



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2014-0132017  
 (43) 공개일자 2014년11월14일

- |  |  |
|--|--|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>C12N 5/02 (2006.01) C12N 5/07 (2010.01)<br>C12P 21/00 (2006.01)<br>(21) 출원번호 10-2014-7030328(분할)<br>(22) 출원일자(국제) 2007년09월13일<br>심사청구일자 없음<br>(62) 원출원 특허 10-2009-7007564<br>원출원일자(국제) 2007년09월13일<br>심사청구일자 2012년09월13일<br>(85) 번역문제출일자 2014년10월29일<br>(86) 국제출원번호 PCT/US2007/020027<br>(87) 국제공개번호 WO 2008/033517<br>국제공개일자 2008년03월20일<br>(30) 우선권주장<br>60/845,158 2006년09월13일 미국(US)<br>60/876,374 2006년12월21일 미국(US) | (71) 출원인<br>애브비 인코퍼레이티드<br>미국 일리노이주 60064 놀스 시카고 놀스 위키건<br>로드 1<br>(72) 발명자<br>플라 이츠코야틀 아.<br>미국 매사추세츠주 01604 우스터 웨더스톤 درا이<br>브 57<br>마룩 조셉 씨.<br>미국 매사추세츠주 01606 우스터 스톤레이 로드<br>16<br>(뒷면에 계속)<br>(74) 대리인<br>장훈 |
|--|--|

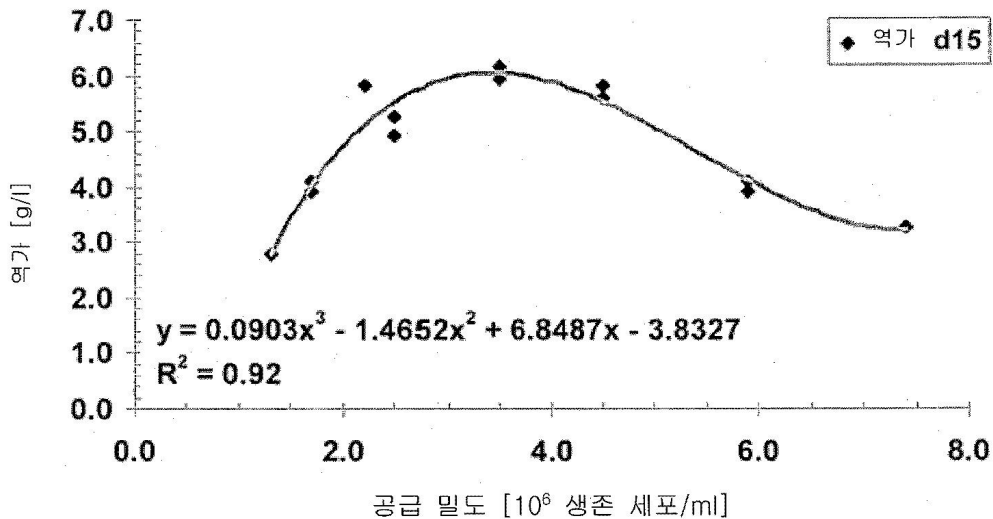
전체 청구항 수 : 총 233 항

(54) 발명의 명칭 세포 배양의 개선

(57) 요약

본 발명은 포유동물 세포 배양에서 재조합 단백질, 예컨대 항체를 생산하는 개선된 방법 및 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 포유동물 세포 배양에서 단백질 생산성을 향상시키는데 사용될 수 있는 개선된 생산 배지, 공급 용액 및 배합 공급물을 비롯한 개선된 세포 배양 배지를 제공한다.

대표도



(72) 발명자

**팬 존 씨.**

미국 매사추세츠주 01545 슈루즈베리 트로우브릿지  
레인 61

**솔츠 크리스토프**

미국 매사추세츠주 01432 에이어 윈터베리 레인 5

**로이 니콜 에이.**

미국 매사추세츠주 01606 우스터 무디 스트리트 1

**브루튼 데이빗 에프.**

미국 코네티컷주 06082 엔필드 하이 메도우 레인  
15

**맥인타이어 제임스**

미국 캘리포니아주 94546 캐스트로 밸리 센터 스트  
리트 18070

**창 유-시양 데이빗**

미국 캘리포니아주 92075 솔라나 비치 롱든 레인  
355

**제콰슈테르 토마스**

미국 캘리포니아주 93065 시미 밸리 클레빈저 플레  
이스 291

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- a) 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지로 필수적으로 이루어진 파트 A;
- b) 무기 철 급원으로 필수적으로 이루어진 파트 B; 및
- c) 재조합 성장인자, 완충액, 삼투물농도 조절제, 에너지원 및 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함하는 파트 C
- 를 포함하는, 무혈청 세포 배양 배지.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 파트 A가 비철계 금속 이온, 비타민 또는 이 둘의 배합물을 추가로 포함하는 세포 배양 배지.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 파트 B의 무기 철 급원이 시트르산철인 세포 배양 배지.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 약 122.5mg/L 또는 0.5mM 최종 용액 농도의 시트르산철을 포함하는 세포 배양 배지.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 파트 C의 재조합 성장인자가 인슐린 또는 이의 재조합 유사체인 IGF-1 및 인슐린과 IGF-1의 배합물로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 세포 배양 배지.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 약 4mg/L 내지 13mg/L의 인슐린 또는 이의 재조합 유사체를 포함하는 세포 배양 배지.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 변형된 기본 배지로부터 제외된 완충액이 HEPES 완충액인 세포배양 배지.

### 청구항 8

제1항에 있어서, 파트 C의 완충액이 인산염 완충액, HEPES 및 중탄산나트륨을 포함하는 세포 배양 배지.

### 청구항 9

제8항에 있어서, 약 1.6g/L의 중탄산나트륨을 포함하는 세포 배양 배지.

### 청구항 10

제8항에 있어서, 약 1.8g/L의 HEPES를 포함하는 세포 배양 배지.

### 청구항 11

제8항에 있어서, 인산염 완충액이 약 0.01 내지 0.5g/L의 일염기성 및 이염기성 인산나트륨을 포함하는 세포 배양 배지.

### 청구항 12

제1항에 있어서, 파트 C가 아스파라긴, 글루타민 또는 글루타민과 아스파라긴을 추가로 포함하는 세포 배양 배지.

**청구항 13**

제1항에 있어서, 파트 C의 삼투물농도 조절제가 NaCl인 세포 배양 배지.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 약 1.0 내지 6.5g/L NaCl을 포함하는 세포 배양 배지.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 파트 C의 에너지원이 단당류인 세포 배양 배지.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 단당류가 글루코스, 말토스, 만노스, 갈락토스 및 프럭토스로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 세포 배양 배지.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 글루코스가 D-글루코스인 세포 배양 배지.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 약 7.0g/L 이하의 글루코스를 포함하는 세포 배양 배지.

**청구항 19**

제1항에 있어서, 파트 C의 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물이, 식물계 가수분해물 및 동물계도 아니고 식물계도 아닌 가수분해물인, 세포 배양 배지.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 식물계 가수분해물이 대두계 가수분해물인 세포 배양 배지.

**청구항 21**

제19항에 있어서, 동물계도 아니고 식물계도 아닌 가수분해물이 효모계 가수분해물인 세포 배양 배지.

**청구항 22**

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 메토틱세이트를 추가로 포함하는 세포 배양 배지.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 약 100nM 내지 5000nM의 메토틱세이트를 포함하는 세포 배양 배지.

**청구항 24**

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 보호제 또는 계면활성제를 추가로 포함하는 세포 배양 배지.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 계면활성제가 메틸 셀룰로스 또는 플루로닉 폴리올인 세포 배양 배지.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 플루로닉 폴리올이 플루로닉(Pluronic) F-68인 세포 배양 배지.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 약 1.0g/L의 플루로닉 F-68을 포함하는 세포 배양 배지.

**청구항 28**

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, L-글루타민을 추가로 포함하는 세포 배양 배지.

**청구항 29**

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, pH가 7.1 내지 7.3 범위인 세포 배양 배지.

**청구항 30**

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 삼투물농도가 320 내지 450 mOsm/kg 범위인 세포 배양 배지.

**청구항 31**

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따르는 세포 배양 배지에서 포유동물 세포를 배양함을 포함하는 단백질 생산방법.

**청구항 32**

제31항에 있어서, 포유동물 세포가 중국 햄스터 난소(CHO) 세포인, 단백질 생산방법.

**청구항 33**

제31항 또는 제32항에 있어서, 단백질이 항체인, 단백질 생산방법.

**청구항 34**

제33항에 있어서, 항체가 항-TNF  $\alpha$  항체, 항-IL-12 항체, 항-IL-18 항체 및 항-EPO 수용체(EPO-R) 항체로 이루어진 그룹 중에서 선택되는, 단백질 생산방법.

**청구항 35**

- a) 기본 배지;
- b) 약 8 내지 12ml/kg 또는 116 내지 126mg/L의 시트르산철;
- c) 약 2 내지 6mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
- d) 약 2 내지 5g/kg의 무수 글루코스;
- e) 약 0.1 내지 0.5g/kg의 L-글루타민;
- f) 약 1 내지 3g/kg의 중탄산나트륨;
- g) 약 0.01 내지 0.05g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;
- h) 약 0.4 내지 0.5g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 및
- i) 약 1.0 내지 3.0g/kg의 효모계 가수분해물을 포함하는, 무혈청 세포 배양 배지.

**청구항 36**

제35항에 있어서,

- a) 기본 배지;
- b) 약 10.0ml/kg 또는 122mg/L의 시트르산철;
- c) 약 4.0mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
- d) 약 3.5g/kg의 무수 글루코스;
- e) 약 0.29g/kg의 L-글루타민;
- f) 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨;

- g) 약 0.03g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;
- h) 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 및
- i) 약 2.0g/kg의 효모계 가수분해물  
을 포함하는, 세포 배양 배지.

**청구항 37**

제35항 또는 제36항에 있어서, 약 2.50mL/kg의 메토틱세이트를 추가로 포함하는 세포배양 배지.

**청구항 38**

- a) 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 포유동물 세포를 제35항 또는 제36항에 따르는 배양 배지에서 배양하는 단계; 및
- b) 단계 a)의 배양물을 세포 배양 생산 배지로 옮겨 단백질이 생산되도록 하는 단계를 포함하는, 단백질 생산방법.

**청구항 39**

제38항에 있어서, 세포 배양 생산 배지로부터 단백질을 분리하는 단계를 추가로 포함하는, 단백질 생산방법.

**청구항 40**

제38항에 있어서, 항체가 항체인, 단백질 생산방법.

**청구항 41**

제40항에 있어서, 항체가 D2E7(아달리무마브)인, 단백질 생산방법.

**청구항 42**

- a) 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투몰농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지;
- b) 약 8 내지 12ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철;
- c) 약 4 내지 8ml/kg 또는 10 내지 14mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
- d) 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스;
- e) 약 0.5 내지 0.7g/kg의 L-글루타민;
- f) 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨;
- g) 약 1 내지 2g/kg의 HEPES;
- h) 약 2 내지 3g/kg의 NaCl;
- i) 약 0.5 내지 2g/kg의 플루로닉 F-68;
- j) 약 0.01 내지 0.1g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;
- k) 약 0.4 내지 0.5g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;
- l) 약 8 내지 12g/kg의 효모계 가수분해물; 및
- m) 약 60 내지 70g/kg의 식물계 가수분해물  
을 포함하는, 무혈청 세포 배양 생산 배지.

**청구항 43**

제42항에 있어서, 세포 배양 배지가

- a) 약 10.0ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철;
  - b) 약 6.0ml/kg 또는 12mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
  - c) 약 7.0g/kg의 무수 글루코스;
  - d) 약 0.58 내지 0.59g/kg의 L-글루타민;
  - e) 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨;
  - f) 약 1.8g/kg의 HEPES;
  - g) 약 2.4 내지 2.5g/kg의 NaCl;
  - h) 약 1.0g/kg의 플루로닉 F-68;
  - i) 약 0.03 내지 0.04g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;
  - j) 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;
  - k) 약 10.7g/kg의 효모계 가수분해물; 및
  - l) 약 6.9 내지 7.0g/kg의 식물계 가수분해물
- 을 포함하는, 세포 배양 생산 배지.

**청구항 44**

제42항 또는 제43항에 있어서, pH가 약 7.10 내지 7.20인 세포 배양 생산 배지.

**청구항 45**

제42항 또는 제43항에 있어서, 삼투물농도가 약 373 내지 403 mOsm/kg인 세포 배양 생산 배지.

**청구항 46**

- a) 중탄산나트륨, 원충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지;
  - b) 약 8 내지 12ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철;
  - c) 약 3 내지 5ml/kg 또는 6 내지 8mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
  - d) 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스;
  - e) 약 0.1 내지 2g/kg의 L-글루타민;
  - f) 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨;
  - g) 약 1 내지 2g/kg의 HEPES;
  - h) 약 2 내지 3g/kg의 NaCl;
  - i) 약 0.1 내지 2g/kg의 플루로닉 F-68;
  - j) 약 0.01 내지 0.1g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;
  - k) 약 0.4 내지 0.5g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;
  - l) 약 0.4 내지 0.5g/kg의 L-아스파라긴 일수화물;
  - m) 약 2 내지 6g/kg의 효모계 가수분해물; 및
  - n) 약 2 내지 4g/kg의 식물계 가수분해물
- 을 포함하는, 무혈청 세포 배양 배지.

**청구항 47**

제46항에 있어서, 세포 배양 배지가

- a) 약 10.0ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철;
  - b) 약 3.8 내지 3.9ml/kg 또는 7.8mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
  - c) 약 7.0g/kg의 무수 글루코스;
  - d) 약 0.8 내지 0.9g/kg의 L-글루타민;
  - e) 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨;
  - f) 약 1.8g/kg의 HEPES;
  - g) 약 2.6 내지 2.7g/kg의 NaCl;
  - h) 약 1.0g/kg의 플루로닉 F-68;
  - i) 약 0.03 내지 0.04g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;
  - j) 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;
  - k) 약 0.45g/kg의 L-아스파라긴 일수화물;
  - l) 약 4.0g/kg의 효모계 가수분해물; 및
  - m) 약 2.6g/kg의 식물계 가수분해물
- 을 포함하는, 세포 배양 배지.

**청구항 48**

제42항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 약 2.50ml/kg의 메토틱세이트를 추가로 포함하는 세포 배양 배지.

**청구항 49**

항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 포유동물 세포를 제42항 내지 제47항 중 어느 한 항에 따르는 세포 배양 배지에서 배양함을 포함하는 단백질 생산방법.

**청구항 50**

제49항에 있어서, 포유동물 세포가 CHO 세포인, 단백질 생산방법.

**청구항 51**

제49항에 있어서, 단백질이 항체인, 단백질 생산방법.

**청구항 52**

제51항에 있어서, 항체가 항-TNF  $\alpha$  항체 또는 항-EPO-R 항체인, 단백질 생산방법.

**청구항 53**

제52항에 있어서, 항-TNF  $\alpha$  항체가 완전한 사람 항-TNF  $\alpha$  항체인, 단백질 생산방법.

**청구항 54**

제53항에 있어서, 완전한 사람 항-TNF  $\alpha$  항체가 D2E7(아달리무마브)인, 단백질 생산방법.

**청구항 55**

a) 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투몰농도 조절제, 계면활성제 및 단당

류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지;

- b) 약 8 내지 10ml/kg 또는 120 내지 130mg/L의 시트르산철;
  - c) 약 3 내지 5ml/kg 또는 7.8mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
  - d) 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스;
  - e) 약 0.8 내지 0.9g/kg의 L-글루타민;
  - f) 약 0.3 내지 0.5g/kg의 L-아스파라긴 일수화물;
  - g) 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨;
  - h) 약 1 내지 2g/kg의 HEPES;
  - i) 약 2 내지 3g/kg의 NaCl;
  - j) 약 0.5 내지 2g/kg의 플루로닉 F-68;
  - k) 약 0.01 내지 0.1g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;
  - l) 약 0.1 내지 1.0g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;
  - m) 약 2 내지 6g/kg의 효모계 가수분해물; 및
  - n) 약 2 내지 4g/kg의 식물계 가수분해물
- 을 포함하는, 무혈청 세포 배양 배지.

**청구항 56**

제55항에 있어서,

- a) 약 10ml/kg 또는 122mg/L의 시트르산철;
  - b) 약 3.8 내지 3.9ml/kg 또는 7.8mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
  - c) 약 7.0g/kg의 무수 글루코스;
  - d) 약 0.87 내지 0.88g/kg의 L-글루타민;
  - e) 약 0.45g/kg의 L-아스파라긴 일수화물;
  - f) 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨;
  - g) 약 1.8g/kg의 HEPES;
  - h) 약 2.67 내지 2.68g/kg의 NaCl;
  - i) 약 1.0g/kg의 플루로닉 F-68;
  - j) 약 0.03 내지 0.04g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;
  - k) 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;
  - l) 약 4.0g/kg의 효모계 가수분해물; 및
  - m) 약 2.6g/kg의 식물계 가수분해물
- 을 포함하는, 세포 배양 배지.

**청구항 57**

제55항 또는 제56항에 있어서, 메토틱렉세이트를 추가로 포함하는 세포 배양 배지.

**청구항 58**

- a) 기본 세포 성장 배지;
- b) 약 8 내지 12ml/kg 또는 120 내지 130mg/L의 시트르산철;
- c) 약 2 내지 6mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
- d) 약 150 내지 250g/kg의 무수 글루코스;
- e) 약 0.1 내지 0.5g/kg의 L-글루타민;
- f) 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨; 및
- g) 약 5 내지 15g/kg의 효모계 가수분해물을 포함하는, 무혈청 세포 배양 배지.

**청구항 59**

제58항에 있어서,

- a) 약 10ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철;
- b) 약 4mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
- c) 약 200g/kg의 무수 글루코스;
- d) 약 0.29 내지 0.30g/kg의 L-글루타민;
- e) 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 및
- f) 약 11g/kg의 효모계 가수분해물을 포함하는, 세포 배양 배지.

**청구항 60**

제58항 또는 제59항에 있어서, 메토틱렉세이트를 추가로 포함하는 세포 배양 배지.

**청구항 61**

단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 포유동물 세포를 제55항 내지 제60항 중 어느 한 항에 따르는 세포 배양 배지에서 배양함을 포함하는 단백질 생산방법.

**청구항 62**

제61항에 있어서, 단백질이 항체인, 단백질 생산방법.

**청구항 63**

제62항에 있어서, 포유동물 세포가 CHO 세포인, 단백질 생산방법.

**청구항 64**

제63항에 있어서, 핵산이, 완전한 사람 항-IL-12 항체를 암호화하는, 단백질 생산방법.

**청구항 65**

제64항에 있어서, 완전한 사람 항-IL-12 항체가 ABT-874인, 단백질 생산방법.

**청구항 66**

- a) 기본 세포 성장 배지;
- b) 약 8 내지 12ml/kg 또는 120 내지 130mg/L의 시트르산철;
- c) 약 2 내지 6mg/kg의 재조합 사람 인슐린;

- d) 약 1 내지 3g/kg의 무수 글루코스;
- e) 약 0.1 내지 1g/kg의 L-글루타민;
- f) 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨; 및
- g) 약 1 내지 4g/kg의 효모계 가수분해물을 포함하는, 무혈청 세포 배양 배지.

**청구항 67**

제66항에 있어서,

- a) 약 10ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철;
- b) 약 4mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
- c) 약 1.5g/kg의 무수 글루코스;
- d) 약 0.29 내지 0.30g/kg의 L-글루타민;
- e) 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 및
- f) 약 2g/kg의 효모계 가수분해물을 포함하는, 세포 배양 배지.

**청구항 68**

제66항 또는 제67항에 있어서, 메토틱렉세이트를 추가로 포함하는 세포 배양 배지.

**청구항 69**

제66항 또는 제67항에 있어서, pH가 약 7.10 내지 7.30인 세포 배양 배지.

**청구항 70**

제66항 또는 제67항에 있어서, 삼투농도가 약 300 내지 340 mOsm/kg인 세포 배양 배지.

**청구항 71**

제66항 또는 제67항에 있어서, 8g/kg 이상의 효모계 가수분해물을 포함하는 세포 배양 배지.

**청구항 72**

항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 포유동물 세포를 제62항 내지 제65항 중 어느 한 항에 따르는 세포 배양 배지에서 배양함을 포함하는 단백질 생산방법.

**청구항 73**

제72항에 있어서, 단백질이 항체인, 단백질 생산방법.

**청구항 74**

제72항에 있어서, 포유동물 세포가 CHO 세포인, 단백질 생산방법.

**청구항 75**

제72항에 있어서, 핵산이 항-IL-12 항체 또는 항-EPO-R 항체를 암호화하는, 단백질 생산방법.

**청구항 76**

제75항에 있어서, 완전한 사람 항-IL-12 항체가 ABT-874인, 단백질 생산방법.

**청구항 77**

- a) 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투몰농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지;
  - b) 약 8 내지 12ml/kg 또는 120 내지 130mg/L의 시트르산철;
  - c) 약 2.5 내지 4.5ml/kg 또는 7.8mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
  - d) 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스;
  - e) 약 0.5 내지 1g/kg의 L-글루타민;
  - f) 약 0.1 내지 1g/kg의 L-아스파라긴 일수화물;
  - g) 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨;
  - h) 약 1 내지 2g/kg의 HEPES;
  - i) 약 1 내지 4g/kg의 NaCl;
  - j) 약 0.1 내지 2g/kg의 플루로닉 F-68;
  - k) 약 0.01 내지 0.1g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;
  - l) 약 0.1 내지 1g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;
  - m) 약 2 내지 6g/kg의 효모계 가수분해물; 및
  - n) 약 2 내지 6g/kg의 식물계 가수분해물
- 을 포함하는, 세포 배양 배지.

**청구항 78**

제77항에 있어서,

- a) 약 10ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철;
  - b) 약 3.8 내지 3.9ml/kg 또는 7.8mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
  - c) 약 7.0g/kg의 무수 글루코스;
  - d) 약 0.87 내지 0.88g/kg의 L-글루타민;
  - e) 약 0.45g/kg의 L-아스파라긴 일수화물;
  - f) 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨;
  - g) 약 1.8g/kg의 HEPES;
  - h) 약 2.67g/kg의 NaCl;
  - i) 약 1.0g/kg의 플루로닉 F-68;
  - j) 약 0.03 내지 0.04g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;
  - k) 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;
  - l) 약 4.0g/kg의 효모계 가수분해물; 및
  - m) 약 2.6g/kg의 식물계 가수분해물
- 을 포함하는, 세포 배양 배지.

**청구항 79**

제77항 또는 제78항에 있어서, pH가 약 7.10 내지 7.20인 세포 배양 배지.

**청구항 80**

제77항 또는 제78항에 있어서, 삼투물농도가 약 373 내지 403 mOsm/kg인 세포 배양 배지.

**청구항 81**

- a) 중탄산나트륨, HEPES 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스가 제거되도록 변형시킨, 변형된 기본 배지;
  - b) 약 8 내지 12ml/kg 또는 120 내지 130mg/L의 시트르산철;
  - c) 약 4 내지 8ml/kg 또는 10 내지 14mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
  - d) 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스;
  - e) 약 0.1 내지 1g/kg의 L-글루타민;
  - f) 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨;
  - g) 약 1 내지 2g/kg의 HEPES;
  - h) 약 1 내지 3g/kg의 NaCl;
  - i) 약 0.5 내지 2g/kg의 플루로닉 F-68;
  - j) 약 0.01 내지 0.1g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;
  - k) 약 0.1 내지 1g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;
  - l) 약 8 내지 12g/kg의 효모계 가수분해물; 및
  - m) 약 6 내지 8g/kg의 식물계 가수분해물
- 을 포함하는, 세포 배양 생산 배지.

**청구항 82**

제81항에 있어서,

- a) 약 10ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철;
  - b) 약 6.0ml/kg 또는 12mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
  - c) 약 7.0g/kg의 무수 글루코스;
  - d) 약 0.58 내지 0.59g/kg의 L-글루타민;
  - e) 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨;
  - f) 약 1.8g/kg의 HEPES;
  - g) 약 2.45g/kg의 NaCl;
  - h) 약 1.0g/kg의 플루로닉 F-68;
  - i) 약 0.03 내지 0.04g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;
  - j) 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;
  - k) 약 10.7g/kg의 효모계 가수분해물; 및
  - l) 약 6.9 내지 7.0g/kg의 식물계 가수분해물
- 을 포함하는, 세포 배양 생산 배지.

**청구항 83**

제80항 또는 제81항에 있어서, pH가 약 7.10 내지 7.20인 세포 배양 생산 배지.

**청구항 84**

제80항 또는 제81항에 있어서, 삼투물농도가 약 373 내지 403 mOsm/kg인 세포 배양 생산 배지.

**청구항 85**

- a) 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨, 변형된 기본 배지;
- b) 약 8 내지 12ml/kg 또는 110 내지 130mg/L의 시트르산철;
- c) 약 4 내지 8ml/kg 또는 11 내지 15mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
- d) 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스;
- e) 약 0.1 내지 1g/kg의 L-글루타민;
- f) 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨;
- g) 약 1 내지 2g/kg의 HEPES;
- h) 약 1 내지 3g/kg의 NaCl;
- i) 약 0.1 내지 2g/kg의 플루로닉 F-68;
- j) 약 0.01 내지 0.1g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;
- k) 약 0.1 내지 1g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;
- l) 약 12 내지 16g/kg의 효모계 가수분해물; 및
- m) 약 8 내지 10g/kg의 식물계 가수분해물을 포함하는, 세포 배양 생산 배지.

**청구항 86**

제85항에 있어서,

- a) 약 10ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철;
- b) 약 6.5ml/kg 또는 13mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
- c) 약 7.0g/kg의 무수 글루코스;
- d) 약 0.58 내지 0.59g/kg의 L-글루타민;
- e) 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨;
- f) 약 1.8g/kg의 HEPES;
- g) 약 2.45g/kg의 NaCl;
- h) 약 1.0g/kg의 플루로닉 F-68;
- i) 약 0.03 내지 0.04g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;
- j) 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;
- k) 약 14.2 내지 14.3g/kg의 효모계 가수분해물; 및
- l) 약 9.2 내지 9.3g/kg의 식물계 가수분해물을 포함하는, 세포 배양 생산 배지.

**청구항 87**

제81항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 메토틱렉세이트를 추가로 포함하는 세포 배양 생산 배지.

**청구항 88**

항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 포유동물 세포를 제81항 내지 제86항 중 어느 한 항에 따르는 세포 배양 생산 배지에서 배양함을 포함하는 항체 생산방법.

**청구항 89**

제88항에 있어서, 포유동물 세포가 CHO 세포인, 항체 생산방법.

**청구항 90**

제88항에 있어서, 핵산이 항-IL-18 항체를 암호화하는, 항체 생산방법.

**청구항 91**

제35항, 제36항, 제42항, 제43항, 제46항, 제47항, 제55항, 제56항, 제77항, 제78항, 제81항, 제82항, 제85항 및 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 식물계 가수분해물이 대두계 가수분해물인 세포 배양 배지.

**청구항 92**

제1항 내지 제30항, 제35항 내지 제37항, 제42항 내지 제48항, 제55항 내지 제60항, 제66항 내지 제71항 및 제81항 내지 제87항 중 어느 한 항에 따르는 세포 배양 배지 중의 중국 햄스터 난소(CHO) 세포.

**청구항 93**

- a) 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 포유동물 세포를 세포 배양 생산 배지를 포함하는 세포 배양물에서 배양하는 단계; 및
- b) 2중 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함하는 가수분해물 강화 용액과 기본 강화 용액을 상기 세포 배양물에 첨가함으로써, 일정 기간 동안 포유동물 세포에 공급하여, 상기 단백질이 생산되도록 하는 단계를 포함하여, 단백질을 생산하는 유가식(fed batch) 방법.

**청구항 94**

제93항에 있어서, 기본 강화 용액이, 농축된 기본 배지를 포함하는 방법.

**청구항 95**

제93항에 있어서, 기본 강화 용액이 기본 배지, 아스파라긴 및 글루코스를 포함하는 방법.

**청구항 96**

제94항 또는 제95항에 있어서, 기본 배지가 PF CHO인 방법.

**청구항 97**

제93항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물 세포가 중국 햄스터 난소(CHO) 세포인 방법.

**청구항 98**

제93항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질이 항체인 방법.

**청구항 99**

제98항에 있어서, 항체가 항-TNF  $\alpha$  항체, 항-IL-12 항체, 항-IL-18 항체 및 항-EPO 수용체(EPO-R) 항체로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법.

**청구항 100**

제93항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 가수분해물 강화 용액이, 식물 또는 동물에서 유래되지 않은 제1

가수분해물 및 제2 식물계 가수분해물을 포함하는 방법.

**청구항 101**

제100항에 있어서, 식물 또는 동물에서 유래되지 않은 가수분해물 및 식물계 가수분해물이 효모계 가수분해물인 방법.

**청구항 102**

제101항에 있어서, 식물계 가수분해물이 대두계 가수분해물인 방법.

**청구항 103**

a) 항-TNF  $\alpha$  항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 세포 배양 생산 배지를 포함하는 세포 배양물에서 배양하는 단계; 및

b) 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함하는 가수분해물 강화 용액과, 기본 배지, 아스파라긴 및 글루코스를 포함하는 기본 강화 용액을 상기 세포 배양물에 첨가함으로써, 일정 기간 동안 CHO 세포에 공급하여, 상기 항-TNF  $\alpha$  항체가 생산되도록 하는 단계

를 포함하여, 항-TNF  $\alpha$  항체를 생산하는 유가식 방법.

**청구항 104**

a) 항-TNF  $\alpha$  항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 CHO 세포를, 글루코스 2.0g/L 이상을 포함하는 세포 배양 생산 배지를 포함하는 세포 배양물에서 배양하되, 2.0g/L 이상의 글루코스 농도가 유지되도록 필요에 따라 세포 배양 생산 배지에 글루코스를 첨가하여 글루코스의 농도를 조절하는 단계; 및

b) 기본 배지, 아스파라긴 및 글루코스를 포함하는 기본 강화 용액과, 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함하는 가수분해물 강화 용액을 상기 세포 배양물에 첨가함으로써, 일정 기간 동안 CHO 세포에 공급하여, 상기 항-TNF  $\alpha$  항체가 생산되도록 하는 단계

를 포함하여, 항-TNF  $\alpha$  항체를 생산하는 유가식 방법.

**청구항 105**

제103항 또는 제104항에 있어서, 항-TNF  $\alpha$  항체를 회수하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 106**

제103항 또는 제104항에 있어서, 세포 배양물이 약 32 내지 38°C 범위의 온도에서 배양되는 방법.

**청구항 107**

제106항에 있어서, 배양 온도가 약 35°C인 방법.

**청구항 108**

제103항 또는 제104항에 있어서, 세포 배양 생산 배지의 용존 산소가 20 내지 65%로 유지되는 방법.

**청구항 109**

제108항에 있어서, 세포 배양 생산 배지의 용존 산소가 약 30%로 유지되는 방법.

**청구항 110**

제103항 또는 제104항에 있어서, 세포 배양 생산 배지의 삼투물농도가 배양 동안 500 mOsm 이하로 유지되는 방법.

**청구항 111**

제103항 또는 제104항에 있어서, 가수분해물 강화 용액이, 식물 또는 동물에서 유래되지 않은 제1 가수분해물

및 제2 식물계 가수분해물을 포함하는 방법.

**청구항 112**

제111항에 있어서, 식물 또는 동물에서 유래되지 않은 가수분해물 및 식물계 가수분해물이 효모계 가수분해물인 방법.

**청구항 113**

제112항에 있어서, 식물계 가수분해물이 대두계 가수분해물인 방법.

**청구항 114**

제103항 또는 제104항에 있어서, 가수분해물 강화 용액이 약 50 내지 280g/kg의 대두계 가수분해물과 약 75 내지 300g/kg의 효모계 가수분해물로 필수적으로 이루어진 방법.

**청구항 115**

제103항 또는 제104항에 있어서, 기본 배지가 PF CHO인 방법.

**청구항 116**

제103항 또는 제104항에 있어서, 기본 강화 용액의 pH가 약 9.0 내지 10.5인 방법.

**청구항 117**

제103항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 일정 기간이 약 9 내지 15일인 방법.

**청구항 118**

제117항에 있어서, 일정 기간이 약 12일인 방법.

**청구항 119**

제103항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 기본 강화 용액이 일정 기간 중 4일, 6일, 9일 및 11일 중 하루 이상의 날에 세포 배양 생산 배지에 첨가되는 방법.

**청구항 120**

제103항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 가수분해물 강화 용액이 일정 기간 중 4일, 7일, 또는 4일과 7일에 세포 배양 생산 배지에 첨가되는 방법.

**청구항 121**

제103항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 생산 배지의 pH를 pH 선형 기울기(ramp)에 따라 조정하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 pH 선형 기울기가 약 7.1 내지 7.2의 pH에서 시작해서 최종 pH가 약 6.9가 됨을 포함하는 방법.

**청구항 122**

제121항에 있어서, pH 선형 기울기가 약 24시간 이상에 걸쳐 조정되는 방법.

**청구항 123**

제121항에 있어서, pH 선형 기울기가 약 48시간 이상에 걸쳐 조정되는 방법.

**청구항 124**

제121항에 있어서, pH 선형 기울기가 약 72시간에 걸쳐 조정되는 방법.

**청구항 125**

제103항 또는 제104항에 있어서, 세포 배양 생산 배지가

- a) 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지;
- b) 약 8 내지 10ml/kg 또는 110 내지 130mg/L의 시트르산철;
- c) 약 4 내지 8ml/kg 또는 10 내지 14mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
- d) 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스;
- e) 약 0.1 내지 1g/kg의 L-글루타민;
- f) 약 1 내지 3g/kg의 중탄산나트륨;
- g) 약 1 내지 3g/kg의 HEPES;
- h) 약 2 내지 3g/kg의 NaCl;
- i) 약 0.1 내지 2g/kg의 플루로닉 F-68;
- j) 약 0.01 내지 0.1g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;
- k) 약 0.1 내지 0.1g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;
- l) 약 8 내지 12g/kg의 효모계 가수분해물; 및
- m) 약 6 내지 8g/kg의 식물계 가수분해물을 포함하는 방법.

**청구항 126**

제125항에 있어서, 세포 배양 생산 배지가

- a) 약 10.0ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철;
- b) 약 6.0ml/kg 또는 12mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
- c) 약 7.0g/kg의 무수 글루코스;
- d) 약 0.58 내지 0.59g/kg의 L-글루타민;
- e) 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨;
- f) 약 1.8g/kg의 HEPES;
- g) 약 2.45g/kg의 NaCl;
- h) 약 1.0g/kg의 플루로닉 F-68;
- i) 약 0.03 내지 0.04g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;
- j) 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;
- k) 약 10.7g/kg의 효모계 가수분해물; 및
- l) 약 6.9 내지 7.0g/kg의 식물계 가수분해물을 포함하는 방법.

**청구항 127**

제103항 내지 제126항 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물 세포가 CHO 세포인 방법.

**청구항 128**

제103항 내지 제126항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양물이 대규모 세포 배양물인 방법.

**청구항 129**

제128항에 있어서, 대규모 세포 배양물이 약 10L 초과인 방법.

**청구항 130**

제128항에 있어서, 대규모 세포 배양물이 13L인 방법.

**청구항 131**

제103항 내지 제126항 중 어느 한 항에 있어서, 항-TNF  $\alpha$  항체가 완전한 사람 항-TNF  $\alpha$  항체인 방법.

**청구항 132**

제131항에 있어서, 항-TNF  $\alpha$  항체가 아달리무마브인 방법.

**청구항 133**

a) 항-IL-12 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 CHO 세포를 세포 배양 생산 배지를 포함하는 세포 배양물에서 배양하는 단계; 및

b) 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함하는 가수분해물 강화 용액과, 기본 배지, 아스파라긴 및 글루코스를 포함하는 기본 강화 용액을 상기 세포 배양물에 첨가함으로써, 일정 기간 동안 CHO 세포에 공급하여, 상기 항-IL12 항체가 생산되도록 하는 단계

를 포함하여, 항-IL12 항체를 생산하는 유가식 방법.

**청구항 134**

제133항에 있어서, 가수분해물 강화 용액이 글루코스를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 135**

제133항에 있어서, 항-IL12 항체를 회수하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 136**

제133항에 있어서, 세포 배양물이 약 32 내지 38℃ 범위의 온도에서 배양되는 방법.

**청구항 137**

제133항에 있어서, 배양 온도가 약 33℃인 방법.

**청구항 138**

제133항에 있어서, 세포 배양 생산 배지의 용존 산소가 20 내지 65%로 유지되는 방법.

**청구항 139**

제138항에 있어서, 세포 배양 생산 배지의 용존 산소가 약 40%로 유지되는 방법.

**청구항 140**

제133항에 있어서, 세포 배양 생산 배지의 pH가 약 6.7 내지 7.2인 방법.

**청구항 141**

제133항에 있어서, 가수분해물 강화 용액이, 식물 또는 동물에서 유래되지 않은 가수분해물과 식물계 가수분해물을 포함하는 방법.

**청구항 142**

제141항에 있어서, 식물 또는 동물에서 유래되지 않은 가수분해물이 효모계 가수분해물인 방법.

**청구항 143**

제142항에 있어서, 식물계 가수분해물이 대두계 가수분해물인 방법.

**청구항 144**

제133항에 있어서, 가수분해물 강화 용액이 약 50 내지 225g/kg의 대두계 가수분해물, 약 75 내지 300g/kg의 효모계 가수분해물 및 약 2 내지 3g/L의 글루코스로 필수적으로 이루어진 방법.

**청구항 145**

제133항에 있어서, 기본 강화 용액이 기본 배지, 아스파라긴 및 글루코스를 포함하는 방법.

**청구항 146**

제145항에 있어서, 기본 강화 용액의 pH가 약 9.7이고 삼투물농도가 약 1400 내지 1500 mOsm인 방법.

**청구항 147**

제145항에 있어서, 기본 강화 용액의 기본 배지가 PF CHO인 방법.

**청구항 148**

제133항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 일정 기간이 14일 내지 15일인 방법.

**청구항 149**

제133항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 기본 강화 용액이 일정 기간 중 5일째부터 시작해서 격일로 세포 배양 생산 배지에 첨가되는 방법.

**청구항 150**

제133항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 가수분해물 강화 용액이 일정 기간 중 6일째부터 시작해서 매일 세포 배양 생산 배지에 첨가되는 방법.

**청구항 151**

제133항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 기본 강화 용액과 가수분해물 강화 용액이 일정 기간 중 5일째부터 시작해서 매일 세포 배양 생산 배지에 첨가되는 방법.

**청구항 152**

제133항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 생산 배지가

- a) 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지;
- b) 약 8 내지 12ml/kg 또는 110 내지 130mg/L의 시트르산철;
- c) 약 5 내지 8ml/kg 또는 11 내지 15mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
- d) 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스;
- e) 약 0.1 내지 1g/kg의 L-글루타민;
- f) 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨;
- g) 약 1 내지 2g/kg의 HEPES;
- h) 약 2 내지 3g/kg의 NaCl;
- i) 약 0.1 내지 2g/kg의 플루로닉 F-68;
- j) 약 0.01 내지 0.1g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;

- k) 약 0.1 내지 1g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;
- l) 약 6 내지 12g/kg의 효모계 가수분해물; 및
- m) 약 6 내지 8g/kg의 식물계 가수분해물  
을 포함하는 방법.

**청구항 153**

제152항에 있어서, 세포 배양 생산 배지가

- a) 약 10ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철;
- b) 약 6.5ml/kg 또는 13mg/kg의 재조합 사람 인슐린;
- c) 약 7.0g/kg의 무수 글루코스;
- d) 약 0.58 내지 0.59g/kg의 L-글루타민;
- e) 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨;
- f) 약 1.8g/kg의 HEPES;
- g) 약 2.45g/kg의 NaCl;
- h) 약 1.0g/kg의 플루로닉 F-68;
- i) 약 0.03 내지 0.04g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;
- j) 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;
- k) 약 10.7g/kg의 효모계 가수분해물; 및
- l) 약 6.9 내지 7.0g/kg의 식물계 가수분해물  
을 포함하는 방법.

**청구항 154**

제133항 내지 제153항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양물이 대규모 세포 배양물인 방법.

**청구항 155**

제154항에 있어서, 대규모 세포 배양물이 10L 초과인 방법.

**청구항 156**

제154항에 있어서, 대규모 세포 배양물이 약 13L인 방법.

**청구항 157**

제133항 내지 제156항 중 어느 한 항에 있어서, 항-IL12 항체가 완전한 사람 항-IL-12 항체인 방법.

**청구항 158**

제157항에 있어서, 완전한 사람 항-IL-12 항체가 ABT-874인 방법.

**청구항 159**

- a) 글루코스;
- b) 기본 배지;
- c) 글루타민 이외의 아미노산; 및
- d) 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물

을 포함하고, pH가 약 6.0 내지 8.0인 배합 공급 용액.

**청구항 160**

제159항에 있어서, 약 100 내지 250g/kg의 글루코스를 포함하는 배합 공급 용액.

**청구항 161**

제159항에 있어서, 아미노산이 아스파라긴인 배합 공급 용액.

**청구항 162**

제160항에 있어서, 약 1.0 내지 15.0g의 아스파라긴을 포함하는 배합 공급 용액.

**청구항 163**

제161항에 있어서, 약 3.0 내지 5.0g/kg의 아스파라긴을 포함하는 배합 공급 용액.

**청구항 164**

제159항에 있어서, 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물이, 식물계 가수분해물과 동물계 또는 식물계가 아닌 가수분해물인, 배합 공급 용액.

**청구항 165**

제164항에 있어서, 동물계 또는 식물계가 아닌 가수분해물이 효모계 가수분해물인 배합 공급 용액.

**청구항 166**

제164항에 있어서, 식물계 가수분해물이 대두계 가수분해물인 배합 공급 용액.

**청구항 167**

제159항에 있어서, 기본 배지가 PF-CHO 또는 DMEM/F12 배지인 배합 공급 용액.

**청구항 168**

제159항에 있어서, 기본 세포 배지가, 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제, 글루타민 및 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지인, 배합 공급 용액.

**청구항 169**

제159항 내지 제168항 중 어느 한 항에 있어서, 또한 혼탁도가 약 15 NTU 미만인 배합 공급 용액.

**청구항 170**

제159항 내지 168항 중 어느 한 항에 따르는 배합 공급 용액을 첨가함을 포함하는, 세포 배양 생산 배지의 일정한 글루코스 수준을 유지시키는 방법.

**청구항 171**

- a) 글루코스와 기본 세포 배지를 용액 속에 배합하는 단계;
- b) 단계 a)의 용액의 pH를 약 9.5 내지 10.5로 조정하는 단계;
- c) 단계 b)의 용액에 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 첨가하는 단계; 및
- d) 단계 c)의 용액의 pH를 조정하여, 배합 공급 용액의 pH가 약 6.5 내지 7.5가 되도록 하는 단계를 포함하는, 기본 배지, 글루코스 및 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함하는 배합 공급 용액의 제조방법.

**청구항 172**

제171항에 있어서, 단계 c)가, 동물계 또는 식물계가 아닌 제1 가수분해물 및 제2 식물계 가수분해물을 첨가함을 포함하는, 배합 공급 용액의 제조방법.

**청구항 173**

제172항에 있어서, 동물계 또는 식물계가 아닌 가수분해물이 효모계 가수분해물인, 배합 공급 용액의 제조방법.

**청구항 174**

제172항에 있어서, 식물계 가수분해물이 대두계 가수분해물인, 배합 공급 용액의 제조방법.

**청구항 175**

a) 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 포유동물 세포를 세포 배양 생산 배지에서 배양하는 단계; 및  
 b) 상기 세포 배양 생산 배지에, 글루코스, 기본 세포 배지, 글루타민 이외의 아미노산 및 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함하는 pH 약 6.7 내지 7.2의 배합 공급 용액을 첨가하여, 약 1.5g/L 이상의 항체가 생산되도록 하는 단계  
 를 포함하여, 포유동물 세포 배양물로부터 약 1.5g/L 이상의 항체를 생산하는 방법.

**청구항 176**

제175항에 있어서, 배합 공급 용액이 약 100 내지 250g/kg의 글루코스를 포함하는 방법.

**청구항 177**

제175항에 있어서, 2g/L 이상의 항체가 생산되는 방법.

**청구항 178**

제175항에 있어서, 4g/L 이상의 항체가 생산되는 방법.

**청구항 179**

제175항에 있어서, 5g/L 이상의 항체가 생산되는 방법.

**청구항 180**

제175항에 있어서, 약 6g/L의 항체가 생산되는 방법.

**청구항 181**

포유동물 세포 배양물로부터 생산되는 항체의 역가를 증가시키는 방법으로서,

a) 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 포유동물 세포를 세포 배양 생산 배지에서 배양하는 단계; 및  
 b) 상기 세포 배양 생산 배지에, 글루코스, 기본 세포 배지, 글루타민 이외의 아미노산 및 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함하는 pH 약 6.7 내지 7.2의 배합 공급 용액을 첨가하여, 생산되는 상기 항체의 역가가 단계 b) 없이 단계 a)에 따라 배양된 대조군 포유동물 세포 배양물보다 50% 이상 높아지도록 하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 182**

제181항에 있어서, 생산된 항체의 역가가 대조군보다 100% 이상 높은 방법.

**청구항 183**

제181항에 있어서, 생산된 항체의 역가가 대조군보다 150% 이상 높은 방법.

**청구항 184**

제175항 내지 제183항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 밀도가  $2.0 \times 10^6$  세포/ml 이상에 도달할 때 배합 공급 용액

이 첨가되는 방법.

**청구항 185**

제175항 내지 제183항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 밀도가 약  $3.5 \times 10^6$  세포/ml에 도달할 때 배합 공급 용액이 첨가되는 방법.

**청구항 186**

a) 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 포유동물 세포를 세포 배양 생산 배지에서 배양하는 단계; 및  
 b) 세포 배양 생산 배지 중의 대사 지시인자 수준을 모니터링하는 피드백 조절 시스템을 이용하여, 상기 피드백 조절 시스템에 의해 결정된 시점에서 배합 공급 용액을 상기 세포 배양 생산 배지에 첨가하여 항체가 생산되도록 하는 단계

를 포함하는, 포유동물 세포 배양에서 단백질을 생산하는 방법.

**청구항 187**

제186항에 있어서, 포유동물 세포가 중국 햄스터 난소(CHO)세포인 방법.

**청구항 188**

제186항 또는 제187항에 있어서, 대사 지시인자가 글루코스 또는 글루타민인 방법.

**청구항 189**

제186항 또는 제187항에 있어서, 공급 용액이 글루코스; 기본 세포 배지; 글루타민 이외의 아미노산; 및 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함하는 배합 공급 용액인 방법.

**청구항 190**

제186항 또는 제187항에 있어서, 단백질이 항체인 방법.

**청구항 191**

제190항에 있어서, 항체가 항-TNF  $\alpha$  항체, 항-IL-12 항체, 항-IL-18 항체 및 항-EPO 수용체(EPO-R) 항체로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법.

**청구항 192**

제190항 또는 제191항에 있어서, 항체가 1.5g/L 이상의 역가로 생산되는 방법.

**청구항 193**

제190항 또는 191항에 있어서, 항체가 2g/L 이상의 역가로 생산되는 방법.

**청구항 194**

제175항 내지 제185항 및 제189항 중 어느 한 항에 있어서, 배합 공급 용액이 약 3.0 내지 12.5g/kg의 아스파라긴을 포함하는 방법.

**청구항 195**

제175항 내지 185항 및 제189항 중 어느 한 항에 있어서, 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물이 식물계 가수분해물 및 동물계 또는 식물계가 아닌 가수분해물을 포함하는 방법.

**청구항 196**

제195항에 있어서, 동물계 또는 식물계가 아닌 가수분해물이 효모계 가수분해물인 방법.

**청구항 197**

제195항에 있어서, 식물계 가수분해물이 대두계 가수분해물인 방법.

**청구항 198**

제175항 내지 제185항 및 제189항 중 어느 한 항에 있어서, 배합 공급 용액이 약 100 내지 200g/kg의 글루코스를 포함하는 방법.

**청구항 199**

제175항 내지 제185항 및 제189항 중 어느 한 항에 있어서, 글루코스 수준이 약 0.25 내지 20.0g/L로 유지되도록 세포 배양 배지 중의 글루코스 수준을 모니터링하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 200**

제199항에 있어서, 글루코스 수준이 자동 샘플링 장치를 이용하여 모니터링되는 방법.

**청구항 201**

제175항 내지 제185항 중 어느 한 항에 있어서, 생산되는 항체가 항-TNF  $\alpha$  항체, 항-IL-18 항체 및 항-IL-12 항체로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법.

**청구항 202**

제191항 또는 제201항에 있어서, 항-TNF  $\alpha$  항체가 D2E7(아달리무마브)인 방법.

**청구항 203**

제191항 또는 제201항에 있어서, 항-IL-18 항체가 ABT-325인 방법.

**청구항 204**

제191항 또는 제201항에 있어서, 항-IL-12 항체가 ABT-874인 방법.

**청구항 205**

- a) 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 포유동물 세포를 세포 배양 생산 배지에서 배양하는 단계;
- b) 세포 배양 생산 배지 중의 대사 지시인자를 모니터링하는 피드백 조절 시스템을 이용하여, 표적 대사 지시인자 설정점(setpoint)에 부합하도록 세포 배양 생산 배지에 배합 공급 용액을 첨가하는 단계; 및
- c) 1일당 세포 배양 생산 배지에 첨가되는 배합 공급 용액의 양을 측정하여, 공급 프로파일을 측정하는 단계를 포함하는, 포유동물 세포 배양물에서 단백질을 생산하기 위해 공급 프로파일을 측정하는 방법.

**청구항 206**

제205항에 있어서, 대사 지시인자가 글루코스 또는 글루타민인 방법.

**청구항 207**

제205항에 따르는 공급 프로파일에 따라 배합 공급 용액을 포유동물 세포 배양물에 첨가하는 단계를 포함하여, 포유동물 세포 배양물에서 단백질을 생산하는 유가식 방법.

**청구항 208**

- a) 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 포유동물 세포를 세포 배양 생산 배지에서 배양하는 단계; 및
- b) 상기 세포 배양 배지에 부티르산나트륨, N-아세틸시스테인 또는 이들의 배합물을 첨가하되, 부티르산나트륨은 최종 농도가 약 0.1mM 내지 10mM이 되도록 첨가하고, N-아세틸시스테인은 최종 농도가 약 1mM 내지 80mM이 되도록 첨가하여, 항체가 100mg/L 이상의 역가로 생산되도록 하는 단계를 포함하는, 항체의 역가가 100mg/L 이상이 되도록 포유동물 세포 배양물에서 항체를 생산하는 방법.

**청구항 209**

제208항에 있어서, 항체 역가가 150mg/L 이상인 방법.

**청구항 210**

제208항에 있어서, 항체 역가가 200mg/L 이상인 방법.

**청구항 211**

제208항에 있어서, 항체 역가가 250mg/L 이상인 방법.

**청구항 212**

제208항에 있어서, 항체 역가가 300mg/L 이상인 방법.

**청구항 213**

제208항에 있어서, 항체 역가가 400mg/L 이상인 방법.

**청구항 214**

항체의 역가가 대조군 포유동물 세포 배양물보다 10% 이상 높아지도록 포유동물 세포 배양물에서 항체를 생산하는 방법으로서,

- a) 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 포유동물 세포를 세포 배양 생산 배지에서 배양하는 단계; 및
- b) 상기 세포 배양 배지에 부티르산나트륨, N-아세틸시스테인 또는 이들의 배합물을 첨가하되, 부티르산나트륨은 최종 농도가 약 0.1mM 내지 10mM이 되도록 첨가하고, N-아세틸시스테인은 최종 농도가 약 1mM 내지 80mM이 되도록 첨가하여, 상기 항체의 역가가 단계 b) 없이 단계 a)를 포함하는 대조군 포유동물 세포 배양물보다 10% 이상 높아지도록 하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 215**

제214항에 있어서, 포유동물 세포 배양물의 항체 역가가 대조군 포유동물 세포 배양물보다 29% 이상 향상되는 방법.

**청구항 216**

제214항에 있어서, 포유동물 세포 배양물의 항체 역가가 대조군 포유동물 세포 배양물보다 40% 이상 향상되는 방법.

**청구항 217**

제214항에 있어서, 포유동물 세포 배양물의 항체 역가가 대조군 포유동물 세포 배양물보다 70% 이상 향상되는 방법.

**청구항 218**

제214항에 있어서, 포유동물 세포 배양물의 항체 역가가 대조군 포유동물 세포 배양물보다 90% 이상 높은 방법.

**청구항 219**

제208항 내지 제218항 중 어느 한 항에 있어서, 부티르산나트륨, N-아세틸시스테인 또는 이들의 배합물이 포유동물 세포 배양물의 증식기 동안 포유동물 세포 배양물에 첨가되는 방법.

**청구항 220**

제208항 내지 제218항 중 어느 한 항에 있어서, 부티르산나트륨, N-아세틸시스테인 또는 이들의 배합물이 배양기간 중 4일째와 7일째 사이에 포유동물 세포 배양물에 첨가되는 방법.

**청구항 221**

제208항 내지 제218항 중 어느 한 항에 있어서, 부티르산나트륨, N-아세틸시스테인 또는 이들의 배합물이 배양 0일째에 포유동물 세포 배양물에 첨가되는 방법.

**청구항 222**

제208항 내지 제218항 중 어느 한 항에 있어서, 부티르산나트륨의 최종 농도가 약 0.1mM 내지 10mM인 방법.

**청구항 223**

제208항 내지 제218항 중 어느 한 항에 있어서, 부티르산나트륨의 최종 농도가 약 0.1mM 내지 8.0mM인 방법.

**청구항 224**

제208항 내지 제218항 중 어느 한 항에 있어서, 부티르산나트륨의 최종 농도가 약 0.1mM 내지 3.0mM 부티르산나트륨인 방법.

**청구항 225**

제208항 내지 제218항 중 어느 한 항에 있어서, N-아세틸시스테인의 최종 농도가 약 20mM 내지 60mM인 방법.

**청구항 226**

제208항 내지 제218항 중 어느 한 항에 있어서, N-아세틸시스테인의 최종 농도가 약 10mM인 방법.

**청구항 227**

제208항 내지 제218항 중 어느 한 항에 있어서, N-아세틸시스테인의 최종 농도가 약 8mM인 방법.

**청구항 228**

대조군 포유동물 세포 배양물에 비해 포유동물 세포 배양물의 수명을 35% 이상 연장시키는 방법으로서,

- a) 항체를 암호화하는 핵산을 포함하는 포유동물 세포를 세포 배양 생산 배지에서 배양하는 단계; 및
- b) 상기 세포 배지에 약 1mM 내지 80mM의 N-아세틸시스테인을 첨가하여, 단계 b) 없이 단계 a)를 포함하는 대조군 포유동물 세포 배양물에 비해 포유동물 세포 배양물의 수명이 35% 이상 연장되도록 하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 229**

제228항에 있어서, 포유동물 세포 배양물의 수명이 대조군 포유동물 세포 배양물에 비해 약 45% 이상 연장되는 방법.

**청구항 230**

제228항에 있어서, 포유동물 세포 배양물의 수명이 대조군 포유동물 세포 배양물에 비해 약 55% 이상 연장되는 방법.

**청구항 231**

제228항 내지 제230항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 생산 배지에 N-아세틸시스테인을 최종 농도가 약 8mM 이 되도록 첨가하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 232**

제208항 내지 제231항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 항-TNF α 항체, 항-IL-18 항체 및 항-IL-12 항체로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법.

**청구항 233**

제232항에 있어서, 항-IL-18 항체가 ABT-325인 방법.

**명세서**

**배경기술**

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2006년 9월 13일에 출원된 미국 임시출원 제60/845158호 및 2006년 12월 21일에 출원된 미국 임시출원 제60/876374호에 대해 우선권 주장하는 출원이다. 상기 각 우선권 서류의 내용은 본 발명에 참고인용된다.

[0003] 배경기술

[0004] 재조합 DNA 기술은 다양한 이용분야, 예컨대 치료용, 진단용, 농업용 및 연구용 등에 사용될 수 있는 양으로 단백질 생산하는 수단을 제공했다.

[0005] 재조합 단백질 생산의 한가지 목표는 단백질의 최대량과 생산성의 가장 효율적인 수단을 제공하기 위한 세포 배양 배지 및 조건의 최적화이다. 임의의 개선, 예컨대 점증적 개선은 경제적으로 막대한 이익을 제공할 수 있다. 제약 산업에서, 질병의 치료를 위한 치료법에 사용되는 생물제제(biologics)를 위한 단백질 생산의 최적화는 이 생물제제가 대규모로 제조될 때 임의의 개선이 유의적인 영향을 미칠 수 있기 때문에 유리하다. 이와 같이, 의약품의 생물학적 단백질을 발현하는 세포 배양으로부터 단백질 생산을 최대화해야 하는 필요성은 여전히 남아있다.

[0006] 통상적인 포유동물 세포 배양 배지는 DMEM 또는 Ham's F12를 비롯한 시판되는 배지 포물레이션을 기초로 한다. 종종 배지 포물레이션은 세포 성장 및 생물학적 단백질 발현 모두의 증가를 지지하기에 충분하게 강화된 것이 아니다. 이에, 개선된 세포 배양 배지, 보충물 및 개선된 단백질 생산을 위한 세포 배양 방법의 필요성이 여전히 남아있다.

**발명의 내용**

[0007] 발명의 개요

[0008] 본 발명은 세포 배양, 특히 포유동물 세포 배양에서 단백질 발현을 개선하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명은 개선된 세포 배양 배지, 예컨대 단백질 발현용 세포 성장용 배지 및 단백질 발현을 위해 최적화된 세포 배양 생산 배지에 관한 것이다.

[0009] 또한, 본 발명은 포유동물 세포 배양에서 높은 단백질 발현을 위해 최적화된 방법 및 배지 포물레이션도 포함한다. 특히, 세포 배양 배지는 CHO 세포와 같은 포유동물 세포 배양에서 항체의 발현을 위해 최적화된 것이다. 또한, 가수분해물 함유 용액 및 농축 기본 배지 용액과 같은 보충 용액을 첨가하여 단백질 생산을 촉진하기 위한 개선된 유가식(fed batch) 방법 및 조성물도 제공한다.

[0010] 본 발명은 포유동물 세포 배양에 사용되는 개선된 무염 기본 성장 배지를 제공한다. 본 발명은 파트 A, 파트 B 및 파트 C를 포함하는 무혈청 세포 배양 배지로서, 파트 A가 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지로 필수적으로 이루어지고; 파트 B가 무기 철 공급원으로 필수적으로 이루어지며; 파트 C가 재조합 성장인자, 완충액, 삼투물농도 조절제, 에너지원; 및 2종 이상의 상이한 비-동물계(non-animal) 가수분해물을 포함하는, 무혈청 세포 배양 배지를 포함한다.

[0011] 한가지 양태에서, 파트 A는 추가로 비철계 금속 이온, 비타민 또는 이 둘의 배합물을 포함한다. 한가지 양태에서, 파트 B의 무기 철 공급원은 시트르산철, 예컨대 최종 용액 농도가 약 100 내지 150mg/L 또는 0.1 내지 1mM 인 시트르산철이다. 다른 양태에서, 파트 B의 무기 철 공급원은 예컨대 약 122.5mg/L 또는 0.5mM 최종 용액 농도의 시트르산철과 같은 시트르산철이다.

[0012] 한가지 양태에서, 파트 C의 재조합 성장인자는 인슐린 또는 이의 재조합 유사체인 IGF-1 및 인슐린과 IGF-1의 배합물로 이루어진 그룹 중에서 선택되고, 예컨대 약 4mg/L 내지 13mg/L의 인슐린 또는 이의 재조합 유사체이다.

- [0013] 한가지 양태에서, 변형된 기본 배지에서 제외된 완충액은 HEPES 완충액이다.
- [0014] 한가지 양태에서, 파트 C의 완충액은 인산염 완충액, HEPES 및 중탄산나트륨, 예컨대 약 0.1 내지 3g/L의 중탄산나트륨, 약 0.1 내지 3g/L HEPES를 포함한다. 한가지 양태에서, 파트 C의 완충액은 1.6g/L의 중탄산나트륨 및 /또는 약 1.8g/L의 HEPES를 포함한다. 한가지 양태에서, 인산염 완충액은 약 0.01 내지 0.5g/L의 일염기성 및 이염기성 인산나트륨을 포함한다.
- [0015] 추가 양태에서, 파트 C는 추가로 아스파라긴, 글루타민 또는 글루타민과 아스파라긴을 포함한다.
- [0016] 한가지 양태에서, 파트 C의 삼투농도 조절제는 NaCl, 예컨대 약 1.0 내지 6.5g/L NaCl이다.
- [0017] 한가지 양태에서, 파트 C의 에너지원은 단당류, 예컨대 글루코스(예컨대, D-글루코스), 말토스, 만노스, 갈락토스 및 프럭토스이다. 한가지 양태에서, 본 발명의 세포 배양 배지는 약 7.0g/L 이하의 글루코스를 포함한다.
- [0018] 다른 양태에서, 본 발명의 세포 배양 배지는 식물계 가수분해물 및 동물계도 아니고 식물계도 아닌 가수분해물인 파트 C의 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함한다. 본 발명에 사용될 수 있는 식물계 가수분해물의 한가지 예는 대두계 가수분해물이다. 동물계도 아니고 식물계도 아닌 가수분해물의 한가지 예는 효모계 가수분해물이다.
- [0019] 한가지 양태에서, 본 발명의 세포 배양 배지는 추가로 메토틱세이트를 포함한다. 한가지 양태에서, 세포 배양 배지는 추가로 약 100nM 내지 5000nM의 메토틱세이트를 포함한다.
- [0020] 또 다른 양태에서, 세포 배양 배지는 추가로 세포 보호제 또는 계면활성제를 포함한다. 본 발명의 세포 배양 배지에 사용될 수 있는 계면활성제의 한가지 예는 메틸 셀룰로스 또는 플루로닉 폴리올, 예컨대 플루로닉 (Pluronic) F-68 이다. 한가지 양태에서, 세포 배양 배지는 약 0.1-5g/L Pluronic F-68을 포함한다. 한가지 양태에서, 세포 배양 배지는 약 1.0g/L의 Pluronic F-68을 포함한다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 양태에서, 세포 배양 배지는 추가로 L-글루타민을 포함한다.
- [0022] 한가지 양태에서, 세포 배양 배지는 pH가 7.1 내지 7.3 범위이다.
- [0023] 다른 양태에서, 본 발명의 세포 배양 배지는 삼투농도가 320 내지 450mOsm/kg 범위이다.
- [0024] 본 발명은 기본 배지; 약 8 내지 12ml/kg 또는 116 내지 126mg/L의 시트르산철; 약 2 내지 6mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 2 내지 5g/kg의 무수 글루코스; 약 0.1 내지 0.5g/kg의 L-글루타민; 약 1 내지 3g/kg의 중탄산나트륨; 약 0.01 내지 0.05g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.4 내지 0.5g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 및 약 1.0 내지 3.0g/kg의 효모계 가수분해물을 포함하는 무혈청 세포 배양 배지를 포함한다. 한가지 양태에서, 세포 배양 배지는 기본 배지; 약 10.0ml/kg 또는 122mg/L의 시트르산철; 약 4.0mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 3.5g/kg의 무수 글루코스; 약 0.29g/kg의 L-글루타민; 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 약 0.03g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 및 약 2.0g/kg의 효모계 가수분해물을 포함한다. 한가지 양태에서, 세포 배양 배지는 필수적으로 기본 배지; 약 10.0ml/kg 또는 122mg/L의 시트르산철; 약 4.0mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 3.5g/kg의 무수 글루코스; 약 0.29g/kg의 L-글루타민; 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 약 0.03g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 및 약 2.0g/kg의 효모계 가수분해물로 이루어진다.
- [0025] 또한, 본 발명은 기본 배지; 약 8 내지 12ml/kg 또는 116 내지 126mg/L의 시트르산철; 약 2 내지 6mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 2 내지 5g/kg의 무수 글루코스; 약 0.1 내지 0.5g/kg의 L-글루타민; 약 1 내지 3g/kg의 중탄산나트륨; 약 0.01 내지 0.05g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.4 내지 0.5g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 및 약 1.0 내지 3.0g/kg의 효모계 가수분해물로 필수적으로 이루어지는 무혈청 세포 배양 배지를 포함한다. 한가지 양태에서, 세포 배양물은 기본 배지; 약 8 내지 12ml/kg 또는 116 내지 126mg/L의 시트르산철; 약 2 내지 6mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 2 내지 5g/kg의 무수 글루코스; 약 0.1 내지 0.5g/kg의 L-글루타민; 약 1 내지 3g/kg의 중탄산나트륨; 약 0.01 내지 0.05g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.4 내지 0.5g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 및 약 1.0 내지 3.0g/kg의 효모계 가수분해물로 필수적으로 이루어진다.
- [0026] 한가지 양태에서, 세포 배양 배지는 추가로 약 2.50mL/kg의 메토틱세이트를 포함한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 단백질을 암호화하는 핵산을 함유한 포유동물 세포를 본 발명의 배양 배지에서 배양하는 단계; 및 이 배양물을 세포 배양 생산 배지로 옮겨 단백질이 생산되도록 하는 단계를 포함하는 단백질의 생산방법도

포함한다.

[0028] 한가지 양태에서, 단백질은 항체, 예컨대 D2E7(아달리무마브)이다.

[0029] 또한, 본 발명은 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지; 약 8 내지 12ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철; 약 4 내지 8ml/kg 또는 10 내지 14mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스; 약 0.5 내지 0.7g/kg의 L-글루타민; 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨; 약 1 내지 2g/kg의 HEPES; 약 2 내지 3g/kg의 NaCl; 약 0.5 내지 2g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.01 내지 1.0g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.4 내지 0.5g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 8 내지 12g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 60 내지 70g/kg의 식물계 가수분해물을 포함하는 무혈청 세포 배양 생산 배지를 제공한다. 한가지 양태에서, 세포 배양 생산 배지는 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지; 약 8 내지 12ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철; 약 4 내지 8ml/kg 또는 10 내지 14mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스; 약 0.5 내지 0.7g/kg의 L-글루타민; 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨; 약 1 내지 2g/kg의 HEPES; 약 2 내지 3g/kg의 NaCl; 약 0.5 내지 2g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.01 내지 1.0g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.4 내지 0.5g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 8 내지 12g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 60 내지 70g/kg의 식물계 가수분해물로 필수적으로 이루어진다. 다른 양태에서, 세포 배양 생산 배지는 기본 배지, 약 10.0ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철; 약 6.0ml/kg 또는 12mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 7.0g/kg의 무수 글루코스; 약 0.58 내지 0.59g/kg의 L-글루타민; 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 약 1.8g/kg의 HEPES; 약 2.4 내지 2.5g/kg의 NaCl; 약 1.0g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.03 내지 0.04g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 10.7g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 6.9 내지 7.0g/kg의 식물계 가수분해물을 포함한다.

[0030] 또한, 본 발명은 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지; 약 8 내지 12ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철; 약 3 내지 5ml/kg 또는 6 내지 8mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스; 약 0.1 내지 2g/kg의 L-글루타민; 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨; 약 1 내지 2g/kg의 HEPES; 약 2 내지 3g/kg의 NaCl; 약 0.1 내지 2g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.01 내지 0.1g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.4 내지 0.5g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.4 내지 0.5g/kg의 L-아스파라긴 일수화물; 약 2 내지 6g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 2 내지 4g/kg의 식물계 가수분해물을 포함하는 무혈청 세포 배양 배지를 제공한다. 한가지 양태에서, 세포 배양 배지는 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지; 약 8 내지 12ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철; 약 3 내지 5ml/kg 또는 6 내지 8mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스; 약 0.1 내지 2g/kg의 L-글루타민; 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨; 약 1 내지 2g/kg의 HEPES; 약 2 내지 3g/kg의 NaCl; 약 0.1 내지 2g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.01 내지 0.1g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.4 내지 0.5g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.4 내지 0.5g/kg의 L-아스파라긴 일수화물; 약 2 내지 6g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 2 내지 4g/kg의 식물계 가수분해물로 필수적으로 이루어진다. 한가지 양태에서, 세포 배양 배지는 변형된 기본 배지; 약 10.0ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철; 약 3.8 내지 3.9ml/kg 또는 7.8mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 7.0g/kg의 무수 글루코스; 약 0.8 내지 0.9g/kg의 L-글루타민; 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 약 1.8g/kg의 HEPES; 약 2.6 내지 2.7g/kg의 NaCl; 약 1.0g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.03 내지 0.04g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.45g/kg의 L-아스파라긴 일수화물; 약 4.0g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 2.6g/kg의 식물계 가수분해물을 포함한다.

[0031] 또한 본 발명은 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지; 약 8 내지 10ml/kg 또는 120 내지 130mg/L의 시트르산철; 약 3 내지 5ml/kg 또는 7.8mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스; 약 0.8 내지 0.9g/kg의 L-글루타민; 약 0.3 내지 0.5g/kg의 L-아스파라긴 일수화물; 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨; 약 1 내지 2g/kg의 HEPES; 약 2 내지 3g/kg의 NaCl; 약 0.5 내지 2g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.01 내지 0.1g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.1 내지 1.0g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 2 내지 6g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 2 내지 4g/kg의 식물계 가수분해물을 포함하는 무혈청 세포 배양 배지를 포함한다. 한가지 양태에서, 세포 배양 배지는

중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지; 약 8 내지 10ml/kg 또는 120 내지 130mg/L의 시트르산철; 약 3 내지 5ml/kg 또는 7.8mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스; 약 0.8 내지 0.9g/kg의 L-글루타민; 약 0.3 내지 0.5g/kg의 L-아스파라긴 일수화물; 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨; 약 1 내지 2g/kg의 HEPES; 약 2 내지 3g/kg의 NaCl; 약 0.5 내지 2g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.01 내지 0.1g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.1 내지 1.0g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 2 내지 6g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 2 내지 4g/kg의 식물계 가수분해물로 필수적으로 이루어진다. 다른 양태에서, 세포 배양 배지는 변형된 기본 배지; 약 10ml/kg 또는 122mg/L의 시트르산철; 약 3.8 내지 3.9ml/kg 또는 7.8mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 7.0g/kg의 무수 글루코스; 약 0.87 내지 0.88g/kg의 L-글루타민; 약 0.45g/kg의 L-아스파라긴 일수화물; 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 약 1.8g/kg의 HEPES; 약 2.67 내지 2.68g/kg의 NaCl; 약 1.0g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.03 내지 0.04g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 4.0g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 2.6g/kg의 식물계 가수분해물을 포함한다.

[0032] 본 발명은 기본 세포 성장 배지; 약 8 내지 12ml/kg 또는 120 내지 130mg/L의 시트르산철; 약 2 내지 6mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 150 내지 250g/kg의 무수 글루코스; 약 0.1 내지 0.5g/kg의 L-글루타민; 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨; 및 약 5 내지 15g/kg의 효모계 가수분해물을 포함하는 무혈청 세포 배양 배지를 포함한다. 한가지 양태에서, 세포 배양 배지는 기본 세포 성장 배지; 약 8 내지 12ml/kg 또는 120 내지 130mg/L의 시트르산철; 약 2 내지 6mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 150 내지 250g/kg의 무수 글루코스; 약 0.1 내지 0.5g/kg의 L-글루타민; 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨; 및 약 5 내지 15g/kg의 효모계 가수분해물로 필수적으로 이루어진다. 추가 양태에서, 세포 배양 배지는 기본 세포 성장 배지; 약 10ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철; 약 4mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 200g/kg의 무수 글루코스; 약 0.29 내지 0.30g/kg의 L-글루타민; 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 및 약 11g/kg의 효모계 가수분해물을 포함한다. 또 다른 양태에서, 단백질은 항체, 예컨대 완전한 사람 항-IL-12 항체, 예컨대 ABT-874 이다.

[0033] 또한, 본 발명은 기본 세포 성장 배지; 약 8 내지 12ml/kg 또는 120 내지 130mg/L의 시트르산철; 약 2 내지 6mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 1 내지 3g/kg의 무수 글루코스; 약 0.1 내지 1g/kg의 L-글루타민; 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨; 및 약 1 내지 4g/kg의 효모계 가수분해물을 포함하는 무혈청 세포 배양 배지를 포함한다. 한가지 양태에서, 세포 배양 배지는 기본 세포 성장 배지; 약 8 내지 12ml/kg 또는 120 내지 130mg/L의 시트르산철; 약 2 내지 6mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 1 내지 3g/kg의 무수 글루코스; 약 0.1 내지 1g/kg의 L-글루타민; 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨; 및 약 1 내지 4g/kg의 효모계 가수분해물로 구성된다. 다른 양태에서, 세포 배양 배지는 기본 세포 성장 배지; 약 10ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철; 약 4mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 1.5g/kg의 무수 글루코스; 약 0.29 내지 0.30g/kg의 L-글루타민; 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 및 약 2g/kg의 효모계 가수분해물을 포함한다. 한가지 양태에서, 세포 배양 배지의 pH는 약 7.10 내지 7.30이고, 삼투물농도는 약 300 내지 340mOsm/kg 범위이다. 또 다른 양태에서, 세포 배양 배지는 적어도 8g/kg의 효모계 가수분해물을 포함한다. 한가지 양태에서, 세포 배양 배지를 사용해서 CHO 세포와 같은 포유동물 세포에서 생산되는 단백질은 항체, 예컨대 항-IL-12 항체 또는 항-EPO-R 항체, 예컨대 ABT-874이다.

[0034] 또한, 본 발명은 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지; 약 8 내지 12ml/kg 또는 120 내지 130mg/L의 시트르산철; 약 2.5 내지 4.5ml/kg 또는 7.8mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스; 약 0.5 내지 1g/kg의 L-글루타민; 약 0.1 내지 1g/kg의 L-아스파라긴 일수화물; 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨; 약 1 내지 2g/kg의 HEPES; 약 1 내지 4g/kg의 NaCl; 약 0.1 내지 2g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.01 내지 0.1g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.1 내지 1g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 2 내지 6g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 2 내지 6g/kg의 식물계 가수분해물을 포함하는 세포 배양 배지를 제공한다. 한가지 양태에서, 본 발명의 세포 배양 배지는 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지; 약 8 내지 12ml/kg 또는 120 내지 130mg/L의 시트르산철; 약 2.5 내지 4.5ml/kg 또는 7.8mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스; 약 0.5 내지 1g/kg의 L-글루타민; 약 0.1 내지 1g/kg의 L-아스파라긴 일수화물; 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨; 약 1 내지 2g/kg의 HEPES; 약 1 내지 4g/kg의 NaCl; 약 0.1 내지 2g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.01 내지 0.1g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.1 내지 1g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 2 내지 6g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 2 내지 6g/kg의 식물계 가수분해물로 필수적으로 이루어진다. 다른 양태에서, 세포 배양 배지는 변형된 기본 배지; 약 10ml/kg 또는

122.45mg/L의 시트르산철; 약 3.8 내지 3.9ml/kg 또는 7.8mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 7.0g/kg의 무수 글루코스; 약 0.87 내지 0.88g/kg의 L-글루타민; 약 0.45g/kg의 L-아스파라긴 일수화물; 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 약 1.8g/kg의 HEPES; 약 2.67g/kg의 NaCl; 약 1.0g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.03 내지 0.04g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 4.0g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 2.6g/kg의 식물계 가수분해물을 포함한다.

[0035] 또한, 본 발명은 중탄산나트륨, HEPES 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제거하는 변형이 이루어진, 변형된 기본 배지; 약 8 내지 12ml/kg 또는 120 내지 130mg/L의 시트르산철; 약 4 내지 8ml/kg 또는 10 내지 14mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스; 약 0.1 내지 1g/kg의 L-글루타민; 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨; 약 1 내지 2g/kg의 HEPES; 약 1 내지 3g/kg의 NaCl; 약 0.5 내지 2g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.01 내지 0.1g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.1 내지 1g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 8 내지 12g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 6 내지 8g/kg의 식물계 가수분해물을 포함하는 세포 배양 생산 배지를 포함한다. 한가지 양태에서, 본 발명의 세포 배양 생산 배지는 중탄산나트륨, HEPES 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제거하는 변형이 이루어진, 변형된 기본 배지; 약 8 내지 12ml/kg 또는 120 내지 130mg/L의 시트르산철; 약 4 내지 8ml/kg 또는 10 내지 14mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스; 약 0.1 내지 1g/kg의 L-글루타민; 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨; 약 1 내지 2g/kg의 HEPES; 약 1 내지 3g/kg의 NaCl; 약 0.5 내지 2g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.01 내지 0.1g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.1 내지 1g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 8 내지 12g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 6 내지 8g/kg의 식물계 가수분해물로 필수적으로 이루어진다. 다른 양태에서, 세포 배양 생산 배지는 변형된 기본 배지; 약 10ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철; 약 6.0ml/kg 또는 12mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 7.0g/kg의 무수 글루코스; 약 0.58 내지 0.59g/kg의 L-글루타민; 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 약 1.8g/kg의 HEPES; 약 2.45g/kg의 NaCl; 약 1.0g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.03 내지 0.04g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 10.7g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 6.9 내지 7.0g/kg의 식물계 가수분해물을 포함한다.

[0036] 본 발명의 다른 관점은 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨, 변형된 기본 배지; 약 8 내지 12ml/kg 또는 110 내지 130mg/L의 시트르산철; 약 4 내지 8ml/kg 또는 11 내지 15mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스; 약 0.1 내지 1g/kg의 L-글루타민; 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨; 약 1 내지 2g/kg의 HEPES; 약 1 내지 3g/kg의 NaCl; 약 0.1 내지 2g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.01 내지 0.1g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.1 내지 1g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 12 내지 16g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 8 내지 10g/kg의 식물계 가수분해물을 포함하는 세포 배양 생산 배지이다. 한가지 양태에서, 세포 배양 생산 배지는 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨, 변형된 기본 배지; 약 8 내지 12ml/kg 또는 110 내지 130mg/L의 시트르산철; 약 4 내지 8ml/kg 또는 11 내지 15mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스; 약 0.1 내지 1g/kg의 L-글루타민; 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨; 약 1 내지 2g/kg의 HEPES; 약 1 내지 3g/kg의 NaCl; 약 0.1 내지 2g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.01 내지 0.1g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.1 내지 1g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 12 내지 16g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 8 내지 10g/kg의 식물계 가수분해물로 필수적으로 이루어진다. 다른 양태에서, 본 발명의 세포 배양 생산 배지는 변형된 기본 배지; 약 10ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철; 약 6.5ml/kg 또는 13mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 7.0g/kg의 무수 글루코스; 약 0.58 내지 0.59g/kg의 L-글루타민; 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 약 1.8g/kg의 HEPES; 약 2.45g/kg의 NaCl; 약 1.0g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.03 내지 0.04g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 14.2 내지 14.3g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 9.2 내지 9.3g/kg의 식물계 가수분해물을 포함한다.

[0037] 한가지 양태에서, 세포 배양 배지는 pH가 약 6 내지 8이다. 다른 양태에서, 세포 배양 배지는 pH가 약 7.10 내지 7.20이다.

[0038] 한가지 양태에서, 세포 배양 배지는 삼투물농도가 약 350 내지 450mOsm/kg이다. 다른 한가지 양태에서, 세포 배양 배지는 삼투물농도가 약 373 내지 403mOsm/kg이다.

[0039] 본 발명의 세포 배양 배지는 추가로 메토티렉세이트를 포함할 수 있다. 한가지 양태에서, 세포 배양 배지는 추

가로 메토티렉세이트, 예컨대 약 1 내지 10mL/kg을 포함한다. 다른 양태에서, 세포 배양 배지는 추가로 약 2.50mL/kg과 같은 메토티렉세이트를 포함한다.

- [0040] 한가지 양태에서, 세포 배양물에서 발견되는 단백질은 항체 또는 이의 항원결합단편이다. 한가지 양태에서, 항체 또는 이의 항원결합단편은 항-TNF  $\alpha$  항체 또는 항-EPO-R 항체이다. 다른 양태에서, 항-TNF  $\alpha$  항체 또는 이의 항원결합단편은 완전한 사람 항-TNF  $\alpha$  항체이고, 예컨대 완전한 사람 항-TNF  $\alpha$  항체는 D2E7(아달리무마브)이다. 또 다른 양태에서, 항체 또는 이의 항원결합단편은 항-IL-12 또는 항-IL-18 항체, 예컨대 완전한 사람 항-IL-12 또는 항-IL-18 항체이다.
- [0041] 또한, 본 발명은 항체와 같은 단백질을 암호화하는 핵산을 함유한 포유동물 세포를 본 명세서에 제시된 세포 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 단백질, 예컨대 항체 또는 이의 항원결합부위의 생산방법을 포함한다. 한가지 양태에서, 세포 배양 배지는 세포 배양 생산 배지이다. 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 생산될 수 있는 항체 또는 이의 항원결합단편의 예에는 항-IL-18 항체, 항-TNF  $\alpha$  항체, 항-IL-12 항체 및 항-EPO 수용체 (EPO-R) 항체가 포함된다.
- [0042] 한가지 양태에서, 본 발명은 추가로 본 명세서에 기술된 세포 배양 생산 배지와 같은 세포 배양 배지로부터 당해 단백질을 분리하는 단계를 포함한다.
- [0043] 한가지 양태에서, 본 발명의 세포 배양 배지 및 방법은 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 비롯한 포유동물 세포를 배양하기 위한 것이다.
- [0044] 또한, 본 발명은 본 명세서에 기술된 임의의 세포 배양 배지 중의 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 포함한다.
- [0045] 또한, 본 발명은 CHO 세포와 같은 포유동물 세포 배양물에서 단백질을 생산하기 위한 개선된 유가식 방법 및 관련된 세포 배양 배지를 제공한다. 본 발명의 한가지 관점은 단백질을 암호화하는 핵산을 포함한 포유동물 세포를 세포 배양 생산 배지를 포함하는 세포 배양물 중에서 배양하는 단계; 및 상기 세포 배양물에, 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함하는 가수분해물 강화 용액과 기본 강화 용액을 첨가함으로써 상기 포유동물 세포에게 일정 기간 동안 공급하여 상기 단백질이 생산되도록 하는 단계를 포함하는, 단백질을 생산하는 유가식 (fed batch) 방법이다.
- [0046] 한가지 양태에서, 기본 강화 용액은 농축된 기본 배지를 포함한다. 다른 양태에서, 기본 강화 용액은 기본 배지, 아스파라긴 및 글루코스를 포함한다. 또 다른 양태에서, 기본 배지는 PF CHO 이다.
- [0047] 한가지 양태에서, 가수분해물 강화 용액은 식물 또는 동물 유래가 아닌 제1 가수분해물 및 제2 식물계 가수분해물을 포함한다. 한가지 양태에서, 식물 또는 동물 유래가 아닌 가수분해물 및 식물계 가수분해물은 효모계 가수분해물이다. 한가지 양태에서, 식물계 가수분해물은 대두계 가수분해물이다.
- [0048] 한가지 양태에서, 생산되는 단백질은 항체 또는 이의 항원결합부위이다. 본 발명의 유가식 방법에 사용될 수 있는 항체 또는 이의 항원결합부위의 예에는 항-TNF  $\alpha$  항체, 항-IL-12 항체, 항-IL-18 항체 및 항-EPO 수용체 (EPO-R) 항체가 포함된다.
- [0049] 본 발명은 항-TNF  $\alpha$  항체를 암호화하는 핵산을 함유한 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 세포 배양 생산 배지를 함유한 세포 배양물 중에서 배양하는 단계; 및 이 세포 배양물에, 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함하는 가수분해물 강화 용액과 기본 배지, 아스파라긴 및 글루코스를 포함하는 기본 강화 용액을 첨가함으로써 CHO 세포에게 일정 기간 동안 공급하여 상기 항-TNF  $\alpha$  항체가 생산되도록 하는 단계를 포함하는, 항-TNF  $\alpha$  항체를 생산하는 유가식 방법을 포함한다.
- [0050] 또한, 본 발명은 항-TNF  $\alpha$  항체를 암호화하는 핵산을 포함한 CHO 세포를, 글루코스 적어도 1 내지 5g/L, 예컨대 2.0g/L을 함유하는 세포 배양 생산 배지를 포함한 세포 배양물에서 배양하되, 글루코스의 농도를 적어도 1 내지 5g/L, 예컨대 2.0g/L의 글루코스 농도로 유지하는데 필요할 때 세포 배양 생산 배지에 글루코스를 첨가함으로써 조절하는 단계; 및 상기 세포 배양물에, 기본 배지, 아스파라긴 및 글루코스를 포함하는 기본 강화 용액과 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함하는 가수분해물 강화 용액을 첨가함으로써 CHO 세포에게 일정 기간 동안 공급하여 상기 항-TNF  $\alpha$  항체가 생산되도록 하는 단계를 포함하는, 항-TNF  $\alpha$  항체를 생산하는 유가식 방법을 특징으로 한다.
- [0051] 한가지 양태에서, 본 발명은 추가로 항-TNF  $\alpha$  항체를 회수하는 단계를 포함한다.
- [0052] 또 다른 양태에서, 세포 배양물은 약 32 내지 38°C 범위의 온도, 예컨대 35°C에서 배양된다.

- [0053] 한가지 양태에서, 세포 배양 생산 배지에는 20 내지 65% 사이의 용존 산소, 예컨대 약 30% 용존 산소가 유지된다.
- [0054] 한가지 양태에서, 세포 배양 생산 배지의 삼투물농도는 배양 동안 500mOsm 이하로 유지된다.
- [0055] 한가지 양태에서, 가수분해물 강화 용액은 식물 또는 동물에서 유래되지 않는 제1 가수분해물과 제2 식물계 가수분해물을 포함한다. 또 다른 양태에서, 식물 또는 동물에서 유래되지 않는 가수분해물 및 식물계 가수분해물이 효모계 가수분해물이다. 또 다른 양태에서, 식물계 가수분해물은 대두계 가수분해물이다. 한가지 양태에서, 가수분해물 강화 용액은 약 50 내지 280g/kg, 예컨대 250 내지 280g/kg의 대두계 가수분해물과 약 75 내지 300g/kg, 예컨대 150 내지 180g/kg의 효모계 가수분해물로 필수적으로 이루어진다. 한가지 양태에서, 가수분해물 농축 용액은 약 50 내지 280g/kg, 예컨대 250 내지 280g/kg의 대두계 가수분해물과 약 75 내지 300g/kg, 예컨대 150 내지 180g/kg의 효모계 가수분해물을 포함한다.
- [0056] 한가지 양태에서, 기본 배지는 PF CHO 이다.
- [0057] 한가지 양태에서, 기본 강화 용액은 pH가 약 9 내지 10.5 이다.
- [0058] 또 다른 양태에서, 유가식 방법의 일정 기간은 약 9 내지 15일 사이; 또는 약 12일이다.
- [0059] 또 다른 양태에서, 기본 강화 용액은 일정 기간 중 4일, 6일, 9일 및 11일 중에서 하루 이상의 날에 세포 배양 생산 배지에 첨가된다. 한가지 양태에서, 가수분해물 강화 용액은 일정 기간 중 4일, 7일, 또는 4일과 7일에 세포 배양 생산 배지에 첨가된다.
- [0060] 또 다른 양태에서, 유가식 방법은 추가로 세포 배양 생산 배지의 pH를 pH 선형 구배(ramp)에 따라 조정하는 단계를 포함하고, 이 pH 선형 구배는 약 6.5 내지 8, 예컨대 약 7.1 내지 7.2의 pH에서 시작해서 약 6.5 내지 7.0, 예컨대 약 6.9의 최종 pH가 된다. 한가지 양태에서, pH 선형 구배는 적어도 약 24시간의 기간 동안 조정된다. 다른 양태에서, pH 선형 구배는 적어도 약 48시간의 기간 동안 조정된다. 또 다른 양태에서, pH 선형 구배는 약 72시간의 기간 동안 조정된다.
- [0061] 또한, 본 발명은 본 명세서에 기술된 세포 배양 배지, 예컨대 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스가 제외된 변형된 기본 배지; 약 8 내지 10ml/kg 또는 110 내지 130mg/L의 시트르산철; 약 4 내지 8ml/kg 또는 10 내지 14mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스; 약 0.1 내지 1g/kg의 L-글루타민; 약 1 내지 3g/kg의 중탄산나트륨; 약 1 내지 3g/kg의 HEPES; 약 2 내지 3g/kg의 NaCl; 약 0.1 내지 2g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.01 내지 0.1g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.1 내지 1.0g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 8 내지 12g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 6 내지 8g/kg의 식물계 가수분해물을 포함하는 세포 배양 생산 배지를 유가식 방법에 사용하는 방법을 포함한다. 한가지 양태에서, 세포 배양 생산 배지는 변형된 기본 배지; 약 10.0ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철; 약 6.0ml/kg 또는 12mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 7.0g/kg의 무수 글루코스; 약 0.58 내지 0.59g/kg의 L-글루타민; 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 약 1.8g/kg의 HEPES; 약 2.45g/kg의 NaCl; 약 1.0g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.03 내지 0.04g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 10.7g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 6.9 내지 7.0g/kg의 식물계 가수분해물을 포함한다.
- [0062] 또한, 본 발명은 항-IL-12 항체를 암호화하는 핵산을 함유한 CHO 세포를 세포 배양 생산 배지를 함유한 세포 배양물 중에서 배양하는 단계; 이 세포 배양물에, 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함하는 가수분해물 강화 용액과 기본 배지, 아스파라긴 및 글루코스를 포함하는 기본 강화 용액을 첨가함으로써 CHO 세포에게 일정 기간 동안 공급하여 상기 항-IL-12 항체가 생산되도록 하는 단계를 포함하는, 항-IL-12 항체를 생산하는 유가식 방법도 제공한다.
- [0063] 한가지 양태에서, 가수분해물 강화 용액은 추가로 글루코스를 포함한다.
- [0064] 한가지 양태에서, 본 발명은 추가로 항-IL-12 항체를 회수하는 단계를 포함한다.
- [0065] 한가지 양태에서, 세포 배양물은 약 32 내지 38°C 범위의 온도, 예컨대 약 33°C에서 배양된다.
- [0066] 본 발명의 한가지 양태에서, 세포 배양 생산 배지에는 20 내지 65% 사이의 용존 산소, 예컨대 약 40%의 용존 산소가 유지된다.
- [0067] 또 다른 양태에서, 세포 배양 생산 배지의 pH는 약 6.7 내지 7.2이다.

- [0068] 본 발명의 또 다른 양태에서, 가수분해물 강화 용액은 식물 또는 동물에서 유래되지 않는 가수분해물과 식물계 가수분해물을 포함한다. 한가지 양태에서, 식물 또는 동물에서 유래되지 않는 가수분해물은 효모계 가수분해물이다. 다른 양태에서, 식물계 가수분해물은 대두계 가수분해물이다. 또 다른 양태에서, 가수분해물 강화 용액은 약 50 내지 225g/kg, 예컨대 150 내지 180g/kg의 대두계 가수분해물; 약 75 내지 300g/kg, 예컨대 250 내지 280g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 1 내지 5g/L, 예컨대 2 내지 3g/L의 글루코스로 필수적으로 이루어진다. 또 다른 양태에서, 가수분해물 강화 용액은 약 50 내지 225g/kg, 예컨대 150 내지 180g/kg의 대두계 가수분해물; 약 75 내지 300g/kg, 예컨대 250 내지 280g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 1 내지 5g/L, 예컨대 2 내지 3g/L의 글루코스를 포함한다. 한가지 양태에서, 기본 강화 용액은 기본 배지, 아스파라긴 및 글루코스를 포함한다.
- [0069] 또 다른 양태에서, 기본 강화 용액이 pH는 약 9 내지 10, 예컨대 약 9.7이고 삼투물농도는 약 1400 내지 1500mOsm이다. 또 다른 양태에서, 기본 강화 용액 중의 배지는 PF CHO이다.
- [0070] 한가지 양태에서, 유가식 방법의 일정 기간은 14일 내지 15일 사이이다.
- [0071] 한가지 양태에서, 기본 강화 용액은 일정 기간 중 5일째부터 시작해서 격일로 세포 배양 생산 배지에 첨가된다.
- [0072] 본 발명의 한가지 양태에서, 가수분해물 강화 용액은 일정 기간 중 6일째부터 시작해서 매일 세포 배양 생산 배지에 첨가된다. 또 다른 양태에서, 기본 강화 용액과 가수분해물 강화 용액은 일정 기간의 5일째부터 시작해서 매일 세포 배양 생산 배지에 첨가된다.
- [0073] 또한, 본 발명은 본 명세서에 기술된 세포 배양 배지, 예컨대 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스가 제외된 변형된 기본 배지; 약 8 내지 12ml/kg 또는 110 내지 130mg/L의 시트르산철; 약 5 내지 8ml/kg 또는 11 내지 15mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 5 내지 9g/kg의 무수 글루코스; 약 0.1 내지 1g/kg의 L-글루타민; 약 1 내지 2g/kg의 중탄산나트륨; 약 1 내지 2g/kg의 HEPES; 약 2 내지 3g/kg의 NaCl; 약 0.1 내지 2g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.01 내지 0.1g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.1 내지 1.0g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 6 내지 12g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 6 내지 8g/kg의 식물계 가수분해물을 포함하는 세포 배양 생산 배지를 유가식 방법에 사용하는 것을 포함한다. 한가지 양태에서, 세포 배양 생산 배지는 약 10ml/kg 또는 122.45mg/L의 시트르산철; 약 6.5ml/kg 또는 13mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 7.0g/kg의 무수 글루코스; 약 0.58 내지 0.59g/kg의 L-글루타민; 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 약 1.8g/kg의 HEPES; 약 2.45g/kg의 NaCl; 약 1.0g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.03 내지 0.04g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 10.7g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 6.9 내지 7.0g/kg의 식물계 가수분해물을 포함한다.
- [0074] 한가지 양태에서, 본 발명은 세포를 대규모로 배양하기 위한 방법을 특징으로 한다. 한가지 양태에서, 대규모 세포 배양물은 약 10L 이다. 다른 양태에서, 대규모 세포 배양물은 약 13L 이다.
- [0075] 또한, 본 발명은 영양소의 배합물을 한 용액으로 제공하기 때문에 유리한 배합 공급 용액(combination feed solution)을 제공한다. 본 발명은 글루코스; 기본 배지; 글루타민 이외의 아미노산; 및 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함하는 배합 공급 용액을 포함한다. 또한, 본 발명은 글루코스; 기본 배지; 글루타민 이외의 아미노산; 및 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물로 필수적으로 이루어지는 배합 공급 용액을 포함한다.
- [0076] 한가지 양태에서, 공급 용액은 pH가 약 6.0 내지 8.0 사이이다.
- [0077] 한가지 양태에서, 배합 공급 용액은 약 100 내지 250g/kg의 글루코스를 포함한다. 한가지 양태에서, 배합 공급 용액은 아미노산 아스파라긴, 예컨대 약 1.0 내지 15.0g의 아스파라긴; 또는 약 3.0 내지 5.0g/kg의 아스파라긴을 함유한다.
- [0078] 한가지 양태에서, 배합 공급 용액에서 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물은 식물계 가수분해물 및 동물계도 아니고 식물계도 아닌 가수분해물이다. 한가지 양태에서, 동물계도 아니고 식물계도 아닌 가수분해물은 효모계 가수분해물이다. 한가지 양태에서, 식물계 가수분해물은 대두계 가수분해물이다.
- [0079] 한가지 양태에서, 배합 공급 용액은 PF-CHO 또는 DMEM/F12 배지인 기본 배지를 포함한다. 한가지 양태에서, 기본 세포 배지는 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제, 글루타민 및 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지이다.

- [0080] 또 다른 양태에서, 배합 공급 용액은 추가로 혼탁도가 약 15 NTU 미만이다.
- [0081] 본 발명은 본 명세서에 기술된 배합 공급 용액을 첨가하는 단계를 포함하여 세포 배양 생산 배지의 안정된 글루코스 수준을 유지시키는 방법을 특징으로 한다.
- [0082] 본 발명의 다른 관점은 글루코스와 기본 세포 배지를 용액에 배합하는 단계; 단계 a)의 용액의 pH를 약 9.5 내지 10.5로 조정하는 단계; 단계 b)의 용액에 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 첨가하는 단계; 및 배합 공급 용액의 pH가 약 6.5 내지 7.5 사이가 되도록 단계 c)의 용액의 pH를 조정하는 단계를 포함하여, 기본 배지, 글루코스 및 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함하는 배합 공급 용액의 제조방법이다. 한가지 양태에서, 단계 c)는 동물계도 아니고 식물계도 아닌 제1 가수분해물과 제2 식물계 가수분해물을 첨가하는 것을 포함한다. 한가지 양태에서, 동물계도 아니고 식물계도 아닌 가수분해물은 효모계 가수분해물이다. 또 다른 양태에서, 식물계 가수분해물은 대두계 가수분해물이다.
- [0083] 또한, 본 발명은 포유동물 세포 배양물로부터 항체 또는 이의 항원결합부위와 같은 단백질 생산을 증가시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 항체를 암호화하는 핵산을 함유한 포유동물 세포를 세포 배양 생산 배지 중에서 배양하는 단계; 및 상기 세포 배양 생산 배지에, 글루코스, 기본 세포 배지, 글루타민 이외의 아미노산 및 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함하는 pH 약 6.7 내지 7.2의 배합 공급 용액을 첨가하여 적어도 약 1.5g/L의 항체가 생산되도록 하는 단계를 포함하여, 포유동물 세포 배양물로부터 적어도 약 1.5g/L의 항체를 생산하는 방법을 제공한다. 한가지 양태에서는, 적어도 2g/L의 항체가 생산된다. 다른 양태에서는 적어도 5g/L의 항체가 생산된다. 추가 양태에서, 본 발명은 약 6g/L의 항체를 생산하는 방법을 제공한다.
- [0084] 한가지 양태에서, 배합 공급 용액은 약 100 내지 250g/kg 글루코스를 포함한다.
- [0085] 또한, 본 발명은 항체를 암호화하는 핵산을 함유한 포유동물 세포를 세포 배양 생산 배지 중에서 배양하는 단계; 및 상기 세포 배양 생산 배지에, 글루코스, 기본 세포 배지, 글루타민 이외의 아미노산 및 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함하는 pH 약 6.7 내지 7.2의 배합 공급 용액을 첨가하는 단계를 포함하여, 생산된 항체의 역가가 단계 b) 없이 단계 a)에 따라 배양된 대조군 포유동물 세포 배양물보다 50% 이상 높아지는, 포유동물 세포 배양물로부터 생산되는 항체의 역가를 증가시키는 방법을 제공한다. 한가지 양태에서, 생산된 항체의 역가는 대조군보다 100% 이상 높다. 다른 양태에서, 생산된 항체의 역가는 대조군보다 150% 이상 높다.
- [0086] 한가지 양태에서, 배합 공급 용액은 세포 밀도가 적어도  $2.0 \times 10^6$  개의 세포/ml에 도달할 때 첨가된다. 한가지 양태에서, 배합 공급 용액은 세포 밀도가 약  $3.5 \times 10^6$  개의 세포/ml에 도달할 때 첨가된다.
- [0087] 또한, 본 발명은 세포 배양 생산 배지에서 단백질을 암호화하는 핵산을 함유한 포유동물 세포를 배양하는 단계; 및 세포 배양 생산 배지에서 대사 지표 수준을 모니터링하는 피드백 조절 시스템을 이용하여, 이 피드백 조절 시스템에 의해 결정된 시점에서 상기 세포 배양 생산 배지에 배합 공급 용액을 첨가하여 항체가 생산되도록 하는 단계를 포함하는 포유동물 세포 배양에서 항체 또는 이의 항원결합부위와 같은 단백질을 생산하는 방법도 제공한다. 한가지 양태에서, 대사 지표는 글루코스 또는 글루타민이다. 다른 양태에서, 공급 용액은 글루코스; 기본 세포 배지; 글루타민 이외의 아미노산; 및 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함하는 배합 공급 용액이다. 한가지 양태에서, 항체는 항-TNF  $\alpha$  항체, 항-IL-12 항체, 항-IL-18 항체 및 항-EPO 수용체(EPO-R) 항체이다.
- [0088] 한가지 양태에서, 본 발명의 방법을 사용할 때 항체가 적어도 1.5g/L의 역가로 생산된다. 다른 양태에서, 적어도 2g/L의 역가가 생산된다.
- [0089] 본 발명의 한가지 양태에서, 배합 공급 용액은 약 3.0 내지 12.5g/kg의 아스파라긴을 포함한다.
- [0090] 본 발명의 한가지 양태에서, 배합 공급 용액을 약 100 내지 200g/kg의 글루코스를 포함한다.
- [0091] 또 다른 양태에서, 본 발명은 추가로 글루코스 수준이 약 0.25 내지 20.0g/L 사이로 유지되도록 세포 배양 배지 중의 글루코스 수준을 모니터링하는 것을 포함한다. 한가지 양태에서, 글루코스 수준은 자동 샘플링 장치에 의해 모니터링된다.
- [0092] 한가지 양태에서, 본 명세서에 개시된 방법과 조성물을 사용해서 생산되는 항체는 항-TNF  $\alpha$  항체, 항-IL-18 항체, 항-EPO-R 항체 및 항-IL-12 항체로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 한가지 양태에서, 항체 또는 이의 항원결합부위는 완전한 사람 항체이다. 한가지 양태에서, 항-TNF  $\alpha$  항체는 D2E7(아달리무마브)이다. 한가지 양태에서, 항-IL-18 항체는 ABT-325이다. 한가지 양태에서, 항-IL-12 항체는 ABT-874이다.

- [0093] 또한, 본 발명은 항체를 암호화하는 핵산을 함유한 포유동물 세포를 세포 배양 생산 배지 중에서 배양하는 단계; 세포 배양 생산 배지 중의 대사 지표를 모니터링하는 피드백 조절 시스템을 이용하여, 목표 대사 지표 설정치(setpoint)에 부합하도록 세포 배양 생산 배지에 배합 공급 용액을 첨가하는 단계; 및 1일당 세포 배양 생산 배지에 첨가되는 배합 공급 용액의 양을 결정하는 공급 프로파일이 측정되도록 하는 단계를 포함하여, 포유동물 세포 배양물에서 단백질을 생산하기 위해 공급 프로파일을 측정하는 방법을 제공한다. 한가지 양태에서, 대사 지표는 글루코스 또는 글루타민이다.
- [0094] 또한, 본 발명은 본 발명의 방법을 사용하여 측정된 공급 프로파일에 따라 배합 공급 용액을 포유동물 세포 배양물에 첨가하는 단계를 포함하여 포유동물 세포 배양물에서 단백질을 생산하기 위한 유가식 방법을 포함한다.
- [0095] 본 발명의 다른 관점은 부티르산나트륨 및/또는 N-아세틸시스테인을 포함하는 개선된 세포 배양 배지이다. 본 발명은 항체를 암호화하는 핵산을 함유한 포유동물 세포를 세포 배양 생산 배지 중에서 배양하는 단계; 최종 농도 약 0.1mM 내지 10mM의 부티르산나트륨, 최종 농도 약 1mM 내지 80mM의 N-아세틸시스테인, 또는 이의 배합물을 상기 세포 배양 배지에 첨가하여 항체가 적어도 300mg/L의 역가로 생산되도록 하는 단계를 포함하여, 항체 역가가 적어도 300mg/L이도록 포유동물 세포 배양물에서 항체를 생산하는 방법을 특징으로 한다. 한가지 양태에서, 항체 역가는 적어도 100mg/L이다. 한가지 양태에서, 항체 역가는 적어도 약 200mg/L이다. 한가지 양태에서, 항체 역가는 적어도 250mg/L이다. 한가지 양태에서, 항체 역가는 적어도 약 300mg/L이다. 한가지 양태에서, 항체 역가는 적어도 400mg/L이다.
- [0096] 또한, 본 발명은 항체 역가가 대조군 포유동물 세포 배양물보다 적어도 10% 이상이도록 포유동물 세포 배양물에서 항체를 생산하는 방법으로서, a) 항체를 암호화하는 핵산을 함유한 포유동물 세포를 세포 배양 생산 배지 중에서 배양하는 단계; 및 b) 상기 세포 배양 배지에 최종 농도 약 0.1mM 내지 10mM의 부티르산나트륨 및 최종 농도 약 1mM 내지 80mM의 N-아세틸시스테인 또는 이의 배합물을 첨가하는 단계를 포함하여, 단계 b) 없이 단계 a)를 포함하는 대조군 포유동물 세포 배양에서보다 항체의 역가가 적어도 10% 이상 큰 방법을 제공한다. 한가지 양태에서, 포유동물 세포 배양물의 항체 역가는 대조군 포유동물 세포 배양물보다 적어도 29% 이상 개선된다. 한가지 양태에서, 포유동물 세포 배양물의 항체 역가는 대조군 포유동물 세포 배양물보다 적어도 40% 이상 개선된다. 한가지 양태에서, 포유동물 세포 배양물의 항체 역가는 대조군 포유동물 세포 배양물보다 적어도 70% 이상 개선된다. 한가지 양태에서, 포유동물 세포 배양물의 항체 역가는 대조군 포유동물 세포 배양물보다 적어도 90% 이상이다.
- [0097] 한가지 양태에서, 부티르산나트륨, N-아세틸시스테인 또는 이의 배합물은 포유동물 세포 배양물의 증식기 동안 포유동물 세포 배양물에 첨가된다.
- [0098] 한가지 양태에서, 부티르산나트륨, N-아세틸시스테인 또는 이의 배합물은 배양 기간의 4일 내지 7일 사이에 포유동물 세포 배양물에 첨가된다.
- [0099] 한가지 양태에서, 부티르산나트륨, N-아세틸시스테인 또는 이의 배합물은 배양 0일째 포유동물 세포 배양물에 첨가된다.
- [0100] 다른 양태에서, 부티르산나트륨의 최종 농도는 약 0.1mM 내지 10mM 사이이다. 한가지 양태에서, 부티르산나트륨의 최종 농도는 약 0.1mM 내지 8.0mM 이다. 한가지 양태에서, 부티르산나트륨의 최종 농도는 약 0.1mM 내지 3.0mM 부티르산나트륨이다.
- [0101] 한가지 양태에서, N-아세틸시스테인의 최종 농도는 약 20mM 내지 60mM 이다. 한가지 양태에서, N-아세틸시스테인의 최종 농도는 약 10mM 이다. 한가지 양태에서, N-아세틸시스테인의 최종 농도는 약 8mM 이다.
- [0102] 본 발명은 추가로 대조군 포유동물 세포 배양물에 비해 포유동물 세포 배양물의 수명을 적어도 35% 연장시키는 방법으로서, a) 항체를 암호화하는 핵산을 함유한 포유동물 세포를 세포 배양 생산 배지 중에서 배양하는 단계; 및 b) 세포 배지에 약 1mM 내지 80mM의 N-아세틸시스테인을 첨가하여, 단계 b) 없이 단계 a)를 포함하는 대조군 포유동물 세포 배양물에 비해 적어도 35% 연장시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0103] 한가지 양태에서, 포유동물 세포 배양물의 수명이 대조군 포유동물 세포 배양물에 비해 적어도 약 45% 연장된다. 한가지 양태에서, 포유동물 세포 배양물의 수명은 대조군 포유동물 세포 배양물에 비해 적어도 약 55% 연장된다.
- [0104] 한가지 양태에서, 본 발명의 방법은 세포 배양 생산 배지에 최종 농도 약 8mM의 N-아세틸시스테인을 첨가하는 것을 특징으로 한다.

- [0105] 한가지 양태에서, 항체 또는 이의 항원결합부위는 항-TNF  $\alpha$  항체, 항-IL-18 항체(예: ABT-325) 및 항-IL-12 항체로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.
- [0106] 본 발명은 파트 A, 파트 B 및 파트 C를 포함하는 무혈청 세포 배양 배지로서, 파트 A가 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 당당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지로 필수적으로 이루어지고; 파트 B가 무기 철 공급원으로 필수적으로 이루어지며; 파트 C가 재조합 성장인자, 완충액, 삼투물농도 조절제, 에너지원; 및 2종 이상의 상이한 비-동물계(non-animal) 가수분해물을 포함하는, 무혈청 세포 배양 배지를 제공한다. 한가지 양태에서, 파트 C는 재조합 성장인자; 완충액; 삼투물농도 조절제; 에너지원; 및 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물로 필수적으로 이루어진다.
- [0107] 또한, 본 발명은 비타민 함량이 감소되고 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 당당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지; 약 10ml/kg 또는 122.45 mg/L의 시트르산철; 약 6.5ml/kg 또는 13mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 7.0g/kg의 무수 글루코스; 약 0.58 내지 0.59g/kg의 L-글루타민; 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 약 1.8g/kg의 HEPES; 약 2.45g/kg의 NaCl; 약 1.0g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.03 내지 0.04g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 10.7g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 6.9 내지 7.0g/kg의 식물계 가수분해물을 함유하는 무혈청 세포 배양 배지를 제공한다.
- [0108] 또한, 본 발명은 비타민 함량이 감소되고, 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 당당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지; 약 150g/kg의 무수 글루코스; 약 5.0g/kg의 L-아스파라긴 일수화물; 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 약 65g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 41g/kg의 식물계 가수분해물을 함유하는 무혈청 세포 배양 배지를 제공한다.
- [0109] 또한, 본 발명은 비타민 함량이 감소되고 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 당당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지; 약 10ml/kg 또는 122.45 mg/L의 시트르산철; 약 6.5ml/kg 또는 13mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 약 200g/kg의 무수 글루코스; 약 0.58 내지 0.59g/kg의 L-글루타민; 약 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 약 1.8g/kg의 HEPES; 약 2.45g/kg의 NaCl; 약 1.0g/kg의 Pluronic F-68; 약 0.03 내지 0.04g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 약 0.43 내지 0.44g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 약 10.7g/kg의 효모계 가수분해물; 및 약 6.9 내지 7.0g/kg의 식물계 가수분해물을 함유하는 무혈청 세포 배양 배지를 제공한다.
- [0110] 또한, 본 발명은 다음과 같은 양태의 개선된 배지를 제공한다. 본 발명은 재조합 생물체제를 발현하는 CHO 세포를 배양하기 위한, 파트 A, B 및 C를 포함하는 개선된 배지로서, 파트 A가 물, 아미노산, 비타민 및 다른 보조인자를 함유하고; 파트 B가 무기 철 공급원을 함유하며; 파트 C가 재조합 성장 인자, 완충액, 삼투물농도 조절제, 에너지원, 비철계 금속 이온, 가수분해물 및 추가 제제를 함유하는 배지를 포함한다.
- [0111] 한가지 양태에서, 파트 C는 중탄산나트륨, HEPES, 일염기성 및 이염기성 인산나트륨, 염화나트륨, Pluronic F-68 및 글루코스를 포함한다. 다른 양태에서, 1.5g/L의 중탄산나트륨이 첨가된다. 다른 양태에서, 1.8g/L의 HEPES가 첨가된다. 또 다른 양태에서, 0.1-0.5g/L의 일염기성 및 이염기성 인산나트륨이 첨가된다. 또 다른 양태에서, 1g/L 내지 6.5g/L의 염화나트륨이 첨가된다. 또 다른 양태에서, 1.0g/L의 Pluronic F-68이 첨가된다. 한가지 양태에서, 1g/L 내지 7g/L의 글루코스가 첨가된다. 한가지 양태에서, 비타민은 PABA(p-아미노벤조산), 비오틴, D-Ca 판토텐네이트(비타민 B5), 엽산, i-이노시톨, 니아신아미드, 피로독신(비타민 B6), 리보플라빈(비타민 B2), 티아민(비타민 B1) 및시아노코발라민(비타민 B12)으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 다른 양태에서, 다른 보조인자는 지질 인자, 알콜 아민, 아미노산 및 펩타이드로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 또 다른 양태에서, 지질 인자는 염화콜린 및 포스파티딜콜린으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 또 다른 양태에서, 알콜 아민은 에탄올아민이다. 한가지 양태에서, 아미노산은 아스파라긴, 글루타민 및 푸트레신으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.
- [0112] 한가지 양태에서, 펩타이드는 글루타티온이다. 한가지 양태에서, 0.4mg/L 내지 1.65mg/L의 글루타티온이 첨가된다.
- [0113] 또 다른 양태에서, 파트 B의 무기 철 공급원은 시트르산철이다. 한가지 양태에서는 10mL/L 또는 122mg/L의 시트르산철이 첨가된다. 또 다른 양태에서, 시트르산철은 122mg/L의 농도로 유지된다. 한가지 양태에서, 재조합 성장 인자는 인슐린 또는 재조합 유사체, IGF-1 또는 인슐린과 IGF-1의 배합물이다. 한가지 양태에서는 4mg/L 또는 13mg/L의 인슐린 또는 재조합 유사체가 첨가된다. 다른 양태에서는 25ng/L 내지 150ng/L의 IGF-1이

첨가된다. 또 다른 양태에서, 50ng/L 내지 100ng/L의 IGF-1이 첨가된다. 또 다른 양태에서, 25ng/L 내지 150ng/L의 IGF-1이 인슐린에 보충된다. 한가지 양태에서는 50ng/L 내지 100ng/L의 IGF-1이 인슐린에 보충된다.

- [0114] 또 다른 양태에서, 삼투물농도 조절제는 NaCl, KCl, KNO<sub>3</sub>으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 한가지 양태에서는 0g/L 내지 10g/L의 삼투물농도 조절제가 첨가된다. 다른 양태에서는 0g/L 내지 6.5g/L의 삼투물농도 조절제가 첨가된다.
- [0115] 또 다른 양태에서, 에너지급원은 단당류, 예컨대 글루코스(예: D-글루코스), 말토스, 만노스, 갈락토스 및 프럭토스이다. 한가지 양태에서, 1.0 내지 7.0g/L의 글루코스가 첨가된다. 다른 양태에서, 1.5 내지 5.0g/L의 글루코스가 첨가된다.
- [0116] 또 다른 양태에서, 비철계 금속 이온은 염화물 염 및 황산염의 형태로 첨가된다. 한가지 양태에서, 비철계 금속 이온은 칼륨, 마그네슘, 구리, 셀레늄, 아연, 니켈, 망간, 주석, 카드뮴, 몰리브데이트, 바나데이트 및 실리케이트로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 한가지 양태에서, 완충액은 탄산염, 염화물, 황산염 및 인산염으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 한가지 양태에서, 완충액은 NaHCO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Na 및 HEPES로 공지된 N-[2-하이드록시에틸]피페라진-N'-[2-에탄설폰산]으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.
- [0117] 본 발명의 한가지 양태에서, 배지에 첨가되는 추가 제제 중 하나는 메토티렉세이트이다. 한가지 양태에서, 메토티렉세이트는 항-IL-18, 항-IL-12, 항-TNF-알파(예: 완전한 사람 항-TNF 알파) 또는 항-EPO-R 항체를 발현하는 CHO 세포의 증식에 사용된다. 한가지 양태에서는 100nM 내지 5000nM이 첨가된다. 한가지 양태에서는 500nM의 메토티렉세이트가 배지에 첨가된다. 한가지 양태에서는 100nM의 메토티렉세이트가 첨가된다. 한가지 양태에서는 5000nM의 메토티렉세이트가 첨가된다.
- [0118] 본 발명의 또 다른 양태에서, 추가 제제 중 하나는 세포 보호제, 예컨대 메틸 셀룰로스 또는 플루로닉 폴리올(예: Pluronic F-68)이다. 한가지 양태에서는 0.5g/L 내지 1.0g/L의 메틸 셀룰로스가 첨가된다. 한가지 양태에서는 0.5g/L 내지 1.0g/L의 Pluronic F-68이 첨가된다. 한가지 양태에서, 0.7g/L 내지 1.2g/L의 Pluronic F-68이 첨가된다.
- [0119] 또 다른 양태에서, 파트 A의 pH는 최대 pH 10으로 증가된다. 한가지 양태에서, 파트 A의 pH는 가수분해물이 첨가될 때 최소 7.0으로 감소된다.
- [0120] 또한, 본 발명은 10.0ml/kg 또는 122mg/L 시트르산철; 2ml/kg 또는 4.0mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 3.5g/kg의 무수 글루코스; 0.292g/kg L-글루타민; 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 0.031g/kg의 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O; 0.436g/kg의 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 2.0g/kg의 가수분해물; 및 2.50ml/kg 메토티렉세이트를 함유하는, 완전한 사람 항-TNF-알파 항체를 발현하는 CHO 세포용 개선 배지를 제공한다.
- [0121] 또한, 본 발명은 10.0ml/kg 또는 122mg/L 시트르산철; 6.0ml/kg 또는 12mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 7.0g/kg의 무수 글루코스; 0.584g/kg L-글루타민; 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 1.8g/kg의 HEPES; 2.45g/kg의 NaCl; 1.0g/kg의 Pluronic F-68; 0.031g/kg의 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O; 0.436g/kg의 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 10.7g/kg의 가수분해물; 6.92g/kg의 피톤 펩톤; 및 2.50ml/kg 메토티렉세이트를 함유하는, 완전한 사람 항-TNF-알파 항체를 발현하는 CHO 세포용 개선 배지를 제공한다.
- [0122] 또한, 본 발명에는 10ml/kg 또는 122mg/L 시트르산철; 3.88ml/kg 또는 7.8mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 7.0g/kg의 무수 글루코스; 0.876g/kg L-글루타민; 0.45g/kg의 L-아스파라긴 일수화물; 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 1.8g/kg의 HEPES; 2.67g/kg의 NaCl; 1.0g/kg의 Pluronic F-68; 0.031g/kg의 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O; 0.436g/kg의 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 10.7g/kg의 가수분해물; 6.92g/kg의 피톤 펩톤; 및 2.50ml/kg 메토티렉세이트를 함유하는, 완전한 사람 항-TNF-알파 항체를 발현하는 CHO 세포용 개선 배지도 포함된다.
- [0123] 또한, 본 발명은 10ml/kg 또는 122mg/L 시트르산철; 3.88ml/kg 또는 7.8mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 7.0g/kg의 무수 글루코스; 0.876g/kg L-글루타민; 0.45g/kg의 L-아스파라긴 일수화물; 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 1.8g/kg의 HEPES; 2.67g/kg의 NaCl; 1.0g/kg의 Pluronic F-68; 0.031g/kg의 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O; 0.436g/kg의 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 4.0g/kg의 효모 근원의 가수분해물; 2.6g/kg의 피톤 펩톤; 및 2.50ml/kg 메토티렉세이트를 함유하는, 완전한 사람 항-TNF-알파 항체를 발현하는 CHO 세포용 개선 배지를 제공한다.
- [0124] 본 발명의 다른 관점은 10ml/kg 또는 122mg/L 시트르산철; 3.88ml/kg 또는 7.8mg/kg의 재조합 사람 인슐린;

7.0g/kg의 무수 글루코스; 0.876g/kg L-글루타민; 0.45g/kg의 L-아스파라긴 일수화물; 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 1.8g/kg의 HEPES; 2.675g/kg의 NaCl; 1.0g/kg의 Pluronic F-68; 0.031g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0.436g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 4.0g/kg의 효모 근원의 가수분해물; 2.579g/kg의 피톤 펩톤; 및 2.50ml/kg 메토틱세이트를 함유하는, 항-IL-18 항체를 발현하는 CHO 세포용 개선 배지이다.

- [0125] 본 발명은 10ml/kg 또는 122mg/L 시트르산철; 6.5ml/kg 또는 13mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 7.0g/kg의 무수 글루코스; 0.584g/kg L-글루타민; 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 1.8g/kg의 HEPES; 2.45g/kg의 NaCl; 1.0g/kg의 Pluronic F-68; 0.031g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0.436g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 10.7g/kg의 효모 가수분해물; 및 6.92g/kg의 피톤 펩톤을 함유하는, 항-IL-18 항체를 발현하는 CHO 세포용 개선 배지를 제공한다.
- [0126] 본 발명은 150.0g/kg의 무수 글루코스; 5.0g/kg의 L-아스파라긴 일수화물; 65.0g/kg의 효모 가수분해물; 및 41.0g/kg의 피톤 펩톤을 함유하는, 항-IL-18 항체를 발현하는 CHO 세포용 개선 배지를 제공한다.
- [0127] 또한, 본 발명은 10ml/kg 또는 122mg/L 시트르산철; 6.5ml/kg 또는 13mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 200.0g/kg의 무수 글루코스; 0.584g/kg L-글루타민; 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 1.8g/kg의 HEPES; 2.45g/kg의 NaCl; 1.0ml/kg의 Pluronic F-68; 0.031g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0.436g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 10.7g/kg의 효모 가수분해물; 및 6.92g/kg의 피톤 펩톤을 함유하는, 항-IL-18 항체를 발현하는 CHO 세포용 개선 배지를 제공한다.
- [0128] 본 발명은 10ml/kg 또는 122mg/kg 시트르산철; 2ml/kg 또는 4mg/kg 재조합 사람 인슐린; 3.5+1.5g/kg 무수 글루코스; 0.292g/kg L-글루타민; 1.6g/kg 중탄산나트륨; 2g/kg 효모 가수분해물; 및 0.25ml/kg 메토틱세이트를 함유하는, 항-IL-18 항체를 발현하는 CHO 세포용 개선 배지를 포함한다.
- [0129] 본 발명은 10ml/kg 또는 122mg/kg 시트르산철; 2ml/kg 또는 4mg/kg 재조합 사람 인슐린; 3.5+1.5g/kg 무수 글루코스; 0.292g/kg L-글루타민; 1.6g/kg 중탄산나트륨; 11g/kg 효모 가수분해물; 및 0.250ml/kg 메토틱세이트를 함유하는, 항-IL-18 항체를 발현하는 CHO 세포용 개선 배지를 포함한다.
- [0130] 본 발명은 10ml/kg 또는 122mg/kg 시트르산철; 2ml/kg 또는 4mg/kg 재조합 사람 인슐린; 200g/l 무수 글루코스; 0.292g/kg L-글루타민; 1.6g/kg 중탄산나트륨; 8g/kg 효모 가수분해물; 및 0.250ml/kg 메토틱세이트를 함유하는, 항-IL-18 항체를 발현하는 CHO 세포용 개선 배지를 포함한다.
- [0131] 본 발명은 10ml/kg 또는 122mg/kg 시트르산철; 3.88ml/kg 또는 7.76mg/L의 재조합 사람 인슐린; 7.0g/l의 무수 글루코스; 0.876g/L L-글루타민; 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 1.8g/L의 HEPES; 2.67g/L의 NaCl; 1.0g/L의 Pluronic; 0.031g/L의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0.436g/L의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 4.0g/L의 효모 추출물; 2.579g/L의 피톤 펩톤; 0.05ml/kg 메토틱세이트; 3.5ml/L 2N NaOH; 및 2.91g/L 2N HCl을 함유하여 최종 pH가 7.10 내지 7.20이고 최종 삼투물농도가 373 내지 403mOsm/kg인, 항-IL-18 항체를 발현하는 CHO 세포용 개선 배지를 포함한다.
- [0132] 본 발명은 10ml/kg 또는 122mg/kg 시트르산철; 3.88ml/kg 또는 7.76mg/L의 재조합 사람 인슐린; 7.0g/l의 무수 글루코스; 0.876g/L L-글루타민; 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 1.8g/L의 HEPES; 2.67g/L의 NaCl; 1.0g/L의 Pluronic; 0.031g/L의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0.436g/L의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 4.0g/L의 효모 추출물; 2.579g/L의 피톤 펩톤; 0.05ml/kg 메토틱세이트; 3.5ml/L 2N NaOH; 및 2.91g/L 2N HCl을 함유하여 최종 pH가 7.10 내지 7.20이고 최종 삼투물농도가 373 내지 403mOsm/kg인, 항-IL-18 항체를 발현하는 CHO 세포용 개선 배지를 포함한다.
- [0133] 본 발명은 10ml/kg 또는 122mg/kg 시트르산철; 4mg/kg 재조합 사람 인슐린; 1.5g/kg 무수 텍스트로스; 0.292g/kg L-글루타민; 1.6g/kg 중탄산나트륨; 2.0g/L 효모 추출물; 및 0.25ml/kg 메토틱세이트를 함유하여, 최종 pH가 7.10 내지 7.30이고 최종 삼투물농도가 300 내지 340mOsm/kg인, 항-IL-18 항체를 발현하는 CHO 세포용 개선 배지를 포함한다.
- [0134] 본 발명은 10ml/kg 또는 122mg/kg 시트르산철; 13mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 7.0g/kg의 무수 텍스트로스; 0.584g/kg L-글루타민; 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 1.8g/kg의 HEPES; 2.45g/kg의 NaCl; 1.0g/kg의 Pluronic F-68; 0.031g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0.436g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 10.7g/L의 효모 추출물; 6.92g/L의 피톤 펩톤; 5.67ml/kg NaOH; 및 2.5ml/kg HCl을 함유하여 최종 pH가 7.10 내지 7.20이고 최종 삼투물농도가 373 내지 403mOsm/kg인, 항-IL-18 항체를 발현하는 CHO 세포용 개선 배지를 포함한다.
- [0135] 본 발명은 10ml/kg 또는 122mg/kg 시트르산철; 7.76mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 7.0g/l의 무수 텍스트로스;

0.876g/kg L-글루타민; 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 1.8g/kg의 HEPES; 2.67g/kg의 NaCl; 1.0g/kg의 Pluronic F-68; 0.031g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0.436g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 4.0g/L의 효모 추출물; 및 2.579g/L의 피톤 펩톤; 0.05ml/L 메토틱렉세이트; 3.5ml/kg NaOH; 및 2.91ml/kg HCl을 함유하여 최종 pH가 7.10 내지 7.20이고 최종 삼투물농도가 373 내지 403mOsm/kg인, 항-IL-18 항체를 발현하는 CHO 세포용 개선 배지를 포함한다.

[0136] 본 발명은 10ml/kg 또는 122mg/kg 시트르산철; 13mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 7.0g/l의 무수 텍스트로스; 0.584g/kg L-글루타민; 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 1.8g/kg의 HEPES; 2.45g/kg의 NaCl; 1.0g/kg의 Pluronic F-68; 0.031g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0.436g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 10.7g/L의 효모 추출물; 및 6.92g/L의 피톤 펩톤; 0.05ml/L 메토틱렉세이트; 5.67ml/kg NaOH; 및 2.5ml/kg HCl을 함유하여 최종 pH가 7.10 내지 7.20이고 최종 삼투물농도가 373 내지 403mOsm/kg인, 항-IL-18 항체를 발현하는 CHO 세포용 개선 배지를 포함한다.

[0137] 본 발명은 10ml/kg 또는 122mg/kg 시트르산철; 13mg/kg의 재조합 사람 인슐린; 7.0g/l의 무수 텍스트로스; 0.584g/kg L-글루타민; 1.6g/kg의 중탄산나트륨; 1.8g/kg의 HEPES; 1.0g/kg의 Pluronic F-68; 0.031g/kg의  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0.436g/kg의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 14.27g/L의 효모 추출물; 9.23g/L의 피톤 펩톤; 0.05ml/L 메토틱렉세이트; 8.95ml/kg NaOH; 및 4.1ml/kg HCl을 함유하여 최종 pH가 7.10 내지 7.20이고 최종 삼투물농도가 373 내지 403mOsm/kg인, 항-IL-18 항체를 발현하는 CHO 세포용 개선 배지를 포함한다.

[0138] 또한, 본 발명은 부티르산나트륨을 첨가하는 단계; 및 N-아세틸시스테인을 첨가하는 단계를 포함하여, 최종 역가를 증가시켜 IgG1 항체를 생산하는 CHO 세포주의 생산성을 증가시키는 방법을 특징으로 한다. 한가지 양태에서, IgG1 항체는 항-IL-18이다. 한가지 양태에서, 생산성의 증가는 최종 역가의 증가에 의해 측정된다. 한가지 양태에서, 최종 역가의 증가는 0.1mM 내지 10mM 농도의 부티르산나트륨의 첨가를 통해 달성된다. 한가지 양태에서, 부티르산나트륨의 농도는 0.1mM 내지 8.0mM이다. 한가지 양태에서, 부티르산나트륨의 농도는 0.1mM 내지 3.0mM 이다. 한가지 양태에서, 부티르산나트륨의 농도는 0.125mM 내지 2.0mM 이다. 한가지 양태에서, 부티르산나트륨의 농도는 0.125mM 이다. 한가지 양태에서, 최종 역가의 증가는 10 내지 80%이다. 한가지 양태에서, 최종 역가의 증가는 20 내지 60%이다. 한가지 양태에서, 최종 역가의 증가는 35 내지 55%이다. 한가지 양태에서, 최종 역가의 증가는 40%이다. 한가지 양태에서, 개선된 세포 배양물의 수명은 0.1mM 내지 10mM 농도의 N-아세틸시스테인의 첨가를 통해 달성된다. 한가지 양태에서, 세포 배양물 수명의 증가는 5 내지 50%이다.

[0139] 또한, 본 발명은 SR-371 및 부티르산나트륨을 포함하여, 최종 역가의 증가를 통해 IgG1 항체 생산용 CHO 세포주의 생산성을 증가시키는 세포 배양 배지를 제공한다. 한가지 양태에서, IgG1 항체는 항-IL-18 이다. 한가지 양태에서, 생산성 증가는 10 내지 80% 증가한 최종 항 IL-18 역가에 의해 측정된다. 한가지 양태에서, 생산성 증가는 20 내지 60% 증가한 최종 항 IL-18 역가에 의해 측정된다. 한가지 양태에서, 생산성 증가는 35 내지 55% 증가한 최종 항 IL-18 역가에 의해 측정된다. 한가지 양태에서, 생산성 증가는 40% 증가한 최종 항 IL-18 역가에 의해 측정된다. 한가지 양태에서, 첨가된 부티르산나트륨의 농도는 0.125mM 내지 8.0mM 이다. 한가지 양태에서, 첨가된 부티르산나트륨의 농도는 0.2mM 내지 3.0mM이다. 한가지 양태에서, 첨가된 부티르산나트륨의 농도는 0.3mM 내지 2.0mM 이다. 한가지 양태에서, 첨가된 부티르산나트륨의 농도는 0.125mM 이다. 한가지 양태에서, 첨가된 N-아세틸시스테인의 농도는 1mM 내지 10mM 이다. 한가지 양태에서, 첨가된 N-아세틸시스테인의 농도는 5mM 내지 10mM 이다. 한가지 양태에서, 평균 최종 역가는 5 내지 50% 증가한다. 한가지 양태에서, 평균 최종 역가는 15 내지 35% 증가한다. 한가지 양태에서, 평균 최종 역가는 25 내지 35% 증가한다.

### 도면의 간단한 설명

[0140] 도 1은 접종시의 생존 세포 밀도의 함수로서 ABT-874 증식 역가를 그래프로 도시한 것이다. 15일째의 역가 결과는 공급시의 생존 세포 밀도와 강한 상관관계가 있다. 상기 데이터에 대한 다항식 적합은 최적의 공급 밀도가 대략  $3.5 \times 10^6$  세포  $\cdot \text{ml}^{-1}$ 임을 시사한다. 공정 파라미터는 pH=6.9, T=35°C, DO=40%, 4X 배지에의 접종비 1:5 또는 1:4였고, 공급은 특정 밀도에서 10일 동안 최초 부피의 1%로 시작했다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0141] I. 정의

[0142] 본 출원에 사용된 용어는 당업계에서 표준이지만, 여기에 제시되는 특정 용어의 정의는 청구항의 의미가 명확하

고 명쾌하게 하기 위한 것이다.

[0143] 본 명세서에 사용된 "항체"란 용어는 4개의 폴리펩타이드 쇠, 즉 이황화 결합에 의해 상호연결된 2개의 중쇄(H)와 2개의 경쇄(L)로 이루어진 면역글로불린 분자를 나타내기 위한 것이다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역(이하, HCVR 또는 VH로 약칭함) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역(이하, LCVR 또는 VL로 약칭함) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 CL로 구성된다. VH와 VL 영역은 다시 상보성 결정 영역(CDR)이라고 불리는 추가변성 영역으로 세분될 수 있고, 이 영역에는 프레임워크 영역(FR)이라는 더욱 보존적인 영역이 산재되어 있다. 각 VH 및 VL은 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성되어 있고, 아미노 말단부터 카르복시 말단까지 다음과 같은 순서로 배열되어 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 본 발명의 방법 및 조성물을 사용하여 생산할 수 있는 항체의 예에는 종양 괴사 인자(TNF)- $\alpha$  항체(항-TNF $\alpha$  항체라고도 지칭함), 인터루킨(IL)-12 항체(항-IL-12 항체라고도 언급함), 인터루킨(IL)-18 항체(항-IL-18 항체라고도 언급함) 및 EPO/R 항체(항-EPO/R 항체라고도 언급함)가 포함된다. 본 발명을 사용하여 생산할 수 있는 TNF $\alpha$  항체는 전문이 본 발명에 참고인용된 미국 특허 6,090,382; 6,258,562; 및 6,509,015에 더욱 자세하게 설명되어 있다.

[0144] 또한, 본 발명은 항체 단편을 생산하는 데에도 사용될 수 있다. 본 명세서에 사용된 항체의 "항원결합부위" 또는 "항원결합단편"(또는 간단히 "항체 부위")이란 용어는 항원(예: hTNF $\alpha$ )에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 의미한다. 전장(full-length) 항체의 단편들은 항체의 항원 결합 기능을 수행할 수 있는 것으로 밝혀져 있다. 항체의 "항원결합부위"란 용어에 포함되는 결합 단편의 예에는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지(hinge) 영역에서 이황화 가교에 의해 결합된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')<sub>2</sub> 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암(arm)의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) VH 또는 VL 도메인으로 이루어진 dAb 단편(Ward et al.(1989) Nature 341: 544-546); (vi) 분리된 상보성 결정 영역(CDR); 및 (vii) 이중 가변 도메인(DVD) 항체가 포함된다. 더욱이, Fv 단편의 두 도메인, VL 및 VH는 분리된 유전자에 의해 암호화될지라도, 제조방법을 이용하여 VL과 VH 영역이 쌍을 이루어 1가 분자를 형성한 단일 단백질체로서 제조될 수 있게 하는 합성 링커에 의해 연결될 수 있다(단일쇄 Fv(scFv)로 알려져 있음; 예: Bird et al(1988) Science 242: 423-426; 및 Huston et al.(1988) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85: 5879-5883). 이러한 단일쇄 항체도 항체의 "항원결합부위"라는 용어에 포함된다. 디아바디(diabody)와 같은 단일쇄 항체의 다른 형태도 포함된다. 디아바디는 VH 및 VL 도메인이 단일 폴리펩타이드 사슬에서 발현되지만, 같은 사슬 상의 두 도메인 사이에 쌍이 이루어기에는 너무 짧은 링커를 사용하여 상기 도메인들이 다른 사슬의 상보성 도메인들과 쌍을 이루어 2개의 항원결합부위를 산출하는 2가의 이특이성 항체이다(예: Holliger et al.(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak et al.(1994) Structure 2: 1121-1123). 본 발명의 방법에 의해 생산될 수 있는 항체 부위의 예는 전문이 참고인용된 미국 특허 6,090,382, 6,258,562, 6,509,015에 더욱 상세하게 설명되어 있다. 본 발명의 방법과 조성물을 사용한 항체 단편 또는 부위의 생산도 본 발명의 범위에 포함된다.

[0145] 본 명세서에 사용된 "제조합 사람 항체"란 용어는 제조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 분리된 모든 사람 항체, 예컨대 숙주 세포를 형질감염시킨 재조합체 발현 벡터에 의해 발현된 항체, 재조합체로부터 분리된 항체, 조합 사람 항체 라이브러리(이하에 더 상세히 기술됨), 사람 면역글로불린 유전자에 돌연변이성인 동물(예: 마우스)로부터 분리된 항체(예: Taylor et al.(1992) Nucl. Acids Res. 20:6287) 또는 다른 DNA 서열에 사람 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱을 수반하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 분리된 항체 등을 포함하는 것을 나타낸다. 이러한 제조합 사람 항체는 사람 배선(germ line) 면역글로불린 서열 유래의 가변 및 불변 영역을 보유한다. 하지만, 특정 양태에서는 이러한 제조합 사람 항체가 시험관내 돌연변이유발(또는 사람 Ig 서열에 돌연변이성인 동물이 사용된 경우에는 생체내 체세포 돌연변이유발)로 처리되어, 제조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 사람 배선 VH 및 VL 서열에서 유래되고 관련이 있지만 생체내 사람 항체 배선 목록에는 본래 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0146] 본 명세서에 사용된 "분리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 보유한 다른 항체가 실질적으로 없는 항체(예컨대, hTNF $\alpha$  외에 다른 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없는 hTNF $\alpha$ 에 특이적으로 결합하는 분리된 항체)를 의미하는 것을 나타낸다. 하지만, hTNF $\alpha$ 에 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 다른 종 유래의 TNF $\alpha$  분자와 같은 다른 항원과 교차반응성이 있을 수 있다. 더욱이, 분리된 항체는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없는 것일 수 있다.

[0147] "기본 배지"란 용어는 세포의 성장을 지지할 수 있는 임의의 배지를 의미한다. 기본 배지는 표준 무기 염, 예컨대

대 아연, 철, 마그네슘, 칼슘 및 칼륨뿐만 아니라, 미량원소, 비타민, 에너지원, 완충 시스템 및 필수아미노산을 공급한다. 기본 배지의 예에는 돌베코(Dulbecco)의 변형 이글(Eagle) 배지(DMEM), DME/F12, 최소필수배지(MEM), 기본 배지 이글(BME), RPMI 1640, F-10, F-12, α-최소 필수 배지(α-MEM), 글라스고우(Glasgow) 최소 필수 배지(G-MEM), PF CHO(SAFC Biosciences) 및 이스코브(Iscove)의 변형 돌베코 배지가 포함되지만, 이에 국한되는 것은 아니다.

- [0148] 본 명세서에 사용된 "변형된 기본 배지"란 용어는 적어도 하나의 표준 성분, 구성재료 또는 영양소(즉, 당업계에 공지된 통상적으로 조제된 기본 배지에서 발견되는 적어도 하나의 성분, 구성재료 또는 영양소)가 제외되거나, 감소되거나 또는 증가된 기본 배지를 의미한다. "변형된 기본 배지"의 문장에서 사용된 "변형"이란 용어는 기본 배지 내의 각 구성재료 사이에 비율의 변화를 의미할 수도 있다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 변형된 기본 배지는 중탄산나트륨, 완충액, 인산나트륨(일염기성 및/또는 이염기성), 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 글루코스, 예컨대 단당류 글루코스 중 적어도 하나의 구성재료를 제외시킨 것이다.
- [0149] 본 명세서에 사용된 "세포 배양 배지", "배양 배지" 및 "배지 포물레이션"이란 용어는 다세포 유기체 또는 조직의 외측인 인공적인 시험관내 환경에서 세포의 유지, 성장, 증식 또는 팽창을 위한 영양소 용액을 의미한다. 세포 배양 배지는 특정 세포 배양용으로 최적화될 수 있으며, 그 예로는 세포 성장의 촉진을 위해 조제된 세포 배양 성장 배지, 또는 재조합 단백질 생산을 촉진하도록 조제된 세포 배양 생산 배지가 있다. 영양소, 성분 및 구성재료란 용어들은 세포 배양 배지를 구성하는 구성성분을 의미하는 것으로, 본 명세서에서 호환 사용되고 있다.
- [0150] 본 명세서에 사용된 "세포 배양 생산 배지" 또는 "생산 배지"란 용어는 세포 배양의 증식기 동안에 사용되도록 설계된 세포 배양 배지를 의미한다. 바람직한 양태에서, 생산 배지는 증식기 동안에 재조합 단백질 발현을 위해 설계된다. 생산 배지의 예는 실시예 1의 표 2 내지 7을 비롯한 본 명세서에 제시되어 있다.
- [0151] 본 명세서에 사용된 "유가식 세포 배양(fed batch cell culture)" 및 "유가식 배양"이란 용어는 세포, 바람직하게는 포유동물의 세포와 배양 배지가 배양 용기에 초기에 공급되고, 배양의 종결 전에 주기적인 세포 및/또는 산물 수거 하에 또는 수거없이 배양 동안 배양물에 추가 배양 영양소를 연속적으로 또는 불연속적인 증가량으로 공급하는 세포 배양을 의미한다.
- [0152] "유가식 방법"은 유가식 세포 배양물에 추가 영양소가 공급되는 방법을 의미한다. 예를 들어, 유가식 방법은 소정의 일정 기간 내에 결정된 공급 계획에 따라 보충 배지를 첨가하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0153] 본 명세서에 사용된 "공급"이란 용어는 접종 후에 배양물에 이루어지는 임의의 물질의 임의의 첨가를 의미한다. 공급은 1회 이상의 첨가일 수 있다.
- [0154] 본 명세서에 사용된 "공급 용액", "공급 배지"란 용어는 접종 후 얼마 시간이 지난 후부터 배양물에 첨가되는 하나 이상의 영양소를 함유하는 배지를 의미한다. 한가지 양태에서, 공급 용액은 기본 배지와 하나 이상의 가수분해물, 예컨대 대두계 가수분해물, 효모계 가수분해물 또는 이 두 종류의 가수분해물의 배합물을 포함하는 배합 공급 용액이다. 본 발명의 다른 양태에서, 공급 용액은 농축된 기본 배지와 같은 기본 배지만을 포함할 수도 있고, 또는 가수분해물 또는 농축된 가수분해물만을 포함할 수도 있다.
- [0155] 본 명세서에 사용된, "피드백 조절 시스템"이란 용어는 소정의 파라미터를 모니터링하여, 원하는 파라미터 설정치에 부합하도록 추가 제제를 첨가하거나 세포 배양의 환경 변형을 수행하는 공정을 의미한다. 한가지 양태에서, 소정의 파라미터는 포유동물 세포 배양물의 글루코스 수준이며, 이에 따라 글루코스 수준은 공급 용액, 예컨대 배합 공급 용액이 세포 배양물에 첨가되어야 하는 시점을 결정하는데 사용된다. 피드백 조절 시스템은 포유동물의 세포 배양에서 단백질 생산을 최적화하는데 필요한 영양 구성재료를 유지시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0156] 본 명세서에 사용된 "공급 프로파일"이란 용어는 포유동물 세포 배양물을 공급 용액, 예컨대 배합 공급 용액으로 보충하기 위한 계획을 의미한다. 공급 프로파일은 피드백 조절 시스템을 사용해서 작성하는 것이 바람직하다.
- [0157] 세포는 특정 폴리펩타이드 또는 단백질의 발현을 허용하는 재조합 핵산 서열이 재조합 바이러스에 의한 바이러스 감염, 형질감염, 형질전환 또는 전기천공과 같은 "유전자조작" 방법을 이용하여 세포에 도입되었을 때 상기 특정 폴리펩타이드 또는 단백질을 발현하도록 "유전자조작"될 수 있다[예컨대, Kaufman et al.(1990), Meth. Enzymol. 185: 487-511; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds.(Wiley & Sons, New York, 1988 및 연4회 갱신) 참조]. 목적 단백질을 발현하는 세포 및/또는 세포주를 유전자조작하는 방법 및 벡터는 당업자에게 공지되어 있다. 유전자조작 기술은 발현 벡터, 표적화된 상동성 재조합 및 유전자 활성화(예컨

대, 미국 특허 5,272,071, Chappel 참조) 및 조작된 전사 인자에 의한 트랜스 활성화(예컨대, Segal et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(6): 2758-63 참조)를 포함하지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 경우에 따라, 폴리펩타이드는 이 폴리펩타이드의 생산을 본래 유도하지 않는 프로모터와 같은 이종의 조절 요소의 조절 하에서 발현된다. 예를 들어, 프로모터는 포유동물 폴리펩타이드의 발현을 유도하는 강한 바이러스 프로모터(예: CMV, SV40)일 수 있다. 숙주 세포는 당해 폴리펩타이드를 정상적으로 생산하거나 생산하지 않을 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포는 사람 폴리펩타이드를 생산하도록 유전자조작된 CHO 세포일 수 있고, 이것은 사람 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산이 CHO 세포에 도입되었음을 의미한다. 대안적으로, 숙주 세포는 정상적으로 매우 소량으로만 존재하던 사람 폴리펩타이드를 증가된 수준으로 생산하도록 유전자조작된 사람 세포일 수 있다(예컨대, 내인성 프로모터를 강한 바이러스 프로모터로 교체함으로써).

[0158] 본 명세서에 사용된 "증식기"는 배양된 세포가 빠르게 분열 및 증가하는 기간을 의미한다. 증식기 동안 세포는 일반적으로 세포 증식을 최대화하도록 설계된 조건 하에 배지에서 배양될 수 있다.

[0159] "가수분해물"이란 용어는 임의의 효소적 분해물, 특히 추출할 물질(예: 식물 구성재료 또는 효모 세포)을 이 물질의 구성재료를 더 간단한 형태(예컨대, 단당류 또는 이당류 및/또는 모노펩타이드, 디펩타이드 또는 트리펩타이드를 포함하는 제조물)로 붕괴할 수 있는 적어도 하나의 효소로 처리함으로써 제조되는 특별한 유형의 추출물을 포함한다. 또한, "가수분해물"은 과과인 등으로 효소 분해될 수 있고(있거나) 자가분해, 열분해 및/또는 원형질분리에 의해 형성될 수 있다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 가수분해물은 동물 근원에서 제조된 것이 아닌, 즉 비-동물계이다. 바람직한 비-동물계 가수분해물의 예에는 식물계 가수분해물, 예컨대 대두계 가수분해물, 및 식물 또는 동물 근원에서 유래된 것이 아닌 가수분해물, 예컨대 효모계 가수분해물이 포함된다.

[0160] "가수분해물 강화 용액" 및 "가수분해물 강화 배지"란 용어는 세포 배양물에 첨가되는 주 성분으로서, 가수분해물 또는 가수분해물의 배합물, 즉 여러 근원에서 추출된 가수분해물들을 함유하는 배지를 의미한다. 가수분해물 강화 용액은 예컨대 단백질 생산을 향상시키기 위해 세포 배양물에 첨가될 수 있다. 이와 마찬가지로, "기본 강화 용액" 및 "기본 강화 배지"란 용어는 주 성분으로서 기본 배지(또는 기본 배지의 배합물)를 함유하는 배지를 의미한다. 한가지 양태에서, 가수분해물 강화 용액 또는 기본 강화 용액 또는 두 강화 용액의 배합물은 단백질 생산시에 세포 배양의 생산성을 증가시키기 위해 세포 배양물에 첨가된다.

[0161] 단백질의 생산은 추가 제제를 첨가하거나 또는 단백질 생산 과정의 파라미터 변경에 의해, 추가 제제를 함유하거나 단백질 생산 과정의 변경된 파라미터를 함유하는 배양에서 생산된 폴리펩타이드의 양이, 추가 제제를 함유하지 않거나 단백질 생산 과정의 변경된 파라미터를 함유하지 않은 것을 제외하고는 동일한 배양에서 생산된 폴리펩타이드의 양보다 많다면, "증가"된 것이다. 단백질 생산 과정의 변경의 예에는 배지 보충물의 첨가, 보충 배지의 양의 증가, 배양 온도의 변동 및 세포가 배양되는 산소의 농도가 포함되지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 추가 제제는 공급 용액과 같은 보충 용액을 사용해서 세포 배양물에 제공될 수 있다.

[0162] "성분"이란 용어는 화학적 또는 생물학적 기원이든지 간에, 세포의 증식 성장을 유지하거나 촉진하기 위해 세포 배양 배지에서 사용할 수 있는 임의의 화합물을 의미한다. "구성재료", "영양소" 및 "성분"이란 용어는 호환적으로 사용되고 모두 상기와 같은 화합물을 의미하도록 의도된 것이다. 세포 배양 배지에 사용되는 통상적인 성분에는 아미노산, 염, 금속, 당, 지질, 핵산, 호르몬, 비타민, 지방산, 단백질 등이 있다. 생체외에서 세포의 배양을 촉진하거나 유지하는 다른 성분은 본 발명의 범위 안에서 특별한 요구에 따라 당업자가 선택할 수 있다.

[0163] 본 명세서에 사용된, "접종"이란 용어는 배양을 시작하기 위해 배지에 세포를 첨가하는 것을 의미한다.

[0164] "생산기"는 세포가 재조합 폴리펩타이드 또는 단백질의 최대량을 생산하는 동안의 기간을 의미한다. 생산기는 증식기 동안보다 적은 세포 분열을 특징으로 하며 폴리펩타이드 생산을 최대화하기 위해 설계된 배지 및 배양 조건의 사용을 포함할 수도 있다.

[0165] "재조합 폴리펩타이드" 또는 "재조합 단백질"은 유전자조작 과정으로부터 획득되는 폴리펩타이드 또는 단백질이다. 바람직한 양태에서, 재조합 단백질은 이 단백질을 발현하는 세포를 세포 배양물에서 배양하여 수득한다.

[0166] "전이기"는 "증식기"와 "생산기" 사이의 세포 배양 기간을 의미한다. 전이기동안에 배지와 환경 조건은 증식을 최대화하도록 설계된 배지와 환경 조건으로부터 폴리펩타이드 생산을 최대화하도록 설계된 배지와 환경 조건으로 전환될 수 있다.

[0167] 본 발명은 포유동물, 예컨대 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 배양에 의해 단백질, 바람직하게는 재조합 단백질, 예컨대 항체를 생산하는 신규 조성물 및 방법을 제공한다. 본 명세서에 기술된 세포 배양 배지 및 방법은 재조합 단백질 생산, 특히 재조합(완전한 사람, 사람화된 또는 키메라) 모노클로날 항체 생산을 위해 사용되었다. 이러

한 배지와 방법은 포유동물, 예컨대 CHO 세포의 증식 및 생산성 증가를 유도하는 다양한 개선과 향상을 혼입하기 위해 많은 항체 산물 계열에 대하여 변형되었다. 본 발명의 개선된 조성물 및 방법의 관점은 이하에 상세하게 제공된다.

[0168] II. 목적 단백질

[0169] 일반적으로, 본 발명의 방법 및 조성물은 재조합 단백질의 생산에 유용하다. 재조합 단백질은 유전자조작 방법에 의해 생산되는 단백질이다. 본 발명의 방법과 조성물에 따라 생산하기에 특히 바람직한 단백질은 생물체제로도 알려진 단백질계 치료제이다. 단백질은 세포의 산물로서 분비되는 것이 바람직하다.

[0170] 본 발명의 방법과 조성물을 사용하여 생산할 수 있는 단백질에는 항체 또는 이의 항원결합단편이 포함되지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 항체 분자를 암호화하는 DNA를 조작하여 단일쇄 항체, 친화성이 증강된 항체 또는 다른 항체계 폴리펩타이드와 같은 재조합 단백질을 암호화할 수 있는 DNA를 생산하는 기술은 다수가 당업계에 공지되어 있다(예컨대, Larrick et al., 1989, Biotechnology 7: 934-938; Reichmann et al., 1988, Nature 332: 323-327; Roberts et al., 1987, Nature 328: 731-734; Verhoeyen et al., 1988, Science 239: 1534-1536; Chaudhary et al., 1989, Nature 339: 394-397, 각 문헌은 본 발명에 참고 인용된다). 완전한 사람 항체(예컨대, 돌연변이 동물에 의해 제조되고, 경우에 따라 시험관내에서 추가 변형된 항체) 뿐만 아니라 사람화된 항체를 생산하는 재조합 세포도 본 발명에 사용될 수 있다. 사람화된 항체란 용어는 단일쇄 항체도 포함한다. 예컨대, 본 발명에 참고인용되는 다음과 같은 문헌을 참고한다: Cabilly et al., 미국 특허 4,816,567; Cabilly et al., 유럽 특허 0,125,023 B1; Boss et al., 미국 특허 4,816,397; Boss et al., 유럽 특허 0,120,694 B1; Neuberger, M.S. et al., WO 86/01533; Neuberger, M.S. et al., 유럽 특허 0,194,276 B1; Winter, 미국 특허 5,225,539; Winter, 유럽 특허 0,239,400 B1; Queen et al., 유럽 특허 0 451 216 B1; 및 Padlan, E.A., et al., EP 0 519 596 A1. 예를 들어, 본 발명은 특정 세포 표적, 예컨대 전술한 임의의 단백질, 사람 EGF 수용체, her-2/neu 항원, CEA 항원, 전립선 특이적 막 항원(PSMA), CD5, CD11a, CD18, NGF, CD20, CD45, CD52, Ep-cam, 다른 암세포 표면 분자, TNF-알파, TGF- $\beta$ 1, VEGF, 다른 사이토카인, 알파 4 베타 7 인테그린, IgE, 바이러스 단백질(예컨대, 사이토메갈로바이러스)을 면역특이적으로 인식하는 사람 및/또는 사람화된 항체의 생산에 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물과 방법을 사용하여 생산할 수 있는 항체의 예에는 항-TNF  $\alpha$  항체, 항-IL-12 항체, 항-IL-18 항체 및 항-EPO 수용체(EPO-R) 항체가 포함되나, 이에 국한되는 것은 아니다. 한가지 양태에서, 항-TNF  $\alpha$  항체는 완전한 사람 항-TNF  $\alpha$  항체, 예: 아달리무마브/D2E7(본 발명에 참고인용된 미국 특허 6,090,382 참조; Humira<sup>®</sup>; Abbott Laboratories)이다. 한가지 양태에서, 항-IL-12 항체는 완전한 사람 항-IL-12 항체, 예컨대 ABT-874(Abbott Laboratories; 본 발명에 참고인용된 미국 특허 6,914,128 참조)이다. 한가지 양태에서, 항-IL-18 항체는 완전한 사람 IL-18 항체(예: ABT-325)[예컨대, US20050147610 A1에 기술된 항체 참조]이다. 한가지 양태에서, 항-EPO/R(ABT-007이라고도 지칭함) 항체는 본 발명에 참고인용된 미국 특허 공개번호 US 20060018902 A1에 기술된 것과 같은 완전한 사람 항체이다.

[0171] 본 발명의 방법과 조성물을 사용하여 생산할 수 있는 단백질 종류의 다른 예에는 융합 단백질이 포함된다. 융합 단백질은 단백질, 도메인 또는 이종 단백질이나 펩타이드에 융합된 단백질(예: 가용성 세포의 도메인)이다. 이러한 융합 단백질의 예에는 면역글로불린 분자의 일부와 융합체로서 발현되는 단백질, 지퍼(zipper) 부와 융합 단백질로서 발현되는 단백질 및 사이토카인과 성장인자의 융합 단백질(즉, GM-CSF와 IL-3, MGF와 IL-3)과 같은 신규 다기능성 단백질이 포함된다. WO 93/08207 및 WO 96/40918은 각각 CD40L이라 불리는 분자의 다양한 가용성 올리고머 형태, 예컨대 면역글로불린 융합 단백질 및 지퍼 융합 단백질의 제조에 대해 기술하고 있으며; 여기에 논의된 기술들은 다른 단백질들에도 적용할 수 있다. 다른 융합 단백질은 엔타너셉트라고도 알려진 재조합 TNFR:Fc이다. 엔타너셉트(또는 Enbrel<sup>®</sup>; Amgen/Wyeth)는 p75 TNF 알파 수용체의 세포외 부위의 두 분자로 이루어진 이량체이며, 각 분자는 사람 IgG1의 232개 아미노산 Fc 부위와 융합된 235개 아미노산 TNFR 유래의 폴리펩타이드로 이루어져 있다. 사실상, 모든 분자가 융합 단백질로서 발현될 수 있으며, 그 예에는 세포 수용체 분자의 세포외 도메인, 효소, 호르몬, 사이토카인, 면역글로불린 분자의 일부, 지퍼 도메인 및 에피토프가 포함되며, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0172] III. 본 발명의 세포 배양 배지

[0173] 본 발명은 항체 또는 이의 항원결합부위와 같은 재조합 단백질의 생산 또는 발현을 위해 포유동물 세포 배양에

사용하기 위한 세포 배양 배지를 제공한다. 본 명세서에 기술된 다양한 세포 배양 배지는 단백질 생산 증가 및 세포 수명 연장 등을 비롯하여 개선된 세포 배양을 위해 각각 또는 공동으로 사용할 수 있다.

- [0174] 바람직한 양태에서, 본 발명의 세포 배양 배지는 혈청(예컨대, 소태아 혈청(FBS), 말 혈청, 염소 혈청 또는 당업자에게 공지된 다른 임의의 동물 유래 혈청)을 함유하지 않는 것을 의미하는 무혈청 배지이다.
- [0175] 제1 관점에서, 본 발명은 전적으로 또는 부분적으로 변형된 기본 배지를 포함하는 포유동물 세포 배양 배지를 제공한다. 변형된 기본 세포 배지는 당업계에 공지된 표준 기본 세포 배지에서 유래될 수 있다. 적당한 기본 배지에는, 둘베코 변형 이글배지(DMEM), DME/F12, 최소 필수 배지(MEM), 기본 배지 이글(BME), RPMI 1640, F-10, F-12,  $\alpha$ -최소 필수 배지( $\alpha$ -MEM), 글라스고우 최소 필수 배지(G-MEM), PF CHO(SAFC Biosciences) 및 이스코브의 변형 둘베코 배지가 포함되지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 본 발명에 사용할 수 있는 기본 배지의 다른 예에는 BME 기본 배지(Gibco-Invitrogen; 참조: Eagle, H(1965) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89, 36); 둘베코 변형 이글 배지(DMEM, 분말)(Gibco-Invitrogen(#31600); 참조: Dulbecco and Freeman(1959) Virology 8, 396; Smith et al.(1960) Virology 12, 185. Tissue Culture Standards Committee, In Vitro 6:2, 93); CMRL 1066 배지(Gibco-Invitrogen(#11530); 참조: Parker R.C. et al. (1957) Special Publications, N.Y. Academy of Sciences, 5, 303)가 포함된다.
- [0176] 기본 배지는 표준 기본 배지에서 발견되는 특정 비영양소 구성재료, 예컨대 다양한 무기 및 유기 완충액, 계면활성제(들) 및 염화나트륨을 제거하기 위해 변형시킬 수 있다. 이러한 구성재료의 기본 세포 배지로부터의 제거는 남은 영양소 구성재료의 농도를 증가시켜서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 전반적인 세포 성장과 단백질 발현을 향상시킨다. 또한, 제거된 구성재료는 세포 배양 조건의 필요에 따라서 변형된 기본 세포 배지를 함유하는 세포 배양 배지에 다시 첨가될 수 있다. 이하에 기술되는 바와 같이, 기본 세포 배지로부터 특정 성분의 분리, 즉 세포 배양 배지의 성분으로서 변형된 기본 세포 배지를 첨가하고, 이어서 별도의 성분으로서 상기 성분을 다시 세포 배양 배지에 첨가하는 것은 세포 배양의 성장 및 단백질 생산에 유리한 성질을 제공하는 것으로 밝혀졌다.
- [0177] 본 발명의 변형된 기본 배지는 다음과 같은 성분 중, 전부는 아니지만 임의의 성분을 제거한 것이다: 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스. 이러한 성분들은 시판되는 기본 세포 배지에서 일반적으로 발견되는 것이다.
- [0178] 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및/또는 단당류 글루코스와 같은 구성재료의 제거는 상업적 배지 서비스, 예컨대 SAFC Pharma™에 의해 수행될 수 있다. 당업자라면, 변형된 기본 배지가 한가지 양태로서 상업적 세포 배양 배지 서비스, 즉 주문제작 배지 서비스에 의해 수득될 수 있다는 것을 잘 알 것이다. 주문제작 배지 서비스는, 예를 들면 SAFC(구, JRH Bioscience), Invitrogen®, Atlanta Biologicals® 및 Lonza와 같은 회사에 의해 제공된다.
- [0179] 대안적으로, 당업자는 기본 세포 배지를 제조하는 표준 방법에 따라서, 본 명세서에 기술된 특정 성분이 제외된 본 발명의 변형된 기본 세포 배지를 제조할 수 있다(예컨대, Freshney (2005) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique; BD Bionutrients Technical Manual, (2006), Third edition; Jenkins, ed. (1999), Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols, Humana Press; Doyle and Griffiths, eds., (1997) Essential Techniques: Mammalian Cell Culture, John Wiley and Sons; Butler, ed. (1991) Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, Oxford University Press; Darling and Morgan (1994) Animal Cells: Culture and Media, John Wiley and Sons; Freshney, ed. (1992), Animal Cell Culture: A Practical Approach (2nd ed), Oxford University Press; Pollard and Walker (1997), Basic Cell Culture Protocols (2nd Ed), Humana Press, (Part of the Methods in Molecular Biology series, Volume 75), 각 문헌은 본 발명에 참고인용되었다).
- [0180] 한가지 양태에서, 본 발명의 세포 배양 배지는 변형된 기본 세포 배지, 철 공급원(바람직하게는 무기성, 예컨대 시트르산철), 재조합 성장인자; 완충액; 계면활성제; 삼투압농도 조절제; 에너지원; 및 2종 이상의 상이한 비동물계 가수분해물을 함유한다. 또한, 변형된 기본 세포 배지는 경우에 따라 아미노산, 비타민 또는 아미노산과 비타민의 배합물을 함유할 수 있다.
- [0181] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "철"이란 용어는 배지를 보충하는데 사용되는 비동물 유래의 철 공급원을 의미한다. 세포 배양 배지 중의 철 공급원은 무기성인 것이 바람직하며, 그 예에는 시트르산철 또는 황산제1철과 같은 제2철염 및 제1철염이 포함된다. 시트르산철 및 시트르산철암모늄과 같은 킬레이팅된 염이 바람직하다. 하지

만, 동물 근원에서 분리되지 않는 다른 철 공급원도 사용될 수 있으며, 그 예에는 등량의 철을 제공하는 화학적 철 킬레이터 또는 재조합 단백질 철 캐리어가 있다. 사용될 수 있는 철 킬레이터 화합물에는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 에틸렌 글리콜-비스(베타-아미노에틸 에테르)-N,N',N'-테트라아세트산(EGTA), 테페록사민 메실레이트, 디머캡토프로판올, 디에틸렌트리아민-펜타아세트산(DPTA) 및 트랜스-1,2-디아미노사이클로헥산-N,N,N',N'-테트라아세트산(CDTA)의 철 킬레이터 뿐만 아니라 시트르산철 킬레이터 및 황산제1철 킬레이터도 포함되지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 철의 특히 바람직한 급원은 세포 배양 배지의 최종 부피에 0.1 내지 1mM의 농도로 존재하는 것이 바람직한 시트르산철이다. 한가지 양태에서, 시트르산철의 농도는 약 0.5mM이다. 다른 양태에서, 시트르산철의 농도는 100 내지 150mg/L, 예컨대 122mg/L이다. 앞에서 언급한 mM의 중간의 수, 예컨대 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 및 1.0mM과, mg/L, 예컨대 100, 110, 120, 130, 140 및 150도 본 발명의 일부인 것으로 간주한다.

[0182] 세포배양 배지에 포함될 수 있는 성장 인자의 비제한적 예는 인슐린 또는 이의 재조합 유사체인 IGF-1, 및 인슐린과 IGF-1의 배합물이다. 특히 바람직한 재조합 성장인자는 세포 배양 배지의 최종 부피에 약 4mg/L 내지 13mg/L 사이의 농도로 존재하는 것이 바람직한, 인슐린 또는 이의 재조합 유사체이다. 전술한 인슐린 농도의 중간의 수, 예컨대 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5 및 13도 본 발명의 일부인 것으로 간주한다.

[0183] 또한, 세포 배양 배지는 완충액을 포함할 수 있다. 바람직한 양태에서, 완충액은 변형된 기본 세포 배지에서 제외되지만, 세포 배양 배지에 별도의 구성재료로서 첨가된다(여기에는 변형된 기본 세포 배지도 첨가된다). 세포 배양 배지용 완충액은 당업계에 공지되어 있다. 세포 배양 배지에 포함될 수 있는 완충액의 비제한적 예는 인산염 완충액, HEPES 및 중탄산나트륨이다. 한가지 양태에서, 중탄산나트륨은 세포 배양 배지에 완충액으로서 약 0.1 내지 3g/L의 최종 농도로 첨가된다. 한가지 양태에서, 중탄산나트륨은 세포 배양 배지에 완충액으로서 약 1.6g/L의 최종 농도로 첨가된다. 한가지 양태에서, HEPES는 세포 배양 배지에 완충액으로서 약 0.1 내지 3g/L의 최종 농도로 첨가된다. 다른 양태에서, HEPES는 세포 배양 배지에 완충액으로서 1.8g/L의 최종 농도로 첨가된다. 한가지 양태에서, 인산염 완충액, 예컨대 일염기성 및 이염기성 인산나트륨은 세포 배양 배지에 0.01 내지 0.5g/L 사이의 최종 농도로 첨가된다. 상기 언급한 농도의 중간의 수, 예컨대 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 및 3.0의 중탄산나트륨 또는 HEPES 농도, 또는 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.2, 0.22, 0.24, 0.26, 0.28, 0.3, 0.32, 0.34, 0.36, 0.38, 0.4, 0.42, 0.44, 0.46, 0.48 및 0.5 g/L의 인산염 완충액 농도 역시 본 발명의 일부인 것으로 간주한다.

[0184] 완충액은 세포 배양 배지가 원하는 pH를 유지하도록 돕기 위해 첨가한다. 한가지 양태에서, 세포 배양 배지의 pH는 6.0 내지 8.0; 6.5 내지 7.5; 또는 7.1 내지 7.2 범위이다. 이러한 pH 값의 중간의 수, 예컨대 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9 및 8.0 뿐만 아니라, 여기에 인용된 모든 다른 수 역시 본 발명의 일부인 것으로 간주한다. 상기 언급한 임의의 값을 상한 및/또는 하한으로 조합한 값의 범위도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 간주한다.

[0185] 세포 배양 배지는 또한 삼투물농도 조절제, 예컨대 NaCl을 포함할 수 있다. 한가지 양태에서, NaCl은 세포 배양 배지에 약 1.0 내지 6.5g/L 사이의 최종 농도로 첨가한다. 한가지 양태에서, 세포 배양 배지의 삼투물농도는 260 내지 450mOsm/kg 범위이다. 한가지 양태에서, 세포 배양 배지의 삼투물농도는 320 내지 450mOsm/kg 범위이다. 언급한 NaCl 농도 및 mOsm/kg 값의 중간의 수, 예컨대 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6 및 6.5의 NaCl 농도 또는 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450의 mOsm/kg 범위 뿐만 아니라, 이들의 중간의 수 역시 본 발명의 일부인 것으로 간주한다. 상기 언급한 값의 조합을 상한 및/또는 하한으로 사용한 값의 범위 역시 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 간주한다.

[0186] 에너지원 역시 본 발명의 세포 배양 배지에 첨가할 수 있다. 에너지원은 단당류인 것이 바람직하다. 세포 배양 배지에 사용할 수 있는 단당류의 예에는 글루코스(예: D-글루코스), 말토스, 만노스, 갈락토스 및 프럭토스가 포함된다. 한가지 양태에서, 글루코스는 세포 배양 배지에 3.5 내지 7.0g/L 범위의 최종 농도로 첨가된다. 한가지 양태에서, 글루코스는 세포 배양 배지에 7.0g/L 이하의 최종 농도로 첨가된다. 한가지 양태에서, 글루코스는 약 7.0g/L의 최종 농도 세포 배양 배지에 첨가된다. 전술한 글루코스 농도의 중간에 속하는 수, 예컨대 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8 및 7, 뿐만 아니라 이들 중간의 수 역시 본 발명의 일부인 것으로 간주한다. 상기 언급한 임의의 값의 조합을 상한 및/또는

하한으로 사용한 값의 범위 역시 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 간주한다.

- [0187] 본 발명의 세포 배양 배지에 중요한 성분은 가수분해물의 첨가이다. 본 발명의 세포 배양 배지는 단일 급원, 예컨대 효모 또는 대두 유래의 가수분해물을 포함할 수도 있고, 또는 효모 가수분해물과 대두계 가수분해물 같이 가수분해물의 배합물을 포함할 수 있다. 본 발명이 세포 배양 배지에 사용되는 가수분해물은 비-동물계인 것이 바람직하다. 비-동물계 가수분해물의 예에는 식물계 가수분해물 및 비식물계 가수분해물, 예컨대 효모계 가수분해물, 트립톤, 카세인 가수분해물, 효모 추출물 또는 과과인 분해된 대두 펩톤이 포함된다. 본 발명의 배지에 사용되는 가수분해물은 시판되는 것이며, 그 예로는 퀘스트 인터내셔널(Quest International)(뉴욕 노르위치 소재), 오르가노 테크니에(Organo Technie)(프랑스 에스.에이. 소재), 도이체 헤페베르케 게엠베하(Deutsche Hefewerke GmbH)(독일) 또는 디엠브이 인터내셔널(DMV Intl.)(뉴욕 델하이 소재)로부터 시판되는 HyPep 1510.RTM., Hy-Soy.RTM., Hy-Yeast 412.RTM 및 Hi-Yeast 444.RTM.이 있다. 또한, 효모 추출물 및 대두 가수분해물의 공급원은 WO 98/15614, WO 00/03000, WO 01/23527 및 미국 특허 5,741,705에 개시되어 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 효모계 가수분해물의 예에는 TC Yeastolate(BD Diagnostic) 및 Yeastolate UF(SAFC Biosciences)가 있고, 식물계 가수분해물의 예에는 Soy Hydrolysate UF(SAFC Biosciences) 및 HyQ<sup>®</sup> Soy Hydrolysate(HyClone Media)가 있다.
- [0188] 한가지 양태에서, 본 발명의 세포 배양 배지는 글루타민, 예컨대 L-글루타민을 추가로 포함한다. L-글루타민의 적합한 급원은 다양한 상업적 공급원, 예컨대 Gibco(Cat.No.25030-081)에서 입수할 수 있다.
- [0189] 경우에 따라, 이하 실시예 부문에 기술된 배지를 비롯한 본 발명의 세포 배양 배지는 메토티렉세이트를 포함할 수 있다. CHO 세포를 배양하기 위한 세포 배양 배지에 사용되는 메토티렉세이트의 양의 예에는 약 100nM 내지 5000nM의 메토티렉세이트가 포함된다. 이 메토티렉세이트 농도의 중간에 해당하는 수, 예컨대 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2200, 2400, 2600, 2800, 3000, 3200, 3400, 3600, 3800, 4000, 4200, 4400, 4600, 4800 및 5000 nM, 뿐만 아니라 이들의 중간의 수 역시 본 발명의 일부인 것으로 간주한다. 상기 언급한 값의 임의의 조합을 상한 및/또는 하한으로서 사용한 값의 범위 역시 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 간주한다.
- [0190] 대규모 생물반응기에서, CHO 세포는 용기에 기체 분사 및 임펠러를 이용한 혼합 시에 발생하는 전단력에 특히 민감하다. 따라서, 본 발명의 세포 배양 배지는 경우에 따라 세포 보호제를 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용된 "세포 보호제"란 용어는 진핵생물 세포를 손상으로부터 보호하는 물질을 의미한다. 이러한 손상은 생물반응기 용기에서 기포 분사 효과 또는 전단력 등에 의해 유발될 수 있다. 세포 손상의 발생을 최소화하기 위해, 배지는 세포 보호제, 예컨대 메틸 셀룰로스, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐 알콜 또는 플루로닉 글리콜 등을 포함하는 것이 유리하다. 이 중에서, Pluronic RTM.(폴리올, BASF Wyandotte Corp.) 폴링로 F68은 폴리비닐알콜과 달리 비독성 물질이고, 폴리에틸렌 글리콜과 달리 다운스트림 정제를 방해하지 않기 때문에 바람직하다.
- [0191] 또한, 본 발명의 세포 배양 배지는 비철 금속 이온을 포함할 수 있다. 비철 금속 이온의 예에는 클로라이드 및 셀페이트 염, 칼륨, 마그네슘, 구리, 셀레늄, 아연, 니켈, 망간, 주석, 카드뮴, 몰리브데이트, 바나데이트 및 실리케이트가 포함되며, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0192] 본 발명의 세포 배양 배지는 또한 비타민과 효소 보조인자를 포함할 수 있다. 이러한 비타민 및 효소 보조인자의 예는 PABA(p-아미노벤조산), 비타민 K(비오틴), 비타민 B5(D-칼슘 판토테네이트), 엽산, I-이노시톨, 니아신 아마이드(니코틴산 아마이드), 비타민 B6(피로독신 HCl)(및 피로독살 HCl), 비타민 B2(리보플라빈), 비타민 B1(티아민) 및 비타민 B12(시아노코발라민)를 포함하나, 이에 국한되지는 않는다. 대안적으로, 비타민 C(L-아스코르브산)를 배지에 첨가할 수도 있다. 또한, 보통 비타민으로 간주되지만 지질 인자로 간주될 수도 있는 염화콜린도 첨가할 수 있다.
- [0193] 또한, 본 발명의 세포 배양 배지는 지질 유사 인자를 포함할 수 있다. 지질 인자의 예에는 염화콜린 및 포스파티딜콜린이 있다. 지질 생산의 보조제, 예컨대 에탄올아민과 같은 알콜 아민도 포함될 수 있다.
- [0194] 본 발명의 방법 및 조성물에서, 세포는 무혈청 배지에서 배양되는 것이 바람직하다. 배지에 사용된 "무혈청"이란 용어는 소태아 혈청과 같은 혈청을 포함하지 않는 임의의 포유동물 세포 배양 배지를 포함한다.
- [0195] 또한, 본 발명의 범위에는 본 명세서에 기술된 모든 개선된 세포 배양 배지 중의 포유동물 세포, 예컨대 CHO 세포도 포함된다.
- [0196] 본 발명의 한가지 관점에서, 특정 항체의 생산을 위해 최적화된 세포 배양 배지의 포물레이션이 제공된다. 최적

화된 포물레이션의 예에는 항-TNF α 항체, 항-IL-12 항체, 항-IL-18 항체 및 항-EPO 수용체(EPO-R) 항체를 발현하는 CHO 세포의 성장 또는 단백질 생산을 위한 세포 배양 배지가 포함된다.

[0197] 본 발명에는 완전한 사람 항-TNF α 항체를 비롯한 항-TNF α 항체를 발현하는 CHO 세포와 같은 포유동물 세포의 세포 배양 배지가 포함된다. 바람직한 양태에서, 완전한 사람 항-TNF α 항체는 아달리무마브(D2E7 및 Humira<sup>®</sup>라고도 불림; Abbott Laboratories)이다. 아달리무마브의 특성, 예컨대 핵산 및 아미노산 서열은 본 발명에 참고 인용된 미국 특허 6,090,382에 기술되어 있다. 아달리무마브는 아달리무마브와 같은 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 CHO 세포 등의 포유동물 세포를 세포 배양 성장 배지에서 배양한 뒤, 이 세포 배양물을 세포 배양 생산 배지로 전달한 다음, 상기 세포 배양 생산 배지로부터 단백질을 분리함으로써 생산할 수 있다.

[0198] 한가지 양태에서, 본 발명은 아달리무마브를 암호화하는 핵산을 포함하는 CHO 세포를 위해 최적화된 세포 배양 성장 배지를 제공한다. 아달리무마브를 발현하는 CHO 세포를 위해 최적화된 무혈청 세포 배양 성장 배지의 포물레이션은 기본 배지; 시트르산철(예: 약 8 내지 12ml/kg, 약 10.0ml/kg 또는 122mg/L); 재조합 사람 인슐린(예: 약 2 내지 6mg/kg 또는 4.0mg/kg); 무수 글루코스(예: 2 내지 5g/kg, 약 3.5g/kg); L-글루타민(예: 약 0.29g/kg); 중탄산나트륨(예: 약 1.6g/kg); NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O(예: 약 0.03g/kg); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(약 0.43 내지 0.44g/kg); 및 효모계 가수분해물(예: 약 2.0g/kg)을 포함한다. 또 다른 아달리무마브 발현 CHO 세포용으로 최적화된 무혈청 세포 배양 성장 배지의 예는 다음과 같은 성분을 포함한다: 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지; 시트르산철(예: 약 10.0ml/kg 또는 122.45mg/kg); 재조합 사람 인슐린(예: 약 3.8 내지 3.9ml/kg 또는 7.8mg/kg); 무수 글루코스(예: 약 7.0g/kg); L-글루타민(예: 약 0.8 내지 0.9g/kg); 중탄산나트륨(예: 약 1.6g/kg); HEPES(예: 약 1.8g/kg); NaCl(예: 약 2.6 내지 2.7g/kg); Pluronic F-68(예: 약 1.0g/kg); NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O(예: 약 0.03g/kg 내지 0.04g/kg); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(약 0.43 내지 0.44g/kg); 효모계 가수분해물(예: 약 4.0g/kg); 및 식물계 가수분해물(예: 약 2.6g/kg)을 포함한다. 아달리무마브 발현용 세포 배양 성장 배지는 추가로 메토티렉세이트, 예컨대 약 1 내지 5ml/kg 또는 약 2.50ml/kg을 포함할 수 있다.

[0199] 한가지 양태에서, 본 발명은 사람 항-TNF α 항체(예: 아달리무마브) 또는 에리트로포이에틴 수용체(EPO/R) 항체 등의 항체를 발현하는 CHO 세포용으로 최적화된 세포 배양 생산 배지를 제공한다. 항-EPO/R 항체의 예는 본 발명에 참고 인용된 미국 특허공개번호 20040071694에 기술되어 있다. 아달리무마브 또는 항-EPO/R 항체와 같은 항체를 발현하는 CHO 세포용으로 최적화된 무혈청 세포 배양 생산 배지의 포물레이션은, 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지; 시트르산철(예: 약 10.0ml/kg 또는 122.45mg/L); 재조합 사람 인슐린(예: 약 6.0ml/kg 또는 12mg/kg); 무수 글루코스(예: 약 7.0g/kg); L-글루타민(예: 약 0.58 내지 0.59g/kg); 중탄산나트륨(예: 약 1.6g/kg); HEPES(예: 약 1.8g/kg); NaCl(예: 약 2.4 내지 2.5g/kg); Pluronic F-68(예: 약 1.0g/kg); NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O(예: 약 0.03g/kg 내지 0.04g/kg); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(약 0.43 내지 0.44g/kg); 효모계 가수분해물(예: 약 10.7g/kg); 및 식물계 가수분해물(예: 약 6.9 내지 7.0g/kg)을 포함한다. 한가지 양태에서, 세포 배양 생산 배지는 pH가 약 7.1 내지 7.2 범위이고 삼투물농도가 373 내지 403mOsm/kg 범위이다. 언급된 인슐린, pH 및 삼투물농도 수치와 같은 상기 수치들의 중간에 속하는 수도 본 발명의 일부인 것으로 간주한다.

[0200] 본 발명의 다른 관점은 CHO 세포에 의해 생산된 완전한 사람 IL-12 항체와 같은 항-인터루킨-12(IL-12) 항체 생산용으로 최적화된 세포 배양 배지에 관한 것이다. 바람직한 양태에서, 완전한 사람 항-IL-12 항체는 ABT-874이다. ABT-874의 특성, 예컨대 핵산 및 아미노산 서열은 본 발명에 참고 인용된 미국 특허 6,914,128에 기술되어 있다.

[0201] 한가지 양태에서, ABT-874를 발현하는 CHO 세포의 성장용으로 최적화된 무혈청 세포 배양 성장 배지는, 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지; 시트르산철(예: 약 10ml/kg 또는 122.45mg/L); 재조합 사람 인슐린(예: 약 3.8 내지 3.9ml/kg 또는 7.8mg/kg); 무수 글루코스(예: 약 7.0g/kg); L-글루타민(예: 약 0.87 내지 0.88g/kg); L-아스파라긴 일수화물(예: 약 0.45g/kg); 중탄산나트륨(예: 약 1.6g/kg); HEPES(예: 약 1.8g/kg); NaCl(예: 약 2.67 내지 2.68g/kg); 약 Pluronic F-68(예: 약 1.0g/kg); NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O(예: 약 0.03g/kg 내지 0.04g/kg); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(약 0.43 내지 0.44g/kg); 효모계 가수분해물(예: 약 4.0g/kg); 및 식물계 가수분해물(예: 약 2.6g/kg)을 포함한다.

- [0202] 한가지 양태에서, ABT-874의 발현용 무혈청 세포 배양 생산 배지는, 비타민 함량이 감소되고 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지; 시트르산철(예: 약 10ml/kg 또는 122.45mg/L); 재조합 사람 인슐린(예: 약 6.5ml/kg 또는 13mg/kg); 무수 글루코스(예: 약 7.0g/kg); L-글루타민(예: 약 0.58 내지 0.59g/kg); 중탄산나트륨(예: 약 1.6g/kg); HEPES(예: 약 1.8g/kg); NaCl(예: 약 2.45g/kg); Pluronic F-68(예: 약 1.0g/kg);  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (예: 약 0.03g/kg 내지 0.04g/kg);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (약 0.43 내지 0.44g/kg); 효모계 가수분해물(예: 약 10.7g/kg); 및 식물계 가수분해물(예: 약 6.9 내지 7.0g/kg)을 포함한다.
- [0203] 한가지 양태에서, 본 발명은 다음과 같은 성분을 포함하는, 항-IL-12 및 항-EPO/R 항체 등의 항체를 발현하는 CHO 세포용 무혈청 세포 배양 성장 배지를 제공한다: 기본 배지; 시트르산철(예: 약 10ml/kg 또는 122.45mg/L); 재조합 사람 인슐린(예: 약 4mg/kg); 무수 글루코스(예: 약 1.5g/kg); L-글루타민(예: 약 0.29 내지 0.30g/kg); 중탄산나트륨(예: 약 1.6g/kg); 및 효모계 가수분해물(예: 적어도 약 2g/kg). 한가지 양태에서, 항-IL-12 및 항-EPO/R 항체 등의 항체를 발현하는 CHO 세포용 세포 배양 성장 배지는 pH가 약 7.10 내지 7.30 범위이고, 삼투물농도가 약 300 내지 340mOsm/kg 범위이다. 이 세포 배양 배지는 추가로 효모계 가수분해물(예: 적어도 약 8g/kg)을 포함할 수 있다.
- [0204] 본 발명의 다른 관점은 CHO 세포에 의해 생산된 완전한 사람 IL-18 항체와 같은 항-인터루킨-18(IL-18) 항체의 생산용으로 최적화된 세포 배양 배지에 관한 것이다. 본 발명의 방법과 조성물을 사용하여 생산할 수 있는 완전한 사람 IL-18 항체의 예는 본 발명에 참고인용된 PCT 공개번호 WO 01/058956에 기술되어 있다.
- [0205] 한가지 양태에서, CHO 세포의 IL-18 항체 생산을 위해 최적화된 세포 배양 성장 배지는, 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지; 시트르산철(예: 약 10ml/kg 또는 122.45mg/L); 재조합 사람 인슐린(예: 약 3.8 내지 3.9ml/kg 또는 7.8mg/kg); 무수 글루코스(예: 약 7.0g/kg); L-글루타민(예: 약 0.87 내지 0.88g/kg); L-아스파라긴 일수화물(예: 약 0.45g/kg); 중탄산나트륨(예: 약 1.6g/kg); HEPES(예: 약 1.8g/kg); NaCl(예: 약 2.67g/kg); Pluronic F-68(예: 약 1.0g/kg);  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (예: 약 0.03g/kg 내지 0.04g/kg);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (약 0.43 내지 0.44g/kg); 효모계 가수분해물(예: 약 4.0g/kg); 및 식물계 가수분해물(예: 약 2.6g/kg)을 포함한다. 완전한 사람 IL-18 항체를 발현하는 세포의 성장용 세포 배양 배지는 pH가 약 7.10 내지 7.20 범위이고 삼투물농도가 373 내지 403mOsm/kg 범위이다. 언급된 인슐린, pH 및 삼투물농도 수치와 같은 상기 수치들의 중간에 속하는 수도 본 발명의 일부인 것으로 간주한다.
- [0206] CHO 세포에서 IL-18 항체 생산을 위해 최적화된 세포 배양 생산 배지의 한가지 예는 다음과 같은 성분을 포함한다: 중탄산나트륨, HEPES 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제거하기 위해 변형시킨 변형된 기본 배지; 시트르산철(예: 약 10ml/kg 또는 122.45mg/L); 재조합 사람 인슐린(예: 약 6.0ml/kg 또는 12mg/kg); 무수 글루코스(예: 약 7.0g/kg); L-글루타민(예: 약 0.58 내지 0.59g/kg); 중탄산나트륨(예: 약 1.6g/kg); HEPES(예: 약 1.8g/kg); NaCl(예: 약 2.45g/kg); Pluronic F-68(예: 약 1.0g/kg);  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (예: 약 0.03g/kg 내지 0.04g/kg);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (약 0.43 내지 0.44g/kg); 효모계 가수분해물(예: 약 10.7g/kg); 및 식물계 가수분해물(예: 약 6.9 내지 7.0g/kg). 완전한 사람 항-IL-18 항체를 생산하기 위한 세포 배양 생산 배지의 다른 예는 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스를 제외시킨 변형된 기본 배지; 시트르산철(예: 약 10ml/kg 또는 122.45mg/L); 재조합 사람 인슐린(예: 약 6.5ml/kg 또는 13mg/kg); 무수 글루코스(예: 약 7.0g/kg); L-글루타민(예: 약 0.58 내지 0.59g/kg); 중탄산나트륨(예: 약 1.6g/kg); HEPES(예: 약 1.8g/kg); NaCl(예: 약 2.45g/kg); Pluronic F-68(예: 약 1.0g/kg);  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (예: 약 0.03g/kg 내지 0.04g/kg);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (약 0.43 내지 0.44g/kg); 효모계 가수분해물(예: 약 14.2 내지 14.3g/kg); 및 식물계 가수분해물(예: 약 9.2 내지 9.3g/kg)을 포함한다. 완전한 사람 IL-18 항체를 생산하는 CHO 세포용 세포 배양 배지는 pH가 약 7.10 내지 7.20 범위이고 삼투물농도가 373 내지 403mOsm/kg 범위일 수 있다. 언급된 인슐린, pH 및 삼투물농도 수치와 같은 상기 수치들의 중간에 속하는 수도 본 발명의 일부인 것으로 간주한다.
- [0207] 본 발명의 범위에 속하는 배지의 다른 예는 항체 생산을 향상시키는 유가식 방법 및 보충 배지, 뿐만 아니라 실시예 부문에 기술되는 예시적 배지에 관하여 이하에 설명된다.
- [0208] 본 발명의 배지는 이 배지 또는 이의 구성재료를 세포 집단 전체 또는 일부와 접촉시킴으로써 세포의 적당한 배

양을 실시하는데 사용될 수 있다. 배지는 하나 이상의 세포를 하나 이상의 화합물, 용액, 배지 등과 혼합, 첨가, 배합, 과중 또는 교반함으로써 세포와 접촉시킬 수 있다. 배지는 또한 이하에 더 상세히 기술되는, 세포가 배양되는 배지를 교체하거나 보충하는 "공급" 등에 의해 단계적 방식으로 또는 점증적으로 또는 즉시 모든 세포와 접촉될 수도 있다.

[0209] IV. 개선된 단백질 생산을 위한 방법 및 조성물

[0210] 본 발명의 방법 및 조성물은 포유동물 세포 배양에 관한 것이다. 한가지 양태에서, 사용된 포유동물 세포는 CHO 세포이다.

[0211] 포유동물 세포에 DNA를 도입시키기 위한 확립된 방법은 문헌[Kaufman, R.J., Large Scale Mammalian Cell Culture, 1990, pp. 15-69]에 기술되어 있다. 시판되는 시약, 예컨대 양이온성 지질 시약 Lipofectamine™, lipofectamine™-200 또는 lipofectamine™-플러스(Invitrogen에서 구입할 수 있다)를 이용한 다른 프로토콜도 세포를 형질감염시키는데 사용할 수 있다[Feigner et al.(1987)., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 84: 7413-7417]. 또한, 핵산으로 코팅된 미세투사 충격 또는 전기천공은 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 및 Fitzpatrick-McElligott (1992), Biotechnology (NY) 10(9): 1036-40] 에서와 같은 절차를 이용하여 포유동물 세포를 형질 감염시키는데 사용할 수 있다. 안정한 형질전환체의 선별은 당업계에 공지된 방법, 예컨대 세포독성 약물에 대한 내성 등을 이용하여 수행할 수 있다. 카우프만 등(Kaufman et al.(1990), Meth. in Enzymology 185:487-511)은 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 내성과 같은 여러 선별 방식을 설명한다. DHFR 선별에 적합한 숙주 균주는 DHFR 결손형인 CHO 균주 DX-B11이다[Urlaub and Chasin (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220]. DHFR cDNA를 발현하는 플라스미드는 균주 DX-B11 내로 도입될 수 있고, 이 플라스미드를 함유하는 세포만이 적당한 선별 배지에서 성장할 수 있다. 발현 벡터에 혼입될 수 있는 선별 마커의 다른 예에는 G418 및 하이그로마이신 B와 같은 항생제에 대한 내성을 부여하는 cDNA가 포함된다. 벡터를 수용한 세포는 상기 화합물에 대한 내성을 기초로 하여 선별될 수 있다.

[0212] 포유동물 발현 벡터로부터 이중 유전자의 발현을 향상시키는 것으로 밝혀진 또 다른 조절 서열에는 CHO 세포 유래의 발현 증강 서열 요소(EASE)(Morris et al., Animal Cell Technology, pp. 529-534 (1997); U.S. 특허 6,312,951 B1, 6,027,915, 및 6,309,841 B1) 및 아데노바이러스 2 유래의 3부 리더(TPL) 및 VA 유전자 RNA(Gingeras et al. (1982), J. Biol. Chem. 257:13475-13491)가 포함된다. 바이러스 기원의 내부 리보솜 결합 부위(IRES) 서열은 디시스트로닉(dicistronic) mRNA가 효율적으로 해독될 수 있게 한다(Oh and Sarnow (1993), Current Opinion in Genetics and Development 3:295-300; Ramesh et al. (1996), Nucleic Acids Research 24:2697- 2700). 디시스트로닉 mRNA의 일부로서 이중 cDNA의 발현 및 그 다음 선별 마커(예: DHFR) 유전자의 발현은 숙주의 형질감염능과 이중 cDNA의 발현을 향상시키는 것으로 밝혀져 있다(Kaufman et al. (1990), Methods in Enzymol. 185:487- 511). 디시스트로닉 mRNA를 이용하는 대표적인 발현 벡터는 pTR-DC/GFP(Mosser et al., Biotechniques 22:150-161 (1997)에 기술되어 있음), 및 p2A5I(Morris et al., in Animal Cell Technology, pp. 529-534 (1997)에 기술되어 있음)이다.

[0213] 유용한 고 발현 벡터, pCAVNOT는 문헌[Mosley et al. (1989), Cell 59:335-348]에 기술되어 있다. 포유동물 숙주 세포에 유용한 다른 발현 벡터는 문헌[Okayama and Berg (1983), Mol. Cell. Biol. 3:280]에 개시된 바와 같이 작제될 수 있다. C127 무린 유방 상피 세포에서 포유동물 cDNA를 높은 수준으로 안정되게 발현시키는데 유용한 시스템은 실질적으로 문헌[Cosman et al. (1986), Mol. Immunol. 23:935]에 기술된 바와 같이 작제될 수 있다. 문헌[Cosman et al. (1984), Nature 312:768]에 기술된 유용한 고 발현 벡터 PMLSV N1/N4는 ATCC 39890 으로서 기탁되어 있다. 또 다른 유용한 포유동물 발현 벡터는 유럽특허 A-0 367 566 및 WO 01/27299 A1에 설명되어 있다. 이 벡터들은 레트로바이러스에서 유도될 수 있다. 자연의 시그날 서열 대신에 이중의 시그날 서열로서, 예컨대 미국 특허 4,965,195에 기술된 IL-7의 시그날 서열; 문헌[Cosman et al. Nature 312:768 (1984)]에 기술된 IL-2 수용체의 시그날 서열; 유럽특허 0 367 566에 기술된 IL-4 시그날 펩타이드; 미국 특허 4,968,607 에 기술된 타입 IL-1 수용체 시그날 펩타이드; 및 유럽특허 0 460 846에 기술된 타입 II IL-1 수용체 시그날 펩타이드 중 하나가 부가될 수 있다.

[0214] 폴리펩타이드는 진핵생물 세포에서 재조합 생산될 수 있고, 세포 배양 시에 성장하도록 개조된 숙주 세포에 의해 분비되는 것이 바람직하다. 본 발명에 유용한 숙주 세포는 포유동물 세포인 것이 바람직하다. 이 세포는 또한 목적 유전자를 발현하도록 유전자 조작될 수 있고, 세포 배양 시에 성장하도록 개조된 포유동물 생산 세포일

수 있고/있거나 동종 세포주일 수 있다. 당업계에서 일반적으로 사용되는 당해 세포의 예는 사이토카인, 응고 인자 및 항체와 같은 여러 복합적인 재조합 폴리펩타이드의 생산에 널리 사용되는, VERO, BHK, HeLa, CV1(예컨대, Cos), MDCK, 293, 3T3, 골수종 세포주(예: NS0, NS1), PC12, WI38 세포 및 중국 햄스터 난소(CHO) 세포이다(Brasel et al. (1996), Blood 88:2004-2012; Kaufman et al. (1988), J.Biol Chem 263:6352-6362; McKinnon et al. (1991), J. Mol. Endocrinol 6:231-239; Wood et al. (1990), J. Immunol. 145:3011-3016). 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 결손형 돌연변이 세포주(Urlaub et al. (1980), Proc Natl Acad Sci USA 77: 4216-4220, 참고 인용됨), DXB1 1 및 DG-44는 효율적인 DHFR 선별가능 및 증폭가능한 유전자 발현 시스템으로 인해 상기 세포들에서 재조합 폴리펩타이드가 높은 수준으로 발현될 수 있기 때문에 바람직한 CHO 숙주 세포주이다(Kaufman R. J. (1990), Meth Enzymol 185:537-566, 참고인용됨). 또한, 이 세포들은 유착성 또는 현탁 배양으로 조작하기 쉽고, 비교적 우수한 유전자 안정성을 나타낸다. CHO 세포 및 여기서 발현되는 재조합 폴리펩타이드는 충분히 특성규명되어 있고, 규제 기관으로부터 임상용 상업적 제조에 사용되도록 승인을 받았다. 본 발명의 방법은 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 사용하여 수행할 수도 있다. 하이브리도마주를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다[예컨대, Berzofsky et al. in Paul, ed., Fundamental Immunology, Second Edition, pp.315-356, at 347-350, Raven Press Ltd., New York (1989) 참조]. 전술한 하이브리도마주 유래의 세포주도 본 발명을 수행하는데 적합하다.

[0215] CHO 세포와 같은 적당한 포유동물 세포주를 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열로 형질전환시킨 후, 재조합 단백질의 안정된 발현을 나타내는 세포를 확인하고 분리했다. 재조합 단백질의 안정된 발현은 적당한 DNA 벡터로 디하이드로폴레이트 리덕타제 결손형(DHFR-) 중국 햄스터 난소 세포(CHO AM-1/D, 미국 특허 6,210,924)를 형질감염시킨 뒤, 당업계에 공지된 방법에 따라서 재조합 단백질의 최고 발현을 증명하는 각 클론을 분리 및 검사하여 달성한다. 소규모 스피너 및 대규모 생물반응기에서의 성장 및 생산에 근거하여, 재조합 단백질 제조를 위한 세포주로서 특정 세포주를 선택한다.

[0216] 최고 수준의 재조합 단백질을 생산하는 세포는 당업계에 공지된 방법, 예컨대 무혈청 조건 하에 96웰 및/또는 24웰 평판에서 한계 희석의 수회 반복에 의한 방법 등으로 본 발명의 세포 배양 배지를 사용하여 클로닝할 수 있다. 클론은 다양한 현탁 용기에서 생산 및 성장 특성에 기초하여 선별한다. 효소 면역검정법(EIA)은 최고 수준의 재조합 단백질을 생산하는 클론을 선별하기 위해 수행될 수 있다. 성장 특성, 예컨대 배가 시간 및 밀도는 100ml부터 최고 3L 범위의 각종 진탕기 또는 스피너 플라스크 및 생물반응기에서 클론을 성장시켜 측정할 수 있다. 배양 중에 최고 밀도에 도달한, 배가 시간이 가장 빠른 클론과 같은 최적 클론을 선별하고, 재조합 단백질 생산용 세포주로서 선택한다. 한가지 양태에서, 재조합 단백질 생산은 상업적 목적에 사용되는 것으로, 대규모 생물반응기를 사용하여 수행할 수 있다.

[0217] 통상적으로, 세포 배양은 멸균, 조절된 온도 및 대기 조건 하에 조직배양판(예: 10cm 평판, 96웰 평판 등)에서 또는 회전병과 같은 현탁 배양으로 수행한다. 배양물은 진탕 플라스크, 소규모 생물반응기 및/또는 대규모 생물반응기에서 성장할 수 있다. 생물반응기는 온도, 대기, 진탕 및/또는 pH와 같은 환경 조건이 모니터되고, 조정되고, 제어될 수 있는, 세포 배양에 사용되는 장치이다. 유가식 방법을 비롯한 본 발명의 방법 및 조성물은 대규모 포유동물 세포 배양물, 예컨대 10L, 11L, 12L, 13L, 14L 등에 사용될 수 있다. 한가지 양태에서, 본 발명의 대규모 세포 배양 방법 및 조성물은 CHO 세포 배양 및 항체 생산에 적합하다.

[0218] 본 발명에 따르면, 포유동물 숙주 세포는 항체 또는 재조합 폴리펩타이드일 수 있는 목적 폴리펩타이드 생산을 촉진하는 조건 하에 배양한다. 당업자는 특별히 배양된 숙주 세포의 세포 성장, 세포 생존도 및/또는 재조합 폴리펩타이드 생산을 최대화하기 위해 개발된 본 명세서에 기술된 하나 이상의 세포 배양 배지를 선택하여 사용할 수 있다. 대안적으로, 본 발명에 따른 방법 및 조성물은 시판되는 세포 배양 배지와 함께 사용될 수 있다.

[0219] 포유동물 세포에 적합한 배양 조건은 당업계에 공지되어 있고(예컨대, Animal cell culture: A Practical Approach, D.Rickwood, ed., Oxford university press, New York(1992)), 본 발명의 개선 방법과 조합될 수 있다. 포유동물 세포는 현탁 상태로 배양되거나 또는 고체 기판에 부착된 상태로 배양될 수 있다. 또한, 포유동물 세포는 유동상 생물반응기, 중공 섬유 생물반응기, 회전병, 진탕 플라스크 또는 교반 탱크 생물반응기 등에서 마이크로캐리어의 존재 또는 부재 하에 배양할 수 있고, 회분식, 유가식, 연속식, 반연속식 또는 관류식으로 작업할 수 있다.

[0220] 본 발명에 따른 방법은 단일 단계 및 다중 단계의 배양 방법 모두에서 재조합 폴리펩타이드의 생산을 향상시키는데 사용될 수 있다. 단일 단계 방법에서는 세포가 배양 환경에 접촉되고 단일 생산 단계 동안에 개시된 방법이 이용된다. 다중 단계 방법에서는 두 단계 이상의 상이한 단계로 배양된다. 예컨대, 세포는 세포 증식 및 생

존도를 최대화하는 환경 조건 하에 먼저 증식기까지 배양될 수 있고, 그 다음 폴리펩타이드 생산을 최대화하는 조건 하에 생산기로 전달될 수 있다. 증식기 및 생산기는 하나 이상의 전이기에 의해 선행되거나 또는 하나 이상의 전이기에 의해 분리될 수 있다. 다중 단계 방법에서, 본 발명에 따른 방법은 적어도 생산기 동안에 이용된다.

[0221] 제한이 아닌 이해를 목적으로, 당업자라면 세포 배양 및 단백질 생산의 배양 작업(culturing run)은 3가지 일반적인 유형; 즉, 연속식 배양, 회분식 배양 및 유가식 배양을 포함할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 연속식 배양에서는 예컨대 신선한 배양 배지 보충물(즉, 공급 배지)이 배양 기간 동안에 세포에 제공되면서, 사용된 배양 배지는 매일 제거되고 산물은 매일 또는 연속적으로 수거된다. 연속식 배양에서, 공급 배지는 매일 첨가될 수 있고, 점적액 또는 주입액으로 연속해서 첨가될 수 있다. 연속식 배양에서 세포는 이 세포가 살아 있고 환경 및 배양 조건이 유지되는 한, 원하는만큼 오래 배양물에 남아 있을 수 있다.

[0222] 회분식 배양에서 세포는 처음에는 배지에서 배양되고, 이 배지는 제거되거나, 교체되거나 또는 보충되지 않으며, 즉 배양 작업 동안 또는 배양 작업 종료 전에 새로운 배지가 "공급"되지 않는다. 원하는 산물은 배양 작업 종료 시에 수거된다.

[0223] 유가식 배양에서 배양 작업 시간은 작업 동안 영양소 용액이 매일 1회 이상(또는 연속적으로) 배양 배지에 보충되어 증가하며, 즉 세포는 배양 기간 동안 공급 배지로 "공급"된다. 유가식 배양은 이하에 기술되는 바와 같은 다양한 공급 방법과 시간, 예컨대 매일, 격일, 2일 등마다, 1일당 1회보다 많이 또는 1일당 1회보다 적게 등을 포함할 수 있다. 또한, 유가식 배양물에는 공급 배지가 연속적으로 공급될 수 있다. 원하는 산물은 배양/생산 작업 종료 시에 수거한다. 본 발명은 단백질을 생산을 증가시키고 단백질 생산기를 연장시킬 수 있는 최적의 공급 용액에 의한 공급을 수반하는 유가식 세포 배양을 포함하는 것이 바람직하다.

[0224] *개선된 유가식 배양: 가수분해물 및 기본 강화 용액*

[0225] 본 발명의 한가지 관점은 보충 기본 용액 및 가수분해물 용액과 함께 개선된 유가식 방법을 사용하여 단백질을 생산을 증가시키는 방법 및 조성물을 특징으로 한다. 개선된 유가식 방법은 부분적으로 단백질 생산 동안의 일정 기간 중에 세포 배양 배지에 첨가되는 2가지 강화 용액, 즉 가수분해물 강화 용액 및 기본 강화 용액의 첨가를 기초로 한다. 본 발명의 유가식 방법에 사용되는 가수분해물 강화 용액은 식물 또는 동물 유래가 아닌 제1 가수분해물과 제2 식물계 가수분해물을 포함한다. 식물 또는 동물 유래가 아닌 가수분해물과 식물계 가수분해물의 예는 효모계 가수분해물이다. 가수분해물 강화 용액에 사용될 수 있는 식물계 가수분해물의 예는 대두계 가수분해물이다. 기본 강화 용액은 기본 배지, 예컨대 PF CHO, 아스파라긴 및 글루코스를 포함하고, 가수분해물 강화 용액은 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함한다. 가수분해물과 기본 강화 용액은 일정 기간 동안 일정 간격으로 세포 배양물에 첨가되고, 예컨대 11 내지 15일 기간 동안 매일 첨가되며, 같은 날 또는 다른 날에 첨가될 수 있다.

[0226] 본 발명은 항-TNF $\alpha$  항체를 암호화하는 핵산을 함유한 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 32 내지 38 $^{\circ}$ C 범위의 배양 온도 하에 세포 배양으로 배양하는 단계를 포함하여, 항-TNF $\alpha$  항체, 예컨대 아달리무마브/D2E7을 생산하는 유가식 방법을 특징으로 한다. 한가지 양태에서, 배양 온도는 35 $^{\circ}$ C이다. CHO 세포에는 영양소 결핍을 처리하여, 예컨대 해결하거나 보정하여, 생산성을 최대화하기 위해 가수분해물 강화 용액과 기본 강화 용액이 공급된다. 가수분해물 및 기본 강화 용액은 세포 배양물에 첨가된다. 한가지 양태에서, 세포 배양 생산 배지는 20 내지 65% 용존 산소, 예컨대 약 30% 용존 산소를 포함한다. 한가지 양태에서, 세포 배양 생산 배지는 단백질 생산에 필요한 수준의 글루코스, 예컨대 적어도 약 1 내지 5g/L의 글루코스를 함유한다. 한가지 양태에서, 세포 배양 생산 배지는 약 1.5 내지 2.5g/L의 글루코스를 포함한다. 추가 양태에서, 세포 배양 생산 배지는 약 2.0g/L의 글루코스를 포함한다. 글루코스 농도는 단백질 생산 배양 과정 전반에 걸쳐서 소정의 농도, 예컨대 적어도 2.0g/L의 글루코스를 유지하는데 필요할 때 세포 배양 생산 배지에 글루코스를 첨가함으로써 조절될 수 있다. 한가지 양태에서, 항-TNF $\alpha$  항체의 유가식 방법에 사용되는 가수분해물 강화 용액은 약 50 내지 280g/L의 대두계 가수분해물(이 범위 안의 범위 및 수, 예컨대 100 내지 225, 50 내지 225, 255 내지 275 및 265g/L도 포함한다)과 약 75 내지 300g/L의 효모계 가수분해물(이 범위 안의 범위와 수, 예컨대 100 내지 250, 150 내지 200, 145 내지 175 및 165g/L도 포함한다)을 포함한다.

[0227] CHO 세포에서 항-TNF $\alpha$  항체, 예컨대 아달리무마브/D2E7을 생산하기 위한 유가식 방법에 최적인 기본 강화 용액은 pH가 약 9.0 내지 10.5(이 범위 안의 범위와 수, 예컨대 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9,

10, 10.1, 10.2, 10.3, 10.4, 10.5도 포함한다)이다. 가수분해물 강화 용액과 기본 강화 용액이 첨가되는 일정 기간은 9 내지 15일, 예컨대 12일이다. 한가지 양태에서, 기본 강화 용액은 일정 기간 중 4일, 6일, 9일 및 11일 중 적어도 한 날에 세포 배양 배지에 첨가되고, 가수분해물 강화 용액은 일정 기간 중 4일, 7일, 또는 4일과 7일에 세포 배양 배지에 첨가된다. 상기 수치들의 중간에 속하는 수도 역시 본 발명의 일부인 것으로 간주한다.

[0228] 다른 대안적 양태에서, 항-TNF $\alpha$  항체, 예컨대 아달리루마브/D2E7을 생산하기 위한 유가식 방법은 약 6.5 내지 8의 pH, 예컨대 7.1 내지 7.2의 pH부터 시작해서, 약 6.9의 최종 pH를 포함하는 pH 선형 구배에 따라 세포 배양 배지의 pH를 조정하는 것을 포함할 수 있다. 한가지 양태에서, pH 선형 구배는 적어도 약 24시간, 48 시간 또는 72 시간의 기간 동안 조정된다.

[0229] 또한, 본 발명은 항-IL-12 항체를 암호화하는 핵산을 함유한 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 32 내지 38 $^{\circ}$ C 범위, 예컨대 33 $^{\circ}$ C의 배양 온도 하에 세포 배양으로 배양하는 단계를 포함하여, 항-IL-12 항체, 예컨대 ABT-874를 생산하는 유가식 방법을 특징으로 한다. IL-12 항체 생산에 사용되는 가수분해물 강화 용액은 추가로 글루코스를 포함할 수 있다. 한가지 양태에서, CHO 세포는 약 6.9의 pH에서 배양된다. CHO 세포에는 영양소 결핍을 유지하여 생산성을 최대화하기 위해 가수분해물 강화 용액과 기본 강화 용액이 공급된다. 가수분해물 및 기본 강화 용액은 세포 배양물에 첨가된다. 한가지 양태에서, 세포 배양 생산 배지는 20 내지 65% 용존 산소, 예컨대 약 40% 용존 산소를 포함한다. 한가지 양태에서, 항-IL-12 항체의 유가식 방법에 사용되는 가수분해물 강화 용액은 약 50 내지 280g/L의 대두계 가수분해물(이 범위 안의 범위 및 수, 예컨대 100 내지 225, 50 내지 225, 255 내지 275 및 265g/L도 포함한다), 약 75 내지 300g/L의 효모계 가수분해물(이 범위 안의 범위와 수, 예컨대 100 내지 250, 150 내지 200, 145 내지 175 및 165g/L도 포함한다) 및 약 2 내지 3g/L의 글루코스, 예컨대 2.4g/L의 글루코스를 포함한다. CHO 세포에서 항-IL-12 항체, 예컨대 ABT-874를 발현시키기 위한 유가식 방법에서 최적인 기본 강화 용액은 pH가 약 9.7이고 삼투물농도가 약 1480mOsm이다. 가수분해물 강화 용액과 기본 강화 용액이 첨가되는 일정 기간은 14 내지 15일 사이, 예컨대 12일이다. 한가지 양태에서, 기본 강화 용액은 일정 기간 중 5일째부터 격일로 세포 배양 생산 배지에 첨가되고, 가수분해물 강화 용액은 일정 기간의 6일째부터 매일 세포 배양 생산 배지에 첨가된다. 대안적으로, 기본 강화 용액과 가수분해물 강화 용액은 일정 기간의 5일째부터 매일 세포 배양 생산 배지에 첨가될 수 있다. 상기 범위 수치들의 중간에 속하는 수도 본 발명의 일부인 것으로 간주한다.

[0230] **안정한 고농도 공급 용액**

[0231] 본 발명의 한가지 관점은 단백질 생산성을 향상시키기 위한 개선된 안정한 고농도의 공급 용액에 관한 조성물 및 방법을 특징으로 한다. 개선된 공급 용액은 항체 생산 시에 세포 배양 생산 배지를 보충하는데 사용될 수 있다. 공급 용액은 글루코스(예: 100 내지 250g/kg); 기본 배지; 글루타민 외에 다른 아미노산, 예컨대 아스파라긴(예: 1.0 내지 15.0g/kg; 3 내지 12.5g/kg 또는 3 내지 5g/kg); 및 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함한다. 또한, 공급 용액의 pH는 약 6.0 내지 7.5이다. 2종의 상이한 비-동물계 가수분해물은 식물계 가수분해물, 예컨대 대두계 가수분해물, 및 동물계도 아니고 식물계도 아닌 가수분해물, 예컨대 효모계 가수분해물을 포함할 수 있다. 당업계에 공지된 임의의 기본 배지는 개선된 공급 용액에 사용될 수 있으며, 그 예로는 PF CHO 또는 DMEM/F12 배지(이에 국한되지 않는다)가 포함된다. 또한, 변형된 기본 배지가 사용될 수 있다. 한가지 양태에서, 기본 세포 배지는 다음과 같은 성분이 제외된다: 중탄산나트륨, 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제, 글루타민 및 글루코스. 개선된 공급 용액은 혼탁도가 약 15NTU 미만인 안정한 용액이다. 또한, 본 발명은 공급 용액을 첨가하여 세포 배양 생산 배지의 안정한 글루코스 수준을 유지시키는 것을 포함한다. 상기 범위 수치들의 중간에 속하는 수, 예컨대 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.6, 3.8, 4, 4.2, 4.4, 4.6, 4.8 및 5g/kg의 아스파라긴도 본 발명의 일부인 것으로 간주한다.

[0232] 또한, 본 발명에는 글루코스와 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함하는 공급 용액을 제조하는 방법도 포함된다. 공급 용액을 제조하는 방법은 글루코스와 기본 세포 배지를 배합 용액으로 배합하는 단계 및 배합 용액의 pH를 약 9.5 내지 10.5로 조정하는 단계를 포함한다. 그 다음, 이 용액에 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 첨가하고, 최종 공급 용액의 pH가 약 6.5 내지 7.5 이도록 pH를 다시 조정한다. 상기 범위의 수치에 중간에 속하는 수, 예컨대 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5의 pH도 본 발명의 일부인 것으로 간주한다.

[0233] 본 발명의 공급 용액은 포유동물 세포 배양으로부터 높은 수준의 재조합 단백질 생산, 예컨대 항체 생산을 달성하는데 사용될 수 있다. 한가지 양태에서, 본 발명은 항체를 암호화하는 핵산을 함유한 포유동물 세포를 세포

배양 생산 배지 중에서 배양하는 것을 포함하여 포유동물 세포 배양으로부터 적어도 1.5g/L의 항체를 생산하는 방법을 특징으로 한다. 그 다음, pH가 약 6.7 내지 7.0인 공급 용액을 세포 배양 생산 배지에 첨가한다. 공급 용액은 글루코스(예: 약 100 내지 250g/kg); 기본 세포 배지; 글루타민 외에 다른 아미노산; 및 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함한다. 한가지 양태에서, 이러한 방법은 적어도 2g/L의 항체를 생산하고, 적어도 4g/L의 항체를 생산하며, 적어도 약 5g/L의 항체를 생산하고, 적어도 6g/L의 항체를 생산한다. 상기 범위 수치의 중간에 속하는 수, 예컨대 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5g/L의 항체도 본 발명의 일부인 것으로 간주한다.

[0234] pH가 약 6.7 내지 7.2이고, 글루코스; 기본 세포 배지; 글루타민 외에 다른 아미노산; 및 2종 이상의 상이한 비-동물계 가수분해물을 포함하는 공급 용액을 사용함으로써, 포유동물 세포 배양으로부터 생산되는 항체의 역가는 증가할 수 있다. 한가지 양태에서, 항체를 암호화하는 핵산을 함유한 포유동물 세포의 세포 배양 생산 배지에 공급 용액의 첨가는 공급 용액의 첨가 없이 배양된 대조군 포유동물 세포 배양보다 적어도 50% 이상 역가를 증가시킨다. 한가지 양태에서, 공급 용액의 첨가는 대조군보다 적어도 100% 이상 역가를 증가시킨다. 한가지 양태에서, 공급 용액의 첨가는 대조군보다 적어도 150% 이상 역가를 증가시킨다. 보충 공급 용액은 특정 세포 밀도, 예컨대 세포 밀도가 적어도  $2.0 \times 10^6$  개의 세포/ml에 도달할 때 또는 세포 밀도가 적어도  $3.5 \times 10^6$  개의 세포/ml에 도달할 때 세포 배양물에 첨가될 수 있다. 또한, 상기 수치 범위의 중간에 속하는 수도 본 발명의 일부인 것으로 간주한다. 상기 언급된 임의의 수치의 조합을 상한 및/또는 하한으로 사용한 수치 범위도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 간주한다.

[0235] 본 발명의 유가식 방법은 단백질, 예컨대 항체의 생산을 위한 세포 배양물의 특정 영양 요구를 처리하는, 예컨대 해결하거나 보정하는 역할을 하므로, 특정 성분을 모니터링하는 것이 유리할 수 있다. 모니터링될 수 있는 성분에는 임의의 대사 지표, 즉 세포 대사의 지표가 포함된다. 한가지 양태에서, 본 발명의 유가식 방법은 세포 배양 배지 중의 글루코스 수준을 모니터링하여, 0.25 내지 20g/L로 유지시킴을 포함한다. 한가지 양태에서, 글루코스 수준은 0.5 내지 5.5g/L 또는 4.0 내지 5.5g/L로 유지된다. 글루코스 수준을 모니터링함으로써, 세포 대사를 간접적으로 모니터링할 수 있다. 하기 실시예 3에 기술한 바와 같이, 글루코스는 대사 지표로서 사용될 수 있다. 한가지 양태에서, 글루코스 수준에 따라, 세포 배양물에 영양 성분(들), 예컨대 가수분해물을 보충할 수 있다. 글루코스 수준을 모니터링하는 방법은 당업계에 익히 공지되어 있고, 자동 샘플링 장치를 사용하는 모니터 방법을 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 대사 지표의 다른 예는 글루타민이다. 상기 수치 범위의 중간에 속하는 수 뿐만 아니라, 여기에 인용된 모든 다른 수 역시 본 발명의 일부인 것으로 간주한다. 상기 언급한 임의의 값의 상한 및/또는 하한으로 조합한 값의 범위도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 간주한다.

[0236] 피드백 조절 시스템은 세포 배양 생산 배지에서 대사 지표인자 수준을 모니터링하는데 사용될 수 있다. 한가지 양태에서, 바람직한 파라미터 설정치, 예컨대 소정의 글루코스 수준에 부합하도록 하기 위해, 배합 공급 용액은 피드백 조절 시스템에 의해 결정된 바와 같이 세포 배양 생산 배지에 첨가한다.

[0237] 피드백 조절 시스템은 소정의 포유동물 세포 배양 및 목적 단백질의 생산을 위한 공급 프로파일을 결정하는데 사용될 수 있다. 한가지 양태에서, 포유동물 세포 배양에서 단백질을 생산하기 위한 공급 프로파일을 결정하는 방법은 상기 단백질을 암호화하는 핵산을 함유한 포유동물 세포를 배양하는 단계 및 대사 지표인자를 모니터링하는 피드백 조절 시스템을 이용하여 세포 배양 배지에 공급 용액, 예컨대 배합 공급 용액을 첨가하는 단계를 포함한다. 공급 용액은 목표 대사 지표인자 설정치, 예컨대 글루코스 수준을 충족시키기 위해 세포 배양 생산 배지에 첨가된다. 세포 배양을 끝낸 후, 세포 배양 생산 배지에 첨가되는 공급 용액의 1일당 양을 결정하고, 공급 용액이 세포 배양물에 첨가되어야만 하는 시점의 공급 프로파일을 제공한다. 공급 프로파일이 일단 확립되면, 목적 단백질을 생산하는 주어진 포유동물 세포 배양물에 대한 대사 지표인자의 모니터링은 더 이상 필요하지 않다. 공급 프로파일은 빈번한 샘플링을 더 이상 필요로 하지 않음으로 인한 오염 위험을 감소를 비롯하여 많은 장점을 제공한다.

[0238] *N*-아세틸시스테인 및 부티르산나트륨 방법 및 조성물

[0239] 진술한 바와 같이, 본 발명의 세포 배양 방법은 증가된 항체 역가를 유리하게 달성한다. 포유동물 세포 배양에서 단백질 생산성을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 관점은 세포 배양 배지에 부티르산 나트륨, *N*-아세틸시스테인 또는 이의 배합물의 첨가를 통해 이루어진다. 한가지 양태에서, 본 발명은 세포 배양 배지에 부티르산나트륨(예: 0.1mM 내지 10mM), *N*-아세틸시스테인(예: 1mM 내지 80mM) 또는 이의 배합물을 첨가하여 항체를 생산하는 방법을 특징으로 한다. 한가지 양태에서, 항체 역가는 적어도 약 100mg/L; 적어도 약 150mg/L; 적어도 약

200mg/L; 적어도 약 250mg/L; 적어도 약 300mg/L; 적어도 약 350mg/L; 또는 적어도 약 400mg/L이다.

[0240] 또한, 본 발명은 세포 배양 배지에 부티르산나트륨(예컨대, 0.1mM 내지 10mM의 최종 농도), N-아세틸시스테인(예: 1mM 내지 80mM의 최종 농도) 또는 이의 배합물을 첨가하여 항체의 역가가 대조군 포유동물 세포 배양물보다 적어도 10% 향상되도록 포유동물 세포 배양으로 항체를 생산하는 방법을 특징으로 한다(따라서, 대조군은 부티르산나트륨, N-아세틸시스테인 또는 이의 배합물이 결여되어 있다). 한가지 양태에서, 포유동물 세포 배양물의 항체 역가는 대조군 포유동물 세포 배양물보다 적어도 29% 향상되고; 대조군 포유동물 세포 배양물보다 적어도 40% 향상되며; 대조군 포유동물 세포 배양물보다 적어도 70% 향상되고; 또는 대조군 포유동물 세포 배양물보다 적어도 90% 향상된다. 부티르산나트륨, N-아세틸시스테인 또는 이의 배합물은 포유동물 세포 배양물의 증식기 동안에 포유동물 세포 배양물에 첨가될 수 있다. 한가지 양태에서, 부티르산나트륨, N-아세틸시스테인 또는 이의 배합물은 배양 시간의 4일과 7일 사이에 포유동물 세포 배양물에 첨가된다. 한가지 양태에서, N-아세틸시스테인은 5mM 내지 80mM, 예컨대 20 내지 60mM, 약 10mM의 최종 농도 범위의 양으로 단독으로 또는 부티르산나트륨과 함께 첨가된다.

[0241] 또한, 본 발명은 세포 배지에 약 0.1mM 내지 10mM의 N-아세틸시스테인을 첨가하여 대조군 포유동물 세포 배양물에 비해 포유동물 세포 배양물의 수명을 적어도 약 45% 연장시키는 방법을 특징으로 한다(대조군은 상기 첨가가 결여된 것이다). 한가지 양태에서, 포유동물 세포 배양물의 수명은 대조군 포유동물 세포 배양물에 비해 적어도 약 35% 연장되거나; 대조군 포유동물 세포 배양물에 비해 적어도 약 55% 연장된다.

[0242] 본 명세서에 기술된 세포 배양 배지 및 개선된 배양 방법은 각각 사용되거나 또는 서로 조합해서 사용할 수 있음을 유의해야 한다.

[0243] 본 발명의 방법과 조성물을 사용하여 배양한 후, 결과적으로 발현된 단백질은 그 다음 회수하거나 수집할 수 있다. 또한, 상기 배양물 또는 구성재료(예컨대, 배양 배지 또는 세포 추출물 또는 체액)으로부터 공지의 방법을 사용하여 단백질을 정제하거나 또는 부분 정제할 수 있다. 분별 절차는 여과, 원심분리, 침전, 상 분리, 친화도 정제, 겔 여과, 이온교환크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC; 페닐 에테르, 부틸 에테르 또는 프로필 에테르와 같은 수지를 사용하여), HPLC 또는 이들의 일부 조합의 하나 이상의 단계를 포함할 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.

[0244] 예를 들어, 폴리펩타이드의 정제는 이 폴리펩타이드에 결합하는 제제를 함유하는 친화도 컬럼을 포함할 수 있고; 이러한 친화도 수지, 예컨대 콘카나발린 A-아가로스, 헤파린-토요펠(HEPARIN-TOYOPEARL)(크로마토그래피 매질) 또는 Cibacrom blue 3GA SEPHAROSE(아가로스 비드)에 대한 하나 이상의 컬럼 단계; 용출을 수반하는 하나 이상의 단계; 및/또는 면역친화도 크로마토그래피를 포함할 수 있다. 폴리펩타이드는 정제를 용이하게 하는 형태로 발현될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩타이드는 융합 폴리펩타이드, 예컨대 말토스 결합 폴리펩타이드(MBP), 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST) 또는 티오레독신(TRX)의 융합 폴리펩타이드로서 발현될 수 있다. 이러한 융합 폴리펩타이드의 발현 및 정제를 위한 키트는 각각 뉴잉글랜드 바이오랩(New England BioLab, 매사추세츠 비버리), 파마시아(뉴저지 피스카타웨이) 및 인비트로젠(InVitrogen)으로부터 시판된다. 폴리펩타이드는 에피토프로 태그화될 수 있고, 이어서 이러한 에피토프에 대한 특이적인 항체를 이용하여 정제할 수 있다. 이러한 에피토프 FLAG(에피토프 태그) 중 하나는 코닥(Kodak)(코네티컷 뉴헤븐 소재)에서 구입할 수 있다. 또한, 발현된 폴리펩타이드를 친화도 정제하기 위해 제조한 단백질에 대한 모노클로날 항체와 같은 폴리펩타이드 결합성 폴리펩타이드를 함유하는 친화도 컬럼을 이용하는 것도 가능하다. 친화도 정제 단계의 다른 종류는 친화도 제제가 Fc 도메인을 함유하는 단백질에 결합하는 단백질 A 또는 단백질 G 컬럼일 수 있다. 폴리펩타이드는 친화도 컬럼으로부터 통상의 기술을 이용하여, 예컨대 고염 용출 완충액에서 분리될 수 있고, 그 다음 사용된 친화도 매트릭스에 따라서 pH 또는 다른 구성재료를 변화시키거나 사용하기 위한 저염 완충액 내로 투석할 수 있고, 또는 친화도 부의 자연 발생의 기질을 이용하여 경쟁적으로 분리할 수도 있다. 한가지 양태에서, 본 발명의 방법과 조성물을 사용하여 생산한 항체는 본 발명에 참고인용된 미국 출원번호 11/732918에 기술된 방법에 따라 정제한다.

[0245] 바람직한 최종 순도는 폴리펩타이드의 사용 목적에 따라 달라진다. 본 발명의 방법과 조성물은 목적 단백질의 치료적 용도에 적합하다. 즉, 폴리펩타이드가 생체내에 투여될 때 비교적 높은 순도가 바람직하다. 이러한 경우에, 폴리펩타이드는 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의한 분석 시에 다른 폴리펩타이드에 대응하는 폴리펩타이드 밴드가 전혀 검출되지 않을 정도로 정제된다. 당해 폴리펩타이드에 대응하는 복수의 밴드가 SDS-PAGE에 의해 가시화될 수 있는데, 이는 차등적 글리코실화, 차등적 해독후 프로세싱 등으로 인한 것임을 당업자라면 잘 알고 있을 것이다. 본 발명의 폴리펩타이드는 SDS-PAGE 분석 시에 단일 폴리펩타이드 밴드로 표시

되는 바와 같이 실질적인 균일성으로 정제되는 것이 가장 바람직하다. 폴리펩타이드 밴드는 은 염색, 쿠마시 블루 염색 또는 자가방사선법(폴리펩타이드가 방사능표지된 경우)으로 가시화될 수 있다.

[0246] 또한, 본 발명은 단백질을 추가로 조제하는 것을 경우에 따라 포함한다. "조제하는"이란 용어는 단백질이 최종 사용자를 위해 완충액 교환, 살균, 벌크 포장 및/또는 포장될 수 있음을 의미한다. 이러한 조성물은 유효량의 단백질과 함께 생리학적으로 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다. "생리학적으로 허용되는"이란 용어는 활성 성분(들)의 생물학적 활성 효과를 방해하지 않는 비독성 물질을 의미한다.

[0247] 본 명세서에 언급된 수와 관련하여, 상기 범위의 중간에 속하는 수 뿐만 아니라 여기에 언급된 모든 다른 수도 본 발명의 일부인 것으로 간주되어야 함을 유의한다. 앞에서 언급한 임의의 수치의 조합을 상한 및/또는 하한으로 이용한 수치 범위도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 간주한다.

[0248] **실시예**

[0249] 이하 실시예는 포유동물 세포를 배양하는 개선된 방법 및 조성물, 예컨대 포유동물 세포에서 생물체제를 발현하기 위한 개선된 방법 및 조성물을 예시한다. 다양한 재조합 생물체제를 발현하기 위해 사용된 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 배양하는 개선된 생화학적 제한 배지는 이하에 개시된다. 또한, 다양한 구성과 규모 하에 생물반응기 작업에서 세포를 대규모 배양하기 위한, 동일한 구성재료를 함유하지만 구성재료 균형이 상이하고 증대된 세포 성장 및 증가된 산물 발현을 허용하기 위해 농축된 배지도 예시된다.

[0250] **실시예 1: 포유동물 세포를 배양하기 위한 개선된 배지**

[0251] 통상적으로, 포유동물, 예컨대 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 배양 배지는 시판되는 배지 포물레이션, 예컨대 DMEM, Ham's F12 또는 이 배지 종류의 배합물을 기본으로 한다. 포유동물 세포에서 단백질을 생산하기 위해 세포 배양 배지는 세포 성장은 물론 생물체제 산물 발현의 증가를 지지하기 위해 충분히 강화되어야 한다. 다음 실시예는 항체를 비롯한 다양한 재조합 생물체제를 발현시키기 위해 포유동물 세포, 즉 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 배양하기 위한 개선된 생화학적 제한 배지를 설명한다.

[0252] 디하이드로폴레이트 리덕타제 결손성[dhfr(-)]인 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 동물 근원 유래의 혈청이나 다른 임의의 물질이 없는 현탁액에서 성장시켰다. 세포는 제조사에서 구입한 제한 세포 배양 배지, JRH PF-CHO(카탈로그 # 67147)에서 하이포산틴 및 티미딘의 부재 하에 성장시켰다. 이 세포주는 글루타민 신타제 결손성은 아니지만, 추가 글루타민을 배양 배지에 첨가했다.

[0253] 주어진 표적에 대한 항체와 같은 생물체제를 발현하는 CHO 세포주는 당업계에서 공지된 분자생물학 기술을 사용하여 제조했다. 간략히 설명하면, 목적 항체를 발현할 수 있고 dhfr 효소 유전자를 발현할 수 있는 발현 벡터는 당업계에서 공지된 방법을 이용하여 CHO 세포에 도입시켰다. 형질감염된 목적 세포는 하이포산틴 및 티미딘의 존재 하에 세포를 선별하여 수득했다. 선별된 형질전환체는 형질감염된 유전자를 증폭시키고 단백질 발현 수율을 증가시키기 위해 증가된 농도의 메토티렉세이트 중에서 추가 배양했다. CHO 세포를 배양하는 데 사용한 개선된 세포 배양 배지는 이하에 설명한다.

[0254] **실시예 1.1: 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 배양용 배지**

[0255] 일반적으로, CHO 세포를 배양하기 위한 배지 포물레이션은 파트 A, 파트 B 및 파트 C로 지칭한 3부로 구성되었다. 파트 A는 기본 배지이며 물, 아미노산, 비타민, 무기 금속 염, 미량원소, 에탄올아민, 푸트레신, 계면활성제, 피루브산나트륨, 글루타티온 및 2-머캅토에탄올을 포함했다. 파트 B는 무기 철 공급원을 포함했고, 파트 C는 재조합 성장인자, 완충액, 삼투물농도 조절제, 에너지원, 다양한 비철계 금속 이온, 계면활성제 및 가수분해물을 포함했다. 배지 구성재료는 대부분 무기성이거나 재조합체 근원 유래이며 고도로 정제된 것이었다. 배지는 동물 근원 유래의 단백질, 지질 및 탄수화물을 함유하지 않았다. 복합 가수분해물은 고도로 가공된 효모 및 식물 근원으로부터 수득했다.

[0256] 배지의 파트 A는 무단백질 CHO(PF CHO) 배지(JRH-SAFC Biosciences; JRH Cat # 67147 - 오리지널 파트 A라고도 지칭함)를 포함했다. 즉, 파트 A는 물, 아미노산 및 비타민을 포함하는 기본 배지를 포함했다. 기본 배지(PF CHO)는 세포 성장과 발현된 단백질 생산성의 추가 증가를 지지하기 위해 변형시키고 다시 조제하기 위해 선택했

다. PF CHO는 특정 구성재료, 예컨대 중탄산나트륨, HEPES 완충액, 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제, 계면활성제 및 단당류 글루코스 등이 제거되도록 변형시켰다(변형된 PF CHO는 변형된 파트 A로 지칭한다(JRH 카탈로그 #67411로도 지칭됨)). 이러한 변형은 또한 대규모 생물반응기에서 세포 배양 공정 조건을 용이하게 개선하기 위해서 이루어졌다.

[0257] 파트 B 구성재료(JRH)는 별도로 첨가되는 농축된 시트르산철 용액으로 구성된다. 파트 B 구성재료의 농도는 모든 CHO 세포 배양 프로젝트에서 일정하게 유지되었다.

[0258] 파트 C 구성재료는 성장인자, 예컨대 인슐린, 아미노산 글루타민, TC 이소톨레이트 및 대두 가수분해물 피톤, 선택 압력의 유지에 필수적인 메토트렉세이트 및 제조 중에 배지가 수화된 후 pH를 조정하기 위한 염기 NaOH 및 산 HCl을 포함했다.

[0259] 개선된 세포 배양 배지 포물레이션은 다음과 같이 제조했다: 먼저, CHO 세포는 처음으로 JRH에서 구입한 PF-CHO 배지(SAFC-JRH 카탈로그 No. 67147)에서 성장시켰다. PF-CHO 배지(카탈로그 #67147)는 이하에 기술되는 바와 같이 CHO 세포주에 사용하기 위해 추가 변형시켰다. 이와 같이 변형된 배지는 JRH에서 새로운 카탈로그 # 67411로 지정되어 있다. 변형의 목표는 삼투물농도와 pH가 영향을 받지 않도록 세포 배양 배지의 파트 A의 농도를 증가시키는 것이었다. 오리지널 파트 A(Cat #67147)는 무단백질성(인슐린 또는 다른 단백질 또는 펩타이드 성장 인자가 전혀 첨가되지 않음)이고, 글루타민 및 중탄산나트륨이 없는 것으로 제조업자(JRH)에 의해 주장되기도 했다. 그 다음, 이와 같이 제외된 구성재료는 특히 효능이 있는 것으로 입증된 CHO 세포주를 위한 67147 및 67411 파트 A 포물레이션 모두에 독립적으로 첨가했다. 이 구성재료는 이하에 파트 C로서 더 상세하게 설명한 구성재료의 일부가 되었다.

[0260] [표 1]

오리지날 세포 배양 배지 포물레이션(파트 A 67147)과 변형된 세포 배양 배지 포물레이션(변형된 파트 A 67411)의 비교

구성재료	67147(RM-003)(오리지날 파트 A)을 함유하는 세포 배양 배지	변형 67411(RM-230)(변형된 파트 A)을 1X, 2X, 3X 및 4X g/L로 함유하는 세포 배양 배지
<b>파트 A</b>		
파트 A 오리지날 파우더: JRH Source 1X 농도	16.45g/L	NA
변형된 파트 A: 특별 JRH Source 중탄산나트륨, HEPES 및 일염기성 및 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제 염화나트륨, 계면활성제 Pluronic F-68 및 단당류 글루코스가 없는 선택된 구성재료	NA	2.63, 5.26, 7.89 및 10.52g/L
<b>파트 B</b>		
파트 B: 시트르산철 JRH 스톡용액	10mL/L(0.5mM)	10mL/L(0.5mM)
<b>파트 C</b>		
성장인자, 단당류, 에너지원 아미노산: 여러 수준		
제조합 hu 인슐린	2-4mg/L	4-13mg/L
글루코스	1.5-3.5g/L	최대 7.0g/L까지
L-글루타민	0.292g/L	0.584g/L
완충액: 단일 농도로 유지		
중탄산나트륨	1.6g/L	1.6g/L
HEPES	NA	1.8g/L
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	NA	0.031g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	NA	0.436g/L
삼투물농도 조절제: 산물 계통당 여러 수준		
NaCl	NA	0-6.5g/L
가수분해물: 산물 계통당 여러 수준		
Bacto TC Yeastolate	NA	2.0-10.7g/L
BD 피톤(대두) 펩톤	NA	0-6.92g/L
프리마톤	NA	2-8g/L
<b>기타/추가 제제</b>		
선택 압력(dhfr 시스템): 산물 계통당 여러 수준		
메토타렉세이트	필요한 증폭 수준으로	필요한 증폭 수준으로
계면활성제-전단 보호제: 단일 수준		
Pleuronic F-68	1.0g/L	1.0g/L
pH 조정용 산-염기		
NaOH	필요한 만큼	필요한 만큼
HCl	필요한 만큼	필요한 만큼
<b>용액 목표</b>		
최종 pH	7.2-7.4	7.1-7.3
최종 삼투물농도	280-320	320-450

[0261]

[0262] **CHO 세포 배양을 위한 세포 배양 배지의 파트 A**

[0263] 전술한 바와 같이, 개선된 세포 배양 배지의 파트 A는 기본 배지의 변형, 즉 PF-CHO 배지를 포함했다. JRH에서 구입한 PF-CHO 배지(카탈로그 No. 67147)는 완충액 중탄산나트륨, HEPES 및 일염기성 및 이염기성 인산나트륨, 삼투물농도 조절제 염화나트륨, 계면활성제 Pluronic F-68 및 단당류 글루코스를 파트 A로부터 제거하여 변형시켰다. 이러한 구성재료는 다시 특정 세포 배양 프로젝트의 필요에 따라서 다양한 농도로 파트 A에 첨가했다. 이것은 완충액 농도가 안정하게 유지되도록 하며, 계면활성제 농도가 세포에 독성인 수준 이하로 유지되게 하면서, 삼투물농도와 탄소 기질 수준을 세포 성장 증가 및 항체 생산 증가를 위해 조작할 수 있게 했다. 이러한 구성재료가 일단 오리지날 JRH 파트 A 포물레이션으로부터 분리되면, 변형된 세포 배양 배지(변형 PF CHO-표 1에 #67411로 지칭한 것)에서 관찰되었듯이 JRH 파트 A의 나머지 구성재료의 농도 증가를 촉진했고, 이로써 세포 성장 및 항체 역가로 측정되는 항체의 발현이 증가되었다. 아미노산, 비타민, 미량 원소 및 기타 무수한 구성재료 분획을 비롯한, 변형된 파트 A 파우더(67411) 포물레이션의 각 구성재료는 배지의 부피를 변화시키지 않아도 오리지날 포물레이션 농도의 4배까지 증가했다. 67147을 이용한 오리지날 파트 A 포물레이션과 67411을 사용한 변형 포물레이션의 비교는 상기 표 1에 제시했다.

- [0264] 정의상으로, 오리지널 JRH PF CHO 기본 배지(카탈로그 # 67147)는 글루타민 및 중탄산나트륨이 없는 PF CHO 기본 배지였다. 파트 1에서 글루코스의 최초 농도는 1.5mg/L였다.
- [0265] **CHO 세포 배양을 위한 세포 배양 배지의 파트 B**
- [0266] 세포 배양 배지의 파트 B 구성재료는 JRH에서 구입한 PF-CHO 배지(카탈로그 번호 67147)의 파트 B 구성재료와 동일한 농축된 시트르산철 용액을 포함했고, 별도로 첨가했다.
- [0267] 제2철염 및 제1철염과 같은 무기 철 공급원, 특히 시트르산철 및 황산제1철을 기본 배지, 즉 파트 A 또는 변형된 파트 A에 첨가했다. 소량의 황산제1철(0.2-0.8mg/L)과 질산제2철 9수화물(0.025 내지 0.11mg/L)을 첨가했지만, 시트르산철과 같은 킬레이팅된 염이 바람직했다. 시트르산철은 액체 보충물로서 더 높은 농도로 첨가했고, PF-CHO 파트 B로서 세포 배양 배지에 첨가했다. 다른 배지 구성재료의 농도는 변화될 수 있고 더 넓은 농도 범위일 수 있지만, 시트르산철은 122mg/L의 단일 농도로 유지시켰다. 이것은 세포 손상을 유발하는 초과산화물과 자유 라디칼의 형성 및 기본 배지에 바람직하지 않은 화합물의 형성때문이었다.
- [0268] **CHO 세포 배양을 위한 세포 배양 배지의 파트 C**
- [0269] 세포 배양 배지의 파트 C는 기본적으로 재조합 성장인자, 완충액, 삼투물농도 조절제, 에너지원 및 가수분해물로 구성되었다. 개발 과정에서 아미노산, 비타민 및 보조인자, 무기 염 및 완충액, 미량원소 또는 무기물의 일반적 그룹에 포함되지 않는 세포 배양 배지에 첨가된 추가 화합물은 상기 표 1에서 "파트 C"로서 제시했다. 표 1에서 파트 C 이하에 언급되는 파트 C와 관련하여, 파트 C에 명시된 성분은 각각 또는 배합해서 첨가할 수 있음을 유의한다.
- [0270] **재조합 성장인자**
- [0271] 펩타이드 호르몬 인슐린 또는 대안적으로 재조합 유사체는 4 내지 13mg/L 범위의 농도로 세포 배양 배지에 첨가했다. IGF-1 역시 50 내지 100ng/L의 농도로 세포 배양 배지에 첨가되는 인슐린을 대체하거나 보충할 수 있다.
- [0272] **삼투물농도 조절제**
- [0273] 다양한 세포 배양 배지의 삼투물농도는 260mOsm 내지 460mOsm 범위였다. 삼투물농도의 조절은 염, 특히 NaCl, KCl 및 KNO<sub>3</sub>를 통해 이루어졌지만, 모든 아미노산과 가수분해물도 삼투물농도를 변화시키는데 상당히 기여한다.
- [0274] **에너지원**
- [0275] 배지에서 가장 풍부한 당당류는 글루코스(D-글루코스)였고, 필요에 따라 보충했다. 세포 배양 배지 중의 초기 농도는 3.5 내지 7.0g/L였다. 다른 당도 대사산물로서 또는 전단 보호제로서 보충될 수 있으며, 그 예로는 말토스, 만노스, 갈락토스 또는 프럭토스를 포함할 수 있다.
- [0276] **가수분해물**
- [0277] 가수분해물은 디펩타이드 및 트리펩타이드와 함께 유리 아미노산의 추가 급원으로 고려된다.
- [0278] **pH 유지(완충액)**
- [0279] 세포 배양 배지의 pH를 6.5 내지 7.5의 범위로 유지하기 위해 다양한 완충액을 사용했다. 배지에 사용한 무기 완충액(또는 완충 시스템)에는 탄산염(NaHCO<sub>3</sub>), 염화물(CaCl<sub>2</sub>), 황산염(MgSO<sub>4</sub>) 및 인산염(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 및 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)이 포함되었다. 또한, 유기 완충액에는 피루브산나트륨(CHONa) 및 HEPES라고도 알려진 N-[2-하이드록시에틸]피페라진-N'-[2-에탄설폰산]이 포함된다.

- [0280] 글루타민
- [0281] 글루타민도 오리지날 파트 A와 변형된 파트 A 모두에서 결여되어 있기 때문에 파트 C에 포함시켰다. 글루타민은 오리지날 파트 A를 함유하는 세포 배양 배지에, 예컨대 0.2 내지 0.4(0.29)g/L로 파트 C에 포함시켰고, 변형된 파트 A를 함유하는 세포 배양 배지에 0.3 내지 0.7, 예컨대 0.58g/L로 포함시켰다(상기 표 1 참조).
- [0282] **CHO 세포 배양을 위한 세포 배양 배지의 다른 성분**
- [0283] 다음은 세포 배양 배지에 첨가될 수 있는 추가 성분을 제공한다. 첨가될 수 있는 추가 성분은 이하에 제공된 예에 한정되는 것은 아님을 유의한다.
- [0284] 추가 펩타이드
- [0285] CHO 세포주에 특이적인 성장과 세포체 구조의 유지를 돕는 푸트레신 HCl 염은 기본 배지에 0.4 내지 1.65mg/L 첨가했다.
- [0286] 글루타민(트리펩타이드)은 0.5 내지 2.0mg/L 범위의 양으로 첨가했다. 또한, 2-머캅토에탄올은 3.6mg/L 첨가했고, 설프하이드릴을 유지하는 환원제로서 작용하고 구리와 같은 다양한 금속에 결합하여 금속을 수송한다. 이는 디하이드로아스코르베이트와 시스틴을 환원시키고 아스코르베이트와 시스테인을 재생시킨다.
- [0287] **메토트렉세이트:**
- [0288] 메토트렉세이트 농도는 산물 계통마다 달성하고자 하는 최종 증폭 수준에 따라 상이했다. 2mM 농도의 스톱 용액을 사용하는 경우, 첨가 부피와 최종 농도는 다음과 같다: 0.250mL/kg은 항-IL-12와 항-EPO-R에서 500nM의 최종 농도를 산출하고, 0.5mL/kg은 항-IL-18에서는 100nM의 최종 농도를 산출하며, 마지막으로 2.5mL/kg,은 항-TNF 알파에서 5000nM의 최종 농도를 산출한다.
- [0289] **세포 보호제/계면활성제**
- [0290] 본 실시예에 기술된 배지는 모든 규모의 반응기, 플라스크 및 스피너 플라스크에서 더욱 큰 전단력을 일으키는 진탕과 분사 하에 현탁된 CHO 세포를 성장시키는데 사용했다. 세포 손상을 최소화하기 위해서, 플루로닉 폴리에틸렌, 특히 Pluronic F-68과 같은 세포 보호제를 약 1g/L 배지의 농도로 첨가했다. 다른 전단 완화제, 예컨대 1g/L 이하의 메틸 셀룰로스, 및 리터 당 그램 양 이하의 다양한 농도의 특정 가수분해물과 식물 추출물도 사용했다.
- [0291] **아미노산**
- [0292] 세포 배양 배지는 본 명세서에 기술된 바와 같은 양의 아미노산을 포함했다. 2가지 아미노산, 아스파라긴과 글루타민은 CHO 세포 배양의 과정 동안 빠르게 제한 영양소가 되기 때문에 다른 아미노산보다 높은 출발 농도로 첨가했다. 특히 아스파라긴은 기본 배지에 약 0.4 내지 0.5g/kg 첨가했다.
- [0293] 아스파라긴은 파트 A(오리지날 PF CHO 및 변형 PF CHO 모두를 포함)의 성분이었지만, 세포 배양 배지에 보충함으로써 아스파라긴의 농도는 증가했다.
- [0294] 세포 배양 배지는 원하는 배지의 목적과 세포 효과가 있는 구성재료의 농도에 따라서 수일 동안 CHO 성장을 매우 낮은 초기 밀도부터  $1.0 \times 10^7$  개의 세포/ml 이상까지 지지할 수 있었다. CHO 프로세스는 또한 이하에 기술되는 증식기와 생산기를 포함하여, 다양한 범위의 구성재료를 필요로 했다. 하지만, 세포 배양 배지 포물레이션 비율과 존재는 동일하게 유지되었다.

[0295] CHO 세포 배지의 최종 제조

[0296] 개선된 세포 배양 배지의 제조는 다양한 구성재료를 특정 순서로 첨가하고 염기 또는 산을 이용한 pH 조정을 특정 횟수로 실시해야만 했다. NaOH 형태의 염기는 포몰레이션 중의 아미노산의 용해에 도움을 주기 위해 최대 pH 10으로 증가시키는 파트 A 기본 농도로서 첨가했다. 이 pH는 HCl 형태의 산을 이용하여 가수분해물을 첨가했을 때 최소 7.0까지 떨어졌다. 특정 pH까지의 추가 조정은 NaOH 또는 HCl 용액을 필요한만큼 사용하여 달성했다.

[0297] 이하 실시예는 다양한 특정 항체의 발현을 위하여 상기한 내용을 기초로 한 세포 배양 배지를 기술한 것이다.

[0298] 실시예 1.2: 항-TNF 알파 항체를 발현하는 CHO 세포를 배양하기 위한 세포 배양 배지

[0299] TNF α (즉, 아달리루마브; D2E7)에 대한 완전한 사람 항체를 발현하는 CHO 세포주를 표 2에 기술된 세포 배양 배지에서 배양했다.

[0300] [표 2]

완전한 사람 항-TNFα 항체를 발현하는 CHO 세포를 배양하기 위한 세포 배양 배지

배지 성분	원료	AF-D2E7-1XP	AF-D2E7-1XP	AF 및 AY-D2E7	AY-D2E7-2XP	AY-D2E7-2XP
구성재료 목록: JRH 파트 A 및 파트 B	품목 #	SR-248 성장	SR-250 성장+ MTX	SR-286 생산 prod_3XP	SR-332 성장 1	SR-333 성장 2
첨가된 ABC 구성재료	최종 pH:	7.2±0.1	7.2±0.1	7.2±0.1	7.2±0.1	7.2±0.1
	최종 삼투물농도:	280-320	280-320	370-390	320-360	320-360
파트 A: 미변형-오리지널-시판품	RM-003	16.45	16.45	NA	NA	NA
특정(변형) 파트 A: 무염	RM-230	NA	NA	7.89 g/kg	5.26 g/kg	5.26 g/kg
파트 B: 시트르산철, 칼레이팅된 철 급원	RM-004	10 ml/kg	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg
파트 C:						
tHu 인슐린; 재조합 단백질 글루코스 조절인자	SR-055	2.0 mL/kg (4 mg/kg)	2.0 mL/kg (4 mg/kg)	6.0 mL/kg (12 mg/kg)	3.88 mL/kg (8 mg/kg)	3.88 mL/kg (8 mg/kg)
글루코스, 무수; 탄소 급원	RM-011	3.5 g/kg	3.5 g/kg	7.0 g/kg	7.0 g/kg	7.0 g/kg
L-글루타민; 아미노산 및 에너지원	RM-071	0.292 g/kg	0.292 g/kg	0.584 g/kg	0.876 g/kg	0.876 g/kg
NaH2PO4·H2O: 인산염 완충액	RM-200	파트 A: 0.031 g/kg	파트 A: 0.031 g/kg	0.031 g/kg	0.031 g/kg	0.031 g/kg
Na2HPO4·7H2O: 인산염 완충액	RM-233	파트 A: 0.436 g/kg	파트 A: 0.436 g/kg	0.436 g/kg	0.436 g/kg	0.436 g/kg
Bacto TC Yeastolate: 효모 급원의 가수분해물	RM-216	2.0 g/kg	2.0 g/kg	10.7 g/kg	4.0 g/kg	4.0 g/kg
피톤 펩톤; 식물-대두 급원의 가수분해물	RM-238	NA	NA	6.92 g/kg	2.6 g/kg	2.6 g/kg
중탄산나트륨; 완충액; CO2-pH 조절인자	RM-077	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg
HEPES; 유기 완충액	RM-090	NA	NA	1.8 g/kg	1.8 g/kg	1.8 g/kg
NaCl (염); 삼투물농도 조절제	RM-174	파트 A: 6.5 g/kg	파트 A: 6.5 g/kg	2.45 g/kg	2.67 g/kg	2.67 g/kg
기타 성분:						
L-아스파라긴 일수화물; 아미노산	RM-284	NA	NA	NA	0.45 g/kg	0.45 g/kg
Pluronic F-68 (Poloxamer 188, NF); 계면활성제, 담체	RM-188	NA	NA	1.0 g/kg	1.0 g/kg	1.0 g/kg
메토틱세이트; CHO 증폭 DHFR 시스템에서 선택적	SR-133	2.50 mL/kg	2.50 mL/kg	2.50 mL/kg	2.50 mL/kg	2.50 mL/kg
NaOH, 2N; 염기	SR-288	필요한 만큼	필요한 만큼	5.67 mL/kg	3.5 mL/kg	3.5 mL/kg
HCl, 2N; 산	SR-287	필요한 만큼	필요한 만큼	2.5 mL/kg	2.91 mL/kg	2.91 mL/kg

[0301]

[0302] 실시예 1.3: IL-12 항체를 발현하는 CHO 세포를 배양하기 위한 배지 조성물

[0303] 완전한 사람 항 IL-12 항체를 발현하는 CHO 세포주를 표 3에 기술된 성장배지에서 배양했다.

[0304] [표 3a]

완전한 사람 항-IL12 항체(ABT-874)를 발현하는 CHO 세포 배양용 배지

	원료	ABT-874 SR-383 성장	ABT-874 SR-352 생산	ABT-874 SR-468 공급	ABT-874 SR-351 Glu 공급	ABT-874 SR-274	ABT-874 SR-273	ABT-874 SR-272
배지 명칭,	품목 #							
최종 pH:						6.5-6.9	6.5-6.9	6.5-6.9
최종 삼투물농도:						265-282	265-282	265-282
파트 A-: 미변형- 오리지널-시판품	RM-003	NA	NA	NA	NA	16.45 g/kg	16.45 g/kg	16.45 g/kg
파트 A (변형): 무염	RM-230	5.26 g/kg	NA	NA	NA	NA	NA	NA
파트 A (변형): 무염 & 감소된 비타민	RM-322	NA	7.89 g/kg	21.0 g/kg	7.89 g/kg	NA	NA	NA
파트 B: 시트르산철: 킬레이팅된 철 급원	RM-004	10 mL/kg	10 mL/kg	NA	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg
파트 C: 스트레스페린: 동물 급원의 Fe 담체	SR-057	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
rHu 인슐린: 재조합 단백질 글루코사 조절인자	SR-055	3.88 mL/kg	6.5 mL/kg	NA	6.5 mL/kg (13 mg/kg)	2 mL/kg (4 mg/L)	2 mL/kg (4 mg/L)	2 mL/kg (4 mg/L)
글루코스, 무수: 탄소 급원	RM-011	7.0 g/kg	7.0 g/kg	150 g/kg	200 g/kg	3.5 + 1.5 g/kg	3.5 + 1.5 g/kg	200 g/L
L-글루타민: 아미노산 및 에너지원	RM-071	0.876 g/kg	0.584 g/kg	NA	0.584 g/kg	0.292 g/kg	0.292 g/kg	0.292 g/kg
중탄산나트륨: 완충액: CO2-pH 조절인자	RM-077	1.60 g/kg	1.60 g/kg	NA	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg
HEPES: 유기 완충액	RM-090	1.80 g/kg	1.80 g/kg	NA	1.8 g/kg	NA	NA	NA
NaCl (염): 삼투물농도 조절인자	RM-174	2.675 g/kg	2.45 g/kg	NA	2.45 g/kg	NA	NA	NA
NaH2PO4·H2O: 인산염 완충액	RM-200	0.031 g/kg	0.031 g/kg	NA	0.031 g/kg	NA	NA	NA
Na2HPO4·7H2O: 인산염 완충액	RM-233	0.436 g/kg	0.436 g/kg	NA	0.436 g/kg	NA	NA	NA
Bacto TC Yeastolate: 효모 급원 가수분해물	RM-216	4.0 g/kg	10.7 g/kg	65.0 g/kg	10.7 g/kg	2 g/kg	11 g/kg	8 g/kg
피톤 펩톤: 식물- 대두 급원 가수분해물	RM-238	2.579 g/kg	6.92 g/kg	41.0 g/kg	6.92 g/kg	NA	NA	NA

[0305]

[0306] [표 3b]

	원료	ABT-874	ABT-874	ABT-874	ABT-874	ABT-874	ABT-874	ABT-874
기타 구성재료								
Pluronic F-68 (Poloxamer 188, NF): 계면활성제, 담체	RM-188	1.00 g/kg	1.00 g/kg	NA	1.0 mL/kg	NA	NA	NA
L-아스파라긴 일수화물: 아미노산	RM-284	0.450 g/kg	NA	5.0 g/kg	NA	NA	NA	NA
Primatone: 소-동물 급원의 가수분해물	RM-149	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
메도트렉세이트: CHO 증폭 DHFR 시스템에서 선택적	SR-133	0.250 mL/kg	NA	NA	NA	0.250 mL/kg	0.250 mL/kg	0.250 mL/kg
NaOH, 2N: 염기	SR-288	3.50 mL/kg	5.67 mL/kg	필요한 만큼	5.67 mL/kg	필요한 만큼	필요한 만큼	필요한 만큼
HCl, 2N: 산	SR-287	2.91 mL/kg	2.5 mL/kg	필요한 만큼	2.5 mL/kg	필요한 만큼	필요한 만큼	필요한 만큼

[0307]

[0308]

위에서 언급된 무염이고 비타민이 감소된 변형된 기본 배지와 관련하여, 비타민 함량은 위에서 RM-003으로 기술된 미변형된 기본 배지 또는 위에서 RM-230으로 기술된 변형 무염 기본 배지에 비해 1/3로 감소된다. 즉, 전술한 바와 같은 감소된 비타민 기본 배지는 RM-003 및 RM-230의 비타민 양의 1/3이었다. 상기 표에 제시된 양으로 사용했을 때, 배지에 존재하는 비타민의 최종 농도는 RM-003 또는 RM-230을 사용했을 때에 비해 1/3로 감소했다. 하지만, 필요하다면 RM-230을 이용한 생산 및 공급 배지가 사용될 수 있음을 유의한다.

[0309]

실시예 1.4: IL-18 및 EPO/R 항체를 발현하는 CHO 세포를 배양하기 위한 배지 조성물

[0310]

표 4는 항-IL-18 및 항-EPO/R 항체를 발현시키는데 사용된 증식 및 생산 배지를 정리한 것이다. 상기 항체들을 발현시키기 위한 배지에 관한 추가 세부사항은 표 5(항-IL-18) 및 표 6(항-EPO/R)에서 찾아볼 수 있다.

[0311] [표 4]

완전한 사람 항-IL18 및 항-EPO/R 항체를 발현하는 CHO 세포 배양용 배지

배지 성분	원료	항-IL18-2XP	항-IL18-3xP	항-IL18-4XP	항-EPO/R-1XP	항-EPO/R-3xP
구성재료 목록: JRH 파트 A 및 파트 B	품목 #	SR-371	SR-372 생산	SR-382 생산	SR-274 성장	SR-286 생산
첨가된 ABC 구성재료	최종 pH:	7.0±0.1	6.9±0.05	7.0±1.0	7.2±0.1	7.2±0.1
	최종 삼투농도:	280-300	373-403	360-400	280-320	370-390
파트 A: 미변형-오리지널-시판품	RM-003	NA	NA	NA	16.45	NA
특정(변형) 파트 A: 무염	RM-230	5.26 g/kg	7.89 g/kg	10.52 g/kg	NA	7.89 g/kg
파트 B: 시트르산철: 킬레이팅된 철 급원	RM-004	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg
파트 C:						
rHu 인슐린: 재조합 단백질 글루코스 조절인자	SR-055	3.88 mL/kg (8 mg/kg)	6.0 mL/kg (12 mg/kg)	6.5 mL/kg (12 mg/kg)	2.0 mL/kg (4 mg/kg)	6.0 mL/kg (12 mg/kg)
글루코스, 무수: 탄소 급원	RM-011	7.0 g/kg	7.0 g/kg	7.0 g/kg	1.5 g/kg	7.0 g/kg
L-글루타민: 아미노산 및 에너지원	RM-071	0.876 g/kg	0.584 g/kg	0.584 g/kg	0.292 g/kg	0.584 g/kg
중탄산나트륨: 완충액: CO <sub>2</sub> -pH 조절인자	RM-077	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg
HEPES: 유기 완충액	RM-090	1.8 g/kg	1.8 g/kg	1.8 g/kg	NA	1.8 g/kg
NaCl (염): 삼투농도 조절인자	RM-174	2.67 g/kg	2.45 g/kg	2.45 g/kg	파트 A: 6.5 g/kg	2.45 g/kg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O: 인산염 완충액	RM-200	0.031 g/kg	0.031 g/kg	0.031 g/kg	파트 A: 0.031 g/kg	0.031 g/kg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O: 인산염 완충액	RM-233	0.436 g/kg	0.436 g/kg	0.436 g/kg	파트 A: 0.436 g/kg	0.436 g/kg
Bacto TC Yeastolate: 효모 급원 가수분해물	RM-216	4.0 g/kg	10.7 g/kg	14.27 g/kg	2.0 g/kg	10.7 g/kg
피톤 펙트: 식물-대두 급원 가수분해물	RM-238	2.6 g/kg	6.92 g/kg	9.23 g/kg	NA	6.92 g/kg
기타:						
L-아스파라긴 일수화물: 아미노산	RM-284	0.45 g/kg	NA	NA	NA	NA
Pluronic F-68 (Poloxamer 188, NF): 계면활성제, 담체	RM-188	1.0 g/kg	1.0 g/kg	1.0 g/kg	NA	1.0 g/kg
메토틱세이트: CHO 증폭 DHFR 시스템에서 선택적	SR-133	0.05 mL/kg	0.05 mL/kg	0.05 mL/kg	0.25 mL/kg	2.50 mL/kg
NaOH, 2N: 염기	SR-288	필요한 만큼	필요한 만큼	필요한 만큼	필요한 만큼	5.67 mL/kg
HCl, 2N: 산	SR-287	필요한 만큼	필요한 만큼	필요한 만큼	필요한 만큼	2.5 mL/kg

[0312]

[0313] IL-18을 발현하는 CHO 세포주를 성장 배지 2xP(SR-371)에서 배양했고, 이후 생산 배지 3xP(SR-372)에서 약 1g/L의 최종 역가로 항체를 생산했다. 고 역가 방법은 생산 배지로서 4xP(SR-382)를 사용하여 약 2g/L의 최종 역가를 달성했다. 항-EPO/R 생산에 사용한 생산 배지는 SR-286과 동일하지만, 세포 성장을 위해 1xP 배지(SR-274)가 사용되었다. 모든 배지는 표 4와 5에 제시했다.

[0314] **실시예 1.5: 포유동물 세포에서 항체를 생산하기 위한 세포 배양 방법**

[0315] 위에서 개시한 배지는 또한 포유동물 세포, 즉 CHO 세포를 배양하기 위한 2가지 프로젝트에 사용된 2종의 생산 기반으로 발전시켰다. 제1 기반은 상기 표 2 내지 4에 기술된 변형 생산 배지에서 기술한 바와 유사한 배지 조성물을 사용하고 세포 배양에 사용된 온도만을 달리하여 발전시켰다. 이 기반은 항-IL-18 항체의 생산은 물론 항-에리트르포이에틴 수용체(항-EPO/R)의 생산에도 사용했다. 영양소 성분을 추가로 강화시킨 제2 배지 기반은 고역가의 항-IL-18 생산에 사용하여 더 큰 부피의 항체 생산성을 달성했다.

[0316] 항-IL-12, 항-IL-18 및 항-EPO/R 항체를 비롯한 모든 항체는 종래 기술된 바와 같이 형질감염된 dhfr(-) CHO 세포주에 의해 발현된 완전한 사람 IgG1 항체였다. 상기 세포주는 소 근원의 혈청 또는 다른 동물 근원의 물질의

도움 없이 현탁 배양했다.

[0317] 항-IL-18 항체를 생산하기 위해, 항-IL-18을 발현하는 CHO 세포주를, 본원에서 SR-371로도 지칭한 성장 배지에 서 배양했다. 배지 SR-371은 보통 세포 성장으로 더 높은 세포 생산성을 지지하기 위해 사용했다. 세포 밀도가 전달 기준에 도달하는 즉시, 세포를 생산 배지(SR-372)로 전달하여 생산기를 시작하게 했다.

[0318] 성장 배지 SR-371은 씨드 트레인(seed train) 및 씨드 반응기에서 사용했다. 생산 배지 SR-372는 3000리터 생산 생물반응기에서 사용했다.

[0319] [표 5]

항-IL18 방법 A에 사용된 배양 배지의 조성

구성재료	성장 배지 SR-371	생산 배지 SR-372
PFCHO 파트 A, 특정 무염 포올레이션	5.26 g/L	7.89 g/L
PFCHO 파트 B (시트르산철 스톱 용액)	10 mL/L	10 mL/L
재조합 사람 인슐린	7.76 mg/L	13 mg/L
덱스트로스, 무수	7.0 g/L	7.0 g/L
L-글루타민	0.876 g/L	0.584 g/L
중탄산나트륨	1.6 g/L	1.6 g/L
HEPES	1.8 g/L	1.8 g/L
NaCl	2.67 g/L	2.45 g/L
Pluronic F-68 (Poloxamer 188, NF)	1.0 g/L	1.0 g/L
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	0.031 g/L	0.031 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.436 g/L	0.436 g/L
Bacto TC Yeastolate	4.0 g/L	10.7 g/L
피톤 펩톤	2.579 g/L	6.92 g/L
메트트렉세이트, 2 mM	0.05 mL/L	0.05 mL/L
NaOH, 2N	3.5 mL/L	5.67 mL/L
HCl, 2N	2.91 g/L	2.5 mL/L
최종 pH	7.10 – 7.20	7.10 – 7.20
최종 삼투농도 (mOsmo/kg)	373 – 403	373 – 403

[0320]

[0321] 온도는 배양 동안에 35°C로 유지시켰다. 세포 배양물의 글루코스 수준이 2g/L 이하이면 추가 4g/L의 글루코스를 첨가했다.

[0322] 항-EPO/R 항체 생산에서도 유사한 방법을 이용했다. 하지만, 씨드 트레인에서 세포 성장을 위하여 영양분이 적은 배지(SR-274)를 사용했다. Humira 생산에 사용된 것과 같은 배지인 배지 SR-286은 항-EPO/R 항체의 생산기에 사용했다(표 6). 증식배지 SR-274는 씨드 트레인 및 씨드 반응기에서 사용했다. 생산 배지 SR-286은 3000리터 생산 생물반응기에서 사용했다.

[0323] [표 6]

항-EPO/R 방법에 사용된 배양 배지의 조성

구성재료	성장 배지 SR-274	생산배지 SR-286
PFCHO 파트 A, RM-003	16.45 g/Kg	N/A
PFCHO 파트 A, RM-230 (무염)	N/A	7.89 g/Kg
PFCHO 파트 B (시트르산철 스톱 용액)	10 mL/Kg	10 mL/Kg
재조합 사람 인슐린	4 mg/Kg	13 mg/Kg
덱스트로스, 무수	1.5 g/Kg	7.0 g/Kg
L-글루타민	0.292 g/Kg	0.584 g/Kg
중탄산나트륨	1.6 g/Kg	1.6 g/Kg
HEPES	N/A	1.8 g/Kg
NaCl	N/A	2.45 g/Kg
Pluronic F-68 (Poloxamer 188, NF)	N/A	1.0 g/Kg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	N/A	0.031 g/Kg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	N/A	0.436 g/Kg
Bacto TC Yeastolate	2.0 g/Kg	10.7 g/Kg
피톤 펩톤	N/A	6.92 g/Kg
메트트렉세이트, 2 mM	0.25 mL/Kg	N/A
NaOH, 2 N	필요한 만큼	5.67 mL/Kg
HCl, 2 N	필요한 만큼	2.5 mL/Kg
최종 pH	<b>7.20 ± 0.10</b>	<b>7.15 ± 0.05</b>
최종 삼투농도 (mOsmo/kg)	<b>320 ± 20</b>	<b>388 ± 15</b>

[0324]

[0325]

성장 배지 SR-274는 스피너 플라스크, 웨이브 백, 100L 씨드 생물반응기 Z-4605 및 3000L 생산 생물반응기 Z-3600에서의 575L 배양물의 초기 단계에 사용했다. 생산 배지 SR-286은 3000L 생산 생물반응기 Z-3600에서만 사용했다.

[0326]

생산 배지 SR-286과 SR-372는 표 5와 6에 열거된 것과 배지 성분이 유사하지만, MTX의 수준이 상이하다(SR-286에는 0nM이고 SR-372에는 100nM이다).

[0327]

항-IL-18 생산을 더 높은 생산율로 수득하기 위해 개선된 방법을 개발했다. 이 신규 방법인 방법 B에는 세포 배양 수명을 연장시키고 항체 부피 생산성을 증가시키기 위해 새로운 배지를 도입했다. 생산 배지(SR-382)는 생산기에 사용된 영양소의 양이 종래 생산 배지와 상이했다. SR-382의 전체 조성은 표 7에 기술했다. 항-IL-18 생산을 위한 신규 방법에서는 씨드 트레인 동안에 세포가 배지 SR-371에서 그대로 배양되었지만, 생산기 1단계 전에는 씨드 생물반응기에서 배지 SR-372를 사용했다. 그 다음, 세포 배양 수명을 연장시키기 위해 세포는 생산기에 온도를 35℃에서 33℃로 변동시켜 배지 SR-382에서 배양했다.

[0328]

성장 배지 SR-371은 스피너 플라스크, 웨이브 백 및 100리터 씨드 생물반응기에서 사용했다. 쇼트-필(short-fill) 배지 SR-372는 3000 리터 생산용 생물반응기에서 575 리터 배양의 초기 단계에 사용했다. 생산 배지 SR-382는 3000 리터 생산용 생물반응기에서만 사용했다.

[0329] [표 7]

항-IL18 방법 B에 사용된 배양 배지의 조성

구성재료	성장 배지 SR-371	쇼트-필 배지 SR-372	생산 배지 SR-382
PFCHO 파트 A, 특정 무염 포물레이션	5.26 g/L	7.89 g/L	10.52 g/L
PFCHO 파트 B (시트르산철 스톡 용액)	10 mL/L	10 mL/L	10 mL/L
재조합 사람 인슐린	7.76 mg/L	13 mg/L	13 mL/L
덱스트로스, 무수	7.0 g/L	7.0 g/L	7.0 g/L
L-글루타민	0.876 g/L	0.584 g/L	0.584 g/L
중탄산나트륨	1.6 g/L	1.6 g/L	1.6 g/L
HEPES	1.8 g/L	1.8 g/L	1.8 g/L
NaCl	2.67 g/L	2.45 g/L	0 g/L
Pluronic F-68 (Poloxamer 188, NF)	1.0 g/L	1.0 g/L	1.0 g/L
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	0.031 g/L	0.031 g/L	0.031 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.436 g/L	0.436 g/L	0.436 g/L
Bacto TC Yeastolate	4.0 g/L	10.7 g/L	14.27 g/L
피톤 펩톤	2.579 g/L	6.92 g/L	9.23 g/L
메토트렉세이트, 2 mM	0.05 mL/L	0.05 mL/L	0.05 mL/L
NaOH, 2N	3.5 mL/L	5.67 mL/L	8.95 mL/L
HCl, 2N	2.91 g/L	2.5 mL/L	4.1 mL/kg
최종 pH	7.1 - 7.2	7.1 - 7.2	7.1 - 7.2
최종 삼투물농도 (mOsm/kg)	373 - 403	373 - 403	373 - 403

[0330]

[0331]

추가로 CHO 세포 성장 및 항체 생산을 위한 에너지원 및 구축용 구성재료를 제공하기 위해 상기 배지에 영양소를 강화했다. 방법 B에서는 세포를 씨드 트레인 동안 배지 SR-371에서 그대로 배양했지만, 생산기 1단계 전인 씨드 생물반응기에서는 배지 SR-372를 사용했다. 그 다음, 생산기에는 세포 배양 수명을 연장시키기 위해 온도를 35°C에서 32°C로 변동시켜 배지 SR-382에서 세포를 배양했고, 이에 따라 세포에 대한 배지 SR-382의 효과를 연장시킬 수 있었다.

[0332]

방법 A: 배지 SR-372 및 배지 SR-286에서 항-IL-18 세포 및 항-EPO/R 세포의 성능

[0333]

항-IL-18 발현 세포를 생산기를 위한 세포량을 축적시키기 위해 100mM MTX를 함유한 배지 SR-371에서 배양했다. 배지 SR-371은 보통의 세포 성장 하에 더 높은 세포 생산성을 지지하는데 사용되었다. 표 8은 3000L 생산 생물반응기에서 항-IL-18을 생산하는 세포의 대표적인 생산 성장 프로파일을 제시한 것이다. 배지 SR-372와 함께 이 방법(방법 A)을 사용하면 최종 역가는 1g/L까지 수득될 수 있다.

[0334] [표 8]

배지 372 (방법 A)에서의 항-IL18 항체의 생산

측정가능한 결과	벤치 규모의 방법 (n= 5) 온도 = 35°C	3000L 방법 (n=6) 온도 = 35°C
최대 세포 밀도 [10 <sup>6</sup> 생존 세포/ml]	8.68	9.2
50% 생존도까지의 기간 [일]	11	11
세포 비생산성 [pg/세포-일]	20.5	17.6
50% 생존도에서의 수거물에 대한 부피 생산성 [mg/L-일]	98.8	81.8
50% 생존도에서의 역가 [mg/L]	1004	900

[0335]

[0336]

MTX 수준을 제외하고는 배지 372와 동일한 포플레이션을 공유하는 배지 286을 항-EPO/R 생산에 사용했다. 일반적으로 생산기에는 낮은 세포 밀도가 획득되지만, 생산 배지로서 SR-286을 사용하면 3000L 규모에서 세포는 최고 1.8g/L의 항체를 생산할 수 있는 높은 생산성이 달성되었다. 표 9에 정리한 바와 같이 적당한 세포 성장이 관찰되었다. 3000L 작업의 결과뿐만 아니라 벤치 규모의 결과도 상기 배지가 세포 비생산성을 증가시키고 1.9g/L까지의 최종 역가가 관찰되었음을 증명했다. 이러한 결과는 유사한 포플레이션을 갖는 배지(표 1과 2의 SR-372 및 SR-286)가 대규모 CHO 세포 배양에서 우수한 세포 성장과 높은 항체 생산물을 지지한다는 것을 나타낸다.

[0337]

[표 9]

배지 286에서의 항-EPO/R 항체의 생산

측정가능한 결과	벤치 규모의 방법 (n= 2) 온도 = 35°C	3000L 방법 (n=1) 온도 = 35°C
최대 세포 밀도 [10 <sup>6</sup> 생존 세포/ml]	4.50	4.80
50% 생존도까지의 기간 [일]	13	13
세포 비생산성 [pg/세포-일]	38.0	53.2
50% 생존도에서의 수거물에 대한 부피 생산성 [mg/L-일]	114.4	146.1
50% 생존도에서의 역가 [mg/L]	1487	1900

[0338]

[0339]

방법 B: 배지 SR-382를 이용한 방법 B에서 항-IL-18 세포의 성능

[0340]

배지 SR-382는 항-IL-18 항체 생산을 위한 연장된 회분식 방법에서 사용되는 가장 강화된 배지이다. 방법 B는

생산기 또는 쇼트-필 단계 전에 씨드 트레인에서 배지 SR-371과 씨드 생물반응기에서 SR-372를 사용하는 것을 포함한다. 이 세포의 성장은 생산기에 배지 SR-372에서의 세포 성장에 비해 보통 수준이었다. 하지만, 온도 변동 시에, 배지 SR-382를 사용함으로써 2.5g/L까지의 최종 역가가 수득되었다.

[0341] 배지 SR-382는 생산 배지에 영양소를 증가시키면 항-IL-18 발현 세포의 세포 비생산성이 비례적으로 증가한다는 것을 입증하는 연구에 기초하여 개발했다. 배지 SR-382는 세포 성장과 최종 역가 증가 사이의 균형을 제공한 최적의 배지였다. 최대 세포 밀도는 겨우  $5.9 \times 10^6$  개의 세포/ml에 이르렀지만, 세포 비생산성은 2배로 증가했다. 세포 배양 기간을 연장시키기 위한 온도 변동을 견뎌야 하면, 최종 역가는 표 10에 제시한 바와 같이 최고 2.2g/L에 이르렀다.

[0342] [표 10]

배지 SR-382(방법 B)에서의 항-IL18 항체의 생산

측정가능한 결과	벤치 규모의 방법 (n=1) 온도 = 35 - 33°C	3000L 방법 (n=1) 온도 = 35 - 33°C
최대 세포 밀도 [ $10^6$ 생존 세포/ml]	7.85	5.90
50% 생존도까지의 기간 [일]	12	13
세포 비생산성 [pg/세포-일]	32.0	42.1
50% 생존도에서의 수거물에 대한 부피 생산성 [mg/L-일]	181.1	191.8
50% 생존도에서의 역가 [mg/L]	2173	2110

[0343]

[0344] **실시예 2: 항체 발현을 위한 개선된 유가식 방법 및 공급 용액**

[0345] 회분식 방법에서 생물반응기의 소모된 배지 분석은 특정 아미노산의 고갈을 나타냈다. 이 발견은 또한 측정되지는 않았지만 또 다른 영양소 결핍으로 이어질 수 있는 다른 배지 구성재료의 고갈도 시사했다. 이러한 잠재적 결핍을 보충하기 위해 영양소 용액을 첨가했다. 조작 분야에서 이러한 시도는 일반적으로 유가식이라 한다.

[0346] 작업 관점에서는 농축된 공급 용액을 사용하는 것이 편리하다. 다음 실시예는 화학적 특정 기본 배지(PFCHO, 카탈로그 # 67411-50L)와 복합 가수분해물, 예컨대 이소톨레이트와 피톤의 고농축 용액의 첨가에 대해 설명한다. 상기 가수분해물의 쌍은 각각의 농도비와 관련된 생산성 증가 상승 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0347] **실시예 2.1: 아달리무마브 유가식 방법**

[0348] 초기 아달리무마브(Humira/D2E7) 방법은 배지를 제거하고 8회 연속으로 보충하는 3일 과정으로 이루어졌다. 개선된 유가식 방법은 배지에서 가수분해물 Primatone을 가수분해물 Yeastolate로 교체하고 새로운 반응 파라미터를 사용하여 개발되었다. 개선된 유가식 방법은 약 12일간 지속되었다.

[0349] 초기 회분식 방법의 생산성은 기본 배지, PFCHO를 재조제하고 새로운 가수분해물, 즉 피톤을 첨가함으로써 더욱 향상되었다. 이 가수분해물 함유 배지 포물레이션은 위에서 SR-286으로 언급한 방법에서 사용했다(표 2 참조). 또한, 반응기 작업 파라미터를 조사하여 총 아달리무마브 생산 방법을 진행하기에 최적인 온도를 확인했다.

[0350] 특히, 반응기 실험으로부터 매일 수집한 샘플의 분석에서 몇몇 잠재적인 영양소 결핍이 두드러졌다. 아달리무마브 회분식 방법의 경우에, 잠재적인 영양소 결핍은 25x 농축된 PFCHO 용액과 가수분해물 이소톨레이트와 피톤의 33x 용액을 공급하여 해결했다. 가수분해물은 이의 농도 비와 관련된 상승 효과를 나타내는 복합 구성재료이다.

이 비는 고농축된 33x 용액에서 유지되었다.

- [0351] 실험 계획
- [0352] 본 실험의 목표는 2가지 회분식 대조 방법에 대한 신규 유가식 방법을 비교하기 위한 것이다(온도 변동 37→33 °C 대 항온 35°C).
- [0353] 유가식 변법은 다음과 같다:
- [0354] 1. 25x 기본 강화 배지(PFCHO 용액)를 아미노산 결핍에 기초하여 공급했다.
- [0355] 2. 33x 가수분해물 강화 용액은 배지의 삼투물농도가 440mOsm(세포 성장과 생존도를 감소시키는 조건)을 절대로 초과하지 않도록 일정 간격으로 공급했다.
- [0356] 3. 반응기 온도는 전 과정 동안 35°C로 설정했다.
- [0357] 본 실험의 대조군은 다음과 같다:
- [0358] a) 동일 반응기에서 현재의 배지(SR-286)를 이용하여 대조군 회분식 방법의 파라미터 하에 작업했다(대조군 조건은 온도 변동 및 선형 pH 기술기와 함께 SR-286 배지를 이용한 반응기를 포함한다), 대조군 #1로 지칭함; 및
- [0359] b) 동일 반응기에서 현재의 배지(SR-286)를 이용하여 전 과정동안 작업 온도가 35°C인 것을 제외한 현재의 회분식 방법의 모든 파라미터 하에 작업했다, 대조군 #2라 지칭함.
- [0360] 재료
- [0361] 작업 부피가 13L인 Braun ED 반응기
- [0362] 작업 세포 बैं크 WCB970513-6을 이용한 파일롯트 플랜트 종균 AFI915A
- [0363] 3XP11Y7P 기본 배지 용액(SR-286)
- [0364] 기본 배지 강화 용액(25x)(PF CHO 용액)
- [0365] 가수분해물 강화 용액(33x)
- [0366] 글루코스 공급 샷(200g/L)(글루코스 용액)
- [0367] pH 조절을 위한 0.5N 수산화나트륨 용액
- [0368] 용액 제조:
- [0369] 1. 생산 배지(상기 표 2에 기술된 SR-286 용액 기록 참조).
- [0370] 2. 2kg의 PFCHO 강화 용액(25x)(기본 강화 용액):

[0371] 일정한 교반하에 다음과 같은 순서로 제조하고 각 첨가 단계 후에는 10분 동안 혼합했다:

구성재료	질량 [g]	비고
MilliQ H <sub>2</sub> O	1500	
PFCHO	131.5	
10N NaOH	49 mL	pH10까지
아스파라긴	15	pH가 약 9.73으로 떨어질 것이다
글루코스	100	pH가 약 9.71로 떨어질 것이다
MilliQ H <sub>2</sub> O	필요한 만큼	2000g 중량으로 맞춤, pH 약 9.70, 오스몰농도 약 1480 mOsm
0.2 μ PES 필터 막으로 여과 4°C에서 보관		
상기 용액의 초기 부피의 1% 첨가마다 다음과 같이 증가시킬 것이다: a) 오리지널 3x 농도에 비해 PFCHO 농도 0.25x 증가 b) 아스파라긴 75mg · L <sup>-1</sup> 증가 c) 글루코스 농도 0.5g · L <sup>-1</sup> 증가 d) 삼투물농도 10mOsm 증가 e) pH 약 0.10 pH 유닛 증가		

[0372]

[0373] 3. 1Kg 가수분해물 강화 용액(33x):

[0374] 일정한 교반 하에 다음과 같은 순서로 제조하고 각 첨가 단계 후에 10분 동안 혼합했다:

구성재료	질량 [g]	비고
MilliQ H <sub>2</sub> O	500	
TC Yeastolate	265	
피톤 펩톤	165	
MilliQ H <sub>2</sub> O	필요한 만큼	1000g 중량으로 맞춤
0.2 μ PES 필터 막으로 여과 4°C에서 보관		
주: 상기 용액의 초기 부피의 1% 첨가시마다 다음과 같이 증가시킬 것이다: a) 오리지날 배치 농도에 비해 TC Yeastolate 농도 2.65g/L(0.33x) 증가 b) 오리지날 배치 농도에 비해 피톤 펩톤 농도 1.65g/L(0.33x) 증가		

[0375]

[0376] 방법:

[0377] 반응기 조작:

[0378] 반응기에 접종하기 위해, 바이알을 해동한 뒤, Humira 씨드 트레이닝 방법 설명에 따라 증량시켰다. 반응기에서 성장 후, 쇼트필 단계를 모의하기 위해 반응기를 3.62L 아래로 배수시켰다. 그 다음, 생산 배지(SR-286)로 반응기를 13L 수준까지 가득채웠다.

[0379] 반응기는 다음과 같은 파라미터 하에 작동시켰다:

[0380] a) 진탕 70RPM

[0381] b) 온도 35°C

[0382] c) pH 선형 구배는 pH 7.16부터 시작해서 72시간에 걸쳐 pH 6.90으로 조정

[0383] d) 용존 산소 30%

[0384] e) 글루코스 수준이 2.0g · L<sup>-1</sup> 이하가 되면 200g/L 글루코스 용액을 195g 공급했다.

[0385] 공급 일정:

[0386] 다음은 아달리무마브 배치에 추가 영양소, 즉 보충 기본 배지 및 가수분해물을 첨가하기 위한 공급 일정을 나타낸 것이다.

[0387] [표 11]

아달리무마브 유가식 방법의 공급 일정

일	공급량 [g]	
	25x PFCHO	33x 가수분해물
0 - 3		
4	130	130
5		
6	260	
7		130, 글루코스
8		
9	260, 글루코스	
10		
11	130	
12 - 13		

[0388]

[0389] 결과:

[0390] 개선된 유가식 방법과 대조군 방법 #1과 #2를 비교한 결과(뿐만 아니라 예상된 개선)은 표 12와 13에 기술한다. 표 12에 제시된 바와 같이, 아달리무마브 생산성은 일정한 온도 하에 개선된 유가식 방법을 이용하고 증가된 강화 기본 배지 및 가수분해물 강화 용액을 첨가함으로써 증가했다.

[0391] [표 12]

아달리무마브 유가식 방법의 비교

측정가능한 결과	대조군 #1 (3000L 방법) 온도 = 37°C ↓ 33°C	대조군 #2 (3000L 방법) 온도 = 35°C	유가식 실험 온도 = 35°C
최대 세포 밀도 [10 <sup>8</sup> 생존 세포/ml]	3.63	4.45	4.41
50% 생존도까지의 기간 [일]	13	10	12
세포 비생산성 [pg/세포-일]	42.5	46.7	61.4
50% 생존도에서의 수거물에 대한 부피 생산성 [mg/L-일]	98	114	163
50% 생존도에서의 역가 [mg/L]	1322	1178	1979

[0392]

[0393] [표 13]

아달리무마브 유가식 방법을 이용한 예상된 결과의 비교

예상된 결과	대조군 #1 (3000L 방법) 온도 = 37°C ↓ 33°C	대조군 #2 (3000L 방법) 온도 = 35°C	유가식 실험 온도 = 35°C
1년당 수거 [3일 턴어라운드(turnaround) 허용]	22	28	24
산물의 연간 수율 (2600L 수거물 기준) [Kg/년]	75.6	85.7	123.4
연간 수율의 증가 (대조군 = 100%)	100%	114%	163%

[0394]

[0395] **실시예 2.2: ABT-874 유가식 방법**

[0396] 위에서 언급한 아달리무마브의 개선된 유가식 방법의 경우와 관련하여, 회분식으로 ABT-874를 배양한 반응기로부터 매일 수집한 샘플의 분석에서는 아미노산 고갈이 두드러졌다. 다시, 이러한 결핍은 25x PFCHO 용액과 농축 33x 가수분해물 용액을 이용하여 해결했다.

[0397] ABT-874의 회분식 방법은 본래 배지의 가수분해물을 교체하고 새로운 반응기 파라미터를 도입함으로써 D2E7(아달리무마브)에 대해서 개발되었다. 더욱이, D2E7(아달리무마브)의 경우에서와 같이, 기본 배지를 재조제하고, 새로운 가수분해물을 첨가했다. 이 배지 포물레이션은 현재의 D2E7 방법에서 SR-286으로서 사용한다(상기 표 2 참조).

[0398] **실험 계획:**

[0399] 본 실험의 목표는, 앞서 아미노산 고갈이 확인된 시점부터 시작해서, 다음 유가식 조건과 대조군 회분식 방법을 비교하는 것이었다.

[0400] a) 기본 배지 강화 25x PFCHO와 33x 가수분해물 강화 용액을 교대로 공급.

[0401] b) 기본 배지 강화 25x PFCHO와 33x 가수분해물 강화 용액을 함께 매일 공급

[0402] 본 실험의 대조군은 현재의 배지(SR-286)를 이용하여 대조 회분식 방법의 파라미터(SR-286 배지, 온도 변동과 선형 pH 기울기) 하에서 조작되는 동일한 반응기를 포함했다.

[0403] **재료:**

[0404] 작업 용량이 13L인 브라운 ED 반응기

[0405] 작업 세포 बैं크 W990107-J695

[0406] 3XP11Y7P 기본 배지 용액(SR-286-111899-1)

[0407] PFCHO-0-500-HG2Y 성장 배지

[0408] 기본 배지 강화 용액(25x)

[0409] 가수분해물 강화 용액(33x)

- [0410] 0.5N 수산화나트륨 용액
- [0411] 용액 제조:
- [0412] 1. 생산 배지(SR-286 용액 기록 참조).
- [0413] 2. 25x PFCHO 용액(기본 강화 용액: 이전 실시예에 기술됨; 단, 글루코스 분말 대신에 462g의 글루코스 용액이 사용되어, 최종 중량이 2170g임).
- [0414] 주: 상기 용액의 초기 부피의 1% 첨가마다 다음과 같이 증가할 것이다:
- [0415] a) 최초 3x 농도에 비해 PFCHO 농도 0.25x 증가.
- [0416] b) 아스파라긴  $75\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  증가
- [0417] c) 글루코스 농도  $2.1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  증가
- [0418] · pH는 약 0.10 pH 유닛 증가
- [0419] 3. 33x 가수분해물 농도(이전 실시예에 기술된 것 +  $2.40\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  글루코스 첨가)
- [0420] 주: 상기 용액의 초기 부피의 1% 첨가마다 다음과 같이 증가할 것이다:
- [0421] a) 최초 배지 농도에 비해 TC Yesatolate 농도 2.65g/L(0.33x) 증가
- [0422] b) 최초 배지 농도에 비해 피톤 펩톤 농도 1.65g/L(0.33x) 증가
- [0423] 방법:
- [0424] 반응기에 접종하기 위해, 바이알을 해동한 뒤, ABT-874 씨드 트레인 방법 설명에 따라 증량시켰다. 반응기에서 성장시킨 후, 쇼트필 단계를 모의하기 위해 반응기를 최소 4.06L(표 13a에 기술된, 작업 명칭 B9013-ED2 및 B9014-ED3)까지 배수시켰다. 그 다음, 반응기는 일반 생산 배지(SR-286)로 반응기를 13L 수준까지 가득 채웠다.
- [0425] 반응기는 다음과 같은 파라미터 하에 작동시켰다:
- [0426] a) 진탕 70RPM
- [0427] b) 온도 33°C
- [0428] c) pH 6.90
- [0429] d) 용존 산소 40%

[0430] [표 13a]

ABT-874를 위한 공급 일정

	공급량 [g]			
	교번식 공급 일정 작업 명칭 B9013-ED2		매일 공급 일정 작업 명칭 B9014-ED3	
	25x PFCHO	33x 가수분해물	25x PFCHO	33x 가수분해물
0-4				
5	130		65	65
6		130	65	65
7	130		65	65
8		130	65	65
9	130		65	65
10		130	65	65
11	130		65	65
12		130	65	65
13	130		65	65
14-15				

[0431]

[0432] 결과

[0433] 개선된 유가식 방법을 비교한 결과를 이하 표 14와 15에 제시했다.

[0434] [표 14]

유가식 방법의 결과

파라미터	대조군 (1000L 방법) 온도 = 33°C	교번 유가식 실험 온도 = 33°C	매일 유가식 실험 온도 = 33°C
최대 세포 밀도 [10 <sup>6</sup> 세포/ml]	3.79	5.39	4.15
50% 생존도까지의 기간 [일]	14 내지 76%	15	15
세포 비생산성 [pg/세포·일]	71	83	82
50% 생존도에서의 수거물에 대한 부피 생산성 [mg/L·일]	188	281	212
50% 생존도에서의 역가 [mg/L]	2505 (76%에서)	3995	3033

[0435]

[0436] [표 15]

유가식 방법의 결과

예상된 결과	대조군 (1000L 방법) 온도 = 33°C	교번 유가식 실험 온도 = 33°C	매일 유가식 실험 온도 = 33°C
1년당 수거 (3일 턴어라운드 허용)	21	20	20
산물의 연간 수율 (2600L 수거물 기준) [Kg/년]	137	208	158
연간 수율의 증가 (대조군 = 100%)	100%	152%	115%

[0437]

[0438] 실시예 3: 유가식 배양의 부피 생산성을 증가시키기 위한 안정한 배합 공급 용액

[0439] 다음 실시예는 2종의 가수분해물, 글루타민 이외의 하나 이상의 아미노산, 당 및 화학적 제한 배지 기체를 포함하는 안정한 고농도 공급 용액을 조제하는 새로운 시도를 설명한다. 수득되는 공급 용액은 재조합 단백질을 생산하는 포유동물 세포주의 부피 생산을 증가시킬 수 있다. 마지막으로, 글루코스 농도의 피드백 조절을 기반으로 한 유가식 방법 개발의 촉진된 방법을 제안한다.

[0440] 재료 및 방법

[0441] 배합 공급물은 가수분해물 Bacto TC 이스트레이트, (RM-216) (BD Difco 255771) 및 피톤 펩톤, (BD Difco 2922450) + 글루코스, L-아스파라긴 일수화물(Sigma-Aldrich), 감소된 변형 DMEM/F12(NaCl, 인산염, pH 지시약 및 다른 비필수 구성재료가 제거된 것; Invitrogen 12500) 또는 글루타민과 NaHCO가 없는 Ex-Cell PFCHO(A)-S1(변형된 결핍형)(JRH Biosciences 67411-500L35470)을 포함했다.

[0442] 용액을 제조하기 위해, 물은 PMQ004D2 여과 팩을 구비한 밀리포어 Milli-Q PF를 이용하여 여과했다. 재료는 벤치탑 자성 교반기를 이용하여 특정 질량의 물에 용해했다. 각 구성재료를 첨가한 후, 다음 구성재료가 첨가되기 전에 완전히 용해되었는지를 육안으로 확인했다.

[0443] 가능할 때, 혼탁도를 HACH 2100P 휴대용 탁도계(Hach Co., 컬럼비아 러브랜드 소재)를 이용하여 정량분석했다. 탁도를 검출하는 육안 역치는 약 15NTU(Nephelometric Turbidity Unit)이다.

[0444] 생물반응기 실험은 캐스캐이딩 공기 및 산소 흐름을 통한 산소 조절, 진탕, 온도, pH 하에 1.5L의 작업 부피로 3L Applikon 생물반응기에서 수행했다. 세포 계수는 Cedex(Innovatis AG, 독일 비엘레펠트 소재)로 수행했다. 글루코스와 락테이트는 YSI 2700(YSI Inc., 오하이오 옐로우 스프링스 소재)을 이용하여 측정했고, 몇몇 경우에는 Nova Bioprofile 400(Nova Biomedical Corp., 매사추세츠 윌담 소재)을 이용하여 다른 대사산물도 측정했다. 산소, 이산화탄소의 평형 부분압(pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>) 및 pH는 ABL5 혈액 기체 분석기(Blood Gas Analyzer)(Radiometer A/S, 덴마크 브린쇼예 코펜하겐 소재)를 이용하여 확인했다.

[0445] 실시예 3.1. 기본 배지로서 PFCHO를 이용한 안정한 배합 공급물의 제조

[0446] 1회의 고농도 공급물은 세포 배양 유가식 제조를 촉진하는데, 그 이유는 필요한 첨가 횟수와 부피를 감소시키기 때문이다. 하지만, 이것은 PFCHO 분말이 9.00 이상의 pH 값에서 용해되어야 한다는 사실로 인해 복잡하다. 더욱이, 가수분해물은 중성 pH 조건 하에서 용해한다. 따라서, 두 구성재료를 중성 또는 높은 pH 값에서 간단히 혼합하기 위한 시도는 분말 현탁액(용해되지 않음)으로 이어질 것이다. 문헌에 보고된 바와 같이, "완전히 최적화된 공급물은 종종 하나 이상의 첨가 속도와 공급 pH(예: 용해성 이유 때문에)를 지지하는 둘 이상의 분리 용액으로 존재한다"[1].

[0447] 배합 공급물 안정성 실험

[0448] 이하 표에 제시된 바와 같이, 가수분해물의 첨가는 PFCHO 농도를 더 장기간 동안 안정하게 유지되도록 하는 것으로 측정되었다. 구성재료 PFCHO 20g Kg<sup>-1</sup>, 아스파라긴 7.5g Kg<sup>-1</sup>, 글루코스 21g Kg<sup>-1</sup>, 효모추출물 22g Kg<sup>-1</sup> 및 피톤 14g Kg<sup>-1</sup>의 양을 약 700g의 물에 차례대로 첨가하고, 마지막에 물을 첨가하여 최종 중량을 1Kg으로 만들었다. 용액을 혼합한 뒤, HCl 2.0N로 목표 pH까지 낮추었다. 다음 표에서, 혼탁도는 육안으로 관찰하여 측정했다.

[0449] [표 16]

상이한 배합 공급 포물레이션에 미치는 최종 pH의 효과

	포물레이션	최종 용액 pH				
		6.75	7.00	7.25	7.50	7.75
1	PFCHO, 아스파라긴 및 글루코스 (pH 10.0에서 용해됨)	N/A	N/A	N/A	4시간 이전에 완전히 침전됨	
2	PH 7.75까지 상기 (1)과 동일, 이후 피톤 및 Yeastolate를 첨가	N/A	N/A	최종 pH 7.3	N/A	N/A
3	상기 (2)와 동일, 이후 pH를 6.75, 7.00, 7.25, 7.50, 7.75로 조정	30 내지 60분 이내에 약간의 혼탁도를 보이지만; 수득된 용액은 안정성을 유지한다				

[0450]

[0451] 표 16에서 확인되었듯이, 2)와 3) pH 6.75와 7.25에서 가장 혼탁도가 낮았다. 특히, 2)와 3)은 거의 24시간 후에도 혼탁해지지 않았다. 이러한 결과를 기초로 할 때, 최종 혼탁도가 낮았는 바, 가수분해물은 용액에서 PFCHO를 안정시키는 것이 분명했다.

[0452] 가수분해물이 최종 혼합물을 안정시킨다면, 피톤과 효모추출물은 pH10.0에서 PFCHO 용액에 첨가될 수 있고; 그 다음 전체 혼합물은 목표 pH로 낮출 수 있다. 이러한 첨가 순서는 PFCHO 용액을 pH 8.0 이하로 유지하기 위한 불안정한 단계, 특히 더 많은 용량을 혼합할 때 불안정한 단계를 제거할 수 있다.

[0453] 이러한 가설을 검사하기 위해, 본 발명자들은 PFCHO 20g · Kg<sup>-1</sup>, 아스파라긴 7.5g · Kg<sup>-1</sup>을 각각 함유하는 포물레이션을 이용한 당해의 새로운 첨가 순서를 검사했다. 최종 용액 X-1을 분할하여, pH를 7.0, 6.75, 6.5 및 6.25로 낮추었다. 이러한 용액은 다음 그래프에서 관찰할 수 있듯이 안정한 것으로 입증되었다.

[0454] [표 17]

상이한 pH 값에서의 포물레이션 X-1의 혼탁도 프로파일(NTU)

시간 [h]	pH			
	6.25	6.50	6.75	7.00
2.25	n/a	8.44	9.86	11.32
4.00	8.77	7.8	9.25	10.70
6.00	7.02	5.71	6.28	4.25

[0455]

[0456] 3시간 후, 가장 혼탁도가 낮은 용액은 pH 6.50인 용액이었다. 특히 pH 7.0에서, 혼탁도의 분명한 감소는 약간의 미세한 입자의 침강때문이었다.

[0457] 안정제로서의 글루코스

[0458] 안정제로서 200gKg<sup>-1</sup> 글루코스를 첨가한 포물레이션(표 18 참조)을 검사했다.

[0459] [표 18]

희석된 D2E7 공급 용액

	MilliQ H <sub>2</sub> O	750.0	g·Kg <sup>-1</sup>	- 물은 과량이었다 - 강력한 안정화제로서
	글루코스	200.0		
	PFCHO	20.0		
+	NaOH 10N			→ pH 10.00
	아스파라긴	2.29		
	Yeastolate	15.7		
	피톤	10.0		
+	HCl 5 N			→ pH 6.75-7.50

구성재료는 칭량해서 순서대로 첨가했다. 물의 초기 질량은 최종 질량을 1Kg으로 하기 위해 감소되어야 한다.

[0460]

[0461] 이 용액은 다음 표에서 관찰할 수 있듯이, 다양한 pH 값에서 수 시간 동안 안정한 것으로 입증되었다:

[0462] [표 19]

시간과 pH의 함수로서의 배합 공급물의 혼탁도 판독값(NTU)

시간 [h]	pH			
	6.72	7.00	7.22	7.50
0.25	3.48	3.75	3.95	5.83
2.50	3.07	3.13	3.42	3.74
8.50	2.98	2.95	2.99	3.15

[0463]

[0464] 글루코스를 함유하는 변형된 배합 공급 용액을 2종의 다른 항체, 즉 아달리무마브(D2E7) 및 항-IL-18 항체 ABT-325를 발현시키는데 사용했다.

[0465] 안정한 D2E7 생산을 위한 배합 공급 용액

[0466] 생물반응기에 첨가된 포물레이션의 부피가 최저 농축 구성재료(즉, PFCHO)를 기초로 한다면, 개별적으로 평가되어야 하는 양에 맞추기 위해서는 매우 많은 양의 공급물이 첨가되어야 할 필요가 있다. 따라서, 효과적인 공급 포물레이션의 개발에 있어서 다음 단계는 더욱 높은 농도이다. 이 용액은 D2E7 배합 공급 용액이라 하며, 다음 표에 제시했다.

[0467] [표 20]

D2E7 배합 공급 용액

	MilliQ H <sub>2</sub> O	750.0	g·Kg <sup>-1</sup>
	글루코스	150.0	
	PFCHO	27.0	
+	NaOH 10N		→ pH 10.00
	아스파라긴	3.1	
	Yeastolate	21.2	
	피톤	13.5	
+	HCl 5 N		→ pH 6.75

구성재료는 칭량해서 순서대로 첨가했다. 물의 초기 질량은 최종 질량을 1Kg으로 하기 위해 감소되어야 한다.

[0468]

[0469] 200, 150 및 100gKg<sup>-1</sup> 글루코스를 함유한 포물레이션을 검사했다. 다음 표에서 확인할 수 있듯이, 이 용액들은 수 시간 동안 안정한 혼탁도를 나타냈다. 표 21은 글루코스의 첨가가 용액의 혼탁도를 감소시킨다는 것을 보여 준다.

[0470] [표 21]

글루코스 농도의 함수로서의 D2E7 배합 공급 용액의 혼탁도 시간 프로파일

시간 [h]	글루코스 [g/Kg 배합 공급물]		
	100	150	200
0	n/a	9.23	7.31
1	13.80	8.77	n/a
2	13.20	9.33	n/a
3	12.80	10.30	n/a
4	12.80	10.70	5.98
7	n/a	n/a	6.80

[0471]

[0472] 표 21에서 확인되듯이, 글루코스 수준의 증가는 용액의 혼탁도를 감소시켰다. 이러한 여러 포물레이션들은 혼탁도 수준을 기준으로 할 때 여과 실험에 허용될 수 있는 것으로 간주되었다.

[0473] 안정한 ABT-325 생산을 위한 배합 공급 용액

[0474] 안정한 ABT-325 배합 공급물을 수득하기 위해, 현재의 포물레이션 50L를 D2E7 배합 공급물에 사용된 방법에 따라 표 22에 제시된 바와 같이 제조했다.

[0475] [표 22]

ABT-325 배합 공급 용액

	Millicg H <sub>2</sub> O	750.0	g·Kg <sup>-1</sup>
	글루코스	150.0	
	PFCHO	21.0	→ pH 10.00
+	NaOH 10N		
	아스파라긴	5.0	
	Yeastolate	65.0	
	피톤	40.0	→ pH 6.75
+	HCl 5 N		

구성재료는 칭량해서 순서대로 첨가했다. 물의 초기 질량은 최종 질량을 1Kg으로 하기 위해 감소되어야 한다.

[0476]

[0477] 제조시, 이 용액의 혼탁도 수준은 다음 표에서 관찰할 수 있는 바와 같이 약 20 내지 30 NTU 수준을 유지했다.

[0478] [표 23]

ABT-325 배합 공급물의 혼탁도

시간 [h]	혼탁도 [NTU]
0.00	41.8
1.00	28.7
1.50	19.8
2.00	20.0
3.50	14.5

[0479]

[0480] ABT-325 포물레이션 배합 공급 용액 50L를 D2E7 방법에 따라 제조하여, 제조 방법의 확장성과 이용성을 검사했다. 위에 제시된 바와 같이, 용액은 4시간 동안 안정성을 유지했다.

[0481] 상기 실시예에서 언급된 PF CHO 배지는 실시예 1의 세포 배양 배지에서 언급한 변형된 PF CHO(변형된 파트 A)에 해당한다는 것을 유의해야 한다.

[0482] 실시예 3.2: 기본 배지로서 DMEM-F12를 이용한 안정한 배합 공급물의 제조

[0483] 앞의 실시예에서 기술한 바와 같이, 글루코스뿐만 아니라 PFCHO와 2종의 가수분해물로 안정한 배합 공급 용액을 제조하는 것이 가능했다. 다음 실시예는 이 방법론을 임의의 기본 공급 포물레이션에 적용할 수 있고 안정한 배합 공급 용액이 생성된다는 것을 증명한다.

[0484] 공개적으로 입수할 수 있는 배지 포물레이션인 DMEM-F12를, 본원에서 DMEM-F12m으로 지칭된 배합 공급물 제조에 적합하도록 변형시켰다. 다음과 같은 구성재료를 제거했다: NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, D-글루코스, HEPES, Na · 하이포잔틴, 페놀 레드, L-글루타민 및 티미딘. D2E7 및 ABT-325 공급 포물레이션에 부합하는 배합 공급물은 실시예 3.0 및 3.1에 기술된 방법에 따라 제조했다. 최종 구성재료와 포물레이션 순서는 다음 표에 제시한다:

[0485] [표 24]

DMEM-F12 배합 공급물

	공급물 I	공급물 II	
MiliQ H <sub>2</sub> O	600.0	600.0	g·Kg <sup>-1</sup>
글루코스	150.0	150.0	
DMEM-F12m	27.0	21.0	
+ NaOH 10N			→ pH 10.00
아스파라긴	3.1	5.0	
Yeastolate	21.2	65.0	
+ 피톤	13.5	40.0	→ pH 6.75
+ HCl 5 N			
MiliQ H <sub>2</sub> O	1000 g이 되도록		

구성재료는 최종 질량을 1Kg으로 하기 위해 칭량해서 순서대로 첨가했다.

[0486]

[0487] 일단 제조되면, 공급물 I과 II는 모두 4시간 이상 동안 12NTU 이하의 혼탁도를 유지했다.

[0488] 실시예 3.3: 배합 공급물 첨가로 인한 세포 성장 및 생산성 향상

[0489] 상기 배합 공급물의 성장 및 역가 촉진 특성을 평가하기 위해, ABT-874 세포(항 IL-12 완전한 사람 IgG1 항체를 발현함)를 사용했다. 이 CHO 세포주는 일반적으로 세포 배양 배지 SR-383(2X + 500nM mtx)에서 배양된다.

[0490] 당해 실험을 위해, 세포를 일정한 성장 속도에 의해 적응이 관찰될 때까지 적어도 5 세대 동안 DMEM/F12를 통해 계대배양했다. 스피너 배양물은 35°C, 5% CO<sub>2</sub> 하의 항온배양기 내의 Thermolyne 교반 플레이트에서 70rpm으로 교반했다. 접종 직전에 세포 현탁액의 필요한 양을 보존 배양물로부터 취했다. 세포를 원심분리하여 상청액은 버리고 펠릿을 새로운 예온된 배지에 4x10<sup>5</sup>/mL의 씨드 밀도로 재현탁시켰다.

[0491] 세포 배양물은 1.5L Applikon 생물반응기에서 1:5의 분할비를 달성하기에 충분한 부피가 생물반응기 접종에서 수득될 때까지 스피너에서 증량시켰다. 반응기 작동 조건은 pH 6.9, 35°C, 150rpm 및 포화의 40%인 용존 산소 수준이었다. 모든 생물반응기 실험은 이반복으로 수행했다. 세포는 작업 과정 동안 격일로 배합 공급물의 초기 반응기 부피의 1%를 일시 첨가로 3회 제공했다.

[0492] 두 배합 공급물의 사용은 세포 배양 성장을 크게 증강시킨다. CF I의 경우에, 최고 세포 밀도의 2배가 달성되었지만, 이 배양물의 지속 시간은 대조군의 13일에 비해 10일에 불과했다. CF II의 경우에는 최고 세포 밀도가 대조군에 비해 거의 3배였고, 배양 지속 시간도 유사했다. 최종 역가 측면에서 더욱 극적인 효과가 관찰되었다. DMEM/F12 배지에서의 역가는 약 41mg/L인데 반해, CFI에서는 188이고 CFII에서는 434mg/L였다. 다른 공급 용액이 최대 세포 밀도, 배양 시간, 역가 및 비생산성에 미치는 효과는 다음 표에 정리했다:

[0493] [표 25]

DMEM-F12m 배합 공급물의 성능

설명	파라미터				
	최고 세포 밀도 [ 10 <sup>6</sup> 생존 세포 /mL ]	최종 IVC [x10 <sup>6</sup> 세포·일/mL]	배양 시간 [일]	최종 역가 [mg/L]	qp [pg/세포-일]
대조군 (n=2)	1.07 +/- 0.018	9.53 +/- 0.005	13	41 +/- 1.9	4.7 +/- 0.29
CFI (n=2)	1.92 +/- 0.031	11.27 +/- 0.004	10	188 +/- 0.1	16.4 +/- 12.03
CFII (n=2)	2.72 +/- 0.009	20.74 +/- 0.177	13	434 +/- 16.5	25.1 +/- 1.17

[0494]

[0495] 실시예 3.4: 배합 공급물의 첨가를 통한 고역가 세포 배양 방법

[0496] 고역가는 소정의 총 수율을 충족시키기 위해 필요한 제조 작업의 횟수를 줄여준다. 다음 실시예는 유가식 방법 동안 평균 약 4g/L의 역가를 산출한 ABT-874용 유가식 대규모 방법을 설명한 것이다. 또한, 배지와 배합 공급물의 추가 개선은 6g/L가 넘는 역가 수준이 달성될 수 있도록 했다.

[0497] 재료 및 방법:

[0498] 모델 시스템으로서, ABT-874 항체 생산주를 사용했다.

[0499] 공급 용액 제조

[0500] 공급 용액은 앞에서 설명한 절차에 따라 제조했다. 2가지 아스파라긴 농도, 즉 5.0 또는 7.5g · Kg<sup>-1</sup>을 사용했다. 제조 방법은 다음 표에 제시한 바와 같다:

[0501] [표 26]

ABT-874 배합 공급물 제조

1	MiliQ H <sub>2</sub> O	600.0	g·Kg <sup>-1</sup>	
2	글루코스	150.0		
3	PFCHO	21.0		
+ 4	NaOH 10N			→ pH 10.00
5	아스파라긴	5.0 or 7.5		
6	Yeastolate	65.0		
7	피톤	40.0		
+ 8	HCl 5 N			→ PH 6.75

구성재료는 최종 질량을 1Kg으로 하기 위해 칭량해서  
순서대로 첨가했다.

[0502]

[0503] 재료는 격렬한 볼텍싱 하에서 벤치탑 자성 교반기를 이용하여 특정 질량의 물에 용해했다. 단계 5까지는 각 구성재료를 첨가한 후 다음 구성재료를 첨가하기에 앞서 완전한 용해를 육안으로 확인했다. 하지만, 이것은 단계 6과 7에서는 불가능했다. 이 두 단계에서는 용액에 분말을 첨가하여도 최종 HCl 첨가를 진행하기에 충분한 것으로 생각되었다.

[0504] 방법 배지 선별

[0505] 기본 성능 데이터를 얻기 위해, 대조군으로서 3X 유가식(FB) 3000L, 원형 4X FB 방법 및 비유가식(연장 회분식: EB) 3X 및 4X 조건을 특징으로 하는 실험을 수행했다. 특히, 고농도 배지는 배양 성장 프로파일에서 초기 지연을 나타냈지만, 연장 회분식(EB) 3X 또는 4X 방법에서는 어떠한 유의적인 지연도 관찰되지 않았다.

- [0506] 예상한 바와 같이, 공급물 보충은 3X 및 4X 방법에서 모두 높은 역가를 유도했다. 그럼에도 불구하고, 4X 방법에서는 공급되면(즉, 유가식) 유의적인 성장 억제가 관찰되었다. 소량 실험에서의 아미노산 분석은 공급된 후에도 아미노산 아스파라긴과 글루타민의 완전 고갈이 존재한다는 것을 보여주었다. 이러한 이유로 인해, 총 공급 시간과 배합 공급물 중의 아스파라긴 양을 모두 증가시켰다. 결론적으로, 4X FB 방법은 EB 방법 또는 3X FB 대조군보다 더욱 높은 최종 역가에 도달할 가능성이 있는 것으로 판단되었다. 따라서, 추가 개발의 출발점으로 선택했다.
- [0507] 3X 유가식 방법(대조군) 및 4X 유가식 방법 사이의 차이는 표 27에 제시했고, 이하에 더욱 상세하게 설명될 것이다.
- [0508] *공급 출발점에서의 생존 세포 밀도*
- [0509] 매우 낮은 세포 밀도에서 공급을 개시하면 세포 성장 및 결과적으로 최종 역가를 억제하는 경향이 있는 것으로 관찰되었다. 따라서, 지나치게 지연된 공급은 세포 기아로 인해 부피 생산성의 손실을 유발할 수 있는 것으로 예상되었다.
- [0510] 상기 가설을 조사하기 위해, 여러 생존 세포 밀도에서 공급의 유의성을 측정하기 위해 여러 실험을 수행했다. 이 실험들의 조합된 결과는 도 1에 도시된 그래프에 플롯팅했다. 도 1에서 관찰할 수 있듯이, 15일째의 역가는 공급 개시일의 생존 세포 밀도와 강한 의존성이 있음을 보여준다. 데이터 포인트에 적합된 3차 다항식은 15일째 최대 역가가  $3.5 \times 10^6$  세포  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>의 공급 밀도에서 예상될 수 있음을 보여준다.
- [0511] *재현성*
- [0512] 6g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 방법의 방법 조건은 이하 표 27에 설명하였고, 세포 밀도  $5.0 \times 10^6$  개의 생존 세포/ml까지 SR-383, pH 7.0, DO=30%, 37°C에서의 쇼트필 작업으로부터 1:4 분할비로의 접종물로서 특정했다. 반응기 작업 조건은 pH 6.9, T=35°C, DO=40%였다. 공급은 생존 세포 밀도가  $3.5 \times 10^6$  개의 세포/ml에 이르렀을 때 개시했고, 매일 초기 반응기 중량의 1%로 이루어진 배합 공급물의 일시 첨가를 통해 10일 동안 지속했다.
- [0513] 4g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 방법의 방법 조건은 이하 표 27에 제시했다.

[0514] [표 27]

4 및 6 g·L<sup>-1</sup> ABT-874 세포 배양 방법의 특징

파라미터	방법	
	3X FB	4X FB
배지	SR-286 (3XPFCHO)	SR-382 (4XPFCHO)
분할비	1:5	1:4
씨드 밀도 [10 <sup>6</sup> 생존 세포·ml <sup>-1</sup> ]	0.5-1.0	1.0-1.25
공급 개시 기준	3일차	3.5·10 <sup>6</sup> 세포·ml <sup>-1</sup>
공급량 [%]	1	1
공급 기간 [일]	7	10
공급물 중의 아스파라긴 [g·l <sup>-1</sup> ]	5.0	7.5
온도 변동	33°C  (3.5·10 <sup>6</sup> 세포·ml <sup>-1</sup> 에서)	없음
최종 역가	4 g·L <sup>-1</sup>	6 g·L <sup>-1</sup> ±0.24 (n=9)

[0515]

[0516] **실시예 3.5: 글루코스 피드백 조절을 통한 배합 공급을 이용한 유가식 방법**

[0517] 피드백 조절은 시스템의 고유 작용의 이해가 매우 제한되어 있어도 소정의 파라미터에 대한 설정치를 목표로 삼을 수 있게 한다. 이러한 방식에서, 표적이 된 설정치는 시스템이 겪을 수 있는 어떠한 장애 또는 변경에 관계없이 유지될 수 있다. 포유동물 세포 배양 대사의 복잡성으로 인해, 배양 궤도의 예측을 허용할 수 있는 포괄적인 모델을 유도하는 것은 많은 노동을 요한다. 그럼에도 불구하고, 목표 글루코스 수준을 유지하기 위해 글루코스를 공급할 수 있기 위해 자동 샘플링의 사용 등과 같은 샘플링 방법을 개발하는 것이 바람직하다. 이것은 주어진 글루코스(또는 다른 대사산물)의 효과를 분리시켜, 배합 공급물 내의 여러 글루코스 비가 다른 배양물에 미치는 효과를 연구하는 수단을 제공하기도 한다. 효과의 분리란, 배합 공급물에 존재하는 여러 글루코스 양을 이용한 효과에 대해, 주어진 글루코스 수준을 유지하는 효과를 의미한다.

[0518] **재료 및 방법**

[0519] 모델 시스템으로서, 2가지 다른 항-IL-12 항체, ABT-874와 1D4.7의 생산주를 사용했다.

[0520] 세포 배양 배지의 글루코스 수준을 모니터링하는 수단으로서 자동 샘플링, 즉 YSI 2700 Bioprocess Analyzer를 선택했다. 온라인 자동 샘플링 장치는 YSI 2730 모니터와 조절 부속품을 YSI 2700 Bioprocess Analyzer(YSI Life Sciences 참조; 오하이오 옐로우 스프링스 소재)에 부착시켜 구축했다. 이 샘플링 장치는 2개의 튜브를 보유한 펌프로 구성되어 있다. 첫번째 튜브는 생물반응기에서 샘플을 수집하는 첫번째 가지와 멸균성을 유지하기 위해 무균 상태로 펌핑되는 두번째 가지인 2개의 가지를 보유한다. 샘플이 채취되는 즉시, 외부 챔버로 펌핑되고, 이로부터 시퍼(sipper)는 실제 분석할 샘플을 취했다. 두번째 튜브는 펌프를 통해 폐용기에 배출물을 수집하는데 사용되었다. 온라인 샘플링 부속품의 여러 파라미터, 예컨대 샘플링 간격 및 TPU(Time per Unit Error, 설정치로부터 측정된 오프셋(offset)에 따라 공급 펌프가 작업한 시간에 해당함)가 조절되었다.

[0521] 펌프는 15핀 커넥터를 이용하여 YSI에 연결시켰다. YSI의 글루코스 프로브(백색-7, 흑색-11)에 해당하는 상기 핀은 펌프의 TTL 온/오프 핀(8)에 연결시켰고, YSI의 그라운드 핀 중 하나(1-5)를 펌프의 15핀 커넥터의 새시에 연결시켰다. 연결은 YSI 셋업 메뉴에서 펌프의 전원을 켜다 꺼서 검사했다. 사용된 펌프 배관은 Masterflex

CFLEX082 였다.

[0522] [표 28]

피드백 초기 실험 셋업

세포	ABT-874
배지	3XPFCCHO (SR-286)
글루코스 공급	400 g/L
YSI TPU	16
시험한 반응기 용적	1.5 L
YSI 퍼징 시간	60 초
펌프 속도	50 (1/2, 약 16RPM)
YSI 샘플링 간격	4시간/2시간 (아래에서 설명)
YSI 출력 신호	X2 (YSI1-A25)
방부제	0.1N NaOH

[0523]

[0524] YSI1-A25 반응기는 4.9g/L의 글루코스로 조절했다. 4.9g/L의 글루코스 조절은 대략 2일째부터 시작해서 4시간의 샘플링 간격을 사용하여 8일까지 실시했다. 8일에는 샘플링 간격을 2시간으로 줄이고, YSI 자동 장치의 설정치를 재설정하여 PID 메모리를 삭제했다. 설정치로부터 오버슈트(overshoot)로 인한 변동은 8일 이후에 크게 감소했다. 따라서, 이러한 조건에서 2시간의 샘플링 간격이 최적인 것이 증명되었다. 2일부터 8일까지의 평균 오버슈트는 0.43g/L였고, 평균 언더슈트(undershoot)는 0.31g/L였으며, 설정치로부터 변동 오차는 약 8%였다. 한편, 8일부터 13일까지의 평균 오버슈트는 0.08g/L였고, 평균 언더슈트는 0.09g/L였으며, 변동 오차는 약 2%였다.

[0525] 배합 공급물을 이용한 글루코스 농도의 조절

[0526] 생물반응기에서 배양물에 배합 공급 용액을 공급하는 일정은 실험적 접근법을 통해 특정했다. 실행가능한 유기식 일정이 발견될 때까지 여러 공급 시간처럼 여러 공급량을 검사했다. 이상적으로는, 배합 공급물의 공급 일정은 주어진 배양물의 특정 조건을 충족해야 한다.

[0527] 상기 고려할 사항을 감안해서, 세포 배양 요구에 기초한 배합 공급물은 영양소 필요 조건의 지표인자로서 글루코스 등을 사용하여 제공하는 것이 유리하다. 이러한 방식에서, 피드백 조절 시스템은 1) 글루코스 농도가 다양한 여러 공급물을 검사하고, 2) 생성된 공급 프로파일을 사용하여 대규모 배양물에 수동으로 공급하기 위해 사용할 수 있다.

[0528] 다음 표는 1D4.7 mAb를 생산하는 세포주를 이용한 2가지 다른 반응기 작업 모드를 정리한 것이다. 참조 실험(표 29에서 기준선으로 언급한 것)은 1.5L Applikon 반응기에서 pH 6.9, T=35°C, DO=40% 하에 작업한 SR-372 배지 중의 연장된 회분식 방법의 통상적인 역가 성능을 예시한 것이다. YSI 실험은 동일한 조건 하에 100, 150 또는 200g · L<sup>-1</sup>의 글루코스를 함유하는 배합 공급물을 공급하는 피드백 조절을 추가하여 작업했다.

[0529] [표 29]

배합 공급물을 이용한 피드백 조절의 성능

실험	최종 역가 [mg/L]
기준선 (n=2)	1312+/-33
YSI 100 (n=1)	1974
YSI 150 (n=2)	2044+/- 164
YSI 200 (n=2)	1837+/- 163

[0530]

[0531] 표 29로부터 관찰할 수 있듯이, 다양한 배합 공급물을 이용한 피드백 시스템은 항체의 최종 역가를 크게 향상시

켰다.

[0532] 앞의 실험에서와 같은 실험으로부터의 공급 프로파일은 매일 공급한 배합 공급물의 양을 칭량해서 얻었다. 전형적인 공급 프로파일은 다음 표에 제시했다:

[0533] [표 30]

피드백 조절을 통해 생성된 전형적인 공급 프로파일 (1D4.7 항체의 프로파일)

일	공급 [%]
1	0.00
2	0.00
3	0.00
4	0.00
5	1.12
6	1.56
7	1.79
8	1.23
9	0.89
10	0.75
11	0.46
12	0.32

[0534]

[0535] 상기 일정은 피드백 조절 시스템 없이도 반응기에 수작업으로 공급하는데 사용될 수도 있다. 이러한 방식으로 공급 일정은 규모가 확대될 수 있다.

[0536] **결과 정리**

[0537] 가수분해물의 혼합물과 화학적 제한 기본 배지를 이용한 유가식 방법은 포유동물 세포 배양에서 분비된 mAb의 최종 역가를 증가시키는 것으로 밝혀졌다.

[0538] 더욱이, 다음과 같은 안정한 배합 공급물을 생성할 수 있는 방법이 입증되었다:

[0539] [표 31]

안정한 배합 공급물

	X-1	D2E7 희석액	D2E7	ABT-325, ABT-874	공급물 I	공급물 II	
글루코스	21	200	100, 150, 250	150	150	150	g·Kg <sup>-1</sup>
PFCHO (p), DMEM- F12m (d), + NaOH 10N	20 (p)	20 (p)	27 (p)	21 (d)	27 (d)	21 (d)	→ pH 10.00
아스파라긴	7.5	2.29	3.1	5, 7.5	3.1	5	
Yeastolate	22	15.7	21.2	65.0	21.2	65.0	
피톤 + HCl 5 N	14	10.0	13.5	40.0	13.5	40.0	→ pH 6.75
MiliqH <sub>2</sub> O	1000 g이 되도록						

[0540]

[0541] 표 31에 기술된 배합 공급물은 MiliqH<sub>2</sub>O(최고 750g)로 시작해서 제조했다. 앞에서 제시한 바와 같이, 성분들을 물에 첨가하여 최종 중량(배합 공급물의 총 중량)을 1000g으로 만들었다. 또한, 배합 공급 용액은 세포 배양 수명, 최고 생존 세포 밀도 및 비생산성을 증가시키는 것으로 확인되었다. 분비된 모노클로날 항체를 6g·L<sup>-1</sup> 이하의 역가 수준까지 이르게 할 수 있는 배합 공급물을 이용한 세포 배양 유가식 방법이 입증되었다. 상기 배합 공

급물은 또한 세포 배양물의 세포 밀도를 증가시키는 것으로 확인되었다.

[0542] 마지막으로, 피드백 조절 시스템과 여러 배합 공급물을 이용하는 방법도 역가 수준을 증가시킬 수 있는 것으로 확인되었다. 이러한 시도는 공급 일정을 빠르게 얻어 세포 배양 방법 개발의 속도를 증가시키는데 사용될 수 있다.

[0543] **참고문헌**

[0544] 1. Whitford, W.G., Fed-Batch Mammalian Cell Culture in Bioproduction. BioProcess International, 2006. 30-40.

[0545] 2. YSI Incorporated. (1998) YSI 2700 Select Biochemistry Analyzer User's Manual.

[0546] 3. YSI Incorporated. (1998) YSI 2730 Monitor and Control Accessory User's Manual.

[0547] 4. Watson Marlow Pumps. 101F, 101U User's Manual.

[0548] **실시예 4: 항 IL-18을 생산하는 CHO 세포주의 생산성을 증가시키는 부티르산나트륨 및 N-아세틸시스테인의 적용**

[0549] 본 발명은 항체, 예컨대 항 IL-18 생산 CHO 세포주의 생산성을 증가시키는 새로운 시도를 포함한다. 보다 구체적으로, 다음 실시예는 세포 배양 배지에 화학물질의 첨가를 통한 최종 항체, 예컨대 항 IL-18의 역가 증가에 관한 것이다. 세포 생존도와 항체 역가의 개선에 대해서는 예시적 항체, 즉 IL-18 항체를 이용하여 이하에 설명한다.

[0550] *세포주 및 배양 배지*

[0551] 다음 실시예에 사용된 항 IL-18 항체는 IL-18에 대한 완전한 사람 IgG1 항체(Ab)이다. 항 IL-18을 발현하는 CHO 세포주는 앞에서 실시예의 1의 표 4에 기술된 성장 배지, SR-371에서 배양했다. 이 세포주의 생산 배지는 실시예 1에서 전술한 바와 같은 SR-372(스피너 플라스크 배양용) 및 SR-382(생물반응기 배양용)였다.

[0552] *스피너 플라스크에서 수행된 실험의 배양 조건*

[0553] 모든 스피너 플라스크 실험은 이반복으로 수행했다. 스피너 배양물은 35°C, 5% CO<sub>2</sub> 하의 항온배양기 내의 Thermolyne 교반 플레이트에서 80rpm으로 교반했다. 접종 직전에 세포 현탁액의 필요한 양을 보존 배양물로부터 취했다. 세포를 원심분리하여 상청액은 버리고 펠릿을 새로운 예운된 배양 배지에 4x10<sup>5</sup>/mL의 씨드 밀도로 재현탁시켰다.

[0554] **실시예 4.1: 성장 배지에서 배양된 항 IL-18 생산 CHO 세포주의 성장 및 생산성에 미치는 부티르산나트륨의 효과**

[0555] 부티르산나트륨의 농도 범위를 측정하기 위해, 1차 실험은 다양한 농도의 부티르산나트륨을 함유하는 SR-371에서 수행했다. 이 실험은 작업 부피가 70mL인 100mL 스피너 플라스크에서 수행했다. 부티르산나트륨은 10ml MilliQ 물에 1.101 g의 부티르산나트륨을 용해한 뒤, 0.2µm 필터를 통해 여과 살균하여 제조한 1M 스톡 용액으로 첨가했다. 이 용액을 -20°C에서 보관했다.

[0556] 부티르산나트륨은 0mM, 0.125mM, 0.5mM 및 1mM의 농도로 배양 시작일(0일)에 첨가했다. 세포 밀도와 생존도는 당해 실시예와 이하 모든 실시예에서 자동 세포 계수기(Cedex, Innovatis, 독일)를 이용하여 측정했다. 표 32는 배양 시간에 따른 생존 세포 밀도를 나타내고, 표 33은 배양 시간에 따른 생존도를 나타낸 것이다. 실험은 12일 동안 수행했다.

[0557] [표 32]

배양 시간에 따른 생존 세포 밀도

생존 세포 밀도 [ $10^5$ /ml]								
일	플라스크 1: 0mM 부티레이트	플라스크 2: 0mM 부티레이트	플라스크 3: 0.125mM 부티레이트	플라스크 4: 0.125mM 부티레이트	플라스크 5: 0.5mM 부티레이트	플라스크 6: 0.5mM 부티레이트	플라스크 7: 1mM 부티레이트	플라스크 8: 1mM 부티레이트
0	3.2	3.85	4.46	3.01	3.66	3.98	3.83	4.07
3	36.38	33.18	27.12	29.96	16.97	11.71	7.68	5.74
5	84.48	70.37	62.56	66.1	21.79	9.77	3.25	2.35
7	65.98	64.19	59.15	68.65	17.72	5.41	1.04	0.7
10	7.83	11.17	8.63	11.85	4.53	9.63	0.8	0.61
12	1.36	2.28	3.68	3.81	2.08	1.89	0.22	0.41

[0558]

[0559] [표 33]

배양 시간에 따른 생존도

생존도 [%]								
일	플라스크 1: 0mM 부티레이트	플라스크 2: 0mM 부티레이트	플라스크 3: 0.125mM 부티레이트	플라스크 4: 0.125mM 부티레이트	플라스크 5: 0.5mM 부티레이트	플라스크 6: 0.5mM 부티레이트	플라스크 7: 1mM 부티레이트	플라스크 8: 1mM 부티레이트
0	98.5	97.5	98.9	100	97.4	98.2	98.8	98.8
3	98.3	98.1	97.3	97.9	95.4	92.2	88.3	73.8
5	96.7	96.7	96	96.7	88.8	72.9	54	40.1
7	73.4	75.5	78.1	83.3	69	43.1	24.2	16.4
10	7.9	13.1	13.1	14.3	21	25.9	11.3	14.5
12	1.4	2.8	5.9	4.9	7.6	14.9	3.2	8.9

[0560]

[0561] 이러한 결과로부터 부티르산나트륨이 세포 성장과 생존도에 영향을 미친다는 것을 분명하게 알 수 있다. 0.125mM의 부티레이트 농도에서는 세포 성장과 생존도에 미치는 효과가 분명하지 않았지만, 0.5mM 부티레이트에서는 세포 성장에 분명한 영향을 미쳐, 최대 세포 밀도가 더 낮았다. 0.5mM 부티르산나트륨은 배양 5일 후 생존도에 영향을 미쳤다. 부티르산나트륨은 1mM 농도에서 세포 성장을 완전히 억제했고, 생존도는 0일부터 연속해서 감소시켰다.

[0562] 표 34는 배양 시간에 따른 항 IL-18 역가를 나타낸다. 본 실시예와 이하 모든 실시예에서 항 IL-18의 농도는 Poros A HPLC 분석으로 측정했다.

[0563] [표 34]

배양 시간에 따른 항 IL-18 역가

역가 [mg/L]								
일	플라스크 1: 0mM 부티레이트	플라스크 2: 0mM 부티레이트	플라스크 3: 0.125mM 부티레이트	플라스크 4: 0.125mM 부티레이트	플라스크 5: 0.5mM 부티레이트	플라스크 6: 0.5mM 부티레이트	플라스크 7: 1mM 부티레이트	플라스크 8: 1mM 부티레이트
0	5.4	2.4	1.8	1.6	1.3	1.3	1.1	1.3
3	68.9	58.1	67.7	65.7	52.1	41.9	36.3	26.2
5	173.2	150.4	169.4	174.3	132.6	84.2	68.6	46.4
7	235.5	211.9	253.6	278.5	217.7	110.7	85	60.9
10	265.5	241.8	304.3	365.9	278.2	163.3	91.8	70.3
12	269.7	244.4	318.7	385.8	282.7	175.9	94	75.4

[0564]

[0565] 0.125mM 부티레이트를 함유한 배양물의 평균 최종 역가는 352mg/L였고, 미처리된 대조군의 평균 최종 역가는 257mg/L였다. 이 농도의 부티레이트 처리는 최종 역가를 40% 증가시켰다.

[0566] 실시예 4.2: SR-372에서 배양된 항 IL-18 생산 CHO 세포주의 성장 및 생산성에 미치는 부티르산나트륨의 효과

[0567] SR-371에서 SR-372로의 배양물 분할의 임의의 가능한 효과를 배제하기 위해서 항 IL-18 발현 CHO 세포주를 SR-372에서 성장하도록 적응시켰다. SR-372에서 성장하도록 적응된 세포를 이용한 모든 실험은 180ml의 작업 부피를 보유한 250ml 스피너 플라스크에서 수행했다. 이 배양물을 전술한 "스피너 플라스크에서 수행된 실험의 배양 조건"이라는 표제 하에 약속된 조건을 적용하여 수행했다.

[0568] 실험은 세포가 지수 성장기 중반 및 후반에 있을 때 부티레이트를 첨가하도록 설계했다. 부티레이트의 낮은 첨가는 세포에 더 적은 스트레스를 야기하여, 0일째 첨가할 때보다 세포당 부티레이트 농도가 더 낮기 때문에 세포 성장을 향상시키고 IVC를 증가시킬 것으로 생각된다 (IVC(생존 세포의 적분값)는 배양 시간에 대한 생존 세포 밀도의 적분값으로 정의된다). 부티레이트는 4일과 5일에 0.5mM과 2mM의 농도로 첨가했다. 이 실험은 12일 동안 수행했다. 표 4는 배양 시간에 따른 생존 세포 밀도를 나타내고, 표 5는 배양 시간에 따른 생존도를 나타낸 것이다. 4일째 첨가된 2mM 부티르산나트륨만이 대조군에 비해 생존도를 감소시켰고, 다른 조건은 생존도에 영향을 미치지 않았다.

[0569] [표 35]

배양 시간에 따른 생존 세포 밀도

생존 세포 밀도 [ $10^5/m1$ ]								
일	플라스크 1: 0mM 부티레이트	플라스크 2: 0mM 부티레이트	플라스크 3: 0.5mM 부티레이트 (4일차에)	플라스크 4: 0.5mM 부티레이트 (4일차에)	플라스크 5: 2mM 부티레이트 (4일차에)	플라스크 6: 2mM 부티레이트 (4일차에)	플라스크 7: 0.5mM 부티레이트 (5일차에)	플라스크 8: 0.5mM 부티레이트 (5일차에)
0	2.35	3.37	3.08	2.61	2.27	2.41	3.2	2.27
3	14.51	15.79	12.79	13.69	14.04	9.42	11.41	11.36
4	28.88	20.91	18.88	26.11	25.48	16.09	18.78	23.15
5	28.58	32.17	36.01	33.03	27.82	21.98	30.76	35.8
6	61.91	54.31	45.2	43.08	37.02	34.28	47.82	55.66
7	56.23	51.59	40.09	36.19	33.34	27.21	42.97	52.08
10	43.06	51.89	29.2	23.33	14.07	13.05	29.58	28.61
12	24.8	33.38	19.38	14.32	9.66	8.22	18.25	16.18

[0570]

[0571] [표 36]

배양 시간에 따른 생존도

생존도 [%]								
일	플라스크 1: 0mM 부티레이트	플라스크 2: 0mM 부티레이트	플라스크 3: 0.5mM 부티레이트 (4일차에)	플라스크 4: 0.5mM 부티레이트 (4일차에)	플라스크 5: 2mM 부티레이트 (4일차에)	플라스크 6: 2mM 부티레이트 (4일차에)	플라스크 7: 0.5mM 부티레이트 (5일차에)	플라스크 8: 0.5mM 부티레이트 (5일차에)
0	98.4	94.6	92.7	99	95.2	94.9	98.8	97.7
3	96.6	97.2	98.8	99	97.2	98	97.8	97.8
4	97	98.5	99	98.6	98.5	98	98.9	97.8
5	96.6	97.7	97.5	97.3	96.6	97.9	98	97.2
6	96.5	96.4	96.2	96	93.6	92.4	96.3	96
7	95.6	95.7	93.8	92.9	87.8	87.5	94.2	94
10	62.6	69.4	61.9	53.9	40.8	39.2	63.7	56.9
12	38.3	46.2	40.4	33.6	24.5	25.2	36.7	32.7

[0572]

[0573] 표 37은 배양 시간에 따른 항 IL-18 역가를 나타낸다. 5일째 첨가된 2mM 부티르산나트륨은 대조군에 비해 29%의 증가를 나타냈다(각각 317mg/L 대 245mg/L). 세포 성장은 이러한 조건 하에서 크게 억제되지 않았다(표 35 참조).

[0574] [표 37]

배양 시간에 따른 항 IL-18 역가

일	플라스크 1: 0mM 부티레이트	플라스크 2: 0mM 부티레이트	플라스크 3: 0.5mM 부티레이트 (4일차에)	플라스크 4: 0.5mM 부티레이트 (4일차에)	플라스크 5: 2mM 부티레이트 (4일차에)	플라스크 6: 2mM 부티레이트 (4일차에)	플라스크 7: 0.5mM 부티레이트 (5일차에)	플라스크 8: 0.5mM 부티레이트 (5일차에)	플라스크 9: 2mM 부티레이트 (5일차에)	플라스크 10: 2mM 부티레이트 (5일차에)
7	138.5	141.1	147.7	139.2	183.4	182	129.5	137.5	152.8	149.5
10	192.2	203.7	226.9	203.3	269.6	259.5	202.5	205.4	266.1	260.6
12	232.2	258.7	269.4	235.3	307.8	286.2	237.4	236.9	319.3	315

[0575]

[0576] 실시예 4.3: 3L 생물반응기에서 SR-382에서 배양된 항 IL-18 생산 CHO 세포주의 성장 및 생산성에 미치는 부티르산나트륨의 효과

[0577] 다음 실시예는 대규모, 즉 3L 생물반응기에서 항 IL-18 방법 B(섹션 1.5 참조)에 부티르산나트륨을 적용함으로써 최종 항 IL-18 역가의 증가를 입증한 것이다. 이 방법은 3L Applikon 생물반응기에서 개발했다. 씨드 트레인 은 쇼트필 단계(SR-372)까지 SR-371에서 수행했다. 쇼트필 단계는 10L 작업 부피를 보유한 20L 바이오웨이브 (Biowave) 백에서 모의실험했다. 항 IL-18 방법 B의 성장과 생산성에 미치는 부티르산나트륨의 효과를 조사하는 실험은 1.5L 작업 부피를 보유한 3L Applikon 생물반응기에서 수행했다. 각 생물반응기에는 1125mL의 SR-382를 채우고, SR-372에 항 IL-18 세포를 함유하는 바이오웨이브 백 유래의 세포 현탁액 375ml를 첨가하여 접종했다.

[0578] 실시예 4.2에서 역가 증가는 세포가 스피너 플라스크에서 5일째인 대수기 중반 내지 후반일 때 부티레이트를 첨가함으로써 달성했다. 과거, 3L 생물반응기에서 항 IL-18 생산 방법의 대수기 중반 내지 후반은 배양 7일째였다. 본 실시예에서는 부티레이트가 대수기 중반 내지 후반에 첨가되도록 배양물에 부티르산나트륨의 첨가 시기를 7일로 선택했다.

[0579] 200mM 농도의 부티르산나트륨 스톡 용액은 배양물에 첨가하기 직전인 7일째에 4.404g 부티르산나트륨을 200mL MilliQ 물에 용해하여 제조했다. 이 용액은 0.22µm 필터를 통해 여과 살균했다.

[0580] 본 실험은 5개의 생물반응기에서 수행했다. 각 생물반응기 작업은 각 생존도가 50% 미만일 때 종결했다. 2개의 생물반응기는 대조군(항 IL-18 방법 B)으로 사용했다. 다른 3개의 생물반응기에는 배양 시간 7일째에 부티르산나트륨을 각각 0.3mM, 1mM 및 3mM의 농도로 첨가했다. 표 38은 배양 시간에 따른 생존 세포 농도를 나타내고, 표 39는 배양 시간에 따른 생존도를 나타낸 것이다.

[0581] [표 38]

배양 시간에 따른 생존 세포 밀도

생존 세포 밀도 [ $10^5$ /ml]

일	반응기 1: 1mM 부티레이트	반응기 2: 부티레이트 없음	반응기 3: 0.3mM 부티레이트	반응기 4: 3mM 부티레이트	반응기 5: 부티레이트 없음
0	5.53	5.22	4.89	5.28	5.41
1	8.21	7.68	7.66	9.66	6.81
2	11.35	13.53	10.39	11.12	10.07
3	15.62	17.37	12.58	14.3	13.07
4	20.69	22.4	18.39	22.46	16.49
5	29.58	31.55	31.15	34.03	23.43
6	41.27	44.42	43.32	46.81	32.3
7	59.07	62.09	56.91	60.46	33.95
8	67.07	76.26	51.82	76.4	45.43
9	68.68	73.23	63.11	61.52	57.6
10	65.55	70.17	64.53	55.52	62.45
11	66.55	72.98	66.23	47.27	63.42
12	60.98	56.33	45.87	30.99	44.65
13	49.67	52.03	40.39	21.34	39.1
14	38.46	30.51	21.93		18.38
15	33.23	38.37	41.34		35.97
16	27.97	29.31	33.89		24.58
17			30.13		17.51
18			20.98		

[0582]

[0583] [표 39]

배양 시간에 따른 생존도

생존도 [%]

일	반응기 1: 1mM 부티레이트	반응기 2: 부티레이트 없음	반응기 3: 0.3mM 부티레이트	반응기 4: 3mM 부티레이트	반응기 5: 부티레이트 없음
0	95.3	96	92.9	94.3	96.4
1	96.4	95.4	96.4	96.3	95.9
2	96.3	95.9	95.9	96.1	96.7
3	96.6	95.6	97.7	96.6	95.3
4	97.3	97.2	96.4	95.8	95.2
5	97.1	96.4	96.2	96.4	95.3
6	96.4	96.5	96.2	96.8	95.9
7	96.3	95.2	95.8	94.3	95.1
8	96.2	95.2	94.2	95.1	94.8
9	95.6	95.2	95.4	93.6	94.2
10	94.3	94.5	94.6	87.4	93.4
11	92.2	93.9	93.8	78.9	93
12	88.1	91.7	92.4	51.9	92
13	80.6	86.9	90.2	33.7	89.2
14	66.7	76.2	88.9		84.1
15	57	60.7	85.2		73.4
16	45.9	42.7	69.5		50.7
17			58.1		34.2
18			41		

[0584]

[0585] 대조군 배양물은 반복물(반응기 2)에서보다 반응기 5에서 성장이 더 느렸는데, 그 이유는 반응기 5에서의 초기 CO<sub>2</sub> 농도가 높았기 때문이다. 반응기 2는 배양 시간 16일째 종결되었고(과거 항 IL-18 생산 방법에서 관찰됨), 반응기 5는 17일째 종결되었다. 3mM 농도의 부티르산나트륨(반응기 4)은 세포 성장 및 생존도에 영향을 미쳤다. 부티레이트 첨가 2일 후부터 세포가 죽기 시작했다. 1mM의 부티레이트는 세포 성장과 생존도에 영향을 미치지 않았고(반응기 1), 반응기 작업은 16일째 종결되었다. 세포 성장은 반응기 2에서의 대조군과 매우 유사했다. 0.3mM의 부티레이트는 배양 시간을 2일 동안 연장시켰다(반응기 3). 표 40은 배양 시간에 따른 항 IL-18 역가를 나타낸다.

[0586] [표 40]

배양 시간에 따른 항 IL-18 역가

역가 [mg/L]

일	반응기 1: 1mM 부티레이트	반응기 2: 부티레이트 없음	반응기 3: 0.3mM 부티레이트	반응기 4: 3mM 부티레이트	반응기 5: 부티레이트 없음
9	1033	1074.2	905.8	966.9	747.4
10	1218.4	1223.9	1096.4	1184.9	877.5
11	1410.4	1460	1261.1	1242.9	1053.5
12	1663.5	1538.1	1485.1	1269.5	1216.7
13	1700.2	1912.5	1750.9	1304.6	1303
14	1852.7	2136.9	1923.4		1429.3
15	1909.4	2223.2	2280.4		1672.3
16	1933.7	2324.7	2108.6		1540.5
17			2561.3		1589.4
18			2448.6		

[0587]

[0588] 반응기 2(항 IL-18 방법 B를 나타냄)에서의 배양물의 최종 역가(16일)는 2325g/L였다. 반응기 5에서의 최종 역가는 1589g/L였다. 이러한 낮은 역가는 배양 배지 중의 높은 초기 CO<sub>2</sub> 농도로 인해 약화된 세포 성장 때문인 것으로 생각된다. 7일째 첨가된 1mM 및 3mM의 부티레이트는 대조군(반응기 2)보다 낮은 최종 역가를 나타냈다. 7일째 첨가된 0.3mM의 부티레이트는 대조군에 비해 10% 증가된 2561g/L의 역가를 17일째 나타냈다. 이러한 역가는 항 IL-18 방법에서 달성된 최고의 역가였다.

[0589] **실시예 4.4: SR-372에서 배양된 항 IL-18 생산 CHO 세포주의 성장과 생산성에 미치는 N-아세틸시스테인(10mM, 20mM, 40mM, 80mM)의 효과**

[0590] N-아세틸시스테인은 포유동물 세포를 세포 사멸로부터 보호할 수 있다. 항산화제로서 N-아세틸시스테인은 반응성 산소종을 직접 감소시킬 수 있다. 탈아세틸화에 의해 이는 시스테인으로 전환될 수 있고 세포내 글루타티온 수준을 증가시킬 수 있다. 글루타티온은 반응성 산소종을 제거할 수 있고 과산화수소의 물로의 환원에 기질로서 작용할 수 있다.

[0591] 본 실시예는 N-아세틸시스테인의 항 IL-18 역가 증가 효과를 입증한다. 본 실험은 180mL 작업 부피를 보유한 250mL 스피너 플라스크에서 수행했다. 배양 배지는 SR-372였다. 실험 전에 세포는 실시예 4.2에 기술된 바와 같이 SR-372에서 성장하도록 예비적응시켰다. 스피너 배양 조건은 전술한 "스피너 플라스크에서 수행된 실험의 배양 조건"이라는 표제 하에서와 같이 적용했다.

[0592] 1M의 N-아세틸시스테인 스톡 용액은 16.32g N-아세틸시스테인을 100mL MilliQ 물에 가열 교반 플레이트에서 용해하여 제조했다. 이 스톡 용액을 0.22 $\mu$ m 필터를 통해 여과 살균했다. N-아세틸시스테인을 실험 개시 1일 전에 SR-372에 첨가하여 0mM, 10mM, 20mM, 40mM 및 80mM의 농도를 수득했다. 본 실험은 상기 "스피너 플라스크에서 수행된 실험의 배양 조건"이라는 표제하에 기술된 바와 같이 CHO 항 IL-18 보존 배양물 유래의 세포를 원심분리하여 개시했다. 각 스피너 배양은 각 생존도가 50% 미만일 때 종결시켰다.

[0593] 세포 성장은 20mM, 40mM 및 80mM의 N-아세틸시스테인 농도에서는 불가능했다. 표 41과 표 42는 0mM N-아세틸시스테인과 10mM N-아세틸시스테인에서 성장된 세포를 사용하여 배양 시간에 따른 생존 세포 밀도와 생존도를 각각 비교한 것이다.

[0594] [표 41]

배양 시간에 따른 생존 세포 밀도

생존 세포 밀도 [ $10^5$ /mL]

일	플라스크 1: N-아세틸시스테인 없음	플라스크 2: N-아세틸시스테인 없음	플라스크 3: 10mM N- 아세틸시스테인	플라스크 4: 10mM N- 아세틸시스테인
0	3.60	3.44	2.73	2.73
3	18.34	17.72	3.58	3.02
4	29.39	29.71	4.47	4.24
5	33.54	31.05	6.46	6.40
6	37.38	32.92	9.84	7.27
7	34.26	31.00	12.36	12.00
8	17.49	17.68	24.20	22.42
9	25.34	21.54	20.14	19.48
10	17.49	17.68	24.20	22.42
11	10.75	13.84	25.02	26.00
12			27.44	27.56
13			25.77	27.86
14			22.77	24.17
15			18.40	19.22
16			14.60	16.30

[0595]

[0596] [표 42]

배양 시간에 따른 생존도

생존도 [%]

일	플라스크 1: N-아세틸시스테인 없음	플라스크 2: N-아세틸시스테인 없음	플라스크 3: 10mM N- 아세틸시스테인	플라스크 4: 10mM N- 아세틸시스테인
0	97.4	96.9	96.2	95.3
3	98.8	98.6	57.2	52.1
4	99.0	98.8	61.9	62.2
5	98.7	98.5	69.5	72.1
6	95.4	92.8	76.0	73.5
7	87.8	84.0	81.5	80.9
8	73.3	69.6	85.5	82.7
9	64.9	60.8	82.7	86.5
10	52.5	49.0	82.5	86.9
11	38.6	38.1	81.7	87.2
12			79.2	83.1
13			74.8	78.9
14			67.2	68.7
15			56.7	56.9
16			49.3	47.2

[0597]

[0598]

대조군 배양물(N-아세틸시스테인 없음)은 배양 11일째 종결되었고, 이에 반해 10mM N-아세틸시스테인 첨가된 배양물은 16일까지 연장될 수 있었다. 초기에 10mM N-아세틸시스테인은 세포 성장과 생존도에 영향을 미치고 3일까지 생존도의 감소를 유도했다. 그 다음, 생존도는 증가하기 시작했다. 10mM N-아세틸시스테인에서 성장된 배양물의 최대 세포 밀도는 대조군에 비해 낮았다. 표 43은 N-아세틸시스테인에 의한 최종 항 IL-18 역가의 증가를 입증한다.

[0599] [표 43]

배양 시간에 따른 항 IL-18 역가

역가 [mg/L]

일	플라스크 1: N-아세틸시스테인 없음	플라스크 2: N-아세틸시스테인 없음	플라스크 3: 10mM N- 아세틸시스테인	플라스크 4: 10mM N- 아세틸시스테인
4	102.0	94.9	23.9	21.9
5	130.5	122.4	35.3	32.5
6	168.5	154.3	60.6	55.9
7	190.4	171.8	84.2	78.0
8	216.4	194.3	125.3	119.3
9	233.0	206.9	156.6	153.1
10	243.2	216.4	185.9	187.7
11	258.6	227.8	224.1	230.9
12			264.1	272.6
13			300.2	311.2
14			334.0	314.6
15			393.0	384.4
16			414.6	421.4

[0600]

[0601] 대조군 배양물의 평균 최종 역가는 243.2mg/L이고, 10mM N-아세틸시스테인에서 성장된 배양물의 평균 최종 역가는 418mg/L였다. 이것은 대조군에 비해 72% 증가한 것이었다.

[0602] 실시예 4.5: SR-372에서 배양된 항 IL-18 생산 CHO 세포주의 성장 및 생산성에 미치는 N-아세틸시스테인(1mM, 2mM, 4mM, 8mM)의 효과

[0603] 실시예 4.4에 기술된 바와 같이, 0일째 첨가된 10mM 농도의 N-아세틸시스테인은 배양 시간을 연장시키고 최종 역가의 증가를 유도할 수 있었다. 하지만, 이 농도에서 세포 생존도는 처음에서는 감소했다. 실시예 4.4의 결과를 기초로 하여, 본 실험은 실시예 4.4에서 검사된 N-아세틸시스테인 농도의 1/10을 사용하여 설계했다. 이 스피너 플라스크 실험의 조건은 실시예 4.4에서와 동일하였다. N-아세틸시스테인은 0mM(대조군), 1mM, 2mM, 4mM 및 8mM의 농도로 첨가했다.

[0604] 표 44는 배양 시간에 따른 생존 세포 밀도를 나타내고, 표 45는 배양 시간에 따른 생존도를 나타낸다.

[0605] [표 44]

배양 시간에 따른 생존 세포 밀도

일	플라스크 1: 0mM N- 아세틸시스테인	플라스크 2: 0mM N- 아세틸시스테인	플라스크 3: 1mM N- 아세틸시스테인	플라스크 4: 1mM N- 아세틸시스테인	플라스크 5: 2mM N- 아세틸시스테인
0	2.75	3.45	3.64	3.22	4.10
3	25.05	22.42	19.25	19.32	17.42
4	35.98	31.42	25.45	24.56	24.96
5	45.43	37.56	31.16	29.23	27.28
6	40.04	39.41	29.67	28.35	28.45
7	35.55	33.25	27.71	27.03	26.65
8	31.56	26.22	24.63	22.33	22.49
9	27.15	23.04	22.23	20.23	19.11
10	23.26	19.88	21.06	17.74	18.07
11					15.48
12					
13					
14					

일	플라스크 6: 2mM N- 아세틸시스테인	플라스크 7: 4mM N- 아세틸시스테인	플라스크 8: 4mM N- 아세틸시스테인	플라스크 9: 8mM N- 아세틸시스테인	플라스크 10: 8mM N- 아세틸시스테인
0	2.96	3.13	2.80	2.97	3.54
3	19.03	17.39	16.39	11.24	10.17
4	28.40	24.80	23.71	14.47	13.88
5	34.21	28.06	26.92	20.68	18.64
6	37.05	30.62	29.54	25.59	23.13
7	32.55	30.66	26.94	28.22	26.12
8	28.99	24.75	23.84	30.00	30.77
9	27.75	22.25	21.71	27.45	28.63
10	23.05	20.06	19.67	27.14	27.90
11	20.75	16.79	16.70	26.42	29.60
12				26.39	25.62
13				21.46	22.29
14				30.47	32.41

[0606]

[0607] [표 45]

배양 시간에 따른 생존도

일	플라스크 1: 0mM N- 아세틸시스테인	플라스크 2: 0mM N- 아세틸시스테인	플라스크 3: 1mM N- 아세틸시스테인	플라스크 4: 1mM N- 아세틸시스테인	플라스크 5: 2mM N- 아세틸시스테인
0	94.6	97.6	96.2	93.3	94.9
3	98.3	97.6	99.1	98.1	98.6
4	98.0	96.8	98.2	97.6	97.2
5	97.1	96.0	96.3	95.0	96.1
6	90.2	89.6	89.3	89.3	89.9
7	79.0	80.1	79.8	77.3	79.6
8	60.6	62.2	64.8	62.2	62.2
9	52.7	53.4	56.9	52.6	54.8
10	46.2	45.5	51.3	45.9	50.2
11					40.3
12					
13					
14					

일	플라스크 6: 2mM N- 아세틸시스테인	플라스크 7: 4mM N- 아세틸시스테인	플라스크 8: 4mM N- 아세틸시스테인	플라스크 9: 8mM N- 아세틸시스테인	플라스크 10: 8mM N- 아세틸시스테인
0	93.8	94.9	91.7	92.1	93.6
3	97.5	97.1	98.4	96.4	94.3
4	98.2	97.4	97.6	96.4	94.4
5	97.1	97.1	96.9	96.5	94.4
6	93.0	92.4	93.1	95.8	92.0
7	86.1	84.5	85.0	93.4	89.6
8	71.9	68.4	70.6	85.6	84.7
9	65.2	58.5	60.3	79.7	79.5
10	54.9	52.0	55.0	76.3	75.0
11	45.1	42.5	45.7	68.4	69.0
12				61.3	61.2
13				51.1	52.2
14				39.4	42.6

[0608]

[0609] 대조군 배양물(0mM N-아세틸시스테인)은 배양 10일 후에 종결되었다. N-아세틸시스테인은 배양 수명을 연장시킬 수 있었다. 8mM N-아세틸시스테인에서 성장된 배양물은 배양 14일 후 종결되었다. N-아세틸시스테인에서 성장된 배양물은 대조군에 비해 낮은 최대 세포 밀도를 나타냈다.

[0610] 표 46은 최종 항 IL-18 역가에 미치는 N-아세틸시스테인의 효과를 나타낸다.

[0611] [표 46]

배양 시간에 따른 항 IL-18 역가

역가 [mg/L]

일	플라스크 1: 0mM N- 아세틸시스테인	플라스크 2: 0mM N- 아세틸시스테인	플라스크 3: 1mM N- 아세틸시스테인	플라스크 4: 1mM N- 아세틸시스테인	플라스크 5: 2mM N- 아세틸시스테인
7	193.1	168.3	210.1	202.5	198.0
8	230.3	199.9	241.6	232.2	227.5
9	244.7	216.2	256.6	245.4	242.0
10	262.7	227.2	268.9	258.3	253.2
11					268.3
12					
13					
14					

일	플라스크 6: 2mM N- 아세틸시스테인	플라스크 7: 4mM N- 아세틸시스테인	플라스크 8: 4mM N- 아세틸시스테인	플라스크 9: 8mM N- 아세틸시스테인	플라스크 10: 8mM N- 아세틸시스테인
7	274.0	210.9	202.0	181.9	175.1
8	323.9	251.6	240.2	237.6	232.2
9	374.7	271.7	259.3	267.7	263.9
10	428.8	288.9	276.3	295.3	292.2
11	444.1	315.5	304.3	349.1	367.9
12				369.5	401.4
13				429.5	432.0
14				477.6	484.4

[0612]

[0613] 대조군 배양물의 평균 최종 항 IL-18 역가는 245mg/L였다(실시에 4.4에서의 243mg/L와 매우 유사). 8mM N-아세틸시스테인에서 성장한 배양물의 최종 항 IL-18 역가는 481mg/L였다. 이것은 대조군에 비해 96% 증가한 것이다.

[0614] **균등물**

[0615] 당업자라면 통상의 실험만을 이용하여 본 명세서에 기술된 본 발명의 특정 양태들에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 균등물은 이하 청구의 범위에 포함되는 것으로 간주한다. 본 출원을 통해 인용된 모든 참고문헌, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 본원에 참조로서 인용된다.

도면  
도면1

