



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0020482
 (43) 공개일자 2017년02월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01) *C07K 16/00* (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01) *C12P 21/02* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0018 (2013.01)
C07K 16/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7001566
- (22) 출원일자(국제) 2015년06월17일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년01월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/036169
- (87) 국제공개번호 WO 2015/195758
 국제공개일자 2015년12월23일
- (30) 우선권주장
 62/013,699 2014년06월18일 미국(US)

- (71) 출원인
메디문 엘엘씨
 미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디문 웨이
- (72) 발명자
홀맨 브레나
 미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디문 웨이 메디문 엘엘씨 내 이 정
- (74) 대리인
김진희, 김태홍

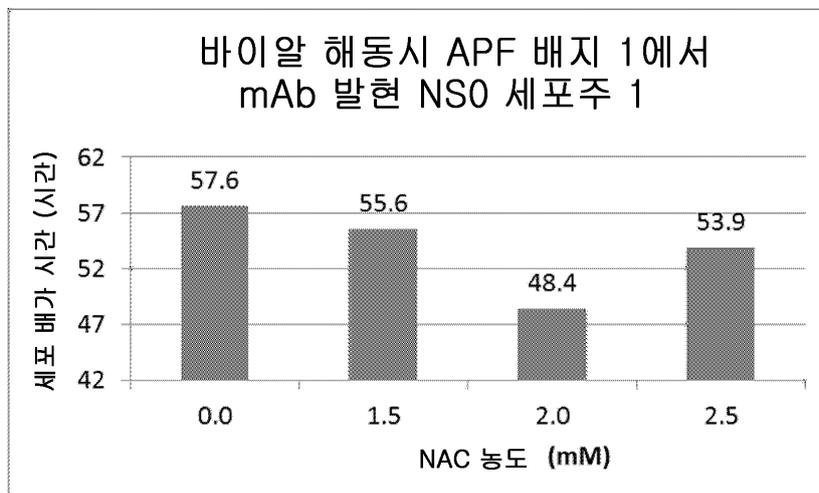
전체 청구항 수 : 총 65 항

(54) 발명의 명칭 **N-아세틸시스테인을 포함하는 세포 배양 방법 및 배지**

(57) 요약

본 출원은 N-아세틸시스테인을 포함하는 개선된 세포 배양 배지 및 세포 배양 방법을 제공한다. 이러한 개선된 세포 배양 배지 및 세포 배양 방법은 콜레스테롤 영양요구주 세포, 골수종 세포 및 하이브리도마 세포의 세포 생존율, 세포 성장률을 증가시키고/시키거나 세포 배양 시간을 감소시킨다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 16/244 (2013.01)

C12P 21/02 (2013.01)

C07K 2317/14 (2013.01)

C12N 2500/36 (2013.01)

C12N 2500/44 (2013.01)

C12N 2511/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

세포를 배양하는 방법으로서,

a. 세포 성장을 지지하기에 충분한 세포 배양 배지를 제공하는 단계로서, 상기 세포 배양 배지는 N-아세틸시스테인을 포함하는 것인 단계; 및

b. 상기 세포 배양 배지에서 세포를 배양하는 단계로서, 상기 세포는 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마인 단계

를 포함하는 방법.

청구항 2

세포 생존율을 증가시키는 방법으로서,

a. 세포 성장을 지지하기에 충분한 세포 배양 배지를 제공하는 단계로서, 상기 세포 배양 배지는 N-아세틸시스테인을 포함하는 것인 단계; 및

b. 상기 세포 배양 배지에서 세포를 배양하는 단계로서, 상기 세포는 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마인 단계

를 포함하는 방법.

청구항 3

세포 성장률을 증가시키는 방법으로서,

a. 세포 성장을 지지하기에 충분한 세포 배양 배지를 제공하는 단계로서, 상기 세포 배양 배지는 N-아세틸시스테인을 포함하는 것인 단계; 및

b. 상기 세포 배양 배지에서 세포를 배양하는 단계로서, 상기 세포는 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마인 단계

를 포함하는 방법.

청구항 4

세포 배가 시간을 감소시키는 방법으로서,

a. 세포 성장을 지지하기에 충분한 세포 배양 배지를 제공하는 단계로서, 상기 세포 배양 배지는 N-아세틸시스테인을 포함하는 것인 단계; 및

b. 상기 세포 배양 배지에서 세포를 배양하는 단계로서, 상기 세포는 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마인 단계

를 포함하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 동결 스톱으로부터 해동되는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 증식기에 있는 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 혈청 무함유 및 동물성 단백질 무함유 배지인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 화학적으로 규정된 배지인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배지는 지질을 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 포유동물로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 포유동물 세포는 뮤린(murine), 햄스터, 래트, 원숭이, 또는 인간인 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 세포는 NS0, NS1, U937, M19, SRD-12B, SRD-13A, CHO-215, X63Ag8, Sp2/0, J558L, U266, P3U1, XG-1, XG-2, XG-3, XG-4, XG-5, XG-6, XG-7, XG-8, XG-9, U266, RPM1-8226, LP1, L363, OPM1, OPM2 및 NCLH929 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 세포는 NS0, NS1, U937, M19, SRD-12B, SRD-13A, CHO-215, X63Ag8, Sp2/0, J558L, U266, P3U1, XG-1, XG-2, XG-3, XG-4, XG-5, XG-6, XG-7, XG-8, XG-9, U266, RPM1-8226, LP1, L363, OPM1, OPM2 또는 NCLH929 세포로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 세포는 NS0 세포인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 콜레스테롤 영양요구주이도록 조작되는 것인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 탄소원, 필수 및 비필수 아미노산원, 비타민, 무기염, 미량 금속, pH 완충제, 계면활성제, 항산화제, 지질 및 콜레스테롤을 포함하는 것인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 약 0.25 mM ~ 약 3 mM의 농도로 N-아세틸 시스테인을 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 약 0.5 ~ 약 2.5 mM의 농도로 N-아세틸 시스테인을 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 약 1.0 ~ 약 1.5 mM의 농도로 N-아세틸 시스테인을 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 약 1 mM 또는 약 1.5 mM의 농도로 N-아세틸

시스테인을 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 이스톨레이트(yeastolate)를 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 1 g/L의 이스톨레이트를 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 평균 배가 시간이 N-아세틸시스테인을 배제한 대조군 배지에 의한 세포 배양에서보다 짧은 것인 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 평균 배가 시간은 N-아세틸시스테인이 없는 세포 배양 배지와 비교하여 약 10% 이상 감소되는 것인 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 평균 배가 시간은 N-아세틸시스테인이 없는 세포 배양 배지와 비교하여 15% 이상 감소되는 것인 방법.

청구항 26

제23항에 있어서, 상기 평균 배가 시간은 N-아세틸시스테인이 없는 세포 배양 배지와 비교하여 20% 이상 감소되는 것인 방법.

청구항 27

제23항에 있어서, 상기 평균 배가 시간은 N-아세틸시스테인이 없는 세포 배양 배지와 비교하여 25% 이상 감소되는 것인 방법.

청구항 28

제23항에 있어서, 상기 평균 배가 시간은 N-아세틸시스테인이 없는 세포 배양 배지와 비교하여 50% 이상 감소되는 것인 방법.

청구항 29

제23항에 있어서, 상기 평균 배가 시간은 60 시간 이하인 방법.

청구항 30

제23항에 있어서, 상기 평균 배가 시간은 42 시간 이하인 방법.

청구항 31

제23항에 있어서, 상기 평균 배가 시간은 34 시간 이하인 방법.

청구항 32

제23항에 있어서, 상기 평균 배가 시간은 30 시간 이하인 방법.

청구항 33

제23항에 있어서, 상기 평균 배가 시간은 약 29 시간 이하인 방법.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 생존율이 N-아세틸시스테인을 배제한 대조군 배지에 의한 세포 배양에 비해 증가되는 것인 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 세포 생존율은 N-아세틸시스테인이 없는 세포 배양 배지와 비교하여 약 5% 이상 증가되는 것인 방법.

청구항 36

제34항에 있어서, 상기 세포 생존율은 N-아세틸시스테인이 없는 세포 배양 배지와 비교하여 7% 이상 증가되는 것인 방법.

청구항 37

제34항에 있어서, 상기 세포 생존율은 N-아세틸시스테인이 없는 세포 배양 배지와 비교하여 10% 이상 증가되는 것인 방법.

청구항 38

제34항에 있어서, 상기 세포 생존율은 약 90% 이상인 방법.

청구항 39

제34항에 있어서, 상기 세포 생존율은 92% 이상인 방법.

청구항 40

제34항에 있어서, 상기 세포 생존율은 93% 이상인 방법.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 이중 단백질을 발현하지 않는 것인 방법.

청구항 42

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 이중 단백질을 발현하는 것인 방법.

청구항 43

제1항 내지 제40항 및 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 이중 핵산에 의해 형질전환되는 것인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 이중 핵산은 cDNA, 벡터, 플라스미드, 프로모터에 작동가능하게 연결된 핵산, 및/또는 계놈 내로 도입되는 핵산인 방법.

청구항 45

제42항에 있어서, 상기 이중 단백질은 일시적으로 발현되는 것인 방법.

청구항 46

제42항에 있어서, 상기 이중 단백질은 안정적으로 발현되는 것인 방법.

청구항 47

제42항, 제45항 및 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중 단백질은 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 IL-13 항체인 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 항체는 BAK502G9 또는 이의 항원 결합 단편인 방법.

청구항 50

제48항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 1, 9, 17 또는 25 중 어느 하나와 약 80% 이상 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 2, 10, 18 또는 26 중 어느 하나와 약 80% 이상 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는 것인 방법.

청구항 51

제48항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은

a. 중쇄 가변 영역으로서,

- i. 서열번호 3, 11, 19 또는 27로부터 선택된 서열과 비교하여 1개의 돌연변이를 갖는 HC CDR1,
- ii. 서열번호 4, 12, 20 및 28로부터 선택된 서열과 비교하여 1개 또는 2개의 돌연변이를 갖는 HC CDR2, 및
- iii. 서열번호 5, 13, 21 및 29로부터 선택된 서열과 비교하여 1개 또는 2개의 돌연변이를 갖는 HC CDR3

를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

b. 경쇄 가변 영역으로서,

- i. 서열번호 6, 14, 22 및 30으로부터 선택된 서열과 비교하여 1개의 돌연변이를 갖는 LC CDR1,
- ii. 서열번호 7, 15, 23 및 31로부터 선택된 서열과 비교하여 1개 또는 2개의 돌연변이를 갖는 LC CDR2, 및
- iii. 서열번호 8, 16, 24 및 32로부터 선택된 서열과 비교하여 1개 또는 2개의 돌연변이를 갖는 LC CDR3

를 포함하는 경쇄 가변 영역

을 포함하는 것인 방법.

청구항 52

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 콜레스테롤 영양요구주인 방법.

청구항 53

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 골수종 세포인 방법.

청구항 54

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 하이브리도마 세포인 방법.

청구항 55

N-아세틸시스테인, 탄수화물원, 아미노산원 및 콜레스테롤원을 포함하는 세포 배양 배지.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 탄수화물원 및 아미노산원은 상이한 것인 세포 배양 배지.

청구항 57

제55항 또는 제56항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 혈청 무함유 및 동물성 단백질 무함유 배지인 세포 배양 배지.

청구항 58

제55항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 화학적으로 규정된 배지인 세포 배양 배지.

청구항 59

제55항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배지는 지질을 추가로 포함하는 것인 세포 배양 배지.

청구항 60

제55항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 약 0.25 mM ~ 약 3 mM의 농도로 N-아세틸 시스테인을 포함하는 것인 세포 배양 배지.

청구항 61

제55항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 약 0.5 ~ 약 2.5 mM의 농도로 N-아세틸 시스테인을 포함하는 것인 세포 배양 배지.

청구항 62

제55항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 약 1.0 ~ 약 1.5 mM의 농도로 N-아세틸 시스테인을 포함하는 것인 세포 배양 배지.

청구항 63

제55항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 약 1 mM 또는 1.5 mM의 농도로 N-아세틸 시스테인을 포함하는 것인 세포 배양 배지.

청구항 64

제55항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 이소플레이트를 추가로 포함하는 것인 세포 배양 배지.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 세포 배양 배지는 1 g/L의 이소플레이트를 포함하는 것인 세포 배양 배지.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 전자적으로 제출된 서열 목록에 관한 언급

[0002] 본 출원과 함께 제출된, 전자적으로 제출되는 ASCII 텍스트 파일의 서열 목록(파일명: IL13-310P1_SL.txt; 크기: 15,073 바이트; 및 생성일: 2014년 6월 11일)의 내용은 그 전체가 참고로 본원에 인용되어 있다.

배경 기술

[0003] 다수의 중요한 단백질 기반의 생물학적 치료제들은 세포 배양에서 생산된다. 이들은, 비제한적으로, 재조합 단백질 및 항체 치료제 모두를 포함한다. 세포 배양으로 생물학적 치료제를 생산하는 것은 종래의 소분자 치료제와 비교하여 상업적 제품 및 임상 후보군 모두의 제조 비용을 증가시킨다. 유의적인 제한 인자 중 하나는, 세포의 동결 스톱으로부터 제조 시설에서의 생산 가동을 확대하는데 걸리는 시간이 있고, 뿐만 아니라 재조합 단백질 및 항체 치료제를 생산하는데 사용되는 세포의 비교적 느린 성장에서 비롯되는 높은 공장 점유율 및 이용률이 있다. 그 결과, 생산 확대 일정, 공장 점유율 또는 이용률을 감소시키고, 비용을 감소시키기 위해, 세포 생존율 및/또는 세포 성장률을 증가시키는(세포 배가 시간 감소를 유도하는) 최적화된 세포 배양 방법 및 시약을 개발할 필요가 있다. 혈청 또는 다른 동물성 단백질 성분들은 실험실 환경에서 성장하는 세포의 능력을 향상시키기 위해 종종 사용된다. 그러나, 규제적 또는 잠재적 안전성 우려 때문에, 세포 배양 배지 및 시약은 생물학적 치료제를 제조할 때 종종 혈청 또는 다른 동물성 단백질 성분을 함유하지 않는다. 동물성 단백질 성분의 제거는 세포가 배양에서 성장하는 것을 더 어렵게 만들고 세포가 동결 스톱으로부터 해동되어 성장을 시작하는 것을 더 어렵게 만들어, 제품 수율을 감소시키고 공장 점유율, 이용률 및 비용을 증가시킨다. 그러므로, 정확하게는 생산 효율이 더 중요해지는 경우, 세포 배양 배지 성분이 제한된다. 따라서, 본 기술분야는 단백질 기반의 생물학적 치료제, 예컨대 이중 단백질 및 항체 치료제를 생산하는데 사용되는 세포주를 위해 세포 배양 성분을 최적화하는데 있어 어려움에 직면한다. 실제로, 많은 배지 성분의 관여, 세포 대사 경로의 복잡함 및 다양한 배

지 성분 및 복잡한 세포 경로 간의 상호의존은 종종 세포 배양 시약 또는 방법을 최적화하는 것을 매우 어렵게 만든다. 이 배경에서, N-아세틸시스테인(NAC)을 포함하는 세포 배양 배지 및 세포 배양 방법이 본원에 제공되며, 이는 세포 배양 배지에 첨가되고/되거나 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마와 관련된 세포 배양 배지에 첨가될 때 놀랍게도 세포 생존율, 세포 성장률을 증가시키고 세포 배가 시간을 감소시킨다.

[0004] 다른 사람들은 각각 T 세포, 신경 전구세포/줄기 세포, 또는 근육 전구세포/줄기 세포의 성장을 지지하기 위해 일반 아미노산원으로서(예컨대, EP 2351827호 참고; 본원에 사용된 것보다 더 작은 규모의 양으로) 또는 일반 환원제로서(예컨대, EP1434856호, W02012095731호, US20060258003호 참고) N-아세틸 시스테인을 세포 배양 배지에 첨가하는 것을 제안하였다. 그에 반하여, 본원에서는 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마 세포의 세포 생존율, 세포 성장률을 증가시키고 세포 배가 시간을 감소시키는 N-아세틸시스테인을 포함하는 세포 배양 배지 및 세포 배양 방법이 제공된다. 본원에 기재된 바와 같이(예컨대 실시예 1-6 참고), N-아세틸시스테인은, 아미노산 및 환원제를 이미 함유하는 세포 배양 배지에 첨가될 때, 놀랍게도 세포 생존율, 세포 성장률을 증가시키고, NSO 세포의 세포 배가 시간을 감소시켰다.

발명의 내용

[0005] 본 명세서 및 청구범위는 N-아세틸시스테인(NAC)을 포함하는 다양한 세포 배양 배지 및 방법을 제공하며, 하기는 상기 배지 및 방법 중 일부의 요약을 제공한다. 상기 설명에 따르면, 일 구현예는 (a) 세포 성장을 지지하기에 충분한 세포 배양 배지를 제공하는 단계로서, 상기 세포 배양 배지는 N-아세틸시스테인을 포함하는 것인 단계; 및 (b) 상기 세포 배양 배지에서 세포를 배양하는 단계로서, 상기 세포는 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마인 단계를 포함하는 세포 배양 방법을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 세포 생존율을 증가시키는 방법은 (a) 세포 성장을 지지하기에 충분한 세포 배양 배지를 제공하는 단계로서, 상기 세포 배양 배지는 N-아세틸시스테인을 포함하는 것인 단계; 및 (b) 상기 세포 배양 배지에서 세포를 배양하는 단계로서, 상기 세포는 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마인 단계를 포함한다. 추가 양태에서, 세포 성장률을 증가시키는 방법은 (a) 세포 성장을 지지하기에 충분한 세포 배양 배지를 제공하는 단계로서, 상기 세포 배양 배지는 N-아세틸시스테인을 포함하는 것인 단계; 및 (b) 상기 세포 배양 배지에서 세포를 배양하는 단계로서, 상기 세포는 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마인 단계를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 세포 배가 시간을 감소시키는 방법은 (a) 세포 성장을 지지하기에 충분한 세포 배양 배지를 제공하는 단계로서, 상기 세포 배양 배지는 N-아세틸시스테인을 포함하는 것인 단계; 및 (b) 상기 세포 배양 배지에서 세포를 배양하는 단계로서, 상기 세포는 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마인 단계를 포함한다. 본원에 개시된 방법의 일 구현예에서, 세포는 콜레스테롤 영양요구주이다. 본원에 개시된 방법의 또 다른 구현예에서, 세포는 골수종이다. 본원에 개시된 방법의 추가 구현예에서, 세포는 하이브리도마이다.

[0006] 일 구현예에서, 세포는 동결 스톱으로부터 해동된다. 또 다른 구현예에서, 세포는 증식기에 있다. 또 다른 구현예에서, 세포 배양 배지는 혈청 무함유 및 동물성 단백질 무함유 배지이다. 또 다른 구현예에서, 세포 배양 배지는 화학적으로 규정된 배지이다. 또 다른 구현예에서, 배지는 지질을 포함한다.

[0007] 또 다른 구현예에서, 세포는 포유동물로부터 유래된다. 또 다른 구현예에서, 포유동물 세포는 뮤린(murine), 햄스터, 래트, 원숭이, 또는 인간이다. 또 다른 구현예에서, 세포는 콜레스테롤 영양요구주이다. 일 구현예에서, 콜레스테롤 영양요구주는 NSO, NS1, U937, M19, SRD-12B, SRD-13A, CHO-215, X63 세포, 이들 세포주로부터 유래된 세포주, 또는 콜레스테롤 영양요구주이도록 조작된 임의의 다른 세포를 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 세포는 NSO 세포이다. 또 다른 구현예에서, 세포는 골수종 또는 하이브리도마이다.

[0008] 또 다른 양태에서 세포 배양 배지는 N-아세틸시스테인, 탄수화물원, 아미노산원, 및 콜레스테롤원을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 탄수화물원 및 아미노산원은 상이하다. 또 다른 구현예에서, 배지는 지질을 추가로 포함한다. 또 다른 구현예에서, 세포 배양 배지는 탄수화물원, 아미노산원, 콜레스테롤원, 비타민, 무기염, 미량 금속, 계면활성제, 및 pH 완충제를 포함한다.

[0009] 또 다른 구현예에서, 세포 배양 배지는 약 0.25 mM ~ 약 3 mM의 농도로 N-아세틸시스테인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 세포 배양 배지는 약 0.5 ~ 약 2.5 mM의 농도로 N-아세틸시스테인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 세포 배양 배지는 약 1.0 ~ 약 1.5 mM의 농도로 N-아세틸시스테인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 세포 배양 배지는 약 1 mM의 농도로 N-아세틸시스테인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 세포 배양 배지는 약 1.5 mM의 농도로 N-아세틸시스테인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 세포 배양 배지는 적어도 약 0.5 mM, 적어도 약 1.0 mM, 적어도 약 1.5 mM 또는 적어도 약 2.0 mM의 농도로 N-아세틸시스테인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 세포 배양 배지는 이스톨레이트(yeastolate)를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 세포 배양 배지는 1 g/L의 이스

톨레이트를 포함한다.

- [0010] 또 다른 구현예에서, 평균 배가 시간은 N-아세틸시스테인을 배제한 대조군 배지에 의한 세포 배양에서보다 짧다. 또 다른 구현예에서, 평균 배가 시간은 N-아세틸시스테인이 없는 세포 배양 배지와 비교하여 적어도 10% 감소된다. 또 다른 구현예에서, 평균 배가 시간은 N-아세틸시스테인이 없는 세포 배양 배지와 비교하여 적어도 15% 감소된다. 또 다른 구현예에서, 평균 배가 시간은 N-아세틸시스테인이 없는 세포 배양 배지와 비교하여 적어도 20% 감소된다. 또 다른 구현예에서, 평균 배가 시간은 N-아세틸시스테인이 없는 세포 배양 배지와 비교하여 적어도 25% 감소된다. 또 다른 구현예에서, 평균 배가 시간은 N-아세틸시스테인이 없는 세포 배양 배지와 비교하여 적어도 50% 감소된다. 또 다른 구현예에서, 평균 배가 시간은 N-아세틸시스테인을 함유하는 세포 배양 배지에서 60시간 이하이다. 또 다른 구현예에서, 평균 배가 시간은 N-아세틸시스테인을 함유하는 세포 배양 배지에서 42시간 이하이다. 또 다른 구현예에서, 평균 배가 시간은 N-아세틸시스테인을 함유하는 세포 배양 배지에서 34시간 이하이다. 또 다른 구현예에서, 평균 배가 시간은 N-아세틸시스테인을 함유하는 세포 배양 배지에서 30시간 이하이다. 또 다른 구현예에서, 평균 배가 시간은 N-아세틸시스테인을 함유하는 세포 배양 배지에서 29시간 이하이다.
- [0011] 또 다른 구현예에서, 세포 생존율은 N-아세틸시스테인을 배제한 대조군 배지에 의한 세포 배양에 비해 증가된다. 또 다른 구현예에서, 세포 생존율은 N-아세틸시스테인이 없는 세포 배양 배지와 비교하여 적어도 5% 증가된다. 또 다른 구현예에서, 세포 생존율은 N-아세틸시스테인이 없는 세포 배양 배지와 비교하여 적어도 7% 증가된다. 또 다른 구현예에서, 세포 생존율은 N-아세틸시스테인이 없는 세포 배양 배지와 비교하여 적어도 10% 증가된다. 또 다른 구현예에서, 세포 생존율은 적어도 90%이다. 또 다른 구현예에서, 세포 생존율은 적어도 92%이다. 또 다른 구현예에서, 세포 생존율은 적어도 93%이다.
- [0012] 또 다른 구현예에서, 세포는 이종 단백질을 발현하지 않는다. 또 다른 구현예에서, 세포는 이종 단백질을 발현한다. 또 다른 구현예에서, 세포는 이종 핵산에 의해 형질전환된다. 또 다른 구현예에서, 이종 핵산은 cDNA, 벡터, 플라스미드, 프로모터에 작동가능하게 연결된 핵산, 및/또는 게놈 내로 도입되는 핵산이다. 또 다른 구현예에서, 이종 단백질은 일시적으로 발현된다. 또 다른 구현예에서, 이종 단백질은 안정적으로 발현된다. 또 다른 구현예에서, 이종 단백질은 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 IL-13 항체이다. 또 다른 구현예에서, 항체는 BAK502G9(서열번호 1-2의 VH 및 VL 도메인 및/또는 서열번호 3-8의 중쇄 및 경쇄 CDR으로서 표시되는 바와 같음), BAK278D6(서열번호 9-10의 VH 및 VL 도메인 및/또는 서열번호 11-16의 중쇄 및 경쇄 CDR로서 표시되는 바와 같음), BAK1183H4(서열번호 17-18의 VH 및 VL 도메인 및/또는 서열번호 19-24의 중쇄 및 경쇄 CDR로 표시되는 바와 같음), 또는 BAK1167F2(서열번호 25-26의 VH 및 VL 도메인 및/또는 서열번호 27-32의 중쇄 및 경쇄 CDR로 표시되는 바와 같음)이다.
- [0013] 부가적인 목적 및 이점이 하기 설명에서 일부 제시될 것이며, 이는 일부 명세서로부터 자명할 것이거나, 또는 실시예 의해 알게 될 수 있다. 상기 목적 및 이점은 첨부된 청구범위에서 특히 지적된 요소 및 조합에 의해 실현되고 달성될 것이다.
- [0014] 진술한 일반적인 설명 및 하기 상세한 설명 모두는 예시적이고 설명적인 것에 불과하며, 청구범위를 제한하는 것이 아닌 것으로 이해되어야 한다.
- [0015] 본 명세서의 일부에 포함되고 이를 구성하는 첨부 도면은 하나(몇 가지)의 구현예(들)을 예시하며, 명세서와 함께 본원에 기재된 원리를 설명하는 역할을 한다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 바이알 해동시 동물성 단백질 무함유(APF) 배지에서 IL-9에 대한 단일클론 항체("mAb")를 발현하는 NSO 세포주 1의 집단 배가 시간을 나타낸다. 동물성 단백질 무함유(APF) 배지 1에서 해동된 동결 NSO 세포주 1 세포에 N-아세틸시스테인(NAC)(1.5 mM, 2.0 mM, 또는 2.5 mM)을 보충하고, 지수 성장기 동안의 생존 세포 밀도를 사용하여 평균 배가 시간을 계산하였다. 1.5 mM ~ 2.5 mM NAC의 첨가는 NSO 세포주 1의 바이알 해동으로부터 세포 생존율을 개선하고, 세포 성장을 증가시키고, 평균 세포 배가 시간을 감소시켰다. hrs = 시간; mM = 밀리몰.
- 도 2는 바이알 해동시 APF 배지 2에서 IL-9에 대한 단일클론 항체("mAb")를 발현하는 NSO 세포주 1의 집단 배가 시간을 나타낸다. 동물성 단백질 무함유(APF) 배지 2에서 해동된 동결 NSO 세포주 1 세포에 N-아세틸시스테인(NAC)(1.5 mM, 2.0 mM, 또는 2.5 mM)을 보충하고, 지수 성장기 동안의 생존 세포 밀도를 사용하여 평균 배가 시간을 계산하였다. 1.5 mM ~ 2.5 mM NAC의 첨가는 NSO 세포주 1의 바이알 해동으로부터 세포 생존율을

개선하고, 세포 성장을 증가시키고, 평균 세포 배가 시간을 감소시켰다. hrs = 시간; mM = 밀리몰.

도 3은 바이알 해동시 APF 배지 1에서 IL-13에 대한 단일클론 항체("mAb")를 발현하는 NS0 세포주 2의 집단 배가 시간을 나타낸다. 동물성 단백질 무함유(APF) 배지 1에서 해동된 동결 NS0 세포주 2 세포에 N-아세틸시스테인(NAC)(0.5 mM, 1.0 mM 또는 2.5 mM)을 보충하고, 지수 성장기 동안의 생존 세포 밀도를 사용하여 평균 배가 시간을 계산하였다. 0.5 mM ~ 2.5 mM NAC의 첨가는 NS0 세포주 2의 바이알 해동으로부터 세포 생존율을 개선하고, 세포 성장을 증가시키고, 평균 세포 배가 시간을 감소시켰다. hrs = 시간; mM = 밀리몰.

도 4는 바이알 해동시 APF 배지 2에서 IL-13에 대한 단일클론 항체("mAb")를 발현하는 NS0 세포주 2의 집단 배가 시간을 나타낸다. 동물성 단백질 무함유(APF) 배지 2에서 해동된 동결 NS0 세포주 2 세포에 N-아세틸시스테인(NAC)(0.5 mM, 1.0 mM 또는 2.0 mM)을 보충하고, 지수 성장기 동안의 생존 세포 밀도를 사용하여 평균 배가 시간을 계산하였다. 0.5 mM ~ 2.0 mM NAC의 첨가는 NS0 세포주 2의 바이알 해동으로부터 세포 생존율을 개선하고, 세포 성장을 증가시키고, 평균 세포 배가 시간을 감소시켰다. hrs = 시간; mM = 밀리몰.

도 5는 바이알 해동시 콜레스테롤(1X 인비트로젠 콜레스테롤 지질 농축물)이 보충된 상업적으로 입수 가능한 NS0 세포 배양 배지(CD Hybridoma, Gibco)에서 IL-13에 대한 단일클론 항체를 발현하는 NS0 세포주 2의 집단 배가 시간을 나타낸다. 1X 콜레스테롤 지질 농축물을 갖는 CD 하이브리도마 배지에서 해동된 동결 NS0 세포주 2 세포에 N-아세틸시스테인(NAC)(0.5 mM, 1.0 mM 또는 2.0 mM)을 보충하고, 지수 성장기 동안의 생존 세포 밀도를 사용하여 평균 배가 시간을 계산하였다. 0.5 mM ~ 2.0 mM NAC의 첨가는 NS0 세포주 2의 세포 생존율을 개선하고, 세포 성장을 증가시키고, 평균 세포 배가 시간을 감소시켰다. hrs = 시간; mM = 밀리몰.

도 6은 바이알 해동시 APF 배지 2에서 NS0 무표지 세포주(재조합 단백질을 발현하지 않는 비형질감염 NS0 세포주)의 집단 배가 시간을 나타낸다. 동물성 단백질 무함유(APF) 배지 2에서 해동된 동결 NS0 무표지 세포주 세포에 N-아세틸시스테인(NAC)(0.5 mM, 1.0 mM 또는 1.5 mM)을 보충하고, 지수 성장기 동안의 생존 세포 밀도를 사용하여 평균 배가 시간을 계산하였다. 0.5 mM ~ 1.5 mM NAC의 첨가는 바이알 해동시 세포 생존율을 개선하고, 세포 성장을 증가시키고, 평균 세포 배가 시간을 감소시켰다. hrs = 시간; mM = 밀리몰.

도 7은 증식 동안 APF 배지 1에서 IL-9에 대한 단일클론 항체("mAb")를 발현하는 NS0 세포주 1의 집단 배가 시간을 나타낸다. NS0 세포주 1 세포를 N-아세틸시스테인(NAC)(1.5 mM, 2.0 mM 또는 2.5 mM)이 보충된 동물성 단백질 무함유(APF) 배지 1에서 배양하였고, 지수 성장기 동안의 생존 세포 밀도를 사용하여 평균 배가 시간을 계산하였다. 1.5 mM ~ 2.0 mM NAC의 첨가는 NS0 세포주 1의 세포 성장을 증가시켰고 평균 세포 배가 시간을 감소시켰다. hrs = 시간; mM = 밀리몰; 오차 막대는 평균 배가 시간의 1 표준 편차를 나타낸다.

도 8은 증식 동안 APF 배지 2에서 IL-9에 대한 단일클론 항체("mAb")를 발현하는 NS0 세포주 1의 집단 배가 시간을 나타낸다. NS0 세포주 1 세포를 다양한 수준의 N-아세틸시스테인(NAC)(1.5 mM, 2.0 mM 또는 2.5 mM)이 보충된 동물성 단백질 무함유(APF) 배지 2에서 배양하였고, 지수 성장기 동안의 생존 세포 밀도를 사용하여 평균 배가 시간을 계산하였다. 1.5 mM ~ 2.5 mM NAC의 첨가는 NS0 세포주 1의 세포 성장을 증가시켰고 평균 세포 배가 시간을 감소시켰다. hrs = 시간; mM = 밀리몰; 오차 막대는 평균 배가 시간의 1 표준 편차를 나타낸다.

도 9는 증식 동안 APF 배지 1에서 IL-13에 대한 단일클론 항체("mAb")를 발현하는 NS0 세포주 2의 집단 배가 시간을 나타낸다. NS0 세포주 2 세포를 N-아세틸시스테인(NAC)(0.5 mM, 1.0 mM 또는 2.5 mM)이 보충된 동물성 단백질 무함유(APF) 배지 1에서 배양하였고, 지수 성장기 동안의 생존 세포 밀도를 사용하여 평균 배가 시간을 계산하였다. 0.5 mM ~ 2.5 mM NAC의 첨가는 NS0 세포주 2의 세포 성장을 증가시켰고 평균 세포 배가 시간을 감소시켰다. hrs = 시간; mM = 밀리몰; 오차 막대는 평균 배가 시간의 1 표준 편차를 나타낸다.

도 10은 증식 동안 APF 배지 2에서 IL-13에 대한 단일클론 항체("mAb")를 발현하는 NS0 세포주 2의 집단 배가 시간을 나타낸다. NS0 세포주 2 세포를 N-아세틸시스테인(NAC)(0.5 mM, 1.0 mM 또는 2.0 mM)이 보충된 동물성 단백질 무함유(APF) 배지 2에서 배양하였고, 지수 성장기 동안의 생존 세포 밀도를 사용하여 평균 배가 시간을 계산하였다. 0.5 mM ~ 2.0 mM NAC의 첨가는 NS0 세포주 2의 세포 성장을 증가시켰고 평균 세포 배가 시간을 감소시켰다. hrs = 시간; mM = 밀리몰; 오차 막대는 평균 배가 시간의 1 표준 편차를 나타낸다.

도 11은 증식 동안 콜레스테롤(1X 인비트로젠 콜레스테롤 지질 농축물)이 보충된 상업적으로 입수 가능한 NS0 세포 배양 배지(CD Hybridoma, Gibco)에서 IL-13에 대한 단일클론 항체를 발현하는 NS0 세포주 2의 집단 배가 시간을 예시한다. NS0 세포주 2 세포를 N-아세틸시스테인(NAC)(0.5 mM, 1.0 mM 또는 2.0 mM)이 보충된 1X 콜레스테롤 지질 농축물을 갖는 CD 하이브리도마 배지에서 배양하였고, 지수 성장기 동안의 생존 세포 밀도를 사용하여 평균 배가 시간을 계산하였다. 1.0 mM ~ 2.0 mM NAC의 첨가는 NS0 세포주 2의 세포 성장을 증가시켰고 평

균 세포 배가 시간을 감소시켰다. 오차 막대의 감소는 또한 세포 성장이 더 강력하다는 것을 입증한다. hrs = 시간; mM = 밀리몰; 오차 막대는 평균 배가 시간의 1 표준 편차를 나타낸다.

도 12는 증식 동안 APF 배지 2에서 NSO 무표지 세포주(재조합 단백질을 발현하지 않는 비형질감염 NSO 세포주)의 집단 배가 시간을 나타낸다. NSO 무표지 세포주 세포를 N-아세틸시스테인(NAC)(0.5 mM, 1.0 mM 또는 1.5 mM)이 보충된 동물성 단백질 무함유(APF) 배지 2에서 배양하였고, 지수 성장기 동안의 생존 세포 밀도를 사용하여 평균 배가 시간을 계산하였다. 0.5 mM ~ 1.5 mM NAC의 첨가는 NSO 무표지 세포주의 세포 성장을 증가시켰고 평균 세포 배가 시간을 감소시켰다. hrs = 시간; mM = 밀리몰; 오차 막대는 평균 배가 시간의 1 표준 편차를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 서열의 설명

[0018] 표 1은 본 구현예에서 언급된 특정 서열의 목록을 제공한다.

표 1

| 설명 | 서열 | 서열 번호 |
|------------------|---|-------|
| BAK502G9 VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLSWVRQAPGQGLEW MGWISANNGDTNYGQEFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLVTVSS | 1 |
| BAK502G9 VL | SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVI YDDGDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTI SRVEAGDEADYYCQVWDTGS DPVVFVGGGTKLTVL | 2 |
| BAK502G9 HC CDR1 | NYGLS | 3 |
| BAK502G9 HC CDR2 | WISANNGDTNYGQEFQG | 4 |
| BAK502G9 HC CDR3 | DSSSSWARWFFDL | 5 |
| BAK502G9 LC CDR1 | GGNIIGSKLVH | 6 |
| BAK502G9 LC CDR2 | DDGDRPS | 7 |
| BAK502G9 LC CDR3 | QVWDTGSDEPVV | 8 |
| BAK278D6 VH | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFRNYGLSWVRQAPGQGLEW MGWISANNGDTNYGQEFQGRITMTTETSTNTAHMELRSLRSDDTAVY YCVRDSSSNWARWFFDLWGKGTMTVTVSS | 9 |
| BAK278D6 VL | SYVLTQPPSVSVAPGQTARIPCGGNNIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVV YDDGDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTI SRIDAGDEADYYCQVWDTGS DPVVFVGGGTKLTVL | 10 |
| BAK278D6 HC CDR1 | NYGLS | 11 |
| BAK278D6 HC CDR2 | WISANNGDTNYGQEFQG | 12 |
| BAK278D6 HC CDR3 | DSSSNWARWFFDL | 13 |
| BAK278D6 LC CDR1 | GGNNIGSKLVH | 14 |
| BAK278D6 LC CDR2 | DDGDRPS | 15 |
| BAK278D6 LC CDR3 | QVWDTGSDEPVV | 16 |

[0019]

| | | |
|----------------------|--|----|
| BAK1183H4 VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLSWVRQAPGQGLEW MGWINYDGGNTQYQGEFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLVTVSS | 17 |
| BAK1183H4 VL | SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVI YDDGDRPSGI PERFGSNGSNTATLTISRVEAGDEADYQCQVWDTGS DPVVFVGGGTKLTVL | 18 |
| BAK1183H4 HC CDR1 | NYGLS | 19 |
| BAK1183H4 HC CDR2 | WINYDGGNTQYQGEFQG | 20 |
| BAK1183H4 HC CDR3 | DSSSSWARWFFDL | 21 |
| BAK1183H4 LC CDR1 | GGNIIGSKLVH | 22 |
| BAK1183H4 LC CDR2 | DDGDRPS | 23 |
| BAK1183H4 LC CDR3 | QVWDTGSDPVV | 24 |
| BAK1167F2 VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTTFEQTGVSWSVRQAPGQGLEW MGWISANNGDTNYQGEFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLVTVSS | 25 |
| BAK1167F2 VL | SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPGQAPVLVI YDDGDRPSGI PERFGSNGSNTATLTISRVEAGDEADYQCQVWDTGS DPVVFVGGGTKLTVL | 26 |
| BAK1167F2 HC CDR1 | QTGVS | 27 |
| BAK1167F2 HC CDR2 | WISANNGDTNYQGEFQG | 28 |
| BAK1167F2 HC CDR3 | DSSSSWARWFFDL | 29 |
| BAK1167F2 LC CDR1 | GGNIIGSKLVH | 30 |
| BAK1167F2 LC CDR2 | DDGDRPS | 31 |
| BAK1167F2 LC CDR3 | QVWDTGSDPVV | 32 |

[0020]

[0021]

정의

[0022]

본 개시내용을 더 쉽게 이해할 수 있도록, 특정 용어들이 먼저 정의된다. 첨가적인 정의가 상세한 설명 전반에 제시되어 있다.

[0023]

이 명세서 및 첨부 청구범위에서, 단수형은 내용상 달리 명확히 나타내지 않는 한 복수형을 포함한다. 단수형 용어뿐만 아니라 용어 "하나 이상," 및 "적어도 하나"는 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포는 단일 세포 또는 세포의 집단을 지칭할 수 있다.

[0024]

더욱이, "및/또는"은 본원에서 사용되는 경우 다른 것과 함께 또는 다른 것 없이 2개의 명시된 특징 또는 성분 각각을 구체적으로 개시하는 것으로 간주되어야 한다. 따라서, 본원에서 "A 및/또는 B"와 같은 문구에서 사용된 바와 같은 용어 "및/또는"은 "A 및 B," "A 또는 B," "A"(단독), 및 "B"(단독)을 포함하는 것으로 의도된다. 마찬가지로, "A, B, 및/또는 C"와 같은 문구에서 사용된 바와 같은 용어 "및/또는"은 하기 양태 각각을 포함하는 것으로 의도된다: A, B, 및 C; A, B, 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A(단독); B(단독); 및 C(단독).

[0025]

명세서 및 청구범위 전반에 수치와 관련하여 사용된 바와 같은 용어 "약" 또는 "대략"은 본 기술분야의 숙련자에게 익숙하고 허용가능한 정확성의 간격을 나타낸다. 일반적으로, 상기 정확성의 간격은 ± 5%이다.

[0026]

달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 개시내용과 관련된 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 예를 들어, 문헌들[Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; and the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press]은 본 개시내용에서 사용된 많

은 용어의 일반 사전을 숙련자에게 제공한다.

- [0027] 단위, 접두사, 및 기호들은 이들의 국제단위계(Système International de Unites(SI)) 허용 형태로 표시된다. 수치 범위는 범위를 한정하는 수를 포함한다. 달리 나타내지 않는 한, 아미노산 서열은 아미노에서 카복시 방향으로 좌측에서 우측으로 작성된다. 본원에서 제공된 제목은 다양한 양태 또는 본 개시내용의 양태를 제한하지 않으며, 이는 명세서 전체로서 참고함으로써 이해될 수 있다. 따라서, 바로 아래에 정의된 용어들은 명세서 전체를 참고함으로써 보다 완전하게 정의된다.
- [0028] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "N-아세틸시스테인", "N-아세틸시스테인", "N-아세틸-L-시스테인", 또는 "아세틸시스테인"("NAC"로 약기함)은 질소 원자에 부착된 아세틸기를 갖는 시스테인으로부터 유래된 화합물을 지칭한다. N-아세틸시스테인은 (2R)-2-아세트아미도-3-설프라닐프로파노산(IUPAC)으로도 지칭되며 616-91-1의 화학 초록 서비스 등록 번호(Chemical Abstracts Service(CAS) Registry Number)를 갖는다. N-아세틸시스테인은 시그마-알드리지를 포함하는 다양한 상업적 판매 회사로부터 입수 가능하다.
- [0029] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "콜레스테롤 영양요구주"는 성장을 위해 콜레스테롤을 필요로 하지만 이를 합성할 수 없는 세포 또는 세포주를 지칭한다. 예시적인 콜레스테롤 영양요구주는, 비제한적으로, NS0, NS1, U937, M19, SRD-12B, SRD-13A, CHO-215, X63 세포, 이들 세포주로부터 유래된 세포주, 또는 콜레스테롤 영양요구주이도록 조작된 임의의 다른 세포를 포함한다. 콜레스테롤 영양요구주를 확인하고/하거나 배양하는 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있다. 예컨대, 각각 그 전체가 본원에 참고로 통합된 문헌[Keen *et al.*, *Cytotechnology*. 17(3):203-11 (1995); Gorfien *et al.*, *Biotechnol Prog.* 16(5):682-7 (2000); Fu, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(41):14551-6 (2005); Birch *et al.*, *Adv Drug Delivery Rev.* 58:671-685 (2006); Feng *et al.*, *MABs.* 2(5): 466-477 (2010)]을 참고한다.
- [0030] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "골수종" 및 "골수종 세포"는 골수구, 혈장 세포 또는 B 세포와 같은 골수 세포로부터 유래된 불멸화 세포주를 지칭한다. 예시적인 골수종 세포는, 비제한적으로, X63Ag8, Sp2/0, NS1, NS0, J558L, U266, U937, P3U1, XG-1, XG-2, XG-3, XG-4, XG-5, XG-6, XG-7, XG-8, XG-9, U266, RPM1-8226, LP1, L363, OPM1, OPM2, 및 NCLH929 세포 또는 이들 세포주로부터 유래된 세포주를 포함한다. 골수종 세포를 확인하고/하거나 배양하는 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있다. 예컨대, 각각 그 전체가 본원에 참고로 통합된 문헌[Fuller, *et al.* Preparation of Myeloma Cells. *Current Protocols in Molecular Biology*. 18:11.5.1-11.5.3 (2001); Zhang *et al.*, *Blood*, 83(12):3654-3663 (1994); and Tai *et al.*, *J. Immunol. Methods*. 235:11-19 (2000)]을 참고한다.
- [0031] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "하이브리도마" 및 "하이브리도마 세포"는 B 세포를 불멸화 세포(예컨대 골수종 세포)와 융합함으로써 형성된 불멸화 세포주를 지칭한다. 하이브리도마를 생성하고/하거나 배양하는 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있다. 예컨대, 각각 그 전체가 본원에 참고로 통합된 문헌[Kohler and Milstein, *Nature* 256:495 (1975); Galfre and Milstein. *Methods Enzymol.* 73(Pt B):3-46 (1981); 및 Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986)]을 참고한다.
- [0032] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "세포 배양 배지"는 다세포성 진핵생물로부터 유래된 세포, 특히 동물 세포의 성장을 지지하도록 설계된 액체 또는 기질을 지칭한다. 세포를 배양하는 예시적인 세포 배양 배지 및 방법은 각각 그 전체가 본원에 참고로 통합된 문헌[Doyle *et al.*, "Mammalian cell culture: essential techniques" Wiley, (1997); Freshney, "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications" John Wiley & Sons, (2011); 및 Meenakshi, "Cell Culture Media: A Review" *Mater Methods*. 3:175 (2013)]에 기재되어 있다.
- [0033] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "혈청 무함유 배지"는 동물 혈청, 예컨대 우태아 혈청, 소 혈청 알부민 또는 인간 혈청 알부민을 함유하지 않는 세포 배양 배지를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "동물성 단백질 무함유 배지(animal-protein free medium)"는 고등 다세포성 비-식물 진핵생물로부터의 단백질 및/또는 단백질 성분, 예컨대 알부민, 트랜스페린, 인슐린 또는 성장 인자를 함유하지 않는 세포 배양 배지를 지칭한다. 동물성 단백질 및 단백질 성분은 식물(일반적으로 10-30 아미노산 길이) 또는 효모와 같은 하등 진핵생물로부터 수득될 수 있는 비-동물성 단백질, 작은 펩타이드 및 올리고펩타이드와 구별되며, 이는 본 발명에 따른 동물성 단백질 무함유 세포 배양 배지 내로 포함될 수 있다. 본원에 개시된 방법에 따른 혈청 무함유 및 동물성 단백질 무함유 배지는 숙련자에게 일반적으로 알려진 DMEM, Ham's F12, Medium 199, McCoy 또는 RPMI와 같은 임의의 기본 배지에 기초할 수 있다. 기본 배지는 아미노산, 비타민, 유기 및 무기염, 및 탄수화물원을 포함하는 많은 성분을 포함할 수 있고, 각각의 성분은 본 기술분야의 숙련자에게 일반적으로 알려진 세포의 배양을 지지하는 양으로

존재한다. 배지는 보조 물질, 예컨대 중탄산나트륨과 같은 완충 물질, 항산화제, 기계적 스트레스에 대항하는 안정화제, 또는 프로테아제 억제제를 함유할 수 있다. 필요하다면, 폴리에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜의 혼합물(예컨대 Pluronic F68®, SERVA)과 같은 비-이온성 계면활성제가 소포제로서 첨가될 수 있다. 혈청 무함유 및 동물성 단백질 무함유 배지의 예는 각각 그 전체가 본원에 참고로 통합된 하기 문헌에 기재된 바와 같이 본 기술분야에서 잘 알려져 있다: Mariani *et al.*, "Commercial serum-free media: hybridoma growth and monoclonal antibody production." *J Immunol Methods*. 145:175-83 (1991); Barnes *et al.*, "Methods for growth of cultured cells in serum-free medium." *Anal Biochem*. 102:255-70 (1980); Waymouth, "Preparation and use of serum-free culture media." In: Barnes DW, Sirbasku DA, Sato GH, editors. "Methods for preparation of media, supplements and substrata for serum-free animal cell culture." New York: Liss; (1984); and Mendelson *et al.*, "Culture of human lymphocytes in serum-free medium." In: Barnes DW, Sirbasku DA, Sato GH, editors. "Methods for serum-free culture of neuronal and lymphoid cells." New York: Liss; (1984).

[0034] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "화학적으로 규정된 배지(Chemically-defined medium)"는 화학 성분 모두가 알려진, 인간 또는 동물 세포의 세포 배양에 적합한 세포 성장 배지이다.

[0035] 본원에 사용된 바와 같이, "세포 성장을 지지하기에 충분한 세포 배양 배지"는 세포의 성장, 생존 및/또는 증식을 지지할 수 있는 세포 배양 배지를 지칭한다. 일반적으로, "세포 성장을 지지하기에 충분한 세포 배양 배지"는 적절한 에너지원 및 아미노산, 비타민, 염, 및/또는 숙련자에게 일반적으로 알려진 영양소의 보충물을 포함한다. 세포 성장을 지지하기에 충분한 예시적인 세포 배양 배지는, 숙련자에게 일반적으로 알려진 바와 같은, 상업적으로 입수 가능한 배지, 화학적으로 규정된 배지, 혈청 무함유 배지, 및 동물성 단백질 무함유 배지를 포함한다.

[0036] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "세포 생존율(cell viability)"은 세포가 생존하거나 발달하는 능력을 지칭한다. 일반적으로, "세포 생존율"을 결정하는 것은, 숙련자에게 일반적으로 알려진 바와 같이, 세포 또는 세포 집단이 생존하거나 발달하는 능력을 측정하는 것(예컨대, 총 세포 샘플에 기초하여, 살아있는 또는 죽은 세포의 수를 결정하는 것을 포함함)을 필요로 한다. 세포 생존율 분석은 본 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 하기를 포함한다: 세포용해 또는 막 누출 분석(예컨대 프로피듐 아이오다이드, 트리판 블루 및/또는 7-아미노액티노마이신 D를 이용함), 미토콘드리아 활성 또는 카스파아제 분석(예컨대 레사주린 및/또는 포르마잔을 이용함), 세포 기능 분석(예컨대 이동 분석, 세포 증식 또는 성장 분석), 계능 및/또는 단백질체학 분석(예컨대 세포 사멸, 손상 또는 스트레스와 연관된 다양한 유전자 또는 단백질의 발현을 측정하는 것), 세포독성 분석, 및 생체 염색(vital staining). 각각 그 전체가 본원에 참고로 통합된 문헌[Chapter 15, "Assays for Cell Viability, Proliferation and Function" In: "The Molecular Probes Handbook. A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies" (I. Johnson and M. Spence (eds.) 11th Edition, Life Technologies (2010))]을 참고한다.

[0037] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "세포 배가 시간" 또는 "배가 시간"은 세포 또는 세포의 집단의 수가 2배가 되는데 필요한 기간을 지칭한다. 세포 또는 세포 집단의 배가 시간은 하기 식을 이용하여 결정될 수 있다: $DT = T \ln 2 / \ln(X2/X1)$, 상기 식에서, DT = 배가 시간이고; T는 임의의 단위의 배양 시간이며; X1은 배양 시간의 초기에 세포의 수이고; X2는 배양 시간의 말기에 세포 수이다. 본원에 사용된 바와 같이, 세포 배가 시간은 세포 또는 세포 집단의 상대적 성장 속도가 일정할 때(예컨대 지수 성장 또는 로그기에서) 측정된다. 세포 계수 분석은 본 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 계수 챔버(예컨대 혈구계)를 이용하여; 분광광도계를 이용하여; 쿨터 계수기(Coulter counter)를 이용하여; 유세포분석법을 이용하여; 또는 현미경을 이용하여 세포를 계수하는 것을 포함한다. 그 전체가 본원에 참고로 통합된 문헌[Chapter 15, "Assays for Cell Viability, Proliferation and Function" In: "The Molecular Probes Handbook. A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies" (I. Johnson and M. Spence (eds.) 11th Edition, Life Technologies (2010))]을 참고한다.

[0038] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "이종 핵산"은 비제한적으로, 각각 그 전체가 본원에 참고로 통합된 문헌 [Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Silhavy *et al.*, "Experiments with Gene Fusions" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1984); and Ausubel, F. M. *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology" published by Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987)]에 기재된 것을 포함하는, 표준 재조합 DNA 및 분자 클로닝 기술을 이용하여 세포 내로 도입된 핵산 분자(예컨대 폴리뉴클레오타이드, cDNA, DNA, RNA, 또는 이의 단편)를 지칭한다. 본 발명에 따른 핵산은 DNA 또는

RNA를 포함할 수 있고 완전히 또는 부분적으로 합성될 수 있다.

- [0039] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "형질전환" 또는 "형질전환된"은 핵산 분자 또는 이의 단편을 숙주 세포 내로 전달하여, 상기 핵산 분자 또는 이의 단편을 숙주 세포의 딸 세포로 유전시키는 것을 지칭한다. 형질전환된 핵산 또는 이의 단편을 함유하는 숙주 세포는 "형질전환" 또는 "재조합" 또는 "형질전환된" 세포로서 본원에서 지칭된다.
- [0040] 용어 "프로모터"는 코딩 서열 또는 기능적 RNA의 발현을 제어할 수 있는 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 일반적으로, 코딩 서열은 프로모터 서열의 3'에 위치한다. 프로모터는 원 유전자로부터 그 전체가 유래될 수 있거나, 또는 자연에서 발견되는 상이한 프로모터들로부터 유래된 상이한 요소를 포함할 수 있거나, 또는 나아가 합성적 DNA 절편을 포함할 수 있다. 본 기술분야의 숙련자는 상이한 프로모터가 상이한 조직 또는 세포 유형에서, 또는 상이한 발달 단계에서, 또는 상이한 환경적 또는 생리적 조건에 반응하여, 핵산의 발현을 유도할 수 있다는 것을 이해한다. 대부분의 시간에 대부분의 세포 유형에서 유전자를 발현시키는 프로모터는 일반적으로 "항시적 프로모터"로 지칭된다. 대부분의 경우 조절 서열의 정확한 경계가 완전히 규명되지 않았으므로, 상이한 길이의 DNA 단편들이 동일한 프로모터 활성을 가질 수 있음이 추가로 인식된다.
- [0041] 용어 "작동가능하게 연결된"은 하나의 기능이 다른 것에 의해 영향을 받도록 하는 단일 핵산 분자 상의 핵산 서열들의 연계(association)를 지칭한다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열을 발현시킬 수 있을 때, 프로모터는 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다(즉, 상기 코딩 서열은 프로모터의 전사적 제어하에 있음). 코딩 서열은 센스 또는 안티센스 방향으로 조절 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다.
- [0042] 용어 "플라스미드" 및 "벡터"는 일반적으로 원형 이중 가닥의 DNA 단편의 형태인 핵산 요소를 지칭한다. 그러한 요소는 임의의 공급원으로부터 유래된 단일- 또는 이중 가닥의 DNA 또는 RNA의 선형 또는 원형의 독자적으로 복제하는 서열, 계놈 삽입 서열, 파아지 또는 뉴클레오타이드 서열일 수 있고, 여기서 많은 뉴클레오타이드 서열은 적절한 3' 비번역 서열과 함께 선택된 유전자 산물을 위한 프로모터 단편 및 DNA 서열을 세포 내로 도입할 수 있는 독특한 구조로 연결되거나 재조합되었다. 적합한 벡터는 프로모터 서열, 종결자 서열, 폴리아데닐화 서열, 인핸서 서열, 마커 유전자 및 적절한 경우 다른 서열을 포함하는, 적절한 조절 서열을 함유하도록 선택되거나 제작될 수 있다.
- [0043] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "발현"은 본 발명의 핵산 분자로부터 유래된 센스(mRNA) 또는 안티센스 RNA의 전사 및 안정적인 축적을 지칭한다. 발현은 또한 mRNA의 폴리펩타이드로의 번역을 지칭할 수 있다.
- [0044] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "이중 단백질"은 이중 핵산에 의해 인코딩되고 숙주 세포에서 발현되는 단백질(예컨대 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 이의 단편)을 지칭한다. 이중 단백질은 일시적으로(예컨대 이중 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 숙주 세포 계놈 내로 도입되지 않는 경우) 또는 안정적으로(예컨대 이중 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 숙주 세포 계놈 내로 도입되는 경우) 발현될 수 있다.
- [0045] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체"(또는 이의 단편, 변이체, 또는 유도체)는 항원에 결합할 수 있는 항체의 적어도 최소한의 부분, 예컨대, B 세포에 의해 생산된 전형적인 항체의 맥락에서 중쇄(VH)의 가변 도메인 및 경쇄(VL)의 가변 도메인을 지칭한다. 척추동물계에서의 기본 항체 구조는 상대적으로 잘 이해되고 있다. 예컨대, 각각 그 전체가 참고로 본원에 통합된, 문헌[Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)]을 참고한다.
- [0046] 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체는, 비제한적으로, 폴리클론, 단일클론, 인간, 인간화, 또는 키메라 항체, 단일 쇠 항체, 에피토프-결합 단편, 예컨대, Fab, Fab' 및 F(ab')₂, Fd, Fvs, 단일-쇄 Fvs(scFv), 단일-쇄 항체, 디설파이드-연결된 Fvs(sdFv), VL 또는 VH 도메인 중 하나를 포함하는 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생산된 단편을 포함한다. ScFv 분자는 본 기술분야에서 알려져 있으며, 예컨대, 그 전체가 본원에 참고로 통합된 US 특허 제5,892,019호에 기술되어 있다. 본 개시내용에 포함된 면역글로불린 또는 항체 분자는 임의의 유형(예컨대, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 및 IgY), 클래스(예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 서브클래스의 면역글로불린 분자일 수 있다.
- [0047] 본원에 개시된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 항원의 에피토프(들) 또는 부분(들), 예컨대 이들이 인식하거나 특이적으로 결합하는 표적 폴리펩타이드의 측면에서 기술되거나 명시될 수 있다. 예를 들어, IL-13 또는 항-IL-13 항체는 IL-13 폴리펩타이드 또는 이의 부분에 결합하는 항체이다. 일부 양태에서, 항-IL-13 항체는 BAK502G9(예컨대 서열번호 1 및 2를 포함하는 항-IL-13 항체)이다. 일 구현예에서, 항체는 BAK502G9(서열번호 1-2의 VH 및 VL 도메인 및/또는 서열번호 3-8의 중쇄 및 경쇄 CDR에 의해 표시된 바와 같

음), BAK278D6(서열번호 9-10의 VH 및 VL 도메인 및/또는 서열번호 11-16의 중쇄 및 경쇄 CDR에 의해 표시된 바와 같음), BAK1183H4(서열번호 17-18의 VH 및 VL 도메인 및/또는 서열번호 19-24의 중쇄 및 경쇄 CDR에 의해 표시된 바와 같음), 또는 BAK1167F2(서열번호 25-26의 VH 및 VL 도메인 및/또는 서열번호 27-32의 중쇄 및 경쇄 CDR에 의해 표시된 바와 같음)이다.

[0048] 사용될 수 있는 다른 항-IL-13 단일클론 항체는 그 전체가 본원에 참고로 통합된 2012년 3월 1일에 공개된 미국 특허 출원 공개 제2012-0052060호에 기술된 것을 포함한다. 다른 IL-13 항체는, 비제한적으로, 항-인간-IL-13 항체, 예를 들어, 레브리키주맵(MILR1444A / RG3637, Roche / Genentech), ABT-308(Abbott), GSK679586(GlaxoSmithKline) 또는 QAX576(Novartis)을 포함한다. 본 기술분야에서 잘 알려진 바와 같이, 항-IL13 항체를 포함하는 항체는 본 기술분야에서 알려진 다양한 기술을 이용하여 세포에서 생산될 수 있다. 예컨대, 문헌[Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet et al.(eds.) Plenum Press, New York (1980); and Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988)]을 참고한다.

[0049] **구현예의 설명**

[0050] **I. 세포 배양 배지**

[0051] 세포 배양은 동물로부터 제거된 세포, 조직, 또는 장기를 이들의 생존, 성장, 및/또는 증식을 촉진하는 인공적인 환경 내에 두는 과정이다. 세포가 최적으로 성장하기 위한 기본 환경적 요건은 적합한 용기, 영양소(비제한적으로, 아미노산, 탄수화물, 비타민, 미네랄, 성장 인자, 호르몬 등 중 적어도 하나를 포함함)를 공급하는 세포 배양/성장 배지, 및 제어된 생리화학적 환경(예컨대, pH, 삼투압, 온도, O₂, CO₂ 등을 제어하기 위함)을 포함한다. 일부 세포는 부착 의존성(anchorage-dependent)이며 고체 또는 반-고체 기질에 부착된 동안 배양되어야 하는 반면(부착 또는 단층 배양), 다른 세포는 배양 배지에서 부유하며 성장될 수 있다(현탁액 배양). 세포 배양의 한 가지 단계는 적절한 성장 배지를 선택하는 것이다. 본원에 개시된 구현예에 따른 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 N-아세틸시스테인을 포함하는 세포 성장을 지지하기에 충분한 세포 배양 배지를 포함한다. 일 구현예에서, 세포 배양 배지는 혈청 무함유 및 동물성 단백질 무함유 배지이다. 일 구현예에서, 세포 배양 배지는 화학적으로 규정된 배지이다. 또 다른 구현예에서, N-아세틸시스테인이 상업적으로 입수 가능한 세포 배양 배지에 첨가된다. 일 구현예에서, 상업적으로 입수 가능한 세포 배양 배지는 NSO 세포용 EX-CELL® NSO 혈청 무함유 배지(Sigma-Aldrich로부터 입수 가능함, 카탈로그 번호 H4281), EX-CELL® CD 하이브리도마 배지(Sigma-Aldrich, 카탈로그 번호 H4409), 하이브리도마 세포용 Ex-Cell 620-HSF 혈청 무함유 배지(Sigma-Aldrich, 카탈로그 번호 14621C), NSO용 Ex-Cell NS-혈청 무함유 배지(Sigma-Aldrich, 카탈로그 번호 14650C), DMEM(Sigma-Aldrich, 카탈로그 번호 D567), 이스코베 변형 둘베코 배지(IMDM)(Sigma-Aldrich로부터 입수 가능함, 카탈로그 번호 I3390), RPMI-1640 배지(Sigma-Aldrich, 카탈로그 번호 R8005), 하이브리도마-SFM(Life Technologies, 카탈로그 번호 12045076), CD 하이브리도마 AGT 배지(Life Technologies, 카탈로그 번호 12372025), CD 하이브리도마 배지(Life Technologies로부터 입수 가능함, 카탈로그 번호 11278023), PFHM-II 단백질 무함유 하이브리도마 배지(Life Technologies, 카탈로그 번호 12040077), Nutridoma-SP(Roche, 카탈로그 번호 11011374001), UltraDOMA-PF 하이브리도마 배지(Lonza, 카탈로그 번호 12-727F), UltraDOMA 혈청 무함유 하이브리도마 배지(Lonza, 카탈로그 번호 12-723B), Hyclone PF-Mab 배지(GE Life Sciences, SH30138.05), Hyclone SFM4Mab 배지(GE Life Sciences SH30391.02), Hyclone SFM4Mab-다목적 배지(GE Life Sciences, 카탈로그 번호 SH30382.02), Hyclone ADCF-Mab 배지(GE Life Sciences, 카탈로그 번호 SH30349.02), Hyclone CCM1 배지(GE Life Sciences, SH30043.03), HyClone CCM4Mab 배지(GE Life Sciences, SH30800.06), Hyclone CDM4NSO 배지(GE Life Sciences, SH30478.06) 등이다. 또 다른 구현예에서, N-아세틸시스테인은 배지의 기초로서 멸균 탈이온수를 이용하여 구성 성분으로부터 제조된 세포 배양 배지에 첨가된다.

[0052] **A. N-아세틸시스테인**

[0053] N-아세틸시스테인은 세포 생존율, 세포 성장률을 증가시키고/시키거나 세포 배가 시간을 감소시키기 위해 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법에 첨가된다. 어느 특정한 이론에 제한되기를 바라지 않지만, N-아세틸시스테인은 세포를 자유 라디칼로부터 보호하고, 세포막 파괴를 방지하고/하거나 비제한적으로 지질(예컨대, 콜레스테롤)을 포함하는 다른 세포 배양 배지 성분의 산화를 방지함으로써 배양에서 성장하는 세포에게 혜택을 제공한다.

[0054] 일 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 약 0.25 mM ~ 약 3 mM, 약 0.5 mM ~ 약 2.5 mM, 약 0.5 mM ~ 약 2.0 mM, 약 0.5 mM ~ 약 1.5 mM, 약 0.5 mM ~ 약 1.0 mM, 약 1.0 mM

~ 약 2.5 mM, 약 1.0 mM ~ 약 2.0 mM, 약 1.0 mM ~ 약 1.5 mM, 약 1.5 mM ~ 약 2.5 mM, 또는 약 1.5 mM ~ 약 2.0 mM의 농도로 N-아세틸시스테인을 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 약 1 mM의 농도로 N-아세틸시스테인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 약 1.5 mM의 농도로 N-아세틸시스테인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 약 2.0 mM의 농도로 N-아세틸시스테인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 약 2.5 mM의 농도로 N-아세틸시스테인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 약 0.5 mM의 농도로 N-아세틸시스테인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 적어도 약 0.5 mM, 적어도 약 1.0 mM, 적어도 약 1.5 mM, 적어도 약 2.0 mM, 또는 적어도 약 2.5 mM의 농도로 N-아세틸시스테인을 포함한다.

[0055] B. 다른 세포 배양 배지 성분

[0056] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 탄소원, 질소원, 및/또는 인원 (phosphorous source)을 추가로 포함한다. 이들은 동일한 동일한 성분 또는 상이한 성분에 의해 제공될 수 있다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 탄소원, 질소원, 인원, 및/또는 미네랄 염을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법에서 사용하기에 적합한 탄소원은 탄수화물(예컨대, 당) 또는 아미노산, 예컨대 L-글루타민 및/또는 피루베이트 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 탄수화물 및 아미노산을 추가로 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 염, 비타민, 대사 전구체, 성장 인자, 호르몬, 및 미량 원소 중 적어도 하나를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 아미노산, 비타민, 무기염, 및 글루코스와 같은 탄소원을 함유하는, 기본 배지를 추가로 포함한다.

[0057] 1. 탄수화물

[0058] 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법에서 사용하기에 적합한 예시적인 탄수화물은 글루코스, 갈락토스, 트레할로스, 글루코사민, 만노스, 라피노스, 프럭토스, 리보스, 글루쿠론산, 락토스, 말토스, 수크로스, 투라노스, 본 기술분야에서 일반적으로 공지된 세포 배양에 적합한 탄수화물, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일 양태에서, 탄수화물은 글루코스 또는 갈락토스일 수 있다.

[0059] 2. 아미노산

[0060] 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법에서 사용하기에 적합한 예시적인 아미노산은 하나 이상 필수 아미노산(즉 히스티딘, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트레오닌, 트립토판, 및/또는 발린), 및/또는 하나 이상 비필수 아미노산(즉 알라닌, 아르기닌, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 글리신, 프롤린, 세린, 타이로신, 및 아스파라긴), 및/또는 이의 필수 및 비필수 아미노산의 임의의 조합을 포함한다. 어떤 세포의 경우, 일부 비필수 아미노산이 필수 아미노산인데, 상기 세포가 상기 아미노산을 합성하는 능력이 없기 때문이다. 예를 들어, NSO 세포는 내인성 글루타민 합성효소가 결여되거나 매우 낮은 수준의 내인성 글루타민 합성 효소를 함유하며, 그와 같이, 글루타민 합성효소가 이중 단백질을 위한 발현 시스템 내에 포함되지 않는 한 글루타민은 NSO 세포에 대해 비필수 아미노산이다.

[0061] 아미노산에 따르면, 본 개시내용은 임의의 아미노산을 포함하고, 이는, 비제한적으로, D- 또는 L-아미노산 및 비-표준 아미노산을 포함한다. 따라서, 용어 아미노산은 아민(-NH₂) 및 카복실산(-COOH) 작용기를 갖는 임의의 화합물을 포함한다.

[0062] 3. 지질

[0063] 일 구현예에서, 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 지질을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법에서 사용하기에 적합한 예시적인 지질은 콜레스테롤, 아라키돈산, 토크페롤 아세테이트, 리놀레산, 리놀렌산, 미리스트산, 올레산, 팔미트산, 팔미톨레산, 스테아르산, 인지질(예컨대 포스파티딜콜린), 본 기술분야에서 일반적으로 공지된 세포 배양에 적합한 임의의 다른 지질, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 막 인지질의 성분으로서 이노시톨이 또한 선택적으로 포함될 수 있다. 합성적 또는 식물-유래의 지질이 또한 상기 배지가 동물-유래의 성분이 없는 상태로 유지되기를 원하는 적용에서 선택적으로 사용될 수 있다. 지질은 사이클로덱스트린-기반의 지질 보충물에 첨가될 수 있다. 사이클로덱스트린은 지질 및/또는

다른 성분, 예컨대 지용성 비타민 및 호르몬을 가용화시키는데 사용될 수 있다.

[0064] 콜레스테롤은 합성적으로 생산될 수 있거나, 그것은 동물 유래일 수 있다. 예를 들어, 콜레스테롤은 양털로부터 분리될 수 있다. 동물성 단백질 무함유 배지는 동물 공급원으로부터 유래된 콜레스테롤을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 콜레스테롤은 상업적 공급원으로부터 취득된다. 예컨대, Gibco로부터의 화학적으로 규정된 지질 농축물; SAFC로부터의 지질 농축물을 참고한다. 콜레스테롤은 합성 콜레스테롤(예컨대, 비제한적으로 SyntheChol™)로서, 콜레스테롤 나노입자(예컨대, Wu et al., Enhanced Productivity of NS0 cells in fed-batch culture with cholesterol nanoparticle supplementation, Biotechnology Progress 27(3):796-802 (2011) 참고)로서 또는 본 기술분야에서 일반적으로 공지된 세포 배양에 적합한 임의의 수단에 의해, 콜레스테롤-사이클로덱스트린 용액으로 배지에 첨가될 수 있다.

[0065] 일 구현예에서, 배지는 약 1 ~ 약 10 g/L의 콜레스테롤을 함유할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 배지는 약 1 ~ 약 5 g/L의 콜레스테롤을 함유할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 배지는 약 1.5 ~ 약 4 g/L의 콜레스테롤을 함유할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 배지는 약 2 ~ 약 3 g/L의 콜레스테롤을 함유할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 배지는 약 2.5 g/L의 콜레스테롤을 함유할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 배지는 적어도 약 1 g/L의 콜레스테롤, 적어도 약 2.5 g/L의 콜레스테롤 또는 적어도 약 5 g/L의 콜레스테롤을 함유할 수 있다.

[0066] 또 다른 구현예에서, 배지는 콜레스테롤 외에 지질을 함유할 수 있다. 일 구현예에서, 배지는 인지질을 함유할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 배지는 포스파티딜콜린을 함유할 수 있다. 일 구현예에서, 배지는 약 1 ~ 약 10 g/L의 포스파티딜콜린을 함유할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 배지는 약 1 ~ 약 5 g/L의 포스파티딜콜린을 함유할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 배지는 약 1.5 ~ 약 4 g/L의 포스파티딜콜린을 함유할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 배지는 약 2 ~ 약 3 g/L의 포스파티딜콜린을 함유할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 배지는 약 2.5 g/L의 포스파티딜콜린을 함유할 수 있다.

[0067] **4. 염**

[0068] 일 구현예에서, 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 염을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법에서 사용하기에 적합한 예시적인 염은 염화칼슘, 염화마그네슘, 염화칼륨, 염화나트륨, 질산칼륨, 본 기술분야에서 일반적으로 공지된 세포 배양에 적합한 임의의 다른 염, 또는 이들의 임의의 조합 중 적어도 하나를 포함한다.

[0069] 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 염화칼슘 또는 염화마그네슘을 포함하지 않는다. 칼슘 및 마그네슘이 세포 부착을 촉진하므로 이 구현예는 세포 해리 또는 방출이 요구될 때 이점을 갖는다.

[0070] **5. 비타민**

[0071] 일 구현예에서, 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 비타민을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법에서 사용하기에 적합한 예시적인 비타민은 지용성 비타민, 비타민 A, D, E, K, B1(티아민), B2(리보플라빈), B3(니코틴아미드), B5(판토텐산), B6(피리독살, 피리독사민, 및/또는 피리독신), B9(엽산), 본 기술분야에 일반적으로 공지된 세포 배양에 적합한 임의의 다른 비타민, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0072] **6. 성장 인자 및 호르몬**

[0073] 일 구현예에서, 적어도 하나의 호르몬이 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법에 부가될 수 있다. 일 구현예에서, 호르몬은 텍사메타손, 에리트로포이에틴, 에스트라디올, 하이드로코티손, 인슐린, 프로게스테론, 소마토스타틴, 티록신(T4), 트리아이오도티로닌(T3), 액티빈, BMP4, BMP7, BMPRI1A, 크립토, FLT3 리간드, HGF, IGF, EGF, FGF, PDGF, IGFBP4, 칼레크레인, LEFTY-A, NGF, TGFβ, VEGF, 또는 본 기술분야에서 일반적으로 공지된 세포 배양에 적합한 임의의 다른 호르몬 또는 성장 인자 중 적어도 하나로부터 선택될 수 있다.

[0074] **7. 미량 원소**

[0075] 일 구현예에서, 적어도 하나의 미량 원소가 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법에 부가될 수 있다. 일 구현예에서, 미량 원소는 아연, 철, 구리, 셀레늄, 마그네슘, 망간, 몰리브덴, 주석, 니켈, 또는 본 기술분야에서 일반적으로 알려진 세포 배양에 적합한 임의의 다른 미량 원소 중 적어도 하나일 수 있다.

[0076] **8. 계면활성제**

[0077] 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 적어도 하나의 계면활성제를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법에서 사용하기에 적합한 예시적인 계면활성제는 트윈-80, 플루로닉 F-68, 또는 본 기술분야에서 일반적으로 알려진 세포 배양에 적합한 임의의 다른 계면활성제를 포함한다.

[0078] **9. 완충제**

[0079] 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 적어도 하나의 pH 완충제를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법에서 사용하기에 적합한 예시적인 완충제는 중탄산나트륨, 붕산, 시트르산, 디티오프레이톨, 에탄올아민, 글리세로포스페이트, 시트르산칼륨, 인산칼륨, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 인산나트륨, 밀로부터의 전분, HEPES, 염화칼슘, MOPS, 또는 본 기술분야에서 일반적으로 알려진 세포 배양에 적합한 임의의 다른 완충제, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.

[0080] **10. 다른 성분**

[0081] 일 구현예에서, 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 비-동물-근원의 가수분해물을 추가로 포함한다. 예를 들어 식물 또는 효모 가수분해물은 아미노산, 짧은 펩타이드, 탄수화물, 비타민, 뉴클레오사이드, 및 미네랄을 포함하는 단백질 소화물을 제공하여, 배지에 다양한 영양 보충물을 제공한다. 예를 들어, 효모 가수분해물인 이스트레이트가 이용될 수 있다. 이스트레이트는 펩타이드, 아미노산, 탄수화물, 지질, 금속 및 비타민의 혼합물이다. 그것은 별도로 제공된 상기 성분에 추가적으로 또는 대신에 첨가될 수 있다. 일 구현예에서, 세포 배양 배지는 1 g/L의 이스트레이트를 포함한다.

[0082] 일 구현예에서, 트로폴론(tropolone)이 또한 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법에 부가될 수 있다. 또 다른 방식에서, 뉴클레오사이드가 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법에 부가될 수 있다. 또 다른 구현예에서, β-머캅토에탄올이 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법에 부가될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 항생제가 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법에 부가될 수 있다.

[0083] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포 배양 배지 또는 세포 배양 방법은 NAC, 아미노산, 비타민, 지질, 탄수화물, pH 완충제, 미량 금속, 무기염, 및 계면활성제를 함유한다. 일 구현예에서, 지질은 콜레스테롤이다.

[0084] **II. 세포 배양 방법**

[0085] **A. 세포 유형**

[0086] 다양한 세포 유형, 예컨대 콜레스테롤 영양요구성 세포, 골수종 세포, 및 하이브리도마 세포가 N-아세틸시스테인을 포함하는 현재 개시된 세포 배양 배지와 함께 배양될 수 있다. 일 구현예에서, 배양되는 세포는, 비제한적으로, 마우스, 래트, 인간, 원숭이, 햄스터, 토끼 등으로부터 유래된 세포를 포함하는 포유동물로부터 유래된다.

[0087] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "콜레스테롤 영양요구주"는 성장을 위해 콜레스테롤을 필요로 하나 이를 합성할 수 없는 세포 또는 세포주를 지칭한다. 일 구현예에서, 콜레스테롤 영양요구주는 NS0, NS1, U937, M19, SRD-12B, SRD-13A, CHO-215, X63 세포, 이들 세포주로부터 유래된 세포주, 또는 콜레스테롤 영양요구주이도록 조작된 임의의 다른 세포이다. 또 다른 구현예에서, 세포는 NS0 세포이다.

[0088] 일 구현예에서, N-아세틸시스테인을 포함하는 현재 개시된 세포 배양 배지와 함께 배양하기에 적합한 세포는 콜레스테롤 영양요구주인 세포이다. 일 구현예에서, N-아세틸시스테인을 포함하는 현재 개시된 세포 배양 배지와 함께 배양하기에 적합한 세포는 NS0 세포이다. 또 다른 구현예에서, 세포는 NS1, U937, M19, SRD-12B, SRD-13A, CHO-215, X63 세포, 이들 세포주로부터 유래된 세포, 또는 콜레스테롤 영양요구주이도록 조작된 임의의 다른 세포이다. 또 다른 구현예에서, N-아세틸시스테인을 포함하는 현재 개시된 세포 배양 배지와 함께 배양하기에 적합한 세포는 콜레스테롤 영양요구주인 무린 골수종 세포이다. 일 구현예에서, 세포는 콜레스테롤 영양요구주인 포유동물 골수종 세포이다. 일 구현예에서 N-아세틸시스테인을 포함하는 현재 개시된 세포 배양 배지와 함께 배양하기에 적합한 세포는 콜레스테롤 영양요구주인 인간 골수종 세포이다.

[0089] 일 구현예에서, N-아세틸시스테인을 포함하는 현재 개시된 세포 배양 배지와 함께 배양하기에 적합한 세포는 골수종 세포이다. 또 다른 구현예에서, 세포는 X63Ag8, Sp2/0, NS1, NS0, J558L, U266, U937, P3U1, XG-1, XG-2, XG-3, XG-4, XG-5, XG-6, XG-7, XG-8, XG-9, U266, RPM1-8226, LP1, L363, OPM1, OPM2, 및 NCLH929 세포 또는

이들 세포주로부터 유래된 세포주이다. 또 다른 구현예에서, N-아세틸시스테인을 포함하는 현재 개시된 세포 배양 배지와 함께 배양하기에 적합한 세포는 하이브리도마 세포이다. 일부 양태에서, N-아세틸시스테인을 포함하는 현재 개시된 세포 배양 배지와 함께 배양하기에 적합한 하이브리도마 세포는 항체를 발현하고/하거나 분비한다.

[0090] B. 생물학적 치료제

[0091] 일 구현예에서, N-아세틸시스테인을 포함하는 현재 개시된 세포 배양 배지와 함께 배양하기에 적합한 세포(예컨대 NSO 세포를 포함하는, 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 세포, 또는 하이브리도마)는 재조합 또는 이종 단백질을 유도하고/하거나 발현하지 않고 배양된다. 일 구현예에서, N-아세틸시스테인을 포함하는 현재 개시된 세포 배양 배지와 함께 배양하기에 적합한 세포(예컨대 NSO 세포를 포함하는, 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 세포, 또는 하이브리도마)는 이종 핵산(비제한적으로 cDNA, 플라스미드, 벡터, 프로모터에 작동가능하게 연결된 핵산, 및/또는 이종 핵산을 일시적으로 발현하거나 또는 이종 핵산을 세포주의 게놈 내로 도입하는 핵산을 포함함)으로 형질전환된다. 또 다른 방법에서, 세포는 재조합 또는 이종 단백질을 발현한다. 하나의 방법에서, 세포는 재조합 또는 이종 단백질을 과발현한다. 다양한 이종 서열을 발현하는 세포주는 본 세포 배양 배지 및 방법으로부터 이익을 얻을 수 있다.

[0092] 일 구현예에서, 이종 단백질은 일시적으로 발현된다. 또 다른 구현예에서, 이종 단백질은 안정적으로 발현된다.

[0093] 일 구현예에서, 이종 단백질은 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 아니다. 일 구현예에서, 이종 단백질은 혈액 인자, 혈액응고방지제, 혈전용해제, 에리트르포이에틴, 인터페론, 호르몬, 효소, 백신, 성장 인자, 및/또는 융합 단백질이다.

[0094] 또 다른 구현예에서, N-아세틸시스테인을 포함하는 현재 개시된 세포 배양 배지와 함께 배양하기에 적합한 세포(예컨대 NSO 세포를 포함하는, 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 세포, 또는 하이브리도마)는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 이종 단백질을 발현한다. 일 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 IL-13에 특이적으로 결합하거나 또는 IL-9에 특이적으로 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 그 전체가 참고로 본원에 통합된 US 제7,947,273호, US 제7,354,584호 또는 US 제7,371,383호에 개시된 항체 또는 항원 결합 단편이다. 또 다른 구현예에서, 항체는 BAK502G9(서열번호 1 및 2를 포함함)이다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 BAK502G9(중쇄 CDR(서열번호 3-5) 및 경쇄 CDR(서열번호 6-8)을 포함함)와 동일한 CDR을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 1, 9, 17 또는 25 중 어느 하나를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 2, 10, 18 또는 26 중 어느 하나를 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 (a) 서열번호 3, 11, 19, 및 27로부터 선택된 HC CDR1; (b) 서열번호 4, 12, 20 및 28로부터 선택된 HC CDR2; 및 (c) 서열번호 5, 13, 21 및 29로부터 선택된 HC CDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (a) 서열번호 6, 14, 22 및 30으로부터 선택된 LC CDR1; (b) 서열번호 7, 15, 23 및 31으로부터 선택된 LC CDR2; 및 (c) 서열번호 8, 16, 24 및 32로부터 선택된 LC CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 표 1에 기재된 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하거나; 또는 표 1에 기재된 CDR 중 6개 CDR의 세트를 포함한다.

[0095] 또 다른 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 1, 9, 17 또는 25 중 어느 하나에 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 98%, 또는 약 99% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 2, 10, 18 또는 26 중 어느 하나에 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 98%, 또는 약 99% 동일한 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 (a) 서열번호 3, 11, 19 또는 27로부터 선택된 서열과 비교하여 1개의 돌연변이를 갖는 HC CDR1; (b) 서열번호 4, 12, 20 및 28로부터 선택된 서열과 비교하여 1개 또는 2개의 돌연변이를 갖는 HC CDR2; 및 (c) 서열번호 5, 13, 21 및 29로부터 선택된 서열과 비교하여 1개 또는 2개의 돌연변이를 갖는 HC CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (a) 서열번호 6, 14, 22 및 30으로부터 선택된 서열과 비교하여 1개의 돌연변이를 갖는 LC CDR1; (b) 서열번호 7, 15, 23 및 31로부터 선택된 서열과 비교하여 1개 또는 2개의 돌연변이를 갖는 LC CDR2; 및 (c) 서열번호 8, 16, 24 및 32로부터 선택된 서열과 비교하여 1개 또는 2개의 돌연변이를 갖는 LC CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 표 1에 기재된 VH 및/또는 VL 서열 중 어느 하나에 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 98%, 또는 약 99% 동일한 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH) 및/또는 경쇄 가변 영역(VL)을 갖는다. 일부 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 표 1에 기재된 CDR 중 어느 하나와 비교하여 1개 또는 2개의 돌연변이를 갖는다.

[0096] 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 당단백질 IIb/IIIa, IL-2 수용체(예컨대 IL-2 수용체 a), TNF- α , RSV, RSV의 F 단백질 에피토프, CD33, 표피 GF 수용체, T-세포 VLA4 수용체, 보체 단백질 C5, IL-1, IL-9, IL-12, IL-13, IL-23, CD-20, 및/또는 BAF에 특이적으로 결합한다.

[0097] 추가 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 오파투무맙(ofatumumab), 벨리무맙(belimumab), 켈투주맙 오조가미신(gemtuzumab ozogamicin), 팔리비주맙(palivizumab), 나탈리주맙(natalizumab), 세특시맙(cetuximab), 카나키누맙(canakinumab), 인플릭시맙(infliximab), 아브식시맙(abciximab), 바실릭시맙(basiliximab), 다클리주맙(daclizumab), 에쿨리주맙(eculizumab), 또는 우스테키누맙(ustekinumab)이다.

[0098] **C. 세포 배양 공정**

[0099] 일 구현예에서, 세포 배양 방법은 세포 성장을 지지하기에 충분한 세포 배양 배지를 제공하는 단계로서, 상기 세포 배양 배지는 N-아세틸시스테인을 포함하는 것이며, 및 상기 세포 배양 배지에서 세포를 배양하는 단계로서, 상기 세포는 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마인 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 상기 방법은 N-아세틸시스테인을 포함하는 세포 성장을 지지하기에 충분한 세포 배양 배지를 제공하고; 상기 세포 배양 배지에서 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마인 세포를 배양함으로써, 세포의 세포 생존율을 증가시키고, 세포 성장물을 증가시키고/시키거나, 세포 배가 시간을 감소시키는 방법이다.

[0100] 일 구현예에서, 세포는 5% CO₂ 및 85% 상대 습도에서 37°C에서 배양된다. 일 구현예에서 pH는 6.8 ~ 7.4일 수 있다. 본 기술분야에서 일반적으로 알려진 다른 허용가능한 조건이 또한 사용될 수 있다.

[0101] 일 양태에서, 세포 배양은 동결 스톱으로부터 큰 생물반응기로 생산을 확대하면서 일어난다. 일 양태에서, 개선된 배지는 세포를 계대할 때 적어도 4배의 분할비(split ratio)를 가능하게 한다(즉 계대될 세포를 함유하는 1X의 세포 배양 배지가 세포를 함유하지 않는 3X의 신선한 세포 배양 배지와 혼합됨). 또 다른 양태에서, 그것은 5배 분할비, 6배 분할비, 또는 7배 분할비를 가능하게 한다.

[0102] 일 구현예에서, 세포는 100 L 생물반응기에서 배양된 다음, 500 L 생물반응기로 옮겨지고, 그 다음 2500 L 생물반응기로 이송된다.

[0103] 일 구현예에서, 세포(예컨대 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마)는 동결 스톱으로부터 해동된다. 일 구현예에서, 세포(예컨대 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마)는 증식기에 있다. 또 다른 구현예에서, 세포(예컨대 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마)는 회분식, 유가식, 연속 배양, 관류에서, 또는 통합된 생물반응기-정제 단위에서 성장된다.

[0104] **D. 세포 배양 효율에 대한 영향**

[0105] 본 세포 배양 방법 및/또는 배지는 다수의 이점을 제공할 수 있다. 하나의 경우에, 그것은 N-아세틸시스테인이 없는 세포 배양 배지와 비교하여 적어도 약 10% ~ 적어도 약 50%(예컨대 적어도 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 또는 약 50%)까지 세포가 용기(예컨대 생물반응기)에서 성장하는데 필요한 시간을 감소시킨다. 일 구현예에서, 이것은 부피당 원하는 세포수에 이르는데 필요한 시간을 계산함으로써 결정된다.

[0106] 또 다른 구현예에서, 세포 배양 방법 및/또는 배지는 N-아세틸시스테인을 배제한 대조군 배지에 의한 세포 배양에서 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)와 비교하여 N-아세틸시스테인을 포함하는 세포 배양 방법 및/또는 배지를 이용하여 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)의 평균 세포 배가 시간을 감소시킨다. 일 구현예에서, N-아세틸시스테인을 포함하는 세포 배양 방법 및/또는 배지를 이용하여 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)의 평균 배가 시간이 N-아세틸시스테인을 배제한 대조군 배지에 의한 세포 배양에서 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)보다 더 짧다. 또 다른 구현예에서, N-아세틸시스테인을 포함하는 세포 배양 방법 및/또는 배지를 이용하여 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)의 평균 및/또는 중앙 세포 배가 시간은 N-아세틸시스테인 없는 세포 배양 배지에서 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)와 비교하여 적어도 약 10% ~ 적어도 약 50%(예컨대 적어도 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 또는 약 50%)까지 감소된다. 일 양태에서, N-아세틸시스테인을 포함하는 세포 배양 방법 및/또는 배지를 이용하여 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)의 평균 및/또는 중앙 세포 배가 시간은 60시간 이하 ~ 약 29시간 이하(예컨대 약 60시간, 약 42시간, 약 34시간, 약 30시간, 또는 약 29시간 이하) 또는 도 1-12에

서 보고된 평균 세포 배가 시간 중 어느 것의 대략 이하이다.

- [0107] 일 구현예에서, 세포 배가 시간은 다수의 시간 간격으로 주어진 세포 배양 배지 내의 세포를 계수하고 그래프 상에 데이터를 플롯팅함으로써 결정될 수 있다. 평균 배가 시간은 식 $DT=T \ln 2/\ln (X2/X1)$ (상기 식에서 DT =배가 시간, T 는 임의의 단위의 배양 시간이며; $X1$ 은 배양 시간의 초기에 세포수이고, $X2$ 는 배양 시간의 말기에 세포수임)을 이용하여 다수의 반복 배양에서 지수 성장기 내의 배가 시간 값을 평균함으로써 계산될 수 있다.
- [0108] 부가적인 구현예에서, 세포 배양 방법 및/또는 배지는 N-아세틸시스테인을 배제한 대조군 배지에 의한 세포 배양에서 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)와 비교하여 N-아세틸시스테인을 포함하는 세포 배양 방법 및/또는 배지를 이용하여 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)의 세포 성장률을 증가시킨다. 일 구현예에서, N-아세틸시스테인을 포함하는 세포 배양 방법 및/또는 배지를 이용하여 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)의 세포 성장률은 N-아세틸시스테인을 배제한 대조군 배지에 의한 세포 배양에서 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)보다 더 높다. 또 다른 구현예에서, N-아세틸시스테인을 포함하는 세포 배양 방법 및/또는 배지를 이용하여 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)의 세포 성장률은 N-아세틸시스테인이 없는 세포 배양 배지에서 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)와 비교하여 적어도 약 10% ~ 적어도 약 50%(예컨대 적어도 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 또는 약 50%)까지 증가된다.
- [0109] 일 구현예에서, 세포 성장은 세포 계수 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 일 구현예에서, 세포 배양 배지의 샘플 부피가 수득되고 세포가 상기 부피에서 계수된다. 세포 계수는 혈구계 또는 쿨터 계수기에서 수행될 수 있다. 또 다른 방법은 시간에 대한 세포의 수를 플롯팅하고, 상기 그래프 스테퍼(stepper)의 기울기는 개선된 성장률을 나타낸다.
- [0110] 또 다른 구현예에서, 본원에 개시된 세포 배양 방법 및/또는 배지는 N-아세틸시스테인을 배제한 대조군 배지에 의한 세포 배양에서 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)보다 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)의 세포 생존율을 증가시킨다. 일 구현예에서, N-아세틸시스테인을 포함하는 세포 배양 방법 및/또는 배지를 이용하여 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)의 세포 생존율은 N-아세틸시스테인을 배제한 대조군 배지에 의한 세포 배양에서 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)와 비교하여 더 높다. 일 구현예에서, N-아세틸시스테인을 포함하는 세포 배양 방법 및/또는 배지를 이용하여 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)의 세포 생존율은 N-아세틸시스테인이 없는 세포 배양 배지에서 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)와 비교하여 적어도 약 5% ~ 적어도 약 15%(예컨대 적어도 약 5%, 약 7%, 약 10%, 약 12%, 또는 약 15%) 증가된다. 일 양태에서, N-아세틸시스테인을 포함하는 세포 배양 방법 및/또는 배지를 이용하여 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)의 세포 생존율은 적어도 약 85% ~ 적어도 약 95%(예컨대 적어도 약 85%, 약 88%, 약 90%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 또는 약 95%)이다.
- [0111] 일 구현예에서, 세포 생존율은 트리판 블루 생존율 배제 분석에 의해 결정될 수 있다. 그러한 분석에서, 세포 현탁액은 인산 완충액 중의 0.4% 트리판 블루와 혼합될 수 있고, 세포는 혈구계를 이용하여 계수된다. 살아있는 세포는 어떤 과란색 염료의 착색없이 원형이고 굴절성으로 보이며, 반면 죽은 세포는 상기 염료를 흡수하여 과란색으로 보인다. 생존율은 계수된 총 세포 대비 생존 세포의 백분율로서 표현될 수 있고, 생존 세포는 그의 막 온전성이 트리판 블루 배제 생존율 분석에서 트립판 블루의 흡수를 여전히 방지할 수 있는 세포이다.
- [0112] 또 다른 구현예에서, 증가된 단백질 수율, 예컨대 증가된 이종 단백질 발현은 본원에 개시된 세포 배양 방법 및/또는 배지를 이용하여 수득된다. 일 구현예에서, 재조합 또는 이종 단백질 발현은 N-아세틸시스테인을 배제한 대조군 배지에 의한 세포 배양에서 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)와 비교하여 N-아세틸시스테인을 포함하는 세포 배양 방법 및/또는 배지를 이용하여 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)에서 더 높다. 일 구현예에서, N-아세틸시스테인을 포함하는 세포 배양 방법 및/또는 배지를 이용하여 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)는 N-아세틸시스테인이 없는 세포 배양 배지에서 배양된 콜레스테롤 영양요구주, 골수종 또는 하이브리도마(예컨대 NS0 세포)와 비교하여 적어도 10% ~ 적어도 200%(예컨대 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%) 더 높은 단백질 발현을 나타낸다.
- [0113] 본 발명의 예시적인 구현예가 이제 상세히 참조될 것이며, 이의 예는 첨부된 도면에 예시되어 있다.

가능하다면, 동일하거나 유사한 부분을 언급하기 위해 도면 전체에 걸쳐 동일한 참조 번호가 사용될 것이다. 다른 구현에는 본원에 개시된 명세서 및 실시를 고려하여 본 기술분야의 숙련자에게 명백할 것이다. 구현에는 하기 실시예에서 더 설명된다. 이들 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아니라, 단지 특정 구현예를 명확하게 하는 역할을 한다. 명세서 및 실시예는 단지 예시적인 것으로 고려되어야 하며, 진정한 범위 및 사상은 하기 청구범위에 의해 나타난다.

[0114] [실시예]

[0115] 실시예 1. 바이알 해동시 APF 배지 1 및 2에서 NSO 세포주 1의 세포 배가 시간

[0116] 이후 계대시 해동 회복, 세포 생존율, 세포 성장 및 세포 배가 시간에 대한 N-아세틸시스테인의 역할을 조사하기 위해, 하기 방법을 사용하였다. 1 ~ 3개의 상이한 동물성 단백질 무함유("APF") 배지에서 배양된 3개의 상이한 NSO 세포주를 바이알 해동시 그리고 일상적인 세포 증식 동안 세포 성장에 대한 N-아세틸시스테인(NAC)의 효과를 연구하기 위해 조사하였다. 상기 세포주 중 하나는 재조합 단백질을 발현하도록 형질전환되지 않은 NSO 무표지 숙주 세포(NSO 무표지 세포주)였다. 다른 두 NSO 세포주는 치료적 재조합 단백질을 발현하도록 조작되었다: NSO 세포주 1(항-IL-9 항체를 발현함) 및 NSO 세포주 2(BAK502G9, 항-IL-13 항체를 발현함). NSO 세포주 1을 해동시키고, 1.5 mM ~ 2.5 mM 범위의 다양한 농도의 NAC가 보충된 2개의 상이한 APF 배지(APF 배지 1 또는 APF 배지 2)에서 증식시켰다. NSO 세포주 2를 해동시키고, 0.5 mM ~ 2.5 mM 범위의 NAC가 보충된 3개의 상이한 APF 배지(APF 배지 1, APF 배지 2 또는 상업적으로 입수 가능한 NSO 세포 배양 배지(인비트로젠/Gibco로부터의 CD 하이브리도마 + 콜레스테롤))에서 증식시킨 반면, 형질전환되지 않은 숙주 세포주(NSO 무표지 세포주)는 0.5 mM ~ 1.5 mM 범위의 NAC가 보충된 APF 배지 2에서 해동시켰다. NAC는 시그마사로부터 취득하였고, 배지에 직접 첨가하거나 또는 적절한 농도로 배지에 첨가하기 전에 100 mM 농도로 물에 용해하였다. 3개의 모든 배지(APF 배지 1, APF 배지 2, 및 인비트로젠/Gibco로부터의 CD 하이브리도마 + 콜레스테롤)는, 도 1-12에 예시된 바와 같이, NSO 세포의 성장을 지지하였다. APF 배지 1 및 APF 배지 2는 하기를 포함하는 표준 세포 배양 성분을 함유한다: 아미노산, 비타민, 지질, 당, 작은 펩타이드, pH 완충제, 미량 금속, 무기염, 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드 전구체, 계면활성제, 환원제, 콜레스테롤, 지질 및 항산화제.

[0117] 바이알 해동 전에, 배지를 웨이커 상에서 120 rpm으로 진탕하면서 37°C에서 6% CO₂ 배양기에서 최소 1시간 동안 온도와 pH를 평형화시켰다. 바이알을 37°C 수조를 이용하여 해동시키고, 전체 내용물을 평형화된 배지로 옮겼다. Beckman Vi-Cell(영상 기반의 세포 생존율 분석기)을 이용한 세포 계수를 취득하여 생존 세포 밀도 및 생존율을 측정하였다.

[0118] 각 계대에서 첫 3일 내지 4일(즉 지수 성장기) 동안의 생존 세포 밀도를 사용하여 세포가 해동으로부터 회복되는 중에 바이알 해동 후 첫 며칠 동안 그리고 세포가 완전히 회복되어 계대부터 계대까지 일관된 배가 시간에 도달하였을 때 이후 세포 계대 동안 집단 배가 시간을 계산하였다.

[0119] 항-IL-9 단일클론 항체를 발현하는 NSO 세포(즉 NSO 세포주 1)는 동결 스톱에 있었다. 동결 NSO 세포주 1 세포를 다양한 농도의 N-아세틸시스테인(NAC)이 보충된 동물성 단백질 무함유(APF) 배지(즉 APF 배지 1 또는 APF 배지 2)에서 해동시키고 지수 성장기 동안의 생존 세포 밀도를 사용하여 상기 기재된 바와 같이 평균 세포 배가 시간을 계산하였다.

[0120] 도 1은 동결 스톱으로부터 해동된 세포에 대해 대조군 배지(NAC가 없는 APF 배지 1) 및 3개의 증가하는 농도의 N-아세틸시스테인이 보충된 APF 배지 1에서 NSO 세포주 1 세포 배가 시간을 보여준다. 1.5 mM ~ 2.5 mM NAC(1.5 mM, 2.0 mM 또는 2.5 mM NAC)의 첨가는 대조군 배지에서 해동된 NSO 세포주 1 세포(57.6시간)와 비교하여 바이알 해동시 평균 세포 배가 시간(각각 55.6시간, 48.4시간, 및 53.9시간)을 감소시켰다. 이론에 구속되지 않더라도, 2 mM 및 2.5 mM 사이의 배가 시간의 약간의 증가는, 특히 NO 세포가 해동 동안 삼투질농도(osmolality)에 민감할 수 있으므로, 용액의 삼투질 농도의 증가 때문일 수 있다.

[0121] 도 2는 동결 스톱으로부터 해동된 세포에 대해 대조군 배지(NAC가 없는 APF 배지 2) 및 3개의 증가하는 농도의 N-아세틸시스테인이 보충된 APF 배지 2에서 NSO 세포주 1 세포 배가 시간을 보여준다. APF 배지 1에서 관찰된 결과와 유사하게, APF 배지 2에 1.5 mM ~ 2.5 mM NAC(1.5 mM, 2.0 mM 또는 2.5 mM NAC)를 첨가하는 것은 또한 대조군 배지에서 해동된 NSO 세포주 1 세포(109.8시간)와 비교하여 바이알 해동시 세포 배가 시간(각각 47.5시간, 56.9시간, 및 47.7시간)을 감소시켰다.

[0122] 이들 실험은 바이알 해동 동안 NSO 세포의 세포 배양 배지에 N-아세틸시스테인(약 1.5 mM ~ 약 2.5 mM; 또는 약 1.5 mM, 약 2.0 mM 또는 약 2.5 mM)을 첨가하는 것이 세포 생존율, 세포 성장을 증가시키고 세포 배가 시간

을 감소시킨다는 것을 보여준다.

- [0123] **실시예 2. 바이알 해동시 APF 배지 1, APF 배지 2 및 CD 하이브리도마 배지에서 NSO 세포주 2의 세포 배가 시간**
- [0124] 단일클론 항체(즉 BAK502G9, 항-IL-13 항체)를 발현하는 NSO 세포(즉 NSO 세포주 2)는 동결 스톱에 있었다. 동결 NSO 세포주 2 세포를 다양한 농도의 N-아세틸시스테인(NAC)이 보충된 동물성 단백질 무함유(APF) 배지(즉 APF 배지 1, APF 배지 2 또는 콜레스테롤(1X 인비트로젠 콜레스테롤 지질 농축물)이 보충된 CD 하이브리도마 배지(Gibco))에서 해동시키고 지수 성장기 동안의 생존 세포 밀도를 사용하여 실시예 1에서 기재된 바와 같이 평균 세포 배가 시간을 계산하였다.
- [0125] 도 3은 동결 스톱으로부터 해동된 세포에 대해 대조군 배지(NAC가 없는 APF 배지 1) 및 3개의 증가하는 농도의 N-아세틸시스테인이 보충된 APF 배지 1에서 NSO 세포주 2 세포 배가 시간을 보여준다. 0.5 mM ~ 2.5 mM NAC(0.5 mM, 1.0 mM 또는 2.5 mM NAC)의 첨가는 대조군 배지에서 해동된 NSO 세포주 2 세포(44.6시간)와 비교하여 바이알 해동에서 평균 세포 배가 시간(각각 39.6시간, 41.6시간, 및 37.5시간)을 감소시켰고, 2.5 mM NAC가 바이알 해동시 세포 배가 시간의 가장 큰 감소를 나타내었다.
- [0126] 도 4는 동결 스톱으로부터 해동된 세포에 대해 대조군 배지(NAC가 없는 APF 배지 2) 및 3개의 증가하는 농도의 N-아세틸시스테인이 보충된 APF 배지 2에서 NSO 세포주 2 세포 배가 시간을 보여준다. APF 배지 1에서 관찰된 결과와 유사하게, 0.5 mM ~ 2.0 mM NAC(0.5 mM, 1.0 mM 또는 2.0 mM NAC)의 첨가는 대조군 배지에서 해동된 NSO 세포주 2 세포(77.0시간)와 비교하여 바이알 해동시 평균 세포 배가 시간(각각 57.7시간, 37.0시간, 및 39.7시간)을 감소시켰고, 1.0 mM 및 2.0 mM이 바이알 해동시 세포 배가 시간의 가장 큰 감소를 나타내었다.
- [0127] 도 5는 동결 스톱으로부터 해동된 세포에 대해 대조군 배지(NAC 없이 1X 인비트로젠 콜레스테롤 지질 농축물이 보충된 CD 하이브리도마 배지(Gibco)) 및 3개의 증가하는 농도의 N-아세틸시스테인이 보충된 대조군 배지에서 NSO 세포주 2 세포 배가 시간을 보여준다. APF 배지 1 및 APF 배지 2에서 관찰된 결과와 유사하게, 1.0 mM ~ 2.0 mM NAC의 첨가는 대조군 배지에서 해동된 NSO 세포주 2 세포(35.5시간)와 비교하여 바이알 해동에서 평균 세포 배가 시간(각각 34.7시간, 30.6시간, 및 30.9시간)을 감소시켰고, 1.0 mM 및 2.0 mM이 바이알 해동에서 세포 배가 시간의 가장 큰 감소를 나타내었다.
- [0128] 이들 실험은 바이알 해동시 NSO 세포의 세포 배양 배지에 N-아세틸시스테인(약 0.5 mM ~ 약 2.5 mM; 또는 약 0.5 mM, 약 1.0 mM, 약 2.0 mM 또는 약 2.5 mM)을 첨가하는 것이 세포 생존율, 세포 성장을 증가시키고 세포 배가 시간을 감소시킨다는 것을 보여준다.
- [0129] **실시예 3. 바이알 해동에서 APF 배지에서 NSO 무표지 세포주의 세포 배가 시간**
- [0130] 이종 단백질로 형질감염되지 않은 NSO 세포(즉 NSO 무표지 세포주)는 동결 스톱에 있었다. 동결 NSO 무표지 세포주 세포를 다양한 농도의 N-아세틸시스테인(NAC)이 보충된 동물성 단백질 무함유(APF) 배지(즉 APF 배지 2)에서 해동시키고, 지수 성장기 동안의 생존 세포 밀도를 사용하여 실시예 1에 기재된 바와 같이 평균 세포 배가 시간을 계산하였다.
- [0131] 도 6은 동결 스톱으로부터 해동된 세포에 대해 대조군 배지(NAC가 없는 APF 배지 2) 및 3개의 증가하는 농도의 N-아세틸시스테인이 보충된 APF 배지에서 NSO 무표지 세포주 세포 배가 시간을 보여준다. 실시예 1 및 2에서 보고된 결과와 유사하게, 0.5 mM ~ 1.5 mM NAC(0.5 mM, 1.0 mM 또는 1.5 mM NAC)의 첨가는 대조군 배지에서 해동된 NSO 무표지 세포주(67.8시간)와 비교하여 바이알 해동시 세포 배가 시간(각각 36.8시간, 38.4시간 및 57.9시간)을 감소시켰고, 0.5 mM 및 1.0 mM이 바이알 해동에서 세포 배가 시간의 가장 큰 감소를 나타내었다.
- [0132] 이들 결과는, 실시예 1 및 2에 요약된 결과와 함께 고려할 때, 0.5 mM, 1.0 mM, 1.5 mM, 2.0 mM, 및 2.5 mM(예컨대 약 0.5 mM ~ 약 2.5 mM)의 농도로 N-아세틸시스테인이 보충된 3개의 상이한 배지에서 해동된 3개의 NSO 세포주가 대조군 배지에서 해동된 NSO 세포와 비교하여 지속적으로 바이알 해동에서 증가된 세포 생존율, 세포 성장 및 감소된 세포 배가 시간을 나타내었음을 보여준다.
- [0133] **실시예 4. 세포 증식 동안 APF 배지 1 및 2에서 NSO 세포주 1의 세포 배가 시간**
- [0134] 항-IL-9 단일클론 항체를 발현하는 NSO 세포(즉 NSO 세포주 1)를 동물성 단백질 무함유(APF) 배지(즉 APF 배지 1 또는 APF 배지 2)에서 배양하였다. 실시예 1에 기술된 바이알 해동 연구에서 사용된 세포를 동일한 배지(다양한 농도의 N-아세틸시스테인이 보충된 APF 배지 1 또는 APF 배지 2)로 분할하고 계대로부터 계대까지 일관된 배가 시간이 달성될 때까지 이후 계대에서 회복시켰다. 회복 후 지수 성장기 동안의 생존 세포 밀도를 사용하여

실시예 1에 기술된 바와 같이 평균 세포 배가 시간을 계산하였다.

[0135] 도 7 및 표 2는 세포 증식 동안 대조군 배지(NAC가 없는 APF 배지 1) 및 3개의 증가하는 농도의 N-아세틸시스테인이 보충된 APF 배지 1에서 NSO 세포주 1 세포 배가 시간을 보여준다. 1.5 mM ~ 2.0 mM NAC(1.5 mM 또는 2.0 mM)의 첨가는 대조군 배지에서 배양된 NSO 세포주 1 세포와 비교하여 세포 증식 동안 평균 세포 배가 시간을 감소시켰다. 오차 막대는 평균 배가 시간의 1 표준 편차(1 S.D.)를 나타낸다.

표 2

| NAC 농도 (mM) | 평균 배가 시간 (시간) | 1 S.D. (시간) |
|-------------|---------------|-------------|
| 0.0 | 47.0 | 1.0 |
| 1.5 | 42.3 | 0.4 |
| 2.0 | 46.1 | 1.1 |
| 2.5 | 63.6 | 3.2 |

[0136]

[0137] 도 8 및 표 3은 증식 동안 대조군 배지(NAC가 없는 APF 배지 2) 및 3개의 증가하는 농도의 N-아세틸시스테인이 보충된 APF 배지 2에서 NSO 세포주 1 세포 배가 시간을 보여준다. APF 배지 1에서 관찰된 결과와 유사하게, 1.5 mM ~ 2.5 mM NAC(1.5 mM, 2.0 mM 또는 2.5 mM NAC)의 첨가는 대조군 배지에서 배양된 NSO 세포주 1 세포와 비교하여 증식 동안 평균 세포 배가 시간을 감소시켰다. 오차 막대는 평균 배가 시간의 1 표준 편차(1 S.D.)를 나타낸다.

표 3

| NAC 농도 (mM) | 평균 배가 시간 (시간) | 1 S.D. (시간) |
|-------------|---------------|-------------|
| 0.0 | 44.3 | 0.7 |
| 1.5 | 34.8 | 0.8 |
| 2.0 | 34.6 | 0.8 |
| 2.5 | 34.8 | 0.8 |

[0138]

[0139] 이들 실험은 NSO 세포가 증식하는 동안 N-아세틸시스테인(약 1.5 mM ~ 약 2.5 mM; 또는 약 1.5 mM, 약 2.0 mM 또는 약 2.5 mM NAC)의 첨가가 세포 생존율, 세포 성장을 증가시키고 세포 배가 시간을 감소시킨다는 것을 보여준다. 또한, 1.5 mM 및 2.0 mM의 N-아세틸시스테인 농도는 2개의 상이한 배지에서 세포 증식을 겪는 NSO 세포주 1 세포의 세포 생존율, 세포 성장을 증가시켰고, 세포 배가 시간을 감소시켰다.

[0140] 실시예 5. 세포 증식 동안 APF 배지 1, APF 배지 2 및 CD 하이브리도마 배지에서 NSO 세포주의 세포 배가 시간

[0141] 단일클론 항체(즉 BAK502G9, 항-IL-13 항체)를 발현하는 NSO 세포(즉 NSO 세포주 2)를 동물성 단백질 무함유(APF) 배지(즉 APF 배지 1, APF 배지 2 또는 콜레스테롤(1X 인비트로젠 콜레스테롤 지질 농축물)이 보충된 CD 하이브리도마 배지(Gibco))에서 배양하였다. 실시예 2에 기술된 바이알 해동에서 사용된 세포를 다양한 농도의 N-아세틸시스테인이 보충된 동일한 배지(APF 배지 1, APF 배지 2 또는 CD 하이브리도마 배지 + 콜레스테롤)로 분할하고, 계대로부터 계대까지 일관된 배가 시간이 달성될 때까지 이후 계대에서 회복시켰다. 회복 후 지수 성장기 동안의 생존 세포 밀도를 사용하여 실시예 1에 기술된 바와 같이 평균 세포 배가 시간을 계산하였다.

[0142] 도 9 및 표 4는 증식 동안 대조군 배지(NAC가 없는 APF 배지 1) 및 3개의 증가하는 농도의 N-아세틸시스테인이 보충된 APF 배지 1에서 NSO 세포주 2 세포 배가 시간을 보여준다. 0.5 mM ~ 2.5 mM NAC(0.5 mM, 1.0 mM 또는 2.5 mM)의 첨가는 대조군 배지에서 배양된 NSO 세포주 2 세포와 비교하여 증식 동안 평균 세포 배가 시간을 감소시켰고, 1.0 mM 및 2.5 mM NAC는 증식 동안 세포 배가 시간의 가장 큰 감소를 보여주었다. 오차 막대는 평균 배가 시간의 1 표준 편차(1 S.D.)를 나타낸다.

표 4

| 표 4: 증식 동안 APF 배지 1에서의 NSO 세포주 2의 집단 배가 시간 | | |
|--|---------------|-------------|
| NAC 농도 (mM) | 평균 배가 시간 (시간) | 1 S.D. (시간) |
| 0.0 | 41.7 | 1.5 |
| 0.5 | 35.4 | 2.3 |
| 1.0 | 31.2 | 1.0 |
| 2.5 | 31.2 | 0.5 |

[0143]

[0144]

도 10 및 표 5는 증식 동안 대조군 배지(NAC가 없는 APF 배지) 및 3개의 증가하는 농도의 N-아세틸시스테인이 보충된 APF 배지 2에서 NSO 세포주 2 세포 배가 시간을 보여준다 APF 배지 1에서 관찰된 결과와 유사하게, 0.5 mM ~ 2.0 mM NAC(0.5 mM, 1.0 mM, 또는 2.0 mM)의 첨가는 대조군 배지에서 배양된 NSO 세포주 2 세포와 비교하여 증식 동안 평균 세포 배가 시간을 감소시켰다. 오차 막대는 평균 배가 시간의 1 표준 편차(1 S.D.)를 나타낸다.

표 5

| 표 5: 증식 동안 APF 배지 2에서의 NSO 세포주 2의 집단 배가 시간 | | |
|--|---------------|-------------|
| NAC 농도 (mM) | 평균 배가 시간 (시간) | 1 S.D. (시간) |
| 0.0 | 38.1 | 1.2 |
| 0.5 | 30.2 | 0.2 |
| 1.0 | 28.8 | 0.6 |
| 2.0 | 31.5 | 0.2 |

[0145]

[0146]

도 11 및 표 6은 증식 동안 대조군 배지(NAC 없이 1X 인비트로젠 콜레스테롤 지질 농축물이 보충된 CD 하이브리도마 배지(Gibco)) 및 3개의 증가하는 농도의 N-아세틸시스테인을 함유하는 대조군 배지에서 NSO 세포주 2 세포 배가 시간을 보여준다. APF 배지 1 및 APF 배지 2에서 관찰된 결과와 유사하게, 1.0 mM ~ 2.0 mM NAC의 첨가는 대조군 배지에서 배양된 NSO 세포주 2 세포와 비교하여 평균 세포 배가 시간을 감소시켰다. 오차 막대는 평균 배가 시간의 1 표준 편차(1 S.D.)를 나타낸다.

표 6

| 표 6: 증식 동안 콜레스테롤이 보충된 인비트로젠 CD 하이브리도마 배지에서의 NSO 세포주 2의 집단 배가 시간 | | |
|---|---------------|-------------|
| NAC 농도 (mM) | 평균 배가 시간 (시간) | 1 S.D. (시간) |
| 0.0 | 40.7 | 14.3 |
| 0.5 | 39.7 | 11.0 |
| 1.0 | 37.5 | 9.3 |
| 2.0 | 35.7 | 4.3 |

[0147]

[0148]

이들 실험은 증식 동안 NSO 세포의 세포 배양 배지에 N-아세틸시스테인(약 0.5 mM ~ 약 2.5 mM; 또는 약 0.5 mM, 약 1.0 mM, 약 2.0 mM 또는 약 2.5 mM NAC)을 첨가하는 것이 세포 생존율, 세포 성장을 증가시키고 세포 배가 시간을 감소시킨다는 것을 보여준다.

[0149]

실시예 6. 세포 증식 동안 APF 배지 2에서 NSO 무표지 세포주의 세포 배가 시간

[0150]

이중 단백질로 형질감염되지 않은 NSO 세포(즉 NSO 무표지 세포주)를 동물성 단백질 무함유(APF) 배지(즉 APF 배지 2)에서 배양하였다. 실시예 3에 기술된 바이알 해동에서 사용된 세포를 동일한 배지(다양한 농도의 N-아세틸시스테인이 보충된 APF 배지 2)로 분할하고, 계대로부터 계대까지 일관된 배가 시간이 달성될 때까지 이후 계

대에서 회복시켰다. 회복 후 지수 성장기 동안의 생존 세포 밀도를 사용하여 실시예 1에 기재된 바와 같이 평균 세포 배가 시간을 계산하였다.

[0151] 도 12 및 표 7은 증식 동안 대조군 배지(NAC가 없는 APF 배지 2) 및 3개의 증가하는 농도의 N-아세틸시스테인이 보충된 APF 배지 2에서 NSO 무표지 세포주 세포 배가 시간을 보여준다. 0.5 mM ~ 1.5 mM NAC(0.5 mM, 1.0 mM 또는 1.5 mM NAC)의 첨가는 대조군 배지에서 배양된 무표지 세포주 세포와 비교하여 증식 동안 세포 배가 시간을 감소시켰다. 오차 막대는 평균 배가 시간의 1 표준 편차(1 S.D.)를 나타낸다.

[0152] 이들 결과는, 실시예 4 및 5에서 요약된 결과와 함께 고려할 때, 0.5 mM, 1.0 mM, 1.5 mM, 및 2.0 mM(예컨대 약 0.5 mM ~ 약 2.0 mM)의 농도로 N-아세틸시스테인이 보충된 3개의 상이한 NSO 배지에서 배양된 3개의 NSO 세포주가 대조군 배지에서 해동된 NSO 세포와 비교하여 세포 증식 동안 지속적으로 세포 생존율, 세포 성장을 증가시켰고 세포의 세포 배가 시간을 감소시켰음을 보여준다.

표 7

| NAC 농도 (mM) | 평균 배가 시간 (시간) | 1 S.D. (시간) |
|-------------|---------------|-------------|
| 0.0 | 31.9 | 9.2 |
| 0.5 | 26.4 | 2.5 |
| 1.0 | 26.4 | 3.6 |
| 1.5 | 26.2 | 2.1 |

[0153]

균등 범위

[0154]

[0155] 상기 기술한 설명은, 당업자가 구현예를 실시할 수 있도록 하기에 충분한 것으로 간주된다. 전술한 내용 및 실시예는 특정 구현예를 상세하게 설명하고, 본 발명자들이 고안한 최적의 방식을 기술한다. 그러나, 전술한 내용이 본문에 얼마나 상세히 나타나는지 여부에 관계없이, 구현예는 다수의 방식으로 실시될 수 있고, 청구범위는 이의 임의의 균등 범위를 포함하는 것으로 이해될 것이다.

[0156]

본원에 사용된 바와 같이, 용어 '약'은 명시적으로 표시되었는지 여부에 관계없이, 예를 들어, 정수, 분수, 및 백분율을 포함하는 수치를 지칭한다. 용어 '약'은 일반적으로 언급된 값과 동등한(예컨대, 동일한 기능 또는 결과를 갖는) 것으로 당업자가 고려할 수치의 범위(예컨대, 언급된 값의 +/-5%)를 지칭한다. 일부 경우, 용어 '약'은 가장 가까운 유효 숫자로 반올림되는 수치를 포함할 수 있다.

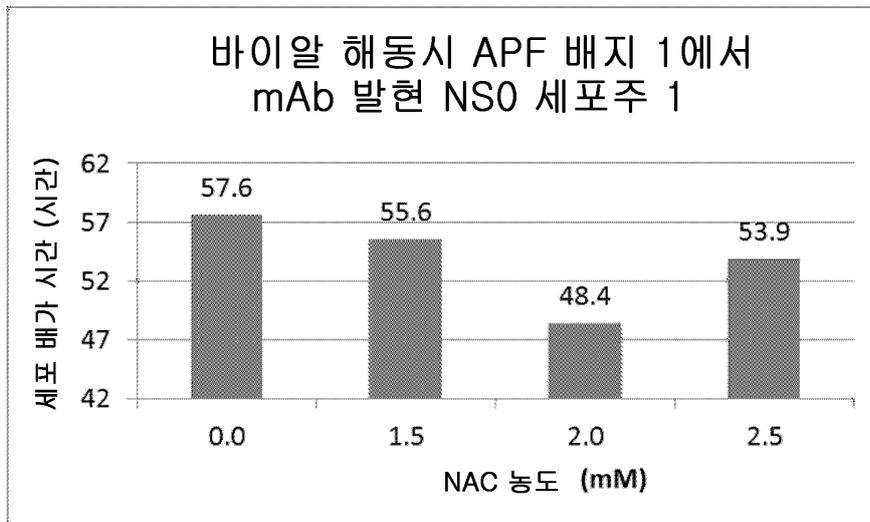
[0157]

[0158]

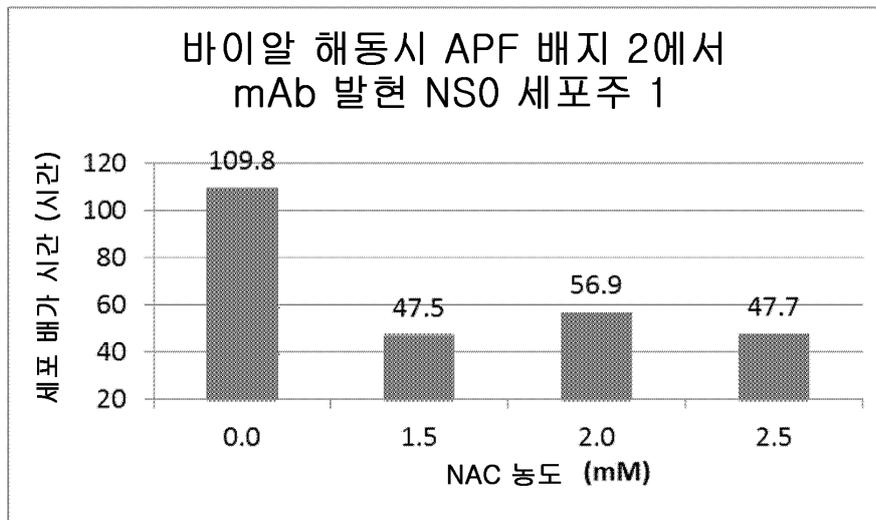
본원에 언급된 모든 공보, 특허, 특허 출원 및/또는 기타 문헌은 개개의 공보, 특허, 특허 출원 및/또는 기타 문헌 각각이 모든 목적으로 참고로 인용되는 것으로서 각각 명시되는 것과 동일한 정도로, 모든 목적으로 그 전체가 참고로 인용된다.

도면

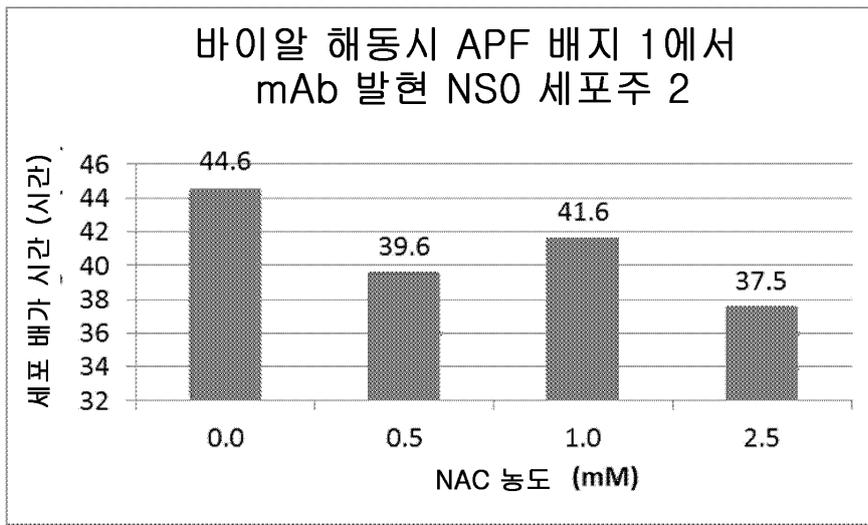
도면1



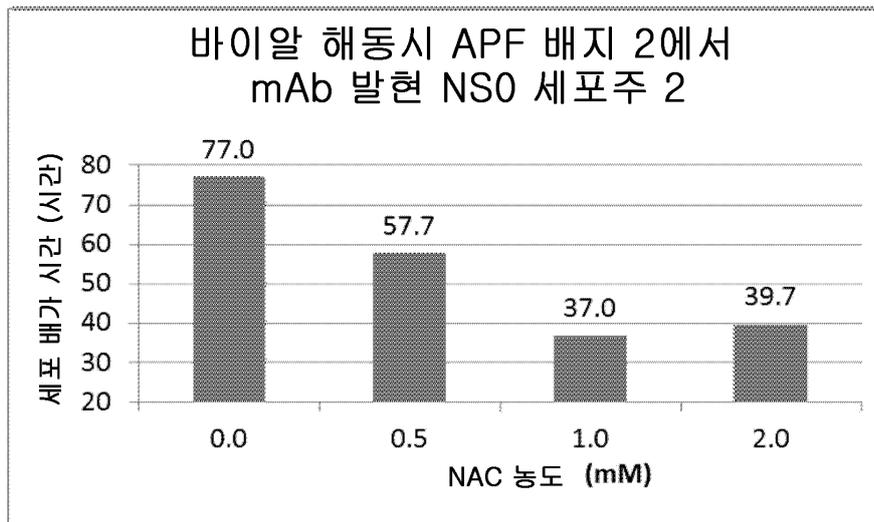
도면2



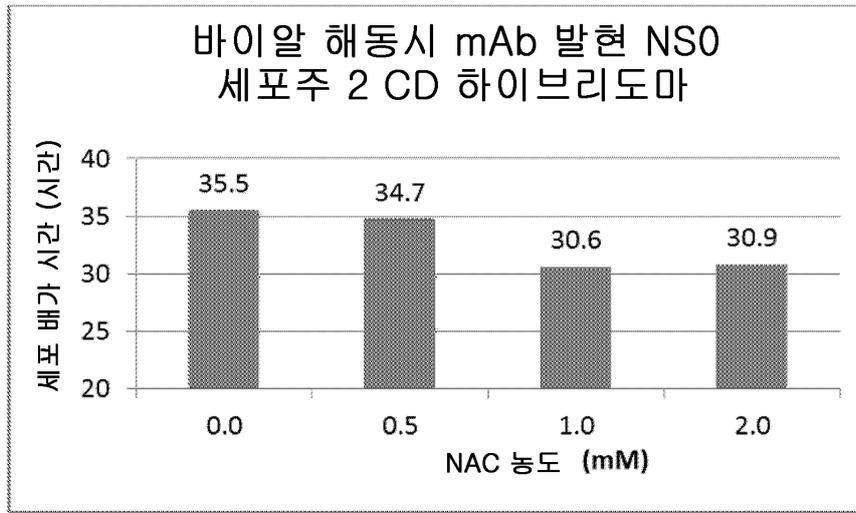
도면3



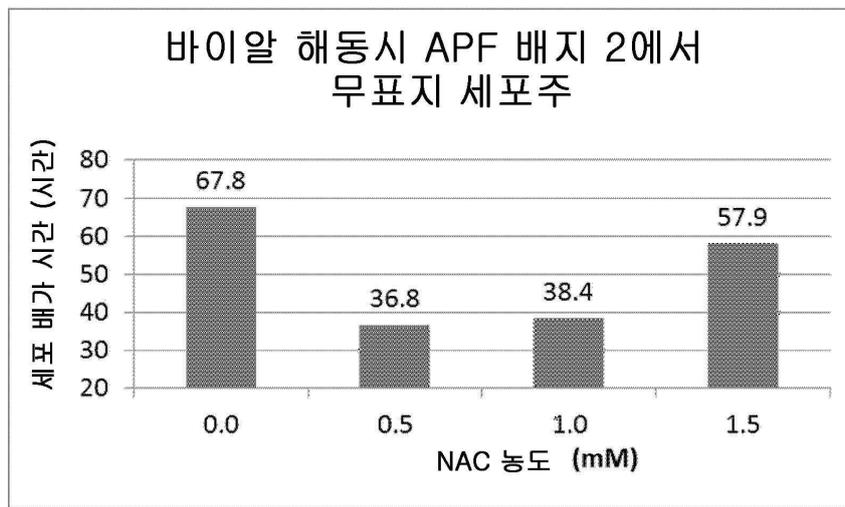
도면4



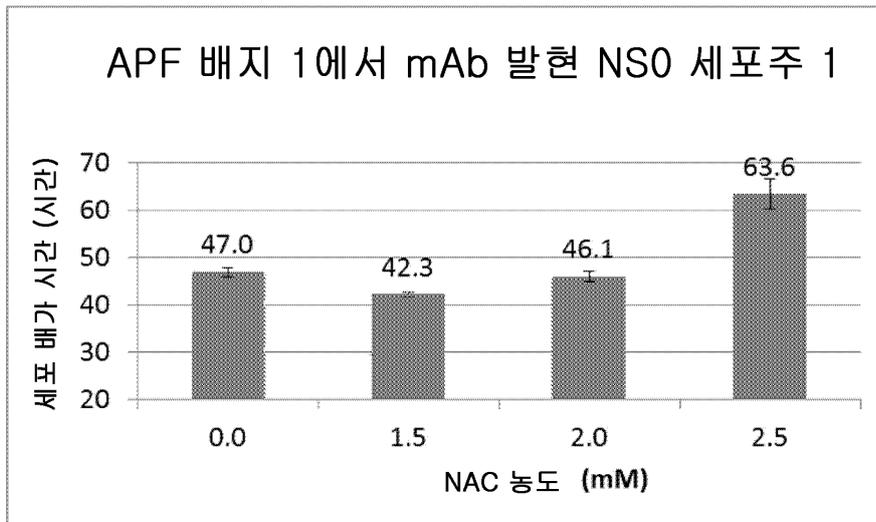
도면5



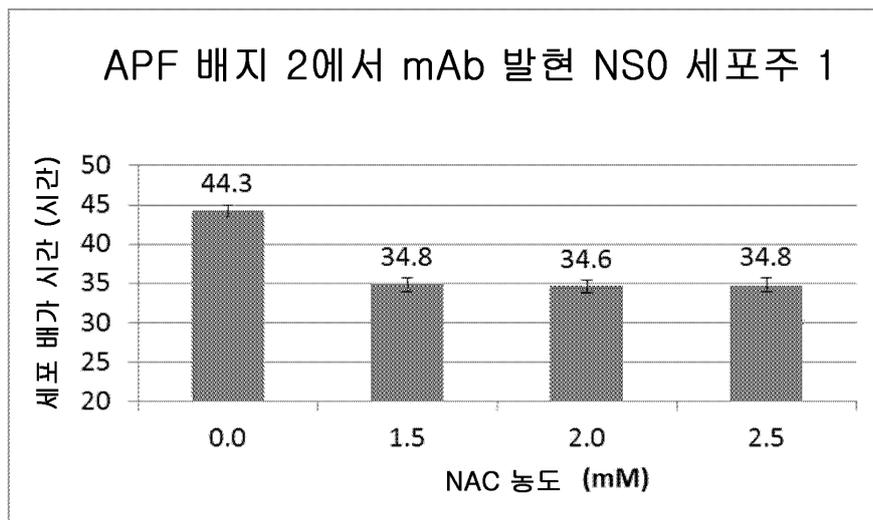
도면6



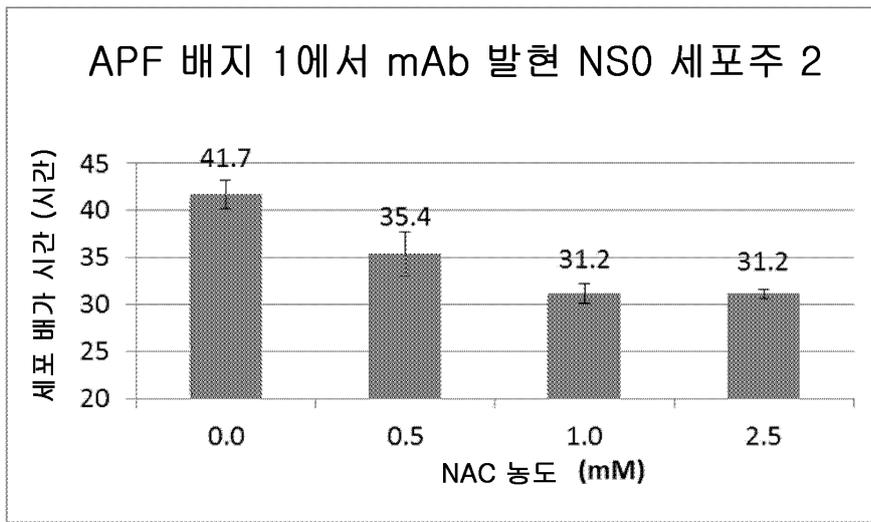
도면7



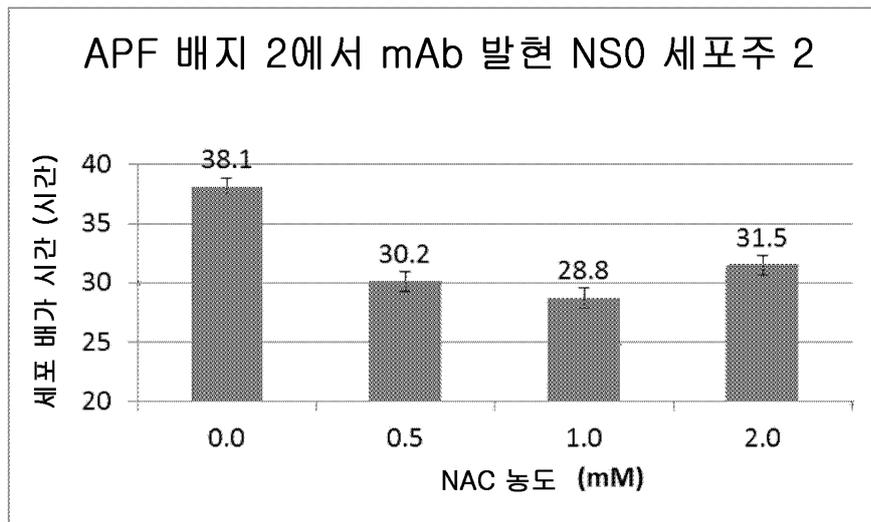
도면8



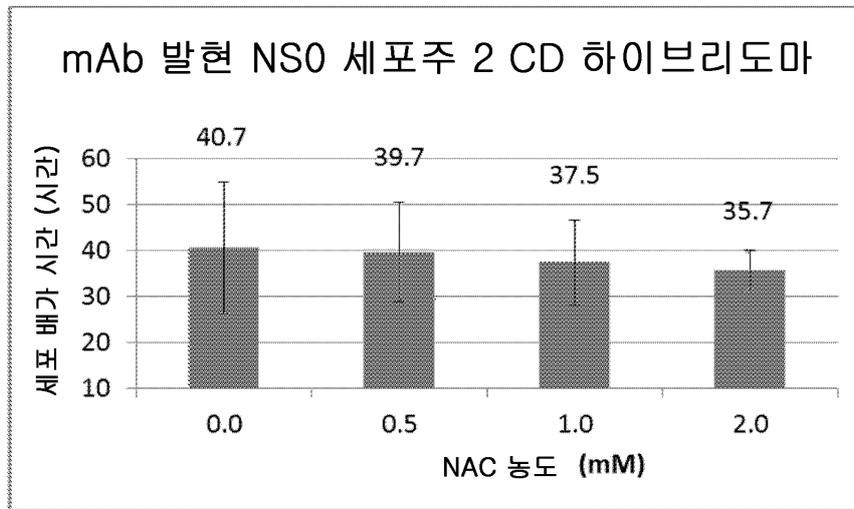
도면9



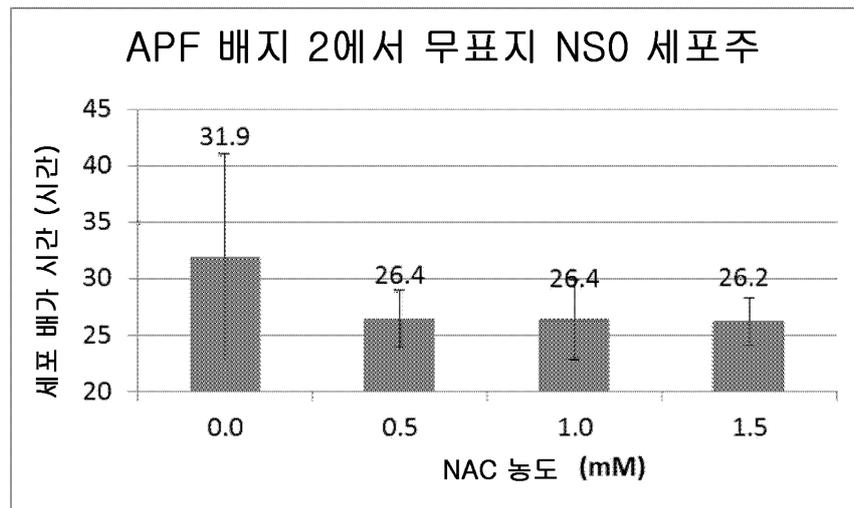
도면10



도면11



도면12



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> MEDIMMUNE, LLC

<120> CELL CULTURE METHODS AND MEDIA COMPRISING N-ACETYLCYSTEINE

<130> IL13-310W01

<140> PCT/US2015/036169

<141> 2015-06-17

<150> 62/013,699

<151> 2014-06-18

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Asn Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Gly Gln Glu Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu Trp
 100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 2

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys

1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly

65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro
 85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 3

Asn Tyr Gly Leu Ser

1 5

<210> 4

<211> 17

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 4

Trp Ile Ser Ala Asn Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Gly Gln Glu Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 5
Asp Ser Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 6
Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val His
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 7
Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223>
> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 8

Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro Val Val

1 5 10

<210> 9

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Arg Asn Tyr

20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Asn Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Gly Gln Glu Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ile Thr Met Thr Thr Glu Thr Ser Thr Asn Thr Ala His

65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Val Arg Asp Ser Ser Ser Asn Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu Trp

100 105 110

Gly Lys Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 10

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Pro Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Leu Val
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ile Asp Ala Gly
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro
 85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 11

Asn Tyr Gly Leu Ser

1 5

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 12

Trp Ile Ser Ala Asn Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Gly Gln Glu Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 13

Asp Ser Ser Ser Asn Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 14

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Leu Val His

1 5 10

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 15

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser

1 5

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 16

Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro Val Val

1 5 10

<210> 17

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 17

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Tyr Asp Gly Gly Asn Thr Gln Tyr Gly Gln Glu Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu Trp

100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 18

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val

 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr

 35 40 45

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro

 85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

 100 105

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 19

Asn Tyr Gly Leu Ser

1 5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 20

Trp Ile Asn Tyr Asp Gly Gly Asn Thr Gln Tyr Gly Gln Glu Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 21

Asp Ser Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 22

Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val His

1 5 10

<210

> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 23

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser

1 5

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 24

Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro Val Val

1 5 10

<210> 25

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 25

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Glu Gln Thr

 20 25 30

Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Asn Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Gly Gln Glu Phe

 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu Trp

 100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 26

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 26

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val

 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr

 35 40 45

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro

 85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

 100 105

<210> 27

<211

> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 27

Gln Thr Gly Val Ser

1 5

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 28

Trp Ile Ser Ala Asn Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Gly Gln Glu Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 29

Asp Ser Ser Ser Ser Trp Ala Arg Trp Phe Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 30

Gly Gly Asn Ile Ile Gly Ser Lys Leu Val His

1 5 10

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 31

Asp Asp Gly Asp Arg Pro Ser

1 5

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 32

Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp Pro Val Val

1 5 10