

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2025-0042168
(43) 공개일자 2025년03월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/00 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01) C12N 15/80 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01) C12N 5/07 (2010.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0018 (2013.01)
C07K 16/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2025-7005569

(22) 출원일자(국제) 2023년07월24일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2025년02월20일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2023/026987

(87) 국제공개번호 WO 2024/024720

국제공개일자 2024년02월01일

(30) 우선권주장

JP-P-2022-118189 2022년07월25일 일본(JP)

(71) 출원인

아지노모토 가부시카가이샤

일본국 도쿄도 주오구 교바시 1조메15반1고

(72) 발명자

마츠바, 아야나

일본 2108681 가나가와켄 가와사키시 가와사키쿠
스즈키쵸 1-1 아지노모토 가부시카가이샤 내

츠치, 치히로

일본 2108681 가나가와켄 가와사키시 가와사키쿠
스즈키쵸 1-1 아지노모토 가부시카가이샤 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장수길, 이유리, 이석재

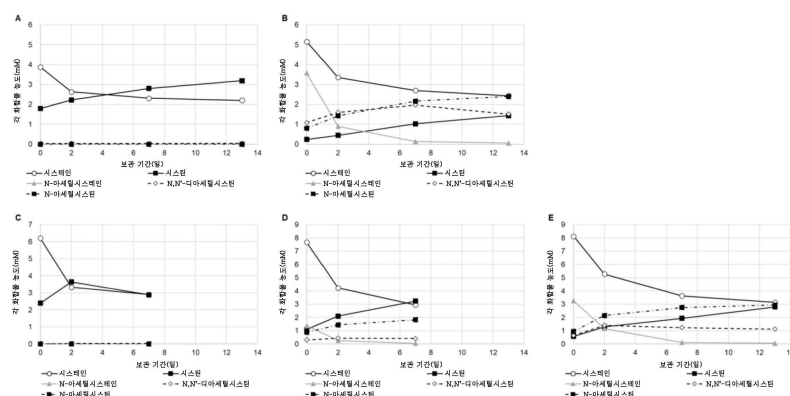
전체 청구항 수 : 총 66 항

(54) 발명의 명칭 세포 배양용의 배지

(57) 요약

배지의 안정성을 향상시키고, 재조합 단백질의 생산성을 향상시키는 방법 또는 제 등이 제공된다. 구체적으로는, N-아세틸시스테인 및 L-시스테인을 포함하는 배지, N-아세틸시스테인 및 L-시스테인을 포함하는 배지를 사용하여 세포를 배양하기 위한 방법, N-아세틸시스테인 및 L-시스테인을 포함하는 배지를 사용하여 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법, N-아세틸시스테인을 포함하는, L-시스테인을 포함하는 배지를 안정화하는 방법 또는 제 등이 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 15/74 (2013.01)

C12N 15/80 (2013.01)

C12N 15/81 (2013.01)

C12N 5/06 (2025.01)

C12N 5/10 (2020.05)

(72) 발명자

하라다, 마사시

일본 2108681 가나가와켄 가와사키시 가와사키쿠
스즈키쵸 1-1 아지노모토 가부시카이사 내

히구치, 다쿠야

일본 2108681 가나가와켄 가와사키시 가와사키쿠
스즈키쵸 1-1 아지노모토 가부시카이사 내

다카하시, 다케시

일본 1158543 도쿄도 기타쿠 우키마 5쵸메 5반 1고
추가이 세이야쿠 가부시카이사 내

명세서

청구범위

청구항 1

10 내지 40mM의 L-시스테인 및 1 내지 40mM의 N-아세틸시스테인을 포함하는, 피드 배지.

청구항 2

L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하고, N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0인, 피드 배지.

청구항 3

제1항에 있어서, 15 내지 30mM의 L-시스테인을 포함하는, 피드 배지.

청구항 4

제1항에 있어서, 2 내지 10mM의 N-아세틸시스테인을 포함하는, 피드 배지.

청구항 5

제1항에 있어서, N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이, 0.04 내지 1.0인, 피드 배지.

청구항 6

제1항에 있어서, N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이, 0.1 내지 0.4인, 피드 배지.

청구항 7

제1항에 있어서, pH가 5.0 내지 9.0인, 피드 배지.

청구항 8

제1항에 있어서, pH가 6.5 내지 7.6인, 피드 배지.

청구항 9

제1항에 있어서, 무혈청 배지 및/또는 동물성 단백질 불함유 배지인, 피드 배지.

청구항 10

제1항에 있어서, 합성 배지인, 피드 배지.

청구항 11

10 내지 40mM의 L-시스테인 및 1 내지 40mM의 N-아세틸시스테인을 포함하는 피드 배지의 조제를 위한, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 분말 배지.

청구항 12

N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0인 피드 배지의 조제를 위한, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 분말 배지.

청구항 13

제11항에 있어서, 피드 배지가 15 내지 30mM의 L-시스테인을 포함하는, 분말 배지.

청구항 14

제11항에 있어서, 피드 배지가 2 내지 10mM의 N-아세틸시스테인을 포함하는, 분말 배지.

청구항 15

제11항에 있어서, 피드 배지 중의 N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0인, 분말 배지.

청구항 16

제11항에 있어서, 피드 배지 중의 N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.1 내지 0.4인, 분말 배지.

청구항 17

제11항에 있어서, 피드 배지의 pH가 5.0 내지 9.0인, 분말 배지.

청구항 18

제11항에 있어서, 피드 배지의 pH가 6.5 내지 7.6인, 분말 배지.

청구항 19

제11항에 있어서, 피드 배지가 무혈청 배지 및/또는 동물성 단백질 불함유 배지인, 분말 배지.

청구항 20

제11항에 있어서, 피드 배지가 합성 배지인, 분말 배지.

청구항 21

세포를 배양하는 배지에 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 기재된 피드 배지를 첨가하는 것을 포함하는, 세포를 배양하기 위한 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 세포가 동물 세포, 식물 세포, 세균 세포, 또는 진균 세포인, 방법.

청구항 23

제21항에 있어서, 세포가 동물 세포인, 방법.

청구항 24

제21항에 있어서, 세포가 포유 동물 세포인, 방법.

청구항 25

제21항에 있어서, 세포가 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포인, 방법.

청구항 26

제21항에 있어서, 세포가 재조합 단백질을 발현하는, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 재조합 단백질이 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 IgG 유래인, 방법.

청구항 29

제21항에 있어서, 열부하에 의한 배지 성분의 석출이 없는, 방법.

청구항 30

제조합 단백질 산생능을 갖는 세포를 배양하는 배지에 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 기재된 피드 배지를 첨가하는 것을 포함하는, 제조합 단백질을 제조하기 위한 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 세포가 동물 세포, 식물 세포, 세균 세포, 또는 진균 세포인, 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, 세포가 동물 세포인, 방법.

청구항 33

제30항에 있어서, 세포가 포유 동물 세포인, 방법.

청구항 34

제30항에 있어서, 세포가 차이나이즈 햄스터 난소(CHO) 세포인, 방법.

청구항 35

제30항에 있어서, 제조합 단백질이 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 IgG 유래인, 방법.

청구항 37

제30항에 있어서, 열부하에 의한 배지 성분의 석출이 없는, 방법.

청구항 38

액체 배지의 안정성을 향상시키기 위한 방법이며, L-시스테인의 농도가 10 내지 40mM, N-아세틸시스테인의 농도가 1 내지 40mM이 되도록, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 39

액체 배지의 안정성을 향상시키기 위한 방법이며, N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0이 되도록, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 40

액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출을 억제하기 위한 방법이며, L-시스테인의 농도가 10 내지 40mM, N-아세틸시스테인의 농도가 1 내지 40mM이 되도록, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 41

액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출을 억제하기 위한 방법이며, N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0이 되도록, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 42

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 43

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 액체 배지가 10 내지 40mM의 L-시스테인을 포함하고, 상기 방법이 N-아세틸시스테인의 농도가 1 내지 40mM이 되도록 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 44

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 액체 배지가 1 내지 40mM의 N-아세틸시스테인을 포함하고, 상기 방법이 L-시스테인의 농도가 10 내지 40mM이 되도록 L-시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 45

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, L-시스테인의 농도가 15 내지 30mM이 되도록, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 46

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, N-아세틸시스테인의 농도가 2 내지 10mM이 되도록 L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 47

제38항 또는 제40항에 있어서, N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0이 되도록 L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 48

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.1 내지 0.4가 되도록 L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 49

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 액체 배지의 pH가 5.0 내지 9.0이 되도록 L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 50

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 액체 배지의 pH가 6.5 내지 7.6이 되도록 L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 51

액체 배지의 안정성을 향상시키기 위한, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 제이며, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지가 10 내지 40mM의 L-시스테인 및 1 내지 40mM의 N-아세틸시스테인을 포함하는, 제.

청구항 52

액체 배지의 안정성을 향상시키기 위한, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 제이며, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지에 있어서의 N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0인, 제.

청구항 53

10 내지 40mM의 L-시스테인을 포함하는 액체 배지의 안정성을 향상시키기 위한, N-아세틸시스테인을 포함하는 제이며, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지가 1 내지 40mM의 N-아세틸시스테인을 포함하는, 제.

청구항 54

L-시스테인을 포함하는 액체 배지의 안정성을 향상시키기 위한, N-아세틸시스테인을 포함하는 제이며, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지에 있어서의 N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0인, 제.

청구항 55

액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출을 억제하기 위한, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 제이며, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지가 10 내지 40mM의 L-시스테인 및 1 내지 40mM의 N-아세틸시스테인을 포함하는, 제.

청구항 56

액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출을 억제하기 위한, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 제이며, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지에 있어서의 N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0인, 제.

청구항 57

10 내지 40mM의 L-시스테인을 포함하는 액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출을 억제하기 위한, N-아세틸시스테인을 포함하는 제이며, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지가 1 내지 40mM의 N-아세틸시스테인을 포함하는, 제.

청구항 58

L-시스테인을 포함하는 액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출을 억제하기 위한, N-아세틸시스테인을 포함하는 제이며, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지에 있어서의 N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0인, 제.

청구항 59

제51항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지가 15 내지 30mM의 L-시스테인을 포함하는, 제.

청구항 60

제51항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지가 2 내지 10mM의 N-아세틸시스테인을 포함하는, 제.

청구항 61

제51항, 제53항, 제55항 및 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지에 있어서의 N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0인, 제.

청구항 62

제51항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지에 있어서의 N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.1 내지 0.4인, 제.

청구항 63

제51항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지의 pH가 5.0 내지 9.0인, 제.

청구항 64

제51항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지의 pH가 6.5 내지 7.6인, 제.

청구항 65

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 기재된 피드 배지 또는 제11항 내지 제20항 중 어느 한 항에 기재된 분말 배지를 조제하기 위한, N-아세틸시스테인 및 L-시스테인을 포함하는 배지 첨가물.

청구항 66

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 기재된 피드 배지 또는 제11항 내지 제20항 중 어느 한 항에 기재된 분말 배지를 조제하기 위한, N-아세틸시스테인을 포함하는 배지 첨가물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 배지에 관한 것이다. 또한, 본 발명은, 배지에 있어서 세포를 배양하기 위한 방법 또는 제조합 단백질질을 제조하기 위한 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 배지의 안정성을 향상시키기 위한 방법 또는 제에도 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세포 배양에 사용하는 배지는, 종종 물리적, 화학적으로 불안정하고, 조제 중, 보존 중 및/또는 세포 배양 중에 성분이 변화되고, 세포 배양의 프로세스에 악영향을 미치는 경우가 있다. 따라서, 특히 산업 규모에서 세포를 배양하는 경우, 생산성을 향상시키고, 생산 비용을 저감하기 위해서는, 높은 안정성을 갖는 배지를 개발하는 것이 중요하다.

[0003] 안정성이 높은 배지를 개발하는 것은, 특히 제조합 단백질을 사용한 제품의 생산성을 향상시키는 데 있어서, 중요하다. 예를 들어 제조합 단백질을 사용한 항체 의약의 경우, 안정성이 높은 배지를 사용함으로써, 높은 사회적 수요가 있는 항체 의약을 보다 안정적으로, 또한 보다 저렴하게, 제조하는 것이 가능해진다. 또한, 막대한 시간과 비용을 요하는 항체 의약의 연구 개발을, 보다 효율적으로 행하는 것도 가능해진다.

[0004] 배지를 개선하는 많은 시도가, 보고되어 있다. 예를 들어, 일본 특허 공표 제2000-507812호 공보에는, 배양물 중 조혈 세포의 증식을 지지하는 배지에 유용한, 안정된 배지 보충 성분이 기재되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 일본 특허 공표 제2000-507812호 공보

발명의 내용

[0006] 본 발명은 높은 안정성을 갖는 배지를 제공할 수 있다.

[0007] 즉, 본 발명에 따르면, 이하에 나타내는 양태가 제공된다.

[0008] [1] 10 내지 40mM의 L-시스테인 및 1 내지 40mM의 N-아세틸시스테인을 포함하는, 피드 배지.

[0009] [2] L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하고, N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0인, 피드 배지.

[0010] [3] 15 내지 30mM의 L-시스테인을 포함하는, [1] 또는 [2]에 기재된 피드 배지.

[0011] [4] 2 내지 10mM의 N-아세틸시스테인을 포함하는, [1] 내지 [3]의 어느 것에 기재된 피드 배지.

[0012] [5] N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이, 0.04 내지 1.0인, [1] 내지 [4]의 어느 것에 기재된 피드 배지.

[0013] [6] N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이, 0.1 내지 0.4인, [1] 내지 [5]의 어느 것에 기재된 피드 배지.

[0014] [7] pH가 5.0 내지 9.0인, [1] 내지 [6]의 어느 것에 기재된 피드 배지.

[0015] [8] pH가 6.5 내지 7.6인, [1] 내지 [7]의 어느 것에 기재된 피드 배지.

[0016] [9] 무혈청 배지 및/또는 동물성 단백질 불함유 배지인, [1] 내지 [8]의 어느 것에 기재된 피드 배지.

[0017] [10] 합성 배지인, [1] 내지 [9]의 어느 것에 기재된 피드 배지.

[0018] [11] 10 내지 40mM의 L-시스테인 및 1 내지 40mM의 N-아세틸시스테인을 포함하는 피드 배지의 조제를 위한, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 분말 배지.

- [0019] [12] N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0인 피드 배지의 조제를 위한, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 분말 배지.
- [0020] [13] 피드 배지가 15 내지 30mM의 L-시스테인을 포함하는, [11] 또는 [12]에 기재된 분말 배지.
- [0021] [14] 피드 배지가 2 내지 10mM의 N-아세틸시스테인을 포함하는, [11] 내지 [13]의 어느 것에 기재된 분말 배지.
- [0022] [15] 피드 배지 중의 N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0인, [11] 내지 [14]의 어느 것에 기재된 분말 배지.
- [0023] [16] 피드 배지 중의 N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.1 내지 0.4인 [11] 내지 [15]의 어느 것에 기재된 분말 배지.
- [0024] [17] 피드 배지의 pH가 5.0 내지 9.0인 [11] 내지 [16]의 어느 것에 기재된 분말 배지.
- [0025] [18] 피드 배지의 pH가 6.5 내지 7.6인, [11] 내지 [17]의 어느 것에 기재된 분말 배지.
- [0026] [19] 피드 배지가 무혈청 배지 및/또는 동물성 단백질 불함유 배지인, [11] 내지 [18]의 어느 것에 기재된 분말 배지.
- [0027] [20] 피드 배지가 합성 배지인, [11] 내지 [19]의 어느 것에 기재된 분말 배지.
- [0028] [21] 세포를 배양하는 배지에 [1] 내지 [10]의 어느 것에 기재된 피드 배지를 첨가하는 것을 포함하는, 세포를 배양하기 위한 방법.
- [0029] [22] 세포가 동물 세포, 식물 세포, 세균 세포, 또는 진균 세포인, [21]에 기재된 방법.
- [0030] [23] 세포가 동물 세포인, [21] 또는 [22]에 기재된 방법.
- [0031] [24] 세포가 포유 동물 세포인, [21] 내지 [23]의 어느 것에 기재된 방법.
- [0032] [25] 세포가 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포인, [21] 내지 [24]의 어느 것에 기재된 방법.
- [0033] [26] 세포가 재조합 단백질을 발현하는, [21] 내지 [25]의 어느 것에 기재된 방법.
- [0034] [27] 재조합 단백질이 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, [21] 내지 [26]의 어느 것에 기재된 방법.
- [0035] [28] 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 IgG 유래인, [27]에 기재된 방법.
- [0036] [29] 열부하에 의한 배지 성분의 석출이 없는, [21] 내지 [28]의 어느 것에 기재된 방법.
- [0037] [30] 재조합 단백질 산생능을 갖는 세포를 배양하는 배지에 [1] 내지 [10]의 어느 것에 기재된 피드 배지를 첨가하는 것을 포함하는, 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법.
- [0038] [31] 세포가 동물 세포, 식물 세포, 세균 세포, 또는 진균 세포인, [30]에 기재된 방법.
- [0039] [32] 세포가 동물 세포인, [30] 또는 [31]에 기재된 방법.
- [0040] [33] 세포가 포유 동물 세포인, [30]로부터 [32]의 어느 것에 기재된 방법.
- [0041] [34] 세포가 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포인, [30]로부터 [33]의 어느 것에 기재된 방법.
- [0042] [35] 재조합 단백질이 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는, [30] 내지 [34]의 어느 것에 기재된 방법.
- [0043] [36] 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 IgG 유래인, [35]에 기재된 방법.
- [0044] [37] 열부하에 의한 배지 성분의 석출이 없는, [30] 내지 [36]의 어느 것에 기재된 방법.
- [0045] [38] 액체 배지의 안정성을 향상시키기 위한 방법이며, L-시스테인의 농도가 10 내지 40mM, N-아세틸시스테인의 농도가 1 내지 40mM이 되도록, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, 방법.
- [0046] [39] 액체 배지의 안정성을 향상시키기 위한 방법이며, N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0이 되도록, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, 방법.
- [0047] [40] 액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출을 억제하기 위한 방법이며, L-시스테인의 농도가 10 내지 40mM, N-아세틸시스테인의 농도가 1 내지 40mM이 되도록, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

- [0048] [41] 액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출을 억제하기 위한 방법이며, N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0이 되도록, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, 방법.
- [0049] [42] L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, [38] 내지 [41]의 어느 것에 기재된 방법.
- [0050] [43] 액체 배지가 10 내지 40mM의 L-시스테인을 포함하고, 상기 방법이 N-아세틸시스테인의 농도가 1 내지 40mM이 되도록 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, [38] 내지 [41]의 어느 것에 기재된 방법.
- [0051] [44] 액체 배지가 1 내지 40mM의 N-아세틸시스테인을 포함하고, 상기 방법이 L-시스테인의 농도가 10 내지 40mM이 되도록 L-시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, [38] 내지 [41]의 어느 것에 기재된 방법.
- [0052] [45] L-시스테인의 농도가 15 내지 30mM이 되도록, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, [38] 내지 [44]의 어느 것에 기재된 방법.
- [0053] [46] N-아세틸시스테인의 농도가 2 내지 10mM이 되도록 L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, [38] 내지 [45]의 어느 것에 기재된 방법.
- [0054] [47] N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0이 되도록 L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, [38] 내지 [46]의 어느 것에 기재된 방법.
- [0055] [48] N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.1 내지 0.4가 되도록 L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, [38] 내지 [47]의 어느 것에 기재된 방법.
- [0056] [49] 액체 배지의 pH가 5.0 내지 9.0이 되도록 L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, [38] 내지 [48]의 어느 것에 기재된 방법.
- [0057] [50] 액체 배지의 pH가 6.5 내지 7.6이 되도록 L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, [38] 내지 [49]의 어느 것에 기재된 방법.
- [0058] [51] 액체 배지의 안정성을 향상시키기 위한, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 제이며, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지가 10 내지 40mM의 L-시스테인 및 1 내지 40mM의 N-아세틸시스테인을 포함하는, 제.
- [0059] [52] 액체 배지의 안정성을 향상시키기 위한, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 제이며, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지에 있어서의 N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0인, 제.
- [0060] [53] 10 내지 40mM의 L-시스테인을 포함하는 액체 배지의 안정성을 향상시키기 위한, N-아세틸시스테인을 포함하는 제이며, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지가 1 내지 40mM의 N-아세틸시스테인을 포함하는, 제.
- [0061] [54] L-시스테인을 포함하는 액체 배지의 안정성을 향상시키기 위한, N-아세틸시스테인을 포함하는 제이며, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지에 있어서의 N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0인, 제.
- [0062] [55] 액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출을 억제하기 위한, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 제이며, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지가 10 내지 40mM의 L-시스테인 및 1 내지 40mM의 N-아세틸시스테인을 포함하는, 제.
- [0063] [56] 액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출을 억제하기 위한, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 제이며, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지에 있어서의 N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0인, 제.
- [0064] [57] 10 내지 40mM의 L-시스테인을 포함하는 액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출을 억제하기 위한, N-아세틸시스테인을 포함하는 제이며, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지가 1 내지 40mM의 N-아세틸시스테인을 포함하는, 제.
- [0065] [58] L-시스테인을 포함하는 액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출을 억제하기 위한, N-아세틸시스테인을 포함하는 제이며, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지에 있어서의 N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0인, 제.

- [0066] [59] 상기 제를 첨가 후의 액체 배지가 15 내지 30mM의 L-시스테인을 포함하는, [51] 내지 [58]의 어느 것에 기재된 제.
- [0067] [60] 상기 제를 첨가 후의 액체 배지가 2 내지 10mM의 N-아세틸시스테인을 포함하는, [51] 내지 [59]의 어느 것에 기재된 제.
- [0068] [61] 상기 제를 첨가 후의 액체 배지에 있어서의 N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.04 내지 1.0인, [51] 내지 [60]의 어느 것에 기재된 제.
- [0069] [62] 상기 제를 첨가 후의 액체 배지에 있어서의 N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이 0.1 내지 0.4인, [51] 내지 [61]의 어느 것에 기재된 제.
- [0070] [63] 상기 제를 첨가 후의 액체 배지의 pH가 5.0 내지 9.0인, [51] 내지 [62]의 어느 것에 기재된 제.
- [0071] [64] 상기 제를 첨가 후의 액체 배지의 pH가 6.5 내지 7.6인, [51] 내지 [63]의 어느 것에 기재된 제.
- [0072] [65] [1] 내지 [10]의 어느 것에 기재된 피드 배지 또는 [11] 내지 [20]의 어느 것에 기재된 분말 배지를 조제하기 위한, N-아세틸시스테인 및 L-시스테인을 포함하는 배지 첨가물.
- [0073] [66] [1] 내지 [10]의 어느 것에 기재된 피드 배지 또는 [11] 내지 [20]의 어느 것에 기재된 분말 배지를 조제하기 위한, N-아세틸시스테인을 포함하는 배지 첨가물.
- [0074] 본 발명은, 배지의 안정성을 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0075] 도 1은, 액체 배지에 있어서의 L-시스테인, 시스틴, N-아세틸시스테인, N-아세틸시스틴 및 N,N'-디아세틸시스틴의 농도의 경시적 변화를 나타내는 그래프이다.
- 도 2는, L-시스테인을 포함하는 배지에 있어서의 배지 성분의 석출에 미치는, N-아세틸시스테인의 영향을 나타내는 사진이다.
- 도 3은, L-시스테인을 포함하는 배지에 있어서의 생세포 밀도에 미치는, N-아세틸시스테인의 영향을 나타내는 그래프이다. 배양 개시 9 및 14일째의 생세포 밀도를 나타낸다.
- 도 4는, L-시스테인을 포함하는 배지에 있어서의 항체 산생량에 미치는, N-아세틸시스테인의 영향을 나타내는 그래프이다. 배양 개시 7, 9, 11 및 14일째의 항체 산생량을 나타낸다.
- 도 5는, 배지에 있어서의 항체 산생량에 미치는, L-시스테인 농도의 영향을 나타내는 그래프이다. 배양 개시 14일째의 항체 산생량의 상대값을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0076] [용어의 설명]
- [0077] 본 개시에 있어서의 각 용어는, 특기가 없는 한, 이하에 나타내는 의미를 갖는다.
- [0078] 본 개시에 있어서의 「세포 배양 배지」는, 세포를 증식 또는 유지하기 위하여 사용되는, 세포의 생육 환경을 제공하는 것을 가리킨다. 세포 배양 배지는, 전형적으로는, 세포의 증식이나 생존에 필수적인 성분이나 유용한 성분을 포함한다.
- [0079] 본 개시에 있어서의 「피드 배지」는, 세포 배양 프로세스 개시 후, 세포 배양 중인 배지에 추가로 첨가하는 성분을 의미한다.
- [0080] 피드 배지는, 전형적으로는, 세포의 증식이나 생존을 달성함에 있어서 필수적인 성분이나 유용한 성분을 포함한다. 피드 배지는, 이들 성분 중의 하나만으로 이루어지는 것이어도, 복수의 성분을 포함하는 조성물이어도 된다. 예를 들어, 본 개시에 있어서의, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인만을 포함하는 액체도, 피드 배지에 포함된다. 피드 배지는, 세포 배양 배지의 성분(예를 들어, 당(글루코오스), 아미노산 등)을 포함하고 있어도 된다. 또한, 「배지」라는 표현은, 세포 배양 배지의 의미로 사용되는 것도, 피드 배지의 의미로 사용되는 것도 있고, 그 양쪽의 의미를 포함한다.
- [0081] 피드 배지는, 전형적으로는, 페드 배지 배양법(유가 배양법)에 의한 세포 배양에 있어서 사용된다. 페드 배지

배양법은, 배양 프로세스 개시 시에 세포 배양을 위한 전체 성분(세포 및 전체 영양원을 포함한다)을 포함하는 기초 배지를 배양 용기에 공급하고, 그 후, 피드 배지를 연속적으로 또는 단계적으로 배양 용기에 첨가하는 배양법이다. 여기서, 기초 배지는, 세포 배양 프로세스 개시 시부터 사용하는 배지이고, 기초 배지로서 사용 가능한 배지라면, 특별히 한정되지 않고, 기초 배지로서 사용할 수 있다.

- [0082] 피드 배지는, 일반적으로, 액체 배지 또는 분말 배지의 형태로 제공, 판매된다. 피드 배지의 보존에는, 전형적으로는, 플라스틱 보틀이나 스테인리스 탱크가 사용되지만, 이들에 한정되지 않는다.
- [0083] 피드 배지를 배양 용기에 첨가하는 시기는, 특별히 한정되는 것은 아니고, 예를 들어 세포 배양의 개시 시, 유도기, 대수 증식기, 정지기 및/또는 사멸기이면 된다. 또한, 피드 배지는, 다른 배양법, 예를 들어 연속 배양법에 있어서 사용되어도 된다. 연속 배양법은, 관류 배양법이라고도 하고, 일정한 속도로 배양 용기에 추가의 배지(피드 배지 등)를 공급하고, 동시에 동량의 배양액을 배양 용기로부터 발취하는 배양법이다.
- [0084] 세포의 증식이나 생존에 필수적인 성분이나 유용한 성분의 비한정의 예로서, 예를 들어 당류(예를 들어, 글루코오스) 등의 탄수화물, 지질, 핵산, 비타민(예를 들어, 티아민), 필수 및 비필수 아미노산, 암모늄염, 질산염, 미네랄(예를 들어, 인, 황, 칼륨, 마그네슘, 철, 마그네슘 및 그것들의 염), 미량 금속(예를 들어, 코발트, 구리, 아연, 니켈 및 그것들의 염), 혈청 및 그의 대체물, 동물성 단백질, 동물 유래 성분(예를 들어, 가수 분해물), 식물성 단백질, 식물 유래 성분(예를 들어, 가수 분해물), 미생물성 단백질, 미생물 유래 성분, (예를 들어, 가수 분해물), 영양/증식 인자, 호르몬, 효소 보조 인자, pH 완충제, 염화나트륨, 염화칼슘, 항생제, 보존제(예를 들어, 항산화제) 그리고 pH 지시약(예를 들어, 페놀레드)을 들 수 있다.
- [0085] 필수 및 비필수 아미노산의 비한정적인 예로서, 알라닌, 시스테인, 아스파르트산, 글루탐산, 페닐알라닌, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 리신, 류신, 메티오닌, 아스파라긴, 프롤린, 글루타민, 아르기닌, 세린, 트레오닌, 발린, 트립토판, 티로신, 시스틴, 히드록시프롤린, 티록신, 포스포세린, 데스모신, β -알라닌, 사르코신, 오르니틴, 시트룰린 및 γ -아미노부티르산 그리고 그것들의 염, 그리고 그것들의 수화물을 들 수 있다.
- [0086] 배지에 있어서의 필수 및 비필수 아미노산의 농도는, 배양의 목적이나 세포에 따라, 적절히 선택된다. 배지가 액체 배지이고, 또한 피드 배지로서 사용되는 경우, 배지가 포함하는 필수 및 비필수 아미노산의 총 농도는, 전형적으로는 10 내지 1000mM이다.
- [0087] pH 완충제의 비한정적인 예로서, 탄산나트륨 완충제, 탄산칼륨 완충제, 인산나트륨 완충제, 인산 완충제, 트리스히드록시메틸아미노메탄 완충제, 시트라산 완충제 및 기타 완충제(예를 들어, HEPES 완충제 및 MES 완충제)를 들 수 있다. 배지가 pH 완충제를 포함하는 경우, pH 완충제의 농도는, 전형적으로는 10 내지 500mM이다.
- [0088] 배지는, 배양하는 세포나 목적에 따라, 상업적으로 입수 가능한 배지나 문헌에 기재된 공지된 배지로부터 적절히 선택할 수 있다. 배양의 목적이나 세포에 따라서 조성을 변경하거나, 제나 배지 첨가물을 배지에 첨가하거나, 2종류 이상의 배지를 혼합하여 사용하거나 해도 된다. 또한, 세포 배양 중에, 추가의 배지, 제 및/또는 배지 첨가물을 배지에 첨가해도 된다.
- [0089] 배지는, 합성 배지이면 된다. 또한, 배지는, 무혈청 배지여도 되고, 동물성 단백질 불함유 배지여도 된다. 또한, 배지는, 액체 배지 또는 분말 배지여도 된다.
- [0090] 상업적으로 이용 가능한 배지의 비한정적인 예로서, 둘베코 개변 이글 배지(DMEM), DME/F12, 이글의 최소 필수 배지(MEM), 기본 배지 이글(BME), F-10 배지, F-12 배지, α 최소 필수 배지(α -MEM), 글래스고 최소 필수 배지(G-MEM), PF CHO 배지, 이스코프 개변 둘베코 배지, AmpliCHO CD 배지, DynamisTM 배지, EX-CELLTM AdvancedTM CHO 유가 배지, CD FortiCHOTM 배지, CP OptiCHOTM, BalanCDTM CHO 증식 A 배지, ActiProTM, RPMI-1640(Roswell Park Memorial Institute 1640) 배지, CELLiSTTM Basal Media(BASAL3, BASAL10) 및 Feed Media(FEED2), HyCloneTM Cell BoostTM 7a Supplement, CellventoTM Feed-200, CellventoTM Feed-210, CellventoTM Feed-220 그리고 CellventoTM 4CHO COMP BalanCD CHO Feed 4를 들 수 있다. 이들의 배지는, 세포 배양 배지로서도, 피드 배지로서도 사용된다. 또한, 이들의 배지는, 액체 배지 및/또는 분말 배지의 형태로 제공, 판매된다.
- [0091] 본 개시에 있어서의 「합성 배지」는, 화학적으로 정의된 성분만으로 조제된 배지를 가리킨다. 합성 배지는, 전형적으로는, 혈청 및 그의 대체물, 미정제의 동물성 단백질, 미정제의 동물 유래 성분(예를 들어, 가수 분해물), 미정제의 식물성 단백질, 미정제의 식물 유래 성분(예를 들어, 가수 분해물), 미정제의 미생물성 단백 그

리고 미정제의 미생물 유래 성분(예를 들어, 가수 분해물)이 첨가되어 있지 않은 배지이다.

- [0092] 본 개시에 있어서의 「무혈청 배지」는, 무조정 또는 미정제의 혈청을 포함하지 않는 배지를 가리킨다. 정제된 혈액 유래 성분이나 동물 조직 유래 성분(예를 들어, 증식 인자)이 혼입되어 있는 배지도, 무조정 또는 미정제의 혈청을 포함하지 않는 한, 무혈청 배지에 포함된다.
- [0093] 본 개시에 있어서의 「동물성 단백질 불함유 배지」는, 동물성 단백질(예를 들어, 알부민, 트랜스페린, 인슐린 및 성장 인자 등의 동물 유래의 단백질)을 포함하지 않는 배지를 가리킨다. 동물성 단백질 불함유 배지는, 소 펩티드 및/또는 올리고펩티드를 포함하고 있어도 된다.
- [0094] 본 개시에 있어서의 「분말 배지」는, 분말 형태의 배지를 가리킨다. 분말 배지에는, 과립 형태의 배지도 포함된다. 또한, 분말 배지에는, 건조 배지도 포함된다. 분말 배지는, 적절한 용매(예를 들어, 물)에 용해되고, 액체 배지로 할 수 있다. 본 개시에 있어서의 임의의 배지를, 분말 배지의 형태로 조제하고, 또한 제공할 수 있다.
- [0095] 본 개시에 있어서의 「액체 배지」는, 액체 형태의 배지를 가리킨다. 본 개시에 있어서의 임의의 배지를, 액체 배지의 형태로 조제하고, 또한 제공할 수 있다. 또한, 액체 배지는, 본 개시에 있어서의 임의의 분말 배지를 적절한 용매(예를 들어, 물)에 용해함으로써, 조제할 수 있다. 액체 배지는, 피드 배지로서 사용할 수 있다.
- [0096] 본 개시에 있어서의 「제조합 단백질」은, 임의의 유전자 제조합 기술을 사용하여 제조된 임의의 길이의 아미노산 폴리머를 가리킨다. 폴리머는, 직쇄상이어도 분지상이어도 되고, 수식 아미노산을 포함하고 있어도 되고, 아미노산 이외의 성분을 포함하고 있어도 된다. 또한, 제조합 단백질은, 디설피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 아미드화, 보호기 등에 의한 유도체화, 절단 또는 표지 성분(예를 들어, 방사성 동위체) 혹은 약물(예를 들어, 독소, 세포 상해성 약물 또는 방사성 동위체)과의 결합 등의 화학적 또는 생물학적 수식을 받고 있어도 된다. 제조합 단백질 부분을 그의 구조의 일부에 포함하는 분자는 모두, 본 개시에 있어서의 제조합 단백질에 포함된다. 유전자 제조합 기술은, 유전자를 인공적으로 조작하는 기술이면 특별히 한정되는 것은 아니지만, 전형적인 예로서, 제조합 단백질을 코딩하는 핵산의 숙주 세포로의 도입 기술을 들 수 있다.
- [0097] 제조합 단백질의 비한정적인 예로서, 유전자 제조합 기술을 사용하여 제조되는 항체 및 그의 항원 결합 단편, 항체 미메틱, 이뮤노아드헤신, 효소, 호르몬, 사이토카인, 응고 인자(또는 혈액 응고 관련 단백질), 세포의 단백질 그리고 막 단백질을 들 수 있다. 이들의 제조합 단백질은, 주로, 의약, 농약, 식품 및 기타 화학 공업 분야에서 사용되지만, 특정한 용도에 한정되는 것은 아니다.
- [0098] 본 개시에 있어서의 「항체」는, 항원과의 결합성을 갖는 면역 글로불린 분자를 가리킨다. 항체에는, 경쇄와 중쇄를 포함하는 폴리펩티드쇄를 갖는 전체 길이 항체 및 그의 단편(예를 들어, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 및 VHII 프래그먼트)이 포함된다. 항체는, 중쇄 및/또는 경쇄를 포함해도 된다. 중쇄 및/또는 경쇄는, 가변 영역(항원에 대한 인식 및 결합에 관계된다)과 정상 영역(국재화 및 세포 간 상호 작용에 관계된다)을 포함해도 된다. 가장 일반적인 전체 길이 항체는, 2군데의 중쇄 정상 영역(CH), 2군데의 중쇄 가변 영역(VH), 2군데의 경쇄 정상 영역(CL) 및 2군데의 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다. 가변 영역은, 항원 특이성을 항체에 부여하는 배열인 상보성 결정 영역(CDR)과 프레임워크 영역(FR)을 포함한다.
- [0099] 항체에는, 모노클로날 항체, 2종류 이상의 항체 또는 항원 결합 부위로 형성되는 다중 특이성 항체(예를 들어 이중 특이성 항체), 원하는 생물학적 활성을 갖는 항체 단편 및 항체의 항원 결합 부위를 포함하는 융합 단백질이 포함된다. 또한, 항체에는, 키메라 항체, 포유 동물 항체(예를 들어, 인간 항체), 포유 동물화 항체(예를 들어, 인간화 항체), 다가 항체 및 개변 항체가 포함된다.
- [0100] 항체는, 어느 클래스(예를 들어, IgG, IgA, IgM, IgD, IgE)여도 되고, 또한, 어느 서브클래스(아이소타입)여도 된다.
- [0101] 항체는, 다른 분자(예를 들어, 저분자 혹은 고분자의 독소(세포 상해성 약물) 또는 방사성 동위체)와 결합하는 등의, 화학적 또는 생물학적 수식을 받고 있어도 되고, 이들의 수식을 받은 항체도, 본 발명의 항체에 포함된다.
- [0102] 본 개시에 있어서의 「항체 미메틱」은, 항원과 특이적으로 결합할 수 있지만, 항체와 구조적으로 관련되지 않은 단백질을 말한다. 항체 미메틱의 구체적인 예로서, 프로테인 A의 Z 도메인(어피바디; Affibody)을 들 수 있고, 보다 구체적인 예로서, ZHER2 어피바디를 들 수 있다.

- [0103] 효소의 예로서, 알칼리포스파타아제, β -라크타마제, 갈락토시다아제, 글루코시다아제, 글루코세레브로시다아제, 슈퍼옥시디스무타아제 및 DNase를 들 수 있다.
- [0104] 호르몬의 예로서, 레닌, 성장 호르몬(인간 성장 호르몬 또는 소 성장 호르몬 등), 부갑상선 호르몬, 갑상선 자극 호르몬, 칼시토닌, 생식선 자극 호르몬(예를 들어, 난포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬), 글루카곤, 인슐린(인슐린 A쇄 및 인슐린 B쇄) 및 프로인슐린을 들 수 있다.
- [0105] 사이토카인의 예로서, 종양 괴사 인자(예를 들어, TNF- α 및 β), 혈관 내피 증식 인자(VEGF), 뇌 유래 신경 영양 인자(BDNF), 신경 영양 인자(예를 들어, NT-3 내지 NT-6), 신경 성장 인자(NGF), 혈소판 유래 증식 인자(PDGF), 섬유아세포 증식 인자(예를 들어, aFGF, bFGF), 상피 성장 인자(EGF), 형질 전환 증식 인자(예를 들어, TGF- α , TGF- β 1 내지 TGF- β 5), 액티빈(예를 들어, 액티빈 A, 액티빈 C, 액티빈 E), 인슐린 모양 성장 인자(예를 들어, IGF-I, IGF-II), 간세포 증식 인자(HGF), 케라티노사이트 증식 인자, 줄기 세포 인자(SCF), 뼈 형성 단백질(BMP), RANTES, 에리트르포이에틴(EPO), 트롬보포이에틴(TPO), 인터페론- α , - β 및 γ , 콜로니 자극 인자(예를 들어, M-CSF, GM-CSF, G-CSF) 및 인터류킨(예를 들어, IL-1 내지 IL-13)을 들 수 있다.
- [0106] 응고 인자 및 혈액 응고 관련 단백질의 예로서, 제VII 인자, 제VIII 인자, 제VIII C 인자, 제IX 인자, 제X 인자, 제XI 인자, 제XII 인자, 조직 인자, 폰빌레브란트 인자, 프로테인 C, 프로테인 S, 플라스미노겐 활성화 인자(예를 들어, 우로키나아제, 인간 오줌 또는 인간 조직 플라스미노겐 활성화 인자(t-PA)), 트롬빈, 프로트론빈, 트롬보포이에틴, 트롬보모듈린, 안티트론빈 III, 피브리노겐 및 혈청 알부민을 들 수 있다.
- [0107] 세포외 단백질의 예로서, 피브로넥틴, 비트로넥틴, 콜라겐, 오스테오키프톤, 라미닌 및 그것들의 단편을 들 수 있다.
- [0108] 막 단백질의 예로서, 막 수용체 단백질, 막 수송체 단백질, 막 효소 및 세포 접착 인자 그리고 그것들의 단편을 들 수 있다.
- [0109] 재조합 단백질은, 상기의 예에 한정되는 것은 아니고, 예를 들어 상기 사이토카인 등의 수용체, 트랜스페린, 각종 CD 단백질, 종양 관련 항원(예를 들어, HER2, HER3 또는 HER4 수용체, CA125), 백신용 등의 바이러스 항원(예를 들어, 바이러스의 엔벨로프 단백질) 등도, 재조합 단백질에 포함된다. 또한, 상술한 어느 한 단백질을 포함하는 융합 단백질도, 재조합 단백질에 포함된다.
- [0110] 본 개시에 있어서의 「재조합 단백질 산생능을 가진다」란, 유전자 재조합 기술에 의해 단백질을 산생하는 능력을 갖는 것을 의미한다. 산생된 재조합 단백질은, 세포 외(즉, 배지 중)에 분비되어도, 세포 내에 축적되어도 되지만, 바람직하게는 세포 외에 분비된다.
- [0111] 전형적으로는, 재조합 단백질을 코딩하는 핵산을 숙주 세포 내에 도입함으로써, 재조합 단백질을 산생하는 능력을 숙주 세포에 부여할 수 있다. 즉, 전형적인 재조합 단백질 산생능을 갖는 세포는, 재조합 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 세포이다. 핵산을 숙주 세포 내에 도입하는 방법으로서, 다양한 방법이 당해 기술분야에 있어서 알려져 있다. 본 개시에서는, 이들 다양한 방법을 포함하고, 본 발명을 실시하는 시점에서 공지된 방법을 임의로 사용할 수 있다. 이러한 방법의 비한정적인 예로서, 재조합 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 숙주 세포에 도입하는 방법을 들 수 있다. 벡터는, 발현 가능한 형(예를 들어 프로모터, 인핸서, 리보솜 결합 서열 및/또는 전사 종결 서열 등의 조절 서열과 작동 가능하게 연결된 형으로)으로 재조합 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터가 바람직하고, 플라스미드여도 된다.
- [0112] 벡터를 숙주 세포에 도입하는 방법의 비한정적인 예로서, 일렉트로포레이션법, 파티클·암법, 인산칼슘법 또는 리포펙션법에 의해, 물리적 또는 화학적으로 숙주 세포 내에 벡터를 도입하는 방법 및 바이러스 벡터를 숙주 세포에 감염시키는 방법을 들 수 있다. 또한, 숙주 세포 내에 도입된 벡터 내의 핵산은, CRISPR/Cas9 등의 게놈 편집 기술에 의해, 숙주 세포 중의 게놈에 내장되어도 된다. 혹은, 재조합 단백질을 코딩하는 핵산을 숙주 세포 내에 도입하는 대신, CRISPR/Cas9 등의 게놈 편집 기술 등에 의해 게놈 DNA 상의 유전자 서열을 직접 개변하여 목적으로 하는 재조합 단백질을 코딩하도록 하거나, 제어 서열 등을 개변하여 목적으로 하는 내재성 단백질의 산생을 제어해도(예를 들어, 향상시켜도) 된다. 이러한 양태에서 산생되는 단백질도 모두, 본 개시에 있어서의 재조합 단백질에 포함된다.
- [0113] 본 개시에 있어서의 「세포」에는, 동물 세포, 식물 세포, 세균 세포 및 진균 세포가 포함된다. 세포는, 바람직하게는 재조합 단백질의 산생에 적합하게 사용되는 주화 세포이다.
- [0114] 동물 세포는, 임의의 동물 유래의 세포이면 되지만, 바람직하게는 포유 동물(포유류), 조류, 양서류, 어류 또는

곤충류 유래의 세포, 보다 바람직하게는 포유 동물 또는 곤충류 유래의 세포, 가장 바람직하게는 포유 동물 유래의 세포이다.

- [0115] 포유 동물 유래의 세포의 비한정적인 예로서, 인간 또는 원숭이 등의 영장류 유래의 세포나 마우스, 래트 또는 햄스터 등의 설치류 유래의 세포를 들 수 있다.
- [0116] 포유 동물 유래의 세포의 비한정적인 예로서, HL-60(ATCC No.CCL-240), HT-1080(ATCC No.CCL-121), HeLa(ATCC No.CCL-2), 293(ECACC No.85120602), Hep G2(ATCC No.HB8065), VERO(ATCC No.CCL-1651), CV1(ATCC No.CCL70), COS-7(ATCC No.CRL-1651), NIH3T3(ATCC No.CRL-1658), NS0(ATCC No.CRL-1827), 차이나이즈 햄스터 난소(CHO) 세포, BHK21(단순히 BHK 세포라고도 칭해진다. ATCC No.CRL-10) 및 MDCK(ATCC No.CCL-34) 등의 세포주나, 이들의 세포주로부터 유도된 아주(예를 들어, BHK 세포의 아주로서의 BHK TK-세포나, CHO 세포의 아주로서의 CHO-K1 세포, CHO-S 세포, CHO-DXB11 세포(CHO-DUKX 세포 또는 DuxB11 세포라고도 칭해진다) 및 CHO-DG44 세포)를 들 수 있다.
- [0117] 조류 유래의 세포의 비한정적인 예로서, 닭 세포주 SL-29를 들 수 있다. 양서류 유래의 세포의 비한정적인 예로서, 아프리카발톱개구리 난소 세포를 들 수 있다. 어류 유래의 세포 비한정적인 예로서, 제브라피시 세포주 ZF4를 들 수 있다.
- [0118] 곤충류 유래의 세포 비한정적인 예로서, 열대거세미나방(*Spodoptera frugiperda*) 유래의 세포를 들 수 있다. 열대거세미나방 유래의 세포 비한정적인 예로서, Sf9 세포, Sf21 세포 및 SF+ 세포를 들 수 있다.
- [0119] 식물 세포는, 채취한 세포 및/또는 조직이 액체 배양 가능한 것이면 특별히 한정은 없다. 식물 세포의 비한정적인 예로서, 생약류(예를 들어, 사포닌, 알칼로이드류, 베르베린, 스코폴린 또는 식물 스테롤)를 생산하는 식물(예를 들어, 약용 인삼, 일일초, 사리풀, 황련 또는 벨라도나)이나, 화장품·식품 원료가 되는 색소나 다당체(예를 들어, 안토시아닌, 홍화 색소, 꼭두서니 색소, 사프란 색소 또는 플라본류)를 생산하는 식물(예를 들어, 블루베리, 잇꽃, 서양 꼭두서니 또는 사프란) 또는 의약품 원료를 생산하는 식물을 들 수 있다.
- [0120] 세균 세포는, 진정 세균(그램 양성 또는 그람 음성) 또는 고세균의 세포이다. 세균 세포의 비한정적인 예에는, 에스케리키아(*Escherichia*)속의 세균 세포(예를 들어, *Escherichia coli*), 바실러스(*Bacillus*)속의 세균 세포(예를 들어, *Bacillus subtilis*), 슈도모나스(*Pseudomonas*)속의 세균 세포(예를 들어, *Pseudomonas fluorescens*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*)속의 세균 세포 및 락토코커스속의 세균 세포(예를 들어, *Lactococcus lactis*)를 들 수 있다.
- [0121] 진균 세포는, 진핵 생물에 속하는 분화한 세포 소기관과 전형적인 핵을 갖는 대형의 세포이다. 진균 세포의 비한정적인 예에는, 사카로미세스(*Saccharomyces*)속의 진균(예를 들어, *Saccharomyces cerevisiae*), 시조사카로미세스(*Schizosaccharomyces*)속의 진균(예를 들어, *Schizosaccharomyces pombe*) 및 피키아(*Pichia*)속의 진균(예를 들어, *Pichia pastoris*)을 들 수 있다.
- [0122] 본 개시에 있어서의 「L-시스테인」은, 용액(예를 들어, 물, 완충액 또는 배지를 용매로 하는 용액) 중에서 L-시스테인으로서 기능하는 L-시스테인염, L-시스테인의 수화물 및 L-시스테인염의 수화물을 포함한다. 단, L-시스테인의 농도에 대하여 언급하는 경우, 그의 농도는, 용액 중에서 기능하는 L-시스테인의 농도를 의미한다.
- [0123] 용액 중의 L-시스테인의 농도는, 전형적으로는, 그의 용액을 조제한 시점의 L-시스테인의 농도(계산값이 바람직하지만, 조제 직후의 실측값이어도 된다)로 나타낸다. 단, 용액 조제 후의 경시적인 농도 변동에 대하여 언급하는 경우, L-시스테인의 농도는, 용액 조제 후 소정의 시간이 경과한 시점의 L-시스테인의 농도를 의미한다.
- [0124] L-시스테인염의 비한정적인 예로서, L-시스테인염산염, L-시스테인나트륨염 및 L-시스테인암모늄염을 들 수 있다. L-시스테인 수화물의 비한정적인 예로서, L-시스테인염산염 1수화물, L-시스테인나트륨염 1수화물 및 L-시스테인암모늄염 1수화물을 들 수 있다. L-시스테인으로서, L-시스테인, L-시스테인염 및 그것들의 수화물 중의 복수를 조합하여 사용하는 것도 가능하다.
- [0125] 본 개시에 있어서의 「N-아세틸시스테인」은, 용액(예를 들어, 물, 완충액 또는 배지를 용매로 하는 용액) 중에서 N-아세틸시스테인으로서 기능하는, N-아세틸시스테인염, N-아세틸시스테인의 수화물 및 N-아세틸시스테인염의 수화물을 포함한다. 단, N-아세틸시스테인 농도에 대하여 언급하는 경우, 그의 농도는, 용액 중에서 기능하는 N-아세틸시스테인의 농도를 의미한다.
- [0126] N-아세틸시스테인은, L체여도 되고, D체여도 된다. 또한, L체와 D체의 혼합물이어도 된다.

- [0127] 용액 중의 N-아세틸시스테인의 농도는, 전형적으로는, 그의 용액을 조제한 시점의 N-아세틸시스테인의 농도(계산값이 바람직하지만, 조제 직후의 실측값이어도 된다)로 나타낸다. 단, 용액 조제 후의 경시적인 농도 변동에 대하여 언급하는 경우, N-아세틸시스테인의 농도는, 용액 조제 후 소정의 시간이 경과한 시점의 N-아세틸시스테인의 농도를 의미한다.
- [0128] N-아세틸시스테인염의 비한정적인 예로서, N-아세틸시스테인나트륨염 및 N-아세틸시스테인암모늄염을 들 수 있다. L-시스테인 수화물의 비한정적인 예로서, N-아세틸시스테인나트륨염 1수화물 및 N-아세틸시스테인암모늄염 1수화물을 들 수 있다. N-아세틸시스테인으로서, N-아세틸시스테인, N-아세틸시스테인염 및 이들의 수화물 중의 복수를 조합하여 사용하는 것도 가능하다.
- [0129] 본 개시에 있어서의 「열부하」는, 조제 중, 보존 중 및/또는 세포 배양 중의 배지에 부여되는 경우, 배지에 악영향을 미칠 수 있는 온도의 열을 부여하는 것을 말한다. 그러한 악영향의 비한정적인 예로서, 조제 중, 보존 중 및/또는 세포 배양 중인 배지에 있어서의 배지 성분의 석출, 그리고 배지에 있어서 산생되는 재조합 단백질의 수량 및/또는 품질의 저하를 들 수 있다. 배지에 악영향을 미칠 수 있는 온도는, 조제, 보존 및/또는 세포 배양 시의 배지가 통상 취할 수 있는 온도(전형적으로는, 4 내지 40℃)여도 되고, 보다 높은 온도를 포함하는 온도(예를 들어, 4℃ 내지 120℃)여도 된다.
- [0130] 본 개시에 있어서의 「안정성」은, 배지에 대하여 사용되는 경우, 조제 중, 보존 중 및/또는 세포 배양 중에 물리적, 화학적 변화가 발생하지 않는, 또는 발생하기 어려운 성질을 가리킨다. 예를 들어, 배지 중에 있어서의 부생성물(예를 들어, L-시스테인으로부터 생성되는 시스틴)의 생성 속도가 느린 경우나, 배지 성분(예를 들어, 시스틴)이 석출되지 않는 경우 또는 석출할 때까지의 시간(일수 등)이 긴 경우, 그의 배지의 안정성은 높다고 할 수 있다.
- [0131] 본 개시에 있어서의 「배지 첨가물」은, 배지에 첨가되는 임의의 물질 또는 물질을 포함하는 조성물을 가리킨다. 배지 첨가물은, 첨가하는 배지에 이미 존재하는 성분을 보충하는 것이어도, 첨가하는 배지에 존재하지 않는 성분을 신규로 추가하는 것이어도 된다. 배지 첨가물은, 전형적으로는, 액체 형태 또는 분말 형태(파립 형태를 포함한다)로 제공된다. 또한, 첨가의 목적은, 특별히 한정되지 않는다.
- [0132] 본 개시에서 사용되는 단수형 「a」, 「an」 및 「the」는, 별도 명확하게 지시되지 않는 한, 복수의 대상을 포함할 수 있다.
- [0133] 본 개시에서 사용되는 「및/또는」는, 「및」으로 표시되는 관계성과, 「또는」으로 표시되는 관계성의 양쪽을 포함한다. 「및」은, 「또한」 또는 「그리고」라고 표현되는 경우도 있다. 「또는」은, 「혹은」이라고 표현되는 경우도 있다. 본 개시에 있어서의 「을 포함한다」에는, 「로부터 주로 이루어진다」, 「로부터 실질적으로 이루어진다」 및 「이루어진다」가 포함되고, 「로부터 주로 이루어진다」에는 「로부터 실질적으로 이루어진다」 및 「이루어진다」가 포함되고, 「로부터 실질적으로 이루어진다」에는 「이루어진다」가 포함된다.
- [0134] 본 개시에 있어서의 각각의 수치 범위에 대해서는, 「내지」, 「로부터」로 나타낸 상한값 및 하한값을 각각 포함하는 것으로 한다. 예를 들어, 수치 A 및 B를 사용한 「A 내지 B」 또는 「A로부터 B」가 되는 기재는, A 이상 B 이하인 것을 의미한다. 또한, 본 개시에 단계적으로 기재되어 있는 수치 범위에 있어서의 「A 내지 B」, 「A로부터 B」 또는 「A 이상 B 이하」라는 기재는, 독립적으로, 「A 이상이 바람직하다」는 것과 「B 이하가 바람직하다」는 것의 양쪽을 포함하고, 이들의 하한값 또는 상한값을 다른 수치 범위의 상한값 또는 하한값으로 치환해도 된다. 또한, 본 개시에 기재되어 있는 수치 범위의 하한값 또는 상한값은, 그의 수치 범위 내의 수치이며, 실시예로 나타나 있는 수치로 치환해도 된다.
- [0135] [실시 형태]
- [0136] 이하, 발명을 실시하기 위한 형태를 사용하여, 본 발명을 상세하게 설명하지만, 본 발명은 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0137] 이들의 실시 형태는, 단독으로 실시해도, 복수를 조합하여 실시해도 된다. 실시 형태에 있어서의 정의나 상세에 대해서, 상술한 「용어의 설명」을 참조할 수 있다.
- [0138] 본 개시에서 사용되는 공지된 기술 및 수순은, 당업자에게 충분히 이해되는 것이고, 통상법에 따라서 실시할 수 있다.
- [0139] 어떤 실시 형태에서는, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 피드 배지(또는 액체 배지)가 제공된다. 또한, 다른 실시 양태에서는, 피드 배지(또는 액체 배지)을 조제하기 위한 N-아세틸시스테인 및 L-시스테인을

포함하는 분말 배지가 제공된다. 또한, 다른 실시 형태에서는, 피드 배지(또는 액체 배지) 혹은 분말 배지를 조제하기 위한 방법이 제공된다. 또한, 다른 실시 형태에서는, 피드 배지(또는 액체 배지) 혹은 분말 배지를 조제하기 위한 배지 첨가물이 제공된다. 이들의 실시 형태에 있어서, 액체 배지는, 바람직하게는 피드 배지이다.

[0140] 이들의 실시 형태의 액체 배지(이하, 액체 배지의 형태의 피드 배지를 포함한다)에 있어서,

[0141] (1) L-시스테인의 농도는, 1 내지 40mM, 바람직하게는 10 내지 40mM, 10 내지 30mM 또는 15 내지 40mM, 보다 바람직하게는 15 내지 30mM이고, 또한/혹은 N-아세틸시스테인의 농도는, 1 내지 40mM, 바람직하게는 1 내지 30mM, 1 내지 20mM 또는 1 내지 10mM, 보다 바람직하게는 2 내지 10mM이고, 또한/또는

[0142] (2) N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율은, 0.04 내지 2.0, 바람직하게는 0.04 내지 1.0, 0.04 내지 0.4, 0.1 내지 2.0, 0.1 내지 1.0 또는 0.1 내지 0.4, 보다 바람직하게는 0.2 내지 0.4이다.

[0143] 이들 실시 형태에 있어서의 액체 배지는, N-아세틸시스테인을 적합한 농도나 함유비로 포함함으로써, 바람직하게는 L-시스테인으로부터의 시스템의 형성 및/또는 석출이 억제되고, 또한/또는, 안정성이 향상되고 있다. 또한, 이들 실시 형태에 있어서의 액체 배지는, 바람직하게는 배양 세포의 성장 또는 증식에 유리한 고농도의 L-시스테인을 포함한다. 이러한 액체 배지를 사용함으로써, 세포 배양의 프로세스를 안정적으로 실시하는 것이 가능하다. 또한, 바람직하게는 세포 배양에 관한 비용이 삭감된다. 또한, 이러한 액체 배지를 재조합 단백질의 산생에 사용함으로써, 재조합 단백질을 사용한 제품의 생산성을 향상시킬 수 있다. 또한, 바람직하게는 재조합 단백질을 사용한 제품의 제조 비용이 삭감된다. 또한, 바람직하게는 재조합 단백질을 사용한 제품의 연구 개발이, 효율화된다.

[0144] 이들 실시 형태에 있어서의 액체 배지는, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 한에 있어서 특정한 조성에 한정되는 것은 아니고, 임의의 액체 배지를 사용할 수 있다. 액체 배지의 pH는 5.0 내지 9.0이어도 되고, 바람직하게는 6.0 내지 8.0, 보다 바람직하게는 6.5 내지 7.5, 가장 바람직하게는 6.5 내지 7.0이다. 액체 배지는, 무혈청 배지 및/또는 동물성 단백질 불함유 배지여도 된다. 또한, 액체 배지는, 합성 배지여도 된다. 액체 배지는, 라지 스케일 프로세스(예를 들어 500L 스케일의 세포 배양)에서 사용되어도 된다.

[0145] 이들 실시 형태에 있어서의 액체 배지를 재조합 단백질 산생능을 갖는 세포의 배양에 사용하는 경우, 재조합 단백질의 산생능을 향상시킬 수 있다. 즉, 세포 배양에 관한 여러 조건을 최적화한 경우, 전형적으로는, 1 내지 20g/L의 재조합 단백질의 산생이 가능해지고, 바람직하게는 2 내지 16g/L, 보다 바람직하게는 6 내지 14g/L, 더욱 보다 바람직하게는 8 내지 12g/L, 가장 바람직하게는 10 내지 12g/L의 재조합 단백질의 산생이 가능해진다. 또한, 액체 배지의 성분은, 바람직하게는 조제 중, 보존 중 및/또는 세포 배양 중, 열부하에 의해 석출되지 않는다.

[0146] 이들 실시 형태에 있어서의 분말 배지는, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함한다. 분말 배지는, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 한에 있어서, 특정한 조성에 한정되는 것은 아니고, 임의의 분말 배지를 사용할 수 있다. 분말 배지는, 용매(예를 들어, 물)에 용해하여 본 개시의 실시 형태의 액체 배지를 조제하기 위하여 사용할 수 있다. 이 경우, 분말 배지는, 액체 배지에 있어서의 L-시스테인 및 N-아세틸시스테인의 농도를 원하는 농도로 하는 양의 L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함한다. 분말 배지에는, 액체 배지에 있어서의 L-시스테인 및 N-아세틸시스테인의 농도를 원하는 농도로 하도록 희석하기 위한 지시서 또는 웹 사이트 상에서의 설명 등이 부수되어 있어도 된다.

[0147] 분말 배지는, 액체 배지와 비교하여, 일반적으로 취급이 보다 용이하고, 예를 들어 보다 안정적으로 보존, 유통할 수 있는 점에서 유리하다.

[0148] 액체 배지 또는 분말 배지를 조제하기 위한 방법은, L-시스테인, N-아세틸시스테인 및 세포의 증식이나 생존에 필수적인 성분이나 유용한 성분 등을 혼합하고, 본 개시의 실시 형태의 어느 것의 액체 배지 또는 분말 배지를 얻는 것을 포함한다. L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인으로서, 본 개시의 실시 형태의 어느 것의 배지 첨가물이나 제를 사용할 수도 있다. 이 방법에 의하면, 액체 배지 또는 분말 배지를, 당업자가 적절하게 조제할 수 있다.

[0149] 배지 첨가물은, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 포함한다. 배지 첨가물은, 세포 배양 배지 및 피드 배지의 어느 배지에도 첨가되어도 되고, 또한, 양쪽의 배지에 첨가되어도 된다. 배지 첨가물은, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 포함하는 한에 있어서, 특정한 조성에 한정되는 것은 아니고, 임의의 조성의 것을 사용할 수 있다. 배지 첨가물은, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인만으로 이루어져도, 혹은, 담체, pH 조정

제, 배지 등을 포함하는 조성물이어도 된다. 배지 첨가물은, 액체의 형태여도 되고, 고체의 형태, 예를 들어 분말의 형태(과립의 형태를 포함한다)여도 된다.

[0150] 배지 첨가물은, 임의의 액체 배지에 첨가할 수 있다. 이 경우, 배지 첨가물은, 전형적으로는 액체 배지에 있어서의 L-시스테인 및 N-아세틸시스테인의 농도를 원하는 농도로 하는 양의 L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 포함한다. 또한, 배지 첨가물은, 임의의 분말 배지에 첨가할 수 있다. 이 경우, 배지 첨가물은, 전형적으로는 배지 첨가물을 첨가한 분말 배지를 용매(예를 들어, 물)에 용해하여 액체 배지를 조제할 때에 액체 배지에 있어서의 L-시스테인 및 N-아세틸시스테인의 농도를 원하는 농도로 하는 양의 L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 포함한다.

[0151] 또한, 배지 첨가물에는, 액체 배지에 있어서의 L-시스테인 및 N-아세틸시스테인의 농도를 원하는 농도로 하도록 희석하기 위한 지시서 또는 웹 사이트 상에서의 설명 등이 부수되어 있어도 된다.

[0152] 배지 첨가물을 첨가함으로써, 본 개시의 실시 형태의 액체 배지 또는 분말 배지를 얻을 수 있다.

[0153] 배지 첨가물은, 액체 배지 또는 분말 배지를 조제하는 것을 그의 용도로 한다. 용도는, 바람직하게는 배지 첨가물의 판매용 팜플렛, 사용 설명서 등에 기재된다. 이 경우, 용도는, 배지 첨가물의 효과로서 기재될 수도 있다.

[0154] 어떤 실시 형태에서는, 세포를 배양하는 배지에, 본 개시의 실시 형태의 액체 배지를 첨가하는 것을 포함하는, 세포를 배양하기 위한 방법이 제공된다. 또한, 다른 실시 양태에서는, 재조합 단백질 산생능을 갖는 세포를 배양하는 배지에, 본 개시의 실시 형태의 액체 배지를 첨가하는 것을 포함하는, 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법이 제공된다.

[0155] 세포를 배양하는 배지는, 전형적으로는, 세포 배양 중인 배양 용기에 가득 채워져 있는 배지이다. 또한, 세포를 배양하는 배지는, 전형적으로는, 기초 배지 또는 피드 배지를 첨가한 기초 배지이다. 세포를 배양하는 배지 및 피드 배지로서, 각각, 본 개시의 실시 형태의 어느 것의 액체 배지(분말 배지로부터 조제한 액체 배지 및 배지 첨가물을 첨가한 액체 배지를 포함한다)를 사용할 수 있다. 세포를 배양하는 배지에 첨가하는 액체 배지는, 전형적으로는 피드 배지이다.

[0156] 세포를 배양하기 위한 방법은, 안정성이 향상된 배지 그리고/또는 시스틴의 형성 및/또는 석출이 억제되어 있는 배지를 사용함으로써, 바람직하게는 세포 배양을 안정적으로 실시하는 것을 가능하게 한다. 또한, 세포를 배양하기 위한 방법은, 바람직하게는 배양에 관한 비용을 삭감한다.

[0157] 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법은, 안정성이 향상된 배지 그리고/또는 시스틴의 형성 및/또는 석출이 억제되어 있는 배지를 사용함으로써, 재조합 단백질을 사용한 제품의 생산성을 향상시킬 수 있다. 또한, 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법은, 바람직하게는 재조합 단백질을 사용한 제품의 제조 비용을 삭감한다. 또한, 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법은, 바람직하게는 재조합 단백질을 사용한 제품의 연구 개발의 효율화에 공헌한다.

[0158] 세포는 동물 세포, 식물 세포, 세균 세포 또는 진균 세포, 바람직하게는 동물 세포, 보다 바람직하게는 포유 세포, 더욱 보다 바람직하게는 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포여도 된다. 또한, 세포는 단백질을 발현해도 된다. 단백질은, 전형적으로는, 재조합 단백질이다. 재조합 단백질은, 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함해도 된다. 항체 또는 그의 항원 결합 단편은, IgG 유래여도 된다.

[0159] 세포를 배양하는 배지에 액체 배지를 첨가하는 횟수는, 특별히 한정되는 것은 아니고, 1회여도, 복수회여도 된다. 세포를 배양하는 배지에 액체 배지를 첨가하는 시기도, 특별히 한정되는 것은 아니고, 배양 개시 전, 배양 개시 시 및 배양 개시 후 중의 어느 시기여도, 그의 복수의 시기여도 된다. 또한, 액체 배지는, 세포를 배양하는 세포에, 연속적으로 첨가되어도 되고, 단계적으로 첨가되어도 된다. 또한, 액체 배지는, 세포를 배양하는 배지에, 단독으로 첨가되어도 되고, 다른 배지, 제 또는 배지 첨가물과 함께 첨가되어도 된다. 또한, 액체 배지를 첨가할 때, 동시에 동량의 배양액이, 발취되어도 된다.

[0160] 세포를 배양하는 배지에 첨가하는 액체 배지의 양은, 전형적으로는 세포를 배양하는 배지의 양의 1 내지 20%이고, 바람직하게는 2 내지 10%이다. 액체 배지를 첨가 후의 세포를 배양하는 배지에 있어서의 L-시스테인의 농도는, 전형적으로는 0.01 내지 8mM이고, 바람직하게는 0.02 내지 4mM이다. 액체 배지를 첨가 후의 세포를 배양하는 배지에 있어서의 N-아세틸시스테인 농도는, 전형적으로는 0.01 내지 8mM이고, 바람직하게는 0.02 내지 4mM이다.

- [0161] 세포를 배양하기 위한 방법 및 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법은, 라지 스케일 프로세스(예를 들어 500L 스케일의 세포 배양)로 사용되어도 된다.
- [0162] 세포를 배양하기 위한 방법은, 배지를 조제하는 것을 포함해도 된다. 또한, 세포를 배양하기 위한 방법은, 세포를 배양하는 것을 포함해도 된다. 세포를 배양하기 위한 방법은, 전형적으로는 페드배지 배양법을 따르지만, 다른 배양법(예를 들어, 연속 배양법)을 따라도 된다.
- [0163] 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법은, 배지를 조제하는 것을 포함해도 된다. 또한, 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법은, 세포를 배양하는 것을 포함해도 된다. 또한, 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법은, 재조합 단백질을 산생하는 것을 포함해도 된다. 또한, 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법은, 산생된 재조합 단백질을 회수하는 것을 포함해도 된다. 또한, 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법은, 그 밖의 추가 공정을 포함해도 된다. 추가적인 공정의 비한정의 예로서, 재조합 단백질을 정제하는 것이나, 재조합 단백질을 화학적 또는 생물학적으로 수식하는 것을 들 수 있다. 재조합 단백질의 정제에는, 통상 복수의 방법이 조합되어 사용되지만, 크로마토그래피가 적합하게 사용된다. 특히 재조합 단백질이 항체인 경우, 친화성 크로마토그래피나 프로테인 A 크로마토그래피 등이 적합하게 사용된다.
- [0164] 재조합 단백질의 화학적 또는 생물학적인 수식의 비한정적인 예로서, 디설피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 아마이드화, 보호기 등에 의한 유도체화, 절단 또는 표지 성분 혹은 약물(독소 등) 등과의 결합을 들 수 있다. 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법에는, 독소 등의 약물과 결합한 항체의 제조 방법도 포함된다. 이 경우, 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법은, 추가 공정으로서, 항체와 약물을 결합시키는 것을 더 포함하고 있어도 된다. 약물과 결합한 항체는, 본 개시의 재조합 단백질에 포함된다.
- [0165] 본 개시의 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법에 의하면, 높은 산생량의 재조합 단백질을 제조할 수 있다. 즉, 본 개시의 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법에 의하면, 배양에 관한 조건을 최적화한 경우, 전형적으로는 1 내지 20g/L의 재조합 단백질의 산생이 가능해지고, 바람직하게는 2 내지 16g/L, 보다 바람직하게는 6 내지 14g/L, 더욱 보다 바람직하게는 8 내지 12g/L, 가장 바람직하게는 10 내지 12g/L의 재조합 단백질의 산생이 가능해진다. 또한, 본 개시의 재조합 단백질을 제조하기 위한 방법에 의하면, 액체 배지의 배지 성분은, 바람직하게는 조제 중, 보존 중 및/또는 세포 배양 중, 열부하에 의해 석출되지 않는다.
- [0166] 어떤 실시 형태에서는, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, 액체 배지(또는 피드 배지)의 안정성을 향상시키기 위한 방법 또는 제가 제공된다. 다른 실시 양태에서는, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가하는 것을 포함하는, 액체 배지(또는 피드 배지)에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출을 억제하기 위한 방법 또는 제가 제공된다. 다른 실시 형태에서는, 액체 배지(또는 피드 배지)의 안정성을 향상시키기 위한, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인의 사용이 제공된다. 다른 실시 형태에서는, 액체 배지(또는 피드 배지)에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출을 억제하기 위한, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인의 사용이 제공된다. 이들의 실시 양태에 있어서의 액체 배지는, 바람직하게는 피드 배지이다.
- [0167] 이들 실시 형태에 있어서, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인은,
- [0168] (1) L-시스테인의 농도가 1 내지 40mM, 바람직하게는 10 내지 40mM, 10 내지 30mM 또는 15 내지 40mM, 보다 바람직하게는 15 내지 30mM에, 또한/혹은 N-아세틸시스테인의 농도가 1 내지 40mM, 바람직하게는 1 내지 30mM, 1 내지 20mM 또는 1 내지 10mM, 보다 바람직하게는 2 내지 10mM이 되도록, 또한/또는
- [0169] (2) N-아세틸시스테인의 L-시스테인에 대한 몰 농도의 비율이, 0.04 내지 2.0, 바람직하게는 0.04 내지 1.0, 0.04 내지 0.4, 0.1 내지 2.0, 0.1 내지 1.0 또는 0.1 내지 0.4, 보다 바람직하게는 0.2 내지 0.4가 되도록,
- [0170] 액체 배지에 첨가되거나, 혹은, 상기 제를 첨가 후의 액체 배지에 있어서의 농도 또는 비율이 상기의 범위 내가 된다.
- [0171] 이들 실시 형태의 방법, 제 또는 사용에 의하면, 적합한 농도나 함유비의 N-아세틸시스테인을 포함함으로써, L-시스테인을 포함하는 액체 배지의 안정성을 향상시키고, 또한/또는, 액체 배지에 있어서의 시스틴의 형성 및/또는 석출을 억제할 수 있다. 따라서, 이들 실시 형태의 방법, 제 또는 사용에 의하면, 산업 규모의 세포 배양을 안정적으로 실시하는 것이 가능해진다.
- [0172] 또한, 이들 실시 형태의 방법, 제 또는 사용을 재조합 단백질의 산생 프로세스에 사용하는 경우, 재조합 단백질을 사용한 제품의 생산성을 향상시킬 수 있다. 또한, 바람직하게는 재조합 단백질을 사용한 제품의 제조 비용을

이 삭감한다. 또한, 바람직하게는 재조합 단백질을 사용한 제품의 연구 개발이 효율적이 된다.

[0173] 이들 실시 형태의 방법, 제 또는 사용은, L-시스테인을 포함하지만 N-아세틸시스테인을 포함하지 않는 액체 배지와 비교하여, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 액체 배지의 안정성을 향상시킬 수 있다. 액체 배지의 안정성의 향상은, 공지된 방법으로 평가해도 되고, 혹은, 평가는 행하지 않고, 단순히 안정성의 향상을 목적으로 하는 것이어도 된다. 안정성을 평가하는 방법의 비한정의 예로서, 눈으로 보아 또는 분광학적 수단(예를 들어, 탁도계)에 의해 배지 성분(예를 들어, 시스틴)의 석출을 검출하고, 석출이 발생할 때까지의 시간(일수 등)에 의해 안정성을 평가하는 방법 및 물리화학적 분석 수단을 사용하여 배지 성분(예를 들어, 시스틴)의 농도 변화를 해석함으로써 안정성을 평가하는 방법을 들 수 있다. 물리화학적 분석 수단의 비한정의 예로서, 예를 들어 국제 공개 제2021/060517호에 기재되는, 액체 크로마토그래프-탠덤 질량 분석 장치를 사용하는 수단을 들 수 있다.

[0174] 본 개시의 가일층의 실시 형태에서는, 액체 배지의 안정성을 향상시키기 위한 방법 또는 제는, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 액체 배지에 있어서 석출이 발생할 때까지의 시간(일수 등)을 L-시스테인을 포함하지만 N-아세틸시스테인을 포함하지 않는 액체 배지와 비교하여, 길게 한다. 길어지는 시간은, 예를 들어 1일 이상, 바람직하게는 5일 이상, 보다 바람직하게는 10일 이상, 더욱 보다 바람직하게는 15일 이상이다. 또한, 다른 실시 형태에서는, 액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출을 억제하기 위한 방법, 제 또는 사용은, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 액체 배지에 있어서의 부생성물(예를 들어, 시스틴)의 생성 속도를, L-시스테인을 포함하지만 N-아세틸시스테인을 포함하지 않는 액체 배지와 비교하여, 10% 이상, 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 30% 이상, 더욱 보다 바람직하게는 40% 이상 저하시킨다. 또한, 또 다른 실시 형태에서는, 액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출을 억제하기 위한 방법, 제 또는 사용은, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 액체 배지에 있어서, 부생성물(예를 들어, 시스틴)을 2주일 이상, 바람직하게는 3주일 이상, 보다 바람직하게는 1개월간 이상, 더욱 보다 바람직하게는 2개월간 이상, 가장 바람직하게는 3개월간 이상의 기간, 석출시키지 않는다.

[0175] 액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출을 억제하기 위한 방법, 제 또는 사용은, L-시스테인을 포함하지만 N-아세틸시스테인을 포함하지 않는 액체 배지와 비교하여, L-시스테인 및 N-아세틸 시스테인을 포함하는 액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출을 억제할 수 있다. 액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출은, 공지된 방법에 의해 평가해도 되고, 혹은, 평가는 행하지 않고, 단순히 액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출의 억제를 목적으로 하는 것이어도 된다. 시스틴의 생성 및/또는 석출의 억제를 평가하는 방법의 비한정적인 예로서, 눈으로 보아 또는 분광학적 수단(예를 들어, 탁도계)에 의해 시스틴의 석출을 검출하고, 석출이 발생할 때까지의 시간(일수 등)에 의해 시스틴의 생성 및/또는 석출의 억제를 평가하는 방법 및 물리화학적 분석 수단을 사용하여 시스틴의 농도 변화를 해석함으로써 시스틴의 생성 및/또는 석출의 억제를 평가하는 방법을 들 수 있다. 물리화학적 분석 수단의 비한정의 예로서, 예를 들어 국제 공개 제2021/060517호에 기재되는, 액체 크로마토그래프-탠덤 질량 분석 장치를 사용하는 수단을 들 수 있다.

[0176] 본 개시의 가일층의 실시 형태에서는, 액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출을 억제하기 위한 방법, 제 또는 사용은, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 액체 배지에 있어서 시스틴이 석출할 때까지의 일수를, L-시스테인을 포함하지만 N-아세틸시스테인을 포함하지 않는 액체 배지와 비교하여, 길게 한다. 길어지는 시간은, 예를 들어 1일 이상, 바람직하게는 5일 이상, 보다 바람직하게는 10일 이상, 더욱 보다 바람직하게는 15일 이상이다. 또한, 다른 실시 형태에서는, 액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출을 억제하기 위한 방법, 제 또는 사용은, L-시스테인 및 N-아세틸시스테인을 포함하는 액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/또는 석출의 속도를, L-시스테인을 포함하지만 N-아세틸시스테인을 포함하지 않는 액체 배지와 비교하여, 10% 이상, 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 30% 이상, 더욱 보다 바람직하게는 40% 이상 저하시킨다.

[0177] L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가한 후의 액체 배지의 pH는, 5.0 내지 9.0이어도 되고, 바람직하게는 6.0 내지 8.0, 보다 바람직하게는 6.5 내지 7.5, 가장 바람직하게는 6.5 내지 7.0이다. L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 배지에 첨가한 후의 액체 배지의 특징은, 본 개시에 있어서의 어느 것에 기재된 액체 배지의 특징과 동일해도 된다.

[0178] L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 액체 배지에 첨가하는 것에는, (1) L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인 또는 이들을 포함하는 조성물을 액체 배지에 첨가하는 것, (2) L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인 또는 이들을 포함하는 조성물을 다른 성분 혹은 다른 성분을 포함하는 다른 조성물(배지 등)과 혼합한 후에 그의 혼

합물을 배지에 첨가하는 것, 그리고, (3) N-아세틸시스테인 또는 그것들을 포함하는 조성물과 다른 성분 혹은 다른 성분을 포함하는 다른 조성물(배지 등)을 혼합하여 배지를 만드는 것의 모두가 포함된다.

- [0179] L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인, 또는 상기 제를 첨가하는 액체 배지는, 이것을 첨가하기 전에, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 포함하고 있어도 된다. 이 경우, 액체 배지에 있어서의 L-시스테인 및 N-아세틸시스테인의 원하는 농도는, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인, 또는 제를 첨가한 후에, 달성되어도 된다.
- [0180] 상기 제는, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인을 포함하는 한에 있어서, 특정한 형태로 한정되는 것은 아니고, L-시스테인 및/또는 N-아세틸시스테인만을 포함해도, 혹은, 담체나 pH 조정제, 배지 등을 포함하는 조성물의 형태여도 된다. 또한, 제는, 액체의 형태이면 되고, 고체, 예를 들어 분말의 형태(과립의 형태를 포함한다)여도 된다.
- [0181] 상기 제는, 바람직하게는 액체 배지의 안정성을 향상시키는 것, 또는 액체 배지에 있어서의 시스틴의 생성 및/혹은 석출을 억제하는 것을, 그의 용도로 한다. 용도는, 바람직하게는 제의 판매용 팜플렛, 사용 설명서, 제품에 관한 웹 사이트 등에 있어서 기재된다. 이 경우, 용도는, 제의 효과로서 기재될 수도 있다.
- [0182] 또한, 상기 실시 형태 등에 의해 설명되는 배지, 방법, 제, 첨가물, 사용 등은, 본 발명을 한정하는 것은 아니고, 예시하는 것을 의도하여 개시되어 있는 것이다. 본 발명의 기술적 범위는, 특허 청구 범위의 기재에 의해 정해지는 것이고, 당업자는, 특허 청구 범위에 기재된 발명의 기술적 범위에 있어서, 다양한 설계적 변경이 가능하다.
- [0183] 예를 들어, 상기의 실시 형태의 설명에서는, 피드 배지를 중심으로 설명을 해 왔지만, 본 개시의 실시 형태는 피드 배지에 한정되는 것은 아니고, 피드에 사용되지 않는 것도 포함하는 임의의 액체 배지 등에 대하여 적용할 수도 있다. 즉, 본 개시의 다른 실시 형태는, 피드 배지가 액체 배지(피드 배지가 아닌 것도 포함한다)로 치환된 상기 어느 것의 실시 형태이다.
- [0184] 또한, 예를 들어 어떤 실시 형태에서는, 본 개시의 실시 형태에서 제조된 재조합 단백질이 제공된다. 또한, 다른 실시 형태는, 그 재조합 단백질을 포함하는 약학적 조성물 또는 의약, 그의 재조합 단백질의 의약 제조에 있어서의 사용, 혹은 그의 재조합 단백질을 투여하는 것을 포함하는 질환의 치료 방법에 관한 것이다. 또한, 다른 실시 형태는, 본 개시의 실시 형태에 관한 어느 것의 공정, 또는 본 개시의 실시 형태에 관한 어느 것의 방법을 포함하고, 그것에 의해 재조합 단백질을 얻는 것을 포함하고, 또한 그 재조합 단백질과 담체를 혼합하는 것을 포함하는, 의약 조성물 또는 의약 제제의 제조 방법에도 관한 것이다.
- [0185] **실시예**
- [0186] 이하, 실시예에 의해, 본 발명을 설명하지만, 이들 실시예는 본 발명을 한정하는 것은 아니다. 또한, 실시예에서 언급되고 있는 시판 시약·기기 등은, 특별히 나타내지 않는 한, 제조자의 사용 설명 또는 통상적인 방법을 따라 사용되었다.
- [0187] [실시예 1]
- [0188] L-시스테인 고농도화 피드 배지의 액체 안정성에 미치는, N-아세틸시스테인의 영향
- [0189] 시판 배지인 CELLiSTTM Feed media(아지노모토 가부시키키가이샤: FEED2)를 기초로, 피드 배지 A가 조제되었다. 피드 배지 A는, N-아세틸시스테인을 포함하지 않는다.
- [0190] 최종 농도로서 18 내지 26mM의 L-시스테인 및 60g/L의 글루코오스를 포함하는 피드 배지 A에, 최종 농도로서 0 내지 5.5mM의 N-아세틸시스테인이 첨가되어, FEED2의 제품 설명서에 기재된 수순에 의해, pH6.7 내지 6.9의 액체 배지가 조제되었다. 조제한 액체 배지는, 200mL씩, 150mL 용량의 스테리컵-GP(Merck: S2GPU01RE)를 사용하여 필터레이션되어, 4℃ 또는 25℃의 차광 조건에서 18일간 보관되었다.
- [0191] 보관 후, 눈으로 보아 석출을 검출한 결과가 표 1에 나타내진다. N-아세틸 시스테인이 첨가되지 않는 피드 배지 A에서는, 18일 후에 석출이 검출되었다. 한편, 18mM의 L-시스테인이 첨가된 피드 배지 A에 있어서 2.7 내지 5.5mM의 N-아세틸 시스테인이 더 첨가된 경우, 석출은 검출되지 않았다.
- [0192] 또한, 22mM의 L-시스테인이 첨가된 피드 배지 A에 있어서, 2.7 내지 5.5mM의 N-아세틸시스테인이 더 첨가된 경우, 석출은 검출되지 않았다.
- [0193] 또한, 24mM 또는 26mM의 L-시스테인이 첨가된 피드 배지 A에 있어서, 3.7mM의 N-아세틸시스테인이 첨가된 경우,

석출이 검출되었다. 한편, 5.5mM의 N-아세틸시스테인이 첨가된 경우, 석출이 검출되지 않았다.

표 1

배지	L-시스테인 농도(mM)	N-아세틸시스테인 첨가 농도(mM)	4℃, 18일간	25℃, 18일간
피드 배지 A	18	0	석출 있음	석출 있음
피드 배지 A	18	2.7	석출 없음	석출 없음
피드 배지 A	18	3.7	석출 없음	석출 없음
피드 배지 A	18	5.5	석출 없음	석출 없음
피드 배지 A	22	2.7	석출 없음	석출 없음
피드 배지 A	22	3.7	석출 없음	석출 없음
피드 배지 A	22	5.5	석출 없음	석출 없음
피드 배지 A	24	3.7	석출 있음	석출 있음
피드 배지 A	24	5.5	석출 없음	석출 없음
피드 배지 A	26	3.7	석출 있음	석출 있음
피드 배지 A	26	5.5	석출 없음	석출 없음

[0194]

[0195]

이상의 결과로부터, N-아세틸시스테인을 첨가함으로써, N-아세틸시스테인을 첨가하지 않은 경우와 비교하여, 고농도의 L-시스테인을 포함하는 액체 배지에 있어서의 석출의 생성이 억제되어, 액체 배지의 안정성이 향상되는 것이 나타났다.

[0196]

[실시예 2]

[0197]

L-시스테인 고농도화 배지의 액체 안정성 및 배지 보관 중의 시스틴 농도에 미치는, N-아세틸 시스테인의 영향

[0198]

시판 배지인 CELLiST™ Feed media(아지노모토 가부시키키가이샤: FEED2)를 기초로, 피드 배지 A가 조제되었다. 피드 배지 A는, N-아세틸시스테인을 포함하지 않는다.

[0199]

최종 농도로서 18mM 또는 24mM의 L-시스테인 및 60g/L의 글루코오스가 첨가된 피드 배지 A에, 최종 농도로서 0 내지 5.5mM의 N-아세틸시스테인이 첨가되고, FEED2의 제품 설명서에 기재된 수순에 의해, pH6.7 내지 6.9의 액체 배지가 조제되었다. 조제한 액체 배지는, 스테리컵-GP를 사용하여 필터레이션되어, 그 25mL 또는 50mL가, 60mL 용량의 PETG 각형 배지 보틀(Thermo Fisher Scientific: 2019-0030)에 가득 채워져, 4℃의 차광 조건에서 21일간 보관되었다.

[0200]

보관 후, 눈으로 보아 결정의 석출을 검출한 결과가 표 2에 나타난다. 18mM의 L-시스테인을 포함하는 피드 배지 A에 있어서, N-아세틸시스테인이 첨가되지 않은 경우, 18 또는 13일 후에 석출이 검출되었다. 한편, 5.5mM의 N-아세틸시스테인이 첨가된 경우, 석출은 검출되지 않았다.

[0201]

또한, 24mM의 L-시스테인을 포함하는 피드 배지 A에 있어서, N-아세틸시스테인이 첨가되지 않은 경우, 7일 후에 석출이 검출되었다. 한편, 2.8mM의 N-아세틸 시스테인이 첨가된 경우, 8 또는 13일 후에 석출이 검출되었다. 또한, 5.5mM의 N-아세틸시스테인이 첨가된 경우, 액량 25mL 조건에서는 21일 후에 석출이 검출되고, 액량 50mL 조건에서는 석출이 검출되지 않았다.

표 2

배지	L-시스테인 농도(mM)	N-아세틸시스테인 첨가 농도(mM)	액량 (mL)	석출이 처음으로 인정된 일수
피드 배지 A	18	0	50	8
피드 배지 A	18	0	25	13
피드 배지 A	18	5.5	50	인정되지 않음
피드 배지 A	18	5.5	25	인정되지 않음
피드 배지 A	24	0	50	7
피드 배지 A	24	0	25	7
피드 배지 A	24	2.8	50	13
피드 배지 A	24	2.8	25	8
피드 배지 A	24	5.5	50	인정되지 않음
피드 배지 A	24	5.5	25	21

[0202]

[0203]

이어서, 표 2에서 사용한 액량 25mL 조건의 5개의 배지에 대해서, 액체 중의 L-시스테인, 시스틴, N-아세틸시스테인, N-아세틸시스틴 및 N,N'-디아세틸시스틴의 농도 변화가, 국제 공개 제2021/060517호에 기재된 방법에 따라, 경시적으로 분석되었다.

[0204]

결과는 도 1에 도시된다. N-아세틸시스테인이 첨가되지 않은 배지에 있어서(도 1의 A, C), 액체 중의 시스틴 농도가 상승하고, 또한, 석출이 검출되었다. 한편, N-아세틸시스테인이 첨가된 배지에 있어서(도 1의 B, D, E), N-아세틸시스틴이 발생하고, 또한, N-아세틸시스테인을 첨가하지 않은 배지와 비교하여, 시스틴의 생성 속도가 둔화되었다.

[0205]

또한, (A) 18mM의 L-시스테인을 포함하고 N-아세틸시스테인을 포함하지 않는 액체 배지, (B) 24mM의 L-시스테인을 포함하고 N-아세틸시스테인을 포함하지 않는 액체 배지, 그리고 (C) 24mM의 L-시스테인 및 5.5mM의 N-아세틸시스테인을 첨가한 액체 배지에 대해서(각 액체 배지의 액량은, 50mL), 조제 후 13일째에 10mL의 액체 배지를 발취한 후, 63일째까지 보관을 계속하고, 석출을 눈으로 보아 검출하였다.

[0206]

결과는, 도 2에 도시된다. N-아세틸시스테인을 포함하지 않는 액체 배지 (A) 및 (B)에 있어서, 석출이 검출되었다. 한편, N-아세틸시스테인을 포함하는 액체 배지 (C)에 있어서, 석출은 검출되지 않았다.

[0207]

이상의 결과로부터, N-아세틸시스테인을 첨가한 L-시스테인을 포함하는 액체 배지에 있어서, 석출의 생성이 억제되는 것, 시스틴 생성의 속도가 둔화되는 것이 나타났다.

[0208]

[실시예 3]

[0209]

L-시스테인 고농도화 배지의 액체 안정성에 미치는, N-아세틸시스테인의 영향

[0210]

시판 배지인 CELLiSTTM Feed media(아지노모토 가부시키키가이샤: FEED2)가 사용되었다. FEED2는, N-아세틸시스테인을 포함하지 않는다. 72g/L의 글루코오스를 함유하는 FEED2에, 최종 농도로서 18mM의 L-시스테인 및 최종 농도로서 0, 3 또는 9mM의 N-아세틸시스테인이 더 첨가되었다. 조제한 액체 배지는, 스테리컬-GP를 사용하여 필터레이션되어, 50mL의 팔콘 튜브에 10 또는 40mL 가득 채워져, 25℃의 차광 조건에서 보관되었다.

[0211]

보관 후, 결정의 석출을 눈으로 보아 검출한 결과가, 표 3에 나타난다. FEED2에 18mM의 L-시스테인을 첨가한 배지에 있어서, 액량 10mL 조건에서는 2일 후, 액량 40mL 조건에서는 5일 후에, 석출이 검출되었다.

[0212]

FEED2에 18mM의 L-시스테인 및 3mM의 N-아세틸시스테인을 첨가한 배지에서는, 액량 10mL 조건에서는 5일 후, 액량 40mL 조건에서는 10일 후에 석출이 검출되었다.

[0213]

FEED2에 18mM의 L-시스테인 및 9mM의 N-아세틸시스테인이 첨가된 배지에서는, 액량 10mL 조건에서는 10일 후, 액량 40mL 조건에서는 19일 후에 석출이 나타났다.

표 3

배지	L-시스테인 첨가 농도(mM)	N-아세틸시스테인 첨가 농도(mM)	액량 (mL)	석출이 처음으로 인정된 일수
FEED2	18	0	10	2
FEED2	18	0	40	5
FEED2	18	3	10	5
FEED2	18	3	40	10
FEED2	18	9	10	10
FEED2	18	9	40	19

[0214]

[0215]

이상의 결과로부터, N-아세틸시스테인이 첨가됨으로써, L-시스테인 고농도화 배지에 있어서의 석출의 생성이 억제되어, 액체 안정성이 향상되는 것이 나타났다.

[0216]

[실시예 4]

[0217]

피드 배지의 액체 안정성에 미치는, N-아세틸시스테인의 영향

[0218]

시판 배지인 CELLiST™ Feed media(아지노모토 가부시키키가이샤: FEED2)가 사용되었다. FEED2는, N-아세틸시스테인을 포함하지 않는다. 72g/L의 글루코오스를 함유하는 FEED2에, 3, 6, 9, 13.5 또는 18mM의 N-아세틸시스테인이 첨가되었다. 조제한 액체 배지는, 스테리컵-GP를 사용하여 필터레이션되어, 산화 반응이 촉진되는 조건하, 50mL의 팔콘 튜브에 10mL 가득 채워져, 25℃의 차광 조건에서 32일간 보관되었다.

[0219]

보관 후, 결정의 석출을 눈으로 보아 검출한 결과가, 표 4에 나타난다. N-아세틸시스테인을 첨가하지 않은 FEED2 배지에 있어서, 22일 후에 석출이 검출되었다. 한편, FEED2에 3, 6, 9, 13.5 또는 18mM의 N-아세틸시스테인을 첨가한 배지에 있어서, 석출은 검출되지 않았다.

표 4

배지	N-아세틸시스테인 첨가 농도(mM)	석출이 처음으로 인정된 일수
FEED2	0	22
FEED2	3	인정되지 않음
FEED2	6	인정되지 않음
FEED2	9	인정되지 않음
FEED2	13.5	인정되지 않음
FEED2	18	인정되지 않음

[0220]

[0221]

이상의 결과로부터, N-아세틸시스테인을 첨가함으로써, L-시스테인 고농도화 배지에 있어서의 석출의 생성이 억제되어, 액체 안정성이 향상되는 것이 나타났다.

[0222]

[실시예 5]

[0223]

CHO 세포의 증식 및 항체 생산에 미치는, 피드 배지로의 N-아세틸시스테인 첨가의 영향

[0224]

CELLiST™ Basal media(아지노모토 가부시키키가이샤: BASAL3)에, LR3-IGF-1(SIGMA-ALDRICH: I1271-1MG, 최종 농도 50 µg/mL)과 L-Glutamine(Thermo Fisher SCIENTIFIC: 25030081, 최종 농도 6mM)이 첨가되어, 기초 배지가 조제되었다.

[0225]

실시예 4에서 사용된 N-아세틸시스테인의 농도가 다른 6종류의 배지가, 조제 후 빠르게 사용되었다.

[0226]

조제된 기초 배지를 사용하여 3×10^5 cells/mL로 조정된 CHO 세포 현탁액이, 6-well plate(CORNING, Cat. No. CLS3471)에 파종되어, 4mL로 배양이 개시되고, 14일간 배양이 행해졌다. 모든 실험군은, n=2로 실시되었다. 배양 온도는, 37℃, 교반 속도는 110rpm으로 되었다. 배양 개시 4, 7, 9 및 11일째에, 관찰 배지에 대해 7%의

피드 배지가 첨가되었다. 배양 개시 7, 9, 11 및 14일째에 세포 배양액이 샘플링되어, 생세포수가 생사 세포 오토 애널라이저 Vi-CELL™ XR(벡만·콜터사)을 사용하여 측정되고, 항체 산생량이 Octet QK(FORTEBIO사)를 사용하여 측정되었다.

- [0227] 결과는, 도 3 및 4에 도시된다. 피드 배지에 3, 6, 9, 13.5 또는 18mM의 N-아세틸시스테인을 첨가한 배지에 있어서도, 충분한 세포 증식 및 항체 생산이 가능하였다.
- [0228] 이들의 결과로부터, N-아세틸시스테인을 첨가한 경우에 있어서도, L-시스테인 고농도화 배지가 초래하는 우수한 세포 증식능, 재조합 단백질 생산능이 유지되는 것이 나타났다.
- [0229] [실시에 6]
- [0230] CHO 세포의 증식 및 항체 생산에 미치는, L-시스테인 고농도화 피드 배지의 영향
- [0231] CELLiST™ Basal media(아지노모토 가부시키키가이샤: BASAL10)를 기초로 설계된 배지에, 최종 농도 4mM의 L-Glutamine(Thermo Fisher SCIENTIFIC: 25030081)이 첨가되어, 기초 배지가 조제되었다.
- [0232] 시판 배지인 CELLiST™ Feed media(아지노모토 가부시키키가이샤: FEED2)를 기초로, 피드 배지 A가 조제되었다. 최종 농도로서 11 또는 18mM의 L-시스테인 및 60g/L의 글루코오스를 함유하는 피드 배지 A가, FEED2의 제품 설명서에 기재된 수순에 의해, pH6.7 내지 6.9가 되도록 조제되었다.
- [0233] 110mM의 L-시스테인 용액(pH11.3)이 조제되었다.
- [0234] 조제된 기초 배지를 사용하여, 7×10^5 cells/mL로 조정된 CHO 세포 현탁액이, ambr15 세포 배양 장치(Sartorius 사)를 사용하여 14일간 배양되었다. 모든 실험군은, n=2로 실시되었다. 실험군은, 11 또는 18mM의 L-시스테인을 포함하는 피드 배지 A가 배양 개시 2일째로부터 매일 3.3%씩 첨가되는 조건구(11mM구, 18mM구)와, 18mM의 L-시스테인을 포함하는 피드 배지 A가 배양 개시 2일째로부터 매일 3.3%씩 더하여지고, 110mM의 L-시스테인 용액이 배양 개시 2일째로부터 매일 0.163% 첨가되는 조건구(23-24mM 상당구)를 포함한다. 이들 조건구에 있어서의 14일째의 항체 산생량은, Cedex BioHT(로슈·다이아그노스틱스사)를 사용하여 측정되었다.
- [0235] 결과가 도 5에 도시된다. 배양 과정에서 공급하는 L-시스테인양이 증가함으로써, 항체 생산량이 향상되는 것이 나타났다.
- [0236] [실시에 7]
- [0237] L-시스테인 고농도화 배지의 액체 안정성에 미치는, N-아세틸시스테인의 영향
- [0238] 시판 배지인 CELLiST™ Feed media(아지노모토 가부시키키가이샤: FEED2)가 사용되었다. FEED2는, N-아세틸시스테인을 포함하지 않는다. FEED2에, 최종 농도로서 0, 4, 9 또는 18mM의 L-시스테인 및 최종 농도로서 0, 2, 10 또는 20mM의 N-아세틸시스테인이 더 첨가되었다. 조제한 액체 배지는, 스테리컵-GP를 사용하여 필터레이션되어, 50mL의 팔콘 튜브에 10 또는 40mL 가득 채워져, 4℃의 차광 조건에서 29일간 보관되었다.
- [0239] 보관 후, 결정의 석출을 눈으로 보아 검출한 결과가, 표 5에 나타난다.

표 5

배지	L-시스테인 첨가 농도(mM)	N-아세틸시스테인 첨가 농도(mM)	액량 (mL)	석출이 처음으로 인정된 일수
FEED2	0	0	10	석출 없음
FEED2	0	2	10	석출 없음
FEED2	0	10	10	석출 없음
FEED2	0	20	10	석출 없음
FEED2	4	0	10	14
FEED2	4	2	10	19
FEED2	4	10	10	석출 없음
FEED2	4	20	10	석출 없음
FEED2	9	0	10	6
FEED2	9	2	10	10
FEED2	9	10	10	29
FEED2	9	20	10	석출 없음
FEED2	18	0	10	3
FEED2	18	2	10	3
FEED2	18	10	10	11
FEED2	18	20	10	21
FEED2	0	0	40	석출 없음
FEED2	0	2	40	석출 없음
FEED2	0	10	40	석출 없음
FEED2	0	20	40	석출 없음
FEED2	4	0	40	19
FEED2	4	2	40	19
FEED2	4	10	40	석출 없음
FEED2	4	20	40	석출 없음
FEED2	9	0	40	10
FEED2	9	2	40	10
FEED2	9	10	40	21
FEED2	9	20	40	석출 없음
FEED2	18	0	40	3
FEED2	18	2	40	3
FEED2	18	10	40	11
FEED2	18	20	40	16

[0240]

[0241] 표 5에 나타내는 바와 같이, L-시스테인을 첨가하고 있지 않은 FEED2 배지에서는, 액량 10mL 조건, 액량 40mL 조건의 어느 것에 있어서도 29일 후에, 석출은 검출되지 않았다.

[0242] FEED2에 4mM의 L-시스테인을 첨가한 배지에서는, 액량 10mL 조건에서는 14일 후, 액량 40mL 조건에서는 19일 후에 석출이 검출되었다. 액량 10mL 조건에서는 2mM의 N-아세틸시스테인 첨가에 의해 석출의 검출일이 19일 후로 지연되고, 10 또는 20mM의 N-아세틸시스테인을 첨가한 배지에서는, 29일 후까지 석출이 확인되지 않았다. 액량 40mL 조건에서는, 10 또는 20mM의 N-아세틸시스테인을 첨가한 배지에서는, 29일 후까지 석출이 확인되지 않았다.

[0243] 또한, FEED2에 9mM의 L-시스테인을 첨가한 배지에서는, 액량 10mL 조건에서는, 6일 후, 액량 40mL 조건에서는 10일 후에 석출이 검출되었다. 액량 10mL 조건에서는 2 또는 10mM의 N-아세틸시스테인 첨가에 의해 석출의 검출일이 10일 후, 29일 후로 지연되고, 20mM의 N-아세틸시스테인을 첨가한 배지에서는, 29일 후까지 석출이 확인되지 않았다. 액량 40mL 조건에서는, 10mM의 N-아세틸시스테인 첨가에 의해 석출의 검출일이 21일 후로 지연되고, 20mM의 N-아세틸시스테인을 첨가한 배지에서는, 29일 후까지 석출이 확인되지 않았다.

[0244] 또한, FEED2에 18mM의 L-시스테인을 첨가한 배지에서는, 액량 10mL 조건, 액량 40mL 조건의 어느 것에 있어서도, 3일 후에 석출이 검출되었다. 액량 10mL 조건에서는, 10 또는 20mM의 N-아세틸시스테인 첨가에 의해 석출의 검출일이 11일 후, 21일 후로 지연하였다. 액량 40mL 조건에서는, 10 또는 20mM의 N-아세틸시스테인 첨

가에 의해 석출의 검출일이 11일 후, 16일 후로 지연되었다.

[0245] 이상의 결과로부터, N-아세틸시스테인을 첨가함으로써, N-아세틸시스테인을 첨가하지 않은 경우와 비교하여, 고 농도의 L-시스테인을 포함하는 액체 배지에 있어서의 석출의 생성이 억제되어, 액체 배지의 안정성이 향상되는 것이 나타났다.

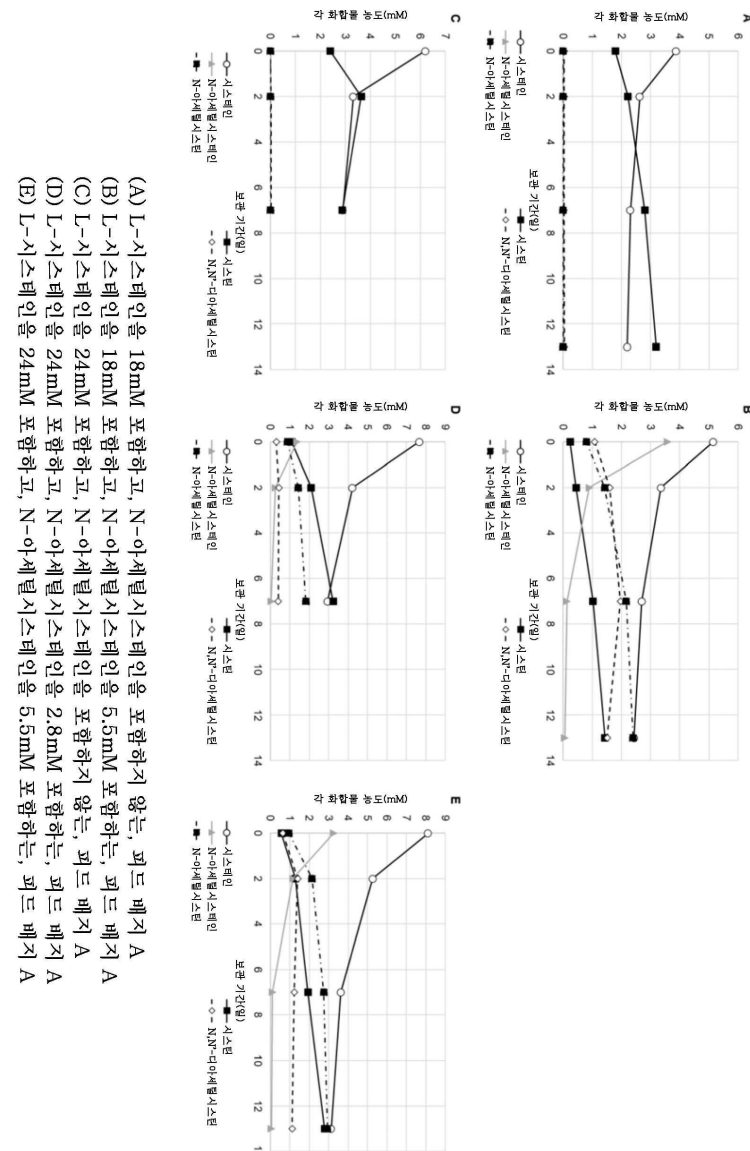
[0246] 또한, 본 개시에 인용된 특허, 특허 출원 및 출판물의 개시 내용은, 그 전체가, 참조에 의해 본 개시에 원용된다.

산업상 이용가능성

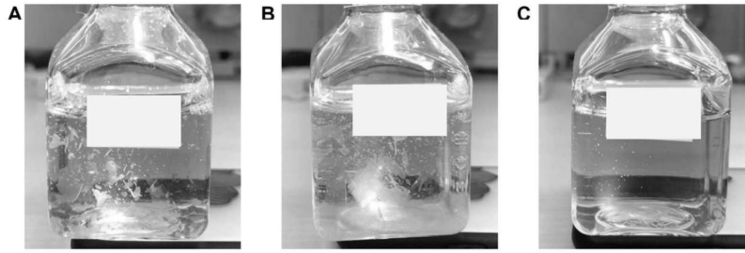
[0247] 본 실시 형태의 배지는, 재조합 단백질을 사용한 제품의 생산성을 향상시킬 수 있기 때문에, 예를 들어 재조합 단백질을 사용한 항체 의약의 생산에 적합하게 사용할 수 있고, 산업상 이용 가능성을 갖고 있다.

도면

도면1

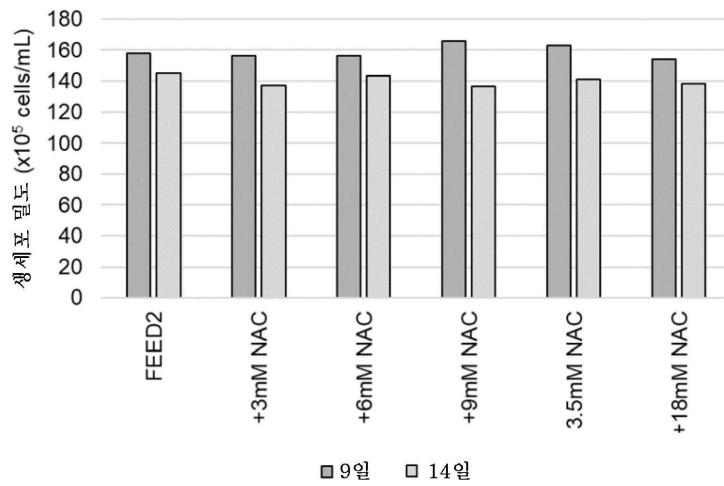


도면2

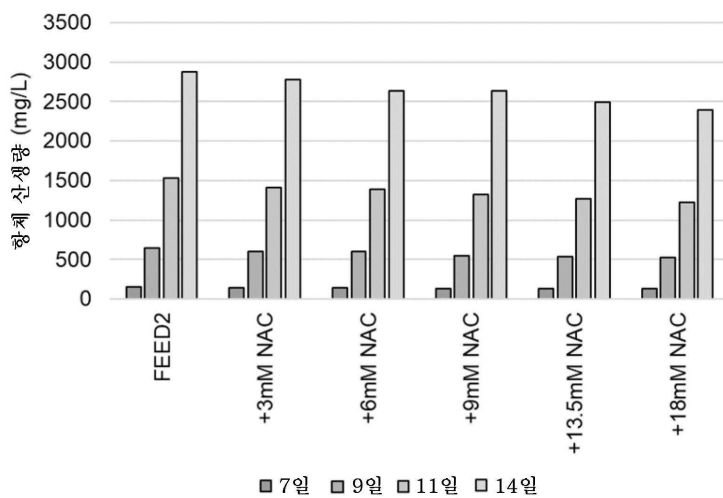


(A) L-시스테인을 18mM 포함하고, N-아세틸시스테인을 포함하지 않는, 피드 배지 A
(B) L-시스테인을 24mM 포함하고, N-아세틸시스테인을 포함하지 않는, 피드 배지 A
(C) L-시스테인을 24mM 포함하고, N-아세틸시스테인을 5.5mM 포함하는, 피드 배지 A

도면3



도면4



도면5

