



등록특허 10-2381791



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월31일
(11) 등록번호 10-2381791
(24) 등록일자 2022년03월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 21/00 (2006.01) *C12N 1/38* (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12P 21/005 (2013.01)
C12N 1/38 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7021677

(22) 출원일자(국제) 2014년12월09일
심사청구일자 2019년11월29일

(85) 번역문제출일자 2016년08월09일

(65) 공개번호 10-2016-0104073

(43) 공개일자 2016년09월02일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/069378

(87) 국제공개번호 WO 2015/105609

국제공개일자 2015년07월16일

(30) 우선권주장

61/926,481 2014년01월13일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Cytotechnology, Vol. 36, pp. 71-83 (2001.)

Chem. Biol. Interact., Vol. 51, pp. 141-149 (1984.)

US20100221823 A1

WO2008154014 A2

(73) 특허권자

암젠 인크

미국 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크, 원 암젠 센터 드라이브

(72) 발명자

강, 소혜

미국 93012 캘리포니아주 카마릴로 리버테일 코트 #404 243

후양, 정-주니어

미국 91320 캘리포니아주 뉴베리 파크 팔브룩 애비뉴 556

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 36 항

심사관 : 황상필

(54) 발명의 명칭 재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량을 조작하기 위한 오르니틴 대사의 조절

(57) 요약

본 발명은 세포 배양 동안 오르니틴 대사를 조절함으로써 재조합 당단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량을 조작하는 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12N 2500/32 (2013.01)

C12N 2500/99 (2013.01)

C12N 2501/70 (2013.01)

C12N 2501/72 (2013.01)

C12N 2501/73 (2013.01)

C12N 2501/999 (2013.01)

C12N 2510/02 (2013.01)

(72) 발명자

바크호다리안, 헤디에

미국 93021 캘리포니아주 무어파크 로렐 레인

14319

본다렌코, 파벨

미국 91320 캘리포니아주 사우전드 오크스 블로썸

코트 1774

장, 종퀴

미국 91362 캘리포니아주 사우전드 오크스 카펠라

웨이] 2676

명세서

청구범위

청구항 1

재조합 단백질을 발현하는 숙주 세포를, 아르기나제 저해제를 포함하는 세포 배양으로 배양하는 단계를 포함하고, 여기서

상기 숙주 세포 내 오르니틴 생성은, 재조합 단백질을 발현하는 숙주 세포를 아르기나제 저해제가 없는 세포 배양으로 배양하는 경우에 비해 감소되고,

재조합 단백질은, 아르기나제 저해제가 없는 세포 배양으로 재조합 단백질을 발현시키는 경우보다 감소된 고수준 만노스(high mannose) 글리코폼(glycoform) 함량을 갖는 것인,

재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량을 감소시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 숙주 세포 내 오르니틴 촉적이 세포 배양물에 아르기나제 저해제를 첨가함으로써 조절되는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 아르기나제 저해제가

NG-하이드록시-L-아르기닌 모노아세테이트,

N ω -하이드록시-노르-아르기닌 디아아세테이트,

BEC (S-(2-보로노에틸)-L-시스테인) 및

DL- α -다이플루오로메틸오르니틴

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 아르기나제 저해제가 BEC (S-(2-보로노에틸)-L-시스테인) 인 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 아르기나제 저해제가 DL- α -다이플루오로메틸오르니틴인 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 아르기나제 저해제가

(a) 1 μ M, 10 μ M 또는 20 μ M의 농도를 갖는 NG-하이드록시-L-아르기닌 모노아세테이트,

(b) 10 μ M 또는 20 μ M의 농도를 갖는 N ω -하이드록시-노르-아르기닌 디아아세테이트,

(c) 1 μ M, 10 μ M, 20 μ M 또는 0.5mM의 농도를 갖는 BEC (S-(2-보로노에틸)-L-시스테인), 또는

(d) 1 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 1mM 또는 2mM의 농도를 갖는 DL- α -다이플루오로메틸오르니틴

인 방법.

청구항 7

제3항에 있어서, 아르기나제 저해제의 농도가

(a) 적어도 10 μ M,

(b) 10 μ M 내지 2mM,

- (c) $10 \mu M$,
- (d) $0.5 mM$,
- (e) $1mM$, 및
- (f) $2mM$

로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 8

재조합 단백질을 발현하는 숙주 세포를, 스페르민을 포함하는 세포 배양으로 배양하는 단계를 포함하고, 여기서

상기 숙주 세포 내 오르니틴 대사 생성은, 재조합 단백질을 발현하는 숙주 세포를 $35 \mu M$ 초과의 스페르민을 갖는 세포 배양으로 배양하는 경우에 비해 감소되고,

재조합 단백질은, $35 \mu M$ 초과의 스페르민을 갖는 세포 배양에 의해 발현된 재조합 단백질보다 감소된 고수준 만노스 글리코폼 함량을 갖는 것인,

재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량을 감소시키는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 세포 배양물에 $35 \mu M$ 이하의 스페르민을 첨가하는 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 스페르민의 농도가

- (a) $7 \mu M$ 내지 $35 \mu M$,
- (b) $17 \mu M$ 내지 $35 \mu M$,
- (c) $7 \mu M$ 내지 $17 \mu M$,
- (d) $35 \mu M$,
- (e) $17 \mu M$, 및
- (f) $7 \mu M$

로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 11

재조합 단백질을 발현하는 숙주 세포를, 오르니틴 또는 아르기닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나를 포함하는 세포 배양으로 배양하는 단계

를 포함하는, 재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량을 증가시키는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 숙주 세포 내 오르니틴 축적이 세포 배양 배지에 적어도 $0.6mM$ 의 오르니틴을 첨가함으로써 조절되는 것인 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 오르니틴의 농도가 0.6 내지 $14.8mM$, 6 내지 $14.8mM$, $0.6mM$, $6mM$ 또는 $14.8mM$ 인 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 숙주 세포 내 오르니틴 축적이 세포 배양 배지에 적어도 $8.7mM$ 의 아르기닌을 첨가함으로써 조절되는 것인 방법.

청구항 15

제11항에 있어서, 아르기닌의 농도가 8.7mM 내지 17.5mM인 방법.

청구항 16

제11항에 있어서, 아르기닌의 농도가 8.7mM인 방법.

청구항 17

제11항에 있어서, 아르기닌의 농도가 17.5mM인 방법.

청구항 18

제1항, 제8항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 단백질을 발현하는 숙주 세포가 배취(batch) 배양, 유가(fed-batch) 배양, 관류 배양, 또는 이들의 조합으로 배양되는 것인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 배양이 관류 배양인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 관류가 연속적 관류를 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제18항에 있어서, 관류 속도가 일정한 것인 방법.

청구항 22

제18항에 있어서, 관류가 1일당 1.0 이하의 작업 용적의 속도로 수행되는 것인 방법.

청구항 23

제18항에 있어서, 관류가 교번의 접선 유동(alternating tangential flow)에 의해 달성되는 것인 방법.

청구항 24

제1항, 제8항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 단백질을 발현하는 숙주 세포가 생물반응기에서 배양되는 것인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 생물반응기의 용량이 적어도 500 ℓ 인 방법.

청구항 26

제24항에 있어서, 생물반응기의 용량이 적어도 500 ℓ 내지 2000 ℓ 인 방법.

청구항 27

제24항에 있어서, 생물반응기의 용량이 적어도 1000 ℓ 내지 2000 ℓ 인 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, 생물반응기에 적어도 0.5×10^6 개 세포/ml를 접종하는 것인 방법.

청구항 29

제1항, 제8항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 단백질을 발현하는 숙주 세포가 무혈청 세포 배양 배지에서 배양되는 것인 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 무혈청 세포 배양 배지가 관류 세포 배양 배지인 방법.

청구항 31

제1항, 제8항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 포유류 세포인 방법.

청구항 32

제1항, 제8항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포인 방법.

청구항 33

제1항, 제8항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 단백질이 당단백질인 방법.

청구항 34

제1항, 제8항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 단백질이 인간 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 재조합 융합 단백질 및 사이토카인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 35

제1항, 제8항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

숙주 세포에 의해 생성된 재조합 단백질의 채취 단계

를 더 포함하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 숙주 세포에 의해 생성된 재조합 단백질을 정제하고, 약제학적으로 허용가능한 제제로 제형화하는 것인 방법.

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2014년 1월 13일자로 출원된 미국 가출원 특허 제61/926,481호의 유익을 주장하며, 이 기초출원은 그의 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.

배경 기술

[0002] 메틸화, 황산화, 인산화, 지질 첨가 및 글리코실화를 포함하는 다양한 번역후 변형은 더 고등 진핵생물에 의해 수행된다. 다수의 분비된 단백질, 막 단백질 및 소수포 또는 특정 세포내 유기체에 표적화된 단백질은 글리코실화되는 것으로 알려져 있다. 글리코실화, 즉, 특이적 아미노산에 대한 당 모이어티의 공유 부착은 재조합 단백질에 대해 가장 흔하고, 또한 중요한 번역 후 변형 중 하나이다. 단백질 글리코실화는 단백질 폴딩 및 품질 제

어, 분자 수송 및 분류 및 세포 표면 수용체 상호작용에서의 그의 본질적 역할을 포함하는 세포 내 다수 기능을 가진다.

[0003] N-연결된 글리코실화는 단백질 내 특성 인식 서열에서 발견된 아스파라긴 잔기에 대한 올리고당의 첨가를 수반 한다(예를 들어, Asn-X-Ser/Thr). N-연결된 당단백질은 만노스(Man), 갈락토스, N-아세틸글루코사민 및 뉴라민 산으로 구성된 표준 분자 구조를 함유한다. 고수준 만노스(high mannose) 올리고당은 전형적으로 다수의 만노스 잔기(5개 이상)를 지니는 2개의 N-아세틸글루코사민을 포함한다. 포유류 세포 배양물에서 생성된 당단백질은 다양한 수준의 이들 고수준 만노스(HM 또는 HMN) 글리코폼(glycoform), 예컨대 만노스5(Man5), 만노스6(Man6), 만노스7(Man7), 만노스8(Man8) 및 만노스9(Man9)를 함유할 수 있다.

[0004] 중국 햄스터 난소(CHO) 숙주 세포에 의해 발현된 재조합 당단백질의 글리코폼이 고유한 유전자 인자에 의해 주로 결정되지만, 고수준 만노스 글리코폼 함량은 또한 세포 배양 조건에 의해 영향받을 수 있다(Pacis, et al., (2011) *Biotechnol Bioeng* 108, 2348-2358).

[0005] 글리코실화는 재조합 단백질 약물의 치료 효능에 영향을 미칠 수 있다. 치료적 당단백질의 생체활성, 약동학, 면역원성, 용해도 및 생체내 클리어런스에 대한 글리코실화의 영향은 생물 약제 제조를 위한 중요한 매개변수인 글리코실화를 모니터링 및 제어하게 하였다. 치료적 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량은 특정 치료적 항체의 약동학적 특성에 영향을 미치는 것으로 발견된 중요한 품질 속성이다(Goetze, et al., (2011) *Glycobiology* 21, 949-59; Yu, et al., (2012) *Mabs* 4, 475-87). 따라서, 치료적 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량을 제어하기 위한 방법이 유리할 것이다.

[0006] 약제학적 산업에서 재조합 치료 당단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량을 조작 및 제어하기 위한 필요가 있으며, 이를 투약하기 위한 방법은 유용할 것이다. 본 발명은 숙주 세포 내 오르니틴 대사를 조절함으로써 재조합 당단백질의 고만노스 글리코폼 함량을 조작하기 위한 방법을 제공한다.

발명의 내용

[0007] 본 발명은 숙주 세포 내 오르니틴 대사를 조절하는 조건하에서 세포 배양물 내 재조합 단백질을 발현시키는 숙주 세포를 배양시키는 단계를 포함하는 재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량을 조작하는 방법을 제공한다.

[0008] 일 실시형태에서, 숙주 세포 내 오르니틴 대사는 숙주 세포에서 오르니틴의 축적을 감소시킴으로써 조절된다. 관련된 실시형태에서, 숙주 세포에서 오르니틴 축적은 아르기나제 저해제 또는 스페르민을 함유하는 세포 배양 배지에서 숙주 세포를 배양시킴으로써 조절된다. 다른 관련된 실시형태에서, 숙주 세포에서 오르니틴 축적은 세포 배양 배지에 대한 아르기나제 저해제의 첨가를 통해 조절된다. 다른 관련된 실시형태에서, 아르기나제 저해제는 BEC (S-(2-보로노에틸)-1-시스테인) 또는 DL-a-다이플루오로메틸오르니틴이다. 다른 관련된 실시형태에서, 아르기나제 저해제는 BEC (S-(2-보로노에틸)-1-시스테인)이다. 다른 관련된 실시형태에서, 아르기나제 저해제는 DL-a-다이플루오로메틸오르니틴이다. 다른 관련된 실시형태에서, 아르기나제 저해제의 농도는 적어도 10 μ M이다. 다른 관련된 실시형태에서, 아르기나제 저해제의 농도는 10 μ M 내지 2mM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기나제 저해제의 농도는 10 μ M이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기나제 저해제의 농도는 0.5mM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기나제 저해제의 농도는 1mM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기나제 저해제의 농도는 2mM이다.

[0009] 다른 실시형태에서, 숙주 세포 내 오르니틴 축적은 35 μ M 이하의 스페르민을 세포 배양 배지에 첨가함으로써 조절된다. 관련된 실시형태에서, 스페르민의 농도는 7 μ M 내지 35 μ M이다. 다른 관련된 실시형태에서, 스페르민의 농도는 17 μ M 내지 35 μ M이다. 다른 관련된 실시형태에서, 스페르민의 농도는 7 μ M 내지 17 μ M이다. 다른 관련된 실시형태에서, 스페르민의 농도는 35 μ M이다. 다른 관련된 실시형태에서, 스페르민의 농도는 17 μ M이다. 다른 관련된 실시형태에서, 스페르민의 농도는 7 μ M이다.

[0010] 다른 실시형태에서, 숙주 세포 내 오르니틴 대사는 숙주 세포 내 오르니틴의 축적을 증가시킴으로써 조절된다. 관련된 실시형태에서, 숙주 세포 내 오르니틴 축적은 오르니틴, 아르기닌, 오르니틴 데카복실라제 저해제, 오르니틴 아미노트랜스퍼라제 저해제, 일산화질소 신타제 저해제 또는 아르기닌 데카복실라제 저해제를 함유하는 세포 배양 배지에서 숙주 세포를 배양시킴으로써 조절된다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 숙주 세포 내 오르니틴 축적은 세포 배양 배지에 대한 적어도 0.6mM 오르니틴의 첨가에 의해 조절된다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 오르니틴의 농도는 0.6 내지 14.8mM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 오르니틴의 농도는 6 내지 14.8mM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 오르니틴의 농도는 0.6mM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 오르니틴의 농도는

6mM이다.

[0011] 또 다른 관련된 실시형태에서, 오르니틴의 농도는 14.8mM이다. 다른 실시형태에서, 숙주 세포 내 오르니틴 축적은 세포 배양 배지에 대한 적어도 8.7mM 아르기닌의 첨가에 의해 조절된다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기닌의 농도는 8.7mM 내지 17.5mM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기닌의 농도는 8.7mM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기닌의 농도는 17.5mM이다.

[0012] 다른 실시형태에서, 숙주 세포 내 오르니틴 축적은 세포 배양 배지에 대한 오르니틴 데카복실라제 저해제, 일산화질소 신타제 저해제, 오르니틴 아미노트랜스퍼라제 저해제, 또는 아르기닌 데카복실라제 저해제의 첨가를 통해 조절된다. 관련된 실시형태에서 숙주 세포 내 오르니틴 축적은 세포 배양 배지에 대한 오르니틴 데카복실라제 저해제의 첨가를 통해 조절된다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 오르니틴 데카복실라제 저해제는 알파-데플루오로메틸오르니틴(DMFO)이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 오르니틴 데카복실라제 저해제는 피페론일 뷰톡사이드(PBO)이다.

[0013] 다른 관련된 실시형태에서, 숙주 세포 내 오르니틴 축적은 세포 배양 배지에 대한 오르니틴 아미노트랜스퍼라제 저해제의 첨가를 통해 조절된다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 오르니틴 아미노트랜스퍼라제 저해제는 5-플루오로메틸오르니틴(F-FMO_n)이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 숙주 세포는 세포 배양 배지에 대한 일산화질소 신타제 저해제의 첨가를 통해 조절된다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 일산화질소 신타제 저해제는 2-에틸-2-티오슈도유레아 또는 N-나이트로-L-아르기닌 및 L^G-모노메틸-L-아르기닌이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 일산화질소 신타제 저해제는 N-나이트로-L-아르기닌 및 L^G-모노메틸-L-아르기닌이다.

[0014] 다른 관련된 실시형태에서, 숙주 세포 내 오르니틴 축적은 세포 배양 배지에 대한 아르기닌 데카복실라제 저해제의 첨가를 통해 조절된다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기닌 데카복실라제 저해제는 비대칭 다이메틸-아르기닌(ADMA)이다.

[0015] 본 발명은 세포 배양물에서 재조합 단백질을 발현시키는 숙주 세포를 발현시키는 숙주 세포를 배양시키는 단계를 포함하는, 고수준 만노스 글리코폼 함량은 감소된 재조합 단백질의 생성 방법을 제공하고, 오르니틴 대사는 숙주 세포 내 오르니틴 축적을 감소시킴으로써 조절된다. 관련된 실시형태에서 숙주 세포 내 오르니틴 축적은 아르기나제 저해제 또는 스페르민을 함유하는 세포 배양 배지에서 숙주 세포를 배양시킴으로써 감소된다.

[0016] 관련된 실시형태에서 숙주 세포 내 오르니틴 축적은 세포 배양 배지에 아르기나제 저해제의 첨가를 통해 감소된다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기나제 저해제는 BEC (S-(2-보로노에틸)-1-시스테인) 또는 DL-a-다이플루오로메틸오르니틴이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기나제 저해제는 BEC (S-(2-보로노에틸)-1-시스테인)이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기나제 저해제는 DL-a-다이플루오로메틸오르니틴이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기나제 저해제는 적어도 10 μM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기나제 저해제는 10 μM 내지 2mM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기나제 저해제는 10 μM 내지 20 μM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기나제 저해제는 10 μM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기나제 저해제는 0.5mM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기나제 저해제는 1mM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기나제 저해제는 2mM이다.

[0017] 다른 실시형태에서, 숙주 세포 내 오르니틴 축적은 세포 배양 배지에서 35 μM 이하의 스페르민을 함유하는 세포 배양 배지에서 숙주 세포를 배양시킴으로써 감소된다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 스페르민의 농도는 7 μM 내지 35 μM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 스페르민의 농도는 17 μM 내지 35 μM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 스페르민의 농도는 0.07mL / ℓ 내지 0.17 mL / ℓ이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 스페르민의 농도는 35 μM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 스페르민의 농도는 17 μM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 스페르민의 농도는 7 μM이다.

[0018] 본 발명은 세포 배양물에서 재조합 단백질을 발현시키는 숙주 세포를 배양시키는 단계를 포함하는, 고수준 만노스 글리코폼 함량이 증가된 재조합 단백질의 생성 방법을 제공하고, 오르니틴 대사는 숙주 세포 내 오르니틴 축적을 증가시킴으로써 조절된다. 관련된 실시형태에서 숙주 세포 내 오르니틴 축적은 세포 배양 배지에 오르니틴, 아르기닌, 오르니틴 데카복실라제 저해제, 오르니틴 아미노트랜스퍼라제 저해제, 일산화질소 신타제 저해제 또는 아르기닌 데카복실라제 저해제를 첨가함으로써 증가된다.

[0019] 다른 관련된 실시형태에서 숙주 세포 내 오르니틴 축적은 적어도 0.6mM의 오르니틴을 함유하는 세포 배양 배지에서 숙주 세포를 배양시킴으로써 증가된다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 오르니틴의 농도는 0.6 내지 14.8mM

이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 오르니틴의 농도는 6 내지 14.8mM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 오르니틴의 농도는 0.6mM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 오르니틴의 농도는 6mM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 오르니틴의 농도는 14.8mM이다.

[0020] 다른 관련된 실시형태에서, 숙주 세포 내 오르니틴 축적은 적어도 8.7mM 아르기닌을 함유하는 세포 배양 배지에서 숙주 세포를 배양시킴으로써 증가된다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기닌의 농도는 8.7mM 내지 17.5mM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기닌의 농도는 8.7mM이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기닌의 농도는 17.5mM이다.

[0021] 다른 관련된 실시형태에서, 오르니틴 축적은 오르니틴 데카복실라제 저해제, 일산화질소 신타제 저해제, 오르니틴 아미노트랜스퍼라제 저해제 또는 아르기닌 데카복실라제 저해제를 함유하는 세포 배양 배지에서 숙주 세포를 배양시킴으로써 숙주 세포에서 증가된다. 다른 관련된 실시형태에서 숙주 세포 내 오르니틴 축적-세포는 오르니틴 데카복실라제 저해제를 함유하는 세포 배양 배지에서 숙주 세포를 배양시킴으로써 증가된다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 오르니틴 데카복실라제 저해제는 알파-데플루오로메틸오르니틴(DMFO)이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 오르니틴 데카복실라제 저해제는 피페론일 뷰톡사이드(PBO)이다.

[0022] 다른 관련된 실시형태에서, 숙주 세포 내 오르니틴 축적은 오르니틴 아미노트랜스퍼라제 저해제를 함유하는 세포 배양 배지에서 숙주 세포를 배양시킴으로써 증가된다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 오르니틴 아미노트랜스퍼라제 저해제는 5-플루오로메틸오르니틴(F-FMOrn)이다.

[0023] 다른 관련된 실시형태에서, 숙주 세포에서 오르니틴 축적은 일산화질소 신타제 저해제를 함유하는 세포 배양 배지에서 숙주 세포를 배양시킴으로써 증가된다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 일산화질소 신타제 저해제는 2-에틸-2-티오슈도유레아 또는 N-나이트로-L-아르기닌 및 L^G-모노메틸-L-아르기닌이다.

[0024] 다른 실시형태에서, 숙주 세포 내 오르니틴 축적은 아르기닌 데카복실라제 저해제를 함유하는 세포 배양 배지에서 숙주 세포를 배양시킴으로써 증가된다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 아르기닌 데카복실라제 저해제는 비대칭 다이메틸- 아르기닌(ADMA)이다.

[0025] 다른 실시형태에서, 재조합 단백질을 발현시키는 숙주 세포는 배취(batch) 배양, 유가 배양, 관류 배양, 또는 이들의 조합에서 배양된다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 배양은 관류 배양이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 관류는 연속적 관류를 포함한다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 관류 속도는 일정하다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 관류는 1일당 1.0 이하의 작업 용적의 속도로 수행된다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 관류는 교번의 접선 유동에 의해 수행된다.

[0026] 다른 실시형태에서, 재조합 단백질을 발현시키는 숙주 세포는 생물반응기에서 배양된다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 생물반응기는 용량이 적어도 500 ℥이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 생물반응기는 용량이 적어도 500 ℥ 내지 2000 ℥이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 생물반응기는 용량이 적어도 1000 ℥ 내지 2000 ℥이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 생물반응기는 적어도 0.5×10^6 개 세포/ml로 접종된다.

[0027] 다른 실시형태에서, 재조합 단백질을 발현시키는 숙주 세포는 무혈청 세포 배양 배지에서 배양된다. 다른 관련된 실시형태에서, 무혈청 배양 배지는 관류 세포 배양 배지이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 숙주 세포는 포유류 세포이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 숙주 세포는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포이다.

[0028] 다른 실시형태에서, 재조합 단백질은 당단백질이다. 다른 실시형태에서, 재조합 단백질은 인간 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 재조합 융합 단백질 또는 사이토카인으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0029] 다른 실시형태에서, 상기 방법은 숙주 세포에 의해 생성된 재조합 단백질을 채취하는 단계를 추가로 포함한다.

[0030] 다른 실시형태에서, 숙주 세포에 의해 생성된 재조합 단백질은 정제되고 약제학적으로 허용가능한 제제로 제형화된다.

[0031] 다른 실시형태에서, 임의의 상기 방법에 의해 생성된 재조합 단백질을 제공한다. 관련된 실시형태에서, 재조합 단백질이 정제된다. 다른 실시형태에서, 재조합 단백질은 약제학적으로 허용가능한 제제로 제형화된다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 오르니틴 대사 개요를 도시한 도면. ARG, 아르기나제; AZ, 안티자임; AZIN, 안티자임 저해제; P5C, 피롤린-5-카복실레이트; ASP, 아스팔테이트; ORNT, 오르니틴 수송체; GATM, 글라이신 아미디노트랜스퍼라제; NOS,

일산화질소 신타제; OAT, 오르니틴 아미노트랜스페라제; ODC, 오르니틴 데카복실라제; OTC, 오르니틴 트랜스카바모일라제; SMS, 스페르민 신타제; SRS, 스페르미딘 신타제.

도 2는 고수준 만노스 글라이칸 수준과 관련된 대사 마커로서 오르니틴의 동정을 도시한 도면. 배지 #1(A) 또는 배지 #2(B) 하에 평가된 유가 공정의 제8일(D8, 백색 막대), 제9일(D9, 회색 막대) 및 제10일(D10, 검정색 막대)에 검출한 8개의 상이한 세포주(세포주 A 내지 H)로부터 분비된 재조합 단클론성 항체의 고수준 만노스 글라이칸 수준(HM%). 고수준 만노스 글라이칸 수준과 세포외 오르니틴 수준 사이의 상관관계를 소모 배지(C)에서 검출하였다. 평균 제9일 오르니틴 수준과 8개 세포주로부터의 고수준 만노스 글라이칸 수준을 비교하였다. 피어슨(Pearson)의 R-값, R=0.83.

도 3은 고수준 만노스와 세포외 오르니틴 수준 사이의 상관관계: A) 세포주 H가 8가지 상이한 생성 조건(#1 내지 #8)에 노출되었을 때, 검출된 고수준 만노스 글리코폼 함량. B) 대응하는 세포외 상대적 오르니틴 수준. C) 고수준 만노스 글리코폼 함량%와 세포외 상대적 오르니틴 수준 사이의 상관관계. 피어슨의 R-값, R=0.78.

도 4는 제3일, 제6일, 제8일, 제9일 및 제10일에 8개의 상이한 세포주로부터 수집한 세포 펠렛으로부터의 아르기나제 1의 상대적 mRNA 발현 수준을 도시한 도면. 대응하는 고수준 만노스 글리코폼 함량을 또한 나타낸다.

도 5는 0, 7, 17, 35 및 100 μM 의 농도에서 스페르민 테트라염산염을 함유하는 세포 배양 배지에서 성장시킨 세포에 의해 발현된 재조합 당단백질에 대한 고수준 만노스 글리코폼 함량을 도시한 도면. 샘플을 모의 관류 분석의 제5일에 수집하였다. 35 μM 샘플은 대조군으로서 작용하였다.

도 6은 0, 7, 17, 35 및 100 μM 의 농도에서 스페르민 테트라염산염에 노출된 세포 배양물에 의해 내인성으로 생성된 세포외 오르니틴(mg/ℓ)의 농도를 도시한 도면. 샘플을 모의 관류 분석의 제5일에 수집하였다. 35 μM 샘플은 대조군으로서 작용하였다.

도 7은 0, 0.6, 6 및 14.8mM의 농도에서 L-오르니틴 일염산염을 함유하는 세포 배양 배지에서 성장시킨 세포에 의해 발현된 재조합 당단백질에 대한 고수준 만노스 글리코폼 함량을 도시한 도면. 샘플을 모의 관류 분석의 제5일에 수집하였다. 0mM 샘플은 대조군으로서 작용하였다.

도 8은 0.1g/ ℓ L-오르니틴 일염산염(검정색 막대)을 함유하는 세포 배양 배지 또는 외인성으로 첨가된 오르니틴을 함유하지 않는 대조군 세포 배양물(백색 막대)에서 성장시킨 세포주 "I"에 의해 발현된 재조합 당단백질에 대한 고수준 만노스 글리코폼 함량을 도시한 도면. 샘플을 제6일, 제8일 및 제12일에 수집하였다.

도 9는 2.2, 4.4, 6.5, 8.7 및 17.5mM의 농도로 아르기닌 일염산염을 함유하는 세포 배양 배지에서 성장시킨 세포에 의해 발현된 재조합 당단백질에 대한 고수준 만노스 글리코폼 함량을 도시한 도면. 8.7mM 샘플은 대조군으로서 작용하였다. 샘플을 모의 관류 분석의 제4일에 수집하였다.

도 10은 1, 10 및 20 μM 의 농도로 다양한 아르기나제 저해제: BEC 염산염(BEC), DL-a, 디아플루오로메틸오르니틴 염산염(DL-a), N^G-하이드록시-L-아르기닌 모노아세테이트 염(NG) 및 N^ω-하이드록시-노르-아르기닌 디아아세테이트 염(Nw)으로 보충한 세포 배양 배지에서 성장시킨 세포에 의해 발현된 재조합 당단백질에 대한 고수준 만노스 글리코폼 함량. 대조군은 저해제를 함유하지 않음. 샘플을 모의 관류 분석의 제4일에 수집하였다.

도 11은 0.0, 0.01 및 0.5mM의 농도로 아르기나제 저해제 BEC 염산염(BEC) 및 0.0, 0.01, 1.0 및 2.0mM의 농도로 DL-a, 디아플루오로메틸오르니틴 염산염(DL-a)을 함유하는 세포 배양 배지에서 성장시키는 세포에 의해 발현된 재조합 당단백질에 대한 고수준 만노스 글리코폼 함량을 도시한 도면. 샘플을 모의 관류 분석의 제4일에 수집하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 발현된 재조합 당단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량은 숙주 세포 내 오르니틴 축적에 의해 영향받았으며, 그 결과 숙주 세포 내 오르니틴 대사를 조절함으로써 조작될 수 있다는 것을 발견하였다.

[0034] 오르니틴은 요소회로, 폴리아민 합성 및 아르기닌 대사에 수반된 비단백질 암호화 아미노산이다. 오르니틴은 또한 오르니틴- δ -아미노트랜스페라제(OAT) 활성을 통한 글루타메이트 및 프롤린의 전구체이다(도 1 참조). 인간에서, OAT의 결핍증은 망막 변성 및 혈장 오르니틴 축적을 특징으로 하는 장애인 맥락막 및 망막의 뇌회형맥락 망막 위축(GA)을 초래한다(Takki K et al., Br J Ophthalmol. 1974; 58(11): 907-16). OAT-결핍증의 마우스 모델에서, 아르기닌 제한 식이요법은 혈장 오르니틴 수준을 감소시키고 망막 변성을 예방하는 것으로 나타났다(Wang T et al., PNAS 2000; 97(3): 1224-1229). 오르니틴의 푸트레신으로의 전환을 촉매하는 오르니틴 데카복

실라제(ODC)는 폴리아민 생합성 경로의 속도 제한 효소이다(Pegg A, JBC. 2006; 281(21): 14529-14532). ODC 합성 및 안정성뿐만 아니라 폴리아민 수송체 활성은 환경의 삼투 조건에 의해 영향을 받는다(Munro G et al., BBA 1975; 411(2): 263-281; Tohyama et al., Eur J Biochem. 1991; 202(3):1327-1331; Michell J et al., 1998; 329:453-459). 증가된 폴리아민 생합성은 식물에서의 삼투 스트레스에 대한 증가된 내성과 관련되었다 (Alcazar R et al., Biotechnol Lett 2006; 28:1867-1876). 오르니틴의 시트룰린으로의 전환은 요소회로의 부분으로서 오르니틴 트랜스카바밀라제(OTC)에 의해 촉매된다. 인간에서 OTC 결핍증은 혈액 중에서 암모니아의 축적을 야기한다(Hopkins et al., Arch Dis Childh., 1969 44:143-148). 오르니틴 대사는 사이토졸과 미토콘드리아 둘 다에서 생기며, OTC와 OAT 촉매된 대사 단계는 미토콘드리아에서 일어난다. 미토콘드리아 오르니틴 수송체 ORNT1은 오르니틴의 미토콘드리아로의 유출에 필요하다. 인간에서, ORNT1의 돌연변이는 오르니틴 및 암모니아의 상승된 혈장 수준을 특징으로 하는 고오르니틴혈증-항암모니아혈증-호모시트룰린뇨증(HHH) 증후군을 초래한다(Camacho et al., Nat Genet (1999); 22:151-158); (Valle D et al., 2001, 1857-1896).

[0035] 본 명세서에서 상기 기재한 바와 같이, 세포 배양 배지에서 오르니틴의 세포외 수준에 의해 측정된 바와 같이 숙주 세포 내 오르니틴 축적 정도는 발현된 재조합 당단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량과 상관관계가 있는 것을 발견하였다. 고수준 만노스 함량의 조작은 숙주 세포 내 오르니틴 대사를 조절함으로써 수행될 수 있었다. 본 발명은 숙주 세포 내 오르니틴 대사를 조절하는 조건하에서 세포 배양물에서 재조합 단백질을 발현시키는 숙주 세포를 배양시키는 단계를 포함하는 재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량을 조작하는 방법을 제공한다. 오르니틴 대사는 숙주 세포에서 오르니틴의 축적을 감소 또는 증가시킴으로써 조절될 수 있다. 세포 배양 물에서 재조합 단백질을 발현시키는 숙주 세포를 배양시키는 단계를 포함하는 재조합 단백질의 생성 방법이 본 명세서에서 제공되며, 고수준 만노스 글리코폼 함량은 감소 또는 증가되고, 숙주 세포 내 오르니틴 축적은 조절된다.

[0036] 오르니틴 대사는 오르니틴 생합성, 수송, 대사 과정 및 대사 전환에 수반된 화학적 또는 효소적 반응 및 경로를 지칭한다. 요소회로, 폴리아민 합성, 크레아틴 합성, 및 미토콘드리아 오르니틴 대사 경로는 오르니틴 대사의 예이다. 개요는 도 1에서 제공된다.

[0037] 숙주 세포 내 오르니틴 축적은 변용된 오르니틴 대사의 결과이다. 숙주 세포 내 오르니틴 축적 정도는 오르니틴 대사를 조절함으로써 조절될 수 있다. 세포내 대사 수준은 세포외 수준에서 반영될 수 있다(즉, 세포 배양 배지에서 검출됨). 숙주 세포 내 오르니틴 축적의 지표는 세포 배양 배지 내로 분비된 오르니틴의 양을 측정함으로써 만들어질 수 있다. 본 명세서에 기재한 바와 같이, 오르니틴 수준에서 시간-과정 의존적 증가가 외인성 오르니틴이 없는 세포 배양 배지에서 발견되었다.

[0038] "고수준 만노스 글리코폼 함량", "고수준 만노스 글라이칸 수준" 및 "고수준 만노스 종의 수준"은 상호호환적으로 사용되며, 약어 "HM", "HM%", "HMN" 또는 "HMN%"로 표기되고, 조합된 만노스5(Man5), 만노스6(Man6), 만노스7(Man7), 만노스8(Man8) 및 만노스9(Man9) 글라이칸 종의 상대적 백분율을 지칭한다.

[0039] 세포 배양 배지로 분비된 오르니틴 수준은 세포 배양물에서 숙주 세포에 의해 발현된 재조합 당단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량과 상관관계가 있다는 것을 발견하였다. 숙주 세포에서 오르니틴의 축적이 아르기나제 저해제 또는 스페르민을 함유하는 세포 배양 배지에서 숙주 세포를 배양함으로써 감소되었을 때, 발현된 당단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량은 감소되었다. 숙주 세포 내 오르니틴 축적이 오르니틴 또는 아르기닌을 함유하는 세포 배양 배지에서 숙주 세포를 배양시킴으로써 증가되었을 때, 발현된 당단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량은 증가되었다.

[0040] 본 발명은 아르기나제 저해제를 함유하는 세포 배양 배지에서 숙주 세포를 배양함으로써 숙주 세포 내 오르니틴 축적을 조절하는 방법을 제공한다. 아르기닌은 오르니틴의 대사 전구체이며 아르기나제는 아르기닌의 오르니틴으로의 전환을 촉매하는 효소이다. 상이한 세포주의 대사 프로파일과 발현 프로파일을 비교하였을 때 아르기나제 mRNA 발현 수준은 오르니틴 축적의 양과 상관관계가 있다는 것을 관찰하였다. 아르기나제 저해제를 이용한 아르기나제 활성의 차단은 오르니틴 생성 수준을 잠재적으로 감소시킬 수 있었다. 그러나, 아르기나제 저해제의 유효성은 세포 배양 배지 내의 고수준의 아르기닌에 기인하여 순상될 수 있다. 추가로, 오르니틴 축적에 기여할 수 있는 오르니틴의 다른 대사 전구체(즉, 글루타메이트 및 프롤린, 도 1 참조)가 있다.

[0041] 본 명세서에 기재한 바와 같이, 배양된 숙주 세포에 의해 발현된 재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량은 세포 배양 배지에 아르기나제 저해제를 첨가함으로써 조절될 수 있다는 것을 발견하였다. 아르기나제의 활성을 차단하는 것은 숙주 세포에서 오르니틴 생성의 양을 감소시키고, 발현된 재조합 당단백질의 고수준 만노스 글라이칸 수준을 저하시켰다.

- [0042] 아르기나제는 또한 오르니틴 트랜스카바모일라제(OTC)를 저해한다(Vissers et al., (1982) J. Gen. Microbiol. 128:1235-1247). 아르기나제의 활성을 저해하는 것은 아르기닌으로부터 오르니틴 생성을 감소시킬 뿐만 아니라 OTC 활성의 억제를 잠재적으로 없애서 오르니틴을 시트룰린으로 전환시키고 오르니틴 축적의 추가적인 감소를 가능하게 할 수 있었다(도 1 참조).
- [0043] OTC 결핍증을 지니는 환자에서, 암모니아 수준은 증가된다. 고 수준의 고수준 만노스 글라이칸을 이용하는 재조합 단백질을 발현시키는 숙주 세포주에서 향상된 아르기나제 발현 또는 활성을 OTC 저해를 유도하고, 이는 또한 암모니아 수준 증가를 초래한다. 암모니아의 세포내 수준의 증가는 골지체의 pH 구배를 잠재적으로 변용시키고, 글리코실 전달효소의 차선 재국소화를 유도해서, 골지 복합체에서의 불완전한 글리칸 분지화에 기인하여 고 수준의 고수준 만노스 글라이칸을 초래할 수 있었다(Campbell et al., (1973) NJM 288 (1):1-6; Hopkins et al., (1969) Archive of Disease in Childhood 44(234):143-148; Mühling et al., (2001) Amino Acids 21(3):303-318; Park et al., (2000) J. Biotechnol. 81(2):129-140; Rivinoja et al., (2009) J. Cell Physiol. 220(1):144-154; 및 Axelsson et al., (2001) Glycobiology 11(8):633-644).
- [0044] 유용한 아르기나제 저해제는 당업계에 공지되어 있으며, 상업적 공급원으로부터 입수가능하다. 이러한 아르기나제 저해제는 BEC 염산염; DL- α , 다이플루오로메틸오르니틴 염산염; N^G-하이드록시-L-아르기닌 및 N ω -하이드록시-노르-아르기닌을 포함한다. 일 실시형태에서, 아르기나제 저해제는 BEC (S-(2-보로노에틸)-1-시스테인) 또는 DL- α -다이플루오로메틸오르니틴이다. 본 발명의 일 실시형태에서, 아르기나제 저해제는 BEC (S-(2-보로노에틸)-1-시스테인)이다. 본 발명의 일 실시형태에서, 아르기나제 저해제는 DL- α -다이플루오로메틸오르니틴이다.
- [0045] 아르기나제 저해제는 생성률에 상당하게 영향을 미치는 일 없이 발현된 재조합 단백질의 고수준 만노스 글라이칸 수준을 감소시키기 위해 적어도 10 μ M의 농도로 세포 배양 배지에 첨가될 수 있다. 일 실시형태에서, 아르기나제 저해제의 농도는 10 μ M 내지 2mM이다. 다른 실시형태에서, 아르기나제 저해제의 농도는 10 μ M이다. 다른 실시형태에서, 아르기나제 저해제의 농도는 0.5mM이다. 다른 실시형태에서, 아르기나제 저해제의 농도는 1mM이다. 다른 실시형태에서, 아르기나제 저해제의 농도는 2mM이다.
- [0046] 숙주 세포 내 오르니틴 축적은 또한 이하의 실시예에 기재하는 바와 같이 스페르민을 함유하는 세포 배양 배지에서 숙주 세포를 배양함으로써 조절될 수 있다. 오르니틴 데카복실라제(ODC)의 작용을 통해 오르니틴은 폴리아민 푸트레신, 스페르미딘 및 스페르민의 폴리아민 경로 및 합성을 위한 시작점이다. 외인성으로 첨가된 스페르민은 직접적으로 또는 안티자임을 통해 ODC를 불활성화시키기 위해 사용될 수 있다(도 1 참조). ODC의 불활성화는 이하에 기재한 바와 같이 오르니틴의 축적을 야기할 수 있다. 외인성으로 첨가된 스페르민의 양을 제한함으로써, ODC 활성의 억제는 완화될 수 있고, 오르니틴은 폴리아민 경로를 통해 대사됨으로써 전반적인 숙주 세포 내 오르니틴 축적을 감소시킬 수 있다.
- [0047] 생성률에 상당히 영향을 미치는 일 없이 발현된 재조합 단백질의 고수준 만노스 글라이칸 수준을 감소시키기 위해 스페르민이 35 μ M 이하의 농도로 세포 배양 배지에 첨가될 수 있다. 일 실시형태에서, 스페르민의 농도는 7 μ M 내지 35 μ M이다. 일 실시형태에서, 스페르민의 농도는 17 μ M 내지 35 μ M이다. 일 실시형태에서, 스페르민의 농도는 7 μ M 내지 17 μ M이다. 다른 실시형태에서, 스페르민의 농도는 35 μ M이다. 다른 실시형태에서, 스페르민의 농도는 17 μ M이다. 다른 실시형태에서, 스페르민의 농도는 7 μ M이다.
- [0048] 오르니틴 대사를 조절하기 위한 다른 방법은 오르니틴의 축적을 증가시키는 것이다. 일 실시형태에서, 본 발명은 오르니틴, 아르기닌, 오르니틴 데카복실라제 저해제, 오르니틴 아미노트랜스퍼라제 저해제, 일산화질소 신타제 저해제 또는 아르기닌 데카복실라제 저해제를 함유하는 세포 배양 배지에서 숙주 세포를 배양시킴으로써 숙주 세포에서 오르니틴 축적을 조절하는 단계를 제공한다.
- [0049] 본 명세서에 기재한 바와 같이, 조건화된 세포 배양 배지에서 세포외 오르니틴의 수준은 재조합 당단백질에 대한 고수준 만노스 글라이칸 수준과 상관관계가 있는 것을 발견하였다. 오르니틴을 함유하는 세포 배양 배지에서 재조합 단백질을 발현시키는 숙주 세포를 배양시키는 단계는 증가된 수준의 고수준 만노스 글라이칸을 갖는 재조합 당단백질을 초래하였다는 것을 발견하였다.
- [0050] 상기 기재한 바와 같이, 세포 배양 배지 내 오르니틴 축적은 오르니틴 대사의 결함 유전자(예를 들어, OTC 결핍증 또는 ORNT1 돌연변이)를 운반하는 환자와 유사하게 암모니아의 축적을 야기할 수 있는 오르니틴 대사의 변용을 반영할 가능성이 있다. 암모니아 유도된 고수준 만노스 증가 뒤의 세포 메커니즘은 알려져 있지 않지만, 골지에서 pH 구배의 변용은 글리코실 전달효소의 차선 재국소화를 야기할 수 있다는 것이 시사되었다. 이들 변화

는 완전한 글리칸 분지화에 대한 글리코실화 효소의 감소된 이용가능성을 야기할 수 있었고, 따라서 더 고수준의 고수준 만노스 글라이칸 수준을 초래한다.

[0051] 다른 가능성은 오르니틴 축적이 잠재적으로 산화환원 항상성의 교란을 유도한다는 것이다(Zanatta et al., (2013) Life sciences 93(4): 161-168). 오르니틴은 고수준 만노스와 양의 상관관계가 있는데 이는 고수준 만노스 글리코폼 함량이 세포의 산화환원 상태에 의해 조절되는 가능성을 시사한다. 오르니틴은 지질 산화 수준을 증가시킬 수 있다. 다수의 글리코실화 조절 효소는 결합된 지질막이기 때문에, 오르니틴 축적에 의해 야기되는 지질 산화의 변용은 골지 및 ER에서 글리코실화 조절 효소의 무결함 및 활성을 잠재적으로 변용시키고, 후속적으로 고수준 만노스 글리코폼 함량에 영향을 미칠 수 있었다.

[0052] 생성률에 상당히 영향을 미치는 일 없이 발현된 재조합 단백질의 고수준 만노스 글라이칸 수준을 증가시키기 위해 오르니틴은 적어도 0.6mM의 농도로 세포 배양 배지에 첨가될 수 있다. 일 실시형태에서, 오르니틴의 농도는 0.6mM 내지 14.8mM이다. 일 실시형태에서, 오르니틴의 농도는 6mM 내지 14.8mM이다. 다른 실시형태에서, 오르니틴의 농도는 0.6mM이다. 다른 실시형태에서, 오르니틴의 농도는 6mM이다. 다른 실시형태에서, 오르니틴의 농도는 14.8mM이다.

[0053] 아르기닌은 오르니틴의 대사 전구체이다. 고수준 만노스 글라이칸 수준은 외인성 아르기닌을 함유하는 세포 배양 배지에서 배양시킨 숙주 세포에서 발현된 재조합 단백질에서 증가된다는 것을 발견하였다. 외인성 아르기닌 양의 증가는 오르니틴 합성에 대해 이용가능한 대사 전구체의 양을 증가시킴으로써 숙주 세포 내 오르니틴 수준을 증가시켰다.

[0054] 본 발명은 생성률에 상당히 영향을 미치는 일 없이 발현된 재조합 단백질의 고수준 만노스 글라이칸 수준을 증가시키기 위해 적어도 8.7mM의 농도로 아르기닌을 첨가함으로써 숙주 세포 내 오르니틴 축적을 조절하는 것을 제공한다. 일 실시형태에서, 아르기닌의 농도는 8.7 내지 17.5mM이다. 다른 실시형태에서, 아르기닌의 농도는 8.7mM이다. 다른 실시형태에서, 아르기닌의 농도는 17.5mM이다.

[0055] 오르니틴 축적은 오르니틴 데카복실라제(ODC), 오르니틴 아미노트랜스퍼라제(OAT), 일산화질소 신타제(NOS) 또는 아르기닌 데카복실라제(ADC)의 저해제의 세포 배양 배지에 대한 첨가를 통해 조절됨으로써, 재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량을 조작하기 위한 숙주 세포 내 오르니틴 대사 및 오르니틴의 축적을 조절하는 방법을 제공할 수 있다.

[0056] 오르니틴 축적은 ODC 및 OAT와 같은 오르니틴 대사 효소의 활성을 차단함으로써 증가될 수 있다(도 1 참조). ODC에 특이적인 소분자 저해제, 예컨대 알파-다이플루오로메틸오르니틴(DFMO) 및 피페론일 뷔톡사이드(PBO)는 상업적으로 입수 가능하다. OAT는 5-플루오로메틸오르니틴(5-FMOrn) T에 의해 차단된다(Daune et al., 1988, Biochem J. 253:481-488). 본 발명은 재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량을 조작하기 위해 숙주 세포 내 오르니틴 축적을 증가시키는 이를 저해제로 세포 배양물을 보충하는 것을 제공한다.

[0057] 오르니틴 축적은 아르기닌 축적을 조절하는 효소의 활성을 차단함으로써 조절될 수 있다(도 1). 소분자 저해제, 예컨대 2-에틸-2-티오슈도유레아 및 N-나이트로-L-아르기닌 및 L⁶-모노메틸-L-아르기닌에 의해 일산화질소 신타제의 활성을 저해하는 것 및/또는 비대칭 다이메틸-아르기닌(ADMA)에 의해 아르기닌 데카복실라제 활성을 저해하는 것은 아르기닌으로부터 오르니틴 전환의 유입을 향상시킬 수 있다. 본 발명은 재조합 단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량을 조작하기 위해 숙주 세포 내 오르니틴 축적을 증가시키는 이를 저해제로 세포 배양물을 보충하는 것을 제공한다.

[0058] 본 발명의 일 실시형태가 제공되며, 단 세포 배양 배지는 무혈청 세포 배양 배지이다. 일 실시형태에서, 세포 배양 배지는 관류 세포 배양 배지이다.

[0059] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "세포 배양 배지"(또한 "배양 배지", "세포 배양 배지", "조직 배양 배지"로 불림)는 성장하는 세포, 예를 들어 동물 또는 포유류 세포에 대해 사용되는 임의의 영양액을 지칭하며, 일반적으로 다음으로부터의 적어도 하나 이상의 구성성분을 제공한다: 에너지 공급원(보통 글루코스와 같은 탄수화물의 형태로); 모든 필수 아미노산 중 하나 이상, 그리고 일반적으로 20종의 염기성 아미노산 + 시스테인; 전형적으로 저농도로 필요한 비타민 및/또는 다른 유기 화합물; 지질 또는 유리 지방산; 및 미량 원소, 예를 들어, 전형적으로 매우 저농도로, 보통 마이크로몰 범위로 필요한 무기 화합물 또는 천연 유래 원소.

[0060] 영양액은 선택적으로 세포의 성장을 최적화하기 위해, 배양될 세포의 필요조건 및/또는 목적으로 하는 세포 배양물 매개변수에 따라서, 추가적인 구성성분, 예컨대 호르몬 및 다른 성장 인자, 예를 들어, 인슐린, 트랜스페

린, 표피성장인자, 혈청 등; 염, 예를 들어, 칼슘, 마그네슘 및 인산염, 및 완충제, 예를 들어, HEPES; 뉴클레오사이드 및 염기, 예를 들어, 아데노신, 티미딘, 하이포크산틴; 및 단백질 및 조직 가수분해물, 예를 들어, 가수분해된 동물 단백질(동물 부산물, 정제된 젤라틴 또는 식물 물질로부터 얻을 수 있는 펩톤 또는 펩톤 혼합물); 항생제, 예를 들어, 겐타마이신; 세포 보호제 또는 계면활성제, 예를 들어, 플루로닉(Pluronic)(등록상표) F68; 폴리아민, 예를 들어, 푸트레신, 스퀘르미딘 또는 스퀘르민(예를 들어, WIPO 공개 번호 WO 2008/154014) 및 피루브산염(예를 들어, 미국 특허 제8053238호)으로 보충될 수 있다.

- [0061] 세포 배양 배지는 전형적으로 임의의 세포 배양 공정, 예컨대 이하로 제한되는 것은 아니지만 배취, 확장된 배취, 유가 배양 및/또는 관류 또는 세포의 연속적 배양에서 사용되고/되거나 상기 임의의 세포 배양 공정과 함께 사용하기 위한 것으로 공지된 것을 포함한다.
- [0062] 세포 배양 배지 구성성분은 분말 배지 제형으로 완전히 분쇄될 수 있고; 필요하다면 세포 배양 배지에 첨가된 액체 보충물과 함께 부분적으로 분쇄될 수 있거나; 또는 영양분이 완전히 액체 형태로 세포 배양물에 첨가될 수 있다.
- [0063] "베이스"(또는 배취) 세포 배양 배지는 전형적으로 세포 배양을 개시하기 사용되고 세포 배양을 지원하기에 충분히 완전한 세포 배양 배지를 지칭한다.
- [0064] "성장" 세포 배양 배지는 "성장기"인 대수 증식기 기간 동안 세포 배양물에서 전형적으로 사용되고, 이 단계 동안 세포 배양을 지원하기에 충분히 완전한 세포 배양 배지를 지칭한다. 성장 세포 배양 배지는 또한 숙주 세포 주내로 혼입된 선택가능한 마커에 대해 내성 또는 생존을 부여하는 선택 작용제를 함유할 수 있다. 이러한 선택 작용제는 제네티신(G4118), 네오마이신, 하이그로마이신 B, 퓨로마이신, 제오신, 메티오닌, 세포 세포 배양 배지를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0065] "생성" 세포 배양 배지는 대수 증식기가 끝나고 이행기 및 생성기 동안 단백질 생성이 이어질 때 세포 배양에서 전형적으로 사용되고, 이들 단계에서 목적으로 하는 세포 밀도, 생존도 및/또는 생성물 역ガ를 유지하기에 충분히 완전한 세포 배양 배지를 지칭한다.
- [0066] "관류" 세포 배양 배지는 관류 또는 연속적 배양 방법에 의해 유지되는 세포 배양에서 전형적으로 사용되고 이 과정 동안 세포 배양을 지원하기에 충분히 완전한 세포 배양 배지를 지칭한다. 관류 세포 배양 배지 제형은 소모 배지를 제거하기 위해 사용되는 방법을 제공하기 위해 베이스 세포 배양 배지 제형보다 풍부화되거나 또는 더 농축될 수 있다. 관류 세포 배양 배지는 성장기와 생성기 둘 다의 동안에 사용될 수 있다.
- [0067] 농축된 세포 배양 배지는 세포 배양을 유지하는데 필수적인 일부 또는 모든 영양분을 함유할 수 있고; 특히, 농축 배지는 세포 배양물의 생성기의 과정 동안 소모될 것으로 동정되거나 또는 알려진 영양분을 함유할 수 있다. 농축 배지는 거의 모든 임의의 세포 배양 배지 제형에 기반할 수 있다. 이러한 농축 공급 배지는, 예를 들어, 그들의 정상적인 양의 약 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 30X, 50X, 100X, 200X, 400X, 600X, 800X 또는 심지어 약 1000X로 세포 배양 배지의 일부 또는 모든 구성성분을 함유할 수 있다.
- [0068] 세포 배양물은 또한 세포 배양물 중에서 제형화되기 어렵거나 또는 빠르게 고갈될 수 있는 특정 영양분의 독립적 농축 공급물로 보충될 수 있다. 이러한 영양분은 아미노산, 예컨대 타이로신, 시스테인 및/또는 시스틴일 수 있다(예를 들어, WIPO 공개 번호 2012/145682 참조). 일 실시형태에서, 타이로신의 농축 용액은 독립적으로 세포 배양물 내 타이로신의 농도가 8mM을 초과하지 않도록 타이로신을 함유하는 세포 배양 배지에서 성장된 세포 배양물에 공급된다. 다른 실시형태에서, 타이로신 및 시스틴의 농축 용액은 독립적으로 타이로신, 시스틴 또는 시스테인이 없는 세포 배양 배지에서 성장 중인 세포 배양물에 공급된다. 독립적 공급은 생성기 전에 또는 시작 시에 시작될 수 있다. 독립적 공급은 농축 공급 배지와 동일 또는 상이한 날에 세포 배양 배지에 유가배양에 의해 수행될 수 있다. 독립적 공급은 또한 관류 배지와 동일 또는 상이한 날에 관류될 수 있다.
- [0069] 특정 실시형태에서, 세포 배양 배지는 무혈청이고/하거나 동물 유래의 생성물 또는 성분이 없다. 특정 실시형태에서, 세포 배양 배지는 모든 화학적 구성성분이 공지된 경우 화학적으로 정해진다.
- [0070] 전문가에 의해 인식될 바와 같이, 동물 또는 포유류 세포는 배양될 특정 세포에 적합한 배지에서 배양되고 과도한 실험 없이 당업자에 의해 결정될 수 있다. 상업적으로 입수가능한 배지가 이용될 수 있고, 이스코브 변형 둘 베코 배지, RPMI 1640, 최소 필수 배지-알파. (MEM-알파), 둘베코 변형 이글 배지(DMEM), DME/F12, 알파 MEM, 이글 BSS를 이용하는 기초 배지 이글, DMEM 고글루코스(글루타민 있음), DMEM 고글루코스(글루타민 없음), DMEM 저글루코스(글루타민 없음), DMEM:F12 1:1(글루타민 있음), GMEM(글래스고(Glasgow's) MEM), GMEM(글루타민 있음)

음), 그레이스 완전 곤충 배지, 그레이스 곤충 배지(FBS 없음), 함(Ham's) F-10(글루타민 있음), 함 F-12(글루타민 없음), HEPES 및 글루타민이 있는 IMDM, HEPES가 있고 글루타민은 없는 IMDM, IP41 곤충 배지, 15(레보비츠)(2X)(글루타민 없음) 또는 폐놀 레드, 15(레보비츠)(글루타민 없음), 맥코이 5A 변형 배지, 배지 199, MEM 이글(글루타민 없음) 또는 폐놀 레드(2X), MEM 이글-얼(Eagle-Earle) BSS(글루타민 있음), MEM 이글-얼 BSS(글루타민 없음), MEM 이글-핸크스 BSS(글루타민 없음), NCTC-109(글루타민 있음), 리히터 CM 배지(글루타민 있음), RPMI 1640(HEPES, 글루타민 및/또는 폐니실린-스트렙토마이신 있음), RPMI 1640(글루타민, RPMI 1640 있고, 글루타민 없음), 슈나이더 곤충 배지(Schneider's Insect Medium) 또는 특정 세포 유형에 대해 제형화되는 당업자에게 공지된 임의의 다른 배지를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 앞서 언급한 예시적 배지에 필요하거나 또는 요망된다면 그리고 일상적인 기술을 이용하여 당업자에게 공지되어 있고 실행될 적절한 농도 또는 양으로 선택적 구성성분을 포함하는 보충적 구성성분 또는 성분이 첨가될 수 있다.

[0071] 본 발명의 일 실시형태가 제공되며, 단, 숙주 세포가 포유류 세포이다. 일 실시형태에서, 숙주 세포는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포이다.

[0072] 본 발명에서 사용되는 세포주(또한 "숙주 세포"로서 지칭됨)는 상업적 또는 과학적 관심 대상의 폴리펩타이드를 발현시키기 위해 유전자 공학처리된다. 세포주는 전형적으로 제한되지 않은 동안 배양물에서 유지될 수 있는 1차 배양물로부터 생기는 계통으로부터 유래된다. 세포는, 예를 들어 형질전환, 형질감염, 감염 또는 주사를 통해 도입된, 배양 과정에서 발현 및 생성을 위해 단백질을 암호화하는 암호화 서열 또는 이의 일부를 보유하는 발현 벡터(작제물), 예컨대 플라스미드 등을 함유할 수 있다. 이러한 발현 벡터는 삽입된 암호화 서열의 전사 및 번역에 필수적인 구성요소를 함유한다. 당업자에게 잘 공지되어 있고 실행되는 방법은 생성된 단백질 및 폴리펩타이드를 암호화하는 서열뿐만 아니라 적절한 전사 및 번역 제어 요소를 함유하는 발현 벡터를 구성하기 위해 사용될 수 있다. 이를 방법은 시험관내 재조합 DNA 기법, 합성 기법, 및 생체내 유전자 재조합을 포함한다. 이러한 기법은 문헌[J. Sambrook et al., 2012, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 4th edition Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. 또는 임의의 이전의 판; F. M. Ausubel et al., 2013, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y. 또는 임의의 이전의 판; Kaufman, R.J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990]에 기재되어 있으며, 이들 모두는 본 명세서에 임의의 목적을 위해 포함된다.

[0073] 동물 세포, 포유류 세포, 배양 세포, 동물 또는 포유류 숙주 세포, 숙주 세포, 재조합 세포, 재조합 숙주 세포 등은 본 발명의 방법에 따라 배양될 수 있는 세포에 대한 모든 용어이다. 이러한 세포는 전형적으로 포유류로부터 얻어지거나 또는 유래되는 세포주이고, 본 명세서에 기재된 것과 같은 적절한 영양분 및/또는 다른 인자를 함유하는 배지에서 단층 배양물 또는 혼탁 배양물 중 하나에 위치될 때 성장 및 생존할 수 있다. 단백질을 발현 및 분비할 수 있거나 또는 다량의 특정 단백질, 더 구체적으로는 관심 대상의 당단백질을 배양 배지 내로 발현 및 분비하도록 분자적으로 공학처리될 수 있는 세포가 전형적으로 선택된다. 숙주 세포에 의해 생성된 단백질은 숙주 세포에 대해 내인성이거나 또는 상동성일 수 있다는 것이 이해될 것이다. 대안적으로, 단백질은 숙주 세포, 예를 들어, 중국 햄스터 난소(CHO) 숙주 세포에 의해 생성 및 분비된 인간 단백질에 대해 이종성, 즉, 외래이다. 추가적으로, 포유류 단백질, 즉, 포유류 유기체로부터 본래 얻어지거나 또는 유래된 것은 본 발명의 방법에 의해 달성되고, 세포에 의해 배양 배지 내로 분비될 수 있다.

[0074] 본 발명의 방법은 다양한 세포의 배양에서 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 배양 세포는 진핵 세포, 예컨대 식물 및/또는 동물 세포이다. 세포는 포유류 세포, 어류 세포, 곤충 세포, 양서류 세포 또는 조류 세포일 수 있다. 배양물 내 성장에 적합한 매우 다양한 포유류 세포주는 미국 미생물 보존센터(American Type Culture Collection, 버지니아주 매너서스에 소재) 및 다른 기탁기관뿐만 아니라 상업적 판매사로부터 입수가능하다. 본 발명의 과정에서 사용될 수 있는 세포는 MK2.7 세포, PER-C6 세포, 중국 햄스터 난소 세포(CHO), 예컨대 CHO-K1(ATCC CCL-61), DG44(Chasin et al., 1986, *Som. Cell Molec. Genet.*, 12:555-556; Kolkekkar et al., 1997, *Biochemistry*, 36:10901-10909; 및 WO 01/92337 A2), 다이하이드로엽산 환원효소 음성 CHO 세포(CHO/-DHFR, 문헌[Urlaub and Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216]), 및 dp12.CHO 세포(미국 특허 제 5,721,121호); 원숭이 신장 세포(CV1, ATCC CCL-70); SV40에 의해 형질감염된 원숭이 신장 CV1 세포(COS 세포, COS-7, ATCC CRL-1651); HEK 293 세포, 및 Sp2/0 세포, 5L8 혼성세포, 다우디(Daudi) 세포, EL4 세포, 헬라(HeLa) 세포, HL-60 세포, K562 세포, 주카트(Jurkat) 세포, THP-1 세포, Sp2/0 세포, 1차 상피 세포(예를 들어, 케라틴 세포, 자궁 경부 상피 세포, 기관지 상피 세포, 기관 상피 세포, 신장 상피 세포 및 망막 상피 세포) 및 확립된 세포주 및 그들의 균주(예를 들어, 인간 배아 신장 세포(예를 들어, 293 세포, 또는 혼탁 배양 물에서 성장을 위해 서브클로닝한 293 세포, Graham et al., 1977, *J. Gen. Virol.*, 36:59); 새끼 햄스터 신장

세포(BHK, ATCC CCL-10); 마우스 세르툴리 세포(TM4, Mather, 1980, *Biol. Reprod.*, 23:243-251); 인간 자궁경부 암종 세포(HELA, ATCC CCL-2); 개신장 세포(MDCK, ATCC CCL-34); 인간 폐 세포(W138, ATCC CCL-75); 인간 간종양 세포(HEP-G2, HB 8065); 마우스 유선 종양 세포(MMT 060562, ATCC CCL-51); 베팔로 래트 간세포(BRL 3A, ATCC CRL-1442); TRI 세포(Mather, 1982, *Annals NY Acad. Sci.*, 383:44-68); MCR 5 세포; FS4 세포; PER-C6 망막 세포, MDBK(NBL-1) 세포, 911 세포, CRFK 세포, MDCK 세포, BeWo 세포, Chang 세포, 디트로이트(Detroit) 562 세포, 헬라 229 세포, 헬라 S3 세포, Hep-2 세포, KB 세포, LS 180 세포, LS 174T 세포, NCI-H-548 세포, RPMI 2650 세포, SW-13 세포, T24 세포, WI-28 VA13, 2RA 세포, WISH 세포, BS-C-I 세포, LLC-MK₂ 세포, 클론 M-3 세포, 1-10 세포, RAG 세포, TCMK-1 세포, Y-1 세포, LLC-PK₁ 세포, PK(15) 세포, GH₁ 세포, GH₃ 세포, L2 세포, LLC-RC 256 세포, MH₁C₁ 세포, XC 세포, MDOK 세포, VSW 세포, 및 TH-I, B1 세포, 또는 이들의 유도체), 임의의 조직 또는 기관(심장, 간, 신장, 결장, 장, 식도, 위, 신경 조직(뇌, 척수), 폐, 혈관 조직(동맥, 정맥, 모세관), 림프 조직(림프선, 아테노이드, 편도, 골수 및 혈액), 비장을 포함하지만, 이들로 제한되지 않음)으로부터의 섬유아세포, 및 섬유아세포 및 섬유아세포-유사 세포주(예를 들어, TRG-2 세포, IMR-33 세포, Don 세포, GHK-21 세포, 시트룰린혈증 세포, 덤프시(Dempsey) 세포, 디트로이트 551 세포, 디트로이트 510 세포, 디트로이트 525 세포, 디트로이트 529 세포, 디트로이트 532 세포, 디트로이트 539 세포, 디트로이트 548 세포, 디트로이트 573 세포, HEL 299 세포, IMR-90 세포, MRC-5 세포, WI-38 세포, WI-26 세포, MiC1₁ 세포, CV-1 세포, COS-1 세포, COS-3 세포, COS-7 세포, 아프리카 그린 원숭이 신장 세포(베로-76, ATCC CRL-1587; 베로, ATCC CCL-81); DBS-FrhL-2 세포, BALB/3T3 세포, F9 세포, SV-T2 세포, M-MSV-BALB/3T3 세포, K-BALB 세포, BLO-11 세포, 노르-10 세포, C₃H/IOTI/2 세포, HSDM₁C₃ 세포, KLN205 세포, 맥코이 세포, 마우스 L 세포, 균주 2071(마우스 L) 세포, L-M 균주(마우스 L) 세포, L-MTK(마우스 L) 세포, NCTC 클론 2472 및 2555, SCC-PSA1 세포, 스위스/3T3 세포, 인디안 문탁(Indian muntac) 세포, SIRC 세포, C₁₁ 세포, 및 엔센(Jensen) 세포, 또는 이들의 유도체) 당업자에게 공지된 임의의 다른 세포 유형을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0075] 세포는 단백질, 예를 들어 항체의 부착, 단일층 또는 혼탁 배양, 형질감염 및 발현에 적합할 수 있다. 세포는 배취, 유가배양 및 관류 또는 연속적 배양 방법에 의해 사용될 수 있다.

[0076] 본 발명의 일 실시형태에서, 재조합 단백질을 발현시키는 숙주 세포는 생물반응기에서 배양된다. 본 발명의 다른 실시형태에서, 생물반응기는 용량이 적어도 500 ℥이다. 관련된 실시형태에서, 생물반응기는 용량이 적어도 500 ℥ 내지 2000 ℥이다. 또 다른 관련된 실시형태에서, 생물반응기는 용량이 적어도 1000 ℥ 내지 2000 ℥이다. 본 발명의 일 실시형태에서, 세포 배양물은 무혈청 배양 배지에서 적어도 0.5×10^6 개 세포/ml로 생물반응기를 접종함으로써 확립된다. 일 실시형태에서, 본 발명은 숙주 세포에 의해 생성된 재조합 단백질을 채취하는 단계를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서 본 발명은 숙주 세포에 의해 생성된 재조합 단백질이 경제되고 약제학적으로 허용가능한 제제로 제형화된다는 것을 제공한다.

[0077] 또한 제한 없이 이해의 목적을 위해, 단백질 생성을 위한 세포 배양물 및 배양 실행은 3가지의 일반적 유형; 즉, 배취 배양, 연장된 배취, 유가 배양, 관류 배양 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다는 것이 당업자에 의해 인식될 것이다. 배취 배양에서, 세포는 초기에 배지에서 배양되고, 이 배지는 제거, 대체 또는 보충되지 않으며, 즉, 세포는 배양 실행의 마지막 동안 또는 전에 새로운 배지로 "공급"되지 않는다. 목적으로 하는 생성물은 배양 실행의 마지막에 채취된다.

[0078] 유가 배양에 대해, 배양 실행 시간은 실행 동안 새로운 배지로 매일 1회 이상(또는 연속적으로) 배양 배지를 보충함으로써 증가되고, 즉, 세포는 배양 기간 동안 새로운 배지("공급 배지")로 "공급"된다. 유가 배양은 상기 기재한 바와 같은 다양한 공급 요법 및 시간, 예를 들어 매일, 격일로, 이틀마다 등, 1일 1회 이상 또는 1일당 1회 미만 등을 포함할 수 있다. 추가로, 유가 배양은 공급 배지로 연속적으로 공급될 수 있다. 이어서, 목적으로 하는 생성물은 배양/생성 실행의 마지막에 채취된다.

[0079] 관류 배양은 세포 배양물이 새로운 관류 배지를 받고 소모된 배지가 제거되는 것이다. 세포 배양물 내로 새로운 배지의 관류 및 소모된 배지의 제거는 연속적, 단계적, 간헐적 또는 이를 중 임의의 또는 모두의 조합일 수 있다. 관류 속도는 1일당 1회 미만의 작업 용적으로부터 1일당 다수의 작업 용적까지의 범위일 수 있다. 바람직하게는, 세포는 배양물에서 보유되고, 제거된 소모 배지는 세포가 실질적으로 없거나 또는 배양물보다 상당히 더 소수의 세포를 가진다. 세포 배양물에 의해 발현된 재조합 단백질은 또한 배양물에 보유될 수 있거나 또는 소모 배지에 의해 제거될 수 있다. 소모 배지의 제거는 원심분리, 침강 또는 여과를 포함하는 다수의 수단에 의해 수행될 수 있다(예를 들어 문헌[Voisard et al., (2003), Biotechnology and Bioengineering 82:751-65] 참조).

바람직한 여과 방법은 교번의 접선 유동 여과이다. 교번의 접선 유동은 ATF 장치를 이용하여 중공사 필터 모듈을 통해 배지를 펌핑함으로써 유지된다. 예를 들어 미국 특허 제6,544,424호; 문헌[Furey (2002) Gen. Eng. News. 22 (7), 62-63] 참조. 필터는 크기 또는 분자량을 기준으로 입자를 분리시킨다. 적용에 따라서, 필터는 기공 크기 또는 분자량 컷오프(molecular weight cut off: MWCO) 값을 기준으로 선택될 수 있다. 필터는 막 필터, 세라믹 필터 및 금속 필터를 포함하고, 나권형 또는 관형 또는 시트형을 포함하는 임의의 형상일 수 있다.

[0080] 용어 "관류 유속"은 생물반응기로부터 통과된, 전형적으로 주어진 시간에 작업 용적의 일부 또는 몇 배로 발현된 배지의 양이다. "작업 용적"은 세포 배양물에 대해 사용된 생물반응기 용적의 양을 지칭한다. 일 실시형태에서, 관류 유속은 1일당 1 작업 용적 이하이다.

[0081] 세포 배양은 동물 또는 포유류 세포 배양을 위해 통상적으로 사용되는 배양관 및/또는 배양 장치를 이용하여 재조합 단백질의 소규모 내지 대규모 생성을 위한 조건하에 수행될 수 있다. 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 조직 배양 접시, T-플라스틱 및 스피너 플라스틱은 전형적으로 실험실 작업 규모로 사용된다. 대규모 장비 상에서 배양을 위해, 예컨대 이하로 제한되는 발효기형 탱크 배양 장치, 에어리프트형 배양 장치, 유동층 생물반응기, 중공사 생물반응기, 롤러 보틀 배양, 교반 탱크 생물반응기 시스템, 충전층 유형 배양 장치, 및 일회용 백 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 적합한 장치가 사용될 수 있다. 마이크로dash은 롤러 보틀 또는 교반 탱크 생물반응기 시스템과 함께 사용될 수도 있고 사용되지 않을 수도 있다. 시스템은 배취, 유가배양 또는 관류/연속 방식으로 작동될 수 있다. 추가로, 배양 장치 또는 시스템은 필터, 중력, 원심분리력 등을 이용하는 세포 분리기와 같은 추가적인 장치를 구비할 수 있다.

[0082] 재조합 단백질의 생성은 다단계 배양 공정으로 행해질 수 있다. 다단계 공정에서, 세포는 2 이상의 별도의 단계로 배양된다. 예를 들어, 세포는 처음에 세포 증식 및 생존도를 최소화하는 환경 조건하에 하나 이상의 성장기에서 배양될 수 있고, 이어서 단백질 생성을 최대화하는 조건하에 생성기로 이행될 수 있다. 포유류 세포에 의한 재조합 단백질의 생성을 위한 상업적 공정에서 최종 생성 배양에 선행하는 상이한 배양 용기(N-x 내지 N-1)에서 생기는, 통상적으로 다수의, 예를 들어, 적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 성장기가 있다. 성장 및 생성기는 하나 이상의 이행기에 의해 선행되거나, 분리될 수 있다. 생성기는 대규모로 수행될 수 있다.

[0083] 용어 세포 배양물의 "성장기"는 기하급수적 세포 성장 기간(즉, 대수기)을 지칭하며, 여기서 세포는 일반적으로 빠르게 분열된다. 세포는 약 1일 또는 약 2일 또는 약 3일, 또는 약 4일, 또는 4일 이상의 기간동안 성장기에서 유지된다. 세포가 성장기에서 유지되는 시간의 지속기간은, 예를 들어 세포유형 및 세포의 성장 속도 및 배양 조건에 기반하여 다를 것이다.

[0084] 용어 "이행기"는 성장기와 생성기 사이의 기간을 지칭한다. 일반적으로, 이행기는 배양 조건이 성장기로부터 생성기까지의 이동을 지원하도록 제어될 수 있는 동안의 시간이다. 제어될 수 있는 다양한 세포 배양물 매개변수는 온도, 삼투질 농도, 비타민, 아미노산, 당, 킵톤, 암모늄 및 염 중 하나 이상을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0085] 세포 배양물의 용어 "생성기"는 세포 성장이 안정 상태를 유지되는 시간 기간을 지칭한다. 대수 세포 성장은 전형적으로 이 단계 전에 또는 이 단계 동안에 끝나며, 단백질 생성을 이어 받는다. 유가배양 및 관류 세포 배양 공정은 이 단계에서 목적으로 하는 세포 밀도, 생존도 및 생성물 역가를 달성 및 유지하기 위해 세포 배양 배지를 보충하거나 또는 새로운 배지를 제공한다. 생성기는 대규모로 수행될 수 있다. 대규모 세포 배양은 적어도 약 100, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 8000, 10,000, 15,000, 20,000 리터의 용적으로 유지될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 생성기는 500 l, 1000 l 및/또는 2000 l 생물반응기에서 수행된다.

[0086] 전형적으로 최종 생성 배양에 선행하는 세포 배양은 2개의 선행기, 즉, 과종 및 접종 과정을 고려한다. 과종 과정기(N-X)는 소규모로 일어나며, 여기서 세포는 숫자상으로 빠르게 확장된다. 접종 과정기(N-1)에서, 세포는 생성 생물반응기에 대한 접종물, 예컨대 적어도 0.5×10^6 개 세포/ml의 접종물을 생성하도록 추가로 확장된다. 과종 및 N-1 과정은 임의의 배양 방법, 전형적으로 배취 세포 배양에 의해 생성될 수 있다. $>15 \times 10^6$ 개 세포/ml 초기의 N-1 세포 밀도는 전형적으로 생성 생물반응기를 과종하기 위한 것이다. 더 높은 N-1 세포 밀도는 생성 생물반응기에서 목적으로 하는 세포 밀도에 도달하는데 필요한 시간을 감소시키거나 또는 심지어 제거할 수 있다. 더 높은 N-1 세포 밀도를 달성하기 위한 바람직한 방법은 교번의 접선 유동 여과를 이용하는 관류 배양이다. 교번의 접선 유동 여과를 이용하는 관류 공정에 의해 성장된 N-1 세포 배양물은 임의의 목적으로 하는 밀도, 예컨대 90×10^6 개 세포/ml 이상의 밀도로 세포를 제공할 수 있다. N-1 세포 배양물은 단일 볼루스 접

종 배양물을 생성하기 위해 사용될 수 있거나 또는 다중 생성 생물반응기를 접종하기 위해 유지된 롤링 종자 저 장액 배양물로서 사용될 수 있다. 접종 밀도는 생성된 재조합 단백질 수준에 대한 긍정적 영향을 가질 수 있다. 생성물 수준은 접종 밀도가 증가함에 따라 증가되는 경향이 있다. 역가의 개선은 더 높은 접종 밀도와 관련될 뿐만 아니라, 생성되는 세포의 대사 및 세포 주기 상태에 의해 영향받을 가능성이 있다.

[0087] 용어 "세포 밀도"는 주어진 용적의 배양 배지 내 세포의 수를 지칭한다. "살아있는 세포 밀도"는 표준 생존도 분석(예컨대 트립판 블루 염료 배제 방법)에 의해 결정되는 바와 같은 배양 배지의 주어진 용적에서의 살아있는 세포의 수를 지칭한다. 용어 "압축세포용적"(packed cell volume: PCV)은 또한 "압축세포용적 백분율"(PCV%)로서 지칭되며, 세포 배양물의 총 용적에 대한 세포에 의해 점유되는 용적의 비(백분율로서 표현)이다(문헌 [Stettler, et al., (2006) Biotechnol Bioeng. Dec 20:95(6):1228-33] 참조). 압축세포용적은 세포 밀도 및 세포 직경의 함수이며; 압축세포용적의 증가는 세포 밀도 또는 세포 직경 중 하나 또는 둘 다의 증가로부터 생길 수 있었다. 압축세포용적은 세포 배양물 내의 고체 수준의 측정이다.

[0088] 생성 동안, 성장기는 생성기보다 고온에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 성장기는 제1 온도 설정값 약 35°C 내지 약 38°C에서 일어날 수 있고, 생성기는 제2 온도 설정값 약 29°C 내지 약 37°C, 선택적으로 약 30°C 내지 약 36°C 또는 약 30°C 내지 약 34°C에서 일어날 수 있다.

[0089] 추가로, 단백질 생성의 화학적 유도자, 예컨대 카페인, 뷰티레이트 및/또는 혼사메틸렌 비스아세트아마이드(HMBA)는 온도 이동과 동시에, 전에 또는 후에 첨가될 수 있다. 유도자가 온도 이동 후에 첨가된다면, 그들은 온도 이동 후에 1시간 내지 5일에, 선택적으로 온도 이동 후 1일 내지 2일에 첨가될 수 있다. 세포 배양물은 며칠 또는 심지어 몇 주 동안 유지될 수 있는 반면, 세포는 목적으로 하는 단백질(들)을 생성할 수 있다.

[0090] 목적으로 하는 생리적 상태에서 세포를 유지하기 위한 다른 방법은 낮은 L-아스파라긴 조건에 대한 세포 배양물의 노출에 의해 세포 성장저지를 유도하는 것이다(예를 들어, WIPO 공개 번호 WO2013/006479 참조). 세포 성장 저지는 세포 배양물에서 제한된 농도의 L-아스파라긴을 함유하고 저농도의 L-아스파라긴을 유지하는 배양 배지를 통해 달성 및 유지될 수 있다. L-아스파라긴의 농도를 5mM 이하로 유지하는 것은 세포를 성장 저지 상태로 유지하기 위해 사용될 수 있고, 이에 의해 생성률은 증가된다.

[0091] 세포 주기 진행 및 전사, DNA 수선, 분화, 노화 및 이와 관련된 세포자멸사의 관련된 과정을 조절하는 것으로 알려지거나 또는 의심되는 화합물인 세포 주기 저해제는 또한 세포 성장 저지를 유도하는데 유용하다. 주기 메커니즘과 상호작용하는 세포 주기 저해제, 예컨대 사이클린-의존적 키나제(CDK)는 다른 경로, 예컨대 세포 주기에 직접적으로 또는 간접적으로 영향을 미치는 AKT, mTOR 및 다른 경로로부터의 단백질과 상호작용하는 해당 분자와 같이 유용하다.

[0092] 본 발명의 방법에 적합한 세포 배양 조건은 pH, 용존산소(O_2), 및 이산화탄소(CO_2), 교반 및 습도 및 온도에 주의를 두고 세포의 배취, 유가배양 또는 관류(연속) 배양 또는 해당 방법의 임의의 조합을 위해 전형적으로 사용되고 공지된 것이다.

[0093] 본 발명의 방법은 관심 대상의 재조합 단백질을 발현시키는 세포를 배양시키기 위해 사용될 수 있다. 발현된 재조합 단백질은 그들이 회수 및/또는 수집될 수 있는 배양 배지 내로 분비될 수 있다. 추가로, 단백질은 당업계에 공지된 및/또는 상업적 판매사로부터 입수 가능한 공지된 과정 및 제품을 이용하여 이러한 배양물 또는 구성 성분으로부터(예를 들어, 배양 배지로부터) 정제 또는 부분적으로 정제될 수 있다. 이어서, 정제된 단백질은 "제형화"될 수 있는데, 이는 완충제가 약제학적으로 허용 가능한 제형으로 교환되고, 멜균, 벌크-포장되고/되거나 최종 사용자를 위해 포장될 수 있다는 것을 의미한다. 약제학적으로 허용 가능한 제형은 희석제, 담체, 용해제, 유화제, 보존제 및/또는 애주번트를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 제형을 제조하는 것은 당업자의 기술 내이며, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. 1995, Mack Publishing Company, Easton, PA]에 기재된 것을 포함한다.

[0094] 본 발명의 일 실시형태에서 재조합 단백질이 당단백질인 것이 제공된다. 본 발명의 일 실시형태에서 재조합 단백질이 인간 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 재조합 융합 단백질 또는 사이토카인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 제공된다. 또한 본 발명의 방법에 의해 생성된 재조합 단백질이 제공된다. 일 실시형태에서 재조합 단백질은 약제학적으로 허용 가능한 제제로 제형화된다.

[0095] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "펩타이드", "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 전체적으로 상호호환적으로 사용되고, 펩타이드 결합에 의해 서로 결합된 2 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 문자를 지칭한다. 펩타이드, 폴리펩타이드 및 단백질은 또한 당단백질을 생성하는 글리코실화, 지질 부착, 황산화, 글루탐산 잔기의 감마-카복실

화, 하이드록실화 및 ADP-리보실화를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 변형을 포함한다.

[0096] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "당단백질"은 항체를 포함하고, 만노스 잔기를 포함하는 적어도 하나의 올리고당 측쇄를 갖는 웨타이드 및 단백질을 지칭한다. 당단백질은 숙주 세포에 대해 상동성일 수 있거나, 또는 이용될 숙주 세포, 예를 들어 중국 햄스터 난소(CHO) 숙주 세포에 의해 생성된 인간 당단백질에 대해 이종성, 즉, 외래일 수 있다. 이러한 당단백질은 일반적으로 "재조합 당단백질"로서 지칭된다. 특정 실시형태에서, 숙주 세포에 의해 발현되는 당단백질은 배지 내로 직접적으로 분비된다.

[0097] 단백질은 단백질계 약물을 포함하는 과학적 또는 상업적 관심대상을 가질 수 있다. 단백질은 특히 항체, 융합 단백질 및 사이토카인을 포함한다. 웨타이드, 폴리웨타이드 및 단백질은 세포 배양 방법을 이용하여 재조합 동물 세포주에 의해 생성될 수 있고, "재조합 웨타이드", "재조합 폴리웨타이드" 및 "재조합 단백질"로서 지칭될 수 있다. 발현 단백질(들)은 세포내로 생성되거나 또는 그것이 회수 및/또는 수집될 수 있는 배양 배지 내로 분비될 수 있다.

[0098] 본 발명의 방법에 의해 유리하게 생성될 수 있는 포유류 단백질의 비제한적 예는 다음의 단백질 중 모두 또는 하나의 부분과 동일하거나 또는 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 포함한다: 종양 괴사 인자(TNF), flt3 리간드(WO 94/28391), 에리스로포이에틴, 트롬보포이에틴, 칼시토닌, IL-2, 앤지오포이에틴-2(Maisonpierre et al. (1997), *Science* 277(5322): 55-60), NF-카파 B의 수용체 활성제에 대한 리간드(RANKL, WO 01/36637), 종양 괴사 인자 (TNF)-관련 세포자멸사-유발 리간드(TRAIL, WO 97/01633), 흥선 간질-유래 림포포이에틴, 과립구 집락 자극인자, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF, 호주 특허 제588819호), 비만 세포 성장 인자, 줄기 세포 성장 인자(미국 특허 제6,204,363호), 표피성장인자, 캐라틴세포 성장 인자, 대핵세포 성장 및 발생 인자, RANTES, 인간 피브리노겐-유사 2 단백질(FGL2; NCBI 수탁 번호 NM_00682; Rüegg and Pytela (1995), *Gene* 160:257-62) 성장 호르몬, 인슐린, 인슐리노트로핀, 인슐린-유사 성장 인자, 부갑상선 호르몬, α-인터페론, γ-인터페론, 및 공통 인터페론을 포함하는 인터페론(미국 특허 제4,695,623호 및 제4,897471호), 신경성장인자, 뇌-유래 신경영양인자, 시냅토태그민-유사 단백질(SLP 1-5), 뉴로트로핀-3, 글루카곤, 인터류킨, 콜로니 자극 인자, 림포톡신-β, 백혈병 저해 인자, 및 온코스타틴-M. 본 발명의 방법에 따라 생성될 수 있는 단백질의 설명은, 예를 들어, 문헌[*Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research, all volumes* (Aggarwal and Gutterman, eds. Blackwell Sciences, Cambridge, MA, 1998); *Growth Factors: A Practical Approach* (McKay and Leigh, eds., Oxford University Press Inc., New York, 1993); 및 *The Cytokine Handbook, Vols. 1 and 2* (Thompson and Lotze eds., Academic Press, San Diego, CA, 2003)]에서 찾을 수 있다.

[0099] 추가적으로 본 발명의 방법은 임의의 상기 언급한 단백질에 대한 수용체, 이러한 수용체에 대한 길항체의 아미노산 서열의 모두 또는 일부를 포함하는 단백질 또는 임의의 상기 언급한 단백질, 및/또는 이러한 수용체 또는 길항체와 실질적으로 유사한 단백질 중 모두 또는 일부를 포함하는 단백질을 생성하는데 유용할 것이다. 이들 수용체 및 길항체는 종양 괴사 인자 수용체의 형태 둘 다(TNFR, p55 및 p75, 미국 특허 제5,395,760호 및 미국 특허 제5,610,279호로서 지칭됨), 인터류킨-1(IL-1) 수용체(I형 및 II형; 유럽 특허 제0460846호, 미국 특허 제4,968,607호 및 미국 특허 제5,767,064호), IL-1 수용체 길항체(미국 특허 제6,337,072호), IL-1 길항체 또는 저해제(미국 특허 제5,981,713호, 제6,096,728호 및 제5,075,222호) IL-2 수용체, IL-4 수용체(유럽 특허 제0 367 566호 및 미국 특허 제5,856,296호), IL-15 수용체, IL-17 수용체, IL-18 수용체, Fc 수용체, 과립구 대식 세포 콜로니 자극 인자 수용체, 과립구 집락 자극인자 수용체, 온코스타틴-M 및 백혈병 저해 인자에 대한 수용체, NF-카파 B의 수용체 활성제(RANK, WO 01/36637호 및 미국 특허 제6,271,349호), 오스테오프로테게린(미국 특허 제6,015,938호), TRAIL에 대한 수용체(TRAIL 수용체 1, 2, 3 및 4를 포함) 및 사멸 도메인을 포함하는 수용체, 예컨대 Fas 또는 세포자멸사-유도 수용체(AIR)를 포함한다.

[0100] 본 발명을 이용하여 생성될 수 있는 다른 단백질은 분화 항원(CD 단백질로서 지칭됨) 또는 그들의 리간드의 아미노산 서열 중 모두 또는 일부를 포함하는 단백질 또는 이들 중 하나와 실질적으로 유사한 단백질을 포함한다. 이러한 항원은 문헌[*Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani et al., eds., Kobe, Japan, 1996)*]에 개시되어 있다. 유사한 CD 단백질은 후속적 작업에서 개시된다. 이러한 항원의 예는 CD22, CD27, CD30, CD39, CD40 및 이에 대한 리간드(CD27 리간드, CD30 리간드 등)를 포함한다. 몇몇 CD 항원은 또한 41BB 및 OX40을 포함하는 TNF 수용체 패밀리의 구성원이다. 리간드는 종종 41BB 리간드 및 OX40 리간드와 같은 TNF 패밀리의 구성원이다.

[0101] 또한 본 발명을 이용하여 효소적으로 활성인 단백질 또는 그들의 리간드가 생성될 수 있다. 예는 다음의 단백질

또는 그들의 리간드 중 하나의 모두 또는 일부를 포함하는 단백질 또는 이들 중 하나와 실질적으로 유사한 단백질을 포함한다: TNF-알파 전환효소를 포함하는 디스인테그린 및 메탈로프로테이나제 도메인 패밀리 구성원, 다양한 키나제, 글루코세레브로시다제, 수퍼옥사이드 디스무타제, 조직 플라스미노겐 활성제, 인자 VIII, 인자 IX, 아포리포단백질 E, 아포리포단백질 A-I, 글로빈, IL-2 길항제, 알파-1 안티트립신, 임의의 상기 언급한 효소에 대한 리간드, 및 수많은 다른 효소 및 그들의 리간드.

[0102] 용어 "항체"는, 달리 구체화되지 않는 한, 인간, 인간화된, 키메라, 다중 특이성, 단클론성, 다클론성 및 올리고머 또는 이들의 항원 결합 단편을 포함하는, 특이적 결합에 대해 무결합 항체와 경쟁하는 임의의 아이소타입 또는 하위분류의 글리코실화된 그리고 비글리코실화된 면역글로불린에 대한 언급 또는 이들의 항원-결합 영역에 대한 언급을 포함한다. 또한 항원 결합 단편 또는 영역, 예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 다이어바디, Fd, dAb, 맥시바디, 단쇄 항체 분자, 상보성 결정 영역(complementarity determining region: CDR) 단편, scFv, 다이어바디, 트라이어바디, 테트라바디, 및 표적 폴리펩타이드에 특이적 항원 결합을 부여하는데 충분한 면역글로불린의 적어도 일부를 함유하는 폴리펩타이드를 갖는 단백질이 포함된다. 용어 "항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 것, 예컨대 항체를 발현시키기 위해 형질전환된 숙주 세포로부터 단리된 항체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0103] 항체의 예는 상기 언급한 단백질 및/또는 다음의 항원: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-7, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-2 수용체, IL-4 수용체, IL-6 수용체, IL-13 수용체, IL-18 수용체 서브세트, FGL2, PDGF- β 및 이들의 유사체(미국 특허 제5,272,064호 및 제5,149,792호 참조), VEGF, TGF, TGF- β 2, TGF- β 1, EGF 수용체(미국 특허 제6,235,883호 참조) VEGF 수용체, 간세포 성장 인자, 오스테오프로테게린 리간드, 인터페론 감마, B 림프구 자극인자(BlyS, 또한 BAFF, THANK, TALL-1 및 zTNF4로서 알려짐; 문헌[Do and Chen-Kiang (2002), *Cytokine Growth Factor Rev.* 13(1): 19-25] 참조, C5 보체, IgE, 종양 항원 CA125, 종양 항원 MUC1, PEM 항원, LCG(폐암과 관련되어 발현된 유전자 산물임), HER-2, HER-3, 종양-관련 당단백질 TAG-72, SK-1 항원, 결장 및/또는 췌장암을 지니는 환자의 혈청에서 높은 수준으로 존재하는 종양-관련 에피토프, 암-관련 에피토프 또는 유방, 결장, 편평세포, 전립선, 췌장, 폐 및/또는 신장암 세포 상에서 및/또는 흑색종, 신경교종 또는 신경아세포종 세포 상에서 발현된 단백질, 종양의 괴사성 코어, 인테그린 알파 4 베타 7, 인테그린 VLA-4, B2 인테그린, TRAIL 수용체 1, 2, 3 및 4, RANK, RANK 리간드, TNF- α , 부착 분자 VAP-1, 상피 세포 부착 분자(EpCAM), 세포내 부착 분자-3(ICAM-3), 류코인테그린 부착소, 혈소판 당단백질 gp IIb/IIIa, 심장 미오신 중쇄, 부갑상선 호르몬, rNAPc2(인자 VIIa-조직 인자의 저해제임), MHC I, 암배 항원(CEA), 알파-태아단백질(AFP), 종양 괴사 인자(TNF), CTLA-4(세포독성 T 림프구-관련 항원임), Fc- γ -1 수용체, HLA-DR 10 베타, HLA-DR 항원, 스클레로스틴, L-셀렉틴, 호흡기 세포융합 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), B형 간염 바이러스(HBV), 스트렙토코쿠스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) 및 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 단백질 중 임의의 하나 또는 조합을 인식하는 것을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 본 발명의 방법을 이용하여 생성될 수 있는 공지된 항체의 구체적 예는 아달리무맙, 베바시주맙, 인플릭시맙, 압식시맙, 알렘투주맙, 바피뉴주맙, 바실락시맙, 벨리무맙, 브리아키누맙, 카나키누맙, 세르톨리주맙 폐골, 세톡시맙, 코나투무맙, 데노수맙, 에콜리주맙, 켐투주맙오조가미신, 골리무맙, 이브리투모맙 티우세탄, 라베투주맙, 마파투무맙, 마투주맙, 메폴리주맙, 모타비주맙, 뮤로모납-CD3, 나탈리주맙, 니모투주맙, 오파투무맙, 오말리주맙, 오레고보맙, 팔리비주맙, 파니투무맙, 펜투모맙, 페투주맙, 라니비주맙, 리툭시맙, 로벨리주맙, 토실리주맙, 토시투모맙, 트라스투주맙, 유스테카누맙, 베돌리조맙, 잘루투무맙 및 자놀리무맙을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0104] 본 발명은 또한, 예를 들어, 임의의 상기 언급한 단백질을 포함하는 재조합 융합 단백질을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 언급한 단백질 + 다양체 도메인 중 하나를 포함하는 재조합 융합 단백질, 예컨대 류신 지퍼, 또꼬인 나선, 면역글로불린의 Fc 부분 또는 실질적으로 유사한 단백질이 본 발명의 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들어 WO94/10308; 문헌[Lovejoy et al. (1993), *Science* 259:1288-1293; Harbury et al.

(1993), *Science* 262:1401-05; Harbury et al. (1994), *Nature* 371:80-83; Håkansson et al.(1999), *Structure* 7:255-64] 참조. 구체적으로는 이러한 재조합 융합 단백질 중에서 수용체의 일부가 항체의 Fc 부분에 융합된 단백질, 예컨대 에타네르셉트(p75 TNFR:Fc) 및 베라타셉트(CTLA4:Fc)가 포함된다. 키메라 단백질 및 폴리펩타이드뿐만 아니라 임의의 앞서 언급한 단백질 및 폴리펩타이드의 단편 또는 일부, 또는 돌연변이체, 변이체 또는 유사체가 또한 본 발명의 방법에 의해 생성될 수 있는 적합한 단백질, 폴리펩타이드 및 웹타이드 중에

포함된다.

[0105] 본 출원에서 사용되는 용어는 당업계에서 표준이지만, 특정 용어의 정의는 본 명세서에서 청구 범위의 의미에 대한 명확성 및 한정됨을 보장하기 위해 제공된다. 단위, 접두사 및 기호는 그들의 SI 허용 형태로 정의될 수 있다. 본 명세서에서 인용된 수치적 범위는 범위를 정하는 숫자를 포함하며, 정해진 범위 내에서 각각의 정수를 뒷받침한다. 본 명세서에 기재된 방법 및 기법은 일반적으로 당업계에 잘 공지된 통상적인 방법에 따라 그리고 달리 표시되지 않는 한 본 명세서 전체적으로 인용 및 논의되는 다양한 일반적이고 더 구체적인 언급에서 기재된 바와 같이 수행된다. 예를 들어, 문헌[Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) 및 Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), 및 Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)] 참조. 특히, 특히 출원, 논문, 교재 및 조약을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 본 출원에서 인용된 모든 문헌 또는 문헌의 일부는 본 명세서에 명확하게 참고로 포함된다. 본 발명의 실시형태에서 기재된 것은 본 발명의 다른 실시형태와 조합될 수 있다.

[0106] 본 발명은 본 발명의 개개 양태의 단일 예시로서 의도되는 본 명세서에 기재된 구체적 실시형태에 의해 범주가 제한되어서는 안 되며, 기능적으로 동등한 방법 및 구성성분은 본 발명의 범주 내에 있다. 사실, 본 명세서에 나타내고 기재된 것에 추가로 본 발명의 다양한 변형은 앞서 언급한 설명 및 수반하는 도면으로부터 당업자에게 명확하게 될 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구범위의 범주 내에 속하는 것으로 의도된다.

[0107] 실시예

[0108] 실시예 1

[0109] 세포외 오르니틴 수준은 고수준 만노스 글리코폼 함량과 상관관계가 있는 것을 발견하였다. < 5% 내지 >20%의 범위에 있는 고수준 만노스 글리코폼 함량을 갖는 재조합 항체를 발현시키는 8개의 CHO 세포주를 이 실험에 대해 선택하였다(세포주 A 내지 세포주 H). 2개의 상이한 등록 상표 세포 배양 배지(각각은 오르니틴을 함유하지 않음)(배지 #1 및 배지 #2)를 이용하여 진탕 플라스크에서 10일 유가 배양으로 세포를 성장시켰다. 소모 배지 샘플을 배양의 제8일, 제9일 및 제10일에 취하였고, 대규모 대사체학(metabolomics) 분석을 실시하였다. 엔도-H rCE-SDS 방법을 이용하여 HM%를 결정하였고, 이후에 이하에 기재하는 HILIC 방법으로 대체하였다. 소모 배지 내 오르니틴의 상대적 수준을 대규모 대사체학 분석에 의해 결정하였고, 이때 배지 구성성분을 액체 크로마토그래피에 의해 분리하고 고분해능 분석법에 의해 검출하였다. 구성성분을 공지된 화합물의 스펙트럼 라이브러리에 대해 그들의 단편 스펙트럼을 매칭시킴으로써 동정하였다. 각각의 구성성분의 상대적 존재비를 그의 질량 분석법 신호의 피크 면적으로부터 결정하였다. 배지 #1 및 배지 #2에서 제8일, 제9일 및 제10일에 세포주 A 내지 H로부터 분비된 단클론성 항체의 고수준 만노스 글라이칸 수준(HM%)을 도 2A 및 도 2B에 나타낸다. 도 2C는 고수준 만노스%와 세포외 오르니틴 수준 사이의 상관관계를 나타낸다. 상관관계는 제9일 샘플로부터의 데이터를 이용하여 모든 8개의 세포주(정사각형으로 표시함)를 비교함으로써 결정하였다. 결과는 고수준 만노스 글리코폼 함량과 오르니틴의 세포외 수준 사이의 강한 상관관계를 시사하였다.

[0110] 다음에, 세포주 H를 3 ℥ 생물반응기에서 유가배양으로 성장시켰다. 배양 지속기간은 12일이었다. 7%, 9%, 9% 및 9%의 4개 볼루스 공급은 제3일, 제5일, 제7일 및 제9일에 이루어졌다. 추가로, 2g/ ℥ 초과의 글루코스를 유지하는데 필요하다면 50% 글루코스 용액을 제3일에 시작해서 매일 첨가하였다. 생성 생물반응기를 성장 4일 후에 15×10^5 개 세포/ml로 접종하였다. 생성기가 개시될 때까지 세포를 성장 배지에서 유지하였다. 이어서 8개의 상이한 처리 조건을 비교하였다. 조건 #1은 대조군으로서 작용하였다. 생성 공급 배지에 대한 변경은 없었다.

[0111] 조건 #2에서, 제0일에 24mM의 농도로 생성 공급 배지에 베타인을 보충하였다. 추가 베타인 공급물을 제공하지 않았다. 7%, 9%, 9% 및 9%의 4개의 볼루스 공급은 제3일, 제5일, 제7일 및 제9일에 이루어졌다. 추가로, 2g/ ℥ 초과의 글루코스를 유지하는데 필요하다면 50% 글루코스 용액을 제3일에 시작해서 매일 첨가하였다.

[0112] 조건 #3 및 #4에서, 황산구리의 제거를 시험하였다. 황산구리를 생성 베이스 배지 분말로부터 제거하였다. 조건 #3은 대조군으로서 작용하며, 황산구리 저장액을 베이스 배지에 첨가하였다. 조건 #4에서, 황산구리를 임의의 배지에 첨가하지 않아서, 구리 결핍 배양 환경을 만들었다. 조건 #3과 #4 둘 다에 대해, 둘 다 구리를 함유하는 동일한 볼루스 "공급" 배지로 처리하였다.

[0113] 조건 #5 내지 #8에서, 고 및 저 삼투질농도를 시험하였다. 조건 #5 및 #6에서, 세포를 90% 생성 배추 배지로 공급하였고, 즉, 10% 미만의 영양분을 제공하였는데, 이는 감소된 삼투질농도를 경험하는 세포로 바뀐다. 조건 #6

에서, 세포 배양 배지는 NaCl에 의한 적정에 의해 대조군 수준인 ~ 300 mOsm로 되돌아왔다. 조건 #7 및 #8에서, 세포에 85% 공급 배지를 공급하였고, 조건 #8의 배지는 NaCl에 의한 역가에 의해 대조군 수준으로 되돌아왔다.

[0114] 소모된 배지 샘플을 배양의 제3일, 제6일, 제8일, 제9일 및 10일에 취하였고, 대규모 대사체학 분석을 실시하였다.

[0115] 또한, 세포외 오르니틴과 고수준 만노스 글리코폼 함량 사이의 상당한 상관관계가 있었다. 도 3A는 세포주 H가 8가지의 생물반응기 조건(#1 내지 #8)에 노출되었을 때 검출된 고수준 만노스 글라이칸 수준%를 나타낸다. 도 3B는 대응하는 세포외 오르니틴 수준을 나타낸다. 도 3C는 고수준 만노스%와 세포외 오르니틴 수준 사이의 상관관계를 나타낸다. 제9일 샘플로부터의 데이터를 이용하여 모든 8개 조건을 비교함으로써 상관관계를 결정하였다 (정사각형으로 표시함).

[0116] 실시예 2

[0117] 실시예 1에 기재한 8개의 세포주를 이용하여 10일의 유가식 생성 배양 동안 선택한 날에 아르기나제 1의 mRNA 발현 수준을 측정하였다.

[0118] mRNA 발현 수준을 제조업자의 설명서에 따라 웨нт진 멀티플렉스 분석 키트(Quantigen Multiplex Assay kit)(캘리포니아주 산타 클라라에 소재한 아피메트릭스 인코포레이티드사(Affymetrix, Inc.))를 이용하여 분석하였다.

[0119] 아르기닌의 오르니틴으로의 전환을 촉매하는 효소인 아르기나제 1은 시간과정 의존적 방식으로 더 높은 수준의 고수준 만노스를 지니는 세포주에서 상향조절된다는 것을 발견하였다(도 4 참조). 이는 아르기나제의 활성을 차단하고 오르니틴 생성량을 감소시키는 아르기나제 저해제를 이용하는 구체적 표적화가 고수준 만노스 글라이칸 수준을 낮추는데 사용될 수 있었다는 것을 시사한다.

[0120] 실시예 3

[0121] 이 실시예는 재조합 당단백질을 발현시키는 숙주 세포 내 오르니틴 축적을 조절함으로써 재조합 당단백질의 고수준 만노스 글리코폼 함량의 조작이 처리된다는 것을 입증한다.

[0122] 세포주, 세포 배양물 및 배지

[0123] 이 연구에서 세포주 H를 사용하였다. 세포를 1ℓ 작업 용적으로 3ℓ 삼각 진탕 플라스크(매사추세츠주 로웰에 소재한 코닝 라이프 사이언스(Corning Life Sciences))에서 유지하고 나서, 36°C, 5% CO₂에서 표준 습윤화 조건하에 배양하고, 자동 CO₂ 인큐베이터(매사추세츠주 월섬에 소재한 씨모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific))에서 70rpm로 진탕시켰다. 세포를 4일마다 500nM 농도의 메토트렉세이트(MTX)를 함유하는 선택 성장 배지에서 부분 배양시키고, 후속적으로 4일 동안 성장 배지에 옮기고, 접종시키고 나서 배양시킨 후에 이하에 기재하는 실험을 위해 24 웰 플레이트에 과종시켰다.

[0124] 소규모 모의 관류

[0125] 24 딥-웰 플레이트(캘리포니아주 유니온 시티에 소재한 악시겐(Axygen))에서 개질 모의 관류를 사용하여 고수준 만노스(HMN) 조절에 대한 스페르민, 아르기닌, 오르니틴 및 아르기나제의 효과를 평가하였다. 관류 배지의 무아르기닌 제형을 실험 설계에 따라 소규모 모의 관류 실험 #3(아르기닌 농도 연구)을 위해 사용하였다. 소규모 모의 관류 실험 #4에서, 모든 아르기나제 저해제를 관류 배지에 첨가하였다. 4종의 아르기나제 저해제, BEC 염산 염, DL-α, 다이플루오로메틸오르니틴 염산염, N^c-하이드록시-L-아르기닌 모노아세테이트 염 및 Nω- 하이드록시-노르-아르기닌 다이아세테이트 염을 EMD 밀리포어 코포레이션(EMD Millipore Corporation)(매사추세츠주 빌러리카에 소재)으로부터 구입하였다.

[0126] 간략하게, CHO 세포를 각각의 웰에 대해 3mL 작업 용적으로 10 내지 20 x 10⁶개 세포/mL의 범위의 표적화된 밀도에서 플레이트에 과종하였다. 세포를 36°C, 5% CO₂, 85% 상대 습도에서 배양시키고 나서, 3 또는 4일 동안 50mm 궤도 직경 퀴너(Kuhner) 인큐베이터(스위스 바젤에 소재한 퀴너 아게(Kuhner AG))에서 225rpm으로 진탕시켰다. 24시간마다, 세포를 200 x g에서 5분 동안 원심분리시켜(캘리포니아주 브레이아에 소재한 벽크만 쿨터(Beckman Coulter)) 소모 배지를 수집하고, 이어서 각각의 웰을 3mL의 새로운 배지로 보충하였다. 수집한 소모 배지를 (필요할 때) 역가, 중요한 대사산물 및 고수준 만노스%(HMN%)에 대해 분석하였다. 이어서, 세포를 채취하고 나서, 세포 계수 및 생존도를 측정하였다.

[0127] 세포 성장, 대사산물 및 항체 역가 분석

[0128] 살아있는 세포 밀도 및 생존도를 세덱스(Cedex) 세포 계수기(독일 빌레펠트에 소재한 로슈 이노베이티브(Roche Innovative))를 이용하여 결정하였다. 글루코스, 락트산염, 암모니아, 글루타민, 글루타메이트를 포함하는 대사산물을 노바바이오프로파일 플렉스(NovaBioprofile Flex)(매사추세츠주 월섬에 소재한 노바 바이오메디컬사(Nova Biomedical))로부터 얻었다. 50mm x 4.6mm i.d. POROS A/20 단백질 A 칼럼(캘리포니아주 칼스베드에 소재한 라이프 테크놀로지즈(Life Technologies))를 구비한 친회도 단백질 A 초고성능 액체 크로마토그래피(UPLC)(매사추세츠주 밀퍼드에 소재한 워터스 코포레이션(Waters Corporation)) 분석을 이용하여 소모 배지의 항체 농도를 결정하였다. 샘플을 주사한 후에, 칼럼을 인산염 완충 식염수(PBS) pH=7.1에 의해 세척하여 CHO 숙주 세포 단백질을 제거하였다. 이어서, 결합 항체를 산성 PBS 완충제(pH=1.9) 중에 용리시키고 나서, 280nm에서 UV 흡광도에 의해 검출하여 항체 농도를 정량화하였다.

[0129] HILIC 글리칸 맵

[0130] 항체의 상이한 N-글리칸 종을 친수성-상호작용 액체 크로마토그래피(HILIC)에 의해 분석하였다. 정제된 항체를 37°C에서 2시간 동안 N-글리코시다제 F(매사추세츠주 임스위치에 소재한 뉴잉글랜드 바이오랩스(New England BioLabs))에 의해 분해시켜 글리칸을 방출시켰다. 방출된 글리칸을 2-아미노벤조산으로 표지하고 나서, 글리코클린 S(GlycoClean S) 카트리지(캘리포니아주 헤이워드에 소재한 프로자임사(Prozyme))를 이용하여 세정하였다. 이어서, 정제한 글리칸을 탈염시키고, 분석을 위해 수 중에서 재구성하였다. UPLC를 이용하는 100mm x 2.1mm i.d BEH 글리칸 칼럼(매사추세츠주 밀포드에 소재한 워터스 코포레이션)을 이용하여 HILIC 크로마토그래피를 수행하고 나서, 용리된 글리칸을 상이한 글리칸의 상이한 용리 시간을 기준으로 형광 검출기에 의해 검출, 동정 및 정량화하였다.

[0131] 소규모 모의 관류 실험 #1: 스페르민 농도 연구

[0132] 5가지 상이한 농도의 스페르민을 이 연구에서 시험하였다. 0, 7, 17, 35 및 100 μM 스페르민 4염산염(스페르민 4HCl)을 함유하는 관류 세포 배양 배지를 시험하였다. 35 μM 스페르민을 함유하는 관류 배지는 대조군으로서 작용하였다. 5개 샘플로부터의 결과는 스페르민 농도가 감소되었고, HMN%가 감소되었음을 나타낸다(도 5 참조). 역가는 스페르민의 감소/고갈에 의해 영향을 받지 않았다. 스페르민의 양이 배지에서 감소되었을 때, 오르니틴 수준의 감소를 통해 HM 수준의 감소를 달성하였다. 도 6에 나타낸 바와 같이, 오르니틴 양이 감소될 수록 스페르민 농도는 감소되었다.

[0133] 소규모 모의 관류 실험 #2: 오르니틴 농도 연구

[0134] 4가지 상이한 농도의 L-오르니틴 일염산염을 시험하였다. 14.8, 6, 0.6 및 0(대조군)mM L-오르니틴 일염산염(미조리주 세인트루이스에 소재한 시그마 알드리치사(Sigma-Aldrich))을 함유하는 관류 세포 배양 배지를 사용하였다. 결과는 오르니틴 농도가 증가되고, HMN%가 증가되었다는 것을 나타내었다(도 7 참조). 2 ℥ 생물반응기에서 세포주 I를 이용하여 제2 실험을 수행하였다. 세포주 I는 IgG2 항체를 발현시키고 유가배양 조건하에 성장시켰다. 하나의 생물반응기에서, 배지는 배양 제0일에 0.1g/ ℥ L-오르니틴 일염산염의 단일 보충을 받았고, 제2 생물반응기는 무오르니틴 대조군으로서 작용하였다. 대두 가수분해물을 함유하는 세포 배양 배지에서 제12일로부터 배양물을 유지하였다. 대두 가수분해물을 함유하는 볼루스 공급 배지를 제4일 및 제8일에 공급하였다.

[0135] 글리칸 프로파일링을 웨بت아이드 맵핑에 의해 수행하였다. 문헌[Ren et al. (2009) Anal. Biochem. 392 12-21]에 기재된 것과 유사한 방법에 의해 트립신에 의해 항체를 분해하였다. 구체적으로, 약 50 내지 70μg의 각각의 항체를 변성시키고, 37°C에서 30분 동안 0.2M 트리스 완충제(pH 7.5) 중에서 7.0M 구아니딘 · HCl, 6mM 디아티오토레이톨(DTT)을 이용하여 환원시켰다. 각각의 변성/환원 샘플을 25°C에서 25분 동안 14mM 요오도아세트산을 이용하여 알킬화시킨 후, 8mM DTT를 첨가함으로써 반응을 퀸칭시켰다. 이어서, 환원/알킬화된 항체 샘플을 제조업자의 제안 프로토콜에 따라 피어스(Pierce) 세정제 제거 스핀 칼럼(일리노이주 락포드에 소재한 써모 피셔 사이언티픽 인코포레이티드사(Thermo Fisher Scientific Inc.))을 이용하여 pH 7.5에서 0.1M 트리스 완충제로 교환하였다. 완충제 교환 샘플을 37°C에서 3.5μg 트립신을 이용하여 60분 동안 인큐베이션시켰다. 분해를 2.2μl의 10% 아세트산을 첨가함으로써 퀸칭시켰다. 약 12 내지 17μg의 분해 항체를 분석을 위해 주사하였다.

[0136] 써모 사이언티픽 LTQ-오비트랩 엘리트 질량 분석기(Thermo Scientific LTQ-Orbitrap Elite mass spectrometer)(일리노이주 락포드에 소재한 써모 피셔 사이언티픽 인코포레이티드)에 직접 연결된 애질런트 1260 HPLC 시스템을 통해 항체를 분석하였다. 단백질 분해 웨بت아이드를 0.2mL/분의 유속으로 40°C에서 워터스 BEH 300 C18 칼럼(매사추세츠주 밀포드에 소재한 워터스 코포레이션) 2.1 x 150mm, 1.7 μ 입자 상에서 분리시켰다.

다. 이동상 A는 수 중에서 0.02% TFA였고, 이동상 B는 아세토나이트릴 중의 0.018% TFA였다. 웹타이드를 90분에 0.5 내지 40% B의 구배로 용리시킨 후에, 칼럼 세척 및 재평형화하였다. 질량 분석계를 120,000 분해능을 지니는 오비트랩에서 완전 MS 스캔 다음에, 동적 배제를 지니는 선형 트랩에서 5개의 데이터-의존적 CID MS/MS 스캔을 설치하였다. 질량 분석기를 이용하여 글리칸 프로파일링에 대한 자동 데이터 분석을 수행하였다(문현[Zhang, (2009) Analytical Chemistry 81: 8354-8364] 참조).

- [0137] 또한 결과는 오르니틴 농도가 증가함에 따라 HMN%가 증가된다는 것을 나타낸다(도 8 참조).

소규모 모의 관류 실험 #3: 아르기닌 농도 연구

[0139] 아르기닌의 5가지 상이한 농도를 이 연구에서 시험하였다. 3.686, 1.38, 0.92 및 0.46g/ℓ 아르기닌을 함유하는 관류 세포 배지를 시험하였다. 1.843g/ℓ 아르기닌을 함유하는 관류 배지를 대조군으로서 사용하였다. 결과는 아르기닌 농도가 증가되면 HM%가 증가된다는 것을 나타낸다(도 9 참조).

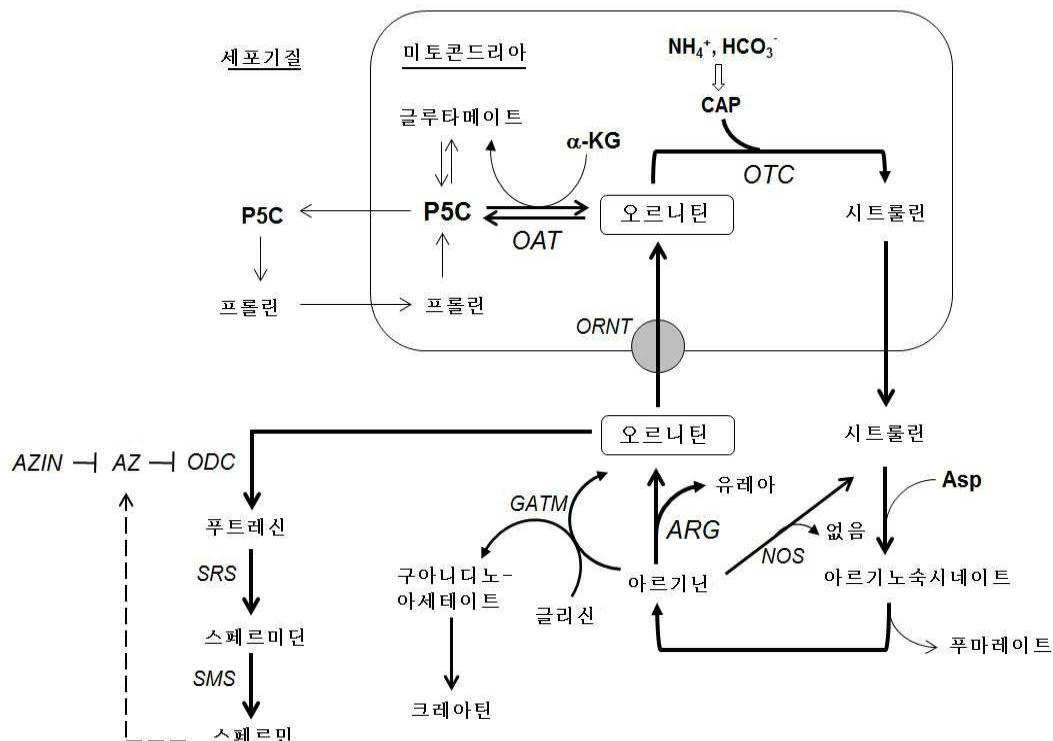
소규모 모의 관류 실험 #4: 아르기나제 저해제 연구

[0141] 두 일련의 아르기나제 저해제 실험을 수행하였다. 실험의 제1 시리즈에서, 4종의 상업적으로 입수가능한 아르기나제 저해제 BEC 염산염, DL- α , 다이플루오로메틸오르니틴 염산염, N^G-하이드록시-L-아르기닌 모노아세테이트 염 및 N ω -하이드록시-노르-아르기닌 다이아세테이트 염을 3가지 상이한 농도, 즉, 1, 10 및 20 μ M에서 세포 배양물에 첨가하였다. 대조군은 저해제가 없었다. 이 실험으로부터, 저해제 BEC 및 DL- α 는 HM%를 감소시킴에 있어서 가장 효과적이라는 결론을 내렸다(도 10).

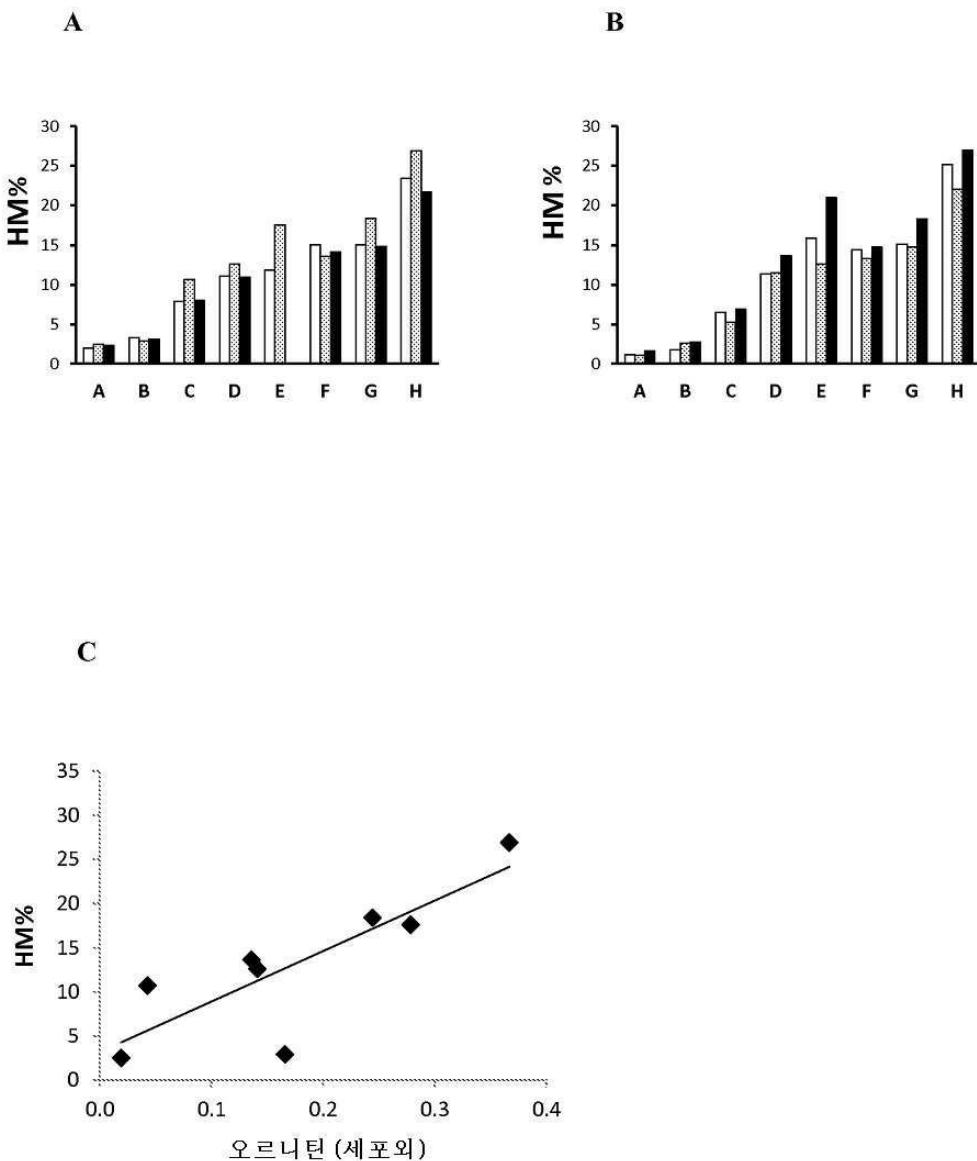
[0142] BEC 및 DL- α 저해제를 이용하여 두 번째 일련의 실험을 수행하였다. BEC 저해제를 관류 세포 배양 배지에서 0(대조군), 10 μ M 및 0.5mM 농도로 시험하였다. DL- α 저해제를 관류 세포 배양 배지에서 0(대조군), 10 μ M, 1.0mM 및 2.0mM 농도로 시험하였다. 저해제 농도가 둘 다 증가됨에 따라 HM%는 감소된다는 것을 입증하였다(도 11 참조).

도면

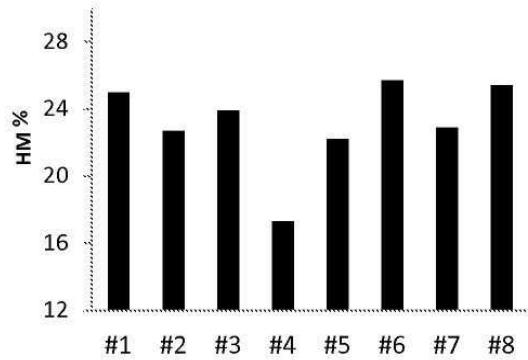
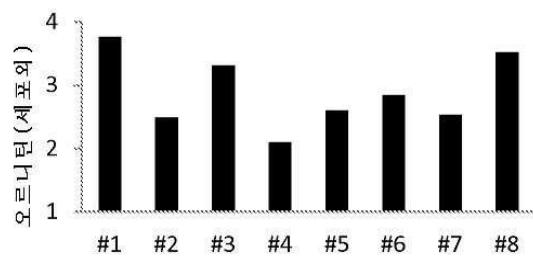
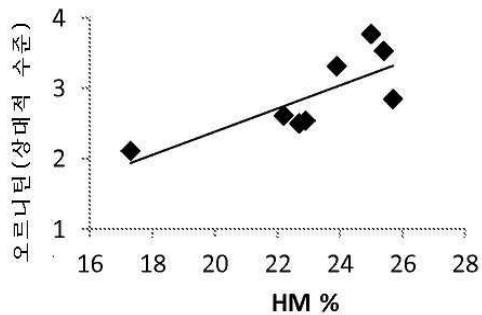
도면1



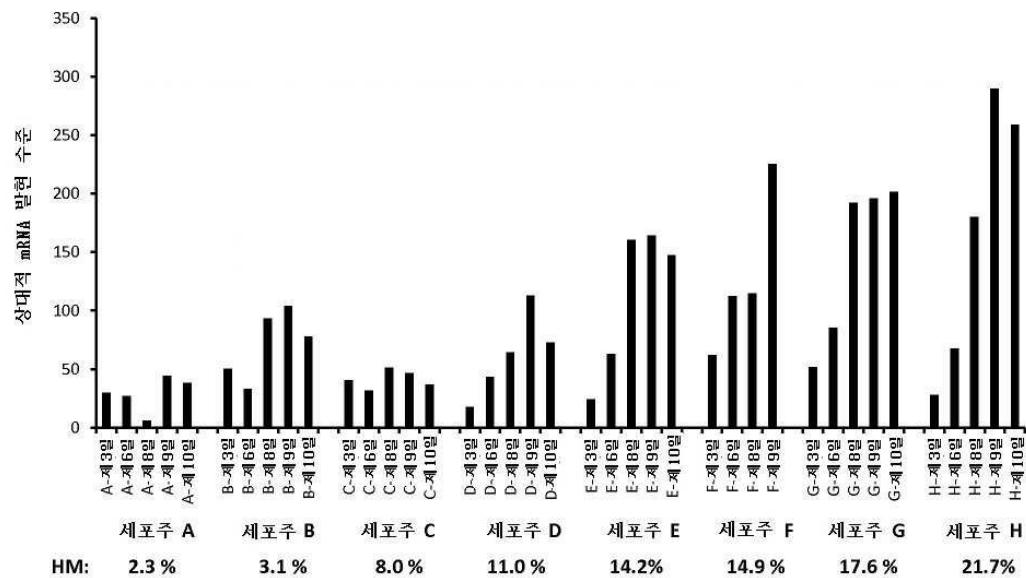
도면2



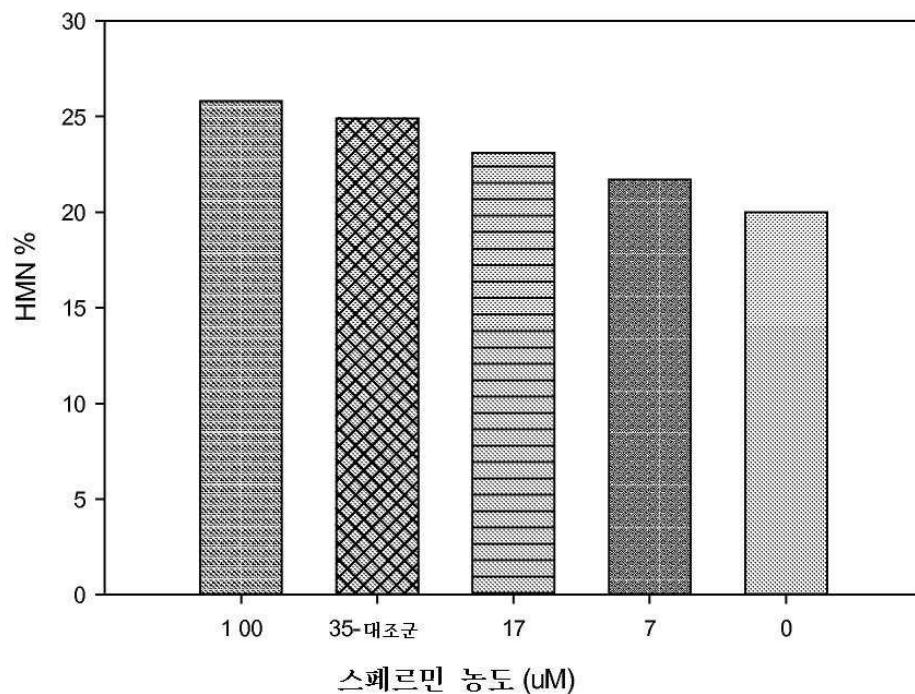
도면3

A**B****C**

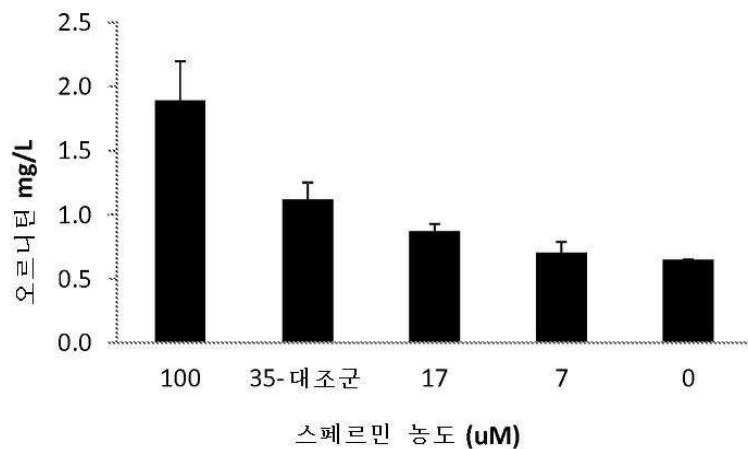
도면4



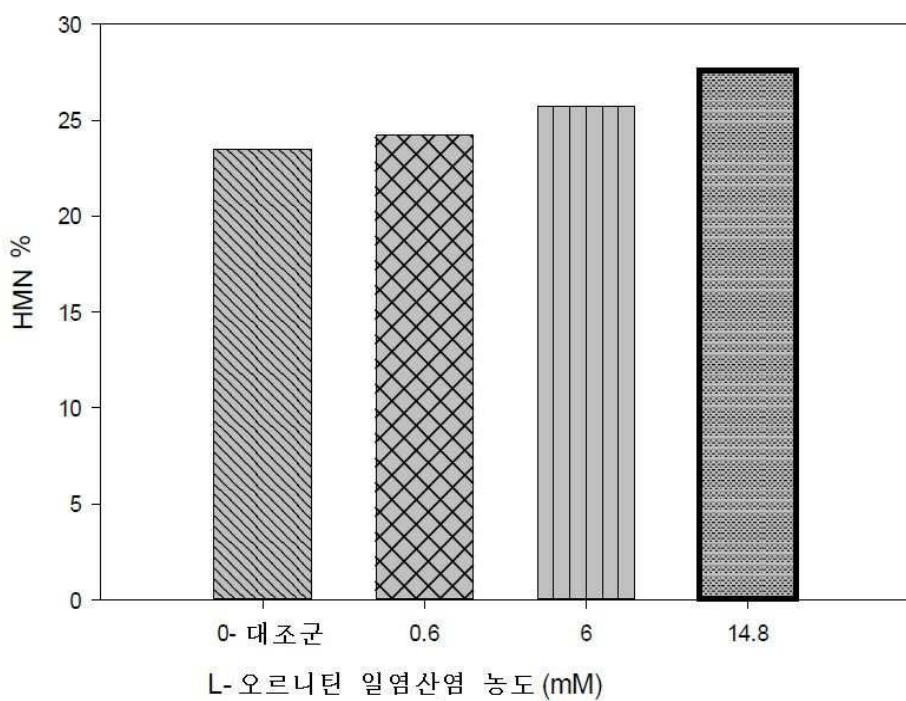
도면5



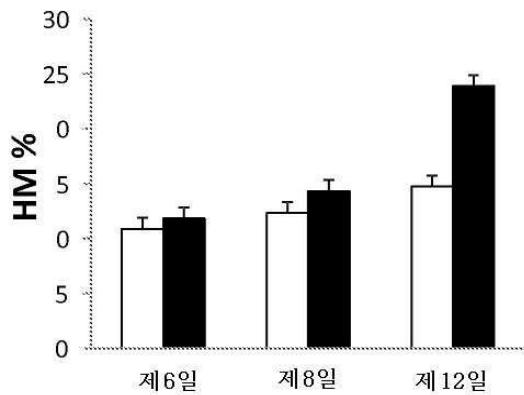
도면6



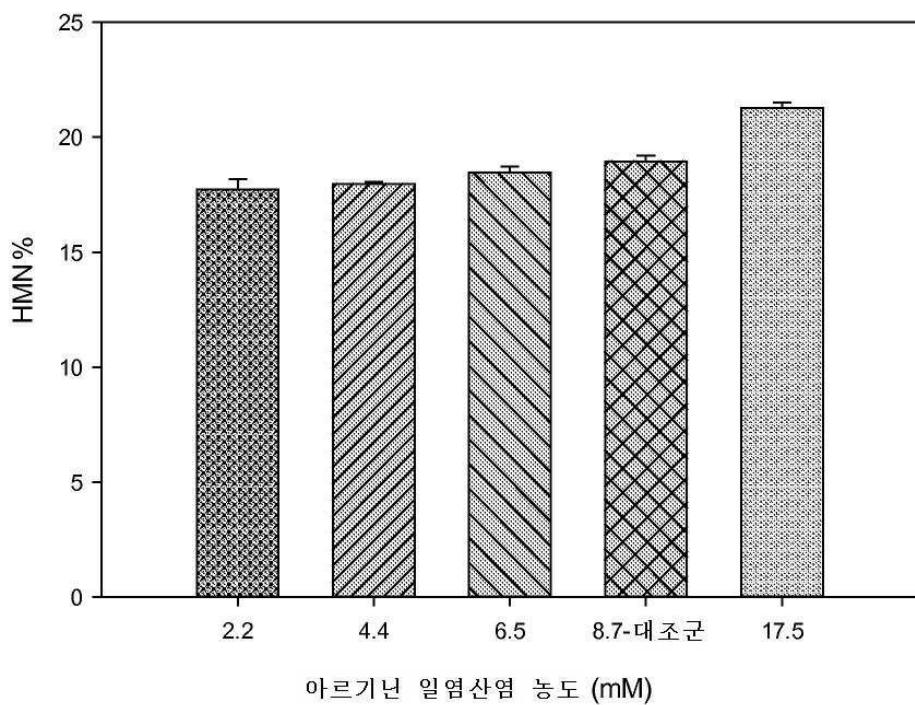
도면7



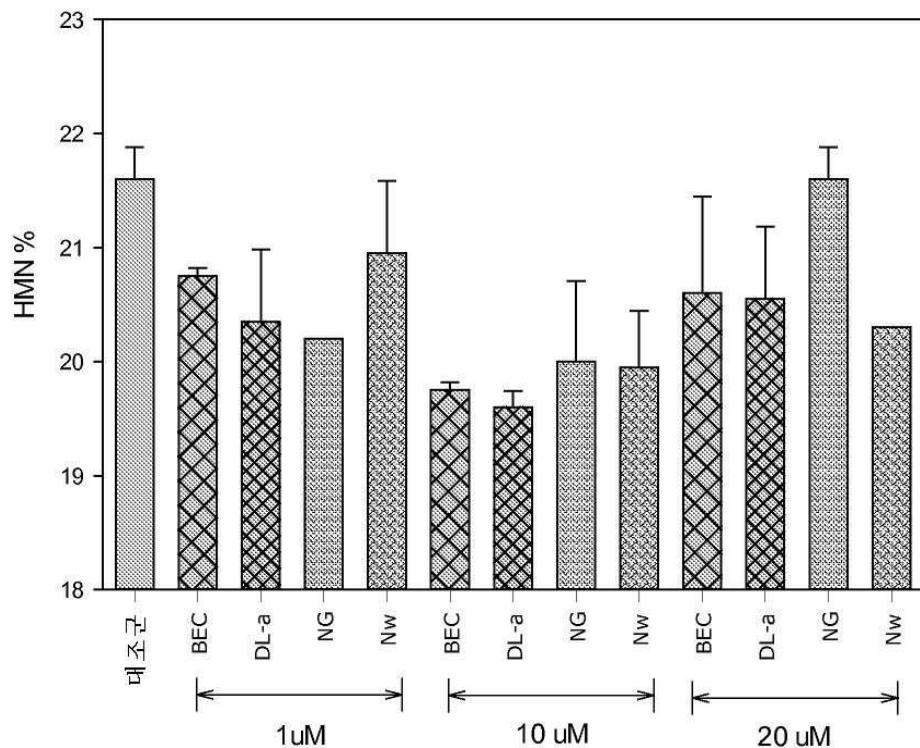
도면8



도면9



도면10



도면11

