



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0144463
(43) 공개일자 2024년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0018 (2013.01)
C07K 16/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7031354(분할)
(22) 출원일자(국제) 2016년08월03일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2018-7002832
원출원일자(국제) 2016년08월03일
심사청구일자 2021년07월12일
(85) 번역문제출일자 2024년09월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/045403
(87) 국제공개번호 WO 2017/024062
국제공개일자 2017년02월09일
(30) 우선권주장
62/200,689 2015년08월04일 미국(US)

(71) 출원인
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777
(72) 발명자
존슨 에이미 에스.
미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
케이시 메간 이.
미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
(74) 대리인
특허법인와이에스장

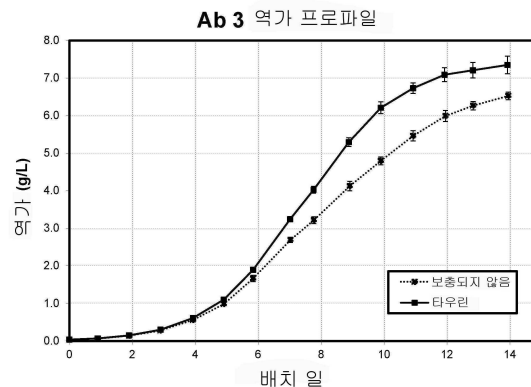
전체 청구항 수 : 총 75 항

(54) 발명의 명칭 타우린 보충된 세포 배양 배지 및 그 사용 방법

(57) 요약

본 명세서는 관심 단백질의 생산에 사용될 수 있는 개선된 진행세포 배양 배지를 포함하는 조성물을 기술한다. 관심 단백질의 생산을 증가시키기 위해 타우린이 무혈청 배지 또는 화학적으로 한정 배지에 첨가될 수 있다. 배지 조성물을 사용하여 높은 수준의 단백질을 재조합으로 발현시키는 방법이 포함된다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 15/85 (2013.01)

C07K 2317/52 (2013.01)

C12N 2500/33 (2013.01)

C12N 2500/46 (2013.01)

(72) 발명자

오쇼디 샤디아

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

로렌스 손

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

명세서

청구범위

청구항 1

개선된 재조합 단백질 생산을 위해 재조합 진핵 세포를 배양하는 방법으로서, (a) 성장기 동안 한정된 세포 배양 배지에서 세포를 증식시키거나 유지하는 단계, (b) 약 0.1 mM 내지 약 10 mM L-타우린으로 기본 세포 배양 배지를 보충하고 생산기 동안에 관심있는 재조합 단백질을 발현시키는 단계, 및 (c) 타우린의 첨가에 의해 관심있는 단백질의 역가를 증가시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제1 항에 있어서, (b)의 타우린 보충은 생산기 동안 적어도 1회 제공되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1 항에 있어서, (b)의 타우린 보충은 생산기 동안 적어도 2회 제공되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1 항에 있어서, (b)의 타우린 보충은 생산기 동안 적어도 3회 제공되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1 항에 있어서, (b)의 타우린 보충은 생산기 동안 적어도 4회 제공되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1 항에 있어서, (b)의 타우린 보충은 생산기 동안 적어도 5회 제공되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1 항에 있어서, (b)의 타우린 보충은 생산기 동안 매일 제공되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1 항 내지 제7 항 중 어느 한 항에 있어서, 성장기 동안 약 0.1 mM 내지 약 10 mM L-타우린으로 한정된 세포 배양 배지의 배양물을 보충하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1 항 내지 제8 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵세포는 포유류 세포, 조류 세포, 곤충 세포, 및 효모 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제9 항에 있어서, 세포는 CHO (예를 들어, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (예를 들어, COS-7), 망막세포, Vero, CV1, 신장 (예를 들어, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, 림프구 (예를 들어, Jurkat, Daudi), A431 (표피), CV-1, U937, 3T3, L 세포, C127 세포, SP2/0, NS-0, MMT 세포, PER.C6® 세포, 줄기 세포, 종양 세포, 및 상기 언급된 세포로부터 유래된 세포주로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제10 항에 있어서, 세포는 CHO 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제1 항 내지 제11 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심있는 단백질은 항원 결합 단백질인 것을 특징으로 하는

방법.

청구항 13

제1 항 내지 제12 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심있는 단백질은 Fc 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제12 항 또는 제13 항에 있어서, 관심있는 단백질은 Fc-융합 단백질, 수용체-Fc-융합 단백질 (TRAP), 항체, 항체 단편, 및 ScFv-Fc 융합 단백질로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제14 항에 있어서, 관심있는 단백질은 항-PD1 항체, 항-PDL-1 항체, 항-DII4 항체, 항-ANG2 항체, 항-AngPt13 항체, 항-PDGFR 항체, 항-Erb3 항체, 항-PRLR 항체, 항-TNF 항체, 항-EGFR 항체, 항-PCSK9 항체, 항-GDF8 항체, 항-GCGR 항체, 항-VEGF 항체, 항-IL1R 항체, 항-IL4R 항체, 항-IL6R 항체, 항-IL1 항체, 항-IL2 항체, 항-IL3 항체, 항-IL4 항체, 항-IL5 항체, 항-IL6 항체, 항-IL7 항체, 항-RSV 항체, 항-NGF 항체, 항-CD3 항체, 항-CD20 항체, 항-CD19 항체, 항-CD28 항체, 항-CD48 항체, 항-CD3/항-CD20 이중특이적 항체, 항-CD3/항-MUC16 이중특이적 항체, 및 항-CD3/항-PSMA 이중특이적 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제14 항에 있어서, 관심있는 단백질은 알리로큐맵, 사릴루맵, 파시누맵, 네스바큐맵, 듀필루맵, 트레보그루맵, 에비나큐맵, 및 리뉴큐맵으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

관심있는 재조합 단백질을 생산하는 방법으로서

(a) 관심있는 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 세포 또는 세포들로 도입하는 단계; (b) 관심있는 단백질을 발현하는 세포(들)를 선택하는 단계; (c) 약 0.1 mM 내지 약 10 mM L-타우린을 포함하는 세포 배양 배지에서 선택된 세포(들)를 배양하는 단계; 및 (d) 세포에서 배지로 분비되는 관심있는 단백질을 생산하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 18

제17 항에 있어서, 관심있는 단백질의 역가는 배지에 타우린의 첨가에 의해 증가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제17 항 또는 제18 항에 있어서, 단계 (c)의 세포(들)는 관심있는 단백질의 고수율 생산을 가능하게 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제17 항 내지 제19 항 중 어느 한 항에 있어서, 세포(들)는 0.1 mM 미만의 L-타우린을 함유하는 세포 배양 배지에서 관심있는 단백질을 발현하는 세포와 비교하여 적어도 3% 더 높은 단백질 수율을 가능하게 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제17 항 내지 제20 항 중 어느 한 항에 있어서, 세포(들)는 0.1 mM 미만의 L-타우린을 함유하는 세포 배양 배지에서 관심있는 단백질을 발현하는 세포와 비교하여 적어도 8% 더 높은 단백질 수율을 가능하게 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제17 항 내지 제21 항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 CHO 세포, HEK293 세포 또는 BHK 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제17 항 내지 제22 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심있는 단백질은 항원-결합 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제17 항 내지 제22 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심있는 단백질은 Fc 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제17 항 내지 제24 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심있는 단백질은 Fc-융합 단백질, 수용체-Fc-융합 단백질 (TRAP), 항체, 및 항체 단편으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제25 항에 있어서, 관심있는 단백질은 항-PD1 항체, 항-PDL-1 항체, 항-DII4 항체, 항-ANG2 항체, 항-AngPt 13 항체, 항-PDGFR 항체, 항-Erb3 항체, 항-PRLR 항체, 항-TNF 항체, 항-EGFR 항체, 항-PCSK9 항체, 항-GDF8 항체, 항-GCGR 항체, 항-VEGF 항체, 항-IL1 R 항체, 항-IL4R 항체, 항-IL6R 항체, 항-IL1 항체, 항-IL2 항체, 항-IL3 항체, 항-IL4 항체, 항-IL5 항체, 항-IL6 항체, 항-IL7 항체, 항-RSV 항체, 항-NGF 항체, 항-CD3 항체, 항-CD20 항체, 항-CD19 항체, 항-CD28 항체, 항-CD48 항체, 항-CD3/항-CD20 이중특이적 항체, 항-CD3/항-MUC16 이중특이적 항체, 및 항-CD3/항-PSMA 이중특이적 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제25 항에 있어서, 관심있는 단백질은 알리로큐맵, 사릴루맵, 파시누맵, 네스바큐맵, 듀필루맵, 트레보그루맵, 에비나큐맵, 및 리뉴큐맵으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

타우린-보충된 배양 배지에서 관심있는 단백질을 생산하는 방법으로서:

- (a) 관심있는 단백질을 암호화하는 서열을 포함하는 핵산을 세포로 도입하는 단계;
- (b) 관심있는 단백질을 발현하는 세포 또는 세포들을 선택하는 단계;
- (c) 세포 배양 배지에서 선택된 세포(들)를 배양하는 단계;
- (d) 약 0.1 mM 내지 약 10 mM의 양의 타우린으로 세포 배양 배지를 보충하는 단계;
- (e) 비-타우린 보충된 배지에서 배양된 세포(들)와 비교하여 세포(들)에서 배지로 분비되는 관심있는 단백질의 더 높은 역가를 발현하도록 (d)의 타우린 보충 조건 하에서 적어도 6일 동안 세포 배양물을 유지하는 단계; 및
- (f) 관심있는 단백질을 수확하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 29

제28 항에 있어서, 관심있는 단백질의 역가는 타우린 보충에 의해 증가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제29 항에 있어서, 수확된 단백질은 비교 대조군 배양물의 역가보다 적어도 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 또는 적어도 20% 더 높은 단백질 역가를 가지며, 비교 대조군 배양 배지는 (d)의 타우린 보충 조건으로 처리되지 않은 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

고수율로 관심있는 재조합 단백질을 생산하는 방법으로서 적어도 약 0.1 mM L-타우린을 포함하는 세포 배양 배지에서 재조합 세포주를 배양하는 단계를 포함하며, 세포주는 재조합 단백질을 암호화하는, 안정하게 통합된 핵산을 포함하는 방법.

청구항 32

제31 항에 있어서, 관심있는 재조합 단백질의 수율은 L-타우린을 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포주와 비교하여 배지에 타우린의 포함에 의해 증가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

제31 항 또는 제32 항에 있어서, 관심있는 단백질은 항원 결합 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제31 항 내지 제33 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심있는 단백질은 Fc 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제31 항 내지 제34 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심있는 단백질은 Fc-융합 단백질, 수용체-Fc-융합 단백질 (TRAP), 항체, 및 항체 단편으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

제35 항에 있어서, 관심있는 단백질은 항-PD1 항체, 항-PDL-1 항체, 항-DII4 항체, 항-ANG2 항체, 항-AngPt13 항체, 항-PDGFR 항체, 항-Erb3 항체, 항-PRLR 항체, 항-TNF 항체, 항-EGFR 항체, 항-PCSK9 항체, 항-GDF8 항체, 항-GCGR 항체, 항-VEGF 항체, 항-IL1R 항체, 항-IL4R 항체, 항-IL6R 항체, 항-IL1 항체, 항-IL2 항체, 항-IL3 항체, 항-IL4 항체, 항-IL5 항체, 항-IL6 항체, 항-IL7 항체, 항-RSV 항체, 항-NGF 항체, 항-CD3 항체, 항-CD20 항체, 항-CD19 항체, 항-CD28 항체, 항-CD48 항체, 항-CD3/항-CD20 이중특이적 항체, 항-CD3/항-MUC16 이중특이적 항체, 및 항-CD3/항-PSMA 이중특이적 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

제35 항에 있어서, 관심있는 단백질은 알리로큐마, 사릴루마, 파시누마, 네스바큐마, 듀필루마, 트레보그루마, 에비나큐마, 및 리뉴큐마로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

제31 항 내지 제37 항 중 어느 한 항에 있어서, 생산 방법은 0.1 mM 미만의 타우린을 함유하는 세포 배양 배지에서 유사한 생산 방법과 비교하여 적어도 0.1 g/L, 적어도 0.5 g/L, 적어도 1 g/L, 적어도 1.2 g/L, 적어도 1.4 g/L, 적어도 1.6 g/L, 적어도 1.8 g/L, 적어도 2 g/L, 적어도 2.2 g/L, 적어도 2.4 g/L, 또는 적어도 2.5 g/L만큼 단백질 수율을 증가시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

제31 항 내지 제38 항 중 어느 한 항에 있어서, 생산 방법은 0.1 mM 미만의 타우린을 함유하는 세포 배양 배지에서 유사한 생산 방법과 비교하여 적어도 3%만큼 단백질 수율을 증가시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

제31 항 내지 제39 항 중 어느 한 항에 있어서, 생산 방법은 0.1 mM 미만의 타우린을 함유하는 세포 배양 배지에서 유사한 생산 방법과 비교하여 적어도 8%만큼 암모니아 축적을 감소시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

제31 항 내지 제40 항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지에 하나 이상의 사용 시점 부가물을 첨가하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

약 0.1 mM 내지 약 10 mM L-타우린을 포함하는, 항체의 고수율 재조합 생산을 위한 CHO 세포 배양 배지.

청구항 43

제42 항에 있어서, 오르니틴을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 CHO 세포 배양 배지.

청구항 44

제43 항에 있어서, 푸트레신을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 CHO 세포 배양 배지.

청구항 45

제42 항 내지 제44 항 중 어느 한 항에 있어서, 아르기닌, 히스티딘, 리신, 아스파르트산, 글루탐산, 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 글리신, 프롤린, 알라닌, 발린, 아이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산의 혼합물을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 CHO 세포 배양 배지.

청구항 46

제42 항 내지 제45 항 중 어느 한 항에 있어서, 배지는 혈청이 없는 것을 특징으로 하는 CHO 세포 배양 배지.

청구항 47

제42 항 내지 제46 항 중 어느 한 항에 있어서, 배지는 가수분해물이 없는 것을 특징으로 하는 CHO 세포 배양 배지.

청구항 48

제42 항 내지 제47 항 중 어느 한 항에 있어서, 배지는 화학적으로 한정된 것을 특징으로 하는 CHO 세포 배양 배지.

청구항 49

제42 항 내지 제48 항 중 어느 한 항에 있어서, 배지는 제0 일에 생산 배치 배양물에 제공되는 것을 특징으로 하는 CHO 세포 배양 배지.

청구항 50

제42 항 내지 제49 항 중 어느 한 항에 있어서, 사료는 제0 일, 제1 일, 제2 일, 제3 일, 제4 일, 제5 일, 제6 일, 제7 일, 제8 일, 제9 일, 및/또는 제10 일에 생산 배치 배양물에 제공되는 것을 특징으로 하는 CHO 세포 배양 배지.

청구항 51

제50 항에 있어서, 생산 배치 배양물에 제공된 배지 및 사료는 생산기 동안에 총 약 5 mM 내지 약 10 mM L-타우린을 함유하는 것을 특징으로 하는 CHO 세포 배양 배지.

청구항 52

제42 항 내지 제51 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 지방산을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 CHO 세포 배양 배지.

청구항 53

제52 항에 있어서, 하나 이상의 지방산은 리놀레산, 리놀렌산, 티옥산, 올레산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키드산, 아라키돈산, 라우르산, 베헨산, 데칸산, 도데칸산, 헥산산, 리그노세르산, 미리스트산, 및 옥탄산으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 CHO 세포 배양 배지.

청구항 54

제42 항 내지 제53 항 중 어느 한 항에 있어서, 비타민 및 비오틴, D-칼슘 판토테네이트, 콜린 클로라이드, 엽산, I-이노시톨, 니코틴아미드, 피리독신 HCl, 리보플라빈, 티아민, HCl, 및 비타민 B12로 구성된 군으로부터 선택된 보조인자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 CHO 세포 배양 배지.

청구항 55

제42 항 내지 제54 항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오사이드의 혼합물을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 CHO 세포 배양 배지.

청구항 56

제55 항에 있어서, 뉴클레오사이드의 혼합물은 아데노신, 구아노신, 시티딘, 유리딘, 티미딘, 및 하이포잔틴 중 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 CHO 세포 배양 배지.

청구항 57

제42 항 내지 제56 항 중 어느 한 항에 있어서, 아데노신, 구아노신, 시티딘, 유리딘, 티미딘, 및 하이포잔틴을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 CHO 세포 배양 배지.

청구항 58

제42 항 내지 제57 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 2가 양이온을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 CHO 세포 배양 배지.

청구항 59

제58 항에 있어서, 2가 양이온은 마그네슘, 칼슘, 또는 둘 다인 것을 특징으로 하는 CHO 세포 배양 배지.

청구항 60

제59 항에 있어서, Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 를 포함하는 것을 특징으로 하는 CHO 세포 배양 배지.

청구항 61

CHO 세포 배양물에서 단백질 생산을 위한 유가식 배지 및/또는 사료로서, 약 0.1 mM 내지 약 10 mM의 양으로 타우린을 포함하는 유가식 배지 및/또는 사료.

청구항 62

제61 항에 있어서, 오르니틴을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 유가식 배지 및/또는 사료.

청구항 63

제62 항에 있어서, 푸트레신을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 유가식 배지 및/또는 사료.

청구항 64

제61 항 내지 제63 항 중 어느 한 항에 있어서, 아르기닌, 히스티딘, 리신, 아스파르트산, 글루탐산, 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 글리신, 프롤린, 알라닌, 발린, 아이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산의 혼합물을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 유가식 배지 및/또는 사료.

청구항 65

관심있는 재조합 단백질의 생산을 위해 진핵세포를 배양하는 방법으로서, (a) 제42 항 내지 제64 항 중 어느 한 항의 세포 배양 배지를 제공하는 단계, 및 (b) 세포 배양 배지에서 관심있는 단백질을 발현하는 세포를 증식시키거나 유지하여 세포 배양물을 형성하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 66

제65 항에 있어서, 진핵세포는 포유류 세포, 조류 세포, 곤충 세포, 및 효모 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 67

제65 항 또는 제66 항에 있어서, 세포는 CHO 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 68

제65 항 내지 제67 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심있는 단백질은 세포에 의해 배지로 분비되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 69

제68 항에 있어서, 관심있는 단백질은 항원 결합 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 70

제68 항 또는 제69 항에 있어서, 관심있는 단백질은 Fc 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 71

제68 항 내지 제70 항 중 어느 한 항에 있어서, 관심있는 단백질은 Fc-융합 단백질, 수용체-Fc-융합 단백질 (TRAP), 항체, 및 항체 단편으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 72

제71 항에 있어서, 관심있는 단백질은 항-PD1 항체, 항-PDL-1 항체, 항-DII4 항체, 항-ANG2 항체, 항-AngPt13 항체, 항-PDGFR 항체, 항-Erb3 항체, 항-PRLR 항체, 항-TNF 항체, 항-EGFR 항체, 항-PCSK9 항체, 항-GDF8 항체, 항-GCGR 항체, 항-VEGF 항체, 항-IL1R 항체, 항-IL4R 항체, 항-IL6R 항체, 항-IL1 항체, 항-IL2 항체, 항-IL3 항체, 항-IL4 항체, 항-IL5 항체, 항-IL6 항체, 항-IL7 항체, 항-RSV 항체, 항-NGF 항체, 항-CD3 항체, 항-CD20 항체, 항-CD19 항체, 항-CD28 항체, 항-CD48 항체, 항-CD3/항-CD20 이중특이적 항체, 항-CD3/항-MUC16 이중특이적 항체, 및 항-CD3/항-PSMA 이중특이적 항체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 73

제71 항에 있어서, 관심있는 단백질은 알리로큐맵, 사틸루맵, 파시누맵, 네스바큐맵, 듀필루맵, 트레보그루맵, 에비나큐맵, 및 리뉴큐맵으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 74

제65 항 내지 제73 항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양물은 0.1 mM 미만의 타우린을 함유하는 배지에서 유사한 세포 배양물과 비교하여 적어도 3%만큼 암모니아 축적을 감소시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 75

제65 항 내지 제74 항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양물은 0.1 mM 미만의 타우린을 함유하는 배지에서 유사한 세포 배양물과 비교하여 적어도 8%만큼 암모니아 축적을 감소시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

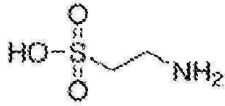
[0001]

본 발명은 세포 배양 및 재조합 단백질 생산을 위한 배지 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 구체적으로는 단백질 생체치료제의 생산을 위해 재조합 진행 세포를 배양하기 위한 타우린 보충된 배지 및 그 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

종종 β-아미노산이라고도 불리는 유기산 타우린은 대부분의 조직에서 높은 농도로 발견되고 아미노산 시스테인의 유도체이다 (Huxtable, R.J., 1992, *Physiol Rev*, 72: 101-163).



타우린의 구조

[0003]

[0004]

타우린은 인간 및 다른 포유류 종의 많은 조직들, 예를 들어, 뇌, 망막, 심근, 골격근 및 평활근, 혈소판 및 호중구에 존재한다. 타우린은 삼투조절, 막 안정화 및 소염을 돕는 것으로 알려져 있고, 또한 초과산화물(superoxide) 생성을 방지하는 향상된 전자 전달계를 통해 미토콘드리아 단백질 합성을 조절한다 (Jong et al., 2010, *Journal of Biomedical Science* 17(Suppl 1):S25; Jong et al., 2012, *Amino Acids* 42:2223-2232sw). 1차 뉴런 배양에서, 타우린은 글루타메이트-유도 독성의 억제로 인해, 세포질 보호제로서 특성화되었다. 배아 배양을 위해 타우린을 함유하는 다양한 배지가 개발되었다.

[0005]

아미노산 공급을 포함한 세포 배양 기술은 배양된 세포로부터 재조합 단백질의 생산에서 사용된 오랜 역사를 가지고 있다. 아미노산은 생합성 전구물질, 에너지원, 삼투물질 등이고, 생산 배양에서 그것들의 사용은 지속적인 세포 성장 및 생산성과 밀접한 관련이 있다.

[0006]

하지만, 생산성 및 고수율 단백질 발현에 기여하는 생리학적 현상은 무수하고, 경쟁적 대사활성 및 수송 메커니즘은 피딩(feeding) 전략의 설계를 어렵게 만든다. 아미노산 보충의 유형 및 추가 시기는 또한 배양물에서 생산된 단백질의 질에 영향을 줄 수 있다 (Altamirano, et al., 2006, *Electron. J. Biotechnol.* 9:61-67). 부산물의 축적은 생산 세포 배양물에서 종종 문제가 되는데, 세포 배양물의 영양분 불균형의 결과로 간주되며, 궁극적으로는 세포 성장을 억제한다 (Fan, Y. et al. *Biotechnol Bioeng.* 2015 Mar; 112(3):521-35). 재조합으로 생산된 폴리펩타이드를 포함한 조성물의 색 강도 감소의 원하는 결과를 달성하기 위해서 세포 배양물에서 하이포타우린 또는 이것의 유사체 또는 전구물질이 제안되었다 (W02014145098A1, 2014년 9월 18일에 공개됨). 미성숙 망막 착색 상피 세포의, 성숙한 망막 안료 상피 세포로의 성숙을 촉진하는 타우린을 포함한 세포 배양 배지가 또한 기술되었다 (W02013184809A1, 2013년 12월 12일에 공개됨). 하지만, 타우린-보충된 배양물에서 재조합 단백질 생산성을 최적화하는 것은 업계에 인식되어 있지 않다. 재조합으로 발현된 단백질의 생산성을 증가시키는 한편, 잠재적으로 독성인 세포 대사 부산물, 예컨대 암모니아의 생산량을 최소화하는 세포 배양 공정이 매우 바람직하다. 생산성의 지속적인 증가는 생체치료제의 상업적 규모에서는 훨씬 더 높은 공급과 동일시될 수 있다.

[0007]

따라서, 업계에서는 건강하고 활발한 세포 성장 및 유지, 및 생체치료제 물질의 높은 역가의 생산을 허용하는, 포유류 세포를 배양하기 위한 배지 및 방법이 필요하다.

발명의 내용

[0008]

발명자들은 세포 배양 배지에서 타우린의 포함이 세포 특이적 생산성을 증가시키고 상기 세포들에 의해 더 적은 암모니아 부산물을 발생시킨다는 놀라운 발견을 하였다. 타우린을 포함한 다양한 피딩 전략은 증가된 역가 단백질 생산을 허용한다. 게다가, 타우린의 첨가는 배양물 성능 또는 결과로 생성된 항체의 질에 부정적인 효과를 나타내지 않는다.

[0009]

본 발명은 높은 수율로 치료 단백질을 생산하는 방법을 제공하는데 타우린을 함유한 배지에서 재조합 세포주를 배양하는 단계를 포함하며, 세포주는 치료 단백질을 암호화하는 안정하게 통합된 핵산을 포함한다.

[0010]

본 발명은 혈청이 없고 약 0.1 mM 내지 약 10 mM 타우린을 포함하는 세포 배양 배지에 관한 것이다. 본 발명은 혈청이 없고 약 0.1 mM 내지 약 1 mM 타우린, 약 0.2 내지 약 1 mM 타우린, 약 0.3 내지 약 1 mM 타우린, 약 0.4 내지 약 1 mM 타우린, 또는 약 0.5 내지 약 1 mM 타우린을 포함하는 세포 배양 배지에 관한 것이다. 본 발명은 혈청이 없고 약 1 mM 내지 약 10 mM 타우린을 포함하는 세포 배양 배지에 관한 것이다. 본 발명은 혈청이 없고 약 1 mM 내지 약 5 mM 타우린, 약 1 mM 내지 약 6 mM 타우린, 약 1 mM 내지 약 7 mM 타우린, 약 1 mM 내지 약 8 mM 타우린, 또는 약 1 mM 내지 약 9 mM 타우린을 포함하는 세포 배양 배지에 관한 것이다.

[0011]

일부 구체예에서, 배지는 아르기닌, 히스티딘, 리신, 아스파르트산, 글루탐산, 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 글리신, 프롤린, 알라닌, 발린, 아이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판으로 구성된 군으로부터 선택된 추가적인 아미노산을 더 포함한다.

[0012]

일부 구체예에서, 배지는 ≤ 16 g/L 가수분해물을 함유한다. 일부 구체예에서, 배지는 어떠한 가수분해물도 없다.

- [0013] 한 구체예에서, 배지는 화학적으로 한정된 기본 배지, 예컨대 맞춤형 제형 또는 상업적으로 이용 가능한 기본 배지를 함유한다. 한 구체예에서, 완전 배지는 화학적으로 한정된 것이고, 혈청이 없고 가수분해물이 없다.
- [0014] 일부 구체예에서, 기본 배지 및 사료를 포함하는 전체 공정은 전부 적어도 115 mM의 아미노산 또는 아미노산 염의 혼합물을 함유한다. 한 구체예에서, 아미노산의 혼합물은 표 1에서 선택된 양으로 아르기닌, 히스티딘, 리신, 아스파르트산, 글루탐산, 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 글리신, 프롤린, 알라닌, 발린, 아이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산을 포함한다.
- [0015] 일부 구체예에서, 배지는 하나 이상의 지방산을 함유한다. 특정 구체예에서, 배지는 지방산 (또는 지방산 유도체)과 알파 토크페롤의 혼합물을 함유한다. 지방산 또는 지방산 유도체는 리놀레산, 리놀렌산, 티옥산, 올레산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키드산, 아라키돈산, 라우르산, 베헤산, 데칸산, 도데칸산, 헥산산, 리그노세르산, 미리스트산, 및 옥탄산으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0016] 일부 구체예에서, 배지는 뉴클레오사이드의 혼합물을 함유한다. 한 구체예에서, 배지는 아데노신, 구아노신, 시티딘, 유리딘, 티미딘, 및 하이포잔틴을 함유한다.
- [0017] 일부 구체예에서, 배지는 염의 혼합물을 함유한다. 염은 2가 양이온, 예컨대 칼슘 및 마그네슘을 포함한다. 한 구체예에서, 배지는 염화 칼슘 및 황산 마그네슘을 함유한다. 다른 염들은 포스페이트 염을 포함할 수도 있다.
- [0018] 한 구체예에서, 배지는 (1) 0.1 ± 0.015 mM, 1 ± 0.015 mM, $3 + 0.05$ mM, $5 + 0.10$ mM, $7 + 0.15$ mM, 또는 $10 + 0.2$ mM 타우린을 함유하고, (2) ≤ 16 g/L의 가수분해물을 함유하고, (3) 혈청이 없고, (4) 선택적으로 추가적으로 아미노산 혼합물을 함유하고, (5) 지방산의 혼합물을 함유하고, (6) 아데노신, 구아노신, 시티딘, 유리딘, 티미딘, 및 하이포잔틴을 포함한 뉴클레오사이드의 혼합물을 함유하고, (7) 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트의 염을 함유한다.
- [0019] 본 발명은 높은 수율로 관심있는 단백질을 생산하는 방법을 제공하는데 적어도 약 0.1 mM 내지 약 10 mM 타우린을 함유하는 세포 배양 배지에서 재조합 세포주를 배양하는 단계를 포함하며, 세포주는 단백질을 암호화하는 안정하게 통합된 핵산을 포함한다. 다른 구체예에서, 배지는 본 발명의 상기 언급된 양태 중 임의의 것을 구현한다.
- [0020] 또 다른 양태에서, 본 발명은 개선된 재조합 단백질 생산을 위해 진핵세포를 배양하는 방법을 제공하는데, (a) 성장기 동안 한정된 세포 배양 배지에서 세포를 증식시키거나 유지하는 단계, (b) 기본 세포 배양 배지를 약 0.1 mM 내지 약 10 mM L-타우린으로 보충하고 생산기 동안 관심있는 재조합 단백질을 발현시키는 단계, 및 (c) 타우린 첨가에 의해 관심있는 단백질의 역가를 증가시키는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 타우린 보충은 생산기 동안에 적어도 한 번, 또는 생산기 동안에 두 번, 세 번, 네 번, 또는 다섯 번, 또는 생산기 동안에 매일 제공된다. 다른 구체예에서, 방법은 성장기 동안 배양 배지를 약 0.1 mM 내지 약 10 mM L-타우린으로 보충하는 단계를 더 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은 타우린이 보충되지 않거나, 또는 0.1 mM 미만의 타우린이 보충되고 그 외에는 동일한 조건의 진핵세포와 비교하여 개선된 재조합 단백질의 생산을 제공한다.
- [0021] 또 다른 양태에서, 본 발명은 세포 배양 배지, 예컨대 상기 언급된 양태에서 기술된 배지의 임의의 구체예에서 세포를 배양하는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, 방법은 (1) 적어도 0.1 mM + 0.015 mM의 농도로 타우린을 함유하고, (2) ≤ 16 g/L 가수분해물을 함유하거나, 또는 가수분해물을 함유하지 않고, (3) 혈청이 없고, (4) 선택적으로 아미노산이 표 1에서 선택된 아미노산의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된 배지에서 세포 또는 세포들을 증식시키거나 유지하는 단계를 이용한다.
- [0022] 한 구체예에서, 아미노산 보충의 선택적 혼합물은 표 1의 아미노산으로 구성된 군으로부터 선택된다:

표 1

[0023]

아미노산	범위 mM (mmol/L)	범위 (g/L)
알라닌	0-11.2	0-1
아르기닌	2.4-11.9	0.5-2.5
아스파라긴	1.3-33.3	0.2-5
아스파르트산	1.5-93.9	0.2-12.5
시스테인	1.1-19.9	0.2-3.5
글루탐산	1.4-47.6	0.2-7

글루타민	0-23.9	0-3.5
글리신	0-16.7	0-1.25
히스티딘	1-9.5	0.2-2
아이소류신	1.5-22.9	0.2-3
류신	1.5-38.1	0.2-5
리신	2.7-24.6	0.5-4.5
메티오닌	1.3-13.4	0.2-2
페닐알라닌	1.2-18.2	0.2-3
프롤린	1.7-26.1	0.2-3
세린	1.9-57.1	0.2-6
트레오닌	1.7-33.6	0.2-4
트립토판	0.5-14.7	0.1-3
티로신	0.9-22.2	0.2-5
발린	1.7-34.1	0.2-4

[0024] 일부 구체예에서, 세포 또는 세포들은 포유류 세포, 조류 세포, 곤충 세포, 효모 세포, 또는 박테리아 세포이다. 한 구체예에서, 세포는 재조합 단백질, 예컨대 CHO 세포 또는 유도체 CHO-K1의 생산에 유용한 포유류 세포이다. 일부 구체예에서, 세포는 관심있는 단백질, 예컨대 생체치료 단백질을 발현한다. 생체치료 단백질은 항원 결합 단백질일 수도 있으며, 이것은 Fc 도메인을 함유할 수도 있다. 일부 구체예에서, 관심있는 단백질은 Fc-융합 단백질, 예컨대 ScFv 분자 또는 트랩(trap) 분자이다. 트랩 분자는 VEGF 트랩 및 IL-1 Trap 단백질을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 구체예에서, 관심있는 단백질은 항체, 예컨대 인간 단클론성 항체, 인간화 단클론성 항체, 이중특이적 항체, 또는 항체 단편이다.

[0025] 다양한 형태의 무혈청 배지에서 타우린을 포함시킴으로써 단백질 생산에 대한 긍정적인 효과를 고려하면, 이 방법에 따라 배양된 세포는 단백질 역가의 평균적인 증가를 초래하였다. 한 구체예에서, 타우린으로 보충되지 않은 배지의 단백질 역가와 비교할 때, 이 방법에 따라 타우린 보충된 배양물에서 자란 세포는 비교 대조군 배양물 (즉, 타우린이 보충되지 않은 배양물)의 역가보다 적어도 8% 더 높은 단백질 역가를 갖는 단백질을 생산한다. 한 구체예에서, 타우린 보충된 배양물에서 자란 세포는 타우린이 보충되지 않은 배지의 단백질 역가와 비교할 때 비교 대조군 배양물의 역가보다 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 11%, 적어도 12%, 적어도 13%, 적어도 14%, 적어도 15%, 적어도 16%, 적어도 17%, 적어도 18%, 적어도 19%, 적어도 20%, 적어도 21%, 적어도 22%, 적어도 23%, 적어도 24%, 적어도 25%, 적어도 26%, 적어도 27%, 적어도 28%, 또는 적어도 29% 더 높은 단백질 역가를 수득한다.

[0026] 유사하게, 무혈청 배지에서 타우린 단독의 포함은 배양된 세포가 타우린을 포함하지 않은 것보다 더 적은 암모니아 부산물을 획득하게 한다. 타우린 보충된 배지의 하나의 무혈청 및 무가수분해물 구체예에서, 세포 배양물은 보충물을 함유하지 않은 (즉, 0.1 mM 미만 타우린 또는 타우린 보충 없음) 유사한 세포 배양 배지에서 유사한 세포 배양물보다 적어도 4% 더 낮거나, 최대 32%까지 더 낮은, 감소된 암모니아 부산물 수준 (mM NH₃)을 획득할 수 있다.

[0027] 또 다른 구체예에서, 방법은 하나 이상의 사용 시점 부가물을 세포 배양 배지에 추가하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 사용 시점 부가물은 NaHCO₃, 글루타민, 인슐린, 글루코스, CuSO₄, ZnSO₄, FeCl₃, NiSO₄, Na₄EDTA, 및 Na₃ 시트레이트 중 임의의 하나 이상이다. 한 구체예에서, 방법은 다음의 사용 시점 화학물질 각각을 세포 배양 배지에 추가하는 단계를 이용한다: NaHCO₃, 글루타민, 인슐린, 글루코스, CuSO₄, ZnSO₄, FeCl₃, NiSO₄, Na₄EDTA, 및 Na₃ 시트레이트. 일부 구체예에서, 사용 시점 부가물은 처음에는 배지에 포함될 수 있다.

[0028] 구체적인 구체예에서, 양태는 근본적으로 (1) 적어도 0.1 mM의 농도의 타우린으로 구성되고 (2) ≤ 16 g/L의 가수분해물을 함유하고, (3) 혈청이 없고, (4) 선택적으로 추가적으로 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 아이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 및 발린으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산의 총 적어도 약 20 mM, 또는 적어도 약 25 mM, 또는 적어도 약 30 mM, 또는 적어도 약 40 mM, 또는 적어도 약 50 mM, 또는 적어도 약 60 mM, 또는 적어도 약 70 mM의 혼합물을 함유하는 무혈청 배지에서 세포를 배양하는 방법을 제공한다.

[0029] 또 다른 양태에서, 본 발명은 (1) 관심있는 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 세포로 도입시키는 단계; (2) 관

심있는 단백질을 발현하는 세포 또는 세포들을 선택하는 단계; (3) 임의의 전술된 양태에서 기술된 무혈청 세포 배양 배지의 구체예에서 또는 본원에서 기술된 방법의 임의의 구체예에 따라 선택된 세포를 배양하는 단계; 및 (4) 배지로 분비된 관심있는 단백질을 세포에서 발현시키는 단계를 이용하여 관심있는 단백질을 생산하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 단백질 생산에 사용된 세포는 생체치료제를 생산할 수 있는 포유류 세포, 예컨대 CHO, 293, 및 BHK 세포, 또는 이것들의 임의의 유도체이다. 한 구체예에서, 세포는 CHO 세포, 예컨대 CHO-K1 세포이다.

[0030] 일부 구체예에서, 관심있는 단백질은 항원 결합 단백질이다. 일부 구체예에서, 관심있는 단백질은 Fc 도메인을 갖는 단백질이다. 예를 들어, 수용체-Fc-융합 단백질, 항체, 및 ScFv 단백질의 경우에서와 같이, 어떤 경우에는, 상기 두 개의 관심있는 단백질이 중첩될 수도 있다. 따라서, 일부 구체예에서는, 관심있는 단백질은 항체, 예컨대 인간 항체 또는 인간화 항체, 항체 단편, 예컨대 Fab 또는 F(ab')₂, 이중특이적 항체, 트랩 분자, 예컨대 VEGF-Trap 또는 IL-1-Trap, ScFv 분자, 가용성 TCR-Fc 융합 단백질, 등이다.

[0031] 한 구체예에서, 관심있는 단백질은 0.1 mM 미만의 타우린이 보충되거나 또는 타우린이 보충되지 않은 무혈청 세포 배양 배지에서 유사한 세포에 의해 생산된 평균 14, 15, 16 또는 17일 역가보다 적어도 8% 더 큰 평균 14, 15, 16 또는 17일 역가로 생산될 수 있다. 한 구체예에서, 관심있는 단백질은 0.1 mM 미만의 타우린이 보충되거나 또는 타우린이 보충되지 않은 무혈청 세포 배양 배지에서 유사한 세포에 의해 생산된 평균 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17일 역가보다 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 11%, 적어도 12%, 적어도 13%, 적어도 14%, 적어도 15%, 적어도 16%, 적어도 17%, 적어도 18%, 적어도 19%, 적어도 20%, 적어도 21%, 적어도 22%, 적어도 23%, 적어도 24%, 적어도 25%, 적어도 26%, 적어도 27%, 적어도 28%, 또는 적어도 29% 더 큰 역가로 생산될 수 있다.

[0032] 또 다른 구체예에서, 관심있는 단백질은 (1) 관심있는 단백질, 예컨대 항체 또는 다른 항원-결합 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 CHO 세포로 도입시키는 단계; (2) 관심있는 단백질을 안정하게 발현하는 세포를 선택하는 단계; (3) 약 0.1 mM 내지 약 10 mM 타우린을 포함하는 무혈청 세포 배양 배지에서 선택된 세포를 배양하는 단계에 의해 생산된다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 Ab3-생산 세포 배양물에서 생산 배양의 각 날짜에 회수된 샘플의 단백질 역가 (수율)을 도시하며, 타우린 보충되지 않은 것 (점선으로 연결된 x)과 비교하여 타우린-보충된 것 (실선으로 연결된 실선 사각형)이 제공된다. 단백질 수율에 대한 타우린-보충된 배양물의 이점은 빠르면 생산 배양의 제6일부터 볼 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 본 발명은 기술된 특정 방법 및 실험 조건에 제한되지 않으며, 이러한 방법 및 조건은 달라질 수도 있다는 것을 이해해야 한다. 또한 본 발명의 범위는 청구범위에 의해 제한되기 때문에, 본원에서 사용된 용어는 단지 특정 구체예를 기술하기 위한 목적을 위한 것이며, 제한하려는 의도가 아니라는 것을 이해해야 한다.

[0035] 이 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수형 "a", "an", 및 "the"는 문맥상 분명하게 달리 지시되지 않으면 복수의 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "방법"에 대한 지시대상은 하나 이상의 방법, 및/또는 본원에서 기술된 및/또는 이 개시물을 읽으면 당업자에게 명백해지는 유형의 단계들을 포함한다.

[0036] 달리 정의되지 않으면, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속한 업계의 당업자에 의해 흔히 이해되는 바와 같은 의미를 갖는다. 본원에서 기술된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료들이 본 발명의 실시예에 사용될 수는 있지만, 특정한 방법 및 재료가 이제 기술된다. 본원에서 언급된 모든 간행물들은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0037] 출원인들은 세포 배양 배지에 타우린의 첨가가 타우린을 거의 함유하지 않거나 전혀 함유하지 않는 세포 배양 배지에 비해 세포 배양물에서 재조합 세포에 의해 단백질 생산을 개선한다는 놀라운 발견을 하였다.

[0038] 본 세포 배양 및 방법을 기술하기 전에, 본 발명은 기술된 특정 방법 및 실험 조건에 제한되지 않으며, 이러한 방법 및 조건들은 달라질 수도 있다는 것을 이해해야 한다. 또한 본원에서 사용된 용어는 단지 특정 구체예를 기술할 목적을 위한 것이고, 제한하려는 의도는 아니라는 것을 이해해야 한다.

[0039] 본원에서 사용된 섹션의 제목들은 단지 유기적의 구조의 목적을 위한 것이며 기술되는 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본원에서 기술된 방법 및 기술은 일반적으로 업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 및 달

리 지시되지 않으면 본 명세서 전반에 걸쳐 인용되고 논의되는 다양한 일반적이고 더 구체적인 참고문헌에서 기술된 바와 같이 수행된다. 예를 들어, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001) 및 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), 및 Julio E. Celis, Cell Biology: A Laboratory Handbook, 2nd ed., Academic Press, New York, N.Y. (1998), 및 Dieffenbach and Dveksler, PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1995) 참조. 이 개시물 전반에 걸쳐 언급되는 모든 간행물들은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0040] 정의

[0041] "타우린"은 2-아미노에탄선폰산 (IUPAC 명명법; CAS 등록 번호 107-35-7)으로도 공지되어 있다. "타우린" 및 "L-타우린"은 같은 유기 화합물을 언급하기 위해 교체 가능하게 사용된다. 타우린은 아미노 기를 함유하는 유기 산이지만, 당업자들에게 전통적으로 공지된 바와 같이 "아미노산"으로 간주되지 않는 반면, 아미노산은 아미노 기 및 카르복실 기 둘 다를 함유한다. 타우린의 생합성은 시스테인의 유도체인 하이포타우린이 산화에 의해 타우린으로 전환될 때 일어난다.

[0042] 용어 "보충", "보충하는", "~로 보충된", 등은 세포의 성장 및/또는 분화를 유지하고 및/또는 촉진하기 위해, 배양물 또는 세포 전체의 속성을 확장하거나 강화하기 위해, 또는 결핍을 보완하기 위해 세포 배양용 배지에 사용될 수 있는 성분, 구성요소, 분자, 등을 첨가하는 것을 말한다. 이를 위해, 타우린-보충은 배양 배지에 용액 중 특정 농도의 타우린의 첨가를 포함한다.

[0043] 용어 "펩타이드", "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 전반적으로 교체 가능하게 사용되고 펩타이드 결합에 의해 서로 결합된 둘 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 분자를 말한다. 펩타이드, 폴리펩타이드 및 단백질은 또한 글리코실화, 지질 부착, 황산화, 글루탐산 잔기의 감마-카르복실화, 알킬화, 하이드록실화 및 ADP-리보실화와 같은 변형을 포함할 수도 있다. 단백질-기반 약물을 포함하여, 펩타이드, 폴리펩타이드, 및 단백질은 과학적으로 또는 상업적으로 관심을 끌 수 있다. 펩타이드, 폴리펩타이드, 및 단백질은, 다른 것들 중에서도, 항체 및 키메라 또는 융합 단백질을 포함한다. 펩타이드, 폴리펩타이드, 및 단백질은 세포 배양 방법을 사용하여 재조합 동물 세포주에 의해 생산된다.

[0044] 용어 "이중 기원 폴리뉴클레오타이드 서열"은, 본원에서 사용된 바와 같이, 관심있는 단백질, 예컨대 키메라 단백질 (트랩 분자 등), 생체치료제 물질로서 생산된 항체 또는 항체 일부 (예를 들어, VH, VL, CDR3)를 암호화하는 핵산 폴리머를 말한다. 이중 기원 폴리뉴클레오타이드 서열 (예를 들어, 키메라 단백질을 암호화하는 서열, 또는 코돈-최적화된 서열, 무인트론(intronless) 서열, 등)은 유전 공학 기술에 의해 제작되고 세포로 도입될 수 있으며, 그것은 에피솜으로서 체류하거나 세포의 게놈에 통합될 수도 있다. 이중 기원 폴리뉴클레오타이드 서열은 생산 세포 게놈 내에서 이소성 부위로 도입된 자연 발생 서열일 수도 있다. 이중 기원 폴리펩타이드 서열은 또 다른 유기체의 자연 발생 서열, 예컨대 인간 오쏘로그(ortholog)를 암호화하는 서열일 수도 있다.

[0045] "항체"는 네 개의 폴리펩타이드 사슬, 이황화 결합으로 서로 연결된 두 개의 중쇄 (H) 및 두 개의 경쇄 (L)로 구성된 면역글로불린 분자를 말한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (HCVR 또는 VH) 및 중쇄 불변 영역을 갖는다. 중쇄 불변 영역은 세 개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3를 함유한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역을 갖는다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 (CL)으로 구성된다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역 (FR)이라고 불리는 더 보존된 영역과 산재된, 상보성 결정 영역 (CDR)이라고 불리는 초가변성의 영역으로 더 세분화될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 아미노 말단에서 카르복시 말단으로 다음 순서로 정렬된 세 개의 CDR 및 네 개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 용어 "항체"는 임의의 아이소타입(isotype) 또는 하위분류의 글리코실화된 면역글로불린 및 글리코실화되지 않은 면역글로불린 둘 다에 대한 지시대상을 포함한다. 용어 "항체"는 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 또는 분리된 항체 분자, 예컨대 항체를 발현하도록 트랜스펙션된 숙주 세포로부터 분리된 항체를 포함한다. 용어 항체는 또한 하나 이상의 다른 에피토프에 결합할 수 있는 헤테로테트라머 면역글로불린을 포함한 이중특이적 항체를 포함한다. 이중특이적 항체는 일반적으로 미국 특허 출원 공개 번호 2010/0331527에서 기술되며, 이것은 본원에 참조로 포함된다.

[0046] 용어 항체의 "항원-결합 부분" (또는 "항체 단편")은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유한 항체의 하나 이상의 단편을 말한다. 용어 항체의 "항원-결합 부분" 내에 포함되는 결합 단편의 예는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 이황화 브릿지에 의해 결합된 두 개의 Fab 단편을

포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 분지(arm)의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편, (v) VH 도메인으로 구성된 dAb 단편 (Ward et al. (1989) Nature 241:544-546), (vi) 분리된 CDR, 및 (vii) VL 및 VH 영역이 쌍을 형성하여 1가 분자를 형성하는 단일 단백질 사슬을 형성하도록 합성 링커에 의해 결합된 Fv 단편의 두 개의 도메인, VL 및 VH로 구성된 scFv를 포함한다. 디아바디와 같은 단일 사슬 항체의 다른 형태가 또한 용어 "항체"에 포함된다 (예를 들어, Holliger et al. (1993) PNAS USA 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) Structure 2: 1121-1123 참조).

[0047] 또한, 항체 또는 이것의 항원-결합 부분은 항체 또는 항체 일부와 하나 이상의 다른 단백질 또는 펩타이드의 공유 또는 비공유 회합에 의해 형성된 더 큰 면역부착 분자의 일부일 수도 있다. 이러한 면역부착 분자의 예는 테트라머 scFv 분자를 제조하기 위한 스트렙타비딘 코어 영역의 사용 (Kipriyanov et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) 및 2가 및 비오틴화된 scFv 분자를 제조하기 위한 시스테인 잔기, 마커 펩타이드 및 C-말단 폴리히스티딘 태그(tag)의 사용 (Kipriyanov et al. (1994) Mol. Immunol. 31: 1047-1058)을 포함한다. Fab 및 F(ab')₂ 단편과 같은 항체 일부는 통상적인 기술을 사용하여, 예컨대 전체 항체의 파괴 또는 펩신 분해를 통해 전체 항체로부터 제조될 수 있다. 더욱이, 항체, 항체 일부 및 면역부착 분자는 업계에 흔히 공지되어 있는 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 얻어질 수 있다 (Sambrook et al., 1989 참조).

[0048] 용어 "인간 항체"는 인간 생식세포 계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역 및 불변영역을 가진 항체를 포함하도록 의도된다. 본 발명의 인간 항체는 예를 들어, CDR에서, 특히 CDR3에서 인간 생식세포 계열 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관 내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이 유발에 의해 또는 생체 내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수도 있다. 하지만, 용어 "인간 항체"는, 본원에서 사용된 바와 같이, 또 다른 포유류 중, 예컨대 마우스의 생식세포 계열로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열로 이식된 항체를 포함하도록 의도된 것은 아니다.

[0049] 용어 "재조합 인간 항체"는, 본원에서 사용된 바와 같이, 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 또는 분리된 모든 인간 항체, 예컨대 숙주 세포로 트랜스펙션된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체, 재조합, 조합적 인간 항체 라이브러리로부터 분리된 항체, 인간 면역글로불린 유전자에 대한 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)로부터 분리된 항체 (예를 들어, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295 참조) 또는 다른 DNA 서열로의 인간 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱을 수반하는 임의의 다른 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 또는 분리된 항체를 포함하도록 의도된다. 이러한 재조합 인간 항체는 인간 생식세포 계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 하지만, 특정 구체예에서, 이러한 재조합 인간 항체는 시험관 내에서 돌연변이 유발되며 (또는, 인간 Ig 서열에 대한 트랜스제닉 동물이 사용될 때에는, 생체 내 체세포 돌연변이 유발) 따라서 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 인간 생식세포 계열 VH 및 VL 서열로부터 유래되고 이것과 관련된 한편, 생체 내 인간 항체 생식세포 계열 레퍼토리 내에서 자연적으로 존재하지 않을 수도 있는 서열이다.

[0050] "Fc 융합 단백질"은 둘 이상의 단백질의 일부 또는 모두를 포함하며, 이것들 중 하나는 면역글로불린 분자의 Fc 부분이고, 이것들은 자연에서 함께 발견되지 않는다. 항체-유래 폴리펩타이드의 다양한 부분 (Fc 도메인 포함)에 융합된 특정 이중 기원 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질의 제조는, 예를 들어, Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535, 1991; Byrn et al., Nature 344:677, 1990; 및 Hollenbaugh et al., "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11, 1992에 의해 기술되었다. "수용체 Fc 융합 단백질"은 Fc 모이어티에 커플링된 수용체의 하나 이상의 세포 외 도메인(들)을 포함하며, 이것은 일부 구체예에서는, 힌지 영역에 이어서 면역글로불린의 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, Fc-융합 단백질은 하나 이상의 리간드(들)에 결합하는 둘 이상의 별개의 수용체 사슬을 함유한다. 예를 들어, Fc-융합 단백질은 예를 들어, IL-1 트랩 (예를 들어, 릴로나셉트, 이것은 hIgG1의 Fc에 융합된 IL-1 R1 세포 외 영역에 융합된 IL-1 RAcP 리간드 결합 영역을 함유함; 미국 특허 번호 6,927,004 참조), 또는 VEGF 트랩 (예를 들어, 아플리버셉트, 이것은 hIgG1의 Fc에 융합된 VEGF 수용체 Flk1의 Ig 도메인 3에 융합된 VEGF 수용체 Flt1의 Ig 도메인 2를 함유함; 미국 특허 번호 7,087,411 및 7,279,159 참조)과 같은 트랩이다.

[0051] 세포 배양

[0052] 용어 "세포 배양 배지" 및 "배양 배지"는 포유류 세포를 성장시키는데 사용되는 양액(nutrient solution)을 말하며, 이것은 전형적으로 탄수화물 에너지원, 필수 아미노산 (예를 들어, 페닐알라닌, 발린, 트레오닌, 트립토판, 메티오닌, 류신, 아이소류신, 리신, 및 히스티딘) 및 비필수 아미노산 (예를 들어, 알라닌, 아스파라긴, 아

스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 글리신, 프롤린, 세린, 및 티로신), 미량의 원소, 에너지원, 지질, 비타민, 등과 같이 세포의 성장을 향상시키기 위해 필요한 영양분을 제공한다. 세포 배양 배지는 추출물, 예를 들어, 혈청 또는 펩톤 (가수분해물)을 함유할 수도 있으며, 이것들은 세포 성장을 지원하는 원료를 공급한다. 배지는 동물-유래 추출물 대신에 효모-유래 또는 대두 추출물을 함유할 수도 있다. 화학적으로 한정된 배지는 모든 화학적 구성성분이 공지되어 있는 (즉, 공지된 화학 구조를 가짐) 세포 배양 배지를 말한다. 화학적으로 한정된 배지는 혈청- 또는 동물-유래 펩톤과 같은 동물-유래 구성성분이 전혀 없다. 한 구체예에서, 배지는 화학적으로 한정된 배지이다.

[0053] 용액은 또한 호르몬 및 성장 인자를 포함하는, 최소 비율보다 성장 및/또는 생존율을 향상시키는 구성성분을 함유할 수도 있다. 용액은 바람직하게는 세포 생존 및 증식에 최적인 pH 및 염 농도로 제조된다.

[0054] "세포주"는 세포의 연속적 계대배양(passaging) 또는 서브컬처(subculturing)을 통해 특정 계통으로부터 유래된 세포 또는 세포들을 말한다. 용어 "세포들"은 "세포 집단"과 교체 가능하게 사용된다.

[0055] 용어 "세포"는 재조합 핵산 서열을 발현시키는데 적합한 임의의 세포를 포함한다. 세포는 진핵생물의 세포, 예컨대 비-인간 동물 세포, 포유류 세포, 인간 세포, 조류 세포, 곤충 세포, 효모 세포, 또는 예를 들어, 하이브리도마(hybridoma) 또는 콰드로마(quadroma)와 같은 세포 융합체를 포함한다. 특정 구체예에서, 세포는 인간, 원숭이, 유인원, 햄스터, 래트 또는 마우스 세포이다. 다른 구체예에서, 세포는 다음 세포들로부터 선택된다: CHO (예를 들어, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (예를 들어, COS-7), 망막 세포, Vera, CV1, 신장 세포 (예를 들어, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, 림프구, 예를 들어, Jurkat (T 림프구) 또는 Daudi (B 림프구), A431 (상피), CV-1, U937, 3T3, L 세포, C127 세포, SP2/0, NS-0, MMT 세포, 줄기 세포, 종양 세포, 및 상기 언급된 세포로부터 유래된 세포주. 일부 구체예에서, 세포, 예를 들어, 바이러스 유전자를 발현하는 망막 세포 (예를 들어, PER.C6® 세포)는 하나 이상의 바이러스 유전자를 포함한다. 일부 구체예에서, 세포는 CHO 세포이다. 다른 구체예에서, 세포는 CHO K1 세포이다.

[0056] 본 발명의 한 양태는 생산 배양에서 단백질 생산 및 수확 전에 세포 집단이 확장되는 시드 배양(seed culture)에 관한 것이다. 타우린은 본원에서 기술된 바와 같이 본 발명에 따라 시드 배양 조제물에서 기본 배지에 첨가될 수도 있다.

[0057] 본 발명의 또 다른 양태는 단백질이 생산되고 수확되는 생산 배양에 관한 것이다. 생산기 전에는, 전형적으로 성장기 (시드 트레인(seed train) 또는 시드 배양으로도 공지되어 있음)가 있으며 세포 배양을 위한 모든 구성 성분은 배양 공정의 시작시 배양 용기에 공급된 다음 세포 집단은 생산 규모에 대한 준비가 될 때까지 확장된다. 이와 같이, 배양 용기는 시작 세포주에 따라 초기 세포 성장기에 적합한 분주 밀도의 세포로 접종된다. 일부 양태에서, 타우린은 이후의 생산기에 세포의 생산성을 더 개선하거나 향상시키기 위해 본원에서 기술된 바와 같이 본 발명에 따르는 시드 배양 조제물로 기본 배양 배지에 첨가될 수도 있다.

[0058] 본 발명의 한 양태는 이러한 세포에 의한 하나 이상의 관심있는 재조합 단백질의 생산을 개선하고 특히 생산 배양 배지 및/또는 시드 트레인 배양물에 타우린을 첨가함으로써 세포 생존율을 유지하는 한편 재조합 진핵세포의 성장을 향상시키도록 세포 배양 조건이 변형되는 생산 배양에 관한 것이다. 생산 배양 용기 또는 바이오리액터(bioreactor)에서, 기본 배양 배지 및 세포는 시드 배양 또는 성장기 이후 배양 용기에 공급된다. 특정 구체예에서, 세포 상층액 또는 세포 용해물은 생산 배양 이후 수확된다. 다른 구체예에서, 폴리펩타이드 또는 관심있는 단백질은 업계에 널리 공지된 기술을 사용하여 배양 배지 또는 세포 용해물, 또는 관심있는 단백질의 위치에 따라 달라질 수도 있는 어느 것로부터 회수된다.

[0059] 배양 용기는 웰 플레이트, T-플라스크, 진탕 플라스크, 교반 용기, 회전 플라스크, 중공섬유, 공기 부양식 바이오리액터, 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 적합한 세포 배양 용기는 바이오리액터이다. 바이오리액터는 환경 조건을 조작하거나 제어하도록 제조되거나 설계된 임의의 배양 용기를 말한다. 이러한 배양 용기는 업계에 널리 공지되어 있다.

[0060] 가스 교환을 최적화하고, 세포 성장 및 생산성을 지속하기에 충분한 산소를 공급하고, CO₂를 제거하기 위한 바이오리액터 공정 및 시스템이 개발되었다. 가스 교환 효율을 유지하는 것은 세포 배양 및 단백질 생산의 성공적인 확장을 보장하기 위한 중요한 기준이다. 이러한 시스템은 당업자에게 널리 공지되어 있다.

[0061] 폴리펩타이드 생산기에서, "유가식(fed-batch) 세포 배양" 또는 "유가 배양"은, 배양 종료 전 주기적인 세포 및/또는 생산물 수확 유무에 관계없이, 동물 세포 및 배양 배지가 초기에 배양 용기에 공급되고 배양 중에 추가적

인 배양 영양분이 지속적으로 또는 이산 증분적으로 배양물에 서서히 공급되는 배치(batch) 배양을 말한다. 유가 배양은 주기적으로 전체 배양물 (세포 및 배지를 포함할 수도 있음)이 제거되고 신선한 배지로 대체되는 "반 연속 유가 배양"을 포함한다. 유가 배양은 단순한 "배치 배양"과 구별되는 반면 세포 배양을 위한 모든 구성성분 (동물 세포 및 모든 배양 영양분 포함)이 배치 배양에서 배양 공정의 시작시 배양 용기에 공급된다. 유가 배양은 공정 중에 상층액이 배양 용기로부터 제거되지 않는 반면, 관류 배양에서는, 세포가 배양에서, 예를 들어, 여과에 의해 역제되고, 배양 배지가 지속적으로 또는 간헐적으로 도입되어 배양 용기로부터 제거되는 점에 있어서 관류 배양과 더 구별될 수 있다. 하지만, 유가식 세포 배양 동안에 테스트 목적을 위한 샘플의 제거가 고려된다. 유가식 공정은 최대 작용 부피 및/또는 단백질 생산에 도달한 것으로 결정될 때까지 계속된다.

[0062] 구절 "연속 세포 배양"은 본원에서 사용될 때, 보통 특정 성장기에서, 세포를 지속적으로 성장시키는데 사용된 기술에 관한 것이다. 예를 들어, 세포의 일정한 공급이 필요하거나, 또는 관심있는 특정 폴리펩타이드 또는 단백질이 필요한 경우, 세포 배양은 특정 성장기에서의 유지를 필요로 할 수도 있다. 따라서, 세포를 특정 단계에서 유지하기 위해서는 조건이 지속적으로 관찰되고 그에 따라 조정되어야 한다.

[0063] 배지

[0064] 본 발명은 무혈청이고 약 0.1 mM 내지 10 mM 타우린을 포함하는 세포 배양 배지를 제공한다. "무혈청"은 동물 혈청, 예컨대 소 태아 혈청을 함유하지 않는 세포 배양 배지에 적용된다. 무혈청 배지는 ≤ 16 g/L의 가수분해물, 예컨대 대두 가수분해물을 함유할 수도 있다. 본 발명은 또한 무혈청일 뿐 아니라 무가수분해물인 화학적으로 한정된 배지를 제공한다. "무가수분해물"은 내인성 단백질 가수분해물, 예컨대 동물 또는 식물 단백질 가수분해물, 예를 들어, 펩톤, 트립톤 등을 함유하지 않는 세포 배양 배지에 적용된다. "기본 배지"는 세포가 증식하는 초기 배지 (시드 트레인 및/또는 세포 배양 생산의 제0 일에 존재함)이고 아미노산 기본 혼합물을 포함하는 모든 필수 영양분을 함유한다. 기본 배지에 대한 다양한 레시피 (즉, 조제물)는 상업적으로 이용 가능한 로트로 제조되거나 구입할 수도 있다. 유사하게 "기본 공급 배지"는 생산 배양 동안에 흔히 소비되고 피딩 전략 (소위 "유가식" 배양)에 활용되는 보충 영양분의 혼합물을 함유한다. 각종 기본 공급 배지는 상업적으로 이용 가능하다. "공급"은 규칙적인 간격으로, 예컨대 케모스타트(chemostat)에서와 같이, 연속 공급 배양 시스템을 포함하는, 프로토콜에 따라 (C. Altamirano et al., Biotechnol Prog. 2001 Nov-Dec; 17(6): 1032-41 참조), 또는 유가식 공정에 따라 (Y.M. Huang et al., Biotechnol Prog. 2010 Sep-Oct; 26(5): 1400-10) 배지에 예정된 첨가 또는 첨가를 포함한다. 예를 들어, 배양물은 하루에 1회, 격일마다, 3일마다 공급될 수 있거나 또는 관찰되고 있는 특정 배지 구성성분의 농도가 원하는 범위 밖에 있을 때 공급될 수도 있다.

[0065] 세포 배양 배지로부터 혈청의 제거 및 가수분해물의 감소 또는 제거는, 로트 간(lot-to-lot) 변동성을 감소시키고 다운스트림 가공 단계를 향상시키는 한편, 불행하게도 세포 성장, 생존률 및 단백질 발현을 감소시킨다. 따라서, 화학적으로 한정된, 무혈청이고 가수분해물이 적거나 없는 배지는 세포 성장 및 단백질 생산을 개선하기 위해서 추가적인 성분을 필요로 한다.

[0066] 따라서, 본 발명의 세포 배양 배지는 살아있는 세포 배양물에 필요한 모든 영양분을 함유하는 기본 배지를 포함한다. 타우린은 본원에서 기술된 바와 같이 본 발명에 따라 시드 배양 조제물에서 기본 배지에 첨가될 수도 있다. 게다가, 타우린은 생산 배양 조제물에서 기본 배지에 첨가될 수도 있으며, 그 다음에는 폴리아민과 같은 추가적인 성분의 유무 또는 아미노산, 염, 당, 비타민, 호르몬, 성장 인자, 버퍼, 항생제, 지질, 미량의 원소 등과 같은 구성성분의 농도 증가 여부와 관계없이, 배양되는 세포의 요건 또는 바람직한 세포 배양 파라미터에 따라, 주기적으로 공급될 수도 있다 (소위 "유가식" 배양과 같음).

[0067] 본 발명은 추가적인 아미노산 보충이 제공되지 않는 경우, 타우린-보충된 세포 배양 배지에서 단백질 생산 배양 과정에 걸쳐 아미노산이 고갈될 수도 있거나, 또는 고갈된 아미노산에 대하여 아미노산 보충이 제공되는 경우, 타우린-보충된 세포 배양 배지는 "고갈되지 않음" 수도 있다는 것을 제공한다 (하기 기술됨). 발명자들은 생산기 중에 타우린으로 보충된 배양물이 상기 기술된 바와 같이 다양한 배양 조건 하에서 제조할 단백질 생산을 개선한다는 것을 관찰하였다.

[0068] 본 발명은 적어도 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 mM의 농도 (리터 당 밀리몰로 표시됨)로 타우린을 함유하는 타우린-보충된 배지를 제공한다.

[0069] 한 구체예에서, 배지는 추가적으로 $100 \mu\text{M} \pm 15 \mu\text{M}$ 오르니틴, 또는 $300 \mu\text{M} \pm 45 \mu\text{M}$ 오르니틴, 또는 $600 \mu\text{M} \pm 90 \mu\text{M}$ 오르니틴, 또는 $900 \mu\text{M} \pm 135 \mu\text{M}$ 오르니틴을 함유한다. 또 다른 구체예에서, 배지는 적어도 약 $5 \text{ mg/L} \pm 1 \text{ mg/L}$ 오르니틴·HCl, 또는 적어도 약 $10 \text{ mg/L} \pm 2 \text{ mg/L}$ 오르니틴·HCl, $15 \text{ mg/L} \pm 2.25 \text{ mg/L}$

오르니틴·HCl, 또는 적어도 약 50 mg/L $\pm$ 7.5 mg/L 오르니틴·HCl, 또는 적어도 약 100 mg/L $\pm$ 15 mg/L 오르니틴·HCl, 또는 적어도 약 150 mg/L $\pm$ 22.5 mg/L 오르니틴·HCl을 함유한다.

[0070] 푸트레신이 선택적으로 보충된 배지에 첨가될 수도 있다. 푸트레신은 일부 세포 배양 배지 조제물의 구성성분으로서 매우 낮은 농도로 포함되었다; 예를 들어, 0.02-0.08 mg/L 푸트레신을 기술하는 WO 2005/028626; 미국 특허 번호 5,426,699 (0.08 mg/L); 미국 특허 번호 RE30,985 (0.16 mg/L); 미국 특허 번호 5,811,299 (0.27 mg/L); 미국 특허 번호 5,122,469 (0.5635 mg/L); 미국 특허 번호 5,063,157 (1 mg/L); WO 2008/154014 (~100 μ M - ~1000 μ M); 미국 특허 출원 번호 2007/0212770 (0.5 - 30 mg/L 폴리아민; 2 mg/L 푸트레신; 2 mg/L 푸트레신 + 2 mg/L 오르니틴; 2 mg/L 푸트레신 + 10 mg/L 오르니틴) 참조.

[0071] 일부 구체예에서, 배지는 오르니틴 및 푸트레신의 조합으로 더 보충되며, 푸트레신은 적어도 약 150 내지 720 μ M의 농도일 수 있다. 일부 구체예에서, 배지는 약 170 내지 230 μ M의 농도의 푸트레신으로 더 보충된다. 한 구체예에서, 배지는 $\geq 90 \mu\text{M} \pm 15 \mu\text{M}$ 오르니틴에 더하여 $200 \mu\text{M} \pm 30 \mu\text{M}$ 푸트레신을 함유한다. 한 구체예에서, 배지는 $\leq 15 \text{ mg/L} \pm 2.25 \text{ mg/L}$ 오르니틴에 더하여 $\leq 30 \text{ mg/L} \pm 4.5 \text{ mg/L}$ 푸트레신·2HCl을 함유한다. 또 다른 구체예에서, 배지는 $\geq 15 \text{ mg/L} \pm 2.25 \text{ mg/L}$ 오르니틴·HCl에 더하여 $\geq 30 \text{ mg/L} \pm 4.5 \text{ mg/L}$ 푸트레신·2HCl을 함유한다 (2014년 9월 18일에 공개된 국제 공개 번호 WO2014/144198A1 참조, 그 전문이 본원에 참조로 포함됨).

[0072] 다른 구체예에서, 오르니틴은 $0.09 \pm 0.014 \text{ mM}$ 내지 $0.9 \pm 0.14 \text{ mM}$, 예컨대 $0.09 \pm 0.014 \text{ mM}$, $0.3 \pm 0.05 \text{ mM}$, $0.6 \pm 0.09 \text{ mM}$, 또는 $0.9 \pm 0.14 \text{ mM}$ 오르니틴의 범위의 농도로 배지에 존재한다. 일부 구체예에서, 배지는 또한 적어도 $0.20 \pm 0.03 \text{ mM}$ 푸트레신을 함유한다. 일부 구체예에서, 추가적인 푸트레신은 $0.20 \pm 0.03 \text{ mM}$ 내지 $0.714 \pm 0.11 \text{ mM}$, 예컨대 $0.20 \pm 0.03 \text{ mM}$, 0.35 ± 0.06 , 또는 $0.714 \pm 0.11 \text{ mM}$ 푸트레신의 범위의 농도이다.

[0073] 다양한 다른 보충물이 배양 배지에 첨가될 수도 있으며, 추가적으로 적절한 조건을 결정하는 것은 당업자의 기술 범위 내에 있다. 일부 구체예에서, 배지는 고갈되지 않도록 또는 보충 영양분이 필요할 때 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글리신, 리신, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 발린, 아르기닌, 히스티딘, 아스파라긴, 글루타민, 알라닌, 아이소류신, 류신, 메티오닌, 티로신, 및 트립토판으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산의 혼합물로 보충된다.

[0074] 한 구체예에서, 배지는 약 170 μ M 내지 175 μ M 뉴클레오사이드로 더 보충된다. 한 구체예에서, 배지는 적어도 40 μ M, 적어도 45 μ M, 적어도 50 μ M, 적어도 55 μ M, 적어도 60 μ M, 적어도 65 μ M, 적어도 70 μ M, 적어도 75 μ M, 적어도 80 μ M, 적어도 85 μ M, 적어도 90 μ M, 적어도 95 μ M, 적어도 100 μ M, 또는 적어도 105 μ M의 점진적 농도로 퓨린 유도체를 함유한다. 한 구체예에서, 배지는 약 100 μ M 내지 110 μ M의 퓨린 유도체를 함유한다. 퓨린 유도체는 하이포잔틴 및 뉴클레오사이드 아데노신 및 구아노신을 포함한다. 한 구체예에서, 배지는 적어도 30 μ M, 적어도 35 μ M, 적어도 40 μ M, 적어도 45 μ M, 적어도 50 μ M, 적어도 55 μ M, 적어도 60 μ M, 또는 적어도 65 μ M의 점진적 농도로 피리미딘 유도체를 함유한다. 한 구체예에서, 배지는 약 65 μ M 내지 75 μ M의 피리미딘 유도체를 함유한다. 피리미딘 유도체는 뉴클레오사이드 티미딘, 유리딘, 및 시티딘을 포함한다. 한 특정 구체예에서, 배지는 아데노신, 구아노신, 시티딘, 유리딘, 티미딘 및 하이포잔틴을 함유한다.

[0075] 상기 첨가제들 중 임의의 것을 포함하는 것에 더하여, 한 구체예에서, 배지는 지방산 (또는 지방산 유도체) 및 토크페롤의 마이크로몰 양으로 더 보충된다. 한 구체예에서, 지방산은 리놀레산, 리놀렌산, 티옥산, 올레산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키드산, 아라키돈산, 라우르산, 베헨산, 데칸산, 도데칸산, 헥산산, 리그노세르산, 미리스트산, 및 옥탄산 중 임의의 하나 이상을 포함한다. 한 구체예에서, 배지는 토크페롤, 리놀레산, 및 티옥산을 함유한다.

[0076] 한 구체예에서, 배지는 또한 적어도 약 700 μ M 또는 적어도 약 2 mM의 점진적 농도로, 다른 영양분 및 필수 영양분을 포함하는, 비타민의 혼합물로 더 보충될 수도 있다. 한 구체예에서, 비타민의 혼합물은 D-비오틴, 콜린 클로라이드, 엽산, 미오-이노시톨, 니아신아미드, 피리독신 HCl, D-판토텐산 (hemiCa), 리보플라빈, 티아민 HCl, 비타민 B12, 등 중 하나 이상을 함유한다. 한 구체예에서, 비타민의 혼합물은 D-비오틴, 콜린 클로라이드, 엽산, 미오-이노시톨, 니아신아미드, 피리독신 HCl, D-판토텐산 (hemiCa), 리보플라빈, 티아민 HCl, 및 비타민 B12 모두를 포함한다.

[0077] 본 발명의 배지의 다양한 구체예는 상기 기술된 구체예들의 조합 중 임의의 것을 포함하며, 표시된 양의

타우린, 플러스 그 중에서도 (a) 아미노산; (b) 선택적으로 뉴클레오사이드; (c) 2가 양이온 염; (d) 지방산 및 토크페롤; 및 (e) 비타민을 포함하는 화학적으로 한정된, 무가수분해물 무혈청 배지를 포함한다. 일부 구체예에서, 모든 소량의 가수분해물이 타우린-보충된 배지에 첨가될 수도 있다.

[0078] 출원인은 본 발명의 실행시 타우린이 사용될 수도 있는 다양한 기본 배지들 중 임의의 하나 이상 또는 이것들의 조합을 구상한다. 기본 배지는 일반적으로 업계에 공지되어 있으며 그 중에서도 이글 MEME(Eagle's MEME) (최소 필수 배지) (Eagle, Science, 1955, 1 12(3168):501-504), 햄 F12(Ham's F12) (Ham, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 1965, 53:288-293), F-12 K 배지, 돌베코 배지(Dulbecco's medium), 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1952 August; 38(8): 747-752), DMEM/햄 F12 1:1, 트로웰 T8(Trowell's T8), A2 배지 (Holmes and Wolf, Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 10:389-401), 웨이머스 배지(Waymouth media) (Davidson and Waymouth, Biochem. J., 1945, 39(2): 188-199), 윌리엄스 E 배지 (Williams E media) (William's et al., Exp. Cell Res., 1971, 69: 105 et seq.), RPMI 1640 (Moore et al., J. Amer. Med. Assoc., 1967, 199:519-524), MCDB 104/110 배지 (Bettger et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 1981, 78(9):5588-5592), Ventrex HL-1 배지, 알부민-글로불린 배지 (Orr et al., Appl. Microbiol., 1973, 25(1):49-54), RPMI-1640 배지, RPMI-1641 배지, 이스코브 변형 돌베코 배지(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), 맥코이 5 A 배지(McCoy's 5 A Medium), 라이보비츠 L-15 배지(Leibovitz's L-15 Medium), 및 무혈청 배지, 예컨대 EX-CELL™ 300 Series (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas), 프로타민-아연-인슐린 배지 (Weiss et al., 1974, US 4,072,565), 비오틴-폴레이트 배지 (Cartaya, 1978, US Re30,985), 트랜스페린-지방산 배지 (Baker, 1982, US 4,560,655), 트랜스페린-EGF 배지 (Hasegawa, 1982, US 4,615,977; Chesesebeuf, 1984, US 4,786,599), 및 다른 배지 치환군 (Inlow, US 6,048,728; Drapeau, US 7,294,484; Mather, US 5,122,469; Furukawa, US 5,976,833; Chen, US 6, 180,401; Chen, US 5,856,179; Etcheverry, US 5,705,364; Etcheverry, US 7,666,416; Ryll, US 6,528,286; Singh, US 6,924,124; Luan, US 7,429,491; 등 참조)을 포함한다.

[0079] 특정 구체예에서, 배지는 화학적으로 한정되고 타우린 외에도 본원에서 정의된 아미노산 혼합물, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; HEPES 버퍼, KCl ; MgSO_4 ; NaCl ; Na_2HPO_4 또는 다른 포스페이트 염; 피루베이트; D-비오틴; 콜린 클로라이드; 염산; 미오-이노시톨; 니아신아미드; 피리독신 HCl ; D-판토텐산; 리보플라빈; 티아민 HCl ; 비타민 B12; p-아미노 벤조산; 에탄올아민 HCl ; 폴록사머 188; DL-a-토크페롤 포스페이트; 리놀레산; Na_2SeO_3 ; 티옥산; 및 글루코스; 및 선택적으로 아데노신; 구아노신; 시티딘; 유리딘; 티미딘; 및 하이포잔틴 2Na를 함유한다.

[0080] 한 구체예에서, 본 발명의 배지의 시작 오스몰 농도는 200-500, 250-400, 275-350, 또는 약 300 mOsm이다. 본 발명의 배지에서 세포의 성장 동안에, 및 특히 유가식 프로토콜에 따르는 임의의 피딩 이후에, 배양물의 오스몰 농도는 최대 약 350, 400, 450, 500 또는 최대 약 550 mOsm까지 증가할 수도 있다.

[0081] 한정 배지의 오스몰 농도가 약 300 미만인 일부 구체예에서, 오스몰 농도는 명시된 양을 초과하여 하나 이상의 염의 첨가로 약 300이 된다. 한 구체예에서, 오스몰 농도는 나트륨 클로라이드, 칼륨 클로라이드, 마그네슘 염, 칼슘 염, 아미노산 염, 지방산의 염, 나트륨 바이카보네이트, 나트륨 카보네이트, 칼륨 카보네이트, 염인 킬레이트, 당 (예를 들어, 갈락토스, 글루코스, 수크로스, 프럭토스, 푸코스, 등), 및 이것들의 조합으로부터 선택된 삼투물질 중 하나 이상을 첨가함으로써 원하는 수준으로 증가할 수 있다. 한 구체예에서, 삼투물질은 이미 한정 배지에 존재하는 구성성분에서 그것의 농도 이상으로 첨가된다 (예를 들어, 당은 당 구성성분에 대하여 명시된 농도 이상으로 첨가된다).

[0082] 상기 기술된 배지의 모든 구체예뿐 아니라, 적어도 약 0.1 mM 타우린을 함유하는 임의의 다른 무혈청 배지는 타우린 보충된 배지라고 불린다. 반대로, 타우린을 함유하지 않는 배지, 또는 0.1 mM 미만의 타우린을 함유하는 배지는 하기 타우린 보충되지 않은 배지 또는 타우린 미보충이라고 불린다.

[0083] 유가 배양

[0084] 세포 배양에 대한 피딩 전략은 다세포 유기체 또는 조직의 외부에서 세포의 최적의 성장 및 증식을 보장하는 것을 목표로 한다. 포유류 세포에 적합한 배양 조건은 업계에 공지되어 있다. 예를 들어, Animal cell culture: A Practical Approach, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992) 참조. 포유류 세포는 현탁액에서 또는 고체 기질에 부착되어 배양될 수도 있다.

[0085] 마이크로담체 유무에 관계없이, 배치, 유가식, 연속, 반연속, 또는 관류 방식으로 작동되는 유동층 바이오리액터, 중공섬유 바이오리액터, 회전병, 진탕 플라스크, 또는 교반 탱크 바이오리액터가 포유류 세포 배양에 이용

가능하다. 세포 배양 배지 또는 농축 공급 배지가 배양 중에 지속적으로 또는 간격을 두고 배지에 첨가될 수도 있다. 예를 들어, 배양물은 하루에 1회, 격일마다, 3일마다 공급될 수 있거나, 또는 관찰되고 있는 특정 배지 구성성분의 농도가 원하는 범위 밖에 있을 때 공급될 수도 있다.

[0086] 타우린의 포함에 더하여, 한 구체예에서, 배지는 적어도 20 mM의 누적 (총) 농도의 아미노산으로 더 보충될 수도 있다. 한 구체예에서, 시작 세포 배양 배지에 포함된 초기 아미노산의 농도는 보충된 아미노산의 이러한 누적 (총) 농도에 포함되지 않는다.

[0087] 세포 배양 배지의 한 구체예에서, 또는 세포를 배양하는 방법 또는 관심있는 단백질을 생산하는 방법에서, 배지는 약 20 mM 초과, 약 25 mM 초과, 약 30 mM 초과, 약 40 mM 초과, 약 50 mM 초과, 또는 약 60 mM 초과, 약 70 mM 초과, 약 100 mM 초과, 약 200 mM 초과, 약 300 mM 초과, 약 400 mM, 또는 약 500 mM 초과,의 양으로 보충될 수도 있다. 또한 본원에서는 표 1을 참조하면 된다. 한 구체예에서 배지에 첨가되는 아미노산의 양은 약 30 mM $\pm$ 10 mM 이상이다.

[0088] 보충 피딩 양생법은 세포 성장을 지지하거나, 세포 스트레스를 최소화하거나, 생산기 동안에 "비-고갈 배지"를 제공하도록 당업자에 의해 최적화될 수도 있다.

[0089] "비-고갈 배지"는 영양분, 특히, 관심있는 재조합 단백질의 생산에 필요한 아미노산을 갖도록 결정된 세포 배양 배지를 포함한다. 아미노산 공급은 전형적으로 세포 배양물에서 재조합 단백질을 생산하기 위한 구성요소로서 필요한 아미노산을 보충한다. 하지만, 일부 아미노산은 배양시 세포에 의해 생산되는 상기 특정 단백질의 요건에 따라 다른 것들에 비해 더 빨리 고갈될 수도 있다. 비-고갈 배지에서는, 피딩 양생법은 필수 아미노산이 소비되는 만큼 보충되도록 결정되었다. 따라서, 고갈 및 그 이후의 최적의 소비율 (pg/세포-일)은 다음 단계에 의해 결정될 수도 있다: 세포 배양 배지에서 관심있는 단백질을 발현하는 진행세포(들)를 배양하는 단계; 고갈 수준을 확립하기 위해 각 시점에서 배양 배지 내 각 아미노산 농도를 측정하는 단계; 아미노산 농도가 고갈 수준보다 낮아진 고갈 시점을 확인하는 단계; 각 아미노산에 대한 소비율을 계산하는 단계; 및 고갈 시점 직전의 시점의 소비율로서 최적의 소비율을 결정하는 단계. 그 다음에 세포 배양은 배양 배지가 고갈되지 않도록, 적절한 농도의 특정 아미노산으로 보충되어 결정된 바와 같은 최적의 소비율을 유지한다.

[0090] 본 발명은 고갈, 및 비-고갈 배양에서도 단백질 역가를 개선하는 타우린-보충된 세포 배양 배지를 제공하는 것으로 이해된다.

[0091] 본 발명은 상기 기술된 바와 같이 타우린-보충된 배지에서 관심있는 단백질을 발현하는 세포주를 포함하는 세포 배양물을 제공한다. 단백질 생체치료제를 생산하는데 일상적으로 사용되는 세포주의 예는 그 중에서도 1차 세포, BSC 세포, HeLa 세포, HepG2 세포, LLC-MK 세포, CV-1 세포, COS 세포, 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 세포, BHK-21 세포, CHO 세포, CHO-K1 세포, NS-1 세포, MRC-5 세포, WI-38 세포, 3T3 세포, 293 세포, Per.C6 세포 및 닭 배아 세포를 포함한다. 한 구체예에서, 세포주는 CHO 세포주 또는 대규모 단백질 생산에 최적화된 여러 특이적 CHO 세포 변종 중 하나 이상, 예를 들어, CHO-K1이다.

[0092] 한 구체예에서, 타우린-보충된 세포 배양물은 인슐린을 함유하며, 이것은 사용 시점 성분으로서 첨가될 수 있거나, 또는 배지 조제물에 포함될 수 있다. 한 구체예에서, 세포주는 생체치료 단백질을 생산할 수 있는 세포를 포함한다.

[0093] 한 구체예에서, 배지는 유가식 공정에 따라 세포 배양 중에 간격을 두고 보충된다. 유가식 배양은 일반적으로 업체에 공지되어 있으며 단백질 생산을 최적화하는데 이용된다 (Y.M. Huang et al., *Biotechnol Prog.* 2010 Sep-Oct;26(5): 1400-10 참조).

[0094] 배지 교환이 제공되지 않은 세포 성장기 또는 시드 배양 (즉, 제1 세포 배양)은 전형적으로 폴리펩타이드 생산 기로 알려져 있는 별개의 제2 배양으로 이어진다. 유가식 공정은 전형적으로 생산기 동안에 사용된다.

[0095] 본 발명은 생산 세포 배양의 시작시 (제0 일) 약 0.1 mM 내지 약 10 mM 타우린을 포함하는 세포 배양 배지를 제공한다. 대안으로, 약 0.1 mM 내지 약 10 mM 타우린을 포함하는 세포 배양 배지는 생산 세포 배양의 제1 일, 제2 일, 제3 일, 제4 일, 제5 일, 제6 일, 제7 일, 제8 일, 제9 일, 및/또는 제10 일에 보충될 수도 있다. 여러 날에 생산 배양물에 첨가된 세포 배양 배지는 약 0.1 mM 내지 약 10 mM의 타우린의 총량을 포함한다. 약 0.1 mM 내지 약 10 mM의 총 타우린을 포함하는 세포 배양 배지는 임의의 순차적인 방식으로 첨가될 수도 있다.

[0096] 타우린은 또한 시드 트레인 확장기에서 기본 배지에 보충될 수도 있다.

- [0097] 보충 공급은 생산 배양 기간 동안 추가적인 영양분, 예컨대 비타민, 아미노산 및 상기 기술된 다른 영양분을 포함하도록 매일, 또는 2-3일마다의 빈도로 간격을 두고 수행될 수도 있다.
- [0098] 보충 공급은 2주 이상의 배양 동안 생산 배양의 기간 전체에 걸쳐 적어도 2회, 또는 적어도 8회 수행될 수도 있다 (영양분을 함유하는 보충된 배지가 첨가됨). 또 다른 구체예에서, 보충 공급은 배양 기간 동안 격일마다 매일 수행될 수 있다. 대안의 배양 피딩 계획이 또한 구상된다.
- [0099] 비-고갈 배지를 제공하기 위해 추가적인 아미노산 보충이 또한 수행될 수도 있으며, 고갈된 아미노산은 업계에 공지되어 있고 본원에서 기술된 방법에 따라 결정된다. 이 양생법이 이용될 때, 추가적인 아미노산은 아미노산 고갈의 결정에 따라, 생산 배양 기간 동안 간격을 두고, 바람직하게는 매일, 또는 2-3일마다의 빈도로 보충되거나 첨가된다. 한 구체예에서, 비-고갈 세포 배양 배지를 유지하기 위해 2주 이상의 배양 동안 추가적인 아미노산의 혼합물이 약 제1 일, 약 제2 일, 약 제3 일, 약 제4 일, 약 제5 일, 약 제6 일, 약 제7 일, 약 제8 일, 약 제9 일, 약 제10 일, 약 제11 일, 약 제12 일, 약 제13 일, 및 약 제14 일에 배양에 첨가된다. 대안의 배양 피딩 계획이 또한 구상된다.
- [0100] 동물 세포, 예컨대 CHO 세포는 소규모 배양으로, 예컨대 약 25 mL 배지가 들어있는 125 mL 용기, 약 50 내지 100 mL의 배지가 들어있는 250 mL 용기, 약 100 내지 200 mL의 배지가 들어있는 500 mL 용기에서 배양될 수도 있다. 대안으로, 배양은, 예를 들어, 약 300 내지 1000 mL의 배지가 들어있는 1000 mL 용기, 약 500 mL 내지 3000 mL의 배지가 들어있는 3000 mL 용기, 약 2000 mL 내지 8000 mL의 배지가 들어있는 8000 mL 용기, 및 약 4000 mL 내지 15000 mL의 배지가 들어있는 15000 mL 용기와 같은 대규모일 수 있다. 제조용 배양물은 10,000 L 이상의 배지를 함유할 수 있다. 예를 들어, 단백질 치료제의 임상적 제조를 위한 대규모 세포 배양물은 세포가 원하는 단백질(들)을 생산하는 동안, 전형적으로 수 일, 또는 심지어는 수 주 동안 유지된다. 이 기간 동안에 배양물은 배양 과정 중에 소비되는 영양분 및 아미노산과 같은 구성성분을 함유한 농축된 공급 배지로 보충될 수 있다. 농축된 공급 배지는 임의의 세포 배양 배지 조제물을 기반으로 할 수도 있다. 이러한 농축된 공급 배지는 세포 배양 배지의 구성성분의 대부분을, 예를 들어, 정상적으로 유용한 양의 약 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 30X, 50X, 100X, 200X, 400X, 600X, 800X, 또는 심지어는 약 1000X로 함유할 수 있다. 농축된 공급 배지는 종종 유가 배양 공정에 사용된다.
- [0101] 일부 구체예에서, 타우린을 함유한 세포 배양물은 세포 성장 또는 단백질 생산 과정 동안에 부가물, 사용 시점 성분, 또는 사용 시점 화학물질로도 알려져 있는 "사용 시점 부가물"로 더 보충된다. 사용 시점 부가물은 성장 인자 또는 성장 인자 또는 기타 단백질, 버퍼, 에너지원, 염, 아미노산, 금속, 및 킬레이터 중 임의의 하나 이상을 포함한다. 기타 단백질은 트랜스페린 및 알부민을 포함한다. 사이토카인 및 케모카인을 포함하는 성장 인자들은 일반적으로 업계에 공지되어 있으며 세포 성장, 또는 어떤 경우에는, 세포 분화를 자극하는 것으로 알려져 있다. 성장 인자는 보통 단백질 (예를 들어, 인슐린), 작은 펩타이드, 또는 스테로이드 호르몬, 예컨대 에스트로겐, DHEA, 테스토스테론, 등이다. 어떤 경우에는, 성장 인자는, 예를 들어, 테트라하이드로폴레이트 (THF), 메토트렉세이트, 등과 같은, 세포 증식 또는 단백질 생산을 촉진하는 비-천연 화학물질일 수도 있다. 단백질 및 펩타이드 성장 인자의 비-제한적 예는 안지오프이오티딘, 골 형태 형성 단백질 (BMP), 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 표피 성장 인자 (EGF), 에리스로포이오티딘 (EPO), 섬유아세포 성장 인자 (FGF), 신경아교세포주-유래 신경영양 인자 (GDNF), 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF), 성장 분화 인자-9 (GDF9), 간세포 성장 인자 (HGF), 간종양-유래 성장 인자 (HDGF), 인슐린, 인슐린-유사 성장 인자 (IGF), 이동-자극 인자, 미오스타틴 (GDF-8), 신경 성장 인자 (NGF) 및 다른 신경영양인자, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 트롬보포이오티딘 (TPO), 형질전환 성장 인자 알파 (TGF- α), 형질전환 성장 인자 베타 (TGF- β), 종양 괴사 인자-알파 (TNF- α), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), wnt 신호전달 경로 작용물질, 태반 성장 인자 (PIGF), 태아 소 소마토트로핀 (FBS), 인터류킨-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, 등을 포함한다. 한 구체예에서, 세포 배양 배지는 사용 시점 부가물 성장 인자 인슐린으로 보충된다. 한 구체예에서, 배지에서 인슐린의 농도, 즉, 첨가 후 세포 배양 배지에서 인슐린의 양은 약 0.1 μ M 내지 10 μ M이다.
- [0102] 버퍼는 일반적으로 업계에 공지되어 있다. 본 발명은 임의의 버퍼 또는 버퍼들에 제한되지 않고, 당업자는 특정 단백질을 생산하는 특정 세포주와 함께 사용에 적절한 버퍼 또는 버퍼 시스템을 선택할 수 있다. 한 구체예에서, 사용 시점 부가물 버퍼는 NaHCO_3 이다. 또 다른 구체예에서, 버퍼는 HEPES이다. 다른 구체예에서, 사용 시점 부가물 버퍼는 NaHCO_3 및 HEPES 둘 다를 포함한다.
- [0103] 세포 배양에서 사용 시점 부가물로서 사용되는 에너지원이 또한 업계에 널리 공지되어 있다. 제한되는 것이 아니라, 한 구체예에서, 사용 시점 부가물 에너지원은 글루코스이다. 특정 세포주 및 생산되는 단백질의 특정 및

구체적인 요건들을 고려하면, 한 구체예에서는 글루코스가 약 1 내지 20 mM의 농도로 배지에 첨가될 수 있다. 어떤 경우에는, 글루코스는 20 g/L 이상의 높은 수준으로 첨가될 수 있다.

[0104] 킬레이터가 또한 세포 배양 및 단백질 생산의 업계에 널리 공지되어 있다. 테트라나트륨 EDTA 디하이드레이트 및 시트레이트는 업계에서 흔히 사용되는 두 가지 킬레이터이지만, 본 발명의 실행시 다른 킬레이터들이 이용될 수도 있다. 한 구체예에서, 사용 시점 부가물 킬레이터는 테트라나트륨 EDTA 디하이드레이트이다. 한 구체예에서, 사용 시점 부가물 킬레이터는 시트레이트, 예컨대 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 이다.

[0105] 한 구체예에서, 세포 배양 배지는 추가적으로 예를 들어, 글루타민과 같은 에너지원으로서 하나 이상의 사용 시점 부가물 아미노산으로 보충될 수도 있다. 한 구체예에서, 세포 배양 배지는 약 1 mM 내지 13 mM의 최종 농도로 사용 시점 부가물 글루타민으로 보충된다.

[0106] 기타 사용 시점 부가물은 다양한 금속 염, 예컨대 철, 니켈, 아연 및 구리의 염들 중 하나 이상을 포함한다. 한 구체예에서, 세포 배양 배지는 구리 설페이트, 아연 설페이트, 제2 철 클로라이드, 및 니켈 설페이트 중 임의의 하나 이상으로 보충된다.

[0107] 일부 구체예에서, 타우린 보충된 배지에서 세포 배양물로부터 수득된 단백질 역가는 타우린 보충되지 않은 배지에서 배양된 세포의 (세포로부터 수득된) 단백질 역가보다 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 11%, 적어도 12%, 적어도 13%, 적어도 14%, 적어도 15%, 적어도 16%, 적어도 17%, 적어도 18%, 적어도 19%, 적어도 20%, 적어도 21%, 적어도 22%, 적어도 23%, 적어도 24%, 적어도 25%, 적어도 26%, 적어도 27%, 적어도 28%, 또는 적어도 29%보다 더 크다. 일부 구체예에서, 타우린 보충된 배지의 세포로부터 수득된 단백질 역가는 타우린 보충되지 않은 배지에서 배양된 유사하거나 동일한 세포의 (세포로부터 수득된) 단백질 역가보다 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 또는 적어도 5% 더 크다.

[0108] 일부 구체예에서, 세포 배양물에서 암모니아 축적은 타우린 보충되지 않은 배지에서의 세포 배양물과 비교하여 타우린 보충된 배지에서 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 또는 20% 더 크게 감소한다.

[0109] 단백질 생산

[0110] 타우린 보충된 배지 및 타우린 보충된 배지에서 세포를 배양하는 방법에 더하여, 본 발명은 타우린 보충된 배지에서 배양된 세포에서 치료적으로 유효한 항체 또는 다른 생체치료제 물질과 같은 단백질을 생산하는 개선된 방법을 제공한다. 본 발명은 높은 수율로 치료 단백질을 생산하는 방법을 제공하며 타우린을 함유한 배지에서 재조합 세포주를 배양하는 단계를 포함하는데, 세포주는 치료 단백질을 암호화하는 안정하게 통합된 핵산을 포함한다.

[0111] 일부 구체예에서, 타우린을 함유한 배지 (타우린 보충된 배지)에서 배양된 포유류 세포에 의한 단백질의 역가 (수율)는 타우린이 보충되지 않은 배지에서 배양된 동일한 포유류 세포에 의한 단백질의 역가보다 적어도 100 mg/L, 적어도 0.5 g/L, 적어도 1 g/L, 적어도 1.2 g/L, 적어도 1.4 g/L, 적어도 1.6 g/L, 적어도 1.8 g/L, 적어도 2 g/L, 적어도 2.5 g/L 더 크다.

[0112] 일부 구체예에서, 배양 배지의 리터 당 단백질 생성물의 그래프로 표현될 수 있는, 타우린 보충된 배지에서 배양된 세포의 단백질 생산 수율 또는 역가는 적어도 100 mg/L, 적어도 1 g/L, 적어도 1.2 g/L, 적어도 1.4 g/L, 적어도 1.6 g/L, 적어도 1.8 g/L, 적어도 2 g/L, 적어도 2.5 g/L, 적어도 3 g/L, 적어도 3.5 g/L, 적어도 4 g/L, 적어도 4.5 g/L, 적어도 5 g/L, 적어도 5.5 g/L, 적어도 6 g/L, 적어도 6.5 g/L, 적어도 7 g/L, 적어도 7.5 g/L, 적어도 8 g/L, 적어도 8.5 g/L, 적어도 9 g/L, 적어도 9.5 g/L, 적어도 10 g/L, 적어도 15 g/L, 또는 적어도 20 g/L이다.

[0113] 일부 구체예에서, 타우린 보충된 배지의 세포로부터 수득된 단백질 역가는 타우린 보충되지 않은 배지에서 배양된 유사하거나 동일한 세포의 단백질 역가 (수율)보다 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 11%, 적어도 12%, 적어도 13%, 적어도 14%, 적어도 15%, 적어도 16%, 적어도 17%, 적어도 18%, 적어도 19%, 적어도 20%, 적어도 21%, 적어도 22%, 적어도 23%, 적어도 24%, 적어도 25%, 적어도 26%, 적어도 27%, 적어도 28% 또는 적어도 29% 더 크다.

[0114] 일부 구체예에서, 단백질 생성물 (관심있는 단백질)은 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단클론성 항체, 다중특이적 항체, 이중특이적 항체, 항원 결합 항체 단편, 단일 사슬 항체, 디아바디, 트리아바디 또는 테트라바디, Fab 단편 또는 F(ab')₂ 단편, IgD 항체, IgE 항체, IgM 항체, IgG 항체, IgG1 항체, IgG2 항체, IgG3 항체, 또는 IgG4 항체이다. 한 구체예에서, 항체는 IgG1 항체이다. 한 구체예에서, 항체는 IgG2 항체이다.

한 구체예에서, 항체는 IgG4 항체이다. 한 구체예에서, 항체는 키메라 IgG2/IgG4 항체이다. 한 구체예에서, 항체는 키메라 IgG2/IgG1 항체이다. 한 구체예에서, 항체는 키메라 IgG2/IgG1/IgG4 항체이다.

[0115]

일부 구체예에서, 항체는 항-예정된 세포 사멸 1 항체 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 US2015/0203579A1에서 기술된 항-PD1 항체), 항-예정된 세포 사멸 리간드-1 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 US2015/0203580A1에서 기술된 항-PD-L1 항체), 항-DI14 항체, 항-안지오프이에틴-2 항체 (예를 들어, 미국 특허 번호 9,402,898에서 기술된 항-ANG2 항체), 항- 안지오프이에틴-유사 3 항체 (예를 들어, 미국 특허 번호 9,018,356에서 기술된 항-AngPt13 항체), 항-혈소판 유래 성장 인자 수용체 항체 (예를 들어, 미국 특허 번호 9,265,827에서 기술된 항-PDGFR 항체), 항-Erb3 항체, 항-프롤락틴 수용체 항체 (예를 들어, 미국 특허 번호 9,302,015에서 기술된 항-PRLR 항체), 항-보체 5 항체 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 US2015/0313194A1에서 기술된 항-C5 항체), 항-TNF 항체, 항-표피 성장 인자 수용체 항체 (예를 들어, 미국 특허 번호 9,132,192에서 기술된 항-EGFR 항체 또는 미국 특허 출원 공개 번호 US2015/0259423A1에서 기술된 항-EGFRvIII 항체), 항-프로단백질 컨버타제 서브틸리신 켄신-9 항체 (예를 들어, 미국 특허 번호 8,062,640 또는 미국 특허 출원 공개 번호 US2014/0044730A1에서 기술된 항-PCSK9 항체), 항-성장 및 분화 인자-8 항체 (예를 들어, 미국 특허 번호 8,871,209 또는 9,260,515에서 기술된 항-GDF8 항체, 항-미오스타틴 항체로도 알려져 있음), 항-글루카곤 수용체 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 US2015/0337045A1 또는 US2016/0075778A1에서 기술된 항-GCGR 항체), 항-VEGF 항체, 항-IL1R 항체, 인터류킨 4 수용체 항체 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 US2014/0271681A1 또는 미국 특허 번호 8,735,095 또는 8,945,559에서 기술된 항-IL4R 항체), 항-인터류킨 6 수용체 항체 (예를 들어, 미국 특허 번호 7,582,298, 8,043,617 또는 9,173,880에서 기술된 항-IL6R 항체), 항-IL1 항체, 항-IL2 항체, 항-IL3 항체, 항-IL4 항체, 항-IL5 항체, 항-IL6 항체, 항-IL7 항체, 항-인터류킨 33 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 US2014/0271658A1 또는 US2014/0271642A1에서 기술된 항-IL33 항체), 항-호흡기 세포 융합 바이러스 항체 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 US2014/0271653A1에서 기술된 항-RSV 항체), 항-분화 클러스터 3 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 US2014/0088295A1 및 US20150266966A1, 및 미국 출원 번호 62/222,605에서 기술된 항-CD3 항체), 항-분화 클러스터 20 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 US2014/0088295A1 및 US20150266966A1, 및 미국 특허 번호 7,879,984에서 기술된 항-CD20 항체), 항-CD19 항체, 항-CD28 항체, 항-분화 클러스터-48 (예를 들어, 미국 특허 번호 9,228,014에서 기술된 항-CD48 항체), 항-Fc γ d1 항체 (예를 들어, 미국 특허 번호 9,079,948에서 기술됨), 항-중등 호흡기 증후군 바이러스 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 US2015/0337029A1에서 기술된 항-MERS 항체), 항-에볼라 바이러스 항체 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 US2016/0215040에서 기술됨), 항-지카 바이러스 항체, 항-림프구 활성화 유전자 3 항체 (예를 들어, 항-LAG3 항체, 또는 항-CD223 항체), 항-신경 성장 인자 항체 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 US2016/0017029 및 미국 특허 번호 8,309,088 및 9,353,176에서 기술된 항-NGF 항체) 및 항-액틴 A 항체로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 이중특이적 항체는 항-CD3 x 항-CD20 이중특이적 항체 (미국 특허 출원 공개 번호 US2014/0088295A1 및 US20150266966A1에서 기술됨), 항-CD3 x 항-뮤신 16 이중특이적 항체 (예를 들어, 항-CD3 x 항-Mud 6 이중특이적 항체), 및 항-CD3 x 항-전립선-특이적 막 항원 이중특이적 항체 (예를 들어, 항-CD3 x 항-PSMA 이중특이적 항체)로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 관심있는 단백질은 알리코쿰, 사틸루마, 파시누마, 네스바큐마, 듀필루마, 트레보그루마, 에비나큐마, 및 리뉴큐마로 구성된 군으로부터 선택된다. 이 개시물 전체에 걸쳐 언급된 모든 간행물들은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0116]

일부 구체예에서, 관심있는 단백질은 Fc 모이어티 및 또 다른 도메인을 함유하는 제조항 단백질 (예를 들어, Fc-융합 단백질)이다. 일부 구체예에서, Fc-융합 단백질은 수용체 Fc-융합 단백질이며, 이것은 Fc 모이어티에 커플링된 수용체의 하나 이상의 세포 외 도메인(들)을 함유한다. 일부 구체예에서, Fc 모이어티는 힌지 영역에 이어서 IgG의 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 수용체 Fc-융합 단백질은 단일 리간드 또는 다수의 리간드에 결합하는 둘 이상의 별개의 수용체 사슬을 함유한다. 예를 들어, Fc-융합 단백질은, 예를 들어, IL-1 트랩 (예를 들어, 티로나셉트, 이것은 hIgG1의 Fc에 융합된 IL-1R1 세포 외 영역에 융합된 IL-1 RAcP 리간드 결합 영역을 함유함; 미국 특허 번호 6,927,004 참조, 이것은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다), 또는 VEGF 트랩 (예를 들어, 아플리버셉트 또는 지브-아플리버셉트, 이것은 hIgG1의 Fc에 융합된 VEGF 수용체 Flk1의 Ig 도메인 3에 융합된 VEGF 수용체 Flt1의 Ig 도메인 2를 함유함; 미국 특허 번호 7,087,411 및 7,279,159 참조)과 같은 TRAP 단백질이다. 다른 구체예에서, Fc-융합 단백질은 ScFv-Fc-융합 단백질이며, 이것은 Fc 모이어티에 커플링된 항체의 하나 이상의 항원-결합 도메인(들), 예컨대 가변 중쇄 단편 및 가변 경쇄 단편 중 하나 이상을 함유한다.

[0117]

본 발명은 단백질 생산을 위해 임의의 특정 유형의 세포에 제한되지 않는다. 단백질 생산에 적합한 세포 유형의

에는 포유류 세포, 곤충 세포, 조류 세포, 박테리아 세포, 및 효모 세포를 포함한다. 세포는 줄기 세포 또는 재조합 유전자 발현을 위해 벡터로 형질전환된 재조합 세포, 또는 바이러스 생성물을 생산하기 위한 바이러스로 트랜스펙션된 세포일 수도 있다. 세포는 관심있는 단백질을 암호화하는 재조합 이중 기원 폴리뉴클레오타이드 구조체를 함유할 수도 있다. 상기 구조체는 에피솜일 수 있거나 또는 세포의 게놈으로 물리적으로 통합된 요소일 수 있다. 세포는 또한 이중 기원 폴리펩타이드 구조체 상에 암호화된 관심있는 단백질 없이 관심있는 단백질을 생산할 수도 있다. 다시 말해서, 항체를 생산하는 B-세포와 같이, 세포는 자연적으로 관심있는 단백질을 암호화할 수도 있다. 세포는 또한 1차 세포, 예컨대 닭 배아 세포, 또는 1차 세포주일 수도 있다. 유용한 세포의 예는 BSC 세포, LLC-MK 세포, CV-1 세포, COS 세포, 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, 닭 배아 세포, NS-1 세포, MRC-5 세포, WI-38 세포, BHK 세포, 293 세포, RK 세포, Per.C6 세포 및 CHO 세포를 포함한다. 다양한 구체예에서, 세포주는 CHO 세포 유도체, 예컨대 CHO-K1, CHO DUX B-11, CHO DG-44, Veggie-CHO, GS-CHO, S-CHO, 또는 CHO lec 돌연변이 라인이다.

[0118] 한 구체예에서, CHO 세포인 세포는 이소성으로 단백질을 발현한다. 한 구체예에서, 단백질은 면역글로불린 중쇄 영역, 예컨대 CH1, CH2, 또는 CH3 영역을 포함한다. 한 구체예에서, 단백질은 인간 또는 설치류 면역글로불린 CH2 및 CH3 영역을 포함한다. 한 구체예에서, 단백질은 인간 또는 설치류 면역글로불린 CH1, CH2, 및 CH3 영역을 포함한다. 한 구체예에서, 단백질은 힌지 영역 및 CH1, CH2, 및 CH3 영역을 포함한다. 한 구체예에서, 단백질은 면역글로불린 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 구체예에서, 단백질은 면역글로불린 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 구체예에서, 단백질은 면역글로불린 중쇄 가변 도메인 및 면역글로불린 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 한 구체예에서, 단백질은 인간 항체, 설치류 항체, 또는 키메라 인간/설치류 항체 (예를 들어, 인간/마우스, 인간/랫트, 또는 인간 햄스터)와 같은 항체이다.

[0119] 생산기는, 진탕 플라스크 또는 웨이브 백(wave bag)에서부터 1리터 바이오리액터, 및 대규모 산업용 바이오리액터까지, 임의의 규모의 배양으로도 실행될 수 있다. 유사하게, 시드 트레인 확장기는, 진탕 플라스크 또는 웨이브 백에서부터, 1리터 이상의 바이오리액터까지, 임의의 규모의 배양으로도 실행될 수 있다. 대규모 공정은 약 100리터 내지 20,000리터 이상의 부피에서 실행될 수 있다. 온도 변화 또는 화학적 유도과 같은 여러 수단들 중 하나 이상이 단백질 생산을 제어하는데 사용될 수도 있다. 성장기는 생산기보다 더 높은 온도에서 발생할 수도 있다. 예를 들어, 성장기는 약 35℃ 내지 38℃의 제1 온도에서 발생할 수도 있고, 생산기는 약 29℃ 내지 37℃, 선택적으로 약 30℃ 내지 36℃ 또는 약 30℃ 내지 34℃의 제2 온도에서 발생할 수도 있다. 이에 더하여, 단백질 생산의 화학적 유도물질, 예컨대 카페인, 부티레이트, 타목시펜, 에스트로젠, 테트라사이클린, 독시사이클린, 및 헥사메틸렌 비스아세트아미드 (HMB)는 온도 변화와 동시에, 이전에, 또는 이후에 첨가될 수도 있다. 온도 변화 이후에 유도물질이 첨가되면, 그것들은 온도 변화 이후 1시간 내지 5일, 예컨대 온도 변화 이후 1일 내지 2일에 첨가될 수 있다. 생산 세포 배양은 케모스타트에서와 같이 (C. Altamirano et al., 2001 supra 참조), 또는 유가식 공정에 따라 (Huang, 2010 supra) 연속 공급 배양 시스템으로서 실행될 수도 있다.

[0120] 본 발명은 세포 배양 공정을 통해 단백질을 생산을 개선하는데 유용하다. 본 발명에서 사용된 세포주는 상업적 또는 과학적으로 관심이 있는 폴리펩타이드를 발현하도록 유전적으로 조작될 수 있다. 세포주를 유전적으로 조작하는 것은 숙주 세포가 원하는 재조합 폴리펩타이드를 발현하도록 세포를 재조합 폴리뉴클레오타이드 분자로 트랜스펙션, 형질전환 또는 형질도입하거나, 또는 (예를 들어, 재조합 세포와 비-재조합 세포의 상동 재조합 및 유전자 활성화 또는 융합에 의해) 달리 변화시키는 것을 수반한다. 관심있는 폴리펩타이드를 발현하도록 세포 또는 세포주를 유전적으로 조작하기 위한 방법 및 벡터는 당업자에게 널리 공지되어 있으며; 예를 들어, 다양한 기술들은 Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds. (Wiley & Sons, New York, 1988, 및 분기별 업데이트); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Laboratory Press, 1989); Kaufman, R. J., Large Scale Mammalian Cell Culture, 1990, pp. 15-69에서 예시되어 있다. 배양물에서 성장에 적합한 다양한 세포주들은 American Type Culture Collection (Manassas, Va.) 및 상업적인 판매 회사로부터 이용 가능하다. 산업상 흔히 사용되는 세포주의 예는 VERO, BHK, HeLa, CVI (Cos 포함), MDCK, 293, 3T3, 골수종 세포주 (예를 들어, NSO, NSI), PC12, WI38 세포, 및 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포를 포함한다. CHO 세포는 복합 재조합 단백질, 예컨대 사이토카인, 응고 인자, 및 항체의 생산에 널리 사용된다 (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)-결핍 돌연변이 세포주 (Urlaub et al. (1980), Proc Natl Acad Sci USA 77: 4216-4220), DXBI 1 및 DG-44는 효율적인 DHFR 선택 가능 및 증폭 가능 유전자 발현 시스템이 이 세포들에서 높은 수준의 재조합 단백질 발현을 허용하기 때문에 (Kaufman RJ. (1990), Meth Enzymol 185:537-566) 바람직한 CHO 숙주 세포주이

다. 이에 더하여, 이 세포들은 부착 또는 현탁 배양으로서 조작하기 쉽고 비교적 양호한 유전적 안정성을 나타낸다. CHO 세포 및 그것들에 의해 재조합으로 발현된 단백질은 광범위하게 특성화되었고 규제 기관에 의해 임상적 및 상업적 제조에서의 사용에 대하여 승인되었다. 일부 구체예에서, CHO 세포주는 미국 특허 출원 공개 번호 2010/0304436 A1, 2009/0162901 A1 및 2009/0137416 A1, 및 미국 특허 번호 7,455,988 B2, 7,435,553 B2, 및 7,105,348 B2에서 기술된 세포주이다.

본 발명은 본원에서 기술된 특정 구체예에 의해 범위가 제한되는 것이 아니며, 이것들은 본 발명의 개개의 양태 또는 구체예의 예시로서 의도된다. 기능적으로 동등한 방법 및 구성성분은 본 발명의 범위 내에 있다. 본 발명의 다양한 변형들은, 본원에서 기술된 것들 외에도, 상기 기술된 설명 및 첨부된 도면으로부터 당업자에게 분명하다. 이러한 변형들은 본 발명의 범위 내에 있다.

실시예

실시예 1: 타우린 보충으로 인한 개선된 항체 역가

실시예 1A - 고처리량 진탕 플라스크 배양: 250mL 진탕 플라스크를 CHO-K1로부터 유래된 단클론성 항체 (Ab1)를 생산하는 세포주의 시드 배양으로부터 접종하였다. 접종된 세포를 35.5℃에서 17일 동안 키웠고 필요에 따라 글루코스 및 다른 보충 영양분을 공급하였다. 세포를 화학적으로 한정된 (무가수분해물 및 무혈청) 기본 배지에서 키웠다.

각 배양 플라스크를 보충하지 않거나 (플라스크 1 a), 또는 제0 일에 1 mM 타우린으로 보충하였다 (플라스크 1 b).

표 2

평균 17일 항체 역가 (g/L) 및 베이스라인에 비해 대략적인 역가 증가 (%)

플라스크	배치 보충	Ab1 역가	
1a	보충되지 않음*	7.3 g/L	
1b	타우린	7.9 g/L [^]	8%

* % 역가 증가에 대한 베이스라인 대조군; 보충되지 않은 배지의 역가와 비교된 플라스크 1 b (플라스크 1 a).

[^] 보충되지 않은 배양물과 보충된 배양물 간의 최종 역가의 차이는 통계적으로 유의하다 ($p < 0.05$).

역가 값을 제17 일에 수확된 단백질로부터 계산하였고, 베이스라인과 비교하여 통계적으로 유의하다 ($p < 0.05$). 타우린-보충된 배양물은 보충되지 않은 배양물보다 최종 단백질 역가의 총 8% 증가를 나타낸다.

실시예 1B - 벤치톱 규모(Benchtop-Scale) 바이오리액터: 유사한 예에서, 더 큰 규모의 생산에서, 2L 바이오리액터를 CHO-K1로부터 유래된 단클론성 항체 (Ab2, Ab3 또는 Ab4)를 생산하는 세포의 시드 배양으로부터 접종하였다. 접종된 배양물을 35.5 °C의 온도, 40.4%의 DO 설정값 및 22 ccm의 공기 살포(air sparge)로 14일 동안 키웠다. Ab2 및 Ab3 공정은 7.0 ± 0.15 의 pH 설정값을 갖는 한편, Ab4 공정은 7.13 ± 0.27 의 pH 설정값을 갖는다. 글루코스, 소포제 및 기본 사료를 필요에 따라 바이오리액터에 공급하였다. 배양물을 보충되지 않은 배지 (바이오리액터 2a, 3a, 4a)에서 키우거나 또는 약 1 mM 타우린-보충된 배지 (Ab2 및 Ab3) 또는 약 3 mM 타우린-보충된 배지 (Ab4)에서 키웠으며, 생산의 제0 일에 첨가하였다 (각각 바이오리액터 2b, 3b 및 4b).

항체 수율 (역가)은 Ab2-생산 세포에 대하여 6.4 g/L였지만, 타우린과 함께 성장한 세포는 8 g/L 단백질을 수득하였다. 타우린 보충 없이 성장한 세포와 비교하여 역가의 24% 증가는 통계적으로 유의하다 ($p < 0.05$). Ab3-생산 배양물 및 Ab4-생산 배양물에 대하여 결과로 얻은 최종 역가는 또한 14일 후 타우린이 보충되지 않은 배양물과 비교하여 유의하게 더 크다 (각각 11% 및 20%) ($p < 0.05$). 표 3 참조.

표 3

[0132]

평균 14일 항체 역가 (g/L) 및 베이스라인에 비해 대략적인 역가 증가 (%)

배지 보충	바이오 리액터 #	Ab2 역가		바이오 리액터 #	Ab3 역가		바이오 리액터 #	Ab4 역가	
보충되지 않음*	2a	6.4 g/L		3a	6.6 g/L		4a	4.4 g/L	
타우린	2b	8g/L [^]	24%	3b	7.3 g/L [^]	11%	4b	5.3 g/L [^]	20%

[0133]

* 보충되지 않은 배지는 % 역가 증가에 대한 베이스라인 대조군이며, 바이오리액터 2b, 3b, 또는 4b % 역가 증가는 보충되지 않은 배지 (각각 바이오리액터 2a, 3a, 또는 4a)의 역가와 비교된다.

[0134]

[^] 보충된 배양물과 보충되지 않은 배양물 간의 최종 역가의 차이는 통계적으로 유의하다 ($p < 0.05$).

[0135]

단백질 역가에 관한 시간 경로를 Ab3-생산 배양물에 대하여 플롯팅하였고 타우린 보충으로 인한 단백질 역가의 유의한 개선을 제6 일에 시작하여, 배양일마다 관찰하였다.

표 4

[0136]

대표적인 시점에 타우린 보충으로 인한 항체 역가 (g/L) 개선

바이오 리액터	배지 보충	제6 일에 Ab3 역가		제9 일에 Ab3 역가		제14 일에 Ab3 역가	
3a	보충되지 않음*	1.7 g/L		4.1 g/L		6.6 g/L	
3b	타우린	1.9 g/L	12%	5.3 g/L [^]	29%	7.3 g/L [^]	11%

[0137]

* 같은 날 수거된 보충되지 않은 배지와 비교하여 대략적인 증가 (%)

[0138]

[^] 타우린 보충으로 역가의 증가는 보충되지 않은 배양물과 비교하여 통계적으로 유의하다 ($p < 0.05$).

[0139]

생산 배양물에서 이르면 제6 일에 역가의 유의한 개선을 볼 수 있었다 (타우린이 보충되지 않은 같은 배양물과 비교하여 12% 증가). 도 1 참조. 이 시간 경로에서 최대 차이는 제9 일에 볼 수 있고 (바이오리액터 3a와 비교하여 바이오리액터 3b에서 29%의 유의한 ($p < 0.05$) 증가), 11%의 유의한 ($p < 0.05$) 역가 증가를 배양의 마지막 날 (제14 일)에 관찰하였다.

[0140]

타우린 보충의 단백질 생산 이점을 다른 규모 (실시에 1A 및 1B) 및 다른 세포주 (실시에 1B)에 걸쳐 관찰한다.

[0141]

실시예 2: 고처리량 진탕 플라스크 배양에서 다양한 타우린 농도로 일정한 생산성

[0142]

생산 제0 일에 배양물에 첨가된 타우린의 양을 변화시켜 단백질 역가의 일관성을 테스트하였다. 250 mL 진탕 플라스크를 CHO-K1으로부터 유래된 단클론성 항체 (Ab1)를 생산하는 세포주의 시드 배양으로부터 접종하였다. 접종된 세포를 35.5°C에서 14일 동안 키웠고 필요에 따라 글루코스 및 다른 보충 영양분을 공급하였다. 세포를 화학적으로 한정된 (무가수분해물 및 무혈청) 기본 배지에서 키웠다.

[0143]

각각의 배양물은 타우린을 함유하지 않거나 (보충되지 않음) 또는 0.1 mM, 0.3 mM, 0.5 mM, 0.7 mM, 1 mM, 3 mM, 5 mM, 7.5 mM 또는 10 mM 농도로 타우린을 함유하였다.

표 5

[0144]

0.1 내지 10 mM 타우린으로 보충된 배양물에 대한 평균 14일 항체 역가 (g/L)

진탕 플라스크	배지 보충	Ab1 역가	
5a	보충되지 않음*	6.5 g/L	
5b	0.1 mM 타우린 [#]	6.7 g/L	3%
5c	0.3 mM 타우린 [^]	6.8 g/L	5%
5d	0.5 mM 타우린 [^]	6.9 g/L	6%
5e	0.7 mM 타우린 [^]	7.0 g/L	8%
5f	1 mM 타우린 [^]	7.0 g/L	8%
5g	5 mM 타우린 [^]	7.1 g/L	9%
5h	7.5 mM 타우린 [^]	7.1 g/L	9%

5i	10 mM 타우린 [^]	7.1 g/L	9%
----	------------------------	---------	----

- [0145] * 보충되지 않은 배지는 % 역가 증가에 대한 베이스라인 대조군이다.
- [0146] # 최종 역가의 차이는 보충되지 않은 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하다 ($p < 0.1$).
- [0147] ^ 최종 역가의 차이는 보충되지 않은 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하다 ($p < 0.05$).
- [0148] 타우린이 적어도 0.1 mM 내지 10 mM의 범위로 보충될 때, 타우린-보충의 양을 변화시키면 일정하게 높은 역가를 생산하는 것으로 보인다. 타우린 보충된 조건에 대한 최종 역가는 일정하게 낮은 조건과 통계적으로 다르다. 0.1 mM 타우린에 대하여, $p < 0.1$ 인 한편 0.3 mM 내지 10 mM 타우린에 대해서는 $p < 0.05$ 이다.
- [0149] **실시예 3: 고처리량 진탕 플라스크 배양에서 다양한 타우린 피딩 계획의 테스트**
- [0150] **실시예 3A: 시드 트레인 확장기 동안에 타우린의 첨가:**
- [0151] 시드 트레인 확장기 동안에 배양물에 타우린 첨가의 이점을 고처리량 진탕 플라스크 모델에서 평가하였다. 플라스크 6a에서 (표 6), Ab1-생산 CHO 세포를 1 mM 타우린으로 보충된 화학적으로 한정된 (무가수분해물 및 무혈청) 기본 배지에서 해동시켰다. 기본 배지의 타우린 농도를 확장기 전체에 걸쳐 1 mM로 유지하였다. 생산 중에, 배양 기본 배지를 제0 일에 1 mM 타우린으로 보충하였다. 글루코스 및 영양분 기본 사료를 17일 생산 동안에 필요에 따라 공급하였다.
- [0152] 플라스크 6b 세포는 시드 트레인 확장기 전체에 걸쳐 타우린이 없는 (보충되지 않은) 화학적으로 한정된 (무가수분해물 및 무혈청) 기본 배지에서 성장하였다. 생산 제0 일에, 배양 기본 배지를 1 mM 타우린으로 보충하였다. 17일 생산 동안에, 글루코스 및 양분 기본 사료를 필요에 따라 공급하였다.

표 6

- [0153] 공정의 다른 단계 동안에 1 mM 타우린으로 보충된 배양물에 대한 평균 17일 항체

진탕 플라스크	1 mM 타우린의 첨가	Ab1 역가
6a	시드 트레인 및 생산기	7.7 g/L
6b	단지 생산기	7.8 g/L

- [0154] 최종 역가 (제17 일)의 차이는 통계적으로 유의하지 않다 ($p > 0.1$)
- [0155] 두 조건 (생산기에만 또는 조합된 시드트레인 및 생산기에 타우린 보충) 모두에 대한 최종 역가 (제17 일) 값은 유사하다. 결과의 역가는 통계적으로 유의하지 않다 ($p > 0.1$). 시드 트레인 확장기에서 타우린 첨가의 이점은 생산기에서 타우린을 보충하는 것과 유사하다.
- [0156] **실시예 3B: 생산기 동안에 다양한 타우린 피딩 계획:** 타우린의 다양한 표준 피딩 계획이 타우린-보충된 배양물에 대한 단백질 역가에 대하여 어떠한 효과가 있는지를 결정하기 위해서, Ab1-생산 CHO 세포를 성장시키는 유사한 진탕 플라스크에서 추가적인 실험을 실행하였다. 세포를 실시예 2와 유사한 다양한 배양 조건으로 처리하였으며, 피딩 계획은 전과 같고, 글루코스/영양분 기본 사료를 필요에 따라 첨가하였다.
- [0157] Ab1-생산 배양물을 총 5 mM 타우린으로 보충하였다. 다양한 타우린 피딩 계획에서 유사한 생산성 (7.1 g/L, 6.8 g/L 및 7.0 g/L)을 관찰한다. 이 실험에서 비교된 바와 같이 역가 값은 통계적으로 다르지 않다 ($p > 0.1$) (표 7 참조).

표 7

- [0158] 다양한 계획으로 5mM 타우린으로 보충된 배양물에 대한 평균 14일 항체 역가 (g/L)

타우린 계획	Ab1 제14 일 역가
5 mM 제0 일	7.1 g/L
1 mM 제0 일, 제3 일, 제5 일, 제7 일, 제10 일 (총 5 mM)	6.8 g/L

1 mM 제0 일; 2 mM 제7 일, 제10 일 (총 5 mM)	7.0 g/L
--	---------

[0159] 제14 일 역가 값 간의 차이는 통계적으로 유의하지 않다 ($p > 0.1$).

[0160] 타우린의 피딩 계획은 어떠한 부정적인 효과도 없을 뿐 아니라, 타우린-보충이 생성물 수율에 이로운 결과를 변화시키지 않았다. 따라서, 타우린 보충은 제0 일에 1회 첨가되거나, 생산기 후속 일에 첨가될 수도 있거나, 또는 생산기 동안에 여러 간격을 두고 첨가될 수도 있다.

[0161] **실시예 4: 고처리량 진탕 플라스크 배양에서 암모니아 부산물의 측정**

[0162] Ab1-생산 CHO 세포의 타우린-보충된 배양물에 대하여 실시예 2와 유사한 방식으로 실행된 14일 배양 이후에 암모니아 부산물을 측정하였다. 세포를 상기와 유사한 다양한 배양 조건으로 처리하였으며 글루코스/양분 기본 사료를 필요에 따라 첨가하였다.

표 8

[0163] 평균 17일 암모니아 (mM) 및 감소 (%)

배지 공급	Ab1 암모니아	
보충되지 않음*	2.56 mM	
타우린	1.73 mM [^]	-32%

[0164] * % 암모니아 감소에 대한 베이스라인 대조군; 보충되지 않은 배지의 암모니아와 비교된 타우린 보충된 조건.

[0165] [^] 암모니아 농도의 감소는 통계적으로 유의하다 ($p < 0.1$).

[0166] Ab1-생산 세포에서, 배지에 타우린 보충은 건강하고, 지속 가능한 배양을 지지하며 암모니아 부산물은 32%만큼 감소하였다. 타우린 보충으로부터 암모니아 농도의 감소는 통계적으로 유의하다 ($p \leq 0.1$).

[0167] 본 발명은 다른 특정 구체예에서 구체화될 수도 있다.

도면

도면1

