(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0154572
(43) 공개일자 2024년10월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 21/02 (2006.01) *C07K 16/00* (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 21/02 (2013.01)
C07K 16/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7030736
(22) 출원일자(국제) 2023년02월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년09월12일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2023/006038
(87) 국제공개번호 WO 2023/157970
국제공개일자 2023년08월24일
(30) 우선권주장
JP-P-2022-024815 2022년02월21일 일본(JP)

(71) 출원인
아지노모토 가부시키가이샤
일본국 도쿄도 쥬오구 교바시 1죠메15반1고
(72) 발명자
다카오, 노부마사
일본 1158543 도쿄도 기타쿠 우키마 5쵸메 5반 1고 추가이 세이야쿠 가부시키가이샤 내
히구치, 다쿠야
일본 2108681 가나가와켄 가와사키시 가와사키쿠 스즈키쵸 1-1 아지노모토 가부시키가이샤 내
후로미츠, 슙페이
일본 2108681 가나가와켄 가와사키시 가와사키쿠 스즈키쵸 1-1 아지노모토 가부시키가이샤 내
(74) 대리인
장수길, 이유리, 이석재

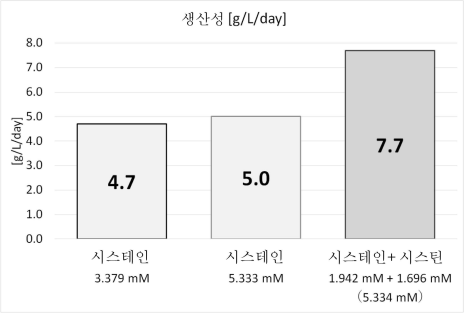
전체 청구항 수 : 총 53 항

(54) 발명의 명칭 **관류 배양 방법**

(57) 요 약

재조합 단백질의 제조에 있어서의 생산성을 개선할 수 있는 관류 배양 방법 등을 제공한다. 구체적으로는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 방법이며, 세포 배양 배지에 시스틴 및/또는 시트르산철암모늄을 첨가하는 것을 포함하는, 방법 등이 제공된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12N 5/0006 (2013.01)
C12N 5/10 (2020.05)

명 세 서

청구범위

청구항 1

재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 방법이며,

세포 배양 배지에 시스틴을 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 2

재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 1 세포당 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 방법이며,

세포 배양 배지에 시스틴을 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 시스테인 환산으로 시스틴과 등몰 농도의 시스테인을 첨가한 경우와 비교하여, 재조합 단백질 산생이 향상되는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 재조합 단백질 산생이 10% 이상 향상되는, 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 배양 개시 1시간 후 이후에 시스틴을 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 배양 개시 6시간 후 이후에 시스틴을 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 배양 개시 24시간 후 이후에 시스틴을 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 배양 개시 72시간 후 이후에 시스틴을 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 관류 배양에 있어서의 초발 배지의 시스테인원 농도가 0.1mM 내지 2.1mM인, 방법.

청구항 10

재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를 관류 배양하기 위한 방법이며,

재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 0.1mM 내지 2.1mM의 시스테인원 농도를 포함하는 세포 배양 초발 배지에서 관류 배양하는 것; 및

배양 개시 72시간 후 이후에, 세포 배양 배지에 시스틴을 첨가하는 것

을 포함하는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 시스테인 환산으로 시스틴과 등몰 농도의 시스테인을 첨가한 경우와 비교하여, 재조합 단백질 산생능이 향상되는, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 재조합 단백질 산생능이 10% 이상 향상되는, 방법.

청구항 13

재조합 단백질을 제조하기 위한 방법이며,

재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 0.1mM 내지 2.1mM의 시스테인원 농도를 포함하는 세포 배양 초발 배지에서 관류 배양하는 것;

배양 개시 72시간 후 이후에, 세포 배양 배지에 시스틴을 첨가하는 것; 및

재조합 단백질을 회수하는 것

을 포함하는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 시스테인 환산으로 시스틴과 등몰 농도의 시스테인을 첨가한 경우와 비교하여, 재조합 단백질 산생이 향상되는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 재조합 단백질 산생이 10% 이상 향상되는, 방법.

청구항 16

제1항, 제2항 및 제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 첨가 후의 시스틴 농도가 0.5mM 내지 10mM인, 방법.

청구항 17

제1항, 제2항 및 제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 첨가 후의 시스틴 농도가 1mM 내지 10mM인, 방법.

청구항 18

제1항, 제2항 및 제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 첨가 후의 시스틴 농도가 1.5mM 내지 10mM인, 방법.

청구항 19

제1항, 제2항 및 제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 첨가 후의 시스틴 농도가 2mM 내지 10mM인, 방법.

청구항 20

제1항, 제2항 및 제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, pH 10 이상으로 조정된 시스틴 함유액을 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 21

제1항, 제2항 및 제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 단백질이 항체인, 방법.

청구항 22

제1항, 제2항 및 제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포가 재조합 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는, 방법.

청구항 23

제1항, 제2항 및 제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 동물 세포가 포유 동물 세포인, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 포유 동물 세포가 CHO 세포인, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, CHO 세포가 CHO-K1 세포, CHO-S 세포, CHO-DXB11 세포 또는 CHO-DG44 세포인, 방법.

청구항 26

제1항, 제2항 및 제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 관류 배양에 있어서의 세포 배양 배지가 시트르산철암모늄을 포함하는, 방법.

청구항 27

시스틴을 유효 성분으로서 포함하는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 제.

청구항 28

재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 방법이며,

재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 시트르산철암모늄을 포함하는 세포 배양 배지에서 관류 배양하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 29

재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 1 세포당 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 방법이며,

재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 시트르산철암모늄을 포함하는 세포 배양 배지에서 관류 배양하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 세포 배양 배지가 시트르산철암모늄 대신에 다른 철원을 포함하는 경우와 비교하여, 재조합 단백질 산생이 향상되는, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 다른 철원이 시트르산제1철나트륨인, 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, 재조합 단백질 산생이 10% 이상 향상되는, 방법.

청구항 33

재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를 관류 배양하기 위한 방법이며,

재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 시트르산철암모늄을 포함하는 세포 배양 배지에서 관류 배양하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 34

재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 세포 증식 속도를 저하시키기 위한 방법이며,

재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 시트르산철암모늄을 포함하는 세포 배양 배지에서 배양하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 세포 배양 배지가 시트르산철암모늄 대신에 다른 철원을 포함하는 경우와 비교하여, 세포 증식 속도가 저하되는, 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 다른 철원이 시트르산제1철나트륨인, 방법.

청구항 37

제35항에 있어서, 세포 증식 속도가 10% 이상 저하되는, 방법.

청구항 38

재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서 배출하는 배양액의 양을 감소시키기 위한 방법이며,

재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 시트르산철암모늄을 포함하는 세포 배양 배지에서 관류 배양하는 것을 포함하고,

상기 배출하는 배양액의 양은 블리딩 공정에 있어서 배출하는 배양액의 양이며, 블리딩 공정은, 배양조로부터 배양액을 배출하고, 당해 배출한 배양액과 동량의 신선 배지를 상기 배양조에 첨가하는 공정인, 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 세포 배양 배지가 시트르산철암모늄 대신에 다른 철원을 포함하는 경우와 비교하여, 배출하는 배양액의 양이 감소하는, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 다른 철원이 시트르산제1철나트륨인, 방법.

청구항 41

제39항에 있어서, 배출하는 배양액의 양이 10% 이상 감소하는, 방법.

청구항 42

재조합 단백질을 제조하기 위한 방법이며,

재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 시트르산철암모늄을 포함하는 세포 배양 배지에서 관류 배양하는 것; 및

재조합 단백질을 회수하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 43

제28항, 제29항, 제33항, 제34항 및 제38항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가, 30mg/L 내지 200mg/L의 철 농도를 부여하는 양의 시트르산철암모늄을 포함하는, 방법.

청구항 44

제28항, 제29항, 제33항, 제34항 및 제38항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가, 40mg/L 내지 200mg/L의 철 농도를 부여하는 양의 시트르산철암모늄을 포함하는, 방법.

청구항 45

제28항, 제29항, 제33항, 제34항 및 제38항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가, 50mg/L 내지 150mg/L의 철 농도를 부여하는 양의 시트르산철암모늄을 포함하는, 방법.

청구항 46

제28항, 제29항, 제33항, 제34항 및 제38항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 단백질이 항체인, 방

법.

청구항 47

제28항, 제29항, 제33항, 제34항 및 제38항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포가 재조합 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는, 방법.

청구항 48

제28항, 제29항, 제33항, 제34항 및 제38항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 동물 세포가 포유 동물 세포인, 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 포유 동물 세포가 CHO 세포인, 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, CHO 세포가 CHO-K1 세포, CHO-S 세포, CHO-DXB11 세포 또는 CHO-DG44 세포인, 방법.

청구항 51

제28항, 제29항, 제33항, 제34항 및 제38항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지에 시스틴을 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 52

시트르산철암모늄을 유효 성분으로서 포함하는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 제.

청구항 53

시스틴 및 시트르산철암모늄을 포함하는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양을 위한 세포 배양 배지.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 동물 세포의 관류 배양 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은, 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법 및 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 방법, 그리고 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 제에도 관한 것이다. 또한, 본 발명은, 동물 세포의 세포 증식 속도를 저하시키기 위한 방법에도 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 근년, 치료용 항체 등의 재조합 단백질의 의약 분야에서의 중요성은 점점 높아지고 있고, 의약으로서 승인된 재조합 단백질의 대부분은, 재조합 단백질을 산생하는 동물 세포를 배양함으로써 제조되고 있다. 그러나, 재조합 단백질의 제조에는, 저분자 화합물의 제조와 비교하여, 높은 비용이 필요하고, 또한 생산물에도, 더 높은 품질이 요구되고 있다.

[0003] 그 때문에, 재조합 단백질의 생산성이나 품질의 향상을 목적으로 한 세포 배양 조건의 제어 및 최적화는, 재조합 단백질의 상업적 생산을 성공시키기 위해 매우 중요한 사항이다.

[0004] 동물 세포의 배양에 의한 재조합 단백질 제조의 생산성을 향상시키기 위한 배양 공정의 연속화 방법의 하나로서, 배양액을 배양조로부터 연속적으로 여과 및 배출하고, 영양 성분을 포함하는 신선한 배지를 연속적으로 배양조에 공급하는 관류 배양 방법이 사용되고 있다. 이 방법에 의하면, 영양 성분 농도 및 노폐물 농도를 일정하게 유지하면서 세포 밀도를 높일 수 있기 때문에, 배양조 용량당 단백질 생산 속도를 향상시킬 수 있다. 또한, 관류 배양 방법에서는, 산생된 재조합 단백질을 배양조로부터 바로 회수할 수 있기 때문에, 높은 품질의 재조합 단백질을 회수하는 것이 가능하고, 배양액 중에서 불안정한 단백질이어도 효율적으로 회수할 수 있다.

[0005] 관류 배양에 있어서의 생산성의 개선을 목적으로 하여, 배양 세포의 개량, 세포 배양 배지의 개량, 관류 배양 방법의 개량 등, 다양한 면에서 각종 개량이 시도되어 왔다.

[0006] 예를 들어, 국제 공개 2018/178069호에는, 세포 배양 배지 중의 칼륨 이온과 나트륨 이온의 몰비를 제어함으로써, 관류 배양에 있어서의 생산성을 개선하는 방법이 기재되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 국제 공개 제2018/178069호

발명의 내용

[0008] 관류 배양에서는, 노폐물과 함께 배지 성분이나 생산물도 연속적으로 발출되기 때문에, 배지 손실에 의한 비용의 증가나 생산물 농도의 저하에 의한 정제 비용의 증가가 발생할 수 있다.

[0009] 본 발명은, 재조합 단백질의 제조에 있어서의 생산성을 개선하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 즉, 본 발명에 따르면, 이하에 나타내는 양태가 제공된다.

[0011] [1]

[0012] 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 방법이며,

[0013] 세포 배양 배지에 시스틴을 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

[0014] [2]

[0015] 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 1 세포당 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 방법이며,

[0016] 세포 배양 배지에 시스틴을 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

[0017] [3]

[0018] 시스테인 환산으로 시스틴과 등몰 농도의 시스테인을 첨가한 경우와 비교하여, 재조합 단백질 산생이 향상되는, [1] 또는 [2]에 기재된 방법.

[0019] [4]

[0020] 재조합 단백질 산생이 10% 이상 향상되는, [3]에 기재된 방법.

[0021] [5]

[0022] 배양 개시 1시간 후 이후에 시스틴을 첨가하는 것을 포함하는, [1] 내지 [4] 중 어느 한 항에 기재된 방법.

[0023] [6]

[0024] 배양 개시 6시간 후 이후에 시스틴을 첨가하는 것을 포함하는, [1] 내지 [4] 중 어느 한 항에 기재된 방법.

[0025] [7]

[0026] 배양 개시 24시간 후 이후에 시스틴을 첨가하는 것을 포함하는, [1] 내지 [4] 중 어느 한 항에 기재된 방법.

[0027] [8]

[0028] 배양 개시 72시간 후 이후에 시스틴을 첨가하는 것을 포함하는, [1] 내지 [4] 중 어느 한 항에 기재된 방법.

[0029] [9]

[0030] 관류 배양에 있어서의 초발 배지의 시스테인원 농도가 0.1mM 내지 2.1mM인, [1] 내지 [8] 중 어느 한 항에 기재된 방법.

[0031] [10]

[0032] 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를 관류 배양하기 위한 방법이며,

[0033] 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 0.1mM 내지 2.1mM의 시스테인원 농도를 포함하는 세포 배양 초발 배지에서 관류 배양하는 것; 및

[0034] 배양 개시 72시간 후 이후에, 세포 배양 배지에 시스틴을 첨가하는 것

[0035] 을 포함하는, 방법.

[0036] [11]

[0037] 시스테인 환산으로 시스틴과 등몰 농도의 시스테인을 첨가한 경우와 비교하여, 재조합 단백질 산생능이 향상되는, [10]에 기재된 방법.

[0038] [12]

[0039] 재조합 단백질 산생능이 10% 이상 향상되는, [11]에 기재된 방법.

[0040] [13]

[0041] 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법이며,

[0042] 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 0.1mM 내지 2.1mM의 시스테인원 농도를 포함하는 세포 배양 초발 배지에서 관류 배양하는 것;

[0043] 배양 개시 72시간 후 이후에, 세포 배양 배지에 시스틴을 첨가하는 것; 및

[0044] 재조합 단백질을 회수하는 것

[0045] 을 포함하는, 방법.

[0046] [14]

[0047] 시스테인 환산으로 시스틴과 등몰 농도의 시스테인을 첨가한 경우와 비교하여, 재조합 단백질 산생이 향상되는, [13]에 기재된 방법.

[0048] [15]

[0049] 재조합 단백질 산생이 10% 이상 향상되는, [14]에 기재된 방법.

[0050] [16]

[0051] 첨가 후의 시스틴 농도가 0.5mM 내지 10mM인, [1] 내지 [15] 중 어느 한 항에 기재된 방법.

[0052] [17]

[0053] 첨가 후의 시스틴 농도가 1mM 내지 10mM인, [1] 내지 [15] 중 어느 한 항에 기재된 방법.

[0054] [18]

[0055] 첨가 후의 시스틴 농도가 1.5mM 내지 10mM인, [1] 내지 [15] 중 어느 한 항에 기재된 방법.

[0056] [19]

[0057] 첨가 후의 시스틴 농도가 2mM 내지 10mM인, [1] 내지 [15] 중 어느 한 항에 기재된 방법.

[0058] [20]

[0059] pH 10 이상으로 조정된 시스틴 함유액을 첨가하는 것을 포함하는, [1] 내지 [19] 중 어느 한 항에 기재된 방법.

[0060] [21]

[0061] 재조합 단백질이 항체인, [1] 내지 [20] 중 어느 한 항에 기재된 방법.

[0062] [22]

[0063] 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포가 재조합 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는, [1] 내지 [21] 중 어느

한 항에 기재된 방법.

[0064] [23]

[0065] 동물 세포가 포유 동물 세포인, [1] 내지 [22] 중 어느 한 항에 기재된 방법.

[0066] [24]

[0067] 포유 동물 세포가 CHO 세포인, [23]에 기재된 방법.

[0068] [25]

[0069] CHO 세포가 CHO-K1 세포, CHO-S 세포, CHO-DXB11 세포 또는 CHO-DG44 세포인, [24]에 기재된 방법.

[0070] [26]

[0071] 관류 배양에 있어서의 세포 배양 배지가 시트르산철암모늄을 포함하는, [1] 내지 [25] 중 어느 한 항에 기재된 방법.

[0072] [27]

[0073] 시스틴을 유효 성분으로서 포함하는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 제.

[0074] [28]

[0075] 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 방법이며,

[0076] 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 시트르산철암모늄을 포함하는 세포 배양 배지에서 관류 배양하는 것을 포함하는, 방법.

[0077] [29]

[0078] 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 1 세포당 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 방법이며,

[0079] 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 시트르산철암모늄을 포함하는 세포 배양 배지에서 관류 배양하는 것을 포함하는, 방법.

[0080] [30]

[0081] 세포 배양 배지가 시트르산철암모늄 대신에 다른 철원을 포함하는 경우와 비교하여, 재조합 단백질 산생이 향상되는, [28] 또는 [29]에 기재된 방법.

[0082] [31]

[0083] 다른 철원이 시트르산제1철나트륨인, [30]에 기재된 방법.

[0084] [32]

[0085] 재조합 단백질 산생이 10% 이상 향상되는, [30] 또는 [31]에 기재된 방법.

[0086] [33]

[0087] 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를 관류 배양하기 위한 방법이며,

[0088] 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 시트르산철암모늄을 포함하는 세포 배양 배지에서 관류 배양하는 것을 포함하는, 방법.

[0089] [34]

[0090] 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 세포 증식 속도를 저하시키기 위한 방법이며,

[0091] 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 시트르산철암모늄을 포함하는 세포 배양 배지에서 배양하는 것을 포함하는, 방법.

[0092] [35]

[0093] 세포 배양 배지가 시트르산철암모늄 대신에 다른 철원을 포함하는 경우와 비교하여, 세포 증식 속도가 저하되는, [33] 또는 [34]에 기재된 방법.

[0094] [36]

[0095] 다른 철원이 시트르산제1철나트륨인, [35]에 기재된 방법.

[0096] [37]

[0097] 세포 증식 속도가 10% 이상 저하되는, [35] 또는 [36]에 기재된 방법.

[0098] [38]

[0099] 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서 배출하는 배양액의 양을 감소시키기 위한 방법이며,

[0100] 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 시트르산철암모늄을 포함하는 세포 배양 배지에서 관류 배양하는 것을 포함하고,

[0101] 상기 배출하는 배양액의 양은 블리딩 공정에 있어서 배출하는 배양액의 양이며, 블리딩 공정은, 배양조로부터 배양액을 배출하고, 당해 배출한 배양액과 동량의 신선 배지를 상기 배양조에 첨가하는 공정인, 방법.

[0102] [39]

[0103] 세포 배양 배지가 시트르산철암모늄 대신에 다른 철원을 포함하는 경우와 비교하여, 배출하는 배양액의 양이 감소하는, [38]에 기재된 방법.

[0104] [40]

[0105] 다른 철원이 시트르산제1철나트륨인, [39]에 기재된 방법.

[0106] [41]

[0107] 배출하는 배양액의 양이 10% 이상 감소하는, [39] 또는 [40]에 기재된 방법.

[0108] [42]

[0109] 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법이며,

[0110] 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 시트르산철암모늄을 포함하는 세포 배양 배지에서 관류 배양하는 것; 및

[0111] 재조합 단백질을 회수하는 것을 포함하는, 방법.

[0112] [43]

[0113] 세포 배양 배지가, 30mg/L 내지 200mg/L의 철 농도를 부여하는 양의 시트르산철암모늄을 포함하는, [28] 내지 [42] 중 어느 한 항에 기재된 방법.

[0114] [44]

[0115] 세포 배양 배지가, 40mg/L 내지 200mg/L의 철 농도를 부여하는 양의 시트르산철암모늄을 포함하는, [28] 내지 [42] 중 어느 한 항에 기재된 방법.

[0116] [45]

[0117] 세포 배양 배지가, 50mg/L 내지 150mg/L의 철 농도를 부여하는 양의 시트르산철암모늄을 포함하는, [28] 내지 [42] 중 어느 한 항에 기재된 방법.

[0118] [46]

[0119] 재조합 단백질이 항체인, [28] 내지 [45] 중 어느 한 항에 기재된 방법.

[0120] [47]

[0121] 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포가 재조합 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는, [28] 내지 [46] 중 어느 한 항에 기재된 방법.

[0122] [48]

[0123] 동물 세포가 포유 동물 세포인, [28] 내지 [47] 중 어느 한 항에 기재된 방법.

[0124] [49]

[0125] 포유 동물 세포가 CHO 세포인, [48]에 기재된 방법.

[0126] [50]

[0127] CHO 세포가 CHO-K1 세포, CHO-S 세포, CHO-DXB11 세포 또는 CHO-DG44 세포인, [49]에 기재된 방법.

[0128] [51]

[0129] 세포 배양 배지에 시스틴을 첨가하는 것을 포함하는, [28] 내지 [50] 중 어느 한 항에 기재된 방법.

[0130] [52]

[0131] 시트르산철암모늄을 유효 성분으로서 포함하는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 제.

[0132] [53]

[0133] 시스틴 및 시트르산철암모늄을 포함하는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양을 위한 세포 배양 배지.

[0134] 본 발명은, 재조합 단백질의 제조에 있어서의 생산성을 개선할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0135] 도 1은, 시스테인원의 차이에 의한 재조합 단백질의 생산성의 차이를 나타내는 그래프이다.

도 2는 철원의 차이에 의한 항체 생산 속도(SPR) 및 세포 증식 속도의 차이를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0136] [용어의 설명]

[0137] 본 개시 중에 있어서는, 특기가 없는 한, 각 용어는 이하에 나타내는 의미를 갖는다.

[0138] 본 개시에 있어서의 「재조합 단백질」은, 임의의 유전자 재조합 기술을 사용하여 제조된 임의의 길이의 아미노산의 폴리머를 말한다. 폴리머는 직쇄상이어도 분지상이어도 되고, 수식 아미노산을 포함하고 있어도 되고, 비아미노산을 포함하고 있어도 된다. 또한, 재조합 단백질은, 디술피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 아미드화, 보호기 등에 의한 유도체화, 절단, 또는 표지 성분(예를 들어, 방사성 동위체) 혹은 약물(예를 들어, 독소, 세포 상해생 약물, 방사성 동위체)과의 결합 등의, 화학적 또는 생물학적 수식을 받아도 된다. 재조합 단백질 부분을 그 구조의 일부에 포함하는 분자는 모두, 본 발명의 재조합 단백질에 포함된다. 사용되는 유전자 재조합 기술은, 유전자를 인공적으로 조작하는 기술이면 특별히 한정되는 것은 아니지만, 전형적인 예는, 재조합 단백질을 코딩하는 핵산의 숙주 세포에의 도입이다.

[0139] 재조합 단백질의 예로서는, 이들에 한정되는 것은 아니지만, 유전자 재조합 기술을 사용하여 제조되는 효소, 호르몬, 사이토카인, 응고 인자(또는 혈액 응고 관련 단백질), 세포 외 단백질, 노치(Notch) 리간드, 항체, 항체 미메틱 및 이뮤노어드헤신을 들 수 있다. 이들 재조합 단백질은 주로, 의약, 농약, 식품, 기타 화학공업 분야에서 사용되지만, 특정한 용도에 한정되는 것은 아니다.

[0140] 효소의 예로서는, 알칼리 포스파타아제, β-락타마아제, 갈락토시다아제, 글루코시다아제, 글루코세레브로시다아제, 슈퍼옥시드디스무타아제 및 DNase를 들 수 있다.

[0141] 호르몬의 예로서는, 레닌, 성장 호르몬(인간 성장 호르몬 또는 소 성장 호르몬 등), 부갑상선 호르몬, 갑상선 자극호르몬, 칼시토닌, 생식선 자극 호르몬(예를 들어, 난포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬), 글루카곤, 인슐린(인슐린 A쇄 및 인슐린 B쇄) 및 프로인슐린을 들 수 있다.

[0142] 사이토카인의 예로서는, 종양 괴사 인자(예를 들어, TNF-α 및 -β), 혈관 내피 증식 인자(VEGF), 뇌 유래 신경 영양 인자(BDNF), 신경 영양 인자(예를 들어, NT-3 내지 NT-6), 신경 성장 인자(NGF), 혈소판 유래 증식 인자(PDGF), 섬유아세포 증식 인자(예를 들어, aFGF, bFGF), 상피 성장 인자(EGF), 형질 전환 증식 인자(예를 들어, TGF-α, TGF-β1 내지 TGF-β5), 액티빈(예를 들어, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E), 인슐린형 성장 인자(예를 들어, IGF-I, IGF-II), 간세포 증식 인자(HGF), 케라티노사이트 증식 인자, 줄기 세포 인자(SCF), 뼈 형성 단백질(BMP), RANTES, 에리트로포에틴(EPO), 트롬보포에틴(TPO), 인터페론-α, -β 및 -γ, 콜로니 자극 인자(예를 들어, M-CSF, GM-CSF, G-CSF) 및 인터류킨(예를 들어, IL-1 내지 IL-13)을 들 수 있다.

[0143] 응고 인자 및 혈액 응고 관련 단백질의 예로서는, 제VII 인자, 제VIII 인자, 제VIIIC 인자, 제IX 인자, 제X 인자, 제XI 인자, 제XII 인자, 조직 인자, 폰·빌레브란트 인자, 프로테인 C, 프로테인 S, 플라스미노겐 활성화 인자(예를 들어, 우로키나아제, 인간 오줌 또는 인간 조직 플라스미노겐 활성화 인자(t-PA)), 트롬빈, 프로트롬빈, 트롬보포에틴, 트롬보모듈린, 안티트롬빈 III, 피브리노겐, 혈청 알부민을 들 수 있다.

[0144] 세포 외 단백질의 예로서는, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 콜라겐, 오스테오폰틴, 라미닌, 그들의 부분 서열을 들 수 있다.

[0145] 노치 리간드의 예로서는, DLL1, DLL3, DLL4, Jagged-1, Jagged-2를 들 수 있다. 노치 리간드는, 예를 들어 Fc 영역과의 융합 단백질로서 구성되어 있어도 된다.

[0146] 본 개시에 있어서의 「항체」는, 항원과의 결합성을 갖는 면역 글로불린 분자를 말하고, 이것에 한정되는 것은 아니지만, 경쇄와 중쇄를 포함하는 폴리펩티드쇄를 갖는 전체 길이 항체 및 그의 일부분(Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$, VHH 프래그먼트 등의 단편)이 포함된다. 각각의 중쇄 또는 경쇄는 가변 영역(항원에 대한 인식 및 결합에 관계됨)과 정상 영역(국재화 및 세포간 상호 작용에 관계됨)을 포함할 수 있다. 가장 일반적인 전체 길이 항체는, 2군데의 중쇄 정상 영역(CH), 2군데의 중쇄 가변 영역(VH), 2군데의 경쇄 정상 영역(CL) 및 2군데의 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다. 가변 영역은, 항원 특이성을 항체에 부여하는 서열인 상보성 결정 영역(CDR)과, 프레임워크 영역(FR)을 포함한다.

[0147] 항체는, 모노클로날 항체, 2종류 이상의 항체 또는 항원 결합 부위로부터 형성되는 다중 특이성 항체(예를 들어 이중 특이성 항체), 원하는 생물학적 활성을 갖는 항체 단편 및 항체의 항원 결합 부위를 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 또한, 항체는 키메라 항체(예를 들어 인간화 항체), (완전)인간 항체, 다가 항체 및 개변 항체를 포함한다.

[0148] 항체는 어느 클래스(예를 들어, IgG, IgA, IgM, IgD, IgE), 어느 서브클래스(아이소타입)여도 된다.

[0149] 항체는 다른 분자(한정되는 것은 아니지만, 저분자 또는 고분자의 독소(세포 상해생 약물)나 방사성 동위체 등)와 결합하는 등의, 화학적 또는 생물학적 수식을 받아도 되고, 이들 수식을 받은 항체도, 본 발명의 항체에 포함된다.

[0150] 본 개시에 있어서의 「항체 미메틱」은, 항원과 특이적으로 결합할 수 있지만, 항체와는 구조적으로 관련되지 않는 단백질을 말한다. 구체적으로는, 항체 미메틱으로서, 프로테인 A의 Z 도메인(어피바디; Affibody)을 들 수 있다. 보다 구체적으로는, 항체 미메틱으로서, ZHER2 어피바디를 들 수 있다.

[0151] 재조합 단백질은 상기 예에 한정되는 것은 아니며, 예를 들어 상기 사이토카인 등의 수용체, 트랜스페린, 각종 CD 단백질, 종양 관련 항원(예를 들어, HER2, HER3 또는 HER4 수용체, CA125), 백신용 등의 바이러스 항원(예를 들어, 바이러스의 엔벨로프 단백질) 등도 포함된다. 또한, 상술한 어느 단백질을 포함하는 융합 단백질도, 재조합 단백질에 포함된다.

[0152] 본 개시에 있어서의 「재조합 단백질 산생능을 갖는다」란, 유전자 재조합 기술에 의해 단백질을 산생하는 능력을 갖는 것을 의미한다. 산생된 재조합 단백질은 세포 외, 즉 배지 중에 분비되어도, 세포 내에 축적되어도 되지만, 바람직하게는 세포 외에 분비된다.

[0153] 전형적으로는, 재조합 단백질을 코딩하는 핵산을 숙주 세포 내에 도입함으로써, 재조합 단백질을 산생하는(발현하는) 능력을 숙주 세포에 부여할 수 있다. 즉, 전형적인 재조합 단백질 산생능을 갖는 세포는, 재조합 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 세포이다. 핵산을 숙주 세포 내에 도입하는 방법은, 당해 기술 분야에서는 다양한 방법이 알려져 있고, 실시 시점에서 공지된 임의의 방법을 사용할 수 있다. 그러한 방법의 예로서는, 재조합 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로, 숙주 세포를 형질 전환하는 방법을 들 수 있다. 벡터는 발현 가능한 형(예를 들어 프로모터, 인핸서, 리보솜 결합 서열 및/또는 전사 종결 서열 등의 조절 서열과 작동 가능

에 연결한 형으로)으로 재조합 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터가 바람직하고, 플라스미드여도 된다.

[0154] 벡터를 숙주 세포에 도입하는 방법의 예에는, 일렉트로포레이션법, 파티클·건법, 인산칼슘법 또는 리포펙션법에 의해, 물리적 또는 화학적으로 숙주 세포 내에 벡터를 도입하는 방법이나, 바이러스 벡터를 숙주 세포에 감염시키는 방법이 포함된다. 숙주 세포 내에 도입된 벡터 내의 핵산은, CRISPR/Cas9 등의 게놈 편집 기술에 의해, 숙주 세포 중의 게놈에 도입되어도 된다. 혹은, 재조합 단백질을 코딩하는 핵산을 숙주 세포 내에 도입하는 대신에, CRISPR/Cas9 등의 게놈 편집 기술 등에 의해, 게놈 DNA 상의 유전자 서열을 직접 개변함으로써, 목적으로 하는 재조합 단백질을 코딩하도록 하거나, 제어 서열 등을 개변하여 목적으로 하는 내재성 단백질의 산생을 제어해도(예를 들어, 향상시켜도) 된다. 이러한 양태에서 산생되는 단백질도 모두, 본 발명의 재조합 단백질에 포함된다.

[0155] 본 개시에 있어서의 「동물 세포」로서는, 임의의 동물 세포를 사용할 수 있지만, 재조합 단백질의 산생에 적합하게 사용되는 주화 세포가 바람직하다. 동물(동물종)로서는, 포유 동물(포유류), 조류, 양서류, 곤충을 들 수 있다. 바람직한 동물로서는, 곤충 및 포유 동물을 들 수 있고, 특히 바람직하게는 포유 동물이다.

[0156] 곤충 세포의 예로서는, 열대거세미나방(Spodoptera frugiperda)의 세포를 들 수 있다. 열대거세미나방의 세포로서는, 열대거세미나방 난소 유래의 Sf9 세포, Sf21 세포, SF+ 세포를 들 수 있다.

[0157] 포유 동물 세포로서는, 인간 또는 원숭이 등의 영장류의 세포나, 마우스, 래트 또는 햄스터 등의 설치류의 세포가 적합하게 사용된다.

[0158] 포유 동물 세포에는, 이것에 한정되는 것은 아니지만, HL-60(ATCC No.CCL-240), HT-1080(ATCC No.CCL-121), HeLa(ATCC No.CCL-2), 293(ECACC No.85120602), Hep G2(ATCC No.HB8065); VERO(ATCC No.CCL-1651), CV1(ATCC No.CCL70) 및 COS-7(ATCC No.CRL-1651); NIH3T3(ATCC No.CRL-1658), NSO(ATCC No.CRL-1827); 차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO 세포), BHK21(간단히 BHK 세포라고도 칭해짐; ATCC No.CRL-10), MDCK(ATCC No.CCL-34) 등의 세포주나, 이들 세포주로부터 유도된 아주(예를 들어, BHK 세포의 아주로서의 BHK TK-세포나, CHO 세포의 아주로서의 CHO-K1 세포, CHO-S 세포, CHO-DXB11 세포(CHO-DUKX 세포 또는 DuxB11 세포라고도 칭해짐) 및 CHO-DG44 세포)가 포함된다.

[0159] 본 개시에 있어서의 「세포 배양 배지」, 「배양 배지」 및 「배지」는, 세포를 증식 또는 유지하기 위해 사용되는 영양원을 포함하는 용액을 말하지만, 판매·제공 형태에 대하여 언급하는 경우에는, 그 용액을 만들기 위한 원액이나 분말(과립)도 포함한다. 영양원은, 세포의 증식이나 생존에 필수적인 성분이나 유용한 성분을 포함하고, 그러한 성분의 예로서는, 당류 등의 탄수화물, 지질, 핵산, 비타민, 필수 및 비필수 아미노산, 필수 원소, pH 조정제 및 용매(물)를 들 수 있다. 배지는 무혈청 배지여도 되고, 동물성 단백질 불함유 배지여도 된다.

[0160] 세포 배양 배지는, 배양하는 세포나 목적에 따라서, 상업적으로 입수 가능한 배지나 문헌에 기재된 공지된 배지로부터 적절히 선택할 수 있고, 2종류 이상의 배지를 혼합하여 사용하거나, 배양의 목적이나 세포에 따라서 조성을 변경하거나, 동물 혈청, 동물 펩톤, 기타 동물 유래 성분이나 영양/증식 인자 또는 호르몬을 첨가할 수도 있다. 세포 배양 배지는, 세포의 생존 및 증식에 적합한 pH 및 염 농도로 조정된다. 세포 배양 배지의 pH는, 예를 들어 5.0 내지 9.0이며, 바람직하게는 6.0 내지 8.0, 보다 바람직하게는 6.5 내지 7.5의 범위에서 사용되는 경우가 많다.

[0161] 상업적으로 이용 가능한 배지의 예로서는, RPMI-1640(Roswell Park Memorial Institute 1640) 배지, L-15 배지, MEM(이글의 최소 필수 배지), DMEM(둘베코의 수정 이글 배지), Iscoves의 수정 DMEM, 햄의 F10 배지 및 F12 배지가 포함된다.

[0162] 본 개시에 있어서의 「화학적으로 정의된 세포 배양 배지」(CDM)는, 동물 혈청이나 펩톤 등의 동물 유래 산물을 포함하지 않고, 모든 성분이 화학적으로 정의된 배지를 말한다. 화학적으로 정의된 세포 배양 배지도, 통상의 세포 배양 배지와 동일하게, 배양하는 세포주나 목적에 따라서, 상업적으로 입수 가능한 배지나 문헌에 기재된 공지된 배지로부터 적절히 선택할 수 있고, 2종류 이상의 배지를 혼합하여 사용하거나, 동물 혈청 기타 동물 성분이나 영양/증식 인자 또는 호르몬을 첨가할 수도 있다. 용액은 세포의 생존 및 증식에 최적인 pH 및 염 농도로 조정된다.

[0163] 상업적으로 이용 가능한 화학적으로 정의된 세포 배양 배지의 예로서는, AmpliCHO CD 배지, Dynamis(등록 상표) 배지, EX-CELL(등록 상표) Advanced(등록 상표) CHO 유가 배지, CD FortiCHO(등록 상표) 배지, CP OptiCHO(등

록 상표), BalanCD(등록 상표) CHO 증식 A 배지, ActiPro(등록 상표), MEM(이글의 최소 필수 배지), DMEM(둘베코의 수정 이글 배지), RPMI-1640(Roswell Park Memorial Institute 1640) 배지 및 CELLiST(등록 상표) Basal Media(BASAL3, BASAL10), Feed Media(FEED2)를 들 수 있다.

[0164] 본 개시에 있어서의 「관류 배양」이란, 배양 중에 세포를 배양조(리액터, 배양기라고도 함) 내에 유지하면서, 세포 배양 배지를 연속적 또는 단속적으로 배양조로부터 배출하고, 영양 성분을 포함하는 배지(신선한 배지)를 연속적 또는 단속적으로 배양조에 도입함(배지의 관류)으로써, 용매량을 대략 일정하게 유지하면서 세포를 배양하는 배양 방법이다.

[0165] 배양 중에 세포를 배양조 내에 유지하기 위해서는, 세포를 배지와 분리하여, 세포를 배양조 내에 머물게 하는 작업이 필요하다. 이 세포와 배지의 분리 방식으로서는, 반투막이나 필터를 사용한 여과(교호 접선류 관류 여과 시스템 등), 중력 침강, 원심 분리 또는 음향 분리 등이 사용된다. 또한, 관류 배양에 적합한 분리 기능 등을 갖는 배양조·배양 장치 또는 배양 시스템도 많이 알려져 있고, 상업적으로 이용 가능하다.

[0166] 관류 배양에 있어서 사용되는 세포 배양 배지는, 다른 방식의 세포 배양에서 사용되는 세포 배양 배지와 동일한 것을 사용할 수 있다. 또한, 배양 개시 시의 배지(초발 배지)와, 그 후의 관류에 사용하는 배지(관류 배지)와는 동일한 조성이어도 다른 조성(일부의 성분이 증감되거나, 다른 성분이 첨가되어 있음)이어도 된다.

[0167] 본 개시에서 사용되는 「시스틴」은, 시스틴(L-시스틴)과, 배지 첨가 후에 시스틴으로서 기능하는 시스틴염과, 그들의 수화물을 포함한다. 단, 시스틴 농도에 대하여 언급하는 경우에는, 시스틴(L-시스틴)의 농도를 의미한다.

[0168] 시스틴염으로서는, 시스틴2염산염, 시스틴2나트륨염, 시스틴2나트륨염1수화물 등을 들 수 있다. 수화물로서는, 시스틴2나트륨염1수화물을 들 수 있다. 복수의 시스틴 또는 시스틴염을 조합하여 사용하는 것도 가능하다.

[0169] 본 개시에서 사용되는 「시스테인원」이란, 필요에 따라서 분해 등의 과정을 거친 후에, 세포 내에서 시스테인으로서 이용될 수 있는 화합물을 의미한다. 시스테인원의 구체예로서는, 시스테인, 시스틴, 글루타티온을 들 수 있다.

[0170] 본 개시에서 사용되는 「시스테인원 농도」란, 시스테인원의 시스테인 환산의 농도를 말한다. 예를 들어, 시스틴의 경우, 시스테인원 농도는 시스틴 농도의 2배가 되고, 글루타티온의 경우에는 시스테인원 농도는 글루타티온 농도와 동등해진다.

[0171] 본 개시에서 사용되는 「시트르산철암모늄」은, 시트르산 이온과 제2철 이온과 암모늄 이온을 포함하는 시트르산철(III)암모늄 또는 그 수화물이면, 특별히 한정되는 것은 아니다. 시트르산철암모늄에 대해서는, 각 이온의 함유 비율에 의해 녹색과 적갈색의 것이 알려져 있지만, 모두 본 개시의 실시 형태에 적합하게 사용할 수 있다.

[0172] 본 개시에서 사용되는 「다른 철원」이란, 세포 배양 배지의 철원으로서 이용 가능한, 시트르산철암모늄 이외의 철 이온 함유 분자를 말한다. 다른 철원의 예로서는, 인산제2철, 피로인산제2철, 질산제2철, 황산제1철, 염화제2철, 락트산제1철, 시트르산제2철, 시트르산제1철나트륨, 에틸렌디아민4아세트산제2철나트륨, 덱스트란철 및 이들의 수화물, 그리고 이들의 임의의 조합이 포함된다.

[0173] 본 개시에 있어서의 「철 농도」(철 이온 농도)에 대해서는, 입수원(시판원 등)으로부터 철원 중의 철 함유량의 값(혹은, 철원의 분자식 등의 철 함유량으로 연결될 수 있는 정보)을 입수할 수 있는 경우, 그 값을 사용하여 철 농도의 이론값을 계산하는 것이 가장 바람직하지만, 그것을 할 수 없는 경우에는, 공지된 방법을 사용하여, 용액 중의 철 농도(철 이온 농도)를 정량해도 된다.

[0174] 용액 중의 철 농도를 정량하는 방법으로서는, 환원 등의 필요한 처리를 적절히 행한 다음의, 페난트롤린 흡광광도법, 프레임 원자 흡광법, 전기 가열 원자 흡광법 및 ICP 발광 분광 분석법을 들 수 있다.

[0175] 시트르산철암모늄을 첨가하는 경우에 있어서, 계산에 의해 철 농도의 이론값을 구할 때, 입수원으로부터 철 함유량의 값 등을 입수할 수 없고, 시트르산철암모늄의 분자식도 불명 또는 미확정인 경우에는, 간편함을 위해, 시트르산철암모늄의 철 함유량으로서 17.5질량%(적갈색의 경우) 또는 15질량%(녹색의 경우)를 사용할 수 있다.

[0176] 본 개시에 있어서의 「배지 첨가물」은, 배지에 첨가되는 임의의 물질 또는 물질을 포함하는 조성물을 가리킨다. 배지 첨가물은, 첨가하는 배지에 이미 존재하는 성분을 보충하는 것이어도, 첨가하는 배지에 존재하지 않는 성분을 신규로 추가하는 것이어도 된다. 배지 첨가물은 전형적으로는, 액체 형태 또는 분말 형태(과립

형태를 포함함)로 제공된다. 또한, 첨가의 목적은 특별히 한정되지 않는다.

[0177] 본 개시에서 사용되는 단수형 「a」, 「an」 및 「the」는, 별도로 명확하게 지시되지 않는 한, 복수의 대상을 포함할 수 있다.

[0178] 본 개시에서 사용되는 「및/또는」은, 「및」으로 표현되는 관계성과, 「또는」으로 표시되는 관계성의 양쪽을 포함한다.

[0179] 본 개시에 있어서의 「를 포함한다」에는, 「로 주로 이루어진다」, 「로 실질적으로 이루어진다」 및 「로 이루어진다」가 포함되고, 「로 주로 이루어진다」에는 「로 실질적으로 이루어진다」 및 「로 이루어진다」가 포함되고, 「로 실질적으로 이루어진다」에는 「로 이루어진다」가 포함된다.

[0180] 본 개시에 있어서의 각각의 수치 범위에 대해서는, 「내지」, 「로부터」로 나타내진 상한값 및 하한값을 각각 포함하는 것으로 한다. 예를 들어, 수치 A 및 B를 사용한 「A 내지 B」 또는 「A로부터 B」 되는 기재는, A 이상 B 이하인 것을 의미한다. 또한, 본 개시에 단계적으로 기재되어 있는 수치 범위에 있어서의 「A 내지 B」, 「A로부터 B」 또는 「A 이상 B 이하」라는 기재는, 독립적으로, 「A 이상이 바람직하다」와, 「B 이하가 바람직하다」의 양쪽을 포함하고, 이들 하한값 또는 상한값을 다른 수치 범위의 상한값 또는 하한값으로 치환해도 된다. 또한, 본 개시에 기재되어 있는 수치 범위의 하한값 또는 상한값은, 그 수치 범위 내의 수치이며, 실시예에서 나타내져 있는 수치로 치환해도 된다.

[0181] [실시 형태]

[0182] 이하, 발명을 실시하기 위한 형태를 사용하여, 본 발명을 상세하게 설명하지만, 본 발명이 이것에 한정되는 것은 아니다.

[0183] 이들 실시 형태는 단독으로도, 복수를 조합해도 된다. 또한, 각 실시 형태의 정의나 상세에 대해서는, 전술한 「용어의 설명」도 참조할 수 있다.

[0184] 본 개시에서 사용되는 공지된 기술 및 수순은, 당업자에게는 충분히 이해되는 것이며, 통상법에 따라서 실시할 수 있다.

[0185] 어떤 실시 형태에서는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 방법이며, 세포 배양 배지에 시스틴을 첨가하는 것을 포함하는, 방법이 제공된다. 이 방법에서는, 관류 배양 시의 재조합 단백질 산생이 향상됨으로써, 재조합 단백질 제조의 생산성이 향상된다.

[0186] 재조합 단백질 산생의 지표로서, 이것에 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어 배양조당 재조합 단백질 산생 속도(단위 시간당 산생량), 단위 배양 용적(배지 용적)당 재조합 단백질 산생 속도(단위 시간당 산생량), 단위 세포당 재조합 단백질 산생 속도(단위 시간당 산생량)를 사용할 수 있다. 이들의 예로서는, 각각, 1일당 재조합 단백질 산생량, 1일, 1L당 재조합 단백질 산생량 및 1일, 1 세포당 재조합 단백질 산생량을 들 수 있다. 어떤 실시 형태에서는, 상기 지표 중 적어도 하나에 있어서, 단백질 산생이 향상된다.

[0187] 단백질의 양은, 각각의 단백질에 따른 공지된 정량 방법에 의해 정량할 수 있다. 단백질의 정량 방법으로서는, 예를 들어, HPLC 등의 크로마토그래피와 단백질의 흡광(예를 들어, 280nm에서의 흡광)을 조합하여, 흡광 계수(아미노산 서열로부터의 계산값이나 BSA 등의 참조 단백질의 값 등을 기초로 한 것)와 흡광 피크 면적으로부터 정량하는 방법이나, 크로마토그래피(예를 들어 HPLC) 등으로 정제/조정제한 단백질의 흡광으로부터 정량하는 방법을 들 수 있다. 정제/조정제한 단백질에 대해서는, BCA법, Bradford법 또는 Lowry법 등을 사용하여 정량할 수도 있다.

[0188] 어떤 실시 형태에서는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 1 세포당 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 방법이며, 세포 배양 배지에 시스틴을 첨가하는 것을 포함하는, 방법이 제공된다. 1 세포당 재조합 단백질 산생의 지표로서는, 1 세포당 재조합 단백질 산생 속도(예를 들어, 1일, 1 세포당 단백질 산생량)를 사용할 수 있다. 재조합 단백질이 항체인 경우, 항체 생산 속도(SPR)가 적합하게 사용된다. 이 방법에서는, 관류 배양 시의 1 세포당 재조합 단백질 산생이 향상됨으로써, 재조합 단백질 제조의 비용이 억제되어, 생산성이 향상된다.

[0189] 1 세포당 재조합 단백질 산생은, 각각의 단백질에 따른 정량 방법에 의해 단백질을 정량하는 모두, 세포수를 계측함으로써 산출할 수 있다. 단백질의 정량 방법은 어느 방법을 사용해도 되고, 세포수의 계측도, 수동으로 계측해도, 기계를 사용하여 계측해도, 혹은 세포수를 정량화할 수 있는 시약을 사용한 생물·화학적 방법에 의해

정량화해도, 이들을 조합하여 계측해도 된다.

[0190] 1 세포당 재조합 단백질 산생이 향상됨으로써, 세포 유래의 불순물·협잡물에 대한 재조합 단백질의 비율(순도)이 증가하기 때문에, 그 후의 정제 공정이 보다 간편한 것으로 되어, 비용을 억제할 수 있다. 또한, 산생 시점에서의 단백질의 품질 개선은, 최종 제품의 품질 개선으로도 연결될 수 있고, 최종 제품의 품질 개선은, 의약 제품이 되었을 때의 안전성 등의 관점에서도 바람직하다.

[0191] 특히, 관류 배양은, 세포 배양 배지를 환류시키기 때문에, 다른 배양 방법과 비교하여, 보다 많은 배지를 소비하게 되어, 비용 증가로 연결될 수 있다는 개선점을 갖고 있었다. 1 세포당 재조합 단백질 산생이 향상됨으로써, 동일한 양의 세포 배양 배지를 사용했을 때, 보다 다량의 재조합 단백질을 얻을 수 있어(동일한 양의 재조합 단백질을 산생하는 데 보다 소량의 배지로 충분하여), 더 한층의 비용 저감·생산성의 향상으로 연결될 수 있다.

[0192] 어떤 실시 형태에서는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를 관류 배양하기 위한 방법이며, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 세포 배양 초발 배지에서 관류 배양하는 것; 및 세포 배양 배지에 시스틴을 첨가하는 것을 포함하는, 방법이 제공된다. 이 방법에서는, 재조합 단백질이 높은 산생능을 갖는 세포를 배양할 수 있다.

[0193] 이 방법에서는, 초발 배지와는 다른 관류 배양용의 관류 배지를 사용하고, 그 관류 배지와 함께 혹은 따로따로 시스틴을 첨가할 수도 있다.

[0194] 어떤 실시 형태에서는, 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법이며, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 세포 배양 초발 배지에서 관류 배양하는 것; 세포 배양 배지에 시스틴을 첨가하는 것; 및 재조합 단백질을 회수하는 것을 포함하는, 방법이 제공된다. 이 방법에서는, 우수한 생산성으로, 재조합 단백질을 제조할 수 있다.

[0195] 이 방법에서는, 초발 배지와는 다른 관류 배양용의 관류 배지를 사용하고, 그 관류 배지와 함께 혹은 따로따로 시스틴을 첨가할 수도 있다.

[0196] 본 개시의 실시 형태에 있어서의 관류 배양(Perfusion 배양)은, 특정한 관류 배양 방법에 한정되는 것은 아니며, 실시 시점에서 공지된 임의의 관류 배양법을 사용할 수 있다. 세포 분리 수단이나 배지의 공급 수단, 배양 조건 (CO_2 농도, DO, 배양 온도, 배양 시간 등)·배양 규모나 배양조에 대해서도, 특별히 한정되지 않고, 배양하는 세포의 성질이나 산생하는 재조합 단백질의 성질 등을 고려한 후, 공지된 조건 등으로부터 적절히 선택하여 실시할 수 있다. 예시적인 배양 조건으로서는, 배양 온도 30 내지 40℃, CO_2 농도 0 내지 40%, DO 20 내지 70%, 배양 시간 1 내지 90일, 배양액량 10mL 내지 2000L, 및/또는 관류량 1일당 0.1 내지 30 배양량을 들 수 있다. 동물 세포는, 바람직하게는 재조합 단백질이 발현되는 조건 하 또는 재조합 단백질의 발현에 적합한 조건 하에서 배양된다.

[0197] 관류 배양에 사용하는 세포 배양 배지에 대해서는, 특정한 것에 한정되는 것은 아니며, 배양하는 세포나 산생하는 재조합 단백질을 고려하여 적절히 선택할 수 있다. 세포 배양 배지는, 바람직하게는 화학적으로 정의된 세포 배양 배지(CDM)이다. 또한, 초발 배지와 관류 배지는, 동일하거나 또는 유사한 조성이어도, 다른 조성이어도 된다. 본 개시의 실시 형태에 있어서, 특별한 언급없이 「배지」, 「배양 배지」 또는 「세포 배양 배지」라고 할 때, 이것은 관류 배양 개시 시의 배지인 「초발 배지」와, 관류를 위해 새롭게 첨가하는 배지인 「관류 배지」의 양쪽 모두를 의미한다.

[0198] 본 개시의 실시 형태에 있어서, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 전형례로서는, 재조합 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 동물 세포를 들 수 있다. 재조합 단백질을 코딩하는 핵산은 게놈에 도입되어 있어도 된다.

[0199] 본 개시의 실시 형태에 있어서의 동물 세포로서는 임의의 동물 세포를 사용할 수 있지만, 주화 세포, 특히 재조합 단백질의 제조에 유용한 동물 세포주가 바람직하다.

[0200] 동물 세포는, 이것에 한정되는 것은 아니지만, 바람직하게는 곤충 세포 및 포유 동물 세포이며, 보다 바람직하게는 포유 동물 세포이다.

[0201] 적합한 곤충 세포주의 예로서는, Sf9 세포, Sf21 세포, SF+ 세포를 들 수 있다.

[0202] 적합한 포유 동물 세포주의 예로서는, BHK21 세포 및 CHO 세포를 들 수 있고, 특히 바람직한 것은 차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO 세포)이다. CHO 세포에는, CHO 세포로부터 파생한 다양한 아주(예를 들어, CHO-K1 세포,

CHO-S 세포, CHO-DXB11 세포(CHO-DUKX 세포 또는 DuxB11 세포라고도 칭해짐) 또는 CHO-DG44 세포)도 포함된다.

[0203] 본 개시의 실시 형태에 있어서, 대상이 되는 재조합 단백질은 특정한 것에 한정되지 않고, 임의의 재조합 단백질을 대상으로 할 수 있다. 재조합 단백질의 적합한 예는, 항체이다.

[0204] 본 개시의 실시 형태에 있어서의 시스틴에 대해서는, 첨가 후에 배지 중에서 시스틴(L-시스틴)으로서 기능하는 것이면 무엇이든지 좋지만, 시스틴의 가용성을 높이는 관점에서 pH를 10 이상으로 조정한 시스틴 함유액을 배지에 첨가하는 것이 바람직하다.

[0205] 시스틴을 첨가하는 시기 및 대상 배지에 대해서는 특별히 한정되는 것은 아니며, 배양 개시 전의 초발 배지에 첨가해도 되고, 관류 배지 및/또는 배양 개시 후의 초발 배지에 첨가해도 된다. 또한, 시스틴은 배지에 대하여 한번에 첨가해도 되고, 복수회로 나누어서 첨가해도 된다. 시스틴은, 바람직하게는 배양 개시 후에 배지에 첨가되고, 보다 더욱 바람직하게는 관류 배지에 첨가된다. 특히 시스틴 농도가 높은 경우, 배양 개시 후에 시스틴을 첨가함으로써, 보다 양호한 세포의 생육으로 연결될 수 있다. 배양 개시 후에 시스틴을 첨가하는 경우, 예를 들어 배양 개시 1시간 후 이후에 첨가되어도 되지만, 바람직하게는 배양 개시 6시간 후 이후, 보다 바람직하게는 24시간 후 이후, 보다 더욱 바람직하게는 72시간 후 이후에 첨가된다. 첨가 시에는, 시스틴을 직접 배지에 첨가해도, 시스틴을 용해·현탁시킨 용액·현탁액 또는 배지를 첨가해도 된다. 관류 배지에 시스틴을 첨가할 때에는, 시스틴 함유 배지를 미리 조제하고, 그것을 관류 배지로서 사용해도 된다.

[0206] 첨가하는 시스틴의 양은, 발명의 효과를 발휘하는 범위 내에서 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어 첨가 후(첨가 직후)의 배지 중의 시스틴 농도가 0.5mM 내지 10mM이 되는 양을 들 수 있다. 첨가 후(첨가 직후)의 배지 중의 시스틴 농도는, 바람직하게는 0.7mM 내지 10mM 또는 0.8mM 내지 10mM, 보다 바람직하게는 1mM 내지 10mM, 보다 더욱 바람직하게는 1.5mM 내지 10mM, 특히 바람직하게는 2mM 내지 10mM, 특히 보다 바람직하게는 2.1mM 내지 10mM, 혹은 2.5mM 내지 10mM이다. 시스틴 첨가량이 이들 범위에 있을 때, 특히 우수한 효과를 발휘할 수 있다. 상기 범위보다 저농도의 시스틴을 첨가한 후에, 상기 범위 내가 되도록 시스틴을 추가 첨가하는 것도 상기 실시 형태에 포함된다.

[0207] 본 개시의 실시 형태에 있어서의 시스틴은, 동물 세포에서 시스테인원으로서 사용된다. 그 때문에, 본 개시의 어느 실시 형태에 따르면, 배지 중의 시스테인원 농도를 제한할 수 있다.

[0208] 즉, 본 개시의 추가의 실시 형태에서는, 초발 배지 및/또는 관류 배지의 시스테인원 농도는, 예를 들어 0.1mM 내지 3mM, 바람직하게는 0.1mM 내지 2.1mM, 보다 바람직하게는 0.1mM 내지 1.5mM이다. 바람직하게는 초발 배지의 시스테인원 농도가 상기 범위 내이다. 보다 바람직하게는, 초발 배지 및 관류 배지의 시스테인원 농도가 상기 범위이다. 이들 시스테인원 농도의 시스테인원에 더하는 형태로, 추가로, 전술한 어느 형태로 시스틴을 첨가해도 된다.

[0209] 다른 실시 형태에서는, 시스테인원이 시스틴 이외의 시스테인원이며, 시스틴 이외의 시스테인원이 상기 농도 범위 내이다. 이 때, 상기 농도 범위의 시스틴 이외의 시스테인원과는 별도로, 시스틴이 첨가되어 있어도 된다. 시스틴 이외의 시스테인원은, 바람직하게는 시스테인이다.

[0210] 다른 실시 형태에서는, 초발 배지 및/또는 관류 배지는 시스틴 이외의 시스테인원을 포함하지 않고, 시스틴만을 시스테인원으로서 함유하고 있어도 된다.

[0211] 시스테인은 배지 안정성에 악영향을 줄 수 있기 때문에, 초발 배지에서의 시스테인원 농도가 낮은 것은, 배지 안정성 상에서 유리해진다.

[0212] 특히 관류 배양은, 다른 배양 방법(예를 들어, 유가 배양(Fed-batch 배양))에 비해, 배지 사용량이 매우 많아지기 때문에, 대량의 배지를 미리 조제할 필요가 있고, 이 대량 조정 시에 배지 안정성을 높이는 매우 유리한 특성이 된다. 즉, 이 효과는, 관류 배양에 있어서 특히 바람직한 효과라고 할 수 있다.

[0213] 본 개시의 실시 형태에 있어서의 「재조합 단백질 산생을 향상시킨다」 또는 「재조합 단백질 산생이 향상된다」란, 본 개시 외의 조건에서 실시했을 때와 비교하여, 재조합 단백질 산생이 향상되는 것을 의미하지만, 바람직하게는 시스테인 환산으로 시스틴과 등몰 농도의 시스테인을 첨가한 경우와 비교하여, 재조합 단백질 산생이 향상된다.

[0214] 즉, 본 개시의 추가의 실시 형태에서는, 시스테인 환산으로 시스틴과 등몰 농도의 시스테인을 첨가한 경우와 비교하여, 재조합 단백질 산생 또는 재조합 단백질 산생능이 향상된다. 실시예에서 나타내진 바와 같이, 놀랍게도, 시스테인 환산으로 시스틴과 등몰 농도의 시스테인을 첨가한 경우와 비교하여, 본 개시의 실시 형태의 방법

에서는, 재조합 단백질 산생 또는 재조합 단백질 산생능이 향상된다.

[0215] 시스틴은 2개의 시스테인이 S-S 결합으로 연결되어 있는 것이며, 시스테인 환산으로 등몰 농도란, 시스틴 농도가 시스테인의 절반의 몰 농도인 것을 의미한다.

[0216] 본 개시의 추가의 실시 형태에서는, 재조합 단백질 산생 또는 재조합 단백질 산생능이 10% 이상 향상된다. 재조합 단백질 산생 또는 재조합 단백질 산생능은, 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 30% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 40% 이상 향상된다.

[0217] 또한, 본 개시의 추가의 실시 형태를 달성할 수 있는 재조합 단백질의 산생능으로서는, 예를 들어 5 내지 20g/L/day, 바람직하게는 5.5 내지 20g/L/day, 보다 바람직하게는 6 내지 20g/L/day, 보다 더욱 바람직하게는 7 내지 20g/L/day를 들 수 있다. 재조합 단백질의 산생능의 다른 지표로서는, 예를 들어 20 내지 200pg/cell/day, 바람직하게는 24 내지 150pg/cell/day, 보다 더욱 바람직하게는 25 내지 120pg/cell/day를 들 수 있다. 또한, 기타 범위로서, 20 내지 40pg/cell/day, 23 혹은 24 내지 40pg/cell/day, 또는 25 내지 40pg/cell/day를 들 수도 있다.

[0218] 본 개시의 실시 형태에 의해 재조합 단백질을 제조할 때에는, 전술한 공정에 더하여, 추가로 각종 추가 공정을 포함해도 되고, 그들도 본 개시의 실시 형태에 포함된다. 추가적인 공정으로서는, 재조합 단백질을 정제하는 것이나, 재조합 단백질을 화학적 또는 생물학적으로 수식하는 것을 들 수 있다.

[0219] 재조합 단백질의 정제에는 통상, 복수의 방법이 조합되어 사용되지만, 크로마토그래피가 적합하게 사용된다. 특히, 재조합 단백질이 항체인 경우에는, 친화성 크로마토그래피나 프로테인 A 크로마토그래피 등이 적합하게 사용된다.

[0220] 재조합 단백질의 화학적 또는 생물학적인 수식으로서는, 이것에 한정되는 것은 아니지만, 디술피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 아미드화, 보호기 등에 의한 유도체화, 절단, 또는 표지 성분 혹은 약물(독소 등) 등의 결합을 들 수 있다. 일례로서, 독소 등의 약물과 결합한 항체의 제조 방법도, 본 개시의 재조합 단백질 제조 방법에 포함되고, 그 경우, 추가적인 공정으로서, 항체와 약물을 결합시키는 것을 더 포함하고 있어도 된다. 이 경우에는, 약물과 결합한 항체는, 본 개시의 재조합 단백질에 포함된다.

[0221] 본 개시의 추가의 실시 형태에서는, 후술하는 시트르산철암모늄에 관한 실시 형태가, 상기 실시 형태와 조합된다.

[0222] 즉, 본 개시의 추가의 실시 형태에서는, 세포 배양 배지가 시트르산철암모늄을 포함한다. 시트르산철암모늄을 사용하는 실시 양태의 상세에 대해서는, 후술하는 설명을 참조할 수 있고, 후술하는 각종 실시 형태를 조합할 수 있다.

[0223] 본 개시의 다른 실시 형태는, 시스틴을 유효 성분으로서 포함하는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 제이다. 이 제는, 관류 배양 시의 재조합 단백질 산생을 향상시킴으로써, 재조합 단백질 제조의 생산성을 향상시킬 수 있다.

[0224] 상기 제의 실시 형태는, 시스틴을 유효 성분으로서 포함하는 한, 특정한 형태에 한정되는 것은 아니며, 시스틴만을 포함하여도, 혹은 담체나 pH 조정제, 배지 등을 포함하는 조성물의 형이어도 상관없다. 또한, 제는 액체의 형태이면 되고, 고체, 예를 들어 분말의 형태(과립의 형태를 포함함)여도 된다.

[0225] 상기 제의 실시 형태는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 재조합 단백질 산생을 향상시키는 것을 용도로 하는 것이다. 용도는, 바람직하게는 제의 판매용 팸플릿, 사용 설명서, 제품에 관한 웹 사이트 등에 있어서 기재된다. 이 경우, 용도는 제의 효과로서 기재될 수도 있다. 또한, 제의 구체적인 사용법으로서는, 배양 전(배지 조제 시) 또는 배양 중에 있어서의 배지 첨가물로서의 사용을 들 수 있다.

[0226] 상기 제의 실시 형태의 상세나 그 추가의 실시 형태에 대해서는, 전술한 방법의 실시 형태의 상세나 각 실시 형태를 참조로 할 수 있고, 그 구성이나 상세가 본 실시 형태에도 원용된다.

[0227] 상기 제의 실시 형태에 관련되는 실시 형태로서, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 제로서의 시스틴의 사용, 또는 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 시스틴 사용을 들 수 있고, 이들 실시 형태도 상기 제의 실시 형태와 마찬가지로 실시할 수 있다.

[0228] 지금까지 시스틴을 사용한 실시 형태에 대하여 설명해왔지만, 본 발명자들은, 철원으로서의

시트르산철암모늄도, 재조합 단백질의 생산성 향상에 기여하는 것을 알아내었다.

[0229] 즉, 본 개시의 어느 실시 형태는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 방법이며, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 시트르산철암모늄을 포함하는 세포 배양 배지에서 관류 배양하는 것을 포함하는, 방법이다. 이 방법에서는, 관류 배양 시의 재조합 단백질 산생이 향상되고, 재조합 단백질 제조의 생산성이 향상된다.

[0230] 본 개시의 어느 실시 형태는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 1 세포당 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 방법이며, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 시트르산철암모늄을 포함하는 세포 배양 배지에서 관류 배양하는 것을 포함하는, 방법이다. 이 방법에서는, 관류 배양 시의 1 세포당 재조합 단백질 산생이 향상됨으로써, 재조합 단백질 제조의 비용이 억제되어, 생산성이 향상된다.

[0231] 본 개시의 실시 형태에 있어서의 「재조합 단백질 산생을 향상시킨다」 또는 「재조합 단백질 산생이 향상된다」란, 본 개시 외의 조건에서 실시했을 때와 비교하여, 재조합 단백질 산생이 향상되는 것을 의미하지만, 바람직하게는 세포 배양 배지가 시트르산철암모늄 대신에 다른 철원을 포함하는 경우와 비교하여, 재조합 단백질 산생이 향상된다.

[0232] 즉, 본 개시의 추가의 실시 형태에서는, 세포 배양 배지가 시트르산철암모늄 대신에 다른 철원을 포함하는 경우와 비교하여, 재조합 단백질 산생 또는 재조합 단백질 산생능이 향상된다. 실시예에서 나타내진 바와 같이, 놀랍게도, 세포 배양 배지가 시트르산철암모늄 대신에 다른 철원을 포함하는 경우와 비교하여, 본 개시의 실시 형태의 방법에서는, 재조합 단백질 산생 또는 재조합 단백질 산생능이 향상된다.

[0233] 본 개시의 추가의 실시 형태에서는, 다른 철원은, 시트르산제1철나트륨이다. 본 실시 형태는, 철원으로서 일반적인 시트르산제1철나트륨을 사용한 경우와 비교하여, 우수한 효과를 발휘한다.

[0234] 본 개시의 추가의 실시 형태에서는, 재조합 단백질 산생 또는 재조합 단백질 산생능이 10% 이상 향상된다. 재조합 단백질 산생 또는 재조합 단백질 산생능은, 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 30% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 40% 이상 향상된다.

[0235] 또한, 본 개시의 추가의 실시 형태를 달성할 수 있는 재조합 단백질의 산생능으로서는, 예를 들어 5 내지 20g/L/day, 바람직하게는 5.5 내지 20g/L/day, 보다 바람직하게는 6 내지 20g/L/day, 보다 더욱 바람직하게는 7 내지 20g/L/day를 들 수 있다. 재조합 단백질의 산생능의 다른 지표로서는, 예를 들어 20 내지 200pg/cell/day, 바람직하게는 24 내지 150pg/cell/day, 보다 더욱 바람직하게는 25 내지 120pg/cell/day를 들 수 있다. 또한, 기타 범위로서, 20 내지 40pg/cell/day, 23 혹은 24 내지 40pg/cell/day, 또는 25 내지 40pg/cell/day를 들 수도 있다.

[0236] 어떤 실시 형태에서는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를 관류 배양하기 위한 방법이며, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 시트르산철암모늄을 포함하는 세포 배양 배지에서 관류 배양하는 것을 포함하는, 방법이 제공된다. 이 방법에서는, 재조합 단백질이 높은 산생능을 갖는 세포를 배양할 수 있다.

[0237] 본 개시의 어느 실시 형태는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 세포 증식 속도를 저하시키기 위한 방법이며, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 시트르산철암모늄을 포함하는 세포 배양 배지에서 배양하는 것을 포함하는, 방법이다. 이 방법에서는, 관류 배양에 있어서의 세포 증식 속도가 저하됨으로써, 재조합 단백질 제조의 생산성이 향상된다.

[0238] 본 개시의 어느 실시 형태는, 재조합 단백질의 산생을 향상시키면서, 세포 증식을 억제할 수 있고, 그 경우에는, 원하는 재조합 단백질의 산생량은 유지하면서, 필요한 배지량 등을 억제할 수 있다. 또한, 동일한 양의 재조합 단백질에 있어서의 세포 유래의 불순물도 저감시킬 수 있어, 정제 비용의 삭감이나 품질의 향상에도 기여한다.

[0239] 본 개시의 실시 형태에 있어서의 「세포 증식 속도를 저하시킨다」 또는 「세포 증식 속도가 저하된다」란, 본 개시 외의 조건에서 실시했을 때와 비교하여, 세포 증식 속도가 저하되는 것을 의미하지만, 바람직하게는 세포 배양 배지가 시트르산철암모늄 대신에 다른 철원을 포함하는 경우와 비교하여, 세포 증식 속도가 저하된다.

[0240] 본 개시의 추가의 실시 형태에서는, 다른 철원은 시트르산제1철나트륨이다. 본 실시 형태는, 철원으로서 일반적인 시트르산제1철나트륨과 비교하여, 우수한 효과를 발휘한다.

[0241] 본 개시의 추가의 실시 형태에서는, 세포 증식 속도가 10% 이상 저하된다. 세포 증식 속도는, 바람직하게는

20% 이상, 보다 바람직하게는 30% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 40% 이상 저하된다.

[0242] 본 개시의 어느 실시 형태는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서 배출하는 배양액의 양을 감소시키기 위한 방법이며, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포를, 시트르산철암모늄을 포함하는 세포 배양 배지에서 관류 배양하는 것을 포함하고, 상기 배출하는 배양액의 양은 블리딩 공정에 있어서 배출하는 배양액의 양이며, 블리딩 공정은, 배양조로부터 배양액을 배출하고, 당해 배출한 배양액과 동량의 신선 배지를 상기 배양조에 첨가하는 공정인, 방법이다. 이 방법에서는, 배출하는 배양액의 양이 감소됨으로써, 재조합 단백질 제조의 생산성이 향상된다. 배출하는 배양액의 감소는, 세포 증식이 억제됨으로써 초래된다.

[0243] 본 개시의 실시 형태에 있어서의 「배출하는 배양액의 양을 감소시킨다」 또는 「배출하는 배양액의 양이 감소된다」란, 본 개시 외의 조건에서 실시했을 때와 비교하여, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서 배출되는 배양액의 양이 감소하는 것을 의미한다. 배출하는 배양액의 양의 지표로서는, 이것에 한정되는 것은 아니지만, 블리딩 공정 전체 혹은 그 중의 일정 시간에서 배출된 배양액의 총량이나 단위 시간 내에 배출된 배양액의 양(배양액의 배출 속도)이 사용된다.

[0244] 본 개시의 어느 실시 형태는, 재조합 단백질의 산생을 향상시키면서, 배출하는 배양액의 양을 감소시킬 수 있고, 그 경우에는, 원하는 재조합 단백질의 산생량은 유지하면서, 필요한 배지량 등을 억제할 수 있다. 또한, 세포 외에 분비되는 재조합 단백질에 대해서는, 배출하는 배양액의 양이 감소됨으로써, 보다 고농도에서의 생산이 가능해지고, 그 후의 품질이나 정제 비용의 점에서도 유리해진다.

[0245] 본 개시의 추가의 실시 형태는, 세포 배양 배지가 시트르산철암모늄 대신에 다른 철원을 포함하는 경우와 비교하여, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서 배출하는 배양액의 양을 감소시킨다. 본 실시 형태에서는, 실시예에서 나타내진 바와 같이, 놀랍게도, 세포 배양 배지가 시트르산철암모늄 대신에 다른 철원을 포함하는 경우와 비교하여, 배출하는 배양액의 양이 감소된다.

[0246] 본 개시의 추가의 실시 형태에서는, 다른 철원은 시트르산제1철나트륨이다. 본 실시 형태는, 철원으로서 일반적인 시트르산제1철나트륨과 비교하여, 우수한 효과를 발휘한다.

[0247] 본 개시의 추가의 실시 형태에서는, 배출하는 배양액의 양이 10% 이상 감소된다. 배출하는 배양액의 양은, 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 30% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 40% 이상 감소된다.

[0248] 본 개시의 실시 형태에 있어서의 시트르산철암모늄은 시트르산철(III)암모늄 또는 시트르산제2철암모늄이라고도 표기될 수 있다. 시트르산철암모늄은 초발 배지 및/또는 관류 배지에 첨가된다. 첨가 시에는, 시트르산철암모늄을 직접 배지에 첨가해도, 시트르산철암모늄을 용해·현탁시킨 용액·현탁액 또는 배지를 첨가해도 된다.

[0249] 첨가하는 시트르산철암모늄의 양은, 발명의 효과를 발휘하는 범위 내에서 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어 첨가 후의 배지 중에 있어서 시트르산철암모늄에서 유래하는 철 농도(철 이온 농도)가 10mg/L 내지 300mg/L이 되는 양을 들 수 있다. 본 개시에서는, 이러한 철 농도를, 예를 들어 「10mg/L 내지 300mg/L의 철 농도를 부여하는 양」이라는 표현을 사용하여 나타내는 경우가 있다. 철 농도는, 바람직하게는 20mg/L 내지 200mg/L 또는 30mg/L 내지 200mg/L, 보다 바람직하게는 40mg/L 내지 200mg/L 또는 40mg/L 내지 150mg/L, 보다 더욱 바람직하게는 50mg/L 내지 200mg/L 또는 50mg/L 내지 150mg/L이다. 시트르산철암모늄이 이들 범위에 있을 때, 특히 우수한 효과를 발휘할 수 있다.

[0250] 다른 실시 형태에서는, 첨가하는 시트르산철암모늄의 양에 대해서는, 발명의 효과를 발휘하는 범위 내에서 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어 세포 배양 배지는 50mg/L 내지 1500mg/L의 시트르산철암모늄을 포함한다. 시트르산철암모늄의 농도는, 바람직하게는 100mg/L 내지 1000mg/L 또는 150mg/L 내지 1000mg/L, 보다 바람직하게는 200mg/L 내지 1000mg/L 또는 200mg/L 내지 750mg/L, 보다 더욱 바람직하게는 250mg/L 내지 1000mg/L 또는 250mg/L 내지 750mg/L이다. 시트르산철암모늄이 이들 범위에 있을 때, 특히 우수한 효과를 발휘할 수 있다.

[0251] 어떤 실시 형태에서는, 세포 배양 배지는, 상술한 시트르산철암모늄에 더하여, 다른 철원을 포함하고 있어도 된다.

[0252] 다른 철원을 포함할 때, 그 양은 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예시적인 철원의 양으로서는, 시트르산철암모늄도 포함한 배지 중의 철 농도가 1mg/L 내지 400mg/L, 10mg/L 내지 300mg/L, 20mg/L 내지 200mg/L, 30mg/L 내지 200mg/L, 40mg/L 내지 200mg/L, 40mg/L 내지 150mg/L, 50mg/L 내지 200mg/L 또는 50mg/L 내지 150mg/L이 되는 양을 들 수 있다.

[0253] 상기 시트르산철암모늄에 관한 실시 형태의 상세나 추가의 실시 형태에 대해서는, 전술한 시스틴에 관한 실시 형태의 상세나 구체적인 실시 형태를 참조로 할 수 있고, 그 구성이나 상세가 시트르산철암모늄에 관한 실시 형태에도 원용된다.

[0254] 예를 들어, 시트르산철암모늄에 관한 실시 형태에 있어서의 재조합 단백질, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포, 관류 배양 또는 재조합 단백질 산생량의 증가에 대해서는, 전술한 시스틴에 관한 실시 형태에 있어서의 재조합 단백질, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포, 관류 배양 또는 재조합 단백질 산생량의 증가의 설명을 참작할 수 있다.

[0255] 본 개시의 다른 실시 형태는, 시트르산철암모늄을 유효 성분으로서 포함하는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 제이다. 이 제는, 관류 배양 시의 재조합 단백질 산생을 향상시킴으로써, 재조합 단백질 제조의 생산성을 향상시킬 수 있다.

[0256] 또한, 본 개시의 다른 실시 형태는, 시트르산철암모늄을 유효 성분으로서 포함하는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 세포 증식 속도를 저하시키기 위한 제, 또는 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서 배출하는 배양액의 양을 저하시키기 위한 제이다.

[0257] 상기 제의 실시 형태는, 시트르산철암모늄을 유효 성분으로서 포함하는 한, 특정한 형태에 한정되는 것은 아니며, 시트르산철암모늄만을 포함하여도, 혹은 담체나 pH 조정제, 배지 등을 포함하는 조성물의 형이어도 상관없다. 또한, 제는 액체의 형태이면 되고, 고체, 예를 들어 분말의 형태(과립의 형태를 포함함)여도 된다.

[0258] 상기 제의 실시 형태는 각각, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 재조합 단백질 산생을 향상시키는 것, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 세포 증식 속도를 저하시키는 것, 또는 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서 배출하는 배양액의 양을 감소시키는 것을 용도로 하는 것이다. 용도는, 바람직하게는 제의 판매용 팸플릿, 사용 설명서, 제품에 관한 웹 사이트 등에 있어서 기재된다. 이 경우, 용도는 제의 효과로서 기재될 수도 있다. 또한, 제의 구체적인 사용법으로서는, 배양 전(배지 조제 시) 또는 배양 중에 있어서의 배지 첨가물로서의 사용을 들 수 있다.

[0259] 상기 실시 형태의 상세나 추가의 구체적인 실시 형태에 대해서는, 전술한 방법의 실시 형태의 상세나 각 실시 형태(시스틴에 관한 실시 형태를 원용한 부분을 포함함)를 참조로 할 수 있고, 그 구성이나 상세가 본 실시 형태에도 원용된다.

[0260] 상기 제의 실시 형태에 관련되는 실시 형태로서, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 제로서의 시트르산철암모늄의 사용, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 재조합 단백질 산생을 향상시키기 위한 시트르산철암모늄의 사용, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 세포 증식 속도를 저하시키기 위한 제로서의 시트르산철암모늄의 사용, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서의 세포 증식 속도를 저하시키기 위한 시트르산철암모늄의 사용, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서 배출하는 배양액의 양을 저하시키기 위한 제로서의 시트르산철암모늄의 사용, 또는 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양에 있어서 배출하는 배양액의 양을 저하시키기 위한 시트르산철암모늄의 사용을 들 수 있고, 이들 실시 형태도 상기 제의 실시 형태와 마찬가지로 실시할 수 있다.

[0261] 본 개시의 다른 실시 형태는, 시스틴 및 시트르산철암모늄을 포함하는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 동물 세포의 관류 배양을 위한 세포 배양 배지이다. 이 배지는, 상술한 시스틴에 관한 실시 형태와 시트르산철암모늄에 관한 실시 형태의 작용 및 효과를 양쪽 모두 발휘함으로써, 재조합 단백질 제조의 생산성을 향상시킬 수 있다. 배지는 초발 배지로서 사용되어도 되고, 관류 배지로서 사용되어도 된다. 또한, 배지에는, 액체 배지 및 분말 배지의 양쪽을 포함한다.

[0262] 상기 실시 형태의 상세나 추가의 구체적인 실시 형태에 대해서는, 전술한 방법의 실시 형태의 상세나 각 실시 형태(시스틴에 관한 실시 형태를 원용한 부분을 포함함)를 참조로 할 수 있고, 그 구성이나 상세가 상기 실시 형태에도 원용된다.

[0263] 또한, 상기 실시 형태 등에 의해 설명되는 각 방법 등은, 본 발명을 한정하는 것은 아니고, 예시하는 것을 의도하여 개시되어 있는 것이다. 본 발명의 기술적 범위는, 특허 청구 범위의 기재에 의해 정해지는 것이며, 당업자는 특허 청구 범위에 기재된 발명의 기술적 범위에 있어서 각종 설계적 변경이 가능하다.

[0264] 예를 들어, 어떤 실시 형태에서는, 본 개시의 실시 형태에서 제조된 재조합 단백질이 제공된다. 또한, 다른 실

시 형태는, 그 재조합 단백질을 포함하는 약학적 조성물 또는 의약, 그 재조합 단백질의 의약 제조에 있어서의 사용, 혹은 그 재조합 단백질을 투여하는 것을 포함하는 질환의 치료 방법에 관한 것이다. 또한, 다른 실시 형태는, 본 개시의 실시 형태에 관한 어느 공정 또는 본 개시의 실시 형태에 관한 어느 방법을 포함하고, 그것에 의해 재조합 단백질을 얻는 것을 포함하고, 또한 그 재조합 단백질과 담체를 혼합하는 것을 포함하는, 의약 조성물 또는 의약 제제의 제조 방법에도 관한 것이다.

[0265] **실시예**

[0266] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 설명하지만, 이들 실시예는 본 발명을 한정하는 것은 아니다. 또한, 실시예에서 언급되고 있는 시판 시약·기기 등은, 특별히 나타내지 않는 한, 제조자의 사용 설명 혹은 통상적인 방법을 따라 사용하였다.

[0267] [재료 및 방법]

[0268] (세포)

[0269] 모든 실험에 대해서, 인간화 IgG 항체를 산생하는 CHO 세포주(DXB-11주; G. Urlaub et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, 1980)를 사용하였다.

[0270] (세포 배양 조건)

[0271] 관류 배양

[0272] 전체 용량 2L의 바이오리액터에 화학적으로 정의된 세포 배양 배지를 첨가하고, 이것에 상기 CHO 세포주를 파종하여, 배양액량 1L, 37℃에서 배양을 개시하였다. DO는 50%, pH는 7.15±0.05로 제어하였다. 배양 1일째부터, 화학적으로 정의된 관류 배지에서, 2.0㎛의 중공사 필터(Repligen, MA, US)를 갖는 교호 접선류 관류 여과 시스템(Refine Technologies, Hanover, NJ)을 사용하여, 1일당 1.0 내지 5.0 배양량으로 관류를 실시하였다.

[0273] 리피트 배양

[0274] 충분량의 상기 CHO 세포주 배양액을 원심하여 상청을 제거한 후, $100x10^5$cells/mL가 되도록 화학적으로 정의된 관류 배지에 현탁시키고, 125mL 삼각 플라스크(Corning, NY, US)에서, 배양액량 20mL, 37℃에서 배양을 개시하였다. 배양 4일째까지 1일마다, 배양액을 원심하여 상청을 제거한 후, $100x10^5$cells/mL가 되도록 화학적으로 정의된 신선한 관류 배지에 재현탁시키고, 배양액량 20mL, 37℃에서 배양을 계속하였다.

[0275] (분석 방법)

[0276] 생세포 밀도·생존율 측정은 Vi-CELL(Beckman Coulter, CA, US)을 사용하고, 역가는 배양액의 원심 상청을 Protein A-HPLC법(아미노산 서열로부터 계산한 흡광 계수와 A280의 피크 면적을 기초로 산출)을 사용하여 측정하였다.

[0277] [실시예 1]

[0278] 시스테인 및 시스틴에 의한 시스테인원 증강 평가

[0279] 본 예는, 시스테인원으로서 시스테인을 증강시키기보다도, 시스틴을 증강시킨 쪽이 생산성이 향상되는 것을 실증하였다. 조건 (1)(시스테인을 3.379mM 포함하는 관류 배지), 조건 (2)(시스테인을 5.333mM 포함하는 관류 배지), 조건 (3)(시스테인을 1.942mM, 시스틴을 1.696mM 포함하는 관류 배지)을 사용하여, 관류 배양(배양 개시 72시간 후에서 시스틴 첨가)에 의한 평가를 실시하였다. 또한, 1.25배 농축한 CELLiST(등록 상표) 기본 배지(Basal media)(아지노모토 가부시키가이샤: BASAL10)와, CELLiST(등록 상표) 공급 배지(Feed media)(아지노모토 가부시키가이샤: FEED2)를 94:6으로 혼합한 것을 세포 배양 초발 배지 및 관류 배지로서 사용하였다. 도 1에 결과를 나타낸다. 조건 (1)과 비교하여, 시스테인원을 증강한 조건 (2), 조건 (3)은 모두 생산성이 향상되었지만, 놀랍게도, 시스테인 환산으로 동등한 mol 농도로 증강한 조건 (2), 조건 (3)에서는, 시스틴으로서 증강한 조건 (3)쪽이 더욱 생산성이 향상되어 있었다.

[0280] [실시예 2]

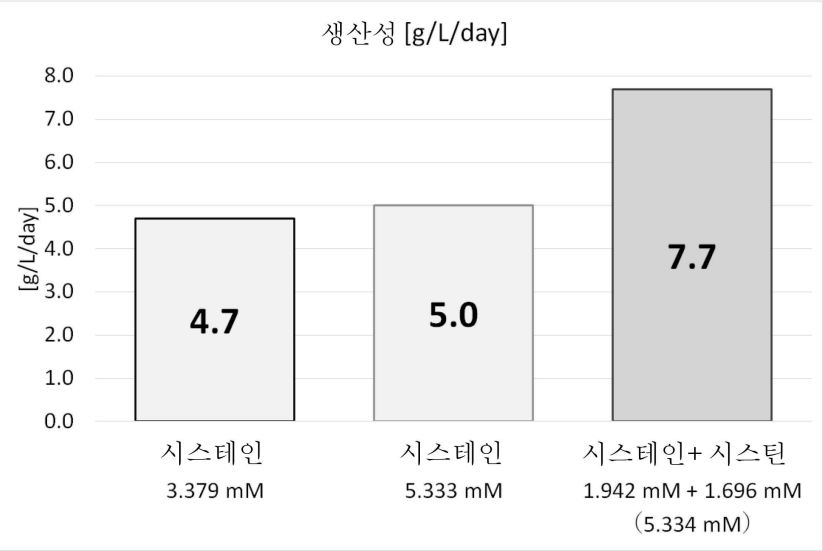
[0281] 시트르산제1철나트륨 및 시트르산철암모늄에 의한 철원 증강 평가

[0282] 본 예는, 철원으로서 시트르산철암모늄을 증강함으로써, 생산성이 대폭 향상되는 한편, 증식성이 억제되는 것을 실증하였다. 세포 배양 초발 배지 및 관류 배지는 철원을 포함하지 않는 형으로 조제되고, 대응하는 양의 시트르산제1철나트륨 및 시트르산철암모늄 각 농축액을 첨가함으로써 철 최종 농도를 조정하였다. 또한, 세포 배양 초발 배지 및 관류 배지로서 CELLiST(등록 상표) 기본 배지(아지노모토 가부시키가이샤: BASAL10)를 사용하였다. 평가는 리피트 배양으로 실시하였다. 결과를 도 2에 나타낸다. 철원을 증강함으로써 생산성이 향상되었지만, 놀랍게도, 시트르산철암모늄으로서 증강한 쪽이, 생산성이 보다 향상된 한편으로 증식성이 둔화되어 있었다.

[0283] 또한, 본 개시에 인용된 특허, 특허 출원 및 출판물의 개시 내용은, 그 전체가, 참조에 의해 본 개시에 원용된다.

도면

도면1



도면2

