



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0093076  
(43) 공개일자 2018년08월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/00 (2006.01) B01J 2/16 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 5/0018 (2013.01)  
B01J 2/16 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2018-7021330  
(22) 출원일자(국제) 2016년12월30일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2017년07월24일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/069564  
(87) 국제공개번호 WO 2017/117559  
국제공개일자 2017년07월06일  
(30) 우선권주장  
62/272,828 2015년12월30일 미국(US)

(71) 출원인  
라이프 테크놀로지스 코퍼레이션  
미국 캘리포니아 92008 칼스베드 뉴턴 드라이브  
5823  
(72) 발명자  
펠프스 브뤼타  
미국 92008 캘리포니아주 칼스베드 뉴턴 드라이브  
5823  
골드 폴  
미국 92008 캘리포니아주 칼스베드 뉴턴 드라이브  
5823  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
양영준, 김윤기

전체 청구항 수 : 총 43 항

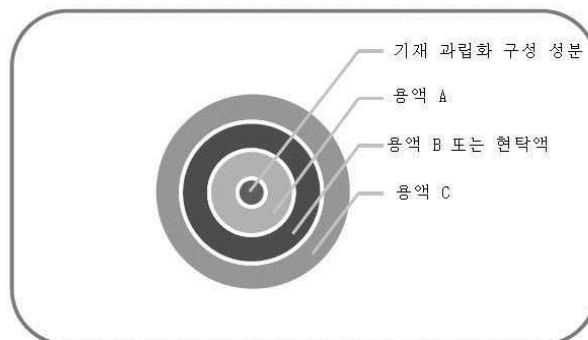
(54) 발명의 명칭 **층상 세포 배양 입자 및 이의 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은 건식 세포 배양 배지 또는 층상 입자를 포함하는 공급물에 관한 것이다. 덜 안정적이거나 민감성 성분은 층상으로 인해 배지, 공급물, 보충물 또는 농축물의 반응성 성분으로부터 공간적으로 분리된다. 본 발명은 이러한 층상 조성물을 제조하는 과정 그리고 열적, 광화학적 및/또는 감마 조사에 안정적인 세포 배양 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 배지 층상 입자를 사용하는 키트 및 배양 시스템에 관한 것이다.

대표도

그림 5b: 세포 배양 배지 층상 과립 - 제형 2



(72) 발명자

**파이크 리차드**

미국 14031 뉴욕주 클래런스 헌팅 밸리 노쓰 9310

**레이놀즈 메리**

미국 92008 캘리포니아주 칼스베드 뉴턴 드라이브  
5823

**하세트 리차드**

미국 92008 캘리포니아주 칼스베드 뉴턴 드라이브  
5823

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

세포 배양용 배지 또는 공급물(feed) 조성물의 제조 방법으로서,

- i) 유동층 장치에서 가스의 이동 칼럼에서 건조 분말을 현탁액에 가하는 단계;
- ii) 단계 (i)의 건조 분말에 분무기를 사용하여 하나 이상의 용매를 도입하여 층상 기재 입자를 형성하는 단계;
- iii) 층상 기재 입자를 건조시키는 단계로 구성되는 방법.

#### 청구항 2

세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법으로서,

- i) 유동층 장치에서 가스의 이동 칼럼에서 건조 분말을 현탁액에 가하는 단계;
- ii) 제1 분무기를 사용하여 제1 용매를 단계 (i)의 건조 분말 상에 도입하여 기재 과립을 형성하는 단계;
- iii) 단계 (ii)의 기재 과립 상에 제2 분무기를 사용하여 적어도 하나의 제2 용매를 도입하여 층상 기재 과립을 형성하는 단계; 및
- iv) 층상 기재 과립을 건조시키는 단계로 구성되는 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 건조 분말이 기초 배지 분말, 완전 배지 분말, 세포 배양 공급물, 세포 배양 보충물, 세포 배양 배지 또는 공급물 농축물 또는 아미노산 혼합물인 제조 방법.

#### 청구항 4

제1항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 제1 분무기가 상단 분무기, 하단 분무기 및 접선 분무기로 이루어진 군으로부터 선택되는 제조 방법.

#### 청구항 5

제2항 또는 제3항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 제1 분무기 또는 제2 분무기가 상단 분무기, 하단 분무기 및 접선 분무기로 이루어진 군으로부터 선택되는 제조 방법.

#### 청구항 6

제2항, 제3항 또는 제5항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 제2 분무기가 하단 분무기인 제조 방법.

#### 청구항 7

제2항 내지 제3항 또는 제5항 내지 제6항 중 어느 항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 제2 분무기가 복수의 용매를 상기 기재 과립에 분무하여 다층 기재 입자를 형성하는 제조 방법.

#### 청구항 8

제1항 또는 제3항 내지 제4항 중 어느 한 항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 제2 분무기가 다층 기재 입자를 형성하도록 상기 기재 입자 상에 복수의 용매를 분무하는 제조 방법.

#### 청구항 9

상기 청구항 중 어느 항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 제2 분무기가 각

분무 단계 사이의 간헐적인 건조 단계를 수반하여 상기 복수의 용매를 순차적으로 분무하는 제조 방법.

#### 청구항 10

상기 청구항 중 어느 항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 제2 분무기가 각 분무 단계 사이의 간헐적인 건조 단계가 부재된 상태에서 상기 복수의 용매를 순차적으로 분무하는 제조 방법.

#### 청구항 11

상기 청구항 중 어느 항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 복수의 용매 중의 각 용매가 각 용매 중에 하나의 성분을 갖는 제조 방법.

#### 청구항 12

제11항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 복수의 용매 중의 각 용매가 동일한 성분을 갖는 제조 방법.

#### 청구항 13

제11항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 복수의 용매 중의 각 용매가 다른 성분을 갖는 제조 방법.

#### 청구항 14

제1항 내지 제11항 및 제13항 중 어느 한 항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 각 용매가 성분의 혼합물을 갖는 제조 방법.

#### 청구항 15

제14항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 성분이 반응성 종 및 민감성 종으로 분리되는 제조 방법.

#### 청구항 16

제15항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 반응성 종 및 민감성 종을 별도로 분무하여 층상 과립을 얻는 제조 방법.

#### 청구항 17

상기 청구항 중 어느 항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 반응성 종이 하나 이상의 미량 원소, 하나 이상의 반응성 아미노산, 하나 이상의 반응성 아미노산, 하나 이상의 금속염, 하나 이상의 산 가용성 반응기, 하나 이상의 알코올 가용성 반응기 및 하나 이상의 pH 조절기로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 18

상기 청구항 중 어느 항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 민감성 종이 하나 이상의 폴리아민, 하나 이상의 비타민, 하나 이상의 성장 인자 및 하나 이상의 불안정한 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 19

상기 청구항 중 어느 항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 방법에서 사용되는 유입 가스가 약 20 °C 내지 30 °C 의 온도인 제조 방법.

#### 청구항 20

상기 청구항 중 어느 항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 방법에서 사용되는 유입 가스가 약 25 °C 의 온도인 제조 방법.

#### 청구항 21

상기 청구항 중 어느 항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 비타민이 비타민 B12, 비오틴, 콜린, 엽산, 니아신아미드, 피리독신, 리보플라빈, 티아민, 아스코르브산 및 파라-아미노벤조산 (PABA)으로 이루어진 군으로 부터 선택되는 제조 방법.

#### 청구항 22

상기 청구항 중 어느 항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 건조 단계의 온도가 약 50 °C 내지 60 °C인 제조 방법.

#### 청구항 23

상기 청구항 중 어느 항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 기재 입자 또는 염기성 과립이 약 0.5 % 내지 10 %의 수분 함량으로 건조되는 제조 방법.

#### 청구항 24

상기 청구항 중 어느 항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 용매가 반응성 종을 포함하는 제조 방법.

#### 청구항 25

상기 청구항 중 어느 항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법에 있어서, 상기 용매가 1종 이상의 항산화제를 추가로 포함하는 제조 방법.

#### 청구항 26

상기 청구항 중 어느 항에서 얻은 층상 기재 입자 또는 층상 기재 과립.

#### 청구항 27

상기 청구항 중 어느 항에 따라 영양 배지 층상 입자, 영양 배지 보충 층상 입자, 영양 배지 하위군 층상 입자를 생성하는 방법에 있어, 상기 기재 입자 또는 기재 과립 상의 적어도 하나의 층이 반응 종을 포함하고 그리고 /또는 기재 입자 또는 기재 과립 상의 적어도 하나의 층이 민감성 종을 포함하는 방법.

#### 청구항 28

상기 청구항 중 어느 항의 방법에 있어서, 상기 반응성 종이 하나 이상의 미량 원소, 하나 이상의 반응성 아미노산, 하나 이상의 반응성 아미노산, 하나 이상의 금속염, 하나 이상의 산 가용성 반응기, 하나 이상의 알코올 가용성 반응기 및 하나 이상의 pH 조절기로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 29

제27항의 방법에 있어서, 상기 민감성 종이 하나 이상의 폴리아민, 하나 이상의 비타민, 하나 이상의 성장 인자 및 하나 이상의 불안정한 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 30

상기 청구항 중 어느 항의 방법에 있어서, 건조 분말이 비타민, 펩크 무기염 및 당으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 31

상기 청구항 중 어느 한 항의 층상 배지 입자로부터 재구성된 액체에서 세포를 배양하는 방법에 있어서,

- i) 적절한 액체 또는 완충액에서 층상 배지 입자를 재구성함에 있어, 상기 층상 배지 입자가 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 농축물로 구성되며,
- ii) 세포를 배양하는 것이 세포의 성장에 유리한 조건하에서 재구성된 액체인 방법.

### 청구항 32

제31항의 세포 배양 방법에 있어서, 상기 배양이 증가된 양의 폴리펩타이드를 생산하는 데 사용되는 방법.

### 청구항 33

제31항 내지 제32항 중 어느 한 항의 세포 배양 방법에 있어서, 폴리펩티드가 재조합 폴리펩티드인 방법.

### 청구항 34

제31항 내지 제33항 중 어느 한 항의 세포 배양 방법에 있어서, 상기 배양이 증상 배지 입자로부터 제조되지 않은 액체 배지를 사용한 배양과 비교할 때, 생성물 생산을 증가시키고 세포 성장을 증가시키는 방법.

### 청구항 35

다음을 포함하는 키트:

- i) 상기 청구 범위 중 어느 한 항에 따른 증상 입자 또는 과립을 포함하는 제1 용기에 있어, 상기 증상 입자 또는 과립이 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 농축물로 구성되는 제1 용기; 및
- ii) 세포 배양을 위해 증상 입자 또는 과립을 사용하는 방법에 대한 지침.

### 청구항 36

상기 청구 범위 중 어느 한 항에 따른 증상 배지 입자로부터 재구성된 액체 배지와 세포를 포함하는 시스템.

### 청구항 37

제36항의 시스템에 있어서, 상기 재구성된 액체 배지가 재조합 폴리펩타이드, 바이러스, 분비된 단백질을 생산하는 세포를 배양하거나 현탁액 또는 부착된 세포 내에서 세포를 배양하는 데 사용되는 시스템.

### 청구항 38

상기 청구 범위 중 어느 한 항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물, 또는 제35항의 키트, 또는 제36항 내지 제37항의 시스템의 제조에 있어, 상기 아미노산이 20개 아미노산, 그 염, 또는 그 유도체들 중 하나 이상으로부터 선택되는 제조.

### 청구항 39

상기 청구 범위 중 어느 한 항의 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물, 또는 제35항의 키트, 또는 제36항 내지 제37항의 시스템의 제조에 있어, 상기 아미노산이 글리신, 알라닌, 아르기닌, 아스파르트 산, 글루탐산, 히스티딘, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 히드록시프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 발린, 티로신, 시스테인 및 리신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 제조.

### 청구항 40

세포 배양용 상기 청구항 중 어느 한 항의 방법으로부터 얻은 증상 입자 또는 과립의 사용.

### 청구항 41

제40항의 사용에 있어서, 상기 세포가 포유류 세포인 사용.

### 청구항 42

제40항 내지 제41항 중 어느 한 항의 사용에 있어서, 상기 세포가 CHO, BHK, HEK, 293 및 VERO 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 사용.

### 청구항 43

제40항 내지 제41항의 사용에 있어서, 상기 세포가 식물 세포, 동물 세포, 진핵 세포, 진핵 세포, 조류 세포, 진균 세포 및 세균 세포인 사용.

## 발명의 설명

### 기술 분야

- [0001] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에서 2015년 12월 30일 수요일자로 출원된 미국 가 출원 일련번호 제 62/272,828호의 유익을 주장한다. 전술 한 출원의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0002] 본 발명은 세포 배양 및 다른 용도에 유용한 증상 입자를 포함하는 건조 세포 배양 배지, 공급물, 보충제 또는 농축액에 관한 것이다. 본 발명은 그러한 증상 조성물을 제조하는 방법 및 예를 들어 열적, 광 화학적 및/또는 감마선 조사에 대해 안정한 세포 배양 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 단백질 및 폴리펩타이드를 생산하고 세포 증식 및 단백질 역가를 증가시키는 이러한 증상 입자 제제의 용도에 관한 것이다.

### 발명의 내용

- [0003] 본 발명은 부분적으로는 세포를 배양하기 위한 배지 또는 공급물 조성의 제조 방법에 관한 것으로, i) 유동층 장치에서 가스의 이동 칼럼에서 건조 분말을 현탁액에 가하는 단계; ii) 단계 (i)의 건조 분말에 분무기를 사용하여 하나 이상의 용매를 도입하여 증상 기재 입자를 형성하는 단계; 및 iii) 증상 기재 입자를 건조시키는 단계를 포함한다.
- [0004] 또한, 본 발명은 부분적으로는 세포를 배양하기 위한 배지 또는 공급물 조성물을 제조하는 방법에 관한 것으로, i) 유동층 장치에서 가스의 이동 칼럼에서 건조 분말을 현탁액에 가하는 단계; ii) 제 1 분무기를 사용하여 제 1 용매를 단계 (i)의 건조 분말 상에 도입하여 기재 과립을 형성하는 단계; iii) 단계 (ii)의 기재 과립 상에 제 2 분무기를 사용하여 적어도 하나의 제 2 용매를 도입하여 증상 기재 과립을 형성하는 단계; iv) 증상 염기성 과립을 건조시키는 단계를 포함한다.
- [0005] 본 발명의 상기 제 1 양태에 따르면, 건조 분말은 기초 배지 분말, 완전 배지 분말, 세포 배양 공급물, 세포 배양 보충물, 세포 배양 배지 또는 공급물 농축 물 또는 아미노산 혼합물 일 수 있다.
- [0006] 제 2 양태에서, 제 1 분무기는 상단 분무기, 하단 분무기 및 접선 분무기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 또는, 제1 또는 제2 분무기는 상단 분무기, 하단 분무기 및 접선 분무기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직한 실시 예에서, 제 2 분무기는 하단 분무기 일 수 있다.
- [0007] 제 3 양태에서, 제 2 분무기는 복수의 용매를 기재 과립에 분무하여 다층 기재 입자 또는 다층 기재 입자를 각각 형성할 수 있다. 대안적으로, 제 2 분무기는 각각의 분무 단계 사이에 간헐적인 건조 단계가 있도록 복수의 용매를 순차적으로 분무 할 수 있다. 또한 대안적으로, 제 2 분무기는 각 분무 단계 사이에 간헐적인 건조 단계 없이 순차적으로 복수의 용매를 분무 할 수 있다.
- [0008] 제 4 양태에서, 복수의 용매 중의 각각의 용매는 하나의 성분을 가질 수 있고; 또는 동일한 구성 요소. 또는 각각의 용매는 상이한 성분을 가질 수 있다. 예를 들어, 각각의 용매는 성분들의 혼합물을 가질 수 있다. 다른 측면에서, 용매는 반응성 종을 포함한다. 다른 측면에서, 용매는 민감성 종을 포함한다.
- [0009] 제 5 양태에서, 용매를 통해 분무 될 성분은 반응성 종 및 민감성 종으로 분리된다.
- [0010] 다른 측면에서, 반응성 종 및 민감성 종이 개별적으로 분무되어 증상 과립을 제공한다. 특정 양태에서, 반응성 종은 하나 이상의 미량 원소, 하나 이상의 반응성 아미노산, 하나 이상의 반응성 아미노산, 하나 이상의 금속염, 하나 이상의 산 가용성 반응성 기, 하나 이상의 알콜 가용성 반응기 및 하나 이상의 pH 조절기 군들을 포함한다.
- [0011] 또 다른 추가적인 양태에서, 민감성 종은 하나 이상의 폴리아민, 하나 이상의 비타민, 하나 이상의 성장 인자 및 하나 이상의 불안정한 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택 될 수 있다.
- [0012] 제 6 양태에서, 유입 기체는 약 20 °C 내지 30 °C의 온도에서 사용될 수있는 방법에 사용된다. 또 다른 측면에서, 상기 방법에서 사용되는 유입 가스는 약 25 °C 일 수 있다.
- [0013] 일곱 번째 측면에서, 민감성 일 수있는 비타민은 비타민 B12, 비오틴, 콜린, 엽산, 니아신 아마이드, 피리독신, 리보플라빈, 티아민, 아스코르브산 및 파라 - 아미노 안식향산 (PABA)으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0014] 제8 양태에서, 건조 단계는 약 50 °C 내지 60 °C 일 수 있다.

- [0015] 제 9 양태에서, 기재 입자 또는 기재 과립은 약 0.5 % 내지 10 %의 수분 함량으로 건조 될 수 있다.
- [0016] 또 다른 추가의 양태에서, 용매는 추가로 적어도 하나의 항산화제, 또는 적어도 하나의 중성 중, 또는 둘 다를 포함한다.
- [0017] 제 10 양태에서, 상기 층형 기재 입자 또는 층상 기재 과립은 상기 한 임의의 방법을 통해 얻어진다.
- [0018] 제 11 양태에서, 상기 방법은 영양 배지 배지 층, 영양 배지 보충 층 입자, 영양 배지 균 그룹 층 입자의 제조에 관한 것으로, 상기 방법은 상기 기재된 방법 중 어느 하나에 따른 층상 배지 입자를 제조하는 단계를 포함하며, 기재 입자 또는 기재 과립상의 적어도 하나의 층은 반응 중 및/또는 기재 입자 또는 기재 과립상의 적어도 하나의 층을 포함하고, 민감성 층을 포함한다. 다른 측면에서, 특정 양태에서, 반응성 층은 하나 이상의 미량 원소, 하나 이상의 반응성 아미노산, 하나 이상의 반응성 아미노산, 하나 이상의 금속염, 하나 이상의 산 가용성 반응성 기, 하나 이상의 알콜 가용성 반응기 및 하나 이상의 pH 조절기 군들을 포함한다. 또는, 민감성 층은 하나 이상의 폴리아민, 하나 이상의 비타민, 하나 이상의 성장 인자 및 하나 이상의 불안정한 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시예에서, 건조 분말은 비타민, 벌크 무기염 및 당으로 이루어진 군으로부터 선택 될 수 있다.
- [0019] 제 12 양태에서, 상기 방법은 상기한 바와 같이 제조된 층상 배지로부터 재구성된 액체 중에서 세포를 배양하는 것에 관한 것으로, 상기 방법은 i) 적절한 액체 또는 완충액 중에서 층상 배지 입자를 재구성하는 단계; 상기 층상 배지 입자는 세포 배양 배지, 공급물, 보충제 또는 농축 물질 일 수 있고; 및 ii) 세포의 배양은 세포의 성장에 유리한 조건하에서 재구성된 액체 일 수 있다. 또 다른 측면에서, 세포의 배양은 증가 된 양의 폴리 펩타이드를 생산하는데 사용될 수 있다. 또 다른 측면에서, 폴리펩티드는 재조합 폴리 펩타이드 일 수 있다. 대안으로, 배양은 층상배지 입자로 제조되지 않은 액체 매질을 갖는 배양물과 비교하여, 생성물 생산을 증가시키고, 세포 성장을 증가시킨다.
- [0020] 제 13 양태는 하기를 포함하는 키트를 제공한다 : i) 상기 청구 범위 중 어느 한 항에 따른 층을 이루는 입자 또는 과립을 포함하는 제 1 용기; 상기 층상 입자 또는 과립은 세포 배양 배지, 공급물, 보충제 또는 농축 물질 일 수 있고; 및 ii) 세포 배양을 위해 층상 입자 또는 과립을 사용하기위한 지침.
- [0021] 제 14 양태는 전술한 방법에 따른 층상 배지 입자로부터 재구성된 액체 매질 및 세포를 포함하는 시스템을 제공한다. 또 다른 측면에서, 재구성된 액체 배지는 재조합 폴리 펩타이드, 바이러스, 분비된 단백질을 생산하는 세포를 배양하거나, 현탁액 또는 부착될 수 있는 세포를 배양하는데 사용될 수 있다.
- [0022] 제 15 양태는 전술한 바와 같은 세포 배양용 배지 또는 공급물 조성물의 제조 방법, 또는 상기 기재 한 바와 같은 키트 또는 상기한 바와 같은 시스템을 제공하며, 여기서 아미노산이 사용되며 아미노산은 하나 또는 20개 이상의 아미노산, 그의 염 또는 이들의 유도체를 포함한다. 또 다른 측면에서, 아미노산은 글리신, 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴산, 글루탐산, 히스티딘, 이소 루이 신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 하이드 록시 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 발린, 티로신, 시스테인 및 라이신 중 하나 또는 그 이상 중에서 선택된다.
- [0023] 제 16 양태는 세포 배양에 사용되는 전술한 방법을 통해 수득 된 층상 입자 또는 과립을 제공한다. 또 다른 측면에서, 세포는 포유류 세포 일 수 있다. 특정 측면에서, 세포는 CHO, BHK, HEK, 293 및 VERO 세포로 이루어진 군으로부터 선택 될 수 있다. 또 다른 측면에서, 세포는 식물 세포, 동물 세포, 진핵 세포, 진핵 세포, 조류 세포, 진균 세포 및 박테리아 세포 일 수 있다.
- [0024] {b>참조 인용<b>
- [0025] 당해 명세서에서 언급된 모든 문헌, 특허, 및 특허 출원은 각각의 개별적인 문헌, 특허, 또는 특허 출원이 참고로 인용되는 것으로 특정하게 개별적으로 지시되는 바와 동일한 정도로 본원에 참고로 인용된다.

## 도면의 간단한 설명

- [0026] 본 발명의 신규한 특징은 첨부된 청구항에서 특정하게 기재된다. 본 발명의 특징 및 장점을 더 잘 이해하는 것은 본 발명의 원리가 이용되는 예시적인 실시형태를 설명하는 하기 상세한 설명 및 첨부된 도면을 참조로 수득 될 것이다:

그림 1: 배양 배지 층상 과립 제형을 만드는 과정의 개략도.

하단 분무 코팅은 6 “Wurster Insert, 2 Liter 제립기 / 건조기/ 도포기가 장착 된 GPCG 1.1을 사용하여 수행

되었다. 하단 분무 층화-층 구성은 각 조립에 따라 다르다.

그림 1a: 실례의 단층, 단일 성분 세포 배양 배지 및 과립의 개략도 - 층상 과립 프로토타입 A

그림 1b: 실례의 다층, 단일 성분 세포 배양 배지 및 과립의 개략도 - 층상 과립 프로토타입 B.

그림 2a: 세포 배양 배지의 층상 과립 프로토타입 A (단층, 단일 성분)의 SEM 이미지.

그림 2b: 세포 배양 배지의 층상 과립 프로토타입 B (다층, 단일 성분)의 SEM 이미지.

그림 3a: 프로토타입 A 층상 세포 공급물 생존률 분석.

그림 3b: 프로토타입 A 층상 세포 공급물 성장 분석.

그림 4: 세포 배양을 위한 층상 배지 / 공급물 과립의 제조를 위한 예시적인 절차.

그림 5a: 배합 1 세포 배양 배지 과립의 개략도.

그림 5b: 배합 2 세포 배양 배지 과립의 개략도.

그림 6a: 제형 1 비 코팅, 비층상 과립 (파란색 막대) 및 코팅 (층상) 과립 (빨간색 막대)의 입도 분석.

그림 6b: 제형 2 비 코팅, 비층상 과립 (파란색 막대) 및 코팅 (층상) 과립 (빨간색 막대)의 입도 분석.

그림 7a: 제형 1 누적 입자 크기 (체) 하단 분무 코팅 전후의 분석 : 층상 단계 전에 과립상 기재 분말의 체분율 분석. 비 코팅, 비층상 과립 (파란색 막대) 및 코팅 (층상) 과립 (빨간색 막대)의 입도 분석.

그림 7b: 제형 2 누적 입자 크기 (체) 하단 분무 코팅 전후의 분석 : 층상 단계 전에 과립상 기재 분말의 체분율 분석.

그림 8a: 제형 1 확대 배율로 제제 1 (F1)의 코팅 (층상) 과립의 SEM 이미지 좌측 패널 : 상면도 100x; 오른쪽 패널 : 횡단면 1500x.

그림 8b: 제형 2 확대 배율로 제제 2 (F2)의 코팅 (층상) 과립의 SEM 이미지 좌측 패널 : 상면도 100x; 오른쪽 패널 : 횡단면 1500x.

그림 9a: 제형 1, 2, 3: 입상 기재 분말 입자 크기 분석. 누적 체 분율 분석. 3 인치 체를 사용하여 3 내지 5 그램의 과립화된 물질로 기재 분말 과립 화의 체 분석을 수행 하였다.

그림 9b: 제형 1, 2, 3: 입상 기재 분말 입자 크기 분석. 3 인치 체를 사용하여 3 내지 5 그램의 과립화된 물질로 기재 분말 과립화의 체 분석을 수행하였다.

그림 10a: 제형 1, 2, 3: 입상 기재 분말 입자 크기 분석. 과립 화 후 분쇄 된 기재 분말에 대한 누적 체 분율 분석.

그림 10b: 제형 1, 2, 3: 분쇄된 입상 분말 입자 크기 분석 막대 그래프. 기재 분말 (과립 화 후 분쇄)의 체 분석은 8 인치 체를 사용하여 95-105 그램의 물질로 수행됨.

그림 11: 층상 과립의 방사선 유발 영양 염류 도면에서 알 수 있듯이 감마선 조사 식 건조 배지 (용량 범위 20kGy-70kGy)에 적용했을 때의 층상 전략은 비 조사 (0kGy) 제어 배지의 민감도 및/또는 반응성 성분의 안정성을 향상시켰다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027]

본 발명은 층상 염기성 입자 또는 층상 염기성 과립을 포함하는 건조 분말상 조성물의 제조 방법에 관한 것이다. 본 공개에서 언급된 건조 분말 배지는 건조 분말 배지 (기재 배지 또는 완전 배지), 건조 농축 세포 배양 배지, 건조 분말 공급 물 또는 보충 물, 건조 분말 농축 공급물 또는 보충 물, 건조 완충 분말을 지칭 할 수 있으며, 조합 또는 부분적으로, 또는 그 자체로 (완전한 배지 일 수있을 때) 배양하여 세포를 배양한다. 일반적으로, 배양은 체 외에서 세포를 배양하는 것을 말한다. 층상 배지 또는 공급물 입자 또는 과립을 제조하기위한 제조 방법을 하기에서 설명한다.

[0028]

세포 배양 배지, 공급물 또는 보충 제형은 제제 자체의 민감성 및 반응성 성분 사이의 유해한 상호 작용으로 인해 시간이 지남에 따라 불안정해지는 (즉, 분해, 산화 등) 또는 불안정한 화학 물질을 함유할 수 있다. 예를 들어, 포도당은 일부 아미노산 또는 폴리아민과 반응하여 용액에 용해될 때 침전되는 바람직하지 않은 Maillard

반응 생성물을 형성할 수 있으며, 이러한 반응은 다음 중 하나 이상에서 더욱 강화될 수 있다: 고 에너지 또는 이온화 방사선, 열 손상, 빛, 환경 화학 물질, 장기 보관, 기계적 진동 등. 따라서 세포 배양 배지는 저온에서 보관하거나 출하해야하므로 비용이 많이 들고 번거로울 수 있다. 이러한 어려움을 극복하기 위해, 그렇지 않으면 역으로 상호 작용할 수 있는 세포 배양 배지 성분을 보호하는 방법이 필요하며, 이는 세포 배양 성분의 분리 또는 그룹화를 통해 달성 될 수 있다. 예를 들어, 반응성 성분은 감수성 성분으로부터 공간적으로 분리 될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 민감성 성분 층 및 / 또는 반응성 성분을 자유 라디칼 또는 반응성 종의 소광제와 혼합하는 단계; 산화 방지제와 같은 성분 및 / 또는 중성 성분 (예를 들어, 하기 실시 예 3의 표 참조)과 같은 성분을 급냉시킨다. 따라서, 상기 문제점에 대한 바람직한 해결책은 세포 배양 시스템에서 보충 을위한 세포 배양 배지 또는 공급물 (기체 또는 완전)를 제공하여 배합물의 민감성 성분 및 / 또는 배합물의 반응성 성분이 계층화를 통해 서로 공간적으로 분리된다. 선택적으로, 항산화제와 같은 불활성 성분 및 / 또는 소광제를 민감성 성분 및 / 또는 반응성 성분 또는 항산화제와 같은 불활성 성분 및 / 또는 소광제는 반응성 층과 민감성 층 사이에 층상될 수 있다. 이러한 층상의 분말 화 된 세포 배양 배지의 적용은 예를 들어 열, 조사 또는 광화학 방사선에 대한 제품의 안정성을 연장시키고 및 / 또는 안정성을 증가시킬 수 있다.

[0029] 다중 성분 세포 배양 배지의 층상 과립을 제조하기 위해, 예를 들어 완전한 배지는 생존 가능한 세포 성장을 유지하고 견고한 단백질 역가를 유지하기 위해 정확한 양으로 각각 필요한 80 내지 100 개의 성분을 포함하기 때문에 공급 또는 보충이 어려울 수 있다.

[0030] 층상 과립을 제조하기 위해, 예를 들어 하단 분무기와 같은 분무기를 사용하여 비 과립화된 또는 과립화되거나 응집된 기체 분말 상에 용매를 분무 할 수 있다. 다양한 입자 크기가 층상 될 수 있다. 예시적인 과립 화 된 분말은 분무 / 습식 과립 화, 유동층 분무 건조를 포함하나 이에 국한되지 않는다. (문헌 [Srivastava et al., International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research 2010; 2 (4) : 236-246; 본 명세서에서 그 전체가 참고로 인용됨]). 따라서, 제 1 층이 과립상에 형성 될 수 있다. 용매는 하나 이상의 화학 물질 / 성분, 또는 하나 이상의 화학 물질 / 성분의 미세 현탁액을 함유 할 수 있다. 특정 실시예에서, 조절 된 두께의 상이한 화학적 층이 과립 상에 생성될 수 있다. 특정 실시예에서, 결합제는 과립을 형성하거나 과립 화하기 위해 용매 또는 임의의 단계에서 사용되지 않는다. 즉, 세포 배양 배지, 공급물 또는 농축 물의 제제는 과립 형성을 위한 결합제 또는 추가 성분의 첨가로 인해 변경 될 필요가 없다. 과립은 제제에 이미 존재하는 성분을 사용하여 층상될 수 있다. 대신, 제제의 성분은 하기 기재된 바와 같이 분리되거나 그룹화된다.

[0031] 화학 물질 / 성분의 분리 및 층상: 층상 과립 중의 화학물 / 성분은, 예를 들면 화학 반응 / 성질에 따라 분리되거나 그룹화 될 수 있고; 열 손상 또는 방사선 손상에 대한 감수성, 또는 광 화학적 손상 또는 용매 용해도 등에 따라 달라진다.

[0032] 예를 들어, 과립의 코어 (기체 과립으로도 지칭 됨)는 하나 이상의 민감성 성분 (때로는 내부 코어 / 층으로 불림)을 포함할 수 있다. 다른 경우, 염기성 과립은 민감성 및 항산화성 성분의 혼합물을 포함 할 수 있다. 또 다른 예에서, 기체 과립은 민감성 성분, 항산화제 및 / 또는 중성 성분의 혼합물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정 양태에서, 과립의 코어는 가장 민감성 성분 또는 가장 민감성 성분의 혼합물을 포함할 수 있고, 하나 이상의 중성 (비활성) 성분 및 / 또는 하나 이상의 항산화 성분을 포함할 수 있다. 다른 경우에, 민감성 성분 및 / 또는 중성 화학 물질 및 / 또는 항산화제 성분이 하나씩 차례로 층상 될 수 있도록 기체 과립 자체가 층상될 수 있다. 예를 들어, 가장 민감성 성분은 기체 과립의 중심 코어를 형성할 수 있고, 그 다음 층의 그 다음으로 민감성 성분을 형성하는 식으로 진행되며, 그 다음에는 중성 / 불활성 성분 및 / 또는 산화 방지제 층에 의해 기체 과립의 최 외각 층과 혼합 또는 진행된다. 또는 중성 성분이 핵심부에 있고, 그 다음 민감성 성분이 있게 될 수 있거나 그 반대일 수 있다. 과립의 민감 / 중성 / 항산화 제층은 세포 배양 배지, 공급물 또는 농축 물의 성분에 따라, 세포 배양 배지 또는 공급물 성분의 특성에 기초하여 숙련된 전문가에 의해 결정된 바와 같이 임의의 순서를 따를 수 있다.

[0033] 다음으로, 반응성 화학 물질은 민감성 성분 기체 과립 (내부 코어 또는 층) 위에 도포될 수 있다. 일부 예에서, 반응성 화학 물질은 함께 혼합되어 하나의 층으로서 기체 과립 위에 도포 될 수 있다. 이 분리는 동일한 과립 내의 민감성 화학 물질과 반응성 화학 물질 사이의 공간 분리를 제공할 수 있다. 다른 경우에, 반응성 화학 물질은 (민감성) 염기성 과립과 접촉하는 가장 반응성이 적은 화학 물질과 함께 하나 이상으로 하나의 층에 도포 될 수 있고, 가장 반응성인 화학 물질은 기체 과립으로부터 공간적으로 거리를 두고 떨어져 있다 (최 외층). 중립 / 불활성 화학 층은 과립의 외부 반응성 층 / 층들로부터 내부의 민감성 층을 분리 할 수 있다.

[0034] 바람직한 실시예에서, AGT 응집된 세포 배양 배지는 유동층 과립 화 방법을 사용하여 제조 될 수 있다. 소정의

기재 입자에, 예를 들어, Wurster 방법과 같은 하단 - 분무 층상 방법을 사용하여 부가적인 유동층 코팅 기술이 적용될 수 있다. AGT 세포 배양 제형에서, 하단 분무 방법은 최종 AGT 생성물에서 반응성 화학 성분을 분리 / 구분하기 위해 화학적 그룹을 특정 순서로 첨가하여 벌크 과립화 성분 주위에 제어된 층을 형성할 수 있게 한다 (즉, 활성 층상으로 지칭). 어떤 면에서, 코팅된 입자는 성분의 서방성을 위해 개질 될 수 있고, 다른 측면에서, 활성층 AGT는 감마 조사, 환경 열화, 습기로 인한 분해 등에 불안정한 제형 성분의 보호를 제공 할 수 있다. 반응성 화학 성분은 항산화제와 혼합되어 보호 효과를 나타낼 수 있다. 하나 이상의 활성층이 제형을 완성하기 위해 AGT 입자상에 분무 될 수 있다. 각 층은 추가적인 안정성을 위해 하나 이상의 항산화제를 포함할 수도 있고 포함하지 않을 수도 있다. 이 방법은 2 차 가공 조건 (예를 들어, 분무 건조, 미세 캡슐화)없이 말단 멸균된 완전한 AGT 배지 (즉, 단일 부분 건식 포맷)를 제공 할 잠재 성이 있다. 안정성 시험은 37C, RT, 4C, 0C 등의 층상 입자 배지를 보관할 경우 1 주, 3 주 또는 그 이상 후에 수행할 수 있다. 조사 및 / 또는 환경 저하, 온도 변화 또는 주에 대한 분석 시험 일상적인 분석을 사용하여 비타민, 에탄올 아민 등과 같은 민감성 성분을 보존하기 위해 분석함으로써 안정성이 수행되었다.

[0035] 예시적인 민감성 또는 덜 안정한 화학 물질 / 성분은 비타민, 폴리아민, 성장 인자, 호르몬 등을 포함 하나 이에 한정되지 않는다. 예시적인 반응성 화학 물질 / 성분은 미량 금속 또는 염, 일부 반응성 아미노산, 일부 당 (예를 들어 특정 아미노산, 폴리아민을 포함하는 다른 성분과 부가 물을 형성 할 수 있는 포도당), 금속 이온 등을 포함 하나 이에 한정되지 않는다. 예시적인 중성 화학 물질 / 성분은 중성 아미노산, 중성 당 등을 포함 하나 이에 한정되지 않는다.

[0036] 정의

[0037] 본문에 사용된 용어 "분말" 또는 "건조 분말"은 건식 형태로 존재하는 세포 배양 용의 배지 분말 또는 분말 배지 조성물을 말하며, 그의 전체 외관은 자유 유동 일 수 있다. 용어 "분말"은 응집 된 분말을 포함한다. 용어 "기재분말" 또는 "건조 기재재 분말" 또는 "건조 분말"은 상호 교환적으로 사용될 수 있으며, 본문에서 사용된 바와 같이 일반적으로 층상되기 전에 출발하는 건조 분말 조성물을 의미한다. "기재 분말" 또는 "건조기재 분말" 또는 "건조 분말"이라는 용어는 예를 들어 유동층 프로세서에서 임의의 수단에 의해 과립화되어 "기재 과립" 또는 "응집 된 과립"을 생성 할 수 있으며, 용매의 "층상"을 통해 추가 층상이 가능하다. 그러나 그것이 층 입자 (또는 과립)가 기재 과립에서 출발해야 한다는 것을 의미하지는 않는다. 층상 입자는 분무 기술을 사용하여 계층화 될 수 있는 간단한 입자화되지 않은 분말로 시작할 수 있다. 편의상, 층상 전에 과립 또는 응집된 시작 입자는 "기재 입자"로 언급 될 수 있다. 그에 상응하여, 건조 분말, 미립자 화 된 시작 입자는 층상 전에 "기재 입자"로 지칭 될 수도 있다. 출발 물질에 건조 분말 또는 응집 된 과립이 완전히 없어야 함을 의미하지는 않는다. 출발 물질은 때때로 용매로 겹치기 전에 건조 분말과 응집된 과립의 혼합물을 가질 수 있다. 건조 또는 응집 된 분말 (해당되는 경우)은 기초 배지 분말, 완전 배지 분말, 세포 배양 공급물, 세포 배양 보충 물, 세포 배양 배지 또는 공급물 농축 물 또는 아미노산 혼합물 일 수 있다.

[0038] 용어 "세포 배양 배지 조성물" 또는 "분말 배지 조성물" 또는 "배지 분말" 또는 "건조 분말 제형" 또는 "배지 배합물"은 상호 교환 가능하게 사용될 수 있으며, 예를 들어, 배지 보조제, 배지 보충제, 배지 보조제, 배지 또는 완충액으로 제한되지는 않으나, 기초 배지, 완전 배지, 배지 공급물, 배지 보충제, 배지 첨가제, 농축 배지, 농축 보조제 및 공급물, 아미노산 또는 아미노산 군, 짧은 펩타이드, 비타민, 완충액, 염, 미량 성분 등이 포함된다. 이들 용어는 일반적으로 세포 배양 중에 첨가되는 성분을 지칭하며, 당업자는 이 용어가 언제 또는 어떻게 사용되는지 명확히 이해할 것이다.

[0039] 배지 "성분" 또는 "성분"이라는 용어는 세포의 성장 및 증식을 유지 또는 촉진하기 위해 세포 배양에 사용될 수 있는 화학적 또는 생물학적 기원을 불문하고 모든 화합물을 의미한다. "구성 성분", "영양 성분", "성분", "중"이라는 용어는 서로 교환하여 사용할 수 있으며, 모두 이러한 화합물을 의미한다. 세포 배양 배지에서 사용되는 전형적인 성분은 아미노산, 염, 금속 이온, 미량 원소, 폴리아민, 당류, 탄수화물, 지질, 핵산, 호르몬, 비타민, 지방산, 완충 염, 단백질 등을 포함한다. 생체 외에서 세포 배양을 촉진 또는 유지시키는 다른 성분은 특정 필요에 따라 당업자에 의해 선택 될 수 있다.

[0040] 분무: 특정 실시예에서, 층상 용 "성분"은 기재 입자 또는 기재 과립에 분무 될 수 있다. 특정 실시예에서, 단일 "구성 성분"은 기재 입자 또는 기재 과립에 분무 될 수 있다. 다른 실시 예에서, 다수의 "구성 요소"가 분무된다. 다수의 "성분"이 분무 될 때, 예를 들어 그의 반응성, 용해도, 그의 성질 (예를 들어, 아미노산 대 설탕)에 따라 함께 그룹화 될 수 있고, 혼합물로서 함께 분무 될 수 있다. 대안 적으로, 성분들은 차례로 분무 될 수 있다.

- [0041] "용매"라는 용어는 물과 같은 모든 액체, 모든 소화전, 모든 완충액 또는 에탄올과 같은 유기 액체를 말하며, 증상되어야 하는 하나 이상의 "구성 요소"를 용해시킬 수 있다. 증상화는 용해된 "구성 요소" 또는 "구성 요소의 혼합물"이 있는 액체의 "분사"를 통해 발생할 수 있다. 용매는 하나 이상의 "유사" 성분을 용해시킬 수 있다. 예를 들어, 에탄올은 지질, 지방산, 콜레스테롤 등을 용해시킬 수 있으며, 용매는 "반응성 성분"과 "항산화제"와 같은 하나 이상의 "유사하지 않은" 성분을 함께 용해시킬 수 있다는데 이는 항산화제 또는 기타 분자 / 성분이 반응성 중 또는 그룹의 분해 단계를 안정화시키거나 감소시키는 것을 돕기 때문이다. 용매는 연속적으로 또는 한번에 분무 될 수 있다. 순차적으로 분무 될 때, 분무되는 각각의 용매는 동일한 조성을 가질 수 있거나, 상이한 조성을 가질 수 있다. 특정 예에서, 복수의 용매가 동일한 기재 입자 또는 과립에 분무되어 다층 기재 입자 또는 과립을 형성 할 수 있다. 특정 예에서, 다층 기재 입자 또는 과립은 활성 중 또는 반응성 중 (또는 성분)을 민감성 중으로부터 공간적으로 분리한다. 한 실시예에서, 용매 도입 속도는 약 1 gm / min 내지 약 30 gm / min 사이 일 수 있다. 다른 실시에서, 용매 도입 속도는 약 5 gm / 분일 수 있다.
- [0042] "분무기"라는 용어는 하나 이상의 성분을 담고있는 액체를 기재 입자 또는 기재 과립에 분무하는 장비를 의미한다. 분무기는 상단 분무기, 하단 분무기 및 접선 분무기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 과립 화 된 입자 (즉, 응집된 입자)를 제조하기 위해 하나의 분무기가 사용될 수 있는 반면에, 제 2 분무기, 일 실시 예에서 하단 분무기가 상기한 바와 같이 용매 및 성분을 증 화하는데 사용될 수 있다.
- [0043] "반응성 중"은 배지 또는 공급물에서 다른 성분과 쉽게 반응하여 부가물, 가교 생성물, 침전물 등과 같은 바람직하지 못한 생성물을 생성하는 성분을 지칭한다. 반응성 중은 고온, 방사선 조사, 다른 화학 물질 또는 반응성 중의 존재 등으로 인해 자기 반응하거나 반응하도록 활성화 될 수 있다. 예시적인 반응 중은 금속 이온, 생성하는 당 부가 물, 미량 금속 성분, 반응성 아미노산 등을 포함한다.
- [0044] "민감성 중"은 배지 또는 공급물로부터 더 많은 반응성 중이나 군을 갖고 있어 원하지 않는 반응으로 인해 쉽게 파괴되는 성분을 의미한다. 민감성 (또는 불안정한) 중은 고온에 노출되거나, 방사선에 노출되거나, 다른 화학 물질이나 반응성 중 등으로 인해 다른 구성 요소, 특히 반응성 중과 반응하도록 자체 반응하거나 활성화 될 수 있다. 예시적인 민감성 중은 비타민, 특정 아미노산, 에탄올 아민과 같은 폴리아민, 성장 인자와 같은 생물학적 성분 등이 시간이 지남에 따라 또는 보다 고온에서, 또는 조사에 노출시 파괴되는 것 또는 이러한 요소들의 복합을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.
- [0045] "세포 배양 배지", "배양 배지" 및 "배지 배합"(각각의 경우 "배지"의 복수형)은 세포의 배양 및 / 또는 성장을 지원하는 영양 용액을 말하며, 이들 문구는 상호 교환 적으로 사용될 수 있다.
- [0046] 용어 "조합"은 성분들의 혼합 또는 혼화를 나타낸다. 혼합은 액체 또는 분말 형태로 또는 하나 이상의 분말 및 하나 이상의 액체로 발생할 수 있다. 다른 예에서, 둘 이상의 분말 성분을 혼합 한 다음 응집 시켜서 배지, 배지 보충제, 배지 하위 군 또는 완충액과 같은 복합 혼합물을 생성시킬 수 있다.
- [0047] "입자 크기"라는 용어는 '체'측정을 통해 결정된 증상 입자의 크기 (분포 일 수 있음)를 의미한다. 일 실시예에서, 증상 입자 또는 기재 과립 크기는 약 0.05 mm 내지 7 mm 일 수 있다. 바람직한 실시예에서, 증상 입자 또는 기재 과립 크기는 약 0.05 mm 내지 약 0.5 mm, 약 0.05 mm 내지 약 1 mm, 약 0.05 mm 내지 약 2 mm, 약 0.05 mm 내지 약 3 mm, 약 0.05 mm 내지 약 4 mm, 약 0.05mm 내지 약 5mm, 약 0.05mm 내지 약 6mm, 약 0.05mm 내지 약 0.1mm, 약 0.05mm 내지 약 0.2mm, 약 0.05mm 내지 약 0.3mm, 약 0.05mm 내지 약 0.4mm, 약 0.1mm 내지 약 0.1mm 약 0.1mm 내지 약 2mm, 약 0.1mm 내지 약 3mm, 약 0.1mm 내지 약 4mm, 약 0.1mm 내지 약 5mm, 약 0.1mm 내지 약 6mm, 약 0.5mm 내지 약 1mm, 약 0.5mm 내지 약 1mm 약 0.5mm 내지 약 3mm, 약 0.5mm 내지 약 4mm, 약 0.5mm 내지 약 5mm, 약 0.5mm 내지 약 6mm, 약 0.5mm 내지 약 7mm, 약 1mm 내지 약 2mm, 약 1mm 내지 약 3mm, 약 1mm 내지 약 4mm, 약 1mm 내지 약 5mm, 약 1mm 내지 약 6mm, 약 1mm 내지 약 7mm 일 수 있다. 또 다른 구현 예에서, 증을 이루는 입자 또는 과립의 크기는 약 0.5 mm보다 크고, 약 0.4 mm보다 크고, 약 0.3 mm보다 크고, 약 0.2 mm보다 크고, 약 0.6 mm보다 크고, 약 0.7mm, 약 0.8mm보다 크고, 약 0.9mm보다 크고, 약 1mm보다 크다.
- [0048] 실시예
- [0049] 본 발명의 바람직한 실시예가 본 명세서에 도시되고 설명되었지만, 당업자에게는 그러한 실시예가 단지 예로서 제공된다는 것이 명백할 것이다. 본 발명을 벗어나지 않고 당 분야의 숙련자에게 다양한 변형, 변경 및 대체가 이루어질 것이다. 여기에 기술된 본 발명의 실시예에 대한 다양한 대안이 본 발명을 실시하는데 사용될 수 있음을 이해해야 한다. 하기 청구 범위는 본 발명의 범위를 정의하고, 청구 범위의 이 청구들의 범위 내에있는 방법

및 구조 및 그 등가물들이 기술된다.

- [0050] 실시예 1: 증상 세포 배양 배지 입자를 제조하기 위한 예시적인 공정 - 프로토 타입 A 및 B (하단 분무기 사용)
- [0051] 과립 배합물은 과립 화용 상단 분무기 및 코팅용 하단 분무기 (예를 들어, 와 스테르 (Wurster))의 조합을 사용함으로써 증화 방법에 의해 설계 및 제조되었다. 한 예에서, 하단 분무 코팅은 6 “Wurster Insert, 2 Liter 제립기 / 건조기/ 도포기가 장착 된 GPCG 1.1을 사용하여 수행되었다. 하단 분무 층의 경우, 층 조성은 각 과립화에 따라 다를 수 있다. 예를 들어 프로토 타입 A와 B의 경우 (그림 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b 참조). 프로토 타입 A & B 용 과립화된 기재 배지는 SKU PL003021, Lot 1024MER1601를 사용. 기재 배지는 상단 분무 과립 화에 의해 제조되었다.
- [0052] 프로토 타입 A는 다음과 같이 증상 되었다. 용액 # 1 (비타민 B-12), SKU PL003023, Lot 1101MER1601.
- [0053] 분무 # 1를 적용 (200X 농도의 배치 당 95ml 사용) 프로토 타입 B는 다음과 같이 증상 되었다 : 용액 # 2 (염 용액 NaCl) SKU PL003024, Lot 1101MER1602. 용액 # 3 (티아민 HCl 용액) SKU PL003029, Lot 1109MER1601. 분무 # 2 (500x 농도의 배치 당 ~ 38ml 사용) 적용 후 분무 # 3 (500x 농도의 배치 당 ~ 38ml 사용)를 적용. 분무 # 2의 최종 적용으로 마침 (500X 농도의 배치 당 ~ 38 ml 사용). 프로토 타입 A와 B의 SEM 이미지가 그림 2a와 2b에 나와 있다. 건조된 증상 제품의 SEM은 과립화된 기재 분말 (상단 분무)에 비해 매끄러운 표면을 갖는 프로토타입 A (하단 분무)를 보여준다. 과립화된 기재 분말(상단 분무)에 비해 보다 거칠게 코팅 된 표면의 프로토타입 B의 SEM. 이는 최 외층이 염층 (NaCl)이기 때문일 가능성이 있다.
- [0054] 실시예 2: 재구성 된 증상 공급물 배지의 분석에서 세포 생존력 및 성장의 비교
- [0055] 양성 대조군의 규칙적인 공급물 배지에 대한 재구성된 증상 공급물 배지의 검정에서 세포 생존력 및 성장의 비교 (시험 = 프로토타입 A 시험) (도 3a 및 3b 참조). 이 분석을 위해, DG44-IgG 세포주를 Efficient Feed B (supplement) # A2530 (양성 대조군)으로 CD-CHO (배지) # 12490에서 배양 하였다. 시험은 재구성 된 증상 공급물 배지 (프로토 타입 A); 음성 대조군 = 포도당이 공급된 배지.
- [0056] 모든 세포는 다음과 같이 하위통로 처리되었다 : 3 일 동안 3 개의 하위 통로; 각 하위통로에서 세포는  $3 \times 10^5$  생존 세포 / ml로 나뉘었다. 4 차 하위통로 처리, 3 일 후 매일 세포 수를 측정하였다. 모든 시험 및 대조군 공급물 배지를 액체로 재구성한 후 멸균 여과 하였다. 도 3a 및 3b에서 알 수있는 바와 같이, 프로토타입 A는 비증상 양성 대조 공급물 배지로 보충 된 세포 배양과 비교하여 높은 생존력을 나타냈다. 세포 성장을 위해, 프로토타입 A는  $\sim 6.6 \times 10^6$  세포 / ml (성장)의 생존 가능한 세포 수, 즉 양성 대조 공급물 ( $\sim 7.5 \times 10^6$ )가 보충 된 세포 배양액보다 약간 낮은 숫자를 나타냈다. 비교를 위해, 보충되지 않은 세포 배양 분석은 포도당 공급물 (음성 대조군)로 표시할 수 있다.
- [0057] 실시예 3: 세포 배양을 위한 증상 배지 / 공급물 과립의 제조를 위한 예시적인 절차.
- [0058] 과립 배합물은 과립 화용 상단 분무기 및 코팅용 하단 분무기 (Wurster)의 조합을 사용함으로써 증화 방법에 의해 설계 및 제조되었다. 그림 4, 5a 및 5b 참조.
- [0059] 기재 분말은 아미노산, d- 포도당, 소금 완충액 및 선택 비타민 (SKU 12681)을 함유한다.
- [0060] 예를 들어 분말은 블렌더 (4qt)를 사용하여 분쇄하고, 상단 분무 공정을 사용한 용매 (예를 들어, 물)(표 1 참조) 및 예를 들어 Niro MP-1, 연동 펌프, Quadro Comil U5; 예를 들어 피츠 밀 L1A 그러나 이에 국한되지 않는 장비를 사용하여 과립화 한다. 여기서, 기재 분말은 증상 전에 과립화되었지만, 기재 분말의 과립화는 필요한 단계가 아닐 수 있다. 과립화는 상단 분무, 하단 분무 또는 접선 분무를 사용할 수 있다. 증상은 일반적으로 하단 분무 층을 사용하여 이루어질 수 있으며 층 구성은 각 과립화에 따라 다를 수 있다. 상단 분무 과립화 파라미터에 대해서는하기 표 1 와 그림 4 내지 그림 11을 참조.

표 1

예시적인 상단 분무 과립 화 매개 변수

제형	배치 크기 (g)	초기 과립화 매개 변수	7 분 과립화 매개 변수	20 분 과립화 매개 변수	30 분 과립화 매개 변수
L	1312	베드 온도 44 °C 가스 흐름 : 20 CMH 아울렛 Td : 5° C 베드 LOD: 0.7wt	베드 온도 30° C 가스 흐름 : 75 CMH 아울렛 Td : 13.5° C 베드 LOD: 2.2wt	베드 온도 34.5° C 가스 흐름 : 60 CMH 아울렛 Td : 14.7° C 베드 LOD: 2.2wt	베드 온도 39° C 가스 흐름 : 60 CMH 아울렛 Td : 10° C 베드 LOD: 1.7wt
2	1437	베드 온도 44 °C 가스 흐름 : 20 CMH 아울렛 Td : 3° C 베드 LOD: 0.7wt	베드 온도 31° C 가스 흐름 : 75 CMH 아울렛 Td : 13.5° C 베드 LOD: 2.8wt	베드 온도 34° C 가스 흐름 : 60 CMH 아울렛 Td : 11° C 베드 LOD: 2.3wt	베드 온도 36° C 가스 흐름 : 60 CMH 아울렛 Td : 6° C 베드 LOD: 1.9wt

[0061]

[0062]

과립화 된 기재 분말을 입자 크기 및 SEM 분석에 적용하였다 (도 6a 및 도 6b; 도 7a 및 도 7b 및 도 8a 및 도 8b 참조). 과립을 제조하는데 사용될 수 있는 예시적인 공정 파라미터는 하기와 같다 : 표 2 참조 :

표 2

【표 2】 공정 매개변수	값	단위
유동 공기 유량	45	CFM
입구 온도 (공정)	50	C
입구 노점	5	C
액체 분무 속도	5 0.5	g/min
분무 공기 압력	1.1	막대
베드 온도	35 2	C
배기 노점	10	C
<b>Product Parameter</b>	<b>값</b>	<b>단위</b>
제품 온도 목표	40	C
최종 수분 %	2.5	%

[0063]

[0064]

표 2 (상기)에서, 하단 분무 코팅은 6 “ 변형된 보울, Schlick 970 노즐 및 1.2 mm 액체 팁 (범위 0.5 내지 4.0 mm)을 갖는 Niro MP-1로 수행되었다. 노즐은 기재 위의 4 cm에서 20 mm (범위)의 기둥 에어 잭으로 고정되었다. 제제 1에 대해서는 7 개의 코팅이 있고 제제 2에 대해서는 8 개의 코팅이 존재한다. 모든 코팅 작업은 균일 한 코팅을 보장하기 위해 최소 20 분이 소요되었다. 각 코팅 사이에 물 5 mL를 라인을 통해 씻어 내었다. 실험이 끝나면 분무기가 꺼지고 입구 온도가 40 ° C로 설정된 10 분 건조 단계가있었다.

[0065] 제제 1에 대해서는 7 개의 코팅이 있고 제제 2에 대해서는 8 개의 코팅이 존재한다. 제형 1 및 2에 대해 분무된 각각의 층의 개략도가 도 5a 및도 5b에 도시되어 있으며, 또한 하기 표 3에 기재되어있다.

[0066] 설명은 Thermo Fisher 카탈로그 (카탈로그 브랜드) CD OptiCHO AGT SKU # A11222-05에 대한 것이다.

### 표 3

제형 1 및 2 의 설명: 기재 과립 및 분무 된 코팅의 내용물.

	제형 1		제형 2	
	발명의 상세한 설명	총 무게 %	발명의 상세한 설명	총 무게 %
기재	• cys, cystine (cys2), met를 제거 • 지방족 아미노산 3 제거	>82%	• cys, met 제거 • 과립 화 후 NaCl 추가	>94%
분무 1	• 글루타티온, cys, met가 함유된 비타민 분무 • 19% cys, 34% met (고체 중량) • 11% 물 안의 고체 중량/부피	>0.7%	• 글루타티온, cys, met가 함유된 비타민 분무 • 26% cys, 39% met (고체 중량) • 11% 물 안의 고체 중량/부피	>0.7%
분무 2	• 중성 분무에 렉스트린 황산염, cys, met • 3.1% cys, 5.7% met (고체 중량) • 8.8% 물 안의 고체 중량/부피	>0.6%	• 알콜 용액 • 60% EtOH/물 안의 고체 중량/부피	>0.01%
분무 3	• cys 와 met이 포함된 알콜 분무 • 12% cys, 22% met (고체 중량) • 60% EtOH/ 물 안의 고체 w/v 0.16 %	>0.01%	• 중성 분무에 렉스트린 황산염, cys, met • 8.8% 물 안의 고체 중량/부피	>0.5%
분무 4	• 지방족 아미노산 • 4.9% 물 안의 고체 중량/부피	>3.5%	• cys 및 met가 포함된 aminesb • 20% cys, 36% met (고체 중량) • 11% 물 안의 고체 중량/부피	>0.7%
분무 5	• 철 킬레이트 분무 • 0.31% 물 안의 고체 중량/부피	>0.02%	• 철 킬레이트 분무 • 0.31% 물 안의 고체 중량/부피	>0.02%
분무 6	• 미량원소 분무 A • 0.15% 물 안의 고체 중량/부피	>0.01%	• 미량원소 분무 A • 0.15% 물 안의 고체 중량/부피	>0.01%
분무 7	• 미량원소 분무 B • 5e-3% 물 안의 고체 중량/부피	>0.0002%	• 미량원소 분무 B • 5e-3% 물 안의 고체 중량/부피	>0.0002%
분무 8	• cys 와 met이 있는 지방족 아미노산 • 3.7% cys, 6.7% met (고체 중량) • 5.5% 물 안의 고체 중량/부피	>3.9%		--
플렌드	• 카탈로그 플렌드	>9.5%	• 플루로닉 F68 전용	>3.9%

[0067]

[0068] 제형 1: 개념 설계 # 1 : 하단 분무 층 (코팅) 방법 (다층, 다중 성분)을 사용하여 민감성 그룹 보호를 달성하고 다음과 같은 층으로 구성된다:

[0069] 제 1 층의 항산화제 ( "코어")로 코팅 된 기재 과립화 성분 (예 : D- 포도당, 엽, 아미노산, 완충액 및 일부 비타민). 그 다음 항산화 성질을 가진 두 번째 영양층으로 코팅된다. 안티 옥시던트 영양소와 혼합 된 민감성 영양소 (즉, 감마 조사의 결과로 농도가 감소 함)를 함유하는 제 3 층이 뒤 따른다. 그 다음 제 4 층은 염층, 추가 분리 장벽 층, 외부 산화 방지제 층 ( "Shell")을 포함하는 나머지 3 개의 층과 민감성 성분을 분리하는 장벽으로 적용될 수 있다.

[0070] 제형 1은 총 코팅 두께가 약 10 $\mu$ m이고 D50 = 180 $\mu$ m 인 8 개의 코팅을 포함한다. 하단 분무 코팅 전후의 체 분석 (그림 6a 및 7a 참조). 코팅 된 과립은 공정 중 과립 마멸로 인해 초기 코팅되지 않은 과립보다 작은 평균 크기

를 갖는다. 체 분석은 예를 들어 Retsch 시브 셰이커를 사용하지만 어떤 셰이커든 사용이 가능하다. 상세 기술: 8 "체, 진폭 6, 펄스, 6 분 지속.

- [0071] 예시적인 층상 AGT 프로토 타입 또는 "양과 겹질" 층상 AGT는 하단 분무 방법을 사용하여 제조되었다. 층상형 AGT 프로토 타입은 반응성 그룹이 분리 / 층상 된 곳에서 제작되었다. 이 방법은 1-2kg까지 확장 가능한 공정이었다. 층 형성은 분석 방법에 의해 발견되고 확인되었다. 예시적인 프로토 타입 제품은 다음 세 가지 레이어로 구성될 수 있다. 벌크 과립 화 성분, 용액 A = 비타민, 용액 B (또는 현탁액) \* = 산화 방지 아미노산 층 (예 : 시스테인 및 메티오닌), 용액 C = 미량 원소 (또는 기타 산소 반응 성분). \* 주 - 시스테인은 한 과립화의 용액으로 제형화할 수 있다. 시스테인은 용액에서 시스틴 (이량 체화)을 형성 할 가능성이 있다. 시스틴의 형성을 피하기 위한 하나의 접근법은 제 2 과립 화에서 미세 현탁액으로서 시스테인을 제형 화하는 것일 수 있다.
- [0072] 제형 2: 개념 설계 # 2 : 하단 분무 층 (코팅) 방법 (다층, 다중 성분)을 사용하여 반응성 군의 분리를 달성하고 다음과 같은 층으로 구성된다:
- [0073] 기재 과립화 성분 (예 : d- 포도당, 소금, 아미노산, 완충액 및 일부 비타민). 용액 A는 민감성 영양소 (즉, 감마선 조사의 결과로 농도가 감소 함)를 함유한다. 용액 B는 항산화 특성을 갖는 영양소를 함유한다. 용액 C는 기재 과립 화 성분에 대해 반응성 일 수 있는 영양분을 함유한다.
- [0074] 제형 2은 층 코팅 두께가 약  $5\mu\text{m}$ 이고  $D50 = 180\mu\text{m}$  인 7 개의 코팅을 포함한다. "양과겹질" 층상(얇은 층들). 하단 분무 코팅 전후의 체 분석 (그림 6b 및 7b 참조).
- [0075] 예시적인 층상 된 배치인 제형 2는 다음과 같이 제조하였다 : 벌크 과립화 성분 - 과립화 단계를 위한 배치 화학 물질의 목록; 제 1 내부 층; (항산화제가 함유 된 비타민) = 예를 들어, 비타민 + 시스테인  $\text{HCl-H}_2\text{O}$  + 메티오닌 = 2 층; (산화 방지제가 첨가된 폴리아민) \* = 예 : 시스테인 및 메티오닌 + 에탄올 아민 = 3 층; 염 # 1 = (철 킬레이트 용액), 예를 들어, EDTA + 황산 제 1 철  $7\text{H}_2\text{O}$  = 4 층; 염 # 2 (미량 원소 용액 A (0116031)) = 5 번째 층; 염 # 3 (미량 원소 용액 B (0116026)) = 6 번째 층.
- [0076] 제형 3: 예시적인 층상 배치, 제형 3 (F3)을 여기에 기재된 바와 같이 제조 하였다 : 하단 분사 방식 ( "Core-Shell" 층상)을 사용하여 제작 된 "Core-Shell" 층상 AGT. 미세 현탁액 층상 방법 (즉, 1 내지 2 kg까지의 확장가능한 공정)의 실시 감소 제형 3 (F3)이 본 문서에 기재되어있다 : 벌크 과립화 성분, 제 1 내부 층, 코팅 # 2 (산화 방지제가 함유된 비타민) = 비타민 + 시스테인  $\text{-HCl}$  + 메티오닌 = 제 2 층; (산화 방지제 미세 현탁액) \* = (시스테인 및 메티오닌은 미세화 / Pluronic / 물 담체 용액 또는 PEG / 물 담체 용액에 현탁) = 3 층; 염 # 1 = (철 킬레이트 용액) = EDTA + 황산 제 1 철,  $7\text{H}_2\text{O}$  = 4 층; 염 # 2 (미량 원소 용액 A (0116031)) = 5 번째 층; 염 # 3 (미량 원소 용액 B (0116026)) = 6 번째 층. 또는 층 4, 5 및 6이 결합 될 수 있다.
- [0077] \* 주: 시스테인은 용액에서 시스틴 (이량 체화)을 형성 할 가능성이 있다. 시스틴 형성을 피하는 한 가지 방법은 시스테인을 미세 현탁액으로 제형 화하는 것일 수 있다. 이들 중합체는 수용성 및 수 불용성 화합물과 양립할 수 있기 때문에 마이크로 서스펜션 용 용매로서 플루로닉 또는 PEG를 사용할 수 있는지 시험한다.
- [0078] 하단 분무 솔루션의 제형화 공정: 하단 분무 방법을 사용하여 생산된 "양과 겹질"층 AGT. 제형 2 (F2) 또는 제형 3 (F3)을 제조하는 단계가 여기에 기술된다. 벌크 과립화 구성 요소 (내부 코어). \* 주 - 산화 방지제가 함유된 폴리아민은 용액으로 제형화할 수 있다 (아래 참조). 단계 1. 폴리아민 용액 (pH 범위 = 6.4-6.6)을 미리 치방하고 무균 여과 ( $0.2\mu\text{m}$ ) 하였다. 단계 2. 1 단계에서 준비한 폴리아민 용액에 산화 방지제를 넣고 용액이 녹을 때까지 용액을 흔들어 준다(자석 접시모양 교반기) (맑은 용액이 형성됨). 단계 3. 맑은 용액의 pH를 측정하고 기록한다 (pH 범위 2.0-3.0). 단계 4. 5N NaOH를 사용하여 용액의 pH를 6.5 - 7.5로 조절한다. 용액은 투명하게 남아 있어야 하며 바닥 분사식 층상 과립을 제조하는 데 사용할 수 있다.

표 4

제형 1 및 2의 물리적 성질

【표 4】 제형1 물리적 특성코팅두께	10 $\mu$ m
탭 밀도	0.89
부피 밀도	0.82
Carr 지표	7.9

[0079]

표 5

【표 5】 제형2 물리적 특성코팅두께	5 $\mu$ m
탭 밀도	0.84
부피 밀도	0.75
Carr 지표	10.7

[0080]

[0081]

비교를 위해, 기재 과립 화 된 입자 크기 (도 9a 및 b) 및 분쇄된 기재 입자 화 된 입자 크기 (도 10a 및 b)도 수행하였다.

[0082]

실시에 4: 감마 방사선 전후의 제형 1 및 2의 분석 시험

[0083]

전술한 방법에 의해 제조된 건조 층상 세포 배양 배지 (제형 1 및 2)를 감마 조사 안정성에 대해 추가로 시험하였다. 이 실험의 목표는 방사선 내성 배지가 공정 조건만을 변경하여 (여기서는 세포 배양 배지를 변화시키지 않고) 배지 / 배지 성분을 변경함으로써 결정될 수 있는지를 결정하는 것이었다. 층상 배지는 약 20 kGy 내지 약 70 kGy의 선량 범위에서 감마선 조사로 처리되었다. 생성된 층상 과립 화 된 배지의 감마 - 조사 내성을 감마선 전후의 민감성 화학적 마커 (예를 들어, 티아민, 비타민 B-12 등의 비타민)의 농도를 측정함으로써 분석하였다. 각 제형 (F1 & F2) 및 감마 방사선 조건에 대해, MilliQ 물을 사용하여 2 개의 1-L 배지 배치를 제조하였다. 각 샘플은 또한 트립토판, 니아신 아마이드, 엽산, 티아민 및 비타민 B12에 대해 (HPLC로) 시험 되었다. 용량 칼럼에 이 연구를 위해 제형이 노출된 감마 방사선의 평균 투여량이 열거되어 있다. 결과는 아래 표 6과 그림 11에 나와 있다. 또한, 생성된 과립의 물리적 특성을 조사하였다 (표 4 및 표 5). 하단 분무 층 화 기술을 사용하여 제조된 다 성분 세포 배양 배지는 내용물의 우수한 균일성을 제공한다는 것이 밝혀졌다. 또한, 기재 과립 분말 주위에 각 층을 조절 배치하는 것은 동일한 제형 내에서 반응성 및 민감성 화학 물질을 물리적으로 분리하는 방법을 제공한다는 것이 또한 주목되었다. 그룹화된 층은 열 반응성 또는 열화, 광화학 반응성 또는 열화, 방사선 유도 반응성 또는 열화를 야기하는 조건에 노출되는 동안 화학 안정성을 더욱 향상시켰다.

표 6

방사선 분석 표 (kGy 단위의 선량)

샘플	용량	잔여%				
		L-트립토판	니아신 아미드	엽산	티아민 HCL	B12
제형 1-0	0	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
제형 1-2	25	>100%	>97%	>95%	>94%	>78%
제형 1-1	35	>100%	>99%	>96%	>96%	>73%
제형 1-3	65	>99%	>101%	>96%	>95%	>64%
제형 2-0	0	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
제형 2-1	25	>102%	>97%	>94%	>95%	>73%
제형 2-2	35	>101%	>98%	>95%	>94%	>69%
제형 2-3	65	>99%	>98%	>94%	>91%	>56%
카탈로그-0	0	>100%	>100%	>100%	>100%	>100%
카탈로그-1	25	>100%	>100%	>99%	>96%	>72%
카탈로그-2	35	>101%	>99%	>100%	>96%	>67%
카탈로그-3	65	>100%	>99%	>99%	>93%	>51%

[0084]

[0085]

표 6의 요약 및 제형 1 및 2에 대한 다른 분석 : 티아민은 용량 의존적 방식으로 9 %까지 분해되었으며, 비타민 B12는 용량 의존적 방식으로 49 %까지 분해되었다. 티아민과 비타민 B12의 분해가 그림 11에 나와 있다. 60-70 kGy에서의 비타민 B12 분해는 각각 제형 1과 2에 대한 카탈로그 대조군에 비해 18 %와 26 % 감소했다 (충상 과립에서 감마 방사선 민감성 영양소의 보호). 감마선 방사선 치료 - 카탈로그 CD OptiCHO AGT 컨트롤, 제형 1 및 제형 2는 예를 들어 감마 방사선 치료를 위해 Steris로 운송되었다. 모든 샘플은 5 ° C에서 보관되었으며 드라이 아이스 온도 (-78 ° C)에서 선적되고 조사되었다. 각 제형을 4 개의 배치로 나누고 (a) 5 ° C 또는 (b) 20 ~ 30 kGy, (c) 30 ~ 40 kGy 또는 (d) 60- 70 kGy의 총 선량으로 조사하였다.

[0086]

트립토판 및 니아신 아미드 분석 수준은 조사된 모든 방사선 수준에 대해 비 조사 배지의 3 % 이내였다. 엽산 함량은 모든 방사선량에 대해 비 조사 배지의 6 % 이내였다. 감마선 방사선 치료 - 카탈로그 CD OptiCHO AGT 컨트롤, 제형 1 및 제형 2는 예를 들어 감마 방사선 치료를 위해 Steris로 운송되었다. 모든 샘플은 5 ° C에서 보관되었으며 드라이 아이스 온도 (-78 ° C)에서 선적되고 조사되었다. 각 제형을 4 개의 배치로 나누어 5 ° C에서 보관하거나 (b) 20 - 30 kGy, 30 - 40 kGy 또는 60-70 kGy의 총 선량으로 조사하였다.

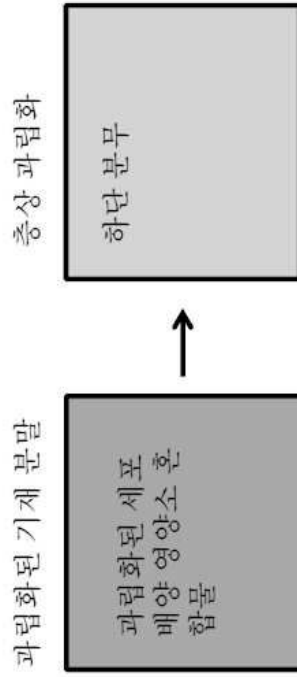
[0087]

상기 기술된 공정은 포유류, 박테리아, 곤충, 곰팡이 등 임의의 세포 유형의 배양에 적용 가능하며, 이는 본 명세서 전반에 걸쳐 설명된 재구성 된 건식 포맷의 충상 세포 배양 배지로부터 영양염 지지체를 유도한다. 상기 일부 실시 예에서 기술 된 바와 같이, 또한 본 발명의 범주 내에 포함되는 것은 마이크로 서스펜션으로서 제형화 된 성분으로 구성된 층의 도포 또는 세포 배양 과립 화 된 배지의 코팅으로서의 적용이다. 세포 배양 배지 성분이 임의의 분말 화 된 세포 배양 배지 / 공급물 또는 과립 화 된 세포 배양 배지 / 공급물 주위의 층내에서 그룹화, 분리 또는 조직화 될 수있는 많은 수의 순열은이 방법론이 , 열 안정성, 방사선 내성, 변형 된 용출 프로파일 등을 증가시킬 수 있다 (당업자라면 쉽게 이해할 수 있음).

도면

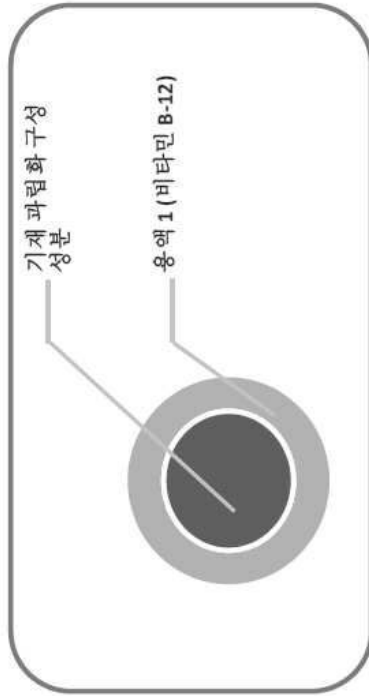
도면1

그림 1: 배양 배지 증상 과립 제형을 제조하기 위한 예시적인  
공정 1



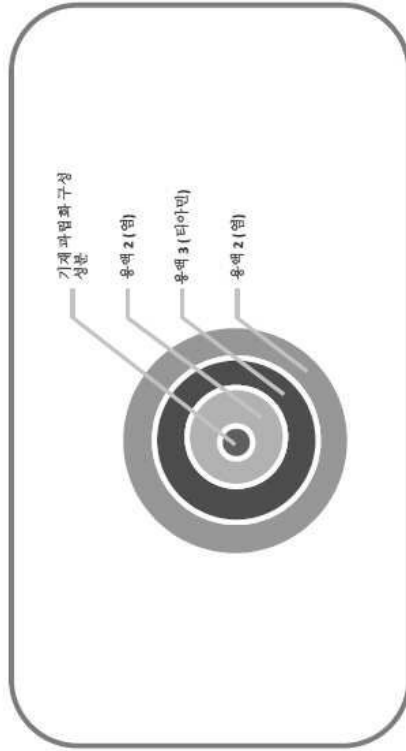
도면1a

그림 1a: 층상 과립 프로토타입 -A (단일 층, 단일 성분)



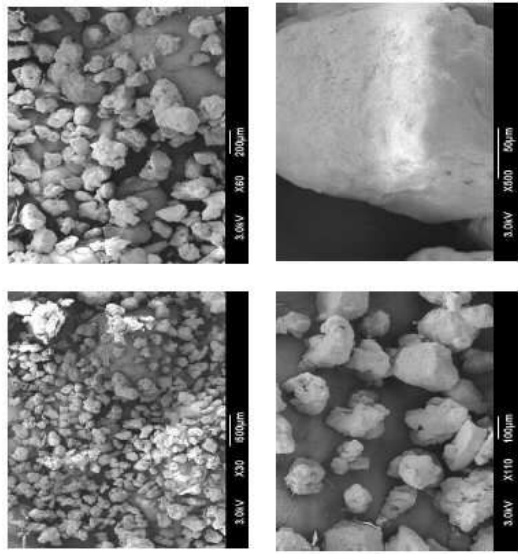
도면1b

그림 1b: 층상 과립 프로토타입-B (각 층의 다중 층상, 단일 성분)



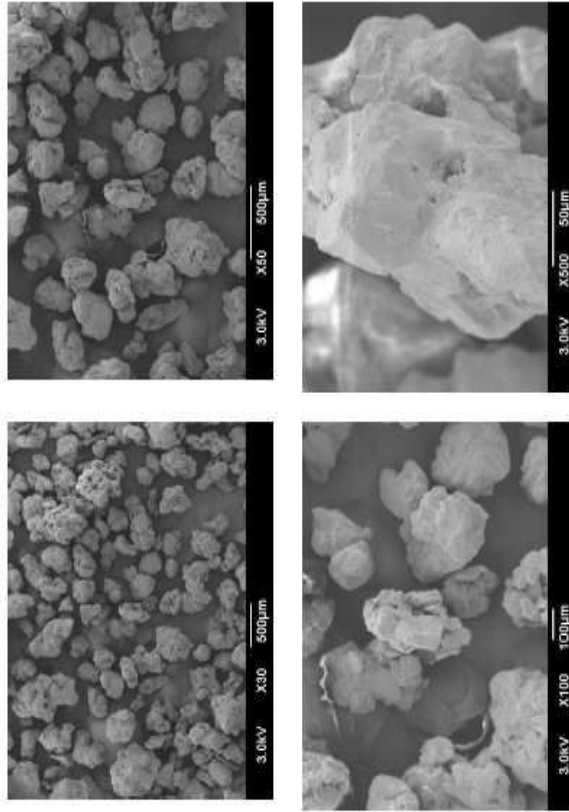
도면2a

그림 2a: 총상 과립 프로토타입 -A의 SEM 이미지 (단일 층, 단일 성분)



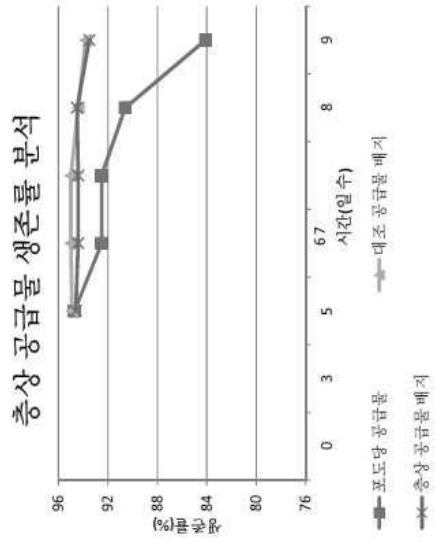
도면2b

그림 2b: 층상 과립 프로토타입-B의 SEM 이미지  
(다중층상, 단일 성분)



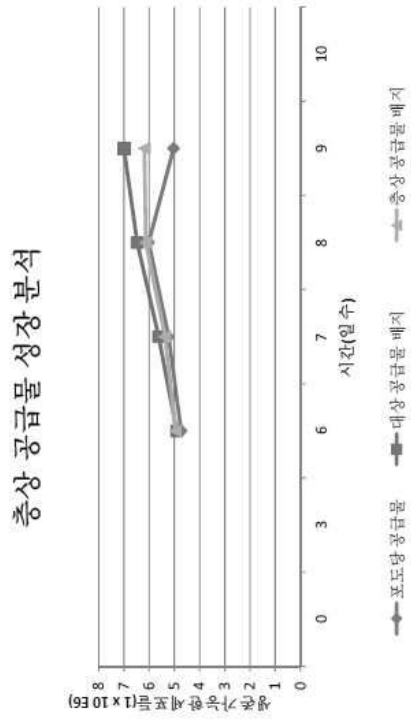
도면3a

그림 3a: 프로토타입 A 증상 공급물 세포 생존률 분석.



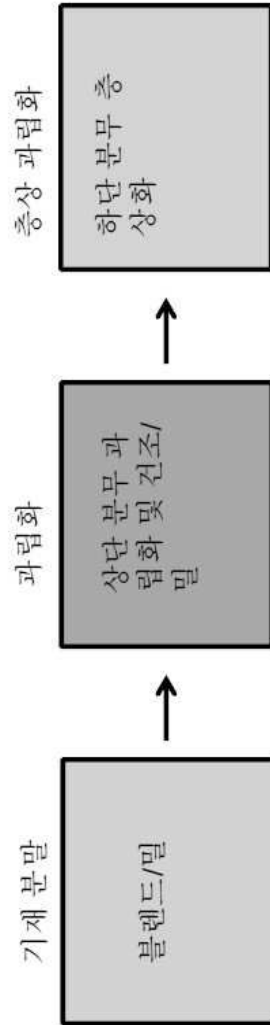
도면3b

그림 3b: 프로토타입 A 총상 공급물 세포 성장 분석.



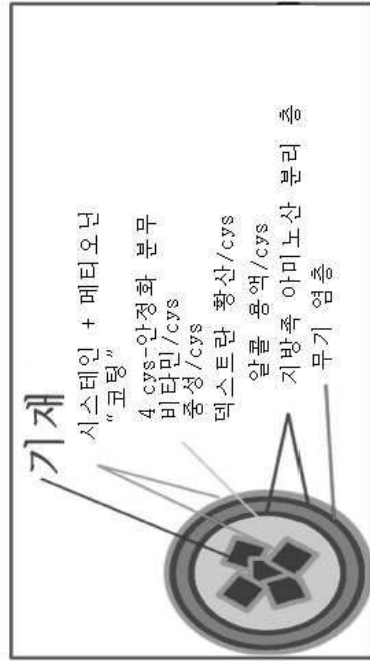
도면4

그림 4: 세 포 배 양 을 위 한 증 상 배 지 / 공 급 물 과 립 의 제 조 를 위 한 예 시 적 인 공 정 2



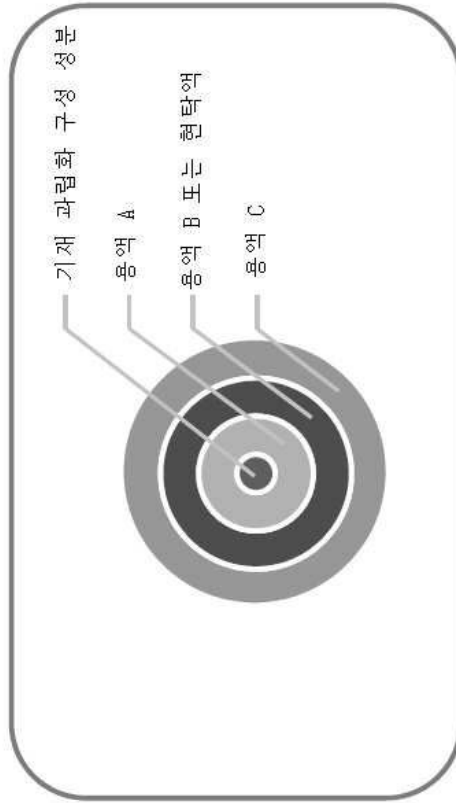
도면5a

그림 5a: 세포 배양 배지 증상 과립 - 제형 1



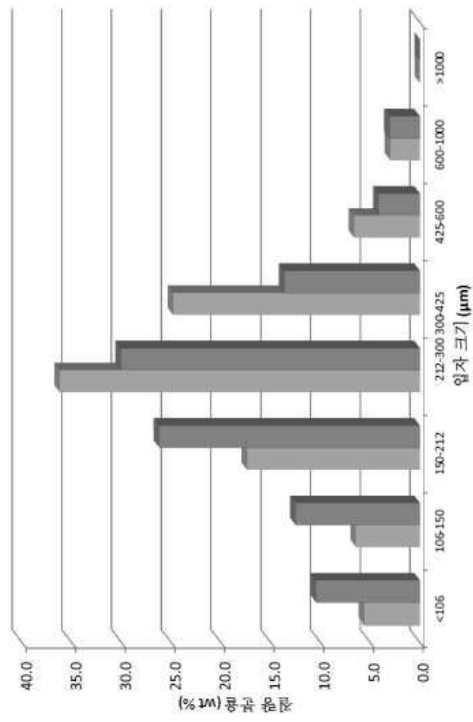
도면5b

그림 5b: 세포 배양 배지 층상 과립 - 제형 2

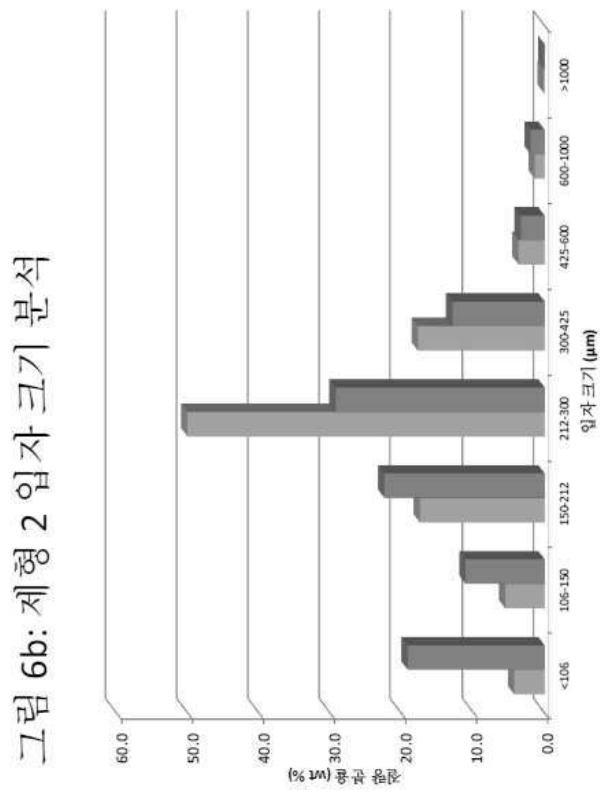


도면6a

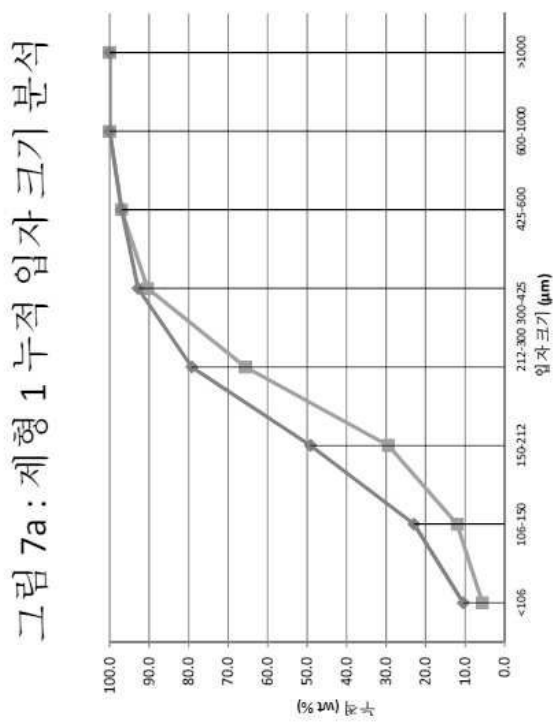
그림 6a: 제형 1 입자 크기 분석



도면6b

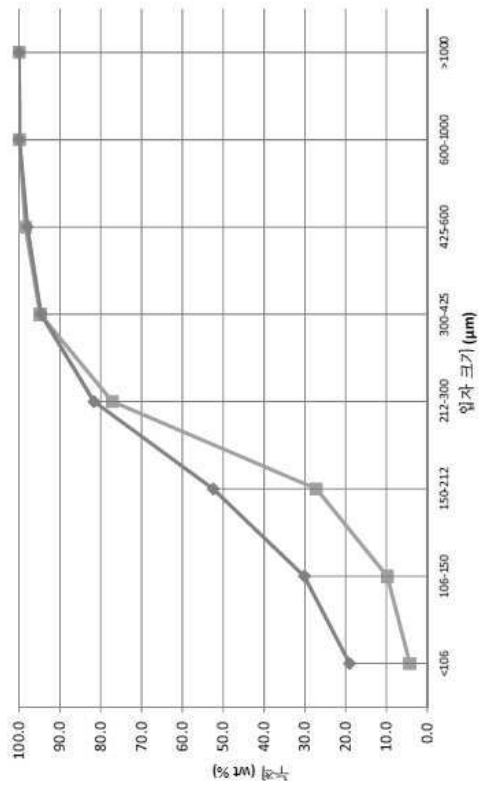


도면7a



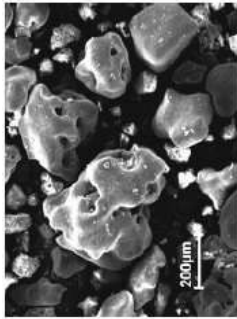
도면7b

그림 7b: 제형 2 누적 입자 크기 분석

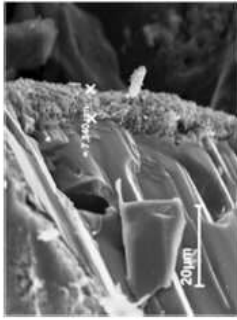


도면8a

그림 8a: 제형 1 SEM



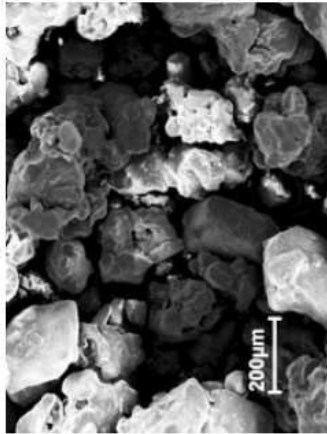
100X SEM



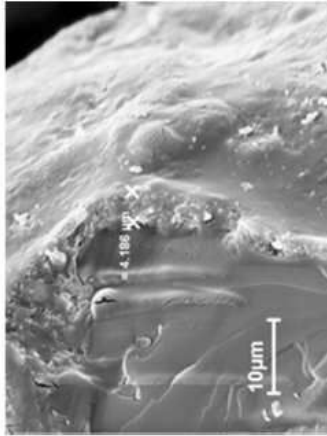
1500X SEM

도면8b

그림 8b: 제형 2 SEM



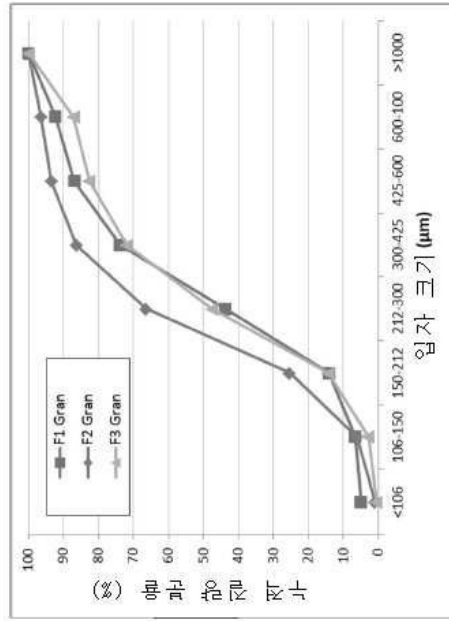
100X



1500X

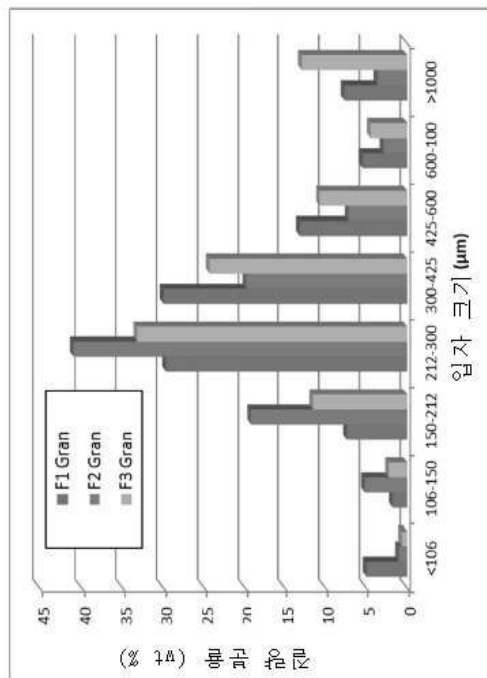
도면9a

그림 9a: 입상 기재 분말 입자 크기 분석.



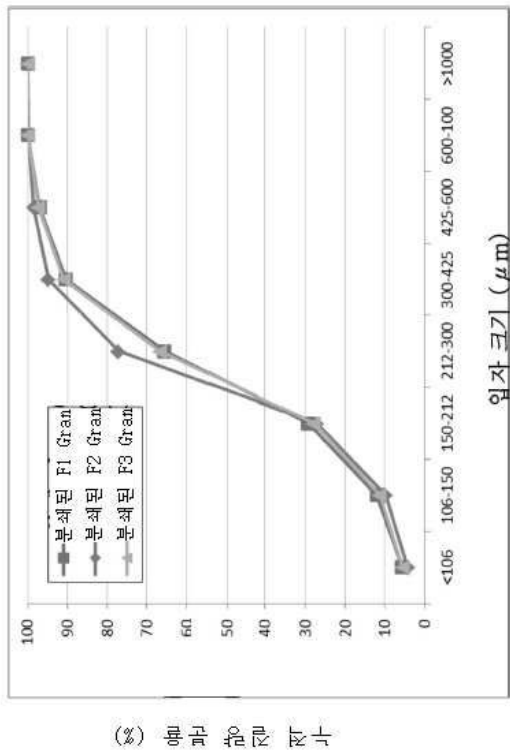
도면9b

그림 9b: 과립화된 기재 분말 입자 크기



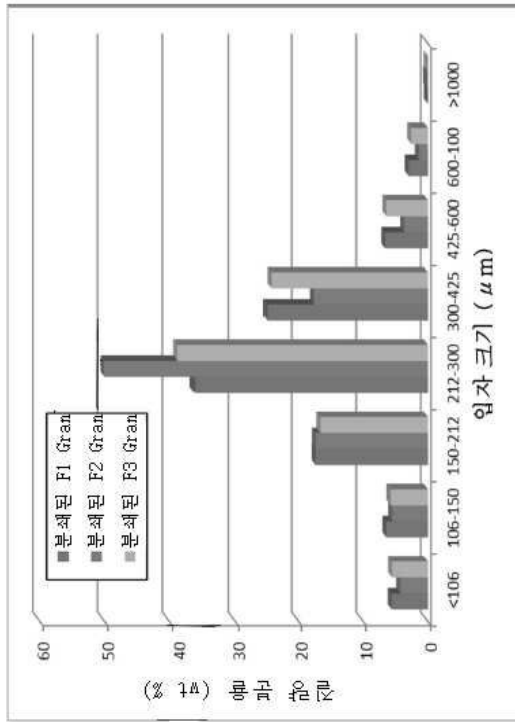
도면10a

그림 10a: 입상 기재 분말 입자 크기 분석.



도면10b

그림 10b: 분쇄 된 과립화기기재 분말 입자 크기 분석 막대 그래프.



도면11

그림 11: 증상 과립에서 방사선이 영양 염류를 유발함

