



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0132016  
(43) 공개일자 2014년11월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/02 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2014-7030274(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2008년04월22일  
심사청구일자 없음  
(62) 원출원 특허 10-2009-7024259  
원출원일자(국제) 2008년04월22일  
심사청구일자 2012년05월24일  
(85) 번역문제출일자 2014년10월28일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2008/061123  
(87) 국제공개번호 WO 2008/131374  
국제공개일자 2008년10월30일  
(30) 우선권주장  
60/913,382 2007년04월23일 미국(US)

(71) 출원인  
와이어쓰 엘엘씨  
미국 10017 뉴욕주 뉴욕 이스트 42엔드 스트리트 235  
(72) 발명자  
고메즈, 호세, 마누엘  
미국 01824 매사추세츠주 챔스포드 리틀톤 로드 46  
힐러, 그레고리, 월터  
미국 01880 매사추세츠주 웨이크필드 켄트릭 로드 74  
(74) 대리인  
김성기, 김진희

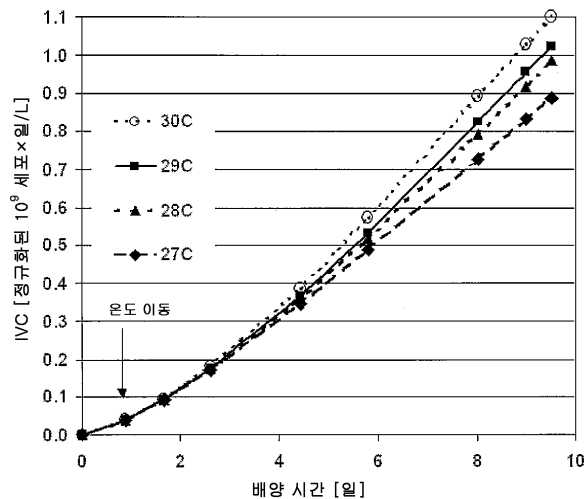
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 세포 배양물에서의 낮은 온도 및/또는 낮은 pH의 사용

(57) 요약

본 발명은 감소된 온도 및/또는 감소된 pH에서 세포 배양물을 성장시킴으로써 세포 배양물에서 단백질 미스폴딩 및 응집을 감소시키는 신규한 방법을 제공한다. 결과로서, 세포 배양물에서 생산된 단백질의 품질은 크게 개선된다. 따라서, 본 발명은 세포 배양물에서 생산된 치료용 단백질의 유효성의 개선을 수월하게 한다.

대표도 - 도1a



**특허청구의 범위**

**청구항 1**

세포 배양물에서 TNFR-Fc의 생산을 향상시키는 방법으로서, 미스폴딩된(misfolded) TNFR-Fc 및/또는 응집된 (aggregated) TNFR-Fc의 생산을 감소시키기 위해 세포 배양물에서 세포를 감소된 pH에서 성장시키는 단계를 포함 하고, 상기 감소된 pH는 6.80 내지 7.00 미만 범위인 방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 세포를 감소된 pH 및 감소된 온도에서 성장시키는 것을 포함하는 방법으로서, 상기 감소된 온 도는 27.0℃ 내지 30.0℃ 미만 범위의 온도인 것인 방법.

**청구항 3**

제1항 또는 제2항에 있어서, 세포 배양물은 대규모 세포 배양물인 방법.

**청구항 4**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양물은 유가(fed-batch) 세포 배양물인 방법.

**청구항 5**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양물은 포유류 세포 배양물인 방법.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 세포 배양물은 CHO 세포 배양물인 방법.

**청구항 7**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 감소된 온도는 29.5℃인 방법.

**청구항 8**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 감소된 pH는 6.95인 방법.

**청구항 9**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, TNFR-Fc를 세포 배양물로부터 분리시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 10**

제9항에 있어서, TNFR-Fc를 제제화를 위해 추가로 정제 또는 처리하는 것인 방법.

**청구항 11**

제10항에 있어서, TNFR-Fc를 약학 조성물로 제제화하는 것인 방법.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, pH에서 세포를 성장시키는 것이 고분자량 응집체를 10% 이상 감소 시키는 것인 방법.

**명세서**

**기술분야**

본원은 2007년 4월 23일자에 출원된 미국 가출원 제60/913,382호의 이익을 청구하고, 이는 참조문헌으로 이의

[0001]

전문으로 본원에 인용된다.

[0002] 기술분야

[0003] 본 발명은 배양된 세포, 특히 포유류 세포에 의한 단백질 생산의 개선 방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 단백질 생산물(들), 예를 들면, 당단백질 생산물(들)의 생산 방법으로, 단백질 생산물 특성은 세포 배양 환경을 조작함으로써 제어하는 것인 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 예를 들면 세포 배양물의 온도 및/또는 pH를 감소시켜 단백질 글리코실화를 조작하고 단백질 응집(aggregation) 및 미스폴딩(misfolding)을 감소시킴으로써 포유류 세포에서 생산된 단백질 생산물(들), 예를 들면, 당단백질 생산물(들)의 치료 효과 및/또는 면역원성을 개선하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0004] 대부분의 생물공학 제품은, 상업적으로 구입가능하든 또는 개발 중에 있든 간에, 단백질 치료제이다. 동물 세포 배양물에서 단백질의 생산에 대한 그리고 이러한 생산과 관련하여 개선된 방법에 대한 요구가 많고 증가하고 있다. 동물 세포의 세포 기계(cellular machinery)가 일반적으로 여러 형태의 단백질 치료제, 예컨대 번역후 변형된(posttranslationally modified) 단백질, 특히 글리코실화된 단백질을 생산하는데 필요하므로 이러한 개선된 방법이 필요하다.

[0005] 대규모 치료용 단백질 생산 방법에서 직면하는 일반적인 문제점은 상당 부분의 단백질 생산물이 미스폴딩된 형태 또는 응집된 형태로, 즉 고분자량 응집체("HMWA") 형태로 생산된다는 점이다. 예를 들면, 세포에서 폴리펩타이드의 재조합 과발현은 소포체(ER) 기계를 과부하(overload)시켜, 증가된 수의 미스폴딩된 및/또는 응집된 단백질이 분해 경로를 벗어나서 ER을 빠져나가게 할 수 있다. 따라서, 현재의 단백질 생산 방법은 결과적으로 응집되고 비기능성이며, 따라서 생산된 대로 사용가능하지 않은 생산물을 다량 생성시킨다. 미스폴딩된 및/또는 응집된 단백질의 존재는 바람직하지 않은데, 왜냐하면 이는 투여시 면역원성(예, 보체 활성화 또는 과민증)에 대한 가능성(이들에 국한되는 것은 아님)을 비롯하여 투여시 부작용을 야기할 수 있기 때문이다. 따라서, 과도한 치료용 단백질 미스폴딩 및/또는 응집은 예를 들면 임상 시험을 실패로 만들 수 있다. 따라서, 당해 분야에 서 단백질 미스폴딩 및/또는 응집을 제한 또는 감소시키는 신규한 방법이 필요하다.

[0006] 단백질 글리코실화는 복합 당 부분이 ER에서 일련의 특수 효소(글리코트랜스퍼라제 및 글리코시다제)의 작용을 통해 단백질에 첨가되는 일반적인 번역후 변형 과정이다. 이러한 과정은 새로 합성된 폴리펩타이드의 적절한 폴딩을 제어할 수 있어, 미스폴딩된 단백질은 분해되는 반면 정확히 폴딩된 폴리펩타이드만이 ER을 빠져나가게 된다. 단백질 글리코실화의 패턴은 단백질 표적화(targeting), 구조, 열역학 안정성 및 효소 활성화에 영향을 미친다(예를 들면, 문헌[Sola et al. (2007) Cell. Mol. Life Sci. 64:2133-52; Sola and Griebenow (2006) FEBS Lett. 580:1685-90] 참조). 예를 들면, N-글리칸 시알릴화는 당단백질의 수명 증가와 관련되는데, 왜냐하면 이러한 당단백질은 분해를 위해 비시알릴화된 단백질을 표적으로 하는 아시알로당단백질 수용체에 의해 인식되지 않기 때문이다(예를 들면, 문헌[Bork et al. (2007) FEBS Letters 581:4195-98] 참조). 따라서, 단백질 글리코실화의 변경은 생산물의 품질 및 유효성에 영향을 미칠 수 있다.

[0007] 또한, 비정상 단백질 글리코실화는 결과적으로 최종 치료용 단백질 생산물의 면역원성을 야기할 수 있다. 비자연적인 차선 조건하에 생산된 단백질은 인간 단백질에서 천연적으로 발견되지 않는 당 및 당 패턴을 획득하여, 결과적으로 피험자에서 면역원성 반응을 야기할 수 있다(Jefferis (2006) Biotechnol. Prog. 21:11-16). 이러한 비자연적인 글리코실화는 단백질 치료제, 예컨대 항체 치료제 또는 Fc 융합 단백질 치료제, 예를 들면, 가용성 수용체 Fc 융합 단백질 치료제에서 특히 일반적이다.

[0008] 이러한 이유로, FDA는 치료용 단백질의 단백질당형(glycoform) 프로파일의 엄격한 범위 내에서 유지될 것을 요구한다. 따라서, 약학 산업에서 단백질 글리코실화의 수준의 제어를 가능하게 하는 세포 배양물에서 치료용 단백질의 생산 방법이 필요하다.

**발명의 내용**

[0009] 발명의 개요

[0010] 따라서, 본 발명은 세포 배양물에서 단백질의 생산 방법으로서, 미스폴딩된 단백질 및/또는 응집된 단백질의 생산이 감소되도록, (a) 세포 배양물에서 세포를 감소된 온도에서 성장시키는 단계, 및 (b) 세포 배양물에서 세포를 감소된 pH에서 성장시키는 단계 중 하나 이상을 포함하는 방법에 관한 것이다. 실시양태에서, 세포는 감소된

온도에서 그리고 감소된 pH에서 세포 배양물에서 성장한다.

- [0011] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 pH 및 온도 매개변수를 변경하여 포유류 세포 배양물, 특히 중국 햄스터 난소("CHO") 세포 배양물에서 미스폴딩된 및/또는 응집된 단백질의 생산을 감소시키는 것에 관한 것이다. 바람직한 실시양태에서, 세포 배양물은 TNFR-Fc 또는 sIL-13R 단백질(이들에 국한되지는 않음)과 같은 가용성 수용체인 단백질("생산된 단백질")을 생산한다. 이러한 바람직한 실시양태에서, 감소된 온도는 27.0°C 내지 30.0°C 미만 범위일 수 있다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 감소된 pH는 6.80 내지 7.00 미만 범위이다. 상술한 범위 내의 pH와 온도의 조합이 또한 사용될 수 있다.
- [0012] 또 다른 양태에서, 본 발명은 세포 배양물에서 단백질의 생산 방법으로서, 생산된 단백질의 단백질 글리코실화의 수준은 세포 배양물의 온도 및/또는 pH를 변경함으로써 제어하는 방법에 관한 것이다. 따라서, N-글리칸 시알릴화(이에 국한되지는 않음)와 같은 글리코실화의 수준은 온도 및/또는 pH를 증가시킴으로써 증가시킬 수 있거나, 또는 온도 및/또는 pH를 감소시킴으로써 감소시킬 수 있다.
- [0013] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 기재된 매개변수를 조절하는 치료용 단백질의 생산 방법에 관한 것이다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 이러한 방법에 의해 제조된 치료용 단백질 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

**도면의 간단한 설명**

- [0014] 도 1a는 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 27.0°C[◆], 28.0°C[▲], 29.0°C[■] 또는 30.0°C[○]에서 성장한 TNFR-Fc로 형질감염된 CHO 세포의, 평균 수확일 IVC로 정규화된, 통합 생존 세포수(Y축; IVC[정규화된 10<sup>9</sup> 세포 × 일/L])를 나타내고, 도 1b는 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 동일 세포의 세포 생존능력(Y축)을 나타낸다.
- 도 2a는 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 27.0°C[◆], 28.0°C[▲], 29.0°C[■] 또는 30.0°C[○]에서 성장한 TNFR-Fc로 형질감염된 CHO 세포의 세포 배양물에서 잔류 글루코스 프로파일(Y축; 글루코스[g/L])을 나타내고, 도 2b는 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 동일 세포의 글루타민 프로파일(Y축; 글루타민[mM])을 나타낸다.
- 도 3a는 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 27.0°C[◆], 28.0°C[▲], 29.0°C[■] 또는 30.0°C[○]에서 성장한 TNFR-Fc로 형질감염된 CHO 세포의 세포 배양물의 배지 중의 락테이트 농도(Y축; 락테이트[g/L])를 나타내고, 도 3b는 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 동일 세포의 암모늄 프로파일(Y축; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>[mM])을 나타낸다.
- 도 4a는 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 27.0°C[◆], 28.0°C[▲], 29.0°C[■] 또는 30.0°C[○]에서 성장한 TNFR-Fc로 형질감염된 CHO 세포의 세포 배양물의, 평균 수확일 누적 평균 Qp로 정규화된, 누적 평균 Qp(X축; 누적 평균 Qp[정규화된 mg/10<sup>9</sup> 세포/일])로 표현되는, 세포 특이적 생산성을 나타내고, 도 4b는 시간(배양 시간[일])에 따른 동일 세포의, 평균 수확일 역가로 정규화된, TNFR-Fc 역가(X축; 생산물 역가[정규화된 mg/L])를 나타낸다.
- 미스폴딩된 및/또는 응집된 TNFR-Fc(Y축; 미스폴딩된/응집된 생산물(%))의 생산에 미치는 TNFR-Fc로 형질감염된 CHO 세포의 세포 배양물에서 생산 온도 변경(X축; 온도[°C])의 효과는 도 5a에 도시되어 있고, HMWA(Y축; 고분자량 중(%))의 생산에 미치는 온도의 효과는 도 5b에 도시되어 있다.
- TNFR-Fc의 총 시알릴화(N- 및 O-연결 시알릴화)의 백분율(Y축; 표준 물질의 총 시알릴화의 백분율)에 미치는 TNFR-Fc로 형질감염된 CHO 세포의 세포 배양물에서 생산 온도 변경(X축; 온도[°C])의 효과는 도 6a에 도시되어 있다. 사용된 표준 물질은 검정 결과가 비교될 수 있는 알려져 있고 바람직한 글리코실화 패턴을 갖는 TNFR-Fc의 특정한 분취량이다. 도 6b는 총 시알릴화된 N-연결 글리칸(□) 또는 비시알릴화된 N-연결 글리칸(●)의 백분율(Y축; 총 N-연결 글리칸의 백분율)에 미치는 동일 세포의 세포 배양물에서 생산 온도 변경(X축; 온도[°C])의 효과를 나타낸다.
- 도 7은 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 CHO 세포 배양물의 pH(Y축)에 미치는 여러 온도(27.0°C[◆], 28.0°C[▲], 29.0°C[■] 또는 30.0°C[○])에서 세포를 성장시키는 효과를 보여준다.
- 도 8a는 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 7.20[◇], 7.10[■], 7.00[◆], 6.90[●] 또는 6.80[▲]의 pH 설정점에서 성장한 TNFR-Fc로 형질감염된 CHO 세포의, 평균 수확일 IVC로 정규화된, 통합 생존 세포수(Y축; IVC[정규화된 10<sup>9</sup> 세포 × 일/L])를 나타내고, 도 8b는 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 동일 세포의 세포 생존능력(Y

축)을 나타낸다.

도 9a는 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 7.20[◇], 7.10[■], 7.00[◆], 6.90[●] 또는 6.80[▲]의 pH 설정점에서 성장한 TNFR-Fc로 형질감염된 CHO 세포의 세포 배양물의 글루코스 프로파일(Y축; 글루코스[g/L])을 나타내고, 도 9b는 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 동일 세포의 글루타민 프로파일(Y축; 글루타민[mM])을 나타낸다.

도 10a는 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 7.20[◇], 7.10[■], 7.00[◆], 6.90[●] 또는 6.80[▲]의 pH 설정점에서 성장한 TNFR-Fc로 형질감염된 CHO 세포의 세포 배양물의 배지 중의 락테이트 농도(Y축; 락테이트[g/L])를 나타내고, 도 10b는 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 동일 세포의 암모늄 프로파일(Y축;  $\text{NH}_4^+$ [mM])을 나타낸다.

도 11a는 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른, TNFR-Fc로 형질감염된 CHO 세포가 7.20[◇], 7.10[■], 7.00[◆], 6.90[●] 또는 6.80[▲]의 pH 설정점에서 성장하는, pH 설정점으로부터 세포 배양물의 pH의 편차(X축; 배양의 pH)를 나타낸다. 도 11b는 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 7.20[◇], 7.10[■], 7.00[◆], 6.90[●] 또는 6.80[▲]의 pH 설정점에서 성장한 동일 세포의 몰삼투압농도(X축; 몰삼투압농도[mOsm/kg])를 나타낸다.

도 12a는 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 7.20[◇], 7.10[■], 7.00[◆], 6.90[●] 또는 6.80[▲]의 pH 설정점에서 성장한 TNFR-Fc로 형질감염된 CHO 세포의 세포 배양물의, 평균 수확일 누적 평균 Qp로 정규화된, 누적 평균 Qp(X축; 누적 평균 Qp[정규화된 mg/10<sup>9</sup> 세포/일])로 표현되는, 세포 특이적 생산성을 나타내고, 도 12b는 시간(배양 시간[일])에 따른 동일 세포의, 평균 수확일 역가로 정규화된, TNFR-Fc 역가(X축; 생산물 역가[정규화된 mg/L])를 나타낸다.

도 13a는 미스폴딩된/응집된 TNFR-Fc(Y축; 미스폴딩된/응집된 생산물(%))의 생산에 미치는 TNFR-Fc로 형질감염된 CHO 세포의 배양의 pH 설정점 변경(X축; pH)의 효과를 나타낸다. 도 13b는 HMWA(Y축; 고분자량 중(%))의 생산에 미치는 세포 배양물의 pH 설정점 변경(X축; pH)의 효과를 나타낸다.

TNFR-Fc의 총 시알릴화의 백분율(Y축; 표준 물질의 총 시알릴화의 백분율)에 미치는 TNFR-Fc로 형질감염된 CHO 세포의 배양에서 pH 설정점 변경(X축; pH)의 효과는 도 14a에 도시되어 있다. 도 14b는 총 시알릴화된 N-연결 글리칸(□) 또는 비시알릴화된 N-연결 글리칸(●)의 백분율(Y축; 총 N-연결 글리칸의 백분율)에 미치는 동일 세포의 세포 배양물에서 세포 배양물 pH 설정점 변경(X축; pH)의 효과를 나타낸다.

도 15는 히드라진 방출된 2-아미노벤즈아미드-(2-AB)-표지된 단백질 단백질형을 정상 크로마토그래피(Normal Phase Chromatography)로 처리함으로써 관찰된 N-연결 글리칸 시알릴화를 보여주는 보유 시간(X축; 분)에 대한 특징적인 형광(Y축; 형광, 단위[mV]) 프로파일을 보여준다.

도 16은 배양의 pH 설정점 변경에서 히드라진 방출된 2-아미노벤즈아미드-(2-AB)-표지된 단백질 단백질형을 TNFR-Fc로 형질감염된 CHO 세포의 세포 배양물의 정상 크로마토그래피로 처리함으로써 관찰된 N-연결 글리칸 시알릴화를 보여주는 보유 시간(X축; 분)에 대한 형광(Y축; mV) 프로파일을 보여준다.

도 17은 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 37.0°C[◆], 33.0°C[■], 32.0°C[●], 31.0°C[◇], 29.0°C[△] 또는 RT[□]에서 성장한 sIL-13R 과발현 세포의 세포 배양물의 (A) 생존 세포 밀도(Y축; 세포/ml), (B) 총 세포 밀도(생존 세포 및 비생존 세포 둘 다 포함)(Y축; 세포/ml), (C) 세포 생존능력(Y축, 및 (D) 통합 생존 세포수(IVC)(Y축; 10<sup>9</sup> 세포×일/L)를 나타낸다.

도 18은 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 37.0°C[◆], 33.0°C[■], 32.0°C[●], 31.0°C[◇], 29.0°C[△] 또는 RT[□]에서 성장한 sIL-13R 과발현 세포 배양물에 대한 sIL-13R 역가(이합체 및 HMWA 둘 다)(Y축; sIL-13R[mg/L])를 나타낸다.

도 19a는 37.0°C, 33.0°C, 32.0°C, 31.0°C, 29.0°C 또는 RT에서 성장한 sIL-13R 과발현 세포 배양물에 대한 다양한 시간 간격(X축) 동안 매일의 특이적 sIL-13R 생산 속도(Y축; Qp[μg/10<sup>9</sup> 세포/일])를 나타낸다. 도 19b는 37.0°C, 33.0°C, 32.0°C, 31.0°C, 29.0°C 또는 RT에서 성장한 sIL-13R 과발현 세포 배양물에 대한 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 누적 평균 세포 특이적 생산성(Y축; 누적 평균 Qp[mg/10<sup>9</sup> 세포/일])을 나타낸다.

도 20은 37.0°C, 33.0°C, 32.0°C, 31.0°C, 29.0°C 또는 RT에서 성장한 sIL-13R 과발현 세포 배양물에 대한 여

러 시간 간격(X축) 동안 매일의 특이적 글루코스 소모 속도(Y축;  $Q_{glc}[g/10^9 \text{ 세포/일}]$ )를 나타낸다.

도 21은 37.0°C, 33.0°C, 32.0°C, 31.0°C, 29.0°C 또는 RT에서 성장한 sIL-13R 과발현 세포 배양물에 대한 여러 시간 간격(X축) 동안 매일의 특이적 글루타민 소모 속도(Y축;  $Q_{gln}[mmol/10^9 \text{ 세포/일}]$ )를 나타낸다.

도 22는 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 37.0°C[◆], 33.0°C[■], 32.0°C[●], 31.0°C[◇], 29.0°C[△] 또는 RT[□]에서 성장한 sIL-13R 과발현 세포의 세포 배양 배지 중의 락테이트 농도(Y축; 락테이트[g/L])를 나타낸다.

도 23은 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 37.0°C[◆], 33.0°C[■], 32.0°C[●], 31.0°C[◇], 29.0°C[△] 또는 RT[□]에서 성장한 sIL-13R 과발현 세포의 세포 배양 배지 중의 암모늄 농도(Y축; 암모니아[mM])를 나타낸다.

도 24는 sIL-13R 과발현 세포 배양 9일째에 HMWA(Y축; 고분자량 중(%))의 생산에 미치는 세포 배양물 온도(X축; 생산 온도[°C])의 효과를 나타낸다.

도 25는 sIL-13R 과발현 세포 배양 18일째에 HMWA(Y축; 고분자량 중(%))의 생산에 미치는 세포 배양물 온도(X축; 생산 온도[°C])의 효과를 나타낸다.

도 26a는 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 37.0°C[◆], 33.0°C[■], 32.0°C[●], 31.0°C[◇], 29.0°C[△] 또는 RT[□]에서 성장한 sIL-13R 과발현 세포의 순화 배지(conditioned medium) 중에 생산된 총 sIL-13R 단백질로부터 회수된 sIL-13R 이합체의 백분율(Y축; sIL-13R 이합체(%))을 나타낸다. 도 26b는 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 sIL-13R 과발현 세포의 순화 배지 중의 총 sIL-13R에 대한 HMWA의 백분율(Y축; 고분자량 중(%))을 나타낸다.

도 27은 시간(X축; 배양 시간[일])에 따른 37.0°C[◆], 33.0°C[■], 32.0°C[●], 31.0°C[◇], 29.0°C[△] 또는 RT[□]에서 성장한 세포의 순화 배지 중의 sIL-13R 이합체 역가(Y축; sIL-13R 이합체 단독[mg/L])를 나타낸다.

#### 발명의 상세한 설명

포유류 세포 배양물에서 치료용 단백질의 생산에 대해 널리 보급된 지식은 생산기 동안의 온도는 적어도 30.0°C 이어야 하고 pH는 적어도 7.00이어야 한다는 것이다. 그러나, 30.0°C 초과와 온도에서 그리고 7.00 초과와 pH에서 생산기 동안 세포 배양물에서 세포를 성장시키면 단백질 응집(또한 본원에서 고분자량 응집체(또는 HMWA) 형성이라 칭함) 및 단백질 미스폴딩이 증가하여, 기능성이고 유용한 단백질은 더 적은 양으로 생산될 수 있다.

본 발명은 세포 배양물에서 신규한 단백질 생산 방법을 제공하고, 이 방법은 결과적으로 단백질 미스폴딩을 감소시키고/시키거나 단백질 응집을 감소시킨다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 단백질 글리코실화의 수준의 제어 방법을 제공한다.

#### 본 발명의 방법에 의해 생산된 단백질

본원에서 사용되는 문구 "폴리펩타이드" 또는 "폴리펩타이드 생산물"은 각각 용어 "단백질" 및 "단백질 생산물"과 동의어이고, 당해 분야에 일반적으로 이해되는 바대로, 연속적인 펩타이드 결합을 통해 연결된 아미노산의 1개 이상의 쇄를 의미한다. 특정한 실시양태에서, "관심의 단백질" 또는 "관심의 폴리펩타이드" 등은 숙주 세포 내로 형질감염 또는 형질전환된, 예를 들면, 숙주 세포 내로 일시적으로 또는 영구적으로 형질감염 또는 형질전환된 외생 핵산 분자에 의해 암호화된 단백질이다. 숙주 세포를 형질감염 또는 형질전환하는 외생 DNA가 "관심의 단백질"을 암호화하는 특정한 실시양태에서, 외생 DNA의 핵산 서열은 아미노산 서열을 결정한다. 이러한 서열은 자연에서 발생하는 서열일 수 있거나, 또는 대안적으로 인간에 의해 조작된 서열일 수 있다. 특정한 실시양태에서, "관심의 단백질"은 숙주 세포에 내생인 핵산 분자에 의해 암호화된 단백질이다. 이러한 관심의 내생 단백질의 발현은 숙주 세포를 예를 들면, 1 이상의 조절 서열을 함유할 수 있고/있거나 관심의 단백질의 발현을 증대시키는 단백질을 암호화할 수 있는 외생 핵산 분자로 형질감염시킴으로써 변경시킬 수 있다. 본 발명의 실시양태에서, 관심의 폴리펩타이드는 예를 들면, 후속 정제를 위해 세포 배양물에서 생산된다.

용어 "당단백질", "글리코실화된 단백질" 등은 아스파라긴 측쇄(N-글리코실화) 또는 세린 및/또는 트레오닌 측쇄(O-글리코실화)에 부착된 당 부분, 예를 들면, 올리고사카라이드 부분을 갖는 단백질을 의미한다. 예를 들면, 하나의 일반적인 유형의 단백질 N-글리코실화는 단백질 시알릴화(N-글리칸 시알릴화로도 공지됨)이다. 대부분의 분비 및 막 단백질(예, 막 수용체)은 ER 및/또는 골지체에서 글리코실화된다. 글리코실화는 ER에서 단백질 폴딩 및 방출을 제어하는 것으로 당해 분야에 공지되어 있다. 추가로, 글리코실화/탈글리코실화의 여러 단계가 골지에서 일어난다. ER 및 골지체 둘 다에서 일어나는 단백질 글리코실화 과정에 대한 현재의 지식에 대해서는 문헌

[Helenius et al. (2001) Science 291:2364-69; Parodi (2000) Biochem. J. 348:1-13; and Parodi (2000) Annu. Rev. Biochem. 69:69-93]을 참조할 수 있다. 따라서, 본 발명의 특정한 실시양태에서, 관심의 폴리펩타이드는 관심의 당단백질이고, 관심의 당단백질은 예를 들면, 후속 정제를 위해 세포 배양물에서 생산된다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 관심의 당단백질은 수용체이고, 가용성 수용체일 수 있다.

본 발명의 방법 및 조성물은 약학적, 진단학적, 농업적 특성, 및/또는 상업, 실험 및/또는 기타 이용분야에 유용한 다양한 다른 특성 중 임의의 특성을 갖는 단백질(이에 국한되지는 않음)을 비롯한 임의의 관심의 단백질을 생산하도록 사용할 수 있다. 또한, 관심의 단백질은 단백질 치료제일 수 있다. 즉, 단백질 치료제(또는 치료용 단백질)은 이것이 작용하는 신체 부분에 또는 이것이 중간체를 통해 간접적으로 작용하는 신체 부분에 생물학적 효과를 미치는 단백질이다. 특정한 실시양태에서, 본 발명의 방법 및/또는 조성물을 사용하여 생산된 단백질은 치료용 단백질로서 피험자에게 투여하기 전에 처리 및/또는 변경될 수 있다.

본 발명은 임의의 치료용 단백질, 예컨대 약학적으로 또는 상업적으로 관련된 효소, 수용체, 수용체 융합, 가용성 수용체, 가용성 수용체 융합, 항체(예, 단클론 및/또는 다클론 항체), 항체의 항원 결합 단편, Fc 융합 단백질, SMIP, 사이토킨, 호르몬, 조절 인자, 성장 인자, 응집/응고 인자, 또는 항원 결합체의 유리한 생산을 위해 세포를 배양하기 위해 사용할 수 있다. 상기 목록의 단백질은 단지 전적으로 예시이고, 제한하는 열거인 것으로 의도되지 않는다. 당해 분야의 숙련된 당업자는 본 발명에 따라 생산될 수 있는 다른 단백질을 알 수 있을 것이고, 이러한 단백질을 생산하기 위해 본원에 개시된 방법을 사용할 수 있을 것이다.

용어 "항체"는 1개 이상, 통상적으로 2개의 VH 도메인 또는 이의 일부, 및/또는 1개 이상, 통상적으로 2개의 VL 도메인 또는 이의 일부를 포함하는 단백질을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 항체는 2개의 면역글로불린 중쇄와 2개의 면역글로불린 경쇄의 4합체이고, 여기서 면역글로불린 중쇄와 면역글로불린 경쇄는 예를 들면 이황화 결합에 의해 서로 연결된다. 항체, 또는 이의 일부는 설치류, 영장류(예, 인간 및 비인간 영장류), 낙타과, 상어(이들에 국한되지는 않음)를 비롯한 임의의 기원으로부터 얻을 수 있을 뿐만 아니라, 예를 들면 당해 분야의 숙련된 당업자에게 널리 공지된 방법에 의해 재조합으로 생산된 항체, 예를 들면, 키메라, 인간화, 및/또는 시험관내 생성된 항체로부터 얻을 수 있다.

본 발명은 또한 "항체의 항원 결합 단편"을 포함하고, 이는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성되는 1가 단편인, Fab 단편; (ii) 경첩 부위에서 이황화 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인, F(ab')<sub>2</sub> 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 구성되는 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 암(arm)의 VL 및 VH 도메인으로 구성되는 Fv 단편; (v) VH 도메인으로 구성되는 dAb 단편; (vi) 낙타과 또는 낙타화(camelized) 가변 도메인, 예를 들면, VHH 도메인; (vii) 단쇄 Fv(scFv); (viii) 이종특이성 항체; 및 (ix) Fc 구역에 융합된 면역글로불린의 1개 이상의 항원 결합 단편을 포함한다. 또한, Fv 단편의 2개의 도메인인, VL 및 VH가 별개의 유전자에 의해 암호화되더라도, 이들은 재조합 방법을 이용하여 합성 링커에 의해 연결될 수 있고, 이 합성 링커는 VL 및 VH가 단일 단백질 쇄로서 제조되게 하고, 이 단일 단백질 쇄에서 VL 구역과 VH 구역은 쌍을 이뤄 1가 분자(단쇄 Fv(scFv)로서 공지됨)를 형성한다(예를 들면, 문헌[Bird et al. (1988) Science 242:423-26; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-83] 참조). 이러한 단쇄 항체는 또한 용어 항체의 "항원 결합 단편" 내에 포함되도록 의도된다. 이러한 항체 단편은 당해 분야의 숙련된 당업자에게 공지된 통상적인 기술을 이용하여 얻고, 이러한 항체 단편은 원형 항체에 대한 기능 평가와 동일한 방식으로 기능 평가한다.

본 발명은 또한 단일 도메인 항체를 포함한다. 단일 도메인 항체는 상보성 결정 구역이 단일 도메인 폴리펩타이드의 일부인 항체를 포함할 수 있다. 예로는 항체로부터 유도된 것 이외에 중쇄 항체, 천연적으로 경쇄를 갖지 않는 항체, 통상적인 4-쇄 항체로부터 유도된 단일 도메인 항체, 조작 항체(engineered antibody) 및 단일 도메인 골격을 포함하지만, 이들에 국한되지는 않는다. 단일 도메인 항체는 당해 분야의 임의의 단일 도메인 항체, 또는 임의의 미래의 단일 도메인 항체일 수 있다. 단일 도메인 항체는 마우스, 인간, 낙타, 라마, 염소, 래빗, 소 및 상어(이들에 국한되지는 않음)를 비롯한 임의의 종으로부터 유도될 수 있다. 본 발명의 하나의 양태에 따르면, 본원에서 사용된 단일 도메인 항체는 경쇄를 갖지 않는 중쇄 항체로서 공지된 천연 단일 도메인 항체이다. 이러한 단일 도메인 항체는 예를 들면 WO 제9404678호에 개시되어 있다. 명확성의 이유로, 천연적으로 경쇄를 갖지 않는 중쇄 항체로부터 유도된 이러한 가변 도메인은 이를 4-쇄 면역글로불린의 통상적인 VH와 구별하기 위해 본원에서 VHH 또는 나노바디(nanobody)로서 알려져 있다. 이러한 VHH 분자는 낙타과 종에서, 예를 들면 낙타, 라마, 단봉 낙타, 알파카 및 구아나코에서 길러진 항체로부터 유도될 수 있다. 낙타과 이외의 다른 종은 천연적으로 경쇄를 갖지 않는 중쇄 항체를 생산할 수 있고, 이러한 VHH는 본 발명의 범위 내에 있다. 단일 도메인 항체는 또한 상어 IgNAR을 포함하고, 예를 들면, 문헌[Dooley et al., Proc. Natl. Acad. Sci.

U.S.A., 103:1846-1851 (2006)]을 참조할 수 있다.

"이중특이성" 또는 "이작용성" 항체 이외에, 항체는 각각의 이의 동일한 결합 자리를 갖는 것으로 이해된다. "이중특이성" 또는 "이작용성 항체"는 2개의 상이한 중쇄/경쇄 쌍 및 2개의 상이한 결합 자리를 갖는 인공 하이브리드(hybrid) 항체이다. 이중특이성 항체는 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 연결을 비롯한 다양한 방법에 의해 생산될 수 있다. 예를 들면, 문헌[Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992)]을 참조할 수 있다.

단백질이 항체 또는 이의 단편인 실시양태에서, 이는 1개 이상, 또는 2개의 전장 중쇄, 및 1개 이상, 또는 2개의 경쇄를 포함할 수 있다. 또는, 항체 또는 이의 단편은 항원 결합 단편(예, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv 또는 단쇄 Fv 단편)만을 포함할 수 있다. 항체 또는 이의 단편은 단클론 또는 단일 특이성 항체일 수 있다. 항체 또는 이의 단편은 또한 인간, 인간화, 키메라, CDR-이식, 또는 시험관내 생성된 항체일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 예를 들면, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4로부터 선택된 중쇄 불변 부위를 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 예를 들면 카파 또는 람다로부터 선택된 경쇄를 갖는다. 하나의 실시양태에서, 불변 부위를 변경, 예를 들면 돌연변이시켜 항체의 특성을 변경(예를 들면, Fc 수용체 결합, 항체 글리코실화, 시스템인 잔기의 수, 작동 세포 기능, 또는 보체 기능 중 1 이상을 증가 또는 감소)시킨다. 통상적으로, 항체 또는 이의 단편은 소정의 항원, 예를 들면 신경퇴행, 대사, 염증, 자동면역 및/또는 악성 장애와 같은 장애와 관련된 항원에 특이적으로 결합한다.

본원에 기재된 단백질은 임의로 예를 들면 안정성, 작동 세포 기능 또는 보체 고정 중 1 이상을 증대시키는 부분을 추가로 포함한다. 예를 들면, 항체 또는 항원 결합 단백질은 페그화된(pegylated) 부분, 알부민, 또는 중쇄 및/또는 경쇄 불변 부위를 추가로 포함할 수 있다.

항체는 일반적으로 예를 들면 전통적인 하이브리도마 기술(Kohler et al., Nature 256:495 499 (1975)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,567호), 또는 항체 라이브러리를 사용하는 파아지 발현(phage display) 기술(Clackson et al., Nature 352:624 628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581 597 (1991))을 통해 제조한다. 다양한 다른 항체 생산 기술의 경우, 문헌[Antibodies: A Laboratory Manual, eds. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]을 참조할 수 있다.

추가로, 항체는 검출가능한 또는 기능성 표지로 표식할 수 있다. 이러한 표지는 식별용 방사성 동위원소(radiolabel)(예, 131I 또는 99Tc), 효소 표지(예, 양고추냉이 펩소시다제 또는 알칼리 포스파타아제), 및 다른 화학 부위(예, 비오틴)를 포함한다.

"Small Modular Immunopharmaceutical" 또는 (SMIP™) 약물(Trubion Pharmaceuticals, 미국 워싱턴주 시애틀 소재)은 항원, 대응수용체(counterreceptor) 등과 같은 동족 구조에 대한 결합 도메인, 1개의 시스템인 잔기를 갖거나 또는 시스템인 잔기를 갖지 않는 경첩 부위 폴리펩타이드, 및 면역글로불린 CH2 및 CH3 도메인으로 구성된 단쇄 폴리펩타이드이다(또한 www.trubion.com 참조). SMIP 및 이의 용도 및 이용분야는 예를 들면, 미국 공개특허공보 제2007/002159호, 제2003/0118592호, 제2003/0133939호, 제2004/0058445호, 제2005/0136049호, 제2005/0175614호, 제2005/0180970호, 제2005/0186216호, 제2005/0202012호, 제2005/0202023호, 제2005/0202028호, 제2005/0202534호, 및 제2005/0238646호, 및 이들의 관련 특허 일군(이들 모두는 참조문헌으로 이의 전문으로 본원에 인용됨)에 개시되어 있다.

본 발명의 하나의 실시양태에서, 관심의 단백질은 가용성 수용체, 예를 들면, 가용성 수용체 융합 단백질이다. 막 단백질, 예를 들면, 수용체는 일반적으로 글리코실화된 단백질이다. 따라서, 본 발명의 방법은 비응집되고 적절하게 폴딩되며 글리코실화된 가용성 수용체 융합 단백질을 생산하는데 특히 유리하다.

가용성 단백질, 예를 들면, 가용성 수용체는 당해 분야에 널리 공지된 방법에 따라 생산할 수 있다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 가용성 수용체는 수용체의 세포외 구역, 또는 수용체의 세포외 구역의 단편을 포함한다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 가용성 수용체는 2개의 폴리펩타이드를 포함한다. 제1 폴리펩타이드는 전체 길이의 수용체를 포함하거나, 또는 제1 폴리펩타이드는 전체 길이 미만의 수용체, 예를 들면, 수용체의 세포외 부분을 포함한다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 제1 폴리펩타이드는 전체 길이의 사이토킨 수용체이거나, 또는 제1 폴리펩타이드는 전체 길이 미만의 사이토킨 수용체, 예를 들면, 사이토킨 수용체의 세포외 부분이다. 이러한 가용성 수용체는 또한 추가의 폴리펩타이드, 예를 들면, GST, Lex-A, MBP 폴리펩타이드 서열 또는 면역글로불린 쇄(예를 들면, Fc 단편, 다양한 아형(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, 및 IgE 포함)의 중쇄 불변 부위 포함)를 포함할 수 있다.

본 발명의 하나의 실시양태에서, 제2 폴리펩타이드는 바람직하게는 가용성이다. 몇몇 실시양태에서, 제2 폴리펩타이드는 연결된 폴리펩타이드의 반감기(예, 혈청 또는 순환 반감기)를 증대시킨다. 바람직한 실시양태에서, 제2 폴리펩타이드는 적어도 면역글로불린 폴리펩타이드 구역을 포함한다. 면역글로불린 융합 폴리펩타이드는 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들면 미국 특허 제5,516,964호, 제5,225,538호, 제5,428,130호, 제5,514,582호, 제5,714,147호, 및 제5,455,165호에 기재되어 있다. 가용성 융합 단백질은 생산 동안 응집되기 쉬운 것으로 알려져 있고, 따라서 본 발명에 따르는 방법은 이러한 유형의 단백질을 생산하는 세포 배양물과 관련하여 특별한 이점을 제공한다.

몇몇 실시양태에서, 제2 폴리펩타이드는 전체 길이의 면역글로불린 폴리펩타이드를 포함한다. 또는, 제2 폴리펩타이드는 전체 길이 미만의 면역글로불린 폴리펩타이드, 예를 들면, 중쇄, 경쇄, Fab, Fab<sub>2</sub>, Fv, 또는 Fc를 포함한다. 제2 폴리펩타이드는 면역글로불린 폴리펩타이드의 중쇄를 포함할 수 있다. 제2 폴리펩타이드는 면역글로불린 폴리펩타이드의 Fc 구역을 포함할 수 있다.

본 발명의 하나의 실시양태에서, 가용성 수용체 융합 단백질은 종양 괴사 인자 억제제를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 종양 괴사 인자 알파 및 베타 수용체 형태(TNFR-1; EP 제417,563호(1991년 3월 20일 공개); 및 TNFR-2, EP 제417,014호(1991년 3월 20일 공개), 이들 각각은 참조문헌으로 이의 전문으로 본원에 인용됨)의 종양 괴사 인자 억제제는 본 발명의 시스템 및 방법에 따라 발현된다(검토를 위해, 문헌[Naismith and Sprang, J. Inflamm. 47(1-2):1-7, 1995-96; 참조문헌으로 이의 전문으로 본원에 인용됨] 참조). 몇몇 실시양태에 따르면, 종양 괴사 인자 억제제는 가용성 TNF 수용체를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 본 발명의 TNF 억제제는 가용성 형태의 TNFRI 및 TNFRII이다. 특정한 실시양태에서, 본 발명의 TNF 억제제는 가용성 TNF 결합 단백질이다. 특정한 실시양태에서, 본 발명의 TNF 억제제는 TNFR 융합 단백질, 예를 들면, TNFR-Ig 또는 TNFR-Fc이다. 본원에서 사용된 "에타네르셉트(etanercept)"는 p75 TNF-알파 수용체의 세포외 부분의 2개의 분자(각각의 분자는 인간 IgG1의 235개의 아미노산 Fc 부분으로 구성됨)의 이합체인 TNFR-Fc를 의미한다. 본 발명에 따라, TNFR-Fc를 발현하는 세포는 감소된 온도 및/또는 감소된 pH에서 세포 배양물에서 성장하여 TNFR-Fc의 생산 동안 미스폴딩된 단백질 및/또는 고분자량 응집체의 양을 감소시킨다. 특정한 실시양태에서, TNFR-Fc를 발현하는 세포는 감소된 온도 및/또는 감소된 pH에서 세포 배양물에서 성장하여 TNFR-Fc의 생산 동안 글리코실화를 조절한다.

본 발명의 또 다른 실시양태에서, 가용성 수용체 융합 단백질은 sIL-13R이다. 본원에서 사용된 가용성 IL-13 수용체(sIL-13R)는 인간 인터루킨(IL)-13-알파2 수용체의 세포외 도메인(ECD) 및 인간 IgG1 중쇄의 Fc 구역을 포함하는 재조합 융합 단백질을 의미한다. sIL-13R은 분자간 이황화 결합에 의해 연결된 것으로 보이는 2개의 동일한 폴리펩타이드 쇠로 구성된다(즉, 2개의 폴리펩타이드 쇠의 이합체). sIL-13R 가용성 수용체 융합 단백질 및 이의 용도는 미국 특허 제5,710,023호에 개시되어 있고, 이는 참조문헌으로 이의 전문으로 본원에 인용된다.

몇몇 실시양태에서, 제2 폴리펩타이드는 야생형 면역글로불린 중쇄의 Fc 구역의 이펙터(effector) 기능보다 낮은 이펙터 기능을 갖는다. Fc 이펙터 기능은 예를 들면 Fc 수용체 결합, 보체 고정 및 T 세포 고갈 활성을 포함한다(예를 들면 미국 특허 제6,136,310호 참조). T 세포 고갈 활성, Fc 이펙터 기능, 및 항체 안정성을 평가하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 하나의 실시양태에서, 제2 폴리펩타이드는 Fc 수용체에 대해 친화성이 낮거나 없다. 대안적인 실시양태에서, 제2 폴리펩타이드는 보체 단백질 C1q에 대해 친화성이 낮거나 없다.

융합 단백질, 예를 들면, 가용성 수용체 융합 단백질은 가용성 수용체 또는 이의 단편을 제2 부분에 연결하는 링커 서열을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면, 융합 단백질은 펩타이드 링커, 예를 들면, 약 2개 내지 20개, 더 바람직하게는 약 5개 내지 10개의 아미노산 길이의 펩타이드 링커를 포함할 수 있다.

다른 실시양태에서, 추가의 아미노산 서열을 융합 단백질의 N- 또는 C-말단에 첨가하여 발현, 검출 및/또는 분리 또는 정제를 수월하게 할 수 있다. 예를 들면, 가용성 수용체 융합 단백질을 1 이상의 추가의 부분, 예를 들면, GST, His6 태그, FLAG 태그에 연결할 수 있다. 예를 들면, 융합 단백질을 추가로 융합 단백질 서열이 GST(즉, 글루타티온 S-트랜스퍼라제) 서열의 C-말단에 융합되는 GST 융합 단백질에 연결할 수 있다. 이러한 융합 단백질은 용해성을 촉진, 즉 정확한 폴딩을 증가시켜, 융합 단백질의 정제를 개선시킬 수 있다.

#### 세포 배양물에서 단백질 생산 방법

본원에서 사용된 용어 "배양" 및 "세포 배양물"은 세포 집단의 생존 및/또는 성장에 적합한 조건하에 세포 배양 배지와 접촉하는 세포 집단을 의미한다. 본원에서 사용된 이 용어는 세포 집단(예, 동물 세포 배양물) 및 그 집단이 접촉하고 있는 배지를 포함하는 조합을 의미할 수 있다.

본 발명에서 사용된 세포는 재조합 숙주 세포, 예를 들면, 동물 세포를 비롯한 진핵 숙주 세포, 즉 관심의 폴리

펩타이드를 암호화하는 핵산을 함유하는 발현 구조체로 형질감염된 세포일 수 있다. 문구 "동물 세포"는 비척추 동물, 비포유류 척추동물(예, 조류, 파충류 및 양서류), 및 포유류 세포를 포함한다. 비척추동물 세포의 비한정적 예로는 다음의 곤충 세포: 스포도프테라 프루지페르다(*Spodoptera frugiperda*)(애벌레), 아에테스 아에집티(*Aedes aegypti*)(모기), 아에테스 알보픽투스(*Aedes albopictus*)(모기), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*)(과실파리), 및 bombyx 모리(*Bombyx mori*)(누에/누에 나방)를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 세포 배양물은 포유류 세포 배양물이다.

많은 포유류 세포주는 관심의 폴리펩타이드의 재조합 발현에 적합한 숙주 세포이다. 포유류 숙주 세포주는, 예를 들면, COS, PER.C6, TM4, VERO076, MDCK, BRL-3A, W138, Hep G2, MMT, MRC5, FS4, CHO, 293T, A431, 3T3, CV-1, C3H10T1/2, Colo205, 293, HeLa, L 세포, BHK, HL-60, FRhL-2, U937, HaK, 주르카트(Jurkat) 세포, Rat2, BaF3, 32D, FDCP-1, PC12, M1x, 쥐과 골수종(예, SP2/0 및 NS0) 및 C2C12 세포뿐만 아니라 형질전환된 영장류 세포주, 하이브리도마, 정상 2배체 세포, 및 1차 조직 및 1차 외식체(explant)의 시험관내 배양으로부터 유도된 세포주를 포함한다. 관심의 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 임의의 진핵 세포는 개시된 방법에서 사용할 수 있다. 다양한 세포주는 상업용 구입처, 예컨대 American Type Culture Collection(ATCC)로부터 구입가능하다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 세포 배양물, 예를 들면, 대규모 세포 배양물은 CHO 세포를 사용한다.

특정한 실시양태에서 세포 배양물이 포유류 세포를 포함하더라도, 당해 분야의 숙련된 당업자는 하등 진핵생물, 예컨대 효모에서, 또는 원핵생물, 예컨대 박테리아에서 관심의 폴리펩타이드를 재조합으로 생산할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 당해 분야의 숙련된 당업자는 효모 및 박테리아 세포 배양물에 대한 배양 조건은 동물 세포의 배양 조건과 다르다는 것을 알 수 있을 것이고, 이러한 조건이 세포 성장 및/또는 단백질 생산을 최적화시키기 위해 어떻게 조정될 필요가 있는지를 이해할 것이다.

적합한 박테리아 균주는 에스케리키아 콜리(*Escherichia coli*), 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 또는 관심의 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 임의의 박테리아 균주를 포함한다. 박테리아에서 발현은 결과적으로 재조합 단백질을 포함하는 봉입체를 형성시킬 수 있다. 따라서, 재조합 단백질의 리폴딩(refolding)은 활성의, 또는 더 활성의 물질을 생산하기 위해 필요할 수 있다. 박테리아 봉입체로부터 정확히 폴딩된 이종성(heterologous) 단백질을 얻는 몇몇 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 이 방법은 일반적으로 봉입체로부터 단백질을 용해시킨 다음, 변성제(chaotropic agent)를 사용하여 단백질을 완전히 변성시키는 단계를 포함한다. 시스템인 잔기가 단백질의 1차 아미노산 서열에 존재할 때, 이황화 결합의 정확한 형성을 허용하는 환경(산화환원 시스템)에서 리폴딩을 달성하는 것이 종종 필요하다. 리폴딩의 일반적인 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌[Kohno (1990) Meth. Enzymol. 185:187-95], EP 제0433225호, 및 미국 특허 제5,399,677호에 개시되어 있다.

폴리펩타이드 생산에 적합한 효모 균주는 사카로마이세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*), 스킴조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 균주, 칸디다(*Candida*), 또는 관심의 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 임의의 효모 균주를 포함한다.

본원에서 사용된 용어 "생물반응기"는 진핵 세포 배양물, 예를 들면, 동물 세포 배양물(예, 포유류 세포 배양물)의 성장에 사용된 임의의 용기를 의미한다. 생물반응기는, 포유류 세포와 같은 세포의 배양에 유용한, 어떤 크기라도 가질 수 있다. 통상적으로, 생물반응기는 적어도 30 ml이고, 적어도 1, 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10,000, 12,000 l 이상, 또는 임의의 중간 부피일 수 있다. pH 및 온도(이들에 국한되지는 않음)를 비롯한 생물반응기의 내부 조건은 통상적으로 배양 기간 동안 제어된다. 본원에서 사용된 용어 "생산 생물반응기"는 관심의 폴리펩타이드 또는 단백질의 생산에 사용된 최종 생물반응기를 의미한다. 대규모 세포 배양물 생산 생물반응기의 부피는 일반적으로 약 100 ml 초과, 통상적으로 적어도 약 10 l 이고, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10,000, 12,000 l 이상, 또는 임의의 중간 부피일 수 있다. 적합한 생물반응기 또는 생산 생물반응기는 본 발명의 배양 조건하에 배지 중에 현탁된 세포 배양물을 유지하기에 적합하고 세포 성장 및 생존능력에 기여하는 유리, 플라스틱 또는 금속 포함을 비롯한 임의의 물질을 포함할 수 있고(즉, 이 물질로 구성될 수 있음), 이 물질(들)은 생산된 생산물, 예를 들면, 치료용 단백질 생산물의 발현 또는 안정성을 방해하지 않아야 한다. 당해 분야의 숙련된 당업자는 본 발명의 실시시 사용에 적합한 생물반응기를 알 수 있을 것이고, 이를 선택할 수 있을 것이다.

본원에서 사용된 용어 "배지", "세포 배양 배지", 및 "배양 배지"는 성장하는 동물 세포, 예를 들면, 포유류 세포에 영양분을 공급하는 영양소 함유 용액을 의미하고, 또한 세포와 조합된 배지를 의미할 수 있다. 용어 "접종

배지"는 세포 배양물을 형성하는데 사용되는 배지를 의미한다. 접종 배지는 세포 성장기의 휴식 동안에 사용된 배지와 조성이 다르거나 다르지 않을 수 있다. 통상적으로, 배지 용액은 적어도 최소 성장 및/또는 생존을 위해 세포가 필요로 하는 필수 아미노산, 비필수 아미노산, 비타민, 에너지원, 지질, 및 미량 원소(이들에 국한되는 것은 아님)를 제공한다. 배지 용액은 또한, 호르몬 및 성장 인자를 비롯하여, 성장 및/또는 생존을 최소 속도보다 높게 증대시키는 성분을 함유할 수 있다. 배지 용액은 바람직하게는 세포 생존 및 증식에 최적인 pH 및 염 농도로 제제화된다. 하나 이상의 실시양태에서, 배지는 한정 배지(defined medium)이다. 한정 배지는 모든 성분이 공지된 화학 구조를 갖는 배지이다. 본 발명의 다른 실시양태에서, 배지는 단일 아미노산 첨가(들)로부터 또는 펩톤 또는 단백질 가수분해물 첨가(들)로부터 유도된 아미노산(들)(동물 또는 식물 공급원(들) 포함)(이들에 국한되는 것은 아님)을 비롯하여 당해 분야에 공지된 임의의 공급원 또는 방법으로부터 유도된 아미노산(들)을 함유할 수 있다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 세포 성장기 동안에 사용된 배지는 농축 배지(concentrated medium), 즉 성장 배양에 보통 필요하고 보통 제공되는 것보다 더 높은 농도의 영양소를 함유하는 배지를 함유할 수 있다. 당해 분야의 숙련된 당업자는 어떠한 세포 배지, 접종 배지 등이 특정한 세포, 예를 들면, 동물 세포(예, CHO 세포)를 배양하는데 적절한지, 그리고 글루코스 및 다른 영양소(예, 글루타민, 철, 미량 D 원소) 또는 배지가 함유해야 하는 다른 배양 변수(예, 발포의 양, 중량물삼투압농도)를 제어하도록 설계된 제제의 양을 알 수 있을 것이다(예를 들면, 문헌[Mather, J.P., et al. (1999) "Culture media, animal cells, large scale production," Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation, Vol. 2:777-85; 미국 공개특허공보 제2006/0121568호; 이들 둘 다 참조문헌으로 이의 전문으로 본원에 인용됨] 참조). 본 발명은 또한 이러한 공지된 배지의 변형(예, 이러한 배지의 영양소 풍부 변형 포함)을 고려한다. 본원에서 사용된 용어 "세포 밀도"는 소정의 부피의 배지 중에 존재하는 세포의 수를 의미한다. 본원에서 사용된 용어 "생존 세포 밀도"는 소정의 일련 실험 조건하에 소정의 부피의 배지 중에 존재하는 살아 있는 세포의 수를 의미한다.

본원에서 사용된 용어 "세포 생존능력"은 소정의 일련 배양 조건 또는 실험 변경하에 생존하는 배양에서 세포의 능력을 의미한다. 본원에서 사용된 이 용어는 또한 특정 시간에 배양에서 총 세포수(살아 있는 세포수 및 죽은 세포수)와 관련하여 그 시간에 살아 있는 세포의 부분을 의미한다.

본원에서 사용된 용어 "통합 생존 세포 밀도", "통합 생존 세포수" 또는 "IVC"는 배양이 진행되는 시간으로 곱한 배양의 과정에 걸친 생존 세포의 평균 밀도를 의미한다. 생산된 단백질의 양이 배양의 과정에 걸쳐 존재하는 생존 세포의 수에 비례할 때, 통합 생존 세포 밀도는 배양의 과정에 걸쳐 생산된 단백질의 양을 추정하는데 유용한 도구이다.

본 발명의 방법은 회분 배양, 유가 배양, 관류 배양, 변형된 유가 배양(미국 가출원 제60/954,922호 참조), 회분 재공급 배양, 또는 임의의 이들의 조합에서 성장한 세포에 적용가능하다.

본원에서 사용된 용어 "회분 배양(batch culture)"은 배지만만 아니라 세포 그 자체를 비롯하여 세포를 배양하는데 결국 사용되는 모든 성분이 배양 과정의 초기에 제공되는 세포의 배양 방법을 의미한다. 회분 배양은 통상적으로 어떤 시점에서 중단되고 배지 내의 세포 및/또는 성분은 수확되고 임의로 정제된다.

본원에서 사용된 용어 "유가 배양(fed-batch culture)"은 추가의 성분이 배양 과정의 초기에 뒤이은 어떤 시점에서 배양에 제공되는 세포의 배양 방법을 의미한다. 제공된 성분은 통상적으로 배양 과정 동안에 고갈된 세포에 대한 영양 보충물을 포함한다. 유가 배양은 통상적으로 어떤 시점에서 중단되고 배지 내의 세포 및/또는 성분은 수확되고 임의로 정제된다.

본원에서 사용된 용어 "관류 배양(perfusion culture)"은 추가의 새로운 배지가 (배양 과정의 초기에 뒤이은) 배양에 일정 기간에 걸쳐 연속적으로 또는 일정 기간에 걸쳐 주기적으로 제공되고 동시에 소모된 배지가 제거되는 세포의 배양 방법을 의미한다. 새로운 배지는 통상적으로 배양 과정 동안에 고갈된 세포에 대한 영양 보충물을 제공한다. 소모된 배지 중에 존재할 수 있는 폴리펩타이드 생산물은 임의로 정제된다. 관류는 또한 생물반응기에서 성장한 세포 배양물로부터 세포 폐기물의 제거(수세(flushing))를 허용한다.

본원에서 사용된 용어 "변형된 유가 배양(modified fed-batch culture)"은 유가 배양 방법과 관류 배양 방법 둘 다를 조합한 세포의 배양 방법을 의미한다. 변형된 유가 배양 방법은 미국 가출원 제60/954,922호(참조문헌으로 이의 전문으로 본원에 인용됨)에 기재되어 있다.

본 발명은 또한 회분 재공급(batch re-feed) 과정으로 실행할 수 있다. 감소된 pH는 단백질 미스폴딩 및/또는 응집을 감소시키는데 그리고 이러한 유형의 세포 배양물에서 글리코실화를 변경시키는데 더 우수한 계기를 제공

하는 것으로 믿어진다.

본 발명의 하나의 실시양태에서, 본 방법은 우선 세포 배양물을 세포 배양물의 성장기 동안 집중 배지로 집중하는 단계, 및 후속적으로 세포를 세포 배양물의 온도 및/또는 pH가 감소된 온도 및/또는 감소된 pH로 조정되는 생산기로 이동시키는 단계를 포함한다. 본원에서 제공된 성장기는 세포가 단백질 생산에 최적인 세포 밀도를 달성하도록 성장하는 세포의 배양 단계를 의미한다.

또 다른 실시양태에서, 성장기 이후에, 세포를 생산기로 이동시킬 수 있고, 생산기는 성장기와 상이한 온도 및/또는 상이한 pH, 예를 들면, 감소된 온도 및/또는 감소된 pH에서 수행할 수 있다. 실시양태에서, 세포 배양물을 집중 1일 후에 성장기로부터 생산기로 이동시킬 수 있다. 다른 실시양태에서, 세포 배양물을 집중 5일 후에 성장기로부터 생산기로 이동시킬 수 있다. 세포 배양물을 성장기로부터 생산기로 이동시킬 때, 그 이동은 비교적 점진적일 수 있다. 또는, 그 이동은 급작스러울 수 있다. 점진적 변화로, 온도 및/또는 pH를 꾸준히 조정, 예를 들면, 감소시킬 수 있다. 또는, 온도 및/또는 pH를 이산 간격으로 조정할 수 있다.

세포 배양물의 생산기는 세포가 관심의 폴리펩타이드, 예를 들면, 치료용 단백질을 생산하는데 최적인 조건하에 성장하는 세포 배양에서의 단계이다. 생산기 동안, 세포 배양물의 감소된 온도 및/또는 감소된 pH는 세포 배양물이 여전히 생존가능하고/하거나, 높은 수준의 단백질이 생산되고/되거나, 대사 폐기물, 예를 들면, 락트산 및 암모니아의 생산 및 축적이 최소화되고/되거나, 단백질의 생산물 품질이 적절하게 제어되고/되거나, 실시자가 중요하다고 고려하는 다른 인자 또는 이런 인자의 임의의 조합이 일어나는 온도 및/또는 pH에 기초하여 선택할 수 있다.

본 발명의 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 방법은 온도 또는 pH 이동이 생산기의 개시시 필요하지 않도록 세포 배양물을 감소된 온도 및/또는 감소된 pH에서 집중하는 단계를 포함한다. 숙련된 당업자는 온도 및 pH가 확립된 온도 및 pH 설정점으로부터 벗어나지 않도록 세포 배양물의 온도 및 pH를 모니터링하는 것을 알 수 있을 것이다. 예를 들면, 숙련된 당업자는 배양이 설정 pH 아래로 벗어나는 것을 방지하기 위해 탄산나트륨 염기와 같은 염기를 사용하는 것을 알 수 있을 것이다.

하기의 실시예에서, 세포 배양 배지는 표적 pH 설정점보다 높은 pH에서 시작하였고, pH 설정점을 의도적으로 조정하지 않았다. 그러나, 당해 분야의 숙련된 당업자가 이해하고 있는 것처럼, 또한 세포 배양의 과정 동안에 pH를 조정할 수 있다. 유사하게, 또한 조정 없이 저온에서 배양을 개시시킬 수 있다. 예를 들면, 이 과정은 생산기만으로 구성될 수 있다.

본원에서 사용된 "감소된 온도"는 세포 유형에 대해 세포 성장에 통상적인 온도(세포가 통상적으로 성장하는 온도)보다 낮은 온도를 의미한다. 예를 들면, 세포가 포유류 세포인 본 발명의 실시양태에서, 생산기에서의 세포 배양물은 바람직하게는 24.0°C 내지 30.0°C 미만 범위, 더 바람직하게는 27.0°C 내지 30.0°C 미만 범위이다. 예를 들면, 세포 배양물의 감소된 온도는 24.0°C, 24.5°C, 25.0°C, 25.5°C, 26.0°C, 26.5°C, 27.0°C, 27.5°C, 28.0°C, 28.5°C, 29.0°C, 29.5°C, 29.6°C, 29.7°C, 29.8°C, 및 29.9°C이다. 본원에 기재된 본 발명의 가장 바람직한 실시양태에서, 세포 배양물의 감소된 온도는 약 29.5°C의 온도이다. 포유류가 아닌 세포에 대한 감소된 온도는 사례별로 기초하여 당해 분야의 숙련된 당업자가 결정할 수 있다.

본원에서 사용된 "감소된 pH"는 특정한 세포 유형에 대해 세포 성장에 통상적인 pH(세포가 통상적으로 성장하는 pH)보다 낮은 pH 설정점을 의미한다. 세포가 포유류 세포인 본 발명의 실시양태에서, 생산기에서의 세포 배양물의 감소된 pH는 7.00 미만이다. 본 발명의 실시양태에서, 세포 배양물의 감소된 pH는 6.50 내지 7.00 미만 범위, 바람직하게는 6.80 내지 7.00 미만 범위이다. 예를 들면, 세포 배양물의 감소된 pH는 6.80, 6.85, 6.90, 6.95, 6.96, 6.97, 6.98, 및 6.99이다. 본 발명의 가장 바람직한 실시양태에서, 세포 배양물의 감소된 pH는 약 6.95이다. 포유류가 아닌 세포에 대한 감소된 pH는 사례별로 기초하여 당해 분야의 숙련된 당업자가 결정할 수 있다.

숙련된 당업자는, 세포 배양물의 세포 유형에 따라, (감소된 온도 및 pH와 구별되는) 통상적인 온도 및 pH가 다르다는 것을 이해할 것이다. 예를 들면, 대부분의 포유류 세포, 예를 들면, CHO 세포에 대한 통상적인 온도 및 pH는 각각 30.0°C 초과(예, 37.0°C 등)이고, 7.00 초과(예, 7.20 등)이다. 숙련된 당업자는 또한 다른 세포 유형, 예를 들면, 곤충 세포에 대한 통상적인 온도 및 pH가 포유류 세포에 대한 통상적인 온도와 다르므로, 본 발명의 방법은 이러한 세포에 대해 상이한 감소된 온도 및 상이한 감소된 pH를 이용한다는 것을 이해할 것이다.

본 발명의 특정한 실시양태에서, 실시자는 성장하는 세포 배양물의 특정한 상태를 정기적으로 모니터링하는 것이 유리하거나 필요하다는 것을 알 수 있을 것이다. 비한정적 예로서, 예를 들면, 온도, pH, 용존 산소, 세포

밀도, 세포 생존능력, 통합 생존 세포 밀도, 락테이트 수준, 암모늄 수준, 글루코스 수준, 글루타민 수준, 중량 몰삼투압농도, 발현된 폴리펩타이드의 역가 등을 모니터링하는 것이 유리하거나 필요할 수 있다. 이러한 상태/기준을 모니터링하는 다양한 기술이 당해 분야의 숙련된 당업자에게 널리 공지되어 있다. 예를 들면, 세포 밀도는 혈구계산기(hemocytometer), 자동 세포 계수 장치(예, Coulter counter, Beckman Coulter Inc., 미국 캘리포니아주 풀러톤 소재), 또는 세포 밀도 검사(예, CEDEX<sup>®</sup>, Innovatis, 미국 펜실베이니아주 말번 소재)를 사용하여 측정할 수 있다. 생존 세포 밀도는 배양 샘플을 트리판 블루(Trypan blue)로 염색함으로써 결정할 수 있다. 락테이트, 암모늄, 글루코스 및 글루타민 수준뿐만 아니라, 용존 산소 및 pH는 예를 들면 세포 배양 배지 내의 중요 영양소, 대사물, 및 가스를 측정하는 BioProfile 400 Chemistry Analyzer(Nova Biomedical, 미국 매사추세츠주 왈탐 소재)로 측정할 수 있다. 용존 산소 및 pH는 또한 예를 들면 혈액 가스 분석기(예, Bayer Rapidlab 248 pH/blood gas analyzer(Bayer HealthCare LLC, 미국 매사추세츠주 이스트 왈폴 소재))를 사용하여 측정할 수 있다. 온도, pH, 및 용존 산소는 또한 예를 들면 다양한 유형의 인시츄(in-situ) 프로브로 측정할 수 있다. 세포 배양물의 중량몰삼투압농도는 예를 들면 어는점 삼투계로 측정할 수 있다. HPLC는 예를 들면 락테이트, 암모늄, 또는 발현된 폴리펩타이드 또는 단백질의 수준을 결정하기 위해 사용할 수 있다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 발현된 폴리펩타이드의 수준은 예를 들면 단백질 A HPLC를 사용하여 결정할 수 있다. 또는, 발현된 폴리펩타이드 또는 단백질의 수준은 표준 기술, 예컨대 SDS-PAGE 겔의 쿠마시(Coomassie) 염색, 웨스턴 블롯팅(Western blotting), 브래드포드(Bradford) 검정, 로우리(Lowry) 검정, 비우렛(biuret) 검정, 및 UV 흡광도로 결정할 수 있다. 발현된 폴리펩타이드 또는 단백질의 번역후 변형, 예를 들면, 글리코실화를 모니터링하는 것이 필요할 수 있다. 단백질의 다른 번역후 변형, 예를 들면, 인산화 등을 모니터링하는 것이 또한 유리할 수 있다. 특정한 세포 배양물 상태를 모니터링하기 위해, 분석을 위해 배양의 소량 분취량을 제거하는 것이 필요할 수 있다. 당해 분야의 숙련된 당업자는 이러한 제거가 잠재적으로 오염을 세포 배양물로 도입시킬 수 있다는 것을 이해할 것이고, 이러한 오염의 위험을 최소화하기 위해 적절히 주의할 것을 기울일 것이다.

본 발명의 하나의 실시양태에서, 실시자는 감소된 세포 배양물 온도 및/또는 감소된 pH에서 통합 생존 세포수를 모니터링할 것이다. 바람직하게는, 감소된 온도 및/또는 감소된 pH에서 성장하는 세포는 통합 생존 세포 밀도를 20%, 더 바람직하게는 20% 미만(예, 15%)으로 감소시킨다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 실시자는 감소된 세포 배양물 온도 및/또는 감소된 pH에서 세포 생존능력을 모니터링할 것이다. 바람직하게는, 감소된 온도 및/또는 감소된 pH에서 성장하는 세포는 세포 생존능력을 15% 미만, 더 바람직하게는 5% 미만으로 감소시킨다.

글루코스는 세포 배양물에 대한 주요 에너지원이다. 세포 배양물에서 글루코스 소모에서의 유의적인 편차는 세포 배양물의 상태에 미치는 세포 배양 조건의 부정적인 효과를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 감소된 온도 및/또는 감소된 pH에서 성장하는 세포는 결과적으로 세포 배양물의 글루코스 소모를 최소로 변화(예, 감소)시킨다.

글루타민은 세포 배양물에 대한 대안적인 에너지원이고, 세포 배양물에서 아미노산과 같은 다양한 분자에 대한 중요한 질소원이다. 따라서, 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 감소된 온도 및/또는 감소된 pH에서 성장하는 세포는 결과적으로 세포 배양물의 글루타민 소모를 최소로 변화(예, 감소)시킨다.

본 발명의 또 다른 실시양태에서, 실시자는 세포 배양물에서 폐기물 생산, 예를 들면, 락테이트 및 암모니아 생산을 모니터링할 것이다. 따라서, 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 감소된 온도 및/또는 감소된 pH에서 성장하는 세포는 결과적으로 락테이트 및 암모니아 생산을 최소로 변화(예, 증가)시킨다. 본 발명의 몇몇 실시양태에서, 감소된 온도 및/또는 감소된 pH에서 성장하는 세포는 락테이트 및 암모니아 생산을 최소화시킬 수 있다.

추가로, 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 감소된 온도 및/또는 감소된 pH에서 성장하는 세포는 결과적으로 누적 평균 생산성 및 생산물 역가를 최소로 감소시킨다. 본원에서 사용된 용어 "역가"는 세포 배양물(예, 동물 세포 배양물)에 의해 생산된 관심의 당단백질과 같은 관심의 폴리펩타이드의 총 양을 소정의 배지 부피량으로 나눈 것을 의미하고, 따라서 "역가"는 농도를 의미한다. 역가는 통상적으로 배지의 리터 당 폴리펩타이드의 밀리리터의 단위로 표현된다. 바람직하게는, 세포 배양물에서 경험하는 세포 생산성 및 생산물 역가의 어떠한 감소라도 응집된 또는 미스폴딩된 단백질 생산물의 생산 감소, 예를 들면, HMWA의 생산 감소로 별충된다.

본원에서 사용된 용어 "응집된 단백질"은 비기능, 차선 또는 원치않는 단백질 생산물을 생산하는 단백질 집합체, 즉 고분자량 응집체를 의미한다. 용어 "미스폴딩된 단백질"은 부적절하게 폴딩된 단백질, 종종 더 이상 정상 생물 활성, 예를 들면, 정상 효소 활성을 나타낼 수 없는 단백질을 의미한다. 당해 분야의 숙련된 당업자는 단백질 응집체가 정확히 폴딩된 단백질 및/또는 미스폴딩된 단백질 중 어느 하나 또는 둘 다를 포함할 수 있다는 것을 알 수 있을 것이다. 응집된 또는 미스폴딩된 단백질은 보통 과발현 세포 배양물, 예를 들면, 관심의

단백질(예, 관심의 당단백질)을 과발현하는 세포 배양물에서 형성된다. 예를 들면, 응집은 폴딩되지 않은 폴리펩타이드 쇠의 비특이적 소수성 상호작용에 의해 또는 폴딩 중간체의 상호작용에 의해 야기될 수 있다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 감소된 온도 및/또는 감소된 pH에서 성장하는 세포는 결과적으로 단백질 미스폴딩/응집을 적어도 50% 감소시키고, 바람직하게는 단백질 미스폴딩/응집을 약 60% 감소시킨다. 당해 분야의 숙련된 당업자는 단백질 응집/미스폴딩을 모니터링하는데 필요한 기술, 예를 들면, 소수성 상호작용 HPLC(HIC-HPLC)를 알 수 있을 것이다.

용어 "고분자량 응집체"(HMWA)는 2 이상의 단백질 사이의 회합으로부터 생성되는 단백질 생산의 바람직하지 않은 부산물을 의미한다. "고분자량 응집체"는 2 이상의 동일한 단백질 사이의 회합 및/또는 관심의 단백질과 세포 배양물에서 발견되는 다른 단백질(예, 숙주 세포 단백질) 사이의 회합일 수 있다. 회합은 공유, 비공유, 이황화, 및/또는 비환원성 가교결합(이들에 국한되지는 않음)을 비롯한 임의의 방법에 의해 일어날 수 있다. 당해 분야의 숙련된 당업자는 언제 단백질이 다합체 형태(예, 이합체 형태)로 활성인지, 즉 언제 1개 이상의 폴리펩타이드 쇠가 단백질 활성화에 필요한지를 이해할 것이고, 용어 "고분자량 응집체"는 2개 이상의 이러한 다합체 형태 사이의 회합을 의미한다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 다합체 형태로 활성인 단백질은 수용체, 예를 들면, 사이토킨 수용체(예, sIL-13R)이다. 하나의 실시양태에서, 감소된 온도 및/또는 감소된 pH에서 성장하는 세포는 결과적으로 고분자량 응집체를 적어도 약 10% 감소시키고, 바람직하게는 약 40% 감소시키고, 더 바람직하게는 약 50% 감소시키고, 심지어 더 바람직하게는 약 80% 이상 감소시키거나, 또는 임의의 중간값으로 감소시킬 수 있다. 당해 분야의 숙련된 당업자는 고분자량 응집체의 생산을 모니터링하는데 필요한 기술, 예를 들면, 크기 배제 고성능 액체 크로마토그래피(SEC-HPLC)를 알 수 있을 것이다.

본 발명의 또 다른 양태에서, 세포 배양물에서 온도 및/또는 pH는 단백질 글리코실화, 예를 들면, 단백질 시알릴화를 소정 수준으로 변화시키는데 사용된다. 예를 들면, 세포 배양물의 pH 및/또는 온도를 감소시키면 결과적으로 N- 및 O-연결 글리코실화 둘 다를 감소시킬 수 있다(예를 들면, N-글리칸 시알릴화를 감소시킴). 단백질 글리코실화(예, 시알릴화)에서의 변화는 치료용 단백질의 안정성, 효소 활성, 순환 수명, 및 면역원성에 영향을 미칠 수 있다. 당해 분야의 숙련된 당업자는 온도 및/또는 pH 변화로 원하는 유형 및 수준의 단백질 글리코실화의 달성을 보장하도록 글리코실화도(예, 시알릴화도)를 모니터링할 수 있을 것이다. 크로마토피 기술, 예를 들면, 정상 크로마토그래피(NPC)는 단백질 생산물의 단백질 글리코실화를 모니터링하는데 사용할 수 있다.

생산기의 종료시에, 세포를 수확하고 관심의 폴리펩타이드를 수집하고 정제한다. 바람직하게는, 생산기의 종료시에, 관심의 폴리펩타이드는 허용가능한 글리코실화 패턴을 보유하는 동시에 감소된 미스폴딩 및/또는 응집을 나타낸다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 생산 과정의 종료시에 관심의 폴리펩타이드는 가용성 형태이다(예, 관심의 폴리펩타이드는 가용성 수용체, 예를 들면, 가용성 사이토킨 수용체임). 이러한 가용성 형태의 폴리펩타이드를 순화 배지로부터 정제할 수 있다.

막 결합 형태의 폴리펩타이드는 발현 세포로부터 총 막 분획을 제조하고 막을 비이온성 세제, 예컨대 TRITON<sup>®</sup> X-100(EMD Biosciences, 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)로 추출함으로써 정제할 수 있다. 세포질 또는 핵 단백질은 숙주 세포를 (기계적 힘, 파르-봄베(Parr-bomb), 초음파 처리, 세제 등을 통해) 용해시키고, 세포막 분획을 원심분리에 의해 제거하고, 상청액을 보유함으로써 제조할 수 있다.

폴리펩타이드는 당해 분야의 숙련된 당업자에게 공지된 다른 방법을 이용하여 정제할 수 있다. 예를 들면, 개시된 방법에 의해 생산된 폴리펩타이드를 상업적으로 구입가능한 단백질 농축 필터, 예를 들면, AMICON<sup>®</sup> 또는 PELLICON<sup>®</sup> 한외여과 유닛(Millipore, 미국 매사추세츠주 빌러리카 소재)을 사용하여 농축시킬 수 있다. 농축 단계 이후에, 농축액을 정제 매트릭스, 예컨대 겔 여과 매체에 도포할 수 있다. 또는, 음이온 교환 수지(예, MonoQ 칼럼, Amersham Biosciences, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)를 사용할 수 있고, 이 수지는 펜던트 디에틸아미노에틸(DEAE) 또는 폴리에틸렌아민(PEI) 기를 갖는 매트릭스 또는 기재를 함유한다. 정제에 사용된 매트릭스는 아크릴아미드, 아가로스, 텍스트란, 셀룰로스 또는 단백질 정제에서 보통 이용되는 다른 유형일 수 있다. 또는, 양이온 교환 단계는 단백질의 정제에 이용할 수 있다. 적합한 양이온 교환기(예, S-SEPHAROSE<sup>®</sup> 칼럼, Sigma-Aldrich, 미국 미조리주 세인트 루이스 소재)는 설포프로필 또는 카르복시메틸 기를 포함하는 다양한 불용성 매트릭스를 포함한다.

배양 상청액으로부터의 폴리펩타이드의 정제는 또한 친화성 수지, 예컨대 콘카나발린 A-아가로스, AF-HEPARIN650, heparin-TOYOPEARL<sup>®</sup> 또는 Cibacron blue 3GA SEPHAROSE<sup>®</sup>(Tosoh Biosciences, 미국 캘리포니아주

센 프란시스코 소재)에 대해 1개 이상의 칼럼 단; 페닐 에테르, 부틸 에테르, 또는 프로필 에테르와 같은 수지를 사용하는 소수성 상호작용 크로마토그래피 칼럼; 또는 표지된 단백질에 대한 항체를 사용하는 면역친화성 칼럼을 포함할 수 있다. 최종적으로, 소수성 HPLC 매체, 예를 들면 펜던트 메틸 또는 다른 지방족 기를 갖는 실리카 겔을 사용하는 1개 이상의 HPLC 단(예, Ni-NTA 칼럼)은 추가로 단백질을 정제하는데 사용할 수 있다. 또는, 폴리펩타이드는 정제를 수월하게 하는 형태로 재조합으로 발현될 수 있다. 예를 들면, 폴리펩타이드는 단백질, 예컨대 말토스 결합 단백질(MBP), 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST), 또는 티오레독신(TRX)과의 융합으로서 발현될 수 있고, 이러한 융합 단백질의 발현 및 정제를 위한 키트는 각각 New England BioLabs(미국 매사추세츠주 비벌리 소재), Pharmacia(미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재), 및 Invitrogen(미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)로부터 상업적으로 구입가능하다. 단백질은 또한 작은 에피토프(예, His, myc 또는 Flag 태그)로 표식하고 후속적으로 선택된 에피토프에 대한 특이적 항체를 사용하여 동정 또는 정제할 수 있다. 일반적인 에피토프에 대한 항체는 다양한 상업용 구입처로부터 구입가능하다. 다른 공지된 방법과 다양하게 조합된 상기한 정제 단계의 일부 또는 전부는 본 발명의 방법에 의해 생산된 치료용 단백질과 같은 관심의 폴리펩타이드를 정제하는데 사용할 수 있다.

**약학 조성물**

본 발명의 특정한 실시양태에서, 본 발명의 1 이상의 방법에 따라 생산된 단백질은 의약품의 제법에서 유용할 수 있다. 본 발명의 1 이상의 방법에 따라 생산된 단백질은 피험자에게 투여할 수 있거나, 우선 예를 들면 비경구(예, 정맥내), 피내, 피하, 경구, 비강, 기관지, 안내, 경피(국소), 경점막, 직장, 및 질내 경로(이들에 국한되는 것은 아님)를 비롯한 임의의 이용가능한 경로에 의한 전달을 위해 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 통상적으로 약학적으로 허용가능한 담체와 조합하여 포유류 세포주로부터 발현된 정제된 단백질, 전달제(예, 상기 기재된 바의 양이온 중합체, 펩타이드 분자 운반체, 계면활성제 등)를 포함한다. 본원에서 사용된 언어 "약학적으로 허용가능한 담체"는 약학 투여에 적합한 활성 성분(들)의 생물 활성의 효과를 방해하지 않는 비독성 물질, 예를 들면, 용매, 분산매, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 담체의 특징은 투여 경로에 의존한다. 보충적인 활성 화합물을 또한 조성물 내로 혼입시킬 수 있다.

약학 조성물은 이의 의도하는 투여 경로에 적합하도록 제제화한다. 본 발명의 1 이상의 방법에 따라 생산된 치료용 단백질을 경구 형태로 투여할 때, 약학 조성물은 정제, 캡슐제, 산제, 용제 또는 엘릭시르제 형태일 수 있다. 정제 형태로 투여할 때, 본 발명의 약학 조성물은 추가로 고체 담체, 예컨대 젤라틴 또는 부형제를 함유할 수 있다. 정제, 캡슐제, 및 산제는 약 5 내지 95% 결합제, 바람직하게는 약 25 내지 90% 결합제를 함유한다. 액체 형태로 투여할 때, 액체 담체, 예컨대 물, 석유, 동물성 또는 식물성 오일, 예컨대 참깨유, 땅콩유(모집단에서 알러지 반응의 발생 고려), 광유, 또는 대두유, 또는 참깨유, 또는 합성유를 첨가할 수 있다. 액체 형태의 약학 조성물은 추가로 생리 식염수, 텍스트로스 또는 다른 사카라이드 용액, 또는 글리콜, 예컨대 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 또는 폴리에틸렌 글리콜을 함유할 수 있다. 액체 형태로 투여할 때, 약학 조성물은 약 0.5 내지 90 중량% 결합제, 바람직하게는 약 1 내지 50 중량% 결합제를 함유한다.

본 발명의 1 이상의 방법에 따라 생산된 치료용 단백질을 정맥내, 피부 또는 피하 주사로 투여할 때, 치료용 단백질은 발열원을 함유하지 않는 비경구로 허용가능한 수용액의 형태이다. pH, 등장성, 안정성 등을 충분히 고려한 이러한 비경구로 허용가능한 단백질 용액의 제법은 당해 분야의 기술 내에 있다. 정맥내, 피부, 또는 피하 주사를 위한 바람직한 약학 조성물은, 치료용 단백질 이외에, 등장성 비히클, 예컨대 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 텍스트로스 주사액, 텍스트로스 및 염화나트륨 주사액, 락트산 링거 주사액, 또는 당해 분야에 공지된 다른 비히클을 함유해야 한다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 안정화제, 보존제, 완충제, 항산화제, 또는 당해 분야의 숙련된 당업자에게 공지된 다른 첨가제를 함유할 수 있다.

본 발명의 1 이상의 방법에 의해 생산된 치료용 단백질을 포함하는 약학 조성물의 추가의 제제화는 당해 분야의 숙련된 당업자에게 공지되어 있다. 당해 분야의 숙련된 당업자는 또한 본 발명에 따라 생산된 단백질에 적합한 단위 제형(dosage formulation)을 알 수 있을 것이다.

본 명세서 전체에 걸쳐 인용된 모든 참조문헌, 특허, 및 특허 출원의 전체 내용은 본원에 의해 참조문헌으로 본원에 인용된다.

**[실시예]**

다음의 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위해 기재되어 있지만, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하도록 의도되지 않고, 본 발명의 범위를 제한하도록 해석되어서는 안 된다. 실시예는 종래 방법, 예를 들면, 클로

닝, 형질감염, 및 세포주에서 단백질을 과발현하는 방법의 기본적인 양태의 상세한 설명을 포함하지 않는다. 이러한 방법은 당해 분야의 숙련된 당업자에게 널리 공지되어 있다.

실시예 1

TNFR-Fc 단백질 생산

실시예 1.1: 제조합 CHO 세포의 세포 배양 성능 및 TNFR-Fc 융합 단백질의 생산물 품질에 미치는 감소된 온도의 효과

실시예 1.1.1: 물질 및 방법

제조합 당단백질 TNFR-Fc를 과발현하는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 37.0°C에서 4개의 별개의 벤치-스케일(bench-scale) 생물반응기 내에서 동일한 농도 및 조건에서 접종하였다. 세포를 1일 동안 유가 배양으로 성장시킨 다음, 30.0°C, 29.0°C, 28.0°C, 또는 27.0°C로 온도 이동시켰다. 배양의 초기 pH 설정점 하한치는 7.00이었다. 세포 샘플을 매일 배양으로부터 제거하여 세포 배양물의 다양한 상태, 예를 들면, 통합 생존 세포수, 세포 생존능력, 잔류 글루코스 프로파일, 잔류 글루타민 프로파일, 락테이트 및 암모니아 농도, 누적 평균 세포 생산성(Qp), 생산물 역가, 미스폴딩된/응집된 생산물의 수준, 고분자량 응집체의 수준, 시알릴화의 수준, 및 pH를 측정하였다.

통합 생존 세포수(IVC)는 세포 밀도 검사(예, CEDEX<sup>®</sup>, Innovatis, 미국 펜실베이니아주 말번 소재)를 이용하여 세포 밀도를 측정함으로써 계산하고 평균 수확일 IVC로 정규화하였다. 평균 수확일 IVC는 시험된 모든 실험 조건에 대해 수확일(예, 10일) 통합 생존 세포 밀도의 산술 평균을 계산함으로써 결정하였다. 이어서, 모든 각각의 IVC 값은 평균 수확일 IVC로 비율증감하여 정규화 값을 생성시켰다.

\*세포 생존능력은 세포 밀도 검사(예, CEDEX<sup>®</sup>, Innovatis, 미국 펜실베이니아주 말번 소재)를 이용하여 트리판 블루로 염색함으로써 측정하였다. 추가로, 세포 배양물에서 잔류 글루코스 프로파일 및 잔류 글루타민 프로파일은 BioProfile Chemistry Analyzer(Nova Biomedical, 미국 매사추세츠주 왈탐 소재)를 사용하여 측정하였다. 폐기물, 락테이트 및 암모니아의 농도는 BioProfile Chemistry Analyzer(Nova Biomedical, 미국 매사추세츠주 왈탐 소재)를 사용하여 측정하였다.

누적 평균 세포 생산성(Qp) 및 생산물 역가는 단백질 A HPLC를 사용하여 측정하고 평균 수확일 누적 평균 Qp 및 역가로 정규화하였다. 평균 수확일 역가는 시험된 모든 실험 조건에 대해 수확일(예, 10일) 역가의 산술 평균을 계산함으로써 결정하였다. 이어서, 모든 각각의 역가 값은 평균 수확일 역가로 비율증감하여 정규화 값을 생성시켰다. 평균 수확일 누적 평균 Qp는 시험된 모든 실험 조건에 대해 수확일 누적 평균 Qp의 산술 평균을 계산함으로써 결정하였다. 이어서, 모든 각각의 값은 평균 수확일 누적 평균 Qp로 비율증감하여 정규화 값을 생성시켰다.

미스폴딩된/응집된 생산물의 수준은 HIC-HPLC를 사용하여 측정하고, 고분자량 응집체의 수준은 SEC-HPLC를 사용하여 측정하였다. 총 및 N-연결 글리칸 시알릴화의 수준은 2-아미노벤즈아미드-(2-AB)-표지된 단백질 단백질당형을 정상 크로마토그래피(NPC)로 처리함으로써 측정하였다. 총 시알릴화(N- 및 O-연결)의 양은 표준 물질, 즉 알려져 있고 바람직한 시알릴화 패턴을 갖는 TNFR-Fc 분취량의 총 시알릴화의 양에 대한 백분율로서 정의된다. 세포 배양물의 pH는 혈액 가스 분석기(Bayer Rapidlab 248 pH/blood gas analyzer(Bayer HealthCare LLC, 미국 매사추세츠주 이스트 왈폴 소재))를 통해 오프라인 측정으로 결정하였다.

실시예 1.1.2: 결과

감소된 온도에서 성장하는 세포는 IVC 수에 최소 효과를 미쳤다. 구체적으로, 더 낮은 조작 온도는 결과적으로 더 낮은 최종 IVC 수를 발생시켰다. 그러나, 27°C로의 세포 배양물 온도의 감소의 효과는 적었다 - IVC 수의 오직 약 20% 감소만이 관찰되었다(도 1a). 세포 생존능력은 온도 감소로 크게 영향을 받지 않았다. 가장 낮은 온도 조건(즉, 27°C)은 5% 더 낮은 수확일 생존능력을 가졌다(도 1b).

추가로, 감소된 조작 온도는 결과적으로 더 높은 잔류 글루코스 프로파일을 발생시켰고, 이는 세포 배양물의 더 낮은 글루코스 소모를 나타낸다(도 2a). 그러나, 글루타민 프로파일은 감소된 온도에 의해 현저히 변경되지 않았다(도 2b).

몇몇 경우에, 세포 배양의 말기에, 락트산 및 암모니아는 또한 세포 배양에 의해 소모될 수 있다. 락트산 및 암모니아의 생산 또는 락트산 및 암모니아의 소모의 증지는 세포 생존능력, 세포 생산성을 증진시키고, 폴리펩타

이드 생산물 역가를 증가시키는 효과를 가질 수 있다. 감소된 온도에서 성장하는 세포는 유가 배양의 후반기에 락테이트의 순소모를 변경시키는 효과를 가졌다(도 3a). 감소된 온도는 또한 결과적으로 더 높은 암모니아 생산을 발생시켰다(도 3b). 감소된 온도는 결과적으로 더 낮은 세포 특이적 생산성(더 낮은 Qp)을 발생시켰고(도 4a), 더 낮은 생산물 역가를 발생시켰다(도 4b). 더 낮은 생산물 역가는 더 낮은 세포 특이적 생산성 및 더 낮은 통합 생존 세포수의 결과이다. 그러나, 더 낮은 생산물 역가 및 세포 생산성은 현저히 감소된 비율의 미스폴딩된 및 응집된 생산물에 의해 별충되었다(도 5a). 또한, 세포 배양물의 온도 감소는 세포 배양물에서 고분자량 응집체의 비율을 현저히 감소시켰다(도 5b). 따라서, 온도 감소는 결과적으로 TNFR-Fc 단백질 생산물을 개선시켰다.

이러한 온도 감소는 총 생산물 시알릴화(N- 및 O-연결 시알릴화 둘 다) 감소와 연관되었다(도 6a). 사실, 세포 배양물 온도 감소와 시알릴화된 N-연결 글리칸의 비율 감소 사이에 직접적인 관계가 존재하였고(도 6b), 이는 생산 온도는 HMWA 및 단백질 미스폴딩을 감소시키는 유리한 효과와 글리코실화를 감소시키는 불리한 효과를 균형화하도록 선택되어야 한다는 것을 나타낸다. 예를 들면, 29.5°C의 감소된 온도에서 성장하는 세포는 TNFR-Fc 글리코실화에 최소 효과를 미치는 동시에 미스폴딩된 TNFR-Fc 및 응집된 TNFR-Fc 둘 다의 농도를 현저히 감소시켰다.

상이한 온도에서 성장한 세포 배양물 사이의 락테이트의 순소모에서의 차이는 수확시에 세포 배양물의 pH에서의 차이를 발생시켰다(도 7). 이는 락테이트(락트산)의 더 많은 순소모는 산이 환경으로부터 제거되므로 배양 pH의 더 큰 상승을 발생시킨다는 사실로 인한 것이다.

실시예 1.2: 재조합 CHO 세포의 세포 배양 성능 및 TNFR-Fc 융합 단백질의 생산물 품질에 미치는 감소된 pH의 효과

실시예 1.2.1: 물질 및 방법.

재조합 당단백질 TNFR-Fc를 과발현하는 CHO 세포를 37.0°C에서 및 7.20, 7.10, 7.00, 6.90 또는 6.80의 pH 설정점에서 동일한 농도에서 접종하였다. 탄산나트륨 염기의 첨가는 배양이 pH 설정점 아래로 벗어나는 것을 방지하기 위해 이용하였다. pH 제어는 pH 설정점 초과에서 이용하지 않았다. 생물반응기는 1일째(접종 1일 후, 즉 실험 시작 1일 후)에 30.0°C로 온도 이동시켰다. 세포 배양물의 다양한 상태는 실시예 1.1.1에 기재된 바대로 측정하였다.

실시예 1.2.2: 결과

pH 7.00으로부터 0.2 pH 단위의 pH 설정점에서 성장하는 세포는 약간 감소된 IVC를 발생시켰고, 구체적으로, 6.80의 pH에서 성장하는 세포는 7.00의 pH에서 성장한 세포와 비교하여 IVC 약 15% 감소를 발생시켰다(도 8a). 추가로, 7.20의 pH에서 성장하는 세포는 더 낮은 세포 생존능력을 발생시켰다(도 8b).

추가로, 더 낮은 조작 pH 설정점은 결과적으로 더 낮은 글루코스 소모를 발생시켰다(도 9a). 글루타민 프로파일은 6.80 내지 7.10의 pH 설정점에서 성장하는 세포에 의해 현저히 변경되지 않았다(도 9b).

당연히, 더 높은 조작 pH 설정점은 더 많은 락테이트 생산을 발생시켰다(도 10a). 6.80의 pH 설정점에서, 유가 배양의 후반기에서 락테이트의 순소모는 일어나지 않았다. 더 낮은 조작 pH 설정점은 결과적으로 더 많은 암모니아 생산을 발생시켰다(도 10b).

(산 첨가가 아닌) 염기 첨가만이 pH를 유지시키는데 이용되므로, 실험의 하반기에서 락테이트의 순소모에서의 차이는 조작 pH 설정점으로부터 배양의 pH의 편차를 발생시켰다(도 11a). pH 설정점에서의 차이, 락테이트 프로파일, 및 적정제 첨가의 결과로서, 몰삼투압농도는 또한 pH 조건 사이에서 상이하였다(도 11b).

pH 7.00으로부터 0.2 pH 단위의 pH 설정점에서 배양을 조작하면 세포 특이적 생산성(즉, Qp)이 약간 더 낮아졌다(도 12a). 6.80 또는 7.20의 pH 설정점을 이용하면 더 낮은 세포 특이적 생산성 및 더 낮은 통합 생존 세포수 둘 다로 인해 결과적으로 생산물 역가가 더 낮아졌다(도 12b).

그러나, 더 낮은 조작 pH 설정점은 결과적으로 생산물 미스폴딩 및 응집을 감소시켰다(도 13a). 추가로, 고분자량 응집체의 비율의 현저한 감소는 더 낮은 pH 설정점에서 관찰되었다(도 13b).

더 낮은 조작 pH 설정점은 결과적으로 더 낮은 총 시알릴화(N- 및 O-연결 글리칸 둘 다)(도 14a) 뿐만 아니라 더 낮은 N-연결 글리칸 시알릴화의 비율을 발생시켰다(도 14b). 총 시알릴화(N- 및 O-연결)의 양은 표준 물질의 총 시알릴화의 양에 대한 백분율로서 정의되므로, 100% 미만의 임의의 값은 총 시알릴화 감소를 나타내고, 100%

초과의 값은 총 시알릴화 증가를 나타낸다. 글리코실화의 패턴은 당단백질의 글리칸의 프로파일로서 도시될 수 있다(도 15). 감소된 pH에서 성장하는 세포는 결과적으로 전체 글리코실화 프로파일을 현저히 변경시켰다(도 16). 새로운 단백질형이 감소된 pH에서 검출되지 않는 한편, 존재하는 단백질형의 비율은 현저히 변경되지 않았고, 감소된 pH에서 성장하는 세포는 결과적으로 복잡한 디-시알릴화된 및 모노-시알릴화된 단백질형을 감소시켰다. 단백질 글리코실화에 대한 감소된 pH의 잠재적으로 불리한 효과 때문에, 세포 배양물의 pH는 단백질 글리코실화에 대한 해로운 효과가 미스폴딩된 및/또는 응집된 단백질의 감소에 대한 유리한 효과에 의해 균형화되는 방식으로 선택되어야 한다. 예를 들면, 6.95의 감소된 pH에서 성장하는 세포는 TNFR-Fc의 글리코실화에 최소 효과를 미치는 동시에 미스폴딩된 및 응집된 TNFR-Fc 단백질의 비율을 현저히 감소시켰다.

실시예 1.3: 토의

이러한 시험은, 27.0°C 내지 30.0°C의 온도 범위 내에 또는 6.80 내지 7.20의 pH 설정점 범위 내에, 세포 배양물의 세포 성장 및 특이적 생산성은 현저히 영향을 받을 수 있다는 것을 증명한다. 그러나, 온도를 1 내지 2°C 만큼 작게 그리고 pH 설정점을 0.1 내지 0.2만큼 작게 변경하는 것이 세포 성장 및 특이적 생산성에 현저히 영향을 미치지 않지만, 단백질 폴딩 및 단백질 응집에서 현저한 (바람직한) 차이가 관찰될 수 있다. 따라서, 세포 성장, 생존능력 또는 생산성에 현저히 영향을 미치지 않는 세포 배양 조건에서의 작은 차이는 생산물 품질을 현저히 변경시킬 수 있다(예를 들면, 단백질 폴딩 및 단백질 응집을 감소시키거나 글리코실화에 영향을 미침).

실시예 2

sIL-13R 생산에 미치는 온도의 효과 및 세포주를 생산하는 새로운 sIL-13R의 평가

실시예 2.1: 물질 및 방법

제조할 당단백질 sIL-13R을 과발현하는 영구적으로 형질감염된 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 Applikon 생물반응기 내에서 Antifoam(Dow Corning Corporation, 미국 미시간주 미들랜드 소재)을 갖는 접종 배지에서  $3 \times 10^5$  세포/ml로 접종하였다. 추가의 Antifoam을 필요한 만큼 첨가하였다. 농축 영양소 배지를 공급물 배지로서 사용하였다. pH 설정점 하한치는 6.80이었다.  $dO_2$  설정점은 7%  $CO_2/93\%$  공기 살포 가스를 이용하여 23%이었고, 교반 속도는 200 rpm이었다. 생물반응기는 5일째에 37.0°C로부터 온도 이동시켰다. 생산기 온도는 37.0°C, 33.0°C, 32.0°C, 28.0°C, 또는 실온(RT; 약 24.0°C)이었다. 실험 조건에 대한 공급 스케줄은 표 1에 요약되어 있다. 공급물 부피는 생물반응기 내의 배양 부피의 백분율로서 기재되어 있다. 세포 배양물에 대한 온도 이동은 약  $6 \times 10^6$  세포/ml에서 발생하였다.

[표 1]

생물반응기 공급 스케줄

실험 조건:	37.0°C	33.0°C	32.0°C	31.0°C	29.0°C	RT
일						
3	10.2%	10.2%	10.2%	10.2%	10.2%	10.2%
5	5%	5%	5%	5%	5%	5%
6	5%					
7	10.2%	5%	5%	5%	5%	5%
9	10.2%	5%	5%	5%	5%	5%
11	5%	5%	5%	5%	5%	5%
13	5%		5%	5%	5%	5%
16			5%	5%	5%	5%

실시예 2.2. 결과

온도 이동 후에 달성된 생존 세포 밀도는 더 높은 온도(약  $8 \times 10^6$  세포/ml)에서보다 RT(약  $6 \times 10^6$  세포/ml) 및 29.0°C(약  $7 \times 10^6$  세포/ml)에서 약간 더 낮았다(도 17a). 유사하게, 온도 이동 후에 달성된 총 세포 밀도는 더 높은 온도(약 8 내지  $9 \times 10^6$  세포/ml)에서보다 RT(약  $6.5 \times 10^6$  세포/ml) 및 29.0°C(약  $7.5 \times 10^6$  세포/ml)에서 약간 더 낮았다(도 17b). 생존능력은 더 낮은 온도에서 유가 전체에 걸쳐 더 우수하게 유지되었다(도 17c). 생존능력에서의 속도 감소는 온도에 따라 변했고, RT 및 29.0°C 배양의 생존능력 프로파일은 나머지 31.0°C, 32.0°C, 33.0°C 및 37.0°C 배양에서보다 현저히 더 높았다(도 17c).

18일 유가 배양의 종료시에, 가장 높은 역가(sIL-13R 이합체와 HMWA의 합한 역가)는 31.0°C 배양에 이어, 32.0°C 배양(188 mg/L), 29.0°C 배양(178 mg/L), 및 33.0°C 배양(151 mg/L)에 의해 달성하였다(도 18). RT 및 37.0°C 배양은 현저히 더 낮은 역가를 가졌다. sIL-13R 생산 세포주의 세포 특이적 생산성, 또는 매일의 특이적 sIL-13R 생산 속도(Qp)는 RT 및 37.0°C에서 현저히 감소하였다(도 19a). 추가로, 누적 평균 특이적 생산성, 또는 누적 평균 Qp는 또한 37.0°C 및 RT에서 더 낮았다(도 19b). 흥미롭게도, 37.0°C, 33.0°C, 32.0°C, 및 31.0°C 배양의 종료에 임박하여 관찰된 특이적 생산성의 큰 증가는 배양 생존능력의 현저한 감소에 상당하였다(데이터 없음).

특이적 글루코스 소모(Qg1c)는 온도 감소에 따라 감소하였다(도 20). 특이적 글루타민 소모(Qg1n)는 또한 온도 감소에 따라 감소하는 것으로 보였다(도 21). 그러나, 특이적 글루타민 소모에 대한 데이터는 배지 내의 글루타민 분해(이러한 분해는 온도 증가에 따라 더 높은 정도로 일어남)를 설명할 수 없다는 것에 주의해야 한다. 따라서, 특이적 글루타민 소모에 대한 온도의 영향은 왜곡될 수 있다. RT, 29.0°C, 31.0°C, 및 32.0°C 배양에 대한 락테이트 농도 프로파일은 온도 이동일에 또는 이동일 근처에서 락테이트 농도 최고수준이 유사하였고, 이어서 18일에 0.7 내지 2.0 g/L로 감소하였다(도 22). 33.0°C 및 37.0°C 배양의 경우, 락테이트 프로파일은 성장기 동안에는 다른 배양과 유사하였지만, 생산기 동안에는 현저히 상이하였다. 33.0°C 배양의 경우, 락테이트 농도는 온도 이동 후에 감소하지 않았고, 대신에 본질적으로 일정하게 유지되었다. 37.0°C 배양의 경우, 락테이트는 유가의 전체 기간에 걸쳐 증가하였다.

암모니아 농도는 온도에 따라 생산기 동안에 변했다(도 23). 29.0°C 배양의 경우, 암모니아 농도는 온도 이동일에 또는 이동일 근처에서 최고수준이었고, 유가의 중간 단계 동안 감소하였고, 이어서 유가의 후기 단계 동안 증가하였다. 29.0°C 초과로 온도가 증가하면서, 유가의 후기 단계에서 암모니아 농도의 증가는 더 높았고 더 빨리 일어났다. 37.0°C 배양의 경우, 암모니아 농도는 유가의 전체 과정에 걸쳐 증가하였다. RT 배양의 경우, 암모니아 수준은 온도 이동 후에 거의 일정하게 유지되었다.

이러한 생물반응기 실행으로부터 순화 배지의 샘플은 배지-결합 단백질 A 용출액의 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 고분자량 응집체(HMWA)에 대해 분석하였다. 세포주의 결과로부터 분명한 경향은 온도 증가에 따른 순화 배지 중에 존재하는 HMWA의 백분율의 상대적인 증가이다(도 24 및 도 25). 따라서, 더 낮은 온도에서 세포 배양물을 조작하면 결과적으로 sIL-13R 생산물 응집이 감소하였다.

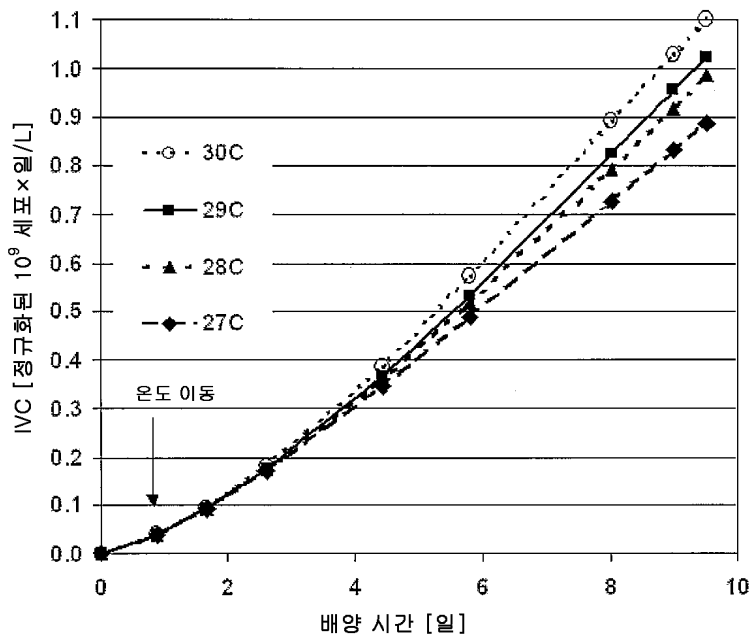
sIL-13R 이합체의 백분율의 감소는 HMWA의 백분율의 증가와 연관되었다(도 26a 및 26b). RT 배양은 다른 배양보다 더 낮은 %HMWA(도 26b) 뿐만 아니라 더 높은 이합체 형성 백분율을 가졌다(도 26a). RT 배양 및 31.0°C 배양은 유사한 이합체(이합체 단독) 역가를 생성시켰지만, 29.0°C 배양은 가장 높은 이합체(이합체 단독) 역가를 생성시켰다(도 27).

SEC 분석으로부터 결과를 확인하기 위해, 순화 배지 샘플을 웨스턴 블롯을 이용하여 분석하였다. 이합체로서 존재하는 sIL-13R의 양에 대해 HMWA 중으로서 존재하는 sIL-13R의 양에서의 정성적 차이를 실험하였다. 웨스턴 블롯은 순화 배지 중에 존재하는 이합체의 양에 대해 순화 배지 중에 존재하는 HMWA 응집체의 양은 온도 증가에 따라 증가한다는 경향을 증명한다(데이터 없음).

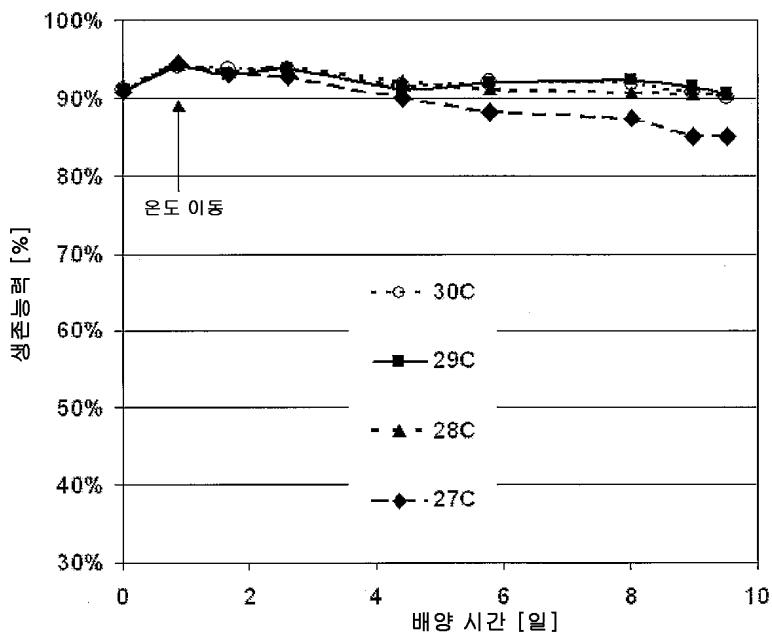
이러한 실험은 sIL-13R 이합체의 부피 생산성에 대한 생존능력 및 생존 세포 밀도의 온도 의존 변수, 특이적 생산성, 및 HMWA 형성 사이의 상호작용의 중요성을 증명한다. 31.0°C 배양이 가장 높은 역가(측정은 HMWA 및 이합체 포함)를 달성하더라도, 더 낮은 온도(예, 29.0°C)에서의 배양은 이합체만을 고려하여 측정할 때 비교할만한 또는 개선된 부피 생산성을 생성할 수 있다.

도면

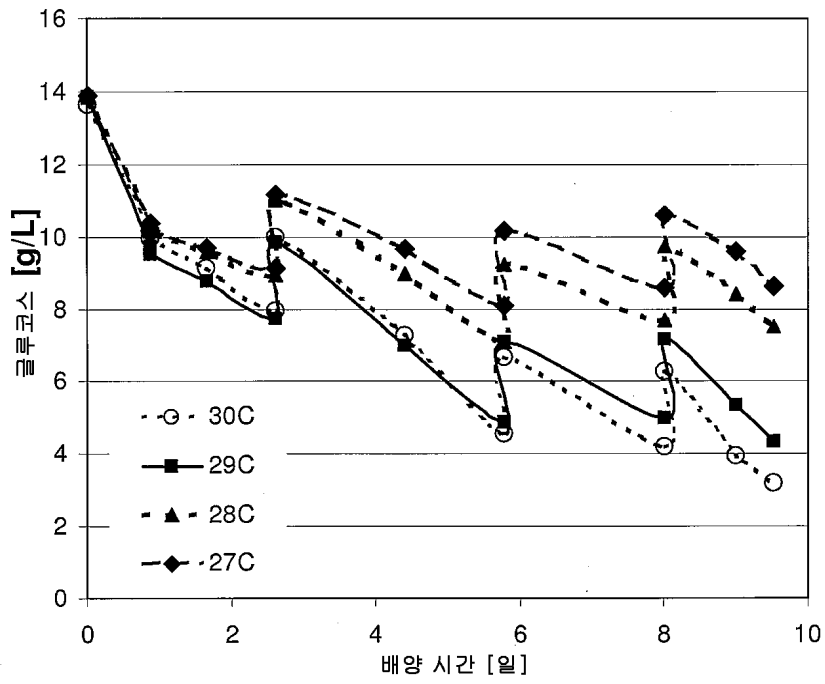
도면1a



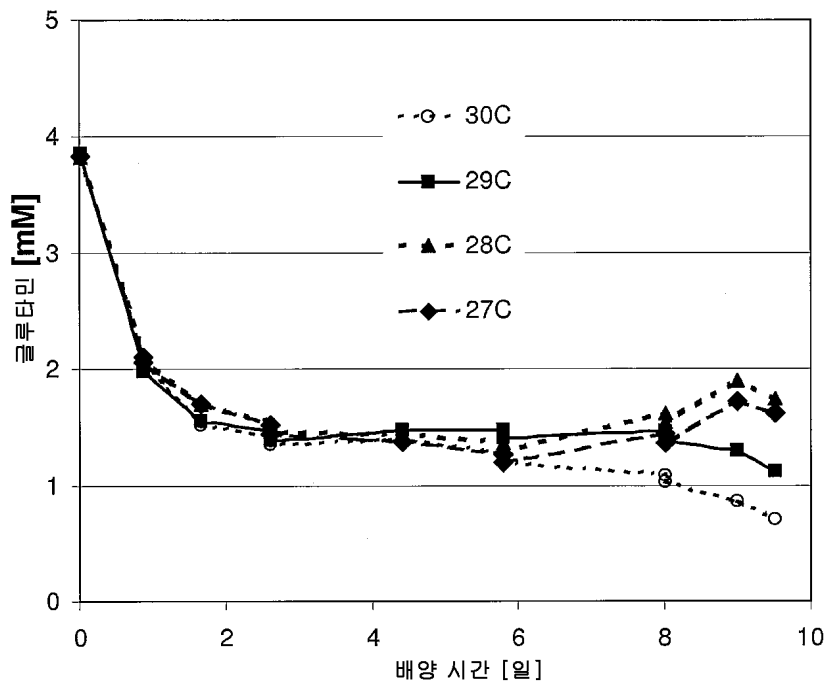
도면1b



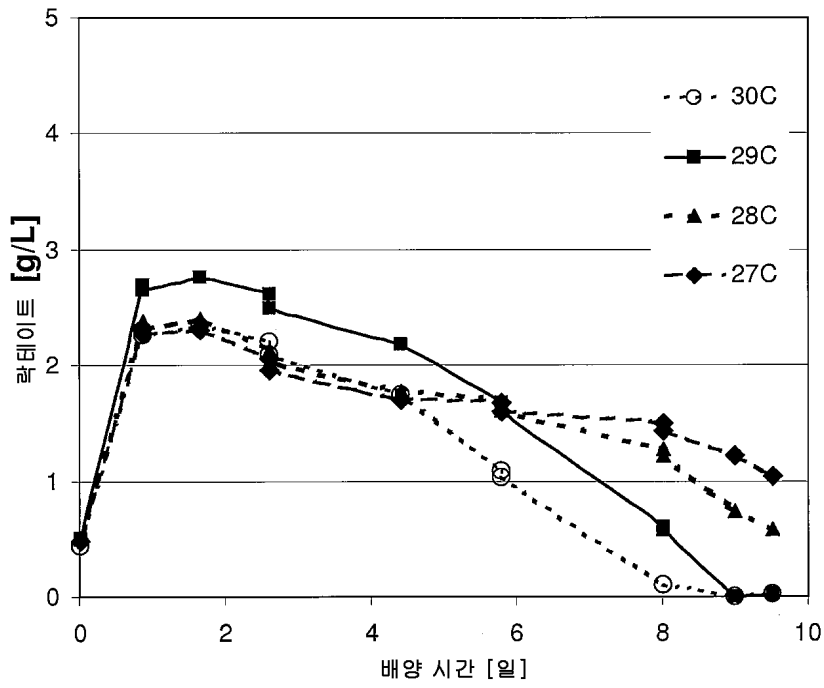
도면2a



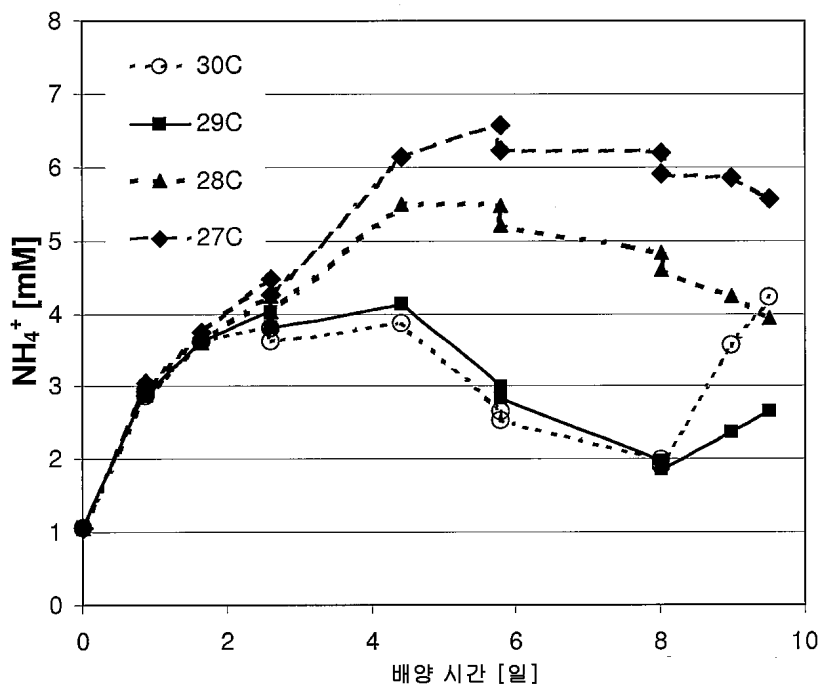
도면2b



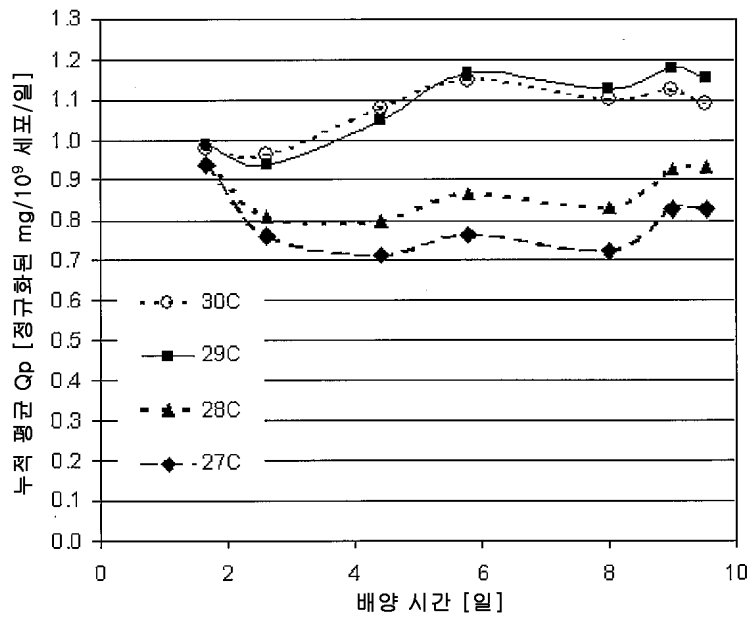
도면3a



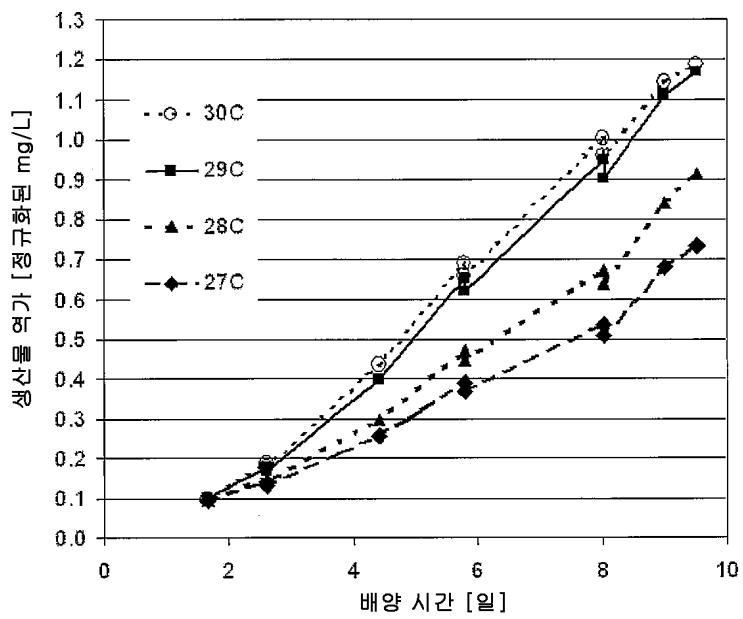
도면3b



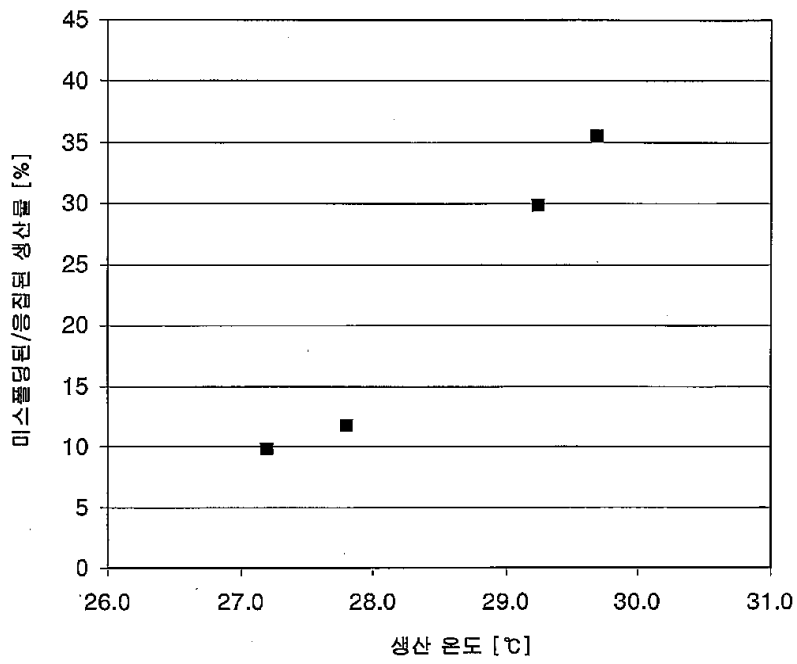
도면4a



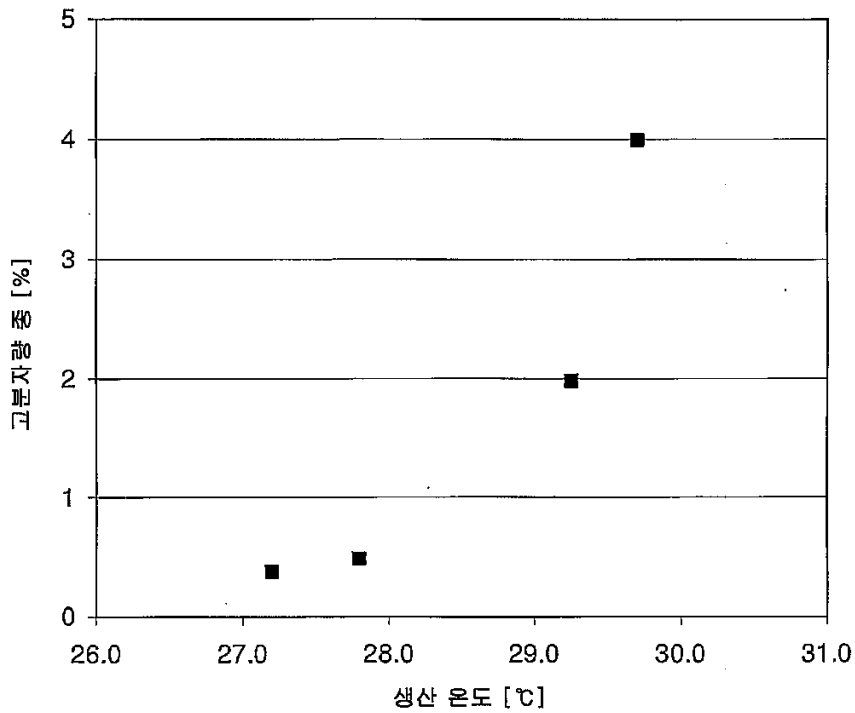
도면4b



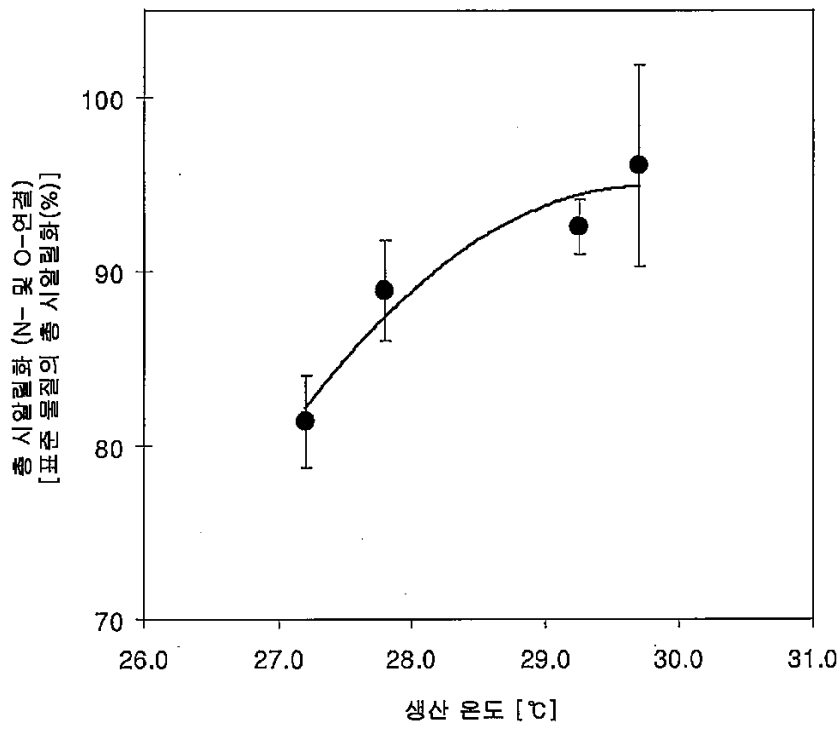
도면5a



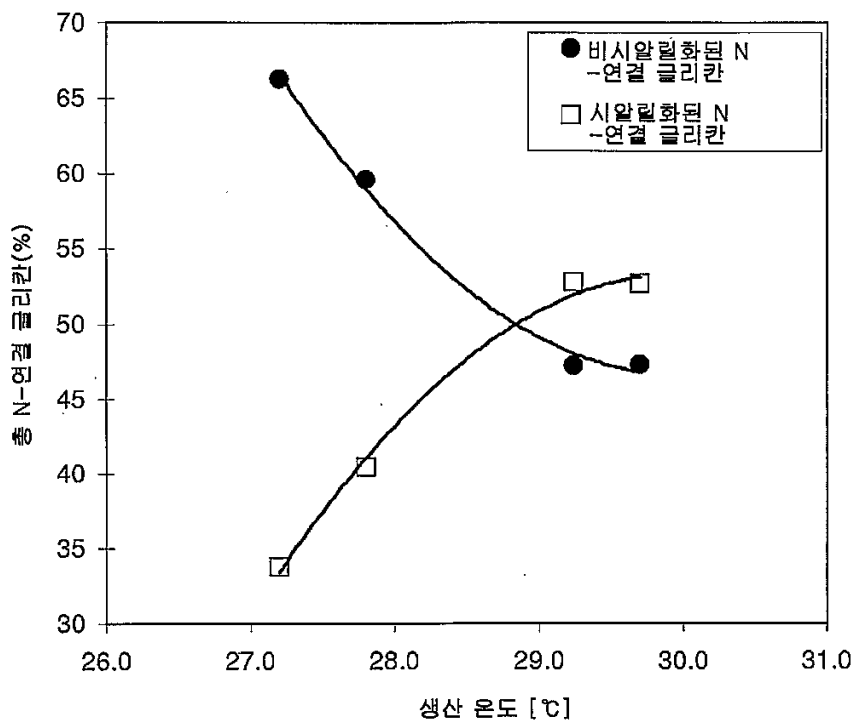
도면5b



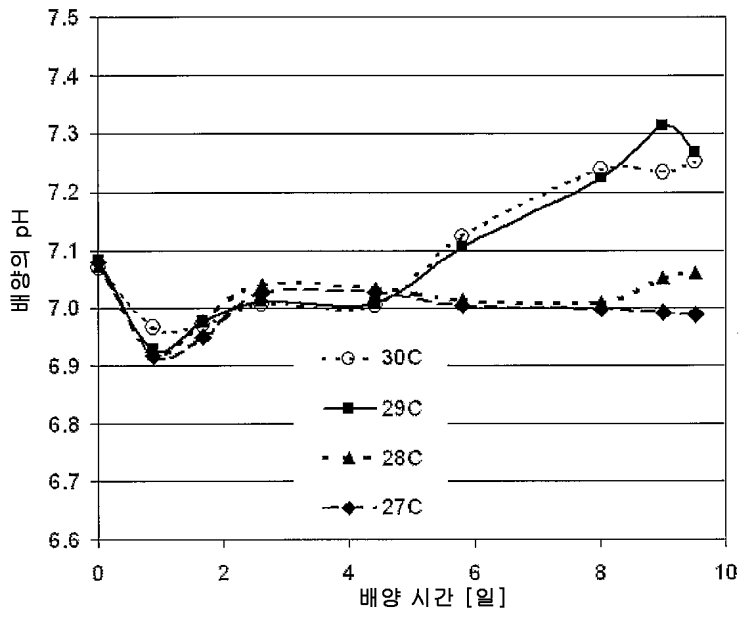
도면6a



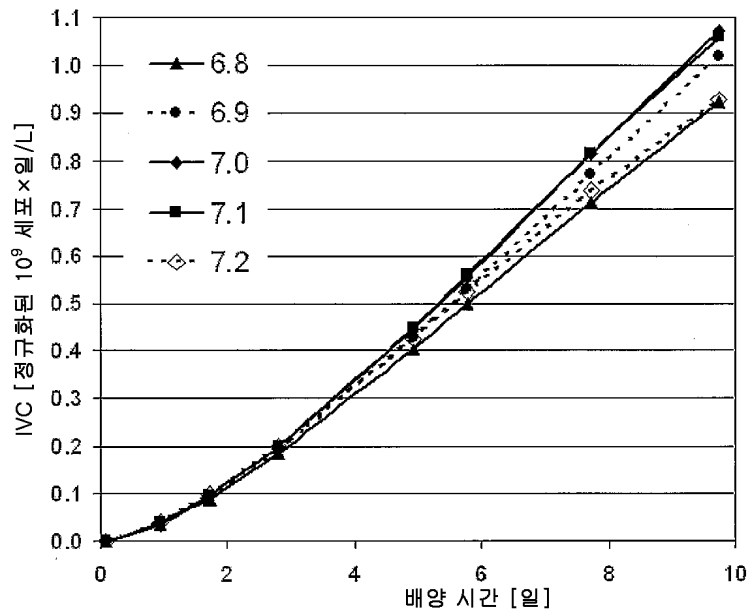
도면6b



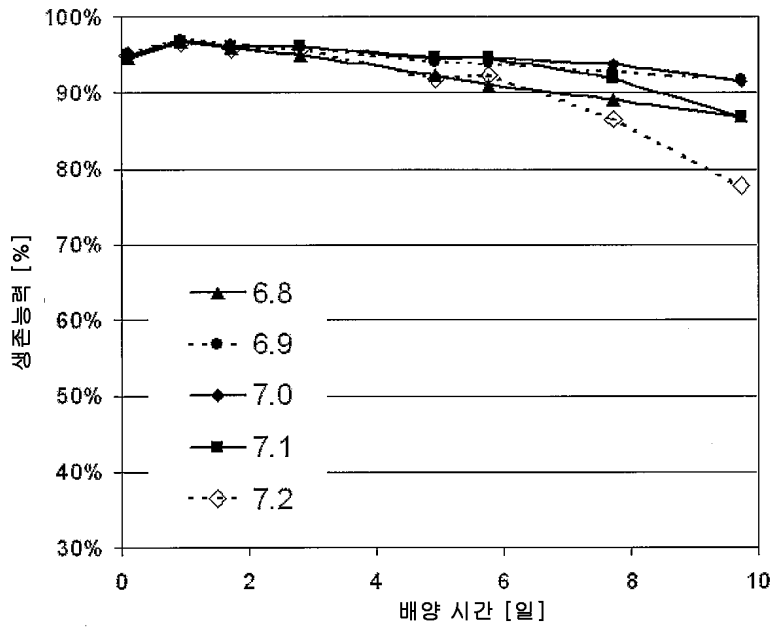
도면7



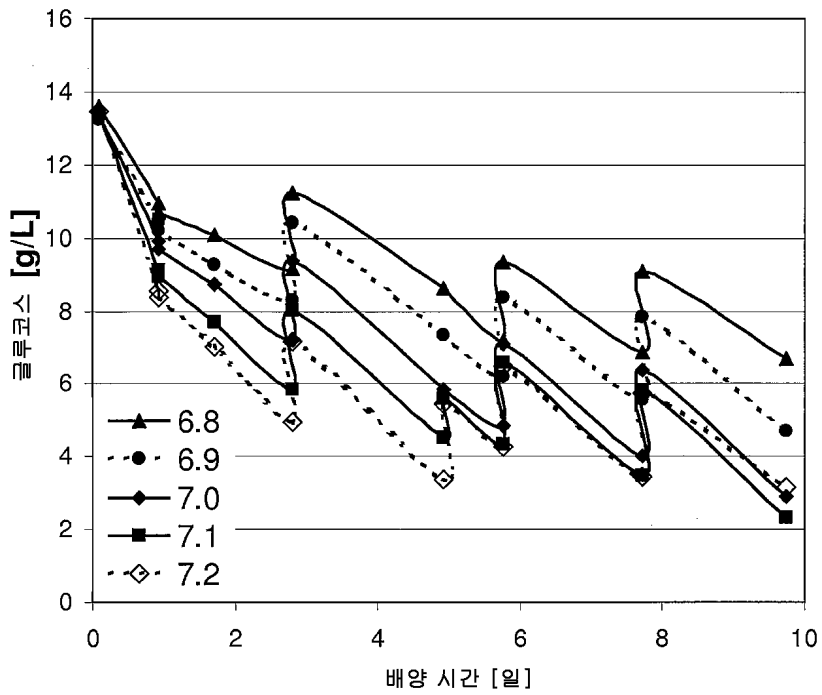
도면8a



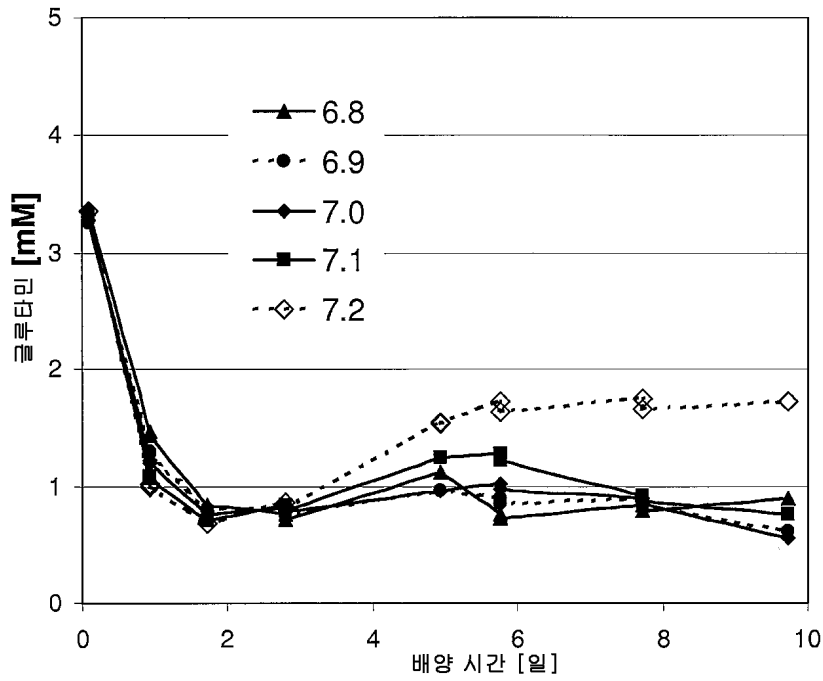
도면8b



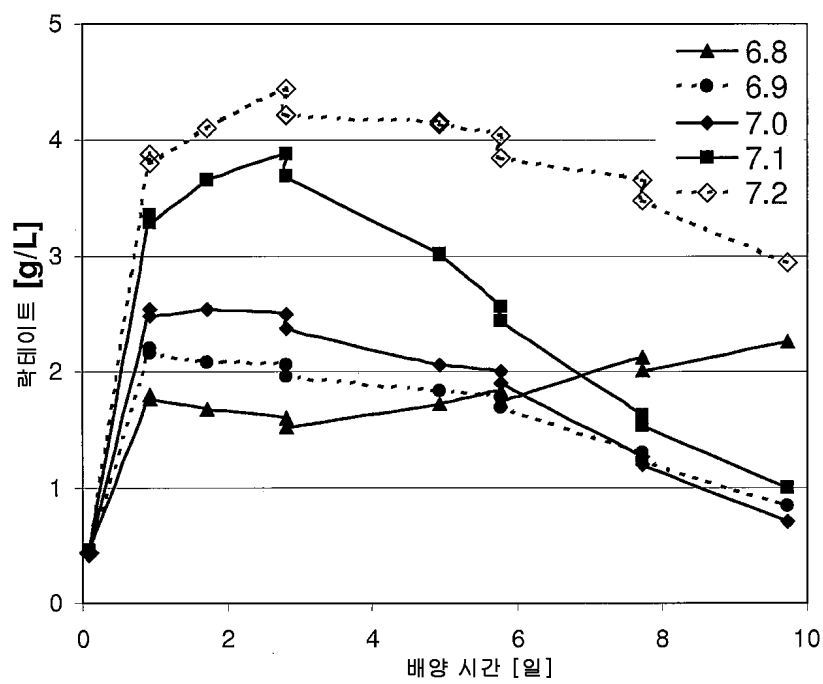
도면9a



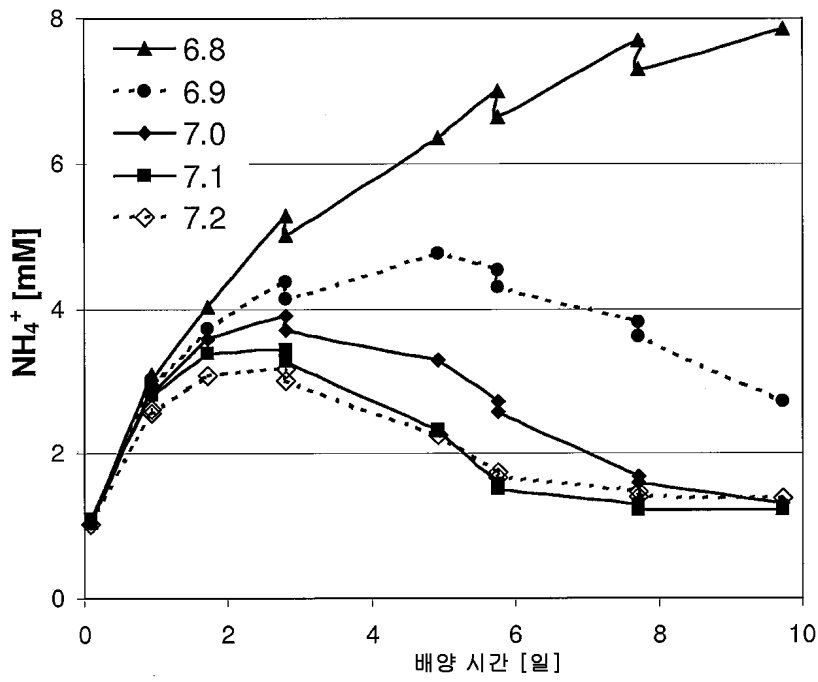
도면9b



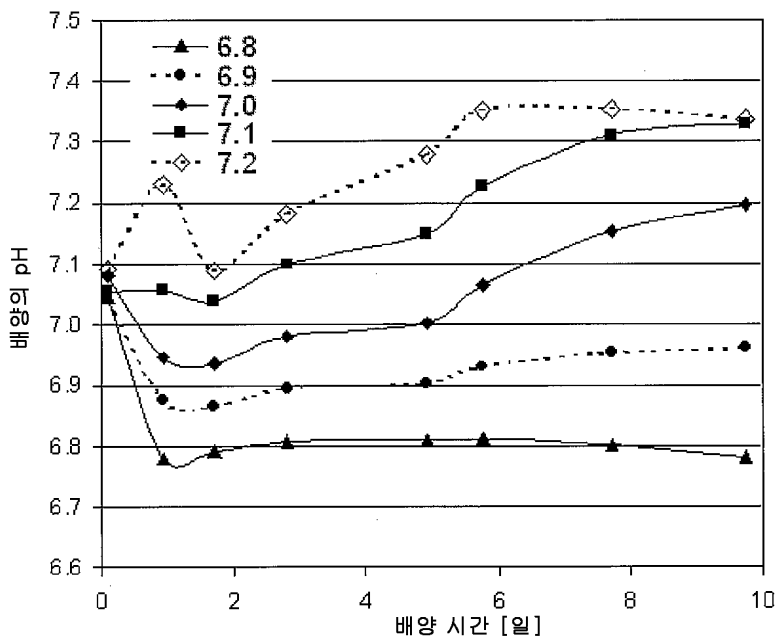
도면10a



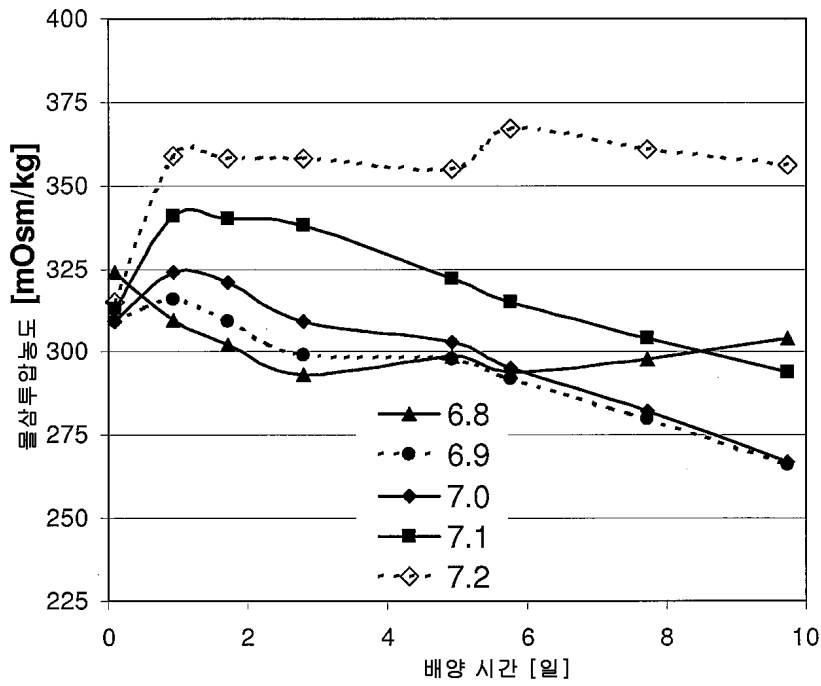
도면10b



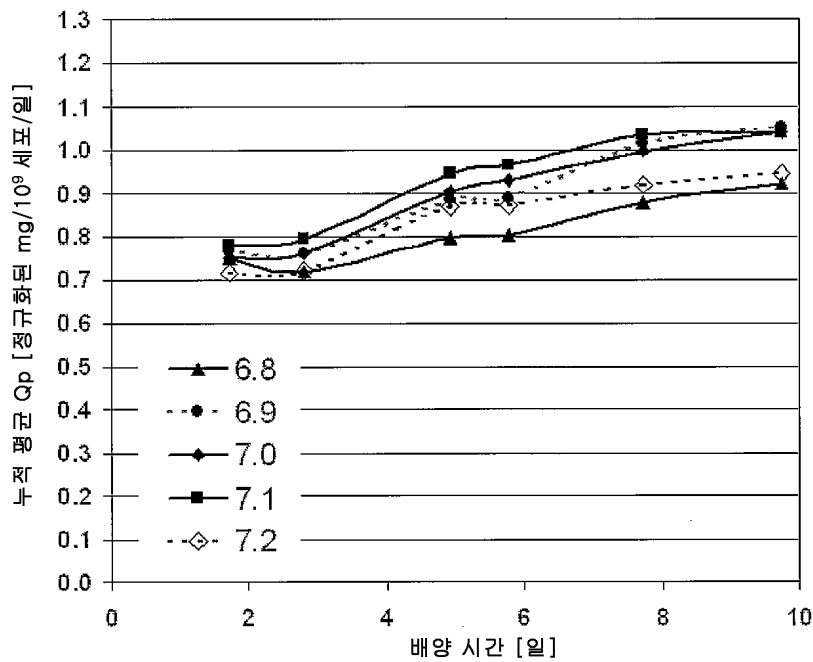
도면11a



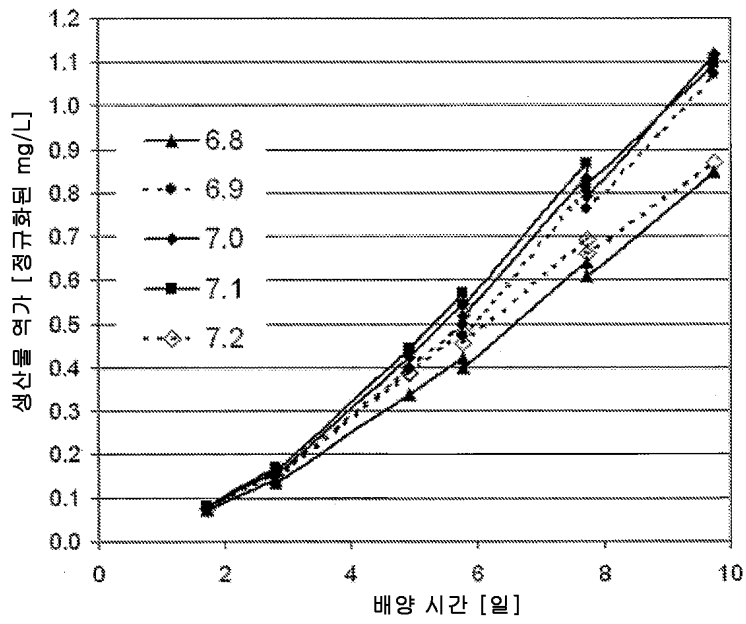
도면11b



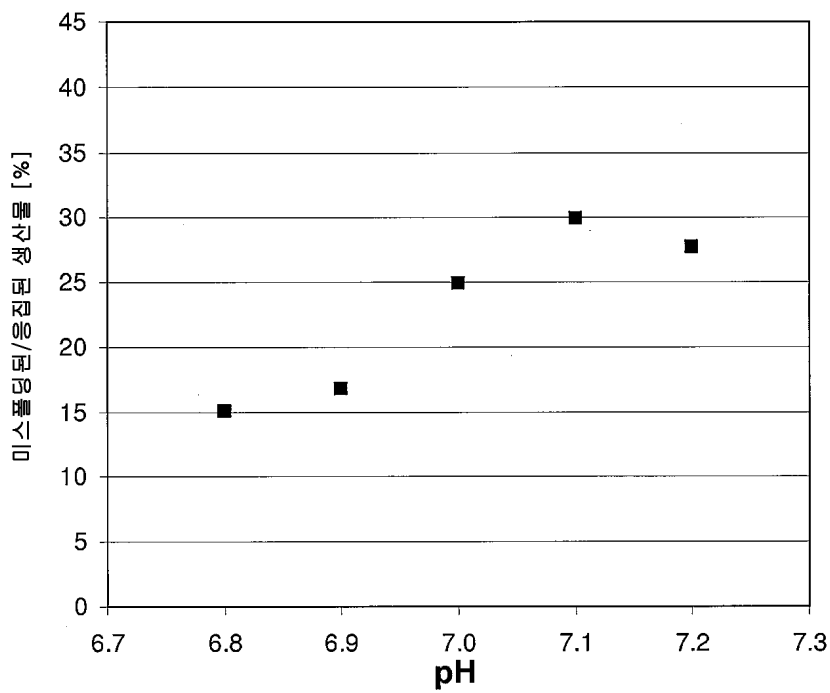
도면12a



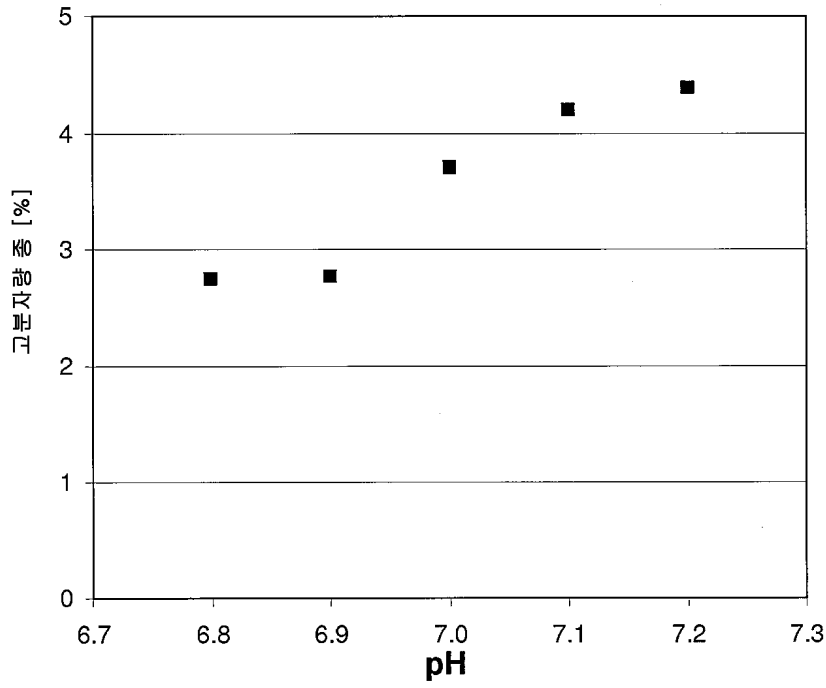
도면12b



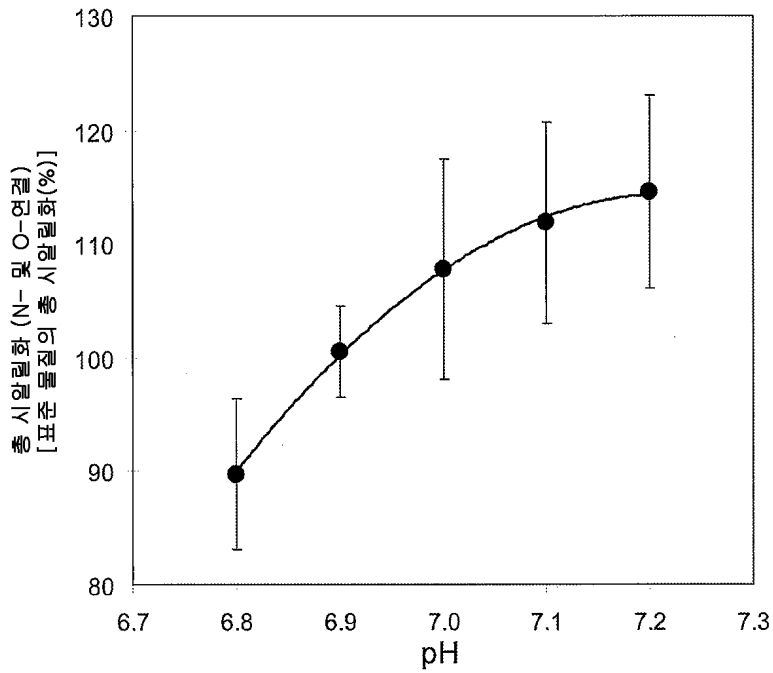
도면13a



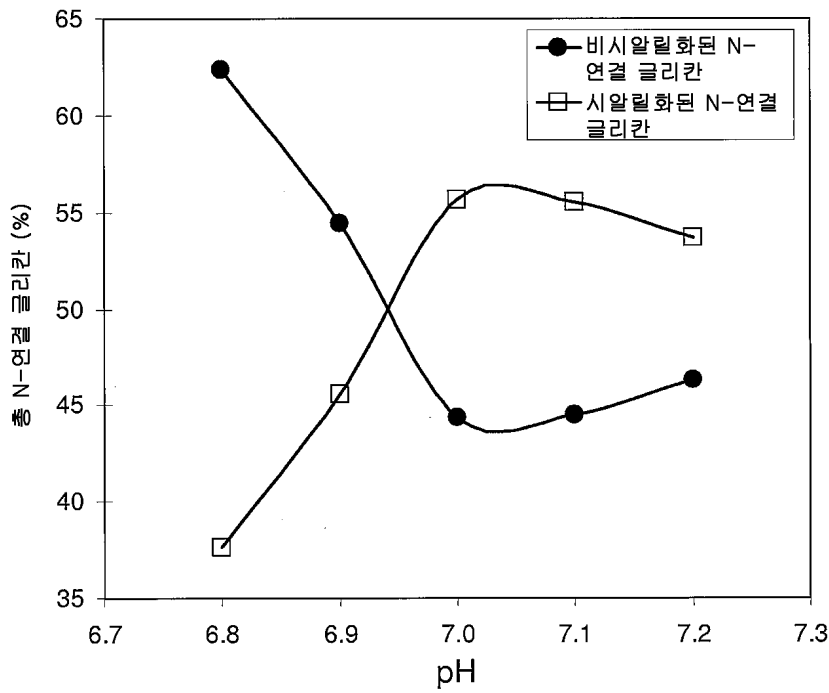
도면13b



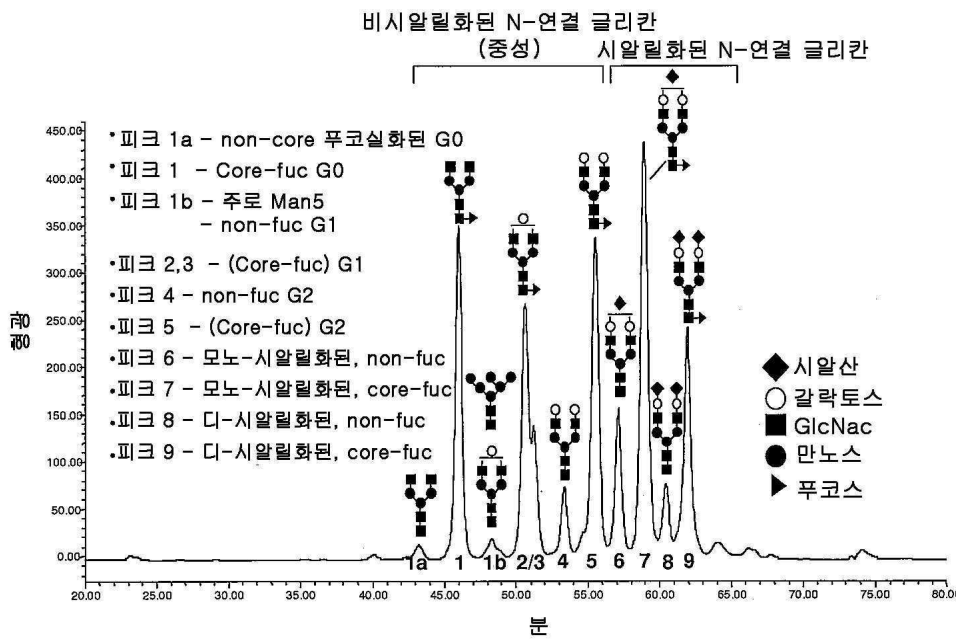
도면14a



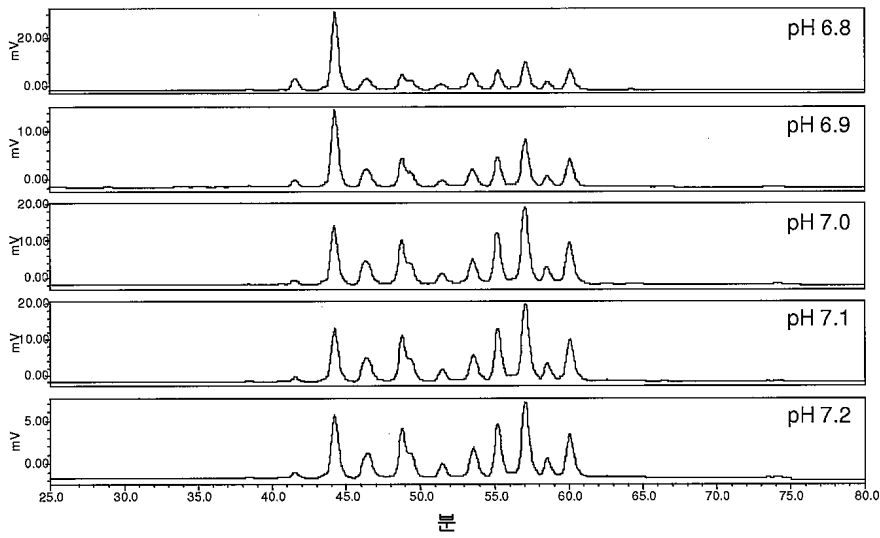
도면14b



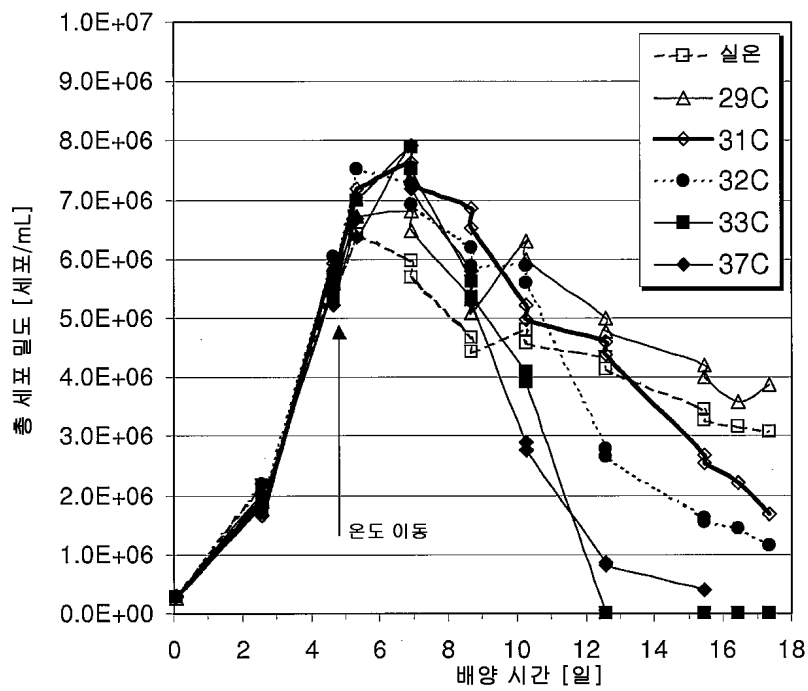
도면15



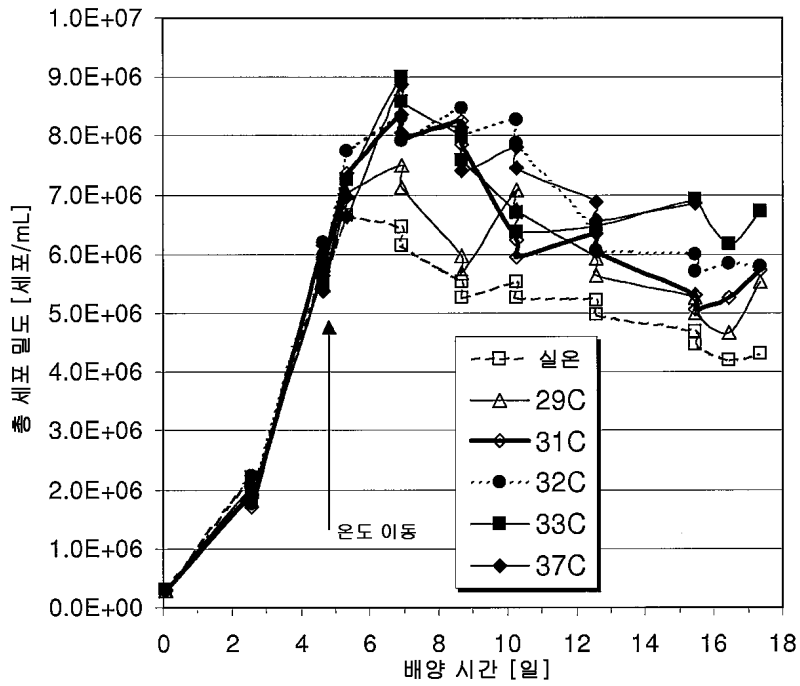
도면16



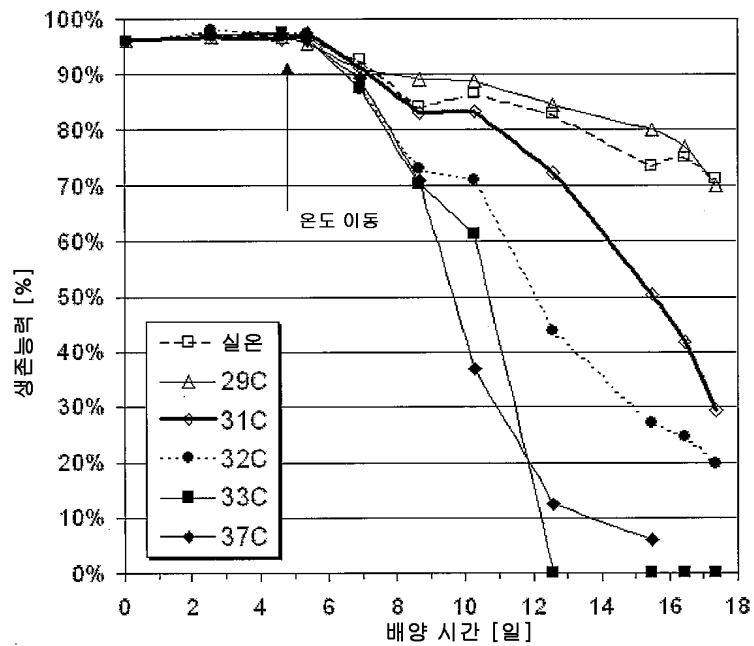
도면17a



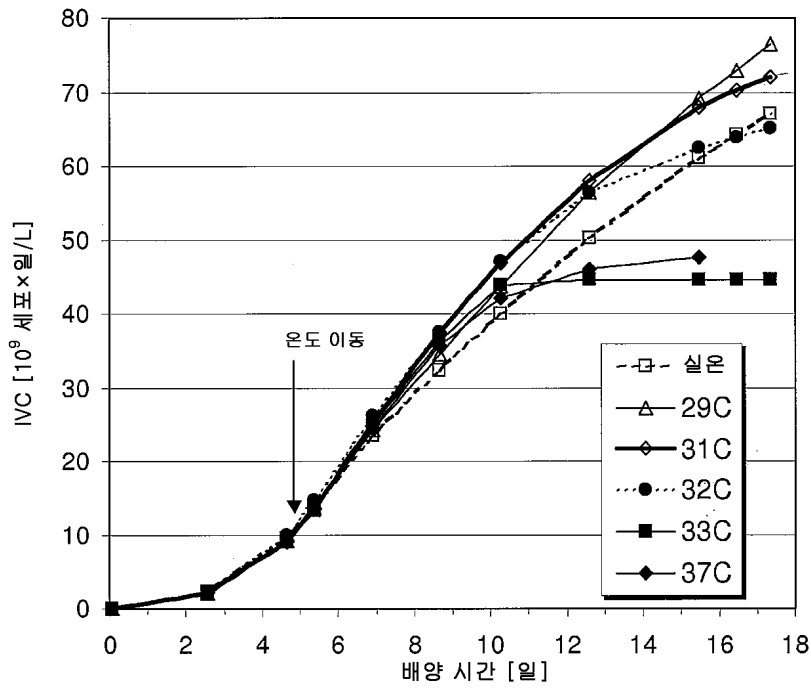
도면17b



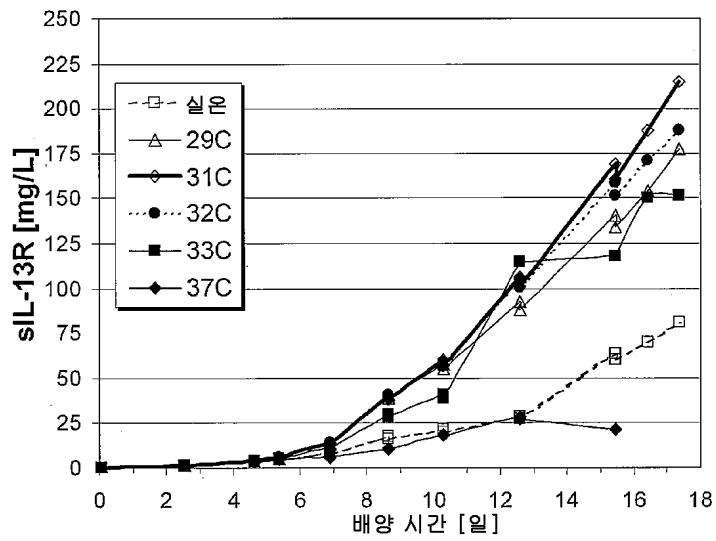
도면17c



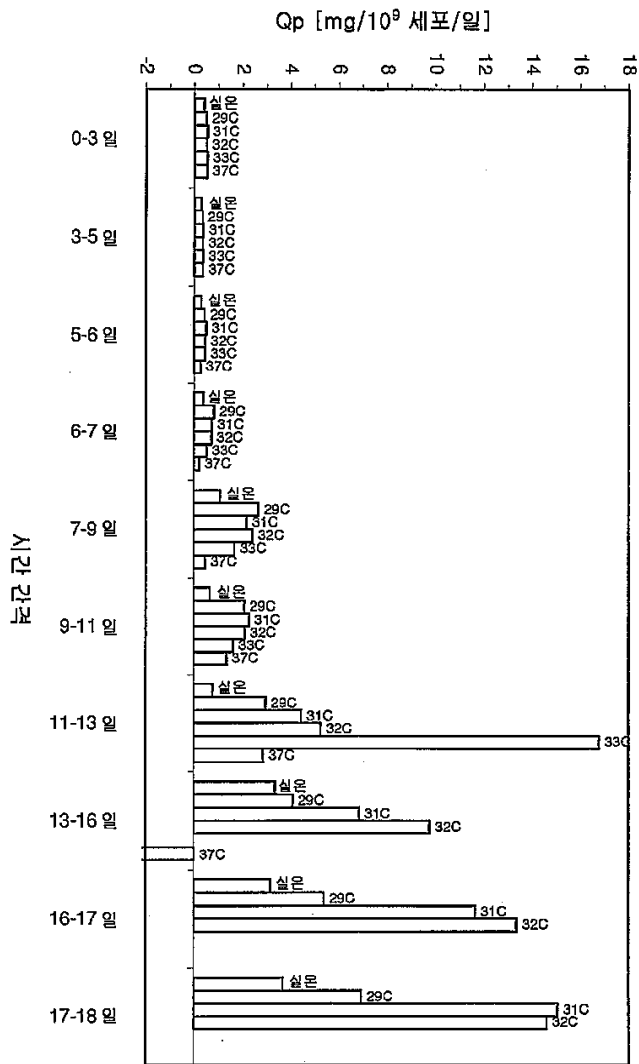
도면17d



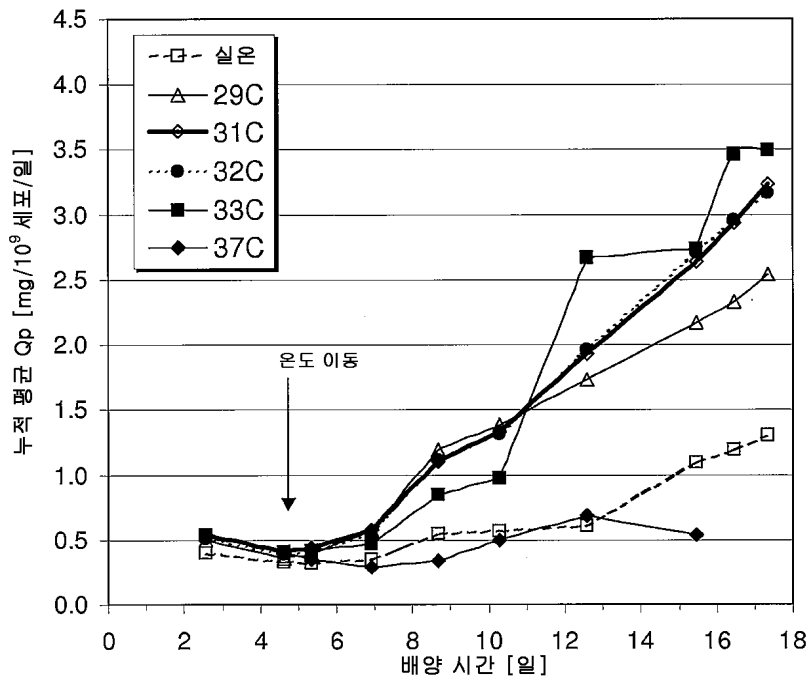
도면18



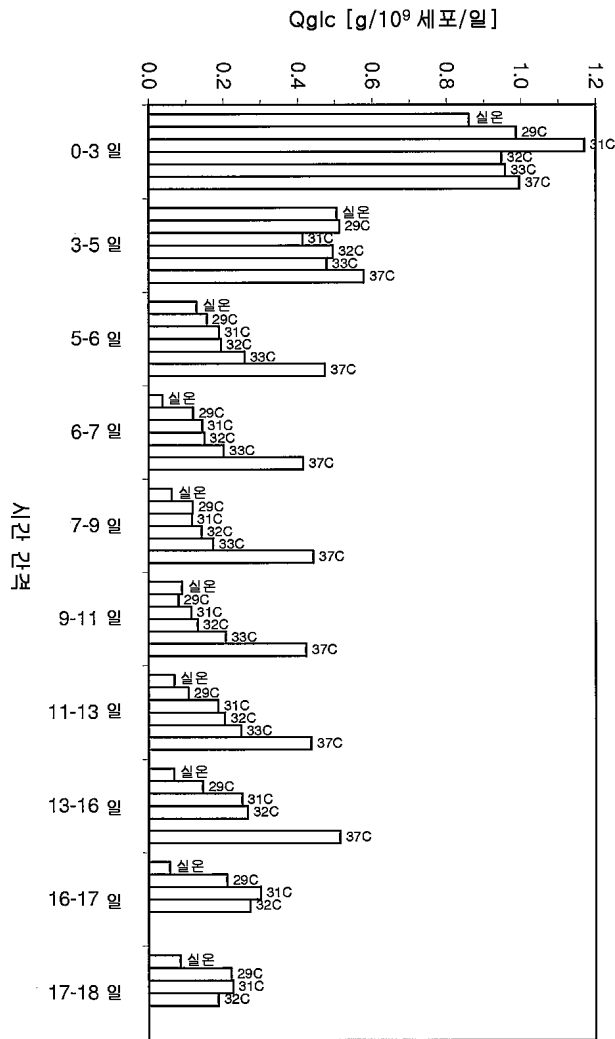
도면19a



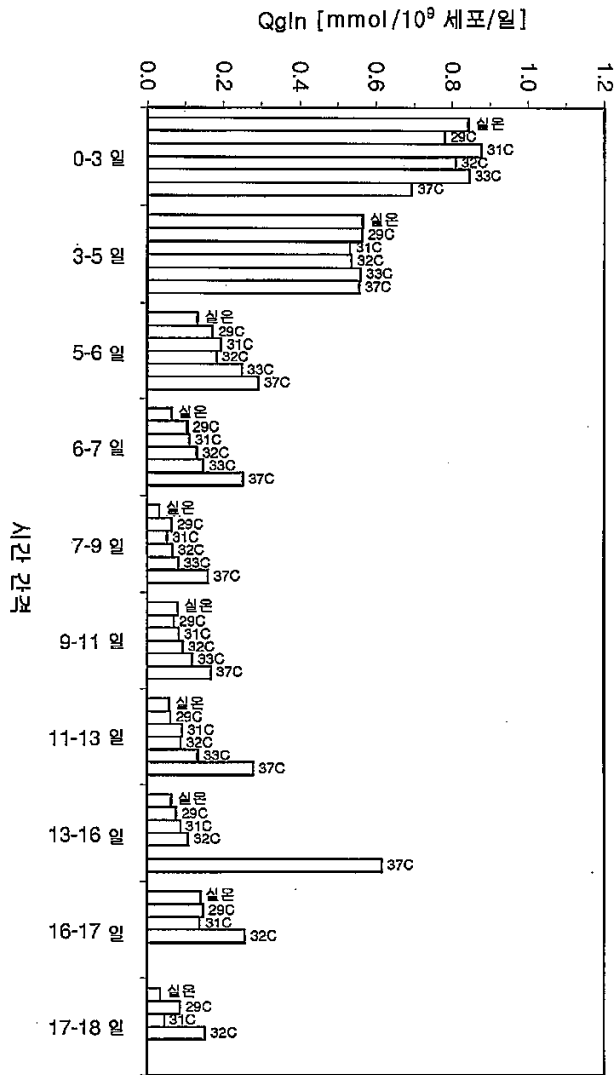
도면19b



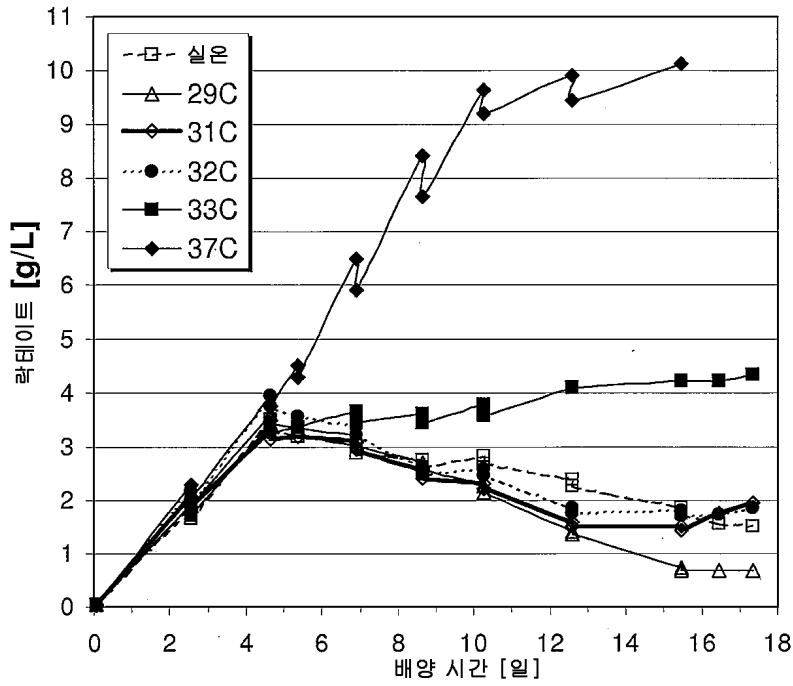
도면20



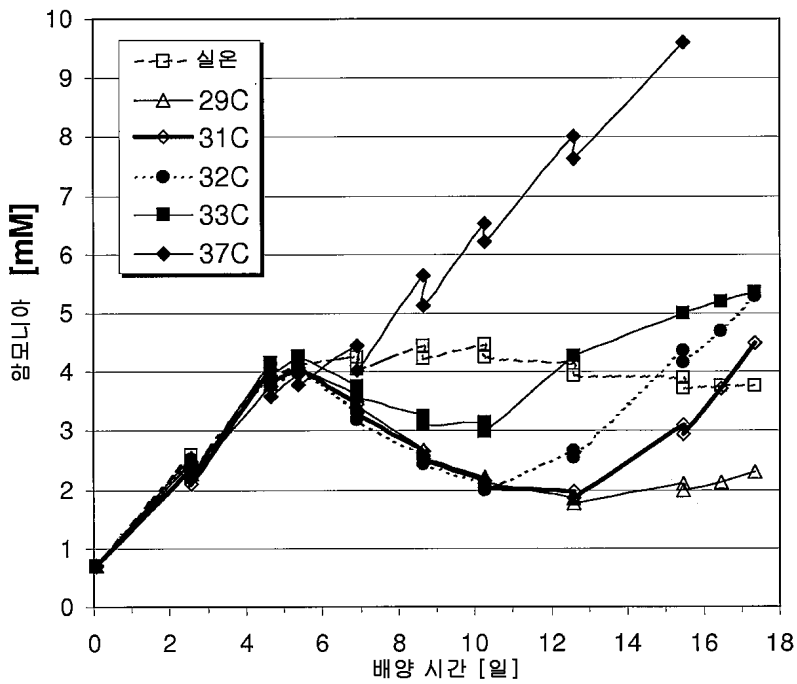
도면21



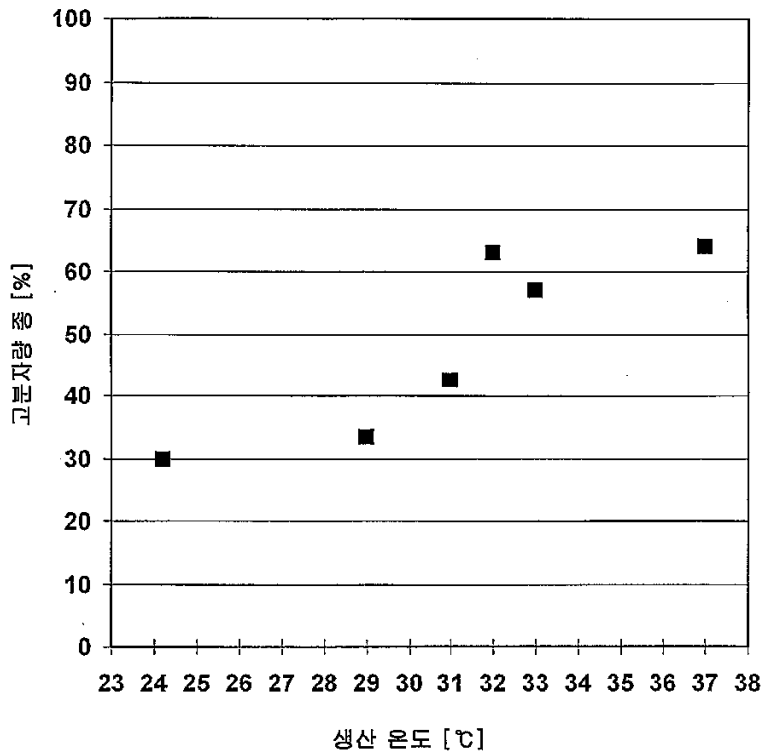
도면22



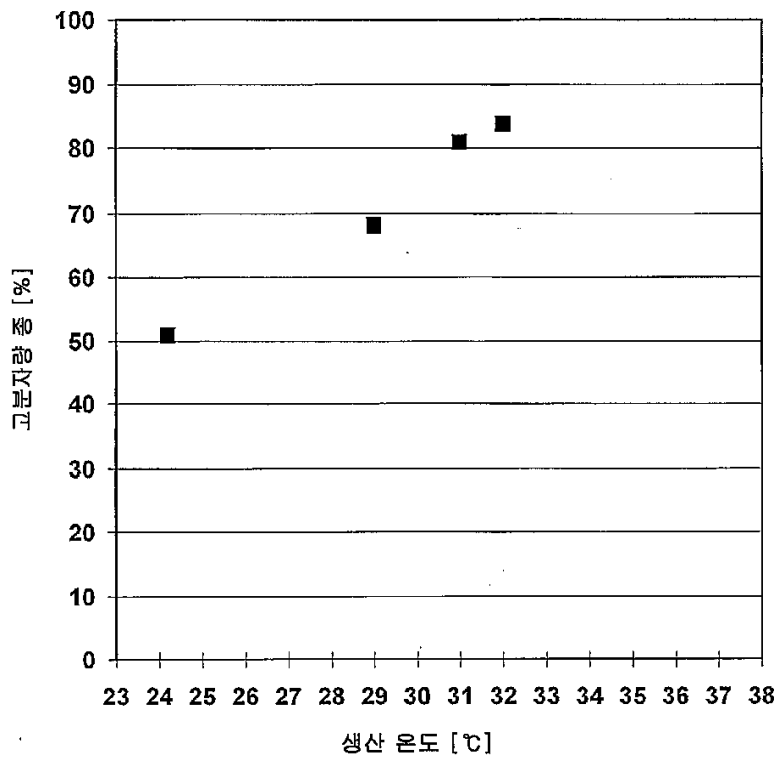
도면23



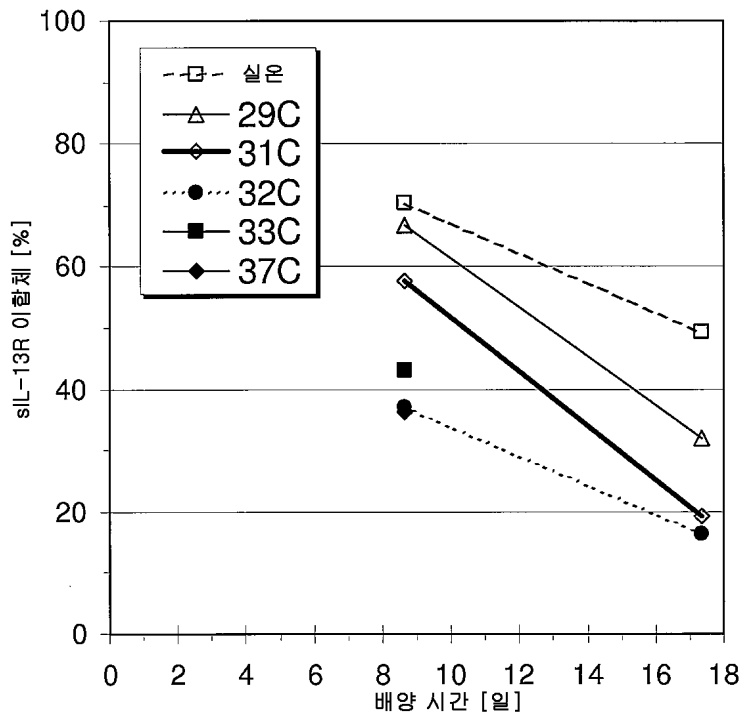
도면24



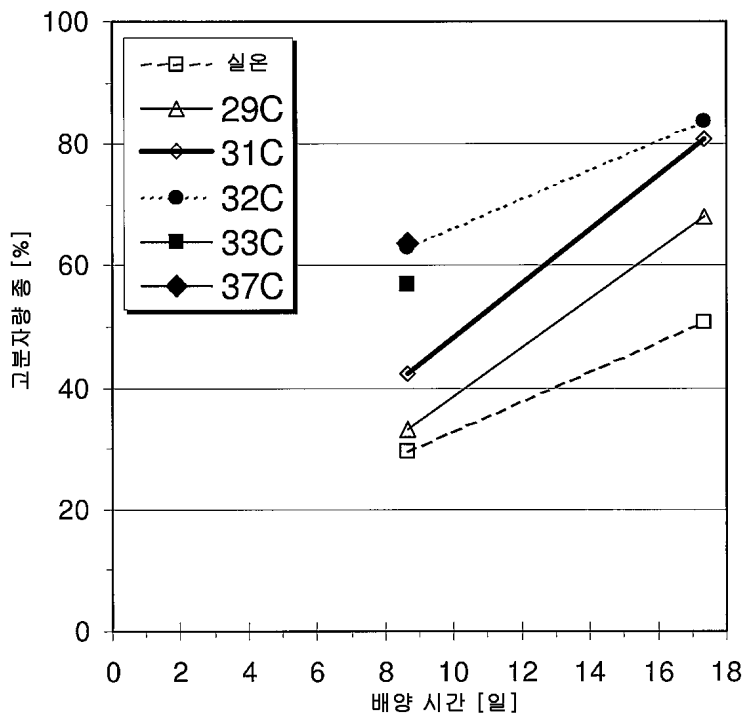
도면25



도면26a



도면26b



도면27

