



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0084859
(43) 공개일자 2009년08월05일

(51) Int. Cl.

C12N 15/85 (2006.01) *C12N 7/08* (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01) *C12R 1/93* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7009590

(22) 출원일자 2007년10월05일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2009년05월08일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/080610

(87) 국제공개번호 WO 2008/051698
국제공개일자 2008년05월02일

(30) 우선권주장

60/862,550 2006년10월23일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인

메디뮨 엘엘씨

미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디뮨 웨이

(72) 발명자

육, 인

미국 캘리포니아주 94710, 베클리, 쇠시스 스트럿 1729

정, 웬린

미국 캘리포니아주 94587, 유니언시티, 팜데일 코트 32831

수구이, 미사

미국 캘리포니아주 95051, 산타 클라라, 파울러 애비뉴 3141

(74) 대리인

김성기, 김진희

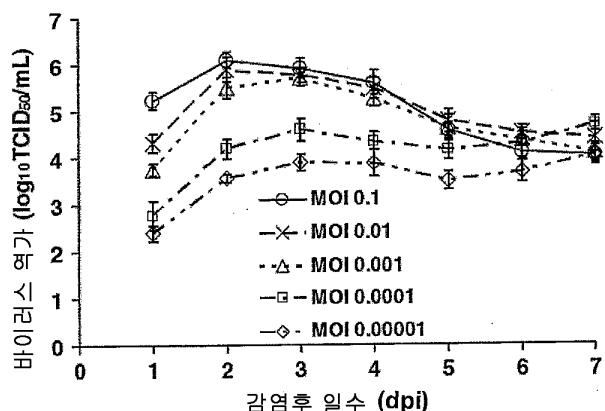
전체 청구항 수 : 총 51 항

(54) 바이러스 백신 후보를 위한 무혈청 바이러스 증식 플랫폼

(57) 요 약

본 발명은 바이러스를 증식하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 바이러스를 증식하기 위해 최적화된 조건을 제공한다. 다음 파라미터들의 최적화를 제공한다: 배지에 대한 보충제로서의 지질 농축액, 감염전에서부터 감염후의 온도 변화, 감염 다중도, 비드 대 비드의 직접 전달 및 감염전 배지의 혈청 보충. 특히, 본 발명은 화학적으로 정의된 지질 농축액(CDLC)를 포함하는 배지에서 바이러스로 감염된 세포를 배양하여 바이러스를 증식하는 방법을 처음으로 제공한다. 다른 청구에서, CDLC를 바이러스 감염된 세포의 배양을 위해, 실질적으로 무혈청 배지에 가한다.

대 표 도 - 도1



(30) 우선권주장

60/944,162 2007년06월15일 미국(US)

60/973,921 2007년09월20일 미국(US)

PCT/US2007/066037 2007년04월05일 세계지적재

산권기구(WIPO)(WO)

특허청구의 범위

청구항 1

실질적으로 무혈청 세포 배양 배지에서 바이러스로 감염된 베로(Vero) 세포를 포함하는 베로 세포 배양물로서, 상기 배양물은 $7.0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 이상의 바이러스 역가를 산출하는 것인 베로 세포 배양물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 약 0.5 내지 약 2.5 g/L 농도의 글루코오스를 포함하는 배양물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 약 1.0 내지 약 2.0 g/L 농도의 락테이트를 포함하는 배양물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 약 2.0 내지 약 4.0 g/L 농도의 글루타민을 포함하는 배양물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 약 1.25 내지 약 2.5 mM 농도의 암모늄 이온을 포함하는 배양물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 배양물은 $8.0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 이상의 바이러스 역가를 산출하는 것인 배양물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 바이러스는 음성 가닥 RNA 바이러스인 것인 배양물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 음성 가닥 RNA 바이러스는 비분절된 것인 배양물.

청구항 9

제8항에 있어서, 바이러스는 파라믹소바이러스(paramyxovirus)인 것인 배양물.

청구항 10

제9항에 있어서, 파라믹소바이러스는 재조합 파라인플루엔자 바이러스, 재조합 호흡기 세포융합 바이러스(respiratory syncytial virus) 또는 재조합 메타뉴모 바이러스(metapneumovirus)인 것인 배양물.

청구항 11

제10항에 있어서, 파라인플루엔자 바이러스는 소의 파라인플루엔자 바이러스인 것인 배양물.

청구항 12

제11항에 있어서, 소의 파라인플루엔자 바이러스는 하나 이상의 인간 파라인플루엔자 바이러스 뉴클레오티드 서열을 더 포함하는 것인 배양물.

청구항 13

제10항에 있어서, 재조합 파라인플루엔자 바이러스는 호흡기 세포융합 바이러스 뉴클레오티드 서열을 더 포함하는 것인 배양물.

청구항 14

a. 화학적으로 정의된 지질 농축액(CDLC)과 마이크로담체를 함유하는 세포 배양 배지를 베로 세포로 씨딩(seeding)하는 단계를 포함하는, 제1 온도의 생물반응기에서 베로 세포를 배양하는 단계;

b. 약 0.001 내지 약 0.10의 감염 다중도 및 제2 온도에서, 단계 (a)에서 배양된 베로 세포를 감염시키는 단계로서, 상기 제2 온도는 상기 제1 온도보다 낮은 것인 감염 단계; 및

c. 단계 (c)의 세포 배양물로부터 바이러스를 회수하는 단계로서, 상기 회수된 바이러스는 $7.0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 이상의 바이러스 역가를 산출하는 것인 회수 단계

를 포함하는 베로 세포내에서 바이러스를 증식시키는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 생물반응기는 일회용 생물반응기(SUB) 시스템인 것인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, SUB는 교반식 탱크 반응기 시스템인 것인 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 세포 배양 배지는 무혈청 배지인 것인 방법.

청구항 18

제14항에 있어서, CDLC는 1% v/v의 농도로 더해지는 것인 방법.

청구항 19

제14항에 있어서, 세포 배양 배지는 OptiPROTM SFM, VP-SFM, SFM4MegaVirTM, Ex-Cell VeroTM 또는 WME로 이루어진 균으로부터 선택되는 무혈청 배지인 것인 방법.

청구항 20

제14항에 있어서, 화학적으로 정의된 지질 농축액은 플루로닉 F-68, 에틸 알콜, 콜레스테롤, 트윈 80, DL-알파-토코페롤 아세테이트, 스테아르산, 미리스트산, 올레산, 리놀레산, 팔미트산, 팔미톨레산, 아라키돈산, 및 리놀렌산 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제14항에 있어서, 화학적으로 정의된 지질 농축액은 플루로닉 F-68, 에틸 알콜, 콜레스테롤, 트윈 80, DL-알파-토코페롤 아세테이트, 스테아르산, 미리스트산, 올레산, 리놀레산, 팔미트산, 팔미톨레산, 아라키돈산, 및 리놀렌산을 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제14항에 있어서, 화학적으로 정의된 지질 농축액은 100,000 mg/L의 플루로닉 F-68, 100,00 mg/L의 에틸 알콜, 220 mg/L의 콜레스테롤, 2,200 mg/L의 트윈 80, 70 mg/L의 DL-알파-토코페롤 아세테이트, 10 mg/L의 스테아르산, 10 mg/L의 미리스트산, 10 mg/L의 올레산, 10 mg/L의 리놀레산, 10 mg/L의 팔미트산, 10 mg/L의 팔미톨레산, 2 mg/L의 아라키돈산, 및 10 mg/L의 리놀렌산을 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제14항에 있어서, 단계 (a)는 약 50 내지 약 150 rpm의 교반 속도로 배양물의 교반을 이용하는 것인 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 교반은 간헐적인 것인 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 단계 (a)의 배양 조건은 약 35% 내지 약 100%의 용존 산소(DO)량을 이용하는 것인 방법.

청구항 26

제14항에 있어서, 제1 온도는 약 36°C 내지 약 38°C인 것인 방법.

청구항 27

제14항에 있어서, 제2 온도는 약 30°C 내지 약 33°C인 것인 방법.

청구항 28

제14항에 있어서, 마이크로담체 농도는 약 1 내지 약 4 g/L인 것인 방법.

청구항 29

제14항에 있어서, 상기 단계 (a)의 상기 세포 배양물은 약 pH 6.6 내지 약 7.6 인 것인 방법.

청구항 30

제14항에 있어서, 단계 (a) 이후이나, 단계 (b) 이전에 세포 배양 배지의 약 50% 내지 약 90%가 교환되는 것인 방법.

청구항 31

제14항에 있어서, 세포 배양 배지는 동일한 조성을 갖는 세포 배양 배지로 교환되는 것인 방법.

청구항 32

제14항에 있어서, 세포 배양 배지는 상이한 조성을 갖는 세포 배양 배지로 교환되는 것인 방법.

청구항 33

제14항에 있어서, 감염 다중도는 약 0.01인 것인 방법.

청구항 34

제14항에 있어서, 배로 세포는 단계 (c)에서 2 내지 12일동안 배양되는 것인 방법.

청구항 35

제14항에 있어서, 바이러스는 음성 가닥 RNA 바이러스인 것인 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 음성 가닥 RNA 바이러스는 비분절된 것인 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 바이러스는 파라미소바이러스인 것인 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 파라미소바이러스는 재조합 파라인플루엔자 바이러스, 재조합 호흡기 세포융합 바이러스 또는 재조합 메타뉴모 바이러스인 것인 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 파라인플루엔자 바이러스는 소의 파라인플루엔자 바이러스인 것인 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 소의 파라인플루엔자 바이러스는 하나 이상의 인간 파라인플루엔자 바이러스 뉴클레오티드 서열을 더 포함하는 것인 방법.

청구항 41

제38항에 있어서, 재조합 파라인플루엔자 바이러스는 호흡기 세포융합 바이러스 뉴클레오티드 서열을 더 포함하

는 것인 방법.

청구항 42

제14항에 있어서, 상기 회수된 바이러스는 $8.0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 이상의 바이러스 역가를 산출하는 것인 방법.

청구항 43

제14항에 있어서, 상기 회수된 바이러스는 $9.0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 이상의 바이러스 역가를 산출하는 것인 방법.

청구항 44

제14항에 있어서, 상기 베로 세포는 약 0.5×10^5 내지 2×10^5 세포/ ml 의 밀도로 씨딩되는 것인 방법.

청구항 45

제14항에 있어서, 단계 (a)의 상기 베로 세포는 약 8×10^5 세포/ ml 이상의 세포 밀도로 배양되는 것인 방법.

청구항 46

제14항에 있어서, 단계 (a)의 상기 세포 배양물의 부피는 1.5 L 이상인 것인 방법.

청구항 47

제15항에 있어서, 단계 (a)의 상기 세포 배양물의 부피는 30 L 이상인 것인 방법.

청구항 48

제14항에 있어서, 단계 (a)에서 트립신이 첨가되지 않는 것인 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 단계 (a)의 상기 배양물을 신규한 마이크로담체를 함유하는 신선한 배양 배지로 1:1 또는 1:5로 분배하는 것인 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 분배는 단계 (b) 이전의 배양 또는 감염전 동안에 1회 이상 또는 2회 이상 수행되는 것인 방법.

청구항 51

제14항 또는 제50항에 있어서, 상기 방법은 30 L의 바이러스 채취 배치당 2백만 이상, 9백만 이상, 천2백만 이상, 일억이천만 이상의 백신 용량을 생산하는 것인 방법.

명세서

기술 분야

<1>

1. 서론

<2>

본 발명은 바이러스를 증식하는 방법에 관한 것이다. 특히 본 발명은 바이러스를 증식하기 위해 최적화된 조건을 제공한다. 다음 파라미터의 최적화가 제공된다: 배지에 대한 보충제로서의 지질 농축액, 감염전에서 감염후로의 온도 변화, 감염 다중도(multiple of infection) 및 감염전 배지의 혈청 보충. 특히, 본 발명은 화학적으로 정의된 지질 농축액(CDLC)을 포함하는 배지에서 바이러스로 감염된 세포를 배양하여 바이러스를 증식하는 방법을 처음으로 제공한다. 다른 구체예에서, 바이러스 감염된 세포 배양을 위해, 실질적으로 무혈청인 배지에 CDLC를 가한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명은 직접 비드 대 비드(bead-to-bead) 전달법에 의한 바이러스 세포 배양물을 증식하는 방법을 제공한다.

배경기술

<3>

2. 배경

<4>

인간 파라인플루엔자 바이러스 타입 1-3(hPIV1-3) 및 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 및 인간 메타뉴모바이러스(hMPV)는 파라믹소바이러스(paramyxovirus) 패밀리의 비분절된 음성 가닥 RNA 바이러스이다. 파라믹소바리대는 서브페밀리인 파라믹소바리내(paramyxovirinae)와 뉴모바리내(Pneumovirinae)로 구성된 모노네가비랄레스(Mononegavirales)속에 속하는 패밀리를 형성한다. 파라인플루엔자 바이러스는 파라믹소바리대 패밀리의 레스피로바이러스 속(PIV1, PIV2 및 PIV3)의 구성원이다. 인간 호흡기 세포융합 바이러스(hRSV)는 뉴모바이러스 속의 일종이며, 전세계적으로 유아기 및 초기 유년기의 하부 호흡기관 감염의 가장 중요한 단일 원인이다 (Domachowske, & Rosenberg, 1999, Clin Microbiol Rev 12(2):298-309). HMPV는 경증의 상부 호흡기관 질환에서부터 중증의 세기관지염 및 폐렴에 이르는 hRSV 감염에 의한 것을 연상시키는 임상 증상을 수반하는 파라믹소바리대 패밀리의 새 구성원이다(Van Den Hoogen et al., 2001, Nature Medicine 7:719-724). 인간 메타뉴모바이러스의 계놈 구성은 문헌[van den Hoogen et al., 2002, Virology 295:119-132]에 기술되어 있다. hPIV3, RSV 및 hMPV은 함께 입원에 이르는 소아과 호흡기 질환 모든 경우의 약 1/3을 초래하는 것으로 간주되고 있다 (Hall, 2001, N Eng J Med 344:1917-1927).

<5>

2.1 PIV 감염

<6>

파라인플루엔자 바이러스 감염(PIV)는 유아와 어린이에게 있어 심각한 호흡기관 질환을 유발한다(Tao et al., 1999, Vaccine 17:1100-08). 감염성 파라인플루엔자 바이러스 감염은 전세계적으로 호흡기관 감염을 앓고 있는 소아 환자 전체 입원 수의 약 20%에 달하는 것으로 설명되고 있다.

<7>

PIV는 두가지 구조 모듈로 이루어진다: (1) 바이러스 계놈을 함유하는 내부 리보핵산단백질 코어, 또는 뉴클레오캡시드, 및 (2) 외부, 거친 구형의 리포단백질 외피(envelope). 이 계놈은 8개 이상의 폴리펩타이드를 암호화하는, 약 15,456개의 뉴클레오티드 길이의 음성 센스 RNA의 단일 가닥이다. 이들 단백질은 뉴클레오캡시드 구조 단백질(속에 의존하는 NP, NC, 또는 N), 인단백질(P), 매트릭스 단백질(M), 융합 당단백질(F), 헤마글루터닌-뉴라미니다제 당단백질(HN), 거대 중합효소 단백질(L), 및 기능이 알려지지 않은 C 및 D 단백질을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

<8>

파라인플루엔자 뉴클레오캡시드 단백질(NP, NC, 또는 N)은 RNA와 직접적으로 상호작용하고 분자의 약 2/3을 포함하는 아미노-말단 도메인, 및 조립된 뉴클레오캡시드의 표면에 놓여 있는 카르복실-말단 도메인을 포함하는 각각의 단백질 단위내 두 도메인으로 이루어진다. 헌자는 이들 두 도메인의 연결부에 존재하는 것으로 여겨지며, 이 단백질에 약간의 유연성을 제공한다(참조: Fields et al.(ed.), 1991, Fundamental Virology, Second Edition, Raven Press, New York, 이의 전체 내용이 본 명세서에 참고로 포함된다). 매트릭스 단백질(M)은 바이러스 조립에 분명히 관여하며, 뉴클레오캡시드 단백질 뿐만 아니라 바이러스 맴브레인 모두와 상호작용한다. 인산화 주체인, 인 단백질(P)는 전사에 있어서 조절 역할을 수행하는 것으로 여겨지며, 메틸화, 인산화 및 폴리아데닐화에도 관여할 수 있다. 융합 당단백질(F)는 바이러스 맴브레인과 상호작용하며, 처음 불활성 전구체로서 생산되고, 이후 번역후 절단되어 두개의 디설파드가 결합된 폴리펩타이드를 생산한다. 활성 F 단백질은 또한 바이러스 외피와 숙주세포 혈장 맴브레인의 융합을 촉진하여 숙주 세포내로 파라인플루엔자 비리온의 침투에 관여한다. 당단백질, 헤마글루터닌-뉴라미니다제(HN)는 외피로부터 돌출되어 있어, 바이러스가 헤마글루터닌과 뉴라미니다제 활성을 모두 함유하게 한다. HN은 아미노 말단에서 매우 소수성으로, 지질 이중층내로 HN 단백질을 고정시키는 기능을 한다. 마지막으로, 거대 중합효소 단백질(L)은 전사 및 복제 모두에서 중요한 역할을 한다.

<9>

2.2 RSV 감염

<10>

호흡기 세포융합 바이러스(RSV)는 유아 및 어린이에게 있어서 심각한 하부 호흡기관 질환의 주된 원인이다 (Feigen et al., eds., 1987, In: Textbook of Pediatric Infectious Diseases, WB Saunders, Philadelphia at pages 1653-1675; New Vaccine Development, Establishing Priorities, Vol. 1, 1985, National Academy Press, Washington DC at pages 397-409; 및 Ruuskanen et al., 1993, Curr Probl Pediatr 23:50-79). 전세계적으로 RSV 감염은 매년 유행하고 있으나, 계절마다 RSV 질병의 중증도와 발생이 지역에 따라 다양하다(Hall, 1993, Contemp Pediatr 10:92-110). 북반구의 온대 지구의 경우, 일반적으로 늦가을에 시작되어 늦봄에 끝난다. 초기 RSV 감염은 6주령 내지 2세의 어린이에게 가장 빈번하게 발생하며, 병원 전염성인 경우 생후 최초 4주동안에는 흔하지 않다(Hall et al., 1979, New Engl J Med 300:393-396). RSV 감염에 고위험군인 소아들은 미숙아

(Hall et al., 1979, *New Engl J Med* 300:393-396) 및 기관지폐 이형성증(Groothuis et al., 1988, *Pediatrics* 82:199-203), 선천적 심질환(MacDonald et al., *New Engl J Med* 307:397-400), 선천성 또는 후천성 면역결핍증(Ogra et al., 1988, *Pediatr Infect Dis J* 7:246-249; 및 Pohl et al., 1992, *J Infect Dis* 165:166-169), 및 낭포성 섬유증을 앓는 소아들(Abman et al., 1988, *J Pediatr* 113:826-830)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. RSV 감염으로 입원한 심장 질환 또는 폐 질환을 앓는 소아의 치사율은 3%-4%이다(Navas et al., 1992, *J Pediatr* 121:348-354).

<11> RSV는 소아 및 어린이 뿐만 아니라 성인들도 감염된다. 건강한 성인들에게 있어서, RSV는 주로 상부 호흡기관 질환을 유발한다. 최근, 일부 성인들, 특히 고령자들이 이전에 보고된 것보다 훨씬 빈번하게 RSV 감염 증상을 앓고 있음이 밝혀지고 있다(Evans, A.S., eds., 1989, *Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control*, 3rd ed., Plenum Medical Book, New York at pages 525-544). 여러 전염 사례들이 간호를 받는 가정 환자들과 시설 보호를 받는 젊은 성인들에서 보고되고 있다(Falsey, A.R., 1991, *Infect Control Hosp Epidemiol* 12:602-608; 및 Garvie et al., 1980, *Br Med J* 281:1253-1254). 마지막으로, RSV는 면역이 억제된 사람, 특히 골수 이식 환자들에게 있어서 심각한 질환을 유발할 수도 있다(Hertz et al., 1989, *Medicine* 68:269-281).

<12> 정립된 RSV 질환의 치료 선택권은 제한되어 있다. 하부 호흡기관의 중증 RSV 질환은 종종 가습산소의 투입 및 호흡보조를 포함하는, 상당한 보조 치료를 요구한다(Fields et al., eds., 1990, *Fields Virology*, 2nd ed., Vol. 1, Raven Press, New York at pages 1045-1072).

<13> 백신이 RSV 감염 및/또는 RSV 관련 질환을 예방할 수 있지만, 어떠한 백신도 이 증상에 대하여 아직 승인을 받지 못한 상태이다. 백신 개발에 있어서 주된 장애 요소는 안전성이다. 포르말린 불활성 백신은, 면역성임에도 불구하고, 유사하게 제조된 3가 파라인플루엔자 백신으로 면역화된 유아에서보다, RSV에 기인한 하부 호흡기관 질환이 더 빈번하고, 더 심각한 중증도로 발생됨을 예기치 못하게 유도하였다(Kim et al., 1969, *Am J Epidemiol* 89:422-434; 및 Kapikian et al., 1969, *Am J Epidemiol* 89:405-421). 몇몇 후보 RSV 백신들은 폐기되었고, 다른 백신 후보들이 개발 중이다(Murphy et al., 1994, *Virus Res* 32:13-36). 그러나, 안전성 문제가 해결된다고 할지라도, 백신의 효능은 개선되어야만 한다. 해결되어야 할 문제들이 많이 남아 있다. 하부 호흡기관 질환의 최고 발병은 2-5월령에서 일어나기 때문에, 면역화는 신생아때에 즉시 이루어져야 할 것이다. 모체로부터 획득한 RSV 항체의 고 역가와 함께 신생아 면역 반응의 불완전성은 신생아의 백신 면역원성을 감소시킬 것으로 예상될 수도 있다(Murphy et al., 1988, *J Virol* 62:3907-3910; 및 Murphy et al., 1991, *Vaccine* 9:185-189). 결국, 초기 RSV 감염과 질환은 이후 RSV 질환에 대해 잘 보호하지 못한다(Henderson et al., 1979, *New Engl J Med* 300:530-534).

<14> 최근, RSV 질환의 예방에 대해 유일하게 승인 받은 치료법은 수동 면역이다. IgG의 보호 작용을 제시한 최초 증거는 페럿(Prince, G.A., Ph.D. diss., University of California, Los Angeles, 1975) 및 인간(Lambrecht et al., 1976, *J Infect. Dis* 134:211-217; 및 Glezen et al., 1981, *J Pediatr* 98:708-715)의 모체 항체를 포함한 관찰에서 얻어진 것이었다. Hemming 등(Morell et al., eds., 1986, *Clinical Use of Intravenous Immunoglobulins*, Academic Press, London at pages 285-294)은 신생아 폐렴증을 앓는 것으로 의심되는 신생아의 정맥내 면역 글로불린(IVIG)의 약동학을 포함한 연구에서 RSV 감염의 치료 또는 예방에 있어서 RSV 항체의 사용 가능성을 인지하였다. 이 연구에서는 RSV를 호흡기 분비물에서 산출한 한 소아가 IVIG 주입이후 빠르게 회복되었음을 주지하고 있다. 이후 IVIG 로트(lot)의 분석에서는 RSV 중화 항체의 비정상적인 고 역가를 나타냈다. 이후 이 동일한 그룹의 연구자들은 RSV 중화 항체가 풍부한, 고면역 혈청 또는 면역 글로불린이 RSV 감염에 대해 코튼 래트와 영장류를 보호하는 능력을 시험하였다(Prince et al., 1985, *Virus Res* 3:193-206; Prince et al., 1990, *J Virol* 64:3091-3092; Hemming et al., 1985, *J Infect Dis* 152:1083-1087; Prince et al., 1983, *Infect Immun* 42:81-87; 및 Prince et al., 1985, *J Virol* 55:517-520). 이들 연구 결과는 IVIG가 RSV 감염 예방에 사용될 수 있으며, 또한 RSV 관련 질환의 치료 또는 예방에도 사용될 수 있음을 보여주었다.

<15> RSV의 F 단백질의 A 항원 자리의 에피토프에 대한 인간화된 항체, SYNAGIS®는 RSV 계절(복반구의 경우, 4월부터 11월)에 걸쳐 체중 kg 당 15mg의 매달 권고 용량으로 RSV에 의한 심각한 하부 호흡기관 질환에 대하여 소아 환자에게 근육주사투여하는 것에 대해 승인받았다. SYNAGIS®는 인간(95%)과 쥐(5%) 항체 서열의 합성물이다. 문헌[Johnson et al., 1997, *J. Infect. Diseases* 176:1215-1224] 및 미국 특허 5,824,307를 참고로 하며, 이의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다. 인간 중쇄 서열은 인간 IgG₁의 불변 도메인과 VH 유전자 또는 가변성 구조체 영역 또는 Cor(Press et al., 1970, *Biochem. J.* 117:641-660) 및 Cess(Takashi et al., 1984,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:194-198)으로부터 유래된다. 인간 경색 서열은 C_K의 불변 도메인과 J_K-4를 갖는 VL 유전자 K104의 가변성 구조체 영역으로부터 유래된다. 쥐 서열은 인간 항체 구조체내의 쥐의 상보적인 결정 영역의 그래프팅을 포함하는 과정에서, 쥐의 모노클로날 항체, Mab 1129로부터 유래된다(Beeler et al., 1989, J. Virology 63:2941-2950).

<16>

2.3 hMPV 감염

<17>

최근, 파라믹소비리대 패밀리의 새 구성원이 경증의 상부 호흡기관 질병에서부터 중증의 세기관지염 및 폐렴에 이르는 범위의 인간 호흡기 세포융합 바이러스("hRSV") 감염에 의한 것과 관련된 임상 징후를 갖는 28명의 어린이들로부터 분리되었다(Van Den Hoogen et al., 2001, Nature Medicine 7:719-724). 신규한 바이러스는 서열 동종성과 유전자 배치(constellation)을 토대로 하여, 인간 메타뉴모 바이러스(hMPV)로 명명되었다. 연구는 사실상 네덜란드의 모든 5세 어린이들이 hMPV에 노출되어 있으며, 이 바이러스가 지난 반세기 이상에 걸쳐 인간을 순환하고 있었음을 추가적으로 보여주었다. 또한, 감염의 계절적 특성(seasonality)은 겨울 수개월간 최대치를 나타내는 RSV와 유사하다(Robinson, 2005, J. Med. Virol. 76:98-105; Williams, 2004, New Engl. J. Med. 350:443-450). 그러나, RSV와 달리, hMPV는 비록 낮은 비율이나, 1년 내내 분리될 수 있다(Robinson, 2005, J. Med. Virol. 76:98-105; Williams, 2004, New Engl. J. Med. 350:443-450). hMPV 감염에 대한 위험 요소는 RSV에서 발견되는 요소들과 유사하다. 인간 메타뉴모바이러스에 의한 빈번한 감염 발생은 어린 어린이, 노령군, 및 면역이 저하된 인간들에게서 발견되어 왔다. 인간 메타뉴모바이러스에 의한 감염은 미성숙 유아의 질병, 조숙 만성 폐 질환, 울혈성 심질환 및 면역 결핍증에서 있어서 상당한 부담 된다(Robinson, 2005, J. Med. Virol. 76:98-105; Williams, 2004, New Engl. J. Med. 350:443-450). 최근 인간 메타뉴모바이러스가 북 아메리카의 환자들로부터 분리되었다(Peret et al., 2002, J. Infect. Diseases 185:1660-1663).

<18>

인간 메타뉴모바이러스의 계통 구조가 문헌[van den Hoogen et al., 2002, Virology 295:119-132]에 기술되어 있다. 계통발생론적 분석은 hMPV 계통을 APV 바이러스와는 다른 하위군 A와 B로 지칭되는, 두개의 유전 집단으로 나누었다(Bastien et al 2003a and b; Biacchesi et al, 2003; Peret et al 2002 and 2004; van den Hoogen, 2002). 이 하위군내, hMPV는 A1, A2, B1 및 B2의 하위 유형으로 더 상세히 나눌 수 있다(van den Hoogen, 2003).

<19>

hMPV는 RSV와 유사한 유전 구조를 공유하고 있으나, RSV에서 발견된 비구조 유전자가 없다(van den Hoogen, 2002, Virology. 295:119-132). 두 바이러스는 모두 표면 당단백질(G) 단백질과 융합(F) 단백질로 정의되는 유사한 표면 단백질을 암호화한다. G 와 F 단백질의 아미노산 서열 간의 차이에 기초하여, RSV와 hMPV은 A 및 B 그룹으로 나뉘어진다. 그러나, hMPV에서 A 및 B 서브그룹은 A1, A2, B1 및 B2 분류로 더 세분화된다(Boivin, 2004, Emerg. Infect. Dis. 10:1154-1157, 25). RSV와 hMPV 바이러스의 경우, G 단백질의 서열은 하위그룹간 폭넓은 다양성을 보여주며; hMPV의 경우, G 단백질은 A와 B 하위그룹간 단지 30%의 동일성을 갖는다. RSV와 hMPV의 경우, F 단백질은 더욱 보전된다; 공지된 hMPV 분리체를 통틀어, F 단백질 아미노산 서열은 95% 보전된다(Biacchesi, 2003, Virology 315:1-9; Boivin, 2004, Emerg. Infect. Dis. 10:1154-1157; van den Hoogen, 2004, Emerg. Infect. Dis. 10:658-666). 바이러스의 구조상 유사성에도 불구하고, hMPV와 RSV의 F 단백질은 단지 33%의 아미노산 서열의 동일성을 공유하며, RSV 또는 hMPV에 대하여 생성되는 항혈청(antisera)은 뉴모비리대 그룹을 중화하지 않는다(Wyde, 2003, Antiviral Research. 60:51-59). RSV의 경우, 융합 (F) 단백질에 대한 단일 모노클로날 항체는 중증의 하부 호흡기관 RSV 감염을 예방할 수 있다. 유사하게, 모든 hMPV 하위그룹을 통틀어 F 단백질의 서열 보존의 높은 수치 때문에, 이 단백질은 항체를 중화하는 크로스-서브 그룹의 생성에 대한 바람직한 항원성 타켓일 수 있다.

<20>

인간 메타뉴모바이러스는 조류 메타뉴모바이러스와 관련있다. 예를 들어, hMPV의 F 단백질은 조류 뉴모바이러스 ("APV")의 F 단백질과 매우 유사하다. 인간 메타뉴모바이러스와 청둥오리(Mallard Duck)으로부터 분리된 조류 뉴모바이러스의 F 단백질의 정렬은 막외부(ectodomain)에서 85.6%의 동일성을 보인다. 터키(서브그룹 B)로부터 분리된 조류 뉴모바이러스의 F 단백질과 인간 메타뉴모바이러스 F 단백질의 정렬은 막외부에서 75%의 동일성을 보인다. 예를 들어, Haller 및 Tang의 동일 출원인 및 2002년 2월 21일자로 출원된, 발명의 명칭 "메타뉴모바이러스로부터 유래한 헤테로 항원을 포함하는 재조합 파라인플루엔자 바이러스 발현 시스템과 백신"의 동시 계류 중인, 미국 가출원 60/358,934호를 참조하며, 이의 전체 내용은 본 명세서에 참고로서 포함된다.

<21>

hMPV로 한 최근의 연구를 기초로 하여, 이와 같은 hMPV는 인간, 특히 청소년 호흡기 질환에 중요한 인자인 것으로 밝혀졌다.

<22>

그러나, 인간 호흡기 질환의 상당 부분이 hPIV3 및 PSV 및 hMPV 감염에 의한다는 사실에 불구하고, 이들 바이러

스에 대한 백신은 유용하지 못한 상태이다(Tang et al., 2004, J Virol 78:11198-11207).

2.4 키메릭 바이러스

재조합 소 PIV3 백터는 소의 PIV3의 융합(F) 및 헤마글루티닌-뉴라미니다제(HN) 당단백질 유전자를 인간 PIV3 및 NH 유전자로 각각 치환하여 구성된 것임이 보고되었다(Haller et al., 2000, J Virol 74:11626-11635). 최근 공개문현(Tang et al., 2003, J Virol 77:10819-10828)은 RSV F 유전자가 소-인간 PIV3 백터 골격(backbone)으로 삽입되어 RSV F 단백질을 발현하는 키메릭 바이러스를 생산하는 것을 기술하고 있다. 이 키메릭 바이러스를 MEDI-534로 명명하였다. 이것은 동물 연구에서 생, 약독화된 2가 백신으로서의 역할을 한다: MEDI-534로 면역화한 햄스터와 인간이 아닌 영장류는 RSV와 hPIV3의 챠린지에 대한 보호를 나타내고, 동물들은 RSV 중화 및 hPIV3 혈구응집-억제 혈청 항체를 생산하였다(Tang et al., 2003, 상기; Tang et al., 2004, 상기).

전임상 동물 모델에서의 가능한 면역원성과 보호 결과를 고려할 때, MEDI-534와 밀접하게 관련 있는 다른 바이러스의 복제가, 복제가 가능한 다른 포유동물 세포주에서 수행되었다(Haller et al., 2003, J Gen Virol 84:2153-2162). 모든 경우에서, 베로 세포는 가장 높은 바이러스 역가를 생산하였다. MEDI-534 바이러스는 베로 세포내에서 10회까지 연속 계대시에도 RSV F 유전자 삽입물을 유지하는 것을 보여주었다(Tang et al., 2003, 상기).

2.5 바이러스 증식

본 발명은 바이러스를 증식하는 방법에 관한 것이다. 예를 들어, 본 발명의 바이러스 백신 후보의 제조에 유용 할 세포 배양물을 확실히 고수율로 생산하기 위해, 바이러스의 증식 조건을 최적화한다.

무혈청 배지

전파성 해면성 뇌증(Asher, 1999, Dev Biol Stand 100:103-118; Galbraith, 2002, Cytotechnology 39:117-124) 및 우발성 바이러스(Erickson et al., 1989, Dev Biol Stand 70:59-66)와 같은 전염성 시약의 인간 노출과 관련된 우려가 증가하고 있는 측면에서, 미국(Food and Drug Administration) 및 유럽(European Medicine Evaluation Agency)의 규제 당국은 이의 생산 공정에서 동물 기원의 물질의 사용을 줄이거나 제하도록 생물제제 제조사에게 권고하였다(Castle and Robertson, 1999, Dev Biol Stand 99:191-196).

열 민감도

열 민감도는 바이러스 시스템에서 관찰된다: 37°C 대신 32°C의 래트로바이러스 패키징 세포 배양은 최대 2 내지 15배의 감염성 바이러스 입자의 수율을 증가시킨다(Kaptein et al., 1997, Gene Therapy 4:172-176; Kotani et al., 1994 Hum Gene Ther 5: 19-28; Lee et al., 1996, Appl Microbiol Biotechnol 45:477-483).

세포 밀도 효과

"세포 밀도 효과"는 배치 배양시 아데노바이러스 생산에서 관찰된다: 특정 바이러스 생산성은 감염시의 세포 밀도 증가에 따라 감소된다(Henry et al., 2004, Biotechnol Bioeng 86:165-11 A; Nadeau and Kamen, 2003, Biotechnol Adv 20:475-489). 통상적인 유가배양 배치 방법(fed-batch strategy)(Nadeau et al., 2002; Yuk et al., 2004 Biotechnol Bioeng 86:637-642)를 이용시 접하게 되는 실패와 비교하여, 아데노바이러스 생성에서의 "세포 밀도 효과"를 극복하기 위한 관류 배양을 이용한 성공(Henry et al., 2004, Biotechnol Bioeng 86:765-774; Yuk et al., 2004 Biotechnol Bioeng 86:637-642)은 배치 및 유가배양 배치 조건하에서 축적되는 하나 이상의 확인되지 않은 억제제의 존재를 암시한다.

발명의 상세한 설명

3. 발명의 개요

본 발명은 바이러스를 증식하는 방법에 관한 것이다. 특정 구체예에서, 본 발명은 음성 가닥 RNA 바이러스를 증식하는 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 파라믹소바이러스와 같은 비분절된, 음성 가닥 RNA 바이러스를 증식하는 방법을 제공한다. 상세하게는, 본 발명은 파라인플루엔자 바이러스(PIV) 및 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 및 메타뉴모 바이러스(MPV)를 증식하는 방법을 제공한다. 보다 상세하게는, 본 발명은 인간 및 소 서열을 갖는 PIV를 증식하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, RSV 뉴클레오티드 서열을 발현하는 키메릭 인간/소 PIV를 본 발명의 방법을 이용하여 증식한다.

특히, 본 발명은 화학적으로 정의된 지질 농축액(CDLC)를 포함하는 배지에서 바이러스로 감염된 세포를 배양하

여 바이러스를 증식하는 방법을 제공한다. 특정 구체예에서, CDLC가 보충된 배지는 실질적으로 무혈청이다. 특정 구체예에서, 배지는 예를 들어, OptiPRO™ SFM 또는 VP-SFM™ 또는 SFM4MegaVir™ (SFM4MV) 또는 Ex-Cell Vero™ 또는 Williams' E 배지와 같은 무혈청 배지이다. 특정 구체예에서, 사용된 세포는 베로 세포이다. 다른 구체예에서, CDLC가 보충된 배지는 0.5% v/v의 최대 혈청 농도를 함유한다. 특정 구체예에서 CDLC는 플루로닉 F-68, 에틸 알콜, 클레스테롤, 트윈 80, DL-알파-토코페롤 아세테이트, 스테아르산, 미리스트산, 올레산, 리놀레산, 팔미트산, 팔미톨레산, 아라키돈산, 및 리놀렌산 중 하나 이상을 포함한다.

<37> 다른 구체예에서, 본 발명은 무혈청 배지에서 바이러스에 의해 감염된 세포를 배양하여 바이러스를 증식하는 방법을 제공한다. 예상되는 무혈청 배지는 예를 들어, VP-SFM™ 또는 SM4MegaVir™, OptiPRO™ SFM 또는 Ex-Cell Vero™ 또는 Williams' E 배지를 포함한다. 특정 구체예에서, 사용된 세포는 베로 세포이다. 다른 구체예에서, 사용된 세포는 무혈청에 적응된 베로 세포이다.

<38> 본 발명은 바이러스를 증식하는데 최적화된 조건을 추가적으로 제공한다. 일 구체예에서, 세포는 바이러스로 감염하기 전에 제1 온도에서 배양되고, 바이러스로 감염한 후에는 제2 온도에서 배양되며, 여기서 제2 온도는 제1 온도보다 낮다. 특정 구체예에서, 세포는 바이러스로 감염하기 전, 즉 감염전 약 37°C에서 배양되고, 바이러스로 감염한 후, 즉, 감염후에는 약 29°C 내지 약 37°C에서 배양된다. 다른 구체예에서, 세포는 바이러스로 감염한 후 약 33°C에서 배양된다. 다른 구체예에서, 세포는 바이러스로 감염한 후 약 30°C에서 배양된다.

<39> 일 구체예에서, 바이러스의 씨딩 밀도는 $1\text{e}5$ 내지 $2\text{e}5$ 세포/ cm^2 의 범위내이다. 다른 구체예에서, 씨딩 밀도는 $2.1\text{e}4$ 내지 $2.9\text{e}4$ 세포/ cm^2 이다. 다른 구체예에서, 씨딩 밀도는 $2.4\text{e}4$ 세포/ cm^2 이다. 또 다른 구체예에서, 바이러스의 씨딩 밀도는 $2\text{e}5$ 세포/ cm^2 이다.

<40> 다른 구체예에서, 세포는 약 0.0001 내지 약 0.1 범위의 감염 다중도(MOI)로 바이러스와 배양된다. 또 다른 구체예에서, 세포는 약 0.001 내지 약 0.01 범위의 MOI로 배양된다.

<41> 또 다른 구체예에서, 세포는 바이러스로 감염 이전에, 혈청 존재하에서 배양된다. 일 구체예에서, 감염전 배지는 태아 소 혈청을 포함한다.

<42> 일 구체예에서, 감염 시점은 씨딩후(dps) 3 또는 4일째이다. 일 구체예에서, 감염후 시점은 4일 내지 11일내이다. 다른 구체예에서, 감염후 시점은 약 5일 또는 약 6일 또는 약 8일이다. 또 다른 구체예에서, 감염 시점은 세포 $\geq 1\text{e}6$ 세포/cm²에 도달한 때이다.

<43> 일 구체예에서, 본 발명의 바이러스 세포 배양물은 배치 공정 또는 유가배양 배치 공정으로 생물반응기의 혼탁 배양물에서 성장된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 바이러스 세포 배양물은 상기 생물반응기내 마이크로담체 비드상에서 배양된다. 특정 구체예에서, 본 발명의 바이러스 세포 배양물은 일회용 생물반응기(SUB)내 혼탁 배양물에서 성장된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 바이러스 세포 배양물은 SUB내 마이크로담체 비드상에서 성장된다.

<44> 일 구체예에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 결과로서 바이러스 역가는 5 \log_{10} TCID₅₀/ml 이상, 6 \log_{10} TCID₅₀/ml 이상, 7 \log_{10} TCID₅₀/ml 이상, 8 \log_{10} TCID₅₀/ml 이상, 9 \log_{10} TCID₅₀/ml 이상, 10 \log_{10} TCID₅₀/ml 이상이다.

<45> 본 발명의 방법은 재조합 바이러스 계놈으로부터 바이러스를 분리할 때도 사용될 수 있다.

3.1 규정 및 약어

<47> ADCF 동물 유래 성분이 없는

<48> CDLC 화학적으로 정의된 지질 농축액

<49> Dpi 가역호 인수

<50> Dns 씨터호, 이승

<51> $\Delta M2-2$ M2-2 오픈 리딩 프레임이 결실된 재조합 생 약독화된 RSV 바이러스 (Lin et al., Vaccine, 2003, pp. 3647-52)

<52>	△NS-1 NS-1 오픈 리딩 프레임이 결실된 재조합 생 약독화된 RSV 바이	러스
	(Jinet al., Vaccine, 2003 pp. 3647-52)	
<53>	F	융합
<54>	FBS	태아 소 혈청
<55>	HMPV	인간 메타뉴모바이러스
<56>	hPIV1-3	인간 파라인플루엔자 바이러스 1, 2 또는 3형
<57>	HN	헤마글루티닌-뉴라미니다제
<58>	MEDI-534	키메릭 소/인간 파라인플루엔자 바이러스 3형/호흡기 세포융합 바이러스(Tang et al., 2003 J Virol 77:10819-1828)
<59>	MEDI-559	MEDI-559는 rA2cp248/404/1030△SH로 명칭된 생, 약독화된 RSV 백신임(Karron et al., JID vol 191 p. 1093 (2005))
<60>	MOI	감염 다중도
<61>	PIV3	파라인플루엔자 바이러스 3형
<62>	증식	바이러스 입자 수 증가
<63>	RB	롤러 베틀(bottle)
<64>	MEDI-560 또는 rcp45 hPIV3	wt HPIV3의 재조합 한랭 계대접종(45 주기) (Karron et al., Pediatr. Inf. Dis. J. 2003, 22:394-405)
<66>	RSV	호흡기 세포융합 바이러스
<67>	SFM	무혈청배지
<68>	SUB	일회용 생물반응기
<69>	TCID ₅₀	50%의 조직 배양 감염 용량
<70>	베로(Vero)	아프리카 그린 원숭이 신장 세포주
<71>	v/v	부피 대 부피 비율
<72>	4. 도면의 간단한 설명	

<73> **도 1.** 상이한 MOI의 바이러스 생성 프로파일. 무혈청 베로 세포의 T-75 플라스크를 2개씩 준비하여, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 또는 0.00001의 MOI에서 씨딩후 3일째 MEDI-534으로 감염시켰다. 배양물은 감염전과 감염후 37°C에서 배양하였다.

<74> **도 2a.** 감염성 바이러스 역가에 대한 감염 시간과 감염후 온도의 효과. 무혈청 베로 배양물을 씨딩후 3일째 MOI 0.001를 이용하여 MEDI-534로 감염시켰다(0.6×10^7 세포/플라스크). T-75 플라스크를 2개씩 준비하여 감염후 33°C 또는 37°C에서 배양하였다.

<75> **도 2b.** 감염성 바이러스 역가에 대한 감염 시간과 감염후 온도의 효과. 무혈청 베로 배양물을 씨딩후 5일째 MOI 0.001를 이용하여 MEDI-534로 감염시켰다(0.6×10^7 세포/플라스크). T-75 플라스크를 2개씩 준비하여 감염후 33°C 또는 37°C에서 배양하였다.

<76> **도 3.** 감염전 FBS로 적정한 RB 배양물의 바이러스 생성 프로파일. 3개씩 준비한 RB의 다음 배지(OptiPROTM SFM, OptiPROTM SFM + 0.5% (v/v) FBS 및 OptiPROTM + 2% (v/v) FBS) 중 하나에 베로 세포를 씨딩하였다. 씨딩후 3일째, 각 조건 중 하나의 RB를 세포 수를 세기 위해 트립신 처리하였다: OptiPROTM SFM(1.9×10^7 세포/플라스크), OptiPROTM SFM + 0.5% (v/v) FBS (9.3×10^7 세포/플라스크) 및 OptiPROTM + 2% (v/v) FBS

(10.4×10^7 세포/플라스크). 잔여 2 x 3 RB를 MOI 0.001에서 MEDI-534로 감염시켰다.

<77> **도 4a.** 상이한 감염전 배지 및 보충제의 세포 수율 비교. 베로 세포를 조건 당 4개의 RB에서 다음 5개의 배지 중 하나에 씨딩하였다: (1) OptiPROTM SFM, (2) OptiPROTM SFM + 1% (v/v) CDLC, (3) OptiPROTM + 0.5% (v/v) FBS, (4) VP-SFM 및 (5) VP-SFM + 1% (v/v) CDLC. 씨딩후 3일째, 조건 당 2개의 RB를 세포 수를 세기 위해 사용하였다. 잔여 RB의 두 세트를 MOI 0.001에서 MEDI-534로 감염시켰다.

<78> **도 4b.** 상이한 감염전 배지 및 보충제의 바이러스 생성 비교. 베로 세포를 조건당 4개의 RB에서 다음 5개의 배지 중 하나에 씨딩하였다: (1) OptiPROTM SFM, (2) OptiPROTM SFM + 1% (v/v) CDLC, (3) OptiPROTM + 0.5% (v/v) FBS, (4) VP-SFM 및 (5) VP-SFM + 1% (v/v) CDLC. 씨딩후 3일째, 세포 카운팅을 위해 조건당 2개의 RB를 사용하였다. 잔여 RB의 두 세트를 MOI 0.001에서 MEDI-534로 감염시켰다.

<79> **도 5a.** 상이한 감염전 배지를 이용한 RB에서의 세포 성장 비교. 베로 세포를 OptiPROTM + 0.5% (v/v) FBS 또는 VP-SFM + 1% (v/v) CDLC에 씨딩하였다. 성장 곡선을 만들기 위해, 각 조건의 RB를 2개씩 준비하여 매일 카운트하였다.

<80> **도 5b.** 상이한 감염전 배지를 이용한 RB에서의 바이러스 생성 비교. 베로 세포를 OptiPROTM + 0.5% (v/v) FBS 또는 VP-SFM + 1% (v/v) CDLC에 씨딩하였다. 바이러스 생성 프로파일을 만들기 위해, 두개의 상이한 감염전 배지에서 RB 배양물을 2개씩 준비하여 씨딩후 3일째 MEDI-534로 감염시켰다. 감염된 배양물을 감염후 2-7일동안 매일 샘플을 채취하였다.

<81> **도 6a.** 감염전 CDLC로 적정한 RB 배양물에서의 세포 수율 비교. 베로 세포를 2개씩 준비한, 3개의 상이한 농도에서 CDLC로 보충된 무혈청 성장 배지(VP-SFM)에 씨딩하였다. 씨딩후 4일째, 배양물을 세포 수를 세기 위해 트립신 처리하고, 3개의 다른 농도에서 가하여진 CDLC를 함유하는 VP-SFM에서 계대접종하였다(4번씩 반복). 씨딩후 3일째, 조건당 2개씩 준비된 RB를 카운트하고, 잔여 RB의 두 세트를 MEDI-534로 감염시켰다.

<82> **도 6b.** 감염전 CDLC로 적정한 RB 배양물에서의 바이러스 생성 비교. 베로 세포를 2개씩 준비한, 3개의 다른 농도에서 CDLC가 보충된 무혈청 성장 배지(VP-SFM)에 씨딩하였다. 씨딩후 4일째, 배양물을 세포 수를 세기 위해 트립신 처리하고, 3개의 다른 농도에서 가하여진 CDLC를 함유하는 VP-SFM에서 계대접종하였다(4번씩 반복). 씨딩후 3일째, 조건당 2개씩 준비된 RB를 카운트하고, 남은 RB 두 세트를 MEDI-534로 감염시켰다.

<83> **도 7.** 상이한 감염후 배지의 MEDI-534 생성 비교. RB 배양물을 VP-SFM + 1% (v/v) CDLC에서 접종하였다. 씨딩후 3일째, 2개씩 준비된 RB를 다음의 SFM(VP-SFM + 1% CDLC, VP-SFM 및 WME) 중 하나에서 MOI 0.001의 MEDI-534로 감염시켰다.

<84> **도 8a.** 상이한 감염전 배지를 이용한 마이크로담체 배양물에서의 세포 성장 비교. 베로 세포를 OptiPROTM + 0.5% (v/v) FBS 또는 VP-SFM + 1% (v/v) CDLC의 2 g/L CytodexTM 1를 함유하는 스피너 플라스크를 2개 준비하여 씨딩하였다. 성장 곡선을 만들기 위해, 샘플을 핵 카운트를 위해 감염되지 않은 플라스크로부터 매일 채취하였다.

<85> **도 8b.** 상이한 감염전 배지를 이용한 마이크로담체 배양물에서의 바이러스 생성 비교. OptiPROTM + 0.5% (v/v) FBS 또는 VP-SFM + 1% (v/v) CDLC에서 2 g/L CytodexTM 1을 함유하는 스피너 플라스크를 2개씩 준비하여 베로 세포를 씨딩하였다. 바이러스 생성 프로파일을 만들기 위해, 각각의 감염전 배지의 플라스크를 2개씩 준비하여 MEDI-534로 씨딩후 5일째 감염시켰다.

<86> **도 9a.** 상이한 pH로 조절된 생물반응기에서의 감염전 베로 세포 성장 비교. 베로 세포를 pH 7.0, pH 7.2 또는 pH 7.4로 유지한 VP-SFM + 1% (v/v) CDLC 내 2 g/L CytodexTM 1을 함유하는 생물반응기에 씨딩한다. 샘플을 감염전 핵 카운트를 위해 매일 생물반응기에서 채취하였다.

<87> **도 9b.** 상이한 pH로 조절된 생물반응기에서의 바이러스 생성 비교. 베로 세포를 pH 7.0, pH 7.2 또는 pH 7.4로 유지한 VP-SFM + 1% (v/v) CDLC 내 2 g/L CytodexTM 1을 함유하는 생물반응기에 씨딩하였다. 씨딩후 4일째, 생물반응기 배양물을 MEDI-534로 감염시켰다.

<88> **도 10.** 37°C의 온도, pH 7.1, 50% 공기 포화도 DO를 이용한 3L 생물반응기내 베로 세포 성장에 대한 교반 속도의 효과. 고속 교반 속도는 125 rpm이며, 저속 교반 속도는 65 rpm이다. 125 rpm의 교반 속도는 세포 성장을 향

상시키고, 고 밀도로 세포를 성장시켰다.

<89> **도 11.** 3L 생물반응기내 베로 세포 성장에 대한 CytodexTM 1 밀도의 효과. DO는 50% 공기포화도, pH는 7.1 및 온도는 37°C로 세팅하였다. 125 rpm의 교반 속도를 사용하였다. 2개의 생물반응기는 2 g/L의 CytodexTM 1과 4 g/L의 CytodexTM 1 두 개를 함유하였다. 4g/L의 CytodexTM 1의 배양물은 2g/L의 CytodexTM 1의 배양물보다 세포 밀도가 훨씬 높았다.

<90> **도 12.** RSV ΔM2-2 생성에 대한 CytodexTM 1 밀도의 효과. 세포를 0.01의 MOI에서 RSV ΔM2-2 바이러스로 감염시키고, 33°C, 100 rpm 교반 및 5% CO₂의 진탕배양기에서 배양시켰다. 4g/L의 CytodexTM 1의 배양물은 2g/L의 마이크로담체 비드로한 배양물보다 높은 바이러스 역가를 생산하였다.

<91> **도 13.** 3일 동안, 125 rpm 교반 속도, 50%의 DO, pH 7.1 및 37°C에서 4g/L의 CytodexTM 1로 배양시킨 생물반응기에서의 베로 세포 성장 곡선.

<92> **도 14.** 생물반응기에서의 MEDI-559의 생성. 2개씩 준비한 생물반응기 배양물을 무혈청 성장 배지내 2e5 세포/mL의 베로 세포로 접종하고, 3일 동안 125 rpm 교반 속도, 50%의 DO, pH 7.1 및 37°C에서 4g/L의 CytodexTM 1로 배양하였다. 세포 성장을 각각의 생물반응기로부터 매일 샘플링하여 모니터링하고, 배양물 샘플중의 핵 수를 카운트하였다. 배양 3일째, 교반을 정지하여, 마이크로담체 비드가 생물반응기의 바닥에 가라앉도록 하였다. 이후 마이크로담체 비드상에 세포를 남기면서, 소비된 성장 배지를 생물반응기로부터 제거하고, 동량의 신선한 감염 후 배지(SFM4MegaVirTM + 4 mM L-GIn)로 대체하였다. 125 rpm으로 다시 교반하였다. 배양온도를 30°C로 낮추고, pH를 7.0으로 세팅하였다. 이후 세포를 0.01의 MOI에서 MEDI-559로 감염시키고, 10일동안 30°C에서 계속 배양하였다. 샘플을 7일 내지 10일까지 매일 배양물로부터 채취하였다. 바이러스 역가는 TCID₅₀ 분석으로 측정하였다. 직선 배치 공정을 이용하여, 대략 8 log₁₀ TCID₅₀의 생산성을 획득하였다.

<93> **도 15.** 다음 감염 조건의 소비된 배양물 배지상의 감염성 MEDI-560 역가: (◇) SFM4MegaVir 배지 및 30°C, (■) 30°C의 William's 배지 E, (◆) 32°C의 SFM4MegaVir 배지, (□) 32°C의 William's 배지 E 및 (△) 32°C의 Ex-Cell Vero 배지

<94> **도 16.** 3개의 생물반응기 배양물의 세포 성장 프로파일. (◆) 3L260307-R9; (▲) 3L120407-R10; 및 (△) SUB120407. 세포 밀도는 밀리리터 당 세포(세포/mL)를 측정하였다.

<95> **도 17.** 3개의 생물반응기 배양물의 세포 성장 프로파일. (◆) 3L260307-R9; (▲) 3L120407-R10; 및 (△) SUB120407. 세포 밀도는 마이크로담체 당 세포를 측정하였다.

<96> **도 18A-B.** 감염전 3개의 생물반응기 배양물의 글루코오스 및 락테이트 프로파일. (◆) 3L260307-R9; (▲) 3L120407-R10; 및 (△) SUB120407.

<97> **도 19A-B.** 감염전 3개의 생물반응기 배양물의 글루타민 및 암모늄 이온 프로파일. (◆) 3L260307-R9; (▲) 3L120407-R10; 및 (△) SUB120407.

<98> **도 20A-B.** 감염동안의 3개의 생물반응기 배양물의 글루코오스 및 락테이트 프로파일. (◆) 3L260307-R9; (▲) 3L120407-R10; 및 (△) SUB120407.

<99> **도 21A-B.** 바이러스 감염동안 3개의 생물반응기 배양물의 글루타민 및 암모늄 이온 프로파일. (◆) 3L260307-R9; (▲) 3L120407-R10; 및 (△) SUB120407.

<100> **도 22.** 1:5 비율로 분배된 후, 시간에 따른 비드 대 비드의 전달에 대한 4개의 다른 간헐 교반 지침을 이용하여 증폭된 생물반응기의 세포 성장 프로파일.

<101> **도 23.** 롤러 베틀(신선한 씨딩)로부터의 세포로 씨딩된 3L 생물반응기, 생물반응기에서 1:5 분배 비율로 1배 증폭한 후의 생물반응기 배양물(1X 1:5 전달) 및 1:5 분배 비율로 두번 연속 증폭하여 유도된 배양물(2X 1:5 전달)에서의 세포 성장 프로파일.

<102> **도 25.** 생물반응기 배양물에서의 MEDI-560 비교: 생물반응기에서 롤러 베틀(신선한 씨딩)으로부터의 세포로 씨딩; 1:5 분배 비율로 1X 증폭한 후(1X 1:5 전달); 및 1:5 분배 비율로 두번 연속 증폭하여 유도된 배양물(2X

1:5 전달).

5. 발명의 상세한 설명

본 발명은 바이러스를 증식하는 방법에 관한 것이다. 특정 구체예에서, 바이러스의 증식을 위한 조건은 확실하고, 측정가능하며 고수율의 세포 배양물을 생산하기 위해 최적화되어 예를 들어, 본 발명의 바이러스 백신 후보의 제조에 유용할 것이다. 일 구체예에서, 화학적으로 정의된 배지는 동물 기원의 물질을 회피하거나 줄이기 위해 이용되며, 바이러스 생산을 증가시키는데 이용된다. 결정적인 파라미터가 동정될 수 있으며, 생산 공정은 우선 소규모의 실험에서 최적화되어 범용성, 확실성 및 재생산성을 결정하며, 연이어 바이러스의 대규모 생산에 적용될 수 있다.

특정 구체예에서, 본 발명의 방법을 이용하여 증식되는 바이러스는 음성 가닥 RNA 바이러스이다. 특정 구체예에서, 증식되는 바이러스는 파라믹소바이러스와 같은, 비분절된, 음성 가닥 RNA 바이러스이다. 상세하게는, 본 발명은 파라인플루엔자 바이러스(PIV) 및 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 및 메타뉴모 바이러스(MPV)를 증식하는 방법을 제공한다. 보다 더욱 상세하게는 본 발명은 인간 및 소 서열을 갖는 PIV를 증식하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 키메릭 인간/소 PIV는 RSV 뉴클레오티드 서열을 발현한다. 특정 구체예에서, 증식되는 바이러스는 MEDI-534이다. 다른 특정 구체예에서, 증식되는 바이러스는 MEDI-559이다. 다른 특정 구체예에서, 증식되는 바이러스는 예를 들어, M2-2 또는 NS-1와 같은 오픈 리딩 프레임이 결손된 바이러스이다. 다른 특정 구체예에서, 증식되는 바이러스는 rcp45 hPIV3 또는 MEDI-560 중 하나이다. 특정 구체예에서, 본 발명의 방법을 이용하여 증식되는 바이러스는 외피 바이러스이다. 다른 구체예에서, 증식되는 바이러스는 부착된 세포에서 감염되고 복제되는 바이러스이다(5.5 부분 참조).

바이러스로 감염되기 이전, 즉, 감염전에 세포는 배지에서 배양된다. 감염전 배지는 FBS와 같이 혈청을 함유할 수 있다. 이후, 세포는 바이러스로 감염되고, 배지에서 배양된다. 감염후 배지는 실질적으로 무혈청이다. 이후 바이러스가 채취된다.

특히, 본 발명은 처음으로 화학적으로 정의된 지질 농축액(CDLC)이 보충된 배지에서 세포를 배양하여 바이러스를 증식시키는 방법을 제공한다. 특정 구체예에서, CDLC가 보충된 배지는 실질적으로 무혈청이다. 특히, 보다 상세한 구체예에서, 배지는 무혈청이다. 일 구체예에서, 화학적으로 정의된 배지는 다양성을 회피하고 바이러스 생산을 증가시키는데 이용된다. 다른 구체예에서, CDLC가 보충된 배지는 0.5% v/v의 최대 혈청 농도를 함유한다. 특정 구체예에서, CDLC는 플루로닉 F-68, 에틸 알콜, 콜레스테롤, 트윈 80, DL-알파-토코페롤 아세테이트, 스테아르산, 미리스트산, 올레산, 리놀레산, 팔미트산, 팔미톨레산, 아라키돈산, 및 리놀렌산 중 하나 이상을 포함한다. 특정 구체예에서, CDLC는 100,000 mg/L의 플루로닉 F-68, 100,00 mg/L의 에틸 알콜, 220 mg/L의 콜레스테롤, 2,200 mg/L의 트윈 80, 70 mg/L의 DL-알파-토코페롤 아세테이트, 10 mg/L의 스테아르산, 10 mg/L의 미리스트산, 10 mg/L의 올레산, 10 mg/L의 리놀레산, 10 mg/L의 팔미트산, 10 mg/L의 팔미톨레산, 2 mg/L의 아라키돈산, 및 10 mg/L의 리놀렌산을 포함한다(5.1.1을 참조).

특정 구체예에서, CDLC가 보충된 배지는 실질적으로 무혈청이다. 특정 구체예에서, 배지는 예를 들어, OptiPROTM SFM 또는 VP-SFMTM 또는 SFM4MegaVirTM(SFM4MV) 또는 Ex-Cell VeroTM 또는 Williams' E 배지와 같은 무혈청 배지이다. 특정 구체예에서, 사용된 세포는 베로 세포이다.

본 발명은 바이러스 증식을 위한 최적화된 조건을 추가적으로 제공한다. 일 구체예에서, 세포 역가는 바이러스와 함께 세포를 배양하기 이전에 최대가 된다. 특정 구체예에서, 세포는 바이러스 또는 바이러스 구조체로 감염되기 이전에 혈청을 함유하는 배지에서 배양되고, 바이러스 또는 바이러스 구조체로 감염된 이후에 세포는 혈청이 없는 배지에서 배양된다. 특정 구체예에서, 혈청은 태아 소 혈청이며, 배양물 부피의 10%, 배양물 부피의 5%, 배양물 부피의 2% 또는 배양물 부피의 0.5%의 농도로 존재한다. 다른 바람직한 구체예에서, 바이러스는 종양형성가능성(tumorigenicity)를 감소시켜 바이러스 증식에 도움이 되는 세포와 함께 배양된다. 특정 구체예에서, 바이러스 증식을 위해 사용되는 세포는 베로 세포이다. 다른 구체예에서, 바이러스 증식을 위해서 사용되는 세포 배양은 관류 배양이다(5.1.2 참조).

특정 구체예에서, 바이러스 역가는 감염후 배양 조건에 대한 파라미터를 조정하여 증가된다. 특히, 바이러스는 무혈청 배지에서 증식될 수 있다. 무혈청 배지는 OptiPROTM SFM(Gibco Cat 12309-019, 2005) 및 바이러스 생성 무혈청 배지(VP-SFM)(Gibco Cat 11681-020, 2005) 또는 SFM4MegaVirTM(Hyclone) 또는 Ex-Cell VeroTM(SAFC Biosciences) 또는 William's E 배지(Hyclone)를 포함하는 임의의 무혈청 배지이나, 이에 제한되지는 않는다

(5.1.1 참조).

<111> 다른 구체예에서, 본 발명은 세포를 감염시키기 위해 사용되는 바이러스의 역가를 조정하여 최적의 바이러스 생산 방법에 관한 것이다. 세포를 감염시키는데 사용되는 바이러스의 평균 수는 감염 다중도(MOI)로 언급된다. 특정 구체예에서, 베로 세포를 감염시키는데 사용되는 MOI는 약 0.0001 내지 약 0.1의 범위내이다. 다른 구체예에서, MOI는 약 0.001 내지 약 0.01의 범위내이다. 일 구체예에서, MOI는 0.001이다. 다른 구체예에서, MOI는 0.01이다.(5.3 참조)

<112> 또 다른 구체예에서, 본 발명은 공정의 파라미터 및 배양 조건을 조정하여 바이러스 생산을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 보다 낮은 감염후 배양 온도로 변화시키는 개선된 방법에 관한 것이다. 특정 구체예에서, 세포는 바이러스로 감염하기 이전에 약 37°C, 즉, 37°C±1, 바이러스로 감염한 이후에는 약 29°C, 즉, 29°C±1 내지 약 35°C, 즉, 35°C±1에서 배양한다. 일 구체예에서, 세포는 바이러스로 감염한 후 약 33°C, 즉, 33°C±1에서 배양한다. 다른 구체예에서, 세포는 바이러스로 감염한 후 약 30°C, 즉, 30°C±1에서 배양된다(5.2 참조).

<113> 일반적인 분석은 특정 숙주세포 타입 및/또는 바이러스에 대한 개별 파라미터를 최적화하는데 사용될 수 있다. 소규모의 실험은 바이러스 생산에 대한 결정적인 공정 파라미터 및 배양 조건을 동정하고 최적화하기 위해 수행된다. 특히, T-플라스크(예를 들어, T-25 또는 T-75 플라스크)는 소규모 실험에 사용되어, 바이러스 생산에 대한 결정적인 공정 파라미터와 배양 조건을 동정하고, 최적화한다. 이후, 바이러스 생산 공정은 중규모의 생산, 예를 들어, 롤러 베틀(roller battle) 또는 스피너 플라스크(spinner flask)를 이용하는 중규모 생산으로 증대된다. 일 구체예에서, 스피너 플라스크는 바이러스의 중규모 생산을 위해 마이크로담체를 사용한다(5.4 참조)

<114> 바이러스는 세포 배양을 위해 마이크로담체를 이용하여 증식될 수도 있다. 마이크로담체를 이용하는 것의 장점은 배양시 성장되는 세포, 특히, 예를 들어, 베로 세포와 같은 부착 세포주의 표면적을 증가시켜, 세포 성장을 향상시킨다. 본 발명과 관련하여 사용되는 마이크로담체는 Pronactin F, Cytodex™ 1 및 Cytodex™ 3를 포함하는 임의의 마이크로담체이나, 이에 제한되지는 않는다. 일 구체예에서, 마이크로담체는 Cytodex™ 1이다. 일 구체예에서, 사용된 마이크로담체 비드의 양은 약 2 g/L 내지 약 20g/L의 범위내이다. 다른 구체예에서, 사용된 마이크로담체의 양은 배치 공정의 경우, 약 2 g/L, 약 4 g/L, 또는 약 5g/L이다. 다른 구체예에서, 사용된 마이크로담체 비드의 양은 유가 배양 공정의 경우, 약 20 g/L이다.

<115> 일단 마이크로담체 비드에서 배양되면, 바이러스 세포 배양물의 증폭은 트립신으로 이루어질 수 있다. 이를 위해, 트립신은 마이크로담체 비드로부터 배양된 세포를 분리하는데 사용되고, 이후 증폭 및 성장을 위해, 세포는 배양물에 가해진 새로운 마이크로담체 비드에 부착될 수 있다.

<116> 대안적으로, 바이러스 세포 배양물의 증폭은 트립신이 없는 경우에도 일어날 수 있다. 대신 생물반응기내 바이러스 세포 배양물 증폭을 위해, 직접 비드 대 비드 전달이 사용된다. 바이러스 세포 배양물 세포들은 부착된 마이크로담체 비드로부터 직접적으로 떨어져나가고, 증폭 및 성장을 위해 신선하게 가해진 비드에 부착된다. 직접 비드 대 비드 전달을 위한 본 발명의 일 구체예에서, 배양되는 동안 바이러스 세포 배양물의 다양한 간헐적인 교반이 포함된다. 일 구체예에서, 간헐적인 교반은 1, 2, 3회 이상의 주기로 수행된다. 일 구체예에서, 각 주기는 배양 동안 5시간 이하, 8시간 이하, 24시간 이하 또는 전체 배양시간에 해당할 수도 있다. 다른 구체예에서, 간헐적인 교반은 제1주기에서 5분 동안 125 rpm에서 수행되며, 이후 30분 동안 0rpm으로 정지된다. 다른 구체예에서, 간헐적인 교반은 제1 주기에서 10분 동안 125 rpm으로 수행되며, 이후 50분 동안 0 rpm으로 정지된다. 다른 구체예에서, 간헐적인 교반은 제2 주기에서 1시간 동안 125 rpm에서 수행되며, 1시간 동안 0 rpm으로 정지된다. 또 다른 구체예에서, 교반은 제2 주기에서 125 rpm으로 일정할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 교반은 제3 주기에서 125 rpm으로 일정할 수 있다. 표 VIII 참조.

<117> 상기에 덧붙어, 직접 비드 대 비드 전달은 마이크로담체 비드를 함유하는 신선한 성장 배지내로 1:1 또는 1:5의 비율로 배양물을 분배하여 바이러스 세포 배양물을 증폭하는 것을 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 바이러스 세포 배양물 밀도 $\geq 1e6$ 세포/mL인 경우, 배양물은 분배된다.

<118> 본 발명의 바이러스 구조체 및 방법은 바이러스의 상업적 생산, 예를 들어, 백신 생산을 위해 사용될 수 있다. 백신의 상업적인 생산의 경우, 백신은 증식된 생 약독화된 바이러스만을 함유하는 것이 바람직하다. 생산하는 동안 백신에 우발적인 시약이 도입되는 오염은 반드시 피해야만 할 것이다. 바이러스 또는 바이러스 단백질의 대규모 생산에 대하여 당해 분야에 알려진 방법이 본 발명의 백신의 상업적인 생산을 위해 사용될 수 있다.

<119> 일 구체예에서, 본 발명의 백신의 상업적인 생산을 위해 세포는 생물반응기 또는 발효기에서 배양된다. 생물반응기는 1 리터 미만 내지 100 리터를 초과하는 부피가 가능하며, 예를 들어, Cyto3 생물반응기(Osmomics, Minnetonka, MN); NBS 생물반응기(New Brunswick Scientific, Edison, N. J.); 및 B. Braun Biotech International사의 실험실 및 상업적 규모의 생물 반응기(B. Braun Biotech, Melsungen, Germany)가 이용될 수 있다. 일 구체예에서, 본 발명의 바이러스 세포 배양물은 3L의 생물반응기에서 성장된다. 일 구체예에서, 본 발명의 바이러스 세포 배양물은 15L의 생물반응기에서 성장된다. 일 구체예에서, 본 발명의 바이러스 세포 배양물은 30L의 생물반응기에서 성장된다. 이러한 생물반응기는 예를 들어, 교반식 탱크 Applikon 생물반응기일 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 바이러스 세포 배양물은 일회용 생물반응기(SUB)내 혼탁 배양물로 성장된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 바이러스 세포 배양물은 SUB내 마이크로담체 비드상에서 성장된다. 다른 구체예에서, 소규모 공정의 최적화 연구는 바이러스의 상업적인 생산 이전에 수행되며, 최적화된 조건은 바이러스의 상업적인 생산을 위해 선택되고 사용된다.

<120> 일 구체예에서, 바이러스는 다음과 같이 증식된다: 최적의 성장 조건하에서, 예를 들어, 혈청 및 37°C에서 잘 성장하는 것으로 알려진 바이러스내의 세포; CDLC가 풍부한 배지, 예를 들어, 혈청이 없는 배지 또는 실질적으로 무혈청 배지내로 세포를 두고, 세포를 바이러스로 감염시킨다; 감염된 세포를 감염전 배양보다 낮은 온도, 예를 들어, 33°C 또는 30°C에서 배양한다.

<121> 본 발명에 따라 성장된 바이러스 세포 배양물은 $7 \log_{10}$ TCID₅₀/mL 이상의 바이러스 역가를 획득할 수 있다. 다른 구체예에서, 획득 바이러스 역가는 $7.5 \log_{10}$ TCID₅₀/mL 이상이다. 다른 구체예에서, 획득 바이러스 역가는 $8 \log_{10}$ TCID₅₀/mL 이상이다. 다른 구체예에서, 획득 바이러스 역가는 $8.5 \log_{10}$ TCID₅₀/mL 이상이다. 다른 구체예에서, 획득 바이러스 역가는 $9 \log_{10}$ TCID₅₀/mL 이상이다.

<122> 본 발명에 따라 성장된 바이러스 세포 배양물은 바이러스 채취 배치당 특정 수의 백신 용량을 산출할 수 있다. 일 구체예에서, 본 발명에 따라 성장된 바이러스 세포 배양물은 30L의 바이러스 채취 배치 당 1백만 이상, 2백만 이상, 5백만 이상, 9백만 이상, 천만 이상, 천백만 이상, 천2백만 이상, 천5백만 이상, 2천만 이상, 2천5백만 이상, 3천만 이상, 3천5백만 이상, 4천만 이상, 4천5백만 이상, 5천만 이상, 5천5백만 이상, 6천만 이상, 6천5백만 이상, 7천만 이상, 7천5백만 이상, 8천만 이상, 8천5백만 이상, 9천만 이상, 1억 이상, 1억5백만 이상, 1억1천만 이상, 1억1천5백만 이상, 1억2천만 이상, 1억2천5백만 이상, 1억3천만 이상, 또는 1억3천5백만 이상의 백신용량을 산출할 수도 있다.

<123> **5.1 무혈청 배지**

<124> 혈청 중 바이러스, 박테리아 및 진균 오염은 생물제제의 제조에 있어서 관심의 대상이다. 특히, 전염성 뇌 해면증(Asher, 1999, Dev Biol Stand 100: 103-118; Galbraith, 2002, Cytotechnology 39:117-124) 및 외래성 바이러스 (Erickson et al., 1989, Dev Biol Stand 70: 59-66)와 같은 감염성 제제에 인간이 노출되는 경우에 대하여 점차 관심이 증대되고 있다. 이것은 제조 공정에 있어서, 무혈청, 비동물성, 단백질이 없는 배지 제제의 사용에 대한 원동력이 되고 있다(Castle and Robertson, 1999, Dev Biol Stand 99:191-196). 결국, 무혈청 배지 또는 실질적으로 무혈청 배지는 세포의 배양에 있어서 표준 혈청을 함유하는 배지에 대한 훌륭한 대안이다.

<125> 특정 구체예에서, 바이러스 증식을 위해 사용되는 세포는 동물이나 인간으로부터 유래된 구성의 첨가 없이도 성장이 가능하고/하거나 유지될 수 있는 세포이다. 특정 구체예에서, 바이러스 증식을 위해 사용되는 세포는 실질적으로 무혈청 배지에서 자란다. 특정 구체예에서, 바이러스 증식을 위한 세포는 혈청 없는 성장에 적용된 세포이다. 특정 구체예에서, 베로 세포가 바이러스 증식을 위해 사용된다. 본 발명의 목적을 위한, 무혈청 배지는 OptiPROTM SFM(Gibco Cat 12309-019) 및 바이러스 생성 무혈청 배지(VP SFM)(Gibco Cat 11681-020)를 포함하는 임의의 무혈청 배지일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 특정 구체예에서, 증식되어질 바이러스에 감염된 세포의 배양을 위해 사용되는 배지는 실질적으로 무혈청 배지이다.

<126> OptiPROTM SFM는 단백질, 펩타이드, 또는 동물이나 인간기원의 다른 성분을 함유하지 않는 무혈청, 극저 단백질 ($7.5 \mu\text{g/mL}$) 배지이다. OptiPROTM SFM의 저장용액(Stock solutions)은 2°C 내지 8°C 온도의 암실에서 저장된다. OptiPROTM SFM은 배지에 부착 단백질 첨가의 필요성 또는 세포를 유도하여 이를 자신의 부착 단백질을 생산하도록 유도하는 것에 의한 부착 표면의 전처리 없이 다수의 부착 의존성 세포주의 성장이 입증된 유일한 것이다.

<127> VP-SFM는 단백질, 펩타이드, 또는 동물이나 인간 기원의 다른 성분을 함유하지 않는 무혈청, 극저 단백질($5 \mu\text{g}$

/m1) 배지이다. VP-SFM는 지질 형태로 사용하기가 용이하며, 2°C 내지 8°C 온도의 암실에서 저장된다.

<128> EX-CELL™ Vero(SAFC BioSciences, JRH Catalog No. 14585)는 무혈청이며, 동물 기원 성분이 없다. 배지는 식물 기원의 가수분해물 및 재조합 단백질을 낮은 수준으로 함유하나, 페놀 레드 또는 플루로닉® F68을 함유하지는 않는다.

<129> 특정 구체예에서, 무혈청 배지는 FNC Coating Mix®(Athena Environmental Sciences), UltaMEM™(Cambrex Corporation), HL-1™(Cambrex Corporation), Neurobasal™ A 배지(Invitrogen), MAM-PF-1-2-3(PromoCell), RenCyte™ BHK(Medicult), Williams' 배지 E(Sigma-Aldrich), 및 Nutridoma-NS Supplement(Roche)와 같이 화학적으로 정의되어 있다. 다른 구체예에서, 무혈청 배지는 OptiPRO™ SFM 및 VP-SFM 또는 SFM4MegaVir™(Hyclone)과 같이 화학적으로 정의되어 있다.

<130> 일 구체예에서, 본 발명은 실질적으로 무혈청인 배지를 이용하여 바이러스 생산을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 실질적으로 무혈청 배지는 5% v/v 미만의 혈청, 2.5% v/v 미만의 혈청, 1% v/v 미만의 혈청, 0.1% v/v 미만의 혈청, 0.01% v/v 미만의 혈청, 0.001% v/v 미만의 혈청을 함유하는 배지일 수 있다. 특정 구체예에서, 바이러스는 5% v/v 미만의 혈청, 2.5% v/v 미만의 혈청, 1% v/v 미만의 혈청, 0.1% v/v 미만의 혈청, 0.01% v/v 미만의 혈청, 또는 0.001% v/v 미만의 혈청을 함유하는 배양물 배지 중 바이러스로 감염된 세포를 배양하여 증식된다. 특정 구체예에서, 바이러스는 혈청의 완벽한 부재시, 바이러스로 감염된 세포를 배양하여 증식된다. 특정 구체예에서, 바이러스는 화학적으로 정의된 지질 농축액(CDLC)을 포함하는 무혈청 배지에서 증식된다.

<131> 특정 구체예에서, 우선 세포를 혈청을 함유하는 배지에서 배양하고, 이후 세포로부터 혈청을 함유하는 배지를 제거하고 혈청이 없는 배지를 가하여, 혈청이 없는 배지내로 옮긴다. 특정 구체예에서, 세포를 혈청이 없는 배지로 세척하여, 바이러스로 감염된 세포가 혈청이 없는 상태에서 배양되도록 한다. 특히, 보다 상세한 구체예에서, 세포를 혈청이 없는 배지로 1회, 2회, 3회, 4회, 5회 이상 또는 10회 이상 세척한다. 특정 구체예에서, 일단 세포가 무혈청 배지에 있게 되면, 이들을 바이러스로 감염시킨다. CDLC는 바이러스로 감염되기 이전 또는 감염된 이후에 가해질 수 있다.

5.1.1 화학적으로 정의된 지질 농축액의 배지 보충

<132> 본 발명은 처음으로 화학적으로 정의된 지질 농축액(CDLC)을 포함하는 배지에서 세포를 배양하여 바이러스를 증식하는 방법을 제공한다. 본 발명은 바이러스로 감염하기 전에 화학적으로 정의된 지질 농축액(CDLC)을 포함하는 배지에서 세포를 배양하는 것을 예측한다. 실질적으로 무혈청으로 정의된 배지를 이용하는 것의 장점은 오염의 위험과 면역원성 자극으로부터 회피할 수 있다는 점이다. 오염원은 바이러스, 프리온, 및 마이코플라즈마를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 이론에 구속됨 없이, 무혈청 배지에의 CDLC 첨가는 세포 부착을 촉진하는데 유용하며, 포유동물 배양 시스템에서 외피 바이러스의 역할을 증가시킨다.

<133> 일 구체예에서, CDLC가 보충된 배지는 실질적으로 무혈청이다. 다른 구체예에서, CDLC가 보충된 배지는 최대 0.5% v/v의 혈청 농도를 함유한다. 특정 구체예에서, CDLC가 보충된 배지는 플루로닉 F-68, 에틸 알콜, 콜레스테롤, 트윈 80, DL-알파-토코페롤 아세테이트, 스테아르산, 미리스트산, 올레산, 리놀레산, 팔미트산, 팔미톨레산, 아라키돈산, 및 리놀렌산 중 하나 이상을 포함한다. 다른 구체예에서, CDLC는 100,000 mg/L의 플루로닉 F-68, 100,00 mg/L의 에틸 알콜, 220 mg/L의 콜레스테롤, 2,200 mg/L의 트윈 80, 70 mg/L의 DL-알파-토코페롤 아세테이트, 10 mg/L의 스테아르산, 10 mg/L의 미리스트산, 10 mg/L의 올레산, 10 mg/L의 리놀레산, 10 mg/L의 팔미트산, 10 mg/L의 팔미톨레산, 2 mg/L의 아라키돈산, 및 10 mg/L의 리놀렌산을 포함한다. 다른 구체예에서, CDLC는 50,000 내지 250,000 mg/L의 플루로닉 F-68, 50,000 내지 250,000 mg/L의 에틸 알콜, 100 내지 300 mg/L의 콜레스테롤, 1,000 내지 4,000 mg/L의 트윈 80, 50 내지 100 mg/L의 DL-알파-토코페롤 아세테이트, 5 내지 20 mg/L의 스테아르산, 5 내지 20 mg/L의 미리스트산, 5 내지 20 mg/L의 올레산, 5 내지 20 mg/L의 리놀레산, 5 내지 20 mg/L의 팔미트산, 5 내지 20 mg/L의 팔미톨레산, 1 내지 5 mg/L의 아라키돈산, 및 5 내지 20 mg/L의 리놀렌산을 포함한다.

<134> 특정 구체예에서, CDLC가 보충된 배지는 0.1% v/v 내지 5% v/v CDLC를 함유한다. 특정 구체예에서, CDLC가 보충된 배지는 0.1% v/v, 0.5% v/v, 1% v/v, 2% v/v, 3% v/v, 4% v/v, 또는 5% v/v를 함유한다. 다른 구체예에서, CDLC가 보충된 배지는 1% v/v의 CDLC를 함유한다.

<136> 특정 구체예에서, 감염전에 CDLC가 세포 배양물 배지에 가해진다. 다른 구체예에서, 하나 이상의 지질는 외부에서 감염후 배지에 가해진다.

<137> **5.1.2 감염전 배지의 혈청 보충**

<138> 특정 구체예에서, 세포는 바이러스 또는 대상 바이러스 구조체로 감염하기전에 혈청을 함유하는 배지에서 배양되고, 바이러스 또는 바이러스 구조체로 감염한 이후에는 세포는 혈청이 없는 배지에서 배양된다. 특정 구체예에서, 혈청은 태아 소 혈청이며, 배양물 부피의 10%, 배양물 부피의 5%, 배양물 부피의 2%, 또는 배양물 부피의 0.5%의 농도로 존재한다. 특정 구체예에서, 혈청은 송아지 혈청, 인간 혈청, 신생 소 혈청, 신생 송아지 혈청, 공여자 소 혈청, 공여자 말 혈청일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

<139> 특정 구체예에서, 세포는 바이러스로 감염되기 이전에는 혈청을 함유하는 배지에서 배양된다. 특정 구체예에서, 바이러스로 세포를 감염한 이후 세포는 무혈청화에서 배양된다. 다른 구체예에서, 처음 세포는 혈청을 함유하는 배지에서 배양되고; 이후 세포는 혈청이 없는 배지로 옮겨지고; 연속하여 세포는 바이러스로 감염되고, 바이러스 없이 추가 배양된다.

<140> 특정 구체예에서, 세포는 세포로부터 혈청을 함유한 배지를 제거하고 혈청이 없는 배지를 가함으로써, 혈청을 함유한 배지에서 혈청이 없는 배지로 옮겨진다. 다른 구체예에서, 세포는 원심분리되고, 혈청을 함유한 배지는 제거되고 혈청이 없는 배지가 가해진다. 특정 구체예에서, 세포를 혈청이 없는 배지로 세척하여, 일단 세포가 바이러스로 감염되면 혈청의 부재하에 배양되도록 한다. 특히, 더욱 상세한 구체예에서는, 세포를 혈청이 없는 배지로 1회, 2회, 3회, 4회, 5회 이상 또는 10회 이상 세척한다.

<141> **5.2 감염전에서 감염후의 온도 변화**

<142> 특정 구체예에서, 세포는 혈청을 함유하는 배지와 바이러스로 감염되기 이전 또는 대상 바이러스 구조체로 형질감염하기 이전에, 세포의 성장에 최적화된 온도에서 배양되며, 세포 배양물은 바이러스로 감염하거나 대상 바이러스 구조체로 형질감염된 이후에는 (대응 바이러스 또는 바이러스 백터에 대한 표준 배양 온도에 비하여 상대적으로) 낮은 온도에서 배양된다. 특정 구체예에서, 세포는 바이러스로 감염되거나 대상 바이러스 구조체로 형질감염되기 이전에는 혈청을 함유하는 배지에서, 37°C 또는 약 37°C(즉, 37±1°C)에서 배양되고, 바이러스로 감염되거나 대상 바이러스 구조체로 형질감염된 이후 세포 배양물은 33°C 또는 약 33°C(즉, 33±1°C)에서 배양된다. 다른 구체예에서, 세포는 바이러스로 감염되거나 대상 바이러스 구조체로 형질감염되기 이전에 37°C 또는 약 37°C(즉, 37±1°C)의 혈청을 함유하는 배지에서 배양되며, 세포 배양물은 바이러스로 감염되거나 대상 바이러스 구조체로 형질감염된 이후에는 30°C 또는 약 30°C(즉, 30±1°C)에서 배양된다.

<143> 또한 다른 구체예에서, 세포는 바이러스로 감염되거나 대상 바이러스 구조체로 형질감염되기 이전에 세포 성장에 최적인 온도에서 혈청을 함유하는 배지내에서 배양되고, 세포 배양물은 바이러스로 감염되거나 대상 바이러스 구조체로 형질감염된 이후에는 (대응 바이러스 또는 바이러스 백터에 대한 표준 배양 온도에 비하여 상대적으로) 낮은 온도에서 혈청 없이 배양된다. 특정 구체예에서, 세포는 바이러스로 감염되거나 대상 바이러스 구조체로 형질감염되기 이전에 37°C의 혈청을 함유하는 배지에서 배양되며, 세포 배양물은 바이러스로 감염되거나 대상 바이러스 구조체로 형질감염된 이후에는 33°C 또는 약 33°C(예를 들어, 33±1°C)에서 혈청 없이 배양된다. 다른 구체예에서, 세포는 바이러스로 감염되거나 대상 바이러스 구조체로 형질감염되기 이전에는 37°C의 혈청을 함유한 배지에서 배양되며, 세포 배양물은 바이러스로 감염되거나 대상 바이러스 구조체로 형질감염된 이후에는 30°C 또는 약 30°C (예를 들어, 30±1°C)에서 혈청 없이 배양된다.

<144> 특정 구체예에서, 세포 배양물은 바이러스로 감염되거나 대상 바이러스 구조체로 형질감염되고, 배양물의 세포에 대한 표준 배양 온도에 비하여, 감염후 낮은 배양 온도에서 배양된다. 특정 구체예에서, 바이러스로 감염되거나 대상 바이러스 구조체로 형질감염된 세포 배양물은 33°C 또는 약 33°C(예를 들어, 33±1°C)에서 배양된다. 특정 구체예에서, 감염후 배양 온도는 약 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C 또는 37°C이다.

<145> 특정 구체예에서, 바이러스는 바이러스로 감염되기 이전에, 세포 성장에 최적화된 온도에서 세포를 배양하여 증식되고, 바이러스로 세포 감염된 이후, 즉, 감염후의 온도는 보다 낮은 온도로 이동된다. 특정 구체예에서 이동은 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, 10°C, 11°C 이상 또는 12°C 이상이다. 특정 구체예에서, 이동은 기껏해야 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, 10°C, 11°C 또는 기껏해야 12°C이다. 특정 구체예에서, 이동은 4°C이다.

<146>

5.3 감염 다중도

<147>

본 발명은 세포를 감염하기 위해 사용되는 바이러스 역가를 조정하여 최적의 바이러스를 생산하는 방법에 관한 것이다. 단일 세포를 감염시키는데 사용되는 바이러스의 평균 수를 감염 다중도(MOI)로 언급한다. 바이러스 제조에 있어서, MOI의 최적 밸런스가 바람직하다. 감염 당 적은 수의 바이러스 접종원은 마스터 바이러스 뱅크의 수명을 연장시킬 수 있으나, 증가된 바이러스 접종원은 높은 바이러스 역가를 산출할 수 있다.

<148>

일 구체예에서, 베로 세포를 감염시키는 데 사용되는 MOI는 약 0.0001 내지 약 0.1의 범위내이다. 다른 구체예에서, MOI는 약 0.001 내지 약 0.01의 범위내이다. 본 발명의 특정 구체예에서, 세포 배양물은 약 0.1의 MOI를 갖는 바이러스로 감염된다. 다른 특정 구체예에서, 세포 배양물은 약 0.01의 MOI를 갖는 바이러스로 감염된다. 또 다른 특정 구체예에서, 세포 배양물은 약 0.001의 MOI를 갖는 바이러스로 감염된다.

<149>

특정 구체예에서, 세포 배양물은 약 0.0005, 0.0006, 0.0007, 0.0008, 0.0009, 0.001, 0.0011, 0.0012, 0.0013, 0.0014, 또는 0.0015의 MOI를 갖는 바이러스로 감염된다. 다른 구체예에서, 세포 배양물은 0.001의 MOI를 갖는 바이러스로 감염된다.

<150>

5.4 소규모, 중규모, 및 대규모의 바이러스 생산

<151>

일 구체예에서, 소규모 실험은 바이러스 생산에 대한 임계적인 공정 파라미터 및 배양 조건을 동정하고 최적화하기 위해 수행된다. 특정 구체예에서, T-플라스크는 소규모 실험에서 이용되어, 바이러스 생산에 대한 임계적인 공정 파라미터와 배양 조건을 동정하고 최적화한다. 다른 구체예에서, T-플라스크 실험은 MEDI-534 또는 MEDI-559, 또는 예를 들어, $\Delta M2-2$, $\Delta NS-1$ 또는 rcp45 hPIV3 (MEDI-560)에 제한되지 않으나, 이와 같이 본 명세서에 개시된 다른 바이러스 구조체 생산에 대한 감염 시간 및 감염후 배양 온도의 조합 효과를 조사하기 위해 수행한다. 또 다른 구체예에서, T-플라스크 실험은 바이러스 생산에 대한 감염전 배양 배지의 효과를 측정할 수 있다.

<152>

본 발명의 일 구체예에서, 바이러스 생산 공정을 중규모 생산으로 증가시킨다. 특정 구체예에서, 롤러 베틀은 바이러스의 중규모 생산에 사용된다. 다른 특정 구체예에서, 스피너 플라스크는 바이러스의 중규모 생산에 사용된다. 일 구체예에서, 스피너 플라스크는 바이러스의 중규모 생산을 위해 마이크로담체를 사용한다. 다른 구체예에서, 롤러 베틀은 바이러스의 중규모 생산을 위해 마이크로담체를 사용한다.

<153>

본 발명의 일 양태에서, 바이러스 생산은 마이크로담체 배양으로 수행된다. 마이크로담체 배양은 앵커리지 (anchorage) 의존성 세포의 실질적으로 고 수율의 배양을 만드는 것이 가능한 기술이다. 마이크로담체는 동물 세포의 성장을 위해 편리한 표면을 제공하며, 단층 배양 용기 및 관류 챔버의 수율을 증가시키거나 혼탁 배양 시스템에서 사용될 수 있다. 마이크로담체의 사용은 대량의 세포, 바이러스 및 재조합 세포 제품의 생산 및 세포 부착, 분화 및 세포 융합에 대한 연구, 관류 컬럼 배양 시스템, 세포 채취 등을 포함한다. 특정 구체예에서, 사용된 마이크로담체는 CytodexTM 1 및 CytodexTM 3 (Amersham Biosciences)이다. 다른 구체예에서, 사용된 마이크로담체는 Pronectin[®]F (Sayno Chemical Industries)이다.

<154>

일반적으로 사용되는 마이크로 담체는 CytodexTM 1 및 CytodexTM 3 (Amersham Biosciences)이다. 이들은 수 밀리미터에서부터 수천리터 범위내 배양물 부피에서 광범위한 동물 세포의 배양을 위해 개발되었다. 혼탁 배양 시스템에서 CytodexTM를 이용하는 것은 밀리리터 당 수백만개의 세포 수율을 얻게된다.

<155>

CytodexTM는 다음의 마이크로담체 기술의 특별한 요구사항을 만족하도록 고안된다: 크기 및 밀도는 매우 다양한 세포의 고 수율과 좋은 성장을 제공하기에 최적화될 것; 매트릭스는 생물학적으로 불활성이며, 교반된 마이크로담체 배양물에 대하여 강하나 뻣뻣하지 않은 기질을 제공할 것; 마이크로담체는 부착된 세포의 용이한 현미경 실험이 가능하도록 투명할 것.

<156>

CytodexTM 1은 양으로 하전된 N,N-디에틸아미노에틸기로 치환된 가교된 텍스트란 매트릭스를 기초로 한다. 하전된 기는 마이크로담체 매트릭스를 통해 분포된다. CytodexTM 1은 일반적인 목적의 마이크로담체 배양, 특히 가장 잘 정립된 세포주에 대하여 적절하다. 이 마이크로담체는 배양물 생산의 최대 회수가 필수적이지 않은 경우, 정상 배수염색체 세포 계통 및 1차 세포의 배양물로부터의 생산에 사용될 수도 있다.

<157>

CytodexTM 3은 가교된 텍스트란의 매트릭스에 화학적으로 커플링된 얇은 층의 변성 콜라겐으로 구성된다.

CytodexTM 3의 변성 콜라겐 층은 트립신 및 콜라제네이즈를 포함하는 다양한 프로테아제에 의해 절단되는데 민감하며, 최대 세포 생존력, 기능 및 보전력을 유지하면서, 마이크로담체로부터 세포를 제거하는 독특한 기회를 제공한다. 분화된 세포 배양 시스템의 경우, CytodexTM 3은 배양물에서 성장하기 어려운 것으로 알려진 공지의 세포, 특히 상피유사 형태의 세포를 위한 선택 마이크로담체이다. 이는 일반적인 목적의 콜라겐으로 코팅된 배양 표면으로 사용될 수 있다.

<158> 본 발명의 일 양태에서, 바이러스 생산은 마이크로담체 배양으로 수행된다. 일 양태에서, 배로 세포는 FBS가 보충되고 CytodexTM 1를 함유하는 OptiPROTM SFM에서 배양된다. 특정 구체예에서, FBS의 농도는 약 0.5% (v/v) 내지 약 2.0% (v/v)이다. 다른 특정 구체예에서, FBS의 농도는 약 0.5% (v/v) 내지 약 1.0% (v/v)이다. 일 양태에서, FBS의 농도는 약 0.5% (v/v)이다. 특정 구체예에서, CytodexTM 1의 농도는 약 1 g/L 내지 약 5 g/L이다. 다른 특정 구체예에서, CytodexTM 1의 농도는 약 1 g/L 내지 약 3 g/L이다. 다른 구체예에서, CytodexTM 1의 농도는 약 2 g/L이다. 또 다른 구체예에서, CytodexTM 1의 농도는 약 4 g/L이다.

<159> 본 발명의 다른 구체예에서, 배로 세포는 FBS가 보충되고 CytodexTM 3을 함유하는 OptiPROTM SFM에서 배양된다. 특정 구체예에서, FBS의 농도는 약 0.5% (v/v) 내지 약 2.0% (v/v)이다. 다른 특정 구체예에서, FBS의 농도는 약 0.5% (v/v) 내지 약 1.0% (v/v)이다. 일 구체예에서, FBS의 농도는 약 0.5% (v/v)이다. 특정 구체예에서, CytodexTM 3의 농도는 약 1 g/L 내지 약 5 g/L이다. 다른 특정 구체예에서, CytodexTM 3의 농도는 약 1 g/L 내지 약 3 g/L이다. 다른 구체예에서, CytodexTM 3의 농도는 약 2 g/L이다.

<160> 본 발명의 또 다른 구체예에서는, 배로 세포는 CDLC가 보충되고 CytodexTM 1를 함유하는 VP-SFM에서 배양된다. 특정 구체예에서, CDLC의 농도는 약 0.5% (v/v) 내지 약 2.0% (v/v)이다. 다른 특정 구체예에서, CDLC의 농도는 약 0.5% (v/v) 내지 약 1.0% (v/v)이다. 일 구체예에서, CDLC의 농도는 약 1.0% (v/v)이다. 특정 구체예에서, CytodexTM 1의 농도는 약 1 g/L 내지 약 5 g/L이다. 다른 특정 구체예에서, CytodexTM 1의 농도는 약 1 g/L 내지 약 3 g/L이다. 다른 구체예에서, CytodexTM 1의 농도는 약 2 g/L이다. 또 다른 구체예에서, CytodexTM 1의 농도는 약 4 g/L이다.

<161> 본 발명의 다른 구체예에서, 배로 세포는 CDLC가 보충되고 CytodexTM 3를 함유하는 VP-SFM에서 배양된다. 특정 구체예에서, CDLC의 농도는 약 0.5% (v/v) 내지 약 2.0% (v/v)이다. 다른 특정 구체예에서, CDLC의 농도는 약 0.5% (v/v) 내지 약 1.0% (v/v)이다. 다른 구체예에서, CDLC의 농도는 약 1.0% (v/v)이다. 특정 구체예에서, CytodexTM 3의 농도는 약 1 g/L 내지 약 5 g/L이다. 다른 특정 구체예에서, CytodexTM 3의 농도는 약 1 g/L 내지 약 3 g/L이다. 다른 구체예에서, CytodexTM 3의 농도는 약 2 g/L이다.

<162> 당업자는 부착 세포를 2차 배양(즉, 세포 증식, 세포 배양의 증폭)공정 동안, 세포를 컨플루언트(confluent) 지지체 표면상에서 합류되는 지지체 표면(예를 들어, 플라스크 표면, 마이크로담체 등)으로부터 새로운 지지체 표면으로 옮겨져야만 한다는 것을 이해할 것이다. 많은 방법들이 이러한 세포 전달을 유도하는데 이용될 수 있다. 예를 들어, 트립신 및 콜라제네이즈를 포함하는 프로테아제는 플라스크나 마이크로담체로부터 세포를 제거하는데 사용될 수 있고, 이후 세포는 세척되고, 증폭을 위한 배지를 함유한 더 큰 플라스크나 큰 부피의 마이크로담체내로 회석된다. TrypLE(Invitrogen, Carlsbad, CA)와 같은 동물 비유래성 프로테아제를 이러한 적용시 사용하는 것이 바람직하다.

<163> 대안적으로, 마이크로담체 배양의 경우, 직접 비드 대 비드 전달 방법을 이용할 수 있으며, 이때 신선한 비드 및 배지는 컨플루언트 비드와 혼합되고, 세포 배양물을 증폭시키고 성장시키기 위해 배양물은 새로운 비드로 세포 전달을 촉진시키는 조건하에서 배양된다. 이러한 비드 대 비드 전달은 예를 들어, 5분 내지 10분 간격동안, 100-130 rpm으로 마이크로담체 비드를 함유하는 배양물을 교반하고, 이후 40분 이하, 50분 이하, 60분 이하 동안 교반을 중지하는 간헐적인 교반법을 이용할 수 있다. 이후 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간 또는 밤새(12-24시간)동안의 교반 패턴을 반복한다. 이후, 소정의 가능한 세포 밀도가 얻어질 때까지 100-130 rpm의 일정한 교반 속도를 다시 유지한다. 이 간헐적인 교반 패턴은 소정의 가능한 세포 밀도가 얻어질때까지 반복될 수도 있다. 이 비드 대 비드 전달 단계는 TrypLE 없이 사용될 수 있으며, 한 비드에서 다른 비드로의 세포 탈착을 돋는다.

<164> 바이러스나 바이러스성 단백질의 대규모 생산에 있어서 당해 분야에 알려진 방법을 본 발명의 백신의 상업적인 생산에 사용할 수 있다. 일 구체예에서, 본 발명의 백신의 상업적인 생산을 위해, 세포는 생물반응기나 발효기에서 배양된다. 생물반응기는 1 리터미만에서부터 100 리터를 초과하는 범위까지 사용가능하며, 예를 들어, Cyto3 생물반응기(Osmonics, Minnetonka, MN); NBS 생물반응기(New Brunswick Scientific, Edison, N.J.); 및 B. Braun Biotech International사의 실험실 및 상업적 규모의 생물반응기(B. Braun Biotech, Melsungen, Germany)를 사용할 수 있다. 다른 구체예에서, 소규모 공정의 최적화 연구는 바이러스의 상업적인 생산 이전에 수행되고, 최적화된 조건은 바이러스의 상업적인 생산을 위해 선택되고 사용되어진다.

<165> 특정 구체예에서, 세포 배양을 위한 가요성의 플라스틱 백과 같은 일회용 요소를 포함하는 반응기 시스템이 이용된다. 이러한 반응기 시스템은 당해 분야에 공지되어 있으며, 상업적으로 입수가능하다. 예를 들어, 국제 출원 공개 WO 05/108546; WO 05/104706; 및 WO 05/10849 및 하기 6.14 부분을 참조한다. ("일회용 생물반응기(들)" 또는 약어 "SUB(들)"로 본 명세서에 언급될 수도 있는) 일회용 요소를 포함하는 반응기 시스템은 미리 살균될 수 있으며, 배양물이나 생산 시스템에서, 배치에서 배치로 또는 제품에서 제품으로 변화시키기 위한 스텁 멸균 장치(SIP) 또는 세정 장치(CIP) 환경을 요구하지 않는다. 이렇게, SUB는 제로 배치 대 배치 I 오염원을 확보하여 규제 조절을 덜 요구하게 되었으며, 따라서 상당한 비용적 장점과 사용 이전에 최소한 또는 별도의 준비 없이 작동될 수 있다. 또한, SUB가 세정이나 멸균을 필요로 하지 않기 때문에, 세포 배양물로부터 다양한 백신 물질(예를 들어, 바이러스)의 생산을 촉진하기 위해 빠르게 성장될 수 있었다. 특정 구체예에서, 일회용 반응기 시스템은 보다 효과적인 영양분, O₂와 pH 조절이 가능한 세포 배양물을 혼합하기 위한, 유체역학적 환경이 가능한 교반식 탱크 반응기 시스템이다.

<166> 본 발명은 교반식 탱크 SUB에서 바이러스 생산을 위한 방법을 제공하며, 여기서 하나 이상의 파라미터는 온도, 교반 속도, pH, 용존산소(DO), O₂ 및 CO₂ 유속으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 이는 모니터링되고/되거나 조절된다. 당업자는 바이러스 생산 이전에, 숙주 세포(예를 들어, 베로 세포)가 적절한 세포 밀도로 증식되어 바이러스의 증식을 촉진시켜야 한다는 것을 알고 있다. 따라서, 본 발명은 추가적으로 SUB에서 상기 세포를 배양시켜 배양물에서 세포(예를 들어, 본 발명의 베로 세포)를 고 세포 밀도까지 증식시키는 방법을 제공한다.

<167> 일 구체예에서, 세포의 배양 및/또는 바이러스 생산은 1% 이상, 또는 2% 이상 또는 3% 이상 또는 4% 이상 또는 5% 이상 또는 6% 이상 또는 7% 이상 또는 8% 이상 또는 9% 이상 또는 10% 이상 또는 20%의 CO₂ 농도의 생물반응기(예를 들어, SUB)에서 수행된다. 특정 구체예에서, CO₂ 유속은 약 0.1 L/분 내지 약 1 L/분으로 유지된다.

<168> 일 구체예에서, 용존 산소(DO) 농도(pO₂ 값)은 세포 배양 및/또는 바이러스 생산동안 유리하게 조절되며, (포화 공기에 대하여) 5% 내지 95%의 범위내이다. 특정 구체예에서, DO는 약 10% 내지 약 80%, 또는 약 20% 내지 약 70%, 또는 약 50%으로 유지된다. 특정 구체예에서, 용존 산소(DO) 농도(pO₂ 값)는 10% 이상, 또는 20% 이상, 또는 30% 이상, 또는 50% 이상 또는 60% 이상이다. 또 다른 구체예에서 DO의 허용가능한 범위는 약 100 내지 35%이다. 특정 구체예에서, DO는 약 35% 내지 약 50%, 또는 약 50%로 유지된다. 또 다른 구체예에서, DO는 약 35% 미만으로 떨어져서는 안된다. 당업자는 초기 DO가 100% 일 수 있으며, DO가 유지된다면, 미리 결정된 수준(예를 들어, 50%)으로 감소될 수 있음을 이해할 것이다. DO는 당해 분야의 공지의 방법, 예를 들어, O₂ 살포법과 같은 임의의 방법을 이용하여 유지된다. 특정 구체예에서, O₂ 유속은 약 2.0L/분 미만으로 유지된다.

<169> 다른 구체예에서, 세포의 배양 및/또는 바이러스의 생산에 사용되는 배양 배지의 pH는 조절되고, pH 6.4 내지 pH 8.0 범위 또는 pH 6.8 내지 pH 7.4 범위내이다. 특정 구체예에서, 배양물 배지의 pH는 약 6.4 또는 약 6.6 또는 약 6.8, 또는 약 7.0 또는 약 7.1 또는 약 7.2 또는 약 7.3 또는 약 7.4 또는 약 7.6 또는 약 7.8 또는 약 8.0으로 유지된다. 당업자는 초기 pH가 이후 소정의 범위보다 낮거나 높을 수 있으며, pH가 유지되는 경우, 소정의 수준(예를 들어, 7.1)로 증가되거나 감소될 수 있음을 이해할 것이다. pH는 당해 분야에 공지된 임의의 방법으로 유지된다. 예를 들어, pH는 CO₂를 살포하고/하거나 필요한 경우, 산(예를 들어, HCl) 또는 염기(예를 들어, NaOH)를 가하여 조절될 수 있다. 특정 구체예에서, pH는 NaOH의 첨가 및/또는 CO₂를 살포하여 조절된다.

<170> 특정 구체예에서, 베로 세포는 감염 이전에, SUB 시스템에서 5x10⁵ 세포/mL 이상, 7.5x10⁵ 세포/mL 이상, 1x10⁶ 세포/mL 이상, 2.5x10⁶ 세포/mL 이상, 5x10⁶ 세포/mL 이상, 7.5x10⁶ 세포/mL 이상, 10x10⁶ 이상 15x10⁶ 세포/mL 이상, 20x10⁶ 세포/mL 이상, 또는 25x10⁶ 세포/mL 이상의 세포 밀도로 배양된다.

<171> 특정 구체예에서, 베로 세포는 상기 전술한 바와 같은(예를 들어, 5.1을 참조) 무혈청 배지의 SUB에서 배양된다. 특정 구체예에서, 배지는 추가 글루코오스로 보충된다. 또 다른 특정 구체예에서, 베로 세포는 상기 기술한 바와 같이(예를 들어, 단락 [00109]-[00111]를 참조) 마이크로담체상의 부착성 세포로서 SUB에서 배양된다. 일 구체예에서, 마이크로담체는 약 1 내지 약 4 g/L의 농도에서 사용된다. 다른 구체예에서, 마이크로담체는 약 2 내지 약 3 g/L의 농도에서 사용된다. 특정 구체예에서, 세포는 임의의 배지 성분의 보충없이 배양된다. 다른 구체예에서, 세포는 글루코오스와 글루타민이 보충되어 배양된다. 또 다른 구체예에서, 세포는 CDLC가 보충되어 배양된다.

<172> 바이러스 배양물이 성장되고 증폭됨에 따라, 배양 배지내로 대사체들이 분비될 것이다. 이를 대사체의 측정은 감염전 또는 감염후 세포의 생존가능성을 나타낼 수 있다. 특정 구체예에서, 감염후 바이러스 세포 배양물 또는 세포 배양물 상청액은 약 1.0 내지 2.0 g/L, 보다 상세하게는 약 1.25 내지 1.5 g/L의 락테이트 농도를 갖는다. 특정 구체예에서, 감염후 바이러스 세포 배양물 또는 세포 배양물 상청액은 약 2.0 내지 약 4.0 g/L, 보다 상세하게는 약 2.0 내지 약 3.0 g/L의 농도의 글루타민을 갖는다. 특정 구체예에서, 감염후 바이러스 세포 배양물 또는 세포 배양물 상청액은 약 0.5 내지 2.5 g/L, 보다 상세하게는 약 1.5 내지 1.75 g/L의 글루코오스 농도를 갖는다. 특정 구체예에서, 감염후 바이러스 세포 배양물 또는 세포 배양물 상청액은 약 1.25 내지 약 2.5 mM, 보다 상세하게는 약 2.0 내지 약 2.25 mM의 암모늄 이온 농도를 갖는다.

<173> 다른 구체예에서, 바이러스는 감염후 2 내지 12일에 바이러스 세포 배양물에서 회수(채취)된다. 다른 구체예에서, 바이러스는 감염후 3일 내지 4일에 바이러스 세포 배양물로부터 회수된다.

<174> 특정 구체예에서, SUB는 약 1×10^4 세포/mL 내지 약 5×10^5 세포/mL의 씨딩 밀도로 배양된 베로 세포로 씨딩된다. 특정 구체예에서, 씨딩 밀도는 약 3×10^4 세포/mL 내지 약 3×10^5 세포/mL, 또는 약 7×10^4 세포/mL 내지 약 2×10^5 세포/mL, 또는 약 8×10^4 세포/mL 내지 약 2×10^5 세포/mL, 또는 약 9×10^4 세포/mL 또는 약 1×10^5 세포/mL, 또는 약 1×10^5 세포/mL 또는 약 2×10^5 세포/mL 내이다. 다른 특정 구체예에서, 씨딩 밀도는 약 1×10^5 세포/mL 내지 약 2×10^5 세포/mL 내이다.

<175> 일 구체예에서, SUB의 교반 속도는 약 50 내지 150 rpm으로 유지된다. 특정 구체예에서, 교반 속도는 약 80 내지 약 120 rpm, 또는 약 90 내지 약 100 rpm으로 유지된다. 다른 특정 구체예에서, 교반 속도는 약 100 내지 약 125 rpm으로 유지된다. 또 다른 구체예에서, 교반 속도는 세포 배양동안에는 한 속도로 유지될 수 있으나, 이후에는 세포 배양중에는 다른 지점의 다른 속도(즉, 간헐적인 교반)로 변화된다. 교반 속도는 당해 분야에 잘 알려진 방법에 의해 조절된다.

<176> 특정 구체예에서, 배지 교환은 세포의 배양 이후 및 감염 이전에 수행될 수 있다. 일 구체예에서, 교환될 배지의 분율은 약 20% 내지 약 100%, 또는 약 30% 내지 약 80%, 또는 약 30% 내지 약 60%, 또는 약 66% 내지 약 90%사이이다. 일 구체예에서, 배지는 동일 부피의 배지로 교환된다. 다른 구체예에서, 배지는 효과적으로 세포를 농축시킬, 감소된 부피의 배지로 교환된다. 배지는 동일하거나 상이한 조성을 갖는 배지로 교환될 수 있다. 일 구체예에서, 성장 배지(즉, 세포의 증식을 위해 사용되는 배지)는 감염 배지(즉, 감염 및 바이러스 성장 동안에 사용되는 배지)로 교환된다. 성장 및 감염 배지의 비제한적인 예가 5.1 및 6에 제공된다. 대안적으로, 배지 교환을 필요로 하지 않기 위해서는 성장 배지는 추가 성분(예를 들어, 글루코오스, 미량 원소, 아미노산 등)이 보충되고/되거나 추가 성분을 포함한다.

<177> **5.5 바이러스**

<178> 특정 구체예에서, 본 발명의 방법을 이용하여 증식되는 바이러스는 음성 가닥 RNA 바이러스이다. 특정 구체예에서, 바이러스는 파라미소바이러스와 같은, 비분절된, 음성 가닥 RNA 바이러스이다. 특정 구체예에서, 본 발명의 방법을 이용하여 증식되는 바이러스는 파라인플루엔자 바이러스(PIV), 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 및 메타뉴모 바이러스(MPV)이다. 다른 구체예에서, 본 발명은 인간 및 소 서열의 PIV를 증식하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 바이러스는 RSV 뉴클레오티드 서열을 발현하는 키메릭 인간/소 PIV이다. 특정 구체예에서, 증식되는 바이러스는 MEDI-534이다. 다른 특정 구체예에서, 증식되는 바이러스는 MEDI-559이다. 다른 특정 구체예에서, 증식되는 바이러스는 예를 들어, M2-2 또는 NS-1와 같은 오픈 리딩 프레임이 결실된 바이러스이다. 다른 특정 구체예에서, 증식되는 바이러스는 rcp45 hPIV3 또는 MEDI-560 중 하나이다. 특정 구체예에서, 본 발명의 방법을 이용하여 증식되는 바이러스는 외피 바이러스이다. 다른 구체예에서, 증식되는 바이러스는 부착 세포내에서 감염되고 복제되는 바이러스이다.

<179> 특정 구체예에서, 증식되는 바이러스는 MEDI-534이다. MEDI-534는 우선 소 PIV3의 음합(F) 및 헤마글루티닌-뉴라미니다제(HN) 당단백질 유전자가 인간 PIV3과 NH 유전자로 각각 치환되어 재조합 소 PIV3 백터를 구성함으로써 구성된다(Haller et al., 2000, J Virol 74:11626-11635). 이후 RSV F 유전자를 소-인간 PIV3 백터 골격내로 삽입하여, RSV F 단백질을 발현하는 키메릭 바이러스를 생성한다(Tang et al., 2003, J Virol 77:10819-10828). 키메릭 바이러스는 MEDI-534로 명명되었고, 이것은 동물 연구에서 생, 약독화된 2가 백신의 기능을 한다: RSV와 hPIV3의 챌린지에 대한 보호를 설명하기 위해, 햄스터와 인간이 아닌 영장류를 MEDI-554로 면역화시켰고, 동물은 RSV-증화 및 hPIV3 헤마글루티닌-억제 혈청 항체를 생산하였다(Tang et al., 2003, 상기; Tang et al., 2004, 상기).

<180> 또 다른 구체예에서, 증식되는 바이러스는 MEDI-559이다. MEDI-559는 rA2cp248/404/1030ΔSH으로 명명된, 생, 약독화된 RSV 백신으로, 온도 민감성이며, 점 돌연변이 및 SH 유전자의 유전자 결손을 포함한다. I상 임상시험에서 소아에게 투여한 때, 우수한 효과와 안전성이 밝혀졌고(Karron et al., JID vol 191 p. 1093(2005)), 이러한 환자에서의 면역 반응을 유도할 수 있었다.

<181> 다른 구체예에서, 증식되는 바이러스는 MEDI-560이다. MEDI-560은 생, 약독화된 HPIV3이다. cp45로 불리는 유도체는 현재 St. Louis University의 Dr. Robert Belshe에 의해 점진적인 차선의 온도에서 wt HPIV3의 계대접종 45 주기에 의해 생산되었다. 이 생물학적으로 유도된 백신 후보는 I상 및 II상 임상시험에서 성인, 혈청반응 양성 및 혈청 반응 음성의 어린이 및 어린 소아를 대상으로 평가되었고, 만족스럽게 약독화되었으며 면역원성을 나타냈다(Karron et al., Pediatr. Inf. Dis. J. 2003, 22:394-405). cp45의 상당한 점 돌연변이는 서열 분석을 통해 동정되었고, 개별적인 야생형 재조합 HPIV3 또는 다양한 조합에서 나타나 이와 관련된 표현형을 측정한다. 이것은 L 단백질의 세가지 주요 ts 및 점 돌연변이의 약독화 뿐만 아니라 C 및 F 단백질의 여러 비-ts 약독화된 점 돌연변이를 동정하였다. 이 바이러스는 현재 cDNA(rcpPIV3)로부터 회수되며, 이것은 허용가능한 기질을 이용하여 공지의 계대접종 히스토리로 바이러스를 제공한다.

<182> 특정 구체예에서, 본 발명의 방법을 이용하여 증식되는 바이러스는 외피 바이러스이다. 외피 바이러스는 파라믹소바이러스, 헤르페스바이러스, 토가바이러스, 램도바이러스, 코로나바이러스를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 다른 구체예에서, 증식되는 바이러스는 앵커리지 의존성 세포내 감염되고 복제되는 바이러스이다. 앵커리지-의존성 세포내 감염되고 복제되는 바이러스는 신드비스(Sindbis) 바이러스, 소수포형 구내염(Vesicular Stomatitis) 바이러스, 온코르나바이러스, 단순 포진(Herpes simplex) 바이러스, A 간염 바이러스, RSV 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 코로나 바이러스, FMDV 바이러스, 광견병 바이러스, 소아마비 바이러스, 및 레오바이러스를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

<183> 5.6 세포

<184> 특정 구체예에서, 바이러스는 포유동물 세포주에서 본 발명의 방법을 이용하여 증식된다. 특정 구체예에서, 바이러스는 앵커리지 의존성 세포내에서 본 발명의 방법을 이용하여 증식된다. 본 발명의 방법을 이용한 앵커리지 의존성 세포는 인간 지방 줄기 세포, 인간 근위세관 세포, 마우스 평활근 세포, 인간 내피 세포, 인간 신장 세포, 인간 대장 세포, 개 신장 세포, 햄스터 난소 세포, 사바나 원숭이 신장 세포, 래트 소장 세포, 인간 방광 세포, 및 인간 전립선 세포를 포함하나 이에 제한되지 않는, 앵커리지 의존성 타입 세포로부터 유래한 세포주일 수 있다.

<185> 특정 구체예에서, 바이러스는 MDBK 세포, MDCK 세포, 베로 세포, PK-15 세포, 및 BHK-21 세포를 포함하나 이에 제한되지 않는 신장 유래성 세포주에서 증식된다. 다른 구체예에서, 바이러스는 BHK-21 세포 또는 베로 세포에서 증식된다. 다른 구체예에서, 바이러스는 베로 세포에서 증식된다.

<186> 연속적인 아프리카 사바나 원숭이 신장 세포주로부터 기원하는, 베로 세포는 백신 생산을 위해 세포주로 가장 흔하게 사용되며, 종양형성 가능성이 없는 것으로 알려져 왔다(Vincent-Falquet et al., 1989, Dev Biol Stand 70:153-156). 인간 폴리오 백신과 래비스 백신은 최근 베로 세포내에서 상업적으로 제조되고(Montagnon, 1989, Dev Biol Stand 93:119-123), 이후 바이러스 백신 생산을 위한 베로 세포의 사용에 대하여 규제 위원회에서 특별한 가이드라인을 제공받았다(WHO, 1987a,b). 베로 세포는 일반적으로 앵커리지 의존성으로 간주되며, 이들은 세포 군집체로서 혼탁액에서도 자랄 수 있지만(Litwin 1992, Cytotechnology 10:169-1974), 정치 배양이나 마이크로담체에서 일반적으로 증식된다(Yokomizo et al., 2004, Biotechnol Bioeng 85:506-515; Wu et al., 2004, Vaccine 22:3858-3864; Berry et al., 1999, Biotechnol Bioeng 62:12-19). 베로 세포의 부착성 배양은 매우 특성화되어 있으며, 우수한 안정성이 보고되고 있다(Montagnon 및 Vincent-Falquet, 1998, Dev Biol Stand 93:119-123). 이전에, MEDI-534와 밀접하게 관련된 세가지 바이러스의 복제를 다른 허용된 포유동물 세포

주와 비교하였다(Haller et al., 2003, J Gen Virol 84:2153-2162). 모든 예시에서, 베로 세포는 가장 높은 바이러스 역가를 생성하였다. 이후 실험들은 MEDI-534 바이러스가 베로 세포내에서 10 이하의 일련의 계대접종에 대하여 안정하게 RSV F 유전자를 삽입물을 유지하고 있음을 보여준다(Tang et al., 2003, J Virol 77:10819-10828).

<187> 특정 구체예에서, 바이러스 증식을 위해 사용되는 세포는 동물이나 인간으로부터 유래한 성분의 첨가 없이 성장되고/되거나 유지될 수 있는 세포이다. 특정 구체예에서, 바이러스 증식을 위해 사용되는 세포는 실질적으로 무혈청 배지 또는 혈청이 없는 배지에서 성장되고/되거나 유지될 수 있는 세포이다.

<188> 특정 구체예에서, 본 발명의 방법을 사용하는 세포는 피브로넥틴(fibronectin)에 부착될 수 있다. 따라서 특정 특별 구체예에서, 세포는 피브로넥틴 기질에 부착되는 동안, 감염후 성장된다.

5.7 분석

5.7.1 바이러스 역가의 측정

<191> 바이러스 역가는 예를 들어, 50%에서의 조직 배양물 감염 용량(TCID₅₀) 분석에 한정되지 않는, 당해 분야에 잘 알려진 임의의 방법에 의해 측정될 수 있다. 분석은 바이러스의 효능/감염성을 측정하며, 베로 세포와 같이, 바이러스로 감염될 수 있는 세포를 사용한다. 특정 구체예에서, TCID₅₀ 분석은 하기와 같이 수행된다: 베로 세포는 96 웰 플레이트에서 바이러스를 함유하는 샘플의 첨가 2일전에 씨딩된다. 세포 플레이트 로트(lot) 번호는 기록되며, 세포 계대접종 수가 126 이상 및 148 이하인지를 입증하기 위한 도구로 사용될 수 있다. 플레이트는 100% 컨플루언트된다: 플레이트의 세포는 웰을 통과하여 부드럽고, 연속적인 단일층으로 분포된다. 세포 플레이트는 SkatronTM 세포 세척기로 세척한다. 세척된 플레이트는 33±1°C, 5±1% CO₂ 배양기로 옮겨지고, 최소 10분동안 배양된다. 바이러스 성장 배지는 바이러스 접종 이전에, 세포 플레이트의 각 웰내로 혼탁된다. 바이러스는 베로 세포 단일층을 함유하는 96-웰 플레이트 위로 연속적으로 희석되며, 이후 6일 동안 접종된 세포는 배양된다. 이후 플레이트를 세척하고, 파라포름알데히드로 고정되고, Numax[®](RSV-F 특이적 MAb)로 접종된다. 이것은 이후 TMB(3,3',5,5'-테트라멘틸벤지딘, Sigma)를 이용한 컬러 검출로 거위 항-인간 호스래디쉬 퍼옥시다아제 컨쥬제이트와 배양된다. 분광 광도계는 웰의 흡수도를 측정하기 위해 사용되며, 값은 음성 대조군의 컷오프 값과 비교된다. 이후 단위는 카이버 식(Karber equation)을 사용되어, log₁₀ TCID₅₀ 역가를 결정하게 된다. 동일한 실험으로부터 얻은 샘플은 같은 날에 시험되고, 4개의 복제물을 각각의 바이러스 샘플에 대해 사용하여, TCID₅₀ 분석에 대하여 본연의 분석간 및 분석내 산포도를 최소화한다.

<192> 세포 수율 및 세포 밀도는 예를 들어, 혈구계수기(hemacytometer) 또는 Cedex 세포 계수기 및 생존 능력 시험 시스템(Innovatis Inc., Malvern, PA)을 이용하는 것에 제한되지 않으나, 당해 분야에 잘 알려진 임의의 방법에 의해 측정될 수 있다. 일 구체예에서, 마이크로담체 배양물의 세포 밀도는 0.1M의 시트르산 용액중 0.1% 크리스탈 바이올렛에 의해 방출된 핵을 계수하여 결정될 수 있다(Hu 및 Wang, 1987, Biotechnol Bioeng 30:548-557).

5.8 키트

<194> 본 발명은 또한 본 발명의 분석 지침을 수행하기 위한 키트를 제공한다. 일 구체예에서, 본 발명의 키트는 무혈청 배지와 지질 농축액을 포함한다. 특정 구체예에서, 키트의 무혈청 배지는 OptiPROTM SFM 또는 VP-SFM 또는 SFM4MegaVirTM이며, 지질 농축액은 CDLC이다. 다른 구체예에서, 키트는 하나 이상의 용기내에 무혈청 배지, 지질 농축액 및 외피 바이러스로 감염될 수 있는 세포 바이알을 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 키트는 하나 이상의 베로 세포의 바이알을 함유한다. 다른 구체예에서, 키트는 무혈청 배지, 지질 농축액, 외피 바이러스로 감염될 수 있는 하나 이상의 세포 바이알 및 하나 이상의 외피 바이러스의 바이알을 포함한다. 특정 구체예에서, 키트는 하나 이상의 MEDI-534 또는 MEDI-559 바이알을 함유한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 키트는 본 발명의 방법을 수행하기 위한 메뉴얼을 포함한다. 특정 구체예에서, 메뉴얼은 하기와 같은 바이러스의 증식을 기술한다: 바이러스가 잘 자라는 것으로 알려진 세포를 최적 성장 조건, 예를 들어, 혈청 및 37°C에서 성장시키고; 세포를 CDLC가 풍부한 배지, 예를 들어, 혈청이 없는 배지 또는 무혈청 배지내 위치시키며, 세포를 바이러스로 감염시키고; 감염된 세포를 감염전 배양물보다 낮은 온도, 예를 들어, 33°C 또는 30°C에서 배양시킨다.

5.9 발명의 구체예

<196> 1. 하기를 포함하는, 베로 세포에서 바이러스를 증식하는 방법:

<197> a. 제1 온도의 생물반응기에서 베로 세포를 배양하는 단계로서, 화학적으로 정의된 지질 농축액(CDLC) 및 마이크로담체를 함유하는 세포 배양 배지에 베로 세포를 씨딩하는 단계를 포함하는 배양 단계;

<198> b. 약 0.001 내지 약 0.10의 감염 다중도 및 제2 온도에서 단계 (a)에서 배양된 베로 세포를 감염시키는 단계로서, 상기 제2 온도는 상기 제1 온도보다 낮은 감염 단계; 및

<199> c. 단계 (c)의 세포 배양물로부터 바이러스를 회수하는 단계로서, 상기 회수된 바이러스는 $7 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 이상의 바이러스 역가를 산출하는 것인 회수 단계.

<200> 2. 제1 구체예에 있어서, 상기 생물반응기는 일회용 생물반응기(SUB) 시스템인 것인 방법.

<201> 3. 제2 구체예에 있어서, SUB는 교반식 탱크 반응기 시스템인 것인 방법.

<202> 4. 제1 구체예에 있어서, 세포 배양물 배지는 무혈청 배지인 것인 방법.

<203> 5. 제1 구체예에 있어서, CDLC는 1 % v/v의 농도로 가해지는 것인 방법.

<204> 6. 제4 구체예에 있어서, 세포 배양 배지는 OptiPROTM SFM, VP-SFM, SFM4MegaVirTM, Ex-Cell VeroTM, 또는 WME로 구성된 군으로부터 선택되는 무혈청 배지인 것인 방법.

<205> 7. 제1 구체예에 있어서, 화학적으로 정의된 지질 농축액은 플루로닉 F-68, 에틸 알콜, 콜레스테롤, 트윈 80, DL-알파-토코페롤 아세테이트, 스테아르산, 미리스트산, 올레산, 리놀레산, 팔미트산, 팔미톨레산, 아라키돈산, 및 리놀렌산 중 하나 이상을 포함하는 것인 방법.

<206> 8. 제1 구체예에 있어서, 화학적으로 정의된 지질 농축액은 플루로닉 F-68, 에틸 알콜, 콜레스테롤, 트윈 80, DL-알파-토코페롤 아세테이트, 스테아르산, 미리스트산, 올레산, 리놀레산, 팔미트산, 팔미톨레산, 아라키돈산, 및 리놀렌산을 포함하는 것인 방법.

<207> 9. 제1 구체예에 있어서, 화학적으로 정의된 지질 농축액은 100,000 mg/L의 플루로닉 F-68, 100,00 mg/L의 에틸 알콜, 220 mg/L의 콜레스테롤, 2,200 mg/L의 트윈 80, 70 mg/L의 DL-알파-토코페롤 아세테이트, 10 mg/L의 스테아르산, 10 mg/L의 미리스트산, 10 mg/L의 올레산, 10 mg/L의 리놀레산, 10 mg/L의 팔미트산, 10 mg/L의 팔미톨레산, 2 mg/L의 아라키돈산, 및 10 mg/L의 리놀렌산을 포함하는 것인 방법.

<208> 10. 제1 구체예에 있어서, 단계 (a)는 약 50 내지 약 150 rpm의 교반 속도로 배양물의 교반을 이용하는 것인 방법.

<209> 11. 제10 구체예에 있어서, 상기 교반은 간헐적인 것인 방법.

<210> 12. 제11 구체예에 있어서, 단계 (a)의 상기 배양 조건은 약 35% 내지 약 100%의 용존산소(DO)량을 이용하는 것인 방법.

<211> 13. 제1 구체예에 있어서, 제1 온도는 약 36°C 내지 약 38°C인 것인 온도.

<212> 14. 제1 구체예에 있어서, 제2 온도는 약 30°C 내지 약 33°C인 것인 온도.

<213> 15. 제1 구체예에 있어서, 마이크로담체 농도는 약 1 내지 약 4 g/L인 것인 방법.

<214> 16. 제1 구체예에 있어서, 단계 (a)의 상기 세포 배양물은 약 6.6 내지 약 7.6의 pH인 것인 방법.

<215> 17. 제1 구체예에 있어서, 단계 (a) 이후 단계 (b) 이전에 세포 배양 배지의 약 50% 내지 약 90%가 교환되는 것인 방법.

<216> 18. 제16 구체예에 있어서, 세포 배양 배지는 동일한 조성을 갖는 세포 배양 배지로 교환되는 것인 방법.

<217> 19. 제16 구체예에 있어서, 세포 배양 배지는 상이한 조성을 갖는 세포 배양 배지로 교환되는 것인 방법.

<218> 20. 제1 구체예에 있어서, 감염 다중도는 약 0.01인 것인 방법.

<219> 21. 제1 구체예에 있어서, 베로 세포는 단계 (C)에서 2일 내지 12일동안 배양되는 것인 방법.

<220> 22. 제1 구체예에 있어서, 바이러스는 음성 가닥 RNA 바이러스인 것인 방법.

<221> 23. 제21 구체예에 있어서, 음성 가닥 RNA 바이러스는 비분절된 것인 방법.

<222> 24. 제22 구체예에 있어서, 바이러스는 파라믹소바이러스인 것인 방법.

<223> 25. 제23 구체예에 있어서, 파라믹소바이러스는 재조합 파라인플루엔자 바이러스, 재조합 호흡기 세포융합 바이러스 또는 재조합 메타뉴모 바이러스인 것인 방법.

<224> 26. 제24 구체예에 있어서, 파라인플루엔자 바이러스는 소 파라인플루엔자 바이러스인 것인 방법.

<225> 27. 제25 구체예에 있어서, 소 파라인플루엔자 바이러스는 하나 이상의 인간 파라인플루엔자 바이러스 뉴클레오티드 서열을 더 포함하는 것인 방법.

<226> 28. 제26 구체예에 있어서, 재조합 파라인플루엔자 바이러스는 호흡기 세포융합 바이러스 뉴클레오티드 서열을 더 포함하는 것인 방법.

<227> 29. 제1 구체예에 있어서, 상기 회수된 바이러스는 $8 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 이상의 바이러스 역가를 산출하는 것인 방법.

<228> 30. 제1 구체예에 있어서, 상기 회수된 바이러스는 $9 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 이상의 바이러스 역가를 산출하는 것인 방법.

<229> 31. 제1 구체예에 있어서, 상기 베로 세포는 약 0.5×10^5 내지 2×10^5 세포/ mL 의 밀도로 씨딩되는 것인 방법.

<230> 32. 제1 구체예에 있어서, 단계 (a)의 상기 베로 세포는 약 8×10^5 세포/ mL 이상의 세포 밀도로 배양되는 것인 방법.

<231> 33. 제1 구체예에 있어서, 단계 (a)의 상기 세포 배양물의 부피는 1.5 L 이상인 것인 방법.

<232> 34. 제2 구체예에 있어서, 단계 (a)의 상기 세포 배양물의 부피는 30L 이상인 것인 방법.

<233> 35. 실질적으로 무혈청 세포 배양 배지 중 바이러스를 포함하는 세포 배양물 상청액로서, 상기 상청액은 $7.0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 이상의 바이러스 역가를 산출하는 것인 베로 세포 배양물 상청액.

<234> 36. 제34 구체예에서, 상기 상청액은 약 0.5 내지 약 2.5 g/L의 글루코오스 농도를 포함하는 것인 상청액.

<235> 37. 제34 구체예에 있어서, 상기 상청액은 약 1.0 내지 약 2.0 g/L의 락테이트 농도를 포함하는 것인 상청액.

<236> 38. 제34 구체예에 있어서, 상기 상청액은 약 2.0 내지 약 4.0 g/L의 글루타민 농도를 포함하는 것인 상청액.

<237> 39. 제34 구체예에 있어서, 상기 상청액은 약 1.25 내지 약 2.5 mM의 암모늄 이온 농도를 포함하는 것인 상청액.

<238> 40. 제34 구체예에 있어서, 상기 상청액은 $8.0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 이상의 바이러스 역가를 산출하는 것인 상청액.

<239> 41. 제34 구체예에 있어서, 바이러스는 음성 가닥 RNA 바이러스인 것인 상청액.

<240> 42. 제40 구체예에 있어서, 음성 가닥 RNA 바이러스는 비분절된 것인 상청액.

<241> 43. 제41 구체예에 있어서, 바이러스는 파라믹소바이러스인 것인 상청액.

<242> 44. 제42 구체예에 있어서, 파라믹소바이러스는 재조합 파라인플루엔자 바이러스, 재조합 호흡기 세포융합 바이러스 또는 재조합 메타뉴모 바이러스인 것인 상청액.

<243> 45. 제43 구체예에 있어서, 파라인플루엔자 바이러스는 소 파라인플루엔자 바이러스인 것인 상청액.

<244> 46. 제44 구체예에 있어서, 소 파라인플루엔자 바이러스는 하나 이상의 인간 파라인플루엔자 바이러스 뉴클레오티드 서열을 더 포함하는 것인 상청액.

<245> 47. 제45 구체예에 있어서, 재조합 파라인플루엔자 바이러스는 호흡기 세포융합 바이러스 뉴클레오티드 서열을 더 포함하는 것인 상청액.

<246> 48. 제10 구체예에서, 단계 (a)에 트립신을 가하지 않는 것인 방법.

<247> 49. 제48 구체예에 있어서, 단계 (a)의 상기 배양물은 새로운 마이크로담체를 함유하는 신선한 배양물 배지로 1:1 또는 1:5로 분배하는 것인 방법.

<248> 50. 제49 구체예에 있어서, 상기 분배는 단계 (b) 이전의 배양 또는 감염전에 1회 이상 또는 2회 이상 수행되는 것인 방법.

<249> 51. 제1 구체예 또는 제50 구체예에 있어서, 상기 방법은 30L의 바이러스 채취 배치 당 2 백만 이상, 9 백만 이상, 천2백만 이상, 천2백만 이상의 백신용량을 생산하는 것인 방법.

실시예

<250> 6. 실시예

<251> 베로 세포(ATCC CCL-81, 계대접종 121) 바이알을 DMEM + 5% (v/v) FBS에 녹이고, 이후 동물 유래 성분이 없는 OptiPRO™ SFM내 혈청이 없는 성장에 직접 적용하기 전에, FBS가 보충된 배지에서 4회 계대접종하였다. 무혈청 베로 세포는 OptiPRO™ SFM내에서 10-15 계대접종한 이후에 저장된다. 본 실험에 사용된 베로 세포는 OptiPRO™ SFM 뱅크로부터 기원되는 것으로 제공되었다.

<252> 세포주 및 배양 유지

<253> 앵커리지 의존성 베로 세포는 일반적으로 대응 배양물의 부피(T-75 플라스크의 경우 35 mL, T-225 플라스크의 경우 100 mL, 및 850 cm² 롤러 베틀(RB)의 경우 350 mL)에 5×10^4 세포/mL로 씨딩되고, 씨딩후 일수(dps) 3-5일에 계대접종하였다. 4-5 dps에 계대접종된 배양물의 경우, 완전 배지 교체는 각각 배양 3 dps에 수행되었다. 2 차 배양을 위한 준비로서, 소비된 배지를 흡입하고, 세포는 DPBS로 2회 행구었다. 플라스크로부터 베로 세포를 탈착시키기 위해, 배양물을 37°C에서 트립신-EDTA 0.05% 용액(T-75 플라스크의 경우 3 mL, T-225 플라스크의 경우 6 mL, RB의 경우 10 mL)로 배양하고, 세포를 탈착한 후, 리마콩 트립신 억제제(Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ)을 가하여 트립신 활성을 퀸치한다. 모든 비감염된 베로 세포의 경우, T-플라스크 배양물을 37°C/5%CO₂/95%Rh 배양기에 유지하고, RB 배양물을 37°C 배양기내 0.3 rpm으로 조작된 롤러 베틀 기기에 놓았다.

<254> 실험을 개시하기 전에, 일회 이상의 계대접종에 대한 각각의 실험에서 시험하기 위한 배지에 세포를 미리 적용시키고, 세포 계대접종 횟수가 165를 초과할때, 배양물을 폐기한다. 글루타민이 없는 배양 배지를 매 사용이전, 4mM L-글루타민으로 항상 보충하였다. 세포 배양 시약과 공급은 GIBCO/Invitrogen(Carlsbad, CA)로부터 제공받았으며, 조직 배양 제품은 다른 특별한 지시가 없는 한, Corning(Corning, NY)사로부터 구입하였다.

<255> 바이러스 구조체 및 씨드 저장액 준비

<256> MEDI-534 바이러스의 구조는 이전에 상세히 개시되었다(Tang et al., 2003). 모든 실험에서 감염을 위해 사용되는 바이러스 씨드를 준비하기 위해, 플라스미드 회수(plasmid rescue)에 의해 얻어진 MEDI-534(Tang et al., 2003, supra)를 0.001의 감염 다중도로 OptiPRO™ SFM에서 3일동안 성장한 베로 세포의 T-225 플라스크 배양물에 가하였다. 4 dpi에서 배양 배지를 수집하고, 다양한 복합 1mL 세포동결 용기(Cryovial)내로 나누기 전에, 10% (v/v)의 수크로오스 포스페이트로 안정화하였다. 바이러스 씨드 저장액을 -80°C에서 저장하고, 사용직전에 녹였다.

<257> T-플라스크 실험

<258> (다른 특별한 지시가 없는 한) 35 mL OptiPRO™ SFM내 1.75×10^6 베로 세포로 T-75 플라스크를 씨딩하고, 37°C /5%CO₂/95%Rh 배양기에서 유지하였다. 감염시, 소비된 배지를 각 플라스크에서부터 제거하고, 세포를 2×10 mL DPBS로 행구었다. 각 배지 조건의 한 플라스크를 트립신으로 처리하고, 세포를 계수하였다. 배양물을 감염시키기 위해, (다른 지시가 없는 한) 적절한 MOI의 MEDI-534를 함유하는 DMEM를 남은 플라스크에 가하였다. 감염후, T-플라스크를 5% CO₂ 오버레이로 습식 배양기에서 유지하였다.

<259> 롤러 베틀 실험

<260> 각각의 850cm² 롤러 베틀(RB)를 선택 성장 배지내에서 1.5×10^7 베로 세포로 씨딩하고, 0.3 rpm의 일정한 회전과 37°C로 유지한다. 모든 경우, 기저 성장 배지는 OptiPRO™ SFM 또는 바이러스 생산 무혈청 배지(VP-SFM)이며, 또한 GIBCO/Invitrogen(Carlsbad, CA)사의 ADCF SFM가 상업적으로 입수가능하다. 일부 예에

서, 기저 성장 배지는 JRH Biosciences, Inc.(Lenexa, KS)사의 태아 소 혈청(FBS) 또는 GIBCO/Invitrogen사로 부터 구입한 화학적으로 정의된 지질 농축액(CDLC)으로 보충된다. OptiPROTM + 0.5% FBS 및 VP-SFM + 1% CDLC내 성장 곡선을 만들기 위해, 각 배지의 RB 배양물을 2개씩 준비하여 트립신 처리하고 매일 카운트하였다. 바이러스 생산 프로파일을 만들기 위해, 소비된 배지를 각각의 RB로부터 제거하고, 감염직전(3 dps)에 300 mL DPBS로 행구었다. 각 배지 조건의 하나 이상의 플라스크를 트립신 처리하고, 세포를 카운트하여, 플라스크 당 세포 수율을 측정하고, MOI 0.001의 감염을 위해 가해지는 바이러스의 적절량을 산출하였다. 이와 다른 지시가 없는 한, MEDI-534를 함유하는 500 mL의 Williams' 배지 E(WME)-화학적으로 정의된 ADCF 기저 배지를 감염시에, 남은 플라스크 각각에 가하였다. 감염후, 모든 RB를 33°C에서 0.3 rpm의 일정한 회전으로 배양하였다.

<261> 스피너 플라스크 실험

성장 배지는 0.5% (v/v) FBS가 보충된 OptiPROTM 또는 1% (v/v) CDLC가 보충된 VP-SFM이다. CytodexTM 1 마이크로담체는 제조사의 권고사항(Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden)에 따라 재수화되고 살균된다. 이후 마이크로담체 비드는 사용이전에 적당한 성장 배지로 한번 행구웠다. 씨딩전 2시간, 각각의 250 mL 유리 스피너 플라스크(Bellco Biotechnology, Inc., Vineland, NJ)를 2 g/L CytodexTM 1를 함유하는 선택 성장 배지 200mL로 충전하고, 60 rpm 교반과 함께 37°C/5%CO₂/95%Rh에서 배양하였다. 스피너 플라스크를 접종하기 위해, 용기 당 2 x 10⁷ 배로 세포를 가하였다. 모든 배양물을 60 rpm으로 유지되는 교반과 함께 37°C/5%CO₂/95%Rh에서 감염전 배양하였다. 성장 곡선을 만들기 위해, 잘 혼합된 샘플을 핵 카운팅을 위해 매일 스피너 플라스크로부터 얻었다. 감염 이전에, 샘플을 각각의 스피너 플라스크로부터 회수하여 핵의 수를 측정하고, MOI 0.001로 감염하기 위한 바이러스 양을 산출하였다. 감염을 위한 준비로, 모든 스피너 플라스크에 대한 교반을 중지하였다. 마이크로담체 비드가 가라앉은 후, 소비된 배지의 90%가 MOI 0.001의 WME를 함유하는 MEDI-534로 치환되었다. 감염후, 배양물은 60 rpm의 일정 교반과 함께 33°C/5%CO₂/95%Rh에서 배양되었다.

<263> MEDI-534을 위한 생물반응기 실험

생물반응기 실험은 50%의 공기 포화도로 유지되는 용존산소(DO)를 수반하는 3L 교반식 탱크 생물 반응기 (Applikon, Foster city, CA)에서 수행되었다. 각각의 생물반응기는 ADI 1030 Bio 조절기(Applikon)와 ADI 1035 Bio 콘솔(Applikon)이 설치되어 있었다. CytodexTM 1 마이크로담체는 다음의 제조사 지시서에 따라 사용을 위해 준비되었다. 씨딩 3시간 전, 3개의 생물반응기를 각각 1% (v/v) CDLC와 2 g/L CytodexTM 1가 보충된 2L VP-SFM로 충전하였다. 생물반응기 내용물을 가열 블랭킷으로 37°C로 가온하고, 단일 마린 임펠러로 60 rpm으로 교반하였다. 3개의 생물반응기의 pH 설정값은 각각 7.0, 7.2 및 7.4 이다. 배양 pH는 유입가스의 CO₂ 퍼센트가 0%로 감소된 이후에는, 1N NaOH 용액의 첨가와 유입가스의 CO₂ 퍼센트에 의해 지정된 수준으로 조절되었다. 실험에 사용된 모든 세포가 동일한 계대접종을 갖도록 하기 위해, 각 실험의 모든 생물반응기는 다양한 RB로부터 얻어진 세포로 접종되었다. 성장 곡선을 만들기 위해, 생물반응기 내용물을 매일 핵(nuclei) 카운팅하였다. 감염 준비를 위해, 생물반응기의 교반을 중지하였다. 마이크로담체 비드가 가라앉은 후에, 소비된 배지의 90%를 MOI 0.001의 MEDI-534를 함유하는 WME로 대체하였다. 감염후, pH와 DO 설정값을 바꾸지 않았으나, 온도 설정값을 33°C로 낮추고, 교반을 100 rpm으로 증가시켰다.

<265> 바이러스 정량을 위한 감염된 샘플의 수집

감염된 T-플라스크와 RB 배양물에서 배지를 샘플링한 후에, 10% (v/v) 수크로오스 포스페이트를 가하여, 바이러스 샘플을 안정화하였다. 감염된 스피너 플라스크와 생물반응기로부터 샘플링한 후에, 샘플중의 마이크로담체 비드가 가라앉도록 하고, 수집된 배양물 상청액을 10% (v/v) 수크로오스 포스페이트로 안정화하였다. 수크로오스 포스페이트로 안정화된 모든 바이러스 샘플을 분석시까지 -80°C에 즉시 저장하였다.

<267> 분석 방법

T-플라스크와 RB의 세포를 혈구계산기 또는 Cedex 세포 계수기를 이용하여 산출하고, 생존가능성 시험 시스템 (Innovatis Inc., Malvern, PA)을 제조사의 지시에 따라 작동하였다. 마이크로담체 배양물의 세포 밀도는 0.1M 시트르산 용액 중 0.1% 크리스탈 바이올렛에 의해 방출된 핵을 세어 측정하였다(Hu 및 Wang, 1987, Biotechnol Bioeng 30:548-557). 감염성 바이러스 역가를 조직내의 50% 조직 배양물 감염 용량(TCID₅₀) 분석으로 측정하고,

결과는 \log_{10} TCID₅₀/mL로 정량화하였다. TCID₅₀ 분석에 대하여 분석간 및 분석내의 고유 가변성을 최소화하기 위해, 동일한 실험에서 얻은 샘플을 가능한 한 같은 날에 시험하고, 각각의 바이러스 샘플에 대하여 4개의 복제물을 사용하였다.

<269> 6.1 상이한 감염 다중도에서의 바이러스 생산 프로파일

<270> 소규모 T-75 플라스크 실험을 수행하여, MEDI-534 생산에 대한 결정적인 공정 파라미터와 배양물 조건을 동정하고 최적화하였다. MEDI-534 생산에 대한 감염 다중도(MOI)의 효과를 실험하였다(도 1). 세가지 MOI(0.1, 0.01 및 0.001)는 유사한 피크 바이러스 역가($6 \log_{10}$ TCID₅₀/mL)를 생성하는 것을 보여주는 반면, 두개의 최저 MOI(0.0001 및 0.00001)은 $1 \log_{10}$ TCID₅₀/mL 이상 보다 낮은 최대 바이러스 역가를 산출하였다. 따라서, 바이러스 씨드 저장액을 보존하면서, 바이러스 수율을 최대화하기 위해서, 0.01 내지 0.001 범위의 MOI를 이후 실험의 감염에 사용하였다.

<271> 6.2 감염성 바이러스 역가에 대한 감염 시간 및 감염후 온도의 효과

<272> MEDI-534 생산에 대한 감염 시간과 감염후 배양온도의 조합 효과를 확인하기 위해 T-플라스크 실험을 실시하였다(도 2a 및 2b). 3 dps와 비교하여, 씨딩후(dps) 5일째 배양물을 감염시킴으로써, 감염된 베로 세포의 수가 0.6×10^7 세포/플라스크에서 1.7×10^7 세포/플라스크로 증가하였다. 3 dps에서 감염된 배양물에서 얻은 피크 바이러스 역가(도 2a)는 5 dps에서 감염된 배양물에서 측정된 것(도 2b)보다 약간 높았다. 따라서, 감염된 베로 세포의 수 증가는 MEDI-534 생산을 증가시키지 않는다. 그러나, 감염후 낮은 배양온도로의 이동(37°C에서 33°C)은 $1 \log_{10}$ TCID₅₀/mL 이상으로 피크 바이러스 역가로 현저하게 상승시켰다. 다음 연구들은 29°C, 31°C 및 35°C의 감염후 배양 온도가 동일한 경향을 갖으나, 33°C의 감염후 온도보다 다소 낮은 MEDI-534 역가를 산출함을 보여주고 있다. 따라서, 이후의 모든 실험에서는 33°C의 감염후 배양 온도를 사용하였다.

<273> 낮은 배양 온도에서 관찰되는 바이러스 역가의 증가는 MEDI-534가 저온에 적응성을 갖지 않았기 때문에, 예측되지 않았다(Tang et al., 2003, J Virol 77:10819-10828). 이 온도 민감성에 대한 특이적 원인은 밝혀지지 않았지만, 바이러스성 중합 효소의 아미노산 변화는 온도 민감성 표현형을 나타내는 PIV3 바이러스를 생산하였다(Feller et al., 2000, Virology 275:190-201; Skiadopoulos et al., 1999, J Virol 73:1374-1381).

<274> 6.3 바이러스 생산에 대한 감염전 배양 배지의 효과

<275> T-플라스크 실험으로 바이러스 생산에 대한 감염전 배양 배지의 효과를 측정하였다(표 I). 감염전 성장 배지를 개선하기 위해, 씨딩할 때 베로 배양물을 FBS로 보충하였다. OptiPROTM SFM에 FBS를 첨가하면 3 dps에서 측정된 세포 수율을 거의 2배로 해주며, 5배 이상으로 최대 바이러스 역가로 증가시킨다. 0.5%, 2% 및 5% 수준의 FBS 보충은 유사한 세포 수율($(1.0-1.1) \times 10^7$ 세포/플라스크) 및 바이러스 역가($(7.6-7.8) \log_{10}$ TCID₅₀/mL)를 생산하고, 이는 FBS 농도의 증가가 추가적인 세포 성장이나 바이러스 생산을 향상시키지는 않을 것임을 제안한다. 레트로바이러스 패키징 세포주에서 수행되는 유사한 실험에서, Lee와 동료 연구자들은 혈청 첨가에 따라 레트로바이러스 백터의 역가는 2배가 되지만, 바이러스 생산은 시험된 혈청 보충 범위(1% 내지 20%)에서 용량 비의존적임을 발견하였다(Lee et al., 1996, Appl Microbiol Biotechnol 45:477-48).

표 1

감염전 FBS로 적정된 배양물에서의 세포 수율과 MEDI-534 생산의 비교

감염전 배양 배지	감염시 세포 수율 (세포/플라스크)	최대 바이러스 역가 (\log_{10} TCID ₅₀ /mL)
DMEM + 5% FBS	1.1×10^7	7.8 ± 0.2
OptiPRO TM + 2% FBS	1.0×10^7	7.6 ± 0.2
OptiPRO TM + 0.5% FBS	1.1×10^7	7.7 ± 0.2
OptiPRO TM SFM	0.6×10^7	$6.9 \pm 0.$

<276> 6.4 FBS 감염전 배지와 보충제로 적정된 룰러 버틀 배양물의 바이러스 생산 프로파일

<278> 세포 수율과 MEDI-534 생산은 씨딩시 0.5% 및 2% FBS가 보충된 RB 배양물에서 측정하여, T-플라스크의 FBS 적정 실험의 법용성 및 재생산성을 결정한다(도 3). 배양물을 1.5×10^7 세포/RB로 접종했음에도 불구하고, OptiPROTM SFM 배양물의 세포 수율은 3 dps에서 단지 1.9×10^7 세포/RB 였다. 이와 반대로, OptiPROTM SFM의 1.75×10^6 세포/플라스크로 씨딩한 베로 세포의 T-플라스크 배양물은 배양 3일 후 세포 수가 3배가 되었다(표 I). 이 결과는 정적 배양물에서 OptiPROTM SFM가 세포 성장에 바람직함을 입증하는 것임을 보여준다. OptiPROTM SFM가 0.5% (v/v) 및 2% (v/v) FBS로 보충될 때, RB 배양물의 세포 성장은 T 플라스크(표 I)과 RB 배양물(도 3의 도 범례) 모두에서 3일 후 약 6배로 증가한 T-플라스크 배양물의 세포수 관찰과 일치하였다. 3 dps에서, OptiPROTM ± 0.5% (v/v) FBS 및 OptiPROTM ± 2% (v/v) FBS 배양물은 각각 9.3×10^7 세포/RB 및 10.4×10^7 세포/RB의 유사한 세포 수율을 얻었다. T 플라스크 결과(표 I)에 따라, FBS가 보충된 RB 배양물은 OptiPROTM SFM 배양물보다 상당히 높은 바이러스 역가를 산출하였다. FBS로 보충된 면역전 성장 배지(OptiPROTM SFM)에서 획득된 성공은 세포 성장 및 바이러스 생산에서의 배양 배지에 의한 효과를 예시한다.

6.5 화학적으로 정의된 지질 농축액이 보충된 감염전 배지에서의 세포 수율 및 바이러스 생산

<280> FBS에 대한 무혈청 대체물로서 화학적으로 정의된 지질 농축액(CDLC)을 평가하였다. 추가적으로, 이 실험은 OptiPROTM SFM과 VP-SFM, 또한 동일한 제조사(GIBCO/Invitrogen)에 의해 개발된 동물 유래 성분이 없는(ADCF) SFM를 비교하여, 베로 성장 및 백신 생산을 확인하였다. 5개의 다른 감염전 배지에서 RB를 두개씩 준비하여, 3 dps에서 다음의 세포 수율(도 4a) 및 피크 바이러스 역가(도 4b)를 얻었다. 데이터를 표 II의 평균±표준 편차로 나타낸다.

<281> 3 dps에서, 세포 밀도는 OptiPROTM SFM 및 VP-SFM 조건 모두에서 1.5×10^7 세포/RB의 씨딩 밀도를 조금 넘게 증가하였다(도 4a). 이와 반대로, 지질 또는 혈청이 보충된 배양물의 세포 수는 3일 후, 수배 증가하였다(도 4a). OptiPROTM + 0.5% (v/v) FBS 배양물에서의 우수한 세포 성장에도 불구하고, 바이러스 역가는 VP-SFM + 1% (v/v) CDLC 배양물에서 상당히 높았다. 세포 성장과 바이러스 생산의 CDLC-관련 부스트(boost)는 OptiPROTM SFM 배양물 보다 VP-SFM 배양물에서 더욱 두드러졌다. 다른 것들보다 일 SFM에서 CDLC 첨가의 더욱 두드러진 효과는 두 SFM의 지질 조성의 차이에 기인한 것으로 보이나, 이 가설은 OptiPROTM SFM 및 VP-SFM의 조성물이 제조사(GIBCO/Invitrogen)에 소유이기 때문에 입증할 수 없었다. 이것은 베로 배양에서 세포 성장과 바이러스 생산을 증가시키기 위한, 지질 보충제의 성공적인 사용을 처음 기술한 것이다.

<282> OptiPROTM SFM은 베로 세포 성장과 MEDI-534 생산을 지지하는데 식별가능한 로트 대 로트의 가변성을 나타내는 화학적으로 정의되지 않은 SFM이다. 제1 및 제2 RB 실험은 다른 로트의 OptiPROTM SFM을 사용했기 때문에, 제2 RB 실험(7.3 ± 0.2 log₁₀ TCID₅₀/mL) 대 제1 실험(도 3; (6.8 ± 0.2) log₁₀ TCID₅₀/mL)에서 OptiPROTM SFM으로 얻어진 높은 피크 바이러스 역가는 OptiPROTM SFM에서의 로트 대 로트 가변성, TCID₅₀ 분석내 가변성 또는 둘 다에 기인한다.

표 II

5개의 다른 감염전 배지에서의 세포 수율 및 MEDI-534 생산 비교

감염전 배양 배지	감염시 세포 수율 (세포/RB)	최대 바이러스 역가 (\log_{10} TCID ₅₀ /mL)
OptiPRO TM SFM	(2.2 ± 0.1) × 10 ⁷	7.3 ± 0.2
OptiPRO TM SFM + 1% (v/v) CDLC	(4.7 ± 0.5) × 10 ⁷	7.4 ± 0.2
OptiPRO TM SFM + 0.5% (v/v) FBS	(7.6 ± 1.0) × 10 ⁷	7.7 ± 0.2
VP-SFM	(1.2 ± 0.4) × 10 ⁷	6.9 ± 0.2
VP-SFM + 1% (v/v) CDLC	(6.0 ± 0.1) × 10 ⁷	7.9 ± 0.2

<283>

<284> 6.6 화학적으로 정의된 지질 농축액이 보충된 감염전 배지를 이용한 룰러 벼틀에서의 세포 성장 및 바이러스 생산

<285> 두 감염전 성장 배지(OptiPROTM ± 0.5% (v/v) FBS 및 VP-SFM ± 1% (v/v) CDLC)내의 세포 성장(도 5a) 및 바이러스 생산(도 5b)의 동역학을 측정하였다. FBS가 보충된 배양물은 무혈청 배양물보다 대략 30% 많은 세포를 산출하나, 피크 바이러스 역가는 비슷하다($8.1 \log_{10}$ TCID₅₀/mL). MEDI-534 생산의 동역학은 면역전 배지에 의해 분명한 영향을 받는다; 최대 바이러스 역가는 OptiPROTM ± 0.5% (v/v) FBS 및 VP-SFM 1% (v/v) CDLC 배양물의 경우, 각각, 4 dpi 및 5 dpi에서 검출되었다(도 5b).

<286> 6.7 화학적으로 정의된 지질 농축액이 보충된 감염전 배지로 적정된 룰러 벼틀 배양물에서의 세포 성장 및 바이러스 생산

<287> VP-SFM내 0.5% (v/v), 1% (v/v) 및 2% (v/v)의 CDLC로 적정된 배로 배양물은 유사한 세포 수율(도 6a) 및 MEDI-534 생산(도 6b)을 보여준다. 모든 추가 실험은 면역전 무혈청 배로 성장 배지로서, VP-SFM + 1% (v/v) CDLC를 사용하였다.

<288> 6.8 화학적으로 정의된 지질 농축액이 보충된 감염후 배지에서의 MEDI-534 생산

<289> 공지된 조성(Williams 및 Gunn, 1974)을 갖는 화학적으로 정의된 ADCF SFM, Williams' 배지 E (WME)를 면역후 SFM으로서, VP-SFM 또는 VP-SFM + 1% (v/v) CDLC로 대체하는 것의 적합성을 조사하였다(도 7). WME가 감염되지 않은 배양물에서 배로 성장을 입증하지는 못했지만, 감염후 배지로서 우수한 기능을 보여준다. VP-SFM + 1% (v/v) CDLC, VP-SFM 및 WME에서 측정한 최대 바이러스 역가(평균±표준 편차)는 각각 (7.5 ± 0.2) \log_{10} TCID₅₀/mL, (7.6 ± 0.1) \log_{10} TCID₅₀/mL 및 (8.1 ± 0.2) \log_{10} TCID₅₀/mL에 대응된다. 생산 공정에서 동물 유래 성분의 사용을 최소화하고, 정제 공정에서 잠재적인 복잡성을 최소화하기 위해, 혈청이 보충된 배지는 시험하지 않았다. 결과적으로, 이후의 MEDI-534로의 감염은 바이러스 생산 배지로서 배타적으로 WME를 사용하였다.

<290> 6.9 화학적으로 정의된 지질 농축액이 보충된 감염전 배지를 이용한 마이크로담체 배양물내 세포 성장 및 바이러스 생산

<291> 스피너 플라스크 실험에서는 혈청이 보충된 배지(OptiPROTM + 0.5% (v/v) FBS) 및 무혈청(VP-SFM + 1% (v/v) CDLC) 배지의 활성을 비교하여, 마이크로담체내 배로 세포 성장(도 8a) 및 MEDI-534 감염(도 8b)을 입증하였다. 양 배지에서 배양된 배로 세포는 CytodexTM 1 및 CytodexTM 3 상에서 성장된다. RB 관찰(도 5a)과 일치하게, OptiPROTM + 0.5% (v/v) FBS 배양물은 VP-SFM + 1% (v/v) CDLC 배양물보다 빠르게 성장하였다. 면역전 배지 모두 (4 dpi에서) 동시에 $8.1 \log_{10}$ TCID₅₀/mL의 동일한 피크 바이러스 역가를 산출하였다. 그러나, 감염성 바이러스 역가는 4dpi부터 7 dpi사이에 혈청 보충된 배양물 한쌍에서 평균 $2.6 \log_{10}$ TCID₅₀/mL로 저하된 반면, 바이러스 역가는 2 무혈청 배양물에서 동일한 시간 동안에 걸쳐 단지 평균 0.4 \log_{10} TCID₅₀/mL만이 감소되었다. RB내

OptiPROTM + 0.5% (v/v) 배양물은 감염성 바이러스 역가에서 이러한 실질적인 손실을 보이지 않았으며(도 4b 및 5b), 스피너 플라스크 배양물내 이 현상에 대한 기저 메카니즘은 알려지지 않았다. 이 실험의 결과에 기초하여, 모든 이후 마이크로담체 실험은 베로 세포를 위한 면역전 성장 배지로서 VP-SFM + 1% (v/v) CDLC를 사용하였다.

<292> 6.10 마이크로담체 배양물내의 MEDI-534 역가에 대한 감염 시간의 영향

<293> MEDI-534 역가에 대한 감염 시간의 영향은 마이크로담체 배양시 고려해야 한다. 3 dps와 5dps에서 감염된 배양물과 유사한 바이러스 역가의 T-플라스크 관찰(표 I)에 따르면, 4, 5 및 6 dps에서 감염된 두 스피너 배양물은 거의 동등한 피크 MEDI-534 역가를 산출하였다(표 II). 이 "세포 밀도 효과"는 배치 배양으로 아데노 바이러스를 생산하는 경우에도 관찰되었다. 특정 바이러스 생산성은 감염시 세포 밀도의 증가에 따라 감소되었다 (Background of the Invention, Henry et al., 2004, Biotechnol Bioeng 86:765-774, Nadeau 및 Kamen, 2003, Biotechnol Adv 20:475-489). 배양 시간을 줄이기 위해, 마이크로담체 배양물을 다음 실험에서는 4 dps에서 감염시켰다.

<294> 생물반응기의 규모를 증대시키기 위한 준비로서, 씨딩 밀도, 무혈청 성장 배지, 교반 속도, 마이크로담체 유형 및 비드 농도를 포함하는 마이크로담체 공정 파라미터를 최적화하기 위한 이후 시도는 현 공정 조건(60 rpm 교반으로, 2 g/L CytodexTM 1를 함유하는 VP-SFM + 1% CDLC의 1 x 105 세포/mL 접종)이 최상의 결과를 야기함을 보여주었다.

표 III

씨딩후 상이한 시점에서 감염된 마이크로담체 배양물에서의 바이러스 생산

감염 시간	감염시 세포 밀도 ($\text{백} / \text{mL}$)	최대 바이러스 역가 ($\log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$)
4 dps	$(5.1 \pm 0.6) \times 10^5$	8.2 ± 0.2
5 dps	$(7.4 \pm 1.4) \times 10^5$	8.1 ± 0.2
6 dps	$(9.6 \pm 2.5) \times 10^5$	8.1 ± 0.3

<295>

<296> 6.11 상이한 pH로 조절된 생물반응기내 감염전 베로 세포 성장 및 바이러스 생산의 비교

<297> 생물반응기 실험을 하여 배양물 pH에 대한 무혈청 MEDI-534 생산 공정의 범용성을 측정하고 세포 성장과 바이러스 생산의 의존성을 산출하였다. 세개의 동등한 생물반응기 배양물을 각각 7.0, 7.2 및 7.4의 pH 설정값으로 유지하였다. 생물반응기 배양물의 면역전 세포 성장(도 9a) 및 바이러스 생산 프로파일(도 9b)은 VP-SFM±1% CDLC 스피너 플라스크 배양물(도 8)에서 관찰한 것과 유사하였다. 이 생물반응기 실험의 반복으로 $8 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 의 최대 바이러스 역가의 동일한 경향성을 얻었다. 이 결과는 마이크로담체 공정이 생물반응기내 규모가 커질수 있음을 나타내며, 세포 성장과 바이러스 생산이 pH 7.0-7.4 범위내에서는 상대적으로 pH 비의존적임을 보여준다. T-플라스크, RB 및 스피너 플라스크 배양물의 pH는 일반적으로 상당히 다양하며, 일부 예에서는 pH는 해로운 효과의 관찰 없이 배양 과정 전반에 걸쳐 7.6에서 6.8로 감소된다.

<298> 6.12 생물반응기내 RSV 공정 생산의 향상

<299> 생물반응기 공정내 RSV 백신의 생산성을 향상하기 위해, 더 바람직한 베로 세포 성장을 위해 Applikon 3L 생물반응기를 이용하여 실험하였다. 바이러스를 생산하는 세포가 더 많이 존재함에 따라, 높은 세포 밀도는 더 높은 바이러스 역가를 유도할 것 같다. 이전의 공정(단락[00167] 참조)에서, 2 g/L의 마이크로담체 CytodexTM 1 및 60 rpm 교반 속도가 사용되었다. 베로 세포 성장 및 RSV 백신 생산에 대하여 빠른 교반 속도와 높은 CytodexTM 1 밀도를 시험하였다.

<300> 베로 세포 성장에 대한 교반 속도의 영향을 평가하기 위해, 4개의 3L 생물반응기를 베로 성장 배지(VP-SFM, 4 mM L-GIn, 및 1% CDLC)내 1.5L 배양물 부피의 2e5 세포/mL의 베로 세포로 접종하였다. 생물반응기 배양을 위한 다음의 파라미터, 50% 공기 포화도의 용존산소(DO), pH 7.1 및 37°C의 온도가 사용되었다. 생물반응기 중 2개의 교반 속도는 65 rpm으로 설정되었고, 다른 두개는 125 rpm으로 설정되었다. 세포 성장은 각각의 생물반응기로부터 매일 샘플을 채취하여 모니터링하고, 크리스탈 블루 염색법을 이용하여 핵의 수를 세었다. 데이터는 도 10에 나타냈다. 배양물 오염 문제 때문에, 65rpm의 두 생물반응기 배양물 중 하나를 버렸다. 고속 교반 속도는 125 rpm이며, 저속 교반 속도는 65 rpm이다. 도 10의 보이는 바와 같이, 125 rpm의 교반 속도는 세포 성장을 향상시

키고, 더 높은 밀도로 세포를 성장시켰다.

<301> 마이크로담체 밀도의 증가는 배로 세포 성장의 개선이 얻어질 수 있는지 보기 위해 시험하였다. 다시, 4개의 생물반응기 배양물을 상기 기술한 바와 같이, 성장 배지에서 2e5 세포/mL 배로 세포로 접종하였다. DO는 50% 공기 포화도이며, pH는 7.1로 설정되었으며, 온도는 37°C였다. 125 rpm의 교반 속도가 사용되었다. 2개의 생물반응기는 2 g/L의 Cytodex™ 1을 함유하고, 다른 2개의 생물반응기는 4 g/L의 Cytodex™ 1을 함유하였다. 세포 성장은 각각의 생물반응기로부터 매일 샘플을 채취하여 모니터링하고, 배양물 샘플의 핵 수를 세었다. 세포 성장 데이터를 도 11에 나타냈다. 4 g/L의 Cytodex™ 1의 배양물은 2 g/L의 Cytodex™ 1의 배양물보다 높은 세포 밀도를 갖는다. 2 g/L의 Cytodex™ 1의 한 생물반응기 배양물은 설비 실패로 인해 소실되었다.

<302> 마이크로담체 밀도의 증가가 높은 바이러스 역가를 유도할 수 있는지를 평가하기 위해, 20mL의 배양물을 3일째 각각의 생물반응기로부터 제거하고, 125mL 진탕 플라스크로 옮겼다. 배로 성장 배지를 감염후 배지(SFM4MegaVir 및 4 mM L-GIn)로 대체하였다. 이후 세포를 0.01의 MOI에서 RSV dM2-2 바이러스로 감염시키고, 100rpm으로 교반하면서 33°C 및 5% CO₂의 진탕 배양기에서 배양하였다. 바이러스 생산은 4, 5, 6 및 7일째 각각의 플라스크로부터 샘플을 채취하여 모니터링하였다. 바이러스 역가는 TCID₅₀ 분석에 의해 측정하였다. 도 12에서 보이는 바와 같이, 4 g/L의 Cytodex™ 1의 배양물은 2 g/L의 마이크로담체 비드의 배양물보다 높은 바이러스 역가를 생산하였다. 4 g/L 배양물의 데이터는 두 배양물의 평균이다.

<303> 두 생물반응기 배양물을 상기 기술한 무혈청 성장 배지내 2e5 세포/mL의 배로 세포로 접종하고, 3일동안 4 g/L의 Cytodex™ 1, 125 rpm 교반 속도, 50%의 DO, pH 7.1 및 37°C의 상기 실험과 동일한 최적 조건하에서 배양하였다. 세포 성장은 각각의 생물반응기로부터 매일 샘플을 채취하여 모니터링하고, 배양물 샘플에서 핵의 수를 세었다. 데이터를 도 13에 나타냈다.

<304> 배양 3일째, 교반을 중지하고, 생물반응기의 바닥에 마이크로담체 비드를 가라앉힌다. 이후 마이크로담체상에 세포를 남겨두면서 소비된 성장 배지를 생물반응기에서 제거하고, 동일한 부피의 신선한 감염후 배지(SFM4MegaVir™ + 4 mM L-GIn)로 대체하였다. 125 rpm으로 다시 교반하였다. 배양물의 온도를 30°C로 낮추고, pH를 7.0으로 설정하였다. 이후 세포를 MOI 0.01의 MEDI-559로 감염하고, 10일동안 30°C로 계속 배양하였다. 샘플을 7일부터 10일까지 매일 배양물로부터 채취하였다. 바이러스 역가는 TCID₅₀ 분석으로 측정하였다. 도 14에서 보여지는 바와 같이, 생물반응기 배양물의 피크 생산성은 8 logs/mL(log₁₀ TCID₅₀)에 도달하였다.

6.13 생물반응기내의 PIV 공정 생산의 개선

세포주 및 배양 유지

<305> 배로 세포주(ATCC CCL-81)는 무혈청 성장 조건에 적응시켜, 저장되어 있다. 워킹 세포 뱅크(WCB 29Apr03 PN532AC (SF) 03BA01 PJS)에서 얻은 세포를 모든 실험에 사용하였다.

<306> 앵커리지 의존성 배로 세포를 T-75 플라스크의 경우 35mL, T-225 플라스크의 경우 100mL, 및 850cm² 롤러 베틀(RB)의 경우, 300mL의 배양물 부피에 대응되는 5 x 10⁴ 세포/mL로 통상적으로 씨딩하고, 매 3-4일마다 계대접종하였다. 2차 배양을 위해, 소비된 배지를 흡입하고, 세포를 DPBS로 행구고, 37°C에서 적절한 양의 TrypLE 용액(Invitrogen, Carlsbad, CA)으로 처리하여 플라스크에서 탈착시켰다. 동일한 부피의 리마콩 트립신 억제제(Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ)을 가하여, TrypLE 활성을 중화하였다. 모든 감염되지 않은 배로 세포를 4mM L-글루타민과 1%의 화학적으로 정의된 지질 농축액(CDLC, Invitrogen, Carlsbad, CA)으로 보충된 VP-SFM(Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 배양하고, T-플라스크 배양물을 37°C/5%CO₂/95%Rh 배양기에서 유지하고, RB 배양물을 37°C 배양기내 0.3 rpm으로 작동되는 롤러 베틀 기기위에 위치시켰다.

바이러스 씨드

<307> MEDI-560은 cp45의 유도체이며, hPIV3 바이러스에 대하여 생, 약독화된 백신후보이다. MEDI-560 바이러스 씨드 저장액을 -80°C에 저장하고, 사용직전에만 용해한다.

T-플라스크 실험

<312> MEDI-560 생산을 위한 감염 파라미터를 먼저 T25 플라스크에서 스크리닝하였다. T-25 플라스크를 4mM L-글루타민과 1% CDLC로 보충된 12 mL의 VP-SFM중 6×10^5 베로 세포로 씨딩하고, 37°C/5%CO₂/95%Rh 배양기에서 유지하였다. 씨딩 후 3일째 감염을 실시하였다. 두 T-25 플라스크내 세포 카운트는 TrypLE 용액으로 세포를 탈착시켜 측정하고, Vi-Cell 세포 생존 가능성 분석기(Beckman Coulter, Miami, FL. Model Vi-Cell XR)로 세포 수를 세었다. 두개의 플라스크로부터의 평균 세포 수를 사용하여 0.01 TCID₅₀/세포의 감염 다중도(MOI)에 기초하여 감염을 위해 사용될 수 있는 바이러스 씨드의 수를 산출하였다. 두 T-25 플라스크를 세 감염 배지(SFM4MegaVir (Hyclone, Logan, UT), William's 배지 E (Lonza), 및 Ex-Cell Vera(SAFC Biosciences JRH)) 중 MEDI-560으로 감염시키고, 모든 배지는 4mM L-글루타민으로 보충되고, 두 온도(32°C 및 30°C)에서 표 IV에서 보이는 바와 같이, 세 시점(감염후 5, 6, 및 7일 또는 dpi)에서 채취하였다. 배양물을 5%CO₂/95%Rh의 배양기에서 유지하였다. 채취시에, 소비 배양물 배지 샘플을 각각의 조건에서 두개씩 준비된 두 플라스크로부터 수집하고, 10X 수크로오스-포스페이트(10X SP) 완충액 10%(v/v)로 안정화하였다. 모든 샘플을 동결하여 ≤-60°C에서 보관하였다. 감염성 바이러스 역가는 TCID₅₀ 분석을 이용하여 측정하였다.

표 IV

T25 플라스크 감염 조건

시험 조건	감염 온도	감염 배지	채취 시간 (감염후 일수)
1	30C	SFM4MegaVir	5
2	30C	SFM4MegaVir	6
3	30C	SFM4MegaVir	7
4	30C	William's 배지 E	5
5	30C	William's 배지 E	6
6	30C	William's 배지 E	7
7	32C	SFM4MegaVir	5
8	32C	SFM4MegaVir	6
9	32C	SFM4MegaVir	7
10	32C	William's 배지 E	5
11	32C	William's 배지 E	6
12	32C	William's 배지 E	7
13	32C	Ex- 세포 배로	5
14	32C	Ex- 세포 배로	6
15	32C	Ex- 세포 배로	7

<313>

6.14 백신 생물반응기 비교

<314> 소규모 생물반응기 실험은 3L 교반식 탱크 생물반응기(Applikon, Foster City, CA)에서 실시하였다. 각 생물반응기는 ADI 1030 Bio 조절자(Applikon)와 ADI 1035 Bio 콘솔(Applikon)이 설치되어 있다. CytodexTM 1 마이크로 담체는 다음 제조사의 지시서를 이용하여 준비되었다.

<315> <316> 감염전 배로 세포 성장의 경우, RB 배양물로부터 채취한 배로 세포를 4 g/L의 Cytodex 1 마이크로 담체를 갖는 배로 세포 성장 배지(4mM L-GIn and 1% CDLC로 보충된 VP-SFM)에 $2e5$ 세포/mL 밀도로 씨딩하거나 3L 생물반응기내 1.5 내지 2L 조업 배양물 부피내 2 g/L의 Cytodex 1 마이크로 담체(변형 공정)으로 $1e5$ 세포/mL로 씨딩하였다. NaOH 용액을 첨가하고 CO₂를 살포하여, pH를 7.1±0.05로 조절하였다. 온도는 37°C로 유지하였다. 초기 배양동안의 용존 산소는 100% 근처이나, 세포가 성장함에 따라, 순수한 산소를 살포하여 공기 포화도 50%로 유지되었다. 교반 속도는 125 rpm으로 설정하였다.

<317> <318> 감염은 씨딩 후 3일 또는 5일에 시행하였다. 샘플 수집 이후, 모든 대조군 루프는 사용할 수 없게 되고, 마이크로 담체를 ≥ 30분 동안 고정하도록 하였다. 이후, 부분 배지 교환을 실시하였다. 소비된 성장 배지를 배출시키고, 동일한 부피의 신선한 감염 배지를 배지 첨가 부분 중 하나를 통하여 가하였다. 교환 배지의 양은 66% 내지 90%이다. 감염기간 동안, pH는 7.1±0.05로 조절되었다. 온도는 30°C로 유지되었다. 용존 산소는 공기 포화도 50%로 유지하였고, 교반은 125 rpm으로 유지하였다. 세포는 0.01 TCID₅₀/세포의 MOI(감염 다중도)로 감염시켰다.

일회용 생물반응기(SUB) 실험

<319> SUB(50L SUB 기본 하드웨어 단위(Hyclone, Logan, UT, Part No.SH3B1744.01)에서 배로 세포를 성장시키는

경우, 세포를 SUB내 30L 배로 세포 성장 배지내 2 g/L의 Cytodex 1 마이크로담체로 1e5 세포/mL 밀도로 씨딩하였다. pH는 NaOH 용액을 첨가하고 CO_2 를 살포하여 7.1 ± 0.05 로 조절하였다. 온도는 37°C 로 유지하였다. 초기 배양시 용존 산소는 100% 근처이나, 세포가 성장함에 따라, 순수한 산소의 살포에 의해 50%의 공기 포화도로 유지된다. 교반 속도는 배양 1일동안 125 rpm으로 유지되고, 남은 기간동안에는 100 rpm으로 감소한다.

<320> 씨딩 후 5일째 감염은 시행되었다. 샘플을 수집한 후, 모든 대조군 루프는 사용할 수 없게 되며, 마이크로담체 비드를 ≥ 30 분동안 고정하도록 하였다. 이후 부분 배지 교환을 실시하였다. 소비된 성장 배지를 배출하고, 동일한 부피의 신선한 감염 배지를 배지 첨가 부분 중 하나를 통하여 가하였다. 배지 교환의 양은 66% 였다. 감염 기간 동안, pH는 7.1 ± 0.05 로 조절되었다. 온도는 30°C 로 유지하였다. 용존 산소는 공기 포화도 50%로 유지하였고, 교반은 100 rpm으로 유지하였다. 세포는 $0.01 \text{ TCID}_{50}/\text{세포의 MOI}$ (감염 다중도)로 감염시켰다.

표 V

세포 성장 조건

조건	3L260307-R9*	3L120407-R10	SUB120407
용기	3L 생물 반응기	3L 생물 반응기	50L SUB
조업 배양물 부피	1.5L	1.5L	30L
세포 성장 배지	VP-SFM/4mM L-Gln/1% CDLC	VP-SFM/4mM L-Gln/1% CDLC	VP-SFM/4mM L-Gln/1% CDLC
씨딩 세포 밀도 (세포/mL)	2e5	1e5	1e5
마이크로 담체 농도 (g/L)	4	2	2
세포/마이크로 담체	12	12	12
교반 (rpm)	125	125	일수 1~100 일수 2내지3~125 일수 4내지5~100
공급	없음	씨딩후 4일째 글루코오스 2g/L 및 글루타민 2mM 각각 공급	없음

표 VI

바이러스 감염 조건

조건	3L260307-R9	3L120407-R10	SUB120407
감염시 세포 농도 (세포/mL)	9.93E5	1.25E6	8.82E5
감염 배지	SFM4MegaVir/4mM L-Gln	SFM4MegaVir/4mM L-Gln	SFM4MegaVir/4mM L-Gln
배지 교환(%)	90	66	66
감염시점 (씨딩후 일수)	3	5	5
교반(rpm)	125	125	100

<324>

분석 방법

<325> T 플라스크와 RB의 세포 카운트와 세포 생존가능성을 혈구계산기 또는 제조사의 지시에 따라 작동되는 Vi-Cell 분석기를 이용하여 측정하였다. 생물반응기 배양물로부터의 세포 농축액은 뉴클레오카운터(New Brunswick Scientific, Edison, NJ, M1293-0000)를 이용하여 측정하였다. 글루코오스, 락테이트, 글루타민 및 암모늄의 농도는 바이로프로파일 400 기기(Nova Biomedical, Waltham, MA, Bioprofile 400)를 이용하여 분석하였다. 바이러스 복제의 진행은 50% 조직 배양물 감염 용량(TCID_{50}) 분석을 이용하여 바이러스 감염성을 측정하여 분석하고, 결과를 $\log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 으로 정량화하였다.

<328>

결과

<329>

T25 플라스크의 감염 파라미터 스크리닝

<330>

상이한 감염 조건하에서 소비된 배양물 배지내 감염성 MEDI-560 역가를 TCID₅₀ 분석으로 측정하고, 도 15에 나타낸다. 최고의 역가는 30°C에서 SFM4MegaVir 배지에서 감염한 때, 최고 역가가 6 dpi에서 얻어진 경우를 제외하고, 모든 조건에서 5 dpi에서 얻었다. 30°C의 SFM4MegaVir 및 William's 배지 E의 감염 조건은 각각 8.4 및 8.5 logs TCID₅₀/mL의 유사한 피크 역가를 수득하였다. 데이터는 MEDI-560가 SFM4MegaVir 및 William's 배지 E 모두에서, 32°C보다 30°C에서 더욱 안정함을 보여준다.

<331>

또한 결과는 MOI 0.01, 감염 배지로서 SFM4MegaVir 배지 및 30°C의 감염조건이 MEDI-560의 고 역가를 수득할 수 있음을 나타낸다. 동일한 0.01의 MOI, 4mM L- GIn가 보충된 감염 배지 SFM4MegaVir 및 온도가 하기 기술된 생물 반응기 실험에 사용되었다(도 15).

<332>

생물반응기내의 배로 세포 성장

<333>

도 16은 3개의 생물반응기 배양물의 세포 성장 프로파일이 감염전 상 동안에, 밀리리터 당 세포(세포/mL)로 측정된 세포 밀도로 배양되는 것을 보여준다. 도 17은 평방 센티미터 당 세포(세포/cm²)로 측정된 세포 밀도의 세포 성장 프로파일을 보여준다.

<334>

예상한 바와 같이 1.5L Applikon 생물반응기 조업, 2e5 세포/mL로 씨딩하여 성장한 3L260307-R9은 동일한 시간 동안 배양할 때, 1e5 세포/mL로 씨딩한 3L120407-R10 보다 높은 세포 밀도를 얻으며, 배양 3일 후, 3L260307-R9은 1e6 세포/mL에 도달하고, 3L120407-R10은 단지 8.3e5 세포/mL에 도달하였다(도 15). 그러나, 3L120407-R10의 세포는 씨딩후 5일에 1.25e6 세포/mL에 도달하였다.

<335>

3L120407-R10를 3L260307-R9의 경우에 사용된 세포의 양의 반, 1e5 세포/mL 대 2e5 세포/mL으로 씨딩하였음에도 불구하고, 3L120407-R10에 사용된 마이크로담체의 양을 반으로 줄였으므로, 양 반응기를 마이크로담체 당 ~13 세포로 씨딩하였다. 두개의 1.5L 생물반응기 배양물에 대한 세포 성장 프로파일은 처음 이를동안을 유사하였다(도 16). 그러나 3L260307-R9의 세포 성장은 3L120407-R10의 96.6 세포/마이크로담체와 비교시, 이를 후부터 느려지고, 3일째, 59 세포/마이크로담체에 도달하였다. 3L260307-R9에서 관찰된 이 느린 성장은 글루코오스의 빠른 고갈에 기인한 것일 수도 있다(도 17).

<336>

SUB120407의 경우, 교반은 배양 첫째날 100rpm으로 유지하여, 마이크로담체 비드에 세포가 부착되도록 하였다. 2일 내지 3일동안에는 교반을 증가시켜, 125 rpm으로 유지하였다. 그러나 SUB의 세포 성장은 1.5L Applikon 생물반응기 배양물, 3L120407-R10보다 뒤쳐진다. 세포 성장을 개선하기 위한 시도에서, 교반을 감소하고, 씨딩후 4일 내지 5일에 100 rpm으로 유지하였다. SUB 배양물의 세포는 첫번째 날동안 1.5L 생물반응기 배양물, 3L120407-R10과 유사하게 성장하였다. 그러나 SUB의 세포 성장은 1일 후, 1.5L 대조군 생물반응기보다 상당히 느려졌다. 교반 속도가 SUB의 MDCK 세포 성장에 상당한 영향을 미침을 보여준다.

<337>

도 18A-B에서 보이는 바와 같이, 3L260307-R9는 높은 세포 밀도를 가지므로, 글루코오스가 가장 빠르게 고갈되었다. 또한 가장 많은 양의 락테이트가 생산되었다. 3L120407-R10는 2일-4일동안, SUB 배양물보다 다소 많은 락테이트를 생산하였다. 그러나, 씨딩후 5일의 최종 락테이트 농도는 두 배양물의 경우 유사하였다.

<338>

3L260307-R9은 4mM의 계산 농도보다 높은 5.6mM의 초기 글루타민 농도를 갖는다(도 19A-B). SUB에서 가장 낮은 세포 밀도를 갖기 때문에, 글루타민의 소비는 다른 두개보다 SUB에서 더 적었다. 3L120407-R10과 SUB120407에 대한 암모늄 이온 생산 프로파일은 매우 유사하다. 3L260307-R9은 더 많은 암모늄 이온을 생산하고, 이는 가장 높은 세포 밀도를 갖는 사실에 기인하는 것으로 보인다.

<339>

생물반응기내의 MEDI-560 생산

<340>

세개의 생물반응기 조업내 바이러스 생산은 TCID₅₀ 분석을 이용하여 측정하고, 표 VII에 요약하였다.

표 VII

MEDI-560 역가 (\log_{10} TCID₅₀/mL)

생물 반응기 조업 ID	1 dpi	2 dpi	3 dpi	4 dpi	5 dpi	6 dpi
3L120407-R10	6.3	8.3 ± 0.3	8.3 ± 0.1	8.4 ± 0.3	8.1 ± 0.1	8.1 ± 0.1
SUB120407	5.8	8.1 ± 0.1	8.6 ± 0.1	8.3 ± 0.1	8.4 ± 0.1	8.5 ± 0.0
3L260307-R9	NA	8.3 ± 0.3	8.5 ± 0.1	8.6 ± 0.1	8 ± 0.1	8.3 ± 0.0

<341>

데이터는 SUB 조업내 3dpi의 MEDI-560 역가 피크 및 두 1.5L Applikon 생물반응기 조업내 4 dpi의 MEDI-560 역가 피크를 나타낸다. 세 생물반응기 조업에 대한 피크 역가는 유사하다.

생물반응기내 마이크로담체상에서 배양된 베로 세포를 증폭하기 위한 직접비드 대 비드 전달법

베로 세포 배양물을 효과적으로 증폭하기 위해, 베로 세포는 부착되어 있는 마이크로담체 비드로부터 탈착되어야 하고, 이후 성장을 위해 신선하게 가해진 마이크로담체 비드에 부착되어야만 한다. 일반적으로 트립신/EDTA가 마이크로담체 비드로부터 베로 세포를 탈착하는데 사용되고, 증폭하게 된다(Sugawara K., et al., *Biologicals* 2002, 30, 303-314). 그러나, 이 접근은 배양 배지의 제거와 과량의 트립신/EDTA의 사용을 포함한다. 이는 귀찮고, 비용이 많이 들며, 오염의 위험이 증가한다.

직접 비드 대 비드 전달법은 트립신이나 트립신 유사 효소를 이용하지 않고 생물반응기내에서 베로 세포 배양물을 증폭하기 위해 개발되었으며, 마이크로담체 비드로부터 베로 세포를 탈착시킨다. 베로 세포를 증폭시키고, 성장시키기 위해, 부착된 마이크로담체 비드로부터 신선하게 가해진 비드에 직접적으로 옮겨도록 하였다. 직접 비드 대 비드 전달법을 이용하여 증폭된 생물반응기 배양물의 세포가 롤러 베틀의 세포로 씨딩된 배양물과 유사한 바이러스 생산성을 갖는지를 시험하기 위해, 다음의 비교 연구를 수행하였다.

베로 세포주(ATCC CCL-81)를 무혈청 성장 조건에 가하여, 저장하였다. 워킹 세포 뱅크(WCB 29Apr03 PN532AC (SF) 03BA01 PJS)로부터 유래한 세포를 모든 실험에 사용하였다.

롤러 베틀 배양: 앵커리지 의존성 베로 세포를 T-75 플라스크의 경우 35mL, T-225 플라스크의 경우 100mL 및 850cm² 롤러 베틀(RB)의 경우 300mL의 배양물 부피에 대응하는, 5×10^4 세포/mL로 씨딩하고, 매 3-4일마다 계 대접종하였다. 2차 배양을 위해, 소비된 배지를 흡입하고, 세포를 DPBS로 헹구고, 37°C에서 적정량의 TrypLE 용액(Invitrogen, Carlsbad, CA)으로 처리하여 플라스크로부터 탈착시켰다. 동일한 부피의 리마콩 트립신 억제제(Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ)을 가하여 TrypLE 활성을 중화하였다. 모든 감염되지 않은 베로 세포를 4mM L-글루타민과 1% 화학적으로 정의된 지질 농축액(CDLC, Invitrogen, Carlsbad, CA)이 보충된 VP-SFM(Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 배양하고, T-플라스크 배양물을 37°C/5%CO₂/95%Rh 배양기에서 유지하고, RB 배양물을 37°C 배양기내 0.3 rpm으로 작동되는 롤러 베틀 기기위에 두었다.

MEDI-560 및 MEDI-559를 실험에 사용하였다. 바이러스 씨드 저장액을 -80°C에 저장하고, 사용직전에만 해동하였다.

직접 비드 대 비드 생물반응기 배양: 소규모의 생물반응기 실험은 3L 교반식 탱크 생물반응기(Applikon, Foster City, CA)에서 실시하였다. 각각의 생물반응기는 ADI 1030 Bio 조절기(Applikon)와 ADI 1035 Bio 콘솔(Applikon)이 설치되어 있다. Cytodex 1 마이크로담체는 다음 제조사의 지시서를 이용하여 준비하였다.

생물반응기 배양을 시작하기 위해, RB 배양물로부터 채취한 베로 세포를 3L 생물반응기내 1.5 내지 2L 조업 배양물 부피내 베로 세포 성장 배지(4mM L-GIn 및 1% CDLC가 보충된 VP-SFM)에서 4g/L의 Cytodex 1 마이크로담체로 2e5 세포/mL 밀도로 씨딩하거나, 2 g/L의 Cytodex 1 마이크로담체로 1e5 세포/mL로 씨딩하였다. NaOH를 첨가하고 CO₂ 살포하여 pH를 7.1±0.05로 조절하였다. 온도는 37°C로 유지하였다. 용존 산소는 초기 배양동안 100% 균쳐였으나, 세포가 성장함에 따라 순수한 산소의 살포에 의해 공기 포화도 50%로 유지되었다. 교반 속도는 125 rpm으로 설정되었다.

트립신을 이용하지 않고 비드로부터 비드로 직접 베로 세포를 옮겨생물반응기로부터 생물반응기로의 베로 세포 배양물의 증폭을 시험하기 위해, 다음 실험을 실시하였다. 상기 기술한 바와 같이 1.5L 조업 부피내 Applikon 생물반응기내 세포 밀도가 $\geq 1e6$ 세포/mL에 도달할 때까지, 베로 세포를 3일동안 배양하였다. 1:1 분배 비율에서 증폭하기 위해, 750mL 내지 1L의 3일 배양물을 4 g/L의 신선한 Cytodex 1 비드와 동일한 부피의 신선한 성장 배지를 함유하는 새로운 생물반응기로 옮겼다. 1:5 분배 비율의 증폭을 위해, 300 mL의 베로 세포 배양물을 4

g/L의 신선한 Cytodex 1 비드와 1.2L의 신선한 성장 배지를 함유하는 신선한 생물반응기로 옮겼다.

<352> 세포는 다음과 같이 교반을 변형시키면서 상기 기술한 바와 같이 동일한 파라미터를 이용하여 배양하였다. 125 rpm의 일정한 교반 대신, 표 VIII에서 보이는 바와 같이, 다양한 간헐 교반 지침을 사용하였다. 4개의 상이한 간헐 교반 지침에 의해 증폭된 생물반응기내 세포 성장 결과를 도 22에 나타냈다.

표 VIII

시험된 다양한 간헐적인 교반지침

	주기 1	기간	주기 2	기간	주기 3	기간	기타
지침 1	125rpm x 5'/0 rpm x 30'	5 hrs	일정 125 rpm	남은 배양 시간	해당없음	해당없음	1:1 분배 비율
지침 2	125rpm x 5'/0 rpm x 30'	24 hrs	125rpm x1hr/0 rpm x 1hr	24 hrs	일정 125 rpm	남은 배양 시간	1:5 분배 비율
지침 3	125rpm x 10'/0 rpm x 50'	8 hrs	일정 125 rpm	남은 배양 시간	해당없음	해당없음	1:5 분배 비율
지침 4	125rpm x 10'/0 rpm x 50'	8 hrs	125rpm x 1 hr/0 rpm x 1hr	8 hrs	일정 125 rpm	남은 배양 시간	1:5 분배 비율

<353>

<354> 직접 비드 대 비드 전달법을 이용하여 증폭된 생물반응기 배양물의 세포가 롤러 베틀의 세포로 씨딩된 배양물과 유사한 바이러스 생산성을 갖는지 시험하기 위해, 신선하기 씨딩된 생물반응기 배양물과 1:5 분배 비율로 증폭된 배양물을 0.01 FFU/세포의 MOI에서 MEDI-559로 감염시켰다. 감염기간동안, pH는 7.1 ± 0.05 로 조절되었다. 온도는 30°C로 유지되었다. 용존산소는 50%의 공기 포화도로 유지되고, 교반은 125 rpm으로 유지되었다. 결과적으로 피크 바이러스 역가는 표 IX에서 보이는 바와 같이 유사하다.

표 IX

베로 세포의 신선한 씨딩과 증폭된 생물 반응기 배양물간 피크 MEDI-559 역가 비교

	피크 역가(\log_{10} FFU/mL)	SD
R3 1:5 분배	7.7	0.04
R4 1:5 분배	7.7	0.03
R7 새로이 씨딩	7.6	0.01
R8 새로이 씨딩	7.6	0.02

<355>

<356> 플랫폼 공정 파라미터를 이용한 3L 생물반응기에서 배양된 베로 세포는 표 X의 하기 기술된 두가지 다른 실험의 15L 생물반응기로 증폭되었다. 세포를 3L 생물반응기로부터 옮기고, 1:5의 분배 비율에서 15L 생물반응기로 증폭시켰다. 3L 생물반응기에서 증폭된 배양에서 보이는 바와 같이 4일 또는 5일째, 세포는 $\geq 1e6$ 핵/mL에 도달하였다(도 22). 15L Applikon 생물반응기에서 증폭된 베로 세포 배양물은 0.01의 MOI에서 MEDI-559 또는 MEDI-560로 감염시켰다. 15L 증폭된 배양물에서 얻은 피크 역가는 3L 생물반응기 배양물로부터의 피크 역가와 유사하다(표 X)

표 X

베로 세포를 3L에서 15L Applikon 생물 반응기로 증폭시키는 실험 디자인 및 결과

씨드 생물반응기	실험 1		실험 2	
	3L Applikon	3L Applikon	3L Applikon	3L Applikon
작업 부피	2L		2L	
배양 피리미터	플랫폼 공정		플랫폼 공정	
배양 시간	4 일		3 일	
최종 세포 밀도	1.2e6 nuclei/mL		1.3e6 nuclei/mL	1.3e6 nuclei/mL
전환된 배양 부피	1.6L	0.4L	2L	NA
전달 반응기	15L Applikon	3L 대조 반응기	15L Applikon	NA
작업 부피	8L	2L	10L	NA
증폭 비율	1:5	1:5	1:5	NA
씨딩 세포 밀도	1.8e5 핵/mL	1.2e5 핵/mL	2.1e5 핵/mL	NA
교반 지침	교반 속도 125에서 90 rpm으로 감소된 지침 4(표 VIII 참조)	지침 4 (표 VIII 참조)	125에서 90 rpm으로 감소된 교반 속도의 지침 4(표 VIII 참조)	NA
배양 시간	4 일	4 일	5 일	NA
최종 세포 밀도	1.2e6 핵/mL	1.1e6 핵/mL	1.1e6 핵/mL	NA
감염된 바이러스	MEDI-559	MEDI-559	MEDI-560	MEDI-560
피크 바이러스 역가	7.23±0.05 log ₁₀ FFU/mL	7.39±0.09 log ₁₀ FFU/mL	8.7 log ₁₀ TCID ₅₀ /mL	8.5 log ₁₀ TCID ₅₀ /mL

<357>

<358> 세포 분배 균일성이 문제가 되는지와 다양한 증폭에서 유래한 세포가 바이러스 생산성을 유지하는지 시험하기 위해, 베로 세포 배양물을 1:5 분배 비율에서 2회 연속(2X) 3L 생물반응기에서 계대접종하였다. 세포 성장 및 MEDI-560 생산은 롤러 베틀(증폭 없음)의 세포로 씨딩한 생물반응기 배양물 또는 생물반응기(IX)내 1:5 분배 비율로 1회 증폭한 후 배양된 생물 반응기 배양물과 유사하다. 실험 디자인, 세포 성장 프로파일, 마이크로담체상의 세포 분배 및 MEDI-560 생산은 표 XI, 도 23 내지 25에 각각 보여진다. 5일(IX 증폭) 및 2회 증폭 후 6일째, 세포 $\geq 1e6$ 핵/mL에 도달하였다. 증폭된 배양물내 세포 성장은 약간의 지연이 발생했다. 1 및 2 증폭 이후, 배양물내 마이크로담체 비드상의 세포 분배는 유사하다(도 24). 모든 배양물은 도 25에서 보이는 바와 같이, 유사한 MEDI-560 생산성을 보였다.

표 XI

실험 디자인

	신선하게 씨딩된 생물 반응기 배양물	1:5분배 비율에서 1X 증폭	1:5분배 비율에서 2X 증폭
씨드 배양 용기	3L	3L	3L
최종 배양 용기	3L	15L	3L
증폭	해당없음	1X 1:5 비율	2X 1:5 비율
감염된 바이러스	MEDI-560	MEDI-560	MEDI-560

<359>

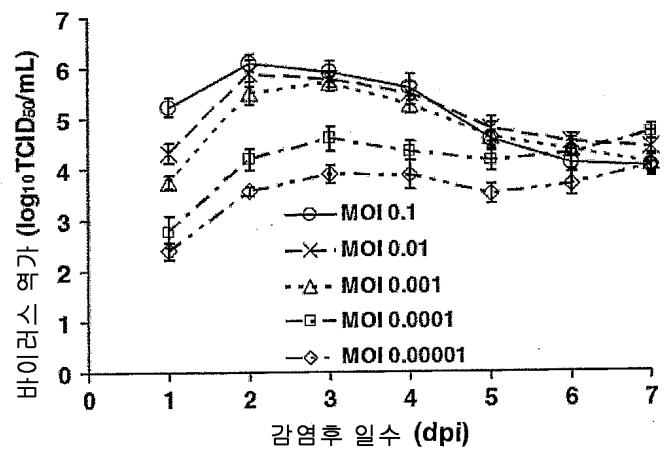
<360> 상기 기술한 비드 대 비드 전달법을 이용하여 증폭된 베로 세포는 롤러베틀에서 유래한 세포로 씨딩된 베로 세포 배양물과 유사한 RSV 백신을 생산하였다.

<361>

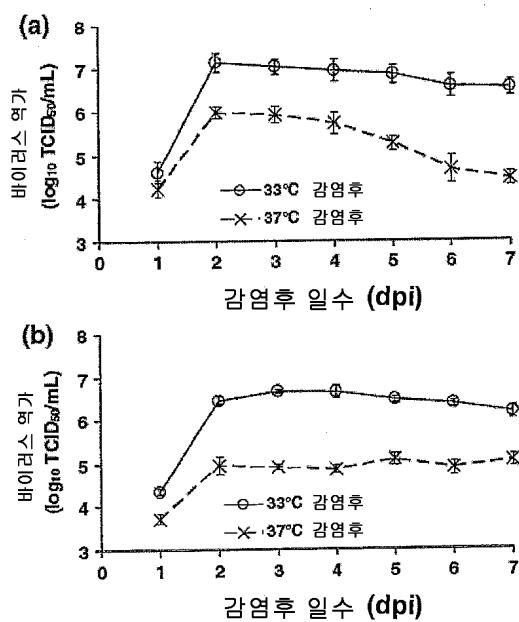
본 발명의 다양한 구체예가 기술되었다. 설명 및 실시예에는 본 발명을 예시하기 위한 의도일 뿐 제한하려는 의도는 없다. 사실, 당업자는 이하 기술되는 청구항의 범주 또는 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않은 범위내에서 기술된 본 발명의 다양한 구체예의 변형이 이루어질 수 있음을 자명하게 유추할 수 있을 것이다. 본 명세서에 인용된 모든 참고문헌은 그 전체내용이 참고로 본 명세서에 포함된다. 또한, 2007년 4월 5일자로 출원된 국제 특허 출원 PCT/US07/66037 및 2006년 10월 23일자로 출원된 미국 출원 60/862,550, 2007년 6월 15일자로 출원된 60/944,162 및 2007년 9월 20일자로 출원된 60/973,921의 전체 내용이 본 명세서에 참고로 포함된다.

도면

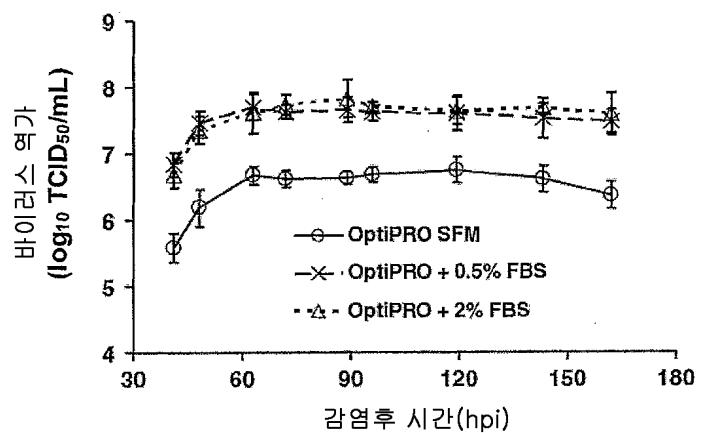
도면1



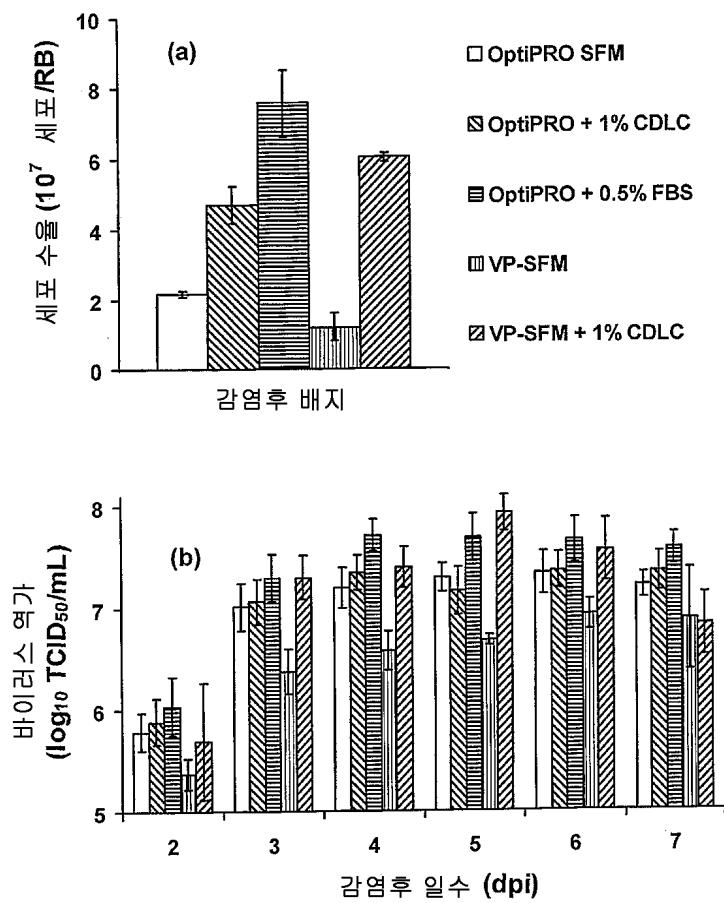
도면2



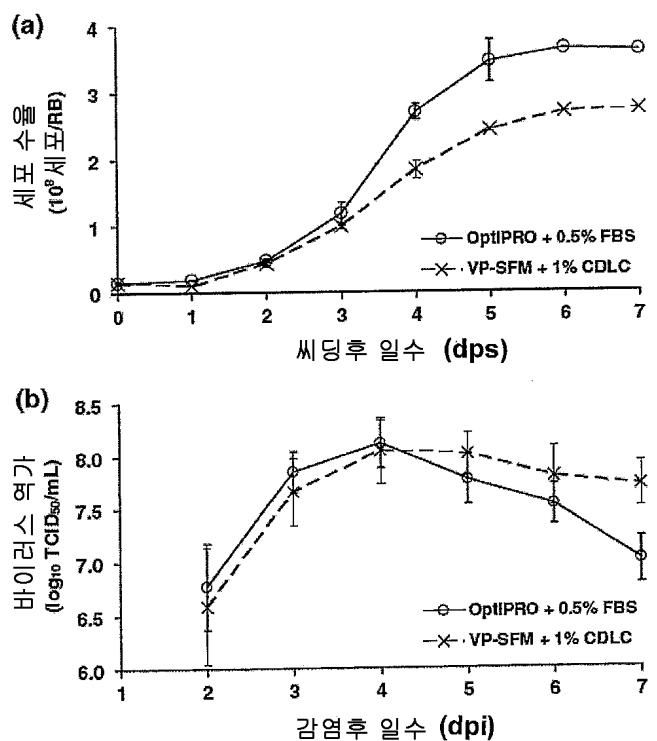
도면3



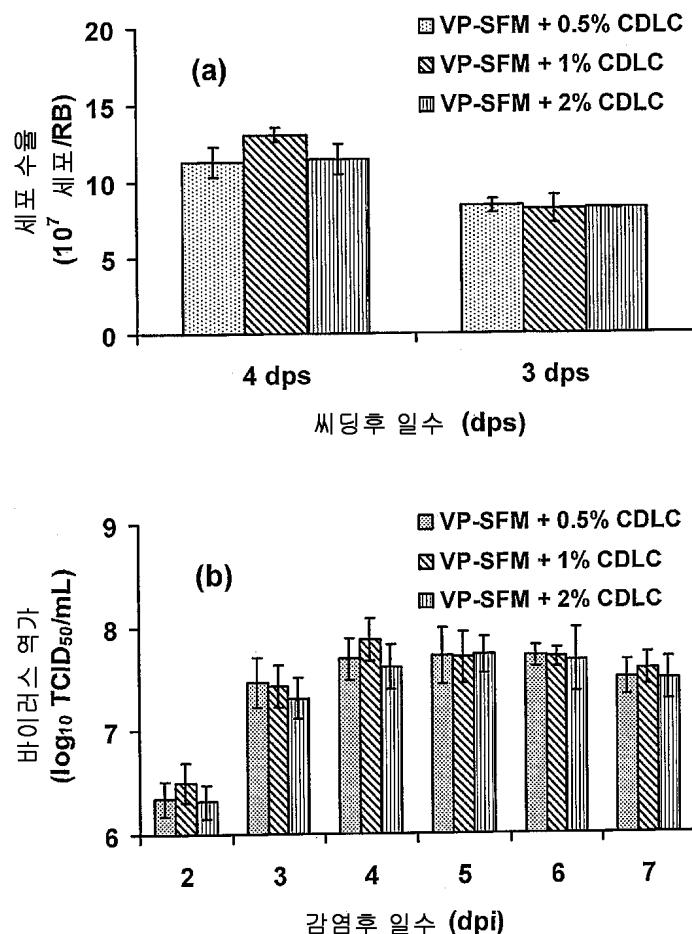
도면4



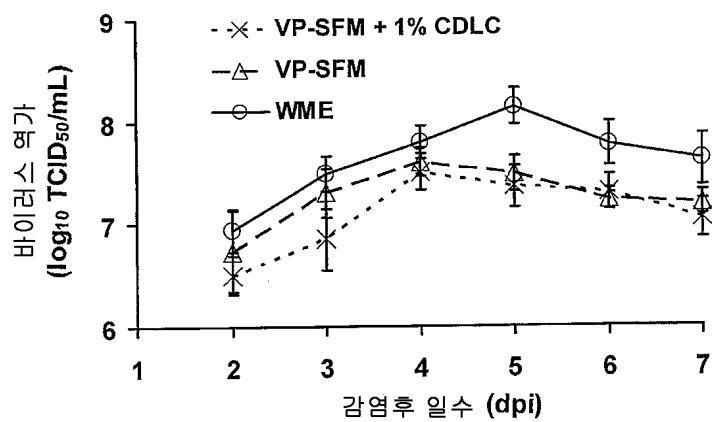
도면5



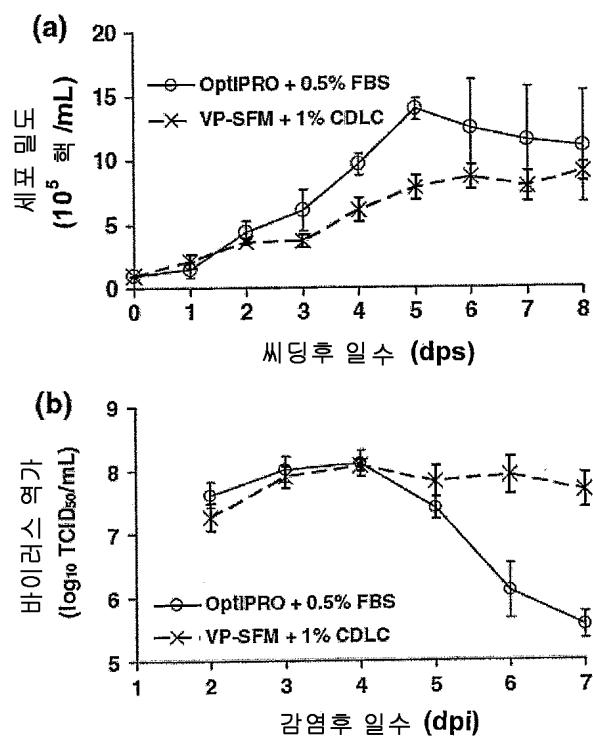
도면6



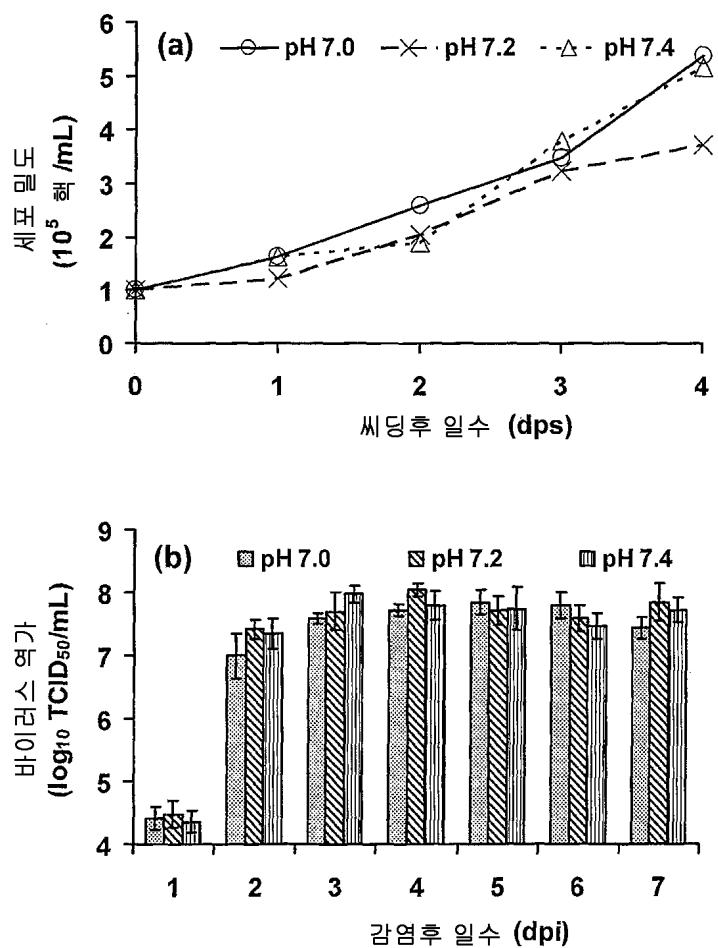
도면7



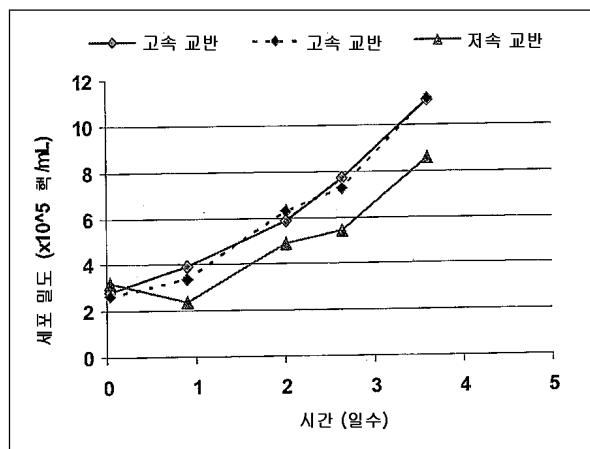
도면8



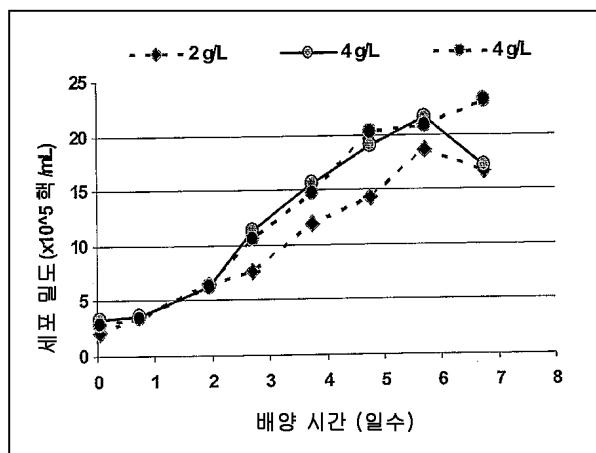
도면9



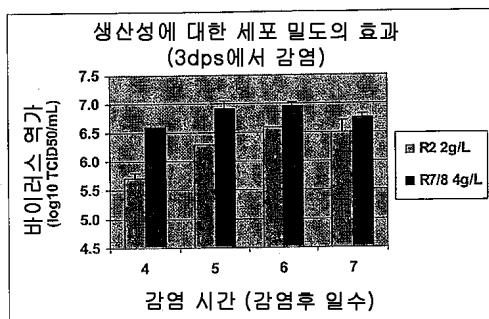
도면10



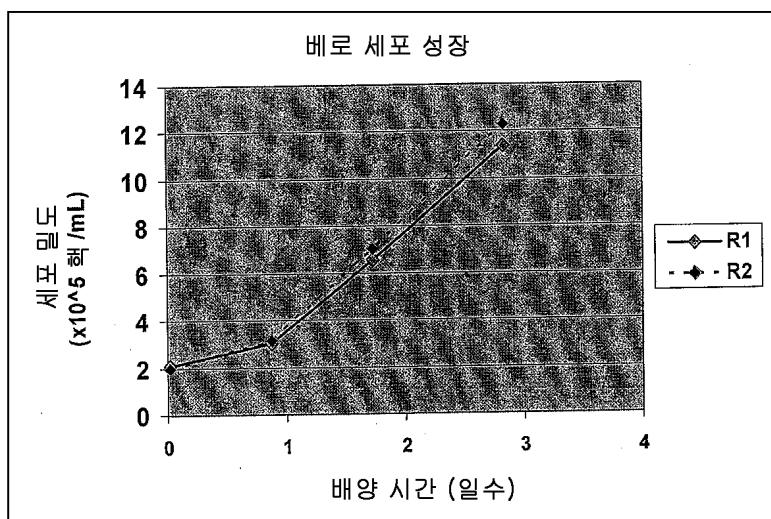
도면11



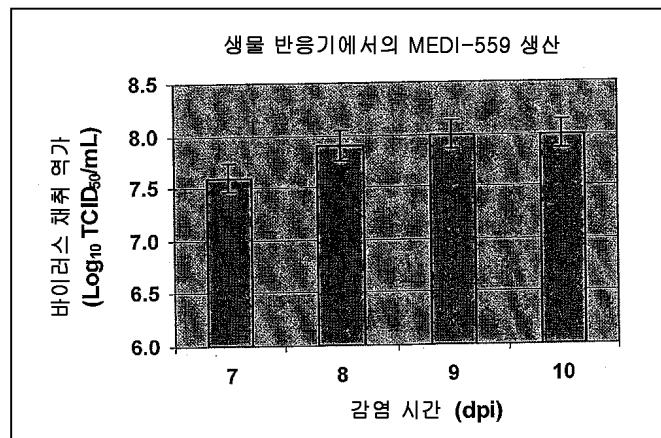
도면12



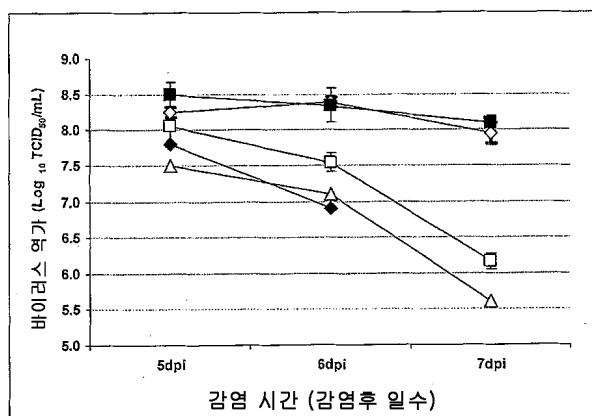
도면13



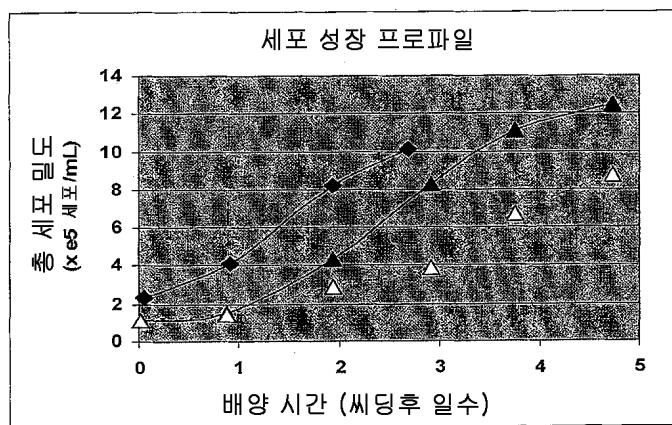
도면14



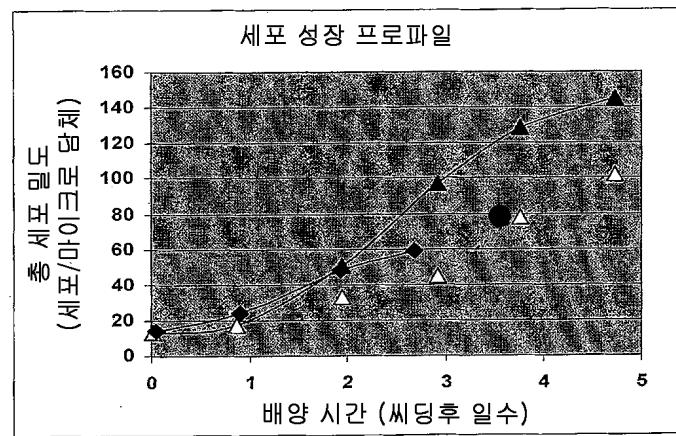
도면15



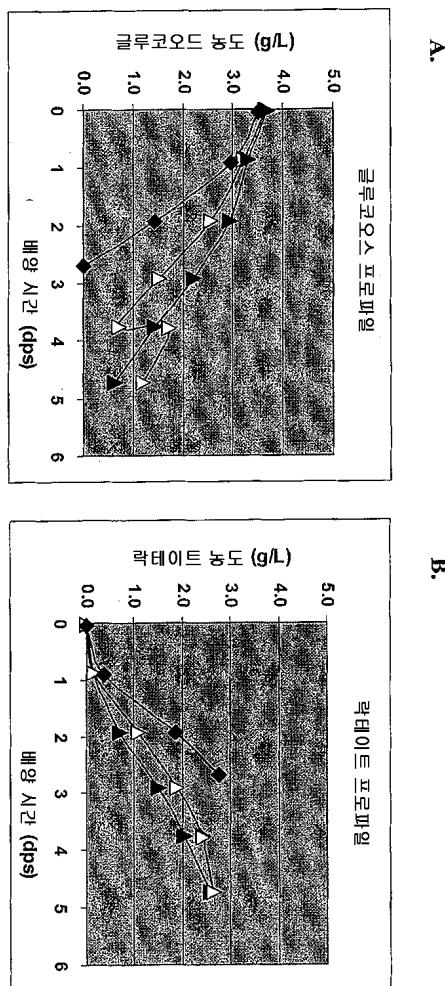
도면16



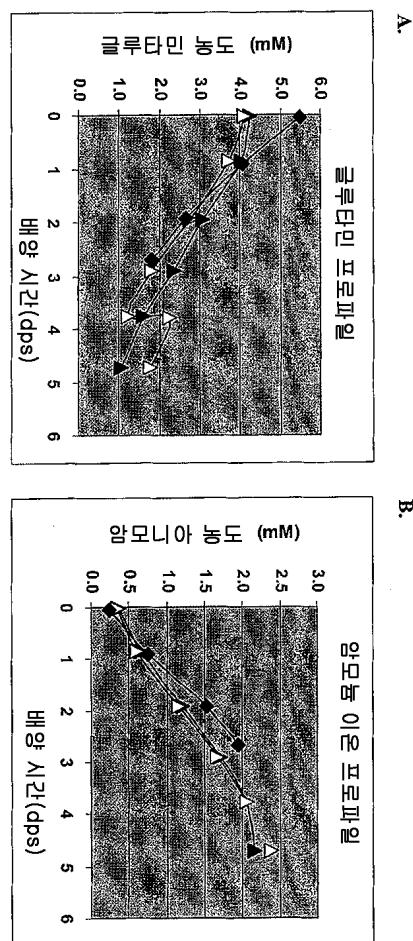
도면17



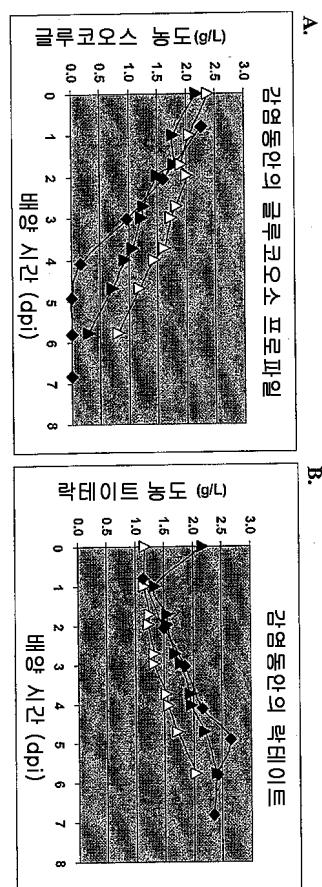
도면18



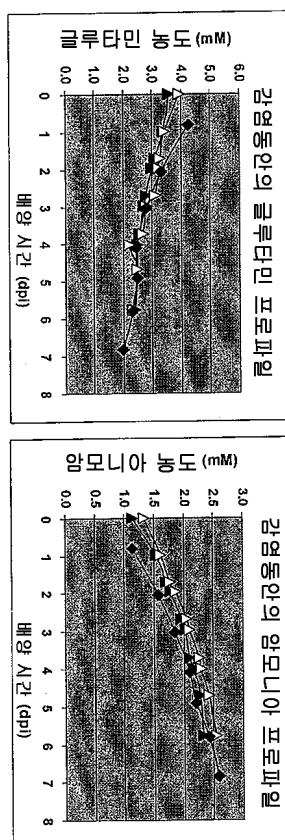
도면19



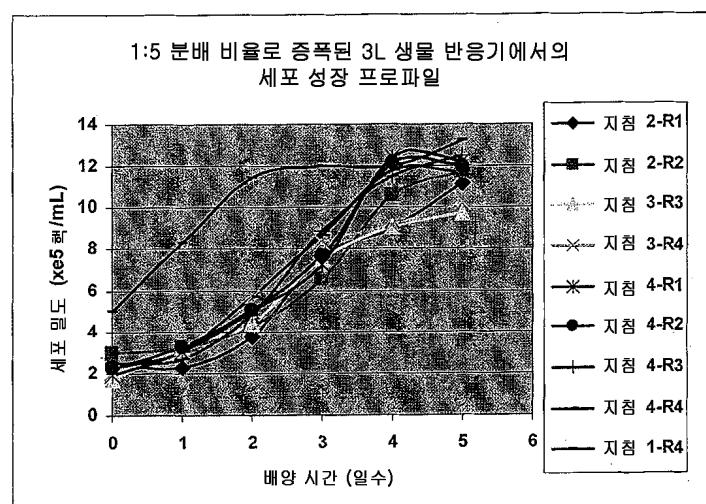
도면20



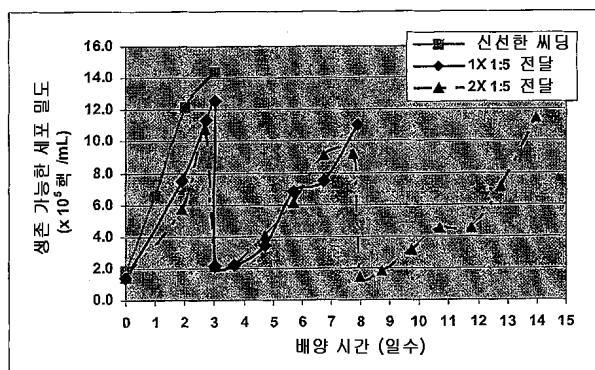
도면21



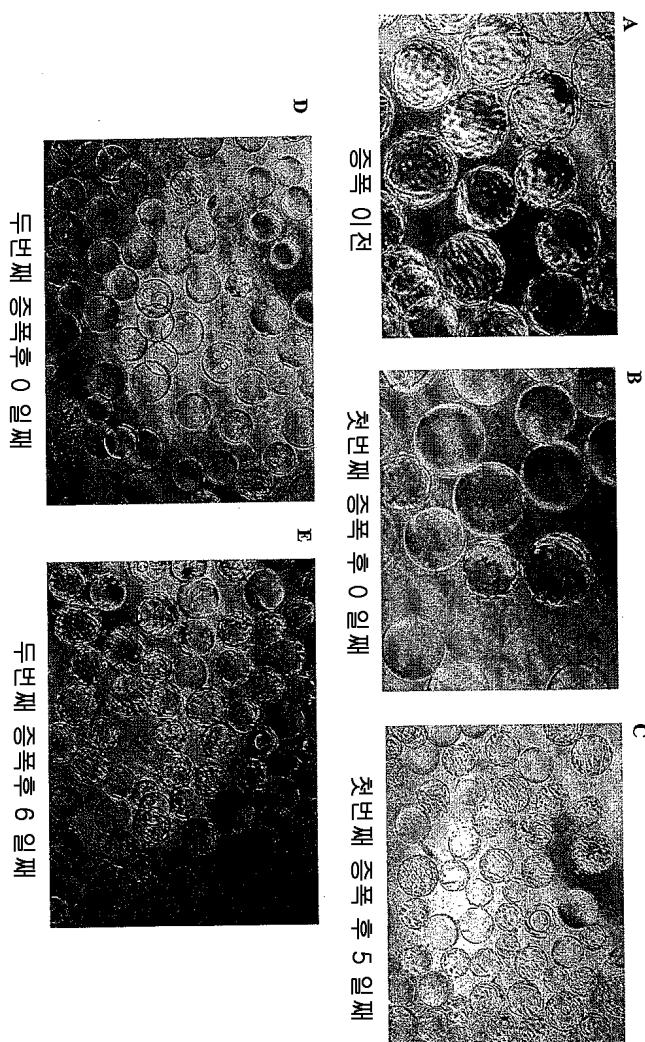
도면22



도면23



도면24



도면25

