



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년07월22일
(11) 등록번호 10-1422435
(24) 등록일자 2014년07월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/02 (2006.01) C12N 1/38 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7022322(분할)
(22) 출원일자(국제) 2007년01월03일
심사청구일자 2013년09월13일
(85) 번역문제출일자 2013년08월23일
(65) 공개번호 10-2013-0100224
(43) 공개일자 2013년09월09일
(62) 원출원 특허 10-2008-7018889
원출원일자(국제) 2007년01월03일
심사청구일자 2011년11월16일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2007/000027
(87) 국제공개번호 WO 2007/077217
국제공개일자 2007년07월12일
(30) 우선권주장
60/756,419 2006년01월04일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
EP00659880 A1
전체 청구항 수 : 총 9 항

(73) 특허권자
박스터 헬쓰케어 에스에이
스위스 8152 글라트파르크 (오프피콘) 투르가우
에르슈트라쎄 130
박스터 인터내셔널 인코포레이티드
미국 일리노이주 60015 디어필드 원 박스터 파크
웨이
(72) 발명자
그릴베르거르, 레오폴드
오스트리아 아-1010 비엔나 포스트가쎄 13/20
라이테르, 만프레드
오스트리아 아-1150 비엔나 게브뤼데르-란크-가쎄
11/17
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영, 양영준

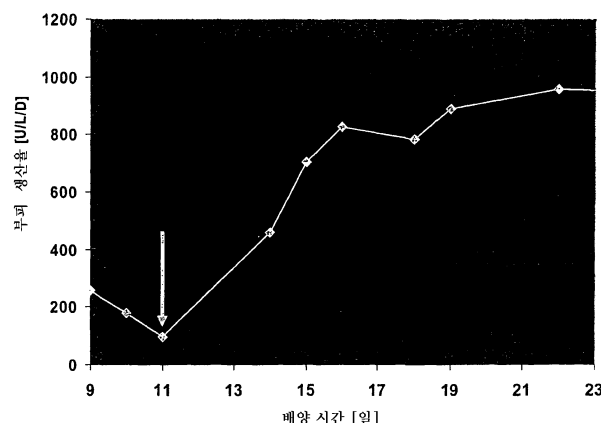
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지**

(57) 요약

본 발명은 폴리아민 0.5 mg/L 이상을 포함하는 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지, 및 폴리아민 0.5 mg/L 이상을 포함하는 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지에서 세포를 배양하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 폴리아민 0.5 mg/L 이상을 포함하는 배지 중에서 1종 이상의 단백질을 발현시키는 방법, 및 폴리아민 0.5 mg/L 이상을 포함하는 배지 중에서 1종 이상의 바이러스를 생산하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

문트, 볼프강

오스트리아 아-1080 비엔나 플로리아니가췌
57/1/2/6

미테레르, 아르투르

오스트리아 아-2304 오르트/도나우 쉬바르젠케르베
크 10

특허청구의 범위

청구항 1

폴리아민 1 mg/L 이상을 포함하고, 20개 이상의 아미노산을 가진 올리고펩티드를 포함하지 않는, 재조합 단백질 발현 또는 바이러스 생산을 위한 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리아민이 카다베린, 푸트레신, 스퍼미딘, 스퍼민, 아그마틴, 오르니틴, 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 폴리아민이 합성에 의해 제조된 것인 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 폴리아민이 배양 배지 중에 1 내지 30 mg/L의 농도로 존재하는 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지.

청구항 5

제1항에 있어서, 3개 이상의 아미노산을 가진 올리고펩티드는 포함하지 않고, 글루타티온을 포함할 수 있는 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지.

청구항 6

제1항에 있어서, 2개 이상의 아미노산을 가진 올리고펩티드는 포함하지 않고, 글루타티온, 하나 이상의 안정한 형태의 글루타민 또는 둘 다를 포함할 수 있는 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지.

청구항 7

제1항에 있어서, 화학적으로 규정된 것인 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지.

청구항 8

- (a) 제1항에 따른 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지를 제공하는 단계, 및
 - (b) 상기 배지에서 세포를 증식시켜 세포 배양물을 형성하는 단계
- 를 포함하는 세포 배양 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 세포가 포유동물 세포, 곤충 세포, 조류 세포, 박테리아 세포, 및 효모 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 10

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 폴리아민 0.5 mg/L 이상을 포함하는 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지, 및 폴리아민 0.5 mg/L 이상을 포함하는 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지에서 세포를 배양하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 폴리아민 0.5 mg/L 이상을 포함하는 배지 중에서 1종 이상의 단백질을 발현시키는 방법, 및 폴리아민 0.5 mg/L 이상을 포함하는 배지 중에서 1종 이상의 바이러스를 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 세포, 특히 진핵 세포, 더욱 구체적으로 포유동물 세포의 배양을 위해, 생물학적 생성물, 특히 생물약제, 예를 들어 재조합 단백질, 항체, 바이러스, 바이러스 항원 및 바이러스-유사 입자의 생산, 및 세포의 효과적인 성장에 필요한 영양 물질을 제공하는 특별한 배양 배지를 사용하는 것이 꾸준히 요구되고 있다. 상기 생물학적 생성물의 효과적인 생산을 위해서는, 최대 생산율을 수득하도록 적정 세포 밀도 및 단백질 발현 자체의 증가를 달성하는 것이 중요하다.
- [0003] 세포 배양 배지 조성은 규정되지 않은 성분들, 예를 들어 소 태아 혈청 (FCS), 여러 동물 유래의 단백질 및/또는 소 기원의 단백질 가수분해물 뿐만 아니라 식물 또는 효모로부터의 단백질 가수분해물을 비롯한 광범위한 첨가제로 보충되었다.
- [0004] 일반적으로, 혈청 또는 혈청-유래 물질, 예컨대 알부민, 트랜스페린 또는 인슐린은 세포 배양물 및 그로부터 수득된 생물학적 생성물을 오염시킬 수 있는 원치않는 제제를 포함할 수 있다. 또한, 인간 혈청 유래의 첨가제의 경우에는 혈청을 통해 전달될 수 있는 간염 바이러스 및 HIV를 비롯한 모든 공지된 바이러스에 대해 시험하여야 한다. 또한, 소 혈청 및 그로부터 유래된 생성물은 BSE 오염의 위험을 안고 있다. 또한, 모든 혈청 유래의 생성물은 미지의 물질로 오염될 수 있다. 세포 배양물 중에 인간 또는 동물 원료로부터 유래된 혈청 또는 단백질 첨가제를 사용하는 경우, 특히 세포를 인간에게 투여하기 위한 약물 또는 백신의 제조에 사용하는 경우, 수많은 문제점 (예를 들어, 배치마다 조성물 품질의 차이, 및 마이코플라즈마, 바이러스 또는 BSE에 의한 오염의 위험)이 있다.
- [0005] 따라서, 혈청 또는 다른 동물 단백질 화합물을 필요로 하지 않는 효과적인 숙주 시스템 및 배양 조건을 제공하고자 하는 여러 시도가 있어왔다.
- [0006] 이러한 혈청-무함유 배지는 식물 또는 효모로부터 유래된 단백질 추출물을 기초로 하여 개발되었다. 예를 들어, 대두 가수분해물은 발효 과정에 유용한 것으로 알려져 있고, 여러 까다로운 유기체, 효모 및 진균의 성장을 개선시킬 수 있다. WO 96/26266은 대두 식품의 파파인 소화제가 탄수화물 및 질소의 원료이고, 상기 여러 성분들은 조직 배양에 사용될 수 있다고 기재하고 있다. 문헌 [Franek et al., Biotechnology Progress (2000) 16, 688 - 692]에는 규정된 대두 및 밀 가수분해물 펩티드 분획이 성장 및 생산율을 증가시키는 효과가 기재되어 있다.
- [0007] WO 96/15231은 척추동물 세포의 증식 및 바이러스 생산 공정을 위한, 합성 최소 필수 배지 및 효모 추출물로 이루어진 혈청-무함유 배지를 기재하고 있다. 쌀 펩티드 및 효모 추출물 및 그의 효소 소화제 및/또는 동물 세포의 성장을 위한 식물 액체를 포함하는 기초 세포 배양 배지로 이루어진 배지 조성이 WO 98/15614에 개시되어 있다. 재조합 세포의 배양을 위해 정제된 대두 가수분해물을 포함하는 배지가 WO 01/23527에 개시되어 있다. WO 00/03000은 대두 가수분해물 및 효모 추출물을 포함하는 배지를 개시하고 있지만, 성장 인자와 같은 동물 단백질의 재조합 형태의 존재를 필요로 한다.
- [0008] EP-A-0 481 791은 유전자 조작된 CHO 세포의 배양을 위한 생화학적으로 규정된 배양 배지를 기재하며, 상기 배지는 동물 원료로부터 단리된 단백질, 액체 및 탄수화물을 함유하지 않으며, 추가로 재조합 인슐린 또는 인슐린 유사체, 1% 내지 0.025% w/v 파파인 소화된 대두 펩톤 및 푸트레신을 포함한다. WO 98/08934는 가수분해된 대두 펩티드 (1 - 1000 mg/L), 0.01 내지 1 mg/L 푸트레신, 및 다양한 동물-유래 성분, 예컨대 알부민, 페투인, 다양한 호르몬 및 기타 단백질을 포함하는 혈청-무함유 진핵 세포 배양물을 기재한다. 이와 관련하여, DMEM/Ham F12와 같은 표준 배지 중에서 푸트레신이 0.08 mg/L의 농도로 구성되는 것도 공지되어 있음을 주목해야 한다.
- [0009] 그러나, 식물 및/또는 효모 가수분해물은 올리고펩티드 및 기타 미지의 성분들 및 오염물의 규정되지 않은 혼합물이다. 또한, 대부분의 시판되는 가수분해물 로트의 품질은 매우 다양하다. 그 결과, 사용된 가수분해물의 로트의 함수로서 ("로트-대-로트 변동") 재조합 단백질 또는 바이러스 생성물의 생산성이 크게 변동된다 (3 인자 이하의 변동). 이러한 단점은 세포 증식 뿐만 아니라, 각 세포의 단백질 발현에 영향을 미친다.
- [0010] 요약하면, 종래 기술에 공지된 배지는 동물, 식물 또는 효모로부터 유래된 단백질 또는 펩티드 추출물로 보충되거나, 인슐린, 인슐린 유사 성장 인자 또는 기타 성장 인자와 같은 재조합 형태의 단백질로 보충된다.
- [0011] 따라서, 상기 언급한 문제점들을 극복하기 위해, 동물, 식물 및 진균 단백질 및/또는 올리고펩티드를 함유하지 않는 세포 배양 배지가 요구된다. 또한, 재조합 단백질 또는 임의의 기타 발현 생성물의 수율을 증가시키고,

인간을 위한 약제 또는 백신으로서 사용하기 위 생물학적 생성물의 생산을 위한 최적 세포 배양 배지를 제공하는 것이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명의 목적은 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지를 제공하는 것이다. 본 발명의 추가의 목적은 상기 배지에서 세포를 배양하는 방법 뿐만 아니라, 재조합 단백질의 효과적인 발현 방법 및/또는 바이러스의 효과적인 생산 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또다른 목적은 동물, 식물 및/또는 효모 유래의 가수분해물을 감소시키고, 첨가된 임의의 보충 단백질 또는 올리고펩티드를 포함하지 않는 배지를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 놀랍게도, 세포 배양 배지에 폴리아민 0.5 mg/L 이상을 첨가하면, 세포 성장을 촉진시킬 뿐만 아니라, 세포당 단백질 및/또는 바이러스 발현을 증가시킴으로써 유리한 효과가 제공된다. 이러한 예상치 못한 유리한 효과는 올리고펩티드-무함유 배지에서도 달성될 수 있다.
- [0015] 또한, 본 발명에 따른 올리고펩티드-무함유 배지는, 임의의 단백질 가수분해물의 품질 또는 로트 변동과 무관하게, 지속적인 세포 성장 및 목적하는 생성물, 특히 재조합 단백질 및/또는 바이러스와 같은 표적 단백질의 수율 증가를 가능하게 한다. 특정 농도의 폴리아민을 갖는 세포 배양 배지의 특정한 보충은 세포 성장, 세포 특이적 생산을 및 최종 세포 밀도를 증가시키도록 작용한다.

발명의 효과

- [0016] 따라서, 본 발명에 따른 배지는 종래 기술에 공지된 배지에 비해 재조합 단백질 발현, 바이러스 생산 및 세포 성장률이 더욱 우수하다. 또한, 본 발명에 따른 올리고펩티드-무함유 배지는 세포 배양 배지에 단백질 가수분해물을 첨가할 필요가 없게 한다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 배양 시간 [일]에 걸쳐 BAV-배지에서 배양된 GD8/6 세포의 FVIII-CoA 부피 생산을 [단위/리터/일; U/L/D]에 대한 2.0 mg/L 푸트레신.2HCl의 첨가의 효과를 도시하는 그래프이다. 화살표 = 제11일: 푸트레신.2HCl (2.0 mg/L) 첨가.
- 도 2는 BAV-배지에서 배양된 GD8/6 세포의 부피 및 세포 특이적 생산을 (QP, [U/L/D]; qp, [mU/10E06 세포/일]), 및 특이적 성장률 μ (특이적 성장률/일, [d^{-1}])에 대한, 임의로 Fe (II) 및 Cu (II)로 추가로 보충된, 푸트레신의 첨가의 효과를 비교한 표이다.
- 도 3은 BAV-배지에서 배양된 GD8/6 세포의 특이적 성장률 (절대적 μ , 상대적 μ) 및 세포 특이적 생산율 (절대적 qp, [mU/10E06 세포/일]; 상대적 qp, [%])에 대한 푸트레신 및/또는 오르니틴의 효과를 비교한 표이다.
- 도 4는 BAV-배지에서 배양된 GD8/6 세포의 특이적 성장률 (절대적 μ , 상대적 μ) 및 세포 특이적 생산율 (절대적 qp, 상대적 qp)에 대한 푸트레신 및 스퍼민의 효과를 비교한 표이다.
- 도 5는 BAV-배지에서 배양된 GD8/6 세포의 특이적 성장률 (절대적 μ , 상대적 μ) 및 세포 특이적 생산율 (절대적 qp, 상대적 qp)에 대한 푸트레신 및 에탄올아민의 효과를 비교한 표이다.
- 도 6은 평균 MVA 바이러스 역가 [TCID₅₀/ml x 10⁸]에 대한 3.6 mg/L 푸트레신.2HCl 첨가의 효과를 도시한 그래프이다. - : 푸트레신 무첨가, Putr.: 3.6 mg/L 푸트레신.2HCl 첨가.
- 도 7은 평균 MVA 바이러스 역가 [TCID₅₀/ml x 10⁸]에 대한 다양한 농도의 푸트레신.2HCl [mg/L]의 첨가의 효과를 도시한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명의 한 측면은 폴리아민 0.5 mg/L 이상을 포함하는 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지에 관한 것이다.
- [0019] 달리 언급하지 않는다면, 본원 전체에 나타난 농도 수치는 해당 성분의 유리 염기 형태에 관한 것이다.
- [0020] 용어 "폴리아민"은 방향족 또는 양이온성 아미노산으로부터 유래된 유기 다중양이온인 생원성 폴리아민의 한 군이다. 폴리아민은 탄소, 질소 및 수소로 이루어지며, 2개 이상의 아미노기를 포함한다. 폴리아민은 1 이상의 양전하 및 소수성 골격을 갖는다. 상기 용어는 예를 들어 카다베린, 푸트레신, 스퍼미딘, 스퍼민, 아그마틴, 오르니틴, 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 분자를 포괄한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 올리고펩티드-무함유 배양 배지는 오르니틴, 또는 푸트레신, 또는 스퍼민, 또는 이들의 조합물을 포함한다.
- [0021] 본 발명에 따른 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지의 또다른 실시양태에서, 폴리아민은 단백질 가수분해물이 아닌 기원으로부터 유래한다. 한 실시양태에서, 폴리아민은 합성에 의해 제조된다.
- [0022] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리아민 농도는 약 0.5 mg/L 이상이고, 또다른 실시양태에서 약 1 mg/L 이상이며, 추가의 실시양태에서 약 2 mg/L 이상이고, 또다른 실시양태에서 5 mg/L 이상이고, 또다른 실시양태에서 8 mg/L 이상이며, 추가의 실시양태에서 10 mg/L 이상이다.
- [0023] 본 발명의 한 실시양태에서, 배지 중 폴리아민 농도는 약 0.5 mg/L 내지 약 30 mg/L이고, 또다른 실시양태에서 약 0.5 mg/L 내지 약 20 mg/L이고, 추가의 실시양태에서 약 1.0 mg/L 내지 약 20 mg/L이고, 추가의 실시양태에서 약 2.0 mg/L 내지 약 20 mg/L이고, 추가의 실시양태에서 약 2 mg/L 내지 약 10 mg/L이고, 대안적인 실시양태에서 약 2 mg/L 내지 약 8 mg/L이고, 추가의 실시양태에서 약 2 mg/L 내지 약 5 mg/L이다.
- [0024] 상기 기재한 농도는 순수 폴리아민 개개의 농도이다. 폴리아민 유도체 또는 폴리아민-포함 화합물을 사용하는 경우, 폴리아민 기의 농도는 상기 명시한 범위내에 있다. 예를 들어, 2 mg/L 푸트레신·2HCl은 약 1.095 mg/L (2HCl 무함유)의 푸트레신 농도와 등가이다.
- [0025] 본 발명에 따른 용어 "올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지"는 올리고펩티드, 예를 들어 단백질 가수분해물로부터 유래된 올리고펩티드를 포함하지 않는 단백질-무함유 배지를 지칭한다. 한 실시양태에서, 배지는 20개 이상의 아미노산을 갖는 올리고펩티드를 포함하지 않는다. 본 발명의 한 실시양태에서, 배지는 15개 이상의 아미노산을 갖는 올리고펩티드를 포함하지 않는다. 본 발명의 또다른 실시양태에서, 배지는 10개 이상의 아미노산을 갖는 올리고펩티드를 포함하지 않는다. 한 실시양태에서 배지는 7개 이상의 아미노산을 갖는 올리고펩티드를 포함하지 않으며, 또다른 실시양태에서는 5개 이상의 아미노산을 갖는 올리고펩티드를 포함하지 않으며, 또다른 실시양태에서는 3개 이상의 아미노산을 갖는 올리고펩티드를 포함하지 않는다. 본 발명의 추가의 실시양태에 따라, 배지는 2개 이상의 아미노산을 갖는 올리고펩티드를 포함하지 않는다.
- [0026] 본 발명에 따른 배지는 임의로 글루타티온 및/또는 하나 이상의 안정한 형태의 글루타민, 예컨대 L-알라닐-L-글루타민을 포함할 수 있다. 본 발명에 사용된 용어 "글루타티온"은 아미노산 글루타메이트, 시스테인 및 글리신으로 이루어진 트리펩티드, 예컨대 산화된 형태의 글루타티온, 즉, 글루타티온 디설파이드 (산화 과정에서 시스테인 술프하이드릴 측쇄들 사이의 디설파이드 결합에 의해 형성된 글루타티온 이합체)를 나타낸다.
- [0027] 본 발명의 한 실시양태에서, 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지는 3개 이상의 아미노산을 가진 올리고펩티드는 포함하지 않지만, 임의로 글루타티온은 포함할 수 있다.
- [0028] 또다른 실시양태에서, 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지는 2개 이상의 아미노산을 가진 올리고펩티드를 포함하지 않지만, 임의로 글루타티온 및/또는 하나 이상의 안정한 형태의 글루타민은 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명에 따른 배지에서 기피하는 전형적인 단백질 및/또는 올리고펩티드는 혈청 및 혈청-유래 물질에서 발견되는 것들, 예를 들어 알부민, 트랜스페린, 인슐린 또는 기타 성장 인자뿐 아니라 이들의 재조합 형태, 또는 식물 또는 효모 가수분해물로부터의 올리고펩티드 또는 그의 한외여과 형태이다.
- [0030] 본 발명에 따른 올리고펩티드-무함유 배양 배지는 당업자에게 일반적으로 공지된 임의의 기초 배지, 예컨대 DMEM, Ham F12, 배지 199, 맥코이(McCoy), 또는 RPMI를 기본으로 한다. 기초 배지는 수많은 성분, 예컨대 아미노산, 비타민, 유기 및 무기 염, 및 탄소화물원을 포함할 수 있으며, 이들 각 성분은 세포의 배양을 유지하는 양으로 존재하고, 상기 양은 일반적으로 당업자에게 공지되어 있다. 배지는 보조 물질, 예컨대 완충 물질, 예를 들어 중탄산나트륨, 항산화제, 기계적 스트레스에 대항하는 안정화제, 또는 프로테아제 억제제를 포함할 수 있다. 경우에 따라, 비-이온성 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체 및/또는 혼합물 (예컨대, 플루로닉(Pluronic) F68®, SERVA)을 첨가할 수 있다.

- [0031] 본 발명에 따른 배양 배지의 한 실시양태에서, 폴리아민은 DNA- 및 RNA-합성, 및/또는 세포 증식, 및/또는 세포 분화, 및/또는 막 안정화, 및/또는 항산화성 DNA-보호를 조절한다.
- [0032] 한 실시양태에서, 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지에 폴리아민 0.5 mg/L 이상을 첨가하면, 배양된 세포에서의 단백질 및/또는 바이러스 발현이 증가한다. 또다른 실시양태에서, 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지에 폴리아민 0.5 mg/L 이상을 첨가함으로써, 배양된 세포에서의 단백질 발현 또는 바이러스 역가가 50% 이상 증가할 수 있다. 또다른 실시양태에서, 이러한 증가는 60% 이상이다. 또다른 실시양태에서, 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지에 폴리아민 0.5 mg/L 이상을 첨가함으로써, 세포 특이적 생산율이 2배 이상 증가하고, 또다른 실시양태에서 세포 특이적 생산율이 3배 이상 증가한다. 또다른 실시양태에서, 폴리아민 0.5 mg/L 이상을 첨가함으로써, 단백질 발현 및/또는 바이러스 역가가 400% 이상 증가하고, 추가의 실시양태에서 500% 이상 증가하고, 또다른 실시양태에서 600% 이상 증가하며, 추가의 실시양태에서 700% 이상 증가한다.
- [0033] 한 실시양태에서, 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지에 폴리아민 0.5 mg/L 이상을 첨가함으로써, 배양된 세포의 특이적 성장률이 증가할 수 있다. 추가의 실시양태에서, 상기 특이적 성장률이 10% 증가할 수 있다. 또다른 실시양태에서, 상기 특이적 성장률이 20% 증가할 수 있다. 또다른 실시양태에서, 상기 특이적 성장률이 50% 증가할 수 있다. 추가의 실시양태에서, 상기 특이적 성장률이 70% 증가할 수 있다. 또다른 실시양태에서, 상기 특이적 성장률이 80% 증가할 수 있다. 또다른 실시양태에서, 상기 특이적 성장률이 90% 증가할 수 있다. 또다른 실시양태에서, 상기 특이적 성장률이 100% 증가할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 추가의 실시양태에서, 배지는 화학적으로 규정된 것이다. 본원에 사용된 용어 "화학적으로 규정된"은 배지가 임의의 규정되지 않은 보충물, 예를 들어 동물 성분, 기관, 샘, 식물, 또는 효모의 추출물을 포함하지 않은 것을 의미한다. 따라서, 화학적으로 규정된 배지의 각 성분들은 정확하게 규정되어 있다.
- [0035] 본 발명은 추가로
- [0036] (a) 본 발명에 따른 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지를 제공하는 단계, 및
- [0037] (b) 상기 배지에서 세포를 증식시켜, 세포 배양물을 형성하는 단계
- [0038] 를 포함하는, 세포 배양 방법에 관한 것이다.
- [0039] 본 발명은 임의 유형의 세포로 제한되지 않는다. 세포 유형의 예로는 포유동물 세포, 곤충 세포, 조류 세포, 박테리아 세포, 및 효모 세포가 있다. 세포는 예를 들어 줄기 세포, 또는 재조합 유전자 발현을 위한 벡터로 형질변형된 재조합 세포, 또는 바이러스 생성물을 생산하기 위한 바이러스로 형질감염된 세포일 수 있다. 세포는 또한 예를 들어 재조합적으로 형질변형되지 않은 해당 단백질을 생산하는 세포, 예를 들어 항체를 생산하는 B-세포일 수 있으며, 이는 Epstein Barr 바이러스 감염과 같은 바이러스 감염에 의해 부동화 상태로 형질변형될 수 있다. 세포는 또한 예를 들어 1차 세포, 예를 들어 닭 배아 세포, 또는 1차 세포주일 수 있다. 시험관내 바이러스 생산을 위해 사용될 수 있는 세포가 유용하다. 유용한 세포의 구체적인 예로는 BSC 세포, LLC-MK 세포, CV-1 세포, COS 세포, 베로(Vero) 세포, MDBK 세포, MDCK 세포, CRFK 세포, RAF 세포, RK 세포, TCMK-1 세포, LLCPK 세포, PK15 세포, LLC-RK 세포, MDOK 세포, BHK-21 세포, CHO 세포, NS-1 세포, MRC-5 세포, WI-38 세포, BHK 세포, 293 세포, RK 세포, Per.C6 세포 및 닭 배아 세포가 있다.
- [0040] 본 발명에 따라 사용되는 세포는 예를 들어 배치-배양, 피드-배치-배양, 관류 배양 및 키모스탯(chemostat) 배양의 군으로부터 선택된 방법에 의해 배양될 수 있으며, 이들은 당분야에 일반적으로 공지되어 있다.
- [0041] 본 발명은 또한
- [0042] (a) 세포 배양물을 제공하는 단계;
- [0043] (b) 1종 이상의 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는 하나 이상의 핵산 서열을 상기 세포에 도입시키는 단계;
- [0044] (c) 상기 핵산 서열을 보유하는 세포를 선별하는 단계; 및
- [0045] (d) 폴리아민 0.5 mg/L 이상을 포함하는 배지 중에서 상기 세포에서 단백질을 발현시키는 단계
- [0046] 를 포함하는, 1종 이상의 단백질, 예를 들어 이중 또는 자가-조직 단백질, 또는 재조합 단백질을 발현시키는 방법에 관한 것이다.
- [0047] 본 발명의 한 실시양태에서, 단계 d)의 배지는 본 발명에 따른 올리고펩티드-무함유 배지이다. 본 발명의 추가의 실시양태에서, 단계 a)의 배양 세포는 본 발명에 따른 올리고펩티드-무함유 세포 배양 배지에서 성장하였다.

또다른 실시양태에서, 단계 a) 내지 d)는 본 발명에 따른 올리고핵티드-무함유 세포 배양 배지에서 수행한다.

- [0048] 1종 이상의 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산 서열은 벡터일 수 있다. 벡터는 바이러스에 의해 전달될 수 있거나, 플라스미드일 수 있다. 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 특정 유전자 또는 그의 생물학적으로 기능성인 부분일 수 있다. 한 실시양태에서, 단백질은 혈액 응고 인자, 예컨대 인자 VIII의 적어도 생물학적 활성 부분, 또는 적혈구의 생산 및 혈관신생과 관련된 단백질, 예컨대 에리트로포이에틴의 적어도 생물학적 활성 부분, 또는 모노클로날 항체이다.
- [0049] 한 실시양태에서, 핵산 서열은 응고 인자 VII, 응고 인자 VIII, 응고 인자 IX, vWF, ADAMTS13, 및 푸린의 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질을 코딩하는 서열을 포함한다.
- [0050] 본 발명의 한 실시양태에서, 핵산은 추가로 단백질의 조절된 발현에 적합한 기타 서열, 예컨대 프로모터 서열, 인핸서, TATA 박스, 전사 개시 부위, 폴리링커, 제한 부위, 폴리-A-서열, 단백질 가공 서열, 선별 마커 등을 포함하며, 이들은 당업자에게 일반적으로 공지되어 있다.
- [0051] 본 발명의 한 실시양태에서, 세포는 CHO 세포, 293 세포, 및 BHK 세포의 군으로부터 선택된다.
- [0052] 본 발명의 또다른 실시양태에 따라, 하기 세포주가 개별 생성물의 발현을 위한 재조합 벡터로 형질변형될 수 있다: 재조합 응고 인자, 예를 들어 인자 VII 및/또는 인자 VIII 및/또는 모노클로날 항체의 생산을 위한 CHO 세포, 재조합 에리트로포이에틴의 생산을 위한 BHK 세포, 인간 항체의 생산을 위한 엡스타인 바르 바이러스로 형질변형된 부동화 인간 B 세포. 유용한 세포/단백질 조합으로는 예를 들어, CHO 세포/응고 인자 VIII, CHO 세포/응고 인자 VII, CHO 세포/ADAMTS13, CHO 세포/푸린, 및 293 세포/응고 인자 IX가 있다.
- [0053] 본 발명의 추가의 실시양태에서, 본 발명의 배지에서 배양되지 않은 세포에 의한 단백질 발현에 비해 본 발명에 따른 배지에서 배양되는 1종 이상의 단백질의 발현이 증가한다. 또다른 실시양태에서, 상기 발현은 10% 이상 증가하고, 추가의 실시양태에 따라 50% 이상 증가한다.
- [0054] 본 발명은 또한
- [0055] (a) 세포 배양물을 제공하는 단계;
- [0056] (b) 세포를 1종 이상의 바이러스로 감염시키는 단계;
- [0057] (c) 바이러스-감염된 세포를 선별하는 단계; 및
- [0058] (d) 폴리아민 0.5 mg/L 이상을 포함하는 배지 중에서 상기 세포에서 1종 이상의 바이러스를 증식시키는 단계
- [0059] 를 포함하는, 1종 이상의 바이러스 또는 바이러스의 적어도 일부분의 생산 방법에 관한 것이다.
- [0060] 본 발명의 한 실시양태에서, 단계 d)의 배지는 본 발명에 따른 올리고핵티드-무함유 배지이다. 본 발명의 추가의 실시양태에서, 단계 a)의 배양 세포는 본 발명에 따른 올리고핵티드-무함유 세포 배양 배지에서 성장하였다. 또다른 실시양태에서, 단계 a) 내지 d)는 본 발명에 따른 올리고핵티드-무함유 세포 배양 배지에서 수행한다.
- [0061] 본 발명에 따른 방법에 사용되는 바이러스는 임의의 바이러스, 예를 들어 폭스바이러스(poxvirus), 예를 들어 우두 또는 약독화 우두 바이러스; 코로나바이러스(coronavirus), 예를 들어 SARS 바이러스; 오르토믹소바이러스(orthomyxovirus), 예를 들어 인플루엔자 A 또는 B 바이러스; 파라믹소바이러스(paramyxovirus); 레트로바이러스(retrovirus), 예를 들어 렌티(Lenti) 바이러스; 토가바이러스(togavirus), 예를 들어 로스강(Ross River) 바이러스; 플라비바이러스(flavivirus), 예를 들어 웨스트 나일(West Nile) 바이러스, 황열(Yellow Fever) 바이러스, 또는 FSME 바이러스 (즉, 진드기 매개 뇌염 바이러스); 엔테로바이러스(enterovirus), 예를 들어 간염 A 바이러스; 피코르나바이러스(picornavirus); 아레나바이러스(arenavirus); 헤르페스바이러스(herpesvirus); 또는 아데노바이러스(adenovirus)일 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 바이러스는 변형 우두 바이러스 안카라 (MVA)이다. 바이러스는 개별 백신의 제조를 위해 본 발명에 따라 증식될 수 있다.
- [0062] 바이러스는 야생형 바이러스, 약독화 바이러스, 유전자-재배열(reassortant) 바이러스 또는 재조합 바이러스, 또는 이들의 조합, 예를 들어 약독화 및 재조합 바이러스일 수 있다. 또한, 세포를 바이러스로 감염시키는데 사용되는 실제 비리온 대신에, 감염성 핵산 클론을 사용할 수 있다. 스플릿 비리온 또한 사용될 수 있다.
- [0063] 상기 바이러스 생산 방법은 바이러스, 바이러스 항원, 또는 바이러스-유사 입자를 포함하는 면역원성 조성물을 제조하기 위해 사용될 수 있다.
- [0064] 본 발명에 따른 바이러스 생산 방법에 사용되는 세포는 포유동물 세포, 곤충 세포, 조류 세포, 박테리아 세포,

및 효모 세포로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 바이러스 생산 방법에 사용되는 세포는 배로 세포 및 닭 배아 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0065] 바이러스 또는 바이러스의 일부를 생산하기 위한 세포와 바이러스의 유용한 조합은 예를 들어, 배로 세포/약독화 우두, 배로 세포/우두, 배로 세포/간염 A, 배로 세포/인플루엔자 바이러스, 배로 세포/웨스트 나일 바이러스, 배로 세포/SARS 바이러스, 배로 세포/황열 바이러스, 및 닭 배아 세포/FSME 바이러스이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 세포/바이러스 조합은 닭 배아 세포/변형 우두 바이러스 안카라 (MVA)이다.

[0066] 유용한 배양 방법으로는 배치-배양, 피드-배치-배양, 관류 배양 및 키모스탯-배양이 있다.

[0067] 본 발명은 이제 하기 실시예에서 추가로 설명될 것이나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0068] 실시예

[0069] 실시예 1: BAV-배지의 제조

[0070] 올리고펩티드-무함유 배지 (BAV-배지)는 무기 염, 아미노산, 비타민 및 기타 성분을 포함하는 기초 DMEM/HAM F12 (1:1) 배지 (라이프 테크놀로지스(Life technologies), 32500 파우더)를 이용하여 제조하였다. 또한, L-글루타민 (600 mg/L), 아스코르브산 (20 μ M), 에탄올 아민 (25 μ M), 신페로닉(Synperonic®) (SERVA) (0.25 g/L), 셀렌화나트륨 (50 nM)을 첨가하였다. 추가로, 상기 세포 배양 배지를 하기 필수 아미노산으로 보충하였다: L-아스파라긴. H_2O 20 mg/L, L-시스테인. $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 15 mg/L, L-시스틴. 2HCl 20 mg/L, L-프롤린 35 mg/L, L-트립토판 20 mg/L.

[0071] 실시예 2: 세포 계수의 측정

[0072] 현탁액 세포 또는 부동화 세포로부터의 세포 계수는 CASY® 세포 계수기를 이용하여 문헌 [Scharfe et al., Biotechnologie in LaborPraxis 10:1096 - 1103 (1988)]에 기재된 바와 같이 또는 시트르산 추출에 의해 측정하고, 핵을 형광 염색한 다음, 뉴클레오카운터(NucleoCounter®) (케모텍(Chemometec), DK)를 이용하여 계수하였다. 특이적 성장률 (μ)은 특정 시간 간격 (t)에 걸쳐 현탁액 세포의 키모스탯 배양물의 정적 상태의 세포 밀도 (X_t) 및/또는 희석률 (D)의 증가로부터 계산된다:

[0073]
$$\mu = D + \ln(X_t/X_0)/t$$

[0074] 실시예 3: FVIII 활성의 측정

[0075] 인자 VIII (FVIII)의 활성 (도 1 내지 5 참조)을 화학원성(chemogenic) 방법 (케모제닉(Chromogenic), 스웨덴)에 의해 측정하였다.

[0076] 실시예 4: 부피 생산율 (QP) 및 세포 특이적 생산율 (qp)의 계산

[0077] 부피 생산율 (QP)은 생산 시스템에서 생산된 활성 단위의 양/반응기 부피 ℓ /일 (U/L/d)로 계산한다.

[0078] 세포 특이적 생산율 (qp)은 생산된 단백질의 특이적 양 (U 또는 μg)/세포 개수/일로서 정의된다.

[0079] 실시예 5: 대규모 세포 배양 조건

[0080] 제조합 포유동물 세포 (예를 들어, 인자 VIII을 안정하게 발현하는 CHO-세포, 예컨대 GD8/6 세포)의 세포 배양물을 10 ℓ 생물반응기에서 키모스탯 배양물의 현탁액 중에서 성장시켰다. 37°C, 산소 포화도 20%, 및 pH 7.0 내지 7.1의 배양 조건을 일정하게 유지하였다. 상기 배양물을 BAV-배지의 일정한 공급물로 보충하였다.

[0081] 실시예 6: FVIII 발현에 대한 폴리아민 첨가의 효과

[0082] GD8/6 세포를 실시예 5에 기재된 바와 같이 BAV-배지의 연속 공급하에 11일 동안 10 ℓ 생물반응기에서 키모스탯 배양물 중에서 성장시킨 결과, 생산율이 100 U/L/d 미만으로 감소하였다. 푸트레신. 2HCl (2 mg/L)을 첨가함으로써, FVIII의 부피 발현이 800%만큼 증가하였다 (도 1 참조). 따라서, 푸트레신은 GD8/6 세포주의 세포 특이적 발현의 유도 인자임이 명백히 확인될 수 있다.

[0083] 실시예 7: FVIII 발현에 대한 폴리아민 및 Fe (II) 및 Cu (II) 첨가의 효과

[0084] GD8/6 세포를 실시예 5에 기재된 바와 같이 10 ℓ 생물반응기에서 키모스탯 배양물 중에서 성장시킨 결과, 낮은 세포 특이적 생산율 및 특이적 성장률을 나타내면서 평균 생산율이 271 U/L/D이었다. 푸트레신. 2HCl (2 mg/L)을 첨가함으로써, FVIII 발현이 870 U/L/D로 증가하였고, 이는 주로 증가된 세포 특이적 생산율에서 기인한 것

이다. 대두 가수분해물에 전형적으로 포함된 것과는 다른 농도로 Fe (II) 및 Cu (II)를 추가 보충한 결과, 특이적 성장률이 대략 0.60 d^{-1} 로 증가하였고, 1700 mU/10E06 세포/일이 넘는 세포 특이적 생산율의 증가가 달성될 수 있었다. 이들 조건하에, 2685 U/L/D가 넘는 부피 생산율에 도달하였다. 세포 밀도를 추가로 증가시킨 결과, 3000 U/L/D이 넘는 부피 생산율이 달성되었다. 유사한 발효 조건하에 대두 가수분해물을 포함하는 배지의 최대 부피 생산율은 2000 내지 2500 U/L/D이었으며, 이는 푸트레신 및 2종의 추가 금속 이온만을 포함하는 화학적으로 규정된 배지가 사전에 이 방법에서 조사된 임의의 대두 가수분해물을 포함하는 배지 구성에 비해 우수하다는 것을 나타낸다 (도 2 참조).

[0085] 실시예 8: 소규모 세포 배양 조건

[0086] 현탁액 배양에서 GD8/6 세포를 이용한 소규모 실험은 37°C 에서 배치 재공급 방식으로 pH 및 pO_2 의 조절 없이 200 ml 작업 부피의 테크 스피너(Techne Spinner) 플라스크에서 수행하였다. 배양물을 푸트레신.2HCl, 오르니틴.HCl, 스퍼민.4HCl, 또는 에탄올아민 또는 이들의 조합물 0 내지 18 mg/L (HCl이 없는 생원성 아민 0 내지 10 mg/L과 동가)이 추가로 보충된 상기 정의된 BAV-배지로 보충하였다 (도 3 내지 5 참조).

[0087] 실시예 9: FVIII 발현에 대한 여러 폴리아민 및 폴리아민 조합물의 첨가의 효과

[0088] 실시예 8에 기재된 BAV-배지를 이용한 배양물로부터의 GD8/6 세포를 원심분리하고, 200 ml 작업 부피의 테크 스피너 플라스크로 옮기고, 도 3, 4 및 5에 도시된 바와 같이 에탄올아민, 푸트레신, 오르니틴, 및/또는 스퍼민으로 보충된 규정된 배지와 함께 약 $1\text{--}2\text{E}06$ 세포/ml의 세포 밀도에서 인큐베이션하였다. 생원성 아민 경로에서 푸트레신의 전구체인 오르니틴은 농도-의존적인 방식으로 푸트레신을 부분적으로 대체할 수 있다. 푸트레신.2HCl을 포함하는 배지에 상이한 농도의 오르니틴을 첨가한 결과, 특이적 FVIII 생산율 및 성장률이 추가로 증가하였다 (도 3 참조). 그러나, 본 발명에 따른 폴리아민이 아닌 에탄올아민은 조사된 어떠한 농도에서도 푸트레신을 대체할 수 없었으며, 푸트레신을 포함하는 배지 중 에탄올아민 농도의 증가는 부피 생산율 또는 특이적 성장률을 유의하게 증가시키지 않았다 (도 5 참조). 유사한 조건하에 추가로 실험한 결과, 생원성 아민의 또다른 중간체인 스퍼민은 농도-의존적인 방식으로 푸트레신을 대체할 수 있었다 (도 4 참조).

[0089] 실시예 10: MVA 바이러스 생산에 대한 폴리아민 첨가의 효과

[0090] 닭 배아의 1차 세포 배양물을 3.6 mg/L 푸트레신.2HCl이 보충되거나 보충되지 않은 펩티드 무함유 배지 (FM-배지)를 사용하여 200 ml 작업 부피의 테크 스피너 플라스크에서 배양하였다.

[0091] FM 배지는 무기 염, 아미노산, 비타민 및 기타 성분을 포함하는 기초 M199 배지 (라이프 테크놀로지스, 31150 파우더)를 사용하여 제조하였다. 또한, NaHCO_3 (4.4 g/L), 겐타마이신. SO_4 (50 $\mu\text{g/L}$) 및 네오마이신. SO_4 (50 $\mu\text{g/L}$)을 첨가하였다.

[0092] 세포 배양물을 MVA 바이러스로 감염시키고, 상청액을 TCID50 검정으로 바이러스 역가에 대해 분석하였다. 푸트레신의 첨가에 의해, 평균 바이러스 역가 ($n =$ 각각 16개 샘플)가 대략 50% 증가될 수 있었다 (도 6 참조).

[0093] 실시예 11: MVA 바이러스 생산에 대한 여러 용량의 폴리아민 첨가의 효과

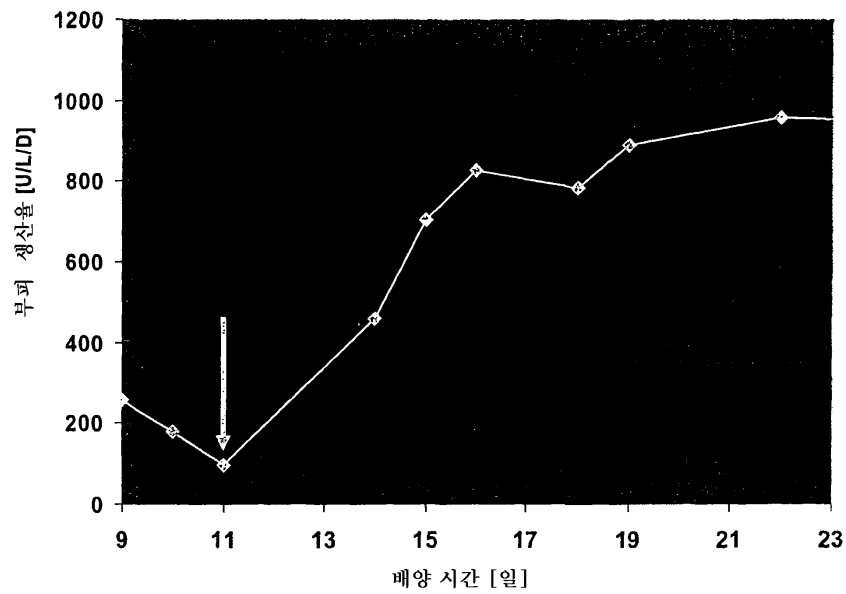
[0094] 닭 배아의 1차 세포 배양물을 3.6 및 9 mg/L 푸트레신.2HCl이 보충되거나 보충되지 않은 펩티드 무함유 배지 (CEM-배지)를 사용하여 200 ml 작업 부피의 테크 스피너 플라스크에서 배양하였다.

[0095] CEM 배지는 무기 염, 아미노산, 비타민 및 기타 성분을 포함하는 기초 DMEM/HAM F12 (1:1) 배지 (라이프 테크놀로지스, 32500 파우더)를 사용하여 제조하였다. 또한, NaHCO_3 (2 g/L) L-글루타민 (600 mg/L), 아스코르브산 (20 μM), 에탄올 아민 (25 μM), 신페로닉® (SERVA) (0.25 g/L), 셀렌화나트륨 (50 nM), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (600 $\mu\text{g/L}$), 겐타마이신. SO_4 (50 $\mu\text{g/L}$) 및 네오마이신. SO_4 (50 $\mu\text{g/L}$)을 첨가하였다. 추가로, 세포 배양 배지에 하기 필수 아미노산을 보충하였다: L-아스파라긴. H_2O 20 mg/L, L-시스테인.HCl. H_2O 15 mg/L, L-시스틴.2HCl 20 mg/L, L-프롤린 35 mg/L, L-트립토판 20 mg/L.

[0096] 세포 배양물을 MVA 바이러스로 감염시키고, 상청액을 TCID50 검정으로 바이러스 역가에 대해 분석하였다. 푸트레신 9 mg/L의 첨가에 의해, 평균 바이러스 역가 ($n =$ 각각 4개 샘플)가 대략 60% 증가될 수 있었다 (도 7 참조).

도면

도면1



도면2

	QP [U/L/D]	qp [mU/10E06 세포 / 일]	μ [d ⁻¹]
보충물 무함유 BAV -배지	271	236	0.37
BAV -배지 + 푸트레신 2HCl (2 mg/L)	870	671	0.41
BAV -배지 + 푸트레신 2HCl (2 mg/L) + Fe(II) 2.3 x 농도 첨가 + Cu (II) 2.0 x 농도 첨가	1393	958	0.59
BAV -배지 + 푸트레신 2HCl (2 mg/L) + Fe(II) 2.3 x 농도 첨가 + Cu (II) 12.5 x 농도 첨가	2685	1744	0.63
BAV -배지 + 푸트레신 2HCl (2 mg/L) + Fe(II) 2.3 x 농도 첨가 + Cu (II) 12.5 x 농도 첨가 증가된 세포 밀도	3107	1756	0.63

도면3

	절대적 qp [mU/10E06 세포 / 일]	상대적qp [%]	절대적μ [d-1]	상대적μ [%]
추가 의 생원성 아민 무함유 BAV 배지	172	100	0.19	100
푸트레신 2HCl (2 mg/L)	697	405	0.34	179
오르니틴 HCl (2 mg/L)	457	266	0.34	179
오르니틴 HCl (10 mg/L)	587	341	0.37	195
푸트레신 2HCl (2 mg/L) + 오르니틴 HCl (2 mg/L)	806	467	0.36	189
푸트레신 2HCl (2 mg/L) + 오르니틴 HCl (10 mg/L)	1050	610	0.39	205

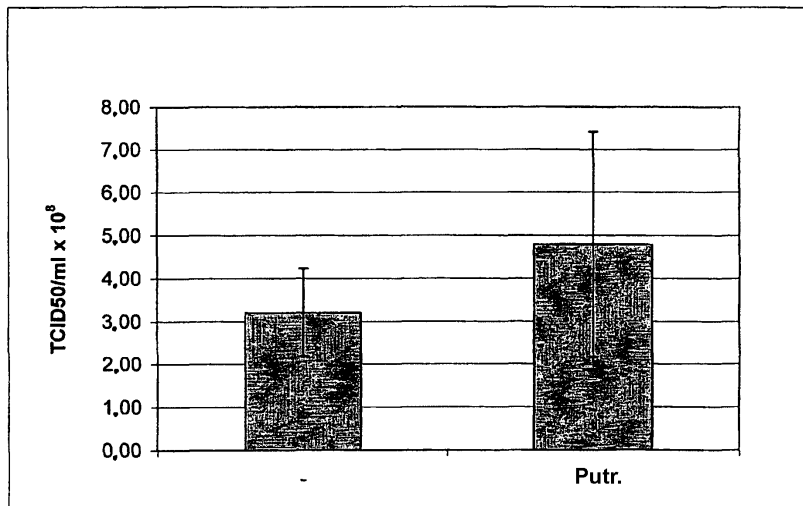
도면4

	절대적 qp [mU/10E06 세포 / 일]	상대적qp [%]	절대적μ [d-1]	상대적μ [%]
푸트레신 2HCl (2 mg/L)	2303	100	0.61	100
스퍼민 4HCl (0.4 mg/L)	1331	58	0.59	97
스퍼민 4HCl (2 mg/L)	2639	115	0.60	98
스퍼민 4HCl (10 mg/L)	2651	115	0.59	97

도면5

	절대적 qp [mU/10E06 세포 / 일]	상대적qp [%]	절대적μ [d-1]	상대적μ [%]
BAV 배지 표준 에탄올아민(1.53 mg/L) 표준 농도 = 음성 대조군	172	100	0.19	100
에탄올아민(3.83 mg/L 첨가)	188	109	0.23	118
에탄올아민(15.3 mg/L 첨가)	183	106	0.22	118
에탄올아민(3.83 mg/L 첨가)	171	100	0.23	125
푸트레신 2HCl (2 mg/L) + 에탄올아민(3.83 mg/L 첨가)	545	317	0.36	193
푸트레신 2HCl (2 mg/L) + 에탄올아민(15.3 mg/L 첨가)	609	354	0.32	173
푸트레신 2HCl (2 mg/L) + 에탄올아민(3.83 mg/L 첨가)	553	322	0.32	172

도면6



도면7

