



등록특허 10-2301034



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년09월13일
(11) 등록번호 10-2301034
(24) 등록일자 2021년09월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01) *C12P 21/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/85 (2013.01)
C07K 14/705 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7021676
- (22) 출원일자(국제) 2014년12월11일
심사청구일자 2019년11월27일
- (85) 번역문제출일자 2016년08월09일
- (65) 공개번호 10-2016-0111943
- (43) 공개일자 2016년09월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/069744
- (87) 국제공개번호 WO 2015/116315
국제공개일자 2015년08월06일

(30) 우선권주장
61/933,137 2014년01월29일 미국(US)

- (56) 선행기술조사문현
WO2011134643 A1
WO2008154014 A2
WO2010049177 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문현

전체 청구항 수 : 총 25 항

심사관 : 최성호

(54) 발명의 명칭 재조합 단백질의 글리코실화를 조절하기 위한 N-글리코실화 경로 조절자의 과발현

(57) 요약

관심 대상의 단백질을 발현시키는 세포 배양물 특성의 조절방법이 제공된다. 다양한 실시형태에서, 상기 방법은 N-글리코실화 경로에 수반되는 단백질의 과발현에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12N 9/1051 (2013.01)
C12P 21/005 (2013.01)
C12Y 204/01094 (2013.01)
C12Y 204/01143 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

N-글리코실화 경로에 수반되는 단백질을 과발현하도록 숙주 세포를 형질감염시키는 단계

를 포함하고, 이때 상기 N-글리코실화 경로에 수반되는 단백질은 N-아세틸-글루코사미닐트랜스페라제-1 (Mgat1에 의해 암호화됨) 및 N-아세틸-글루코사미닐트랜스페라제-2 (Mgat2에 의해 암호화됨)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인,

포유류 세포 배양 방법 동안 재조합 단백질의 고수준 만노스(hight mannose) 글리코폼(glycoform) 함량을 조절하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 숙주 세포를 N-글리코실화 경로에 수반되는 단백질을 2종 이상 발현하도록 형질감염시키고, 이때 상기 단백질은 Mgat1과 Mgat2, Mgat1과 Slc35a2, Mgat2와 Slc35a2, 또는 Mgat1, Mgat2와 Slc35a2에 의해 암호화된 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 숙주 세포가 재조합 단백질을 발현하도록 이전에 형질감염된 것이고, 이후 N-글리코실화 경로에 수반되는 단백질을 발현하도록 형질감염시키는 것인 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 숙주 세포가 N-글리코실화 경로에 수반되는 단백질로 우선 형질감염되고, 이후 재조합 단백질을 발현하도록 형질감염되는 것인 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 재조합 단백질이 항체 Fc 영역을 포함하는 단백질인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 재조합 단백질이 Fc 융합 단백질, 항체, 면역글로불린 및 펩티바디(peptibody)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, N-글리코실화 경로에 수반되는 단백질을 과발현하도록 형질감염된 세포에서 발현되는 재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량이, N-글리코실화 경로에 수반되는 단백질을 과발현하도록 하는 형질감염에 의한 조작이 이루어지지 않은 세포의 배양에 의해 생성된 함량에 비해 감소되는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 고수준 만노스 글리칸 종이 만노스5 (Man5), 만노스6 (Man6), 만노스7 (Man7), 만노스8 (만노스8a 및 8b (Man8a 및 8b)를 포함), Man8a 및 8b, 또는 만노스9 (Man9), 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량이 5% 이하인 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 포유류 세포 배양 방법이 유가(fed-batch) 배양 방법, 관류 배양 방법 또는 이들의 조합을 이용하는 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 배양이 교번 접선 유동(alternating tangential flow) (ATF)을 이용하여 관류되는 것인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 관류가 세포 배양의 제1일 내지 제9일에 시작되는 것인 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 관류가 세포 배양의 제3일 내지 제7일에 시작되는 것인 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 세포가 생성기(production phase)에 도달되었을 때 관류가 시작되는 것인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 관류가 울트라필터 또는 마이크로필터를 이용한 교번 접선 유동에 의해 달성되는 것인 방법.

청구항 16

제10항에 있어서, 세포 배양이 유가 배양에 의해 유지되는 것인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 배양이 생성 동안 3회 공급되는 것인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 배양이 제2일 내지 제4일, 제5일 내지 제7일, 및 제8일 내지 제10일에 공급되는 것인 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 배양이 생성 동안 4회 공급되는 것인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 배양이 제2일 내지 제4일, 제5일 내지 제6일, 제7일 내지 제8일, 및 제8일 내지 제10일 또는 그 이후에 공급되는 것인 방법.

청구항 21

제1항 또는 제2항에 있어서, 포유류 세포 배양물이, 무혈청 배양 배지 중 적어도 0.5×10^6 개 내지 3.0×10^6 개 세포/ mL 로 생물반응기에 접종됨으로써 확립되는 것인 방법.

청구항 22

제1항 또는 제2항에 있어서, 포유류 세포가 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포인 방법.

청구항 23

제1항 또는 제2항에 있어서, 재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코풀 함량을 감소시키는 방법.

청구항 24

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 재조합 단백질의 채취 단계

를 더 포함하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 채취된 재조합 단백질을 정제하고, 약제학적으로 허용가능한 제제로 제형화하는 것인 방법.

청구항 26

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 포유류 세포 배양물, 예컨대 CHO 세포 배양물을 포함하는 세포 배양물에 의해 생성된 재조합 단백질의 하나 이상의 특성을 조절하는 방법에 관한 것이다.

관련 출원에 대한 상호참조

[0003] 본 출원은 2014년 1월 29일자로 출원된 미국 가출원 특허 제61/933,192호의 유익을 주장하며, 이 기초출원은 본 명세서에 참고로 포함된다.

배경 기술

[0004] 글리코실화는 포유류 세포에서 통상적인 번역 후 변형이며; 정상 인간 면역글로불린과 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 생성된 치료적 단클론성 항체(mAb)는 둘 다 당단백질이다. 치료적 mAb의 약동학 특성과 효과기 기능은 둘 다 글리코실화에 의해 영향받을 수 있다. 말단당, 예컨대 푸코스 및 갈락토스는 항체-의존적 세포독성(ADCC) 및 상보체-의존적 세포독성(complement-dependent cytotoxicity: CDC; Wright, A. and S.L. Morrison, *Trends Biotechnol* (1997) 15:26-32)에 영향을 미칠 수 있다. 고수준 만노스(high mannose) 글리칸은 특정 mAb의 혈청 클리어런스를 증가시킬 수 있으며, 따라서 효능에 잠재적으로 영향을 미칠 수 있다(Goetze, et al., (2011) *Glycobiology* 21:949-59). 대안적으로, 고수준 만노스 글리코폼(glycoform)은 Fc 감마 III 수용체에 대한 항체의 친화도를 증가시킬 수 있고, 따라서 특정 항체의 ADCC 활성을 증가시킬 수 있다(Yu, et al. (2012) *Mabs* 4:475-87). 따라서, 각각의 재조합 mAb에 대해, mAb의 치료 가능성을 가장 잘 뒷받침하는 특정 글리코실화 프로파일이 유지될 필요가 있다.

[0005] 세포 배양물에서 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량을 조작하는 방법은 배지 조성, 삼투압물농도, pH, 온도 등의 변화를 포함한다(Yu, et al., 상기 참조, Pacis et al., 상기 참조, Chee Furng Wong et al. (2005) *Biotechnol Bioeng* 89:164-177; Ahn, et al. (2008) *Biotechnol Bioeng* 101:1234-44). 이들 방법의 유효성은 세포주, 분자 유형 및 배지 환경에 특이적이며, 전형적으로 시행착오에 의해 얻어진다. 추가적으로, 이들 방법은 또한 항체 생산성, 세포 배양물 거동 및 다른 항체 품질 속성을 변용시키는 경향이 있다.

[0006] CHO 생성 배양물 성능 및 항체 수율을 손상시키는 일 없이, mAb에 대해 고수준 만노스 글리코폼(특히 만노스5)을 조절할 수 있는 메커니즘을 동정할 필요가 여전히 존재한다. 이러한 방법은 치료적 단백질의 공정 개발에 유익할 것이다. 본 발명은 N-글리코실화 경로에 수반되는 단백질의 발현 수준을 조작함으로써 고수준 만노스 글리코폼 함량을 조절하는 방법을 제공한다.

발명의 내용

[0007] 본 발명은 N-글리코실화 경로에 수반되는 단백질을 과발현시키기 위해 숙주 세포를 형질감염시키는 단계를 포함하는 포유류 세포 배양 공정 동안 재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량을 조절하는 방법을 제공한다. 본 발명은 포유류 세포 배양 공정 동안 재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량을 감소시키는 방법을 추가로 제공한다. 일 실시형태에서, 단백질은 N-아세틸-글루코사미닐트랜스퍼라제-1(Mgat1에 의해 암호화됨)이고; 본 발명의 다른 실시형태에서, 단백질은 N-아세틸-글루코사미닐트랜스퍼라제-2(Mgat2에 의해 암호화됨)이다. 본 발명의 추가 실시형태에서, 단백질은 UDP-갈락토스 수송체(Slc35a2에 의해 암호화됨)이다.

[0008] 본 발명의 추가 실시형태는 앞서 언급한 단백질의 조합물을 포함하는 N-글리코실화 경로에 수반되는 2 이상의 단백질을 과발현시키기 위해 숙주 세포의 형질감염을 포함한다. 일 실시형태에서, 숙주 세포는 Mgat1 및 Mgat2에 의해 형질감염되고; 다른 실시형태에서, 숙주 세포는 Mgat1 및 Slc35a2에 의해, Mgat2 및 Slc35a2에 의해, 또는 Mgat1, Mgat2 및 Slc35a2에 의해 형질감염된다.

- [0009] 본 발명은 또한 재조합 단백질을 발현시키기 위해 먼저 형질감염된 숙주 세포주의 형질감염을 제공한다. 일 실시형태에서, 재조합 단백질은 항체 Fc 영역을 포함하는 단백질이다. 추가 실시형태는 Fc 융합 단백질, 항체, 면역글로불린 및 펩티바디로 이루어진 군으로부터 선택된 재조합 단백질을 발현시키는 숙주 세포를 포함한다.
- [0010] 추가 실시형태에서, 숙주 세포는 처음에 Mgat1, Mgat2 및 S1c35a2 중 하나 이상을 과발현시키도록 형질감염되고, 이어서, 재조합 단백질을 발현시키도록 형질감염된다. 일 실시형태에서, 재조합 단백질은 항체 Fc 영역을 포함하는 단백질이다. 추가 실시형태는 Fc 융합 단백질, 항체, 면역글로불린 및 펩티바디로 이루어진 군으로부터 선택된 재조합 단백질의 발현을 포함한다.
- [0011] 선택적으로, 본 발명은 추가로 세포 배양에 의해 생성된 재조합 단백질을 채취하는 단계를 포함한다. 추가 실시 형태에서, 세포 배양에 의해 생성된 재조합 단백질은 정제되고, 약제학적으로 허용가능한 제제로 제형화된다.
- [0012] 추가 실시형태에서, 재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량은 배양에 의해 생성된 것에 비해 감소되며, 여기서 세포는 N-연결 글리코실화에 수반되는 단백질을 과발현시키기 위해 형질감염에 의해 조작되지 않는다. 일 실시형태에서, 고수준 만노스 글리칸 종은 만노스5(Man5)이다. 다른 실시형태에서, 고수준 만노스 글리칸 종은 만노스6(Man6), 만노스7(Man7), 만노스8(만노스8a 및 8b; Man8a 및 8b를 포함), 또는 만노스9(Man9)이다. 추가 실시형태에서, 고수준 만노스 글리칸 종은 Man5, Man6, Man7, Man8a, Man8b 및/또는 Man9의 혼합물을 포함한다.
- [0013] 본 발명은 재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량이 감소되는 추가 실시형태를 제공한다. 추가 실시형태에서, 재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량은 5% 이하이다. 다른 실시형태에서, 재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량은 10% 이하이다. 추가 실시형태에서, 본 발명의 세포 배양에 의해 생성된 재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량은 6, 7, 8, 9 또는 10% 미만이다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 세포 배양에 의해 생성된 재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량은 0.5, 1, 2, 3, 4 또는 5%이다. 추가 실시형태는 12% 미만, 15% 미만, 20% 미만 또는 30%, 40% 또는 50% 미만의 고수준 만노스 글리코폼 함량을 포함한다.
- [0014] 추가 실시형태는 배취(batch) 또는 유가(fed-batch) 배양의 사용 및 관류 배양의 사용을 포함한다. 일 실시형태에서, 배양물은 교변 접선 유동(alternating tangential flow: ATF)을 이용하여 관류된다.
- [0015] 본 명세서에 기재된 본 발명의 임의의 실시형태에 조합하여, 필요하다면 배양 용기에 거품억제제가 첨가될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, pH를 목적으로 하는 설정값에서 유지하기 위해 1M 탄산나트륨 또는 다른 적합한 염기가 사용된다.
- [0016] 본 명세서에 기재한 바와 같이, 본 발명의 일 양태에서, 세포 배양은 관류에 의해 유지될 수 있다. 일 실시형태에서 관류는 세포 배양의 제1일에 또는 약 제1일에 내지 제9일에 또는 약 제9일에 시작한다. 관련된 실시형태에서, 관류는 세포 배양의 제3일에 또는 약 제3일에 내지 제7일에 또는 약 제7일에 시작한다. 일 실시형태에서, 관류는 세포가 생성기에 도달되었을 때 시작한다. 본 발명의 추가 실시형태에서, 관류는 교변 접선 유동에 의해 달성된다. 관련된 실시형태에서, 관류는 울트라필터 또는 마이크로필터를 이용하여 교변 접선 유동에 의해 달성된다.
- [0017] 본 발명의 추가 실시형태는 지속적 관류를 제공하고; 또한 추가 실시형태에서, 관류 속도는 일정하다. 본 발명의 일 실시형태는 1일당 1.0 이하의 작업 용적의 속도로 수행되는 관류를 제공한다. 관련된 실시형태에서, 관류는 세포 배양 동안 1일당 0.25 작업 용적으로부터 1일당 1.0 작업 용적까지의 생성기 동안 증가되는 속도로 수행된다. 다른 관련된 실시형태에서 관류는 세포 배양의 제9일 내지 제11일에 1일당 1.0 작업 용적에 도달하는 속도로 수행된다. 다른 관련된 실시형태에서 관류는 세포 배양의 제10일에 1일당 1.0 작업 용적에 도달하는 속도로 수행된다.
- [0018] 일 실시형태에서, 세포 배양물은 배양의 제3일 내지 제7일 전에 볼루스 세포 배양 배지 공급물을 받는다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 양태에서, 세포 배양은 유가 배양에 의해 유지된다. 유가 배양의 일 실시형태에서, 배양은 생성 동안 3회 공급된다. 추가 실시형태에서, 배양은 제2일 내지 제4일에, 제5일 내지 제7일에, 그리고 제8일 내지 제10일에 공급된다. 다른 실시형태는 배양물이 생성 동안 4회 공급되는 유가 배양 방법을 제공한다. 또한 추가 실시형태에서, 배양은 제2일 내지 제4일에, 제5일 내지 제6일에, 제7일 내지 제8일에, 그리고 제8일 내지 제10일에 공급된다.
- [0020] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 포유류 세포 배양은 무혈청 배양 배지에서 적어도 0.5×10^6 내지 3.0×10^6 세포/ mL 로 생물반응기를 접종시킴으로써 확립된다. 대안의 또는 추가 실시형태에서, 포유류 세포 배양은 무혈청

배양 배지에서 적어도 0.5×10^6 내지 1.5×10^6 세포/ mL 로 생물반응기를 접종함으로써 확립된다.

[0021] 본 발명은 추가로 배양 동안 온도 이동을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 온도 이동은 36°C 내지 31°C이다. 일 실시형태에서, 본 발명은 추가로 36°C 내지 33°C의 온도 이동을 포함한다. 관련된 실시형태에서, 온도 이동은 성장기와 생성기 사이의 전이 시 일어난다. 관련된 실시형태에서, 온도 이동은 생성기 동안 일어난다.

[0022] 다른 실시형태에서, 본 발명은 추가로 L-아스파라긴 기아에 의해 세포성장-저지를 유도하는 단계 다음에 L-아스파라긴 농도가 5mM 이하인 무혈청 관류 배지에 의한 관류 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 추가로 L-아스파라긴 농도가 5mM 이하인 무혈청 관류 배지를 이용하여 관류에 의해 세포 성장 저지를 유도하는 단계를 포함한다. 관련된 실시형태에서, 무혈청 관류 배지에서 L-아스파라긴의 농도는 5mM 이하이다. 관련된 실시형태에서, 무혈청 관류 배지에서 L-아스파라긴의 농도는 4.0mM 이하이다. 관련된 실시형태에서, 무혈청 관류 배지에서 L-아스파라긴의 농도는 3.0mM 이하이다. 관련된 실시형태에서, 무혈청 관류 배지에서 L-아스파라긴의 농도는 2.0mM 이하이다. 관련된 실시형태에서, 무혈청 관류 배지에서 L-아스파라긴의 농도는 1.0mM 이하이다. 관련된 실시형태에서, 무혈청 관류 배지에서 L-아스파라긴의 농도는 0mM이다. 관련된 실시형태에서, 세포 배양 배지의 L-아스파라긴 농도는 L-아스파라긴 기아 전에 및 기아 동안 모니터링된다.

[0023] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 생성기 동안의 압축세포용적이 35% 이하인 것을 포함한다. 관련된 실시형태에서, 압축세포용적은 35% 이하이다. 관련된 실시형태에서, 압축세포용적은 30% 이하이다.

[0024] 관련된 실시형태에서, 35% 이하의 압축세포용적에서 포유류 세포 배양물의 생존 세포 밀도는 10×10^6 개 생존 세포/ mL 내지 80×10^6 개 생존 세포/ mL 이다. 다른 실시형태에서, 포유류 세포 배양물의 생존 세포 밀도는 20×10^6 개 생존 세포/ mL 내지 30×10^6 개 생존 세포/ mL 이다.

[0025] 또 다른 실시형태에서, 생물반응기는 용량이 적어도 500 ℓ 이다. 또 다른 실시형태에서, 생물반응기는 용량이 적어도 500 ℓ 내지 2000 ℓ 이다. 또 다른 실시형태에서, 생물반응기는 용량이 적어도 1000 ℓ 내지 2000 ℓ 이다.

[0026] 또 다른 실시형태에서, 포유류 세포는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포이다. 또 다른 실시형태에서, 재조합 단백질은 인간 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 재조합 융합 단백질 또는 사이토카인으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 실시예 2에서 유가 배양의 제1 세트에 대해 사용된 세포주에 대한 계대 동안 배가시간에서의 클론 생존도를 도시한 도면. 이 실시예에서, MAb B를 발현시키는 세포주로부터의 세포를 형질감염시켜 Mgat1, Mgat2 및/또는 S1c35A2를 과발현시켰다. M1M2는 Mgat1 및 Mgat2(속이 찬 원으로 표시한 개개 클론)를 과발현시키는 세포주를 표시하고; M1M2S는 Mgat1, Mgat2 및 S1c35a2(속이 빈 삼각형으로 표시한 개개 클론)를 과발현시키는 세포주를 표시하며; S는 S1c35A2(속이 찬 정사각형으로 표시한 개개 클론)를 과발현시키는 세포주를 표시한다. 대조군 세포(속이 빈 정사각형으로 표시한 개개 클론)는 빈 벡터로 형질감염시켰다. 중앙의 박스는 1/4 분위수(Q1) 내지 3/4 분위수(Q3)에 걸쳐 있으며, 박스의 높이는 사분범위(IQR)이고, 박스 안쪽의 밴드는 중앙값이며, 값이 Q3+1.5IQR을 초과하지 않는다면, 상부 위스커(wisker)는 Q3으로부터 Q3+1.5IQR 미만에 속하는 가장 큰 값 또는 최대값까지 연장된다. Q1-1.5IQR 미만인 것이 없다면, 하부 위스커는 Q1으로부터 Q1-1.5IQR에 속하는 가장 작은 값 또는 최소값까지 연장된다.

도 2는 실시예 2에서 유가 배양 세포의 제2 세트에 대해 사용된 세포주에 대한 계대 동안 배가시간에서의 클론 생존도를 도시한 도면. 이 실시예에서, MAb B를 발현시키는 세포주로부터의 세포를 형질감염시켜 Mgat1, Mgat2 및/또는 S1c35A2를 과발현시켰다. M1M2는 Mgat1 및 Mgat2를 과발현시키는 세포주를 표시하고; M1M2S는 Mgat1, Mgat2 및 S1c35a2를 과발현시키는 세포주를 표시하며; S는 S1c35A2를 과발현시키는 세포주를 표시한다. 대조군 세포는 빈 벡터로 형질감염시켰다. 개개의 클론을 도 1에 대해 기재한 바와 같이 표시하고; 각각의 박스에 대한 매개변수는 도 1에 대해 기재한 것과 동일하다.

도 3은 생존 세포 밀도에 관해 나타낸 성장이 실시예 2에 기재한 제2 유가 배양 실험의 제10일에 대조군에 비해 모든 과발현된 세포주(M1M2, M1M2S 및 S)와 비슷하다는 것을 제시한 도면. 각각의 박스에서 개개 값은 또한 관찰된 클론 생존도를 도시한다. 개개 클론을 도 1에 대해 기재한 바와 같이 표시하고; 각각의 박스에 대한 매개변수는 도 1에 대해 기재한 것과 동일하다.

도 4는 실시예 2에 기재된 제2 유가 배양 실험 동안 생성된 항체 역가의 클론 생존도의 비교를 제시한 도면. 개개 클론을 도 1에 대해 기재한 바와 같이 표시하고; 각각의 박스에 대한 매개변수는 도 1에 기재한 것과 동일하다.

도 5는 실시예 2에 기재한 제2 유가 배양 실험 동안 생성된 항체의 구체적 생성률에서 클론 생존도를 도시한 도면. 개개 클론을 도 1에 기재한 바와 같이 표시하고; 각각의 박스에 대한 매개변수는 도 1에 기재한 것과 동일하다.

도 6은 실시예 2에 기재된 제2 유가 배양 실험 동안 생성된 항체에 대한 클론 생존도(HM%)의 표시를 제공한 도면. 개개 클론을 도 1에 기재한 바와 같이 표시하고; 각각의 박스에 대한 매개변수는 도 1에 기재한 것과 동일하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028]

본 출원에서 사용되는 용어는 당업계 내에서 표준이지만, 청구범위 의미의 분명함 및 명확성을 보장하기 위해 특정 용어의 정의가 본 명세서에서 제공된다. 단위, 접두사 및 기호는 그들의 SI(단위의 국제 시스템) 협용 형태로 나타낼 수 있다. 본 명세서에 인용된 수치 범위는 범위를 정하는 숫자를 포함하며, 정해진 범위 내의 각각의 정수를 뒷받침한다. 본 명세서에 기재된 방법 및 기법은 일반적으로 당업계에 잘 공지된 통상적인 방법에 따라 그리고 달리 표시되지 않는 한 본 명세서 전체적으로 인용 및 논의되는 다양한 일반적이고 더 구체적인 참고문헌에 기재된 바와 같이 수행된다. 예를 들어, 문헌[Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) 및 Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), 및 Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)] 참조.

[0029]

개시된 방법은 교반 탱크 반응기(전통적인 배취 및 유가 배양 세포 배양물을 포함, 교반 필터를 포함할 수도 있지만 포함할 필요는 없음), 관류 시스템(교번 접선 유동("ATF") 배양, 음향 관류 시스템, 깊이 필터(depth filter) 관류 시스템 및 다른 시스템을 포함함), 중공사 생물반응기(HFB, 이 경우에 관류 공정에서 사용될 수 있음)뿐만 아니라 다양한 다른 세포 배양 방법(예를 들어, 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 문헌[Tao *et al.*, (2003) *Biotechnol. Bioeng.* 82:751-65; Kuystermans & Al-Rubeai, (2011) "Bioreactor Systems for Producing Antibody from 포유류 Cells" in Antibody Expression and Production, Cell Engineering 7:25-52, Al-Rubeai (ed) Springer; Catapano *et al.*, (2009) "Bioreactor Design and Scale-Up" in Cell and Tissue Reaction Engineering: Principles and Practice, Eibl *et al.* (eds) Springer-Verlag] 참조)에서의 부착 배양 또는 혼탁 배양에 적용 가능하다.

[0030]

특히, 특히 출원, 논문, 책 및 조약을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 본 출원에 인용된 모든 문헌 또는 문헌의 일부는 본 명세서에 명확하게 참고로 포함된다. 본 발명의 실시형태에 기재된 것은 본 발명의 다른 실시형태에 조합될 수 있다.

[0031]

정의

[0032]

본 명세서에서 사용되는 단수의 용어는 달리 구체적으로 표시되지 않는 한 하나 이상의 의미한다. 추가로, 문맥에 의해 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함할 것이며, 복수 용어는 단수를 포함할 것이다. 일반적으로, 본 명세서에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학 및 혼성화와 관련되어 사용되는 명명법 및 기법은 당업계에 잘 공지되고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0033]

본 개시내용은 "관심 대상의 단백질"을 발현시키는 세포의 특성을 조절하는 방법을 제공하며, "관심 대상의 단백질"은 천연 유래 단백질, 재조합 단백질, 및 공학 처리된 단백질(예를 들어, 천연에서 발생하지 않고 인간에 의해 설계되고/되거나 생성된 단백질)을 포함한다. 관심 대상의 단백질은 치료적으로 적절한 것으로 알려져 있거나 또는 치료적으로 적절한 것으로 의심되는 단백질일 수 있지만, 그런 단백질일 필요는 없다. 관심 대상의 단백질의 특정 예는 항원 결합 단백질(본 명세서에 기재되고 정의됨), 웹타이드(즉, 항체의 Fc 도메인과 같은 다른 분자에 직접적으로 또는 간접적으로 융합된 웹타이드(들)를 포함하는 분자, 여기서 웹타이드 모이아티는 목적으로 하는 표적에 특이적으로 결합하며; 웹타이드(들)는, 예를 들어 본 명세서에 전문이 참고로 포함된 미국 특허 출원 공개 제2006/0140934호에 기재된 바와 같은 Fc 영역에 융합되거나 또는 Fc-루프 또는 변형된 Fc 분자 내로 삽입될 수 있음), 융합 단백질(예를 들어, Fc 융합 단백질, 여기서, Fc 단편은 웹타이드를 포함하는 단백질 또는 웹타이드에 융합됨), 사이토카인, 성장 인자, 호르몬 및 다른 천연 유래 분비 단백질뿐만 아니라

천연 유래 단백질의 돌연변이체 형태를 포함한다.

[0034]

용어 "항원 결합 단백질"은 그의 가장 넓은 의미로 사용되고, 항원 또는 표적에 결합하는 부분, 몇 선택적으로 항원 결합 부분이 항원에 대한 항원 결합 단백질의 결합을 촉진시키는 입체구조를 채택하게 하는 스캐폴드 또는 프레임워크 부분을 포함하는 단백질을 의미한다. 항원 결합 단백질의 예는 인간 항체, 인간화된 항체; 키메라 항체; 재조합 항체; 단쇄 항체; 다이어바디; 트라이어바디; 테트라바디; Fab 단편; $F(ab')_2$ 단편; IgG 항체; IgE 항체; IgM 항체; IgG1 항체; IgG2 항체; IgG3 항체; 또는 IgG4 항체 및 이의 단편을 포함한다. 항원 결합 단백질은, 예를 들어, 접합된 CDR 또는 CDR 유도체를 지니는 대안의 단백질 스캐폴드 또는 인공 스캐폴드를 포함할 수 있다. 이러한 스캐폴드는, 예를 들어, 항원 결합 단백질뿐만 아니라, 예를 들어, 생체에 적합한 중합체를 포함하는 전적으로 합성인 스캐폴드의 3차원 구조를 안정화시키기 위해 도입된 돌연변이를 포함하는 항체-유래 스캐폴드를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌[Korndorfer et al., 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 53(1):121-129 (2003); Roque et al., *Biotechnol. Prog.* 20:639-654 (2004)] 참조. 추가로, 웹타이드 항체 모방체("PAM")뿐만 아니라 스캐폴드로서 피브로넥틴 구성성분을 이용하는 항체 모방체에 기반한 스캐폴드가 사용될 수 있다.

[0035]

항원 결합 단백질은, 예를 들어 천연 유래 면역글로불린의 구조를 가질 수 있다. "면역글로불린"은 4량체 분자이다. 천연 유래 면역글로불린에서, 각각의 4량체는 폴리펩타이드 쇄의 2개의 동일한 쌍으로 구성되며, 각각의 쌍은 하나의 "경" 쇄(약 25kDa) 및 하나의 "중" 쇄(약 50 내지 70kDa)를 가진다. 각각의 쇄의 아미노-말단 부분은 주로 항원 인식을 초래하는 약 100 내지 110개 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함한다. 각각의 쇄의 카복시-말단 부분은 주로 효과기 기능을 초래하는 불변 영역을 나타낸다. 인간 경쇄는 카파 및 람다 경쇄로서 분류된다. 중쇄는 뮤, 델타, 갑마, 알파 또는 엡실론으로서 분류되고, 각각 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE로서 항체의 아이소타입을 나타낸다.

[0036]

천연 유래 면역글로불린 쇄는 또한 상보성 결정 영역 또는 CDR로 불리는 3개의 초가변 영역에 의해 결합된 상대적으로 보존된 프레임워크 영역(FR)의 동일한 일반적 구조를 나타낸다. N-말단으로부터 C-말단까지, 경쇄와 중쇄는 둘 다 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함한다. 각각의 도메인에 대한 아미노산의 배치는 문헌[Kabat et al. in Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, (1991)]에 따라 행해질 수 있다. 요망된다면, CDR은 코티아(Chothia) 명명법과 같은 대안의 명명 계획에 따라 재정립될 수 있다(문헌[Chothia & Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia et al., (1989) *Nature* 342:878-883 또는 Honegger & Pluckthun, (2001) *J. Mol. Biol.* 309:657-670] 참조).

[0037]

본 개시내용과 관련하여, 해리 상수(K_D)가 $\leq 10^{-8}$ M일 때, 항원 결합 단백질은 그의 표적 항원에 "특이적으로 결합"되거나 또는 "선택적으로 결합"되는 것으로 언급된다. K_D 가 $\leq 5 \times 10^{-9}$ M일 때, 항체는 "고친화도"로 항원에 특이적으로 결합하고, K_D 가 $\leq 5 \times 10^{-10}$ M일 때, "매우 고친화도"를 가진다.

[0038]

용어 "항체"는 달리 구체화되지 않는 한, 임의의 아이소타입 또는 하위분류의 글리코실화된 면역글로불린과 비글리코실화된 면역글로불린에 대한 언급 또는 특이적 결합에 대해 무결함 항체와 경쟁하는 이의 항원 결합 영역에 대한 언급을 포함한다. 추가적으로, 용어 "항체"는, 달리 구체화되지 않는 한, 무결함 면역글로불린 또는 특이적 결합에 대해 무결함 항체와 경쟁하는 이의 항원 결합 부분을 지칭한다. 항원 결합 부분은 재조합 DNA 기법에 의해 또는 무결함 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생성될 수 있으며, 관심 대상의 단백질의 구성요소를 형성할 수 있다. 항원 결합 부분은, 특히 Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, 도메인 항체(dAb), 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 단편, 단쇄 항체(scFv), 키메라 항체, 다이어바디, 트라이어바디, 테트라바디 및 폴리펩타이드에 대한 특이적 항원 결합을 부여하기에 충분한 면역글로불린의 적어도 일부를 함유하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0039]

Fab 단편은 V_L , V_H , C_L 및 C_H1 도메인을 갖는 1가 단편이고; $F(ab')_2$ 단편은 헌지 영역에서 이황화 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 갖는 2가 단편이며; Fd 단편은 V_H 및 C_H1 도메인을 가지고; Fv 단편은 항체의 단일 암(arm)의 V_L 및 V_H 도메인을 가지며; dAb 단편은 V_H 도메인, V_L 도메인 또는 V_L 도메인의 항원 결합 단편을 가진다(미국 특허 제6,846,634호, 제6,696,245호, 미국 특허 출원 공개 제05/0202512호, 제04/0202995호,

제04/0038291호, 제04/0009507호, 제03/0039958호, 문헌[Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546]).

[0040] 단쇄 항체(scFv)는 V_L 및 V_H 영역이 링커(예를 들어, 아미노산 잔기의 합성 서열)를 통해 결합되어 연속적 단백질 쇄를 형성하는 항체이며, 여기서, 링커는 단백질 쇄가 그 자체에서 다시 접하고 1가 항원 결합 부위를 형성하게 하는데 충분히 길다(예를 들어, 문헌[Bird et al., *Science* 242:423-26 (1988) 및 Huston et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83] 참조). 다이어바디는 2개의 폴리펩타이드 쇄를 포함하는 2가 항체이 되, 각각의 폴리펩타이드 쇄는 동일한 쇄 상에서 두 도메인 사이에서 짹지어지는데 너무 짧고, 따라서 각각의 도메인이 다른 폴리펩타이드 쇄 상에서 상보적 도메인과 짹지어지게 하는 링커에 의해 결합되는 V_H 및 V_L 도메인을 포함한다(예를 들어, 문헌[Holliger et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-48; 및 Poljak et al., (1994) *Structure* 2:1121-23] 참조). 다이어바디의 2개의 폴리펩타이드 쇄가 동일하다면, 그들의 쌍으로부터 초래된 다이어바디는 2개의 동일한 항원 결합 부위를 가질 것이다. 상이한 서열을 갖는 폴리펩타이드 쇄는 다이어바디가 2개의 상이한 항원 결합 부위를 지니게 하기 위해 사용될 수 있다. 유사하게, 트라이바디 및 테트라바디는, 동일 또는 상이할 수 있는, 각각 3개 및 4개의 폴리펩타이드 쇄를 포함하고, 각각 3개 및 4개의 항원 결합 부위를 형성하는 항체이다.

[0041] 하나 이상의 CDR은 공유적으로 또는 비공유적으로 분자에 혼입되어 그것을 항원 결합 단백질로 만들 수 있다. 항원 결합 단백질은 더 큰 폴리펩타이드 쇄의 부분으로서 CDR(들)을 혼입시킬 수 있고, CDR(들)을 다른 폴리펩타이드 쇄에 공유적으로 연결할 수 있거나, 또는 CDR(들)을 비공유적으로 혼입시킬 수 있다. CDR은 항원 결합 단백질이 관심 대상의 특정 항원에 특이적으로 결합되게 한다.

[0042] 항원 결합 단백질은 하나 이상의 결합 부위를 가질 수 있다. 하나 초과의 결합 부위가 있다면, 결합 부위는 서로 동일할 수 있고 또는 상이할 수 있다. 예를 들어, 천연 유래 인간 면역글로불린은 전형적으로 2개의 동일한 결합 부위를 갖는 반면, "이중특이성" 또는 "2작용성" 항체는 2개의 상이한 결합 부위를 가진다.

[0043] 명확함의 목적을 위해 그리고 본 명세서에 기재한 바와 같이, 항원 결합 단백질은 인간 유래(예를 들어, 인간 항체)일 수 있지만, 그럴 필요는 없고, 일부 경우에 비인간 단백질, 예를 들어 래트 또는 뮤린 단백질을 포함할 것이고, 다른 경우에, 항원 결합 단백질은 인간 및 비인간 단백질(예를 들어, 인간화된 항체)의 혼성체를 포함할 수 있다는 것이 주목된다.

[0044] 관심 대상의 단백질은 인간 항체를 포함할 수 있다. 용어 "인간 항체"는 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 하나 이상의 가변 및 불변 영역을 갖는 모든 항체를 포함한다. 일 실시형태에서, 모든 가변 및 불변 도메인은 인간 면역글로불린 서열(완전한 인간 항체)로부터 유래된다. 이러한 항체는 인간 중쇄 및/또는 경쇄 암호화 유전자로부터 유래된 항체를 발현시키도록 유전자 변형된 마우스, 예컨대 제노마우스(Xenomouse)(등록상표), 울티맙(UltiMab)(상표명) 또는 벨로시뮨(Velocimmune)(등록상표) 시스템으로부터 유래된 마우스의 관심 대상의 항원에 의한 면역화를 통하는 것을 비롯한 다양한 방법으로 제조될 수 있다. 과거 기반 접근이 또한 사용될 수 있다.

[0045] 대안적으로, 관심 대상의 단백질은 인간화된 항체를 포함할 수 있다. "인간화된 항체"는 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 및/또는 첨가에 의해 비인간 종으로부터 유래된 항체의 서열과 상이한 서열을 가지므로, 인간화된 항체는 그것이 인간 대상체에게 투여될 때, 비인간 종 항체에 비해 면역반응을 유도할 가능성이 더 적고/적거나, 덜 심한 면역 반응을 유도한다. 일 실시형태에서, 비인간 종 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 프레임 워크 및 불변 도메인(들)은 비인간 종의 가변 도메인(들)에 융합된다. 인간화된 항체의 제조방법의 예는 미국 특허 제6,054,297호, 제5,886,152호 및 제5,877,293호에서 발견할 수 있다.

[0046] 본 명세서에서 사용되는 용어로서 "Fc" 영역은 항체의 C_{H2} 및 C_{H3} 도메인을 포함하는 2개의 중쇄 단편을 포함한다. 2개의 중쇄 단편은 2 이상의 이황화 결합에 의해 그리고 C_{H3} 도메인의 소수성 상호작용에 의해 함께 보유된다. 항원 결합 단백질 및 Fc 융합 단백질을 포함하는 Fc 영역을 포함하는 관심 대상의 단백질은 본 개시내용의 다른 양상을 형성한다.

[0047] "헤미바디(hemibody)"는 완전 중쇄, 완전 경쇄 및 완전 중쇄의 Fc 영역과 짹지어진 제2 중쇄 Fc 영역을 포함하는 면역학적으로 기능성인 면역글로불린 작제물이다. 링커는 중쇄 Fc 영역 및 제2 중쇄 Fc 영역을 결합시키기 위해 사용될 수 있지만, 그럴 필요는 없다. 특정 실시형태에서, 헤미바디는 본 명세서에 개시된 항원 결합 단백질의 1가 형태이다. 다른 실시형태에서, 하전 잔기의 쌍은 하나의 Fc 영역을 제2 Fc 영역과 결합하기 위해 사용

될 수 있다. 헤미바디는 본 개시내용과 관련하여 관심 대상의 단백질일 수 있다.

[0048] 용어 "속주 세포"는 핵산 서열에 의해 형질감염되었거나, 또는 형질감염될 수 있고, 이에 의해 관심 대상의 유전자를 발현시킬 수 있는 세포를 의미한다. 상기 용어는, 관심 대상의 유전자가 존재한다면, 자손이 본래 모 세포에 대한 형태와 또는 유전적 구성과 동일하든 아니든 모 세포의 자손을 포함한다. 세포 배양물은 하나 이상의 속주 세포를 포함할 수 있다.

[0049] 용어 "혼성세포"는 불멸 세포 및 항체 생성 세포의 융합으로부터 초래된 세포 또는 세포의 자손을 의미한다. 언어진 혼성세포는 항체를 생성하는 불멸 세포이다. 혼성세포를 생성하기 위해 사용되는 개개 세포는 햄스터, 래트, 돼지, 토끼, 양, 염소 및 인간을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 임의의 포유류 공급원으로부터 유래될 수 있다. 상기 용어는 또한 이종혼성체 골수종의 자손이 융합될 때 초래되고, 인간 세포와 뮤린 골수종 세포주 사이의 융합 산물이며, 후속적으로 혈장 세포와 융합하는 트리오마(trioma) 세포주를 포함한다. 상기 용어는, 예를 들어, 쿼드로마(quadroma)와 같은 항체를 생성하는 임의의 불멸 혼성 세포주를 포함하는 것으로 의미된다 (예를 들어, 문헌[Milstein et al., (1983) *Nature*, 537:3053] 참조).

[0050] 용어 "배양물"과 "세포 배양물"은 상호호환적으로 사용되며, 세포 집단의 생존 및/또는 성장에 적합한 조건 하에서 배지에서 유지되는 세포 집단을 지칭한다. 당업자에게 분명할 바와 같이, 이를 용어는 또한 세포 집단 및 집단이 혼탁되는 배지를 포함하는 조합물을 지칭한다.

[0051] 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"(예를 들어, 관심 대상의 단백질 또는 관심 대상의 폴리펩타이드와 관련하여 사용됨)은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 본 명세서에서 상호호환적으로 사용된다. 상기 용어는 또한 하나 이상의 아미노산 잔기가 대응하는 천연 유래 아미노산의 유사체 또는 모방체인 아미노산 중합체뿐만 아니라 천연 유래 아미노산 중합체에 적용될 수 있다. 상기 용어는 또한, 예를 들어 당단백질을 형성하기 위해 탄수화물 잔기의 첨가에 의해 변형되었거나 또는 인산화된 아미노산 중합체를 포함할 수 있다. 폴리펩타이드 및 단백질은 천연 유래 및 비제조합 세포에 의해 생성될 수 있고, 또는 폴리펩타이드 및 단백질은 유전자 공학 처리된 세포 또는 재조합 세포에 의해 생성될 수 있다. 폴리펩타이드 및 단백질은 천연 단백질의 아미노산 서열을 갖는 문자, 또는 천연 서열의 하나 이상의 아미노산으로부터의 결실, 첨가 및/또는 치환을 갖는 문자를 포함할 수 있다.

[0052] 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 단지 천연 유래 아미노산을 포함하는 문자뿐만 아니라 비천연 유래 아미노산을 포함하는 문자를 포함한다. 비천연 유래 아미노산(요망된다면, 본 명세서에 개시된 임의의 서열에서 발견되는 임의의 천연 유래 아미노산으로 치환될 수 있음)의 예는 4-하이드록시프롤린, γ-카복시글루타메이트, ε-N,N,N-트라이메틸라이신, ε-N-아세틸라이신, O-포스포세린, N-아세틸세린, N-포밀메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-하이드록시라이신, σ-N-메틸아르기닌, 및 다른 유사한 아미노산 및 이미노산(예를 들어, 4-하이드록시프롤린)을 포함한다. 본 명세서에서 사용된 폴리펩타이드 표기법에서, 표준 사용 및 관습에 따르면, 좌선 방향은 아미노 말단 방향이고, 우선 방향은 카복시 말단 방향이다.

[0053] 단백질 또는 폴리펩타이드 서열 내로 삽입될 수 있거나 또는 단백질 또는 폴리펩타이드 서열에서 야생형 잔기로 치환될 수 있는 비천연 유래 아미노산의 예의 비제한적 열거는 β-아미노산, 호모아미노산, 환식 아미노산 및 유도체화된 측쇄를 지니는 아미노산을 포함한다. 예는 (L-형 또는 D-형으로; 삽입어구에서와 같이 약칭됨) 시트룰린(Cit), 호모시트룰린(hCit), N α -메틸시트룰린(NMeCit), N α -메틸호모시트룰린(N α -MeHoCit), 오르니틴(Orn), N α -메틸오르니틴(N α -MeOrn 또는 NMeOrn), 사르코신(Sar), 호모라이신(hLys 또는 hK), 호모아르기닌(hArg 또는 hR), 호모글루타민(hQ), N α -메틸아르기닌(NMeR), N α -메틸류신(N α -MeL 또는 NMeL), N-메틸호모라이신(NMeHoK), N α -메틸글루타민(NMeQ), 노르류신(Nle), 노르발린(Nva), 1,2,3,4-테트라하이드로아이소퀴놀린(Tic), 옥타하이드로인돌-2-카복실산(Oic), 3-(1-나프틸)알라닌(1-Nal), 3-(2-나프틸)알라닌(2-Nal), 1,2,3,4-테트라하이드로아이소퀴놀린(Tic), 2-인단일글리신(IgI), 파라-요오도페닐알라닌(pI-Phe), 파라-아미노페닐알라닌(4AmP 또는 4-아미노-Phe), 4-구아니디노 페닐알라닌(Guf), 글리실라이신("K(N ϵ -글리실)" 또는 "K(글리실)" 또는 "K(gly)"으로 약칭), 나이트로페닐알라닌(nitrophe), 아미노페닐알라닌(aminophe 또는 아미노-Phe), 벤질페닐알라닌(benzylphe), γ-카복시글루탐산(γ-carboxyglu), 하이드록시프롤린(hydroxypro), p-카복실-페닐알라닌(Cpa), α-아미노아디프산(Aad), N α -메틸 발린(NMeVal), N-α-메틸 류신(NMeLeu), N α -메틸노르류신(NMeNle), 사이클로펜틸글리신(Cpg), 사이클로헥실글리신(Chg), 아세틸아르기닌(acetylarg), α,β-다이아미노프로피온산(Dpr), α,γ-다이아미노뷰티르산(Dab), 다이아미노프로피온산(Dap), 사이클로헥실알라닌(Cha), 4-메틸-페닐알라닌(MePhe), β,β-다이페닐-알라닌(BiPhA), 아미노뷰티르산(Abu), 4-페닐-페닐알라닌(또는 바이페닐알라닌; 4Bip), α-아미노-아이소뷰티르산(Aib), 베타-알라닌, 베타-아미노프로피온산, 피페르딘산 아미노카프

론산, 아미노헵탄산, 아미노페렐린산, 데스모신, 다이아미노페렐린산, N-에틸글리신, N-에틸아스파라긴, 하이드록시라이신, 알로-하이드록시라이신, 아이소데스모신, 알로-아이소류신, N-메틸글리신, N-메틸아이소류신, N-메틸발린, 4-하이드록시프롤린(Hyp), γ -카복시글루타메이트, ϵ -N,N,N-트라이메틸라이신, ϵ -N-아세틸라이신, O-포스포세린, N-아세틸세린, N-포밀메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-하이드록시라이신, ω -메틸아르기닌, 4-아미노-0-프탈산(4APA) 및 다른 유사한 아미노산 및 임의의 구체적으로 열거된 것의 유도체화된 형태를 포함한다.

[0054] "세포 배양물" 또는 "배양물"은 다세포 유기체 또는 조직 외부의 세포의 성장 및 증식을 의미한다. 포유류 세포에 대한 적합한 배양 조건은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어 문헌[*Animal cell culture: A Practical Approach*, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992)] 참조. 포유류 세포는 혼탁액 중에서 배양될 수 있고 또는 한편으로는 고체 기질에 부착될 수 있다. 마이크로담체가 있거나 또는 없는, 유동층 생물반응기, 중공사 생물반응기, 롤러 보틀, 진탕 플라스크 또는 교반 탱크 생물반응기가 사용될 수 있다. 일 실시 형태에서 500 l 내지 2000 l 생물반응기가 사용된다. 일 실시형태에서, 1000 l 내지 2000 l 생물반응기가 사용된다.

[0055] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "세포 배양 배지"(또한 "배양 배지", "세포 배양 배지", "조직 배양 배지"로 불림)는 성장하는 세포, 예를 들어 동물 또는 포유류 세포에 대해 사용되는 임의의 영양액을 지칭하며, 일반적으로 다음으로부터의 적어도 하나 이상의 구성성분을 제공한다: 에너지 공급원(보통 글루코스와 같은 탄수화물의 형태로); 모든 필수 아미노산 중 하나 이상, 그리고 일반적으로 20종의 염기성 아미노산 + 시스테인; 전형적으로 저농도로 필요한 비타민 및/또는 다른 유기 화합물; 지질 또는 유리 지방산; 및 미량 원소, 예를 들어, 전형적으로 매우 저농도로, 보통 마이크로몰 범위로 필요한 무기 화합물 또는 천연 유래 원소.

[0056] 영양액은 선택적으로 세포의 성장을 최적화하기 위해, 배양될 세포의 필요조건 및/또는 목적으로 하는 세포 배양물 매개변수에 따라서, 추가적인 선택적 구성성분, 예컨대 호르몬 및 다른 성장 인자, 예를 들어, 인슐린, 트랜스페린, 표피성장인자, 혈청 등; 염, 예를 들어, 칼슘, 마그네슘 및 인산염, 및 완충제, 예를 들어, HEPES; 뉴클레오사이드 및 염기, 예를 들어, 아데노신, 티미딘, 하이포크산틴; 및 단백질 및 조직 가수분해물, 예를 들어, 가수분해된 동물 또는 식물 단백질(동물 부산물, 정제된 젤라틴 또는 식물 물질로부터 얻을 수 있는 웨튼 또는 웨튼 혼합물); 항생제, 예를 들어, 젠타마이신; 세포 보호제 또는 계면활성제, 예컨대, 플루로닉(Pluronic)(등록상표) F68(또한 루트롤(Lutrol)(등록상표) F68 및 콜리포(Kolliphor)(등록상표) P188로서 지칭됨; 폴리옥시에틸렌(폴리(에틸렌 옥사이드))의 2개의 친수성 쇄에 측접된 폴리옥시프로필렌(폴리(프로필렌 옥사이드))의 중앙 소수성 쇄로 구성된 비이온성 트라이블록 공중합체; 폴리아민, 예를 들어, 배양될 세포의 필요조건 및/또는 요망되는 세포 배양물 매개변수에 따라서 푸트레신, 스페르미딘 및 스페르민(예를 들어, WIPO 공개 번호 WO 2008/154014 참조) 및 피루브산염(예를 들어 미국 특허 제8053238호 참조).

[0057] 세포 배양 배지는 전형적으로 임의의 세포 배양 공정, 예컨대 이하로 제한되는 것은 아니지만 배취, 확장된 배취, 유가 배양 및/또는 관류 또는 세포의 연속적 배양에서 사용되고/되거나 상기 임의의 세포 배양 공정과 함께 사용하기 위한 것으로 공지된 것을 포함한다.

[0058] "베이스"(또는 배취) 세포 배양 배지는 전형적으로 세포 배양을 개시하기 사용되고 세포 배양을 지원하기에 충분히 완전한 세포 배양 배지를 지칭한다.

[0059] "성장" 세포 배양 배지는 "성장기"인 대수 증식기 기간 동안 세포 배양물에서 전형적으로 사용되고, 이 단계 동안 세포 배양을 지원하기에 충분히 완전한 세포 배양 배지를 지칭한다. 성장 세포 배양 배지는 또한 숙주 세포 주내로 혼입된 선택가능한 마커에 대해 내성 또는 생존을 부여하는 선택 작용제를 함유할 수 있다. 이러한 선택 작용제는 제네티신(G4118), 네오마이신, 하이그로마이신 B, 퓨로마이신, 제오신, 메티오닌 세폭시민, 메토트렉세이트, 무글루타민 세포 배양 배지, 글리신, 하이포크산틴 및 티미딘이 없거나 또는 티미딘 단독의 세포 배양 배지를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0060] "생성" 세포 배양 배지는 대수 증식기가 끝나고 "이행기" 및/또는 "생성기"에 걸쳐 단백질 생성이 이어질 때, 이행 동안 세포 배양에서 전형적으로 사용되고, 이들 단계 동안 목적으로 하는 세포 밀도, 생존도 및/또는 생성물 역ガ를 유지하기에 충분히 완전한 세포 배양 배지를 지칭한다.

[0061] "관류" 세포 배양 배지는 관류 또는 연속적 배양 방법에 의해 유지되는 세포 배양에서 전형적으로 사용되고 이 공정 동안 세포 배양을 지원하기에 충분히 완전한 세포 배양 배지를 지칭한다. 관류 세포 배양 배지 제형은 소모 배지를 제거하기 위해 사용되는 방법을 제공하기 위해 베이스 세포 배양 배지 제형보다 풍부하게 되거나 또는 더 농축될 수 있다. 관류 세포 배양 배지는 성장기와 생성기 둘 다의 동안에 사용될 수 있다.

- [0062] 농축된 세포 배양 배지는 세포 배양을 유지하는데 필수적인 일부 또는 모든 영양분을 함유할 수 있고; 특히, 농축 배지는 세포 배양의 생성기의 공정 동안 소모될 것으로 동정되거나 또는 알려진 영양분을 함유할 수 있다. 농축 배지는 거의 모든 임의의 세포 배양 배지 제형에 기반할 수 있다. 이러한 농축 공급 배지는, 예를 들어, 그들의 정상적인 양의 약 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 30X, 50X, 100X, 200X, 400X, 600X, 800X 또는 심지어 약 1000X로 세포 배양 배지의 일부 또는 모든 구성성분을 함유할 수 있다.
- [0063] 세포 배양 배지를 준비하기 위해 사용되는 구성성분은 분말 배지 제형으로 완전히 분쇄될 수 있고; 필요하다면 세포 배양 배지에 첨가된 액체 보충물과 함께 부분적으로 분쇄될 수 있거나; 또는 완전히 액체 형태로 세포 배양물에 첨가된다.
- [0064] 세포 배양물은 또한 세포 배양물 중에서 제형화되기 어렵거나 또는 빠르게 고갈될 수 있는 특정 영양분의 독립적 농축 공급물로 보충될 수 있다. 이러한 영양분은 아미노산, 예컨대 타이로신, 시스테인 및/또는 시스틴일 수 있다(예를 들어, WIPO 공개 번호 2012/145682 참조). 일 실시형태에서, 타이로신의 농축 용액은 독립적으로 세포 배양물 내 타이로신의 농도가 8mM을 초과하지 않도록 타이로신을 함유하는 세포 배양 배지에서 성장된 세포 배양물에 공급된다. 다른 실시형태에서, 타이로신 및 시스틴의 농축 용액은 독립적으로 타이로신, 시스틴 또는 시스테인이 없는 세포 배양 배지에서 성장 중인 세포 배양물에 공급된다. 독립적 공급은 생성기 전에 또는 시작 시에 시작될 수 있다. 독립적 공급은 농축 공급 배지와 동일 또는 상이한 날에 세포 배양 배지에 유가 배양에 의해 수행될 수 있다. 독립적 공급은 또한 관류 배지와 동일 또는 상이한 날에 관류될 수 있다.
- [0065] "무혈청"은 동물 혈청, 예컨대 소 태아 혈청을 함유하지 않는 세포 배양 배지에 적용된다. 정의된 배양 배지를 포함하는 다양한 조직 배양 배지는 상업적으로 입수 가능하며, 예를 들어, 특히 다음의 세포 배양 배지 중 하나 또는 조합물: RPMI-1640 배지, RPMI-1641 배지, 둘베코 변형 이글 배지(DMEM), 최소 필수 배지 이글, F-12K 배지, 함(Ham's) F12 배지, 이스코브 변형 둘베코 배지, 맥코이 5A 배지, 레보비츠's L-15 배지, 및 무혈청 배지, 예컨대 EX-CELL(상표명) 300 시리즈(JRH 바이오사이언시즈(JRH Biosciences), 캔자스주 르넥사에 소재)가 사용될 수 있다. 이러한 배양 배지의 무혈청 형태를 또한 이용 가능하다. 세포 배양 배지는 배양될 세포의 필요 조건 및/또는 목적으로 하는 세포 배양 매개변수에 따라서 추가적인 또는 증가된 농도의 구성성분, 예컨대 아미노산, 염, 당, 비타민, 호르몬, 성장 인자, 완충제, 항생제, 지질, 미량 원소 등으로 보충될 수 있다.
- [0066] 용어 "생물반응기"는 세포 배양물의 성장에 유용한 임의의 용기를 의미한다. 본 개시내용의 세포 배양물은 생물 반응기에서 성장하는 세포에 의해 생성된 관심 대상의 단백질의 적용에 기반하여 선택될 수 있는 생물반응기에서 성장될 수 있다. 생물반응기는 세포의 배양에 유용하다면, 임의의 크기를 가질 수 있고; 전형적으로, 생물반응기는 그것 내부에서 성장 중인 세포 배양물의 용적에 적절한 크기이다. 전형적으로, 생물반응기는 적어도 1리터일 것이고, 2, 5, 10, 50, 100, 200, 250, 500, 1,000, 1500, 2000, 2,500, 5,000, 8,000, 10,000, 12,000 리터 이상, 또는 그 사이의 임의의 용적일 수 있다. pH 및 온도를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 생물반응기의 내부 조건은 배양 기간 동안 제어될 수 있다. 당업자는 적절한 고려사항에 기반하여 본 발명을 실행하는데 사용하기 위한 적합한 생물반응기를 인식하고, 선택할 것이다.
- [0067] "세포 밀도"는 주어진 용적의 배양 배지 내의 세포수를 지칭한다. "생존 세포 밀도"는 표준 생존도 분석(예컨대 트립판 블루 염료 배제 방법)에 의해 결정된 바와 같은, 주어진 용적의 배양 배지 내 생존 세포수를 지칭한다.
- [0068] 용어 "세포 생존도"는 주어진 세트의 배양 조건 또는 실험 변형 하에서 생존하는 배양물 내 세포의 능력을 의미한다. 상기 용어는 또한 해당 시간에 배양물 내에서 세포(생존 세포와 죽은 세포)의 총 수에 대해 특정 시간에 생존 세포의 부분을 지칭한다.
- [0069] "압축세포용적 백분율"(PCV%)로서도 지칭되는 "압축세포용적"(PCV)은 백분율로서 표현한, 세포 배양물의 총 용적에 대한 세포에 의해 점유되는 용적의 비이다(문헌[Stettler, et al., (2006) Biotechnol Bioeng. Dec 20:95(6):1228-33]). 압축세포용적은 세포 밀도와 세포 직경의 함수이며; 압축세포용적의 증가는 세포 밀도 또는 세포 직경 중 하나 또는 둘 다의 증가로부터 생길 수 있었다. 압축세포용적은 세포 배양물 내 고체 함량의 측정이다. 고체는 채취 및 하류의 정제 동안 제거된다. 더 많은 고체는 채취 및 하류 정제 단계 동안 목적으로 하는 산물로부터 고체 물질을 분리시키기 위한 더 많은 노력을 의미한다. 또한, 목적으로 하는 생성물은 고체에 가둬질 수 있고, 채취 공정 동안 상실되어, 감소된 생성물 수율을 야기한다. 숙주 세포는 크기가 다르고 세포 배양물은 또한 사멸된 세포 및 사멸 중인 세포 및 다른 세포 파편을 함유하기 때문에, 압축세포용적은 세포 밀도 또는 생존 세포 밀도보다 세포 배양물 내에서의 고체 함량을 설명하는 더 정확한 방법이다. 예를 들어, 세포 밀도가 50×10^6 개 세포/ml인 2000 l 배양물은 세포의 크기에 따라 대단히 상이한 압축세포용적을 가질 것이다.

추가로, 성장 저지 단계에 있을 때 일부 세포는 크기가 증가할 것이고, 따라서 성장 저지 전에 그리고 성장 저지 후에 압축세포용적은 세포 크기 증가에 대한 결과로서 바이오매스의 증가에 기인하여 상이하게 될 가능성이 있을 것이다.

[0070] "세포 저지"로서도 지칭될 수 있는 "성장 저지"는 세포가 수의 증가를 중단하거나 또는 세포 주기가 더 이상 진행되지 않을 때의 지점이다. 세포 저지는 세포 배양물의 생존 세포 밀도를 결정함으로써 모니터링될 수 있다. 성장 저지 단계에서 일부 세포는 크기는 증가할 수 있지만, 수는 증가되지 않을 수 있으며, 따라서, 성장 저지 배양물의 압축세포용적은 증가될 것이다. 세포가 성장 저지를 야기하는 조건을 반전시킴으로써 세포가 건강한 상태를 쇠퇴시키지 않는다면, 성장 저지는 일정한 정도로 반전될 수 있다.

[0071] 용어 "역가"는 주어진 양의 배지 용적에서 세포 배양물에 의해 생성된 폴리펩타이드 또는 관심 대상의 단백질(관심 대상의 천연 유래 또는 재조합 단백질일 수 있음)의 총량을 의미한다. 역가는 배지의 밀리리터 당 폴리펩타이드 또는 단백질(또는 다른 측정 용적)의 밀리그램 또는 마이크로그램 단위로 표현될 수 있다. "누적 역가"는 배양 공정 동안 세포에 의해 생성되는 역가이고, 예를 들어 1일 역가를 측정하고 해당 값을 이용하여 누적 역가를 계산함으로써 결정될 수 있다.

[0072] 용어 "유가 배양"은 혼탁 배양 형태를 지칭하며, 추가적인 구성성분이 따로따로 또는 배양 공정의 시작에 후속적인 시간에 제공된 세포의 배양 방법을 의미한다. 제공된 구성성분은 전형적으로 배양 공정 동안 고갈된 세포에 대한 영양 보충물을 포함한다. 추가적으로 또는 대안적으로, 추가적인 구성성분은 보충적 구성성분(예를 들어, 세포 주기 저해 화합물)을 포함할 수 있다. 유가 배양은 전형적으로 일정 시점에 중단되고, 배지 내 세포 및/또는 구성성분은 채취되며 선택적으로 정제된다.

[0073] 용어 "통합된 생존 세포 밀도" 또는 "IVCD"는 상호호환적으로 사용되고, 배양 공정에 걸쳐 생존 세포의 평균 밀도에 배양 시간의 양을 곱하는 것을 실행한 것을 의미한다.

[0074] "누적 생존 세포 밀도"(CVCD)는 두 시점 사이의 평균 생존 세포 밀도(VCD)와 해당되는 두 시점 사이의 시간 지속을 곱함으로써 계산된다. CVCD는 시간에 대해 VCD를 플로팅하는 것에 의한 곡선화 면적이다.

세포 배양 공정의 설명

[0075] 세포가 더 많은 세포를 생성하는 대신 관심 대상의 재조합 단백질을 생성하기 위해 에너지 및 기질을 사용하는 경우, 재조합 단백질 생성 동안, 세포가 목적으로 하는 밀도로 성장되고, 이어서, 세포의 생리적 상태가 성장 저지된, 고생성을 상태로 전환되는 제어된 시스템을 갖는 것이 바람직하다. 이 목적을 달성하기 위한 다양한 방법이 존재하며, 온도 이동 및 아미노산 기아뿐만 아니라 세포 주기 저해제 또는 세포사를 야기하는 일 없이 세포 성장을 저지할 수 있는 다른 분자의 사용을 포함한다.

[0076] 재조합 단백질의 생성은 배양 플레이트, 플라스크, 관, 생물반응기 또는 다른 적합한 용기에서 단백질을 발현시키는 세포의 포유류 세포 생성 배양을 확립하는 것으로 시작한다. 더 작은 생성 생물반응기의 전형적으로 사용되며, 일 실시형태에서, 생물반응기는 500 l 내지 2000 l이다. 다른 실시형태에서, 1000 l 내지 2000 l 생물반응기가 사용된다. 생물반응기를 접종하기 위해 사용되는 과종 세포 밀도는 생성된 재조합 단백질 수준에 대해 긍정적인 영향을 가질 수 있다. 일 실시형태에서, 생물반응기는 무혈청 배양 배지에서 적어도 0.5×10^6 개까지 그리고 3.0×10^6 개 이상의 생존 세포/ml로 접종된다. 다른 실시형태에서, 접종은 1.0×10^6 개 생존 세포/ml이다.

[0077] 이어서, 포유류 세포는 대수 증식기를 겪는다. 세포 배양물은 목적으로 하는 세포 밀도가 달성될 때까지 보충적 공급 없이 유지될 수 있다. 일 실시형태에서, 세포 배양물은 보충적 공급과 함께 또는 보충적 공급 없이 3일까지 동안 유지된다. 다른 실시형태에서, 배양물은 짧은 성장기 없이 생성기가 시작하는 목적으로 하는 세포 밀도에서 접종될 수 있다. 본 명세서의 임의의 실시형태에서, 성장기로부터 생성기로의 전환은 또한 임의의 앞서 언급한 방법에 의해 개시될 수 있다.

[0078] 성장기와 생성기 사이의 이행 시, 그리고 생성기 동안에, 압축세포용적 백분율(PCV%)은 35% 이하이다. 생성기 동안 유지된 목적으로 하는 압축세포용적은 35% 이하이다. 일 실시형태에서, 압축세포용적은 30% 이하이다. 다른 실시형태에서, 압축세포용적은 20% 이하이다. 또 다른 실시형태에서, 압축세포용적은 15% 이하이다. 추가 실시형태에서, 압축세포용적은 10% 이하이다.

[0079] 성장기와 생성기 사이의 이행기에 그리고 생성기 동안에 유지된 목적으로 하는 생존 세포 밀도는 계획에 따라서 다양할 수 있다. 이는 이력 데이터로부터의 동등한 압축세포용적에 기반하여 결정할 수 있다. 일 실시형태에서,

생존 세포 밀도는 적어도 약 10×10^6 개 생존 세포/ml 내지 80×10^6 개 생존 세포/ml이다. 일 실시형태에서, 생존 세포 밀도는 적어도 약 10×10^6 개 생존 세포/ml 내지 70×10^6 개 생존 세포/ml이다. 일 실시형태에서, 생존 세포 밀도는 적어도 약 10×10^6 개 생존 세포/ml 내지 60×10^6 개 생존 세포/ml이다. 일 실시형태에서, 생존 세포 밀도는 적어도 약 10×10^6 개 생존 세포/ml 내지 50×10^6 개 생존 세포/ml이다. 일 실시형태에서, 생존 세포 밀도는 적어도 약 10×10^6 개 생존 세포/ml 내지 40×10^6 개 생존 세포/ml이다. 다른 실시형태에서, 생존 세포 밀도는 적어도 약 10×10^6 개 생존 세포/ml 내지 30×10^6 개 생존 세포/ml이다. 다른 실시형태에서, 생존 세포 밀도는 적어도 약 10×10^6 개 생존 세포/ml 내지 20×10^6 개 생존 세포/ml이다. 다른 실시형태에서, 생존 세포 밀도는 적어도 약 20×10^6 개 생존 세포/ml 내지 30×10^6 개 생존 세포/ml이다. 다른 실시형태에서, 생존 세포 밀도는 적어도 약 20×10^6 개 생존 세포/ml 내지 적어도 약 25×10^6 개 생존 세포/ml, 또는 적어도 약 20×10^6 개 생존 세포/ml이다.

[0081]

생성기 동안 더 낮은 압축세포용적은 더 높은 세포 밀도 관류 배양을 방해할 수 있는 용존산소 스파징 문제를 완화시키게 한다. 더 낮은 압축세포용적은 또한 더 작은 배지 저장 용기를 사용하게 하는 더 작은 배지 용적을 가능하게 하며, 더 느린 유속과 조합될 수 있다. 더 낮은 압축세포용적은 또한 더 높은 세포 바이오매스 배양에 비해 채취 및 하류 가공에 대해 더 적은 영향을 가진다. 이들 모두는 재조합 단백질 치료제를 제조하는 것과 관련된 비용을 감소시킨다.

[0082]

3가지 방법(배취 배양, 유가 배양 및 관류 배양)이 포유류 세포 배양에 의한 재조합 단백질의 생성을 위한 상업적 공정에서 전형적으로 사용된다. 배취 배양은 세포가 단기간 동안 배양 배지의 고정된 용적에서 성장된 다음 완전히 채취되는 불연속적 방법이다. 배취 방법을 이용하여 성장시킨 배양물을 최대 세포 밀도에 도달될 때까지 세포 밀도의 증가를 경험한 다음, 배지 구성성분이 소모됨에 따라 생존 세포 밀도는 감소되고, 대사 부산물(예컨대, 탁테이트 및 암모니아) 수준은 늘어난다. 채취는 전형적으로 최대 세포 밀도가 달성되는 시점에 일어난다 (전형적으로 배지 제형, 세포주 등에 따라서 5 내지 10×10^6 개 세포/ml). 배취 공정은 가장 단순한 배양 방법이지만, 생존 세포 밀도는 영양 이용성에 의해 제한되며, 일단 세포가 최대 밀도라면, 배양은 줄어들고 생성은 감소된다. 폐 생성물의 축적 및 영양분 고갈은 배양물 감소를 빠르게 야기하기 때문에(전형적으로 약 3 내지 7 일), 생성기를 연장시키는 능력은 없다.

[0083]

유가 배양은 소모된 해당 배지 구성성분을 보충하기 위해 볼루스 또는 연속적 배지 공급물을 제공함으로써 배취 공정보다 개선된다. 유가 배양은 실행 전체적으로 추가적인 영양분을 받기 때문에, 그들은 배취 방법에 비해 더 높은 세포 밀도(배지 제형, 세포주 등에 따라서 >10 내지 30×10^6 개 세포/ml) 및 증가된 생성물 역ガ를 달성할 가능성이 있다. 배취 공정과 달리, 2상 배양물은 목적으로 하는 세포 밀도를 달성하기 위한 세포 증식 기간(성장기)을 혼탁 또는 느린 세포 성장 기간(생성기)과 구별하기 위해 공급 전략 및 배지를 조작함으로써 생성 및 지속될 수 있다. 이와 같이, 공급된 배취 배양은 배취 배양에 비해 더 높은 생성물 역ガ를 달성할 가능성을 가진다. 전형적으로, 배취 방법은 성장기 동안 사용되고, 유가 배양 방법은 생성기 동안 사용되지만, 유가 배양 공급 전략은 전체 공정 전체적으로 사용될 수 있다. 그러나, 배취 공정과 달리, 생물반응기 용적은 공급량을 제한하는 제한 인자이다. 또한, 배취 방법에 따라, 대사 부산물 축적은 약 1.5 내지 3주인 생성기의 지속기간을 제한하는 배양물 감소를 야기할 것이다. 유가 배양은 불연속적이고, 전형적으로 대사 부산물 수준 또는 배양 생존도가 사전결정된 수준에 도달될 때 일어난다. 공급이 일어나지 않는 배취 배양에 비해, 유가 배양은 더 많은 양의 재조합 단백질을 생성할 수 있다. 예를 들어 미국 특허 제5,672,502호 참조.

[0084]

관류 방법은 새로운 배지를 첨가함으로써 그리고 동시에 소모 배지를 제거함으로써 배취 및 유가 배양 방법 이상으로 잠재적 개선을 제공한다. 전형적인 대규모 상업적 세포 배양 전략은 높은 세포 밀도, 60 내지 90(+) x 10^6 개 세포/ml에 도달하도록 분투하며, 반응기 용적의 거의 1/3 내지 1/2 이상은 바이오매스이다. 관류 배양에 의해, 1×10^8 개 세포/ml 초과의 극도의 세포 밀도가 달성되었고, 훨씬 더 높은 밀도가 예측된다. 전형적인 관류 배양은 1일 또는 2일 동안 지속되는 배취 배양 착수에 의해 시작된 다음에, 배양물에 대한 새로운 공급 배지의 연속적, 단계적 및/또는 간헐적 첨가 및 배양물의 성장 및 생성기 전체적으로 추가적인 고분자량 화합물, 예컨대 단백질(필터 분자량 컷오프에 기반함) 및 세포의 체류가 있는 소모 배지의 동시 제거가 이어진다. 소모 배지를 제거하는 반면, 세포 밀도를 유지하기 위해 다양한 방법, 예컨대 침강, 원심분리 또는 여과가 사용될 수 있다. 1일당 작업 용적 분획 내지 1일당 다수의 다중 작업 용적 분획의 관류 유속이 보고되었다.

- [0085] 관류 공정의 이점은 배양물의 생성이 배취 또는 유가 배양 방법보다 더 장기간 동안 유지될 수 있다는 것이다. 그러나, 증가된 배지 제조, 사용, 저장 및 처리는 장기간 관류 배양, 특히 또한 훨씬 더 많은 영양소가 필요한 높은 세포 밀도를 지니는 것을 뒷받침하는데 필수적이며, 이를 모두는 배취 및 유가 배양 방법에 비해 훨씬 더 높은 생성 비용을 유발한다. 추가로, 더 높은 세포 밀도는 용존산소 수준을 유지하는 것과 같은 생성 동안의 문제 및 더 많은 거품형성 및 거품방지 전략에 대한 변경을 위한 필요를 야기하는 더 많은 산소를 공급하는 것 및 더 많은 이산화탄소를 제거하는 것을 포함하는 증가된 가스발생에 의한 문제뿐만 아니라 채취 및 하류 가공 동안의 문제를 야기할 수 있으며, 여기서, 과량의 세포 물질을 제거하기 위해 필요한 노력은 생성물의 손실을 야기하여, 증가된 세포질량에 기인하는 증가된 역가의 이점을 무효화할 수 있다.
- [0086] 또한 성장기 동안 유가 배양 공급 다음에 생성기 동안 연속적 관류를 조합하는 대규모 세포 배양 전략이 제공된다. 상기 방법은 세포 배양물이 35% 이하의 압축세포용적에서 유지되는 생성기를 표적화한다.
- [0087] 일 실시형태에서, 볼루스 공급물에 의한 유가 배양은 성장기 동안 세포 배양물을 유지하기 위해 사용된다. 이어서, 관류 공급은 생성기 동안 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 세포가 생성기에 도달되었을 때 관류가 시작된다. 다른 실시형태에서, 관류는 세포 배양의 제3일에 또는 약 제3일에 내지 제9일에 또는 약 제9일에 시작한다. 다른 실시형태에서, 관류는 세포 배양의 제5일에 또는 약 제5일에 내지 제7일에 또는 약 제7일에 시작한다.
- [0088] 성장 동안 볼루스 공급을 이용하여 세포를 생성기로 이행되게 하여, 생성기의 개시 및 제어 수단으로서 온도 이동에 대한 더 적은 의존도를 야기하지만, 36°C의 31°C로의 온도 이동은 성장기와 생성기 사이에 일어날 수 있다. 일 실시형태에서, 36°C로부터 33°C로 이동된다. 다른 실시형태에서, 유가 배양에서 세포 성장 저지의 개시는 유가 배양을 세포주기 저해제에 노출시킴으로써 개시될 수 있다. 다른 실시형태에서, 유가 배양에서 세포 주기 저지의 개시는 세포주기 저해제를 포함하는 무혈청 관류 배지를 이용하는 관류에 의해 달성될 수 있다.
- [0089] 본 명세서에 기재한 바와 같이, 생물반응기는 무혈청 배양 배지에서 적어도 0.5×10^6 개까지 그리고 3.0×10^6 개 이상의 생존 세포/ml, 예를 들어 1.0×10^6 개 생존 세포/ml로 접종될 수 있다.
- [0090] 관류 배양은 세포 배양물이 새로운 관류 공급 배지를 받는 한편, 동시에 소모 배지가 제거된 것이다. 관류는 연속적, 단계적, 간헐적이며 또는 이들 중 임의의 또는 모두의 조합물일 수 있다. 관류 속도는 1일당 다수의 작업 용적에 대해 작업 용적 미만일 수 있다. 세포는 배양물에서 유지되고, 제거된 소모 배지는 세포가 실질적으로 없거나 또는 배양물보다 상당히 더 적은 세포를 가진다. 세포 배양에 의해 발현된 재조합 단백질은 또한 배양물에서 보유될 수 있다. 관류는 원심분리, 침강 또는 여과를 포함하는 다수의 수단에 의해 달성될 수 있다, 예를 들어 문헌[Voisard et al., (2003), Biotechnology and Bioengineering 82:751-65] 참조. 여과 방법의 예는 교번 접선 유동 여파이다. 대안의 접선유동은 중공사 필터 모듈을 통해 배지를 평평함으로써 유지된다. 예를 들어 미국 특허 제6,544,424호; 문헌[Furey (2002) Gen. Eng. News. 22 (7), 62-63] 참조.
- [0091] "관류 유속"은 주어진 시간에 작업 용적의 일부분 또는 다수로서 전형적으로 표현되는 생물반응기로부터 통과된 (첨가 및 제거된) 배지의 양이다. "작업 용적"은 세포 배양물에 대해 사용되는 생물반응기 용적의 양을 지칭한다. 일 실시형태에서, 관류 유속은 1일당 1 작업 용적 이하이다. 관류 공급 배지는 관류 속도를 최소화하기 위해 관류 영양분 농도를 최대화하도록 제형화될 수 있다.
- [0092] 세포 배양물은 세포 배양물의 생성기 공정 동안 소모되는 영양분 및 아미노산과 같은 구성성분을 함유하는 농축된 공급 배지로 공급될 수 있다. 농축된 공급 배지는 거의 임의의 세포 배양 배지 제형에 기반할 수 있다. 이러한 농축된 공급 배지는, 예를 들어, 약 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 30X, 50X, 100X, 200X, 400X, 600X, 800X, 또는 심지어 약 1000X의 그들의 정상적인 양으로 세포 배양 배지의 대부분의 구성성분을 함유할 수 있다. 농축된 배양 배지는 종종 공급 배취 배양 공정에서 사용된다.
- [0093] 본 발명에 따른 방법은 다상 배양 공정에서 재조합 단백질의 생성을 개선시키기 위해 사용될 수 있다. 다단계 공정에서, 세포는 2개의 별개의 상에서 배양된다. 예를 들어, 세포는 처음에 세포 증식 및 생존도를 최대화하는 환경적 조건 하에서 하나 이상의 성장기에서 배양될 수 있고, 이어서, 단백질 생성을 최대화하는 조건 하에서 생성기로 전달될 수 있다. 포유류 세포에 의해 단백질 생성을 위한 상업적 공정에서, 최종 생성 배양물에 앞서는 상이한 배양 용기에서 일어나는 통상적으로 다수의, 예를 들어, 적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 성장기가 있다.
- [0094] 성장기 및 생성기는 하나 이상의 이행기에 의해 선행되거나 또는 분리될 수 있다. 다상 공정에서, 본 발명에 따른 방법은 그것이 또한 선행 성장기에서 사용될 수 있지만, 적어도 상업적 세포 배양물의 최종 생성기의 성장

및 생성기 동안에 사용될 수 있다. 생성기는 대규모로 수행될 수 있다. 대규모 공정은 적어도 약 100, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 8000, 10,000, 15,000, 20,000 리터의 용적으로 수행될 수 있다. 일 실시형태에서, 생성은 500 ℥, 1000 ℥ 및/또는 2000 ℥ 생물반응기에서 수행된다.

[0095] 성장기는 생성기보다 더 고온에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 성장기는 약 35°C 내지 약 38°C의 제1 온도에서 일어날 수 있고, 생성기는 약 29°C 내지 약 37°C, 선택적으로 약 30°C 내지 약 36°C, 또는 약 30°C 내지 약 34°C의 제2 온도에서 일어날 수 있다. 추가로, 단백질 생성의 화학적 유도자, 예를 들어, 카페인, 뷰티레이트 및 헥사메틸렌 비스아세트아마이드(HMBA)는 온도 이동과 동시에, 전에 및/또는 후에 첨가될 수 있다. 온도 이동 후에 유도자가 첨가된다면, 그들은 온도 이동 후에 1시간 내지 5일, 선택적으로 온도 이동 후에 1 내지 2일에 첨가될 수 있다. 세포 배양물은 며칠 또는 심지어 몇 주 동안 유지될 수 있는 한편, 세포는 목적으로 하는 단백질(들)을 생성한다.

[0096] 세포 배양물로부터의 샘플은 당업계에 공지된 임의의 분석 기법을 이용하여 모니터링 및 평가될 수 있다. 재조합 단백질 및 배지 품질 및 특징을 포함하는 다양한 매개변수는 배양의 지속기간 동안 모니터링될 수 있다. 샘플은 취해지고, 연속적 모니터링, 실시간 또는 거의 실시간을 포함하는 바람직한 빈도로 간헐적으로 모니터링될 수 있다.

[0097] 전형적으로, 최종 생성 배양물(N-x 내지 N-1)에 선행하는 세포 배양물을 사용하여 생성 생물반응기를 접종하기 위해 사용될 파종 세포를 생성한다(N-1 배양물). 파종 세포 밀도는 생성된 재조합 단백질 수준에 대한 긍정적 영향을 가질 수 있다. 생성물 수준은 파종 밀도가 증가됨에 따라 증가되는 경향이 있다. 역가의 개선은 더 높은 파종 밀도에 묶여있을 뿐만 아니라 생성에 놓인 세포의 대사 및 세포 주기 상태에 의해 영향을 받을 가능성이 있다.

[0098] 파종 세포는 임의의 배양 방법에 의해 생성될 수 있다. 하나의 이러한 방법은 교번 접선 유동 여과를 이용하는 관류 배양이다. N-1 생물반응기는 교번 접선 유동 여과를 이용하여 실행되어 생성 생물반응기를 접종하기 위해 고밀도로 세포를 제공할 수 있다. N-1 단계는 90×10^6 개 세포/ml 초과의 밀도로 세포를 성장시키기 위해 사용될 수 있다. N-1 생물반응기는 블루스 파종 배양물을 생성하기 위해 사용될 수 있거나 또는 높은 파종 세포 밀도로 다중 생성 생물반응기를 파종하는데 유지될 수 있는 룰링 파종 저장 배양물로서 사용될 수 있다. 생성의 성장 단계의 지속기간은 7 내지 14일의 범위에 있을 수 있고, 생성 생물반응기의 접종 전에 대수 증식기에서 세포를 유지하도록 설계될 수 있다. 관류 속도, 배지 제형 및 시간은 세포를 성장시키도록 최적화되고, 그들의 생성의 최적화하는데 가장 도움이 되는 단계에서 생성 생물반응기에 그들을 전달한다. 생성 생물반응기를 파종시키기 위해 15×10^6 개 세포/ml 초과의 파종 세포 밀도가 달성될 수 있다. 접종 시 고속 세포 밀도는 목적으로 하는 생성 밀도 도달되는데 필요한 시간을 감소 또는 심지어 없앨 수 있다.

[0099] 본 발명은 재조합 단백질의 글리코실화의 존재 및/또는 양을 조절함에 있어서 특정 효용을 발견한다. 본 발명에서 사용되는 세포주(또한 "숙주 세포"로서 지칭됨)는 상업적 또는 과학적 관심의 폴리펩타이드를 발현시키도록 유전자 공학 처리된다. 세포주는 전형적으로 제한되지 않은 시간 동안 배양물에서 유지될 수 있는 1차 배양물로부터 생긴 계통으로부터 유래된다. 세포주를 유전자 공학처리하는 것은 재조합 폴리펩타이드 분자로 세포를 형질감염, 형질전환 또는 형질도입하는 것 및/또는 숙주 세포가 목적으로 하는 재조합 폴리펩타이드를 발현시키도록 야기하기 위한 (예를 들어, 상동성 재조합 및 유전자 활성화 또는 재조합 세포와 비재조합 세포의 융합에 의한) 다른 변용을 수반한다. 관심 대상의 폴리펩타이드를 발현시키기 위해 세포 및/또는 세포주를 유전자 공학처리하기 위한 방법 및 백터는 당업자에게 잘 공지되어 있고; 예를 들어, 다양한 기법이 문헌[*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds. (Wiley & Sons, New York, 1988, and quarterly updates); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Laboratory Press, 1989); Kaufman, R.J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, pp. 15-69]에 예시되어 있다.

[0100] 동물 세포주는 전구체가 다세포 동물로부터 유래된 세포로부터 유래된다. 동물 세포주 중 하나의 유형은 포유류 세포주이다. 배양물에서 성장에 적합한 매우 다양한 포유류 세포주는 미국 미생물 보존센터(버지니아주 매너서스에 소재) 및 상업적 판매사로부터 입수 가능하다. 산업에서 통상적으로 사용되는 세포주의 예는 베로, BHK, HeLa, CV1(Cos를 포함함), MDCK, 293, 3T3, 골수종 세포주(예를 들어, NSO, NS1), PC12, WI38 세포 및 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 포함한다. CHO 세포는 복합 재조합 단백질, 예를 들어 사이토카인, 응고인자 및 항체의 생성을 위해 널리 사용된다(Brasel et al. (1996), *Blood* 88:2004-2012; Kaufman et al. (1988), *J. Biol Chem* 263:6352-6362; McKinnon et al. (1991), *J. Mol Endocrinol* 6:231-239; Wood et al. (1990), *J. Immunol* 145:3011-3016). 다이하이드로엽산 환원효소(DHFR)-결핍 돌연변이체 세포주(Urlaub et al. (1980), *Proc Natl*

Acad Sci USA 77: 4216-4220), DXB11 및 DG-44는 바람직한 CHO 숙주 세포주인데, 효율적인 DHFR 선택가능하고 증폭가능한 유전자 발현 시스템이 이들 세포에서 고수준의 재조합 단백질 발현을 허용하기 때문이다(Kaufman R.J. (1990), Meth Enzymol 185:537-566). 추가로, 이들 세포는 부착물 또는 혼탁 배양물로서 조작되는 것이 용이하며, 상대적으로 양호한 유전자 안정성을 나타낸다. 그들에서 재조합적으로 발현된 CHO 세포 및 단백질은 광범위하게 특성규명되었고, 조절제에 의해 임상의 상업적 제조에서 사용을 위해 승인되었다.

[0101] 다른 양상에서, 본 발명은 재조합 발현 벡터가 도입된 숙주 세포를 제공한다. 숙주 세포는 임의의 원핵 세포(예를 들어, 이콜라이(*E. coli*)) 또는 진핵세포(예를 들어, 효모, 곤충 또는 포유류 세포(예를 들어, CHO 세포)일 수 있다. 벡터 DNA는 통상적인 형질전환 또는 형질감염 기법을 통해 원핵 또는 진핵 세포 내로 도입될 수 있다. 수많은 형질감염 방법이 당업계에 공지되어 있으며, 지질(예를 들어, 리포펙타민(Lipofectamin)(등록상표)), 인산칼슘, 양이온성 중합체, DEAE-덱스트란, 활성화된 덴드리머 및 자기 비드의 사용을 포함한다. 추가적인 형질감염 방법은 기기 기반 기법을 이용한다. 예는 전기천공법, 유전자총 기법, 혼미주사 및 숙주 세포 내로 핵산을 도입하기 위해 광(예를 들어, 레이저)을 사용하는 레이저 형질감염(laserfection)/광학적 형질감염(optoinjection)을 포함한다.

[0102] 포유류 세포의 안정한 형질감염을 위해, 사용된 발현 벡터 및 형질감염 기법에 따라서, 세포의 소분획만이 외래 DNA를 그들의 게놈에 통합시킬 수 있다는 것이 공지되어 있다. 이들 통합물을 동정 및 선택하기 위해, (예를 들어, 항생제에 대한 내성을 위해) 선택가능한 마커를 암호화하는 유전자는 일반적으로 관심 대상의 유전자와 함께 숙주 세포 내로 도입된다. 바람직한 선택가능한 마커는 약물, 예컨대 G418, 하이그로마이신 및 메토트렉세이트에 대한 내성을 부여하는 것을 포함한다. 도입된 핵산에 의해 안정하게 형질감염된 세포는 특히 방법 중에서도 약물 선택에 의해 동정될 수 있다(예를 들어 선택가능한 마커 유전자를 혼입한 세포가 생존하는 반면, 다른 세포는 사멸됨).

관심 대상의 단백질

[0104] 본 발명의 방법은 관심 대상의 재조합 단백질을 발현시키는 세포를 배양시키기 위해 사용될 수 있다. 발현된 재조합 단백질은 그들이 회수 및/또는 수집될 수 있는 배양 배지 내로 분비될 수 있다. 추가로, 단백질은 상업적 판매사로부터 입수 가능한 공지된 공정 및 제품을 이용하여 이러한 배양물 또는 구성성분으로부터(예를 들어, 배양 배지로부터) 정제 또는 부분적으로 정제될 수 있다. 이어서, 정제된 단백질은 "제형화"될 수 있는데, 이는 완충제가 교환되고, 멸균, 벌크-포장되고/되거나 최종 사용자를 위해 포장될 수 있다는 것을 의미한다. 약제학적 조성물에 대한 적합한 제형은 문헌[*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th ed. 1995, Mack Publishing Company, Easton, PA]에 기재된 것을 포함한다.

[0105] 본 발명의 방법에 의해 생성될 수 있는 폴리펩타이드의 예는 다음의 단백질 중 모두 또는 하나의 부분과 동일하거나 또는 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 포함한다: 종양 괴사 인자(TNF), f1t3 리간드(WO 94/28391), 에리스로포이에틴, 트롬보포이에틴, 칼시토닌, IL-2, 앤지오포이에틴-2(Maisonpierre et al. (1997), Science 277(5322): 55-60), NF-카파 B의 수용체 활성제에 대한 리간드(RANKL, WO 01/36637), 종양 괴사 인자(TNF)-관련 세포자멸사-유발 리간드(TRAIL, WO 97/01633), 흥선 간질-유래 림포포이에틴, 과립구 접락 자극인자, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF, 호주 특허 제588819호), 비만 세포 성장 인자, 줄기 세포 성장 인자(미국 특허 제6,204,363호), 표피성장인자, 케라틴세포 성장 인자, 대핵세포 성장 및 발생 인자, RANTES, 인간 피브리노겐-유사 2 단백질(FGL2; NCBI 수탁 번호 NM_00682; Rüegg and Pytela (1995), Gene 160:257-62) 성장 호르몬, 인슐린, 인슐리노트로핀, 인슐린-유사 성장 인자, 부갑상선 호르몬, α-인터페론, γ-인터페론, 및 공통 인터페론을 포함하는 인터페론(미국 특허 제4,695,623호 및 제4,897471호), 신경성장인자, 뇌-유래 신경영양인자, 시냅토태그민-유사 단백질(SLP 1-5), 뉴로트로핀-3, 글루카곤, 인터류킨, 콜로니 자극 인자, 림포톡신-β, 백혈병 저해 인자, 및 온코스타틴-M. 본 발명의 방법에 따라 생성될 수 있는 단백질의 설명은, 예를 들어, 문헌[*Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research, all volumes* (Aggarwal and Guterman, eds. Blackwell Sciences, Cambridge, MA, 1998); *Growth Factors: A Practical Approach* (McKay and Leigh, eds., Oxford University Press Inc., New York, 1993); 및 *The Cytokine Handbook, Vols. 1 and 2* (Thompson and Lotze eds., Academic Press, San Diego, CA, 2003)]에서 찾을 수 있다.

[0106] 추가적으로 본 발명의 방법은 임의의 상기 언급한 단백질에 대한 수용체, 이러한 수용체에 대한 길항제의 아미노산 서열의 모두 또는 일부를 포함하는 단백질 또는 임의의 상기 언급한 단백질, 및/또는 이러한 수용체 또는 길항제와 실질적으로 유사한 단백질 중 모두 또는 일부를 포함하는 단백질을 생성하는데 유용할 것이다. 이들 수용체 및 길항제는 종양 괴사 인자 수용체의 형태 둘 다(TNFR, p55 및 p75, 미국 특허 제5,395,760호 및 미국

특허 제5,610,279호로서 지칭됨), 인터류킨-1(IL-1) 수용체(I형 및 II형; 유럽 특허 제0460846호, 미국 특허 제4,968,607호 및 미국 특허 제5,767,064호), IL-1 수용체 길항제(미국 특허 제6,337,072호), IL-1 길항제 또는 저해제(미국 특허 제5,981,713호, 제6,096,728호 및 제5,075,222호) IL-2 수용체, IL-4 수용체(유럽 특허 제0367 566호 및 미국 특허 제5,856,296호), IL-15 수용체, IL-17 수용체, IL-18 수용체, Fc 수용체, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 수용체, 과립구 접락 자극인자 수용체, 온코스타틴-M 및 백혈병 저해 인자에 대한 수용체, NF-카파 B의 수용체 활성제(RANK, WO 01/36637호 및 미국 특허 제6,271,349호), 오스테오프로테게린(미국 특허 제6,015,938호), TRAIL에 대한 수용체(TRAIL 수용체 1, 2, 3 및 4를 포함) 및 사멸 도메인을 포함하는 수용체, 예컨대 Fas 또는 세포자멸사-유도 수용체(AIR)를 포함한다.

[0107] 본 발명을 이용하여 생성될 수 있는 다른 단백질은 분화 항원(CD 단백질로서 지칭됨) 또는 그들의 리간드의 아미노산 서열 중 모두 또는 일부를 포함하는 단백질 또는 이들 중 하나와 실질적으로 유사한 단백질을 포함한다. 이러한 항원은 문헌[*Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani et al., eds., Kobe, Japan, 1996)*]에 개시되어 있다. 유사한 CD 단백질은 후속적 작업에서 개시된다. 이러한 항원의 예는 CD22, CD27, CD30, CD39, CD40 및 이에 대한 리간드(CD27 리간드, CD30 리간드 등)를 포함한다. 몇몇 CD 항원은 또한 41BB 및 OX40을 포함하는 TNF 수용체 패밀리의 구성원이다. 리간드는 종종 41BB 리간드 및 OX40 리간드와 같은 TNF 패밀리의 구성원이다.

[0108] 또한 본 발명을 이용하여 효소적으로 활성인 단백질 또는 그들의 리간드가 생성될 수 있다. 예는 다음의 단백질 또는 그들의 리간드 중 하나의 모두 또는 일부를 포함하는 단백질 또는 이들 중 하나와 실질적으로 유사한 단백질을 포함한다: TNF-알파 전환효소를 포함하는 디스인테그린 및 메탈로프로테이나제 도메인 패밀리 구성원, 다양한 키나제, 글루코세레브로시다제, 수퍼옥사이드 디스무타제, 조직 플라스미노겐 활성제, 인자 VIII, 인자 IX, 아포리포단백질 E, 아포리포단백질 A-I, 글로빈, IL-2 길항제, 알파-1 안티트립신, 임의의 상기 언급한 효소에 대한 리간드, 및 수많은 다른 효소 및 그들의 리간드.

[0109] 생성될 수 있는 항체의 예는 상기 언급한 단백질 및/또는 다음의 항원: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80(B7.1), CD86(B7.2), CD147, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-7, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-1 수용체, IL-2 수용체, IL-4 수용체, IL-6 수용체, IL-13 수용체, IL-18 수용체 서브세트, FGL2, PDGF- β 및 이들의 유사체(미국 특허 제5,272,064호 및 제5,149,792호 참조), VEGF, TGF- β 2, TGF- β 1, EGF 수용체(미국 특허 제6,235,883호 참조) VEGF 수용체, 간세포 성장 인자, 오스테오프로테게린 리간드, 인터페론 감마, B 림프구 자극인자(BlyS, 또한 BAFF, THANK, TALL-1 및 zTNF4로서 알려짐; 문헌[Do and Chen-Kiang (2002), *Cytokine Growth Factor Rev.* 13(1): 19-25]) 참조, C5 보체, IgE, 종양 항원 CA125, 종양 항원 MUC1, PEM 항원, LCG(폐암과 관련되어 발현된 유전자 산물임), HER-2, HER-3, 종양-관련 당단백질 TAG-72, SK-1 항원, 결장 및/또는 췌장암을 지니는 환자의 혈청에서 높은 수준으로 존재하는 종양-관련 에피토프, 암-관련 에피토프 또는 유방, 결장, 편평세포, 전립선, 췌장, 폐 및/또는 신장암 세포 상에서 및/또는 흑색종, 신경교종 또는 신경아세포종 세포 상에서 발현된 단백질, 종양의 괴사성 코어, 인테그린 알파 4 베타 7, 인테그린 VLA-4, 인테그린(알파4베타7을 포함하는 인테그린을 포함함), TRAIL 수용체 1, 2, 3 및 4, RANK, RANK 리간드, TNF- α , 부착 분자 VAP-1, 상피 세포 부착 분자(EpCAM), 세포내 부착 분자-3(ICAM-3), 류코인테그린 부착소, 혈소판 당단백질 gp IIb/IIIa, 심장 미오신 중쇄, 부갑상선 호르몬, rNAPc2(인자 VIIa-조직 인자의 저해제임), MHC I, 암배 항원(CEA), 알파-태아단백질(AFP), 종양 괴사 인자(TNF), CTLA-4(세포독성 T 림프구-관련 항원임), Fc- γ -1 수용체, HLA-DR 10 베타, HLA-DR 항원, 스클레로스틴, L-셀렉틴, 호흡기 세포융합 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), B형 간염 바이러스(HBV), 스트렙토코쿠스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) 및 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 단백질 중 임의의 하나 또는 조합을 인식하는 것을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0110] 본 발명의 방법을 이용하여 생성될 수 있는 공지된 항체의 구체적 예는 아달리무맙, 베바시주맙, 인플릭시맙, 암식시맙, 알렘투주맙, 바피뉴주맙, 바실락시맙, 벨리무맙, 브리아키누맙, 브로달루맙, 카나키누맙, 세르톨리주맙 페꼴, 세톡시맙, 코나투무맙, 데노수맙, 에콜리주맙, 에트롤리주맙, 에볼로쿠맙, 켐투주맙오조가미신, 골리무맙, 이브리투모맙 티우세탄, 라베투주맙, 마파투무맙, 마투주맙, 메폴리주맙, 모타비주맙, 뮤로모닙-CD3, 나탈리주맙, 니모투주맙, 오파투무맙, 오말리주맙, 오레고보맙, 팔리비주맙, 파니투무맙, 펩투모맙, 페투주맙, 라니비주맙, 리툭시맙, 로벨리주맙, 토실리주맙, 토시투모맙, 트라스투주맙, 유스테키누맙, 베돌리조맙, 잘루투무맙 및 자놀리무맙을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0111] 본 발명은 또한, 예를 들어, 임의의 상기 언급한 단백질을 포함하는 재조합 융합 단백질을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 언급한 단백질 + 다량체 도메인 중 하나를 포함하는 재조합 융합 단백질, 예컨대

류신 지퍼, 또꼬인 나선, 면역글로불린의 Fc 부분 또는 실질적으로 유사한 단백질이 본 발명의 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들어 WO94/10308; 문헌[Lovejoy et al. (1993), *Science* 259:1288-1293; Harbury et al. (1993), *Science* 262:1401-05; Harbury et al. (1994), *Nature* 371:80-83; et al.(1999), *Structure* 7:255-64] 참조. 구체적으로는 이러한 재조합 융합 단백질 중에서 수용체의 일부가 항체의 Fc 부분에 융합된 단백질, 예컨대 에타네르셉트(p75 TNFR:Fc), 아바타셉트 및 멜라타셉트(CTLA4:Fc)가 포함된다.

[0112] 본 발명은 본 발명의 개개 양태의 단일 예시로서 의도되는 본 명세서에 기재된 구체적 실시형태에 의해 범주가 제한되어서는 안 되며, 기능적으로 동등한 방법 및 구성성분은 본 발명의 범주 내에 있다. 사실, 본 명세서에 나타내고 기재된 것에 추가로 본 발명의 다양한 변형은 앞서 언급한 설명 및 수반하는 도면으로부터 당업자에게 명확하게 될 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구범위의 범주 내에 속하는 것으로 의도된다.

[0113] 실시예

[0114] 실시예 1

[0115] 낮은 수준의 고-만노스(HM) 발현(MAb A)을 전통적으로 나타낸 재조합 인간 항체를 발현시키는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포주를 생성하는 단클론성 항체를 siRNA 실험을 위해 사용하였다. 세포주는 DHFR 기반 선택을 이용하여 클론적으로 유래되었고; 일상적인 배양을 위해, 세포를 혼탁액 중에서, 메토트렉세이트(MTX)를 함유하는 선택적 배지에서 배양시켰다. 배양물을 통기시킨 125ml 또는 250ml 삼각 진탕 플라스크(매사추세츠주 로웰에 소재한 코닝 라이프 사이언시즈(Corning Life Sciences)) 또는 50ml 통기 교반관(스위스 트라사던겐에 소재한 TPP사)에서 36°C, 5% CO₂ 및 85% 상대 습도에서 유지하였다. 삼각 플라스크를 대용량 자동 CO₂ 인큐베이터(매사추세츠주 월섬에 소재한 씨모 피셔 사이언티픽사(Thermo Fisher Scientific))에서 25mm 궤도 직경으로 120rpm에서 진탕시키고, 교반관을 대용량 ISF4-X 인큐베이터(스위스 바젤에 소재한 쿠너 아게사(Kuhner AG))에서 225rpm, 50mm 궤도 직경으로 진탕시켰다.

[0116] 8개의 상이한 19량체 siRNA를 Mgat1, Mgat2 및 S1c35a2에 대해 시험하였다. siRNA를 제조업자의 프로토콜에 따라 리포펙타민(Lipofectamine)(등록상표) RNAiMAX(인비트로젠사(Invitrogen); 라이프 테크놀로지즈; 핵산과 복합체화되고 핵산에 의한 세포의 형질감염을 용이하게 하는 지질 기반 형질감염 시약)를 이용하여 MAb A 세포주 내로 일시적으로 형질감염시켰다. 간략하게, 세포를 형질감염일에 500μl 배지를 이용하여 6웰 플레이트(코닝사) 상에 웰 당 2 × 10⁵개로 플레이팅하였다. 형질감염을 위해, 10pmol의 siRNA를 100μl 옵티-엠이엠(Opti-Mem) I 배지에서 1.5μl의 리포펙타민 RNAiMAX와 복합체화하였고, 실온에서 10분 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, RNAi-리포펙타민 RNAiMax 시약 복합체를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 36°C에서 CO₂ 인큐베이터에서 3일 동안 인큐베이션시켰다. 세포를 50°C에서 1시간 동안 1X 용해 완충제(캘리포니아주 산타 클라라에 소재한 애피메트릭스 인코포레이티드사)를 이용하여 용해시켰다. 용해물을 FLEXMAP 3D(등록상표) 시스템(루미넥스(Luminex), 텍사스주 오스틴에 소재; 단백질 및 게놈 다중복합 비드 어레이 분석)을 이용하는 퀄티진(Quant iGene)(등록상표) 다중복합 분석에 의한 mRNA 발현 분석을 위해 사용하였다.

[0117] mRNA 발현 분석을 위해, 퀄티진 플렉스(Quant iGene Plex) 2.0 시약 시스템(캘리포니아주 산타 클라라에 소재한 애피메트릭스 인코포레이티드사)을 이용하였다. 간략하게, 5 × 10⁵개 생존 세포로부터의 세포 펠렛을 프로테이나 제 K(저장 농도 50mg/ml)로 보충한 1X 용해 완충제(QS0100)(캘리포니아주 산타 클라라에 소재한 애피메트릭스 인코포레이티드사)를 이용하여 용해시키고, 50°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 세포 용해물을 사용을 위한 준비가 될 때까지 -80°C에서 저장하였다. Mgat1, Mgat2 및 S1c35a3뿐만 아니라 정규화 유전자를 표적화하는 관습적 유전자 특이적 프로프 세트(캘리포니아주 산타 클라라에 소재한 애피메트릭스 인코포레이티드사)를 사용하였다. 냉동시킨 용해물을 해동시키고 나서, mRNA 발현 수준 분석을 위한 표준 애피메트릭스 프로토콜을 이용하여 처리하였다.

[0118] 데이터는 분석한 웰마다 유전자 당 100개의 비드로부터 중앙값 리포터 형광을 측정하는 것으로부터 유래되며, 중앙값 형광 강도(MFI)로서 나타내었다. 블랭크 샘플로부터 표적 mRNA가 없는 배경 신호를 결정하고 나서, 표적 mRNA의 존재에서 얻은 신호로부터 차감하였다. 관심 대상의 유전자의 형광 강도를 2개의 하우스키핑 유전자(GusB 및 TBP)에 대해 정규화시켰다.

$$\text{정규비} = \frac{\text{관심 대상의 유전자의 MFI}}{\text{하우스키핑 유전자의 MFI}}$$

[0119]

- [0120] 각각의 표적 RNA에 대한 분석 민감도를 신호가 배경 초과의 표준 편차의 3배인 표적 농도 정의한 검출 한계(LOD)를 결정함으로써 평가하였다. 변동계수(CV)는 분석 분석 정밀도를 측정하며, 표준편차 및 평균의 비이다.
- [0121] 모든 샘플을 3회 중복해서 실행하였고, 용해 완충제를 블랭크로서 사용하였다. 바이오-플렉스(Bio-Plex) 3D 플레이트 판독기(루미넥스 코포레이션(Luminex Corporation))를 이용하여 샘플을 분석하고, 바이오-플렉스 데이터 매니저 5.0 소프트웨어(캘리포니아주 허큘러스에 소재한 바이오-래드 래버토리즈(Bio-Rad Laboratories))를 이용하여 데이터를 획득하였다.
- [0122] 각각의 유전자에 대해, 임의의 상당한 표적을 벗어난 효과 없이 85% 초과의 넉다운을 달성한 2개의 siRNA를 선택하였다. 이어서, 선택한 siRNA를 MAb A 세포주 내로 형질감염시키고, 10일 유가 배양 항체 생성 실행을 수행하였다. 유가 배양 생성 연구에서, 세포를 3.5×10^5 개 세포/ mL 로 생성 배지에 파종하였다. 24 딥 웰 플레이트(캘리포니아주 유니온 시티에 소재한 압시겐 사이언티픽(Axygen Scientific))에서 3mL 작업 용적을 사용하거나, 또는 125mL 통기 진탕 플라스크에서 25mL 작업 용적을 사용하였다. 배양물에 제3일, 제6일 및 제8일에 초기 배양 용적의 7%의 단일 볼루스 공급물을 공급하였다. 글루코스를 제3일, 제6일 및 제8일에 10g/ L 표적에 공급하였다. 원심분리한 조건화 배지를 생성 실행의 제10일에 채취하였다. 또한 샘플을 성장, 생존도 및 대사 데이터에 대해 제3일, 제6일, 제8일 및 제10일에 취하였고, 역가 및 HM 분석에 대해 제6일, 제8일 및 제10일에 취하였다.
- [0123] 세포 펠렛 샘플을 mRNA 발현 분석에 대해 제3일, 제6일, 제8일 및 제10일에 배양물로부터 취하였고; 결과를 이하의 표 1에 나타낸다.

표 1

샘플	siRNA 처리에 의한 Mgat1, Mgat2 및 Slc35a2 수준의 감소			
	제3일	제6일	제8일	제10일
si RNA-Mgat1	90	83	85	67
si RNA-Mgat2	78	64	71	59
si RNA-SLC35A2	57	51	14	7

- [0125] mRNA 발현 분석은 Mgat1 및 Mgat2 전사체 수준이 10일 생성 실행에 걸쳐 50% 초과만큼 감소되었다는 것을 나타내었다. Slc35a2의 발현 수준은 제3일 내지 제6일에 50% 초과만큼 감소되었지만, 제8일 및 제10일까지 7 내지 14% 감소만이 보였다.
- [0126] 항체 역가 및 HM%를 유가 배양의 제10일에 결정하였다. 워터스 UPLC를 이용함으로써 친화도 단백질 A POROS PA ID 센서 카트리지에 의해 역가를 측정하였다. 캘리퍼 GX II HM 분석(캘리퍼 라이퍼 사이언시즈 인코포레이티드(Caliper Life Sciences Inc.), 퍼킨엘머 컴퍼니)을 이용하거나 또는 UPLC HILIC(친수성 상호작용 크로마토그래피)(액퀴티 UPLC BEH 글리칸 칼럼과 함께 사용한 UPLC 형광(FLR) 검출기를 구비한 워터스 액퀴티 UPLC)를 이용하여 고수준 만노스 함량을 측정하였다. 결과를 이하의 표 2에 나타낸다(결과를 평균값 +/- 표준 편차로서 제시함).

표 2

siRNA로 처리한 세포주의 역가 및 HM%		
샘플	역가(g/ L)	HM%
siRNA 없음	0.75+0.09	0.81+0.07
siRNA MGAT1	0.73+0.05	72.42+3.28
siRNA MGAT2	0.87+0.27	1.98+0.31
siRNA Slc35A2	0.57+0.36	1.56+0.29

- [0128] 이들 결과의 분석은 Mgat1 siRNA로 처리한 세포에서 HM 수준이 70%만큼 증가된 반면, Mgat2 또는 Slc35a2 중 하나의 넉다운은 HM에 상당하게 영향을 미치지 않았다는 것을 나타내었다. 그러나, 제10일까지, Slc35a2의 수준은 90%의 대조군 값으로 회복되었고, 따라서, 이 실험을 위해 HM을 조절함에 있어서 이 유전자에 대해 어떤 역할을

제외하는 것은 가능하지 않다. siRNA 처리에 의해 생성된 항체 역가의 상당한 변화는 관찰되지 않았다. 더 나아가, siRNA 처리는 생성률 또는 세포 생존도에 영향을 미치는 것으로 나타나지 않았는데, 이는 감소된 Mgat1 mRNA 발현에 의해 관찰된 증가된 HM 수준이 감소된 Mgat1 활성과 직접적으로 관련될 가능성이 있다는 것을 나타낸다.

[0129] 설시예 2

[0130] 고수준(즉, 10% 초과)의 고수준 만노스 유형 글리칸(MAb B)을 전통적으로 나타낸 재조합 인간 항체를 발현시키는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포주를 생성하는 단클론성 항체를 형질감염 실험을 위해 사용하였다. 세포주는 DHFR 기반 선택을 이용하여 클론적으로 유래되었고; 일상적인 배양을 위해, 세포를 혼탁액 중에서, MTX를 함유하는 선택 배지에서 배양시켰다. 통기시킨 125ml 또는 250ml 삼각 진탕 플라스크(매사추세츠주 로웰에 소재한 코닝 라이프 사이언시즈) 또는 실질적으로 앞서 기재한 바와 같은 50ml 통기시킨 교반관(스위스 트라사딘겐에 소재한 TPP)에서 배양물을 유지하였다.

[0131] MAb B 세포를 다음 중 하나로 형질감염시켰다: 삭제(null) 발현 벡터 대조군, 퓨린 pep2A와 연결된 Mgat1 및 Mgat2를 함유하는 2시트론성 발현 벡터(M1M2), S1c35a2(S)를 함유하는 벡터 또는 Mgat1, Mgat2 및 S1c35a2 벡터의 공동형질감염(M1M2S). 선택 배지에서 80% 초과의 생존도로 이를 세포를 회수한 후에, 그들은 유세포 분석기를 이용하여 클로닝시킨 단일 세포였다. 단일 세포로부터 유래된 해당 세포주에 대해, 관심 대상의 유전자의 발현 수준을 분석하였다. 각각 4개의 상이한 벡터 입체배치를 위해, 관심 대상의 유전자의 발현에 대해 40개 초과의 클론을 분석하였고, 이 분석에 기반하여 20개의 과발현 세포주 및 10개의 대조군 세포주를 2회의 별도 10일 유가 배양 생성 실행에서 추가로 특성규명을 위해 선택하고 나서, 실질적으로 앞서 기재한 바와 같이 수행하였다.

[0132] 제1 유가 배양 생성의 시작 시, 과발현 세포주에 대한 배가시간의 평균은 더 높았고(25시간 초과) PDL은 더 높은 PDL을 이용하는 대조군(25시간 미만)에 비해 더 낮았다(도 1). 따라서, 두번째 10일 유가 배양 실험을 더 작은 클론의 서브세트에 대해 수행하였고, 이를 모두는 유사한 배가시간을 나타내었다(도 2).

[0133] 제2 유가 배양 실험으로부터 선택한 클론에서 mRNA 발현의 통계학적 분석은 과발현에서 배수 변화가 대조군에 비해 상당하다는 것을 확인하였다. Mgat2 유전자는 Mgat1 유전자에 비해 발현의 더 큰 배수적 증가가 있었다. 결과를 이하의 표 3에 나타낸다.

표 3

3세트의 과발현 클론에 대한 Mgat1, Mgat2 및 S1c35a2의 전사체 수준의 평균 배수 증가.			
샘플	Mgat1	Mgat2	S1c35A2
M1M2	6.24	26.29	0.99
M1M2S	1.45	7.76	37.28
S	0.83	0.99	27.1

[0135] 유도된 과발현 수준을 추가로 조사하기 위해, 액체 크로마토그래피-坦덤 질량분석법(LC-MS/MS)을 이용하여 Mgat1 및 Mgat2의 단백질 수준을 정량화하였다. 빈 벡터(EV)뿐만 아니라 Mgat1과 Mgat2(B1 및 B2) 둘 다를 과발현시키는 두 계통을 이용하여 형질감염시킨 대조군 세포주를 분석하였다. 결과를 이하의 표 4에 나타낸다. 상대적 단백질 발현을 백만분율(ppm)로 측정한다.

표 4

제10일에 대조군 세포주 및 Mgat1 및 Mgat2를 과발현시키는 두 세포주에서 정규화된 mRNA 및 단백질 수준				
	단백질	EV	B1	B2
mRNA	Mgat1	0.527	5.855	13.042
	Mgat2	1.242	20.313	44.156
	Mgat2/Mgat1	2.4	3.5	3.4
단백질	MGAT1(ppm)	0.8	101	160.1
	MGAT2(ppm)	6.6	527.8	783.4
	MGAT2/MGAT1	8.3	5.2	4.9

[0137] 표 4에서 입증하는 바와 같이, EV는 Mgat1 및 Mgat2의 기저 발현 수준을 나타낸 반면, 해당 단백질의 발현 수준은 B1 및 B2 세포주에서 상당히 증가되었다. 더 나아가, B1 및 B2 세포주에서, Mgat2는 Mgat1에 비해 상승된 발현 수준을 나타내었다. 이들 데이터는 제10일에 Mgat1 및 Mgat2의 mRNA 발현 수준에 대해 관찰된 것과 상당히 상관관계가 있다.

[0138] 대조적으로, 하우스키핑 대조군 단백질(GAPDH; 데이터 미제시)의 발현 수준은 제8일 및 제10일(단백질 발현을 분석한 이들)에 이들 3종의 세포주에 대해 일정하게 남아있었다.

[0139] 도 3, 4 및 5는 성장 및 특이적 생성률이 그룹 간에 유사하였다는 것을 나타내지만; 그러나 역가는 2개의 다른 그룹에 비해 Mgat1 및 2 과발현 클론에 대해 상당히 증가되었다. Mgat1 및 Mgat2를 과발현시키는 세포주(M1M2)뿐만 아니라 모두 3개의 유전자를 과발현시키는 해당 클론(M1M2S)은 대조군 세포에 비해 고수준 만노스 수준의 감소를 나타내었다(각각 70% 및 29%)(도 6). 그러나, S1c35a2(S)를 과발현시키는 세포주는 대조군에 비교할 때 통계학적으로 상당한 변화를 나타내지 않았다(도 6). UDP-갈락토스 수송체(S1c35A2에 의해 암호화된 단백질)의 역할은 UDP-GlcNAc를 포함하는 뉴클레오타이드 당 기질을 골지체에 수송하는 것이기 때문에, UDP-GlcNAc 수준이 제한적이라면, 증가된 수준의 S1c35a2는 후속적 글리칸 가공에 영향을 미치지 않을 것이다.

[0140] 분비된, 재조합 MAb B의 글리코폼 프로파일을 각각의 과발현된 세포주(M1M2, M1M2S 및 S)에 대해 평가하였다. M1M2 세포주는 대조군 세포주에 비해 M5, M6, M7 및 M8b와 같은 모든 HM 종에서 상당한 감소를 나타내었다. 결과를 이하의 표 5에 나타낸다.

표 5

유가 배양의 제10일에 Mgat1, Mgat2 및/또는 S1c35a2 과발현 세포주에서 생성된 항체의 글리코실화 프로파일					
글리코폼 유형	글리코폼	대조군	M1M2 클론	M1M2S 클론	S 클론
고수준 만노스	M8a	0.52	1	0	1
	M8b	0.78	0.37	0.52	0.53
	M7	2.65	0.58	1.25	1.24
	M6	3.78	0.68	1.23	1.41
	M5	7.98	1.21	4.82	10.89
혼성체	혼성체	2.53	2.93	3.04	4.33
복합체	A1G1F	0.80	0.17	0.42	1.08
	A1G0	1.22	1.00	1.42	1.12
	A2G0	1.04	2.33	1.97	0.64
	A2GOF	49.17	62.50	52.32	45.09
	A1GOF	4.10	2.37	2.57	4.07
	A2G1F	16.46	16.72	20.45	19.48
	A2G2F	2.26	1.94	3.10	2.70
	A2G1	0.12	0.23	0.21	0.11

[0142] 대조군 빈 벡터 세포주에서, 평가한 8개의 복합체 글리칸 종 중에서 A2GOF가 우세한 종(49.17%)이었고, 다음은 A2G1F(16.46%) 및 다른 복합체 글리코폼이었다. 다양한 종의 백분율에 관한 유사한 경향이 M1M2 및 M1M2S에 대해 보였다. 그러나, M1M2 세포주의 경우에, A2GOF 글리코폼의 양은 대조군에 비해 27%만큼 상당히 증가되었다(유의도 값 $p=0.0076$). 이는 Mgat2의 과발현에 의해, 혼성 글리칸(A1GOM5)의 A2G0로의 효율적인 전환에 있었고, 따라서 대조군 세포주에 비해 더 많은 A2GOF 산물을 생성하기 위해 더 많은 기질이 푸코실트랜스퍼라제8(Fut8)에 대해 이용 가능하다는 것을 나타낸다. S1c35a2의 과발현은 이 실험에서 복합체 글리칸 수준의 상당한 증가를 야기하는 것으로 나타나지 않았지만, 이들 결과는 Mgat1 및 Mgat2의 과발현이 HM 글리칸의 복합체 글리코폼으로의 전환을 증가시킴으로써 HM 수준을 낮출 수 있다는 것을 시사한다.

[0143] 실시예 3

[0144] CHO 숙주 세포는 Mgat1, 또는 Mgat2 중 하나로 개별적으로 형질감염되거나, 또는 Mgat1과 Mgat2 발현 벡터 둘 다로 공동 형질감염되었다. 선택 배지에서 80% 초파의 생존도로 이들 세포의 회수 후에, 그들은 유세포 분석기를 이용하여 클로닝한 단일 세포였다. 총 291개의 클론을 Mgat1 및 Mgat2 유전자의 발현에 대해 분석하였다. 이

중에서, 고수준 만노스 유형 글리칸(MAb A)의 전통적으로 낮은(즉, 5% 미만) 수준의 인간 단클론성 항체를 발현시키는 재조합 CHO 세포주에서 검출한 수준을 초과하는 Mgat1 및 Mgat2 수준을 발현시키는 48개의 클론을 양호한 성장 및 생존도에 기반하여 선택하였다.

[0145] 모두 48개의 클론을 적어도 60 PDL(집단배가수준)에 대해 성장시켰고, 이 시간 공정 동안 Mgat 1 및 Mgat2의 mRNA 발현 수준을 3회의 상이한 시점에 분석하였다. 각각의 mRNA의 안정한 발현 수준에 기반하여 16개의 클론을 선택하였다. 이들 클론의 형질감염능력을 추가로 평가하기 위해, 모두 48개의 클론을 실질적으로 문헌[Remy and Michnick (1999), Proc. Natl. Acad. Sci., 96:5394-5399]에 의해 기재한 바와 같은 단백질-단편 상보성 분석에서 녹색 형광 단백질(GFP)-함유 벡터를 이용하여 일시적으로 형질감염시켰다.

[0146] 가장 높은 형질감염 효율을 나타내는 7개의 클론을 추가 분석을 위해 선택하였다. 대조군 CHO에 비해 상위 7개 클론의 Mgat1 및 Mgat2 mRNA 배수 변화를 표 6에 도시한다.

표 6

Mgat1 및 Mgat2의 전사체 수준의 평균 배수 증가			
클론명	설명	CHO에 비교한 Mgat1 배수 증가	CHO에 비교한 Mgat2 배수 증가
18E11	Mgat2 고	0.6	30.4
2B8	Mgat1 중	5.9	0.9
31H7	Mgat1 및 Mgat2 고	12.4	6.3
38C2	Mgat1 고	15.6	0.9
45F2	Mgat1 고	20.2	0.7
61A9	Mgat2 고	0.5	12.7
63C5	Mgat1 및 Mgat2 고	14.7	15.6
대조군		0.5	1.5

[0148] 고수준 만노스 유형 글리칸(MAb C)의 고수준(즉, 15% 초과)을 전통적으로 나타내는 단클론성 항체를 Mgat1 및/ 또는 Mgat2를 과발현시키는 공학 처리된 숙주 세포 또는 대조군 비공학 처리된 CHO 숙주 세포에서 형질감염을 위해 사용하였다. 적합한 풀을 생성하고, 앞서 설명한 바와 같이 제10일 유가 배양 생성 실행에서 추가 특성 규명을 위해 선택하였다. 분비된, 재조합 MAb C의 글리코폼 프로파일 및 역가를 각각의 과발현 세포주에 대해 평가하였다. 상당히 낮은 수준의 고수준 만노스 글리칸을 생성률(즉, 역가)에 영향을 미치는 일 없이 MAb C에 대한 대조군 숙주에 비교하여 숙주 38C2에서 검출하였다. 결과를 표 7에 나타내고; 값은 제10일 역가 및 유가 배양 생성 분석으로부터 얻은 글리칸 수준을 반영한다.

표 7

MAb C를 발현시키는 비증폭 클론의 역가 및 글리코실화 프로파일							
클론명	역가	A2GOF%	A2G1F%	A2G2F%	A-푸코%	M5%	HM
18E11	0.45	63.4	18.43	2.17	85.7	4.83	5.83
2B8	0.77	63.4	22.5	2.9	91.7	1.4	2.5
31H7	0.9	63.37	22.9	3.03	90.7	3.5	4.77
38C2	0.76	63.87	23.67	2.93	92.6	0.8	1.77
45F2	0.79	60.77	20.5	2.4	87.8	2.07	5.6
61A9	0.7	63.33	22.43	2.77	90.1	3.93	4.93
63C5	0.61	65.53	21.4	2.53	91.7	1.77	2.63
대조군	0.82	53.85	26.3	3.7	88.2	6.05	7.3
							1

[0150] 유사하게 150nM 및 300nM 증폭 풀을 생성하고 나서, 제10일 유가 배양 생성 분석에서 분석하였다. 150nM 풀의 경우에, 모든 과발현 숙주 세포는 역가에 영향을 미치는 일 없이 대조군 숙주 세포에 비해 상당히 더 낮은 고수준 만노스%를 나타내었다. 결과를 표 8 및 표 9에 나타낸다.

표 8

MAb C를 발현시키는 150nM 증폭 클론의 역가 및 글리코실화

PQA	상이한 글리코폼	대조군	2B8	31H7	38C2	45F2
역가		2.82	3.53	3.72	3.39	2.78
높은 만노스 (HM)	HM	16.2	5.55	10.6	4.17	6.73
	M8a	0.45	0.45	0.6	0.5	0.5
	M8b	0.55	0.3	0.33	0.3	0.47
	M7	1.4	1.05	0.8	1.07	1.77
	M6	1.9	1.7	0.93	1.77	2.57
	M5	11.85	2	7.93	0.53	1.43
혼성체	혼성체	13.75	13.2	12.37	12.93	11.75
복합체	A1G1F	1.3	1.15	0.13	1.2	0.87
	A1G0	0.8	4.7	0.83	4.7	7.2
	A2G0	0.75	0.8	2.03	0.77	0.67
	A2G0F	49.25	57.35	60.03	59.9	55.63
	A1G0F	4.15	5.25	2.7	3.53	6.9
	A2G1Fa	9.05	7.75	7.73	8.4	6.33
	A2G2F	2.15	1.6	1.6	1.77	1.2
대조군에 비교한 HM에 대한 p-값		1	0.0008*	0.0475*	0.0001*	0.0011*

[0151]

PQA	상이한 글리코폼	대조군	61A9	63C5	18E11
역가		2.82	2.53	2.99	3.25
높은 만노스 (HM)	HM	16.2	6.97	6.97	10.13
	M8a	0.45	0.43	0.63	0.47
	M8b	0.55	0.2	0.6	0.15
	M7	1.4	0.4	1.87	0.47
	M6	1.9	0.43	2.5	0.57
	M5	11.85	5.6	1.4	8.53
혼성체	혼성체	13.75	12.44	11.66	10.41
복합체	A1G1F	1.3	0.1	0.67	0.23
	A1G0	0.8	0.5	3.9	0.9
	A2G0	0.75	1.67	1.27	5.1
	A2G0F	49.25	63.57	60.73	62.07
	A1G0F	4.15	2.13	3.5	1.87
	A2G1Fa	9.05	8.5	7.13	6.07
	A2G2F	2.15	1.93	1.37	1.33
대조군에 비교한 HM에 대한 p-값		1	0.0013*	0.0013*	0.0301*

* p-값은 유의하다는 것을 나타낸다.

[0152]

300nM 증폭에 의해, 표 9에 나타낸 바와 같이 상당히 감소된 수준의 고수준 만노스 글리칸 수준을 5개 풀(61A9, 45F2, 63C5, 38C2 및 2B8)에 대해 검출하였다.

표 9

300nM 증폭 MAb C의 역가 및 글리코실화 프로파일

PQA	상이한 글리코폼	대조군	2B8	31H7	38C2	45F2
역가		2.59	4.39	4.63	4.69	3.48
높은 만노스 (HM)	HMN	19.6	6.2	11.27	6.27	8
	M8a	0.5	0.5	0.67	0.6	0.5
	M8b	0.5	0.4	0.4	0.5	0.8
	M7	1.4	1.25	0.97	1.8	2.8
	M6	1.8	1.8	1.13	2.77	3.6
	M5	15.4	2.3	8.17	0.67	0.3
혼성체	혼성체	12.4	13.15	11.93	13.13	11.6
표 9 계속						
복합체	A1G1F	1.1	1.2	0.1	1.4	0.8
	A1G0	1.1	4.35	0.87	5.27	6.85
	A2G0	0.8	1.15	2.07	0.9	0.75
	A2G0F	48.8	57.15	60.13	56.83	55.15
	A1G0F	4.7	4.7	2.77	4.13	6.85
	A2G1Fa	7.6	7.7	7.17	7.53	5.75
	A2G2F	1.6	1.6	1.47	1.5	1.05
대조군에 비교한 HM에 대한 p-값		1	0.0119*	0.1039	0.0083*	0.0283*

[0154]

PQA	상이한 글리코폼	대조군	61A9	63C5	18E11
역가		2.59	2.53	3.4	3.98
높은 만노스 (HM)	HMN	19.6	9.13	7.83	13.47
	M8a	0.5	0.5	0.87	0.47
	M8b	0.5	0.23	0.8	0.2
	M7	1.4	0.5	2.1	0.63
	M6	1.8	0.63	2.77	0.8
	M5	15.4	7.2	1.23	11.4
혼성체	혼성체	12.4	11.6	12.17	9.75
복합체	A1G1F	1.1	0.1	0.7	0.2
	A1G0	1.1	0.73	3.23	1.2
	A2G0	0.8	2	1.13	4.7
	A2G0F	48.8	62.8	59.87	60.23
	A1G0F	4.7	2.77	3.33	2.53
	A2G1Fa	7.6	7.2	7.03	5.07
	A2G2F	1.6	1.53	1.43	0.97
대조군에 비교한 HM에 대한 p-값		1	0.0359*	0.0185*	0.2835

*p 값은 유의하다는 것을 나타냄

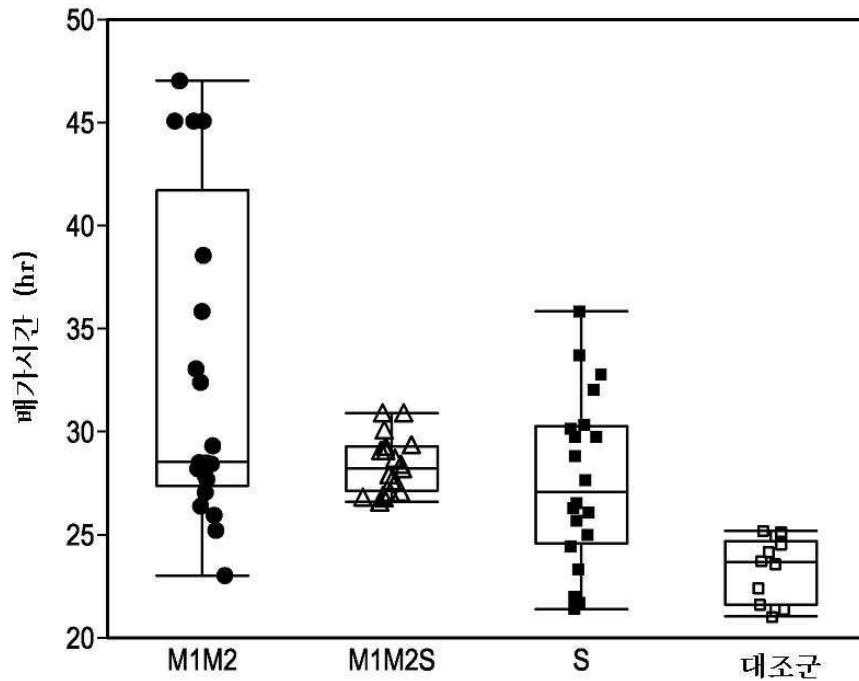
[0155]

이를 결과는 Mga1 및/또는 Mga2를 과발현시키기 위해 형질감염된 숙주 세포가 HM 글리칸의 복합체 글리코폼으

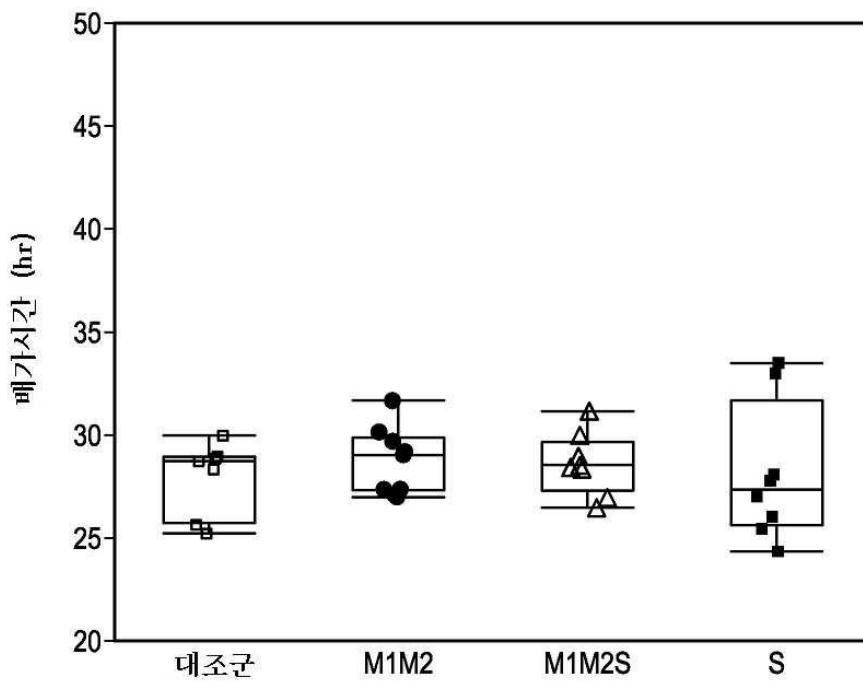
로의 전환을 증가시키고, 따라서 HM 수준을 감소시키는 재조합 단백질을 제조하는데 사용될 수 있다는 것을 나타낸다.

도면

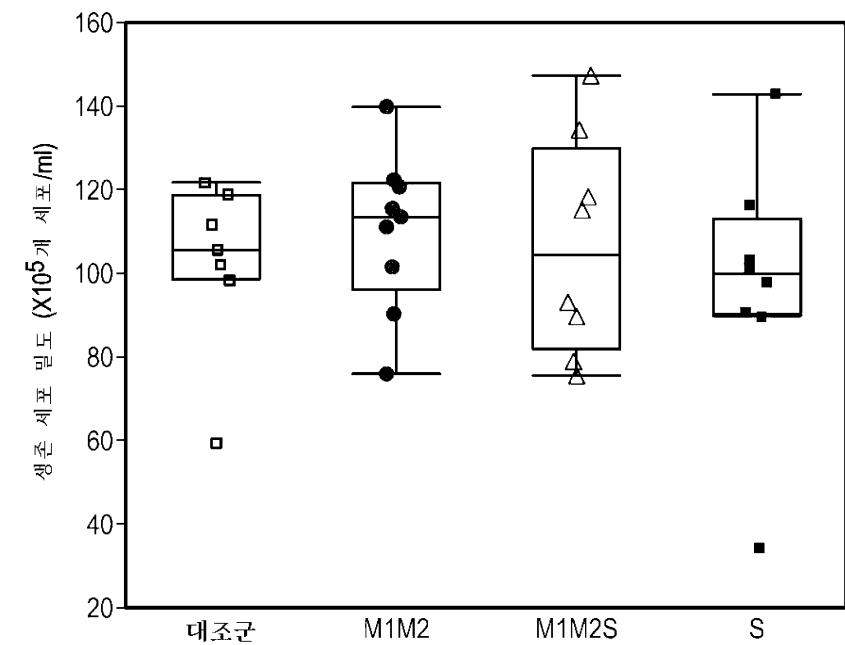
도면1



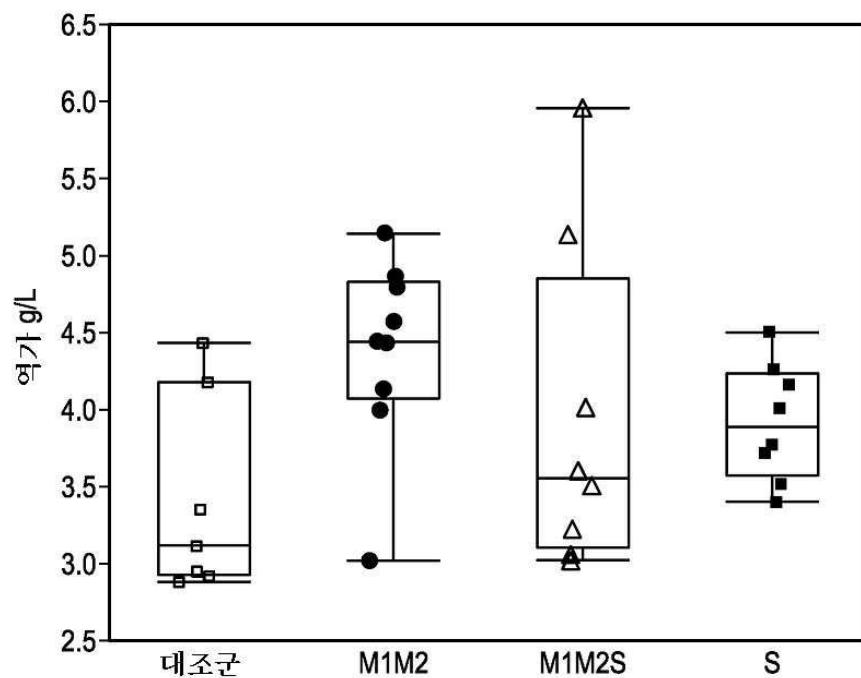
도면2



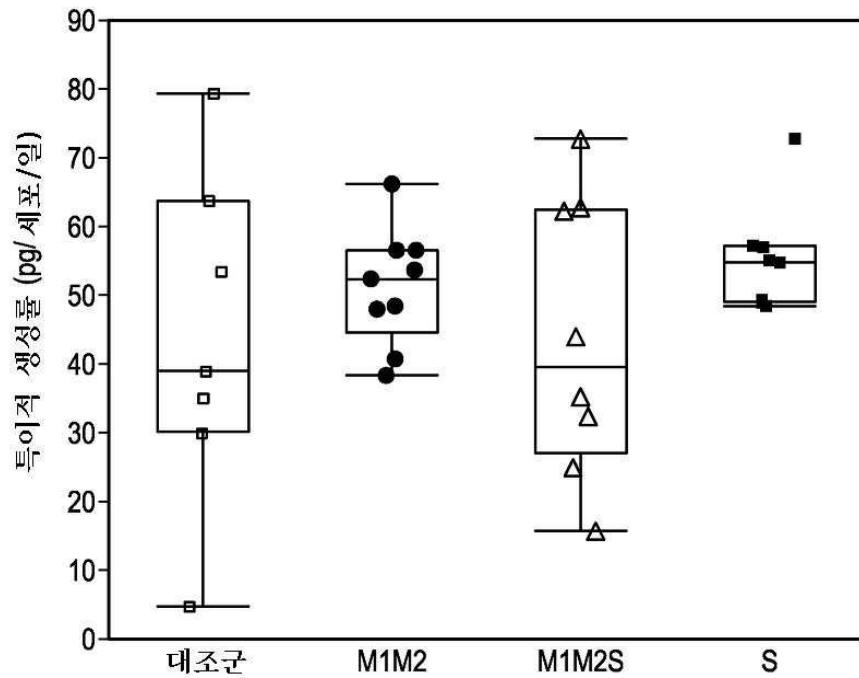
도면3



도면4



도면5



도면6

