



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년09월27일

(11) 등록번호 10-2584375

(24) 등록일자 2023년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/00 (2006.01) C12M 3/06 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12M 29/10 (2013.01)
C12M 23/28 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7022305(분할)

(22) 출원일자(국제) 2015년06월08일

심사청구일자 2022년07월29일

(85) 번역문제출일자 2022년06월29일

(65) 공개번호 10-2022-0098051

(43) 공개일자 2022년07월08일

(62) 원출원 특허 10-2017-7000249
원출원일자(국제) 2015년06월08일

심사청구일자 2020년06월08일

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/034709

(87) 국제공개번호 WO 2015/191462

국제공개일자 2015년12월17일

(30) 우선권주장
62/009,553 2014년06월09일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20030113915 A1*

Tao 등. Development and implementation of a perfusion-based high cell density cell banking process. American Institute of Chemical Engineers. 2011. vol.27, no.3, pp.824-829 1부.*

Shukla 등. Single-use disposable technologies for biopharmaceutical manufacturing. Trends in biotechnology. 2013. vol.31, no.3, pp.147-154 1부.*

JP2005509406 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

젠자임 코퍼레이션

미국 메사추세츠주 02141 캠브리지 워터 스트리트 450

(72) 발명자

브루닝하우스, 마이클

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 코포레이트 드라이브 55 사노피 내

콘스탄티노브, 콘스탄틴

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 코포레이트 드라이브 55 사노피 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 28 항

심사관 : 이진욱

(54) 발명의 명칭 시드 트레인 공정 및 그 용도

(57) 요약

시드 트레인 공정 및 이러한 시드 트레인 공정의 사용을 포함하는 제조합 단백질 제조 방법이 본원에 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12M 23/58 (2013.01)

C12M 27/16 (2013.01)

C12N 5/0031 (2013.01)

(72) 발명자

라이트, 벤자민

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 코퍼레이트 드라
이브 55 사노피 내

주, 웨이창

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 코퍼레이트 드라
이브 55 사노피 내

명세서

청구범위

청구항 1

시드 트레인(seed train) 방법이며,

- (a) 복수의 포유류 세포를 베셀 내에 포함된 제1 배양 배지 내에 배치하여 제1 세포 배양물을 제공하는 단계;
- (b) 상기 제1 세포 배양물을 1.0×10^6 세포/mL 내지 5.0×10^6 세포/mL의 세포 밀도 범위로 희분 배양하는 단계;
- (c) 단계 (b)의 소정 부피의 제1 세포 배양물을 관류 생물반응기 내에 포함된 제2 배양 배지 내에 배치하여 0.25×10^6 세포/mL 내지 0.5×10^6 세포/mL 범위의 초기 세포 밀도를 갖는 제2 세포 배양물을 제공하는 단계;
- (d) 상기 제2 세포 배양물을 5×10^6 세포/mL 내지 120×10^6 세포/mL의 세포 밀도 범위로 관류 배양하는 단계;
- (e) 단계 (d)의 소정 부피의 제2 세포 배양물을 생산용 생물반응기 내에 포함된 제3 배양 배지 내에 배치하여 0.25×10^6 세포/mL 내지 10×10^6 세포/mL 범위의 초기 세포 밀도를 갖는 생산용 세포 배양물을 제공하는 단계;
- (f) 상기 포유류 세포가 재조합 단백질을 분비하게 하는 조건 하에서 상기 생산용 세포 배양물을 관류 배양하는 단계; 및
- (g) 상기 생산용 세포 배양물로부터 상기 재조합 단백질을 채취하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, (a)에서 복수의 포유류 세포를 배치하여 제1 세포 배양물을 제공하는 단계가 냉동 세포은행을 해동하는 단계; 및 소정 부피의 해동된 상기 세포은행을 제1 배양 배지 내에 배치하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 냉동 세포은행이 10×10^7 세포/mL 내지 50×10^7 세포/mL의 세포 밀도를 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 해동된 세포은행이 적어도 60%의 생세포 백분율을 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 해동된 세포은행이 적어도 90%의 생세포 백분율을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, (a)에서 복수의 포유류 세포를 배치하여 제1 세포 배양물을 제공하는 단계가 복수의 포유류 세포를 포함하는 소정 부피의 제3 세포 배양물을 제1 배양 배지 내에 배치하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

(1) 복수의 포유류 세포를 베셀 내에 포함된 제4 배양 배지 내에 배치하여 제3 세포 배양물을 제공하는 단계; 및

(2) (1)의 제3 세포 배양물을 1.0×10^6 세포/mL 내지 5.0×10^6 세포/mL의 세포 밀도 범위로 희분 배양하는 단계

를 더 포함하고,

여기서 (2)의 소정 부피의 제3 세포 배양물이 (a)의 제1 배양 배지 내에 배치되는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, (1)에서 복수의 포유류 세포를 배치하는 단계가

냉동 세포은행을 해동하는 단계; 및

소정 부피의 해동된 상기 세포은행을 제4 배양 배지 내에 배치하는 단계

를 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, (a)의 베셀 또는 (1)의 베셀 중 하나 또는 둘 모두가 사용 후 버리는 1회용 생물반응기인 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 사용 후 버리는 1회용 생물반응기가 플라스틱 멸균 백을 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, (a)의 제1 세포 배양물이 1.0 L 내지 50 L의 부피 범위를 갖는 것인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, (c)의 제2 세포 배양물이 5 L 내지 600 L의 부피 범위를 갖는 것인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, (e)의 생산용 세포 배양물이 50 L 내지 20,000 L의 부피 범위를 갖는 것인 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, (a)의 베셀이 1.5 L 내지 100 L의 내부 용적 범위를 갖는 것인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, (c)의 관류 생물반응기가 7.5 L 내지 1,000 L의 내부 용적 범위를 갖는 것인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, (e)의 생산용 생물반응기가 150 L 내지 25,000 L의 내부 용적 범위를 갖는 것인 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, (c)에서의 관류 배양이 교반 접선 유동 여과 장치가 장착된 관류 생물반응기를 이용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 18

제1항에 있어서,

(e)의 초기 세포 밀도가 2.0×10^6 세포/mL 내지 10×10^6 세포/mL의 범위; 및/또는

(e)의 초기 세포 밀도가 정상 상태(steady state) 생산용 세포 밀도의 적어도 10%인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, (e)의 초기 세포 밀도가 정상 상태 생산용 세포 밀도의 적어도 20%인 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, (e)에서의 생산용 세포 배양물의 추가 관류 배양이 1일 내지 10일의 기간에 정상 상태 생산용 세포 밀도에 도달하는 생산용 세포 배양물을 생성하는 것인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, (e)에서의 생산용 세포 배양물의 추가 관류 배양이 2일 내지 5일의 기간에 정상 상태 생산용 세포 밀도에 도달하는 생산용 세포 배양물을 생성하는 것인 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, (g)에서의 채취가 상기 생산용 생물반응기로부터 배양 배지를 제거하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 제거된 상기 배양 배지로부터 상기 재조합 단백질을 분리하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 분리하는 단계가 통합 연속 방법을 이용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 분리된 상기 재조합 단백질을 약제로 제형화하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 26

제1항에 있어서, 상기 제2 세포 배양물이 50×10^6 세포/mL 내지 120×10^6 세포/mL의 세포 밀도 범위로 관류 배양되는 것인 방법.

청구항 27

제1항에 있어서, 생산용 세포 배양물이 5×10^6 세포/mL 내지 10×10^6 세포/mL 범위의 초기 세포 밀도로 제공되는 것인 방법.

청구항 28

제1항에 있어서,

(e)의 초기 세포 밀도가 2.0×10^6 세포/mL 내지 8×10^6 세포/mL의 범위; 및/또는

(e)의 초기 세포 밀도가 정상 상태(steady state) 생산용 세포 밀도의 적어도 10%인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2014년 6월 9일 출원된 미국 특허 가출원 제62/009,553호에 대해 우선권을 주장하며, 그 전체 내용은 본원에 참조로 통합된다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 발명은 생명공학기술의 방법 및 재조합 단백질의 바이오 제조에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산을 함유하는 포유류 세포는 치료상 또는 상업적으로 중요한 단백질을 제조하기 위해 흔히 사용된다. 다양한 제품 경로의 현재 상황에서, 생명공학 회사들은 치료제의 매우 유연하고 비용 효과적인 제조를 위한 혁신적 해결책을 점점 더 개발해야 하는 상황에 놓여있다.

[0006] 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산을 함유하는 포유류 세포는 관심 있는 치료 단백질을 제조하기 위해 대규모 생산용 생물반응기에서 흔히 배양된다. 시드 트레인 공정은 대규모 생산용 생물반응기를 접종하기에 충분한 수의 이러한 포유류 세포를 생성하는 데 이용된다. 종래의 시드 트레인 공정은 저온보존된 세포은행 바이알의 해동으로 시작하여 이후 점차 더 큰 배양 베셀에서 여러 배양 단계(예를 들어, 5 단계 이상)로 이어진다. 종래의 시드 트레인 공정은 각 단계에서 여러 수동 조작을 필요로 하여 전체 공정을 오염 및 작업자 실수에 취약하게 하는 것을 포함하여 몇 가지 단점을 갖는다. 또한, 종래의 시드 트레인 공정은 배양 단계의 수로 인해, 그리고 대규모 생산용 생물반응기에서 0.5×10^6 세포/mL 미만의 출발 세포 밀도만을 만들어 낼 수 있는 N-1 단계(생산용 생물반응기의 접종 마지막에서 두 번째 세포 배양)에서 얻어지는 낮은 세포 밀도로 인해 시간이 많이 소모되며, 이는 정상 상태 생산용 세포 밀도에 도달하기 위해 5~10일의 성장 단계를 필요로 한다.

발명의 내용

[0007] 본 발명은, 적어도 부분적으로, 예를 들어 복잡성 감소, 배양 단계수 감소, 출발 세포 배양물(예를 들어, 해동된 세포은행)로부터 생산용 생물반응기 접종까지의 시간 단축, 수동 조작량 감소, 오염 위험 감소, 생산용 생물반응기 내 출발 세포 생세포 밀도 증가, 및 생산용 생물반응기 내 짧은 성장 단계(예를 들어, 정상 상태 생산용 세포 밀도 도달에 필요한 짧은 시간)를 포함한 몇 가지 장점이 있는 시드 트레인 공정의 개발에 기초를 두고 있다. 제공된 시드 트레인 공정은 (a) 복수의 재조합 포유류 세포를 베셀 내에 포함된 제1 배양 배지 내에 배치하여 제1 세포 배양물을 제공하는 단계; (b) 제1 세포 배양물을 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 세포/mL의 세포 밀도 범위로 희분 배양하는 단계; (c) (b)의 소정 부피의 제1 세포 배양물을 관류 생물반응기 내에 포함된 제2 배양 배지 내에 배치하여 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 0.50×10^6 세포/mL 범위의 초기 세포 밀도를 가진 제2 세포 배양물을 제공하는 단계; (d) 제2 세포 배양물을 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 120×10^6 세포/mL의 세포 밀도 범위로 관류 배양하는 단계; 및 (e) (d)의 소정 부피의 제2 세포 배양물을 생산용 생물반응기 내에 포함된 제3 배양 배지 내에 배치하여 약 0.20×10^6 세포/mL 내지 약 8.0×10^6 세포/mL 범위의 초기 세포 밀도를 가진 생산용 세포 배양물을 제공하는 단계를 포함한다. 또한, 본원에 기술된 시드 트레인 공정 중 하나의 이용을 포함하는, 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 치료 단백질)을 제조하는 방법이 본원에 제공된다.

[0008] 다음 단계들을 포함하는 시드 트레인 공정이 본원에 제공된다: (a) 복수의 재조합 포유류 세포를 베셀 내에 포함된 제1 배양 배지 내에 배치하여 제1 세포 배양물을 제공하는 단계; (b) 제1 세포 배양물을 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 세포/mL의 세포 밀도 범위로 희분 배양하는 단계; (c) 단계 (b)의 소정 부피의 제1 세포 배양물을 관류 생물반응기 내에 포함된 제2 배양 배지 내에 배치하여 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 0.5×10^6 세포/mL 범위의 초기 세포 밀도를 가진 제2 세포 배양물을 제공하는 단계; (d) 제2 세포 배양물을 약 5×10^6 세포/mL 내지 약 120×10^6 세포/mL의 세포 밀도 범위로 관류 배양하는 단계; 및 (e) 단계 (d)의 소정 부피의 제2 세포 배양물을 생산용 생물반응기 내에 포함된 제3 배양 배지 내에 배치하여 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 8×10^6 세포/mL 범위의 초기 세포 밀도를 가진 생산용 세포 배양물을 제공하는 단계. 이 방법들의 일부 구현예에서, (a)에서 복수의 재조합 포유류 세포를 배치하는 단계는, 냉동 세포은행을 해동하는 단계; 및 소정 부피의 해동된 세포은행을 제1 배양 배지 내에 배치하는 단계를 포함한다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부

구현예에서, 냉동 세포은행은 약 10×10^7 세포/mL 내지 약 50×10^7 세포/mL의 세포 밀도 범위를 포함한다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 해동된 세포은행은 적어도 60%(예를 들어, 적어도 90%)의 생세포 백분율을 포함한다.

[0009] 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (a)에서 복수의 재조합 포유류 세포를 배치하는 단계는 복수의 재조합 포유류 세포를 포함하는 소정 부피의 제3 세포 배양물을 제1 배양 배지 내에 배치하는 단계를 포함한다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예는, (1) 복수의 재조합 포유류 세포를 베셀 내에 포함된 제4 배양 배지 내에 배치하여 제3 세포 배양물을 제공하는 단계; 및 (2) (1)의 제3 세포 배양물을 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 세포/mL의 세포 밀도 범위로 희분 배양하는 단계를 더 포함하되, (2)의 소정 부피의 제3 세포 배양물은 (a)의 제1 배양 배지 내에 배치된다. 본원에 제공된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (a)의 베셀과 (1)의 베셀 중 하나 또는 모두는 사용 후 버리는 1회용 생물반응기(예를 들어, 플라스틱 멸균 백을 포함하는 사용 후 버리는 1회용 생물반응기)이다.

[0010] 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (1)에서 복수의 재조합 포유류 세포를 배치하는 단계는, 냉동 세포은행을 해동하는 단계; 및 소정 부피의 해동된 세포은행을 제4 배양 배지 내에 배치하는 단계를 포함한다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 냉동 세포은행은 약 10×10^7 세포/mL 내지 약 50×10^7 세포/mL의 세포 밀도 범위를 포함한다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 해동된 세포은행은 적어도 60%(예를 들어, 적어도 90%)의 생세포 백분율을 포함한다.

[0011] 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (a)의 제1 세포 배양물은 약 1.0 L 내지 약 50 L(예를 들어, 약 5.0 L 내지 약 10 L)의 부피 범위를 갖는다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (c)의 제2 세포 배양물은 약 5 L 내지 약 600 L(예를 들어, 약 10 L 내지 약 300 L)의 부피 범위를 갖는다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (e)의 생산용 세포 배양물은 약 50 L 내지 약 20,000 L(예를 들어, 약 100 L 내지 약 10,000 L)의 부피 범위를 갖는다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (1)의 제4 배양 배지는 약 500 mL 내지 약 20 L(예를 들어, 약 500 mL 내지 약 10 L)의 부피 범위를 갖는다.

[0012] 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (a)의 베셀은 약 1.5 L 내지 약 100 L(예를 들어, 약 1.5 L 내지 약 50 L)의 내부 용적을 갖는다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (c)의 관류 생물반응기는 약 7.5 L 내지 약 1,000 L(예를 들어, 약 50 L 내지 약 1000 L)의 내부 용적을 갖는다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (e)의 생산용 생물반응기는 약 150 L 내지 약 25,000 L(예를 들어, 약 150 L 내지 약 10,000 L)의 내부 용적을 갖는다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (1)의 베셀은 약 1 L 내지 약 40 L(예를 들어, 약 1 L 내지 약 20 L)의 내부 용적을 갖는다.

[0013] 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (c)의 관류 배양하는 단계는 교반 접선 유동 여과 장치가 장착된 관류 생물반응기를 이용하여 수행된다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (e)의 초기 세포 밀도는 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 8×10^6 세포/mL의 범위이다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (e)의 초기 세포 밀도는 정상 상태 생산용 세포 밀도의 적어도 10%(예를 들어, 적어도 20%)이다.

[0014] 또한, 다음 단계들을 포함하는 재조합 단백질 제조 방법이 제공된다: (a) 복수의 재조합 포유류 세포를 베셀 내에 포함된 제1 배양 배지 내에 배치하여 제1 세포 배양물을 제공하는 단계; (b) 제1 세포 배양물을 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 세포/mL의 세포 밀도 범위로 희분 배양하는 단계; (c) (b)의 소정 부피의 제1 세포 배양 배지를 관류 생물반응기 내에 포함된 제2 배양 배지 내에 배치하여 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 0.5×10^6 세포/mL 범위의 초기 세포 밀도를 가진 제2 세포 배양물을 제공하는 단계; (d) 제2 세포 배양물을 약 5×10^6 세포/mL 내지 약 60×10^6 세포/mL의 세포 밀도 범위로 관류 배양하는 단계; (e) (d)의 소정 부피의 제2 세포 배양물을 생산용 생물반응기 내에 포함된 제3 배양 배지 내에 배치하여 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 8×10^6 세포/mL 범위의 초기 세포 밀도를 가진 생산용 세포 배양물을 제공하는 단계; (f) 재조합 포유류 세포가 재조합 단백질을 분비할 수 있는 조건 하에서 생산용 세포 배양물을 관류 배양하는 단계; 및 (g) 생산용 세포 배양물로부터 재조합 단백질을 채취하는 단계. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (a)에서 복수의 재조합 포유류 세포를 배치하는 단계는, 냉동 세포은행을 해동하는 단계; 및 소정 부피의 해동된 세포은행을 제1 배양 배지 내에 배치하는 단계를 포함한다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 냉동 세포은행

행은 약 10×10^7 세포/mL 내지 약 50×10^7 세포/mL의 세포 밀도 범위를 갖는다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 해동된 세포은행은 적어도 60%(예를 들어, 적어도 90%)의 생세포 백분율을 포함한다.

[0015] 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (a)에서 복수의 재조합 포유류 세포를 배치하는 단계는 복수의 재조합 포유류 세포를 포함하는 소정 부피의 제3 세포 배양물을 제1 배양 배지 내에 배치하는 단계를 포함한다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예는, (1) 복수의 재조합 포유류 세포를 베셀 내에 포함된 제4 배양 배지 내에 배치하여 제3 세포 배양물을 제공하는 단계; 및 (2) (1)의 제3 세포 배양물을 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 세포/mL의 세포 밀도 범위로 희분 배양하는 단계를 더 포함하되, (2)의 소정 부피의 제3 세포 배양물은 (a)의 제1 배양 배지 내에 배치된다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (a)의 베셀과 (1)의 베셀 중 하나 또는 모두는 사용 후 버리는 1회용 생물반응기(예를 들어, 플라스틱 멸균 백을 포함하는 사용 후 버리는 1회용 생물반응기)이다.

[0016] 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (1)에서 복수의 재조합 포유류 세포를 배치하는 단계는, 냉동 세포은행을 해동하는 단계; 및 소정 부피의 해동된 세포은행을 제4 배양 배지 내에 배치하는 단계를 포함한다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 해동된 세포은행은 약 1.0×10^7 세포/mL 내지 약 50×10^7 세포/mL(예를 들어, 약 10×10^7 세포/mL 내지 약 50×10^7 세포/mL)의 세포 밀도 범위를 포함한다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 해동된 세포은행은 적어도 60%(예를 들어, 적어도 90%)의 생세포 백분율을 포함한다.

[0017] 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (a)의 제1 세포 배양물은 약 1.0 L 내지 약 50 L(예를 들어, 약 5.0 L 내지 약 10.0 L)의 부피 범위를 갖는다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (c)의 제2 세포 배양물은 약 5 L 내지 약 600 L(예를 들어, 약 10 L 내지 약 300 L)의 부피 범위를 갖는다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (e)의 생산용 세포 배양물은 약 50 L 내지 약 20,000 L(예를 들어, 약 100 L 내지 약 10,000 L)의 부피 범위를 갖는다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (1)의 제4 배양 배지는 약 500 mL 내지 약 20 L(예를 들어, 약 500 mL 내지 약 10 L)의 부피 범위를 갖는다.

[0018] 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (a)의 베셀은 약 1.5 L 내지 약 100 L(예를 들어, 약 1.5 L 내지 약 50 L)의 내부 용적을 갖는다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (c)의 관류 생물반응기는 약 7.5 L 내지 약 1,000 L(예를 들어, 약 50 L 내지 약 1000 L)의 내부 용적을 갖는다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (e)의 생산용 생물반응기는 약 150 L 내지 약 25,000 L(예를 들어, 150 L 내지 약 10,000 L)의 내부 용적을 갖는다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (1)의 베셀은 약 1 L 내지 약 40 L(예를 들어, 약 1 L 내지 약 20 L)의 내부 용적을 갖는다.

[0019] 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (c)의 관류 배양하는 단계는 교반 접선 유동 여과 장치가 장착된 관류 생물반응기를 이용하여 수행된다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (e)의 초기 세포 밀도는 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 8×10^6 세포/mL의 범위이다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (e)의 초기 세포 밀도는 정상 상태 생산용 세포 밀도의 적어도 10%(예를 들어, 적어도 20%)이다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 정상 상태 생산용 세포 밀도는 약 5×10^6 세포/mL 내지 약 50×10^6 세포/mL(예를 들어, 약 15×10^6 세포/mL 내지 약 50×10^6 세포/mL)이다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (f)의 상기 관류 배양하는 단계는 약 1일 내지 약 10일(예를 들어, 약 2일 내지 약 5일)의 기간에 정상 상태 생산용 세포 밀도에 도달하는 생산용 세포 배양물을 생성한다.

[0020] 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (g)의 채취하는 단계는 생산용 생물반응기로부터 배양 배지를 제거(예를 들어, 연속적으로 제거)하는 단계를 포함한다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예는 제거된 배양 배지로부터 재조합 단백질을 분리시키는 단계를 더 포함한다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 분리시키는 단계는 통합 연속 공정을 이용하여 수행된다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예는 분리된 재조합 단백질을 약제로 제형화하는 단계를 더 포함한다.

[0021] 본원에 사용된 바와 같이, 단수 명사는 특정 명사의 하나 이상을 나타낸다. 예를 들어, 어구 "재조합 포유류 세포"는 "하나 이상의 재조합 포유류 세포"를 나타낸다.

[0022] 용어 "포유류 세포"는 임의의 포유동물(예를 들어, 인간, 햄스터, 마우스, 녹색 원숭이, 랫트, 돼지, 소, 또는 토끼)에서 얻거나 이로부터 유래하는 임의의 세포를 의미한다. 예를 들어, 포유류 세포는 무한증식 세포일 수

있다. 일부 구현예에서, 포유류 세포는 분화 세포이다. 일부 구현예에서, 포유류 세포는 미분화 세포이다. 포유류 세포의 비제한적 예는 본원에 기술되어 있다. 포유류 세포의 추가 예는 당해 분야에 알려져 있다.

- [0023] 용어 "시드 트레인 공정"은 당해 분야에 알려져 있으며, 제1 세포 배양물 내 시작 세포(예를 들어 재조합 포유류 세포)의 수가, 통상적인 생산용 생물반응기를 0.25×10^6 세포/mL 초과와 초기 세포 밀도에서 접종하기에 충분한 수의 세포를 포함하는 N-1 세포 배양물로 확장되는 다단계 방법을 의미한다.
- [0024] 용어 "실질적으로 존재하지 않는"은 특정 물질(예를 들어, 포유류 세포)이 적어도 또는 약 90% 존재하지 않는(예를 들어, 적어도 또는 약 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 적어도 또는 약 99% 존재하지 않는, 또는 약 100% 존재하지 않는) 조성물(예를 들어, 액체 배양 배지)을 의미한다.
- [0025] 용어 "0.5x 부피"는 부피의 약 50%를 의미한다. 용어 "0.6x 부피"는 부피의 약 60%를 의미한다. 마찬가지로, 0.7x, 0.8x, 0.9x 및 1.0x는 각각 부피의 약 70%, 80%, 90%, 또는 100%를 의미한다.
- [0026] 용어 "배양" 또는 "세포 배양"은 제어된 세트의 물리적 조건 하에서 포유류 세포(예를 들어, 재조합 포유류 세포)의 유지 또는 증식을 의미한다.
- [0027] 용어 "포유류 세포의 배양물" 또는 "세포 배양물"은 제어된 세트의 물리적 조건 하에서 유지되거나 증식된 복수의 포유류 세포를 포함하는 액체 배양 배지를 의미한다.
- [0028] 용어 "액체 배양 배지" 또는 "배양 배지"는 시험관 내에서 세포(예를 들어, 포유류 세포)를 성장시키거나 증식시킬 수 있는 충분한 영양소를 포함하는 유체를 의미한다. 예를 들어, 액체 배양 배지는 아미노산(예를 들어, 20개 아미노산), 푸린(예를 들어, 하이포크산틴), 피리미딘(예를 들어, 티미딘), 콜린, 이노시톨, 티아민, 폴산, 바이오틴, 칼슘, 니아신아미드, 피리독신, 리보플라빈, 티미딘, 시아노코발라민, 피루베이트, 리포산, 마그네슘, 글루코오스, 나트륨, 칼륨, 철, 구리, 아연, 및 중탄산나트륨 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 포유류로부터의 혈청을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 포유동물로부터의 혈청 또는 다른 추출물을 포함하지 않는다(규정된 액체 배양 배지). 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 미량 금속, 포유류 성장 호르몬, 및/또는 포유류 성장 인자를 포함할 수 있다. 액체 배양 배지의 다른 예는 최소 배지(예를 들어, 무기염, 탄소원, 및 물만을 포함하는 배지)이다. 액체 배양 배지의 비제한적 예는 본원에 기술되어 있다. 액체 배양 배지의 추가 예는 당해 분야에 알려져 있으며 상업적으로 입수 가능하다. 액체 배양 배지는 임의의 밀도의 포유류 세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원에 사용된 바와 같이, 생산용 생물반응기로부터 제거된 소정 부피의 액체 배양 배지에는 포유류 세포가 실질적으로 존재하지 않을 수 있다.
- [0029] 용어 "동물-유래 성분이 존재하지 않는 액체 배양 배지"는 포유동물로부터 유래된 임의의 성분들(예를 들어, 단백질 또는 혈청)을 포함하지 않는 액체 배양 배지를 의미한다.
- [0030] 용어 "혈청이 없는 액체 배양 배지"는 포유류 혈청을 포함하지 않는 액체 배양 배지를 의미한다.
- [0031] 용어 "혈청-함유 액체 배양 배지"는 포유류 혈청을 포함하는 액체 배양 배지를 의미한다.
- [0032] 용어 "화학적으로 규정된 액체 배양 배지"는 당해 분야의 용어로서, 모든 화학적 성분들이 알려진 액체 배양 배지를 의미한다. 예를 들어, 화학적으로 규정된 액체 배양 배지는 우태아 혈청, 소 혈청 알부민, 또는 인간 혈청 알부민을 포함하지 않는데, 왜냐하면, 이러한 제조물은 통상적으로 알부민과 지질의 복합 혼합물을 포함하기 때문이다.
- [0033] 용어 "단백질이 없는 액체 배양 배지"는 임의의 단백질(예를 들어, 임의의 검출 가능한 단백질)을 포함하지 않는 액체 배양 배지를 의미한다.
- [0034] 용어 "교반"은 베셀(예를 들어, 생물반응기)에서 액체 배양 배지의 일부를 뒤섞거나 달리 이동시키는 것을 의미한다. 이것은, 예를 들어 베셀(예를 들어, 생물반응기)에서 액체 배양 배지 내 용존 O_2 농도를 증가시키기 위해 수행된다. 교반은 당해 분야에 알려진 방법, 예를 들어 기기 또는 프로펠러를 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 교반은 틸팅 및/또는 회전하는 플랫폼 상에 베셀을 놓음으로써 수행될 수 있다. 베셀(예를 들어, 생물반응기)에서 액체 배양 배지의 일부를 교반시키는 데 사용될 수 있는 예시적 장치 및 방법은 당해 분야에 알려져 있다.
- [0035] 용어 "통합형 공정"은, 특정 결과(예를 들어, 액체 배양 배지로부터 단리된 재조합 단백질의 생성)를 달성하기 위해 공동으로 기능하는 구성 요소들을 사용하여 수행되는 공정을 의미한다.

- [0036] 용어 “연속 공정”은 시스템의 적어도 일부를 통해 유체를 연속적으로 공급하는 공정을 의미한다.
- [0037] 용어 “면역글로불린”은 적어도 15개의 아미노산(예를 들어, 적어도 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100 개의 아미노산)의 면역글로불린 단백질의 아미노산 서열(예를 들어, 가변 도메인 서열, 프레임워크 서열, 및/또는 불변 도메인 서열)을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. 면역글로불린은 예를 들어, 적어도 15개의 아미노산의 경쇄 면역글로불린, 예를 들어 적어도 15개의 아미노산의 중쇄 면역글로불린을 포함할 수 있다. 면역글로불린은 단리된 항체(예를 들어, IgG, IgE, IgD, IgA, 또는 IgM)일 수 있다. 면역글로불린은 IgG의 서브클래스(subclass)(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4)일 수 있다. 면역글로불린은 항체 단편, 예를 들어, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, 또는 scFv 단편일 수 있다. 면역글로불린은 이중-특이적 항체 또는 삼중-특이적 항체, 또는 다이머, 트라이머, 또는 멀티머 항체, 또는 디아바디(diabody), Affibody®, 또는 Nanobody®일 수도 있다. 면역글로불린은 적어도 하나의 면역글로불린 도메인을 포함하는 조작된 단백질(예를 들어, 융합 단백질)일 수도 있다. 면역글로불린의 비제한적 예는 본원에 기술되어 있으며, 면역글로불린의 추가 예는 당해 분야에 알려져 있다.
- [0038] 용어 “단백질 단편” 또는 “폴리펩티드 단편”은 길이가 적어도 또는 약 4개의 아미노산, 적어도 또는 약 5개의 아미노산, 적어도 또는 약 6개의 아미노산, 적어도 또는 약 7개의 아미노산, 적어도 또는 약 8개의 아미노산, 적어도 또는 약 9개의 아미노산, 적어도 또는 약 10개의 아미노산, 적어도 또는 약 11개의 아미노산, 적어도 또는 약 12개의 아미노산, 적어도 또는 약 13개의 아미노산, 적어도 또는 약 14개의 아미노산, 적어도 또는 약 15개의 아미노산, 적어도 또는 약 16개의 아미노산, 적어도 또는 약 17개의 아미노산, 적어도 또는 약 18개의 아미노산, 적어도 또는 약 19개의 아미노산, 또는 적어도 또는 약 20개의 아미노산이거나 길이가 20개를 초과하는 아미노산인 폴리펩티드 서열의 일부를 의미한다. 재조합 단백질 단편은 본원에 기술된 임의의 공정을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0039] 용어 “조작된 단백질”은 유기체(예를 들어, 포유동물) 내에 존재하는 내인성 핵산에 의해 자연적으로 인코딩되지 않는 폴리펩티드를 의미한다. 조작된 단백질의 예는 효소(예를 들어, 조작된 효소의 안정성 및/또는 촉매 활성의 증가를 야기하는 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 삽입 또는 첨가를 가짐), 융합 단백질, 항체(예를 들어, 2가 항체, 3가 항체, 또는 디아바디), 및 적어도 하나의 재조합 스캐폴딩 서열(recombinant scaffolding sequence)을 포함하는 항원-결합 단백질을 포함한다.
- [0040] 용어 “다중-컬럼 크로마토그래피 시스템” 또는 “MCCS”는 총 둘 이상의 상호 연결 또는 스위칭 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인을 가진 시스템을 의미한다. 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템의 비제한적 예는 총 둘 이상의 상호 연결 또는 스위칭 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인을 포함하는 주기적 역류 크로마토그래피 시스템(PCC)이다. 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템의 추가 예는 본원에 기술되어 있으며 당해 분야에 알려져 있다.
- [0041] 용어 “포집”은, 액체 배양 배지 또는 희석된 액체 배양 배지(예를 들어, 배양 배지 단백질 또는 포유류 세포에 존재하거나 포유류 세포에서 분비되는 하나 이상의 기타 성분(예를 들어, DNA, RNA, 또는 기타 단백질))에 존재하는 하나 이상의 기타 성분으로부터 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 치료 단백질)을 부분적으로 정제하거나 단리시키고(예를 들어, 중량으로 적어도 또는 약 5%, 예를 들어, 적어도 또는 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 적어도 또는 약 95% 순도), 농축하고, 안정화시키기 위해 수행되는 단계를 의미한다. 일반적으로, 포집은 재조합 단백질과 결합하는 수지를 사용하여(예를 들어, 친화성 크로마토그래피를 사용하여) 수행된다. 액체 배양 배지 또는 희석된 액체 배양 배지로부터 재조합 단백질을 포집하기 위한 비제한적 방법은 본원에 기술되어 있으며, 다른 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 재조합 단백질은 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인)을 사용하여 액체 배양 배지로부터 포집될 수 있다.
- [0042] 용어 “정제”는, 재조합 단백질을 포함하는 유체(예를 들어, 액체 배양 배지 단백질 또는 포유류 세포에 존재하거나 포유류 세포에서 분비되는 하나 이상의 기타 성분(예를 들어, DNA, RNA, 기타 단백질, 내독소, 바이러스 등))에 존재하는 하나 이상의 기타 불순물(예를 들어, 벌크 불순물) 또는 성분들로부터 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 치료 단백질)을 단리시키기 위해 수행되는 단계를 의미한다. 예를 들어, 정제는 초기 포집 단계 중 또는 그 후에 수행될 수 있다. 정제는 재조합 단백질 또는 오염물 중 어느 하나와 결합하는 수지, 멤브레인, 또는 임의의 기타 고체 담체를 사용하여(예를 들어, 친화성 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 또는 분자체 크로마토그래피를 사용하여) 수행될 수 있다. 재조합 단

백질은 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인)을 사용하여 재조합 단백질을 포함하는 유체로부터 정제될 수 있다.

- [0043] 용어 “폴리싱”은 당해 분야의 용어로서, 원하는 최종 순도에 가까운 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 치료 단백질)을 포함하는 유체로부터 남아있는 미량 또는 소량의 오염물 또는 불순물을 제거하기 위해 수행되는 단계를 의미한다. 예를 들어, 폴리싱은 재조합 단백질을 포함하는 유체에 존재하는 표적 재조합 단백질 또는 소량의 오염물이나 불순물 중 어느 하나와 선택적으로 결합하는 크로마토그래피 컬럼(들) 또는 멤브레인 흡수체(들)에 재조합 단백질을 포함하는 유체를 통과시켜 수행될 수 있다. 이러한 예에서, 크로마토그래피 컬럼(들) 또는 멤브레인 흡수체(들)의 용출액/여과액은 재조합 단백질을 포함한다.
- [0044] 용어 “용출액/여과액”은 당해 분야의 용어로서, 검출 가능한 양의 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 치료 단백질)을 포함하는 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인으로부터 방출되는 유체를 의미한다.
- [0045] 용어 “여과”는, 액체(예를 들어 본원에 기술된 임의의 시스템 또는 공정에 존재하는 액체 배양 배지 또는 유체)로부터 원치 않는 생물학적 오염물(예를 들어, 포유류 세포, 박테리아, 효모 세포, 바이러스, 또는 마이코박테리아) 및/또는 입자상 물질(예를 들어, 침전된 단백질)의 적어도 일부(예를 들어, 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%)를 제거하는 것을 의미한다.
- [0046] 용어 “분비 단백질” 또는 “분비 재조합 단백질”은 포유류 세포 내에서 번역될 때 본래 적어도 하나의 분비 신호 서열을 포함하고, 적어도 일부, 포유류 세포에서 분비 신호 서열의 효소적 분해를 통해, 적어도 일부 세포 외 공간(예를 들어, 액체 배양 배지)으로 분비되는 단백질(예를 들어, 재조합 단백질)을 의미한다. “분비” 단백질이 분비 단백질로 간주되기 위해서는 세포로부터 완전히 분리될 필요가 없다는 것은 당업자가 이해할 것이다.
- [0047] 용어 “관류 배양”은 당해 분야의 용어로서, 베셀(예를 들어, 생물반응기)에서의 세포 배양물 배양을 의미하며, 여기서, 베셀에서의 세포 배양물 배양은 베셀에 존재하는 액체 배양 배지(예를 들어, 세포가 실질적으로 존재하지 않는 액체 배양 배지)의 주기적 또는 연속 제거 및 그와 동시에 또는 직후에 실질적으로 동일한 부피의 대체 액체 배양 배지를 베셀에 첨가하는 것을 포함한다. 일부 예에서, 배양 기간 동안(예를 들어, 일일 기준으로 배양 배지 재공급 속도) 점진적 기간(예를 들어, 약 24시간의 기간, 약 1분 내지 약 24시간의 기간, 또는 24시간 초과인 기간)에 걸쳐 제거되는 액체 배양 배지의 부피 및 첨가되는 대체 배양 배지의 부피의 점진적 변화(예를 들어, 증가 또는 감소)가 있다. 날마다 제거되고 대체되는 배지의 분율은 배양되는 특정 세포, 초기 시딩 밀도, 및 특정 시간에서의 세포 밀도에 따라 달라질 수 있다. “RV” 또는 “반응기 부피”는 배양 공정의 초기에 존재하는 배양 배지의 부피(예를 들어, 시딩 후 존재하는 배양 배지의 총 부피)를 의미한다.
- [0048] 용어 “베셀”은 당해 분야에 알려져 있으며, 세포를 유지 또는 증식시킬 수 있는 제어된 세트의 물리적 조건 하에서 액체 배양 배지 내 복수의 세포(예를 들어, 재조합 포유류 세포)를 배양하기에 적합한 내부 용적을 갖는 장치를 의미한다. 베셀의 비제한적 예는 생물반응기(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 알려진 임의의 예시적 생물반응기)이다.
- [0049] 용어 “관류 생물반응기”는 당해 분야에 알려져 있으며, 액체 배양 배지에서 복수의 세포(예를 들어, 재조합 포유류 세포)를 배양하기 위한 내부 용적, 생물반응기에서 액체 배양 배지를 주기적 또는 연속적으로 제거하기 위한 수단(예를 들어, 출구, 입구, 펌프 등의 장치), 및 실질적으로 동일한 부피의 대체 액체 배양 배지를 생물반응기에 추가하기 위한 수단(예를 들어, 출구, 입구, 펌프 등의 장치)을 갖는 생물반응기를 의미한다. 대체 액체 배양 배지의 추가는 생물반응기로부터 액체 배양 배지의 제거와 실질적으로 동시에 또는 그 직후에 수행될 수 있다. 생물반응기로부터 액체 배양 배지를 제거하기 위한 수단 및 대체 액체 배양 배지를 추가하기 위한 수단은 단일 장치 또는 시스템일 수 있다.
- [0050] 용어 “생산용 생물반응기”는 당해 분야의 용어로서, (예를 들어, 500 L, 1,000 L, 5,000 L, 10,000 L, 20,000 L, 50,000 L, 또는 100,000 L가 넘는 내부 용적을 갖는) 대규모 생물반응기를 의미한다. 예를 들어, 생산용 생물반응기는 관류 생물반응기일 수 있다.
- [0051] 용어 “정상 상태 생산용 세포 밀도”는 당해 분야의 용어로서, 시간 경과에 따라 관류 배양 중에 유지되는 배양 배지 내 생세포(예를 들어, 생존 가능한 재조합 포유류 세포)의 목표 농도를 의미한다.
- [0052] 용어 “회분 배양”은 당해 분야의 용어로서, 액체 배양 배지에 복수의 세포(예를 들어, 포유류 세포)를 포함하는 베셀(예를 들어, 생물반응기)을 의미하며, 여기서, 베셀(예를 들어, 생물반응기)에 존재하는 세포의 배양은 배양 중에 실질적 또는 상당한 양의 새로운 액체 배양 배지를 세포 배양물에 첨가하는 것을 포함하지 않고, 세

포 배양물로부터 실질적 또는 상당한 양의 액체 배양 배지를 제거하는 것을 포함하지 않는다.

- [0053] 용어 “유가 배양(fed-batch culturing)”은 당해 분야의 용어로서, 액체 배양 배지에 복수의 세포(예를 들어, 포유류 세포)를 포함하는 베셀(예를 들어, 생산용 생물반응기)을 의미하며, 여기서, 베셀(예를 들어, 생산용 생물반응기)에 존재하는 세포의 배양은 배양 중에 베셀로부터 액체 배양 배지의 실질적 또는 상당한 제거 없이 새로운 액체 배양 배지를 베셀에 주기적으로 또는 연속적으로 첨가하는 것을 포함한다. 새로운 액체 배양 배지는 배양의 시작 시 베셀에 존재하는 액체 배양 배지와 동일할 수 있다. 유가 배양의 일부 예에서, 새로운 액체 배양 배지는 배양의 시작 시 베셀에 존재하는 액체 배양 배지의 농축된 형태이다. 유가 배양의 일부 예에서, 새로운 배양 배지는 건조 분말로서 첨가된다.
- [0054] 용어 “단위 조작”은 당해 분야의 용어로서, 액체 배양 배지로부터 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 치료 단백질)을 분리시키는 공정에서 수행될 수 있는 기능 단계를 의미한다. 예를 들어, 조작의 단위는 여과(예를 들어, 재조합 단백질을 포함하는 유체로부터 오염 박테리아, 효모 바이러스, 또는 마이코박테리아, 및/또는 입자상 물질의 제거), 포집, 에피토프 태그 제거, 정제, 수용 또는 저장, 폴리싱, 바이러스 비활성화, 재조합 단백질을 포함하는 유체의 이온 농도 및/또는 pH 조절, 및 원치 않는 염의 제거일 수 있다.
- [0055] “특정 생산율” 또는 “SPR”은 당해 분야의 용어로서, 본원에 사용된 바와 같이, 포유류 세포 당 하루에 생성되는 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 치료 단백질)의 질량 또는 효소 활성을 지칭한다. 재조합 항체에 대한 SPR은 일반적으로 [질량/세포/일]로 측정된다. 재조합 효소에 대한 SPR은 일반적으로 [단위/세포/일] 또는 [(단위/질량)/세포/일]로 측정된다.
- [0056] “부피 생산율” 또는 “VPR”은 당해 분야의 용어로서, 본원에 사용된 바와 같이, 배양물의 부피 당(예를 들어, 생물반응기, 베셀, 또는 튜브 부피의 L 당) 하루에 생성되는 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 치료 단백질)의 질량 또는 효소 활성을 지칭한다. 재조합 항체에 대한 VPR은 일반적으로 [질량/L/일]로 측정된다. 재조합 효소에 대한 VPR은 일반적으로 [단위/L/일] 또는 [질량/L/일]로 측정된다.
- [0057] “스키드(skid)”는 당해 분야의 용어로서, 본원에 사용된 바와 같이, 본원에 기술된 시스템을 위한 플랫폼 또는 지지대 역할을 할 수 있는 3차원 입체 구조물을 지칭한다. 스키드가 이동을 가능하게 하는 하나 이상의 구조물(예를 들어, 휠, 롤러 등)을 포함하는 경우 시스템 또는 그 일부에 이동성을 부여한다. 스키드의 비제한적 예는 본원에 기술되어 있다. 스키드의 추가 예는 당해 분야에 알려져 있다.
- [0058] 달리 규정하지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 발명에서 사용하기 위한 방법 및 물질은 본원에 기술되어 있으며, 당해 분야에 공지된 다른 적합한 방법 및 물질이 또한 사용될 수 있다. 물질, 방법, 및 예는 단지 예시적인 것으로서, 제한적인 것으로 의도된 것은 아니다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허출원, 특허, 서열, 데이터 베이스 항목, 및 기타 참조문헌은 그 전체가 참조로 통합된다. 상충되는 경우에, 정의를 포함하는 본 명세서에 따른다.
- [0059] 본 발명의 다른 특징 및 장점들은 하기 상세한 설명 및 도면으로부터, 그리고 청구범위로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0060] 도 1은 500-L 생산용 관류 생물반응기의 접종으로 끝나는 종래의 시드 트레인 공정을 나타내는 개략도(상) 및 500-L 생산용 관류 생물반응기의 접종으로 끝나는 본원에 제공된 예시적 시드 트레인 공정의 개략도(하)이다.
- 도 2는 10,000-L 생산용 회분 또는 유가 생물반응기의 접종으로 끝나는 종래의 시드 트레인 공정을 나타내는 개략도(상) 및 10,000-L 생산용 회분 또는 유가 생물반응기의 접종으로 끝나는 본원에 제공된 예시적 시드 트레인 공정의 개략도(하)이다.
- 도 3은 본원에 기술된 예시적 시드 트레인 공정의 단계에 걸쳐 생세포 밀도를 나타내는 그래프이다: 2-L의 사용 후 버리는 1회용 생물반응기에서 1-L 제3 세포 배양물의 회분 배양, 20-L의 사용 후 버리는 1회용 생물반응기에서 7.5-L 제1 세포 배양물의 회분 배양, 및 15-L 관류 생물반응기에서 10-L 제2 세포 배양물의 관류 배양.
- 도 4는 본원에 기술된 예시적 시드 트레인 공정에서 N-1 관류 세포 배양물의 커패시턴스의 함수로써 나타난 생세포 밀도의 그래프이다.
- 도 5는 (생산용 생물반응기를 나타내는) 스핀 튜브에서 0.5×10^6 세포/mL의 출발 생세포 밀도를 얻기 위해 25

10^6 세포/mL(파란선), 50×10^6 세포/mL(녹색선), 또는 100×10^6 세포/mL(빨간선)의 생세포 밀도를 갖는 소정 부피의 N-1 세포 배양물로 접종된 스핀 튜브에 대한 시간 경과에 따른 생세포 밀도(실선) 및 백분율 세포 생존율(파선) 그래프이다. 실선 및 파선은 데이터의 평균($n = 3$)을 나타낸다. 음영 영역은 ± 2 표준 편차를 나타낸다.

도 6은 (생산용 생물반응기를 나타내는) 스핀 튜브에서 2.5×10^6 세포/mL의 출발 생세포 밀도를 얻기 위해 25×10^6 세포/mL(파란선), 50×10^6 세포/mL(녹색선), 또는 100×10^6 세포/mL(빨간선)의 생세포 밀도를 갖는 소정 부피의 N-1 세포 배양물로 접종된 스핀 튜브에 대한 시간 경과에 따른 생세포 밀도(실선) 및 백분율 세포 생존율(파선) 그래프이다. 실선 및 파선은 데이터의 평균($n = 3$)을 나타낸다. 음영 영역은 ± 2 표준 편차를 나타낸다.

도 7은 (생산용 생물반응기를 나타내는) 스핀 튜브에서 5.0×10^6 세포/mL의 출발 생세포 밀도를 얻기 위해 25×10^6 세포/mL(파란선), 50×10^6 세포/mL(녹색선), 또는 100×10^6 세포/mL(빨간선)의 생세포 밀도를 갖는 소정 부피의 N-1 세포 배양물로 접종된 스핀 튜브에 대한 시간 경과에 따른 생세포 밀도(실선) 및 백분율 세포 생존율(파선) 그래프이다. 실선 및 파선은 데이터의 평균($n = 3$)을 나타낸다. 음영 영역은 ± 2 표준 편차를 나타낸다.

도 8은 50×10^6 생세포/mL의 N-1 관류 생물반응기로부터 5.0×10^6 생세포/mL에서 접종된 10-L 생산용 생물반응기($n = 2$)(녹색선) 대비 2.5×10^6 생세포/mL의 N-1 관류 생물반응기로부터 0.5×10^6 세포/mL에서 접종된 10-L 생산용 생물반응기($n = 2$)(빨간선)에 대한 시간 경과에 따른 생세포 밀도를 나타낸 그래프이다. 파선은 생산용 생물반응기의 정상 상태 작동에 대한 목표 생세포 밀도를 나타낸다. 실선은 데이터의 평균($n = 2$)을 나타낸다. 음영 영역은 ± 2 표준 편차를 나타낸다.

도 9는 50×10^6 세포/mL의 N-1 생물반응기로부터 5.0×10^6 생세포/mL에서 접종된 10-L 생산용 생물반응기(녹색점) 대비 2.5×10^6 생세포/mL의 N-1 관류 생물반응기로부터 0.5×10^6 생세포/mL에서 접종된 10-L 생산용 생물반응기(빨간점)에 대한 적분 생세포 농도의 함수로써 누적 생산성(단위/L)을 나타낸 그래프이다. 점들은 데이터의 평균($n = 2$)을 나타내며, 에러바는 ± 2 표준 편차를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 제공된 시드 트레인 공정은 (a) 복수의 재조합 포유류 세포를 베셀 내에 포함된 제1 배양 배지 내에 배치하여 제1 세포 배양물을 제공하는 단계; (b) 제1 세포 배양물을 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 세포/mL의 세포 밀도 범위로 희분 배양하는 단계; (c) (b)의 소정 부피의 제1 세포 배양물을 관류 생물반응기 내에 포함된 제2 배양 배지 내에 배치하여 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 0.50×10^6 세포/mL 범위의 초기 세포 밀도를 가진 제2 세포 배양물을 제공하는 단계; (d) 제2 세포 배양물을 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 120×10^6 세포/mL의 세포 밀도 범위로 관류 배양하는 단계; 및 (e) (d)의 소정 부피의 제2 세포 배양물을 생산용 생물반응기 내에 포함된 제3 배양 배지 내에 배치하여 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 8.0×10^6 세포/mL 범위의 초기 세포 밀도를 가진 생산용 세포 배양물을 제공하는 단계를 포함한다.

[0062] 본원에 기술된 시드 트레인 공정은 많은 이익을 제공한다. 제1 양태에서, 본 시드 트레인 공정은 종래의 시드 트레인 공정에 비해 생산용 세포 배양물을 제공하기 전 배양 단계가 덜 필요하며(1 내지 2의 상이한 배양 단계 제거)(예를 들어, 소규모 확장 단계 수의 감소), 이는 결국 세포 배양의 수동 조작을 줄이고 생산용 세포 배양물의 오염 위험을 감소시킨다. 본원에 기술된 시드 트레인 공정은 생산용 세포 배양물의 배양 성장 특성을 손상시키지 않고 12일 내에, 예를 들어 최대 100×10^6 생세포/mL의, 높은 생세포 밀도를 가진 N-1 세포 배양물(생산용 세포 배양물을 접종하는 데 사용되는 제2 세포 배양물)을 얻을 수 있다. 본원에 기술된 시드 트레인 공정을 이용하여 N-1 배양물(제2 세포 배양물)에서 얻은 높은 생세포 밀도는 생산용 생물반응기에서 생산용 세포 배양물의 더 높은 초기 세포 밀도를 가능하게 한다. 예를 들어, 본 시드 트레인 공정은 약 0.50×10^6 생세포/mL 내지 10×10^6 생세포/mL의 초기 세포 밀도를 얻는 데 사용될 수 있고, 이는 결국 생산용 세포 배양물의 정상 상태 생산용 세포 밀도 도달 시간을 단축시킨다(예를 들어, 4~6일 단축). 생산용 세포 배양물의 정상 상태

생산용 세포 밀도 도달 시간의 이러한 단축은 50일 생산용 배양 작업의 전체 생산성을 10% 증가시킬 수 있다. 본원에 제공된 시드 트레인 공정은 또한, 다른 시드 트레인 공정에서 생성되는 생산용 세포 배양물보다 더 높은 부피 생산율 및 특정 생산율을 갖는 생산용 세포 배양물을 생성할 수 있다.

[0063] **시드 트레인 공정**

[0064] 다른 시드 트레인 공정에 비해 몇 가지 장점을 제공하는 시드 트레인 공정이 본원에 제공된다. 이러한 시드 트레인 공정의 비제한적 양태들은 본원에 기술되어 있으며, 임의의 조합으로 사용될 수 있다.

[0065] **제1 세포 배양물의 제공**

[0066] 본원에 기술된 시드 트레인 공정은 (a) 복수의 재조합 포유류 세포(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 알려진 임의의 재조합 포유류 세포)를 배셀 내에 포함된 제1 배양 배지 내에 배치하여 제1 세포 배양물을 제공하는 단계를 포함한다. 일부 예에서, 제1 배양 배지 내에 배치되는 복수의 재조합 포유류 세포는 약 4.5×10^7 세포 내지 약 450×10^7 세포(예를 들어, 약 9.0×10^7 세포 내지 약 450×10^7 세포, 약 22.5×10^7 세포 내지 약 450×10^7 세포, 약 45×10^7 세포 내지 약 450×10^7 세포, 약 67.5×10^7 세포 내지 약 450×10^7 세포, 약 90×10^7 세포 내지 약 450×10^7 세포, 약 112.5×10^7 세포 내지 약 450×10^7 세포, 약 135×10^7 세포 내지 약 450×10^7 세포, 약 157.5×10^7 세포 내지 약 450×10^7 세포, 약 180×10^7 내지 약 450×10^7 세포, 약 4.5×10^7 세포 내지 약 405×10^7 세포, 약 9.0×10^7 세포 내지 약 405×10^7 세포, 약 22.5×10^7 세포 내지 약 405×10^7 세포, 약 45×10^7 내지 약 405×10^7 세포, 약 67.5×10^7 세포 내지 약 405×10^7 세포, 약 90×10^7 내지 약 405×10^7 세포, 약 112.5×10^7 내지 약 405×10^7 세포, 약 135×10^7 세포 내지 약 405×10^7 세포, 약 157.5×10^7 세포 내지 약 405×10^7 세포, 약 180×10^7 세포 내지 약 405×10^7 세포, 약 4.5×10^7 세포 내지 약 360×10^7 세포, 약 9.0×10^7 세포 내지 약 360×10^7 세포, 약 22.5×10^7 세포 내지 약 360×10^7 세포, 약 45×10^7 세포 내지 약 360×10^7 세포, 약 67.5×10^7 세포 내지 약 360×10^7 세포, 약 90×10^7 세포 내지 약 360×10^7 세포, 약 112.5×10^7 세포 내지 약 360×10^7 세포, 약 135×10^7 세포 내지 약 360×10^7 세포, 약 157.5×10^7 세포 내지 약 360×10^7 세포, 약 180×10^7 세포 내지 약 360×10^7 세포, 약 4.5×10^7 세포 내지 약 315×10^7 세포, 약 9.0×10^7 세포 내지 약 315×10^7 세포/mL, 약 22.5×10^7 세포 내지 약 315×10^7 세포, 약 45×10^7 세포 내지 약 315×10^7 세포, 약 67.5×10^7 세포 내지 약 315×10^7 세포, 약 90×10^7 세포 내지 약 315×10^7 세포, 약 112.5×10^7 세포 내지 약 315×10^7 세포, 약 135×10^7 세포 내지 약 315×10^7 세포, 약 157.5×10^7 세포 내지 약 315×10^7 세포, 약 180×10^7 세포 내지 약 315×10^7 세포, 약 4.5×10^7 세포 내지 약 270×10^7 세포, 약 9.0×10^7 세포 내지 약 270×10^7 세포, 약 22.5×10^7 세포 내지 약 270×10^7 세포, 약 45×10^7 세포 내지 약 270×10^7 세포, 약 67.5×10^7 세포 내지 약 270×10^7 세포, 약 90×10^7 세포 내지 약 270×10^7 세포, 약 112.5×10^7 세포 내지 약 270×10^7 세포, 약 135×10^7 세포 내지 약 270×10^7 세포, 약 157.5×10^7 세포 내지 약 270×10^7 세포, 약 180×10^7 세포 내지 약 270×10^7 세포, 약 4.5×10^7 세포 내지 약 225×10^7 세포, 약 9.0×10^7 세포 내지 약 225×10^7 세포, 약 22.5×10^7 세포 내지 약 225×10^7 세포, 약 45×10^7 세포 내지 약 225×10^7 세포, 약 67.5×10^7 세포 내지 약 225×10^7 세포, 약 90×10^7 세포 내지 약 225×10^7 세포, 약 112.5×10^7 세포 내지 약 225×10^7 세포, 약 135×10^7 세포 내지 약 225×10^7 세포, 약 4.5×10^7 세포 내지 약 180×10^7 세포, 약 9.0×10^7 세포 내지 약 180×10^7 세포, 약 22.5×10^7 내지 약 180×10^7 세포, 약 45×10^7 세포 내지 약 180×10^7 세포, 약 67.5×10^7 내지 약 180×10^7 세포, 약 90×10^7 내지 약 180×10^7 세포, 약 4.5×10^7 세포 내지 약 135×10^7 세포, 약 9.0×10^7 내지 약 135×10^7 세포, 약 22.5×10^7 세포 내지 약 135×10^7 세포, 약 45×10^7 세포 내지 약 135×10^7 세포, 약 4.5×10^7 세포 내지 약 90×10^7 세포, 약 9.0×10^7 세포 내지 약 90×10^7 세포, 약 22.5×10^7 세포 내지 약 90×10^7

세포, 또는 약 45×10^7 내지 약 90×10^7 세포)일 수 있고, 베셀 내에 포함된 제1 배양 배지의 부피에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 제1 액체 배양 배지에 배치되는 복수의 세포는 제1 세포 배양물에서 약 0.10×10^6 내지 약 0.80×10^6 세포/mL(예를 들어, 약 0.10×10^6 세포/mL 내지 약 0.75×10^6 세포/mL, 약 0.10×10^6 세포/mL 내지 약 0.70×10^6 세포/mL, 약 0.10×10^6 세포/mL 내지 약 0.65×10^6 세포/mL, 약 0.10×10^6 세포/mL 내지 약 0.60×10^6 세포/mL, 약 0.10×10^6 세포/mL 내지 약 0.55×10^6 세포/mL, 약 0.10×10^6 세포/mL 내지 약 0.50×10^6 세포/mL, 약 0.10×10^6 세포/mL 내지 약 0.45×10^6 세포/mL, 약 0.10×10^6 세포/mL 내지 약 0.40×10^6 세포/mL, 약 0.10×10^6 세포/mL 내지 약 0.35×10^6 세포/mL, 약 0.10×10^6 세포/mL 내지 약 0.30×10^6 세포/mL, 약 0.15×10^6 세포/mL 내지 약 0.80×10^6 세포/mL, 약 0.15×10^6 세포/mL 내지 약 0.75×10^6 세포/mL, 약 0.15×10^6 세포/mL 내지 약 0.70×10^6 세포/mL, 약 0.15×10^6 세포/mL 내지 약 0.65×10^6 세포/mL, 약 0.15×10^6 세포/mL 내지 약 0.60×10^6 세포/mL, 약 0.15×10^6 세포/mL 내지 약 0.55×10^6 세포/mL, 약 0.15×10^6 세포/mL 내지 약 0.50×10^6 세포/mL, 약 0.15×10^6 세포/mL 내지 약 0.45×10^6 세포/mL, 약 0.15×10^6 세포/mL 내지 약 0.40×10^6 세포/mL, 약 0.15×10^6 세포/mL 내지 약 0.35×10^6 세포/mL, 약 0.20×10^6 세포/mL 내지 약 0.80×10^6 세포/mL, 약 0.20×10^6 세포/mL 내지 약 0.75×10^6 세포/mL, 약 0.20×10^6 세포/mL 내지 약 0.70×10^6 세포/mL, 약 0.20×10^6 세포/mL 내지 약 0.65×10^6 세포/mL, 약 0.20×10^6 세포/mL 내지 약 0.60×10^6 세포/mL, 약 0.20×10^6 세포/mL 내지 약 0.55×10^6 세포/mL, 약 0.20×10^6 세포/mL 내지 약 0.50×10^6 세포/mL, 약 0.20×10^6 세포/mL 내지 약 0.45×10^6 세포/mL, 약 0.20×10^6 세포/mL 내지 약 0.40×10^6 세포/mL, 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 0.75×10^6 세포/mL, 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 0.70×10^6 세포/mL, 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 0.65×10^6 세포/mL, 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 0.60×10^6 세포/mL, 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 0.55×10^6 세포/mL, 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 0.50×10^6 세포/mL, 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 0.45×10^6 세포/mL, 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 0.40×10^6 세포/mL, 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 0.35×10^6 세포/mL, 약 0.30×10^6 세포/mL 내지 약 0.80×10^6 세포/mL, 약 0.30×10^6 세포/mL 내지 약 0.75×10^6 세포/mL, 약 0.30×10^6 세포/mL 내지 약 0.70×10^6 세포/mL, 약 0.30×10^6 세포/mL 내지 약 0.65×10^6 세포/mL, 약 0.30×10^6 세포/mL 내지 약 0.60×10^6 세포/mL, 약 0.30×10^6 세포/mL 내지 약 0.55×10^6 세포/mL, 약 0.30×10^6 세포/mL 내지 약 0.50×10^6 세포/mL, 약 0.30×10^6 세포/mL 내지 약 0.45×10^6 세포/mL, 또는 약 0.30×10^6 내지 약 0.40×10^6 세포/mL)의 초기 세포 밀도를 얻기에 충분할 수 있다.

[0067] 당해 분야에서 이해될 수 있는 바와 같이, 단계 (a)의 베셀은 여러 상이한 부피를 가질 수 있다. 예를 들어, 제1 배양 배지를 포함하는 단계 (a)의 베셀은 약 0.50 L 내지 약 200 L(예를 들어, 약 0.50 L 내지 약 180 L, 약 0.50 L 내지 약 160 L, 약 0.50 L 내지 약 140 L, 약 0.50 L 내지 약 120 L, 약 0.50 L 내지 약 100 L, 약 0.50 L 내지 약 90 L, 약 0.50 L 내지 약 80 L, 약 0.50 L 내지 약 70 L, 약 0.50 L 내지 약 60 L, 약 0.50 L 내지 약 50 L, 약 0.50 L 내지 약 40 L, 약 0.50 L 내지 약 30 L, 약 0.50 L 내지 약 20 L, 약 0.50 L 내지 약 10 L, 약 0.50 L 내지 약 5.0 L, 약 1.0 L 내지 약 200 L, 약 1.0 L 내지 약 180 L, 약 1.0 L 내지 약 160 L, 약 1.0 L 내지 약 140 L, 약 1.0 L 내지 약 120 L, 약 1.0 L 내지 약 100 L, 약 1.0 L 내지 약 90 L, 약 1.0 L 내지 약 80 L, 약 1.0 L 내지 약 70 L, 약 1.0 L 내지 약 60 L, 약 1.0 L 내지 약 50 L, 약 1.0 L 내지 약 40 L, 약 1.0 L 내지 약 30 L, 약 1.0 L 내지 약 20 L, 약 1.0 L 내지 약 10 L, 약 1.0 L 내지 약 5.0 L, 약 1.5 L 내지 약 200 L, 약 1.5 L 내지 약 180 L, 약 1.5 L 내지 약 160 L, 약 1.5 L 내지 약 140 L, 약 1.5 L 내지 약 120 L, 약 1.5 L 내지 약 100 L, 약 1.5 L 내지 약 90 L, 약 1.5 L 내지 약 80 L, 약 1.5 L 내지 약 70 L, 약 1.5 L 내지 약 60 L, 약 1.5 L 내지 약 50 L, 약 1.5 L 내지 약 40 L, 약 1.5 L 내지 약 30 L, 약 1.5 L 내지 약 20 L, 약 1.5 L 내지 약 10 L, 약 1.5 L 내지 약 5.0 L, 약 2.0 L 내지 약 200 L, 약 2.0 L 내지 약 180 L, 약 2.0 L 내지 약 160 L, 약 2.0 L 내지 약 140 L, 약 2.0 L 내지 약 120 L, 약 2.0 L 내지 약 100 L, 약 2.0 L 내지 약 90 L, 약 2.0 L 내지 약 80 L, 약 2.0 L 내지 약 70 L, 약 2.0 L 내지 약 60 L, 약 2.0 L 내지

약 50 L, 약 2.0 L 내지 약 40 L, 약 2.0 L 내지 약 30 L, 약 2.0 L 내지 약 20 L, 약 2.0 L 내지 약 10 L, 약 2.0 L 내지 약 5.0 L, 약 2.5 L 내지 약 200 L, 약 2.5 L 내지 약 180 L, 약 2.5 L 내지 약 160 L, 약 2.5 L 내지 약 140 L, 약 2.5 L 내지 약 120 L, 약 2.5 L 내지 약 100 L, 약 2.5 L 내지 약 90 L, 약 2.5 L 내지 약 80 L, 약 2.5 L 내지 약 70 L, 약 2.5 L 내지 약 60 L, 약 2.5 L 내지 약 50 L, 약 2.5 L 내지 약 50 L, 약 2.5 L 내지 약 40 L, 약 2.5 L 내지 약 30 L, 약 2.5 L 내지 약 20 L, 약 2.5 L 내지 약 10 L, 약 2.5 L 내지 약 5.0 L, 약 5.0 L 내지 약 200 L, 약 5.0 L 내지 약 180 L, 약 5.0 L 내지 약 160 L, 약 5.0 L 내지 약 140 L, 약 5.0 L 내지 약 120 L, 약 5.0 L 내지 약 100 L, 약 5.0 L 내지 약 90 L, 약 5.0 L 내지 약 80 L, 약 5.0 L 내지 약 70 L, 약 5.0 L 내지 약 60 L, 약 5.0 L 내지 약 50 L, 약 5.0 L 내지 약 40 L, 약 5.0 L 내지 약 30 L, 약 5.0 L 내지 약 20 L, 또는 약 5.0 L 내지 약 10 L)의 내부 용적을 가질 수 있다.

[0068] 당해 분야에서 이해될 수 있는 바와 같이, 제1 세포 배양물을 포함하는 베셀은 포유류 세포를 배양하기 위한 당해 분야에서 사용되는 임의의 장치(예를 들어, 플라스크(예를 들어, 스핀 플라스크), 롤링 튜브, 또는 생물반응기)일 수 있다. 베셀은 교반용 내부 수단(예를 들어, 임펠러)을 포함할 수 있거나, 베셀은 외부에서(예를 들어, 회전 및/또는 틸팅하는 플랫폼을 사용하여) 교반될 수 있다. 베셀은 스테인리스 스틸 또는 플라스틱(예를 들어, 플라스틱 멸균 백)으로 만들 수 있다. 일부 구현예에서, 베셀은 사용 후 버리는 1회용 생물반응기(예를 들어, Millipore™ Mobius® Cellready 3L 1회용 생물반응기, Pierre Guerin ATM1 Nucleo™ 20 L 1회용 생물반응기, Sartorius Cultibag STR™ 50 L 1회용 생물반응기, Sartorius Cultibag RMT™ 20 L, Sartorius Cultibag Orbital™ 50 L, GE Wave 생물반응기 2/10 시스템 5 L, GE Wave 생물반응기 20/50 시스템 25 L, GE Wave 생물반응기 200 시스템 200 L, 또는 GE Wave 생물반응기 500/1000 시스템 500 L)일 수 있다. 베셀의 내부 표면은 적어도 하나의 코팅(예를 들어, 젤라틴, 콜라겐, 폴리-L-오르니틴, 폴리스티렌, 및 라미닌 중 적어도 하나의 코팅)을 가질 수 있고, 당해 분야에 알려진 바와 같이, 제1 액체 배양 배지에 O_2 , CO_2 , 및 N_2 를 뿌리기 위한 하나 이상의 포트를 가질 수 있다. 베셀은 하나 이상의 센서 프로브를 구비할 수 있다. 베셀이 연결 플라스틱 재료(예를 들어, 플라스틱 멸균 백)로 이루어진 경우, 베셀은 베셀을 둘러싸고 지지하는 외부 지지물에 연결될 수 있다.

[0069] 제1 세포 배양물은 여러 상이한 부피를 가질 수 있는데, 예를 들어 제1 세포 배양물은 약 0.30 L 내지 약 100 L(예를 들어, 약 0.30 L 내지 약 90 L, 약 0.30 L 내지 약 80 L, 약 0.30 L 내지 약 70 L, 약 0.30 L 내지 약 60 L, 약 0.30 L 내지 약 50 L, 약 0.30 L 내지 약 40 L, 약 0.30 L 내지 약 30 L, 약 0.30 L 내지 약 20 L, 약 0.30 L 내지 약 10 L, 약 0.30 L 내지 약 5.0 L, 약 0.50 L 내지 약 100 L, 약 0.50 L 내지 약 90 L, 약 0.50 L 내지 약 80 L, 약 0.50 L 내지 약 70 L, 약 0.50 L 내지 약 60 L, 약 0.50 L 내지 약 50 L, 약 0.50 L 내지 약 40 L, 약 0.50 L 내지 약 30 L, 약 0.50 L 내지 약 20 L, 약 0.50 L 내지 약 10 L, 약 0.50 L 내지 약 5.0 L, 약 1.0 L 내지 약 100 L, 약 1.0 L 내지 약 90 L, 약 1.0 L 내지 약 80 L, 약 1.0 L 내지 약 70 L, 약 1.0 L 내지 약 60 L, 약 1.0 L 내지 약 50 L, 약 1.0 L 내지 약 40 L, 약 1.0 L 내지 약 30 L, 약 1.0 L 내지 약 20 L, 약 1.0 L 내지 약 10 L, 약 1.0 L 내지 약 5.0 L, 약 1.5 L 내지 약 100 L, 약 1.5 L 내지 약 90 L, 약 1.5 L 내지 약 80 L, 약 1.5 L 내지 약 70 L, 약 1.5 L 내지 약 60 L, 약 1.5 L 내지 약 50 L, 약 1.5 L 내지 약 40 L, 약 1.5 L 내지 약 30 L, 약 1.5 L 내지 약 20 L, 약 1.5 L 내지 약 10 L, 약 1.5 L 내지 약 5.0 L, 약 2.0 L 내지 약 100 L, 약 2.0 L 내지 약 90 L, 약 2.0 L 내지 약 80 L, 약 2.0 L 내지 약 70 L, 약 2.0 L 내지 약 60 L, 약 2.0 L 내지 약 50 L, 약 2.0 L 내지 약 40 L, 약 2.0 L 내지 약 30 L, 약 2.0 L 내지 약 20 L, 약 2.0 L 내지 약 10 L, 약 2.0 L 내지 약 5.0 L, 약 2.5 L 내지 약 100 L, 약 2.5 L 내지 약 90 L, 약 2.5 L 내지 약 80 L, 약 2.5 L 내지 약 70 L, 약 2.5 L 내지 약 60 L, 약 2.5 L 내지 약 50 L, 약 2.5 L 내지 약 40 L, 약 2.5 L 내지 약 30 L, 약 2.5 L 내지 약 20 L, 약 2.5 L 내지 약 10 L, 약 2.5 L 내지 약 5.0 L, 약 5.0 L 내지 약 100 L, 약 5.0 L 내지 약 90 L, 약 5.0 L 내지 약 80 L, 약 5.0 L 내지 약 70 L, 약 5.0 L 내지 약 60 L, 약 5.0 L 내지 약 50 L, 약 5.0 L 내지 약 40 L, 약 5.0 L 내지 약 30 L, 약 5.0 L 내지 약 20 L, 또는 약 5.0 L 내지 약 10 L)의 부피를 가질 수 있다.

[0070] 당해 분야에서 이해될 수 있는 바와 같이, 베셀에 포함된 제1 배양 배지 내에 복수의 세포를 배치할 수 있는 많은 방법이 있다. 예를 들어, 복수의 제조합 포유류 세포를 배치하는 단계는 냉동 세포은행(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 알려진 임의의 예시적 냉동 세포은행)을 해동하는 단계, 및 소정 부피의 해동된 세포은행을 제1 배양 배지 내에 배치(예를 들어, 멸균 피펫팅)하는 단계를 포함할 수 있다. 냉동 세포은행은, 예를 들어 약 1.0×10^7 세포/mL 내지 약 100×10^7 세포/mL(예를 들어, 약 2.0×10^7 세포/mL 내지 약 100×10^7 세포/mL, 약 5.0×10^7 세포/mL 내지 약 100×10^7 세포/mL, 약 10×10^7 세포/mL 내지 약 100×10^7 세포/mL, 약

15×10^7 세포/mL 내지 약 100×10^7 세포/mL, 약 20×10^7 세포/mL 내지 약 100×10^7 세포/mL, 약 25×10^7 세포/mL 내지 약 100×10^7 세포/mL, 약 30×10^7 세포/mL 내지 약 100×10^7 세포/mL, 약 35×10^7 세포/mL 내지 약 100×10^7 세포/mL, 약 40×10^7 세포/mL 내지 약 100×10^7 세포/mL, 약 1.0×10^7 세포/mL 내지 약 90×10^7 세포/mL, 약 2.0×10^7 세포/mL 내지 약 90×10^7 세포/mL, 약 5.0×10^7 세포/mL 내지 약 90×10^7 세포/mL, 약 10×10^7 세포/mL 내지 약 90×10^7 세포/mL, 약 15×10^7 세포/mL 내지 약 90×10^7 세포/mL, 약 20×10^7 세포/mL 내지 약 90×10^7 세포/mL, 약 25×10^7 세포/mL 내지 약 90×10^7 세포/mL, 약 30×10^7 세포/mL 내지 약 90×10^7 세포/mL, 약 35×10^7 세포/mL 내지 약 90×10^7 세포/mL, 약 40×10^7 세포/mL 내지 약 90×10^7 세포/mL, 약 1.0×10^7 세포/mL 내지 약 80×10^7 세포/mL, 약 2.0×10^7 세포/mL 내지 약 80×10^7 세포/mL, 약 5.0×10^7 세포/mL 내지 약 80×10^7 세포/mL, 약 10×10^7 내지 약 80×10^7 세포/mL, 약 15×10^7 세포/mL 내지 약 80×10^7 세포/mL, 약 20×10^7 세포/mL 내지 약 80×10^7 세포/mL, 약 25×10^7 세포/mL 내지 약 80×10^7 세포/mL, 약 30×10^7 세포/mL 내지 약 80×10^7 세포/mL, 약 35×10^7 세포/mL 내지 약 80×10^7 세포/mL, 약 40×10^7 세포/mL 내지 약 80×10^7 세포/mL, 약 1.0×10^7 세포/mL 내지 약 70×10^7 세포/mL, 약 2.0×10^7 세포/mL 내지 약 70×10^7 세포/mL, 약 5.0×10^7 세포/mL 내지 약 70×10^7 세포/mL, 약 10×10^7 세포/mL 내지 약 70×10^7 세포/mL, 약 15×10^7 세포/mL 내지 약 70×10^7 세포/mL, 약 20×10^7 세포/mL 내지 약 70×10^7 세포/mL, 약 25×10^7 세포/mL 내지 약 70×10^7 세포/mL, 약 30×10^7 세포/mL 내지 약 70×10^7 세포/mL, 약 35×10^7 세포/mL 내지 약 70×10^7 세포/mL, 약 40×10^7 세포/mL 내지 약 70×10^7 세포/mL, 약 1.0×10^7 세포/mL 내지 약 60×10^7 세포/mL, 약 2.0×10^7 세포/mL 내지 약 60×10^7 세포/mL, 약 5.0×10^7 내지 약 60×10^7 세포/mL, 약 10×10^7 세포/mL 내지 약 60×10^7 세포/mL, 약 15×10^7 세포/mL 내지 약 60×10^7 세포/mL, 약 20×10^7 세포/mL 내지 약 60×10^7 세포/mL, 약 25×10^7 세포/mL 내지 약 60×10^7 세포/mL, 약 30×10^7 내지 약 60×10^7 세포/mL, 약 35×10^7 세포/mL 내지 약 60×10^7 세포/mL, 약 40×10^7 세포/mL 내지 약 60×10^7 세포/mL, 약 1.0×10^7 세포/mL 내지 약 50×10^7 세포/mL, 약 2.0×10^7 세포/mL 내지 약 50×10^7 세포/mL, 약 5.0×10^7 세포/mL 내지 약 50×10^7 세포/mL, 약 10×10^7 세포/mL 내지 약 50×10^7 세포/mL, 약 15×10^7 세포/mL 내지 약 50×10^7 세포/mL, 약 20×10^7 세포/mL 내지 약 50×10^7 세포/mL, 약 25×10^7 세포/mL 내지 약 50×10^7 세포/mL, 또는 약 30×10^7 세포/mL 내지 약 50×10^7 세포/mL)의 세포 밀도 범위를 가질 수 있다. 이러한 냉동 세포은행을 생성하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 2013년 3월 15일 출원된 미국 가특허출원 제61,793,021호, 2014년 3월 14일 출원된 미국 특허출원 제14/212,607호, 및 2014년 3월 14일에 출원된 국제출원 제 PCT/US2014/027757호를 참조). 당해 분야에 잘 알려진 바와 같이, 냉동 세포은행의 해동은, (실온에 노출시키는 것이 아니라) 예를 들어, 냉동 세포은행을 (예를 들어, 30℃ 또는 37℃로 설정된) 수조 또는 블록 히터와 같은 가열 요소에 노출시켜 수행될 수 있다. 일부 예에서, 해동은 1초 내지 1분, 1초 내지 55초, 1초 내지 50초, 1초 내지 45초, 1초 내지 40초, 1초 내지 35초, 1초 내지 30초, 1초 내지 25초, 또는 1초 내지 20초의 기간에 걸쳐 수행될 수 있다. 냉동 세포은행을 실온(예를 들어, 약 25℃)에 노출시켜 냉동 세포은행을 해동할 수도 있다. 냉동 세포은행은, 예를 들어 적어도 60%(예를 들어, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%) 백분율의 생세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, 냉동 세포은행은 60% 내지 약 98%(예를 들어, 약 60% 내지 약 95%, 약 60% 내지 약 90%, 약 60% 내지 약 85%, 약 60% 내지 약 80%, 약 60% 내지 약 75%, 약 60% 내지 약 70%, 약 65% 내지 약 98%, 약 65% 내지 약 95%, 약 65% 내지 약 90%, 약 65% 내지 약 85%, 약 65% 내지 약 80%, 약 65% 내지 약 75%, 약 70% 내지 약 98%, 약 70% 내지 약 95%, 약 70% 내지 약 90%, 약 70% 내지 약 85%, 약 70% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 98%, 약 80% 내지 약 95%, 약 80% 내지 약 90%, 약 85% 내지 약 98%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 98%, 또는 약 90% 내지 약 95%) 백분율의 생세포를 포함할 수 있다.

[0071] 일부 예에서, 복수의 재조합 포유류 세포를 제1 배양 배지 내에 배치하여 제1 세포 배양물을 생성하는 단계는, 복수의 재조합 포유류 세포를 포함하는 소정 부피의 제3 세포 배양물을 제1 배양 배지 내에 배치하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 제1 배양 배지 내에 배치되는 제3 배양물의 부피는, 예를 들어 0.10 mL 내지 약 10

L(예를 들어, 약 0.10 mL 내지 약 8.0 L, 약 0.10 mL 내지 약 6.0 L, 약 0.10 mL 내지 약 4.0 L, 약 0.10 mL 내지 약 2.0 L, 약 0.10 mL 내지 약 1.0 L, 약 0.10 mL 내지 약 800 mL, 약 0.10 mL 내지 약 600 mL, 약 0.10 mL 내지 약 400 mL, 약 0.10 mL 내지 약 200 mL, 약 0.10 mL 내지 약 100 mL, 약 0.10 mL 내지 약 50 mL, 약 0.10 mL 내지 약 25 mL, 약 0.10 mL 내지 약 10 mL, 약 0.50 mL 내지 약 10 L, 약 0.50 mL 내지 약 8.0 L, 약 0.50 mL 내지 약 6.0 L, 약 0.50 mL 내지 약 4.0 L, 약 0.50 mL 내지 약 2.0 L, 약 0.50 mL 내지 약 1.0 L, 약 0.50 mL 내지 약 800 mL, 약 0.50 mL 내지 약 600 mL, 약 0.50 mL 내지 약 400 mL, 약 0.50 mL 내지 약 200 mL, 약 0.50 mL 내지 약 100 mL, 약 0.50 mL 내지 약 50 mL, 약 0.50 mL 내지 약 25 mL, 약 1.0 mL 내지 약 10 L, 약 1.0 mL 내지 약 8.0 L, 약 1.0 mL 내지 약 6.0 L, 약 1.0 mL 내지 약 4.0 L, 약 1.0 mL 내지 약 2.0 L, 약 1.0 mL 내지 약 1.0 L, 약 1.0 mL 내지 약 800 mL, 약 1.0 mL 내지 약 600 mL, 약 1.0 mL 내지 약 400 mL, 약 1.0 mL 내지 약 200 mL, 약 0.10 mL 내지 약 100 mL, 약 1.0 mL 내지 약 50 mL, 약 1.0 mL 내지 약 25 mL, 약 2.0 mL 내지 약 10 L, 약 2.0 mL 내지 약 8.0 L, 약 2.0 mL 내지 약 6.0 L, 약 2.0 mL 내지 약 4.0 L, 약 2.0 mL 내지 약 2.0 L, 약 2.0 mL 내지 약 1.0 L, 약 2.0 mL 내지 약 800 mL, 약 2.0 mL 내지 약 600 mL, 약 2.0 mL 내지 약 400 mL, 약 2.0 mL 내지 약 200 mL, 약 2.0 mL 내지 약 100 mL, 약 2.0 mL 내지 약 50 mL, 약 2.0 mL 내지 약 25 mL, 약 5.0 mL 내지 약 10 L, 약 5.0 mL 내지 약 8.0 L, 약 5.0 mL 내지 약 6.0 L, 약 5.0 mL 내지 약 4.0 L, 약 5.0 mL 내지 약 2.0 L, 약 5.0 mL 내지 약 1.0 L, 약 5.0 mL 내지 약 800 mL, 약 5.0 mL 내지 약 600 mL, 약 5.0 mL 내지 약 400 mL, 약 5.0 mL 내지 약 200 mL, 약 5.0 mL 내지 약 100 mL, 약 5.0 mL 내지 약 50 mL, 약 5.0 mL 내지 약 25.0 mL, 약 10.0 mL 내지 약 10 L, 약 10.0 mL 내지 약 8.0 L, 약 10.0 mL 내지 약 6.0 L, 약 10.0 mL 내지 약 4.0 L, 약 10.0 mL 내지 약 2.0 L, 약 10.0 mL 내지 약 1.0 L, 약 10.0 mL 내지 약 800 mL, 약 10.0 mL 내지 약 600 mL, 약 10.0 mL 내지 약 400 mL, 약 10.0 mL 내지 약 200 mL, 약 10.0 mL 내지 약 100 mL, 약 10.0 mL 내지 약 50 mL, 또는 약 10.0 mL 내지 약 25.0 mL)일 수 있다. 제1 배양 배지 내에 배치되는 제3 세포 배양물의 세포 밀도는 임의의 예시적 세포 밀도 또는 본원에 기술된 세포 밀도 범위일 수 있다. 당업자에 의해 이해될 수 있는 바와 같이, 약 0.10×10^6 세포/mL 내지 약 0.80×10^6 세포/mL(또는 앞서 제1 세포 배양물에 대해 열거한 초기 세포 밀도 중 임의의 다른 예시적 범위)의 초기 세포 밀도로 제1 세포 배양물을 생성하기에 충분한 제3 세포 배양물의 부피는, (제1 배양 배지 내에 제3 세포 배양물을 배치하기 전에) 제3 세포 배양물의 세포 밀도와 베셀에 존재하는 제1 액체 배양 배지의 부피로부터 결정될 수 있다.

[0072] 제3 세포 배양물을 사용하는 일부 구현에는, 복수의 재조합 포유류 세포를 베셀 내에 포함된 제4 배양 배지 내에 배치하여 제3 세포 배양물을 제공하는 단계, 및 (2) (1)의 제3 세포 배양물을 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 15.0×10^6 세포/mL(예를 들어, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 12.5×10^6 세포/mL, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 10.0×10^6 세포/mL, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 7.5×10^6 세포/mL, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 세포/mL, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 2.5×10^6 세포/mL, 약 1.5×10^6 세포/mL 내지 약 15.0×10^6 세포/mL, 약 1.5×10^6 세포/mL 내지 약 12.5×10^6 세포/mL, 약 1.5×10^6 세포/mL 내지 약 10×10^6 세포/mL, 약 1.5×10^6 세포/mL 내지 약 7.5×10^6 세포/mL, 약 1.5×10^6 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 세포/mL, 약 1.5×10^6 세포/mL 내지 약 2.5×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 15×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 12.5×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 10×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 7.5×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 2.5×10^6 세포/mL, 약 2.5×10^6 세포/mL 내지 약 15×10^6 세포/mL, 약 2.5×10^6 세포/mL 내지 약 12.5×10^6 세포/mL, 약 2.5×10^6 세포/mL 내지 약 10×10^6 세포/mL, 약 2.5×10^6 세포/mL 내지 약 7.5×10^6 세포/mL, 약 2.5×10^6 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 15×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 12.5×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 10×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 7.5×10^6 세포/mL, 약 7.5×10^6 세포/mL 내지 약 15×10^6 세포/mL, 약 7.5×10^6 세포/mL 내지 약 12.5×10^6 세포/mL, 약 7.5×10^6 세포/mL 내지 약 10×10^6 세포/mL, 약 10×10^6 세포/mL 내지 약 15×10^6 세포/mL, 또는 약 10×10^6 세포/mL 내지 약 12.5×10^6 세포/mL)의 세포 밀도 범위로 회분 배양하는 단계를 포함할 수 있고, 여기서 (2)의 소정 부피의 제3 세포 배양물은 이후 제1 배양 배지 내에 배치되어 제1 세포 배양

물을 생성한다. 제4 배양 배지 내에 배치되는 복수의 세포는, 예를 들어 약 0.10×10^7 세포 내지 약 20×10^7 세포(예를 들어, 약 0.10×10^7 세포 내지 약 15×10^7 세포, 약 0.10×10^7 세포 내지 약 10×10^7 세포, 약 0.10×10^7 세포 내지 약 5.0×10^7 세포, 약 0.10×10^7 세포 내지 약 2.0×10^7 세포, 약 0.10×10^7 세포 내지 약 1.0×10^7 세포, 약 0.10×10^7 세포 내지 약 0.50×10^7 세포, 약 0.20×10^7 세포 내지 약 20×10^7 세포, 약 0.20×10^7 세포 내지 약 15×10^7 세포, 약 0.20×10^7 세포 내지 약 10×10^7 세포, 약 0.20×10^7 세포 내지 약 5.0×10^7 세포, 약 0.20×10^7 세포 내지 약 2.0×10^7 세포, 약 0.20×10^7 세포 내지 약 1.0×10^7 세포, 약 0.20×10^7 세포 내지 약 0.50×10^7 세포, 약 0.40×10^7 세포 내지 약 20×10^7 세포, 약 0.40×10^7 세포 내지 약 15×10^7 세포, 약 0.40×10^7 세포 내지 약 10×10^7 세포, 약 0.40×10^7 세포 내지 약 5.0×10^7 세포, 약 0.40×10^7 세포 내지 약 2.0×10^7 세포, 약 0.40×10^7 세포 내지 약 1.0×10^7 세포, 약 0.60×10^7 세포 내지 약 20×10^7 세포, 약 0.60×10^7 세포 내지 약 15×10^7 세포, 약 0.60×10^7 세포 내지 약 10×10^7 세포, 약 0.60×10^7 세포 내지 약 5×10^7 세포, 약 0.60×10^7 세포 내지 약 2×10^7 세포, 약 0.60×10^7 세포 내지 약 1×10^7 세포, 약 0.80×10^7 세포 내지 약 1.0×10^7 세포, 약 1.0×10^7 세포 내지 약 20×10^7 세포, 약 1.0×10^7 세포 내지 약 15×10^7 세포, 약 1.0×10^7 세포 내지 약 10×10^7 세포, 약 1.0×10^7 세포 내지 약 5.0×10^7 세포, 약 1.0×10^7 세포 내지 약 2.0×10^7 세포, 약 5.0×10^7 세포 내지 약 20×10^7 세포, 약 5.0×10^7 세포 내지 약 15×10^7 세포, 또는 약 5.0×10^7 세포 내지 약 10×10^7 세포)일 수 있으며, 베셀 내에 포함된 제4 배양 배지의 부피에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 제3 액체 배양 배지에 배치되는 복수의 세포는 제3 세포 배양물에서 약 0.10×10^6 세포/mL 내지 약 0.80×10^6 세포/mL의 초기 세포 밀도(예를 들어, 임의의 예시적 초기 세포 밀도 또는 제1 세포 배양물에 대해 앞서 열거한 초기 세포 밀도 범위)를 얻기에 충분할 수 있다.

[0073] 일부 구현예에서, 복수의 제조합 포유류 세포를 제4 배양 배지 내에 배치하여 제3 세포 배양물을 생성하는 단계는 냉동 세포은행을 해동하는 단계 및 소정 부피의 해동된 세포은행을 제4 배양 배지 내에 배치하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 구현예에서, 냉동 세포은행은 임의의 세포 밀도 또는 본원에 기술된 냉동 세포은행에 대한 세포 밀도 범위를 가질 수 있다. 냉동 세포은행은 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 방법을 이용하여 해동될 수 있다. 생성된 해동 세포은행은 임의의 생세포 백분을 또는 본원에 기술된 해동 세포은행에 대한 임의의 생세포 백분 범위를 가질 수 있다.

[0074] 제3 세포 배양물을 포함하는 베셀의 내부 용적은, 예를 들어 약 0.20 L 내지 약 30 L(예를 들어, 약 0.20 L 내지 약 20 L, 약 0.20 L 내지 약 10 L, 약 0.20 L 내지 약 5.0 L, 약 0.20 L 내지 약 2.5 L, 약 0.50 L 내지 약 30 L, 약 0.50 L 내지 약 20 L, 약 0.50 L 내지 약 10 L, 약 0.50 L 내지 약 5.0 L, 약 0.50 L 내지 약 2.5 L, 약 1.0 L 내지 약 30 L, 약 1.0 L 내지 약 20 L, 약 1.0 L 내지 약 10 L, 약 1.0 L 내지 약 5.0 L, 약 1.0 L 내지 약 2.5 L, 약 2.0 L 내지 약 30 L, 약 2.0 L 내지 약 20 L, 약 2.0 L 내지 약 10 L, 약 2.0 L 내지 약 5.0 L, 약 5.0 L 내지 약 30 L, 약 5.0 L 내지 약 20 L, 약 5.0 L 내지 약 10 L, 약 10 L 내지 약 30 L, 또는 약 10 L 내지 약 20 L)일 수 있다. 제4 배양 배지는, 예를 들어 약 0.10 L 내지 약 20 L(예를 들어, 약 0.10 L 내지 약 20 L, 약 0.10 L 내지 약 15 L, 약 0.10 L 내지 약 10 L, 약 0.10 L 내지 약 5.0 L, 약 0.20 L 내지 약 20 L, 약 0.20 L 내지 약 15 L, 약 0.20 L 내지 약 10 L, 약 0.20 L 내지 약 5.0 L, 약 0.50 L 내지 약 20 L, 약 0.50 L 내지 약 15 L, 약 0.50 L 내지 약 10 L, 약 0.50 L 내지 약 5.0 L, 약 1.0 L 내지 약 20 L, 약 1.0 L 내지 약 15 L, 약 1.0 L 내지 약 10 L, 약 1.0 L 내지 약 5.0 L, 약 1.5 L 내지 약 20 L, 약 1.5 L 내지 약 15 L, 약 1.5 L 내지 약 10 L, 약 1.5 L 내지 약 5.0 L, 약 2.0 L 내지 약 25 L, 약 2.0 L 내지 약 20 L, 약 2.0 L 내지 약 15 L, 약 2.0 L 내지 약 10 L, 약 2.0 L 내지 약 5.0 L, 약 5.0 L 내지 약 20 L, 약 5.0 L 내지 약 15 L, 약 5.0 L 내지 약 10 L, 약 10 L 내지 약 20 L, 또는 약 10 L 내지 약 15 L)의 부피를 가질 수 있다.

[0075] 당해 분야에서 이해될 수 있는 바와 같이, 제3 세포 배양물을 포함하는 베셀은 포유류 세포를 배양하기 위한 당해 분야에서 사용되는 임의의 장치(예를 들어, 플라스크(예를 들어, 스핀 플라스크), 롤링 튜브, 또는 생물반응기)일 수 있다. 베셀은 교반용 내부 수단(예를 들어, 임펠러)을 포함할 수 있거나, 베셀은 외부에서(예를 들어, 회전 및/또는 틸팅하는 플랫폼을 사용하여) 교반될 수 있다. 베셀은 스테인리스 스틸 또는 플라스틱(예를 들어,

플라스틱 멸균 백)으로 만들 수 있다. 일부 구현예에서, 베셀은 사용 후 버리는 1회용 생물반응기(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 사용 후 버리는 1회용 생물반응기)일 수 있다. 관류 생물반응기의 내부 표면은 적어도 하나의 코팅(예를 들어, 젤라틴, 콜라겐, 폴리-L-오르니틴, 폴리스티렌, 및 라미닌 중 적어도 하나의 코팅)을 가질 수 있고, 당해 분야에 알려진 바와 같이, 제3 배양 배지에 O_2 , CO_2 , 및 N_2 를 뿌리기 위한 하나 이상의 포트를 가질 수 있다. 베셀은 하나 이상의 센서 프로브를 구비할 수 있다. 베셀이 연질 플라스틱 재료(예를 들어, 플라스틱 멸균 백)로 이루어진 경우, 베셀은 외부 구조물에 의해 둘러싸이고 지지될 수 있다.

[0076] 본원에 기술된 각각의 배지 단계는 멸균 피펫(예를 들어, 조직 배양 후드에서의 멸균 피펫팅)을 사용하여 수행될 수 있다.

[0077] **제1 세포 배양물의 회분 배양**

[0078] 단계 (a)의 제1 세포 배양물 제공 후, 본원에 기술된 시드 트레인 공정은 제1 세포 배양물을 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 20.0×10^6 세포/mL(예를 들어, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 17.5×10^6 세포/mL, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 15.0×10^6 세포/mL, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 12.5×10^6 세포/mL, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 10.0×10^6 세포/mL, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 7.5×10^6 세포/mL, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 세포/mL, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 2.5×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 20.0×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 17.5×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 15.0×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 12.5×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 10.0×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 7.5×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 20.0×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 17.5×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 15.0×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 12.5×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 10.0×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 7.5×10^6 세포/mL, 약 7.5×10^6 세포/mL 내지 약 20.0×10^6 세포/mL, 약 7.5×10^6 세포/mL 내지 약 17.5×10^6 세포/mL, 약 7.5×10^6 세포/mL 내지 약 15.0×10^6 세포/mL, 약 7.5×10^6 세포/mL 내지 약 12.5×10^6 세포/mL, 약 7.5×10^6 세포/mL 내지 약 10.0×10^6 세포/mL, 10.0×10^6 세포/mL 내지 약 20.0×10^6 세포/mL, 약 10.0×10^6 세포/mL 내지 약 17.5×10^6 세포/mL, 약 10.0×10^6 세포/mL 내지 약 15.0×10^6 세포/mL, 약 10.0×10^6 세포/mL 내지 약 12.5×10^6 세포/mL, 약 12.5×10^6 세포/mL 내지 약 20.0×10^6 세포/mL, 약 12.5×10^6 세포/mL 내지 약 17.5×10^6 세포/mL, 또는 약 12.5×10^6 세포/mL 내지 약 15.0×10^6 세포/mL)의 세포 밀도 범위로 회분 배양하는 단계 (b)를 포함한다. 세포 밀도를 결정하는 여러 상이한 방법이 당해 분야에 알려져 있다(예를 들어, 광학 현미경 및 혈구계의 사용 또는 예를 들어, Countess® 자동 셀 카운터(Life Technologies), Cellometer® (Nexcelom Bioscience), Luna™ 자동 셀 카운터(Logos Biosystems)와 같은 자동 셀 카운터, 또는 Vi-Cell® 세포 생존율 분석기).

[0079] 제1 세포 배양물의 회분 배양은 배양 중에 실질적 또는 상당한 양의 액체 배양 배지를 제1 세포 배양물에 첨가하는 것을 포함하지 않고, 실질적 또는 상당한 양의 제1 세포 배양 배지를 제거하는 것을 포함하지 않는다. 회분 배양은 본원에 기술된 임의의 예시적 온도 및/또는 CO_2 가스 노출을 이용하여 수행될 수 있다. 회분 배양은 당해 분야에 알려진 임의의 O_2 및/또는 N_2 가스 노출을 이용하여 수행될 수 있다. 회분 배양은 본원에 기술된 임의의 타입의 교반을 포함할 수도 있다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 20.0×10^6 세포/mL(또는 임의의 다른 세포 밀도 또는 본원에 기술된 세포 밀도 범위)의 목표 세포 밀도를 얻는 데 필요한 제1 세포 배양물의 회분 배양 시간은 제조할 포유류 세포의 성장 속도 및 제1 세포 배양물의 초기 세포 밀도에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 제1 세포 배양물은 약 1일 내지 약 9일(예를 들어, 약 1일 내지 약 8일, 약 1일 내지 약 7일, 약 1일 내지 약 6일, 약 1일 내지 약 5일, 약 1일 내지 약 4일, 약 1일 내지 약 3일, 약 2일 내지 약 9일, 약 2일 내지 약 8일, 약 2일 내지 약 7일, 약 2일 내지 약 6일, 약 2일 내지 약 5일, 약 2일 내지 약 4일, 약 3일 내지 약 9일, 약 3일 내지 약 8일, 약 3일 내지 약 7일, 약 3일 내지 약 6일, 약 3일 내지

약 5일, 약 4일 내지 약 9일, 약 4일 내지 약 8일, 약 4일 내지 약 7일, 약 4일 내지 약 6일, 약 5일 내지 약 9일, 약 5일 내지 약 8일, 약 5일 내지 약 7일, 약 6일 내지 약 9일, 약 6일 내지 약 8일, 또는 약 7일 내지 약 9일)의 기간 동안 배양될 수 있다. 본 방법에서 사용될 수 있는 다른 예시적 회분 배양 파라미터들은 본원에 기술되어 있다.

[0080] 제2 세포 배양물의 제공

[0081] 본원에 기술된 시드 트레인 공정은 (c) 단계 (b)의 소정 부피의 제1 세포 배양물을 관류 생물반응기 내에 포함된 제2 배양 배지 내에 배치하여 약 0.10×10^6 세포/mL 내지 약 0.8×10^6 세포/mL 범위(예를 들어, 임의의 초기 세포 밀도 또는 앞서 제1 세포 배양물에 대해 기술한 초기 세포 밀도 범위)의 초기 세포 밀도를 가진 제2 세포 배양물을 제공하는 단계를 더 포함한다. 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 제2 세포 배양물에 대해 약 0.10×10^6 세포/mL 내지 약 0.80×10^6 세포/mL 범위의 초기 세포 밀도에 도달하도록 제2 세포 배양 배지 내에 배치할 제1 세포 배양물의 적절한 부피는 제1 세포 배양물의 세포 밀도 및 제2 배양 배지의 부피로부터 결정될 수 있다. 제2 배양 배지 내에 배치되는 제1 세포 배양물의 부피는, 예를 들어 0.30 L 내지 약 100 L(예를 들어, 약 0.30 L 내지 약 90 L, 약 0.30 L 내지 약 80 L, 약 0.30 L 내지 약 70 L, 약 0.30 L 내지 약 60 L, 약 0.30 L 내지 약 50 L, 약 0.30 L 내지 약 40 L, 약 0.30 L 내지 약 30 L, 약 0.30 L 내지 약 20 L, 약 0.30 L 내지 약 10 L, 약 1.0 L 내지 약 100 L, 약 1.0 L 내지 약 90 L, 약 1.0 L 내지 약 80 L, 약 1.0 L 내지 약 70 L, 약 1.0 L 내지 약 60 L, 약 1.0 L 내지 약 50 L, 약 1.0 L 내지 약 40 L, 약 1.0 L 내지 약 30 L, 약 1.0 L 내지 약 20 L, 약 1.0 L 내지 약 10 L, 약 2.5 L 내지 약 100 L, 약 2.5 L 내지 약 90 L, 약 2.5 L 내지 약 80 L, 약 2.5 L 내지 약 70 L, 약 2.5 L 내지 약 60 L, 약 2.5 L 내지 약 50 L, 약 2.5 L 내지 약 40 L, 약 2.5 L 내지 약 30 L, 약 2.5 L 내지 약 20 L, 약 2.5 L 내지 약 10 L, 약 5.0 L 내지 약 100 L, 약 5.0 L 내지 약 90 L, 약 5.0 L 내지 약 80 L, 약 5.0 L 내지 약 70 L, 약 5.0 L 내지 약 60 L, 약 5.0 L 내지 약 50 L, 약 5.0 L 내지 약 40 L, 약 5.0 L 내지 약 30 L, 약 5.0 L 내지 약 20 L, 약 5.0 L 내지 약 10 L, 약 15 L 내지 약 100 L, 약 15 L 내지 약 90 L, 약 15 L 내지 약 80 L, 약 15 L 내지 약 70 L, 약 15 L 내지 약 60 L, 약 15 L 내지 약 50 L, 약 15 L 내지 약 40 L, 약 15 L 내지 약 30 L, 약 15 L 내지 약 20 L, 약 20 L 내지 약 100 L, 약 20 L 내지 약 90 L, 약 20 L 내지 약 80 L, 약 20 L 내지 약 70 L, 약 20 L 내지 약 60 L, 약 20 L 내지 약 50 L, 약 20 L 내지 약 40 L, 약 30 L 내지 약 100 L, 약 30 L 내지 약 90 L, 약 30 L 내지 약 80 L, 약 30 L 내지 약 70 L, 약 30 L 내지 약 60 L, 약 30 L 내지 약 50 L, 약 40 L 내지 약 100 L, 약 40 L 내지 약 90 L, 약 40 L 내지 약 80 L, 약 40 L 내지 약 70 L, 약 40 L 내지 약 60 L, 약 50 L 내지 약 100 L, 약 50 L 내지 약 90 L, 약 50 L 내지 약 80 L, 약 50 L 내지 약 70 L, 약 60 L 내지 약 100 L, 약 60 L 내지 약 90 L, 약 60 L 내지 약 80 L, 약 70 L 내지 약 100 L, 약 70 L 내지 약 90 L, 또는 약 80 L 내지 약 100 L)일 수 있다.

[0082] 제2 세포 배양물의 부피는, 예를 들어 2.0 L 내지 800 L(예를 들어, 약 2.0 L 내지 약 750 L, 약 2.0 L 내지 약 700 L, 약 2.0 L 내지 약 650 L, 약 2.0 L 내지 약 600 L, 약 2.0 L 내지 약 550 L, 약 2.0 L 내지 약 500 L, 약 2.0 L 내지 약 450 L, 약 2.0 L 내지 약 400 L, 약 2.0 L 내지 약 350 L, 약 2.0 L 내지 약 300 L, 약 2.0 L 내지 약 250 L, 약 2.0 L 내지 약 200 L, 약 2.0 L 내지 약 150 L, 약 2.0 L 내지 약 100 L, 약 2.0 L 내지 약 50 L, 약 2.0 L 내지 약 25 L, 약 5.0 L 내지 약 800 L, 약 5.0 L 내지 약 750 L, 약 5.0 L 내지 약 700 L, 약 5.0 L 내지 약 650 L, 약 5.0 L 내지 약 600 L, 약 5.0 L 내지 약 550 L, 약 5.0 L 내지 약 500 L, 약 5.0 L 내지 약 450 L, 약 5.0 L 내지 약 400 L, 약 5.0 L 내지 약 350 L, 약 5.0 L 내지 약 300 L, 약 5.0 L 내지 약 250 L, 약 5.0 L 내지 약 200 L, 약 5.0 L 내지 약 150 L, 약 5.0 L 내지 약 100 L, 약 5.0 L 내지 약 50 L, 약 5.0 L 내지 약 25 L, 약 10 L 내지 약 800 L, 약 10 L 내지 약 750 L, 약 10 L 내지 약 700 L, 약 10 L 내지 약 650 L, 약 10 L 내지 약 600 L, 약 10 L 내지 약 550 L, 약 10 L 내지 약 500 L, 약 10 L 내지 약 450 L, 약 10 L 내지 약 400 L, 약 10 L 내지 약 350 L, 약 10 L 내지 약 300 L, 약 10 L 내지 약 250 L, 약 10 L 내지 약 200 L, 약 10 L 내지 약 150 L, 약 10 L 내지 약 100 L, 약 10 L 내지 약 50 L, 약 10 L 내지 약 25 L, 약 15 L 내지 약 800 L, 약 15 L 내지 약 750 L, 약 15 L 내지 약 700 L, 약 15 L 내지 약 600 L, 약 15 L 내지 약 550 L, 약 15 L 내지 약 500 L, 약 15 L 내지 약 450 L, 약 15 L 내지 약 400 L, 약 15 L 내지 약 350 L, 약 15 L 내지 약 300 L, 약 15 L 내지 약 250 L, 약 15 L 내지 약 200 L, 약 15 L 내지 약 150 L, 약 15 L 내지 약 100 L, 약 15 L 내지 약 50 L, 약 15 L 내지 약 25 L, 약 20 L 내지 약 800 L, 약 20 L 내지 약 750 L, 약 20 L 내지 약 700 L, 약 20 L 내지 약 650 L, 약 20 L 내지 약 600 L, 약 20 L 내지 약 550 L, 약 20 L 내지 약 500 L, 약 20 L 내지 약 450 L, 약 20 L 내지 약 400 L, 약 20 L 내지 약 350 L, 약 20 L 내지 약 300 L, 약 20 L 내지 약 250 L, 약 20 L 내지 약 200

L, 약 20 L 내지 약 150 L, 약 20 L 내지 약 100 L, 약 20 L 내지 약 50 L, 약 25 L 내지 약 800 L, 약 25 L 내지 약 750 L, 약 25 L 내지 약 700 L, 약 25 L 내지 약 650 L, 약 25 L 내지 약 600 L, 약 25 L 내지 약 550 L, 약 25 L 내지 약 500 L, 약 25 L 내지 약 450 L, 약 25 L 내지 약 400 L, 약 25 L 내지 약 350 L, 약 25 L 내지 약 300 L, 약 25 L 내지 약 250 L, 약 25 L 내지 약 200 L, 약 25 L 내지 약 150 L, 약 25 L 내지 약 100 L, 약 25 L 내지 약 50 L, 약 50 L 내지 약 800 L, 약 50 L 내지 약 750 L, 약 50 L 내지 약 700 L, 약 50 L 내지 약 650 L, 약 50 L 내지 약 600 L, 약 50 L 내지 약 550 L, 약 50 L 내지 약 500 L, 약 50 L 내지 약 450 L, 약 50 L 내지 약 400 L, 약 50 L 내지 약 350 L, 약 50 L 내지 약 300 L, 약 50 L 내지 약 250 L, 약 50 L 내지 약 200 L, 약 50 L 내지 약 150 L, 약 50 L 내지 약 100 L, 약 75 L 내지 약 800 L, 약 75 L 내지 약 750 L, 약 75 L 내지 약 700 L, 약 75 L 내지 약 650 L, 약 75 L 내지 약 600 L, 약 75 L 내지 약 550 L, 약 75 L 내지 약 500 L, 약 75 L 내지 약 450 L, 약 75 L 내지 약 400 L, 약 75 L 내지 약 350 L, 약 75 L 내지 약 300 L, 약 75 L 내지 약 250 L, 약 75 L 내지 약 200 L, 약 75 L 내지 약 150 L, 약 75 L 내지 약 100 L, 약 100 L 내지 약 800 L, 약 100 L 내지 약 750 L, 약 100 L 내지 약 700 L, 약 100 L 내지 약 650 L, 약 100 L 내지 약 600 L, 약 100 L 내지 약 550 L, 약 100 L 내지 약 500 L, 약 100 L 내지 약 450 L, 약 100 L 내지 약 400 L, 약 100 L 내지 약 350 L, 약 100 L 내지 약 300 L, 약 100 L 내지 약 250 L, 약 100 L 내지 약 200 L, 약 100 L 내지 약 150 L, 약 150 L 내지 약 800 L, 약 150 L 내지 약 750 L, 약 150 L 내지 약 700 L, 약 150 L 내지 약 650 L, 약 150 L 내지 약 600 L, 약 150 L 내지 약 550 L, 약 150 L 내지 약 500 L, 약 150 L 내지 약 450 L, 약 150 L 내지 약 400 L, 약 150 L 내지 약 350 L, 약 150 L 내지 약 300 L, 약 150 L 내지 약 250 L, 약 150 L 내지 약 200 L, 약 200 L 내지 약 800 L, 약 200 L 내지 약 750 L, 약 200 L 내지 약 700 L, 약 200 L 내지 약 650 L, 약 200 L 내지 약 600 L, 약 200 L 내지 약 550 L, 약 200 L 내지 약 500 L, 약 200 L 내지 약 450 L, 약 200 L 내지 약 400 L, 약 200 L 내지 약 350 L, 약 200 L 내지 약 300 L, 약 200 L 내지 약 250 L, 약 250 L 내지 약 800 L, 약 250 L 내지 약 750 L, 약 250 L 내지 약 700 L, 약 250 L 내지 약 650 L, 약 250 L 내지 약 600 L, 약 250 L 내지 약 550 L, 약 250 L 내지 약 500 L, 약 250 L 내지 약 450 L, 약 250 L 내지 약 400 L, 약 250 L 내지 약 350 L, 약 250 L 내지 약 300 L, 약 300 L 내지 약 800 L, 약 300 L 내지 약 750 L, 약 300 L 내지 약 700 L, 약 300 L 내지 약 650 L, 약 300 L 내지 약 600 L, 약 300 L 내지 약 550 L, 약 300 L 내지 약 500 L, 약 300 L 내지 약 450 L, 약 300 L 내지 약 400 L, 약 300 L 내지 약 350 L, 약 350 L 내지 약 800 L, 약 350 L 내지 약 750 L, 약 350 L 내지 약 700 L, 약 350 L 내지 약 650 L, 약 350 L 내지 약 600 L, 약 350 L 내지 약 550 L, 약 350 L 내지 약 500 L, 약 350 L 내지 약 450 L, 약 350 L 내지 약 400 L, 약 400 L 내지 약 800 L, 약 400 L 내지 약 750 L, 약 400 L 내지 약 700 L, 약 400 L 내지 약 650 L, 약 400 L 내지 약 600 L, 약 400 L 내지 약 550 L, 약 400 L 내지 약 500 L, 약 400 L 내지 약 450 L, 약 450 L 내지 약 800 L, 약 450 L 내지 약 750 L, 약 450 L 내지 약 700 L, 약 450 L 내지 약 650 L, 약 450 L 내지 약 600 L, 약 450 L 내지 약 550 L, 약 450 L 내지 약 500 L, 약 500 L 내지 약 800 L, 약 500 L 내지 약 750 L, 약 500 L 내지 약 700 L, 약 500 L 내지 약 650 L, 약 500 L 내지 약 600 L, 약 500 L 내지 약 550 L, 약 500 L 내지 약 500 L, 약 550 L 내지 약 800 L, 약 550 L 내지 약 750 L, 약 550 L 내지 약 700 L, 약 550 L 내지 약 650 L, 약 550 L 내지 약 600 L, 약 600 L 내지 약 800 L, 약 600 L 내지 약 750 L, 약 600 L 내지 약 700 L, 약 600 L 내지 약 650 L, 약 650 L 내지 약 800 L, 약 650 L 내지 약 750 L, 약 650 L 내지 약 700 L, 약 700 L 내지 약 800 L, 약 700 L 내지 약 750 L, 또는 약 750 L 내지 약 800 L)일 수 있다.

[0083] 관류 생물반응기는 본원에 기술되거나 당해 분야에 알려진 임의의 예시적 관류 생물반응기일 수 있다. 예를 들어, 관류 생물반응기는 스테인리스 스틸 또는 플라스틱(예를 들어, 플라스틱 멸균 백)으로 만들 수 있다. 관류 생물반응기의 내부 표면은 적어도 하나의 코팅(예를 들어, 젤라틴, 콜라겐, 폴리-L-오르니틴, 폴리스티렌, 및 라미닌 중 적어도 하나의 코팅)을 가질 수 있고, 당해 분야에 알려진 바와 같이, 액체 배양 배지에 O_2 , CO_2 , 및 N_2 를 뿌리기 위한 하나 이상의 포트를 가질 수 있으며, 액체 배양 배지를 교반하기 위한 교반 기구를 가질 수 있다. 관류 생물반응기는 또한, 생물반응기로부터 소정 부피의 제2 액체 배양 배지를 제거할 수 있는 기계 장치를 구비할 수 있고, 생물반응기로부터 제2 액체 배양 배지를 전달하는 공정 중에 제2 액체 배양 배지로부터 세포를 제거하는 기계 장치 내 필터(예를 들어, 교반 접선 유동(ATF), 접선 유동 여과(TFF) 시스템, 또는 미국 가특허 출원 제61/878,502호에 기술된 여과 시스템)를 선택적으로 구비할 수 있다. 생물반응기는 또한, 하나 이상의 펌프, 및 제거된 제2 배양 배지와 관류 생물반응기로 관류될 새로운 배양 배지를 수용할 하나 이상의 저장소를 구비할 수 있다.

[0084] 관류 생물반응기는 약 5.0 L 내지 약 2,000(예를 들어, 약 5.0 L 내지 약 1,900 L, 약 5.0 L 내지 약 1,800 L, 약 5.0 L 내지 약 1,700 L, 약 5.0 L 내지 약 1,600 L, 약 5.0 L 내지 약 1,500 L, 약 5.0 L 내지 약 1,400 L,

약 5.0 L 내지 약 1,300 L, 약 5.0 L 내지 약 1,200 L, 약 5.0 L 내지 약 1,100 L, 약 5.0 L 내지 약 1,000 L, 약 5.0 L 내지 약 900 L, 약 5.0 L 내지 약 800 L, 약 5.0 L 내지 약 700 L, 약 5.0 L 내지 약 600 L, 약 5.0 L 내지 약 500 L, 약 5.0 L 내지 약 400 L, 약 5.0 L 내지 약 300 L, 약 5.0 L 내지 약 200 L, 약 5.0 L 내지 약 100 L, 약 5.0 L 내지 약 50 L, 약 100 L 내지 약 2,000 L, 약 100 L 내지 약 1,900 L, 약 100 L 내지 약 1,800 L, 약 100 L 내지 약 1,700 L, 약 100 L 내지 약 1,600 L, 약 100 L 내지 약 1,500 L, 약 100 L 내지 약 1,400 L, 약 100 L 내지 약 1,300 L, 약 100 L 내지 약 1,200 L, 약 100 L 내지 약 1,100 L, 약 100 L 내지 약 1,000 L, 약 100 L 내지 약 900 L, 약 100 L 내지 약 800 L, 약 100 L 내지 약 700 L, 약 100 L 내지 약 600 L, 약 100 L 내지 약 500 L, 약 100 L 내지 약 400 L, 약 100 L 내지 약 300 L, 약 100 L 내지 약 200 L, 약 150 L 내지 약 2,000 L, 약 150 L 내지 약 1,900 L, 약 150 L 내지 약 1,800 L, 약 150 L 내지 약 1,700 L, 약 150 L 내지 약 1,600 L, 약 150 L 내지 약 1,500 L, 약 150 L 내지 약 1,400 L, 약 150 L 내지 약 1,300 L, 약 150 L 내지 약 1,300 L, 약 150 L 내지 약 1,200 L, 약 150 L 내지 약 1,100 L, 약 150 L 내지 약 1,000 L, 약 150 L 내지 약 900 L, 약 150 L 내지 약 800 L, 약 150 L 내지 약 700 L, 약 150 L 내지 약 600 L, 약 150 L 내지 약 500 L, 약 150 L 내지 약 400 L, 약 150 L 내지 약 300 L, 약 150 L 내지 약 200 L, 약 200 L 내지 약 2,000 L, 약 200 L 내지 약 1,900 L, 약 200 L 내지 약 1,800 L, 약 200 L 내지 약 1,700 L, 약 200 L 내지 약 1,600 L, 약 200 L 내지 약 1,500 L, 약 200 L 내지 약 1,400 L, 약 200 L 내지 약 1,300 L, 약 200 L 내지 약 1,200 L, 약 200 L 내지 약 1,100 L, 약 200 L 내지 약 1,000 L, 약 200 L 내지 약 900 L, 약 200 L 내지 약 800 L, 약 200 L 내지 약 700 L, 약 200 L 내지 약 600 L, 약 200 L 내지 약 500 L, 약 200 L 내지 약 400 L, 약 200 L 내지 약 300 L, 약 300 L 내지 약 2,000 L, 약 300 L 내지 약 1,900 L, 약 300 L 내지 약 1,800 L, 약 300 L 내지 약 1,700 L, 약 300 L 내지 약 1,600 L, 약 300 L 내지 약 1,500 L, 약 300 L 내지 약 1,400 L, 약 300 L 내지 약 1,300 L, 약 300 L 내지 약 1,200 L, 약 300 L 내지 약 1,100 L, 약 300 L 내지 약 1,000 L, 약 300 L 내지 약 900 L, 약 300 L 내지 약 800 L, 약 300 L 내지 약 700 L, 약 300 L 내지 약 600 L, 약 300 L 내지 약 500 L, 약 300 L 내지 약 400 L, 약 400 L 내지 약 2,000 L, 약 400 L 내지 약 1,900 L, 약 400 L 내지 약 1,800 L, 약 400 L 내지 약 1,700 L, 약 400 L 내지 약 1,600 L, 약 400 L 내지 약 1,500 L, 약 400 L 내지 약 1,400 L, 약 400 L 내지 약 1,300 L, 약 400 L 내지 약 1,200 L, 약 400 L 내지 약 1,100 L, 약 400 L 내지 약 1,000 L, 약 400 L 내지 약 900 L, 약 400 L 내지 약 800 L, 약 400 L 내지 약 700 L, 약 400 L 내지 약 600 L, 약 400 L 내지 약 500 L, 약 500 L 내지 약 2,000 L, 약 500 L 내지 약 1,900 L, 약 500 L 내지 약 1,800 L, 약 500 L 내지 약 1,700 L, 약 500 L 내지 약 1,600 L, 약 500 L 내지 약 1,500 L, 약 500 L 내지 약 1,400 L, 약 500 L 내지 약 1,300 L, 약 500 L 내지 약 1,200 L, 약 500 L 내지 약 1,100 L, 약 500 L 내지 약 1,000 L, 약 500 L 내지 약 900 L, 약 500 L 내지 약 800 L, 약 500 L 내지 약 700 L, 약 500 L 내지 약 600 L, 약 600 L 내지 약 2,000 L, 약 600 L 내지 약 1,900 L, 약 600 L 내지 약 1,800 L, 약 600 L 내지 약 1,700 L, 약 600 L 내지 약 1,600 L, 약 600 L 내지 약 1,500 L, 약 600 L 내지 약 1,400 L, 약 600 L 내지 약 1,300 L, 약 600 L 내지 약 1,200 L, 약 600 L 내지 약 1,100 L, 약 600 L 내지 약 1,000 L, 약 600 L 내지 약 900 L, 약 600 L 내지 약 800 L, 약 600 L 내지 약 700 L, 약 700 L 내지 약 2,000 L, 약 700 L 내지 약 1,900 L, 약 700 L 내지 약 1,800 L, 약 700 L 내지 약 1,700 L, 약 700 L 내지 약 1,600 L, 약 700 L 내지 약 1,500 L, 약 700 L 내지 약 1,400 L, 약 700 L 내지 약 1,300 L, 약 700 L 내지 약 1,200 L, 약 700 L 내지 약 1,100 L, 약 700 L 내지 약 1,000 L, 약 700 L 내지 약 900 L, 약 700 L 내지 약 800 L, 800 L 내지 약 2,000 L, 약 800 L 내지 약 1,900 L, 약 800 L 내지 약 1,800 L, 약 800 L 내지 약 1,700 L, 약 800 L 내지 약 1,600 L, 약 800 L 내지 약 1,500 L, 약 800 L 내지 약 1,400 L, 약 800 L 내지 약 1,300 L, 약 800 L 내지 약 1,200 L, 약 800 L 내지 약 1,100 L, 약 800 L 내지 약 1,000 L, 약 800 L 내지 약 900 L, 약 1,000 L 내지 약 2,000 L, 약 1,000 L 내지 약 1,750 L, 약 1,000 L 내지 약 1,500 L, 약 1,000 L 내지 약 1,250 L, 약 1,250 L 내지 약 2,000 L, 약 1,250 L 내지 약 1,750 L, 약 1,250 L 내지 약 1,500 L, 약 1,500 L 내지 약 2,000 L, 약 1,500 L 내지 약 1,750 L, 또는 약 1,750 L 내지 약 2,000 L)의 내부 용적을 가질 수 있다.

[0085] 제2 세포 배양물의 관류 배양

[0086] 본원에 기술된 시드 트레인 공정은 (d) 제2 세포 배양물을 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 140×10^6 세포/mL(예를 들어, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 130×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 120×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 110×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 100×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 90×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 80×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 70×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 60×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 50

[illegible]

약 50×10^6 세포/mL 내지 약 60×10^6 세포/mL, 약 60×10^6 세포/mL 내지 약 140×10^6 세포/mL, 약 60×10^6 세포/mL 내지 약 130×10^6 세포/mL, 약 60×10^6 세포/mL 내지 약 120×10^6 세포/mL, 약 60×10^6 세포/mL 내지 약 110×10^6 세포/mL, 약 60×10^6 세포/mL 내지 약 100×10^6 세포/mL, 약 60×10^6 세포/mL 내지 약 90×10^6 세포/mL, 약 60×10^6 세포/mL 내지 약 80×10^6 세포/mL, 약 60×10^6 세포/mL 내지 약 70×10^6 세포/mL, 약 70×10^6 세포/mL 내지 약 140×10^6 세포/mL, 약 70×10^6 세포/mL 내지 약 130×10^6 세포/mL, 약 70×10^6 세포/mL 내지 약 120×10^6 세포/mL, 약 70×10^6 세포/mL 내지 약 110×10^6 세포/mL, 약 70×10^6 세포/mL 내지 약 100×10^6 세포/mL, 약 70×10^6 세포/mL 내지 약 90×10^6 세포/mL, 약 70×10^6 세포/mL 내지 약 80×10^6 세포/mL, 약 80×10^6 세포/mL 내지 약 140×10^6 세포/mL, 약 80×10^6 세포/mL 내지 약 130×10^6 세포/mL, 약 80×10^6 세포/mL 내지 약 120×10^6 세포/mL, 약 80×10^6 세포/mL 내지 약 110×10^6 세포/mL, 약 80×10^6 세포/mL 내지 약 100×10^6 세포/mL, 약 80×10^6 세포/mL 내지 약 90×10^6 세포/mL, 약 90×10^6 세포/mL 내지 약 140×10^6 세포/mL, 약 90×10^6 세포/mL 내지 약 130×10^6 세포/mL, 약 90×10^6 세포/mL 내지 약 120×10^6 세포/mL, 약 90×10^6 세포/mL 내지 약 110×10^6 세포/mL, 약 90×10^6 세포/mL 내지 약 100×10^6 세포/mL, 약 100×10^6 세포/mL 내지 약 140×10^6 세포/mL, 약 100×10^6 세포/mL 내지 약 130×10^6 세포/mL, 약 100×10^6 세포/mL 내지 약 120×10^6 세포/mL, 약 100×10^6 세포/mL 내지 약 110×10^6 세포/mL, 약 110×10^6 세포/mL 내지 약 140×10^6 세포/mL, 약 110×10^6 세포/mL 내지 약 140×10^6 세포/mL, 약 110×10^6 세포/mL 내지 약 130×10^6 세포/mL, 약 110×10^6 세포/mL 내지 약 120×10^6 세포/mL, 약 120×10^6 세포/mL 내지 약 140×10^6 세포/mL, 약 120×10^6 세포/mL 내지 약 130×10^6 세포/mL, 또는 약 130×10^6 세포/mL 내지 약 140×10^6 세포/mL)의 세포 밀도로 관류 배양하는 단계를 더 포함한다.

[0087] 관류 배양은 당해 분야에 잘 알려져 있으며, 이 단계는 관류 생물반응기로부터 소정 부피의 액체 배양 배지(세포가 실질적으로 존재하지 않는 관류 생물반응기 내 소정 부피의 제2 액체 배양 배지)를 제거하는 단계, 및 거의 동시에 또는 실질적으로 동시에 소정 부피의 대체 배양 배지를 첨가하는 단계를 포함한다. 제거 및 첨가는 동시에 또는 순차적으로, 또는 둘의 조합으로 수행될 수 있다. 또한, 제거 및 첨가는 연속적으로(예를 들어, 임의의 주어진 시간에 걸쳐(예를 들어, 24시간에 걸쳐, 약 1시간 내지 약 24시간의 증분 시간에 걸쳐, 또는 24시간 초과와 증분 시간에 걸쳐) 관류 생물반응기의 부피 또는 배양 시작 시 액체 배양 배지의 초기 부피(예를 들어, 제2 액체 배양 배지 부피)의 0.1% 내지 800%(예를 들어, 1% 내지 700%, 1% 내지 600%, 1% 내지 500%, 1% 내지 400%, 1% 내지 350%, 1% 내지 300%, 1% 내지 250%, 1% 내지 100%, 100% 내지 200%, 5% 내지 150%, 10% 내지 50%, 15% 내지 40%, 8% 내지 80%, 및 4% 내지 30%)의 부피를 제거하고 대체하는 속도로) 또는 주기적으로(예를 들어, 3일에 한번, 격일에 한번, 하루에 한번, 하루에 두번, 하루에 세번, 하루에 네번, 또는 하루에 다섯번), 또는 이들의 조합으로 수행될 수 있다. 주기적으로 수행되는 경우, (예를 들어, 약 24시간 내에, 약 1시간 내지 약 24시간의 증분 시간 내에, 또는 24시간 초과와 증분 시간 내에) 제거되거나 대체되는 부피는, 예를 들어 관류 생물반응기의 부피 또는 배양 시작 시 생물반응기 내 배양 배지 부피(예를 들어, 제2 액체 배양 배지 부피)의 0.1% 내지 800%(예를 들어, 1% 내지 700%, 1% 내지 600%, 1% 내지 500%, 1% 내지 400%, 1% 내지 300%, 1% 내지 200%, 1% 내지 100%, 100% 내지 200%, 5% 내지 150%, 10% 내지 50%, 15% 내지 40%, 8% 내지 80%, 및 4% 내지 30%)일 수 있다. 제거되는 액체 배양 배지의 부피 및 첨가되는 대체 액체 배양 배지(예를 들어, 새로운 액체 배양 배지)의 부피는 일부 경우에 배양 기간의 전체 또는 일부에 걸쳐 매 24시간(또는, 대안적으로 약 1시간 내지 약 24시간의 증분 시간 또는 24시간 초과와 증분 시간)에 걸쳐 거의 동일하게 유지될 수 있다. 당해 분야에 알려진 바와 같이, 액체 배양 배지의 부피가 제거되는 속도(부피/단위시간) 및 대체 액체 배양 배지(예를 들어, 새로운 제2 액체 배양 배지)의 부피가 첨가되는 속도(부피/단위시간)는 변화될 수 있다. 액체 배양 배지의 부피가 제거되는 속도(부피/단위시간) 및 대체 액체 배양 배지(예를 들어, 새로운 액체 배양 배지)의 부피가 첨가되는 속도(부피/단위시간)는 거의 동일하거나 상이할 수 있다.

[0088] 대안적으로, 제거되고 첨가되는 부피는 배양 기간 동안 매 24시간(또는, 대안적으로 1시간 내지 약 24시간의 증분 시간 또는 24시간 초과와 증분 시간)에 걸쳐 변할 수 있다(예를 들어, 점차 증가할 수 있다). 예를 들어, 배양 기간에 걸쳐 매 24시간(또는, 대안적으로 약 1시간 내지 약 24시간의 증분 시간 또는 24시간 초과와 증분 시

간) 내에 제거되는 액체 배양 배지의 부피 및 첨가되는 대체 액체 배양 배지(예를 들어, 첨가되는 새로운 액체 배양 배지)의 부피는 생물반응기 부피 또는 배양 시작 시에 존재하는 액체 배양 배지 부피(예를 들어, 제2 액체 배양 배지 부피)의 0.5% 내지 약 20%의 부피에서 생물반응기 부피 또는 배양 시작 시에 존재하는 액체 배양 배지 부피(예를 들어, 제2 배양 배지 부피)의 약 25% 내지 약 300%까지(예를 들어, 점차 또는 시차를 둔 증분을 통해) 증가될 수 있다.

[0089] 당업자는 제거되는 액체 배양 배지 및 첨가되는 대체 액체 배양 배지(예를 들어, 첨가되는 새로운 액체 배양 배지)가 동일한 타입의 배지(예를 들어, 혈청 또는 혈청, 단백질이 없는 화학적으로 규정된 배지)일 수 있다. 다른 경우에, 제거되는 액체 배양 배지 및 첨가되는 대체 액체 배양 배지(예를 들어, 첨가되는 새로운 액체 배양 배지)는 상이할 수 있다.

[0090] 액체 배양 배지의 부피는, 예를 들어 기계 시스템을 이용하고/하거나 부피에 존재하는 포유류 세포를 제외한 분획 분자량을 가진 멸균 멤브레인을 통한 부피의 누출 또는 중력 유동에 의해 제거될 수 있다.

[0091] 대체 액체 배양 배지(예를 들어, 새로운 제2 액체 배양 배지)의 부피는 자동화된 방식으로, 예를 들어 관류 펌프에 의해 생물반응기에 첨가될 수 있다. 일부 경우에, 액체 배양 배지의 부피(예를 들어, 포유류 세포가 실질적으로 존재하지 않는 제2 액체 배양 배지의 부피) 제거 및 대체 액체 배양 배지(예를 들어, 새로운 액체 배양 배지)의 부피 첨가는 포유류 세포를 이용한 관류 생물반응기 시당의 적어도 1시간 내에(예를 들어, 2시간 내에, 3시간 내에, 4시간 내에, 5시간 내에, 6시간 내에, 7시간 내에, 8시간 내에, 9시간 내에, 10시간 내에, 12시간 내에, 14시간 내에, 16시간 내에, 18시간 내에, 24시간 내에, 36시간 내에, 48시간 내에, 72시간 내에, 96시간 내에, 또는 96시간 후에) 일어날 수 있다.

[0092] 당업자가 이해하는 바와 같이, 약 5×10^6 세포/mL 내지 약 140×10^6 세포/mL(또는 임의의 다른 세포 밀도 또는 본원에 기술된 세포 밀도 범위)의 목표 세포 밀도를 얻는 데 필요한 제2 세포 배양물의 관류 배양 시간은 재조합 포유류 세포의 성장 속도 및 제2 세포 배양물의 초기 세포 밀도에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 제2 배양물은 약 1일 내지 약 9일의 기간(예를 들어, 앞서 회분 배양에 대해 열거한 임의의 예시적 시간 범위) 동안 관류 배양될 수 있다. 본 방법에서 사용될 수 있는 다른 관류 배양 파라미터들은 본원에 기술되어 있다.

[0093] **생산용 세포 배양물의 제공**

[0094] 본원에 기술된 시드 트레인 공정은 (e) 단계 (d)의 소정 부피의 제2 세포 배양물을 생산용 생물반응기 내에 포함된 제3 배양 배지 내에 배치하여 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 10×10^6 세포/mL(예를 들어, 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 9.0×10^6 세포/mL, 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 8.0×10^6 세포/mL, 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 7.0×10^6 세포/mL, 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 6.0×10^6 세포/mL, 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 세포/mL, 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 4.0×10^6 세포/mL, 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 3.0×10^6 세포/mL, 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 2.0×10^6 세포/mL, 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 1.0×10^6 세포/mL, 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 0.75×10^6 세포/mL, 약 0.50×10^6 세포/mL 내지 약 10×10^6 세포/mL, 약 0.50×10^6 세포/mL 내지 약 9.0×10^6 세포/mL, 0.50×10^6 세포/mL 내지 약 8.0×10^6 세포/mL, 약 0.50×10^6 세포/mL 내지 약 7.0×10^6 세포/mL, 약 0.50×10^6 세포/mL 내지 약 6.0×10^6 세포/mL, 약 0.50×10^6 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 세포/mL, 약 0.50×10^6 세포/mL 내지 약 4.0×10^6 세포/mL, 약 0.50×10^6 세포/mL 내지 약 3.0×10^6 세포/mL, 약 0.50×10^6 세포/mL 내지 약 2.0×10^6 세포/mL, 약 0.50×10^6 세포/mL 내지 약 1.0×10^6 세포/mL, 약 0.75×10^6 세포/mL 내지 약 10×10^6 세포/mL, 약 0.75×10^6 세포/mL 내지 약 9.0×10^6 세포/mL, 약 0.75×10^6 세포/mL 내지 약 8.0×10^6 세포/mL, 약 0.75×10^6 세포/mL 내지 약 7.0×10^6 세포/mL, 약 0.75×10^6 세포/mL 내지 약 6.0×10^6 세포/mL, 약 0.75×10^6 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 세포/mL, 약 0.75×10^6 세포/mL 내지 약 4.0×10^6 세포/mL, 약 0.75×10^6 세포/mL 내지 약 3.0×10^6 세포/mL, 약 0.75×10^6 세포/mL 내지 약 2.0×10^6 세포/mL, 약 0.75×10^6 세포/mL 내지 약 1.0×10^6 세포/mL, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 10×10^6 세포/mL, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 9.0×10^6 세포/mL, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 8.0×10^6 세포/mL, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 7.0×10^6 세포/mL, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지

약 6.0×10^6 세포/mL, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 세포/mL, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 4.0×10^6 세포/mL, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 3.0×10^6 세포/mL, 약 1.0×10^6 세포/mL 내지 약 2.0×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 10×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 9.0×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 8.0×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 7.0×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 6.0×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 4.0×10^6 세포/mL, 약 2.0×10^6 세포/mL 내지 약 3.0×10^6 세포/mL, 약 2.5×10^6 세포/mL 내지 약 10×10^6 세포/mL, 약 2.5×10^6 세포/mL 내지 약 9.0×10^6 세포/mL, 약 2.5×10^6 세포/mL 내지 약 8.0×10^6 세포/mL, 약 2.5×10^6 세포/mL 내지 약 7.0×10^6 세포/mL, 약 2.5×10^6 세포/mL 내지 약 6.0×10^6 세포/mL, 약 2.5×10^6 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 세포/mL, 약 2.5×10^6 세포/mL 내지 약 4.0×10^6 세포/mL, 약 2.5×10^6 세포/mL 내지 약 3.0×10^6 세포/mL, 약 3.0×10^6 세포/mL 내지 약 10×10^6 세포/mL, 약 3.0×10^6 세포/mL 내지 약 9.0×10^6 세포/mL, 약 3.0×10^6 세포/mL 내지 약 8.0×10^6 세포/mL, 약 3.0×10^6 세포/mL 내지 약 7.0×10^6 세포/mL, 약 3.0×10^6 세포/mL 내지 약 6.0×10^6 세포/mL, 약 3.0×10^6 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 세포/mL, 약 3.0×10^6 세포/mL 내지 약 4.0×10^6 세포/mL, 약 4.0×10^6 세포/mL 내지 약 10×10^6 세포/mL, 약 4.0×10^6 세포/mL 내지 약 9.0×10^6 세포/mL, 약 4.0×10^6 세포/mL 내지 약 8.0×10^6 세포/mL, 약 4.0×10^6 세포/mL 내지 약 7.0×10^6 세포/mL, 약 4.0×10^6 세포/mL 내지 약 6.0×10^6 세포/mL, 약 4.0×10^6 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 10×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 9.0×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 8.0×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 7.0×10^6 세포/mL, 약 5.0×10^6 세포/mL 내지 약 6.0×10^6 세포/mL, 약 6.0×10^6 세포/mL 내지 약 10×10^6 세포/mL, 약 6.0×10^6 세포/mL 내지 약 9.0×10^6 세포/mL, 약 6.0×10^6 세포/mL 내지 약 8.0×10^6 세포/mL, 약 6.0×10^6 세포/mL 내지 약 7.0×10^6 세포/mL, 약 7.0×10^6 세포/mL 내지 약 10×10^6 세포/mL, 약 7.0×10^6 세포/mL 내지 약 9.0×10^6 세포/mL, 약 7.0×10^6 세포/mL 내지 약 8.0×10^6 세포/mL, 약 8.0×10^6 세포/mL 내지 약 10×10^6 세포/mL, 약 8.0×10^6 세포/mL 내지 약 9.0×10^6 세포/mL, 또는 약 9.0×10^6 세포/mL 내지 약 10×10^6 세포/mL) 범위의 초기 세포 밀도를 가진 생산용 세포 배양물을 제공하는 단계를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 생산용 세포 배양물의 초기 세포 밀도는 정상 상태 생산용 세포 밀도의 적어도 약 8%(예를 들어, 적어도 약 10%, 적어도 약 12%, 적어도 약 14%, 적어도 약 16%, 적어도 약 18%, 적어도 약 20%, 적어도 약 22%, 적어도 약 24%, 적어도 약 26%, 적어도 약 28%, 적어도 약 30%, 적어도 약 32%, 적어도 약 34%, 적어도 약 36%, 적어도 약 38%, 적어도 약 40%, 또는 적어도 약 50%)이다. 예를 들어, 생산용 세포 배양물의 초기 세포 밀도는 정상 상태 생산용 세포 밀도의 약 4.0% 내지 약 30%(예를 들어, 약 4.0% 내지 약 28%, 약 4.0% 내지 약 26%, 약 4.0% 내지 약 24%, 약 4.0% 내지 약 22%, 약 4.0% 내지 약 20%, 약 4.0% 내지 약 18%, 약 4.0% 내지 약 16%, 약 4.0% 내지 약 14%, 약 4.0% 내지 약 12%, 약 4.0% 내지 약 10%, 약 4.0% 내지 약 8.0%, 약 4.0% 내지 약 6.0%, 약 5.0% 내지 약 30%, 약 5.0% 내지 약 28%, 약 5.0% 내지 약 26%, 약 5.0% 내지 약 24%, 약 5.0% 내지 약 22%, 약 5.0% 내지 약 20%, 약 5.0% 내지 약 18%, 약 5.0% 내지 약 16%, 약 5.0% 내지 약 14%, 약 5.0% 내지 약 12%, 약 5.0% 내지 약 10%, 약 5.0% 내지 약 8.0%, 약 10% 내지 약 30%, 약 10% 내지 약 28%, 약 10% 내지 약 26%, 약 10% 내지 약 24%, 약 10% 내지 약 22%, 약 10% 내지 약 20%, 약 10% 내지 약 18%, 약 10% 내지 약 16%, 약 10% 내지 약 14%, 약 10% 내지 약 12%, 약 15% 내지 약 30%, 약 15% 내지 약 28%, 약 15% 내지 약 26%, 약 15% 내지 약 24%, 약 15% 내지 약 22%, 약 15% 내지 약 20%, 약 15% 내지 약 18%, 약 20% 내지 약 30%, 약 20% 내지 약 28%, 약 20% 내지 약 26%, 약 20% 내지 약 24%, 약 20% 내지 약 22%, 약 25% 내지 약 30%, 또는 약 25% 내지 약 28%)일 수 있다. 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 생산용 세포 배양물에 대해 약 0.25×10^6 세포/mL 내지 약 10×10^6 세포/mL 범위의 초기 세포 밀도에 도달하도록 제3 배양 배지 내에 배치할 제2 세포 배양물의 적절한 부피는 제2 세포 배양물의 세포 밀도 및 생산용 생물반응기 내 제3 배양 배지의 부피로부터 결정될 수 있다. 예를 들어, 제3 세포 배양 배지 내에 배치되는 제2 세포 배양물의 부피는, 예를 들어 2.0 L 내지 800 L(예를 들어, 본원에 기술된 제2 세포 배양물 부피의 임의의 예시적 범위)일 수 있다.

[0095] 제3 세포 배양물은, 예를 들어 약 50 L 내지 약 20,000 L(예를 들어, 약 50 L 내지 약 17,500 L, 약 50 L 내지 약 15,000 L, 약 50 L 내지 약 12,500 L, 약 50 L 내지 약 10,000 L, 약 50 L 내지 약 7,500 L, 약 50 L 내지 약 5,000 L, 약 50 L 내지 약 2,500 L, 약 50 L 내지 약 1,000 L, 약 50 L 내지 약 750 L, 약 50 L 내지 약 500 L, 약 50 L 내지 약 200 L, 약 50 L 내지 약 100 L, 약 100 L 내지 약 20,000 L, 약 100 L 내지 약 17,500 L, 약 100 L 내지 약 15,000 L, 약 100 L 내지 약 12,500 L, 약 100 L 내지 약 10,000 L, 약 100 L 내지 약 7,500 L, 약 100 L 내지 약 5,000 L, 약 100 L 내지 약 2,500 L, 약 100 L 내지 약 1,000 L, 약 100 L 내지 약 750 L, 약 100 L 내지 약 500 L, 약 100 L 내지 약 250 L, 약 200 L 내지 약 20,000 L, 약 200 L 내지 약 17,500 L, 약 200 L 내지 약 15,000 L, 약 200 L 내지 약 12,500 L, 약 200 L 내지 약 10,000 L, 약 200 L 내지 약 7,500 L, 약 200 L 내지 약 5,000 L, 약 200 L 내지 약 2,500 L, 약 200 L 내지 약 1,000 L, 약 200 L 내지 약 750 L, 약 200 L 내지 약 500 L, 약 200 L 내지 약 250 L, 약 500 L 내지 약 20,000 L, 약 500 L 내지 약 17,500 L, 약 500 L 내지 약 15,000 L, 약 500 L 내지 약 12,500 L, 약 500 L 내지 약 10,000 L, 약 500 L 내지 약 7,500 L, 약 500 L 내지 약 5,000 L, 약 500 L 내지 약 2,500 L, 약 500 L 내지 약 1,000 L, 약 500 L 내지 약 750 L, 약 750 L 내지 약 20,000 L, 약 750 L 내지 약 17,500 L, 약 750 L 내지 약 15,000 L, 약 750 L 내지 약 12,500 L, 약 750 L 내지 약 10,000 L, 약 750 L 내지 약 7,500 L, 약 750 L 내지 약 5,000 L, 약 750 L 내지 약 2,500 L, 약 750 L 내지 약 1,000 L, 약 1,000 L 내지 약 20,000 L, 약 1,000 L 내지 약 17,500 L, 약 1,000 L 내지 약 15,000 L, 약 1,000 L 내지 약 12,500 L, 약 1,000 L 내지 약 10,000 L, 약 1,000 L 내지 약 7,500 L, 약 1,000 L 내지 약 5,000 L, 약 1,000 L 내지 약 2,500 L, 약 2,500 L 내지 약 20,000 L, 약 2,500 L 내지 약 17,500 L, 약 2,500 L 내지 약 15,000 L, 약 2,500 L 내지 약 12,500 L, 약 2,500 L 내지 약 10,000 L, 약 2,500 L 내지 약 7,500 L, 약 2,500 L 내지 약 5,000 L, 약 5,000 L 내지 약 20,000 L, 약 5,000 L 내지 약 17,500 L, 약 5,000 L 내지 약 15,000 L, 약 5,000 L 내지 약 12,500 L, 약 5,000 L 내지 약 10,000 L, 약 5,000 L 내지 약 7,500 L, 약 7,500 L 내지 약 20,000 L, 약 7,500 L 내지 약 17,500 L, 약 7,500 L 내지 약 15,000 L, 약 7,500 L 내지 약 12,500 L, 약 7,500 L 내지 약 10,000 L, 약 10,000 L 내지 약 20,000 L, 약 10,000 L 내지 약 17,500 L, 약 10,000 L 내지 약 15,000 L, 약 10,000 L 내지 약 12,500 L, 약 12,500 L 내지 약 20,000 L, 약 12,500 L 내지 약 17,500 L, 약 12,500 L 내지 약 15,000 L, 약 15,000 L 내지 약 20,000 L, 약 15,000 L 내지 약 17,500 L, 또는 약 17,500 L 내지 약 20,000 L)의 부피를 가질 수 있다.

[0096] 이 방법들에 사용되는 생산용 생물반응기는, 예를 들어 100 L 내지 약 25,000 L(예를 들어, 약 100 L 내지 약 22,500 L, 약 100 L 내지 약 20,000 L, 약 100 L 내지 약 17,500 L, 약 100 L 내지 약 15,000 L, 약 100 L 내지 약 12,500 L, 약 100 L 내지 약 10,000 L, 약 100 L 내지 약 7,500 L, 약 100 L 내지 약 5,000 L, 약 100 L 내지 약 2,500 L, 약 100 L 내지 약 1,000 L, 약 100 L 내지 약 500 L, 약 100 L 내지 약 250 L, 약 200 L 내지 약 25,000 L, 약 200 L 내지 약 22,500 L, 약 200 L 내지 약 20,000 L, 약 200 L 내지 약 17,500 L, 약 200 L 내지 약 15,000 L, 약 200 L 내지 약 12,500 L, 약 200 L 내지 약 10,000 L, 약 200 L 내지 약 7,500 L, 약 200 L 내지 약 5,000 L, 약 200 L 내지 약 2,500 L, 약 200 L 내지 약 1,000 L, 약 200 L 내지 약 750 L, 약 200 L 내지 약 500 L, 약 200 L 내지 약 250 L, 약 500 L 내지 약 25,000 L, 약 500 L 내지 약 22,500 L, 약 500 L 내지 약 20,000 L, 약 500 L 내지 약 17,500 L, 약 500 L 내지 약 15,000 L, 약 500 L 내지 약 12,500 L, 약 500 L 내지 약 10,000 L, 약 500 L 내지 약 7,500 L, 약 500 L 내지 약 5,000 L, 약 500 L 내지 약 2,500 L, 약 500 L 내지 약 1,000 L, 약 500 L 내지 약 750 L, 약 1,000 L 내지 약 25,000 L, 약 1,000 L 내지 약 22,500 L, 약 1,000 L 내지 약 20,000 L, 약 1,000 L 내지 약 17,500 L, 약 1,000 L 내지 약 15,000 L, 약 1,000 L 내지 약 12,500 L, 약 1,000 L 내지 약 10,000 L, 약 1,000 L 내지 약 7,500 L, 약 1,000 L 내지 약 5,000 L, 약 1,000 L 내지 약 2,500 L, 약 5,000 L 내지 약 25,000 L, 약 5,000 L 내지 약 22,500 L, 약 5,000 L 내지 약 20,000 L, 약 5,000 L 내지 약 17,500 L, 약 5,000 L 내지 약 15,000 L, 약 5,000 L 내지 약 12,500 L, 약 5,000 L 내지 약 10,000 L, 약 5,000 L 내지 약 7,500 L, 약 7,500 L 내지 약 25,000 L, 약 7,500 L 내지 약 22,500 L, 약 7,500 L 내지 약 20,000 L, 약 7,500 L 내지 약 17,500 L, 약 7,500 L 내지 약 15,000 L, 약 7,500 L 내지 약 12,500 L, 약 7,500 L 내지 약 10,000 L, 약 10,000 L 내지 약 25,000 L, 약 10,000 L 내지 약 22,500 L, 약 10,000 L 내지 약 20,000 L, 약 10,000 L 내지 약 17,500 L, 약 10,000 L 내지 약 15,000 L, 약 10,000 L 내지 약 12,500 L, 약 12,500 L 내지 약 25,000 L, 약 12,500 L 내지 약 22,500 L, 약 12,500 L 내지 약 20,000 L, 약 12,500 L 내지 약 17,500 L, 약 12,500 L 내지 약 15,000 L, 약 15,000 L 내지 약 25,000 L, 약 15,000 L 내지 약 22,500 L, 약 15,000 L 내지 약 20,000 L, 약 15,000 L 내지 약 17,500 L, 약 17,500 L 내지 약 25,000 L, 약 17,500 L 내지 약 22,500 L, 약 17,500 L 내지 약 20,000 L, 약 20,000 L 내지 약 25,000 L, 약 20,000 L 내지 약 22,500 L, 또는 약 22,500 L 내지 약 25,000 L)의 내부 용적을 가질 수 있다.

- [0097] 생산용 생물반응기는 당해 분야에 알려진 임의의 적절한 생물반응기(예를 들어, 대규모 관류 생물반응기, 회분 생물반응기, 또는 유가 생물반응기)일 수 있다. 예를 들어, 적절한 생산용 생물반응기는 Xcellerex, Thermo Fisher, 및 GE Healthcare로부터 입수할 수 있다. 예를 들어, 대규모 생산용 생물반응기(예를 들어, 관류, 회분, 또는 유가 생물반응기)는 Holloway American (Springfield, MO)에 의해 제조되고 Cotter Brothers Corporation (Danvers, MA)에서 생물반응기 스킴드 상에 조립된다.
- [0098] **포유류 세포**
- [0099] 제조합 포유류 세포는 인간, 마우스, 햄스터, 또는 원숭이 세포일 수 있다. 예를 들어, 제조합 포유류 세포는 세포주, 예를 들어 중국 햄스터 난소(CHO) 세포(예를 들어, CHO DG44 세포, CHO-K1s 세포, C02.31 클론 세포, A14.13 클론 세포, C02.57 클론 세포, 및 F05.43 클론 세포), Sp2.0, 골수종 세포(예를 들어, NS/O), B-세포, 하이브리도마 세포, T-세포, 인간 배아 신장(HEK) 세포(예를 들어, HEK 293E 및 HEK 293F), 아프리카 녹색 원숭이 신장 상피 세포(Vero) 세포, 또는 Madin-Darby 개과(Cocker Spaniel) 신장 상피 세포(MDCK) 세포일 수 있다.
- [0100] 제조합 단백질을 인코딩하는 핵산은 분자 생물학 및 분자 유전학에 알려진 매우 다양한 방법을 사용하여 포유류 세포에 도입되어 제조합 포유류 세포를 제조할 수 있다. 비제한적 예는 트랜스펙션(예를 들어, 리포펙션), 형질 도입(예를 들어, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 또는 레트로바이러스 감염), 및 전기천공법을 포함한다. 일부 경우에, 제조합 단백질을 인코딩하는 핵산은 제조합 포유류 세포의 염색체에 안정적으로 통합되지 않는 반면(일시적 트랜스펙션), 다른 제조합 포유류 세포에서 핵산은 통합된다. 대안적으로 또는 추가로, 제조합 단백질을 인코딩하는 핵산은 플라스미드 및/또는 포유류 인공 염색체(예를 들어, 인간 인공 염색체)에 존재할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 핵산은 바이러스 벡터(예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 또는 아데노바이러스 벡터)를 사용하여 포유류 세포에 도입될 수 있다. 핵산은 프로모터 서열(예를 들어, β -액틴 프로모터 및 CMV 프로모터와 같은 강한 프로모터, 또는 유도성 프로모터)에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 핵산을 포함하는 벡터는 원하는 경우, 선택 가능한 마커(예를 들어, 포유류 세포에 히그로마이신, 푸로마이신, 또는 네오마이신 내성을 부여하는 유전자)를 포함할 수도 있다.
- [0101] **액체 배양 배지**
- [0102] 액체 배양 배지(배양 배지)는 당해 분야에 알려져 있다. 액체 배양 배지는 포유류 혈청(예를 들어, 태아 송아지 혈청 및 우태아 혈청), 및/또는 성장 호르몬 또는 성장 인자(예를 들어, 인슐린, 트랜스페린, 및 상피 성장 인자)로 보충될 수 있다. 본원에 기술된 임의의 액체 배양 배지는 동물-유래 성분이 없는 액체 배양 배지, 혈청이 없는 액체 배양 배지, 또는 혈청-함유 액체 배양 배지, 화학적으로 규정된 액체 배양 배지, 및 단백질이 없는 액체 배양 배지의 군으로부터 선택될 수 있다. 화학적으로 규정된 액체 배양 배지, 동물-유래 성분이 없는 액체 배양 배지, 혈청이 없는 액체 배양 배지, 및 혈청-함유 액체 배양 배지의 비제한적 예는 상업적으로 이용 가능하다.
- [0103] 액체 배양 배지는 일반적으로 에너지원(예를 들어, 글루코오스와 같은 탄수화물), 필수 아미노산(예를 들어, 20 개의 아미노산의 기본 세트 및 시스테인), 비타민 및/또는 저 농도로 요구되는 기타 유기 화합물, 자유 지방산, 및/또는 미량 원소를 포함한다. 액체 배양 배지(예를 들어, 제1 및/또는 제2 액체 배양 배지)는, 원하는 경우, 예를 들어, 포유류 호르몬 또는 성장 인자(예를 들어, 인슐린, 트랜스페린, 또는 상피 성장 인자), 염 및 완충제(예를 들어, 칼슘, 마그네슘, 및 포스페이트 염), 뉴클레오타이드 및 염기(예를 들어, 아데노신, 티미딘, 및 하이폭산틴), 단백질 및 조직 가수분해물, 및/또는 이러한 첨가제들의 임의의 조합으로 보충될 수 있다.
- [0104] 본원에 기술된 임의의 방법의 임의의 단계에서 세포(예를 들어, 포유류 세포)를 배양하기 위해 사용될 수 있는 매우 다양한 상이한 액체 배양 배지는 당해 분야에 알려져 있다. 본 공정에 유용할 수도 있는 배지 성분들은 화학적으로 규정된(CD) 가수분해물, 예를 들어, CD 펩톤, CD 폴리펩티드(2개 이상의 아미노산), 및 CD 성장 인자를 포함하지만, 이들로 한정되는 것은 아니다. 액체 조직 배양 배지 및 배지 성분의 추가 예는 당해 분야에 알려져 있다.
- [0105] 제조합 포유류 세포 배양물로부터 얻은 액체 배양 배지는 세포 및/또는 바이러스가 실질적으로 존재하지 않는 액체 배양 배지를 얻기 위해 여과되거나 정화될 수 있다. 세포를 제거하기 위해 액체 배양 배지를 여과 또는 정화하기 위한 방법은 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 0.2 μ m 여과 및 교번 접선 유동(ATF™) 시스템, 접선 유동 여과(TFF) 시스템, 또는 미국 특허출원 제61/878,502호에 기술된 임의의 여과 시스템을 이용한 여과). 제조합 세포는 또한 원심분리기를 이용하여 세포가 실질적으로 존재하지 않는 액체 배양 배지인 상청액을

제거하거나, 액체 배양 배지를 포함하는 용기(예를 들어, 베셀)의 중력 바닥에 세포를 가라앉도록 하여, 가라앉은 재조합 포유류 세포로부터 떨어진 액체 배양 배지(세포가 실질적으로 존재하지 않는 액체 배양 배지)를 제거함으로써 액체 배양 배지로부터 제거될 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 배양 배지, 제2 배양 배지, 제3 배양 배지, 및 제4 배양 배지 중 하나 이상(예를 들어, 둘, 셋, 또는 모두)은 동일하다.

[0106] 본원에 기술된 임의의 방법의 임의의 단계에 사용되는 액체 배양 배지는 본원에 기술되거나 당해 분야에 알려진 임의의 타입의 액체 배양 배지일 수 있다. 본원에 기술된 재조합 단백질을 분리시키는 임의의 예시적 방법에서, 생산용 세포 배양물로부터 얻은 액체 배양 배지는 제1 MCCS(예를 들어, 제1 PCCS)에 공급되기 전에 제2 유체(예를 들어, 완충액)의 첨가에 의해 희석될 수 있다.

[0107] 세포가 실질적으로 존재하지 않는 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 치료 단백질)을 포함하는 액체 배양 배지는, 재조합 단백질을 분리시키기 전에(예를 들어, 액체 배양 배지를 제1 MCCS(예를 들어 제1 PCCS)에 공급하기 전에), 예를 들어, 약 15℃ 미만(예를 들어, 약 10℃ 미만, 약 4℃ 미만, 약 0℃ 미만, 약 -20℃ 미만, 약 -50℃ 미만, 약 -70℃ 미만, 또는 약 -80℃ 미만)의 온도에서 적어도 1일(예를 들어, 적어도 약 2일, 적어도 약 5일, 적어도 약 10일, 적어도 약 15일, 적어도 약 20일, 또는 적어도 약 30일) 동안 저장될 수 있다. 대안적으로, 일부 예에서, 세포가 실질적으로 존재하지 않는 재조합 단백질을 포함하는 액체 배양 배지는 재조합 단백질을 분리시키기 위해 사용되는 시스템에 공급된다(예를 들어, 생산용 생물반응기로부터 직접 제1 MCCS(예를 들어, 제1 PCCS)에 공급된다(예를 들어, 여과 또는 정화 단계 후 생산용 생물반응기로부터 직접 제1 MCCS(예를 들어, 제1 PCCS)에 공급된다)).

[0108] 재조합 단백질

[0109] 재조합 단백질은 재조합 치료 단백질일 수 있다. 본원에 제공된 방법에 의해 제조될 수 있는 재조합 치료 단백질의 비제한적 예는 면역글로불린(경쇄 및 중쇄 면역글로불린을 포함), 항체, 또는 항체 단편(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 항체 단편), 효소(예를 들어, 갈락토시다아제(예를 들어, 알파-갈락토시다아제), Myozyme®, 또는 Cerezyme®), 단백질(예를 들어, 인간 에리스로포이에틴, 종양 괴사 인자(TNF), 또는 인터페론 알파 또는 베타), 또는 면역원성 또는 항원성 단백질 또는 단백질 단편(예를 들어, 백신에서 사용하기 위한 단백질)을 포함한다. 재조합 치료 단백질은 적어도 하나의 다기능성 재조합 단백질 스캐폴드를 포함하는 조작된 항원-결합 폴리펩티드일 수 있다(예를 들어, (그 전체가 본원에 참조로 통합된) Gebauer et al., Current Opin. Chem. Biol. 13:245~255, 2009, 및 미국 특허 출원 공개 제2012/0164066호에 기술된 재조합 항원-결합 단백질 참조). 항체인 재조합 치료 단백질의 비-제한적인 예는 파니투무맙(panitumumab), 오말리주맙(omalizumab), 아바고보맙(abagovomab), 압식시맙(abciximab), 악톡수맙(actoxumab), 아달리무맙(adalimumab), 아데카투무맙(adecatumumab), 아펠리모맙(afelimomab), 아푸투주맙(afutuzumab), 알라시주맙(alacizumab), 알라시주맙(alacizumab), 알렘투주맙(alemtuzumab), 알리코쿠맙(alirocucumab), 알투모맙(altumomab), 아마투시맙(amatuximab), 아마투시맙(amatuximab), 아나투모맙(anatumomab), 안루킨주맙(anrukinzumab), 아폴리주맙(apolizumab), 아크시투모맙(arcitumomab), 아티누맙(atinumab), 토실리주맙(tocilizumab), 바실리지맙(basilizumab), 벡투모맙(bectumomab), 벨리무맙(belimumab), 베바시주맙(bevacizumab), 베실레소맙(besilesomab), 베즐로톡수맙(bezlotoxumab), 비시로맙(biciromab), 카나키누맙(canakinumab), 세톨리주맙(certolizumab), 세톡시맙(cetuximab), 식수투무맙(cixutumumab), 다클리주맙(daclizumab), 데노수맙(denosumab), 덴수맙(densumab), 에쿨리주맙(eculizumab), 에드레콜로맙(edrecolomab), 에팔리주맙(efalizumab), 에폰구맙(efungumab), 에프라투주맙(epratuzumab), 에르투막소맙(ertumaxomab), 에타라시주맙(etaracizumab), 피지투무맙(figitumumab), 골리무맙(golimumab), 이브리투모맙 튜세탄(ibrutumomab tiuxetan), 이고보맙(igovomab), 임가투주맙(imgatuzumab), 인플릭시맙(infliximab), 이놀리모맙(inolimomab), 이노투주맙(inotuzumab), 라베투주맙(labetuzumab), 레브리키주맙(lebrikizumab), 목세투모맙(moxetumomab), 나탈리주맙(natalizumab), 오비누투주맙(obinutuzumab), 오레고보맙(oregovomab), 팔리비주맙(palivizumab), 파니투무맙(panitumumab), 페르투주맙(pertuzumab), 라니비주맙(ranibizumab), 리톡시맙(rituximab), 토실리주맙(tocilizumab), 토시투모맙(tositumomab), 트랄로키누맙(tralokinumab), 투코투주맙(tucotuzumab), 트라스투주맙(trastuzumab), 벨투주맙(veltuzumab), 잘루투무맙(zalutumumab), 및 자톡시맙(zatuximab)을 포함한다. 본원에 기술된 방법에 의해 제조될 수 있는 재조합 치료 항체의 추가 예는 당해 분야에 알려져 있다. 본 방법에 의해 제조될 수 있는 재조합 치료 단백질의 추가의 비제한적 예는 알글루코시다아제 알파, 라로니다아제, 아바타셉트, 갈실과제, 루트로핀 알파, 항혈우병 인자, 아갈시다아제 베타, 인터페론 베타-1a, 다르베포에틴 알파, 테넥테플라아제, 에타네르셉트, 웅고 인자 IX, 난포 자극 호르몬, 인터페론 베타-1a, 이미글루세라아제, 도나아제 알파, 에포에틴 알파, 인슐린 또는 인슐린 유사체, 메카세르민, 인자 VIII, 인자 VIIa, 항-트롬빈 III, 단백

질 C, 인간 알부민, 에리스로포이에틴, 과립구 콜로니 자극 인자, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자, 인터루킨-11, 라로니다아제, 이두설파아제, 갈설파아제, α -1 프로테이나아제 억제제, 락타아제, 아테노신 데아미나아제, 조직 플라스미노겐 활성제, 티로트로 핀 알파(Thyrogen®) 및 알테플라아제를 포함한다. 본 방법에 의해 제조될 수 있는 재조합 단백질의 추가 예는 산성 α -글루코시다아제, 알글루코시다아제 알파(예를 들어, Myozyme® 및 Lumizyme®), α -L-이두로니다아제(예를 들어, Aldurazyme®), 이두로네이트 설파타아제, 헤파란 N-설파타아제, 갈락토오스-6-설파타아제, 산성 β -갈락토시다아제, β -글루쿠로니다아제, N-아세틸글루코사민, 1-포스포트랜스퍼라아제, α -N-아세틸갈락토사미니다아제, 산성 리파아제, 리소좀 산 세라미다아제, 산성 스팅고미엘리나아제, β -글루코시다아제(예를 들어, Cerezyme® 및 Ceredase®), 갈락토실세라미다아제, α -갈락토시다아제-A(예를 들어, Fabrazyme®), 산성 β -갈락토시다아제, β -갈락토시다아제, 뉴라미니다아제, 헥소사미니다아제 A, 및 헥소사미니다아제 B를 포함한다.

[0110] 분비 가용성 재조합 단백질은 세포(예를 들어, 포유류 세포)로부터 액체 배양 배지를 제거하거나 달리 물리적으로 분리하여 액체 배양 배지로부터 회수될 수 있다. 세포(예를 들어, 포유류 세포)로부터 액체 배양 배지를 제거하기 위한 여러 상이한 방법은, 예를 들어, 원심분리, 여과, 피펫팅, 및/또는 흡인을 포함하여, 당해 분야에 공지되어 있다. 분비 재조합 치료 단백질은 이후 여러 타입의 크로마토그래피(예를 들어, 친화성 크로마토그래피, 분자체 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 또는 음이온 교환 크로마토그래피) 및/또는 여과(예를 들어, 분획 분자량 여과)를 포함한 다양한 생화학 기술을 이용하여 액체 배양 배지로부터 회수되고 분리될 수 있다.

[0111] **배양 파라미터**

[0112] 본원에 기술된 임의의 회분 또는 관류 배양 단계는 약 31°C 내지 약 40°C의 온도에서 수행될 수 있다. 당업자는 배양 단계 중에 특정 시점(들)에, 예를 들어 매 시간 또는 매일, 온도가 변경될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 베셀(예를 들어, 생물반응기)을 세포(예를 들어, 재조합 포유류 세포)로 초기 시딩한 후 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 또는 약 20일 또는 그 후에 온도가 변화되거나 달라질 수 있다(예를 들어, 높아지거나 낮아질 수 있다). 예를 들어, 온도는 높아질 수 있다(예를 들어, 최대 또는 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 최대 또는 약 20°C의 변화). 예를 들어, 온도는 낮아질 수 있다(최대 또는 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 최대 또는 약 20°C의 변화).

[0113] 본원에 기술된 관류 및 회분 배양 단계는 베셀, 관류 생물반응기, 또는 생산용 생물반응기 내 액체 배양 배지를 최대 또는 약 15%의 CO₂(예를 들어, 최대 또는 약 14%의 CO₂, 12%의 CO₂, 10%의 CO₂, 8%의 CO₂, 6%의 CO₂, 5%의 CO₂, 4%의 CO₂, 3%의 CO₂, 2%의 CO₂, 또는 최대 또는 약 1%의 CO₂)를 포함하는 분위기에 노출시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 베셀, 관류 생물반응기, 또는 생산용 생물반응기는 제어된 가습 분위기(예를 들어, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가 넘는 습도, 또는 100%의 습도)에서 세포 배양물을 배양할 수 있다. 관류 및 생산용 생물반응기는 또한, 생물반응기로부터 소정 부피의 액체 배양 배지를 제거할 수 있는 기계 장치를 구비할 수 있고, 생물반응기로부터 액체 배양 배지를 전달하는 공정 중에 액체 배양 배지로부터 세포를 제거하는 기계 장치 내 필터(예를 들어, ATF 시스템)를 선택적으로 구비할 수 있다.

[0114] 본원에 기술된 임의의 베셀, 관류 생물반응기, 또는 생산용 생물반응기의 내부 표면은 적어도 하나의 코팅(예를 들어, 젤라틴, 콜라겐, 폴리-L-오르니틴, 폴리스티렌, 및 라미닌 중 적어도 하나의 코팅)을 가질 수 있고, 당해 분야에 알려진 바와 같이, 액체 배양 배지에 O₂, CO₂, 및 N₂를 뿌리기 위한 하나 이상의 포트를 가질 수 있고, 액체 배양 배지를 교반하기 위한 교반 기구를 가질 수 있으며, 하나 이상의 센서(예를 들어, 용존 O₂ 및 용존 CO₂ 센서)를 가질 수 있다.

[0115] **재조합 단백질 제조 방법**

[0116] 전술한 임의의 예시적 시드 트레인 공정 및 (f) 재조합 포유류 세포가 재조합 단백질을 분비할 수 있는 조건 하에서 생산용 세포 배양물을 관류 배양하는 단계, 및 생산용 세포 배양물로부터 재조합 단백질을 채취하는 단계의 추가 단계를 포함하는 재조합 단백질 제조 방법이 또한 제공된다.

[0117] 재조합 단백질을 제조하는 다른 방법은 본원에 제공된 임의의 예시적 시드 트레인 공정 및 (f) 재조합 세포가

재조합 단백질을 분비할 수 있는 조건 하에서 생산용 세포 배양물을 회분 또는 유가 배양하는 단계, 및 생산용 세포 배양물로부터 재조합 단백질을 채취하는 단계의 추가 단계를 포함한다.

[0118] 생산용 세포 배양물의 관류 배양은 본원에 기술되거나 당해 분야에 알려진 임의의 예시적 관류 배양 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, (제2 세포 배양물을 제3 배양 배지 내에 배치한 후) 생산용 세포 배양물의 생성과 생산용 세포 배양물이 정상 상태 생산용 세포 밀도에 도달하는 시간 사이의 기간은 약 1.5일 내지 약 5.0일(예를 들어, 약 1.5일 내지 약 4.0일, 약 1.5일 내지 약 3.5일, 약 1.5일 내지 약 3.0일, 약 1.5일 내지 약 2.5일, 약 1.5일 내지 2.0일, 약 2.0일 내지 약 5.0일, 약 2.0일 내지 약 4.5일, 약 2.0일 내지 약 4.0일, 약 2.0일 내지 약 3.5일, 약 2.0일 내지 약 3.0일, 약 2.0일 내지 약 2.5일, 약 2.5일 내지 약 5일, 약 2.5일 내지 약 4.5일, 약 2.5일 내지 약 4.0일, 약 2.5일 내지 약 3.5일, 약 2.5일 내지 약 3.0일, 약 3.0일 내지 약 5.0일, 약 3.0일 내지 약 4.5일, 약 3.0일 내지 약 4.0일, 약 3.0일 내지 약 3.5일, 약 3.5일 내지 약 5.0일, 약 3.5일 내지 약 4.5일, 약 3.5일 내지 약 4.0일, 약 4.0일 내지 약 5.0일, 약 4.0일 내지 약 4.5일, 또는 약 4.5일 내지 약 5.0일)이다. 생산용 세포 배양물의 관류 배양은, 예를 들어 5.0일 내지 200일(예를 들어, 5.0일 내지 190일, 5.0일 내지 180일, 5.0일 내지 170일, 5.0일 내지 160일, 5.0일 내지 150일, 5.0일 내지 140일, 5.0일 내지 130일, 5.0일 내지 120일, 5.0일 내지 110일, 5.0일 내지 110일, 5.0일 내지 100일, 5.0일 내지 90일, 5.0일 내지 80일, 5.0일 내지 70일, 5.0일 내지 60일, 5.0일 내지 50일, 5.0일 내지 40일, 5.0일 내지 30일, 5.0일 내지 20일, 5.0일 내지 10일, 10일 내지 200일, 10일 내지 190일, 10일 내지 180일, 10일 내지 170일, 10일 내지 160일, 10일 내지 150일, 10일 내지 140일, 10일 내지 130일, 10일 내지 120일, 10일 내지 110일, 10일 내지 100일, 10일 내지 90일, 10일 내지 80일, 10일 내지 70일, 10일 내지 60일, 10일 내지 50일, 10일 내지 40일, 10일 내지 30일, 10일 내지 20일, 20일 내지 200일, 20일 내지 190일, 20일 내지 180일, 20일 내지 170일, 20일 내지 160일, 20일 내지 150일, 20일 내지 140일, 20일 내지 130일, 20일 내지 120일, 20일 내지 110일, 20일 내지 100일, 20일 내지 90일, 20일 내지 80일, 20일 내지 70일, 20일 내지 60일, 20일 내지 50일, 20일 내지 40일, 30일 내지 200일, 30일 내지 190일, 30일 내지 180일, 30일 내지 170일, 30일 내지 160일, 30일 내지 150일, 30일 내지 140일, 30일 내지 130일, 30일 내지 120일, 30일 내지 110일, 30일 내지 100일, 30일 내지 90일, 30일 내지 80일, 30일 내지 70일, 30일 내지 60일, 30일 내지 50일, 30일 내지 40일, 40일 내지 200일, 40일 내지 190일, 40일 내지 180일, 40일 내지 170일, 40일 내지 160일, 40일 내지 150일, 40일 내지 140일, 40일 내지 130일, 40일 내지 120일, 40일 내지 110일, 40일 내지 100일, 40일 내지 90일, 40일 내지 80일, 40일 내지 70일, 40일 내지 60일, 40일 내지 50일, 50일 내지 200일, 50일 내지 190일, 50일 내지 180일, 50일 내지 170일, 50일 내지 160일, 50일 내지 150일, 50일 내지 140일, 50일 내지 130일, 50일 내지 120일, 50일 내지 110일, 50일 내지 100일, 50일 내지 90일, 50일 내지 80일, 50일 내지 70일, 50일 내지 60일, 75일 내지 200일, 75일 내지 175일, 75일 내지 150일, 50일 내지 125일, 50일 내지 100일, 50일 내지 75일, 75일 내지 200일, 75일 내지 175일, 75일 내지 200일, 75일 내지 175일, 75일 내지 150일, 75일 내지 125일, 75일 내지 100일, 100일 내지 200일, 100일 내지 175일, 100일 내지 150일, 100일 내지 125일, 125일 내지 200일, 125일 내지 175일, 125일 내지 150일, 150일 내지 200일, 150일 내지 175일, 또는 175일 내지 200일)의 기간 동안 포함될 수 있다.

[0119] 배양 배지는 생산용 생물반응기로부터 연속적 또는 주기적 제거(예를 들어, 관류 배양 중에 동시에 또는 다양한 빈도로)에 의해 제거될 수 있다. 배양 배지는 수동으로(예를 들어, 피펫팅에 의해) 또는 펌프 시스템(예를 들어, 교반 접선 유동(ATF) 여과 시스템 또는 접선 유체 여과)에 의해 제거될 수 있다.

[0120] 재조합 단백질의 분리

[0121] 본원에 기술된 재조합 단백질 제조 방법은 (관류 배양 중에) 생산용 생물반응기로부터 제거된 배양 배지로부터 재조합 단백질을 분리시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 생산용 생물반응기로부터 제거된 배양 배지로부터 재조합 단백질을 분리시키는 단계는 포집, 정제, 폴리싱, 바이러스 비활성화, 재조합 단백질을 포함하는 유체의 이온 농도 및/또는 pH 조절, 및 여과의 군으로부터 선택되는 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개)의 단위 조작 수행을 포함할 수 있다. 예를 들어, 재조합 단백질을 분리시키는 하나 이상의 단위 조작은 재조합 단백질을 포함하는 유체를 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 또는 5개)의 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템(MCCS)을 통과시켜 수행될 수 있다. 배양 배지로부터 재조합 단백질을 분리시키는 단계는 통합 연속 공정을 이용하여 수행될 수 있다.(예를 들어, 예시적 공정은 미국 가특허 출원 제61/775,060호, 미국 가특허출원 제 61/856,390호, 미국 특허출원 제14/195,481호, 국제특허출원 제PCT/US2014/019909호 및 미국 가특허출원 제61/928,906호에 기술되어 있으며, 각 출원의 전체 내용은 본원에 참조로 통합된다). 예시적 공정은 세포가 실질적으로 존재하지 않는 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 치료 단백질)을 포함하는 액체 배양 배지(예를 들어, 생산용 생물반응기

로부터 제거되고 ATF 시스템을 통해 여과된 액체 배양 배지)를 제공하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 공정은 액체 배양 배지(예를 들어, 생산용 생물반응기로부터 제거되고 ATF를 통해 여과된 액체 배양 배지)를 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼을 포함하는 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템(MCCS)에 연속적으로 공급하는 단계를 포함하며, 이들 공정은 통합형이며 액체 배양 배지로부터 정제 재조합 단백질을 제조하는 단계로부터 용출액까지 연속적으로 진행된다. 일부 공정은 액체 배양 배지(예를 들어, 생산용 생물반응기로부터 제거되고 ATF 시스템을 통해 여과된 액체 배양 배지)를 제1 MCCS(MCCS1)에 연속적으로 공급하는 단계, MCCS1을 이용하여 액체 배양 배지로부터 재조합 단백질을 포집하는 단계, 재조합 단백질을 포함하는 MCCS1으로부터 용출액을 제조하고 용출액을 제2 MCCS(MCCS2)에 연속적으로 공급하는 단계, 및 이어서 (MCCS2로부터) 재조합 단백질을 용출시켜 분리된 재조합 단백질을 제조하는 단계를 포함하며, 공정은 통합형이며 액체 배양 배지로부터 분리된 재조합 단백질을 제조하는 단계를 포함한다. 일부 구현에는 분리된 상기 재조합 단백질을 약제로 제형화하는 단계를 더 포함한다.

[0122] 임의의 이들 공정에 사용될 수 있는 MCCS(MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2)의 비제한적 양태는 (각각 본원에 참조로 통합된) 미국 가특허출원 제61/775,060호, 미국 가특허출원 제61/856,390호, 미국 특허출원 제14/195,481호, 국제특허출원 제PCT/US2014/019909호, 및 미국 가특허출원 제61/928,906호에 기술되어 있다. 이들 예시적 공정의 다양한 추가적 양태는 이하 기술되어 있고 본원에 제공된 공정에서 임의의 조합으로 제한 없이 사용될 수 있다. 제공된 공정의 예시적 양태가 이하 기술되어 있지만, 당업자는 본원에 기술된 공정에 추가 단계들이 추가될 수 있고 본원에 기술된 공정의 임의의 단계를 수행하기 위해 다른 물질들이 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0123] 본원에 기술된 예시적 공정은 하나의 MCCS 또는 둘 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 또는 6개)의 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템(MCCS)(예를 들어, MCCS1 및 MCCS2)의 사용을 포함할 수 있다. MCCS는 둘 이상의 크로마토그래피 컬럼, 둘 이상의 크로마토그래피 멤브레인, 또는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼과 적어도 하나의 크로마토그래피 멤브레인의 조합을 포함할 수 있다. 비제한적 예에서, MCCS(예를 들어, 본원의 임의의 공정에서의 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2)는 4개의 크로마토그래피 컬럼, 3개의 크로마토그래피 컬럼과 1개의 크로마토그래피 멤브레인, 3개의 크로마토그래피 컬럼, 2개의 크로마토그래피 컬럼, 2개의 크로마토그래피 멤브레인, 및 2개의 크로마토그래피 컬럼과 1개의 크로마토그래피 멤브레인을 포함할 수 있다. 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인의 조합에 대한 추가 예는 MCCS(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 공정에서의 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2)에서의 사용을 위해 당업자에 의해 제한 없이 구상될 수 있다. MCCS에 존재하는 개별 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인은 동일하거나(예를 들어, 동일한 형상, 부피, 수지, 포집 메커니즘, 및 단위 조작을 갖거나), 상이할 수 있다(예를 들어, 하나 이상의 상이한 형상, 부피, 수지, 포집 메커니즘, 및/또는 단위 조작을 가질 수 있다). MCCS(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 공정에서의 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2)에 존재하는 개별 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)은 동일한 단위 조작(예를 들어, 포집, 정제, 또는 폴리싱의 단위 조작) 또는 상이한 단위 조작(예를 들어, 포집, 정제, 폴리싱, 바이러스 비활성화, 재조합 단백질을 포함하는 유체의 이온 농도 및/또는 pH 조절, 및 여과의 균으로부터 선택되는, 예를 들어 상이한 단위 조작)을 수행할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 공정의 예에서, MCCS 또는 MCCS1의 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인은 재조합 단백질을 포집하는 단위 조작을 수행한다.

[0124] 본원에 기술된 임의의 공정에 사용되는 MCCS(예를 들어, MCCS, MCCS1 및/또는 MCCS2)의 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼은 실질적으로 동일한 수지 부피를 갖거나 상이한 수지 부피를 가질 수 있다. 본원에 기술된 임의의 공정에서 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2의 사용 시 하나 이상(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24개)의 상이한 타입의 완충액이 사용될 수 있다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 본원에 기술된 공정에서 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2에 사용되는 하나 이상의 타입의 완충액은 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2의 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)에 존재하는 수지, 재조합 단백질의 생물물리학적 성질, 및 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2의 특정 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)에 의해 수행되는 단위 조작(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 예시적 단위 조작)에 따라 달라질 것이다. 본원에 기술된 임의의 공정에서 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2의 사용 시 사용되는 완충액의 부피 및 타입은 (예를 들어, 이하 더 상세히 설명되는 바와 같이) 당업자에 의해 결정될 수도 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 임의의 공정에서 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2의 사용 시 사용되는 완충액의 부피 및 타입(들)은 분리된 재조합 단백질에서 다음 중 하나 이상을 최적화하기 위해 선택될 수 있다: 재조합 단백질의 전체 수율, 재조합 단백질의 활성, 재조합 단백질의 순도의 수준, 및 재조합 단백질을 포함하는 유체(예를 들어, 액체 배양 배지)로부터 생물학적 오염물의 제거(예를 들어, 활성 바이러스, 마이코박테리아, 효모, 박테리아, 또는 포유류 세포의 부재).

- [0125] MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2는 주기적 역류 크로마토그래피 시스템(PCCS)일 수 있다. PCCS는 예를 들어, 둘 이상의 크로마토그래피 컬럼으로부터 재조합 단백질의 연속 용출을 가능하게 하기 위해 스위칭 되는 둘 이상의 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, 3개의 컬럼 또는 4개의 컬럼)을 포함할 수 있다. PCCS는 둘 이상의 크로마토그래피 컬럼, 둘 이상의 크로마토그래피 멤브레인, 또는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼과 적어도 하나의 크로마토그래피 멤브레인을 포함할 수 있다. 컬럼 작동(사이클)은 일반적으로, 로딩, 세척, 용출, 및 재생 단계로 이루어진다. PCCS에서, 다수의 컬럼은 동일한 단계들을 개별적으로 그리고 순환 방식으로 연속적으로 진행시키기 위해 사용된다. 컬럼들은 직렬로 작동되기 때문에, 하나의 컬럼을 통한 흐름 및 하나의 컬럼으로부터의 세척은 다른 컬럼에 의해 포집된다. PCCS의 이러한 독특한 특징은 일괄 모드 크로마토그래피에서는 일반적인 것으로, 동적 결합 용량 대신에 정적 결합 용량에 가까운 수지의 로딩을 가능하게 한다. 연속 사이클링 및 용출의 결과로서, PCCS에 유입되는 유체는 연속적으로 처리되며, 재조합 단백질을 포함하는 용출액이 연속적으로 생성된다.
- [0126] 컬럼 스위칭 방식은 PCCS 사이클에서 하나의 단계로부터 다른 단계까지 진행시키기 위해 사용된다. PCCS에 사용될 수 있는 컬럼 스위칭의 예는 미국 가특허출원 제61/775,060호, 미국 가특허출원 제61/856,390호, 미국 특허출원 제14/195,481호, 국제특허출원 제PCT/US2014/019909호, 및 미국 가특허출원 제61/928,906호에 기술되어 있다. PCCS에서, 제1 컬럼/멤브레인으로부터의 누출이 PCCS의 다른 컬럼/멤브레인 상에 포집될 수 있기 때문에, PCCS에 존재하는 각 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인 상에서의 재조합 단백질의 체류 시간(RT)은 컬럼/멤브레인 크기를 증가시키지 않고 감소될 수 있다. 연속 공정 시스템은 $V = D * RT$ 의 식을 이용하여 컬럼/멤브레인 부피(V) 및 RT를 변화시킴으로써 임의의 관류 속도(D)로 액체 배양 배지를 처리하도록 설계될 수 있다.
- [0127] 본원에 기술된 공정에 사용되는 MCCS 또는 MCC1 및/또는 MCCS2에 의해 수행될 수 있는 하나 이상의 단위 조작은, 예를 들어 재조합 단백질의 포집, 재조합 단백질을 포함하는 유체에 존재하는 바이러스의 비활성화, 재조합 단백질의 정제, 재조합 단백질의 폴리싱, (예를 들어, 본원에 기술된 임의의 예시적 브레이크 탱크(들)를 사용한) 재조합 단백질을 포함하는 유체의 수용, 재조합 단백질을 포함하는 유체로부터 미립자 물질 및/또는 세포의 여과 또는 제거, 및 재조합 단백질을 포함하는 유체의 이온 농도 및/또는 pH 조절을 포함한다. 일부 구현 예에서, MCCS 또는 MCCS1은 재조합 단백질을 포집하는 단위 조작을 수행하는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인을 포함한다. 포집의 단위 조작은, 예를 들어 포집 메커니즘을 이용하는, 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 수지를 사용하여 수행될 수 있다. 포집 메커니즘의 비제한적 예는 단백질 A-결합 포집 메커니즘, 항체- 또는 항체 단편-결합 포집 메커니즘, 기질-결합 포집 메커니즘, 아프타머-결합 포집 메커니즘, 태그-결합 포집 메커니즘(예를 들어, 폴리-His 태그-기반 포집 메커니즘), 및 공동 인자-결합 포집 메커니즘을 포함한다. 포집은 또한, 양이온 교환 또는 음이온 교환 크로마토그래피, 분자체 크로마토그래피, 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행하기 위해 사용될 수 있는 수지를 사용하여 수행될 수 있다. 재조합 단백질을 포집하기 위해 사용될 수 있는 비제한적 수지는 본원에 기술되어 있다. 재조합 단백질을 포집하기 위해 사용될 수 있는 수지의 추가 예는 당해 분야에 알려져 있다.
- [0128] 재조합 단백질을 포함하는 유체에 존재하는 바이러스를 비활성화시키는 단위 조작은, (예를 들어 크로마토그래피 컬럼, 크로마토그래피 멤브레인, 또는 약 3.0 내지 5.0(예를 들어, 약 3.5 내지 약 4.5, 약 3.5 내지 약 4.25, 약 3.5 내지 약 4.0, 약 3.5 내지 약 3.8, 또는 약 3.75)의 pH에서 적어도 30분의 기간(예를 들어, 약 30분 내지 1.5시간의 기간, 약 30분 내지 1.25시간의 기간, 약 0.75시간 내지 1.25시간의 기간, 또는 약 1시간의 기간) 동안 재조합 단백질을 포함하는 유체를 배양할 수 있는 수용 탱크를 포함하는) MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0129] 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작은, 예를 들어 포집 시스템을 이용하는, 예를 들어 수지를 포함하는 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 포함하는 하나 이상의 MCCS(예를 들어, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2)를 사용하여 수행될 수 있다. 포집 메커니즘의 비제한적 예는 단백질 A-결합 포집 메커니즘, 항체- 또는 항체 단편-결합 포집 메커니즘, 기질-결합 포집 메커니즘, 아프타머-결합 포집 메커니즘, 태그-결합 포집 메커니즘(예를 들어, 폴리-His 태그-기반 포집 메커니즘), 및 공동 인자-결합 포집 메커니즘을 포함한다. 정제는 또한, 양이온 교환 또는 음이온 교환 크로마토그래피, 분자체 크로마토그래피, 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행하기 위해 사용될 수 있는 수지를 사용하여 수행될 수 있다. 재조합 단백질을 정제하기 위해 사용될 수 있는 비제한적 수지는 본원에 기술되어 있다. 재조합 단백질을 정제하기 위해 사용될 수 있는 수지의 추가 예는 당해 분야에 알려져 있다.
- [0130] 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작은, 예를 들어 양이온 교환, 음이온 교환, 분자체 크로마토그래피, 또는

소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행하기 위해 사용될 수 있는, 예를 들어 수지를 포함하는 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 포함하는 하나 이상의 MCCS(예를 들어, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2)를 사용하여 수행될 수 있다. 재조합 단백질을 폴리스싱하기 위해 사용될 수 있는 비제한적 수지는 본원에 기술되어 있다. 재조합 단백질을 폴리스싱하기 위해 사용될 수 있는 수지의 추가 예는 당해 분야에 알려져 있다.

[0131] 재조합 단백질을 포함하는 유체를 여과하는 단위 조작용, 예를 들어 필터, 또는 분자체 수지를 포함하는 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 포함하는 MCCS(예를 들어, MCCS, MCCS1 및/또는 MCCS2)를 사용하여 수행될 수 있다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 매우 다양한 서브마이크론 필터(예를 들어, 1 μm 미만, 0.5 μm 미만, 0.3 μm 미만, 약 0.2 μm , 0.2 μm 미만, 100 nm 미만, 80 nm 미만, 60 nm 미만, 40 nm 미만, 20 nm 미만, 또는 10 nm 미만의 기공 크기를 갖는 필터)는 당해 분야에서 입수 가능한 것으로서, 임의의 침전된 물질 및/또는 세포(예를 들어, 침전된, 폴딩되지 않은 단백질; 침전된, 원치 않는 숙주 세포 단백질; 침전된 지질; 박테리아; 효모 세포; 진균 세포; 마이코박테리아 및/또는 포유류 세포)를 제거할 수 있다. 약 0.2 μm 또는 0.2 μm 미만의 기공 크기를 갖는 필터는 재조합 단백질을 포함하는 유체로부터 박테리아를 효과적으로 제거하는 것으로 알려져 있다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 분자체 수지를 포함하는 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인 또한, 재조합 단백질을 포함하는 유체를 여과하는 단위 조작용을 수행하기 위해 MCCS(예를 들어, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2)에서 사용될 수 있다.

[0132] 재조합 단백질을 포함하는 유체의 이온 농도 및/또는 pH를 조절하는 단위 조작용 (예를 들어, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2 내의 컬럼들 사이에, 또는 끝에서 두 번째 MCCS(예를 들어, MCCS1)의 마지막 컬럼 이후에 그리고 재조합 단백질을 포함하는 유체가 다음 MCCS(예를 들어, MCCS2)의 제1 컬럼에 공급되기 전에) 새로운 완충 용액을 재조합 단백질을 포함하는 유체에 첨가하는 완충액 조절 저장소(예를 들어, 인라인 완충액 조절 저장소)를 포함 및 사용하는 MCCS(예를 들어, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2)를 사용하여 수행될 수 있다.

[0133] 본원에 기술된 예시적 공정에서, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2는 둘 이상의 단위 조작용을 수행할 수 있다. 예를 들어, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2 각각은 적어도 다음의 단위 조작용을 수행할 수 있다: 재조합 단백질의 포집 및 재조합 단백질을 포함하는 유체에 존재하는 바이러스의 비활성화; 재조합 단백질의 포집, 재조합 단백질을 포함하는 유체에 존재하는 바이러스의 비활성화, 및 재조합 단백질을 포함하는 액체의 이온 농도 및/또는 pH 조절; 재조합 단백질의 정제 및 재조합 단백질의 폴리스싱; 재조합 단백질의 정제, 재조합 단백질의 폴리스싱, 및 재조합 단백질을 포함하는 유체의 여과 또는 재조합 단백질을 포함하는 유체로부터 침전물 및/또는 미립자 물질 제거; 및 재조합 단백질의 정제, 재조합 단백질의 폴리스싱, 재조합 단백질을 포함하는 유체의 여과 또는 재조합 단백질을 포함하는 유체로부터 침전물 및/또는 미립자 물질 제거, 및 재조합 단백질을 포함하는 액체의 이온 농도 및/또는 pH 조절.

[0134] 본원에 기술된 예시적 공정에서, 액체 배양 배지로부터 재조합 단백질을 포집하는 단계는 MCCS 또는 MCCS1을 이용하여 수행된다. 당해 분야에서 이해될 수 있는 바와 같이, 재조합 단백질의 포집을 달성하기 위해, MCCS 또는 MCCS1의 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 적어도 하나의 크로마토그래피 멤브레인은 포집 메커니즘(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 예시적 포집 메커니즘)을 이용하는 수지를 포함해야 하거나, 양이온 교환, 음이온 교환, 분자체, 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행할 수 있는 수지를 포함한다. 예를 들어, 재조합 단백질이 항체 또는 항체 단편인 경우, 포집 시스템은 단백질 A-결합 포집 메커니즘 또는 (재조합 항체 또는 항체 단편에 의해 포집 항원이 특이적으로 인식되는) 항원-결합 포집 메커니즘일 수 있다. 재조합 단백질이 효소인 경우, 포집 메커니즘은 재조합 효소를 포집하기 위해 효소에, 재조합 효소를 포집하기 위해 효소의 기질에, 재조합 효소를 포집하기 위해 효소의 공동 인자에, 또는 재조합 효소가 태그를 포함하는 경우, 재조합 효소에 존재하는 태그에 특이적으로 결합하는 단백질, 금속 킬레이트, 또는 항체(또는 항체 단편)에, 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체 단편을 이용할 수 있다. 재조합 단백질을 포집하기 위해 사용될 수 있는 비제한적 수지는 본원에 기술되어 있으며, 재조합 단백질을 포집하기 위해 사용될 수 있는 추가적 수지는 당해 분야에 공지되어 있다. 단백질 A-결합 포집 메커니즘을 이용하는 수지의 비제한적 일례는 Mab Select SuRe 수지(GE Healthcare, Piscataway, NJ), JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 (Sunnyvale, CA), 및 Kaneka KanCap A (Osaka, Japan)이다.

[0135] 본원에 기술된 일부 예시적 공정에서 MCCS 또는 MCCS1은, 낮은 pH(예를 들어, 4.6 미만, 4.4 미만, 4.2 미만, 4.0 미만, 3.8 미만, 3.6 미만, 3.4 미만, 3.2 미만, 또는 3.0 미만의 pH)에서, 예를 들어 약 1분 내지 1.5시간(예를 들어, 약 1시간) 동안 재조합 단백질을 포함하는 유체를 수용하고, 재조합 단백질을 포함하는 유체에 존재하는 바이러스를 비활성화시키는 저장소를 포함할 수 있다. 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 바이러스 비활성화의 단위 조작용을 수행하기 위해 다양한 기타 수단이 사용될 수 있다. 예를 들어, 재조합 단백질을 포함

하는 유체의 UV 조사가 바이러스 비활성화의 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수도 있다.

[0136] MCCS 또는 MCCS1은, 네 개의 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 세 개가 (예를 들어, 포집의 단위 조작을 수행할 수 있는 수지를 포함하는 임의의 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼(예를 들어 본원에 기술된 임의의 크로마토그래피 컬럼)을 포함하는 MCCS를 이용하여) 액체 배양 배지로부터 재조합 단백질을 포집하는 단위 조작을 수행하는, 네 개의 크로마토그래피 컬럼을 포함하는 PCCS를 포함할 수 있다. 이러한 예에서, PCC의 네 번째 컬럼은 재조합 단백질을 포함하는 유체 내 바이러스를 비활성화시키는 단위 조작을 수행할 수 있다(예를 들어, 재조합 단백질을 포함하는 유체의 바이러스 비활성화를 달성하기 위해 사용될 수 있는, 본원에 기술된 임의의 예시적 컬럼).

[0137] 본원에 기술된 예시적 공정에서 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2는 재조합 단백질 정제 및 폴리싱의 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, MCCS2는 재조합 단백질의 정제 및 폴리싱 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있으며, MCCS2로부터의 용출액은 단리된 재조합 단백질이다. MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2는 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나(예를 들어, 2, 3, 또는 4개)의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인, 및 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나(예를 들어, 2, 3, 또는 4개)의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 포함할 수 있다.

[0138] 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인은, 포집 메커니즘(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 포집 메커니즘)을 이용하는 수지, 또는 음이온 교환, 양이온 교환, 분자체, 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행하기 위해 사용될 수 있는 수지를 포함할 수 있다. 재조합 단백질을 폴리싱하는 조작 단위를 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인은 음이온 교환, 양이온 교환, 분자체, 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행하기 위해 사용될 수 있는 수지(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 음이온 교환, 양이온 교환, 분자체, 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행하기 위한 임의의 예시적 수지)를 포함할 수 있다. 폴리싱의 단위 조작을 수행하기 위해 사용되는 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인은, 재조합 단백질을 포함하는 유체에 존재하는 불순물을 유지하거나 그와 선택적으로 결합하는 수지를 포함할 수 있다.

[0139] 본원에 기술된 예시적 공정의 일부 예에서, MCCS2는 세 개의 크로마토그래피 컬럼과 하나의 크로마토그래피 멤브레인을 포함하는 PCCS를 포함하며, 예를 들어, 여기서 PCCS의 세 개의 크로마토그래피 컬럼은 (예를 들어, 단백질을 정제하는 조작 단위를 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼을 사용하여) 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하고 PCCS의 크로마토그래피 멤브레인은 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행한다. 이러한 예에서, 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 PCCS의 크로마토그래피 멤브레인은 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 본원에 기술된 임의의 예시적 크로마토그래피 멤브레인일 수 있다. 이 예에서 PCCS의 첫 번째 세 개의 크로마토그래피 컬럼 및 크로마토그래피 멤브레인이 언제 스위칭될 수 있는지 결정하기 위해, 본원에 기술된 임의의 컬럼 스위칭 방법이 사용될 수 있다.

[0140] 예시적 재조합 단백질 단리 시스템

[0141] 본원에 기술된 공정을 수행하는 데 유용하고 MCCS 또는 MCCS1과 MCCS2를 포함하는 생물학적 제조 시스템의 예는 (참조로 통합된) 미국 가특허출원 제61/775,060호, 미국 가특허출원 제61/856,390호, 미국 특허출원 제14/195,481호, 국제특허출원 제PCT/US2014/019909호, 및 미국 가특허출원 제61/928,906호에 기술되어 있다. 전체 시스템은 총 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 또는 20개의 크로마토그래피 컬럼을 포함할 수 있다. 예를 들어, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2는 (또는 각각은) 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개의 크로마토그래피 컬럼을 포함할 수 있다.

[0142] 예를 들어, 유용한 시스템은 입구를 포함하는 MCCS1 및 출구를 포함하는 MCCS2, 또는 입구와 출구를 포함하는 MCCS를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, MCCS1 및 MCCS2는 서로 유체 연통되어 있다. 이러한 시스템은 유체가 MCCS1 및 MCCS2를 통해 입구 안으로 통과하여 출구를 통해 제조 시스템을 빠져 나가도록 구성될 수도 있다.

[0143] 이러한 예시적 시스템에서, MCCS 또는 MCCS1은 각각 유체(예를 들어, 세포가 실질적으로 존재하지 않는 생산용 생물반응기로부터의 액체 배양 배지)가 MCCS 또는 MCCS1 안으로 통과될 수 있는 입구를 포함할 수 있다. 입구는 이러한 목적을 위한 당해 분야에 공지된 임의의 구조일 수 있다. 입구는, 예를 들어, 입구에 유체 도관을 삽입

한 후 유체가 입구 밖으로 심각하게 누출되지 않고 입구를 통해 MCCS 또는 MCCS1에 유입되도록, 유체 도관이 삽입되도록 할 수 있는 스레딩(threading), 리빙(ripping), 또는 시일(seal)을 포함할 수 있다. 본 시스템에 사용될 수 있는 비제한적 입구는 공지되어 있고 당업자에 의해 이해될 것이다.

[0144] MCCS 또는 MCCS1은 적어도 두 개의 크로마토그래피 컬럼, 적어도 두 개의 크로마토그래피 멤브레인, 또는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼과 적어도 하나의 크로마토그래피 멤브레인, 및 입구를 포함할 수 있다. MCCS 또는 MCCS1은 본원에 기술된 임의의 예시적 MCCS이거나, 본원에 기술된 (임의의 조합의) MCCS의 하나 이상의 임의의 예시적 특징을 가질 수 있다. MCCS 또는 MCCS1에 존재하는 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)은 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 하나 이상의 임의의 예시적 형상, 크기, 부피(충진층 부피), 및/또는 단위 조작을 가질 수 있다.

[0145] MCCS 또는 MCCS1에 존재하는 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)은 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 하나 이상의 임의의 예시적 수지를 포함할 수 있다. 예를 들어, MCCS 또는 MCCS1에 존재하는 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인에 포함된 수지는 포집 메커니즘(예를 들어, 단백질 A-결합 포집 메커니즘, 단백질 G-결합 포집 메커니즘, 항체- 또는 항체 단편-결합 포집 메커니즘, 기질-결합 포집 메커니즘, 공동 인자-결합 포집 메커니즘, 아프타머-결합 포집 메커니즘, 및/또는 태그-결합 포집 메커니즘)을 이용하는 수지일 수 있다. MCCS 또는 MCCS1의 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인에 포함된 수지는 양이온 교환 수지, 음이온 교환 수지, 분자체 수지, 또는 소수성 상호작용 수지, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 재조합 단백질을 정제하기 위해 사용될 수 있는 수지의 추가 예는 당해 분야에 알려져 있고, MCCS 또는 MCCS1에 존재하는 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인에 포함될 수 있다. MCCS 또는 MCCS1에 존재하는 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인들은 동일한 수지 및/또는 상이한 수지(예를 들어, 재조합 단백질 정제에 사용하기 위한 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 수지)를 포함할 수 있다.

[0146] MCCS 또는 MCCS1에 존재하는 둘 이상의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 수지는 하나 이상의 단위 조작(예를 들어, 재조합 단백질의 포집, 재조합 단백질의 정제, 재조합 단백질의 폴리싱, 바이러스의 비활성화, 재조합 단백질을 포함하는 유체의 이온 농도 및/또는 pH 조절, 또는 재조합 단백질을 포함하는 유체의 여과)을 수행할 수 있다. 비제한적 예에서, MCCS 또는 MCCS1은 유체(예를 들어, 액체 배양 배지)로부터 재조합 단백질을 포집하는 단위 조작 및 재조합 단백질을 포함하는 유체에 존재하는 바이러스를 비활성화시키는 단위 조작을 수행할 수 있다. MCCS 또는 MCCS1은 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 둘 이상의 단위 조작의 임의의 조합을 수행할 수 있다.

[0147] MCCS 또는 MCCS1에 존재하는 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)은 스위칭 메커니즘(예를 들어, 컬럼-스위칭 메커니즘)에 의해 연결되거나 서로에 대해 이동될 수 있다. MCCS 또는 MCCS1은 또한 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 또는 5개)의 펌프(예를 들어, 자동, 예를 들어, 자동 연동 펌프)를 포함할 수 있다. 컬럼-스위칭 사건은 MCCS 또는 MCCS1을 통과하는 유체 내 재조합 단백질(예를 들어, MCCS 또는 MCCS1의 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인으로의 입력 및/또는 그로부터의 용출)의 특정 수준에 해당하는 UV 흡광도, 액체(예를 들어, 완충액)의 특정 부피, 또는 특정 경과 시간에 의해 검출되는 재조합 단백질 수준의 검출에 의해 작동될 수 있다. 컬럼 스위칭은 일반적으로 MCCS 또는 MCCS1의 적어도 두 개의 상이한 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(예를 들어, MCCS1 또는 MCCS2에 존재하는 둘 이상의 상이한 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인)이 공정의 적어도 일부 동안 실질적으로 동일한 시간에 상이한 단계(예를 들어, 평형화, 로딩, 용출, 또는 세척)를 통과하도록 허용되는 메커니즘을 의미한다.

[0148] MCCS 또는 MCCS1은 주기적 역류 크로마토그래피 시스템(PCCS)일 수 있다. 예를 들어, MCCS 또는 MCCS1인 PCCS(즉, 각각 PCCS 또는 PCCS1)는, 첫 번째 세 개의 컬럼이 유체(예를 들어, 액체 배양 배지)로부터 재조합 단백질을 포집하는 단위 조작을 수행하고 PCCS의 네 번째 컬럼이 재조합 단백질을 포함하는 유체 내 바이러스를 비활성화시키는 단위 조작을 수행하는, 네 개의 크로마토그래피 컬럼을 포함할 수 있다. MCCS 또는 MCCS1인 PCCS는 컬럼-스위칭 메커니즘을 이용할 수 있다. PCC 시스템은 최대, 예를 들어 4, 5, 6, 7, 또는 8개의 컬럼, 또는 그 이상을 작동시킬 수 있는 수정된 AEKTA 시스템(GE Healthcare, Piscataway, NJ)을 사용할 수 있다.

[0149] 본원에 기술된 예시적 시스템에서 제2 MCCS(MCCS2)는 적어도 두 개의 크로마토그래피 컬럼, 적어도 두 개의 크로마토그래피 멤브레인, 또는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼과 적어도 하나의 크로마토그래피 멤브레인, 및 출구를 포함할 수 있다. MCCS2는 본원에 기술된 임의의 예시적 MCCS이거나, 본원에 기술된 (임의의 조합의)

MCCS의 하나 이상의 임의의 예시적 특징을 가질 수 있다. MCCS2에 존재하는 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)은 본원에 기술된 하나 이상의 임의의 형상, 크기, 부피(충진층 부피), 및/또는 단위 조작을 가질 수 있다. 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)은 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 예시적 수지를 포함할 수 있다. 예를 들어, MCCS2에 존재하는 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인에 포함된 수지는 포집 메커니즘(예를 들어, 단백질 A-결합 포집 메커니즘, 단백질 G-결합 포집 메커니즘, 항체- 또는 항체 단편-결합 포집 메커니즘, 기질-결합 포집 메커니즘, 공동 인자-결합 포집 메커니즘, 태그-결합 포집 메커니즘, 및/또는 아프타머-결합 포집 메커니즘)을 이용하는 수지일 수 있다. 유용한 수지는, 예를 들어 양이온 교환 수지, 음이온 교환 수지, 분자체 수지, 및 소수성 상호 작용 수지를 포함한다. 수지의 추가 예는 당해 분야에 알려져 있다. MCCS2에 존재하는 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인들은 동일한 수지 및/또는 상이한 수지(예를 들어, 재조합 단백질 정제에 사용하기 위한 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 수지)를 포함할 수 있다.

[0150] MCCS2에 존재하는 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)은 하나 이상의 단위 조작(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 단위 조작 또는 본원에 기술된 단위 조작의 임의의 조합)을 수행할 수 있다. 비제한적 예에서, MCCS2는 유체로부터 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작 및 재조합 단백질을 포함하는 유체에 존재하는 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행할 수 있다. 다른 비제한적 예에서, MCCS2는 유체에 존재하는 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작, 유체에 존재하는 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작, 및 재조합 단백질을 포함하는 유체를 여과하는 단위 조작을 수행할 수 있다. 다른 예에서, MCCS2는 유체에 존재하는 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작, 유체에 존재하는 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작, 재조합 단백질을 포함하는 유체를 여과하는 단위 조작, 및 재조합 단백질을 포함하는 유체의 이온 농도 및/또는 pH를 조절하는 단위 조작을 수행할 수 있다. MCCS2는 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 둘 이상의 단위 조작의 임의의 조합을 수행할 수 있다.

[0151] MCCS2에 존재하는 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)은 스위칭 메커니즘(예를 들어, 컬럼-스위칭 메커니즘)에 의해 연결되거나 서로에 대해 이동될 수 있다. MCCS2는 또한 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 또는 5개)의 펌프(예를 들어, 자동, 예를 들어, 자동 연동 펌프)를 포함할 수 있다. 컬럼-스위칭 사건은 MCCS2를 통과하는 유체 내 재조합 단백질(예를 들어, MCCS2의 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인으로의 입력 및/또는 그로부터의 용출)의 특정 수준에 해당하는 UV 흡광도, 액체(예를 들어, 완충액)의 특정 부피, 또는 특정 경과 시간에 의해 검출되는 재조합 단백질 수준의 검출에 의해 작동될 수 있다.

[0152] MCCS2는 주기적 역류 크로마토그래피 시스템(PCCS2)일 수 있다. 예를 들어, PCCS2는 유체로부터 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하는 세 개의 컬럼, 및 유체에 존재하는 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하는 크로마토그래피 멤브레인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 유체로부터 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하는 세 개의 컬럼은, 예를 들어 양이온 교환 수지를 포함할 수 있으며, 폴리싱의 단위 조작을 수행하는 크로마토그래피 멤브레인은 양이온 교환 수지를 포함할 수 있다. PCCS2는 컬럼-스위칭 메커니즘을 이용할 수 있다. PCCS2는 최대, 예를 들어 4, 5, 6, 7, 또는 8개의 컬럼, 또는 그 이상을 작동시킬 수 있는 수정된 AEKTA 시스템(GE Healthcare, Piscataway, NJ)을 사용할 수 있다.

[0153] MCCS2는 단리된 재조합 단백질이 시스템을 시스템을 빠져 나갈 수 있는 출구를 포함할 수 있다. 출구는, 예를 들어 유체 도관이 삽입되도록 할 수 있는 스테딩, 리빙, 또는 시일, 또는 단리된 재조합 단백질을 수용하거나 저장하도록 설계된 바이알을 포함할 수 있다. 저장된 바이오버든 바이알 또는 저장 용기 내로 단리 재조합 단백질이 직접 흐를 수 있게 하기 위해, 출구는 저장된 바이오버든 바이알 또는 기타 이러한 저장 용기를 출구에 밀봉시키기 위해 사용될 수 있는 표면을 포함할 수 있다. 본 시스템에 사용될 수 있는 비제한적 출구는 공지되어 있고 당업자에 의해 이해될 것이다.

[0154] **단리된 재조합 단백질의 제형화**

[0155] 단리된 재조합 단백질은 또한, 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 약제로 제형화될 수 있다. 약제는 의도된 투여 경로에 맞도록(예를 들어, 정맥내, 동맥내, 근육내, 피내, 피하, 또는 복강내) 제형화된다. 약제는 멸균 희석제(예를 들어, 멸균수 또는 생리 식염수), 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜, 또는 기타 합성 용매, 항균제 또는 항진균제, 예컨대 벤질 알코올 또는 메틸파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등, 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 아황산수소나트륨, 킬레이트제, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산, 완충액, 예컨대 아세테이트, 시트레이트, 또는 포스페이트, 및 등장화제, 예컨대 당류(예를

들어, 텍스트로오스), 폴리알코올(예를 들어, 만니톨 또는 소르비톨), 또는 염(예를 들어, 염화나트륨), 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체로서 리포솜 현탁액이 사용될 수도 있다(미국 특허 제4,522,811호 참조). 약제의 제제는 앰플, 일회용 주사기, 또는 다중 용량 바이알에 제형화 및 봉입될 수 있다. (예를 들어, 주사용 제형에서와 같이) 필요한 경우, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅 또는 계면활성제의 사용에 의해 적절한 유동성을 유지할 수 있다. 단리된 단백질의 흡수는 흡수 지연제(예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴)를 포함함으로써 연장될 수 있다. 대안적으로, 제어된 방출은, 생분해성, 생체적합성 중합체(예를 들어, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리옥소에스테르, 및 폴리락트산; Alza Corporation 및 Nova Pharmaceutical, Inc.)를 포함할 수 있는 임플란트 및 마이크로캡슐화 전달 시스템에 의해 달성될 수 있다.

[0156] 임의의 단리된 재조합 단백질 중 하나 이상을 포함하는 약제는 투약 단위 형태(즉, 투여의 용이성과 투여량의 균일성을 위해 소정량의 활성 단백질을 함유하는 물리적으로 분리된 단위)로 비경구(예를 들어, 정맥내, 동맥내, 근육내, 피내, 피하 또는 복강내) 투여용으로 제형화될 수 있다.

[0157] 약제의 독성 및 치료 효능은 세포 배양물 또는 실험 동물(예를 들어, 원숭이)에서의 표준 약제학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, LD50(모집단의 50%에게 치사량) 및 ED50(모집단의 50%에서 치료 효과가 있는 용량)을 결정할 수 있으며, 치료 지수는 LD50:ED50의 비이다. 치료 지수가 높은 약제가 바람직하다. 약제가 바람직하지 않은 부작용을 나타내는 경우, 손상 가능성을 최소화하기 위해(즉, 원하지 않는 부작용을 줄이기 위해) 주의해야 한다. 독성 및 치료 효능은 다른 표준 약제학적 절차에 의해 결정될 수 있다.

[0158] 대상체(예를 들어, 인간)에 사용하기 위한 임의의 주어진 단리 재조합 단백질의 적절한 투여량을 제형화하기 위해 세포 배양 검정 및 동물 연구로부터 얻은 데이터를 사용할 수 있다. 본원에 기술된 임의의 약제의 유효성 및 투여량은 당해 분야에 알려진 방법을 이용하여 보건 전문가 또는 의사에 의해 결정될 수 있다. 특정 인자(예를 들어, 질병 또는 장애의 중증도, 이전의 치료, 대상체의 일반 건강 및/또는 나이, 및 다른 질병의 존재)는 대상체를 효과적으로 치료하는 데 필요한 투여량 및 시기에 영향을 미칠 수 있다.

[0159] 다음의 실시예에서 본 발명을 더 설명하지만, 이것이 청구범위에 기술된 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0160] 실시예

[0161] 실시예 1 2단계 예시적 시드 트레인 공정

[0162] 개선된 시드 트레인 공정을 개발하기 위해 실험을 수행하였다. 본원에 제공된 예시적 시드 트레인 공정을 도 1 및 도 2에 도시하였다. 종래의 시드 트레인 공정에 비해, 본원에 제공된 예시적 시드 트레인 공정은 2개의 중간 스피너 배양 단계를 제거한다. 도 1 및 도 2에 도시된 예시적 시드 트레인 공정은 스피너 배양(예를 들어, 도 1 및 도 2의 125-mL 내지 10-L 스피너 배양)을 웨이브 생물반응기(도 1 및 도 2의 2-L 및 20-L)로 대체한다. 다중 스피너 배양을 도 1 및 도 2의 웨이브 생물반응기로 대체하면 층류 후드에서 필요한 조작의 수를 줄이므로, 닫힌 시스템 하에서 작동을 가능하게 함으로써 작동 성과를 향상시킨다. N-1 관류 배양 단계에서의 관류 배양의 사용(예를 들어, 도 1 및 도 2의 ATF 여과 장치를 구비한 50-L 관류 생물반응기) 또한 50×10^6 생세포/mL 이상의 배양 세포 밀도에 도달할 수 있도록 한다. N-1 관류 배양 단계에서 달성된 높은 생세포 밀도는 500-L 생산용 생물반응기에서 5×10^6 생세포/mL의 접종 밀도를 가능하게 하고, 이는 종래의 시드 트레인 공정에 의해 달성되는 생산용 생물반응기에서의 초기 세포 밀도보다 상당히 높다(도 1). 본 시드 트레인 공정에 의해 제공되는 보다 높은 생산용 생물반응기 시딩 밀도는 생산용 생물반응기 성장 단계를 약 5일 단축하여 50일 동안 작동하는 생산용 생물반응기에 대한 제조 공장 시간을 절약하는 데 도움이 된다. 도 1 및 도 2에 도시된 예시적 시드 트레인 공정의 생산성을 시험하기 위해 사용된 재료 및 방법을 이하 설명한다.

[0163] 재료 및 방법

[0164] 세포주 및 배지

[0165] 4 mM 글루타민(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)으로 보충된 상업적으로 입수 가능한 화학적으로 규정된 세포 배양 배지(Life Technologies, Grand Island, NY) 및 재조합 인간 효소를 생성하는 CHO 세포주를 사용하여 모든 실험을 수행하였다.

[0166] 2-L 및 20-L 웨이브 생물반응기에서의 회분 시드 트레인 배양

[0167] 고밀도(HD) 세포은행 바이알(10×10^7 생세포/mL, 4.5 mL/바이알)을 1-L 작업 부피의 2-L 웨이브 세포백(GE

Healthcare, Piscataway, NJ)으로 해동하였다. 2-L 웨이브 세포백의 생세포 밀도가 3.0×10^6 생세포/mL에 도달했을 때, 배양물을 7.5-L 작업 부피의 20-L 웨이브 세포백으로 확장하였다. 2-L 및 20-L 웨이브 세포백 모두에 대한 락킹 플랫폼(rocking platform)으로서 웨이브 생물반응기 시스템(모델 20/50 EHTD)(GE Healthcare)을 사용하였다. 배양물을 37°C의 온도, 16 RPM의 락킹 속도, 및 7°의 락킹 각도로 유지하였다. 20% O₂와 5% CO₂의 가스 혼합물을 0.25 slpm의 유량으로 헤드스페이스에 첨가하였다.

[0168] **시드 트레인 N-1 관류 배양**

[0169] ATF4 관류 장치(Refine Technology, Pine Brook, NJ)가 장착된 15-L 글래스 관류 생물반응기(Broadley-James Corporation, Irvine, CA)를 사용하여 시드 트레인 N-1 단계(도 1에 도시된 바와 같은 50-L 생물반응기)를 모사하였다. 20- μ m 소결 스파저(sparger)를 통해 산소를 첨가하여 용존 산소를 40%로 조절하였고, 1-mm 구멍이 뚫린 스파저를 통해 질소를 첨가하여 용존 CO₂ 수준을 120 mmHg 미만으로 조절하였다. 0.5 M 탄산나트륨을 첨가하여 생물반응기 배양물의 pH를 6.85보다 높게 유지하였다. 10% 소포제 용액(FoamAway, Life Technologies, Grand Island, NY)을 첨가하여 필요한 대로 폼(foam) 수준을 조절하였다.

[0170] 10-L 작업 부피의 15-L 생물반응기를 0.5×10^6 생세포/mL에서 시딩하였고, 관류가 시작된 2일째까지 회분 모드에서 배양물을 조작하였다. 온라인 커패시턴스 센서(Aber Instruments, Aberystwyth, UK) 및 프로그램 가능 논리 제어기(Delta V)를 이용하여 관류 속도를 초기에 0.2 nL/세포/일의 세포-특정 관류 속도(CSPR)로 제어하였다. 생세포 밀도가 20×10^6 세포/mL에 도달한 후, 관류 속도의 한도를 하루에 4 생물반응기 부피(RV/일)로 정하였다.

[0171] **접종 밀도 평가를 위한 50-mL 스핀 튜브 회분 재공급 모델**

[0172] 세포 밀도가 25×10^6 생세포/mL, 50×10^6 생세포/mL, 및 100×10^6 생세포/mL에 도달했을 때 시드 트레인 N-1 생물반응기로부터 배양물의 분취량을 제거하고 나서 50-mL 스핀 튜브(TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland)에 3가지 상이한 접종 밀도로 3차례 접종하였다: 10 mL의 작업 부피에서 0.5×10^6 생세포/mL, 2.5×10^6 생세포/mL, 또는 5.0×10^6 생세포/mL. 이 규모로 연속 관류를 수행할 수 없으므로 하루에 한번 재공급을 행하였다. 1일째 배양기로부터 스핀 튜브를 제거하는 것을 시작으로, 세포를 5분 동안 1100 RPM으로 스핀 다운하고, 상청액을 제거하고 나서, 재현탁 세포에 새로운 배지를 첨가하여 재공급을 수행하였다. 재공급 방식은 상이한 접종 밀도 조건에 걸쳐 동일한 CSPR을 제공하도록 설계되었다. 모든 스핀 튜브를 Multitron II 진탕 배양기(HT Infors, Bottmingen, Switzerland)에서 37°C의 온도, 160 RPM의 락킹 속도, 벤치탑에 대해 45도의 락킹 각도, 80%의 상대 습도, 및 5%의 CO₂ 농도로 유지하였다.

[0173] **생산용 생물반응기**

[0174] 도 1에 도시된 500-L 생산용 생물반응기를 모사하기 위해, 10 L의 작업 부피를 가진 15-L 생물반응기(Broadley-James Corporation, Irvine, CA)를 20- μ m 소결 스파저를 구비한 ATF4 관류 장치(Refine Technology, Pine Brook, NJ)를 이용하여 관류 모드로 작동시켜 용존 산소를 40%로 조절하였고, 1-mm 구멍이 뚫린 스파저를 통해 질소를 첨가하여 용존 CO₂ 수준을 120 mmHg 미만으로 유지하였다. 0.5 M 탄산나트륨을 첨가하여 pH를 6.85보다 높게 유지하였다. 연동 펌프를 통해 10% 소포제 용액(FoamAway, Life Technologies, Grand Island, NY)을 첨가하여 폼 수준을 조절하였다.

[0175] 생산용 생물반응기 중 한 세트는 회분 모드로 작동된 시드 베셀로부터 저밀도(0.5×10^6 생세포/mL)에서 접종되었다. 1일째 0.5 RV/일로 관류를 시작하였고 2 RV/일의 관류 속도에 도달할 때까지 매일 0.5 RV/일씩 증가시켰다. 다른 세트의 생산용 반응기는 밀도가 50×10^6 생세포/mL에 도달했을 때 N-1 15-L 관류 시드 베셀로부터 고밀도(5.0×10^6 생세포/mL)에서 접종되었다. 높은 접종 밀도로 인해, 접종 직후 2 RV/일로 관류를 시작하였다. 모든 생산용 생물반응기에 대해, 온라인 커패시턴스 센서 및 블리드 펌프를 이용하여 생세포 밀도를 40×10^6 생세포/mL로 조절하였다. 모든 생산용 생물반응기를 50일 동안 작동시켰다.

[0176] **분석 방법**

[0177] 생세포 밀도는 ViCell XR 세포 생존율 분석기(Beckman Coulter, Brea, CA)를 이용하여 측정하였다. 오프라인

pH 및 pCO₂는 RAPIDLab 혈액 가스 분석기(Siemans, Tarrytown, NY)를 이용하여 측정하였다. 단백질 생산성은 특허된 측광 효소 활성 분석법으로 측정하였다.

[0178] **결과 및 고찰**

[0179] 도 3은 회분 웨이브 배양 및 N-1 관류 배양을 포함하여, 본 실시예들에 기술된 예시적 시드 트레인 공정의 생세포 밀도 성장 프로파일을 보여준다. 회분 2-L 및 20-L 웨이브 배양의 기간은 각각 8일 및 5일이었다. N-1 관류 생물반응기를 12일 동안 작동시켜 110×10^6 생세포 밀도/mL의 최종 생세포 밀도와 98% 초과 생존율에 도달하였다. 생세포 밀도는 9일째 50×10^6 세포/mL에 도달했으며, 이는 (50-L N-1 생물반응기로부터) 5×10^6 생세포/mL에서 500-L 생물반응기를 접종하는 데 필요한 세포 밀도이다.

[0180] N-1 생물반응기에 대해, 2일째 관류를 개시하였고, 온라인 커패시턴스 프로브를 이용하여 세포 밀도가 증가함에 따라 자동으로 공급 속도를 증가시켜 0.2 nL/세포/일의 CSPR을 유지하도록 제어하였다. 이러한 관류 속도 제어 방식의 성공 여부는 커패시턴스 프로브의 정확한 생세포 밀도 추정 능력에 달려있다. 관류 속도의 한도를 4 RV/일로 정하였기 때문에 이 방식은 7일째까지만 사용하였지만, 프로브는 110×10^6 생세포/mL에 도달한 12일째까지의 실행에 걸쳐 밀도를 정확히 추정할 수 있었다(도 4).

[0181] 소규모 스핀 튜브 모델을 사용하여 생산용 생물반응기에서의 세포 성장에 미치는 N-1 세포 밀도의 영향을 평가하였다. 세포 밀도가 각각 25×10^6 생세포/mL, 50×10^6 생세포/mL, 또는 100×10^6 생세포/mL일 때 N-1 생물반응기로부터 배양물 샘플을 제거하였다. 이들을 3개의 분취량으로 나누어, 새로운 배지와 0.5×10^6 생세포/mL, 2.5×10^6 생세포/mL, 또는 5×10^6 생세포/mL로 희석하고 나서, (관류 생산용 생물반응기를 본떠서 만든) 스핀 튜브에 3차례 접종하였다. 배양물을 각각의 접종 밀도로 나누었을 때 이루어진 희석으로 인해 매일의 재공급은 1일째까지 수행되지 않았다. 스핀 튜브의 접종 밀도에 기초하여 재공급 속도를 조절하여 각각의 접종 밀도 조건이 해당 세포 밀도에서 동일한 CSPR을 갖도록 할 수 있었다.

[0182] 세포 수 및 생존율 프로파일을 도 5 내지 도 7에 나타내었고, 각각의 접종 밀도에서 N-1 밀도 조건들 간의 비교를 할 수 있도록 플롯팅하였다. 스핀 튜브 모델에서 최대 관류 속도는 1 RV/일이기 때문에, CSPR을 관류 생물반응기 모델에 맞추기 위해 배양물은 20×10^6 생세포/mL까지만 성장되었다. 시험한 3개의 접종 밀도 모두에 대해, 상이한 N-1 밀도 조건들 간의 식별 가능한 성장 차이는 없었다.

[0183] 생산용 생물반응기 세포 성장 및 생산성에 미치는 N-1 밀도 및 접종 밀도의 영향을 검토하기 위해, 50×10^6 생세포/mL의 N-1 생물반응기로부터 5.0×10^6 생세포/mL에서 생물반응기를 접종하였고, 2.5×10^6 생세포/mL의 N-1 생물반응기로부터 0.5×10^6 생세포/mL에서 접종한 생물반응기와 비교하였다. 두 조건에 대한 세포 성장은 도 8에 도시된 바와 같이 유사했다. 50일의 실행에 걸쳐 세포 생존율은 두 접종 조건 모두에 대해 90% 넘게 유지되었다. 도 9는 적분 생세포 밀도에 대한 누적 생산성을 보여주며, 조건들 간에 유사한 특정 생산율을 나타낸다. 가장 주목할 것은, 높은 접종 밀도 조건인 경우 40×10^6 생세포/mL의 정상 상태 세포 밀도(도 8) 및 정제에 필요한 역가가 4~5일 더 일찍 도달했다는 것이다.

[0184] 본원에 기술된 예시적 시드 트레인 공정은 경제적 장점뿐만 아니라 작동상의 장점을 갖는다. 예를 들어, 5.0×10^6 세포/mL에서 500-L 관류 생산용 생물반응기를 접종하면 성장 단계 기간을 4~5일 단축시켜 50일의 실행 동안 생산성을 10% 증가시킨다. 또한, N-1 관류 생물반응기는 100×10^6 생세포/mL에 도달할 수 있고, 이론적으로는 10×10^6 생세포/mL에서 500-L 생물반응기를 접종할 수 있어서, 성장 단계 기간을 더(예를 들어, 총 5~6일) 단축시킬 수 있다.

[0185] 본원에 기술된 예시적 시드 트레인 공정은 회분 또는 유가 모드로 작동되는 생산용 생물반응기를 접종하도록 사용될 수도 있다. 500-L 생물반응기를 사용하는 21일의 유가 세포 배양 공정에 대해, 5.0×10^6 생세포/mL의 접종 밀도는 생산용 생물반응기 기간을 25% 단축시킬 수 있다. 전반적으로, 이는 연간 5~6 회분을 추가할 수 있어 제조 생산성을 25%~30% 증가시킬 수 있다.

[0186] 대부분의 경우, 회분 및 유가 공정은 관류 공정에 사용되는 것보다 훨씬 더 큰 생산용 생물반응기를 일반적으로

사용하므로, 대규모 스테인리스 스틸 생물반응기에서 몇 개의 시드 트레인 단계를 필요로 한다. 도 2는 10,000-L 생물반응기를 접종하는 데 사용되는 종래의 시드 트레인 공정의 예를 ATF 관류 장치를 구비한 50-L N-1 생물반응기를 사용하는 시드 트레인 공정과 비교하여 도시한다. 본원에 기술된 예시적 시드 트레인 공정을 사용하면, $50 \sim 100 \times 10^6$ 생세포/mL의 50-L N-1 생물반응기가 0.25×10^6 생세포/mL 내지 0.50×10^6 생세포/mL에서 10,000-L 생물반응기를 접종할 수 있으므로, 2개의 중간 시드 트레인 세포 배양 단계를 제거할 수 있다.

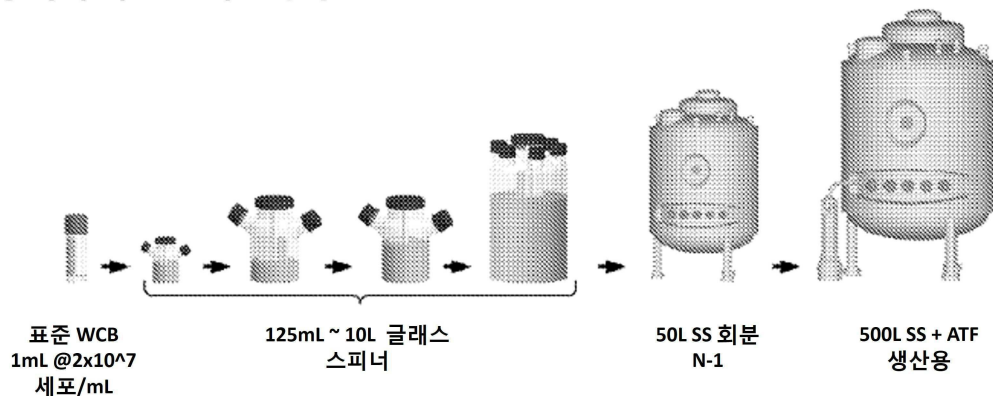
[0187]

본 실시예에 기술된 데이터는 HD 세포 बैं킹, 사용 후 버리는 1회용 생물반응기 기술, 및 N-1 생물반응기 단계에서의 관류 배양을 포함하는 예시적 시드 트레인 공정을 보여준다. 본원에 제공된 시드 트레인 공정은 소규모 배양 단계의 수를 줄여 종래의 시드 트레인 공정의 복잡성을 감소시킨다. 본 실시예에 기술된 데이터는 N-1 단계에서 관류 배양을 이용하는 것이 추가 확장 단계 후 세포 성장 특성을 손상시키지 않고 12일 내에 100×10^6 생세포/mL까지 생세포 밀도를 달성할 수 있음을 보여준다. 이 데이터들에 근거하여, 본원에 기술된 예시적 시드 트레인 공정은 5×10^6 생세포/mL 세포 밀도에서 500-L 생산용 생물반응기에 접종하는 데 사용되어 정상 상태 세포 밀도에 도달하는 시간을 4~5일 단축하고 50일 실행의 전체 생산성을 10% 증가시킬 수 있다. 10,000-L와 같이 더 큰 생산용 생물반응기를 필요로 하는 회분 또는 회분 공정에 대해, 본원에 제공된 시드 트레인 공정은 N-1 단계에서 하나의 50-L 관류 생물반응기를 사용하여 확장 과정에서 1~2 단계를 제거할 수 있다.

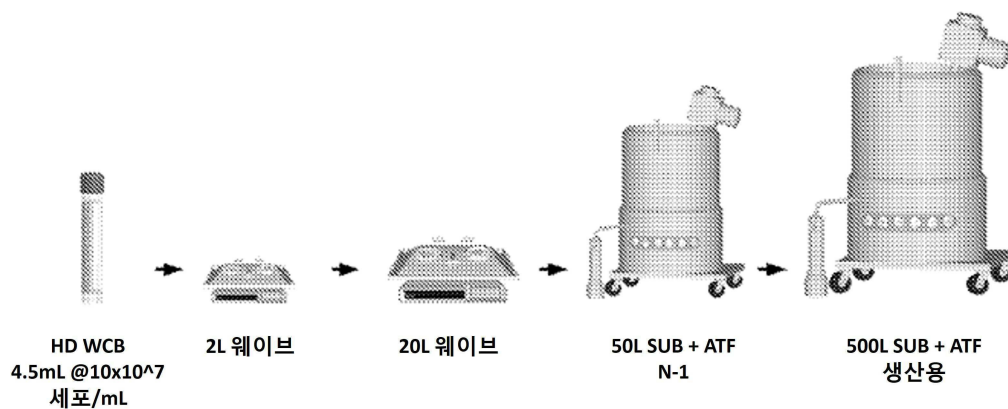
도면

도면1

종래의 시드 트레인 공정:

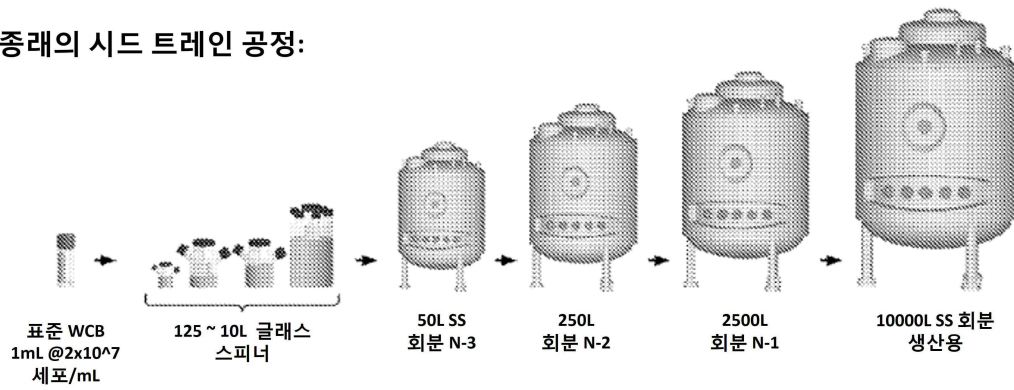


본원에 제공된 예시적 시드 트레인 공정:

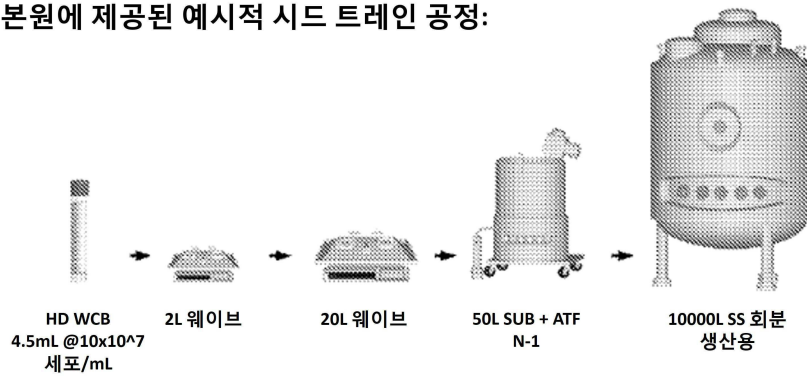


도면2

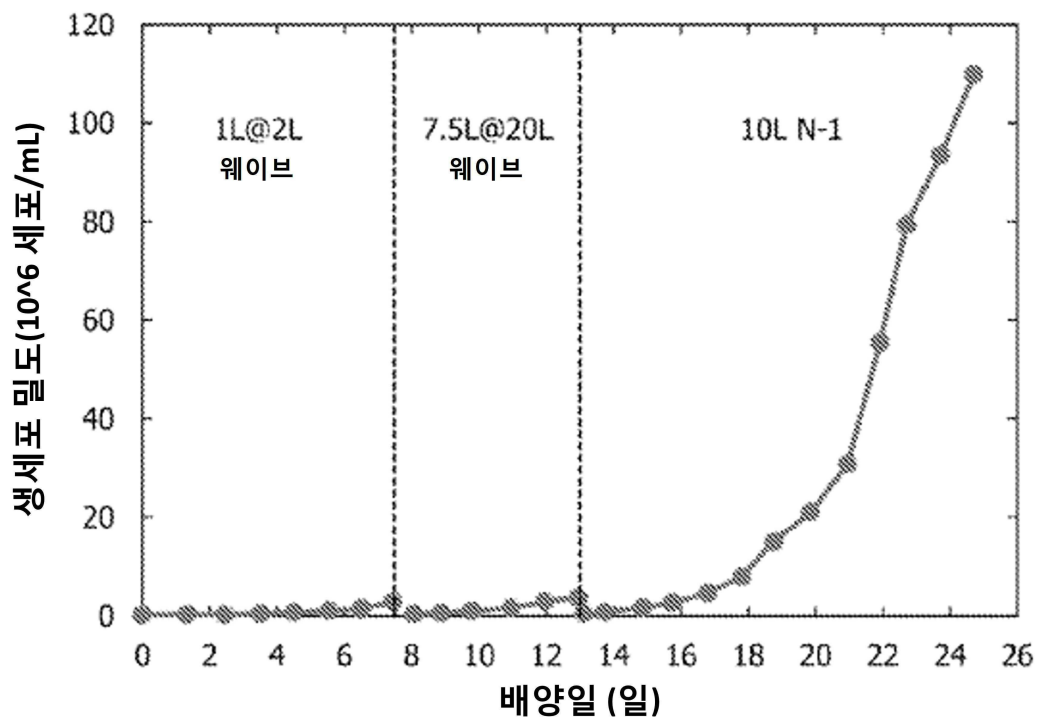
종래의 시드 트레인 공정:



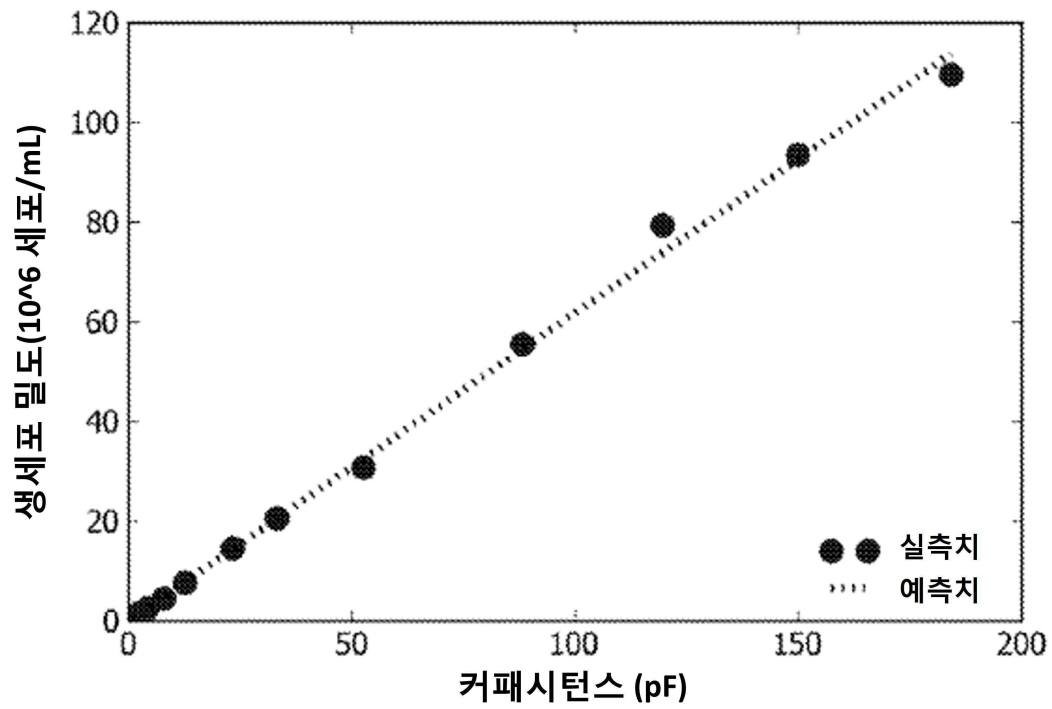
본원에 제공된 예시적 시드 트레인 공정:



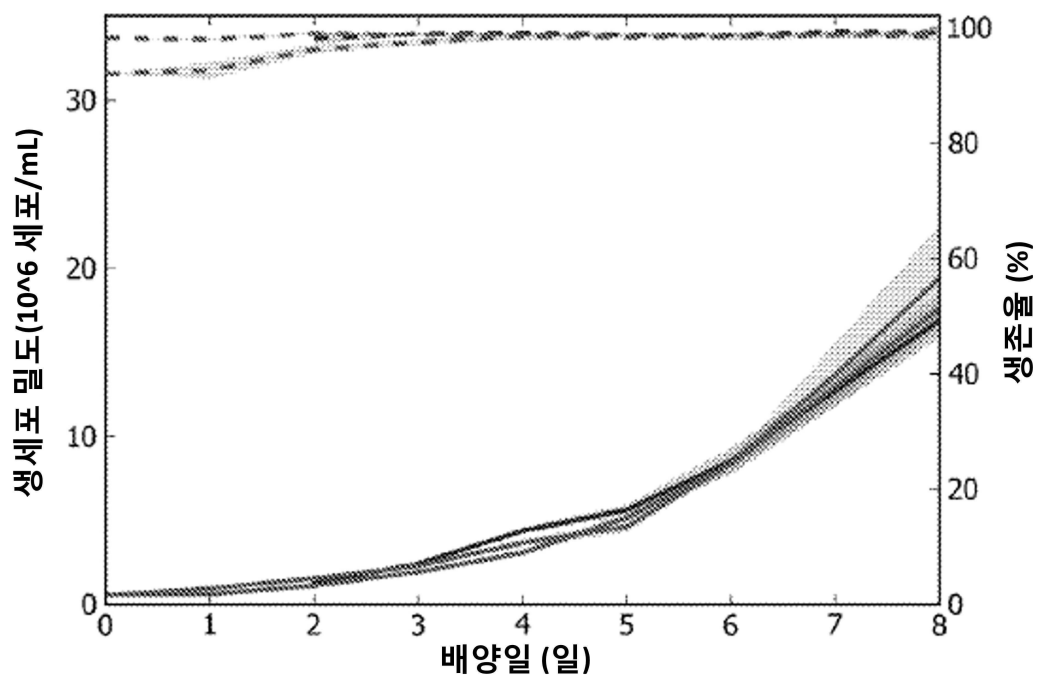
도면3



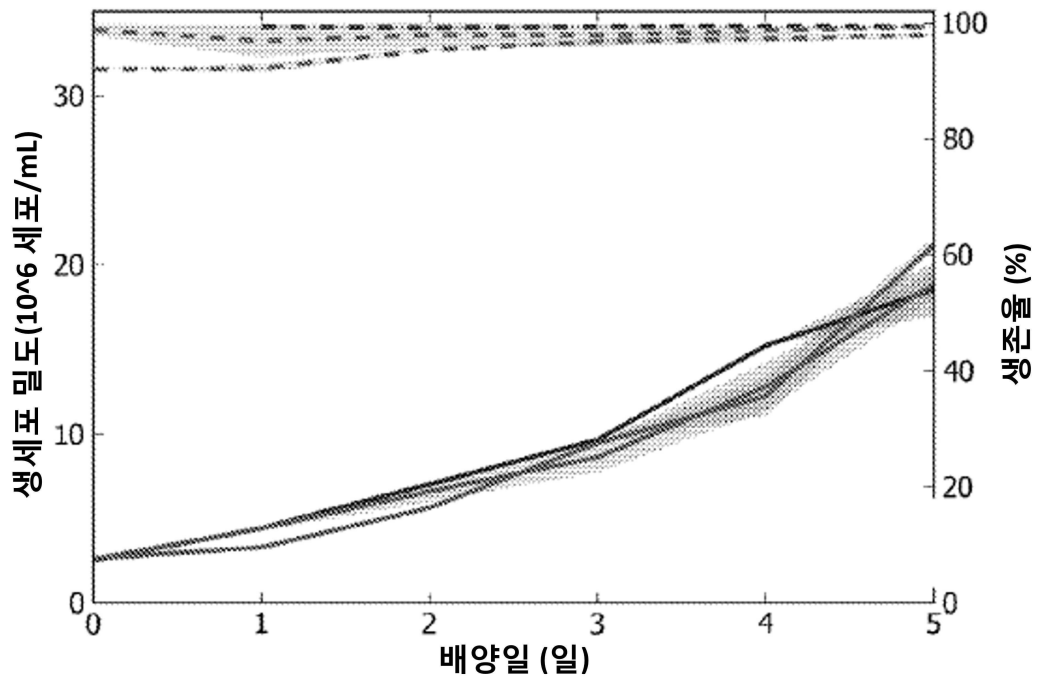
도면4



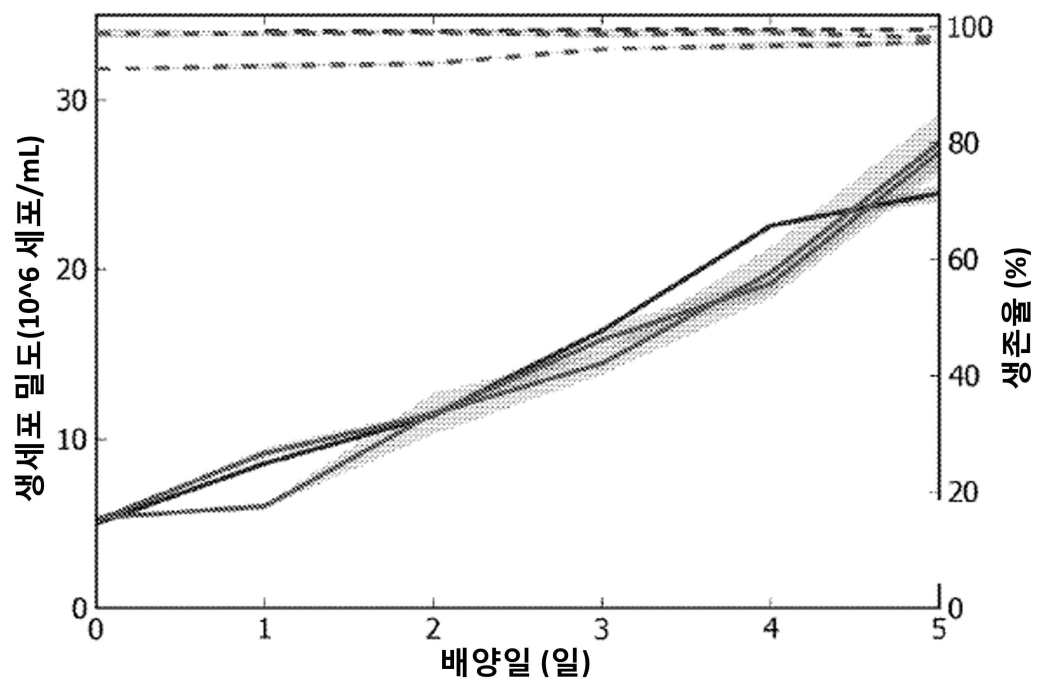
도면5



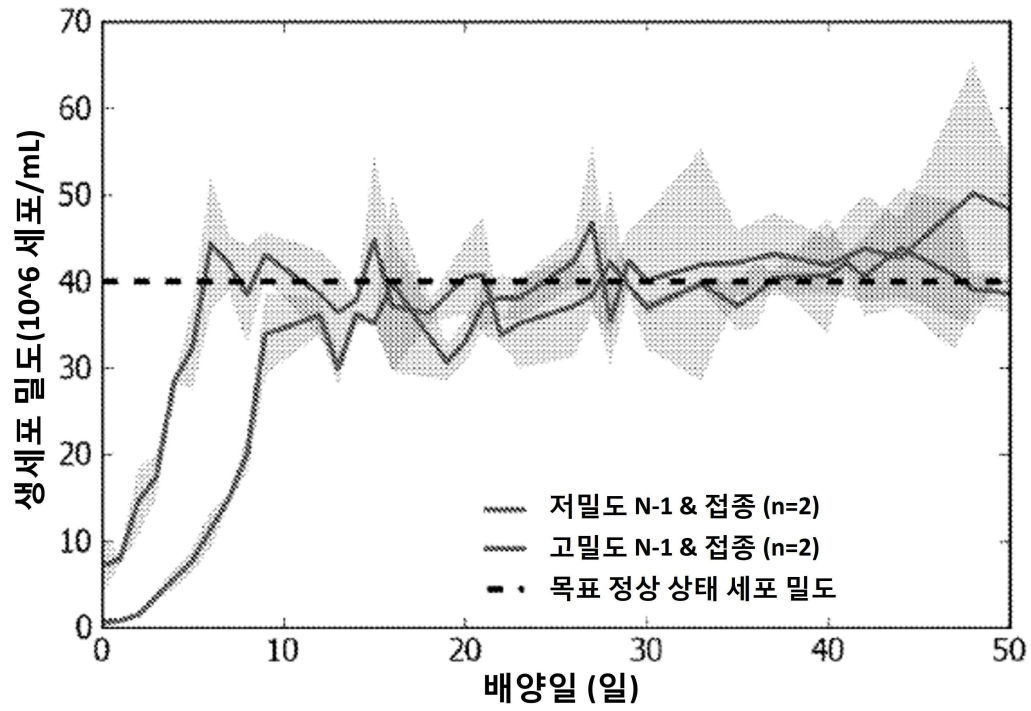
도면6



도면7



도면8



도면9

