

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2021-0084695
(43) 공개일자 2021년07월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 21/00 (2006.01) C07K 14/71 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12P 21/005 (2013.01)
C07K 14/71 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7020548(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2018년07월03일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2020-7000732
원출원일자(국제) 2018년07월03일
- (85) 번역문제출일자 2021년06월30일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/040734
- (87) 국제공개번호 WO 2019/010191
국제공개일자 2019년01월10일
- (30) 우선권주장
62/529,471 2017년07월06일 미국(US)
62/625,744 2018년02월02일 미국(US)

- (71) 출원인
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777
- (72) 발명자
첸 존
미국 10591 뉴욕주 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777
로렌스 손
미국 10591 뉴욕주 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김진희, 김태홍

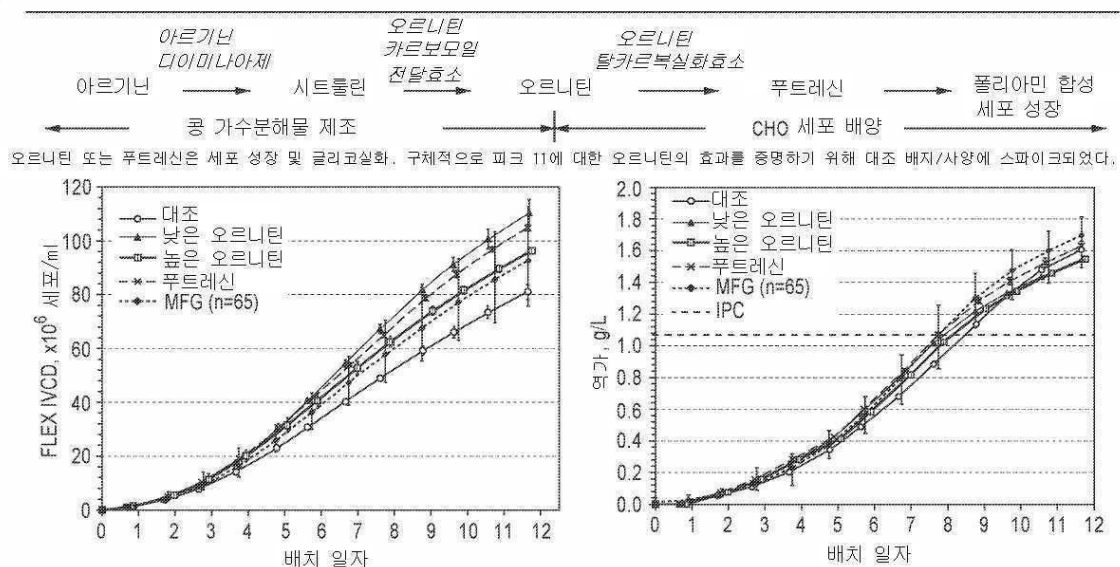
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 당단백질을 만들기 위한 세포 배양 과정

(57) 요약

본 발명은 원하는 양의 성분, 예를 들면, 오르니틴 또는 푸트레신에 대해 콩 가수분해물의 배치를 선별검사하고, 그리고 원하는 양의 이런 성분을 갖는 콩 가수분해물의 배치만을 선별하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명은 또한, 관심되는 단백질의 더욱 일관된, 높은 품질 로트를 생산하기 위해 콩의 선별된 배치로 보충된 배치에서 세포를 배양하기 위한 방법을 진술한다. 게다가, 본 발명은 원하는 양의 오르니틴 또는 푸트레신을 내포하는 콩 가수분해물의 별개의 배치로 보충된 배치에서 세포를 배양함으로써 각각 생산된 복수의 단백질 제조물을 제공하는데, 여기서 생산된 단백질의 각 배치는 관심되는 단백질의 향상된 품질 또는 품질 단백질의 향상된 생산량을 전시한다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 14/7155 (2013.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

C07K 2319/32 (2013.01)

(72) 발명자

존슨 에이미

미국 10591 뉴욕주 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777

로니 데오도어

미국 10591 뉴욕주 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777

판굴레 라빈드라

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 해나 웨이 308

황 타-춘

미국 12047 뉴욕주 코호스 스테이시 코트 31

카버 스콧

미국 10591 뉴욕주 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777

셸링 베른하르트

미국 10591 뉴욕주 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는 방법:

- 콩 가수분해물을 제조하기 위해 콩 추출물을 잔류물-없는 반응 용기에서 효소적으로 소화시키고,
- 콩 가수분해물에서 오르니틴 또는 푸트레신의 양을 측정하고, 그리고
- 세포 배양 배지에서 이용을 위한 $\leq 0.067\%$ (w/w) 오르니틴 또는 푸트레신을 갖는 콩 가수분해물을 선별함.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 서열 목록의 편입

[0002] 2018년 2월 1일자에 창출되었고, 그리고 크기가 11.2 KB인 "REGE009P02US_SeqList.txt"으로 명명된 텍스트 파일의 내용은 본원에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0003] 분야

[0004] 본 발명은 세포의 배양을 위한 방법 및 재조합 단백질의 생산을 위한 방법에 관계한다. 본 발명은 특히, 높은 품질 재조합 단백질의 일관된 생산을 달성하기 위해 콩 가수분해물-내포 배지에서 세포의 배양을 위한 방법에 관계한다.

배경 기술

[0005] 단백질 가수분해물, 예를 들면, 콩 가수분해물을 내포하는 세포 배양 배지는 배양된 세포로부터 재조합 단백질의 생산에서 통상적으로 이용된다. 하지만, 단백질 가수분해물은 세포 성장 또는 재조합 단백질 생산에 부정적인 충격을 주는 화합물을 내포할 수 있다. 이들 결점에도 불구하고, 단백질 가수분해물은 세포 배양에서 보충물로서 폭넓게 이용되고 있다.

[0006] 인간 생물학적 치료제 (생물약제)는 일반적으로, 포유류 세포 배양에서 생산된다. 하지만, 생물학적 치료제의 품질과 성과는 제조 공정에 고도로 의존한다. Tebbey, P. and Declerck, P. Generics and Biosimilars Initiative Journal (2016) 5:2, pp. 70-73은 일관된 글리코실화를 갖는 생물학적 약물을 제조하는 것에 관해 본원에 편입된다. 당단백질의 제조를 위한 세포 배양 과정에 변화는 글리코실화 패턴, 산 종류 (가령, 시알산)의 존재 또는 단백질에서 글리칸의 양에서 변이를 야기할 수 있다. 동일 문서. 이런 변이는 결과의 단백질 생산에서 단백질 동종형의 이질성을 증가시키는데, 이것은 생물학적 치료제의 안정성, 효력 또는 면역원성을 변경하고 단백질의 로트의 거부를 궁극적으로 야기할 수 있다.

[0007] 따라서, 약물 산물 수율과 조성에서 로트별 가변성을 제거하는 세포 배양 방법이 고도로 바람직하다. 본 발명은 배치별로 변하고, 그리고 콩 가수분해물을 이용한 배양에서 생산된 높은 품질 당단백질의 조성구 수율을 변경할 수 있는 식물 단백질 가수분해물 (가령, 콩 가수분해물)에서 일정한 성분을 확인한다. 본 발명은 그 중에서도 특히, 식물 단백질 가수분해물의 배치를 선별검사하고, 그리고 생물약제의 생산에서 이용을 위한 식물 단백질 가수분해물의 성분의 바람직한 농도를 포함하는 배치를 선별함으로써, 향상된 세포 배양 방법에 대한 필요성을 해소한다.

발명의 내용

[0008] 본 발명은 콩 가수분해물의 배치에서 오르니틴 또는 푸트레신의 농도가 콩 가수분해물을 이용한 세포 배양에서 생산된 단백질의 품질과 조성에 영향을 준다는 발견에 부분적으로 입각된다. 본 발명은 또한, 일정한 농도의 오르니틴 또는 푸트레신을 포함하는 콩 가수분해물을 포함하는 배지에서 배양된 세포가 로트별로 더욱 일관된 글리코실화 패턴, 글리칸의 양 및 시알산 프로필을 전시하는 높은 품질 단백질을 더욱 많은 양으로 생산한다는 것

을 제시한다.

- [0009] 한 양상에서, 본 발명은 재조합 이중성 당단백질을 생산하기 위해 콩 가수분해물을 포함하는 세포 배양 배지에서 재조합 이중성 당단백질을 발현하는 세포 개체군을 배양하는 방법에 관계하고, 그리고 여기서 콩 가수분해물은 $\leq 0.067\%$ (w/w) 오르니틴 또는 푸트레신을 포함한다.
- [0010] 일부 구체예에서, 상기 방법은 콩의 그램 (g)당 ≤ 0.67 밀리그램 (mg) 이하의 오르니틴 (w/w), 또는 약 $0.003\% - 0.067\%$ (w/w) 오르니틴을 내포하는 콩 가수분해물을 포함하는 세포 배양 배지에서 재조합 이중성 당단백질을 발현하는 세포 개체군을 배양하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 배양 배지는 $\leq 5\text{mg/L}$ 오르니틴, 또는 약 $0.6 - 3 \text{ mg/L}$ 오르니틴을 내포한다. 일부 구체예에서, 세포 개체군은 재조합 이중성 당단백질을 발현하는 세포의 클론 확장에 의해 획득된다.
- [0011] 한 양상에서, 본 발명은 당단백질을 생산하기 위한 방법에 관계한다. 한 구체예에서, 상기 방법은 콩의 그램 (g)당 ≤ 0.67 밀리그램 (mg) 이하의 푸트레신 (w/w), 또는 약 $0.003\% - 0.067\%$ (w/w) 푸트레신을 내포하는 콩 가수분해물을 내포하는 배양 배지에서 재조합 이중성 당단백질을 발현하는 세포 개체군을 배양하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 배양 배지는 $\leq 5\text{mg/L}$ 푸트레신, 또는 약 $0.6 - 3 \text{ mg/L}$ 푸트레신을 내포한다. 일부 구체예에서, 세포 개체군은 재조합 이중성 당단백질을 발현하는 세포의 클론 확장에 의해 획득된다.
- [0012] 한 구체예에서, 당단백질은 트랩 분자, 예를 들면, 티로나셉트 (가령, US 특허 번호 6,927,004에서 개시된 IL1-트랩), 아플리베르셉트 (가령, US 특허 번호 7,087,411 에서 개시된 VEGF-트랩), 콘베르셉트 (가령, US 특허 번호 7,750,138 및 8,216,575에서 개시된 VEGF-트랩), 그리고 에타네르셉트 (가령, US 특허 번호 5,610,279에서 개시된 TNF-트랩)이다. 한 구체예에서, 당단백질의 모든 N-글리칸 종류의 총량의 $\geq 10\%$ (w/w)는 A1 N-글리칸이다.
- [0013] 한 양상에서, 본 발명은 당단백질을 생산하는 방법에 관계한다. 다른 양상에서, 본 발명은 당단백질의 생산에서 콩 가수분해물을 이용하는 방법에 관계한다. 다른 양상에서, 본 발명은 생산된 당단백질의 품질을 평가함으로써, 당단백질을 생산하는데 이용을 위한 콩 가수분해물을 선별하는 방법에 관계한다. 한 구체예에서, 상기 방법은 글리코실화된 단백질을 발현하는 세포를 세포 배양 배지에서 배양하여 당단백질을 생산하고, 글리코실화된 단백질을 정제하고, 정제된 글리코실화된 단백질을 올리고당류 지문 분석에 종속시키고, 상기 당단백질의 N-글리칸 종류의 총량과 비교하여 A1 N-글리칸의 상대적 양을 결정하고; 그리고 상기 당단백질의 N-글리칸 종류의 총량과 비교하여 최소한 10% (w/w) A1 N-글리칸을 제공하는 콩 가수분해물을 선별하는 것을 포함한다.
- [0014] 한 구체예에서, 상기 방법은 콩 가수분해물을 내포하는 세포 배양 배지를 제조하고, 당단백질을 발현하는 세포를 세포 배양 배지에서 배양하고, 글리코실화된 단백질을 정제하고, 정제된 글리코실화된 단백질을 올리고당류 지문 분석에 종속시키고, 상기 당단백질의 N-글리칸 종류의 총량과 비교하여 A1 N-글리칸의 상대적 양을 결정하고, 그리고 이후, 상기 당단백질의 N-글리칸 종류의 총량과 비교하여 최소한 10% (w/w) A1 N-글리칸을 갖는 당단백질의 생산을 제공하는 콩 가수분해물을 선별하는 단계를 포함한다.
- [0015] 한 구체예에서, 선별된 콩 가수분해물은 콩 g당 $\leq 0.67 \text{ mg}$ 오르니틴 (w/w), 또는 약 $0.003\% - 0.067\%$ (w/w) 오르니틴을 내포한다. 한 구체예에서, 배양 배지는 $\leq 5 \text{ mg/L}$ 오르니틴, 또는 약 $0.6 - 3 \text{ mg/L}$ 오르니틴을 내포한다.
- [0016] 한 구체예에서, 선별된 콩 가수분해물은 콩 g당 $\leq 0.67 \text{ mg}$ 푸트레신 (w/w), 또는 약 $0.003\% - 0.067\%$ (w/w) 푸트레신을 내포한다. 한 구체예에서, 배양 배지는 $\leq 5 \text{ mg/L}$ 푸트레신, 또는 약 $0.6 - 3 \text{ mg/L}$ 푸트레신을 내포한다.
- [0017] 한 양상에서, 본 발명은 콩 가수분해물에서 오르니틴 또는 푸트레신의 양을 측정함으로써, 당단백질을 생산하는데 이용을 위한 콩 가수분해물을 선별하는 방법에 관계한다. 한 구체예에서, 상기 방법은 콩 가수분해물에서 오르니틴의 양을 측정하고, 콩 g당 $\leq 0.67 \text{ mg}$ 오르니틴, 또는 약 $0.003\% - 0.067\%$ (w/w) 오르니틴을 갖는 콩 가수분해물 선별하고, 그리고 선별된 콩 가수분해물을 추가 성분과 조합하여 $\leq 5 \text{ mg/L}$ 오르니틴, 또는 약 $0.6 - 3 \text{ mg/L}$ 오르니틴을 갖는 세포 배양 배지를 형성하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 상기 방법은 잠재적으로 유용한 콩 가수분해물에서 푸트레신의 양을 측정하고, 콩 g당 $\leq 0.67 \text{ mg}$ 푸트레신, 또는 약 $0.003\% - 0.067\%$ (w/w) 푸트레신을 갖는 콩 가수분해물을 선별하고, 그리고 선별된 콩 가수분해물을 추가 성분과 조합하여 $\leq 5 \text{ mg/L}$ 푸트레신, 또는 약 $0.6 - 3 \text{ mg/L}$ 푸트레신을 갖는 세포 배양 배지를 형성하는 단계를 포함한다.
- [0018] 한 양상에서, 본 발명은 A1 N-글리칸 및 최소한 하나의 다른 N-글리칸 종류를 포함하는 당단백질에 관계하고, 여기서 A1 N-글리칸의 상대적 양은 제공된 당단백질의 N-글리칸의 총량의 최소한 10% (w/w)이다. 한

구체예에서, A1 N-글리칸의 상대적 양은 약 10% - 17% (w/w)이다.

[0019] 한 구체예에서, 당단백질은 또한, A2 N-글리칸, A2F N-글리칸, A1F N-글리칸, NGA2F N-글리칸, NA2G1F N-글리칸, NA2 N-글리칸, 그리고 NA2F N-글리칸을 갖는다.

[0020] 한 구체예에서, 당단백질은 당단백질의 몰당 8 - 65 몰의 시알산을 내포한다. 당단백질이 락토나셉트인 한 구체예에서, 서열 번호: 1의 아스파라긴 잔기 N37, N98, N418 및 N511 중에서 한 가지는 A1 N-글리칸을 내포한다. 당단백질이 아플리베르셉트인 한 구체예에서, 서열 번호: 2의 아스파라긴 잔기 N123 및 N196 중에서 한 가지는 A1 N-글리칸을 내포한다.

[0021] 한 구체예에서, 당단백질의 A1 N-글리칸의 상대적 양은 A1 N-글리칸의 피크 아래 면적을, 모세관 전기이동에 의해 획득된 당단백질의 올리고당류 지문으로부터 획득된 모든 N-글리칸에 대한 피크 아래 총면적과 비교함으로써 결정된다.

[0022] 한 양상에서, 감소된 양의 오르니틴 또는 푸트레신을 갖는 쿵 가수분해물을 제조하는 방법이 제공된다. 한 구체예에서, 상기 방법은 쿵 추출물을 잔류물-없는 반응 용기에서 효소적으로 소화시키고, 쿵 가수분해물에서 오르니틴의 양을 측정하고, 그리고 세포 배양 배지에서 이용을 위한 $\leq 0.067\%$ (w/w) 오르니틴 또는 푸트레신을 내포하는 쿵 가수분해물의 로트를 선별하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 상기 방법은 쿵 추출물을 잔류물-없는 반응 용기에서 효소적으로 소화시키고, 쿵 가수분해물에서 푸트레신의 양을 측정하고, 그리고 세포 배양 배지에서 이용을 위한 $\leq 0.067\%$ (w/w) 오르니틴 또는 푸트레신을 갖는 쿵 가수분해물을 선별하는 단계를 포함한다.

[0023] 용어 "약"은 진술된 값의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 또는 0.01% 이내인 것으로 이해될 수 있다. 문맥으로부터 별도로 명백하지 않으면, 본원에서 제공된 모든 수치 값은 용어 "약"에 의해 수식된다.

[0024] 비록 본원에서 설명된 것들과 유사하거나 또는 동등한 방법과 재료가 본 발명의 실시 또는 검사에서 이용될 수 있긴 하지만, 적합한 방법과 재료가 아래에 설명된다. 본원에서 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참고문헌은 전체적으로 참조로서 편입된다. 본원에서 인용된 참고문헌은 청구된 발명에 대한 선행 기술인 것으로 인정되지 않는다. 충돌의 경우에, 정의를 비롯한 본 명세서가 우선할 것이다. 이에 더하여, 이들 재료, 방법 및 실험은 단지 예시이고 한정하는 것으로 의도되지 않는다. 본 발명의 다른 특징과 이점은 하기의 상세한 설명 및 청구항으로부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0025] 임의의 상기 양상과 구체예는 본원에서 요약 및/또는 상세한 설명 섹션에서 개시된 바와 같이, 임의의 다른 양상 또는 구체예와 조합될 수 있다.

특히 또는 출원 파일은 유색으로 작성된 최소한 하나의 도면을 내포한다. 유색 도면을 갖는 이러한 특히 또는 특허 출원 공보의 사본은 요구 및 수수료의 납부 시에 사무국에 의해 제공될 것이다.

본 발명의 다양한 목적과 이점 및 본 발명에 관한 더욱 완전한 이해는 첨부된 도면과 함께 취해질 때 하기의 상세한 설명 및 첨부된 청구항을 참조함으로써 명확하고 더욱 쉽게 인지되는데, 여기서:

도 1은 다투어-유래된 아미노산의 크로마토그래피 용리 프로필을 묘사한다. X 축은 크로마토그래피 칼럼으로부터 용리의 시간 (체류 시간)을 묘사하고, 그리고 Y 축은 570 nm에서 광 흡광도를 묘사한다. 패널 A는 FDA 기준에 의한 허용되는 N-글리칸 혼합물을 생산하기 위한 기준에 부합하지 않는 배치를 묘사한다. 패널 B는 쿵 당단백질 가수분해물의 허용되는 아미노산 분석을 묘사한다. 오르니틴을 나타내는 피크는 양쪽 크로마토그램에서 동그라미 쳐진다.

도 2는 펩티드:N-글리코시다아제 F (PNGase F) 소화에 의해 당단백질로부터 방출된 올리고당류의 모세관 전기이동도를 묘사한다. X 축은 모세관으로부터 용리의 시간을 묘사하고, 그리고 Y 축은 광 흡광도 또는 형광 강도를 묘사한다. 피크는 1-21로 넘버링된다. 피크 1은 N-글리칸 A2를 나타내고; 피크 4는 N-글리칸 A2F를 나타내고; 피크 11은 N-글리칸 A1을 나타내고; 피크 14는 N-글리칸 A1F를 나타내고; 피크 16은 N-글리칸 NGA2F를 나타내고; 피크 19는 N-글리칸 NA2G1F를 나타내고; 피크 20은 N-글리칸 NA2를 나타내고; 그리고 피크 21은 N-글리칸 NA2F를 나타낸다.

도 3은 A1 N-글리칸의 상대적 양의 도트 블롯을 쿵 단백질 가수분해물에서 오르니틴과 시트룰린 농도의 함수로

서 묘사한다. X 축은 시트룰린 또는 오르니틴의 농도를 mg/L 단위에서 묘사한다. Y 축은 피크 11의 상대적 면적을 묘사하는데, 이것은 A1 N-글리칸을 나타낸다.

도 4는 아플리베르셉트에서 피크 11의 상대적 양 (A1 N-글리칸, 왼쪽 상단 사분면)에 대한 콩 가수분해물에서 오르니틴 농도 (오른쪽 하단 사분면)의 음성 상관을 묘사하는 상관 플롯이다.

도 5는 (i) 킬로나셉트의 최종 역가 (오른쪽 상단 사분면)에 대한 콩 가수분해물에서 오르니틴 농도 (왼쪽 하단 사분면)의 음성 상관; 그리고 (ii) 배지에서 유산염의 축적 (왼쪽 하단 사분면)에 대한 콩 가수분해물에서 오르니틴 농도 (왼쪽 하단 사분면)의 양성 상관을 묘사하는 상관 플롯이다.

도 6a는 대조, 높은 및 낮은 오르니틴 농도, 푸트레신, MFC 및 IPC를 비롯한 다양한 조건 하에 배치 일자의 함수로서 IVCD x 10⁶ 세포-일/ml로서 또는 역가로서 (ml당 그래프로서) 묘사된, CHO 세포 배양액으로부터 합성된 폴리아민의 양을 묘사하는 한 쌍의 그래프이다.

도 6b는 도 6a에서 묘사된 각 연구 군의 실험 조건을 제공하는 표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 상세한 설명

[0027] 본 발명의 범위는 설명된 특정 방법 및 실험 조건에 한정되지 않는 것으로 이해되는데, 그 이유는 이런 방법 및 조건이 변할 수 있기 때문이다. 또한, 본원에서 이용된 용어는 단지 특정한 구체예를 설명하기 위한 것이고, 그리고 한정하는 것으로 의도되지 않는 것으로 이해된다.

[0028] 별도로 규정되지 않으면, 본 출원에서 이용된 모든 기술 용어와 과학 용어는 본 발명이 속하는 당해 분야의 평균적 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 비록 본 출원에서 설명된 것들과 유사하거나 또는 동등한 임의의 방법과 재료가 본 발명의 실시 또는 검사에서 이용될 수 있긴 하지만, 일정하고 특정한 방법과 재료가 지금부터 설명된다. 단위, 접두사 및 부호는 그들의 표준, 업계 용인된 형태로 표시될 수 있다. 본원에서 언급된 수치 범위는 개방형 괄호로 묶이는데, 이것은 이들이 상기 범위를 규정하는 숫자를 포함한다는 것을 의미한다. 별도로 언급되지 않으면, 용어 "a" 또는 "an"은 "중에서 최소한 한 가지"를 의미하는 것으로 해석되어야 한다.

[0029] 본원에서 이용된 섹션 표제는 단지 조직 목적으로만 제공되고 설명된 요부를 제한하는 것으로 해석되지 않는다. 본원에서 설명된 방법과 기술은 일반적으로, 당해 분야에서 공지된 전통적인 방법에 따라서, 그리고 별도로 지시되지 않으면 본 명세서 전반에서 인용되고 논의되는 다양한 일반적인 참고문헌 및 더욱 특정한 참고문헌에서 설명된 바와 같이 수행된다. 참조: 가령, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), 그리고 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), 그리고 Julio E. Celis, Cell Biology: A Laboratory Handbook, 2nd ed., Academic Press, New York, N.Y. (1998), 그리고 Dieffenbach and Dveksler, PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1995). 본 명세서 전반에서 언급된 모든 간행물은 본원에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0030] 정의

[0031] 별도로 규정되지 않으면, 본 출원에서 이용된 모든 기술 용어와 과학 용어는 본 발명이 속하는 당해 분야의 평균적 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0032] 관용구 "상대적 양"은 일반적인 유형의 모든 분자 종류의 총량에 비하여 한 분자 종류의 양을 의미한다. 가령, A1 글리칸 (다시 말하면, (GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)2(Gal)2(SA)1)의 상대적 양은 A1의 양 / 모든 N 글리칸의 양의 합계로서 계산된다. 상대적 양은 절대적 질량-대-질량 양 (다시 말하면, 그래프당 그래프) 또는 백분율, 다시 말하면, % (w/w)로서 표현될 수 있다.

[0033] "오르니틴"은 요소 회로, 폴리아민 합성 및 아르기닌 물질대사에 관련된 비단백질 코딩 아미노산이다. 오르니틴은 또한, 재조합 단백질의 글리코형 함량에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 참조: PCT/US2014/069378. 오르니틴은 여러 효소에 의해 작동된다. 가령, 오르니틴 탈카르복실화효소는 폴리아민 생합성 경로에서 오르니틴의 푸트레신으로의 전환을 촉매작용한다. 참조: Pegg A, J. of Biol. Chem. (2006) 281:21 pp. 14532. 추가적으로,

시트룰린으로의 오르니틴 전환은 요소 회로의 일부로서 오르니틴 카르바밀전달효소에 의해 촉매된다. 오르니틴 물질대사는 배양 중인 세포의 시토줄 및 미토콘드리아 둘 모두에서 일어난다. 푸트레신의 존재 또는 오르니틴의 존재는 화학적으로 규정된 배지에서 배양된 세포의 성장 및 생산성을 위해 결정적인 것으로 간주되긴 하지만, 이런 세포에 의해 생산된 단백질의 중요한 품질 속성에 대한 영향은 설명되지 않았다.

[0034] "푸트레신"은 요소 회로에 관련된 비단백질 코딩 아미노산, 폴리아민이다. 푸트레신 ($C_4H_{12}N_2$ 의 화학식을 갖는, 1,4-디아미노부탄으로서 또한 알려져 있음)은 오르니틴의 탈카르복실화에 의해 생산되고 감마-아미노부티르산염 (γ -아미노부티르산염)에 대한 전구체로서 역할을 한다.

[0035] 본원에서 이용된 바와 같이, "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질"은 전역에서 교체가능하게 이용되고, 그리고 펩티드 결합에 의해 서로 결합된 2개 또는 그 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 분자를 지칭한다. 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질은 또한, 변형, 예를 들면, 글리코실화, 지질 부착, 황산화, 글루타민산 잔기의 감마-카르복실화, 알킬화, 히드록실화 및 ADP-리보실화를 포함할 수 있다. 단백질-기초된 약물 (생물치료제)을 비롯하여, 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질은 과학적으로 또는 상업적으로 관심을 받고 있다. 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질은 그 중에서도 특히, 항체 및 키메라 또는 융합 단백질을 포함한다. 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질은 세포 배양 방법을 이용하여 재조합 동물 세포주, 예를 들면, 포유류 세포주에 의해 생산될 수 있다.

[0036] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "폴리뉴클레오타이드 서열" 또는 "펩티드 서열"은 관심되는 단백질, 예를 들면, 생물약제학적 약물 물질로서 생산되는 키메라 단백질 (가령, 트랩 분자), 항체 또는 항체 부분 (가령, VH, VL, CDR3)을 인코딩하는 핵산 중합체를 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드 서열은 유전공학 기술 (가령, 키메라 단백질을 인코딩하는 서열, 또는 코돈 최적화된 서열, 무인트론 서열)에 의해 제조되고 세포 내로 도입될 수 있는데, 여기서 이것은 에피솜으로서 체류하거나 또는 세포의 유전체 내로 통합될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 서열은 숙주 세포 유전체 내에 이소성 부위 내로 도입되는 자연발생 서열일 수 있다. 펩티드 서열은 이중성, 예를 들면, 다른 생물체로부터 자연발생 서열, 재조합 서열, 유전적으로 변형된 서열, 또는 그 중에서도 특히, 야생형과 다른 프로모터의 제어 하에 발현된 서열, 예를 들면, 인간 오르소로그를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열일 수 있고, 여기서 숙주 (생산) 세포는 CHO 세포이다.

[0037] 관용구 "항원 결합 단백질"은 최소한 하나의 CDR을 갖고, 그리고 항원을 선별적으로 인식할 수 있는, 다시 말하면, 최소한 마이크로몰 범위 내에 있는 KD로 항원에 결합할 수 있는 단백질을 포함한다. 치료적 항원 결합 단백질 (가령, 치료 항체)은 나노몰 또는 피코몰 범위 내에 있는 KD를 빈번하게 필요로 한다. 전형적으로, 항원 결합 단백질은 2개 또는 그 이상의 CDRs, 예를 들면, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 CDRs를 포함한다. 항원 결합 단백질의 실례는 항체, 항체의 항원 결합 단편, 예를 들면, 항체의 중쇄와 경쇄의 가변 영역을 내포하는 폴리펩티드 (가령, Fab 단편, F(ab')₂ 단편), 그리고 항체의 중쇄와 경쇄의 가변 영역을 내포하고 중쇄 및/또는 경쇄의 불변 영역 (가령, 하나 또는 그 이상의 불변 도메인, 다시 말하면, CL, CH1, 힌지, CH2 및 CH3 도메인 중에서 한 가지 또는 그 이상)으로부터 추가 아미노산을 내포하는 단백질을 포함한다.

[0038] "항체"는 디설피드 결합에 의해 상호 연결된 2개의 무거운 (H) 사슬 및 2개의 가벼운 (L) 사슬인 4개의 폴리펩티드 사슬로 구성되는 면역글로불린 분자를 지칭한다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역 (HCVR 또는 VH) 및 중쇄 불변 영역을 갖는다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3을 내포한다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역 (VL) 및 경쇄 불변 영역을 갖는다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 (CL)으로 구성된다. VH와 VL 영역은 프레임워크 영역 (FR)으로 명명되고 더욱 보존되는 영역이 산재된, 상보성 결정 영역 (CDR)으로 명명된 초가변성의 영역으로 더욱 세분화될 수 있다. 각 VH와 VL은 아미노 말단으로부터 카르복시 말단으로 하기 순서로 배열된 3개의 CDRs 및 4개의 FRs로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4. 용어 "항체"는 임의의 아이소타입 또는 하위부류의 글리코실화된 및 비글리코실화된 면역글로불린 둘 모두를 포함한다. 용어 "항체"는 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 추출되거나 또는 단리된 항체 분자, 예를 들면, 항체를 발현하기 위해 뉴클레오타이드 서열로 형질감염된 숙주 세포로부터 단리된 항체를 포함한다. 용어 "항체"는 또한, 하나 이상의 에피토프에 결합할 수 있는 이중삼합체성 면역글로불린을 포함하는 이중특이적 항체를 포함한다. 이중특이적 항체는 U.S. 특허 출원 공개 번호 2010/0331527에서 전반적으로 설명되는데, 이것은 본원에서 참조로서 편입된다.

[0039] 항체 (또는 항체 단편) 또는 관심되는 단백질의 용어 "항원 결합 부분"은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 유지하는, 항체 또는 관심되는 단백질의 하나 또는 그 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 용어 "항원 결합 부분" 내에 포괄되는 단백질 결합 단편의 무제한적 실례는 하기를 포함한다: (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성되는 일가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디설피드 다리에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 이가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 구성되는 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 팔의 VL과 VH 도메인

으로 구성되는 Fv 단편, (v) VH 도메인으로 구성되는 dAb 단편 (Ward et al., Nature (1989) 241:544-546), (vi) 단리된 CDR, 그리고 (vii) 합성 링커에 의해 연결되어 단일 단백질 사슬을 형성하는 Fv 단편의 2개 도메인, VL과 VH로 구성되는 scFv (여기서 VL과 VH 영역은 쌍을 이루어 일가 분자를 형성한다). 단일 사슬 항체의 다른 형태, 예를 들면, 디아바디 역시 용어 "항체" 하에 포괄된다. 참조: 가령, Holliger et al., PNAS USA (1993) 90:6444-6448; Poljak et al., Structure (1994) 2:1121-1123.

[0040] 더 나아가, 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 상기 항체 또는 항체 부분 및 한 가지 또는 그 이상의 다른 단백질 또는 펩티드의 공유 또는 비공유 연관에 의해 형성된 더욱 큰 면역부착 분자의 부분일 수 있다. 이런 면역부착 분자의 무제한적 실례는 사합체성 scFv 분자를 만들기 위한 스트랩타비딘 코어 영역의 이용 (Kipriyanov et al., Human Antibodies and Hybridomas (1995) 6:93-101), 그리고 이가 및 비오틴화된 scFv 분자를 만들기 위한 시스테인 잔기, 마커 펩티드 및 C 말단 폴리히스티딘 태그의 이용 (Kipriyanov et al. Mol. Immunol. (1994) 31:1047-1058)을 포함한다. 항체 부분, 예를 들면, Fab 및 F(ab')₂ 단편은 전통적인 기술을 이용하여, 예를 들면, 전체 항체의 파파인 또는 펩신 소화를 통해 전체 항체로부터 제조될 수 있다. 게다가, 항체, 항체 부분 및 면역부착 분자는 당해 분야에 통상적으로 공지된 표준 재조합 DNA 기술을 이용하여 획득될 수 있다 (참조: Sambrook et al., 1989).

[0041] 용어 "인간 항체"는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변과 불변 영역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명의 인간 항체는 예로서, CDRs 및 특히, CDR3에서 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해 인코딩되지 않은 아미노산 잔기 (가령, 시험관내에서 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이유발에 의해 도입되거나, 또는 생체내에서 체성 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 추출되거나 또는 단리된 모든 인간 항체, 예를 들면, 숙주 세포 내로 형질감염된 재조합 발현 벡터를 이용하여 발현된 항체, 재조합, 조합 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 인간 면역글로불린 유전자에 대해 유전자도입성인 동물 (가령, 생쥐)로부터 단리된 항체 (참조: 가령, Taylor et al. Nucl. Acids Res. (1992) 20:6287-6295), 또는 다른 DNA 서열에 인간 면역글로불린 유전자 서열을 스플라이싱하는 것을 수반하는 임의의 다른 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 추출되거나 또는 단리된 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 이런 재조합 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변과 불변 영역을 갖는다. 일정한 구체예에서, 하지만, 이런 재조합 인간 항체는 시험관내 돌연변이유발 (또는, 인간 Ig 서열에 대해 유전자도입성인 동물이 이용될 때, 생체내 체성 돌연변이유발)에 종속되고, 그리고 따라서, 이들 재조합 항체의 VH와 VL 영역의 아미노산 서열은 인간 생식계열 VH와 VL 서열로부터 유래되고 이들 서열에 관련되긴 하지만, 생체내에서 인간 항체 생식계열 레퍼토리 내에 자연적으로 존재할 수 없는 서열이다.

[0042] "Fc 융합 단백질"은 2개 또는 그 이상의 단백질의 일부 또는 전부를 포함하고, 이들 중에서 하나는 면역글로불린 분자의 Fc 부분인데, 이들은 만약 그렇지 않으면, 자연에서 함께 발견되지 않는다. 항체-유래된 폴리펩티드의 다양한 부분 (Fc 도메인 포함)에 융합된 일정한 이종성 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질의 제조는 가령, Ashkenazi et al., PNAS USA (1991) 88:10535; Byrn et al., Nature (1990) 344:677; 및 Hollenbaugh et al., Current Protocols in Immunology (1992) Suppl. 4, pp. 10.19.1 - 10.19.11에 의해 설명되었다. "수용체 Fc 융합 단백질"은 일부 구체예에서, 면역글로불린의 힌지 영역, 그 이후에 CH₂와 CH₃ 도메인을 포함하는 Fc 모이 어티에 연계된 수용체의 하나 또는 그 이상의 세포외 도메인(들)을 포함한다. 일부 구체예에서, Fc-융합 단백질은 하나 또는 그 이상의 리간드(들)에 결합하는 2개 또는 그 이상의 상이한 수용체 사슬을 내포한다.

[0043] 일정한 구체예에서, "Fc-융합 단백질"은 "트랩 분자"인데, 이것은 상응하는 내인성 수용체의 결합 도메인 및 항체의 Fc 부분을 모방하는 2개의 상이한 수용체 성분을 포함하는 미끼 수용체 분자이다. 트랩 분자의 무제한적 실례는 하기를 포함한다: IL-1 트랩 (가령, IL-1R1 세포외 영역에 융합되고, 이것이 차례로 hIgG1의 Fc에 융합되는 IL-1RAcP 리간드 결합 영역을 내포하는 릴로나셉트) (가령, 서열 번호:1) (참조: U.S. 특허 번호 6,927,004), 또는 VEGF 트랩 (가령, VEGF 수용체 Flk1의 Ig 도메인 3에 융합되고, 이것이 차례로 hIgG1의 Fc에 융합되는 VEGF 수용체 Flt1의 Ig 도메인 2를 내포하는 아플리베르셉트. 가령, U.S. 특허 번호 7,087,411, 7,279,159를 참조한다; 또한, 에타네르셉트 (TNF 트랩)에 대해 U.S. 특허 번호 5,610,279를 참조한다.

[0044] "글리코실화"는 올리고당류가 단백질의 아스파라긴 (Asn) 잔기 (다시 말하면, N-연결된), 또는 세린 (Ser) 또는 트레오닌 (Thr) 잔기 (다시 말하면, O-연결된)의 측쇄에 부착되는 당단백질의 형성을 포함한다. "당단백질"은 O-연결된 글리칸 또는 N-연결된 글리칸을 내포하는 임의의 단백질을 포함한다. 글리칸은 당당류 잔기의 동종-또는 이종중합체일 수 있는데, 이들은 선형이거나 또는 분지될 수 있다. N-연결된 글리코실화는 소포체에서 일차적으로 개시되는 것으로 알려져 있고, 반면 O-연결된 글리코실화는 ER 또는 골지 기관에서 개시되는 것으로

밝혀진다. 용어 "N-글리칸"은 "N-연결된 올리고당류"와 교체가능하게 이용된다. 용어 "O-글리칸"은 "O-연결된 올리고당류"와 교체가능하게 이용된다.

[0045] "N-글리칸 단백질"은 N-연결된 올리고당류를 내포하거나 또는 수용할 수 있는 단백질을 포함한다. N-글리칸은 N-아세틸 갈락토사민 (GalNAc), 만노오스 (Man), 푸코오스 (Fuc), 갈락토오스 (Gal), 뉴라민산 (NANA), 그리고 다른 당당류로 구성될 수 있지만, N-글리칸은 통상적으로, 3개의 만노오스 및 2개의 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc) 당을 포함하는 통상적인 코어 오당류 구조를 갖는다. 연속 아미노산 서열, Asn-X-Ser 또는 Asn-X-Thr (여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다)을 갖는 단백질은 N-글리칸에 대한 부착 부위를 제공할 수 있다.

[0046] N-글리칸은 표 1에서 열거된 N-연결된 올리고당류를 포함한다. 열거된 올리고당류의 속기 명칭이 올리고당류를 설명하기 위한 단순화된 명칭으로서 본원에서 이용된다. 따라서 예로서, A1 N-글리칸은 (SA)(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3으로 구성되는 올리고당류에 연결된 아르기닌을 내포한다.

[0047] 표 1: N-연결된 올리고당류

표 1

분자의 명칭*	속기 명칭	예상된 질량 (g/mol)	그래픽 묘사*
(SA)(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3	A1	2051.7	
(SA)(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3(Fuc)	A1F	2197.7	
(SA)2(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3	A2	2343.2	
(SA)2(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3(Fuc)	A2F	2488.8	
(Man)5(GlcNAc)2	Man5	1354.4	
(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3	NA2	1760.6	
(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3(Fuc)	NA2F	1906.6	
(Gal)(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3	NA2G1	1598.5	
(Gal)(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3(Fuc)	NA2G1F	1744.1	
(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)2	NGA2	1436.5	
(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)2(Fuc)	NGA2F	1582.5	

[0048]

[0049] * 단당류에 대한 약어는 시알산 (SA), 갈락토오스 (Gal), 만노오스 (Man), GlcNAc (N-아세틸글루코사민) 및 푸코오스 (Fuc)이다. ** 글리칸 핵심: 삼각형 = 푸코오스; 사각형 = N-아세틸 글루코사민; 원 = 만노오스; 별 = 시알산.

[0050] 선별검사

[0051] "가수분해물"은 식물 재료, 동물 재료, 유장, 효모 등의 가수분해로부터 유래된 복합체 물질이다. 용어 "가수분해물"은 "단백질 가수분해물"과 교체가 가능하게 이용된다. "식물 가수분해물" (식물 단백질 가수분해물)은 가수분해된 식물 재료, 예를 들면, 쌀가루, 밀가루, 옥수수 가루, 콩가루, 기타 등등이다. 단백질 가수분해물은 3가지 일반적인 방법에 의해 제조될 수 있다: 산 가수분해, 알칼리 가수분해, 그리고 효소적 가수분해. 생물치료제 제조를 비롯한 생물학적 적용을 위해, 단백질 가수분해물은 주로, 효소적 가수분해에 의해 만들어진다. 가령, 펩신 소화에 의해 만들어진 콩 가수분해물은 "콩 펩톤"으로 불릴 수 있고, 또는 트립신 소화에 의해 만들어진 효모 가수분해물은 "효모 트립톤"으로 불릴 수 있다. Franek et al., Biotechnol. Prog. 16(5): 688-92 (2000)는 식물 단백질 가수분해물 및 이들을 제조하는 방법에 대해 본원에 편입된다.

[0052] 일부 구체예에서, 요지 가수분해물은 식물 가수분해물이다. 특정한 구체예에서, 요지 단백질 가수분해물은 콩 가수분해물이다. "콩 가수분해물"은 거의 화학적으로 규정되지 않은, 대두 그릿으로부터 유래된 효소적으로 소화된 콩 산물이다. 일반적으로, 콩 가수분해물은 아미노산, 단백질, 탄수화물, 무기질 및 비타민의 집합체로 구성된다. 콩 가수분해물은 예로서, 높은 농도 용액 (가령, HyClone™ HyQ 콩 가수분해물 용액) 또는 분말 (가령, Sigma Aldrich ® S1674 (Amisoy™), 콩 단백질 가수분해물) 형태에서 상업적으로 가용한 식물-유래된 단백질 가수분해물이다. 본원에서 이용된 바와 같이, 콩 가수분해물의 "배치" 또는 "로트"는 대두 그릿의 가수분해로부터 발생하는 콩 가수분해물의 제조된 양을 지칭한다. 가령, 각 가수분해 과정은 다양한 농도의 성분, 예를 들면, 비타민, 아미노산, 펩티드 및 당을 갖는 콩 가수분해물의 독특한 "배치" 또는 "로트"를 유발할 수 있다. 콩 가수분해물은 통상적으로, 상업적인 생물치료제, 예를 들면, 항체의 생산 동안 포유류 세포주의 성장을 위한 동물 단백질-없는 세포 배양 배지와 함께 이용된다. 더욱 특정하게는, 콩 가수분해물은 세포로 접종에 앞서 또는 접종 동안 세포 배양 배지에 첨가된다. 세포는 이후, 이들이 수확될 때까지, 가수분해물-내포 배지에서 배양된다. 콩 가수분해물의 규정되지 않은 성격 때문에, 콩 가수분해물의 배치는 배치별 (또는 로트별)로 변할 것인데, 이것은 생물치료제의 상업적인 제조에서 불일치를 야기할 수 있다.

[0053] 본 발명은 콩 가수분해물의 배치에서 일정한 성분의 농도가 콩 가수분해물을 이용한 세포 배양에서 생산된 단백질의 품질과 조성에 영향을 준다는 것을 확인하였다. 본 발명은 바람직한 양의 성분, 예를 들면, 예로서 오르니틴, 푸트레신, 시트룰린, 아르기닌 또는 이들의 조합을 내포하는 콩 가수분해물의 일정한 배치를 선별하기 위해 콩 가수분해물의 배치를 선별검사하기 위한 방법을 제공한다.

[0054] 일정한 구체예에서, 선별검사 방법은 콩 가수분해물의 배치의 최소한 일부 (다시 말하면, 표본)에서 오르니틴 또는 푸트레신의 양을 측정하는 것을 포함한다. 특정한 구체예에서, 콩 가수분해물 표본은 계량되고, 그리고 이들의 일부가 원하는 농도로 용해된다. 일부 구체예에서, 콩 가수분해물 용액은 이후, 용매에서 두 번째 원하는 농도 (가령, 1 g/L 내지 25 g/L)로 희석되고, 그리고 이후, 결과의 콩 가수분해물 용액의 조성이 결정될 수 있다.

[0055] 일부 구체예에서, 측정하는 단계는 예로서, 포스트 칼럼 다회도 반응 이후에 수행된 비색 검출, 또는 크로마토그래피 f 용리된 다회도-양성 화합물을 포함하는, 콩 가수분해물 표본의 분자 조성을 결정하기 위한 적합한 방법, 예를 들면, HPLC 또는 UPLC를 이용하고, 그리고 각 성분 (가령, 오르니틴 또는 푸트레신)의 측정된 양을 표현하는데 이용된 단위는 임의의 적합한 단위 (가령, 마이크로몰/L, mg/L 또는 g/L)일 수 있다. 일부 구체예에서, 오르니틴 또는 푸트레신의 양을 측정하는 것은 표본 내에 오르니틴의 농도를 측정하거나, 또는 콩 가수분해물 표본 내에 오르니틴의 총량을 측정하는 것을 포함한다. 하지만, 오르니틴 또는 푸트레신의 양이 측정되고, 그리고 측정된 양을 표현하는데 어떤 단위가 이용되든, 콩 가수분해물의 선별된 배치 내에 오르니틴 또는 푸트레신의 농도는 콩 g당 0.67 mg 오르니틴 또는 푸트레신보다 적거나 또는 이와 동등하다.

[0056] 한 구체예에서, 콩 가수분해물의 배치의 표본이 획득되고, 그리고 상기 표본의 오르니틴 또는 푸트레신 함량이 포스트 칼럼 다회도 검출과 함께 이온 교환 칼럼에서 아미노산의 크로마토그래피에 의해 측정된다. 더욱 특정하게는, 특정한 구체예에서 선별검사 방법은 콩 가수분해물 표본의 산 가수분해 및 표본 완충액에서 재구성을 포함한다. 가수분해된 표본은 이후, 예로서 술폰화된 폴리스티렌 수지 (Dowex 50)의 칼럼 상에서 고성능 양이온

교환 분리, 그 이후에 표본 내에서 개별 아미노산의 민감한 검출을 허용하는 포스트 칼럼 유도체화에 종속된다. 참조: 가령, Moore and Stein. J. Biol. Chem. (1954) Vol. 211 pp. 907-913; Nemkov, et al., Amino Acids 2015 Nov; 47(11): 2345-2357; Wahl and Holzgrabe, "Amino acid analysis for pharmacopoeial purposes," Talanta 154:150-163, 1 July 2016. 닥히드린 시약에 의한 포스트 칼럼 발색 현상 이후에, 흡광도가 닥히드린 자주색 범위, 예를 들면, 570 nm에서 계측된다. 데이터 획득은 아미노산마다 마이크로몰/L, 아미노산마다 mg/L, 또는 아미노산마다 g/L을 보여주는 정량적 크로마토그램을 제공하는 크로마토그래피 소프트웨어 (가령, Hitachi 버전 3.1.5b 크로마토그래피 소프트웨어를 위한 EZChrom Elite)를 이용하여 달성된다.

[0057] 당업자는 표본 조성에서 아미노산의 확인과 계측을 위한 다른 방법, 예를 들면, 액체 크로마토그래피 및 질량 분광법을 이용한 전치칼럼 유도체화 크로마토그래피 또는 역상 액체 크로마토그래피 방법이 본 발명의 방법에 따라서 이용될 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0058] 일정한 구체예에서, 액체 크로마토그래피-질량 분광분석법이 쿡 가수분해물 표본을 선별검사하는데 이용된다. 가령, 쿡 가수분해물의 배치의 표본이 본원에서 진술된 바와 같이 획득되고, 그리고 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 시스템, 예를 들면, Agilent 1100 또는 Agilent 1200SL에서 한 번의 크로마토그래피 실행, 또는 일련의 크로마토그래피 실행에 종속될 수 있다. 계측되는 쿡 가수분해물 표본의 조성을 설명하는 고분해능 정량적 데이터를 제공하기 위해 질량 분광분석법 분석이 실행될 수 있다.

[0059] 일부 구체예에서, 본 발명은 원하는 양의 성분, 예를 들면, 오르니틴, 푸트레신 및/또는 시트룰린에 대해 쿡 가수분해물의 배치를 선별검사하고, 그리고 원하는 양의 이런 성분을 갖는 쿡 가수분해물의 배치를 선별하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 가령, 쿡 가수분해물 분말의 배치의 일부를 포함하는 표본이 진술된 바와 같이 선별 검사되고, 그리고 표본 실행과 동일한 조건 하에 산출된 아미노산 표준 프로파일과 비교될 수 있다. 도 1a-1b에서 도시된 바와 같이, 결과의 크로마토그램(들)은 쿡 가수분해물 표본 내에 존재하는 각 아미노산 성분의 농도를 제공할 것이다 (가령, 아미노산마다 마이크로몰/L, 아미노산마다 mg/L, 또는 아미노산마다 g/L). 크로마토그램을 분석하는 것은 원하는 농도의 성분, 예를 들면, 오르니틴, 푸트레신 및/또는 시트룰린을 내포하는 쿡 가수분해물의 배치 (다시 말하면, 표본)의 확인을 용이하게 한다. 원하는 양의 특정한 성분 또는 성분들을 포함하는 쿡 가수분해물의 각 배치는 이후, 본원에서 설명된 바와 같이, 예로서 세포 배양에서 추가 이용을 위해 선별된다. 도 1, 패널 A는 아미노산 확인 이후에 거부된 배치를 묘사한다. 도 1, 패널 B는 동일한 조건 하에 허용되는 쿡 가수분해물 배치 실행의 실례를 묘사한다. 오르니틴에 상응하는 아미노산 피크는 양쪽 도면에서 동그라미 쳐진다. 오르니틴 또는 푸트레신의 농도가 결정되면 표준 곡선이 산출되고 표본 오르니틴 또는 푸트레신 농도가 보간될 수 있다. 대안으로, 오르니틴 또는 푸트레신의 상대적 양이 오르니틴 또는 푸트레신 피크에 대한 곡선 아래 면적을 결정하고, 그리고 이것을 모든 아미노산에 대한 피크 아래 총면적으로 나누거나, 또는 피크 면적을 표준과 비교함으로써 결정될 수 있다.

[0060] 일정한 구체예에서, 선별되는 쿡 가수분해물의 성분 (가령, 오르니틴 또는 푸트레신)의 원하는 농도는 5 mg/L 또는 그 이하이다. 한 구체예에서, 선별되는 쿡 가수분해물의 배치에서 오르니틴 또는 푸트레신의 원하는 농도는 0.5 mg/L 내지 5.0 mg/L 또는 0.5 mg/L 내지 2.0 mg/L의 범위에서 변한다. 다른 구체예에서, 쿡 가수분해물의 선별된 배치에서 오르니틴 또는 푸트레신의 농도는 0.5 mg/L 내지 4.5 mg/L, 0.5 mg/L 내지 4.0 mg/L, 0.5 mg/L 내지 3.5 mg/L, 0.5 mg/L 내지 3.0 mg/L, 0.5 mg/L 내지 2.5 mg/L, 0.5 mg/L 내지 2.0 mg/L, 0.5 mg/L 내지 1.5 mg/L 또는 0.5 mg/L 내지 1.0 mg/L의 범위에서 변한다. 일부 구체예에서, 쿡 가수분해물의 선별된 배치에서 오르니틴 또는 푸트레신의 농도는 1.0 mg/L 내지 5.0 mg/L, 1.5 mg/L 내지 5.0 mg/L, 2.0 mg/L 내지 5.0 mg/L, 2.5 mg/L 내지 5.0 mg/L, 3.0 mg/L 내지 5.0 mg/L, 3.5 mg/L 내지 5.0 mg/L, 4.0 mg/L 내지 5.0 mg/L 또는 4.5 mg/L 내지 5.0 mg/L의 범위에서 변한다.

[0061] 특정한 구체예에서, 쿡 가수분해물의 배치에서 오르니틴 또는 푸트레신의 원하는 농도는 최소한 0.5 mg/L, 0.6 mg/L, 0.7 mg/L, 0.8 mg/L, 0.9 mg/L, 1.1 mg/L, 1.2 mg/L, 1.3 mg/L, 1.4 mg/L, 1.5 mg/L, 1.6 mg/L, 1.7 mg/L, 1.8 mg/L, 1.9 mg/L, 2.0 mg/L, 2.1 mg/L, 2.2 mg/L, 2.3 mg/L, 2.4 mg/L, 2.5 mg/L, 2.6 mg/L, 2.7 mg/L, 2.8 mg/L, 2.9 mg/L, 3.0 mg/L, 3.1 mg/L, 3.2 mg/L, 3.3 mg/L, 3.4 mg/L, 3.5 mg/L, 3.6 mg/L, 3.7 mg/L, 3.8 mg/L, 3.9 mg/L, 4.0 mg/L, 4.1 mg/L, 4.2 mg/L, 4.3 mg/L, 4.4 mg/L, 4.5 mg/L, 4.6 mg/L, 4.7 mg/L, 4.8 mg/L, 4.9 mg/L, 또는 5.0 mg/L 오르니틴 또는 푸트레신이다.

[0062] 다른 구체예에서, 쿡 가수분해물의 배치에서 오르니틴 또는 푸트레신의 원하는 농도는 쿡 g당 0.67 mg 오르니틴보다 많지 않다. 또 다른 구체예에서, 쿡 가수분해물의 배치에서 오르니틴 또는 푸트레신의 원하는 농도는 쿡 g당 0.27 mg 오르니틴보다 많지 않다. 다른 구체예에서, 쿡 가수분해물의 배치에서 오르니틴 또는 푸트레신의 원

하는 농도는 콩 g당 0.24 mg 오르니틴 또는 푸트레신보다 많지 않다. 일부 구체예에서, 콩의 배치에서 오르니틴 또는 푸트레신의 원하는 농도는 콩 g당 0.067 mg 내지 0.67 mg 오르니틴 또는 푸트레신이다. 또 다른 구체예에서, 콩 가수분해물의 배치에서 오르니틴 또는 푸트레신의 원하는 농도는 콩 g당 0.067 mg 내지 0.27 mg 오르니틴의 범위에 들어간다. 또 다른 구체예에서, 콩 가수분해물의 배치에서 오르니틴 또는 푸트레신의 원하는 농도는 콩 g당 0.067 mg 내지 0.24 mg 오르니틴 또는 푸트레신의 범위에 들어간다.

[0063] 한 구체예에서, 선별된 콩 가수분해물에서 오르니틴 또는 푸트레신의 질량에 의한 상대적 양 (% w/w) (w/w = 오르니틴 또는 푸트레신의 질량/가수분해물의 전체 질량)은 $\leq 0.067\%$, 예를 들면, 0.0001%, 0.0002%, 0.0003%, 0.0004%, 0.0005%, 0.0006%, 0.0007%, 0.0008%, 0.0009%, 0.001%, 0.0015%, 0.002%, 0.0025%, 0.003%, 0.0035%, 0.004%, 0.0045%, 0.005%, 0.0055%, 0.006%, 0.0061%, 0.0062%, 0.0063%, 0.0064%, 0.0065%, 0.0066% (이들 모두 w/w)이다.

[0064] 한 구체예에서, 식물 단백질 가수분해물은 특정한 품질 속성을 갖는 당단백질을 생산하는 것에 근거하여 선별된다. 당단백질의 품질은 당단백질 상에서 한 가지 또는 그 이상의 특정한 N-글리칸의 수준을 사정함으로써, 또는 당단백질 상에서 한 가지 또는 그 이상의 특정한 당의 수준 또는 복수 속성의 조합을 사정함으로써 결정될 수 있다. 가령, 특정한 푸코오스 수준, 예를 들면, 당단백질의 몰당 5-10 몰의 푸코오스를 갖는 당단백질은 품질 속성 기준일 수 있고; 또는 특정한 시알산 수준, 예를 들면, 당단백질의 몰당 5-15 몰의 시알산; 또는 모든 N-글리칸의 전체마다 A1 N-글리칸의 특정한 비율, 예를 들면, 10-17% (w/w)는 필수적인 품질 속성을 갖는 것으로 고려될 수 있다. 상기 당단백질의 생산을 실시가능하게 하는 식물 단백질 가수분해물은 선별가능한 것으로 고려될 것이다.

[0065] 한 구체예에서, 식물 단백질 가수분해물은 잠재적인 선별된 (잠재적으로 선별가능) 식물 단백질 가수분해물 (가령, 콩 가수분해물)을 내포하는 배치에서 배양된 세포에서 당단백질을 생산하고, 당단백질을 정제하고, 당단백질을 올리고당류 지문확인에 종속시키고, 그리고 A1 N-글리칸과 연관된 피크 아래 면적을 계산하고 상기 값을 모든 N-글리칸의 피크 아래 총면적으로 나눔으로써 A1 N-글리칸의 상대적 양을 결정하고, 그리고 $\geq 10\%$, $\geq 10.5\%$, 10-17%, 10%, 10.5%, 11%, 11.5%, 12%, 12.5%, 13%, 13.5%, 14%, 14.5%, 15%, 15.5%, 16%, 16.5%, 17%, 17.5%, 또는 18%의 A1 N-글리칸의 상대적 양을 갖는 당단백질의 생산을 가능하게 한 식물 단백질 가수분해물을 선별함으로써 선별된다.

[0066] 세포 배양

[0067] 본 발명은 전술된 바와 같이, 콩 가수분해물의 선별된 배치를 이용하여 세포 배양 배치에서 관심되는 단백질을 발현하는 세포를 배양하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명은 세포 배양 배치에서 5.0 mg/L 오르니틴 또는 그 이하를 포함하는 콩 가수분해물의 선별된 배치의 이용이 로트별 가변성을 감소시키고 단백질 산물 품질을 향상시킨다는 것을 처음 발견하였다. 본 발명은 세포 배양 배치에서 5.0 mg/L 푸트레신 또는 그 이하를 포함하는 콩 가수분해물의 선별된 배치의 이용이 로트별 가변성을 감소시키고 단백질 산물 품질을 향상시킨다는 것을 처음 발견하였다.

[0068] "세포 배양" 또는 "배양"은 다세포 생물체 또는 조직의 외부에서 세포의 성장과 증식을 의미한다. 포유류 세포에 대한 적합한 배양 조건은 당해 분야에서 공지된다. 참조: 가령, Animal cell culture: A Practical Approach, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992). 포유류 세포는 현탁 상태에서 또는 고체 기질에 부착된 상태에서 배양될 수 있다. 마이크로캐리어가 있거나 또는 없고, 그리고 배치, 유가, 연속, 반-연속, 또는 관류 방식으로 작동되는 유동층 생물반응기, 중공 섬유 생물반응기, 롤러 병, 진탕 플라스크, 또는 교반된 탱크 생물반응기가 포유류 세포 배양에 이용가능하다. 세포 배양 배치 또는 농축된 유가 배치가 배양 동안 연속적으로 또는 간격을 두고 배양액에 첨가될 수 있다. 가령, 배양액은 하루 1 회 공급되거나, 2 일마다 공급되거나, 3 일마다 공급되거나, 또는 모니터링되는 특정한 배치 성분의 농도가 원하는 범위 밖에 있을 때 공급될 수 있다.

[0069] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "세포 배양 배치", "배지", "세포 배지", "세포 배양 배지" 또는 "배양 배지"는 세포, 예를 들면, 동물 또는 포유류 세포를 성장시키는데 이용되는 임의의 영양소 용액을 지칭하고, 그리고 일반적으로, 하기로부터 최소한 한 가지 또는 그 이상의 성분을 제공한다: 에너지 공급원 (통상적으로 탄수화물, 예를 들면, 글루코오스의 형태에서); 모든 필수 아미노산 중에서 한 가지 또는 그 이상, 그리고 일반적으로 20개의 기본 아미노산, 플러스 시스테인; 전형적으로 낮은 농도에서 필요한 비타민 및/또는 다른 유기 화합물; 지질 또는 유리 지방산; 그리고 전형적으로 매우 낮은 농도에서, 통상적으로 마이크로몰 범위에서 필요한 미량 원소, 예를 들면, 무기 화합물 또는 자연발생 원소. 일부 구체예에서, 세포 배양 배지는 콩 또는 다른 식

물 단백질 가수분해물을 추가 성분과 조합함으로써 형성된다.

- [0070] 본원에서 이용된 바와 같이, "추가 성분"은 물, 에너지 공급원, 모든 필수 아미노산 중에서 한 가지 또는 그 이상, 그리고 일반적으로 20개의 기본 아미노산, 플러스 시스템; 전형적으로 낮은 농도에서 필요한 비타민 및/또는 다른 유기 화합물, 지질 또는 유리 지방산, 그리고 미량 원소를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 세포 배양 배지 성분 중에서 한 가지 또는 그 이상을 포함한다.
- [0071] 특정한 구체예에서, 세포 배양 배지는 콩 가수분해물의 선별된 배치의 양으로 보충된다. 일정한 구체예에서, 세포 배양 배지는 약 0.5 g/L 내지 약 25 g/L의 선별된 콩 가수분해물로 보충된다. 일부 구체예에서, 세포 배양 배지는 약 0.5 g/L, 1 g/L, 1.5 g/L, 2 g/L, 2.5 g/L, 2 g/L, 2.5 g/L, 3 g/L, 3.5 g/L, 4 g/L, 4.5 g/L, 5 g/L, 5.5 g/L, 6 g/L, 6.5 g/L, 7 g/L, 7.5 g/L, 8 g/L, 8.5 g/L, 9 g/L, 9.5 g/L, 10 g/L, 10.5 g/L, 11 g/L, 11.5 g/L, 12 g/L, 12.5 g/L, 13 g/L, 13.5 g/L, 14 g/L, 14.5 g/L, 15 g/L, 15.5 g/L, 16 g/L, 16.5 g/L, 17 g/L, 17.5 g/L, 18 g/L, 18.5 g/L, 19 g/L, 19.5 g/L, 20 g/L, 20.5 g/L, 21 g/L, 21.5 g/L, 22 g/L, 22.5 g/L, 23 g/L, 23.5 g/L, 24 g/L, 24.5 g/L, 또는 약 25 g/L의 콩 가수분해물의 선별된 배치로 보충된다.
- [0072] 한 구체예에서, 식물 단백질 가수분해물의 첨가 후 세포 배양 배지에서 오르니틴 또는 푸트레신의 농도는 $\leq$ 5mg/L, 0.6 - 3 mg/L, 0.01 mg/L, 0.02 mg/L, 0.03 mg/L, 0.04 mg/L, 0.05 mg/L, 0.06 mg/L, 0.07 mg/L, 0.08 mg/L, 0.09 mg/L, 0.010 mg/L, 0.015 mg/L, 0.02 mg/L, 0.025 mg/L, 0.03 mg/L, 0.035 mg/L, 0.04 mg/L, 0.045 mg/L, 0.05 mg/L, 0.055 mg/L, 0.06 mg/L, 0.065 mg/L, 0.07 mg/L, 0.075 mg/L, 0.08 mg/L, 0.085 mg/L, 0.09 mg/L, 0.095 mg/L, 0.1 mg/L, 0.15 mg/L, 0.2 mg/L, 0.25 mg/L, 0.3 mg/L, 0.35 mg/L, 0.4 mg/L, 0.45 mg/L, 0.5 mg/L, 0.55 mg/L, 0.6 mg/L, 0.65 mg/L, 0.7 mg/L, 0.75 mg/L, 0.8 mg/L, 0.85 mg/L, 0.9 mg/L, 0.95 mg/L, 1 mg/L, 1.5 mg/L, 2 mg/L, 2.5 mg/L, 3 mg/L, 3.5 mg/L, 4 mg/L, 4.5 mg/L, 또는 5 mg/L이다.
- [0073] 한 구체예에서, 배양되는 세포는 생물치료 단백질을 생산할 수 있는 세포주의 세포이다. 단백질 생물치료제를 생산하는데 이용되는 세포주의 무제한적 실례는 그 중에서도 특히, 일차 세포, BSC 세포, HeLa 세포, HepG2 세포, LLC-MK 세포, CV-1 세포, COS 세포, VERO 세포, MDBK 세포, MDCK 세포, CRFK 세포, RAF 세포, RK 세포, TCMK-1 세포, LLCPK 세포, PK15 세포, LLC-RK 세포, MDOK 세포, BHK 세포, BHK-21 세포, CHO 세포, CHO-K1 세포, NS-1 세포, MRC-5 세포, WI-38 세포, BHK 세포, 3T3 세포, 293 세포, RK 세포, Per.C6 세포 및 닭 배아 세포를 포함한다. 한 구체예에서, 세포주는 CHO 세포주, 또는 대규모 단백질을 생산을 위해 최적화된 여러 특정한 CHO 세포 변이체 중에서 한 가지 또는 그 이상, 예를 들면, CHO-K1, 또는 CHO-K1-유래된 EESYR® (증강된 발현 및 안정성 영역) 세포 (US 특허 번호 7,771,997)를 포함한다.
- [0074] 한 구체예에서, 배양되고 이중성 당단백질을 발현하는 세포는 당단백질 또는 당단백질의 아단위를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 품고 발현하는 세포 (다시 말하면, 선조 세포)의 클론 확장에 의해 획득된 세포 개체군인데, 여기서 상기 당단백질은 복합 다중아단위 단백질, 예를 들면, 항체이다. 일부 구체예에서 선조 세포로부터 클론 확장에 의해 획득되거나 또는 유래된 세포 개체군의 성분 세포 중에서 최소한 50%, 최소한 60%, 최소한 70%, 최소한 80%, 최소한 90%, 최소한 95%, 최소한 98%, 최소한 99%, 또는 약 100%가 당단백질-인코딩 폴리뉴클레오티드를 내포하고 상기 당단백질을 발현한다.
- [0075] 포유류 세포, 예를 들면, CHO 세포는 소규모 세포 배양 용기에서, 예를 들면, 약 25 ml의 배지를 갖는 125 ml 용기, 약 50 내지 100 ml의 배지를 갖는 250 ml 용기, 약 100 내지 200 ml의 배지를 갖는 500 ml 용기에서 배양될 수 있다. 대안으로, 배양액은 대규모, 예를 들면, 예로서 약 300 내지 1000 ml의 배지를 갖는 1000 ml 용기, 약 500 ml 내지 3000 ml의 배지를 갖는 3000 ml 용기, 약 2000 ml 내지 8000 ml의 배지를 갖는 8000 ml 용기, 그리고 약 4000 ml 내지 15000 ml의 배지를 갖는 15000 ml 용기일 수 있다. 제조를 위한 배양액 (다시 말하면, 생산 세포 배양액)은 10,000 L의 배지 또는 그 이상을 내포할 수 있다. 예로서, 단백질 치료제의 임상적 제조를 위한 대규모 세포 배양액 또는 "생산 세포 배양액"은 전형적으로 수일, 또는 심지어 수주 동안 유지되고, 이 기간 동안 이들 세포는 원하는 단백질(들)을 생산한다. 이러한 시간 동안 배양액은 배양의 코스 동안 소비되는 성분, 예를 들면, 영양소 및 아미노산을 내포하는 농축된 유가 배지로 보충될 수 있다.
- [0076] 일정한 구체예에서, 농축된 유가 배지가 이용된다. 농축된 유가 배지는 임의의 세포 배양 배지 구성에 근거될 수 있다. 이런 농축된 유가 배지는 본원에서 설명된 세포 배양 배지의 성분 중에서 대부분을 예로서, 그들의 정상적인 유용한 양의 약 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 30X, 50X, 100X, 200X, 400X, 600X, 800X, 또는 심지어 약 1000X로 내포할 수 있다. 농축된 유가 배지는 유가 배양 과정에서 종종 이용된다.

- [0077] 일부 구체예에서, 세포 배양 배지는 세포 성장 또는 단백질 생산의 코스 동안, 첨가로서 또한 알려져 있는 "사용 현장 첨가", 사용 현장 성분, 또는 사용 현장 화합물로 보충된다. 사용 현장 첨가는 성장 인자 또는 다른 단백질, 완충액, 에너지 공급원, 염, 아미노산, 금속, 그리고 킬레이터 중에서 한 가지 또는 그 이상을 포함한다. 다른 단백질은 트랜스페린 및 알부민을 포함한다. 사이토킨 및 케모킨을 포함하는 성장 인자는 당해 분야에서 전반적으로 공지되어 있고 세포 성장, 또는 일부 경우에, 세포 분화를 자극하는 것으로 알려진다. 성장 인자는 통상적으로 단백질 (가령, 인슐린), 작은 펩티드, 또는 스테로이드 호르몬, 예를 들면, 에스트로겐, DHEA, 테스토스테론 등이다. 일부 경우에, 성장 인자는 세포 증식 또는 단백질 생산을 증진하는 비자연 화합물, 예를 들면, 예로서 테트라히드로폴레이트 (THF), 메토크사트 등일 수 있다. 단백질과 펩티드 성장 인자의 무제한적 실례는 안지오프로이오티, 뼈 형태형성 단백질 (BMPs), 뇌-유래된 신경영양 인자 (BDNF), 표피 성장 인자 (EGF), 에리트로포이오티 (EPO), 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 신경아교 세포주-유래된 신경영양 인자 (GDNF), 과립구 집락 자극 인자 (G-CSF), 과립구 대식세포 집락 자극 인자 (GM-CSF), 성장 분화 인자-9 (GDF9), 간세포 성장 인자 (HGF), 간암-유래된 성장 인자 (HDGF), 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자 (IGF), 이주-자극 인자, 미오스타틴 (GDF-8), 신경 성장 인자 (NGF) 및 다른 뉴로트로핀, 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF), 트롬보포이오티 (TPO), 전환 성장 인자 알파(TGF- α), 전환 성장 인자 베타(TGF- β), 종양 괴사 인자-알파(TNF- α), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), wnt 신호전달 경로 효연제, 태반 성장 인자 (PlGF), 태아 소 소마토트로핀 (FBS), 인터류킨-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 등을 포함한다. 한 구체예에서, 세포 배양 배지는 사용 현장 첨가 성장 인자 인슐린으로 보충된다. 한 구체예에서, 배지에서 인슐린의 농도, 다시 말하면, 첨가 후 세포 배양 배지에서 인슐린의 양은 약 0.1 μ M 내지 10 μ M이다. 한 가지 또는 그 이상의 사용 현장 첨가는 또한 일부 구체예의 배지 조성 내에 포함될 수 있다.
- [0078] 완충액은 당해 분야에서 전반적으로 공지되어 있다. 본 발명은 임의의 특정 완충액 또는 완충액들에 한정되지 않고, 그리고 임의의 당업자는 특정 단백질을 생산하는 특정 세포주용으로 온당한 완충액 또는 완충계를 선별할 수 있다. 한 구체예에서, 사용 현장 첨가 완충액은 NaHCO₃/CO₂ 시스템이다. 한 구체예에서, 사용 현장 첨가 완충액은 NaHCO₃을 포함한다. 다른 구체예에서, 완충액은 HEPES이다.
- [0079] 세포 배양에서 사용 현장 첨가로서 이용을 위한 에너지 공급원 역시 당해 분야에서 널리 공지된다. 제한 없이, 한 구체예에서, 사용 현장 첨가 에너지 공급원은 글루코오스이다. 특정 세포주 및 생산되는 단백질의 특정하고 특이적인 요건을 고려하여, 한 구체예에서 글루코오스는 배지에서 약 1 내지 20 mM의 농도로 첨가될 수 있다.
- [0080] 킬레이터는 세포 배양 및 단백질 생산의 분야에서 유사하게 널리 공지된다. 비록 다른 킬레이터가 본 발명의 실시에서 이용될 수 있긴 하지만, 테트라소듐 EDTA 건조물 및 구연산염이 당해 분야에서 이용되는 2가지 통상적인 킬레이터이다. 한 구체예에서, 사용 현장 첨가 킬레이터는 테트라소듐 EDTA 이수화물이다. 한 구체예에서, 사용 현장 첨가 킬레이터는 구연산염, 예를 들면, Na₃C₆H₅O₇이다.
- [0081] 한 구체예에서, 세포 배양액은 한 가지 또는 그 이상의 사용 현장 첨가 아미노산, 예를 들면, 글루타민으로 보충될 수 있다. 다른 사용 현장 첨가는 다양한 금속 염, 예를 들면, 철, 니켈, 아연 및 구리의 염 중에서 한 가지 또는 그 이상을 포함한다. 한 구체예에서, 세포 배양 배지는 황산동, 황산아연, 염화철; 그리고 황산니켈 중에서 한 가지 또는 그 이상으로 보충된다.
- [0082] 한 구체예에서, 배지는 유가 과정에 따라서 세포 배양 동안 간격을 두고 보충된다. 유가 배양은 당해 분야에서 전반적으로 공지되어 있고 최적화된 단백질 생산에 이용된다. 참조: 가령, Y.M. Huang et al., *Biotechnol Prog.* (2010) 26(5) pp.1400-1410.
- [0083] 본 발명의 다른 양상에서, 원하는 농도 (다시 말하면, 5.0 mg/L보다 적거나 또는 이와 동등한 농도, 예를 들면, 0.5 mg/L 내지 5.0 mg/L 또는 0.5 mg/L 내지 2.0 mg/L)에서 오르니틴 또는 푸트레신을 내포하는 용 가수분해물을 포함하는 배지에서 배양되는 세포는 5 mg/L보다 큰 농도에서 오르니틴 또는 푸트레신을 내포하는 용 가수분해물을 포함하는 배지에서 배양되는 세포와 비교하여 향상된 품질을 갖는 관심되는 단백질을 생산한다. 일정한 구체예에서, 향상된 단백질 품질은 하기에 의해 측정된다: 관심되는 단백질 상에서 하나 또는 그 이상의 아미노산에서 글리코실화의 존재 또는 부재, 관심되는 단백질 상에서 글리칸의 양, 관심되는 단백질 상에서 하나 또는 그 이상의 글리코실화 부위에서 시알산의 존재, 또는 이들의 조합. 본원에서 이용된 바와 같이, "증강된 품질", "향상된 품질" 또는 "높은 품질" 단백질 산물은 또한, 더욱 일관된 품질, 예를 들면, 생물치료 단백질 생산 로트에서 관찰되는 번역후 변형을 지칭할 수 있다. 일관된 품질은 예로서, 복제 생산 라인 후 반복적인 원하는 글리코실화 프로필을 갖는 것을 포함한다. 품질에 대하여 일관성은 균일성 및 표준화의 정도를 지칭하고, 반면 복제 생산 배치는 변이가 본질적으로 없다.

[0084] 일정한 구체예에서, 단백질 산물 (관심되는 단백질)은 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단일클론 항체, 다중특이적 항체, 이중특이적 항체, 항원 결합 항체 단편, 단일 사슬 항체, 디아바디, 트리아바디 또는 테트라바디, Fab 단편 또는 F(ab')₂ 단편, IgD 항체, IgE 항체, IgM 항체, IgG 항체, IgG1 항체, IgG2 항체, IgG3 항체, 또는 IgG4 항체이다. 한 구체예에서, 항체는 IgG1 항체이다. 한 구체예에서, 항체는 IgG2 항체이다. 한 구체예에서, 항체는 IgG4 항체이다. 한 구체예에서, 항체는 키메라 IgG2/IgG4 항체이다. 한 구체예에서, 항체는 키메라 IgG2/IgG1 항체이다. 한 구체예에서, 항체는 키메라 IgG2/IgG1/IgG4 항체이다.

[0085] 일부 구체예에서, 항체는 항-예정된 세포 사멸 1 항체 (가령, U.S. 특허 출원 공개 번호 US2015/0203579A1에서 설명된 바와 같은 항-PD1 항체), 항-예정된 세포 사멸 리간드-1 (가령, U.S. 특허 출원 공개 번호 US2015/0203580A1에서 설명된 바와 같은 항-PD-L1 항체), 항-D114 항체, 항-안지오프로테틴-2 항체 (가령, U.S. 특허 번호 9,402,898에서 설명된 바와 같은 항-ANG2 항체), 항-안지오프로테틴-유사 3 항체 (가령, U.S. 특허 번호 9,018,356에서 설명된 바와 같은 항-AngPt13 항체), 항혈소판 유래된 성장 인자 수용체 항체 (가령, U.S. 특허 번호 9,265,827에서 설명된 바와 같은 항-PDGFR 항체), 항-Erb3 항체, 항-프로락틴 수용체 항체 (가령, U.S. 특허 번호 9,302,015에서 설명된 바와 같은 항-PRLR 항체), 항보체 5 항체 (가령, U.S. 특허 출원 공개 번호 US2015/0313194A1에서 설명된 바와 같은 항-C5 항체), 항-TNF 항체, 항-표피 성장 인자 수용체 항체 (가령, U.S. 특허 번호 9,132,192에서 설명된 바와 같은 항-EGFR 항체, 또는 U.S. 특허 출원 공개 번호 US2015/0259423A1에서 설명된 바와 같은 항-EGFRvIII 항체), 항-전단백질 전환효소 서브틸리신 켄신-9 항체 (가령, U.S. 특허 번호 8,062,640 또는 U.S. 특허 출원 공개 번호 US2014/0044730A1에서 설명된 바와 같은 항-PCSK9 항체), 항-성장 및 분화 인자-8 항체 (가령, U.S. 특허 번호 8,871,209 또는 9,260,515에서 설명된 바와 같은, 항-미오스타틴 항체로서 또한 알려져 있는 항-GDF8 항체), 항-글루카곤 수용체 (가령, U.S. 특허 출원 공개 번호 US2015/0337045A1 또는 US2016/0075778A1에서 설명된 바와 같은 항-GCGR 항체), 항-VEGF 항체, 항-IL1R 항체, 인터류킨 4 수용체 항체 (가령, U.S. 특허 출원 공개 번호 US2014/0271681A1 또는 U.S. 특허 번호 8,735,095 또는 8,945,559에서 설명된 바와 같은 항-IL4R 항체), 항-인터류킨 6 수용체 항체 (가령, U.S. 특허 번호 7,582,298, 8,043,617 또는 9,173,880에서 설명된 바와 같은 항-IL6R 항체), 항-IL1 항체, 항-IL2 항체, 항-IL3 항체, 항-IL4 항체, 항-IL5 항체, 항-IL6 항체, 항-IL7 항체, 항-인터류킨 33 (가령, U.S. 특허 출원 공개 번호 US2014/0271658A1 또는 US2014/0271642A1에서 설명된 바와 같은 항-IL33 항체), 항-호흡기 합포체 바이러스 항체 (가령, U.S. 특허 출원 공개 번호 US2014/0271653A1에서 설명된 바와 같은 항-RSV 항체), 항-분화 클러스터 3 (가령, U.S. 특허 출원 공개 번호 US2014/0088295A1 및 US20150266966A1에서 및 U.S. 출원 번호 62/222,605에서 설명된 바와 같은 항-CD3 항체), 항-분화 클러스터 20 (가령, U.S. 특허 출원 공개 번호 US2014/0088295A1 및 US20150266966A1에서 및 U.S. 특허 번호 7,879,984에서 설명된 바와 같은 항-CD20 항체), 항-CD19 항체, 항-CD28 항체, 항-분화 클러스터-48 (가령, U.S. 특허 번호 9,228,014에서 설명된 바와 같은 항-CD48 항체), 항-Fe1 d1 항체 (가령, U.S. 특허 번호 9,079,948에서 설명된 바와 같이), 항-중동 호흡성 증후군 바이러스 (가령, U.S. 특허 출원 공개 번호 US2015/0337029A1에서 설명된 바와 같은 항-MERS 항체), 항-에볼라 바이러스 항체 (가령, U.S. 특허 출원 공개 번호 US2016/0215040에서 설명된 바와 같이), 항-지카 바이러스 항체, 항림프구 활성화 유전자 3 항체 (가령, 항-LAG3 항체, 또는 항-CD223 항체), 항-신경 성장 인자 항체 (가령, U.S. 특허 출원 공개 번호 US2016/0017029, 그리고 U.S. 특허 번호 8,309,088 및 9,353,176에서 설명된 바와 같은 항-NGF 항체), 그리고 항-엑티빈 A 항체로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예에서, 이중특이적 항체는 항-CD3 x 항-CD20 이중특이적 항체 (U.S. 특허 출원 공개 번호 US2014/0088295A1 및 US20150266966A1에서 설명된 바와 같이), 항-CD3 x 항-뮤신 16 이중특이적 항체 (가령, 항-CD3 x 항-Muc16 이중특이적 항체), 그리고 항-CD3 x 항-전립선-특이적 막 항원 이중특이적 항체 (가령, 항-CD3 x 항-PSMA 이중특이적 항체)로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구체예에서, 관심되는 단백질은 알리코쿠마, 사릴루마, 파시누마, 네스바쿠마, 두필루마, 트레보그루마, 에비나쿠마 및 리누쿠마로 구성된 군에서 선택된다. 본 명세서 전반에서 언급된 모든 간행물은 본원에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0086] 다른 구체예에서, 관심되는 단백질은 Fc 모이어티 및 다른 도메인을 내포하는 재조합 단백질 (가령, Fc-융합 단백질)이다. 일부 구체예에서, Fc-융합 단백질은 수용체 Fc-융합 단백질인데, 이것은 Fc 모이어티에 연계된 수용체의 하나 또는 그 이상의 세포외 도메인(들)을 내포한다. 일부 구체예에서, Fc 모이어티는 IgG의 힌지 영역, 그 이후에 CH2와 CH3 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 수용체 Fc-융합 단백질은 단일 리간드 또는 복수 리간드에 결합하는 2개 또는 그 이상의 상이한 수용체 사슬을 내포한다. 가령, Fc-융합 단백질은 트랩 단백질, 예를 들면, 예로서 IL-1 트랩 (가령, 릴로나셉트, 이것은 hIgG1의 Fc에 융합된 IL-1R1 세포외 영역에 융합된 IL-1RAcP 리간드 결합 영역을 내포한다; 참조: U.S. 특허 번호 6,927,004, 이것은 본원에서 전체적으로 참조로서 편입된다), VEGF 트랩 (가령, 아플리베르셉트 또는 지브-아플리베르셉트, 이것은 hIgG1의 Fc에 융합된 VEGF 수

용체 Flk1의 Ig 도메인 3에 융합된 VEGF 수용체 Flt1의 Ig 도메인 2를 내포한다; 참조: U.S. 특허 번호 7,087,411 및 7,279,159; 또는 콘베르셉트, 이것은 hIgG1의 Fc에 융합된 VEGF 수용체 Flk1의 Ig 도메인 4에 융합된 VEGF 수용체 Flk1의 Ig 도메인 3에 융합된 VEGF 수용체 Flt1의 Ig 도메인 2를 내포한다; 참조: U.S. 특허 번호 8,216,575), 또는 TNF 트랩 (가령, 에타네르셉트, 이것은 hIgG1의 Fc에 융합된 TNF 수용체를 내포한다; 참조: U.S. 특허 번호 US 특허 번호 5,610,279)이다. 다른 구체예에서, Fc-융합 단백질은 ScFv-Fc-융합 단백질인데, 이것은 Fc 모이어티에 연계된 항체의 하나 또는 그 이상의 항원 결합 도메인(들), 예를 들면, 가변 중쇄 단편 및 가변 경쇄 단편 중에서 하나 또는 그 이상을 내포한다.

[0087] 단백질 생산

[0088] 관심되는 단백질은 당업자에 의해 알려진 방법을 이용하여 숙주 세포에 의해 발현될 수 있다. 일반적으로, 포유류 세포에서 발현에 적합한 관심되는 임의의 단백질이 본 발명의 방법에 의해 생산될 수 있긴 하지만, 당단백질이 특히, 본 발명의 방법으로부터 이익을 얻을 것이다. 가령, 특정한 구체예에서 관심되는 단백질은 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 이중특이적 항체 또는 이의 단편, 키메라 항체 또는 이의 단편, ScFv 또는 이의 단편, Fc-태깅된 단백질 (가령, 트랩 단백질) 또는 이의 단편, 성장 인자 또는 이의 단편, 사이토킨 또는 이의 단편, 또는 세포 표면 수용체의 세포외 도메인 또는 이의 단편이다.

[0089] 아스파라긴-연결된 (N-연결된) 글리칸을 갖는 당단백질은 진핵 세포에서 편재성이다. 이들 글리칸의 생합성 및 이들의 폴리펩티드로의 전달은 소포체 (ER)에서 일어난다. N-글리칸 구조는 ER 및 골지 복합체에서 다수의 글리코시다아제 및 글리코실-전달효소에 의해 더욱 변형된다. 본 발명의 방법을 이용한 단백질 생산은 면역원성 에피토프 ("글리코토프")를 제거하기 위해 원하는 N-글리칸 구조의 일관성을 향상시키는 것으로 지향된다. 글리칸-연결된 단백질의 상술된 구조 분석은 상기 단백질의 기능적 특성과 상관될 수 있다. 단백질 글리코실화를 특징짓는 이런 분석은 전형적으로 여러 단계를 수반한다: i) 부착된 글리칸의 효소적 또는 화학적 방출; ii) 방향족 또는 지방족 아민으로 환원성 아미노화 또는 페메틸화를 통해, 방출된 글리칸의 유도체화; iii) 글리칸의 분석. 글리코실화 패턴을 분석하는 많은 번이가 당업자에게 공지되어 있다. 당단백질은 다양한 부위를 접유하는 여러 유형의 글리코형을 특정한 양으로 보유할 수 있고, 그리고 이런 이유로, 이들의 복잡성은 일정한 생산 방법에서 재현하는 것을 어렵게 만들 수 있다. 글리코형의 유형과 양의 일관성은 예측가능하고, 그리고 치료적 단백질 생산을 위한 바람직한 결과를 나타낸다.

[0090] 본 발명은 특정한 농도의 오르니틴 또는 푸트레신을 갖는 쿵 가수분해물을 포함하는 배지에서 관심되는 단백질을 발현하는 세포를 배양함으로써 배치 또는 유가 배양에서 관심되는 단백질의 다양한 배치를 생산하는 것이 생산되는 단백질의 증가된 품질 및 배치별로 향상된 일관성을 유발한다는 것을 보여준다. 이런 이유로, 본 발명의 다른 양상은 미리 결정된 양의 오르니틴 또는 푸트레신을 내포하는 쿵 가수분해물의 별개의 배치를 포함하는 배지에서 세포를 배양함으로써 각각 생산된 복수의 단백질 제조물을 제공한다. 일정한 구체예에서, 세포 배양에서 이용을 위해 선별된 쿵 가수분해물의 각 배치는 쿵 g당 0.67 mg 오르니틴 또는 푸트레신 또는 그 이하, 특히 쿵 g당 0.0067 mg 내지 0.67 mg 오르니틴 또는 푸트레신, 또는 쿵 g당 0.0067 내지 0.27 mg 오르니틴 또는 푸트레신의 농도를 갖는다.

[0091] 다른 구체예에서, 쿵 가수분해물에서-내포 세포 배양 배치에서 오르니틴 또는 푸트레신의 농도는 0.5 mg/L 내지 4.5 mg/L, 0.5 mg/L 내지 4.0 mg/L, 0.5 mg/L 내지 3.5 mg/L, 0.5 mg/L 내지 3.0 mg/L, 0.5 mg/L 내지 2.5 mg/L, 0.5 mg/L 내지 2.0 mg/L, 0.5 mg/L 내지 1.5 mg/L 또는 0.5 mg/L 내지 1.0 mg/L의 범위에서 변한다. 일부 구체예에서, 쿵 가수분해물-내포 세포 배양 배치에서 오르니틴 또는 푸트레신의 농도는 1.0 mg/L 내지 5.0 mg/L, 1.5 mg/L 내지 5.0 mg/L, 2.0 mg/L 내지 5.0 mg/L, 2.5 mg/L 내지 5.0 mg/L, 3.0 mg/L 내지 5.0 mg/L, 3.5 mg/L 내지 5.0 mg/L, 4.0 mg/L 내지 5.0 mg/L 또는 4.5 mg/L 내지 5.0 mg/L의 범위에서 변한다.

[0092] 특정한 구체예에서, 쿵 가수분해물을 내포하는 세포 배양 배치는 0.5 mg/L, 0.6 mg/L, 0.7 mg/L, 0.8 mg/L, 0.9 mg/L, 1.1 mg/L, 1.2 mg/L, 1.3 mg/L, 1.4 mg/L, 1.5 mg/L, 1.6 mg/L, 1.7 mg/L, 1.8 mg/L, 1.9 mg/L, 2.0 mg/L, 2.1 mg/L, 2.2 mg/L, 2.3 mg/L, 2.4 mg/L, 2.5 mg/L, 2.6 mg/L, 2.7 mg/L, 2.8 mg/L, 2.9 mg/L, 3.0 mg/L, 3.1 mg/L, 3.2 mg/L, 3.3 mg/L, 3.4 mg/L, 3.5 mg/L, 3.6 mg/L, 3.7 mg/L, 3.8 mg/L, 3.9 mg/L, 4.0 mg/L, 4.1 mg/L, 4.2 mg/L, 4.3 mg/L, 4.4 mg/L, 4.5 mg/L, 4.6 mg/L, 4.7 mg/L, 4.8 mg/L, 4.9 mg/L, 또는 5.0 mg/L의 양에서 오르니틴 또는 푸트레신을 포함한다.

[0093] 다른 구체예에서, 쿵 가수분해물을 내포하는 배지의 배치에서 오르니틴 또는 푸트레신의 원하는 농도는 5.0 mg/L보다 많지 않다. 또 다른 구체예에서, 쿵 가수분해물을 내포하는 배지의 배치에서 오르니틴 또는 푸트레신의 원하는 농도는 2.0 mg/L보다 많지 않다. 다른 구체예에서, 쿵 가수분해물을 내포하는 배지의 배치에서 오르

니틴 또는 푸트레신의 원하는 농도는 1.8 mg/L보다 많지 않다. 일부 구체예에서, 콩을 내포하는 배지의 배치에서 오르니틴 또는 푸트레신의 원하는 농도는 0.5 mg/L 내지 5.0 mg/L이다. 또 다른 구체예에서, 콩 가수분해물을 내포하는 배지의 배치에서 오르니틴 또는 푸트레신의 원하는 농도는 0.5 mg/L 내지 2.0 mg/L의 범위에 들어간다. 또 다른 구체예에서, 콩 가수분해물을 내포하는 배지의 배치에서 오르니틴 또는 푸트레신의 원하는 농도는 0.5 mg/L 내지 1.8 mg/L의 범위에 들어간다.

[0094] 일정한 구체예에서, 복수의 단백질 제조물의 각 단백질 제조물에서 생산된 관심되는 단백질의 품질 또는 일정한 글리칸의 양은 5 mg/L보다 큰 농도에서 오르니틴 또는 푸트레신을 내포하는 콩 가수분해물로 보충된 배지에서 세포를 배양하는 것을 포함하는 방법에 의해 생산된 단백질 제조물과 비교할 때 향상된다. 일정한 구체예에서, 각 단백질 제조물에 의해 전시되는 향상된 단백질 품질은 하기에 의해 계측된다: 관심되는 단백질의 하나 또는 그 이상의 아미노산에서 글리코실화의 존재 또는 부재, 관심되는 단백질 상에서 글리칸의 양, 관심되는 단백질 상에서 하나 또는 그 이상의 글리코실화 부위에서 시알산의 존재, 또는 이들의 조합. 한 구체예에서, 단백질 품질은 배양 동안 생산된 단백질의 개체군의 개별 구성원의 글리코실화 상태에 상응한다. 일정한 구체예에서, 품질은 5.0 mg/L 또는 그 이하의 오르니틴 또는 푸트레신, 0.5 mg/L 내지 5.0 mg/L의 오르니틴 또는 푸트레신, 또는 0.5 mg/L 내지 2.0 mg/L의 오르니틴 또는 푸트레신의 농도를 갖는 콩 가수분해물로 보충된 배지에서 세포를 배양함으로써, 배양 동안 생산된 단백질의 개체군의 개별 당단백질 상에 존재하는 글리코실화 치환을 조정함으로써 향상된다.

[0095] 한 구체예에서, 단백질 품질은 복수의 단백질 제조물로부터 단백질의 각 배치에서 최소한 하나의 글리칸 분자의 존재비를 단백질의 다른 배치에서 동일한 글리칸 분자(들)의 존재비와 비교함으로써 결정된다. 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "존재비"는 특정 생산 로트에서 특정 글리칸 분자를 갖는 단백질의 백분율, 또는 생산 로트에서 모든 유형의 글리칸 분자의 양에 비하여 특정 글리칸 분자를 갖는 단백질의 양을 지칭한다. 일부 구체예에서, 글리칸 분자는 하기와 같이 구성된 군에서 선택된다: A1, A1F, A2, A2F, Man5, NA2, NA2F, NA2G1, NA2G1F, NA2G2 및 NA2G2FI. 특정한 구체예에서, 글리칸 분자는 A1 (가령, 도 2의 피크 11)이다.

[0096] 본 발명의 세포 배양 방법에 의해 생산된 관심되는 단백질은 우호적인 품질 특징을 전시한다. 단백질 품질은 예로서, 당업자에게 널리 공지된 방법, 예를 들면, 약한 양이온 교환 크로마토그래피, 모세관 등전위 초점, 크기 배제 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC), ELISA 및/또는 웨스턴 블롯 분석을 이용함으로써 계측될 수 있다. 일부 구체예에서, 단백질 품질은 질량 분광분석법, 예를 들면, 모세관 전기이동 질량 분광분석법 (CE-MS)에 의해 계측된다. 특정한 구체예에서, 단백질 품질은 복수의 단백질 제조물로부터 단백질의 각 배치의 질량 분광분석법 판독을 비교함으로써 결정된다.

[0097] 예시적인 생산 로트의 형광 검출과 함께 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)는 0.5 mg/L 내지 5.0 mg/L의 오르니틴 또는 푸트레신 농도를 갖는 콩 가수분해물을 포함하는 배치에서 배양된 세포로부터 생산된 관심되는 단백질 (당단백질)이 본원의 표 2-4에서 예증된 바와 같이, 더욱 일관된 글리칸 발현 및 글리코실화 패턴을 갖는다는 것을 보여준다.

[0098] 올리고당류 프로파일링

[0099] 당단백질 상에서 특정한 N-연결된 당 사슬의 정도와 분포는 올리고당류 프로파일링에 의해 확인될 수 있다. 한 구체예에서, 당단백질은 N-연결된 올리고당류를 개열하고 이들을 아스파라긴 측쇄로부터 제거하기 위해 펩티드:N-글리코시다아제 F (PNGase F)로 데글리코실화된다. 올리고당류는 이후, 형광 시약, 예를 들면, 안트라닐산으로 유도체화된다. 당 사슬은 이후, 정상 음이온-교환 HPLC에 의해 분리되고 형광 검출기로 검출되어, HPLC 크로마토그램이 산출된다.

[0100] 다른 구체예에서, 전반적인 탄수화물 특징화 분석의 일부로서, 개별 당펩티드는 환원된 및 알킬화된 당단백질의 트립신 소화 이후에 단리된다. 개별 트립신 당펩티드는 역상 HPLC에 의해 분리되고, 필요에 따라 증가된 분해능을 위해 차후 C18 칼럼과 연계된다. 올리고당류는 각각의 분리된 당펩티드로부터 PNGase F 소화에 의해 방출되고, 안트라닐산으로 유도체화되고, 그리고 형광 HPLC에 의해 분석되어 당단백질의 부위 특이적 올리고당류 프로파일 획득된다. 당단백질이 티로나셉트 (서열 번호: 1)인 한 구체예에서, N37, N87, N91, N98, 임의선택적으로 N176, N189, N279, N418, N511, N551, N567, N581, N615 및 N730에서 아스파라긴 잔기가 글리코실화된다. 한 구체예에서, 티로나셉트의 잔기 N37, N98, N418 및 N511 (서열 번호: 1과 상관하는 잔기 위치) 중에서 하나 또는 그 이상은 A1 올리고당류를 내포한다. 당단백질이 아폴리베르셉트 (서열 번호: 2)인 한 구체예에서, N36, N68, N123, N196 및 N282에서 아스파라긴 잔기가 글리코실화된다. 한 구체예에서, 아폴리베르셉트의 잔기 N123 및 N196 (서열 번호: 2와 상관하는 잔기 위치) 중에서 하나 또는 둘 모두 A1 올리고당류를 내포한다.

- [0101] 다른 구체예에서, 당단백질로부터 올리고당류 풀이 PNGase F로 이들 단백질의 데글리코실화, 그 이후에 안트라닐산 유도체화 및 차후 고체상 추출 (SPE)에 의해 산출된다. 올리고당류의 질량이 이후, 2, 4, 6-트리히드록시 아세트페논 (THAP)을 매트릭스로서 이용한 음성 선형 방식에서 MALDI-TOF를 이용하여 계측된다.
- [0102] 각 관찰된 질량은 재조합 단백질에서 통상적으로 관찰되는 N-연결된 글리칸의 질량에 근거하여 독특한 올리고당류 구조에 배정된다. 모든 피크의 예상된 질량 배정은 표 1에서 요약된다. 예상된 질량은 안트라닐산 잔기 질량의 부가를 갖는 제안된 N-연결된 당 사슬 구조에 근거하여 계산된 평균 질량이다. 단당류 조성물 역시 제안된 N-연결된 당 사슬 구조에 근거하여 열거된다.
- [0103] 다른 구체예에서, 모세관 전기이동을 이용한 정량적 올리고당류 지문 검정이 요지 당단백질의 N-글리칸 (올리고당류) 구조를 특징짓는데 이용된다. 당단백질은 변성되고, 그리고 이후, PNGase F로 처리에 의해 데글리코실화된다. 방출된 올리고당류는 이후, 단백질의 제거 이후에 침전에 의해 단리된다. 단리된 올리고당류 풀은 형광단 8-아미노피렌 1,3,6-트리스술포산염 (APTS)으로 표지화된다. 표지화된 올리고당류는 이후, 모세관 전기이동에 의해 분리되고, 그리고 488 nm의 여기 파장 및 520 nm의 방출 파장을 이용한 레이저 유도된 형광 검출기로 모니터링된다.
- [0104] 전기이동도는 아플리베르셉트 당단백질에 대해 도 2에서 묘사된 바와 같이 산출되는데, 모든 정량가능한 피크가 넘버링된다 (본 실시예에서 총 21개의 피크). 올리고당류 지문에 대한 완전한 통합된 피크 면적 (전체 피크 면적)이 결정된다. 각 올리고당류의 상대적 양은 특정 올리고당류에 대한 피크 면적 (가령, A1 피크 면적)을 전체 피크 면적으로 나눔으로써 결정될 수 있다.
- [0105] 일부 구체예에서, 요지 당단백질의 품질은 시알화의 수준 (당단백질마다 시알산 잔기의 양) 또는 푸코실화의 수준 (당단백질마다 푸코오스 잔기의 양)을 결정함으로써 사정된다. 한 구체예에서, 당단백질 상에서 시알산의 총 수는 정량적 HPLC 검정을 이용하여 결정된다. 이러한 검정에서, 시알산은 약한 산 가수분해를 이용하여 당단백질로부터 방출되고, 이후 α -페닐렌디아민으로 유도체화되고, HPLC에 의해 분리되고, 그리고 UV 또는 형광 검출기로 검출된다. 시알산의 정량은 예로서, 시알릴락토오스를 이용한 표준 곡선에 비하여 사정될 수 있다. 시알산 함량은 방출된 시알산의 몰 및 반응에서 이용된 당단백질의 몰로부터 계산된다.
- [0106] 한 구체예에서, 릴로나셉트 당단백질의 시알산 함량은 1 몰의 당단백질마다 약 30 - 70 몰 시알산 (몰/몰), 약 35 - 65 몰/몰, 30 몰/몰, 31 몰/몰, 32 몰/몰, 33 몰/몰, 34 몰/몰, 35 몰/몰, 36 몰/몰, 37 몰/몰, 38 몰/몰, 39 몰/몰, 40 몰/몰, 41 몰/몰, 42 몰/몰, 43 몰/몰, 44 몰/몰, 45 몰/몰, 46 몰/몰, 47 몰/몰, 48 몰/몰, 49 몰/몰, 50 몰/몰, 51 몰/몰, 52 몰/몰, 53 몰/몰, 54 몰/몰, 55 몰/몰, 56 몰/몰, 57 몰/몰, 58 몰/몰, 59 몰/몰, 60 몰/몰, 61 몰/몰, 62 몰/몰, 63 몰/몰, 64 몰/몰, 65 몰/몰, 66 몰/몰, 67 몰/몰, 68 몰/몰, 69 몰/몰, 또는 70 몰/몰이다.
- [0107] 한 구체예에서, 아플리베르셉트 당단백질의 시알산 함량은 1 몰의 당단백질마다 약 5 - 15 몰 시알산 (몰/몰), 약 8 - 12 몰/몰, 4 몰/몰, 5 몰/몰, 6 몰/몰, 7 몰/몰, 8 몰/몰, 9 몰/몰, 10 몰/몰, 11 몰/몰, 12 몰/몰, 13 몰/몰, 14 몰/몰, 15 몰/몰, 16 몰/몰, 17 몰/몰, 18 몰/몰, 19 몰/몰, 또는 20 몰/몰이다.
- [0108] 한 구체예에서, 올리고당류 프로파일링이 당단백질 상에서 N-연결된 당 사슬의 시알화의 정도와 분포를 결정하는데 이용된다. 당단백질은 PNGase F로 데글리코실화되고, 그리고 이후, 형광 시약, 안트라닐산으로 유도체화된다. 올리고당류는 이후, 정상 음이온-교환 HPLC에 의해 분리되고 형광 검출기로 검출되어 올리고당류 프로파일의 HPLC 크로마토그램이 산출된다. 당단백질에 대한 Z 수 (이것은 평균 시알화도를 계측한다)는 하기 공식으로부터 계산된다:
- [0109]
$$(OS \cdot A \cdot 0) + (ISA \cdot 111 - (2SA \cdot 2) + (3SA \cdot 3) + \dots (nSA \cdot n)) / ((OSA + 15A + 2SA + 35A + \dots n5A))$$
- [0110] Z 수를 결정하기 위해, 올리고당류 프로파일로부터 각 피크의 면적이 통합된다. 전체 시알산은 0에 의해 곱해진 0 시알산/사슬 피크, 1에 의해 곱해진 1 시알산/사슬 피크, 2에 의해 곱해진 2 시알산/사슬 피크, 그리고 3에 의해 곱해진 3 시알산/사슬 피크, 기타 등등의 면적의 합계로서 계산된다. 당 사슬의 총수는 모든 피크의 면적의 합계로서 산출된다. Z 수는 전체 당 사슬 면적에 의해 나누어진 전체 시알산 면적이다.
- [0111] 한 구체예에서, 릴로나셉트 당단백질의 시알산 Z 수는 약 1.3 - 1.6, 1.4 - 1.5, 1.41 - 1.48, 1.3, 1.31, 1.32, 1.33, 1.34, 1.35, 1.36, 1.37, 1.38, 1.39, 1.4, 1.41, 1.42, 1.43, 1.44, 1.45, 1.46, 1.47, 1.48, 1.49, 1.5, 1.51, 1.52, 1.53, 1.54, 1.55, 1.56, 1.57, 1.58, 1.59, 또는 1.60이다.
- [0112] 한 구체예에서, 아플리베르셉트 당단백질의 시알산 Z 수는 약 0.5 - 2, 1 - 1.5, 1 - 1.2, 0.5, 0.51, 0.52,

0.53, 0.54, 0.55, 0.56, 0.57, 0.58, 0.59, 0.6, 0.61, 0.62, 0.63, 0.64, 0.65, 0.66, 0.67, 0.68, 0.69, 0.7, 0.71, 0.72, 0.73, 0.74, 0.75, 0.76, 0.77, 0.78, 0.79, 0.8, 0.81, 0.82, 0.83, 0.84, 0.86, 0.87, 0.88, 0.89, 0.9, 0.91, 0.92, 0.93, 0.94, 0.95, 0.96, 0.97, 0.98, 0.99, 1, 1.01, 1.02, 1.03, 1.04, 1.05, 1.06, 1.07, 1.08, 1.09, 1.1, 1.11, 1.12, 1.13, 1.14, 1.15, 1.16, 1.17, 1.18, 1.19, 1.2, 1.21, 1.22, 1.23, 1.24, 1.25, 1.26., 1.27, 1.28, 1.29, 또는 1.3이다.

[0113] 실시예

[0114] 하기 실시예는 본원에서 설명된 방법과 조성물을 어떻게 만들고 이용하는 지를 당업자에게 제공하기 위해 제안 되고, 그리고 본 발명자들이 그들의 발명으로서 간주하는 것의 범위를 한정하는 것으로 의도되지 않는다. 이용 된 숫자 (가령, 양, 온도 등)에 대하여 정확도를 담보하기 위한 노력이 이루어졌지만, 일부 실험 오차와 편차가 고려되어야 한다. 별도로 지시되지 않으면, 분율은 중량에 의한 분율이고, 분자량은 평균 분자량이고, 온도는 섭씨 온도이고, 그리고 압력은 대기압이거나 또는 이에 가깝다.

[0115] 실시예 1: 아미노산 농도를 결정하기 위한 콩 가수분해물 선별검사.

[0116] 콩 가수분해물 표본이 계량되었고, 그리고 이의 20 그램 분량이 1 L 물에서 20 g/L의 시작 농도까지 용해되었다. 결과의 콩 가수분해물 용액은 이후, 세포 배양에서 이용을 위한 원하는 농도까지 물에서 더욱 희석 되었고, 그리고 결과의 콩 가수분해물 용액의 분자 조성이 크로마토그래피를 이용하여 결정되었다.

[0117] 콩 가수분해물 표본에서 아미노산의 농도는 포스트 칼럼 다회전 검출과 함께 이온 교환 칼럼 상에서 크로마토 그래피에 의해 계속되었다. 참조: 가령, Moore and Stein. J. Biol. Chem. (1954) Vol. 211 pp. 907-913. 콩 가수분해물 표본은 HPLC 칼럼으로부터 용리되고 표준과 비교될 때 개별 피크 (아미노산)의 민감한 분리 및 분해 능을 허용하기 위해 희석되었다. 도 1a와 1b에서 도시된 바와 같이, 크로마토그램의 각 피크 면적은 각 용출물의 농도를 결정하기 위해 표준과 비교되었다.

[0118] 콩 가수분해물 분말의 배치가 콩 그램당 0.67 밀리그램보다 적은 오르니틴 또는 푸트레신을 내포하는 지를 결정 하기 위해, 각 대표적인 표본의 크로마토그램이 표준과 비교된다. 가령, 도 1a는 체류 시간 89.02에서 오르니틴 을 내포하는 용출물을 갖는 콩 가수분해물의 배치를 보여주는데, 이것은 표준과 비교하여, 콩 g당 1.57 mg 오르 니틴의 오르니틴과 동등한 피크 면적을 드러낸다. 도 1b는 콩 g당 0.67 mg보다 적은 오르니틴의 오르니틴 농도 를 갖는 콩 가수분해물의 배치를 도해한다. 콩 g당 0.067 내지 0.67 mg 오르니틴을 갖는 콩 가수분해물의 배치 가 로트별로 더욱 일관된 단백질 글리코실화를 갖는 생물치료 단백질을 생산하기 위한 세포 배양 방법에서 이용 을 위해 선택되었다. 하지만, 단백질 생산에 대한 콩 가수분해물 오르니틴 농도의 효과를 결정하기 위해, 콩 g 당 0.67 mg보다 크거나 또는 이보다 작은 오르니틴의 농도에서 오르니틴을 내포하는 콩 가수분해물 배치가 아래 에 설명된 바와 같이, 추가 실험에서 이용되었다.

[0119] 실시예 2: 관심되는 단백질의 발현 및 글리코실화 프로파일.

[0120] 어떤 아미노산 성분이 생산된 단백질의 품질에 영향을 주는 지를 결정하기 위해, 트랩 단백질 (수용체-Fc 융합 단백질, VEGF-트랩)을 발현하는 CHO 세포가 변하는 양의 오르니틴, 푸트레신 및 시트룰린, 또는 이들의 조합을 내포하는 콩 가수분해물을 포함하는 소유 배지에서 배양되었다. 표 2는 시트룰린 농도와는 관계없이 5.0 mg/L보 다 적은 농도에서 오르니틴을 내포하는 콩 가수분해물로 보충된 배지에서 CHO 세포를 배양하는 결과로서 산출된 단백질 로트에 대한 핵심 N-글리칸에 대한 증가된 곡선 아래 면적에 의해 지시된 바와 같이, 가수분해물에서 오르니틴의 수준이 단백질 생산 로트의 품질과 부정적으로 상관한다는 것을 보여준다.

[0121] 표 2에서 도시되고 도 3에서 묘사된 바와 같이, 2.0 mg/L 또는 그 이하의 오르니틴 농도를 갖는 콩 가수분해물 을 포함하는 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 VEGF-트랩 단백질 산물 로트는 5.0 mg/L보다 많은 오르니틴, 시트룰린 또는 푸트레신을 포함하는 배지에서 배양된 세포와 비교할 때, 더욱 높은 품질 단백질을 생산한 다.

표 2

[0122]

콩 아미노산 농도	A1 N-글리칸 상대적 양 (% 곡선 아래 면적)
1.6 mg/L 오르니틴	12.5
6.6 mg/L 오르니틴	9.8
31.6 mg/L 오르니틴	9.3
36.6 mg/L 푸트레신	9.0

1.6 mg/L 오르니틴; 0 mg/L 시트룰린	12.0
1.6 mg/L 오르니틴; 30 mg/L 시트룰린	11.5
31.6 mg/L 오르니틴; 0 mg/L 시트룰린	8.8

[0123] 상술된 글리칸 분석은 오르니틴이 단백질 글리코실화 프로필에 대한 영향을 주는 지를 결정하기 위해 당단백질의 각 로트에 대해 HPLC 및 형광 안트라닐산 (AA) 태그에 대해 널리 알려진 방법 (Anumula, and Dhume, Glycobiology (1998) 8(7) pp. 685-694)에 근거된 크로마토그래피를 이용하여 수행되었다. 표 3에서 도시된 바와 같이, 콩 g당 0.67 mg보다 적거나 또는 이와 동등한 오르니틴을 포함하는 콩 가수분해물을 포함하는 배지에서 세포를 배양하는 것은 로트별로 더욱 일관된 단백질 생산을 유발한다. 더욱 특정하게는, 선별된 콩 가수분해물을 포함하는 배지에서 배양된 생산 로트중에서 ~90%가 FDA 생산 기준에 부합한다. 대조적으로, 5 mg/L보다 많은 오르니틴을 갖는 콩 가수분해물을 포함하는 배지에서 배양된 생산 로트 중에서 단지 57%만 FDA 생산 기준에 부합한다 (특정한 N-글리칸 피크에 대한 곡선 아래 면적). 표 3에서 도시된 바와 같이, 콩 g당 0.67 mg 오르니틴 또는 그 이하의 오르니틴 농도를 갖는 콩 가수분해물을 포함하는 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 VEGF-트랩 단백질 산물 로트는 증가된 산물 품질 및 로트별로 더욱 일관된 품질을 전시한다.

표 3

[0124]

콩 g당 mg 오르니틴	10.5%보다 큰 글리칸 양을 갖는 로트 (품질 파라미터)	적합한 단백질 산물 로트	실패한 단백질 산물 로트
≤ 0.67	21	19/21	2/21
> 0.67	4	4/7	3/7

[0125] 각 생산 로트는 또한, 예시적인 VEGF-트랩 단백질에 대한 단백질의 치료적으로 허용되는 배치를 나타내는 참조 표준과 비교되었다 (글리칸 프로필에 대하여). 0.5 mg/L 및 2.0 mg/L 사이에 오르니틴의 최종 농도를 유발하는 콩 가수분해물로 보충된 배지에서 배양된 세포로부터 생산된 단백질 로트에 대한 대표적인 글리칸 분석은 표 4에서 도시된다. 참조와 비교하여, 각 생산된 트랩 단백질은 허용되는 범위 (분석된 로트 중에서 75%) 이내에 피크를 갖는 일관된 글리칸 프로필을 포함한다. 대조적으로, 5.0 mg/L보다 많은 오르니틴을 포함하는 콩 가수분해물로 보충된 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 각 로트는 FDA 용인 기준에 부합하는데 실패하였다. 표 4에서 도시된 바와 같이, 0.5 mg/L 내지 2.0 mg/L 또는 그 이하의 오르니틴 농도를 갖는 콩 가수분해물을 포함하는 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 단백질 산물 로트는 산물 용인 기준에 미치지 못하는 A1 N-글리칸 수준에 의해 증명된 바와 같이, 5.0 mg/L보다 큰 오르니틴 농도를 갖는 더욱 많은 콩 가수분해물을 포함하는 배지에서 배양된 세포보다 더욱 높은 품질 로트를 생산한다.

표 4

[0126]

글리칸	A2	A2F	A1	A1F	NGA2F	NA2G1F	NA2	NA2F	오르니틴 (mg/L)
산물 로트 용인 기준 (% 곡선 아래 면적)	4-9	10-23	10-17	11-19	5-17	8-13	4-11	2-8	————
콩 가수분해물 배치 # 1	6.4	15.2	12.5	14.1	9.9	9.6	6.7	4.4	1.8
콩 가수분해물 배치 # 2	7.0	16.8	13.2	13.9	9.6	9.9	6.7	4.1	0.5
콩 가수분해물 배치 # 3	7.0	18.5	11.9	13.5	9.5	10.2	5.9	4	1.5
콩 가수분해물 배치 # 4	9.7	18.1	14.7	11.0	8.5	9.5	5.5	3.6	0.6
콩 가수분해물 배치 # 5	6.0	16.6	9.8	13.5	11.6	9.9	5.8	4.3	13.6
콩 가수분해물 배치 # 6	5.6	15.7	9.2	14.2	12.1	10.5	6.3	4.5	28.6

[0127] 도 4는 A1 N-글리칸 수준에 의해 증명된 바와 같이, 콩 가수분해물에서 오르니틴의 수준 및 당단백질 (아플리베르셉트) 품질 사이에 강한 음성 상관을 보여준다.

[0128] **실시예 3: 당단백질 생산 역가**

[0129] 16개의 콩 가수분해물 로트가 킬로나셉트의 CHO 세포 생산의 대사체학에 영향을 주는 능력에 대해 검사되었다. 대략 426개의 콩 가수분해물 피분석물이 계측되고, 그리고 최종 당단백질 역가 및 유산염 물질대사에 대해 비교되었다. 도 5는 콩 가수분해물 피분석물, 그리고 최대 유산염 및 최종 당단백질 역가 사이에 상관의 부하 플롯을 묘사한다. 유산염 및 당단백질 역가의 결정은 콩 가수분해물에서 오르니틴의 음성 상관을 증명한다.

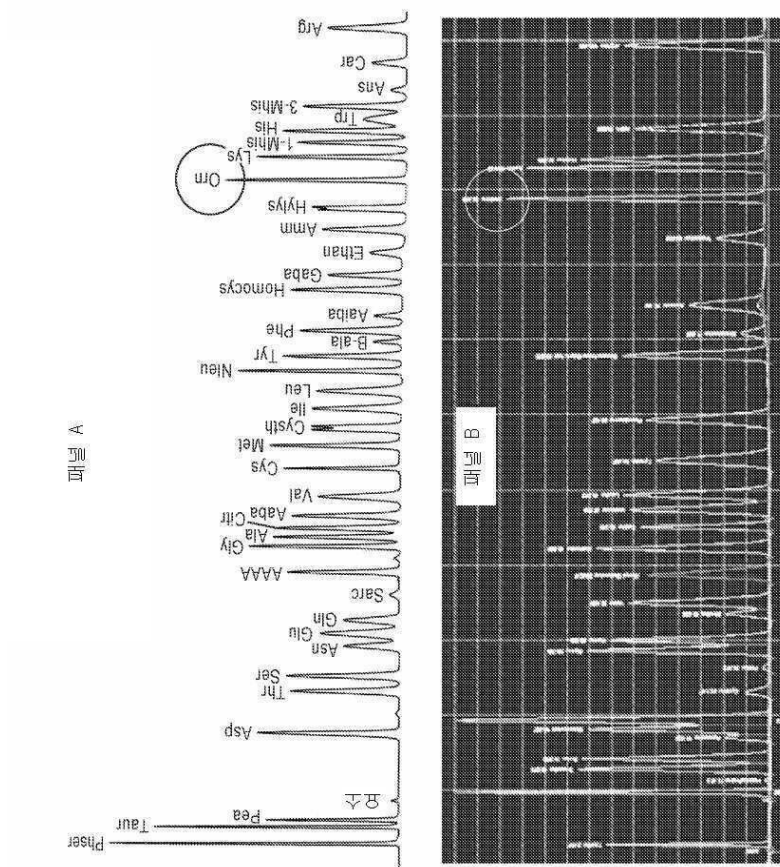
[0130] **실시예 4: 스파이킹 연구로 마커 검증**

[0131] 도 6a와 6b는 세포 성장 및 글리코실화에 대한 오르니틴 및 푸트레신 각각의 효과를 증명하기 위해 오르니틴 또는 푸트레신의 스파이크를 제공받았던, 대조 배지와 사양 조건 하에 CHO 세포 배양액을 묘사한다. 도 6B는 피크 11에서 효과를 부각시키는데, 이것은 특히 확연하다.

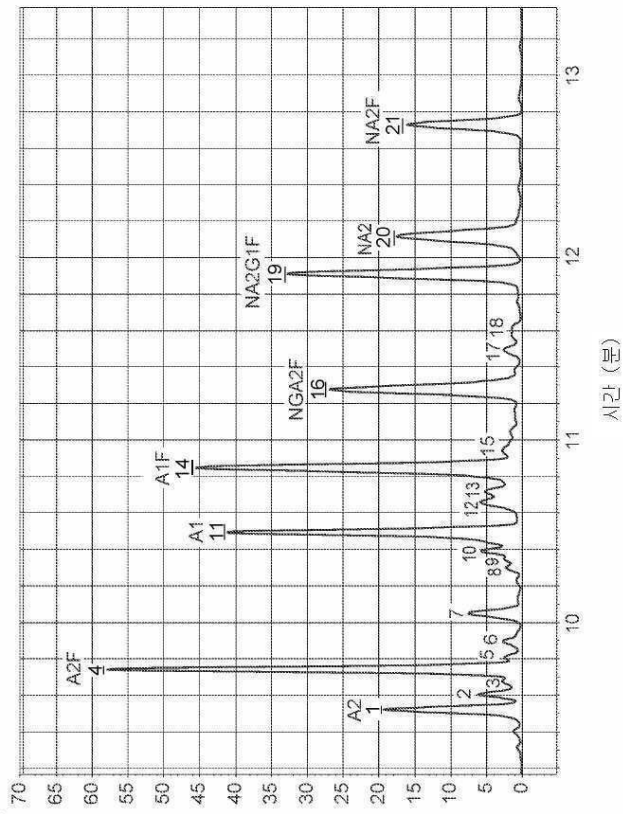
[0132] 첨부된 도면을 참고로 하여 본 발명의 구체예가 설명되긴 했지만, 본 발명은 정확한 구체예에 한정되지 않고, 그리고 다양한 변화와 변형이 첨부된 청구항에서 규정된 바와 같은 본 발명의 범위 또는 사상으로 부터 벗어나지 않으면서 당업자에 의해 그 안에서 달성될 수 있는 것으로 이해된다.

도면

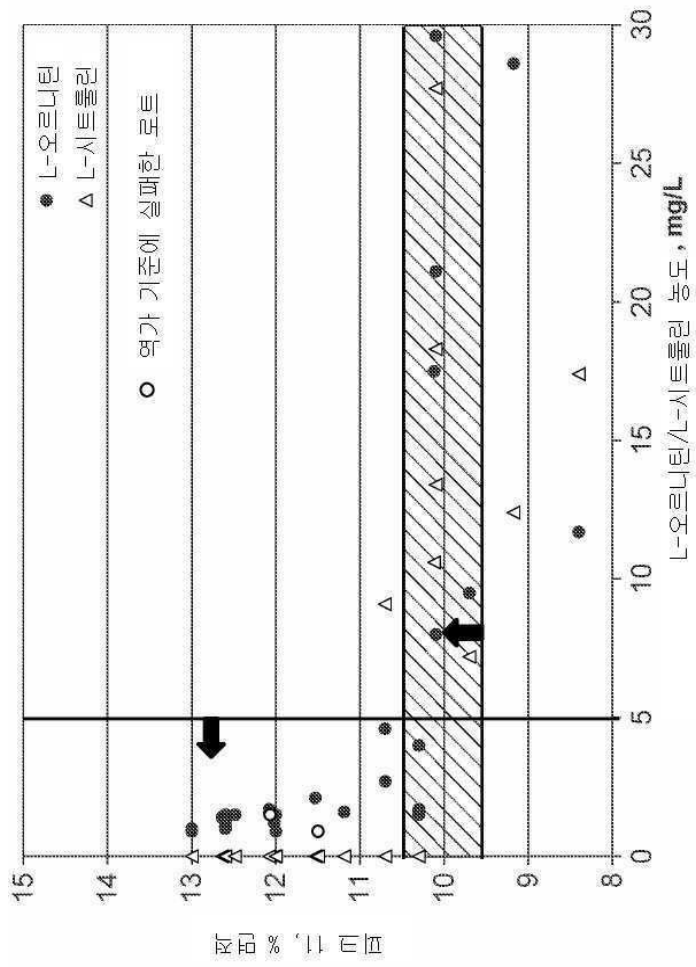
도면1



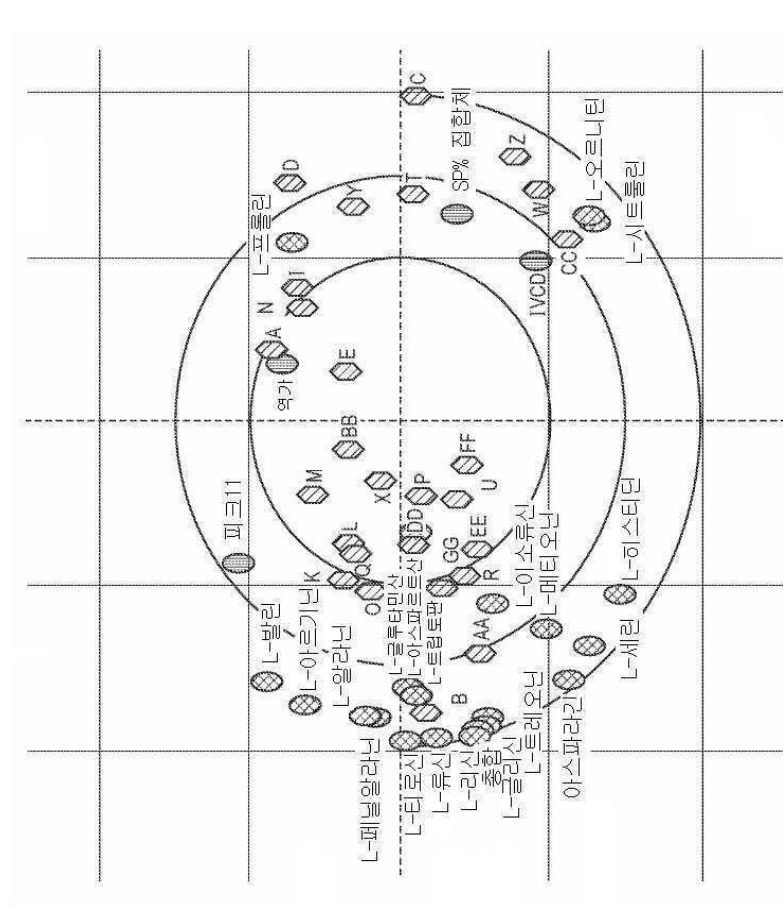
도면2



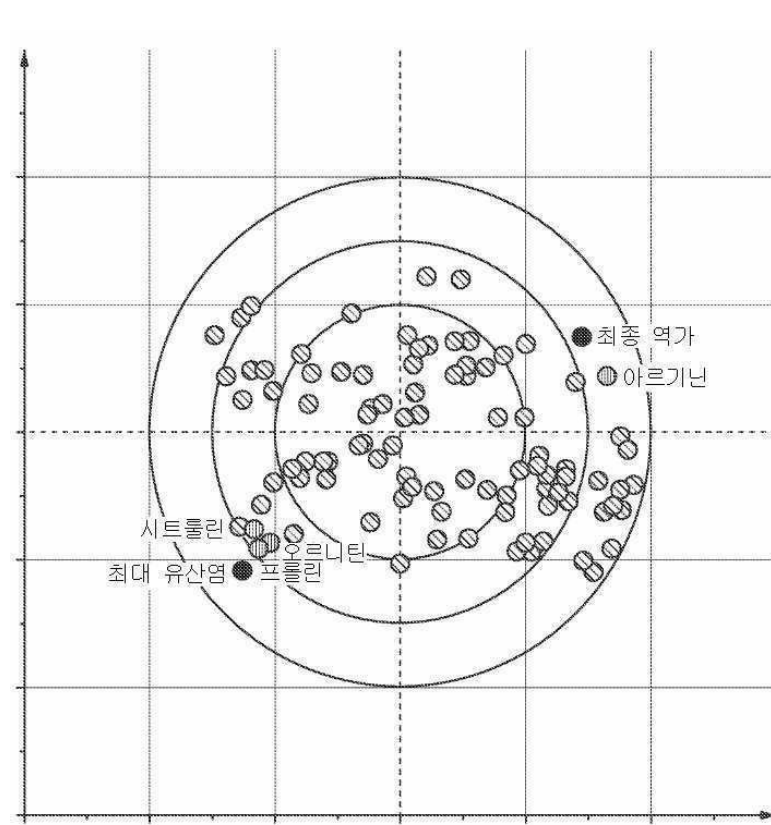
도면3



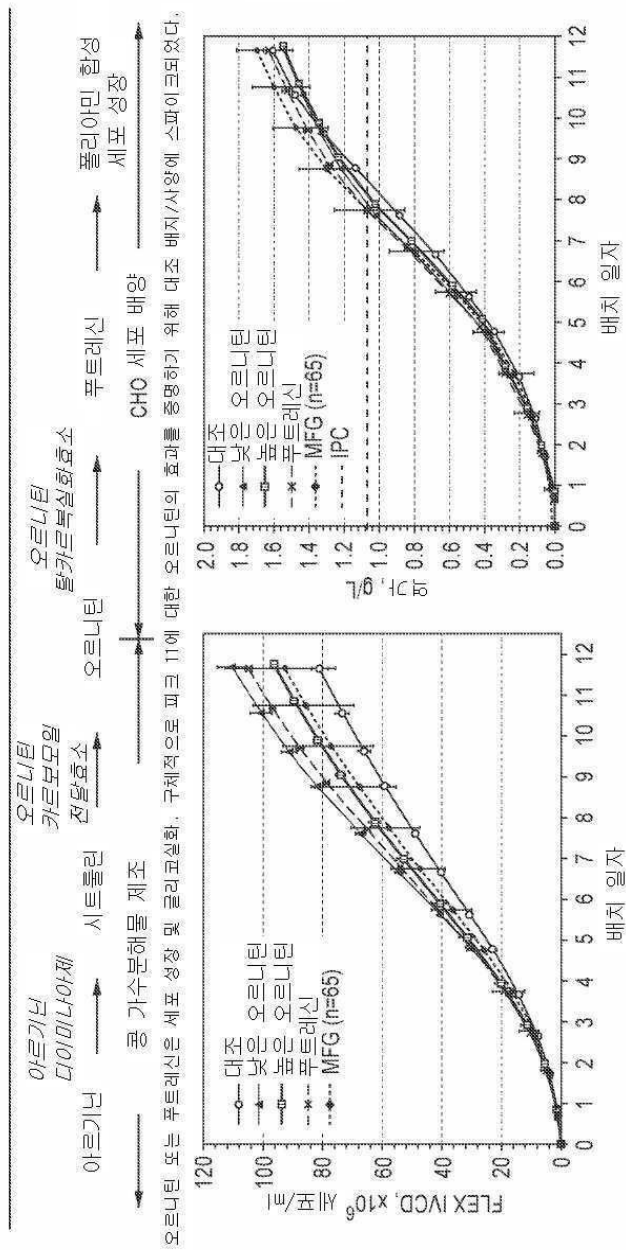
도면4



도면5



도면 6a



도면6b

조건	대조	낮은 오르니틴 스파이크	높은 오르니틴 스파이크	푸트세린 스파이크
농도, mg/L	1.6	6.6	31.6	36.6
역가, g/L	1.61	1.55	1.55	1.63
IVCD, x10 ⁶ 세포-일 /ml	80.9	110.4	96.2	104.8
피크 11, %	12.5	9.8	9.3	9.0

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
- <120> Cell Culture Process for Making a Glycoprotein
- <130> REGE-009/P02US
- <140>
- <141>
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 879

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> synthetic

<400> 1

Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp Thr Met Arg Gln Ile Gln

1 5 10 15

Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys Cys Pro Leu Phe Glu His

20 25 30

Phe Leu Lys Phe Asn Tyr Ser Thr Ala His Ser Ala Gly Leu Thr Leu

35 40 45

Ile Trp Tyr Trp Thr Arg Gln Asp Arg Asp Leu Glu Glu Pro Ile Asn

50 55 60

Phe Arg Leu Pro Glu Asn Arg Ile Ser Lys Glu Lys Asp Val Leu Trp

65 70 75 80

Phe Arg Pro Thr Leu Leu Asn Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Cys Met Leu

85 90 95

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

100 105 110

Gln Lys Asp Ser Cys Phe Asn Ser Pro Met Lys Leu Pro Val His Lys

115 120 125

Leu Tyr Ile Glu Tyr Gly Ile Gln Arg Ile Thr Cys Pro Asn Val Asp

130 135 140

Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Val Lys Pro Thr Ile Thr Trp Tyr Met Gly

145 150 155 160

Cys Tyr Lys Ile Gln Asn Phe Asn Asn Val Ile Pro Glu Gly Met Asn

165 170 175

Leu Ser Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ser Asn Asn Gly Asn Tyr Thr Cys

180 185 190

Val Val Thr Tyr Pro Glu Asn Gly Arg Thr Phe His Leu Thr Arg Thr

195 200 205

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

210	215	220	
Ile His Ser Pro Asn Asp His Val Val Tyr Glu Lys Glu Pro Gly Glu			
225	230	235	240
Glu Leu Leu Ile Pro Cys Thr Val Tyr Phe Ser Phe Leu Met Asp Ser			
245	250	255	
Arg Asn Glu Val Trp Trp Thr Ile Asp Gly Lys Lys Pro Asp Asp Ile			
260	265	270	
Thr Ile Asp Val Thr Ile Asn Glu Ser Ile Ser His Ser Arg Thr Glu			
275	280	285	
Asp Glu Thr Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ile Lys Lys Val Thr Ser Glu			
290	295	300	
Asp Leu Lys Arg Ser Tyr Val Cys His Ala Arg Ser Ala Lys Gly Glu			
305	310	315	320
Val Ala Lys Ala Ala Lys Val Lys Gln Lys Val Pro Ala Pro Arg Tyr			
325	330	335	
Thr Val Glu Lys Cys Lys Glu Arg Glu Glu Lys Ile Ile Leu Val Ser			
340	345	350	
Ser Ala Asn Glu Ile Asp Val Arg Pro Cys Pro Leu Asn Pro Asn Glu			
355	360	365	
His Lys Gly Thr Ile Thr Trp Tyr Lys Asp Asp Ser Lys Thr Pro Val			
370	375	380	
Ser Thr Glu Gln Ala Ser Arg Ile His Gln His Lys Glu Lys Leu Trp			
385	390	395	400
Phe Val Pro Ala Lys Val Glu Asp Ser Gly His Tyr Tyr Cys Val Val			
405	410	415	
Arg Asn Ser Ser Tyr Cys Leu Arg Ile Lys Ile Ser Ala Lys Phe Val			
420	425	430	
Glu Asn Glu Pro Asn Leu Cys Tyr Asn Ala Gln Ala Ile Phe Lys Gln			
435	440	445	
Lys Leu Pro Val Ala Gly Asp Gly Gly Leu Val Cys Pro Tyr Met Glu			
450	455	460	

Phe Phe Lys Asn Glu Asn Asn Glu Leu Pro Lys Leu Gln Trp Tyr Lys
465 470 475 480

Asp Cys Lys Pro Leu Leu Leu Asp Asn Ile His Phe Ser Gly Val Lys
485 490 495

Asp Arg Leu Ile Val Met Asn Val Ala Glu Lys His Arg Gly Asn Tyr
500 505 510

Thr Cys His Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu Gly Lys Gln Tyr Pro Ile Thr
515 520 525

Arg Val Ile Glu Phe Ile Thr Leu Glu Glu Asn Lys Pro Thr Arg Pro
530 535 540

Val Ile Val Ser Pro Ala Asn Glu Thr Met Glu Val Asp Leu Gly Ser
545 550 555 560

Gln Ile Gln Leu Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Leu Ser Asp Ile Ala
565 570 575

Tyr Trp Lys Trp Asn Gly Ser Val Ile Asp Glu Asp Asp Pro Val Leu
580 585 590

Gly Glu Asp Tyr Tyr Ser Val Glu Asn Pro Ala Asn Lys Arg Arg Ser
595 600 605

Thr Leu Ile Thr Val Leu Asn Ile Ser Glu Ile Glu Ser Arg Phe Tyr
610 615 620

Lys His Pro Phe Thr Cys Phe Ala Lys Asn Thr His Gly Ile Asp Ala
625 630 635 640

Ala Tyr Ile Gln Leu Ile Tyr Pro Val Thr Asn Ser Gly Asp Lys Thr
645 650 655

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
660 665 670

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
675 680 685

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
690 695 700

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

705 710 715 720
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 725 730 735

 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 740 745 750
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 755 760 765
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 770 775 780
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 785 790 795 800

 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 805 810 815
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 820 825 830
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 835 840 845
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 850 855 860

 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 865 870 875
 <210> 2
 <211> 431
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> synthetic
 <400> 2
 Ser Asp Thr Gly Pro Arg Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
 1 5 10 15
 Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
 20 25 30

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr

35 40 45

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe

50 55 60

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu

65 70 75 80

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg

85 90 95

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly

145 150 155 160

Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr

165 170 175

Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met

180 185 190

Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr

195 200 205

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

210 215 220

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

225 230 235 240

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

290 295 300
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
305 310 315 320

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
325 330 335

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
340 345 350

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

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

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

385 390 395 400
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

405 410 415
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

420 425 430