(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년05월08일
(11) 등록번호 10-1733834
(24) 등록일자 2017년04월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/02 (2006.01) *C07K 5/06* (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01) *C12N 7/01* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7030539
(22) 출원일자(국제) 2011년04월22일
심사청구일자 2016년04월11일
(85) 번역문제출일자 2012년11월22일
(65) 공개번호 10-2013-0106762
(43) 공개일자 2013년09월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/033630
(87) 국제공개번호 WO 2011/133902
국제공개일자 2011년10월27일
(30) 우선권주장
13/092,016 2011년04월21일 미국(US)
61/327,644 2010년04월23일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2008035631 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
라이프 테크놀로지스 코포레이션
미국 캘리포니아 92008 칼스베드 뉴톤 드라이브 5823
(72) 발명자
바레트, 션
미국 14032 뉴욕 클라렌스 센터 비아 시마토 디알 9300
자코비아, 스콧
미국 14226 뉴욕 스나이더 다윈 드라이브 277
(74) 대리인
양영준, 양영환

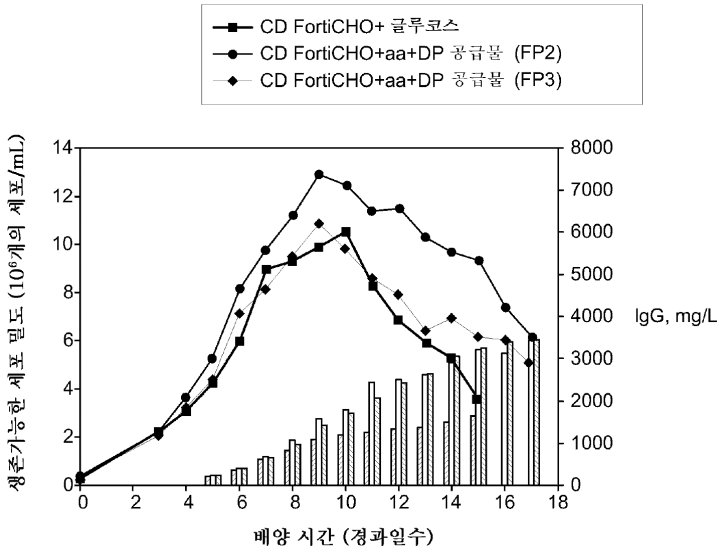
전체 청구항 수 : 총 14 항 심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **소형 펩티드를 포함하는 세포 배양 배지**

(57) 요 약

세포 배양 배지, 농축 배지, 및 공급물, 세포 배양 배지 및 공급물을 제조하는 방법, 및 세포를 배양하는 방법을 제공한다. 디펩티드를 비롯한, 하나 이상의 소형 펩티드를 세포 배양 배지에 첨가함으로써 안정성을 개선시키고, 세포 배양 조건을 개선시킨다.

대 표 도



명 세 서

청구범위

청구항 1

a) 6개 이하의 아미노산을 가지며, 여기서 상기 아미노산 중 적어도 1개는 시스테인을 포함하는 것인 펩티드; 및

b) 6개 이하의 아미노산을 가지며, 여기서 상기 아미노산 중 적어도 1개는 티로신을 포함하는 것인 펩티드

를 포함하는, 세포 배양에 사용하기 위한 무혈청 공급물.

청구항 2

제1항에 있어서, 나머지 아미노산이 20개의 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 무혈청 공급물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 일체형인 무혈청 공급물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, pH가 중성인 무혈청 공급물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 펩티드를 함유하지 않는 공급물에 비해 세포 배양 시스템에서 증가된 세포 성장, 증가된 세포 생존력 또는 증가된 단백질 또는 바이러스 역가를 지원하는 무혈청 공급물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 액체, 건조 분말 또는 과립화된 건조 분말인 무혈청 공급물.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 펩티드가 1 g/L 내지 16 g/L의 농도로 존재할 수 있는 것인 무혈청 공급물.

청구항 9

제7항에 있어서, 액체가 2-8℃에서 보관 시 12개월 초과 동안 침전물이 없는 상태로 유지되는 것인 무혈청 공급물.

청구항 10

제1항에 따른 a) 펩티드 및 b) 펩티드를 탄수화물 및 적어도 하나의 아미노산 또는 그의 염과 배합하는 것을 포함하는, 무혈청 공급물을 제조하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 비타민, 염, 완충제, 무기질 또는 동물-기원 물질 무함유 펩티드 중 하나가 추가로 포함되며, 여기서 동물-기원 물질 무함유 펩티드는 비-동물 세포주에서 발현되는 펩티드를 의미하는 것인 방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 공급물이 유가식 배양, 생물반응기 또는 발효기에 첨가되는 것인 방법.

청구항 13

1개 이상의 용기를 포함하며, 여기서 제1 용기는 제1항 또는 제2항에 따른 무혈청 공급물을 함유하고, 상기 공급물은 상기 펩티드를 함유하지 않는 세포 배양 배지에 비해 증가된 세포 성장, 증가된 세포 생존력 또는 증가된 단백질 또는 바이러스 생산을 지원하는 것인, 시험관내 세포 배양에 사용하기 위한 키트.

청구항 14

삭제

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 곤충 세포, 선충 세포, CHO 세포, COS 세포, VERO 세포, BHK 세포, AE-1 세포, SP2/0 세포, L5.1 세포, PerC6 세포 및 하이브리도마 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포를 배양하고/거나 재조합 단백질 또는 바이러스를 생산하는 데 사용하기 위한 무혈청 공급물.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 따른 무혈청 공급물을 함유하지 않는 세포 배양 시스템에 비해 증가된 세포 성장, 증가된 세포 생존력 또는 증가된 단백질 또는 바이러스 생산을 지원하는, 제1항 또는 제2항에 따른 무혈청 공급물을 포함하는 진핵 세포 배양 시스템.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

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

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

발명의 설명

배 경 기 술

[0001] 세포 배양 배지는 제어된 인공의 시험관내 환경에서 세포를 유지시키고, 성장시키는 데 필요한 영양을 제공한다. 세포 배양 배지의 영양 제제, pH, 및 오스몰랄농도는 파라미터, 예를 들어, 세포 유형, 세포 밀도, 및 사용되는 배양 시스템에 따라 달라진다.

[0002] 동물, 식물 및 박테리아 세포를 비롯한 많은 세포 유형을 배양하는 데 배지 제제가 사용되어 왔다. 배양된 세포는 유용한 생물학적 물질의 생산 및 생리학적 과정에 관한 연구를 비롯한 많은 용도로 사용된다. 상기와 같이 유용한 생성물의 예로는 폴리펩티드, 예를 들어, 모노클로날 항체, 호르몬, 성장 인자, 효소, 및 관심이 대상이 되는 다른 폴리펩티드를 포함한다. 그러한 생성물은 여러모로 상업상 및 치료학상 적용되며, 재조합 DNA 기술의 도래로, 세포가 상기 생성물을 다량으로 생산할 수 있도록 조작할 수 있다. 배양된 세포는 또한 통상적으로 벡터 및/또는 백신으로서 사용될 수 있는 바이러스의 단리, 확인 및 성장을 위해 사용된다. 따라서, 세포를 시험관내에서 배양할 수 있는 능력은 세포 생리학 연구를 위해서도 중요하지만, 비용면에서 효율적인 수단에 의해서는 달리 수득될 수 없는 유용한 물질을 생산하는 데에도 필요하다.

[0003] 세포 배양 배지 제제는 문헌에 문서상으로 잘 입증되어 있으며, 많은 배지가 상업적으로 입수가능하다. 조기의 세포 배양 실험에서, 배지 제제는 혈액의 화학 조성 및 물리화학적 특성 (예컨대, 오스몰랄농도, pH 등)을 기반으로 하며, 이는 "생리 용액"으로 언급되었다 (문헌 [Ringer, S., J. Physiol. 3:380-393 (1980)]; [Waymouth, C, In: Cells and Tissues in Culture, Vol. 1, Academic Press, London, pp. 99-142 (1965)]; [Waymouth, C,

In Vitro 6: 109-127 (1970)]). 그러나, 포유동물 신체의 다른 조직내의 세포는 산소/이산화탄소 부분압 및 영양소, 비타민, 및 미량 원소의 농도와 관련하여 다른 미세환경에 노출되고, 따라서, 대개 상이한 세포 유형의 성공적인 시험관내 배양을 위해서는 상이한 배지 제제를 사용하여야 할 것이다. 세포 배양 배지의 전형적인 구성성분으로는 아미노산, 유기염 및 무기염, 비타민, 미네랄, 미량 금속, 당, 지질, 및 핵산을 포함하는데, 이들의 유형 및 양은 주어진 세포 또는 조직 유형의 특정의 요건에 따라 달라질 수 있다.

[0004] 글루타민의 경우, 이는 배양되는 세포를 위한 주된 에너지원이 되는 것으로 보여지는 바, 세포 배양 배지에 통상적으로 사용된다. 1959년, 이글(Eagle)이 포유동물 세포 배양물의 최적의 성장을 위해 필요한 글루타민 양은 다른 아미노산 양보다 3 내지 10배 더 많다는 것을 밝혀냈다 (문헌 [Eagle et al., Science 130:432-37 (1959)]). 그러나, 글루타민은 수용액 중에서 및 승온에서는 불안정하고, 피로글루타메이트 및 암모니아를 형성하는데, 이는 특정 세포에는 독성일 수 있다 (문헌 [Roth et al., In Vitro Cellular & Developmental Biology 24(7):696-98 (1988)]). 따라서, 글루타민은 전형적으로 사용 직전에 세포 배양 배지에 첨가된다.

[0005] 별법으로, 피로글루타메이트 및 암모니아와 같은 독성 물질이 형성되지 못하도록 하기 위해서는 글루타민 대신 글루타민을 함유하는 디펩티드, 예를 들어, 알라닐-글루타민 또는 글리실-글루타민이 세포 배양 배지에 사용될 수 있다 (문헌 [Roth et al., *In Vitro* Cellular & Developmental Biology 24(7):696-98 (1988)]). 글루타메이트는 또한 세포 배양 배지 중에서 암모니아의 축적을 감소시키기 위해 글루타민을 대신하여 사용되어 왔다 (문헌 [Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies, 52, Sadettin Ozturk and Wei-Shou Hu eds., Taylor and Francis Group (2006)] 참조).

[0006] 디펩티드가 가열 멸균 조건하에서 더 큰 안정성을 가질 수 있도록 하기 위해 디펩티드, 예를 들어, 알라닐 글루타민을 아실화시키는 것도 다른 연구원들을 통해 제안되었다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,534,538에는 가열 멸균 조건하에서 N-아실 디펩티드가 상응하는 비-아실화된 디펩티드보다 안정성이 더 크고, 이롭게는 디펩티드가 신장에 도달할 때까지 N-아실 기가 디펩티드의 분할을 지연시키는 것인, 경장 또는 비경구적 영양 공급에서 사용하기 위한 N-아실 디펩티드가 기술되어 있다. 미국 특허 번호 5,534,538에서는 또한 N-아실 알라닐 글루타민은, 공지된 세포 배양 배지의 한 구성성분인 상응하는 비-아실화된 디펩티드 (알라닐 글루타민)와 유사하게, 세포 배양 배지에 적합한 글루타민 공급원이라는 것이 밝혀졌다 (상기 문헌 [Roth et al.] 참조). 미국 특허 번호 5,534,538에는 추가로 적어도 부분적으로는 가열 멸균 조건하에서 N-아실 디펩티드의 안정성은 증가된 상태이기 때문에 N-아실 디펩티드가 유리 디펩티드보다 이롭다고 기술되어 있다. 따라서, 미국 특허 번호 5,534,538은 실제로 N-말단 아미노산이 유리 아미노 기를 가지는 디펩티드를 사용하는 것과는 다른 것을 교시한다.

[0007] 본 출원인들은, 티로신과 같은 특정의 아미노산은 최대 세포 성장 또는 단백질 생산을 위한 원하는 농도에서 제한된 용해도를 갖는다는 것을 발견하였다. 본 출원인들은 또한, 시스테인과 같은 다른 아미노산은 수성 세포 배양 배지, 특히 농축 세포 배양 배지 중에서는 시간이 경과함에 따라 불안정해지고, 침전되기 쉽다는 것을 발견하였다. 구체적으로, 시스테인은 티올 기를 가지고 있기 때문에, 두 시스테인 잔기는 디술피드 결합에 의해 함께 결합됨으로써 시스틴 ($SCH_2CH(NH_2)CO_2H)_2$을 형성하는 산화 반응이 쉽게 발생할 수 있다. 시스틴의 수용해도는 낮고, 용액으로부터 쉽게 침전된다. 그 결과, 최대 세포 성장 및/또는 단백질 생산을 위해 필요한 농도로 티로신 및 시스테인을 함유하는 저장 안정성의 액체 세포 배양 배지를 제조하는 것은 불가능하였다.

[0008] 본 출원인들은 또한 수성 세포 배양 배지 중에서 티로신 또는 시스테인을 원하는 농도보다 더 낮은 농도로 사용함으로써 상기 문제를 해결하고자 시도하였다. 그렇게 함으로써, 허용되는 수성 저장 수명을 달성할 수 있다. 그러나, 최적의 세포 성장, 단백질 생산 또는 바이러스 생산의 희생으로 달성되는 것이다. 다시 말해, 티로신 및 시스테인을 최적의 농도로 함유하는 세포 배양 배지와 비교하였을 때, 티로신 및 시스테인을 보다 저농도로 함유하는 세포 배양 배지가 감소된 세포 성장 및/또는 단백질 생산을 지원한다.

[0009] 따라서, 시간이 경과함에 따라 용액으로부터 침전될 수 있는 시스테인의 경향을 비롯한, 시스테인의 제한된 안정성 또는 티로신의 제한된 용해도에 의해 유발되는 문제들은 회피하면서, 최대 세포 성장, 및/또는 단백질 또는 바이러스 생산을 지원하는 데 충분한 양으로 티로신 및 시스테인을 함유하는 배지, 농축 배지, 또는 농축 공급 보충물이 현재 요구되고 있다. 추가로, 그의 첨가로 인해 최종 세포 배양 시스템의 부피가 크게 증가하지 않도록 하는, 농축된 형태의 상기와 같은 공급 보충물이 요구되고 있다. 또한, 상기와 같은 영양 공급물 첨가 시, 생성된 시스템의 pH 및 오스몰랄농도는 자동적으로 균형을 이루어야 하며, 배지 또는 농축 공급물은 액체 또는 건식 포맷으로 이용가능하여야 할 필요가 있다. 마지막으로, 최대 세포 성장 및/또는 단백질 생산, 및/또는 고품질의 발현된 단백질을 지원하는 데 충분한 양으로 시스테인 및 티로신을 포함하는, 단일 요법용의 농축

공급 보충물이 요구되고 있다.

발명의 내용

[0010] **요약**

[0011] 본 발명의 조성물은 부분적으로는 시스테인 및 티로신의 제한된 용해도 및 안정성에 의해 유발되는 문제들을 회피하면서, 최대 세포 성장 및/또는 단백질, 또는 바이러스 생산을 지원하는 농도로 시스테인 및 티로신을 포함하는 세포 배양 배지, 농축 배지, 또는 농축 공급 보충물에 관한 것이다. 한 측면에서, 배지, 농축 공급 보충물, 또는 농축 배지는 무혈청 조성물일 수 있다. 한 측면에서, 조성물은, 인간 혈청 알부민과 같은 인간 혈청 구성성분을 포함할 수 있다. 추가의 측면에서, 인간 혈청 알부민은 재조합 공급원으로부터, 일부 바람직한 경우에, 식물 공급원, 예로서, 벼, 옥수수, 밀, 감자로부터, 또는 진균 공급원으로부터, 또는 효모 또는 당업계에 주지되어 있는 다른 등가의 미생물 (이종 물질 무함유(xeno-free) 배양물)로부터 유래된 재조합의 것 (r-인간 혈청 알부민)일 수 있다. 또 다른 측면에서, 배지, 농축 공급 보충물, 또는 농축 배지는 무단백질 조성물일 수 있다. 추가의 또 다른 측면에서, 배지, 농축 공급 보충물, 또는 농축 배지는 단백질 가수분해물 무함유 조성물일 수 있고, 추가로, 단백질-가수분해물의 분획도 함유하지 않을 수 있다. 특정 측면에서, 배지, 농축 공급 보충물, 또는 농축 배지는 무혈청, 무단백질, 및 단백질 가수분해물 무함유 조성물일 수 있다. 바람직한 측면에서, 이러한 조성물은 화학적 한정(chemically-defined), 무혈청, 무단백질, 임의의 단백질 가수분해물, 또는 그의 분획 무함유인 구성성분을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 소형 펩티드, 또는 하나 이상의 디펩티드를 포함하는 세포 배양 배지, 농축 배지 또는 세포 배양 공급 보충물은 추가로 하기: 지질, 가수분해물 또는 그의 분획, 또는 성장 인자 중 하나 이상을 함유하지 않는다.

[0012] 본 발명은 또한 부분적으로는 시스테인 또는 티로신을 포함하는 짧은 펩티드의 존재 또는 부재에 대하여 상기 기술된 조성물을 분석하는 방법에 관한 것이다. 배지 분석은 당업계에 공지되어 있는 임의의 방법, 예를 들어, 질량 분광측정법 (LCMS), 모세관 전기영동 또는 HPLC에 의해 수행된다.

[0013] 특히, 본 개시내용은 본 출원에서 추후 정의되는 바와 같이, 2 내지 6개의 아미노산을 가지는 하나 이상의 소형 펩티드를 포함하는 세포 배양 배지, 농축 공급물, 또는 세포 배양 보충물에 관한 것이다. 따라서, 본 개시내용은 배지, 공급물 또는 보충물이 X_{1-5}-티로신, X_{1-5}-시스테인, 티로신-X_{1-5}, 및 시스테인-X_{1-5}로부터 선택되는 하나 이상의 소형 펩티드, 또는 시스테인 또는 티로신이 1 내지 6개의 아미노산으로 이루어진 짧은 펩티드 내 어디든 존재하는 임의의 소형 펩티드 (예컨대, X-시스테인-X_{1-4}, X-티로신-X_{1-4} 등) 또는 그의 염 (여기서, X는 임의의 아미노산이고, 여기서, 짧은 펩티드의 N-말단 아미노산은 유리 아미노 기를 갖는다)을 포함하는 것인 세포 배양 배지, 농축 공급물, 또는 세포 배양 보충물을 제공한다. 한 실시양태에서, X는 알라닌 또는 글리신이다. 또 다른 실시양태에서, X는 세린, 발린, 프롤린, 아스파르트산, 또는 글루탐산이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 배지, 공급물 또는 보충물이 X-티로신, X-시스테인, 티로신-X, 및 시스테인-X, 또는 그의 염으로부터 선택되는 하나 이상의 디펩티드 (여기서, X는 임의의 아미노산이고, 디펩티드의 N-말단 아미노산은 유리 아미노 기를 갖는다)를 포함하는 것인 세포 배양 배지, 농축 공급물, 또는 세포 배양 보충물을 제공한다. 한 실시양태에서, X는 알라닌 또는 글리신이다. 또 다른 실시양태에서, X는 세린, 발린, 프롤린, 아스파르트산, 또는 글루탐산이다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 하나 이상의 디펩티드는 알라닐 티로신 및/또는 알라닐 시스테인이다. 세포 배양 배지, 농축 공급물, 또는 세포 배양 보충물은 액체 용액 또는 건조 분말, 예를 들어, 건조 분말 배지 (DPM) 또는 응집 분말 (AGT™)일 수 있다. 한 실시양태에서, 액체 용액이 2-8℃에서 보관되고, 12개월이 넘는 기간 동안 침전물이 없는 상태로 유지된다.

[0014] 본 발명의 한 실시양태에서, 배지, 공급물 또는 보충물 중 용액 중 (소형 펩티드 내에 포함되어 있는 것으로서의) 티로신의 농도는, 티로신이 단량체로 존재할 경우 (즉, 소형 펩티드 중의 티로신이 용액을 "티로신에 대해 과포화"가 되도록 만들 수 있는 경우), 동일 용액 중 가용성인 상태로 남아 있는 티로신의 농도보다 클 것이다. 한 실시양태에서, 단량체로도 가능한 바, 상기 용액은 가용성 티로신 농도의 약 1 내지 적어도 약 100배, 또는 약 1 내지 적어도 약 25배 사이의 농도를 가질 것이다. 예를 들어, 단량체로도 가능한 바, 일부 세포 배양 배지, 농축 공급물 또는 보충물 중 소형 펩티드 또는 디펩티드의 농도는 가용성 티로신 농도의 약 1 내지 적어도 약 5배, 약 1 내지 적어도 약 10배, 약 1 내지 적어도 약 15배, 약 1 내지 적어도 약 20배, 약 1 내지 적어도 약 30배, 약 1 내지 적어도 약 40배, 약 1 내지 적어도 약 50배, 약 1 내지 적어도 약 60배, 약 1 내지 적어도 약 70배, 약 1 내지 적어도 약 80배, 약 1 내지 적어도 약 90배, 약 1 내지 적어도 약 100배, 약 10 내지 적어도 약 20배, 약 10 내지 적어도 약 30배, 약 10 내지 적어도 약 40배, 약 10 내지 적어도 약 50배, 약 10 내지

적어도 약 60배, 약 10 내지 적어도 약 70배 등일 수 있다.

[0015] 본 발명의 한 실시양태에서, 배지, 공급물 또는 보충물 중 용액 중 (소형 펩티드 내에 포함되어 있는 것으로서의) 시스테인의 농도는, 시스테인이 단량체로 존재할 경우 (즉, 소형 펩티드 중의 시스테인이 용액을 "시스테인에 대해 과포화"가 되도록 만들 수 있는 경우), 동일 용액 중 가용성인 상태로 남아 있는 시스테인의 농도보다 클 것이다. 한 실시양태에서, 시스테인의 용해도 (또는 그의 결핍)은 예를 들어, 시스테인이 시스틴으로 전환됨으로써 유발되는 용해도 손실을 포함할 것이다. 한 실시양태에서, 단량체로도 가능한 바, 상기 용액은 가용성 시스테인 농도의 적어도 약 1 내지 약 25배 사이를 포함할 것이다. 예를 들어, 단량체로도 가능한 바, 일부 세포 배양 배지, 농축 공급물 또는 보충물 중 소형 펩티드 또는 디펩티드의 농도는 가용성 시스테인 농도의 약 1 내지 적어도 약 5배, 약 1 내지 적어도 약 10배, 약 1 내지 적어도 약 15배, 약 1 내지 적어도 약 20배, 약 1 내지 적어도 약 30배, 약 1 내지 적어도 약 40배, 약 1 내지 적어도 약 50배, 약 1 내지 적어도 약 60배, 약 1 내지 적어도 약 70배, 약 1 내지 적어도 약 80배, 약 1 내지 적어도 약 90배, 약 1 내지 적어도 약 100배, 약 1 내지 적어도 약 110배, 약 10 내지 적어도 약 20배, 약 10 내지 적어도 약 30배, 약 10 내지 적어도 약 40배, 약 10 내지 적어도 약 50배, 약 10 내지 적어도 약 60배, 약 10 내지 적어도 약 70배, 약 10 내지 적어도 약 80배, 약 10 내지 적어도 약 90배, 약 10 내지 적어도 약 100배, 약 10 내지 적어도 약 110배 등일 수 있다. 한 실시양태에서, 용액은 티로신 및 시스테인 둘 모두에 대해 과포화이다.

[0016] 한 실시양태에서, 용액은 예를 들어, 티로신 또는 시스테인 단독 각각에 대해 상기 기술된 범위에서 티로신 및 시스테인 둘 모두에 대해 과포화일 것이다.

[0017] 한 실시양태에서, 상기 기술된 농축 공급물, 배지 또는 보충물을 첨가하면 배양 시스템, 예컨대, 유가식 배양 (이는 이미 진행 중일 수도 있다)에의 보충 부피가 감소될 수 있을 것이다. 배양은 수시간 내지 수일 동안 진행 중일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 소형 펩티드 내에 포함된 시스테인 및 티로신의 용해도를 증가시키면, 또한 pH가 중성일 수도 있는 일체형 농축 공급물을 디자인할 수 있으며, 이는 본 발명의 일부가 된다. 본 발명은 부분적으로는 조성물 내에서의 시스테인 및 티로신의 용해도 및 안정성을 증가시키기 위한 소형 펩티드 내 포함된 시스테인 및 티로신을 포함하는 단일 요법용 농축 공급물, 농축 배지 및 농축 보충물 제조에 관한 것이다.

[0018] 하나 이상의 소형 펩티드, 또는 하나 이상의 디펩티드를 포함하는 세포 배양 배지, 농축 공급물 또는 세포 배양 보충물은 임의로 하기, 즉 탄수화물, 비타민, 염, 무기질, 완충제, 및 아미노산, 또는 그의 염 중 하나 이상을 포함한다. 한 실시양태에서, 탄수화물은 헥소스 당이다. 별법으로, 펜토스, 헥소스, 또는 그의 유도체 또는 다른 등가물이 사용될 수 있다. 일부 경우에, 올리고사카라이드 또는 그의 유도체가 사용될 수 있거나; 또는 헥소스는 글루코스, 갈락토스, 프룩토스 및 말토스로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 특정 실시양태에서, 탄수화물은 글루코스이다.

[0019] 한 실시양태에서, 아미노산, 또는 그의 염은 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 및 발린 중 하나 이상의 것이다.

[0020] 한 실시양태에서, 세포 배양 배지, 농축 공급물 또는 세포 배양 보충물은 1) 제1 디펩티드인 X-티로신, 또는 그의 염, 및 제2 디펩티드인 X-시스테인, 또는 그의 염 (여기서, X는 알라닌 또는 글리신이고, 여기서, 알라닌 또는 글리신은 유리 아미노 기를 갖는다), 2) 탄수화물, 예를 들어, 글루코스, 및 3) 아미노산, 또는 그의 염을 포함한다. 아미노산, 또는 그의 염은 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 및 발린 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0021] 한 실시양태에서, 세포 배양 배지, 농축 공급물 또는 세포 배양 보충물은 박테리아 세포, 효모 세포, 식물 세포, 또는 동물 세포, 예를 들어, 곤충 세포 (예컨대, 드로소필라(*Drosophila*) 세포, 스포로프테라(*Spodoptera*) 세포 또는 트리코플러시아(*Trichoplusia*) 세포), 선충 세포 (예컨대, 씨. 엘레간스(*C. elegans*) 세포) 또는 포유동물 세포 (예컨대, CHO 세포, COS 세포, VERO 세포, BHK 세포, AE-1 세포, SP2/0 세포, L5.1 세포, PerC6, 하이브리도마 세포, HEK 293 (인간 세포 포함))를 배양하는 데 적합한, 하나 이상의 소형 펩티드, 또는 하나 이상의 디펩티드를 갖는다.

[0022] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 소형 펩티드 또는 하나 이상의 디펩티드를 가지는 세포 배양 배지는 1X 제제이다. 다른 실시양태에서, 세포 배양 배지는 본 출원 전역에서 논의되고 있는 바와 같이, 2X 이상의 제제로 농축

된다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 소형 펩티드 또는 디펩티드, 예를 들어, X-티로신, X-시스테인, 티로신-X, 또는 시스테인-X는 약 1 g/L 내지 약 16 g/L, 약 1 g/L 내지 약 10 g/L, 약 1 g/L 내지 약 5 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 16 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 10 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 5 g/L, 또는 약 2.5 g/L 내지 약 8.5 g/L의 농도로 세포 배양 배지 중에 존재한다.

[0023] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 세포의 배양을 지원하는 조건하에서 본원에 기술된 소형 펩티드- 또는 디펩티드-함유 세포 배양 배지와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포를 배양하는 방법을 제공한다. 임의의 세포, 특히, 박테리아 세포, 효모 세포, 식물 세포 또는 동물 세포를 본 발명에 따라 배양할 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따라 배양하기 위한 동물 세포는 곤충 세포 (예컨대, 드로소필라 세포, 스포로프테라 세포 또는 트리코플러시아 세포), 선충 세포 (예컨대, 씨. 엘레간스 세포) 또는 포유동물 세포 (예컨대, CHO 세포, COS 세포, VERO 세포, BHK 세포, AE-1 세포, SP2/0 세포, L5.1 세포, PerC6, 하이브리도마 세포, HEK 293 또는 다른 인간 세포)이다.

[0024] 또 다른 실시양태에서, 세포를 배양하는 방법은 세포의 배양을 지원하는 조건하에서 기초 세포 배양 배지와 세포를 접촉시키는 단계, 및 본원에 기술된 바와 같이, 하나 이상의 소형 펩티드 또는 하나 이상의 디펩티드를 가지는 세포 배양 배지, 세포 배양 보충물, 또는 세포 배양 공급물로 기초 세포 배양 배지를 보충하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 디펩티드는 X-티로신, X-시스테인, 티로신-X, 또는 시스테인-X, 또는 그의 염으로부터 선택되고, 여기서, X는 알라닌, 글리신, 세린, 발린, 프롤린, 아스파르트산, 또는 글루탐산으로부터 선택되고, 여기서, 디펩티드 중 하나의 N-말단 아미노산은 유리 아미노 기를 갖는다). 또 다른 실시양태에서, 하나 이상의 디펩티드는 알라닐 티로신 및/또는 알라닐 시스테인이다.

[0025] 한 실시양태에서, 1일 초과의 시점에, 소형 펩티드 중 시스테인 및 티로신을 포함하는 용액으로 기초 세포 배양 배지를 보충하며, 여기서, 상기 용액은 농축 배지, 또는 농축 공급 보충물이다. 특정 실시양태에서, 본 출원인들은 배지, 공급물, 보충물, 또는 소형 펩티드를 포함하는 다른 용액 (예를 들어, 적어도 하나의 티로신 또는 시스테인 잔기를 포함하는 디펩티드를 포함하는 용액 포함)의 용도를 언급할 수 있다. 사실상, 본 출원인들의 발명의 한 실시양태는 세포 배양시 상기 용액의 용도이다. 그와 관련하여, 당업자는 본원의 특정 설명에서 출원인들이 본원에 기술된 용액 유형들 중 임의의 것에 동등하게 적용될 수 있는 실시양태의 단순한 한 일례로서 구체적인 보충물, 배지들 (배지), 공급물 또는 용액을 언급할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 특정의 아미노산 조성물을 포함하는 "보충물"에 대한 언급은 유사 조성물을 포함하는 "공급물"을 동일하게 기술하는 것일 수 있으며, 그리고, 그 반대의 경우도 가능하다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0026] 기초 세포 배양 배지, 농축 배지, 농축 공급물 또는 보충물은 세포 배양 개시 후 0일째, 1일째, 2일째, 3일째, 4일째, 또는 5일째 소형 펩티드- 또는 디펩티드-함유 배지 또는 공급물을 포함할 수 있고, 그 후 13일 또는 14일째까지, 또는 배양물의 생존력이 예정된 수준 (예컨대, 50%) 아래로 떨어질 때까지 매일 보충된다. 기초 세포 배양 배지는 임의로 기초 세포 배양 배지 총 부피의 약 2%의 소형 펩티드- 또는 디펩티드-함유 세포 배양 배지로 보충된다. 한 실시양태에서, 세포는 단백질, 펩티드, 소형 RNA (예컨대, miRNA, siRNA 등)를 생산한다. 단백질은 재조합 단백질 또는 천연적으로 발생된 단백질을 의미한다. 재조합이든 또는 천연이든 상관없이, 단백질은 또한 전장의 단백질, 또는 그의 일부 (예로서, 도메인, 모티프, 폴리펩티드 쇄, 또는 폴리펩티드 단편)를 의미한다. 재조합이든 또는 천연이든 상관없이, 단백질은 또한 세포내 단백질, 세포외 단백질, 분비된 단백질, 호르몬, 시토카인, 수용체, 세포외 기질 단백질, 이뮤노글로불린 또는 이뮤노글로불린의 일부, 또는 그의 단편을 의미한다. 바람직하게, 본 발명의 짧은 펩티드 또는 디펩티드를 포함하는 세포 배양 배지, 공급물 또는 보충물을 사용할 때 단백질 수율은 더 높을 수 있다. 구체적인 측면에서, 예를 들어, 적어도 14일간의 배양 후 이뮤노글로불린에 대한 단백질 수율은 3,000 mg/L의 이뮤노글로불린 초과일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 세포는 바이러스 또는 VLP (바이러스 유사 입자)를 생산할 수 있다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 세포는 원하는 세포 생성물, 예로서, 비타민, 대사산물, 당단백질, 탄수화물, 지질, 또는 지단백질을 생산할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 세포 그 자체를 성장시켜 수거될 수 있다. 본 발명의 배지 및 공급 보충물 조성물은 시스테인 및 티로신의 제한된 용해도에 의해 유발되는 문제들은 회피하면서, 바이러스 또는 VLP 생산을 위한 최대 세포 성장, 또는 최대 비타민 생산, 또는 당단백질, 또는 백신 생산 등을 지원하는 농도로 시스테인 및 티로신을 포함한다.

[0027] 임의의 세포, 예를 들어, 박테리아 세포, 효모 세포, 식물 세포, 곤충 세포 또는 포유동물 세포를 비롯한 동물 세포가 본 방법에 따라 배양될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 방법에 따라 배양하기 위한 동물 세포는 곤충 세포 (예컨대, 드로소필라 세포, 스포로프테라 세포 또는 트리코플러시아 세포), 선충 세포 (예컨대, 씨. 엘레간스 세포) 또는 포유동물 세포 (예컨대, CHO 세포, COS 세포, VERO 세포, BHK 세포, AE-1 세포, SP2/0 세포,

L5.1 세포, PerC6, 하이브리도마 세포, 또는 다른 인간 세포)이다. 한 실시양태에서, 세포는 CHO 세포이다.

[0028] 또 다른 측면은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 소형 펩티드 또는 디펩티드를 탄수화물, 예를 들어, 글루코스, 및 적어도 하나의 아미노산 또는 그의 염, 예를 들어, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 히스티딘, 이소류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 히드록시프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 글루타민, 및 발린과 함께 조합하는 단계를 포함하는, 세포 배양 배지를 제조하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 디펩티드는 X-티로신, X-시스테인, 티로신-X, 또는 시스테인-X, 또는 그의 염으로부터 선택되며, 여기서, X는 알라닌, 글리신, 세린, 발린, 프롤린, 아스파르트산, 또는 글루탐산으로부터 선택되고, 여기서, 디펩티드 중 하나의 N-말단 아미노산은 유리 아미노 기를 갖는다). 또 다른 실시양태에서, 하나 이상의 디펩티드는 알라닐 티로신 및/또는 알라닐 시스테인이다.

[0029] 다른 실시양태에서, 본 방법에 따라 제조되는 세포 배양 배지는 본 출원 전역에서 논의되고 있는 바와 같이, 2X 이상의 제제로 농축된다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 소형 펩티드 또는 디펩티드, 예를 들어, 알라닐 티로신 및/또는 알라닐 시스테인은 본 방법에 따라 제조된 세포 배양 배지 중에 존재한다.

[0030] 예를 들어, 일부 세포 배양 배지 또는 농축 배지 또는 공급물 중 소형 펩티드 또는 디펩티드의 농도는 약 0.5 g/L 내지 약 30 g/L, 약 0.5 g/L 내지 약 25 g/L, 약 0.5 g/L 내지 약 20 g/L, 약 0.5 g/L 내지 약 16 g/L, 약 0.5 g/L 내지 약 10 g/L, 약 0.5 g/L 내지 약 5 g/L, 약 0.5 g/L 내지 약 4 g/L, 약 1 g/L 내지 약 30 g/L, 약 1 g/L 내지 약 20 g/L, 약 1 g/L 내지 약 16 g/L, 약 1 g/L 내지 약 10 g/L, 약 1 g/L 내지 약 5 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 30 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 20 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 16 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 10 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 5 g/L, 또는 약 2.5 g/L 내지 약 4.5 g/L, 약 5 g/L 내지 약 30 g/L, 약 5 g/L 내지 약 25 g/L, 약 5 g/L 내지 약 20 g/L, 약 5 g/L 내지 약 16 g/L, 약 5 g/L 내지 약 10 g/L, 약 5 g/L 내지 약 5 g/L, 약 5 g/L 내지 약 4 g/L 등일 수 있다.

[0031] 또 다른 측면은 본원에 기술된 소형 펩티드- 또는 디펩티드-함유 세포 배양 배지 및 상기 기술된 바와 같은 적어도 하나의 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 한 실시양태에서, 적어도 하나의 세포는 CHO 세포이다.

[0032] 추가로 또 다른 측면은 세포 배양에 사용하기 위한 키트에 관한 것이다. 키트는 본원에 기술된 소형 펩티드- 또는 디펩티드-함유 세포 배양 배지를 함유하는 하나 이상의 용기를 포함할 수 있다. 키트는 임의로 적어도 하나의 성장 인자, 적어도 하나의 동물 조직 추출물, 적어도 하나의 동물 기관 추출물, 적어도 하나의 동물 선 추출물, 적어도 하나의 효소, 적어도 하나의 단백질, 적어도 하나의 비타민, 적어도 하나의 시토카인, 적어도 하나의 지질, 적어도 하나의 미량 원소, 적어도 하나의 세포외 기질 구성성분, 적어도 하나의 완충제, 적어도 하나의 항산화제, 및 적어도 하나의 바이러스 억제제로부터 선택되는 적어도 하나의 추가 구성성분을 포함한다. 키트는 또한 하나 이상의 세포 또는 세포 유형을 포함할 수 있다.

[0033] 또 다른 측면은 본원에 기술된 소형 펩티드- 또는 디펩티드-함유 세포 배양 배지를 사용하여 바이러스 또는 VLP를 제조하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 방법은 (a) 바이러스에 의한 세포 감염을 촉진시키는 데 적합한 조건하에서 세포 (예컨대, 포유동물 세포)를 바이러스와 접촉시키는 단계; 및 (b) 세포에 의한 바이러스 생산을 촉진시키는 데 적합한 조건하에 본원에 기술된 배양 배지 중에서 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 바이러스 또는 VLP를 생산하는 세포는 포유동물 세포, 예를 들어, CHO 세포, 또는 곤충 세포, 또는 식물 세포, 또는 진균 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 비-포유동물 바이러스 또는 VLP는 포유동물 숙주 세포, 예컨대, 인간 세포를 감염시킬 수 있도록 조작된다.

[0034] 추가의 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기술된 소형 펩티드- 또는 디펩티드-함유 세포 배양 배지를 사용하여 폴리펩티드, 예를 들어, 이뮤노글로불린 또는 그의 단편을 제조하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 본 방법은 폴리펩티드를 생산하도록 유전자 조작된 세포를, 세포에 의한 폴리펩티드 발현에 적합한 조건하에 디펩티드-함유 배양 배지 중에서 배양하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포, 예를 들어, CHO 세포이다.

[0035] 따라서, 본 발명의 한 측면은 아미노산 중 적어도 하나가 시스테인 또는 티로신인 적어도 2개의 아미노산을 포함하는 적어도 하나의 소형 펩티드를 포함하는 세포 배양 배지, 농축 공급물, 또는 농축 공급 보충물에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 측면은 소형 펩티드의 나머지 아미노산 중 적어도 하나가 알라닌, 글리신, 세린, 발린, 프롤린, 아스파르트산, 및 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 상기 기술된 세포 배양 배지, 농축 공급물, 또는 농축 공급 보충물에 관한 것이다. 본 발명의 추가의 또 다른 측면에서, 소형 펩티드의 나머지 아미노산 중 적어도 하나는 알라닌 또는 글리신이다. 본 발명의 또 다른 측면은 적어도 하나의 소형 펩티드

가 X-티로신, X-시스테인, 티로신-X, 및 시스테인-X, 또는 그의 염으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서, X가 알라닌, 글리신, 세린, 발린, 프롤린, 아스파르트산, 및 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택되고/거나, 여기서, 소형 펩티드 중 하나의 N-말단 아미노산이 유리 아미노 기를 갖는다) 상기 기술된 세포 배양 배지, 농축 공급물, 또는 농축 공급 보충물 배지에 관한 것이다. 한 측면에서, X는 알라닌 또는 글리신이다.

[0036] 본 발명의 일부 측면에서, 소형 펩티드는 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드, 펜타펩티드, 헥사펩티드, 헵타펩티드, 옥타펩티드, 노나펩티드, 또는 데카펩티드일 수 있거나; 또는 소형 펩티드는 길이가 적어도 약 2 내지 10개의 아미노산일 수 있거나; 일부 측면에서, 소형 펩티드는 길이가 적어도 약 10개의 아미노산이다. 일부 측면에서, 짧은 펩티드는 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0037] 다른 측면에서, 세포 배양 배지는 액체 용액이다.

[0038] 상기 기술된 세포 배양 배지 중 어느 하나에서, 세포 배양 배지, 농축 공급물, 또는 농축 공급 보충물은 건조 분말 또는 과립화된 건조 분말이다.

[0039] 추가의 측면에서, 상기 기술된 세포 배양 배지 중 어느 하나는 탄수화물 및 아미노산, 또는 그의 염을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 탄수화물은 헥소스이다. 다른 실시양태에서, 아미노산, 또는 그의 염은 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 히스티딘, 이소류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 히드록시프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 및 발린 중 임의의 하나 이상의 것이다. 추가의 실시양태에서, 배지는 추가로 비타민, 염, 완충제, 또는 무기질을 포함한다.

[0040] 상기 기술된 일부 측면에서, 세포 배양 배지, 농축 공급물, 또는 농축 공급 보충물은 지질, 가수분해물 또는 그의 분획, 또는 성장 인자를 함유하지 않는다. 상기 기술된 다른 측면에서, 세포 배양 배지, 농축 공급물, 또는 농축 공급 보충물은 단백질을 함유하지 않는다. 따라서, 일부 바람직한 측면에서, 소형 펩티드를 포함하는 세포 배양 배지, 농축 공급물, 또는 재구성된 배지는 무혈청, 무단백질 및/또는 가수분해물 무함유일 수 있다.

[0041] 특정 측면에서, 세포 배양 배지, 농축 공급물, 또는 농축 공급 보충물은 2X 이상의 제제로 농축된다. 바람직한 측면에서, 상기 기술된 세포 배양 배지, 농축 공급물, 또는 농축 공급 보충물은 알라닐 티로신 및/또는 알라닐 시스테인 및/또는 알라닐 시스틴 이량체 중 어느 것일 수 있는, 하나 이상의 디펩티드를 포함한다. 바람직한 측면에서, 하나 이상의 디펩티드는 약 1 g/L 내지 약 16 g/L의 농도로 존재할 수 있거나; 또는 하나 이상의 디펩티드는 약 2.5 g/L 내지 약 8.5 g/L의 농도로 존재할 수 있다. 한 측면에서, 2-8℃에서 보관된 액체 용액은 12개월이 넘는 기간 동안 침전물이 없는 상태로 유지된다.

[0042] 본 발명은 또한 세포의 배양을 지원하는 조건하에서 기초 세포 배양 배지와 세포를 접촉시키는 단계, 및 상기 기술된 농축 공급물 또는 배지로 기초 세포 배양 배지를 보충하는 단계를 포함하는, 세포를 배양하는 방법에 관한 것이다. 보충은 유가식 배양 동안에 수행할 수 있거나; 또는 현 공급 스케줄에 추가하여 실시될 수 있거나; 또는 보충은 볼루스 첨가인 경우에 증분식인 것과는 대조적으로 연속적으로 실시될 수 있다. 일부 경우에, 1일 초과의 시점에 기초 세포 배양 배지를 농축 공급물 또는 배지로 보충할 수 있거나, 또는 단일 농축 공급물, 또는 다중 농축 공급물을 사용하여 기초 세포 배양 배지 보충을 수행할 수 있거나; 또는 세포 배양 개시 후 0일째, 1일째, 2일째, 3일째, 4일째, 또는 5일째로부터 보충을 수행할 수 있고, 그 후 13일 또는 14일째까지 매일 보충하거나; 또는 각 보충은 기초 세포 배양 배지 총 출발 부피의 약 1-10%, 또는 약 5-20%로 이루어질 수 있다.

[0043] 본원에서 사용된 방법의 모든 측면에서, 세포는 조작된 세포일 수 있거나; 또는 세포는 재조합 세포일 수 있거나; 또는 세포는 식물 세포일 수 있거나, 또는 세포는 동물, 식물, 곤충, 조류(avian), 효모, 조류(algal) 또는 어류 세포 중 어느 하나일 수 있다. 동물 세포는 포유동물, 곤충, 소, 영장류, 또는 만능 줄기 세포일 수 있다. 한 측면에서, 동물 세포는 포유동물 세포일 수 있고; 포유동물 세포는 각질세포, 경부 상피 세포, 기관지 상피 세포, 기관 상피 세포, 신장 상피 세포 및 망막 상피 세포 및 확립된 세포주 및 그의 계통 (예컨대, 293 배아 신장 세포, BHK 세포, HeLa 경부 상피 세포 및 PER-C6 망막 세포, MDBK (NBL-1) 세포, 911 세포, CRFK 세포, MDCK 세포, CHO 세포, BeWo 세포, 창(Chang) 세포, 디트로이트(Detroit) 562 세포, HeLa 229 세포, HeLa S3 세포, Hep-2 세포, KB 세포, LS180 세포, LS174T 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-MK_2 세포, 클론(Clone) M-3 세포, 1-10 세포, RAG 세포, TCMK-1 세포, Y-1 세포, LLC-PK_1 세포, PK(15) 세포, GH_1 세포, GH_3 세포, L2 세포, LLC-RC 256 세포, MH_1C_1 세포, XC 세포, MDOK 세포, VSW 세포, 및 TH-I, B1 세포, 또는 그의 유도체), (심장, 간, 신장, 결장, 소장, 식도, 위, 신경 조직 (뇌, 척수), 폐, 혈관 조직 (동맥, 정맥, 모세관), 림프계 조직 (림프선, 아데노이드,

편도, 골수, 및 혈액), 비장을 포함하나, 이에 한정되지 않는) 임의 조직 또는 기관으로부터의 섬유모세포 세포, 및 섬유모세포 및 섬유모세포 유사 세포주 (예컨대, CHO 세포, TRG-2 세포, IMR-33 세포, Don 세포, GHK-21 세포, 시트룰린혈증 세포, 뎀프시(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, $MiCl_1$ 세포, CHO 세포, CV-1 세포, COS-1 세포, COS-3 세포, COS-7 세포, 베로(Vero) 세포, DBS-FrhL-2 세포, BALB/3T3 세포, F9 세포, SV-T2 세포, M-MSV-BALB/3T3 세포, K-BALB 세포, BLO-11 세포, NOR-10 세포, C_3H/IOTI/2 세포, $HSDM_1C_3$ 세포, KLN_2O_5 세포, 맥코이(McCoy) 세포, 마우스 L 세포, 계통 2071 (마우스 L) 세포, L-M 계통 (마우스 L) 세포, L-MTK^- (마우스 L) 세포, NCTC 클론 2472 및 2555, SCC-PSA1 세포, 스위스(Swiss)/3T3 세포, 인디안 먼트잭(Indian muntjac) 세포, SIRC 세포, C_{II} 세포, 및 옌센(Jensen) 세포, Sp2/0, NS0, NS1 세포 또는 그의 조작된 세포일 수 있다. 한 측면에서, 포유동물 세포는 CHO 세포일 수 있다.

[0044] 본원에서 사용된 방법의 모든 측면에서, 세포는 이뮤노글로불린 또는 그의 단편을 생산할 수 있고; 세포는 3,000 mg/L 초과로 이뮤노글로불린 또는 그의 단편을 생산할 수 있다.

[0045] 별법으로, 본원에서 사용된 방법의 모든 측면에서, 세포는 바이러스 또는 바이러스 유사 입자 (VLP)를 생산할 수 있고; 바이러스는 재조합 바이러스일 수 있다. 바이러스는 아데노바이러스, 렌티바이러스, 바큘로바이러스, 센다이 바이러스, 백시니아 바이러스, 또는 그의 조작된 바이러스 유도체일 수 있지만, 상기의 것으로 한정되지 않는다. 본원에 기술된 측면에서, VLP는 핵산을 보유할 수 있거나, 이는 RNA를 보유할 수 있다.

[0046] 추가의 또 다른 측면에서, 본 발명은 또한 하나 이상의 소형 펩티드를 탄수화물 및 적어도 하나의 아미노산 또는 그의 염과 함께 조합하는 단계를 포함하며, 여기서, 하나 이상의 소형 펩티드가 각각 시스테인 또는 티로신을 포함하는 것인, 세포 배양 배지, 농축 공급물 또는 세포 배양 보충물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 소형 펩티드의 아미노산 중, 시스테인 또는 티로신이 아닌 아미노산 (또는 나머지 아미노산으로 언급되는 것)은 알라닌, 글리신, 세린, 발린, 프롤린, 아스파르트산, 아르기닌, 글루타민 또는 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 한 바람직한 측면에서, 시스테인 또는 티로신이 아닌 아미노산은 알라닌 또는 글리신이다. 또 다른 세트에서, 나머지 아미노산은 또한 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 히스티딘, 이소류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 히드록시프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 및 발린 중 하나 이상의 것일 수 있다. 상기 방법 중 또 다른 바람직한 측면에서, 하나 이상의 디펩티드는 X-티로신, X-시스테인, 티로신-X, 또는 시스테인-X, 또는 그의 염으로부터 선택될 수 있고, 여기서, X는 알라닌, 글리신, 세린, 발린, 프롤린, 아스파르트산, 아르기닌 또는 글루탐산으로부터 선택되고, 하나 이상의 디펩티드의 N-말단 아미노산은 유리 아미노 기를 갖는다). 가장 바람직한 측면에서, X는 알라닌 또는 글리신이다. 가장 바람직한 측면에서, 탄수화물은 글루코스일 수 있다. 추가로, 세포 배양 배지는 추가로 비타민, 염, 완충제, 또는 무기질을 추가로 포함할 수 있거나; 또는 지질, 가수분해물 또는 그의 분획, 또는 성장 인자를 함유하지 않을 수 있거나; 또는 단백질을 함유하지 않을 수 있거나; 또는 세포 배양 배지는 2X 이상의 제제로 농축될 수 있거나; 또는 하나 이상의 디펩티드는 알라닐 티로신 및/또는 알라닐 시스테인일 수 있거나; 또는 하나 이상의 디펩티드는 세포 배양 배지 중에 약 1 g/L 내지 약 16 g/L의 농도로 존재하거나; 또는 바람직하게, 하나 이상의 디펩티드는 약 2.5 g/L 내지 약 8.5 g/L의 농도로 존재한다. 대부분의 측면에서, 2-8℃에서 보관된 세포 배양 배지는 12개월이 넘는 기간 동안 침전물이 없는 상태로 유지된다.

[0047] 본 발명은 또한 배지 중, 시스테인 또는 티로신을 포함하는 짧은 펩티드의 존재 또는 부재를 측정하는 단계를 포함하는, 세포 배양 배지, 농축 공급물, 또는 재구성된 배지를 분석하는 방법에 관한 것이다. 한 측면에서, 세포 배양 배지, 농축 공급물, 또는 재구성된 배지는 무혈청, 무단백질, 가수분해물 무함유일 수 있고, 분석은 이로 제한되는 것은 아니지만, 질량 분광측정법 (LCMS); 모세관 전기영동 및 HPLC에 의해 수행될 수 있다.

[0048] 본 발명은 또한 상기 기술된 세포 배양 배지, 농축 공급물, 또는 재구성된 배지 및 세포를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0049] 본 발명은 또한 세포를, 상기 기술된 세포 배양 배지, 농축 공급물, 또는 재구성된 배지와 접촉시키는 단계; 및 상기 세포의 성장 및/또는 상기 재조합 단백질의 발현에 적합한 조건하에서 상기 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 세포 배양 배지 중에서 재조합 단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0050] 본 발명은 또한 하나 이상의 용기를 포함하며, 여기서, 제1 용기는 상기 기술된 적어도 하나의 디펩티드를 포함하는 배지를 함유하고, 이때 상기 배지는 배양물 중에서의 세포 성장 및/또는 재조합 단백질의 발현을 지원하는

것인, 시험관내 세포 배양용 키트에 관한 것이다. 세포 배양물은 현탁액 형태이거나 또는 부착성 배양물일 수 있다. 성장은 고밀도 성장일 수 있다.

[0051] 본 발명은 또한 상기 기술된 세포 배양 배지 중에서 재조합 세포를 배양하는 단계를 포함하며, 여기서, 배지는 바이러스 또는 바이러스 입자의 발현에 적합한 조건하에서 상기 세포의 성장을 지원하는 것인, 상기 기술된 세포 배양 배지, 농축 공급물, 또는 재구성된 배지 중에서 바이러스 또는 바이러스 입자를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0052] 본 발명은 또한 상기 기술된 방법에 의해 제조된 재조합 단백질; 또는 상기 기술된 방법에 의해 제조된 바이러스 또는 바이러스 입자; 또는 바이러스 또는 재조합 단백질을 제조하기 위한, 상기 기술된 세포 배양 배지, 농축 공급물, 또는 재구성된 배지의 용도; 또는 상기 기술된 방법에 의해 제조된 배양 배지, 농축 공급물, 또는 재구성된 배지에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0053] 본 명세서에 포함되어 있고, 그의 일부를 구성하는 첨부된 도면은 본 발명의 특정 실시양태를 설명하며, 서면으로 작성된 설명과 함께 본 발명의 특정 원리를 설명하는 역할을 한다.

도 1은 (i) 글루코스 공급물로 보충된 기초 세포 배양 배지 (CD FortiCHO™), 및 (ii) CD FortiCHO™ + aa (저수준의 시스테인 및 티로신을 포함하는 농축 아미노산 혼합물 + 글루코스) + DP (디펩티드) 공급물 스케줄 2 (FP2) 또는 (iii) CD FortiCHO™ + aa (저수준의 시스테인 및 티로신을 포함하는 농축 아미노산 혼합물 + 글루코스) + DP (디펩티드) 공급물 스케줄 3 (FP3)중에서 성장된 CHO 세포의 생존가능한 세포 밀도 ($x10^6$개의 세포/mL) (곡선으로 표시), 및 IgG 역가 (mg/L) (막대 그래프로 표시)를 나타내는 것이다. 실시예를 참조한다.

도 2는 Ala-Tyr 디펩티드를 함유하는 용액의 예시적인 프로파일 크로마토그램을 나타내는 것으로서, Ala-Tyr 디펩티드는 6.172분 (하단 패널)에서의 피크로 나타나 있다.

도 3은 Ala-Cys 디펩티드를 함유하는 용액의 예시적인 프로파일 크로마토그램을 나타내는 것으로서, Ala-Cys 디펩티드는 6.631분 (하단 패널)에서의 피크로 나타나 있다.

도 4는 Ala-Tyr 디펩티드 표준물을 함유하는 용액의 예시적인 프로파일인 추출된 이온 크로마토그램을 나타내는 것으로서, 이는 8.8분에서의 피크로 나타나 있다.

도 5는 Ala-Cys 이량체 표준을 함유하는 용액의 예시적인 프로파일인 추출된 이온 크로마토그램을 나타내는 것으로서, 이는 9.6분에서의 피크로 나타나 있다.

도 6은 Ala-Cys 이량체 및 Ala-Tyr 디펩티드를 함유하는 예시적인 공급물 샘플의 예시적인 프로파일인 전체 이온 크로마토그램을 나타내는 것이다.

도 7은 Ala-Tyr 디펩티드 및 Ala-Cys 이량체를 함유하는 예시적인 공급물 샘플의 예시적인 프로파일인 추출된 이온 크로마토그램을 나타내는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] **상세한 설명**

[0055] 이제 다양한 예시적인 실시양태를 상세하게 언급할 것이다. 하기의 상세한 설명은 독자가 본 발명의 측면에 관한 특정의 실시양태, 특징, 설명을 보다 충분하게 이해할 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이며, 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되서는 안된다는 것을 이해하여야 한다.

[0056] 1. 정의

[0057] 본 발명을 보다 쉽게 이해할 수 있도록 하기 위해, 먼저 특정 용어들을 정의한다. 추가의 정의는 상세한 설명 전역에서 기술된다.

[0058] 본원에서 사용되는 바, "세포 배양" 또는 "배양"이란 인공 (예컨대, 시험관내) 환경에서 세포를 유지시키는 것을 의미한다. 그러나, "세포 배양"이라는 용어는 일반 용어이며, 이는 개별 원핵 (예컨대, 박테리아) 또는 진핵 (예컨대, 동물, 식물 및 진균) 세포 뿐만 아니라, 조직, 기관, 기관계, 또는 전체 유기체의 배양을 포함하는 데 사용될 수 있다는 것을 이해하여야 하며, 이 경우 "조직 배양," "기관 배양," "기관계 배양" 또는 "기관형적

배양"이라는 용어가 종종 "세포 배양"이라는 용어와 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0059] 본원에서 사용되는 바, "배양"이란 세포의 성장, 분화, 또는 지속적인 생존능에 유리한 조건하에 인공 환경에서 세포를 활성 또는 휴지 상태로 유지시키는 것을 의미한다. 따라서, "배양"은 "세포 배양" 또는 상기 기술된 그의 동의어 중 어느 것과 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0060] 본원에서 사용되는 바, "세포 배양 배지," "배양 배지," 또는 "배지" (및 각 경우의 복수 형태의 배지들)란 세포의 배양 및/또는 성장을 지원하는 영양 조성물을 의미한다. 세포 배양 배지는 완전 제제, 즉, 세포를 배양하는 데 어떤 보충도 필요로 하지 않는 세포 배양 배지일 수 있거나, 불완전 제제, 즉, 보충을 필요로 하는 세포 배양 배지일 수 있거나, 또는 불완전 제제를 보충할 수 있는 배지일 수 있거나, 또는 완전 제제인 경우에도 배양 또는 배양 결과를 개선시키는 배지일 수 있다. "세포 배양 배지," "배양 배지," 또는 "배지" (및 각 경우의 복수 형태의 배지들)라는 용어는 문맥상 달리 명시되지 않는 한, 세포와 함께 인큐베이션된 적이 없는 비조건화된 세포 배양 배지를 의미한다. 따라서, "세포 배양 배지," "배양 배지," 또는 "배지" (및 각 경우의 복수 형태의 배지들)라는 용어는 "소모된" 또는 "조건화된" 배지와 구별되는데, 이는 배지의 원래의 구성성분들 다수와, 각종의 세포 대사산물 및 분비된 단백질도 함유할 수 있다.

[0061] 본원에서 사용되는 바, "소형 펩티드"란 하나 이상의 펩티드 결합 또는 등가의 결합에 의해 함께 연결되어 있는 2 내지 6개의 아미노산으로 이루어진 쇄로서, 여기서, 아미노산 중 적어도 하나는 티로신 또는 시스테인인 쇄를 의미한다. 바람직하게, 소형 펩티드 중, 티로신 또는 시스테인이 아닌 아미노산은 중성 pH에서 우수한 용해도 특성을 나타낸다. 따라서, 한 실시양태에서, 소형 펩티드 중, 티로신 또는 시스테인이 아닌 아미노산은 알라닌, 글리신, 세린, 발린, 프롤린, 글루탐산, 아스파르트산, 글루타민, 및 아르기닌으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 소형 펩티드의 N-말단 아미노산은 유리 아미노 기를 갖는다. 본 발명의 한 실시양태에서, 소형 펩티드는 에탄올아민과 같이 유리 아민 기를 포함하거나, 유리 카르복실 기를 포함하는 비-아미노산, 또는 유사 화합물을 포함할 수 있다.

[0062] 본원에서 사용되는 바, "추출물"은 전형적으로는 (예컨대, 압력 처리에 의해) 기계적으로, 또는 (예컨대, 증류, 침전, 효소 작용 또는 고염 처리에 의해) 화학적으로 물질을 처리함으로써 형성된, 물질의 구성성분, 또는 물질의 하위군의 농축된 시료를 포함하는 조성물을 의미한다.

[0063] 본원에서 사용되는 바, "성분"이라는 용어는 화학적 기원이든 또는 생물학적 기원이든 간에, 세포의 성장 또는 증식을 유지 또는 촉진시키기 위해 세포 배양 배지에 사용될 수 있는 임의의 화합물을 의미한다. "구성성분," "영양소" 및 "성분"이라는 용어는 상호교환적으로 사용될 수 있고, 이들은 모두 상기와 같은 화합물을 의미하는 것으로 한다. 세포 배양 배지에 사용될 수 있는 전형적인 성분으로는 아미노산, 염, 금속, 당, 탄수화물, 지질, 핵산, 호르몬, 비타민, 지방산, 단백질 등을 포함한다. 생체외에서 세포 배양을 촉진시키거나 유지시키는 다른 성분은 특별히 필요한 때에 따라 당업자가 선택할 수 있다.

[0064] "1X 제제"란 세포 배양 배지 중에서 발견되는 성분들 중 일부 또는 그들 모두를 작업 농도로 함유하는 임의의 수용액을 의미한다. "1X 제제"는 예를 들어, 세포 배양 배지, 또는 상기 배지에 대한 성분의 임의의 하위군을 의미할 수 있다. 1X 용액 중 성분의 농도는 시험관내에서 세포를 유지시키거나 배양하는 데 사용되는 세포 배양 제제에서 발견되는 상기 성분의 농도와 거의 동일하다. 세포의 시험관내 배양을 위해 사용되는 세포 배양 배지는 정의상 1X 제제이다. 많은 성분이 존재할 경우, 1X 제제 중의 각 성분은 세포 배양 배지 중의 상기 성분의 농도와 거의 동일한 농도를 갖는다. 예를 들어, RPMI-1640 배양 배지는 다른 성분들 중에서도 0.2 g/L의 L-아르기닌, 0.05 g/L의 L-아스파라긴, 및 0.02 g/L의 L-아스파르트산을 함유한다. 이러한 아미노산으로 이루어진 "1X 제제"는 용액 중 거의 동일한 농도로 상기 성분들을 함유한다. 따라서, "1X 제제"를 언급할 경우, 용액 중의 각 성분들은 기술된 세포 배양 배지 중에서 발견되는 것과 동일하거나, 거의 동일한 농도를 갖는다. 세포 배양 배지의 1X 제제 중 성분의 농도는 당업계의 숙련가에게 주지되어 있다. 문헌 [Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies, 42-50 (Sadettin Ozturk and Wei-Shou Hu eds., Taylor and Francis Group 2006)] (이는 그 전문이 본원에 참고로 포함된다)을 참조한다. 그러나, 특히 1X 제제 중에 보다 적은 성분이 함유되어 있는 경우에는, 배양 배지와 비교하였을 때 1X 제제 중에서의 오스몰랄농도 및/또는 pH는 상이할 수 있다.

[0065] "10X 제제"는 용액 중 각 성분이 세포 배양 배지 중의 동일 성분보다 약 10배로 더 많이 농축되어 있는 것인 용액을 의미하는 것으로 한다. 예를 들어, RPMI-1640 배양 배지의 10X 제제는 다른 성분들 중에서도 2.0 g/L의 L-아르기닌, 0.5 g/L의 L-아스파라긴, 및 0.2 g/L의 L-아스파르트산을 함유할 수 있다 (상기 1X 제제와 비교). "10X 제제"는 1X 배양 배지 중에서 발견되는 것의 약 10배되는 농도의 다수의 추가 성분들을 함유할 수 있다.

쉽게 알 수 있는 바와 같이, "5X 제제," "25X 제제," "50X 제제," "100X 제제," "500X 제제," 및 "1,000X 제제"란 1X 세포 배양 배지와 비교하였을 때, 각각 약 5-, 25-, 50-, 100-, 500-, 또는 1,000배의 농도로 성분을 함유하는 용액을 가리키는 것이다. 또한, 배지 제제 및 농축 용액의 오스몰랄농도 및 pH는 달라질 수 있다. 제제는 특정의 세포 배양 프로토콜과 관련하여 1X로 구성성분 또는 성분들을 함유할 수 있지만, 상이한 배양 프로토콜 또는 상이한 기초 배지와 관련해서 예를 들어, 2, 2.5, 5, 6.7, 9, 12X 등의 농도로 구성성분 또는 성분들을 함유할 수 있다.

[0066] 이량체는 2개의 디펩티드로 구성된다. 따라서, 예를 들어 Ala-Cys로 이루어진 이량체는 Ala-Cys-Cys-Ala를 포함하는데, 여기서, cys-cys는 디술피드 연결에 의해 결합되어 있다. Ala-Cys-Cys-Ala는 또한 N,N'-디-L-알라닐-L-시스틴으로도 언급될 수 있다.

[0067] 1. 소형 펩티드

[0068] 본 개시내용은 세포 배양 배지 중에서의, 디펩티드를 비롯한, 소형 펩티드의 용도에 관한 것이다. 티로신의 낮은 용해도 및 시스테인의 낮은 안정성 때문에, 티로신 및 시스테인과 같은 특정의 아미노산을 원하는 농도로 함유하는 세포 배양 배지를 제조한다는 것이 불가능하다는 것을 본 출원인들은 발견하게 되었다. 티로신 및 시스테인의 용해도 및 안정성에 관한 문제는 수성 세포 배양 배지 중에서 티로신 또는 시스테인을 원하는 농도보다 낮은 농도로 사용함으로써 해소되었고, 그에 따라 영양소가 세포 배양 동안 사용되는 바, 티로신 또는 시스테인은 최적의 세포 성장 및/또는 단백질 생산을 위한 속도 제한 아미노산이 된다. 비록 티로신 및 시스테인을 원하는 농도보다 낮은 농도로 사용하여도 허용되는 수성 저장 수명, 용해도 및 안정성을 얻을 수는 있지만, 이는 또한 원하는 생산성을 얻기 위해서는 세포 배양 보충시 예컨대, 유가식 배양 시스템에 더 많은 부피의 배지를 첨가할 것을 필요로 할 수 있다. 이는 시스템의 화학량론적 균형, pH 및/또는 오스몰랄농도 또한 재조정되어야 할 필요가 있기 때문에 바람직하지 못하다.

[0069] 다량의 보충과 관련된 문제는 농축 공급 보충물에 의해 해소될 수 있다. 바람직한 농축 공급 보충물은 유가식 배양 시스템에서 영양 고갈 배양 시스템을 보충하며, 추가로, 및 바람직하게는, 자가-pH 및 자가-오스몰랄농도 균형화 특징을 가질 수 있는, 영양학상 복합성이고, 화학량론적으로는 균형잡힌 영양 첨가제이다. 그러나, 티로신의 낮은 용해도 및 시스테인의 낮은 안정성 때문에, 고수준의 시스테인 및 티로신을 함유하는 농축 공급물 조성물을 제조한다는 것은 도전과제가 되어왔다. 일반적으로는 시간이 경과함에 따라 시스테인 또는 티로신이 용액으로부터 석출하게 된다. 따라서, 안정성을 띠며, 일체형인 중성 pH의 화학적 한정 농축 공급물을 합성하다는 것은 어려웠다. 그러한 문제를 회피하기 위해, 산성 또는 알칼리성인 다중 부분 농축 공급물이 제조되었다.

[0070] 본 출원인들은, 세포 배양 배지 중 유리 아미노산, 티로신 및 시스테인을, 소형 펩티드, 예로서, 디펩티드 알라닐-티로신, 글리실-티로신, 알라닐-시스테인 (디술피드 이량체, $[AlaCys]_2$를 형성하는 것), 또는 글리실-시스테인 (디술피드 이량체, $[GlyCys]_2$를 형성하는 것), 또는 하나 이상의 티로신 또는 시스테인을 포함하는 다른 소형 펩티드로 치환시킬 수 있다는 것을 발견하게 되었다. 이러한 디펩티드, 또는 다른 소형 펩티드를 함유하는 세포 배양 배지는 유리 티로신 및/또는 시스테인과 관련된 용해도 및 안정성에 관한 문제들은 회피하면서, 최대 세포 성장 및/또는 단백질 생산을 지원하는 데 충분한 농도로 티로신 및/또는 시스테인을 세포에 제공한다.

[0071] 본 발명의 소형 펩티드는 2 내지 6개의 아미노산를 가지는데, 여기서, 아미노산 중 적어도 하나는 시스테인 또는 티로신이고, 나머지 아미노산은 임의의 아미노산일 수 있다. 바람직하게, 소형 펩티드 중, 티로신 또는 시스테인이 아닌 아미노산은 중성 pH에서 우수한 용해도 특성을 나타내는 것이다. 한 실시양태에서, 소형 펩티드 중, 티로신 또는 시스테인이 아닌 아미노산은 알라닌, 글리신, 세린, 발린, 프롤린, 글루탐산, 또는 아스파르트산으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 소형 펩티드의 N-말단 아미노산은 유리 아미노 기를 갖는다. 본 발명의 한 실시양태에서, 소형 펩티드 (2, 3, 4, 5 또는 6개의 아미노산)는 에탄올아민과 같이 유리 아민 기를 포함하거나, 유리 카르복실 기를 포함하는 비-아미노산, 또는 펩티드 결합에 기여할 수 있는 유사 화합물을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 소형 펩티드는 술피드 결합을 통해 이량체화된 시스테인을 포함할 수 있다. 비록 본 발명의 소형 펩티드는 그 길이가 2 내지 6개의 아미노산인 것으로 정의되기는 하지만, 시스테인-시스테인 이량체화 (cys-cys) 이량체화에 기인하여, 본 발명의 배지 또는 공급물 내에서 발생할 수 있는 자발적인 시스테인-시스테인 이량체화를 통해 보다 장쇄인 펩티드를 형성하는 조성물이 존재할 수 있다. 그러한 화합물은 또한 고농도인 경우에도 가용성이며, 따라서, 본 발명의 범주내에 완전하게 포함된다.

[0072] 다른 실시양태에서, 소형 펩티드는 2개의 아미노산을 가진 디펩티드이고, 이는 식 X-티로신, X-시스테인, 티로

신-X, 또는 시스테인-X, 또는 그의 염 (여기서, X는 임의의 아미노산이고, 여기서, 디펩티드의 N-말단 아미노산은 유리 아미노 기를 갖는다)으로 나타낼 수 있다. 따라서, 상기 디펩티드는, N-말단 아미노산의 아미노 기에 공유적으로 결합된 아실 기를 필요로 하는, 미국 특허 번호 5,534,538에 개시된 N-아실 디펩티드와는 상이한 것이다. 미국 특허 번호 5,534,538에 따르면, 아실 기의 존재를 통해 디펩티드는 우수한 안정성 특성을 가지게 된다. 바람직하게, X는 우수한 용해도 특성을 가진 아미노산이다. 한 실시양태에서, X는 알라닌 또는 글리신이다. 또 다른 실시양태에서, X는 세린, 발린, 프롤린, 글루탐산, 또는 아스파르트산이다.

[0073] 한 실시양태에서, 소형 펩티드는 2개의 아미노산을 가진 디펩티드이고, 본 발명의 하나 이상의 디펩티드는 X-티로신, X-시스테인, 티로신-X, 및 시스테인-X, 또는 그의 염으로부터 선택된다 (여기서, X는 임의의 아미노산이고, 디펩티드의 N-말단 아미노산은 유리 아미노 기를 갖는다). 한 실시양태에서, X는 알라닌 또는 글리신이다. 또 다른 실시양태에서, X는 임의의 아미노산, 아미노산의 유도체, 아미노 기를 가진 비-아미노산, 예로서, 에탄올아민이다. 상기 실시양태의 한 측면에서, 바람직한 아미노산은 세린, 발린, 프롤린, 아스파르트산, 아르기닌, 글루타민, 또는 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0074] 또 다른 실시양태에서, 소형 펩티드는 3개의 아미노산을 가진 트리펩티드이며, 이는 하기 트리펩티드: X-X-티로신, X-X-시스테인, X-티로신-X, X-시스테인-X, 티로신-X-X, 시스테인-X-X, 또는 그의 염을 포함한다 (여기서, X는 임의의 아미노산이다). 한 실시양태에서, 트리펩티드의 N-말단 아미노산은 유리 아미노 기를 갖는다. 바람직하게, X는 우수한 용해도 특성을 가진 아미노산이다. 한 실시양태에서, X는 알라닌 또는 글리신이다. 또 다른 실시양태에서, X는 세린, 발린, 프롤린, 글루탐산, 글루타민, 아르기닌, 또는 아스파르트산이다. 본 발명의 특정 측면에서, 소형 펩티드 중 시스테인 및 티로신을 함유하는, 상기 기술된 것과 같은 조성물은 세포주에서 단백질의 생산을 증가시키는 데 사용된다. 본 발명의 바람직한 측면에서, 소형 펩티드를 함유하지 않는 배지 중에서 제조된 것보다 더 높은 역가로 제조된, 증가된 단백질은 항체이다. 항체 생산이 더 높다는 것은 약 0.1 g/L 내지 약 10 g/L, 약 0.1 g/L 내지 약 5 g/L, 약 0.1 g/L 내지 약 2.5 g/L, 약 0.1 g/L 내지 약 1 g/L, 바람직하게는 약 1 g/L 내지 약 10 g/L, 더욱 바람직하게는 약 2 g/L 내지 약 8 g/L 등인 것을 의미한다.

[0075] 세포 및 세포의 목적 용도에 따라, 세포 배양 배지, 공급물, 농축 배지 또는 공급물 등의 하나 이상의 소형 펩티드 또는 디펩티드는 세포 배양 성능을 최적화하는 데 화학량론적으로 균형잡힌 농도로 최적으로 존재할 것이다. 예를 들어, 일부 세포 배양 배지 또는 농축 공급물 중 하나 이상의 소형 펩티드 또는 디펩티드의 농도는 약 0.5 g/L 내지 약 30 g/L, 약 0.5 g/L 내지 약 25 g/L, 약 0.5 g/L 내지 약 20 g/L, 약 0.5 g/L 내지 약 16 g/L, 약 0.5 g/L 내지 약 10 g/L, 약 0.5 g/L 내지 약 5 g/L, 약 0.5 g/L 내지 약 4 g/L, 약 1 g/L 내지 약 30 g/L, 약 1 g/L 내지 약 20 g/L, 약 1 g/L 내지 약 16 g/L, 약 1 g/L 내지 약 10 g/L, 약 1 g/L 내지 약 5 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 30 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 20 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 16 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 10 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 5 g/L, 또는 약 2.5 g/L 내지 약 4.5 g/L, 약 5 g/L 내지 약 30 g/L, 약 5 g/L 내지 약 25 g/L, 약 5 g/L 내지 약 20 g/L, 약 5 g/L 내지 약 16 g/L, 약 5 g/L 내지 약 10 g/L, 약 5 g/L 내지 약 5 g/L, 약 5 g/L 내지 약 4 g/L 등일 수 있다. 일부 배지 제제 또는 원형 배지 제제 중, 하나 이상의 소형 펩티드, 및/또는 하나 이상의 디펩티드는 배지 또는 원형 배지 중 약 2.5 g/L 내지 약 8.5 g/L인 농도로 존재할 수 있다. 추가로, 본 발명의 일부 실시양태는 용매로 재수화/재구성할 때 자동적으로 원하는 pH가 되는 "자가-pH 배지" 또는 공급물 분말을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따라, 상기 배지 또는 공급물은 분말형 (건조 분말 (DPM), 고도 분말 (APM) 또는 고도 과립화 기술 (AGT)) 또는 액체 형태일 수 있다.

[0076] 본 방법에 의해 제조된 동물 세포 배양 배지 또는 공급물은 재구성시 바람직하게는 약 6-8, 또는 약 7-8, 또는 약 6.0-6.3의 pH를 가지게 될 것이고, 더욱 바람직하게는 약 7-7.5 또는 약 7.2-7.4, 가장 바람직하게는 약 7.0의 pH를 가지게 될 것이며; 본 방법에 의해 제조된 식물 세포 배양 배지 또는 공급물은 재구성시 바람직하게는 약 4-8, 바람직하게는 약 4.5-7, 5-6 또는 5.5-6, 또는 바람직하게는 약 6.0 내지 6.3의 pH를 가지게 될 것이다. 물론, 특정 세포 유형에 대해 사용되는 주어진 배양 배지에 대해 최적인 pH도 또한 당업계의 숙련가에 의해 당업계에 공지된 방법을 사용하여 실험적으로 측정될 수 있다.

[0077] 2. 세포 배양 배지

[0078] 세포 배양 배지는 많은 성분들로 구성되며, 이러한 성분은 배양 배지마다 다르다. 상기 언급한 바와 같이, 세포 배양 배지는 완전 제제, 즉, 세포를 배양하는 데 어떤 보충도 필요로 하지 않는 세포 배양 배지일 수 있거나, 불완전 제제, 즉, 보충을 필요로 하는 세포 배양 배지일 수 있거나, 또는 불완전 제제를 보충할 수 있는 보충물일 수 있거나, 또는 완전 제제인 경우에도 배양 또는 배양 결과를 개선시키는 배지일 수 있다.

[0079] 일반적으로, 세포 배양 배지는 용매 중에 용해된 용질을 가질 것이다. 용질은 세포막 (또는 벽)을 통한 삼투압

의 균형을 위해 삼투력을 제공한다. 추가로, 용질은 세포를 위한 영양소를 제공할 것이다. 일부 영양소는 세포 작동을 위한 화학적 연료가 될 것이며; 일부 영양소는 세포의 동화작용에 사용되는 원료가 될 수 있고; 일부 영양소는 예를 들어, 세포 대사를 촉진시키는 효소 또는 운반체와 같은 기구일 수 있고; 일부 영양소는 세포가 사용하기 위한 성분에 결합하여 완충처리하거나, 유해 세포 생성물에 결합하거나 이를 격리시키는 결합제일 수 있다.

[0080] 세포 및 세포의 목적 용도에 따라, 세포 배양 배지의 성분은 세포 배양 성능을 최적화하는 데 균형잡힌 농도로 최적으로 존재할 것이다. 성능은 하나 이상의 원하는 특징, 예를 들어, 세포수, 세포 질량, 세포 밀도, O_2 소비량, 배양 성분, 예를 들어, 글루코스 또는 뉴클레오티드 소비량, 생체분자 생산, 생체분자 분비, 폐기물의 형성 또는 생성물, 예컨대, 대사산물에 의해, 지표계 상의 활성 또는 신호 분자에 따라 측정될 것이다. 따라서, 각각의 성분 또는 성분을 선택하는 것은 바람직하게는 의도하는 목적을 위한 작업 농도로 최적화될 것이다.

[0081] 본 발명의 배양 배지 또는 공급 보충물은 단지 용매, 예를 들어, 물의 첨가만을 필요로 하는 건식 포맷으로 이용될 수 있다. 바람직하게, 건식 포맷의 분말은 밀링, 충돌, 압출 및 절단 또는 파쇄, 습식 과립화, 고전단 과립화, 팬 과립화 및 유동상 응집으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 방법에 의해 제조된다. 건식 포맷은 건조 분말 포맷 (DPM), 응집형 (AGT™) 포맷, 고도 분말 배지 (APM), 또는 다른 적합한 건식 포맷을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게, 일단 물이 첨가되고 나면, 빠르게 용해되어야 하고, 생성된 액체는 여과될 수 있고, 어떤 pH 조정도 없이 세포에 직접 첨가될 수 있다. 재구성된 배지 또는 농축 보충물은 가변적인 벌크량으로 제조될 수 있고, 특별히 이온화 또는 자외선 조사에 의해 쉽게 멸균 처리될 수 있다.

[0082] a. 탄수화물

[0083] 세포 배양 배지 성분은 전형적으로 탄수화물, 아미노산, 염, 미량 원소, 및 비타민을 포함한다. 포유동물 세포의 경우, 세포 배양 배지에 사용되는 주된 탄수화물은 글루코스이며, 이는 통상 5 내지 25 nM로 보충된다. 문헌 [Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies, 51 (Sadettin Ozturk and Wei-Shou Hu eds., Taylor and Francis Group 2006)]을 참조한다. 글루코스 이외에도, 임의의 헥소스, 예로서, 갈락토스, 프룩토스, 또는 만노스 또는 이들의 조합이 사용될 수 있다. 추가로, 포유동물 세포는 또한 주 에너지 공급원으로서 글루타민을 사용할 수 있다. 글루타민은 대개 다른 아미노산보다 고농도로 포함되어 있다 (2-8 mM). 그러나, 상기 언급한 바와 같이, 글루타민은 자발적으로 분해됨으로써 암모니아를 형성할 수 있고, 특정 세포주는 보다 빠르게 암모니아를 생산하는 데, 이는 독성이다. 따라서, 세포 배양 배지 중 독성 암모니아가 축적되는 것을 감소시키기 위해 글루타민을 대신하는 치환물로서 글루타메이트 및 글루타민 디펩티드가 사용되어 왔다.

[0084] b. 아미노산

[0085] 아미노산은 세포 배양 배지 중에서 배양된 세포의 대사 기능을 유지시키는 데 중요하다. 세포 배양 배지는 전형적으로 필수 아미노산 (즉, 보통은 포유동물에 의해 생체내에서 합성되지 않는 아미노산) 뿐만 아니라, 특정의 비-필수 아미노산을 포함한다. 비-필수 아미노산은 전형적으로는 세포가 상기 아미노산을 합성할 수 없는 경우, 또는 세포주가 아미노산을, 최대 성장을 지원하는 데 충분한 양으로 생산하지 못하는 경우에, 세포 배양 배지 중에 포함된다. 예시적인 아미노산으로는 L-알라닌, L-아르기닌, L-아스파라긴, L-아스파르트산, L-시스테인, L-글루탐산, L-글루타민, 글리신, L-히스티딘, L-이소류신, L-류신, L-리신, L-메티오닌, L-페닐알라닌, L-프롤린, L-히드록시프롤린, L-세린, L-트레오닌, L-트립토판, L-티로신, 및 L-발린이 포함된다.

[0086] c. 염

[0087] 염은 등장성 조건을 유지시키고, 삼투압 불균형을 막기 위해 세포 배양 배지에 첨가된다. 표준 포유동물 세포 배양 배지의 오스몰랄농도는 약 300 mOsm/kg이나, 많은 세포주가 상기 값의 대략 10% 정도의 변동은 허용할 수 있다. 일부 곤충 세포 배양물의 오스몰랄농도는 300 mOsm/kg보다 높은 경향이 있으며, 이는 300 mOsm/kg보다 0.5%, 1%, 2 내지 5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30% 정도 더 높을 수 있다. 세포 배양 배지 중에 가장 보편적으로 사용되는 염으로는 Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Cl^-, SO_4^{2-}, PO_4^{3-}, 및 HCO_3^- (예컨대, $CaCl_2$, KCl, NaCl, $NaHCO_3$, Na_2HPO_4)을 포함한다. 따라서, 특정 세포 유형의 배양을 위한 세포 배양 배지의 바람직한 오스몰랄농도는 또한 당업계의 숙련가에 의해 당업계에 공지된 방법을 사용하여 실험적으로 측정될 수 있다.

[0088] d. 무기질

[0089] US 2005/0287666 (이는 그 전문이 본원에 참고로 포함된다)에 기술되어 있는 바와 같이, 혈청 중 미량으로 존재하는 다른 무기질이 세포 배양 배지 중에 포함될 수 있다. 이는 Mn, Cu, Zn, Mo, Va, Se, Fe, Ca, Mg, Si, 및 Ni을 포함한다. 비록 빈번하지는 않지만, 세포 배양 배지에 첨가되는 다른 무기질로는 Al, Ag, Ba, Br, Cd, Co, Cr, F, Ge, J, Rb, 및 Zr을 포함한다. 이들 원소들 다수가 효소적 활성에 관여한다. 이는 염 형태로, 예를 들어, $CaCl_2$, $Fe(NO_3)_3$, $MgCl_2$, $MgSO_4$, $MnCl_2$, NaCl, $NaHCO_3$, Na_2HPO_4, 및 미량 원소, 예를 들어, 셀레늄, 바나듐, 및 아연의 이온으로 제공될 수 있다. 이러한 미량 원소는 다양한 형태로, 바람직하게는 염 형태로, 예를 들어, Na_2SeO_3, NH_4VO_3 등으로 제공될 수 있다. 이러한 무기 염 및 미량 원소는 예를 들어, 시그마(Sigma: 미국 미주리주 세인트 루이스)로부터 상업적으로 입수할 수 있다.

[0090] e. 비타민

[0091] 비타민은 전형적으로는 보조인자로서 세포에 의해 사용된다. 각 세포주의 비타민 요구량은 매우 다양하지만, 일반적으로는 세포 배양 배지가 혈청을 거의 함유하지 않거나, 전혀 함유하지 않을 경우, 또는 세포가 고밀도로 성장한 경우, 과량의 비타민을 필요로 한다. 예시적인 비타민으로는 비오틴, 염화콜린, 폴산, i-이노시톨, 니코틴아미드, D-Ca^{++}-판토테네이트, 피리독살, 리보플라빈, 티아민, 피리독신, 니아신아미드, A, B_6, B_{12}, C, D_3, E, K, 및 p-아미노벤조산 (PABA)을 포함한다.

[0092] f. 혈청

[0093] 응고된 혈액의 상청액인 혈청은 세포 성장 및/또는 생산성을 촉진시키는 성분을 제공하기 위해 세포 배양 배지 중에 사용될 수 있다. 이러한 혈청 성분은 부착 인자, 미량영양소 (예컨대, 미량 원소), 성장 인자 (예컨대, 호르몬, 프로테아제), 및 보호 원소 (예컨대, 항독소, 항산화제, 항프로테아제)를 포함한다. 혈청은 소 또는 말을 비롯한, 다양한 동물 공급원으로부터 이용가능하다. 혈청이 세포 배양 배지에 포함될 경우, 이는 전형적으로는 5-10%의 농도로 첨가된다. 특정 세포 배양 배지는 무혈청이다.

[0094] g. 성장 인자

[0095] 혈청의 부재하에서의 또는 혈청이 감소된 배지 중에서의 세포 성장을 촉진시키기 위해서는 하기 폴리펩티드 중 하나 이상이 세포 배양 배지에 첨가될 수 있다: 예를 들어, 섬유모세포 성장 인자 (FGF) (산성 FGF 및 염기성 FGF 포함), 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자 (IGF), 상피 성장 인자 (EGF), 신경 성장 인자 (NGF), 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 및 형질전환 성장 인자 (TGF) (TGFα 및 TGFβ 포함), 임의의 시토카인, 예를 들어, 인터류킨 1, 2, 6, 과립구 자극 인자, 백혈구 억제 인자 (LIF) 등.

[0096] 특정 실시양태에서, 세포 배양 배지는 성장 인자를 함유하지 않는다. 무단백질 배지 중에서, 인슐린은 WO 98/08934 (이는 그 전문이 본원에 참고로 포함된다)에 기술되어 있는 바와 같이, 아연 또는 아연 함유 화합물로 대체될 수 있다.

[0097] h. 지질

[0098] 하나 이상의 지질 또한 세포 배양 배지에 첨가될 수 있다. 혈청은 전형적으로는 지질, 예를 들어, 지방산 (예컨대, 리놀레산, 리놀렌산, 아라키돈산, 팔미톨레산, 올레산, 폴리엔산, 및/또는 각 탄소 원자가 분지형 또는 비분지형인, 탄소 원자수가 12, 14, 16, 18, 20, 또는 24개인 지방산), 인지질, 레시틴 (포스파티딜콜린), 및 콜레스테롤을 함유한다. 별법으로, 이들 지질 중 하나 이상이 보충물로서 무혈청 배지 중에 포함될 수 있다. 포스파티딘산 및 리소포스파티딘산은 특정의 고정-의존성 세포, 예를 들어, MDCK, 마우스 상피, 및 다른 신장 세포주의 성장을 자극시키는 반면, 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 및 포스파티딜이노시톨은 무혈청 배지 중에서의 인간 섬유모세포의 성장을 자극시킨다. 에탄올아민 및 콜레스테롤도 또한 특정 세포주의 성장을 촉진시키는 것으로 밝혀졌다. 특정 실시양태에서, 세포 배양 배지는 지질을 함유하지 않는다.

[0099] i. 운반체 단백질

[0100] 하나 이상의 운반체 단백질, 예를 들어, 소 혈청 알부민 (BSA) 또는 트랜스페린이 또한 세포 배양 배지에 첨가될 수 있다. 운반체 단백질은 특정 영양소 또는 미량 원소의 수송에 도움을 줄 수 있다. BSA는 전형적으로는, 수용액 중에서는 불용성인 지질, 예를 들어, 리놀레산 및 올레산의 운반체로서 사용된다. 추가로, BSA는 또한 특정 금속, 예를 들어, Fe, Cu, 및 Ni에 대한 운반체로서의 역할을 할 수 있다. 무단백질 제제 중에서, 비-동물 유래의, BSA에 대한 치환물, 예를 들어, 시클로덱스트린이 지질 운반체로서 사용될 수 있다. 트랜스페린은 세포막을 가로지르는 철 수송에 관여한다. 특정 경우에, 인간 혈청 알부민은 하류의 치료학적 용도를 위해 생

성되는 생성물에 바람직할 수 있는 (예를 들어, 이종 물질 무함유 (XF) 배양물 중에서의) 세포 배양을 위해 필요할 수 있다. 다른 경우에, 재조합 인간 혈청 알부민은 세포 배양을 위해 세포 배양 배지 중에 사용될 수 있다. 특정 경우에, 재조합 인간 혈청 알부민은 세포의 동물-기원 물질 무함유 (AOF) 배양을 위해 식물, 조류 또는 진균 공급원, 예를 들어, 벼, 옥수수, 감자, 밀, 심지어는 효모 등으로부터 유래될 수 있다. 무단백질 제제 중, 트랜스페린은 WO 98/08934 (이는 그 전문이 본원에 참고로 포함된다)에 기술되어 있는 바와 같이, 제2철염 및/또는 제1철염으로, 또는 US 2007/0254358 (이는 그 전문이 본원에 참고로 포함된다)에 기술되어 있는 바와 같이, 히드록시피리딘 유도체로 대체될 수 있다. 추가로, 무단백질 제제 중, 인슐린은 아연, 바나듐 또는 다른 적합한 2가 염으로 대체될 수 있다.

[0101] j. 부착 단백질

[0102] 하나 이상의 부착 단백질, 예를 들어, 피브로넥틴, 라미닌, 및 프로넥틴이 또한 고정-의존성 세포의 기질에의 부착을 촉진시키는 데 도움을 주도록 세포 배양 배지에 첨가될 수 있다.

[0103] k. 완충제

[0104] 세포 배양 배지는 임의로 하나 이상의 완충제를 포함할 수 있다. 적합한 완충제로는 N-[2-히드록시에틸]-피페라진-N'-[2-에탄술폰산] (HEPES), MOPS, MES, 인산염, 중탄산염 및 세포 배양 용도에 사용하기에 적합한 다른 완충제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 적합한 완충제는 완충능을 제공하면서도 배양되는 세포에 대해 실질적으로 세포독성은 없는 것이다. 적합한 완충제를 선택하는 것은 세포 배양 분야의 숙련가의 능력 범위 내에 있다.

[0105] l. 다중 음이온 또는 다중 양이온 화합물

[0106] 다중 음이온 또는 다중 양이온 화합물은 세포가 응집되지 못하도록 막을 수 있고, 현탁액 중에서 세포의 성장을 촉진시킬 수 있다. WO 98/08934 (이는 그 전문이 본원에 참고로 포함된다)를 참조한다. 예시적인 다중 음이온 화합물은 폴리술폰화된 또는 폴리술페이트화된 화합물, 예를 들어, 헤파린, 덱스트란 술페이트, 헤파란 술페이트, 더마탄 술페이트, 콘드로이틴 술페이트, 펜토산 폴리술페이트, 프로테오글리칸 등을 포함한다.

[0107] 본원에 기술된 소형 펩티드 또는 디펩티드 이외에도, 세포 배양 배지는 하나 이상의 성분, 예를 들어, 상기 열거된 것들을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 소형 펩티드 또는 하나 이상의 디펩티드를 포함하고, 임의로 하기 성분들 중 하나 이상을 포함한다: 에탄올아민, D-글루코스, HEPES, 인슐린, 시토카인 (예컨대, IL-6), 헤파린, 덱스트란 술페이트, 리놀레산, 리포산, 페놀 레드, 플루로닉(PLURONIC)® F68, 푸트레신, 피루브산나트륨, 트랜스페린, L-알라닌, L-아르기닌, L-아스파라긴, L-아스파르트산, L-시스테인, L-글루탐산, L-글루타민, 글리신, L-히스티딘, L-이소류신, L-류신, L-리신, L-메티오닌, L-페닐알라닌, L-프롤린, L-세린, L-트레오닌, L-트립토판, L-티로신, L-발린, 비오틴, 염화콜린, D-Ca^{++}-판토테네이트, 폴산, i-이노시톨, 니아신아미드, 피리독신, 리보플라빈, 티아민, 비타민 B_{12}, 하나 이상의 칼슘 염, $Fe(NO_3)_3$, KCl, 하나 이상의 마그네슘 염, 하나 이상의 망가니즈 염, NaCl, $NaHCO_3$, Na_2HPO_4, 하나 이상의 셀레늄 염, 하나 이상의 바나듐 염 및 하나 이상의 아연 염. 한 실시양태에서, 하나 이상의 디펩티드는 X-티로신, X-시스테인, 티로신-X, 및 시스테인-X, 또는 그의 염으로부터 선택된다 (여기서, X는 임의의 아미노산이고, 디펩티드의 N-말단 아미노산은 유리 아미노 기를 갖는다). 한 실시양태에서, X는 알라닌 또는 글리신이다. 또 다른 실시양태에서, X는 세린, 발린, 프롤린, 아스파르트산, 또는 글루탐산이다.

[0108] 본원에 기술된 배지는 1X 제제일 수 있거나, 또는 개별 성분의 용해도가 허용하는 바, 1X 제제보다 큰 임의의 것으로, 예를 들어, 2X, 5X, 10X, 20X, 50X, 500X, 또는 1,000X 배지 제제로 농축될 수 있다. 개별 배지 성분이 별개의 농축액으로 제조되는 경우, 적절량 (충분량)의 각 농축물을 희석제와 조합하여 1X 제제를 제조한다. 전형적으로 사용되는 희석제는 물이지만, 수성 완충제, 염수 수용액 또는 다른 수용액을 비롯한 다른 용액도 사용될 수 있다.

[0109] 본원에 기술된 배지는 상이한 형태, 예를 들어, 건조 분말 배지, 과립형 제제 (이는 다른 처리, 예를 들어, pH 조절 (pHing)은 필요하지 않지만, 물 첨가는 필요로 한다), 액체 배지, 또는 배지 농출물로 제조될 수 있다.

[0110] 3. 무혈청 배지

[0111] 배치(batch)마다의 차이, 단백질 고함량, 오염 물질 (예컨대, 바이러스, 미코플라스마, 프리온)의 위험, 제한된 이용가능성, 및 고비용을 비롯한, 혈청과 관련된 잠재적인 문제들로 인해 무혈청 배지 생산이 추진되었다. 추

가로, 혈청이 보충된 배지에서 성장시킨 세포에서 관찰되는 발현 수준과 비교하였을 때, 무혈청 배지에서 성장시킨 세포로부터 재조합 단백질 발현 수준은 개선된 것으로 나타날 수 있다 (문헌 [Battista, P. J. et al., Am. Biotech Lab. 12: 64-68 (1994)]).

[0112] 이러한 무혈청 배지에서, 혈청은 히드로코르티손, 인슐린, 트랜스페린, 에탄올아민, 및 셀레나이트를 함유하는, 한정된(defined) 호르몬, 또는 호르몬 칵테일, 예를 들어, HITES 또는 ITES로 대체될 수 있다. 별법으로, 무혈청 배지는 내분비선으로부터의 성장 인자 추출물, 예를 들어, 표피 또는 섬유모세포 성장 인자를 함유할 수 있다. 무혈청 배지는 또한 혈청에 대한 치환물로서, 정제된 단백질 (동물 또는 재조합), 펩톤, 아미노산, 무기염, 및 동물 또는 식물 가수분해물 (또는 그의 분획)을 비롯한, 다른 성분을 함유할 수 있다.

[0113] 무혈청 배지는 화학적으로 한정된 것이거나, 또는 비한정된 것일 수 있다. 화학적 한정 배지 중, 성분의 실체 및 그의 양은 공지되어 있는 반면, 화학적으로 비한정된 배지인 경우에는 사실상 그와 반대이다. 따라서, 화학적 한정 배지는 부분적으로는 오염물질의 위험을 감소시키고, 배치마다의 차이를 감소시킬 수 있도록 디자인된다. 세포 배양 배지에 첨가될 수 있는 화학적 한정 보충물은 성장 인자, 호르몬, 운반체 단백질, 및/또는 부착 인자를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 소형 펩티드를 포함하는 배지 또는 공급물과 함께 사용되는 기초 배지는 화학적 한정 배지이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 소형 펩티드를 본 발명의 농축 세포 배양 배지 또는 농축 공급물은 또한 화학적 한정 조성물이다. 추가의 또 다른 바람직한 실시양태에서, 시스테인 및 티로신을 포함하는 소형 펩티드를 포함하는 본 발명의 농축 공급물 또는 배지는 일체형 공급물이고, 화학적으로 한정된 것이다. 또 다른 측면에서, 시스테인 및 티로신을 포함하는 소형 펩티드를 포함하는 상기 모든 조성물은 자가-pH 및 자가-오스몰랄농도 조절형이다. 추가의 또 다른 측면에서, 시스테인 및 티로신을 포함하는 소형 펩티드를 포함하는 상기 모든 조성물은 화학량론적으로 균형잡힌 것이다.

[0114] 4. 무단백질 배지

[0115] 무혈청 배지는 혈청을 함유하는 세포 배양 배지에 비해 감소된 양의 단백질을 함유한다. 그러나, 무혈청 배지는 알부민, 페튜인, 각종 호르몬 및 다른 단백질을 비롯한, 다양한 동물 유래의 성분들 중 하나 이상을 여전히 함유할 수 있다. 단백질이 존재하게 되면, 재조합 단백질의 정제는 어려워지고, 시간이 많이 소요되며, 비용이 많이 들고, 또한 생성물의 수율 및/또는 순도를 감소시킬 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 무단백질이다.

[0116] 무단백질 배지는 당업계에 공지된 방법에 의해, 예를 들어, 임의의 남아있는 단백질을 무혈청 배지로부터 제거함으로써 수득될 수 있다. 상기 단백질을 세포 배양 배지로부터 제거하는 것이 세포 성장을 지원할 수 있는 배지의 능력을 손상시킬 수 있는 바, 단백질을 배지로부터 제거함으로써 일어나는 효과를 완화시키기 위해 배지에 다른 성분을 첨가할 수 있다. 예를 들어, 상기 논의된 바와 같이, 시클로텍스트린이 BSA를 대신할 수 있고, 철염 또는 히드록시피리딘 유도체가 트랜스페린을 대신할 수 있다. 다른 경우에, 동물 조직 또는 식물 가수분해물 (또는 그의 분획)이 무단백질 배지를 보충하기 위해 사용되어 왔다.

[0117] 5. 유가식 배양

[0118] 세포의 유가식 배양은 전형적으로 세포 농도를 증가시키고, 고농도의 생성물 및 다량의 생산성을 위해 배양 수명을 연장시키기 위하여 생체분자, 예를 들어, 단백질을 산업적으로 생산하는 데 사용된다. 유가식 배양은 세포에 의해 빠르게 사용되는 영양소, 예를 들어, 글루코스, 아미노산을 함유할 수 있는 공급물 형태로 하나 이상의 영양소를 기초 배지에 조절 방식으로 첨가하는 것을 포함한다. 영양소(들)는 영양소 결핍 및 부산물 축적을 막기 위해 시도함으로써 세포 배양물의 성장을 조절하고, 중요한 파라미터, 예를 들어, pH, 오스몰랄농도 및 CO_2 농도를, 최적의 생성물 발현을 위해 세포 성장을 촉진시키거나, 세포 사멸을 최소화하는 수준에 포함되도록 조절하는 데 도움을 준다 (문헌 [Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies, 349-386 (Sadettin Ozturk and Wei-Shou Hu eds., Taylor and Francis Group 2006)] 참조). 그렇다고 하더라도, 유가식 배양은 대개 고농도의 억제성 대사산물과 높은 오스몰랄농도를 초래하며, 이로써 결국에는 세포 생존력과 비상용성이 된다.

[0119] 기초 배지는 전형적으로 세포 배양물을 유지시키는 데 사용되고, 이는 아미노산, 비타민, 유기염 및 무기염, 당 및 다른 성분을 비롯한, 다수의 성분들을 포함할 수 있으며, 여기서, 각 성분들은 시험관내에서의 세포의 배양을 지원하는 양으로 존재한다. 박테리아 및 원시박테리아 배양을 비롯한, 원핵 세포 배양, 바이러스 배양, 식물 세포 배양, 곤충 세포 배양, 포유동물 세포 배양에 유용한 기초 배지를 소형 펩티드와 함께 사용할 수 있다. 기초 배지의 예로는 이글(Eagle) 기초 배지 (BME), 이글 최소 필수 배지 (EMEM), 둘베코(Dulbecco) 변형 이글

배지 (DMEM), 글래스고우(Glasgow) 변형 이글 배지 (GMEM), 죠크릭(Joklik) 변형 이글 배지, 알파 변형 이글 배지, 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트(Roswell Park Memorial Institute: RPMI) 배지, 피셔(Fischer) 배지, 레이보비츠(Leibovitz) L-15 배지, 트로웰(Trowell) T-8 배지, 윌리엄스(Williams) 배지 E, 비거스(Biggers) 배지, 코노트 메디컬 리서치 라보라토리즈(Connaught Medical Research Laboratories: CMRL) 1066 배지, 햄(Ham) F10 배지, 햄 F12 배지, 이스코브(Iscove) 변형 둘베코 배지 (IMDM), MCDB 104, MCDB 110, MCDB 153, 배지 199, NCTC 135 배지, 및 웨이머스(Waymouth) 배지 MB 752/1을 포함한다. CHO 세포에 바람직한 기초 배지로는 CD CHO, CD OptiCHO™, 및 CD FortiCHO™ (이들 모두 라이프 테크놀러지스 코포레이션(Life Technologies Corp.: 미국 캘리포니아주 칼즈배드)으로부터 입수)를 포함한다. CHO 세포에 바람직한 농축 공급 보충물로는 CHO CD 에피션트피드(EfficientFeed)™ A (인비트로젠 카탈로그 번호 A1023401), CHO CD 에피션트피드™ B (인비트로젠 카탈로그 번호 A1024001), CHO CD 에피션트피드™ 키트 (인비트로젠 카탈로그 번호 A1024101), CD 에피션트피드™ C AGT™ (인비트로젠 카탈로그 번호 A1327501, 라이프 테크놀러지스 코포레이션(미국 캘리포니아주 칼즈배드))을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0120] 유가식 배양에서는 전형적으로 세포를 기초 배지를 사용하여 회분식 모드로 특정 시점까지 성장시킨다. 이어서, 단일 또는 다중 영양소로 이루어진 농축 용액을 포함하는 배지 보충물 (농축 공급물) 첨가를 통해, 부피 증가 또는 배양물 희석은 최소화시키면서, 영양소를 제공한다. 배지 보충물을 기초 배지에 첨가하면, 예를 들어, 더 신속하게 세포가 성장하거나, 배가 시간은 단축되거나, 달성가능한 세포 밀도는 더 높아지거나, 생체분자, 예를 들어, 단백질, 예컨대, 치료학상 관심의 대상이 되는 항체 또는 다른 단백질의 생산 또는 수율이 더 높아지는 것으로 나타나는 등, 세포 배양은 개선된다.

[0121] 기초 배지 보충을 위해 사용하기에 적합한, 본 발명의 세포 배양 배지 또는 농축 공급물은 본원에 기술된, 하나 이상의 디펩티드를 포함하는 하나 이상의 소형 펩티드를 포함한다. 시스테인 및 티로신을 포함하는 세포 배양 배지 또는 농축 공급물은 임의로, 또 다른 공급물, 즉, 하기 성분, 즉 아데닌, 에탄올아민, 탄수화물 공급원 (예를 들어, 헥소스, 예로서, 글루코스, 만노스, 갈락토스, 프룩토스, 또는 그의 조합까지도), 헤파린, 완충제, 히드로코르티손, 리포산, 페놀 레드, 포스포에탄올아민, 푸트레신, 피루브산나트륨, 트리-아이오도티로닌, 티미딘, L-알라닌, L-아르기닌, L-아스파라긴, L-아스파르트산, L-시스테인, L-글루탐산, L-글루타민, 글리신, L-히스티딘, L-히드록시프롤린, L-이소류신, L-류신, L-리신, L-메티오닌, L-페닐알라닌, L-프롤린, L-세린, L-트레오닌, L-트립토판, L-티로신, L-발린, N-아세틸-시스테인, 비오틴, 염화콜린, D-Ca^{++}-판토테네이트, 폴산, i-이노시톨, 니아신아미드, 피리독신, 리보플라빈, 티아민, 비타민 B_{12}, 플루로닉 F68, 재조합 인슐린, 칼슘 염, $CuSO_4$, $FeSO_4$, $FeCl_3$, $Fe(NO_3)_3$, KCl, 마그네슘 염, 망가니즈 염, 아세트산나트륨, NaCl, $NaHCO_3$, Na_2HPO_4, Na_2SO_4, 셀레늄 염, 실리콘 염, 몰리브데넘 염, 바나듐 염, 니켈 염, 주석 염, $ZnCl_2$, $ZnSO_4$ 또는 다른 아연 염 중 하나 이상의 것을 포함할 수 있는 농축 아미노산 혼합물과 함께 사용될 수 있다.

[0122] 따라서, 기초 배지를 보충하는 데 사용되는 농축 아미노산 혼합물은 화학량론적으로 균형잡힌 아미노산 혼합물로 구성될 수 있고, 시스테인 및 티로신을 함유할 수 있거나, 함유하지 않을 수 있으며, 임의로 하기, 즉 탄소 공급원, 비타민, 미량 원소 중 하나 이상의 것을 함유할 수 있고, 추가로, 어떤 지질, 가수분해물, 또는 성장 인자도 함유하지 않는다는 점에서 화학적으로 한정된 것일 수 있다. 일부 경우에, 농축 아미노산 혼합물은 동물 기원의 것을 제외한 가수분해물 또는 가수분해물의 분획, 예컨대, 식물 가수분해물을 함유할 수 있다. 임의의 상업적으로 입수가능한 농축 아미노산 혼합물, 예를 들어, CHO CD 에피션트피드™ A (인비트로젠 카탈로그 번호 A1023401), CHO CD 에피션트피드™ B (인비트로젠 카탈로그 번호 A1024001), CHO CD 에피션트피드™ 키트 (인비트로젠 카탈로그 번호 A1024101), CD 에피션트피드™ C AGT™ (인비트로젠 카탈로그 번호 A1327501, 라이프 테크놀러지스 코포레이션(미국 캘리포니아주 칼즈배드))이 사용될 수 있다.

[0123] 한 실시양태에서, 기초 배지를 보충하는 데 사용하기에 적합한, 본 발명의 시스테인 및 티로신 함유 세포 배양 배지, 또는 농축 공급물은 무단백질이다. 또 다른 실시양태에서, 기초 배지를 보충하는 데 사용하기에 적합한, 본 발명의 세포 배양 배지, 또는 농축 공급물은 무단백질이고, 추가로 지질, 가수분해물 또는 그의 분획, 또는 성장 인자도 함유하지 않으며, 따라서, 화학적으로 한정된 (CD) 것으로 간주될 것이다. 본 실시양태의 한 측면에서, 본 발명의 시스테인 및 티로신 함유 세포 배양 배지, 또는 농축 공급물은 임의로 하기, 즉 탄소 공급원, 비타민, 미량 원소 중 하나 이상의 것을 함유할 수 있고, 추가로, 어떤 지질, 가수분해물, 또는 성장 인자도 함유하지 않는다는 점에서 화학적으로 한정된 것일 수 있다.

[0124] 6. 세포

[0125] 본원에 기술된 시스테인 및 티로신 함유 소형 펩티드 또는 디펩티드를 함유하는 배지는 또한 다양한 세포를 배양하는 데 사용될 수 있다. 본원에 기술된 배양 배지 및 공급물을 사용하여 성장되는 세포는 원시박테리아를 비롯한, 임의의 원핵 생물, 조류, 효모, 진균, 식물, 곤충, 동물, 바람직하게, 포유동물, 및 가장 바람직하게, 마우스 또는 인간으로부터 유래될 수 있다. 한 실시양태에서, 배지는 식물 또는 동물 세포, 예를 들어, 포유동물 세포, 어류 세포, 곤충 세포, 양서류 세포 또는 조류 세포를 비롯한, 진핵 세포를 배양하는 데 사용된다.

[0126] 본원에 기술된 배지를 사용하여 배양될 수 있는 포유동물 세포로는 1차 상피 세포 (예컨대, 각질세포, 경부 상피 세포, 기관지 상피 세포, 기관 상피 세포, 신장 상피 세포 및 망막 상피 세포) 및 확립된 세포주 및 그의 계통 (예컨대, 293 배아 신장 세포, BHK 세포, HeLa 경부 상피 세포 및 PER-C6 망막 세포, MDBK (NBL-1) 세포, 911 세포, CRFK 세포, MDCK 세포, CHO 세포, BeWo 세포, 창 세포, 디트로이트 562 세포, HeLa 229 세포, HeLa S3 세포, Hep-2 세포, KB 세포, LS180 세포, LS174T 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-MK_2 세포, 클론 M-3 세포, 1-10 세포, RAG 세포, TCMK-1 세포, Y-1 세포, LLC-PK_1 세포, PK(15) 세포, GH_1 세포, GH_3 세포, L2 세포, LLC-RC 256 세포, MH_1C_1 세포, XC 세포, MDOK 세포, VSW 세포, 및 TH-I, B1 세포, 또는 그의 유도체), (심장, 간, 신장, 결장, 소장, 식도, 위, 신경 조직 (뇌, 척수), 폐, 혈관 조직 (동맥, 정맥, 모세관), 림프계 조직 (림프샘, 아데노이드, 편도, 골수, 및 혈액), 비장을 포함하나, 이에 한정되지 않는) 임의의 조직 또는 기관으로부터의 섬유모세포 세포, 및 섬유모세포 및 섬유모세포 유사 세포주 (예컨대, CHO 세포, TRG-2 세포, IMR-33 세포, Don 세포, GHK-21 세포, 시트룰린혈증 세포, 뎀프시 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, $MiCl_1$ 세포, CHO 세포, CV-1 세포, COS-1 세포, COS-3 세포, COS-7 세포, 베로 세포, DBS-FrhL-2 세포, BALB/3T3 세포, F9 세포, SV-T2 세포, M-MSV-BALB/3T3 세포, K-BALB 세포, BLO-11 세포, NOR-10 세포, C_3H/IOTI/2 세포, $HSDM_1C_3$ 세포, KLN_2O_5 세포, 맥코이 세포, 마우스 L 세포, 계통 2071 (마우스 L) 세포, L-M 계통 (마우스 L) 세포, L-MTK^- (마우스 L) 세포, NCTC 클론 2472 및 2555, SCC-PSA1 세포, 스위스/3T3 세포, 인디안 먼트잭 세포, SIRC 세포, C_{II} 세포, 및 옌센 세포, Sp2/0, NSO, NS1 세포 또는 그의 유도체를 포함한다.

[0127] 본원에 개시된 방법에 따라 배양되는 세포는 정상 세포, 이환 세포, 형질전환된 세포, 돌연변이체 세포, 체세포, 유전자 조작된 세포, 생식 세포, 줄기 세포, 전구체 세포 또는 배아 세포일 수 있고, 상기 세포 중 임의의 것은 확립되거나 형질전환된 세포주일 수 있거나, 천연 공급원으로부터 수득될 수 있다. 세포는 실험 목적으로, 또는 유용한 성분의 생산을 위해 사용될 수 있다. 특정 경우에, 배양된 세포 그 자체가 세포 요법에서 세포의 생성물 및 용도이다. 세포는 또한 항체 생산을 비롯한 단백질 생산을 위해, (예로서, miRNA 또는 siRNA와 같은) 소형 RNA의 생산을 위해, 바이러스 또는 VLP (바이러스 유사 입자)의 생산을 위해, DNA 또는 바이러스 벡터의 생성 및 단리를 위해, 핵산 생산을 위해, 비타민 생산을 위해 바람직한 대사산물, 생체 연료의 합성 등을 위해 배양될 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에 기술된 배지는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포를 배양하는 데 사용된다. CHO 세포는 차이니즈 햄스터 난소로부터 유래된 상피 및 섬유모세포 세포, 둘 모두로 분류되었다. 차이니즈 햄스터 난소로부터 출발된 세포주 (CHO-K1) (문헌 [Kao, F.-T. And Puck, T. T., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60: 1275-1281 (1968)])가 수년간 배양되어 왔다. 세포주의 번역 후 변형, 예를 들어, 인간-유사 당화 패턴이 정확하고, 인간 바이러스의 전파 위험이 낮다는 많은 이점 때문에, 현재 대부분 생체제약 분야에서는 CHO 세포 중에서 단백질을 생산한다.

[0128] 7. 세포 배양

[0129] 본원에 기술된 배양 배지에 의해 지원되는 세포를 연구자에 의해 결정된 실험 조건에 따라 배양할 수 있다. 하기 예는 특정의 포유동물 세포를 배양하는 데 유용한, 적어도 하나의 기능적 배양 조건 세트를 나타낸다. 그러나, 주어진 동물 세포 유형에 최적인 플레이팅 및 배양 조건은 단지 통상의 실험을 사용하여 당업계의 숙련가에 의해 결정될 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 통상의 단층 배양 조건을 위해, 본원에 기술된 세포 배양 배지를 사용하여, 부착 인자없이 세포를 배양 용기의 표면 상에 플레이팅시킬 수 있다. 별법으로, 예를 들어, 라이프 테크놀러지스 코포레이션 (미국 캘리포니아주 칼즈배드), R&D 시스템즈, 인크.(R&D Systems, Inc.: 미국 미네소타주 로체스터), 겐자임(Genzyme: 미국 매사추세츠주 케임브리지) 및 시그마 (미국 미주리주 세인트루이스)로부터 상업적으로 입수가능한, 천연, 재조합, 또는 합성 부착 인자 또는 펩티드 단편 (예컨대, 콜라겐, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 라미닌 등, 또는 그의 천연 또는 합성 단편)으로 용기를 사전에 코팅시킬 수 있다.

세포는 또한 천연 또는 합성 3차원 지지 매트릭스, 예를 들어, 예비성형된 콜라겐 겔 또는 합성 생체중합체 물질 내에 또는 그 위에 시딩될 수 있다. 현탁 배양을 위해, 전형적으로는 세포를 본원에 기술된 배양 배지 중에 현탁시키고, 현탁액 중에서의 세포 배양을 촉진시키는 배양 용기, 예를 들어, 스피너 플라스크, 관류 장치, 또는 생물반응기 내로 도입한다 (문헌 [Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies, 156-174 (Sadettin Ozturk and Wei-Shou Hu eds., Taylor and Francis Group 2006)] 참조). 일부 경우에, 배지 및 현탁된 세포를 일정 수준으로 교반시키는 것이 필요하다. 배양 동안 세포의 전단 및 배지 성분의 변성을 막기 위해서는 교반을 최소화할 수 있다.

[0130] 각 실험 조건을 위한 세포 시딩 밀도는 사용되는 특정의 배양 조건을 위해 최적화될 수 있다. 플라스틱 배양 용기 중에서의 통상의 단층 배양을 위해서는 1-5 x 10^5개의 세포/㎠인 초기 시딩 밀도가 바람직할 수 있지만, 현탁 배양의 경우, 보다 높은 시딩 밀도 (예컨대, 5-20 x 10^5개의 세포/ml)가 사용될 수 있다.

[0131] 포유동물 세포는 전형적으로는 세포 인큐베이터, 바람직하게 약 37℃에서 배양되지만, 30℃ 내지 39℃ 사이의 어느 온도에서나 가능하다. 비-포유동물 세포는 다른 바람직한 배양 온도를 가질 수 있다. 포유동물 및 비-포유동물 세포의 배양은 단계적으로, 예를 들어, 최적의 세포 성장을 위한 한 온도에서, 및 최적의 단백질/펩티드/단편 또는 바이러스 생산을 위한 또 다른 온도에서 수행될 수 있다. 인큐베이터 대기는 습윤화된 것일 수 있고, 비록 최적의 결과를 얻기 위해서는 특정 세포주를 배양하는 데 공기 중 20% 정도 만큼의 이산화탄소가 필요할 수 있지만, 인큐베이터 대기는 공기 중 약 3-10% 이산화탄소, 더욱 바람직하게는, 공기 중 약 5-10% 이산화탄소, 및 가장 바람직하게는, 공기 중 약 3-8% 이산화탄소를 함유할 수 있다. 배양 배지 pH는 세포 유형에 따라 바람직한 범위일 수 있으며, 예를 들어, 곤충 세포의 경우, 약 6-8.5, 바람직하게, 약 7.1 내지 7.6, 또는 바람직하게, 약 7.1 내지 7.4, 또는 더욱 바람직하게, 약 7.1 내지 7.3 또는 바람직하게, 약 6-6.3일 수 있다.

[0132] 폐쇄식 또는 회분식 배양에서의 세포의 경우, 세포의 밀도가 약 1.5 - 2.0 x 10^6개의 세포/ml에 도달하였을 때에 완전하게 배지가 교체되어야 한다 (즉, 소모된 배지를 새로운 배지로의 대체). (예컨대, 생물반응기 또는 발효기 중의) 관류 배양에서의 세포의 경우, 연속 재순환 방식을 기초로 하여 새로운 배지를 받게 될 것이다.

[0133] 8. 바이러스 제조

[0134] 현탁액 중에서 또는 단층 배양액 중에서의 세포 배양 이외에도, 본 배지는 포유동물 세포로부터 바이러스를 제조하는 방법에서 사용될 수 있다. 그러한 방법은 (a) 바이러스에 의한 세포 감염을 촉진시키는 데 적합한 조건하에서 세포 (예컨대, 포유동물 세포)를 바이러스와 접촉시키는 단계; 및 (b) 세포에 의한 바이러스 생산을 촉진시키는 데 적합한 조건하에 본원에 기술된 소형 펩티드- 또는 디펩티드-함유 세포 배양 배지 중에서 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 배양 배지 중에서 세포를 배양하기 이전에, 배양하는 동안, 또는 그 이후에 세포를 바이러스와 접촉시킬 수 있다. 포유동물 세포를 바이러스로 감소시키는 최적의 방법은 당업계에 주지되어 있고, 숙련가는 잘 알고 있을 것이다. 본원에 기술된 배양 배지 중에서 배양된, 바이러스로 감염된 포유동물 세포는 본원에 기술된 세포 배양 배지 이외의 세포 배양 배지 중에서 배양된 세포보다 더 높은 바이러스 역가 (예컨대, 2-, 3-, 5-, 10-, 20-, 25-, 50-, 100-, 250-, 500-, 또는 1,000-배 더 높은 역가)를 산출하는 것으로 기대될 수 있다.

[0135] 이러한 방법은 아데노바이러스 및 그의 유도체, 아데노-관련 바이러스 및 그의 유도체, 레트로바이러스 및 그의 유도체, 렌티바이러스 및 그의 유도체, 곤충 바이러스, 예로서, 바큘로바이러스 및 그의 유도체, 센다이 바이러스 및 그의 유도체 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 다양한 포유동물 바이러스, 또는 포유동물 세포를 감염시키도록 적합화된 바이러스, 바이러스 유사 입자 및 바이러스 벡터를 제조하는 데 사용될 수 있다. 감염된 세포를 본원에 기술된 배양 배지 중에서 배양한 후, 재조합 바이러스, 바이러스 벡터, 바이러스 입자 또는 그의 성분 (단백질 및/또는 핵산 (DNA 및/또는 RNA))일 수 있는, 바이러스를 포함하는 사용된 배양 배지는, 백신 생산, 억제성 RNA 분자, 예로서, miRNA, siRNA 등의 생산, 세포 형질감염 또는 유전자 요법에서 사용하기 위한 바이러스 벡터의 생산, 동물 또는 세포 배양물 감염, 바이러스 단백질 및/또는 핵산 연구 등을 비롯한 다양한 목적을 위해 사용될 수 있다. 별법으로, 바이러스, 바이러스 벡터, 바이러스 입자 또는 그의 성분은 임의로, 당업계의 숙련가가 잘 알고 있는 단백질 및/또는 핵산 단리 기법에 따라 사용된 배양 배지로부터 단리될 수 있다.

[0136] 한 실시양태에서, 세포는 VLP를 생산한다. "VLP" 또는 "바이러스 유사 입자"는 생물학적 물질, 예를 들어, 지질, 탄수화물, 단백질 및 핵산을 비롯한, 하나 이상의 화합물을 세포 내로 전달하기 위한 비히클이다. VLP와 함께 전달될 수 있는 다른 화합물로는 염료 (예컨대, 형광성 염료), 표지 (예컨대, 형광성 또는 방사성 표지), 및 약물 (예컨대, 항생제 또는 항바이러스제)를 포함한다. VLP는 일반적으로 적어도 하나의 바이러스 단백질을

함유한다. 전형적으로, 바이러스 단백질이 상기 화합물을 둘러싼다. 그러나, 특정 경우에, 전달하고자 하는 화합물은 VLP에의 봉입 이외의 다른 수단에 의해 VLP에 결합될 수 있다. 예를 들어, 화합물은 바이러스 단백질에 부착 (예컨대, 공유적으로, 또는 비공유적으로 부착)될 수 있거나, 존재하는 경우, 외피 내로 통합될 수 있다. 한 측면에서, VLP는 다양한 유형의 핵산 (예컨대, 이종성 핵산), 예를 들어, DNA, RNA, RNA 및 DNA 둘 모두, 또는 RNA/DNA 하이브리드, 또는 당업계에 공지된 유도체에 결합될 수 있다. VLP의 예로는 비라파워(VIRAPOWER)™ 아데노바이러스 및 렌티 바이러스 벡터 키트 (예컨대, 인비트로젠 코포레이션 카탈로그 번호 K4930-00, K4940-00, K4950-00, K4955-00, K4960-00, K4965-00, K4967-00, 및 K4985-00)를 사용하여 생산된 바이러스 입자 생성물을 포함한다.

[0137] VLP 제조에 사용될 수 있는 바이러스로는 예를 들어, 파지, (예컨대, T 짝수 파지 (예컨대, T4 파지 등), T 홀수 파지 (예컨대, T7 파지 등), 박테리오파지 phi29, 람다 파지 등), 바큘로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 렌티바이러스 (예컨대, 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(Moloney Murine leukemia virus), HIV1, HTLV-III 등), 센다이 바이러스, 폭스 바이러스, 및 알파바이러스 (예컨대, 셈리키 포리스트 바이러스(Semliki Forest virus), 신드비스 바이러스(SindBis virus) 등)를 포함한다. VLP 제조 방법 뿐만 아니라, VLP 제조에 사용될 수 있는 바이러스에 대한 추가 예도 본원 다른 곳에도 기술되어 있다.

[0138] 9. 재조합 단백질 제조

[0139] 본 배양 배지는 또한 상기 기술된 세포, 바람직하게, 포유동물 세포, 및 특히, 현탁액 중에서 성장되는 포유동물 세포로부터 재조합 단백질을 제조하는 방법에서 사용될 수 있다. 본 배양 배지는 포유동물 세포를 신속하게 고밀도로 현탁 배양시킬 수 있기 때문에, 본 방법은 재조합 단백질의 제조가 증진되도록 촉진시킨다. 단백질은 전장의 단백질, 단백질 단편, 펩티드, 절단된 단백질 생성물, 교차 결합된 단백질 생성물, 태깅된 펩티드 또는 단백질 등을 의미한다. 단백질은 또한 재조합, 돌연변이체, 조작된, 키메라, 당단백질, 지단백질, 활성, 프로세싱된 단백질을 비롯한, 모든 유형의 천연 및 변경된 단백질을 의미한다. 단백질은 세포 또는 세포주에 의해 천연적으로 발현될 수 있거나, 또는 세포주는, 형질감염, 형질도입, 전기천공 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 당업계에 공지된 표준 유전자 조작 방법을 사용하여 단백질을 발현하도록 조작될 수 있다. 생성된 단백질 또는 펩티드는 원하는 수준의 순도로 정제 또는 단리될 수 있다. 본 발명의 배지 및/또는 공급물 조성물을 사용하여 생산 또는 발현될 수 있는 단백질 또는 펩티드, 또는 그의 단편으로는 세포외 단백질, 예로서, 라미닌, 피브로넥틴, 인테그린 등, 효소, 예로서, 카스파제, 프로테아제, 섭틸리신, 키나제, RNAse, DNAse 등, 펩티드 호르몬, 예로서, 인슐린, PTHrP 등, 세포내 단백질 (막 단백질, 수용체, 핵 단백질, 소포체 단백질 등 포함), 항체, 임의의 항체 단편, 예로서, 항체의 중쇄 또는 경쇄, 항원 결합 부위 또는 모티프, 키메라 항체 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 키메라 항체는 종/종 키메라 또는 부류/부류 키메라일 수 있다. 본 발명의 조성물 및 배지/공급물을 사용하여 제조될 수 있는, 발현된 단백질 또는 폴리펩티드는, 하류의 치료학적 용도를 위해 외래성 물질이 없는, 동물 기원의 것을 제외한 단백질을 생산하기 위해 비-동물 세포주, 예로서, 식물 세포에서 발현되는 인간 또는 포유동물 유래의 단백질 서열일 수 있다.

[0140] 본 발명에 따른 폴리펩티드 제조 방법은 폴리펩티드를 생산하도록 유전자 조작된 세포 (예컨대, 포유동물 세포)를, 이 세포에 의한 폴리펩티드 발현에 적합한 조건하에 본원에 기술된 소형 펩티드- 또는 디펩티드-함유 세포 배양 배지 중에서 배양하는 단계를 포함한다. 관심의 대상이 되는 폴리펩티드를 발현하도록 포유동물 세포를 유전자 조작하는 최적의 방법은 당업계에 주지되어 있고, 따라서, 당업계의 숙련가는 잘 알고 있을 것이다 (예컨대, 문헌 [Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies, 15-40 (Sadettin Ozturk and Wei-Shou Hu eds., Taylor and Francis Group 2006)] 참조). 세포를 본 발명의 배지 중에서 배양하기 이전에 유전자 조작할 수 있거나, 또는 배지에서 배양한 후, 하나 이상의 외인성 핵산 분자로 형질감염시킬 수 있다. 유전자 조작된 세포를 단층 배양으로, 또는 더욱 바람직하게는 상기 기술된 방법에 따른 현탁 배양으로, 본 배양 배지 중에서 배양할 수 있다. 세포를 배양한 후, 관심의 대상이 되는 폴리펩티드를 임의로, 당업계의 숙련가가 잘 알고 있는 단백질 단리 기법에 따라 세포 및/또는 사용된 배양 배지로부터 정제할 수 있다.

[0141] 10. 배양 배지 중 또는 농축 공급물 중의 소형 펩티드의 검출

[0142] 본원에 기술된 소형 펩티드 및 디펩티드는 산 가수분해, 액체 크로마토그래피, 모세관 전기영동 (문헌 [Brown et al., J. Chrom. (1994) A, 661: 279-285]), HPLC (문헌 [van Wandelen et al., J. Chrom. (1997) A, 763: 11-22]), 또는 질량 분광측정법을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 당업계에 공지되어 있는, 임의의 아미노산 및/또는 소형 펩티드 검출 기법을 사용하여 검출될 수 있다. 아미노산 조성 및 농도를 크로마토그래피법으로 분

석하기 위한 펩티드의 산 가수분해는 당업계에 주지되어 있다. 크로마토그래피법으로 분석된, 산 가수분해 이전 및 이후의 아미노산 피크에 대한 프로파일을 비교함으로써 아미노산의 조성 및 농도를 나타낼 수 있고, 이로써, 배지, 공급물 또는 보충물 중의 소형 펩티드에 대해 나타낼 수 있다. 예를 들어, 티로신이 배지 중의 소형 펩티드 중에 존재할 경우, 산 가수분해 이전의 동일의 배지 샘플의 피크 높이/면적과 비교하였을 때, 배지 샘플의 산 가수분해물 중의 그의 농도 (예컨대, 티로신 피크 높이 및/또는 피크 면적)는 증가할 것이다.

[0143] 일례로, 본원에 기술된 알라닐 티로신 및 알라닐 시스테인 디펩티드를 문헌 [van Wandelen et al., J. Chrom. (1997) A, 763: 11-22]에 기술된 방법을 사용하여 검출하였는데, 이러한 방법은 AccQ-태그 울트라(AccQ-Tag Ultra)™ (워터스 코포레이션(Waters Corp.: 미국 매사추세츠주 밀퍼드) 칼럼 (2.1 x 100 mm, 1.7 ㎛) 상에서 6-아미노퀴놀릴-N-히드록시숙신이미딜 카르바메이트 (AQC)-유도체화된 아미노산 혼합물을 HPLC (고성능 액체 크로마토그래프)로 분리하는 것을 포함하였다. 검출기 파라미터를 하기와 같이 설정하였다: 파장 모드: 단일 파장; 파장: 260 nm; 샘플링 속도: 20 (포인트/sec); 시간 상수: 0.4000 (sec). 이러한 파라미터를 사용하였을 때, 예시적인 전개에서, 알라닐 티로신 디펩티드 샘플의 피크 용리 시간은, 내부 표준 (AABA) 직후인 약 6.172 분 (도 2 참조)이었고, 또 다른 예시적인 전개에서, 알라닐 시스테인 디펩티드 샘플의 피크 용리 속도는 리신과 티로신 사이인, 6.631분이었다 (도 3 참조).

[0144] 따라서, 초고성능 액체 크로마토그래프(Ultra High Performance Liquid Chromatograph: UPLC) 방법을 사용하는 상기의 AccQ-태그™ 울트라 (워터스 코포레이션 (미국 매사추세츠주 밀퍼드)) 프리-칼럼 유도체화는 시스테인 또는 티로신을 포함하는 소형 펩티드, 예를 들어, 디펩티드, 알라닐 티로신 또는 알라닐 시스테인을 함유하는지 여부를 알아보기 위해 임의의 샘플 배지 또는 공급 보충물을 시험하는 한 방법을 제공한다. 관심의 대상이 되는 다른 디펩티드를 비롯한, 다른 소형 펩티드를 검출하는 데에도 또한 같은 방법이 사용될 수 있다.

[0145] 추가로, 본원에 기술된 디펩티드는 또한 질량 분광측정법을 동반한 액체 크로마토그래피 (LC/MS)를 수행하는 검출을 통해 정량화될 수 있다. 4중 비행 시간 질량 분광측정계 (워터스® 시냅트™ HDMS™ 시스템(Waters® SYNAPT™ HDMS™ System: 미국 매사추세츠주 밀퍼드))와 커플링된 역상 액체 크로마토그래피 칼럼 (액퀴티 (Acquity) UPLC® HSS T3 1.8-㎛, 2.1-mm i.d x 150-mm, 40℃에서)을 사용하여 분리를 수행하였다. 극성 화합물의 최적의 분리를 위한 이온쌍 형성제로서 퍼플루오린화된 카르복실산 (예컨대, 퍼플루오로펜탄산)을 사용하였다 (문헌 [Jun Qu, Yiming Wang, Guan Luo, Zhuping Wu, and Chengdui Yang, Anal. Chem., 2002, 74, 2034-2040]; 본 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다). 이동상-A는 물 중 0.1% 포름산 및 0.05% 퍼플루오로펜탄산이고, 이동상-B는 80% 아세토니트릴 중 0.1% 포름산 및 0.05% 퍼플루오로펜탄산이었다. 모든 시약은 LC/MS 등급이었다. 15 min 동안 0.4-mL/min의 유속으로 1-45%의 이동상-B 상에서 초고성능 액체 크로마토그래피 (UPLC) 구배는 선형이었다. 연속형, 양성 전기분무 (+ES), 및 V-모드로 70-1,000 Da 내에서 매 0.5-sec마다 질량 스펙트럼을 수집하였다. 전체 이온 크로마토그램으로부터 양성자화된 L-알라닐-L-시스테인 이량체 및 양성자화된 L-알라닐-L-티로신 이온이 각각 383.105 (±0.03) Da 및 253.118 (±0.03) Da으로서 추출되었다. 양성자화된 L-알라닐-L-시스테인 이량체 및 양성자화된 L-알라닐-L-티로신 이온에 대한 체류 시간은 각각 9.60 (±0.03) min 및 8.75 (±0.03) min (도 4 내지 7)이었다.

[0146] 달리 정의하지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 당업계의 숙련가가 통상적으로 이해하고 있는 것과 같은 의미를 갖는다. 상충되는 경우, 정의를 비롯한 본 명세서가 우선할 것이다. 본원에 기술된 방법 및 출원에 대한 다른 적합한 변형 및 적합화는 명백하며, 본 발명 또는 그의 임의의 실시양태의 범주로부터 벗어남 없이 이루어질 수 있다는 것이 관련 업계의 숙련가에게 쉽게 자명해질 것이다. 추가로, 물질, 방법 및 일례는 단지 예시적인 것이며, 제한하고자 하는 것이 아니다. 본원에서 언급된 모든 공개 문헌, 특허 출원, 특허 및 다른 참고 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0147] **실시예 1: 디펩티드-함유 배양 배지 제조**

[0148] 디펩티드 알라닐 티로신 (AlaTyr) 및 알라닐 시스테인 (이는 디술피드 이량체, $[AlaCys]_2$를 형성)을 함유하는 예시적인 세포 배양 배지를 제조하였다. 구체적으로, 글루코스 및 농축 아미노산 혼합물을 함유하는 수성 기초 세포 배양 배지에 디펩티드, 알라닐 티로신 및 알라닐 시스테인을 건조 분말로서 첨가하고, 용해될 때까지 혼합하였다. 알라닐 티로신은 약 4.0 g/L의 농도로 세포 배양 배지에 첨가하였다. 알라닐 시스테인은 약 3.0 g/L의 농도로 세포 배양 배지에 첨가하였다. 관찰 결과, 물 중 디펩티드의 용해도는 AlaTyr의 경우, 약 15.4 g/L, AlaCys의 경우, > 100 g/L, 및 $[AlaCys]_2$ 이량체의 경우, 약 8.7 g/L인 것으로 측정되었다. 비교로, 물 중 L-티로신의 용해도는 20℃에서 약 0.38 g/L이다. 유리 L-시스테인은 시스틴으로 쉽게 산화된다. L-시스테인 히

드로클로라이드는 산성 수용액 중에서는 안정성이 상당히 더 크지만, 중성 또는 알칼리성 수용액 중에서는 호기성 산화에 의해 역시 L-시스틴으로 전환된다. 물 중 L-시스틴의 용해도는 25℃에서 약 0.11 g/L였다.

[0149] **실시예 2: 유가식 시험**

[0150] 기초 세포 배양 배지 CD FortiCHO™ (인비트로젠(Invitrogen) 카탈로그 번호 A-1148301 및 커스텀 스톡(Custom Stock) A-11437DK; 라이프 테크놀러지스 코포레이션(미국 캘리포니아주 칼즈배드))에서 성장시키고, 글루코스(CD FortiCHO™ + 글루코스; 도 1: 검은색 사각형으로 표시된 곡선 ( ) 및 슬래쉬로 표시된 막대 그래프 (▨)), 또는 저수준의 시스테인 또는 티로신을 포함하는 농축 아미노산 혼합물과 글루코스 + 디펩티드 (DP) 함유 배양 배지 또는 공급물 (실시예 1에 기술)의 혼합물 (CD FortiCHO™ + aa + DP 공급물 FP2 및 FP3; 도 1 참조: (FP2) 동그라미로 표시된 곡선 ( ) 및 흰색 막대 그래프 (□); (FP3) 다이아몬드 마크로 표시된 곡선 ( ) 및 역 슬래쉬로 표시된 막대 그래프 (▧))으로 보충된, IgG-생산 CHO 세포를 사용하여 통합된 유가식 시험을 수행하였다. 도 1에서 "aa"는 저수준의 시스테인 및 티로신을 포함하는 농축 아미노산 혼합물과 글루코스의 혼합물을 나타낸다.

[0151] 다른 기초 세포 배양 배지, CD OptiCHO™, CD CHO (이들 모두 라이프 테크놀러지스 코포레이션 (미국 캘리포니아주 칼즈배드)으로부터 입수)에 대한 연구도 실시하였다 (데이터는 나타내지 않음). 사용된 배지 중 바람직한 배지는 CD FortiCHO™였다. 예시적인 농축 아미노산 혼합물로는 예를 들어, CHO CD 에피션트피드™ A (인비트로젠 카탈로그 번호 A1023401), CHO CD 에피션트피드™ B (인비트로젠 카탈로그 번호 A1024001), CHO CD 에피션트피드™ 키트 (인비트로젠 카탈로그 번호 A1024101), CD 에피션트피드™ C AGT™ (커스텀 스톡 A- 11525SA, 라이프 테크놀러지스 코포레이션 (미국 캘리포니아주 칼즈배드))가 있다. 당업자에 의해 간주될 수 있는 바와 같이, 원하는 세포 유형의 성장을 위해 적합한, 임의의 예시적인 기초 세포 배양 배지, 임의의 예시적인, 임의로 글루코스, 비타민, 미량 원소 등과 농축 아미노산 (aa)의 화학량론적으로 균형잡힌 혼합물과 함께 사용하기 위해 본 발명의 세포 배양 배지 또는 보충 공급물 중 시스테인 및 티로신 함유 소형 펩티드를 디자인하였다.

[0152] 작업 부피가 500 mL인 다스깁(DasGip) 생물반응기 중, pH 제어 설정점 7.0 ± 0.05 및 pO2 제어 설정점 30%에서 세포를 성장시켰다. 글루코스 수준이 2 g/L에 도달할 때마다, 글루코스로 보충된 CHO 세포에 3 g/L의 글루코스를 자동으로 공급하였다. 디펩티드 (DP)로 보충된 CHO 세포는 2개의 공급 스케줄로 공급받았다. 제1 공급 스케줄에서는 (도 1 참조, 적색 곡선 및 막대: FP2), 4일째부터 13일째까지 매일 2%의 디펩티드-함유 배지를 CHO 세포에 공급하였다. 제2 공급 스케줄에서는 (도 1 참조, 녹색 곡선 및 막대: FP3), 5일째부터 14일째까지 매일 2%의 디펩티드-함유 배지를 CHO 세포에 공급하였다.

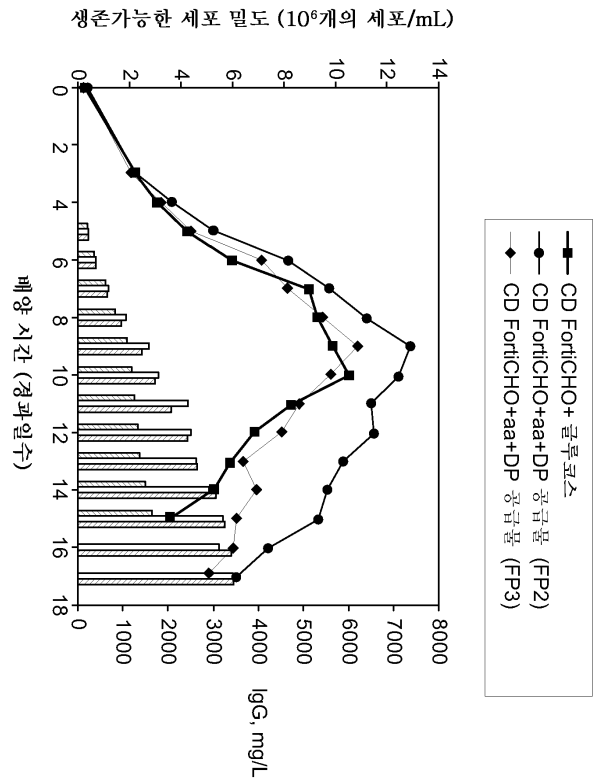
[0153] CD FortiCHO™ 배지 중에서 성장시키고, 글루코스로 보충된 세포의 IgG 생산성 (1,600 mg/L)은 CD OptiCHO™ (라이프 테크놀러지스 코포레이션 (미국 캘리포니아주 칼즈배드)) 또는 CD CHO (라이프 테크놀러지스 코포레이션 (미국 캘리포니아주 칼즈배드)) 기반 유가식 프로세스 (데이터를 나타내지 않음)와 유사하거나, 그보다는 우수하였다. CD FortiCHO™ 중에서 성장시키고, 실시예 1의 농축 아미노산 및 디펩티드-함유 배지로 보충된 CHO 세포의 생존력은 12일 경과 후 개선되었고, 생산성 수준은 2배가 되었으며, 15일째 CD FortiCHO™ + 글루코스의 IgG 역가가 약 1,600 mg/L인 것과 비교하여, 15일째까지의 IgG 역가가 약 3,200 mg/L였다 (도 1). CD FortiCHO™ + aa + 디펩티드 (DP) 공급물에 대한 두 공급 스케줄 중 둘 모두 효과가 우수하였고, IgG 생산 수준이 유사한 것으로 나타났다. FP3 프로파일은 FP2에 비해 유지되는 글루코스 수준이 보다 우수하였고, IgG 생산 수준이 보다 일정한 반면, FP2 프로파일은 보다 더 높은 최고 세포 밀도를 촉진시켰다. 특히, 디펩티드-함유 세포 배양 배지는 공급물 부피의 비율이 현저히 감소된 상태하에서 세포 밀도 및 생산성 수준을 증진시켰는데, 이는 본원에 기술된 디펩티드-함유 세포 배양 배지를 사용함으로써 얻게 되는 추가의 또 다른 이점이다.

[0154] 디펩티드 알라닐 티로신 및 알라닐 시스테인을 함유하는 액체 세포 배양 배지 또는 공급물 용액을 2-8℃에서 보관할 수 있고, 10개월이 넘는 기간 동안 침전물이 없는 상태로 유지되어 왔으며, 따라서, 이는 상기 농축 용액에 대해 기대되는 것보다도 유의적으로 더 긴 장기간 동안의 액체 안정성을 입증한다.

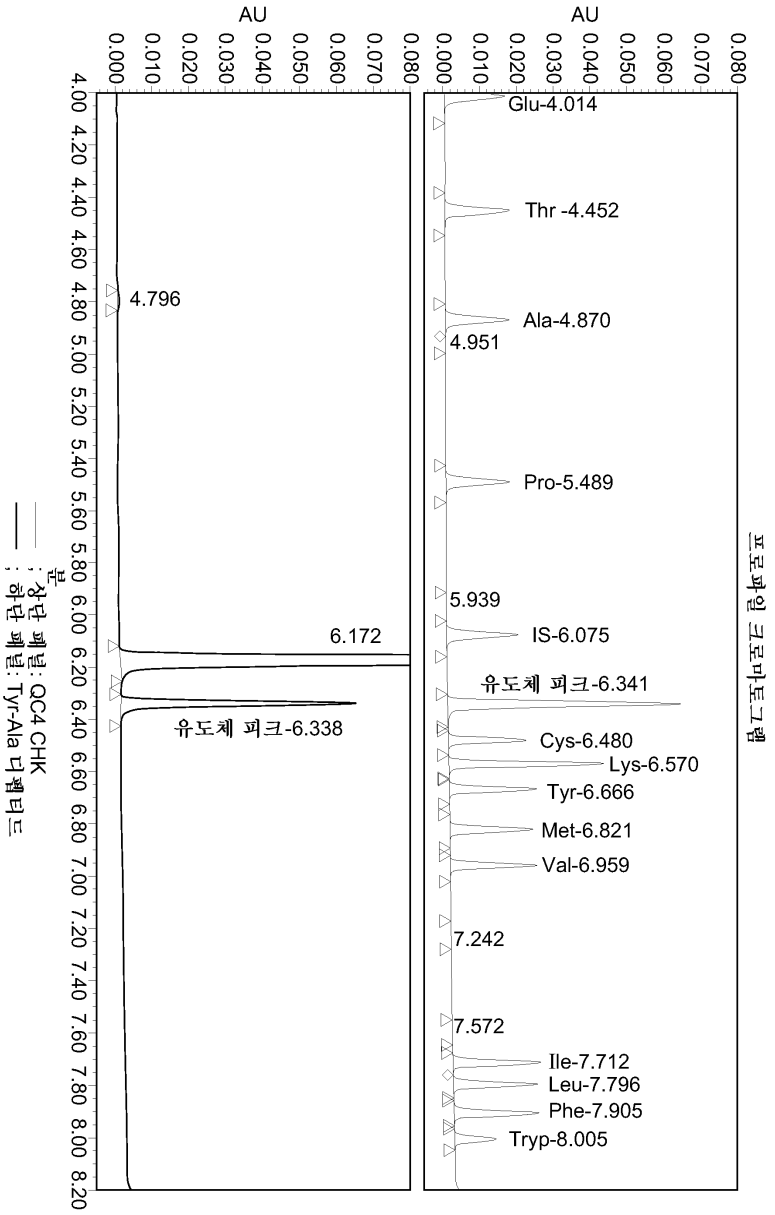
[0155] 본원에서 인용된 모든 특허, 특허 출원, 및 공개된 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다. 본 발명은 특별히 그의 바람직한 실시양태를 참고로 하여 제시되고 기술되었지만, 첨부된 특허청구범위에 의해 포함되는 본 발명의 범주로부터 벗어남 없이 그 안에서 어떤 형태로든 상세히 다양하게 변형될 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

도면

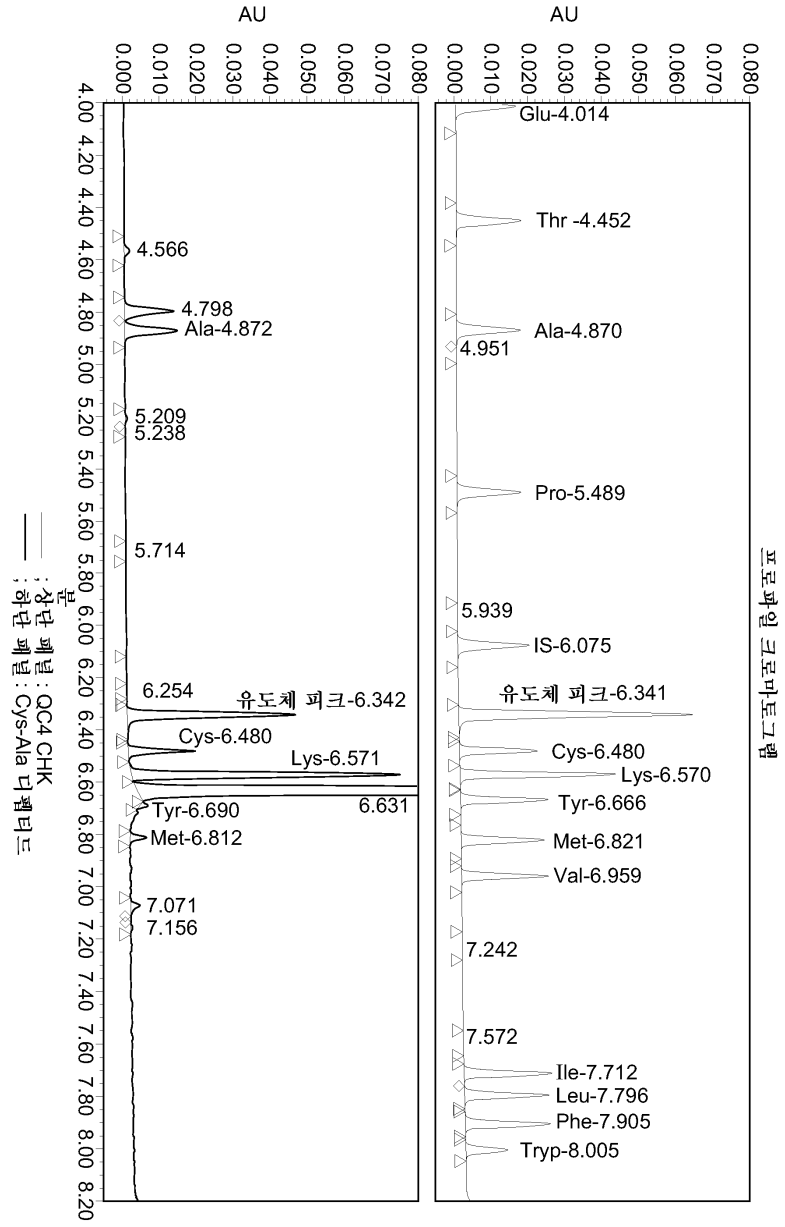
도면1


생존가능한 세포 밀도 (10⁶개의 세포/mL)
배양 시간 (경과일수)
IgG, mg/L
CD FortiCHO+ 글루코스
CD FortiCHO+aa+DP 공급물 (FP2)
CD FortiCHO+aa+DP 공급물 (FP3)

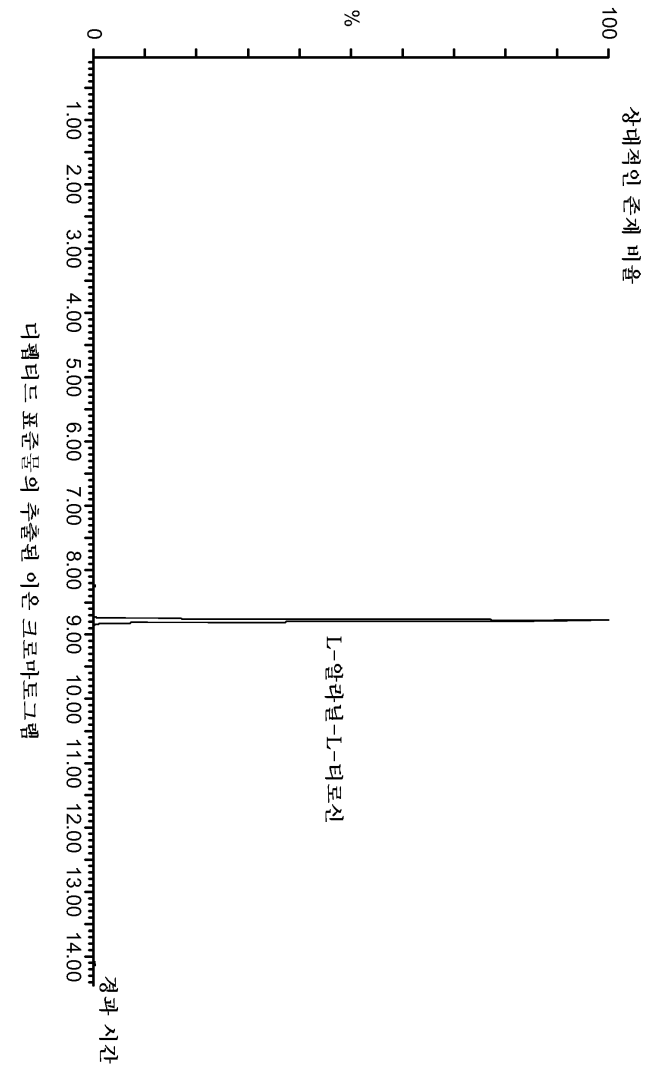
도면2


AU
AU
Glu-4.014
Thr -4.452
Ala-4.870
4.951
Pro-5.489
5.939
IS-6.075
유도체 피크-6.341
Cys-6.480
Lys-6.570
Tyr-6.666
Met-6.821
Val-6.959
7.242
7.572
Ile-7.712
Leu-7.796
Phe-7.905
Tryp-8.005
프로파일 크로마토그램
4.796
6.172
유도체 피크-6.338
분
상단 패널: QC4 CHK
하단 패널: Tyr-Ala 디펩티드

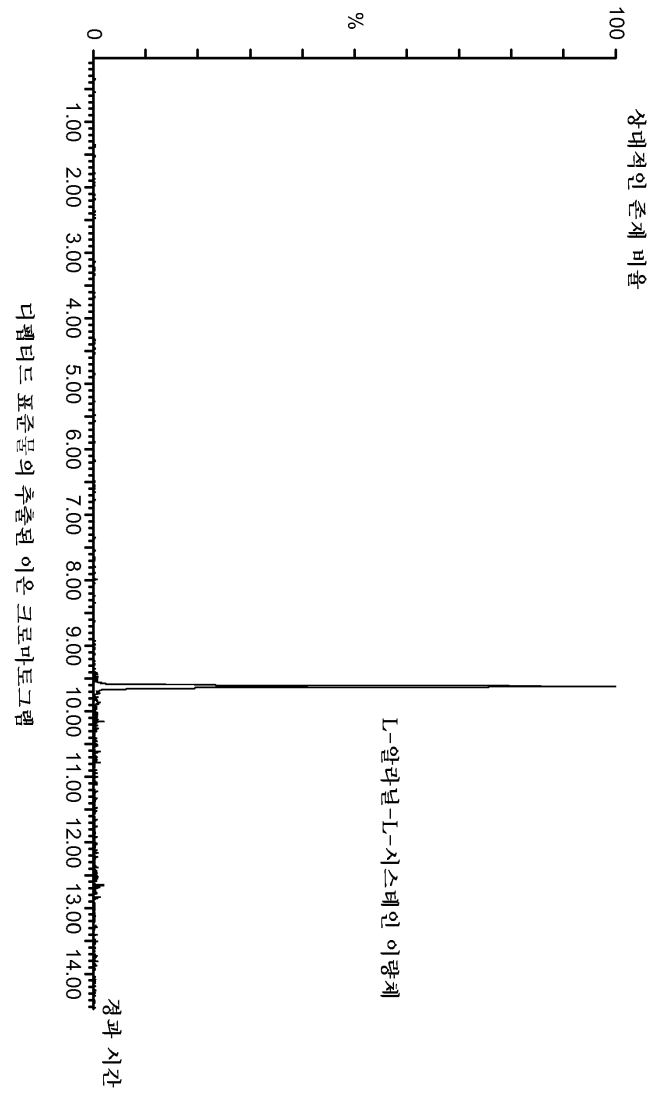
도면3


AU
AU
0.000
0.010
0.020
0.030
0.040
0.050
0.060
0.070
0.080
4.00
4.20
4.40
4.60
4.80
5.00
5.20
5.40
5.60
5.80
6.00
6.20
6.40
6.60
6.80
7.00
7.20
7.40
7.60
7.80
8.00
8.20
4.566
4.798
Ala-4.872
5.209
5.238
5.714
6.254
유도체 피크-6.342
Cys-6.480
Lys-6.571
6.631
Tyr-6.690
Met-6.812
7.071
7.156
Glu-4.014
Thr -4.452
Ala-4.870
4.951
Pro-5.489
5.939
IS-6.075
유도체 피크-6.341
Cys-6.480
Lys-6.570
Tyr-6.666
Met-6.821
Val-6.959
7.242
7.572
Ile-7.712
Leu-7.796
Phe-7.905
Tryp-8.005
프로파일 크로마토그램
—— : 상단 패널 : QC4 CHK
—— : 하단 패널 : Cys-Ala 디펩티드

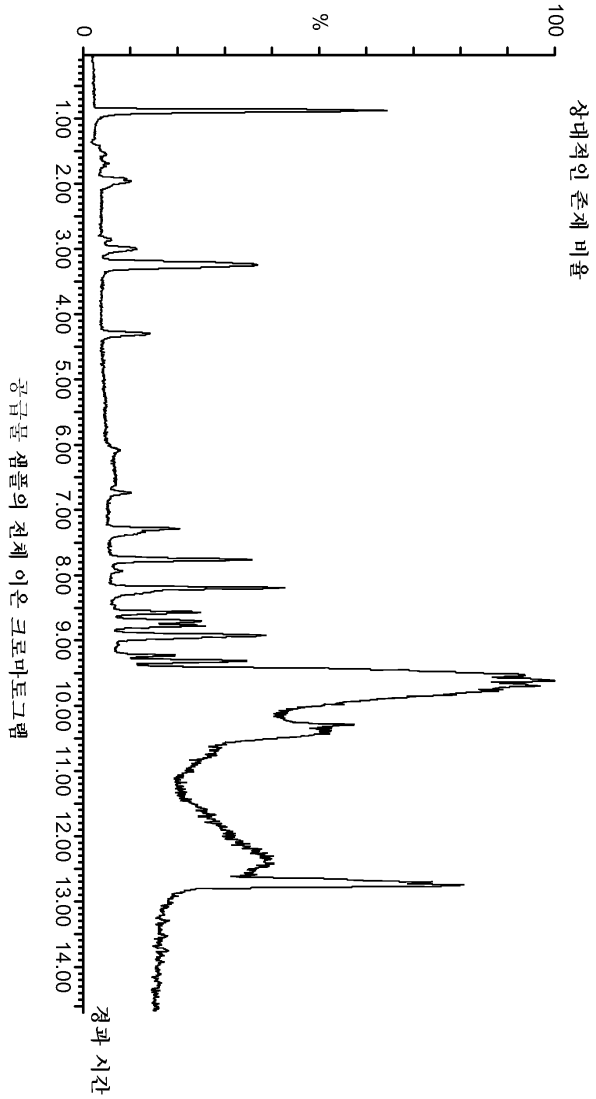
도면4


100
%
0
상대적인 존재 비율
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
경과 시간
L-알라닐-L-티로신
디웰터드 표준물의 추출된 이온 크로마토그램

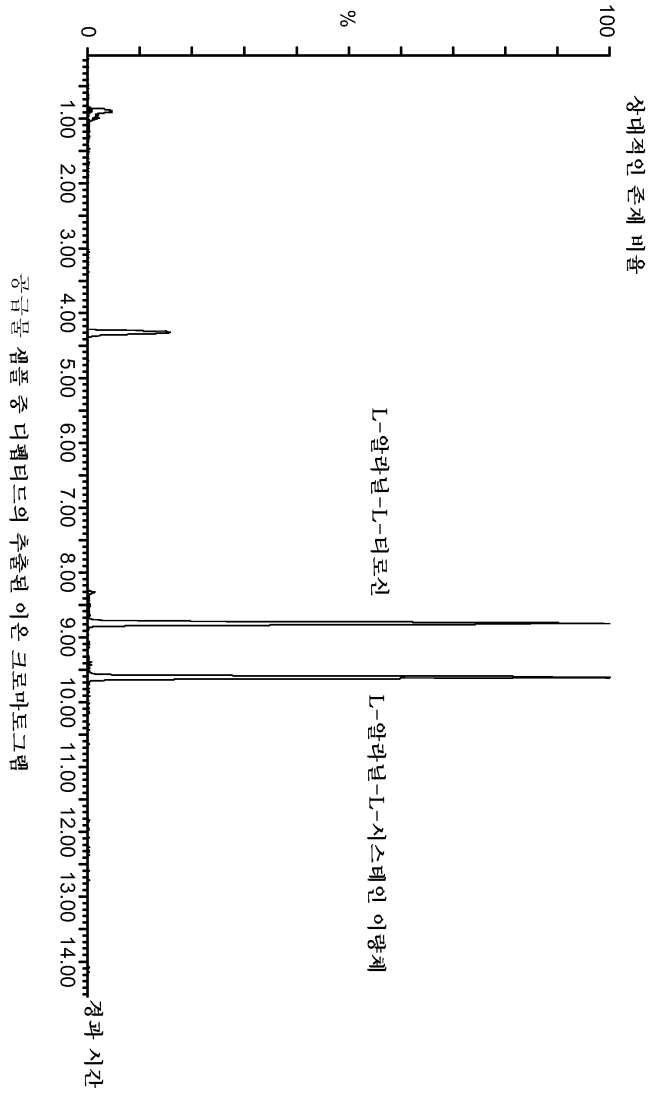
도면5


100
%
0
상대적인 존재 비율
1.00 2.00 3.00 4.00 5.00 6.00 7.00 8.00 9.00 10.00 11.00 12.00 13.00 14.00
경과 시간
L-알라닐-L-시스테인 이량체
디펩티드 표준물의 추출된 이온 크로마토그램

도면6


100
%
0
상대적인 존재 비율
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
경과 시간
공급물 샘플의 전체 이온 크로마토그램

도면7



공급물 샘플 중 디펩티드의 추출된 이온 크로마토그램