

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 7월 1일 (01.07.2021)



(10) 국제공개번호
WO 2021/133084 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 5/071* (2010.01) *C12N 7/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/019066
- (22) 국제출원일: 2020년 12월 24일 (24.12.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2019-0174356 2019년 12월 24일 (24.12.2019)KR
- (71) 출원인: 주식회사 엘지화학 (LG CHEM, LTD.) [KR/KR]; 07336 서울시 영등포구 여의대로 128, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 송지혜 (SONG, Ji Hae); 34122 대전시 유성구 문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR). 김양현 (KIM, Yang Hyun); 34122 대전시 유성구 문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR). 문수진 (MOON, Soojin); 34122 대전시 유성구 문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR). 김민정 (KIM, Min Jeong); 34122 대전시 유성구 문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR). 김혜숙 (KIM, Hye Suk); 34122 대전시 유성구 문지로 188 LG화학 기술연구원, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 유미특허법인 (YOU ME PATENT AND LAW FIRM); 06134 서울시 강남구 테헤란로 115, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,

MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

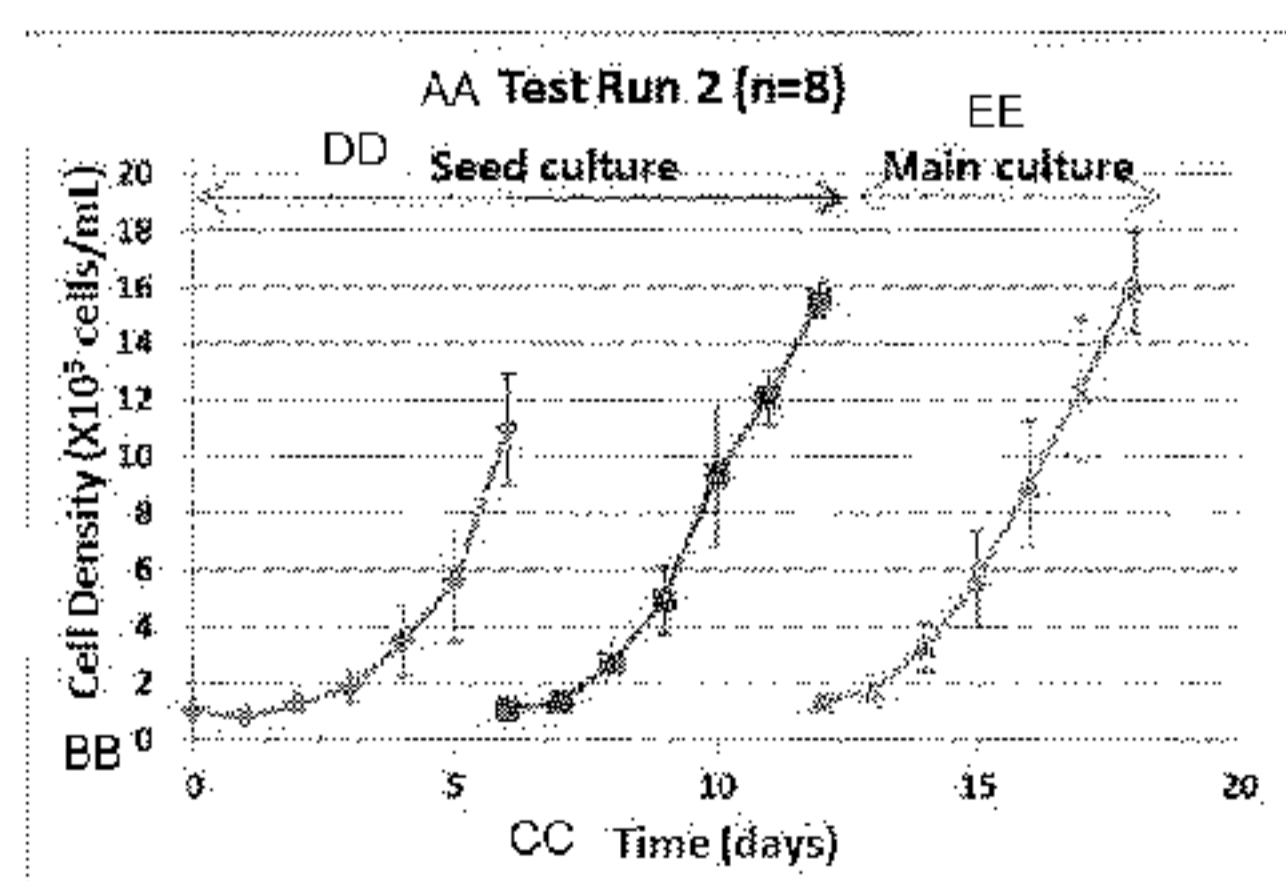
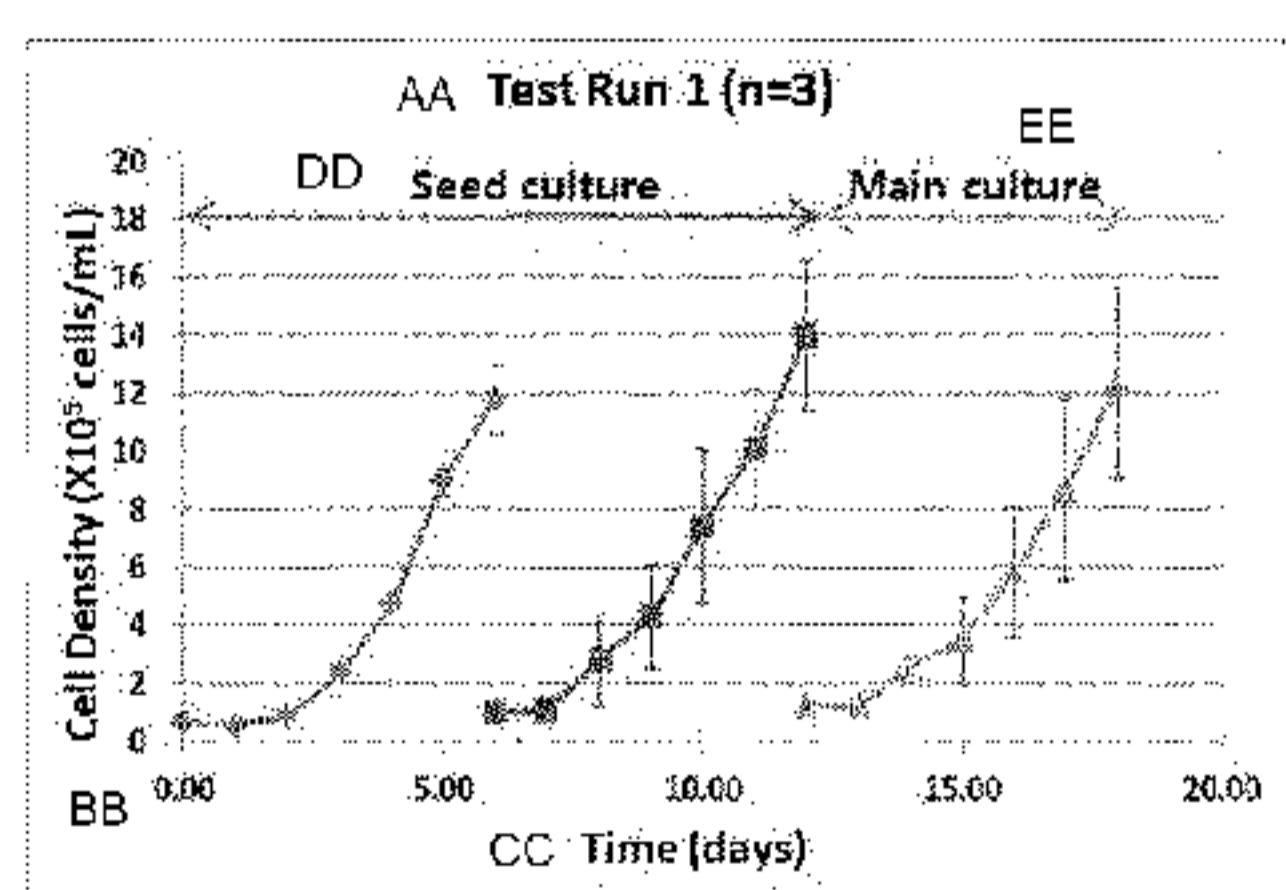
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: LOW-SERUM MEDIUM COMPOSITION FOR CULTURING VERO CELLS AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 베로 세포 배양용 저혈청 배지 조성물 및 이의 이용



AA ... Test Run
 BB ... Cell Density (x10⁶ cells/mL)
 CC ... Time (days)
 DD ... Seed culture
 EE ... Main culture
 FF ... Medium change

(57) Abstract: The present invention relates to a low-serum medium composition for culturing vero cells, and a vero cell-culturing method and a virus-producing method, each using same.

(57) 요약서: 본 발명은 베로 세포 배양용 저혈청 배지 조성물 및 이를 이용한 베로 세포의 배양 방법 및 바이러스 생산 방법에 관한 것이다.



WO 2021/133084 A1

명세서

발명의 명칭: 베로 세포 배양용 저혈청 배지 조성물 및 이의 이용 기술분야

[1] 관련 출원들과의 상호 인용

[2] 본 출원은 2019년 12월 24일자 대한민국 특허출원 제10-2019-0174356호에 기초한 우선권의 이익을 주장하며, 상기 출원의 문헌에 개시된 모든 내용은 본 명세서의 참조로서 포함된다.

[3] 본 발명은 베로 세포(Vero cell) 배양용 저혈청 배지 조성물 및 이를 이용한 베로 세포의 배양 방법 및 바이러스 생산 방법에 관한 것이다.

배경기술

[4] 베로 세포(Vero cell)는 바이러스 백신 제조에 널리 승인되고 사용되는 연속 계대 세포주(Continuous cell line)이다. 베로 세포는 아프리카 초록원숭이 신장세포로부터 처음 분리되었고, 소아마비 바이러스 백신(inactivated poliovirus vaccine, IPV), 경구용 소아마비 생백신, 광견병 백신 등의 생산에 이용되고 있다. 베로 세포는 각종 바이러스에 대해 폭넓은 감수성을 가지고 있고, 발암으로부터 안전하다고 보고되었으며, 세계보건기구에 의해 인간의 건강에 위협을 제시하지 않는 것으로 나타나, 베로 세포 유래 백신들이 현재 전세계로 공급되고 있다.

[5] 종래 동물 세포를 이용한 백신 생산은, 세포를 증식시키거나 세포에 바이러스를 감염시켜 바이러스를 증식시키는 단계에 동물 유래 물질(예, 혈청, 트립신, 알부민 등)이 첨가된 배지를 사용하는 것이 일반적이었다. 특히, 혈청은 영양분, 호르몬, 성장 인자, 사이토카인 등 세포의 생존과 증식을 촉진하는 물질들을 포함하며 세포 성장에 필수적인 기능을 하고, 물리적 손상이나 전단력으로 부터 세포를 보호하고, 부착성 세포가 용기에 부착하고 퍼지는 것을 용이하게 하므로, 배양 배지를 체내 환경과 유사하게 모방할 수 있는 이점이 있다. 그러나, 혈청의 화학적 조성의 복잡성으로, 단일한 제품 생산이 어려워 세포 성장에 다양한 변수를 제공하고, 단가가 비싸며, 혈청을 사용하여 생산한 백신의 경우 외인성 병원성 인자의 감염 위험이 있고, 복잡한 정제과정(downstream process)을 필요로 하는 등의 단점이 있다.

[6] 베로 세포는 부착성 세포로서, 10%의 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)이 포함된 일반 배지에서 마이크로캐리어(microcarrier)에 부착하여 배양되는 것이 일반적이다. FBS에 포함된 주요 성분은 알부민으로, 세포 부착에 중요한 역할을 하는 단백질로 알려져 있다. 그러나, 전술한 바와 같은 혈청 배지의 단점으로 인하여, 저혈청(serum-reduced) 또는 무혈청(serum-free) 배지의 필요성이 대두되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 따라서, 혈청의 양을 줄이는 대신 세포 부착에 도움을 주고 세포 성장을 촉진시킬 수 있는 보충제들이 포함된 조성의 배지 개발이 요구된다.

과제 해결 수단

- [8] 본원의 일 예는, 신생우아혈청(newborn calf serum, NCS) 1~7%(v/v); 가수분해물(hydrolysate) 1~6 g/L; 및 인슐린 1~6 mg/L 을 포함하는, 배로 세포의 배양용 배지 조성물을 제공한다.
- [9] 본원의 다른 예는, 신생우아혈청(newborn calf serum, NCS) 1~7%(v/v); 가수분해물(hydrolysate) 1~6 g/L; 및 인슐린 1~6 mg/L 을 포함하는 배지 조성물에서 배로 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 배로 세포의 배양 방법을 제공한다.
- [10] 본원의 다른 예는, 신생우아혈청(newborn calf serum, NCS) 1~7%(v/v); 가수분해물(hydrolysate) 1~6 g/L; 및 인슐린 1~6 mg/L 을 포함하는 배지 조성물에서 배로 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 바이러스 생산 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [11] 도 1은 본원의 일 실시예(실험No.1)에 따른 배지 조건에서의 배로 세포 배양 결과를 나타낸다.
- [12] 도 2는 본원의 일 실시예(실험No.2)에 따른 배지 조건에서의 배로 세포 배양 결과를 나타낸다.
- [13] 도 3은 본원의 일 실시예(실험No.3)에 따른 배지 조건에서의 배로 세포 배양 결과를 나타낸다.
- [14] 도 4는 본원의 일 실시예(실험No.4)에 따른 배지 조건에서의 배로 세포 배양 결과를 나타낸다.
- [15] 도 5는 본원의 일 실시예(실험No.5)에 따른 배지 조건에서의 배로 세포 배양 결과를 나타낸다.
- [16] 도 6은 본원의 일 실시예(실험No.6)에 따른 배지 조건에서의 배로 세포 배양 결과를 나타낸다.
- [17] 도 7은 본원의 일 실시예(실험No.7)에 따른 배지 조건에서의 배로 세포 배양 결과를 나타낸다.
- [18] 도 8은 본원의 일 실시예(실험No.7)에 따른 배지 조건에서의 배로 세포 배양 결과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [19] 본 발명의 한 측면에 따라 신생우아혈청(newborn calf serum, NCS) 1~7%(v/v); 가수분해물(hydrolysate) 1~6 g/L; 및 인슐린 1~6 mg/L 을 포함하는, 배로 세포의 배양용 배지 조성물이 제공된다.
- [20] 일 구현예로, 상기 배지 조성물은 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)을

- 포함하지 않을 수 있다.
- [21] 일 구현예로, 상기 가수분해물이, 동물성 요소 및 단백질이 없는(animal component-free, protein-free) 가수분해물일 수 있다.
- [22] 일 구현예로, 상기 배로 세포가 마이크로캐리어(microcarrier)에 부착되어 배양될 수 있다.
- [23] 일 구현예로, 상기 배로 세포가 마이크로캐리어(microcarrier)에 부착되어 배양되는 것을 포함할 수 있다.
- [24] 일 구현예로, 상기 배지가 MEM 배지를 포함할 수 있다.
- [25] 본 발명의 다른 측면에 따라, 상기 배지 조성물에서 배로 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 배로 세포의 배양 방법이 제공된다.
- [26] 일 구현예로, 상기 배양이 10mL 내지 1000L 의 스케일로 행해지는 것일 수 있다.
- [27] 본 발명의 다른 측면에 따라, 상기 배지 조성물에서 배양된 배로 세포에 바이러스를 감염하는 단계; 및 바이러스가 감염된 배로 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 바이러스 생산 방법이 제공된다.
- [28] 일 구현예로, 상기 바이러스가 감염된 배로 세포의 배양이 10mL 내지 2000L 의 스케일로 행해지는 것일 수 있다.
- [29] 이하, 본 발명을 보다 자세히 설명한다.
- [30] 용어 "배로 세포"는 임의의 배로 세포주 또는 이로부터 배양 또는 계대배양된 세포주를 말하며, 유전적으로 변형된 배로 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 공지된 배로 세포의 비제한적인 예로는, VERO (ATCC Number CCL-81), VERO C1008 (ATCC Number CRL-1586), VERO 76 (ATCC Number CRL-1587) 및 Vero-SF-ACF (ATCC Number CCL-81.5) 등을 예시할 수 있다.
- [31] 용어 "배로 세포 배양"이란 배로 세포가 생존가능한 상태로 성장하거나 유지되는 임의의 절차를 포함한다. 예를 들어, 배로 세포의 배양은, 세포가 성장 또는 증식하는 과정뿐 아니라, 세포의 수가 실질적으로 증가하지 않으나 생존가능한 상태가 유지되는 과정도 포함한다.
- [32] 바람직한 예로, 본원에서 배로 세포는 바이러스 백신, 또는 바이러스나 바이러스 벡터 기반의 치료 요법 등의 매개체로 사용될 수 있다. 일예로, 배로 세포는 바이러스에 감염되어 바이러스를 생산할 수 있다. 배로 세포로부터 생산될 수 있는 바이러스는 약독화 바이러스, 재조합 바이러스, 또는 종양용해성 바이러스일 수 있다. 또한, 배로 세포에서 생산될 수 있는 바이러스는 소아마비 바이러스, 엔테로바이러스, IBDV (전염성 F낭병 바이러스), 로타 바이러스, 홍역 바이러스, 천연두 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 광견병 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV), 센다이 바이러스, 시미안 바이러스40(SV40), 치쿤구니아 바이러스 및 뎅기 바이러스 등을 예시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [33] 용어, "배양용 배지"는 배로 세포를 배양하는데 사용되며 성장에 필요한

성분들을 포함하고 있는 조성물을 말한다. 본원에서 배로 세포의 배지는, MEM, DMEM, DMEM/F12, MDSS2, CCM5, Medium 199, 또는 RPMI와 같은 당업계에 일반적으로 알려진 임의의 배지를 기본 배지로 할 수 있다. 이러한 배양 배지는 배로 세포의 배양을 지지하는 아미노산, 비타민, 유기 및 무기 염 및 탄수화물 공급원을 포함하는 다수의 성분을 포함 할 수 있다.

- [34] 본 명세서에 기재된 바로서, "(소정의 성분을) 포함하는"은 기재된 성분 이외의 성분을 포함할 수 있는 것 (comprising) 또는 기재된 성분을 필수적으로 포함 (consisting essentially of)하는 것을 의미할 수 있다.
- [35] 바람직한 예로, 본원에서 배로 세포 배양용 배지는, 기본 배지에 신생우아혈청(newborn calf serum, NCS) 1~7%(v/v), 가수분해물 (hydrolysate) 1~6 g/L, 및 인슐린 1~6 mg/L이 보충된 배지이다.
- [36] 다른 예로, 본원에서 배로 세포 배양용 배지는, 기본 배지에 신생우아혈청(newborn calf serum, NCS) 1~7%(v/v), 예를 들어 1~7%(v/v), 1~6%(v/v), 1~5%(v/v), 1~4%(v/v), 1~3%(v/v), 1%(v/v), 2%(v/v), 3%(v/v), 4%(v/v), 5%(v/v), 6%(v/v) 또는 7%(v/v); 가수분해물 (hydrolysate) 1~6 g/L, 예를 들어 1~6 g/L, 1~5 g/L, 1~4 g/L, 1~3 g/L, 1~2 g/L, 2~4 g/L, 2~3 g/L 또는 2 g/L; 및 인슐린 1~6 mg/L, 예를 들어 1~6 mg/L, 1~5 mg/L, 1~4 mg/L, 1~3 mg/L, 2~6 mg/L, 2~5 mg/L, 2~4 mg/L, 2~3 mg/L 또는 3 mg/L 이 보충된 배지이다.
- [37] 신생우아혈청(NCS)은 신생아 송아지의 혈청, 전형적으로는 생후 약 20일 이하, 예를 들어 약 14일 이하, 또는 약 10일 이하, 또는 약 3일 내지 10일의 송아지에서 채취한 혈청으로, 우태아혈청(FBS)에 비해 1/10 가격에 판매되고 있다. 개발한 백신을 입찰시장에 진출시키기 위해서 가격경쟁력을 가지는 것이 필수적인데 우태아혈청(FBS) 대신 신생우아혈청(NCS)을 사용하는 것은 뚜렷한 원가 절감 효과가 있다. 또한 신생우아혈청(NCS)은 우태아혈청(FBS) 보다 공급 면에서 안정적이고 Lot variation이 덜해 일관성 있는 실험결과를 얻을 수 있으며, 동물 윤리 관점에서도 유리하다.
- [38] 본원의 배지 조성물에서 신생우아혈청(NCS)이 1~7%(v/v)로 함유되어, 배로 세포 배양에 일반적으로 사용되는 조건인 10% FBS 보다 낮은 농도로 사용가능하다. 본원 실시예에 의하면 1~7%(v/v) NCS 조건에서 세포 성장이 촉진되며 상기 범위 내에서 바이러스 생산성이 유사한 결과를 보이므로, 예를 들어 1~7%(v/v), 1~6%(v/v), 1~5%(v/v), 1~4%(v/v) 또는 1~3%(v/v), 더 구체적으로는 1~3%(v/v) 또는 2%(v/v) 등이 바람직한 농도로 제시될 수 있다. 그러나 상기 농도 범위는, 바이러스 생산성에 영향을 미치는 다른 배양 조건이 변경될 경우 당업자의 통상의 기술 수준 범위 내에서 적절히 증감될 수 있다.
- [39] 본원에서 "가수분해물 (hydrolysate)"은 단백질의 펩타이드 결합 (peptide bond) 을 분해시켜 획득된 물질로, 이는, 우유 유래이거나 (예를 들어, 카제인 (casein), 유청 (whey protein)), 동물 유래 단백질(고기(meat), 콜라겐(collagen)), 또는 식물 유래일 수 있다. 예를 들어, 식물성 가수분해물은 대두 가수분해물, 밀

가수분해물, 감자 가수분해물, 면실 가수분해물, 쌀 가수분해물, 완두콩 가수분해물 또는 옥수수 가수분해물 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[40] 바람직한 일례로, 가수분해물의 Lot Variation을 줄이고, 정제공정 (downstream process)을 효율적으로 수행할 수 있도록 하기 위하여 Digestion, Processing 등의 방법을 달리하여 생산된 동물성 요소 및 단백질이 없는 (animal component-free, protein-free) 가수분해물을 사용할 수 있다. 상업적으로 이용가능한 동물성 요소 및 단백질이 없는 가수분해물로, 구체적으로는 Hypep™ 1510, Hypep™ 1511, Hypep™ 5603, Sheff-CHO PF ACF, Sheff-CHO Plus PF ACF, Sheff-VAX PF ACF, SheffVax Plus PF ACF, SheffVax Plus PF ACF VP 등을 예시할 수 있으나, 본원의 범위가 이에 제한되는 것은 아니다.

[41] 본원의 배지 조성물에서 가수분해물은 1~10 g/L로 포함될 수 있으나, 고농도 조건에서는 세포 성장에 부정적인 영향이 있을 수 있으므로, 본원 실시예에서는 6 g/L 까지로 제한하여 실험을 수행하였다. 따라서, 바람직한 일례로, 세포 성장에 긍정적인 영향을 미치는 농도를 고려하여, 가수분해물은 1~6 g/L, 예를 들어 1~6 g/L, 1~5 g/L, 1~4 g/L, 1~3 g/L, 1~2 g/L, 2~4 g/L, 2~3 g/L 또는 2 g/L 이 바람직한 농도로 제시될 수 있다. 그러나 상기 농도 범위는, 바이러스 생산성에 영향을 미치는 다른 배양 조건이 변경될 경우 당업자의 통상의 기술 수준 범위 내에서 적절히 증감될 수 있다.

[42] 본원의 배지 조성물은 또한 인슐린을 포함한다. 예를 들어, 인슐린은 천연 인슐린 또는 재조합 인슐린일 수 있고, 더 구체적으로는 인간 재조합 인슐린일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[43] 본원의 배지 조성물에서 인슐린은 1~6 mg/L, 1~5 mg/L, 1~4 mg/L, 1~3 mg/L, 2~6 mg/L, 2~5 mg/L, 2~4 mg/L, 2~3 mg/L 또는 3 mg/L로 포함될 수 있다. 그러나 상기 농도 범위는, 바이러스 생산성에 영향을 미치는 다른 배양 조건이 변경될 경우 당업자의 통상의 기술 수준 범위 내에서 적절히 증감될 수 있다.

[44] 바람직한 일례로, 배로 세포는 마이크로캐리어(microcarrier) 등의 캐리어에 부착되어 배양될 수 있다. 마이크로캐리어는 마이크로 수준의 지름을 가지며 배로 세포가 부착될 수 있는 임의의 고체 지지체 매트릭스를 말하며, 예컨대 그 표면에 세포를 세포를 부착시켜 액체 배지 중에서 현탁 상태로 세포 배양이 가능하다. 마이크로캐리어의 재료로는 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리카보네이트, 폴리아미드, 폴리아세탈 및 폴리우레탄과 같은 플라스틱 및 이들의 공중합체; 유리; 세라믹; 금속; 아크릴아미드; 실리카; 실리콘 고무; 폴리라이신; 셀룰로오스; 덱스트란; 콜라겐(젤라틴); 및 글리코사미노글리칸 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 마이크로캐리어는 약 100 μm 이상, 약 200 μm 이상, 약 300 μm 이상, 약 400 μm 이상, 약 500 μm 이상, 약 600 μm 이상, 약 700 μm 이상, 약 800 μm 이상, 약 900 μm 이상, 또는 약 1 mm 이상의 지름을 가질 수 있으며, 비즈(구형), 원반, 스트립, 시트, 섬유, 필라멘트, 막대, 디스크, 큐브, 관 등의 형태일 수 있으나, 이에

제한되는 것은 아니다. 일례로, 마이크로캐리어는 다공성일 수 있다.

- [45] 바람직한 일례로, 배로 세포의 배양은 배양이 10mL 내지 1000L 또는 그 이상, 예를 들어 10mL 내지 2000L 또는 그 이상의 스케일로 행해질 수 있으며, 바이오 리액터에서 10 mL 이상의 규모로 생산이 가능하다. "바이오 리액터(bioreactor)"는 배로 세포를 배양하는데 사용될 수 있는 임의의 용기를 말하며, 마이크로캐리어를 포함하는 고정층(fixed bed)을 가지는 고정층 바이오 리액터를 포함한다. 본원에서 배로 세포는 바이오 리액터 내 마이크로캐리어 상에서 배양될 수 있고, 다른 예로, 배치 공정 또는 유가배양 배치 공정으로 바이오 리액터에서 현탁 배양될 수 있다.
- [46] 배로 세포의 배양 과정에서, 배지는 배양 기간 중 필요에 따라 교환될 수 있다. 배지의 pH는 약 6 ~ 8 인 것이 바람직하고, 약 6.5 ~ 7.5, 또는 약 7 일 수 있다. 배양은 통상적으로 약 35°C ~ 40°C 에서 약 5 ~ 9 일간 실시할 수 있고, 필요에 따라 통기나 교반을 추가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 세포 배양시의 용존 산소 농도 (DO) 는, 약 60 ~ 90%, 약 70 ~ 80% 동일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [47] 본 발명에 따라 배양된 배로 세포는 바이러스 백신, 또는 바이러스나 바이러스 벡터 기반의 치료 요법 등의 매개체로서, 바이러스를 생산하는데 사용될 수 있다. 이에, 본 발명은 또한, 전술한 바와 같은 배지 조성물에서 배양된 배로 세포에 바이러스를 감염하는 단계; 및 바이러스가 감염된 배로 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 바이러스 생산 방법을 제공한다.
- [48] 바이러스가 감염된 배로 세포는 바이러스를 증식하는데 최적화된 조건에서 배로 세포를 배양할 수 있다. 예를 들어, 배로 세포는 바이러스로 감염하기 전에 제1 온도에서 배양되고, 바이러스로 감염한 후에는 제2 온도에서 배양되며, 여기서 제2 온도는 제1온도보다 낮을 수 있다. 예를 들어, 배로 세포는 바이러스로 감염하기 전, 즉 감염 전 약 37°C에서 배양되고, 바이러스로 감염한 후, 즉, 감염 후에는 약 29°C 내지 약 37°C에서 배양될 수 있다. 다른 예로, 배로 세포는 바이러스로 감염한 후 약 33°C에서 배양될 수 있다. 다른 예로, 배로 세포는 바이러스로 감염한 후 약 30°C에서 배양될 수 있다. 감염 시점은 세포 접종 후 1일 후, 2일 후, 또는 3 또는 4일 후 일 수 있다.
- [49] 바이러스 배양 종료 후, 마이크로캐리어를 제거하고, 바이러스를 함유하는 바이러스액을 회수할 수 있다. 회수된 바이러스액은 여과막 등으로 여과하여 세포 잔해를 제거하거나, 불활화 전 또는 후에 농축 및/또는 정제할 수 있다. 농축 방법으로는, 한외 여과법, 초원심법, 투석법 등을 예시할 수 있고, 정제 방법으로는, 예를 들어, 정제 대상물의 크기, 밀도, 침강 계수 등의 물리적 성질을 이용하는 방법, 화학 또는 물리 화학적 반응 (흡탈착 등) 을 이용하는 방법 등을 예시할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 실시를 위한 형태

[50] 이하 본 발명을 다음의 실시예에 의하여 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 이들은 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[51]

[52] 베로 세포의 최적의 배지 조성 확인

[53] 베로 세포의 최적의 배지 조성을 찾기 위하여 다음과 같은 실험을 설계하였다. 베로세포를 마이크로캐리어에 부착하여 웨이크플라스크 또는 바이오리액터에서 배양하였다.

[54] [Table 1]

실험N o.	대조군	실험군	실험규모
1	5% FBS	- 2% FBS + 2.5 g/L Hydrolysate - 1% FBS + 2.5 g/L Hydrolysate	40mL (웨이크플라스크)
2	5% FBS	- 2% FBS- 1% FBS - 0% FBS - 2% FBS + 2.5 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린 - 1% FBS + 2.5 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린 - 0% FBS + 2.5 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린	30mL (웨이크플라스크)
3	5% FBS	- 1~2% FBS + 0~6 g/L Hydrolysate + 0~6 mg/L 인슐린	30mL(웨이크플라스크)
4	5% FBS	- 1%, 2% FBS - 1%, 2%, 5% NCS	30mL (웨이크플라스크)
5	5% FBS	- 2% FBS + 2 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린 - 2% NCS + 2 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린	2L (BRX)
6	2% FBS + 2 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린	- 2% NCS + 2 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린 - 7% NCS + 2 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린	2L (BRX)
7	2L	- 40L - 1000L	40L 1000L

[55]

[56] 실험재료

[57] Hydrolysate (Kerry, Ireland)

[58] 인슐린: 재조합 인간 인슐린 (Gibco, USA)

[59] FBS: 우태아혈청(Fetal Bovine Serum) (Hyclone, USA)

[60] NCS: 신생우아혈청(newborn calf serum) (Hyclone, USA)

[61] BRX: 바이오리액터(bioreactor) (Model: Biostat B, Sartorius, Germany)

[62]

[63] **실험No.1.**

[64] FBS의 농도를 줄이고 가수분해물(hydrolysate)을 첨가한 경우 배로 세포의 성장 효과를 확인하였다. 배로 세포는 ATCC Number CCL-81 유래 세포를 사용하였다. 대조군으로는 5% FBS가 보충된 아미노산, 비타민, 무기질, 포도당 등이 포함된 MEM 배지를 사용하고, 실험군으로는 2% FBS + 2.5 g/L Hydrolysate, 또는 1% FBS + 2.5 g/L Hydrolysate가 각각 보충된 MEM 배지를 사용하였다. 상기 준비된 배로 세포를 상기 준비된 배지 40mL에서 5일간 배양한 결과(37°C, 5% CO₂, 80±5% Humidity에서 배양), 2% FBS + 2.5 g/L Hydrolysate가 보충된 배지에서 대조군과 유사한 세포 성장 프로파일을 확인할 수 있었던 반면, 1% FBS + 2.5 g/L Hydrolysate가 보충된 배지에서는 대조군보다 세포 성장이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 1).

[65]

[66] **실험No.2.**

[67] FBS의 농도를 줄이고 가수분해물(hydrolysate) 및 인슐린을 첨가한 경우 배로 세포의 성장 효과를 확인하였다. 배로 세포는 ATCC Number CCL-81 유래세포를 사용하였다. 대조군으로는 5% FBS가 보충된 아미노산, 비타민, 무기질, 포도당 등이 포함된 MEM 배지를 사용하고, 실험군으로는 2% FBS, 1% FBS, 0% FBS, 2% FBS + 2.5 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린, 1% FBS + 2.5 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린, 또는 0% FBS + 2.5 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린이 각각 보충된 MEM 배지를 사용하였다. 상기 준비된 배로 세포를 상기 준비된 배지 30mL에서 14일간 3회 계대배양한 결과(37°C, 5% CO₂, 80±5% Humidity에서 배양), 2% FBS + 2.5 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린이 보충된 배지에서 대조군보다 높은 세포 성장 프로파일을 확인할 수 있었던 반면, 1% FBS + 2.5 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린이 보충된 배지에서는 대조군보다 세포 성장이 감소하지만, 2% FBS군보다는 높은 성장 프로파일을 보였으며 Hydrolysate와 인슐린 의한 뚜렷한 성장촉진 효과가 있음을 확인할 수 있었다. FBS가 포함되지 않은 배지조건에서는 Hydrolysate와 인슐린을 추가하여도 세포성장이 일어나지 않아 1st passage에서 배양을 종료하였다(도 2).

[68]

[69] **실험No.3.**

[70] 가수분해물(hydrolysate) 및 인슐린의 최적 농도를 확인해보았다. 배로 세포는 ATCC Number CCL-81 유래세포를 사용하였다. 다음 표에 나타난 바와 같이, 대조군으로는 5% FBS가 보충된 MEM 배지를 사용하고, 실험군으로는 0~6 g/L Hydrolysate + 0~6 mg/L 인슐린이 각각 보충된 MEM 배지를 사용하였다.

[71] [Table 2]

샘플ID	FBS(%)	Hydrolysate(g/L)	인슐린(mg/L)
M5	5	0	0
S1	1	0	0
S2	1	0	6
S3	1	6	0
S4	1	6	6
S5	1.5	3	3
S6	1.5	3	3
S7	1.5	3	3
S8	2	0	0
S9	2	0	6
S10	2	6	0
S11	2	6	6
S12	2	2	0
S13	2	2	3
S14	2	2	6
S15	2	4	0
S16	2	4	3
S17	2	4	6

[72] 상기 준비된 배로 세포를 상기 준비된 배지 30mL 에서 6일간 배양한 결과(37°C, 5% CO₂, 80±5% Humidity에서 배양), 6 g/L Hydrolysate 조건(S10)의 경우 최종세포수는 가장 높았지만 2 g/L Hydrolysate 조건에서는 3mg/L 인슐린이 보충된 조건(S13)을 바이오리액터에서 배양을 진행할 조건으로 선택하였다. 배양 초기 세포 성장속도가 빠른 결과를 보여 바이오리액터에서 유가식 배양을 진행할 때 세포 성장에 더 유리한 조건이라고 판단하였다(도 3).

[73]

[74] **실험No.4.**

[75] FBS 를 NCS로 대체할 수 있는지 농도별로 확인해보았다. 배로 세포는 ATCC Number CCL-81 유래세포를 사용하였다. 대조군으로는 5% FBS 가 보충된 MEM 배지를 사용하고, 실험군으로는 1% 또는 2% FBS, 또는 1%, 2% 또는 5% NCS가 각각 보충된 MEM 배지를 사용하였다. 상기 준비된 배로 세포를 상기 준비된 배지 30 mL 에서 5일간 배양한 결과(37°C, 5% CO₂, 80±5% Humidity에서 배양),

FBS와 NCS가 각각 같은 농도일 때 유사한 세포 성장 프로파일을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며 (도 4), 이는 FBS 를 NCS로 대체할 수 있음을 시사한다.

[76]

[77] **실험No.5.**

[78] 실험No.3에서 선택한 조건(2% FBS + 2 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린 조건)을 2L 배양기 규모로 확대하여 실험을 진행하고, FBS 를 NCS로 대체할 수 있는지 2% NCS + 2 g/L Hydrolysate + 3 mg/L 인슐린 조건을 추가하여 확인해보았다. 배로 세포는 ATCC Number CCL-81 유래세포를 사용하였다. 대조군으로는 5% FBS 가 보충된 MEM 배지를 사용하여 종배양 및 본배양을 진행하고(#R02), 실험군으로는 2% NCS + 2 g/L Hydrolysate + 3 mg/L 인슐린(#R03), 또는 2% FBS + 2 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린이 보충된 MEM 배지에서 종배양 및 본배양을 진행하였다(#R04) (온도 37°C, pH 7.2 ±0.05, DO 50%, 배양방법: 유가식 배양 (Fed-batch), 배양일수: 종배양 및 본배양 18일 배양 진행).

[79] 그 결과, 5% FBS가 보충된 MEM 배지를 사용한 조건과 2% FBS + 2 g/L Hydrolysate + 3 mg/L 인슐린이 보충된 배지 조건과 2% NCS + 2 g/L Hydrolysate + 3 mg/L 인슐린 조건에서 유사한 세포 성장 프로파일을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 5% FBS 조성 대신 2% FBS 또는 NCS에 Hydrolysate와 인슐린이 보충된 조성으로 대체 가능하며 또한 FBS 를 NCS로 대체할 수 있음을 시사한다(도 5).

[80]

[81] **실험No.6.**

[82] 실험 No.6 에서 Hydrolysate와 인슐린이 포함된 조성에서 NCS 농도에 따라 세포 성장 및 바이러스 생산성에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 배로 세포는 ATCC Number CCL-81 유래세포를 사용하였다. 대조군으로는 2% FBS + 2 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린이 보충된 MEM 배지를 사용하고(#R02), 실험군으로 2% NCS + 2 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린이 보충된 MEM 배지 (#R04), 또는 7% NCS + 2 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린이 보충된 MEM 배지(#R03)를 사용하였다. 상기 준비된 배로 세포를 상기 준비된 배지를 사용하여 2L 바이오리액터에서 19일간 배양한 결과(온도 37°C, pH 7.2 ±0.05, DO 50%, 배양방법: 유가식 배양 (Fed-batch), 배양일수: 종배양 및 본배양 19일 배양 진행), 2% NCS + 2 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린이 보충된 MEM 배지에서 대조군과 유사한 세포 성장 프로파일이 나타나 FBS 를 NCS 로 대체할 수 있음을 확인하였고, 7% NCS 농도조건에서 2% NCS 조건보다 세포 성장이 증가하는 것을 확인하였다(도 6). 각각의 조건에서 배양한 세포에 바이러스를 감염시켜 4일 배양 후 (온도 32.5°C, pH 7.4±0.1, DO 25%, 배양일수: 4일 배양 진행)에 회수하여 바이러스 농도를 정량하여 생산성을 비교하였다. 7% NCS + 2 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린 (#R03) 조건에서 최종세포수가 가장 높았지만, 바이러스 생산성은 2% NCS + 2 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린 (#R04) 조건과

비교했을 때 유사한 수준임을 확인하였다. 따라서 배로 세포 배양 성장 및 바이러스 배양을 통한 생산성을 바탕으로 FBS는 NCS로 대체되어 사용될 수 있음을 확인하였고, 2% NCS + 2 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린 조성을 선택하여 배양규모 확대실험을 진행하였다 (도 6).

[83]

[84] **실험No.7.**

[85] 앞선 실험들을 통해 FBS를 대체할 수 있는 NCS, Hydrolysate, 인슐린이 포함된 배지 조성으로 선택된 배지(2% NCS + 2 g/L Hydrolysate + 3mg/L 인슐린)로 배양 규모를 2L, 40L 및 1000L 로 각각 확대해가며 세포 성장이 유지되는지를 확인해보았다 (온도 37°C, pH 7.2 ±0.05, DO 50%, 배양방법: 유가식 배양 (Fed-batch), 배양일수: 종배양 및 본배양 18일 배양 진행). 각각의 조건에서 배양한 배로세포에 바이러스를 감염시켜 3~4일 배양한 후 회수하여 바이러스 생산성을 비교하였다.

[86] 2L 와 40L의 배양 규모에서의 세포 성장을 비교한 결과를 아래 표와 도 7에 나타내었으며, 40L 규모에서도 동등 이상의 세포 성장결과를 확인할 수 있었다.

[87] [Table 3]

배양규모	2L (n=6)	40L (n=3)
최종 세포밀도 (X10 ⁵ cells/mL)	15.03	17.95
SGR, D1~4 (day ⁻¹)	0.68	0.71
SGR, D1~6 (day ⁻¹)	0.53	0.56

[88] * SGR: 비성장율(specific growth rate)

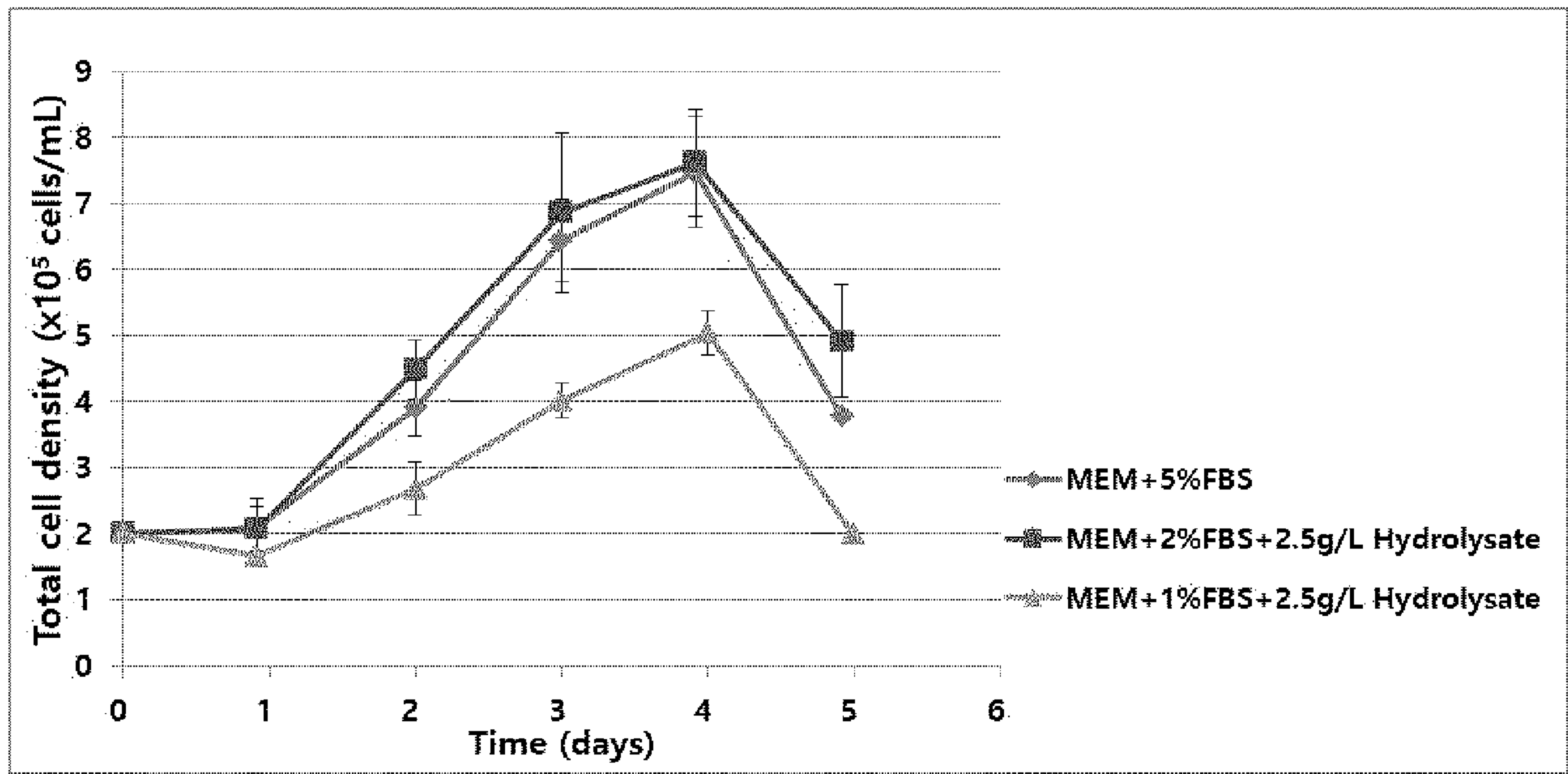
[89] 또한, 1000L 규모에서 FBS가 포함된 배지조건 과 NCS, Hydrolysate, 인슐린이 포함된 배지조건에서의 세포 성장을 비교한 결과를 도 8에 나타내었으며, 1000L 규모에서도 동등 이상의 세포 성장을 보이는 것을 확인할 수 있었다. NCS, Hydrolysate, 인슐린 조성 배지로 변경 전과 후의 바이러스 생산성을 배양 규모별로 비교하여 도 8에 나타내었다. 배지 변경 후에 바이러스 생산성이 더 증가하고 2000L 배양 규모까지 확대했을 때도 동등이상의 바이러스 생산성을 확인할 수 있었다.

[90] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

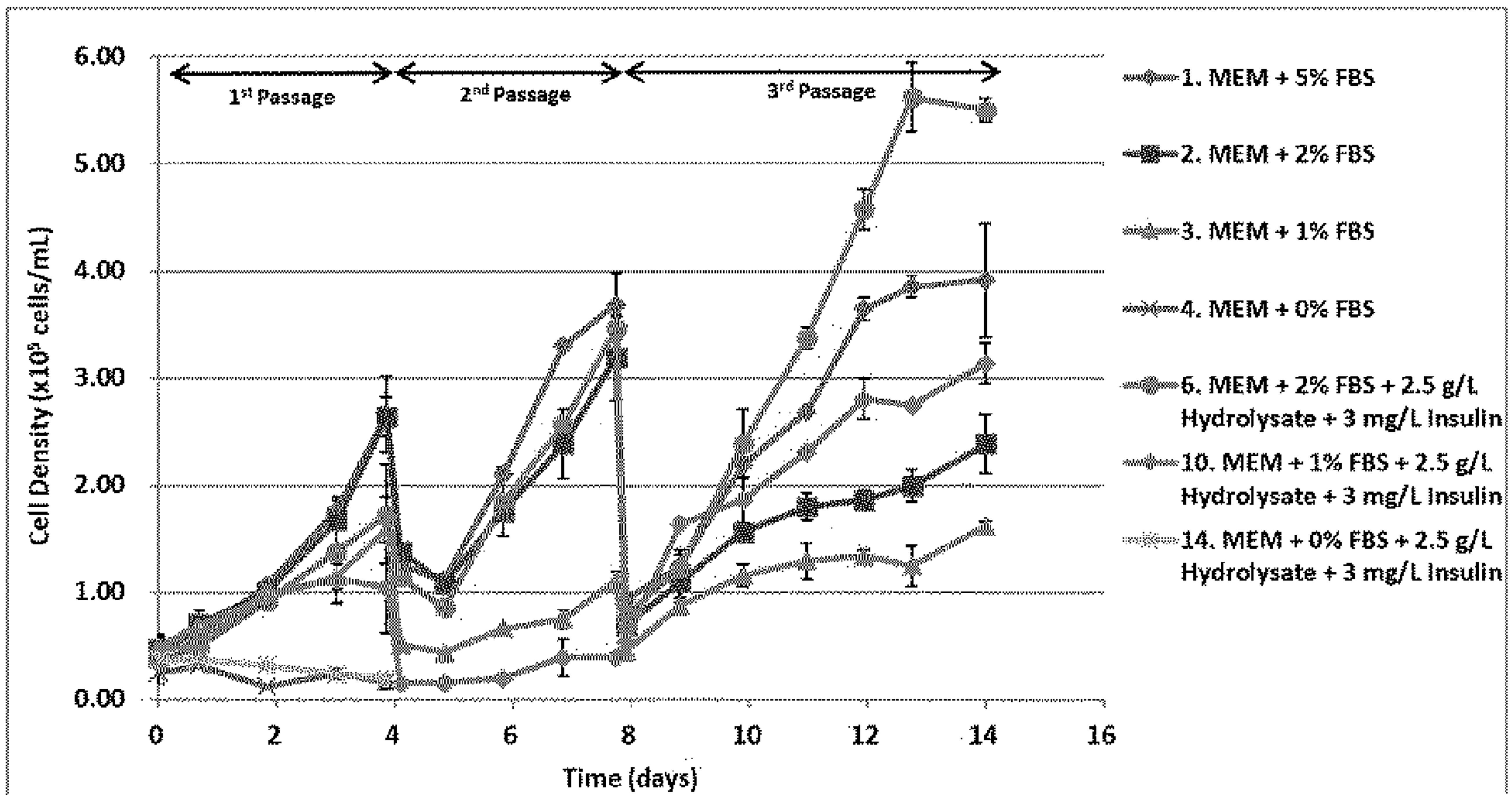
청구범위

- [청구항 1] 신생우아혈청(newborn calf serum, NCS) 1~7%(v/v), 가수분해물 (hydrolysate) 1~6 g/L, 및 인슐린 1~6 mg/L 을 포함하는, 배로 세포의 배양용 배지 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는, 배지 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 가수분해물이, 동물성 요소 및 단백질이 없는 동물성 요소 및 단백질이 없는(animal component-free, protein-free) 가수분해물인, 배지 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 배로 세포가 마이크로캐리어(microcarrier)에 부착되어 배양되는 것을 포함하는, 배지 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 배지가 MEM 배지를 포함하는, 배지 조성물.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 배지 조성물에서 배로 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 배로 세포의 배양 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 배양이 10mL 내지 1000L 의 스케일로 행해지는, 방법.
- [청구항 8] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 배지 조성물에서 배양된 배로 세포에 바이러스를 감염하는 단계; 및 바이러스가 감염된 배로 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 바이러스 생산 방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 바이러스가 감염된 배로 세포의 배양이 10mL 내지 2000L 의 스케일로 행해지는, 방법.

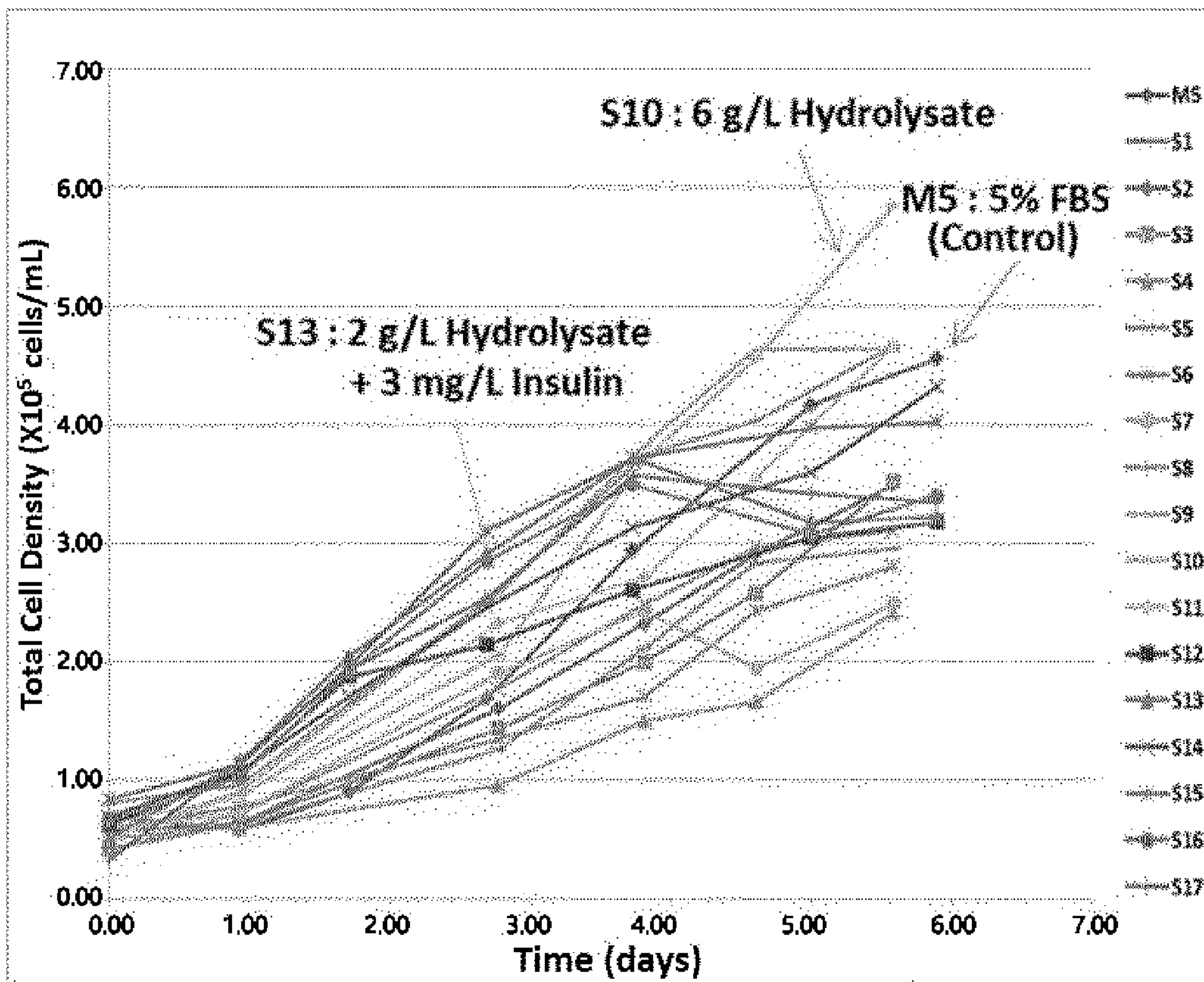
[Fig. 1]



[Fig. 2]

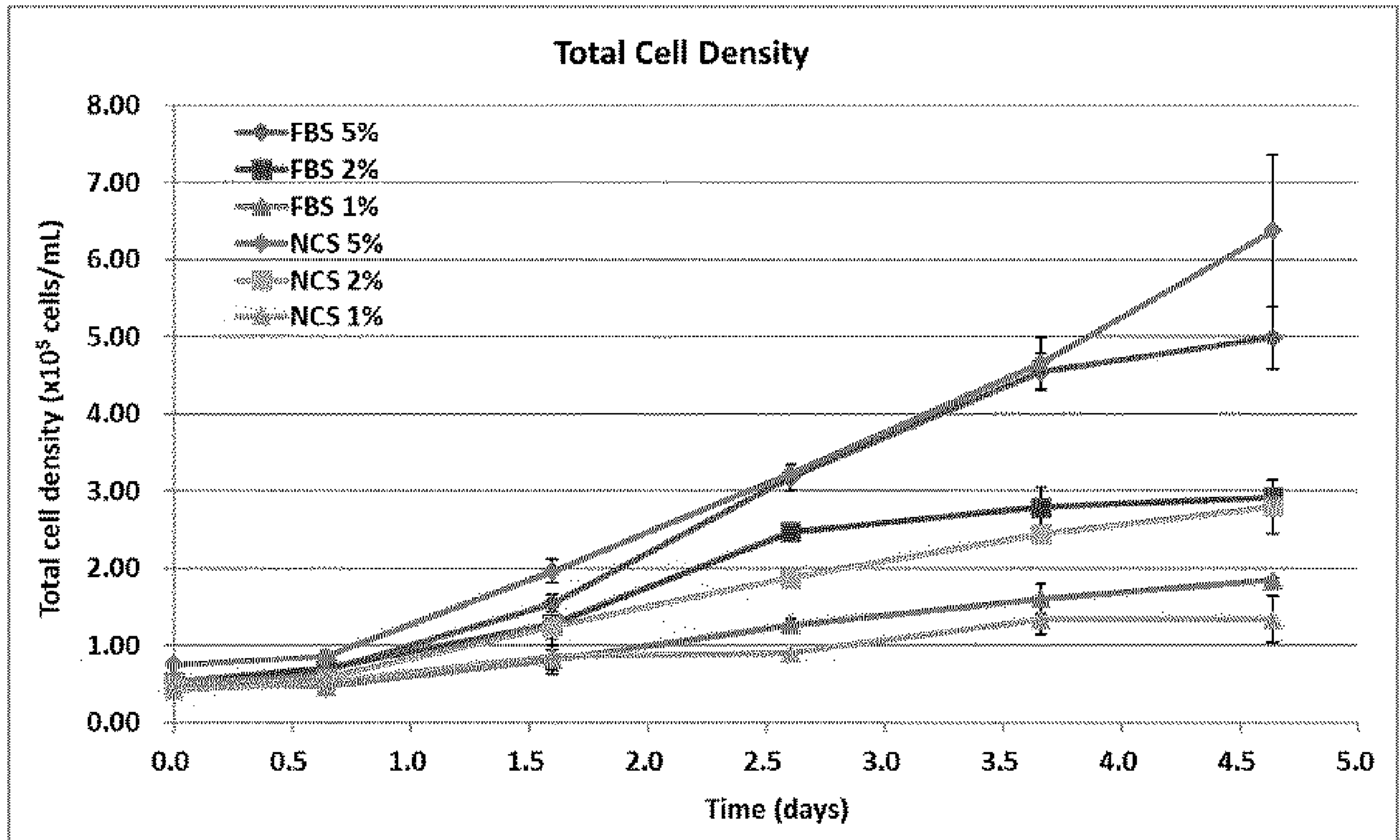


[Fig. 3]

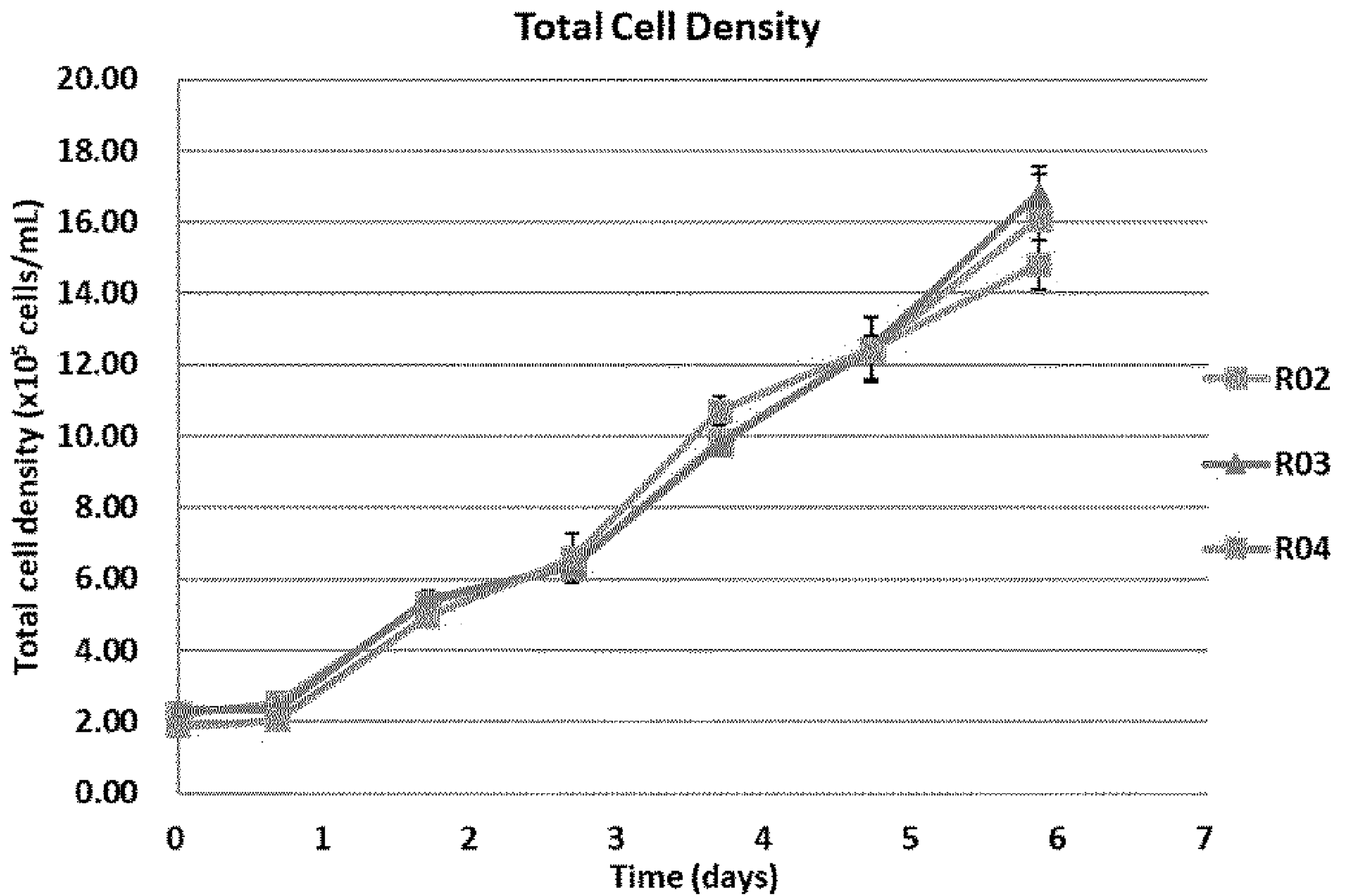


FBS (%)	Hydrolysate (g/L)	Insulin (mg/L)	Sample ID
1	0	0	S1
1	0	6	S2
1	6	0	S3
1	6	6	S4
15	3	3	S5
15	3	3	S6
15	3	3	S7
2	0	0	S8
2	0	6	S9
2	6	0	S10
2	6	6	S11
2	2	0	S12
2	2	3	S13
2	2	6	S14
2	4	0	S15
2	4	3	S16
2	4	6	S17
5	0	0	M5

[Fig. 4]



[Fig. 5]

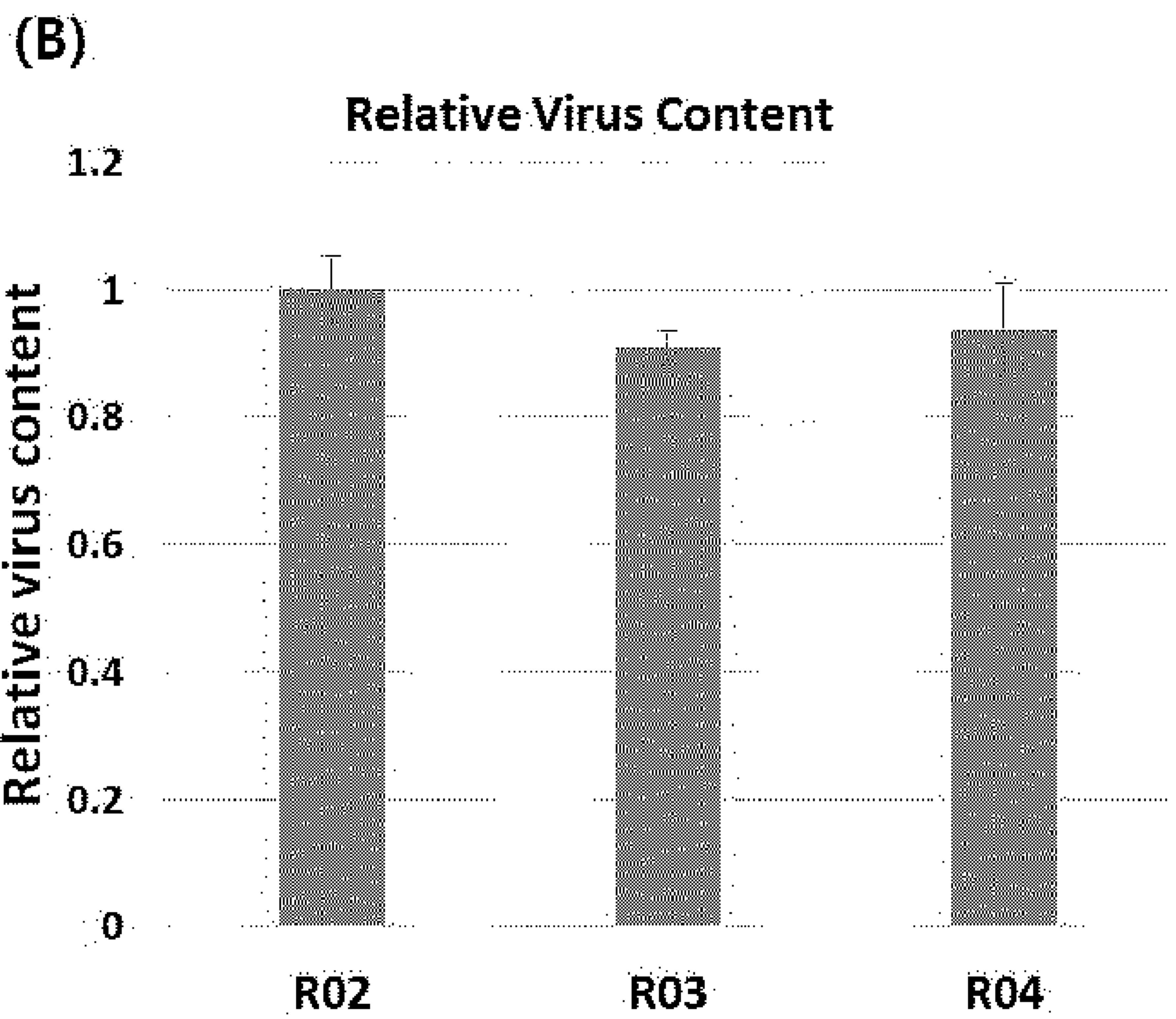
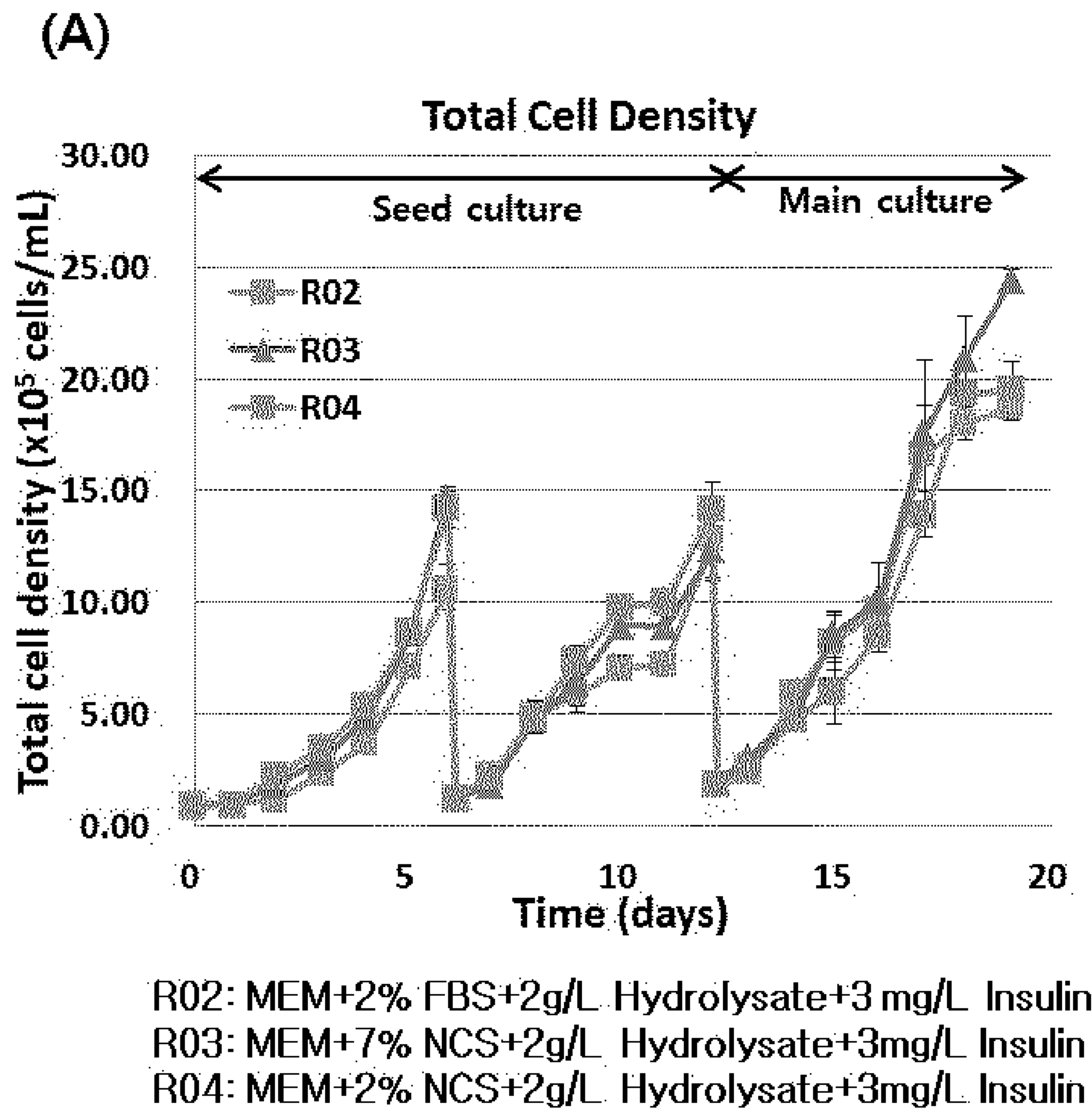


R02: MEM+5% FBS

R03: MEM+2%NCS+2g/L Hydrolysate+3mg/L Insulin

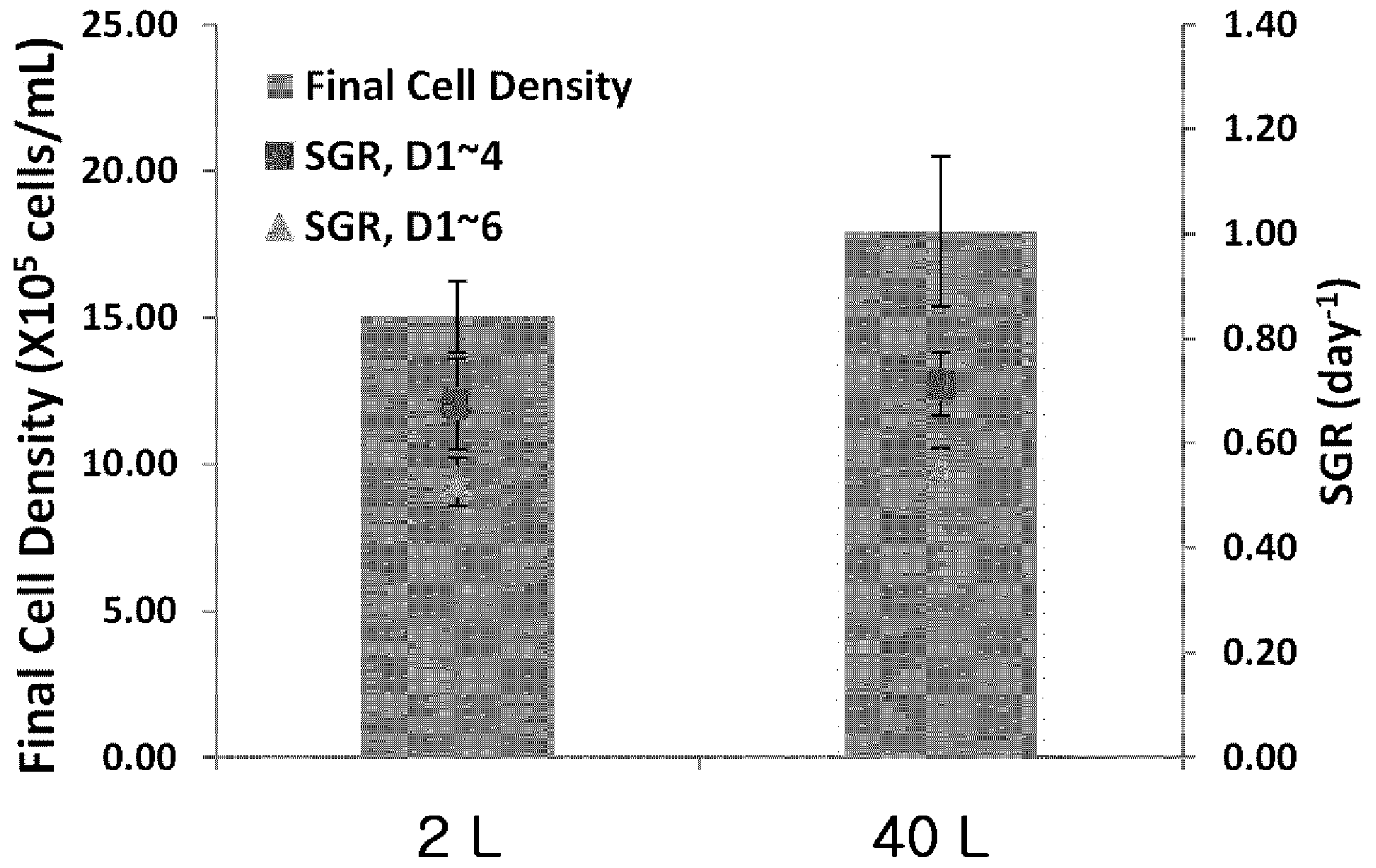
R04: MEM+2% FBS+2g/L Hydrolysate+3mg/L Insulin

[Fig. 6]

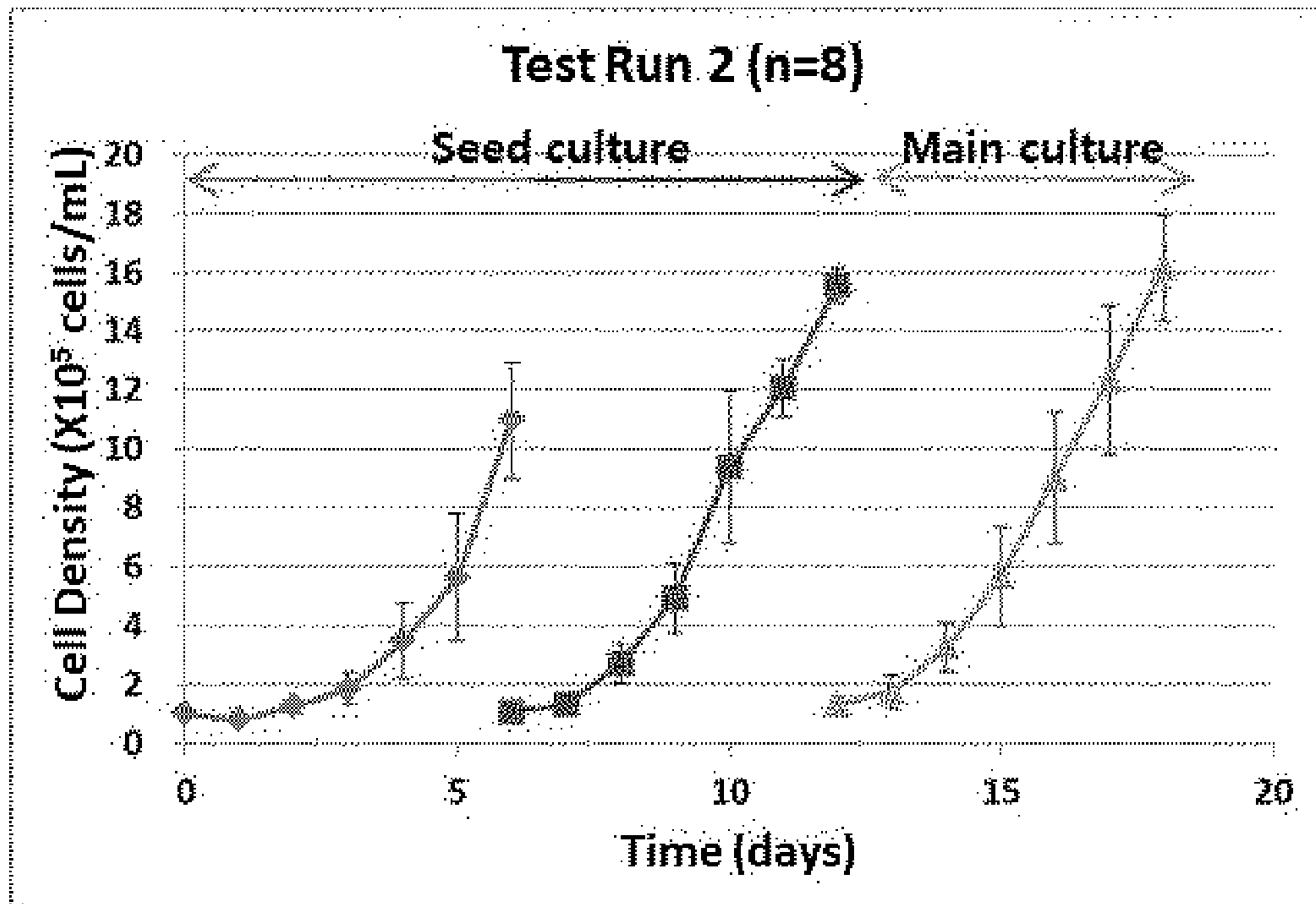
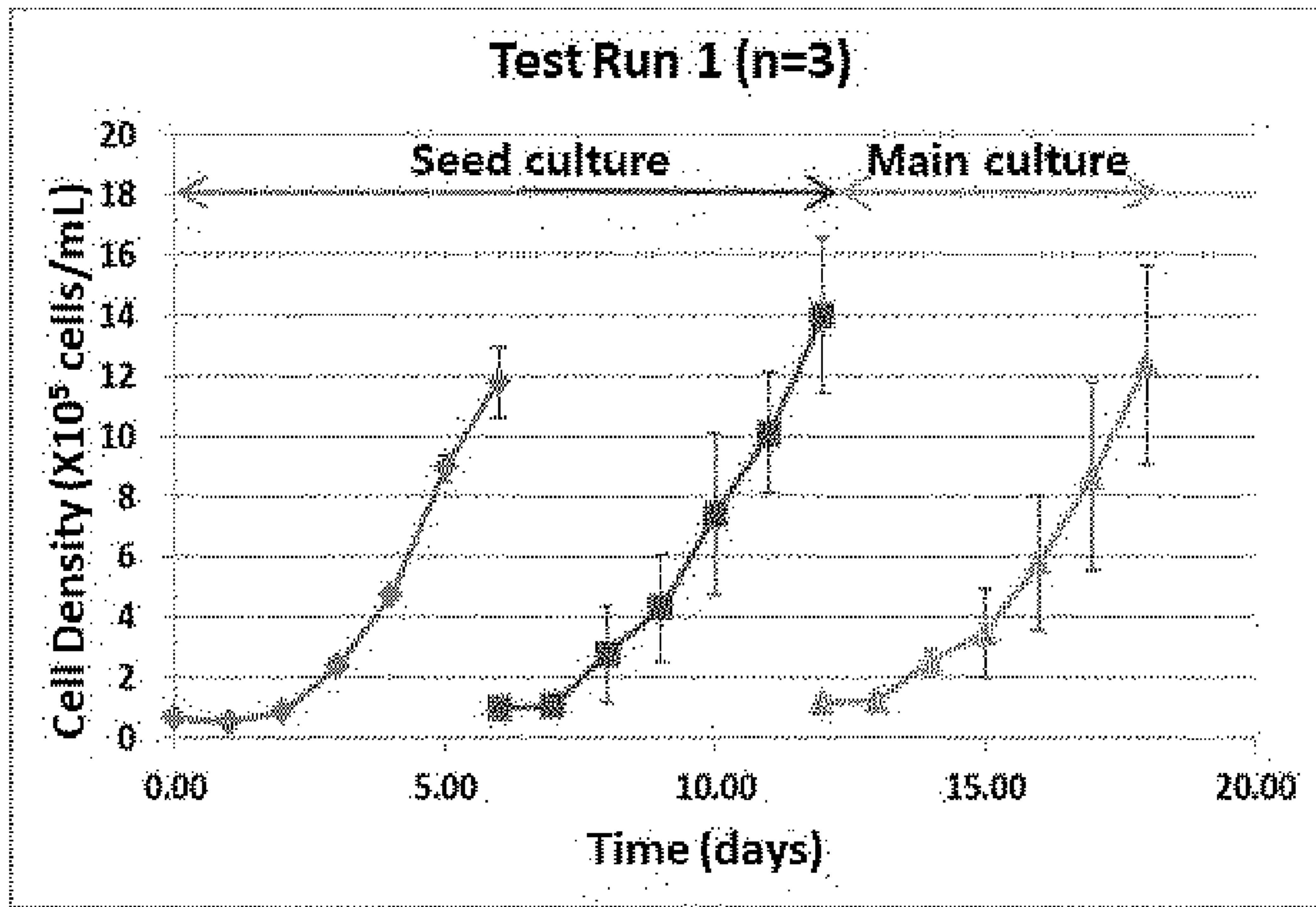


[Fig. 7]

Cell Density & SGR (2 L vs. 40 L)



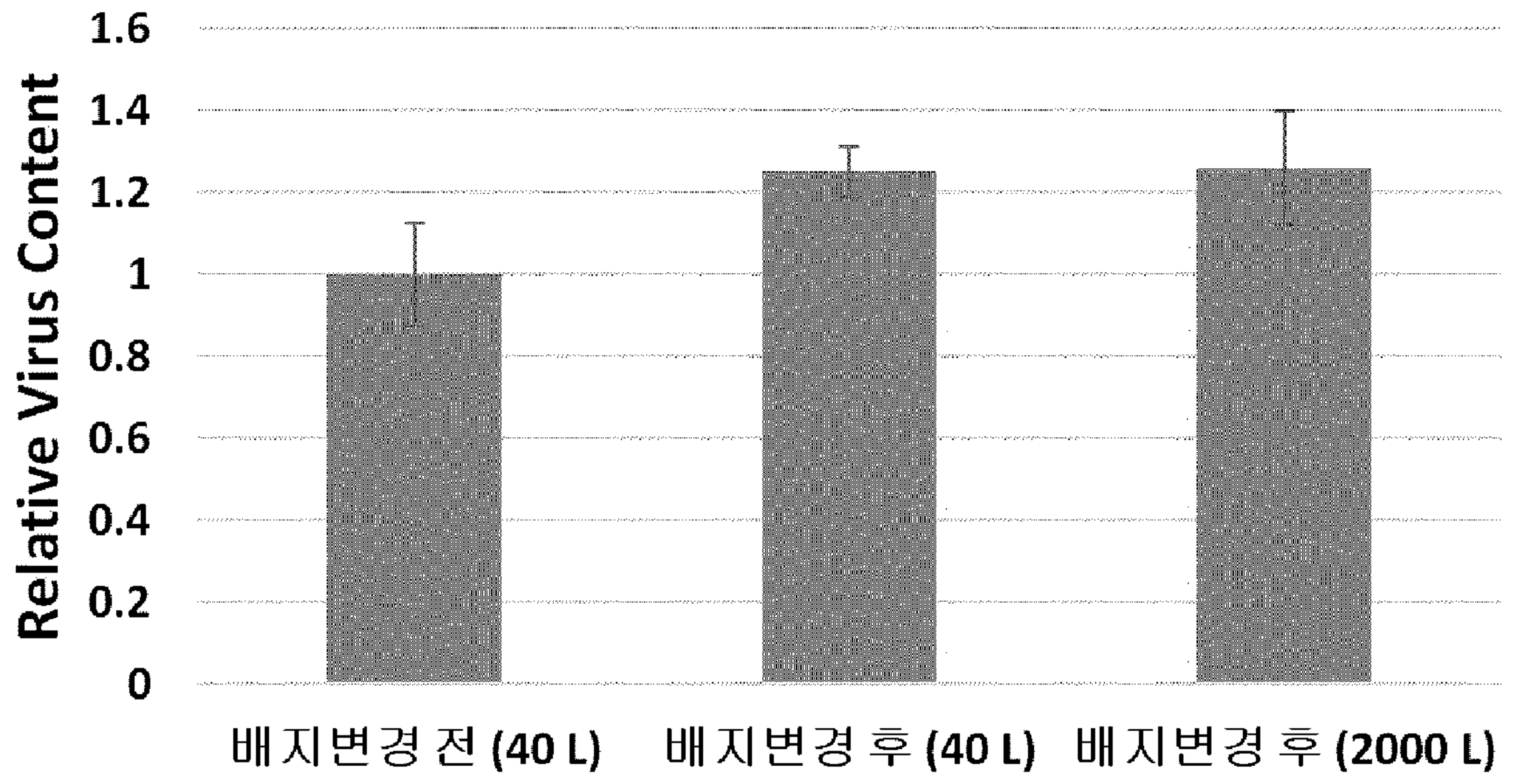
[Fig. 8a]



[Fig. 8b]

(B)

Relative Virus Content



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/019066

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/071(2010.01)i; C12N 7/00(2006.01)i</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>																				
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 5/071(2010.01); C12N 5/00(2006.01); C12N 5/02(2006.01); C12N 5/07(2010.01)</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 베로(vero), 배양(culture), 신생우아혈청(newborn calf serum, NCS), 가수분해물(hydrosate), 인슐린(insulin), 매지(media)</p>																				
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">Category*</th> <th style="width:70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width:20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td align="center">Y</td> <td>US 2012-0077268 A1 (AERTS, B. G. L. et al.) 29 March 2012 (2012-03-29) See abstract; paragraphs [0005], [0092] and [0102]; table 2; example 12; and claims 1, 6-9, 12 and 23.</td> <td align="center">1-9</td> </tr> <tr> <td align="center">Y</td> <td>CHEN, J.-W. et al. Applicability of modified M199 medium in Vero cell culture. Chinese Journal of Biologicals. 2014, vol. 27, no. 1, pp. 76-77. See abstract.</td> <td align="center">1-9</td> </tr> <tr> <td align="center">Y</td> <td>EP 1983044 B1 (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION) 10 August 2016 (2016-08-10) See claims 1, 7, 15 and 17-18.</td> <td align="center">1-9</td> </tr> <tr> <td align="center">A</td> <td>KOLELL, K. et al. Virus production in Vero cells using a serum-free medium. In: Cell Technology for Cell Products. Springer. Dordrecht. 2007, pp. 583-585. See abstract; figure 2; and pages 583 and 585.</td> <td align="center">1-9</td> </tr> <tr> <td align="center">A</td> <td>CN 102827804 A (SUZHOU WOMEI BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD. et al.) 19 December 2012 (2012-12-19) See claims 1-15.</td> <td align="center">1-9</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	US 2012-0077268 A1 (AERTS, B. G. L. et al.) 29 March 2012 (2012-03-29) See abstract; paragraphs [0005], [0092] and [0102]; table 2; example 12; and claims 1, 6-9, 12 and 23.	1-9	Y	CHEN, J.-W. et al. Applicability of modified M199 medium in Vero cell culture. Chinese Journal of Biologicals. 2014, vol. 27, no. 1, pp. 76-77. See abstract.	1-9	Y	EP 1983044 B1 (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION) 10 August 2016 (2016-08-10) See claims 1, 7, 15 and 17-18.	1-9	A	KOLELL, K. et al. Virus production in Vero cells using a serum-free medium. In: Cell Technology for Cell Products. Springer. Dordrecht. 2007, pp. 583-585. See abstract; figure 2; and pages 583 and 585.	1-9	A	CN 102827804 A (SUZHOU WOMEI BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD. et al.) 19 December 2012 (2012-12-19) See claims 1-15.	1-9
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
Y	US 2012-0077268 A1 (AERTS, B. G. L. et al.) 29 March 2012 (2012-03-29) See abstract; paragraphs [0005], [0092] and [0102]; table 2; example 12; and claims 1, 6-9, 12 and 23.	1-9																		
Y	CHEN, J.-W. et al. Applicability of modified M199 medium in Vero cell culture. Chinese Journal of Biologicals. 2014, vol. 27, no. 1, pp. 76-77. See abstract.	1-9																		
Y	EP 1983044 B1 (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION) 10 August 2016 (2016-08-10) See claims 1, 7, 15 and 17-18.	1-9																		
A	KOLELL, K. et al. Virus production in Vero cells using a serum-free medium. In: Cell Technology for Cell Products. Springer. Dordrecht. 2007, pp. 583-585. See abstract; figure 2; and pages 583 and 585.	1-9																		
A	CN 102827804 A (SUZHOU WOMEI BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD. et al.) 19 December 2012 (2012-12-19) See claims 1-15.	1-9																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.</p>																				
<table style="width:100%;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family</p>																
<p>* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family</p>																			
<p>Date of the actual completion of the international search 08 April 2021</p>		<p>Date of mailing of the international search report 08 April 2021</p>																		
<p>Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578</p>		<p>Authorized officer Telephone No.</p>																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/019066

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2007-0032273 A (WYETH LLC) 21 March 2007 (2007-03-21) See entire document.	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/019066

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)				
US	2012-0077268	A1	29 March 2012	AU	2004-217807	A1	16 September 2004				
				AU	2004-217807	B2	25 June 2009				
				BR	PI0407636	A	21 February 2006				
				CA	2517327	A1	16 September 2004				
				CN	101200705	A	18 June 2008				
				CN	1756837	A	05 April 2006				
				CN	1756837	B	26 May 2010				
				CO	5601047	A1	31 January 2006				
				EP	1599580	A1	30 November 2005				
				EP	2186885	A1	19 May 2010				
				EP	2192175	A1	02 June 2010				
				IL	170116	A	21 February 2006				
				IS	7992	A	18 August 2005				
				JP	2006-519023	A	24 August 2006				
				JP	2010-273683	A	09 December 2010				
				JP	4787739	B2	05 October 2011				
				KR	10-1242090	B1	08 March 2013				
				KR	10-2005-0105509	A	04 November 2005				
				MA	27631	A1	01 November 2005				
				MX	PA05009096	A	19 October 2005				
				NO	20054124	A	27 September 2005				
				NZ	541908	A	30 April 2008				
				RU	2005125606	A	10 March 2006				
				US	2006-0183224	A1	17 August 2006				
				US	8034617	B2	11 October 2011				
				WO	2004-078955	A1	16 September 2004				
				<hr/>							
				EP	1983044	B1	10 August 2016	AT	399855	T	15 July 2008
								AU	4751697	A	05 May 1998
								EP	0954563	A1	10 November 1999
EP	0954563	B1	02 July 2008								
EP	1983044	A2	22 October 2008								
EP	1983044	A3	14 January 2009								
JP	2001-501830	A	13 February 2001								
JP	2010-154866	A	15 July 2010								
JP	4543402	B2	15 September 2010								
US	106103529	A	15 August 2000								
US	2004-0171152	A1	02 September 2004								
US	2006-0286668	A1	21 December 2006								
US	2009-0061516	A1	05 March 2009								
US	2011-0039330	A1	17 February 2011								
US	2013-0084640	A1	04 April 2013								
US	2014-0273205	A1	18 September 2014								
WO	98-15614	A1	16 April 1998								
WO	99-57246	A1	11 November 1999								
WO	99-57246	A8	12 October 2000								
WO	99-57246	A9	21 June 2001								
<hr/>											
CN	102827804	A	19 December 2012	CN	102827804	B	12 February 2019				
<hr/>											
KR	10-2007-0032273	A	21 March 2007	AT	502104	T	15 April 2011				
				AU	2004-312352	A1	21 July 2005				
				AU	2004-312352	B2	19 August 2010				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/019066

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		BR PI0417775 A	20 March 2007
		CA 2548162 A1	21 July 2005
		CA 2548162 C	29 October 2013
		CN 1894400 A	10 January 2007
		CN 1894400 B	09 February 2011
		DK 1694828 T3	23 May 2011
		EP 1694828 A1	30 August 2006
		EP 1694828 B1	16 March 2011
		ES 2360799 T3	09 June 2011
		IL 176338 A	05 October 2006
		JP 2007-514449 A	07 June 2007
		JP 4541365 B2	08 September 2010
		MX PA06007047 A	14 December 2006
		PL 1694828 T3	30 November 2011
		PT 1694828 E	12 May 2011
		SI 1694828 T1	29 July 2011
		US 2009-0246868 A1	01 October 2009
		WO 2005-066332 A1	21 July 2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 5/071(2010.01)i; C12N 7/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/071(2010.01); C12N 5/00(2006.01); C12N 5/02(2006.01); C12N 5/07(2010.01)		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 베로(vero), 배양(culture), 신생우아혈청(newborn calf serum, NCS), 가수분해물(hydrosate), 인슐린(insulin), 배지(media)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	US 2012-0077268 A1 (AERTS, B. G. L. 등) 2012.03.29 요약; 단락 [0005], [0092], [0102]; 표 2; 실시예 12: 청구항 1, 6-9, 12, 23	1-9
Y	CHEN, J.-w. 등, Applicability of modified M199 medium in Vero cell culture, Chinese Journal of Biologicals, 2014, 27권, 1호, 페이지 76-77 초록	1-9
Y	EP 1983044 B1 (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION) 2016.08.10 청구항 1, 7, 15, 17-18	1-9
A	KOLELL, K., 등, Virus production in Vero cells using a serum-free medium. In: Cell Technology for Cell Products. Springer, Dordrecht, 2007, 페이지 583-585 초록; 도면 2; 페이지 583, 585	1-9
A	CN 102827804 A (SUZHOU WOMEI BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO.,LTD. 등) 2012.12.19 청구항 1-15	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년04월08일(08.04.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년04월08일(08.04.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2007-0032273 A (와이어쓰) 2007.03.21 전체 문헌	1-9

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2012-0077268 A1	2012/03/29	AU 2004-217807 A1	2004/09/16
		AU 2004-217807 B2	2009/06/25
		BR PI0407636 A	2006/02/21
		CA 2517327 A1	2004/09/16
		CN 101200705 A	2008/06/18
		CN 1756837 A	2006/04/05
		CN 1756837 B	2010/05/26
		CO 5601047 A1	2006/01/31
		EP 1599580 A1	2005/11/30
		EP 2186885 A1	2010/05/19
		EP 2192175 A1	2010/06/02
		IL 170116 A	2006/02/21
		IS 7992 A	2005/08/18
		JP 2006-519023 A	2006/08/24
		JP 2010-273683 A	2010/12/09
		JP 4787739 B2	2011/10/05
		KR 10-1242090 B1	2013/03/08
		KR 10-2005-0105509 A	2005/11/04
		MA 27631 A1	2005/11/01
		MX PA05009096 A	2005/10/19
		NO 20054124 A	2005/09/27
		NZ 541908 A	2008/04/30
		RU 2005125606 A	2006/03/10
		US 2006-0183224 A1	2006/08/17
		US 8034617 B2	2011/10/11
		WO 2004-078955 A1	2004/09/16
		EP 1983044 B1	2016/08/10
AU 4751697 A	1998/05/05		
EP 0954563 A1	1999/11/10		
EP 0954563 B1	2008/07/02		
EP 1983044 A2	2008/10/22		
EP 1983044 A3	2009/01/14		
JP 2001-501830 A	2001/02/13		
JP 2010-154866 A	2010/07/15		
JP 4543402 B2	2010/09/15		
US 106103529 A	2000/08/15		
US 2004-0171152 A1	2004/09/02		
US 2006-0286668 A1	2006/12/21		
US 2009-0061516 A1	2009/03/05		
US 2011-0039330 A1	2011/02/17		
US 2013-0084640 A1	2013/04/04		
US 2014-0273205 A1	2014/09/18		
WO 98-15614 A1	1998/04/16		
WO 99-57246 A1	1999/11/11		
WO 99-57246 A8	2000/10/12		
WO 99-57246 A9	2001/06/21		
CN 102827804 A	2012/12/19	CN 102827804 B	2019/02/12
KR 10-2007-0032273 A	2007/03/21	AT 502104 T	2011/04/15
		AU 2004-312352 A1	2005/07/21
		AU 2004-312352 B2	2010/08/19

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		BR PI0417775 A	2007/03/20
		CA 2548162 A1	2005/07/21
		CA 2548162 C	2013/10/29
		CN 1894400 A	2007/01/10
		CN 1894400 B	2011/02/09
		DK 1694828 T3	2011/05/23
		EP 1694828 A1	2006/08/30
		EP 1694828 B1	2011/03/16
		ES 2360799 T3	2011/06/09
		IL 176338 A	2006/10/05
		JP 2007-514449 A	2007/06/07
		JP 4541365 B2	2010/09/08
		MX PA06007047 A	2006/12/14
		PL 1694828 T3	2011/11/30
		PT 1694828 E	2011/05/12
		SI 1694828 T1	2011/07/29
		US 2009-0246868 A1	2009/10/01
		WO 2005-066332 A1	2005/07/21