



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0042125
(43) 공개일자 2023년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 21/02 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 21/02 (2013.01)
C07K 14/70521 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7008351
(22) 출원일자(국제) 2021년08월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년03월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/046029
(87) 국제공개번호 WO 2022/036275
국제공개일자 2022년02월17일
(30) 우선권주장
63/066,122 2020년08월14일 미국(US)

(71) 출원인
브리스톨-마이어스 스텝 컴퍼니
미국, 뉴저지 08543-4000, 프린스턴, 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드
(72) 발명자
루이스, 아만다 모건
미국 01434 매사추세츠 테벤스 잭슨 로드 38
마스카스, 다니엘 로버트
미국 01434 매사추세츠 테벤스 잭슨 로드 38
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이귀동

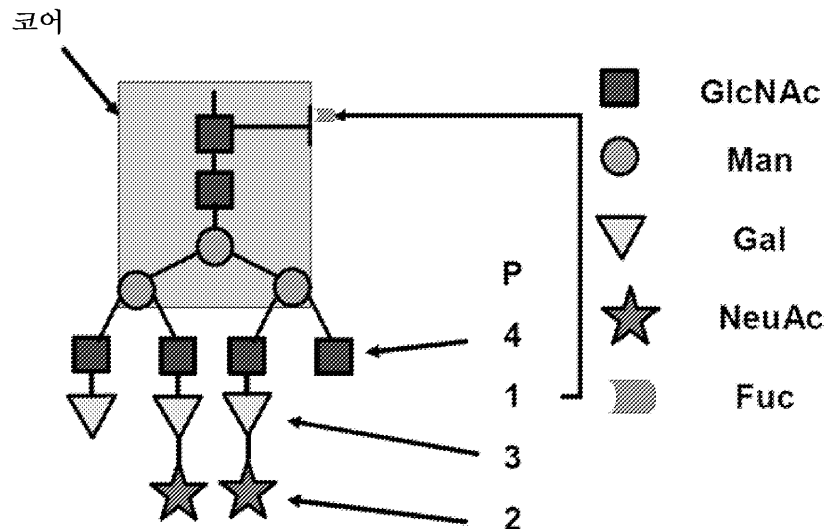
전체 청구항 수 : 총 139 항

(54) 발명의 명칭 단백질에 대한 제조 공정

(57) 요약

본 개시내용은 생산 동안 단백질의 글리코실화 프로파일을 제어하는 신규한 방법을 제공한다. 본 개시내용은 또한 단백질의 글리코실화 프로파일을 제어하면서 단백질 수득량을 개선시키는 신규한 방법을 제공한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C12N 5/0018 (2013.01)

C12P 21/005 (2013.01)

G01N 33/5308 (2013.01)

G01N 33/582 (2013.01)

G01N 33/68 (2013.01)

C12N 2523/00 (2013.01)

G01N 2333/70521 (2013.01)

(72) 발명자

가르, 에릭 리처드

미국 01434 매사추세츠 데벤스 잭슨 로드 38

워렐, 다이앤 케이

미국 01434 매사추세츠 데벤스 잭슨 로드 38

루드윅, 리처드 토마스

미국 08543 뉴저지 프린스턴 루트 206 앤드 프로빈
스 라인 로드

명세서

청구범위

청구항 1

단백질을 생산하기 위한 세포의 세포 성장 속도, 세포 생존력, 생존 세포 밀도 및/또는 역가를 제어하는 방법으로서, 세포를 생물반응기에서 단백질 유도 상 동안 36℃의 초기 온도 설정치 하에서 배양하고, 세포를 33℃의 제2 온도 설정치 및 31℃의 최종 온도 설정치에서 배양하는 것을 포함하는 방법.

청구항 2

세포에 의한 단백질의 수득량을 개선시키는 방법으로서, 세포를 생물반응기에서 적합한 조건 하에서 배양하는 것을 포함하고, 여기서 적합한 조건은 (i) 36.0℃의 초기 온도 설정치 및 36℃ 미만의 제2 온도 설정치; (ii) 36.5℃ 미만의 초기 온도 설정치 및 31℃의 최종 온도 설정치; 또는 (iii) 36.5℃ 미만의 초기 온도 설정치, 33℃의 제2 온도 설정치, 및 33℃ 미만의 최종 온도 설정치를 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 적합한 조건이 7.0의 초기 pH 설정치 및 6.9의 제2 pH 설정치 또는 pH 6.9의 초기 pH 설정치를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 적합한 조건이 약 96시간에서의 pH 이동을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 적합한 조건이 약 0.30×10^6 개의 세포/mL의 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 적합한 조건이 15% 내지 25%의 초기 CO₂ 설정치를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 적합한 조건이 약 76시간에서의 제1 공급 시간을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 8

세포에 의한 단백질의 수득량을 개선시키는 방법으로서, 세포를 생물반응기에서 단백질 유도 상 동안 적합한 조건 하에서 배양하는 것을 포함하고, 여기서 적합한 조건은 하기를 포함하는 것인 방법:

- 36℃의 초기 온도 설정치, 33℃의 제2 온도 설정치, 및 31℃의 제3 온도 설정치;
- 7.0의 초기 pH 설정치 및 6.9의 제2 pH 설정치 또는 6.9의 초기 pH;
- 0.15×10^6 개의 세포/mL 내지 0.45×10^6 개의 세포/mL의 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치;
- 10% 내지 40%의 초기 CO₂ 설정치; 또는
- 이들의 임의의 조합.

청구항 9

제1항에 있어서, 적합한 조건이 하기를 포함하는 것인 방법:

- a. 36℃의 초기 온도 설정치, 33℃의 제2 온도 설정치, 및 31℃의 제3 온도 설정치;
- b. 7.0의 초기 pH 설정치 및 6.9의 제2 pH 설정치;
- c. 약 0.30×10^6 개의 세포/mL의 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치; 및
- d. 15% 내지 25%의 초기 CO₂ 설정치.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 최종 온도 설정치가 약 228 내지 약 252시간에서 발생하는 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 최종 온도 설정치가 초기 온도 설정치 후 약 228시간, 약 234시간, 약 240시간, 약 246시간, 또는 약 252시간에서 발생하는 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 최종 온도 설정치가 31℃이고, 240시간 후에 발생하는 것인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 온도 설정치가 약 120시간 내지 약 168시간에서 발생하는 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 제2 온도 설정치가 약 120시간, 약 126시간, 약 132시간, 약 138시간, 약 144시간, 약 150시간, 약 156시간, 약 162시간, 또는 약 168시간에서 발생하는 것인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 온도 설정치가 144시간 후에 33℃인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 조건이 단백질 수득량을 적합한 조건 없는 방법과 비교하여 적어도 150%, 적어도 약 160 %, 적어도 약 170 %, 적어도 약 180 %, 적어도 약 190 %, 적어도 약 200 %, 적어도 약 210 %, 적어도 약 220 %, 적어도 약 230 %, 적어도 약 240 %, 적어도 약 250 %, 적어도 약 260 %, 적어도 약 270 %, 적어도 약 280 %, 적어도 약 290 %, 적어도 약 300 %, 적어도 약 310 %, 적어도 약 320 %, 적어도 약 330 %, 적어도 약 340 %, 적어도 약 350 %, 적어도 약 360 %, 적어도 약 370 %, 적어도 약 380 %, 적어도 약 390 %, 또는 적어도 약 400 % 개선시키는 것인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 세포 성장 속도를 감소시키는 것인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 세포 성장이 약 30.0시간 내지 약 40.0시간의 평균 0-5일 배가 시간을 나타내는 것인 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 세포 성장이 약 35.1시간의 평균 0-5일 배가 시간을 나타내는 것인 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 세포 생존력을 제어하는 것인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 세포 생존력이 약 10.0×10^6 개의 세포/mL 내지 약 15.0×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타내는 것인 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 세포 생존력이 약 11.2×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타내는 것인 방법.

청구항 23

제20항에 있어서, 세포 생존력이 약 0.05×10^9 개의 세포/mL 내지 약 0.11×10^9 개의 세포/mL의 평균 0-14일 생존 세포 밀도의 적분 (IVCD)을 나타내는 것인 방법.

청구항 24

제21항에 있어서, 세포 생존력이 약 0.10×10^9 개의 세포/mL의 평균 0-14일 생존 세포 밀도의 적분 (IVCD)을 나타내는 것인 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 역가를 제어하는 것인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 역가가 약 1.50 g/L 내지 약 3.5 g/L의 평균 제14일 역가를 나타내는 것인 방법.

청구항 27

제25항에 있어서, 역가가 약 2.87 g/L의 평균 제14일 역가를 나타내는 것인 방법.

청구항 28

제25항에 있어서, 역가가 약 20.0 pg/세포-일 내지 약 40.0 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타내는 것인 방법.

청구항 29

제25항에 있어서, 역가가 약 38.5 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타내는 것인 방법.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 공정이 상류 생물반응기 파라미터를 변형시키는 것을 추가로 포함하고, 여기서 상류 반응기 파라미터는 (i) 공급 시간, (ii) 초기 pH, (iii) pH 이동, (iv) CO₂, (v) 초기 세포 밀도, 또는 (vi) 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 단백질의 글리코실화 프로파일을 제어하는 것인 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 글리코실화 프로파일이 하나 이상의 N-연결된 글리칸을 포함하는 것인 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, N-연결된 글리칸이 G0F, G1F, G2F, S1G1F, S1G2F, 및/또는 S2G2F를 포함하는 것인 방법.

청구항 34

제31항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 제14일 후에 글리코실화 프로파일을 측정하는 것을 추가로 포함하

는 방법.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질이 CTLA4 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 36

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질이 융합 단백질인 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 융합 단백질이 Fc 부분을 포함하는 것인 방법.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질이 아바타셉트인 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 단백질이 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 아미노산 서열인 방법.

청구항 40

제33항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, GOF가 약 7.0% 또는 약 6.5% 이하의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 41

제33항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, G1F가 약 7.5% 또는 약 7% 이하의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 42

제33항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, G2F가 약 25% 이하의 또는 약 1.5% 내지 약 23%의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 43

제33항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, S1G1F가 약 13.5% 또는 약 12.5% 이하의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 44

제33항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, S1G2F가 약 33% 이상의 또는 약 32% 내지 약 49%의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 45

제33항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, S2G2F가 약 12% 이상의 또는 약 14% 내지 약 48.5%의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 46

제33항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, G2F가 약 1.5% 내지 약 23%의 상대 풍부도를 포함하고/거나, S1G2F가 약 32% 내지 약 49%의 상대 풍부도를 포함하고/거나, S2G2F가 약 14% 내지 약 48.5%의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 47

제33항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, G2F가 약 25% 이하의 상대 풍부도를 포함하고/거나, S1G2F가 약 33% 이상의 상대 풍부도를 포함하고/거나, S2G2F가 약 12% 이상의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 48

제33항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, GOF가 약 6.5% 이하의 상대 풍부도를 포함하고/거나, G1F가 약 7% 이하의 상대 풍부도를 포함하고/거나, G2F가 약 1.5% 내지 약 23%의 상대 풍부도를 포함하고/거나, S1G1F가 약 12.5% 이하의 상대 풍부도를 포함하고/거나, S1G2F가 약 32% 내지 약 49%의 상대 풍부도를 포함하고/거나, S2G2F가 약 14% 내지 약 48.5%의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 49

제33항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, GOF가 약 7.0% 이하의 상대 풍부도를 포함하고/거나, G1F가 약 7.5% 이하의 상대 풍부도를 포함하고/거나, G2F가 약 25% 이하의 상대 풍부도를 포함하고/거나, S1G1F가 약 13.5% 이하의 상대 풍부도를 포함하고/거나, S1G2F가 약 33% 이상의 상대 풍부도를 포함하고/거나, S2G2F가 약 12% 이상의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 50

제39항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 아바타셉트의 Asn76 (T5), Asn108 (T7), 및/또는 Asn207 (T14)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 잔기에 위치하는 것인 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 2.0% 내지 약 10.0%의 GOF의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 2.5% 내지 약 10%, 약 2.5%, 약 9.5%, 약 2.5% 내지 약 9%, 약 2.5% 내지 약 8.5%, 약 2.5% 내지 약 8%, 약 2.5% 내지 약 7.5%, 약 2.5% 내지 약 7%, 약 2.5% 내지 약 6.5%, 약 3.0% 내지 약 10%, 약 3.0%, 약 9.5%, 약 3.0% 내지 약 9%, 약 3.0% 내지 약 8.5%, 약 3.0% 내지 약 8%, 약 3.0% 내지 약 7.5%, 약 3.0% 내지 약 7%, 또는 약 3.0% 내지 약 6.5%의 GOF의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 53

제51항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 3.2% 내지 6.6%, 약 3.2% 내지 약 4.6%, 또는 3.2% 내지 약 6.6%의 GOF의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 54

제51항에 있어서, GOF의 상대 풍부도가 약 4.0%인 방법.

청구항 55

제50항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 1.0% 내지 약 6%의 GOF의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 56

제50항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 1.0% 내지 약 6%, 약 1.0% 내지 약 5.5%, 약 1.0% 내지 약 5.0%, 약 1.0% 내지 약 4.5%, 약 1.0% 내지 약 4.0%, 약 1.5% 내지 약 6%, 약 1.5% 내지 약 5.5%, 약 1.5% 내지 약 5.0%, 약 1.5% 내지 약 4.5%, 약 1.5% 내지 약 4.0%, 약 2.0% 내지 약 6%, 약 2.0% 내지 약 5.5%, 약 2.0% 내지 약 5.0%, 약 2.0% 내지 약 4.5%, 또는 약 2.0% 내지 약 4.0%의 GOF의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 57

제50항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 2.1% 내지 약 4.0%, 약 1.8% 내지 약 3.5%, 또는 약 1.8% 내지 4.0%의 GOF의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 58

제57항에 있어서, G0F의 상대 풍부도가 약 3.4%인 방법.

청구항 59

제50항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 5% 내지 약 12%의 G2F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 60

제50항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 5% 내지 약 12%, 약 5% 내지 약 11.5%, 약 5% 내지 약 11%, 약 5% 내지 약 10.5%, 약 5% 내지 약 10%, 약 5.5% 내지 약 12%, 약 5.5% 내지 약 11.5%, 약 5.5% 내지 약 11%, 약 5.5% 내지 약 10.5%, 약 5.5% 내지 약 10%, 약 6% 내지 약 12%, 약 6% 내지 약 11.5%, 약 6% 내지 약 11%, 약 6% 내지 약 10.5%, 약 6% 내지 약 10%, 약 6.5% 내지 약 12%, 약 6.5% 내지 약 11.5%, 약 6.5% 내지 약 11%, 약 6.5% 내지 약 10.5%, 약 6.5% 내지 약 10%, 약 7% 내지 약 12%, 약 7% 내지 약 11.5%, 약 7% 내지 약 11%, 약 7% 내지 약 10.5%, 또는 약 7% 내지 약 10%의 G2F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 61

제50항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 7.2% 내지 약 9.8%, 약 6.3% 내지 10.6%, 또는 약 7.2% 내지 약 10.6%의 G2F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, G2F의 상대 풍부도가 약 7.8%인 방법.

청구항 63

제50항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 5% 내지 약 21%의 G2F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 64

제50항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 5% 내지 약 21%, 약 5% 내지 약 20.5%, 약 5% 내지 약 20%, 약 5% 내지 약 19.5%, 약 5% 내지 약 19%, 약 5.5% 내지 약 21%, 약 5.5% 내지 약 20.5%, 약 5.5% 내지 약 20%, 약 5.5% 내지 약 19.5%, 약 5.5% 내지 약 19%, 약 6% 내지 약 21%, 약 6% 내지 약 20.5%, 약 6% 내지 약 20%, 약 6% 내지 약 19.5%, 약 6% 내지 약 19%, 약 6.5% 내지 약 21%, 약 6.5% 내지 약 20.5%, 약 6.5% 내지 약 20%, 약 6.5% 내지 약 19.5%, 약 6.5% 내지 약 19%, 약 7% 내지 약 21%, 약 7% 내지 약 20.5%, 약 7% 내지 약 20%, 약 7% 내지 약 19.5%, 약 7% 내지 약 19%, 약 7.5% 내지 약 21%, 약 7.5% 내지 약 20.5%, 약 7.5% 내지 약 20%, 약 7.5% 내지 약 19.5%, 약 7.5% 내지 약 19%, 약 8% 내지 약 21%, 약 8% 내지 약 20.5%, 약 8% 내지 약 20%, 약 8% 내지 약 19.5%, 또는 약 8% 내지 약 19%의 G2F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 65

제50항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 8.2% 내지 약 14.1%, 약 8.0% 내지 약 18.6%, 또는 약 8.2% 내지 약 14.1%의 G2F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, G2F의 상대 풍부도가 약 12.4%인 방법.

청구항 67

제63항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, G2F가 갈락토스-알파-1,3-갈락토스 모이어티 (G2F-Gal)를 추가로

포함하고, G2F-Gal이 약 1.4% 이하의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, G2F-Gal이 약 1.0% 내지 약 1.4%의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 69

제67항에 있어서, G2F-Gal이 약 0.4% 내지 약 0.9%의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 70

제50항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 29% 내지 약 38%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 71

제50항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 29% 내지 약 38%, 약 29% 내지 약 37.5%, 약 29% 내지 약 37%, 약 29% 내지 약 36.5%, 약 29.5% 내지 약 38%, 약 29.5% 내지 약 37.5%, 약 29.5% 내지 약 37%, 약 29.5% 내지 약 36.5%, 약 30% 내지 약 38%, 약 30% 내지 약 37.5%, 약 30% 내지 약 37%, 약 30% 내지 약 36.5%, 약 31.5% 내지 약 38%, 약 31.5% 내지 약 37.5%, 약 31.5% 내지 약 37%, 약 31.5% 내지 약 36.5%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 72

제50항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 31.6% 내지 약 35.1%, 약 31.3% 내지 약 36.5%, 또는 약 31.3% 내지 약 36.5%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 73

제72항에 있어서, S1G2F의 상대 풍부도가 약 33.3%인 방법.

청구항 74

제50항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 33% 내지 약 45%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 75

제50항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 33% 내지 약 45%, 약 33% 내지 약 44.5%, 약 33% 내지 약 44%, 약 33% 내지 약 43.5%, 약 33% 내지 약 43%, 약 33% 내지 약 42.5%, 약 33.5% 내지 약 45%, 약 33.5% 내지 약 44.5%, 약 33.5% 내지 약 44%, 약 33.5% 내지 약 43.5%, 약 33.5% 내지 약 43%, 약 33.5% 내지 약 42.5%, 약 34% 내지 약 45%, 약 34% 내지 약 44.5%, 약 34% 내지 약 44%, 약 34% 내지 약 43.5%, 약 34% 내지 약 43%, 약 34% 내지 약 42.5%, 약 34.5% 내지 약 45%, 약 34.5% 내지 약 44.5%, 약 34.5% 내지 약 44%, 약 34.5% 내지 약 43.5%, 약 34.5% 내지 약 43%, 또는 약 34.5% 내지 약 42.5%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 76

제50항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 34.2% 내지 약 37.7%, 약 35.5% 내지 약 42.3%, 또는 약 34.2% 내지 약 42.3%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 77

제76항에 있어서, S1G2F의 상대 풍부도가 약 36.5%인 방법.

청구항 78

제74항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, S1G2F가 갈락토스-알파-1, 3-갈락토스 모이어티 (S1G2F-Gal)를 추가로 포함하고, S1G2F-Gal이 약 4.7% 이하의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 79

제78항에 있어서, S1G2F-Gal이 약 2.3% 내지 약 4.7%의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 80

제78항에 있어서, S1G2F-Gal이 약 1.4% 내지 약 1.8%의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 81

제50항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 13% 내지 약 25%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 82

제50항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 13% 내지 약 25%, 약 13% 내지 약 24.5%, 약 13% 내지 약 24%, 약 13% 내지 약 23.5%, 약 13% 내지 약 23%, 약 13.5% 내지 약 25%, 약 13.5% 내지 약 24.5%, 약 13.5% 내지 약 24%, 약 13.5% 내지 약 23.5%, 약 13.5% 내지 약 23%, 약 14% 내지 약 25%, 약 14% 내지 약 24.5%, 약 14% 내지 약 24%, 약 14% 내지 약 23.5%, 약 14% 내지 약 23%, 약 14.5% 내지 약 25%, 약 14.5% 내지 약 24.5%, 약 14.5% 내지 약 24%, 약 14.5% 내지 약 23.5%, 약 14.5% 내지 약 23%, 약 15% 내지 약 25%, 약 15% 내지 약 24.5%, 약 15% 내지 약 24%, 약 15% 내지 약 23.5%, 약 15% 내지 약 23%, 약 15.5% 내지 약 25%, 약 15.5% 내지 약 24.5%, 약 15.5% 내지 약 24%, 약 15.5% 내지 약 23.5%, 또는 약 15.5% 내지 약 23%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 83

제50항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 18.1% 내지 약 22.9%, 약 15.4% 내지 약 20%, 약 15.4% 내지 약 22.9%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 84

제83항에 있어서, S2G2F의 상대 풍부도가 약 18.5%인 방법.

청구항 85

제50항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 18% 내지 약 36%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 86

제50항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 18% 내지 약 36%, 약 18% 내지 약 35.5%, 약 18% 내지 약 35%, 약 18% 내지 약 34.5%, 약 18% 내지 약 34%, 약 18% 내지 약 33.5%, 약 18.5% 내지 약 36%, 약 18.5% 내지 약 35.5%, 약 18.5% 내지 약 35%, 약 18.5% 내지 약 34.5%, 약 18.5% 내지 약 34%, 약 18.5% 내지 약 33.5%, 약 19% 내지 약 36%, 약 19% 내지 약 35.5%, 약 19% 내지 약 35%, 약 19% 내지 약 34.5%, 약 19% 내지 약 34%, 약 19% 내지 약 33.5%, 약 19.5% 내지 약 36%, 약 19.5% 내지 약 35.5%, 약 19.5% 내지 약 35%, 약 19.5% 내지 약 34.5%, 약 19.5% 내지 약 34%, 약 19.5% 내지 약 33.5%, 약 20% 내지 약 36%, 약 20% 내지 약 35.5%, 약 20% 내지 약 35%, 약 20% 내지 약 34.5%, 약 20% 내지 약 34%, 약 20% 내지 약 33.5%, 약 20.5% 내지 약 36%, 약 20.5% 내지 약 35.5%, 약 20.5% 내지 약 35%, 약 20.5% 내지 약 34.5%, 약 20.5% 내지 약 34%, 또는 약 20.5% 내지 약 33.5%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 87

제50항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 23.2% 내지 약 33.8%, 약 20.8% 내지 약 32.6%, 또는 약 20.8% 내지 약 33.8%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함하는

것인 방법.

청구항 88

제87항에 있어서, S2G2F의 상대 풍부도가 약 23.5%인 방법.

청구항 89

제50항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 2% 내지 약 8%의 S1G3F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 90

제50항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 2% 내지 약 8%, 약 2% 내지 약 7.5%, 약 2% 내지 약 7%, 약 2% 내지 약 6.5%, 약 2% 내지 약 6%, 약 2% 내지 약 5.5%, 약 2.5% 내지 약 8%, 약 2.5% 내지 약 7.5%, 약 2.5% 내지 약 7%, 약 2.5% 내지 약 6.5%, 약 2.5% 내지 약 6%, 약 2.5% 내지 약 5.5%, 약 3% 내지 약 8%, 약 3% 내지 약 7.5%, 약 3% 내지 약 7%, 약 3% 내지 약 6.5%, 약 3% 내지 약 6%, 약 3% 내지 약 5.5%, 약 3.5% 내지 약 8%, 약 3.5% 내지 약 7.5%, 약 3.5% 내지 약 7%, 약 3.5% 내지 약 6.5%, 약 3.5% 내지 약 6%, 약 3.5% 내지 약 5.5%, 약 4% 내지 약 8%, 약 4% 내지 약 7.5%, 약 4% 내지 약 7%, 약 4% 내지 약 6.5%, 약 4% 내지 약 6%, 또는 약 4% 내지 약 5.5%의 S1G3F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 91

제50항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 4.4% 내지 약 5.6% 또는 약 4.0% 내지 약 5.5%의 S1G3F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 92

제91항에 있어서, S1G3F의 상대 풍부도가 약 4.6%인 방법.

청구항 93

제50항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 0.5% 내지 약 4%의 S1G3F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 94

제50항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 0.5% 내지 약 4%, 약 0.5% 내지 약 3.5%, 약 0.5% 내지 약 3%, 약 0.5% 내지 약 2.5%, 약 1% 내지 약 4%, 약 1% 내지 약 3.5%, 약 1% 내지 약 3%, 또는 약 1% 내지 약 2.5%의 S1G3F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 95

제50항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 1.4% 내지 약 2.2%, 약 1.1% 내지 약 1.9%, 또는 약 1.1% 내지 약 2.2%의 S1G3F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 96

제95항에 있어서, S1G3F의 상대 풍부도가 약 1.8%인 방법.

청구항 97

제50항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 0.5% 내지 약 4%의 S2G4F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 98

제50항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약

0.5% 내지 약 4%, 약 0.5% 내지 약 3.5%, 약 0.5% 내지 약 3%, 약 0.5% 내지 약 2.5%, 약 1% 내지 약 4%, 약 1% 내지 약 3.5%, 약 1% 내지 약 3%, 또는 약 1% 내지 약 2.5%의 S2G4F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 99

제50항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 1.9% 내지 약 2.4%, 약 1.4% 내지 약 2.1%, 또는 약 1.4% 내지 약 2.4%의 S2G4F의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 100

제99항에 있어서, S2G4F의 상대 풍부도가 약 2.3%인 방법.

청구항 101

제32항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 시알산이고, 약 8 내지 약 11의 NANA의 몰 비를 갖는 것인 방법.

청구항 102

제32항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 시알산이고, 약 8.3 내지 약 11, 약 9.5 내지 약 10.1, 또는 약 8.3 내지 약 10.1의 NANA의 몰 비를 갖는 것인 방법.

청구항 103

제102항에 있어서, NANA의 몰 비가 약 10.0인 방법.

청구항 104

제32항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 시알산이고, 약 0.1 내지 약 2.0의 NGNA의 몰 비를 갖는 것인 방법.

청구항 105

제32항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 시알산이고, 0.90 내지 약 1.20 또는 약 0.3 내지 약 1.2의 NGNA의 몰 비를 갖는 것인 방법.

청구항 106

제105항에 있어서, NGNA의 몰 비가 약 1.0인 방법.

청구항 107

제32항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 글리코실화 프로파일이 N-연결된 탄수화물 프로파일 방출 방법을 통해 분석되는 것인 방법.

청구항 108

제107항에 있어서, 글리코실화 프로파일이 하나 이상의 비시알릴화된 글리칸 (도메인 I), 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II), 디-시알릴화된 글리칸 (도메인 III), 및/또는 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)을 포함하는 것인 방법.

청구항 109

제108항에 있어서, 비시알릴화된 글리칸 (도메인 I)이 약 28 내지 약 37, 약 29 내지 약 32, 약 28 내지 약 32, 또는 약 29 내지 약 37의 몰 비를 갖는 것인 방법.

청구항 110

제109항에 있어서, 비시알릴화된 글리칸 (도메인 I)이 약 31의 몰 비를 갖는 것인 방법.

청구항 111

제108항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)이 약 26 내지 약 28, 약 27 내지 약 33, 약 26 내지 약 33, 약 27 내지 약 28의 몰 비를 갖는 것인 방법.

청구항 112

제111항에 있어서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)이 약 27의 몰 비를 갖는 것인 방법.

청구항 113

제108항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 디-시알릴화된 글리칸 (도메인 III)이 약 27 내지 약 28, 약 22 내지 약 31, 약 27 내지 약 31, 또는 약 22 내지 약 28의 몰 비를 갖는 것인 방법.

청구항 114

제113항에 있어서, 디-시알릴화된 글리칸 (도메인 III)이 약 27.4의 몰 비를 갖는 것인 방법.

청구항 115

제108항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)이 약 13 내지 약 16, 약 8 내지 약 16, 또는 약 8 내지 약 16의 몰 비를 갖는 것인 방법.

청구항 116

제115항에 있어서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)이 약 14.6의 몰 비를 갖는 것인 방법.

청구항 117

제31항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 글리코실화 프로파일이 하나 이상의 O-연결된 글리칸을 포함하는 것인 방법.

청구항 118

제31항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 글리코실화 프로파일이 하나 초과와 갈락토스-알파-1,3-갈락토스 (알파-gal) 연결을 포함하지 않는 것인 방법.

청구항 119

제35항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, CTLA4가 C-말단 리신을 포함하는 것인 방법.

청구항 120

제119항에 있어서, C-말단 리신이 약 20% 내지 약 25%의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 121

제119항에 있어서, C-말단 리신이 약 3% 내지 약 10%의 상대 풍부도를 포함하는 것인 방법.

청구항 122

제117항에 있어서, O-연결된 글리칸이 잔기 Ser129, Ser130, Ser136, 및/또는 Ser139에 위치하는 것인 방법.

청구항 123

제1항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 생물반응기가 글루코스 또는 갈락토스를 포함하는 공급 배지를 포함하는 것인 방법.

청구항 124

제1항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 포유동물 세포인 방법.

청구항 125

제124항에 있어서, 세포가 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포인 방법.

청구항 126

제125항에 있어서, 세포가 CHO-K1 세포, CHO-DXB11 세포, 또는 CHO-DG44 세포인 방법.

청구항 127

CTLA4-Fc 융합 단백질의 이중-안테나성 글리칸을 분석하는 방법으로서, CTLA4 단백질에서의 하나 이상의 아스파라긴 잔기에 부착된 하나 이상의 N-연결된 글리칸을 측정하는 것을 포함하고, 여기서 이중-안테나성 글리칸 중 하나는 G2F인 방법.

청구항 128

제127항에 있어서, 이중-안테나성 글리칸이 G0F, G1F, G2F, S1G1F, S1G2F, 및/또는 S2G2F로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 129

제127항 또는 제128항에 있어서, 이중-안테나성 글리칸이 형광 검출을 갖는 초성능 액체 크로마토그래피 (UPLC-FLR)를 통해 측정되는 것인 방법.

청구항 130

제127항 내지 제129항 중 어느 한 항에 있어서, 이중-안테나성 글리칸이 HILIC N-연결된 글리칸 프로파일링 방법을 통해 측정되는 것인 방법.

청구항 131

제127항 내지 제129항 중 어느 한 항에 있어서, CTLA4 -Fc 융합 단백질의 Fc 도메인이 측정 전에 절단되는 것인 방법.

청구항 132

CTLA4-Fc 융합 단백질의 이중-안테나성 글리칸을 분석하는 방법으로서, CTLA4-Fc 융합 단백질의 등전위 포커싱을 수행하는 것을 포함하는 방법.

청구항 133

제132항에 있어서, 등전위 포커싱이 영상화 모세관 등전위 포커싱인 방법.

청구항 134

제132항 또는 제133항에 있어서, 등전위 포커싱된 CTLA4-Fc 융합 단백질이 그룹 I, 그룹 II, 및 그룹 III을 형성하는 것인 방법.

청구항 135

제134항에 있어서, 그룹 I이 전체의 4% 이하이고/거나, 그룹 II가 전체의 87% 이상이고/거나, 그룹 III이 전체의 10% 이하인 방법.

청구항 136

제1항 내지 제131항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 세포.

청구항 137

제136항에 있어서, 세포가 포유동물 세포인 세포.

청구항 138

제137항에 있어서, 세포가 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포인 세포.

청구항 139

제138항에 있어서, 세포가 CHO-K1 세포, CHO-DXB11 세포, 또는 CHO-DG44 세포인 세포.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 관련 출원에 대한 상호-참조

[0002] 본 출원은 2020년 8월 14일에 출원된 미국 가출원 번호 63/066,122의 우선권을 주장하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] EFS-웹을 통해 전자적으로 제출된 서열 목록에 대한 참조

[0004] 본 출원과 함께 출원된 ASCII 텍스트 파일 (명칭 3338_188PC01_Seqlisting_ST25.txt; 크기: 24,720 바이트; 및 생성일: 2021년 8월 12일)로의 전자적으로 제출된 서열 목록의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0005] 단백질 치료제에 대한 시장은 상당히 성장하였으며, 개발의 속도는 계속 증가하고 있다. 그러나, 양을 유지하고, 생산의 비용을 감소시키고, 생산 유연성을 제공하면서, 목적하는 품질 속성, 예를 들어, 글리코실화를 유지하는 것은 산업에 대한 과제이다. 단백질 치료제의 효율적인 제조 규모 생산은 시장의 요구를 계속 충족시키기 위해 요구된다.

[0006] 글리코실화는 모든 단백질 번역후 변형 (PTM)의 가장 풍부한 것 중 하나이다. 이는 당단백질을 형성하기 위한 단백질 측쇄에의 당 잔기의 첨가로부터 초래된다. 포유동물 당단백질 올리고사카라이드는 통상적으로 제한된 수의 모노사카라이드로부터 수립되지만, 그들의 구조적 다양성은 대단한데, 이는 주로 이들이 종종 복잡한 분지화 패턴을 형성하기 때문이다.

[0007] 글리코실화는 면역 방어, 수정, 바이러스 복제, 기생충 감염, 세포 성장, 염증, 및 세포-세포 부착을 포함하는 많은 특이적 생물학적 기능에 있어서 중요한 역할을 한다. 제약 당단백질에 대해, 글리코실화는 단백질 형태의 안정성, 청소율, 단백질분해로부터의 보호에 영향을 미치고, 단백질 용해도를 개선시킨다. 상이한 글리코형은 상이한 생물학적 특성을 가질 잠재성을 갖기 때문에, 생산 동안 글리코실화를 모니터링하고 제어하는 능력은 생물제약 분자의 품질에 중요하다.

[0008] 그러나, 발효 동안 글리코실화는 특정 정도의 이질성으로 자연적으로 발생하며, 많은 상이한 인자, 예컨대 발현 시스템, 공정 조건, 배지 조성, 공급 프로토콜, 정제 공정, 또는 이들의 임의의 조합에 의해 영향을 받을 수 있다. 결과적으로, 단백질의 글리코실화 패턴을 일관되게 유지하면서 배양을 포함하는 단백질 제조 공정을 개선시킬 필요가 있다.

발명의 내용

[0009] 본 개시내용은 세포에 의한 단백질의 수득량을 개선시키는 방법으로서, 세포를 생물반응기에서 단백질 유도 상 동안 적합한 조건 하에서 배양하는 것을 포함하고, 여기서 적합한 조건은 36℃의 초기 온도 설정치, 33℃의 제2 온도 설정치, 및 31℃의 제3 온도 설정치; 7.0의 초기 pH 설정치 및 6.9의 제2 pH 설정치; 0.15 X 10⁶개의 세포/mL 내지 0.45 X 10⁶개의 세포/mL, 예를 들어, 0.30 X 10⁶개의 세포/mL의 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치; 6.9의 초기 pH; 10% 내지 40%의 초기 CO₂ 설정치; 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인 방법에 관한 것이다. 일부 측면에서, 적합한 조건은 36℃의 초기 온도 설정치, 33℃의 제2 온도 설정치, 및 31℃의 제3 온도 설정치; 7.0의 초기 pH 설정치 및 6.9의 제2 pH 설정치; 0.30 X 10⁶개의 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치; 및 15% 내지 25%의 초기 CO₂ 설정치를 포함한다.

[0010] 본 개시내용은 단백질을 생산하기 위한 세포의 세포 성장 속도, 세포 생존력, 생존 세포 밀도 및/또는 역가를

제어하는 방법으로서, 세포를 생물반응기에서 단백질 유도 상 동안 36℃의 초기 온도 설정치 하에서 배양하고, 세포를 33℃의 제2 온도 설정치 및 31℃의 최종 온도 설정치에서 배양하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.

- [0011] 본 개시내용은 또한 세포에 의한 단백질의 수득량을 개선시키는 방법으로서, 세포를 생물반응기에서 적합한 조건 하에서 배양하는 것을 포함하고, 여기서 적합한 조건은 (i) 36.0℃의 초기 온도 설정치 및 36.0℃ 미만의 제2 온도 설정치; (ii) 36.5℃ 미만의 초기 온도 설정치 및 31.0℃의 최종 온도 설정치; 또는 (iii) 36.5℃ 미만의 초기 온도 설정치, 33.0℃의 제2 온도 설정치, 및 33.0℃ 미만의 최종 온도 설정치를 포함하는 것인 방법에 관한 것이다.
- [0012] 일부 측면에서, 최종 온도 설정치는 약 228 내지 약 252시간에서 발생한다. 일부 측면에서, 최종 온도 설정치는 초기 온도 설정치 후 약 228시간, 약 234시간, 약 240시간, 약 246시간, 또는 약 252시간에서 발생한다. 일부 측면에서, 최종 온도 설정치는 31.0℃이고, 240시간 후에 발생한다. 일부 측면에서, 제2 온도 설정치는 약 120시간 내지 약 168시간에서 발생한다. 일부 측면에서, 제2 온도 설정치는 약 120시간, 약 126시간, 약 132시간, 약 138시간, 약 144시간, 약 150시간, 약 156시간, 약 162시간, 또는 약 168시간에서 발생한다. 일부 측면에서, 제2 온도 설정치는 144시간 후에 33.0℃이다.
- [0013] 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적합한 조건 없는 방법과 비교하여 적어도 150%, 적어도 약 160 %, 적어도 약 170 %, 적어도 약 180 %, 적어도 약 190 %, 적어도 약 200 %, 적어도 약 210 %, 적어도 약 220 %, 적어도 약 230 %, 적어도 약 240 %, 적어도 약 250 %, 적어도 약 260 %, 적어도 약 270 %, 적어도 약 280 %, 적어도 약 290 %, 적어도 약 300 %, 적어도 약 310 %, 적어도 약 320 %, 적어도 약 330 %, 적어도 약 340 %, 적어도 약 350 %, 적어도 약 360 %, 적어도 약 370 %, 적어도 약 380 %, 적어도 약 390 %, 또는 적어도 약 400 % 개선시킨다. 일부 측면에서, 방법은 세포 성장 속도를 감소시킨다. 일부 측면에서, 세포 성장은 약 30.0시간 내지 약 40.0시간의 평균 0-5일 배가 시간을 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 성장은 약 35.1시간의 평균 0-5일 배가 시간을 나타낸다.
- [0014] 일부 측면에서, 방법은 세포 생존력을 제어한다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 10.0×10^6 개의 세포/mL 내지 약 15.0×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 11.2×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 0.05×10^9 개의 세포/mL 내지 약 0.11×10^9 개의 세포/mL의 평균 0-14일 생존 세포 밀도의 적분 (IVCD)을 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 0.10×10^9 개의 세포/mL의 평균 0-14일 생존 세포 밀도의 적분 (IVCD)을 나타낸다. 일부 측면에서, 방법은 역가를 제어한다. 일부 측면에서, 역가는 약 1.50 g/L 내지 약 3.5 g/L의 평균 제14일 역가를 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 2.87 g/L의 평균 제14일 역가를 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 20.0 pg/세포-일 내지 약 40.0 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 38.5 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 공정은 상류 생물반응기 파라미터를 변형시키는 것을 추가로 포함하고, 여기서 상류 반응기 파라미터는 (i) 공급 시간, (ii) 초기 pH, (iii) pH 이동, (iv) CO₂, (v) 초기 세포 밀도, 또는 (vi) 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0015] 일부 측면에서, 방법은 단백질의 글리코실화 프로파일을 제어한다. 일부 측면에서, 글리코실화 프로파일은 하나 이상의 N-연결된 글리칸을 포함한다. 일부 측면에서, N-연결된 글리칸은 G0F, G1F, G2F, S1G1F, S1G2F, 및/또는 S2G2F를 포함한다. 일부 측면에서, 방법은 제14일 후에 글리코실화 프로파일을 측정하는 것을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 단백질은 CTLA4 도메인을 포함한다. 일부 측면에서, 단백질은 융합 단백질이다. 일부 측면에서, 융합 단백질은 Fc 부분을 포함한다. 일부 측면에서, 단백질은 아바타셉트이다. 일부 측면에서, 단백질은 서열식별번호(SEQ ID NO): 5에 제시된 바와 같은 아미노산 서열이다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 아바타셉트의 Asn76 (T5), Asn108 (T7), 및/또는 Asn207 (T14)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 잔기에 위치한다. 일부 측면에서, G0F는 약 7.0% 또는 약 6.5% 이하의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, G1F는 약 7.5% 또는 약 7% 이하의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, G2F는 약 25% 이하의 또는 약 1.5% 내지 약 23%의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, S1G1F는 약 13.5% 또는 약 12.5% 이하의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, S1G2F는 약 33% 이상의 또는 약 32% 내지 약 49%의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, S2G2F는 약 12% 이상의 또는 약 14% 내지 약 48.5%의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, G2F는 약 1.5% 내지 약 23%의 상대 풍부도를 포함하고/거나, S1G2F는 약 32% 내지 약 49%의 상대 풍부도를 포함하고/거나, S2G2F는 약 14% 내지 약 48.5%의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, G2F는 약 25% 이하의 상대 풍부도를 포함하고/거나, S1G2F는 약 33% 이상의 상대 풍부도를

포함하고/거나, S2G2F는 약 12% 이상의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, G0F는 약 6.5% 이하의 상대 풍부도를 포함하고/거나, G1F는 약 7% 이하의 상대 풍부도를 포함하고/거나, G2F는 약 1.5% 내지 약 23%의 상대 풍부도를 포함하고/거나, S1G1F는 약 12.5% 이하의 상대 풍부도를 포함하고/거나, S1G2F는 약 32% 내지 약 49%의 상대 풍부도를 포함하고/거나, S2G2F는 약 14% 내지 약 48.5%의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, G0F는 약 7.0% 이하의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, G1F는 약 7.5% 이하의 상대 풍부도를 포함하고/거나, G2F는 약 25% 이하의 상대 풍부도를 포함하고/거나, S1G1F는 약 13.5% 이하의 상대 풍부도를 포함하고/거나, S1G2F는 약 33% 이상의 상대 풍부도를 포함하고/거나, S2G2F는 약 12% 이상의 상대 풍부도를 포함한다.

[0016] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 2.0% 내지 약 10.0%의 G0F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 2.5% 내지 약 10%, 약 2.5%, 약 9.5%, 약 2.5% 내지 약 9%, 약 2.5% 내지 약 8.5%, 약 2.5% 내지 약 8%, 약 2.5% 내지 약 7.5%, 약 2.5% 내지 약 7%, 약 2.5% 내지 약 6.5%, 약 3.0% 내지 약 10%, 약 3.0%, 약 9.5%, 약 3.0% 내지 약 9%, 약 3.0% 내지 약 8.5%, 약 3.0% 내지 약 8%, 약 3.0% 내지 약 7.5%, 약 3.0% 내지 약 7%, 또는 약 3.0% 내지 약 6.5%의 G0F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 3.2% 내지 6.6%, 약 3.2% 내지 약 4.6%, 또는 3.2% 내지 약 6.6%의 G0F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, G0F의 상대 풍부도는 약 4.0%이다.

[0017] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 1.0% 내지 약 6%의 G0F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 1.0% 내지 약 6%, 약 1.0% 내지 약 5.5%, 약 1.0% 내지 약 5.0%, 약 1.0% 내지 약 4.5%, 약 1.0% 내지 약 4.0%, 약 1.5% 내지 약 6%, 약 1.5% 내지 약 5.5%, 약 1.5% 내지 약 5.0%, 약 1.5% 내지 약 4.5%, 약 1.5% 내지 약 4.0%, 약 2.0% 내지 약 6%, 약 2.0% 내지 약 5.5%, 약 2.0% 내지 약 5.0%, 약 2.0% 내지 약 4.5%, 또는 약 2.0% 내지 약 4.0%의 G0F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 2.1% 내지 약 4.0%, 약 1.8% 내지 약 3.5%, 또는 약 1.8% 내지 4.0%의 G0F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, G0F의 상대 풍부도는 약 3.4%이다.

[0018] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 5% 내지 약 12%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 5% 내지 약 12%, 약 5% 내지 약 11.5%, 약 5% 내지 약 11%, 약 5% 내지 약 10.5%, 약 5% 내지 약 10%, 약 5.5% 내지 약 12%, 약 5.5% 내지 약 11.5%, 약 5.5% 내지 약 11%, 약 5.5% 내지 약 10.5%, 약 5.5% 내지 약 10%, 약 6% 내지 약 12%, 약 6% 내지 약 11.5%, 약 6% 내지 약 11%, 약 6% 내지 약 10.5%, 약 6% 내지 약 10%, 약 6.5% 내지 약 12%, 약 6.5% 내지 약 11.5%, 약 6.5% 내지 약 11%, 약 6.5% 내지 약 10.5%, 약 6.5% 내지 약 10%, 약 7% 내지 약 12%, 약 7% 내지 약 11.5%, 약 7% 내지 약 11%, 약 7% 내지 약 10.5%, 또는 약 7% 내지 약 10%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 7.2% 내지 약 9.8%, 약 6.3% 내지 10.6%, 또는 약 7.2% 내지 약 10.6%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, G2F의 상대 풍부도는 약 7.8%이다.

[0019] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 5% 내지 약 21%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 5% 내지 약 21%, 약 5% 내지 약 20.5%, 약 5% 내지 약 20%, 약 5% 내지 약 19.5%, 약 5% 내지 약 19%, 약 5.5% 내지 약 21%, 약 5.5% 내지 약 20.5%, 약 5.5% 내지 약 20%, 약 5.5% 내지 약 19.5%, 약 5.5% 내지 약 19%, 약 6% 내지 약 21%, 약 6% 내지 약 20.5%, 약 6% 내지 약 20%, 약 6% 내지 약 19.5%, 약 6% 내지 약 19%, 약 6.5% 내지 약 21%, 약 6.5% 내지 약 20.5%, 약 6.5% 내지 약 20%, 약 6.5% 내지 약 19.5%, 약 6.5% 내지 약 19%, 약 7% 내지 약 21%, 약 7% 내지 약 20.5%, 약 7% 내지 약 20%, 약 7% 내지 약 19.5%, 약 7% 내지 약 19%, 약 7.5% 내지 약 21%, 약 7.5% 내지 약 20.5%, 약 7.5% 내지 약 20%, 약 7.5% 내지 약 19.5%, 약 7.5% 내지 약 19%, 약 8% 내지 약 21%, 약 8% 내지 약 20.5%, 약 8% 내지 약 20%, 약 8% 내지 약 19.5%, 또는 약 8% 내지 약 19%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 8.2% 내지 약 14.1%, 약 8.0% 내지 약 18.6%, 또는 약 8.2% 내지 약 14.1%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, G2F의 상대 풍부도는 약 12.4%이다. 일부 측면에서, G2F는 갈락토스-알파-1,3-갈락토스 모이어티 (G2F-Gal)를 추가로 포함하고, 여기서 G2F-Gal은 약 1.4% 이하의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, G2F-Gal은 약 1.0% 내지 약 1.4%의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, G2F-Gal은 약 0.4% 내지 약 0.9%의 상대 풍부도를 포함한다.

[0020] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 29% 내지 약 38%의 S1G2F의 상

대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 29% 내지 약 38%, 약 29% 내지 약 37.5%, 약 29% 내지 약 37%, 약 29% 내지 약 36.5%, 약 29.5% 내지 약 38%, 약 29.5% 내지 약 37.5%, 약 29.5% 내지 약 37%, 약 29.5% 내지 약 36.5%, 약 30% 내지 약 38%, 약 30% 내지 약 37.5%, 약 30% 내지 약 37%, 약 30% 내지 약 36.5%, 약 31.5% 내지 약 38%, 약 31.5% 내지 약 37.5%, 약 31.5% 내지 약 37%, 약 31.5% 내지 약 36.5%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 31.6% 내지 약 35.1%, 약 31.3% 내지 약 36.5%, 또는 약 31.3% 내지 약 36.5%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, S1G2F의 상대 풍부도는 약 33.3%이다.

[0021] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 33% 내지 약 45%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 33% 내지 약 45%, 약 33% 내지 약 44.5%, 약 33% 내지 약 44%, 약 33% 내지 약 43.5%, 약 33% 내지 약 43%, 약 33% 내지 약 42.5%, 약 33.5% 내지 약 45%, 약 33.5% 내지 약 44.5%, 약 33.5% 내지 약 44%, 약 33.5% 내지 약 43.5%, 약 33.5% 내지 약 43%, 약 33.5% 내지 약 42.5%, 약 34% 내지 약 45%, 약 34% 내지 약 44.5%, 약 34% 내지 약 44%, 약 34% 내지 약 43.5%, 약 34% 내지 약 43%, 약 34% 내지 약 42.5%, 약 34.5% 내지 약 45%, 약 34.5% 내지 약 44.5%, 약 34.5% 내지 약 44%, 약 34.5% 내지 약 43.5%, 약 34.5% 내지 약 43%, 또는 약 34.5% 내지 약 42.5%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 34.2% 내지 약 37.7%, 약 35.5% 내지 약 42.3%, 또는 약 34.2% 내지 약 42.3%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, S1G2F의 상대 풍부도는 약 36.5%이다. 일부 측면에서, S1G2F는 갈락토스-알파-1, 3-갈락토스 모이어터 (S1G2F-Gal)를 추가로 포함하고, 여기서 S1G2F-Gal은 약 4.7% 이하의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, S1G2F-Gal은 약 2.3% 내지 약 4.7%의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 여기서 S1G2F-Gal은 약 1.4% 내지 약 1.8%의 상대 풍부도를 포함한다.

[0022] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 13% 내지 약 25%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 13% 내지 약 25%, 약 13% 내지 약 24.5%, 약 13% 내지 약 24%, 약 13% 내지 약 23.5%, 약 13% 내지 약 23%, 약 13.5% 내지 약 25%, 약 13.5% 내지 약 24.5%, 약 13.5% 내지 약 24%, 약 13.5% 내지 약 23.5%, 약 13.5% 내지 약 23%, 약 14% 내지 약 25%, 약 14% 내지 약 24.5%, 약 14% 내지 약 24%, 약 14% 내지 약 23.5%, 약 14% 내지 약 23%, 약 14.5% 내지 약 25%, 약 14.5% 내지 약 24.5%, 약 14.5% 내지 약 24%, 약 14.5% 내지 약 23.5%, 약 14.5% 내지 약 23%, 약 15% 내지 약 25%, 약 15% 내지 약 24.5%, 약 15% 내지 약 24%, 약 15% 내지 약 23.5%, 약 15% 내지 약 23%, 약 15.5% 내지 약 25%, 약 15.5% 내지 약 24.5%, 약 15.5% 내지 약 24%, 약 15.5% 내지 약 23.5%, 또는 약 15.5% 내지 약 23%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 18.1% 내지 약 22.9%, 약 15.4% 내지 약 20%, 약 15.4% 내지 약 22.9%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, S2G2F의 상대 풍부도는 약 18.5%이다.

[0023] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 18% 내지 약 36%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 18% 내지 약 36%, 약 18% 내지 약 35.5%, 약 18% 내지 약 35%, 약 18% 내지 약 34.5%, 약 18% 내지 약 34%, 약 18% 내지 약 33.5%, 약 18.5% 내지 약 36%, 약 18.5% 내지 약 35.5%, 약 18.5% 내지 약 35%, 약 18.5% 내지 약 34.5%, 약 18.5% 내지 약 34%, 약 18.5% 내지 약 33.5%, 약 19% 내지 약 36%, 약 19% 내지 약 35.5%, 약 19% 내지 약 35%, 약 19% 내지 약 34.5%, 약 19% 내지 약 34%, 약 19% 내지 약 33.5%, 약 19.5% 내지 약 36%, 약 19.5% 내지 약 35.5%, 약 19.5% 내지 약 35%, 약 19.5% 내지 약 34.5%, 약 19.5% 내지 약 34%, 약 19.5% 내지 약 33.5%, 약 20% 내지 약 36%, 약 20% 내지 약 35.5%, 약 20% 내지 약 35%, 약 20% 내지 약 34.5%, 약 20% 내지 약 34%, 약 20% 내지 약 33.5%, 약 20.5% 내지 약 36%, 약 20.5% 내지 약 35.5%, 약 20.5% 내지 약 35%, 약 20.5% 내지 약 34.5%, 약 20.5% 내지 약 34%, 또는 약 20.5% 내지 약 33.5%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 23.2% 내지 약 33.8%, 약 20.8% 내지 약 32.6%, 또는 약 20.8% 내지 약 33.8%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, S2G2F의 상대 풍부도는 약 23.5%이다.

[0024] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 2% 내지 약 8%의 S1G3F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 2% 내지 약 8%, 약 2% 내지 약 7.5%, 약 2% 내지 약 7%, 약 2% 내지 약 6.5%, 약 2% 내지 약 6%, 약 2% 내지 약 5.5%, 약 2.5% 내지 약 8%, 약 2.5% 내지 약 7.5%, 약 2.5% 내지 약 7%, 약 2.5% 내지 약 6.5%, 약 2.5% 내지 약 6%, 약 2.5% 내지 약 5.5%, 약 3% 내지 약 8%, 약 3% 내지 약 7.5%, 약 3% 내지 약 7%, 약 3% 내지 약 6.5%, 약 3%

내지 약 6%, 약 3% 내지 약 5.5%, 약 3.5% 내지 약 8%, 약 3.5% 내지 약 7.5%, 약 3.5% 내지 약 7%, 약 3.5% 내지 약 6.5%, 약 3.5% 내지 약 6%, 약 3.5% 내지 약 5.5%, 약 4% 내지 약 8%, 약 4% 내지 약 7.5%, 약 4% 내지 약 7%, 약 4% 내지 약 6.5%, 약 4% 내지 약 6%, 또는 약 4% 내지 약 5.5%의 S1G3F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 4.4% 내지 약 5.6% 또는 약 4.0% 내지 약 5.5%의 S1G3F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, S1G3F의 상대 풍부도는 약 4.6%이다.

[0025] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 0.5% 내지 약 4%의 S1G3F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 0.5% 내지 약 4%, 약 0.5% 내지 약 3.5%, 약 0.5% 내지 약 3%, 약 0.5% 내지 약 2.5%, 약 1% 내지 약 4%, 약 1% 내지 약 3.5%, 약 1% 내지 약 3%, 또는 약 1% 내지 약 2.5%의 S1G3F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 1.4% 내지 약 2.2%, 약 1.1% 내지 약 1.9%, 또는 약 1.1% 내지 약 2.2%의 S1G3F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, S1G3F의 상대 풍부도는 약 1.8%이다.

[0026] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 0.5% 내지 약 4%의 S2G4F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 0.5% 내지 약 4%, 약 0.5% 내지 약 3.5%, 약 0.5% 내지 약 3%, 약 0.5% 내지 약 2.5%, 약 1% 내지 약 4%, 약 1% 내지 약 3.5%, 약 1% 내지 약 3%, 또는 약 1% 내지 약 2.5%의 S2G4F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 1.9% 내지 약 2.4%, 약 1.4% 내지 약 2.1%, 또는 약 1.4% 내지 약 2.4%의 S2G4F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, S2G4F의 상대 풍부도는 약 2.3%이다.

[0027] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 8 내지 약 11의 NANA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 8.3 내지 약 11, 약 9.5 내지 약 10.1, 또는 약 8.3 내지 약 10.1의 NANA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, NANA의 몰 비는 약 10.0이다.

[0028] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 0.1 내지 약 2.0의 NGNA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 0.90 내지 약 1.20 또는 약 0.3 내지 약 1.2의 NGNA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, NGNA의 몰 비는 약 1.0이다.

[0029] 일부 측면에서, 글리코실화 프로파일은 N-연결된 탄수화물 프로파일 방출 방법을 통해 분석된다. 일부 측면에서, 글리코실화 프로파일은 하나 이상의 비시알릴화된 글리칸 (도메인 I), 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II), 디-시알릴화된 글리칸 (도메인 III), 및/또는 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)을 포함한다. 일부 측면에서, 비시알릴화된 글리칸 (도메인 I)은 약 28 내지 약 37, 약 29 내지 약 32, 약 28 내지 약 32, 또는 약 29 내지 약 37의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 비시알릴화된 글리칸 (도메인 I)은 약 31의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)은 약 26 내지 약 28, 약 27 내지 약 33, 약 26 내지 약 33, 약 27 내지 약 28의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)은 약 27의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 디-시알릴화된 글리칸 (도메인 III)은 약 27 내지 약 28, 약 22 내지 약 31, 약 27 내지 약 31, 또는 약 22 내지 약 28의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 디-시알릴화된 글리칸 (도메인 III)은 약 27.4의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 13 내지 약 16, 약 8 내지 약 16, 또는 약 8 내지 약 16의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 14.6의 몰 비를 갖는다.

[0030] 일부 측면에서, 글리코실화 프로파일은 하나 이상의 O-연결된 글리칸을 포함한다. 일부 측면에서, 글리코실화 프로파일은 하나 초과와 갈락토스-알파-1,3-갈락토스 (알파-gal) 연결을 포함하지 않는다. 일부 측면에서, CTLA4는 C-말단 리신을 포함한다. 일부 측면에서, C-말단 리신은 약 20% 내지 약 25%의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, C-말단 리신은 약 3% 내지 약 10%의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, O-연결된 글리칸은 잔기 Ser129, Ser130, Ser136, 및/또는 Ser139에 위치한다. 일부 측면에서, 생물반응기는 글루코스 또는 갈락토스를 포함하는 공급 배지를 포함한다. 일부 측면에서, 세포는 포유동물 세포이다. 일부 측면에서, 세포는 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포이다. 일부 측면에서, 세포는 CHO-K1 세포, CHO-DXB11 세포, 또는 CHO-DG44 세포이다.

[0031] 본 개시내용의 방법은 또한 CTLA4-Fc 융합 단백질의 이중-안테나성 글리칸을 분석하는 방법으로서, CTLA4 단백질에서의 하나 이상의 아스파라긴 잔기에 부착된 하나 이상의 N-연결된 글리칸을 측정하는 것을 포함하고, 여기

서 이중-안테나성 글리칸 중 하나는 G2F인 방법을 포함한다. 일부 측면에서, 이중-안테나성 글리칸은 G0F, G1F, G2F, S1G1F, S1G2F, 및/또는 S2G2F로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 측면에서, 이중-안테나성 글리칸은 형광 검출을 갖는 초성능 액체 크로마토그래피 (UPLC-FLR)를 통해 측정된다. 일부 측면에서, CTLA4 -Fc 융합 단백질의 Fc 도메인은 측정 전에 절단된다. 일부 측면에서, 방법은 생물반응기로부터 단백질을 수거하는 것을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 방법은 바이러스 불활성화 공정을 통해 단백질을 실행하는 것을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 활성화 공정에서의 바이러스는 0.5% 트리톤(Triton) X-100으로 실행된다.

[0032] 일부 측면에서, 방법은 단백질의 농도를 조정하는 것을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 방법은 단백질을 제제화하는 것을 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1a는 통상적인 N-연결된 글리칸의 일반적 구조를 제시한다. GlcNAc (정사각형)는 N-아세틸글루코사민이다. Man (원)은 만노스이다. Gal (실선 삼각형)은 갈락토스이다. NeuAc 또는 Neu5Ac (별)는 N-아세틸뉴라민산이다. Fuc (총알)는 푸코스이다. 코어 구조는 회색 박스에 제시된다. 도 1b 및 1c는 G0F (만노스-3-N-아세틸글루코사민-4-푸코스), G1F (만노스-3-N-아세틸글루코사민-4-갈락토스-1-푸코스), G2F (만노스-3-N-아세틸글루코사민-4-갈락토스-2-푸코스), S1G1F (모노-시아릴화된 만노스-3-N-아세틸글루코사민-4-갈락토스-1-푸코스), S1G2F (모노-시아릴화된 만노스-3-N-아세틸글루코사민-4-갈락토스-2-푸코스), S1G3F (모노-시아릴화된 만노스-3-N-아세틸글루코사민-4-갈락토스-3-푸코스), 및 S2G2F (디-시아릴화된 만노스-3-N-아세틸글루코사민-4-갈락토스-2-푸코스)의 예시적인 구조를 제시한다. 도 1d는 아바타셉트 분자 상의 특이적 N-연결된 글리코실화 부위 (Asn76 상의 T5, Asn108 상의 T7, 및 Asn207 상의 T14)를 제시한다. 프로테아제 및 아미노산 서열이 또한 제시된다.

도 2a는 5-L 생물반응기에서 다양한 조건으로 처리 후의 평균 생존 세포 밀도 (VCD) 프로파일의 도해를 제시한다. 시험된 조건은 22.4%의 CO₂ 설정치, 96시간 후의 제1 공급, 6.9의 초기 pH, 0.15 x 10⁶개의 세포/mL의 초기 생존 세포 밀도, 0.45 x 10⁶개의 세포/mL의 초기 생존 세포 밀도, -1℃의 전체 온도 이동 (36℃, 33℃, 및 31℃의 3개의 온도 설정치), 72시간의 pH 이동 타이밍치, 제2 설정치에서의 온도 이동 (37℃, 33℃, 및 32℃), 및 제3 설정치에서의 온도 이동 (37℃, 34℃, 및 31℃)을 포함한다.

도 2b는 다양한 인자로의 실험 후의 표 형태의 평균 피크 VCD (10⁶개의 세포/mL), 피크 VCD 던넛(Dunnett) 검정 p-값, 평균 제0-5일 배가 시간 (hrs), 배가 시간 던넛 검정 p-값, 평균 제0-14일 IVCD (10⁹개의 세포 일/mL), IVCD 던넛 검정 p-값, 및 VCD 프로파일 값을 제시한다: 높은 CO₂는 22.4%의 CO₂ 설정치를 나타낸다. 후기 제1 공급은 96시간에서의 제1 공급이다. 낮은 초기 pH는 6.9의 유도 pH이다. 낮은 초기 VCD는 0.15 x 10⁶개의 세포/mL의 유도 밀도이다. 높은 초기 VCD는 0.45 x 10⁶개의 세포/mL의 유도 밀도이다. 낮은 전체 온도는 3개의 설정치, 즉, 초기 온도 설정치로서 36℃, 제2 온도 설정치로서 33℃, 및 최종 온도 설정치로서 31℃를 사용한 온도 이동 프로파일이다. 낮은 온도 이동 1은 3개의 설정치, 즉, 초기 온도 설정치로서 37℃, 제2 온도 설정치로서 33℃, 및 최종 온도 설정치로서 32℃를 사용한 온도 이동 프로파일이다. 낮은 온도 이동 2는 3개의 설정치, 즉, 초기 온도 설정치로서 37℃, 제2 온도 설정치로서 34℃, 및 최종 온도 설정치로서 31℃를 사용한 온도 이동 프로파일이다.

도 3은 각각의 처리 그룹에 대한 평균 생산 생물반응기 생존력 프로파일을 제시한다. 시험된 조건은 22.4%의 CO₂ 설정치, 96시간 후의 제1 공급, 6.9의 초기 pH, 0.15 x 10⁶개의 세포/mL의 초기 생존 세포 밀도, 0.45 x 10⁶개의 세포/mL의 초기 생존 세포 밀도, -1℃의 전체 온도 이동, 72시간의 pH 이동 타이밍치, 제2 설정치에서의 온도 이동 (37℃, 33℃, 및 32℃), 및 제3 설정치에서의 온도 이동 (37℃, 34℃, 및 31℃)을 포함한다.

도 4a-4h는 아바타셉트에 대해 실행된 생물반응기 생산의 제14일에 수집된 다양한 글리코실화 데이터를 제시한다. 도 4a는 제14일 시알산 및 N-연결된 도메인 (도메인 I, I, III, 및 IV+V)의 통계적 비교를 제시한다. 도 4b는 시험 그룹 사이의 역가 및 비생산성의 비교를 제시한다. 높은 CO₂는 22.4%의 CO₂ 설정치를 나타낸다. 후기 제1 공급은 96시간에서의 제1 공급이다. 낮은 초기 pH는 6.9의 유도 pH이다. 낮은 초기 VCD는 0.15 x 10⁶개의 세포/mL의 유도 밀도이다. 높은 초기 VCD는 0.45 x 10⁶개의 세포/mL의 유도 밀도이다. 낮은 전체 온도는

3개의 설정치, 즉, 초기 온도 설정치로서 36℃, 제2 온도 설정치로서 33℃, 및 최종 온도 설정치로서 31℃를 사용한 온도 이동 프로파일이다. 낮은 온도 이동 1은 3개의 설정치 (37℃, 33℃, 및 32℃)를 사용한 온도 이동 프로파일이다. 낮은 온도 이동 2는 3개의 설정치 (37℃, 34℃, 및 31℃)를 사용한 온도 이동 프로파일이다. 도 4c는 각각의 시험 조건을 사용한 5-L 생물반응기 제조 실행에 걸친 제14일에서의 부위 T5 및 T7에 존재하는 GOF 글리칸의 분석을 제시한다. 도 4d는 각각의 시험 조건을 사용한 5-L 생물반응기 제조 실행에 걸친 제14일에서의 부위 T5 및 T7에 존재하는 G2F 글리칸의 분석을 제시한다. 도 4e는 각각의 시험 조건을 사용한 5-L 생물반응기 제조 실행에 걸친 제14일에서의 부위 T5 및 T7에 존재하는 S1G2F 글리칸의 분석을 제시한다. 도 4f는 각각의 시험 조건을 사용한 5-L 생물반응기 제조 실행에 걸친 제14일에서의 부위 T5 및 T7에 존재하는 S2G2F 글리칸의 분석을 제시한다. 도 4g는 각각의 시험 조건을 사용한 5-L 생물반응기 제조 실행에 걸친 제14일에서의 부위 T5 및 T7에 존재하는 S1G3F 글리칸의 분석을 제시한다. 도 4h는 각각의 시험 조건을 사용한 5-L 생물반응기 제조 실행에 걸친 제14일에서의 T5 부위에 존재하는 S2G4F 글리칸의 분석을 제시한다.

도 5는 N-연결된 글리코실화 (도메인 I, II, III, 및 IV+V), 고분자량 오염물, 숙주 세포 단백질, 및 리보솜 DNA (rDNA) 오염에 관한 제16일 수거 데이터를 제시한다. 제16일 수거 전 N-연결, HMW, HCP 및 rDNA에 대한 그의 던넷 검정 p-값 결과가 또한 제공된다.

도 6a는 5-L 규모 생물반응기에 대한 시험된 공정 파라미터의 도해를 제시한다. 도 6b-6c는 오염물, 예컨대 HMW, HCP, 및 DNA와 함께, 다수의 샘플 생물반응기 실행에 걸쳐 생산된 단백질의 글리코실화 프로파일을 제시한다.

도 7은 공정 파라미터의 변형에 의해 영향을 받은 공정 속성의 요약을 제시한다.

도 8a는 본 개시내용에 사용된 공정 (J), 및 대체 공정 (F)에 걸친 T5 글리코실화 부위 상에 존재하는 다양한 글리코형의 상대 풍부도를 제시한다. 도 8b는 이들 글리코형을 나타내는 피크를 확인하는 대표적인 질량 분광법 분석을 제시한다. 대체 공정은 본 개시된 조건 중 임의의 것을 채용하지 않는 대조군 공정을 의미한다.

도 9a는 본 개시내용에 사용된 공정 (J), 및 대체 공정 (F)에 걸친 T5 글리코실화 부위 상에 존재하는 다양한 글리코형의 상대 풍부도를 제시한다. 도 9b는 이들 글리코형을 나타내는 피크를 확인하는 대표적인 질량 분광법 분석을 제시한다.

도 10a-10f는 본 개시내용에 사용된 공정 (J), 및 대체 공정 (F) 사이에 비교된 다양한 시알릴화된 N-연결된 글리칸의 통계적 비교를 제시한다. 글리칸 분석은 도메인 I (도 10a), 도메인 II (도 10b), 도메인 III (도 10c), 도메인 IV+V (도 10d), NANA (도 10e), 및 NGNA (도 10f)를 포함한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 본 개시내용은 단백질의 목적하는 특성, 예를 들어, 글리코실화 패턴을 유지하면서 세포에 의한 단백질의 수득량을 개선시키는 방법에 관한 것이다. 일부 측면에서, 수득량을 개선시키는 방법은 세포를 생물반응기에서 단백질 유도 상 동안 온도를 조정하는 것, pH를 설정하는 것, 특정한 생존 세포 밀도를 사용하는 것, CO₂ 농도를 설정하는 것, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 적합한 조건 하에서 배양하는 것을 포함한다.

[0035] **I. 정의**

[0036] 본원에 사용되는 경우 용어 "및/또는"은 다른 것을 갖는 또는 갖지 않는 2개의 특정된 특색 또는 구성요소의 각각의 구체적인 개시내용으로서 취해져야 한다. 따라서, "A 및/또는 B"와 같은 어구에 사용된 용어 "및/또는"은 "A 및 B", "A 또는 B", "A" (단독), 및 "B" (단독)를 포함하는 것으로 의도된다. 마찬가지로, "A, B, 및/또는 C"와 같은 어구에 사용된 용어 "및/또는"은 하기 측면의 각각을 포괄하는 것으로 의도된다: A, B, 및 C; A, B, 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A (단독); B (단독); 및 C (단독).

[0037] 언어 "포함하는"과 함께 본원에 기재된 측면의 어디든지, 다르게는 "이루어진" 및/또는 "본질적으로 이루어진"의 용어로 기재된 유사한 측면이 또한 제공됨이 이해된다.

[0038] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시내용이 관련되는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 예를 들어, 문헌 [the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press]; [The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press]; 및 [the Oxford Dictionary of

Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press]은 통상의 기술자에게 본 개시 내용에 사용된 많은 용어의 일반적 사전용을 제공한다.

[0039] 단위, 접두사, 및 기호는 그들의 국제 단위계 (SI) 허용된 형태로 표시된다. 수치 범위는 범위를 한정하는 수를 포함한다. 본원에서 제공된 표제는 본 개시내용의 다양한 측면의 제한이 아니며, 이는 전체로서 본 명세서를 참조하여 가져질 수 있다. 따라서, 바로 아래에 정의된 용어는 그 전체로 본 명세서를 참조하여 보다 완전히 정의된다.

[0040] 대안 (예를 들어, "또는")의 사용은 대안의 어느 하나, 둘 다, 또는 이들의 임의의 조합을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 본원에 사용된 단수 형태는 임의의 나열된 또는 열거된 구성요소 중 "하나 이상"을 지칭하는 것으로 이해되어야 한다.

[0041] 용어 "약" 또는 "본질적으로 포함하는"은 부분적으로 값 또는 조성물이 측정되거나 결정되는 방법, 즉, 측정 시스템의 한계에 의존할 것인 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정되는 바와 같은 특정한 값 또는 조성물에 대한 허용되는 오차 범위 내인 값 또는 조성물을 지칭한다. 예를 들어, "약" 또는 "본질적으로 포함하는"은 관련 기술분야의 관행에 따라 1 또는 1 초과의 표준 편차 내를 의미할 수 있다. 대안적으로, "약" 또는 "본질적으로 포함하는"은 최대 20%의 범위를 의미할 수 있다. 더욱이, 특히 생물학적 시스템 또는 공정에 관하여, 상기 용어는 값의 최대 한 자릿수 또는 최대 5배를 의미할 수 있다. 특정한 값 또는 조성물이 본 출원 및 청구 범위에서 제공되는 경우, 달리 언급되지 않는 한, "약" 또는 "본질적으로 포함하는"의 의미는 그 특정한 값 또는 조성물에 대한 허용되는 오차 범위 내인 것으로 가정되어야 한다.

[0042] 본원에 기재된 바와 같이, 임의의 농도 범위, 백분율 범위, 비 범위 또는 정수 범위는 달리 지시되지 않는 한, 나열된 범위내의 임의의 정수, 및 적절한 경우, 그의 분수 (예컨대 정수의 1/10 및 1/100)의 값을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0043] 본원에 사용된 용어 "CTLA4 세포의 도메인"은 B7-1 (CD80) 및/또는 B7-2 (CD86)에 결합하는 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열의 전부 또는 부분을 포함하는 단백질 도메인을 지칭한다. 일부 측면에서, CTLA4 세포의 도메인은 서열식별번호: 1과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. CTLA4 세포의 도메인은 하기 서열에 의해 나타내어진다:

SEQ ID NO: 1:

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSI

CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPYPYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSD

[0044]

[0045] 본원에 사용된 용어 "CTLA4-Ig" 또는 "CTLA4-Ig 분자" 또는 "CTLA4Ig 분자" 또는 "CTLA4-Ig 단백질" 또는 "CTLA4Ig 단백질" 또는 "CTLA4-Fc"는 상호교환가능하게 사용되며, CTLA4 세포의 도메인 및 이뮤노글로불린 불변 영역 또는 그의 부분을 갖는 적어도 CTLA4-Ig 폴리펩티드를 포함하는 단백질 분자를 지칭한다. 일부 측면에서, 예를 들어, CTLA4-Ig 폴리펩티드는 적어도 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 측면에서, CTLA4 세포의 도메인 및 이뮤노글로불린 불변 영역 또는 그의 부분은 야생형, 또는 돌연변이체이거나 변형될 수 있다. 돌연변이체 CTLA4-Ig 폴리펩티드는 돌연변이체 CTLA4 세포의 도메인을 포함하는 CTLA4-Ig 폴리펩티드이다. 돌연변이체 CTLA4Ig 분자는 적어도 돌연변이체 CTLA4-Ig 폴리펩티드를 포함한다. 일부 측면에서, CTLA4 세포의 도메인 및 이뮤노글로불린 불변 영역 또는 그의 부분은 인간 또는 마우스를 포함하는 포유동물일 수 있다. 일부 측면에서, 돌연변이체 CTLA4 세포의 도메인은 서열식별번호: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8 중 임의의 하나 이상에 제시된 CTLA4 세포의 도메인과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 폴리펩티드는 추가의 단백질 도메인을 추가로 포함할 수 있다. CTLA4-Ig 분자는 CTLA4-Ig 폴리펩티드의 단량체를 지칭할 수 있고, 또한 폴리펩티드의 다량체 형태, 예컨대 이량체, 사량체, 및 육량체 등 (또는 다른 고분자량 종)을 지칭할 수 있다. CTLA4-Ig 분자는 또한 CD80 및/또는 CD86에 결합할 수 있다. CTLA4-Ig 및 단편 (예를 들어, 아바타셉트)의 예는 서열식별번호: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 및 8에 제시된다. 일부 측면에서, 아바타셉트는 서열식별번호: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 및 8의 조합이다.

SEQ ID NO:2 [CTLA4-Ig 아미노산 서열]

MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQ
ADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYL
GIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPKSSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:3 [SEQ ID NO:2의 아미노산 서열 25-383]

MAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDD
SICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPK
SSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:4 [SEQ ID NO:2의 아미노산 서열 26-383]

AMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDD
ICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPK
SDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:5 [SEQ ID NO:2의 아미노산 서열 27-383]

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDD
SICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSQEPK
SSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:6 [SEQ ID NO:2의 아미노산 서열 25-382]

[0046]

MAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDD
SICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDSDQEPK
SSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:7 [SEQ ID NO:2의 아미노산 서열 26-382]

AMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSI
ICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDSDQEPKSS
SDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:8 [SEQ ID NO:2의 아미노산 서열 27-382]

MHVQAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSI
CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDSDQEPKSS
DKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0047]

[0048]

본원에 사용된 용어 "가용성 CTLA4"는 생체내에서 순환할 수 있는 분자 또는 세포막에 결합되지 않는 CTLA4를 의미한다. 예를 들어, 가용성 CTLA4는 Ig에 연결된 CTLA4의 세포의 영역을 포함하는 CTLA4-Ig를 포함할 수 있다.

[0049]

본원에 사용된 용어 "이량체"는 함께 연결되거나 결합된 2개의 CTLA4-Ig 폴리펩티드 또는 단량체로 구성된 CTLA4-Ig 단백질 또는 CTLA4-Ig 분자를 지칭한다. 단량체 또는 이량체 사이의 연결은 비-공유 연결 또는 상호작용, 공유 연결 또는 상호작용 (예를 들어, 하나 이상의 디설피드 결합), 또는 둘 다일 수 있다. 2개의 동일한 단량체로 구성된 CTLA4-Ig 단백질 또는 CTLA4-Ig 분자는 동종이량체이다. CTLA4-Ig 동종이량체는 또한 서열에 있어서 약간 상이할 수 있는 2개의 단량체를 포함하는 분자를 포괄한다. 동종이량체는 함께 결합된 단량체가 실질적으로 동일한 서열을 갖는 이량체를 포괄한다. 동종이량체를 포함하는 단량체는 상당한 구조적 상동성을 공유한다. 예를 들어, 서열의 차이는 단량체의 N-말단 프로세싱 변형에 기인할 수 있다.

[0050]

본원에 사용된 용어 "글루타메이트" 및 "글루탐산"은 상호교환가능하게 사용된다.

[0051]

본원에 사용된 "T5", "T7", 및 "T15"는 아바타셉트 분자 상에 존재하는 특이적 글리코실화 부위를 지칭한다. 이들 표지는 각각 아스파라긴 76, 아스파라긴 108, 및 아스파라긴 207에 상응하고, 서열식별번호: 5에서의 잔기 (볼드체)에 상응한다. T5, T7 및 T14의 펩티드 서열은 도 1c에 열거된다. 주요 글리코형의 상대 풍부도를 글리코펩티드의 추출된 이온 크로마토그램으로부터 계산하였다.

[0052]

N-연결된 글리코실화 부위는 질량 분광법 검출을 갖는 LC-MS 트립신 펩티드 맵핑에 의해 서열식별번호: 5에 관하여 Asn76, Asn108 (CTLA4 영역) 및 Asn207 (Fc 영역)에서 확인되었다. 탄수화물 구조적 부류를 정의하는데 5-문자 부호, 예를 들어, P2100, P2120, P2121, P3131, 및 P4142가 사용된다. 이 표지화 스킴에 관하여, 부호에서 제1 문자 (P)는 트리만노실 코어 구조를 함유하는 N-연결된 구조로서 방출된 탄수화물을 정의한다. 제2 문자는 코어에 부착된 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc) 단위의 수를 나타낸다. 제3 문자 (0 또는 1)는 코어의 제1 GlcNAc에 부착된 푸코스 (Fuc)가 있는지 여부를 나타낸다. 제4 문자는 코어에 부착된 갈락토스 (Gal) 당의 수를 나타낸다. 제5 문자는 탄수화물에 부착된 SA (N-아세틸뉴라민산 또는 N-글리콜릴뉴라민산)의 수를 나타낸다. P2100은 또한 G0F로 표시될 수 있다. P2110은 또한 G1F로 표시될 수 있다. P2120은 또한 G2F로 표시될 수 있다. P2121은 또한 S1G2F로 표시될 수 있다. P2122는 또한 S2G2F로 표시될 수 있다. P3131은 또한 S1G3F로 표시될 수 있다. P4142는 또한 S2G4F로 표시될 수 있다. 이들 글리칸의 대표적인 도해는 도 1a 및 1b에서 볼 수 있다.

- [0053] 본원에 사용된 "도메인 I"은 비시알릴화된 글리칸 (예컨대 G0F, G1F, 및 G2F)을 지칭하고, "도메인 II"는 모노-시알릴화된 글리칸 (예컨대 S1G1F 및 S1G2F)을 지칭하고, "도메인 III"은 디-시알릴화된 글리칸 (예컨대 S2G2F)을 지칭하고, "도메인 IV" 및 "도메인 V"는 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸을 지칭한다.
- [0054] 본원에 사용된 용어 "정제된"은 그의 자연 환경으로부터 제거된 (예를 들어, 분리된) 및 그것이 자연적으로 연관된 다른 구성요소, 예컨대 세포성 물질 또는 배양 배지가 적어도 90% 없는, 91% 없는, 92% 없는, 93% 없는, 94% 없는, 95% 없는, 96% 없는, 97% 없는, 98% 없는, 99% 없는, 99.5% 없는, 또는 99.9% 없는 CTLA4-Ig 분자, 또는 CTLA4-Ig 분자의 선택된 집단을 포함하는 조성물을 지칭한다. "정제된"은 또한 그의 자연 환경으로부터 제거되고, 그것이 자연적으로 연관된 다른 구성요소, 예컨대 세포성 물질 또는 배양 배지가 적어도 60% 없는, 65% 없는, 70% 없는, 75% 없는, 80% 없는, 또는 85% 없는 CTLA4-Ig 분자, 또는 CTLA4-Ig 분자의 선택된 집단을 포함하는 조성물을 지칭할 수 있다. 예를 들어, 재조합적으로 생산된 CTLA4-Ig 단백질 분자에 관하여, 용어 "정제된"은 또한 생산 환경으로부터 제거되고, 그에 따라 단백질 분자가 관심의 것인 서열식별번호: 2의 폴리펩티드 또는 서열식별번호: 2의 돌연변이체 폴리펩티드가 아닌 단백질 분자가 적어도 90% 없는, 91% 없는, 92% 없는, 93% 없는, 94% 없는, 95% 없는, 96% 없는, 97% 없는, 98% 없는, 99% 없는, 99.5% 없는, 또는 99.9% 없는 CTLA4-Ig 단백질을 포함하는 조성물을 지칭할 수 있다. "정제된"은 CTLA4-Ig 분자 (예컨대 이량체)와 다른 CTLA4-Ig 분자 (예컨대 사량체)의 혼합물을 배제하지 않는다. "정제된"은 CTLA4-Ig 분자와 조합된 제약상 허용되는 부형제 또는 담체를 배제하지 않고, 여기서 CTLA4-Ig 분자는 그들의 천연 환경으로부터 취해졌다.
- [0055] 본원에 사용된 용어 "대규모 공정"은 용어 "산업적-규모 공정"과 상호교환가능하게 사용된다. 용어 "배양 용기"는 "생물반응기", "반응기" 및 "탱크"와 상호교환가능하게 사용된다. 산업적 규모로 사용되는 생물반응기는 적어도 2,000 L, 적어도 5,000 L, 적어도 10,000 L, 적어도 15,000L, 적어도 20,000 L, 적어도 25,000 L, 또는 산업적 공급을 생성하는데 필요한 큰 생산 규모에 적절한 임의의 크기일 수 있다.
- [0056] "액체 배양물"은 지지체 상에서 성장되거나, 액체 영양 배지에 현탁되어 성장하는 세포 (예를 들어, 박테리아, 식물, 곤충, 효모, 또는 동물 세포)를 지칭한다.
- [0057] "시드 배양물"은 보다 큰 부피의 배양 배지를 접종하는데 사용되기 위해 성장된 세포 배양물을 지칭한다. 시드 배양물은 배양물에서 성장하는 세포 (예를 들어, 현탁액에서 성장된 세포)의 수를 확장시키기 위해 보다 큰 부피의 배지를 접종하는데 사용될 수 있다.
- [0058] 본원에 사용된 용어 "배양 배지" 및 "세포 배양 배지" 및 "공급 배지" 및 "발효 배지"는 세포, 특히 포유동물 세포를 성장시키는데 및 또는 유지하는데 사용되는 영양분 용액을 지칭한다. 제한 없이, 이들 용액은 통상적으로 하기 카테고리 중 하나 이상으로부터의 적어도 하나의 구성요소를 제공한다: (1) 통상적으로 탄수화물, 예컨대 글루코스의 형태의 에너지 공급원; (2) 모든 필수 아미노산, 및 통상적으로 20개의 아미노산의 기본적 세트 더하기 시스테인; (3) 낮은 농도로 요구되는 비타민 및/또는 다른 유기 화합물; (4) 유리 지방산 또는 지질, 예를 들어 리놀레산; 및 (5) 미량 원소, 여기서 미량 원소는 전형적으로 매우 낮은 농도로, 통상적으로 마이크로몰 범위로 요구되는 무기 화합물 또는 천연 발생 원소로 정의됨. 영양분 용액은 하기 카테고리 중 임의의 것으로부터의 하나 이상의 구성요소로 선택적으로 보충될 수 있다: (1) 호르몬 및 다른 성장 인자, 예컨대, 혈청, 인슐린, 트랜스페린, 및 표피 성장 인자; (2) 염, 예를 들어, 마그네슘, 칼슘, 및 포스페이트; (3) 완충액, 예컨대 HEPES; (4) 뉴클레오시드 및 염기, 예컨대, 아데노신, 티미딘, 및 히포크산틴; (5) 단백질 및 조직 가수분해물, 예를 들어 정제된 젤라틴, 식물 물질, 또는 동물 부산물로부터 수득될 수 있는 펩톤 또는 펩톤 혼합물; (6) 항생제, 예컨대 겐타마이신; (7) 세포 보호제, 예를 들어 플루로닉 폴리올; 및 (8) 갈락토스. 상업적으로 입수가능한 배지, 예컨대 햄(Ham) F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지(Minimal Essential Medium) ((MEM), (시그마)), RPMI-1640 (시그마), 및 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ((DMEM), (시그마))는 숙주 세포를 배양하는데 적합하다. 또한, 문헌 [Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)], [Barnes et al., Anal. Biochem.102:255 (1980)]에 기재된 배지 중 임의의 것은 숙주 세포에 대한 배양 배지로서 사용될 수 있다. 임의의 다른 필요한 보충물은 또한 적절한 농도로 포함될 수 있다.
- [0059] 본원에 사용된 "배양"은 정의된 또는 제어된 조건 하에서 시험관내에서 하나 이상의 세포를 성장시키는 것을 지칭한다. 정의될 수 있는 배양 조건의 예는 온도, 기체 혼합물, 시간, 및 배지 체제를 포함한다.
- [0060] 본원에 사용된 "확장"은 배양물에서 보다 많은 수의 세포를 수득할 목적으로 시험관내에서 하나 이상의 세포를 배양하는 것을 지칭한다.
- [0061] 본원에 사용된 "온도 설정치"는 세포를 성장시키고/거나 단백질 생성물을 생산하는데 사용되는 생물반응기 또는

다른 상류 프로세싱 용기의 온도 설정을 지칭한다. 온도 설정치는 세포 배양의 시작에서 확립될 수 있으며, 여기서 이는 또한 "초기 온도 설정치"로 지칭될 수 있다. 초기 온도 설정치 후 세포 배양 동안 온도의 후속 변화는 통상적인 넘버링을 사용하여, 즉, 제2 온도 설정치, 또는 후속적으로 제3 온도 설정치로 지칭될 수 있다. 하류 프로세싱 전의 마지막 온도 설정치는 또한 "최종 온도 설정치"로 지칭될 수 있다. 일부 경우에, 공정은 초기 온도 설정치, 제2 온도 설정치, 및 제3 (및 최종) 온도 설정치를 포함할 수 있다.

[0062] 본원에 사용된 "CO₂ 설정치" 또는 "CO₂ 설정치"는 상류 생산 공정에 존재하는 CO₂의 농도를 지칭한다. CO₂ 설정치는 부피 백분율 (%)로 나타내어진다.

[0063] 본원에 사용된 "집단"은 하나 이상의 측정가능한 또는 검출가능한 특성의 존재 또는 부재를 특징으로 하는 2개 이상의 분자 ("분자의 집단") 또는 세포 ("세포의 집단")의 그룹을 지칭한다. 균질한 집단에서, 집단 중의 분자 또는 세포는 동일한 또는 실질적으로 동일한 특성을 특징으로 한다 (예를 들어, 클론성 세포주의 세포). 이질적인 집단에서, 집단 중의 분자 또는 세포는 동일한 또는 실질적으로 동일한 적어도 하나의 특성을 특징으로 하며, 여기서 세포 또는 분자는 또한 동일하지 않은 특성을 나타낼 수 있다 (예를 들어, 실질적으로 유사한 평균 시알산 함량을 갖지만, 비-유사한 만노스 함량을 갖는 CTLA4-Ig 분자의 집단).

[0064] 본원에 사용된 "고분자량 응집체"는 적어도 3개의 CTLA4-Ig 단량체를 포함하는 CTLA4-Ig 분자를 지칭하기 위해 "고분자량 중" 또는 "HMW"와 상호교환가능하게 사용된다. 예를 들어, 고분자량 응집체는 사량체, 오량체 또는 육량체일 수 있다.

[0065] 본원에 사용된 "단백질 A"는 대략 42 kDa이고, 이뮤노글로불린의 Fc 부분에 매우 강하게 결합하는 단백질을 지칭하며, 항체의 정제에서 그의 사용은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 단백질 A는 정제를 위해 관련 기술분야에서 광범위하게 사용되었다. (Boyle et al., 1993; Hou et al. 1991). 단백질 A에 적용되는 경우, 용어 "잔류", 또는 "rPA"는 제조 공정에서 추가의 상류의 관심의 단백질 또는 항체의 정제에서의 그의 사용으로 인해 혼합물에 존재하는 임의의 남아 있는 단백질 A를 지칭한다.

[0066] "퍼센트 (%) 수득량"은 실제 수득량을 이론적 수득량으로 나누고, 그 값에 100을 곱한 것을 지칭한다. 실제 수득량은 중량으로서 그램으로 또는 몰로 (예를 들어, 몰 수득량) 주어질 수 있다. 이론적 수득량은 이상적인 또는 수학적으로 계산된 수득량으로서 주어질 수 있다.

[0067] 본원에 사용된 "글리코실화 함량"은 단백질 분자, 예컨대 CTLA4-Ig 분자와 같은 당단백질에 공유 부착된 N-연결된 또는 O-연결된 당 잔기의 양을 지칭한다.

[0068] 본원에 사용된 "글리코실화"는 폴리펩티드 쇄 내의 특이적 부위에서의 단백질에의 복잡한 올리고사카라이드 구조의 첨가를 지칭한다. 단백질의 글리코실화 및 첨가된 탄수화물의 후속 프로세싱은 단백질 폴딩 및 구조, 단백질 반감기를 포함하는 단백질 안정성, 및 단백질의 기능적 특성에 영향을 미칠 수 있다. 단백질 글리코실화는 변형이 발생하는 서열 맥락에 의해 2개의 부류, 즉, O-연결된 글리코실화 및 N-연결된 글리코실화로 나누어질 수 있다. O-연결된 폴리사카라이드는 히드록실 기에, 통상적으로 세린 또는 트레오닌 잔기 중 어느 하나의 히드록실 기에 연결된다. O-글리칸은 모든 세린 및 트레오닌 잔기에 첨가되지는 않는다. O-연결된 올리고사카라이드는 통상적으로 단일 또는 이중안테나성이며, 즉, 이들은 하나 또는 많아야 2개의 분지 (안테나)를 포함하고, 하나 하나씩 첨가되는 1 내지 4개의 상이한 종류의 당 잔기를 포함한다. N-연결된 폴리사카라이드는 아스파라긴의 아미드 질소에 부착된다. 단지 아스파라긴-X-세린 또는 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임) 중 어느 하나인 2개의 트리펩티드 서열 중 하나의 부분인 아스파라긴은 글리코실화를 위한 표적이다. N-연결된 올리고사카라이드는 단일-, 이중-, 삼중-, 사중안테나성으로 지칭되는 1 내지 4개의 분지를 가질 수 있다. N- 및 O-연결된 올리고사카라이드에서 발견되는 당 잔기의 구조는 상이하다. 그 차이에도 불구하고, N- 및 O-연결된 폴리사카라이드 둘 다의 각각의 분지 상의 말단 잔기는 시알산 캡핑으로 지칭되는 시알산 분자 변형에 의해 변형될 수 있다. 시알산은 다른 올리고사카라이드에 연결될 수 있는 고유한 9-탄소 모노사카라이드의 패밀리에 대한 통상적인 명칭이다. 2개의 패밀리 구성원은 Neu5Ac, NeuAc, 또는 NANA로 약칭되는 N-아세틸 뉴라민산, 및 Neu5Gc 또는 NGNA로 약칭되는 N-글리콜릴 뉴라민산이다. 인간에서 시알산의 가장 통상적인 형태는 NANA이다. N-아세틸뉴라민산 (NANA)은 CTLA4-Ig 분자에 존재하는 주요 시알산 중이다. 그러나, N 글리콜릴뉴라민산 (NGNA)의 소수의 그러나 검출가능한 수준은 또한 CTLA4-Ig 분자에 존재함이 주목되어야 한다. 더욱이, 본원에 기재된 방법은 NANA 및 NGNA 둘 다에 대한 시알산의 몰의 수를 결정하는데 사용될 수 있으며, 따라서 NANA 및 NGNA 둘 다의 수준은 CTLA4-Ig 분자에 대해 결정되고 보고된다. N- 및 O-연결된 올리고사카라이드는 상이한 수의 분지를 가지며, 이는 시알산 분자가 부착될 수 있는 상이한 수의 위치를 제공한다. N-연결된 올리고사카라이드는 시알산에 대한 최대 4개의 부착 위치를 제공할 수 있는 반면, O-연결된 올리고사카라이드는 시알산에 대한 최대 1개의 부착 위치를 제공할 수 있다.

고사카라이드는 시알산 부착을 위한 2개의 부위를 제공할 수 있다.

- [0069] 본원에 사용된 용어 "시알산 대 단백질의 몰 비" 또는 "MR"은 단백질 (CTLA4-Ig 분자) 또는 이량체의 몰당 시알산 분자의 몰의 수로서 계산되고 주어진다.
- [0070] 본원에 사용된 용어 "당단백질"은 하나 이상의 당 잔기의 첨가를 포함하는 하나 이상의 탄수화물의 첨가에 의해 변형된 단백질을 지칭한다.
- [0071] 본원에 사용된 용어 "시알릴화"는 당단백질을 포함하는 단백질에의 시알산 잔기의 첨가를 지칭한다.
- [0072] 본원에 사용된 용어 "당단백질 이소형"은 등전위 포커싱 (IEF) 겔 전기영동 또는 그들의 분자량, 전하, 및/또는 다른 특징에 의해 혼합물에서 상이한 단백질을 구별하는 다른 적합한 방법에 의해 결정된 바와 같은 그의 탄수화물 및 시알산 함량을 특징으로 하는 분자를 지칭한다. 예를 들어, IEF 겔 상에서 관찰된 각각의 별개의 밴드는 특정한 등전점 (pI) 및 따라서 동일한 순 전체 전하를 갖는 분자를 나타낸다. 당단백질 이소형은 IEF 겔 상에서 관찰된 별개의 밴드일 수 있으며, 여기서 각각의 밴드는 특정한 pI를 갖는 분자의 집단일 수 있다.
- [0073] 본원에 사용된 영상화 모세관 등전위 포커싱 (iCIEF)은 그들의 등전점 (pI)에 의한 단백질의 분리에 사용되는 방법을 지칭한다. 이 방법에서, 샘플은 물, 메틸 셀룰로스, 양쪽성 전해질, 및 pI 마커로 ~1 mg/mL의 최종 농도로 제조되고, 이어서 오토샘플러에 의해 영상화 모세관 등전위 포커싱 시스템 (iCIEF) 내로 주사된다. 전기영동은 이소형의 전하 변동에 기반하여 플루오로화탄소 (FC) 코팅된 모세관 내의 pH 구배를 통해 샘플을 분리한다.
- [0074] "면역 내성"은 사람이 정상적으로 반응성인 특이적 항원 또는 항원의 그룹에 대한 비반응성의 상태 (예를 들어, T 세포가 더 이상 항원에 반응할 수 없는 상태)를 지칭한다.
- [0075] "효력"은 리간드 농도의 함수로서의 반응의 척도를 지칭한다. 예를 들어, 효능제 효력은 절반 최대 효과를 생성하는 리간드의 농도 (EC₅₀)로서 정량화된다. 효력의 비-제한적 약리학적 정의는 친화도 및 효능의 구성요소를 포함하며, 여기서 효능은 결합되면 반응을 일으키는 약물의 능력이다. 효력은 친화도와 관련되지만, 효력 및 친화도는 약물 작용의 상이한 척도이다.
- [0076] 본원에 사용된 "제약상 허용되는 담체"는 약리학상 활성제에 대한 비히클을 지칭한다. 담체는 작용제의 기능을 종결시키지 않으면서 표적 부위에의 활성제의 전달을 용이하게 한다. 담체의 적합한 형태의 비-제한적 예는 용액, 크림, 겔, 겔 에멀전, 젤리, 페이스트, 로션, 연고, 스프레이, 연고, 분말, 고체 혼합물, 에어로졸, 에멀전 (예를 들어, 유중수 또는 수중유), 겔 수용액, 수용액, 현탁액, 리니먼트, 토크, 및 국소 투여에 적합한 패치를 포함한다.
- [0077] 본원에 사용된 어구 "제약상 허용되는 조성물" (또는 "제약 조성물")은 예컨대 인간에의 제약 투여를 위해 허용되는 조성물을 지칭한다. 이러한 조성물은 제약 투여를 위한 허용되는 수준을 초과하지 않는 수준에서 불순물인 물질을 포함할 수 있으며 (이러한 수준은 이러한 불순물의 부재를 포함함), 임의의 활성제(들) 외에도, 예를 들어, 투여의 용이성을 위해 이러한 조성물을 제제화하는 제약상 허용되는 부형제, 비히클, 담체 및 다른 불활성 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 제약상 허용되는 CTLA4-Ig 조성물은 MCP-1 또는 DNA를, 그러한 물질이 인간에의 투여를 위한 허용되는 수준인 한, 포함할 수 있다.
- [0078] "약물 물질"은 제약 조성물에 함유되는 활성 제약 성분이다. 용어 "약물 물질"은 용액에 및/또는 완충된 형태에 활성 제약 성분을 포함한다. "약물 생성물"은 제약 투여를 위해 제제화된 약물 물질을 함유하는 제약 조성물이다. 약물 물질 및/또는 약물 생성물을 지칭할 수 있는 실시예 및 본원의 다른 곳에 함유된 검정의 목적을 위해, 검정될 수 있는 예시적인 약물 물질 및 약물 생성물은 하기와 같다.
- [0079] CTLA4Ig 분자에 대한 예시적인 약물 생성물은 하기를 포함한다:

[0080] 동결건조된 CTLA4-Ig 단백질 (250mg/바이알) 약물 생성물의 조성

구성요소	양 (mg/바이알)
CTLA4-Ig 단백질	262.5
말토스 1수화물	525
1염기성 인산나트륨, 1수화물	18.1
염화나트륨	15.3
염산	pH 7.5로 조정
수산화나트륨	pH 7.5로 조정

[0081]

[0082] 본원에 사용된 용어 "접종"은 배양을 시작하기 위한 배양 배지에의 세포의 첨가를 지칭한다.

[0083]

본원에 사용된 용어 세포 배양의 "유도" 또는 "유도 상" 또는 "성장 상"은 상류 세포 배양의 시작에서 생물반응기의 초기 시딩을 지칭하며, 세포가 주로 급속하게 분열하고 있는 지수적 세포 성장의 기간 (예를 들어, 로그 상)을 포함한다. 이 상 동안, 생존 세포의 밀도의 증가의 속도는 임의의 다른 시점에서보다 더 높다.

[0084]

본원에 사용된 용어 세포 배양의 "생산 상"은 세포 성장이 고정적이고 거의 일정한 수준에서 유지되는 기간을 지칭한다. 생존 세포의 밀도는 주어진 기간에 걸쳐 대략 일정하게 잔류한다. 대수적 세포 성장은 종결되었고, 단백질 생산은 생산 상 동안 주요 활성이다. 이 시간에서의 배지는 일반적으로 계속되는 단백질 생산을 지지하고 목적하는 당단백질 생성물을 달성하도록 보충된다.

[0085]

본원에 사용된 용어 "발현" 또는 "발현하다"는 세포 내에서 발생하는 전사 및 번역을 지칭하기 위해 사용된다. 숙주 세포에서의 생성물 유전자의 발현의 수준은 세포에 존재하는 상응하는 mRNA의 양 또는 세포에 의해 생산된 생성물 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 양 중 어느 하나, 또는 둘 다에 기반하여 결정될 수 있다.

[0086]

본원에 사용된 "N-연결된 글리칸"은 글리칸이 질소 연결을 통해 당접합체에 연결되는 단백질 변형을 지칭한다. 글리칸의 수용자는 각각 ER의 주변세포질 또는 루멘에 들어간 폴리펩티드 쇄의 선택된 아스파라긴 잔기이다. N-글리코실화 경로의 중심 효소인 올리고사카릴트랜스퍼라제는 컨센서스 서열 N-X-S/T에 의해 특정된 아스파라긴 잔기의 측쇄 아미드에의 올리고사카라이드의 N-글리코시드 연결의 형성을 촉매한다. 모든 진행 N-글리칸은 공통적인 코어, 즉, Man α 1-3(Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn-X-Ser/Thr를 공유하며, 3가지 유형으로 분류된다: (1) 올리고만노스, 여기서 단지 Man 잔기는 코어를 연장함; (2) 복합체, 여기서 GlcNAc에 의해 개시된 "안테나"는 코어를 연장함; 및 (3) 하이브리드, 여기서 Man은 코어의 Man α 1-6 아암을 연장하고, 1 또는 2개의 GlcNAc는 Man α 1-3 아암을 연장함.

[0087]

본원에 사용된 "N-연결된 글리코실화"는 질소 원자, 통상적으로 아스파라긴 잔기의 N4에의 올리고사카라이드의 부착을 지칭한다. N-글리코실화는 주로 진핵생물 및 고세균에서 분비된 또는 막 결합된 단백질 상에서 발생할 수 있다. N-연결된 글리칸 (예를 들어, 높은 만노스 유형 올리고사카라이드)을 생성하는데 사용되는 생합성 경로 및 효소의 상세한 검토는 문헌 [Stanley et al., "N-Glycans" in Essentials of Glycobiology, Ed. Varki, Cummings, and Eskho, Cold Spring Harbor Press, 2009]에 기재되어 있다.

[0088]

본원에 사용된 용어 "질량 분광법"은 그들의 질량-대-전하 (m/z) 비에 기반하여 분자를 검출하고, 확인하고, 정량하는데 사용되는 민감한 기술을 지칭한다. 전기장은 그들의 질량-대-전하 비 (m/z), 질량 대 전하의 정수 (z)의 비에 따라 이온을 분리하는데 사용되는데, 이는 이들이 평행 및 등거리 폴 또는 로드, 예컨대 4개의 폴 또는 로드를 함유하는 사중극의 중심 축을 따라 통과하기 때문이다. 각각의 로드는 인가된 2개의 전압을 가지며, 그 중 하나는 고정된 직류이고, 두번째 것은 중첩된 무선 주파수로 순환하는 교류이다. 인가된 전기장의 규모는 단지 특이적 m/z 비를 갖는 이온만이 검출되기 전에 사중극을 통해 활주할 수 있도록 정돈될 수 있다. 모든 다른 m/z 값을 갖는 이온은 이들이 사중극 로드와 충돌하고 방전되거나, 또는 질량 분석기 장으로부터 탈출하고 진공을 통해 제거되는 것을 유발할 궤적 상으로 편향된다. 사중극은 종종 배타적 검출기로 지칭되는데, 이는 단지 특이적 m/z 를 갖는 이온만이 임의의 한 시간에서 사중극에서 안정하기 때문이다. 안정한 궤적을 갖는 그러한 이온은 종종 비충돌성, 공명 또는 안정한 궤적을 갖는 것으로 지칭된다.

[0089]

일반적으로, 삼중-사중극 질량 분광계 상의 실험을 위해, 제1 사중극 (Q1)은 단지 샘플에서의 예상된 화학 종의

특정된 m/z 의 이온 (전구체 이온)을 통과시키도록 설정된다. 제2 사중극 (즉, Q2 또는 충돌 세포)은 Q1을 통해 통과하는 이온을 단편화하는데 사용된다. 제3 사중극 (Q3)은 단지 예상된 화학 종의 예상된 단편화 생성물에 상응하는 특정된 m/z 의 이온 (단편 이온)만을 검출기에 통과시키도록 설정된다. 일부 측면에서, 샘플은 질량 분광계에서 이온화되어 하나 이상의 양성자화된 또는 탈양성자화된 분자 이온을 생성한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 양성자화된 또는 탈양성자화된 분자는 단독으로 하전되거나, 이중으로 하전되거나, 삼중으로 하전되거나 또는 그 초과이다. 일부 측면에서, 질량 분광계는 삼중 사중극 질량 분광계이다. 일부 측면에서, Q1 및 Q3에 사용된 해상도는 단위 해상도이다. 다른 측면에서, Q1 및 Q3에 사용된 해상도는 상이하다. 다른 측면에서, Q1에 사용된 해상도는 Q3의 단위 해상도보다 더 높다.

[0090] 본원에 사용된 용어 "형광단"은 광 여기시 광을 재-방출할 수 있는 형광 화학 화합물을 지칭한다. 형광단은 전형적으로 몇몇 조합된 방향족 기, 또는 몇몇 π 결합을 갖는 평면 또는 시클릭 분자를 함유한다. 2개의 통상적으로 사용되는 형광단은 2-AB (2-아미노벤즈아미드) 및 2-AA (안트라닐산 또는 2-아미노벤조산)이다. 다른 형광단은 PA (2-아미노피리딘), AMAC (2-아미노아크리돈), ANDS (7-아미노-1,3-나프탈렌디술폰산), ANTS (8-아미노나프탈렌-1,3,6-트리술폰산), APTS (9-아미노피렌-1,4,6-트리술폰산), 및 3-(아세틸아미노)-6-아미노아크리딘을 포함한다.

[0091] 본 개시내용에 사용된 "글리칸 프로파일"은 또 다른 샘플 또는 샘플의 그룹으로부터 유래된 참조 값 또는 프로파일과의 비교를 위해 사용될 수 있는 글리칸에 대한 정량적 결과의 값의 임의의 정의된 세트인 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 단백질 샘플로부터의 샘플의 글리칸 프로파일은 대체 공급원으로부터의 샘플의 글리칸 프로파일과는 유의하게 상이할 수 있다. 글리칸 프로파일은 프로파일을 참조 또는 표준 프로파일과 비교함으로써 단백질의 약역학 (PD) 또는 약동학 (PK) 치료 효과를 예측하거나 예상하는 것을 보조할 수 있다. 참조 및 샘플 글리칸 프로파일은 글리칸을 검출할 수 있는 임의의 분석 기기, 예컨대 질량 분광법에 의해 생성될 수 있다. 하나 이상의 N-글리칸은 갈락토스 (Gal), N-아세틸갈락토스아민 (GalNAc), 갈락토스아민 (GalN), 글루코스 (Glc), N-아세틸글루코스아민 (GlcNAc), 글루코스아민 (GlcN), 만노스 (Man), N-아세틸만노스아민 (ManNAc), 만노스아민 (ManN), 크실로스 (Xyl), N-아세틸뉴라민산 (Neu5Ac), N-글리콜릴뉴라민산 (Neu5Gc), 2-케토-3-데옥시노난산 (Kdn), 푸코스 (Fuc), 글루쿠론산 (GlcA), 이두론산 (IdoA), 갈락투론산 (GalA), 만누론산 (ManA), 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다.

[0092] 본원에 사용된 어구 "작업 용액(들)"은 방법에 사용되는 용액을 지칭한다. 작업 용액의 비-제한적 예는 완충액을 포함한다.

[0093] 본원에 사용된 "참조 물질"은 방법에서 표준물질로서 사용되는 물질을 지칭한다. 예를 들어, 참조 물질은 실험 샘플이 비교될 표준물질로서 사용될 수 있다.

[0094] 물질의 부재는 이러한 물질의 양의 범위에 관하여 하한이 제공되지 않는 경우 고려된다.

[0095] 세포 배양에 관하여 본원에 사용된 나열된 온도는 생물반응기의 온도를 조절하는 기기 상의 온도 설정을 지칭한다. 물론, 액체 배양 자체의 온도는 생물반응기에 대한 온도를 조절하는 기기 상에 설정된 온도를 채택할 것이다. 온도가 인큐베이터에서 선반 상에 유지되는 세포 배양을 지칭하는 경우, 온도는 인큐베이터의 선반 온도를 지칭한다.

[0096] II. 수득량을 개선시키는 방법

[0097] 본 개시내용은 세포에 의한 단백질의 수득량을 개선시키는 방법으로서, 세포를 생물반응기에서 단백질 유도 상 동안 적합한 조건 하에서 배양하는 것을 포함하고, 여기서 적합한 조건은 초기 온도 설정치의 조정, 제2 온도 설정치의 조정, 최종 온도 설정치의 조정, 공급 시간의 조정, 초기 pH의 조정, pH 이동의 조정, CO₂ 농도의 조정, 초기 세포 밀도의 조정, 또는 이들의 임의의 조합의 조정을 포함하나 이에 제한되지는 않는 것인 방법을 제공한다.

[0098] 본 개시내용의 방법은 반응기 조건을 생성하는데 유용하며, 여기서 반응기 조건은 단백질 수득량을 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적합한 조건, 예를 들어, 초기, 제2, 및 최종 온도 설정치의 조정, 예를 들어, 36°C, 33°C, 및 31°C의 온도 설정치 없는 방법과 비교하여 적어도 150%, 적어도 약 160 %, 적어도 약 170 %, 적어도 약 180 %, 적어도 약 190 %, 적어도 약 200 %, 적어도 약 210 %, 적어도 약 220 %, 적어도 약 230 %, 적어도 약 240 %, 적어도 약 250 %, 적어도 약 260 %, 적어도 약 270 %, 적어도 약 280 %, 적어도 약 290 %, 적어도 약 300 %, 적어도 약 310 %, 적어도 약 320 %, 적어도 약 330 %, 적어도 약 340 %, 적어도 약 350 %, 적어도 약 360 %, 적어도 약 370 %, 적어도 약 380 %, 적어도 약 390 %, 또는 적어도 약 400 % 개선시

킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 150% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 160% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 170% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 180% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 190% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 200% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 210% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 220% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 230% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 240% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 250% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 260% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 270% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 280% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 290% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 300% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 310% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 320% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 330% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 340% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 350% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 360% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 370% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 380% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 390% 개선시킨다. 일부 측면에서, 조건은 단백질 수득량을 적어도 400% 개선시킨다.

[0099] 일부 측면에서, 본 방법은 단백질 수득량을 적합한 조건, 예를 들어, 초기, 제2, 및 최종 온도 설정치의 조정, 예를 들어, 36℃, 33℃, 및 31℃의 온도 설정치 없는 방법보다 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 또는 적어도 약 10배 더 높게 개선시킨다. 일부 측면에서, 본 방법은 단백질 수득량을 약 2배 내지 약 3배 개선시킨다. 일부 측면에서, 본 방법은 단백질 수득량을 약 3배 내지 약 4배 개선시킨다. 일부 측면에서, 본 방법은 단백질 수득량을 약 4배 내지 약 5배 개선시킨다. 일부 측면에서, 본 방법은 단백질 수득량을 약 5배 내지 약 6배 개선시킨다. 일부 측면에서, 본 방법은 단백질 수득량을 약 6배 내지 약 7배 개선시킨다. 일부 측면에서, 본 방법은 단백질 수득량을 약 7배 내지 약 8배 개선시킨다. 일부 측면에서, 본 방법은 단백질 수득량을 약 8배 내지 약 9배 개선시킨다.

[0100] 본 개시내용의 방법은 또한 배치당 보다 큰 단백질 수득량이 달성되도록 총 숙주 세포 단백질의 분율로서의 총 단백질 산출량을 증가시키는데 유용하다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 방법은 또한 골지에서의 단백질의 체류 시간 및 글리코실화 효소에의 노출에 대한 변경에 기반하여 목적하는 글리코실화 패턴을 갖는 총 단백질 산출량을 증가시키는데 유용하다. 일부 측면에서, 조건은 목적하는 글리코실화 프로파일을 갖는 단백질의 단백질 수득량을 적합한 조건, 예를 들어, 초기, 제2, 및 최종 온도 설정치의 조정, 예를 들어, 36℃, 33℃, 및 31℃의 온도 설정치 없는 방법과 비교하여 적어도 150%, 적어도 약 160 %, 적어도 약 170 %, 적어도 약 180 %, 적어도 약 190 %, 적어도 약 200 %, 적어도 약 210 %, 적어도 약 220 %, 적어도 약 230 %, 적어도 약 240 %, 적어도 약 250 %, 적어도 약 260 %, 적어도 약 270 %, 적어도 약 280 %, 적어도 약 290 %, 적어도 약 300 %, 적어도 약 310 %, 적어도 약 320 %, 적어도 약 330 %, 적어도 약 340 %, 적어도 약 350 %, 적어도 약 360 %, 적어도 약 370 %, 적어도 약 380 %, 적어도 약 390 %, 또는 적어도 약 400 % 개선시킨다.

[0101] 본 개시내용의 방법은 단백질의 전체 수득량을 개선시키고/거나 글리코실화 프로파일을 제어하기 위해 배양물의 성장 속도 및/또는 정상 상태 세포 밀도를 감소시키는데 유용하다. 일부 측면에서, 방법은 세포 성장 속도를 감소시킨다. 일부 측면에서, 세포 성장은 약 30.0시간 내지 약 45.0시간, 약 30.0시간 내지 약 40.0시간, 약 31시간 내지 약 44시간, 약 32시간 내지 약 43시간, 또는 약 33시간 내지 약 42시간의 평균 0-5일 배가 시간을 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 성장은 약 30시간 내지 약 42시간, 예를 들어, 30시간, 31시간, 32시간, 33시간, 34시간, 35시간, 36시간, 37시간, 38시간, 39시간, 40시간, 41시간, 또는 42시간의 평균 0-5일 배가 시간을 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 성장은 약 32시간 내지 약 38시간의 평균 0-5일 배가 시간을 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 성장은 약 33시간 내지 약 37시간의 평균 0-5일 배가 시간을 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 성장은 약 34시간 내지 약 36시간의 평균 0-5일 배가 시간을 나타낸다.

[0102] 일부 측면에서, 세포 성장 속도는 약 30시간의 평균 0-5일 배가 시간을 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 성장 속도는 약 32시간의 평균 0-5일 배가 시간을 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 성장 속도는 약 34시간의 평균 0-5일 배가 시간을 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 성장 속도는 약 38시간의 평균 0-5일 배가 시간을 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 성장 속도는 약 40시간의 평균 0-5일 배가 시간을 나타낸다.

[0103] 본 개시내용의 방법은 또한 단백질 생산 동안 생존 세포 밀도 또는 피크 생존 세포 밀도를 제어하는데

유용하다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 5×10^6 개의 세포/mL 내지 약 21×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 6×10^6 개의 세포/mL 내지 약 20×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 7×10^6 개의 세포/mL 내지 약 19×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 8×10^6 개의 세포/mL 내지 약 18×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 9×10^6 개의 세포/mL 내지 약 17×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 10×10^6 개의 세포/mL 내지 약 16×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 11×10^6 개의 세포/mL 내지 약 15×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 12×10^6 개의 세포/mL 내지 약 14×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다.

[0104] 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 6×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 6×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 10×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 10.5×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 11×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 11.5×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 12×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 12.5×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 13×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 13.5×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 14×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 14.5×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 15×10^6 개의 세포/mL의 평균 피크 생존 세포 밀도 (VCD)를 나타낸다.

[0105] 본 개시내용의 방법은 또한 평균 0-14일 생존 세포 밀도의 적분 (IVCD) 후의 세포 생존력을 개선시키거나 제어하는데 유용하다. IVCD 척도는 생존 세포 밀도의 순간 척도에 반대되는 바와 같은 상류 공정의 생산을 측정하는 대체 방식이다. 각각의 세포는 가변적인 단백질 생산 수명을 가지며, 다양한 세포 배양 조건은 시간 경과에 따른 생존 세포 비율에 영향을 미치기 때문에, IVCD는 전체 공정의 시간 경과에 따른 단백질 생성물의 총 생산을 추정하는데 유용하다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 0.05×10^9 개의 세포/mL 내지 약 0.2×10^9 개의 세포/mL의 평균 0-14일 생존 세포 밀도의 적분 (IVCD)을 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 0.1×10^9 개의 세포/mL 내지 약 0.15×10^9 개의 세포/mL의 평균 0-14일 생존 세포 밀도의 적분 (IVCD)을 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 0.05×10^9 개의 세포/mL 내지 약 0.15×10^9 개의 세포/mL의 평균 0-14일 생존 세포 밀도의 적분 (IVCD)을 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 0.05×10^9 개의 세포/mL 내지 약 0.1×10^9 개의 세포/mL의 평균 0-14일 생존 세포 밀도의 적분 (IVCD)을 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 0.09×10^9 개의 세포/mL 내지 약 0.13×10^9 개의 세포/mL의 평균 0-14일 생존 세포 밀도의 적분 (IVCD)을 나타낸다. 일부 측면에서, 세포 생존력은 약 0.09×10^9 개의 세포/mL 내지 약 0.11×10^9 개의 세포/mL의 평균 0-14일 생존 세포 밀도의 적분 (IVCD)을 나타낸다.

[0106] 본 개시내용의 방법은 또한 단백질 역가를 제어하는데 유용하다. 일부 측면에서, 역가는 약 14일의 기간 후에 측정된다. 일부 측면에서, 역가는 약 1.5 g/L 내지 약 3.5 g/L의 평균 제14일 역가를 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 1.5 g/L 내지 약 3 g/L의 평균 제14일 역가를 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 2 g/L 내지

약 3 g/L의 평균 제14일 역가를 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 2 g/L 내지 약 2.5 g/L의 평균 제14일 역가를 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 2.5 g/L 내지 약 3 g/L의 평균 제14일 역가를 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 2 g/L의 평균 14일 역가를 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 2.5 g/L의 평균 14일 역가를 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 2.8 g/L의 평균 14일 역가를 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 2.87 g/L의 평균 14일 역가를 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 2.9 g/L의 평균 14일 역가를 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 3 g/L의 평균 14일 역가를 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 3.5 g/L의 평균 14일 역가를 나타낸다.

[0107] 본 개시내용의 방법은 또한 개별적인 세포 산출량 생산에 의해 측정된 바와 같은, 세포의 단백질 생산을 제어하는데 유용하다. 개별적인 세포 산출량 생산을 통해 산출량을 측정하는 것은 반응기 조건의 함수로서 세포 건강을 모니터링하는데 유용하다. 일부 측면에서, 역가는 약 20 pg/세포-일 내지 약 45 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 20 pg/세포-일 내지 약 40 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 30 pg/세포-일 내지 약 45 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 20 pg/세포-일 내지 약 35 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 25 pg/세포-일 내지 약 35 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 25 pg/세포-일 내지 약 30 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 30 pg/세포-일 내지 약 40 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 30 pg/세포-일 내지 약 35 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 20 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 25 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 30 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 31 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 32 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 33 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다.

[0108] 일부 측면에서, 역가는 약 34 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 35 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 36 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 37 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 38 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 39 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 40 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 41 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 42 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다. 일부 측면에서, 역가는 약 45 pg/세포-일의 평균 비생산성을 나타낸다.

[0109] 본 개시내용의 방법은 에너지 공급원을 사용한 용기에서의 세포의 성장을 통해 이용될 수 있다. 일부 측면에서, 용기는 생물반응기이고, 글루코스 또는 갈락토스를 포함하는 공급 배지를 포함한다. 일부 측면에서, 세포는 포유동물 세포이다. 일부 측면에서, 세포는 진핵 세포이다. 일부 측면에서, 세포는 포유동물 세포이다. 일부 측면에서, 세포는 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, HEK293 세포, 마우스 골수종 (NS0), 아기 햄스터 신장 세포 (BHK), 원숭이 신장 섬유모세포 세포 (COS-7), 마딘-다비(Madin-Darby) 소 신장 세포 (MDBK), 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택된다. 한 측면에서, 세포는 중국 햄스터 난소 세포이다. 일부 측면에서, 세포는 곤충 세포, 예를 들어, 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda) 세포이다. 다른 측면에서, 세포는 포유동물 세포이다. 이러한 포유동물 세포는 CHO, VERO, BHK, 헬라(Hela), MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, NS0, CRL7030, COS (예를 들어, COS1 또는 COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 및 HsS78Bst 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 측면에서, 포유동물 세포는 CHO 세포이다. 일부 측면에서 CHO 세포는 CHO-DG44, CHOZN, CHO/dhfr-, CHOK1SV GS-KO, 또는 CHO-S이다. 일부 측면에서, CHO 세포는 CHO-DG4이다. 일부 측면에서, CHO 세포는 CHOZN이다. 본원에 개시된 다른 적합한 CHO 세포주는 CHO-K (예를 들어, CHO K1), CHO pro3-, CHO P12, CHO-K1/SF, DUXB11, CHO DUKX; PA-DUKX; CHO pro5; DUK-BII 또는 그의 유도체를 포함한다.

[0110] IIA. 온도

[0111] 생산 용기, 예컨대 생물반응기의 온도는 생물생산의 중요한 측면일 수 있는데, 이는 생물반응기의 온도가 세포 성장, 생존 세포 밀도, 세포 장수 및/또는 세포 내부의 글리코실화 효소의 글리코실화 활성화에 있어서 역할을 하기 때문이다. 온도 변화는 세포 내의 효소 반응의 속도에 유의하게 영향을 미치고/거나, 단백질을 변성시키고/거나, 세포 배양에 대한 다른 효과를 유발할 수 있다. 세포는 예를 들어, 최대 생존 세포 밀도를 권장하기 위해 초기 온도 설정치, 예컨대 37°C에서 배양될 수 있고, 이어서 온도는 세포 장수를 연장시키거나 세포 내의 목적하는 글리코실화 활성을 증진시키기 위해 또 다른 온도 설정치 (즉, 제2 온도 설정치 또는 최종 온도 설정

치)로 변형될 수 있다. 하나 이상의 온도 설정치는 전체 세포 밀도, 단백질 수득량, 또는 관심의 단백질의 단백질 글리코실화 프로파일을 개선시키기 위해 상류 생산 공정의 다양한 상 동안 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 방법은 단백질 생산 동안 하나 이상의 온도 조절에 관한 것이다. 온도 조절은 제조 공정 동안 작동 온도의 감소일 수 있다. 온도 조절은 또한 제조 공정 동안 작동 온도의 증가일 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 방법은 제조 공정 동안 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개, 또는 적어도 4개의 온도 조절을 사용한다.

[0112] 본 개시내용의 방법은 또한 단백질을 생산하기 위한 세포의 세포 성장 속도, 세포 생존력, 생존 세포 밀도 및/또는 역가를 제어하는 것에 관한 것이다. 초기 온도 설정치는 로그 성장 상 동안 세포 확장 및 세포의 성장에 도움이 되는 반응기 조건을 생성하는데 중요하다. 초기 로그 상 후에, 초기 설정치보다 더 낮은 제2 온도 설정치가 비바람직한 세포 밀도 및 총 세포 생존력의 후속 소실을 초래할 세포 배양물의 과다성장을 방지하기 위해 세포 확장 조건을 감소시키는데 사용된다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 방법은 세포를 생물반응기에서 유도 상 동안 36℃의 초기 온도 설정치 하에서 배양하고, 후속적으로 세포를 33℃의 제2 온도 설정치에서 배양하고, 최종적으로 세포를 31℃의 최종 온도 설정치에서 배양하는 것을 수반한다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 방법은 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 또는 적어도 5개의 온도 설정치, 예를 들어, 초기 온도 설정치, 최종 설정치, 또는 초기 온도 설정치 후에 그러나 최종 설정치 전에 보다 많은 설정치를 사용한다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 방법은 적어도 3개의 온도 설정치, 즉, 초기 온도 설정치, 제2 온도 설정치, 및 최종 온도 설정치를 사용한다.

[0113] 일부 측면에서, 본 방법을 위한 초기 온도 설정치는 약 37℃이고, 제2 온도 설정치는 약 36℃ 미만이다. 일부 측면에서, 초기 온도 설정치는 약 36℃이고, 제2 온도 설정치는 제1 온도 설정치 미만, 예를 들어, 약 35℃, 약 34℃, 약 33℃, 약 32℃, 또는 약 31℃이다. 일부 측면에서, 초기 온도 설정치는 약 37℃이고, 제2 온도 설정치는 약 34℃ 미만이다. 일부 측면에서, 초기 온도 설정치는 약 36℃이고, 제2 온도 설정치는 약 35℃, 약 34℃, 또는 약 33℃ 미만이다. 일부 측면에서, 초기 온도 설정치는 약 36.5℃ 미만이고, 최종 온도 설정치는 약 31℃이다. 일부 측면에서, 초기 온도 설정치는 약 36.0℃이고, 최종 온도 설정치는 약 31℃이다. 일부 측면에서, 초기 온도 설정치는 약 35.5℃ 미만이고, 최종 온도 설정치는 약 31℃이다. 일부 측면에서, 초기 온도 설정치는 약 35.0℃ 미만이고, 최종 온도 설정치는 약 31℃이다. 일부 측면에서, 초기 온도 설정치는 약 36.5℃ 미만이고, 제2 온도 설정치는 약 33℃이고, 최종 온도 설정치는 약 33℃ 또는 약 32℃ 미만이다. 일부 측면에서, 초기 온도 설정치는 약 36.0℃이고, 제2 온도 설정치는 약 33℃이고, 최종 온도 설정치는 약 33℃ 또는 약 32℃ 미만이다. 일부 측면에서, 초기 온도 설정치는 약 36.0℃이고, 제2 온도 설정치는 약 33℃이고, 최종 온도 설정치는 약 32℃ 미만이다. 일부 측면에서, 초기 온도 설정치는 약 36.0℃이고, 제2 온도 설정치는 약 33℃이고, 최종 온도 설정치는 약 31℃이다.

[0114] 본 개시내용의 방법은 초기 온도 설정치, 제2 온도 설정치, 및 제3 및/또는 최종 설정치를 포함할 수 있다. 초기, 제2, 및 제3 및/또는 최종 온도 설정치는 제조 공정 동안 정상-상태 세포 밀도를 추가로 제어하고/거나, 생존 세포 백분율을 제어하고/거나, 배양물의 세포-주기 분열을 관리하고/거나, 생산된 단백질의 글리코실화 속도 및 글리코실화 프로파일을 변경시키는데 사용된다. 일부 측면에서, 제3 온도 설정치는 제2 온도 설정치 미만이다. 일부 측면에서, 초기 온도 설정치는 37℃ 내지 34℃의 온도, 예를 들어, 37℃, 36℃, 35℃, 또는 34℃이고; 제2 온도 설정치는 34℃ 내지 32℃의 온도, 예를 들어, 34℃, 33℃, 또는 32℃이고; 최종 온도 설정치는 32℃ 내지 30℃의 온도, 예를 들어, 32℃, 31℃, 또는 30℃이고, 여기서 제2 온도 설정치는 제1 온도 설정치 미만이고, 최종 온도 설정치는 제2 온도 설정치 미만이다. 일부 측면에서, 초기 온도 설정치는 37℃ 내지 34℃의 온도, 예를 들어, 37℃, 36℃, 35℃, 또는 34℃이고; 제2 온도 설정치는 34℃ 내지 32℃의 온도, 예를 들어, 34℃, 33℃, 또는 32℃이고; 최종 온도 설정치는 32℃ 내지 30℃의 온도, 예를 들어, 32℃, 31℃, 또는 30℃이고, 여기서 제1 온도 설정치는 37℃가 아니고/거나, 제2 온도 설정치는 34℃가 아니고/거나, 최종 온도 설정치는 32℃가 아니다.

[0115] 본 개시내용의 방법은 초기 온도 설정치, 제2 온도 설정치, 제3 온도 설정치, 및 임의로 제4 온도 설정치, 임의로 제5 온도 설정치, 및 임의로 제6 온도 설정치를 포함할 수 있다. 이들 제4, 제5, 및 제6 온도 설정치는 제조 공정 동안 정상-상태 세포 밀도를 추가로 제어하고/거나, 생존 세포 백분율을 제어하고/거나, 배양물의 세포-주기 분열을 관리하고/거나, 생산된 단백질의 글리코실화 속도 및 글리코실화 프로파일을 변경시키는데 사용된다. 일부 측면에서, 방법은 임의적 제4 온도 설정치, 임의적 제5 온도 설정치, 임의적 제6 온도 설정치를 설정하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 임의적 제4 온도 설정치, 제5 온도 설정치, 및/또는 제6 온도 설정치는 제3 온도 설정치 미만이다. 일부 측면에서, 방법은 임의적 제4 온도 설정치, 임의적 제5 온도 설정치, 및 임의적 제6 온도 설정치를 설정하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 임의적 제4 온도 설정치, 제5 온도 설정치, 및/또는

제6 온도 설정치는 제3 온도 설정치 초과이다. 일부 측면에서, 제4, 제5, 또는 제6 온도 설정치, 제5 온도 설정치, 및/또는 제6 온도 설정치는 약 30℃, 약 31℃, 약 32℃, 약 33℃, 약 34℃, 약 35℃, 약 36℃, 약 37℃, 약 38℃, 약 39℃, 또는 약 40℃이다. 일부 측면에서, 제4, 제5, 또는 제6 온도 설정치, 제5 온도 설정치, 및/또는 제6 온도 설정치는 약 30℃이다. 일부 측면에서, 제4, 제5, 또는 제6 온도 설정치는 약 31℃이다. 일부 측면에서, 제4, 제5, 또는 제6 온도 설정치는 약 32℃이다. 일부 측면에서, 제4, 제5, 또는 제6 온도 설정치는 약 33℃이다. 일부 측면에서, 제4, 제5, 또는 제6 온도 설정치는 약 34℃이다. 일부 측면에서, 제4, 제5, 또는 제6 온도 설정치는 약 35℃이다. 일부 측면에서, 제4, 제5, 또는 제6 온도 설정치는 약 36℃이다. 일부 측면에서, 제4, 제5, 또는 제6 온도 설정치는 약 37℃이다. 일부 측면에서, 제4, 제5, 또는 제6 온도 설정치는 약 38℃이다. 일부 측면에서, 제4, 제5, 또는 제6 온도 설정치는 약 39℃이다. 일부 측면에서, 제4, 제5, 또는 제6 온도 설정치는 약 40℃이다.

[0116] 온도 설정치 외에도, 본 개시내용의 방법은 또한 특이적 시간 창 내의 온도 이동을 수행하기 위한 온도 설정치의 타이밍의 변형을 수반한다. 온도 이동의 타이밍은 상류 공정 동안 세포 밀도, 세포 성장, 및 세포 배양물의 단백질 생산 특징을 제어하는데 중요하다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 방법은 세포에 의한 단백질의 수득량을 개선시키는 방법으로서, 세포를 생물반응기에서 적합한 조건 하에서 배양하는 것을 포함하고, 여기서 적합한 조건은 (i) 36.0℃의 초기 온도 설정치 및 36℃ 미만의 제2 온도 설정치; (ii) 36.5℃ 미만의 초기 온도 설정치 및 31℃의 최종 온도 설정치; 또는 (iii) 36.5℃ 미만의 초기 온도 설정치, 33℃의 제2 온도 설정치, 및 33℃ 미만의 최종 온도 설정치를 포함하는 것인 방법에 관한 것이다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 방법은 세포에 의한 단백질의 수득량을 개선시키는 방법으로서, 세포를 생물반응기에서 적합한 조건 하에서 배양하는 것을 포함하고, 여기서 적합한 조건은 (i) 36.0℃의 초기 온도 설정치 및 34℃ 미만의 제2 온도 설정치; (ii) 36.5℃ 미만의 초기 온도 설정치 및 31℃의 최종 온도 설정치; 또는 (iii) 36.5℃ 미만의 초기 온도 설정치, 32℃의 제2 온도 설정치, 및 32℃ 미만의 최종 온도 설정치를 포함하는 것인 방법에 관한 것이다.

[0117] 일부 측면에서, 세포는 생물반응기에서 (i) 35℃ 초과와 그러나 37℃ 미만의 초기 온도 설정치 및 32℃ 초과와 그러나 34℃ 미만의 제2 온도 설정치, (ii) 35.5℃ 초과와 그러나 37.5℃ 미만의 초기 온도 설정치 및 32℃ 초과와 그러나 34℃ 미만의 제2 온도 설정치, 및 (iii) 35℃ 초과와 그러나 37℃ 미만의 초기 온도 설정치, 32℃ 초과와 그러나 34℃ 미만의 제2 온도 설정치, 및 30℃ 초과와 그러나 32℃ 미만의 최종 온도 설정치를 포함하는 적합한 조건 하에서 배양된다.

[0118] 본 개시내용의 방법은 또한 초기 온도 설정치 후에 생물반응기에서 온도 설정치를 조정함으로써 세포에 의한 단백질의 수득량을 개선시키는데 유용하다. 일부 측면에서, 초기 온도 설정치는 약 35℃ 초과 및 37℃ 미만, 예를 들어, 약 36℃이고, 제2 온도 설정치는 약 32℃ 초과 및 약 34℃ 미만, 약 33℃이고, 제3 온도 설정치는 약 30℃ 초과 및 약 32℃ 미만, 예를 들어, 약 31℃이고, 여기서 제2 온도 설정치는 초기 온도 설정치 후 약 120시간 내지 약 168시간, 예를 들어, 약 5일, 약 6일, 또는 약 7일에서 발생한다. 일부 측면에서, 초기 온도 설정치는 약 35℃ 초과 및 37℃ 미만, 예를 들어, 약 36℃이고, 제2 온도 설정치는 약 32℃ 초과 및 약 34℃ 미만, 약 33℃이고, 제3 온도 설정치는 약 30℃ 초과 및 약 32℃ 미만, 예를 들어, 약 31℃이고, 여기서 제2 온도 설정치는 초기 온도 설정치 후 약 120시간, 약 126시간, 약 132시간, 약 138시간, 약 144시간, 약 150시간, 약 156시간, 약 162시간, 또는 약 168시간에서 발생한다.

[0119] 일부 측면에서, 초기 온도 설정치는 약 35℃ 초과 및 37℃ 미만, 예를 들어, 약 36℃이고, 제2 온도 설정치는 약 32℃ 초과 및 약 34℃ 미만, 약 33℃이고, 제3 온도 설정치는 약 30℃ 초과 및 약 32℃ 미만, 예를 들어, 약 31℃이고, 여기서 제2 온도 설정치는 초기 온도 설정치 후 약 120시간, 5일에서 발생한다. 일부 측면에서, 초기 온도 설정치는 약 35℃ 초과 및 37℃ 미만, 예를 들어, 약 36℃이고, 제2 온도 설정치는 약 32℃ 초과 및 약 34℃ 미만, 약 33℃이고, 제3 온도 설정치는 약 30℃ 초과 및 약 32℃ 미만, 예를 들어, 약 31℃이고, 여기서 제2 온도 설정치는 초기 온도 설정치 후 약 144시간, 6일에서 발생한다. 일부 측면에서, 초기 온도 설정치는 약 35℃ 초과 및 37℃ 미만, 예를 들어, 약 36℃이고, 제2 온도 설정치는 약 32℃ 초과 및 약 34℃ 미만, 약 33℃이고, 제3 온도 설정치는 약 30℃ 초과 및 약 32℃ 미만, 예를 들어, 약 31℃이고, 여기서 제2 온도 설정치는 초기 온도 설정치 후 약 168시간, 7일에서 발생한다. 일부 측면에서, 제2 온도 설정치는 초기 온도 설정치 후 약 192시간, 예를 들어, 8일에서 발생한다.

[0120] 본 개시내용의 방법은 또한 최종 온도 설정치로의 전이 타이밍을 제어하는데 사용된다. 일부 측면에서, 초기 온도 설정치는 약 35℃ 초과 및 37℃ 미만, 예를 들어, 약 36℃이고, 제2 온도 설정치는 약 32℃ 초과 및 약 34℃ 미만, 약 33℃이고, 최종 온도 설정치는 약 30℃ 초과 및 약 32℃ 미만, 예를 들어, 약 31℃이고, 여기서 최종 온도 설정치는 초기 온도 설정치 후 약 168시간 내지 약 312시간, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11

일, 약 12일, 또는 약 13일, 7일 내지 12일, 8일 내지 13일, 9일 내지 13일, 8일 내지 12일, 8일 내지 11일에서 발생한다. 일부 측면에서, 초기 온도 설정치는 약 35℃ 초과 및 37℃ 미만, 예를 들어, 약 36℃이고, 제2 온도 설정치는 약 32℃ 초과 및 약 34℃ 미만, 약 33℃이고, 최종 온도 설정치는 약 30℃ 초과 및 약 32℃ 미만, 예를 들어, 약 31℃이고, 여기서 최종 온도 설정치는 약 192시간 내지 약 300시간에서 발생한다. 일부 측면에서, 최종 온도 설정치는 약 216시간 내지 약 288시간에서 발생한다. 일부 측면에서, 최종 온도 설정치는 약 216시간 내지 약 264시간에서 발생한다.

[0121] **IIB. pH**

[0122] 한 측면에서, 본 개시내용의 방법은 공정의 pH를 변형시킴으로써 단백질 생산을 개선시키거나 제어하는 것을 수반한다. 세포내 pH의 조절은 세포의 성장 및 대사에 대해 크게 중요한 근본적인 생리학적 공정이다. 세포내 pH는 영양분 및 호르몬의 수송에 대한, 및 세포에서의 효소 반응에 대한 폭넓은 범위의 결과를 갖기 때문에, 세포는 세포질 pH의 조절에 많은 에너지를 쏟는다. 더욱이, pH는 세포에 의해 생산되는 단백질의 글리코실화 속도 및 프로파일에 있어서 역할을 한다.

[0123] 일부 측면에서, pH를 변형시키는 것은 배양 공정 동안 하나 초과의 pH 설정치, 2개 초과의 pH 설정치, 3개 초과의 pH 설정치, 4개 초과의 pH 설정치 또는 5개 초과의 pH 설정치를 사용함으로써 수행될 수 있다. 일부 측면에서, pH를 변형시키는 것은 초기 pH 설정치 및 제2 pH 설정치를 사용한다. 일부 측면에서, pH를 변형시키는 것은 초기 pH 설정치, 제2 pH 설정치, 및 제3 pH 설정치를 사용한다. 일부 측면에서, pH를 변형시키는 것은 배양 공정 동안 pH를 감소시키는 것을 포함한다. 일부 측면에서, pH를 변형시키는 것은 pH를 적어도 약 0.5, 적어도 약 1.0, 적어도 약 1.5, 적어도 약 2.0, 적어도 약 0.1, 적어도 약 0.2, 적어도 약 0.3, 또는 적어도 약 0.4 감소시키는 것을 포함한다. 일부 측면에서, pH를 변형시키는 것은 pH를 적어도 약 0.1 감소시키는 것을 포함한다. 일부 측면에서, pH를 변형시키는 것은 pH를 적어도 약 0.2 감소시키는 것을 포함한다. 일부 측면에서, pH를 변형시키는 것은 pH를 적어도 약 0.5 감소시키는 것을 포함한다. 일부 측면에서, pH를 변형시키는 것은 pH를 적어도 약 1 감소시키는 것을 포함한다. 일부 측면에서, pH를 변형시키는 것은 pH를 적어도 약 1.5 감소시키는 것을 포함한다. 일부 측면에서, pH를 변형시키는 것은 pH를 적어도 약 2 감소시키는 것을 포함한다.

[0124] 일부 측면에서, 초기 pH 설정치는 pH 7.0이고, 제2 pH 설정치는 6.9이다. 일부 측면에서, 초기 pH는 7.0이다. 일부 측면에서, 초기 pH 설정치는 6이다. 일부 측면에서, 초기 pH 설정치는 6.1이다. 일부 측면에서, 초기 pH 설정치는 6.2이다. 일부 측면에서, 초기 pH 설정치는 6.3이다. 일부 측면에서, 초기 pH 설정치는 6.4이다. 일부 측면에서, 초기 pH 설정치는 6.5이다. 일부 측면에서, 초기 pH 설정치는 6.6이다. 일부 측면에서, 초기 pH 설정치는 6.7이다. 일부 측면에서, 초기 pH 설정치는 6.8이다. 일부 측면에서, 초기 pH 설정치는 6.9이다. 일부 측면에서, 초기 pH 설정치는 7이다. 일부 측면에서, 제2 pH 설정치는 6이다. 일부 측면에서, 제2 pH 설정치는 6.1이다. 일부 측면에서, 제2 pH 설정치는 6.2이다. 일부 측면에서, 제2 pH 설정치는 6.3이다. 일부 측면에서, 제2 pH 설정치는 6.4이다. 일부 측면에서, 제2 pH 설정치는 6.5이다. 일부 측면에서, 제2 pH 설정치는 6.6이다. 일부 측면에서, 제2 pH 설정치는 6.7이다. 일부 측면에서, 제2 pH 설정치는 6.8이다. 일부 측면에서, 제2 pH 설정치는 6.9이다. 일부 측면에서, 제2 pH 설정치는 7이다. 일부 측면에서, 제3 pH 설정치는 6이다. 일부 측면에서, 제3 pH 설정치는 6.1이다. 일부 측면에서, 제3 pH 설정치는 6.2이다. 일부 측면에서, 제3 pH 설정치는 6.3이다. 일부 측면에서, 제3 pH 설정치는 6.4이다. 일부 측면에서, 제3 pH 설정치는 6.5이다. 일부 측면에서, 제3 pH 설정치는 6.6이다. 일부 측면에서, 제3 pH 설정치는 6.7이다. 일부 측면에서, 제3 pH 설정치는 6.8이다. 일부 측면에서, 제3 pH 설정치는 6.9이다. 일부 측면에서, 제3 pH 설정치는 7이다. 일부 측면에서, 초기 pH는 7.0이고, 제2 pH는 6.9이다. 일부 측면에서, 초기 pH는 7.1이고, 제2 pH는 6.8이다. 일부 측면에서, 초기 pH는 7.1이고, 제2 pH는 6.9이다. 일부 측면에서, 초기 pH는 7.1이고, 제2 pH는 7.0이다. 일부 측면에서, 초기 pH는 6.9이고, 제2 pH는 6.8이다. 일부 측면에서, 초기 pH는 6.9이고, 제2 pH는 6.7이다.

[0125] 상류 생산 공정의 pH가 중요할 뿐만 아니라, 생산 동안 임의 pH 이동의 타이밍도 또한 공정에서 중요한 역할을 한다. 생산 동안 pH 이동은 주로 세포 성장 및 대사에 대한 효과로 인해 공정 성능의 변경을 초래한다. 본 개시내용의 방법은 단백질 생산 동안 pH를 이동시켜 단백질의 글리코실화를 제어하는 것에 관한 것이다. 일부 측면에서, pH는 약 6.0의 pH로 이동된다. 일부 측면에서, pH는 약 6.1의 pH로 이동된다. 일부 측면에서, pH는 약 6.2의 pH로 이동된다. 일부 측면에서, pH는 약 6.3의 pH로 이동된다. 일부 측면에서, pH는 약 6.4의 pH로 이동된다. 일부 측면에서, pH는 약 6.5의 pH로 이동된다. 일부 측면에서, pH는 약 6.6의 pH로 이동된다. 일부 측면에서, pH는 약 6.7의 pH로 이동된다. 일부 측면에서, pH는 약 6.8의 pH로 이동된다. 일부 측면에서, pH는 약 6.9의 pH로 이동된다. 일부 측면에서, pH는 약 7.0의 pH로 이동된다. 일부 측면에서, pH는 약 7.1의 pH로 이동된다. 일부 측면에서, pH는 약 7.2의 pH로 이동된다. 일부 측면에서, pH는 약 7.3의 pH로 이동된다.

일부 측면에서, pH는 약 7.4의 pH로 이동된다. 일부 측면에서, pH는 약 7.5의 pH로 이동된다.

[0126] 생산 동안 pH가 조정되는 배양 유도 후의 시간 (이하 "pH 이동" 또는 "pH 타이밍"으로 지칭됨)은 또한 세포 성장 및 대사의 효과로 인해 공정의 변경을 초래한다. 본 개시내용의 방법은 단백질 생산 동안 pH를 이동시켜 단백질의 글리코실화를 제어하는 것에 관한 것이다. 일부 측면에서, pH 이동은 유도 후 약 50시간 내지 약 150시간이다. 일부 측면에서, pH 이동은 유도 후 약 72시간 내지 약 120시간이다. 일부 측면에서, pH 이동은 유도 후 약 80시간 내지 약 100시간이다. 일부 측면에서, pH 이동은 유도 후 약 90시간이다. 일부 측면에서, pH 이동은 유도 후 약 100시간이다. 일부 측면에서, pH 이동은 유도 후 약 96시간이다.

[0127] IIC. 생존 세포 밀도

[0128] 생물반응기 공정의 시작에서 세포의 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 또는 시드 밀도는 상류 성장 공정의 중요한 측면일 수 있는데, 이는 초기 생존 세포 밀도 (VCD)가 생산 동안 세포 배양물의 정상-상태 및/또는 최대 생존 세포 밀도에 영향을 미치기 때문이다. 보다 높은 초기 세포 밀도는 상류 공정의 초기 성장 상 동안 생산되는 훨씬 더 많은 수의 세포를 초래할 수 있으며, 궁극적으로 보다 빠른 세포 사멸 및 보다 짧은 생물반응기 실행 시간을 초래할 수 있다. 생물반응기 생산 공정은 단축될 수 있지만, 일부 경우에, 공정에 의해 생산된 단백질에 대해 이루어진 번역후 변형은 영향을 받을 수 있는데, 이는 보다 짧은 생물반응기 실행 시간이 끝지에서의 단백질의 변경된 체류 시간, 및 따라서 변경된 번역후 변형, 예컨대 단백질의 글리코실화 패턴에 대한 변화를 초래할 수 있기 때문이다. 초기 세포 밀도가 단백질의 전체 수득량 및 품질 산출에 미칠 수 있는 폭넓은 영향 때문에, 초기 생존 세포 밀도는 상류 단백질 생산에 대한 중요한 파라미터이다.

[0129] 일부 측면에서, 본 개시내용의 방법은 생물반응기를 초기 생존 세포 밀도 (VCD)로 시딩하는 것을 수반한다. 일부 측면에서, 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치는 약 0.05×10^6 개의 세포/mL 내지 약 0.95×10^6 개의 세포/mL이다. 일부 측면에서, 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치는 약 0.05×10^6 개의 세포/mL 내지 약 0.9×10^6 개의 세포/mL이다. 일부 측면에서, 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치는 약 0.05×10^6 개의 세포/mL 내지 약 0.85×10^6 개의 세포/mL이다. 일부 측면에서, 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치는 약 0.05×10^6 개의 세포/mL 내지 약 0.8×10^6 개의 세포/mL이다. 일부 측면에서, 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치는 약 0.05×10^6 개의 세포/mL 내지 약 0.75×10^6 개의 세포/mL이다. 일부 측면에서, 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치는 약 0.05×10^6 개의 세포/mL 내지 약 0.7×10^6 개의 세포/mL이다. 일부 측면에서, 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치는 약 0.05×10^6 개의 세포/mL 내지 약 0.65×10^6 개의 세포/mL이다. 일부 측면에서, 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치는 약 0.1×10^6 개의 세포/mL 내지 약 0.6×10^6 개의 세포/mL이다. 일부 측면에서, 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치는 약 0.15×10^6 개의 세포/mL 내지 약 0.6×10^6 개의 세포/mL이다. 일부 측면에서, 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치는 약 0.15×10^6 개의 세포/mL 내지 약 0.55×10^6 개의 세포/mL이다. 일부 측면에서, 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치는 약 0.15×10^6 개의 세포/mL 내지 약 0.5×10^6 개의 세포/mL이다. 일부 측면에서, 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치는 약 0.15×10^6 개의 세포/mL 내지 약 0.45×10^6 개의 세포/mL이다. 일부 측면에서, 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치는 약 0.15×10^6 개의 세포/mL 내지 약 0.4×10^6 개의 세포/mL이다. 일부 측면에서, 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치는 약 0.2×10^6 개의 세포/mL 내지 약 0.4×10^6 개의 세포/mL이다. 일부 측면에서, 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치는 약 0.2×10^6 개의 세포/mL 내지 약 0.35×10^6 개의 세포/mL이다. 일부 측면에서, 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치는 약 0.25×10^6 개의 세포/mL 내지 약 0.35×10^6 개의 세포/mL이다.

[0130] IID. 세포 공급 시간

[0131] 본 개시내용의 방법은 또한 세포의 성장 조건에 영향을 미치거나 이를 제어하도록 세포 공급 시간을 변경시키는 것을 통해 달성될 수 있다. 공급 공정의 타이밍은 세포 배양 생산 공정의 목적하는 성장 특성, 예컨대 세포 밀도를 생성하는데 중요하다. 생물반응기에서의 최적 공급 전략은 반응 동역학의 구조 및 상이한 반응 사이의 상호작용, 예컨대 단백질 합성 및 그러한 단백질의 번역후 변형 (즉, 글리코실화)에 의존한다. 세포 집단을 과다 공급하는 것 및 과소공급하는 것 둘 다는 세포 성장 및 생성물 형성에 유해하며, 따라서 공급의 타이밍은 최대

생성물 수득량을 보장하기 위해 중요할 수 있다. 배양물의 과소공급은 영양분 고갈 및 세포 사멸을 초래할 수 있는 반면, 과다공급은 과량의 영양분, 삼투압의 증가 및 밀집한 세포 환경에서의 세포 스트레스, 및 관심의 단백질의 비바람직한 번역후 변형을 초래할 수 있다.

[0132] 일부 측면에서, 세포 공급 시간은 유도 후 약 24시간 내지 약 100시간이다. 일부 측면에서, 세포 공급 시간은 유도 후 약 48시간 내지 약 100시간이다. 일부 측면에서, 세포 공급 시간은 유도 후 약 48시간 내지 약 72시간이다. 일부 측면에서, 세포 공급 시간은 유도 후 약 48시간 내지 약 96시간이다. 일부 측면에서, 세포 공급 시간은 유도 후 약 72시간 내지 약 96시간이다. 일부 측면에서, 세포 공급 시간은 유도 후 약 24시간이다. 일부 측면에서, 세포 공급 시간은 유도 후 약 48시간이다. 일부 측면에서, 세포 공급 시간은 유도 후 약 72시간이다. 일부 측면에서, 세포 공급 시간은 유도 후 약 96시간이다.

[0133] **IIE. CO₂**

[0134] 본 개시내용의 방법은 또한 초기 CO₂ 설정치에 관한 것이다. 상류 생물반응기 공정에서 CO₂의 농도는 세포 성장 및 pH를 제어하기 위한 중요한 요소이다. CO₂의 높은 농도는 세포 배양 배지에 용해된 추가의 CO₂를 초래할 수 있으며, 이는 세포 배양 배지의 pH를 저하시킬 것이다. 더욱이, CO₂의 농도는 상류 생물제조 공정 동안 변화할 가능성이 있을 것인데, 이는 이산화탄소가 호흡 공정의 불가피한 생성물이고, 따라서 호기성 생물공정에 항상 존재하기 때문이다. 제조 동안 CO₂의 높은 농도는 세포 배양물의 성장 속도 및/또는 단백질 생산 산출량의 감소를 초래할 수 있다. 단백질 글리코실화 패턴은 또한 CO₂ 농도의 변화에 의해 영향을 받는데, 이는 단백질 생산 속도에 대한 변화가 골지에서의 단백질 체류 시간에 영향을 미칠 수 있기 때문이다.

[0135] 일부 측면에서, 초기 CO₂ 설정치는 약 5% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 45%, 약 10% 내지 약 40%, 약 10% 내지 약 35%, 약 10% 내지 약 30%, 약 15% 내지 약 30%, 약 15% 내지 약 25%, 또는 약 20% 내지 약 25이다. 일부 측면에서, 초기 CO₂ 설정치는 약 0% 내지 약 75%이다. 일부 측면에서, 초기 CO₂ 설정치는 약 5% 내지 약 50%이다. 일부 측면에서, 초기 CO₂ 설정치는 약 10% 내지 약 45%이다. 일부 측면에서, 초기 CO₂ 설정치는 약 10% 내지 약 40%이다. 일부 측면에서, 초기 CO₂ 설정치는 약 10% 내지 약 35%이다. 일부 측면에서, 초기 CO₂ 설정치는 약 10% 내지 약 30%이다. 일부 측면에서, 초기 CO₂ 설정치는 약 15% 내지 약 30%이다. 일부 측면에서, 초기 CO₂ 설정치는 약 15% 내지 약 25%이다. 일부 측면에서, 초기 CO₂ 설정치는 약 10% 내지 약 25%이다. 일부 측면에서, 초기 CO₂ 설정치는 약 15% 약 16%, 약 17% (예를 들어, 16.8%), 약 18%, 약 19%, 약 20%, 약 21%, 약 22%, 약 23%, 약 24%, 또는 약 25%이다. 일부 측면에서, 초기 CO₂ 설정치는 약 17% (예를 들어, 16.8%)이다. 일부 측면에서, 초기 CO₂ 설정치는 약 22%, 예를 들어, 22.4%이다. 일부 측면에서, 초기 CO₂ 설정치는 약 23%이다.

[0136] 일부 측면에서, 초기 CO₂ 농도는 세포 배양 공정 전반에 걸쳐 모니터링되고 유지된다. 다른 측면에서, 초기 CO₂ 농도는 설정되지만, 세포 배양 공정 전반에 걸쳐 모니터링되지 않는다.

[0137] **IIF. 조건의 조합**

[0138] 일부 측면에서, 본 개시내용의 방법은 상기 열거된 조건의 임의의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 방법은 (i) 약 35℃ 내지 약 37℃, 예를 들어, 약 36℃의 초기 온도 설정치, 32℃ 내지 약 34℃, 예를 들어, 약 33℃의 제2 온도 설정치, 및 약 30℃ 내지 약 32℃, 예를 들어, 약 31℃의 제3 온도 설정치; (ii) pH 7.0의 초기 pH 설정치 및 6.9의 제2 pH 설정치; (iii) 약 0.15×10^6 개의 세포/mL 내지 약 0.45×10^6 개의 세포/mL의 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치; (iv) 6.9의 초기 pH; (v) 약 96시간에서의 pH 이동; 및 (vi) 약 15% 내지 약 25%, 예를 들어, 약 16.8%의 초기 CO₂ 설정치로 이루어진 군으로부터 선택되는 2개 이상의 조건을 포함한다.

[0139] 일부 측면에서, 방법은 (i) 약 35℃ 내지 약 37℃, 예를 들어, 약 36℃의 초기 온도 설정치, 32℃ 내지 약 34℃, 예를 들어, 약 33℃의 제2 온도 설정치, 및 약 30℃ 내지 약 32℃, 예를 들어, 약 31℃의 제3 온도 설정치 및 (ii) pH 7.0의 초기 pH 설정치 및 6.9의 제2 pH 설정치를 포함한다.

[0140] 일부 측면에서, 방법은 (i) 36℃의 초기 온도 설정치, 33℃의 제2 온도 설정치, 및 31℃의 제3 온도 설정치 및 (ii) 약 0.15×10^6 개의 세포 내지 약 0.45×10^6 개의 세포 (예를 들어, 0.30×10^6 개의 세포)의 초기 생존 세

포 밀도 (VCD) 설정치를 포함한다.

- [0141] 일부 측면에서, 방법은 (i) 약 35℃ 내지 약 37℃, 예를 들어, 약 36℃의 초기 온도 설정치, 32℃ 내지 약 34℃, 예를 들어, 약 33℃의 제2 온도 설정치, 및 약 30℃ 내지 약 32℃, 예를 들어, 약 31℃의 제3 온도 설정치 및 (ii) 약 15% 내지 약 25%, 예를 들어, 약 15%, 약 16%, 약 16.8%, 약 17%, 약 22%, 또는 약 22.4%의 초기 CO₂ 설정치를 포함한다.
- [0142] 일부 측면에서, 방법은 (i) 약 35℃ 내지 약 37℃, 예를 들어, 약 36℃의 초기 온도 설정치, 32℃ 내지 약 34℃, 예를 들어, 약 33℃의 제2 온도 설정치, 및 약 30℃ 내지 약 32℃, 예를 들어, 약 31℃의 제3 온도 설정치, (ii) pH 7.0의 초기 pH 설정치 및 6.9의 제2 pH 설정치, 및 (iii) 약 0.15×10^6 개의 세포 내지 약 0.45×10^6 개의 세포 (예를 들어, 0.30×10^6 개의 세포)의 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치를 포함한다.
- [0143] 일부 측면에서, 방법은 (i) 약 35℃ 내지 약 37℃, 예를 들어, 약 36℃의 초기 온도 설정치, 32℃ 내지 약 34℃, 예를 들어, 약 33℃의 제2 온도 설정치, 및 약 30℃ 내지 약 32℃, 예를 들어, 약 31℃의 제3 온도 설정치, 및 (ii) pH 6.9의 초기 pH 설정치를 포함한다.
- [0144] 일부 측면에서, 방법은 (i) 약 35℃ 내지 약 37℃, 예를 들어, 약 36℃의 초기 온도 설정치, 32℃ 내지 약 34℃, 예를 들어, 약 33℃의 제2 온도 설정치, 및 약 30℃ 내지 약 32℃, 예를 들어, 약 31℃의 제3 온도 설정치, (ii) pH 6.9의 초기 pH 설정치, 및 (iii) 약 0.15×10^6 개의 세포 내지 약 0.45×10^6 개의 세포 (예를 들어, 0.30×10^6 개의 세포)의 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치를 포함한다.
- [0145] 일부 측면에서, 방법은 (i) 약 35℃ 내지 약 37℃, 예를 들어, 약 36℃의 초기 온도 설정치, 32℃ 내지 약 34℃, 예를 들어, 약 33℃의 제2 온도 설정치, 및 약 30℃ 내지 약 32℃, 예를 들어, 약 31℃의 제3 온도 설정치, (ii) pH 7.0의 초기 pH 설정치 및 pH 6.9의 제2 pH 설정치, 또는 pH 6.9의 초기 pH 설정치, 및 (iii) 약 15% 내지 약 25%, 예를 들어, 약 15%, 약 16%, 약 16.8%, 약 17%, 약 22%, 또는 약 22.4%의 초기 CO₂ 설정치를 포함한다.
- [0146] 일부 측면에서, 방법은 (i) 약 35℃ 내지 약 37℃, 예를 들어, 약 36℃의 초기 온도 설정치, 32℃ 내지 약 34℃, 예를 들어, 약 33℃의 제2 온도 설정치, 및 약 30℃ 내지 약 32℃, 예를 들어, 약 31℃의 제3 온도 설정치, (ii) pH 7.0의 초기 pH 설정치 및 pH 6.9의 제2 pH 설정치, 또는 pH 6.9의 초기 pH 설정치, (iii) 약 0.15×10^6 개의 세포 내지 약 0.45×10^6 개의 세포 (예를 들어, 0.30×10^6 개의 세포)의 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치; 및 (iv) 약 15% 내지 약 25%, 예를 들어, 약 15%, 약 16%, 약 16.8%, 약 17%, 약 22%, 또는 약 22.4%의 초기 CO₂ 설정치를 포함한다.
- [0147] 일부 측면에서, 방법은 (i) 약 35℃ 내지 약 37℃, 예를 들어, 약 36℃의 초기 온도 설정치, 32℃ 내지 약 34℃, 예를 들어, 약 33℃의 제2 온도 설정치, 및 약 30℃ 내지 약 32℃, 예를 들어, 약 31℃의 제3 온도 설정치, (ii) pH 7.0의 초기 pH 설정치 및 pH 6.9의 제2 pH 설정치, 또는 pH 6.9의 초기 pH 설정치, (iii) 약 15% 내지 약 25%, 예를 들어, 약 15%, 약 16%, 약 16.8%, 약 17%, 약 22%, 또는 약 22.4%의 초기 CO₂ 설정치, 및 (iv) 약 0.15×10^6 개의 세포 내지 약 0.45×10^6 개의 세포 (예를 들어, 0.30×10^6 개의 세포)의 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치를 포함한다.
- [0148] 일부 측면에서, 방법은 (i) 약 35℃ 내지 약 37℃, 예를 들어, 약 36℃의 초기 온도 설정치, 32℃ 내지 약 34℃, 예를 들어, 약 33℃의 제2 온도 설정치, 및 약 30℃ 내지 약 32℃, 예를 들어, 약 31℃의 제3 온도 설정치, (ii) pH 7.0의 초기 pH 설정치 및 pH 6.9의 제2 pH 설정치, 또는 pH 6.9의 초기 pH 설정치 (여기서 초기 pH 설정치로부터 제2 pH 설정치로의 이동은 약 96시간에서임); 및 (iii) 약 15% 내지 약 25%, 예를 들어, 약 15%, 약 16% (예를 들어, 약 16.8%), 약 17%, 약 22%, 또는 약 22.4%의 초기 CO₂ 설정치를 포함한다.
- [0149] 일부 측면에서, 방법은 (i) 약 35℃ 내지 약 37℃, 예를 들어, 약 36℃의 초기 온도 설정치, 32℃ 내지 약 34℃, 예를 들어, 약 33℃의 제2 온도 설정치, 및 약 30℃ 내지 약 32℃, 예를 들어, 약 31℃의 제3 온도 설정치, (ii) pH 7.0의 초기 pH 설정치 및 pH 6.9의 제2 pH 설정치 (여기서 초기 pH 설정치로부터 제2 pH 설정치로의 이동은 약 96시간에서임); 및 (iii) 약 15% 내지 약 25%, 예를 들어, 약 15%, 약 16%, 약 16.8%, 약 17%, 약 22%, 또는 약 22.4%의 초기 CO₂ 설정치; 및 (iv) 약 0.15×10^6 개의 세포 내지 약 0.45×10^6 개의 세포 (예

를 들어, 0.30×10^6 개의 세포)의 초기 생존 세포 밀도 (VCD) 설정치를 포함한다.

[0150] **III. 글리코실화 프로파일**

[0151] 본 개시내용의 방법 및 조건은 본 방법에 의해 생산된 단백질의 글리코실화 프로파일에 영향을 미치고/거나, 이를 유지하고/거나, 제어하고/거나, 변형시키는데 유용하다. 일부 측면에서, 방법은 단백질의 글리코실화 프로파일을 제어한다. 일부 측면에서, 단백질의 글리코실화 프로파일은 하나 이상의 N-연결된 글리칸을 포함한다.

[0152] 본 개시내용의 방법은 글리칸 방출 검정을 포함하는 다양한 방법을 사용한 글리칸 분석을 통해 달성되거나 입증될 수 있다. 당-접합체, 예컨대 당단백질의 글리칸 분석에서 제1 단계는 이들이 부착된 분자로부터 당의 방출이다. 당단백질 상의 N-연결된 글리칸은 아미다제, 예컨대 펩티드-N-글리코시다제 F (PNGase F)에 의해 방출될 수 있다. 생물학적 공급원으로부터의 올리고사카라이드의 분석을 위한 대부분의 방법은 글리칸 유도체화 단계를 요구한다: 글리칸은 크로마토그래피적 또는 전기영동적 분리 후의 검출을 용이하게 하는 발색단 또는 형광단을 도입하도록 유도체화될 수 있다. 유도체화는 또한 환원 단부에서 하전된 또는 소수성 기를 연결하여 글리칸 분리 및 질량-분광법 검출을 증진시키기 위해 적용될 수 있다. 더욱이, 유도체화 단계, 예컨대 페메틸화는 시알산 잔기를 안정화시켜, 질량-분광법 민감도를 증진시키고, (탠덤) 질량 분광법에 의한 상세한 구조적 특징 규명을 지지하는 것을 목표로 한다.

[0153] 질량 분광법 ("MS" 또는 "매스-스펙(mass-spec)")은 질량-대-전하 비 이온을 측정하는데 사용되는 분석 기술이다. 이는 샘플을 이온화하고, 상이한 질량의 이온을 분리하고, 이온 유동의 강도를 측정함으로써 그들의 상대 풍부도를 기록함으로써 달성된다. 전형적인 질량 분광계는 3개의 부분을 포함한다: 이온 공급원, 질량 분석기, 및 검출기 시스템. 이온 공급원은 분석 하의 물질 (분석물)을 이온화하는 질량 분광계의 부분이다. 이어서 이온은 자기장 또는 전기장에 의해 질량 분석기에 수송되며, 이는 이온을 그들의 질량-대-전하 비 (m/z)에 따라 분리한다. 많은 질량 분광계는 탠덤 질량 분광법 (MS/MS)을 위해 2개 이상의 질량 분석기를 사용한다. 검출기는 이온이 통과하거나 표면을 칠 때 유도된 전하 또는 생성된 전류를 기록한다. 질량 스펙트럼은 질량 분석기로 m/z 이온을 스캐닝할 때 검출기에서 생성된 신호를 측정하는 것의 결과이다.

[0154] 일부 측면에서, N-연결된 글리칸은 소수성 상호작용 액체 크로마토그래피 (HILIC)에 의해 분석될 수 있다. 글리칸은 CTLA4로부터 절단되고, 형광 표지되고, 분석을 위해 HILIC에 의해 분리될 수 있다. 글리칸을 형광 표지 (예를 들어, 2-아미노벤조아미드)로 태그부착하는 것은 글리칸이 펩토물 수준에서 검출되는 것을 허용한다. 일부 측면에서, CTLA4 N-연결된 글리칸은 질량 분광법과 결합된 HILIC에 의해 분석된다.

[0155] 다양한 N-연결된 글리칸은 단백질의 글리코실화 프로파일에 존재할 수 있다. 일부 측면에서, N-연결된 글리칸은 G0F, G1F, G2F, S1G1F, S1G2F, S2G2F, S1G3F, 및/또는 S2G4F를 포함한다. G0F, G1F, G2F, S1G1F, S2G2F, S1G3F, 및 S2G4F의 대표적인 도해는 도 1b-1c에서 볼 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 방법은 제1일, 제2일, 제3일, 제4일, 제5일, 제6일, 제7일, 제8일, 제9일, 제10일, 제11일, 제12일, 제13일, 제14일, 제15일, 제16일, 제17일, 제18일, 제9일, 제20일, 또는 제21일 후에 글리코실화 프로파일을 측정하는 것을 수반한다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 방법은 제7일 후에 글리코실화 프로파일을 측정하는 것을 수반한다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 방법은 제14일 후에 글리코실화 프로파일을 측정하는 것을 수반한다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 방법은 제21일 후에 글리코실화 프로파일을 측정하는 것을 수반한다.

[0156] 일부 측면에서, 글리코실화된 단백질은 CTLA4 단백질이다. CTLA4 분자 또는 CTLA4 세포의 도메인은 Fc에 융합될 수 있고, 여기서 분자는 CTLA4-Fc 또는 CTLA4-Ig로 지칭된다. "Fc 영역" (단편 결정화가능한 영역), "Fc 도메인", 또는 "Fc"는 면역계의 다양한 세포 (예를 들어, 이펙터 세포) 상에 위치한 Fc 수용체에의 또는 고전적인 보체계의 제1 구성요소 (C1q)에의 결합을 포함하는, 숙주 조직 또는 인자에의 이뮤노글로불린의 결합을 매개하는 항체의 중쇄의 C-말단 영역을 지칭한다. 따라서, Fc 영역은 제1 불변 영역 이뮤노글로불린 도메인 (예를 들어, CH1 또는 CL)을 제외한 항체의 불변 영역을 포함한다. IgG, IgA 및 IgD 항체 이소타입에서, Fc 영역은 항체의 2개의 중쇄의 제2 (CH2) 및 제3 (CH3) 불변 도메인으로부터 유래된 2개의 동일한 단백질 단편을 포함하며; IgM 및 IgE Fc 영역은 각각의 폴리펩티드 체에 3개의 중쇄 불변 도메인 (CH 도메인 2-4)을 포함한다. IgG 이소타입은 특정 종에서 하위부류로 나누어진다: 인간에서 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4, 및 마우스에서 IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3. IgG에 대해, Fc 영역은 이뮤노글로불린 도메인 CH2 및 CH3 및 CH1 및 CH2 도메인 사이의 힌지를 포함한다. 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계의 정의는 다양할 수 있지만, 본원에서 정의된 바와 같이, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 IgG1에 대한 아미노산 잔기 D221, IgG2에 대한 V222, IgG3에 대한 L221 및 IgG4에 대한 P224로부터 중쇄의 카르복시-말단으로 스트레치되는 것으로 정의되고, 여기서 넘버링은 카바트(Kabat) 넘버링 스킴에 따른다. 인간 IgG Fc 영역의 CH2 도메인은 아미노산 237로부터 아미노산 340으로 연장되고, CH3 도

메인은 Fc 영역에서의 CH2 도메인의 C-말단 측 상에 위치되며, 즉, 이는 IgG의 아미노산 341로부터 아미노산 447 또는 446 (C-말단 리신 잔기가 부재하는 경우) 또는 445 (C-말단 글리신 및 리신 잔기가 부재하는 경우)로 연장된다. 본원에 사용된 Fc 영역은 임의의 동종이형 변이체, 또는 변이체 Fc (예를 들어, 비-천연-발생 Fc)를 포함하는 천연 서열 Fc일 수 있다. 본 개시내용의 방법은 또한 CTLA4 도메인을 포함하는 단백질을 생산하는데 유용하다. 본 개시내용의 방법은 또한 Fc 부분에 융합된 CTLA4 도메인을 생산하는데 유용하다. 일부 측면에서, 단백질은 융합 단백질이다. 일부 측면에서, 융합 단백질은 Fc 부분을 포함한다. 일부 측면에서, 단백질은 아바타셉트이다. 일부 측면에서, 단백질은 서열식별번호: 1-8로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 단백질은 서열식별번호: 1을 포함한다. 일부 측면에서, 단백질은 서열식별번호: 2를 포함한다. 일부 측면에서, 단백질은 서열식별번호: 3을 포함한다. 일부 측면에서, 단백질은 서열식별번호: 4를 포함한다. 일부 측면에서, 단백질은 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 측면에서, 단백질은 서열식별번호: 6을 포함한다. 일부 측면에서, 단백질은 서열식별번호: 7을 포함한다. 일부 측면에서, 단백질은 서열식별번호: 8을 포함한다.

[0157] CTLA4-Ig 융합 단백질은 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, CTLA4-Ig 융합 단백질은 (a) 서열식별번호: 8 (아미노산 위치 27에 메티오닌 및 아미노산 위치 382에 글리신)의 아미노산 서열을 갖는 CTLA4-Ig 융합 단백질; (b) 서열식별번호: 5 (아미노산 위치 27에 메티오닌 및 아미노산 위치 383에 리신)의 아미노산 서열을 갖는 CTLA4-Ig 융합 단백질; (c) 서열식별번호: 7 (아미노산 위치 26에 알라닌 및 아미노산 위치 382에 글리신)의 아미노산 서열을 갖는 CTLA4-Ig 융합 단백질; (d) 서열식별번호: 4 (아미노산 위치 26에 알라닌 및 아미노산 위치 383에 리신)의 아미노산 서열을 갖는 CTLA4-Ig 융합 단백질; (e) 서열식별번호: 6 (아미노산 위치 25에 메티오닌 및 아미노산 위치 382에 글리신)의 아미노산 서열을 갖는 CTLA4-Ig 융합 단백질; 또는 (f) 서열식별번호: 3 (아미노산 위치 25에 메티오닌 및 아미노산 위치 383에 리신)의 아미노산 서열을 갖는 CTLA4-Ig 융합 단백질이다. 일부 측면에서, CTLA4-Ig 융합 단백질은 하기이다: (a) CTLA4-Ig 폴리펩티드의 약 90%는 잔기 27에서 메티오닌으로 시작하는 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함하고; (b) CTLA4-Ig 폴리펩티드의 약 10%는 잔기 번호 26에서 알라닌으로 시작하는 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함하고; (c) CTLA4-Ig 폴리펩티드의 약 4%는 잔기 번호 383에서 리신으로 종료하는 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함하고, (d) CTLA4-Ig 폴리펩티드의 약 96%는 잔기 번호 382에서 글리신으로 종료하는 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함하고; 임의로, (e) CTLA4-Ig 폴리펩티드의 약 1% 미만은 잔기 번호 25에서 메티오닌으로 시작하는 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함한다.

[0158] 본 개시내용의 단백질은 글리코실화 부위를 갖는다. 글리코실화는 폴리펩티드쇄 내의 특이적 부위에서의 단백질에의 복잡한 올리고사카라이드 구조의 첨가를 수반하는 공정이다. 단백질의 글리코실화 및 첨가된 탄수화물의 후속 프로세싱은 단백질 폴딩 및 구조, 단백질 반감기를 포함하는 단백질 안정성, 및 단백질의 기능적 특성에 영향을 미칠 수 있다. 단백질 글리코실화는 변형이 발생하는 서열 맥락에 의해 2개의 부류, 즉, 0-연결된 글리코실화 및 N-연결된 글리코실화로 나누어질 수 있다. 0-연결된 폴리사카라이드는 히드록실기에, 통상적으로 세린 또는 트레오닌 잔기 중 어느 하나의 히드록실기에 연결된다. 0-글리칸은 모든 세린 및 트레오닌 잔기에 첨가되지는 않는다. 0-연결된 올리고사카라이드는 통상적으로 단일 또는 이중안테나성이며, 즉, 이들은 하나 또는 많아야 2개의 분지(안테나)를 포함하고, 하나 하나씩 첨가되는 1 내지 4개의 상이한 종류의 당 잔기를 포함한다. N-연결된 폴리사카라이드는 아스파라긴의 아미드 질소에 부착된다. 단지 아스파라긴-X-세린 또는 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임) 중 어느 하나인 2개의 트리펩티드 서열 중 하나의 부분인 아스파라긴은 글리코실화를 위한 표적이다. N-연결된 올리고사카라이드는 단일-, 이중-, 삼중- 사중안테나성으로 지칭되는 1 내지 4개의 분지를 가질 수 있다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 아바타셉트의 Asn76 (T5), Asn108 (T7), 및/또는 Asn207 (T14)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아스파라긴 잔기에 위치한다.

[0159] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 2.0% 내지 약 10.0%의 GOF의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 2.5% 내지 약 10%, 약 2.5% 내지 약 9.5%, 약 2.5% 내지 약 9%, 약 2.5% 내지 약 8.5%, 약 2.5% 내지 약 8%, 약 2.5% 내지 약 7.5%, 약 2.5% 내지 약 7%, 약 2.5% 내지 약 6.5%, 약 3.0% 내지 약 10%, 약 3.0%, 약 9.5%, 약 3.0% 내지 약 9%, 약 3.0% 내지 약 8.5%, 약 3.0% 내지 약 8%, 약 3.0% 내지 약 7.5%, 약 3.0% 내지 약 7%, 또는 약 3.0% 내지 약 6.5%의 GOF의 상대 풍부도를 포함한다.

[0160] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 3.2% 내지 약 6.6%, 약 3.2% 내지 약 4.6%, 또는 3.2% 내지 약 5.6%의 GOF의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결

된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 3.2% 내지 약 4.6%의 GOF의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 3.2% 내지 약 6.6%의 GOF의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 3.2% 내지 약 5.6%의 GOF의 상대 풍부도를 포함한다.

[0161] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 1.0% 내지 약 6%의 GOF의 상대 풍부도를 포함한다.

[0162] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 1.0% 내지 약 6%, 약 1.0% 내지 약 5.5%, 약 1.0% 내지 약 5.0%, 약 1.0% 내지 약 4.5%, 약 1.0% 내지 약 4.0%, 약 1.5% 내지 약 6%, 약 1.5% 내지 약 5.5%, 약 1.5% 내지 약 5.0%, 약 1.5% 내지 약 4.5%, 약 1.5% 내지 약 4.0%, 약 2.0% 내지 약 6%, 약 2.0% 내지 약 5.5%, 약 2.0% 내지 약 5.0%, 약 2.0% 내지 약 4.5%, 또는 약 2.0% 내지 약 4.0%의 GOF의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 2.1% 내지 약 4.0%, 약 1.8% 내지 약 3.5%, 또는 약 1.8% 내지 4.0%의 GOF의 상대 풍부도를 포함한다.

[0163] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 1.0% 내지 약 6%의 GOF의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 1.0% 내지 약 5.5%의 GOF의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 1.0% 내지 약 5.0%의 GOF의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 1.0% 내지 약 4.5%의 GOF의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 1.0% 내지 약 4.0%의 GOF의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 1.5% 내지 약 6%의 GOF의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 1.5% 내지 약 5.5%의 GOF의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 1.5% 내지 약 5.0%의 GOF의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 1.5% 내지 약 4.5%의 GOF의 상대 풍부도를 포함한다.

[0164] 본 개시내용의 방법은 단백질의 G2F 함량을 제어하거나 유지하는데 유용하다. 단백질의 G2F 함량은 인체로부터의 단백질의 제거 속도와 관련되며, 따라서 본 방법은 또한 G2F 함량을 포함하는 그의 글리칸 함량을 제어함으로써 단백질의 제거 반감기를 제어하는 것에 관한 것이다. 일부 측면에서, 본 개시내용의 방법은 그의 제거 속도를 감소시킴으로써 단백질의 순환 반감기를 증가시키는데 유용하다. 일부 측면에서, 단백질은 재조합 (예를 들어, 아바타셉트)이다. 일부 측면에서, 단백질의 제거 반감기는 감소된다. 일부 측면에서, 단백질의 순환 반감기는 증가된다.

[0165] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 5% 내지 약 12%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 5% 내지 약 12%, 약 5% 내지 약 11.5%, 약 5% 내지 약 11%, 약 5% 내지 약 10.5%, 약 5% 내지 약 10%, 약 5.5% 내지 약 12%, 약 5.5% 내지 약 11.5%, 약 5.5% 내지 약 11%, 약 5.5% 내지 약 10.5%, 약 5.5% 내지 약 10%, 약 6% 내지 약 12%, 약 6% 내지 약 11.5%, 약 6% 내지 약 11%, 약 6% 내지 약 10.5%, 약 6% 내지 약 10%, 약 6.5% 내지 약 12%, 약 6.5% 내지 약 11.5%, 약 6.5% 내지 약 11%, 약 6.5% 내지 약 10.5%, 약 6.5% 내지 약 10%, 약 7% 내지 약 12%, 약 7% 내지 약 11.5%, 약 7% 내지 약 11%, 약 7% 내지 약 10.5%, 또는 약 7% 내지 약 10%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 7.2% 내지 약 9.8%, 약 6.3% 내지 10.6%, 또는 약 7.2% 내지 약 10.6%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 5% 내지 약 21%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 방법은 단백질을 본원에 개시된 조건 중 어느 하나, 예를 들어, 약 35℃ 내지 약 37℃, 예를 들어, 약 36℃의 초기 온도 설정치, 32℃ 내지 약 34℃, 예를 들어, 약 33℃의 제2 온도 설정치, 및 약 30℃ 내지 약 32℃, 예를 들어, 약 31℃의 제3 온도 설정치의 조건 하에서 배양하는 것을 포함하고, 여기서 단백질은 약 5% 내지 약 12%의 G2F의 상대 풍부도를 갖는 잔기 Asn76 (T5)에 N-연결된 글리칸, 예를 들어, G2F를 갖는다.

[0166] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 5% 내지 약 11.5%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 5% 내

지 약 11%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 5% 내지 약 10.5%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 5% 내지 약 10%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 5.5% 내지 약 12%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 5.5% 내지 약 11.5%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 5.5% 내지 약 11%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 5.5% 내지 약 10.5%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 5.5% 내지 약 10%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 7.2% 내지 약 9.8%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 6.3% 내지 약 10.6%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 5% 내지 약 21%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다.

[0167] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 5% 내지 약 21%, 약 5% 내지 약 20.5%, 약 5% 내지 약 20%, 약 5% 내지 약 19.5%, 약 5% 내지 약 19%, 약 5.5% 내지 약 21%, 약 5.5% 내지 약 20.5%, 약 5.5% 내지 약 20%, 약 5.5% 내지 약 19.5%, 약 5.5% 내지 약 19%, 약 6% 내지 약 21%, 약 6% 내지 약 20.5%, 약 6% 내지 약 20%, 약 6% 내지 약 19.5%, 약 6% 내지 약 19%, 약 6.5% 내지 약 21%, 약 6.5% 내지 약 20.5%, 약 6.5% 내지 약 20%, 약 6.5% 내지 약 19.5%, 약 6.5% 내지 약 19%, 약 7% 내지 약 21%, 약 7% 내지 약 20.5%, 약 7% 내지 약 20%, 약 7% 내지 약 19.5%, 약 7% 내지 약 19%, 약 7.5% 내지 약 21%, 약 7.5% 내지 약 20.5%, 약 7.5% 내지 약 20%, 약 7.5% 내지 약 19.5%, 약 7.5% 내지 약 19%, 약 8% 내지 약 21%, 약 8% 내지 약 20.5%, 약 8% 내지 약 20%, 약 8% 내지 약 19.5%, 또는 약 8% 내지 약 19%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다.

[0168] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 8.2% 내지 약 14.1%, 약 8.0% 내지 약 18.6%, 또는 약 8.2% 내지 약 14.1%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, G2F는 갈락토스-알파-1,3-갈락토스 모이어티 (G2F-Gal)를 추가로 포함하고, 여기서 G2F-Gal은 약 1.4% 이하의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, G2F-Gal은 약 1.0% 내지 약 1.4%의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, G2F-Gal은 약 0.4% 내지 약 0.9%의 상대 풍부도를 포함한다.

[0169] 일부 측면에서, 글리코실화 프로파일은 하나 초과와 갈락토스-알파-1,3-갈락토스 (알파-gal) 연결을 포함하지 않는다.

[0170] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 5% 내지 약 21%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 5% 내지 약 20.5%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 5% 내지 약 20%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 5.5% 내지 약 21%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 5.5% 내지 약 21%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 5.5% 내지 약 20.5%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 8.2% 내지 약 14.1%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 8.0% 내지 약 18.6%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 8.2% 내지 약 14.1%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다.

[0171] 일부 측면에서, 방법은 단백질을 본원에 개시된 조건 중 어느 하나, 예를 들어, 약 35°C 내지 약 37°C, 예를 들어, 약 36°C의 초기 온도 설정치, 32°C 내지 약 34°C, 예를 들어, 약 33°C의 제2 온도 설정치, 및 약 30°C 내지 약 32°C, 예를 들어, 약 31°C의 제3 온도 설정치의 조건 하에서 배양하는 것을 포함하고, 여기서 단백질은 약 5% 내지 약 21%의 G2F의 상대 풍부도를 갖는 잔기 Asn108 (T7)에 N-연결된 글리칸, 예를 들어, G2F를 갖는다.

[0172] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 29% 내지 약 38%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 29% 내지 약 38%, 약 29% 내지 약 37.5%, 약 29% 내지 약 37%, 약 29% 내지 약 36.5%, 약 29.5% 내지 약 38%, 약 29.5% 내지 약 37.5%, 약 29.5% 내지 약 37%, 약 29.5% 내지 약 36.5%, 약 30% 내지 약 38%, 약 30% 내지 약

은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 33.5% 내지 약 43%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 33.5% 내지 약 42.5%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다.

[0177] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 34% 내지 약 45%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 34% 내지 약 44.5%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 34% 내지 약 44%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 34% 내지 약 43.5%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 34% 내지 약 43%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 34% 내지 약 42.5%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 34.2% 내지 약 37.7%, 약 35.5% 내지 약 42.3%, 또는 약 34.2% 내지 약 42.3%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 34.2% 내지 약 42.3%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 35.2% 내지 약 42.3%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn108 (T7)에 위치하고, 약 34.2% 내지 약 37.7%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, S1G2F는 갈락토스-알파-1, 3-갈락토스 모이어티 (S1G2F-Gal)를 추가로 포함하고, 여기서 S1G2F-Gal은 약 4.7% 이하의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, S1G2F-Gal은 약 2.3% 내지 약 4.7%의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, S1G2F-Gal은 약 1.4% 내지 약 1.8%의 상대 풍부도를 포함한다.

[0178] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 13% 내지 약 25%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 13% 내지 약 25%, 약 13% 내지 약 24.5%, 약 13% 내지 약 24%, 약 13% 내지 약 23.5%, 약 13% 내지 약 23%, 약 13.5% 내지 약 25%, 약 13.5% 내지 약 24.5%, 약 13.5% 내지 약 24%, 약 13.5% 내지 약 23.5%, 약 13.5% 내지 약 23%, 약 14% 내지 약 25%, 약 14% 내지 약 24.5%, 약 14% 내지 약 24%, 약 14% 내지 약 23.5%, 약 14% 내지 약 23%, 약 14.5% 내지 약 25%, 약 14.5% 내지 약 24.5%, 약 14.5% 내지 약 24%, 약 14.5% 내지 약 23.5%, 약 14.5% 내지 약 23%, 약 15% 내지 약 25%, 약 15% 내지 약 24.5%, 약 15% 내지 약 24%, 약 15% 내지 약 23.5%, 약 15% 내지 약 23%, 약 15.5% 내지 약 25%, 약 15.5% 내지 약 24.5%, 약 15.5% 내지 약 24%, 약 15.5% 내지 약 23.5%, 또는 약 15.5% 내지 약 23%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다.

[0179] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 13% 내지 약 25%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 13% 내지 약 24.5%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 13% 내지 약 24%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 13% 내지 약 23.5%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 13% 내지 약 23.5%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다.

[0180] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 13.5% 내지 약 25%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 13.5% 내지 약 24.5%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 13.5% 내지 약 24%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 13.5% 내지 약 23.5%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 13.5% 내지 약 23.5%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 14% 내지 약 25%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 14% 내지 약 24.5%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 14% 내지 약 24%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5)에 위치하고, 약 14% 내지 약 23.5%의

약 3% 이하, 약 2% 이하, 또는 약 1% 이하의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5) 단독, Asn108 (T7) 단독, Asn207 (T14) 단독, 또는 이들의 임의의 조합에 위치하고, 약 2.0% 내지 약 23%의, 약 3% 내지 약 23%의, 약 4% 내지 약 23%의, 약 5% 내지 약 23%의, 약 6% 내지 약 23%의, 약 7% 내지 약 23%의, 약 8% 내지 약 23%의, 약 9% 내지 약 23%의, 약 10% 내지 약 23%의, 약 11% 내지 약 23%의, 약 12% 내지 약 23%의, 약 13% 내지 약 23%의, 약 14% 내지 약 23%의, 약 15% 내지 약 23%의, 약 16% 내지 약 23%의, 약 17% 내지 약 23%의, 약 18% 내지 약 23%의, 약 19% 내지 약 23%의, 약 20% 내지 약 23%의, 약 21% 내지 약 23%의, 또는 약 22% 내지 약 23%의 G2F의 상대 풍부도를 포함한다.

[0199] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5) 단독, Asn108 (T7) 단독, Asn207 (T14) 단독, 또는 이들의 임의의 조합에 위치하고, 13.5% 또는 약 12.5% 이하의 S1G1F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5) 단독, Asn108 (T7) 단독, Asn207 (T14) 단독, 또는 이들의 임의의 조합에 위치하고, 약 12% 이하, 약 11% 이하, 약 10% 이하, 약 9% 이하, 약 8% 이하, 약 7% 이하, 약 6% 이하, 약 5% 이하, 약 4% 이하, 약 3% 이하, 약 2% 이하, 약 1% 이하의, 또는 약 0%와 동등한 S1G1F의 상대 풍부도를 포함한다.

[0200] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5) 단독, Asn108 (T7) 단독, Asn207 (T14) 단독, 또는 이들의 임의의 조합에 위치하고, 약 33% 이상의 또는 약 32% 내지 약 49%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5) 단독, Asn108 (T7) 단독, Asn207 (T14) 단독, 또는 이들의 임의의 조합에 위치하고, 약 34% 이상, 약 35% 이상, 약 36% 이상, 약 37% 이상, 약 38% 이상, 약 39% 이상, 약 40% 이상, 약 41% 이상, 약 42% 이상, 약 43% 이상, 약 44% 이상, 약 45% 이상, 약 46% 이상, 약 47% 이상, 약 48% 이상, 또는 약 49% 이상의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5) 단독, Asn108 (T7) 단독, Asn207 (T14) 단독, 또는 이들의 임의의 조합에 위치하고, 약 33% 내지 약 49%, 약 34% 내지 약 49%, 약 35% 내지 약 49%, 약 36% 내지 약 49%, 약 37% 내지 약 49%, 약 38% 내지 약 49%, 약 39% 내지 약 49%, 약 40% 내지 약 49%, 약 41% 내지 약 49%, 약 42% 내지 약 49%, 약 43% 내지 약 49%, 약 44% 내지 약 49%, 약 45% 내지 약 49%, 약 46% 내지 약 49%, 약 47% 내지 약 49%, 또는 약 48% 내지 약 49%의 S1G2F의 상대 풍부도를 포함한다.

[0201] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5) 단독, Asn108 (T7) 단독, Asn207 (T14) 단독, 또는 이들의 임의의 조합에 위치하고, 약 12% 이상의 또는 약 14% 내지 약 48.5%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5) 단독, Asn108 (T7) 단독, Asn207 (T14) 단독, 또는 이들의 임의의 조합에 위치하고, 약 15% 내지 약 45.5%, 약 15% 내지 약 45.5%, 약 16% 내지 약 45.5%, 약 16% 내지 약 45.5%, 약 17% 내지 약 45.5%, 약 18% 내지 약 45.5%, 약 19% 내지 약 45.5%, 약 20% 내지 약 45.5%, 약 21% 내지 약 45.5%, 약 22% 내지 약 45.5%, 약 23% 내지 약 45.5%, 약 24% 내지 약 45.5%, 약 25% 내지 약 45.5%, 약 26% 내지 약 45.5%, 약 27% 내지 약 45.5%, 약 28% 내지 약 45.5%, 약 29% 내지 약 45.5%, 약 30% 내지 약 45.5%, 약 31% 내지 약 45.5%, 약 32% 내지 약 45.5%, 약 33% 내지 약 45.5%, 약 34% 내지 약 45.5%, 약 35% 내지 약 45.5%, 약 36% 내지 약 45.5%, 약 37% 내지 약 45.5%, 약 38% 내지 약 45.5%, 약 39% 내지 약 45.5%, 약 40% 내지 약 45.5%, 약 41% 내지 약 45.5%, 약 42% 내지 약 45.5%, 약 43% 내지 약 45.5%, 약 44% 내지 약 45.5%, 약 44% 내지 약 45.5%, 또는 약 45% 내지 약 45.5%의 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다.

[0202] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5) 단독, Asn108 (T7) 단독, Asn207 (T14) 단독, 또는 이들의 임의의 조합에 위치하고, 약 1.5% 내지 약 23%의 상대 풍부도를 포함하는 G2F, 약 32% 내지 약 49%의 상대 풍부도를 포함하는 S1G2F, 및/또는 약 14% 내지 약 48.5%의 상대 풍부도를 포함하는 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다.

[0203] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5) 단독, Asn108 (T7) 단독, Asn207 (T14) 단독, 또는 이들의 임의의 조합에 위치하고, 약 25% 이하의 상대 풍부도를 포함하는 G2F, 약 33% 이상의 상대 풍부도를 포함하는 S1G2F, 및/또는 약 12% 이상의 상대 풍부도를 포함하는 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다.

[0204] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5) 단독, Asn108 (T7) 단독, Asn207 (T14) 단독, 또는 이들의 임의의 조합에 위치하고, 약 6.5% 이하의 상대 풍부도를 포함하는 G0F, 약 7% 이하의 상대 풍부도를 포함하는 G1F, 약 1.5% 내지 약 23%의 상대 풍부도를 포함하는 G2F, 약 12.5% 이하의 상대 풍부도를 포함하는 S1G1F, 약 32% 내지 약 49%의 상대 풍부도를 포함하는 S1G2F, 및/또는 약 14% 내지 약 48.5%의 상대 풍부도를 포함하는 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다.

- [0205] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 잔기 Asn76 (T5) 단독, Asn108 (T7) 단독, Asn207 (T14) 단독, 또는 이들의 임의의 조합에 위치하고, 약 7.0% 이하의 상대 풍부도를 포함하는 G0F, 약 7.5% 이하의 상대 풍부도를 포함하는 G1F, 약 25% 이하의 상대 풍부도를 포함하는 G2F, 약 13.5% 이하의 상대 풍부도를 포함하는 S1G1F, 약 33% 이상의 상대 풍부도를 포함하는 S1G2F, 및/또는 약 12% 이상의 상대 풍부도를 포함하는 S2G2F의 상대 풍부도를 포함한다.
- [0206] 본 개시내용의 방법은 또한 단백질의 시알산 함량을 특징규명하거나, 분석하거나, 제어하는데 유용하다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 8 내지 약 11의 NANA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 8.3 내지 약 11, 약 9.5 내지 약 10.1, 또는 약 8.3 내지 약 10.1의 NANA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 8.3 내지 약 11의 NANA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 9.5 내지 약 10.1의 NANA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 8.3 내지 약 10.1의 NANA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 8 내지 약 11의 NANA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 8 내지 약 10의 NANA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 9 내지 약 10의 NANA의 몰 비를 갖는다.
- [0207] 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 0.1 내지 약 2.0의 NGNA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 0.90 내지 약 1.20 또는 약 0.3 내지 약 1.2의 NGNA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 0.80 내지 약 1.20의 NGNA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 0.80 내지 약 1.30의 NGNA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 0.80 내지 약 1.40의 NGNA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 0.70 내지 약 1.40의 NGNA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 0.70 내지 약 1.50의 NGNA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 0.1 내지 약 2의 NGNA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 0.9 내지 약 1.2의 NGNA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 0.3 내지 약 1.2의 NGNA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 0.8 내지 약 1.2의 NGNA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 0.8 내지 약 1.3의 NGNA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 0.8 내지 약 1.4의 NGNA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 0.7 내지 약 1.4의 NGNA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 0.7 내지 약 1.5의 NGNA의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 하나 이상의 N-연결된 글리칸은 시알산이고, 약 0.8 내지 약 1.5의 NGNA의 몰 비를 갖는다.
- [0208] 본 개시내용의 방법은 또한 단백질 상에 존재하는 글리칸의 시알릴화 프로파일을 분석하는데 유용하다. 일부 측면에서, 글리코실화 프로파일은 하나 이상의 비시알릴화된 글리칸 (도메인 I), 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II), 디-시알릴화된 글리칸 (도메인 III), 및/또는 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)을 포함한다. 이들 도메인은 그들의 등전점 (pI)에 의한 단백질의 분리에 사용되는 방법을 지칭하는 영상화 모세관 등전위 포커싱 (iCIEF)을 통해 분석될 수 있다. 이 방법에서, 샘플은 물, 메틸 셀룰로스, 양쪽성전해질, 및 pI 마커로 ~1 mg/mL의 최종 농도로 제조되고, 이어서 오토샘플러에 의해 영상화 모세관 등전위 포커싱 시스템 (iCIEF) 내로 주사된다. 전기영동은 이소형의 전하 변동에 기반하여 플루오르화탄소 (FC) 코팅된 모세관 내의 pH 구배를 통해 샘플을 분리한다. 이어서 결과는 구성요소의 그룹을 비교하고 특징규명하기 위해 참조분리와 비교된다.
- [0209] 일부 측면에서, 비시알릴화된 글리칸 (도메인 I)은 약 28 내지 약 37, 약 29 내지 약 32, 약 28 내지 약 32, 또는 약 29 내지 약 37의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 비시알릴화된 글리칸 (도메인 I)은 약 28 내지 약 37의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 비시알릴화된 글리칸 (도메인 I)은 약 26 내지 약 40의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 비시알릴화된 글리칸 (도메인 I)은 약 28 내지 약 39의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 비시알릴화된 글리칸 (도메인 I)은 약 29 내지 약 39의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 비시알릴화된 글리칸 (도메인 I)은 약 29 내지 약 38의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 비시알릴화된 글리칸 (도메인 I)은 약 29 내지 약 37의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 비시알릴화된 글리칸 (도메인 I)은 약 30 내지 약 37의 몰 비를 갖는다.

[illegible]

[0211] 일부 측면에서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)은 약 26 내지 약 28, 약 27 내지 약 33, 약 26 내지 약 33, 약 27 내지 약 28의 물 비를 갖는다. 일부 측면에서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)은 약 26 내지 약 33의 물 비를 갖는다. 일부 측면에서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)은 약 26 내지 약 28의 물 비를 갖는다. 일부 측면에서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)은 약 27 내지 약 28의 물 비를 갖는다. 일부 측면에서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)은 약 27 내지 약 29의 물 비를 갖는다. 일부 측면에서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)은 약 27 내지 약 30의 물 비를 갖는다. 일부 측면에서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)은 약 27 내지 약 31의 물 비를 갖는다. 일부 측면에서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)은 약 27 내지 약 32의 물 비를 갖는다. 일부 측면에서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)은 약 27 내지 약 33의 물 비를 갖는다.

[illegible]

일부 측면에서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)은 약 32의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)은 약 32.5의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)은 약 33의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)은 약 33.5의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)은 약 34의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)은 약 34.5의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)은 약 35의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 모노-시알릴화된 글리칸 (도메인 II)은 약 27의 몰 비를 갖는다.

[0213] 일부 측면에서, 디-시알릴화된 글리칸 (도메인 III)은 약 27 내지 약 28, 약 22 내지 약 31, 약 27 내지 약 31, 또는 약 22 내지 약 28의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 디-시알릴화된 글리칸 (도메인 III)은 약 22 내지 약 28의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 디-시알릴화된 글리칸 (도메인 III)은 약 22 내지 약 31의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 디-시알릴화된 글리칸 (도메인 III)은 약 24 내지 약 31의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 디-시알릴화된 글리칸 (도메인 III)은 약 25 내지 약 31의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 디-시알릴화된 글리칸 (도메인 III)은 약 27 내지 약 28의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 디-시알릴화된 글리칸 (도메인 III)은 약 27 내지 약 35의 몰 비를 갖는다.

[illegible]

[0215] 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 13 내지 약 16, 약 8 내지 약 16, 또는 약 8 내지 약 16의 물 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 8 내지 약 20의 물 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 8 내지 약 16의 물 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 10 내지 약 16의 물 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 12 내지 약 16의 물 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 13 내지 약 20의 물 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 13 내지 약 18의 물 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 13 내지 약 16의 물 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 13 내지 약 16의 물 비를 갖는다.

[0216] 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 5의 몰 비를 갖는다. 일부

측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 5.5의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 6의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 6.5의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 7의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 7.5의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 8의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 8.5의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 9의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 9.5의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 10의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 10.5의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 11의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 11.5의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 12의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 12.5의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 13의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 13.5의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 14의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 14.5의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 15의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 15.5의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 16의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 16.5의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 17의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 17.5의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 18의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 18.5의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 19의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 19.5의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 20의 몰 비를 갖는다. 일부 측면에서, 트리-시알릴화된 및 테트라-시알릴화된 글리칸 (도메인 IV+V)은 약 14.6의 몰 비를 갖는다.

[0217] 본 개시내용의 방법은 또한 0-연결된 글리칸을 분석하는데 유용하다. 일부 측면에서, 글리코실화 프로파일은 하나 이상의 0-연결된 글리칸을 포함한다. 일부 측면에서, 0-연결된 글리칸은 잔기 Ser129, Ser130, Ser136, 및/또는 Ser139에 위치한다.

[0218] 일부 측면에서, 본원에 기재된 CTLA4-Fc 융합 단백질은 C-말단 리신을 포함한다. 일부 측면에서, C-말단 리신은 약 20% 내지 약 25%의 상대 풍부도를 포함한다. 일부 측면에서, 여기서 C-말단 리신은 약 3% 내지 약 10%의 상대 풍부도를 포함한다.

[0219] 본 개시내용의 방법은 또한 CTLA4 단백질에서의 하나 이상의 아스파라긴 잔기에 부착된 하나 이상의 N-연결된 글리칸을 측정하는 것을 포함하는, CTLA4-Fc 융합 단백질의 이중-안테나성 글리칸을 분석하는데 유용하고, 여기서 이중-안테나성 글리칸 중 하나는 G2F이다. 일부 측면에서, CTLA4 단백질에서의 하나 이상의 아스파라긴 잔기에 부착된 하나 이상의 N-연결된 글리칸이 측정되고, 여기서 이중-안테나성 글리칸 중 하나는 G0F이다. 일부 측면에서, 이중-안테나성 글리칸은 G0F, G1F, G2F, S1G1F, S1G2F, 및/또는 S2G2F로 이루어진 군으로부터 선택된다. 액체 크로마토그래피는 본 개시내용의 글리칸을 분석하는데 사용될 수 있다. 특정한 당단백질은 탄수화물의 이질성을 나타낼 수 있다. 이질성은 몇몇 수준에서 보여질 수 있다: 글리코실화 부위는 완전히 점유된 것으로부터 비점유된 것까지 다양할 수 있으며, 임의의 특이적 부위는 많은 상이한 올리고사카라이드 구조로 채워질 수 있고, 여기서 각각의 구조는 시알산 분자, 예컨대 NANA 또는 NGNA에 의해 변형될 수 있다.

[0220] 일부 측면에서, 본 개시내용은 CTLA4-Fc 융합 단백질의 이중-안테나성 글리칸을 분석하는 방법으로서, CTLA4-Fc 융합 단백질의 등전위 포커싱을 수행하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 측면에서, 등전위 포커싱은 영상화 모세관 등전위 포커싱이다. 일부 측면에서, 등전위 포커싱된 CTLA4-Fc 융합 단백질은 그룹 I, 그룹 II,

및 그룹 III을 형성한다. 일부 측면에서, 그룹 I은 전체의 4% 이하이고/거나, 그룹 II는 전체의 87% 이상이고/거나, 그룹 III은 전체의 10% 이하이다.

[0221] 본 개시내용의 단백질의 탄수화물 함량은 본원의 실시예에 기재된 방법을 포함하는 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 분석될 수 있다. 몇몇 방법은 글리코실화 분석에 대해 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 본 개시내용의 맥락에서 유용하다. 이들 방법은 생산된 펩티드에 부착된 올리고사카라이드의 신원 및 조성에 관한 정보를 제공한다. 본 개시내용에 관하여 유용한 탄수화물 분석을 위한 방법은 렉틴 크로마토그래피; 고 pH 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 전하에 기반하여 올리고사카라이드를 분리하는 펄스화된 전류측정 검출과 조합된 고성능 음이온-교환 크로마토그래피 (HPAEC-PAD); NMR; 질량 분광법; HPLC; 다공성 흑연화 탄소 (GPC) 크로마토그래피를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0222] 올리고사카라이드를 방출시키는 방법은 1) 통상적으로 펩티드-N-글리코시다제 F/엔도- α -갈락토시다제를 사용하여 수행되는 효소적 방법; 2) 가혹한 알칼리성 환경을 사용하여 주로 O-연결된 구조를 방출시키는 β -제거 방법; 및 3) 무수 히드라진을 사용하여 N- 및 O-연결된 올리고사카라이드 둘 다를 방출시키는 화학적 방법을 포함한다. 분석을 위한 방법은 하기 단계 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 1. 샘플을 탈이온수에 대해 투석하여 모든 완충액 염을 제거하고, 이어서 동결건조; 2. 무손상 올리고사카라이드 쇄를 무수 히드라진으로 방출시킴; 3. 무손상 올리고사카라이드 쇄를 무수 메탄올성 HCl로 처리하여 개별적인 모노사카라이드를 O-메틸 유도체로서 유리시킴; 4. 임의의 1차 아미노기를 N-아세틸화함; 5. 유도체화하여 퍼-O-트리메틸실릴 메틸 글리코시드를 수득함; 6. 유도체를 CP-SIL8 칼럼 상의 모세관 기체-액체 크로마토그래피 (GLC)에 의해 분리함; 7. 개별적인 글리코시드 유도체를 공지된 표준물에 비해 GLC 및 질량 분광법으로부터의 체류 시간에 의해 확인함; 및 8. 개별적인 유도체를 내부 표준물 (13-O-메틸-D-글루코스)로 FID에 의해 정량화함. 일부 측면에서, 이중-안테나성 글리칸은 형광 검출을 갖는 초성능 액체 크로마토그래피 (UPLC-FLR)를 통해 측정된다. 일부 측면에서, CTLA4-Fc 융합 단백질의 Fc 도메인은 측정 전에 절단된다. 일부 측면에서, 단백질은 바이러스 불활성화 공정을 통해 실행된다. 일부 측면에서, 바이러스 불활성화 공정은 0.5% 트리톤 X-100으로 실행된다.

[0223] IV. 제약 조성물

[0224] 본 개시내용의 방법에 의해 제조된 조성물은 또한 제약 제제를 고려한다. 제약 투여에 적합한 조성물, 이러한 조성물은 제약 투여를 위한 허용되는 수준을 초과하지 않는 수준에서 불순물인 물질을 포함할 수 있으며 (이러한 수준은 이러한 불순물의 부재를 포함함), 임의의 활성제(들) 외에도, 예를 들어, 투여의 용이성을 위해 이러한 조성물을 제제화하는 제약상 허용되는 부형제, 비히클, 담체 및 다른 불활성 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 제약상 허용되는 CTLA4-Ig 조성물은 MCP-1 또는 DNA를, 그러한 물질이 인간에의 투여를 위한 허용되는 수준인 한, 포함할 수 있다.

[0225] 본 개시내용은 또한 동결건조된 혼합물로서 기재된 CTLA4-Ig 분자 중 임의의 것을 제공한다. 동결건조되는 CTLA4-Ig를 포함하는 제제는 3가지 기본적 구성요소를 추가로 포함할 수 있다: (1) 다른 단백질 또는 소분자 (예컨대 면역억제제)를 포함하는 추가의 활성 성분(들), (2) 부형제(들) 및 (3) 용매(들). 부형제는 양호한 동결건조된 케이크 특성을 제공하는 (벌크화제), 뿐만 아니라 생물학적 활성 (활성 성분 안정성, 예컨대 단백질 안정성을 포함함)의 실질적 보유가 유지되도록 단백질의 동결건조보호 및/또는 동결보호 ("안정화제"), pH의 유지 (완충제), 및 저장 동안 단백질의 적절한 형태를 제공하는 제약상 허용되는 시약을 포함한다. 부형제에 관하여, 제제의 예는 완충제(들), 벌크화제(들), 단백질 안정화제(들) 및 항미생물제(들) 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 당 또는 폴리올은 용액에서 및 동결-해동 및 동결-건조 동안 비특이적 단백질 안정화제로서 사용될 수 있다. 중합체는 용액에서 및 동결-해동 및 동결-건조 동안 단백질을 안정화시키는데 사용될 수 있다. 한 대중적인 중합체는 동결보호제 및 동결건조보호제 둘 다로서 사용된 혈청 알부민이다. 한 측면에서, 본 개시내용은 알부민 무함유인 제제를 제공한다. 다양한 염은 벌크화제로서 사용될 수 있다. 예시적인 염 벌크화제는 예를 들어, NaCl, MgCl₂ 및 CaCl₂를 포함한다.

[0226] 특정 아미노산은 동결보호제 및/또는 동결건조보호제 및/또는 벌크화제로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 아미노산은 글리신, 프롤린, 4-히드록시프롤린, L-세린, 글루탐산나트륨, 알라닌, 아르기닌 및 리신 염산염을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 폭넓은 pH 범위를 커버하는 많은 완충제는 제제에서의 선택을 위해 이용가능하다. 완충제는 예를 들어, 아세테이트, 시트레이트, 글리신, 히스티딘, 포스페이트 (나트륨 또는 칼륨), 디에탄올아민 및 트리스(Tris)를 포함한다. 완충제는 동결건조 전에 용액 pH를 허용되는 범위에서 유지하는 작용제를 포괄한다. 한 측면에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 1-8 중 어느 하나에 따른 임의의 서열을 포함하는 적어도 90%, 95%, 99%, 또는 99.5% CTLA4-Ig 이량체를 포함하는 동결건조된 CTLA4-Ig 혼합물을 제공한다. 한

측면에서, 본 개시내용은 적어도 90%, 95%, 99%, 또는 99.5% CTLA4-Ig 이량체 및 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 이하의 CTLA4-Ig 사량체를 포함하는 동결건조된 CTLA4-Ig 혼합물을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 적어도 90%, 95%, 99%, 또는 99.5% CTLA4-Ig 이량체, 및 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 이하의 CTLA4-Ig 사량체, 및 2%, 1.5%, 1.0%, 0.8%, 0.5%, 또는 0.3% 이하의 CTLA4-Ig 단량체를 포함하는 동결건조된 CTLA4-Ig 혼합물을 제공한다. 추가의 측면에서, 본 개시내용은 CTLA4-Ig 이량체의 몰당 또는 CTLA4-Ig 분자에 대해 적어도 8.0 몰의 시알산을 포함하는 동결건조된 CTLA4-Ig 혼합물을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 CTLA4-Ig 분자 또는 이량체의 몰당 약 15 내지 약 35 몰의 GlcNac; CTLA4-Ig 이량체의 몰당 또는 CTLA4-Ig 분자에 대해 약 1 내지 약 5 몰의 GalNac; CTLA4-Ig 이량체의 몰당 또는 CTLA4-Ig 분자에 대해 약 5 몰 내지 약 20 몰의 갈락토스; CTLA4-Ig 이량체의 몰당 또는 CTLA4-Ig 분자에 대해 약 2 내지 약 10 몰의 푸코스; 및/또는 CTLA4-Ig 이량체의 몰당 또는 CTLA4-Ig 분자에 대해 약 5-15 몰의 만노스를 포함하는 동결건조된 CTLA4-Ig 혼합물을 제공한다.

[0227] 본 개시내용은 또한 피하 (SC) 제제로서 기재된 CTLA4-Ig 분자 중 임의의 것을 제공한다. IV 제제는 빈번한 만성 요법을 필요로 하는 대상체에 대해 불편하다. 대상체는 1시간만큼 길게 지속될 수 있는 IV 주입을 통해 약물을 받기 위해 빈번한 여행을 해야 한다. 결과적으로, 가정에서 자기-투여될 수 있는 SC 제제는 매우 유익할 것이다. 피하 투여를 위해, 높은 단백질 농도를 갖는 투여 형태가 요망된다. 1 mg/kg 초과 (용량당 >100 mg)의 높은 용량으로의 치료는 SC 투여에 의해 주어질 수 있는 작은 부피 (<1.5 ml) 때문에 100 mg/ml를 초과하는 농도에서의 제제의 개발을 요구한다. 본 개시내용의 SC 제제는 수성 담체 중에, 안정화 수준에서의 당과 조합으로 적어도 100 mg/ml의 단백질 농도, 바람직하게는 안정화 수준에서의 당과 조합으로 적어도 125 mg/ml의 단백질 농도로 CTLA4-Ig 분자를 포함한다. 당은 바람직하게는 적어도 1:1.1 단백질 대 당의 중량 비로 있다. 안정화제는 바람직하게는 SC 시린지를 통한 투여를 위해 비바람직하거나 비적합한 점도를 발생시킬 수 있는 것 이하의 양으로 채용된다. 당은 바람직하게는 디사카라이드, 가장 바람직하게는 수크로스이다. SC 제제는 또한 완충제, 계면활성제, 및 보존제로 이루어진 목록으로부터 선택되는 구성요소 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0228] V. 치료 방법

[0229] 본 개시내용의 방법에 의해 제조된 조성물은 다양한 질환을 치료하는데 유용하다. 본 개시내용은 T 세포 증식 (또는 활성화)을 억제하는 방법으로서, T 세포를 유효량의 본 개시내용의 CTLA4-Ig 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 대상체에서 면역 반응을 억제하는 방법으로서, 유효량의 본 개시내용의 CTLA4-Ig 조성물을 면역 반응의 억제를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 대상체에서 항원에 대한 면역 내성을 유도하는 방법으로서, 유효량의 본 개시내용의 CTLA4-Ig 조성물을 항원에 대한 면역 내성의 유도를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 대상체에서 염증을 치료하는 방법으로서, 유효량의 본 개시내용의 CTLA4-Ig 조성물을 염증의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 류마티스 관절염을 치료하는 방법으로서, 유효량의 본 개시내용의 CTLA4-Ig 조성물을 류마티스 관절염의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0230] 본 개시내용은 대상체에서 건선을 치료하는 방법으로서, 유효량의 본 개시내용의 CTLA4-Ig 조성물을 건선의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 대상체에서 알레르기를 치료하거나 예방하는 방법으로서, 유효량의 본 개시내용의 CTLA4-Ig 조성물을 알레르기의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 대상체에서 이식편 대 숙주 질환을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 유효량의 본 개시내용의 CTLA4-Ig 조성물을 이식편 대 숙주 질환의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 대상체에서 이식된 기관의 거부를 치료하거나 예방하는 방법으로서, 유효량의 본 개시내용의 CTLA4-Ig 조성물을 이식된 기관의 거부의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0231] 본 개시내용은 대상체에서 크론병을 치료하는 방법으로서, 유효량의 본 개시내용의 CTLA4-Ig 조성물을 크론병의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 대상체에서 제I형 당뇨병을 치료하는 방법으로서, 유효량의 본 개시내용의 CTLA4-Ig 조성물을 제I형 당뇨병의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0232] 본 개시내용은 대상체에서 난소염을 치료하는 방법으로서, 유효량의 본 개시내용의 CTLA4-Ig 조성물을 난소염의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 대상체에서 사구체신염을 치료하는 방법으로서, 유효량의 본 개시내용의 CTLA4-Ig 조성물을 사구체신염의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 대상체에서 알레르기성 뇌척수염을 치료하는

방법으로서, 유효량의 본 개시내용의 CTLA4-Ig 조성물을 알레르기성 뇌척수염의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0233] 본 개시내용은 대상체에서 중증 근무력증을 치료하는 방법으로서, 유효량의 본 개시내용의 CTLA4-Ig 조성물을 중증 근무력증의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 따라서, 본 개시내용의 특정 측면에서, 본 개시내용은 일반적으로 임의의 T-세포 의존성 림프증식성 질환 또는 장애 및 임의의 T-세포 의존성 자가면역 질환 또는 장애, 및 보다 구체적으로: T 세포 림프종, T 세포 급성 림프모구성 백혈병, 고환 혈관중심성 T 세포 림프종, 양성 림프구성 맥관염, 이식편 대 숙주 질환 (GVHD), 이식편 이식 거부와 연관된 면역 장애, 건선, 염증, 알레르기, 난소염, 사구체신염, 뇌척수염, 하시모토 갑상선염, 그레이브스병, 애디슨병, 원발성 점액수종, 악성 빈혈, 자가면역 위축성 위염, 류마티스 관절염, 인슐린 의존성 진성 당뇨병, 굿패스처 증후군, 중증 근무력증, 수포창, 교감성 안염, 자가면역 포도막염, 자가면역 용혈성 빈혈, 특발성 혈소판감소증, 원발성 담관 간경화증, 만성 활동 간염, 공피증, 다발근육염, 및 혼합 결합 조직 질환을 포함하나 이에 제한되지는 않는 T-세포 관련 질환 또는 장애를 치료하기 위해 본원에 기재된 생산 방법에서 세포주에 의해 생산된 CTLA4-Ig 분자를 제공한다.

[0234] 본 개시내용은 T 세포 증식 (또는 활성화)을 억제하는 방법으로서, 또 다른 작용제, 예컨대 메토타렉세이트와 조합으로 또는 없이 T 세포를 유효량의 본 개시내용의 CTLA4-Ig 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 대상체에서 면역 반응을 억제하는 방법으로서, 단독으로 또는 메토타렉세이트와 조합으로 유효량의 본 개시내용의 CTLA4-Ig 조성물을 면역 반응의 억제를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 대상체에서 항원에 대한 면역 내성을 유도하는 방법으로서, 메토타렉세이트와 조합으로 유효량의 본 개시내용의 CTLA4-Ig 조성물을 항원에 대한 면역 내성의 유도를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0235] 본 개시내용의 다양한 측면은 하기 하위섹션에서 추가로 상세하게 기재된다. 본 개시내용은 추가의 제한으로서 해석되지 않아야 하는 하기 실시예에 의해 추가로 예시된다. 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌의 내용은 명백하게 본원에 참조로 포함된다.

[0236] 실시예

[0237] 실시예 1

[0238] 5L 벤치 규모 제조

[0239] 아바타셉트는 인간 세포독성 T-림프구 항원-4 (CTLA-4)의 기능적 결합 도메인 및 IgG1 부류의 인간 모노클로날 이뮤노글로불린의 Fc 도메인으로 이루어진 유전자 조작된 융합 단백질이다. 아바타셉트는 각각 단일 디설피드 결합을 통해 공유 연결된 대략 46 kDa의 2개의 상동 글리코실화된 폴리펩티드 쇄로 구성된다.

[0240] 아바타셉트는 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포주를 사용한 대규모 세포 배양에서 세포의 단백질로서 생산된다. 제조 공정은 제조용 세포 은행 (WCB) 바이알의 해동으로 개시된다. 배양물을 일련의 배플형 진탕 플라스크, 세포 배양 생물반응기 및 시드 생물반응기에서 번식시킨다. 최종 단계 접종물 배양물을 생산 생물반응기에 옮긴다. 생산 생물반응기를 표적 시알산 (SA) 대 아바타셉트 단백질 몰 비 (MR) 및 세포 배양 지속기간에 기반하여 수거한다. 세포 배양 수거물을 1차 회수 수거 단계, 이어서 멸균 등급 여과를 사용하여 정화시킨다. 무세포 수거물질을 특정된 pH에 도달하도록 조정하고, 트리톤 X-100을 하류 프로세싱을 위해 제조에서 바이러스 불활성화를 위해 첨가한다.

[0241] 도 1a, 1b, 및 1c는 잠재적으로 위치 T5, T7, 및 T14에 존재할 수 있는 다양한 글리칸을 제시한다. 도 1d는 아바타셉트의 1차 아미노산 서열 (또한 서열식별번호: 5에서 발견됨)에서의 N-연결된 글리코실화 부위 (T5, T7, 및 T14)의 특이적 위치를 제시한다. 도 2a는 각각의 처리 그룹에 대한 평균 생존 세포 밀도 (VCD) 프로파일을 제시하고, 처리 그룹에 의한 이 생물반응기 세포 성장 데이터의 요약은 도 2b에서 볼 수 있다. 낮은 초기 pH (6.9) 및 낮은 초기 VCD 처리 그룹은 실험 전반에 걸쳐 팩의 바닥에 있는 경향이 있고, 이는 제11일 내지 제12일에 2개의 가장 낮은 피크 VCD 값에 도달한다. 초기 pH 이동 조건은 제3일을 통해 다른 조건과 유사하게 성장 하였지만, 점차적으로 제3일에 pH 이동 후에 대조군 그룹으로부터 분리되고, 보다 낮은 피크 VCD에 도달하였다. 낮은 전체 온도 그룹은 제6일 이후부터 대조군 그룹보다 더 느린 성장을 나타내었다. 이 성장의 효과는 보다 평평한 형상의 곡선 및 상대적으로 낮은 피크 VCD에서 볼 수 있다. 높은 초기 VCD 처리 그룹 및 후기 제1 공급 처리 그룹은 제3일 이후부터 팩의 상부에 있는 경향이 있었다. 접종물을 규모 확대하고, 생산 생물반응기 전에 5-L 시드 생물반응기의 2개의 단계 (N-2 및 N-1)를 통해 통과시켰다. 이어서 생산 생물반응기 단계를 접종 후

14 - 17일 동안 실행시켰다. 표 1은 이 연구에 사용된 중심점 5-L 생산 생물반응기의 작동 파라미터를 제시한다. 시험된 조건의 각각에 관하여 세포 생존력 프로파일은 도 3에서 볼 수 있다. 0.45×10^6 개의 세포/mL의 초기 세포 밀도는 제14일에서 가장 큰 생존력 소실을 나타내고, 약 86% 세포 생존력으로 하향되며, 이는 세포 밀도가 너무 높은 수준에 도달하여 보다 높은 수준의 세포 생존력을 지속할 수 없었음을 시사한다.

5-L 생물반응기 글리칸 프로파일 분석

시알산 함량을 질량 분광법을 통해 분석하였다. 각각의 처리 그룹으로부터의 결과를 대조군과 비교하는 던넛 검정의 p-값과 함께, 제14일 수거 전 NANA, NGNA, 및 N-연결 값의 평균 값은 도 4a에 제시된다. 도메인 IV+V는 N-연결 도메인 IV 및 도메인 V 값의 합계로서 정의된다. ≤ 0.05 의 p-값을 갖는 처리는 대조군과 유의하게 상이한 것으로 간주되었다. 제14일 NANA, NGNA, 도메인 I, 도메인 II, 및 도메인 III 값은 대조군 값과 유의한 차이를 나타내지 않는다. 대부분의 도메인 IV+V 값은 대조군 값에 비해 유의한 차이를 나타내지 않는다. 그러나, 낮은 전체 온도 및 낮은 온도 이동 1 처리 그룹은 대조군에 비해 유의하게 더 낮은 수준의 도메인 IV+V를 산출하였다. 도메인 IV+V에 대한 DS 방출 명세는 $\leq 16\%$ 이며, 따라서 이 감소는 생성물 품질에 대한 위험을 제기하지 않는다. 처리 그룹을 대조군과 비교하는 대조군 던넛 검정으로부터의 p-값과 함께, 평균 제14일 역가 및 평균 비생산성 (Qp) 값은 도 4b에서 볼 수 있다. ≤ 0.05 의 p-값은 유의한 차이로 간주되었다. 낮은 초기 pH, 낮은 초기 VCD, 및 낮은 전체 온도는 대조군에 비해 유의하게 더 낮은 제14일 역가를 갖는 것으로 나타났다. 낮은 초기 pH 및 초기 pH 이동 타이밍 조건은 대조군보다 유의하게 더 높은 비생산성을 갖는 것으로 밝혀졌다.

표 1: 5-L 생산 생물반응기 중심점 작동 파라미터

파라미터	설정치	범위
WCB 해동으로부터, 전달에서의 세대 수	N/A ^a	25 - 55
주위 온도에서의 배지 유지 시간 (h)	≤ 48	N/A
37°C에서의 배지 유지 시간 (점종 전) (h)	≤ 24	N/A
점종 생존 세포 밀도 (10^6 개의 세포/mL)	0.3	0.15-0.45
초기 온도 (°C)	36	35- 37
초기 pH	7.0	6.9 - 7.1
초기 작업 부피 (L)	2.5	2.4 - 2.6
pH 이동 설정치	6.9	6.8-7.0
pH 이동의 타이밍 (시간)	96	72 - 120
제1 온도 이동 설정치 (°C)	33	32 - 34
제1 온도 이동의 타이밍 (시간)	144	120 - 168
제2 온도 이동 설정치 (°C)	31	30 - 32
제2 온도 이동 설정치의 타이밍 (시간)	240	228 - 252
제6-8일 동안 CO ₂ 포화 표적 (% 포화)	16.8	11.2 - 22.4
pH 및 CO ₂ 포화 조건에 대한 염기	1M Na ₂ CO ₃	N/A
교반 (rpm)	240	N/A
하부 공기 유량 (mL/min)	30	N/A
상부 공기 유량 (mL/min)	40	N/A
용존 산소 (%)	40	20-80
제1 공급물 첨가의 타이밍 (시간)	76	72-96

공급 전략	수거까지 72 - 96 시간에서 및 그 후 24 ± 4 시간마다 접종 후 부피의 4.5%의 고정된 매일 공급	N/A
글루코스 첨가	[글루코스]가 200 g/L 스톱을 사용하여 5 g/L 최종 농도를 표적화하는 <2.0 g/L인 경우 볼루스 첨가	N/A

[0246]

[0247]

연구를 하기 표 2에 따른 한 번에 한 인자 (OFAT) 방법으로 수행하였으며, 각각의 조건은 중심점 대조군에 비해 단일 파라미터를 변화시킨다. 글리코실화 데이터 결과는 도 4a-4h에서 볼 수 있다. 각각의 설정치는 하기와 같이 조정되었다:

[0248]

표 2

실험 디자인			
처리 그룹	복제실험의 수	세포 배양 파라미터	설정치
대조군	2	N/A	N/A
높은 pCO ₂	2	제6-8일 동안 CO ₂ 포화 표적 (%)	22.4%
후기 제1 공급	2	제1 공급물 첨가의 타이밍 (시간)	96시간
낮은 초기 pH	2	초기 pH	6.90
처리 그룹	복제실험의 수	세포 배양 파라미터	설정치
낮은 초기 VCD	2	접종 생존 세포 밀도 (10 ⁶ 개의 세포/mL)	0.15
높은 초기 VCD	2	접종 생존 세포 밀도 (10 ⁶ 개의 세포/mL)	0.45
낮은 전체 온도	2	초기 온도 (°C)	36
		제1 온도 이동 설정치 (°C)	33
		제2 온도 이동 설정치 (°C)	31
조기 pH 이동 타이밍	2	pH 이동의 타이밍 (시간)	72
낮은 온도 이동 1	2	제1 온도 이동 설정치 (°C)	33
낮은 온도 이동 2	2	제2 온도 이동 설정치 (°C)	31

[0249]

실험 결과

[0250]

[0251]

아바타셉트 분자 상의 N-글리코실화의 연장된 특징규명을 생물반응기로부터의 수거 후에 수행하였다. 생물반응기 샘플을 정제용 단백질 A 워터스(Waters) HPLC 시스템을 사용하여 정제하였다. 이어서 정제된 샘플을 10kD 컷오프 원심분리 필터 유닛 (밀리포어(Millipore))을 사용하여 > 4.0 g/L의 최종 농도로 농축시켰다. 생성된 아바타셉트 단백질을 환원시키고, 알킬화하고, 트립신, 이어서 GluC에 의해 소화시켰다. 트립신-GluC 소화물을 역상 크로마토그래피에 의해 분리하고, 질량 분광법에 의해 검출하였다. 각각의 글리코형의 백분율을 그 글리코펩티드의 추출된 이온 크로마토그램 하의 피크 면적을 관심의 모든 글리코펩티드의 합계된 피크 면적으로 나눈 것으로부터 계산하였다. 글리칸을 방출시키고, 형광 표지 키트를 사용하여 표지하고, 이어서 형광 검출을 갖는 초성능 액체 크로마토그래피 시스템 (UPLC-FLR) 상에서 샘플을 분석하였다. 글리칸 G0F, G2F, S1G2F, S2G2F S1G3F 및 S2G4F를 질량 분광법을 통해 분석하였다. 이들 6종의 글리칸의 분석의 결과는 도 4c-4h에서 볼 수 있다. 도 4c는 아바타셉트 분자 상의 T5 및 T7 N-글리코실화 부위에서의 상대 풍부도로 보고된, G0F 글리코형에 대한 평균 액체 크로마토그래피-질량 분광법 (LC-MS) 결과를 제시한다. 도 4d는 아바타셉트 분자 상의 T5 및 T7 N-글리코실화 부위에서의 상대 풍부도로 보고된, G2F 글리코형에 대한 평균 액체 크로마토그래피-질량 분광법 (LC-MS) 결과를 제시한다. 도 4e는 아바타셉트 분자 상의 T5 및 T7 N-글리코실화 부위에서의 상대 풍부도로 보고된, S1G2F 글리코형에 대한 평균 액체 크로마토그래피-질량 분광법 (LC-MS) 결과를 제시한다. 도 4f는 아바타셉트 분자 상의 T5 및 T7 N-글리코실화 부위에서의 상대 풍부도로 보고된, S2G2F 글리코형에 대한 평균 액체 크로마토그래피-질량 분광법 (LC-MS) 결과를 제시한다. 도 4g는 아바타셉트 분자 상의 T5 및 T7 N-글리코실화 부위에서의 상대 풍부도로 보고된, S1G3F 글리코형에 대한 평균 액체 크로마토그래피-질량 분광법 (LC-MS) 결과를 제시한다. 도 4h는 아바타셉트 분자 상의 T5 N-글리코실화 부위에서의 상대 풍부도로 보고된, S2G4F 글

리코형에 대한 평균 LC-MS 결과를 제시한다.

[0252] 실시예 2

[0253] **CTLA4-Ig 공정 생산 생물반응기 단계의 수거 전 N-글리코형 분포에 대한 세포 연령의 영향**

[0254] 공정에 대한 접종물의 세대 수의 효과 및 저하된 온도 설정치에서의 아바타셉트 제조 공정에서의 품질 속성을 이해하기 위해, 생물반응기를 접종하는 세포의 세대의 총 수에 대한 실패 경계를 조사하였다. 모든 조건을 5-L 생물반응기에서 중복으로 연구하였다. 세포 바이알을 해동시키고, 계대하고, 확장시키고, 최종적으로 5, 10, 15, 및 21의 계대에서 banking하였다. 이 생물반응기 연구를 개시하기 전에, 세포 은행 바이알을 해동시키고, 6개의 계대 동안 3-L 단계까지 확장시켰다. 각각의 3-L 플라스크를 사용하여 단일 $n-2$ 시드 생물반응기를 접종하고, 이어서 이를 $n-1$ 시드 생물반응기로 물렁하였다. 각각의 $n-1$ 시드 생물반응기를 사용하여 2개의 5-L 생산 생물반응기를 접종하였다.

[0255] VCD, 생존력, pH, DO, 영양분 및 대사물 수준을 포함하는 세포 배양물 성능을 매일 모니터링하였다. 역가 및 시알산 함량을 제10-16일에 매일 측정하고, 분석하였다. 고분자량 중 (HMW), 잔류 DNA, 숙주 세포 단백질 (HCP) 및 N-연결 글리코실화를 제16일에 측정하였다 (도 5). 글리코형 분포를 제16일에 LC/MC에 의해 측정하였다 (도 5).

[0256] 실시예 3

[0257] **생산 생물반응기 온도 범위**

[0258] 생산 생물반응기 단계에서 허용가능한 온도 범위를 평가하기 위해, 공정 성능 및 공정 품질에 대한 생물반응기 접종 생존 세포 밀도 (VCD), pH 이동 설정치, PCO₂ 이동 설정치, 제1 온도 설정치, 제2 온도 설정치 및 제3 온도 설정치의 효과를 분석하였다. 공정 파라미터 및 특징규명 범위는 도 6a에 제시된다. 생산 생물반응기 특징 규명을 5-L 사르토리우스(Sartorius) 및 피네스(Finesse) 용기 및 컨트롤러를 사용하여 수행하였다. 생산 생물반응기 단계에 대한 작동 조건은 도 6a에 제시된 6개의 실험 범위를 예외로 하여, 표 X를 따랐다. 평가된 공정 파라미터의 설정치 또는 중간치는 표 Y에 제시된 바와 같이 2개의 대조군을 포함하여 22개의 처리 사이에 다양하였다. 복제실험을 단지 대조군, 중심점 조건에 대해 실행하였다.

[0259] **표 X. 5-L 생산 생물반응기 중심점 작동 파라미터**

파라미터	설정치	범위
접종 생존 세포 밀도 (10 ⁶ 개의 세포/mL)	0.3	0.15-0.45
초기 온도 (°C)	36	35-37
초기 pH	7.0	6.9-7.1
초기 작업 부피 (L)	2.5	2.4-2.6
pH 이동 설정치	6.9	6.8-7.0
pH 이동의 타이밍 (시간)	96	72-100
제1 온도 이동 설정치 (°C)	33	32-34
온도 이동 설정치의 타이밍 (시간)	144	120-168
제2 온도 이동 설정치 (°C)	31	30-32
제2 온도 이동 설정치의 타이밍 (시간)	240	228-252

[0260]

[0261] 표 Y. 용기 ID에 의한 생산 생물반응기 조건

생물반응기 ID	접종 VCD (x10 ⁶ 개의 세포/mL)	pH 이동 설정치	pCO ₂ 이동 설정치	제1 온도 설정치 (°C)	제2 온도 설정치 (°C)	제3 온도 설정치 (°C)
180608-01	0.2	6.8	11.2	35	32	30
180608-02	0.5	7.1	22.4	37	32	31
180609-03	0.5	7.1	11.2	37	34	32
180608-04	0.2	7.1	22.4	35	32	30
180608-05	0.2	6.9	11.2	35	34	32
180608-11	0.2	6.8	22.4	36	32	32
180609-12	0.5	6.8	22.4	37	34	32
180608-14	0.2	7.1	16.8	36	33	31
180608-15	0.2	6.8	11.2	36	34	30
180608-16	0.2	7	11.2	37	32	31
180608-21	0.2	6.8	22.4	37	33	32
180608-22	0.2	7.1	22.4	37	34	30
180608-24	0.3	6.9	16.8	36	33	31
180608-31	0.5	6.9	22.4	35	32	32
180608-32	0.5	6.8	11.2	37	32	30
180608-33	0.3	6.9	22.4	37	32	30
180608-34	0.3	7.1	22.4	35	34	31
180608-36	0.3	6.9	16.8	36	33	31
180609-404	0.4	7.1	11.2	36	32	32
180608-405	0.5	6.9	22.4	35	32	32
180608-406	0.5	7.1	11.2	35	33	30
180609-407	0.5	6.8	11.2	35	34	31
180609-408	0.5	7	16.8	36	33	31

[0262]

[0263]

공정 파라미터의 유의한 주요 효과의 요약은 도 7에 제시된다. 공정 파라미터의 상호작용 및 2차 효과는 공정 성능 및 생성물 품질에 대해 통계적으로 유의한 것으로 밝혀졌다. 연구 디자인에 포함된 모든 2차 효과는 공정 속성 또는 품질 속성 중 어느 하나에 영향을 미쳤다. 하기 파라미터 상호작용은 공정 또는 품질 속성 중 어느 하나에 대한 영향을 갖는 것으로 결정되었다: 접종 VCD x 제1 온도 설정치, 접종 VCD x 제3 온도 설정치, 접종 VCD x 제2 온도 설정치, 제2 온도 설정치 x pCO₂ 설정치, 제2 온도 설정치 x pH 이동 설정치, 및 제3 온도 이동 설정치 x pH 이동 설정치.

[0264]

실시예 4

[0265]

CTLA4-Ig를 발현하는 현탁액 포유동물 세포의 상업적 규모 배양:

[0266]

이 실시예는 CTLA4-Ig 분자의 생산을 기재한다. 이 실시예에 기재된 방법은 분비된 단백질, 예컨대 시토카인 및 다른 호르몬, Ig 슈퍼패밀리의 구성원이고 Ig 슈퍼패밀리 단백질의 부분을 포함하는 분비된 단백질, 및 일반적으로 CHO 세포에서 발현된 임의의 단백질을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다른 단백질의 생산에 대해 적용되고 연장될 수 있다.

[0267]

배양 플라스크 (예를 들어, 진탕 플라스크 및 에른마이어(Erlenmeyer) 플라스크), 볼러 보틀, 및 세포 배양 CTLA4-Ig 배양 공정의 접종물 확장 단계에 사용하여 동결된 바이알로부터 세포를 일련적으로 번식시켜 25,000-L 생물반응기를 접종하기 위한 충분한 수의 생존 세포를 제공하였다.

[0268]

CTLA4-Ig의 상업적 규모 생산: 25,000-L 생산 생물반응기에서 발생하는 본 개시내용의 생산 상은 2-단계 온도 이동을 갖는 배양 실행을 수반하는 많은 양 및 높은 품질 둘 다의 CTLA4-Ig 단백질을 생산한다. 생물반응기를 유도 후 대략 76시간에 공급 배지로 보충하고, 이 공급물을 생산 반응기에 매일 제공한다. 25,000L 배양물을 유도 후 대략 144시간까지 36°C에서 CD-CHO 배지에서 인큐베이션하고, 이어서 약 144시간 (대수적 성장 상의 종료) 후에 36°C에서 33°C로 온도 이동 (T-이동)으로 처리한다. 33°C 온도를 약 144시간 내지 약 240시간 유지한다. 이어서 25,000L 배양물을 유도로부터 약 240시간 후에 33°C에서 31°C로 제2 및 최종 온도 이동 (T-이동)으로 처리하고, 약 240-시간 점으로부터 수거까지 유지한다.

[0269]

샘플을 분석을 위해 생산 생물반응기로부터 매일 기초로 취하였다. 예를 들어, 세포 카운팅에 사용된 샘플을 트리판 블루 (시그마, 미국 미주리주 세인트 루이스)로 염색하였다. 세포 카운트 및 세포 생존력 결정을 혈구 계산기를 사용하여 수행하여 현미경 하에서 생존 염색된 세포를 카운팅하였다. 대사물의 분석을 위해, 추가의 샘플 분취물을 2000 rpm (4°C)에서 20분 동안 원심분리하여 세포를 펠릿화하였다. 상청액을 관련 기술분야에서

통상적으로 실시되는 기술 및 프로토콜을 사용하여 단백질 역가, 시알산, 글루코스, 락테이트, 글루타민, 글루타메이트, pH, pO₂, pCO₂, 암모니아, 및 LDH에 대해 분석하였다.

[0270] 실시예 5

[0271] **25,000 L 생물반응기에서 생산된 CTLA4-Ig의 글리코실화 분석**

[0272] 영상화 모세관 등전위 포커싱 (iCIEF)을 수행하여 글리칸 함량을 분석하였다. 이 방법은 그들의 등전점 (pI)에 의한 단백질의 분리에 사용된다. 이 방법에서, 아바타셉트 샘플을 물, 메틸 셀룰로스, 양쪽성 전해질, 및 pI 마커로 ~1 mg/mL의 최종 농도로 제조하고, 이어서 오토샘플러에 의해 영상화 모세관 등전위 포커싱 시스템 (iCIEF) 내로 주사하였다. 전기영동은 이소형의 전하 변동에 기반하여 플루오로화탄소 (FC) 코팅된 모세관 내의 pH 구배를 통해 샘플을 분리한다. 고전압 포커싱 후, 샘플 이동을 전체 칼럼 CCD 카메라에 의해 포획하고, 피크의 정량적 분석을 연관된 소프트웨어를 사용하여 수행한다. 결과는 샘플에 존재하는 총 글리코형의 백분율로서 보고되며, 도 8a-8b 및 9a-9b에서 볼 수 있다.

[0273] **25,000 L 생물반응기에서 생산된 CTLA4-Ig의 글리코실화 도메인 분석**

[0274] 아바타셉트의 N-연결된 올리고사카라이드 프로파일 (글리코실화 패턴)을 결정한다. 아바타셉트 상의 올리고사카라이드를 PNGase F로의 효소적 가수분해에 의해 유리시킨다. 유리 올리고사카라이드를 전기화학적 검출을 사용한 고성능 음이온 교환 크로마토그래피 (HPAEC)에 의해 프로파일링한다. 약물 물질의 올리고사카라이드 프로파일을 참조 물질의 공동 실행된 샘플에 대해 평가한다. 결과를 선택된 도메인의 절대 퍼센트 면적 또는 참조 표준물에서의 동일한 도메인으로부터의 선택된 도메인의 퍼센트 편차 중 어느 하나로서 보고한다. 도메인 I, II, III, 및 VI+V 결과는 도 10a-10d에서 볼 수 있다. 시알산 분석 (NANA 및 NGNA의 결과는 도 10e 및 10f에서 볼 수 있다.

[0275] 실시예 6

[0276] **아바타셉트의 생체내 효능**

[0277] 참조 공정 (예를 들어, PCT/US2006/049074에 기재된 공정 F) 및 본원에 기재된 공정 (예를 들어, 공정 J)에 의해 제조된 아바타셉트의 약동학을 비교하기 위한 임상 연구를 수행하였다. 임상 연구는 건강한 참가자에서 단일 용량 (30-분 IV 주입으로서 투여된 750 mg) 후에 참조 공정에 비해 본원에 기재된 공정에 의해 제조된 아바타셉트의 약동학 (PK)을 비교하기 위해 수행된 개방-표지, 무작위화, 평행-그룹, 단일-용량 연구였다.

[0278] 임상 PK 연구의 결과는 아바타셉트의 N-글리칸 조성의 제어에 대한 필요를 입증하였다. N-글리칸 조성을 HILIC N-연결된 글리칸 프로파일링 방법에 의해 결정하였다. 이 방법을 PK에 영향을 미친 CTLA4 영역 상의 주요 이중 안테나성 글리코형의 총체를 정량화하도록 디자인하였다.

[0279] 임상 연구는 CTLA4 G2F, S1G2F, 및 S2G2F 글리코형이 전체 제어 전략 및 PK에 대해 가장 영향이 있음을 입증하였으며, 따라서 이들 글리칸에 대해 양측 한계가 제안되었다 (표 3). CTLA4 G2F는 PK 청소율에 대한 강한 상관관계로 인해 아바타셉트에 대한 중요한 품질 속성이다. S1G2F는 PK에 대한 최소 영향을 가졌으며, 양측 한계는 제조 일관성을 위해 적용되었다. 제조 공정 및 청소율 둘 다에서 G2F에 대한 그의 강한 상관관계로 인해, 양측 한계가 S2G2F에 적용되었다. 단측 한계는 G0F, G1F, 및 S1G1F에 대해 제안되었는데, 이는 이들이 전체 청소율에 대한 무시가능한 영향을 가졌기 때문이다. 추가의 정당성은 표 3에 제공된다. 표 3에서 모든 글리칸에 대한 제안된 한계는 허용된 PK 파라미터 내의 글리칸의 제어를 보장하였다. 하나의 속성의 실패는 임상 및 제조 경험과의 일관성을 유지하기 위해 배치의 거부를 촉발시켰다.

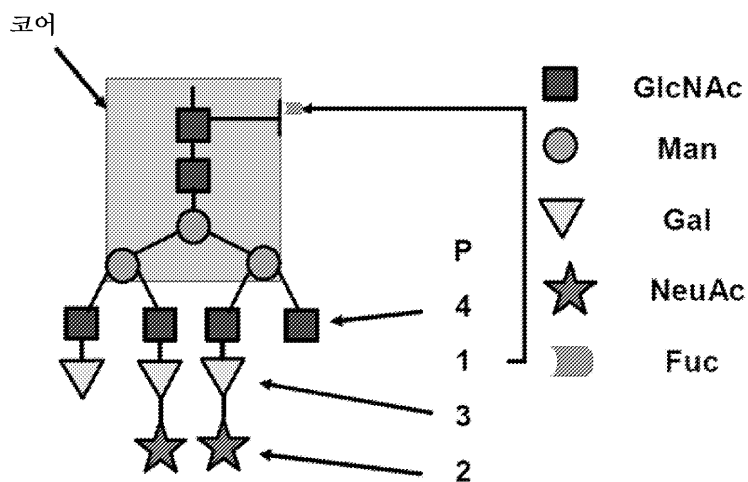
[0280] 표 3.

글리칸	최적 범위	정당성
G0F	$\leq 6.5\%$	수정된 한계는 추가의 공정 J 제조 경험을 포함하는 공정 F 및 J로부터의 임상 및 제조 경험에 기반한다.
G1F	$\leq 7.0\%$	수정된 한계는 추가의 공정 J 제조 경험을 포함하는 공정 F 및 J로부터의 임상 및 제조 경험에 기반한다.
G2F	1.5% - 23%	G2F는 빠르게 청소되는 글리칸이고, PK 결과에 대한 상관관계를 갖는다. 수정된 한계는 추가의 공정 J 제조 경험을 포함하는 공정 F 및 J로부터의 임상 및 제조 경험에 기반한다.
S1G1F	$\leq 12.5\%$	수정된 한계는 추가의 공정 J 제조 경험을 포함하는 공정 F 및 J로부터의 임상 및 제조 경험에 기반한다.
S1G2F	32.0% - 49.0%	S1G2F는 느리게 청소되고, PK 결과와 상관되지 않는다. 수정된 한계는 추가의 공정 J 제조 경험을 포함하는 공정 F 및 J로부터의 임상 및 제조 경험에 기반한다.
S2G2F	14.0% - 48.5%	S2G2F는 느리게 청소되는 글리칸이고, PK 결과에 대한 상관관계를 갖는다. 수정된 한계는 추가의 공정 J 제조 경험을 포함하는 공정 F 및 J로부터의 임상 및 제조 경험에 기반한다.

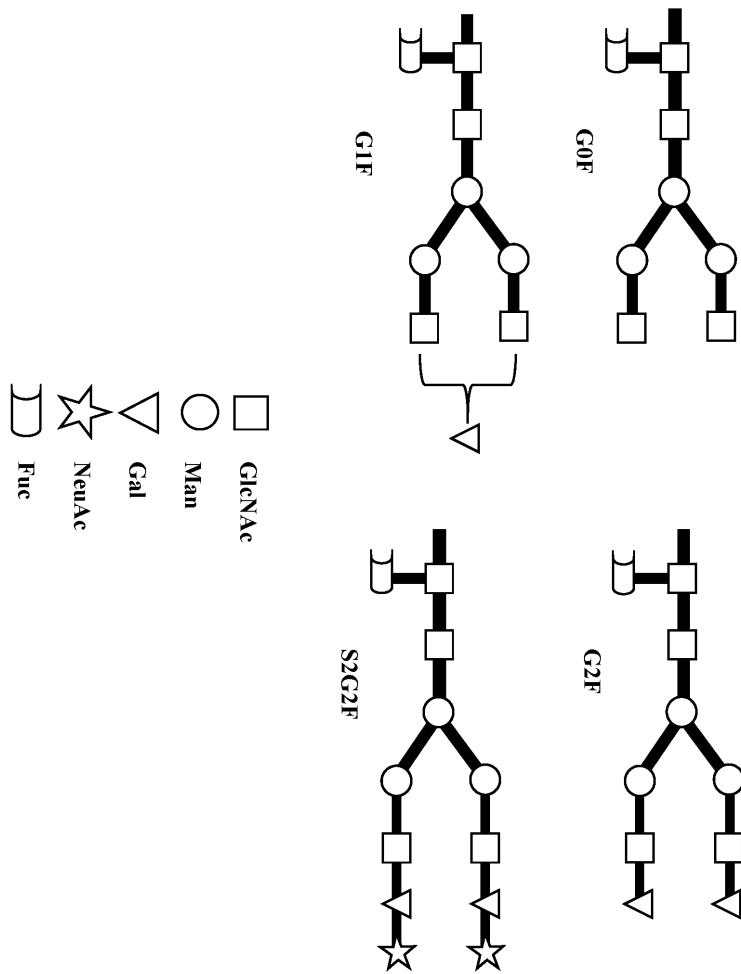
[0281]

도면

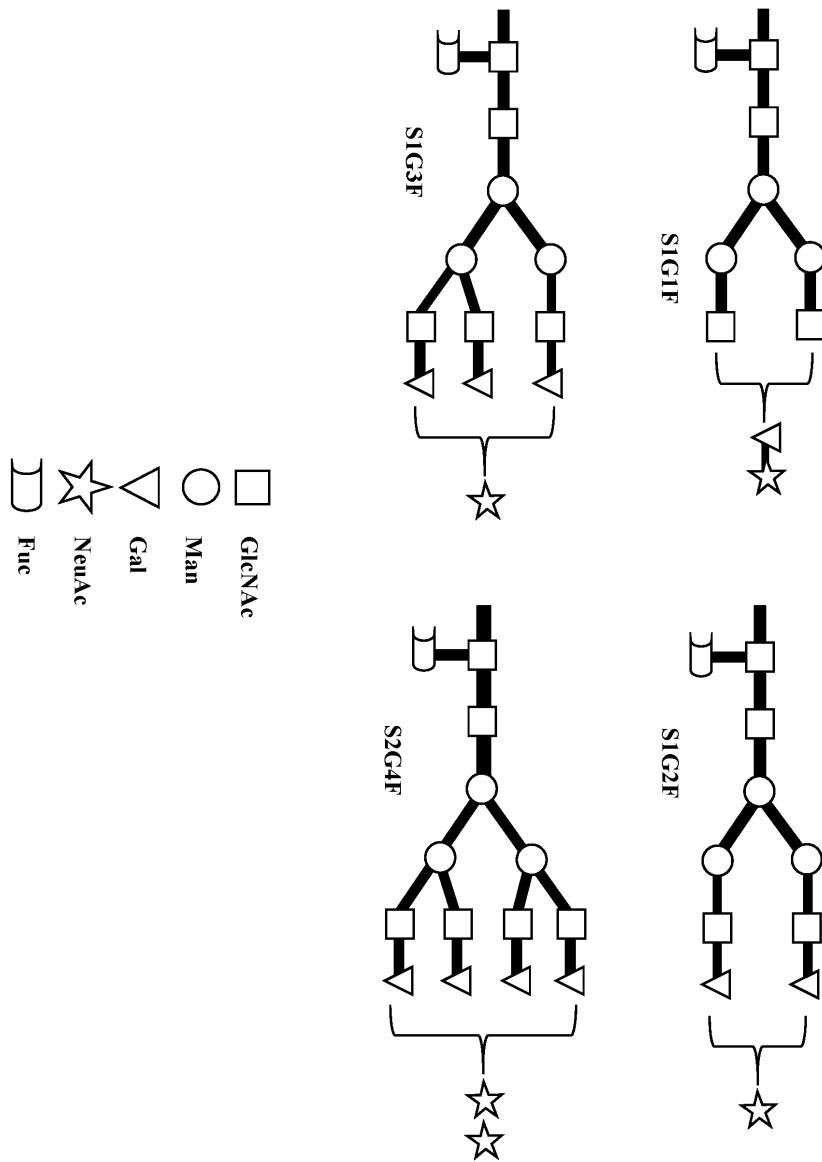
도면1a



도면1b



도면1c

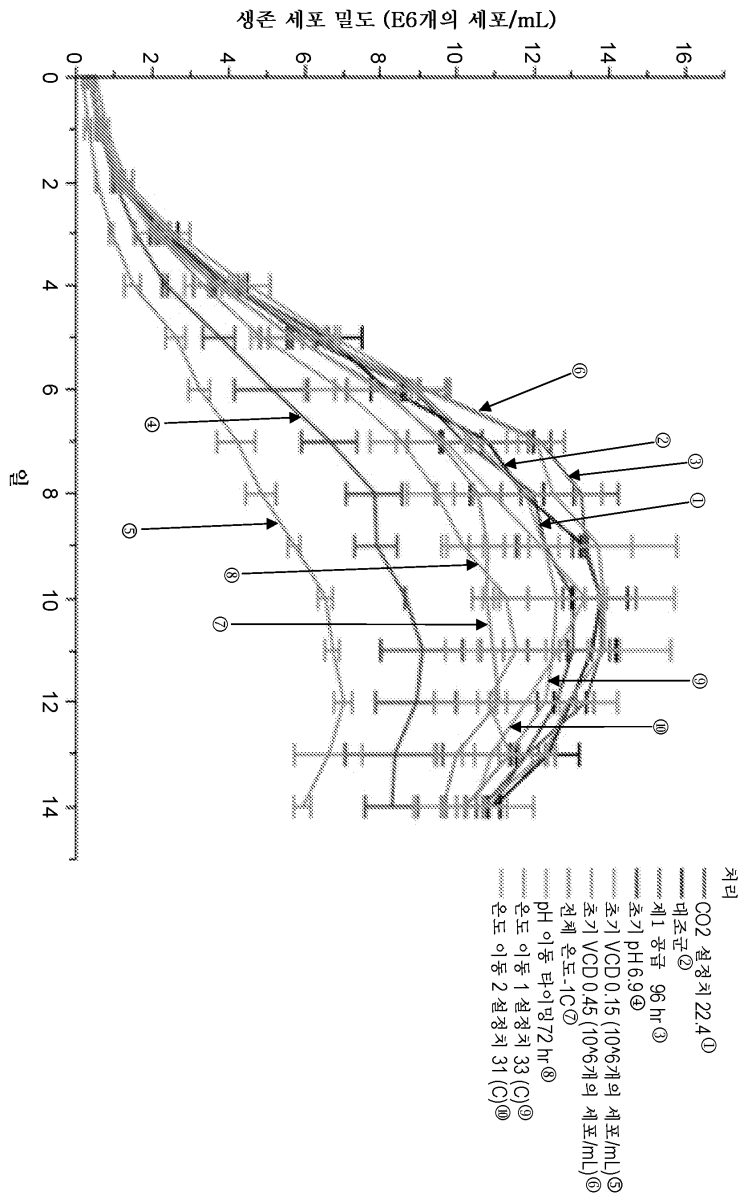


도면1d

N-글리코펩티드 서열			
펩티드	글리코실화 부위	프로테아제	아미노산 서열
T5	Asn76	트립신 및 GluC	LTF ¹ LDSDSICGTSSGNQVNLTIQGLR (SEQ ID NO: 9)
T7	Asn108	트립신 및 GluC	VELMYPPPY ¹ YLGI ¹ NGTQIYVIDPEPCPDSDQEPK (SEQ ID NO: 10)
T14	Asn207	트립신 및 GluC	EEQYNSTYR (SEQ ID NO: 11)

참고: N-글리코실화 부위.

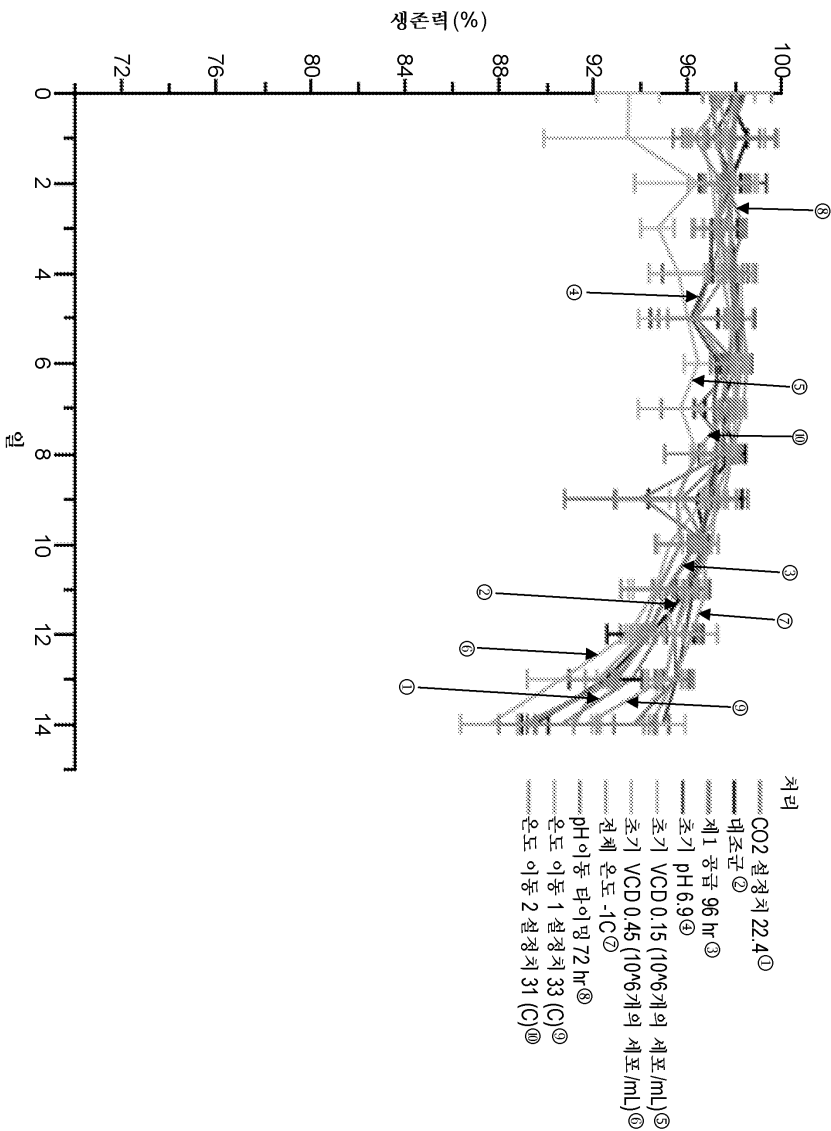
도면2a



도면2b

처리	평균 피크 VCD (10^6 개의 세포/mL)	피크 VCD 던넛 검정 p- 값	평균 제0-5일 배가 시간 (hrs)	배가 시간 던넛 검정 p-값	평균 제0-14일 IVCD (10^9 개의 세포-일/mL)	IVCD 던넛 검정 p-값	VCD 프로파일 값
대조군	13.8	N/A	34.8	N/A	0.11	N/A	N/A
높은 CO2	13.4	1.00	33.6	0.97	0.11	1.00	0.43
후기 제1 공급	14.0	1.00	33.3	0.85	0.12	1.00	0.58
낮은 초기 pH	9.2	< 0.01	41.1	0.01	0.07	< 0.01	0.02
낮은 초기 VCD	7.0	< 0.01	34.8	0.95	0.05	< 0.01	< 0.01
높은 초기 VCD	14.5	0.98	37.7	0.80	0.12	1.00	0.52
낮은 전체 온도	11.2	0.12	35.1	1.00	0.10	0.30	0.08
조기 pH 이동	11.7	0.27	37.2	0.83	0.10	0.22	0.04
낮은 온도 이동 1	12.9	0.93	33.0	1.00	0.11	0.98	0.41
낮은 온도 이동 2	13.3	1.00	36.3	0.98	0.11	0.90	0.62

도면3



도면4a

제14일 시알산 및 N-연결 도메인 결과의 통계적 비교												
처리	평균 제14일 NANA (AIR)	NANA 단백질 검정 P-값	평균 제14일 NANA (AIR)	NGNA 단백질 검정 P-값	평균 제14일 도메인 I (AIR)	도메인 I 단백질 검정 P-값	평균 제14일 도메인 II (AIR)	도메인 II 단백질 검정 P-값	평균 제14일 도메인 III (AIR)	도메인 III 단백질 검정 P-값	평균 제14일 도메인 IV+V (AIR)	도메인 IV+V 단백질 검정 P-값
대조군	8.50	N/A	0.85	N/A	33.45	N/A	29.65	N/A	25.5	N/A	11.40	N/A
높은 CO ₂	8.70	0.86	0.75	0.87	34.30	0.97	30.60	0.70	24.9	1.00	10.25	0.17
풍기 제1 공급	8.70	0.86	0.70	0.55	33.05	1.00	29.60	1.00	26.45	0.97	10.90	0.86
낮은 초기 pH	8.60	1.00	0.90	1.00	31.55	0.49	30.35	0.90	27.80	0.39	10.35	0.23
낮은 초기 VCD	8.70	0.86	1.15	0.06	30.45	0.13	29.75	1.00	28.45	0.19	11.40	1.00
높은 초기 VCD	8.40	1.00	0.85	1.00	34.75	0.81	30.65	0.65	24.20	0.87	10.35	0.23
낮은 전체 온도	8.30	0.86	0.80	1.00	33.55	1.00	30.05	1.00	26.85	0.85	9.55	0.02
조기 pH 이동 타이밍	8.75	0.70	0.90	1.00	31.70	0.57	30.20	0.97	27.10	0.73	11.00	0.95
낮은 온도 이동 1	8.60	1.00	0.75	0.87	33.35	1.00	31.05	0.33	25.95	1.00	9.60	0.02
낮은 온도 이동 2	8.35	0.96	0.75	0.87	34.00	1.00	30.80	0.52	24.85	1.00	10.35	0.23

도면4b

처리 그룹 및 대조군 그룹 사이의 제14일 역가 및 비생산성의 통계적 비교				
처리	제14일 역가 (g/L)	제14일 역가 턴넷 검정 p-값	Qp (pg/세포-일)	Qp 턴넷 검정 p-값
대조군	3.43	N/A	34.2	N/A
높은 CO ₂	3.44	1.00	36.7	0.98
후기 제1 공급	3.33	0.98	32.1	0.99
낮은 초기 pH	2.59	<0.01	46.8	0.03

처리 그룹 및 대조군 그룹 사이의 제14일 역가 및 비생산성의 통계적 비교				
처리	제14일 역가 (g/L)	제14일 역가 턴넷 검정 p-값	Qp (pg/세포-일)	Qp 턴넷 검정 p-값
낮은 초기 VCD	1.57	<0.01	39.4	0.59
높은 초기 VCD	3.30	0.93	29.0	0.57
낮은 전체 온도	2.87	0.02	38.5	0.76
조기 pH 이동 테이밍	3.38	1.00	45.8	0.04
낮은 온도 이동 1	3.48	1.00	42.0	0.22
낮은 온도 이동 2	3.03	0.10	31.6	0.97

제14일 수거 전 샘플에서의 GOF (P2100) 클리코형 상대
농부도

처리 그룹	T5			T7		
	GOF 평균 상대 농부도 (%)	대조군 으로부터의 퍼센트 차이 (%)	대조군 단넷 P-값	GOF 평균 상대 농부도 (%)	대조군 으로부터의 퍼센트 차이 (%)	대조군 단넷 P-값
대조군	6.1	N/A	N/A	5.2	N/A	N/A
높은 pCO ₂ 이동	6.3	3.3	1.00	5.2	0.0	1.00
후기 제1 공급	6.6	8.2	0.81	5.7	9.7	0.80
낮은 초기 pH	5.0	-18.9	0.12	4.1	-20.4	0.16
낮은 초기 VCD	4.7	-23.0	0.05	4.1	-21.4	0.14
높은 초기 VCD	7.1	16.4	0.21	6.2	20.4	0.16
낮은 전체 온도	6.0	-2.5	1.00	5.1	-1.0	1.00
조기 pH 이동	5.4	-11.5	0.53	4.4	-15.5	0.38
낮은 온도 이동 1	5.9	-3.3	1.00	4.9	-5.8	0.98
낮은 온도 이동 2	5.8	-4.9	0.98	4.9	-4.9	0.99

도면4c

도면4d

제14일 수거 샘플에서의 G2F (P2120) 클리코형 상대 중부도						
처리 그룹	I5			I7		
	G2F 평균 상대 중부도 (%)	대조군 으로부터의 퍼센트 차이 (%)	대조군 단넷 D-값	G2F 평균 상대 중부도 (%)	대조군 으로부터의 퍼센트 차이 (%)	대조군 단넷 D-값
대조군	11.2	N/A	N/A	17.6	N/A	N/A
높은 pCO2 이동	9.7	-13.3	0.72	14.9	-15.3	0.82
후기 제1 공급	9.3	-18.1	0.51	14.3	-19.0	0.65
낮은 초기 pH	7.0	-38.5	0.03	10.2	-42.3	0.06
낮은 초기 VCD	5.1	-54.9	<0.01	8.1	-54.0	0.01
높은 초기 VCD	11.6	1.8	1.00	19.1	8.2	0.99
낮은 전체 온도	7.2	-36.7	0.04	10.5	-40.6	0.07
조기 pH 이동	8.1	-28.8	0.12	11.8	-33.0	0.17
낮은 온도 이동 1	8.7	-23.5	0.26	13.1	-25.9	0.36
낮은 온도 이동 2	10.2	-8.4	0.94	15.9	-9.7	0.98

도면4e

제14일 수거 물질에서의 SIG2F (P2121) 클리코형 상대
농부도

	T5			T7		
	SIG2F 평균 상대 농부도 (%)	대조군 으로부터의 퍼센트 차이 (%)	대조군 대넷 P-값	SIG2F 평균 상대 농부도 (%)	대조군 으로부터의 퍼센트 차이 (%)	대조군 대넷 P-값
대조군	33.2	N/A	N/A	36.5	N/A	N/A
높은 pCO2 이동	33.2	0	1.00	36.1	-1.1	1.00
혼기 제1 공급	33.7	1.4	1.00	36.5	0	1.00
낮은 초기 pH	37.7	13.4	<0.01	36.1	-1.2	0.99
낮은 초기 VCD	39.9	20.0	<0.01	34.2	-6.4	0.06
높은 초기 VCD	31.9	-4.1	0.57	35.5	-2.9	0.67
낮은 전체 온도	37.0	11.3	<0.01	35.7	-2.2	0.86
조기 pH 이동	36.0	8.13	0.54	37.2	1.9	0.92
낮은 온도 이동 1	34.5	3.9	0.60	36.7	0.4	1.00
낮은 온도 이동 2	34.4	3.6	0.71	36.2	-0.8	1.00

제14일 수거 샘플에서의 S2G2F (P2122) 클리코형 상태
중부도

처리 그룹	I5			I7		
	S2G2F 평균 상태 중부도 (%)	대조군 으로부터의 퍼센트 차이 (%)	대조군 대넷 P-값	S2G2F 평균 상태 중부도 (%)	대조군 으로부터의 퍼센트 차이 (%)	대조군 대넷 P-값
대조군	14.7	N/A	N/A	20.1	N/A	N/A
높은 pCO ₂ 이동	15.1	3.1	1.00	23.1	15.2	0.79
후기 제1 공급	15.3	4.1	1.00	22.8	13.5	0.86
낮은 초기 pH	17.7	20.5	0.11	29.0	44.6	0.03
낮은 초기 VCD	18.9	29.0	0.02	32.8	63.3	<0.01
높은 초기 VCD	13.2	-9.9	0.71	17.7	-11.7	0.92
낮은 전체 온도	16.3	10.9	0.62	28.3	40.9	0.05
조기 pH 이동	16.4	11.9	0.54	26.8	33.4	0.13
낮은 온도 이동 1	16.0	9.2	0.77	25.0	24.7	0.35
낮은 온도 이동 2	15.5	5.8	0.97	21.9	9.2	0.98

도면4f

제14일 수거 샘플에서의 SIG3F (P3131) 클리코형 상대 풍부도

처리 그룹	T5		T7	
	SIG3F 평균 상대 풍부도 (%)	대조군 으로부터의 퍼센트 차이 (%)	대조군 평균 상대 풍부도 (%)	대조군 으로부터의 퍼센트 차이 (%)
대조군	5.2	N/A	2.4	N/A
높은 pCO ₂ 이동	4.5	-12.6	0.71	2.0
환기 제1 공급	4.5	-12.6	0.71	2.0
낮은 초기 pH	3.6	-31.1	0.05	1.4
낮은 초기 VCD	3.4	-35.0	0.025	1.2
높은 초기 VCD	5.3	2.9	1.00	2.7
낮은 전체 온도	3.4	-34.0	0.03	1.4
조기 pH 이동	4.0	-23.3	0.17	1.6
낮은 온도 이동 1	4.1	-20.4	0.27	1.9
낮은 온도 이동 2	4.8	-7.8	0.96	2.1

도면4g

제14일 수거 샘플에서의 T5 S2G4F (P4142) 글리코형 상태
공부도

처리	T5 S2G4F 평균 상태 공부도 (%)	대조군으로부터의 퍼센트 차이 (%)	대조군 던넷 p-값
대조군	1.7	N/A	N/A
높은 pCO2 이동	1.6	-5.9	0.98
후기 제1 공급	1.6	-5.9	0.98

제14일 수거 샘플에서의 T5 S2G4F (P4142) 글리코형 상태
공부도

처리	T5 S2G4F 평균 상태 공부도 (%)	대조군으로부터의 퍼센트 차이 (%)	대조군 던넷 p-값
낮은 초기 pH	1.2	-29.4	0.04
낮은 초기 VCD	1.1	-35.3	0.01
높은 초기 VCD	1.7	0.0	1.00
낮은 전체 온도	1.2	-32.4	0.02
초기 pH 이동	1.4	-17.6	0.30
낮은 온도 이동 1	1.6	-8.8	0.88
낮은 온도 이동 2	1.6	-5.9	0.98

도면4h

도면5

제16일 수거 전 N-연결, HMW, HCP, 및 rDNA

조건	N-연결				HMW (%)	HCP (x10 ⁵ ng/mL)	rDNA (x10 ⁶ pg/mL)
	도메인 I (%)	도메인 II (%)	도메인 III (%)	도메인 IV+V (%)			
25 세대	30.1±0.4	30.4±0.4	28.1 ^a	11.4±0.1	30.0±0.4	5.0±0.4	8.1±0.5
33 세대	35.6±0.5	29.5±0.1	23.7±0.5	11.4±0.1	27.7±0.3	4.0±0.1	3.4±0.4
57 세대	39±1	29.9±0.6	21±1	10±0.1	26.7±0.2	3.5±0.1	6±1
77 세대	38.0±0.6	29.6±0.2	21.4±0.4	11.2±0.1	25±2	3.4±0.1	5±5 ^b
99 세대	39±1	29.5±0.1	20.6±0.1	11.0±0.8	25.6±0.4	3.3 ^a	11.5±0.7

^a 중복 샘플은 동일한 값으로 복귀하였음

^b 값은 8.4 x 10⁶ 및 1.0 x 10⁶ pg/mL임

제16일 수거 전 N-연결, HMW, HCP 및 rDNA에 대한 던넷 검정
p-값 결과

조건	p-값						
	N-연결				HMW	HCP	rDNA
	도메인 I	도메인 II	도메인 III	도메인 IV+V			
33 세대	0.0049	0.1301	0.0014	1.0000	0.9913	0.0069	0.2844
57 세대	0.0005	0.4791	0.0001	0.0501	0.3805	0.0011	0.8851
77 세대	0.0009	0.1811	0.0002	0.9544	0.0834	0.0009	0.5110
99 세대	0.0005	0.1534	0.0001	0.7824	0.0398	0.0007	0.4898

도면6a

실험 디자인에 대한 공정 파라미터 및 특정규명 범위

파라미터	중간치	연구 범위
접종 VCD (10 ⁶ 개의 세포/mL)	0.3	0.20-0.50
pH 이동 설정치 ^a	6.9	6.8-7.1
pCO ₂ 이동 설정치	16.8	11.2-22.4
제1 온도 설정치 (°C)	36	35-37
제2 온도 설정치 (°C)	33	32-34
제3 온도 설정치 (°C)	31	30-32

^a pH는 설정치의 ±0.02 단위 내에서 제어됨

도면6b

수정		생물반응기의 측정된 수성 값															
		생물반응기 ID															
		180608 -01	180608 -02	180609 -03	180608 -04	180608 -05	180608 -11	180609 -12	180608 -14	180608 -15	180608 -16	180608 -21	180608 -22	180608 -24	180608 -31		
IVCD(10 ² 개의 세포-일/mL)	0.03	0.15	0.14	0.04	0.04	0.05	0.02	0.08	0.09	0.04	0.06	0.04	0.10	0.14	0.11		
최종 생존력 (%)	81.9	73.8	81.0	82.1	88.9	83.8	69.0	82.0	85.3	88.5	79.2	90.1	83.2	86.8			
제10일 역가 (g/L)	0.6	4.5	4.2	1.8	1.7	1.0	2.6	3.8	1.0	1.7	1.1	3.7	4.7	4.1			
Qp (g/g/세포-일)	22.4	28.8	31.3	33.8	33.0	26.1	30.8	42.7	24.1	30.0	28.2	35.8	33.6	38.6			
제10일 NANA(MR)	7.4	8.8	9.8	7.3	7.8	7.5	8.5	8	7.4	7.7	7.3	8.8	9.1	8.4			
제11일 NANA(MR)	7.5	9.5	9	7.5	8	7.6	8.4	8.2	8.1	8.3	7.7	8.9	8.8	8.3			
제12일 NANA(MR)	7.5	9.1	8.7	7.2	7.8	7.7	8.1	8.2	8	7.8	7.7	8.9	8.8	8.1			
제13일 NANA(MR)	7.1	8.4	8.3	7.1	7.9	7.7	7.7	7.9	7.8	7.7	7.5	8.7	8.5	7.6			
제14일 NANA(MR)	6.6	7.8	7.8	6.8	7.6	7.3	7.3	7.5	7.6	7.5	7.2	8.2	7.7	7.4			
제15일 NANA(MR)	6.3	7.3	7.7	6.7	7.3	6.9	6.7	7	6.9	6.9	6.7	7.9	7.3	6.9			
제16일 NANA(MR)	6.5	7.1	7.8	6.8	7.2	6.9	6.5	7.1	7.1	7.2	6.8	7.6	6.5	6.9			
제16일 NANA(MR)	0.6	0.8	1.2	1.3	1.4	0.6	0.7	1.5	0.7	0.9	0.6	1.2	1	1			
N-연결 도메인 I (%)	39.4	41.3	34.6	37.5	34.6	38	39.9	36.1	37.2	38	38.8	35.5	40.2	38.7			
N-연결 도메인 II (%)	27.6	29.4	29.2	28.1	27.6	28.3	30.2	27.1	28.8	29.4	29.5	28.3	29.4	29.7			
N-연결 도메인 III (%)	22.8	19.5	22.7	23	24.2	23.8	21	23.4	23.5	22.7	2.7	23.3	20.2	21.7			
N-연결 도메인 IV+V (%)	8.5	7.6	10.4	9	10.3	7.6	7.2	10.4	8.5	7.6	7.2	10	8.1	7.8			
HMAIV (%)	26.7	23.9	20.9	27.8	24.1	25.7	26.2	28.4	25.5	26	26.4	28	26.8	27.6			
HCP(10 ⁴ ppm) ³	8.5	4	5	2.4	2.1	1.2	2.2	4	1.1	2.4	1.1	3.9	3.5	3.5			
DNA(10 ⁶ ppb) ³	3.31	3.82	4.49	1.17	1.48	2.72	2.97	1.40	1.68	1.30	2.00	1.02	1.50	0.86			

³ 불순물의 절대 농도 나누기 역가

도면6c

생산물반응기의 측정된 수정 값 (계속)									
수정	생산물반응기 ID								
	180608-32	180608-33	180609-34	180608-36	180609-404	180608-405	180609-406	180609-407	180609-408
IVCD (10 ⁶ 개의 세포-일/mL)	0.05	0.06	0.09	0.13	0.12	0.11	0.12	0.12	0.14
최종 생존력 (%)	66.2	85.7	80.2	85.9	68.8	88.6	79.3	86.7	N/A
제16일 역가 (g/L)	0.9	1.6	3.8	4.6	4.8	5.0	4.7	4.2	4.8
Qp (pg/세포-일)	17.5	28.0	43.7	35.4	38.7	43.1	38.0	35.3	N/A ^a
제10일 NANA (MR)	6.8	7.8	8.1	8.8	9	8.3	8.6	8.9	9.6
제11일 NANA (MR)	7.3	8.2	8.3	9.2	8.8	8.1	8.8	8.5	9.2
제12일 NANA (MR)	7.1	7.9	8.3	8.8	8.6	8	8.8	8.5	9
제13일 NANA (MR)	6.6	7.6	8	8.3	8.3	8	8.4	8.2	8.5
제14일 NANA (MR)	6.1	7.4	7.8	8.1	N/A	7.7	7.9	7.8	7.8
제15일 NANA (MR)	5.5	6.9	7.4	7.8	7.4	7.1	7.3	7.5	7.3
제16일 NANA (MR)	5.7	7.1	7.1	7	7.1	6.9	7	7.3	6.9
제16일 NGNA (MR)	0.4	0.8	1.5	1	0.8	1.3	1.1	1	1
N-연결 도메인 I (%)	47.2	N/A	35.2	38.1	38.3	36.7	37.6	36.5	39
N-연결 도메인 II (%)	27.4	N/A	27.3	30.3	30.6	28.9	29	29.5	29.4
N-연결 도메인 III (%)	18.7	N/A	23.8	21.7	21.4	22.6	21.7	23.2	21.3
N-연결 도메인 IV-V (%)	5.5	N/A	10.3	7.9	7.9	9.3	8.9	8.7	7.9
HMW (%)	26.7	27	27.7	26.5	24.9	28	27	27.4	25
DNA (10 ⁶ pb) ^a	8.6	1.9	4.4	3.4	4.3	4.5	4.2	3.5	3.7
DNA (10 ⁶ pb) ^b	7.15	2.13	1.20	1.22	2.06	1.02	1.75	1.00	1.76

분순물의 절대 농도 나누기 역가

^a 분순물의 절대 농도 나누기 역가

도면7

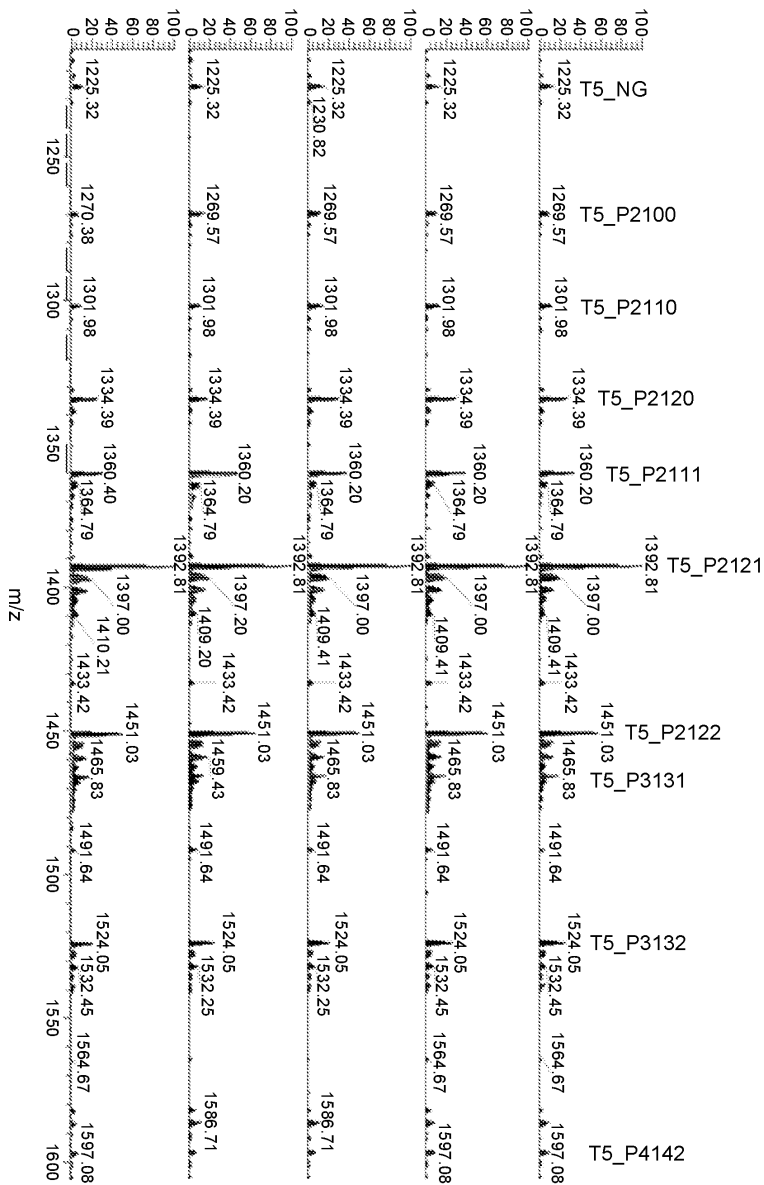
유의한 주요 효과의 요약		
공정 파라미터	반응	
	공정 속성	품질 속성
점중 VCD (10 ⁶ 개의 세포/mL)	pVCD, 제16일 역가, DNA	제8-14일 NANA, 제16일 HCP, 제16일 DNA, T5_P2120, T5_P3131, T7_P2120, T7_P3131
pH 이동 설정치	D5 성장 속도, pVCD, 제16일 역가, Qp	제13-16일 NANA, 제16일 NGNA, DNA, T5_P3131, T7_P2122, T7_P3131, N-연결 도메인 V & IV+ V
pCO ₂ 이동 설정치	HMW, DNA	N/A
제1 온도 설정치 (°C)	제16일 역가, Qp, HMW, DNA	제11-12일 & 제16일 NANA, 제16일 NGNA
제2 온도 설정치 (°C)	DNA, 제13-16일 NANA, 제16일 NGNA,	N-연결 도메인 V
제3 온도 설정치 (°C)	제16일 역가, HMW	제8일 NANA, 제12일 NANA, 제8-12일 NGNA

T5 클리코펩티드 상의 이중안테나성 클리칸의 상대 풍부도

공정	샘플	T5_P2100	T5_P2110	T5_P2120	T5_P2111	T5_P2121	T5_P2122	T5_P3131	T5_P3132	T5_P4142	T5_NG
F	551125	6.6	4.6	7.8	14.0	32.3	17.9	4.5	6.5	1.6	4.2
F	554526	6.4	4.1	6.3	15.1	31.3	20.0	4.0	6.9	1.6	4.1
F	554529	6.6	4.0	6.7	13.6	31.8	20.0	4.2	7.0	1.7	4.4
F	AAV2291	5.9	5.3	10.5	12.6	33.0	15.5	4.9	6.2	1.7	4.5
F	AAV2516	4.9	5.1	10.6	11.9	34.5	15.5	5.2	6.2	1.7	4.5
F	AAV2805	5.1	5.1	10.6	12.6	33.1	15.4	5.4	6.0	1.8	4.8
J	AAV7512	4.4	4.4	9.5	10.8	33.1	18.1	5.6	7.7	2.3	4.2
J	AAZ4611	3.2	3.7	7.2	10.4	35.1	21.8	4.4	7.0	1.9	5.2
J	AAZ7138	4.6	5.1	9.8	11.8	31.6	18.1	5.4	7.5	2.3	3.8
J	AAZ9651	4.0	4.9	9.7	10.8	33.3	18.5	5.5	7.1	2.4	3.7
J	ABA0706	3.2	4.3	7.2	11.8	32.7	22.9	4.4	7.7	2.1	3.7
J	ABA2568	4.4	4.4	7.8	11.1	32.6	21.2	4.6	7.5	2.3	4.1
F	RM1	3.7	4.1	10.4	11.4	36.5	16.3	5.3	6.1	1.4	4.9
F	RM2	3.2	4.0	9.7	11.1	34.8	18.3	5.5	6.9	2.1	4.4
F	범위	3.2 - 6.6	4.0 - 5.3	6.3 - 10.6	11.1 - 15.1	31.3 - 36.5	15.4 - 20.0	4.0 - 5.5	6.0 - 7.0	1.4 - 2.1	4.1 - 4.9
J	범위	3.2 - 4.6	3.7 - 5.1	7.2 - 9.8	10.4 - 11.8	31.6 - 35.1	18.1 - 22.9	4.4 - 5.6	7.0 - 7.7	1.9 - 2.4	3.7 - 5.2

도면8a

도면8b

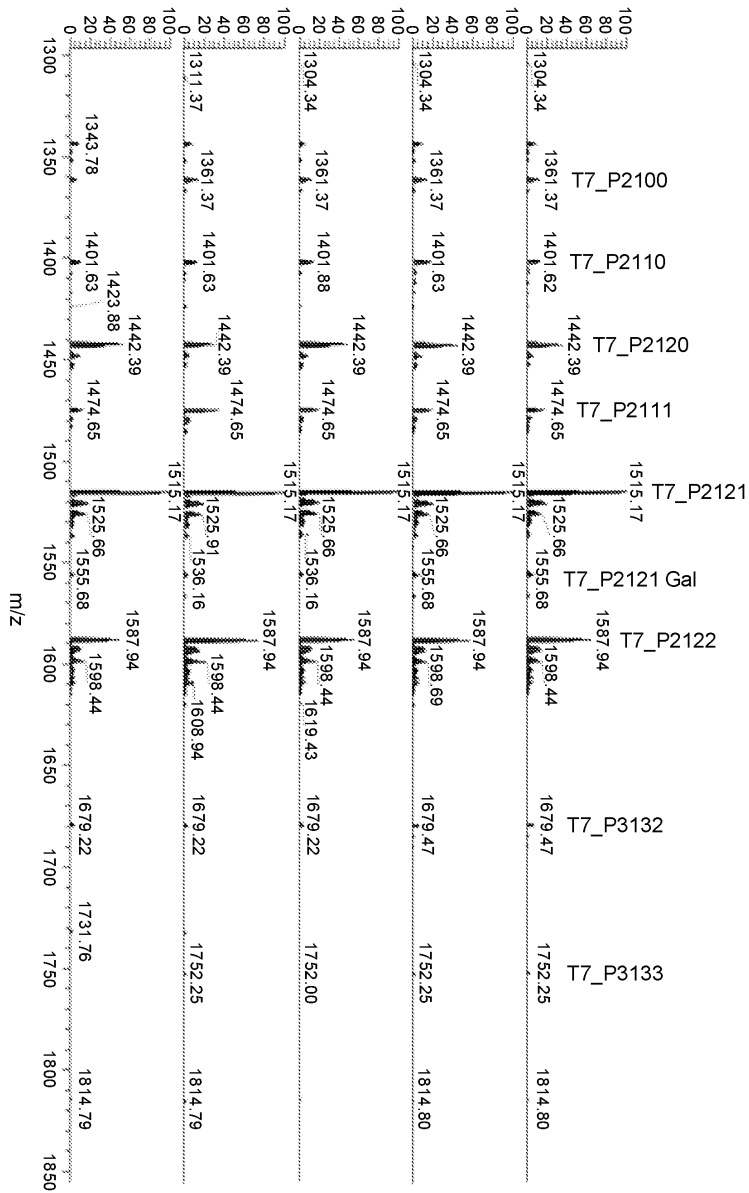


도면9a

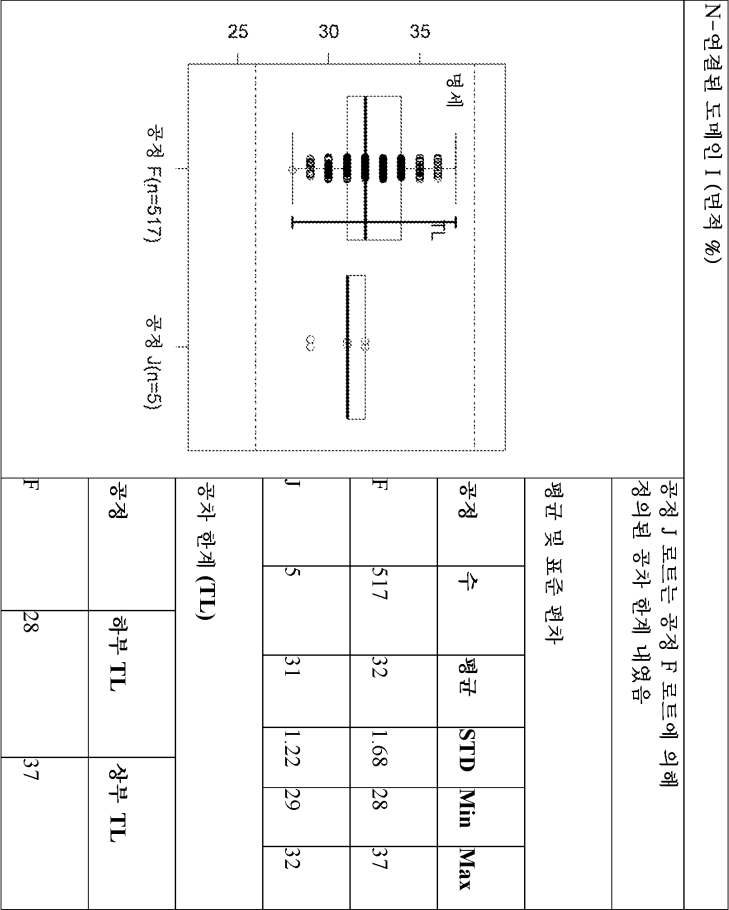
T7 클리코펩티드 상의 이중안테나성 클리칸의 상대 풍부도

공정	샘플	T7_P2100	T7_P2110	T7_P2120	T7_P2111	T7_P2121	T7_P2122	T7_P3131	T7_P3132	T7_P3133	T7_P2121_Gal	T7_P2120_Gal	T7_Man5
F	551125	3.5	3.5	10.0	10.3	37.3	29.0	1.2	2.1	1.1	1.5	0.5	0.0
F	554526	3.4	3.3	9.0	11.3	35.3	31.0	1.2	2.3	1.4	1.5	0.4	0.0
F	554529	3.5	2.9	8.0	10.5	35.2	32.6	1.1	2.3	1.5	1.8	0.5	0.0
F	AAV2291	3.4	4.0	15.1	7.1	39.1	24.3	1.5	2.2	0.9	1.5	0.8	0.0
F	AAV2516	2.7	3.9	18.0	6.2	40.3	21.5	1.9	2.2	0.8	1.5	0.9	0.0
F	AAV2805	2.8	4.2	18.6	6.4	39.9	20.8	1.9	2.3	0.7	1.4	0.9	0.0
J	AAV7512	3.5	3.6	11.2	6.0	37.7	27.2	2.0	3.4	1.6	2.6	1.0	0.1
J	AAZ4611	2.1	2.7	8.2	5.3	35.9	33.8	1.4	2.7	1.8	4.7	1.1	0.2
J	AAZ7138	4.0	4.9	13.9	6.6	36.5	23.5	2.2	3.3	1.6	2.3	1.2	0.1
J	AAZ9651	3.4	4.9	14.1	6.6	37.0	23.2	2.2	3.1	1.5	2.7	1.3	0.1
J	ABA0706	2.5	3.8	10.1	6.3	36.4	30.2	1.7	3.1	2.0	2.8	1.0	0.1
J	ABA2568	4.0	5.0	12.4	7.1	34.2	25.9	1.9	3.1	1.8	3.1	1.4	0.1
F	RM1	1.8	2.9	17.8	4.9	42.3	23.4	1.8	2.2	0.6	1.5	0.8	0.0
F	RM2	1.9	3.0	18.0	4.9	40.4	23.8	1.9	2.6	1.0	1.6	0.9	0.0
F	범위	1.8-3.5	2.9-4.2	8.0-18.6	4.9-11.3	35.2-42.3	20.8-32.6	1.1-1.9	2.1-2.6	0.6-1.5	1.4-1.8	0.4-0.9	0.0-0.0
J	범위	2.1-4.0	2.7-5.0	8.2-14.1	5.3-7.1	34.2-37.7	23.2-33.8	1.4-2.2	2.7-3.4	1.5-2.0	2.3-4.7	1.0-1.4	0.1-0.2

도면9b

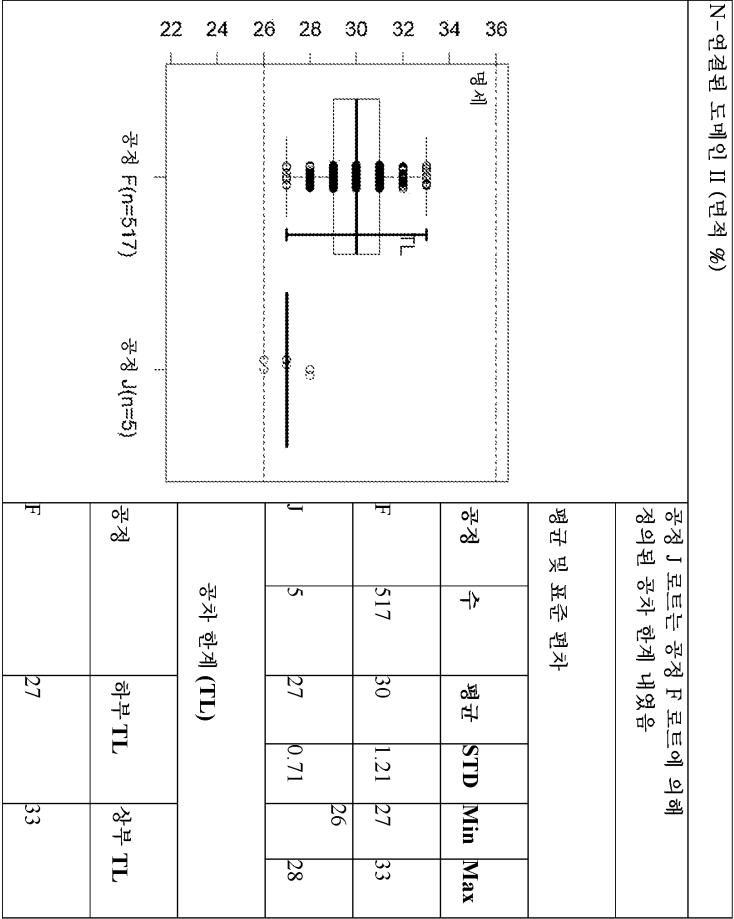


공정 F 및 공정 J 로트로부터의 N-연결된 도메인 I 시험 결과의 통계적 비교



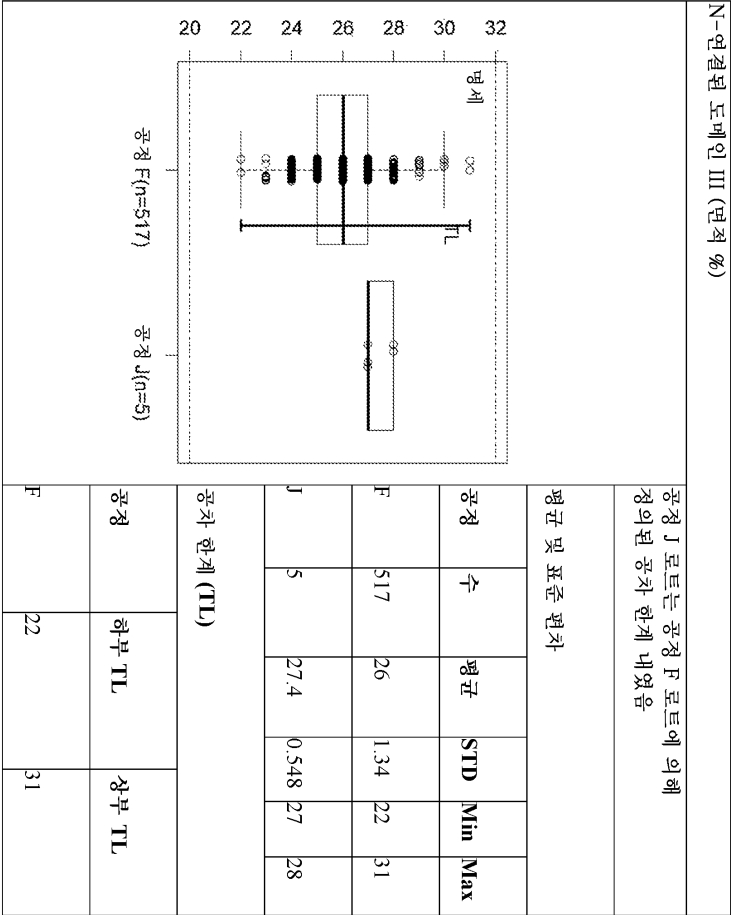
도면10a

공정 F 및 공정 J 로트로부터의 N-연결된 도메인 II 시험 결과의 통계적 비교



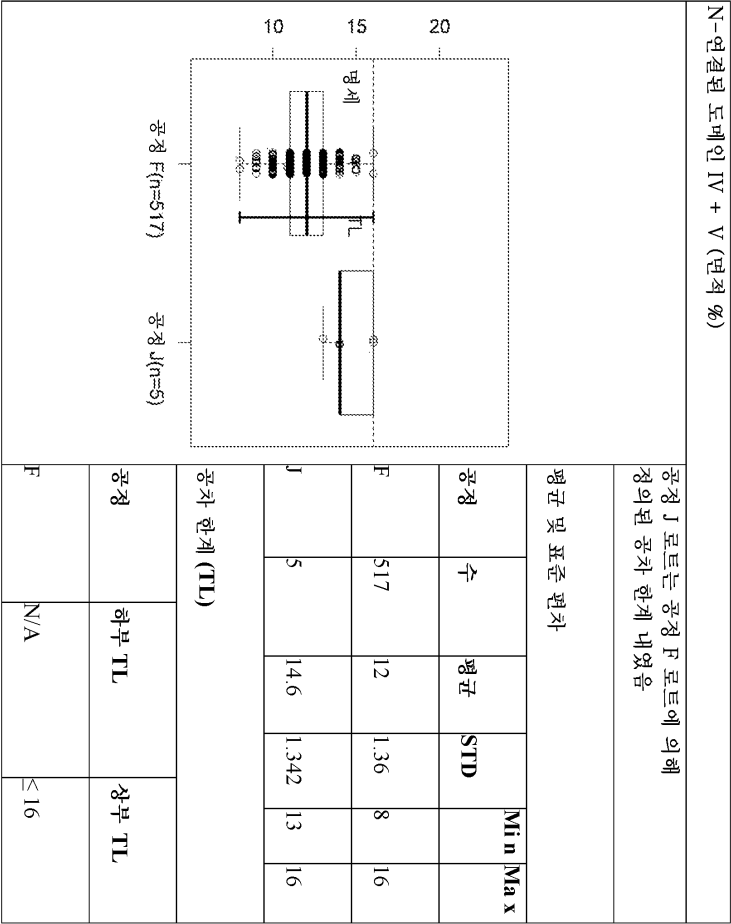
도면10b

공정 F 및 공정 J 로트로부터의 N-연결된 도메인 III 시험 결과의 통계적 비교



도면10c

공정 F 및 공정 J 로트로부터의 N-연결된 도메인 IV + V 시험 결과의 통계적 비교



도면10d

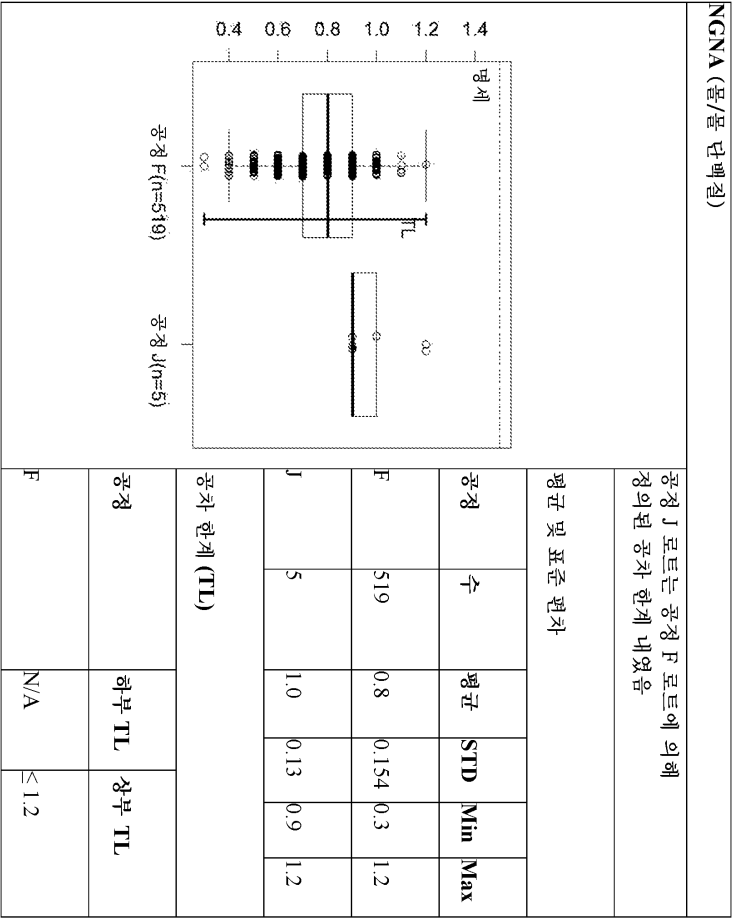
도면10e

공정 F 및 공정 J 로트로부터의 NANA 시험 결과의 통계적 비교

NANA (물/물 단백질)					
공정 J 로트는 공정 F 로트에 의해 정의된 공차 한계 내였음					
평균 및 표준 편차					
공정	수	평균	STD	Min	Max
F	519	9.3	0.418	8.3	11
J	5	10.0	0.23	9.5	10.1
공차 한계 (TL)					
공정	허부 TL		상부 TL		
F	8.3		11		

도면10f

공정 F 및 공정 J 로트로부터의 NGNA 시험 결과의 통계적 비교



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Bristol-Myers Squibb Company
- <120> MANUFACTURING PROCESS FOR PROTEIN
- <130> 3338.188PC01
- <150> US 63/066,122
- <151> 2020-08-14
- <160> 11
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220><223> CTLA4 Extracellular Domain

<400> 1

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

<210> 2

<211> 383

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CTLA4-Ig amino acid sequence

<400> 2

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala

1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro

20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu

35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg

50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
115 120 125

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
210 215 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
225 230 235 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
245 250 255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
260 265 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
275 280 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
290 295 300

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

305 310 315 320

 325 330 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
340 345 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
355 360 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375 380

<210> 3

<211> 359

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acids 25-383 of SEQ ID NO:2

<400> 3

Met	Ala	Met	His	Val	Ala	Gln	Pro	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Ser	Ser	Arg
1				5					10					15	
Gly	Ile	Ala	Ser	Phe	Val	Cys	Glu	Tyr	Ala	Ser	Pro	Gly	Lys	Ala	Thr
			20					25					30		
Glu	Val	Arg	Val	Thr	Val	Leu	Arg	Gln	Ala	Asp	Ser	Gln	Val	Thr	Glu
		35					40					45			
Val	Cys	Ala	Ala	Thr	Tyr	Met	Met	Gly	Asn	Glu	Leu	Thr	Phe	Leu	Asp
	50						55					60			

Asp	Ser	Ile	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Asn	Gln	Val	Asn	Leu	Thr
65				70				75				80			
Ile	Gln	Gly	Leu	Arg	Ala	Met	Asp	Thr	Gly	Leu	Tyr	Ile	Cys	Lys	Val
				85				90				95			
Glu	Leu	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr
100								105				110			
Gln	Ile	Tyr	Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro	Cys	Pro	Asp	Ser	Asp	Gln	Glu
115				120				125							

Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro

130 135 140

Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

145 150 155 160

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

165 170 175

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

180 185 190

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

195 200 205

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

210 215 220

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

225 230 235 240

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

245 250 255

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys

260 265 270

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

275 280 285

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

290 295 300

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

305 310 315 320

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

325 330 335

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

340 345 350

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

355

<210> 4

<211> 358

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acids 26-383 of SEQ ID NO:2

<400> 4

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly

1 5 10 15
Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu

20 25 30
Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val

35 40 45
Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp

50 55 60
Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile

65 70 75 80
Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu

85 90 95
Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln

100 105 110
Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro

115 120 125
Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu

130 135 140
Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

145 150 155 160
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

165 170 175
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

180 185 190
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

195 200 205
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

210 215 220
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 225 230 235 240
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 245 250 255
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 260 265 270
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 275 280 285
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 290 295 300
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 305 310 315 320
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

325 330 335
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 340 345 350
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355

<210> 5

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acids 27-383 of SEQ ID NO:2

<400> 5

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 1 5 10 15
 Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30
 Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 35 40 45
 Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50				55				60							
Ile	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Asn	Gln	Val	Asn	Leu	Thr	Ile	Gln
65				70				75				80			
Gly	Leu	Arg	Ala	Met	Asp	Thr	Gly	Leu	Tyr	Ile	Cys	Lys	Val	Glu	Leu
85				90				95							
Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	Gln	Ile
100				105				110							
Tyr	Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro	Cys	Pro	Asp	Ser	Asp	Gln	Glu	Pro	Lys
115				120				125							
Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
130				135				140							
Leu	Gly	Gly	Ser	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
145				150				155				160			
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
165				170				175							
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
180				185				190							
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
195				200				205							
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
210				215				220							
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
225				230				235				240			
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
245				250				255							
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln
260				265				270							
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala
275				280				285							
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
290				295				300							

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 305 310 315 320
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 325 330 335
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 340 345 350
 Leu Ser Pro Gly Lys
 355
 <210> 6
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Amino Acids 25-382 of SEQ ID NO:2
 <400> 6
 Met Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
 1 5 10 15
 Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr
 20 25 30
 Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu
 35 40 45
 Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp
 50 55 60
 Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val
 85 90 95
 Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr
 100 105 110
 Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu
 115 120 125
 Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro
 130 135 140

Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 145 150 155 160
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 165 170 175
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 180 185 190
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 195 200 205
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 210 215 220
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 245 250 255
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 260 265 270
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 275 280 285
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 290 295 300
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 305 310 315 320
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 325 330 335
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 340 345 350
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 355

<210> 7

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acids 26-382 of SEQ ID NO:2

<400> 7

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly

1 5 10 15

Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu

20 25 30

Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val

35 40 45

Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp

50 55 60

Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile

65 70 75 80

Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu

85 90 95

Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln

100 105 110

Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro

115 120 125

Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu

130 135 140

Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

145 150 155 160

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

165 170 175

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

180 185 190

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

195 200 205

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

210 215 220

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro

225	230	235	240
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
245	250	255	
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn			
260	265	270	
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile			
275	280	285	
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr			
290	295	300	
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys			
305	310	315	320
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys			
325	330	335	
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu			
340	345	350	
Ser Leu Ser Pro Gly			
355			
<210>	8		
<211>	356		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
><223>	Amino acids 27-382 of SEQ ID NO:2		
<400>	8		
Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile			
1	5	10	15
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val			
20	25	30	
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys			
35	40	45	
Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser			
50	55	60	

Ile	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Asn	Gln	Val	Asn	Leu	Thr	Ile	Gln				
65					70					75					80				
Gly	Leu	Arg	Ala	Met	Asp	Thr	Gly	Leu	Tyr	Ile	Cys	Lys	Val	Glu	Leu				
85					90					95									
Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	Gln	Ile				
100					105					110									
Tyr	Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro	Cys	Pro	Asp	Ser	Asp	Gln	Glu	Pro	Lys				
115					120					125									
Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu				
130					135					140									
Leu	Gly	Gly	Ser	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr				
145					150					155					160				
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val				
165					170					175									
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val				
180					185					190									
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser				
195					200					205									
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu				
210					215					220									
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala				
225					230					235					240				
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro				
245					250					255									
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln				
260					265					270									
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala				
275					280					285									
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr				
290					295					300									
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu				

305 310 315 320
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 325 330 335
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 340 345 350

Leu Ser Pro Gly

355

<210> 9

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T5

<400> 9

Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn

1 5 10 15

Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg

20 25

<210> 10

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T7

<400> 10

Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly

1 5 10 15

Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln

20 25 30

Glu Pro Lys

35

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T14

<400> 11

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

1 5