



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년01월17일  
(11) 등록번호 10-2352250  
(24) 등록일자 2022년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C08G 65/48 (2006.01) C08G 65/34 (2006.01)  
C12N 5/00 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C08G 65/48 (2013.01)  
C08G 65/34 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2016-7029244  
(22) 출원일자(국제) 2015년03월25일  
심사청구일자 2020년03월12일  
(85) 번역문제출일자 2016년10월20일  
(65) 공개번호 10-2016-0138161  
(43) 공개일자 2016년12월02일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/022592  
(87) 국제공개번호 WO 2015/148736  
국제공개일자 2015년10월01일  
(30) 우선권주장  
61/970,281 2014년03월25일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
US20060115535 A1\*  
US20090156482 A1  
US20050220831 A1\*  
US20110151506 A1\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
제넨테크, 인크.  
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우  
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1  
(72) 발명자  
비스베스바란, 가네쉬, 프라사드  
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디  
엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내  
키스, 로버트, 데이빗  
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디  
엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
양영준, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 29 항

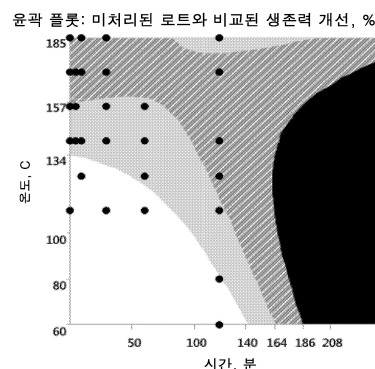
심사관 : 윤종화

(54) 발명의 명칭 세포 배양 배지에 사용하기 위한 폴록사머를 제조하는 방법

## (57) 요약

세포 배양 배지에서 사용하기 위한 폴록사머를 제조하는 방법이 본원에 제공된다. 본원의 방법에 의해 제조된 폴록사머를 함유하는 세포 배양 배지, 뿐만 아니라 세포 배양 및 세포로부터 폴리펩타이드 생산을 위한 배지를 사용하는 방법이 본원에 또한 제공된다.

## 대표도



(52) CPC특허분류

**C12N 5/0018** (2013.01)

**C08G 2650/58** (2013.01)

(72) 발명자

**마이어, 스티븐, 제이.**

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디  
엔에이 웨이 1 제네테크, 인크. 내

**권, 인찬**

미국 22911 버지니아주 샬러츠빌 몽고메리 릿지 로  
드 2540

**칼훈, 카라**

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디  
엔에이 웨이 1 제네테크, 인크. 내

**원체스터, 케이트**

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디  
엔에이 웨이 1 제네테크, 인크. 내

**아담스, 아멜리아**

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디  
엔에이 웨이 1 제네테크, 인크. 내

**글렌, 마리온**

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디  
엔에이 웨이 1 제네테크, 인크. 내

**콰니크, 스테판**

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디  
엔에이 웨이 1 제네테크, 인크. 내

**디스, 앨런**

미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디  
엔에이 웨이 1 제네테크, 인크. 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

세포 배양 배지에서 사용하기 위한 폴록사머를 제조하는 방법이며,

(a) 고체 폴록사머를 적어도 60℃로 가열하여 액체 폴록사머를 형성하는 단계이며, 이때 상기 폴록사머가

- (1) 1분 내지 250분 동안 157℃ 내지 185℃로 가열되거나,
- (2) 1분 내지 250분 동안 134℃ 내지 157℃로 가열되거나,
- (3) 62분 내지 250분 동안 120℃ 내지 134℃로 가열되거나,
- (4) 98분 내지 250분 동안 100℃ 내지 120℃로 가열되거나,
- (5) 122분 내지 250분 동안 80℃ 내지 100℃로 가열되거나,
- (6) 143분 내지 250분 동안 60℃ 내지 80℃로 가열되는 것인

단계, 및

(b) 상기 액체 폴록사머를 50℃ 미만의 온도로 냉각시켜 고체 가열-처리된 폴록사머를 형성하는 단계를 포함하고,

상기 냉각은 프릴링(prilling) 또는 밀링(milling) 디바이스에서 수행되지 않고,

상기 폴록사머는 식  $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_m(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$ 를 갖는 에틸렌 옥사이드와 프로필렌 옥사이드의 코폴리머를 포함하고, 여기서의  $n$ 의 값은 80이고  $m$ 의 값은 27이고, 상기 폴록사머의 평균 분자량이 7680 내지 9510 g/mol인, 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 가열-처리된 폴록사머를 포함하는 세포 배양 배지에서의 세포 생존력이, 상기 단계 (a) 전의 폴록사머를 포함하는 세포 배양 배지에서의 세포 생존력과 비교하여 증가되는 것인 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 가열-처리된 폴록사머를 포함하는 세포 배양 배지에서의 세포 생존력이, 상기 단계 (a) 전의 폴록사머를 포함하는 세포 배양 배지에서의 세포 생존력과 비교하여 적어도 10% 증가되는 것인 방법.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 세포 생존력이 적어도 20% 증가되는 것인 방법.

#### 청구항 5

제3항에 있어서, 상기 세포 생존력이 적어도 30% 증가되는 것인 방법.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 액체 폴록사머가 주위 온도, 2℃ 내지 8℃, 또는 0℃ 미만의 온도에서 냉각되는 것인 방법.

#### 청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴록사머가 진공 하에 가열되는 것인 방법.

#### 청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 액체 폴록사머가 적어도 20분 동안 냉각되는 것인 방법.

#### 청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (b)에서 생산된 가열-처리된 폴록사머를 세포 배양 배지에 추가하는 방법.

#### 청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가열-처리된 폴록사머를 상기 세포 배양 배지에 추가하기 전에 단계 (a) 및 (b)가 적어도 1회 반복되는 것인 방법.

#### 청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴록사머가 단계 (a) 전에 프리팅 공정에 의해 처리된 것인 방법.

#### 청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴록사머의 용융 온도가 55℃인 방법.

#### 청구항 13

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴록사머가 폴록사머 188인 방법.

#### 청구항 14

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 포유동물 세포인 방법.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 세포가 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포인 방법.

#### 청구항 16

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 곤충 세포인 방법.

#### 청구항 17

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 폴리펩타이드를 생산하는 것인 방법.

#### 청구항 18

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 폴록사머를 포함하는 세포 배양 배지.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, 상기 가열-처리된 폴록사머를 0.1 g/L 내지 10 g/L로 포함하는 세포 배양 배지.

#### 청구항 20

제19항에 있어서, 상기 가열-처리된 폴록사머를 0.1 g/L 내지 3 g/L로 포함하는 세포 배양 배지.

#### 청구항 21

제19항에 있어서, 상기 가열-처리된 폴록사머를 3 g/L 내지 10 g/L로 포함하는 세포 배양 배지.

#### 청구항 22

세포 배양시 폴리펩타이드를 생산하는 방법이며,

상기 폴리펩타이드의 생산에 적합한 조건 하에 세포 배양 배지에서 상기 폴리펩타이드를 생산하는 세포를 배양하는 단계

를 포함하고, 상기 세포 배양 배지는 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 폴록사머를 포함하는 것인

방법.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 상기 세포가 포유동물 세포인 방법.

**청구항 24**

제22항에 있어서, 상기 세포가 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포인 방법.

**청구항 25**

제22항에 있어서, 상기 세포가 곤충 세포인 방법.

**청구항 26**

제22항에 있어서, 상기 세포 배양 배지가 상기 가열-처리된 폴록사머를 0.1 g/L 내지 10 g/L로 포함하는 것인 방법.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 상기 세포 배양 배지가 상기 가열-처리된 폴록사머를 0.1 g/L 내지 3 g/L로 포함하는 것인 방법.

**청구항 28**

제26항에 있어서, 상기 세포 배양 배지가 상기 가열-처리된 폴록사머를 3 g/L 내지 10 g/L로 포함하는 것인 방법.

**청구항 29**

제22항에 있어서, 상기 폴리펩타이드가 항체 또는 그것의 항원-결합 단편인 방법.

**청구항 30**

삭제

**청구항 31**

삭제

**청구항 32**

삭제

**청구항 33**

삭제

**청구항 34**

삭제

**청구항 35**

삭제

**청구항 36**

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

## 청구항 53

삭제

## 청구항 54

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본원은 2014년 3월 25일자로 출원된 미국 가출원 시리즈 번호 61/970,281의 우선권 이점을 주장하며, 이는 그 전체가 본원에 참고로 편입되어 있다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 (예를 들면, 세포 배양 배지에서 사용하기 위한) 폴록사머를 제조하는 방법, 본원에 기재된 바와 같이 제조된 폴록사머를 함유하는 세포 배양 배지, 및 세포를 배양하고 폴리펩타이드를 생산하기 위해 본원에 기재된 세포 배양 배지를 사용하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0005] 세포 배양 제조 기술은 약제학적 제형에 사용하기 위한 단백질-기반 치료제, 예컨대 항체의 생산에 널리 사용된다. 단백질-기반 생성물, 예컨대 항체 생성물의 상업적 생산은, 세포가 다량의 단백질 생성물을 생산하여 제조업 수요를 충족시키도록 세포 배양 파라미터의 최적화를 필요로 한다. 단백질-기반 생성물이 산업적 규모로 제조되는 경우, 단백질 생산 효율 및 원료 (예를 들면, 세포 배양 배지의 성분)의 비용과 같은 인자가 결정적으로 중요하다.

[0006] 폴록사머는 산업적 단백질 생산에 널리 사용되는 세포 배양 배지의 성분이다. 그것은 세포 배양 배지에 부가되어 배양된 세포의 생존력을 증진시킨다. 그것의 다수의 기능 중 하나는 세포 배양 배지에서 세포와 가스 기포 사이의 부착력을 감소시키고 기포가 터질 때 세포가 손상되는 것을 막는 계면활성제로서 작용하는 것이다. 그것은 또한 세포막을 강화시키고, 배양물의 포움 층으로부터 세포 배액(cell drainage)을 개선시키고 기포 빈도 및 속도를 변경시킬 수 있다.

[0007] 불행하게도, 폴록사머 성능에서의 상당한 로트-대-로트(lot-to-lot) 가변성이 관측되었다. 폴록사머의 불량한 수행 로트는, 세포 배양 배지에서 사용될 때, 세포 생존력 및 세포 성장률을 감소시킬 수 있다. 감소된 세포 생존력은 감소된 단백질 생산으로 이어진다. 배양이 산업적 규모로 수행되는 경우, 이러한 감소된 생산은 심각한 재정적 손실을 초래할 수 있다.

[0008] 따라서, 폴록사머 가변성을 감소시키고 폴록사머 성능, 특히 불량한 수행 로트에 대한 폴록사머 성능을 개선시키는 단순하고 저렴한 해결책이 필요하다.

[0009] 본원에 인용된 모든 공보, 특허, 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 이들의 전문이 본원에 참조로 편입된다.

[0010] 발명의 요약

[0011] 본원에 제공된 발명은, 그 중에서도, (예를 들면, 세포 배양 배지에서 사용하기 위한) 폴록사머를 제조하는 방법을 개시한다. 또한, 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 폴록사머가 제공된다. 추가로, 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 폴록사머를 함유하는 세포 배양 배지 조성물이 본원에 개시된다. 추가로, 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 폴록사머를 함유하는 세포 배양 배지에서 폴리펩타이드를 생산하는 세포를 배양함으로써 세포 배양시 폴리펩타이드를 생산하는 방법이 본원에 개시된다.

[0012] 따라서, 한 측면에서, 하기 단계를 포함하는, 세포 배양 배지에서 사용하기 위한 폴록사머를 제조하는 방법이 본원에 제공된다: (a) 고체 폴록사머를 적어도 약 60℃로 가열하여 액체 폴록사머를 형성하는 단계; 및 (b) 액체 폴록사머를 약 50℃ 미만의 온도로 냉각시켜 고체 가열-처리된 폴록사머를 형성하는 단계로서, 상기 냉각은 프릴링(prilling) 또는 밀링(milling) 디바이스에서 수행되지 않으며, 상기 폴록사머는 에틸렌 옥사이드와 프로

필렌 옥사이드의 코폴리머를 포함하는, 상기 고체 가열-처리된 폴록사머 형성 단계. 일부 구현예에서, 가열-처리된 폴록사머를 포함하는 세포 배양 배지에서의 세포 생존력은 단계 (a) 전에 폴록사머를 포함하는 세포 배양 배지에서의 세포 생존력과 비교하여 증가된다. 일부 구현예에서, 단계 (a)의 폴록사머는 약 60℃ 내지 약 185℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 단계 (a)의 폴록사머는 약 157℃ 내지 약 185℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 적어도 1분 동안 약 157℃ 내지 약 185℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 1분 내지 약 250분 동안 약 157℃ 내지 약 185℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 단계 (a)의 폴록사머는 약 134℃ 내지 약 157℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 적어도 1분 동안 약 134℃ 내지 약 157℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 1분 내지 약 250분 동안 약 134℃ 내지 약 157℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 단계 (a)의 폴록사머는 약 120℃ 내지 약 134℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 적어도 약 62분 동안 약 120℃ 내지 약 134℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 약 62분 내지 약 250분 동안 약 120℃ 내지 약 134℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 단계 (a)의 폴록사머는 약 100℃ 내지 약 120℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 적어도 약 98분 동안 약 100℃ 내지 약 120℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 98분 내지 약 250분 동안 약 100℃ 내지 약 120℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 단계 (a)의 폴록사머는 약 80℃ 내지 약 100℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 적어도 약 122분 동안 약 80℃ 내지 약 100℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 약 122분 내지 약 250분 동안 약 80℃ 내지 약 100℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 단계 (a)의 폴록사머는 약 60℃ 내지 약 80℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 적어도 약 143분 동안 약 60℃ 내지 약 80℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 약 143분 내지 약 250분 동안 약 60℃ 내지 약 80℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 가열-처리된 폴록사머를 포함하는 세포 배양 배지에서의 세포 생존력은 단계 (a) 전에 폴록사머를 포함하는 세포 배양 배지에서의 세포 생존력과 비교하여 적어도 10% 증가된다. 일부 구현예에서, 상기 세포 생존력은 적어도 약 20% 증가된다. 일부 구현예에서, 상기 세포 생존력은 적어도 약 30% 증가된다. 일부 구현예에서, 단계 (a) 전에 폴록사머를 포함하는 세포 배양 배지에서의 세포 생존력은 약 3시간의 세포 배양 후 약 80% 미만이다. 일부 구현예에서, 단계 (b)의 액체 폴록사머는 주위 온도, 약 2℃ 내지 약 8℃, 또는 0℃ 미만에서 냉각된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 진공 하에 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 액체 폴록사머는 적어도 약 20분 동안 냉각된다. 일부 구현예에서, 단계 (b)에서 생산된 가열-처리된 폴록사머는 세포 배양 배지에 추가된다. 일부 구현예에서, 단계 (a) 및 (b)는 가열-처리된 폴록사머를 세포 배양 배지에 추가하기 전에 적어도 1회 반복된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 단계 (a) 전에 프리팅 공정으로 처리되었다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 식  $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_m(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$ 를 가지며, 식 중, n은 약 60 내지 약 150이고, m은 약 25 내지 약 60이다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머의 용융 온도는 약 55℃이다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머의 평균 분자량은 약 6,000 내지 약 18,000 달톤이다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 식  $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_m(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$ 를 갖는 코폴리머로서, 식 중, n은 약 80의 값을 갖고, m은 약 27의 값을 갖는 코폴리머를 포함하며, 상기 폴록사머의 평균 분자량은 약 7680 내지 약 9510 g/mol 이다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 폴록사머 188이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 곤충 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 폴리펩타이드를 생산한다.

[0013] 또 다른 측면에서, 상기 및 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 제조된 폴록사머가 본원에 제공된다.

[0014] 추가의 측면에서, 상기 및 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 제조된 폴록사머를 포함하는 세포 배양 배지가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 세포 배지는 가열-처리된 폴록사머를 약 0.1 g/L 내지 약 10 g/L로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포 배지는 가열-처리된 폴록사머를 약 0.1 g/L 내지 약 3 g/L로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포 배지는 가열-처리된 폴록사머를 약 3 g/L 내지 약 10 g/L로 포함한다.

[0015] 또 추가의 측면에서, 폴리펩타이드의 생산에 적합한 조건 하에 세포 배양 배지에서 폴리펩타이드를 생산하는 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 세포 배양시 폴리펩타이드를 생산하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 세포 배양 배지는 상기 및 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 생산된 폴록사머를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 곤충 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포 배지는 가열-처리된 폴록사머를 약 0.1 g/L 내지 약 10 g/L로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포 배지는 가열-처리된 폴록사머를 약 0.1 g/L 내지 약 3 g/L로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포 배지는 가열-처리된 폴록사머를 약 3 g/L 내지 약 10 g/L로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 폴리펩타이드는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편이다.

[0016] 따라서, 한 측면에서, (a) 정제된 폴록사머를 약 80℃ 또는 그 초과 온도 (예를 들면, 약 80℃ 내지 약 100℃)로 가열하여 액체 폴록사머를 형성하는 단계 및 (b) 액체 폴록사머를 약 50℃ 또는 그 미만의 온도로 냉



각시켜 고체 가열-처리된 폴록사머를 형성하는 단계를 포함하는, (예를 들면, 세포 배양 배지에 사용하기 위한) 폴록사머를 제조하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 냉각은 플릴링 또는 밀링 디바이스에서 수행되지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 에틸렌 옥사이드와 프로필렌 옥사이드의 코폴리머를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 식  $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_m(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$  (식 중,  $n$ 은 약 60 내지 약 150이고,  $m$ 은 약 25 내지 약 60이다)를 갖는, 에틸렌 옥사이드와 프로필렌 옥사이드의 코폴리머를 포함한다. 일부 구현예에서, 가열-처리된 폴록사머를 포함하는 세포 배양 배지에서의 세포 생존력은 단계 (a) 전에 폴록사머를 포함하는 세포 배양 배지에서의 세포 생존력과 비교하여 증가된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 정제된 폴록사머이다. 일부 구현예에서, 정제된 폴록사머는 또 다른 치료학적 또는 약제학적 화합물을 함유하지 않는 폴록사머 조성물이다. 일부 구현예에서, 단계 (a)의 폴록사머는 또 다른 치료학적 또는 약제학적 화합물을 함유하지 않는다. 일부 구현예에서, 단계 (a)의 폴록사머 약 85°C 내지 약 91°C로 가열된다. 본원의 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 약 10 내지 약 15분 가열된다. 본원의 일부 구현예에서, 단계 (b)의 액체 폴록사머는 주위 온도, 약 2°C 내지 약 8°C, 또는 0°C 미만의 온도에서 냉각된다. 본원의 일부 구현예에서, 상기 액체 폴록사머는 적어도 약 20분 동안 냉각된다. 본원의 일부 구현예에서, 단계 (b)에서 생산된 가열-처리된 폴록사머는 세포 배양 배지에 부가된다. 본원의 일부 구현예에서, 단계 (a) 및 (b)는 가열-처리된 폴록사머를 세포 배양 배지 내로 부가하기 전에 적어도 1회 반복된다. 본원의 일부 구현예에서, 세포 생존력은 적어도 약 10% 증가된다. 본원의 일부 구현예에서, 세포 생존력은 적어도 약 30% 증가된다. 본원의 일부 구현예에서, 단계 (a) 전에 폴록사머를 포함하는 세포 배양 배지에서의 세포 생존력은 약 80% 미만이다. 본원의 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 단계 (a) 전에 프릴링 단계로 처리되었다. 본원의 일부 구현예에서, 상기 폴록사머의 용융 온도는 약 45°C 내지 약 60°C의 범위이다. 본원의 일부 구현예에서, 상기 폴록사머의 평균 분자량은 약 6,000 내지 약 18,000 달톤이다. 본원의 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 폴록사머 188이다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 식  $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_m(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$ 를 갖는 코폴리머로서, 식 중,  $n$ 은 약 80의 값이고,  $m$ 은 약 27의 값을 갖는 코폴리머를 포함하며, 상기 폴록사머의 평균 분자량은 약 7680 내지 약 9510 g/mol이다. 본원의 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 폴록사머 237이다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 식  $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_m(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$ 를 갖는 코폴리머로서, 식 중,  $n$ 은 약 64의 값이고,  $m$ 은 약 37의 값을 갖는 코폴리머를 포함한다. 본원의 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 폴록사머 338이다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 식  $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_m(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$ 를 갖는 코폴리머로서, 식 중,  $n$ 은 약 141의 값이고,  $m$ 은 약 44의 값을 갖는 코폴리머를 포함한다. 본원의 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 폴록사머 407이다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 식  $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_m(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$ 를 갖는 코폴리머로서, 식 중,  $n$ 은 약 101의 값이고,  $m$ 은 약 56의 값을 갖는 코폴리머를 포함한다. 본원의 일부 구현예에서, 상기 세포는 포유동물 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포일 수 있다. 본원의 일부 구현예에서, 상기 세포는 곤충 세포일 수 있다. 본원의 일부 구현예에서, 상기 세포는 폴리펩타이드를 생산한다. 일부 구현예에서, 상기 폴리펩타이드는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편이다. 또 다른 측면에서, 상기 및 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 생산된 폴록사머가 본원에 제공된다.

[0017] 또 다른 측면에서, 상기 및 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 생산된 폴록사머를 포함하는 세포 배양 배지가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 세포 배지는 가열-처리된 폴록사머를 약 0.1 g/L 내지 약 10 g/L로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포 배지는 가열-처리된 폴록사머를 약 0.1 g/L 내지 약 3 g/L로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포 배지는 가열-처리된 폴록사머를 약 3 g/L 내지 약 10 g/L로 포함한다.

[0018] 또 다른 측면에서, 폴리펩타이드의 생산에 적합한 조건 하에 세포 배양 배지에서 폴리펩타이드를 생산하는 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 세포 배양시 폴리펩타이드를 생산하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 세포 배양 배지는 상기 및 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 생산된 폴록사머를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 곤충 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포 배지는 가열-처리된 폴록사머를 약 0.1 g/L 내지 약 10 g/L로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포 배지는 가열-처리된 폴록사머를 약 0.1 g/L 내지 약 3 g/L로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포 배지는 가열-처리된 폴록사머를 약 3 g/L 내지 약 10 g/L로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포에 의해 생산된 폴리펩타이드는 항체 또는 그것의 항원-결합 단편이다.

[0019] 본원에 기재된 다양한 구현예의 특징 중 하나, 일부 또는 모두는 조합되어 본 발명의 다른 구현예를 형성할 수 있음이 이해되어야 한다. 본 발명의 이들 및 다른 측면은 당해기술의 숙련가에게 분명할 것이다.

## 도면의 간단한 설명

[0020]

도 1은 폴록사머의 가열 처리가 배양시 세포 생존력에 대한 그것의 효과를 개선시킨다는 것을 보여준다. 다이아몬드 플롯은 평균 (중심선) 및 상부/하부 95% 신뢰 구간 (다이아몬드의 포인트들), 뿐만 아니라 각각의 실험 조건에 대한 세포 생존력 값들 (점들)을 나타낸다. 각각의 실험은, x-축 상에 나타난 바와 같이, 양호한 또는 불량한 ("의심스러운") 폴록사머 로트로부터의 미처리된 및 가열-처리된 (HT) 폴록사머를 비교한다. 화살표는 불량한 로트의 열처리시 세포 생존력에서의 개선을 나타낸다. 열처리는 또한 양호한 로트의 세포 생존력을 평균 대략 85%로부터 대략 95%의 값으로 개선시켰음을 주목한다.

도 2는 미처리된 및 열 처리된 (HT) 폴록사머 샘플 A, B 및 C에 대한 고전단 진탕 플라스크 모델 (HSSF) 시험에서의 세포 생존력 (%)을 보여준다 (또한 표 2 참조).

도 3은 오븐에서 시험된 조건의 반응 표면 디자인을 보여준다. 각각의 조건은 포맷 "시간, 온도"로 표시된다. '◆'로 표시된 조건은 HSSF에서 시험되었다. '◇'로 표시된 조건은 오븐에서 제조되었지만 HSSF에서 시험되지 않았다. 온도 (°C)는 오븐의 설정 온도를 나타내는 한편, 시간 (분)은 폴록사머 샘플이 오븐에서 체류하는 시간을 나타낸다.

도 4는, 양성 ("양호한 로트") 및 음성 ("미처리된 불량한 로트") 대조군 (각각 D 및 C)과 비교하여, 지시된 조건 하에 오븐에서 열 처리된 C 폴록사머 샘플에 대한 세포 생존력 (%) ( $V_f(\text{처리}) - V_f(\text{미처리})$ )의 개선을 보여준다. 오차 막대는 하나의 표준 편차를 도시한다.

도 5는 세포 배양시 폴록사머 성능에 대한 상이한 가열 처리 조건의 효과를 조사하는 실험 (DOE)의 완전한 디자인으로부터 윤곽 플롯(contour plot)을 보여준다. HSSF 시험에서의 생존력 개선 ( $V_f(\text{처리}) - V_f(\text{미처리})$ )은 시간 및 온도의 함수로서 보여준다. 점들은 시험된 샘플 조건을 나타낸다.

도 6은 지시된 조건 하에 열 처리된 3개의 불량한 로트 (H, F 및 G) 및 하나의 양호한 로트 (E)로부터의 폴록사머 샘플에 대한 HSSF 시험에서 세포 생존력 (%) ( $V_f(\text{처리}) - V_f(\text{미처리})$ )의 개선을 보여준다.

도 7은 긴 지속시간 (120분) 동안 낮은 온도 (60-80°C)에서 처리된 불량한 폴록사머 로트 (H 및 G)에 대한 세포 생존력 (%) ( $V_f(\text{처리}) - V_f(\text{미처리})$ )에서의 개선의 비교를 보여준다. \* HSSF 모델은 중복하여 실시된다.

도 8은, 미처리된 샘플과 비교하여, 진공 조건 하에서 열 처리된 폴록사머 샘플 (H 및 G)에 대한 HSSF 시험에서 세포 생존력 (%) ( $V_f(\text{처리}) - V_f(\text{미처리})$ )의 개선을 보여준다.

도 9는 오븐에서 폴록사머 물질에 대한 가열 및 냉각 프로파일을 보여준다. 3개의 온도를 시험했다: 140°C, 155°C 및 170°C. 온도 판독치가 안정되기 시작하면, 오븐으로부터 물질을 제거하고 실온으로 냉각시켰다. 프로파일은 폴록사머의 용융점 근처인 40°C에서 수평을 유지했다.

도 10은 양성 대조군 (D) 및 미처리된 물질과 비교하여 각각의 열 처리된 폴록사머 로트에 대한 스튜던트 t-시험 결과를 보여준다. 평균 다이아몬드는 각각의 데이터 세트에 대한 95% 신뢰 구간 (상부 및 하부 포인트들) 및 평균 (중심선)을 보여준다.

도 11은 폴록사머 가열 처리 조건에 대한 넓은 작동 범위를 실증하는 반응 표면 및 완전한 DOE 실험으로부터의 데이터에 대한 윤곽 플롯을 보여준다. 각각의 실험 공간에 대한 세포 생존력 (%)에서의 변화가 실증된다. HSSF 시험에서의 생존력 개선 ( $V_f(\text{처리}) - V_f(\text{미처리})$ )은 시간 및 온도의 함수로서 보여준다. 반응 표면 데이터는 항온처리 시간, 및 표적 온도에 도달하는데 필요한 시간에 대해 보정된 온도를 반영한다. 점들은 시험된 샘플 조건을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021]

본원의 발명자들은 폴록사머의 가열 처리가 세포 배양시 생존력을 지지하는 폴록사머의 능력을 개선시킨다는 것을 실증했다. 본원의 데이터는, 가열-처리된 폴록사머와 함께 세포 배양 배지를 사용하는 것이 가열 처리되지 않은 세포 배양 배지를 사용하는 것과 비교하여 세포 생존력을 개선시킨다는 것을 보여준다. 본 발명자들은, 폴록사머의 상이한 로트가, 세포 배양 배지에 부가될 때, 세포 생존력에 대해 대단히 상이한 효과를 나타내며, 본원에 기재된 가열 처리가 폴록사머의 양호한 및 불량한 로트 둘 다에 대해 세포 생존력에 대한 효과를 개선시킨다는 것을 실증했다.

[0022]

한 측면에서, 폴록사머를 가열하고 상기 폴록사머를 냉각시켜 폴록사머를 제조하는 방법이 본원에 제공되며, 여

기서 상기 냉각은 프릴링 또는 밀링 디바이스에서 수행되지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 폴록사머를 약 80℃ 또는 그 초과 온도 (예를 들면, 약 100℃)로 가열하여 액체 폴록사머를 형성하고, 상기 액체 폴록사머를 약 50℃ 미만의 온도로 냉각시켜 고체 가열-처리된 폴록사머를 형성함으로써 폴록사머를 제조하는 것을 포함하며, 여기서 상기 냉각은 프릴링 또는 밀링 디바이스에서 수행되지 않으며, 상기 폴록사머는 에틸렌 옥사이드와 프로필렌 옥사이드의 코폴리머를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 식  $HO(C_2H_4O)_n(C_3H_6O)_m(C_2H_4O)_nH$ 를 가지며, 식 중, n은 약 60 내지 약 150이고, m은 약 25 내지 약 60인, 에틸렌 옥사이드와 프로필렌 옥사이드의 코폴리머를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 가열 및 냉각 공정 전의 고체 폴록사머이다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 가열 및 냉각 공정 전의 실온에서의 액체 폴록사머이다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 가열 및 냉각 공정 전에 액체 또는 수용액에 용해된 고체 폴록사머이다. 예를 들면, 본원에 제공된 방법은 세포 배양시 또는 세포 배양 배지에서 사용하기 위한 폴록사머를 제조하는데 사용될 수 있다.

[0023] 또 다른 측면에서, 가열-처리된 폴록사머를 포함하는 세포 배양용 조성물이 본원에 제공된다. 또 다른 측면에서, 세포 배양 배지에서 가열-처리된 폴록사머를 함유하는 세포 배양용 조성물이 제공된다.

[0024] 또 다른 측면에서, 폴리펩타이드의 생산에 적합한 조건 하에 가열-처리된 폴록사머를 함유하는 세포 배양 배지에서 폴리펩타이드를 생산하는 세포를 배양함으로써 세포 배양시 폴리펩타이드를 생산하는 방법이 본원에 제공된다.

# I. 정의

[0026] 본 발명을 상세히 기재하기 전에, 본 발명은 특정한 조성물 또는 생물학적 시스템에 제한되지 않으며, 그것은 물론 가변적일 수 있음이 이해되어야 한다. 본원에 사용된 용어는 단지 특정한 구현예를 기재하기 위한 것이며 제한하는 것으로 의도되지 않음이 또한 이해되어야 한다.

[0027] 본 명세서 및 첨부된 청구항들에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 ("a," "an," 및 "the")는, 그 내용이 다르게 명확히 지시되지 않으면, 복수의 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들면, "분자"에 대한 언급은 2개 또는 그 초과와 그와 같은 분자의 조합 등을 임의로 포함한다.

[0028] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "약"은 본 기술 분야의 숙련자에게 쉽게 공지된 각각의 값에 대한 통상적인 오차 범위를 나타낸다. 본원에서 "약" 값 또는 파라미터에 대한 언급은 상기 값 또는 파라미터 그 자체에 관한 구현예를 포함한다 (그리고 기재한다).

[0029] 본원에 기재된 발명의 측면 및 구현예는 "포함하는(comprising)", "구성되는(consisting) 및 "~로 본질적으로 구성되는"의 측면 및 구현예를 포함하는 것으로 이해된다.

[0030] 용어 "폴록사머"는 2개의 폴리옥시에틸렌 (용어 "에틸렌 옥사이드"가 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다) 사슬이 측면에 배치된 폴리옥시프로필렌 (용어 "프로필렌 옥사이드"가 본원에서 상호교환적으로 사용될 수 있다)의 사슬로 구성된 블록 코폴리머를 나타낸다. 폴록사머는 PLURONIC<sup>®</sup> (BASF), KOLLIPHOR<sup>®</sup> (BASF), LUTROL<sup>®</sup> (BASF) 및 SYNPERONIC<sup>®</sup> (Croda International)를 포함하는 상표명으로 시판될 수 있다. 특정한 폴록사머 종이 명시되지 않으면, "폴록사머"에 대한 언급은 일반적으로 다수의 폴록사머 종을 나타낼 수 있다.

[0031] 일부 구현예에서, 폴록사머는 정제된 폴록사머이다. 용어 "정제된 폴록사머"는 다른 화합물이 실질적으로 없는 폴록사머 조성물을 나타낸다. 정제된 폴록사머는, 예를 들면, 기술적 또는 고급 등급의 상업적으로 이용가능한 폴록사머를 포함할 수 있다. 기술적 또는 고급 등급의 예는 기술적 등급, 정제된 등급, N.F.등급 (미국 처방집 (US National Formulary)), U.S.P. 등급 (미국 약전), 시약 등급 및 A.C.S. 등급 (미국 화학 학회(American Chemical Society))를 포함할 수 있다. 정제된 폴록사머는 또 다른 화합물과 혼합되지 않은 것을 나타낸다. 예를 들면, 정제된 폴록사머는, 예를 들면, 약물 제형의 일부로서 치료적 또는 약제학적 화합물과 혼합되지 않은 폴록사머를 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, 정제된 폴록사머는 미반응된 반응물, 촉매 또는 폴록사머 합성 공정 또는 반응을 통해 산출된 다른 산물이 실질적으로 없거나 이들과 혼합되지 않은 것이다.

[0032] 용어 "가열-처리된 폴록사머"는 본원에 제공된 방법에 의해 적어도 1회 가열 처리된 폴록사머를 나타낸다.

[0033] 용어 "배지" 및 "세포 배양 배지"는 세포의 성장 또는 유지에 사용되는 영양 공급원을 나타낸다. 당해기술의 숙련자에게 의해 이해되는 바와 같이, 영양 공급원은 세포가 성장 및/또는 생존에 필요로 하는 성분을 함유할 수 있거나 세포 성장 및/또는 생존에 도움이 되는 성분을 함유할 수 있다. 비타민, 필수 또는 비-필수 아미노산, 미

량 원소 및 계면활성제 (예를 들면, 폴록사머)가 배지 성분의 예이다. 본원에 제공된 임의의 배지는 또한 인슐린, 식물 가수분해물 및 동물 가수분해물 중 임의의 하나 이상으로 보충될 수 있다.

- [0034] 세포의 "배양"은 세포의 생존력 및/또는 성장 및/또는 증식에 적합한 조건 하에 세포를 세포 배양 배지와 접촉시키는 것을 나타낸다.
- [0035] "배지 배양"은 세포 배양을 위한 모든 성분 (세포 및 모든 배양 영양소 및 성분을 포함)이 배양 과정을 개시할 때 배양 용기에 공급되는 배양법을 나타낸다.
- [0036] 본원에 사용된 바와 같이, 어구 "유가식(fed batch) 세포 배양"은 세포 및 배양 배지가 배양 용기에 초기에 공급되고, 배양 종료 전에 주기적인 세포 및/또는 생성물 수집의 존재 또는 부재 하에 추가의 배양 영양소를 배양 공정 동안 연속적으로 또는 별개의 증분으로 배양물에 공급하는 배지 배양법을 나타낸다.
- [0037] "관류 배양"은, 세포가, 예를 들면, 여과, 캡슐화, 마이크로캐리어로의 앵커링(anchoring) 등에 의해 배양물에 구속되고, 배양 배지는 배양 용기로부터 연속적으로 또는 간헐적으로 도입되고 제거되는 배양법이다.
- [0038] "배양 용기"는 세포를 배양하는데 사용되는 용기를 나타낸다. 배양 용기는 그것이 세포의 배양에 유용하기만 하다면 임의의 크기일 수 있다.
- [0039] 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 임의의 길이의 아미노산의 폴리머를 나타내는데 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 폴리머는 선형 또는 분지형일 수 있으며, 그것은 변형된 아미노산을 포함할 수 있고, 비-아미노산에 의해 방해될 수 있다. 상기 용어는 또한 천연적으로 또는 개체에 의해; 예를 들면, 이황화 결합 형성, 당화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 다른 조작 또는 변형, 예컨대 표지 요소와의 접합에 의해 변형된 아미노산 폴리머를 포함한다. 예를 들면, 하나 또는 그 초과 아미노산 유사체 (예를 들면, 비천연 아미노산 등 포함), 뿐만 아니라 당해기술에 공지된 다른 변형을 함유하는 폴리펩타이드가 또한 본 정의 내에 포함된다. 본원의 정의 내에 포함되는 폴리펩타이드의 예는 포유동물 단백질, 예를 들면, 레닌; 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬을 포함하는 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지질단백질; 알파-1-항트립신; 인슐린 A-사슬; 인슐린 B-사슬; 프로인슐린; 여포자극 호르몬; 칼시토닌; 황체형성 호르몬; 글루카곤; 응고 인자 예컨대 인자 VIIIC, 인자 IX, 조직 인자, 및 폰빌레브란트 인자; 항-응고 인자 예컨대 단백질 C; 심방 나트륨 이뇨 인자; 폐 계면활성제; 플라스미노겐 활성화제, 예컨대 우로키나제 또는 인간 소변 또는 조직-유형 플라스미노겐 활성화제 (t-PA); 붐베신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 종양 괴사 인자-알파 및 -베타; 엔케팔리나제; RANTES (활성화에 대해 조절된 일반적으로 T-세포 발현된 및 분비된(regulated on activation normally T-cell expressed and secreted)); 인간 대식세포 염증성 단백질 (MIP-1-알파); 혈청 알부민 예컨대 인간 혈청 알부민; 뮐러관 억제 물질(Muellerian-inhibiting substance); 릴락신 A-사슬; 릴락신 B-사슬; 프로릴락신; 마우스 성선자극호르몬-관련된 펩타이드; 미생물 단백질, 예컨대 베타-락타마제; DNase; IgE; 세포독성 T-림프구 관련된 항원 (CTLA), 예컨대 CTLA-4; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자 (VEGF); 호르몬 또는 성장 인자를 위한 수용체; 단백질 A 또는 D; 류마티스성 인자; 신경친화성 인자 예컨대 골-유도된 신경친화성 인자 (BDNF), 뉴로트로핀-3, -4, -5 또는 -6 (NT-3, NT-4, NT-5 또는 NT-6), 또는 신경 성장 인자 예컨대 NGF-b; 혈소판-유도된 성장 인자 (PDGF); 섬유아세포 성장 인자 예컨대 aFGF 및 bFGF; 표피 성장 인자 (EGF); TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4 또는 TGF- $\beta$ 5를 포함하는, 형질전환 성장 인자 (TGF) 예컨대 TGF-알파 및 TGF-베타; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II (IGF-I 및 IGF-II); des(1-3)-IGF-I (또는 IGF-I), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 (IGFBPs); CD 단백질 예컨대 CD3, CD4, CD8, CD19 및 CD20; 에리트로포이에틴; 골 유도성 인자; 면역독소; 골 형성 단백질 (BMP); 인터페론 예컨대 인터페론-알파, -베타, 및 -감마; 집락 자극 인자 (CSFs), 예를 들면, M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF; 인터루킨 (ILs), 예를 들면, IL-1 내지 IL-10; 수퍼록사이드 디스무타제; T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 붕괴 촉진 인자; 바이러스 항원, 예를 들면, AIDS 엔빌로프의 일부; 수송 단백질; 귀소 수용체; 아드레신; 조절 단백질; 인테그린 예컨대 CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 및 VCAM; 종양 관련된 항원 예컨대 CA125 (난소암 항원) 또는 HER2, HER3 또는 HER4 수용체; 이뮤노어드헤신(immunoadhesin); 및 임의의 상기-열거된 단백질의 단편 및/또는 변이체 뿐만 아니라, 예를 들면, 임의의 상기-열거된 단백질을 포함하는 단백질에 결합하는, 항체 단편을 포함하는 항체를 포함한다.
- [0040] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "역가"는 세포 배양에 의해 생산된 재조합으로 발현된 항체의 총량을 주어진 양의 배지 용적으로 나눈 수치를 나타낸다. 역가는 전형적으로 배지 밀리리터당 항체 밀리그램 단위로 표시된다. 역가는 상이한 배양 조건 하에 단백질 생성물을 수득하는 것과 비교하여 역가에서의 증가율과 같이, 상대적 측정치의 측면에서 표현되거나 평가될 수 있다.



- [0041] 용어 "항체"는 본원에서 광범위한 의미로 사용되며, 구체적으로는 단클론성 항체 (전장 단클론성 항체 포함), 다클론성 항체, 다중특이적 항체 (예를 들면, 이중특이적 항체), 및 원하는 생물학적 활성을 나타내기만 한다면 항체 단편을 포함한다. 항체는 인간, 인간화된 및/또는 친화성 성숙된(affinity matured) 항체일 수 있다.
- [0042] 용어 "전장 항체," "온전한 항체" 및 "전체 항체"는 하기 정의된 바와 같이 항체 단편이 아닌, 그것의 실질적으로 온전한 형태의 항체를 나타내는데 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 특히 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 나타낸다.
- [0043] "항체 단편"은 온전한 항체의 일부, 바람직하게는 그것의 항원 결합 영역 (용어 "항원-결합 단편"이 상호교환적으로 사용될 수 있다)을 포함하는 온전한 항체의 일부를 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체(linear antibodies); 단일-쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.
- [0044] **II. 폴록사머의 제조 방법**
- [0045] 폴록사머, 예를 들면, 세포 배양 배지에서 사용하기 위한 폴록사머를 제조하는 방법이 본원에 제공된다.
- [0046] 가열
- [0047] 일부 측면에서, 본원에 제공된 세포 배양 배지에서 사용하기 위한 폴록사머를 제조하는 방법은 폴록사머 (예를 들면, 정제된 폴록사머)를 가열하여 액체 폴록사머를 형성하는 것을 포함한다. 예를 들면, 고체상에서 정제된 폴록사머는 용융되도록 가열되어 액체 폴록사머를 형성할 수 있다. 폴록사머가 가열되는 온도는 사용된 특정한 폴록사머 종의 용융 온도를 기반으로 조정될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 정제된 폴록사머의 용융 온도는 약 45℃ 내지 약 60℃의 범위이다. 일부 구현예에서, 정제된 폴록사머의 용융 온도는 약 50℃ 내지 약 55℃의 범위이다.
- [0048] 일부 구현예에서, 본원에서 제공된 세포 배양 배지에서 사용하기 위한 폴록사머를 제조하는 방법은 폴록사머를 적어도 약 60℃로 가열하여 액체 폴록사머를 형성하고, 상기 폴록사머를 약 50℃ 미만의 온도로 냉각시켜 고체 가열-처리된 폴록사머를 형성하는 것을 포함하며, 여기서 상기 냉각은 프릴링 또는 밀링 디바이스에서 수행되지 않으며, 상기 폴록사머는 에틸렌 옥사이드와 프로필렌 옥사이드의 코폴리머를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 정제된 폴록사머이다. 일부 구현예에서, 정제된 폴록사머는 또 다른 치료학적 또는 약제학적 화합물을 함유하지 않는 폴록사머 조성물이다.
- [0049] 일부 구현예에서, 상기 폴록사머 (예를 들면, 정제된 폴록사머)는 적어도 대략 임의의 하기 온도 (℃)로 가열된다: 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180 또는 185. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머 (예를 들면, 정제된 폴록사머)는 적어도 1분 동안 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 적어도 약 1분, 적어도 약 2분, 적어도 약 3분, 적어도 약 4분, 적어도 약 5분, 적어도 약 6분, 적어도 약 7분, 적어도 약 8분, 적어도 약 9분, 적어도 약 10분, 적어도 약 15분, 적어도 약 20분, 적어도 약 25분, 적어도 약 30분, 적어도 약 35분, 적어도 약 40분, 적어도 약 45분, 적어도 약 50분, 적어도 약 55분, 적어도 약 60분, 적어도 약 65분, 적어도 약 70분, 적어도 약 75분, 적어도 약 80분, 적어도 약 85분, 적어도 약 90분, 적어도 약 100분, 적어도 약 110분, 적어도 약 120분, 적어도 약 130분, 적어도 약 140분, 적어도 약 150분, 적어도 약 160분, 적어도 약 170분, 적어도 약 180분, 적어도 약 190분, 적어도 약 200분, 적어도 약 210분, 적어도 약 220분, 적어도 약 230분, 또는 적어도 약 240분 동안 가열된다.
- [0050] 일부 구현예에서, 상기 폴록사머 (예를 들면, 정제된 폴록사머)는 약 60℃ 내지 약 185℃로 가열된다. 다르게 명쾌하게 언급되지 않으면, 본원에 기재된 임의의 온도 범위가 포함되는 것으로 여겨짐이 주목된다. 예를 들면, 약 60℃ 내지 약 185℃의 온도 범위는 상기 범위 내에 있는 것으로서 약 60℃ 및 약 185℃를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 대략 임의의 하기 온도보다 낮은 온도 (℃)로 가열된다: 185, 180, 175, 170, 165, 160, 155, 150, 145, 140, 135, 130, 125, 120, 115, 110, 105, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70 또는 65. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 대략 임의의 하기 온도보다 높은 온도 (℃)로 가열된다: 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 또는 180. 즉, 상기 폴록사머는 185, 180, 175, 170, 165, 160, 155, 150, 145, 140, 135, 130, 125, 120, 115, 110, 105, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70 또는 65의 상한, 및 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 또는 180의 독립적으로 선택된 하한을 갖는 온도 범위의 온도로 가열될 수 있으며, 여기서 하한은 상한보다 낮다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머 (예를 들

면, 정제된 폴록사머)는 적어도 1분 동안 약 60℃ 내지 약 185℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 적어도 약 1분, 적어도 약 2분, 적어도 약 3분, 적어도 약 4분, 적어도 약 5분, 적어도 약 6분, 적어도 약 7분, 적어도 약 8분, 적어도 약 9분, 적어도 약 10분, 적어도 약 15분, 적어도 약 20분, 적어도 약 25분, 적어도 약 30분, 적어도 약 35분, 적어도 약 40분, 적어도 약 45분, 적어도 약 50분, 적어도 약 55분, 적어도 약 60분, 적어도 약 65분, 적어도 약 70분, 적어도 약 75분, 적어도 약 80분, 적어도 약 85분, 적어도 약 90분, 적어도 약 100분, 적어도 약 110분, 적어도 약 120분, 적어도 약 130분, 적어도 약 140분, 적어도 약 150분, 적어도 약 160분, 적어도 약 170분, 적어도 약 180분, 적어도 약 190분, 적어도 약 200분, 적어도 약 210분, 적어도 약 220분, 적어도 약 230분 또는 적어도 약 240분 동안 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 1분 내지 약 250분 동안 약 60℃ 내지 약 185℃로 가열된다. 다르게 명쾌하게 언급되지 않으면, 본원에 기재된 임의의 시간 범위가 포함되는 것으로 여겨짐이 주목된다. 예를 들면, 약 1분 내지 약 250분의 시간 범위는 상기 범위 내에 있는 것으로서 약 1분 및 약 250분을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 대략 임의의 하기 시간보다 적은 시간 (분) 동안 가열된다: 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2분. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 대략 임의의 하기 시간보다 많은 시간 (분) 동안 가열된다: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230 또는 240분. 즉, 상기 폴록사머는 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2분의 상한, 및 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230 또는 240의 독립적으로 선택된 하한을 갖는 시간 범위의 시간 동안 가열될 수 있으며, 여기서 하한은 상한보다 적다.

[0051] 일부 구현예에서, 상기 폴록사머 (예를 들면, 정제된 폴록사머)는 약 157℃ 내지 약 185℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 대략 임의의 하기 온도보다 낮은 온도 (℃)로 가열된다: 185, 180, 175, 170, 165 또는 160. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 대략 임의의 하기 온도보다 높은 온도 (℃)로 가열된다: 157, 160, 165, 170, 175 또는 180. 즉, 상기 폴록사머는 185, 180, 175, 170, 165 또는 160의 상한, 및 157, 160, 165, 170, 175 또는 180의 독립적으로 선택된 하한을 갖는 온도 범위의 온도로 가열될 수 있으며, 여기서 하한은 상한보다 낮다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 적어도 약 1분, 적어도 약 2분, 적어도 약 3분, 적어도 약 4분, 적어도 약 5분, 적어도 약 6분, 적어도 약 7분, 적어도 약 8분, 적어도 약 9분, 적어도 약 10분, 적어도 약 15분, 적어도 약 20분, 적어도 약 25분, 적어도 약 30분, 적어도 약 35분, 적어도 약 40분, 적어도 약 45분, 적어도 약 50분, 적어도 약 55분, 적어도 약 60분, 적어도 약 65분, 적어도 약 70분, 적어도 약 75분, 적어도 약 80분, 적어도 약 85분, 적어도 약 90분, 적어도 약 100분, 적어도 약 110분, 적어도 약 120분, 적어도 약 130분, 적어도 약 140분, 적어도 약 150분, 적어도 약 160분, 적어도 약 170분, 적어도 약 180분, 적어도 약 190분, 적어도 약 200분, 적어도 약 210분, 적어도 약 220분, 적어도 약 230분, 또는 적어도 약 240분 동안 약 157℃ 내지 약 185℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 250분 이하 동안 약 157℃ 내지 약 185℃로 가열된다.

[0052] 일부 구현예에서, 상기 폴록사머 (예를 들면, 정제된 폴록사머)는 약 134℃ 내지 약 157℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 대략 임의의 하기 온도보다 낮은 온도 (℃)로 가열된다: 157, 155, 150, 145, 140 또는 135. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 대략 임의의 하기 온도보다 높은 온도 (℃)로 가열된다: 134, 135, 140, 145, 150 또는 155. 즉, 상기 폴록사머는 157, 155, 150, 145, 140 또는 135의 상한, 및 134, 135, 140, 145, 150 또는 155의 독립적으로 선택된 하한을 갖는 온도 범위의 온도로 가열될 수 있으며, 여기서 하한은 상한보다 낮다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 적어도 약 1분, 적어도 약 2분, 적어도 약 3분, 적어도 약 4분, 적어도 약 5분, 적어도 약 6분, 적어도 약 7분, 적어도 약 8분, 적어도 약 9분, 적어도 약 10분, 적어도 약 15분, 적어도 약 20분, 적어도 약 25분, 적어도 약 30분, 적어도 약 35분, 적어도 약 40분, 적어도 약 45분, 적어도 약 50분, 적어도 약 55분, 적어도 약 60분, 적어도 약 65분, 적어도 약 70분, 적어도 약 75분, 적어도 약 80분, 적어도 약 85분, 적어도 약 90분, 적어도 약 100분, 적어도 약 110분, 적어도 약 120분, 적어도 약 130분, 적어도 약 140분, 적어도 약 150분, 적어도 약 160분, 적어도 약 170분, 적어도 약 180분, 적어도 약 190분, 적어도 약 200분, 적어도 약 210분, 적어도 약 220분, 적어도 약 230분, 또는 적어도 약 240분 동안 약 134℃ 내지 약 157℃로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 250분 이하 동안 약 134℃ 내지 약 157℃로 가열된다.

[0053] 일부 구현예에서, 상기 폴록사머 (예를 들면, 정제된 폴록사머)는 약 120℃ 내지 약 134℃로 가열된다. 일부 구

현예에서, 상기 폴록사머는 대략 임의의 하기 온도보다 낮은 온도 (°C)로 가열된다: 134, 130 또는 125. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 대략 임의의 하기 온도보다 높은 온도 (°C)로 가열된다: 120, 125 또는 130. 즉, 상기 폴록사머는 134, 130 또는 125의 상한, 및 120, 125 또는 130의 독립적으로 선택된 하한을 갖는 온도 범위의 온도로 가열될 수 있으며, 여기서 하한은 상한보다 낮다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 적어도 약 20분, 적어도 약 30분, 적어도 약 40분, 적어도 약 50분 또는 적어도 약 60분 동안 약 120°C 내지 약 134°C로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 적어도 약 62분, 적어도 약 65분, 적어도 약 70분, 적어도 약 75분, 적어도 약 80분, 적어도 약 85분, 적어도 약 90분, 적어도 약 100분, 적어도 약 110분, 적어도 약 120분, 적어도 약 130분, 적어도 약 140분, 적어도 약 150분, 적어도 약 160분, 적어도 약 170분, 적어도 약 180분, 적어도 약 190분, 적어도 약 200분, 적어도 약 210분, 적어도 약 220분, 적어도 약 230분 또는 적어도 약 240분 동안 약 120°C 내지 약 134°C로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 250분 이하 동안 약 120°C 내지 약 134°C로 가열된다.

[0054] 일부 구현예에서, 상기 폴록사머 (예를 들면, 정제된 폴록사머)는 약 100°C 내지 약 120°C로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 대략 임의의 하기 온도보다 낮은 온도 (°C)로 가열된다: 120, 115, 110 또는 105. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 대략 임의의 하기 온도보다 높은 온도 (°C)로 가열된다: 100, 105, 110 또는 115. 즉, 상기 폴록사머는 120, 115, 110 또는 105의 상한, 및 100, 105, 110 또는 115의 독립적으로 선택된 하한을 갖는 온도 범위의 온도로 가열될 수 있으며, 여기서 하한은 상한보다 낮다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 적어도 약 20분, 적어도 약 30분, 적어도 약 40분, 적어도 약 50분 또는 적어도 약 60분, 적어도 약 70분, 적어도 약 80분, 또는 적어도 약 90분 동안 약 100°C 내지 약 120°C로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 적어도 약 98분, 적어도 약 100분, 적어도 약 110분, 적어도 약 120분, 적어도 약 130분, 적어도 약 140분, 적어도 약 150분, 적어도 약 160분, 적어도 약 170분, 적어도 약 180분, 적어도 약 190분, 적어도 약 200분, 적어도 약 210분, 적어도 약 220분, 적어도 약 230분 또는 적어도 약 240분 동안 약 100°C 내지 약 120°C로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 250분 이하 동안 약 100°C 내지 약 120°C로 가열된다.

[0055] 일부 구현예에서, 상기 폴록사머 (예를 들면, 정제된 폴록사머)는 약 80°C 내지 약 100°C로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 대략 임의의 하기 온도보다 낮은 온도 (°C)로 가열된다: 100, 95, 90 또는 85. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 대략 임의의 하기 온도보다 높은 온도 (°C)로 가열된다: 80, 85, 90 또는 95. 즉, 상기 폴록사머는 100, 95, 90 또는 85의 상한, 및 80, 85, 90 또는 95의 독립적으로 선택된 하한을 갖는 온도 범위의 온도로 가열될 수 있으며, 여기서 하한은 상한보다 낮다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 적어도 약 20분, 적어도 약 30분, 적어도 약 40분, 적어도 약 50분 또는 적어도 약 60분, 적어도 약 70분, 적어도 약 80분, 또는 적어도 약 90분, 적어도 약 100분, 적어도 약 110분, 적어도 약 120분 동안 약 80°C 내지 약 100°C로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 적어도 약 122분, 적어도 약 130분, 적어도 약 140분, 적어도 약 150분, 적어도 약 160분, 적어도 약 170분, 적어도 약 180분, 적어도 약 190분, 적어도 약 200분, 적어도 약 210분, 적어도 약 220분, 적어도 약 230분 또는 적어도 약 240분 동안 약 80°C 내지 약 100°C로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 250분 이하 동안 약 80°C 내지 약 100°C로 가열된다.

[0056] 일부 구현예에서, 상기 폴록사머 (예를 들면, 정제된 폴록사머)는 약 60°C 내지 약 80°C로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 대략 임의의 하기 온도보다 낮은 온도 (°C)로 가열된다: 80, 75, 70 또는 65. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 대략 임의의 하기 온도보다 높은 온도 (°C)로 가열된다: 60, 65, 70 또는 75. 즉, 상기 폴록사머는 80, 75, 70 또는 65의 상한, 및 60, 65, 70 또는 75의 독립적으로 선택된 하한을 갖는 온도 범위의 온도로 가열될 수 있으며, 여기서 하한은 상한보다 낮다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 적어도 약 20분, 적어도 약 30분, 적어도 약 40분, 적어도 약 50분, 또는 적어도 약 60분, 적어도 약 70분, 적어도 약 80분, 또는 적어도 약 90분, 적어도 약 100분, 적어도 약 110분, 적어도 약 120분, 적어도 약 130분 또는 적어도 약 140분 동안 약 60°C 내지 약 80°C로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 적어도 약 143분, 적어도 약 150분, 적어도 약 160분, 적어도 약 170분, 적어도 약 180분, 적어도 약 190분, 적어도 약 200분, 적어도 약 210분, 적어도 약 220분, 적어도 약 230분 또는 적어도 약 240분 동안 약 60°C 내지 약 80°C로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 250분 이하 동안 약 60°C 내지 약 80°C로 가열된다.

[0057] 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 진공 하에 가열된다. 예를 들면, 상기 폴록사머는 인가된 진공 하에 진공 오븐에서 가열될 수 있다. 하기 기재된 바와 같이, 인가된 진공 하에 본원에 기재된 온도에서 폴록사머를 가열함으로써 폴록사머의 성능을 개선시킨다는 사실이 예상외로 발견되었다 (예를 들면, 실시예 7 참조). 환언하면, 가열 동안 폴록사머에 진공을 인가하는 것은 차후의 폴록사머 성능, 예를 들면, 세포 배양시 폴록사머 성능에 대한 가열의 유리한 효과를 무효화하지 않는다.

- [0058] 다른 구현예에서, 폴록사머를 일정 기간 동안 표적 온도로 가열하는 것은 폴록사머가 특정한 온도에서 체류하는 시간을 나타낼 수 있다. 즉, 시간 = 0은 폴록사머가 표적 온도에 도달한 시간을 나타낼 수 있다. 예를 들면, 폴록사머를 5분 동안 140℃로 가열하는 것은 폴록사머가 140℃의 온도에 도달한 후 5분 동안 가열되었음을 나타낼 수 있다. 예를 들면, 폴록사머 (예를 들면, 정제된 폴록사머)를 적어도 1분 동안 약 60℃ 내지 약 185℃로 가열하는 것은, 상기 폴록사머가 적어도 약 1분 동안 표적 온도 (예를 들면, 약 60℃ 내지 약 185℃)에 도달했음을 나타낸다.
- [0059] 일부 구현예에서, 가열 공정 동안 상기 정제된 폴록사머의 온도는 약 120℃를 초과하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 정제된 폴록사머는 가열 공정 전에 액체 또는 수용액에 용해될 수 있다. 일부 구현예에서, 액체 또는 수용액에 용해된 정제된 폴록사머는 고체 폴록사머에 대해 사용되는 온도보다 더 높은 온도로 가열될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 정제된 폴록사머는 가열 공정 전의 고체 폴록사머이다. 일부 구현예에서, 상기 정제된 폴록사머는 가열 공정 전의 실온에서의 액체 폴록사머이다.
- [0060] 일부 구현예에서, 상기 정제된 폴록사머는 약 80℃ 내지 약 100℃의 온도로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 정제된 폴록사머는 약 85℃ 내지 약 91℃의 온도로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 정제된 폴록사머는 대략 임의의 하기 온도보다 낮은 온도 (℃)로 가열된다: 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82 또는 81. 일부 구현예에서, 상기 정제된 폴록사머는 대략 임의의 하기 온도보다 높은 온도 (℃)로 가열된다: 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99. 즉, 상기 정제된 폴록사머는 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82 또는 81의 상한, 및 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99의 독립적으로 선택된 하한을 갖는 온도 범위의 온도로 가열될 수 있으며, 여기서 하한은 상한보다 낮다. 일부 구현예에서, 상기 정제된 폴록사머는 약 120℃ 미만의 온도로 가열된다. 일부 구현예에서, 상기 정제된 폴록사머는 101℃, 102℃, 103℃, 104℃, 105℃, 106℃, 107℃, 108℃, 109℃, 110℃, 111℃, 112℃, 113℃, 114℃, 115℃, 116℃, 117℃, 118℃ 및 119℃ 중 대략 임의의 온도 미만의 온도로 가열된다.
- [0061] 상기 정제된 폴록사머는 임의의 원하는 기간 동안 가열될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 정제된 폴록사머는 약 10분 내지 약 15분 동안 가열된다. 가열 시간은 상기 폴록사머에 열이 가해지는 총 시간을 나타낼 수 있으며, 따라서, 가열 시간은 상기 폴록사머가 원하는 온도를 달성하는 시간에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 정제된 폴록사머는 약 10 내지 약 15분의 총 시간 동안 가열되며, 상기 가열은, 폴록사머가 원하는 최대 온도, 예를 들면, 약 80℃ 내지 약 100℃를 달성할 때 중지된다.
- [0062] 당해기술에 공지된 임의의 적합한 가열 장치는 정제된 폴록사머의 가열에 사용될 수 있다. 비제한적 예로써, 고체 폴록사머는, 표준 실험실 가열 플레이트 (예를 들면, Corning®, Costar® 또는 Thermo Scientific™에 의해 판매되는 교반 핫플레이트) 상에서 가열되는 유리 용기 (예를 들면, PYREX® 비이커, 플라스크 또는 다른 개방 용기)에서 가열될 수 있다. 대안적으로, 상기 폴록사머는 진공 오븐에서 가열될 수 있다.
- [0063] 당해기술에 공지된 임의의 적합한 온도 측정 도구가 가열 처리 동안/후 폴록사머의 온도를 측정하는데 사용될 수 있으며, 단, 상기 온도 측정 도구는 폴록사머 온도의 정확한 측정이 (예를 들면, 사용을 위한 제조자의 설명서에 따라서) 이루어질 수 있는 방식으로 사용된다. 적합한 온도 측정 도구의 비제한적인 예는, 제한 없이, 온도계 (예를 들면, 유리 내 액체(liquid-in-glass) 온도계, 열전쌍 (예를 들면, 하기 기재된 바와 같음), 저항 온도 측정기 (RTDs) 및/또는 서미스터(thermistor)를 포함한다. 일부 구현예에서, 온도 측정 도구는 가열에 사용된 장비에 본래 갖추어져 있을 수 있다.
- [0064] 냉각
- [0065] 일부 측면에서, 본원에 기재된 세포 배양 배지에서 사용하기 위한 폴록사머를 제조하는 방법은 가열된, 정제된 폴록사머를 냉각시켜 고체 열-처리된 폴록사머를 형성하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 액체 폴록사머는 약 50℃ 미만의 온도로 냉각된다. 액체 폴록사머가 냉각되는 온도는 그것의 동결 온도 미만의 임의의 온도일 수 있으며, 그것은 사용된 특정한 폴록사머에 따라 달라질 수 있다. 예를 들면, 폴록사머 188의 동결 온도는 약 52℃이므로, 이러한 폴록사머를 약 52℃ 미만의 임의의 온도로 냉각시켜 고체 가열-처리된 폴록사머를 형성할 수 있다.
- [0066] 가열된 액체 폴록사머는 폴록사머를 동결시키기에 충분한 임의의 온도에서 냉각될 수 있다. 일부 구현예에서, 가열된 액체 폴록사머는 주위 온도에서 냉각된다. 일부 구현예에서, 가열된 액체 폴록사머는 약 2℃ 내지 약 8℃에서 냉각된다. 일부 구현예에서, 가열된 액체 폴록사머는 약 0℃ 미만, 예를 들면, 약 -20℃ 또는 약 -70℃



에서 냉각된다.

[0067] 가열된 액체 폴록사머는 가열된 액체 폴록사머를 그 냉각 온도에서 동결시키기에 충분한 임의의 원하는 시간 동안 냉각될 수 있다. 일부 구현예에서, 액체 폴록사머는 약 20분 동안 냉각된다. 냉각 시간은, 폴록사머가 가열되는 온도 및/또는 냉각 온도에 의존적일 수 있다. 냉각 온도 및 시간은 (소정의 시간 동안 소정의 온도로 가열된) 액체 폴록사머가 특정한 냉각 온도에서 동결되는데 걸리는 시간을 관측함으로써 실증적으로 결정될 수 있다.

[0068] 프릴링 또는 밀링 디바이스는 제외하고, 당해기술에 공지된 임의의 적합한 냉각 장치는 가열된 액체 폴록사머를 냉각시키는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 가열된 액체 폴록사머는 냉장고, 냉동고, 또는 상기 기재된 바와 같이 충분한 냉각 온도에서 유지되는 콜드 룸(cold room)에 배치될 수 있다. 대안적으로, 특정한 냉각 장치가 사용되지 않을 수 있지만, 그보다 가열된 액체 폴록사머는 가열 장치가 가열을 중단하거나 중지하도록 프로그래밍된 후 상기 장치에서 냉각될 수 있다. 이러한 경우에, 가열된 액체 폴록사머를 주위 온도에서 냉각시킨다. 예를 들면, 폴록사머가 핫플레이트 상에서 가열되는 경우, 가열된 액체 폴록사머는 단순히 핫플레이트의 가열 기능이 중단된 후 핫플레이트 상에 그것을 방치시켜 냉각될 수 있다. 대안적으로, 상기 폴록사머는 진공 오븐에서 냉각될 수 있다. 일부 구현예에서, 가열된 액체 폴록사머의 냉각은 액체 질소의 사용을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 가열된 액체 폴록사머의 냉각은 특정한 온도에서 유지되는 가스를 통해 가열된 액체 폴록사머를 분무하거나 아토마이징(atomizing)하는 것을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 가열된 액체 폴록사머의 냉각은 폴록사머를 특정한 또는 균일한 크기 및/또는 형상의 입자 또는 미립자로 성형하는 것을 포함하지 않는다.

[0069] *프릴링/밀링*

[0070] 일부 구현예에서, 상기 냉각은 프릴링 또는 밀링 디바이스에서 수행되지 않는다. 폴록사머는 특정한, 균일한 폴록사머 입자 크기 및/또는 형상을 달성하도록 당해기술에서 프릴링 또는 밀링에 의해 제조되었다 (폴록사머 프릴링 및 밀링을 기재하는 예에 대해서는, 유럽 특허 EP1661558 B1 또는 U.S. 특허 번호 7,887,844를 참조한다). 폴록사머 프릴링은 아토마이저를 통해 액체 폴록사머를 통과시켜 액체 폴록사머 입자를 형성하고, 이들 입자를 냉각 매체, 예를 들면, 특정한 온도에서 유지된 가스 또는 액체 질소에서 냉각시키는 것을 수반한다. 냉각 매체의 온도는 폴록사머의 동결 속도를 결정하는 것으로 사료되며, 그것은 폴록사머 입자의 최종 크기 및 형상에 영향을 준다. 프릴링 디바이스의 예는, 비제한적으로, 프릴링 타워(prilling tower)를 포함할 수 있다. 프릴링 타워에서, 아토마이징된 폴록사머는 상기 타워의 상부로부터 방출되며, 그것은 가스 또는 액체 냉각 매체 (예를 들면, 주위 공기, 특정한 온도에서 유지된 공기, 또는 액체 질소)를 거쳐 떨어지면서 입자로 동결된다.

[0071] 폴록사머 밀링 (또는 마이크로-밀링)은 고체 폴록사머를 분쇄하거나, 또는 특정한 크기의 폴록사머 입자가 생성될 때까지 고체 폴록사머를 노즐을 통해 고압으로 가압하는 것을 수반한다. 밀링은 열을 발생시킬 수 있으며 폴록사머는 비교적 낮은 용융 온도를 갖기 때문에, 폴록사머는 종종 밀링 공정 동안 고체 상을 유지하기 위해, 예를 들면, 냉각된 공기 또는 액체 질소로 냉각시킴으로써 냉각된다. 폴록사머는 또한 밀링 전에 냉각되고 폴록사머가 용융되기에 충분한 시간 동안 밀링될 수 있다. 밀링 디바이스의 예는, 비제한적으로, 에어-제트 밀(air-jet mill), 볼-밀(ball-mill) 및 프리저 밀(freezer mill) (예를 들면, SPEX SamplePrep® Freezer/Mill®)을 포함할 수 있다.

[0072] 프릴링 및 밀링은, 예를 들면, 약물 제형의 일부로서 폴록사머 입자 크기 및 형상에 대해 엄격한 기준을 필요로 하는 공정에 유용하다. 폴록사머는 용해를 돕고 약물 방출에 영향을 주는 약물 제형의 성분으로서 당해기술에 공지되어 있다. 이들 제형에서, 폴록사머 입자는 약물 제형의 원하는 약동학적 특성을 부여하고 엄격한 약물 안전성 및 재현성 기준을 고수하기 위해 표준 특성을 유지해야 한다. 본원에 기재된 방법은 폴록사머에 대한 그와 같은 엄격하거나 정확한 기준을 필요로 하지 않아서 이들 프릴링 또는 밀링 방법이 사용되지 않는다는 점이 주목된다.

[0073] 일부 구현예에서, 폴록사머는 본원에 기재된 바와 같이 가열되기 전에 프릴링 공정으로 처리되었다. 세포 배양에 사용하기 위한 많은 상업적으로 이용가능한 폴록사머 (예를 들면, BASF®에 의해 시판되는 Pluronic® F68 NF Prill Poloxamer 188)는 제조 동안 프릴링 또는 마이크로-프릴링 공정을 겪는다. 본원에 기재된 방법에 포함되는 가열 및 냉각 단계는 프릴링을 수반하지 않는다. 그보다는 오히려, 그것은 이미 프릴링 또는 마이크로-프릴링된 폴록사머에 적용될 수 있다. 세포 배양시 상업적으로 이용가능한 폴록사머 (예를 들면, 프릴링된 또는 마이크로-프릴링된 폴록사머)의 성능은 본원에 기재된 바와 같은 가열 및 냉각에 의해 개선될 수 있음이 본 개시 내용의 발견이다.

- [0074] 일부 측면에서, 본원에 기재된 세포 배양 배지에서 사용하기 위한 폴록사머를 제조하는 방법은 가열-처리된 폴록사머를 세포 배양 배지 내에 부가하는 것을 포함한다. 가열 및 냉각 후, 고체 가열-처리된 폴록사머는 당해 기술에 공지된 임의의 방법에 의해 세포 배양 배지에 용해될 수 있다. 예를 들면, 폴록사머가 개방 유리 용기에서 가열되고 냉각되는 경우, 수득한 고체 가열-처리된 폴록사머는 단순히 세포 배양 배지에 부가하기에 적절한 양(중량 기준)으로 스크레이핑(scraping)되거나 플레이킹(flaking)될 수 있다. 가열-처리된 폴록사머는 즉시 세포 배양 배지에 부가될 수 있거나, 또는 보관되고 이후에(예를 들면, 가열 처리 후 약 1일 초과, 약 1개월 초과 또는 약 1년 초과 시점에) 세포 배양 배지에 부가될 수 있다.
- [0075] 일부 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 가열 및 냉각 단계는 각각 가열-처리된 폴록사머를 세포 배양 배지 내로 부가하기 전에 1회 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 기재된 바와 같은 가열 및 냉각 단계는 가열-처리된 폴록사머를 세포 배양 배지 내로 부가하기 전에 적어도 1회 반복된다.
- [0076] **III. 폴록사머 및 폴록사머 특성**
- [0077] 폴록사머를 제조하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 방법에 의해 생산된 폴록사머는 세포 배양 배지에 사용하기 위한 것이다.
- [0078] 용어 "폴록사머"는 다수의 뚜렷이 다른 화합물을 포함할 수 있으며, 그 이유는 폴리옥시프로필렌과 폴리옥시에틸렌 사슬에 대해 상이한 길이가 조합에 사용될 수 있기 때문이다. 폴록사머에 존재하는 폴리옥시프로필렌과 폴리옥시에틸렌 사슬의 특정한 조합은 특정한 화학 및/또는 생물리적 특성을 발생시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 폴록사머는 화학식  $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_m(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$ 를 갖는다. 일부 구현예에서,  $n$  (즉, 폴리옥시에틸렌 사슬 길이)은 약 60 내지 약 150의 값을 갖는다. 일부 구현예에서,  $m$  (즉, 폴리옥시프로필렌 사슬 길이)은 약 25 내지 약 60의 값을 갖는다.
- [0079] 폴록사머는 그것의 근사 분자량 및 폴리옥시에틸렌 함량 백분율을 명시하는 번호 체계로 종종 기재된다. 이들 값은 폴록사머 조성물에서 각각의 폴록사머 분자의 절대 값으로 보다는 폴록사머 조성물에서의 평균 값을 나타낼 수 있다. 이러한 시스템 하에, 처음 2개의 숫자는 폴리옥시프로필렌 블록의 근사 분자량을 제공하기 위해 100을 곱한 수치이며, 세번째 숫자는 폴리옥시에틸렌 블록의 중량백분율을 제공하기 위해 10을 곱한 수치이다. 예를 들면, 폴록사머 188 (CAS No. 9003-11-6)은 상기 도시된 식에서와 같이  $n$ 의 값이 약 80이고,  $m$ 의 값이 약 27인 폴록사머를 나타낼 수 있다. 폴록사머 237은  $n$ 의 값이 약 64이고,  $m$ 의 값이 약 37인 폴록사머를 나타낼 수 있다. 폴록사머 338은  $n$ 의 값이 약 141이고,  $m$ 의 값이 약 44인 폴록사머를 나타낼 수 있다. 폴록사머 407은  $n$ 의 값이 약 101이고,  $m$ 의 값이 약 56인 폴록사머를 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, 폴록사머의 평균 분자량은 약 6,000 내지 약 18,000 달톤이다. 일부 구현예에서, 폴록사머 188은 상기 도시된 식에서와 같이  $n$ 의 값이 약 80이고,  $m$ 의 값이 약 27인 폴록사머로서, 평균 분자량이 약 7680 내지 약 9510 g/mol인, 폴록사머를 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, 폴록사머 188은 상기 도시된 식에서와 같이  $n$ 의 값이 약 80이고,  $m$ 의 값이 약 27인 폴록사머로서, 평균 분자량이 약 7000 내지 약 10000 g/mol인, 폴록사머를 나타낼 수 있다.
- [0080] 상표명, 예를 들면, PLURONIC<sup>®</sup> 하에 시판되는 폴록사머는 상이한 시스템에 의하여 명명될 수 있다. 알파벳 대문자가 물리적 상태를 나타내는데 사용될 수 있다 (예를 들면, 고체의 경우 F, 페이스트의 경우 P 또는 액체의 경우 L). 2 또는 3자리 숫자는 화학 특성을 나타내는데 사용될 수 있다. 처음 하나 또는 두 자리는 폴리옥시프로필렌 블록의 근사 분자량을 제공하기 위해 300을 곱한 수치이며, 세번째 자리는 폴리옥시에틸렌 블록의 중량백분율을 제공하기 위해 10을 곱한 수치이다. 예를 들면, PLURONIC<sup>®</sup> F68은 상기 도시된 식에서와 같이  $n$ 의 값이 약 80이고,  $m$ 의 값이 약 27인 고체 폴록사머를 나타낼 수 있다. PLURONIC<sup>®</sup> F87은  $n$ 의 값이 약 64이고,  $m$ 의 값이 약 37인 고체 폴록사머를 나타낼 수 있다. PLURONIC<sup>®</sup> F108은  $n$ 의 값이 약 141이고,  $m$ 의 값이 약 44인 고체 폴록사머를 나타낼 수 있다. PLURONIC<sup>®</sup> F127은  $n$ 의 값이 약 101이고,  $m$ 의 값이 약 56인 고체 폴록사머를 나타낼 수 있다.
- [0081] 폴록사머가 다양한 길이의 소수성 (폴리옥시프로필렌) 및 친수성 (폴리옥시에틸렌) 모이어티를 갖기 때문에, 상이한 폴록사머는 상이한 친수성-친유성 균형 (HLBs)을 가질 수 있다. 화합물의 HLB는 친수성 또는 친유성인 화합물의 상대적 비율을 계산함으로써 결정되며, HLB 값은 화합물의 계면활성제 특성을 예상하는데 사용된다. 예를 들면, 10 미만의 HLB를 갖는 화합물은 수 불용성인 것으로 예상되며, 10 초과인 HLB를 갖는 화합물은 수 가용성인 것으로 예상된다. 바람직한 구현예에서, 세포 배양에 사용하기 위한 폴록사머는 24 또는 그 초과인 HLB를 갖는다. 폴록사머의 HLB는 하기에 기재된 것들을 포함하는, 당해기술에 익히 공지된 방법에 따라서 계산될

수 있다: Griffin, W.C. (1954) *J. Soc. Cosmet. Chemists* 5(4):249-56 및 Davies, J.T. (1957) *Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interfaces: Proc. of 2<sup>nd</sup> Intl. Congress Surface Activity*, Butterworths (London): 426-38.

[0082] 일부 구현예에서, 폴록사머의 물리적 및/또는 화학적 특성을 측정할 수 있다. 예를 들면, 폴록사머의 물리적 및/또는 화학적 특성은 가열-처리된 폴록사머와 관련된 특성을 확인하기 위해 본원에 기재된 바와 같이 가열-처리 전후 측정될 수 있다. 또 다른 예로써, 본원에 기재된 바와 같이 양호한 폴록사머 로트와 불량한 폴록사머 로트의 물리적 및/또는 화학적 특성은 양호한 폴록사머 로트와 관련된 특성을 확인하기 위해 측정될 수 있다.

[0083] 물리적 및/또는 화학적 특성을 측정하는 분석의 예는, 비제한적으로, MALDI-MS, 겔 투과 크로마토그래피, 분말-XRD, 준탄성 광 산란(Quasi-elastic light scattering) 및 고체 상태 NMR을 포함할 수 있다. MALDI-MS (매트릭스-연관된 레이저 탈착/이온화 질량 분석법)는 화합물을, 예를 들면, 그것의 분자 질량 및 전하에 의해 분석, 정량화 또는 확인하기 위한 기술로서 당해기술에 공지되어 있다. 비제한적인 예로써, MALDI-MS는, 가열-처리된 폴록사머 또는 양호한 폴록사머 로트와 비교하여, 가열 처리 전 폴록사머 로트 또는 불량한 폴록사머 로트와 우선적으로 관련되거나 이에 존재하는 화합물 (예를 들면, 불순물)을 확인하는데 사용될 수 있다. 겔 투과 크로마토그래피는 화합물을 크기로 분리하는 기술로서 당해기술에 공지되어 있다. 비제한적인 예로써, 겔 투과 크로마토그래피는, 가열-처리된 폴록사머 또는 양호한 폴록사머 로트와 비교하여, 가열 처리 전 폴록사머 로트 또는 불량한 폴록사머 로트와 우선적으로 관련되거나 이에 존재하는 화합물 (예를 들면, 불순물)을 분리하는데 사용될 수 있다. 분말-XRD (분말 X-선 회절)는 화합물의 구조를 확인하는 기술로서 당해기술에 공지되어 있으며, 화합물의 분말 샘플 (복수의 무작위로 배향된 미결정(crystallite)을 함유함)을 산출하고, X-선 회절을 사용하여 미결정의 구조적 특징을 분석하는 단계를 수반할 수 있다. 비제한적인 예로써, 분말-XRD는, 예를 들면, 가열 처리 전 폴록사머 또는 불량한 폴록사머 로트와 비교하여, 열-처리된 폴록사머 또는 양호한 폴록사머 로트의 구조적 특성을 확인하는데 사용될 수 있다. 준탄성 광 산란 (역학적 광 산란 및 광자 상관 분광학으로 알려짐)은 용액 또는 서스펜션 중 입자의 크기 분포 프로파일을 결정하기 위한 기술로서 당해기술에 공지되어 있다. 비제한적인 예로써, 준탄성 광 산란은, 가열-처리된 폴록사머 또는 양호한 폴록사머 로트와 비교하여, 가열 처리 전 폴록사머 로트 또는 불량한 폴록사머 로트와 우선적으로 관련되거나 이에 존재하는 화합물 (예를 들면, 불순물)을 그것의 입자 크기로 식별하는데 사용될 수 있다.

[0084] 고체 상태 NMR (핵 자기 공명, 또는 SSNMR)은 화합물의 다양한 구조적 특징을 결정하는 기술로서 당해기술에 공지되어 있다. 예를 들면, 고체 상태 NMR은 분자 형태, 배열, 화학적 이동 또는 화합물의 다형성 특징을 확인하는데 사용될 수 있다. 비제한적인 예로써, 고체 상태 NMR은, 가열 처리 전 폴록사머 또는 불량한 폴록사머 로트와 비교하여, 가열-처리된 폴록사머 또는 양호한 폴록사머 로트의 구조적 특성을 확인하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 고체 상태 NMR에 의해 결정된 구조적 특성은 폴록사머 샘플에서 결정성 대 비정질 폴록사머의 비를 포함할 수 있다. 또 다른 비-제한적인 예로써, 고체 상태 NMR은 하나 또는 그 초과 폴록사머 다형체를 분해하거나 프로파일링할 수 있는 스펙트럼을 제공하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 고체 상태 NMR은, 불량한 폴록사머 로트 또는 가열 처리 전 폴록사머에 존재하는 폴록사머 다형체와 비교하여, 양호한 폴록사머 로트 또는 가열-처리된 폴록사머에서의 하나 또는 그 초과 폴록사머 다형체를 분해하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 고체 상태 NMR에 의해 발생된 폴록사머 스펙트럼은, 예를 들면, 불량한 폴록사머 로트 또는 가열 처리 전 폴록사머를 함유하는 세포 배양 배지에서 성장된 세포 배양물의 세포 생존력과 비교하여, 양호한 폴록사머 로트 또는 가열-처리된 폴록사머를 함유하는 세포 배양 배지에서 성장된 세포 배양물의 세포 생존력을 측정함으로써 세포 배양 배지에서 폴록사머의 성능과 서로 관련될 수 있다.

#### [0085] IV. 세포 배양시 폴록사머의 용도 및 폴리펩타이드의 생산

[0086] 본원에 제공된 가열-처리된 폴록사머는 방법 (예를 들면, 본 개시내용의 가열-처리된 폴록사머를 함유하는 배양 배지를 사용하여 세포를 배양하고 폴리펩타이드를 생산하는 방법) 및 조성물 (예를 들면, 본 개시내용의 가열-처리된 폴록사머를 함유하는 세포 배양 배지)에서 사용될 수 있다.

#### [0087] 세포 배양시 폴록사머의 용도

[0088] 폴록사머는 당해기술에 공지된 세포 배양 배지에 대해 첨가제로서 사용될 수 있다. 이론에 구속시키고자 하지 않으면서, 폴록사머는 세포가 손상되는 것을 막고 세포 생존력을 증진시킬 수 있는, 세포 배양 배지에서의 다수의 기능을 갖는 것으로 사료된다. 예를 들면, 폴록사머는 세포에 대한 전단 보호제(shear protectant)로서 작용할 수 있다. 폴록사머는 세포-기포 부착을 감소시킬 수 있으며/있거나 기포가 터질 때 충격을 감소시켜 세포 손상을 예방할 수 있다. 폴록사머는 또한 기포 속도 및 빈도를 변경시키고/시키거나 포움 층으로부터 세포 배액을

개선시키고/시키거나 세포막을 강화시킬 수 있다. 예를 들면, Meier, S.J., *et al.* (1999) *Biotechnol. Bioeng.* 62(4):468-78; Chisti, Y. (2000) *Trends Biotechnol.* 18(10):420-32; 및 Tharmalingam, T., *et al.* (2008) *Mol. Biotechnol.* 39(2): 167-77을 참조한다.

[0089] 본원에 기재된 바와 같이 가열-처리된 폴록사머는 폴록사머에 대해 전형적으로 사용되는 임의의 농도에서 세포 배양 배지에 부가될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 배양 배지는 가열-처리된 폴록사머를 약 0.1 g/L 내지 약 10 g/L로 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 배양 배지는 가열-처리된 폴록사머를 약 0.1 g/L 내지 약 3 g/L로 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 배양 배지는 가열-처리된 폴록사머를 약 3 g/L 내지 약 10 g/L로 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 배양 배지는 가열-처리된 폴록사머를 약 0.1 g/L, 약 0.2 g/L, 약 0.3 g/L, 약 0.4 g/L, 약 0.5 g/L, 약 0.6 g/L, 약 0.7 g/L, 약 0.8 g/L, 약 0.9 g/L, 약 1 g/L, 약 2 g/L, 약 3 g/L, 약 4 g/L, 약 5 g/L, 약 6 g/L, 약 7 g/L, 약 8 g/L, 약 9 g/L 또는 약 10 g/L로 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같이 제조된 가열-처리된 폴록사머는 가열 처리 전 폴록사머보다 원하는 수준의 세포 생존력을 달성하는데 세포 배양 배지에서 더 낮은 농도로 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같이 제조된 가열-처리된 폴록사머는 가열 처리 전 폴록사머보다 원하는 수준의 세포 생존력을 달성하는데 세포 배양 배지에서 더 일관되거나 표준화된 농도로 사용될 수 있다.

[0090] 폴록사머와 같은 계면활성제는, 부가되는 추가의 계면활성제 분자가 용액에 용해되기보다는 미셀 내로 혼입되기 시작하는, 임계 미셀 농도 (CMC)로 불리는 용해 한계를 갖는다. CMC보다 더 높은 농도에서, 용액의 표면 장력은 더이상 계면활성제 농도에 비례하여 동일한 속도로 감소되지 않는다. 바람직한 구현예에서, 가열-처리된 폴록사머는 그것의 CMC보다 낮은 농도로 세포 배양 배지에 부가된다. 예를 들면, 폴록사머 188의 CMC는 100 mg/mL인 것으로 결정되었다 (Kabanov, A.V., *et al.* (1995) *Macromolecules* 28(7):2303-14). 폴록사머의 CMC는 폴록사머가 부가되는 동안 용액의 표면 장력을 측정함으로써 결정될 수 있다. 폴록사머 농도의 증가가 더이상 표면 장력의 증가를 초래하지 않는 농도가 상기 폴록사머에 대한 CMC이다. 표면 장력은, 예를 들면 그리고 비제한적으로, 표면장력계 (예를 들면, Attension으로부터의 Sigma 700/701 표면장력계)를 사용하여 측정될 수 있다.

[0091] 세포 배양 배지

[0092] 본 개시내용의 특정 측면은 세포 배양 배지에서 세포를 배양하는 것에 관한 것이다. 원하는 유형의 세포 및/또는 폴리펩타이드 생성물을 위해 적합한, 당해기술에 공지된 임의의 세포 배양 배지가 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 세포 배양 배지는 화학적으로 정의된 배지이다. 다른 구현예에서, 상기 세포 배양 배지는 화학적으로 정의되지 않은 배지이다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 가열-처리된 폴록사머가 기저 세포 배양 배지에 부가된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 가열-처리된 폴록사머가 공급 또는 배지-공급 세포 배양 배지에 부가된다.

[0093] 예컨대, 비제한적으로, Ham's F10 (Sigma), 최소 필수 배지 ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma), 둘베코 변형된 이글 배지 ([DMEM], Sigma), 루리아 액체배지(Luria broth; LB), 및 테리픽 액체배지(Terrific broth; TB)를 포함하는 상업적으로 이용가능한 배지가 사용될 수 있으며, 이들 배지 중 어느 것은 본원에 상세히 기재된 바와 같은 배지 성분 중 어느 것 (예를 들면, 가열-처리된 폴록사머)으로 보충될 수 있다. 또한, 모든 개시내용이 그 전체로 본원에 참고로 편입된, 문헌(참조: Ham and Wallace, *Meth. Enz.*, 58:44 (1979), Barnes and Sato, *Anal. Biochem.*, 102:255 (1980), Vijayasankaran *et al.*, *Biomacromolecules.*, 6:605:611 (2005), Patkar *et al.*, *J Biotechnology*, 93:217-229 (2002)), 미국 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 또는 4,560,655; WO 90/03430; WO 87/00195; 미국 특허 번호 Re. 30,985; 또는 미국 특허 번호 5,122,469에 기재된 배지 중 어느 것은 본원에 상세히 기재된 바와 같은 배지 성분 중 어느 것 (예를 들면, 가열-처리된 폴록사머)으로 보충될 수 있다.

[0094] 본원에 제공된 임의의 배지는 또한 필요하다면 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 이온 (예컨대 나트륨, 클로라이드, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 버퍼 (예컨대 HEPES), 뉴클레오사이드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 미량 원소 (마이크로몰 범위의 최종 농도로 통상적으로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨), 계면활성제 예컨대 폴록사머, 및 글루코스 또는 상응하는 에너지 공급원으로 보충될 수 있다. 일부 측면에서, 본원에 제공된 세포 배양 배지는 식물 또는 동물로부터 유래된 단백질을 함유한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 배양물은 식물 또는 동물로부터 유래된 단백질을 함유하지 않는다. 임의의 다른 필수적인 보충물을 또한 당해기술의 숙련자에게 공지된 적절한 농도로 포함할 수 있다.

[0095] 세포 생존력



- [0096] 일부 구현예에서, 가열-처리된 폴록사머를 포함하는 세포 배양 배지에서 세포 생존력은 미처리된 폴록사머 (또는 가열 처리 전의 폴록사머)를 포함하는 세포 배양 배지에서 세포 생존력과 비교하여 증가된다. 본원에 기재된 바와 같은 폴록사머의 제조는, 가열-처리된 폴록사머가 세포 배양 배지에 사용될 때, 미처리된 폴록사머가 동일한 세포 배양 배지에 사용되는 경우와 비교하여 증가된 세포 생존력을 초래한다는 점이 본 개시내용의 발견이다. 세포 생존력을 시험하는 방법은 당해기술에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 세포 생존력은 본원에 제공된 실시예에 상세히 기재된 바와 같이 측정된다. 일부 구현예에서, 세포 배양 배지에서 세포 생존력은 (예를 들면, 하기 기재된 바와 같이) 약 1시간 후, 약 2시간 후 또는 약 3시간 후 측정될 수 있다.
- [0097] 본원에서 사용된 바와 같이, 세포 생존력은 용액 중 살아있는 세포의 백분율 (즉, 살아있는 세포 수를 총 세포 수로 나눈 수치)로서 정량된다. 당해기술에 공지된 임의의 적합한 방법은 세포 생존력을 측정하는데 사용될 수 있다. 세포는 살아있거나 죽어 있을 수 있기 때문에, 세포 생존력은 죽은 세포 또는 살아있는 세포를 정량함으로써 측정될 수 있다. 하나의 적합한 방법은 트립판 블루 배제(trypsin blue exclusion)이다. 이러한 방법에서, 세포 샘플은 세포 배양물로부터 수득된다. 트립판 블루 용액을 상기 샘플에 부가한다. 단지 비-생존 세포만이 트립판 블루를 흡수하고, 이들은 차후에 청색으로 염색된다. 따라서, 청색 세포의 수를 계수하고, 총 세포 수에서 공제하여 살아있는 세포의 수를 산출하며, 이러한 수를 총 세포 수로 나누어 세포 생존율을 산출한다. 세포는, 혈구계수기와 같이, 수동으로 또는, 예를 들면, Vi-Cell<sup>®</sup> 생존력 분석기 (Beckman Coulter)와 같이 자동적으로 계수될 수 있다. 세포 생존력을 측정하는 다른 분석법은, 제한 없이, 프로피듐 요오다이드 염색, TUNEL, 레자주린(Resazurin), 메틸 바이올렛, 락트산 탈수소효소, 플루오레세인 디아세테이트 가수분해, MTT, 카스파제 및 ATP 분석법을 포함할 수 있다.
- [0098] 가열-처리된 폴록사머의 효과는, 예를 들면, 가열-처리된 폴록사머를 함유하는 세포 배양 배지에서 성장된 세포 배양물에서 세포 생존력을 측정하고, 그것을 동일한 농도의 미처리된 폴록사머를 함유하는 세포 배양 배지에서 성장된 세포 배양물에서의 세포 생존력과 비교함으로써 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 배양물은 배플형 진탕 플라스크(baffled shake flask)에서 성장할 수 있다. 일부 구현예에서, 가열-처리된 폴록사머의 사용은 미처리된 폴록사머와 비교하여 세포 생존력을 적어도 약 10% 증가시킨다. 일부 구현예에서, 가열-처리된 폴록사머의 사용은 미처리된 폴록사머와 비교하여 세포 생존력을 적어도 약 15% 증가시킨다. 일부 구현예에서, 가열-처리된 폴록사머의 사용은 미처리된 폴록사머와 비교하여 세포 생존력을 적어도 약 20% 증가시킨다. 일부 구현예에서, 가열-처리된 폴록사머의 사용은 미처리된 폴록사머와 비교하여 세포 생존력을 적어도 약 25% 증가시킨다. 일부 구현예에서, 가열-처리된 폴록사머의 사용은 미처리된 폴록사머와 비교하여 세포 생존력을 적어도 약 30% 증가시킨다. 일부 구현예에서, 가열-처리된 폴록사머의 사용은 미처리된 폴록사머와 비교하여 세포 생존력을 적어도 약 35% 증가시킨다. 일부 구현예에서, 가열-처리된 폴록사머의 사용은 미처리된 폴록사머와 비교하여 세포 생존력을 적어도 약 40% 증가시킨다. 일부 구현예에서, 가열-처리된 폴록사머의 사용은 미처리된 폴록사머와 비교하여 세포 생존력을 적어도 약 45% 증가시킨다. 일부 구현예에서, 가열-처리된 폴록사머의 사용은 미처리된 폴록사머와 비교하여 세포 생존력을 적어도 약 50% 증가시킨다.
- [0099] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 가열-처리된 폴록사머를 포함하는 세포 배양 배지에서 세포 생존력은 가열 처리 전의 폴록사머를 포함하는 세포 배양 배지에서 세포 생존력과 비교하여 적어도 10% 증가된다. 일부 구현예에서, 세포 생존력은 적어도 약 1%, 적어도 약 2%, 적어도 약 3%, 적어도 약 4%, 적어도 약 5%, 적어도 약 6%, 적어도 약 7%, 적어도 약 8%, 적어도 약 9%, 적어도 약 10%, 적어도 약 11%, 적어도 약 12%, 적어도 약 13%, 적어도 약 14%, 적어도 약 15%, 적어도 약 16%, 적어도 약 17%, 적어도 약 18%, 적어도 약 19%, 적어도 약 20%, 적어도 약 21%, 적어도 약 22%, 적어도 약 23%, 적어도 약 24%, 적어도 약 25%, 적어도 약 26%, 적어도 약 27%, 적어도 약 28%, 적어도 약 29%, 적어도 약 30%, 적어도 약 31%, 적어도 약 32%, 적어도 약 33%, 적어도 약 34%, 적어도 약 35%, 적어도 약 36%, 적어도 약 37%, 적어도 약 38%, 적어도 약 39% 또는 적어도 약 40% 증가된다.
- [0100] 가열-처리된 폴록사머는 세포 배양 배지에 부가될 때 만족스러운 세포 생존력을 산출하지 않는 폴록사머 (예를 들면, 특정 로트의 원하는 폴록사머)의 성능을 개선시키는데 특히 유용할 수 있다. 일부 구현예에서, 미처리된 폴록사머를 갖는 세포 배양 배지에서 세포 생존력은 약 80% 미만이다. 일부 구현예에서, 미처리된 폴록사머를 갖는 세포 배양 배지에서 세포 생존력은 약 70% 미만이다. 일부 구현예에서, 미처리된 폴록사머를 갖는 세포 배양 배지에서 세포 생존력은 약 60% 미만이다. 일부 구현예에서, 미처리된 폴록사머를 갖는 세포 배양 배지에서 세포 생존력은 약 50% 미만이다. 일부 구현예에서, 미처리된 폴록사머를 갖는 세포 배양 배지에서 세포 생존력은 약 40% 미만이다.

- [0101] 세포 성장 및 폴리펩타이드 생산
- [0102] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 세포 (예를 들면, 본원에 기재된 세포 배양 배지에서 배양된 세포)는 목적하는 폴리뉴클레오타이드 (예를 들면, 목적하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 그 자체로 목적하는 폴리뉴클레오타이드)를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 세포는 형질감염되거나, 형질 전환되거나, 또는 달리 목적하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 다양한 세포의 형질감염 또는 형질전환에 적합한 방법은 당해기술에 널리 공지되어 있다. 폴리펩타이드 생산과 관련하여 예시적인 참조는 하기 제공되며; 당해기술의 숙련가는 본원에 개시된 방법이 폴리펩타이드 생산에 제한되지 않는다는 것을 이해할 것이다.
- [0103] 일반적으로 세포는, 세포 성장, 유지 및/또는 폴리뉴클레오타이드 및/또는 폴리펩타이드 생산 중 어느 것을 촉진시키는 하나 이상의 조건 하에 본원에 기재된 임의의 세포 배양 배지와 조합 (접촉)된다. 세포 배양 및 폴리펩타이드 생산 방법은 세포 및 세포 배양 배지를 함유하도록 배양 용기 (생물반응기)를 이용한다. 배양 용기는 유리, 플라스틱 또는 금속을 포함하는, 세포 배양에 적합한 임의의 재료로 구성될 수 있다. 전형적으로, 배양 용기는 적어도 1 리터일 것이며, 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10,000, 25,000 리터 또는 그 초과일 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 조건이며, 숙련자에게 분명할 것이다. 배양 공정 동안 조정될 수 있는 배양 조건은, 비제한적으로, pH 및 온도를 포함한다.
- [0104] 세포 배양물은 세포 배양물의 생존, 성장, 생존력 (유지), 및 폴리펩타이드 생산 능력에 도움이 되는 조건 하에 유지될 수 있다. 정확한 조건은 세포 유형, 세포가 유래되는 유기체, 및 발현된 폴리펩타이드의 성질 및 특성에 따라 달라질 것이다. 폴리펩타이드 생산 단계 동안, 세포 배양물은 임의로 세포 배양물의 생존 및 생존력에 도움이 되고 원하는 폴리펩타이드의 발현에 적절한 (초기 성장 단계와 비교하여) 제2 세트의 배양 조건 하에 유지될 수 있다.
- [0105] 어떤 경우에, 세포 배양물을, 세포에 의해 고갈되거나 대사되는 영양소 또는 다른 배지 성분으로 보충하는 것이 유리하거나 필요할 수 있다. 예를 들면, 세포 배양물을, 세포 배양의 모니터링 동안 고갈되는 것으로 관측되는 영양소 또는 다른 배지 성분으로 보충하는 것이 이로울 수 있을 것이다. 대안적으로 또는 추가로, 생산 단계 전에 세포 배양물을 보충하는 것이 유리하거나 필요할 수 있다. 비제한적인 예로써, 세포 배양물을 호르몬 및/또는 다른 성장 인자, 특정 이온 (예컨대 나트륨, 칼로라이드, 칼슘, 마그네슘, 및 포스페이트), 버퍼, 비타민, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드, 미량 원소 (통상적으로 매우 낮은 최종 농도로 존재하는 무기 화합물), 아미노산, 지질 또는 글루코스 또는 다른 에너지 공급원으로 보충하는 것이 유리하거나 필요할 수 있다.
- [0106] 본원에 상세히 기재된 세포 배양 배지는 항체를 포함하는 폴리펩타이드를 생산하는 세포 배양 방법에 사용될 수 있다. 배지는, 배지 배양이든, 유가식 배양이든 또는 관류 배양이든, 세포 배양 방법에 사용될 수 있으며, 본원에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드의 임의의 측면 또는 구현예를 포함하는 임의의 폴리펩타이드를 생산하는 방법에 사용될 수 있다. 본원에 상세히 기재된 방법 (예를 들면, 본 개시내용의 가열-처리된 폴록사머를 함유하는 배양 배지를 사용하여 세포를 배양하고 폴리펩타이드를 생산하는 방법)에 의해 생산된 폴리펩타이드는 숙주 세포에 상동성일 수 있거나, 바람직하게는, 외인성일 수 있으며, 이는, CHO 세포에 의해 생산된 인간 단백질, 또는 포유동물 세포에 의해 생산된 효모 폴리펩타이드와 같이, 이들이 이용되는 숙주 세포에 이종성, 즉, 이질성이라는 것을 의미한다. 하나의 변형에서, 폴리펩타이드는 숙주 세포에 의해 배지 내에 직접적으로 분비되는 포유동물 폴리펩타이드 (예컨대 항체)이다. 또 다른 변형에서, 폴리펩타이드는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포의 용해에 의해 배지 내로 방출된다.
- [0107] 숙주 세포에서 발현가능한 임의의 폴리펩타이드는 본 개시내용에 따라서 생산될 수 있으며 제공된 조성물에 존재할 수 있다. 폴리펩타이드는 숙주 세포에 내인성인 유전자로부터, 또는 유전 공학을 통해 숙주 세포 내로 도입되는 유전자로부터 발현될 수 있다. 폴리펩타이드는 천연에서 발생하는 것일 수 있거나, 대안적으로 인간의 손에 의해 조작되거나 선택된 서열을 가질 수 있다. 조작된 폴리펩타이드는 천연에서 개별적으로 발생하는 다른 폴리펩타이드 분절로부터 조립될 수 있거나, 천연적으로 발생하지 않는 하나 이상의 분절을 포함할 수 있다.
- [0108] 본 발명에 따라서 바람직하게 발현될 수 있는 폴리펩타이드는 종종 흥미로운 생물학적 또는 화학적 활성에 기초하여 선택될 것이다. 예를 들면, 본 발명은 임의의 약제학적으로 또는 상업적으로 적절한 효소, 수용체, 항체, 호르몬, 조절 인자, 항원, 결합제 등을 발현시키는데 이용될 수 있다.
- [0109] 세포 배양시 폴리펩타이드, 예컨대 항체를 생산하는 방법은 당해기술에 익히 공지되어 있다. 세포 배양시 항체

(예를 들면, 전장 항체, 항체 단편 및 다중특이적 항체)를 생산하는 비제한적인 예시적 방법이 본원에 제공된다. 본원의 방법은 다른 단백질, 예컨대 단백질-기반 억제제의 생산을 위해 당해기술의 숙련가에 의해 조정될 수 있다. 단백질 (예를 들면, 치료 단백질)의 생산을 위한 일반적으로 잘 이해되고 보통 이용되는 기술 및 절차에 대해서는 하기 문헌을 참조하며, 이들은 모두 이들 전체가 본원에 참조로 편입되어 있다: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook et al., 4<sup>th</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, et al. eds., 2003); *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., J. Wiley and Sons, 2002); *Current Protocols in Protein Science*, (Horswill et al., 2006); *Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow and Lane, eds., 1988); *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I. Freshney, 6<sup>th</sup> ed., J. Wiley and Sons, 2010).

- [0110] 다양한 숙주 세포 유형 및 폴리펩타이드를 위한 폴리펩타이드의 생산에 적합한 조건은 당해기술에 공지되어 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 것들이며, 숙련가에게 분명할 것이다.
- [0111] 세포 배양물은 산소화 및 세포 내로 영양소의 분산을 증가시키기 위해 세포 배양 동안 교반되거나 진탕될 수 있다. 폴록사머의 사용은 진탕되는 세포 배양시 특히 이로울 수 있으며, 그 이유는 세포를 잠재적으로 손상시키는 전단력 때문이다. 본 발명에 따라서, 당해기술의 숙련가는, 비제한적으로 pH, 온도, 산소화 등을 포함하는, 초기 성장 단계 동안 생물반응기의 어떤 내부 조건을 제어하거나 조절하는 것이 유리할 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들면, pH는 적절한 양의 산 또는 염기를 공급하여 제어될 수 있고 산소화는 당해기술에 익히 공지된 살포 디바이스에 의해 제어될 수 있다.
- [0112] 세포
- [0113] 배양 배지에서 배양하고 폴리펩타이드를 생산하기에 적합한 세포는 원핵, 효모 또는 고등 진핵 (예를 들면, 포유동물) 세포를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 포유동물 세포가 사용된다. 일부 구현예에서, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포가 사용된다.
- [0114] 포유동물 세포를 배양할 수 있고, 배양 (조직 배양)시 포유동물 세포의 증식은 일상적인 절차가 되었다. 포유동물 숙주 세포주의 예는, 비제한적으로, SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651)에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주; 인간 배아 신장 세포주 (현탁 배양시 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); 아기 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 그린 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 랫트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암 세포주 (Hep G2)를 포함할 수 있다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 골수종 세포주 예컨대 NS0 및 Sp2/0을 포함한다. 항체 생산에 적합한 어떤 포유동물 숙주 세포주의 검토를 위해, 예를 들면, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 255-268을 참조한다.
- [0115] 일부 구현예에서, CHO 세포가 배양될 수 있다. CHO 세포는 세포 배양시 폴리펩타이드, 예를 들면, 항체를 생산하기 위한 기술에 익히 공지되고 일상적으로 사용된다. CHO 세포는, 비제한적으로, DHFR<sup>-</sup> CHO 세포 (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)), 예를 들면, ATCC CRL-9096을 포함할 수 있다.
- [0116] 이러한 목적을 위해 적합한 원핵 세포는 진정박테리아, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들면, 엔테로박테리아세아에(Enterobacteriaceae) 예컨대 에스케리치아(*Escherichia*), 예를 들면, 이. 콜라이(*E. coli*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 어위니아(*Erwinia*), 클렙시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 예를 들면, 살모넬라 타이피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아(*Serratia*), 예를 들면, 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*), 및 시겔라(*Shigella*), 뿐만 아니라 바실러스(*Bacilli*) 예컨대 비. 서브틸리스(*B. subtilis*) 및 비. 리케니포르미스(*B. licheniformis*) (예를 들면, 1989년 4월 12일자로 공개된 DD 266,710에 개시된 비. 리케니포르미스 41P), 슈도모나스(*Pseudomonas*) 예컨대 피. 에어루기노사(*P. aeruginosa*), 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)를 포함한다. 하나의 바람직한 이. 콜라이 클로닝 숙주는 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446)이지만, 다른 균주 예컨대 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 X1776 (ATCC 31,537), 및

이. 콜라이 W3110 (ATCC 27,325)이 적합하다. 이들 예는 제한적이라기 보다는 예증적이다.

- [0117] 원핵생물 이외에, 진핵 미생물 예컨대 사상균 또는 효모가 항체-암호화 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. *사카로마이세스 세레비시아에*(*Saccharomyces cerevisiae*), 또는 보통의 빵 효모(baker's yeast)가 하등 진핵 숙주 미생물 중에서 가장 통상적으로 사용된다. 그러나, 수많은 다른 속, 종 및 균주, 예컨대 *쉬조사카로마이세스 폼베*(*Schizosaccharomyces pombe*); *클루이베로마이세스*(*Kluyveromyces*) 숙주, 예를 들면, *케이. 락티스*(*K. lactis*), *케이. 프라길리스*(*K. fragilis*) (ATCC 12,424), *케이. 불가리쿠스*(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045), *케이. 위케라미*(*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178), *케이. 왈티이*(*K. waltii*) (ATCC 56,500), *케이. 드로스필라룸*(*K. drosophilum*) (ATCC 36,906), *케이. 써모톨레란스*(*K. thermotolerans*), 및 *케이. 막시아누스*(*K. marxianus*); *야로위아*(*Yarrowia*) (EP 402,226); *피치아 패스토리스*(*Pichia pastoris*) (EP 183,070); *칸디다*(*Candida*); *트리코테르마 리시아*(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234); *뉴로스포라 크라싸*(*Neurospora crassa*); *쉬완니오마이세스*(*Schwanniomyces*) 예컨대 *쉬완니오마이세스 옥시덴탈리스*(*Schwanniomyces occidentalis*); 및 사상균, 예를 들면, *뉴로스포라*(*Neurospora*), *페니실리움*(*Penicillium*), *톨리포클라디움*(*Tolypocladium*), 및 *아스페르길루스*(*Aspergillus*) 숙주 예컨대 *에이. 니들란스*(*A. nidulans*) 및 *에이. 니제르*(*A. niger*)도 통상적으로 이용가능하며 본원에 유용하다. 치료 단백질의 생산을 위한 효모 및 사상균의 사용을 논의하는 검토를 위해, 예를 들면, Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004)를 참조한다.
- [0118] 당화 경로가 "인간화"되어 부분적 또는 완전 인간 당화 패턴을 갖는 항체의 생산을 초래하는 어떤 진균 및 효모 균주가 선택될 수 있다. 예를 들면, Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006) (*피치아 패스토리스*에서 당화 경로의 인간화를 기재함); 및 상기 Gerngross et al.을 참조한다.
- [0119] 당화된 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다중세포 유기체 (무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 수많은 바콜로바이러스 균주 및 변이체, 및 숙주 예컨대 *스포도프테라 프루지페르다*(*Spodoptera frugiperda*) (유충), *아에데스 아에집티*(*Aedes aegypti*) (모기), *아에데스 알보픽투스*(*Aedes albopictus*) (모기), *드로소필라 멜라노가스테르*(*Drosophila melanogaster*) (초파리), 및 *봄빅스 모리*(*Bombyx mori*)로부터의 곤충 세포가 확인되었다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주, 예를 들면, *오토그라파 칼리포르니카*(*Autographa californica*) NPV의 L-1 변종 및 *봄빅스 모리* NPV의 Bm-5 균주가 공공연하게 이용가능하며, 그와 같은 바이러스는, 특히 *스포도프테라 프루지페르다* 세포의 형질감염을 위한 본 발명에 따르는 바이러스로서 본원에 사용될 수 있다. 곤충 세포의 예는, 비제한적으로, *드로소필라*(*Drosophila*) 세포 (예를 들면, S2 세포), *트리코플루시아 니*(*Trichoplusia ni*) 세포 (예를 들면, High Five™ 세포), 및 *스포도프테라 프루지페르다*(*Spodoptera frugiperda*) 세포 (예를 들면, Sf21 또는 Sf9 세포)를 포함할 수 있다.
- [0120] 면, 옥수수, 감자, 대두, 피튜니아, 토마토, 쭉개구리밥(duckweed) (*Leninaceae*), 알팔파 (*M. truncatula*) 및 담배의 식물 세포 배양물이 또한 숙주로서 이용될 수 있다. 예를 들면, U.S. 특허 번호 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 및 6,417,429 (형질전환 식물에서 항체를 생산하는 PLANTIBODIES™ 기술을 기재함)를 참조한다.
- [0121] 항체 생산
- [0122] 일부 구현예에서, 가열-처리된 폴록사머를 함유하는 세포 배양 배지에서 배양된 세포는 항체를 생산하는데 사용된다.
- [0123] 일부 구현예에서, 상기 항체는 단클론성 항체이다. 수식어 "단클론성"은 항체의 실질적으로 상동성의 모집단으로부터 수득된 바와 같은 항체의 특성을 나타내며, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 해석되지 않는다. 예를 들면, 본 발명에 따라서 사용되는 단클론성 항체는, 예를 들면, 하이브리도마 방법 (예를 들면, Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., 하기: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), 재조합 DNA 방법 (예를 들면, 미국 특허 번호 4,816,567 참조), 파지-디스플레이(phage-display) 기술 (예를 들면, Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004) 참조), 및 인간 면역글로불린 유전자좌(locus) 또는 인간 면역글로불린 서열을 암호화하는 유전자의 일부 또는 모두를 갖는 동물에서 인간 또는 인간-유사 항체를 생산하기 위한 기술 (예를 들면, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al.,



*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016; Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuburger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); 및 Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995) 참조)을 포함하는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법에 의해 생산된 항체는 인간화된 항체, 키메라 항체, 인간 항체, 라이브러리-유도된(library-derived) 항체 또는 다중특이적 항체이다.

[0124] 항체는, 예를 들면, CHO 세포를 사용하는 항체의 생산에서 재조합 방법을 사용하여 생산될 수 있다. 항-항원 항체의 재조합 생산을 위해, 항체를 암호화하는 핵산을 단리하고 추가의 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제가능한 벡터 내로 삽입한다. 항체를 암호화하는 DNA는 쉽게 단리되고 (예를 들면, 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 종래의 절차를 사용하여 서열분석될 수 있다. 많은 벡터가 이용가능하다. 벡터 성분은 일반적으로, 비제한적으로, 하기 중 하나 또는 그 조합을 포함한다: 신호 서열, 복제 기원, 하나 또는 그 조합의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종료 서열.

[0125] 본 발명의 항체는 직접적으로 뿐만 아니라 이중 폴리펩타이드와 함께 융합 폴리펩타이드로서 재조합으로 생산될 수 있으며, 상기 이중 펩티드는 바람직하게 신호 서열, 또는 성숙 단백질 또는 폴리펩타이드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩타이드이다. 선택된 이중 신호 서열은 바람직하게는 숙주 세포에 의해 인식되고 처리되는 (예를 들면, 신호 펩티다아제에 의해 절단되는) 것이다. 원상태 항체 신호 서열을 인지하고 처리하지 못하는 원핵 숙주 세포의 경우, 신호 서열은, 예를 들면, 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, lpp, 또는 열안정성 엔테로톡신 II 리더의 그룹으로부터 선택된 원핵 신호 서열로 치환된다. 효모 분비의 경우, 원상태 신호 서열은, 예를 들면, 효모 인버타제 리더, 인자 리더 (사카로마이세스 및 클루이베로마이세스 α-인자 리더 포함), 또는 산 포스파타제 리더, *씨. 알비칸스(C. albicans)* 글루코아밀라아제 리더, 또는 W0 90/13646에 기재된 신호로 치환될 수 있다. 포유동물 세포 발현에서, 포유동물 신호 서열 뿐만 아니라 바이러스 분비성 리더 (viral secretory leaders), 예를 들면, 단순 헤르페스 gD 신호가 이용가능하다.

[0126] 항체는 세포 내에서 생산되거나, 원형질막 주위 공간에서 생산되거나 또는 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포 내에서 생산되는 경우, 제1 단계로서, 숙주 세포 또는 용해된 단편인 특정한 파편은, 예를 들면, 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거된다. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)은 *이. 콜라이*의 원형질막 주위 공간에 분비되는 항체를 단리하기 위한 절차를 기재한다. 간략히, 세포 페이스트를 아세트산 나트륨 (pH 3.5), EDTA, 및 페닐메틸설포닐플루오라이드 (PMSF)의 존재 하에 약 30분에 걸쳐서 해동시킨다. 세포 파편을 원심분리로 제거할 수 있다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우, 그와 같은 발현계로부터의 상청액은 일반적으로 우선 상업적으로 이용가능한 단백질 농축 필터, 예를 들면, 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘 (Millipore Pellicon) 한외여과 단위를 사용하여 농축된다. 프로테아제 억제제 예컨대 PMSF는 단백질 분해를 억제하기 위해 전술된 단계들 중 어느 단계에 포함될 수 있으며, 외래 오염물질의 성장을 예방하기 위해 항생제를 포함할 수 있다.

[0127] 항체는, 예를 들면, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피(hydroxylapatite chromatography), 소수성 상호작용 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화도 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있으며, 친화도 크로마토그래피가 전형적으로 바람직한 정제 단계 중 하나이다. 친화성 리간드로서 단백질 A의 적합성은 항체에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소형에 의존적이다. 단백질 A는 인간 γ1, γ2, 또는 γ4 중쇄에 기반하여 항체를 정제하는데 사용될 수 있다 (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 γ3에 대해 권고된다 (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔히 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 역학적으로 안정한 매트릭스 예컨대 제어 공극 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스를 사용하여 달성될 수 있는 것보다 더 빠른 유속 및 더 짧은 처리 시간을 가능하게 한다. 항체가 C<sub>H</sub>3 도메인을 포함하는 경우, Bakerbond ABX™ 수지 (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.)가 정제에 유용하다. 단백질 정제를 위한 다른 기술 예컨대 이온-교환 컬럼 상의 분획화, 에탄올 침전법, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 헤파린 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 상의 SEPHAROSE™ 크로마토그래피 (예컨대 폴리아스파르트산 컬럼), 크로마토포커싱 (chromatofocusing), SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전법이 또한 회수되는 항체에 따라 이용가능하다.

- [0128] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항체는 그것의 항원-결합 단편이다. 항원-결합 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. Fab 단편은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 함유하고, 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터 하나 또는 그 초과인 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카복시 말단에서 몇 개의 잔기를 부가함으로써 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올 그룹을 갖는 Fab'에 대한 본원에서의 명칭이다. F(ab')<sub>2</sub> 항체 단편은 본래 이들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생산되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다. "Fv"는 완전한 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. "단일-쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하며, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩타이드 사슬에 존재한다. 일반적으로, scFv 폴리펩타이드는 VH와 VL 도메인 사이에 폴리펩타이드 링커를 추가로 포함하며, 그것은 scFv가 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있게 한다. scFv의 검토를 위해, 예를 들면, **Pluckthün** 하기: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315를 참조한다. 상기 기재된 항체를 정제하는 다수의 방법은 항원-결합 항체 단편을 정제하기 위해 적절하게 조정될 수 있다.
- [0129] 일반적으로, 상기-기재된 방법론과 일치하고/하거나 목적하는 특정 항체에 대해 당해기술의 숙련가에 의해 적절한 것으로 간주되는, 연구, 시험 및 임상에 사용하기 위한 항체를 제조하기 위한 다양한 방법론은 당해기술에 잘-확립되어 있다.
- [0130] 실시예
- [0131] 본 발명은 하기 실시예를 참조하여 더 완전히 이해될 것이다. 그러나, 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다. 본원에 기재된 실시예 및 구현예는 단지 예시적인 목적을 위한 것이며 이에 비추어 다양한 변형 및 변화가 당해기술의 숙련가에게 제안될 것이며, 그것은 본원의 사상 및 권한 그리고 첨부된 청구항들의 범위 내에 포함된다는 것이 이해된다.
- [0132] **실시예 1: 가열 처리는 세포 배양 동안 폴록사머 성능을 개선시킨다**
- [0133] 폴록사머는 살포 및/또는 기포-관련된 손상으로부터 세포를 보호하는 계면활성제로서 세포 배양시 보통 사용된다. 불행하게도, 로트-대-로트 가변성은 그것의 유효성을 훼손시키며, 제조할 생성물 수율의 감소를 초래한다. 예를 들면, 불량한 로트의 폴록사머는 세포 생존력을 감소시키고, 생성물 역가를 최대 45% 감소시킬 수 있다. 광범위한 일련의 연구 후, 불량한 폴록사머 로트는 생성물 수율의 상당한 감소 및 산업적 단백질 생산에서 차후의 재정적 손실의 원인이었음이 발견되었다. 따라서, 폴록사머 성능을 개선시키는 방법은 매우 이로운 것이다.
- [0134] 놀랍게도, 단일 가열 처리에 의해 세포 배양시 폴록사머 성능을 증가시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다. 중요한 것은, 이러한 가열 처리에 의해 불량한 폴록사머 로트의 성능이 개선될 뿐 아니라 양호한 로트의 성능도 마찬가지로 추가로 증진될 수 있다. 세포 배양 보충물로서의 성능을 개선시키기 위한 폴록사머를 처리하는 방법도 본원에 기재된다.
- [0135] 방법
- [0136] **폴록사머 처리**
- [0137] 15 g의 폴록사머 188 (PLURONIC<sup>®</sup> F 68 NF Prill Poloxamer 188, BASF)을 10-12분 동안 표준 교반 플레이트 상에서 가열했다. 폴록사머가 86-91℃의 온도에 도달할 때 가열을 중지했다. 이후, 폴록사머를 실온, 2-8℃ 또는 -72℃에서 대략 20분 동안 냉각시켰다. 이후, 고체 폴록사머를 벗겨내고 시험을 위해 세포 배양 배지에 부가했다.
- [0138] **세포 배양 시험 모델**
- [0139] 상기 기재된 바와 같이 가열 처리된 폴록사머 188을 표준, 무혈청 CHO 세포 배지에 1 g/L의 최종 농도로 부가했다. CHO 세포를 5% CO<sub>2</sub>에서 1.5x10<sup>6</sup> 세포/mL의 농도로 250 mL 배플형 진탕 플라스크 중의 37℃, 25-75 mL 세포 배양 배지에서 성장시켰다. 세포 배양 동안, 플라스크를 오비탈 진탕기 상에서 250 내지 350 rpm으로 회전시켰다. 배플형 진탕 플라스크의 사용은 배양물에서 다량의 비말동반된(entrained) 기포를 발생시켰다. 세포 생존력을 Vi-Cell<sup>®</sup> 생존력 분석기 (Beckman Coulter)를 사용하여 트립판 블루 배제에 의해 측정했다. 300 μL의 세포

배양물을 샘플링하고, 세포 생존력 백분율을 샘플에서 생존 세포의 수 (즉, 트립판 블루를 흡수하지 않은 것들)를 총 세포 수로 나누어 계산했다.

[0140] **결과**

[0141] 단순 스크리닝 모델은 산업적 규모라기보다는 실험실에서 세포 배양 생존력에 대한 폴록사머의 효과를 시뮬레이션하기 위해 개발되었다. 간략히, CHO 세포를 상기 기재된 바와 같이 250 mL 플라스크에서 성장시켰다. 양호한 및 불량한 로트의 폴록사머에 의해 산출된 세포 생존력에서의 차이를 최대화하기 위해, 세포 배양 배지의 용적 및 진탕 속도를 시험했다. 세포를 25, 50 또는 75 mL 배지에서 성장시키고 오비탈 진탕기 플랫폼 상에서 250, 300 또는 350 rpm으로 진탕시켰다. 배지의 용적은  $\Delta$  생존력에 대한 효과 (즉, 폴록사머의 공지된 양호한 로트와 공지된 불량한 로트 사이에 백분율로서의 세포 생존력의 차이)가 없는 것으로 밝혀졌지만, 높은 진탕 속도는  $\Delta$  생존력의 증가를 보여주었다.

[0142] 도 1에서 보여주는 바와 같이, 가열-처리된 폴록사머 (방법 참조)는 세포 배양시 폴록사머의 성능을 상당히 개선시키는 것으로 밝혀졌다. 다양한 폴록사머 로트를 상기 스크리닝 모델을 사용하여 세포 생존력에 대한 그것의 효과에 대해 시험했다. 일부 로트는 잘 수행되는 것으로 공지되었지만, 다른 로트는 불량하게 수행되는 것으로 사료되었다. 각각의 로트에 대해, 미처리된 및 가열-처리된 (HT) 배치를 시험을 위해 세포 배양 배지에 추가했다. 미처리된 폴록사머와 비교하여, 가열-처리된 폴록사머는 시험된 모든 로트에서 세포 생존력을 개선시키는 것으로 밝혀졌다 (도 1). 일부 경우에, 가열-처리된 폴록사머는 45%로부터 거의 90%로 생존력을 배가시킬 수 있었다. 중요한 것은, 가열-처리된 폴록사머가 고 성능이 이미 입증된 로트에 대해서도 생존력을 개선시킬 수 있었다는 것이다 (예를 들면, 도 1에서 "양호한 4"를 참조한다).

[0143] 이들 결과는 폴록사머의 가열 처리가 세포 배양시 생존력에 대한 그것의 효과를 개선시킬 수 있다는 것을 실증한다. 가열 처리는 불량한 폴록사머 로트의 성능을 극적으로 개선시킬 수 있었고, 심지어 양호한 로트의 성능을 추가로 증진시키며, 이는 폴록사머 가열 처리를 수행함으로써 폴록사머 로트 가변성 문제를 상당히 감소시킬 수 있음을 시사한다.

[0144] **실시예 2: RTD 온도계로 측정된 폴록사머 가열 처리**

[0145] 실시예 1에 기재된 실험을 핫 플레이트 상에서 수행했다. 이들 실험은 폴록사머를 대략 80-100°C (RTD로 측정됨)로 10분에 걸쳐 가열하는 것을 수반했다. 이들 실험은 100°C 초과 (즉, 124°C)로 가열된 샘플의 부가와 함께 반복되었다.

[0146] **방법**

[0147] 폴록사머 188 제조업체 및 로트

[0148] 폴록사머 188 물질을 사용했다. 식별 기호 및 관련된 세포 배양 성능 (고전단 진탕 플라스크 시험, HSSF에서의 성능에 의해 결정됨)은 표 1에 열거된다.

[0149] **표 1.** 식별 기호 (차후의 실시예 전체에 걸쳐 로트를 나타내는데 사용됨) 및 HSSF 데이터로부터 관련된 세포 배양 성능

식별 번호	세포 배양 성능
G	불량
D	우수
H	불량
B	불량
C	불량
F	불량
E	미미함
A	우수

[0150]

[0151] **가열 처리 방법**

[0152] 폴록사머 가열 처리 공정을 평가하기 위해, 수 개의 가열 처리 방법을 평가했다: 핫 플레이트 상의 가열, 오븐에서의 가열 또는 오토클레이브에서의 가열.

[0153] **핫 플레이트**

- [0154] 5 내지 15 그램의 폴록사머를 유리 비이커 (100-400mL)에 넣고 연속적으로 교반하면서 핫 플레이트 상에서 가열했다. 폴록사머의 온도를 열전쌍 (Kaye 731 Thermocouple) 또는 저항 온도 측정기(RTD) (Fluke 5627A-12 정밀 RTD 프로브)를 사용하여 측정했다. 폴록사머를 그것이 표적 온도에 도달할 때까지 (대략 5 내지 10분) 가열한 후 즉시 열로부터 제거했다. 용융된 폴록사머를 실온에서 냉각시켰다.
- [0155] **오븐**
- [0156] 5 그램의 폴록사머를 20 mL 섬광 유리 바이알에 칭량하여 넣었다. 열전쌍을 바이알에 고정시켜 팁을 건조 폴록사머에 함침시켰다. 이후 폴록사머 및 열전쌍을 이미 표적 온도에 있는 오븐에 두었다 (Yamato ADP 21 진공 건조 오븐). 다르게 구체화되지 않으면, 오븐은 (대기압에서) 진공 기능 없이 작동되었다. 폴록사머를 표적 온도에 도달하게 하였고 (열전쌍에 의해 측정될 때  $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ), 폴록사머가 이러한 표적 온도에 도달한 시간을 시간 = 0으로 표시했다. 원하는 항온처리 시간 후, 약간의 진공을 10-30초 동안 적용하여 오븐 내에 방출된 임의의 휘발물질을 방출시켰다. 통기 후, 유리 바이알을 오븐으로부터 제거하고 실온에서 냉각시켰다 (캡핑되지 않음).
- [0157] **CHO 세포 배양 및 배지**
- [0158] 표준, 무혈청, CHO 세포 배지를 모든 실험에 사용했지만, 하나의 주목할 만한 예외가 있었다: 플루로릭 F68을 배지에서 생략했다. 이러한 연구를 지지하기 위해, 2개의 해동된 CHO 세포주를 씨드 트레이닝 생물반응기 (seed train bioreactor; STB)에서 유지시켰다.
- [0159] **고전단 세포 배양 진탕 플라스크 방법**
- [0160] **세포 배양 배지에 폴록사머 샘플의 부가**
- [0161] 배지는, 샘플당 250 mL의 표준, 무혈청, CHO 세포 배지 (폴록사머 없음)를 PETG 용기 내에 분취하여 넣고 0.25 그램의 폴록사머 샘플을 각각의 분취량에 부가함으로써 제조되었다. 배지를 150 rpm에서 적어도 5분 동안 교반시켜 배지에 폴록사머를 완전히 용해시켰다. 이후, 배지를 0.22  $\mu\text{m}$  PES 필터 단위를 사용하여 생물안전성 캐비닛 (biosafety cabinet; BSC)에서 진공-여과했다. 배지를 24시간 내에 사용하기 위해  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 보관했다.
- [0162] **배지 교환 및 세포 배양 검정**
- [0163] 세포 배양 샘플을 50 mL 팔콘 튜브에 옮기고, 이로써, 각각의 분취량은 대략  $7.5 \times 10^7$  세포를 함유했다. 세포를 830 x g에서 10분 동안 원심분리하여 펠렛을 형성했다. 상청액을 제거하고 세포를 시험을 위한 폴록사머 샘플을 함유하는 배지에 재현탁시킨 후 250 mL 통기된 배플형 진탕 플라스크 내로 옮겼다. 초기 총 세포 밀도 (TCD) 및 생존력은, 세포를 고르게 분포시키기 위해 수 분 동안 150 rpm으로 플라스크를 진탕시킨 후 NOVA Flex를 사용하여 측정되었다. 이후, 진탕 플라스크를 5%  $\text{CO}_2$ , 80% 습도 및  $37^{\circ}\text{C}$ 의 인큐베이터에 배치하고 300 rpm에서 3시간 동안 진탕시켰다. TCD 및 생존력 측정치를 항온처리 1시간, 2시간 및 3시간 후에 취득하였고, 최초 TCD 및 생존력과 비교했다.
- [0164] **결과**
- [0165] 양호한 로트의 폴록사머 (A) 및 2개의 불량한 로트 (B 및 C)의 샘플을 대략  $100^{\circ}\text{C}$ 로 가열 처리했다. 추가 샘플 C를  $124^{\circ}\text{C}$ 로 가열 처리했다. 가열 처리 후, 샘플을 HSSF시험에서 시험했다.
- [0166]  $100^{\circ}\text{C}$  (RTD에 의해 측정됨)로 처리된 모든 폴록사머 샘플은 동일한 로트의 미처리된 물질에 비해 개선되지 않았음을 보여준다 (표 2). 그러나,  $124^{\circ}\text{C}$ 로 가열 처리된 C는 미처리된 C와 비교하여 최종 생존력에서 19% 증가를 실증했다. 추가로, 가열 처리된 C에 대한 전반적인 생존력 변화 (즉, 최종 생존력 %,  $V_f$ , 마이너스 초기 생존력 %,  $V_0$ )는 미처리된 C와 비교하여 21% 증가된  $-27.4\%$ 였다 (표 2).
- [0167] **표 2.** HSSF 시험에서 가열 처리된 폴록사머 샘플, 조건, 미처리된 로트와 비교된 생존력 개선, 및 최종 생존력.

샘플 설명	샘플 ID	미처리된 로트와 비교된 생존력 개선 @3 시간 (%)	생존력 @ 3시간 (%)
양호한 로트, 미처리	A	0.0	85.6
양호한 로트, 가열 처리	A_HT	1.8	87.4
불량한 로트 (B), 미처리	B	0.0	69.0
불량한 로트 (B), 100C로 가열 처리	B_HT	-5.4	63.6
불량한 로트 (C), 미처리	C	0.0	49.0
불량한 로트 (C), 100C로 가열 처리	C_HT	-2.8	46.2
불량한 로트 (C), 124C로 가열 처리	C_HT_124C	21.8	68.0

[0168]

[0169]

*N=1로 실시된 고전단 진탕 플라스크 모델*

[0170]

이들 결과는 가열 처리가 세포 배양시 폴록사머 성능을 개선시키고 효과적인 온도 및 처리 지속시간의 사전 지표를 제공한다는 것을 확증하였다. 그러나, 이들 결과는, 100℃보다 더 높은 온도가 세포 배양을 위해 폴록사머를 가열-처리하는데 더 효과적일 수 있음을 시사한다. 온도 측정 (예를 들면, 폴록사머의 온도를 측정하는데 사용된 온도계의 유형)의 차이는 폴록사머 가열 처리에 대한 상이한 유효 범위를 초래할 수 있는 것으로 사료된다 (추가 데이터 및 논의를 위해 실시예 8을 참조한다).

[0171]

### 실시예 3: 오븐으로 가열 처리의 이동

[0172]

벤치 탑 건조 오븐(bench top drying oven)을 대안적인 가열 기전으로 사용했으며, 그것은 온도 조절 및 채현성을 제공했다. 추가로, 진공 기능은 용융 폴록사머에 의해 방출된 연무를 오븐의 개방 및 가열 처리된 폴록사머의 제거 전에 오븐으로부터 방출되게 한다. 오븐 실험은 실시예 2에 기재된 방법에 따라 수행되었다.

[0173]

오븐에서의 초기 실험은 최소 수의 필요한 샘플과 함께 넓은 범위의 조건을 시험하기 위해 반응 표면 디자인을 사용했다 (도 3). 온도 범위는 92-148℃였고, 항온처리 시간은 10-120분이었다. 불량한 로트 (C)의 샘플을 오븐에서 명시된 조건으로 가열 처리했다. 이후 수득한 샘플을 HSSF 모델에서 시험하여 세포 배양 성능의 개선을 결정했다.

[0174]

140℃에서 60분 동안 그리고 150℃에서 35분 동안 오븐에서 가열된 불량한 수행 폴록사머는, HSSF 시험에서 양성 대조군의 것에 상응하는, 최종 생존력의 상당한 증가를 보여주었다 (도 4 및 표 3).



표 3. 오븐에서 가열된 폴록사머의 생존력.

샘플 ID	평균 생존력 @ 3시간	표준 편차(SD)*	미처리된 로트와 비교된 평균 생존력 개선 @ 3 시간	표준 편차 (SD)*
미처리된 불량한 로트 (C)	30.4	11.1	0.0	0.0
양성 대조군 (D)	88.4	2.5	58.1	13.6
C 100C, 10 분	40.5	3.9	10.1	15.0
C 100C, 60 분	42.6	8.1	12.2	3.0
C 120C, 35 분	42.1	1.0	11.8	10.1
C 140C, 10 분	46.7	0.1	16.4	11.2
C 140C, 60 분	89.7	0.4	59.4	10.7
C 150C, 35 분	91.6	0.5	61.2	11.6

\* 중복하여 실시된 HSSF 모델

그러나, 이들 실험에서, 140℃ 미만 및/또는 60분 미만 동안의 조건에서 가열 처리된 폴록사머는 성능의 개선을 보여주지 않았다. 이들 데이터는 폴록사머 성능을 개선시키는 가열 처리의 최소 온도가 시험된 지속시간에서 대략 140℃였음을 나타냈다. 가열 온도 및 지속시간에 대한 더 광범위한 시험은 하기, 예를 들면, 실시예 5에 기재된다.

## 실시예 4: 오븐 가열 처리 DOE

오븐에서의 가열 처리 조건을 위한 일차 반응 표면 맵은 시험된 조건 하에 효과적인 가열 처리를 위한 최소 온도가 대략 140℃였음을 나타냈다. 실험의 완전한 디자인 (DOE)을 오븐에서 실시예 2의 방법에 따라서 수행하여 매우 높은 온도 및 긴 항온처리 시간으로 진행시키면서 작동 범위를 결정했다. 시험된 최대 온도는 185℃였고 각 온도에 대해 시험된 최대 항온처리 시간은 120분이었다. 불량한 로트의 폴록사머 (G)를 라틴 정방 디자인 (Latin Square design)을 사용하여 구분된 6-샘플 블록에서 처리하고 시험했다. 통틀어, 3개의 샘플 블록 및 목적하는 조건의 추가의 6개의 샘플을 처리했다 (표 4). 이후, 이들 샘플을 HSSF 시험에서 시험하여 세포 배양 성능을 결정했다.

표 4. 오븐에서 완전 DOE에서 평가된 가열 처리 조건. 온도 범위는 110-185° C였고; 지속시간 범위는 1-120 분이었다. 알파벳 대문자로 표시된 박스 (표 5의 블록에 상응함)는 표 5에서 열거된 바와 같이 시험된 처리 조건을 나타낸다.

	시간 (분)					
	1	5	10	30	60	120
110	A			D	X	F
125			D		F	A
140	F	A	X	X	D	X
155	X	D		F	A	
170		F	A			D
185	D		F	A		X

DOE 원 데이터는 표 5에서 보여준다. 완전 DOE 결과는, 윤곽 플롯 상에서 맵핑될 때, 폴록사머 성능을 개선시키는 가열 처리 조건의 넓은 작동 범위를 실증했다 (도 5).

[0184] 표 5: 완전 DOE 실험으로부터의 원 데이터.

로트 번호	시간 , 분	온도, C	블록	생존력 @3 시 간	생존력 개선 (미처리된 대조 군 평균과 비교됨) %
G	1	110	A	74.9	-4.8
G	5	140	A	77.1	-2.6
G	10	170	A	88.9	9.2
G	30	185	A	89.5	9.8
G	60	155	A	88.7	9.0
G	120	125	A	82.3	2.6
G	10	140	B	91.3	11.6
G	1	155	C	93.6	13.9
G	30	140	C	95.5	15.8
G	120	185	C	95.9	16.2
G	1	185	D	93.9	14.2
G	5	155	D	92.6	12.9
G	10	125	D	73.4	-6.3
G	30	110	D	51.9	-27.8
G	60	140	D	93.7	14.0
G	120	170	D	82.6	2.9
G	60	110	E	82.1	2.4
G	120	140	E	95.9	16.2
G	1	140	F	68.5	-11.2
G	5	170	F	94.5	14.8
G	10	185	F	95.6	15.9
G	30	155	F	95.2	15.5
G	60	125	F	68.2	-11.5
G	120	110	F	94.8	15.1

[0185]

[0186] 모든 향온처리 시간에 대해 155℃에서 또는 그 초과에서 가열 처리된 샘플은 세포 배양 성능에서 극적인 개선을 초래했다. HSSF 시험에서, 이들 샘플은 3시간 후 10% 미만의 생존력 변화를 나타냈다. 140℃에서, 가열 처리는 향온처리 시간이 30분 이상일 때까지 효과적이지 않았다. 추가로, 시험된 최저 온도, 125℃ 및 110℃는 샘플이 2시간 동안 향온처리될 때까지 효과적이지 않았다.

[0187] 실시예 5: 가열 처리 강건성(robustness) 및 재현성

[0188] 도 5에 실증된 가열 처리 디자인 공간의 재현성 및 강건성을 입증하기 위해, 완전 DOE로부터 주요 처리 조건을 실시예 2에 기재된 방법에 따라서 추가의 로트의 폴록사머를 사용하여 반복하였다. 이들 조건 중 2개는 재현성을 다루기 위해 중복되었다. 선택된 조건은 작동 범위 내에 속하거나 작동 범위의 경계에 있었다. 통틀어, 3개의 불량한 로트를 처리했다 (G를 포함함, 그것은 이전에 DOE에 대해 사용되었음) (표 6). 가열 처리가 양호한 로트에서 수행되는 경우 해롭지 않을 것이라는 것을 보장하기 위해, 하나의 양호한 로트를 또한 처리했다 (E).

[0189] 표 6. 4개의 폴록사머 로트에 걸쳐 시험된 주요 가열 처리 조건에 대한 반복 횟수.

온도	시간	불량한 로트 #1 (G)	불량한 로트 #2 (H)	불량한 로트 #3 (F)	양호한 로트 (E)
170C	1 분	1	1	1	1
	30 분	1	1	1	1
155C	1 분	3	2	2	2
	30 분	2	1	1	1
140C	1 분	2	1	1	1
	30 분	3	2	2	2

[0190]

[0191] 반복된 처리 조건에 대한 HSSF 시험 결과는 최초 DOE로부터의 결과와 매우 비슷했지만 (표 7 및 8); 불량한 로

트에 걸쳐서 최적의 가열 처리 조건에서는 관측가능한 가변성이 있었다 (도 6).

**표 7.** 4개의 폴록사머 로트: E (양호한 로트), F (불량한 로트), H (불량한 로트) 및 G (완전 DOE 실험에 사용된 불량한 로트)에 대해 HSSF 시험에서 시험된 가열 처리 조건에 대한 최종 세포 생존력.

샘플	E	F	G	H
미처리	92.2	72.7	78.8	77.5
140C, 30 분 #1	93.8	89.8	91.5	77.3
140C, 30 분 #2	96.1	89.8	89.5	90.6
140C, 1 분	95.3	90.8	90.0	90.7
155C, 1 분 #1	95.2	90.2	90.8	84.1
155C, 1 분 #2	94.8	89.9	90.7	81.5
155C, 30 분	96.0	91.0	89.5	92.4
170C, 1 분	95.5	87.4	90.6	93.4
170C, 30 분	94.0	89.2	89.4	92.0

**표 8.** 4개의 상이한 폴록사머 로트: E (양호한 로트), F (불량한 로트), H (불량한 로트) 및 G (완전 DOE 실험에 사용된 불량한 로트)에 대해 시험된 가열 처리 조건에 대한 HSSF 시험에서의 세포 생존력 변화 ( $V_f$  (처리) -  $V_f$  (미처리)).

미처리된 로트와 비교된 생존력 개선 @ 3 시간 (%)				
샘플	로트			
	E	F	G	H
140C, 1 분	3.1	18.1	11.2	-0.2
140C, 30 분 #1	1.6	17.1	12.7	13.1
140C, 30 분 #2	3.9	17.1	10.7	13.2
155C, 1 분 #1	3.1	17.5	12.0	6.6
155C, 1 분 #2	2.6	17.2	11.9	4.1
155C, 30 분	3.8	18.3	10.7	15.0
170C, 1 분	3.3	14.7	11.8	15.9
170C, 30 분	1.8	16.5	10.6	14.5

N=1로 실시된 고전단 진탕 플라스크 모델

로트 G 및 F는, 155℃에서 1분 동안 또는 140℃에서 1분 동안 처리될 때, 세포 배양 성능의 유의미한 증가를 입증했다. 그러나, 로트 H는 140℃에서 1분 동안 처리될 때 개선을 나타내지 않았으며, 155℃에서 1분 동안 처리할 때 단지 미미한 (< 10%) 개선을 나타냈다. 이 로트에 대한 모든 다른 처리 조건은 세포 배양시 유의미한 개선을 보여주었다. 이들 결과는, 로트들이 가열 처리의 최소 온도 및 항온처리 시간에서 약간의 차이를 갖는다는 것을 입증한다.

**실시예 6: 낮은 온도 및 긴 지속시간의 평가**

실시예 2-5에 기재된 가열 처리 조건은 폴록사머의 용융점보다 훨씬 높았다. 폴록사머의 용융점보다 단지 약간 높은 온도 (~50℃)가 세포 배양 생존력에 대해 효과를 가질 것인지를 결정하기 위해, 2개의 불량한 로트의 폴록사머 (H 및 G) 샘플을 60℃ 및 80℃의 오븐에서 120분 동안 처리한 후 실시예 2에 따라서 HSSF 방법으로 시험했다.



[0200] 가열 처리된 샘플에 대한 결과는, 온도와 상관없이, 미처리된 폴록사머와 비교하여 유의미한 성능의 개선이 없는 것으로 입증되었다 (도 7). 이론에 구속시키고자 하지 않으면서, 이러한 낮은 온도의 경우 개선된 폴록사머를 획득하기 위해 긴 항온처리 시간이 필요할 수 있음이 가정된다.

[0201] 실시예 7: 진공에서 가열 처리

[0202] 폴록사머 가열 처리에 대한 산소의 영향을 결정하기 위해, 2개의 불량한 폴록사머 로트 (H 및 G)의 샘플을 오븐에서 약간의 진공 하에 실시예 2의 방법에 따르면서 140℃로 가열 처리했다. 어떤 항온처리 시간 후 진공으로부터 샘플을 제거하기 보다는, 폴록사머를 오븐에서 진공 하에 실온으로 냉각시켜 폴록사머를 표적 온도에서 체류시키면서 외부 산소 노출이 없었음을 확실히 하였다.

[0203] 표 9. 진공에서 시험된 샘플에 대한 폴록사머 가열 처리 조건 및 HSSF 결과.

[0204]

샘플 ID	평균 생존력 @ 3시간	표준 편차(SD)*	미처리된 로트와 비교된 평균 생존력 개선 @3 시간	생존력 개선 표준 편차(SD)*
H (미처리)	58.8	-37.5	0.0	0.0
H 60C 120 분	68.3	0.0	9.5	18.8
H 80C 120 분	63.4	9.4	4.6	9.4
G (미처리)	80.0	-16.5	0.0	0.0
G 60C 120 분	77.2	2.5	-2.8	4.6
G 80C 120 분	74.8	0.1	-5.2	7.3

[0205] \* N=2로 실시된 고전단 진탕 플라스크 모델

[0206] 진공에서 처리된 폴록사머는, 세포 배양시 미처리된 폴록사머와 비교하여 유의미한 개선 (최종 생존력에서 > 20% 증가)을 입증했다 (도 8, 표 9). 이들 결과는 폴록사머 가열 처리 동안 외부 산소 노출이 개선된 폴록사머를 생산하는데 필요하지 않을 수 있음을 입증한다.

[0207] 실시예 8: RTD 대 와이어 열전쌍(wire thermocouple)을 사용한 온도 측정

[0208] 이전의 데이터는 가열 처리 공정을 위해 80-100℃의 온도 범위를 지지했다. 그러나, 완전 DOE (예를 들면, 도 5에서 보여주는 바와 같음)는 140℃에서 또는 그 초과 작동 범위를 지지했다.

[0209] 가열 처리 동안 폴록사머 온도를 측정하는데 사용된 2개의 상이한 온도계를 시험하는 실험을 수행했다. 실시예 1에 기재된 실험은 RTD를 사용하는 한편, 와이어 열전쌍은 모든 오븐 실험에서 사용되었다. 사용된 RTD는 정확한 온도 측정을 위해 4"의 함침 깊이를 필요로 한다. 역으로, 와이어 열전쌍은 그것의 팁에서 온도를 정확하게 측정하도록 디자인되며, 이는 단지 폴록사머의 수 밀리미터만 함침시키면서 온도를 정확히 측정할 수 있게 한다.

[0210] 실시예 2의 방법에 따라서 핫 플레이트 상에서 폴록사머를 가열 처리하면서 사이드-바이-사이드 비교(side-by-side comparison)를 수행했다. 와이어 열전쌍은 152.6℃의 온도 판독치를 제공하였고, 반면 RTD 온도계는 81.65℃의 판독치를 제공하였다. 따라서, RTD는 열전쌍과 비교할 때 유의미한 온도의 하향-측정(under-measurement) (> 70℃)을 나타냈다. 이들 결과는, 상이한 폴록사머 온도 판독치가 개선된 폴록사머를 생산하기에 충분한 효과적인 온도 범위의 차이의 근거가 된다는 것을 입증한다.

[0211] 실시예 9: 오븐에서 가열 램프 및 냉각 속도 특성규명

[0212] 폴록사머 샘플은, 오븐에 배치되면, 즉시 표적 온도에 도달하지 않는다. DOE에 사용된 3개의 온도에 대한 가열 및 냉각 프로파일은 실시예 2의 방법에 따라서 오븐에서 평가되었다.

[0213] 샘플은 오븐에서 표적 온도 (+/- 3℃)에 도달하는데 평균 18분이 걸렸으며, 표준 편차는 5.8분이었다 (도 9). 가열 시간에서의 가변성에도 불구하고, 냉각 속도는 비교적 유사했다. 샘플이 폴록사머의 용융 온도 (~40℃)에 도달하는 평균 시간은 7분이었고, 표준 편차는 0.8분이었다. 냉각 프로파일이 주로 선형이라고 가정하면, 170C, 155C 및 140C로 가열된 샘플에 대한 냉각 속도는 각각 대략 -19℃/분, -19.5℃/분 및 -18℃/분이었다.

[0214] 실시예 10: 생존력 및 폴록사머 가열 처리의 통계적 유의성

[0215] 스튜던트 t-시험은 HSSF 시험에서 폴록사머 대조군 로트의 성능 및 세포 배양 성능에서 관측된 개선의 유의성 사이의 차이를 결정하는데 사용되었다. 오븐 DOE로부터의 모든 HSSF 대조군 결과가 데이터 세트에 포함되었다. 가열 처리된 샘플의 경우, 단지 작동 범위 내의 샘플만이 가열 처리 후 세포 생존력의 평균 변화를 계산하는데 사용되었다. 작동 범위는 HSSF 시험에서 생존력의 변화가 15% 미만인 조건으로 정의되었다.

[0216] 처리된 및 미처리된 폴록사머를 스튜던트 t-시험 ( $\alpha = 0.05$ )을 사용하여 비교하여 통계적으로 유의미한 차이를 평균으로 결정하였다. 추가로, 처리된 물질의 결과를 양성 대조군 (D) 결과와 비교하였다.

[0217] 표 10: 시험된 로트의 처리된 및 미처리된 폴록사머 물질에 대한 HSSF 시험에서의 평균 델타 생존력 ( $V_f$  (처리) -  $V_f$  (미처리))

로트 번호	평균 생존력 @ 3시간 (%), 미처리	평균 생존력 @ 3 시간 (%), 처리	P 값
			미처리 x 처리
G	78.7	91.4	< 0.0001*
E	92.2	95.1	0.2490
F	79.3	89.8	< 0.0006*
H	67.9	91.8	<0.0001*
D	87.8	-	-

[0218]

[0219] 0.05의 알파 수준으로, 미처리된 불량한 로트의 폴록사머와 양성 대조군 로트 (D) 사이의 평균 비교는 유의미한 차이를 입증하였다 (표 10). 가열 처리 후, 모든 로트는 양성 대조군 로트보다 유의미하게 더 우수하게 수행되었지만, 단, H는 양성 대조군 로트와 비슷했다. 양호한 로트인, 로트 E는 > 0.05의 p 값을 가졌으며, 이는 그것의 성능이 양성 대조군 로트와 유의미하게 상이하지 않았음을 나타낸다. 그러나, 로트 E로부터의 가열 처리된 폴록사머는 양성 대조군 (p 값 = 0.0005)보다 HSSF 시험에서 유의미하게 더 우수하게 수행되었고, 이는 가열 처리 공정이 이미 허용가능한 로트를 개선시켰음을 실증한다.

[0220] 이들 결과는 도 10에서 실증되었고, 도 10에서는 전체 양성 대조군 데이터 세트와 비교된 각각의 로트의 처리된 및 미처리된 결과를 보여준다. 예를 들면, 도 10은, 불량한 로트 G의 경우, 미처리된 G, 양성 대조군 양호한 로트 D 및 가열-처리된 G 모두가 통계적으로 구별가능했으며, 가열-처리된 G 로트는 양성 대조군 양호한 로트 (D) 또는 미처리된 G 불량한 로트 중 어느 것과 비교하여 유의미하게 개선된 생존력을 보여주었음을 실증한다.

[0221] 이러한 분석을 토대로, 가열 처리 공정이 성공적인 것으로 간주되는 경우는 미처리된 물질에 비해 18%의 개선을 입증했다. 더욱이, 처리된 물질은 이들 실험에서 사용된 양성 대조군 로트와 전반적으로 적어도 마찬가지로 수행되었다.

[0222] 세포 배양 배지에 사용하기 전 가열 처리된 불량한 로트의 폴록사머는 그것의 세포 보호 성능을 개선시키는 효과적인 방법이었다. 가열 처리는 광범위한 온도 및 지속시간에서 효과적이었지만; 온도가 낮아질수록 필요한 처리 시간은 더 길어진다. 이러한 공정은 강건하며 (이는 수 개의 폴록사머 로트에 걸쳐 유사한 결과를 입증함) 재현가능했다. 본원에 주어진 결과는 오븐에서 수행된 실험으로부터 초래되었지만, 상기 공정은 더 큰 규모의 장비로 이동될 수 있다. 본원에 기재된 가열 처리 공정은 필요한 온도에서 필요한 지속시간 동안 폴록사머의 일관된 가열을 보장할 임의의 처리 방법으로 이동될 수 있다.

# [0223] 실시예 11: DOE 시험 데이터의 통계적 분석

[0224] 상기 기재된 실시예는 세포 배양시 차후의 성능 (예를 들면, 세포 생존력)에 대한 폴록사머 가열 처리의 효과를 입증한다. 다음으로, 2개의 종속 변수 (온도 및 시간)의 함수로서 아웃풋 (진탕 플라스크 모델에서의 생존력 @3 시간)에 대한 수학적 모델인 전달 함수(transfer function)의 산출을 위한 분석을 착수하였다.

[0225] 온도 및 시간을 변수로 하여, 오븐에서 수집된 DOE 시험 데이터 (표 12에 기재됨)를 반응 표면 회귀 방법 (Response Surface Regression method)에 의해 Minitab에서 분석했다. 공지된 불량한 로트의 폴록사머 (G)를 DOE 시험 디자인마다 가열-처리하고, 전단 보호 기능을 위한 대용물로서 사용된 고전단 진탕 플라스크 모델에서 시험했다. 3 시간 시험 종료시 높은 생존력은 폴록사머의 더 나은 성능을 나타낸다. 유사하게, 미처리된 샘플 (음성 대조군)과 비교하여 성능을 개선시키도록 처리된 동일한 로트의 폴록사머 사이의 평가를 수행했다. 불량한 수행 로트에서 관측된 로트내 가변성을 해명하기 위해, 6개의 G 대조군의 평균 최종 생존력을 기준선으로 사용하여 각각의 시험 사례에 대해 관측된 생존력 개선의 백분율을 계산했다. 3시간에서의 생존력 (%) 및 처리 대

미처리 로트의 차이 (%)는 반응 변수였다. 이 결과는, 이러한 불량한 수행 로트의 품질이 생존력의 증가로 측정된 바와 같이 개선될 수 있다는 것을 보여준다. 생존력에서의 양의 변화 (처리된 로트 - 미처리된 로트)의 원하는 생존력 목표는 다양한 온도 및 시간 처리에서 달성될 수 있다.

[0226] 상기 분석은 생존력의 변화 (처리된 로트 - 미처리된 로트) @3시간으로 수행되었다. 불량한 수행 로트 중 하나의 평균 최종 생존력을 스트레스 상태 하에 연구한 후, G는 79.7 +/-5.0%인 것으로 밝혀졌고, 윤곽 플롯을 위해 그리고 지정된 온도에서 가열 처리의 최소 지속시간을 확립하기 위해 생존력의 10% 또는 20% 증가율이 표적화되었다. 또 다른 불량한 수행 로트 C의 경우에, G에 대해 보여준 것보다 더 낮은 생존력 (44.8 +/-7.8%)이 미처리된 대조군에 대해 예상될 수 있음이 또한 주목되어야 한다. 따라서, C의 경우, 로트 G에 대해 20% 증가가 달성된 조건에서 생존력의 >35% 개선이 예상될 수 있다. 이들 결과는 온도와 시간의 상호작용인 온도와 시간의 선형 효과가 존재한다는 것을 나타낸다. 상기 모델에서 항들은 <0.05의 P-값과 함께 95% 신뢰 수준에서 통계적으로 유의미하다. 최적의 작동 범위의 확인 및 모델에서의 인자는 예기치 못한 새로운 발견이다.

[0227] 표 12. 로트 G 가열 처리에 대한 데이터 세트.

로트 번호	시간, 분	온도, C	생존력 @3 시간	생존력 개선 (미처리 대조군 평균과 비교됨) %
G	1	110	74.9	-4.77
G	5	140	77.05	-2.62
G	10	170	88.9	9.23
G	30	185	89.5	9.83
G	60	155	88.65	8.98
G	120	125	82.25	2.58
G	10	140	91.3	11.63
G	1	155	93.6	13.93
G	30	140	95.5	15.83
G	120	185	95.85	16.18
G	1	185	93.9	14.23
G	5	155	92.6	12.93
G	10	125	73.4	-6.27
G	30	110	51.9	-27.77
G	60	140	93.7	14.03
G	120	170	82.6	2.93
G	60	110	82.1	2.43
G	120	140	95.9	16.23
G	1	140	68.5	-11.17
G	5	170	94.5	14.83
G	10	185	95.6	15.93
G	30	155	95.2	15.53
G	60	125	68.15	-11.52
G	120	110	94.75	15.08
G	1	140	91.5	11.83
G	30	140	89.5	9.83
G	30	140	90	10.33
G	1	155	90.8	11.13
G	1	155	90.7	11.03
G	30	155	89.5	9.83
G	1	170	90.6	10.93
G	30	170	89.4	9.73
G	120	60	77.2	-2.47
G	120	80	74.7	-4.97

[0228]

[0229] 중복하여 실시된 HSSF 모델

[0230] 분석 소프트웨어의 경우, Minitab 버전 17.1 (Minitab.com, State College PA)을 사용했다. 분석은 회귀 분석 (RSRegress)이었다. 반응 표면 회귀를 사용하여 생존력 개선 (미처리된 로트와 비교됨) 대 시간 (분) 및 온도

(℃)를 분석했다.

분산 분석, 모델 요약, 및 코드화된(coded) 계수를 하기 표 13-15에 제공된다.

표 13. 분산 분석.

소스	DF	Adj SS	Adj MS	F-값	P-값
모델	5	1666.90	333.38	5.29	0.002
선형	2	1369.54	684.77	10.87	0.000
시간, 분	1	484.39	484.39	7.69	0.010
온도, ℃	1	1356.83	1356.83	21.54	0.000
제곱	2	203.14	101.57	1.61	0.217
(시간, 분) <sup>2</sup>	1	12.47	12.47	0.20	0.660
(온도, C) <sup>2</sup>	1	201.47	201.47	3.20	0.085
2원 상호작용	1	432.89	432.89	6.87	0.014
(시간, 분)*(온도, C)	1	432.89	432.89	6.87	0.014
오차	28	1764.05	63.00		
적합성 결여	22	1455.72	66.17	1.29	0.403
순오차	6	308.33	51.39		
총	33	3430.94			

표 14. 모델 요약.

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
7.93736	48.58%	39.40%	8.41%

표 15. 코드화된 계수.

항	효과	계수	SE 계수	T-값	P-값	VIF
상수		1.59	3.01	0.53	0.602	
시간, 분	16.01	8.01	2.89	2.77	0.010	2.49
온도, ℃	41.89	20.94	4.51	4.64	0.000	2.31
(시간, 분) <sup>2</sup>	3.32	1.66	3.73	0.44	0.660	1.08
(온도, C) <sup>2</sup>	-22.36	-11.18	6.25	-1.79	0.085	2.37
(시간, 분)*(온도, C)	-24.78	-12.39	4.73	-2.62	0.014	2.22

이들 결과를 토대로, (코드화되지 않은 단위에서) 회귀 방정식을 하기와 같이 결정했다: 생존력 개선(미처리된 로트에 비교됨), % = -113.5 + 0.486\*(시간, 분) + 1.238\*(온도, C) + 0.00047\*(시간, 분)<sup>2</sup> - 0.00286\*(온도, C)<sup>2</sup> - 0.00333\*(시간, 분)\*(온도, C)

상기 나타난 전달 함수에 의해 가열 처리 온도 및 지속시간의 함수로서 미처리된 대조군에 비해 로트 G에 대한 생존력의 개선이 예측된다. 상기 함수는 또한 온도 및 시간 및 그것의 상호작용을 수반하는 2차 항들을 함유한다. 상기 모델을 사용하여, (실험적으로 유도되지 않은) 시험 사례에 대한 예상되는 생존력을 수득할 수 있다. 시험 조건 157℃ 및 1분에 대한 샘플 아웃풋 예측은 하기에서 보여준다:

생존력 개선 = -113.5 + (0.486 \*1) + (1.238 \*157) + 0.00047 \*1<sup>2</sup> - (0.00286 \*157<sup>2</sup>) - (0.00333 \*1\*157) = 10.3%

실험 데이터는 도 11에서 보여주는 윤곽 플롯을 생성하는데 사용되었다 (흑색 원으로 보여주는 실험적 데이터). 회귀에 의해 발생된 모델을 토대로, 5개의 포인트가 수학적으로 추론될 수 있다.

첫째, 처리 반응은 3개의 온도 구역 (157℃-185℃), (134℃-157℃) 및 (60℃-134℃)으로 분류될 수 있다.



[0243] 둘째, 157℃-185℃의 고온 구역에서, 가열 처리된 로트의 생존력은 1분의 최소 가열 처리 내에 1%로부터 20%까지 개선될 수 있다.

[0244] 셋째, 134℃-157℃의 중간 온도 구역에서, 가열 처리된 로트의 생존력은 1분의 최소 가열 처리 지속시간 내에 1내지 10% 개선될 수 있다. 생존력은 120분의 최소 가열 처리 지속시간에 의해 최대 20% 증진될 수 있다.

[0245] 넷째, 60℃-134℃의 저온 구역에서, 가열 처리된 로트의 생존력은 140 분의 가열 처리 지속시간 내에 최대 10% 개선될 수 있다. 생존력은 164분의 최소 가열 처리 지속시간에 의해 최대 20% 증진될 수 있다. 중간 온도 및 저온 구역에 대해 기재된 지속시간은 간소화된 가이드라인이라는 점을 주의해야 한다. 예를 들면, 도 11에서 보여주는 바와 같이, 저온 구역 내의 60℃, 80℃, 120℃의 온도는 생존력에서 적어도 10%의 개선을 달성하는데 각각 164분, 147분 및 115분을 필요로 한다. 예시적인 값은 하기 표 16에 기재된다.

[0246] 표 16. 예시적인 온도, 시간 및 상응하는 생존력 개선.

온도 범위, °C	밝은 회색 구역 (1-10%) 개선을 위해 필요한 최소 시간, 분	암회색 구역 (10-20%) 개선을 위해 필요한 최소 시간, 분	암회색 구역 (>20%) 개선을 위해 필요한 최소 시간, 분
60	143	164	186
80	122	147	175
100	98	132	166
120	62	115	162
134	1	102	163
157	1	1	NA
185	1	1	NA

[0247]

[0248] 다섯째, 상기 기재된 모델은 로트 G에 의해 발생된 데이터로부터 유도되었다. 미처리된 대조군이 79%의 높은 기준선 생존력을 가졌기 때문에, 생존력 개선은 최대 20%까지 실현될 수 있다. 그러나, 미처리된 로트가 45%의 훨씬 낮은 생존력을 갖는 C와 같은 로트의 경우, 더 높은 수준의 개선이 실현될 수 있다. 예를 들면, 134℃-157℃의 중간 온도 구역에서, 로트 C에 대한 생존력은 15분의 가열 처리 지속시간 내에 42% 개선될 수 있다. 로트 C와 G 사이에 관측된 성능 차이는 하기 표 17에 요약된다.

[0249] 표 17. C 및 G 성능의 요약

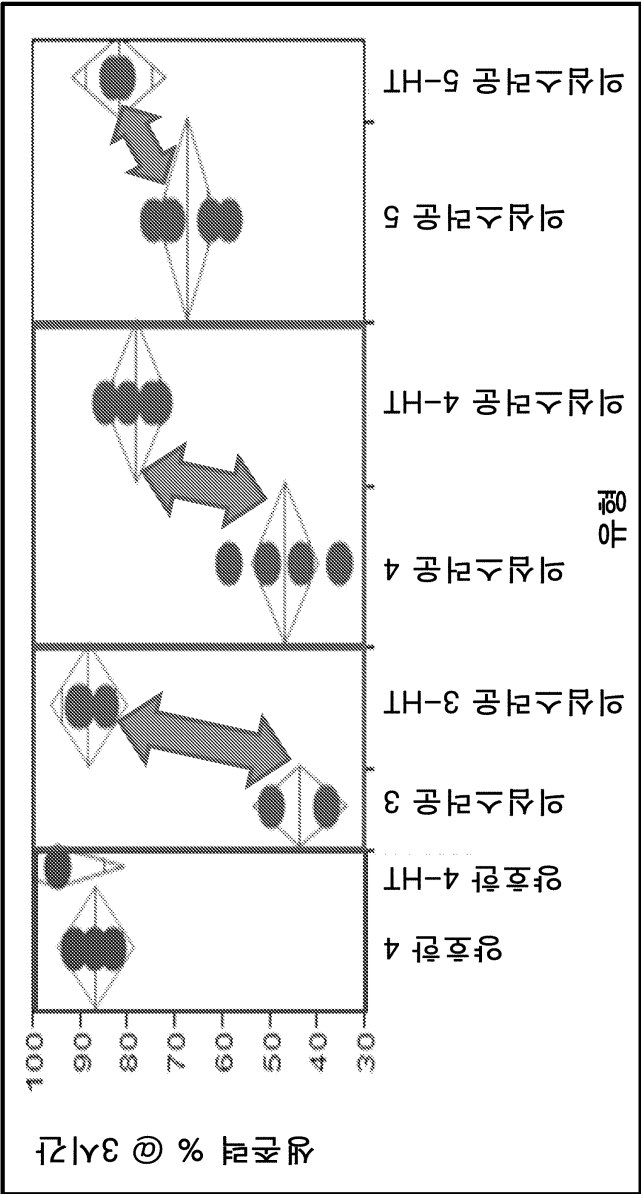
C		G	
파라미터	샘플 생존력 (%) @3 시간	파라미터	샘플 생존력 (%) @3 시간
평균	44.8	평균	79.7
표준 편차	7.4	표준 편차	5.0
N	6	N	6

[0250]

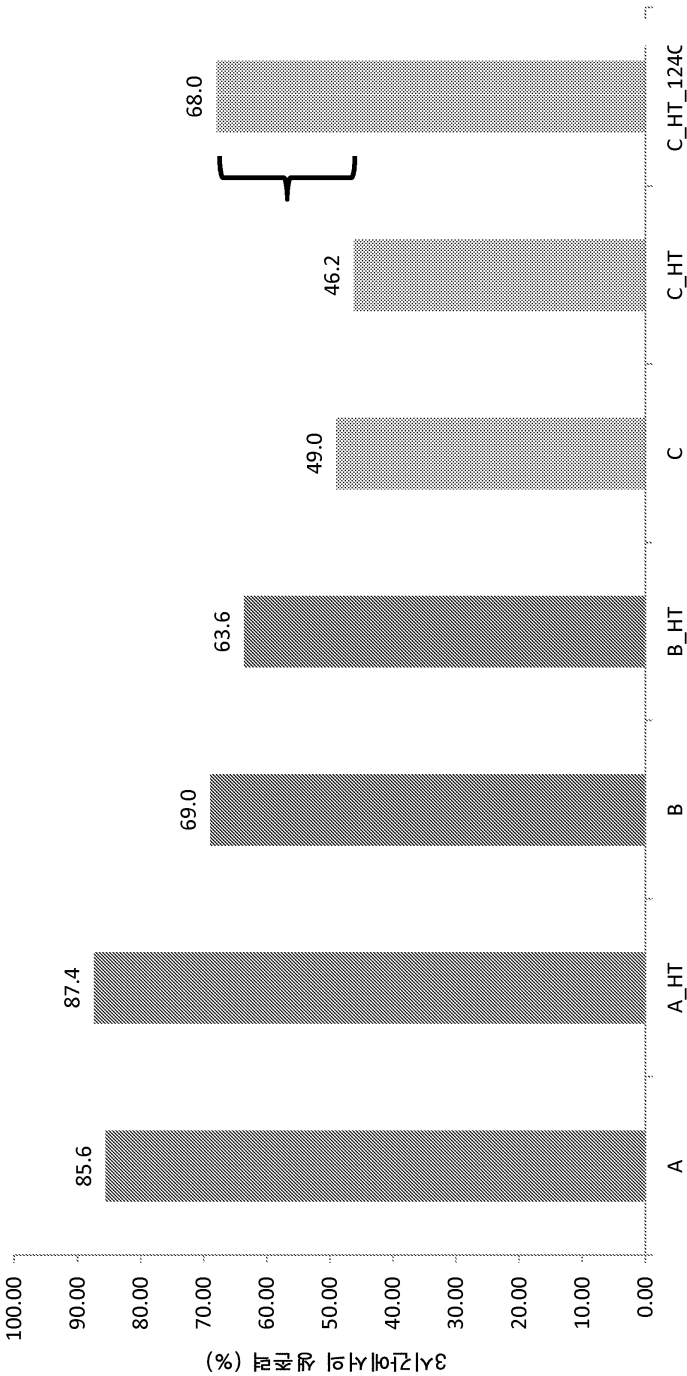
[0251] 따라서, 가열 처리 값은 C와 같은 로트에서 더 뚜렷하다. 이러한 로트에 대한 완전한 데이터 세트는 완전한 세트의 실험을 실시하기 위한 원료의 부족으로 인해 수행될 수 없었다. G는 미미하게 불량한 수행 로트를 나타내며, 상기 예상된 모델은 보존적인 것으로 간주될 수 있다. 로트 C 및 G를 사용하여 발생된 데이터는, 가열-처리된 폴록사머가 본원에 시험되지 않은 다른 폴록사머 로트의 성능을 개선시킬 수 있다는 것을 입증한다. 성능의 개선은 상기 기재된 바와 같이 시간과 온도에 영향을 받을 수 있다. 상기 기재된 결과는, 온도의 증가가 폴록사머 성능을 개선시키는데 필요한 가열 처리의 지속시간을 단축시키고, 낮은 온도는 긴 지속시간에 의해 폴록사머 성능을 개선시키는데 사용될 수 있다는 것을 입증한다. 이론에 구속시키고자 하지 않으면서, 가열 처리시 관측된 생존력 개선의 정확한 백분율은 가열 처리 전 특정 폴록사머 로트에 대해 관측된 기준선 생존력에 의존적일 것으로 사료된다.

도면

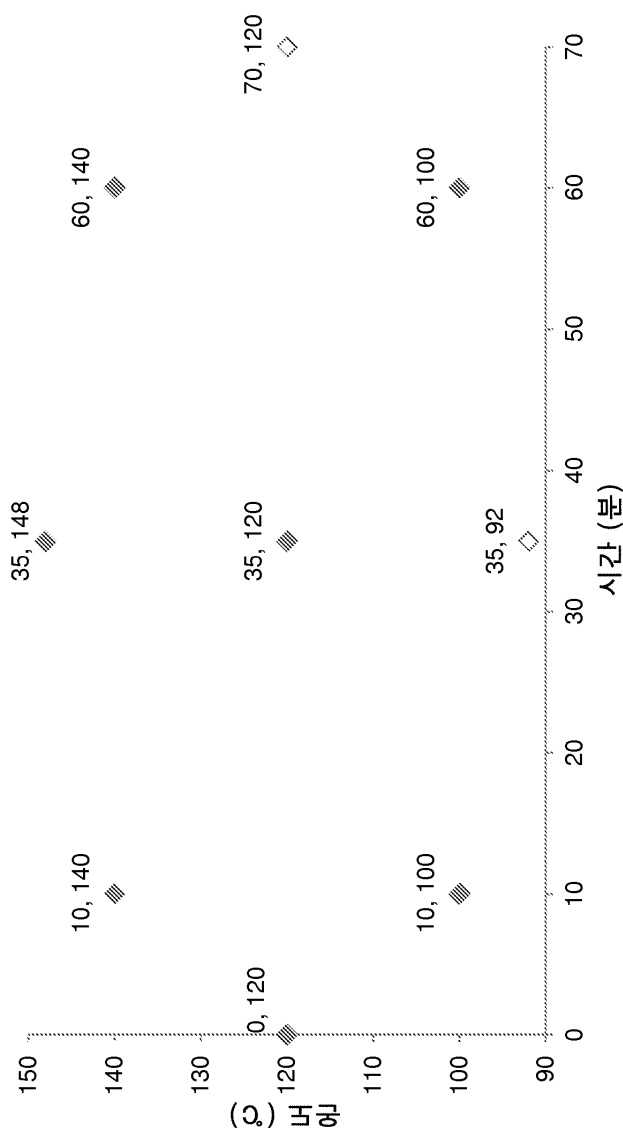
도면1



도면2

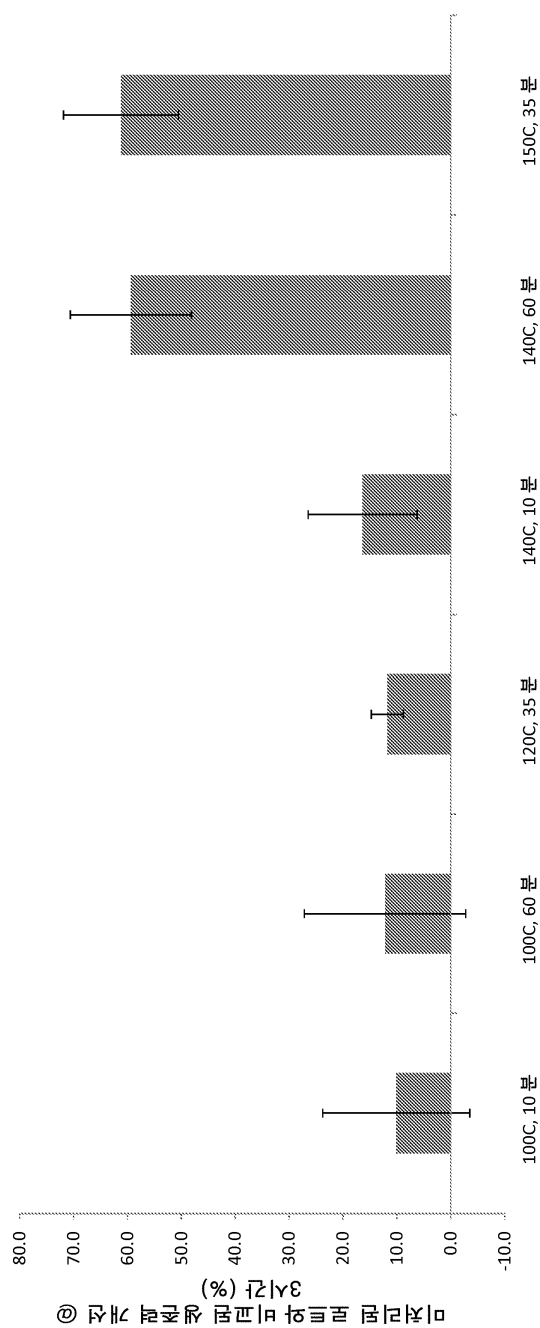


도면3

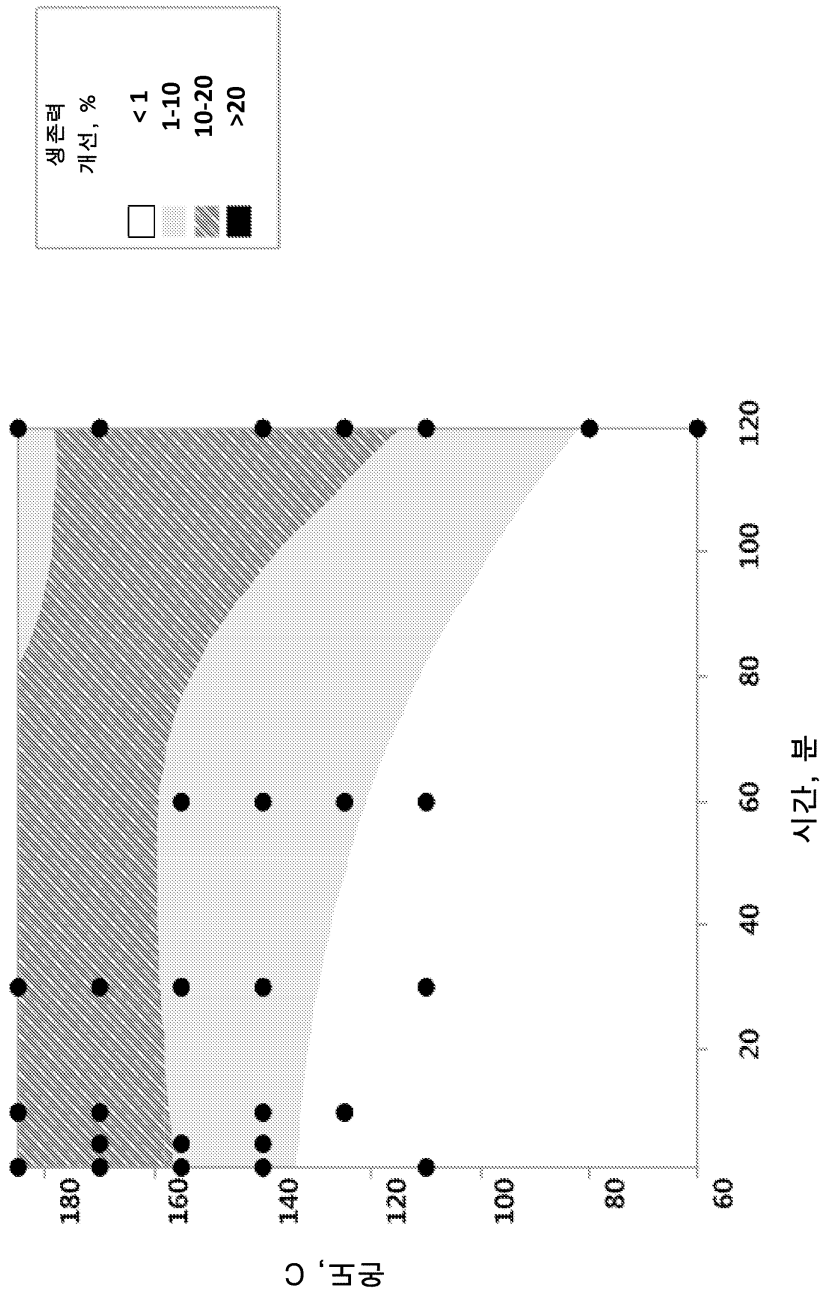




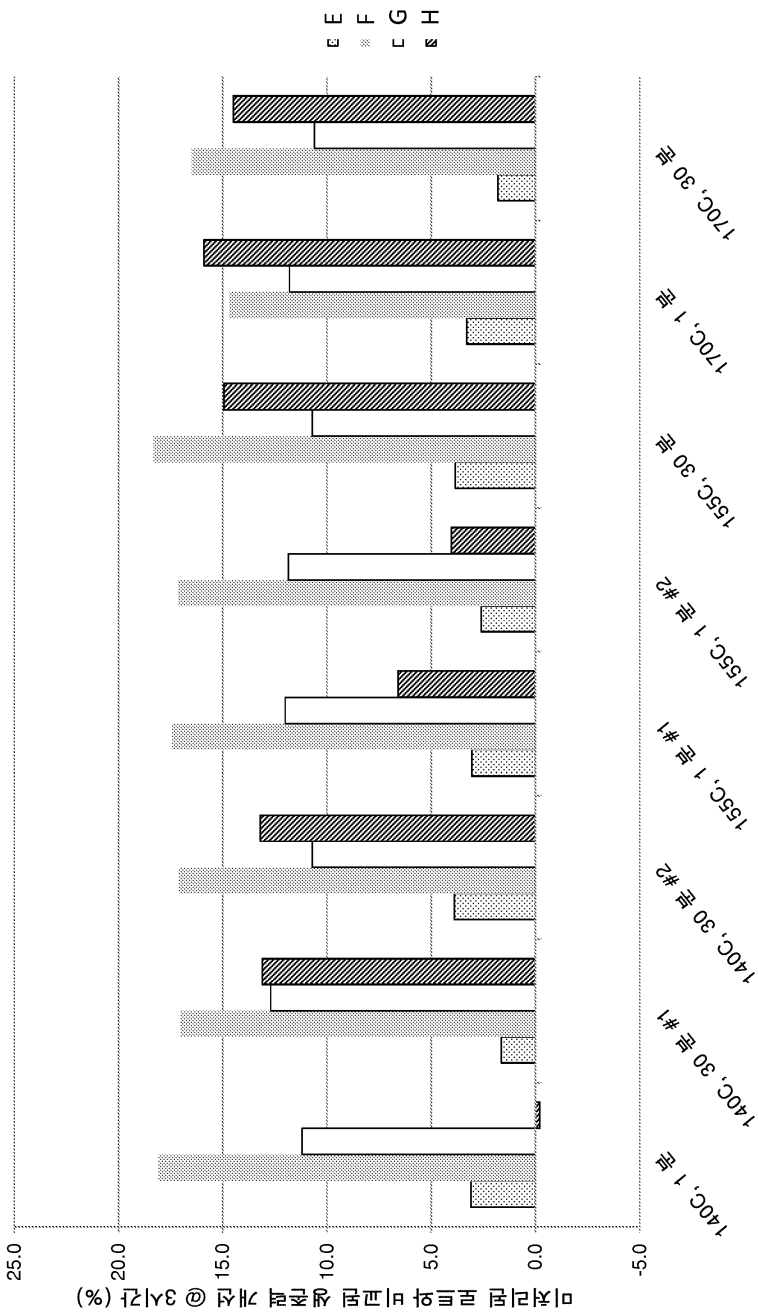
도면4



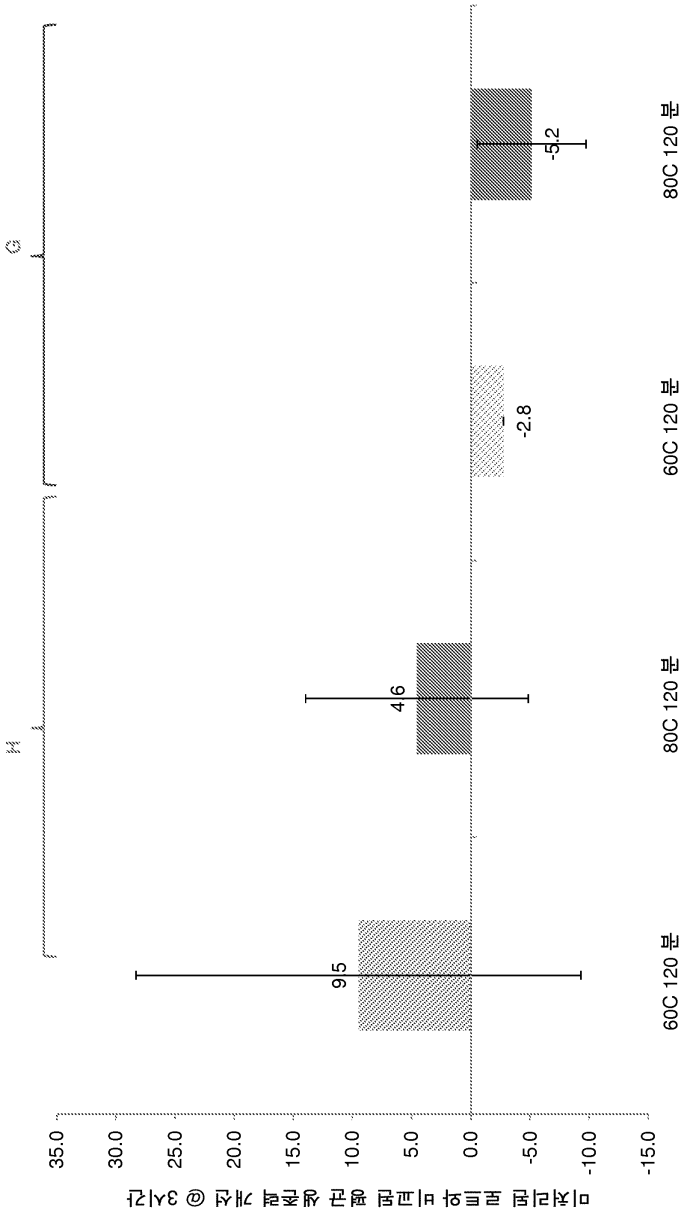
도면5



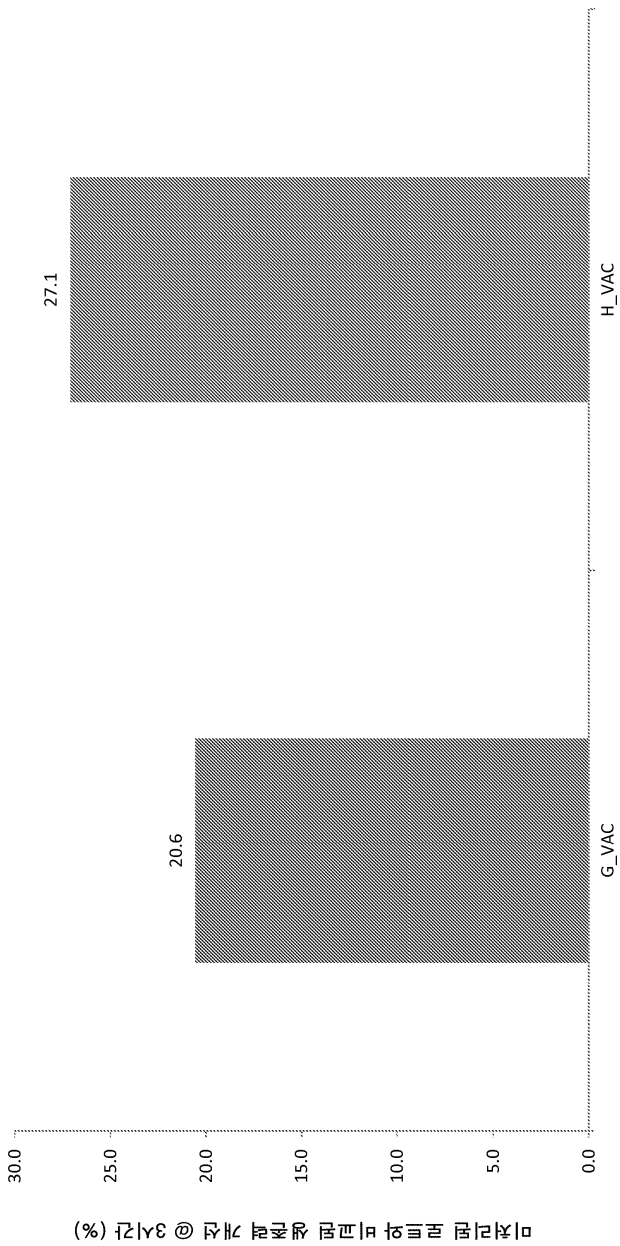
도면6



도면7

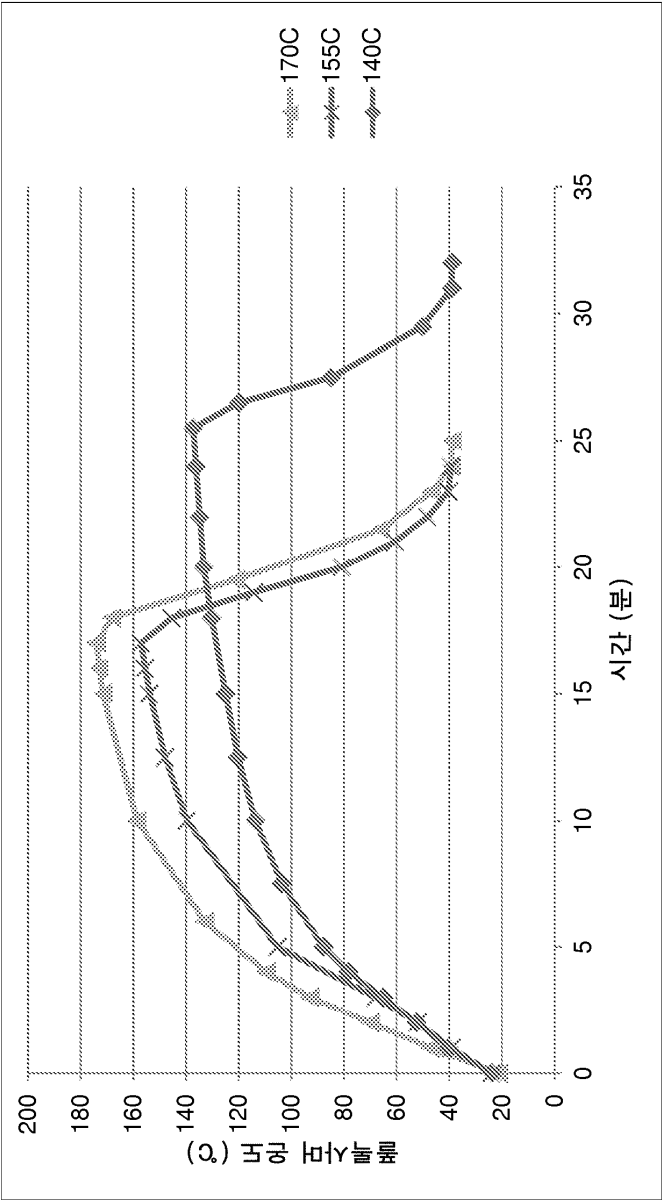


도면8

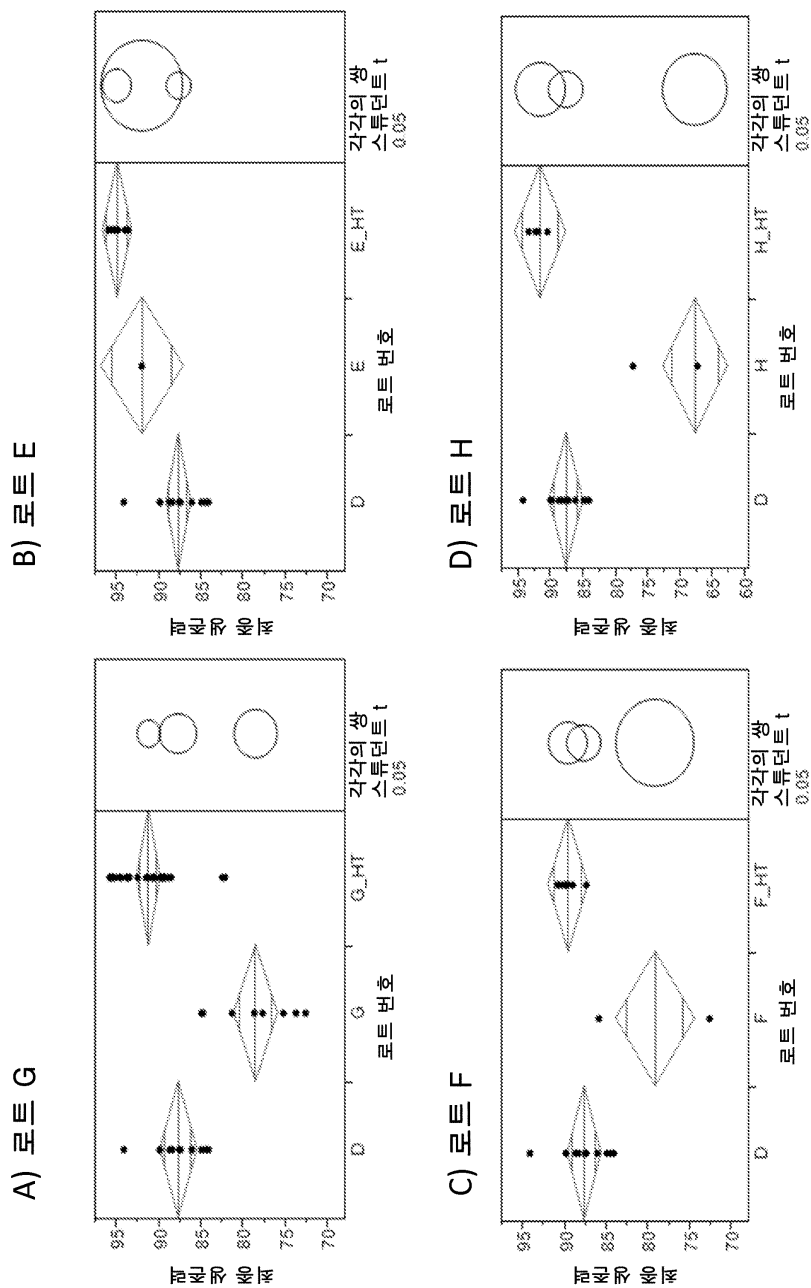




도면9



도면10



도면11

