



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0119702  
(43) 공개일자 2011년11월02일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/02 (2006.01) C12N 5/075 (2010.01)

C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/54 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7018800

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년01월22일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2011년08월12일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/031678

(87) 국제공개번호 WO 2010/085251

국제공개일자 2010년07월29일

(71) 출원인

모멘타 파머슈티컬스 인코포레이티드

미국 메사추세츠 02142 케임브리지 웨스트 첸달 스트리트 675

(72) 발명자

보스퀘스 카를로스

미국 메사추세츠주 02476 알링턴 아파트먼트 7 브 래틀 스트리트 40

머피 제니퍼

미국 메사추세츠주 02050 마쉬필드 폴리머스 애비뉴 51

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장훈

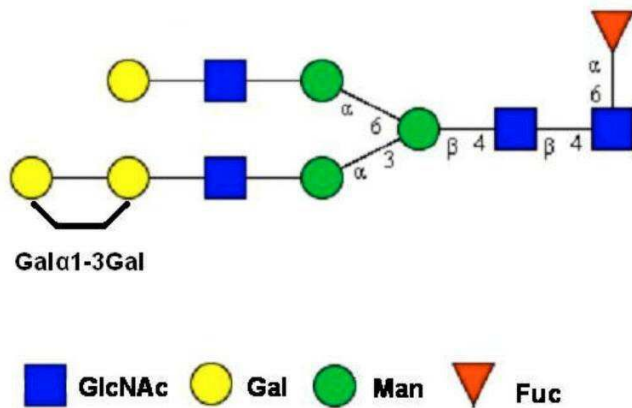
전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) CHO 세포에서 유도된 글리코단백질 생성물에서의 갈락토오스-알파-1,3-갈락토오스-함유 N-글리칸

(57) 요약

본 발명은 중국 햄스터 난소(CHO) 세포군에 의해 생성되는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유한 글리칸을 측정함으로써 CHO 세포군을 평가하는 방법을 제공하며, 여기서 CHO 세포는 알파-갈락토실 전이효소 암호서열을 발현하도록 유전자 조작 처리를 거치지 않은 것이다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

**사르바이야 헤탈**

미국 매사추세츠주 02169 퀸시 아파트먼트 4112 폴  
스 블러바드 500디

**워시먼 나다니엘**

미국 매사추세츠주 02478 벨몬트 아파트먼트 3 그  
로브 스트리트 65

**류 추이화**

미국 매사추세츠주 02478 벨몬트 메릴 애비뉴 16

**쉬 샤오-진**

미국 매사추세츠주 01772 사우스보로 록포인트 로  
드 6

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

중국 햄스터 난소(CHO) 세포군을 평가하는 방법이며,

- (a) 세포군으로부터의 CHO 세포를 하나 이상 제공하는 단계; 및
- (b) 상기 세포에 의해 생성되는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유한 글리칸을 측정하는 단계를 포함하고,

CHO 세포는 알파-갈락토실 전이효소 암호서열을 발현하도록 유전자 조작되지 않은 것인 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 측정 단계는:

- (a) CHO 세포로부터 생성된 글리코단백질을 단리시키고, 글리코단백질에 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸을 측정하는 조작,
- (b) CHO 세포로부터 생성된 특이적 글리코단백질 조성물을 단리시키고, 단리된 글리코단백질 조성물에 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸을 측정하는 조작,
- (c) 글리코단백질 제제로부터, 또는 CHO 세포로부터 생성되어 단리된 글리코단백질로부터 글리칸 제제를 얻은 후, 글리칸 제제 내 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸을 측정하는 조작,
- (d) CHO 세포로부터 생성된 글리코단백질 생성물에 존재하는 글리칸으로부터, 또는 하나 이상의 CHO 세포의 세포표면에 있는 글리칸으로부터 단백질을 절단하고, 절단된 단백질로부터 말단기가 방출된 알파-갈락토오스 잔기를 검출하는 조작,
- (e) CHO 세포로부터 생성된 글리코단백질 제제에서 얻은 하나 이상의 펩타이드를 제공하고, 하나 이상의 펩타이드에 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸을 측정하는 조작, 및
- (f) 하나 이상의 CHO 세포의 세포 표면 상의 글리칸으로부터의 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸을 측정하는 조작 중 임의의 것을 포함하는 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서, CHO 세포군은 클론 세포군인 것인 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 단계 (b)에서 측정된 수준을 기준 수준 또는 사양과 비교하는 단계를 더 포함하는 방법.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 측정 단계는 말단 갈락토오스-알파-1,3-갈락토오스 잔기를 함유한 글리칸을 동정 또는 정량화 하기 위해 크로마토그래피법, 질량분석(MS)법, 전기영동법, 핵자기공명(NMR)법, 단당류 분석, 형광법, UV-VIS 흡광도 측정, 효소적 방법, 및 검출분자를 사용하는 방법 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 방법을 이용하는 것인 방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서, CHO 세포군은 치료용 글리코단백질을 생성하는 생물반응기 내 세포 배양액으로부터의 시료인 것인 방법.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 제공 단계와 측정 단계를 시간에 걸쳐 적어도 한 번 반복하는 방법.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 측정 단계는 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 에피톱에 결합되는 검출분자를 이용하는 조작을 포함하는 방법.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 검출분자는 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 에피톱에 결합될 수 있는 렉틴을 포함하는 것인 방법.

**청구항 10**

제8항에 있어서, 검출분자는 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 에피톱에 대한 항체를 포함하는 것인 방법.

**청구항 11**

제8항에 있어서, 검출분자는 라벨표시된 부분이 포함된 분자를 포함하거나 또는 상기 분자에 결합되는 것인 방법.

**청구항 12**

제1항에 있어서, 측정 단계의 결과를 인쇄매체 또는 컴퓨터 판독가능 매체에 기록하는 단계를 더 포함하는 방법.

**청구항 13**

제1항에 있어서, CHO 세포가 세포 배양액에 존재하는 것인 방법.

**청구항 14**

제1항에 있어서, CHO 세포군은 인간 치료용 글리코단백질을 암호화하는 벡터를 이용하여 전환된 것인 방법.

**청구항 15**

제1항에 있어서, CHO 세포에 존재하는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 에피톱 또는 에피톱을 함유하는 글리칸의 양을 정량화하는 단계를 더 포함하는 방법.

**청구항 16**

제1항에 있어서, 측정 단계는 CHO 세포로부터 생성된 글리코단백질을 단리시키고, 글리코단백질에 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸을 측정하는 조작을 포함하는 방법.

**청구항 17**

제1항에 있어서, 측정 단계는 CHO 세포로부터 생성된 특이적 글리코단백질 조성물을 단리시키고, 단리된 글리코단백질 조성물로부터 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸을 측정하는 조작을 포함하는 방법.

**청구항 18**

제1항에 있어서, 측정 단계는 글리코단백질 제제 또는 CHO 세포로부터 생성되어 단리된 글리코단백질로부터 글리칸 제제를 얻은 후, 글리칸 제제 내 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸을 측정하는 조작을 포함하는 방법.

**청구항 19**

제1항에 있어서, 측정 단계는 (d) CHO 세포로부터 생성된 글리코단백질 생성물에 존재하는 글리칸으로부터, 또는 하나 이상의 CHO 세포의 세포표면에 있는 글리칸으로부터 당당류를 절단하고, 말단을 검출하는 조작을 포함하는 방법.

**청구항 20**

제1항에 있어서, 측정 단계는 CHO 세포로부터 생성된 글리코단백질 제제에서 얻은 하나 이상의 펩타이드를 제공하고, 하나 이상의 펩타이드에 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸을 측정하는 조작을 포함하는 방법.

**청구항 21**

제1항에 있어서, 측정 단계는 하나 이상의 CHO 세포의 세포표면에 있는 글리코포합체 상의 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 측정하는 조작을 포함하는 방법.

**청구항 22**

제1항에 있어서, 측정 단계는 크로마토그래피법을 수행하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 23**

제1항에 있어서, 측정 단계는 질량분석(MS)법을 수행하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 24**

제1항에 있어서, 측정 단계는 전기영동법을 수행하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 25**

제1항에 있어서, 측정 단계는 핵자기공명(NMR)법을 수행하는 조작을 포함하는 방법.

**청구항 26**

글리코단백질에 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸을 생성할 수 있도록 하나 이상의 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 스크리닝하는 방법이며,

- (a) 유전자 조작을 거치지 않은 복수의 CHO 세포군을 제공하여 글리칸에 말단 알파-갈락토실 잔기를 생성하는 단계;
- (b) 상기 복수의 CHO 세포군 각각을 글리코단백질 발현 생성물의 발현에 적합한 조건 하에서 배양시키는 단계;
- (c) 상기 복수의 CHO 세포 각각에 의해 생성되는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸을 측정하는 단계; 및
- (d) 상기 복수의 CHO 세포 제제 중 하나 이상을 선택하되, 상기 선택된 CHO 세포 제제에 의해 목표 수준의 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기가 생성되는지에 근거하여 선택하는 단계를 포함하고,  
CHO 세포에는 알파-갈락토실 전이효소 암호서열을 트랜스펙트(transfect)하지 않은 방법.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 상기 복수의 CHO 세포군 각각이 세포 배양액에 존재하는 것인 방법.

**청구항 28**

제26항에 있어서, 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유한 글리칸을 CHO 세포군의 단리된 글리코단백질 발현 생성물 상에서 측정하는 방법.

**청구항 29**

제26항에 있어서, 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유한 글리칸을 CHO 세포군의 글리코단백질 발현 생성물로부터 얻은 펩타이드 상에서 측정하는 방법.

**청구항 30**

제26항에 있어서, 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유한 글리칸을 CHO 세포군의 세포표면 글리칸 으로부터 측정하는 방법.

**청구항 31**

제26항에 있어서, 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유한 글리칸을 CHO 세포군으로부터, 또는 이의 글리코단백질 발현 생성물로부터 얻은 글리칸 제제 상에서 측정하는 방법.

**청구항 32**

제26항에 있어서, 측정 단계는 (i) 상기 복수의 CHO 세포군의 각가으로부터 글리코단백질 발현 생성물을 단리시키는 단계, 및 (ii) 글리코단백질 발현 생성물 상의 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 측정하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 33**

제27항에 있어서, 세포 배양액은 생물반응기 내에 있는 방법.

**청구항 34**

제26항에 있어서, 측정 단계는 말단 갈락토오스-알파-1,3-갈락토오스 잔기를 함유한 글리칸을 동정 또는 정량화하기 위해 크로마토그래피법, 질량분석(MS)법, 전기영동법, 핵자기공명(NMR)법, 당당류 분석, 형광법, UV-VIS 흡광도 측정, 효소적 방법, 및 검출분자를 사용하는 방법 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 방법을 이용하는 것인 방법.

**청구항 35**

제26항에 있어서, 상기 복수의 CHO 세포군 중 하나 이상은 인간 치료용 글리코단백질을 암호화하는 벡터를 이용하여 전환된 것인 방법.

**청구항 36**

제26항에 있어서, 상기 복수의 CHO 세포군은: 둘 이상의 상이한 CHO 균주, 둘 이상의 상이한 클론 세포군, 및 치료용 글리코단백질을 위한 제조 트레인으로부터의 둘 이상의 상이한 시료로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 특성을 가지는 것인 방법.

**청구항 37**

제26항에 있어서, 선택된 CHO 세포 제제를 배양시켜 치료용 글리코단백질 생성물을 제조하는 단계를 더 포함하는 방법.

**청구항 38**

CHO 숙주 세포에 생성된 글리코단백질 조성물의 평가 방법이며,

글리코단백질 조성물에 존재하는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스의 양을 측정하는 단계를 포함하고,

글리코단백질 조성물은 CHO 숙주 세포에서 생성된 것이고, CHO 숙주 세포는 CHO 세포는 알파-갈락토실 전이효소 암호서열을 발현하도록 유전자 조작 처리를 하지 않은 방법.

**청구항 39**

제38항에 있어서, 글리코단백질 조성물에 존재하는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 수준을 인쇄매체 또는 컴퓨터 판독가능 매체에 기록하는 단계를 더 포함하는 방법.

**청구항 40**

제38항에 있어서, 글리코단백질 조성물에 존재하는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스의 측정 수준을 기준 수준과 비교하는 단계를 더 포함하는 방법.

**청구항 41**

제40항에 있어서, 기준 수준은 글리코단백질 조성물을 함유하는 약학적 제제에 대한 사양 또는 품질 평가기준인 것인 방법.

**청구항 42**

제40항에 있어서, 기준 수준은 글리칸/총 글리칸을 기준으로 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스가 5% 이하인 것인 방법.

**청구항 43**

제38항에 있어서, 글리코단백질 조성물에 존재하는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스의 양을 측정하는 단계는 크로마토그래피법을 수행하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 44**

제38항에 있어서, 글리코단백질 조성물에 존재하는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스의 양을 측정하는 단계는 질량분석(MS)법을 수행하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 45**

제38항에 있어서, 글리코단백질 조성물에 존재하는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스의 양을 측정하는 단계는 핵자기공명(NMR)법을 수행하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 46**

제38항에 있어서, 글리코단백질 조성물에 존재하는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스의 양을 측정하는 단계는 단당류 분석을 수행하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 47**

제38항에 있어서, 글리코단백질 조성물에 존재하는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스의 양을 측정하는 단계는 형광법을 수행하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 48**

제38항에 있어서, 글리코단백질 조성물에 존재하는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스의 양을 측정하는 단계는 UV-VIS 흡광도 측정을 수행하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 49**

제38항에 있어서, 글리코단백질 조성물에 존재하는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스의 양을 측정하는 단계는 효소적 방법을 수행하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 50**

제38항에 있어서, 글리코단백질 조성물에 존재하는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스의 양을 측정하는 단계는 검출분자를 이용하는 것을 포함하는 방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 포유류 세포 발현 시스템으로부터 발현된 단백질에서 특정 글리칸 구조를 검출하는 방법 및 물질에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 많은 제조용 치료용 생물약제학적 생성물은 중국 햄스터 난소(CHO) 세포와 같은 포유류 세포 배양액(culture)에서 생성된다. 주로 포유류 세포 배양액은 인간이 일반적으로 인식하고 내성을 가지는 글리코실화 패턴을 지닌 글리코단백질을 생성하기 때문에, 제조용 글리코단백질을 생성하는 효모 및 원핵생물계 같은 다른 기타 발현 시스템보다 선호된다.

[0003] 말단 알파결합 갈락토오스(gal- $\alpha$ -1,3-gal) 결합의 잠재적인 부작용에 대해서는 Chung et al., N Engl J Med,

358:11 (2008)에 공지되어 있다. 이러한 말단 알파-갈(alpha-gal) 결합이 CHO 세포에 의해 생성되는 재조합 글리코단백질에는 존재하지 않는다고 이전에 보고된 적이 있다. 예를 들어, NSO에서 생성되는 anti-CDw52 항체인 Campath (쥐에서 개발된 골수종 세포주)가 비환원 말단 알파갈 결합 갈락토오스 잔기를 가지며 잠재적으로 면역원성인 단백질형(glycoform)을 포함하는 한편, CHO 세포로부터 생성되는 Campath는 주로 정상적인 인간 IgG와 일치되는 3개의 단백질형을 함유한다. Sheeley et al., Analytical Biochemistry 247:102-110 (1997)을 참조한다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

- [0004] 본 발명은, 부분적으로, 재조합 CHO 세포로부터 생성되는 글리코단백질이 말단 갈락토오스-알파-1,3-갈락토오스 결합을 가진 글리칸 구조를 함유하며, 이는 글리코단백질을 치료 목적으로 사용함에 있어 해로운 영향을 미칠 수 있다는 발견에 근거한다. 예를 들어, 말단 알파-갈 결합을 가진 글리코단백질을 치료 목적으로 인간에 투여하면 환자의 재조합 글리코단백질에 단클론항체가 형성됨에 따라, 후속 투여가 덜 효과적이 되거나, 심지어 환자에게 해로운 과민반응을 일으킬 수 있다.
- [0005] 이전의 교시와는 달리, 본 출원인은 놀랍게도 CHO 세포 배양액에서 생성되는 재조합 글리코단백질의 상당한 분량이 말단 gal- $\alpha$ -1,3-gal 결합의 존재를 보임으로써, 환자에게 투여된 단백질 또는 펩티드 생성물에 부작용의 잠재성을 제공할 수 있다는 것을 발견하였다.
- [0006] 본 발명은 CHO 세포로부터의 재조합 글리코단백질의 생성 및 분석에 유용한 화합물과 방법, 그리고 이러한 글리코단백질을 함유하는 조성물을 제공하며, 이때 글리코단백질은 조절된(예컨대, 감소되거나 일부 경우에는는 증가된) 수준의 말단 gal- $\alpha$ -1,3-gal 결합을 포함한다.

#### 과제의 해결 수단

- [0007] 따라서, 제1 양상에서, 본 발명은 중국 햄스터 난소(CHO) 세포군을 평가하는 방법을 포함한다. 특정 구현예에 의하면, 이러한 시험 방법은:
- [0008] (a) 세포군으로부터의 CHO 세포를 하나 이상 제공하는 단계; 및
- [0009] (b) 상기 세포에 의해 생성되는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유한 글리칸을 측정하는 단계를 포함하며, 이때 CHO 세포는 알파-갈락토실 전이효소 암호서열을 발현하도록 유전자 조작 처리를 거치지 않았다.
- [0010] 측정 단계는: (a) 세포에 의해 생성된 글리코단백질을 분리시키고, 글리코단백질에 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸을 측정하는 조작, (b) 세포에 의해 생성된 특이적 글리코단백질 조성물을 분리시키고, 분리된 글리코단백질 조성물에 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸을 측정하는 조작, (c) 세포에 의해 생성된 글리코단백질로부터 글리칸을 분리시키고, 분리된 글리칸에 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸을 측정하는 조작, (d) 글리코단백질 또는 하나 이상의 CHO 세포에 존재하는 글리칸으로부터 단당류를 절단하고, 절단된 단당류로부터 말단기가 방출된 알파-갈락토오스 잔기를 검출하는 조작, (e) 세포에 의해 생성된 글리코단백질로부터 하나 이상의 펩타이드를 제공하고, 상기 하나 이상의 펩타이드에 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸을 측정하는 조작, 및 (f) 하나 이상의 CHO 세포의 세포표면에 있는 글리칸을 측정함으로써 글리코단백질에 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸의 상대적 수준을 측정하는 조작 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 말단 갈락토오스-알파-1,3-갈락토오스 결합을 측정하는데 사용되는 기법에는: 크로마토그래피법, 질량분석(MS)법, 전기영동법(예컨대, 모세관 전기영동), 핵자기공명(NMR)법, 단당류 분석, 형광법, UV-VIS 흡광도 측정, 효소적 방법, 및 검출분자(예컨대, 항체 또는 렉틴)를 사용하는 방법 중 하나 이상, 및 이들 방법의 임의의 조합이 포함될 수 있다.
- [0011] 단계 2의 측정을 위한 글리칸의 공급원은: CHO 세포군; CHO 세포의 표면에 발현된 글리코단백질 또는 글리칸; CHO 세포군의 세포 표면에 존재하는 단백질을 절단시켜 유도되는 펩타이드; CHO 세포군의 표면에 존재하는 글리칸; CHO 세포 또는 CHO 세포군으로부터 발현되는 분리 글리코단백질 발현 생성물로서, CHO 세포군에 의해 분비되거나 발현되는 글리코단백질; CHO 세포 또는 CHO 세포군으로부터 발현되는 분리 단백질 발현 생성물로부터 유도되는 펩타이드; 또는 CHO 세포 또는 직접 CHO 세포군으로부터 발현되는 분리 단백질 발현 생성물로부터 유도되는 글리칸으로 이루어진 군에서 선택할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 방법은 글리칸 또는 글리코펩타이드의



공급원을 알파-갈락토시다아제 효소-함유 엑소글리코시다아제(exoglycosidase) 1종 이상으로 처리한 후 글리칸군(glycan population)을 분석하는 단계를 포함한다.

- [0012] 일부 구현예에 의하면, 본 발명에 사용되는 방법은 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸의 정량적 측정치를 제공한다. 일부 구현예에 의하면, 본 발명에 사용되는 방법은 정성적 측정치를 제공한다.
- [0013] 일부 구현예에서, 본 방법은 또한 CHO 세포 배양액으로부터 글리코단백질 제제를 생성하는 단계, (예컨대,  $\alpha$ -1,3-갈락토시다아제;  $\alpha$ -1,4-갈락토시다아제; 또는  $\alpha$ -1,6-갈락토시다아제 같은 글리코시다아제 1종 이상을 사용하여) 글리코단백질 제제로부터 1종 이상의 글리칸을 절단시키는 단계; 및 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0014] 특정 구현예에서, 본 방법은 치료용 글리코단백질의 생산 실행(production run) 동안에 예를 들어 생산 도중 글리칸의 구조를 모니터링하기 위해 생산 라인의 CHO 세포 배양액으로부터 시료를 채취함으로써 수행된다. 특정 구현예에 의하면, 측정 단계를 시간 경과에 따라 한 번 이상 반복하는데, 예를 들면, CHO 세포 배양 기간 동안 측정 단계를 한 번, 두 번, 세 번 또는 그 이상 반복한다. 다른 구현예에서, 본 방법은, 예를 들어 글리코단백질 생성물의 품질 또는 방출 시험의 일부로, CHO 세포로부터 생성되는 글리코단백질 생성물에 수행된다.
- [0015] 일부 구현예에서, 측정 단계는 제1 CHO 세포군으로부터 생성된 제1 글리코단백질 제제에 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸 수준과, 제2 CHO 세포군으로부터 생성된 제2 글리코단백질 제제에 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸 수준을 비교하는 조작을 포함한다. 일부 이러한 구현예에서는, 상이한 배양 조건 하에 배양된 CHO 세포군으로부터의 글리코단백질 제제의 글리칸을 구하여 비교한다.
- [0016] 일부 구현예에서, 본 방법은 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸 수준을 기준 수준(예컨대, 제어 수준, 또는 제품 사양에서의 범위 또는 수치)에 비교하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0017] 본 방법의 특정 구현예에서, 측정 단계는 말단 알파-갈락토실 잔기가 존재 또는 부재하는지 검출할 수 있는 검출분자의 사용을 포함한다. 특정 구현예에서, 검출분자는 말단 알파-갈락토실 에피토프(epitope)에 결합될 수 있는 항체를 포함한다. 본 발명의 다른 구현예에 의하면, 검출분자는 렉틴을 포함한다. 일부 구현예에서, 검출분자는 형광 부분(fluorescent moiety) 또는 방사성동위원소 부분을 포함할 수 있다.
- [0018] CHO 세포군은 클론 세포군을 포함할 수 있다. CHO 세포군은 배양되거나, 또는 예를 들어 치료용 글리코단백질을 생성하는 생물반응기 내 세포 배양액으로부터의 시료일 수 있다. 특정 구현예에서, CHO 세포군은 치료용 글리코단백질을 암호화하는 하나 이상의 벡터를 이용하여 전환된다. 치료용 글리코단백질은 인체 또는 비인체(non-human)에서 유래하거나 또는 합성될 수 있다. 치료용 글리코단백질은 인간 또는 수의 증상 치료 목적으로 사용될 수 있다.
- [0019] 일부 구현예에서, 본 방법은 세포에 의해 생성된 글리코단백질의 생물학적 활성을 평가하는 단계, 이를 테면, 예컨대 동물 모델에서 생체내 또는 생체의 글리코단백질의 면역원성 잠재능 존재 또는 수준을 평가하는 단계를 더 포함한다.
- [0020] 제2 양상에서, 본 발명은 글리코단백질에 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸을 생성할 수 있도록 하나 이상의 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 스크리닝하는 방법을 포함하며, 상기 방법은:
- [0021] (a) 유전자 조작을 거치지 않은 복수의 CHO 세포군(예컨대, 알파-갈락토실 전이효소 암호서열을 발현하도록 유전자 조작을 거치지 않음)을 제공하여 글리칸에 말단 알파-갈락토실 잔기를 생성하는 단계;
- [0022] (b) 상기 복수의 CHO 세포 각각을 글리코단백질 발현 생성물의 발현에 적합한 조건 하에서 배양시키는 단계;
- [0023] (c) 상기 복수의 CHO 세포 각각에 의해 생성되는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸을 측정하는 단계; 및
- [0024] (d) 상기 복수의 CHO 세포 제제 중 하나 이상을 선택하되, 상기 선택된 CHO 세포 제제에 의해 목표 수준의 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기가 생성되는지에 근거하여 선택하는 단계를 포함한다.
- [0025] 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸은, CHO 세포 제제에 의해 생성된 글리코단백질로부터, CHO 세포 제제의 단리 글리코단백질 발현 생성물로부터, CHO 세포 제제의 글리코단백질 발현 생성물에서 얻은 펩타이드로부터, CHO 세포 제제의 세포 표면 글리칸으로부터, 또는 CHO 세포 제제나 이들의 글리코단백질 발현 생성물에서 얻은 글리칸 제제로부터 수득 및 측정가능하다. 특정 구현예에서, 스크리닝 방법은 세포 배양

액으로부터 글리코단백질 발현 생성물을 단리시키는 단계, 및 단계 (c)에서 세포에 의해 생성된 글리코단백질에서의 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 측정하는 단계를 더 포함한다. 특정 구현예에서, 세포 스크리닝 방법은 글리코단백질 발현 생성물 상에 존재하는 알파-갈락토실 잔기의 양을 정량화하는 단계를 더 포함한다. 특정 구현예에서, 세포 스크리닝 방법의 단계 (b)는 생물반응기에서 수행된다.

- [0026] 상기 복수의 CHO 세포군 각각은 상이한 CHO 균주군, 상이한 클론 세포군, 또는 치료용 글리코단백질을 위한 제조 트레인(manufacturing train) 내 세포 배양액으로부터의 여러 시료들(예컨대, 시간을 두고 채취한 시료들)을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, CHO 세포군은 치료용 글리코단백질(예컨대, 인간 치료용 글리코단백질)을 암호화하는 하나 이상의 백터를 이용하여 전환된다. 세포 스크리닝 방법의 특정 구현예에 의하면, 글리코단백질 발현 생성물은 CHO 세포로부터 발현된 분비형 글리코단백질이다.
- [0027] 스크리닝 방법 중 측정 단계는 글리코단백질 상의 말단 알파-갈락토실 잔기를 동정(identify) 및/또는 정량화하기 위해 본원에 개시된 임의의 기법을 포함할 수 있다.
- [0028] 제3 양상에서, 본 발명은 CHO 숙주 세포에 생성된 글리코단백질 조성물의 평가 방법을 포함한다. 이 방법은 글리코단백질 조성물에 존재하는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스의 양을 측정하는 단계를 포함하며, 여기서 글리코단백질 조성물은 CHO 숙주 세포에서 생성된 것이고, CHO 숙주 세포는 알파-갈락토실 전이효소 암호서열을 발현하도록 유전자 조작 처리를 거치지 않았다.
- [0029] 일부 구현예에 의하면, 본 방법은 글리코단백질 조성물에 존재하는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 수준을 인쇄매체 또는 컴퓨터 관독가능 매체에 기록하는 단계를 포함한다.
- [0030] 일부 구현예에 의하면, 본 방법은 또한 글리코단백질 조성물에 존재하는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스의 측정 수준을 예컨대 대조 또는 기준 사양 등의 기준 수준과 비교하는 단계를 포함한다. 기준 수준은 글리코단백질 조성물을 함유하는 약학적 제제에 대한 사양(예컨대, FDA 라벨 또는 Physician's Insert) 또는 품질 평가기준일 수 있다.
- [0031] 일부 구현예에 의하면, 글리코단백질 조성물에 존재하는 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스가 5% 이하, 예컨대, 4.5% 이하, 4%, 3.5%, 3%, 2.5%, 2%, 1.5%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.2%, 0.1% 또는 그 미만인 기준 수준 또는 품질 평가기준이다. 글리코단백질 조성물에 존재하는 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스의 수준은 글리코단백질 제제 같은 시료 내 글리칸 총량에 대한 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스-함유 글리칸의 수준으로서 측정될 수 있다.
- [0032] 일 구현예에서, 말단 gal- $\alpha$ -1,3-gal 결합을 측정하는데 사용하는 기법에는 크로마토그래프법이 포함된다.
- [0033] 일 구현예에서, 말단 gal- $\alpha$ -1,3-gal 결합을 측정하는데 사용하는 기법에는 질량분석(MS)법이 포함된다.
- [0034] 일 구현예에서, 말단 gal- $\alpha$ -1,3-gal 결합을 측정하는데 사용하는 기법에는 전기영동법(예컨대, 모세관 전기영동)이 포함된다.
- [0035] 일 구현예에서, 말단 gal- $\alpha$ -1,3-gal 결합을 측정하는데 사용하는 기법에는 핵자기공명(NMR)법이 포함된다.
- [0036] 일 구현예에서, 말단 gal- $\alpha$ -1,3-gal 결합을 측정하는데 사용하는 기법에는 단당류 분석이 포함된다.
- [0037] 일 구현예에서, 말단 gal- $\alpha$ -1,3-gal 결합을 측정하는데 사용하는 기법에는 형광법이 포함된다.
- [0038] 일 구현예에서, 말단 gal- $\alpha$ -1,3-gal 결합을 측정하는데 사용하는 기법에는 UV-VIS 흡광도 측정이 포함된다.
- [0039] 일 구현예에서, 말단 gal- $\alpha$ -1,3-gal 결합을 측정하는데 사용하는 기법에는 효소적 방법이 포함된다.
- [0040] 일 구현예에서, 말단 gal- $\alpha$ -1,3-gal 결합을 측정하는데 사용하는 기법에는 검출분자(예컨대, 항체 또는 렉틴)를 사용하는 방법이 포함된다.

**도면의 간단한 설명**

- [0041] **도 1**은 N-글리칸 구조에 공통적인 코어 5당류를 예시한다.
- 도 2**는 말단 gal- $\alpha$ -1,3-gal 결합을 갖는 비환원 말단 N-글리칸 구조를 예시한다.
- 도 3**은 아바타셉트(Abatacept)로부터 유도되는 글리칸의 일부분에 대한 형광 크로마토그램으로, 갈락토오스- $\alpha$ -1-3-결합된 갈락토오스-함유 구조에 해당될 수 있는 조성물 HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>6</sub>Fuc<sub>1</sub>을 가진 글리칸 종의 검출을 보여준

다.

도 4는 조성물 HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>6</sub>Fuc<sub>1</sub>을 가진 아바타셋트로부터 유도된 글리칸 종의 MS<sup>2</sup> 스펙트럼을 예시한다. 스펙트럼은 비-환원성 말단 갈락토오스-α-1-3-갈락토오스를 함유하는 글리칸 구조와 상관 관계를 가진다.

도 5는 아바타셋트 및 대조군 단백질(또한 조성물 HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>6</sub>Fuc<sub>1</sub>을 가진 글리칸을 함유함)로부터 유도된 글리칸의 일부분을 α-갈락토시다아제로 처리하기 전후의 형광 크로마토그램이다.

도 6은 아바타셋트로부터 유도된 글리칸 부분을 알파 갈락토시다아제로 처리하여 생성된 조성물 HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>6</sub>Fuc<sub>1</sub>을 가진 종들의 MS<sup>2</sup> 스펙트럼이다.

도 7은 아바타셋트로부터 유도된 글리칸의 일부분을 여러 엑소글리코시다아제로 처리한 후의 MALDI-MS 스펙트럼을 예시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### [0042] 정의

[0043] 이하에 달리 명시되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 용어는 당업자가 이해하는 바와 같은 그들 통상의 의미로 사용된다.

[0044] *대략, 약, Ca*: 본원에 사용된 바와 같이, 해당되는 하나 이상의 값에 적용되는 "대략", "약" 또는 "ca.,"란 용어는 명시된 기준값에 유사한 값을 가리킨다. 특정 구현예에서, "대략", "약" 또는 "CA.,"란 용어는 명시된 기준값의 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 미만에 속하는 값들의 범위를 가리킨다.

[0045] *검출, 검출하는*: 본원에 사용된 바와 같이, "검출하는", "검출" 및 "검출 수단"이란 용어들은 서로 혼용되어 사용되어 말단 알파-1,3-갈락토실 잔기와 같은 특정의 화학적 부분이 화합물, 조성물, 세포 또는 세포군에 존재 또는 부재하는지 결정하는 것을 가리킨다. 검출 수단은 선별 마커, 또는 형광 부분 또는 방사성 부분 같은 확인 가능한 특성을 이용하거나, 또는 시약, 화합물, 세포 또는 세포군의 라벨링 방법을 이용할 수 있다. 또한 검출은 화합물, 조성물, 세포 또는 세포군 상에 화학적 부분이 존재 또는 부재하는지 결정하기 위해 질량분석법 또는 관련 방법들, 전기영동법, 핵자기공명법, 크로마토그래피법 또는 이들의 조합과 같은 기법을 이용한 화합물, 조성물, 세포 또는 세포군의 분석을 가리킬 수 있다. 검출은 또한 검출대상 화학적 부분의 절대적 수준 또는 상대적 수준을 정량화하는 것을 포함할 수 있다.

[0046] *글리칸*: 당해 기술분야에 공지되어 있으며 본원에 사용된 바와 같이, "글리칸"은 당류이다. 글리칸은 당잔기의 단량체 또는 중합체일 수 있지만, 보통은 3종 이상의 당을 함유하며, 선형이거나 또는 분지형일 수 있다. 글리칸은 천연 당잔기(예컨대, 글루코오스, N-아세틸글루코사민, N-아세틸 뉴라민산, 갈락토오스, 마노스, 푸코스(fucose), 헥소스, 아라비노오스, 리보오스, 자일로스 등) 및/또는 변형된 당(예컨대, 2'-플루오리보오스, 2'-디옥시리보오스, 포스포마노스, 6'숄포 N-아세틸글루코사민 등)을 포함할 수 있다. "글리칸"이란 용어는 당잔기의 단일중합체 및 이중중합체를 포함한다. "글리칸"이란 용어는 또한 글리코단백질의 글리칸 구성요소(예컨대, 글리코단백질, 글리코지질(glycolipid), 프로테오글리칸 등)를 포함할 수 있다. 이 용어는 또한 글리코단백질로부터 절단되었거나 아니면 방출된 글리칸 등의 자유 글리칸을 포함한다.

[0047] *글리칸 제제*: 본원에 사용된 바와 같이 "글리칸 제제"란 용어는 특정 생성 방법에 따라 얻어지는 글리칸의 집합체를 가리킨다. 일부 구현예에서, 글리칸 제제는 글리코단백질 제제(하기 글리코단백질 제제의 정의를 참조함)로부터 얻어지는 글리칸의 집합체를 가리킨다. 일부 구현예에 의하면, 글리칸 제제에는 글리코단백질이 포함된다. 일부 구현예에 의하면, 글리칸 제제에는 방출된 글리칸이 포함된다.

[0048] *글리코단백질*: 본원에 사용된 바와 같이, "글리코단백질"이란 용어는 (여기에 정의된 바대로) 하나 이상의 당 부분(즉, 글리칸)에 공유결합된 펩타이드 주쇄를 함유하는 "단백질"을 가리킨다. 당업자가 알고 있는 바와 같이, 펩타이드 주쇄는 보통 아미노산 잔기의 선형 사슬을 포함한다. 당잔기(들)는 단당류, 이당류, 올리고당류 및/또는 다당류 형태로 존재할 수 있다. 당잔기(들)는 비분지형(unbranched) 단일 사슬, 또는 하나 이상의 분지형 사슬의 당잔기들로 이루어질 수 있다. 특정 구현예에 의하면, 당잔기는 황산염기 및/또는 인산염기를 포함할 수 있다. 대안 또는 추가적으로, 당잔기에는 아세틸기, 글리콜기, 프로필기 또는 기타 다른 알킬 변형 형태(alkyl modification)가 포함될 수 있다. 특정 구현예에 의하면, 글리코단백질에는 O-결합 당잔기가 함유되며;

특정 구현예에 의하면, 글리코단백질에는 N-결합 당잔기가 함유된다.

- [0049] **글리코단백질 제제:** 본원에 사용된 바와 같이, "글리코단백질 제제"란 용어는 개별적 글리코단백질 분자들의 집합체를 가리키며, 각각은 특정 아미노산 서열(하나 이상의 글리코실화 부위를 포함함)을 갖는 폴리펩타이드 및 상기 하나 이상의 글리코실화 부위에 공유결합된 하나 이상의 글리칸을 포함한다. 글리코단백질 제제 내의 특정 글리코단백질의 개별 분자들은 동일한 아미노산 서열을 가지지만, 하나 이상의 글리코실화 부위의 점유 및 /또는 하나 이상의 글리코실화 부위에 결합된 글리칸의 고유성 면에서 다를 수 있다. 다시 말해, 글리코단백질 제제는 특정 글리코단백질의 단일 단백질형만 함유할 수 있으나, 더 일반적으로는 복수의 단백질형을 함유한다. 동일한 글리코단백질의 상이한 제제들은 존재하고 있는 단백질형과 다를 수 있고/있거나(예컨대, 한 제제에 존재하는 단백질형은 다른 제제에서는 부재일 수 있음) 상이한 단백질형의 상대량 면에서 다를 수 있다.
- [0050] **글리코시다아제:** 본원에 사용된 바와 같이, "글리코시다아제"란 용어는 글리칸 내 연속적 당들 사이의 공유결합 또는 당과 주쇄부분 사이(예컨대, 당과 글리코단백질의 펩타이드 주쇄 사이)의 공유결합을 절단시키는 작용제를 가리킨다. 일부 구현예에 의하면, 글리코시다아제는 효소이다. 특정 구현예에서, 글리코시다아제는 하나 이상의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 단백질(예컨대, 단백질 효소)이다. 특정 구현예에서, 글리코시다아제는 화학적 절단제, 예를 들어, 하이드라진이다.
- [0051] **N-글리칸:** 본원에 사용된 바와 같이, "N-글리칸"이란 용어는 이전에 질소 결합을 통해 글리코단백질에 결합되었으나(하기 N-결합 글리칸의 정의를 참조) 글리코단백질로부터 방출된 당의 중합체를 가리킨다.
- [0052] **N-결합 글리칸:** N-결합 글리칸은 질소 결합을 통해 글리코단백질에 결합된 글리칸이다. 여러 종류의 N-결합 글리칸이 존재하지만, 보통은 공통된 코어 5당(Man)<sub>3</sub>(GlcNAc)(GlcNAc)에 기초한다.
- [0053] **O-글리칸:** 본원에 사용된 바와 같이, "O-글리칸"이란 용어는 이전에 산소 결합을 통해 당포합체 (glycoconjugate)에 결합되었으나(하기 O-결합 글리칸의 정의를 참조) 당포합체로부터 방출된 당의 중합체를 가리킨다.
- [0054] **O-결합 글리칸:** O-결합 글리칸은 산소 결합을 통해 당포합체에 결합된 글리칸이다. 보통 O-결합 글리칸은, L-세린(Ser) 또는 L-쓰레오닌(Thr)의 하이드록실기에 결합된 N-아세틸-D-갈락토사민(GalNAc) 또는 N-아세틸-D-글루코사민(GlcNAc)을 통해 글리코단백질에 부착된다.
- [0055] **조절(modulate):** 본원에 사용된 바와 같이 "조절"이란 용어는, 미리 정해진 제한범위 내에서, 글리코단백질 조성물에 존재하는 알파-갈락토오스 잔기의 수준 같은 변수의 값을 조정하는 작용주체(actor)의 능력을 가리킨다. 따라서, 일부 구현예에서는, 알파-갈락토오스 잔기의 수준을 조절함으로써 미리 정해진 제한범위 내에 유지되도록 할 수 있다. 일부 구현예에서는, 알파-갈락토오스 잔기의 수준을 조절함으로써, 글리코단백질 조성물에 존재하는 전체 N-글리칸의 5.0%, 1.0%, 0.5%, 0.1%, 0.05% 또는 0.01%를 초과하지 않도록 한다. 다른 구현예에서는, 알파-갈락토오스 잔기의 수준을 조절함으로써 미리 정해진 수준 또는 원하는 수준에서 10.0%, 5.0%, 1.0%, 0.5% 또는 0.1% 넘게 변화되지 않도록 한다.
- [0056] **프로테아제(protease):** 본원에 사용된 바와 같이, "프로테아제"란 용어는 폴리펩타이드 사슬 내 연속적 아미노산 사이의 펩타이드 결합을 절단시키는 작용제를 가리킨다. 일부 구현예에서, 프로테아제는 효소(즉, 단백질분해 효소)이다. 특정 구현예에 의하면, 프로테아제는 하나 이상의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 단백질(예컨대, 단백질 효소)이다. 특정 구현예에 의하면, 프로테아제는 화학적 절단제이다.
- [0057] **제공:** 본원에 사용된 바와 같이, "제공"이란 용어는 CHO 세포, CHO 세포 제제 또는 글리코단백질 제제 같은 대상 항목을 임의의 공급원으로부터 얻는 작용주체를 가리키며, 작용주체 자체가 항목을 제조하거나 또는 작용주체가 다른 주체(another party)로부터 항목을 입수하는 방법이 포함되되, 이에 한정되지는 않는다. 예를 들어, CHO 세포 제제는, 제조 또는 입수된 경우에, 임의의 기계, 사람 또는 단체에 의해 제공된다. 일부 구현예에서는, 기계에 의해 CHO 세포 제제를 입수한 후에 글리코단백질 제제에 하나 이상의 시험, 처리 또는 정제 조작을 수행할 수 있다. 일부 구현예에 의하면, 사람에 의해 CHO 세포 제제를 입수할 수 있다. 일부 구현예에 의하면, 외부 단체에 의해 CHO 세포 제제를 입수할 수 있다. 일부 구현예에 의하면, 제2의 사람 또는 사업체를 위해 특성화 서비스를 수행하는 사람 또는 사업체에 의해 CHO 세포 제제를 입수할 수 있다.
- [0058] **말단 α-1,3-갈락토오스 잔기; 말단 gal-α-1,3-gal 결합:** 본원에 사용된 바와 같이, "말단 α-1,3-갈락토오스 잔기", "말단 gal-α-1,3-gal 결합" 및 "비-환원성 말단 α-1,3 결합 갈락토오스 잔기"란 용어들은 서로 혼용되어 사용되어 도 2에 예시된 글리칸 구조를 설명하는 것으로, 이때 펩타이드 또는 단백질에 부착될 수 있는 글리

칸 구조는 갈락토오스 분자들 상에 각각 잔기 1 및 잔기 3으로 명명되는 잔기들에서 서로에게 결합된 두 갈락토오스 잔기로 말단이 구성된다.

[0059] 비록 재조합 글리코단백질 합성에 사용되는 숙주 세포가 복잡한 글리코실화를 생성하기 위한 세포내 기구를 갖고 있지만, 글리코단백질이 자연적으로 발현되는 세포와 동일한 효소 보체(compliment of enzymes)를 이들 세포가 항상 소유하고 있지는 않다. 세포주의 클론 선택 및 생성 조건의 다양화로 인해, 배양된 세포에서 발현되는 글리코단백질이 불균질하게 될 수도 있다. 글리코단백질 합성에서 글리코실화 반응의 기능적 역할을 위해, 세포주에서 생성되는 치료용 생성물을 주의깊게 특징화시킬 필요가 있다.

[0060] 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에 의해 생성되는 재조합 글리코단백질에는 말단 gal- $\alpha$ -1,3-gal 결합이 존재하지 않는다는 것이 이전에 보고된 적이 있다. Chung et al., N Engl J Med, 358:11(2008)을 참조한다. 본 발명의 적어도 일부가 말단  $\alpha$ -1,3-갈락토오스 잔기를 CHO 세포에 의해 생성되는 글리코단백질에서 발견할 수 있다는 예상치 않은 발견에 근거를 둬서 따라, CHO 세포를 사용할 때 이러한 글리칸 구조의 양상을 확인하고, 모니터링 하며, 제어하여 치료용 제품을 생성하는 것이 중요하다.

[0061] 본 발명은 CHO 세포에 의해 생성되는 글리코단백질의 글리칸 조성물을 분석하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, CHO 세포에서 생성된 글리코단백질 제제로부터의 글리칸을 분석하여 이들 글리칸이 말단  $\alpha$ -1,3-갈락토오스 잔기를 포함하는지 결정할 수 있다. 본 발명은 이러한 변형체(modification)를 검출하는 방법, 및 이러한 변형체를 포함하거나 결여된 글리코단백질을 생성하는 방법을 제공한다.

[0062] 글리칸 제제

[0063] 본 발명은 글리칸 제제 내의 개별적 글리칸의 구조 및/또는 조성물을 분석하는 방법, 예컨대, CHO 세포에 의해 생성된 말단 갈락토오스-알파-1-3-갈락토오스 잔기를 함유하는 글리칸을 평가하고, 예컨대 CHO 세포에 의해 생성된 글리코단백질 상의 말단 알파-갈락토실 잔기를 평가하는 방법을 제공한다. 글리칸 제제는 당해 기술분야에서 이용가능한 임의의 방법을 통해 세포 제제 또는 글리코단백질로부터 얻을 수 있다. 일반적으로, 글리칸 제제를 얻는 방법은 (1) 세포 제제 또는 글리코단백질 제제를 얻는 단계; 및 (2) 선택적으로는, 세포 제제 또는 글리코단백질 제제로부터 글리칸을 방출하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에 의하면, 글리칸 제제를 얻는 방법은 검출가능한 라벨을 가진 글리칸 제제를 라벨링하는 단계를 선택적으로 포함한다.

[0064] 글리코단백질 제제

[0065] 글리코단백질의 재조합 생성 방법을 기술하였다. 배양된 세포에 의해 분비되는 글리코단백질은 모든 이용가능한 수단, 이를 테면, 음이온-교환 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 겔 여과, 면역친화 크로마토그래피, 및 이들의 조합에 의해 분리 및 정제될 수 있다.

[0066] N-결합 글리칸 제제

[0067] 일부 구현예에 의하면, N-글리칸 제제는 글리코단백질 균을 제공하고, 상기 균에 있는 글리코단백질로부터 N-결합 글리칸을 제거함으로써 얻어진다.

[0068] 일부 구현예에 의하면, N-결합 글리칸은 분해(digestion) 작용을 통해 글리코단백질로부터 제거된다. 일반적으로, 본 발명에 따라 사용되는 글리카나아제(glycanase)가 코어의 GlcNAc-Asn, GlcNAc-GlcNAc, 또는 Man-GlcNAc 잔기들 사이에서 절단된다. 글리코단백질로부터 N-결합 글리칸을 제거시키는 데 사용될 수 있는 바람직한 효소로는, N-글리카나아제 F 및/또는 N-글리카나아제-A, O-글리카나아제 및/또는 엔도(Endo) H가 포함되되, 이에 한정되지는 않는다.

[0069] 일부 구현예에 의하면, N-결합 글리칸은 화학적 절단을 통해 글리코단백질로부터 제거된다. 단지 몇가지 예를 들자면, 하이드라진, 수소화붕소 나트륨(sodium borohydride) 및/또는 트리플루오로메탄 술폰산(TFMS)을 사용하여 글리코단백질로부터 글리칸을 제거할 수 있다.

[0070] O-결합 글리칸 제제

[0071] 일부 구현예에 의하면, O-결합 글리칸 제제는 글리코단백질균을 제공하고, 상기 균에 있는 글리코단백질로부터 O-결합 글리칸을 제거함으로써 얻어진다.

[0072] 일부 구현예에 의하면, O-결합 글리칸은 b-제거법(b-elimination)을 통해 글리코단백질로부터 제거된다. 일부 구현예에 의하면, O-결합 글리칸은 환원성 b-제거법을 통해 글리코단백질로부터 제거된다. 일부 구현예에 의하면, O-글리칸은 비환원성 b-제거법을 통해 글리코단백질로부터 제거된다.

- [0073] 일부 구현예에서는, 글리코단백질 제제를 알칼리성 테트라하이드로붕산염이 함유된 용액에 배양시킴으로써 글리코단백질 제제로부터 O-결합 글리칸을 제거시킨다. 일부 구현예에서는 예를 들면 O-결합 글리칸의 검출을 용이하게 하는 듀테리움 라벨을 도입하는데 테트라듀테리오붕산염(tetradeuterioborate)을 사용한다. 다양한 바람직한 방법에서는, 글리코단백질 제제를 0.8-1.0M NaBH<sub>4</sub> 및 0.05-0.1M NaOH가 함유된 용액에 42-45°C에서 2-24 시간 동안 배양시킨다. O-결합 글리칸을 제거하는 반응은 산(예컨대, 1.0M HCl)을 첨가함으로써 종결시킬 수 있다.
- [0074] 일부 구현예에서는, 글리코단백질 제제를 NaOH가 함유된 용액에 배양시킴으로써 글리코단백질 제제로부터 O-결합 글리칸을 제거시킨다. 다양한 바람직한 방법에서는, 글리코단백질을 50-200mM NaOH가 함유된 용액에 27-45°C에서 2-48 시간 동안 배양시킨다. 산을 첨가함으로써 반응을 종결시킬 수 있다.
- [0075] 일부 구현예에서는, 글리코단백질 제제를 NH<sub>4</sub>OH가 함유된 용액에 배양시킴으로써 글리코단백질 제제로부터 O-결합 글리칸을 제거한다. 다양한 바람직한 방법에서는, 글리코단백질을 25-28% NH<sub>4</sub>OH가 함유된 용액에 45-60°C에서 2-40 시간 동안 배양시킨다. 진공 하에서 NH<sub>4</sub>OH를 제거함으로써 반응을 종결시킬 수 있다. 일부 구현예에 의하면, 용액에는 (예컨대, 포화 농도로) 탄산암모늄이 함유된다. 일부 구현예에서는, NH<sub>4</sub>OH-처리된 제제를 산(예컨대, 붕산)으로 처리한다.
- [0076] 일부 구현예에서는, 글리코단백질 제제를 에틸아민(예컨대, 약 70%의 에틸아민) 또는 메틸아민(예컨대, 약 40%의 메틸아민)이 함유된 수용액에 약 4-24 시간 동안 배양시킴으로써 글리코단백질 제제로부터 O-결합 글리칸을 제거한다.
- [0077] 일부 구현예에서는, N-결합 글리칸이 제거되었던 글리코단백질 균으로부터 O-결합 글리칸 제제를 얻을 수 있다.
- [0078] 글리칸 라벨링
- [0079] 일부 구현예에 의하면, 글리코단백질로부터의 방출 전후로 글리칸에 라벨을 표시할 수 있다. N-결합 글리칸 또는 O-결합 글리칸(예컨대, 글리코단백질 균으로부터 제거되었던 N-글리칸)에 하나 이상의 검출가능 라벨을 표시할 수 있다. 검출가능 라벨은 보통 글리칸의 환원말단과 부착(associate)될 수 있다. 일부 구현예에 의하면, 검출가능 라벨은 형광 부분이다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 바람직한 형광물질(fluorophore)에는 2-아미노벤조산(2AA), 2-아미노벤즈아미드(2AB), 및/또는 2-아미노퓨린(2AP)이 포함되되, 이에 한정되지는 않는다. 일반적으로, 본 발명에 따라 사용되는 형광물질은 글리칸을 손상시키고/시키거나 파괴하지 않는 조건 하에서 올리고당 및/또는 단당의 환원말단과 반응하는 것을 특징으로 한다. 일부 구현예에 의하면, 형광 부분은 환원말단에 직접 부착된다. 예를 들어, 이러한 직접적인 부착은 환원성 아민화 반응에 의한 직접 포함으로 달성될 수 있다. 일부 구현예에서는, 형광 부분이 환원말단에 간접적으로 부착된다. 예를 들어, 이러한 간접적인 부착은 반응성 링커 암(linker arm)에 의해 달성될 수 있다.
- [0080] 일부 구현예에서, 검출가능 라벨은 방사성 부분을 포함하거나 또는 동위원소-라벨링된 분자를 포함한다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 바람직한 방사성 부분으로는, 트리튬(<sup>3</sup>H), 듀테리움(<sup>2</sup>H), 및/또는 <sup>35</sup>S가 포함되되, 이에 한정되지는 않는다. 보통, 이러한 부분은 형광물질에 직접 부착되거나, 그렇지 않으면 형광물질과 부착된다. 방사성 형광물질의 단지 한 예를 들자면, 모든 수소가 중수소화되도록 2AP를 개질시킬 수 있다.
- [0081] 글리칸 방출
- [0082] 본 발명은 글리코단백질의 글리코실화 패턴을 결정하는 개선된 방법을 제공한다. 이러한 방법은 글리칸 균을 1종 이상의 엑소글리코시다아제로 처리하는 단계와, 분해 생성물(digestion product)의 구조 및/또는 조성물을 분석하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예에 의하면, 본 발명에 따라 사용되는 엑소글리코시다아제는 글리코시드 결합의 한 특정 유형만 인식하고 절단시킨다. 일부 구현예에 의하면, 본 발명에 따라 사용되는 엑소글리코시다아제는 1종 이상의 특정 글리코시드 결합 유형을 인식하고 절단시킨다. 본 발명에 유용할 수 있는 엑소글리코시다아제 중에는 표 1에 기술한 바와 같이 α-갈락토시다아제, β-갈락토시다아제; 헥소사미니다아제, 마노시다아제; 및 이들의 조합물이 있다.
- [0083] 엑소글리코시다아제
- [0084] 엑소글리코시다아제는 글리칸의 비-환원말단으로부터 말단 글리코시드 결합을 절단시키는 효소이다. 이들은 보통 특정 단당 결합 및 아노머성(anomericity)(α/β)에 매우 특이적이다. 일부 구현예에 의하면, 이웃하는 분지

형 패턴이 엑소글리코시다아제 특이성에 영향을 미칠 수 있다. 대개 엑소글리코시다아제 처리의 결과로, 3 마노스 및 2 GlcNAc 잔기를 함유한 5당 코어(M3N2)까지 절단되는 표준 안테나 결합(antennary linkage)의 글리칸이 생성된다. 그러나, 비정상적으로 개질된 종(예컨대, 안테나 또는 코어 푸코실화 종, 고(high)-마노스 및 혼종 글리칸, 락토사민-연장 글리칸, 황화 글리칸, 인산화 글리칸 등)은 엑소글리코시다아제 처리에 내성을 띄며, M3N2 5당에 대해 크로마토그래피적으로 용해되어 정량화될 수 있다.

[0085] 본 발명에 따라 사용될 수 있는 바람직한 엑소글리코시다아제로는, 시알리다아제, 갈락토시다아제, 헥소사미니다아제, 푸코시다아제 및 마노시다아제가 포함되되, 이에 한정되지는 않는다. 엑소글리코시다아제는 상업용 공급원을 포함한 임의의 공급원으로부터 얻을 수 있거나, 또는 세포원(예컨대, 박테리아, 효모, 식물 등)으로부터의 분리 및/또는 정제 방법을 통해 얻을 수 있다.

[0086] 일부 구현예에 의하면, 엑소글리코시다아제(예컨대, 시알리다아제, 갈락토시다아제, 헥소사미니다아제, 푸코시다아제 및 마노시다아제)를 다수의 부류 또는 부분집합체(subset)로 구분할 수 있다. 일부 구현예에 의하면, 서로 상이한 부분집합체는 서로 상이한 유형의 결합을 절단시키는 다양한 능력을 나타낸다. 일부 바람직한 엑소글리코시다아제, 이들의 결합 특이성 및 이들 각각이 유도된 유기체(organism)를 표 1에 제공하였다. 당업자라면 이들이 엑소글리코시다아제 목록의 전체가 아닌 한 예이고, 임의의 결합특이성을 갖는 모든 엑소글리코시다아제를 본 발명에 따라 사용할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

표 1

엑소글리코시다아제

효소 종류	EC #*	활성	유기체
α-시알리다아제	3.2.1.18	α-2/3,6,8 (보통 결합 특이성이 없음)	아트르박터 우레아파키엔스 콜레라균 가스피저균
		α-2,3 (올리고당류로부터의 NeuAc)	살모넬라균 페렴연쇄구균
		α-2/3,6 (복합체로부터의 NeuAc)	가스피저균
β-갈락토시다아제	3.2.1.23	β-1/3,4,6 Gal 결합	우낭 크산토모나스종 연쇄구균종 대장균
		β-1/4,6 Gal 결합	작두콩
		β-1,4 Gal 결합	페렴연쇄구균
		β-1,3-Gal 결합	대장균
		β-1/3,6-Gal 결합	크산토모나스종 대장균
β-헥소사미니다아제	3.2.1.52 3.2.1.30	β-1/2,3,4,6 헥소사민	연쇄구균플리카투스 페렴연쇄구균 박테로이데스 작두콩
α-푸코시다아제	3.2.1.51 3.2.1.111	α-1-3,4-Fuc (보통 디-글리코실레이트 루이스 구조임)	크산토모나스 아몬드식
		α-1/2,3,4,6-Fuc (보통 광(broad)특이성을 가짐)	소신장 크리서박테리움메니고셀터쿰
		α-1,6-Fuc	대장균
		α-1,2-Fuc	크산토모나스
α-마노시다아제	3.2.1.24	α-1/2,3,6-Man	작두콩
		α-1/2,3-Man	크산토모나스마니호티스
		α-1,6-Man (통상, 코어 마노시다아제)	크산토모나스종
		α-1,2-Man	아스페르길루스사이토이
β-마노시다아제	3.2.1.25	α-1,4-Man	헬릭스포마티아(브르코뉴달팽이)

[0087]

[0088] \* "EC #"은 효소협회 등록 번호를 가리킨다.

[0089] 본 발명에 따르면, 글리칸 군은 임의의 엑소글리코시다아제 또는 엑소글리코시다아제의 임의의 집합체를 이용하여 분해가능하다. 일반적으로, 엑소글리코시다아제 반응은 효소 활성에 적합한 조건 하에서 일어난다. 예를 들어, 원하는 수준의 엑소글리코시다아제 활성을 달성하기 위해 pH, 온도, 반응액 구성요소 및 농도(예컨대, 염, 세제 등), 그리고 반응시간의 길이를 최적화시킬 수 있다. 예컨대, 본원에 내용이 참조로 통합된 WO 2008/130926을 참고한다.

- [0090] 글리칸의 구조 및 활성 분석
- [0091] 일반적으로, 본 발명에 따른 방법은 글리칸 제제를 분석하여 글리칸에 특정 유형의 변형체(예컨대, 말단 α-1,3-갈락토오스 잔기)가 포함되어 있는지 결정하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에 의하면, 상기 분석은 하나의 공급원으로부터 얻은 한(one) 글리코단백질 제제 내 글리칸의 구조 및/또는 기능을 다른 공급원으로부터 얻은 1종 이상의 다른 글리코단백질 제제 내 글리칸의 구조 및/또는 기능과 비교하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에 의하면, 상기 분석은 하나 이상의 시료 내 글리칸의 구조 및/또는 기능을 기준 시료 내 글리칸의 구조 및/또는 기능과 비교하는 단계를 포함한다.
- [0092] 글리칸의 구조 및 조성물은 임의의 이용가능한 방법을 통해 분석가능하다. 일부 구현예에 있어서, 글리칸의 구조 및 조성물은 크로마토그래피법, 질량분석(MS)법, 크로마토그래피법과 후속으로는 MS법, 전기영동법, 전기영동법과 후속으로는 MS법, 핵자기공명(NMR)법, 및 이들의 조합으로 분석가능하다.
- [0093] 일부 구현예에 있어서, 글리칸의 구조 및 조성물은 액체 크로마토그래피(LC), 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 초고성능 액체 크로마토그래피(UPLC), 박막 크로마토그래피(TLC), 아미드 칼럼 크로마토그래피, 및 이들의 조합을 포함하되 이에 한정되지는 않는 크로마토그래피법을 통해 분석가능하다.
- [0094] 일부 구현예에 있어서, 글리칸의 구조 및 조성물은 탠덤(초정밀 이중) MS, LC-MS, LC-MS/MS, 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온 질량분석(MALDI-MS), 푸리에 변환 질량분석(FTMS), 질량분석을 겸한 이온 이동성 분리(IMS-MS), 전자 전달 해리 질량분석(ETD-MS), 및 이들의 조합을 포함하되 이에 한정되지는 않는 질량분석(MS) 및 관련 방법을 통해 분석가능하다.
- [0095] 일부 구현예에 있어서, 글리칸의 구조 및 조성물은 모세관 전기영동(CE), CE-MS, 겔 전기영동, 아가로오스 겔 전기영동, 아크릴아미드 겔 전기영동, SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)과 후속으로는 특이 글리칸 구조를 인식하는 항체를 이용한 웨스턴 블로팅(Western blotting) 방법, 및 이들의 조합을 포함하되 이에 한정되지는 않는 전기영동법을 통해 분석가능하다.
- [0096] 일부 구현예에 있어서, 글리칸의 구조 및 조성물은 1차원 NMR(1D-NMR), 2차원 NMR(2D-NMR), 상관 분광학 자기각도 스피닝 NMR(COSY-NMR), 총 상관 분광학 NMR(TOCSY-NMR), 이핵 단일-양자 결맞음 NMR(HSQC-NMR), 이핵 이중-양자 결맞음 NMR(HMQC-NMR), 회전 핵 오버하우저 효과 분광학 NMR(ROESY-NMR), 핵 오버하우저 효과 분광학 NMR(ROESY-NMR), 및 이들의 조합을 포함하되 이에 한정되지는 않는 핵자기공명(NMR) 및 관련 방법을 통해 분석가능하다.
- [0097] 일부 구현예에 의하면, 여기에 기술된 기법들은 글리칸 또는 글리칸단백질의 검출, 분석 및/또는 단리를 위한 기타 다른 기법들 중 하나 이상과 조합될 수 있다. 예를 들어, 특정 구현예에 의하면, 하나 이상의 이용가능한 방법을 이용하여 본 발명에 따라 글리칸을 분석한다(단지 몇가지 예로, Anumula, *Anal. Biochem.* 350(1):1, 2006; Klein et al., *Anal. Biochem.*, 179:162, 1989; 및/또는 Townsend, R.R. *Carbohydrate Analysis" High Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis.*, Ed. Z. El Rassi, pp 181-209, 1995를 참고하면 되며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 통합됨). 예를 들어, 일부 구현예에서는, 크로마토그래피법, 전기영동법, 핵자기공명법, 및 이들의 조합에 의해 글리칸을 특징화한다. 이러한 바람직한 방법에는, 예를 들어, NMR, 질량분석, 액체 크로마토그래피, 2차원 크로마토그래피, SDS-PAGE, 항체염색, 렉틴염색, 단당 정량, 모세관 전기영동, 형광단-보조 탄수화물 전기영동(FACE), 마이셀 전기동역학적 크로마토그래피(MEKC), 엑소글리코시다아제 또는 엔도글리코시다아제 처리, 및 이들의 조합이 포함된다. 당업자라면 글리칸을 특징화하는데 있어서 본원에 기술된 방법들과 함께 기타 다른 기법들을 이용할 수 있다는 것을 이해할 것이다.
- [0098] 일부 구현예에 의하면, 본원에 기술된 방법은 글리칸 군 내에 낮은 수준으로 존재하는 글리칸 종(이를 테면 말단 알파-갈락토실 잔기)을 검출할 수 있도록 한다. 예를 들면, 본 방법은 글리칸 군 내에 10% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 1.5% 미만, 1% 미만, 0.75% 미만, 0.5% 미만, 0.25% 미만, 0.1% 미만, 0.075% 미만, 0.05% 미만, 0.025% 미만, 또는 0.01% 미만의 수준으로 존재하는 글리칸 종을 검출할 수 있도록 한다.
- [0099] 일부 구현예에 의하면, 본원에 기술된 방법은 글리칸 군 내에 낮은 수준으로 존재하는 특정 구조(이를 테면, 말단 알파-갈락토실 잔기)를 검출할 수 있도록 한다. 예를 들면, 본 방법은 글리칸 군 내에 10% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 1.5% 미만, 1% 미만, 0.75% 미만, 0.5% 미만, 0.25% 미만, 0.1% 미만, 0.075% 미만, 0.05% 미만, 0.025% 미만, 또는 0.01% 미만의 수준으로 존재하는 특정 구조를 검출할 수 있도록 한다.
- [0100] 일부 구현예에 의하면, 본원에 기술된 방법은 글리칸 군 내에 존재하는 개별적 글리칸 종의 상대적 수준을 검출



할 수 있도록 한다. 예를 들어, 액체 크로마토그래피의 각 피크 아래 면적을 측정하여 전체에 대한 비율(%)로 표현할 수 있다. 이러한 분석법은 글리칸 군 내에 존재하는 각 글리칸 중의 상대적 퍼센트 양을 제공한다. 다른 예로는, 1D-NMR 실험에서의 피크 면적으로부터, 또는 1H-15HSQC 스펙트럼에서 크로스 피크(cross peak)의 체적으로부터(예컨대, 표준에 대한 반응에 기초하여 교정함), 또는 시료들에 걸쳐 동일한 피크를 비교하여 상대적 정량법에 의해 개별적 글리칸 중의 상대적 수준을 결정한다.

[0101] 일부 구현예에서는, 글리코단백질 제제의 생물학적 활성을 평가한다. 글리코단백질 제제의 생물학적 활성은 임의의 이용가능한 방법에 의해 분석가능하다. 일부 구현예에서는, 글리코단백질의 결합 활성(binding activity) (예컨대, 수용체로의 결합)을 평가한다. 일부 구현예에서는, 글리코단백질의 치료학적 활성(예컨대, 질환 또는 병태의 심각도 또는 증상을 감소시키거나, 질환 또는 병태의 증상이 나타나는 것을 지연시키는데 있어서 글리코단백질의 활성)을 평가한다. 일부 구현예에서는, 글리코단백질의 약물활성(예컨대, 생체이용율, 약동학, 약역학)을 평가한다. 글리코단백질 치료법의 생체이용율, 약동학 및 약역학을 분석하는 방법에 관해서는 예를 들어 Weiner et al., J Pharm Biomed Anal. 15(5):571-9, 1997; Srinivas et al., J. Pharm. Sci. 85(1):1-4, 1996; 및 Srinivas et al., Pharm. Res. 14(7):911-6, 1997을 참조한다.

[0102] 당업자가 이해하고 있는 바와 같이, 검사가능한 특성의 생물학적 활성 또는 치료학적 활성은 특정 글리코단백질에 따라 다양해진다.

[0103] 글리코단백질 제제의 잠재적인 부정적 활성 또는 독성(예컨대, 고혈압, 알리지 반응, 혈전성 사건(thrombotic event), 발작, 또는 기타 부정적인 사건을 일으키는 성향)은 임의의 이용가능한 방법을 통해 분석가능하다. 일부 구현예에서는, 글리코단백질 제제의 면역원성을 평가하는데, 이는 예를 들면 상기 제제가 대상에 항체 반응을 끌어내는지 결정함으로써 이루어진다.

[0104] 다양한 구현예에서, 말단 알파-갈락토실 잔기를 갖는 글리코단백질 제제의 생물학적 활성, 치료학적 활성 등은 말단 알파-갈락토실 잔기가 부족한 글리코단백질 제제와 비교된다. 다양한 구현예에서, 말단 알파-갈락토실 잔기를 갖는 글리코단백질 제제의 생물학적 활성, 치료학적 활성 등은 상이한 수준의 말단 알파-갈락토실 잔기를 갖는 글리코단백질 제제와 비교된다.

[0105] 용도

[0106] 본 발명의 방법은, 예를 들어, 자유 글리칸, 글리코단백질(예컨대, 글리코펩타이드, 글리코지질, 프로테오글리칸 등), 세포부착 글리칸(예컨대, 핵-, 세포질-, 세포막-부착 글리칸 등); 세포, 세포외, 세포내, 및/또는 세포하(subcellular) 구성요소와 부착된 글리칸(예컨대, 단백질); 세포외 공간에 있는 글리칸(예컨대, 세포 배지) 등을 비롯한 각종 상태 중에서 임의의 상태에 있는 글리코단백질로부터의 글리칸을 분석하는데 활용될 수 있다.

[0107] 본 발명의 방법은 치료용 또는 기타 상업적으로 관련된 글리코단백질의 생성을 위한 프로세스 개발 중 하나 이상의 단계에서 이용될 수 있다. 본 발명의 방법을 이용할 수 있는 이러한 프로세스 개발 단계들의 비제한적 예로, 세포 선택, 클론 선택, 매질 최적화, 배양 조건, 프로세스 조건 및/또는 정제 과정이 포함된다. 당업자라면 기타 다른 프로세스 개발 단계들을 알고 있을 것이다.

[0108] 본 발명은 또한 특정 세포 배양액에서 발생하는 글리코실화 반응의 정도 및/또는 유형(예컨대, 세포 배양액에서 생성된 글리코단백질 제제의 말단 알파-갈락토실 잔기의 정도)을 모니터링하는데 활용될 수 있으며, 이런 식으로 배양을 조절하거나 가능하다면 종결함으로써, 예를 들어, 특성의 원하는 글리코실화 패턴을 얻거나 또는 특성의 원하지 않는 글리코실화 패턴이 발전되는 것을 방지하도록 한다.

[0109] 또한 본 발명은, 특성의 원하는 글리코단백질 생성용으로 고려되고 있는 세포 또는 세포주(예컨대, CHO 세포주) (예를 들어, 이러한 글리코단백질을 생성하거나 또는 이러한 글리코단백질을 상업적 규모로 제조하기 위해 세포 또는 세포주를 조작하기도 전)의 글리코실화 특성을 평가하는데 활용될 수 있다.

[0110] 예를 들어, 표적 글리코단백질이 (이를 테면, 하나 이상의 국가에서 규제검토를 거친) 치료용 글리코단백질이라면, 배양액을 모니터링하여 이들 배양액이 해당 약품의 정해진 글리코실화 패턴에 가능한 한 가까운 글리코실화 패턴을 가진(예컨대, 약품의 말단 알파-갈락토실 잔기에 근접한 말단 알파-갈락토실 잔기 수준을 가짐) 약품을 생산하게 될 것인가에 대한 가능성(정확히 동일한 경로로 생산되든지 아니든지에 상관 없음)을 평가하는 것이 종종 바람직할 것이다. 본원에 사용된 바와 같이, "근접한(close)"이란 표현은 해당 약품의 정해진 글리코실화 패턴에 대해 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 상관도를 가지는 글리코실화 패턴을 가리킨다. 이러한 구현예의 경우에는, 보통 생성물 배양액의 시료를 많은 시점에서 채취한 후, 정해진 표준 또는 대조군

배양액과 비교하여 상대적인 글리코실화를 평가하도록 한다.

- [0111] 예를 들어, 일부 구현예에서, 글리코단백질의 제조를 모니터링하는 방법은: (i) 글리코단백질의 생성 도중에, 생성 시스템으로부터 적어도 제1 및 제2 글리칸-함유 시료를 제거하는 단계; (ii) 제1 및 제2 글리칸-함유 시료 각각을 분석하여 특정 변형체(예컨대, 말단 알파-갈락토실 잔기)가 존재하는지 결정하는 단계; 및 (iii) 제1 글리칸-함유 시료로부터 얻은 생성물을 제2 글리칸-함유 시료로부터 얻은 생성물과 비교하여 차이점을 구함으로써 글리코단백질 생성 과정을 모니터링하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에 의하면, 글리코단백질은 아바타셉트이다. 일부 구현예에 의하면, 생성 시스템은 CHO 세포를 포함한다.
- [0112] 품질 관리 차원에서 특성의 표적 단백질 생성 과정을 모니터링 하든지 하지 않든지, 본 발명은, 예를 들어, 개발의 특정 단계들에서나 또는 특정 성장 조건 하에서 글리코실화 반응을 모니터링하는데 활용될 수 있다.
- [0113] 일부 구현예에 의하면, 본원에 기술된 방법을 이용하여 치료용 제품의 품질을 특성화하고, 조정 및/또는 관리하거나, 또는 비교할 수 있다. 단지 한 예를 들자면, 본 방법론은 치료용 단백질 생성물을 생산하는 세포에서의 글리코실화 반응을 평가하는데 이용될 수 있다. 특히 글리코실화 반응이 치료용 단백질 생성물의 활성, 생체이용률 또는 기타 특성들에 종종 영향을 미칠 수 있다는 것을 감안할 때, 이러한 치료용 단백질 생성물의 생성 도중에 세포의 글리코실화 반응을 평가하는 방법은 특히 바람직한 것이다. 그 중에서도, 본 발명은 치료용 단백질을 위한 생성 시스템에서 글리코실화 반응의 실시간 분석을 용이하게 할 수 있으므로, 글리코실화 반응을 조절할 수 있게 된다.
- [0114] 본 발명에 따라 생성 및/또는 품질이 모니터링될 수 있는 대표적인 치료용 글리코단백질 생성물로는, 예를 들어, (이를 테면, 에리트로포이어틴, 혈액-클로팅 인자 등을 비롯한) 각종 혈액 작용제(hematologic agent), 인터페론(interferon), 집락 자극 인자, 항체, 효소, 및 호르몬이 포함된다.
- [0115] CHO 세포에서 생성된 경우, 시판 중인 대표적인 글리코단백질 생성물로는 예를 들어 표 2에 제공된 생성물들이 포함된다.

표 2

시판 중인 글리코단백질 생성물의 예

단백질 생성물	참조약품
감마인터페론-1b	Actimmune®
알테플라아제; 조직 플라스미노겐 활성화자	Activase®/Cathflo®
제조합 항혈우병인자(antihemophilic factor)	에드베이트
인체알부민	Albutein®
라로니다아제(Laronidase)	Aldurazyme®
인터페론알파-N3, 유도된 인체 백혈구	Alferon N®
인체 항혈우병인자	Alphanate®
바이러스-여과 인체응고인자 IX	AlphaNine® SD
알레파셉트(Alefacept); 제조합, 이량체용합단백질 LFA3-Ig	Amevive®
비발리루딘(Bivalirudin)	Angiomax®
다베포에틴알파(darbepoetinalfa)	Aranesp™
베바시주맙(Bevacizumab)	Avastin™
인터페론베타-1a; 제조합	Avonex®
응고인자 IX	BeneFix™
인터페론베타-1b	Betaseron®
토시투모맙(Tositumomab)	Bexxar®
항혈우병인자	Bioclate™
인체 성장호르몬	BioTropin™
보툴리눔 A형독소(botulinum toxin type A)	Botox®
알렘투주맙(Alemtuzumab)	Campath®
아르시투모맙(arcitumomab); 테크네슘(technetium)-99 라벨이 표시됨	CEA-Scan®
알글루세라제(alglucerase); 베타-글루코세레브로시다아제의 변형된 형태	Ceredase®
이미글루세라제(imiglucerase); 베타-글루코세레브로시다아제의 제조합 형태	Cerezyme®
크로탈리대다가면역Fab, 양	CroFab™
디콕신면역 Fab, 양	DigiFab™
라스부리카아제(Rasburicase)	Elitek®
에타네르셉트(Etanercept)	Enbrel®
에포에틴알파(epoetinalfa)	Epogen®
세톡시맙(Cetuximab)	Erbix™
알가시다아제베타(algasidasebeta)	Fabrazyme®
요난포자극호르몬(Urofollitropin)	Fertinex™
폴리트로핀베타(follitropin beta)	Follistim™
테리파라타이드(Teriparatide)	Forteo®
인체소마트로핀(human somatropin)	GenoTropin®
글루카곤(Glucagon)	GlucaGen®
폴리트로핀알파(follitropinalfa)	Gonal-F®
항혈우병인자	Helixate®
항혈우병인자; 인자 XIII	Hemofil®
트라스투주맙(Trastuzumab)	Herceptin®
인슐린	Humalog®
항혈우병인자/본빌레브란드인자(complex-human)	Humate-P®

[0116]

단백질 생성물	참조약품
소마트로핀(Somatotropin)	Humatrope®
인체인슐린(human insulin)	Humulin®
아달리무맙(Adalimumab)	HUMIRA™
재조합 인체 히알루로니다아제(recombinant human hyaluronidase)	Hylenex™
인터페론알파콘(interferon alfacon)-1	Infergen®
엠티피바티드(Eptifibatide)	Integrilin™
알파-인터페론(alpha-interferon)	Intron A®
팔리페르민(Palifermin)	케피반스
아나킨라(Anakinra)	Kineret™
항혈우병인자	Kogenate®FS
인슐린글라긴(insulin glargine)	Lantus®
과립구 큰포식 세포 집락자극인자(granulocyte macrophage colony-stimulating factor)	Leukine®/Leukine® Liquid
주사용 루트로핀알파(lutropin alfa)	루베리스
OspA지질단백질	LYMERix™
라니비주맙(Ranibizumab)	Lucentis®
젬투주맙오조가마이신(gemtuzumabozogamicin)	Mylotarg™
갈설페제(Galsulfase)	Naglazyme™
네시리타이드(Nesiritide)	Natrecor®
페그필그라스티움(Pegfilgrastim)	Neulasta™
오프렐베킨(Oprelvekin)	Neumega®
필그라스티움(Filgrastim)	Neupogen®
파놀레소맙(Fanolesomab)	NeuroSpec™ (formerly LeuTech®)
소마트로핀(somatotropin) [rDNA]	Norditropin®/NorditropinNordiflex®
인슐린; 아연 현탁액;	Novolin L®
인슐린; 이소판(isophane)현탁액	Novolin N®
속효인슐린( regular insulin);	Novolin R®
인슐린	Novolin®
응고인자(coagulation factor) VIIa	NovoSeven®
소마트로핀(Somatotropin)	Nutropin®
정맥주사용 면역글로블린(immunoglobulin intravenous)	Octagam®
PEG-L-아스파라긴산(asparaginase)	Oncaspar®
아바타셉트(abatacept), 인체 내에서 완전히 용해되는 융합단백질	Orencia™
뮤로모나브(muromonab)-CD3	Orthoclone OKT3®
인체 용모생식샘 자극 호르몬(human chorionic gonadotropin)	Ovidrel®
페그인터페론알파(peginterferonalfa)-2a	Pegasys®
페길화된(pegylated) 인터페론알파-2b	PEG-Intron™
아바렐릭스(Abarelix) (주사용 현탁액); 생식샘 자극 호르몬 방출 호르몬 길항제(gonadotropin-releasing hormone antagonist)	Plenaxis™
에포에틴알파(epoetin alfa)	Procrit®
알데스류킨(Aldesleukin)	Proleukin, IL-2®
소마트렘(Somatrem)	Protropin®
도르나제알파(domasealfa)	Pulmozyme®
에팔리주맙(Efalizumab); 선택적, 가역적 T-세포차단제(T-cell blocker)	Raptiva™
리바비린(ribavirin)및 알파인터페론의 조합물	Rebetron™
인터페론베타 1a	Rebif®
항혈우병인자(antihemophilic factor)	Recombinate®

[0117]

단백질 생성물	참조약품
rAHF/항혈우병인자(antihemophilic factor)	ReFacto®
레피루딘(Lepirudin)	Refludan®
인플릭시맵(Infliximab)	Remicade®
앨식시맵(Abciximab)	ReoPro™
레테플라아제(Retepase)	Retavase™
리톡시맵(Rituximab)	Rituxan™
인터페론알파-2a	Roferon-A®
소마트로핀	Saizen®
합성포신세크레틴(synthetic porcine secretin)	SecreFlo™
바실릭시맵(Basiliximab)	Simulect®
에쿨리주맵(Eculizumab)	Soliris®
페그비소만트(Pegvisomant)	Somavert®
팔리비주맵(Palivizumab); 재조합으로 생성됨, 인체형(humanized)mAb	Synagis™
티로트로핀알파(thyrotropin alfa)	Thyrogen®
테넥테플라제(Tenecteplase)	TNKase™
나탈리주맵(Natalizumab)	Tysabri®
인체 정맥주사용 면역글로불린 5% 및 10% 용액	Venoglobulin-S®
인터페론알파-n1, 림프아구(lymphoblastoid)	Wellferon®
드로트레코긴알파(drotrecogin alfa)	Xigris™
오말리주맵(Omalizumab); 재조합 DNA-유도 인간 단일클론항체 표적 면역글로불린-E	Xolair®
다클리주맵(Daclizumab)	Zenapax®
이브리투모맵티우제탄(ibritumomabtiuxetan)	Zevalin™
소마트트로핀	Zorbitive™ (Serostim®)

[0118]

[0119]

일부 구현예에서, 본 발명은 여러 공급원들 또는 시료들로부터의 글리코단백질에서 얻은 글리칸을 서로 비교하는 방법을 제공한다. 일부 이러한 예의 경우, 동일한 공급원으로부터(예컨대, 동일한 CHO 세포원으로부터) 시간을 두고 다수의 시료들을 채취함으로써, 글리코실화 패턴(그리고, 특히는 세포 표면 글리코실화 패턴)에 생기는 변화(예컨대, 말단 알파-갈락토실 잔기의 존재 또는 정도에 있어서의 변화)를 모니터링한다. 일부 구현예에서, 이들 시료 중 하나는 이력용 시료(historical sample) 또는 이력용 시료의 기록물이다. 일부 구현예에서, 이들 시료 중 하나는 기준 시료이다.

[0120]

일부 구현예에서, 본 발명은 상이한 세포원에 의해 발견되는 글리코단백질로부터 얻은 글리칸을 서로 비교하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에 의하면, 이들 비교되는 세포원 중 하나 이상이 CHO 세포이다.

[0121]

일부 구현예에서는, 다음 중 하나 이상의 선택된 변수들: 예를 들어, 세포 종류, 배양 방식(예컨대, 연속식 공급 대 회분식 공급 등), 배양 조건(예컨대, 배지 종류, 특정 배지(들)의 특정 구성요소의 존재 또는 농도, 삼투질 농도, pH, 온도, (삼투질 농도, pH, 온도 등과 같은 하나 이상의 구성요소에 있어서) 변화 타이밍 또는 변화 정도), 배양 시간, 단리 단계 등에서 차이가 나되 그밖에는 동일한 조건 하에서 제조된 상이한 세포 배양 시료로부터 얻은 글리칸을 서로 비교함으로써, 선택된 변수가 글리코실화에 미치는 영향을 결정한다. 특정 구현예에서는, 단지 하나의 선택 변수에서 차이가 나는 조건 하에서 제조된 상이한 세포 배양 시료로부터 얻은 글리칸을 서로 비교함으로써, 선택된 변수가 글리코실화에 미치는 영향(예컨대, 말단 알파-갈락토실 잔기의 존재 또는 부재)을 결정한다. 따라서, 기타 용도들 중에서도, 본원에 기술된 기법을 이용하게 되면 특정 변수들이 세포 내에서의 글리코실화 패턴에 미치는 영향을 결정하는 일이 용이해질 수 있다.

[0122]

일부 구현예에서는, 동일한 방법 또는 상이한 방법으로 제조되었는지, 그리고 동시에 또는 따로 마련되었는지에, 글리코단백질의 여러 배치(batch)에서 얻은 글리칸을 비교한다. 이러한 구현예의 경우, 본 발명은 글리코단백질 제제의 품질 관리를 용이하게 한다. 대안 또는 추가적으로, 일부 이러한 구현예는 (예컨대, 서로 다른 시점에서 시료들을 배양액으로부터 제거하고, 분석하며, 서로 비교하는 경우에) 글리코단백질을 생성하는 특정 배양 과정의 모니터링을 용이하게 한다. 일부 예에서는, 동일한 공급원으로부터 시간을 두고 다수의 시료들을 채취함으로써, 글리코실화 패턴에 생기는 변화를 모니터링한다. 일부 구현예에서는, 글리칸-함유 시료들을 약 30초, 약 1분, 약 2분, 약 5분, 약 10분, 약 30분, 약 1 시간, 약 2 시간, 약 3 시간, 약 4 시간, 약 5 시간, 약 10 시간, 약 12 시간, 또는 약 18 시간 간격으로 제거하거나, 또는 더 긴 간격을 두고 제거한다. 일부 구현예에서는, 글리칸-함유 시료들을 불규칙적인 간격을 두고 제거한다. 일부 구현예에서는, 글리칸-함유 시료들을 5 시간 간격으로 제거한다.

[0123]

일부 구현예에 의하면, 본 발명에 따른 방법은, 세포에 의한 글리코단백질의 생성 과정 도중에 글리코단백질의 글리코실화 패턴을 모니터링하는데 이용될 수 있다. 예를 들어, 글리코단백질의 생성(예컨대, 상업용 생성) 방법은 (1) 글리코단백질을 생성하는 세포를 배양시키는 단계, (2) 배양 도중에 규칙적인 간격 또는 불규칙적인

간격을 두고 시료를 채취하는 단계, 및 (3) 채취된 시료(들)에 생성된 글리코단백질(들)의 글리코실화 패턴을 분석하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에 의하면, 이러한 방법은 채취된 시료들에서 생성된 글리코단백질(들)의 글리코실화 패턴을 서로 비교하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예에 의하면, 이러한 방법은 채취된 시료(들)에서 생성된 글리코단백질(들)의 글리코실화 패턴을 기준 시료의 글리코실화 패턴과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0124] 이들 구현예 중 어느 것에서도, 글리칸 분석의 특징을, 예를 들어, 품질 관리 기록 형태로 기록가능하다. 위에 지적한 바와 같이, 일부 구현예에 의하면, 글리코단백질의 이전 또는 표준 배치의 이력용 기록과 비교하고/하거나 글리코단백질의 기준 시료와 비교한다.

[0125] 일부 구현예에서는, 동일한 방법 또는 상이한 방법으로 제조되었는지, 그리고 동시에 또는 따로 마련되었는지에, 특정 글리코단백질의 상이한 배치에서 얻은 글리칸을 서로 비교하고/하거나 기준 시료와 비교한다. 일부 구현예에 의하면, 배치간 비교(batch-to-batch comparison)는 (i) 글리코단백질의 제1 배치로부터의 제1 글리칸 체제를 제공하는 단계; (ii) 글리코단백질의 제2 배치로부터의 제2 글리칸 체제를 제공하는 단계; (iii) 제1 및 제2 글리칸 체제 각각을 분석하는 단계; 및 (iv) 제1 글리칸 체제로부터 얻은 분석 결과를 제2 글리칸 체제로부터 얻은 절단 생성물과 비교하여, 두 배치의 일관성을 평가하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예에 의하면, 글리칸 체제의 제공 단계는 한 배치로부터의 글리코단백질 1종 이상으로부터 하나 이상의 글리칸을 제거하고, 선택적으로는, 제거된 글리칸을 단리시킴으로써 이루어질 수 있다. 일부 구현예에 의하면, 글리칸 체제의 라벨 표시는 본원에 기술된 바와 같이(예컨대, 단리 조작 이전 및/또는 이후에, 형광 형태 및/또는 방사선 형태로) 이루어질 수 있다.

[0126] 일부 구현예에서, 본 발명은 글리코단백질 체제의 품질 관리를 용이하게 한다. 글리칸 분석의 특징을, 예를 들어, 품질 관리 기록 형태로 기록가능하다. 위에 지적한 바와 같이, 일부 구현예에 의하면, 글리코단백질의 이전 또는 표준 배치의 이력용 기록과 비교한다. 일부 구현예에서는, 글리코단백질의 기준 시료와 비교한다.

[0127] 특정 구현예에서, 본 발명은 세포의 글리코실화 특성을 개질하기 위한 연구에 활용하여, 예를 들면, 한 가지 이상의 바람직한 글리코실화 특성을 이용하여 세포주 (예컨대, 말단 알파-갈락토실 잔기를 가지거나 가지지 않는 글리코단백질을 생성하는 세포주) 및/또는 배양 조건을 확립할 수 있다. 이러한 세포주 및/또는 배양 조건을, 원한다면, 이로울 것으로 예상되는 글리코실화 특성(들)을 지니는 특성의 표적 글리코단백질을 생성하는데 활용할 수 있다. 특정 구현예에 의하면, 이러한 세포는 CHO 세포이다.

[0128] 본 발명에 따르면, 본원에 기술된 기법을 이용하여, 원하는 글리칸 또는 원하지 않는 글리칸의 검출, 예를 들면, 글리코단백질 생성물 내 1종 이상의 오염물질의 존재를 검출 또는 정량화하거나, 하나 이상의 활성 중 또는 바람직한 종의 존재를 검출 또는 정량화할 수 있다.

[0129] 특정 구현예에 의하면, 본원에 기술된 방법은 공급원(예컨대, 생물학적 시료, 글리칸 체제 등)에 매우 낮은 수준으로 존재하는 글리칸을 용이하게 검출하도록 한다. 이들 구현예에 의하면, 글리칸 군 내에 약 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1.5%, 1%, 0.75%, 0.5%, 0.25%, 0.1%, 0.075%, 0.05%, 0.025%, 또는 0.01% 미만의 수준으로 존재하는 글리칸 수준을 검출하고/하거나 선택적으로는 정량화하는 것이 가능하다. 일부 구현예에 의하면, 글리칸 체제를 0.1% 내지 5%, 예컨대 0.1% 내지 2%, 예컨대 0.1% 내지 1% 포함하는 글리칸의 수준을 검출하고/하거나 선택적으로는 정량화하는 것이 가능하다.

[0130] 일부 구현예에 의하면, 본원에 기술된 방법은 글리칸 군 내에 낮은 수준으로 존재하는 특정 결합을 검출할 수 있도록 한다. 예를 들어, 본 방법은 글리칸 군 내에 10% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 1.5% 미만, 1% 미만, 0.75% 미만, 0.5% 미만, 0.25% 미만, 0.1% 미만, 0.075% 미만, 0.05% 미만, 0.025% 미만, 또는 0.01% 미만의 수준으로 존재하는 특정 결합(예컨대, 말단 gal- $\alpha$ -1,3-gal 결합)을 검출할 수 있도록 한다.

[0131] 일부 구현예에 의하면, 본원에 기술된 방법은 글리칸 군 내에 존재하는 개별적 글리칸 종의 상대적 수준을 검출할 수 있도록 한다. 예를 들어, 액체 크로마토그래피의 각 피크 아래 면적을 측정하여 전체에 대한 비율(%)로 표현할 수 있다. 이러한 분석은 글리칸 군 내 각 글리칸 종의 상대적 퍼센트 양을 제공한다.

[0132] 하기의 실시예를 참조로 본 발명을 더 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예에 의해 본 발명이 어떠한 방식으로든 한정되는 것은 아님을 이해하여야 한다.

[0133] 당업자라면 여기에 제공된 명세서를 참조로 한 실시예를 고려하여 본 발명의 범주 내에서 기타 다양한 조합을 쉽게 생각해 낼 수 있을 것이다.

- [0134] 실시에
- [0135] 실시예 1:
- [0136] Orencia™ (아바타셉트)는 인간의 면역글로불린 G1(IgG1)의 변형된 Fc(힌지(hinge), CH2 및 CH3 영역) 부분에 결합된 인간의 세포독성 T-림프구(T-lymphocyte)-부착 항원 4(CTLA-4)의 세포외 영역으로 구성된 가용성 융합(fusion) 단백질이다. 아바타셉트는 포유류 세포 발현 시스템에서 재조합 DNA 기법을 통해 생성된다. 아바타셉트의 겔보기 분자량은 92 킬로 달톤이다. 아바타셉트는 류마티스 관절염 증상을 치료하고, 관절 손상의 진행을 늦추고, 신체적 기능을 향상시키는데 사용된다. 많은 글리코실화(3개의 N-결합 및 2개의 O-결합 글리코실화 부위)에서 생기는 생물요법의 큰 복잡성으로 인해 신중한 생성 및 특성화 과정이 요구된다. 단백질 화학적 조성물에 대한 여러 변형(단백질 주쇄 변형, 글리코실화 등)이 글리코단백질의 생물학적 작용에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 제조시 생물요법의 화학적 특성 및 물리적 특성을 확실히 잘 관리하는 것이 중요하다.
- [0137] Gal- $\alpha$ 1-3Gal 에피토프("알파-갈")은 보통 인체 단백질 내에서 발견되지 않으며, CHO 유도 생성물 내에서도 기대할 수 없다. 이러한 에피토프는 보통 돼지와 쥐에서 단리된 단백질에서 관찰된다. 인간은 Gal  $\alpha$ 1-3-Gal 말단에 대한 순환 항체를 가지고 있으므로, 글리코단백질 요법에서 이들 종을 모니터링하고 이것이 프로세스 개발에 어떻게 관련되어 있는지 이해하는 것이 중요하다. 이러한 발견은 (CHO 세포에서 발견되는) 아바타셉트 내에 알파-갈 구조가 존재함을 나타낸다.
- [0138] 글리칸 종의 분석에 사용되는 과정:
- [0139] PNGase-F를 이용한 처리와 후속으로는 고상 추출 정제조작을 수행하여 원료약품으로부터 N-글리칸을 단리시켰다. 그런 후에는 글리칸에 2AB 라벨을 표시하고, 선택된 분획들을 LC-MS-MS로 분석하였다. 엑소글리코시다아제, MALDI-MS 및 Lc-MS/MS를 조합한 방법으로 글리칸 구조를 추가 확인하였다.
- [0140] 이렇게 얻은 자료는 아바타셉트-CTLA4 글리코단백질 N-글리칸 내에 말단 알파 결합된 갈락토오스가 존재한다는 것을 보여 주었다. 인간의 면역글로불린 G1(IgG1)의 변형된 Fc(힌지, CH2 및 CH3 영역) 부분에 결합된 인간의 세포독성 T-림프구(T-lymphocyte)-부착 항원 4(CTLA-4)의 세포외 영역으로 구성된 가용성 융합 단백질인 Orencia™ (아바타셉트)의 N-결합 글리칸 시료를 LC-MS/MS를 통해 분석하였다. 도 3은 아바타셉트로부터 유도되는 글리칸의 일부분에 대한 형광 크로마토그램으로, 갈락토오스- $\alpha$ -1-3 갈락토오스-함유 구조에 해당될 수 있는 조성물 HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>6</sub>Fuc<sub>1</sub>을 가진 글리칸 종의 검출을 보여준다.
- [0141] 조성물 HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>6</sub>Fuc<sub>1</sub>을 가진 Orencia™에서 유도된 글리칸 종의 MS<sup>2</sup> 스펙트럼은, 혼종 유형의 글리칸 같은 기타 잠재적인 구조의 가능성을 배제하지는 않지만 비-환원성 말단 갈락토오스- $\alpha$ -1-3 결합된 갈락토오스가 존재한다는 것을 제시하였다(도 4).
- [0142] 여러 엑소글리코시다아제 치료법에 이어 LC-ESI-MS/MS 및 MALDI-MS를 조합한 방법을 이용하여 이러한 구조를 추가 확인하였다. Orencia™에서 유도된 N-글리칸 분획 및 대조군 단백질을 엑소글리코시다아제 효소로 처리하였다. 이들 시료 모두를 (i) 알파-갈락토시다아제 및 (ii) 베타-갈락토시다아제, 베타-N-아세틸헥소사미노다아제, 및 마노시다아제의 혼합물로 처리하여, 잠재적인 비-환원성 말단 갈락토오스- $\alpha$ -1-3 결합된 갈락토오스 구조를 용해시켰다. 이들 두 반응의 생성물들에 대한 형광 크로마토그램 비교 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0143] 대조군 단백질로부터의 글리칸을  $\alpha$ -갈락토시다아제로 처리하기 전과 후의 경우에서 주요한 차이점은 전혀 관찰되지 않았다. 한편, Orencia™의 경우에는, HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>5</sub>Fuc<sub>1</sub> 조성물을 포함한 종의 뚜렷한 감소와, 이에 수반하여 HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>5</sub>Fuc<sub>1</sub> 조성물을 포함한 종의 증가가 관찰되었다. 또한, 효소 처리의 결과로 아바타셉트로부터의 HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>6</sub>Fuc<sub>1</sub> 조성물을 포함한 종의 MS<sup>2</sup>를 도 6에 나타내었다.
- [0144] MALDI-TOF-MS(도 7)를 통해 분석하였듯이, 엑소글리코시다아제의 다른 집합체(베타-갈락토시다아제, 헥소사미니다아제 및 마노시다아제)를 이용한 처리 결과로 추가 확인하였다.
- [0145] 이렇게 얻은 자료는, Orencia™ 내 HexNAc<sub>4</sub>Hex<sub>6</sub>Fuc<sub>1</sub> 조성물을 갖는 종에는 주로 비-환원성 말단 갈락토오스- $\alpha$ 1-3 결합된 갈락토오스가 함유되어 있다는 것을 제시하였다.

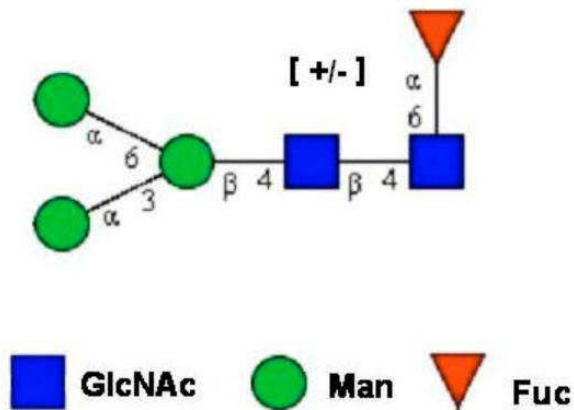
[0146] 확장 및 대안

[0147] 구체적인 예시적 구현예들을 참조로 본 발명의 방법을 특히 도시하고 설명하였지만, 본 발명의 사상 및 범주를 벗어나지 않으면서 형태 및 상세사항에서 다양한 변경이 있을 수 있다는 것을 이해해야 한다. 따라서, 본 방법의 범주 및 사상에 속하는 모든 구현예들, 이에 대등한 예들도 청구범위 내에 있어야 할 것이다. 본 발명에 의한 방법의 청구범위, 명세서 및 도면, 시스템, 그리고 검정 결과는 그 효과에 명시하지 않은 한 기술된 구성요소 순서에 제한되는 것으로 이해되어서는 안된다.

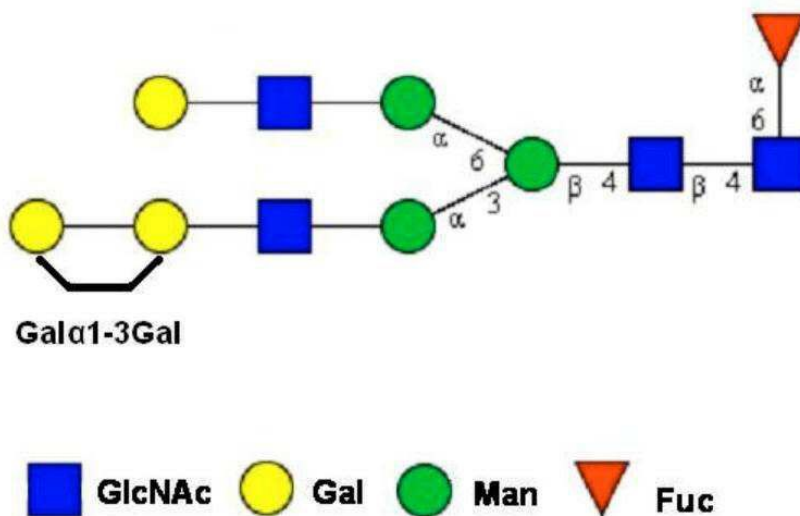
[0148] 비제한적으로는 특허, 특허출원, 사실, 도서, 학술 논문 및 웹 페이지를 비롯하여 본 출원에서 인용된 모든 문헌 및 유사한 자료는, 이러한 문헌 및 유사한 자료의 형식에 상관없이, 그 전체가 참조로 분명하게 통합되었다. 비제한적으로는 정의된 용어, 용어 사용, 기술된 기법들 등을 비롯하여, 이들 통합된 문헌 및 유사한 자료 중 하나 이상이 본 출원과 다르거나 대조를 이루는 경우에는 본 출원이 좌우한다. 본원에 사용된 부분 제목들은 체계적 목적을 위한 것일 뿐 어떠한 식으로든 발명의 주제를 한정하는 것으로 간주되어서는 안된다. 본 방법을 다양한 구현예 및 실시예와 연관지어 설명하였지만, 이들 방법을 이러한 구현예 또는 실시예에 한정시키고자 함이 아니다. 오히려, 이들 방법은 당업자라면 이해하듯이 다양한 대안, 변형예 및 대등한 예를 포함한다.

도면

도면1

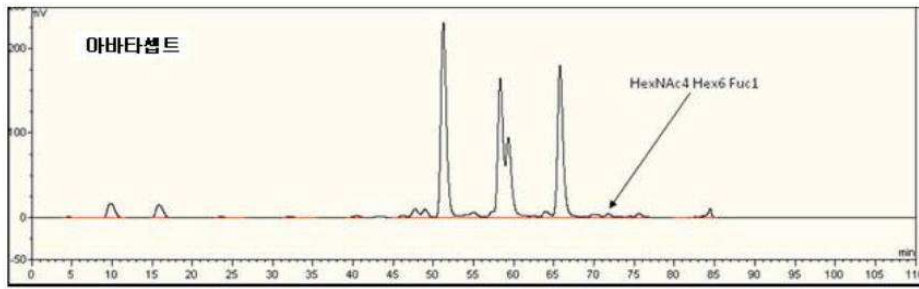


도면2

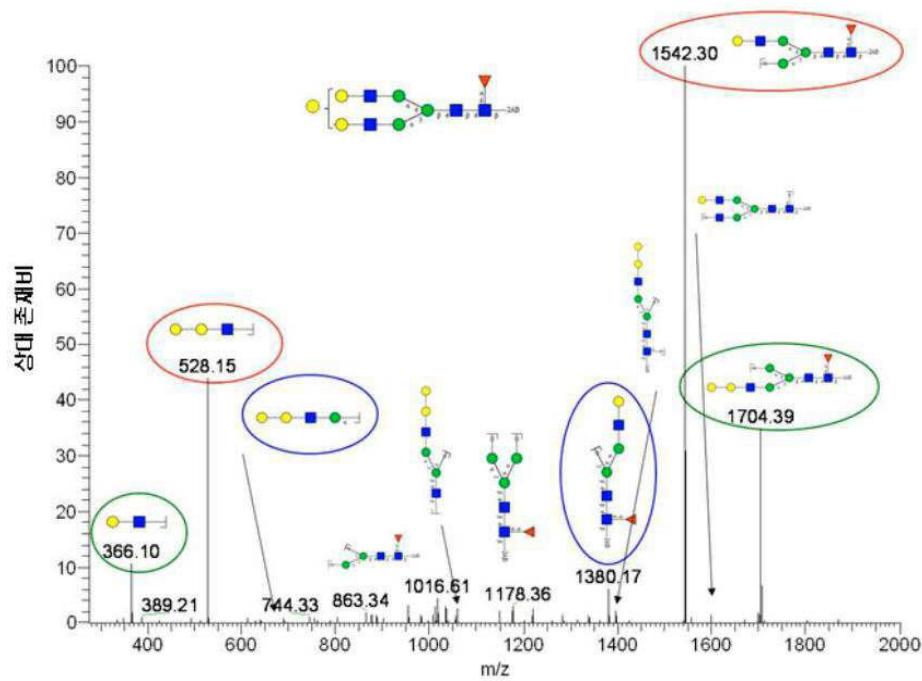




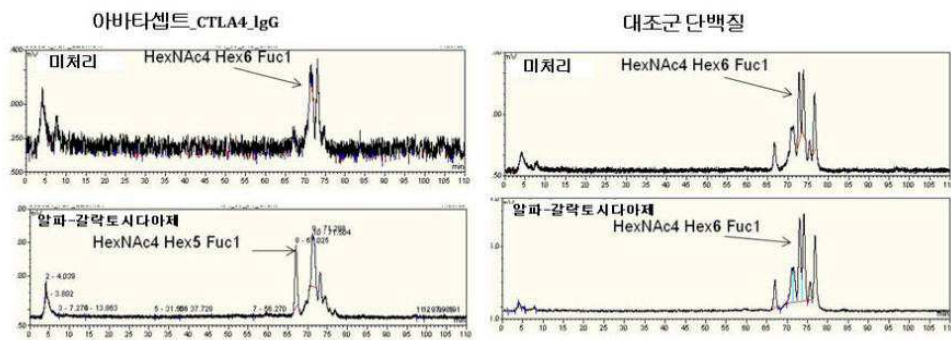
도면3



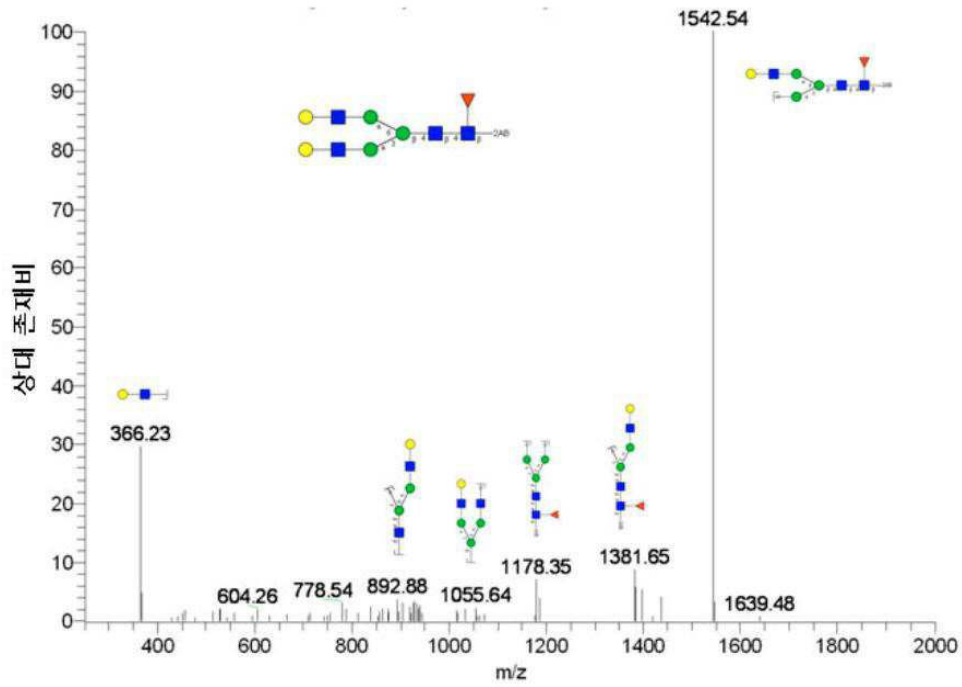
도면4



도면5



도면6



도면7

