(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0094723
(43) 공개일자 2013년08월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 21/00 (2006.01) *C12N 5/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7030710
(22) 출원일자(국제) 2011년04월25일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2012년11월23일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2011/056507
(87) 국제공개번호 WO 2011/134919
국제공개일자 2011년11월03일
(30) 우선권주장
61/327,846 2010년04월26일 미국(US)

(71) 출원인
노파르티스 아게
스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35
(72) 발명자
유스텐, 크리스토프 이.
스위스 체하-4002 바젤 포스트파흐 노파르티스 파마 아게
라이스트, 크리스티안
스위스 체하-4002 바젤 포스트파흐 4002 노파르티스 파마 아게
슈미트, 외르크
스위스 체하-4002 바젤 포스트파흐 노파르티스 파마 아게
(74) 대리인
위혜숙, 양영준

전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **개선된 세포 배양 방법**

(57) 요 약

본 발명은 세포 사멸을 감소시키고, 생성물 수율을 증가시키며 생성물 품질을 개선하기 위해 변환 시기 및 단계 크기 면에서 조정되는 1회 이상의 온도 및 pH 변환을 특징으로 하는 포유동물 CHO 세포에서의 폴리펩티드 생산을 위한 세포 배양 방법에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

CHO 세포를 1회 이상의 온도 변환 및 1회 이상의 pH 변환을 포함하는 조건 하에 배지에서 배양하는 단계 및 재조합 폴리펩티드를 발현시키는 단계를 포함하고, 이때

- 세포가 제1 온도에서 3일 이상 동안 성장된 후, 온도가 제1 온도보다 약 1℃ 내지 약 8℃ 더 낮은 제2 온도로 변환되고, 세포가 상기 제2 온도에서 또 다른 2일 이상의 기간 동안 유지되고;

- 세포가 제1 pH 값에서 2일 이상 동안 성장된 후, pH가 제1 pH보다 약 0.05 내지 약 1 pH 단위 더 낮은 제2 pH 값으로 변환되고, 세포가 상기 제2 pH에서 1일 이상 동안 성장되는 것인

재조합 폴리펩티드의 생산 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, pH가 상기 제1 pH 값과 상기 제2 pH 값 사이에서 능동적으로 변화되는 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, pH가 상기 제1 pH 값과 상기 제2 pH 값 사이에서 수동적으로 변화되는 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 온도가 약 33℃ 내지 약 38℃의 범위인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 온도가 약 30℃ 내지 약 37℃의 범위인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 pH 값이 약 pH 6.8 내지 약 pH 7.5의 범위인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 pH 값이 약 pH 6.0 내지 약 pH 7.1의 범위인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 pH가 배양 말기까지 능동적으로 유지되는 것인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 pH 변환에 이어 1일 이상 후에 제2 pH 변환이 후속되고, 이때 제3 pH 값이 제2 pH 값보다 약 0.05 pH 단위 내지 약 1 pH 단위 더 높은 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, pH가 상기 제2 pH 값에서 상기 제3 pH 값으로 능동적으로 변화되는 것인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, pH가 상기 제2 pH 값에서 상기 제3 pH 값으로 수동적으로 변화되는 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 배지가 무단백질 및 무혈청이고, 약 40 내지 약 100 mM의 총 아미노산 함량을 특징으로 하는 것인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 배양이 배양물에 첨가되는 2가지 이상의 영양소 용액의 공급을 포함하는 유가식(fed batch) 방식으로 행해지는 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 배양 배지에 첨가되는 공급 용액 중 하나가 디펩티드 시스틴 및 아미노산 티로신을 포함하는 공급물인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 공급물이 10을 초과하는 염기성 pH의 수용액 내에 각각 약 6.5 g/ℓ 내지 약 8.0 g/ℓ 범위 및 약 9 g/ℓ 내지 약 11 g/ℓ 범위의 농도로 디펩티드 시스틴 및 아미노산 티로신을 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 배양 배지에 첨가되는 시스틴 및 티로신을 포함하는 공급 용액의 양이 1일당 초기 배양 배지 중량의 약 0.2 내지 약 0.8 중량%의 범위인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 생산된 폴리펩티드가 글리코실화된 것인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 항체 또는 항체 단편인 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] **[발명의 기술 분야]**

[0002] 본 발명은 일반적인 생물공학 분야, 특히 세포 배양, 및 산업적 규모의 폴리펩티드 생산을 위한 그의 용도에 관한 것이다.

[0003] 본 발명은 1회 이상의 온도 변환 및 1회 이상의 pH 변환을 특징으로 하는 세포 배양 방법을 제공한다. 이러한 방법은 세포 생존율이 높은 세포, 바람직하게는 CHO 세포와 같은 포유동물 세포의 배양에 적절하다. 추가로 본 발명에 따른 세포 배양 방법은 특히 산업적 규모에서, 특히 포유동물 세포 배양 시스템에서의 폴리펩티드의 재조합 발현에 의해, 폴리펩티드 생산에 사용되는 경우에 높은 폴리펩티드 생산성을 수득하는 것을 허용한다.

배 경 기 술

[0004] **[발명의 기술적 배경]**

[0005] 재조합 기술을 사용하는 폴리펩티드 제조는 지난 몇십 년 동안 표준 절차로 발전되었다. 각각의 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 클로닝한 후, 이어서 적절한 발현 숙주를 발현될 유전자로 형질전환시키고, 최종적으로 재조합 폴리펩티드 생성물을 생산하고, 수득된 재조합 폴리펩티드 생성물을 정제하는 것에 의한 재조합 폴리펩티드의 입수는 완전히 새로운 부류의 생물학적으로 디자인 및 생산된 치료학에 대한 접근을 제공하였다.

[0006] 제약상 활성인 화합물들이 재조합 DNA 기술에 이어지는 생물공학 분야에서 개발된 생산 방법을 사용하여 제약 산업에서 점점 더 많이 제조되었다.

[0007] 이같은 생물학적 생성물에는 모노클로날 항체가 포함되고, 이는 자가면역 질환, 염증성 장애, 면역억제, 종양학 등이 포함되는 다양한 의학 분야에서 중요한 치료 선택사항으로 개발되었다.

[0008] 생물학적 기원의 이같은 치료학의 발달은 산업적 규모의 생산을 필요로 하고, 이에 의해 대량의 재조합 폴리펩티드의 입수를 제공한다. 바람직한 발현 시스템은 곤충 세포, 효모 등을 기초로 하는 대부분의 다른 진핵생물 시스템 또는 심지어 전통적인 원핵생물 발현 시스템보다 우월한 포유동물 세포 배양이다.

[0009] 그러나, 포유동물 세포 배양은, 특히 산업적 규모에서, 거대한 난제를 포함한다. 포유동물 세포 배양을 위한 생산 설비는 다수의 공정 조건의 면밀한 최적화를 필요로 한다.

[0010] 특히, 포유동물 세포에서의 폴리펩티드 생산을 위한 세포 배양 방법은 최적의 생성물 품질과 조합된 높은 용적 생성물 수율에 도달하기 위해 배양 조건의 지속적인 최적화 및 특정 세포주 또는 생성물에 대한 그의 적합화를 필요로 한다.

[0011] 많은 기존의 노력은 예를 들어 이온, 아미노산, 비타민 또는 미량 원소의 종류 및 농도에 관련된 배지 조성 및 배지의 오스몰랄농도가 포함되는 세포 배양 배지의 기본적인 파라미터에 집중되었다. 연구의 초점이 맞춰진 추가적인 중요한 파라미터는, 예를 들어, 최적의 세포 성장에 도달하기 위한 공급물 조성 또는 공급 일정이다.

[0012] 또한, 기본적인 생리학적 파라미터로서의 온도 및 pH가 포유동물 세포의 배양에 대한 유의한 영향이 있는 것으로 공지되어 있다. 온도는 일반적으로 세포의 성장 상태 및 생존율에 상당히 영향을 미친다. 그러나, 이에 더하여, 예를 들어 글리코실화를 변경시킴으로써, 온도는 또한 더욱 특히 폴리펩티드 생성물 및 그의 특성에 영향을 미칠 수 있다 (US 2003/0190710 A1; EP 1 373 547 A1; US 2004/0214289 A1).

[0013] 성장 배지 및 세포가 유지되는 pH 또한 특정 세포주 및 생성물에 의존하는 특이적 방식으로 세포 성장 및 폴리펩티드 생산에 영향을 미치고 이를 변경시킬 수 있다 (문헌 [Sauer et al. Biotechnology and Bioengineering 2000, Vol 67, pg. 586-597]; [Yoon et al., Biotechnology and Bioengineering 2004, Vol 89, pg. 346-356]; [Kuwae et al., Journal of Bioscience and Bioengineering 2005, Vol 100, pg. 502-510]).

[0014] 배양 과정에 걸쳐, 세포의 요구사항이 변화될 수 있다. 처음에는 조건을 개선된 세포 성장에 대해 최적화하는 것이 유리한 한편, 더 나중의 단계에서는 높은 생성물 역가를 수득하는 것에 관련된 강화된 세포 생존 및 생존 세포 밀도의 유지가 중요해진다. 이와 관련하여, 세포 배양 동안 하나 이상의 온도 단계를 도입하는 것이 제안되었다 (문헌 [Chen et al., J Biosci Bioeng. 2004; 97 (4):239-43]). 이를 위해, 포유동물 세포가 적어도 2가지 상이한 온도에서 배양되고, 이때 더 높은 제1 온도는 세포 성장에 최적화되는 한편, 더 낮은 제2 또는 제3 온도는 세포의 생산성을 개선하도록 선택된다 (예를 들어 문헌 [Weidemann et al., Cytotechnology. 1994; 15(1-3); 111-6]; WO 00/36092; EP 0 764 719 A2, US 2005/019859, EP 1 575 998, US 2008/081356). 기타 문헌에 추가적인 특이적 배지 특색과 조합된 온도 단계들의 사용이 기술되어 있다. 예를 들어, EP 1 757 700 A2에는 배지 성분으로서의 부티레이트 염의 존재와 조합된 온도 단계가 개시되어 있는 한편, EP 1 789 571 A1에는 규정된 아미노산 함량과 조합된 온도 단계가 기술되어 있다.

[0015] 또한, 기타 세포 배양 조건들이 변화되었다. US 5 856 179는 유가식(fed batch) 세포 배양물에서 폴리펩티드를 생산하는 방법을 발표하였고, 이때 배양 동안 배지의 오스몰랄농도가 주요 성장기에서의 약 280-330 mOsm에서 생산기 동안 약 400-600 mOsm으로 상당히 변경된다.

[0016] WO 02/101019는 온도 및 pH에서의 변화를 포함하여 다수의 특정 배지 성분 예컨대 글루타민 및 글루코스 농도를 주목하였다. 그러나, 고-글루코스 배지에서의 pH 변환이 배양물에 대한 부정적인 영향이 있다는 것과 성장기 또는 생산기 동안 pH를 감소시키는 것이 권장되지 않는다는 것이 발견되었다.

[0017] WO 2006/026445에는 세포 배양 조건이 한 배양 조건 세트에서 제2 세트로 변화되고, 이러한 변화가 특정 아미노산의 함량에 관한 특정한 배지 특색과 조합되는 폴리펩티드 생산 방법이 개시되어 있다. 조건 변화는 구체적으로 온도 변환과 관련된다. pH 또는 오스몰랄농도와 같은 조건에서의 기타 변화가 추가적인 선택사항으로 일반적으로 언급되지만, 특정한 파라미터 설정은 명시되지 않는다.

[0018] 상기 난제들 및 기존의 불리함을 고려하여, 심지어 더 높은 수율, 즉 개선된 특이적 및 전체적 생산성, 및 증가된 생성물 품질로 산업적 규모에서 재조합 폴리펩티드가 생산되게 하는 개선된 배양 방법이 산업적 생물공학 분야에서 계속 요구된다.

[0019] 폴리펩티드 생산 방법의 특정한 기술적 목표는 전체적인 세포 배양 방법의 파라미터들을 최적화함으로써 폴리펩티드의 최종 수율을 최대화하고 높은 세포 생존율을 유지하는 것이다.

발명의 내용

[0020] **[발명의 개요]**

[0021] 본 발명은 재조합 폴리펩티드의 생산을 위한 방법에서 온도 및 pH 변환을 조합하는 것에 관한 것이다. 재조합 세포, 특히 CHO 세포의 요구에 대해 적합화되어, 이러한 2가지 파라미터의 특이적 조합은 증가된 세포 생산성, 뿐만 아니라 재조합에 의해 생산된 폴리펩티드의 개선된 생성물 품질에 이르게 한다. 특히, 본 발명은 절대적 및 상대적 관점에서의 온도 및 pH 변환(들)의 특정 시기 및 일정을 기초로, 뿐만 아니라 이러한 변환의 특정 규

모에 관하여 긍정적인 효과를 발견하였다.

[0022] 본 발명의 첫 번째 측면에 따르면, 배지에서 CHO 세포를 배양하는 단계 및 재조합 폴리펩티드를 발현시키는 단계를 포함하고, 이때 온도 및 pH가 공정 동안 변화되는 것인 재조합 폴리펩티드의 생산 방법이 개시된다.

[0023] 특히, 본 발명에 따른 방법은 1회 이상의 온도 변환 및 1회 이상의 pH 변환을 수반한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 세포가 1차로 제1 온도에서 3일 이상, 별법적으로는 4일 이상, 또는 5일 이상 동안 성장 및 유지된 후, 더 높은 제1 온도에서 더 낮은 제2 온도로의 변환이 수행된다. 더 낮은 제2 온도는 제1 온도보다 약 1℃ 내지 약 8℃ 더 낮다. 본 발명의 또 다른 별법적인 실시양태에서, 온도 변환은 예를 들어 약 2℃ 내지 약 5℃, 특히 약 4℃ 또는 약 3.5℃이다. 그 후, 제2 온도가 2일 이상 동안 유지된다. 수확할 때까지 제2 온도가 유지될 수 있다.

[0024] 본 발명의 한 실시양태에 따르면, 제1 온도는 바람직하게는 약 33℃ 내지 약 38℃ 범위이고, 제2 온도는 바람직하게는 약 30℃ 내지 약 37℃ 범위이다.

[0025] 온도 변환에 더하여, pH 또한 제1 pH에서 제2 pH로 변화된다. 따라서, 본 발명에 따른 방법은 1회 이상의 pH 변환을 포함한다. 특히, 세포가 2일 이상 동안 제1 pH 값에서 성장된 후, pH가 제1 pH보다 약 0.05 내지 약 1 pH 단위 더 낮은 제2 pH 값으로 변환되고, 세포가 상기 제2 pH에서 1일 이상 동안, 별법적으로는 2일 이상 동안 성장된다. 일부 실시양태에서, 수확할 때까지 제2 pH가 유지될 것이다.

[0026] 제1 pH 값은 바람직하게는 약 pH 6.8 내지 약 pH 7.5 범위이다. 제2 pH 값은 바람직하게는 약 pH 6.0 내지 약 pH 7.1 범위이다.

[0027] 따라서, 본 발명의 한 실시양태는 CHO 세포를 1회 이상의 온도 변환 및 1회 이상의 pH 변환을 포함하는 조건 하에 배지에서 배양하는 단계 및 재조합 폴리펩티드를 발현시키는 단계를 포함하고,

[0028] 이때

[0029] - 세포가 제1 온도에서 3일 이상 동안 성장된 후, 온도가 제1 온도보다 약 1℃ 내지 약 8℃ 더 낮은 제2 온도로 변환되고, 세포가 상기 제2 온도에서 또 다른 2일 이상의 기간 동안 유지되고;

[0030] - 세포가 제1 pH 값에서 2일 이상 동안 성장된 후, pH가 제1 pH보다 약 0.05 내지 약 1 pH 단위 더 낮은 제2 pH 값으로 변환되고, 세포가 상기 제2 pH에서 1일 이상 동안 성장되는 것인

[0031] 재조합 폴리펩티드의 생산 방법이다.

[0032] 본 발명에 따른 방법은 임의적으로 제2 pH 변환을 포함할 수 있고, 이는 1일 이상 후에 제1 pH 변환에 이어 후속된다. 제1 pH 변환에 이어 1일 이상 후에 제2 pH 변환이 후속되면, 제3 pH 값은 제2 pH 값보다 약 0.05 pH 단위 내지 약 1 pH 단위 더 높다. 수확할 때까지 제3 pH 값이 유지될 수 있다.

[0033] 본 발명에 따른 세포 배양 방법은 능동 및/또는 수동 pH 변환을 포함하고, 즉 pH가 pH 설정점을 새로운 값으로 변화시킴으로써 "능동적으로" 변경되고/되거나, 대사 생성물의 축적에 의해 배지의 pH가 변화되게 하여, 미리 정해진 pH 범위 내의 세포 배양물 특이적 대사 pH 프로파일을 따름으로써 "수동적으로" 변경된다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 당업자에게 공지된 각각의 pH 변화 및 조절제(들), 예컨대 산, 예를 들어 HCl, 또는 염기, 예를 들어 NaOH를 첨가하는 것에 의해 능동 변환이 유도된다. 이러한 방법의 추가로 바람직한 실시양태에서, 이는 1개의 pH 설정점 및 pH가 변화되도록 허용되는 불감대(deadband)를 규정함으로써 달성된다. 능동 변환과 대조적으로, pH의 수동 변환 또는 변화는 각각의 pH 변화제(들)를 첨가함으로써 유도되지 않는다.

[0034] 추가적인 측면에서, 본 발명에 따른 방법은 무단백질 및 무혈청인 배지를 사용하여 수행된다. 바람직하게는, 배지는 약 40 mM 내지 약 100 mM, 별법적으로는 약 50 내지 약 100 mM의 총 아미노산 함량을 특징으로 한다.

[0035] 상기 정의된 바와 같은 바람직한 방법은 배양물에 첨가되는 2가지 이상의 영양소 용액의 공급을 포함하는 유가식 방식으로 행해진다. 이같은 방법에서, 예를 들어, 배양 배지에 첨가되는 공급 용액 중 하나는 디펩티드 시스틴 및 아미노산 티로신을 포함하는 공급물이다. 공급물이 10을 초과하는 염기성 pH의 수용액 내에 각각 약 6.5 g/ℓ 내지 약 8.0 g/ℓ 범위 및 약 9 g/ℓ 내지 약 11 g/ℓ 범위의 농도로 디펩티드 시스틴 및 아미노산 티로신을 포함하는 것이 추가로 바람직하다. 특히, 농도는 시스틴의 경우 약 7.25 g/ℓ, 티로신의 경우 약 10.06 g/ℓ일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 시스틴 및 티로신을 포함하는 공급 용액은 1일당 초기 배양 배지 중량의 약 0.2 내지 약 0.8 중량%의 범위로 또는 별법적으로 1일당 초기 세포 배양 배지 중량의 약 0.4 중량%로 배양 배지에 첨가된다.

[0036] 본 발명에 따른 방법은 글리코실화된 재조합 폴리펩티드의 생산에 바람직하게 사용된다. 특정 실시양태에 따르면, 폴리펩티드는 항체 또는 항체 단편이다.

도면의 간단한 설명

[0037] **[도면의 간단한 설명]**

본 발명은 하기의 실시예 및 도면을 참조로 더욱 잘 이해될 것이다. 그러나, 실시예는 본 발명의 범주를 한정하도록 의도되지 않는다.

도 1은 pH 7.00에서 6.80으로 변환되는 능동 pH 변환의 단계-변화 실행의 도해이다.

도 2A는 수동 pH 변환 실행에 의해 수득된 pH 프로파일을 나타낸다. 생산용 생물반응기에서의 7.00에서 6.80으로의 pH 변환은 설정점을 6.90으로 설정하고 0.10의 불감대를 규정함으로써 도달되었다. 6.80으로의 제1 pH 변환 후, 배양 말기까지 pH가 능동적으로 6.80에서 유지된다.

도 2B는 제2 pH 변환이 있는 pH 프로파일을 나타낸다. 이러한 예에서, (이전의) pH 상한에 도달되지 않는다.

도 2C는 제2 pH 변환이 있는 pH 프로파일을 나타내지만, 여기에서는 pH가 다시 pH 상한을 달성하고, 거기에서 유지된다.

도 3은 진탕 플라스크 배양에서 mAb1을 생산하는 CHO 세포 클론의 생존 세포 밀도에 대한 일정한 온도 대 온도 변환의 효과를 배양 시간의 함수로서 나타낸다 (실시예 1 참조).

도 4는 mAb1을 생산하는 CHO 세포 클론의 생존율에 대한 일정한 온도 대 온도 변환의 효과를 나타낸다 (실시예 1 참조).

도 5는 온도 변환 하에서 및 온도 변환 부재 하에서 mAb1을 생산하는 CHO 세포 클론의 진탕 플라스크 배양에 대한 배양 시간의 함수로서 생성물 역가를 나타낸다 (실시예 1 참조).

도 6은 mAb2를 생산하는 클론에서의 배양 시간에 걸친 락테이트 농도를 나타낸다 (실시예 2 참조).

도 7은 CHO 세포 클론의 300 ℓ 생물반응기에서의 생존 세포 밀도를 배양 시간의 함수로서 나타낸다. 배양 조건은 온도 단계 (제5일), 및 설정점 및 불감대로의 pH 조절로 인한 2회의 pH 변환을 포함하였다 (실시예 2를 또한 참조한다).

도 8은 CHO 세포 클론의 300 ℓ 생물반응기에서의 생성물 역가를 배양 시간의 함수로서 나타낸다. 이러한 방법은 온도 변환과 pH 변환을 조합하였다 (도 7 및 실시예 2를 또한 참조한다).

도 9는 생존 세포의 적분의 함수로서 유리 생물반응기에서 배양된 CHO 세포 배양물로의 유가식 방법에 의해 수득된 mAb3 농도를 3회의 독립적인 실험에 대해 나타낸다. 배양 조건은 3가지 실험 모두에 대한 동일한 온도 변환 및 1개의 실험 단독에서의 추가적인 pH 변환을 포함하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] **[발명의 상세한 설명]**

[0039] 본 발명에 따르면, 재조합 폴리펩티드 제조 방법은 CHO 세포를 배양하는 단계 및 재조합 폴리펩티드를 발현시키는 단계를 포함하고, 이때 공정 동안 온도 및 pH가 변화된다. 본 발명은 온도 및 pH 변환을 포함하여 배양 과정에 걸쳐 세포 배양 조건을 동적으로 적합화함으로써 CHO 세포 배양에서의 폴리펩티드의 대규모 생산 방법을 개선하는 것을 추구한다.

[0040] 폴리펩티드의 "대규모 생산"이라는 용어는 치료적으로 활성인 생물제약품의 제조에 사용되는 재조합 폴리펩티드의 산업적 생산에 전형적으로 요구되는 양에 관련된다. 500 ℓ 이상의 부피, 또는 1000 ℓ 이상, 또는 별법적으로 5000 ℓ 이상 또는 심지어 더 높은 부피의 세포 배양 배지를 사용하는 세포 배양물이 전형적으로 대규모 생산 용도를 나타낸다.

[0041] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "세포 배양 배지"는 장기간에 걸쳐 세포를 성장시키는데 사용될 수 있는 영양소들의 수용액을 지칭한다. 전형적으로, 세포 배양 배지는 하기의 성분들을 포함한다: 에너지 공급원 (일반적으로 탄수화물 화합물, 바람직하게는 글루코스일 것이다), 아미노산, 바람직하게는 기본적인 아미노산 세트 (모든 필수 아미노산이 포함됨), 비타민 및/또는 기타 유기 화합물 (낮은 농도로 필요함), 유리 지방산, 및 미량

원소, 무기 염, 완충 화합물 및 뉴클레오시드 및 염기를 포함하는 무기 화합물.

[0042] 제약 산업 분야에서의 세포 배양 배지의 용도, 예를 들어, 치료적으로 활성인 재조합 폴리펩티드의 생산을 위한 용도는 안전성 및 오염 쟁점으로 인해 일반적으로 어떠한 생물학적 기원 물질의 사용도 허용하지 않는다. 따라서, 본 발명에 따른 세포 배양 배지는 바람직하게는 무혈청 및/또는 무단백질 배지이다. 용어 "무혈청 및/또는 무단백질 배지"는 조직 가수분해물, 예를 들어 소 태아 혈청 등과 같은 동물 공급원으로부터의 첨가물을 함유하지 않는 완전히 화학적으로 규정되는 배지를 나타낸다. 추가로, 단백질, 특히 성장 인자 예컨대 인슐린, 트랜스페린 등이 또한 바람직하게는 본 발명에 따른 세포 배양물에 첨가되지 않는다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 세포 배양 배지에는 가수분해된 단백질 공급원 예컨대 대두, 밀 또는 쌀 펩톤 또는 효모 가수분해물 등이 또한 보충되지 않는다.

[0043] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "온도 변환"은 온도 설정점을 더 낮은 값으로 능동적으로 변경시키는 것에 의한 생물반응기/배양 용기 내의 배양물의 온도에서의 변화를 지칭한다. 온도가 1차로 제어되고, 규정된 온도에서 일정 기간 동안 안정화되고, 설정점을 변화시킨 후, 또 다른 규정된 온도에서 일정 기간 동안 안정화된다. 이러한 온도 단계는 배양물에서의 자발적인 소규모 온도 변동을 지칭하지 않는다.

[0044] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "pH 변환"은 pH 설정점을 더 낮은 값 또는 더 높은 값으로 능동적으로 변화시키는 것 또는 pH 상한과 하한 사이에서 pH 변환이 일어나도록 하는 것에 의한 생물반응기/배양 용기 내의 배양물의 pH의 변화를 지칭한다.

[0045] 배양 용기/생물반응기의 크기 및 배양물 부피에 따라, 배지에서 측정되는 바와 같은 각각의 파라미터의 변환은 수분 내지 수시간이 걸릴 수 있다.

[0046] pH는 하기에 더욱 상세하게 기술된 바와 같은 능동 및/또는 수동 접근법에 의해 2가지 상이한 방식으로 변환될 수 있다.

[0047] pH의 "능동 변환"이라는 용어는 새로운 값으로의 pH 설정점의 변화에 의해 정의된다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 능동 변환은 당업자에게 공지된 각각의 pH 변화 및 조절제(들)을 첨가함으로써 유도된다.

[0048] 용어 "수동 변환"은 pH의 수동 변환 동안 세포 자체가 대사 생성물의 축적에 의해 배지의 pH를 변화시키도록 허용되어, 미리 정해진 pH 범위 내의 세포 배양물 특이적 대사 pH 프로파일을 따른다는 것을 가리킨다. 이러한 방법의 한 실시양태에서, 이는 1개의 pH 설정점 및 pH가 변화되도록 허용되는 불감대를 규정함으로써 달성된다. 능동 변환과 대조적으로, pH의 수동 변환 또는 변화는 각각의 pH 변화제(들)를 첨가함으로써 유도되지 않는다.

[0049] pH를 특정 설정점에서 유지시키기 위해 또는 pH 변환 동안 pH를 변화시키기 위해 pH 조절제가 배양물에 첨가된다. 세포 배양 목적에 사용되는 전형적인 pH 조절제에는 액체 염기 또는 산 용액 예컨대 NaOH 또는 HCl이 포함된다. 이러한 pH 조절제들이 배양 용기/생물반응기 내의 배지에 첨가된다. 별법적으로, pH를 조정하기 위해 세포 배양 배지에 CO_2 기체가 공급될 수 있다.

[0050] 본 발명의 첫 번째 측면에 따르면, CHO 세포를 배양하는 단계 및 재조합 폴리펩티드를 발현시키는 단계를 포함하고, 이때 온도 및 pH가 공정 동안 변화되는 것인 재조합 폴리펩티드 제조 방법이 개시된다. 더욱 특히, 세포가 1차로 제1 온도에서 3일 이상, 별법적으로는 4일 이상, 또는 5일 이상 동안 성장 및 유지된 후에 더 높은 제1 온도에서 더 낮은 제2 온도로의 변환이 일어난다. 이러한 더 낮은 제2 온도는 제1 온도보다 약 1℃ 내지 약 8℃ 더 낮다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 온도 변환은 약 2℃ 내지 약 5℃일 수 있고, 일부 실행에서는 이는 약 4℃ 또는 약 3.5℃이다. 그 후, 이러한 제2 온도가 2일 이상 동안 유지된다. 온도 변환에 더하여, pH가 또한 제1 pH에서 제2 pH로 변화된다.

[0051] 온도 및 pH의 변환에 관한 정확한 파라미터는 생산되는 각각의 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 특정 유전자 구축물로 형질감염된 세포주의 요구를 기초로 미리 결정되고 적합화된다. 별법적으로, 이러한 요구를 생물반응기에서의 대규모 생산을 위한 배양 동안 결정되는 대사 파라미터에 의존적이게 할 수 있다.

[0052] 더 높은 온도에서 더 낮은 온도로의 온도 변환이 유용한데, 이는 제1 온도는 세포 성장에 최적인 한편 더 낮은 온도는 세포 사멸율을 감소시키기 때문이다. 따라서, 감소된 온도는 높은 생존 세포 밀도의 더 긴 유지를 허용할 것이다. 이러한 감소된 온도에서의 관심 폴리펩티드의 세포-특이적 생산성은 일반적으로 초기 온도에 비해 급격하게 감소되지 않고, 때때로 세포-특이적 생산성이 동일할 수 있거나 또는 때때로 심지어 우월할 수 있다. 높은 생존 세포 밀도가 더 길게 유지되는 것은 부적절한 품질의 생성물이 형성되는 것을 최소화하는 이점을 추가적으로 제공할 수 있다. 이러한 인자들의 조합은 높은 용적 생산성, 및 수확 시점에 적절한 품질의 관심 생

성물의 높은 역가를 달성하는 것을 가능하게 한다. 한 실시양태에서, 제1 온도는 약 33℃ 내지 약 38℃ 범위이다. 또 다른 예에서, 제1 온도는 약 36℃ 내지 약 38℃이다. 온도 변환 후에 도달되는 제2 온도는 약 30℃ 내지 약 37℃, 또는 약 32℃ 내지 약 34℃, 또는 별법적으로 약 30℃ 내지 약 32℃ 범위일 수 있다.

[0053] 온도 변환 시기가 생산성을 최대화하는데 중요하다. 온도 변환이 너무 일찍 수행되면, 높은 세포 밀도가 도달되지 않거나 또는 도달되는데 오래 걸릴 것이다. 온도 변환이 너무 늦게 수행되면, 생존 세포 밀도에서의 감소를 효과적으로 방지하지 못할 수 있다. 바람직하게는, 온도 변환 시기는 재조합 폴리펩티드의 대규모 생산에 사용된 생물반응기의 접종 후의 일수로 정의된다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 이러한 시기는 대규모 생산용 생물반응기에서 도달되는 세포 밀도를 통해 정의될 수 있다. 예를 들어, 세포의 선형 또는 대수 성장기 동안 또는 최대 세포 밀도의 40 내지 90%에 도달했을 때 온도 변환이 개시된다. 세포 밀도 의존적 설정점은 상대적인 관점 (도달될 수 있는 최대 세포 밀도의 %) 또는 절대적인 관점 (생존 세포의 개수/㎖)으로 표현될 수 있다. 한 특정 예에서, 세포 밀도는 60 내지 90%이도록 선택된다.

[0054] 생물반응기/성장 용기의 접종과 온도 변환 사이의 시기는 사용된 특정 생물반응기/성장 용기 및 세포주에 따라 약 3일 내지 약 14일 범위일 수 있다. 별법적으로, 변환이 3일 내지 8일 사이에 일어난다. 상기 개요된 바와 같은 단일 기준에 대한 별법으로서, 시간 및/또는 세포 밀도에 관한 선택된 조건이 충족되어야 하도록 상기 언급된 변수들 중 2개를 조합함으로써 이중 기준이 또한 설정될 수 있다.

[0055] 최적의 성장 및 생산에 필요하다면, 1회를 초과하는 온도 단계, 예를 들어, 각각 약 1℃ 이상, 별법적으로는 약 2℃ 이상의 온도 변화로 이루어진 2회 이상의 단계가 또한 사용될 수 있고, 이때 각각의 온도가 1일 이상 동안 유지된다. 따라서, 온도가 심지어 추가로 감소될 수 있고, 더 복잡한 온도 프로파일을 따를 수 있다.

[0056] 본 발명에 따르면, 세포가 pH 변환 전에 2일 이상 동안, 별법적으로는 3일 이상 동안, 예를 들어 4일 이상 동안 또는 심지어 5일 이상 동안 제1 pH 값에서 성장된다. 배양을 시작한 후 처음 며칠에 대한 pH는 생물반응기에서의 세포 밀도의 급속한 확장에 알맞도록 선택된다. 이러한 시간 동안, 생물 반응기의 pH는 세포 성장에 최적인 특정한 설정점에서 제어된다. 일단 특정 세포 밀도에 도달하면, 배양물의 pH를 변형시키는 것이 유리하다. 이러한 제1 기간 후에 pH가 제1 pH보다 약 0.05-1 pH 단위 더 낮은 제2 pH 값으로 변환된다. 세포는 상기 제2 pH에서 2일 이상 동안 성장된다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 제2 pH 값은 제1 pH보다 약 0.15 내지 약 1 pH 단위 더 낮을 수 있다. 이러한 pH 변환은 일반적으로 생물반응기/배양 용기의 pH 설정점을 변화시킴으로써 달성된다. 제2 pH 값은 세포 사멸 (예를 들어 아폽토시스)을 감소시키도록, 그리고 적합한 품질의 폴리펩티드의 높은 세포-특이적 생산율을 유지하는 것을 허용하도록 선택된다. 결과적으로, 첫 번째 실시양태에서, pH 변환 시기는 재조합 폴리펩티드의 대규모 생산에 사용된 생물반응기의 접종 후의 일수로 정의된다. 두 번째 실시양태에서, 이러한 시기는 대규모 생물반응기에서 도달되는 세포 밀도를 통해 정의될 수 있다. 추가적인 별법에 따르면, 또한 이러한 시기를 세포 배양 배지에서 배양하는 동안 측정되는 특정 대사 파라미터에 의존적이게 할 수 있다. 한 비제한적인 예에서, 이는 락테이트 농도일 수 있다. 또한, 배양물의 대사 상태를 반영하는 직접적이지 않은 파라미터, 예를 들어, pH를 상위 pH 설정점에서 유지시키기 위한 시간 당 CO_2 또는 제어용 산의 필요 용량 또는 pH를 하위 pH 설정점에서 지속시키기 위한 NaOH 또는 제어용 부식제의 필요 용량을 사용할 수 있다. pH 변환에 대한 오직 1개의 기준을 사용하는 대신, 별법적으로, 예를 들어 접종 후 일수 및 세포 밀도와 같은 파라미터들을 조합함으로써 조합 기준을 설정할 수 있다.

[0057] pH 변환 전략의 이익은 용해된 이산화탄소 수준 및 염기 첨가가 배양 과정 동안에 감소될 수 있고, 이는 따라서 이들의 부정적 효과를 방지한다는 사실을 또한 수반한다. 배양을 시작할 때, 배양 용기 또는 생물반응기 내의 pH 값이 더 높은 것 (예를 들어 7.0)이 유리한데, 이는 더 낮은 pH 값 (예를 들어 6.8)은 pH를 유지하기 위해 더 높은 수준의 이산화탄소를 필요로 할 것이기 때문이다. 그러나, 이러한 높은 수준의 이산화탄소는 세포에 대한 부정적인 효과가 있을 수 있고, 성장율을 감소시킬 수 있다. 대조적으로, 더 나중의 배양 단계에서는, 높은 pH (예를 들어 7.0)를 유지하는 것이 낮은 pH (예를 들어 6.8)를 유지하는 것보다 더 많은 염기 첨가를 요구한다. 그 이유는 락트산이 형성되므로 생성된 산성을 염기 첨가에 의해 보상해야 하기 때문이다. pH 설정점이 높을수록, 요구되는 염기의 양이 더 높다. 염기 첨가는 배양물의 오스몰랄농도를 증가시키고, 이는 성장 및 높은 생존 세포 밀도의 유지에 불리할 수 있다.

[0058] pH 변환 전략의 잠재적인 이익은 락트산 형성을 최소화하는 관점에서 또한 기술될 수 있다. 일반적으로 CHO 세포는 더 높은 값 (예를 들어 7.0)에서보다 더 낮은 pH 값 (예를 들어 6.8)에서 더 적은 락트산을 생산한다. 생산되는 락트산이 더 적게 되면 첨가되는 염기가 더 적게 되고, 이는 상기 기술된 바와 같이 이롭다.

[0059] 한 실시양태에서, 제1 pH는 pH 6.8 내지 7.5의 범위이도록 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 제1 pH는 pH 6.8

내지 7.2의 범위이도록 선택된다. 추가적인 실시양태에서, 제1 pH는 최대 pH 7이도록, 또는 별법적으로 pH 7 미만이도록 선택된다. pH 변환 후에 도달되는 제2 pH 값은 pH 6.0 내지 pH 7.5, 또는 pH 6.5 내지 6.8의 범위이다.

[0060] 온도 및 pH 변환의 상대적인 시기는 가장 최적의 결과를 달성하기 위해 선택된다. 온도 및 pH 변환의 최적 시기는 방법-특이적인 것을 기초로 선택되고, 배양물의 성장 상태 또는 대사 상태에 의존적이게 된다. 원칙적으로 온도 변환은 pH 변환 시기와 독립적인 배양 시점에 실행될 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 온도 변환은 pH 변환 전에 또는 pH 변환과 동시에 일어날 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 온도 변환은 pH 변환 전에 일어난다. 예를 들어, 온도 변환은 pH 변환이 일어나기 1-5일 전에 개시될 수 있다. 본 발명의 또 다른 두 번째 실시양태에서, 온도 변환은 pH 변환과 동시에 개시된다. 본원에서 용어 "동시에"는 제1 값에서 제2 값으로의 각각의 파라미터 둘 모두의 진행 중인 변환을 지칭한다. 이같은 동시 변환은 온도 설정점 및 pH 설정점이 변화되었고 두 파라미터 모두가 이들의 제2의 안정적인 값에 아직 도달하지 않았을 때 일어날 수 있다. 별법적으로, 수동 pH 변화기 동안 온도 설정점이 변화되었을 때 이같은 시나리오가 일어날 수 있다. 이는 설정점 및 pH 상한 및 하한을 규정하는 불감대에 의해 pH를 조절하는 경우에 일어난다 (하기를 또한 참조한다). 본 발명의 추가적인 실시양태에서, 온도 변환은 pH 변환 후에 일어날 수 있다. 예를 들어, 온도 변환은 pH가 변환되고 나서 1일 내지 5일 후에 개시될 수 있다.

[0061] 본 발명의 추가적인 측면에서, 상기 제1 pH 값과 상기 제2 pH 값 사이에서 pH가 능동적으로 또는 수동적으로 변화된다. 배양물의 pH를 제어하고 pH 변환을 실행시키는 다수의 가능한 방식이 있다. 본 발명의 한 측면에서, 새로운 값으로 pH 제어기의 pH 설정점을 (불감대 없이) 변화시킴으로서 pH가 제1 pH 값에서 제2 pH 값으로 능동적으로 변환된다.

[0062] 그 결과, 제1 pH 값에서 제2 pH 값으로의 변화는 배양물에서 준-즉각적(quasi-immediate) (단계-변화)이다. 도 1은 pH 변환의 이같은 단계-변화 실행을 도해하고, 이때 이러한 특정 예에서 pH가 7.00에서 6.80으로 변환된다. 본 발명의 이러한 실행에서, pH가 먼저 상위 pH 값에서 이에 따른 pH 조절제 (예를 들어 CO_2 또는 NaOH)를 투여함으로써 유지된 후, 설정점을 (불감대 없이) 능동적으로 변화시킴으로서 하위 값으로 변화된다. 하위 설정점의 pH는 능동적으로 산성화제를 배양물에 투여/첨가하여 급속한 변화를 초래함으로써 또는 pH를 더욱 염기성인 제1 pH에서 지속시키는 작용제를 생략함으로써 도달될 수 있다. 생물반응기의 크기 및 pH에 영향을 미치는 상기 언급된 방법을 기초로, pH 변화는 수분 내지 24시간 이내에 완료될 수 있다.

[0063] 본 발명의 추가적인 측면에서, pH는 제1 pH 값에서 제2 pH 값 (pH 상한 및 pH 하한에 상응함)으로 수동적으로 변환 (표류(drift))하게 되고, 따라서 세포 배양물 특이적 대사 프로파일을 따르게 된다. 그 결과, 제1 pH 값에서 제2 pH 값으로의 변화는 점진적이다. 세포 배양 배지의 pH를 제어하고 pH 변환을 실행시키는 이러한 별법적인 방식은 설정점 및 불감대로 생물반응기의 pH 제어기를 프로그래밍함으로써 도달된다. 이는 pH 제어기가 작용하지 않는, 공정에 대한 허용되는 pH 범위를 규정한다. 예를 들어, 6.90의 설정점 pH + 0.10 pH 단위의 불감대는 pH 7.00을 pH 상한으로, pH 6.80을 pH 하한으로 규정할 것이다. 세포 배양 생산용 생물반응기에서, 배양을 시작할 때 (처음 며칠) pH는 전형적으로 상한일 것이고, 이때 제어기는 이산화탄소를 배양물 내로 투여함으로써 pH가 상승하는 것을 방지한다. 세포가 생산하는 락트산의 점진적인 축적으로 인해, 궁극적으로 pH는 계속해서, 예를 들어 7.00에서 6.80으로, 전형적으로는 수시간 이내에, 감소될 것이다. 일단 예를 들어 6.80의 pH 하한에 도달되면, 제어기는 염기 용액을 배양물 내로 투여함으로써 pH가 이러한 pH 너머로 감소되는 것을 방지한다. 생물반응기의 크기, 특정한 세포주, 세포 밀도 또는 배지 조건에 따라, 점진적인 pH 변화가 수시간 내에 일어날 수 있거나 또는 하루가 걸릴 수 있다.

[0064] 본 발명의 추가적인 측면에서, pH 변환 후 배양물의 제2 pH는 수확할 때까지 나머지 배양 시간 동안 제2 pH에서 능동적으로 유지된다. 이는 pH 설정점을 상기 제2 pH 값으로 변화시키고 이에 따라 pH 조절제를 투여함으로써 달성된다.

[0065] 본 발명의 추가적인 측면에서, 제1 pH 변환에 이어 제2 변환이 후속된다. 제2 pH 변환은 제1 변환으로부터 1일 이상 후에 일어나고, 도달되는 제3 pH 값은 제2 pH보다 0.05 pH 단위 이상 더 높다.

[0066] 본 발명의 추가적인 측면에서, 제2 pH 변환도 또한 상기 제3 pH 값에 도달하도록 능동적으로 또는 수동적으로 일어날 수 있다. 첫 번째 실시양태에서, 이는 제1 pH 변환에 대해 이미 개요된 바와 같이 pH 설정점을 능동적으로 변화시킴으로써 행해질 수 있다 (상기 참조). 제2 pH 변환의 시기는 제1 pH 변환 후의 일수로 정의될 수 있고/있거나 또다시 대사 파라미터, 예를 들어, 락테이트 농도에 의존적이게 될 수 있다. 이같은 변환은 전형적으로 제1 pH 변환으로부터 1일 내지 10일 후에 일어날 수 있다. 능동 변환은 배양물의 pH 설정점을 변화시킴

으로써 개시된다. 이에 따라 pH 조절제가 투여될 것이다.

[0067] 두 번째 실시양태에서, pH는 또한 수동적으로 변화되게 될 수 있고 그의 대사 pH 프로파일을 따르게 될 수 있다. 이는, 예를 들어, 상기에 이미 개요된 바와 같이 pH 하한 및 pH 상한을 규정함으로써 실행될 수 있다. 이러한 경우의 pH 상한은 제1 pH 변환에 대해 정의된 것과 동일한 pH 상한에 상응할 수 있거나, 또는 새로운 더 낮은 값 또는 더 높은 값으로 변경될 수 있다. 바람직하게는, 이같은 pH 하한 및 pH 상한은 설정점 및 불감대로 생물반응기의 pH 제어기를 프로그래밍함으로써 달성될 수 있다. 이같은 수동적인 pH 변화는 세포에 의한 배양물 내의 락트산의 재대사화(remetabolization)에 의해 일어날 수 있고, 이는 pH 범위의 상기 하한을 초과하는 값으로 pH가 다시 증가되게 한다. 일부 예에서 pH가 다시 범위의 상한에 도달하는 것이 가능하고, 기타 경우에 이는 또한 이러한 한계 미만에서 머무를 수 있다. 제2 pH 변환의 규모는 0.05 내지 1 pH 단위의 값을 포함할 수 있다. 이같은 수동 pH 변환의 기간은 정확하게 규정되지 않는데, 이는 변환/변화 속도가 대사 활성 및 세포에 의한 락트산의 재대사화에 의존적이기 때문이다. pH 상한에 도달하는데 전형적으로 0.5일 내지 2일이 걸릴 수 있지만, 수동 변화의 경우에는, pH가 배양 말기까지 규정된 상위 역치 미만에서 또한 유지될 수 있다.

[0068] 실행할 전략의 선택은 다중 요인, 예컨대 CO_2에 대한 세포의 감수성 및 생성물 형성에 대한 최적의 pH에 좌우될 것이다. 배양 과정에 걸쳐 2가지 이상의 특정한 설정점을 규정함으로써 또는 단순히 설정점 및 불감대 (임의적으로, 배양 동안 또한 변화될 수 있음)를 규정함으로써 상이한 pH 프로파일들을 수득할 수 있다. 설정점 및 불감대를 설정함으로써 수득될 수 있는 상이한 pH 프로파일들이 예시적인 값으로서의 pH 6.90의 설정점 + 0.10의 불감대에 대해 도 2에서 도해된다.

[0069] 본 발명의 추가적인 측면에서, 온도 변환 및 1회 이상의 pH 변환을 포함하는 방법에 의해 생산된 폴리펩티드의 총량이 온도 변환을 1회 이상의 pH 변환과 조합하지 않는 것보다 크다. 특정한 형질감염된 세포주의 요구에 대해 시기 및 단계 크기 면에서 적합화된 1회 이상의 pH 변환과 1회 이상의 온도 변환을 조합하는 것은 더욱 더 양호한 생성물 수율을 야기하였다.

[0070] 본 발명의 추가적인 측면에서, 온도 변환 및 1회 이상의 pH 변환을 포함하는 방법은 온도 변환을 1회 이상의 pH 변환과 조합하지 않으면서 수득된 품질과 비교하여 개선된 품질의 생성물에 이르는 잠재력이 있다. 생산기 동안 배양물에서 pH를 더 낮은 pH 값으로 변환시키는 것의 이로운 효과에 대한 한가지 가능한 이유는 하기와 같을 수 있다: 암모니아가 전형적으로 배양 시간에 따라 세포 배양 배지 내에 축적되고, 생성물 글리코실화에 잠재적으로 영향을 미치는 것으로 공지되어 있으며, 이때 생성물 품질이 감소되는 결과가 가능하다. 암모니아는 NH_3의 형태로 세포에 진입하는 것으로 가정되고, 세포에서 H_3O^+ 이온을 포착함으로써 세포내 pH에 영향을 미칠 수 있다. 초래된 세포내 pH 증가가 글리코실화에 영향을 미칠 수 있다. 배양물의 pH를 더 낮은 값으로 변환시키는 것은 NH_3의 NH_4^+로의 양성자화의 증가를 통해 세포외 NH_3의 농도를 감소시킬 것인데, 세포는 NH_4^+에 대해 불투과성이다.

[0071] 본 발명에 따른 온도 변환 및 1회 이상의 pH 변환을 포함하는 세포 배양 방법을 다양한 세포 배양 배지를 사용하여 수행할 수 있다. 사용될 수 있는 통상적으로 사용되는 세포 배양 배지는 예를 들어 D-MEM (둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium)), D-MEM/F-12, MEMα, 피셔(Fischer) 배지, RPMI 1640BME, BGJb이지만, 이러한 예들에 한정되지는 않는다. 이러한 배지들에 예를 들어 영양소, 비타민 또는 탄수화물과 같은 추가적인 성분들이 추가로 보충될 수 있다.

[0072] 세포 성장을 위해 일차적으로 최적화된 적절한 배지는 바람직하게는 하기 범위에 따른 초기 아미노산 농도를 함유한다.

아미노산	농도 (mmol/L)
아르기닌, 유리 염기	4.0 – 6.0,바람직하게는 4.5 – 5.5
아스파라긴 1수화물	3.0 – 6.0,바람직하게는 4.0 – 5.5
아스파르트산	2.5 – 4.0,바람직하게는 3.0 – 3.6
글리신	0.3 – 0.8,바람직하게는 0.5 – 0.7
히스티딘, HCl H_2O	0.6 – 1.0,바람직하게는 0.7 – 0.9
이소류신	2.0 – 5.0,바람직하게는 3.0 – 4.0
류신	3.0 – 7.0,바람직하게는 3.5 – 6.0
리신 HCl	2.0 – 4.0,바람직하게는 2.5 – 3.5
메티오닌	1.0 – 1.5,바람직하게는 1.2 – 1.4
페닐알라닌	1.0 – 2.0,바람직하게는 1.3 – 1.8
프롤린	2.5 – 6.0,바람직하게는 3.0 – 5.5
세린	3.0 – 8.0,바람직하게는 4.0 – 7.0
트레오닌	2.0 – 3.5,바람직하게는 2.5 – 3.1
트립토판	0.4 – 1.0,바람직하게는 0.5 – 0.8
발린	2.5 – 5.0,바람직하게는 3.0 – 4.5
티로신	1.0 – 2.0,바람직하게는 1.2 – 1.8
시스틴	0.5 – 1.0,바람직하게는 0.6 – 0.8
글루타민	5.5 – 9.5,바람직하게는 6.2 – 8.2

[0073]

[0074] 상기 표에 정의된 바와 같은 아미노산을 함유하는 배지가 본 발명에 따른 개선된 세포 배양 방법에서 유리하게 사용될 수 있다.

[0075] 본 발명의 추가적인 측면은 재조합 폴리펩티드의 대규모 생산용으로 디자인된 생산 배지의 사용을 포함한다. 이러한 생산 배지는 임의적으로 성분들, 예를 들어 아미노산을 증가된 양으로 함유할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 약 40 mM 내지 약 100 mM, 별법적으로는 약 50 내지 약 100 mmol/ℓ의 범위의 초기 아미노산 함량이 이러한 배지에서 사용된다. 본 발명의 별법적인 실시양태에서, 이같은 생산 배지는 하기 범위에 따른 초기 아미노산 농도를 함유한다.

아미노산	농도 (mmol/L)
아르기닌, 유리 염기	4.0 – 6.0,바람직하게는 4.5 – 5.5
아스파라긴 1수화물	9.0 – 11.0,바람직하게는 9.5 – 10.5
아스파르트산	2.5 – 4.0,바람직하게는 3.0 – 3.6
글리신	0.3 – 0.8,바람직하게는 0.5 – 0.7
히스티딘 , HCl H_2O	1.0 – 1.5,바람직하게는 1.1 – 1.3
이소류신	5.5 – 7.0,바람직하게는 6.0 – 6.8
류신	8.0 – 10.0,바람직하게는 9 – 9.2
리신 HCl	3.0 – 6.0,바람직하게는 4.0 – 5.0
메티오닌	1.5 – 2.5,바람직하게는 1.5 – 2.0
페닐알라닌	2.0 – 3.5,바람직하게는 2.5 – 3.0
프롤린	7.5 – 9.0,바람직하게는 8.0 – 8.5
세린	10.5 – 13.0,바람직하게는 11.0 – 11.9
트레오닌	3.5 – 5.5,바람직하게는 4.0 – 5.0
트립토판	0.9 – 2.0,바람직하게는 1.0 – 1.4
발린	5.5 – 7.5,바람직하게는 6.0 – 6.8
티로신	1.0 – 3.0,바람직하게는 2.0 – 2.5
시스틴	0.5 – 2.0,바람직하게는 1.0 – 1.3
글루타민	5.5 – 9.5,바람직하게는 6.2 – 8.2
글루탐산	0.5 – 2.5,바람직하게는 1.0 – 1.2

[0076]

[0077] 상기 표에 정의된 바와 같은 아미노산을 함유하는 생산 배지가 본 발명에 따른 개선된 세포 배양 방법에서 유리하게 사용될 수 있다.

[0078] 세포 배양은 부착 배양으로, 예를 들어, 단층 배양으로, 또는 바람직하게는 현탁 배양으로 수행될 수 있다.

[0079] 대규모 세포 배양은, 예를 들어, 산업적 생물공학에서 확립된 다양한 발효 방법에 의해 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 세포 배양 배지를 사용하여 연속 및 불연속 세포 배양 방법을 이용할 수 있다. 기타 공지된 반응기 기술, 예를 들어, 관류 기술 등을 또한 이용할 수 있다. 회분식 방법이 한 바람직한 실시양태이다.

[0080] 회분식 세포 배양은 유가식 배양 또는 단순 회분식 배양을 포함한다. 유가식 세포 배양은 포유동물 세포 및 세포 배양 배지가 초기에 배양 용기에 공급되고, 배양 종결 전에 주기적으로 세포 및/또는 생성물을 수확하면서 또는 수확하지 않으면서 배양 공정 동안 추가적인 배양 영양소가 연속적으로 또는 불연속적인 증분으로 배양물에 공급되는 세포 배양을 지칭한다. 단순 회분식 배양은 배양 공정을 시작할 때 포유동물 세포 및 세포 배양 배지가 포함되는 세포 배양을 위한 모든 성분이 배양 용기에 공급되는 절차에 관련된다.

[0081] 본 발명의 추가적인 측면에서, 배양물의 공급이 유가식 방법으로 행해지고, 이때 공급물은 배양물에 첨가되는 2가지 영양소 용액으로 이루어진다. 두 영양소 용액 모두 특정 세포주 및 생성물에 대해 결정된 미리 정해진 일정을 기초로 또는 배양 용기 내의 예를 들어 글루코스 또는 아미노산의 소비를 측정함으로써 결정되는 대사성 요구에 따라 배양 용기에 첨가된다. 두 영양소 용액 모두 독립적으로 볼루스(bolus) 공급물로서 또는 연속적으로 첨가될 수 있다. 전형적으로, 영양소 공급 용액은 아미노산, 에너지 공급원으로서의 하나 이상의 탄수화물, 미량 원소, 비타민, 또는 특정 이온을 포함한다. 큰 부피 증가 및 생성물 희석을 방지하기 위해, 농축된 공급 용액을 사용하는 것이 특히 유리하다. 일부 실시양태에서, 2가지 이상의 상이한 공급 용액이 있는 것이 또한 유용할 수 있다. 이는 2가지 이상의 상이한 군의 영양소 및 성분을 세포에 독립적으로 투여하는 것을 허용하고, 따라서 특정 영양소의 최적의 공급에 관한 공급 조건의 더 양호한 조정을 허용한다.

[0082] 본 발명의 추가적인 실시양태에서, 세포 배양 배지에 첨가되는 2가지 공급 용액 중 하나는 10을 초과하는 염기성 pH의 수용액 내에 각각 약 6.5 g/ℓ 내지 약 8.0 g/ℓ 범위 및 약 9 g/ℓ 내지 약 11 g/ℓ 범위의 농도로 디펩티드 시스틴 및 아미노산 티로신을 포함하는 농축된 공급물이다. 특정 실시양태에서, 이러한 농축된 공급물은 10을 초과하는 pH에서 각각 10.06 g/ℓ L-티로신 및 7.25 g/ℓ 시스틴의 농도로 디펩티드 시스틴 및 아미노산 티로신을 포함한다.

[0083] 상기 기술된 바와 같은 시스틴 및 티로신을 포함하는 공급 배지는 각각의 아미노산의 소비 측정을 기초로 또는 고정된 일정에 따라 예를 들어 1일당 초기 세포 배양 배지 중량의 약 0.2 내지 약 0.8 중량% 또는 1일당 초기 세포 배양 배지 중량의 약 0.4 중량%로 첨가될 수 있다.

[0084] 일부 예에서, 나머지 공급 용액은 티로신 및 시스틴을 제외한 기본 배지 내에 또한 존재하는 모든 기타 아미노산을 함유한다. 일부 예에서, 이러한 추가적인 공급 용액은 특정한 선택된 성분, 예를 들어, 아미노산 또는 탄수화물로 이루어질 수 있다. 본 발명의 추가적인 실시양태에서, 바람직하게는 이러한 농축된 공급 배지는 하기의 농도 범위에 따른 선택된 아미노산을 함유한다.

[0085]

아미노산	공급 배지 농도 (mmol/L)
아르기닌, 유리 염기	12.0 – 17, 바람직하게는 13.5 – 16.0
히스티딘, HCl H2O	5.5 – 7.5, 바람직하게는 5.9 – 7.0
이소류신	21 – 28.0, 바람직하게는 22.0 – 27
류신	32 – 42, 바람직하게는 34.5 – 40.0
리신 HCl	17.0 – 22.0, 바람직하게는 17.5 – 21.5
메티오닌	5.5 – 8.0, 바람직하게는 6.0 – 7.5
페닐알라닌	8.5 – 12.0, 바람직하게는 9.0 – 10.5
프롤린	18.0 – 24, 바람직하게는 18.5 – 22.0
세린	39.0 – 49.0, 바람직하게는 39.5 – 46.5
트레오닌	14.5 – 19.0, 바람직하게는 15.0 – 18.5
트립토판	3.0 – 5.0, 바람직하게는 3.5 – 4.9
발린	23.0 – 29.0, 바람직하게는 23.8 – 27.5
글루타민	175.0 – 220.0, 바람직하게는 176.0 – 201

[0086] 바람직하게는, 글루코스와 같은 탄수화물이 또한 이러한 농축된 공급 배지에 첨가되고, 이때 바람직한 농도는 약 1200 내지 약 1400 mmol/ℓ, 또는 별법적으로는 약 1300 내지 약 1395 mmol/ℓ이다.

[0087] 바람직하게는 탄수화물, 예컨대 글루코스를 포함하는 방금 기술된 바와 같은 공급 배지는 각각의 아미노산의 소비 측정을 기초로 또는 고정된 일정에 따라 예를 들어 1일당 초기 세포 배양 배지 중량의 약 1 내지 약 4 중량%, 예를 들어 1일당 초기 세포 배양 배지 중량의 약 2 중량%로 첨가될 수 있다.

[0088] 본 발명에 따른 세포 배양물 및 세포 배양 배지로부터 생산될 수 있는 폴리펩티드는 제한되지 않는다. 폴리펩티드는 재조합 폴리펩티드일 수 있거나 재조합 폴리펩티드가 아닐 수 있다. 폴리펩티드는 숙주 세포에 대해 동종성일 수 있거나, 또는 바람직하게는 외래 기원일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 폴리펩티드는 펩티드 결합으로 연결된 2개를 초과하는 아미노산의 사슬로 구성된 분자; 2개 이상의 이같은 사슬을 함유하는 분자; 예를 들어 글리코실화에 의해, 추가적으로 변형된 하나 이상의 이같은 사슬을 포함하는 분자를 포함한다. 용어 폴리펩티드는 단백질을 포함하도록 의도된다. 관심 폴리펩티드는 임의의 기원일 수 있다. 바람직한 관심 폴리펩티드는 인간 기원이고, 더욱 바람직하게는 관심 단백질은 치료 단백질이다.

[0089] 본 발명에 따른 세포 배양물 및 세포 배양 배지에 의해 생산되는 폴리펩티드의 바람직한 부류는 재조합 항체이다.

[0090] 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 모노클로날 항체 (전장 모노클로날 항체 포함), 폴리클

로날 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 나노바디(nanobody), 변형된 항체, 항체의 서브유닛, 항체 유도체, 인공 항체, 항체와 단백질의 조합물, 및 원하는 생물학적 활성을 나타내도록 충분히 긴 항체 단편을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같은 모노클로날 항체는 인간 항체일 수 있다.

[0091] 그러나, 항체 이외의 폴리펩티드, 예를 들어 막횡단 단백질, 수용체, 호르몬, 성장 인자, 프로테아제, 응고 및 항-응고 단백질, 억제제 단백질, 인터류킨, 운반 인자, 융합 단백질 등과 같은 폴리펩티드가 본 발명에 따른 세포 배양물 및 세포 배양 배지를 사용하여 또한 생산될 수 있다.

[0092] 이같은 세포 배양 방법으로부터 수득된 생성물을 제약 제제의 제조용으로 사용할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 단백질(들)은 생물학적으로 활성인 작용제의 다른 성분들 예컨대 제약상 허용되는 계면활성제, 부형제, 담체, 희석제 및 비히클과 함께 투여될 수 있다.

[0093] 본 발명은 하기의 실시예에 의해 추가로 설명된다.

[0094] **실시예**

[0095] 하기 기술된 실시예에서, 하기 표 1에 상술된 바와 같은 조성의 화학적으로 규정되는 세포 배양 배지 1 및 2가 사용된다. 이러한 세포 배양 배지들의 개별적인 성분들은 표준 시판원으로부터 입수가능하다.

표 1

성분	배지 1 최종 농도 (mg/l)	배지 2 최종 농도 (mg/l)
$CaCl_2$, 무수물	131	133.2
KCl, 무수물	800	800
$MgCl_2$, 무수물	155	250.4
NaCl	850.6	500
인산수소이나트륨, 무수물	710	1065
탄산수소나트륨, 무수물	2500	2000
L-아르기닌, 유리 염기	871	871
L-아스파라긴, H_2O	616	1501
L-아스파르트산	461	461
L-시스틴	200.1	304.5
L-글루탐산 Na 염 수화물	-	182
L-글루탐산	-	-
L-히스티딘 , HCl-H_2O	168	268
L-이소류신	394	894
L-류신	499	1199
L-리신 , HCl	621	821
L-메티오닌	179	279
L-페닐알라닌	264	464
L-프롤린	368	968
L-세린	432	1232
L-트레오닌	333	533
L-트립토판	102	252
L-발린	375	775
L-티로신	277.7	422.5
글리신	38	38
L-글루타민	1169.2	1169.2
비오틴	0.4	0.4
D-Ca- 판토테네이트	4	4
폴산	5	5
미오-이노시톨	40	140
니코틴아미드	4	4
피리독신 , HCl	2	2

[0096]

리보플라빈	0.4	0.4
비타민 B12	2	2
티아민, HCl	4	4
푸트레신, 2HCl	10	110
염화콜린	40	240
아셀렌산나트륨 (Na_2SeO_3)	0.03	0.03
염화망가니즈 4수화물	0.3	0.3
몰리브데넘산암모늄 4수화물	0.3	0.3
염화아연, 무수물	3	3
염화제2구리 2수화물	0.3	0.3
염화코발트 6수화물	0.3	0.3
에탄올아민	10	100
모노티오글리세롤	2	-
HEPES, 산 형태	17870	4766
시트르산3나트륨 2수화물	911.7	1235.2
$FeCl_3x6H_2O$	54.1	54.1
플루로닉(Pluronic) F68	1000	1000
D-글루코스, 무수물	10000	10000
HCl	-	327.6
NaOH	799.2	339.9

[0097]

[0098] 하기 표 2는 L-티로신 및 시스틴을 함유하는 농축된 공급 배지의 조성을 나타낸다. 이러한 공급 배지는 각각의 아미노산의 소비 측정을 기초로 또는 고정된 일정에 따라 예를 들어 1일당 0.4 중량%로 첨가될 수 있다.

표 2

성분	공급 배지 (g/l)
NaOH 32%	18.7 mL
L-티로신	10.06
시스틴	7.25

[0099]

[0100] 하기 표 3은 예시적인 농축된 공급 배지의 조성을 나타낸다. 이러한 공급 배지는 아미노산의 소비 측정을 기초로 또는 고정된 일정에 따라 예를 들어 1일당 2 중량%로 첨가될 수 있다.

표 3

성분	공급 배지 (g/l)
L-아르기닌, 유리 염기	2.72
L-히스티딘, HCl-H_2O	1.44
L-이소류신	3.44
L-류신	5.20
L-리신, HCl	3.72
L-메티오닌	1.08
L-페닐알라닌	1.72
L-프롤린	2.44
L-세린	4.76
L-트레오닌	2.08
L-트립토판	0.88
L-발린	3.16
L-글루타민	29.23
D-글루코스-1수화물	275.00
25% HCL	8.25 ml
32 % NaOH	5.6 ml

[0101]

[0102] 실시예의 실험을 위해, dhfr (+) CHO-K1 세포주 ATCC CCL-61 (문헌 [Kao et al., Genetics, 1967, 55, 513-524]; [Kao et al., PNAS, 1968, 60, 1275-1281]; [Puck et al., J. Exp. Med., 1958, 108, 945-959])로부터

무혈청의 무단백질 배지 조건에 대한 적합화에 의해 유래된 모(parental) CHO 세포주를 사용하였다. 이러한 모 세포주의 3개의 분취량을 형질감염시켜 3가지 상이한 모노클로날 항체인 mAB1, mAB2, mAB3을 각각 발현하도록 하였다.

[0103] **실시예 1**

[0104] 실시예 1에서, 배지 1을 함유하는 2개의 진탕 플라스크 배양물에 mAb1을 생산하는 CHO 클론을 병행하여 접종하였다. 이러한 진탕 플라스크 배양물을 37℃에서 이산화탄소 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 제3일에, 1개의 진탕 플라스크를 33℃로 설정된 이산화탄소 인큐베이터로 옮겼다. 두 진탕 플라스크 모두에 유사하게 2가지 공급 용액을 공급하였다. 공급물은 고정된 일정에 따라 보충되었고, 이때 1일당 0.4%의 제1 공급 용액 (표 2) 및 2%의 제2 공급물 (표 3)의 첨가가 제5일에 시작하여 배양 말기까지 계속되었다.

[0105] 33℃로의 온도 변환은, 전체 실험 기간 동안 37℃에서 유지된 배양물과 비교하여, 시간에 따른 배양물의 생존 세포 밀도 및 생존율의 더 긴 유지 (도 3 및 4) 및 더 높은 생성물 역가의 달성 (도 5)을 가능하게 하였다. 이러한 실시예는 CHO 숙주 세포주를 기초로 하는 세포 배양 생산 공정 동안 33℃로의 온도 변환을 실행하는 것의 이익을 예시한다.

[0106] **실시예 2**

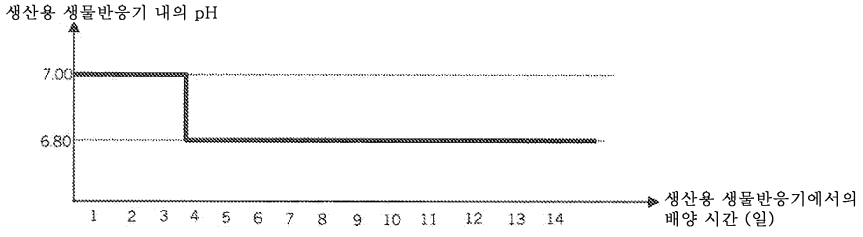
[0107] 이러한 실시예에서, 배지 2를 함유하는 300ℓ 생물반응기에 mAb2를 생산하는 CHO 클론을 접종하였다. 제5일에, 생물반응기의 온도를 36.5℃에서 33℃로 변환시켰다. pH 설정점은 6.90이었고, 불감대는 0.10이었다. 그 결과, 배양이 pH 7.00에서 시작하였고, 제2일과 제4일 사이에 pH가 6.80으로 표류된 후, 세포에 의한 락트산 소비로 인해 점진적으로 7.00으로 복귀하였다(도 6). pH 6.80으로의 변환은 일정한 pH 7.00의 시나리오와 비교하여 염기 첨가를 감소시키는 것을 가능하게 하였다. pH 7.00으로의 복귀는 pH가 제1 변환 후 그대로 6.80인 시나리오와 비교하여 배지 내의 CO_2 농도를 감소시키는 것을 가능하게 하였다. 온도 및 pH 변환이 조합된 이러한 방법에서, 높은 생존 세포 밀도가 도달되었고, 시간에 따른 생존 세포 밀도의 감소가 최소화되어 (도 7), 제14일에 적절한 품질의 생성물의 높은 역가에 도달할 수 있게 하였다 (도 8). 공급은 실시예 1에서와 유사하게 적용되었다.

[0108] **실시예 3**

[0109] 이 실시예에서, mAb3을 생산하는 CHO 세포 클론 및 배지 2 (표 1 참조)를 사용하여 유리 생물반응기에서 3개의 독립적인 유가식 배양 방법을 수행하였다. 실시예 1의 공급물 계획을 다시 적용하였다. 2개의 독립적인 배양은 추가적인 pH 변환 없이 온도 변환을 포함하였고, 즉 두 세포 배양물 모두의 pH가 전체 배양 기간에 걸쳐 pH 7.0의 값에서 유지되었다. 제3 배양 실험은 배양 제3일에 적용된 pH 7.0에서 pH 6.8로의 추가적인 pH 변환에 의해 처음 2개의 실험과 상이하였다. 3개의 실험 모두에서 수행된 온도 변환은 각각 4-6×10^6개의 생존 세포/mℓ의 세포 밀도에서 일어났다. 도 9에서, 상응하는 CHO 클론으로부터의 발현 생성물로서 수득된 mAb3 농도가 생존 세포의 적분 (IVC)의 함수로서 도시되고, 이는 세포 배양물 1 mℓ 내의 세포 농도/mℓ VCD로부터 계산된 모든 살아있는 세포의 적분이다. 기울기 y/x는 세포-특이적 생산성 qp [pg/VC/h]이고, 이는 1개의 살아있는 세포가 1시간에 생산할 수 있는 재조합 mAb3 생성물의 양을 가리킨다. 그 결과로서, 도 9는 추가적인 pH 전환에 적용된 경우의 세포 배양물에서의 세포-특이적 생산성의 증가를 도해한다. 추가적인 pH 변환으로 인해, 세포가 더 느리게 성장하였지만, 증가된 생산성을 나타냈다.

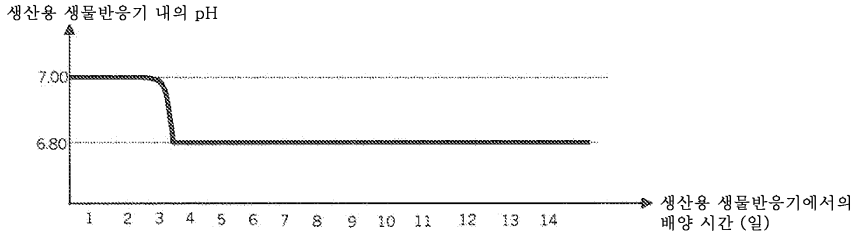
도면

도면1

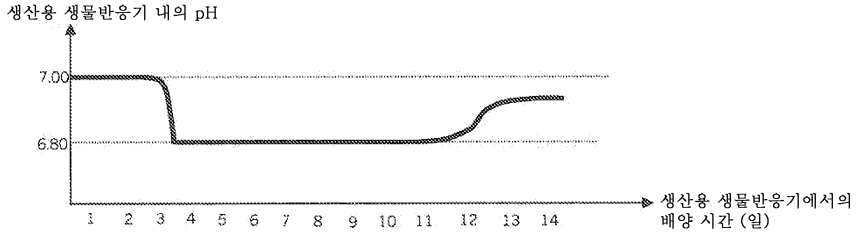


도면2

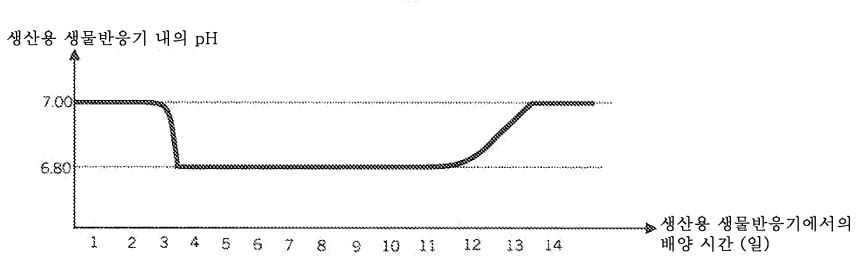
2A



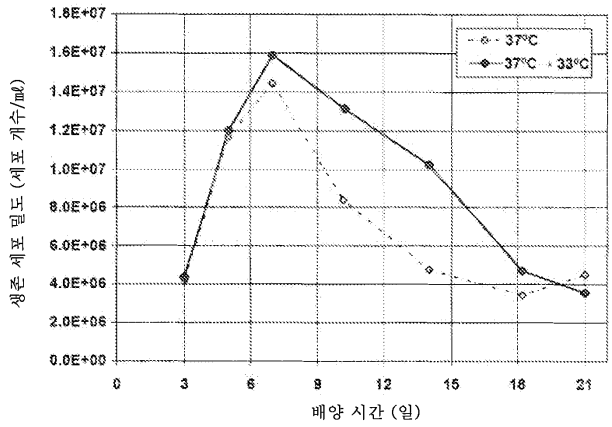
2B



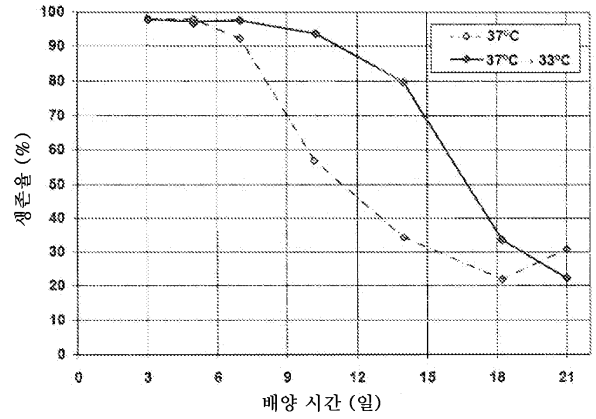
2C



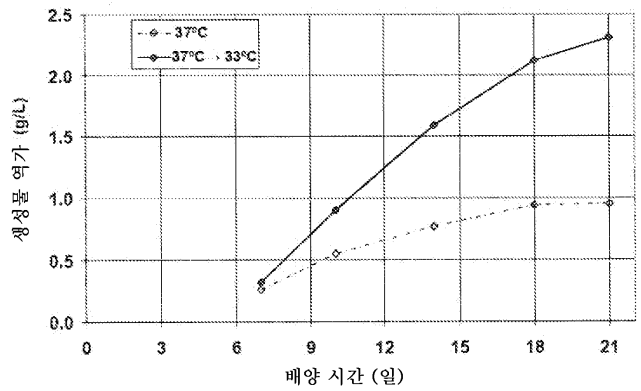
도면3



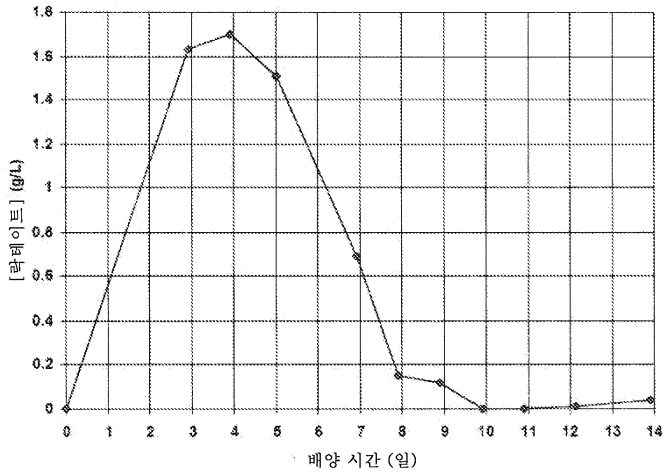
도면4



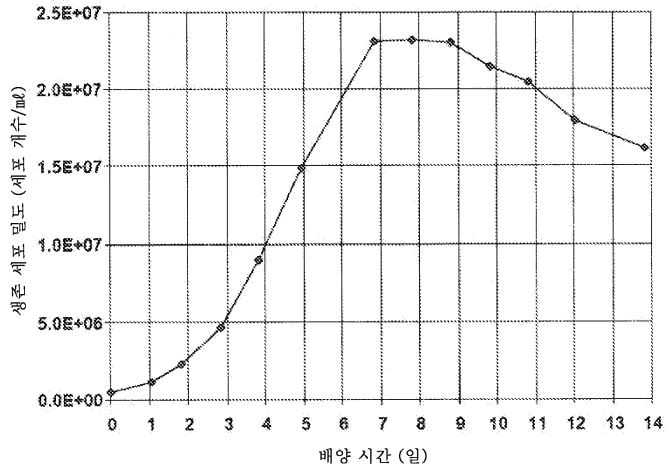
도면5



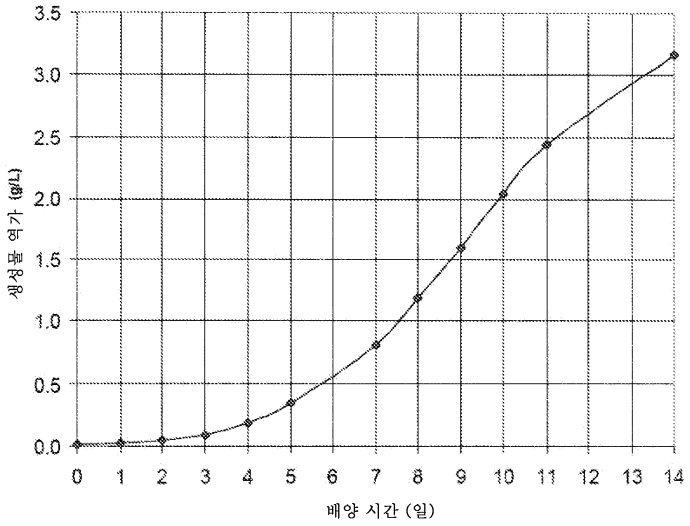
도면6



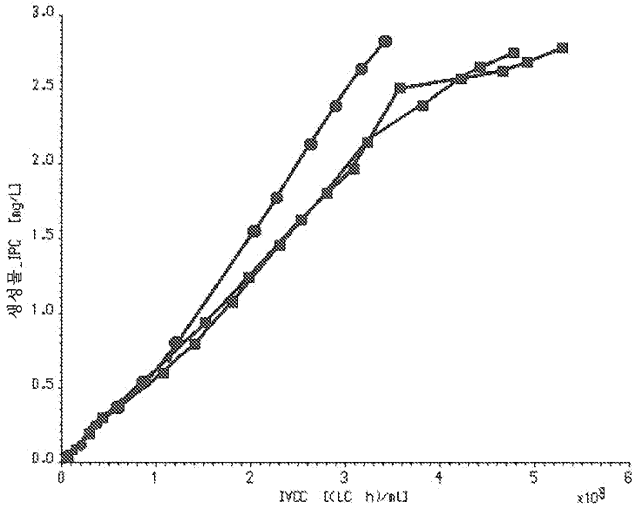
도면7


2.5E+07
2.0E+07
1.5E+07
1.0E+07
5.0E+06
0.0E+00
생존 세포 밀도 (세포 개수/㎖)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
배양 시간 (일)

도면8


3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
생성물 역가 (g/L)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
배양 시간 (일)

도면9



실험 1 (pH 변환 있음)
실험 2 (pH 변환 없음)
실험 3 (pH 변환 없음)