



등록특허 10-2893388



(19) 대한민국 지식재산처(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년11월28일

(11) 등록번호 10-2893388

(24) 등록일자 2025년11월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/00 (2006.01) C12P 21/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0018 (2013.01)

C12P 21/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0143427

(22) 출원일자 2016년10월31일

심사청구일자 2021년10월25일

(65) 공개번호 10-2018-0047404

(43) 공개일자 2018년05월10일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020120088667 A*

Applied Microbiology and Biotechnology (2012)
94:563 (2012.02.29.) 1부.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

삼성바이오에피스 주식회사

인천광역시 연수구 송도교육로 76(송도동)

(72) 발명자

박준태

서울특별시 은평구 통일로 660, 304동 201호 (녹
번동, 북한산푸르지오아파트)

이경주

인천광역시 연수구 송도문화로28번길 81, 112동
903호(송도동, 송도더샵그린스퀘어)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리엔목특허법인

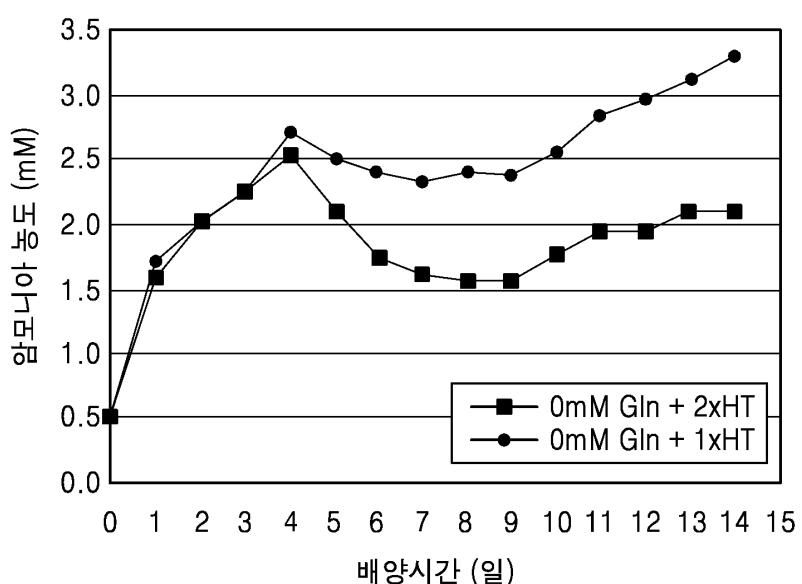
전체 청구항 수 : 총 25 항

심사관 : 안해지

(54) 발명의 명칭 세포 배양 배지에서 원치 않는 배양 부산물을 감소시키는 공정

(57) 요약

글루타민-불포함 세포 배양 배지에서 목적 단백질 생산 시 원치 않는 배양 부산물을 감소시키는 향상된 배양 공정, 또는 글루타민-불포함 세포 배양 배지에서 목적 단백질의 생산성을 유지하거나 향상시키는 배양 공정을 제공한다.

대 표 도 - 도1

(52) CPC특허분류

C12N 2500/16 (2013.01)

C12N 2500/32 (2013.01)

C12N 2500/40 (2024.08)

C12N 2500/60 (2013.01)

C12N 2523/00 (2013.01)

(72) 발명자

임주송

경기도 안양시 만안구 경수대로1273번길 55, 102동
603호(석수동, 안양 석수 대주파크빌)

임형택

인천광역시 부평구 원적로269번길 15, 109동 603호
(산곡동, 현대아파트)

허윤정

경기도 수원시 영통구 봉영로 1617, 823호(영통동,
웨미리타워)

이재선

인천광역시 연수구 송도과학로27번길 55, 103동
1301호(송도동, 롯데캐슬 캠퍼스타운)

민호성

서울특별시 서초구 잠원로14길 3, 105동 904호(잠
원동, 롯데캐슬갤럭시)

명세서

청구범위

청구항 1

글루타민-불포함 세포 배양 배지에서 목적 단백질 생산 시 암모니아를 감소시키는 향상된 배양 공정으로서,

포유동물 세포를 글루타민-불포함 세포 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함하고,

상기 세포 배양 배지는 $150 \mu\text{M}$ 내지 $1000 \mu\text{M}$ 의 하이포잔틴 (hypoxanthine) 및 $25 \mu\text{M}$ 내지 $1000 \mu\text{M}$ 의 티미딘 (thymidine)을 포함하는 것인 공정.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 암모니아의 양이, 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 10% 이상 감소된 것인 공정.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 공정 조건에서 유지된 세포는, 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 세포의 포도당 소모량이 증가된 것인 공정.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 포도당 소모량은, 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서의 포도당 소모량에 비해, 10% 이상 증가된 것인 공정.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 공정 조건에서 유지된 세포는, 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 세포 생존능 (viability)이 증가된 것인 공정.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 세포 생존능은, 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서의 세포 생존능에 비해, 3% 이상 증가된 것인 공정.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 공정 조건에서 유지된 세포는, 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 세포의 폴리펩티드 발현 수준 (titer)이 증가된 것인 공정.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 세포의 폴리펩티드 발현 수준 (titer)은, 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서의 폴리펩티드 발현 수준에 비해, 10% 이상 증가된 것인 공정.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 $150 \mu\text{M}$ 내지 $750 \mu\text{M}$ 의 하이포잔틴을 포함하는 것인 공정.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 $25 \mu\text{M}$ 내지 $200 \mu\text{M}$ 의 티미딘을 포함하는 것인 공정.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 세포 배양 배지에 우리딘 (uridine)을 보충하는 단계를 더 포함하는 것인 공정.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 세포 배양 배지에 마그네슘을 보충하는 단계를 더 포함하는 것인 공정.

청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 목적 단백질은 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 면역접합체 (immunoadhesin), 형질전환 성장 인자 (Transforming Growth Factor: TGF)-베타 수퍼페밀리 신호전달 분자, 혈액 응고 인자, 항-종양因子 인자 수용체 (tumor necrosis factor receptor: TNFR) 항체, 항-인간 표피 성장 인자 수용체 2 (human epidermal growth factor receptor 2: HER2) 항체 및 TNFR:Fc로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 공정.

청구항 15

청구항 1에 있어서, 상기 목적 단백질은 아바고보맙 (abagovomab), 압식시맙 (abciximab), 아달리무맙 (adalimumab), 아데카투무맙 (adecatumumab), 알렘투주맙 (alemtuzumab), 알투모맙 (altumomab), 알투모맙 펜테테이트 (altumomab pentate), 아나투모맙 (anatumomab), 아나투모맙 마페나토스 (anatumomab mafenatox), 아르시투모맙 (arcitumomab), 아틀리주맙 (atlimumab), 바실리지맙 (basiliximab), 벡투모맙 (bectumomab), 엑투모맙 (ectumomab), 벨리무맙 (belimumab), 벤랄리주맙 (benralizumab), 베바시주맙 (bevacizumab), 브렌툭시맙 (brentuximab), 카나키누맙 (canakinumab), 카프로맙 (capromab), 카프로맙 펜데티드 (capromab pentetide), 카투마조맙 (catumaxomab), 세르톨리주맙 (certolizumab), 클리바투주맙 테트라제탄 (clivatuzumab tetraxetan), 다클리주맙 (daclizumab), 데노수맙 (denosumab), 에쿨리주맙 (eculizumab), 에드레콜로맙 (edrecolomab), 에팔리주맙 (efalizumab), 에타라시주맙 (etaracizumab), 에르투마조맙 (ertumaxomab), 패놀레소맙 (fanolesomab), 폰톨리주맙 (fontolizumab), 겜투주맙 (gemtuzumab), 기렌툭시맙 (girentuximab), 골리무맙 (golimumab), 이브리투모맙 (ibritumomab), 이고보맙 (igovomab), 인플릭시맙 (infliximab), 이플리무맙 (ipiimumab), 라베투주맙 (labetuzumab), 메폴리주맙 (mepolizumab), 무로모납 (muromonab), 무로모납(muromonab)-CD3, 나탈리주맙 (natalizumab), 네시투무맙 (necitumumab), 니모투주맙 (nimotuzumab), 오파투무맙 (ofatumumab), 오말리주맙 (omalizumab), 오레고보맙 (oregovomab), 팔리비주맙 (palivizumab), 파니투무맙 (panitumumab), 라니비주맙 (ranibizumab), 리툭시맙 (rituximab), 사투모맙 (satumomab), 술레소맙 (sulesomab), 이브리투모맙 (ibritumomab), 이브리투모맙 티وخ제탄 (ibritumomab tiuxetan), 토실리주맙 (tocilizumab), 토시투모맙 (tositumomab), 트라스투주맙 (trastuzumab), 우스케티누맙 (ustekinumab), 비실리주맙 (visilizumab), 보투무맙 (votumumab), 잘루투무맙 (zalutumumab), 브로달루맙 (brodalumab), 안루킨주맙 (anrukinzumab), 바피네우주맙 (bapineuzumab), 달로투주맙 (dalotuzumab), 템시주맙 (demcizumab), 가니투맙 (ganitumab), 이노투주맙 (inotuzumab), 마브릴리무맙 (mavrilimumab), 모제투모맙 파수도토스 (moxetumomab pasudotox), 릴로투무맙 (rilotumumab), 시팔리무맙 (sifalimumab), 타네주맙 (tanezumab), 트랄로키누맙 (tralokinumab), 트레멜리무맙 (tremelimumab), 우렐루맙 (urelumab), 아도르나제 알파 (adornase alfa), 레비프 (Rebif), 베카플레르민 (becaplermin), 알테플라제 (alteplase), 라로니다제 (laranidase), 알레파셉트 (alefacept), 애플리버셉트 (aflibercept), 락시바쿠맙 (Raxibacumab), 다르베포에틴 알파 (darbepoetin alfa), 베카플레르민 농축물 (Becaplermin Concentrate), 인터페론 베타 (interferon beta)-1b, 보툴리눔 독소 유형 (Botulinum Toxin Type) A, 라스부리카제 (rasburicase), 아스파라기나제 (asparaginase), 에포에틴 알파 (epoetin alfa), 에타네르셉트(etanercept), 아갈시다제 베타 (agalsidase beta), 인터페론 알파콘 (interferon alfacon)-1, 인터페론 알파 (interferon alfa)-2a, 아나킨라 (anakinra), 보툴리눔 독소 유형 (Botulinum Toxin Type) B, 페그필그라스팀 (pegfilgrastim), 오프렐베킨 (oprelvekin), 필그라스팀 (filgrastim), 데닐레우킨 디프티톡스 (denileukin diftitox), 페긴테르페론 알파 (peginterferon alfa)-2a, 알데스레우킨 (aldesleukin), 도르나제 알파 (dornase alfa), 인터페론 베타 (interferon beta)-1a, 베타플레르민 (becaplermin), 래테플라제 (reteplase), 인터페론 알파 (interferon alfa)-2, 테넥테플라제 (tenecteplase), 드로트레코긴 알파 (drotrecogin alfa), 릴로나셉트 (rilonacept), 로미플로스팀 (romiprolistim), 메톡시폴리에틸렌 글리콜 (methoxypolyethylene glycol)-에포에틴 베타 (epoetin beta), C1 에스테라제 (esterase) 저해제, 이두르술파제 (idursulfase), 알글루코시다제 알파 (alglucosidase alfa), 아바타셉트 (abatacept), 갈술파제 (galsulfase), 팔리페르민 (palifermin) 및 인터페론 감마 (interferon gamma)-

1b로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 공정.

청구항 16

청구항 12에 있어서, 상기 세포 배양 배지에서 유지된 세포는, 우리딘을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 세포 생존능(viability)이 증가된 것인 공정.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 세포 생존능은, 우리딘을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서의 세포 생존능에 비해, 3% 이상 증가된 것인 공정.

청구항 18

청구항 12에 있어서, 상기 세포 배양 배지에서 유지된 세포는, 우리딘을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 세포 수(Viable Cell Density)가 증가된 것인 공정.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 세포 수는, 우리딘을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서의 세포 수에 비해, 5% 이상 증가된 것인 공정.

청구항 20

청구항 13에 있어서, 상기 세포 배양 배지에서 유지된 세포는, 마그네슘을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 세포 생존능(viability)이 증가된 것인 공정.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 세포 생존능은, 마그네슘을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서의 세포 생존능에 비해, 1% 이상 증가된 것인 공정.

청구항 22

청구항 13에 있어서, 상기 세포 배양 배지에서 유지된 세포는, 마그네슘을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 세포 수(Viable Cell Density)가 증가된 것인 공정.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 세포 수(Viable Cell Density)는, 마그네슘을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서의 세포 수에 비해, 5% 이상 증가된 것인 공정.

청구항 24

청구항 1에 있어서, 상기 세포는 CHO 세포, DG44 세포, HEK 세포, NSO 세포, PER.C6 세포, HeLa 세포, 및 MDCK 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 공정.

청구항 25

청구항 1에 있어서, 상기 배양 공정은 1회 이상의 온도 변화 조건, 1회 이상의 pH 변화 조건, 또는 이들의 조합을 포함하고,

상기 온도 변화 조건은,

제1 온도에서 세포가 배지에서 3일 이상 성장하고, 제1 온도 보다 1°C 내지 8°C 낮은 제2 온도로 온도가 변화되며, 상기 제2 온도에서 세포가 2일 이상 유지(maintain)되는 단계를 포함하고,

상기 pH 변화 조건은,

제1 pH 값에서 세포가 배지에서 2일 이상 성장하고, 제1 pH값 보다 0.05 내지 1 낮은 제2 pH로 pH 변화가 되며, 상기 제2 pH 값에서 세포가 1일 이상 성장하는 단계를 포함하는 것인, 공정.

청구항 26

청구항 1에 있어서, 상기 글루타민-불포함 세포 배양 배지에서 포도당이 2 g/L 이상의 농도로 유지되도록 포도당을 첨가하는 단계를 더 포함하는 것인 공정.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

글루타민-불포함 세포 배양 배지에서 원치 않는 배양 부산물을 감소시키는 공정 및 목적 단백질의 생산성을 유지하거나 향상시키는 배양 공정에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

생명 공학 분야에서의 동물 세포 배양은 새로운 항체 생산과 백신의 개발 및 생산 등의 고부가가치의 물질들을 양산하기 위한 중요한 기술로 여겨져 왔다. 세포의 물질 대사 및 조절 방법을 연구하는 것도 이와 같은 경제적인 가치를 높이는데 중요한 역할을 하고 있다. 그렇기 때문에, 세포를 배양할 때 필요한 배지 성분의 많은 연구가 진행되어 왔고, 배지 성분에 다양한 영양 성분들을 첨가함으로써, 얻고자 하는 단백질의 생산성을 높이려고 수많은 노력을 기울여 왔다.

[0003]

항체를 포함한 단백질의 생산 효율을 높이기 위해, 세포의 생존능을 향상시키는 것이 중요하다. 그러나, 단백질 생산성을 향상시키는데 제약이 되는 요인들이 있다. 그 중 가장 큰 요인은 세포 배양 시 생성되는 노폐물 또는 부산물이다. 세포의 물질 대사 과정에서 불필요하게 생산되는 이런 물질들은 세포에 독성을 나타내거나, 여러 다른 방법으로 세포 성장과 대사를 저해할 수 있다. 이러한 부산물 중에서 가장 대표적인 것이 암모니아이다. 일반적으로, 세포 배양 배지 중 2 내지 10 mM의 암모니아에서 세포 독성을 나타낸다는 보고가 많이 있다. 예를 들어, 중국 햄스터 난소 (Chinese hamster ovary: CHO) 세포에서는 8 mM의 암모니아가 50%의 세포 성장 억제를 보였고 (Kurano N, Leist C, et al., 1990, J. Biotechnol. 15:113-128), 당화에 관여하는 중요한 효소들의 발현을 직접 억제함으로써 단백질의 당화를 저해하는 것으로 알려져 있다 (Chen P, and Harcum SW., 2006, Metab. Eng., 8:123-132). 따라서, 암모니아가 단순히 세포 독성뿐만 아니라, 생산하고자 하는 목적 단백질의 구조적 및 기능적인 결함까지도 야기할 수 있다. 이 밖에도, 암모니아는 물질 대사에 관여하는 다른 성분들의 기능을 저하시키고, 중요한 대사 물질들을 세포 밖으로 방출시켜 버리는 불필요한 기능을 나타낼 수도 있다. 그러나, 암모니아는 세포 배양 배지에서 쉽게 제거되기 어렵기 때문에, 배지 중 암모니아 농도는 목적 단백질의 생산에 더욱 치명적인 요인이 될 수 있다.

[0004]

따라서, 동물 세포 배양에서 부산물, 특히 암모니아의 발생을 억제하거나 줄이면서, 동시에 목적 단백질의 생산성을 유지하거나 향상시키는 방법을 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 글루타민-불포함 세포 배양 배지에서 목적 단백질 생산 시 원치 않는 배양 부산물을 감소시키는 배양 공정을 제공한다.

[0006] 다른 양상은 글루타민-불포함 세포 배양 배지에서 목적 단백질의 생산성을 유지하거나 향상시키는 배양 공정을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0007] 일 양상은 글루타민-불포함 세포 배양 배지에서 목적 단백질 생산 시 원치 않는 배양 부산물을 감소시키는 향상된 배양 공정으로서,

[0008] 포유동물 세포를 글루타민-불포함 세포 배양 배지에서, 세포의 생존 또는 증식을 허용하는 조건 하에서, 배양하는 단계를 포함하고,

[0009] 상기 세포 배양 배지는 약 20 μM 내지 약 1000 μM 의 하이포잔틴 (hypoxanthine) 및 약 2 μM 내지 약 1000 μM 의 티미딘 (thymidine)을 포함하는 공정을 제공한다.

[0010] 상기 용어 "글루타민 (glutamine: Gln 또는 Q)"은 아미노산 L-글루타민을 말한다.

[0011] 상기 용어 "세포 배양 배지 (cell culture medium)"은 동물 진핵 세포를 배양하는데 필요한 영양 성분을 함유한 용액을 말한다. 상기 "세포 배양 배지"는 "배양 배지 (culture medium)", "배지 (medium)", 또는 "성장 배지 (growth medium)"과 교환적으로 사용 가능하다. 상기 배지는 동물 세포를 배양하는데 이용되는 상업화된 또는 제조된 배지를 포함한다.

[0012] 상기 용어 "글루타민-불포함 세포 배양 배지(glutamine-free cell culture medium)"은 글루타민을 포함하지 않는 세포 배양 배지를 말한다. 상기 글루타민-불포함 세포 배양 배지는 글루타민을 실질적으로 포함하지 않는 세포 배양 배지도 포함한다.

[0013] 상기 세포 배양 배지는 약 20 μM 내지 약 1000 μM 의 하이포잔틴 (hypoxanthine) 및 약 2 μM 내지 약 1000 μM 의 티미딘 (thymidine)을 포함한다. 하이포잔틴은 퓨린 유도체로서, 분자식 $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}$ 의 화합물이다. 상기 하이포잔틴은 천연 또는 합성된 하이포잔틴일 수 있다. 상기 티미딘은 피리미딘 데옥시뉴클레오시드의 화합물이다. 티미딘은 데옥시티미딘, 데옥시리보설타민, 또는 티민 데옥시리보시드로도 불린다. 티미딘은 천연 또는 합성된 티미딘일 수 있다.

[0014] 상기 세포 배양 배지는 약 50 μM 내지 약 1000 μM 의 하이포잔틴을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 세포 배양 배지는 약 100 μM 내지 약 1000 μM , 약 100 μM 초과 및 약 1000 μM 이하, 약 100 μM 내지 약 900 μM , 약 100 μM 내지 약 800 μM , 약 100 μM 내지 약 700 μM , 약 100 μM 내지 약 600 μM , 약 100 μM 내지 약 500 μM , 약 100 μM 내지 약 400 μM , 약 100 μM 내지 약 300 μM , 약 100 μM 내지 약 200 μM , 약 110 μM 내지 약 950 μM , 약 120 μM 내지 약 900 μM , 약 130 μM 내지 약 850 μM , 약 140 μM 내지 약 800 μM , 약 150 μM 내지 약 750 μM , 약 150 μM 내지 약 700 μM , 약 150 μM 내지 약 650 μM , 약 150 μM 내지 약 600 μM , 약 150 μM 내지 약 550 μM , 약 150 μM 내지 약 500 μM , 약 150 μM 내지 약 450 μM , 약 150 μM 내지 약 350 μM , 약 150 μM 내지 약 300 μM , 약 150 μM 내지 약 250 μM , 약 175 μM 내지 약 225 μM , 또는 약 200 μM 의 하이포잔틴을 포함할 수 있다.

[0015] 상기 세포 배양 배지는 약 2 μM 내지 약 500 μM 의 티미딘을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 세포 배양 배지는 약 6 μM 내지 약 500 μM , 약 9 μM 내지 약 500 μM , 약 12 μM 내지 약 500 μM , 약 16 μM 내지 약 500 μM , 약 16 μM 초과 및 약 500 μM 이하, 약 18 μM 내지 약 450 μM , 약 18 μM 내지 약 400 μM , 약 18 μM 내지 약 350 μM , 약 18 μM 내지 약 300 μM , 약 20 μM 내지 약 300 μM , 약 20 μM 내지 약 250 μM , 약 20 μM 내지 약 200 μM , 약 20 μM 내지 약 150 μM , 약 25 μM 내지 약 200 μM , 약 25 μM 내지 약 150 μM , 약 25 μM 내지 약 100 μM , 약 25 μM 내지 약 75 μM , 약 25 μM 내지 약 50 μM , 약 25 μM 내지 약 40 μM , 약 30 μM 내지 약 40 μM , 약 30 μM 내지 약 35 μM , 또는 약 32 μM 의 티미딘을 포함할 수 있다.

[0016] 상기 용어 "배양 부산물 (culturing by-product)"는 동물 세포를 배양할 경우 세포에서 생성하여 배지로 분비되는 물질을 말한다. 상기 배양 부산물은 배양되는 세포의 단백질 발현, 생존, 증식, 성장, 분화, 또는 기능에 해로운 영향을 미칠 수 있다. 상기 "배양 부산물"은 "노폐물(waste product)"과 교환적으로 사용 가능하다.

- [0017] 상기 원치 않는 배양 부산물은 암모니아일 수 있다. 암모니아의 양은, 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 실질적으로 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 약 10% 이상 감소될 수 있다. 예를 들어, 암모니아의 양은 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 99% 이상, 약 100%, 약 10% 내지 약 60%, 약 10% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 40%, 약 20% 내지 약 60%, 약 20% 내지 약 50%, 약 20% 내지 약 40%, 약 20% 내지 약 30%, 약 30% 내지 약 40%, 약 40% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 60%, 약 60% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 90%, 또는 약 90% 내지 약 100% 감소될 수 있다.
- [0018] 상기 공정은 포유동물 세포를 글루타민-불포함 세포 배양 배지에서, 세포의 생존 또는 증식을 허용하는 조건 하에서, 배양하는 단계를 포함한다.
- [0019] 상기 포유동물 세포는 마우스, 래트, 토끼, 개, 고양이, 양, 소, 말, 원숭이, 침팬지, 또는 인간으로부터 유래된 세포를 말한다. 상기 세포는 세포주일 수 있다.
- [0020] 상기 세포는 예를 들어, CHO (Chinese hamster ovary) 세포, DG44 세포, HEK (Human embryonic kidney) 세포, NS0 세포, PER.C6 세포, HeLa 세포, 및 MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 세포이다. 상기 CHO 세포는 CHO K1 또는 CHO DUKX 세포일 수 있다. 상기 HEK 세포는 HEK 293 세포일 수 있다.
- [0021] 상기 세포의 생존 또는 증식을 허용하는 조건은 세포의 종류에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 세포는 세포의 증식에 필요한 영양 성분을 포함하는 배지의 존재에서 배양될 수 있다. 상기 세포는 약 25°C 내지 약 42°C, 약 25°C 내지 약 40°C, 약 30°C 내지 약 40°C, 약 30°C 내지 약 37°C, 또는 약 37°C에서 배양될 수 있다. 상기 세포는 약 1% CO₂ 내지 약 10% CO₂, 또는 약 5% CO₂ 내지 약 10% CO₂의 공기의 존재에서 배양될 수 있다.
- [0022] 상기 배양은 세포의 종류에 따라 달라질 수 있다. 상기 배양은 알려진 방법을 이용할 수 있다. 상기 배양은 플레이트, 플라스크 등에서 수행될 수 있다. 상기 배양은 기질에 부착시키거나 또는 배양액에 부유시키는 방법으로 수행할 수 있다. 상기 배양은 계대 배양 (subculture)으로 수행될 수 있다. 상기 배양은 회분 배양 (batch culture)일 수 있다. 상기 회분 배양은 유가 배양 (fed-batch)일 수 있다. 상기 배양 시 세포 배양 배지를 신선한 배지로 주기적으로 교환할 수 있다. 상기 세포를 약 1일 이상, 약 2일 이상, 약 3일 이상, 약 4일 이상, 약 5일 이상, 약 6일 이상, 약 1주일 이상, 약 10일 이상, 약 2주일 이상, 약 3주일 이상, 약 1개월 이상, 약 1일 내지 약 1개월, 약 1일 내지 약 3주, 약 1일 내지 약 2주, 약 2일 내지 약 2주, 약 3일 내지 약 2주, 약 4일 내지 약 2주, 약 5일 내지 약 2주, 약 6일 내지 약 2주, 또는 약 1주 내지 약 2주 동안 배양할 수 있다.
- [0023] 상기 공정 조건에서 유지된 세포는, 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 실질적으로 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 세포의 포도당 소모량이 증가할 수 있다. 세포는 에너지원으로서 포도당을 사용하기 때문에, 세포의 포도당 소모량이 증가하는 것은 세포의 대사활성이 증가하는 것을 의미할 수 있다. 상기 포도당 소모량은, 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 실질적으로 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서의 포도당 소모량에 비해 약 10% 이상 증가할 수 있다. 예를 들어, 포도당 소모량은 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 99% 이상, 약 100%, 약 10% 내지 약 60%, 약 10% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 40%, 약 10% 내지 약 30%, 약 15% 내지 약 60%, 약 15% 내지 약 50%, 약 15% 내지 약 40%, 약 15% 내지 약 30%, 약 15% 내지 약 20%, 약 20% 내지 약 30%, 약 30% 내지 약 40%, 약 40% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 60%, 약 60% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 90%, 또는 약 90% 내지 약 100% 증가할 수 있다.
- [0024] 상기 공정 조건에서 유지된 세포는, 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 실질적으로 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 세포 생존능 (viability)이 증가할 수 있다. 세포 생존능은 배양된 세포가 배양되는 환경에서 생존, 성장, 또는 증식할 수 있는 활성을 말하고, 세포 생존능(%)은 음성 대조군에 대비하여 실험군에서 살아있는 세포의 수의 상대적인 비율로 산출될 수 있다. 상기 세포 생존능은, 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 실질적으로 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서의 세포 생존능에 비해, 약 3% 이상 증가할 수 있다. 예를 들어, 세포 생존능은 약 5% 이상, 약 8% 이상, 약 10% 이상, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 3% 내지 약 50%, 약 3% 내지 약 40%, 약 3% 내지 약 30%, 약 3% 내지 약 20%, 약 3% 내지 약 10%, 약 3% 내지 약 5%, 약 5% 내지 약 50%, 약 5% 내지 약 40%, 약 5% 내지 약 30%, 약 5% 내지 약 20%, 약 5% 내지 약 10%, 약 10% 내지 약 15%, 약 15% 내지 약 20%, 약 20% 내지 약 30%, 약 30% 내지 약 40%, 약 40% 내지 약 50%, 약 50%

내지 약 60%, 약 60% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 90%, 또는 약 90% 내지 약 100% 증가 할 수 있다.

[0025] 상기 공정 조건에서 유지된 세포는, 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 실질적으로 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 세포의 폴리펩티드 발현 수준 (titer)이 증가할 수 있다. 상기 "세포의 폴리펩티드 발현 수준"은 "역가 (titer)"와 상호교환적으로 치환될 수 있다. 상기 세포의 폴리펩티드 발현 수준은 상기 공정을 통해 수득된 세포 배양 배지 중 단백질의 농도 (g/L)로 나타낼 수 있다. 상기 세포의 폴리펩티드 발현 수준은, 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 실질적으로 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서의 폴리펩티드 발현 수준에 비해, 약 10% 이상 증가할 수 있다. 예를 들어, 세포의 폴리펩티드 발현 수준은 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 99% 이상, 약 100%, 약 10% 내지 약 60%, 약 10% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 40%, 약 15% 내지 약 60%, 약 15% 내지 약 50%, 약 15% 내지 약 40%, 약 15% 내지 약 30%, 약 10% 내지 약 40%, 약 40% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 60%, 약 60% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 90%, 또는 약 90% 내지 약 100% 증가할 수 있다.

[0026] 상기 목적 단백질은 세포를 배양하여 얻고자 하는 단백질을 말한다. 상기 목적 단백질은 세포질성 폴리펩티드, 막성 폴리펩티드, 또는 분비성 폴리펩티드일 수 있다. 상기 목적 단백질은 재조합 단백질일 수 있다. 상기 재조합 단백질은 예를 들어, 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 면역접합체 (immunoadhesin), 형질전환 성장 인자 (Transforming Growth Factor: TGF)-베타 수퍼페밀리 신호전달 분자, 혈액 응고 인자, 항-종양 괴사 인자 수용체 (tumor necrosis factor receptor: TNFR) 항체, 항-인간 표피 성장 인자 수용체 2 (human epidermal growth factor receptor 2: HER2) 항체 및 TNFR:Fc로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 상기 용어 "항체 (antibody)"는 용어 "면역글로불린 (immunoglobulin: Ig)"과 상호교환적으로 사용된다. 완전한 항체는 2개의 전장 (full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합 (disulfide bond: SS-bond)으로 결합한다. 항체는 예를 들면, IgA, IgD, IgE, IgG, 또는 IgM일 수 있다. 상기 항체는 모노클론 항체 또는 폴리클론 항체일 수 있다. 상기 항체는 동물 유래 항체, 마우스-인간 키메릭 항체 (chimeric antibody), 인간화 항체 (humanized antibody), 또는 인간 항체일 수 있다. 상기 용어 "항원 결합 단편 (antigen-binding fragment)"은 면역글로불린 전체 구조에 대한 그의 단편으로, 항원이 결합할 수 있는 부분을 포함하는 폴리펩티드의 일부를 말한다. 예를 들어, 항원 결합 단편은 scFv, (scFv)₂, Fv, Fab, Fab', Fv F(ab')₂, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 면역접합체는 항체 유사 단백질로서, 면역글로불린의 Fc 영역과, 결합 단백질의 기능성 도메인 (예, 수용체, 리간드 세포-부착 (cell-adhesion) 분자)의 융합 단백질을 말한다. TGF-베타 수퍼페밀리 신호전달 분자는 예를 들어 TGF-베타 1, TGF-베타 2, 또는 TGF-베타 3일 수 있다. 상기 혈액 응고 인자는 혈액 응고에 관여하는 인자를 말한다. 상기 혈액 응고 인자는 예를 들어, 피브리노겐, 프로트롬빈, 조직 트롬보플라스틴, 인자 V, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 IX, 인자 X, 인자 XI, 인자 XII, 인자 XIII, 폰 빌레브란트 인자 (von Willebrand factor), 프리칼리크레이 (prekallikrein), 고분자량 키니노겐, 피브로넥틴, 안티트롬빈 III, 해파린 공인자 II, 단백질 C, 단백질 S, 단백질 Z, 단백질 Z-연관 프로테아제 저해제, 플라스미노겐, 알파 2-안티플라스민, 조직 플라스미노겐 활성제, 우로ки나제 (urokinase), 플라스미노겐 활성제 저해제-1, 플라스미노겐 활성제 저해제-2, 또는 암 프로코아글란트 (cancer procoagulant)이다. 상기 항-TNFR 항체는 TNFR에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. 항-HER2 항체는 HER2에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다. TNFR:Fc는 TNFR과 Fc 영역의 융합 단백질을 말한다.

[0027] 상기 목적 단백질은 아바고보맙 (abagovomab), 압시비맙 (abciximab), 아달리무맙 (adalimumab), 아데카투무맙 (adecatumumab), 알렌투주맙 (alemtuzumab), 알투모맙 (altumomab), 알투모맙 펜테테이트 (altumomab pentetate), 아나투모맙 (anatumomab), 아나투모맙 마페나톡스 (anatumomab mafenatox), 아르시투모맙 (arcitumomab), 아틀리주맙 (atlimumab), 바실리지맙 (basiliximab), 벡투모맙 (bectumomab), 엑투모맙 (ectumomab), 벨리무맙 (belimumab), 벤랄리주맙 (benralizumab), 베바시주맙 (bevacizumab), 브렌툭시맙 (brentuximab), 카나키누맙 (canakinumab), 카프로맙 (capromab), 카프로맙 펜데티드 (capromab pentetide), 카투마조맙 (catumaxomab), 세르톨리주맙 (certolizumab), 클리바투주맙 테트라제탄 (clivatuzumab tetraxetan), 다클리주맙 (daclizumab), 데노수맙 (denosumab), 에클리주맙 (eculizumab), 에드레콜로맙 (edrecolomab), 에팔리주맙 (efalizumab), 에타라시주맙 (etaracizumab), 에르투마조맙 (ertumaxomab), 파놀레소맙 (fanolesomab), 폰톨리주맙 (fontolizumab), 겜투주맙 (gentuzumab), 기렌툭시맙 (girentuximab), 골리무맙 (golimumab), 이브리투모맙 (ibrutumomab), 이고보맙 (igevomab), 인플릭시맙 (infliximab), 이플리무맙 (ipilimumab), 라베투주맙 (labetuzumab), 메폴리주맙 (mepolizumab), 무로모납 (muromonab), 무로모납

(muromonab)-CD3, 나탈리주맙 (natalizumab), 네시투무맙 (necitumumab), 니모투주맙 (nimotuzumab), 오파투무맙 (ofatumumab), 오말리주맙 (omalizumab), 오레고보맙 (oregovomab), 팔리비주맙 (palivizumab), 파니투무맙 (panitumumab), 라니비주맙 (ranibizumab), 리툭시맙 (rituximab), 사투모맙 (satumomab), 슬레소맙 (sulesomab), 이브리투모맙 (ibrutinomab), 이브리투모맙 티وخ제탄 (ibrutinomab tiuxetan), 토실리주맙 (tocilizumab), 토시투모맙 (tositumomab), 트라스투주맙 (trastuzumab), 우스케티누맙 (ustekinumab), 비실리주맙 (visilizumab), 보투무맙 (votuzumab), 잘루투무맙 (zalutumumab), 브로달루맙 (brodalumab), 안루킨주맙 (anrukizumab), 바피네우주맙 (bapineuzumab), 달로투주맙 (dalotuzumab), 덴시주맙 (demcizumab), 가니투맙 (ganitumab), 이노투주맙 (inotuzumab), 마브릴리무맙 (mavrilimumab), 모제투모맙 파수도톡스 (moxetumomab pasudotox), 릴로투무맙 (rilotumumab), 시팔리무맙 (sifalimumab), 타네주맙 (tanezumab), 트랄로키누맙 (tralokinumab), 트레멜리무맙 (tremelimumab), 우렐루맙 (urelumab), 아도르나제 알파 (adornase alfa), 레비프 (Rebif), 베카플레르민 (bevacizumab), 알테플라제 (alteplase), 라로니다제 (laranidase), 알레파셉트 (alefacept), 애플리버셉트 (afilbercept), 락시바쿠맙 (Raxibacumab), 다르베포에틴 알파 (darbepoetin alfa), 베카플레르민 농축물 (Becaplermin Concentrate), 인터페론 베타 (interferon beta)-1b, 보툴리눔 독소 유형 (Botulinum Toxin Type) A, 라스부리카제 (rasburicase), 아스파라기나제 (asparaginase), 에포에틴 알파 (epoetin alfa), 에타네르셉트(etanercept), 아갈시다제 베타 (agalsidase beta), 인터페론 알파콘 (interferon alfacon)-1, 인터페론 알파 (interferon alfa)-2a, 아나킨라 (anakinra), 보툴리눔 독소 유형 (Botulinum Toxin Type) B, 페그필그라스팀 (pegfilgrastim), 오프렐베킨 (oprelvekin), 필그라스팀 (filgrastim), 데닐레우킨 디프티톡스 (denileukin diftitox), 페긴테르페론 알파 (peginterferon alfa)-2a, 알데스레우킨 (aldesleukin), 도르나제 알파 (dornase alfa), 인터페론 베타 (interferon beta)-1a, 베타플레르민 (bevacizumab), 레테플라제 (reteplase), 인터페론 알파 (interferon alfa)-2, 테넥테플라제 (tenecteplase), 드로트레코긴 알파 (drotrecogin alfa), 릴로나셉트 (rilonacept), 로미플로스팀 (romiprostim), 메톡시폴리에틸렌 글리콜 (methoxypolyethylene glycol)-에포에틴 베타(epoetin beta), C1 에스테라제 (esterase) 저해제, 이두르술파제 (idursulfase), 알글루코시다제 알파 (alglucosidase alfa), 아바타셉트 (abatacept), 갈술파제 (galsulfase), 팔리페르민 (palifermin) 및 인터페론 감마 (interferon gamma)-1b로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0028]

상기 폴리펩티드는 목적 단백질일 수 있다.

[0029]

다른 양상은 글루타민-불포함 세포 배양 배지에서 목적 단백질 생산 시 원치 않는 배양 부산물을 감소시키는 향상된 배양 공정으로서,

[0030]

포유동물 세포를 글루타민-불포함 세포 배양 배지에서, 세포의 생존 또는 증식을 허용하는 조건 하에서, 배양하는 단계를 포함하고,

[0031]

상기 세포 배양 배지는 약 150 μM 내지 약 300 μM 의 하이포잔틴 및 약 25 μM 내지 약 150 μM 의 티미딘 (thymidine)을 포함하고,

[0032]

상기 공정 조건에서 유지된 세포는, 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 실질적으로 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 원치 않는 배양 부산물로서 암모니아 양의 감소, 세포의 포도당 소모량의 증가, 세포 생존능의 증가 및 세포의 폴리펩티드 발현 수준의 증가 중 어느 하나 이상을 나타내는 것인 공정을 제공한다.

[0033]

상기 세포, 세포 배양 배지, 글루타민-불포함 세포 배양 배지, 배양 부산물, 원치 않는 배양 부산물, 세포의 생존 또는 증식을 허용하는 조건, 배양, 하이포잔틴, 티미딘, 암모니아, 포도당 소모량, 세포 생존능, 폴리펩티드, 및 세포의 폴리펩티드 발현 수준은 전술한 바와 같다.

[0034]

상기 공정 조건에서 유지된 세포는, 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 실질적으로 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 원치 않는 배양 부산물로서 암모니아 양의 감소, 세포의 포도당 소모량의 증가, 세포 생존능의 증가 및 세포의 폴리펩티드 발현 수준의 증가 중 어느 하나 이상을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 상기 암모니아 양의 감소는 약 10% 이상 감소, 상기 세포의 포도당 소모량의 증가는 약 10% 이상 증가, 상기 세포 생존능의 증가는 약 3% 이상 증가, 상기 세포의 폴리펩티드 발현 수준의 증가는 약 10% 이상 증가, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0035]

상기 일 양상에 따른 공정 및 다른 양상에 따른 공정에서, 상기 공정은 상기 세포 배양 배지에 우리딘 (uridine)을 보충하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 우리딘은 피리미딘 뉴클레오시드의 화합물이다. 우리딘

은 천연 또는 합성된 우리딘일 수 있다. 상기 세포 배양 배지 중 우리딘의 양은 약 0.01 mM 내지 약 100 mM, 약 0.05 mM 내지 약 95 mM, 약 0.1 mM 내지 약 90 mM, 약 0.1 mM 내지 약 85 mM, 약 0.5 mM 내지 약 80 mM, 약 1 mM 내지 약 80 mM, 약 1 mM 내지 약 75 mM, 약 1 mM 내지 약 70 mM, 약 1 mM 내지 약 65 mM, 약 1 mM 내지 약 60 mM, 약 1 mM 내지 약 55 mM, 약 1 mM 내지 약 50 mM, 약 1 mM 내지 약 45 mM, 약 1 mM 내지 약 40 mM, 약 1 mM 내지 약 35 mM, 약 1 mM 내지 약 30 mM, 약 1 mM 내지 약 25 mM, 약 1 mM 내지 약 20 mM, 약 1.5 mM 내지 약 20 mM, 약 2 mM 내지 약 20 mM, 약 2 mM 내지 약 15 mM, 약 2 mM 내지 약 10 mM, 약 2.5 mM 내지 약 10 mM, 약 2.5 mM 내지 약 9 mM, 약 2.5 mM 내지 약 8 mM, 약 3 mM 내지 약 8 mM, 약 3 mM 내지 약 7 mM, 약 3.5 mM 내지 약 7 mM, 약 3.5 mM 내지 약 6 mM, 약 3.5 mM 내지 약 5 mM, 또는 약 4 mM일 수 있다. 상기 보충은 배양 초기 또는 배양 중 세포 배양 배지에 첨가되는 것일 수 있다.

[0036] 상기 일 양상에 따른 공정 및 다른 양상에 따른 공정에서, 상기 공정은 상기 세포 배양 배지에 마그네슘 (Magnesium: Mg)을 보충하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 마그네슘은 마그네슘 이온 또는 마그네슘 염일 수 있다. 상기 세포 배양 배지 중 마그네슘의 양은 약 0.01 mM 내지 약 100 mM, 약 0.01 mM 내지 약 95 mM, 약 0.01 mM 내지 약 90 mM, 약 0.01 mM 내지 약 85 mM, 약 0.01 mM 내지 약 50 mM, 약 0.05 mM 내지 약 85 mM, 약 0.05 mM 내지 약 80 mM, 약 0.1 mM 내지 약 80 mM, 약 0.1 mM 내지 약 75 mM, 약 0.1 mM 내지 약 70 mM, 약 0.1 mM 내지 약 65 mM, 약 0.1 mM 내지 약 60 mM, 약 0.1 mM 내지 약 55 mM, 약 0.1 mM 내지 약 50 mM, 약 0.2 mM 내지 약 50 mM, 약 0.2 mM 내지 약 45 mM, 약 0.2 mM 내지 약 40 mM, 약 0.2 mM 내지 약 35 mM, 약 0.4 mM 내지 약 35 mM, 약 0.4 mM 내지 약 30 mM, 약 0.4 mM 내지 약 25 mM, 약 0.4 mM 내지 약 20 mM, 약 0.5 mM 내지 약 25 mM, 약 0.6 mM 내지 약 20 mM, 약 0.6 mM 내지 약 15 mM, 약 0.6 mM 내지 약 10 mM, 약 0.6 mM 내지 약 9 mM, 약 0.6 mM 내지 약 8 mM, 약 0.6 mM 내지 약 7 mM, 약 0.6 mM 내지 약 6 mM, 약 0.6 mM 내지 약 5 mM, 약 0.8 mM 내지 약 5 mM, 약 0.8 mM 내지 약 4 mM, 약 0.8 mM 내지 약 3 mM, 약 0.8 mM 내지 약 2 mM, 약 0.8 mM 내지 약 1.5 mM, 약 0.8 mM 내지 약 1.2 mM, 또는 약 1 mM일 수 있다. 상기 보충은 배양 초기 또는 배양 중 세포 배양 배지에 첨가되는 것일 수 있다.

[0037] 다른 양상은 글루타민-불포함 세포 배양 배지에서 목적 단백질을 생산하는 향상된 배양 공정으로서,

[0038] 포유동물 세포를 글루타민-불포함 세포 배양 배지에서, 세포의 생존 또는 증식을 허용하는 조건 하에서, 배양하는 단계를 포함하고,

[0039] 상기 세포 배양 배지는 약 0.01 mM 내지 약 100 mM 우리딘을 포함하는 것인 공정을 제공한다.

[0040] 상기 세포, 세포 배양 배지, 글루타민-불포함 세포 배양 배지, 목적 단백질, 세포의 생존 또는 증식을 허용하는 조건, 배양, 및 우리딘은 전술한 바와 같다.

[0041] 상기 세포 배양 배지에서 유지된 세포는, 우리딘을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 세포 생존능이 증가할 수 있다. 상기 세포 생존능은, 우리딘을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서의 세포 생존능에 비해, 약 3% 이상 증가할 수 있다. 예를 들어, 세포 생존능은 약 5% 이상, 약 8% 이상, 약 10% 이상, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 3% 내지 약 50%, 약 3% 내지 약 40%, 약 3% 내지 약 30%, 약 3% 내지 약 20%, 약 3% 내지 약 10%, 약 3% 내지 약 5%, 약 5% 내지 약 50%, 약 5% 내지 약 40%, 약 5% 내지 약 30%, 약 5% 내지 약 20%, 약 5% 내지 약 10%, 약 10% 내지 약 15%, 약 15% 내지 약 20%, 약 20% 내지 약 30%, 약 30% 내지 약 40%, 약 40% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 60%, 약 60% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 90%, 또는 약 90% 내지 약 100% 증가할 수 있다.

[0042] 상기 세포 배양 배지에서 유지된 세포는, 우리딘을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 세포 수(Viable Cell Density: VCD)가 증가할 수 있다. 상기 세포 수는, 우리딘을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서의 세포 수에 비해, 약 5% 이상 증가할 수 있다. 예를 들어, 세포 수는 약 5% 이상, 약 10% 이상, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 3% 내지 5%, 약 5% 내지 약 10%, 약 5% 내지 약 60%, 약 5% 내지 약 50%, 약 5% 내지 약 40%, 약 5% 내지 약 30%, 약 5% 내지 약 20%, 약 10% 내지 약 60%, 약 10% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 40%, 약 10% 내지 약 30%, 약 10% 내지 약 20%, 약 10% 내지 약 15%, 약 20% 내지 약 30%, 약 30% 내지 약 40%, 약 40% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 60%, 약 60% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 90%, 또는 약 90% 내지 약 100% 증가할 수 있다.

[0043] 상기 세포 배양 배지는 약 20 μ M 내지 약 1000 μ M의 하이포잔틴 및 약 2 μ M 내지 약 1000 μ M의 티미딘을 더

포함할 수 있다. 상기 세포 배양 배지에서 유지된 세포는, 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 실질적으로 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 상기 세포 배양 배지의 원치 않는 배양 부산물로서 암모니아의 양이 감소할 수 있다. 상기 암모니아의 양은, 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 실질적으로 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 99% 이상, 약 100%, 약 10% 내지 약 60%, 약 10% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 40%, 약 20% 내지 약 60%, 약 20% 내지 약 50%, 약 20% 내지 약 40%, 약 20% 내지 약 30%, 약 30% 내지 약 40%, 약 40% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 60%, 약 60% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 90%, 또는 약 90% 내지 약 100% 감소될 수 있다.

[0044] 다른 양상은 글루타민-불포함 세포 배양 배지에서 목적 단백질을 생산하는 향상된 배양 공정으로서,

[0045] 포유동물 세포를 글루타민-불포함 세포 배양 배지에서, 세포의 생존 또는 증식을 허용하는 조건 하에서, 배양하는 단계를 포함하고,

[0046] 상기 세포 배양 배지는 약 0.01 mM 내지 약 100 mM 마그네슘을 포함하는 것인 공정을 제공한다.

[0047] 상기 세포, 세포 배양 배지, 글루타민-불포함 세포 배양 배지, 목적 단백질, 세포의 생존 또는 증식을 허용하는 조건, 배양, 및 마그네슘은 전술한 바와 같다.

[0048] 상기 세포 배양 배지에서 유지된 세포는, 마그네슘을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 세포 생존능이 증가할 수 있다. 상기 세포 생존능은, 마그네슘을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서의 세포 생존능에 비해, 약 1% 이상 증가할 수 있다. 예를 들어, 세포 생존능은 약 1.5% 이상, 약 2% 이상, 약 3% 이상, 약 5% 이상, 약 10% 이상, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 1% 내지 약 5%, 약 1% 내지 약 10%, 약 1% 내지 약 20%, 약 1% 내지 약 30%, 약 1.5% 내지 약 5%, 약 1.5% 내지 약 10%, 약 1.5% 내지 약 20%, 약 1.5% 내지 약 30%, 약 3% 내지 5%, 약 5% 내지 약 10%, 약 5% 내지 약 15%, 약 10% 내지 약 15%, 약 15% 내지 약 20%, 약 20% 내지 약 30%, 약 30% 내지 약 40%, 약 40% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 60%, 약 60% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 90%, 또는 약 90% 내지 약 100% 증가할 수 있다.

[0049] 상기 세포 배양 배지에서 유지된 세포는, 마그네슘을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 세포 수가 증가할 수 있다. 상기 세포 수는, 마그네슘을 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서의 세포 수에 비해, 약 5% 이상 증가할 수 있다. 예를 들어, 세포 수는 약 10% 이상, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 5% 내지 약 60%, 약 5% 내지 약 50%, 약 5% 내지 약 40%, 약 5% 내지 약 30%, 약 5% 내지 약 20%, 약 5% 내지 약 10%, 약 10% 내지 약 60%, 약 10% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 40%, 약 10% 내지 약 30%, 약 10% 내지 약 20%, 약 10% 내지 약 15%, 약 20% 내지 약 30%, 약 30% 내지 약 40%, 약 40% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 60%, 약 60% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 90%, 또는 약 90% 내지 약 100% 증가할 수 있다.

[0050] 상기 세포 배양 배지는 약 20 μM 내지 약 1000 μM 의 하이포잔틴 및 약 2 μM 내지 약 1000 μM 의 티미딘을 더 포함할 수 있다. 상기 세포 배양 배지에서 유지된 세포는, 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 실질적으로 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 상기 세포 배양 배지의 원치 않는 배양 부산물로서 암모니아의 양이 감소할 수 있다. 상기 암모니아의 양은, 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 실질적으로 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지에서 보다, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 99% 이상, 약 100%, 약 10% 내지 약 60%, 약 10% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 40%, 약 20% 내지 약 60%, 약 20% 내지 약 50%, 약 20% 내지 약 40%, 약 20% 내지 약 30%, 약 30% 내지 약 40%, 약 40% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 60%, 약 60% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 90%, 또는 약 90% 내지 약 100% 감소될 수 있다.

[0051] 상기 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 실질적으로 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지는 100 μM 미만, 90 μM 이하, 80 μM 이하, 70 μM 이하, 60 μM 이하, 50 μM 이하, 40 μM 이하, 30 μM 이하, 20 μM 이하, 10 μM 이하, 5 μM 이하, 또는 1 μM 이하의 하이포잔틴을 포함하거나, 하이포잔틴을 포함하지 않는 배지일 수 있다. 상기 하이포잔틴 및 티미딘 중 어느 하나 이상을 실질적으로 포함하지 않는 글루타민-불포함 배양 배지는 16 μM 미만, 15 μM 이하, 14 μM 이하, 13 μM 이하, 12 μM 이하, 11 μM 이하, 10 μM 이하, 9 μM 이하, 8 μM 이하, 7 μM 이하, 6 μM 이하, 5 μM 이하, 4 μM 이하, 3 μM 이하, 2 μM 이하, 또는 1 μM 이하의 티미딘을 포함하거나, 티미딘을 포함하지 않는 배지일 수 있다.

[0052] 일 양상 또는 다른 양상에 있어서, 상기 배양 공정은 1회 이상의 온도 변화 조건, 1회 이상의 pH 변화 조건, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0053] 상기 온도 변화 조건은, 제1 온도에서 세포가 배지에서 3일 이상 성장하고, 제1 온도 보다 약 1°C 내지 약 8°C 낮은 제2 온도로 온도가 변화되며, 상기 제2 온도에서 세포가 약 2일 이상 유지(maintain)될 수 있다. 상기 세포는 제1 온도에서 배지에서 약 3일 이상, 약 4일 이상, 약 1주일 이상, 약 2일 내지 약 1주, 또는 약 2일 내지 약 4일 동안 성장할 수 있다. 상기 세포는 제2 온도에서 배지에서 약 2일 이상, 약 3일 이상, 약 4일 이상, 약 1주일 이상, 약 2주일 이상, 약 3주일 이상, 약 1개월 이상, 약 1일 내지 약 1개월, 약 1일 이상 약 3주, 약 1일 이상 약 2주, 약 1일 이상 약 1주, 또는 약 1일 이상 약 4일 동안 유지될 수 있다. 상기 제1 온도는 약 30°C 내지 약 42°C, 약 32°C 내지 약 42°C, 약 32°C 내지 약 40°C, 약 34°C 내지 약 40°C, 약 36°C 내지 약 40°C, 또는 약 37°C일 수 있다. 상기 제2 온도는 약 25°C 내지 약 41°C, 약 27°C 내지 약 41°C, 약 27°C 내지 약 40°C, 약 30°C 내지 약 40°C, 약 30°C 내지 약 37°C, 약 30°C 내지 약 35°C, 약 30°C 내지 약 33°C, 또는 약 31°C 내지 약 33°C일 수 있다. 상기 변화되는 온도의 차이는 예를 들어 약 1°C 내지 약 8°C, 약 1°C 내지 약 7°C, 약 1°C 내지 약 6°C, 약 1°C 내지 약 5°C, 약 1°C 내지 약 4°C, 약 1°C 내지 약 3°C, 또는 약 1°C 내지 약 2°C일 수 있다.

[0054] 상기 pH 변화 조건은, 제1 pH 값에서 세포가 배지에서 약 2일 이상 성장하고, 제1 pH값 보다 약 0.05 내지 약 1낮은 제2 pH로 pH 변화가 되며, 상기 제2 pH 값에서 세포가 약 1일 이상 성장할 수 있다. 상기 세포는 제1 pH 값에서 배지에서 약 2일 이상, 약 3일 이상, 약 4일 이상, 약 1주일 이상, 약 2일 내지 약 1주, 또는 약 2일 내지 약 4일 동안 성장할 수 있다. 상기 세포는 제2 pH 값에서 배지에서 약 1일 이상, 약 2일 이상, 약 3일 이상, 약 4일 이상, 약 1주일 이상, 약 2주일 이상, 약 3주일 이상, 약 1개월 이상, 약 1일 내지 약 1개월, 약 1일 이상 약 3주, 약 1일 이상 약 2주, 약 1일 이상 약 1주, 또는 약 1일 이상 약 4일 동안 유지될 수 있다. 상기 제1 pH 값은 약 pH 6.8 내지 약 pH 7.5, 약 pH 6.8 내지 약 pH 7.2, 약 pH 6.8 내지 약 pH 7.0, 또는 약 pH 7.0 내지 약 pH 7.2일 수 있다. 상기 제2 pH 값은 약 pH 6.0 내지 약 pH 7.1, 약 pH 6.0 내지 약 pH 7.0, 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.8, 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.6, 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.4, 또는 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.2일 수 있다. 상기 변화되는 pH의 차이는 예를 들어 pH 약 0.05 내지 약 1, 약 0.05 내지 약 0.9, 약 0.05 내지 약 0.8, 약 0.05 내지 약 0.7, 약 0.05 내지 약 0.6, 약 0.05 내지 약 0.5, 약 0.05 내지 약 0.4, 약 0.05 내지 약 0.3, 약 0.05 내지 약 0.2, 약 0.05 내지 약 0.1, 또는 약 0.05 내지 약 0.08일 수 있다.

[0055] 일 양상 또는 다른 양상에 있어서, 상기 공정은 글루타민-불포함 세포 배양 배지에서 포도당이 약 2 g/L 이상의 농도로 유지되도록 포도당을 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0056] 상기 세포 배양 배지 중 포도당의 농도는 약 2 g/L 이상, 약 2.5 g/L 이상, 약 3.0 g/L 이상, 약 3.5 g/L 이상, 약 4 g/L 이상, 약 4.5 g/L 이상, 약 5 g/L 이상, 약 5.5 g/L 이상, 약 6 g/L 이상, 약 7 g/L 이하, 약 2 g/L 내지 약 7 g/L, 약 2 g/L 내지 약 6 g/L, 약 2.5 g/L 내지 약 5.5 g/L, 약 3 g/L 내지 약 5 g/L, 약 3.5 g/L 내지 약 5 g/L, 또는 약 3.5 g/L 내지 약 4.5 g/L로 유지될 수 있다. 상기 포도당은 세포 배양 중에 세포 배양 배지에 첨가될 수 있다.

발명의 효과

[0057] 일 양상 또는 다른 양상에 따라, 세포를 글루타민-불포함 배지에 하이포잔틴, 티미딘, 우리딘, 마그네슘, 또는 이들의 조합을 첨가한 배지에서 배양하여 세포에 의한 암모니아 생성을 감소시키고, 세포의 폴리펩티드 발현 수준을 증가시키고, 세포의 수를 증가시키고, 세포 생존능을 증가시킬 수 있고, 이에 의해 세포로부터 목적 단백질의 생산량을 현저하게 증가시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 하이포잔틴 및 티미딘의 존재에서 CHO 세포의 배양 시간(일)에 대한 세포 배양 배지(글루타민-불포함) 중 암모니아의 농도(mM)를 나타내는 그래프이다 (■: 0 mM 글루타민 + 2x HT, ●: 0 mM 글루타민 + 1x HT).

도 2는 하이포잔틴 및 티미딘의 존재에서 CHO 세포의 배양 시간(일)에 대한 세포 배양 배지 (글루타민-불포함) 중 포도당의 농도 (g/L)를 나타내는 그래프이다 (■: 0 mM 글루타민 + 2x HT, ●: 0 mM 글루타민 + 1x HT).

도 3은 하이포잔틴 및 티미딘의 존재에서 CHO 세포의 배양 시간(일)에 대한 세포 생존능(%)을 나타내는 그래프이다 (■: 0 mM 글루타민 + 2x HT, ●: 0 mM 글루타민 + 1x HT).

도 4는 하이포잔틴 및 티미딘의 존재에서 CHO 세포의 배양 시간(일)에 대한 세포의 폴리펩티드 발현 수준 (g/L)를 나타내는 그래프이다 (■: 0 mM 글루타민 + 2x HT, ▨: 0 mM 글루타민 + 1x HT).

도 5a는 2x HT 배지에 4 mM 우리딘을 가한 경우 배양 시간(일)에 대한 세포의 수 (CHO 세포/ml)를 나타내는 그래프이다 (■: 0 mM 글루타민 + 2x HT + 4 mM 우리딘, ●: 0 mM 글루타민 + 2x HT).

도 5b는 2x HT 배지에 8 mM 갈락토스를 가한 경우 배양 시간(일)에 대한 세포의 수 (CHO 세포/ml)를 나타내는 그래프이다 (■: 0 mM 글루타민 + 2x HT + 8 mM 갈락토스, ●: 0 mM 글루타민 + 2x HT).

도 6a는 2x HT 배지에 4 mM 우리딘을 가한 경우 배양 시간(일)에 대한 세포 생존능(%)을 나타내는 그래프이다 (■: 0 mM 글루타민 + 2x HT + 4 mM 우리딘, ●: 0 mM 글루타민 + 2x HT).

도 6b는 2x HT 배지에 8 mM 갈락토스를 가한 경우 배양 시간(일)에 대한 세포 생존능(%)을 나타내는 그래프이다 (■: 0 mM 글루타민 + 2x HT + 8 mM 갈락토스, ●: 0 mM 글루타민 + 2x HT).

도 7 및 도 8은 2x HT 배지에 1 mM의 마그네슘을 가한 경우 각각 세포의 수 (CHO 세포/ml) 및 세포 생존능(%)을 나타내는 그래프이다 (■: 0 mM 글루타민 + 2x HT + 1 mM의 마그네슘, ●: 0 mM 글루타민 + 2x HT).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059]

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0060]

실시예 1. 2x HT의 존재에 따른 세포 배양 배지 중 암모니아 및 포도당 농도의 변화

[0061]

세포를 배양하면 세포 배양 배지 중의 암모니아의 농도가 높아지고, 암모니아는 세포 독성을 나타낸다. 또한, 세포 배양 시, 세포의 수가 증가함에 따라 세포가 소모하는 포도당의 양이 증가하고, 세포 배양 배지 중의 포도당 함량이 감소하게 된다. 세포 배양 배지에 2x HT를 가한 경우, 세포 배양 시 세포에 의해 생성되는 암모니아의 양이 감소하고, 세포의 포도당 소모량이 증가하는지 여부를 확인하였다.

[0062]

우선, 융합 단백질을 발현하는 세포주 (CHO 세포주)를 준비하고 (세포주는 CHO 셀라인에 융합 단백질을 발현하는 벡터를 형질감염시켜 자체 제작함), 상기 세포를 글루타민을 포함하지 않는 배지에서 배양하였다. 9×10^5 세포 /ml의 세포 배양 접시에 접종하고, 글루타민을 포함하지 않는 배지를 가하였다. 배지에 10 mM 소듐 하이포잔틴 및 1.6 mM 티미딘의 100X 스톡 (카탈로그 번호: 11067030, Gibco)을 가하여 배지 중 최종 농도 100 μ M 하이포잔틴 및 16 μ M 티미딘 (이하, "1x HT"로 기재함), 또는 200 μ M 하이포잔틴 및 32 μ M 티미딘 (이하, "2x HT"로 기재함)이 되도록 하였다. 세포를 37°C의 온도 및 5% CO_2 의 조건 하에서 배양하였고, 배지를 2일마다 신선한 배지로 교환하였다.

[0063]

약 15일 동안 배양하면서, 배양 시간(일)에 따른 배지 중 암모니아의 농도 (mM) 및 포도당의 농도 (g/L)를 Bioprofile 어날라이저 (모델 번호: BioProfile 400, Nova Biomedical)에서 암모늄 이온-선택적 전극과 포도당 맴브레인 키트 (카탈로그 번호: 24458, Nova Biomedical)를 이용하여 측정하였다. 측정된 결과를 각각 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[0064]

도 1에 나타난 바와 같이, 글루타민-불포함 배지에 1x HT를 가한 경우에 비해 2x HT를 가한 경우, 세포 배양 시간에 따라 세포 배양 배지 중 암모니아의 농도가 현저하게 감소하였다. 예를 들어, 배양한지 14일 경과 후, 1x HT를 가한 경우에는 배지 중 암모니아의 농도가 3.31 mM인 반면에, 2x HT를 가한 경우에는 배지 중 암모니아의 농도가 2.21 mM로 감소하였다.

[0065]

또한, 도 2에서 나타난 바와 같이, 글루타민-불포함 배지에 1x HT를 가한 경우에 비해 2x HT를 가한 경우, 세포 배양 시간에 따라 세포 배양 배지 중 포도당의 농도가 현저하게 감소하였다. 예를 들어, 배양한지 14일 경과 후, 1x HT를 가한 경우에는 배지 중 포도당의 농도가 14.00 g/L인 반면에, 2x HT를 가한 경우에는 배지 중 포도당의 농도가 11.12 g/L로 감소하였다.

[0066]

따라서, 세포 배양 시 글루타민-불포함 및 2x HT를 포함하는 배지에서 세포를 배양할 경우, 글루타민-불포함 및 1x HT를 포함하는 배지에서 배양하는 경우에 비해, 세포에 의한 암모니아 생산이 감소하고, 생산된 암모니아에 의한 세포 독성이 감소하고, 이에 따라 세포의 포도당 소모량이 증가함을 확인하였다.

[0067]

실시예 2. 2x HT의 존재에 의한 세포 생존능 및 세포의 폴리펩티드 발현 수준의 변화

- [0068] 세포를 글루타민 불포함 및 2x HT의 존재에서 배양할 경우, 글루타민 불포함 및 1x HT의 존재에서 배양하는 경우와 비교하여, 배양된 세포의 세포 생존능 (viability) 및 세포의 폴리펩티드 발현 수준 (titer)에 차이가 있는지 확인하였다.
- [0069] 실시예 1에 기재된 방법과 동일한 방법으로 세포를 글루타민 불포함 및 2x HT, 또는 글루타민 불포함 및 1x HT의 존재에서 배양하였다. 음성 대조군으로서 글루타민 불포함 배지에서 배양한 세포를 사용하였다.
- [0070] 음성 대조군에 대한 상대적인 세포의 생존능(%) 및 폴리펩티드 발현 수준(g/L)을 각각 Cedex HiRes 어날라이저 (모델 번호: 05650216001, Roche)와 HPLC (모델 번호: 720000370EN, Waters)를 이용하여 트립판 블루 배제 (Trypan blue exclusion) 방법과 UV280 측정 방법을 통해서 측정하였다. 측정된 결과를 각각 도 3 및 도 4에 나타내었다.
- [0071] 도 3 및 도 4에 나타난 바와 같이, 글루타민-불포함 및 1x HT를 포함하는 배지에서 세포를 배양한 경우에 비해 글루타민-불포함 및 2x HT를 포함하는 배지에서 세포를 배양한 경우, 세포의 생존능 및 세포의 폴리펩티드 발현 수준이 유의하게 증가하였다. 예를 들어, 배양한지 14일 경과 후, 1x HT를 가한 경우에는 세포 생존능이 81.4(%)인 반면에, 2x HT를 가한 경우에는 배지 중 포도당의 농도가 88.1%로 증가하였다. 또한, 배양한지 14일 경과 후, 1x HT를 가한 경우에는 세포의 폴리펩티드 발현 수준이 1.29 g/L인 반면에, 2x HT를 가한 경우에는 배지 중 포도당의 농도가 1.76 g/L로 증가하였다.
- [0072] 실시예 3. 우리딘의 첨가에 의한 세포의 수 및 세포 생존능에의 영향**
- [0073] 2x HT에 우리딘을 첨가한 배지에서 세포를 배양할 경우, 우리딘의 첨가에 의한 세포의 수 (Viable Cell Density: VCD) 및 세포 생존능에 영향이 있는지 여부를 확인하였다.
- [0074] 실시예 1에 기재된 방법과 동일한 방법으로 세포를 준비하고, 준비된 세포에 글루타민 불포함 및 2x HT를 포함한 배지를 가하였다. 배지에 4 mM의 우리딘 (카탈로그 번호: U3003, Sigma) 또는 8 mM 갈락토스 (카탈로그 번호: G0750, Sigma)를 가하였다. 세포를 37°C의 온도 및 5% CO₂의 조건 하에서 배양하였고, 배지를 2일 마다 신선한 배지로 교환하였다. 음성 대조군으로서 글루타민 불포함 배지에서 배양한 세포를 사용하였다.
- [0075] 약 14일 후, 세포의 수 및 세포 생존능을 Cedex HiRes 어날라이저 (모델 번호: 05650216001, Roche)에서 스캐너-기반 이미지화 방법과 트립판 블루 배제 방법을 사용하여 측정하였다. 우리딘 및 갈락토스의 존재에서 배양된 세포의 수 (CHO 세포/mL)를 각각 도 5a 및 도 5b에 나타내었다. 또한, 우리딘 및 갈락토스의 존재에서 배양된 세포의 생존능(%)을 각각 도 6a 및 도 6b에 나타내었다.
- [0076] 도 5a에 나타난 바와 같이, 글루타민 불포함 및 2x HT 포함 배지에 우리딘을 추가한 경우에는 우리딘을 추가하지 않은 경우에 비해, 배양된 세포의 수가 유의하게 증가하였다. 예를 들어, 배양한지 14일 경과 후, 우리딘을 포함하지 않는 경우에는 세포의 수가 67.22 세포/mL인 반면에, 우리딘을 포함한 경우에는 세포의 수가 79.37 세포/mL로 증가하였다.
- [0077] 반면에, 도 5b에 나타난 바와 같이, 글루타민 불포함 및 2x HT 포함 배지에 갈락토스를 추가한 경우에는 갈락토스를 추가하지 않은 경우에 비해, 배양된 세포의 수에 유의한 차이가 없었다.
- [0078] 도 6a에 나타난 바와 같이, 글루타민 불포함 및 2x HT 포함 배지에 우리딘을 추가한 경우에는 우리딘을 추가하지 않은 경우에 비해, 배양된 세포의 생존능이 유의하게 증가하였다. 예를 들어, 배양한지 14일 경과 후, 우리딘을 포함하지 않는 경우에는 세포 생존능이 89.6%인 반면에, 우리딘을 포함한 경우에는 세포 생존능이 94.6%로 증가하였다.
- [0079] 반면에, 도 6b에 나타난 바와 같이, 글루타민 불포함 및 2x HT 포함 배지에 갈락토스를 추가한 경우에는 갈락토스를 추가하지 않은 경우에 비해, 배양된 세포의 수에 유의한 차이가 없었다.
- [0080] 따라서, 세포를 2x HT 및 우리딘을 포함한 배지에서 배양할 경우, 세포의 수 및 세포 생존능이 현저하게 높아짐을 확인하였다.
- [0081] 실시예 4. 마그네슘의 첨가에 의한 세포의 수 및 세포 생존능에의 영향**
- [0082] 실시예 3과 유사하게, 2x HT에 마그네슘을 첨가한 배지에서 세포를 배양할 경우, 마그네슘의 첨가에 의한 세포의 수 및 세포 생존능에 영향이 있는지 여부를 확인하였다.
- [0083] 실시예 1에 기재된 방법과 동일한 방법으로 세포를 준비하고, 준비된 세포에 글루타민 불포함 및 2x HT를 포함

한 배지를 가하였다. 배지에 1 mM의 마그네슘 (카탈로그 번호: M4880, Sigma)을 가하였다. 세포를 37°C의 온도 및 5% CO₂의 조건 하에서 배양하였고, 배지를 2일마다 신선한 배지로 교환하였다. 음성 대조군으로서 글루타민 불포함 배지에서 배양한 세포를 사용하였다.

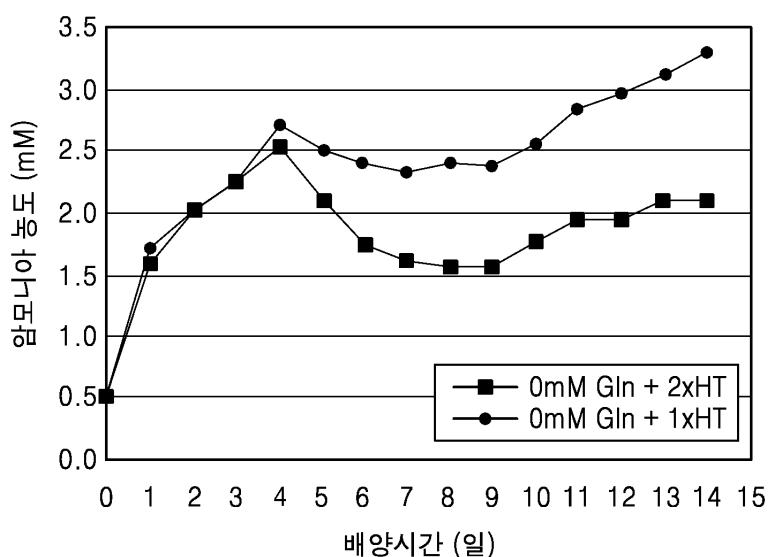
[0084] 약 14일 후, 세포의 수 및 세포 생존능을 각각 Cedex HiRes 어날라이저 (모델 번호: 05650216001, Roche)에서 스캐너 기반 이미지화 방법과 트립판 블루 배제 방법을 사용하여 측정하였다. 마그네슘의 존재에서 배양된 세포의 수 (CHO 세포/mL) 및 세포 생존능을 각각 도 7 및 도 8에 나타내었다.

[0085] 도 7 및 도 8에 나타난 바와 같이, 글루타민 불포함 및 2x HT 포함 배지에 마그네슘을 추가한 경우에는 마그네슘을 추가하지 않은 경우에 비해, 배양된 세포의 수가 유의하게 증가하고, 세포 생존능이 유의하게 증가하였다. 예를 들어, 배양한지 14일 경과 후, 마그네슘을 포함하지 않는 경우에는 세포의 수가 67.22 세포/mL인 반면에, 마그네슘을 포함한 경우에는 세포의 수가 76.35 세포/mL로 증가하였다. 또한, 배양한지 14일 경과 후, 마그네슘을 포함하지 않는 경우에는 세포 생존능이 89.6%인 반면에, 마그네슘을 포함한 경우에는 세포 생존능이 91.5%로 증가하였다.

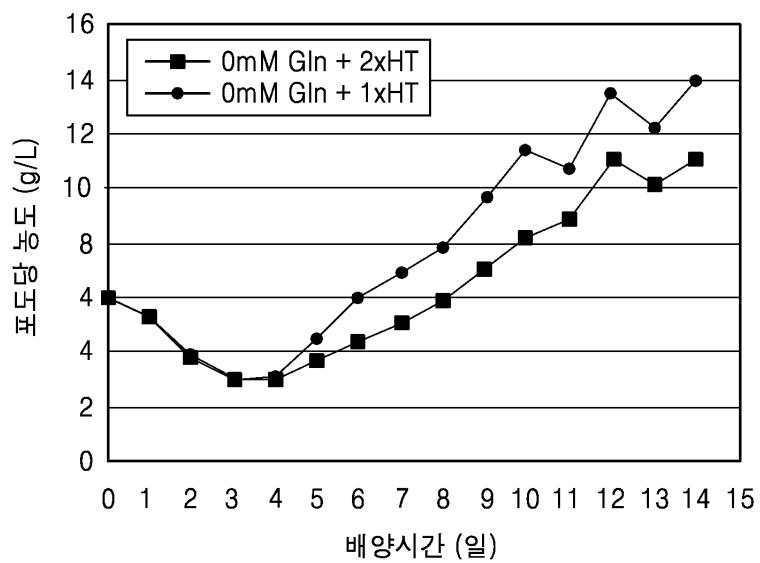
[0086] 따라서, 세포를 2x HT 및 마그네슘을 포함한 배지에서 배양할 경우, 세포의 수 및 세포 생존능이 현저하게 높아짐을 확인하였다.

도면

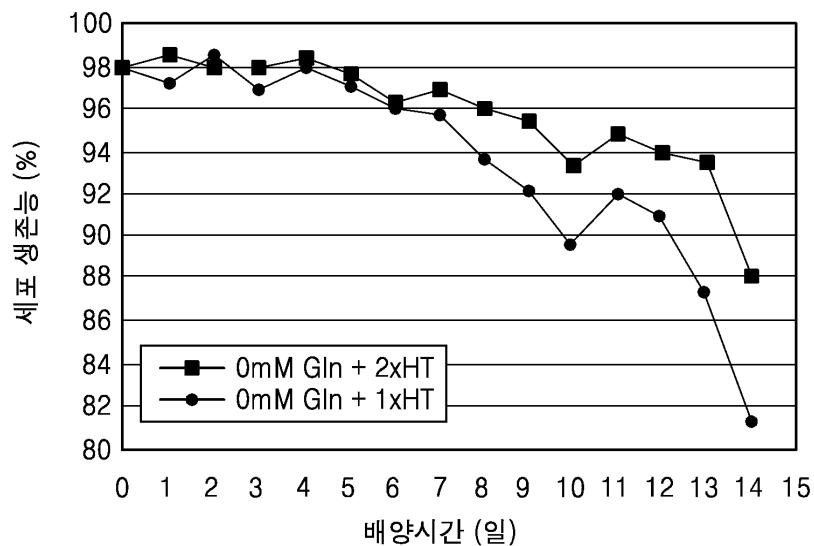
도면1



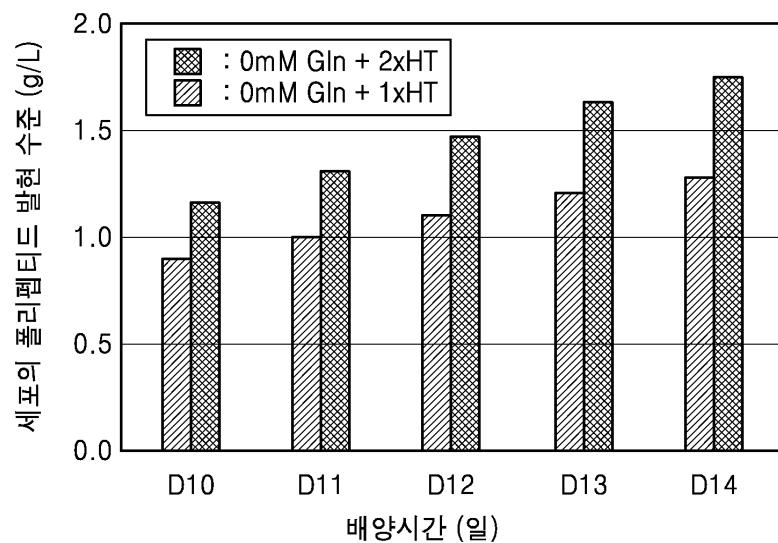
도면2



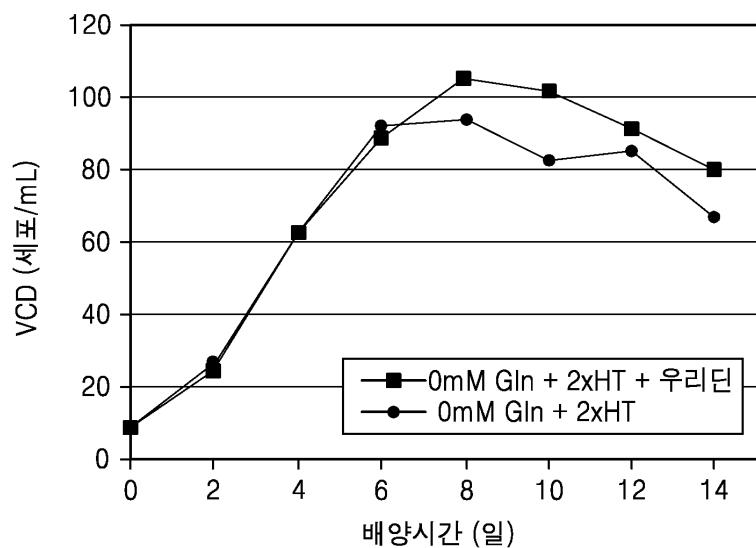
도면3



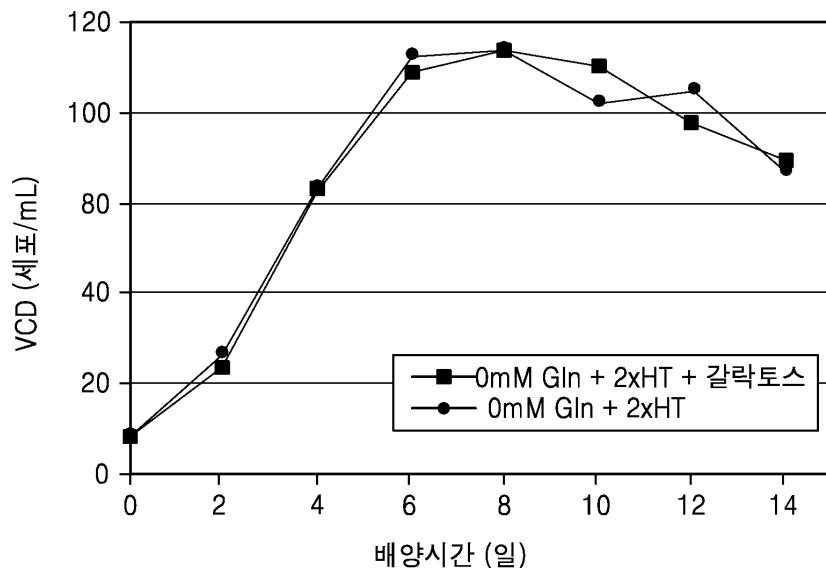
도면4



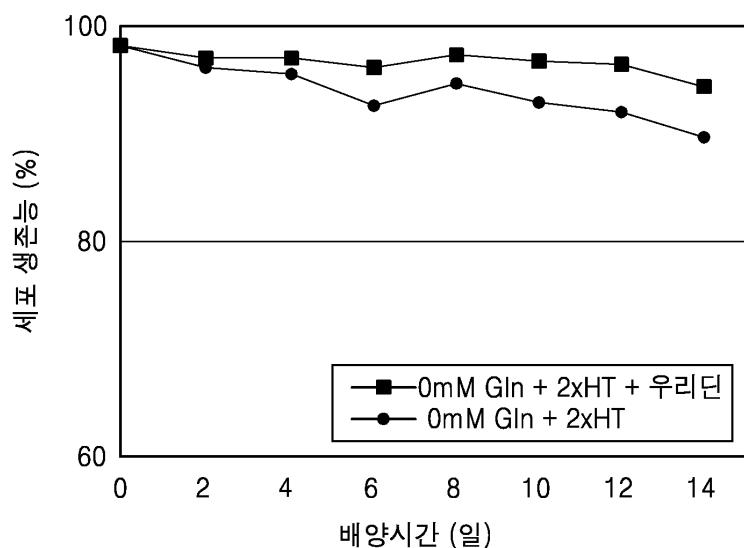
도면5a



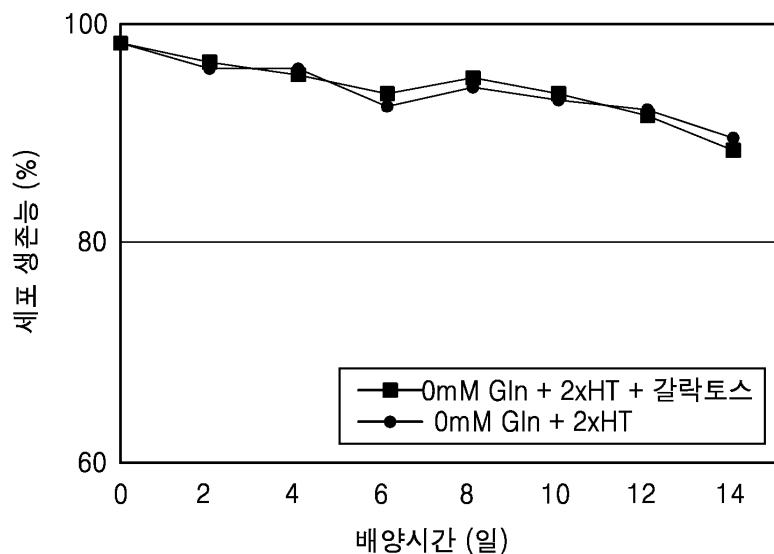
도면5b



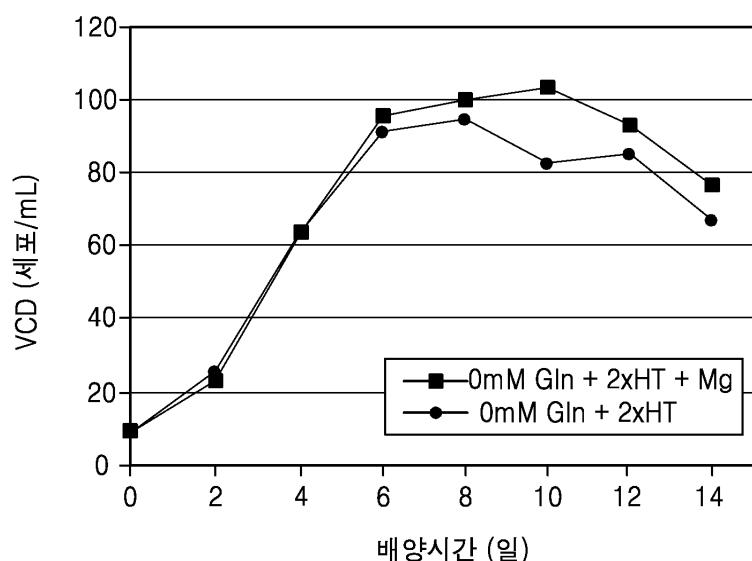
도면6a



도면6b



도면7



도면8

