쇄 가변 영역에 포함된 하나 이상의 하이드록시아미노산에 N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine)이 결합된 것일 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 상기 O-결합 글리코실화 시 O-GlcNAc 전이효소(O-GlcNAc transferase; OGT)를 이용하여 상기 항-CD20 항체 또는 항-PD-1 항체의 경쇄, 또는 경쇄 가변 영역 내 하이드록시아미노산에 N-아세틸글루코사민을 결합시킬 수 있다. 여기서 상기 O-GlcNAc 전이효소의 계통명(systematic name)은 "UDP-N-아세틸-D-글루코사민:프로테인-O-베타-N-아세틸-D-글루코사미닐 전이효소(UDP-N-acetyl-D-glucosamine:protein-O-beta-N-acetyl-D-glucosaminyl transferase)"라고 불리우며, 인간에서 상기 효소는 OGT 유전자에 의해 코딩된다.
- [0040] 본 발명에서 상기 O-결합 글리코실화는 O-GlcNAcase 억제제(O-GlcNAcase inhibitor; OGA inhibitor)를 이용하여 이루어질 수 있는 것이다. 여기서 상기 O-GlcNAcase 억제제는 티아멧-G (Thiamet-G), 스트렙토조토신(streptozotocin; STZ), PUGNAc, NAG-티아졸린(NAG-thiazoline), NButGT, (2R,3S)-이미노시클리톨((2R,3S)-iminocyclitol), PUGNAc-이미다졸 하이브리드(PUGNAc-imidazole hybrid) 및 GlcNAc스타틴 C(GlcNAcstatin C)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있지만, 바람직하게는 티아멧-G일 수 있으며, 보다 바람직하게는 각 항체를 생산하는 숙주세포에 상기 O-GlcNAcase 억제제를 추가하여 얻어질 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명에서는 상기 항-CD20 항체 또는 항-PD-1 항체의 경쇄 O-결합 글리코실화를 위하여, 상기 숙주 세포의 배양 시 N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine)의 글리코실 연결기를 추가로 첨가할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 항체의 경쇄에 포함된 하나 이상의 하이드록시아미노산(hydroxyamino acid)을 O-결합 글리코실화(O-linked glycosylation)하는 단계를 포함하는, 항체를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0044] 본 발명의 방법에서는 O-결합 글리코실화를 위하여 우선 항체를 준비하는 단계를 수행할 수 있다. 여기서, 상기 항체는 경쇄, 바람직하게는 경쇄 가변 영역의 분자 내에 수산기를 갖는 아미노산인 하이드록시아미노산으로, 세린(Serine, Ser), 트레오닌(Threonine, Thr) 또는 티로신(Tyrosine, Tyr), 바람직하게는 세린(Ser)이나 트레오닌(Thr) 잔기를 포함하는 것일 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 상기 항체는 경쇄, 바람직하게는 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째, 14번째, 26번째, 51번째, 55번째, 62번째, 101번째, 155번째 및 181번째 중 적어도 하나에 하이드록시아미노산 잔기를 포함하는 것일 수 있다.
- [0046] 본 발명에서 상기 항체는 경쇄, 바람직하게는 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나에 하이드록시아미노산 잔기를 포함하는 것일 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명에서 상기 항체는 항-CD20 항체 또는 항-PD-1 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명에서 상기 항-CD20 항체는 유형 I 키메라 항-CD20 항체로, 예를 들면, 리투시맵(Rituximab), HI47 IgG3(ECACC, 하이브리도마), 2C6 IgG1(국제 특허출원공개 제2005/103081호에 개시됨), 2F2 IgG1(국제 특허출원공개 제2004/035607호 및 국제 특허출원공개 제2005/103081호에 개시됨) 또는 2H7 IgG1(국제 특허출원공개 제2004/056312호에 개시됨)일 수 있지만, 바람직하게는 리투시맵(Rituximab)일 수 있다.
- [0049] 본 발명에서 상기 리투시맵(Rituximab)을 준비하기 위해서, 상기 리투시맵을 코딩하는 일 이상의 재조합 핵산 분자로 형질 전환된 숙주 세포를 준비하고 배양할 수 있다. 일 실시형태에서, 서열번호 1로 표시되는 인간 면역글로불린 감마 1 중쇄 불변 영역(human immunoglobulin G1 (IgG1) heavy chain constant region); 서열번호 2로 표시되는 인간 카파 경쇄 불변 영역(human kappa light chain constant region); 서열번호 3으로 표시되는 생쥐 유래 중쇄 가변 영역(murine heavy chain variable region) 및 서열번호 4로 표시되는 생쥐 유래 경쇄 가변 영역(murine light chain variable region)을 코딩하는 일 이상의 재조합 핵산 분자로 형질 전환된 숙주 세포를 준비하고 배양할 수 있다. 다른 실시형태에서, 서열번호 5로 표시되는 중쇄 및 서열번호 6으로 표시되는 경쇄를 코딩화하는 일 이상의 재조합 핵산 분자로 형질 전환된 숙주 세포를 준비하고 배양할 수 있다.
- [0050] 본 발명에서 상기 항-PD-1 항체는 니볼루맵(Nivolumab), 펌브롤리주맵(Pembrolizumab), 피딜리주맵(Pidilizumab), AMP 514 (Amplimmune), PDR-001 (Novartis), MEDI-0690 (또한 AMP-514로도 공지됨) (MedImmune LLC), SHR-1210 (Incyte Corp.), REGN-2810 (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), PF-06801591 (Pfizer), TSR-042 (또한, ANB011으로도 공지됨)(Tesarro, Inc.), BGB-A317 (BeiGene, Ltd.) 또는 JS001 (Shanghai Junshi Bioscience Co., Ltd.)일 수 있으나, 바람직하게는 니볼루맵, 펌브롤리주맵 또는 피딜리주맵일 수 있다.

- [0051] 본 발명에서 상기 니볼루맵을 준비하기 위해서, 상기 니볼루맵을 코딩하는 일 이상의 재조합 핵산 분자로 형질 전환된 숙주 세포를 준비하고 배양할 수 있다. 일 실시형태에서, 서열번호 7로 표시되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8로 표시되는 경쇄 가변 영역을 코딩하는 일 이상의 재조합 핵산 분자로 형질 전환된 숙주 세포를 준비하고 배양할 수 있다. 다른 실시형태에서, 서열번호 9로 표시되는 중쇄 및 서열번호 10으로 표시되는 경쇄를 코딩화하는 일 이상의 재조합 핵산 분자로 형질 전환된 숙주 세포를 준비하고 배양할 수 있다.
- [0052] 본 발명에서 상기 펩트올리주맵을 준비하기 위해서, 상기 펩트올리주맵을 코딩하는 일 이상의 재조합 핵산 분자로 형질 전환된 숙주 세포를 준비하고 배양할 수 있다. 일 실시형태에서, 서열번호 11로 표시되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 12로 표시되는 경쇄 가변 영역을 코딩하는 일 이상의 재조합 핵산 분자로 형질 전환된 숙주 세포를 준비하고 배양할 수 있다. 다른 실시형태에서, 서열번호 13으로 표시되는 중쇄 및 서열번호 14로 표시되는 경쇄를 코딩화하는 일 이상의 재조합 핵산 분자로 형질 전환된 숙주 세포를 준비하고 배양할 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 상기 피딜리주맵을 준비하기 위해서, 상기 피딜리주맵을 코딩하는 일 이상의 재조합 핵산 분자로 형질 전환된 숙주 세포를 준비하고 배양할 수 있다. 일 실시형태에서, 서열번호 15로 표시되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 16으로 표시되는 경쇄 가변 영역을 코딩하는 일 이상의 재조합 핵산 분자로 형질 전환된 숙주 세포를 준비하고 배양할 수 있다. 다른 실시형태에서, 서열번호 17로 표시되는 중쇄 및 서열번호 18로 표시되는 경쇄를 코딩화하는 일 이상의 재조합 핵산 분자로 형질 전환된 숙주 세포를 준비하고 배양할 수 있다.
- [0054] 본 발명에서 상기 숙주 세포로는 포유류, 식물, 곤충, 균류 또는 세포성 기원의 세포를 포함할 수 있으나, 바람직하게는 포유류 세포일 수 있다. 본 발명의 항체를 발현하기 위한 적합한 포유류 숙주 세포는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포(DHFR 선별 마커와 함께 사용된 dhfr(-) CHO 세포를 포함), NS0 골수종 세포, COS 세포, SP2 세포, 원숭이 신장 CV1, 인간 배아 신장 세포주 293, 새끼 햄스터 신장 세포(BHK), 생쥐 세르톨리 세포(TM4), 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76), 인간 자궁경부암 세포(HELA), 개 신장 세포(MDC), 버팔로 랫트 간 세포(BRL 3 A), 인간 폐 세포 (W138), 인간 간 세포 (Hep G2), 생쥐 유방암 세포 (MMT 060562), TRI 세포, MRC 5 세포 및 FS4 세포를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 숙주 세포는 설치류로부터 유래될 수 있고, 보다 바람직하게는, 포유류 세포는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포일 수 있으며, 더욱 바람직하게 세포는 CHO-K1 세포일 수 있고, 가장 바람직하게는 세포는 CHO-K1 세포로, 배양 배지로는 CHO-K1세포 성장에 적합한 무혈청 배지를 사용할 수 있고, 또는 Sigma #14360C (EX-CELL® CD CHO Serum-Free Medium for CHO Cells, Chemically Defined) 제품을 사용하여 제작할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명에서 상기 숙주 세포는 재조합 단백질을 안정하게 제조할 수 있는 발현 벡터와 같은 적어도 하나의 재조합 핵산 분자로 형질 전환, 즉 유전자적으로 변형된 것일 수 있다. 본 발명의 항체의 제조에 있어서, 상기 숙주 세포는 항체의 중쇄 및 경쇄를 모두 코딩하는 하나의 재조합 핵산 분자, 또는 하나는 항체의 경쇄를 코딩하고 다른 하나는 항체의 중쇄를 코딩하는 2개의 재조합 핵산 분자에 의해 형질 전환될 수 있다. 일 실시형태에서, 재조합 항체는 항체의 중쇄 및 경쇄를 모두 코딩하는 하나의 재조합 핵산 분자로부터 제조될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 항체는 하나의 재조합 핵산 분자로부터 제조되며, 중쇄 및 경쇄의 발현은 동일하거나 상이할 수 있는 별개의 프로모터에 의해 제어될 수 있다. 가장 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 항체는 하나의 재조합 핵산 분자로부터 제조되며, 중쇄 및 경쇄의 발현은 동일한 별개의 프로모터에 의해 제어될 수 있다.
- [0056] 본 발명에서 상기 "벡터"는 어떤 핵산 분자가 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 상기 핵산 분자이다. 벡터의 한 가지 유형은, 추가적인 DNA 세그먼트가 결합될 수 있는 원형 이중가닥 DNA를 가리키는 "플라스미드"이다. 또 다른 유형의 벡터는 파지 벡터이다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스성 벡터로, 추가적인 DNA 세그먼트가 바이러스 게놈에 결합될 수 있다. 어떤 벡터들은 그들이 유입된 숙주세포에서 자율적인 복제를 할 수 있다(예컨대, 박테리아성 벡터는 박테리아성 복제 기원을 갖는 에피솜 포유류 벡터). 기타 벡터(예컨대, 비-에피솜 포유류 벡터)는 숙주세포에 유입되면서 숙주 세포의 게놈에 통합될 수 있고, 그럼으로써, 숙주 게놈과 함께 복제된다. 뿐만 아니라, 어떤 벡터는 이들이 작동차원에서 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이와 같은 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" 또는 단순히 "발현 벡터"라 명명된다. 일반적으로 재조합 DNA 기법에서 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태로 존재한다. 본 명세서에서, "플라스미드"와 "벡터"는, 플라스미드가 벡터 중 가장 통상적으로 사용되는 형태이기 때문에, 상호 교환하여 사용될 수 있다.
- [0057] 본 발명에서 상기 발현 벡터의 구체적인 예시로는 상업적으로 널리 사용되는 pCDNA 벡터, F, R1, RP1, Col, pBR322, ToL, Ti 벡터; 코스미드; 람다, 람다이드(lambdoid), M13, Mu, p1 P22, Q μ , T-even, T2, T3, T7 등의 파아지; 식물 바이러스로 이루어진 균으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 당업자에게 발현 벡터로 알려진 모든 발현 벡터는 본 발명에 사용 가능하고, 발현 벡터를 선택할 때에는 목적으로 하는 숙주 세

포의 성질에 따른다. 숙주 세포로의 벡터 도입 시 인산칼슘 트랜스펙션, 바이러스 감염, DEAE-텍스트란 조절 트랜스펙션, 리포펙타딘 트랜스펙션 또는 전기천공법에 의해 수행될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며 당업자는 사용하는 발현 벡터 및 숙주 세포에 알맞은 도입 방법을 선택하여 이용할 수 있다. 바람직하게 벡터는 하나 이상의 선별 마커를 함유하나 이에 한정되지 않으며, 선별 마커를 포함하지 않은 벡터를 이용하여 생산물 생산 여부에 따라 선별이 가능하다. 선별 마커의 선택은 목적하는 숙주 세포에 의해 선별되며, 이는 이미 당업자에게 알려진 방법을 이용하므로 본 발명은 이에 제한을 두지 않는다.

- [0058] 본 발명에서는 항체의 정제를 용이하게 하기 위하여 태그 서열을 발현 벡터 상에 삽입하여 융합시킬 수 있다. 상기 태그로는 헥사-히스티딘 태그, 헤마글루티닌 태그, myc 태그 또는 flag 태그를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니며 당업자에게 알려진 정제를 용이하게 하는 태그는 모두 본 발명에서 이용 가능하다.
- [0059] 본 발명에서 상기 숙주 세포의 배양 시 사용되는 배양 배지는 포유류 세포를 성장시키기 위하여 요구되는 영양분을 함유하는 용액으로, 전형적으로 최소 성장 및/또는 생존을 위하여 세포가 필요로 하는 필수 및 비필수 아미노산, 비타민, 에너지원, 리피드 및 미량 원소를 포함할 수 있다. 바람직하게, 배지는 모든 성분 및 그 농도가 알려져 있다는 점에서 화학적으로 규명된다. 또한, 바람직한 실시형태에서 상기 배지는 무혈청이고, 가수분해물을 함유하지 않으며, 동물로부터 유래된 성분을 전혀 함유하지 않을 수 있다. 보다 바람직한 실시형태에서, 배지는 무혈청이고, 가수분해물을 함유하지 않고, 동물로부터 유래된 성분을 전혀 함유하지 않으나, 분리 과정에 필요한 일부 화학 물질을 함유할 수 있다.
- [0060] 본 발명에서는 상기 숙주 세포의 배양 시 발현되는 항체의 경쇄 또는 경쇄 가변 영역에 포함되는 하나 이상의 하이드록시아미노산(hydroxyamino acid)으로 세린(Ser), 트레오닌(Thr) 또는 티로신(Tyr) 잔기, 바람직하게는 세린(Ser) 또는 트레오닌(Thr) 잔기를 글리코실화할 수 있다.
- [0061] 본 발명에서는 상기 숙주 세포의 배양 시 발현되는 리톡시맵 항체의 서열번호 6으로 표시되는 경쇄 또는 서열번호 4로 표시되는 표시되는 경쇄 가변 영역에 포함되는 하나 이상의 하이드록시아미노산을 글리코실화할 수 있다.
- [0062] 또한, 본 발명에서는 상기 숙주 세포의 배양 시 발현되는 리톡시맵에 있어서 경쇄의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째, 14번째, 26번째, 51번째, 55번째, 62번째, 101번째, 155번째 및 181번째 중 적어도 하나의 하이드록시아미노산 잔기, 바람직하게는 상기 리톡시맵의 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째, 14번째, 26번째 및 62번째 중 적어도 하나의 세린(Ser) 잔기, 보다 바람직하게는 상기 항체의 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나의 세린(Ser) 잔기를 글리코실화할 수 있다.
- [0063] 본 발명에서는 상기 숙주 세포의 배양 시 발현되는 니볼루맵 항체의 서열번호 10으로 표시되는 경쇄 또는 서열번호 8로 표시되는 표시되는 경쇄 가변 영역에 포함되는 하나 이상의 하이드록시아미노산을 글리코실화할 수 있다.
- [0064] 또한, 본 발명에서는 상기 숙주 세포의 배양 시 발현되는 니볼루맵에 있어서 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나의 세린(Ser) 잔기를 글리코실화할 수 있다.
- [0065] 본 발명에서는 상기 숙주 세포의 배양 시 발현되는 펄브롤리주맵 항체의 서열번호 14로 표시되는 경쇄 또는 서열번호 12로 표시되는 표시되는 경쇄 가변 영역에 포함되는 하나 이상의 하이드록시아미노산을 글리코실화할 수 있다.
- [0066] 또한, 본 발명에서는 상기 숙주 세포의 배양 시 발현되는 펄브롤리주맵에 있어서 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나의 세린(Ser) 잔기를 글리코실화할 수 있다.
- [0067] 본 발명에서 상기 글리코실화(glycosylation)는 O-결합 글리코실화(O-linked glycosylation)인 것이 바람직하고, 본 발명에서 상기 항체는 경쇄, 또는 경쇄 가변 영역에 포함된 하나 이상의 하이드록시아미노산에 N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine; GlcNAc)이 결합될 수 있다.
- [0068] 본 발명에서 상기 숙주 세포의 배양 시 발현되는 항체로, 항-CD20 항체 또는 항-PD-1 항체의 경쇄에 포함된 하나 이상의 하이드록시아미노산을 O-결합 글리코실화 (O-linked glycosylation) 하기 위하여는 상기 숙주 세포의 배양 시 O-GlcNAcase 억제제 (O-GlcNAcase inhibitor; OGA inhibitor)를 첨가할 수 있다.
- [0069] 본 발명에서 상기 OGA 억제제로는 티아멧-G (Thiamet-G), 스트렙토조토신(streptozotocin; STZ), PUGNAc, NAG-티아졸린(NAG-thiazoline), NButGT, (2R,3S)-이미노시클리톨((2R,3S)-iminocyclitol), PUGNAc-이미다졸 하이브리드(PUGNAc-imidazole hybrid) 및 GlcNAc스타틴 C(GlcNAcstatin C)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수

있지만, 바람직하게는 티아멧-G일 수 있다.

- [0070] 본 발명에서는 상기 0-결합 글리코실화를 통하여 상기 항체의 경쇄, 또는 경쇄 가변 영역에 포함된 하나 이상의 하이드록시아미노산, 바람직하게는 상기 경쇄의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째, 14번째, 26번째, 51번째, 55번째, 62번째, 101번째, 155번째 및 181번째 중 적어도 하나, 바람직하게는 7번째, 12번째, 14번째, 26번째 및 62번째 중 적어도 하나, 보다 바람직하게는 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나에 위치하는 하이드록시아미노산 잔기가 0-결합 글리코실화될 수 있다.
- [0071] 또한, 본 발명에서는 상기 0-결합 글리코실화를 통하여 상기 리톡시맵 항체의 경쇄의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째, 14번째, 26번째, 51번째, 55번째, 62번째, 101번째, 155번째 및 181번째 중 적어도 하나, 바람직하게는 상기 리톡시맵의 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째, 14번째, 26번째 및 62번째 중 적어도 하나의 세린(Ser) 잔기가 0-결합 글리코실화될 수 있다.
- [0072] 또한, 본 발명에서는 상기 0-결합 글리코실화를 통하여 상기 니블루맵 항체의 경쇄의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나, 바람직하게는 상기 니블루맵의 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나의 세린(Ser) 잔기가 0-결합 글리코실화될 수 있다.
- [0073] 또한, 본 발명에서는 상기 0-결합 글리코실화를 통하여 상기 펌브롤리주맵 항체의 경쇄의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나, 바람직하게는 상기 펌브롤리주맵의 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나의 세린(Ser) 잔기가 0-결합 글리코실화될 수 있다.
- [0074] 또한, 본 발명에서는 상기 0-결합 글리코실화를 통하여 상기 피딜리주맵 항체의 경쇄의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나, 바람직하게는 상기 피딜리주맵의 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 중 적어도 하나의 세린(Ser) 잔기가 0-결합 글리코실화될 수 있다.
- [0075] 또한, 본 발명에서는 상기 항-CD20 항체 또는 항-PD-1 항체의 0-결합 글리코실화를 위하여, 상기 숙주 세포의 배양 시 O-GlcNAc 전이효소(O-GlcNAc transferase; OGT)를 추가로 첨가하여 상기 항-CD20 항체 또는 항-PD-1 항체의 경쇄 또는 경쇄 가변 영역 내 하이드록시아미노산에 N-아세틸글루코사민을 결합시킬 수 있다.
- [0076] 또한, 본 발명에서는 상기 항-CD20 항체 또는 항-PD-1 항체의 경쇄 0-결합 글리코실화를 위하여, 상기 숙주 세포의 배양 시 N-아세틸글루코사민 (N-acetylglucosamine)의 글리코실 연결기를 추가로 첨가할 수 있다.
- [0077] 본 발명의 방법에 따라 0-결합 글리코실화된 항체를 제조한 후, 이를 수확할 수 있다. 포유류 세포로부터 발현된 재조합 단백질인 0-결합 글리코실화된 항체는 전형적으로 배양 과정 중에 세포 배양액으로 분비되므로, 배양 과정의 마지막에 생성물 수확은 세포로부터 0-결합 글리코실화된 항체를 포함하는 세포 배양액을 분리함으로써 이루어진다. 본 발명에서 세포를 분리하는 방법은, 상기 항체 생성물의 품질에 영향을 미칠 수 있는 세포 파편의 증가와, 프로테아제 및 다른 분자의 배출을 방지하기 위하여 세포 파괴를 최소화하도록 온화하여야 한다. 일반적으로, 0-결합 글리코실화된 항체와 같은 재조합 단백질을 포함하는 세포 배양액의 수확은 원심 분리 및/또는 여과를 포함하며, 이에 의해 재조합 단백질이 상청액 및 여액에 각각 존재할 수 있다. 팽창층 흡착 크로마토그래피(Expanded bed adsorption chromatography)가 원심분리/여과 방법을 피하기 위한 대안이 될 수 있다.
- [0078] 본 발명에서는 상기와 같이 0-결합 글리코실화된 항체를 포함하는 세포 배양액을 수확한 후에, 세포 배양액으로부터 상기 0-결합 글리코실화된 항체를 정제할 수 있다. 상기 0-결합 글리코실화된 항체의 정제 시 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 수산화인회석 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피와 같은 일련의 크로마토그래피 단계에 의해 일반적으로 이루어질 수 있다. 또한, 정제 과정은 일 이상의 한외여과(ultrafiltration), 나노여과(nanofiltration) 또는 투석여과(diafiltration) 단계를 포함할 수 있다. PCT/EP2015/054862에 기재된 특히 적합한 방법은 플로우-스루 모드(flow-through mode)에서의 음이온 교환 크로마토그래피, 단백질 A 수지 상의 친화성 크로마토그래피 및 결합 및 용리 모드(bind-and-elute mode)에서의 양이온 교환 크로마토그래피의 단계를 포함한다.
- [0079] 본 발명의 방법은 적어도 500 또는 1,000 리터, 바람직하게 적어도 5,000 또는 8,000 리터, 가장 바람직하게 10,000 또는 20,000 리터의 배양 부피(culture volume)를 의미하는 대규모로 0-결합 글리코실화된 항체를 제조하는데 사용될 수 있다.
- [0081] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 글리코실화된 항체를 유효 성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0082] 본 발명에서 제공하는 글리코실화된 항체는, 그 중에서도 특히 항-CD20 항체 또는 항-PD-1 항체의 특정 하이드

록시아미노산 잔기에 0-결합 글리코실화를 수행함으로써 항체의 역가는 동등 이상의 수준으로 유지하면서 항체의 생산성을 현저히 높일 수 있으므로, 이를 암의 예방 또는 치료 용도로 사용할 수 있다.

- [0083] 본 발명에서 상기 "암"은 포유류에서 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장으로 특징지어진 생리적 상태를 나타내거나 가리킨다. 본 발명에서 상기 예방 또는 치료의 대상이 되는 암은 그 발생 부위에 따라 췌장암, 갑상선암, 유방암, 담도암, 담낭암, 대장암, 자궁암, 식도암, 위암, 뇌암, 직장암, 폐암, 방광암, 신장암, 난소암, 전립선암, 자궁암, 두경부암, 피부암, 혈액암 또는 간암 등 일 수 있으나, 바람직하게는 혈액암, 흑색종, 폐암, 신장암, 두경부암 또는 위암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0084] 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 암 증상을 차단하거나, 암 증상의 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0085] 본 발명에서, "치료"는 본 발명의 약학적 조성물을 조사하여 암 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0086] 본 발명의 약학적 조성물은 다른 항암제와도 추가로 병용 투여할 수 있으며, 이를 통해서 암 세포에 대한 성장 억제 효과를 더욱 증강시킬 수 있다.
- [0087] 여기서 상기 항암제로는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리투시맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 만데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조미브, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맙, 시스플라틴, 세툽시맙, 비스큐알분, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맙오조가마이신, 이브리투모맙티세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레볼린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산효몰 키토산, 켈시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토티렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토푸린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모퍼, 라티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시롤리무스, 테모졸로마이드, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토락솔, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비갈루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0088] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0089] 본 발명의 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.
- [0090] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0091] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장 포함된다. 경구 또는 비

경구 투하가 바람직하다.

- [0092] 본 발명에서, "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0093] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.
- [0095] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 암을 예방 또는 치료하기 위하여, 목적하는 개체에 본 발명에서 제공하는 글리코실화된 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.
- [0096] 본 발명에서 상기 암은 췌장암, 갑상선암, 유방암, 담도암, 담낭암, 대장암, 자궁암, 식도암, 위암, 뇌암, 직장암, 폐암, 방광암, 신장암, 난소암, 전립선암, 자궁암, 두경부암, 피부암, 혈액암 또는 간암 등 일 수 있으나, 바람직하게는 혈액암, 흑색종, 폐암, 신장암, 두경부암 또는 위암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0097] 본 발명에서 제공하는 글리코실화된 항체의 투여량, 스케줄 및 투여 경로는 개체의 크기 및 조건에 따라, 그리고 표준 약제학적 관행에 따라 결정될 수 있다. 예시적인 투여 경로는 정맥내, 동맥내, 복강내, 폐내, 혈관내, 근육내, 기관내, 피하, 안내, 척수강내 또는 경피를 포함한다.
- [0098] 개체에 투여되는 항체의 용량은, 예를 들어, 투여되는 항체의 특정 유형, 투여 경로 및 치료되는 암의 특정 유형과 병기에 따라 달라질 수 있다. 상기 양은 심한 독성 또는 유해 사례없이, 암에 대한 치료 반응과 같은 원하는 반응을 가져오기 충분해야 한다. 일부 실시 형태에서, 투여될 글리코실화된 항체의 양은 치료적 유효량이다. 일부 실시 형태에서, 글리코실화된 항체의 양은 치료 전의 동일한 개체에서의 상응하는 종양 크기, 암 세포의 수 또는 종양 성장 속도와 비교하여, 또는 치료를 받지 않은 다른 개체에서의 상응하는 활성과 비교하여 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100% 중 어느 하나만큼 종양 크기를 감소시키거나, 암 세포의 수를 감소시키거나, 종양의 성장 속도를 감소시키기 충분한 양이다. 정제된 효소를 사용한 시험관내 검정, 세포 기반 검정, 동물 모델 또는 인체 실험과 같은 표준 방법을 사용하여 효과의 규모를 측정할 수 있다.
- [0099] 본 발명에서 상기 글리코실화된 항체의 투여 시 단독으로 또는 다른 요법, 예컨대 수술, 방사선 치료, 유전자 치료, 면역치료, 골수 이식, 줄기세포 이식, 호르몬 요법, 표적 치료, 냉동요법, 초음파 치료, 광역동 치료, 화학요법 등과 함께 수행될 수 있다. 추가로, 증식성 질환이 발병할 위험이 더 큰 사람은 질환의 발병을 억제 및/또는 지연하기 위한 치료를 받을 수 있다.

발명의 효과

- [0100] 본 발명에서는 항체, 그 중에서도 특히 항-CD20 항체 또는 항-PD-1 항체의 특정 하이드록시아미노산 잔기에 0-결합 글리코실화를 수행함으로써 항체의 역가는 동등 이상의 수준으로 유지하면서 항체의 생산성을 현저히 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0101] 도 1은 실험예 1에서 숙주 세포를 이용한 리톡시맵의 발현 시 티아멧-G (Thiamet G)를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우 발현되는 리톡시맵 항체의 생산 수율을 비교한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 2는 실험예 2에서 숙주 세포를 이용한 리톡시맵의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)의 첨가 후 시간의 경과에 따른 리톡시맵 항체의 중쇄 및 경쇄의 발현 수준의 변화를 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3의 (a)는 실험예 2에서 숙주 세포를 이용한 리톡시맵의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)의 첨가 후 시간의 경과에 따른 리톡시맵 항체의 중쇄의 발현 수준의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 3의 (b)는 실험예 2에서 숙주 세포를 이용한 리톡시맵의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)의 첨가 후 시간의 경

과에 따른 리톡시맵 항체의 경쇄의 발현 수준의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 실험예 2에서 숙주 세포를 이용한 리톡시맵의 발현 시 OSMI-1의 첨가 후 시간의 경과에 따른 리톡시맵 항체의 중쇄 및 경쇄의 발현 수준의 변화를 웨스턴 블랏을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 실험예 3에서 숙주 세포를 이용한 리톡시맵의 발현 시 OSMI-1의 첨가 후 시간의 경과에 따른 리톡시맵 항체의 중쇄의 발현 수준의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 6의 (a)는 실험예 4에서 숙주 세포를 이용한 리톡시맵의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)를 첨가한 경우와 무첨가한 경우에 있어 숙주 세포의 용해물(CHO-RTX Lysate)의 여러가지 단백질과, 그로부터 분리 및 정제한 리톡시맵 항체에서 O-결합 N-아세틸글루코사민(O-linked N-acetylglucosamine; O-GlcNAc)의 결합 정도를 O-결합 N-아세틸글루코사민 특이적 항체 (RL2)를 이용한 웨스턴 블랏을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6의 (b)는 도 6의 (a)에서 3번째 및 4번째에 사용된 리톡시맵 항체의 양을 인간 면역글로불린 특이적 항체를 이용한 웨스턴 블랏을 통해 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 7의 (a)는 실험예 5에서 숙주 세포를 이용한 리톡시맵의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)를 첨가한 경우와 무첨가한 경우에 있어 숙주 세포의 용해물(Lysate)과, 그로부터 분리 및 정제한 리톡시맵 항체에서 O-결합 N-아세틸글루코사민(O-linked N-acetylglucosamine; O-GlcNAc)의 결합 정도를 O-결합 N-아세틸글루코사민 특이적 항체 (RL2)를 이용하여 환원 조건에서 웨스턴 블랏을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7의 (b)는 실험예 5에서 숙주 세포를 이용한 리톡시맵의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)를 첨가한 경우와 무첨가한 경우에 있어 숙주 세포의 용해물(Lysate)과, 그로부터 분리 및 정제한 리톡시맵 항체에서 O-결합 N-아세틸글루코사민(O-linked N-acetylglucosamine; O-GlcNAc)의 결합 정도를 O-결합 N-아세틸글루코사민 특이적 항체 (RL2)를 이용하여 비-환원 조건에서 웨스턴 블랏을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 실험예 6에서 숙주 세포를 이용한 리톡시맵의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)를 첨가한 경우와 무첨가한 경우에 있어 숙주 세포의 용해물(Lysate)과, 그로부터 분리 및 정제한 리톡시맵 항체에서 O-결합 N-아세틸글루코사민(O-linked N-acetylglucosamine; O-GlcNAc)의 결합 정도를 메타볼릭 라벨링(metabolic labeling)을 이용하여 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 실험예 7에서 LC-MS/MS 분석을 통해 숙주 세포를 이용한 리톡시맵의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)를 첨가한 경우 상기 리톡시맵 항체의 경쇄 내 O-GlcNAc이 결합한 세린 잔기의 위치를 나타낸 것이다.

도 10은 실험예 7에서 LC-MS/MS 분석을 통해 숙주 세포를 이용한 리톡시맵의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)를 첨가한 경우 상기 리톡시맵 항체의 경쇄 내 O-GlcNAc이 결합한 세린 잔기의 위치를 나타낸 것이다.

도 11은 실험예 8에서 오프라인 프로그램 (OGAP)을 통해 숙주 세포를 이용한 리톡시맵의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)를 첨가한 경우 상기 리톡시맵 항체의 경쇄 내 O-GlcNAc이 결합하는 것으로 예측되는 세린 잔기의 위치를 나타낸 것이다.

도 12의 (a)는 실험예 9에서 숙주 세포를 이용해 리톡시맵의 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 세린 잔기가 알라닌으로 부위 특이적 돌연변이(site-directed mutagenesis)가 유도된 리톡시맵 항체의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)를 첨가한 경우에 있어 리톡시맵 항체의 중쇄 및 경쇄의 발현 수준의 변화를 웨스턴 블랏을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 12의 (b)는 실험예 9에서 숙주 세포를 이용해 리톡시맵의 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 26번째 및 62번째 세린 잔기가 알라닌으로 부위 특이적 돌연변이(site-directed mutagenesis)가 유도된 리톡시맵 항체의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)를 첨가한 경우에 있어 리톡시맵 항체의 중쇄 및 경쇄의 발현 수준의 변화를 웨스턴 블랏을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 실험예 10에서 숙주 세포를 이용해 리톡시맵의 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째 및 14번째 세린 잔기가 알라닌으로 부위 특이적 돌연변이(site-directed mutagenesis)가 유도된 리톡시맵 항체의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)를 첨가한 경우에 있어 리톡시맵 항체의 중쇄 및 경쇄의 발현 수준의 변화를 웨스턴 블랏을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 실험예 11에서 숙주 세포를 이용한 리톡시맵의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)를 첨가한 경우와 무첨가한 경우에 있어 얻어진 리톡시맵 항체의 항원에 대한 결합 친화성을 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 15는 실험예 11에서 숙주 세포를 이용한 리톡시맵의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)를 첨가한 경우와 무첨가한 경우에 있어 얻어진 리톡시맵 항체의 보체 의존적 세포 독성을 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 16은 실험예 11에서 숙주 세포를 이용한 리톡시맵의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)를 첨가한 경우와 무첨가한 경우에 있어 얻어진 리톡시맵 항체의 항체-의존적 세포 중재 독성을 분석한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 17의 (a)는 실험예 12에서 숙주 세포를 이용한 리톡시맵의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)를 첨가한 경우와 무첨가한 경우에 있어 리톡시맵 항체 내 O-GalNAc의 결합정도의 차이를 O-GalNAc과 결합하는 락틴인 (Jacalin-HRP)을 이용한 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 17의 (b)는 도 17의 (a)에서 1번째 및 2번째에 사용된 리톡시맵 항체의 양을 인간 면역글로불린 특이적 항체를 이용한 웨스턴 블롯을 통해 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 18은 실험예 12에서 LC-MS/MS 분석을 통해 숙주 세포를 이용한 리톡시맵의 발현 시 티아멧-G(TMG)를 첨가한 경우와 무첨가한 경우에서 상기 리톡시맵 항체의 경쇄 내 O-GalNAc의 결합 정도의 변화를 나타낸 것이다.

도 19는 실험예 13에서 숙주 세포를 이용한 리톡시맵(RTX), 니볼루맵(NIV) 및 펌브롤리맵(PEMB)의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)의 첨가 후 각 항체의 중쇄 및 경쇄의 발현 수준의 변화를 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 20은 실험예 13에서 숙주 세포를 이용한 리톡시맵(RTX), 니볼루맵(NIV) 및 펌브롤리맵(PEMB)의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)의 첨가 후 첨가 전에 비하여 각 항체의 경쇄의 발현 수준의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

도 21은 실험예 13에서 리톡시맵(RTX), 니볼루맵(NIV) 및 펌브롤리맵(PEMB)의 경쇄 서열을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 22는 실험예 14에서 숙주 세포를 이용한 리톡시맵(RTX), 니볼루맵(NIV) 및 펌브롤리맵(PEMB)의 발현 시 티아멧-G(Tg)의 첨가 후 각 항체의 중쇄 및 경쇄의 발현 수준의 변화를 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 23은 실험예 14에서 숙주 세포를 이용한 리톡시맵(RTX), 니볼루맵(NIV) 및 펌브롤리맵(PEMB)의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)의 첨가 후 각 항체의 중쇄 및 경쇄의 발현 수준의 변화를 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 24는 실험예 15에서 숙주 세포를 이용한 리톡시맵의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)의 첨가 농도에 따른 리톡시맵의 중쇄 및 경쇄의 발현 수준의 변화를 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 25는 실험예 15에서 숙주 세포를 이용한 리톡시맵의 발현 시 티아멧-G(Thiamet G)의 첨가 농도에 따른 리톡시맵의 중쇄 및 경쇄의 발현 수준의 변화를 웨스턴 블롯을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0102] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0104] 실시예

[0106] [실시예 1] 항체의 생산

[0107] 1. 항체 및 글리코실화 효소 클로닝

[0108] 리톡시맵(rituximab)의 서열은 Drugbank (<https://www.drugbank.ca>)에서 참고할 수 있다. DNA 합성을 통하여 리톡시맵의 중쇄(서열번호 5) 및 경쇄(서열번호 6)를 제작하였다. 단, 중쇄의 불변 영역의 경우는 건강한 기증자의 DNA에서 PCR을 통해 얻었다.

[0109] 2. 렌티바이러스(lentivirus) 제작

[0110] HEK293T 세포에 상기 실시예 1의 1.에서 제작한 항체 클론 DNA 및 렌티바이러스 구성 DNA를 공동-형질전환(co-transfection)하여 배양하였다. 밤새 배양(overnight)한 후, 세포 배양액을 갈아주었다. 24 시간이 경과된 후, 세포 배양액을 분리하여 4 °C에서 1000 rcf, 3분간 원심 분리하고 상층액만 따로 깨끗한 튜브(tube)로 옮긴 뒤

세포 배양액 내에 섞여있는 세포를 제거하였다. 이를 -70 °C에 보관하였다.

[0111] 3. 항체의 제작

[0112] CHO-K1 세포를 12 웰 플레이트에 1×10^5 세포/웰로 접종한 후 배양하였다. 다음 날, 세포에 렌티바이러스가 들어있는 배양액과 신선한 배양액을 1:1로 섞어 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 새로 교체한 뒤 퓨로마이신(puromycin) 및 블라스티시딘(blasticidin)을 각각 10 ug/ml로 처리하여 선별(selection)하였다. 72 시간 경과된 후, 남아있는 세포를 증식시켜 충분한 세포를 확보하였다. 이처럼 확보한 세포의 배양액을 무혈청 배지 (EX-CELL CD CHO Serum-Free Medium for CHO Cells, Chemical Defined, Sigma, 14360C)로 갈아준 뒤, Thiamet-G(Sigma cat# SML0244) 시약을 30 uM의 농도로 처리하였다. 세포를 30 °C, CO₂ 인큐베이터(incubator)에서 2주간 배양한 후, 배양액을 모아 4 °C에서 1000 rcf로 3분간 원심 분리하여 상층액을 따로 깨끗한 튜브로 옮기고, 상기 상층액에 섞여있는 세포를 제거하였다. 이를 4 °C에서 보관하였다.

[0113] 4. 항체의 정제

[0114] 항체가 들어있는 배양액에 A 단백 아가로스 비드(Protein A agarose bead, Pierce Protein A Agarose, thermos, QE218104)를 처리하여 4 °C에서 4 시간 동안 반응시켰다. 원심 분리하여 상층액을 제거하고, 세척 버퍼(washing buffer: 0.1 M NaPO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.4)로 5번 세척하였다. 다시 상층액을 제거한 비드에 용출 버퍼(elution buffer: 0.2 M glycine, pH 3)로 비드 볼륨으로 5번 용출시켰다. 용출한 부분을 원심 분리용 여과 유닛(Centrifugal filter units)(Amicon Ultra-4, Millipore, #UFC800324)에 모아 13200 rpm으로 1시간씩 3회에 걸쳐 PBS로 버퍼를 바꾸어 주었다. 이후, 브래드포드(Bradford) 방법으로 총 단백을 정량하였다.

[0116] [실험예 1] 항체의 생산량 증가 확인(1)

[0117] 상기 실시예 1에서 Thiamet-G를 통한 리톡시맵의 O-결합 글리코실화 시 항체의 생산량 변화를 확인하기 위하여, 3. 항체의 제작 시 Thiamet-G를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우 정제된 항체의 생산량을 측정하였다. 그 결과를 도 1에서 보는 바와 같이, Thiamet-G를 첨가하여 리톡시맵을 O-결합 글리코실화시킨 경우 아무런 처리를 하지 않은 경우와 비교하여 항체의 생산량이 대략 2배 정도 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0119] [실험예 2] 항체의 생산량 증가 확인(2)-(Thiamet-G 처리에 의한 항체의 중쇄와 경쇄의 단백질량의 증가 확인)

[0120] 상기 실험예 1에서 Thiamet-G를 통한 리톡시맵의 O-결합 글리코실화 시 항체의 생산량이 증가됨을 확인하였고, Thiamet-G의 첨가 후 시간에 따른 항체의 생산량 변화를 확인하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다. 구체적으로는 상기 실시예 1에서 3. 항체의 제작 시 Thiamet-G를 30 uM의 농도로 첨가한 후 24시간, 48시간, 72시간이 경과한 후 세포 배양액을 회수하였다. 회수된 배양물과 같은 양을 아크릴아마이드 겔(acrylamide gel)에서 전기영동하여 단백을 크기 별로 분리한 후, 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane, NC 막)으로 영동시켰다. 니트로셀룰로오스 막에 전기적으로 전달된 단백질 이외의 부분을 5 % 탈지 우유(non-fat milk)와 0.1 % Tween 20이 함유된 TBS-T로 상온에서 1시간 동안 블로킹(blocking)하고, 항-인간-HRP(Anti-human-HRP)와 항-마우스-HRP(Anti-Mouse-HRP) 항체를 상온에서 30분 배양한 후 TBS-T로 10분씩 세 번 세척하였다. ECL 용액을 사용하여 X-ray 필름에 감광시키고(도 2), 각 시간에 따른 중쇄 및 경쇄의 생산량을 분석하였다(도 3). 그 결과, Thiamet-G를 처리한 경우 시간이 경과할수록 항체의 중쇄 및 경쇄의 생산량이 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0122] [실험예 3] 항체의 생산량 증가 확인(3)-(OSMI: Thiamet-G와 반대 작용을 하는 약물에 의한 항체의 중쇄와 경쇄의 단백질량의 감소 확인)

[0123] 상기 실험예 2에서 확인한 바와 같이 항체의 생산량의 증가가 리톡시맵의 O-결합 글리코실화에 의한 것인지를 확인하기 위하여, 대조예로서 상기 실시예 1에서 3. 항체의 제작 시 Thiamet-G 대신에 OGT 억제제에 해당하는 OSMI-1(sigma #SML1621) 시약을 30 uM의 농도로 첨가한 후 상기와 동일한 방법으로 24시간, 48시간, 72시간이 경과한 뒤 세포 배양액을 회수한 후 웨스턴 블롯(Western blot)을 통해 항체 및 그 중쇄의 생산량을 분석하였다(도 4 및 5). 그 결과, OSMI-1를 처리한 경우에도 시간이 경과할수록 항체의 중쇄 및 경쇄의 생산량은 증가하였지만, 무처리한 음성 대조군에 비하여는 생산 증가 폭이 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0125] [실험예 4] 항체의 O-GlcNAc 결합 정도 차이 확인(1)-(O-GlcNAc 검출용 항체를 이용한 O-GlcNAc 결합량 비교)

[0126] 분리한 리톡시맵의 총 단백량을 맞추어 아크릴아마이드 겔에서 전기영동하여 단백을 크기별로 분리한 후, 니트로셀룰로오스 막으로 영동시켰다. 니트로셀룰로오스 막에 전기적으로 전달된 단백질 이외의 부분을 5 % 탈지유,

0.1 % Tween 20이 함유된 TBS-T로 상온에서 1시간 동안 블러킹(blocking)하고, O-결합 N-아세틸글루코사민(O-linked N-acetylglucosamine; O-GlcNAc) 특이적 항체(RL2-HRP)를 상온에서 1시간 동안 배양한 후, TBS-T로 10분씩 세 번 세척하였다. ECL 용액을 사용하여 X-ray 필름에 감광시켰다(도 6(a)).

[0127] 리톡시맵의 양이 동량인지 확인하기 위해 니트로셀룰로오스 막에 결합한 O-결합 N-아세틸글루코사민(O-linked N-acetylglucosamine; O-GlcNAc) 특이적 항체(RL2-HRP)를 스트리핑(stripping)으로 제거한 후 항-인간-HRP와 항-마우스-HRP(RITUXIMAB은 human과 mouse가 합쳐진 chimeric 항체) 항체를 상온에서 30분 동안 배양한 후, TBS-T로 10분씩 세 번 세척하였다. ECL 용액을 사용하여 X-ray 필름에 감광시켰다(도 6(b)). 그 결과, 도 6(b)에서 Thiamet-G를 처리한 경우 리톡시맵이 동일한 양임에도 불구하고 도 6(a)와 같이 O-결합 N-아세틸글루코사민(O-GlcNAc)이 더 많이 결합하고 있음을 나타낸다. 즉, Thiamet-G를 처리한 경우 리톡시맵에서 O-GlcNAc의 결합이 증가하여 그 발현 수준 또한 증가한 것임을 확인할 수 있었다.

[0129] [실험예 5] 항체의 O-GlcNAc 결합 정도 차이 확인(2)-(O-GlcNAc 검출용 항체를 이용한 O-GlcNAc 결합량 비교)

[0130] 렌티 바이러스 시스템(Lenti-virus system)으로 리톡시맵 안정 세포주를 제작하였다. 상기 세포주를 Thiamet-G(TMG) 50uM을 처리한 무혈청 RPMI 배지(Serum free RPMI media)에서 72시간 배양 후 수확한 뒤 세포 용해물(lysate)을 제작하였다. 또한, 상기 세포주를 Thiamet-G 50uM을 처리한 무혈청 RPMI 배지에서 2주간 30℃ 인큐베이터(incubator)에서 배양한 후 단백질 A(Protein A)로 리톡시맵을 분리하였다. 분리한 항체 1μg을 환원(reducing)과 비-환원(non-reducing) 조건에서 웨스턴 블롯(western blot)을 수행하여 항-O-GlcNAc 항체(RL2-HRP)로 면역 블롯을 수행하고, SDS 겔에 영동(running)시킨 후 쿠마시 블루 염색(coomassie blue staining)을 하였다. 그 결과는 도 7의 (a) 및 (b)에 나타내었다. 단, 여기서 대조군으로 마테라주(Mabthera; Mab)(Roche)를 사용하였다. 그 결과, 도 7에서 보는 바와 같이 리톡시맵에 Thiamet-G를 처리한 군에서 O-GlcNAc이 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0132] [실험예 6] 항체의 O-GlcNAc 결합 정도 차이 확인(3)-(메타볼릭 라벨링을 이용한 O-GlcNAc 결합량 비교)

[0133] 렌티 바이러스 시스템(Lenti-virus system)으로 리톡시맵 안정 세포주를 제작하였다. 상기 세포주에 Thiamet-G 50uM과 Ac4GlcNAz(azido sugar) 50uM을 처리하고 4일간 배양한 후 단백질 A로 리톡시맵을 분리하였다. 분리한 리톡시맵을 포스핀-비오틴(phosphine-biotin)과 상온에서 16시간 클릭 반응(click reaction) 후 웨스턴 블롯을 수행하여 스트렙타비딘(streptavidin)-HRP로 면역 블롯을 수행하여 리톡시맵의 O-GlcNAc을 메타볼릭 라벨링(metabolic labeling)을 하였다. 또한, 리톡시맵의 양을 알기 위해 상기 실험 결과에서 스트리핑(stripping) 후 항-인간 IgG-HRP와 항-마우스 IgG-HRP로 면역 블롯을 수행하였다. 그 결과 도 8에서 보는 바와 같이 리톡시맵에 Thiamet-G를 처리한 군에서 O-GlcNAc이 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0135] [실험예 7] 항체의 O-GlcNAc 결합 정도 차이 확인(4)-(항체 내 O-결합 글리코실화 부위의 확인)

[0136] 리톡시맵의 항체에서 O-결합 글리코실화 부위를 확인하기 위하여, 하기의 실험을 수행하였다. 상기 실험예 2에서 SDS-PAGE 겔에 전기 영동한 단백질의 밴드(band)를 여러조각으로 자른 후 25 mM 암모늄 중탄산 버퍼(ammonium bicarbonate buffer)(pH 7.8, containing 50 % (v/v) acetonitrile (ACN))에서 실온 1시간 동안 세척하였다. 이후, 원심분리 진공 농축기(centrifugal vacuum concentrator)(Biotron, Inc., Incheon, Korea)에서 10분 동안 탈수(dehydration) 과정을 거친 뒤 50 ng의 시퀀싱 그레이드 트립신 용액(grade trypsin solution)(Promega, Madison, WI, USA)에서 재수화(rehydration) 시켰다. 25 mM 암모늄 중탄산 버퍼에 16시간 배양한 후, 포름산(formic acid)으로 펩타이드를 분리하였다. 이후 수행할 질량 분석(mass spectrometric)에 앞서 역상 컬럼(reversed-phase column)(Gobom et al., 1999)을 통과시켜 펩타이드 용액(peptide solution)을 탈염(desalting)시켰다. LC-MS/MS 분석을 위하여 Nano ACQUITY UPLC and LTQ-orbitrap-mass spectrometer(Thermo Electron, San Jose, CA)로 분석을 수행하였고, 컬럼은 BEH C18 1.7 μm, 100 μm × 100 mm column(Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였다. MS/MS 각각의 스펙트라(spectra)는 SEQUEST software(Thermo Quest, San Jose, CA, USA)로 처리한 후 MASCOT program(Matrix Science Ltd., London, UK)으로 피크 리스트(peak list)를 만들었다(도 9 및 10). 그 결과, 무처리한 경우에 비하여 Thiamet-G를 처리한 경우 항체의 경쇄의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째, 14번째 및 181번째에 위치한 세린 잔기에 N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine)이 결합하여 O-결합 글리코실화된 것을 알 수 있다.

[0138] [실험예 8] 항체의 O-GlcNAc 결합 정도 차이 확인(2)-(항체 내 O-결합 글리코실화 부위의 확인)

[0139] 리톡시맵의 항체에서 O-결합 글리코실화 부위를 예측하기 위하여, 하기의 실험을 수행하였다. 업체공 프로그램(OGAP)(<http://cbsb.lombardi.georgetown.edu/OGAP.html>..)(BMC Bioinformatics. 2011 Apr 6;12:91. doi:

10.1186/1471-2105-12-91.)을 이용하되 프로그램의 역치 값(threshold)을 150으로 정하여 Thiamet-G를 처리한 리톡시맵의 경쇄 내 N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine)이 결합한 위치를 확인하였다(도 11). 단, 도 11은 리톡시맵의 경쇄에 22개의 아미노산으로 이루어진 시그널 펩타이드(signal peptide)를 포함한 결과이다. 그 결과, 리톡시맵의 경쇄의 5' 말단으로부터 26번째 및 62번째에 위치한 세린 잔기에 N-아세틸글루코사민이 결합하여 O-결합 글리코실화된 것을 알 수 있다.

[0141] [실험예 9] 항체 내 O-결합 글리코실화 부위의 확인-(O-GlcNAc 결합부위 돌연변이로 O-GlcNAc 결합 부재 효과 확인)

[0142] 실시예 1과 동일한 방법으로 항체를 제작하되, 상기 실험예 5에서 질량 분석 시 O-결합 N-아세틸글루코사민(O-GlcNAc)이 결합하는 것으로 확인한 7번째, 12번째 및 14번째 세린(serine) 잔기와 O-GlcNAc이 결합하는 것으로 예측되는 26번째 및 62번째 세린 잔기를 알라닌(alanine)으로 부위 특이적 돌연변이(site-directed mutagenesis)를 유도한 뒤 항체의 생산량을 분석하였다. 상세하게는 HEK293T 세포에 리톡시맵 중쇄 및 경쇄의 야생형과 돌연변이를 1:1로 형질 전환시킨 뒤 배양하였고, 그 외의 조건은 실시예 1과 동일하게 수행하였다. 24시간이 경과한 후, 세포의 배양액을 제거하고 PBS로 3번 세척한 뒤 용혈 버퍼(lysis buffer)(150 mM NaCl, 5 mM NaEDTA, 10 % glycerol, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5% Triton X-100, and proteinase inhibitors (Complete, Roche Applied Science))를 넣고, 세포를 모아서 깨끗한 튜브로 옮겼다. 이후, 음파 처리(sonication)를 이용한 세포 용해를 수행하고 4 °C에서 13200 rpm, 10분간 원심 분리하여 상층액을 따로 깨끗한 튜브에 옮긴 뒤 세포 용해물(cell lysate)을 얻어 브래드포드 방법으로 총 단백을 정량하였다. 총 단백량을 맞추어 아크릴아마이드 겔(acrylamide gel)에서 전기영동하여 단백을 크기 별로 분리한 후, 니트로셀룰로오스 막으로 이동시켰다. 니트로셀룰로오스 막에 전기적으로 전달된 단백질 이외의 부분을 5 % 탈지 우유, 0.1 % Tween 20이 함유된 TBS-T로 상온에서 1시간 동안 블러킹(blocking)하고, 항-인간-HRP와 항-마우스-HRP 항체를 이용하여 상온에서 30분 배양한 후, TBS-T로 10분씩 세 번 세척하였다. ECL 용액을 사용하여 X-ray 필름에 감광시켰다(도 12). 그 결과, 리톡시맵 항체의 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 7번째, 12번째, 26번째 및 62번째에 위치한 세린 잔기를 알라닌으로 치환시킨 경우, 항체의 중쇄 및 경쇄의 생산량이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0144] [실험예 10] 항체 내 O-결합 글리코실화 부위의 확인-(O-GlcNAc 결합부위 돌연변이로 O-GlcNAc 결합 부재 효과 확인)

[0145] 상기 실험예 9와 동일한 방법으로 리톡시맵 항체에 부위 특이적 돌연변이(site-directed mutagenesis)를 유도하되, 숙주 세포로 HEK293T 세포 대신에 CHO-K1 세포를 사용하였다. 형질 전환 후 24시간이 경과하였을 때 세포의 배양액을 제거하고 무혈청 RPMI 배지를 넣고 30°C에서 5일간 추가로 배양한 후 배지를 수확하였다. 배지 동량을 전기영동하여 단백을 크기 별로 분리한 후, PVDF 막으로 이동시켰다. 막에 전기적으로 전달된 단백질 이외의 부분을 5 % 탈지유, 0.1 % Tween 20이 함유된 TBS-T로 상온에서 1시간 동안 블러킹(blocking)하고, 항-인간-HRP와 항-마우스-HRP 항체를 상온에서 30분 배양한 후, TBS-T로 10분씩 세 번 세척하였다. ECL 용액을 사용하여 X-ray 필름에 감광시켰다(도 13). 그 결과, 리톡시맵 항체의 경쇄 가변 영역의 5' 말단으로부터 특히 12번째에 위치한 세린 잔기를 알라닌으로 치환시킨 경우, 항체의 중쇄 및 경쇄의 생산량이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0147] [실험예 11] 항체의 역가 유지 확인

[0148] 1. 결합 친화성 확인

[0149] 상기 실시예 1에서 리톡시맵의 경쇄를 O-결합 글리코실화함으로써 항체의 역가에 변화가 있는 지 확인하기 위하여, Ramos 세포를 튜브 당 1×10^5 세포로 PBS 50 μ l에 현탁시키고 각 조건 별로 생산한 리톡시맵 또는 리톡시맵과 동일한 타겟에 결합하는 것으로 알려진 오비누투유맵(OBI)을 0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ g/ml의 양으로 처리한 뒤 4 °C에서 30분 동안 배양하였다. PBS로 1번 세척하는 과정을 거친 후 50 μ l PBS에 항-인간 Ig Fc-특이적 FITC-컨쥬게이트된 2차 항체(109-095-008, 1:200 dilution; Jackson Laboratories)를 1:500 희석 처리하여 4 °C에서 30분 배양하였다. PBS로 1번 세척한 후 유세포 분석기(flow cytometry)(FACS, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)로 총 10,000 개의 세포를 카운팅하여 FlowJo 소프트웨어로 분석하였다(도 14). 그 결과, Thiamet-G를 처리하여 O-결합 글리코실화한 리톡시맵은 아무런 처리를 하지 않고 얻어진 리톡시맵과 결합 친화성에 있어서 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다.

[0150] 2. 보체-의존적 세포 독성(complementary dependent cell death)

- [0151] Ramos 세포를 Serum free RPMI에서 Calcein-AM 5 μ M로 처리한 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분 간 배양(incubation)하였다. 염색 한 Ramos 세포를 1×10^5 세포/웰의 양으로 분주 한 후 각 조건별로 생산한 리툽시맵 또는 오비누투주맵, 또는 인간 IgG(human IgG)을 0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ g/ml의 양으로 처리하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 배양하였다. 이에 토끼 보체 MA (Cedarlane, cat#CL3221)를 1:4 비율로 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 인큐베이터에서 2시간 동안 배양하였다. 이후 세포는 FACSVerse (BD Biosciences) 기계로 총 10,000개의 세포를 카운팅하여 FlowJo 소프트웨어로 분석하였다(도 15). 그 결과, Thiamet-G를 처리하여 O-결합 글리코실화한 리툽시맵은 아무런 처리를 하지 않고 얻어진 리툽시맵과 보체-의존적 세포 독성에 있어서 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다.
- [0152] 3. 항체-의존적 세포 중재 독성(Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)
- [0153] Ramos 세포를 칼세인(calcein)-AM 을 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 인큐베이터(incubator)에서 30분간 처리한 후, 세포를 원심분리 시켰다. Ramos 세포를 튜브 당 1×10^5 세포로 접종한 뒤 각 조건 별로 생산한 리툽시맵 또는 OBI, 또는 인간 IgG(human IgG)를 0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ g/ml의 양으로 처리한 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 배양하였다. 상층액을 모두 제거하고, 100 μ l의 배지로 재부유 하였다. 이에 사람 혈액에서 분리한 PBMC (poly basic mononuclear cell)를 1:25의 비율로 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 인큐베이터에서 4시간 동안 배양하였다. 이후 세포는 FACSVerse (BD Biosciences) 기계로, 총 10,000개의 세포를 카운팅하여 FlowJo 소프트웨어로 분석하였다(도 16). 그 결과, Thiamet-G를 처리하여 O-결합 글리코실화한 리툽시맵은 아무런 처리를 하지 않고 얻어진 리툽시맵과 항체-의존적 세포 용혈에 있어서 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다.
- [0155] [실험예 12] Thiamet-G에 의한 당단백질화 효과
- [0156] 실시예 1에서 얻어진 리툽시맵의 총 단백량을 맞추어 비-환원 시료 버퍼(Non-reducing sample buffer)에 넣고 아크릴아마이드 겔에서 전기 영동 후, 니트로셀룰로오스 막으로 이동시켰다. 니트로셀룰로오스 막을 PBS-T(Tween 0.5%)로 1시간 블러킹한 후 O-GalNAc 결합 렉틴(Biotinylated-Jacalin)을 첨가하고 상온에서 1시간 배양하였다. PBS-T 로 10분씩 세 번 세척한 후 스트렙타비딘(Streptavidin)-HRP를 상온에서 30분 배양하였다. PBS-T로 10분씩 세 번 세척한 후 ECL 용액을 사용하여 X-ray 필름에 감광시켰다. 리툽시맵의 양이 동량인지 확인하기 위해 스트리핑(striping) 후 항-인간-HRP와 항-마우스-HRP 항체를 상온에서 30분 동안 배양시킨 후 TBS-T 로 10분씩 세 번 세척하였다. ECL 용액을 사용하여 X-ray 필름에 감광시켰다(도 17). 그 결과, Thiamet-G를 처리하지 않은 리툽시맵은 도 17(b)의 결과에 의거 리툽시맵 항체가 동일한 양임에도 불구하고 도 17(a)와 같이 O-결합 N-아세틸갈락토사민 (O-GalNAc)의 더 적게 결합하고 있는 것을 나타낸다. 즉, Thiamet-G를 처리하여 얻어진 리툽시맵에서는 큰 부피로(bulky) 신장된 형태(extension)인 O-GalNAc이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한, Thiamet-G를 처리하여 얻어진 리툽시맵에서 O-GalNAc이 결합된 잔기를 확인하기 위하여 상기 실험예 5와 같이 LC-MS/MS 분석을 수행하였다(도 18). 그 결과, 무처리한 리툽시맵의 경우 경쇄 내에 포함된 7개의 잔기에서 O-GalNAc이 결합된 것을 확인할 수 있었다. 하지만, 본 발명과 같이 Thiamet-G를 처리한 경우 잔기 7개 중 5개에서 O-GalNAc의 결합이 감소한 것을 확인할 수 있었다.
- [0158] [실험예 13] 항체의 생산량 증가 확인(4)
- [0159] 리툽시맵, 니볼루맵 및 켈브롤리주맵 각각을 발현하는 세포주를 1×10^6 세포수로 60mm 플레이트에서 배양하였다. 다음 날, CHO 배지 3ml에 Thiamet-G를 50 μ M로 처리하여 2주간 30 $^{\circ}$ C에서 배양한 후 배지를 수확(harvest) 하였다. 배지 동량을 전기영동하여 단백을 크기 별로 분리한 후, PVDF 막으로 영동시켰다. 막에 전기적으로 전달된 단백질 이외의 부분을 5 중량% 탈지 우유(non-fat milk), 0.1 중량% Tween 20이 함유된 TBS-T로 상온에서 1시간 동안 블러킹(blocking)하고, 항-인간-HRP(Anti-human-HRP)와 항-마우스-HRP(Anti-Mouse-HRP)(RITUXIMAB은 human과 mouse가 합쳐진 chimeric 항체) 항체를 상온에서 30분 배양한 후 TBS-T로 10분씩 세 번 세척하였다. ECL 용액을 사용하여 X-ray 필름에 감광시켰고(도 19), 각 항체 별 Thiamet-G 처리에 따른 생산량의 변화를 측정하였다(도 20). 그 결과, 리툽시맵, 니볼루맵 및 켈브롤리주맵 항체 모두를 발현함에 있어서 Thiamet-G를 처리한 경우 경쇄의 생산량이 2배 이상 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이렇게 Thiamet-G의 처리로 생산량이 증가한 리툽시맵, 니볼루맵 및 켈브롤리주맵의 경쇄 서열을 CLUSTALW로 비교한 결과(도 21), 5' 말단으로부터 3가지 항체 모두 7번째, 12번째 및 14번째에 세된 잔기를 포함하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0161] [실험예 14] 항체의 생산량 증가 확인(5)
- [0162] 리툽시맵, 니볼루맵 및 켈브롤리주맵 각각을 발현하는 CHO 세포주를 1×10^6 세포수로 60mm 플레이트에서 배양하

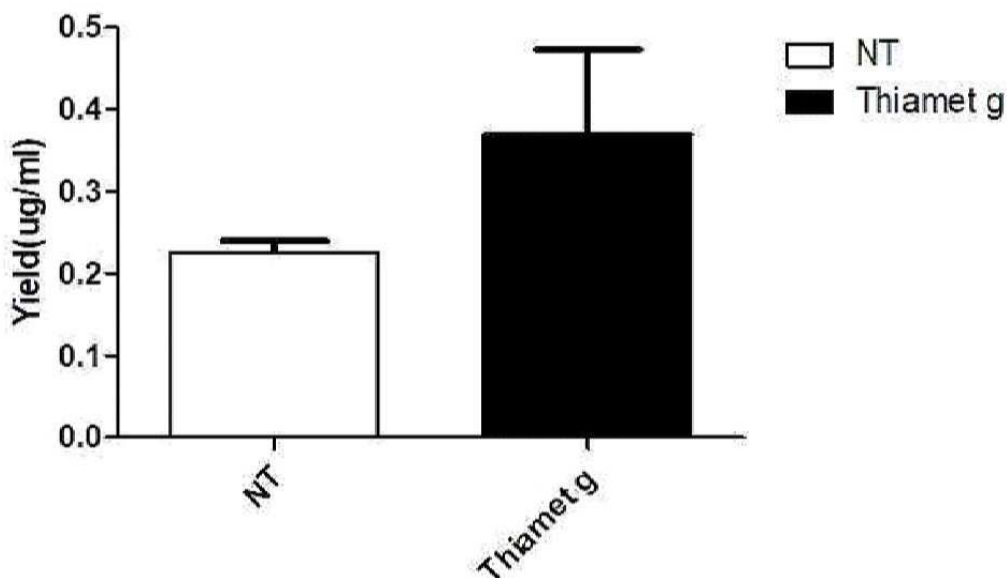
였다. 다음 날, CHO 배지 3ml에 Thiamet-G를 50uM로 처리하여 7일 간 30 ℃에서 배양한 후 배지를 수확(harvest) 하였다. 배지 동량을 전기영동하여 단백을 크기 별로 분리한 후, PVDF 막으로 영동시켰다. 막에 전기적으로 전달된 단백질 이외의 부분을 5 중량% 탈지 우유(non-fat milk), 0.1 중량% Tween 20이 함유된 TBS-T로 상온에서 1시간 동안 블러킹(blocking)하고, 항-인간-HRP(Anti-human-HRP)와 항-마우스-HRP(Anti-Mouse-HRP)(RITUXIMAB은 human과 mouse가 합쳐진 chimeric 항체) 항체를 1:1 또는 1:2의 비율로 상온에서 30분 배양한 후 TBS-T로 10분씩 세 번 세척하였다. ECL 용액을 사용하여 X-ray 필름에 감광시켰다(도 22 및 23). 그 결과, 리툽시맵, 니볼루맵 및 켈브롤리주맵 항체 모두를 발현함에 있어서 Thiamet-G를 처리한 경우 생산량이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0164] [실험예 15] Thiamet-G 처리 농도에 따른 항체의 생산량 증가 확인

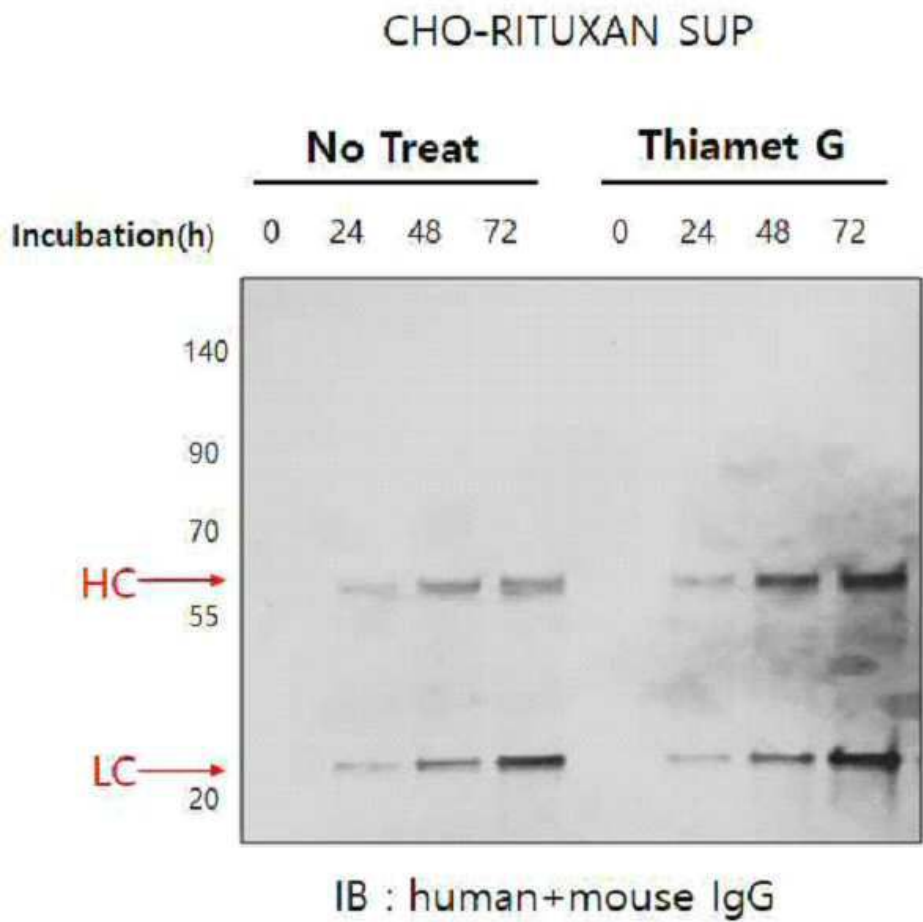
[0165] 실시예 1과 동일한 방법으로 리툽시맵 항체를 제작하되, Thiamet-G를 0, 30uM 또는 50uM로 72 시간 동안 처리하였다. 배지 동량을 전기영동하여 단백을 크기 별로 분리한 후, PVDF 막으로 영동시켰다. 막에 전기적으로 전달된 단백질 이외의 부분을 5 중량% 탈지 우유(non-fat milk), 0.1 중량% Tween 20이 함유된 TBS-T로 상온에서 1시간 동안 블러킹(blocking)하고, 항-인간-HRP(Anti-human-HRP)와 항-마우스-HRP(Anti-Mouse-HRP)(RITUXIMAB은 human과 mouse가 합쳐진 chimeric 항체) 항체를 1:1 또는 1:2의 비율로 상온에서 30분 배양한 후 TBS-T로 10분씩 세 번 세척하였다. ECL 용액을 사용하여 X-ray 필름에 감광시켰다(도 24 및 25). 그 결과, Thiamet-G의 처리량이 증가할수록 리툽시맵의 생산량 또한 비례적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

도면

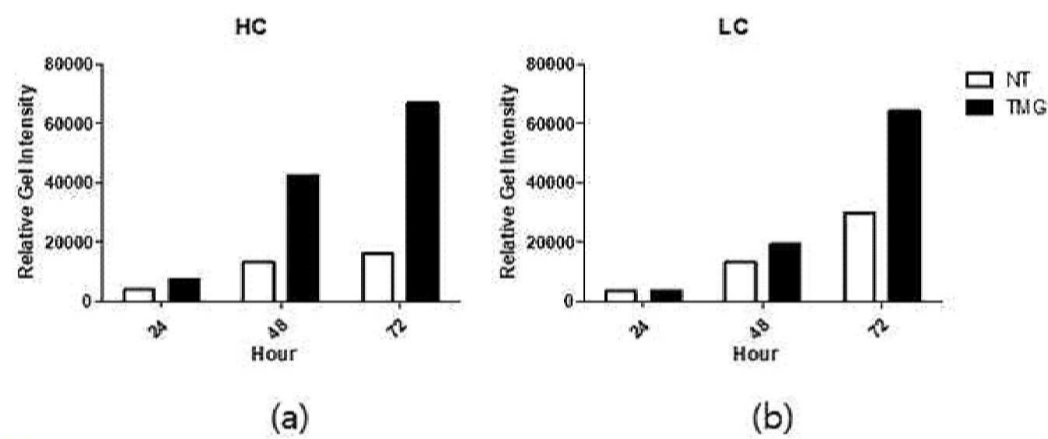
도면1



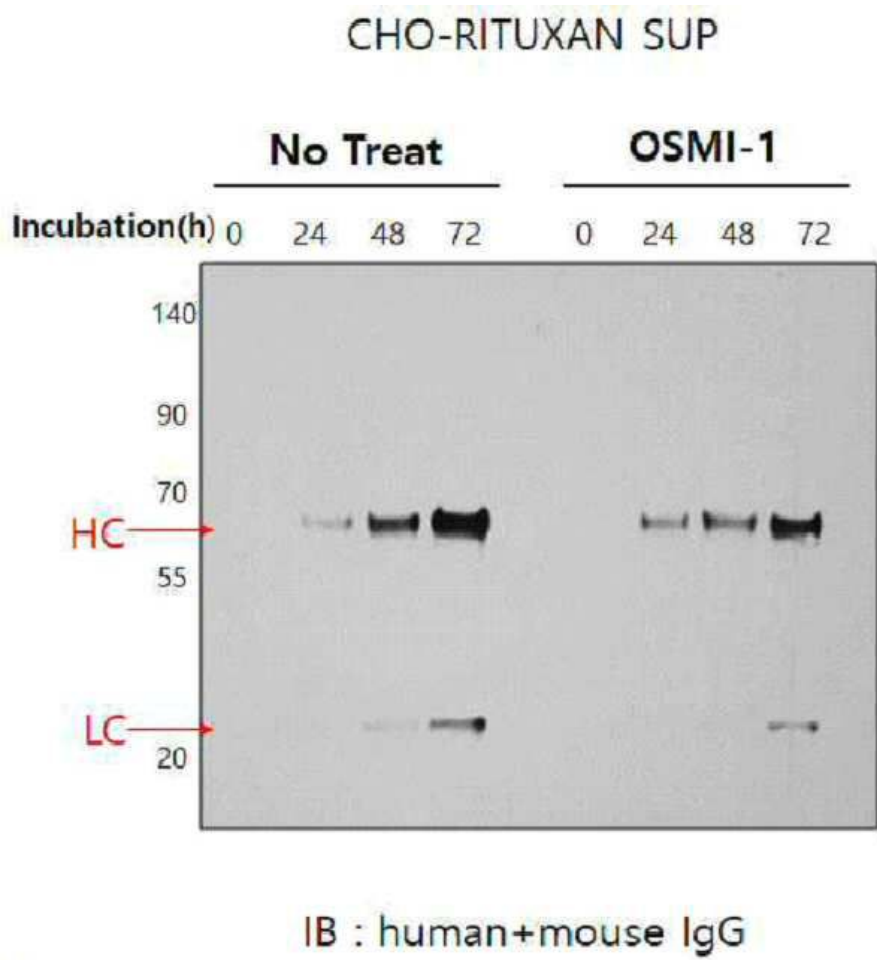
도면2



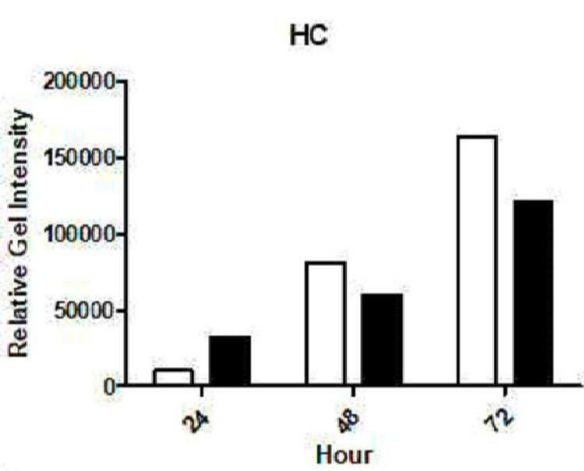
도면3



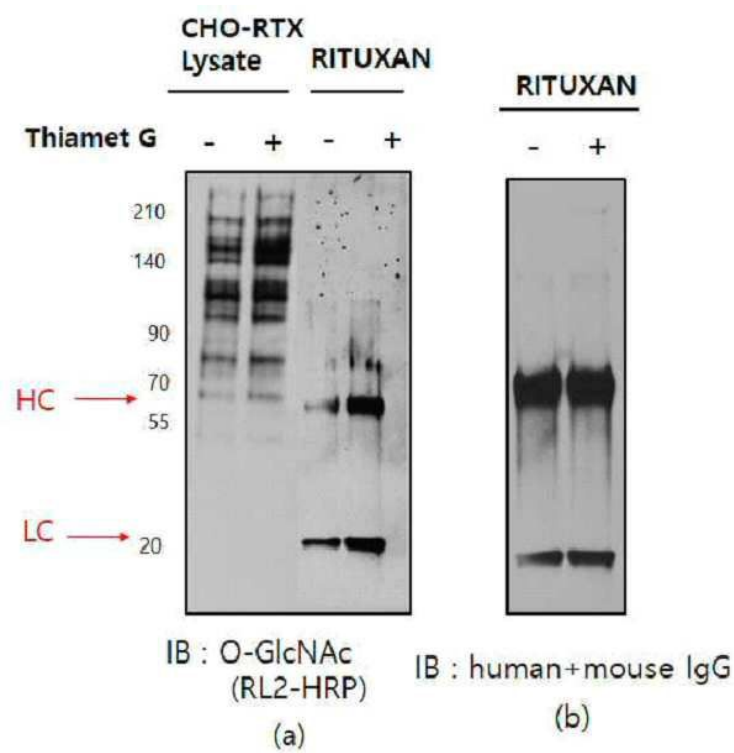
도면4



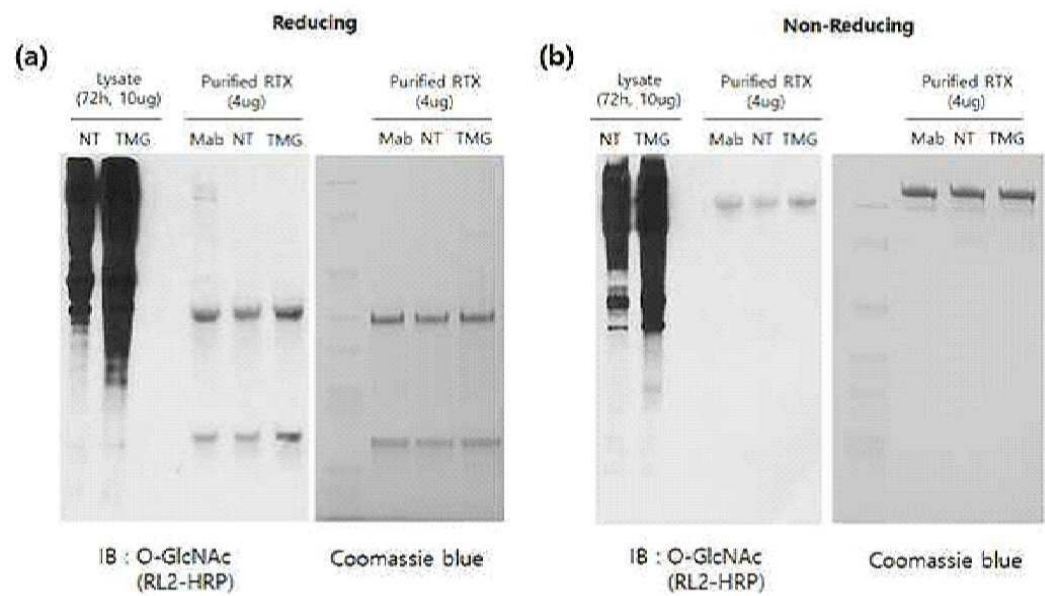
도면5



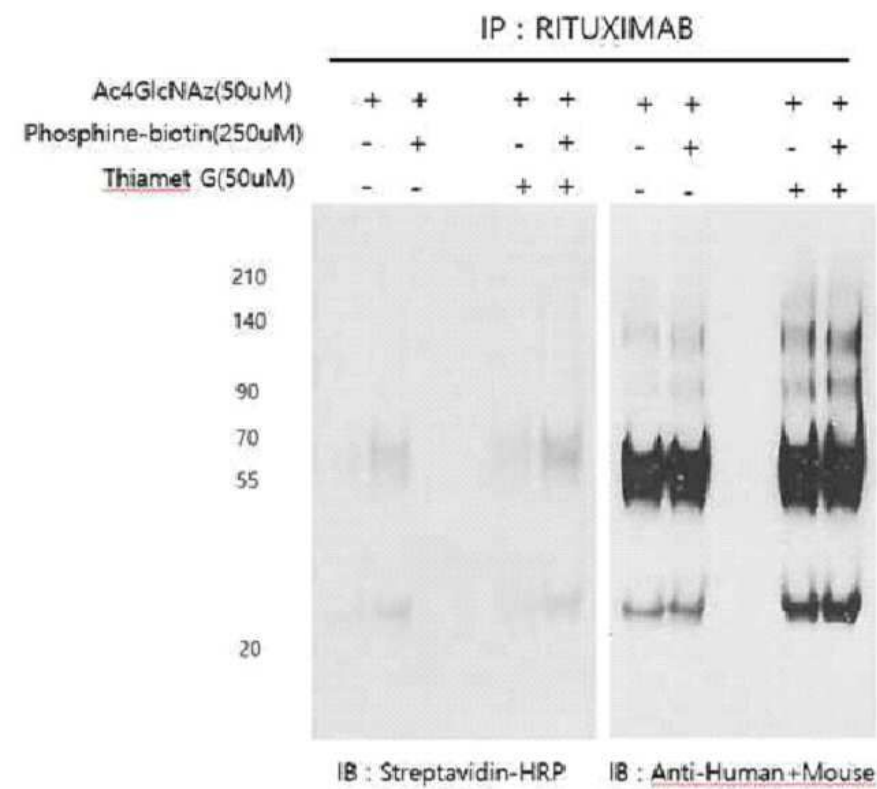
도면6



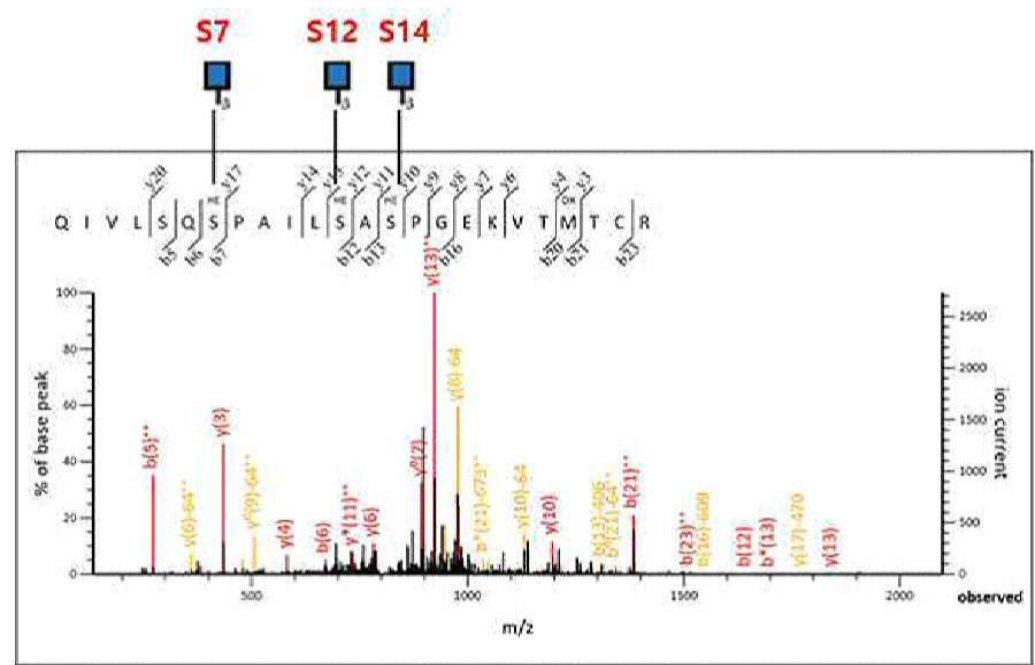
도면7



도면8



도면9



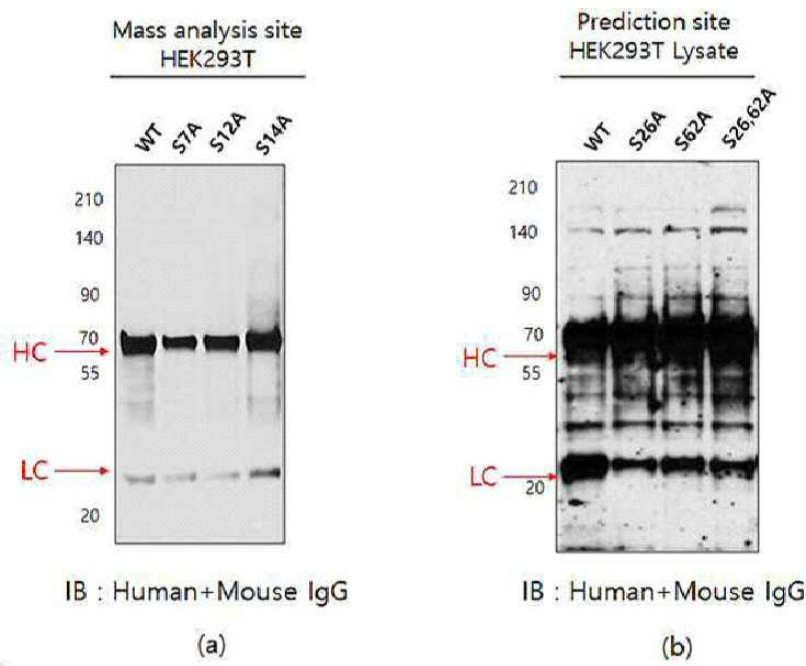
도면10

	Num.	S/T	Percentage	%(Matching A.A)
NT	208	S	5	(1/21)
TMG	7	S	100	(1/1)
	12	S	100	(1/1)
	14	S	100	(1/1)
	181	S	33	(1/3)

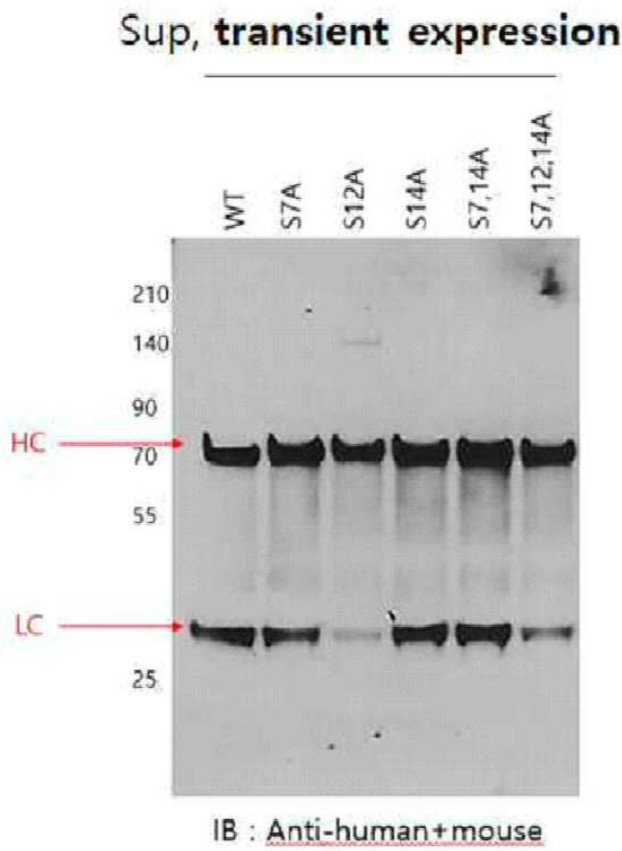
도면11

RTX_LC					
dbOGAP home	<div> <div>Low</div> <div>[Help on result interpretation]</div> <div>High</div> </div>				
	Adjust precision threshold by sliding the bar or enter a value: 0.001 × <input type="text" value="150"/> (16 to 171)				
Sequence (235 aa)	10	20	30	40	50
	MDFQVQIISF	LLISASVIMS	RQQIVLSQSP	AILSASPGEK	VTMTCRASS
	VSYIHWFPQK				
	70	80	90	100	110
	PGSSPKPWIY	ATSNLASGVP	VRFSGSGSGT	SYSLTISRVE	AEDAATYYCQ
Sequence (235 aa)	120	130	140	150	160
	QWISNPPTFG	GGTKLEIKRT	VAAPSVFIFP	PSDEQLKSGT	ASVVCLLNNF
	YFREAKVQWK	VDNALQSGNS			
	170	180	190	200	210
	QESVTEQDSK	DSTYLSSTL	TLKADYEKH	KVYACEVTHQ	GLSSPVTKSF
Sequence (235 aa)	220	230			
	NRGEC				
Predicted O-GlcNAc Sites (S/T)	Rank	Position	AA	Estimated Precision	Lift
	1	84	S	0.1710	13.8772
	2	48	S	0.1562	12.6744

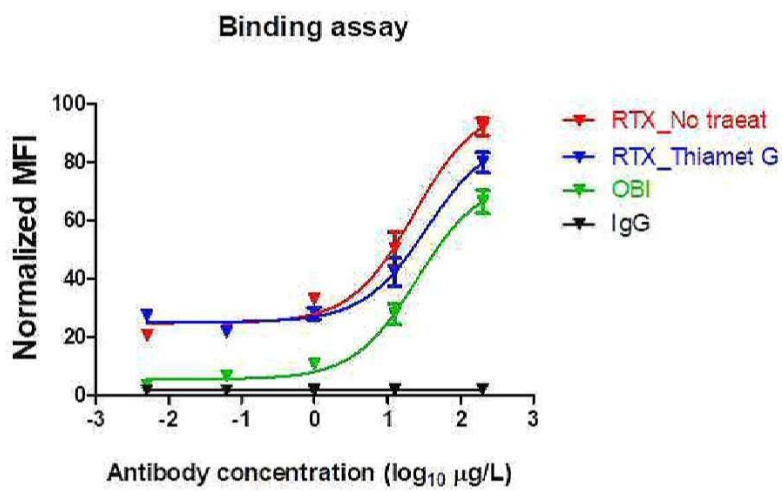
도면12



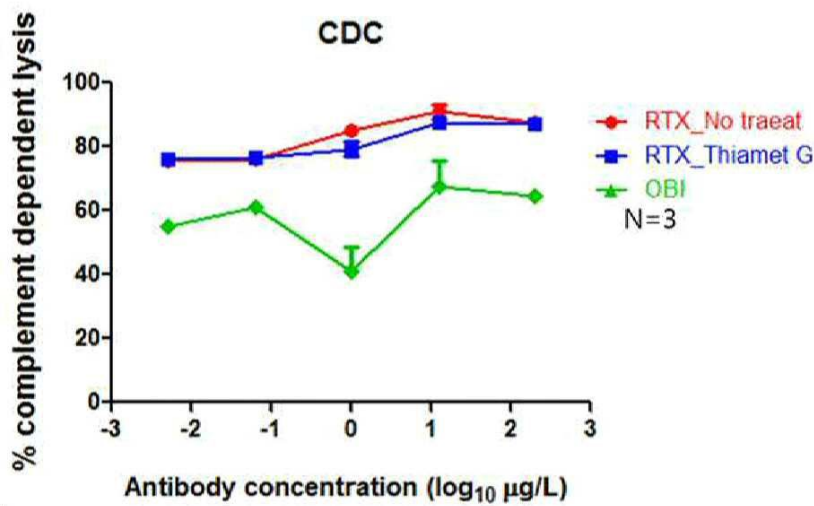
도면13



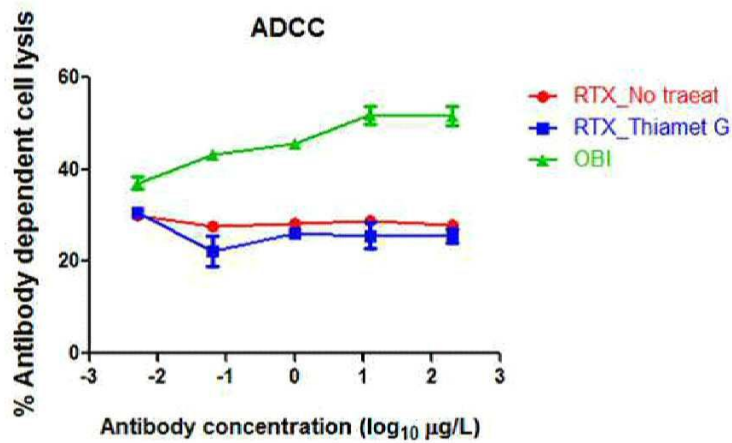
도면14



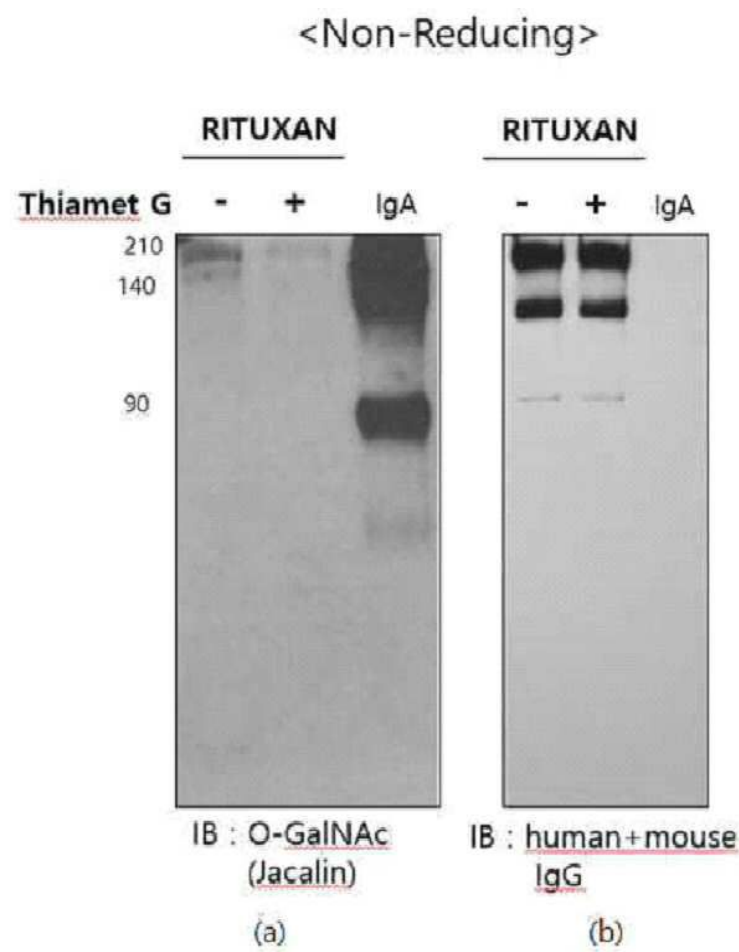
도면15



도면16



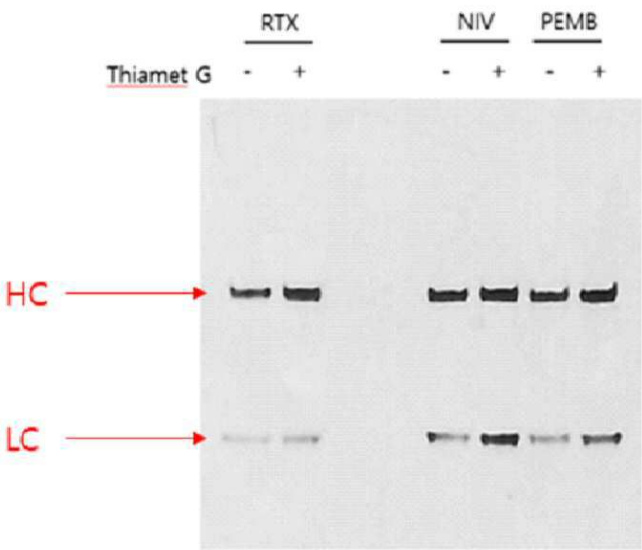
도면17



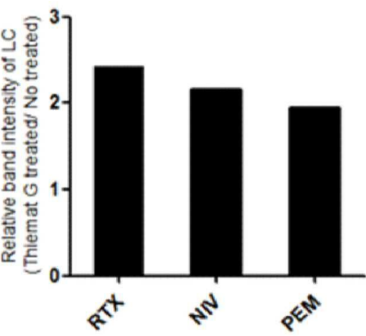
도면18

Num.	S/T	Percentage%(Matching A.A)	
		NT	TMG
42	S	9.1 (3/33)	18.2 (4/22)
* 51	S	11.8 (2/17)	5.9 (2/34)
* 55	S	41.2 (7/17)	5.9 (2/34)
91	T	4.3 (1/23)	5.3 (1/19)
* 101	T	30.4 (7/23)	15.8 (3/19)
* 155	S	7.7 (5/65)	4.4 (3/68)
* 181	S	6.2 (4/65)	5.3 (3/57)

도면19



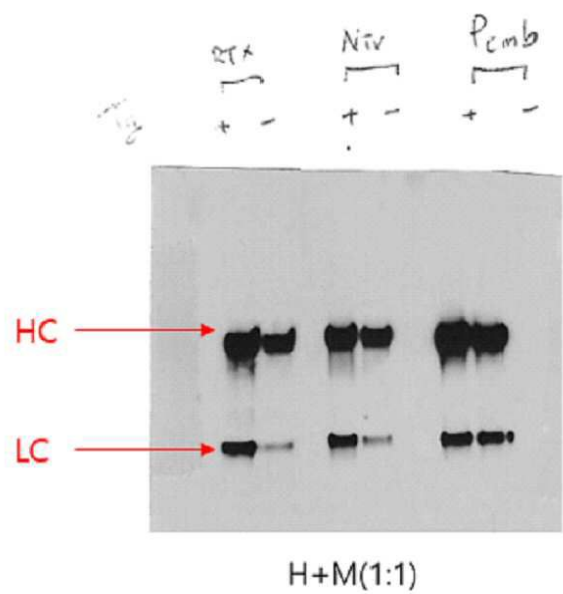
도면20



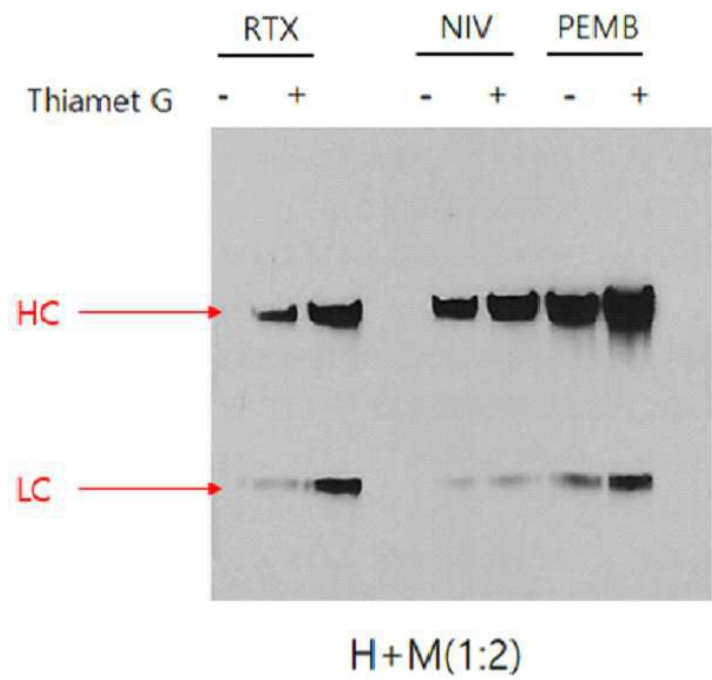
도면21

NIV_LC	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S Y S S ----- Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A
Pemb_LC	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S K G V S T S G - Y S Y L H W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y L A S Y L E
RTX_LC	Q I V L S Q S P A I L S A S P G E K Y T M T C R A S S S Y S Y ----- I H W F Q Q K P G S S P K P W I Y A T S N L A

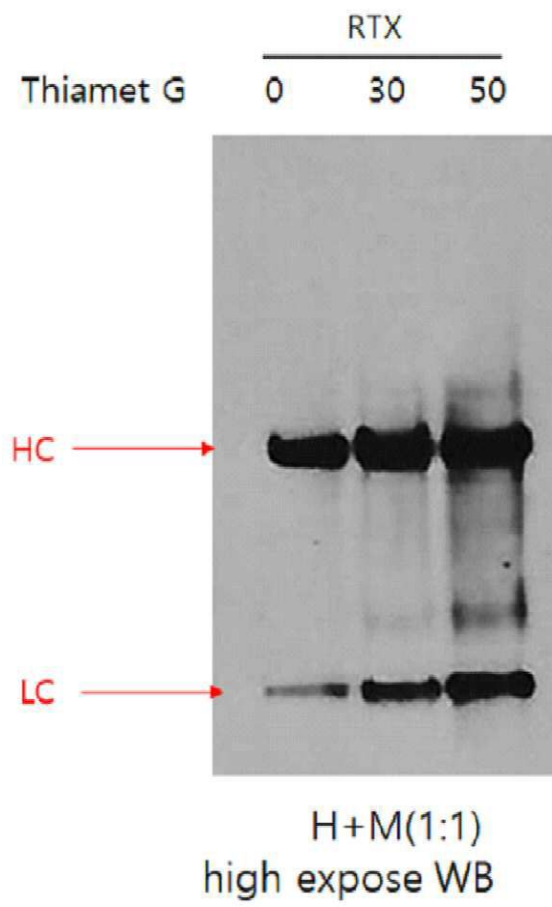
도면22



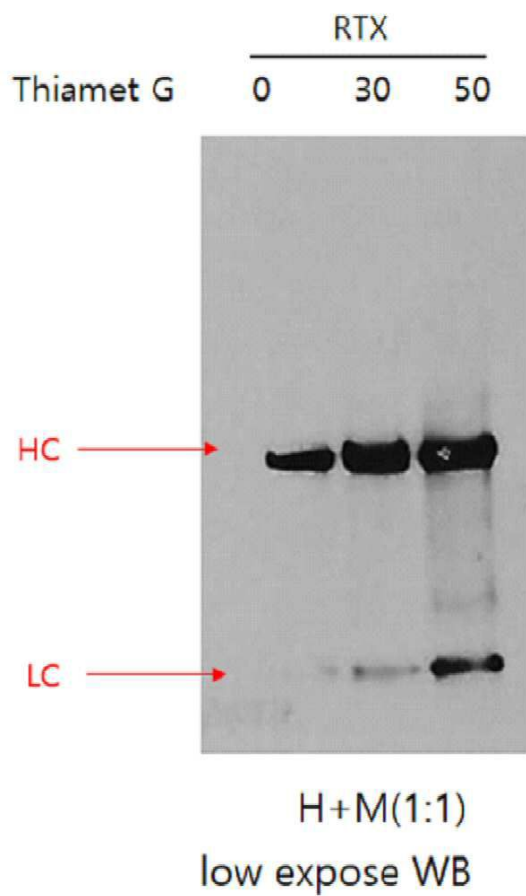
도면23



도면24



도면25



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Antibody having enhanced productivity and the method for preparing the same
- <130> PDPB187192k01
- <150> KR 1020180122775
- <151> 2018-10-15
- <160> 18
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 330
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

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

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

225 230 235 240

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

245 250 255

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

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

305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 2
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

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

35 40 45
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 50 55 60
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 65 70 75 80
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 85 90 95
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 100 105 110

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 115
 <210> 3
 <211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly

100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala

115 120

<210

> 4

<211> 95

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile

20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro
85 90 95
<210> 5
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Heavy chain
<400> 5
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
100 105 110
Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

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

370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys

450

<210> 6

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain

<400> 6

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile

20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr

85 90 95

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

100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 7

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nivolumab heavy chain variable region

<400> 7

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

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nivolumab light chain variable region

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 9

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nivolumab heavy chain

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

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

 195 200 205
 Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 210 215 220
 Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 225 230 235 240
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 245 250 255
 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 260 265 270

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

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr

340 345 350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

355 360 365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr

370 375 380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

385 390 395 400
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe

405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 10

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nivolumab light chain

<400> 10

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

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

20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 11

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pembrolizumab heavy chain variable region

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr

65					70				75				80			
Met	Glu	Leu	Lys	Ser	Leu	Gln	Phe	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85				90				95				
Ala	Arg	Arg	Asp	Tyr	Arg	Phe	Asp	Met	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				100				105				110				
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
				115				120								
<210>	12															
<211>	119															
<212>	PRT															
<213>	Artificial Sequence															
<220><223>	Pembrolizumab light chain variable region															
<400>	12															
Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
1				5				10				15				
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Gly	Val	Ser	Thr	Ser	
				20				25				30				
Gly	Tyr	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	
				35				40				45				
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	
				50				55				60				
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	
65				70				75				80				
Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Arg	
				85				90				95				
Asp	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Thr	
				100				105				110				
Ser	Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	Gln										
				115												
<210>	13															
<211>	447															
<212>	PRT															

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pembrolizumab heavy chain

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 14

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pembrolizumab light chain

<400> 14

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 15

<211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pidilizumab heavy chain variable region
 <400> 15
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 16
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pidilizumab light chain variable region
 <400> 16
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

35 40 45
 Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 17
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pidilizumab heavy chain
 <400> 17

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

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130	135	140	
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser			
145	150	155	160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser			
	165	170	175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Trp Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu			
	180	185	190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr			
	195	200	205
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr			
	210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe			
225	230	235	240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro			
	245	250	255
Glu Val Thr Cys Val Trp Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys			
	260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
	275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Trp Ser Val Leu Thr			
	290	295	300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val			
305	310	315	320
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala			
	325	330	335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg			
	340	345	350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly			
	355	360	365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro			
	370	375	380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser			

385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415

 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440
 <210> 18
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pidilizumab light chain
 <400> 18
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met

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

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

145	150	155	160
Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr			
	165	170	175
Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys			
180	185	190	
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn			
195	200	205	
Arg Gly Glu Cys			
210			