



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0083564
(43) 공개일자 2020년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/14 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 1/14 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7015833
(22) 출원일자(국제) 2018년11월05일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년06월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/059213
(87) 국제공개번호 WO 2019/094333
국제공개일자 2019년05월16일
(30) 우선권주장
62/585,397 2017년11월13일 미국(US)

(71) 출원인
암젠 인크
미국 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크, 원
암젠 센터 드라이브
(72) 발명자
크라우스 엘리야후
미국, 메사추세츠 01590, 서튼, 27 베노니 드라이브
(74) 대리인
특허법인한얼

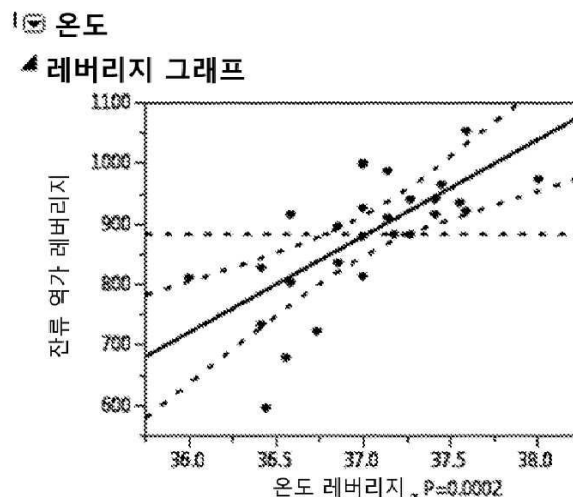
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 단백질 산물을 제조하는 방법

(57) 요약

본 발명은 최종 제조 바이오리액터 공정에 선행하는 바이오리액터 공정의 온도를 조작하거나 제어함으로써 제조 바이오리액터 공정에서 재조합적으로 제조되는 단백질 및 폴리펩타이드의 수율을 개선하고 품질을 보존하는 방법에 관한 것이다. 특정 구현예에서 본 발명은 이러한 방법뿐만 아니라 이러한 방법을 사용하여 제조되는 재조합 단백질 및 폴리펩타이드, 이의 제형물, 그리고 이러한 단백질, 폴리펩타이드, 및 제형물을 사용하여 환자를 치료하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 19/02 (2018.01)

C07K 14/4703 (2013.01)

C12M 41/12 (2013.01)

C12N 15/85 (2013.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

N 제조 바이오리액터를 운전하기 전에 37℃ 내지 38℃의 온도에서 N-1 관류 바이오리액터를 운전하는 단계를 포함하는, 제조합 CHO 세포로부터 에타너셉트를 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 N-1 관류 바이오리액터가 37.5℃의 온도에서 운전되는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 N-1 관류 바이오리액터 및 상기 N 제조 바이오리액터가 상이한 바이오리액터 용기에서 운전되는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 N-1 관류 바이오리액터 및 상기 N 제조 바이오리액터가 동일한 바이오리액터 용기에서 운전되는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 방법이 N-1 관류 바이오리액터가 37℃ 미만의 온도에서 운전되는 것을 제외하고 동일한 에타너셉트를 제조하는 방법의 N 제조 바이오리액터 역가보다 높은 N 제조 바이오리액터 역가를 생성하는 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 방법이 N-1 관류 바이오리액터가 37.5℃ 미만의 온도에서 운전되는 것을 제외하고 동일한 에타너셉트를 제조하는 방법의 N 제조 바이오리액터 역가보다 높은 N 제조 바이오리액터 역가를 생성하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 N 제조 바이오리액터에 의해 제조되는 총 단백질이 N-1 관류 바이오리액터가 37℃ 미만의 온도에서 운전되는 것을 제외하고 동일한 에타너셉트를 제조하는 방법의 N 제조 바이오리액터에 의해 제조되는 총 단백질보다 많은 방법.

청구항 8

제2항에 있어서, 상기 N 제조 바이오리액터에 의해 제조되는 총 단백질이 N-1 관류 바이오리액터가 37.5℃ 미만의 온도에서 운전되는 것을 제외하고 동일한 에타너셉트를 제조하는 방법의 N 제조 바이오리액터에 의해 제조되는 총 단백질보다 많은 방법.

청구항 9

제1항의 방법을 사용하여 제조되는 에타너셉트를 포함하는, 에타너셉트 제형물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 제형물이 50 mg/ml의 상기 에타너셉트, 1% 수크로스(w/v), 100 mM 나트륨 클로라이드, 25 mM 나트륨 포스페이트, 25 mM L-아르기닌, 및 물로 구성되는 제형물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 제형물이 25 mg의 상기 에타너셉트, 40 mg 만니톨, 10 mg 수크로스, 및 1.2 mg 트로메타민의 동결건조 분말로 구성되는 제형물.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 제형물이 50 mg/ml의 상기 에타너셉트, 1% 수크로스(w/v), 120 mM 나트륨 클로라이드, 25 mM L-아르기닌, 및 물로 구성되는 제형물.

청구항 13

제10항 또는 제12항에 있어서, 1 ml의 상기 제형물이 프리필드 주사기 또는 SURECLICK® 자동주사장치에 있는 제형물.

청구항 14

제10항 또는 제12항에 있어서, 0.51 ml의 상기 제형물이 프리필드 주사기 또는 SURECLICK® 자동주사장치에 있는 제형물.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 동결건조 분말이 다회용 바이알에 있는 제형물.

청구항 16

치료를 필요로 하는 환자를 치료하는 방법으로서, 제1항의 방법을 사용하여 제조되는 유효 용량의 에타너셉트를 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 17

제10항에 있어서, 상기 환자가 류마티스 관절염, 다관절 소아 특발성 관절염, 건선 관절염, 강직성 척추염, 또는 플라크 건선을 갖는 방법.

청구항 18

제9항 내지 제15항 중 어느 한 항의 제형물 및 상기 제형물의 사용 지침을 포함하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은 2017년 11월 13일자로 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/585,397의 이익을 청구하며, 이는 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0003]

기술분야

[0004]

본 발명은 일반적으로 바이오리액터에서의 재조합 단백질의 제조에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

치료 단백질의 임상적 제조는, 고비용이 드는 대규모 시도이다. 세포 배양 공정 전체에 걸친 세포 성장 및 생존력의 유지가 매우 중요하다. 더 많은 양의 치료적 재조합 단백질에 대한 수요가 증가함에 따라, 세포 개발, 배지 최적화 및 공정 제어 파라미터를 개선하고, 수확 및 정제 공정을 증대시킬 새로운 방법을 구현함으로써 단백질 제조, 세포 성장 및 생존력의 긍정적인 증가가 추구하고 있다.

[0006]

약학적 치료제로서 사용하기 위한 재조합 폴리펩타이드의 제조는 전형적으로 제조 바이오리액터의 접종을 위해 충분한 세포 물질을 생성하도록 설계된 일련의 스케일-업 및 증식 단계로 구성되는 원료 의약품 세포 배양 공정을 이용한다. 세포 배양 공정은 작업 세포 은행(WCB)으로부터의 바이알을 해동하고, 예를 들어, 일련의 진탕 플라스크, 배양 백 및/또는 증식 씨드 바이오리액터(예컨대, N-3, N-2 바이오리액터로서, 여기서 숫자는 바이오리액터가 N 최종(또는 제조) 바이오리액터로부터 얼마나 많은 단계 앞에 있는지를 시사함) 등의 사용에 의한 배양의 증식 등에 의해 개시된다. 씨드 배양 바이오리액터에서의 성장에 이어, 배양은 N-1 바이오리액터로 전달되며, 이는 예를 들어 관류 바이오리액터일 수 있다. N-1 관류 바이오리액터에서, 최종 배양 단계인 제조

바이오리액터(N)의 접종에 충분한 세포 밀도를 생성하기 위해 배양은 신선 배지로 관류된다. 제조 바이오리액터는 제조합 폴리펩타이드의 효율적인 제조를 최대화하도록 작동한다.

[0007] 제조합 폴리펩타이드의 효율적인 제조를 최대화하기 위한 현재까지의 대부분의 시도에는 N 제조 바이오리액터 운전의 조작이 관여되었다. N(제조) 바이오리액터 온도 및 역가 간 상관관계가 에타너셉트 및 다른 산물에 대해 실증되었다. N 바이오리액터 온도가 최적화되는 경우 증가된 역가의 원인은 비생산성(specific productivity) (예컨대, 단백질 pg/세포/일로 측정되는, 경시적으로 세포에 의해 제조되는 단백질의 양)의 증가뿐만 아니라 세포 성장의 증가 모두에 기인한다. 유사하게, 역가 및 각각의 N 바이오리액터 pH, 초기 생존 세포 밀도(iVCD) 및 기간 파라미터 간의 상관관계가 나타났다. iVCD 및 기간의 최적화에 의해 유도되는 역가 증가는 세포 물질의 증가 또는 유지에 기인하는 경향이 있지만, pH로 인한 역가 증가는 증가된 세포 물질 및/또는 증가된 비생산성에 기인할 수 있다.

[0008] 그러나, 현재까지 N-1 바이오리액터 파라미터 및 N 바이오리액터 역가 간의 직접적 상관관계는 나타나지 않았다.

[0009] ENBREL®(에타너셉트; Immunex Inc., Thousand Oaks, CA)은 유전적으로 조작된 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포에서 제조된 제조합 인간 종양 괴사 인자 수용체(TNFR):Fc 융합 단백질의 공유 이량체화 형태이다.

발명의 내용

[0010] 본 출원은, N-1 관류 바이오리액터 운전 온도가, 후속 N 제조 바이오리액터를 접종하기 위해 사용되는 세포의 역가와 독립적인 방식으로 N 제조 바이오리액터의 생산성을 증가시키기 위해 제어되거나 조작될 수 있다는 예상치 못한 관찰을 최초로 보고한다. 따라서, 본 발명은 선행하는 N-1 관류 바이오리액터 운전 온도를 조작하거나 제어함으로써 제조합 폴리펩타이드의 N 제조 바이오리액터 운전 역가를 개선하는 방법 및 장치를 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한 본원에 기재되는 바와 같이 조작되거나 제어되는 온도로 N-1 관류 바이오리액터에 후속하는 N 제조 바이오리액터 운전으로 생성되는 조성물을 제공한다. 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 제조 기법에 따라 제조되는 에타너셉트 산물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 N-1 바이오리액터 온도 및 N 바이오리액터 잔류 역가 수준 간 상관관계를 실증하는 그래프를 제공한다.

도 2은 N-1 바이오리액터 배양 기간 및 N 바이오리액터 잔류 역가 수준 간 상관관계를 실증하는 그래프를 제공한다.

도 3은 N-1 바이오리액터 pH 및 N 바이오리액터 잔류 역가 수준 간 상관관계를 실증하는 그래프를 제공한다.

도 4은 N-1 바이오리액터 iVCD 및 N 바이오리액터 잔류 역가 수준 간 상관관계를 실증하는 그래프를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은, 최초로 본원에서 개시된 바와 같이, N-1 관류 바이오리액터가 운전되는 온도를 제어함으로써 제조합 폴리펩타이드의 N 제조 바이오리액터 역가가 증가될 수 있다는 신규하고 예상치 못한 실증에 부분적으로 기반한다.

[0014] 본 출원에서 사용되는 용어는 당분야에서의 표준 용어이지만, 소정 용어의 정의가 또한 청구범위의 의미에 대한 명확성과 정의를 확실히 하기 위해 본원에서 제공된다. 단위, 접두사, 및 기호는 이의 SI 승인 형태로 표시될 수 있다. 본원에서 인용되는 수치 범위는 범위를 정의하는 수치를 포함하며 정의된 범위 내의 각 정수를 뒷받침한다. 달리 주지되지 않는 한, 단수형의 용어는 "적어도 하나"의 의미로서 해석되어야 한다. 본원에서 사용되는 섹션 제목은 단지 체계화 목적을 위한 것이고 기재되는 주제를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 본원에서 기재되는 방법 및 기법은 일반적으로 당분야에 잘 알려져 있는 통상적 방법에 따라, 그리고 달리 나타내지 않는 한, 본 명세서에 걸쳐 인용되고 논의되는 다양한 일반적인 참고문헌 및 더 구체적인 참고문헌에 기재된 바와 같이 수행된다. 예컨대, 문헌[Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992); 및 Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)]을 참고한다. 특히, 특허 출원, 기사, 도서, 및 논문을 포함하되 이에 제한되지 않는, 본 출원에서 인용되는 모든 문헌, 또는 문헌의 일부

가 본원에 참조로 명시적으로 포함된다.

[0015] 본원에서 사용되는 "펩타이드", "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 본원 전체에서 상호 교환적으로 사용되며 펩타이드 결합에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 분자를 나타낸다. 펩타이드, 폴리펩타이드 및 단백질은 비제한적으로 글리코실화, 지질 부착, 황산화, 글루탐산 잔기의 감마-카복실화, 하이드록실화 및 ADP-리보실화를 포함하는 개질을 또한 포함한다. 폴리펩타이드는 단백질-기반 약물을 포함하는, 과학적 또는 상업적 관심 대상일 수 있다. 폴리펩타이드에는 특히 항체, 융합 단백질, 및 사이토카인이 포함된다. 펩타이드, 폴리펩타이드 및 단백질은 세포 배양 방법을 사용하여 재조합 동물 세포주에 의해 제조되며 "재조합 펩타이드", "재조합 폴리펩타이드" 및 "재조합 단백질"로 언급될 수 있다. 발현되는 단백질(들)은 이들이 회수되고/되거나 수집될 수 있는 배양 배지 내로 분비되거나 세포내 제조될 수 있다.

[0016] 본 발명의 방법으로 제조될 수 있는 폴리펩타이드의 예에는 하기 단백질 중 하나의 전체 또는 일부와 동일하거나 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 포함하는 단백질이 포함된다: 종양 괴사 인자(TNF), flt3 리간드(WO 94/28391), 에리트로포이에틴, 트롬보포이에틴, 칼시토닌, IL-2, 안지오프로피에틴-2(Maisonpierre et al. (1997), Science 277 (5322): 55-60), NF- κ B의 수용체 활성화제에 대한 리간드(RANKL, WO 01/36637), 종양 괴사 인자(TNF)-관련 아포토시스-유도 리간드(TRAIL, WO 97/01633), 가슴샘 간질-유래 림포포이에틴, 과립구 콜로니 자극 인자, 과립구-대식구 콜로니 자극 인자(GM-CSF, 호주 특허 번호 588819), 비만 세포 성장 인자, 줄기 세포 성장 인자(미국 특허 번호 6,204,363), 표피 성장 인자, 각질세포 성장 인자, 거핵구 성장 및 발생 인자, RANTES, 인간 피브리노겐-유사 2 단백질(FGL2; NCBI 접근 번호 NM-00682; R $\ddot{u}$ egg and Pytela (1995), Gene 160:257-62) 성장 호르몬, 인슐린, 인슐리노트로핀, 인슐린-유사 성장 인자, 부갑상샘 호르몬, α -인터페론, γ -인터페론, 및 공통 인터페론을 포함하는 인터페론(미국 특허 번호 4,695,623 및 4,897,471), 신경 성장 인자, 뇌-유래 신경영양 인자, 시냅토타그민-유사 단백질(SLP 1-5), 뉴로트로핀-3, 글루카곤, 인터류킨, 콜로니 자극 인자, 림프독소- β , 백혈병 억제 인자, 및 온코스타틴-M. 본 발명의 방법에 따라 제조될 수 있는 단백질의 설명은, 예를 들어 문헌[Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research, 전체(Aggarwal and Guterman, eds. Blackwell Sciences, Cambridge, Mass., 1998); Growth Factors: A Practical Approach (McKay and Leigh, eds., Oxford University Press Inc., New York, 1993); 및 The Cytokine Handbook, Vols. 1 and 2 (Thompson and Lotze eds., Academic Press, San Diego, Calif., 2003)]에서 확인할 수 있다.

[0017] 또한 본 발명의 방법은 임의의 상기 언급된 단백질에 대한 수용체, 이러한 수용체 또는 임의의 상기 언급된 단백질에 대한 길항제, 및/또는 이러한 수용체 또는 길항제와 실질적으로 유사한 단백질의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 단백질을 제조하는 데 유용할 것이다. 이들 수용체 및 길항제에는 종양 괴사 인자 수용체의 두 형태(TNFR, p55 및 p75로 언급됨, 미국 특허 번호 5,395,760; 및 미국 특허 번호 5,610,279), 인터류킨-1(IL-1) 수용체(I형 및 II형; EP 특허 번호 0460846, 미국 특허 08/4,968,607; 및 미국 특허 번호 5,767,064), IL-1 수용체 길항제(미국 특허 번호 6,337,072), IL-1 길항제 또는 억제제(미국 특허 번호 5,981,713, 6,096,728, 및 5,075,222) IL-2 수용체, IL-4 수용체(EP 특허 번호 0 367 566 및 미국 특허 번호 5,856,296), IL-15 수용체, IL-17 수용체, IL-18 수용체, Fc 수용체, 과립구-대식구 콜로니 자극 인자 수용체, 과립구 콜로니 자극 인자 수용체, 온코스타틴-M 및 백혈병 억제 인자에 대한 수용체, NF- κ B의 수용체 활성화제(RANK, WO 01/36637 및 미국 특허 번호 6,271,349), 오스테오프로테게린(미국 특허 번호 6,015,938), TRAIL에 대한 수용체(TRAIL 수용체 1, 2, 3, 및 4 포함), 및 사멸 도메인을 포함하는 수용체, 예컨대 Fas 또는 아포토시스-유도 수용체(AIR)가 포함된다.

[0018] 본 발명을 사용하여 제조될 수 있는 다른 단백질에는 분화 항원(CD 단백질로 언급됨) 또는 이의 리간드 또는 이들 중 어느 하나와 실질적으로 유사한 단백질의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 단백질이 포함된다. 이러한 항원은 문헌[백혈구 유형분석 VI(Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani et al., eds., Kobe, Japan, 1996)]에 개시되어 있다. 유사한 CD 단백질이 후속 워크샵에서 개시된 바 있다. 이러한 항원의 예에는 CD22, CD27, CD30, CD39, CD40, 및 이의 리간드(CD27 리간드, CD30 리간드, 등)가 포함된다. 몇몇 CD 항원은 TNF 수용체 패밀리의 구성원이며, 여기에는 41BB 및 OX40이 또한 포함된다. 리간드는 종종 41BB 리간드 및 OX40 리간드와 마찬가지로, TNF 패밀리의 구성원이다.

[0019] 효소 활성 단백질 또는 이의 리간드가 또한 본 발명을 사용하여 제조될 수 있다. 예에는 하기 단백질 또는 이의 리간드 또는 이들 중 하나와 실질적으로 유사한 단백질 중 하나의 전부 또는 일부를 포함하는 단백질이 포함된다: TNF-알파 전환 효소를 포함하는 디스인테그린 및 메탈로프로티나제 도메인 패밀리의 구성원, 다양한 키나제, 글루코세레브로시다제, 수퍼옥사이드 디스무타제, 조직 플라스미노겐 활성화제, 인자 VIII, 인자 IX, 아포리프

단백질 E, 아포리포단백질 A-I, 글로빈, IL-2 길항제, 알파-1 안티트립신, 임의의 상기-언급된 효소에 대한 리간드, 및 수많은 다른 효소 및 이의 리간드.

[0020] 용어 "항체"에는 달리 명시되지 않는 한, 인간, 인간화, 키메라, 다중-특이적, 모노클로날, 폴리클로날, 및 이의 올리고머 또는 항원 결합 단편을 포함하는, 임의의 이소형 또는 서브클래스의 글리코실화 및 비-글리코실화 면역글로불린 모두 또는 특이적 결합에 대해 온전한 항체와 경쟁하는 이의 항원-결합 영역에 대한 언급이 포함된다. 또한 항원 결합 단편 또는 영역을 갖는 단백질, 예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 디아바디, Fd, dAb, 맥시바디, 단일쇄 항체 분자, 상보성 결정 영역(CDR) 단편, scFv, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 및 표적 폴리펩타이드에 특이적 항원 결합을 부여하기 충분한 면역글로불린의 적어도 일부를 함유하는 폴리펩타이드가 포함된다. 용어 "항체"는 비제한적으로 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나, 단리되는 것들, 예컨대 항체를 발현하기 위해 전달감염된 숙주 세포로부터 단리된 항체가 포함된다.

[0021] 항체의 예에는 비제한적으로 상기 언급된 단백질 및/또는 하기 항원을 포함하는 단백질 중 임의의 하나 또는 조합을 인식하는 것들이 포함된다: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80(B7.1), CD86(B7.2), CD147, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-7, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-2 수용체, IL-4 수용체, IL-6 수용체, IL-13 수용체, IL-18 수용체, 서브유닛, FGL2, PDGF- β 및 이의 유사체(미국 특허 번호 5,272,064 및 5,149,792 참고), VEGF, TGF, TGF- β 2, TGF- β 1, EGF 수용체(미국 특허 번호 6,235,883 참고) VEGF 수용체, 간세포 성장 인자, 오스테오포테게린 리간드, 인터페론 감마, B 림프구 자극인자(BAFF, THANK, TALL-1, 및 zTNF4로도 알려진, BlyS; 문헌[Do and Chen-Kiang (2002), Cytokine Growth Factor Rev. 13(1): 19-25] 참고), C5 보체, IgE, 종양 항원 CA125, 종양 항원 MUC1, PEM 항원, LCG(폐암과 연관되어 발현되는 유전자 산물임), HER-2, HER-3, 종양-연관 당단백질 TAG-72, SK-1 항원, 결장암 및/또는 췌장암 환자의 혈청에서 상승된 수준으로 존재하는 종양-연관 에피토프, 유방암, 결장암, 편평상피세포암, 전립샘암, 췌장암, 폐암, 및/또는 신장암 세포 및/또는 흑색종, 교종, 또는 신경모세포종 세포, 종양의 괴사 코어 상에서 발현되는 암-연관 에피토프 또는 단백질, 인테그린 알파 4 베타 7, 인테그린 VLA-4, B2 인테그린, TRAIL 수용체 1, 2, 3, 및 4, RANK, RANK 리간드, TNF- α , 부착 분자 VAP-1, 상피 세포 부착 분자(EpCAM), 세포내 부착 분자-3(ICAM-3), 류코인테그린 어드헤신, 혈소판 당단백질 gp IIb/IIIa, 심장 미오신 중쇄, 부갑상샘 호르몬, rNAPc2(인자 VIIa-조직 인자의 억제제임), MHC I, 암배아 항원(CEA), 알파-태아단백질(AFP), 종양 괴사 인자(TNF), CTLA-4(세포독성 T 림프구-연관 항원임), Fc- γ -1 수용체, HLA-DR 10 베타, HLA-DR 항원, 스클레로스틴, L-셀렉틴, 호흡기 세포융합 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), B형 간염 바이러스(HBV), 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*), 및 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*). 본 발명의 방법을 사용하여 제조될 수 있는 알려진 항체의 구체예에는 비제한적으로 아달리무맙, 베바시주맙, 인플릭시맙, 엠식시맙, 알렘투주맙, 바피뉴주맙, 바실릭시맙, 벨리무맙, 브리아키누맙, 카나키누맙, 세르톨리주맙 페골, 세톡시맙, 코나투무맙, 데노수맙, 에쿨리주맙, 켄투주맙 오조가미신, 골리무맙, 이브리투모맙 티옥세탄, 라베투주맙, 마파투무맙, 마투주맙, 메폴리주맙, 모타비주맙, 무로모넵-CD3, 나탈리주맙, 니모투주맙, 오파투무맙, 오말리주맙, 오레고보맙, 팔리비주맙, 파니투무맙, 팜투모맙, 페르투주맙, 라니비주맙, 리톡시맙, 로벨리주맙, 토실리주맙, 토시투모맙, 트라스투주맙, 우스테키누맙, 베돌리조맙, 잘루투무맙, 및 자노리무맙이 포함된다.

[0022] 본 발명은 또한, 예를 들어, 임의의 상기 언급된 단백질을 포함하는 재조합 융합 단백질을 제조하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 하나의 상기 언급된 단백질 및 다량체화 도메인, 예컨대 류신 지퍼, 코일드 코일, 면역글로불린의 Fc 부분, 또는 실질적으로 유사한 단백질을 포함하는 재조합 융합 단백질이 본 발명의 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예컨대 W094/10308; 문헌[Lovejoy et al. (1993), Science 259:1288-1293; Harbury et al. (1993), Science 262:1401-05; Harbury et al. (1994), Nature 371:80-83; Hekansson et al. (1999), Structure 7:255-64]을 참고한다. 이러한 재조합 융합 단백질 중에서, 수용체의 일부가 항체의 Fc 부분에 융합되는 단백질, 예컨대 에타너셉트(p75 TNFR:Fc), 및 벨라타셉트(CTLA4:Fc)가 구체적으로 포함된다.

[0023] 본 발명의 목적을 위해, 세포 배양 배지는 시험관내 세포 배양에서 동물 세포, 예컨대 포유류 세포의 성장에 적합한 배지이다. 세포 배양 배지 제형물은 당분야에 잘 알려져 있다. 전형적으로, 세포 배양 배지는 완충제, 염, 탄수화물, 아미노산, 비타민 및 미량 필수 원소로 이루어진다. 세포 배양 배지는 혈청, 펩톤, 및/또는 단백질을 함유할 수도 함유하지 않을 수도 있다. 무혈청 및 한정 배양 배지를 포함하는 다양한 조직 배양 배지가 상업적으로 이용 가능하며, 예를 들어, 특히 하기 세포 배양 배지 중 임의의 하나 또는 조합이 사용될 수 있다: RPMI-1640 배지, RPMI-1641 배지, Dulbecco 개질 Eagle 배지(DMEM), 최소 필수 배지 Eagle, F-12K 배지, Ham F12 배지, Iscove 개질 Dulbecco 배지, McCoy 5A 배지, Leibovitz L-15 배지, 및 무혈청 배지, 예컨대 EX-CELL™ 300

시리즈(JRH Biosciences, Lenexa, Kans.). 세포 배양 배지에는 추가적인 또는 증가된 농도의 성분, 예컨대 아미노산, 염, 당, 비타민, 호르몬, 성장 인자, 완충제, 항생제, 지질, 미량 원소 등이 배양될 세포의 요건 및/또는 요망되는 세포 배양 파라미터에 따라 보충될 수 있다.

[0024] 세포 배양 배지는 무혈청, 무단백질, 및/또는 무펩톤일 수 있다. "무혈청"은 동물 혈청, 예컨대 우태 혈청을 함유하지 않는 세포 배양 배지에 적용된다. "무단백질"은 외인성으로 첨가된 단백질, 예컨대 트랜스페린, 단백질 성장 인자 IGF-1, 또는 인슐린이 없는 세포 배양 배지에 적용된다. 무단백질 배지는 펩톤을 함유할 수도 함유하지 않을 수도 있다. "무펩톤"은 외인성 단백질 가수분해물, 예컨대 동물 및/또는 식물 단백질 가수분해물을 함유하지 않는 세포 배양 배지에 적용된다. 세포 배양 배지로부터의 혈청 및/또는 가수분해물의 제거는 로트별 변동성을 감소시키고 가공 단계, 예컨대 여과를 증강시키는 장점을 갖는다. 그러나, 혈청 및/또는 펩톤이 세포 배양 배지로부터 제거되면, 세포 성장, 생존력 및/또는 단백질 발현이 감소되거나 최적보다 못할 수 있다. 이와 같이, 무혈청 및/또는 무펩톤 세포 배양 배지에는 아미노산, 미량 원소 등이 고도로 농축될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,122,469 및 5,633,162를 참고한다. 여러 배지 제형물이 존재하지만, 동물 혈청 및/또는 펩톤을 함유하는 것들만큼 우수하게 또는 바람직하게는 더 잘 작용하는 한정 배지 제형물을 개발하는 것이 요구된다.

[0025] 아미노산, 무기 염, 탄수화물, 지질, 비타민, 완충제 및 미량 필수 원소를 함유하는 한정 세포 배양 배지 제형물은 복잡하다. 요망되는 특징을 갖는 세포 배양을 유지하는 데에 필요하고 유익한 성분을 확인하는 것이 진행되고 있다. 특정 숙주 세포의 필요성에 부합하도록 또는 요망되는 수행능력 파라미터에 부합하도록 한정 기본 배지 제형물을 보충 또는 농축하는 것은 개발 중인 한정 배지에 대한 하나의 접근이다. 개선된 세포 성장, 생존력 및 단백질 제조를 야기하는 이들 성분 및 최적 농도의 확인이 진행되고 있다.

[0026] 세포 배양 또는 "배양"이란 다세포 유기체 또는 조직 외부의 세포 성장 및 증식을 의미한다. 포유류 세포에 적합한 배양 조건은 당분야에 알려져 있다. 예컨대 문헌[Animal cell culture: A Practical Approach, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992)]을 참고한다. 포유류 세포는 현탁 배양되거나 고체 지지체에 부착된 채 배양될 수 있다. 마이크로담체를 포함하거나 포함하지 않고, 회분식, 공급 회분식, 연속식, 반연속식, 또는 관류식으로 작동되는 유동층 바이오리액터, 중공사 바이오리액터, 롤러 보틀, 진탕 플라스크, 또는 교반 탱크 바이오리액터가 포유류 세포 배양을 위해 이용 가능하다.

[0027] 포유류 세포, 예컨대 CHO 세포는 소규모 배양으로, 예컨대 약 30 ml 배지를 갖는 100 ml 용기, 약 80 내지 약 90 ml 배지를 갖는 250 ml 용기, 약 150 내지 약 200 ml 배지를 갖는 250 ml 용기 중에 배양될 수 있다. 대안적으로, 배양은 대규모, 예컨대 약 300 내지 약 1000 ml 배지를 갖는 1000 ml 용기, 약 500 ml 내지 약 3000 ml 배지를 갖는 3000 ml 용기, 약 2000 ml 내지 약 8000 ml 배지를 갖는 8000 ml 용기, 및 약 4000 ml 내지 약 15000 ml 배지를 갖는 15000 ml 용기일 수 있다. 예컨대 단백질 치료제의 임상 제조를 위한 대규모 세포 배양은 세포가 요망되는 단백질(들)을 제조하는 동안 전형적으로 수 일 동안, 또는 심지어 수 주 동안 유지된다.

[0028] 상기 시간 동안, 배양에는 세포 배양의 제조 단계의 과정 동안 소비되는 성분, 예컨대 영양분 및 아미노산을 함유하는 농축 공급 배지가 보충될 수 있다. 농축 공급 배지는 임의의 세포 배양 배지 제형물에만 기반할 수 있다. 이러한 농축 공급 배지는 세포 배양 배지의 대부분의 성분을, 예를 들어 정상량의 약 5×, 6×, 7×, 8×, 9×, 10×, 12×, 14×, 16×, 20×, 30×, 50×, 100×, 200×, 400×, 600×, 800×, 또는 심지어 약 1000×로 함유할 수 있다. 농축 공급 배지는 공급 회분 배양 공정에서 종종 사용된다.

[0029] 공급 회분 배양은 포유류 세포로부터의 단백질의 대규모 제조를 위해 널리 실시되는 배양 방법이다. 예컨대 문헌[Chu and Robinson (2001), Current Opin. Biotechnol. 12: 180-87]을 참고한다. 포유류 세포의 공급 회분 배양은 배양에 연속적으로 또는 주기적으로 영양분을 함유하는 농축 공급 배지가 공급되는 것이다. 공급은 소정 일정, 예를 들어 매일, 2일 1회, 3일 1회 등으로 수행될 수 있다. 배양은 배양 배지에서 티로신, 시스틴 및/또는 시스테인 수준에 대해 모니터링될 수 있으며, 티로신, 시스틴 및/또는 시스테인을 요망되는 범위 내로 유지하기 위해 농축 티로신 또는 티로신 및 시스틴 용액의 공급을 통해 조절될 수 있다. 공급을 수행하지 않는 회분 배양과 비교되는 경우, 공급 회분 배양은 더 많은 양의 단백질을 제조할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,672,502를 참고한다.

[0030] 본 발명에 따른 방법은 원료 의약품 제조 공정에서 재조합 단백질의 제조를 개선하기 위해 사용될 수 있고 이에 의해 세포는 2개 이상의 구별되는 단계에서 배양된다. 예를 들어, 세포는 먼저 세포 증식 및 생존력을 최대화하는 환경 조건에서 하나 이상의 성장 단계로 배양된 후, 단백질 제조를 최대화하는 조건의 제조 단계로 전달될 수 있다. 각각의 단계가 전용의 바이오리액터 용기에서 수행되거나 더 많은 단계가 공통 바이오리액터 용기에서

수행될 수 있다. 하나의 이러한 예에서, 성장 단계 및 제조 단계는 동일한 바이오리액터 용기에서 수행된다. 포유류 세포에 의한 단백질의 제조를 위한 상업적 공정에서, 예를 들어, 최종 제조 단계에 앞서 상이한 배양 용기에서 수행하는, 보통 여러 개, 예를 들어 적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 성장 단계가 존재한다. 본 발명에 따른 방법은 적어도 N-1 성장 단계 동안 이용될 수 있지만, 이전의 성장 단계에서 이용될 수도 있다. 제조 단계는 대규모로 수행될 수 있다. 대규모 공정은 적어도 약 100, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 8000, 10,000, 15,000, 20,000리터 부피로 수행될 수 있다. 성장 단계는 제조 단계보다 높은 온도에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 성장 단계는 약 35℃ 내지 약 38℃의 제1 온도에서 수행될 수 있고, 제조 단계는 약 29℃ 내지 약 37℃, 선택적으로 약 30℃ 내지 약 36℃ 또는 약 30℃ 내지 약 34℃의 제2 온도에서 수행될 수 있다. 또한, 단백질 제조의 화학적 유도제, 예컨대 카페인, 부티레이트, 및 헥사메틸렌 비스아세트아미드(HMB A)가 온도 변화와 동시에, 전에, 및/또는 후에 첨가될 수 있다. 유도제가 온도 변화 후에 첨가되는 경우, 이들은 온도 변화 1시간 내지 5일 후에, 선택적으로 온도 변화 1일 내지 2일 후에 첨가될 수 있다.

[0031] 본 발명에서 사용되는 세포주("숙주 세포"로도 언급됨)는 상업적 또는 과학적 관심 폴리펩타이드를 발현하도록 유전적으로 조작된다. 세포주는 전형적으로 무한한 시간 동안 배양에서 유지될 수 있는 일차 배양으로부터 발생한 계통에서 유래된다. 세포주의 유전적 조작에는 재조합 폴리뉴클레오타이드 분자를 이용하는 세포의 전달감염, 형질전환 또는 형질도입, 및/또는 다르게는 숙주 세포가 요망되는 재조합 폴리펩타이드를 발현하도록 유도하기 위한 변경(예컨대, 상동 재조합 및 유전자 활성화 또는 재조합 세포와 비-재조합 세포의 융합에 의함)이 관여된다. 관심 폴리펩타이드를 발현하기 위해 세포 및/또는 세포주를 유전적으로 조작하는 방법 및 벡터는 당업자에게 잘 알려져 있다; 예를 들어, 다양한 기법이 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds. (Wiley & Sons, New York, 1988, and quarterly updates); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Laboratory Press, 1989); Kaufman, R. J., Large Scale Mammalian Cell Culture, 1990, pp. 15-69]에 예시된다.

[0032] 동물 세포주는 그 전구체가 다세포 동물로부터 유래되는 세포로부터 유래된다. 동물 세포주의 한 유형은 포유류 세포주이다. 배양에서의 성장에 적합한 매우 다양한 포유류 세포주가 미국 유형 배양 컬렉션(Manassas, Va.) 및 상업적 공급업체로부터 이용 가능하다. 산업에서 일반적으로 사용되는 세포주의 예에는 VERO, BHK, HeLa, CV1(Cos 포함), MDCK, 293, 3T3, 골수종 세포주(예컨대, NSO, NS1), PC12, WI38 세포, 및 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포가 포함된다. CHO 세포는 복합 재조합 단백질, 예컨대 사이토카인, 옹고 인자, 및 항체의 제조를 위해 널리 사용된다(Brasel et al. (1996), Blood 88:2004-2012; Kaufman et al. (1988), J. Biol Chem 263:6352-6362; McKinnon et al. (1991), J Mol Endocrinol 6:231-239; Wood et al. (1990), J. Immunol. 145:3011-3016). 디하이드로폴레이트 환원효소(DHFR)-결핍 돌연변이체 세포주(Urlaub et al. (1980), Proc Natl Acad Sci USA 77: 4216-4220), DXB11 및 DG-44는 효율적인 DHFR 선택 가능 및 증폭 가능 유전자 발현 시스템이 이들 세포에서 고수준의 재조합 단백질 발현을 허용하므로 바람직한 CHO 숙주 세포주이다(Kaufman R. J.(1990), Meth Enzymol 185:537-566). 또한, 이들 세포는 부착 또는 현탁 배양으로 조작하기 용이하고 상대적으로 우수한 유전적 안정성을 나타낸다. CHO 세포 및 이들에서 재조합적으로 발현되는 단백질은 광범위하게 특성규명되었고, 규제 당국으로부터 임상적 상업적 제조에서의 사용을 승인받았다.

[0033] 본 발명의 방법은 관심 재조합 단백질을 발현하는 세포를 배양하기 위해 사용될 수 있다. 발현되는 재조합 단백질은 이들이 회수되고/되거나 수집될 수 있는 배양 배지 내로 분비되거나 세포내 제조될 수 있다. 또한, 단백질은 알려진 공정 및 상업적 공급업체로부터 이용 가능한 제품을 사용하여 이러한 배양 또는 성분으로부터(예컨대, 배양 배지 또는 세포 추출물 또는 체액으로부터) 정제되거나, 부분적으로 정제될 수 있다. 이어서 정제된 단백질은 "제형물화"될 수 있다(즉, 완충제가 교환되고, 멸균화되고, 벌크-패키징되고/되거나 최종 사용자를 위해 패키징될 수 있다). 약학 조성물에 적합한 제형물에는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. 1995, Mack Publishing Company, Easton, Pa]에 기재된 것들이 포함된다.

[0034] 본 발명은 본 발명의 개별 양태의 단일 예시로서 의도되는 본원에 기재되는 구체적 구현예에 의해 범위가 제한되지 않으며, 기능적으로 동등한 방법 및 성분은 본 발명의 범위 내에 있다. 실제로, 본원에 나타내고 설명된 것들에 부가하여 본 발명의 다양한 변형이 상기 설명 및 수반되는 도면으로부터 당업자에게 명확해질 것이다. 이러한 변형은 첨부되는 청구 범위 내에 속하는 것이다.

[0035] 본 발명의 특히 바람직한 구현예에서, 본원에서 개시되는 방법 및 기법이 에타너셉트를 제조하기 위해 사용된다. 에타너셉트는 인간 IgG1의 Fc 도메인에 융합된 p75 TNF 수용체(TNFR:Fc)의 가용성 형태이다. 상업적으로 이용 가능한 에타너셉트는 ENBREL®로 알려져 있다. ENBREL®은 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 포유류 세포 발현 시스템에서 재조합 DNA 기술에 의해 제조된다. 이는 934개의 아미노산으로 구성되며 대략 150킬로달톤의

겔보기 분자량을 갖는다(Physicians Desk Reference, 2002, Medical Economics Company Inc.). CHO 세포에서 발현되는 전체 서열을 아래에 나타낸다. 그러나, 상기 서열의 소소한 변형 및 결실(최대 10%)이 있을 수 있고 본 발명의 범위 내에서 사용될 수 있음이 이해되어야 한다. 본 발명의 방법 및 기법은, 예를 들어 제형물, 투여량, 프리젠테이션, 승인된 적응증 또는 용도, 서열, 글리코실화 패턴, 또는 다른 번역-후 개질이 ENBREL®과 상이한 바이오시밀러 에타너셉트를 제조하기 위해 사용될 수 있다.

1 Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-Thr-Pro-Tyr-
 11 Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys-Arg-Leu-
 21 Arg-Glu-Tyr-Tyr-Asp-Gln-Thr-Ala-Gln-Met-
 31 Cys-Cys-Ser-Lys-Cys-Ser-Pro-Gly-Gln-His-

[0036]

41 Ala-Lys-Val-Phe-Cys-Thr-Lys-Thr-Ser-Asp-
 51 Thr-Val-Cys-Asp-Ser-Cys-Glu-Asp-Ser-Thr-
 61 Tyr-Thr-Gln-Leu-Trp-Asn-Trp-Val-Pro-Glu-
 71 Cys-Leu-Ser-Cys-Gly-Ser-Arg-Cys-Ser-Ser-
 81 Asp-Gln-Val-Glu-Thr-Gln-Ala-Cys-Thr-Arg-
 91 Glu-Gln-Asn-Arg-Ile-Cys-Thr-Cys-Arg-Pro-
 101 Gly-Trp-Tyr-Cys-Ala-Leu-Ser-Lys-Gln-Glu-
 111 Gly-Cys-Arg-Leu-Cys-Ala-Pro-Leu-Arg-Lys-
 121 Cys-Arg-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Arg-Pro-
 131 Gly-Thr-Glu-Thr-Ser-Asp-Val-Val-Cys-Lys-
 141 Pro-Cys-Ala-Pro-Gly-Thr-Phe-Ser-Asn-Thr-
 151 Thr-Ser-Ser-Thr-Asp-Ile-Cys-Arg-Pro-His-
 161 Gln-Ile-Cys-Asn-Val-Val-Ala-Ile-Pro-Gly-
 171 Asn-Ala-Ser-Met-Asp-Ala-Val-Cys-Thr-Ser-
 181 Thr-Ser-Pro-Thr-Arg-Ser-Met-Ala-Pro-Gly-
 191 Ala-Val-His-Leu-Pro-Gln-Pro-Val-Ser-Thr-
 201 Arg-Ser-Gln-His-Thr-Gln-Pro-Thr-Pro-Glu-
 211 Pro-Ser-Thr-Ala-Pro-Ser-Thr-Ser-Phe-Leu-
 221 Leu-Pro-Met-Gly-Pro-Ser-Pro-Pro-Ala-Glu-
 231 Gly-Ser-Thr-Gly-Asp-Glu-Pro-Lys-Ser-Cys-
 241 Asp-Lys-Thr-His-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-
 251 Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-
 261 Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-
 271 Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Thr-
 281 Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-
 291 Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-

[0037]

301 Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-
 311 Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn-Ser-Thr-Tyr-
 321 Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-
 331 Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-
 341 Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys-Ala-Leu-Pro-Ala-
 351 Pro-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-Lys-Ala-Lys-
 361 Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-
 371 Leu-Pro-Pro-Ser-Arg-Glu-Glu-Met-Thr-Lys-
 381 Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-Leu-Val-Lys-
 391 Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-
 401 Trp-Glu-Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-
 411 Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-Leu-Asp-Ser-
 421 Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Lys-Leu-
 431 Thr-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Gln-Gly-
 441 Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-Val-Met-His-Glu-
 451 Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-
 461 Leu-Ser-Leu-Ser-Pro-Gly-Lys (SEQ ID NO :1)

[0038]

[0039]

본 발명의 방법, 기법, 및 조성물은 재조합 단백질 산물을 제조하기 위한, 특히 에타너셉트를 제조하기 위한 다른 방법, 기법, 및 조성물과 병용될 수 있다. 이러한 다른 방법, 기법, 및 조성물의 예는 미국 특허 번호 7,915,225; 8,119,605; 8,410,060, 8,722,631; 7,648,702; 8,119,604; 8,828,947; 7,294,481; 7,476,722; 7,122,641; 6,872,549; 7,452,695; 7,300,773; 8,063,182; 8,163,522; 6,924,124; 7,645,609; 6,890,736; 7,067,279; 7,384,765; 7,829,309; 6,974,681; 6,309,841; 7,834,162; 8,217,153; 8,273,707; 7,781,395; 7,427,659; 7,157,557; 7,544,784; 7,083,948; 7,723,490; 8,053,236; 7,888,101; 8,247,210; 8,460,896; 8,680,248; 6,413,744; 7,091,004; 6,897,040; 6,632,637; 7,956,160; 및 7,276,477에서 확인되며, 각각 교시하거나 개시하는 모든 내용에 대해 전문이 참조로 포함된다.

[0040]

실시예

[0041]

본 실시예는 에타너셉트 N-1(관류)에서의 온도를 제어하여 후속 N(제조) 바이오리액터에서의 역가를 증가시킬 수 있다는 예상치 못한 발견을 실증한다.

[0042]

중양 복합 설계(CCD)를 사용해서 N-1 관류 바이오리액터 수행능력(즉, N-1 단계 말기의 세포 성장 및 생존력)에 대한 소정 작동 파라미터(씨드 VCD, 배양 기간, 바이오리액터 pH 및 바이오리액터 온도)의 효과를 모델링하였다. N-1 바이오리액터를 또한 제조 바이오리액터 내로 전방-가공하여 역가에 대한 이들 파라미터의 영향을 평가하였다.

[0043]

CCD는 선형, 2-인자 상호작용, 및 OP의 2차 효과를 포함하는 전체 2차 모델의 산정에 적절한 반응 표면 설계의 한 유형이다. 상기 실험 설계를 구조 및 통계적 특성에 기반하여 선택하였다. CCD는 곡률의 산정을 허용하는 축점 그룹으로 강화되는 중심점을 갖는 2^k 요인 설계를 포함한다. 요인점들에 대해 OR을 선택함으로써, 모든 조합을 실험에서 직접 관찰할 수 있다. 또한, 축점을 요망되는 특성규명 범위로 설정함으로써, 이들 값의 상이한 조합에서 민감도 분석을 수행하기 위한 모델을 개발할 수 있다. 결과를 표 1 및 도 1 내지 4에 제공한다.

[0044]

표 1 및 도 1에 나타난 바와 같이, 데이터는 제조 바이오리액터가 중심점에서 운전되고 있음에도(즉, 제조 바이오리액터가 온도, pH, 배양 기간, 및 N iVCD를 포함하는 동일한 조건을 사용하여 운전됨에도) 불구하고, 평가된 범위 내에서 N-1 바이오리액터 온도 증가가 제조 바이오리액터 역가의 통계적으로 유의미하고 재현 가능한 증가를 일으켰음을 실증한다. 대조적으로, 도 2~4는 다른 평가 파라미터(pH, 기간 및 N-1 iVCD)가 평가된 파라미터

내에서 변경되는 경우, 역가의 통계적으로 유의미한 증가가 관찰되지 않았음을 나타낸다. (모든 도면에 대한 데이터를 표 1에 제공한다).

표 1

	배양 기간	pH	온도	iVC	역가
1	108	7	37.5	4	930
2	108	7	36.5	6	917
3	132	7.1	36.5	6	786
4	132	7.1	37.5	4	934
5	132	7	37.5	6	NT
6	108	7.1	37.5	4	1003
7	108	7.1	37.5	6	1018
8	120	7.05	37	5	996
9	132	7	36.5	4	625
10	120	7.05	37	5	925
11	120	7.05	37	5	812
12	108	7	37.5	6	923
13	108	7	36.5	4	748
14	120	7.05	37	5	877
15	132	7.1	37.5	6	1036
16	108	7.1	36.5	6	648
17	132	7.1	36.5	4	821
18	108	7.1	37.5	4	946
19	132	7	37.5	4	880
20	132	7	36.5	6	658
21	120	7.15	37	5	884
22	120	7.05	37	5	998
23	120	7.05	37	5	996
24	120	7.05	36	5	809
25	96	7.05	37	5	963
26	144	7.05	37	5	841
27	120	7.05	38	5	972
28	120	6.95	37	5	936
29	120	7.05	37	7	871
30		7.05	37	3	973

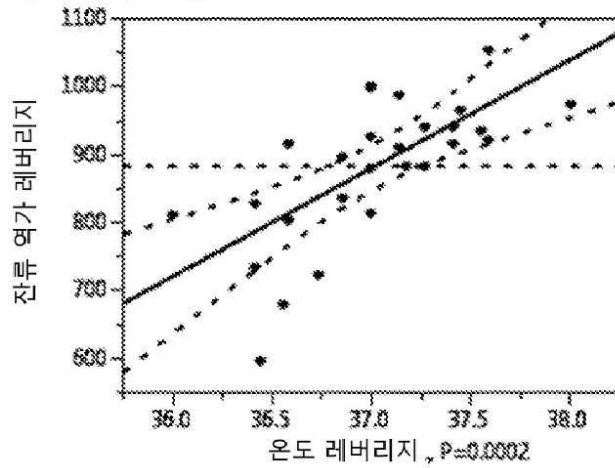
[0045]

도면

도면1

온도

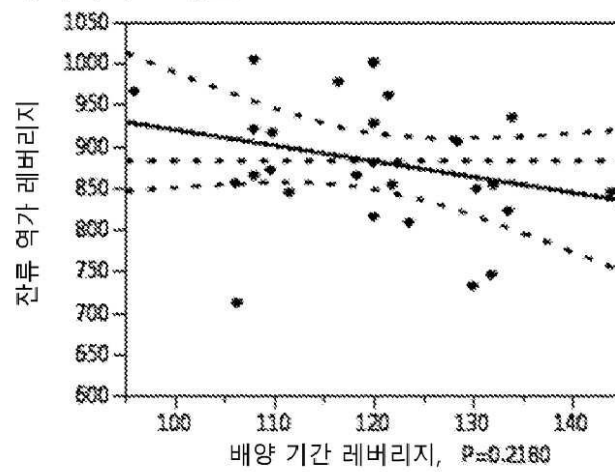
▲ 레버리지 그래프



도면2

배양 기간

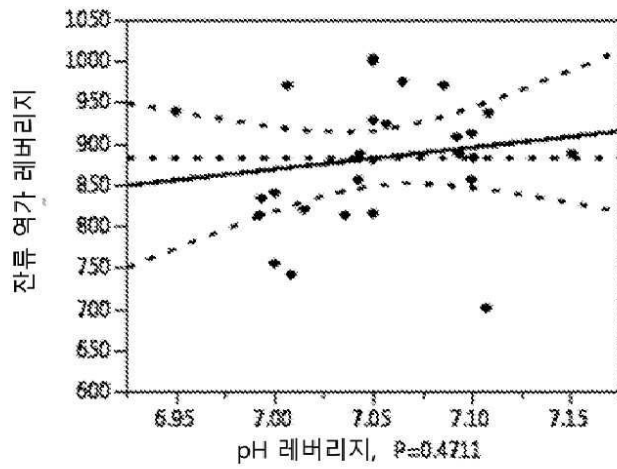
▲ 레버리지 그래프



도면3

pH

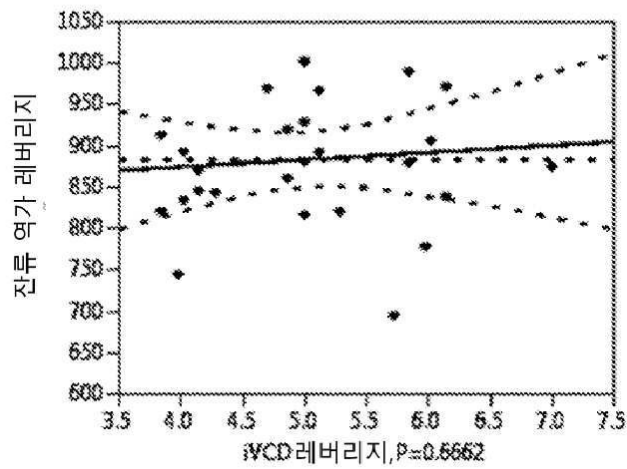
레버리지 그래프



도면4

iVCD

레버리지 그래프



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> AMGEN INC.

KRAUS, Eliyahu

<120> METHODS FOR PRODUCING PROTEIN PRODUCTS

<130> A-2192-WO-PCT

<140> XX/XXX,XXX

<141> 2018-11-02

<150> 62/585,397

<151> 2017-11-13

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion

<400> 1

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

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
20 25 30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
35 40 45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
50 55 60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65 70 75 80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
85 90 95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
100 105 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
115 120 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
130 135 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145 150 155 160

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
165 170 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
180 185 190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
195 200 205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
210 215 220

Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Lys
 465