



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년07월20일
(11) 등록번호 10-1869987
(24) 등록일자 2018년06월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 5/10 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-7033948
- (22) 출원일자(국제) 2011년05월26일
심사청구일자 2016년05월26일
- (85) 번역문제출일자 2012년12월27일
- (65) 공개번호 10-2013-0077843
- (43) 공개일자 2013년07월09일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2011/038191
- (87) 국제공개번호 WO 2011/150241
국제공개일자 2011년12월01일
- (30) 우선권주장
61/349,727 2010년05월28일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Applied Microbiology and Biotechnology, 2007,
74:152-159
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 43 항

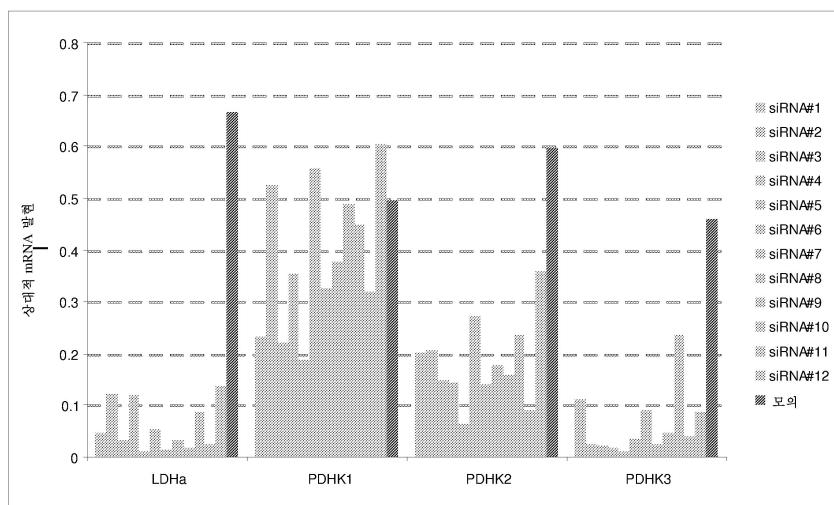
심사관 : 김승범

(54) 발명의 명칭 **락테이트 데히드로게나제 및 피루베이트 데히드로게나제 키나제의 발현의 하향조절에 의한 락테이트 수준의 감소 및 폴리펩티드 생산의 증가**

(57) 요 약

본 발명은 배양된 세포에서 락테이트 생산을 감소시키고 폴리펩티드 생산을 증가시키는 방법 및 조성물을 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 a) 락테이트 데히드로게나제 (LDH)에 특이적인 소형 간섭 RNA (siRNA) 및 b) 피루베이트 데히드로게나제 키나제 (PDHK)에 특이적인 siRNA를 발현하는 세포를 배양하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 LDH에 특이적인 siRNA 및 PDHK에 특이적인 siRNA를 포함하는 배양된 세포 또는 벡터를 제공한다.

대 표 도



(72) 발명자

엔지, 치 킨, 도밍고스

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1

센, 에이미

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔
에이 웨이 1

(56) 선행기술조사문헌

The Journal of Biological Chemistry, 2008,

283(42):28106 -28114

British Journal of Cancer, 2008, 98:1975-1984

WO2002004598 A2

Biotechnology and Bioengineering, 2001, 72:
55-61

명세서

청구범위

청구항 1

락테이트 데히드로게나제 (LDH)에 특이적인 소형 간섭 RNA (siRNA)를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 피루베이트 데히드로게나제 키나제 (PDHK)에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 세포를 배양하는 것을 포함하는, 배양된 세포에서 락테이트 생산을 감소시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, LDH가 LDHa인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 배양된 세포가 제2 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제3 이종 핵산 서열을 추가로 포함하며, 여기서 제3 이종 핵산 서열은 제3 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 배양된 세포가 제3 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제4 이종 핵산 서열을 추가로 포함하며, 여기서 제4 이종 핵산 서열은 제4 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 배양된 세포가 제4 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제5 이종 핵산 서열을 추가로 포함하며, 여기서 제5 이종 핵산 서열은 제5 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, PDHK가 PDHK1, PDHK2, PDHK3 및 PDHK4로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, PDHK가 PDHK1, PDHK2 및 PDHK3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, PDHK가 PDHK1 및 PDHK2로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, PDHK가 PDHK1 및 PDHK3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, PDHK가 PDHK2 및 PDHK3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 11

제4항에 있어서, LDH가 LDHa이고, 제1 PDHK가 PDHK1이고, 제2 PDHK가 PDHK2이고, 제3 PDHK가 PDHK3인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 배양된 세포가 이종 폴리펩티드를 생산하는 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 이종 폴리펩티드가 항체인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 배양된 세포의 평균 락테이트 생산율이 $- 0.02 \text{ mg}/10^6 \text{ 개 세포}/\text{일}$ 미만인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 배양된 세포가 PDHK 및 LDH에 대한 siRNA를 코딩하는 이종 핵산 서열이 없는 배양된 세포보다 적어도 75% 높은 이종 폴리펩티드 생산성을 갖는 것인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 배양된 세포가 300 mOsm 미만의 오스몰랄농도를 갖는 것인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 배양된 세포가 PDHK 및 LDH에 대한 siRNA를 코딩하는 이종 핵산 서열이 없는 배양된 세포보다 적어도 68% 높은 이종 폴리펩티드 생산성을 갖는 것인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 배양된 세포가 포유동물 세포인 방법.

청구항 19

락테이트 데히드로게나제 (LDH)에 특이적인 소형 간섭 RNA (siRNA)를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 피루베이트 데히드로게나제 키나제 (PDHK)에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 벡터를 세포에 도입하는 것을 포함하며, 여기서 siRNA는 발현되어 LDH 및 PDHK의 유전자 전사를 침묵시키거나 또는 하향-조절하는 것인, 배양된 세포에서 LDH 및 PDHK 전사를 침묵시키거나 또는 하향-조절하는 방법.

청구항 20

LDH에 특이적인 소형 간섭 RNA (siRNA)를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 벡터를 세포에 도입하는 것을 포함하는, 배양물 중 감소된 락테이트 생산을 나타내는 세포를 제조하는 방법.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

락테이트 데히드로게나제 (LDH)에 특이적인 제1 소형 간섭 RNA (siRNA)를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 피루베이트 데히드로게나제 키나제 (PDHK)에 특이적인 제2 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인, 배양물 중의 세포.

청구항 25

제24항에 있어서, 제2 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제3 이종 핵산 서열을 추가로 포함하며, 여기서 제3 이종 핵산 서열은 제3 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 세포.

청구항 26

제25항에 있어서, 제3 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제4 이종 핵산 서열을 추가로 포함하며, 여기서 제4 이종 핵산 서열은 제4 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 세포.

청구항 27

제26항에 있어서, 제4 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제5 이종 핵산 서열을 추가로 포함하며, 여기서 제5 이종 핵산 서열은 제5 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 세포.

청구항 28

제24항에 있어서, PDHK가 PDHK1, PDHK2, PDHK3 및 PDHK4로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 세포.

청구항 29

제24항에 있어서, PDHK가 PDHK1, PDHK2 및 PDHK3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 세포.

청구항 30

제24항에 있어서, PDHK가 PDHK1 및 PDHK2로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 세포.

청구항 31

제24항에 있어서, PDHK가 PDHK1 및 PDHK3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 세포.

청구항 32

제24항에 있어서, PDHK가 PDHK2 및 PDHK3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 세포.

청구항 33

제26항에 있어서, LDH가 LDHa이고, 제1 PDHK가 PDHK1이고, 제2 PDHK가 PDHK2이고, 제3 PDHK가 PDHK3인 세포.

청구항 34

제24항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 이종 폴리펩티드를 생산하는 세포.

청구항 35

제34항에 있어서, 이종 폴리펩티드가 항체인 세포.

청구항 36

제24항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, $-0.02 \text{ mg}/10^6\text{개 세포}/\text{일}$ 미만의 평균 락테이트 생산율을 갖는 세포.

청구항 37

제24항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, LDH 및 PDHK에 대한 siRNA를 코딩하는 이종 핵산 서열이 없는 세포보다 적어도 75% 높은 이종 폴리펩티드 생산성을 갖는 세포.

청구항 38

제24항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 300 mOsm 미만의 오스몰랄농도를 갖는 세포.

청구항 39

제24항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, LDH 및 PDHK에 대한 siRNA를 코딩하는 이종 핵산 서열이 없는 세포보다 적어도 68% 높은 이종 폴리펩티드 생산성을 갖는 세포.

청구항 40

제24항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물 세포인 세포.

청구항 41

락테이트 데히드로게나제 (LDH)에 특이적인 소형 간섭 RNA (siRNA)를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 피루베이트 데히드로게나제 키나제 (PDHK)에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 백터.

청구항 42

a) 락테이트 데히드로게나제 (LDH)에 특이적인 소형 간섭 RNA (siRNA) 및 b) 피루베이트 데히드로게나제 키나제 (PDHK)에 특이적인 siRNA를 발현하는 세포를 배양하는 것을 포함하는, 배양된 세포에서 락테이트 생산을 감소시키는 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 배양된 세포가 제2 PDHK에 특이적인 siRNA를 추가로 발현하는 것인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 배양된 세포가 제3 PDHK에 특이적인 siRNA를 추가로 발현하는 것인 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 배양된 세포가 제4 PDHK에 특이적인 siRNA를 추가로 발현하는 것인 방법.

청구항 46

제42항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 배양된 세포가 LDH 및 PDHK에 특이적인 siRNA가 없는 배양된 세포보다 적어도 68% 높은 폴리펩티드 생산성을 갖는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

<관련 출원에 대한 상호 참조>

[0002]

본원은 2010년 5월 28일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 61/349,727을 우선권 주장하며, 그의 내용은 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0003]

<발명의 분야>

[0004]

본 발명의 분야는 일반적으로 배양된 세포에서 락테이트 생산을 감소시키고 폴리펩티드 생산을 증가시키는 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

생물제약 시장은 빠르게 성장하고 있고, 산업은 2010년까지 700억 달러에 도달할 것으로 추정된다. 문헌 [Genetic Engineering in Livestock: New Applications and Interdisciplinary Perspectives (Engelhard et al., 2009) Springer Berlin Heidelberg]을 참조한다. 치료 단백질의 수요 증가 및 회사들 사이의 시장 공유 경쟁의 증가로 인해, 치료 단백질의 보다 우수한 생산성을 달성하기 위한 기술 개선이 요구되고 있다. 이 목적을 위해, 다른 접근법, 예컨대 숙주 세포 조작이 연구되었다. 문헌 [Kuystermans et al., Cytotechnology 53(1-3):3-22 (2007); 및 O'Callaghan and James, Brief Funct. Genomic Proteomic 7(2):95-110 (2008)]을 참조한다. 배양된 세포, 예컨대 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포는 치료 단백질의 생산에 널리 이용된다. 예를

들어, pH-제어 페드-배치(fed-batch) 생물반응기 배양은 재조합 모노클로날 항체의 생산에 널리 이용되어 왔다. 문헌 [Langheinrich and Nienow, *Biotechnol. Bioeng.* 66(3):171-9 (1999)]을 참조한다. 락테이트는 페드-배치 배양 동안 축적되는 주요 폐기물 중 하나이며, 이는 세포 성장 및 단백질 생산을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 문헌 [Glacken et al., *Biotechnol. Bioeng.* 32:491-506 (1988); 및 Lao and Toth, *Biotechnol. Prog.* 13:688-691 (1997)]을 참조한다. 이는 또한 pH의 제어를 위해 배양 배지에 첨가하는데 필요한 알칼리의 양을 증가시킨다. 문헌 [Dietl et al., *J. Immunol.* 184(3):1200-9 (2010); Langheinrich and Nienow, *Biotechnol. Bioeng.* 66(3):171-9 (1999)]. pH를 유지하기 위해 세포 배양 배지에 첨가하는 알칼리가 증가하면 오스몰랄농도가 증가할 수 있으며, 이러한 증가는 세포 성장 억제 및 항체 생산성 감소로 이어질 수 있다. 문헌 [Cruz et al., *Enzyme Microb. Technol.* 27(1-2):43-52 (2000); Iran et al., *Biotechnol. Bioeng.* 66:238-246 (1999)]. 따라서, 락테이트 수준을 감소시키는 것이 폴리펩티드 또는 보다 높은 역가의 항체 생산 과정의 개발에 바람직하다.

[0006] 피루베이트 수준의 제어와 같이 세포 배양물에서 락테이트 생산에 영향을 미칠 수 있는 다수의 요인이 존재한다. 문헌 [Liu et al., *J. Biol. Chem.*, 284(5):2811-22 (2009); 및 Samuvel et al., *J. of Immunol.* 182(4):2476-84 (2009)]을 참조한다. 피루베이트는 효소 피루베이트 데히드로게나제 (PDH) 및 락테이트 데히드로게나제 (LDH)에 대한 기질이다.

[0007] PDH 복합체는 3종의 촉매 효소, E1, E2 및 E3으로 이루어진 다중-효소 단위이다. 문헌 [Patel and Korotchkina, *Exp. Mol. Med.* 33(4):191-7 (2001)]. 이 복합체는 트리카르복실산 (TCA) 사이클의 진입점인 피루베이트로부터 아세틸-CoA로의 전환에서 속도-제한 전환 반응을 촉매한다. PDH의 활성은 효소 피루베이트 데히드로게나제 키나제 (PDHK) 및 피루베이트 데히드로게나제 포스파타제 (PDHP)에 의해 조절된다. PDHK는 PDH를 인산화하여 그의 효소적 활성을 저해하는 반면, PDHP는 PDH를 탈인산화시켜 활성화시킨다. 문헌 [Patel and Korotchkina, *Exp. Mol. Med.* 33(4):191-7 (2001); Roche and Hiromasa, *Cell Mol. Life Sci.* 64(7-8):830-49 (2007); Holness and Sugden, *Biochemical Society Transactions*, 31:1143-1151 (2003)]을 참조한다. 포유동물 세포에 조직 특이적 분포를 갖는 PDHK의 4종의 이소형 (PDHK1, PDHK2, PDHK3 및 PDHK4)이 존재한다. 문헌 [Harris et al., *Adv. Enzyme Regul.* 42:249-59 (2002); 및 Bowker-Kinley et al., *Biochem. J.* 329(1):191-6 (1998)]을 참조한다.

[0008] LDH는 피루베이트 및 락테이트의 상호전환을 NADH 및 NAD⁺의 동시 상호전환과 직접적으로 촉매한다. 포유동물 세포에서, LDH는 LDHa 및 LDHb 유전자에 의해 코딩되는 A 및 B 서브유닛 (또는 각각 H 및 M 서브유닛)으로 대부분 이루어진 동종사량체 또는 이종사량체로서, 및 때때로 LDHc 유전자에 의해 코딩되는 C 서브유닛의 동종사량체로서 존재한다. 문헌 [Baumgart et al., *J. Biol. Chem.* 271(7):3846-55 (1996); Li et al., *J. Biol. Chem.* 258(11):7029-32 (1983); Skory C.D., *Appl. Environ. Microbiol.* 66(6):2343-8 (2000); 및 Read et al., *Proteins* 43(2):175-185 (2001)]을 참조한다. 예를 들어, CHO 세포에서, LDH 이소형은 A3B 및 A2B2 사량체의 중간체인 것으로 밝혀졌다. 문헌 [Jeong et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289(5):1141-9 (2001)]. 이전 연구는 상동성 재조합 (문헌 [Chen et al., *Biotechnol. Bioeng.* 72(1):55-61 (2001)]), 안티센스 기술 (문헌 [Jeong et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289(5):1141-9 (2001)]) 또는 소형 또는 짧은 간섭 RNA (siRNA) (문헌 [Kim and Lee, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74(1):152-9 (2007)])를 통한 유전자의 과괴에 의한 CHO 세포에서의 LDHa의 하향-조절이 락테이트 수준을 감소시킬 수 있으나, 단백질 생산성의 감지가능한 개선을 달성하지 못하였음을 보여주었다. 예를 들어, LDHa 특이적 siRNA의 경우에, 보고에 따르면 락테이트 수준이 45-79% 감소하였을지라도, 비생산성 (Qp) 및 산물 (항체) 역가는 유의하게 개선되지 않았으며, 이는 CHO 세포에서 LDHa 단독 녹다운이 Qp 및 산물 수율을 효율적으로 개선시키기에 충분하지 않다는 것을 시사한다. 따라서, 락테이트 생산을 감소시키는 보다 효율적인 방법이 보다 우수한 치료 폴리펩티드 생산을 달성하기 위해 필요하다.

[0009] 본원에 인용된 모든 간행물, 특히 및 특히 출원은 각각의 개별 간행물, 특히 및 특히 출원이 구체적 및 개별적으로 참고로 포함되도록 지시된 바와 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그의 전문이 본원에서 참고로 포함된다.

발명의 내용

[0010] <발명의 간단한 개요>

[0011] 본 발명은 배양된 세포에서 락테이트 생산을 감소시키고 폴리펩티드 생산을 증가시키는 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명자들은 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)를 발현하는 배양된 세포에서 siRNA를 통한 LDH 및 PDHK의 공동 하향조절이 락테이트 수준, 락테이트 생산율 및 오스몰랄농도를 감소시키고, 비 폴리펩티드 생산성 (예를

들어, 비생산성) 및 폴리펩티드 생산 (예를 들어, 생산성)을 증가시킨다는 것을 발견하였다. 또한, 하향조절된 LDH 및 PDHK를 갖는 이들 배양된 세포는 세포 성장, 세포 생존율 및 생산된 폴리펩티드의 품질에 대해 어떠한 부정적인 영향도 나타내지 않았다.

[0012] 한 측면에서, 본 발명은 a) 락테이트 데히드로게나제 (LDH)에 특이적인 소형 간섭 RNA (siRNA) 및 b) 피루베이트 데히드로게나제 키나제 (PDHK)에 특이적인 siRNA를 발현하는 세포를 배양하는 것을 포함하는, 배양된 세포에서 락테이트 생산을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0013] 또 다른 측면에서, 본 발명은 a) LDH에 특이적인 siRNA 및 PDHK에 특이적인 siRNA를 포함하는 배양물 중의 세포를 제공한다.

[0014] 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 제2 PDHK에 특이적인 siRNA를 추가로 발현한다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 제3 PDHK에 특이적인 siRNA를 추가로 발현한다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 제4 PDHK에 특이적인 siRNA를 추가로 발현한다.

[0015] 또 다른 측면에서, 본 발명은 락테이트 데히드로게나제 (LDH)에 특이적인 소형 간섭 RNA (siRNA)를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 피루베이트 데히드로게나제 키나제 (PDHK)에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 세포를 배양하는 것을 포함하는, 배양된 세포에서 락테이트 생산을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0016] 또 다른 측면에서, 본 발명은 LDH에 특이적인 제1 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 PDHK에 특이적인 제2 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인, 배양물 중의 세포를 제공한다.

[0017] 일부 실시양태에서, 세포는 제2 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제3 이종 핵산 서열을 추가로 포함하며, 여기서 제3 이종 핵산 서열은 제3 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 세포는 제3 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제4 이종 핵산 서열을 추가로 포함하며, 여기서 제4 이종 핵산 서열은 제4 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 세포는 제5 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제5 이종 핵산 서열을 추가로 포함하며, 여기서 제5 이종 핵산 서열은 제5 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0018] 일부 실시양태에서, LDH는 LDHa, LDHb 또는 LDHc이다.

[0019] 일부 실시양태에서, PDHK는 PDHK1, PDHK2, PDHK3 및 PDHK4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PDHK는 PDHK1, PDHK2 및 PDHK3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PDHK는 PDHK1 및 PDHK2로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PDHK는 PDHK1 및 PDHK3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PDHK는 PDHK2 및 PDHK3으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0020] 일부 실시양태에서, 배양된 세포에서 락테이트 생산을 감소시키는 방법은 락테이트 데히드로게나제 (LDH)에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 제1, 제2 및 제3 PDHK에 특이적인 3종의 상이한 siRNA를 코딩하는 제2, 제3 및 제4 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2, 제3 및 제4 이종 핵산 서열은 각각 제2, 제3 및 제4 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 세포를 배양하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, LDH는 LDHa이고, 여기서 제1 PDHK는 PDHK1이고, 제2 PDHK는 PDHK2이고, 제3 PDHK는 PDHK3이다.

[0021] 일부 실시양태에서, 배양물 중의 세포는 LDH에 특이적인 제1 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 제1, 제2 및 제3 PDHK에 대해 특이적인 3종의 상이한 siRNA를 코딩하는 제2, 제3 및 제4 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2, 제3 및 제4 이종 핵산 서열은 각각 제2, 제3 및 제4 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, LDH는 LDHa이고, 여기서 제1 PDHK는 PDHK1이고, 제2 PDHK는 PDHK2이고, 제3 PDHK는 PDHK3이다.

[0022] 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 이종 폴리펩티드를 생산한다. 일부 실시양태에서, 이종 폴리펩티드는 항체이다.

[0023] 일부 실시양태에서, 배양된 세포의 락테이트 합성 속도는 락테이트 소비 속도보다 낮다. 일부 실시양태에서, 평균 락테이트 생산율은 약 $-0.02 \text{ mg}/10^6 \text{ 개 세포}/\text{일}$ 미만이다.

- [0024] 일부 실시양태에서, LDH 및 PDHK에 특이적인 siRNA를 함유하는 배양된 세포는 약 300 mOsm 미만의 오스몰랄농도를 갖는다.
- [0025] 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 PDHK 및 LDH를 포함하는 이종 핵산 서열 없이 배양된 세포보다 적어도 약 75% 높은 비생산성 (Qp)을 갖는다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 LDH 및 PDHK에 특이적인 siRNA 없이 배양된 세포보다 적어도 약 75% 높은 비생산성 (Qp)을 갖는다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 PDHK 및 LDH를 포함하는 이종 핵산 서열 없이 배양된 세포보다 약 10% 내지 약 800% 높은 폴리펩티드 생산성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 PDHK 및 LDH에 특이적인 siRNA 없이 배양된 세포보다 약 55% 높은 폴리펩티드 생산성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 PDHK 및 LDH를 포함하는 이종 핵산 서열 없이 배양된 세포보다 적어도 약 68% 높은 폴리펩티드 생산성을 갖는다.
- [0028] 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 PDHK 및 LDH에 특이적인 siRNA 없이 배양된 세포보다 약 10% 내지 약 800% 높은 폴리펩티드 생산성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 PDHK 및 LDH에 특이적인 siRNA 없이 배양된 세포보다 약 55% 높은 폴리펩티드 생산성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 PDHK 및 LDH에 특이적인 siRNA 없이 배양된 세포보다 적어도 약 68% 높은 폴리펩티드 생산성을 갖는다.
- [0029] 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 비-포유동물 세포이다.
- [0030] 또 다른 측면에서, 본 발명은 LDH에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 벡터를 세포에 도입하는 것을 포함하며, 여기서 siRNA는 발현되어 LDH 및 PDHK의 유전자 전사를 침묵시키거나 또는 하향-조절하는 것인, 배양된 세포에서 LDH 및 PDHK 전사를 침묵시키거나 또는 하향-조절하는 방법을 제공한다.
- [0031] 또 다른 측면에서, 본 발명은 LDH에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 벡터를 세포에 도입하는 것을 포함하는, 배양물 중 감소된 락테이트 생산을 나타내는 세포를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0032] 또 다른 측면에서, 본 발명은 락테이트 데히드로게나제 (LDH)에 특이적인 소형 간섭 RNA (siRNA)를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 피루베이트 데히드로게나제 키나제 (PDHK)에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 벡터를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 LDHa/PDHK1, 2, 3을 표적화하는 siRNA 구축물을 보여준다. LDHa, PDHK1, PDHK2 및 PDHK3을 표적화하는 siRNA는 단일 p사일렌서 3.1 히그로마이신 벡터로 클로닝하였다. LDHa에 대한 표적화 서열은 U6 프로모터 조절 하에 있는 반면 PDHK1, 2 및 3에 대한 siRNA는 H1 프로모터 조절 하에 있다.
- 도 2는 선택된 12개의 siRNA 클론에서 상대적 LDHa, PDHK1, 2 및 3 mRNA 발현 수준을 보여준다 (밝은 회색으로 나타난 바와 같음). LDHa 및 PDHK의 발현 수준은 하우스키핑 유전자 b-마이크로글로불린에 대해 정규화하였다. 12개의 모의 클론으로부터의 평균 mRNA 발현 수준은 어두운 회색으로 나타내었다.
- 도 3은 페드-배치 진탕 플라스크 평가에서 락테이트 프로파일, 평균 락테이트 생산율 및 제14일 pH 값을 보여준다. 락테이트 농도는 14-일 진탕 플라스크 평가 동안 제3, 7, 10 및 14일에 노바(Nova) 분석기를 사용하여 측정된다. 3a). 모의 (어두운 회색) 및 siRNA (밝은 회색) 클론의 락테이트 프로파일; 3b). 제3일 및 제14일 사이의 평균 락테이트 생산율 ($mg/10^6$ 개 세포/일); 및 3c). 제14일 pH 값. 페드-배치 진탕 플라스크 실험은 3회 수행되었고, 제시된 데이터는 1 실험으로부터의 것이다.
- 도 4는 페드-배치 진탕 플라스크 평가에서 역가, 비생산성 (Qp) 및 세포 성장 프로파일을 보여준다. 4a). 제14일 역가 (생산성) (g/L); 4b). 비생산성 (pg/세포/일); 및 4c). 통합된 생존 세포 카운트 (IVCC) (1억개 세포/

일/L)에 의한 세포 성장 측정. 모의 클론은 어두운 회색이고, siRNA 클론은 밝은 회색이다.

도 5는 2L 생물반응기 평가에서 락테이트 프로파일, 평균 락테이트 생산율 및 오스몰랄농도 프로파일을 보여준다. 5a). 락테이트 프로파일; 5b). 평균 락테이트 생산율; 및 5c). 오스몰랄농도 프로파일.

도 6은 2L 생물반응기 평가에서 siRNA, 모의 또는 모 클론을 함유하는 배양된 세포의 생산성 프로파일을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] <발명의 상세한 설명>

[0035] 본 발명은 배양된 세포에서 락테이트 생산을 감소시키고 폴리펩티드 생산을 증가시키는 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명자들은 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)를 발현하는 배양된 세포에서 RNA 간섭 (RNAi)으로 공지된 과정에 의한 siRNA를 통한 LDH 및 PDHK의 공동 하향조절이 락테이트 수준, 락테이트 생산율 및 세포 오스몰랄농도를 감소시키고, 비 폴리펩티드 생산성 (예를 들어, 비생산성) 및 폴리펩티드 생산 (예를 들어, 생산성)을 증가시킨다는 것을 발견하였다. 또한, 하향조절된 LDH 및 PDHK를 갖는 이를 배양된 세포는 세포 성장, 세포 생존율 및 생산된 폴리펩티드 품질에 부정적인 영향을 나타내지 않았다. 따라서, 이론에 제한되지 않으면서, LDH 발현의 녹다운에 의한 피루베이트-락테이트 전환의 감소 및 하나 이상의 PDHK 발현의 녹다운에 의한 피루베이트의 트리카르복실산 사이클 (TCA 또는 크렙스 사이클)로의 촉진이 락테이트의 감소 및 보다 많은 에너지 및 대사 중간체를 갖는 세포의 제공에 상승작용 효과를 나타낼 수 있다. 이러한 효과는 이어서 배양된 세포에서 증가된 폴리펩티드 (예를 들어, 항체) 생산으로 이어질 수 있다.

[0036] 따라서, 본 발명의 한 측면에서, a) LDH에 특이적인 siRNA 및 b) PDHK에 특이적인 siRNA를 발현하는 세포를 배양하는 것을 포함하는, 배양된 세포에서 락테이트 생산을 감소시키는 방법이 제공된다.

[0037] 또 다른 측면에서, a) LDH에 특이적인 siRNA 및 PDHK에 특이적인 siRNA를 포함하는 배양물 중의 세포가 제공된다.

[0038] 또 다른 측면에서, 본 발명은 LDH에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 세포를 배양하는 것을 포함하는, 배양된 세포에서 락테이트 생산을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0039] 또 다른 측면에서, 본 발명은 LDH에 특이적인 제1 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 PDHK에 특이적인 제2 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인, 배양물 중의 세포를 제공한다.

[0040] 본 발명의 실시는 달리 나타내지 않는 한 당업계 기술 내의 문자 생물학 (재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상적인 기술을 이용할 것이다. 이러한 기술은 하기와 같은 문헌에 자세하게 설명되어 있다: 문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)].

[0041]

정의

[0042]

본원에 사용된 바와 같이 용어 "배양물 중의 세포" 또는 "배양된 세포"는 세포의 1회 이상의 세포 분열을 허용하는 용액 (예를 들어, 세포 배지) 중의 2개 이상의 세포를 지칭한다.

[0043]

본원에서 교환가능하게 사용되는 바와 같이 용어 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 지칭하고, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 테옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 또는 염기 및/또는 이들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라제에 의해 중합체로 혼입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화 뉴클레오티드 및 그의 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 존재하는 경우에 중합체의 어셈블리 이전 또는 이후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드의 서열에 비-뉴클레오티드 성분이 개재될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는, 예컨대 표지 성분과의 접합에 의해, 중합 후에 추가로 변형될 수 있다. 다른 유형의 변형은, 예를 들어 "캡", 1개 이상의 자연 발생 뉴클레오티드의 유사체로의 치환, 뉴클레오티드간 변형, 예컨대 예를 들어 비하전된 연결을 갖는 것 (예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카르바메이트 등) 및 하전된 연결을 갖는 것 (예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등), 웨던트 모이어티, 예컨대 예를 들어 단백질 (예를 들어, 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 웹티드, 폴리-L-리신 등)을 함유하는 것, 삽입제 (예를 들어, 아크리딘, 프소랄렌 등)가 있는 것, 킬레이터 (예를 들어, 금속, 방사성 금속, 봉소, 산화성 금속 등)를 함유하는 것, 알킬레이터를 함유하는 것, 변형된 결합이 있는 것 (예를 들어, 알파 아노머 핵산 등), 뿐만 아니라 변형되지 않은 형태의 폴리뉴클레오티드(들)를 포함한다. 또한 당에 본래 존재하는 임의의 히드록실 기는 예를 들어 포스포네이트 기, 포스페이트 기에 의해 대체되거나, 표준 보호기에 의해 보호되거나, 또는 추가의 뉴클레오티드에 대한 추가의 연결을 제조하기 위해 활성화될 수 있거나, 또는 고체 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH가 인산화되거나 또는 아민 또는 1 내지 20개 탄소 원자의 유기 캡핑 기 모이어티로 치환될 수 있다. 다른 히드록실이 또한 표준 보호기로 유도체화될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한 일반적으로 당업계에 공지된 리보스 또는 테옥시리보스 당의 유사형, 예를 들어 2'-0-메틸-, 2'-0-알릴, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 카르보시클릭 당 유사체, α-아노머 당, 에피머 당, 예컨대 아라비노스, 크실로스 또는 립소스, 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헵톨로스, 비시클릭 유사체 및 무염기성 뉴클레오시드 유사체, 예컨대 메틸 리보시드를 함유할 수 있다. 하나 이상의 포스포디에스테르 연결이 대안적인 연결 기로 대체될 수 있다. 이들 대안적인 연결 기는 포스페이트가 P(O)S ("티오에이트"), P(S)S ("디티오에이트"), (O)NR₂ ("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂ ("포름아세탈") (여기서, 각각의 R 또는 R'는 독립적으로 H이거나 또는 임의로 에테르 (-O-) 연결을 함유하는 치환 또는 비치환 알킬 (1-20 C), 아릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아르알딜임)로 대체되는 실시양태를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 폴리뉴클레오티드 내의 모든 연결이 동일할 필요는 없다. 상기 설명은 RNA 및 DNA를 비롯하여 본원에서 언급되는 모든 폴리뉴클레오티드에 적용된다.

[0044]

용어 "RNA 간섭 (RNAi)"은 siRNA에 의해 매개되거나 개시되는 서열-특이적, 전사 유전자 침묵 (예를 들어, 전사 후 유전자 침묵)의 과정을 지칭한다. 이론에 제한되지 않으면서, RNAi 동안, 본 발명의 방법을 실시함에 있어, siRNA는 LDH 및 하나 이상 PDHK의 유전자 발현의 결과적인 서열-특이적 억제와 표적 mRNA의 분해를 유도할 수 있다.

[0045]

용어 "이종 핵산" 또는 "이종 폴리펩티드"는 그의 서열이 동일한 숙주 세포에서 자연적으로 발견되는 또 다른 핵산 또는 폴리펩티드의 서열과 동일하지 않은 핵산 또는 폴리펩티드를 지칭한다.

[0046]

용어 "소형 간섭 RNA", "짧은 간섭 RNA" 또는 "siRNA"는 뉴클레오티드의 RNA 듀플렉스, 또는 일부 대안적 측면에서 관심 핵산, 예를 들어 LDH 또는 PDHK에 표적화된 RNA의 단일 문자를 지칭한다. siRNA는 표준 왓슨-크릭 염기-쌍형성 상호작용에 의해 함께 어닐링된 센스 RNA 가닥 및 상보적 안티센스 RNA 가닥을 포함한다. siRNA는 또한 직접 형질감염될 수 있거나 다르게는 배양된 세포 내에서 생산될 수 있다.

[0047]

하나의 변형법에서, 센스 RNA 가닥 및 상보적 안티센스 RNA 가닥은 스페이서에 의해 연결되어 스템-루프 또는 헤어핀 구조 (짧은 헤어핀 RNA (shRNA)로 지칭됨)의 발현으로 이어진다. 헤어핀은 이어서 엔도뉴클레아제 (예를 들어, 다이서(Dicer))에 의해 절단되어 siRNA를 생성한다. 또 다른 변형법에서, shRNA는 2개의 스템-루프 구조로 이루어진 비-관능성 shRNA이고, 이 때 하나의 스템-루프 구조는 절단 의존성 RISC (RNA-유도된 침묵 복합체) 로딩을 통한 mRNA 분해를 위해 RNA 듀플렉스를 안내하는 완전히 매치된 서열로 구성되고, 제2 스템-루프 구조는 절단-비의존성 RISC 로딩을 통한 mRNA 격리를 통해 mRNA의 번역을 억제하는 미스-매치 가닥으로 구성된다.

- [0048] 본원에 사용된 바와 같이 LDH 또는 PDHK에 대해 "특이적인" siRNA는 관심 핵산 (예를 들어, LDH 또는 PDHK)에 표적화된 siRNA 및 siRNA의 듀플렉스 부분의 뉴클레오티드 서열이 표적화된 유전자 (예를 들어, LDH 또는 PDHK)의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 siRNA를 지칭한다.
- [0049] 본원에 사용된 바와 같이, 본원에 사용된 "작동가능하게 연결된"은 2개 이상의 핵산 (예를 들어, DNA) 절편 사이의 기능적 관계를 지칭한다. 전형적으로, 이는 전사되는 서열에 대한 전사 조절 서열의 기능적 관계를 지칭한다. 예를 들어, 프로모터가 적절한 숙주 세포 또는 다른 발현 시스템에서 코딩 서열의 전사를 자극하거나 조정하는 경우, 이는 코딩 서열, 예컨대 본 발명의 핵산에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, 전사되는 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터 전사 조절 서열은 전사되는 서열에 물리적으로 인접하여 위치하며, 즉, 이들은 시스-작용성이다. 그러나, 일부 전사 조절 서열, 예컨대 인핸서는 이것이 전사를 증진시키는 코딩 서열에 물리적으로 인접하거나 근접하여 위치할 필요가 없다.
- [0050] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "프로모터"는 배양된 세포, 예를 들어 포유동물 세포에서 코딩 서열의 전사를 구동할 수 있는 모든 서열을 포함한다. 따라서, 본 발명의 구축물에 사용되는 프로모터는 유전자 (예를 들어, LDH 또는 PDHK)의 전사의 시점 및/또는 속도를 조절 또는 조정하는데 관련된 시스-작용성 전사 제어 요소 및 조절 서열을 포함한다. 예를 들어, 프로모터는 전사 조절에 관련된 인핸서, 프로모터, 전사 종결인자, 복제 기점, 염색체 통합 서열, 5' 및 3' 비번역 영역 또는 인트론 서열을 포함하는, 시스-작용성 전사 제어 요소일 수 있다. 이러한 시스-작용성 서열은 전형적으로 전사를 수행 (턴 온/오프, 조절, 조정 등)하기 위해 단백질 또는 다른 생체분자와 상호작용한다. "구성적" 프로모터는 발생 또는 세포 분화의 대부분의 환경 조건 및 상태 하에 계속적으로 발현을 구동하는 것이다. "유도성" 또는 "조절성" 프로모터는 환경 조건 또는 발생 조건의 영향 하에 본 발명의 핵산의 발현을 지시한다. 유도성 프로모터에 의해 전사에 영향을 미칠 수 있는 환경 조건의 예는 협기성 조건, 상승된 온도, 고갈 또는 빛의 존재를 포함한다.
- [0051] 본원에 사용된 바와 같이 "벡터"는 숙주 세포에서 하나 이상의 관심 유전자(들) 또는 서열(들) (예를 들어, LDH 및 PDHK)을 전달할 수 있고, 바람직하게는 이를 발현시킬 수 있는 구축물을 의미한다. 벡터의 예는 바이러스 벡터, 네이키드 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 플라스미드, 코스미드 또는 파지 벡터, 양이온 축합체와 회합된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 리포솜에 캡슐화된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 및 특정 진핵 세포, 예컨대 생산자 세포를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 벡터는 이용되는 숙주 세포와 상용가능한 것이다. 적합한 벡터는 예를 들어, 박테리아, 바이러스 (예컨대, 박테리오파지 T7 또는 M-13 유래의 파지), 코스미드, 효모 또는 식물로부터 유래될 수 있다. 이러한 벡터의 수득 및 사용을 위한 프로토콜은 당업자에게 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor, 1989] 참조).
- [0052] 본원에 사용된 바와 같이 평균 락테이트 생산율은 락테이트 합성 속도 마이너스 락테이트 소비 속도 (mg/세포/일)로 계산된다.
- [0053] 본원에 사용된 바와 같이 "비생산성" 또는 "Qp"는 특정 단백질 (예를 들어, 항체) 생산율 (pg/세포/일)을 지칭한다. 비생산성은 단백질 역가 (pg/세포/일)/IVCC (통합된 생존 세포 카운트 계산; 세포/일)로 계산된다.
- [0054] 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 본원에서 교환가능하게 사용되며, 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 지칭한다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 변형된 아미노산을 포함할 수 있으며, 비-아미노산이 개재될 수 있다. 또한 이 용어는 자연적으로, 또는 개재, 예를 들어 디슬피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화 또는 임의의 다른 조작 또는 변형, 예컨대 표지 성분과의 접합에 의해 변형된 아미노산 중합체를 포함한다. 또한 이러한 정의에는, 예를 들어 하나 이상의 아미노산 유사체 (예를 들어, 비천연 아미노산 등 포함) 뿐만 아니라 당업계에 공지된 다른 변형을 함유하는 폴리펩티드가 포함된다.
- [0055] 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 모노클로날 항체 (전장 모노클로날 항체 포함), 폴리클로날 항체, 다중-특이적 항체 (예를 들어, 이중-특이적 항체) 및 항체 단편을 포함한다.
- [0056] "항체 단편"은 전장 항체의 일부, 일반적으로 그의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 단일-쇄 항체 분자; 디아바디; 선형 항체; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중 특이적 항체를 포함한다.
- [0057] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 나타내고, 즉, 이러한 집단을 포함하는 개별 항체는 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하

고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대해 지시되며 고도로 특이적이다. 또한, 전형적으로 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 통상의 (폴리클로날) 항체 제제와는 반대로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 지시된다. 수식어 "모노클로날"은 항체의 특징을 실질적으로 동종인 항체들의 집단으로부터 수득하였다는 것으로 표시하고, 임의의 특정한 방법을 통한 항체 생산이 필요하다는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975)]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조)에 의해 제조될 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한 예를 들어 문헌 [Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991) 및 Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 사용하여 과거 항체 라이브러리로부터 단리할 수 있다.

[0058]

본원에서 모노클로날 항체는 구체적으로 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정한 종으로부터 유래되거나 특정한 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고, 쇄(들)의 나머지 부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체 (이뮤노글로불린), 뿐만 아니라 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 한 이러한 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)]).

[0059]

용어 "초가변 영역"은 본원에서 사용되는 경우에 항원-결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 "상보적 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (즉, 경쇄 가변 도메인의 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3) 및 중쇄 가변 도메인의 잔기 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3); 문헌 [Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] 및/또는 "초가변 루프"로부터의 잔기 (즉, 경쇄 가변 도메인의 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3) 및 중쇄 가변 도메인의 잔기 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3); 문헌 [Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)])를 포함한다. "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0060]

"인간화" 형태의 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 초가변 영역 잔기가 바람직한 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비-인간 종 (공여자 항체)의 초가변 영역의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 치환된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서는 발견되지 않는 잔기를 포함할 수도 있다. 이러한 변형은 항체 성능이 추가로 개선되게 한다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비인간 이뮤노글로불린의 것에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 이뮤노글로불린 서열의 것이다. 임의로, 인간화 항체는 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로는 인간 이뮤노글로불린의 것을 또한 포함할 것이다. 보다 상세한 내용은 문헌 [Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); 및 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)]을 참조한다.

[0061]

본원에 사용된 바와 같이 용어 "이뮤노어드헤신"은 이뮤노글로불린 불변 도메인의 이펙터 기능을 갖는 이종 "어드헤신" 단백질 (예를 들어, 수용체, 리간드 또는 효소)의 "결합 도메인"을 조합한 항체-유사 분자를 지칭한다. 구조적으로, 이뮤노어드헤신은 항체의 항원 인식 및 결합 부위 (항원 결합 부위)가 아닌 (즉, "이종"인) 바람직한 결합 특이성을 갖는 어드헤신 아미노산 서열 및 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열의 융합체를 포함한다. 이 뮤노어드헤신에서 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열은 바람직하게는 γ 1, γ 2, 또는 γ 4 중쇄로부터 유래되며, 이는 이러한 영역을 포함하는 이뮤노어드헤신이 단백질 A 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있기 때문이다 (문헌 [Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)]).

[0062]

본원에 사용된 바와 같이 용어 "리간드 결합 도메인"은 적어도 상응하는 천연 수용체의 정량적 리간드 결합을 유지하는 임의의 천연 세포-표면 수용체 또는 그의 임의의 영역 또는 유도체를 지칭한다. 구체적 실시양태에서, 수용체는 이뮤노글로불린 초유전자 패밀리의 구성원과 상동성인 세포외 도메인을 갖는 세포-표면 폴리펩티드로부터의 것이다. 이뮤노글로불린 초유전자 패밀리의 구성원은 아니지만 그럼에도 불구하고 구체적으로 이러한 정의에 포함되는 다른 수용체는 시토카인에 대한 수용체, 및 특히 티로신 키나제 활성을 갖는 수용체 (수용체 티로신 키나제), 혈마토포이에틴 및 신경 성장 인자 수용체 슈퍼패밀리의 구성원, 및 세포 부착 분

자, 예를 들어 (E-, L- 및 P-) 셀렉틴이다.

[0063] 용어 "수용체 결합 도메인"은 세포 부착 분자를 포함하는, 수용체에 대한 임의의 천연 리간드, 또는 적어도 상응하는 천연 리간드의 정성적 수용체 결합 능력을 유지하는 이러한 천연 리간드의 유도체를 지정하는데 사용된다. 이 정의는 특히 구체적으로 상기 언급된 수용체에 대한 리간드로부터의 결합 서열을 포함한다.

[0064] "항체-이뮤노어드헤신 키메라"는 (본원에 정의된 바와 같은) 적어도 하나의 이뮤노어드헤신과 (본원에 정의된 바와 같은) 항체의 적어도 하나의 결합 도메인을 조합한 분자를 포함한다. 예시적인 항체-이뮤노어드헤신 키메라는 문헌 [Berg et al., PNAS (USA) 88:4723-4727 (1991) 및 Chamow et al., J. Immunol. 153:4268 (1994)]에 기재된 이중특이적 CD4-IgG 키메라이다.

[0065] 용어 "オス몰랄농도"는 1 리터의 용액에 용해된 용질 입자의 수를 지칭한다. 그의 오스몰랄농도가 증가하도록 배양 배지에 첨가될 수 있는 용질은 단백질, 펩티드, 아미노산, 비-대사 중합체, 비타민, 이온, 염 (예를 들어, 나트륨 또는 칼륨 염), 당, 대사물, 유기 산, 지질 등을 포함한다. 본원에 사용되는 경우 약어 "mOsm"은 "밀리오스몰/리터 H₂O"를 의미한다.

[0066] 본원에 사용된 바와 같이 "숙주 세포"는 폴리펩티드 생산을 위한 폴리뉴클레오티드 삽입물의 혼입에 사용되는 백터(들) 또는 siRNA(들)에 대한 수용자일 수 있거나 이러한 수용자인 개별 세포, 배양된 세포 또는 배양물 중의 세포를 포함한다. 숙주 세포는 단일 배양된 세포의 자손을 포함하고, 자손은 자연적, 우발적 또는 계획적 돌연변이로 인해 본래 모 세포와 (형태적으로 또는 게놈 DNA 상보체에서) 완전하게 동일할 필요가 없을 수 있다.

[0067] 본원에서 사용하기 위해, 달리 명백하게 나타내지 않는 한, 단수형의 사용은 하나 이상을 지칭한다.

[0068] 본원에서 "약" 값 또는 파라변수의 언급은 상기 값 또는 파라미터 자체에 대한 실시양태를 포함(하고 이를 기재)한다. 예를 들어, "약 X"를 언급하는 설명은 "X"의 설명을 포함한다. 수치 범위는 그 범위를 정의하는 숫자를 포함한다.

[0069] 실시양태가 본원에서 용어 "포함하는"으로 기재되는 어떠한 경우에든, 다르게는 "~로 이루어진" 및/또는 "~로 본질적으로 이루어진"의 용어가 기재된 유사한 실시양태가 또한 제공된다는 점을 이해한다.

[0070] 본 발명의 측면 또는 실시양태를 마쿠쉬 군 또는 다른 대안적 분류의 방법으로 기재한 경우, 본 발명은 전체로서 열거한 전체 군 뿐만 아니라, 군의 각 구성원을 개별적으로, 및 주요 군의 모든 가능한 하위군 뿐만 아니라 하나 이상의 군 구성원이 없는 주요 군을 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 특허청구범위에서 하나 이상의 임의의 군 구성원이 명시적으로 배제된 것도 고려한다.

[0071] 락테이트 생산을 감소시키는 방법

[0072] 본원에서 방법은 LDH 및 적어도 하나 이상의 PDHK에 특이적인 siRNA를 발현하는 세포를 배양하여 RNA 간섭 (RNAi)을 통해 락테이트 생산을 감소시키는 것을 포함한다. 한 측면에서, 방법은 a) LDH에 특이적인 siRNA 및 b) PDHK에 특이적인 siRNA를 발현하는 세포를 배양하는 것을 포함한다.

[0073] 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 제2 PDHK에 특이적인 siRNA를 추가로 발현한다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 제3 PDHK에 특이적인 siRNA를 추가로 발현한다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 제4 PDHK에 특이적인 siRNA를 추가로 발현한다.

[0074] 또 다른 측면에서, 방법은 LDH에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0075] 또 다른 측면에서, LDH에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 백터를 세포에 도입하는 것을 포함하며, 여기서 siRNA는 발현되어 LDH 및 PDHK의 유전자 전사를 침묵시키거나 또는 하향-조절하는 것인, 배양된 세포에서 LDH 및 PDHK 전사를 침묵시키거나 또는 하향-조절하는 방법이 제공된다.

[0076] 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 제2 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제3 이종 핵산 서열을 추가로 포함하며, 여기서 제3 이종 핵산 서열은 제3 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 제3 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제4 이종 핵산 서열을 추가로 포함하며, 여기서 제4 이종 핵산 서열은

제4 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 제5 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제5 이종 핵산 서열을 추가로 포함하며, 여기서 제5 이종 핵산 서열은 제5 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0077] 일부 실시양태에서, LDH는 LDHa, LDHb 또는 LDHc이다. 일부 실시양태에서, PDHK는 PDHK1, PDHK2, PDHK3 및 PDHK4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PDHK는 PDHK1, PDHK2 및 PDHK3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PDHK는 PDHK2, PDHK3 및 PDHK4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PDHK는 PDHK1, PDHK3 및 PDHK4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PDHK는 PDHK1 및 PDHK2로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PDHK는 PDHK1 및 PDHK3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PDHK는 PDHK2 및 PDHK4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PDHK는 PDHK3 및 PDHK4로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0078] 일부 실시양태에서, 방법은 a) LDHa에 특이적인 siRNA 및 b) 각각 PDHK1, PDHK2 및 PDHK3에 특이적인 siRNA를 발현하는 세포를 배양하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 a) LDHb에 특이적인 siRNA 및 b) 각각 PDHK1, PDHK2 및 PDHK3에 특이적인 siRNA를 발현하는 세포를 배양하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 a) LDHc에 특이적인 siRNA 및 b) 각각 PDHK1, PDHK2 및 PDHK3에 특이적인 siRNA를 발현하는 세포를 배양하는 것을 포함한다.

[0079] 일부 실시양태에서, 방법은 a) LDHa, LDHb 또는 LDHc에 특이적인 siRNA 및 b) 2종의 PDHK에 특이적인 siRNA를 발현하는 세포를 배양하는 것을 포함하며, 여기서 PDHK는 PDHK1, PDHK2, PDHK3 및 PDHK4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예를 들어, 방법은 각각 a) LDHa에 특이적인 siRNA 및 b) PDHK1 및 PDHK2에 특이적인 siRNA를 발현하는 세포를 배양하는 것을 포함한다.

[0080] 일부 실시양태에서, LDH 및 PDHK에 특이적인 siRNA 없이 배양된 세포에 비해 a) LDH에 특이적인 siRNA 및 b) PDHK에 특이적인 siRNA를 발현하는 배양된 세포에서 LDH에 대한 mRNA 발현 수준은 적어도 약 75% 감소되고, PDHK에 대한 mRNA 발현 수준은 적어도 약 25% 감소된다. 일부 실시양태에서, LDH는 LDHa, LDHb 또는 LDHc이고, LDH에 대한 mRNA 발현 수준은 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95% 감소된다. 일부 실시양태에서, PDHK는 PDHK1, PDHK2 또는 PDHK3이고, PDHK에 대한 mRNA 발현 수준은 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95% 감소된다.

[0081] 일부 실시양태에서, LDHa, PDHK1, PDHK2 및 PDHK3에 특이적인 siRNA 없이 배양된 세포에 비해 a) LDHa에 특이적인 siRNA 및 b) PDHK1, PDHK2 및 PDHK3에 특이적인 siRNA를 발현하는 배양된 세포에서 LDHa에 대한 mRNA 발현 수준은 약 90% 감소되고, PDHK1, PDHK2 및 PDHK3에 대한 mRNA 발현 수준은 각각 약 32%, 83% 및 70% 감소된다.

[0082] 일부 실시양태에서, 방법은 LDHa, LDHb 또는 LDHc에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열, PDHK1에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열, PDHK2에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제3 이종 핵산 서열 및 PDHK3에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제4 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2, 제3 및 제4 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0083] 일부 실시양태에서, 방법은 LDHa, LDHb 또는 LDHc에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열, PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열 및 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제3 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2 및 제3 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결되고, PDHK는 PDHK1, PDHK2, PDHK3 및 PDHK4로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0084] 일부 실시양태에서, LDH 및 PDHK를 포함하는 이종 핵산 서열 없이 배양된 세포에 비해 LDH에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열을 포함하는 배양된 세포에서 LDH에 대한 mRNA 발현 수준은 적어도 약 75% 감소되고, PDHK에 대한 mRNA 발현 수준은 적어도 약 25% 감소되며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, LDH는 LDHa, LDHb 또는 LDHc이고, LDH에 대한 mRNA 발현 수준은 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95% 감소된다. 일부 실시양태에서, PDHK는 PDHK1, PDHK2 또는 PDHK3이고, PDHK에 대한 mRNA 발현 수준은 적어도 약 25%, 적어도 약

30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95% 감소된다.

[0085] 일부 실시양태에서, LDHa, PDHK1, PDHK2 및 PDHK3에 특이적인 siRNA 없이 배양된 세포에 비해 LDHa에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열, PDHK1에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열, PDHK2에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제3 이종 핵산 서열 및 PDHK3에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제4 이종 핵산 서열을 포함하는 배양된 세포 (여기서, 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 여기서 제2, 제3 및 제4 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결됨)에서 LDHa에 대한 mRNA 발현 수준은 약 90% 감소되고, PDHK1, PDHK2 및 PDHK3에 대한 mRNA 발현 수준은 각각 약 32%, 83% 및 70% 감소된다.

[0086] 본원에 기재된 본 발명에 사용되는 siRNA는 본원에 기재된 바와 같이, 예를 들어 시험관내, 생체외 또는 생체내에서 생산된 다양한 공급원으로부터 수득되거나 제조될 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA는 약 1 내지 약 200개의 뉴클레오티드, 약 5 내지 약 100개의 뉴클레오티드, 약 10 내지 약 50개의 뉴클레오티드, 약 15 내지 약 30개의 뉴클레오티드 또는 약 19 내지 약 25개의 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA의 길이는 30개 미만의 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, siRNA의 길이는 30개 초과의 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, siRNA는 길이는 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9개 또는 그 미만의 뉴클레오티드일 수 있다.

[0087] 일부 실시양태에서, siRNA는 화학적 합성에 의해, 폴리미라제를 이용하는 시험관내 전사에 의해, 또는 긴 이중 가닥 RNA (dsRNA)의 엔도리보뉴클레아제 (예를 들어, 다이서) 소화에 의해 생성될 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA는 전체적으로 또는 부분적으로 합성 뉴클레오티드, 천연 염기 또는 변형된 염기로 구성될 수 있다.

[0088] 일부 실시양태에서, siRNA는 세포내에서 발현될 수 있다. siRNA는 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있고, 핵산 서열은 또한 하나 이상의 프로모터를 포함할 수 있다. 핵산 서열은 또한 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, RNA 듀플렉스의 센스 및 안티센스 가닥은 2개의 독립적인 프로모터로부터 생산되고, 배양된 세포와 어닐링될 수 있다. 일부 실시양태에서, RNA 듀플렉스의 센스 및 안티센스 가닥은 또한 염기 쌍 스페이서 (예를 들어, 염기 쌍 스페이서가 단일 또는 다중 염기 쌍을 포함할 수 있음) 또는 shRNA를 형성하기 위한 스템-루프에 의해 연결되고, 단일 프로모터에 의해 발현될 수 있다. 일부 실시양태에서, shRNA는 비-관능성 shRNA일 수 있다. 헤어핀은 엔도리보뉴클레아제 (예를 들어, 다이서)에 의해 절단되어 효과적인 siRNA 분자를 생성할 수 있다. 스페이서 또는 스템-루프는 듀플렉스를 형성하는 센스 및 안티센스 가닥 사이에 배치된다. 스템-루프의 길이는 달라질 수 있다. 일부 실시양태에서, 스템-루프의 길이는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 또는 그 초과의 뉴클레오티드이다. 헤어핀 구조는 또한 3' 또는 5' 오버행 부분을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 오버행의 길이는 3' 또는 5' 오버행 1, 2, 3, 4 또는 5개 뉴클레오티드이다. siRNA, shRNA 또는 이관능성 shRNA에 의한 RNA-매개 유전자 조절을 위한 조성물 및 방법은 예를 들어 미국 출원 번호 20090215860, 문현 [Rutz and Scheffold, *Arthritis Research & Therapy*, 6(2):78-85 (2004), 및 Rao et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 61:746-759 (2009)]에 기재되어 있다.

[0089] 일부 실시양태에서, 본 발명에 사용되는 siRNA는 표적 특이적 반응을 생산하기 위한 표적 서열과 완전한 상동성을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 사용되는 siRNA는 표적 서열과 약 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 92%, 91%, 90%, 88%, 86%, 84%, 82%, 80%, 78%, 76%, 74%, 72%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% 또는 5%의 상동성을 갖는다. 하나의 변형법에서, 본 발명에 사용되는 siRNA는 핵산 표적 서열에 생리적 조건 하에 혼성화할 수 있고, 예를 들어 이는 구체적으로 세포에서, 예를 들어 생체내에서 표적 서열과 혼성화할 수 있다. 또 다른 변형법에서, siRNA는 하나 초과의 표적 서열, 표적 마커 또는 리포터 유전자를 표적화한다.

[0090] 표적 핵산에 대한 siRNA의 생체내 표적화 (예를 들어, 생리적 조건 하에 세포에서의 표적 서열에 대한 siRNA의 특이적 결합)에 필요한 서열 동일성 (상동성)의 정도는 통상적인 스크리닝 조건 하에, 예를 들어 세포 배양 등에서 시험될 수 있다.

[0091] 일부 실시양태에서, PDHK1에 대한 표적 서열은 GCAGTCCCTGGACTTCGGA (서열 2)이다. 일부 실시양태에서, PDHK2에 대한 표적 서열은 CATTCACTTCTTGGAC (서열 3)이다. 일부 실시양태에서, PDHK3에 대한 표적 서열은 TGTAGCTGATGTCGTGAAA (서열 4)이다.

[0092] 락테이트 데히드로게나제 (LDH)는 피루베이트를 락테이트로 전환시킨다. 예시적인 LDH (예를 들어, LDHa, LDHb 또는 LDHc) 폴리펩티드 및 핵산의 등록 번호는 DQ912661 (CHO 세포에서 LDHa), BC067223 (인간 LDHa), BC084698 (래트 LDHa), BC094428 (마우스 LDHa), BC002362 (인간 LDHb), NM_012595 (래트 LDHb), NM_008492 (마우스 LDHb), BC090043 (인간 LDHc), NM_017266 (래트 LDHc) 및 NM_013580 (마우스 LDHc)을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 당업자에 의해 공지된 표준 방법은 LDH 폴리펩티드가 시험관내, 세포 추출물 또는 생체내에서 피루베이트를 락테이트로 전환시키는 폴리펩티드의 능력을 측정함으로써 LDH 활성을 갖는지 여부를 결정하는데 사용될 수 있다.

[0093] 피루베이트 데히드로게나제 키나제 (PDHK)는 피루베이트의 아세틸-CoA로의 전환을 억제한다. 예시적인 PDHK1 폴리펩티드 및 핵산의 등록 번호는 L42450 (인간), BC089783 (래트) 및 NM_172665 (마우스)를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 예시적인 PDHK2 폴리펩티드 및 핵산의 등록 번호는 NM_002611 (인간), NM_030872 (래트) 및 NM_133667 (마우스)을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 예시적인 PDHK3 폴리펩티드 및 핵산의 등록 번호는 L42452 (인간), BC169078 (래트) 및 NM_145630 (마우스)을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 예시적인 PDHK4 폴리펩티드 및 핵산의 등록 번호는 NM_002612 (인간), NM_053551 (래트) 및 NM_013743 (마우스)을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 당업자에 의해 공지된 표준 방법은 PDHK 폴리펩티드가 시험관내, 세포 추출물 또는 생체내에서 피루베이트의 아세틸-CoA로의 전환을 억제하는 폴리펩티드의 능력을 측정함으로써 PDHK 활성을 갖는지 여부를 결정하는데 사용될 수 있다.

[0094] 프로모터는 당업계에 널리 공지되어 있다. 숙주 세포에서 기능하는 임의의 프로모터는 숙주 세포에서 LDH 및 하나 이상의 PDHK에 특이적인 siRNA의 발현에 사용될 수 있다. 실질적으로 이러한 siRNA를 구동할 수 있는 임의의 프로모터 (U6, H1, CYC1, HIS3, GAL1, GAL4, ADH1, PGK, PHO5, GAPDH, T7, CMV, SV40 및 EF1a를 포함하나 이에 제한되지는 않음)가 본 발명에 적합하다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 방법은 LDHa에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열, PDHK1에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열, PDHK2에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제3 이종 핵산 서열 및 PDHK3에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제4 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터 U6에 작동가능하게 연결되고, 제2, 제3 및 제4 이종 핵산 서열은 제2 프로모터 H1에 작동가능하게 연결된다. 하나의 변형법에서, siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열은 LDHb에 특이적이다. 또 다른 변형법에서, siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열은 LDHc에 특이적이다.

[0095] 또 다른 측면에서, LDH에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 벡터를 세포에 도입하는 것을 포함하는, 배양물 중 감소된 락테이트 생산을 나타내는 세포를 제조하는 방법이 제공된다.

[0096] LDH에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열은 다양한 절차에 의해 벡터에 삽입될 수 있다. 예를 들어, LDH 및 PDHK siRNA 서열은 적절한 제한 엔도뉴클레아제, 예컨대 KasI, BamHI, HindIII 또는 BglII로의 삽입물 및 벡터의 소화 후에 벡터에서 바람직한 위치에 라이게이션된다. 일부 실시양태에서, LDHa 및 PDHK1, PDHK2 및 PDHK3에 특이적인 siRNA 서열을 함유하는 벡터는 LDHa siRNA 서열을 벡터 (예를 들어, p사일렌서 3.1-H1 허그로 벡터)의 KasI 부위에 삽입하고 그의 바로 5' 말단에 U6 프로모터를 첨가하고, PDHK1 및 PDHK2 siRNA 서열을 각각 BamHI/HindIII 및 HindIII 부위에 삽입하고, PDHK3 siRNA 서열을 BglII에 삽입하고 PDHK1, PDHK2 및 PDHK3의 바로 5' 말단에 H1 프로모터를 삽입하여 구축된다. 감소된 락테이트 생산을 나타내는 배양된 세포는 이어서 LDHa 및 PDHK1, PDHK2 및 PDHK3 siRNA를 함유하는 벡터를 형질감염시킴으로써 생성될 수 있다.

[0097] 조성물

[0098] 본원에 기재된 방법에 의해 생산된 배양된 세포가 또한 본 발명에 제공된다. 본 발명의 조성물은 생체내, 생체외 또는 시험관내에서 실시될 수 있다. 한 측면에서, a) LDH에 특이적인 siRNA 및 b) PDHK에 특이적인 siRNA를 발현하는 배양물 중의 세포가 제공된다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 제2 PDHK에 특이적인 siRNA를 추가로 발현한다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 제3 PDHK에 특이적인 siRNA를 추가로 발현한다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 제4 PDHK에 특이적인 siRNA를 추가로 발현한다.

[0099] 일부 실시양태에서, 배양물 중의 세포는 a) LDHa에 특이적인 siRNA 및 b) 각각 PDHK1, PDHK2 및 PDHK3에 특이적인 siRNA를 발현한다. 일부 실시양태에서, 배양물 중의 세포는 a) LDHb에 특이적인 siRNA 및 b) 각각 PDHK1, PDHK2 및 PDHK3에 특이적인 siRNA를 발현한다. 일부 실시양태에서, 배양물 중의 세포는 a) LDHc에 특이적인

siRNA 및 b) 각각 PDHK1, PDHK2 및 PDHK3에 특이적인 siRNA를 발현한다.

[0100] 일부 실시양태에서, 배양물 중의 세포는 a) LDHa에 특이적인 siRNA 및 b) 2종의 PDHK에 특이적인 siRNA를 발현하며, 여기서 PDHK는 PDHK1, PDHK2, PDHK3 및 PDHK4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 배양물 중의 세포는 a) LDHb에 특이적인 siRNA 및 b) 2종의 PDHK에 특이적인 siRNA를 발현하며, 여기서 PDHK는 PDHK1, PDHK2, PDHK3 및 PDHK4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 배양물 중의 세포는 a) LDHc에 특이적인 siRNA 및 b) 2종의 PDHK에 특이적인 siRNA를 발현하며, 여기서 PDHK는 PDHK1, PDHK2, PDHK3 및 PDHK4로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0101] 또 다른 측면에서, LDH에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인, 배양물 중의 세포가 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포는 제2 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제3 이종 핵산 서열을 추가로 포함하며, 여기서 제3 이종 핵산 서열은 제3 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 세포는 제3 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제4 이종 핵산 서열을 추가로 포함하며, 여기서 제4 이종 핵산 서열은 제4 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 세포는 제5 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제5 이종 핵산 서열을 추가로 포함하며, 여기서 제5 이종 핵산 서열은 제5 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0102] 일부 실시양태에서, 배양물 중의 세포는 LDHa에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열, PDHK1에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열, PDHK2에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제3 이종 핵산 서열 및 PDHK3에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제4 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터 (예를 들어, U6)에 작동가능하게 연결되고, 제2, 제3 및 제4 이종 핵산 서열은 제2 프로모터 (예를 들어, H1)에 작동가능하게 연결된다. 하나의 변형법에서, siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열은 LDHb에 특이적이다. 또 다른 변형법에서, siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열은 LDHb에 특이적이다.

[0103] 일부 실시양태에서, 배양물 중의 세포는 LDHa에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열, PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열, PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제3 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 PDHK는 PDHK1, PDHK2, PDHK3 및 PDHK4로 이루어진 군으로부터 선택되고, 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터 (예를 들어, U6)에 작동가능하게 연결되고, 제2 및 제3 이종 핵산 서열은 제2 프로모터 (예를 들어, H1)에 작동가능하게 연결된다. 하나의 변형법에서, siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열은 LDHb에 특이적이다. 또 다른 변형법에서, siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열은 LDHc에 특이적이다.

[0104] 일부 실시양태에서, 세포 배양물은 적어도 약 5, 10, 15, 20, 50, 75, 100, 200, 500, 750, 1,000, 5,000, 7,500, 10,000, 15,000개 또는 그 초과의 세포를 포함한다.

[0105] 또 다른 측면에서, 락테이트 소비 속도보다 낮은 락테이트 합성 속도를 갖는 배양물 중의 세포가 제공된다. 일부 실시양태에서, 배양물 중의 세포는 약 - 0.2 mg/10⁶개 세포/일, - 0.1 mg/10⁶개 세포/일, - 0.08 mg/10⁶개 세포/일, - 0.06 mg/10⁶개 세포/일, - 0.04 mg/10⁶개 세포/일, - 0.02 mg/10⁶개 세포/일, - 0.01 mg/10⁶개 세포/일, - 0.008 mg/10⁶개 세포/일, - 0.006 mg/10⁶개 세포/일, - 0.004 mg/10⁶개 세포/일 또는 - 0.002 mg/10⁶개 세포/일 미만의 평균 락테이트 생산율을 갖는다.

[0106] 일부 실시양태에서, 배양물 중의 세포는 LDHa에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열, PDHK1에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열, PDHK2에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제3 이종 핵산 서열 및 PDHK3에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제4 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터 (예를 들어, U6)에 작동가능하게 연결되고, 제2, 제3 및 제4 이종 핵산 서열은 제2 프로모터 (예를 들어, H1)에 작동가능하게 연결되고, 배양물 중의 세포는 약 - 0.02 mg/10⁶개 세포/일의 평균 락테이트 생산율을 갖는다.

[0107] 또 다른 측면에서, 감소된 오스몰랄농도를 갖는 LDH 및 PDHK에 특이적인 siRNA를 포함하는 배양물 중의 세포가 제공된다. 일부 실시양태에서, LDH 및 PDHK에 특이적인 siRNA를 포함하는 배양물 중의 세포는 약 500 mOsm, 450 mOsm, 400 mOsm, 350 mOsm, 300 mOsm, 250 mOsm, 200 mOsm 또는 150 mOsm 미만의 오스몰랄농도를 갖는다.

[0108] 일부 실시양태에서, 배양물 중의 세포는 LDHa에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열, PDHK1에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열, PDHK2에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제3 이종 핵산 서열 및 PDHK3에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제4 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터 (예를 들어, U6)에 작동가능하게 연결되고, 제2, 제3 및 제4 이종 핵산 서열은 제2 프로모터 (예를 들어, H1)에 작동가능하게 연결된다.

동가능하게 연결되고, 배양물 중의 세포는 약 300 mOsm의 오스몰랄농도를 갖는다.

[0109] 또 다른 측면에서, 증가된 비생산성 (0p)을 갖는 배양물 중의 세포가 제공된다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 PDHK 및 LDH를 포함하는 이종 핵산 서열 없이 배양된 세포보다 적어도 약 60% 높은, 적어도 약 65% 높은, 적어도 약 70% 높은, 적어도 약 75% 높은, 적어도 약 80% 높은, 적어도 약 85% 높은, 적어도 약 90% 높은 또는 적어도 약 95% 높은 비생산성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 PDHK 및 LDH를 포함하는 이종 핵산 서열 없이 배양된 세포보다 약 67% 높은, 약 69% 높은, 약 71% 높은, 약 72% 높은, 약 73% 높은, 약 74% 높은, 약 75% 높은, 약 76% 높은, 약 77% 높은, 약 78% 높은, 약 79% 높은, 약 81% 높은, 약 83% 높은, 약 85% 높은, 약 87% 높은, 약 89% 높은, 약 91% 높은, 약 93% 높은, 약 95% 높은, 약 97% 높은 또는 약 99% 높은 비생산성을 갖는다.

[0110] 일부 실시양태에서, 배양물 중의 세포는 LDHa에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열, PDHK1에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열, PDHK2에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제3 이종 핵산 서열 및 PDHK3에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제4 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터 (예를 들어, U6)에 작동가능하게 연결되고, 제2, 제3 및 제4 이종 핵산 서열은 제2 프로모터 (예를 들어, H1)에 작동가능하게 연결되고, 배양물 중의 세포가 약 75% 높은 비생산성을 갖는다.

[0111] 또 다른 측면에서, 증가된 폴리펩티드 생산성 (예를 들어, 항체 생산성 또는 역가 (g/L))을 갖는 본원의 방법에 의해 생산된 배양된 세포가 제공된다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 PDHK 및 LDH를 포함하는 이종 핵산 서열 없이 배양된 세포보다 약 10% 내지 약 800% 높은 폴리펩티드 생산성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 PDHK 및 LDH를 포함하는 이종 핵산 서열 없이 배양된 세포보다 약 10% 높은, 약 15% 높은, 약 20% 높은, 약 25% 높은, 약 30% 높은, 약 35% 높은, 약 40% 높은, 약 45% 높은, 약 50% 높은, 약 55% 높은, 약 58% 높은, 약 60% 높은, 약 65% 높은, 약 70% 높은, 약 71% 높은, 약 75% 높은, 약 80% 높은, 약 85% 높은, 약 90% 높은, 약 95% 높은, 약 100% 높은, 약 125% 높은, 약 150% 높은, 약 200% 높은, 약 250% 높은, 약 300% 높은, 약 350% 높은, 약 400% 높은, 약 450% 높은, 약 500% 높은, 약 550% 높은, 약 600% 높은, 약 650% 높은, 약 700% 높은, 약 750% 높은 또는 약 800% 높은 폴리펩티드 생산성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 PDHK 및 LDH를 포함하는 이종 핵산 서열 없이 배양된 세포보다 적어도 약 55% 높은, 적어도 약 60% 높은, 적어도 약 65% 높은, 적어도 약 68% 높은, 적어도 약 70% 높은, 적어도 약 80% 높은, 적어도 약 85% 높은 또는 적어도 약 90% 높은 폴리펩티드 생산성을 갖는다.

[0112] 일부 실시양태에서, 배양물 중의 세포는 LDHa에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열, PDHK1에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열, PDHK2에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제3 이종 핵산 서열 및 PDHK3에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제4 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터 (예를 들어, U6)에 작동가능하게 연결되고, 제2, 제3 및 제4 이종 핵산 서열은 제2 프로모터 (예를 들어, H1)에 작동가능하게 연결되고, 배양된 세포는 PDHK1, PDHK2, PDHK3 및 LDHa를 포함하는 이종 핵산 서열 없이 배양된 세포보다 적어도 약 68% 높은 항체 생산성 (예를 들어, g/L)을 갖는다.

[0113] 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 PDHK 및 LDH (일부 실시양태에서, 항체)에 특이적인 siRNA 없이 배양된 세포보다 약 10% 내지 약 800% 높은 폴리펩티드 생산성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 PDHK 및 LDH에 특이적인 siRNA 없이 배양된 세포보다 약 10% 높은, 약 15% 높은, 약 20% 높은, 약 25% 높은, 약 30% 높은, 약 35% 높은, 약 40% 높은, 약 45% 높은, 약 50% 높은, 약 55% 높은, 약 60% 높은, 약 65% 높은, 약 70% 높은, 약 75% 높은, 약 80% 높은, 약 85% 높은, 약 90% 높은, 약 95% 높은, 약 100% 높은, 약 125% 높은, 약 150% 높은, 약 200% 높은, 약 250% 높은, 약 300% 높은, 약 350% 높은, 약 400% 높은, 약 450% 높은, 약 500% 높은, 약 550% 높은, 약 600% 높은, 약 650% 높은, 약 700% 높은, 약 750% 높은 또는 약 800% 높은 폴리펩티드 생산성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 PDHK 및 LDH에 특이적인 siRNA 없이 배양된 세포보다 적어도 약 65% 높은, 적어도 약 68% 높은, 적어도 약 70% 높은, 적어도 약 80% 높은, 적어도 약 85% 높은 또는 적어도 약 90% 높은 폴리펩티드 생산성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체 생산성을 PDHK 및 LDH에 특이적인 siRNA 없이 배양된 세포보다 적어도 약 68% 높다.

[0114] 또 다른 측면에서, LDH에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제1 이종 핵산 서열 및 PDHK에 특이적인 siRNA를 코딩하는 제2 이종 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 이종 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 제2 이종 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 벡터가 제공된다.

[0115] 일부 실시양태에서, 벡터는 발현 제어 서열의 제어 하에 핵산을 함유한다. 본원에 사용된 바와 같이 "발현 제어 서열"은 관심 핵산의 전사를 지시하는 핵산 서열을 의미한다. 발현 제어 서열은 프로모터, 예컨대 구성적

또는 유도성 프로모터, 또는 인핸서일 수 있다. "유도성 프로모터"는 환경 또는 발생 조절 하에 활성인 프로모터이다. 발현 제어 서열은 전사될 핵산 절편에 작동가능하게 연결된다.

[0116] 일부 실시양태에서, 벡터는 또한 종결 서열을 포함한다. 종결 제어 영역은 또한 숙주 세포에 대해 천연인 다양한 유전자로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 종결 서열 및 프로모터 서열은 동일한 공급원으로부터 유래된다. 또 다른 실시양태에서, 종결 서열은 숙주 세포에 내인성이다. 임의로, 종결 부위가 포함될 수 있다. 폴리펩티드의 효과적인 발현을 위해, 폴리펩티드를 코딩하는 DNA는 발현이 적절한 메신저 RNA를 형성하도록 선택된 발현 제어 영역에 개시 코돈을 통해 작동가능하게 연결된다.

[0117] 일부 실시양태에서, 벡터는 선택 마커를 포함한다. 용어 "선택 마커"는 도입된 핵산 또는 벡터를 함유하는 숙주 세포의 선택을 용이하게 하는 숙주 세포에서 발현이 가능한 핵산을 지칭한다. 선택 마커의 예는 항생제 내성 핵산 (예를 들어, 카나마이신, 암피실린, 카르베니실린, 젠타미신, 히그로마이신, 플레오마이신, 블레오마이신, 네오마이신 또는 클로람페니콜) 및/또는 대사 이점, 예컨대 숙주 세포에 대한 영양 이점을 부여하는 핵산을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 선택 마커는 히그로마이신 핵산이다.

[0118] 폴리펩티드

[0119] 본원에 기재된 방법 및 배양된 세포를 이용하여 생산될 폴리펩티드 또는 단백질은 항체 또는 이뮤노어드헤신을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 이러한 분자를 생성하기 위한 기술은 아래 논의된다.

[0120] 항체

[0121] 본 발명의 범위 내에 포함되는 항체는 하기를 포함하나 이에 제한되지 않는다: 항-CD20 항체, 예컨대 미국 특허 번호 5,736,137에서와 같은 키메라 항-CD20 "C2B8" (리툭산(RITUXAN)[®]); 항-VEGF 항체, 예를 들어 인간화 및/또는 친화도 성숙 항-VEGF 항체, 예컨대 인간화 항-VEGF 항체 huA4.6.1 아바스틴(AVASTIN)[®] (문헌 [Kim et al., Growth Factors, 7:53-64 (1992)], 국제 공보 번호 WO 96/30046, 및 WO 98/45331, 1998년 10월 15일 공개) 및 V3LA; 항-MUC16 항체; 항-CD4 항체, 예컨대 cM-7412 항체 (문헌 [Choy et al. Arthritis Rheum. 39(1):52-56 (1996)]) 및 이발리주맙 (TNX355) 항체; 항-MET 항체, 예컨대 1-아암 5D5 항-C-Met 항체; 항-HER2 항체 트라스투주맙 (헤르셉틴(HERCEPTIN)[®]) (문헌 [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285-4289 (1992)], 미국 특허 번호 5,725,856) 및 인간화 2C4 (WO01/00245, Adams et al.), 미국 특허 번호 5,721,108B1에서와 같은 2H7 항체의 키메라 또는 인간화 변이체, 또는 토시투모맙 (벡사르(BEXXAR)[®]); 항-IL-8 항체 (문헌 [St John et al., Chest, 103:932 (1993)], 및 국제 공보 번호 WO 95/23865); 항-전립선 줄기 세포 항원 (PSCA) 항체 (WO01/40309); 항-CD40 항체, 예를 들어 S2C6 및 그의 인간화 변이체 (WO00/75348); 항-CD1 항체 (미국 특허 번호 5,622,700, WO 98/23761, 문헌 [Steppe et al., Transplant Int. 4:3-7 (1991), 및 Hourmant et al., Transplantation 58:377-380 (1994)]); 항-CD18 (미국 특허 번호 5,622,700, 1997년 4월 22일 허여, 또는 WO 97/26912, 1997년 7월 31일 공개); 항-IgE 항체 (예를 들어, E25, E26 및 E27; 미국 특허 번호 5,714,338, 1998년 2월 3일 허여, 또는 미국 특허 번호 5,091,313, 1992년 2월 25일 허여, WO 93/04173, 1993년 3월 4일 공개, 또는 국제 출원 번호 PCT/US98/13410, 1998년 6월 30일 출원, 미국 특허 번호 5,714,338, 문헌 [Presta et al., J. Immunol. 151:2623-2632 (1993)], 및 국제 공보 번호 WO 95/19181); 항-Apo-2 수용체 항체 (WO 98/51793, 1998년 11월 19일 공개); 항-TNF- α 항체, 예를 들어 cA2 (래미카데 (REMICADE)[®]), CDP571 및 MAK-195 (미국 특허 번호 5,672,347, 1997년 9월 30일 허여, 문헌 [Lorenz et al. J. Immunol. 156(4):1646-1653(1996), 및 Dhainaut et al. Crit. Care Med. 23(9):1461-1469 (1995)] 참조); 항-조직 인자 (TF) 항체 (유럽 특허 번호 0 420 937 B1, 1994년 11월 9일 등록); 항-인간 α 4 β 7 인테그린 항체 (WO 98/06248, 1998년 2월 19일 공개); 항-표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 항체 (예를 들어, WO 96/40210 (1996년 12월 19일 공개)에서와 같은 키메라 또는 인간화 225 항체); 항-CD3 항체, 예컨대 OKT3 (미국 특허 번호 4,515,893, 1985년 5월 7일 허여); 항-CD25 또는 항-Tac 항체, 예컨대 CHI-621 (시뮬렉트(SIMULECT)[®] 및 제나팍스(ZENAPAX)[®] (미국 특허 번호 5,693,762 참조, 1997년 12월 2일 허여); 항-CD52 항체, 예컨대 CAMPATH-1H (문헌 [Riechmann et al. Nature 332:323-337 (1988)]); 항-Fc 수용체 항체, 예컨대 문헌 [Graziano et al. J. Immunol. 155(10):4996-5002 (1995)]에서와 같이 Fc_Y RI에 대해 지시된 M22 항체; 항-항암배아성 항원 (CEA) 항체, 예컨대 hMN-1 4 (문헌 [Sharkey et al. Cancer Res. 55(23Suppl): 5935s-5945s (1995)]); 유방 상피 세포에 대해 지시된 항체, 예를 들어 huBrE-3, hu-Mc 3 및 CHL6 (문헌 [Ceriani et al. Cancer Res. 55(23): 5852s-5856s (1995); 및 Richman et al. Cancer Res. 55(23 Supp): 5916s-5920s (1995)]); 결장 암종 세포에

결합하는 항체, 예컨대 C242 (문헌 [Litton et al. Eur J Immunol. 26(1): 1-9 (1996)]); 항-CD38 항체, 예를 들어 AT 13/5 (문헌 [Ellis et al. J. Immunol. 155(2):925-937 (1995)]); 항-CD33 항체, 예컨대 Hu M195 (문헌 [Jurcic et al. Cancer Res 55(23 Suppl):5908s-5910s (1995)]) 및 CMA-676 또는 CDP771; 항-CD22 항체, 예컨대 LL2 또는 럼포사이드 (문헌 [Juveid et al. Cancer Res 55(23 Suppl):5899s-5907s (1995)]); 항-EpCAM 항체, 예컨대 17-1A (파노렉스(PANOREX)[®]); 항-GpIIb/IIIa 항체, 예컨대 암식시맙 또는 c7E3 Fab (레오프로(REOPRO)[®]); 항-RSV 항체, 예컨대 MEDI-493 (시나기스(SYNAGIS)[®]); 항-CMV 항체, 예컨대 프로토비르(PROTOVIR)[®]; 항-HIV 항체, 예컨대 PRO542; 항-간염 항체, 예컨대 항-Hep B 항체 오스타비르(OSTAVIR)[®]; 항-CA 125 항체, 예컨대 오바렉스; 항-이디오타입 GD3 에피토프 항체 BEC2; 항- α v β 3 항체, 예를 들어 비탁신(VITAXIN)[®]; 항-인간 신세포 암종 항체, 예컨대 ch-G250; ING-1; 항-인간 17-1A 항체 (3622W94); 항-인간 결장직장 종양 항체 (A33); GD3 강글리오시드에 대해 지시된 항-인간 흑색종 항체 R24; 항-인간 편평-세포 암종 (SF-25); 및 항-인간 백혈구 항원 (HLA) 항체, 예컨대 스마트 ID10 및 항-HLA DR 항체 온콜립 (Lym-1).

[0122] 상기에서 구체적으로 확인된 항체를 제외하고, 예를 들어 하기에 기재된 기술을 이용하여, 당업자는 관심 항원에 대해 지시된 항체를 생성할 수 있다.

[0123] (i) 항원 선택 및 제조

[0124] 본원에서 항체는 관심 항원에 대해 지시된다. 바람직하게는, 항원은 생물학적으로 중요한 폴리펩티드이고, 질환 또는 장애를 앓는 포유동물에게 항체를 투여하는 것은 이러한 포유동물에서 치료 이점을 유도할 수 있다. 그러나, 비폴리펩티드 항원 (예컨대, 종양-연관 당지질 항원; 미국 특허 번호 5,091,178 참조)에 대해 지시된 항체가 또한 고려된다. 항원이 폴리펩티드인 경우, 이는 막횡단 분자 (예를 들어, 수용체) 또는 리간드, 예컨대 성장 인자일 수 있다. 예시적인 항원은 하기 섹션 (3)에 기재된 단백질을 포함한다. 본 발명에 포함되는 항체에 대한 예시적인 분자 표적은 CD 단백질, 예컨대 CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22 및 CD34; ErbB 수용체 패밀리의 구성원, 예컨대 EGFR, HER2, HER3 또는 HER4 수용체; 세포 부착 분자, 예컨대 LFA-1, Mac1, p150, 95, VLA-4, ICAM-1, VCAM 및 α v β 3 인테그린 (그의 α 또는 β 서브유닛 포함) (예를 들어, 항-CD11a, 항-CD18 또는 항-CD11b 항체); 성장 인자, 예컨대 VEGF; IgE; 혈액형 항원; f1k2/f1t3 수용체; 비만 (OB) 수용체; mp1 수용체; CTLA-4; 단백질 C, 또는 본원에서 언급된 다른 항원 중 임의의 것을 포함한다.

[0125] 가용성 항원 또는 그의 단편 (임의로 다른 분자에 접합됨)이 항체를 생성시키기 위한 면역원으로 사용될 수 있다. 막횡단 분자, 예컨대 수용체의 경우에는, 그의 단편 (예를 들어, 수용체의 세포외 도메인)이 면역원으로 사용될 수 있다. 대안적으로, 막횡단 분자를 발현하는 세포가 면역원으로 사용될 수 있다. 이러한 세포는 천연 공급원 (예를 들어, 암 세포주)으로부터 유래될 수 있거나, 또는 막횡단 분자를 발현하도록 재조합 기술에 의해 형질전환된 세포일 수 있다.

[0126] 항체의 제조에 유용한 다른 항원 및 그의 형태가 당업자에게 명백할 것이다.

[0127] (ii) 폴리클로날 항체

[0128] 폴리클로날 항체는 관련 항원 및 아주반트의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물을에서 바람직하게 생성된다. 이관능성 또는 유도체화 작용제, 예를 들어, 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 통한 접합), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, SOCl_2 , 또는 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (식 중, R 및 R^1 은 상이한 알킬 기임)을 사용하여, 면역화될 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들어 키홀 립팻 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 대두 트립신 억제제에 항원을 접합시키는 것이 유용할 수 있다.

[0129] 예를 들어 단백질 또는 접합체 100 μg 또는 5 μg (각각, 토끼 또는 마우스의 경우)을 3 부피의 프로인트 완전 아주반트와 합하고, 상기 용액을 여러 부위에 피내 주사함으로써, 동물을 항원, 면역원성 접합체 또는 유도체에 대해 면역화한다. 1개월 후에, 동물은 프로인트 완전 아주반트 중의 항원 또는 접합체를 본래 양의 1/5 내지 {분율 (1/10)}으로 다중 부위에 피하 주사하여 부스팅된다. 7 내지 14일 후, 동물에서 채혈하여, 혈청을 항체 역가에 대해 검정한다. 역자가 정체기에 도달할 때까지 동물을 부스팅시킨다. 바람직하게는, 상이한 단백질에 및/또는 상이한 가교제를 통해 접합된 동일한 항원의 접합체로 동물을 부스팅한다. 접합체는 또한 재조합 세포 배양에서 단백질 융합체로서 제조될 수 있다. 또한, 명반과 같은 응집제를 적절하게 사용하여 면역 반응을 증진시킨다.

[0130] (ii) 모노클로날 항체

[0131] 모노클로날 항체를 문헌 [Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975)]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법을 이용하여 제조할 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (미국 특허 번호 4,816,567)에 의해 제조할 수 있다.

[0132] 하이브리도마 방법에서는, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터 또는 마카쿠 원숭이를 상기 기재된 바와 같이 면역화시켜, 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유발시킨다. 대안적으로, 림프구를 시험관내에서 면역화시킬 수 있다. 이어서, 적합한 융제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 림프구를 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성한다 (문헌 [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]).

[0133] 이와 같이 제조된 하이브리도마 세포를, 바람직하게는 융합되지 않은 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에 시팅하여 성장시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포에 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT) 효소가 없는 경우, 하이브리도마용 배양 배지는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이며 (HAT 배지), 이러한 물질들은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.

[0134] 바람직한 골수종 세포는 효율적으로 융합되고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 높은 수준의 안정적인 항체 생산을 지지하며, HAT 배지와 같은 배지에 감수성이 있는 것이다. 이들 중에서, 바람직한 골수종 세포주는 뮤린 골수종 세포주, 예컨대 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터 (Salk Institute Cell Distribution Center, 미국 캘리포니아주 샌 디에고)로부터 입수 가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양으로부터 유래된 것, 및 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (American Type Culture Collection, 미국 메릴랜드주 록빌)으로부터 입수 가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 또한 인간 모노클로날 항체 생산과 관련하여 기재된 바 있다 (문헌 [Kozbor, J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]).

[0135] 하이브리도마 세포가 성장되는 배양 배지를 항원에 대해 지시된 모노클로날 항체의 생산에 대해 검정한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역침전 또는 시험관내 결합 검정, 예컨대 방사성면역검정 (RIA) 또는 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 결정한다.

[0136] 바람직한 특이성, 친화도 및/또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 클론을 한계 희석 절차에 의해 서브클로닝하고, 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다 (문헌 [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]). 이러한 목적에 적합한 배양 배지는 예를 들어 DMEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포가 동물에서 복수 종양으로서 생체내에서 성장될 수 있다.

[0137] 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 통상적인 이뮤노글로불린 정제 절차, 예컨대 예를 들어, 단백질 A-세파로스, 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적합하게 분리된다. 바람직하게는 본원에 기재된 pH 구배를 사용하는 단백질 A 친화성 크로마토그래피 절차가 이용된다.

[0138] 통상적인 절차 (예를 들어, 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용함)을 이용하여 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA가 용이하게 단리되고 서열분석된다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로 기능한다. 일단 단리되면, DNA를 발현 백터 내로 넣을 수 있고, 이후에 이를 달리 이뮤노글로불린 단백질을 생산하지 않는 숙주 세포, 예컨대 이. 콜라이 (*E. coli*) 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포 내로 형질감염시켜, 재조합 숙주 세포에서의 모노클로날 항체의 합성을 달성한다.

[0139] DNA는 또한 예를 들어 상동성 뮤린 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 치환시키거나 (미국 특허 번호 4,816,567; 문헌 [Morrison, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)]), 또는 이뮤노글로불린 코딩 서열에 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부를 공유 연결함으로써 변형시킬 수 있다.

[0140] 전형적으로, 이러한 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드는 항체의 불변 도메인에 대해 치환되거나 항체의 하나의 항원-결합 부위의 가변 도메인에 대해 치환되어, 항원에 대한 특이성을 갖는 하나의 항원-결합 부위 및 상이한 항원에 대한 특이성을 갖는 또 다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 2가 항체를 생성한다.

- [0141] 모노클로날 항체는 문헌 [McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990)]에 기재된 기술을 이용하여 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 문헌 [Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) 및 Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]에는 파지 라이브러리를 사용하여 뮤린 및 인간 항체를 각각 단리하는 방법이 기재되어 있다. 이후의 간행물은 쇄 셔플링에 의한 고친화도 (nM 범위) 인간 항체의 생산 (문헌 [Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)]), 뿐만 아니라 매우 큰 파지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서의 조합 감염 및 생체내 재조합 (문헌 [Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)])을 기재한다. 따라서, 이러한 기술은 모노클로날 항체의 단리를 위한 통상적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기술에 대한 실행가능한 대안이다.
- [0142] (iv) 인간화 및 인간 항체
- [0143] 인간화 항체에는 비-인간 공급원으로부터의 1개 이상의 아미노산 잔기가 도입되어 있다. 이러한 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "유입" 잔기라 지칭되고, 전형적으로는 "유입" 가변 도메인으로부터의 것이다. 인간화는 설치류 CDR 또는 CDR 서열을 인간 항체의 상응하는 서열에 대해 치환함으로써 본질적으로 윈터(Winter) 및 동료들의 방법 (문헌 [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)])에 따라 수행될 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 적은 부분이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열에 의해 치환된 키메라 항체 (미국 특허 번호 4,816,567)이다. 실제로, 전형적으로 인간화 항체는 일부 CDR 잔기 및 아마도 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.
- [0144] 인간화 항체의 제조에 사용되는 인간 가변 도메인 경쇄 및 중쇄 둘 다의 선택은 항원성 감소에 매우 중요하다. 소위 "최적 맞춤" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인 서열을 공지의 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 서열이 인간화 항체를 위한 인간 FR로서 수용된다 (문헌 [Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993)]). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정한 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정한 프레임워크를 이용한다. 여러 상이한 인간화 항체에 대해 동일한 프레임워크를 사용할 수 있다 (문헌 [Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)]).
- [0145] 또한, 항체가 항원에 대해 높은 친화도를 보유하고 다른 유리한 생물학적 특성을 보유하도록 인간화하는 것이 중요하다. 이 목표를 달성하기 위해서, 바람직한 방법에 따라, 인간화 항체는 모 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하는 모 서열 및 다양한 개념적 인간화 산물의 분석 과정에 의해 제조된다. 3차원 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 이용가능하고, 당업자에게 익숙하다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3차원 입체형태적 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이러한 디스플레이를 조사하면 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능에 있어서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 이뮤노글로불린이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석이 가능하다. 이러한 방식으로, FR 잔기는 수용자 서열 및 유입 서열로부터 선택 및 조합되어 바람직한 항체 특징, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 친화도 증가를 달성할 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기가 항원 결합에 영향을 미치는데 직접적으로, 및 가장 실질적으로 연관된다.
- [0146] 대안적으로, 면역화시에 내인성 이뮤노글로불린 생산의 부재 하에 인간 항체의 전체 래퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)을 생산하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 배선 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역 (JH) 유전자를 동형접합 결실시키면 내인성 항체의 생산이 완전히 억제된다는 것이 기재되어 있다. 인간 배선 이뮤노글로불린 유전자 어레이를 이같은 배선 돌연변이 마우스에게 전달하면, 항원 접종시에 인간 항체가 생산될 것이다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Brugermann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); 및 Duchosal et al. *Nature* 355:258 (1992)]을 참조한다. 파지-디스플레이 라이브러리로부터 인간 항체가 또한 유래될 수 있다 (문헌 [Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Vaughan et al. *Nature Biotech* 14:309 (1996)]).
- [0147] (v) 항체 단편
- [0148] 항체 단편 생산을 위한 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이를 단편은 무손상 항체의 단백질분해적 소화를 통해 유래되었다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) 및 Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 현재 이러한 단편들이 재조합 속주 세포에 의해 직접적으로 생산될 수 있다. 예를 들어, 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 항체 단편이 단리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편은 이 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어

$F(ab')_2$ 단편을 형성할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]). 또 다른 접근법에 따라, $F(ab')_2$ 단편은 재조합 속주 세포 배양물로부터 직접 단리될 수 있다. 단일 쇄 Fv 단편 (scFv)은 또 한 단리될 수 있다. WO 93/16185를 참조한다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술이 당업자에게 명백할 것이다.

[0149] (vi) 다중특이적 항체

[0150] 다중특이적 항체는 2종 이상의 상이한 항원에 대한 결합 특이성을 갖는다. 이러한 분자는 통상적으로 오직 2종의 항원과 결합할 것이지만 (즉, 이중특이적 항체, BsAb), 추가의 특이성을 갖는 항체, 예컨대 삼중특이적 항체가 본원에 사용되는 경우에는 이러한 표현에 포함된다.

[0151] 이중특이적 항체의 제조 방법이 당업계에 공지되어 있다. 전장 이중특이적 항체의 통상적인 생산은 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공동 발현을 기초로 하며, 여기서 2개의 쇄는 상이한 특이성을 갖는다 (문헌 [Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)]). 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류로 인해, 이들 하이브리도마 (쿼드로마)는 10종의 상이한 항체 분자들의 잠재적인 혼합물을 생성하며, 이 중에서 오직 1종만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는다. 일반적으로 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 이루어지는 올바른 분자의 정체는 다소 번거롭고, 산물 수율이 낮다. 유사한 절차가 WO 93/08829, 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

[0152] WO96/27011에 기재된 또 다른 접근법에 따라, 항체 분자의 쌍 사이의 인터페이스를 조작하여 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이종이량체의 백분율을 최대화할 수 있다. 바람직한 인터페이스는 항체 불변 도메인의 C_H3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 인터페이스로부터의 1개 이상의 작은 아미노산 측쇄가 더 큰 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 아미노산 측쇄 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 큰 측쇄(들)에 대한 동일하거나 유사한 크기의 보상 "공동"이 제2 항체 분자의 인터페이스 상에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 바람직하지 않은 최종-산물에 비해 이종이량체의 수율을 증가시키는 메카니즘을 제공한다.

[0153] 이중특이적 항체는 가교된 또는 "이중접합체" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이중접합체 내의 항체 중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 하나는 비오틴에 커플링될 수 있다. 이러한 항체는 예를 들어 면역계 세포의 원치 않는 세포로의 표적화 (미국 특허 번호 4,676,980) 및 HIV 감염의 치료 (WO 91/00360, WO 92/200373, 및 EP 03089)를 위해 제안된 바 있다. 임의의 편리한 가교 방법을 이용하여 이중접합체 항체를 제조할 수 있다. 적합한 가교제가 당업계에 널리 공지되어 있고, 수많은 가교 기술과 함께 미국 특허 번호 4,676,980에 개시되어 있다.

[0154] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성시키는 기술이 또한 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 화학적 연결을 이용하여 이중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)]은 무손상 항체를 단백질분해적으로 절단하여 $F(ab')_2$ 단편을 생성하는 절차를 기재한다. 이러한 단편을 디티올 착화제인 아비산나트륨의 존재 하에 환원시켜, 인접한 디티올을 안정화시키고 분자간 디술피드 형성을 방지한다. 이어서, 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 이어서, Fab'-TNB 유도체 중 하나를 메르캅토에틸아민으로의 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환시키고 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합하여 이중특이적 항체를 형성시킨다. 생산된 이중특이적 항체를 효소의 선택적 고정화를 위한 작용제로서 사용할 수 있다.

[0155] 최근의 진보는 이중특이적 항체를 형성하도록 화학적으로 커플링될 수 있는, 이. 콜라이로부터의 Fab'-SH 단편의 직접 회수를 용이하게 하였다. 문헌 [Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)]은 완전 인간화 이중특이적 항체 $F(ab')_2$ 분자의 생산을 기재한다. 각각의 Fab' 단편을 이. 콜라이로부터 개별적으로 분비시키고, 이중특이적 항체를 형성하도록 시험관내 지시된 화학적 커플링 반응을 실시하였다. 이와 같이 형성된 이중특이적 항체는 ErbB2 수용체를 과다발현하는 세포 및 정상 인간 T 세포에 결합할 수 있을 뿐만 아니라, 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 촉발할 수도 있었다.

[0156] 재조합 세포 배양물로부터 직접적으로 이중특이적 항체 단편을 제조 및 단리하기 위한 다양한 기술이 또한 기재되었다. 예를 들어, 류신 지퍼를 사용하여 이중특이적 항체가 생산되었다. 문헌 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드가 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 유전자 융합에 의해 연결되었다. 항체 동종이량체가 헌지 영역에서 환원되어 단량체가 형성된 후

에 재산화되어 항체 이종이량체가 형성되었다. 이러한 방법은 항체 동종이량체의 생산에 또한 이용될 수 있다. 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편의 제조를 위한 대안적인 메카니즘을 제공한다. 상기 단편은 동일 쇄 상의 2개의 도메인 사이의 쌍 형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함한다. 따라서, 한 단편의 V_H 및 V_L 도메인이 또 다른 단편의 상보적인 V_L 및 V_H 도메인과 쌍을 이루게 되어, 2개의 항원-결합 부위가 형성된다. 단일-쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 또 다른 전략이 또한 보고되었다. 문헌 [Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)]을 참조한다. 대안적으로, 항체가 문헌 [Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)]에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 간략하게, 이러한 항체는 항원 결합 영역의 쌍을 형성하는 일렬의 Fd 절편 ($V_H-C_H1-V_H$ 및 V_L)의 쌍을 포함한다. 선형 항체는 이중특이적 또는 단일특이적일 수 있다.

[0157] 2 초과의 원자가를 갖는 항체가 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)].

이뮤노어드헤신

[0159] 가장 단순하고 가장 간단한 이뮤노어드헤신 설계는 어드헤신의 결합 도메인(들) (예를 들어, 수용체의 세포외 도메인 (ECD))을 이뮤노글로불린 중쇄의 헌지 및 Fc 영역과 조합시키는 것이다. 통상적으로, 본 발명의 이뮤노어드헤신을 제조할 때, 어드헤신의 결합 도메인을 코딩하는 핵산이 C-말단에서 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열의 N-말단을 코딩하는 핵산에 융합될 것이지만, N-말단 융합도 또한 가능하다.

[0160] 전형적으로, 이러한 융합에서 코딩된 키메라 폴리펩티드는 이뮤노글로불린 중쇄의 불변 영역의 적어도 기능적 활성 헌지, C_H2 및 C_H3 도메인을 보유할 것이다. 융합은 또한 불변 도메인의 Fc 부분의 C-말단에, 또는 중쇄의 C_H1 또는 경쇄의 상응하는 영역에 대해 바로 N-말단에서 이루어진다. 융합이 이루어지는 정확한 부위는 중요하지 않다; 특정한 부위들이 널리 공지되어 있고, 이뮤노어드헤신의 생물학적 활성, 분비 또는 결합 특징을 최적화하기 위해 선택될 수 있다.

[0161] 일부 실시양태에서, 어드헤신 서열은 이뮤노글로불린 G₁ (Ig G₁)의 Fc 도메인의 N-말단에 융합된다. 전체 중쇄 불변 영역을 어드헤신 서열에 융합시키는 것이 가능하다. 그러나, 바람직하게는, IgG Fc를 화학적으로 제한하는 파파인 절단 부위 (즉, 중쇄 불변 영역의 첫번째 잔기를 114로 간주했을 때 잔기 216), 또는 다른 이뮤노글로불린의 유사한 부위의 바로 상류의 헌지 영역에서 시작되는 서열이 융합에 사용된다. 일부 실시양태에서, 어드헤신 아미노산 서열은 IgG 중쇄의 (a) 헌지 영역 및 또는 C_H2 및 C_H3 또는 (b) C_H1 , 헌지, C_H2 및 C_H3 도메인에 융합된다.

[0162] 이중특이적 이뮤노어드헤신의 경우, 이뮤노어드헤신은 다량체로서, 특히 이종이량체 또는 이종사량체로서 어셈블리된다. 일반적으로, 이러한 어셈블리된 이뮤노글로불린은 공지된 단위 구조를 가질 것이다. 기본적인 4쇄 구조 단위는 IgG, IgD 및 IgE가 존재하는 형태이다. 보다 높은 분자량의 이뮤노글로불린에서는 4쇄 단위가 반복되고, IgM은 일반적으로 디슬퍼드 결합에 의해 함께 유지되는 4개의 기본 단위의 오량체로서 존재한다. IgA 글로불린, 및 때때로 IgG 글로불린은 혈청 내에서 다량체 형태로 존재할 수도 있다. 다량체의 경우, 각각의 4개 단위는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0163] 본원의 범위 내에 속하는 다양한 예시적인 어셈블리된 이뮤노어드헤신을 하기 개략적으로 다이어그램화한다:

[0164] (a) AC_L-AC_L ;

[0165] (b) $AC_H-(AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H,$ 또는 $V_LC_L-AC_H)$;

[0166] (c) $AC_L-AC_H-(AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H,$ 또는 $V_LC_L-V_HC_H)$;

[0167] (d) $AC_L-V_HC_H-(AC_H,$ 또는 $AC_L-V_HC_H,$ 또는 $V_LC_L-AC_H)$;

[0168] (e) $V_LC_L-AC_H-(AC_L-V_HC_H,$ 또는 $V_LC_L-AC_H)$; 및

[0169] (f) $(A-Y)_n-(V_LC_L-V_HC_H)_2$,

- [0170] 여기서, 각각의 A는 동일하거나 상이한 어드헤신 아미노산 서열을 나타내고,
- [0171] V_L 은 이뮤노글로불린 경쇄 가변 도메인이고;
- [0172] V_H 는 이뮤노글로불린 중쇄 가변 도메인이고;
- [0173] C_L 은 이뮤노글로불린 경쇄 불변 도메인이고;
- [0174] C_H 는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인이고;
- [0175] n은 1 초과의 정수이고;
- [0176] Y는 공유 가교체의 잔기를 나타낸다.
- [0177] 간결하게 나타내기 위해, 상기 구조는 주요 특징만을 제시하고, 이뮤노글로불린의 연결 (J) 또는 다른 도메인은 나타내지 않았으며, 디슬피드 결합도 제시되지 않았다. 그러나, 이러한 도메인이 결합 활성에 필요한 경우, 이들은 이뮤노글로불린 분자 내에서 차지하는 통상적인 위치 내에 존재하도록 구축될 것이다.
- [0178] 대안적으로, 키메라 중쇄를 포함하는 이뮤노글로불린이 수득되도록 어드헤신 서열이 이뮤노글로불린 중쇄 서열과 경쇄 서열 사이에 삽입될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 힌지 및 C_H2 도메인 사이 또는 C_H2 및 C_H3 도메인 사이에서 이뮤노글로불린의 각 아암 내의 이뮤노글로불린 중쇄의 3' 말단에 어드헤신 서열이 융합된다. 유사한 구축물이 문헌 [Hoogenboom, et al., Mol. Immunol. 28:1027-1037 (1991)]에서 보고되었다.
- [0179] 이뮤노글로불린 경쇄의 존재가 본 발명의 이뮤노어드헤신에 필요하지는 않지만, 이뮤노글로불린 경쇄가 어드헤신-이뮤노글로불린 중쇄 융합 폴리펩티드에 공유 회합되거나 어드헤신에 직접 융합되어 존재할 수 있다. 전자의 경우, 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA는 어드헤신-이뮤노글로불린 중쇄 융합 단백질을 코딩하는 DNA와 전형적으로 공발현된다. 분비시에, 하이브리드 중쇄 및 경쇄가 공유 회합되어 2개의 디슬피드-연결 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍을 포함하는 이뮤노글로불린-유사 구조가 제공될 것이다. 이러한 구조의 제조에 적합한 방법은 예를 들어 1989년 3월 28일에 허여된 미국 특허 번호 4,816,567에 개시되어 있다.
- [0180] 가장 편리하게는, 이뮤노어드헤신은 어드헤신 부분을 코딩하는 cDNA 서열을 이뮤노글로불린 cDNA 서열에 인-프레임으로 융합시켜 구축된다. 그러나, 계놈 이뮤노글로불린 단편에 대한 융합이 또한 사용될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Aruffo et al., Cell 61:1303-1313 (1990); 및 Stamenkovic et al., Cell 66:1133-1144 (1991)] 참조). 후자 유형의 융합에는 발현을 위한 Ig 조절 서열의 존재가 필요하다. 혼성화 또는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 기술에 의해 비장 또는 말초 혈액 림프구로부터 유래된 cDNA 라이브리리로부터의 공개된 서열에 기초하여 IgG 중쇄 불변 영역을 코딩하는 cDNA를 단리할 수 있다. 이뮤노어드헤신의 "어드헤신" 및 이뮤노글로불린 부분을 코딩하는 cDNA는 선택된 숙주 세포에서 효율적인 발현을 지시하는 플라스미드 벡터 내로 일렬로 삽입된다.
- [0181] 폴리펩티드의 발현
- [0182] 본원에 기재된 방법을 이용하여 생산될 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)는 일반적으로 재조합 기술을 이용하여 생산된다.
- [0183] 본원 벡터에서 siRNA를 클로닝 또는 발현시키는데 적합한 숙주 세포는 원핵생물, 효소 또는 고등 진핵 세포이다. 이러한 목적에 적합한 원핵생물은 유박테리움, 예컨대 그램-음성 또는 그램-양성 유기체, 예를 들어 엔테로박테리아세아에(Enterobacteriaceae), 예컨대 에스케리키아(Escherichia), 예를 들어 이. 콜라이, 엔테로박터(Enterobacter), 에르위니아(Erwinia), 클레브시엘라(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 살모넬라(Salmonella), 예를 들어 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아(Serratia), 예를 들어 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*) 및 시겔라(Shigella), 뿐만 아니라 바실루스, 예컨대 비. 서브틸리스(*B. subtilis*) 및 비. 리케니포르미스(*B. licheniformis*) (예를 들어, 1989년 4월 12일에 공개된 DD 266,710에 개시된 비. 리케니포르미스 41P), 슈도모나스(Pseudomonas), 예컨대 피. 애루기노사(*P. aeruginosa*) 및 스트렙토미세스(Streptomyces)를 포함한다. 이러한 예는 제한적이기보다는 예시적이다.
- [0184] 원핵생물 뿐만 아니라, 진핵 미생물, 예컨대 사상 진균 또는 효모는 폴리펩티드 코딩 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 하등 진핵 숙주 미생물 중에서 사카로미세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 또는 통상적인 빵 효모가 가장 흔하게 사용된다. 그러나, 다수의 다른 속, 종, 및 군주가 본원에서 통상적으로 이용가능하며 유용한데, 예컨대 스키조사카로미세스 품베(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로미세스 숙주,

예컨대 예를 들어 케이. 락티스(*K. lactis*), 케이. 프라길리스(*K. fragilis*)(ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스(*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045), 케이. 위케라미이(*K. wickeramii*)(ATCC 24,178), 케이. 왈티이(*K. waltii*)(ATCC 56,500), 케이. 드로소필라룸(*K. drosophilae*)(ATCC 36,906), 케이. 써모톨레란스(*K. thermotolerans*), 및 케이. 마르시아누스(*K. marxianus*); 야로위아(*yarrowia*)(EP 402,226); 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)(EP 183,070); 칸디다(*Candida*); 트리코더마 레에시아(*Trichoderma reesia*)(EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*); 슈와니오미세스(*Schwanniomyces*), 예컨대 슈와니오미세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*); 및 사상 진균, 예컨대 예를 들어 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*), 및 아스페르길루스(*Aspergillus*) 숙주, 예컨대 에이. 니둘란스(*A. nidulans*) 및 에이. 니거(*A. niger*)가 있다.

[0185]

글리코실화 폴리펩티드의 발현에 적합한 배양된 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) (모충), 아에데스 아에집티(*Aedes aegypti*) (모기), 아에데스 알보픽투스(*Aedes albopictus*) (모기), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*) (과실파리), 및 봄빅스 모리(*Bombyx mori*)와 같은 숙주로부터의 수많은 바이러스 균주, 예를 들어, 아우토그라파 칼리포르니카(*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주가 공개적으로 이용가능하고, 이러한 바이러스들은, 특히 스포도프테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위해, 본 발명에 따라 본원에서 바이러스로 사용될 수 있다. 목화, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토 및 담배의 식물 세포 배양물이 또한 숙주로서 사용될 수 있다.

[0186]

그러나, 척추동물 세포가 가장 흥미롭고, 배양물 (조직 배양물)에서의 척추동물 세포의 증식은 통상적인 절차가 되어 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포 (COS-7, ATCC CRL 1651), 인간 배아 신장 세포 (293 세포 또는 혼탁 배양으로 성장시키기 위해 서브클로닝된 293 세포, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]), 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10), 차이니즈 햄스터 난소 세포/DHFR (CHO, 문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]), 마우스 세르톨리 세포 (TM4, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]), 원숭이 신장 세포 (CV1, ATCC CCL 70), 아프리카 뉴색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587), 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2), 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34), 베팔로 래트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442), 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75), 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065), 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51), TRI 세포 (문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]), MRC 5 세포, FS4 세포, 및 인간 간세포암 세포 (Hep G 2)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0187]

숙주 세포를 상기 기재된 폴리펩티드 생산을 위한 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 바람직한 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형시킨 통상적인 영양 배지에서 배양한다.

[0188]

본 발명의 방법에 사용되는 폴리펩티드를 생산하는데 사용되는 숙주 세포는 다양한 배지 중에서 배양될 수 있다. 상업적으로 입수가능한 배지, 예컨대 햄 F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 ((MEM), (시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 둘베코 변형 이글 배지 ((DMEM), (시그마), 또는 갑코(GIBCO)[®] 둘베코 변형 이글 배지: 영양소 혼합물 F-12 (인비트로젠(Invitrogen))가 숙주 세포의 배양에 적합하다. 또한, 문헌 [Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)], 미국 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 번호 Re. 30,985에 기재된 배지 중 임의의 것을 숙주 세포용 배양 배지로 사용할 수 있다. 다른 한정 또는 합성 성장 배지가 또한 사용될 수 있으며, 특정 유형의 숙주 세포의 성장에 적절한 배지는 문자 및 세포 생물학 분야의 당업자에 의해 공지되어 있다. 임의의 이러한 배지에 필요하다면 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대, 인슐린, 트랜스페린, 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제 (예컨대, HEPES), 뉴클레오티드 (예컨대, 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대, 젠타마이신 (GENTAMYCIN)TM, 히그로마이신), 미량 원소 (마이크로몰 범위의 최종 농도로 통상적으로 존재하는 무기 화합물로 정의됨), 및 글루코스 또는 등가의 에너지원이 보충될 수 있다. 또한, 임의의 다른 필요한 보충물을 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함시킬 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 이용된 것이고, 당업자에게 명백할 것이다.

[0189]

표준 세포 배양 조건이 세포 배양에 이용될 수 있다. 세포는 적절한 온도, 기체 혼합물 및 pH (예컨대, 약 20

℃ 내지 약 37℃, 약 6% 내지 약 84% CO₂, 및 약 5 내지 약 9의 pH)에서 성장 및 유지시킨다. 일부 실시양태에서, 세포는 처음 48시간 동안 37℃에서 적절한 세포 배지에서 성장시키고, 다음 12일 동안 33℃로 옮긴다. 반응은 숙주 세포의 요구사항에 기초하여 호기성 또는 혐기성 조건 하에 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 배치, 페드-배치 또는 연속 공정을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 임의의 공지된 발효 방식을 이용하여 성장시킨다.

[0190] 재조합 기술을 이용하는 경우, 폴리펩티드는 세포 내에서 또는 주변세포질 공간 내에서 생산될 수 있거나, 또는 배지로 직접 분비될 수 있다. 폴리펩티드가 세포내에서 생산되면, 제1 단계로서 숙주 세포든 용해된 세포든 입자형 잔해물 (예를 들어, 균질화로부터 생성된 것)을 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거한다. 폴리펩티드가 배지로 분비되는 경우, 일반적으로는 우선 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 상업적으로 입수 가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 장치를 이용하여 농축시킨다.

[0191] 키트

[0192] 본 발명은 또한 조성을 및 본 발명의 방법의 설명을 포함하는 사용 지침서를 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 배양된 세포, siRNA, 표적 서열, 형질감염 작용제, 본 발명의 방법에 대한 지침서 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0193] 하기 실시예는 본 발명을 비제한적으로 설명하기 위해 제공된다.

[0194] <실시예>

[0195] 본원에 기재된 실시예 및 실시양태는 단지 예시적 목적을 위한 것이며, 이러한 관점에서 다양한 변형 또는 변화가 당업자에게 제시될 것이고, 이는 본 출원의 취지 및 범위 내에 포함됨을 이해한다.

[0196] 실시예 1: PDHK1, PDHK2, PDHK3 및 LDHa의 녹다운은 락테이트 생산을 감소시키고, 항체 역가/생산성을 증가시킨다

[0197] 물질 및 방법

[0198] LDHa/PDHK1, 2, 3을 표적화하는 벡터의 구축

[0199] LDHa에 대한 표적화 서열을 문헌 [Kim and Lee et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 74(1):152-159 (2007)]에 이전에 기재된 바와 같이 선택하였고, LDHa siRNA 서열은 CTCGATTCCGTTATCTGAT (서열 1)이다. PDHK에 대한 siRNA-표적화 서열을 설계하기 위해, CHO PDHK1, 2 및 3에 대한 부분 cDNA 서열을 PDHK의 고도로 보존된 영역 내에 위치하는 프라이머를 사용하는 폴리머라제 연쇄 반응의 역전사 (RT-PCR)에 의해 클로닝하였다. 부분적으로 클로닝된 서열을 문헌 [Elbashier et al. (Methods 26:199-213 (2002))]에 기재된 방법에 따라 siRNA 서열 설계에 사용하였다.

PDHK1 표적화 (siRNA) 서열 : GCAGTTCTGGACTTCGGA (서열 2)

PDHK2 표적화 (siRNA) 서열 : CATTCAAGTACTTCTTGGAC (서열 3)

PDHK3 표적화 (siRNA) 서열 : TGTAGCTGATGTCGTGAAA (서열 4)

[0200] [0201] LDHa 및 PDHK에 대한 표적화 서열을 함유하는 단일 구축물을 p사일렌서 3.1-H1 히그로 벡터 (Cat#. AM5766, 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems)/암비온(Ambion), 텍사스주 오스틴)를 사용하여 구축하였다. LDHa siRNA를 그의 바로 5' 말단에 p사일렌서 2.1로부터의 U6 프로모터를 첨가하면서 p사일렌서 3.1의 KasI 부위에 삽입하였다. PDHK1에 대한 siRNA 서열 및 2개의 siRNA를 각각 BamHI/HindIII 및 HindIII 부위에 삽입하였다. BgIII 부위를 PDHK2 siRNA의 3' 측면에 도입하고, PDHK3 siRNA의 삽입에 사용하였다. 음성 대조군의 경우, 스크램블링된 siRNA 서열을 함유하는 p사일렌서 3.1 벡터를 사용하였다.

[0202] 세포 배양

[0203] 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR)가 결핍된 CHO 세포를 37℃ 및 5% CO₂에서 진탕 플라스크 용기 중의 독점적 DMEM/F12-기반 배지에서 배양하였다. 세포를 3 내지 4일마다 계대배양하였다.

[0204] 완정한 siRNA 세포주 (siRNA 클론) 개발

[0205] 25 nM 메토트렉세이트 (MTX)에 대해 내성이며 재조합 모노클로날 항체를 발현하는 CHO 세포주를 제조업체의 제안 (인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드)에 따라 리포펙타민 2000 CD (Cat#12566-014, 인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드)를 사용하여 형질감염시켰다. 형질감염된 세포를 원심분리하고, 25 nM MTX 및 400 ug/ml 히그로마이신을 함유하는 DMEM/F-12-기반 선택적 (글리신-, 하이포크산틴- 및 티미딘-무함유) 배지 (Cat # 10687010, 인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드)에 시팅하였다. 재현탁된 세포를 96-웰 플레이트에 플레이팅하여 개별 클론을 생성하였다. siRNA 클론은 LDHa 및 PDHK 유전자에 대한 표적화 서열을 함유하는 siRNA 플라스미드 형질감염으로부터 유래된 한편, 모의 클론은 공지된 유전자에 대한 감지가능한 상동성을 갖지 않는 제조업체에 의해 설계된 스크램블 서열을 함유하는 모의 플라스미드 (Cat# AM5766, 어플라이드 바이오시스템즈/암비온, 텍사스주 오스틴) 형질감염으로부터 유래되었다.

[0206] 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR 또는 택맨) 분석

[0207] 개별 클론으로부터의 전체 RNA를 RNeasy 96 키트 (Cat#74181, 퀴아젠(Qiagen))를 이용하여 단리하고, DNase 소화 (Cat#79254, RNase 무함유 DNase 세트, 퀴아젠)로 처리하여 단리된 RNA 샘플에 존재할 수 있는 잔류 DNA를 제거하였다. 택맨은 제조업체의 지침에 따라 보편적인 qRT-PCR 마스터 믹스 (Cat# 4309169, 어플라이드 바이오시스템즈)를 사용하여 수행하고, PDHK 및 LDHa의 발현 수준을 하우스키핑 유전자 β -마이크로글로불린에 대해 정규화하였다.

[0208] 택맨 분석에 사용된 프라이머 및 프로브 서열은 다음과 같았다:

PDHK1 정방향 프라이머 : GCCCATCTCATCGAAAAACA (서열 5)

PDHK1 역방향 프라이머 : AGCCATCTTAAATGACTTCGACTAC (서열 6)

PDHK1 프로브 : TCGCAGTTGGATTTATGCTCCAATG (서열 7)

PDHK2 정방향 프라이머 : GATCTGTCCATCAAAATGAGTG (서열 8)

PDHK2 역방향 프라이머 : TGTGGAGTACATGTAGCTGAAGAG (서열 9)

PDHK2 프로브 : CTCTCAATCTCCTCAAGGGGACACC (서열 10)

PDHK3 정방향 프라이머 : CAGCCTGGAGCCTACAAGA (서열 11)

PDHK3 역방향 프라이머 : GGCATACAGTCGAGAAATTGG (서열 12)

PDHK3 프로브 : AAGCCATAACCAAATCCAGCCAAGG (서열 13)

LDHa 정방향 프라이머 : GCCGAGAGCATAATGAAGAA (서열 14)

LDHa 역방향 프라이머 : CCATAGAGACCCCTTAATCATGGTA (서열 15)

LDHa 프로브 : CTTAGGCGGGTGCATCCCATT (서열 16)

β -마이크로글로불린 정방향 프라이머 : TCCTCTCAGTGGTCT GCT TGG (서열 17)

β -마이크로글로불린 역방향 프라이머 : TGGCGTGTGTAGACTTGCACCTT (서열 18)

β -마이크로글로불린 프로브 : TGCCATCCAGCGTCCCCCA (서열 19)

[0210] 페드-배치 진탕 플라스크 클론 평가

[0211] 12개의 siRNA 클론 및 12개의 모의 클론을 제3일에 하나의 볼루스를 공급하는 14-일 페드-배치 배양 과정을 이용하여 7.15의 pH를 갖는 독점적 생산 배지로 시팅하고, 온도를 제2일에 37°C로부터 33°C로 이동시켰다. 세포 생존율 및 생존 세포 카운트를 비셀(Vicell) (베크만 쿨터(Beckman Coulter))을 이용하는 트리판 블루 염료 제거에 의해 모니터링하였다. 락테이트 농도를 노바 바이오프로파일(Nova Bioprofile) 분석기 (노바 바이오메디칼(Nova biomedical))를 이용하여 제3, 7, 10 및 14일에 측정하였다. 평균 세포 특이적 락테이트 생산율, q_s 를 통합된 전체 세포 수의 그래프의 기울기로 계산하고, 생산된 누적 락테이트, $[S_t - S_0]$ 는 전체 배양 부피에 대해 작성된 락테이트 질량 균형 방정식에 기초하여 계산하였다:

$$S_t - S_0 = q_s \int_0^t X dt$$

[0212]

[0213] 여기서, S_t 는 시간 t 에서 배양 부피 중 락테이트의 총량 (mg)이고, S_0 은 시간 $t=0$ 에서 배양 부피 중 락테이트 총량 (mg)이고, X 는 임의의 주어진 시간 t 에서 배양 부피 중 세포의 총수이고, q_s 는 특정 락테이트 생산율 (mg/세포/일)이다. 상기 방정식은 $t=0$ 내지 $t=t$ 의 시간 간격에 대해 쓰여지므로, q_s 는 이 시간 간격에 걸친 평균 락테이트 생산율이다. 이러한 작업에서 사용되는 관례 당 세포에 의해 소비되는 것보다 많은 락테이트가 생산된다면 q_s 의 값은 양의 값이다.

[0214] 생물반응기 페드-배치 작동

[0215] 생물반응기 실험을 1.5 L 작업 부피에서 작동하는 2 L 교반 탱크 생물반응기 (어플리콘(Applikon), 캘리포니아주 포스터 시티)에서 수행하였다. 농축된 영양소를 접종 72시간 후에 공급한 다음, 글루코스를 14-일 페드-배치 배양 동안 필요에 따라 첨가하였다. 용존 산소 및 교반은 생물반응기 배양 중에 각각 30%의 공기 포화 및 275 rpm의 설정점에서 유지하였다. 배양물 pH를 CO_2 기체 또는 1 M Na_2CO_3 의 첨가에 의해 7.0에서 제어하였다. 배양 온도를 처음 48시간 동안 37°C에서 유지하고, 그 후에 33°C로 이동시켰다. 각각의 생물반응기에서의 공정 제어는 비. 브라운 바이오테크(B. Braun Biotech) (펜실베니아주 알렌타운)로부터의 디지털 제어 장치를 이용하여 달성하였다.

[0216] 샘플 분석

[0217] 항체 역가를 UV 검출과 통상적인 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 이용하여 결정하였다. 문현 [Fahrner et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 30:121-128 (1999)]을 참조한다. 배양 샘플을 생존 세포 농도 및 생존율에 대해 비셀 AS 세포 카운터 (베크만 쿨터, 캘리포니아주 풀러톤)에 의해 분석하고, pH 및 락테이트에 대해 바이오프로파일 400 생물분석기 (노바 바이오메디칼, 매사추세츠주 월섬)에 의해 분석하고, 오스몰랄농도에 대해 다중-샘플 삼투압계 (어드밴스드 인스트루먼츠(Advanced Instruments), 매사추세츠주 노르우드)에 의해 분석하였다.

[0218] 통계적 분석

[0219] 양측 스튜던트 t -검정을 JMP 소프트웨어를 이용하여 수행하였다.

[0220] 결과

[0221] PDHK 및 LDHa를 표적화하는 siRNA 벡터의 구축

[0222] 문현 [Harris et al. (Adv. Enzyme Regul. 42:249-59 (2002))에 보고된 4종의 PDHK 유전자가 포유동물 세포에 존재한다. 모든 4종의 PDHK 유전자가 CHO 세포에 존재하는지 평가하기 위해, 4개 세트의 RT-PCR 프라이머를 인간 및 마우스 PDHK 서열 사이의 보존된 영역에 기초하여 설계하였다. PCR 결과는 모든 4종의 PDHK mRNA가 CHO 세포에서 검출될 수 있을지라도, DHFR-결핍 (디히드로폴레이트 리덕타제-결핍) CHO 세포에서 PDHK4 mRNA 수준이 가장 낮으며 다른 3개의 PDHK보다 훨씬 더 낮다는 것을 밝혀내었다. 따라서, PDHK1, 2 및 3 유전자의 발현만이 LDHa 유전자와 함께 녹다운되었다. LDHa 및 각 PDHK의 경우, 3개의 siRNA 서열을 설계하고 CHO 세포에서 시험하여 표적 유전자의 가장 우수한 하향-조절을 나타내는 siRNA 서열을 선택하였다. LDHa에 대해 가장 우수한 siRNA 서열을 문현 [Kim and Lee. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74(1):152-9 (2007)]에 의한 발견에 기초하여 선택하였다. LDHa 및 PDHK에 대한 siRNA 서열을 단일 벡터에 구축하였으며, 여기서 LDHa에 대한 siRNA는 U6 프로모터의 제어 하에 있는 반면, 각 PDHK에 대한 siRNA는 H1 프로모터에 의해 구동되었다 (도 1).

[0223] PDHK1, 2, 3, 및 LDHa의 감소된 발현을 나타내는 안정한 클론의 생성

[0224] PDHK 및 LDHa를 표적화하는 siRNA 구축물을 모노클로날 항체를 발현하는 CHO 세포에 형질감염시켜 siRNA 클론으로 지칭되는 개별 클론을 얻었다. 개별 siRNA 클론을 택멘 분석을 이용하여 4종의 유전자, PDHK1, 2, 3 및 LDHa의 mRNA 발현에 대해 검정하였다. 상기 4종의 유전자의 최대 감소된 발현을 나타내는 12개의 siRNA 클론을 추가의 분석을 위해 확인하였다 (도 2). 스크램블 서열을 함유하는 모의 벡터를 또한 동일한 항체 발현 세포에 형질감염시켜 모의 클론으로 지칭되는 개별 클론을 얻었다. 12개의 모의 클론을 대조군으로 무작위적으로 선택하고, 이들의 LDHa 및 PDHK1, 2 및 3 유전자의 mRNA 발현 수준을 또한 택멘에 의해 분석하였다. 평균적으로, 선택된 12개의 siRNA 클론에서 LDHa, PDHK1, 2 및 3에 대한 mRNA 발현 수준은 모의 클론에 비해 각각 90%, 32%, 83% 및 70% 감소하였다 (도 2).

[0225] siRNA 및 모의 클론의 페드-배치 진탕 플라스크 평가

[0226] (a) siRNA 클론에서 관찰된 배양 배지 중 감소된 락테이트 수준 및 보다 높은 pH

락테이트 생산에 대한 LDHa 및 PDHK의 siRNA-매개 하향-조절의 효과를 평가하기 위해, 12개의 siRNA 및 12개의 모의 클론을 14-일, 페드-배치, 및 온도 이동 과정을 이용하여 본 발명자들의 독점 배지에서 진탕 플라스크 용기에서 평가하였다. 실험을 3회 반복하였으며, 유사한 결과가 관찰되었다. 한 세트의 실험으로부터의 결과를 대표로 도면에 제시하였다. 이 결과는 일반적으로 모의 클론에 비해 siRNA 클론이 감소된 락테이트 수준을 갖는다는 것을 보여주었다 (도 3). 제14일까지, siRNA 클론은 모의 클론보다 평균 91% 적은 락테이트를 나타내었다 ($p<0.0001$) (도 3a). 14-일 생산 기간에 걸친 siRNA 클론에서의 보다 낮은 락테이트 수준과 마찬가지로, siRNA 클론에서 평균 락테이트 생산율은 $-0.02 \text{ mg}/10^6 \text{ 개 세포}/\text{일}$ 이었으며, 이는 락테이트 합성 속도가 소비 속도보다 낮다는 것을 시사한다. 대조적으로, 모의 클론에서 평균 락테이트 생산율은 $0.01 \text{ mg}/10^6 \text{ 개 세포}/\text{일}$ 이었으며, 이는 전반적인 락테이트 합성 속도가 소비 속도보다 높다는 것을 나타낸다. siRNA 및 모의 클론 사이의 이러한 락테이트 생산율 차이는 통계적으로 유의하였다 ($p<0.002$) (도 3b). 배지 중 락테이트 수준이 pH에 영향을 미치기 때문에, 제14일까지, 모의 클론에서 평균 pH는 6.54까지 떨어진 반면, siRNA 클론에서 평균 pH는 7.04였다 (도 3c). 모의 클론에서 관찰된 보다 낮은 평균 pH는 보다 높은 평균 락테이트 수준과 일치한다.

[0228] b) siRNA 클론에서 관찰된 증가된 항체 역가 및 비생산성 (Qp)

PDHK 및 LDHa 유전자 발현의 뉴다운이 항체 생산에 영향을 미치는지 조사하기 위해, 페드-배치 진탕 플라스크 실험으로부터 제3, 7, 10 및 14일에 샘플을 수집하여 단백질 A 크로마토그래피에 의해 항체 역가를 측정하였다. 데이터는 평균적으로 siRNA 클론이 모의 클론보다 68% 많은 항체를 생산하고 (도 4a, $p<0.022$), siRNA 클론에서 $\text{pg}/\text{세포}\cdot\text{d}$ 로 측정된 평균 세포-비생산성 (Qp)이 모의 클론보다 75% 높다는 것을 보여주었다 (도 4b, $p<0.006$). 세포 성장을 평가하기 위해, 진탕 플라스크 샘플을 제3, 7, 10 및 14일에 수집하여 생존 세포 카운트 및 생존율을 측정함으로써 통합된 생존 세포 카운트 (IVCC)를 계산하였다. 항체 역가 및 Qp와 대조적으로, 2개의 군 사이에 감지가능한 세포 성장 차이가 관찰되지 않았다 (도 4c). 글리칸 프로파일, 전하 변이체 및 응집 백분율을 포함하는 항체 산물 품질 특성은 siRNA 및 모의 클론 사이에서 대등하였다.

[0230] siRNA 모의 클론의 생물반응기 페드-배치 배양 평가

pH-제어 페드-배치 생물반응기 배양이 대규모 제조를 위한 표준 규모-축소 모델이기 때문에, 2L 생물반응기에서 일부 siRNA 및 모의 클론의 성능을 추가로 조사하였다. 생물반응기 이용가능성 및 실험적 복잡성의 제한이 있어, 12개의 siRNA 및 12개의 모의 클론 (2별)은 실행불가능성으로 인해 실행하지 못하였다. 대사 프로파일이 선택 편향성을 최소화시키는 각각의 군의 평균 성능을 가장 잘 나타내는 2개의 대표적인 siRNA 클론 및 2개의 대표적인 모의 클론을 2L 생물반응기 평가에서 siRNA 및 모의 플라스미드 형질감염에 사용되는 모 세포주와 함께 선택하였다. 세포 배양 샘플을 락테이트, 글루코스, 오스몰랄농도 및 역가 분석을 위해 매일 (제6일 및 제13일 제외) 수집하였다. siRNA 클론에서 락테이트 수준은 일반적으로 일정하게 유지되는 반면 모의 및 모 클론에서 락테이트 수준은 14-일 생산 기간 동안 계속 증가하였다. 제14일에, 2개의 siRNA 클론은 평균적으로 배지 중에서 모의 클론 또는 모 클론보다 86% 낮은 락테이트 수준을 가졌다 (도 5a), 모의 클론 및 모 세포주보다 낮은 특정 락테이트 생산율을 가졌다 (도 5b). 유사하게, siRNA 클론에서 오스몰랄농도는 대략 300 mOsm에서 유지되는 반면, 모의 클론 또는 모 클론에서 오스몰랄농도는 14-일 생산 기간 동안 계속 증가하였다. 제14일에, 2개의 siRNA 클론에서 평균 오스몰랄농도는 모의 및 모 클론보다 60% 낮았다 (도 5c). 중요하게, 제14일에, siRNA 클론은 평균적으로 모의 클론보다 125% 많은 항체를 생산하였다 (도 6). 페드-배치 진탕 플라스크 평가에서 관찰된 바와 같이, siRNA 및 모의 클론은 2L 생물반응기에서 대등한 생존율 및 세포 성장을 갖는다.

[0232] 논의

이전 연구는 LDHa 유전자 발현의 단독 하향-조절이 락테이트 생산을 감소시킬 수 있다는 것을 입증하였다. 문헌 [Kim and Lee, Appl. Microbiol. Biotechnol. 74(1):152-9 (2007)]. 그러나, 이들의 연구에서 락테이트 수준의 45-79% 감소에도 불구하고, Qp 및 산물 역가는 유의하게 개선되지 않았으며, 이는 CHO 세포에서 LDHa 단독 뉴다운이 Qp 및 생산물 수율을 효율적으로 개선시키기에 충분하지 않다는 것을 시사한다. 또한, CHO 세포에서 PDHK1, 2 및 3의 동시 하향-조절은 락테이트 수준을 감소시키는데 충분하지 않을 뿐만 아니라 항체 생산성을 증가시키는데 충분하지 않다. 세포가 락테이트를 생성하는 유일한 방식이 피루베이트 환원을 통하고, 피루베이트는 LDH에 의해 락테이트로 전환될 뿐만 아니라 PDH에 의해 아세틸-CoA로 전환되어 TCA 사이클에 진입한 다음 산화될 수 있기 때문에, LDHa 발현의 뉴다운에 의한 락테이트 생산의 감소 및 PDHK의 뉴다운에 의한 피루베이트의 TCA 사이클로의 촉진은 락테이트 수준을 감소시키고 보다 많은 에너지 및 아마도 대사 중간체를 갖는 세포를 제

공하는데 상승작용 효과를 나타낼 수 있으며 이는 항체 생산 증가로 이어진다.

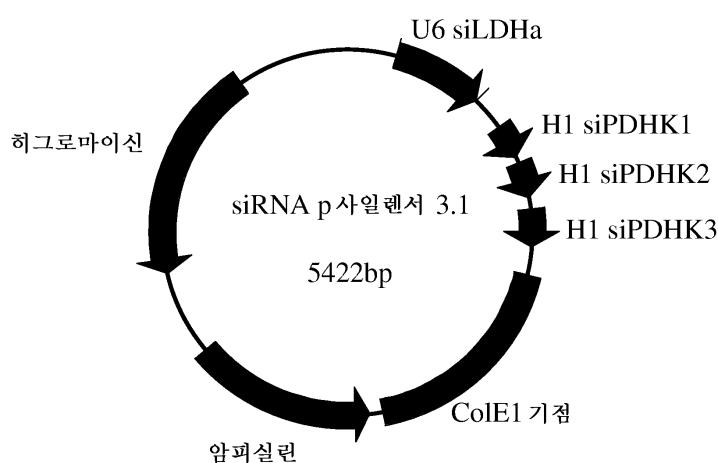
[0234] 시험된 모든 클론에서 LDHa, PDHK2 및 PDHK3의 발현이 실질적으로 감소되었고, PDHK1의 발현은 중간 정도로 감소되었다. PDHK1 발현의 중간 정도의 감소는 아마도 중간 정도의 감소가 시험된 3개의 PDHK1 siRNA 서열에서 관찰되었으므로 비-최적 siRNA 표적화 서열 때문일 것이다. 모의 및 siRNA 클론에서 락테이트 생산 및 항체 생산에 대한 변화가 관찰되었으며, 이는 각각의 클론이 LDHa 및 PDHK의 상이한 발현 수준을 가졌기 때문이다. 그럼에도 불구하고, 제14일까지, siRNA 군에서의 평균 락테이트 수준은 모의 군보다 낮았으며, 이는 페드-배치 진탕 플라스크 배양에서 siRNA 클론보다 낮은 모의 클론의 평균 pH로 이어진다. 보다 중요하게, 보다 낮은 특정 락테이트 생산율 뿐만 아니라, siRNA 클론의 평균 역가 및 Qp는 모의 클론에 비해 각각 68% 및 75% 증가하였으며, 이 때 siRNA 및 모의 클론 사이에 세포 성장 및 산물 품질의 주목할만한 차이는 없었다. 흥미롭게도, 제14일 역가 대 제14일 락테이트 수준에서, 모의 클론 사이에 역가와 락테이트 수준 사이의 우수한 반대 관계가 있었으나, siRNA 클론 사이에는 없었다. 모의 클론 사이에 역가 및 락테이트 수준의 관찰된 차이는 아마도 세포 주가 단일 클론으로부터 유래되었을지라도 모 클론의 항체 생산성 및 세포 대사가 불균질하기 때문일 것이다. 총 12개의 모의 클론을 클론 변이를 고려하기 위해 평가하였다. 데이터는 LDHa 및 PDHK의 녹다운이 CHO 세포에서 동시에 락테이트 수준을 감소시키고 항체 생산을 개선시킨다는 것을 나타낸다. 따라서, 강건하고 생산적인 항체 생산 과정의 개발을 위해, LDHa 및 PDHK 둘 다의 동시 하향 조절은 효율적인 접근법을 제공한다.

[0235] 2L 생물반응기 (2벌)에서의 2개의 모의 및 2개의 siRNA 클론의 성능을 추가로 조사하였다. 페드-배치 진탕 플라스크 평가에 기초하여 각각의 군에서 평균 생산성을 가장 잘 나타내는 4개의 클론을 선택하였다. 진탕 플라스크 실험으로부터의 관찰과 유사하게, siRNA 클론은 2L 생물반응기 평가에서 모의 클론보다 낮은 락테이트 수준 및 높은 역가를 가졌다. 페드-배치 2L 생물반응기에서 pH가 제어되면, 모의 클론에서 더 높은 락테이트 수준은 설정점 pH를 유지하기 위해 더 많은 알칼리 첨가를 필요로 하기 때문에 모의 배양물이 siRNA 배양물보다 증가된 오스몰랄농도를 나타내었다.

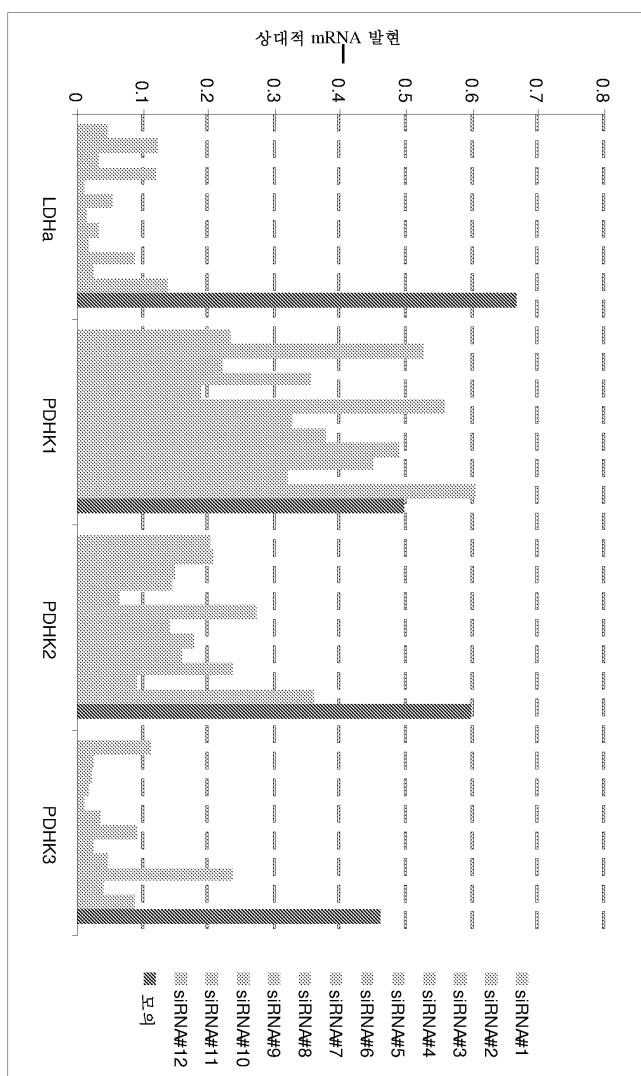
[0236] 요약하여, 페드-배치 진탕 플라스크 및 2L 생물반응기 평가로부터의 데이터는 CHO 세포에서 LDHa, PDHK1, 2 및 3의 동시 녹다운이 세포 성장 및 산물 품질에 영향을 주지 않으면서 락테이트 수준을 감소시키고 항체 역가를 증가시키는데 효과적임을 입증하였다.

도면

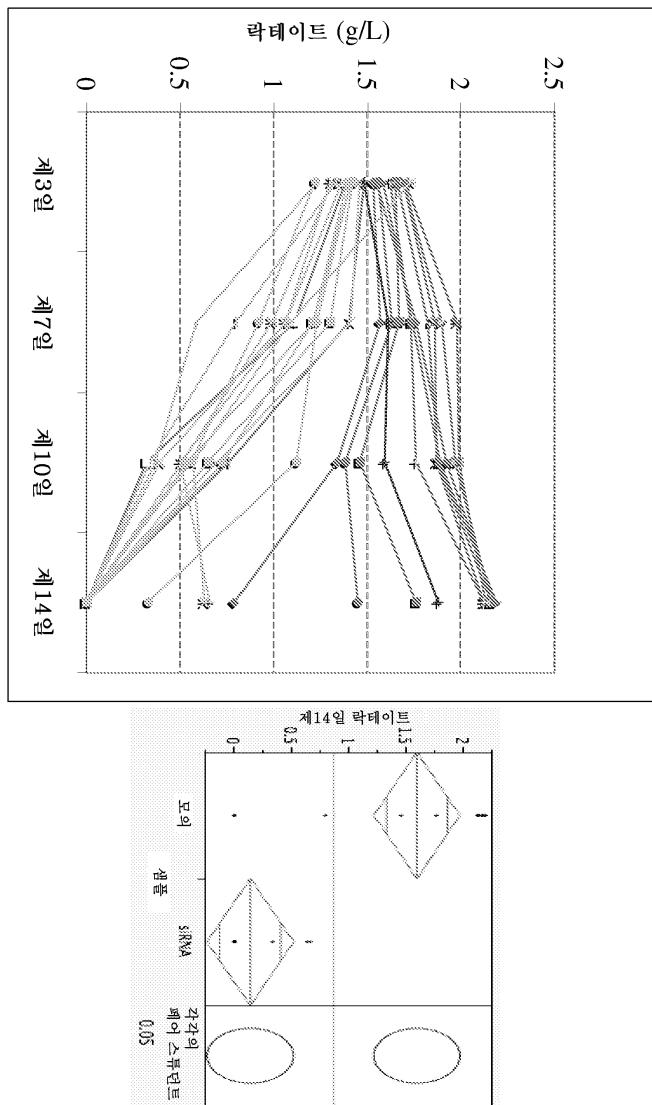
도면1



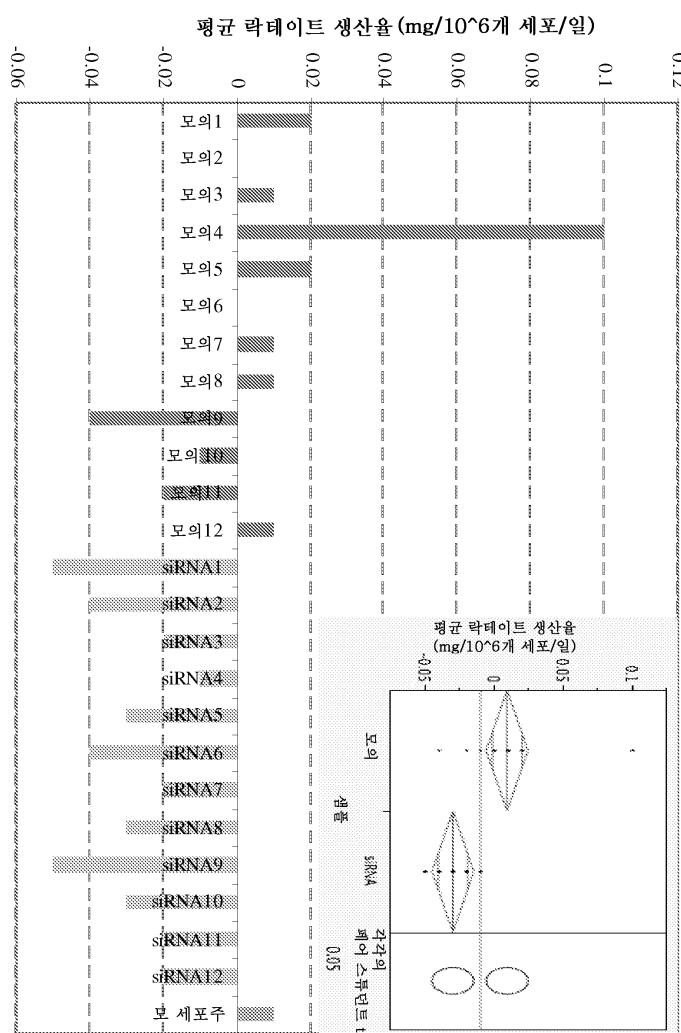
도면2



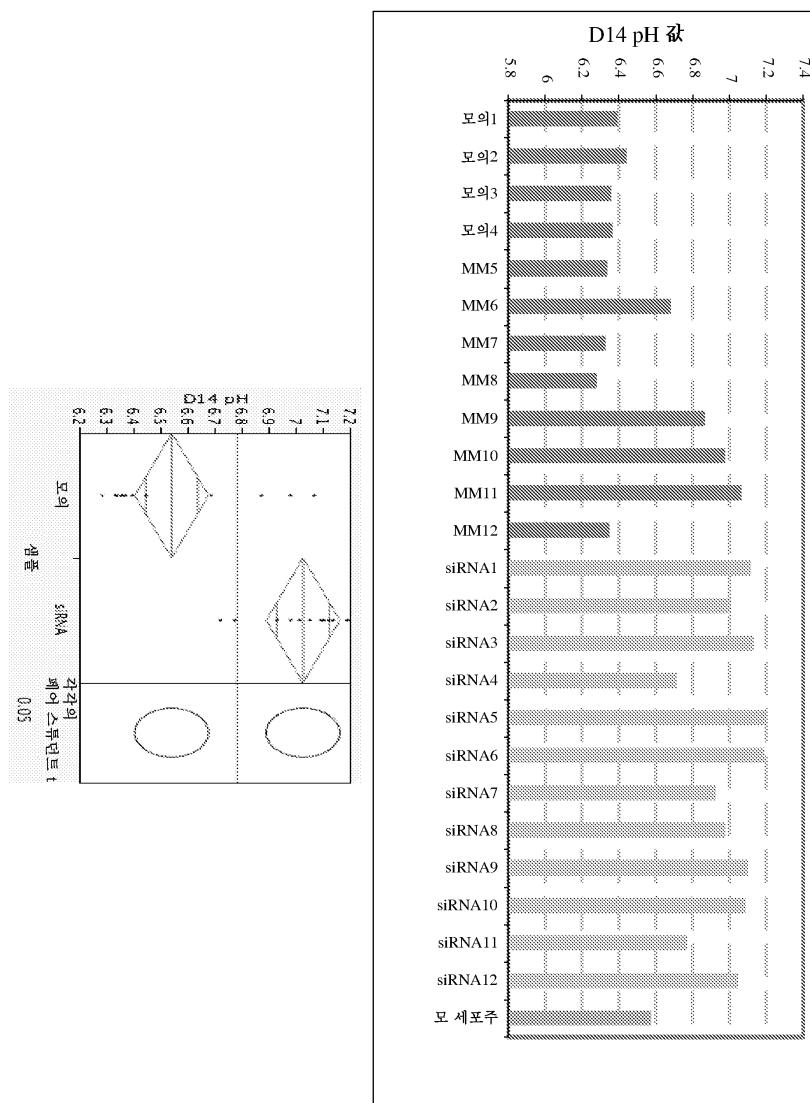
도면3a



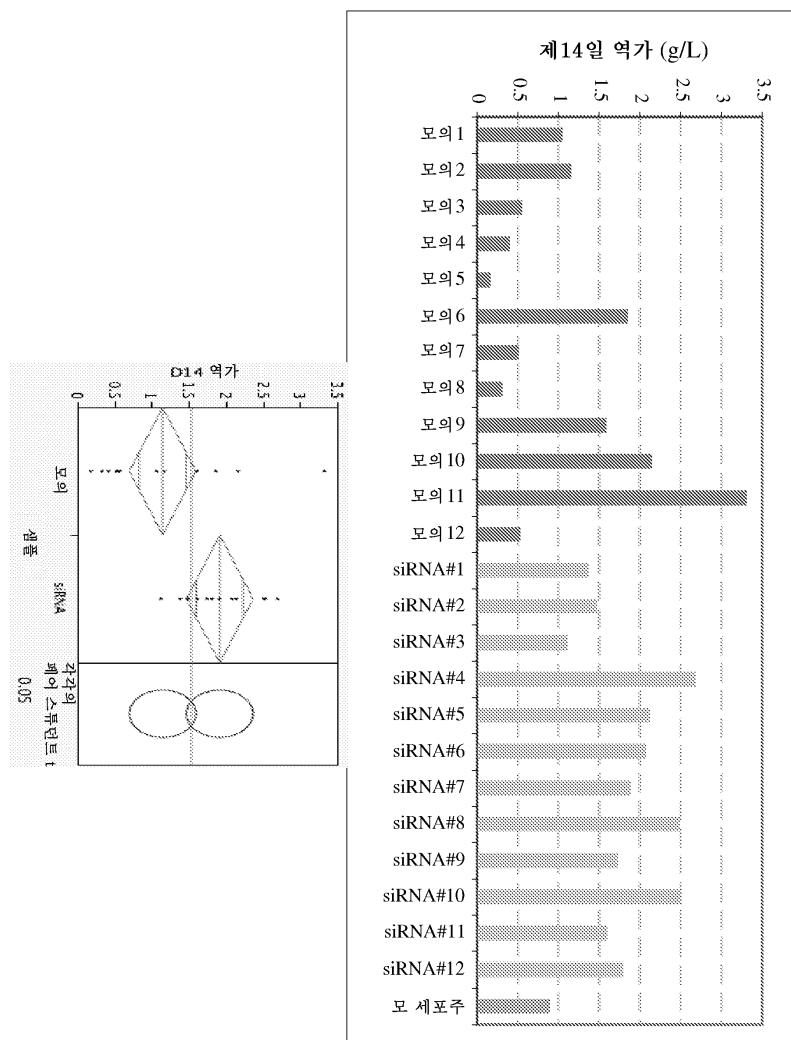
도면3b



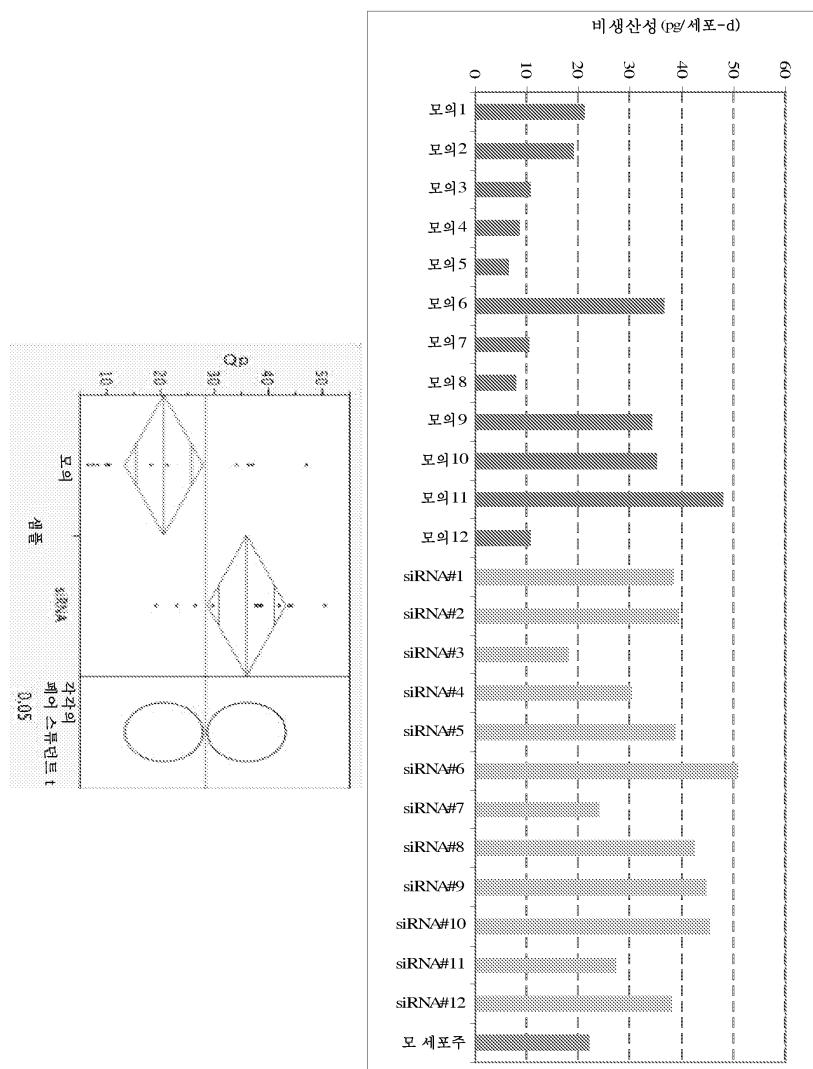
도면3c



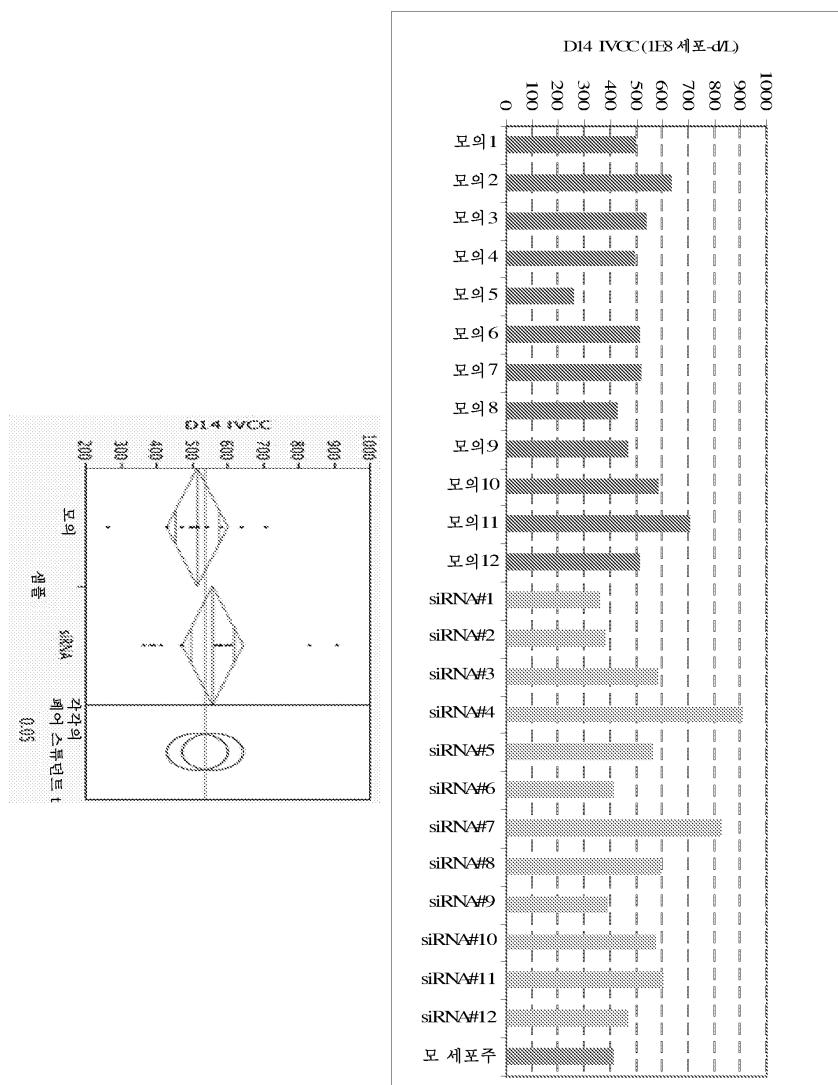
도면4a



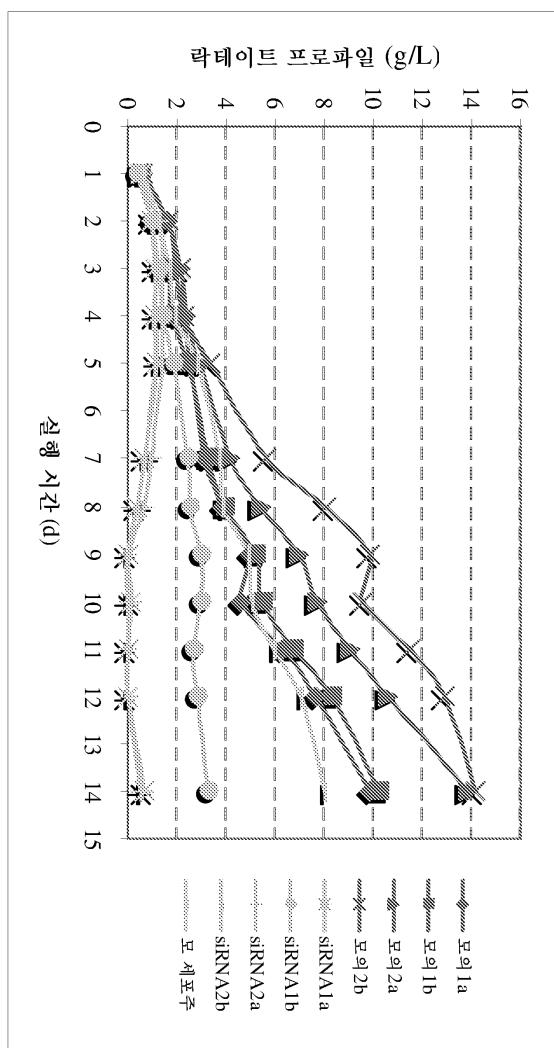
도면4b



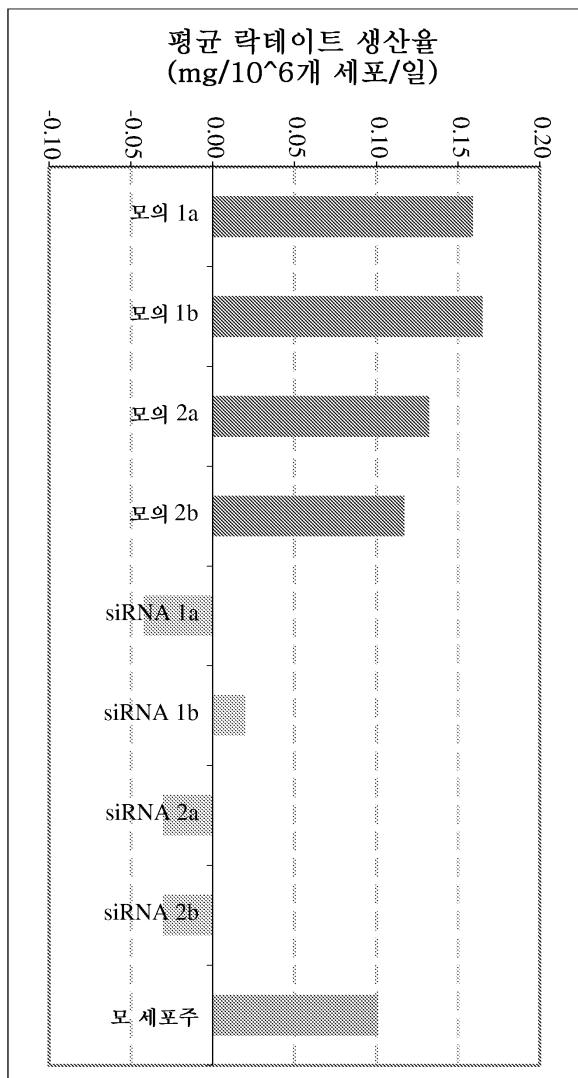
도면4c



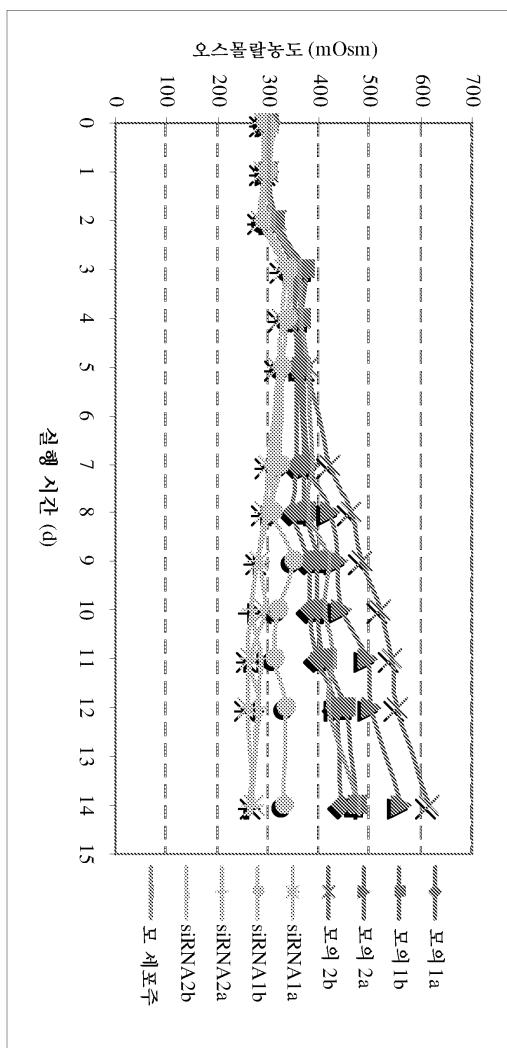
도면5a



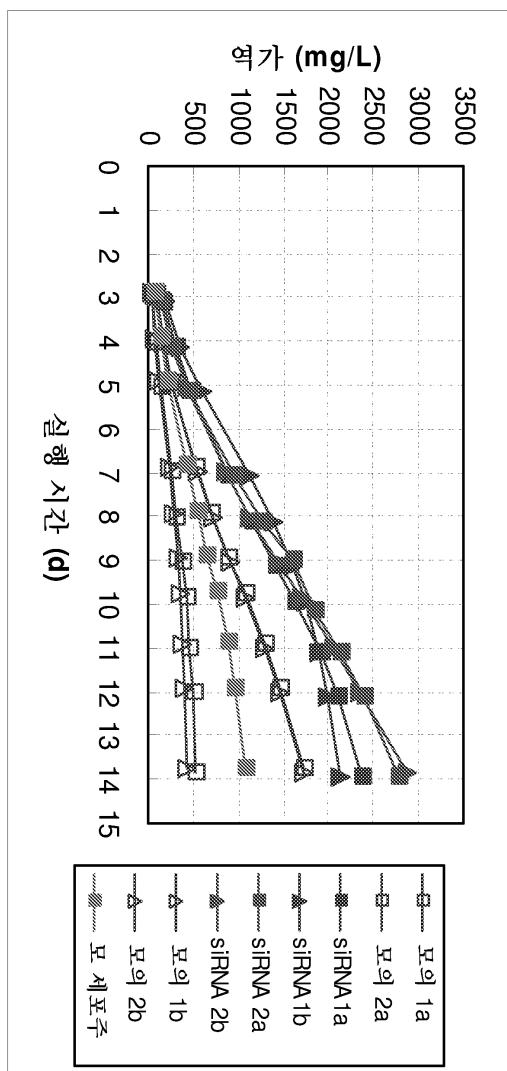
도면5b



도면5c



도면6



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC.

F. HOFFMAN-LA ROCHE AG

ZHOU, Meixia

SNEDECOR, Bradely Richard

NG, Chi Kin Domingos

SHEN, Amy

<120> DECREASING LACTATE LEVEL AND INCREASING

POLYPEPTIDE PRODUCTION BY DOWNREGULATING THE EXPRESSION OF
LACTATE DEHYDROGENASE AND PYRUVATE DEHYDROGENASE KINASE

<130> 146392007840

<140> PCT/US2011/038191
 <141> 2011-05-26
 <150> US 61/349,727
 <151> 2010-05-28
 <160> 19
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 1

ctcgattccg ttatctgat

19

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 2

gcagttcctg gacttcgga

19

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 3

cattcagtagtac ttcttggac

19

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 4

tgtagctgat gtcgtgaaa 19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 5

gcccatctca tcgaaaaca 19

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 6

agccatctt aatgacttcg actac 25

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 7

tcgcagttt gatttatgct tccaatg 27

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 8

gatctgtcca tcaaaatgag tga 23

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 9

tgtggagtagt ac atgttagctga aga 23

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 10

ctctcaatct tcctcaaggg gacacc 26

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 11

cagcctggag cctacaaga 19

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 12

ggcatacagt cgagaaattg g	21
<210> 13	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Construct	
<400> 13	
aagccataac caaatccagc caagg	25
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Construct	
<400> 14	
gccgagagca taatgaagaa	20
<210> 15	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Construct	
<400> 15	
ccatagagac ccttaatcat ggtt	24
<210> 16	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Construct	
<400> 16	
cttaggcggg tgcatccat tt	22

<210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct
 <400> 17

tcctctcagt ggtctgcttg g 21

<210> 18
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Construct
 <400> 18

tggcgtgtgt agacttgcac tt 22

<210> 19
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Construct
 <400> 19

tgcctatccag cgtccccca 19

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 16

【변경전】

배양된 세포가 약 300 mOsm 미만의

【변경후】

배양된 세포가 300 mOsm 미만의