



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0125352
(43) 공개일자 2016년10월31일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01) *A01N 1/02* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0037 (2013.01)
A01N 1/021 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7019241
- (22) 출원일자(국제) 2014년12월19일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2016년07월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/071388
- (87) 국제공개번호 WO 2015/095651
국제공개일자 2015년06월25일
- (30) 우선권주장
61/918,833 2013년12월20일 미국(US)

- (71) 출원인
이센셜 파마수티컬스 엘엘씨
미국 08628 뉴저지주 유잉 프린스턴 사우스 코포레이트 센터 100 퍼스트 플로어 스위트 140
- (72) 발명자
엘호피, 애덤
미국 08628 뉴저지주 유잉 프린스턴 사우스 코포레이트 센터 100 퍼스트 플로어 스위트 140
웨버, 앤런
- (74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 46 항

(54) 발명의 명칭 세포 배양용 배지

(57) 요 약

본 개시내용은, 일반적으로, 콜레스테롤, 포스파티딜콜린 및 지방산을 포함하는 리포좀 및 기본 생리 완충제를 포함하는 배지, 예를 들어, 혈청 대체물, 배지 보충물, 완전 배지 또는 동결보존 배지에 관한 것이다. 배지는 본 명세서에 기재된 혈청 대체물을 이용하지 않고 배양된 세포에 비해 배양 시 세포 성장을 개선시키는 이점을 제공하는 것이 상정된다.

(52) CPC특허분류

C12N 2500/10 (2013.01)

C12N 2500/24 (2013.01)

C12N 2500/32 (2013.01)

C12N 2500/35 (2013.01)

C12N 2500/38 (2013.01)

C12N 2500/46 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

현탁액 중에서 또는 부착 배양물 중에서 세포와 함께 사용하기 위한 배지로서,

기본 생리 완충제 액체 혼합물 및

(a) 콜레스테롤, 포스파티딜콜린 및 지방산을 포함하는 리포좀; 또는

(b) 펙틴; 또는

(a)와 (b)를 포함하되,

상기 리포좀은, 세포 현탁액 또는 부착 배양물 중의 콜레스테롤의 최종 농도가 1 내지 20mg/ℓ 가 되고, 그리고 세포 현탁액 또는 부착 배양물 중의 포스파티딜콜린의 최종 농도가 100 내지 1000mg/ℓ 가 되도록 하는 양인, 배지.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 리포좀은 리놀렌산, 리놀레산, 미리스트산 및 올레산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 지방산을 포함하는, 배지.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 리포좀은 에탄올아민 및 폴리솔베이트를 더 포함하는, 배지.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 현탁액 또는 부착 배양물 중의 펙틴의 최종 농도는 25 내지 500mg/ℓ 인, 배지.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기본 생리 완충제 액체 혼합물은 하나 이상의 유기염, 무기염, 완충제, 철 공급원 또는 철 수송체, 글리세롤, 아미노산, 비타민, 당, 항산화제 및 미량원소를 포함하는, 배지.

청구항 6

제5항에 있어서, 세포 현탁액 또는 부착 배양물 중의 글리세롤의 최종 농도는 2μl/ℓ 내지 0.5ml/ℓ 인, 배지.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 철 공급원 또는 철 수송체는 트랜스페린, 락토페린, 황산 제1철, 시트르산 제1철, 시트르산 제2철, 질산 제2철, 황산 제2철, 시트르산 제2철 암모늄, 옥살산 제2철 암모늄, 푸마르산 제2철 암모늄, 말산 제2철 암모늄 및 숙신산 제2철 암모늄으로 이루어진 군으로부터 선택된, 배지.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 배지는 글리신, L-알라닌, L-알기닌, L-아스파라긴, L-아스팔트산, L-시트룰린, L-시스테인 염산염, L-시스틴, L-글루탐산, L-글루타민, L-히스티딘, L-아이소류신, L-류신, L-라이신, L-메티오닌, L-오르니틴, L-페닐알라닌, L-프롤린, L-세린, L-트레오닌, L-트립토판, L-타이로신 및 L-발린으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산을 포함하는, 배지.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 배지는 인산칼륨, 염화칼슘(무수), 황산구리, 질산 제2철, 황산 제2철, 염화마그네슘(무수), 황산마그네슘(무수), 염화칼륨, 중탄산나트륨, 염화나트륨, 인산나트륨 2염기성 무수물, 인산나트륨 1염기성, 염화주석, 황산아연 및 중탄산나트륨으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 염을 포함하는, 배지.

청구항 10

제5항에 있어서, 상기 배지는 바이오틴, 염화콜린, D-칼슘 판토테네이트, 폴산, 나이아신아마이드, 피리독신 염산염, 비보플라빈, 티아민 염산염, 비타민 B12 및 i-이노시톨로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 비타민을 포함하는, 배지.

청구항 11

제5항에 있어서, 상기 배지는 셀레늄, 몰리브덴산염, 크롬, 코발트, 니켈, 아연, 구리, 망간, 바륨, 갈륨, 리튬, 주석, 티타늄, 브로뮴, 요오드, 바나듐, 게르마늄, 몰리브덴, 규소, 철, 플루오린, 은, 루비듐, 지르코늄, 카드뮴 및 알루미늄으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 미량 원소를 포함하는, 배지.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 미량 원소는 셀레늄이고, 세포 혼탁액 또는 부착 배양물 중의 셀레늄의 최종 농도는 0.005mg/ ℥ 내지 0.05mg/ ℥ 인, 배지.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배지는 혈청 대체물, 완전 배지, 배지 보충물 또는 동결보존 배지인, 배지.

청구항 14

리포좀 및 기본 생리 완충제 액체 혼합물을 포함하는 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물로서, 상기 리포좀은 포스파티딜콜린, 에탄올아민, 리놀렌산, 리놀레산, 콜레스테롤 및 폴리솔베이트를 포함하고, 상기 기본 액체 혼합물은 적어도 하나의 무기염, 적어도 하나의 당, 글리세롤 및 적어도 하나의 미량 원소를 포함하는, 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물.

청구항 15

제14항에 있어서, 적어도 하나의 비이온성 계면활성제 및 적어도 하나의 철 공급원을 더 포함하는, 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 리포좀은, 세포 혼탁액 또는 부착 배양물 중의 콜레스테롤의 최종 농도가 1 내지 20mg/ ℥ 이 되고, 그리고 세포 혼탁액 또는 부착 배양물 중의 포스파티딜콜린의 최종 농도가 100 내지 1000mg/ ℥ 가 되도록 하는 양인, 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기본 생리 완충제 액체 혼합물은 인산칼륨, 염화칼슘(무수), 황산구리, 질산 제2철, 황산 제2철, 염화마그네슘(무수), 황산마그네슘(무수), 염화칼륨, 중탄산나트륨, 염화나트륨, 인산나트륨 2염기성 무수물, 인산나트륨 1염기성, 황산아연 및 염화주석으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 염을 포함하는, 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물.

청구항 18

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 액체 혼합물은 염화나트륨, 염화칼륨, 인산나트륨 및 인산칼륨을 포함하는, 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물을 포함하는, 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물.

청구항 19

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 액체 혼합물은 셀레늄, 몰리브덴산염, 크롬, 코발트, 니켈, 아연, 구리, 망간, 바륨, 갈륨, 리튬, 주석 및 티타늄으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 미량 원소를 포함하는, 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 액체 혼합물은 셀레늄 및 몰리브덴산염을 포함하는, 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물.

청구항 21

제13항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 액체 혼합물은 트랜스페린, 락토페린, 황산 제1철, 시트르산 제1철, 질산 제2철, 황산 제2철, 시트르산 제2철, 시트르산 제2철 암모늄, 옥살산 제2철 암모늄, 푸마르산 제2철 암모늄, 말산 제2철 암모늄 및 숙신산 제2철 암모늄으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 철 공급원 또는 철 수송체를 포함하는, 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 철 공급원은 시트르산 제2철인, 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물.

청구항 23

제14항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 액체 혼합물은 플루로닉(Pluronic)-68, F68 파스틸(Pastille), 플루로닉-128, 솔비탄, 폴리솔베이트 및 블록 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 비이온성 계면활성제를 포함하는, 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 비이온성 계면활성제는 플루로닉-68인, 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물.

청구항 25

제14항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈청 대체물 중의 콜레스테롤의 최종 농도는 약 10 내지 200 mg/ l이고, 상기 혈청 대체물 중의 상기 포스파티딜콜린의 최종 농도는 약 1000mg 내지 10g/ l인, 혈청 대체물.

청구항 26

제14항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완전 배지 중의 콜레스테롤의 농도는 약 1 내지 20mg/ l이고, 상기 완전 배지 중의 상기 포스파티딜콜린의 상기 농도는 약 100mg 내지 1000mg/ l인, 완전 배지.

청구항 27

제14항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배지 보충물 중의 콜레스테롤의 농도는 약 100 내지 2000mg/ l이고, 상기 배지 보충물 중의 상기 포스파티딜콜린의 상기 농도는 약 10g 내지 100g/ l인, 배지 보충물.

청구항 28

제14항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 펙틴을 더 포함하는, 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리포좀은 나노입자인, 배지, 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 상기 나노입자는 평균 직경이 약 50nm 내지 약 500nm의 범위에 있는, 배지, 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 무 동물성분(animal-component free)인, 배지, 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물.

청구항 32

리포좀 및 기본 생리 완충제 액체 혼합물을 포함하는 세포 동결보존 배지로서, 상기 동결보존 배지 중의 콜레스테롤의 최종 농도는 약 10 내지 200mg/ℓ이고, 상기 동결보존 배지 중의 포스파티딜콜린의 최종 농도는 약 1000mg 내지 10g/ℓ인, 세포 동결보존 배지.

청구항 33

제32항에 있어서, 펙틴을 더 포함하는, 세포 동결보존 배지.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 세포 혼탁액 중의 펙틴의 최종 농도는 약 50mg/ℓ 내지 5g/ℓ인, 세포 동결보존 배지.

청구항 35

제32항 또는 제33항에 있어서, 글리세롤을 더 포함하는, 세포 동결보존 배지.

청구항 36

제35항에 있어서, 세포 혼탁액 중의 글리세롤의 최종 농도는 약 0.02 내지 5mℓ/ℓ인, 세포 동결보존 배지.

청구항 37

제32항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 다이메틸 실록사이드(DMSO)를 더 포함하되, 상기 DMSO는 4% 미만의 농도인, 세포 동결보존 배지.

청구항 38

제32항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배지는 폴리라이신을 더 포함하는, 세포 동결보존 배지.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항의 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물을 함유하는 배지에서 세포를 배양시키는 단계를 포함하는, 세포 배양 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 세포는 만능 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 골수 기질 세포, 조혈 전구 세포, 럼프 줄기 세포, 골수 줄기 세포, T 세포, B 세포, 대식세포, 간 세포, 췌장 세포, 암종 세포 및 세포주로 이루어진 군으로부터 선택된, 세포 배양 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 세포주는 CHO, CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, BHK, TM4, 베로(VERO), 헬라(HELA), MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, T 세포주, B 세포주, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U2OS, HT1080, L929, 혼성세포 및 암 세포주로 이루어진 군으로부터 선택된, 세포 배양 방법.

청구항 42

세포를 동결보존시키는 방법으로서, 제1항 내지 제41항 중 어느 한 항의 동결보존 배지에서 세포를 혼탁시키는 단계 및 상기 세포를 8°C 미만의 환경에 배치시키는 단계를 포함하는, 세포를 동결보존시키는 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 세포를 해동시키는 단계 및 해동된 상기 세포를 제1항 내지 제42항 중 어느 한 항의 배지에 배치시키는 단계를 더 포함하는, 세포를 동결보존시키는 방법.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 세포의 적어도 30%는 해동 시 생존한 채로 남아있는, 세포를 동결보존시키는 방법.

청구항 45

제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 만능 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 골수 기질 세포, 조혈 전구 세포, 램프 줄기 세포, 골수 줄기 세포, T 세포, B 세포, 대식세포, 간 세포, 혈장 세포, 암종 세포 및 세포주로 이루어진 군으로부터 선택된, 세포를 동결보존시키는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 세포주는 CHO, CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, BHK, TM4, 베로, 헬라, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, T 세포주, B 세포주, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U2OS, HT1080, L929, 혼성세포 및 암 세포주로 이루어진 군으로부터 선택된, 세포를 동결보존시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 출원은 2013년 12월 20일자로 출원된 미국 가출원 특허 제61/918,833호의 우선권 유익을 주장하며, 이 기초 출원은 본 명세서에 그의 전문이 참고로 포함되어 있다.

[0002]

본 발명의 기술분야

[0003]

본 발명은 일반적으로 무혈청 환경에서 세포를 배양하기 위해 열역학적으로 안정한 리포좀 및 액체 기본 혼합물을 포함하는 세포 배양 배지 조성물, 예를 들어, 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물에 관한 것이다. 리포좀은 콜레스테롤 및 포스파티딜콜린 및 지방산을 포함하는 것으로 상정된다. 또한 냉동 동안 세포를 보존하는데 사용하기 위해 리포좀을 포함하는 동결보존 배지가 상정된다.

배경 기술

[0004]

인간 또는 동물에 투여를 위한 시험관내 실험 또는 생체밖 배양을 위한 세포, 예를 들어 포유류 세포 또는 곤충 세포는 인간 질환의 연구 및 치료를 위한 중요한 도구이다. 세포 배양물은 다양한 생물학적으로 활성인 제품, 예컨대 바이러스 백신, 단클론성 항체, 폴리펩타이드 성장 인자, 호르몬, 효소 및 종양 특이적 항원의 생산을 위해 널리 사용된다. 그러나, 세포를 배양하기 위해 사용되는 다수의 배지 또는 방법은 미분화 세포 배양물의 세포 성장 및/또는 유지에 대해 부정적인 효과를 가질 수 있는 성분을 포함한다. 예를 들어, 포유류 또는 곤충 세포 배양 배지는 종종 성장인자, 운반 단백질, 부착 및 퍼짐 인자, 영양소 및 배양물에서 세포의 증식 및 성장을 촉진시키는 미량원소를 제공하기 위해 혈액 유래 혈청, 예컨대 송아지태아 혈청(FCS) 또는 소태아 혈청(FBS)으로 보충된다. 그러나, FCS 또는 FBS에서 발견되는 인자, 예컨대 형질전환성장인자(TGF) 베타 또는 레티노산은 특정 세포 유형의 분화를 촉진시킬 수 있거나(Ke et al., Am J Pathol. 137:833-43, 1990) 또는 배양물 내 원치 않는 세포 활성을 촉진시키는 세포에서 의도하지 않은 하류의 신호전달을 개시한다(Veldhoen et al., Nat Immunol. 7(11):1151-6, 2006).

[0005]

혈청 조성물 및 혈청의 로트-대-로트 변형의 특성규명되지 않은 특성은 바람직한 무혈청 배지에서 혈청 대체물 및 배양물을 사용하게 한다(Pei et al., Arch Androl. 49(5):331-42, 2003). 게다가, 세포 배양물 중에서 성장 시킨 치료 용도의 세포, 재조합 단백질 또는 백신에 대해, 동물 유래 성분의 첨가는 잠재적 바이러스 오염물질에 기인하고/하거나 인간에게 투여될 때 동물 단백질의 잠재적 면역원성 효과에 기인하여 바람직하지 않다.

[0006]

혈청 대체물은 세포 배양물에 대한 FCS의 효과를 최소화할 뿐만 아니라 인간 세포의 배양을 위해 사용되는 동물 단백질의 양을 최소화하기 위한 시도에서 개발되었다. 혈청이 없고 세포 성장을 위한 필수 영양소 및 다른 단백질을 함유하는 혈청 대체물, 예컨대 네아웃(KNOCKOUT)(상표명) 혈청 대체물(캘리포니아주 칼스베드에 소재한 인비드로젠(Invitrogen))을 화학적 한정 배양 배지로 칭한다. 네아웃 SR(상표명)은 이 제형에서의 부적합한 세포 부착을 초래하는 부착 인자의 결여에 기인하는 피더 세포(feeder cell)의 플레이팅에서 FBS에 대한 대체물로서 사용될 수 없다. PC-1(상표명) 무혈청 배지(메릴랜드주 워커스빌에 소재한 론자(Lonza))는 특별하게 변형된 DMEM/F12 배지 기저에서 제형화된 저단백질, 무혈청 배지이고, 공지된 양의 인슐린, 트랜스페린, 지방산 및 등록상표 단백질을 지니는 완전 HEPES 완충제 시스템을 함유한다.

[0007]

셀그로(Cellegro) 캠플리트(COMPLETE)(상표명)(버지니아주 매너서스에 소재한 셀그로)는 DMEM/F12, RPMI 1640 및 맥코이(McCoy) 5A 기본 배지의 혼합물에 기반한 무혈청, 저단백질 배양 배지이다. 셀그로 캠플리트(상표명)

는 인슐린, 트랜스페린, 콜레스테롤, 성장 또는 부착 인자를 함유하지 않지만, 미량원소와 고분자량 탄수화물, 추가 비타민, 비동물 단백질 공급원 및 소혈청 알부민을 포함한다.

[0008] 무혈청 배지는 또한 특허 공개 WO2009023194, WO2008137641, WO2006017370, WO2001011011, WO2007071389, WO2007016366, WO2006045064, WO2003064598, WO2001011011, 미국 특허 공개 제20050037492호, 미국 특허 공개 제20080113433호, 미국 특허 공개 제20080299540호, 미국 특허 제4,560,655호, 제5,324,666호, 제6,162,643호, 제6,103,529호, 제6,048,728호, 제7,709,229호 및 유럽 특허 출원 제2243827호에 기재되어 있다.

[0009] 미국 특허 제7,220,538호는 친유성 나노입자 및 기본 영양 배지를 포함하는 세포 배양 배지를 기재한다.

발명의 내용

[0010] 본 개시내용은 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물로서 사용될 수 있는, 콜레스테롤, 포스파티딜콜린 및 지방산을 포함하는 리포좀 및 기본 생리 완충제 액체 혼합물을 포함하는 배지를 제공한다. 배지는 세포 배양물에서 1차 세포 또는 세포주의 생존도, 성장 및 증식을 촉진시키는데 유용하되, 배지는 세포 유지 및 성장에 도움이 되는 지질 프로파일을 지니는 리포좀을 포함한다. 또한 리포좀을 포함하는 동결보존 배지가 상정된다.

[0011] 다양한 실시형태에서, 본 개시내용은 혼탁액 중에서 또는 부착 배양물 중에서 세포와 함께 사용하기 위한 배지를 제공하며, 상기 배지는 기본 생리 완충제 액체 혼합물 및 (a) 콜레스테롤, 포스파티딜콜린 및 지방산을 포함하는 리포좀; 또는 (b) 펩틴; 또는 (a) 및 (b)를 포함하되, 상기 리포좀은, 세포 혼탁액 또는 부착 배양물 중의 콜레스테롤의 최종 농도가 1 내지 20mg/ℓ가 되고, 세포 혼탁액 또는 부착 배양물 중의 포스파티딜콜린의 최종 농도가 100 내지 1000mg/ℓ가 되도록 하는 양이다.

[0012] 다양한 실시형태에서, 리포좀은 지질, 지방산, 스테롤 및/또는 유리 지방산을 포함한다. 예시적인 지방산은 리놀렌산, 리놀레산, 미리스트산, 올레산 미리스트올레산, 팔미트올레산, 사피엔산, 엘라딘산, 박센산, 리노엘라딘산, α-리놀렌산, 아라키돈산, 에이코사펜타엔산, 에루크산, 도코사헥사엔산, 카프릴산, 카프르산, 라우르산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키딘산, 베헨산, 리그노세르산 및 세로틴산을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 다양한 실시형태에서, 리포좀은 리놀렌산, 리놀레산, 미리스트산 및 올레산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 지방산을 포함한다.

[0013] 다양한 실시형태에서, 리포좀은 추가로 에탄올아민 및 폴리솔베이트를 포함한다. 다양한 실시형태에서, 리포좀은 항산화제를 포함한다.

[0014] 다양한 실시형태에서, 기본 생리 완충제 혼합물은 유기염, 무기염, 완충제, 철 공급원 또는 철 수송체, 글리세롤, 아미노산, 비타민, 당 및 미량원소 중 하나 이상을 포함한다. 선택적으로, 기본 생리 완충제 혼합물은 항산화제를 포함한다.

[0015] 다양한 실시형태에서, 철 공급원 또는 철 수송체는 트랜스페린, 락토페린, 황산 제1철, 시트르산 제1철, 시트르산 제2철, 질산 제2철, 황산 제2철, 시트르산 제2철 암모늄, 옥살산 제2철 암모늄, 푸마르산 제2철 암모늄, 말산 제2철 암모늄 및 숙신산 제2철 암모늄으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0016] 다양한 실시형태에서, 기본 생리 완충제 혼합물은 글리신, L-알라닌, L-알기닌, L-아스파라긴, L-아스팔트산, L-시트룰린, L-시스테인 염산염, L-시스틴, L-글루탐산, L-글루타민, L-히스티딘, L-아이소류신, L-류신, L-라이신, L-메티오닌, L-오르니틴, L-페닐알라닌, L-프롤린, L-세린, L-트레오닌, L-트립토판, L-타이로신 및 L-발린으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산을 포함한다.

[0017] 다양한 실시형태에서, 기본 생리 완충제 혼합물은 인산칼륨, 염화칼슘(무수), 황산구리, 질산 제2철, 황산 제2철, 염화마그네슘(무수), 황산마그네슘(무수), 염화칼륨, 중탄산나트륨, 염화나트륨, 인산나트륨 2염기성 무수물, 인산나트륨 1염기성, 염화주석, 황산아연 및 중탄산나트륨으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유기 또는 무기염을 포함한다.

[0018] 다양한 실시형태에서, 리포좀은 또는 기본 생리 완충제 혼합물은 하나 이상의 항산화제를 포함한다. 예시적인 항산화제는 토코페롤, 토코트라이엔올, 알파-토코페롤, 베타-토코페롤, 감마-토코페롤, 델타-토코페롤, 알파-토코트라이엔올, 베타-토코트라이엔올, 알파-토코페롤퀴논, 트롤록스(6-하이드록시-2,5,7,8-테트라메틸크로만-2-카복실산), 뷔틸화된 하이드록시아니솔(BHA), 뷔틸화된 하이드록시톨루엔(BHT), 플라보노이드, 아이소플라본, 라이코펜, 베타-카로텐, 셀레늄, 유비퀴논, 루에틴, S-아데노실메티오닌, 글루타티온, 타우린, N-아세틸시스테인, 시트르산, L-카르니틴, BHT, 모노티오글리세롤, 아스코르브산, 프로필 갈레이트, 메티오닌, 시스테인,

호모시스테인, 글루타티온, 시스타민 및 시스스타티오닌 및 글리신-글리신-히스티딘(트라이펩타이드)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0019] 다양한 실시형태에서, 기본 생리 완충제 액체 혼합물은 바이오틴, 염화콜린, D-칼슘 판토테네이트, 폴산, 나이아신아마이드, 피리독신 염산염, 비보플라빈, 티아민 염산염, 비타민 B12 및 i-아노시톨로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 비타민을 포함한다.

[0020] 다양한 실시형태에서, 기본 생리 완충제 액체 혼합물은 셀레늄, 몰리브덴산염, 크롬, 코발트, 니켈, 아연, 구리, 망간, 바륨, 칼륨, 리튬, 주석, 티타늄, 브로뮴, 요오드, 바나듐, 게르마늄, 몰리브덴, 규소, 철, 플루오린, 은, 루비듐, 지르코늄, 카드뮴 및 알루미늄으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 미량 원소를 포함한다. 다양한 실시형태에서, 액체 혼합물은 셀레늄 및 몰리브덴산염을 포함한다.

[0021] 다양한 실시형태에서, 배지는 혈청 대체물, 완전 배지, 배지 보충물 또는 동결보존 배지이다.

[0022] 다양한 실시형태에서, 세포 배양에서 사용하기 위한 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물은 리포좀 및 기본 생리 완충제 액체 혼합물을 포함한다. 선택적으로, 완전 배지 또는 배지 보충물은 펙틴을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물은 추가로 하나 이상의 유기 또는 무기염, 철 공여체를 포함하고, 선택적으로 펙틴, 글리세롤, 아미노산, 비타민, 당, 유기염, 무기염 및 미량 원소를 포함하는 기본 생리 완충제 액체 혼합물을 포함한다.

[0023] 다양한 실시형태에서, 개시내용은 또한 리포좀 및 기본 생리 완충제 액체 혼합물을 포함하는 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물을 제공하되, 리포좀은 포스파티딜콜린, 에탄올아민, 리놀렌산, 리놀레산, 콜레스테롤 및 폴리솔베이트를 포함하고, 기본 액체 혼합물은 적어도 1종의 유기 또는 무기염, 적어도 1종의 당, 글리세롤, 적어도 1종의 미량원소, 적어도 1종의 비이온성 계면활성제 및 적어도 1종의 철 공급원을 포함한다. 다양한 실시 형태에서, 리포좀은 또는 기본 액체 혼합물은 적어도 1종의 항산화제를 포함한다.

[0024] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물에 대해, 리포좀은, 세포 혼탁액 또는 부착 배양물 중의 콜레스테롤의 최종 농도가 1 내지 20mg/ℓ이고, 세포 혼탁액 또는 부착 배양물 중의 포스파티딜콜린의 최종 농도가 100 내지 1000mg/ℓ가 되도록 하는 양이다.

[0025] 다양한 실시형태에서, 리포좀은 리놀렌산, 리놀레산, 미리스트산 및 올레산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 지방산을 포함한다. 상정된 추가적인 지방산은 미리스트올레산, 팔미트올레산, 사피엔산, 엘라딘산, 박센산, 리노엘라딘산, α-리놀렌산, 아라키돈산, 에이코사펜타엔산, 에루크산, 도코사헥사엔산, 카프릴산, 카프로산, 라우르산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키딘산, 베헨산, 리그노세르산 및 세로틴산을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0026] 다양한 실시형태에서, 리포좀은 추가로 에탄올아민을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 리포좀은 추가로 폴리솔베이트를 포함한다. 폴리솔베이트는 폴리솔베이트 20, 폴리솔베이트 40, 폴리솔베이트 60 또는 폴리솔베이트 80일 수 있다는 것이 상정된다. 예시적인 폴리솔베이트는 트윈(TWEEN)(등록상표) 20 및 트윈(등록상표) 80을 포함한다.

[0027] 다양한 실시형태에서, 하나 이상의 유기 또는 무기염은 인산칼륨, 염화칼슘(무수), 황산구리, 질산 제2철, 황산 제2철, 염화마그네슘(무수), 황산마그네슘(무수), 염화칼륨, 중탄산나트륨, 염화나트륨, 인산나트륨 2염기성 무수물, 인산나트륨 1염기성, 염화주석, 황산아연 및 중탄산나트륨으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다양한 실시형태에서, 액체 혼합물은 염화나트륨, 염화칼륨, 인산나트륨 및 인산칼륨을 포함한다.

[0028] 다양한 실시형태에서, 배지는 추가로 철 공급원 또는 철 수송체를 포함한다. 다양한 실시형태에서, 철 공급원 또는 철 수송체는 트랜스페린, 락토페린, 황산 제1철, 시트르산 제1철, 시트르산 제2철, 질산 제2철, 황산 제2철, 시트르산 제2철 암모늄, 옥살산 제2철 암모늄, 푸마르산 제2철 암모늄, 말산 제2철 암모늄 및 숙신산 제2철 암모늄으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다양한 실시형태에서, 철 공급원은 시트르산 제2철이다. 다양한 실시형태에서, 철 수송체는 트랜스페린이다.

[0029] 다양한 실시형태에서, 혈청 대체물은 추가로 구리 공급원 또는 구리 수송체(예를 들어, GHK-Cu)를 포함한다. 예시적인 구리 공급원은 염화구리 및 황산구리를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0030] 다양한 실시형태에서, 액체 혼합물은 플루로닉(Pluronic)-68(F68 파스틸(Pastille)), 플루로닉-128, 솔비탄, 폴리솔베이트 및 블록 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 비이온성 계면활성제를 포함한다. 다

양한 실시형태에서, 비이온성 계면활성제는 플루로닉-68(F68 파스틸)이다.

[0031] 다양한 실시형태에서, 배지는 세포 배양물, 예를 들어, 세포 혼탁액 또는 부착 배양물 중의 글리세롤의 최종 농도가 리터 당 약 $2\mu\text{l}$ 내지 $0.5\text{m}\ell/\text{l}$ 가 되도록 제공된다.

[0032] 다양한 실시형태에서, 배지는 세포 배양물, 예를 들어, 세포 혼탁액 또는 부착 배양물 중의 펙틴의 최종 농도가 약 0.25 내지 $0.5\text{g}/\text{l}$, 또는 25 내지 $500\text{mg}/\text{l}$ 가 되도록 제공된다.

[0033] 다양한 실시형태에서, 배지는 세포 배양물, 예를 들어, 세포 혼탁액 또는 부착 배양물 중의 셀레늄의 최종 농도가 약 0.005 내지 $0.050\text{mg}/\text{l}$ 가 되도록 제공된다.

[0034] 다양한 실시형태에서, 또한 혈청 대체물이 상정되되, 혈청 대체물 중의 리포좀으로부터의 콜레스테롤의 최종 농도는 약 10 내지 $200\text{mg}/\text{l}$ 이고, 혈청 대체물 중의 리포좀으로부터의 포스파티딜콜린의 최종 농도는 약 50mg 내지 $1\text{g}/\text{l}$, 또는 약 1000mg 내지 $10\text{g}/\text{l}$ 이다.

[0035] 다양한 실시형태에서, 개시내용은 완전 배지를 제공하되, 완전 배지 중의 리포좀으로부터의 콜레스테롤의 농도는 약 1 내지 $20\text{mg}/\text{l}$ 이고, 완전 배지 중의 리포좀으로부터의 포스파티딜콜린의 농도는 약 100mg 내지 $1000\text{mg}/\text{l}$ 이다.

[0036] 다양한 실시형태에서, 개시내용은 배지 보충물을 제공하되, 배지 보충물 중의 리포좀으로부터의 콜레스테롤의 농도는 약 100 내지 $2000\text{mg}/\text{l}$ 이상이고, 배지 보충물 중의 리포좀으로부터의 포스파티딜콜린의 농도는 약 10g 내지 $100\text{g}/\text{l}$ 이다.

[0037] 다양한 실시형태에서, 개시내용은 동결보존 배지를 제공하며, 동결보존 배지 중의 리포좀으로부터의 콜레스테롤의 농도는 약 10 내지 $200\text{mg}/\text{l}$ 이고, 동결보존 배지 중의 리포좀으로부터의 포스파티딜콜린의 최종 농도는 약 1000mg 내지 $10\text{g}/\text{l}$ 이다.

[0038] 다양한 실시형태에서, 리포좀은 나노입자이다. 다양한 실시형태에서, 나노입자는 평균 직경이 약 50 내지 500nm , 약 100nm 내지 약 300nm 또는 약 100 내지 200nm 의 범위에 있다.

[0039] 본 명세서에서 리포좀은 열역학적으로 안정한 것으로 제공된다. 다양한 실시형태에서, 리포좀은 수용액 중에서 안정하다(예를 들어, 침전되지 않음). 다양한 실시형태에서, 리포좀은 37°C , 25°C , 4°C , 0°C 또는 -20°C 에서 적어도 7일, 10일, 14일, 21일, 30일, 2개월, 3개월, 6개월 또는 1년 이상의 기간 동안 수용액 중에서 안정하다. 예시적인 수용액은 물, 완충 식염수 및 다른 평형 염류 용액, 기저 세포 배양 배지 및 완전 세포 배양 배지를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0040] 또한 본 명세서에서 리포좀, 기본 생리 완충제 액체 혼합물, 및 선택적으로, 펙틴을 포함하는 세포 동결보존 배지가 제공된다.

[0041] 또한 본 명세서에서 기본 생리 완충제 액체 혼합물 및 펙틴을 포함하는 세포 동결보존 배지가 상정된다.

[0042] 다양한 실시형태에서, 동결보존 배지에서, 세포 혼탁액 중의 펙틴의 최종 농도는 약 0.25 내지 $5\text{g}/\text{l}$, 또는 250 내지 $5000\text{mg}/\text{l}$ 또는 약 $50\text{mg}/\text{l}$ 내지 $5\text{g}/\text{l}$ 이다.

[0043] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 동결보존 배지는 추가로 글리세롤을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 동결보존 배지를 이용할 때, 세포 혼탁액 중의 글리세롤은 약 0.2 내지 $5\text{m}\ell/\text{l}$ 의 최종 농도이다.

[0044] 다양한 실시형태에서, 동결보존 배지는 추가로 리포좀을 포함하되, 리포좀은 콜레스테롤, 포스파티딜콜린 및 지방산을 포함하고, 리포좀은 세포 혼탁액 중의 콜레스테롤의 최종 농도가 약 10 내지 $200\text{mg}/\text{l}$ 가 되고, 세포 혼탁액 중의 포스파티딜콜린의 최종 농도는 약 1 내지 $10\text{g}/\text{l}$ 인, 양이다.

[0045] 다양한 실시형태에서, 동결보존 배지는 추가로 다이메틸 셀록사이드(DMSO)를 포함하되, DMSO는 동결보존 배지 중의 농도가 4% 이하이다. 다양한 실시형태에서, DMSO의 농도는 4% , 3% , 2% , 1% 또는 0.5% 이다.

[0046] 다양한 실시형태에서, 동결보존 배지는 추가로 폴리라이신을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 폴리라이신은 변형된 폴리라이신이다. 다양한 실시형태에서, 폴리라이신은 앱실론-폴리-L-라이신이다. 특정 실시형태에서, 폴리라이신은 카복실화된 아미노기를 포함한다. 다양한 실시형태에서, 폴리라이신은 최종 농도가 약 10% , 9% , 8% , 7% , 6% , 5% , 4% , 3% , 2% , 1% 또는 0.5% 이다.

[0047] 다양한 실시형태에서, 혈청 대체물 또는 배지 보충물은 세포 배양 전에 기본 배지에 첨가된다. 표준 기본 배지는 당업계에 공지되어 있고, 상업적으로 입수가능하다. 이러한 배지의 예는 둘베코 변형 이글 배지(DMEM), DMEM

F12, 이스코브 변형 둘베코 배지, 함(Ham) 영양 혼합물 F-10(함 F-10) 또는 함 F-12, 로스웰 파크 기념 연구소 배지(Roswell Park Memorial Institute Medium: RPMI), MCDB 131, 클릭 배지, 맥코이 5A 배지, 배지 199, 윌리엄 배지 E, 및 곤충 배지, 예컨대 그레이스 배지 및 TNM-FH를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0048] 임의의 이들 배지는 선택적으로 염, 아미노산, 비타민, 완충제, 뉴클레오타이드, 항생제, 미량 원소, 및 글루코스 또는 동등한 에너지 공급원으로 보충된다. 다른 선택적 보충물은 또한 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배지 보충물은 당업계에 잘 공지되어 있고, 상업적으로 입수 가능하며, 상세한 설명에서 더 상세하게 기재된다.

[0049] 다양한 실시형태에서, 혈청 대체물 그 자체는, 혈청 대체물이 무혈청 완전 배지로서 제공되도록, 상기 기재한 바와 같은 기본 배지 및 보충물의 구성요소, 예를 들어, 염, 아미노산, 비타민, 완충제, 뉴클레오타이드, 항생제, 미량 원소, 항산화제, 및 글루코스 또는 동등한 에너지 공급원을 포함한다는 것이 추가로 상정된다.

[0050] 다양한 실시형태에서, 배지는 동물 성분이 없다.

[0051] 다양한 실시형태에서, 리포좀은 본 명세서에 기재된 기본 액체 혼합물과 함께 로딩된다. 추가로, 리포좀은 세포 배양에서 유리한 다른 조성물과 함께 로딩된다는 것이 상정된다. 세포 배양물에서 유리한 예시적인 조성물은 완충제, 철 수송체, 유리 지방산, 성장 웹타이드(예를 들어, 인슐린, gly-his-lys 삼량체를 포함하는 GHK 웹타이드), 아미노산(필수 및 비필수), 비타민, 미량 원소, 항산화제 및/또는 염을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0052] 다양한 실시형태에서, 개시내용은 본 명세서에 기재된 혈청 대체물 또는 배지 보충물을 함유하는 완전 배지 또는 배지에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는 세포의 배양 방법을 제공한다.

[0053] 다양한 실시형태에서, 세포는 포유류 세포 및 곤충 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다양한 실시형태에서, 세포는 포유류 대상체로부터 단리된다. 다양한 실시형태에서, 세포는 1차 배양물 또는 세포주이다. 다양한 실시형태에서, 세포는 만능 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 골수 기질 세포, 조혈 전구 세포, 럼프 줄기 세포, 골수 줄기 세포, T 세포, B 세포, 대식세포, 간 세포, 췌장 세포 및 세포주로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0054] 상정된 포유류 세포주는 CHO, CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, BHK, TM4, 베로(VERO), 헬라(HELA), MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, T 세포주(예를 들어, 주카트(Jurkat)), B 세포주(예를 들어, BJAB, EW36, CA46, ST486 및 MC116, 라지(Raji), 나말바(Namalva) 및 다우디(Daudi)), 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6(등록상표), SP2/0, NS-0, U2OS, HT1080, L929, 혼성세포, 암 세포주 및 당업계에 잘 공지된 다른 세포주를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 상정된 곤충 세포주는 Sf9, Sf21, 하이 파이브(HIGH FIVE)(상표명), EXPRESSF+(등록상표), S2, Tn5, TN-368, BmN, 슈나이더 2(Schneider 2), D2, C6/36 및 KC 세포를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0055] 다양한 실시형태에서, 개시내용은 본 명세서에 기재된 동결보존 배지에서 혼탁 세포를 포함하고, 선택적으로 패틴을 포함하거나, 또는 선택적으로 리포좀을 포함하는 세포를 동결보존시키는 단계, 및 8°C 미만의 환경에 세포를 배치시키는 단계의 방법을 상정한다. 예시적인 8°C 미만의 온도는 4°C, 0°C, -20°C, -70°C, -135°C 이하, 또는 액체 질소 중의(-196°C) 온도를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0056] 다양한 실시형태에서, 상기 방법은 세포를 해동시키는 단계 및 그들을 본 명세서에 기재한 바와 같은 배지에 위치시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0057] 다양한 실시형태에서, 적어도 30%의 냉동 세포는 혈청 대체물, 배지 보충물 또는 완전 배지로서 사용되든 아니든, 본 명세서에 기재된 배지에 위치될 때 해동 시 생존된 채로 남아있다. 다양한 실시형태에서, 해동 시 세포의 생존도는 약 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 이상이다.

[0058] 일 실시형태에서, 배지(혈청 대체물, 배지 보충물, 완전 배지 또는 동결보존 배지)는 10ml, 50ml, 100ml, 500ml 또는 1ℓ의 용적으로 패키징된다. 관련된 실시형태에서, 혈청 대체물, 배지 보충물 또는 동결보존 배지는 1X, 5X, 10X 또는 20X 용액 중에서 패키징된다.

[0059] 또한 본 명세서에 기재된 리포좀의 제조방법이 제공된다. 다양한 실시형태에서, 리포좀의 제조 방법은 목적으로 하는 양의 콜레스테롤을 비메탄을 또는 비클로로폼 용액 중에 용해시키는 단계를 포함한다. 다양한 실시형태에서, 콜레스테롤은 액체 인지질 용액 중에 용해된다. 다양한 실시형태에서, 콜레스테롤은 비메탄을 또는 비클로로폼 용액 중에서 실온에서 혼합되거나 또는 콜레스테롤이 용액일 때까지 비메탄을 또는 비클로로폼 용액에서

가열된다. 용액은 약 35°, 40°, 45°, 50°, 55° 또는 60°C 및 80°C 이하로 가열될 수 있다. 일단 용해되면, 다음의 조성물은 콜레스테롤 조성물에 첨가되고, 혼합된다: 폴리솔베이트, 에탄올아민 및 지방산. 최종 혼합물은 4°C, 0°C 또는 -20°C에서 저장된다. 선택적으로, 콜레스테롤 용액은 남아있는 화합물의 첨가 전에 혼합된다.

[0060] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 배지 조성물 또는 리포좀 조성물은 상이한 세트의 성분을 포함하는 배지 또는 리포좀에 비해, 세포의 개선된 배양, 예를 들어 증가된 세포 성장, 세포 생존도 또는 재조합 단백질의 증가된 발현을 촉진시키는 것이 상정된다. 세포의 개선된 배양을 촉진시키는 해당 배지 또는 리포좀 조성물은 추가 실험을 위해 사용된다는 것이 상정된다.

[0061] 본 명세서에 기재된 각각의 특징 또는 실시형태 또는 조합은 본 발명의 임의의 양상의 비제한적, 예시적 예이며, 본 명세서에 기재된 임의의 다른 특징 또는 실시형태 또는 조합과 조합될 수 있는 것을 의미하는 것으로 이해된다. 각각의 이들 유형의 실시형태는 모든 가능한 조합을 열거하는 일 없이 본 명세서에 기재된 임의의 다른 특징 또는 특징들의 조합과 조합될 것으로 의도되는 특징의 비제한적 예이다. 이러한 특징 또는 특징들의 조합은 본 발명의 임의의 양상에 적용한다. 범위 내에 속하는 값의 예가 개시되는 경우, 임의의 이들 예는 범위의 가능한 종점으로서 상정되고, 이러한 종점 사이의 모든 수치적 값이 상정되며, 상한과 하한의 임의의 그리고 모든 조합이 생각된다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 자극된 비장세포 상에서의 본 명세서에 기재한 혈청 대체물의 효과를 상업적으로 입수가능한, FDA 승인된 무혈청 배지에 비교하여 도시한 도면.

도 2A 및 도 2B는 자극된 비장세포의 성장에 대한 본 명세서에 기재된 혈청 대체물의 효과를 소태아 혈청을 포함하는 배지에서의 비장세포의 배양물과 비교하여 도시한 도면.

도 3A는 혈청 대체물 + 성장 인자가 배지 + FBS보다 더 큰 정도로 세포 증식을 유도한다는 것을 도시한 도면. 도 3B는 증식에서의 실험내 변산(intra-experimental variation)이, 세포가 혈청 대체물과 함께 배양될 때 FBS에 의해 감소된다는 것을 도시한 도면.

도 4A는 혈청 대체물 + 성장 인자에서의 세포 배양물이, 배지 + FBS에서 배양된 세포에 비해 3일 배양에 걸쳐 세포사 수준을 감소시킨다는 것을 도시한 도면. 도 4B는 세포가 혈청 대체물을 함유하는 배지와 함께 배양될 때 FBS를 포함하는 배지에 의해 세포자멸사의 실험내 변산이 감소된다는 것을 도시한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 본 개시내용은 기본 생리 완충제 액체 혼합물, 및 콜레스테롤, 포스파티딜콜린 및 지방산을 포함하는 리포좀을 포함하는 배지를 제공하며, 여기서 배지는 FBS가 세포 생리에 기여하는 비특이적 부작용 없이 소태아 혈청(FBS)에서의 성장과 비슷한 세포의 성장을 제공하기 위해 시험관내 세포의 배양물에서 사용하기 위한 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충 조성물일 수 있다. 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물 중의 리포좀이 세포에 대해 혈장막과 유사하게 환경을 제공하도록 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물은 지방산과 조합하여 생리적으로 적절한 농도에서 콜레스테롤 및 포스파티딜콜린을 포함하는 리포좀을 제공한다. 선택적으로, 완전 배지, 혈청 대체물 또는 배지 보충물은 팩틴을 포함한다. 또한 리포좀 및/또는 팩틴을 포함하는 동결보존 배지가 제공된다. 본 명세서의 배지(혈청 대체물, 완전 배지, 배지 보충물 또는 동결보존 배지) 조성물은 FBS를 함유하는 배지에서 또는 무혈청 배지에서 세포 배양물 이상으로 이점을 제공한다.

[0064] 본 명세서 및 첨부하는 청구범위에서 사용되는 바와 같은, 단수의 용어는 달리 명확하게 표시되지 않는 한, 단수뿐만 아니라 복수를 포함한다.

[0065] 용어 "약" 또는 "대략"은 당업자에 의해 결정된 바와 같은 특정 값에 대해 허용 가능한 오차를 의미하며, 이는 값이 측정 또는 결정되는 방법에 부분적으로 의존한다. 특정 실시형태에서, 용어 "약" 또는 "대략"은 1, 2, 3 또는 4 표준편차 이내를 의미한다. 특정 실시형태에서, 용어 "약" 또는 "대략"은 주어진 값 또는 범위의 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% 또는 0.05% 내를 의미한다.

[0066] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "배지" 또는 "세포 배양 배지"는 세포의 성장, 생존도 또는 저장을 제공하는 수계 용액을 지칭한다. 본 명세서에서 상정되는 바와 같은 배지는 목적으로 하는 세포의 활성, 예컨대 세포 생존도, 배지에서 배양된 세포의 성장, 증식, 분화를 촉진시키기 위해 상세한 설명에 기재하는 바와 같은 영양소로 보충될 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 배지는 혈청 대체물, 배지 보충물, 완전 배지 또는 동결보존

배지를 포함한다.

[0067]

본 명세서에 사용된 바와 같은 "혈청 대체물" 또는 "혈청 대체물 배지"는 배양물에서 세포 성장 및 생존을 촉진시키기 위해 기본 배지와 함께 또는 완전배지로서 사용될 수 있는 조성물을 지칭한다. 다양한 실시형태에서, 혈청 대체물은 시험관내 세포의 배양을 위해 배지에 특징적으로 첨가된 임의의 혈청의 대체물로서 기본 또는 완전 배지에서 사용된다. 혈청 대체물은 배양물에서 세포의 성장 및 생존을 위해 단백질 및 다른 인자를 포함하는 것으로 상정된다. 다양한 실시형태에서, 혈청 대체물은 세포 배양물에서 사용 전에 기본 배지에 첨가된다. 다양한 실시형태에서, 혈청 대체물이 세포 배양을 위해 무혈청 완전 배지로서 유용하도록, 혈청 대체물은 기본 배지 및 기본 영양소, 예컨대 염, 아미노산, 비타민, 미량 원소, 항산화제 등을 포함할 수 있다는 것이 추가로 상정된다.

[0068]

본 명세서에 사용된 바와 같은 "기본 배지(basal media)", "기본 배지(base media)", "기본 배지(base medium)" 또는 "기본 영양 배지"는 정상 세포 대사에 필수적인 특정 별크 무기 이온 및 물과 함께 세포를 제공하고 세포내 및 세포외 삼투압 균형을 유지하는 염 및 다른 구성요소의 수용액 또는 기본 염 영양소를 지칭한다. 다양한 실시형태에서, 기본 배지는 에너지 공급원으로서 적어도 하나의 탄수화물 및/또는 생리적 pH 범위 내에서 배지를 유지하기 위한 완충 시스템을 포함한다. 상업적으로 입수가능한 기본 배지의 예는 인산염 완충 식염수(PBS), 둘베코 변형 이글 배지(DMEM), 최소 필수 배지(MEM), 기본 배지 이글(Basal Medium Eagle: BME), RPMI 1640, 함(Ham)의 F-10, 함의 F-12, α-최소 필수 배지(α MEM), 글래스고(Glasgow)의 최소 필수 배지(G-MEM), 이스코브 변형 둘베코 배지, 또는 만능 세포와 함께 사용하기 위해 변형된 일반적 목적의 배지, 예컨대 X-VIVO (Lonza) 또는 조혈 기본 배지를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 기본 배지는 상세한 설명에서 더욱 상세하게 기재되는 바와 같은 영양소로 보충될 수 있다.

[0069]

본 명세서에 사용되는 바와 같은 "완전 배지"는 세포 성장에 기여할 수 있는 첨가된 보충물, 예컨대 성장인자, 호르몬, 단백질, 혈청 또는 혈청 대체물, 미량 원소, 당, 항생제, 항산화제 등을 추가로 포함하는 기본 배지를 지칭한다. 예를 들어, 상업적으로 입수가능한 완전 배지는 에탄올아민, 글루타티온(환원), 아스코르브산 인산염, 인슐린, 인간 트랜스페린, 지질-풍부 소 혈청 알부민, 미량염, 아셀렌산나트륨, 메타바니듐산암모늄, 황산구리 및 염화제일망간(DMEM 어드밴스드(DMEM ADVANCED)(상표명) 배지, 라이프 테크놀로지즈(Life Technologies))과 같은 보충물을 포함한다.

[0070]

본 명세서에서 사용한 바와 같은 "배지 보충물"은 세포의 배양 전에 기본 배지에 첨가된 제제 또는 조성물을 지칭한다. 배지 보충물은 배양물에서 세포 성장에 유리한 제제, 예컨대 성장 인자, 호르몬, 단백질, 혈청 또는 혈청 대체물, 미량 원소, 당, 항생제, 항산화제 등일 수 있다. 전형적으로 배지 보충물은 세포 배양을 위한 적절한 최종 농도에 도달하기 위해 완전 또는 기본 배지 내로 희석될 목적으로 하는 보충물의 농축 용액이다.

[0071]

본 명세서에 사용된 바와 같은 "동결보존 배지"는 4°C, 0°C, -20°C, -70°C, -135°C 이하의 온도 또는 액체 질소 (-196°C)를 포함하는, 8°C 이하의 온도에서 혼탁액 중에 세포를 저장 또는 냉동시키는데 유용한 배양 배지를 지칭한다.

[0072]

본 명세서에 사용된 바와 같은 "펙틴"은 분자량이 30,000 달톤(Da) 내지 250,000Da인 식물 세포벽으로부터 유래된 구조적 헤테로다당류를 지칭한다. 펙틴은 주로 α-1-4 연결된 갈락투론산 잔기로 구성된다. 특정 실시형태에서, 펙틴이 에스터화되고(예를 들어, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 이상의 에스터화를 가짐), 고- 또는 저-에스터-펙틴일 수 있다. 다양한 실시형태에서, 펙틴은 칼슘 민감성이다. 칼슘 민감성 펙틴은 칼슘과 상호작용하여 겔을 형성할 수 있는 반면, 비-칼슘 민감성 펙틴은 그렇지 않다. 펙틴은 사용된 펙틴의 유형에 따라서 pH 4.5 내지 6.9 범위의 산성 용액 또는 pH 7.5 내지 10 범위의 염기성 용액인 것이 상정된다. 선택적으로, 펙틴은 pH 범위 7.0 내지 7.4를 지니는 용액이다. 상이한 pH 수준에서 사용하기 위한 펙틴은 일반적 지식 및 당업계의 기술을 이용하여 결정될 수 있고, 목적으로 하는 pH 수준에서 사용한 펙틴은 펙틴의 에스터화 또는 칼슘 민감도 수준에 의해 영향받는다.

[0073]

펙틴은 상업적 공급원에 의해 보충되고, 펙틴을 갖는 임의의 식물, 예컨대 배, 사과, 구아바, 퀸스, 자두, 구스베리, 오렌지 및 기타 시트리스 과일, 체리, 포도 및 딸기로부터 유래될 수 있다. 다양한 정도의 에스터화(메틸화) 및 칼슘 민감도를 갖는 펙틴 조성물은 본 명세서에 참고로 포함되는 WO 2000008952에 기재되어 있다.

[0074]

본 명세서에서 사용한 바와 같은 "리포좀"은 내부 수성 공간을 둘러싸는 외부의 지질 이중층 또는 다중층막을 포함하는 폐쇄 구조를 지칭한다. 리포좀은 다중층 또는 단일층일 수 있다. 리포좀은 나노입자 크기에 대해 직경의 크기가 5 내지 10μm의 범위에 있는 것으로 상정된다. 특정 실시형태에서, 리포좀 나노입자는 직경이 약 50

내지 500nm, 약 100nm 내지 300nm 또는 약 100 내지 200nm이다.

[0075] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "액체 기본 혼합물" 또는 "기본 생리 완충제 액체 혼합물"은 세포 배양 배지 조성물을 완전하게 하기 위해 리포좀이 혼탁된 혈청 대체물 또는 배지 보충물의 기본 액체 용액을 지칭한다. 다양한 실시형태에서, 세포 배양물 내 세포에 의해 융합되고/취해질 때 리포좀이 세포에 액체 기본 혼합물의 양을 전달하도록 액체 기본 혼합물이 리포좀 내로 로딩된다는 것이 추가로 상정된다. 다양한 실시형태에서, 본 명세서에서 액체 기본 혼합물 또는 기본 생리 완충제 액체 혼합물은 혈청 대체물, 완전 배지, 배지 보충물 또는 동결보존 배지를 형성하기 위해 리포좀 및/또는 본 명세서의 다른 성분과 함께 사용될 수 있는 기본 배지, 완전 배지 또는 생리적 완충 용액, 예컨대 인산염 완충 식염수(PBS) 및 다른 평형 염류 용액이라는 것이 상정된다.

[0076] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "세포의 개선된 배양"은 본 명세서에 기재된 배지 조성물(혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물)을 이용하여 배양할 때 리포좀 또는 무혈청 배지를 포함하는 혈청 대체물을 이용하는 세포의 배양물에 비해 세포의 증가된 증식, 세포의 증가된 성장, 감소된 세포사 또는 세포의 증가된 단백질 생성(재조합 또는 내인성)을 지칭한다. 세포사의 증가된 증식, 증가된 성장 및 변화는 성장 곡선 분석, 자극 지수, 트리판 블루에 의한 혈미경 평가, 적정된 티미딘(³H) 증식 분석, MTT 분석, 레자주린 기반 분석 및 DNA 래더링(laddering) 분석을 포함하는 당업계에 잘 공지된 방법을 이용하여 측정된다. 세포의 증가된 단백질 생성(재조합 또는 내인성)은 총 단백질 또는 mRNA의 정량화 또는 관심대상의 특정 단백질 수준의 정량화를 포함하는 당업계에 공지된 기법을 이용하여 측정된다.

[0077] 본 명세서에서 사용한 바와 같은 "무 동물성분"(animal-component free)은 성분이 동물로부터 유래되지 않은 조성물을 지칭한다. 성분은 재조합적으로 생성되거나 또는 동물로부터 직접 단리되는 것 이외의 다른 공급원 또는 식물로부터 유래된다는 것이 상정된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 무 동물 성분은 동물계 세포주에서 배지 성분의 재조합 생성을 가능하게 한다.

배지 조성

[0079] 지질 성분 및 리포좀을 포함하는 세포 배양 배지는 세포 배양에서의 용도를 위해 이전에 기재되었지만, 성공은 제한적이었다. 예를 들어, 햄스(Hams) 등(Proc Natl Acad Sci USA 78:5588-92, 1981)은 상이한 지질 성분, 예를 들어 콜레스테롤, 레시틴 또는 정제된 포스파티딜콜린, 스팽고마이엘린 및 비타민 E를 포함하는 리포좀을 포함하는 배지에서 인간 섬유아세포를 배양시키는 것을 개시한다. 그러나, 햄스는 리포좀이 사용 24시간 이내에 제조될 필요가 있다는 점에서 안정하지 않다는 것을 기재하고, 완전 배지에서 리포좀을 단순히 이용하는 것이 세포 성장을 촉진시키지 않는다는 것을 나타낸다. 스펜스(Spens) 등(Biotechnol Prog 21:87-95, 2005)은 특히 콜레스테롤, 사이클로덱스트린, 포스파티딜콜린, 비타민 E, 시트르산 제2철, 플루로닉 및 아미노산을 추가로 포함하는 무단백질 배지에서의 NS0 골수종 세포의 배양을 기재한다. 스펜스(상기 참조)는 고수준의 지질이 용액 밖으로 침전된다는 것을 기재한다(citing Keen et al., Cytotechnology. 17(3):203-11, 1995).

[0080] 액체 수화 또는 다중층 소수포(지질의 일련의 동심 이중층을 가짐)를 제조하기 위한 용매 소구체 제조, 위생 시설, 프렌치 프레스, 용매 주사, 세정제 제거, 역상 증발, 칼슘 유도 융합, 미세유동화 또는 단일층 소수포(단일층의 지질을 가짐)를 제조하기 위한 냉동-해동 방법을 포함하는, 리포좀의 제조방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0081] 리포좀 제조는 미국 특허 제7,220,538호, 미국 특허 제6,217,899호; 미국 특허 공개 제20100021531호(리히텐베르크(Lichtenberg) 등, 발명의 명칭: Methods Biochem Anal. 33:337-462, 1988); 및 문헌[G. Gregoriadis: "Liposome Technology 리포좀 Preparation and Related Techniques," 2nd edition, Vol. I-III, CRC Press]에 기재되어 있다. 약제학적 용도를 위한 리포좀은 문헌[Mozafari, M., Liposomes, Methods and Protocols Vol. 1, Chapter 2, V. Wessing Ed. 2010, Humana Press)]에 개시되어 있다.

[0082] 다양한 실시형태에서, 개시내용은 혼탁액에서 또는 부착 배양물에서 세포와 함께 사용하기 위한 배지를 제공하며, 상기 배지는 기본 생리 완충제 액체 혼합물 및 (a) 콜레스테롤, 포스파티딜콜린 및 지방산을 포함하는 리포좀; 또는 (b) 펙틴; 또는 (a) 및 (b)를 포함하되, 상기 리포좀은, 세포 혼탁액 또는 부착 배양물 중의 콜레스테롤의 최종 농도가 1 내지 20mg/ℓ가 되고, 그리고 세포 혼탁액 또는 부착 배양물 중의 포스파티딜콜린의 최종 농도가 5 내지 100mg/ℓ가 되도록 하는 양이다.

[0083] 다양한 실시형태에서, 배지는 혈청 대체물, 배지 보충물 또는 완전 배지이다. 다양한 실시형태에서, 개시내용은 리포좀 및 기본 생리 완충제 액체 혼합물을 포함하고, 선택적으로 펙틴을 포함하는 세포 동결보존 배지를 제공하되, 상기 리포좀은 콜레스테롤, 포스파티딜콜린 및 지방산을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 리포좀은, 세포 혼탁액 중의 콜레스테롤의 최종 농도가 1 내지 20mg/ℓ가 되고, 그리고 세포 혼탁액 중의 포스파티딜콜린의 최

종 농도가 5 내지 100mg/ℓ 가 되도록 하는 양이다.

[0084] 다양한 실시형태에서, 개시내용은 기본 생리 완충제 액체 혼합물 및 팩틴을 포함하는 동결보존 배지를 제공한다.

[0085] 리포좀은 다중층 또는 단일층일 수 있다. 리포좀은 나노입자 크기에 대해 직경의 크기가 5 내지 10μm의 범위에 있는 것으로 상정된다. 일부 실시형태에서, 리포좀은 나노입자이다. 특정 실시형태에서, 나노입자는 평균 직경이 약 50 내지 500nm, 약 100nm 내지 300nm 또는 약 100 내지 200nm의 범위에 있다. 리포좀 크기는 동적 광산란법에 의해 입자 크기를 전체 입자의 평균 직경 값으로서 측정하는 제타시저(Zetasizer)(영국에 소재한 멜버른 인스트루먼츠(Malvern Instruments))의 사용을 포함하는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 측정될 수 있다.

[0086] 다양한 실시형태에서, 리포좀은 지질, 지방산, 스테롤 및/또는 유리 지방산을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 리포좀은 세포 성장을 위해 더 생리적으로 적절한 환경을 제공하는 농도로 콜레스테롤 및 포스파티딜콜린, 및 지방산을 포함한다. 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물 조성물 내 리포좀 성분의 예시적인 최종 농도를 표 1에 제시한다.

표 1

성분	배지 보충물	혈청 대체물	완전 배지
콜레스테롤	100 내지 2000mg/ℓ	10 내지 200mg/ℓ	1 내지 20mg/ℓ
포스파티딜콜린	10 내지 100g/ℓ	50mg/ℓ 내지 1g/ℓ ; 1000mg 내지 10g/ℓ	5 내지 100mg/ℓ ; 100 내지 1000mg/ℓ
지방산	5 내지 50mg/ℓ	0.5 내지 5mg/ℓ	0.05 내지 0.5mg/ℓ
에탄올아민	1 내지 5g/ℓ	0.5 내지 50mg/ℓ	5 내지 500mg/ℓ

[0088] 다양한 실시형태에서, 혈청 대체물 리포좀은 콜레스테롤을 최종 농도 약 10 내지 200mg/ℓ, 25 내지 175mg/ℓ, 50 내지 150mg/ℓ, 60 내지 120mg/ℓ, 20 내지 100mg/ℓ, 30 내지 90mg/ℓ, 40 내지 80mg/ℓ 또는 50 내지 70mg/ℓ로 포함한다. 다양한 실시형태에서, 혈청 대체물 리포좀은 콜레스테롤을 최종 농도 약 50mg/ℓ, 약 55mg/ℓ, 약 60mg/ℓ, 약 65mg/ℓ, 약 70mg/ℓ 또는 약 75mg/ℓ로 포함한다.

[0089] 다양한 실시형태에서, 혈청 대체물 중의 리포좀은, 세포 혈탁액 또는 부착 배양물 중의 콜레스테롤의 최종 농도가 1 내지 20mg/ℓ가 되고, 그리고 세포 혈탁액 또는 부착 배양물 중의 포스파티딜콜린의 최종 농도가 5 내지 100mg/ℓ 또는 100 내지 1000mg/ℓ가 되도록 하는 양이다.

[0090] 다양한 실시형태에서, 리포좀은 하나 이상의 지방산을 포함한다. 예시적인 지방산은 리놀렌산, 리놀레산, 미리스트산, 올레산, 미리스트올레산, 팔미트올레산, 사피엔산, 엘라딘산, 박센산, 리노엘라딘산, α-리놀렌산, 아라키돈산, 에이코사펜타엔산, 에루크산, 도코사헥사엔산, 카프릴산, 카프르산, 라우르산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키딘산, 베렌산, 리그노세르산 및 세로틴산을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 다양한 실시형태에서, 혈청 대체물 리포좀은 지방산을 최종 농도 약 0.5 내지 5mg/ℓ, 0.75 내지 4, 1 내지 3, 0.5 내지 3, 0.5 내지 2, 또는 1 내지 2mg/ℓ로 포함한다. 다양한 실시형태에서, 혈청 대체물 리포좀은 리놀레산 또는 리놀렌산을 최종 농도 약 0.5 내지 5mg/ℓ로 포함한다.

[0091] 다양한 실시형태에서, 혈청 대체물 리포좀은 에탄올아민을 최종 농도 약 0.5 내지 50mg/ℓ, 1 내지 50mg/ℓ, 2.5 내지 40mg/ℓ, 5 내지 35mg/ℓ, 10 내지 30mg/ℓ, 또는 15 내지 25mg/ℓ로 포함한다. 다양한 실시형태에서, 혈청 대체물 중의 에탄올 아민의 최종 농도는 약 1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50mg/ℓ이다.

[0092] 다양한 실시형태에서, 리포좀은 추가로 폴리솔베이트를 포함한다. 특정 실시형태에서, 폴리솔베이트는 폴리솔베이트 20, 폴리솔베이트 40, 폴리솔베이트 60 또는 폴리솔베이트 80이다. 예시적인 폴리솔베이트는 트윈(등록상표) 20 또는 트윈(등록상표) 80을 포함한다. 혈청 대체물 중의 폴리솔베이트의 최종 농도는 약 100 내지 1000μl/ℓ, 200 내지 800μl/ℓ 300 내지 700μl/ℓ 또는 400 내지 600μl/ℓ인 것이 상정된다. 다양한 실시형태에서, 혈청 대체물 중의 폴리솔베이트의 최종 농도는 약 500μl/ℓ이다.

[0093] 혈청 대체물 조성물에 대해 상기 기재한 최종 농도는 배지 보충물 또는 완전 배지 중 하나에서 성분의 농도를 계산하기 위한 기준으로서 사용될 수 있다. 배지 보충물 중의 각각의 성분의 최종 농도는 혈청 대체물 조성물에서 사용되는 것보다 10X 더 크다. 완전 배지에서 각각의 성분의 최종 농도는 혈청 대체물에서 사용되는 것보다

10X 더 작다. 예시적인 농도를 표 1 및 표 2에 제시한다.

[0094] 혈청 대체물은 5X 또는 10X 초과의 희석으로 사용된다는 것이 추가로 상정된다. 다양한 실시형태에서, 혈청 대체물은 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:250, 1:300, 1:400, 1:500, 1:600, 1:700, 1:800, 1:900 1:1000, 1:1500 또는 1:2000의 희석으로 사용된다.

[0095] 동결보존 배지에 대해, 성분의 시작 농도는 혈청 대체물 배지에 대해 사용한 것(즉, 완전 배지에서 사용된 것의 10X 농도)과 동일하다. 그러나, 성분의 최종 농도와 시작 농도가 거의 동일하도록 동결보존 배지는 희석이 없거나 또는 단지 최소의 희석을 지닌다. 예를 들어, 동결보존 배지에 대한 다양한 실시형태에서, 세포 혼탁액 중의 콜레스테롤의 최종 농도는 10 내지 200mg/ℓ이고, 세포 혼탁액 중의 포스파티딜콜린의 최종 농도는 50mg/ℓ 내지 1g/ℓ, 또는 1000mg 내지 10g/ℓ이다.

[0096] 본 명세서에 기재된 리포좀은 고농도의 콜레스테롤 및 포스파티딜콜린이 혈청 대체물 또는 배지 보충물에서 사용을 위한 리포좀에 존재함에도 불구하고, 그리고 완전한 세포 배양 배지 용액에서 사용될 때 수용액에 대한 장기간 노출을 고려하여, 수용액 중에서 열역학적으로 안정한 것으로 상정된다. 본 개시내용은 표 1에 제시된 성분의 최종 농도를 갖는 본 명세서에 기재된 리포좀이 수용액 중에서 안정하다(예를 들어, 침전되지 않음)는 것을 제공한다. 다양한 실시형태에서, 리포좀은 37°C, 25°C, 4°C, 0°C 또는 -20°C에서 적어도 7일, 10일, 14일, 21일, 30일, 2개월, 3개월, 6개월 또는 1년 이상의 기간 동안 수용액 중에서 안정하다. 예시적인 수용액은 물, 완충 식염수 및 기타 평형 염류 용액, 기저 세포 배양 배지 및 완전 세포 배양 배지를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 본 리포좀 조성물의 이점은 우수한 성장 상승 작용을 제공하는 생리적으로 적절한 수준의 스테롤 및 지방산을 함유하고 며칠 후에 용액 밖으로 침전되지(고수준의 제제, 예컨대 콜레스테롤 및 포스파티딜콜린을 포함하는 다른 배지에서 관찰됨) 않는다는 것이다(Spens et al., Keen et al., 상기 참조).

[0097] 배지의 액체 기본 혼합물 성분은 펙틴, 글리세롤, 셀레늄 및 철 공급원 중 하나 이상을 포함한다는 것이 상정된다. 선택적으로, 액체 기본 혼합물은 아미노산, 비타민, 당, 무기염, 항산화제 및 미량 원소를 추가로 포함한다. 상기 기재한 리포좀 복합체와 유사하게, 리포좀이 제조되는 액체 기본 혼합물은 혈청 대체물, 배지 보충물 또는 완전 배지에서 사용을 위해 상이한 농도로 제조될 수 있다. 예시적인 최종 농도는 표 2에 제시한다.

표 2

성분	배지 보충물	혈청 대체물	완전 배지
글리세롤	2 내지 100mℓ/ℓ	0.02 내지 5mℓ/ℓ	2μℓ 내지 0.5mℓ/ℓ
펩틴	2.5 내지 50g/ℓ	0.25 내지 5g/ℓ	25 내지 500mg/ℓ
셀레늄	0.5 내지 5mg/ℓ	0.05 내지 0.5mg/ℓ	0.005 내지 0.050mg/ℓ

[0099] 다양한 실시형태에서, 글리세롤은 혈청 대체물 중의 최종 농도가 약 0.02 내지 5mℓ/리터(ℓ), 또는 0.05 내지 4, 0.1 내지 3, 0.5 내지 2.5, 또는 1 내지 2mℓ/ℓ이다. 다양한 실시형태에서, 글리세롤은 혈청 대체물 중의 최종 농도가 약 0.02, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 또는 5mℓ/ℓ이다.

[0100] 다양한 실시형태에서, 펙틴은 혈청 대체물 중에서 최종 농도가 약 0.25 내지 5g/ℓ, 0.5 내지 4g/ℓ, 1.5 내지 3g/ℓ 또는 1 내지 2g/ℓ이다. 다양한 실시형태에서, 펙틴은 혈청 대체물 중의 최종 농도가 약 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 또는 5g/ℓ이다.

[0101] 예시적인 무기염은 인산칼륨, 염화칼슘(무수), 황산구리, 질산 제2철, 황산 제2철, 염화마그네슘(무수), 황산마그네슘(무수), 염화칼륨, 중탄산나트륨, 염화나트륨, 인산나트륨 2염기성 무수물, 인산나트륨 1염기성, 염화주석 및 황산아연을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 예시적인 유기염은 중탄산나트륨 또는 HEPES를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0102] 예시적인 당은 텍스트로스, 글루코스, 락토스, 갈락토스, 프럭토스 및 이들 당의 다량체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0103] 예시적인 항산화제는 토코페롤, 토코트라이엔올, 알파-토코페롤, 베타-토코페롤, 감마-토코페롤, 델타-토코페롤, 알파-토코트라이엔올, 베타-토코트라이엔올, 알파-토코페롤퀴논, 트롤록스(6-하이드록시-2,5,7,8-테트라메틸크로만-2-카복실산), 뷔틸화된 하이드록시아니솔(BHA), 뷔틸화된 하이드록시톨루엔(BHT), 플라보노이드, 아이소플라본, 라이코펜, 베타-카로텐, 셀레늄, 유비퀴논, 루에틴, S-아데노실메티오닌, 글루타티

온, 타우린, N-아세틸시스테인, 시트르산, L-카르니틴, BHT, 모노티오글리세롤, 아스코르브산, 프로필갈레이트, 메티오닌, 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온, 시스타민 및 시스스타티오닌, 및 글리신-글리신-히스티딘(트라이펩타이드)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0104] 예시적인 미량 원소는 구리, 철, 아연, 망간, 규소, 몰리브덴산염, 몰리브덴, 바나듐, 니켈, 주석, 알루미늄, 은, 바륨, 브로민, 카드뮴, 코발트, 크롬, 칼슘, 2가 양이온, 플루오린, 게르마늄, 요오드, 류비듐, 지르코늄, 또는 셀레늄을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 추가적인 미량 금속은 WO 2006/004728에 개시되어 있다.

[0105] 다양한 실시형태에서, 배지는 또는 액체 기본 혼합물은 철 공급원 또는 철 수송체를 포함한다. 예시적인 철 공급원은 제2철염 및 제1철염, 예컨대 황산 제1철, 시트르산 제1철, 시트르산 제2철, 질산 제2철, 황산 제2철, 제2철 암모늄 화합물, 예컨대 시트르산 제2철 암모늄, 옥살산 제2철 암모늄, 푸마르산 제2철 암모늄, 말산 제2철 암모늄 및 숙신산 제2철 암모늄을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 예시적인 철 수송체는 트랜스페린 및 락토페린을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0106] 다양한 실시형태에서, 배지가 무혈청 완전 배지로서 사용될 수 있도록, 배지 또는 액체 기본 혼합물 또는 리포좀은 기본 배지 및 상기 기재한 바와 같은 보충물 중 하나 이상의 구성요소, 예를 들어, 염, 아미노산, 비타민, 완충제, 뉴클레오타이드, 항생제, 미량 원소, 항산화제 및 글루코스 또는 동등한 에너지 공급원을 포함한다.

[0107] 다양한 실시형태에서, 배지 또는 액체 기본 혼합물은 구리 공급원 또는 구리 수송체(예를 들어, GHK-Cu)를 추가로 포함한다. 예시적인 구리 공급원은 염화구리 및 황산구리를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0108] 다양한 실시형태에서, 철 공급원 또는 구리 공급원은 약 0.05 내지 250ng/ml, 0.05 내지 100ng/ml, 약 0.05 내지 50ng/ml, 약 0.05 내지 10ng/ml, 약 0.1 내지 5ng/ml, 약 0.5 내지 2.5ng/ml, 또는 약 1 내지 5ng/ml 범위의 최종 농도로 혈청 대체물 배지에 첨가된다. 추가로 철 공급원 또는 구리 공급원은 혈청 대체물의 최종 농도가 약 0.05, 0.1, 0.25, 0.35, 0.45, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10ng/ml인 것이 상정된다.

[0109] 혈청 대체물 조성물의 배지 또는 액체 혼합물 중의 성분에 대해 상기 기재한 최종 농도는 배지 보충물 또는 완전 배지 중 하나에서 성분의 농도를 계산하기 위한 기준으로서 사용될 수 있다. 배지 보충물 중의 각각의 성분의 최종 농도는 혈청 대체물 조성물에서 사용되는 것보다 10X 더 크다. 완전 배지에서 각각의 성분의 최종 농도는 혈청 대체물에서 사용되는 것보다 10X 더 작다.

[0110] 동결보존 배지에 대해, 혈청 대체물에 대해 상정되는 시작 농도 범위는 동결보존 배지에 대해 상정된 것과 동일하다. 그러나, 성분의 최종 농도 및 시작 농도는 거의 동일하도록 동결보존 배지는 희석이 없이 또는 단지 최소의 희석에 의해 사용된다. 예를 들어, 동결보존 배지에 대한 다양한 실시형태에서, 세포 혼탁액 중의 펩틴의 최종 농도는 약 0.25 내지 5g/l, 0.5 내지 4g/l, 1.5 내지 3g/l 또는 1 내지 2g/l이다.

[0111] 다양한 실시형태에서, 리포좀은 세포 배양에 유리한 성분과 함께 로딩된다. 세포 배양에서 유리한 예시적인 조성물은 철 수송체, 유리 지방산, 성장 웹타이드(예를 들어, 인슐린, gly-his-lys 삼량체를 포함하는 GHK 웹타이드) 아미노산(필수 및 비필수), 비타민, 미량 원소 항산화제 및 염을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 다양한 실시형태에서, 리포좀은 추가적인 에탄올아민 및 유리 지방산과 함께 로딩된다는 것이 상정된다.

[0112] 다양한 실시형태에서, 혈청 대체물 또는 배지 보충물은 기본 배지에 첨가된다. 표준 기본 배지는 세포 배양 분야에 공지되어 있고, 상업적으로 입수가능하다. 기본 배지의 예는 둘베코 변형 이글 배지(DMEM), DMEM F12(1:1), 이스코브 변형 둘베코 배지, 함 영양 혼합물 F-10 또는 F-12, 로스웰 파크 기념 연구소 배지(RPMI), MCDB 131, 클릭 배지, 맥코이 5A 배지, 배지 199, 월리엄 배지 E, 및 곤충 배지, 예컨대 그레이스 배지 및 TNM-FH를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0113] 본 명세서에 기재된 혈청 대체물 및 배지 보충물은 또한 상업적으로 입수가능한 무혈청 배양 배지에서 사용을 위해 상정된다. 예시적인 무혈청 배지는 AIM-V(캘리포니아주 칼스베드에 소재한 라이프 테크놀로지즈), PER-C6(캘리포니아주 칼스베드에 소재한 라이프 테크놀로지즈), 네아웃(Knock-Out)(상표명)(라이프 테크놀로지즈), 스템프로(StemPro)(등록상표)(라이프 테크놀로지즈), 셀그로(CellGro)(등록상표)(버지니아주 매너서스에 소재한 코닝 라이프 사이언시즈(Corning Life Sciences) - 메디아테크 인코포레이티드(Mediatech Inc.))를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0114] 임의의 이들 배지는 선택적으로 염(예컨대, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 인산염), 아미노산, 비타민, 완충제(예컨대, HEPES), 뉴클레오타이드(예컨대, 아데노신 및 티미딘), 항생제(예컨대 젠타마이신 약물), 미량 원소

(보통 최종 농도에서 마이크로몰 범위로 존재하는 무기 화합물로서 정의함), 항산화제 및 글루코스 또는 동등한 에너지 공급원로 보충된다. 임의의 다른 필수적 보충물은 또한 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 보통의 당업자에게 명확할 것이다.

[0115] 배지 조성물은 제형으로 패키징된다는 것이 상정된다. 일 실시형태에서, 배지(혈청 대체물, 배지 보충물, 완전 배지 또는 동결보존 배지)는 10ml, 50ml, 100ml, 500ml 또는 1ℓ의 용적으로 패키징된다. 관련된 실시형태에서, 혈청 대체물, 배지 보충물 또는 동결보존 배지는 1X, 5X, 10X 또는 20X 용액으로 패키징된다.

[0116] 세포 배양

[0117] 본 명세서에 기재된 배지, 예를 들어, 혈청 대체물, 배지 보충물, 완전 배지 또는 동결보존 배지는 시험관내 세포의 배양에 대해, 바람직하게는 시험관내에서 적합한 성장을 위해 전형적으로 혈청 보충물 또는 한정 배지를 필요로 하는 세포에 대해 유용하다는 것이 상정된다. 이러한 세포는 진핵 세포, 예컨대 포유류 세포 및 곤충 세포를 포함한다. 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물의 사용으로부터 유익을 얻는 것으로 상정된 포유류 세포는 햄스터, 원숭이, 침팬지, 개, 고양이, 젖소/황소, 돼지, 마우스, 래트, 토끼, 양 및 인간 세포를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 곤충 세포는 스포돕테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*)(애벌레), 아에데스 아에기프티(*Aedes aegypti*)(모기), 아데스 알보픽투스(*Aedes albopictus*)(모기), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*)(과실파리) 및 봄빅스 모리(*Bombyx mori*)로부터 유래된 세포를 포함한다.

[0118] 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물과 함께 배양시키거나, 또는 동결보존 배지와 함께 냉동시킨 세포는 불멸 세포(세포주) 또는 비불멸(1차 또는 2차) 세포이고, 생체내에서 발견되는 임의의 매우 다양한 세포 유형일 수 있다는 것이 상정된다. 예시적인 세포 유형은 섬유아세포, 케라틴세포, 상피 세포, 난소 세포, 내피 세포, 신경교 세포, 신경 세포, 혈액의 형성된 구성요소(예를 들어, 림프구, 골수 세포), 연골세포 및 기타 뼈 유래 세포, 간세포, 췌장 세포, 및 이들 체세포 유형의 전구체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0119] 다양한 실시형태에서, 배지와 함께 사용하기 위해 상정되는 세포는 포유류 대상체로부터 단리된다. 포유류 대상체로부터 단리된 세포는 만능 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 골수 기질 세포, 조혈 전구 세포, 림프 줄기 세포, 골수 줄기 세포, 림프구, T 세포, B 세포, 대식세포, 내피 세포, 신경교 세포, 신경 세포, 연골세포 및 기타 뼈 유래 세포, 간세포, 췌장 세포, 체세포 유형의 전구체 및 임의의 암종 또는 종양 유래 세포를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0120] 다양한 실시형태에서, 세포는 세포주이다. 예시적인 세포주는 CHOK1, DXB-11, DG-44 및 CHO/-DHFR을 포함하는 중국 햄스터 난소 세포; 원숭이 신장 CV1, COS-7; 인간 배아 신장(HEK) 293; 새끼 햄스터 신장 세포(BHK); 마우스 세르톨리 세포(TM4); 아프리카 그린 원숭이 신장 세포(베로); 인간 자궁경부 암종 세포(헬라); 개 신장 세포(MDCK); 베팔로 래트 간 세포(BRL 3A); 인간 폐 세포(W138); 인간 간세포암 세포(Hep G2; SK-Hep); 마우스 유방 종양(MMT); TRI 세포; MRC 5 세포; FS4 세포; T 세포주(주카트(Jurkat)), B 세포주, 마우스 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6(등록상표), SP2/0, NS-0, U20S, HT1080, L929, 혼성세포, 종양 세포, 및 불멸 1차 세포를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0121] 예시적인 곤충 세포주는 Sf9, Sf21, 하이 파이브(상표명), EXPRESSF+(등록상표), S2, Tn5, TN-368, BmN, 슈나이더 2, D2, C6/36 및 KC 세포를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0122] 추가적인 세포 유형 및 세포주는 본 명세서에 참고로 포함된 WO 2006/004728에 개시되어 있다. 이들 세포는, CD34+ 조혈 세포 및 골수 계통의 세포, 293 배아 신장 세포, A-549, 주카트, 나말와(Namalwa), HeLa, 293BHK 세포, 헬라 자궁경부 상피 세포, PER-C6 망막 세포(PER.C6), MDBK(NBL-I) 세포, 911 세포, CRFK 세포, MDCK 세포, BeWo 세포, Chang 세포, 디트로이트(Detroit) 562 세포, 헬라 229 세포, 헬라 S3 세포, Hep-G2 세포, KB 세포, LS 180 세포, LS 174T 세포, NCI-H-548 세포, RPMI 2650 세포, SW- 13 세포, T24 세포, WI-28 VA1 3, 2RA 세포, WISH 세포, BS-C-I 세포, LLC-MK2 세포, 클론 M-3 세포, 1-10 세포, RAG 세포, TCMK-I 세포, Y-I 세포, LLC-PK1 세포, PK(15) 세포, GH1 세포, GH3 세포, L2 세포, LLC-RC 256 세포, MH1C1 세포, XC 세포, MDOK 세포, VSW 세포, TH-I, B1 세포, 또는 이들의 유도체, 임의의 조직 또는 기관으로부터의 섬유아세포(심장, 간, 신장, 결장, 장, 식도, 위, 신경 조직(뇌, 척수), 폐, 혈관 조직(동맥, 정맥, 모세혈관), 림프 조직(임파선, 아데노이드, 편도, 골수, 및 혈액), 비장, 섬유아세포 및 섬유아세포-유사 세포주), TRG-2 세포, IMR-33 세포, Don 세포, GHK-21 세포, 시트룰린혈증 세포, 덤프시(Dempsey) 세포, 디트로이트 551 세포, 디트로이트 510 세포, 디트로이트 525 세포, 디트로이트 529 세포, 디트로이트 532 세포, 디트로이트 539 세포, 디트로이트 548 세포, 디트로이트 573 세포, HEL 299 세포, MR-90 세포, MRC-5 세포, WI-38 세포, WI-26 세포, MiC11 세포,

CV-I 세포, COS-I 세포, COS-3 세포, COS-7 세포, 베로 세포, DBS-FrhL-2 세포, BALB/3T3 세포, F9 세포, SV-T2 세포, M-MSV- BALB/3T3 세포, K-BALB 세포, BLO-I1 세포, NOR-IO 세포, C3H/IOTI/2 세포, HSDM1C3 세포, KLN205 세포, McCoy 세포, 마우스 L 세포, 균주 2071 (마우스 L) 세포, L-M 균주(마우스 L) 세포, L-MTK (마우스 L) 세포, NCTC 클론 2472 및 2555, SCC-PSA1 세포, NSO, NS1, 스위스/3T3 세포, 문착 세포, SIRC 세포, Cn 세포, 엔센(Jensen) 세포, COS 세포 및 Sp2/0 세포, 모방 세포 및/또는 이들의 유도체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0123] 본 명세서에서 상정되는 세포 배양 조건은 세포가 성장하는데 적합한 임의의 기질에 적합화될 수 있다. 적합한 표면을 갖는 기질은 조직 배양 웰, 배양 플라스크, 롤러 보틀, 기체-투과성 용기, 편평 또는 평행 평면판 생물 반응기 또는 세포 공장을 포함한다. 또한 세포가 교반 탱크 용기에서 혼탁액 중에서 유지시킨 마이크로담체 또는 입자에 부착되는 배양 조건이 상정된다.

[0124] 세포 배양 방법은 일반적으로 문헌[Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 6th Edition, 2010 (R. I. Freshney ed., Wiley & Sons); General Techniques of Cell Culture (M. A. Harrison & I. F. Rae, Cambridge Univ. Press), 및 Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols (K. Turksen ed., Humana Press)]에 기재되어 있다. 다른 참고문헌은 문헌[Creating a High Performance Culture (Aroselli, Hu. Res. Dev. Pr. 1996) 및 Limits to Growth (D. H. Meadows et al., Universe Publ. 1974)]을 포함한다. 조직 배양 공급물 및 시약은 당업자에게 잘 공지되어 있고, 상업적으로 입수 가능하다.

[0125] 세포는 혈청 대체물, 완전 배지 또는 배지 보충물과 함께 사용되는 특정 세포주 또는 단리된 세포 유형에 대해 적절한 밀도로 배양물에 위치된다는 것이 이해된다. 특정 실시형태에서, 세포는 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 또는 5×10^6 개 세포/ml로 배양된다.

[0126] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 배지는 동결보존 배지로서 사용된다는 것이 상정된다. 동결보존은 세포의 장기간 저장을 가능하게 하고 4°C, 0°C, -20°C, -70°C, -135°C 이하, 또는 액체 질소 중의(-196°C) 온도를 포함하는 8°C 미만의 임의의 온도에 있을 수 있는, 8°C 미만의 환경에서의 세포 또는 조직의 저장을 지칭한다. 콜린염 및 수크로스를 함유하는 배지와 함께 세포를 동결보존하는 방법은 미국 특히 제5,985,538호에 개시되어 있다. 추가적인 동결보존 조성물 및 방법은 미국 특히 제7,935,478호 및 제7,112,576호에 개시되어 있다. 본 명세서에 기재된 동결보존 배지는 다음의 제제: 다이메틸 셀록사이드(DMSO), 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 당 (예컨대 수크로스, 엑스트로스, 트래할로스, 펙틴), 단백질, 탄수화물(예컨대 하이드록시 에틸 전분(HES)), 엑스트란 및/또는 폴리라이신 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다는 것이 상정된다. 다양한 실시형태에서, 동결보존 배지는 리포좀 및/또는 펙틴을 포함한다.

[0127] 다양한 실시형태에서, 적어도 30%의 세포는 본 명세서의 배지에 위치될 때, 혈청 대체물, 배지 보충물 또는 완전 배지로서 사용되든 아니든, 해동 시 생존된 채로 남아있다. 다양한 실시형태에서, 해동 시 세포의 생존도는 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 이상이다.

[0128] 동결보존 후에 생존도를 측정하는 추가적인 분석은 줄기 세포의 콜로니 형성 단위의 결정, 세포 배가 시간의 결정 및 증식, MTT 분석, 레자주린 분석 및 세포 생존도 및 성장을 측정하기 위해 당업계에서 사용되는 다른 분석을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0129] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 특정 배지 조성물 또는 리포좀 조성물은 세포의 개선된 배양, 예를 들어 상이한 세트의 성분을 포함하는 배지 또는 리포좀 조성물에 비해 증가된 세포 성장, 세포 생존도 또는 재조합 단백질의 증가된 발현을 촉진시키는 것으로 상정된다. 세포의 개선된 배양을 촉진시키는 해당 배지 또는 리포좀 조성물은 추가 실험을 위해 사용된다는 것이 상정된다.

[0130] 다양한 실시형태에서, 항산화제를 갖는 리포좀을 포함하는 혈청 대체물 배지는 배양에서 세포의 증가된 성장을 뒷받침하는 것으로 입증되었다. 이는 항산화제 비타민 E, 또는 알파 토코페롤이 배양물에서 세포 성장을 억제하는 것으로 나타난 이전의 연구와는 대조적이다.

키트

[0132] 본 개시내용은 추가로 본 명세서에 기재된 바와 같은 배지, 예를 들어, 혈청 대체물, 배지 보충물, 완전 배지 또는 동결보존 배지, 및 사용 설명서를 포함하는 키트를 제공한다. 다양한 실시형태에서, 배지는 혈청 대체물, 배지 보충물 또는 동결보존 배지이고, 키트는 기본 배지, 및/또는 완전 배지를 생성하는데 유용한 추가적인 인자를 제공한다. 다양한 실시형태에서, 배지는 시험관내, 생체내 또는 생체밖에서 사용하기 위한 조성물의 용도

를 기재하는 용기에 고정된 또는 패키지에 포함된 라벨을 지니는 용기에 패키징된다. 예시적인 용기는 그릇, 바이알, 관, 앰플, 보틀, 플라스크 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 추가로 용기는 배지, 예를 들어, 액체 또는 냉동 형태의 혈청 대체물, 배지 보충물 또는 동결보존 배지를 패키징하는데 적합하다는 것이 상정된다. 용기는 유리, 폴리프로필렌, 폴리스타이렌 및 기타 플라스틱을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 당업계에 잘 공지된 물질로 이루어진다는 것이 상정된다. 다양한 양태에서, 조성물은 제형으로 패키징된다. 키트는 선택적으로 혈청 대체물, 배지 보충물 또는 동결보존 배지를 기본 배지와 조합하는데 적합한 장치, 대안적으로 배지를 추가적인 성장 인자와 조합하는데 적합한 장치를 포함한다. 다양한 양상에서, 키트는 세포 배양 또는 동결보존을 위한 배지의 사용을 기재하는 라벨 및/또는 설명서를 포함한다.

[0133] 본 혈청 대체물의 추가적인 양상 및 상세한 설명은 다음의 실시예로부터 명확해질 것이며, 이는 제한이라기보다는 예시적인 것으로 의도된다.

실시예 1

예시적인 리포좀 혈청 대체물 조성물

[0136] 본 명세서에 상정된 예시적인 리포좀 및 혈청 대체물 배지의 제조방법을 이하에 기재한다. 혈청 대체물에서 유용한 성분을 표 3 및 표 4에 제시한다. 표에 열거한 성분은 제한하는 것으로 의미되지 않으며, 혈청 대체물 중의 리포좀 복합체의 효능을 입증하기 위한 것이다. 표 3은 리포좀 조성물의 예시적인 성분을 제시한다. 선택적으로, 리포좀 복합체는 트윈(등록상표)(예를 들어, 50 μ l / l)을 포함할 수 있다.

표 3

성분	농도(리터당)	예시적 공급업자	카탈로그 #
포살(PHOSAL)(등록상표) 53	250 μ l	리포이드(Lipoid)	368204
에탄올	750 μ l	콥테크(KOPTEC)	V1016
에탄올아민	5mg	시그마(Sigma)	398136
리놀렌산	0.1mg	시그마	L2376
리놀레산	0.5mg	시그마	L1012
콜레스테롤	50mg	시그마	C1231

[0138] 리포좀을 제조하기 위해, 700 μ l 에탄올을 1.5ml 마이크로원심분리관에 넣고, 250 μ l의 PHOSAL(등록상표) 53을 에탄올에 첨가하였다. 50mg의 콜레스테롤을 포살(등록상표) 혼합물에 첨가하고 나서, 콜레스테롤이 용해될 때까지, 50°C로 가열하였다. 혼합물을 용액이 맑은 호박색이 될 때까지(잠시 교반시키고, 지질 혼합물을 다시 가열하고, 용해될 때까지 반복함) 20 내지 30초 증가할 동안 10에서 교반시켰다(볼텍스 제니(VORTEX GENIE)(등록상표), 뉴욕주 보헤미아에 소재한 사이언티픽 인더스트리즈 인코포레이티드(Scientific Industries Inc.)). 선택적으로, 50 μ l의 트윈(등록상표) 20을 지질 혼합물에 첨가하고 나서, 교반시킨다. 에탄올아민을 혼합물에 첨가하고 나서, 교반시켰다. 이어서, 지방산, 예컨대 리놀레산 및 리놀렌산을 첨가하고 나서 교반에 의해 혼합하였다. 최종 액체 혼합물을 암실에서 4°C로 저장한다.

[0139] 혈청 대체물은 또한 상기 기재한 액체 혼합물과 조합될 기본 배지 액체 혼합물을 포함한다. 일 실시형태에서, 기본 배지 액체 혼합물은 다음의 성분을 포함한다: 퀘틴, 염화나트륨(NaCl), 텍스트로스, 염화칼륨(KCl), 인산나트륨(Na₂HPO₄), 인산칼륨(KH₂PO₄), 셀레늄, 몰리브덴산염, 시트르산 제2철, 글리세롤 및 플루로닉. 기본 액체 혼합물의 예시적인 실시형태를 표 4에 기재한다.

표 4

성분	농도 (리터당)	예시적 공급원	카탈로그#
액체 성분			
NaCl	8 g	시그마	S9888
KCl	0.2 g	시그마	P4504
Na ₂ HPO ₄	1.5 g	시그마	S0876
KH ₂ PO ₄	0.2 g	시그마	P5379
덱스트로스	5 g	시그마	G6138
펙틴	1 g	길코(Gillco) (듀퐁(DuPont))	413720
글리세롤	0.03 ml	시그마	G2025
셀레늄	50 ug	시그마	S5261
플루로닉 68	0.5 g	시그마	P1300
몰리브덴산염	10 ug	시그마	M1651
시트르산 제2철	2 mg	시그마	F3388

[0140]

[0141] 텍스트로스, 펙틴 및 NaCl을 분말로서 혼합하고, 600ml의 재증류수(ddH₂O)에 서서히 첨가하였다. 염화칼륨, 인산나트륨 및 인산칼륨 분말을 펙틴-NaCl 용액에 첨가하고 나서, 용해될 때까지 혼합하였다. 셀레늄, 몰리브덴산염 및 시트르산 제2철을 인산염 완충 식염수(PBS) 중에서 회색시키고, 용해될 때까지 혼합하였다. 글리세롤을 첨가하고 나서, 1N NaOH를 이용하여 용액의 pH를 7.2로 만들었다. 플루로닉을 용액에 첨가하고 나서, ddH₂O를 이용하여 용적을 1ℓ로 만들었다.

[0142]

지질과 액체 혼합물을 조합하기 위해, 이어서, 1ml의 지질 혼합물을 10ml의 혈청 대체물 기본 액체 중에서 혼합한다. 지질 혼합물을 낮은 결합 필터 기공 크기(예를 들어, 0.22 μM)를 통해 여과시킨다. 10ml의 기본 배지 혼합물을 멸균 100ml 용기에 넣는다. 지질 혼합물을 10ml의 기본 배지에 서서히 적가하는 한편, 10ml의 기본 배지를 교반시키고, 예를 들어, 교반을 이용하여 격렬하게 혼합한 다음, 보틀을 진탕시켰다. 선택적으로, 리포좀 혼합물을 균일한 크기의 나노리포좀을 생성하는 것을 돋는 마이크로플루이다이저에 통과시킨다. 더 큰 용적의 용액을 생성하기 위해, 기본 배지를 교반시켜 1 리터 용액에 도달되는 동안 10ml 리포좀 혼합물을 990ml 액체 혼합물 내로 서서히 점적한다.

실시예 2

리포좀 혈청 대체물은 세포 성장 및 생존을 촉진시킨다

[0145]

세포 성장 및 세포의 증식을 용이하게 하는 실시예 1에 기재한 혈청 대체물의 능력을 입증하기 위해, 마우스 또는 세포주로부터 단리한 1차 세포를 혈청 대체물을 포함하는 저장 배지에서 배양시켰다.

[0146]

비장세포를 앞서 기재한 바와 같은(McRae et al., J Exp Med. 182(1):75-85, 1995) 인산 지질 단백질(PLP) 139-151을 이용하여 앞서 면역화한 SJL 마우스로부터 단리시키고, DMEM + 10% 혈청 대체물 중의 세포 성장을 상업적으로 입수가능한 무혈청 배지 AIM-V(등록상표)(캘리포니아주 칼스베드에 소재한 인비트로젠)에서의 성장에 비교하였다. 5 x 10⁵개 세포를 200μl의 성장 배지 내 96웰 플레이트에 넣고, PLP139-151(0, 0.5, 5 또는 50μg/ml)를 이용하는 재자극에 반응한 비장세포 증식 수준을 3일 후에 측정하였다. 도 1은 DMEM + 10% 혈청 대체물에서 세포의 배양물이 무혈청 배지보다 상당히 더 큰 증식을 초래하였다는 것을 나타낸다. FBS를 함유하는 DMEM 또는 DMEM + 10% 혈청 대체물 중에서의 비장세포 성장을 또한 비교하였다. 도 2A는 DMEM + 10% FBS에서 배양시킨 세포가 자극되었든 자극되지 않았든 증식되어서, 낮은 자극 지수를 야기하는 한편, DMEM + 10% 혈청 대체물 중에서 배양시킨 비장세포의 수는 배가되었음을 나타낸다. 도 2B는 제2 증식 분석을 나타내며, 이때 비장세포를 DMEM + 10% FBS 또는 DMEM + 10% 혈청 대체물에서 배양시켰다. 도 2B는 DMEM/10% FBS에서 배양시킨 세포가 3 초

과의 자극 지수를 갖는 반면, DMEM/10% 혈청 대체물에서 배양시킨 세포는 3보다 약간 적은 자극 지수를 가졌다는 것을 나타낸다. 흥미롭게도, 도 2A 및 도 2B의 데이터는 DMEM/10% 혈청 대체물 중의 세포 배양물이 비자극 세포 집단에서 조차 비특이적 증식을 초래할 수 있는 DMEM/FBS 중의 세포 배양물에 대한 일관된 증식 결과를 제공한다는 것을 나타낸다. 본 명세서에 기재된 혈청 대체물은 세포 자극 특성을 가질 수 있고 내부 로트-대-로트 변이에 의 세포 자극을 야기할 수 있는 FBS 중의 배양에 비해 더 일관되고, 재생가능한 세포 배양 조건을 제공한다.

[0147] 1차 세포 배양에 추가로, 세포주의 성장에 대한 혈청 대체물의 효과를 결정하였다. 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 함의 (F12) 배지 단독에서 또는 10% 혈청 대체물을 함유하는 함의 배지에서 배양시켰고(96 웰 플레이트에서 5×10^5 개), 세포 성장 및 생존도를 측정하였다. 함의 배지에서 배양시킨 CHO 세포의 수는 4일에 배가된 반면, 함/10% 혈청 대체물에서 배양시킨 CHO 세포의 수는 4일에 대략 8배만큼 증가되었다. 배양 조건 중 하나에서 세포의 생존도는 4일에 대략 90%였다.

[0148] 또한 알파 토코페롤을 포함하는 리포좀을 포함하는 혈청 대체물 배지는 항산화제가 없는 리포좀을 갖는 혈청 대체물에 비해 세포 성장을 개선시킨다는 것을 입증하였다. 이는 알파 토코페롤이 배양물 내 세포 성장을 억제한다는 보고와 대조적이다. 예를 들어, 문헌[Sylvester et al., "Vitamin E inhibition of normal mammary epithelial cell growth is associated with a reduction in protein kinase C(alpha) activation" Cell Prolif. 34(6):347-57, 2001, 또는 Neuzil et al., "Vitamin E analogues as inducers of apoptosis: implications for their potential antineoplastic role" Redox Rep. 6(3):143-51, 2001] 참조.

[0149] 이를 결과는 본 명세서에 기재된 리포좀을 포함하는 혈청 대체물이 시험관내 세포주의 성장을 효과적으로 제공한다는 것을 입증한다.

실시예 3

리포좀 혈청 대체물은 혈청에 비해 세포사 및 실험내 변산도를 감소시킨다

[0152] 본 명세서에 기재된 혈청 대체물을 또한 단리된 CD4⁺ T 세포를 이용하는 배양 동안 세포사를 늦추거나 또는 감소시키는 그의 능력에 대해 시험하였다.

[0153] CD4⁺ T 세포를 자기 비드 단리 프로토콜(예를 들어, MACS(등록상표) 단리, 캘리포니아주 오번에 소재한 밀테니 바이오텍 인코포레이티드(Miltenyi Biotec Inc.) 또는 다이나비즈(DYNABEADS)(등록상표), 캘리포니아주 칼스베드에 소재한 라이프 테크놀로지즈 참조)을 이용하여 마우스의 비장으로부터 단리시켰다. DMEM + 10% 혈청 대체물 중의 세포 성장을 10% FBS를 포함하는 DMEM 중의 성장과 비교하였다. 혈청 대체물을 포함하는 배지를 FBS 중에서 발견되는 해당되는 추가적인 성장 인자를 보충하는 다양한 성장인자로 보충하였다(예를 들어, 미국 특허 공개 제20130130373호 참조). 5×10^5 개 CD4⁺ T 세포를 200 μ l 성장 배지 내 96웰 플레이트에 위치시키고, 항-CD3/항-CD28에 의한 자극에 반응한 T 세포 증식 수준을 3일에 걸쳐 WST-1 혼입을 통해 측정하였다(예를 들어, 문헌[Francoeur et al., Biochemica 3:19-25, 1996] 참조). WST-1 분석은 세포 증식을 측정하기 위해 가용성 포르마잔 염료에 대한 테트라졸륨 염 WST-1의 결단을 이용한다. 세포 수가 증가됨에 따라, 테트라졸륨 환원효소 수준은 상승되어서, WST-1의 검출가능한 염료로의 전환 증가를 초래한다. 염료의 정량화를 440nm에서의 흡광도에 의해 측정한다.

[0154] 도 3은 자극된 CD4⁺ T 세포가 배지 + FBS에서 배양시킨 세포에서 관찰된 증식보다 더 양호하게 또는 적어도 비슷하게 증식되었다는 것을 나타낸다. 실험내 변산을 계산할 수 있도록 8개의 복제 배양물을 각각의 자극 그룹에 대해 사용하였다. 변산을 증식에서 관찰한 표준 편차의 제곱으로서 결정하였다. 도 3B는 혈청 대체물 및 성장 인자에서 세포의 배양이 FBS에서의 배양에 비해 최소의 실험내 변산을 초래한다는 것을 나타낸다. 3일 배양 과정에 걸친 세포사를 또한 락트산 탈수소효소(lactate dehydrogenase: LDH) 세포자멸사 분석(예를 들어, 문헌[Wolterbeek, H.T., 및 van deer Meer, J.G.M., Assay Drug Dev Technol 3:675-682, 2005] 참조)에 의해 측정하였다. 분석은 세포막 파괴로부터 초래된 상청액 중의 LDH 수준을 측정한다. 일련의 반응을 통해, LDH는 490nm에 520nm 흡광도에 의해 정량화를 가능하게 하는 검출가능한 가용성 염료의 생성을 야기한다. 더 고수준의 LDH는 증가된 세포자멸사를 나타낸다. 도 4A는 배지 + 혈청 대체물 및 성장 인자에서의 배양이 FBS에 의한 배양에 비해 배양 동안 세포자멸사가 일어나는 수준을 감소시킨다는 것을 나타낸다. 도 4B는 이 실험에서 실험내 변산이 또한 FBS를 함유하는 배지와 함께 배양한 것과 비교하여 혈청 대체물에서 배양시킨 세포에서 최소였다는

것을 설명한다.

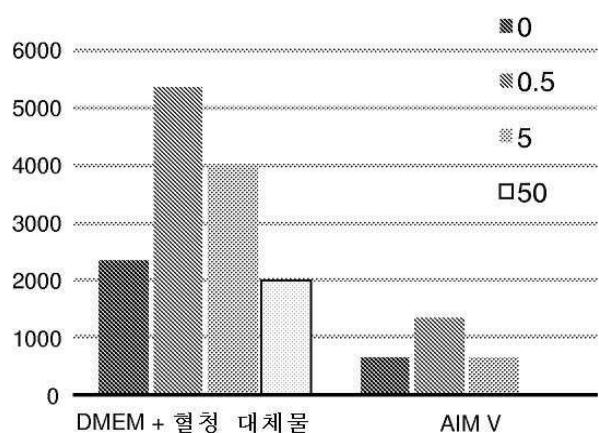
[0155] 이를 결과는 본 명세서에 기재한 혈청 대체물뿐만 아니라 리포좀을 포함하는 완전 배지 또는 배지 보충물이 FBS에서의 성장과 비슷하지만, FBS를 지니는 배양에서 보이는 단점, 예컨대 로트-대-로트 변산 및 실험내 변산이 없는 세포 배양 환경을 제공한다는 것을 나타낸다.

[0156] 상기 예시적 실시예에서 제시한 바와 같은 본 발명의 수많은 변형 및 변화는 당업자에게 일어날 것으로 예상된다. 그 결과, 첨부하는 청구범위에서 나타나는 바와 같은 이러한 제한만이 본 발명에 놓여야 한다.

도면

도면1

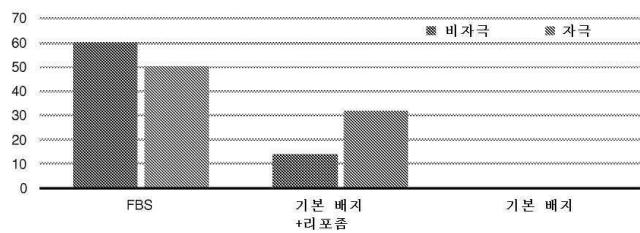
제자극 후의 비장세포 증식



도면2

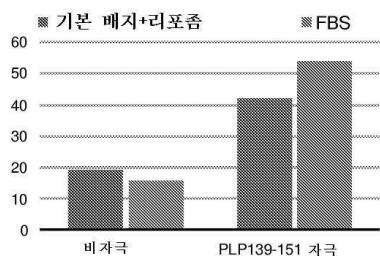
A

SJL 제자극 비장세포



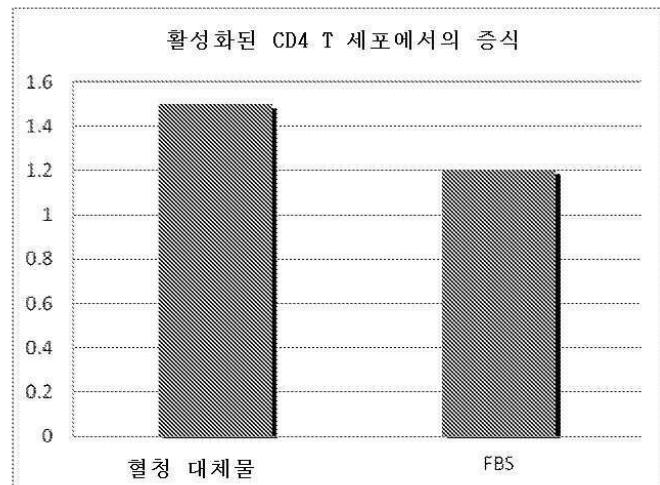
B

PLP 139151에 의해
제자극된 SJL 비장세포

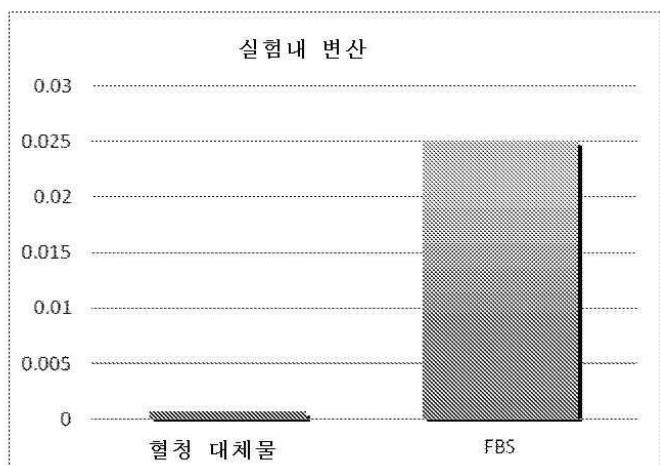


도면3

A

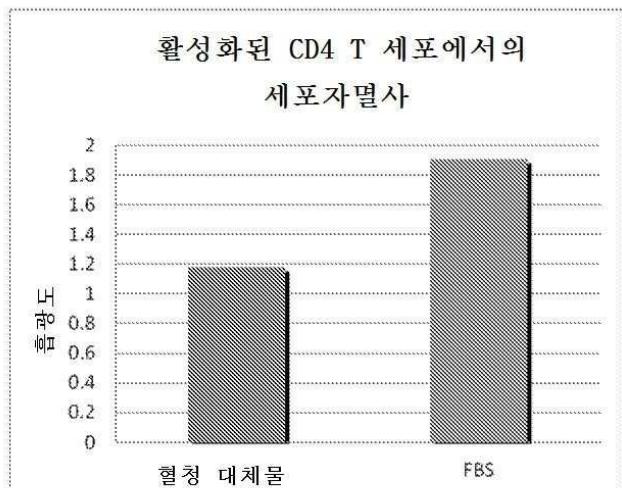


B



도면4

A



B

