



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0057795
(43) 공개일자 2020년05월26일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 5/005 (2013.01)
C12N 2500/24 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-7014171(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2013년04월24일
심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2014-7032389
원출원일자(국제) 2013년04월24일
심사청구일자 2018년04월24일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2020년05월18일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2013/037992</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2013/163294
국제공개일자 2013년10월31일</p> <p>(30) 우선권주장
61/637,778 2012년04월24일 미국(US)
(뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1</p> <p>(72) 발명자
마이어, 스티븐, 제이.
미국 94080-4990 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 엠에스49 디엔에이 웨이 1
문, 델리사, 에스.
미국 94080-4990 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 엠에스49 디엔에이 웨이 1
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
장덕순, 이귀동</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 111 항

(54) 발명의 명칭 세포 배양 조성물 및 폴리펩티드 생산 방법

(57) 요약

세포 배양 배지, 예컨대 화학적으로 규정된 세포 배양 배지, 및 세포 성장 (즉, 세포 배양) 및 폴리펩티드 (예를 들어, 항체) 생산을 위해 이러한 배지를 사용하는 방법이 제공된다. 또한, 이러한 방법에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물이 제공된다.

(52) CPC특허분류

C12N 2500/32 (2013.01)

C12N 2500/38 (2013.01)

C12N 2501/39 (2013.01)

(72) 발명자

비자야산카란, 나타라잔

미국 94080-4990 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코
엠에스49 디엔에이 웨이 1

바르마, 샤라트

미국 94080-4990 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코
엠에스49 디엔에이 웨이 1

양, 이

미국 94080-4990 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코
엠에스49 디엔에이 웨이 1

장, 보안

미국 94080-4990 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코
엠에스49 디엔에이 웨이 1

아레발로, 실바나, 알.

미국 94080-4990 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코
엠에스49 디엔에이 웨이 1

가블리체크, 마르틴

미국 94080-4990 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코
엠에스49 디엔에이 웨이 1

카발할, 베로니카

미국 94080-4990 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코
엠에스49 디엔에이 웨이 1

(30) 우선권주장

61/637,780 2012년04월24일 미국(US)

13/841,864 2013년03월15일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

약 200 mg/L 내지 약 1200 mg/L 시스틴;
 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2;
 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6;
 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9; 및
 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12
 를 포함하는 세포 배양 배지와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포를 배양하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,
 약 0.7 mM 내지 약 2.5 mM 시스틴;
 약 0.11 μ M 내지 약 0.72 μ M 비타민 B2;
 약 4.5 μ M 내지 약 30.0 μ M 비타민 B6;
 약 3.4 μ M 내지 약 22.0 μ M 비타민 B9; 및
 약 0.2 μ M 내지 약 1.5 μ M 비타민 B12
 를 포함하는 세포 배양 배지와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 세포 배양 배지가 비타민 B1, 비타민 B3, 비타민 B5 및 비타민 B7 중 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 세포 배양 배지가
 약 2.0 μ M 내지 약 14.0 μ M 비타민 B1;
 약 11.0 μ M 내지 약 72.0 μ M 비타민 B3;
 약 6.8 μ M 내지 약 44.0 μ M 비타민 B5; 및
 약 0.02 μ M 내지 약 0.14 μ M 비타민 B7
 중 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 철 공급원을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 철 공급원이 시트르산제2철 또는 황산제1철인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 약 2 μ M 내지 약 80 μ M의 농도의 시트르산제2철을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 약 11.0 μM 내지 약 36.0 μM 의 농도의 시트르산 제2철을 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 히드로코르티손을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 세포 배양 배지 중의 히드로코르티손의 농도가 약 0.05 μM 내지 약 0.25 μM 인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 화학적으로 규정된 세포 배양 배지인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 세포를 세포의 성장기 동안 세포 배양 배지와 접촉시키는 것인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 세포를 세포의 생산기 동안 세포 배양 배지와 접촉시키는 것인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 세포 배양 배지에 시스테인을 첨가하는 단계를 추가로 포함 하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 80 mg/L 내지 약 1500 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 1500 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 140 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.

청구항 19

폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포를 세포 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함하며, 여기서

(a) 세포 배양 배지는

약 200 mg/L 내지 약 1200 mg/L 시스틴;

약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2;

약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6;

약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9;
 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12
 를 포함하고;

(b) 세포는 폴리펩티드를 발현하는 것인,
 폴리펩티드를 생산하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 세포 배양 배지가
 약 0.7 mM 내지 약 2.5 mM 시스틴;
 약 0.11 μ M 내지 약 0.72 μ M 비타민 B2;
 약 4.5 μ M 내지 약 30.0 μ M 비타민 B6;
 약 3.4 μ M 내지 약 22.0 μ M 비타민 B9; 및
 약 0.2 μ M 내지 약 1.5 μ M 비타민 B12
 를 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 세포 배양 배지가 비타민 B1, 비타민 B3, 비타민 B5 및 비타민 B7 중 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 세포 배양 배지가
 약 2.0 μ M 내지 약 14.0 μ M 비타민 B1;
 약 11.0 μ M 내지 약 72.0 μ M 비타민 B3;
 약 6.8 μ M 내지 약 44.0 μ M 비타민 B5; 및
 약 0.02 μ M 내지 약 0.14 μ M 비타민 B7
 중 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 철 공급원을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 철 공급원이 시트르산제2철 또는 황산제1철인 방법.

청구항 25

제19항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 약 2 μ M 내지 약 80 μ M의 농도의 시트르산제2 철을 포함하는 것인 방법.

청구항 26

제19항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 약 11.0 μ M 내지 약 36.0 μ M의 농도의 시트르산제2철을 포함하는 것인 방법.

청구항 27

제19항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 히드로코르티손을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 세포 배양 배지 중의 히드로코르티손의 농도가 약 0.05 μM 내지 약 0.25 μM 인 방법.

청구항 29

제19항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 화학적으로 규정된 세포 배양 배지인 방법.

청구항 30

제19항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지인 방법.

청구항 31

제19항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 배양을 세포의 성장기 동안 수행하는 것인 방법.

청구항 32

제19항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 배양을 세포의 생산기 동안 수행하는 것인 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 세포 배양 배지에 시스테인을 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 80 mg/L 내지 약 1500 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.

청구항 35

제33항에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 1500 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.

청구항 36

제33항에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 140 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.

청구항 37

제19항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 항체인 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 항체가 IgG1 항체인 방법.

청구항 39

제37항 또는 제38항에 있어서, 항체가 항-VEGF, 항-메소텔린, 항-PCSK9 또는 항-베타7 항체인 방법.

청구항 40

제19항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지로부터 폴리펩티드를 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 분리된 폴리펩티드를 포함하는 조성물이 무색 또는 약간 유색의 액체로 나타나는 것인 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 조성물이 적어도 100 mg/mL의 농도의 단리된 폴리펩티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 43

제19항 내지 제42항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 폴리펩티드.

청구항 44

제43항의 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 45

세포 배양 배지 중에 약 200 mg/L 내지 약 1200 mg/L 시스틴을 제공하는 양의 시스틴;

세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2를 제공하는 양의 비타민 B2;

세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6을 제공하는 양의 비타민 B6;

세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9를 제공하는 양의 비타민 B9; 및

약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12를 제공하는 양의 비타민 B12

를 포함하는, 세포 배양 배지를 화학적으로 규정된 구성성분으로 보충하기 위한 키트.

청구항 46

제45항에 있어서,

세포 배양 배지 중에 약 0.7 mM 내지 약 2.5 mM 시스틴을 제공하는 양의 시스틴;

세포 배양 배지 중에 약 0.11 μ M 내지 약 0.72 μ M 비타민 B2를 제공하는 양의 비타민 B2;

세포 배양 배지 중에 약 4.5 μ M 내지 약 30.0 μ M 비타민 B6을 제공하는 양의 비타민 B6;

세포 배양 배지 중에 약 3.4 μ M 내지 약 22.0 μ M 비타민 B9를 제공하는 양의 비타민 B9; 및

세포 배양 배지 중에 약 0.2 μ M 내지 약 1.5 μ M 비타민 B12를 제공하는 양의 비타민 B12

를 포함하는 키트.

청구항 47

제45항 또는 제46항에 있어서, 비타민 B1, 비타민 B3, 비타민 B5 및 비타민 B7 중 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 키트.

청구항 48

제47항에 있어서,

세포 배양 배지 중에 약 2.0 μ M 내지 약 14.0 μ M 비타민 B1을 제공하는 양의 비타민 B1;

세포 배양 배지 중에 약 11.0 μ M 내지 약 72.0 μ M 비타민 B3을 제공하는 양의 비타민 B3;

세포 배양 배지 중에 약 6.8 μ M 내지 약 44.0 μ M 비타민 B5를 제공하는 양의 비타민 B5; 및

세포 배양 배지 중에 약 0.02 μ M 내지 약 0.14 μ M 비타민 B7을 제공하는 양의 비타민 B7

중 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 키트.

청구항 49

제45항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 철 공급원을 추가로 포함하는 키트.

청구항 50

제49항에 있어서, 철 공급원이 시트르산제2철 또는 황산제1철인 키트.

청구항 51

제45항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 히드로코르티손을 추가로 포함하는 키트.

청구항 52

약 200 mg/L 내지 약 1200 mg/L 시스틴;
 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2;
 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6;
 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9; 및
 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12
 를 포함하는 세포 배양 배지.

청구항 53

제52항에 있어서,
 약 0.7 mM 내지 약 2.5 mM 시스틴;
 약 0.11 μ M 내지 약 0.72 μ M 비타민 B2;
 약 4.5 μ M 내지 약 30.0 μ M 비타민 B6;
 약 3.4 μ M 내지 약 22.0 μ M 비타민 B9; 및
 약 0.2 μ M 내지 약 1.5 μ M 비타민 B12
 를 포함하는 배지.

청구항 54

제52항 또는 제53항에 있어서, 비타민 B1, 비타민 B3, 비타민 B5 및 비타민 B7 중 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 배지.

청구항 55

제54항에 있어서,
 약 2.0 μ M 내지 약 14.0 μ M 비타민 B1;
 약 11.0 μ M 내지 약 72.0 μ M 비타민 B3;
 약 6.8 μ M 내지 약 44.0 μ M 비타민 B5; 및
 약 0.02 μ M 내지 약 0.14 μ M 비타민 B7
 중 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 배지.

청구항 56

제52항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 철 공급원을 추가로 포함하는 것인 배지.

청구항 57

제56항에 있어서, 철 공급원이 시트르산제2철 또는 황산제1철인 배지.

청구항 58

제57항에 있어서, 세포 배양 배지가 약 2 μ M 내지 약 80 μ M의 농도의 시트르산제2철을 포함하는 것인 배지.

청구항 59

제58항에 있어서, 세포 배양 배지가 약 11.0 μM 내지 약 36.0 μM 의 농도의 시트르산제2철을 포함하는 것인 배지.

청구항 60

제52항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 히드로코르티손을 추가로 포함하는 것인 배지.

청구항 61

제60항에 있어서, 세포 배양 배지가 약 0.05 μM 내지 약 0.25 μM 의 농도의 히드로코르티손을 포함하는 것인 배지.

청구항 62

약 200 mg/L 내지 약 1200 mg/L 시스틴;

약 2 μM 내지 약 80 μM 시트르산제2철; 및

약 0.05 μM 내지 약 0.5 μM 히드로코르티손

을 포함하는 세포 배양 배지와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포를 배양하는 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 세포 배양 배지가 비타민 B2, 비타민 B6, 비타민 B9 및/또는 비타민 B12를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 64

제62항 또는 제63항에 있어서, 세포 배양 배지가 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L의 비타민 B2를 포함하는 것인 방법.

청구항 65

제62항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L의 비타민 B6을 포함하는 것인 방법.

청구항 66

제62항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L의 비타민 B9를 포함하는 것인 방법.

청구항 67

제62항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L의 비타민 B12를 포함하는 것인 방법.

청구항 68

제62항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 화학적으로 규정된 세포 배양 배지인 방법.

청구항 69

제62항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지인 방법.

청구항 70

제62항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 세포를 세포의 성장기 동안 세포 배양 배지와 접촉시키는 것인 방법.

청구항 71

제62항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 세포를 세포의 생산기 동안 세포 배양 배지와 접촉시키는 것인 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 세포 배양 배지에 시스테인을 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 73

제72항에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 80 mg/L 내지 약 1500 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.

청구항 74

제72항에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 1500 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.

청구항 75

제72항에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 140 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.

청구항 76

폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포를 세포 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함하며, 여기서

(a) 세포 배양 배지는

약 200 mg/L 내지 약 1200 mg/L 시스틴;

약 2 μ M 내지 약 80 μ M 시트르산제2철; 및

약 0.05 μ M 내지 약 0.5 μ M 히드로코르티손

을 포함하고;

(b) 세포는 폴리펩티드를 발현하는 것인,

폴리펩티드를 생산하는 방법.

청구항 77

제76항에 있어서, 세포 배양 배지가 비타민 B2, 비타민 B6, 비타민 B9 및/또는 비타민 B12를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 78

제76항 또는 제77항에 있어서, 세포 배양 배지가 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L의 비타민 B2를 포함하는 것인 방법.

청구항 79

제76항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L의 비타민 B6을 포함하는 것인 방법.

청구항 80

제76항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L의 비타민 B9를 포함하는 것인 방법.

청구항 81

제76항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L의 비타민 B12를

포함하는 것인 방법.

청구항 82

제76항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 화학적으로 규정된 세포 배양 배지인 방법.

청구항 83

제76항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지가 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지인 방법.

청구항 84

제76항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 배양을 세포의 성장기 동안 수행하는 것인 방법.

청구항 85

제76항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 배양을 세포의 생산기 동안 수행하는 것인 방법.

청구항 86

제85항에 있어서, 세포 배양 배지에 시스테인을 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 87

제86항에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 80 mg/L 내지 약 1500 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.

청구항 88

제86항에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 1500 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.

청구항 89

제86항에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 140 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.

청구항 90

제76항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리펩티드가 항체인 방법.

청구항 91

제90항에 있어서, 항체가 IgG1 항체인 방법.

청구항 92

제90항 또는 제91항에 있어서, 항체가 항-VEGF, 항-메소텔린, 항-PCSK9 또는 항-베타7 항체인 방법.

청구항 93

제76항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지로부터 폴리펩티드를 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 94

제93항에 있어서, 분리된 폴리펩티드를 포함하는 조성물이 무색 또는 약간 유색의 액체로 나타나는 것인 방법.

청구항 95

제94항에 있어서, 조성물이 적어도 100 mg/mL의 농도의 분리된 폴리펩티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 96

제76항 내지 제95항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 폴리펩티드.

청구항 97

제96항의 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 98

세포 배양 배지 중에 약 200 mg/L 내지 약 1200 mg/L 시스틴을 제공하는 양의 시스틴;

세포 배양 배지 중에 약 2 μM 내지 약 80 μM 시트르산제2철의 농도를 제공하는 양의 시트르산제2철; 및

세포 배양 배지 중에 약 0.05 μM 내지 약 0.5 μM 히드로코르티손의 농도를 제공하는 양의 히드로코르티손을 포함하는, 세포 배양 배지를 화학적으로 규정된 구성성분으로 보충하기 위한 키트.

청구항 99

제98항에 있어서, 비타민 B2, 비타민 B6, 비타민 B9 및/또는 비타민 B12를 추가로 포함하는 키트.

청구항 100

제98항 또는 제99항에 있어서, 세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L의 비타민 B2를 제공하는 양의 비타민 B2를 포함하는 키트.

청구항 101

제98항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L의 비타민 B6을 제공하는 양의 비타민 B6을 포함하는 키트.

청구항 102

제98항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L의 비타민 B9를 제공하는 양의 비타민 B9를 포함하는 키트.

청구항 103

제98항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L의 비타민 B12를 제공하는 양의 비타민 B12를 포함하는 키트.

청구항 104

약 200 mg/L 내지 약 1200 mg/L 시스틴;

약 2 μM 내지 약 80 μM 시트르산제2철; 및

약 0.05 μM 내지 약 0.5 μM 히드로코르티손

을 포함하는 세포 배양 배지.

청구항 105

제104항에 있어서, 비타민 B2, 비타민 B6, 비타민 B9 및/또는 비타민 B12를 추가로 포함하는 배지.

청구항 106

제104항 또는 제105항에 있어서, 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L의 비타민 B2를 포함하는 배지.

청구항 107

제104항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L의 비타민 B6을 포함하는 배지.

청구항 108

제104항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L의 비타민 B9를 포함하는 배지.

청구항 109

제104항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L의 비타민 B12를 포함하는 배지.

청구항 110

(a) 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포; 및 (b) 제52항 내지 제61항 및 제104항 내지 제109항 중 어느 한 항에 따른 배지를 포함하는 조성물.

청구항 111

(a) 폴리펩티드; 및 (b) 제52항 내지 제61항 및 제104항 내지 제109항 중 어느 한 항에 따른 배지를 포함하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 특허 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 2012년 4월 24일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 61/637,778, 2012년 4월 24일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 61/637,780, 및 2013년 3월 15일에 출원된 미국 정식 출원 일련 번호 13/841,864를 우선권 주장하며, 이들 각각의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] 재조합 세포 배양을 이용하여 시험관내에서 단백질을 생산하는 방법은 널리 공지되어 있으며, 단백질-기재 약물 제품을 생산하기 위해 산업적 규모로 이용된다. 그러나, 재조합 세포 배양로부터의 단백질의 효율적인 제조를 위한 중요한 도전이 남아있다. 예를 들어, 단백질-기재 약물은 단백질의 생산 공정에 의해 영향을 받을 수 있는 특성의 품질 특성, 예컨대 크기 분포, 서열 완전성 및 제품 색을 갖는다.

[0004] 특별히 관심있는 하나의 품질 특성은 단백질 약물 제품의 색이다. 단백질-기재 약물 제품에 대해 허용되는 색 수준과 관련된 규제 요구사항이 또한 충족되어야 한다. 따라서, (예를 들어, 제품 마케팅에 대한 규제 요구사항을 만족시키기 위해) 허용되는 색을 갖는 단백질 제품을 생산하는 것이 약물 생산의 중요한 측면이다. 이전의 임상적 물질과의 제품 품질 비교가능성을 확립하는 것이 또한 결정적일 수 있다.

[0005] 모노클로날 항체의 피하 전달에 대한 최근의 경향은 제제화된 약물 물질의 농도의 증가 (예를 들어, ≥ 150 mg/mL까지)를 수반하였다. 이러한 농도에서, 약물 제품의 색은 보다 진해질 수 있으며, 이에 따라 허용되는 색을 갖는 단백질-기재 약물 제품을 생산하는 것이 더 어려워진다. 세포 배양 조건은 단백질-기재 약물 제품의 품질 특성에 영향을 미칠 수 있다. 세포를 배양한 배지는 단백질 생산에 대해 특히 중요한 영향을 미칠 수 있다.

[0006] 시험관내에서 단백질을 생산하기 위한 재조합 DNA 기술은 전통적으로 가변적이며 화학적으로 규정되지 않은 배지 성분, 예컨대 동물 혈청 및 펩톤이 보충된 배지에서 배양된 세포주를 이용하였다. 화학적으로 규정되지 않은 영양소는 로트-투-로트(lot-to-lot) 가변성으로 이어질 수 있으며, 동물-유래 제품은 배지를 바람직하지 않은 구성성분으로 오염시킬 수 있다. 지속적인 로트-투-로트의 공지된 조성물의 화학적으로 규정된 세포 배양 배지 ("CDM")가 이러한 사안을 다루기 위해 개발되었다. 단백질 생산을 위한 CDM의 사용과 연관된 다양한 이점으로 인해, CDM을 활용하는 공정에 유리한 혈청 함유 및 펩톤 함유 공정으로부터 멀어지기 위한 산업상 광범위한 경향이 존재한다. 다양한 CDM이 특허 문헌, 예컨대 미국 특허 번호 4,767,704; 5,691,202; 6,048,728; 6,900,056; 및 7,601,535, 및 미국 특허 출원 공개 번호 20030087372 및 20110039330에 기재되어 있다. 그러나, 화학적으로 규정되지 않은 배지는 단백질 생산에 있어 그 용도에 대한 발견이 계속된다.

[0007] 허용되는 제품 품질 특성을 갖는 단백질 (예를 들어, 항체)을 시험관내에서 생산하는 개선되고 비용-효율적인 방법을 제공하는 것이 계속 요망되고 있다. 하나 이상의 제품 품질 특성을 조정하는 세포 배양 배지가 바람직

하다. 바람직한 단백질 농도 (예를 들어, ≥ 150 mg/mL)를 유지하면서 보다 낮은 색 강도의 단백질 제품을 지속적으로 전달하는 성분을 갖는 세포 배양 배지는 화학적으로 규정되지 않은 것이든 또는 화학적으로 규정된 것이든 단백질 제품, 예컨대 항체, 예를 들어 피하 주사를 위한 것의 개발에 있어 그의 용도가 밝혀질 것이다.

발명의 내용

[0008] 허용되는 색을 갖는 약물 제품을 제공하는 세포 배양 배지 조성물, 및 세포 성장 (즉, 세포 배양) 및/또는 단백질 생산을 위해 이러한 배지를 사용하는 방법이 기재된다. 바람직한 단백질-기재 약물 제품 농도 (예를 들어, ≥ 100 mg/mL 또는 ≥ 150 mg/mL)를 유지하면서 허용되는 색을 갖는 단백질-기재 약물 제품을 제공하는 배지가 또한 제공되며, 단백질 생산 방법, 예컨대 피하 주사를 위한 항체의 생산에 있어 그의 용도가 발견될 수 있다. 본원에 상세히 기재된 바와 같은 세포 배양 배지는 화학적으로 규정되지 않은 것이거나 또는 CDM일 수 있다. 본원에 제공된 바와 같은 배지 및 폴리펩티드 (예를 들어, 숙주 세포에 의해 배지로 분비된 폴리펩티드) 및/또는 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포를 포함하는 조성물이 또한 고려된다. 본원에 상세히 기재된 방법에 의해 제조된 폴리펩티드, 및 폴리펩티드 및 담체 (예를 들어, 제약상 허용되는 담체)를 포함하는 제제가 제공된다. 한 측면에서 폴리펩티드 제제는 허용되는 색을 가지며, 적어도 100 mg/mL 또는 150 mg/mL의 단백질-기재 약물 제품 농도를 유지한다.

[0009] 본원에 상세히 기재된 세포 배양 배지는 일반적으로 단백질 제품 품질 특성, 예컨대 색에 영향을 미치는 양으로 하기 성분 중 하나 이상을 포함한다: (a) 시스틴 또는 시스테인; (b) 비타민 B2, (c) 비타민 B6 (피리독신 및/또는 피리독살, HCl 염으로 제공될 수 있음), (d) 비타민 B9, (e) 비타민 B12, (f) 철 공급원, 예컨대 질산철, 시트르산제2철 또는 황산제1철 및 (g) 히드로코르티손. 한 변형법에서, 세포 배양 배지는 성분 (a), (b), (c), (d), (e), (f) 및 (g) 중 2 또는 3 또는 4 또는 5 또는 6개 또는 각각을 포함한다. 본원에 제공된 세포 배양 배지가 각각의 및 모든 조합이 구체적이고 개별적으로 열거되는 것과 같이 성분 (a), (b), (c), (d), (e), (f) 및 (g)의 임의의 조합을 함유할 수 있는 것으로 이해된다. 한 측면에서, 세포 배양 배지는 CDM이다. 또 다른 측면에서, 세포 배양 배지는 화학적으로 규정되지 않은 것이다. 특정한 변형법에서, 본원에 상세히 기재된 세포 배양 배지는 (a) 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴; (b) 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2; (c) 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6; (d) 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9; 및 (e) 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12를 포함하고, 여기서 세포 배양 배지는 (a) 한 변형법에서 CDM일 수 있고/거나 (b) 하기 성분 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다: (1) 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 또는 황산제1철 (한 측면에서, 약 2 μ M 내지 약 80 μ M의 농도로 존재함), 및 (2) 히드로코르티손 (한 측면에서, 약 0.05 μ M 내지 약 0.25 μ M의 농도로 존재함). 또 다른 변형법에서, 본원에 상세히 기재된 바와 같은 세포 배양 배지는 (a) 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴; (b) 약 2 μ M 내지 약 80 μ M 시트르산제2철; 및 (c) 약 0.05 μ M 내지 약 0.5 μ M 히드로코르티손을 포함하고, 여기서 세포 배양 배지는 (1) 한 변형법에서 CDM일 수 있고/거나 (2) 하기 성분 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다: (A) 비타민 B2 (한 측면에서, 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L의 농도로 존재함); (B) 비타민 B6 (한 측면에서, 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L의 농도로 존재함); (C) 비타민 B9 (한 측면에서, 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L의 농도로 존재함); 및 (D) 비타민 B12 (한 측면에서, 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L의 농도로 존재함). 본원에 제공된 임의의 배지의 경우에, 한 변형법에서 배지는 폴리펩티드가 상이한 세포 배양 배지 (예를 들어, 동일한 배지 성분을 포함하지 않거나 또는 동일한 배지 성분을 함유하지만 상이한 양으로 함유하는 배지)에서 생산되는 경우에 수득한 전하 변이체 (한 측면에서, 산성 전하 변이체임)와 비교하여 폴리펩티드를 생산하는 방법에 사용된 경우에 전하 변이체 (한 측면에서, 산성 전하 변이체임)의 존재를 감소시킨다. 본원에 제공된 조성물 및 방법의 한 변형법에서, 전하 변이체 (한 측면에서, 산성 전하 변이체임)는 폴리펩티드 제품의 25% 또는 20% 또는 18% 또는 15% 또는 10% 이하를 구성한다. 본원에 제공된 조성물 및 방법의 또 다른 변형법에서, 폴리펩티드 제품의 적어도 75% 또는 80% 또는 85% 또는 90% 또는 95% 또는 그 초과가 주요 중 단백질이다. 일부 변형법에서, 주요 중 단백질은 단백질의 아미노산 서열, 2차 구조 및/또는 3차 구조에 의해 확인된 바와 같이 정량적으로 우세한 단백질이다. 일부 변형법에서, 주요 중 단백질은 하나 이상의 번역후 변형에 의해 확인된 정량적으로 우세한 단백질이다. 일부 변형법에서, 번역후 변형은 글리코실화이다. 본원에 기재된 바와 같은 폴리펩티드 제품의 백분율은 폴리펩티드 제품의 정제 전에, 폴리펩티드 제품의 정제 후에, 또는 폴리펩티드 정제 공정 동안의 임의의 단계에서 결정될 수 있는 것으로 이해된다.

[0010] 산성 변이체는 다양한 방법에 의해 평가될 수 있으나, 바람직하게는 이러한 방법은 다음 중 1, 2, 3, 4 또는 5개를 포함한다: 이온 교환 크로마토그래피 (IEC) (여기서, 조성물은 IEC 전에, 후에 및/또는 그 동안에 시알리다제로 처리됨) (예를 들어, 시알릴화 변이체를 평가하기 위함), 환원된 CE-SDS (예를 들어, 디설피드 환원된

변이체를 평가하기 위함), 비-환원된 CE-SDS (예를 들어, 비-환원성 변이체를 평가하기 위함), 보로네이트 크로마토그래피 (예를 들어, 글리코실화 변이체를 평가하기 위함) 및 펩티드 맵핑 (예를 들어, 탈아미드화 변이체를 평가하기 위함). 한 변형법에서, 전체 산성 변이체는 이온 교환 크로마토그래피에 의해, 예를 들어 약한 양이온 교환기 및/또는 카르복실레이트 관능기를 갖는 양이온 교환기를 사용하여 (예를 들어, 디오넥스(DIONEX) 프로팩(PROPAC)TM WCX-10 크로마토그래피 칼럼을 사용함) 평가될 수 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 측면에서, 본원에 상세히 기재된 세포 배양 배지는 일반적으로 단백질 제품 품질 특성, 예컨대 색에 영향을 미치는 양으로 하기 성분 중 하나 이상을 포함한다: (a) 시스틴; (b) 비타민 B1; (c) 비타민 B2; (d) 비타민 B3; (e) 비타민 B5; (f) 비타민 B6 (피리독신 및/또는 피리독살, HCl 염으로서 제공될 수 있음); (g) 비타민 B7; (h) 비타민 B9; (i) 비타민 B12; 및 (j) 철 공급원, 예컨대 질산철, 시트르산제2철 또는 황산제1철. 한 변형법에서, 세포 배양 배지는 성분 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i) 및 (j) 중 2 또는 3 또는 4 또는 5 또는 6 또는 7 또는 8 또는 9개 또는 각각을 포함한다. 본원에 제공된 세포 배양 배지는 각각의 및 모든 조합이 구체적이며 개별적으로 열거되는 것과 같이 성분 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i) 및 (j)의 임의의 조합을 함유할 수 있는 것으로 이해된다. 한 측면에서, 세포 배양 배지는 CDM이다. 또 다른 측면에서, 세포 배양 배지는 화학적으로 규정되지 않은 것이다. 특정한 변형법에서, 본원에 상세히 기재된 세포 배양 배지는 (a) 약 0.8 mM (일부 실시양태에서, 0.7 mM) 내지 약 2.5 mM 시스틴; (b) 약 0.11 μ M 내지 약 0.72 μ M 비타민 B2; (c) 약 4.5 μ M 내지 약 30.0 μ M 비타민 B6; (c) 약 3.4 μ M 내지 약 22.0 μ M 비타민 B9; 및 (d) 약 0.2 μ M 내지 약 1.5 μ M 비타민 B12를 포함하고, 여기서 세포 배양 배지는 (a) 한 변형법에서 CDM일 수 있고/거나 (b) 하기 성분 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다: (1) 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 또는 황산제1철 (한 측면에서, 약 11.0 μ M 내지 약 36.0 μ M의 농도로 존재함), (2) 비타민 B1 (한 측면에서, 약 2.0 μ M 내지 약 14.0 μ M의 농도로 존재함), (3) 비타민 B3 (한 측면에서, 약 11.0 μ M 내지 약 72.0 μ M의 농도로 존재함), (4) 비타민 B5 (한 측면에서, 약 6.8 μ M 내지 약 44.0 μ M의 농도로 존재함) 및 (5) 비타민 B7 (한 측면에서, 약 0.02 μ M 내지 약 0.24 μ M의 농도로 존재함).

[0012] 본원에 상세히 기재된 세포 배양 배지의 사용은 상이한 조성의 세포 배양 배지 (예를 들어, 본원에 상세히 기재된 바와 같은 배지 성분 및/또는 성분의 양을 포함하지 않은 배지)에서 생산된 단백질 제품과 비교하여, 예컨대 주요 중 단백질의 산화를 감소시킴으로써, 단백질 제품의 안정성 (예를 들어, 물리적 안정성 및/또는 화학적 안정성)을 증가시킬 수 있다. 본원에 상세히 기재된 세포 배양 배지의 사용은 또한 상이한 조성의 배지 (예를 들어, 본원에 상세히 기재된 바와 같은 배지 성분 및/또는 성분의 양을 포함하지 않은 배지)에서 생산된 폴리펩티드 제품과 비교하여 유색 형태의 폴리펩티드 형태를 감소시킬 수 있다. 본원에 상세히 기재된 세포 배양 배지의 사용은 또한 상이한 조성의 배지 (예를 들어, 본원에 상세히 기재된 바와 같은 배지 성분 및/또는 성분의 양을 포함하지 않은 배지)에서 생산된 폴리펩티드 제품과 비교하여 세포 배양 용기 내의 다른 물질 (예를 들어, 부가물)에 대한 폴리펩티드 제품의 결합을 감소시킬 수 있다. 폴리펩티드 조성물의 안정성을 증가시키는 방법, 및 유색 형태의 폴리펩티드 제품의 존재 및/또는 양을 감소시키는 방법 및 세포 배양 용기 내의 다른 물질, 예컨대 부가물에 대한 폴리펩티드 제품의 결합을 감소시키는 방법이 또한 고려된다.

[0013] 본원에 상세히 기재된 임의의 방법에 의해 제공된 바와 같은 폴리펩티드를 생산하는 단계 및 이러한 폴리펩티드를 하나 이상의 제제 성분, 예컨대 제약상 허용되는 담체 또는 부형제와 합하는 단계를 포함하는, 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)를 포함하는 제제를 제조하는 방법이 또한 제공된다.

[0014] 본원에 상세히 기재된 임의의 방법에 의해 생산된 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)를 포함하는 제제가 또한 제공된다. 제제는 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다. 개체에게 투여하기에 적합할 수 있는 폴리펩티드 제제는 단리된 및/또는 정제된 항체를 포함할 수 있고, 하나 이상의 바람직한 제품 품질 특성, 예컨대 허용되는 색을 갖는다. 한 측면에서, 본원에 제공된 임의의 방법에 의해 수득한 폴리펩티드 제품을 포함하는 제제는 적어도 100 mg/mL 또는 적어도 150 mg/mL의 농도의 폴리펩티드를 포함한다. 적어도 100 mg/mL 또는 적어도 150 mg/mL의 폴리펩티드 제품 (예를 들어, 항체, 예컨대 IgG1 항체)을 포함하는 제제는 또한 허용되는 색일 수 있다. 이러한 제제는 개체 (한 측면에서, 인간임)에 대한 주사, 예컨대 피하 주사에 적합할 수 있다. 일부 측면에서, 주사에 적합한 폴리펩티드 약물 제품은 적어도 100 mg/mL, 적어도 125 mg/mL 또는 적어도 150 mg/mL 초과 농도이고, COC 검정에 의해 측정시에 B3, B4, B5, B6, B7, B8 또는 B9 초과 색 강도를 갖는다. COC 검정에 의해 결정된 바와 같은 색 강도 값은 갈색 (B), 갈색빛-황색 (BY), 황색 (Y), 녹색빛-황색 (GY) 또는 적색 (R) 중 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되지는 않는 것으로 이해되며, 여기서 보다 높은 값은 보다 밝은 색 강도를 나타낸다. 일부 측면에서, 주사에 적합한 폴리펩티드 약물 제품은 적어도 100 mg/mL, 적어도 125 mg/mL 또는 적어도 150 mg/mL 초과 농도이고, 색 검정 (예를 들어, 전체 색 검정 또는

NIFTY 검정)에 의해 측정시에 참조 용액의 색 강도 값 미만의 색 강도 값을 갖는다. 본원에 제공된 바와 같은 제제는 폴리펩티드 제품의 25% 또는 20% 또는 18% 또는 15% 또는 10% 이하가 폴리펩티드 전하 변이체 (한 측면에서, 산성 전하 변이체임)인 폴리펩티드 제품을 포함할 수 있다. 본원에 상세히 기재된 바와 같은 제제는 또한 폴리펩티드 제품의 적어도 75% 또는 80% 또는 85% 또는 90% 또는 95% 또는 그 초과가 주요 종 단백질인 폴리펩티드 제품을 포함할 수 있다. 특징한 변형법에서, 폴리펩티드 (예를 들어, 항체) 제품을 포함하는 제제가 제공되며, 여기서 제제는 100 mg/mL 초과 또는 125 mg/mL 초과 또는 150 mg/mL 초과의 농도의 폴리펩티드 제품을 포함하고, 제제는 허용되는 색이며, 폴리펩티드 제품의 25% 또는 20% 또는 18% 또는 15% 또는 10% 이하가 폴리펩티드 전하 변이체 (한 측면에서, 산성 전하 변이체임)이다.

[0015]

세포 배양 배지 및 하나 이상의 다른 성분, 예컨대 세포 및/또는 바람직한 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)를 포함하는 조성물이 또한 제공된다. 조성물은 세포 배양의 임의의 및 모든 기, 예컨대 시딩, 세포 성장 및 세포 생산/유기 기를 포괄한다. 한 변형법에서, (a) 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포; 및 (b) 본원에 제공된 바와 같은 세포 배양 배지를 포함하는 조성물이 제공된다. 또 다른 변형법에서 (a) 폴리펩티드; 및 (b) 본원에 제공된 바와 같은 세포 배양 배지를 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 한 측면에서 폴리펩티드는 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포에 의해 배지로 분비되거나 또는 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포의 용해에 의해 배지로 방출된다. 세포 및 배지의 각각의 및 모든 조합이 구체적이며 개별적으로 열거되는 것과 같이, 조성물의 세포는 본원에 상세히 기재된 임의의 세포 (예를 들어, CHO 세포)일 수 있고, 조성물의 세포 배양 배지는 본원에 상세히 기재된 임의의 배지일 수 있다. 마찬가지로, 폴리펩티드 및 배지의 각각의 및 모든 조합이 구체적이며 개별적으로 열거되는 것과 같이, 조성물의 폴리펩티드는 본원에 상세히 기재된 임의의 폴리펩티드일 수 있고, 조성물의 배지는 본원에 상세히 기재된 임의의 배지일 수 있다.

[0016]

세포를 본원에 상세히 기재된 바와 같은 세포 배양 배지와 접촉시킴으로써 세포를 성장시키는 (즉, 세포를 배양하는) 방법이 제공된다. 세포를 성장시키는 (즉, 세포를 배양하는) 방법의 특징한 변형법에서, 세포 배양 배지는 CDM이다. 한 변형법에서, 세포를 성장시키는 (즉, 세포를 배양하는) 방법은 (a) 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴; (b) 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2; (c) 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6; (d) 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9; 및 (e) 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12를 포함하는 세포 배양 배지와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 세포 배양 배지는 하기 성분 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다: (1) 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 또는 황산제1철 (한 측면에서, 약 2 μ M 내지 약 80 μ M의 농도로 존재함), 및 (2) 히드로코르티손 (한 측면에서, 약 0.05 μ M 내지 약 0.25 μ M의 농도로 존재함). 또 다른 변형법에서, (a) 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴; (b) 약 2 μ M 내지 약 80 μ M 시트르산제2철; 및 (c) 약 0.05 μ M 내지 약 0.5 μ M 히드로코르티손을 포함하는 세포 배양 배지와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 세포 배양 배지는 하기 성분: (1) 비타민 B2 (한 측면에서, 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L의 농도로 존재함); (2) 비타민 B6 (한 측면에서, 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L의 농도로 존재함); (3) 비타민 B9 (한 측면에서, 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L의 농도로 존재함); 및 (4) 비타민 B12 (한 측면에서, 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L의 농도로 존재함) 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있는 것인, 세포를 성장시키는 (즉, 세포를 배양하는) 방법이 제공된다. 본원에 제공된 세포를 성장시키는 (즉, 세포를 배양하는) 임의의 방법에서, 세포는 세포 배양 배지와 세포의 성장기 및/또는 생산기 동안 접촉할 수 있다. 세포를 본원에 상세히 기재된 배지와 세포 배양의 임의의 기에서, 예컨대 세포 성장, 생산 및 유지 동안 접촉시키는 것이 고려된다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 세포는 폴리펩티드의 생산을 포함하며, 세포 유지 및/또는 성장을 촉진하는 조건 (예를 들어, 온도, pH, 오스몰랄농도 등) 하에 본원에 상세히 기재된 바와 같은 배지와 접촉시킨다.

[0017]

본 발명의 또 다른 변형법에서, 세포를 성장시키는 (즉, 세포를 배양하는) 방법은 (a) 약 0.8 mM (일부 실시양태에서, 0.7 mM) 내지 약 2.5 mM 시스틴; (b) 약 0.11 μ M 내지 약 0.72 μ M 비타민 B2; (c) 약 4.5 μ M 내지 약 30.0 μ M 비타민 B6; (d) 약 3.4 μ M 내지 약 22.0 μ M 비타민 B9; 및 (e) 약 0.2 μ M 내지 약 1.5 μ M 비타민 B12를 포함하는 세포 배양 배지와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 세포 배양 배지는 하기 성분 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다: (1) 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 또는 황산제1철 (한 측면에서, 약 11.0 μ M 내지 약 36.0 μ M의 농도로 존재함), (2) 비타민 B1 (한 측면에서, 약 2.0 μ M 내지 약 14.0 μ M의 농도로 존재함), (3) 비타민 B3 (한 측면에서, 약 11.0 μ M 내지 약 72.0 μ M의 농도로 존재함), (4) 비타민 B5 (한 측면에서, 약 6.8 μ M 내지 약 44.0 μ M의 농도로 존재함), 및 (5) 비타민 B7 (한 측면에서, 약 0.02 μ M 내지 약 0.24 μ M의 농도로 존재함).

[0018] 본 발명의 또 다른 변형법에서, 세포를 성장시키는 (즉, 세포를 배양하는) 방법은 약 0.7 mM 내지 약 2.5 mM 시스틴; 약 2 μ M 내지 약 80 μ M 시트르산제2철; 약 0.05 μ M 내지 약 0.5 μ M 히드로코르티손; 약 0.11 μ M 내지 약 0.72 μ M 비타민 B2; 약 4.5 μ M 내지 약 30.0 μ M 비타민 B6; 약 3.4 μ M 내지 약 22.0 μ M 비타민 B9; 및 약 0.2 μ M 내지 약 1.5 μ M 비타민 B12를 포함하는 세포 배양 배지와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 세포 배양 배지는 하기 성분 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다: (1) 비타민 B1 (한 측면에서, 약 2.0 μ M 내지 약 14.0 μ M의 농도로 존재함), (2) 비타민 B3 (한 측면에서, 약 11.0 μ M 내지 약 72.0 μ M의 농도로 존재함), (3) 비타민 B5 (한 측면에서, 약 6.8 μ M 내지 약 44.0 μ M의 농도로 존재함), 및 (4) 비타민 B7 (한 측면에서, 약 0.02 μ M 내지 약 0.24 μ M의 농도로 존재함).

[0019] 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포를 세포 배양 배지에서 성장시킴으로써 (즉, 세포 배양 배지에서 배양함으로써) 폴리펩티드를 생산하는 방법이 또한 제공되며, 여기서 (a) 세포는 폴리펩티드를 발현하고, (b) 세포 배양 배지는 (1) 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴; (2) 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2; (3) 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6; (4) 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9; 및 (5) 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12를 포함하며, 여기서 세포 배양 배지는 하기 성분 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다: (A) 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 또는 황산제1철 (한 측면에서, 약 2 μ M 내지 약 80 μ M의 농도로 존재함) 및 (B) 히드로코르티손 (한 측면에서, 약 0.05 μ M 내지 약 0.25 μ M의 농도로 존재함). 또 다른 변형법에서, 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포를 세포 배양 배지에서 성장시킴으로써 (즉, 세포 배양 배지에서 배양함으로써) 폴리펩티드를 생산하는 방법이 제공되며, 여기서 (a) 세포는 폴리펩티드를 발현하고, (b) 세포 배양 배지는 (1) 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴; (2) 약 2 μ M 내지 약 80 μ M 시트르산제2철; 및 (3) 약 0.05 μ M 내지 약 0.5 μ M 히드로코르티손을 포함하며, 여기서 세포 배양 배지는 하기 성분 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다: (A) 비타민 B2 (한 측면에서, 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L의 농도로 존재함); (B) 비타민 B6 (한 측면에서, 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L의 농도로 존재함); (C) 비타민 B9 (한 측면에서, 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L의 농도로 존재함); 및 (D) 비타민 B12 (한 측면에서, 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L의 농도로 존재함).

[0020] 본 발명의 또 다른 변형법에서, 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포를 세포 배양 배지에서 성장시킴으로써 (즉, 세포 배양 배지에서 배양함으로써) 폴리펩티드를 생산하는 방법이 또한 제공되며, 여기서 (a) 세포는 폴리펩티드를 발현하고, (b) 세포 배양 배지는 (a) 약 0.8 mM (일부 실시양태에서, 0.7 mM) 내지 약 2.5 mM 시스틴; (b) 약 0.11 μ M 내지 약 0.72 μ M 비타민 B2; (c) 약 4.5 μ M 내지 약 30.0 μ M 비타민 B6; (c) 약 3.4 μ M 내지 약 22.0 μ M 비타민 B9; 및 (d) 약 0.2 μ M 내지 약 1.5 μ M 비타민 B12를 포함하며, 여기서 세포 배양 배지는 하기 성분 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다: (1) 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 또는 황산제1철 (한 측면에서, 약 11.0 μ M 내지 약 36.0 μ M의 농도로 존재함), (2) 비타민 B1 (한 측면에서, 약 2.0 μ M 내지 약 14.0 μ M의 농도로 존재함), (3) 비타민 B3 (한 측면에서, 약 11.0 μ M 내지 약 72.0 μ M의 농도로 존재함), (4) 비타민 B5 (한 측면에서, 약 6.8 μ M 내지 약 44.0 μ M의 농도로 존재함), 및 (5) 비타민 B7 (한 측면에서, 약 0.02 μ M 내지 약 0.24 μ M의 농도로 존재함).

[0021] 본 발명의 또 다른 변형법에서, 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포를 세포 배양 배지에서 성장시킴으로써 (즉, 세포 배양 배지에서 배양함으로써) 폴리펩티드를 생산하는 방법이 또한 제공되며, 여기서 (a) 세포는 폴리펩티드를 발현하고, (b) 세포 배양 배지는 약 0.7 mM 내지 약 2.5 mM 시스틴; 약 2 μ M 내지 약 80 μ M 시트르산제2철; 약 0.05 μ M 내지 약 0.5 μ M 히드로코르티손; 약 0.11 μ M 내지 약 0.72 μ M 비타민 B2; 약 4.5 μ M 내지 약 30.0 μ M 비타민 B6; 약 3.4 μ M 내지 약 22.0 μ M 비타민 B9; 및 약 0.2 μ M 내지 약 1.5 μ M 비타민 B12를 포함하며, 여기서 세포 배양 배지는 하기 성분 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다: (1) 비타민 B1 (한 측면에서, 약 2.0 μ M 내지 약 14.0 μ M의 농도로 존재함), (2) 비타민 B3 (한 측면에서, 약 11.0 μ M 내지 약 72.0 μ M의 농도로 존재함), (3) 비타민 B5 (한 측면에서, 약 6.8 μ M 내지 약 44.0 μ M의 농도로 존재함), 및 (4) 비타민 B7 (한 측면에서, 약 0.02 μ M 내지 약 0.24 μ M의 농도로 존재함).

[0022] 본원에 기재된 방법에 의해 생산되거나 또는 조성물에 존재하는 폴리펩티드는 한 변형법에서 항체, 예컨대 IgG1 항체일 수 있다. 한 측면에서, 본원에 기재된 방법에 의해 생산되거나 또는 조성물에 존재하는 폴리펩티드는 항-VEGF, 항-메소텔린, 항-PCSK9 또는 항-베타7 항체이다. 본원에 제공된 방법에 따라 생산되거나 또는 기재된 조성물에 존재하는 폴리펩티드는 세포 배양 배지로부터 단리될 수 있고, 추가로 정제될 수 있다. 폴리펩티드 (예컨대, 항체)는 또한 농축되어 원하는 농도를 달성할 수 있다. 폴리펩티드를 농축시키는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 폴리펩티드 또는 단백질의 농도는 한외여과를 이용하여 증가시킬 수 있다. 특정한

변형법에서, 폴리펩티드는 적어도 100 mg/mL 또는 150 mg/mL의 농도로 단리되고/거나 무색 또는 약간 유색의 액체로 나타난다. 특정한 변형법에서, 조성물은 적어도 100 mg/mL의 농도의 단리된 폴리펩티드를 포함하고/거나 무색 또는 약간 유색의 액체로 나타난다. 또 다른 변형법에서, 조성물은 적어도 1 mg/mL 또는 10 mg/mL 또는 50 mg/mL 또는 75 mg/mL의 농도의 단리된 폴리펩티드를 포함하고/거나 무색 또는 약간 유색의 액체로 나타난다. 또 다른 변형법에서, 조성물은 적어도 약 1 mg/mL 또는 10 mg/mL 또는 50 mg/mL 또는 75 mg/mL 중 어느 하나의 농도의 단리된 폴리펩티드를 포함하고/거나 무색 또는 약간 유색의 액체로 나타난다. 또 다른 변형법에서, 조성물은 적어도 약 1 mg/mL 또는 10 mg/mL 또는 50 mg/mL 또는 75 mg/mL 내지 약 125 mg/mL 또는 내지 약 150 mg/mL 중 어느 하나의 농도의 단리된 폴리펩티드를 포함하고/거나 무색 또는 약간 유색의 액체로 나타난다. 또한, 본원에 상세히 기재된 방법에 의해 수득한 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물이 기재된다.

[0023]

(a) 세포 배양 배지 중에 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴을 제공하는 양의 시스틴; (b) 세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2를 제공하는 양의 비타민 B2; (c) 세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6을 제공하는 양의 비타민 B6; (d) 세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9를 제공하는 양의 비타민 B9; 및 (e) 세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12를 제공하는 양의 비타민 B12를 포함하며, 하기 성분: (1) 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 또는 황산제1철 (한 측면에서, 약 2 μ M 내지 약 80 μ M의 농도의 철 공급원을 제공하는 양임) 및 (2) 히드로코르티손 (한 측면에서, 약 0.05 μ M 내지 약 0.25 μ M의 농도의 히드로코르티손을 제공하는 양임) 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있는, 세포 배양 배지를 화학적으로 규정된 구성성분으로 보충하기 위한 키트가 또한 기재된다. 또 다른 변형법에서, (a) 세포 배양 배지 중에 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴을 제공하는 양의 시스틴; (b) 세포 배양 배지 중에 약 2 μ M 내지 약 80 μ M 시트르산제2철의 농도를 제공하는 양의 시트르산제2철; 및 (c) 세포 배양 배지 중에 약 0.05 μ M 내지 약 0.5 μ M 히드로코르티손의 농도를 제공하는 양의 히드로코르티손을 포함하며, 하기 성분: (1) 비타민 B2 (한 측면에서, 세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L의 비타민 B2를 제공하는 양임); (2) 비타민 B6 (한 측면에서, 세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L의 비타민 B6을 제공하는 양임); (3) 비타민 B9 (한 측면에서, 세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L의 비타민 B9를 제공하는 양임); 및 (4) 비타민 B12 (한 측면에서, 세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L의 비타민 B12를 제공하는 양임) 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있는, 세포 배양 배지를 화학적으로 규정된 구성성분으로 보충하기 위한 키트가 기재된다. 또한, (a) 세포 배양 배지 중에 약 0.8 mM (일부 실시양태에서, 0.7 mM) 내지 약 2.5 mM 시스틴을 제공하는 양의 시스틴; (b) 세포 배양 배지 중에 약 0.11 μ M 내지 약 0.72 μ M 비타민 B2를 제공하는 양의 비타민 B2; (c) 세포 배양 배지 중에 약 4.5 μ M 내지 약 30.0 μ M 비타민 B6을 제공하는 양의 비타민 B6; (d) 세포 배양 배지 중에 약 3.4 μ M 내지 약 22.0 μ M 비타민 B9를 제공하는 양의 비타민 B9; 및 (e) 세포 배양 배지 중에 약 0.2 μ M 내지 약 1.5 μ M 비타민 B12를 제공하는 양의 비타민 B12를 포함하며, 하기 성분: (1) 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 또는 황산제1철 (한 측면에서, 세포 배양 배지 중에 약 11.0 μ M 내지 약 36.0 μ M을 제공하는 양임), (2) 비타민 B1 (한 측면에서, 세포 배양 배지 중에 약 2.0 μ M 내지 약 14.0 μ M을 제공하는 양), (3) 비타민 B3 (한 측면에서, 세포 배양 배지 중에 약 11.0 μ M 내지 약 72.0 μ M을 제공하는 양임), (4) 비타민 B5 (한 측면에서, 세포 배양 배지 중에 약 6.8 μ M 내지 약 44.0 μ M을 제공하는 양임), 및 (5) 비타민 B7 (한 측면에서, 세포 배양 배지 중에 약 0.02 μ M 내지 약 0.24 μ M을 제공하는 양임) 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있는, 세포 배양 배지를 화학적으로 규정된 구성성분으로 보충하기 위한 키트가 본원에 제공된다. 키트는 또한 사용을 위한 지침서, 배지 (예를 들어, CDM)를 제공하고/거나 및/또는 세포 배양 시스템으로부터 폴리펩티드 (항체 포함)를 생산하기 위한 지침서를 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024]

도 1은 다양한 세포 배양 조건 하에 배양된 세포주로부터 단리된 항체 샘플에 대한 COC 검정을 입증하는 그림이다. 좌측으로부터 우측으로, 바이알은 I) 화학적으로 규정되지 않은 배지; II) 기초 배지 1 및 공급 배지 2; III) 기초 배지 1 및 공급 배지 2; IV) 기초 배지 5 및 공급 배지 4; V) 기초 배지 5 및 공급 배지 2; VI) 시스틴 대신에 시스테인을 함유하는 변형된 기초 배지 3 및 공급 배지 4; VII) 기초 배지 3 및 공급 배지 4; 및 VIII) 시스틴 대신에 시스테인을 함유하는 변형된 기초 배지 3 및 공급 배지 4에서 배양된 세포로부터 단리된 항체를 갖는 제제를 함유한다. COC 값은 바이알 위에 도시된다. 모든 바이알은 대략 150 g/L 단백질을 함유한다. 제제 III, IV 및 VI는 NIFTY 검정에 의해 측정시에 각각 1.59, 1.47 및 0.71의 색 강도 값을 가졌다. 제제 III, IV 및 VI는 전체 색 검정에 의해 측정시에 각각 2.62, 2.04 및 1.00의 색 강도 값을 가졌다.

도 2는 기초 배지 1 및 공급 배지 2와 비교하여 기초 배지 3 및 공급 배지 4와 인큐베이션된 세포 배양물에서의 세포 수 및 항체 생산의 약간의 감소를 보여주는 일련의 그래프이다. A 및 C) 전체 배양물 부피의 퍼센트로서 표현된 충전 세포 부피 (PCV)에 의해 측정된 바와 같은 인큐베이션 기간에 걸친 배양물에서의 세포 수. B 및 D) 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정되고 항체 역가로 표현된 바와 같은 인큐베이션 기간에 걸친 세포 배양물에서의 항체 생산.

도 3은 다양한 수준의 비타민 B2, 비타민 B6 및 비타민 B9를 비타민 B12와 함께 함유하는 화학적으로 규정된 배지 (CDM)에서 성장한 세포 배양물에 의한 생산적 세포 바이오매스 및 항체 생산에 대한 효과를 입증하는 일련의 그래프이다. A) 전체 배양물 부피의 퍼센트로서 표현된 충전 세포 부피 (PCV)에 의해 측정된 바와 같은 배양물에서의 생산적 바이오매스. B) 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정되고 항체 역가로서 표현된 바와 같은 세포로부터의 항체 생산. 비타민 B2의 경우에, -1은 0.25 mg/L 기초 및 0 mg/L 공급을 나타내고, 1은 1.41 mg/L 및 10 mg/L 공급을 나타내고; 비타민 B6의 경우에, -1은 5.35 mg/L 기초 (피리독신) 및 0 mg/L 공급을 나타내고, 1은 0 mg/L 기초 및 60 mg/L 공급에서의 피리독살과 조합된 15.42 mg/L 기초 및 7 mg/L 공급에서의 피리독신을 나타내고; 비타민 B9의 경우에, -1은 8.61 mg/L 기초 및 0 mg/L 공급을 나타내고, 1은 9.93 mg/L 기초 및 197 mg/L 공급을 나타내고; 비타민 B12의 경우에, -1은 1.76 mg/L 기초 및 0 mg/L 공급을 나타내고, 1은 3.05 mg/L 기초 및 48 mg/L 공급을 나타낸다. 중앙선은 데이터로부터 유도된 선형 모델로부터 계산된 예측값을 나타낸다. 상부 및 하부 선은 예측의 95% 신뢰 구간을 나타낸다.

도 4는 다양한 수준의 비타민 B2, 비타민 B6 및 비타민 B9를 비타민 B12와 함께 함유하는 CDM에서 성장한 세포 배양물로부터 단리된 항체의 색 강도를 보여주는 일련의 그래프이다. 색 강도는 색 검정으로 결정하였으며, 여기서 보다 높은 수치 값은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 수치 값은 보다 낮은 색 강도를 나타낸다. 비타민 B2의 경우에, -1은 0.25 mg/L 기초 및 0 mg/L 공급을 나타내고, 1은 1.41 mg/L 기초 및 10 mg/L 공급을 나타내고; 비타민 B6의 경우에, -1은 5.35 mg/L 기초 (피리독신) 및 0 mg/L 공급을 나타내고, 1은 0 mg/L 기초 및 60 mg/L 공급에서의 피리독살과 조합된 15.42 mg/L 기초 및 7 mg/L 공급에서의 피리독신을 나타내고; 비타민 B9의 경우에, -1은 8.61 mg/L 기초 및 0 mg/L 공급을 나타내고, 1은 9.93 mg/L 기초 및 197 mg/L 공급을 나타내고; 비타민 B12의 경우에, -1은 1.76 mg/L 기초 및 0 mg/L 공급을 나타내고, 1은 3.05 mg/L 기초 및 48 mg/L 공급을 나타낸다.

도 5 A-C)는 증가하는 농도의 황산제1철을 함유하는 CDM에서 성장한 세포 배양물로부터 단리된 항체의 생산적 세포 바이오매스, 항체 생산, 및 색 강도를 보여주는 일련의 그래프이다. A) 시간 경과에 따른 충전 세포 부피 (IVPCV)에 의해 측정된 바와 같은 배양물에서의 생산적 바이오매스. B) 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정된 바와 같은 세포로부터의 항체 생산. C) 색 검정에 의해 측정된 바와 같은 세포로부터 단리된 항체의 색 강도 (여기서, 보다 높은 수치 값은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 수치 값은 보다 낮은 색 강도를 나타냄). 막대는 데이터의 보다 높은 및 보다 낮은 정도 및 평균을 나타낸다. D)는 시험관내 실험에서 증가하는 농도의 황산제1철을 함유하는 배지에서 인큐베이션된 항체의 색 강도를 보여주는 그래프이다.

도 6은 증가하는 농도의 철을 함유하고 다양한 철 공급원을 사용하는 CDM에서 성장한 세포 배양물로부터 단리된 항체의 생산적 세포 바이오매스, 항체 생산, 및 색 강도를 보여주는 일련의 그래프이다. A) 시간 경과에 따른 충전 세포 부피 (IVPCV)에 의해 측정된 바와 같은 배양물에서의 생산적 바이오매스. B) 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정된 바와 같은 세포로부터의 항체 생산. C) 색 검정에 의해 측정된 바와 같은 세포로부터 단리된 항체의 색 강도 (여기서, 보다 높은 수치 값은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 수치 값은 보다 낮은 색 강도를 나타냄). 막대는 데이터의 보다 높은 및 보다 낮은 정도 및 평균을 나타낸다. D-E)는 변화하는 농도의 상이한 철 공급원 및 감소된 비타민 B 수준을 함유하는 CDM에서 성장한 세포 배양물로부터 단리된 항체의 항체 생산 및 색 강도를 보여준다. 플러스 기호는 낮은 비타민 조건을 나타내고, 빈 구체는 높은 비타민 조건을 나타낸다. D) 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정된 바와 같은 세포로부터의 항체 생산. E) NIFTY 검정에 의해 측정된 바와 같은 세포로부터 단리된 항체의 색 강도 (여기서, 보다 높은 수치 값은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 수치 값은 보다 낮은 색 강도를 나타냄).

도 7은 시험관내 실험에서 카탈라제의 부재 또는 존재 하에 변화하는 농도의 황산제1철 또는 비타민 B2를 함유하는 CDM에서 인큐베이션된 항체의 색 강도를 보여주는 일련의 그래프이다. A) 카탈라제의 부재 하의 항체의 색 강도. B) 카탈라제의 존재 하의 항체의 색 강도. 색 검정에 의해 측정된 바와 같은 색 강도 (여기서, 보다 높은 수치 값은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 수치 값은 보다 낮은 색 강도를 나타냄). 황산제1철의 경우에, -1은 18 μ M 기초 및 0 μ M 공급을 나타내고, 1은 75 μ M 기초 및 0 μ M 공급을 나타내고; 비타민 B2의 경우에, -1은 0.25 mg/L 기초 및 0 mg/L 공급을 나타내고, 1은 1.41 mg/L 및 10 mg/L 공급을 나타낸다.

중앙선은 데이터로부터 유도된 선형 모델로부터 계산된 예측값을 나타낸다. 상부 및 하부 선은 예측의 95% 신뢰 구간을 나타낸다.

도 8은 A) 변형된 기초 배지 1 및 공급 배지 2 (빈 구체)와 비교하여 변형된 기초 배지 3 및 공급 배지 4 (플러스 기호)에서 성장한 세포 배양물로부터 수득한 항체 용액에서의 감소된 색 강도 및 산성 전하 변이체의 감소된 존재 사이의 상관관계를 보여주는 그래프이다. 변형된 배지 1은 10 μ M, 18 μ M 또는 75 μ M 황산제1철을 함유하였다. 변형된 배지 3은 10 μ M 또는 18 μ M 시트르산제2철을 함유하였다. B) 75 μ M 황산제1철 (플러스 기호)과 비교하여 18 μ M 황산제1철 (빈 구체)을 함유하는 배지에서 성장한 세포 배양물로부터 수득한 항체 용액에서의 감소된 색 강도 및 산성 전하 변이체의 감소된 존재 사이의 상관관계를 보여주는 그래프. C) 변화하는 수준의 비타민 B2, B6, B9 및 B12를 함유하는 배지에서 성장한 세포 배양물로부터 수득한 항체 용액에서의 감소된 색 강도 및 산성 전하 변이체의 감소된 존재 사이의 상관관계를 보여주는 그래프. 비타민 B 수준은 낮은 농도 (빈 구체), 중간 농도 (플러스 기호) 또는 높은 농도 (빈 다이아몬드)로 동시에 변화하였다. 색 검정에 의해 측정된 바와 같은 색 강도 (여기서, 보다 높은 수치 값은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 수치 값은 보다 낮은 색 강도를 나타냄). 항체 용액에서의 산성 전하 변이체의 퍼센트를 이온 교환 크로마토그래피에 의해 결정하였다.

도 9는 감소된 농도의 비타민 B2 및 비타민 B6을 함유하는 배지에서 성장한 세포 배양물로부터 수득한 항체 용액에서의 감소된 색 강도 및 산성 전하 변이체의 감소된 존재 사이의 상관관계를 보여주는 일련의 그래프이다. A) 색 검정에 의해 측정된 바와 같은 세포로부터 단리된 항체의 색 강도 (여기서, 보다 높은 수치 값은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 수치 값은 보다 낮은 색 강도를 나타냄). B) 이온 교환 크로마토그래피에 의해 결정된 바와 같은 항체 용액에서의 산성 전하 변이체 퍼센트. 비타민 B2의 경우에, -1은 0.25 mg/L 기초 및 0 mg/L 공급을 나타내고, 1은 1.41 mg/L 기초 및 10 mg/L 공급을 나타내고; 비타민 B6의 경우에, -1은 5.35 mg/L 기초 (피리독신) 및 0 mg/L 공급을 나타내고, 1은 0 mg/L 기초 및 60 mg/L 공급에서의 피리독살과 조합된 15.42 mg/L 기초 및 7 mg/L 공급에서의 피리독신을 나타낸다.

도 10은 변화하는 농도의 피리독살을 갖는 시트르산제2철 대 황산제1철을 함유하는 기초 배지에서 성장한 세포 배양물로부터 수득한 항체 용액에서의 감소된 색 강도 및 산성 전하 변이체의 감소된 존재를 보여주는 일련의 그래프이다. A) 색 검정에 의해 측정된 바와 같은 세포로부터 단리된 항체의 색 강도 (여기서, 보다 높은 수치 값은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 수치 값은 보다 낮은 색 강도를 나타냄). B) 이온 교환 크로마토그래피에 의해 측정된 바와 같은 항체 용액에서의 산성 전하 변이체 퍼센트. 피리독살의 경우에, -1은 0 mg/L 기초 및 0 mg/L 공급을 나타내고, 1은 0 mg/L 기초 및 60 mg/L 공급을 나타낸다. 시트르산제2철 또는 황산제1철은 기초 배지에 18 μ M으로 존재하였다.

도 11은 공급 배지에서 변화하는 농도의 비타민 B2, B6, B9 및 B12를 갖는 시트르산제2철 대 황산제1철을 함유하는 기초 배지에서 성장한 세포 배양물로부터 수득한 항체 용액에서의 감소된 색 강도 및 산성 전하 변이체의 수준을 보여주는 일련의 그래프이다. A) 색 검정에 의해 측정된 바와 같은 세포로부터 단리된 항체의 색 강도 (여기서, 보다 높은 수치 값은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 수치 값은 보다 낮은 색 강도를 나타냄). B) 이온 교환 크로마토그래피에 의해 측정된 바와 같은 항체 용액에서의 산성 전하 변이체 퍼센트. 수준 1은 비타민 B2, B6, B9 및 B12를 함유하지 않는 공급 배지를 나타낸다. 수준 2는 10 mg/L 비타민 B2, 7 mg/L 피리독신, 60 mg/L 피리독살, 197 mg/L 비타민 B9 및 48 mg/L 비타민 B12를 함유하는 공급 배지를 나타낸다. 수준 3은 5 mg/L 비타민 B2, 3.5 mg/L 피리독신, 30 mg/L 피리독살, 98.5 mg/L 비타민 B9 및 24 mg/L 비타민 B12를 함유하는 공급 배지를 나타낸다. 시트르산제2철 또는 황산제1철은 기초 배지에 18 μ M으로 존재하였다.

도 12는 바람직하게는 철 공급원으로서 황산제1철 대신 시트르산제2철을 사용하는 감소된 농도의 철을 함유하는 기초 배지에서 성장한 세포 배양물로부터 수득한 항체 용액에서의 감소된 색 강도 및 감소된 수준의 산성 전하 변이체를 보여주는 일련의 그래프이다. A) 색 검정에 의해 측정된 바와 같은 세포로부터 단리된 항체의 색 강도 (여기서, 보다 높은 수치 값은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 수치 값은 보다 낮은 색 강도를 나타냄). B) 이온 교환 크로마토그래피에 의해 측정된 바와 같은 항체 용액에서의 산성 전하 변이체 퍼센트.

도 13은 감소된 농도의 시트르산제2철을 함유하는 기초 배지에서 성장한 세포 배양물로부터 수득한 항체 용액에서의 감소된 색 강도 및 감소된 수준의 산성 전하 변이체를 보여주는 일련의 그래프이다. A) 색 검정에 의해 측정된 바와 같은 세포로부터 단리된 항체의 색 강도 (여기서, 보다 높은 수치 값은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 수치 값은 보다 낮은 색 강도를 나타냄). B) 이온 교환 크로마토그래피에 의해 측정된 바와 같은 항체 용액에서의 산성 전하 변이체 퍼센트. *는 지시된 농도의 시트르산제2철을 함유하도록 변형된 기초

배지 1을 나타낸다. ‡는 지시된 농도의 시트르산제2철을 함유하도록 변형된 기초 배지 3을 나타낸다. ○은 33℃에서 배양된 세포로부터 단리된 항체 용액을 나타낸다. +는 37℃에서 배양된 세포로부터 단리된 항체 용액을 나타낸다.

도 14는 시스테인 대신에 시스틴을 첨가하고 히드로코르티손의 존재 하에 감소된 농도의 비타민 B2, B6, B9 및 B12를 함유하는 기초 배지에서 성장한 세포 배양물로부터 수득한 항체 용액에서의 감소된 색 강도 및 감소된 수준의 산성 전하 변이체를 보여주는 일련의 그래프이다. A) 색 검정에 의해 측정된 바와 같은 세포로부터 단리된 항체의 색 강도 (여기서, 보다 높은 수치 값은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 수치 값은 보다 낮은 색 강도를 나타냄). B) 이온 교환 크로마토그래피에 의해 측정된 바와 같은 항체 용액에서의 산성 전하 변이체 퍼센트. *는 1.41 mg/L 비타민 B2, 15.42 mg/L 피리독신, 0 mg/L 피리독살, 9.93 mg/L 비타민 B9 및 3.05 mg/L 비타민 B12를 함유하는 기초 배지를 나타낸다. ‡는 0.7 mg/L 비타민 B2, 7.7 mg/L 피리독신, 0 mg/L 피리독살, 4.9 mg/L 비타민 B9 및 1.5 mg/L 비타민 B12를 함유하는 기초 배지를 나타낸다. ○은 480 mg/L 시스틴을 나타낸다. △는 525 mg/L 시스테인을 나타낸다. 히드로코르티손은 지시된 용액에 150 nM으로 존재한다.

도 15는 색 강도에 대한 COC 검정 측정값과 비교하여 전체 색 검정 및 NIFTY 검정 측정값 사이의 상관관계를 보여주는 일련의 그래프이다. A) 전체 색 및 NIFTY 값을 COC 값을 나타내는 기호로 플롯팅하였다. B) 단백질 A 풀 및 상응하는 약물 물질 제제에서 NIFTY 검정에 의한 색 측정값을 COC 값을 나타내는 기호로 플롯팅하였다. C) 단백질 A 풀 및 상응하는 약물 물질 제제에서 전체 색 검정에 의한 색 측정값을 COC 값을 나타내는 기호로 플롯팅하였다. 빈 구체는 ≤B3의 COC 값을 나타내고; 빈 다이아몬드는 ≤B4 또는 BY4의 COC 값을 나타내고; 플러스 기호는 ≤B5 또는 BY5의 COC 값을 나타내고; DS NIFTY 및 DS 전체 색은 최종 약물 물질 제제에서 상응하는 검정 값을 나타내고; ProA NIFTY 및 ProA 전체 색은 단백질 A 풀에서 상응하는 검정 값을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025]

세포 배양 배지 및 세포 성장 (즉, 세포 배양) 및 폴리펩티드 생산에 배지를 사용하는 방법이 기재된다. 기재된 방법에 의해 생산된 폴리펩티드 (항체 포함)가 또한 제공된다. 배지 및 배지를 포함하는 조성물을 제조하기 위한 키트, 및 기재된 방법에 의해 생산된 세포 및/또는 폴리펩티드를 포함하는 조성물이 또한 제공된다. 적어도 100 mg/mL, 적어도 125 mg/mL 또는 적어도 150 mg/mL 초과 농도의 폴리펩티드를 포함하며 색, 단백질 및 색조(Color, Opalescence and Coloration) (COC) 검정에 의해 측정시에 B3, B4, B5, B6, B7, B8 또는 B9 초과 색 강도 값을 갖는 제약 조성물이 기재된다. 적어도 1 mg/mL, 적어도 10 mg/mL, 적어도 25 mg/mL, 적어도 50 mg/mL 또는 적어도 75 mg/mL 초과 농도의 폴리펩티드를 포함하며 COC 검정에 의해 측정시에 B3, B4, B5, B6, B7, B8 또는 B9 초과 색 강도 값을 갖는 제약 조성물이 또한 기재된다. COC 검정에 대한 참조 표준은 B, BY, Y, GY 또는 R 중 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되지는 않는 것으로 이해되며, 여기서 보다 높은 값은 보다 밝은 색 강도를 나타낸다. 또한, 적어도 100 mg/mL, 적어도 125 mg/mL 또는 적어도 150 mg/mL 초과 농도의 폴리펩티드를 포함하며 색 검정 (예를 들어, 전체 색 검정 또는 NIFTY 검정)에 의해 측정시에 참조 용액의 색 강도 값보다 낮은 색 강도 값을 갖는 제약 조성물이 제공된다. 또한, 적어도 1 mg/mL, 적어도 10 mg/mL, 적어도 25 mg/mL, 적어도 50 mg/mL 또는 적어도 75 mg/mL 초과 농도의 폴리펩티드를 포함하며 색 검정 (예를 들어, 전체 색 검정 또는 NIFTY 검정)에 의해 측정시에 참조 용액의 색 강도 값보다 낮은 색 강도 값을 갖는 제약 조성물이 본원에 제공된다. 또한, 폴리펩티드-함유 용액 (예를 들어, 항체-함유 용액)에서 색을 평가하는 방법이 제공된다. 특정한 변형법에서, 배지, 방법, 키트 및 조성물은 CDM을 포함한다.

[0026]

폴리펩티드 생산에 사용되는 특정 세포 배양 배지 (예를 들어, CDM)는 허용되는 품질 특성을 갖는 폴리펩티드 약물 제품을 제공하는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, 특정 CDM은 폴리펩티드 약물 제품의 색 강도를 조정하는 것으로 밝혀졌으며, CDM에서 생산된 폴리펩티드는 CDM의 사용과 연관된 이점을 유지하면서 (예를 들어, 주사가 가능한 약물 제품으로 사용하기 위해) 허용되는 색을 제공한다. 이러한 CDM은 폴리펩티드 생산의 방법에 사용되는 경우에 상이한 배지 (예를 들어, 본원에 상세히 기재된 바와 같은 배지 성분 및/또는 성분의 양을 포함하지 않는 배지)에서 생산된 폴리펩티드와 비교하여 폴리펩티드 약물 제품의 색 강도를 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 세포 배양 배지는 화학적으로 규정되거나 또는 화학적으로 규정되지 않은 것일 수 있다.

[0027]

이론에 제한되지 않고, 특정 농도의 특정한 배지 성분 (예컨대 시스틴 및/또는 시스테인, 특정 B 비타민, 히드로코르티손 및/또는 철 공급원)의 사용은 허용되는 품질 특성, 특히 허용되는 색을 갖는 폴리펩티드 약물 제품을 생산하는 것으로 여겨진다. 세포 성장에 사용되는 기초 배지 중의 이들 배지 성분의 사용이 특히 폴리펩티드 약물 제품의 품질 특성에 영향을 미치는 것으로 여겨질지라도, 본원에 제공된 바와 같은 배지는 기초 및 공

급 배지에서서를 포함하며 세포 성장, 유지 및 폴리펩티드 생산 공정의 임의의 단계에서 이용될 수 있을 것으로 고려된다. 본원에 제공된 배지는 세포를 성장시키는 (즉, 세포를 배양하는) 방법 및 폴리펩티드의 생산에 사용될 수 있으며, 목적하는 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포의 성장기, 유지기 및/또는 생산기에 있어 그의 용도가 발견될 수 있다. 본원에 기재된 배지를 이용하여 폴리펩티드 약물 제품의 하나 이상의 특성 (예를 들어, 색, 조성물, 순도 등) 또는 폴리펩티드 생산 방법의 하나 이상의 측면 (예를 들어, 회분-대-회분 재현가능성, 제작의 용이성, 제작 비용 등)을 개선시킬 수 있다. 본원에 제공된 배지를 사용하는 세포 배양에 의해 생산된 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)가 기재된다. 한 측면에서, 폴리펩티드는 적어도 100 mg/mL, 적어도 125 mg/mL 또는 적어도 150 mg/mL 초과 농도이고, COC 검정에 의해 측정시에 B3, B4, B5, B6, B7, B8 또는 B9 초과 색 강도 값을 갖는다. 또 다른 측면에서, 폴리펩티드는 적어도 1 mg/mL, 적어도 10 mg/mL, 적어도 25 mg/mL, 적어도 50 mg/mL 또는 적어도 75 mg/mL 초과 농도이고, COC 검정에 의해 측정시에 B3, B4, B5, B6, B7, B8 또는 B9 초과 색 강도 값을 갖는다. 일부 측면에서, COC 검정에 의해 결정된 바와 같은 색 강도 값은 B, BY, Y, GY 또는 R 중 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되지는 않으며, 여기서 보다 높은 값은 보다 밝은 색 강도를 나타낸다. 본원에 상세히 기재된 폴리펩티드 제품을 투여하는 방법, 및 본원에 제공된 바와 같은 폴리펩티드 제품을 포함하는 제조품이 또한 기재된다.

- [0028] 정의
- [0029] 본원에 사용되는 경우에, 달리 명백하게 나타내지 않는 한, 단수형 용어의 사용은 하나 이상을 지칭한다.
- [0030] 본원에서 "약" 값 또는 파라미터에 대한 언급은 그 값 또는 파라미터 자체에 대한 실시양태를 포함(하고 이를 기재)한다. 예를 들어, "약 X"를 언급하는 기재는 "X"의 기재를 포함한다. 수치 범위는 그 범위를 규정하는 숫자를 포함한다.
- [0031] "전하 변이체"는 주요 종 단백질의 전하보다 상이한 전하를 갖는 주요 종 단백질 (예를 들어, 항체)의 변이체이다.
- [0032] "산성 전하 변이체"는 주요 종 단백질 (예를 들어, 항체)보다 산성인 주요 종 단백질 (예를 들어, 항체)의 변이체이다. 산성 변이체는 주요 종 단백질 (예를 들어, 항체)이 비해 음성 전하를 획득하였거나 양성 전하를 상실하였다. 이러한 산성 전하 변이체는 전하에 따라 단백질을 분리하는 분리 방법론, 예컨대 이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 해석될 수 있다.
- [0033] 본원에서 용어 "주요 종 단백질"은 조성물에서 정량적으로 우세한 단백질 (예를 들어, 항체) 분자인 조성물 내의 단백질 (예를 들어, 항체) 아미노산 서열 구조를 지칭한다.
- [0034] 세포를 "배양하는 것"은 세포의 생존 및/또는 성장에 적합한 조건 하에 세포를 세포 배양 배지와 접촉시키는 것을 지칭한다.
- [0035] "회분 배양"은 세포 배양을 위한 모든 성분 (세포 및 모든 배양 영양소 포함)이 배양 과정의 시작 시점에 배양 용기에 공급되는 배양을 지칭한다.
- [0036] 본원에 사용된 어구 "유가식 세포 배양"은 세포 및 배양 배지가 처음에 배양 용기에 공급되고, 추가의 배양 영양소가 배양 종결 전에 주기적으로 세포 및/또는 제품을 수확하거나 또는 수확하지 않으면서 배양 과정 동안 배양물에 연속적으로 또는 불연속적 증분으로 공급되는 회분 배양을 지칭한다.
- [0037] "관류 배양"은 세포가, 예를 들어 여과, 캡슐화, 마이크로담체에 대한 고정 등에 의해 배양물에서 제한되는 배양이고, 배양 배지는 배양 용기로부터 연속적으로 또는 간헐적으로 도입되고 제거된다.
- [0038] "배양 용기"는 세포를 배양하는데 사용되는 용기를 지칭한다. 배양 용기는 세포 배양에 적합한 한 임의의 크기일 수 있다.
- [0039] "역가": 본원에 사용된 용어 "역가"는 주어진 양의 배지 부피에 의해 나눈 세포 배양물에 의해 생산된 제조품적으로 발현된 폴리펩티드의 총량을 지칭한다. 역가는 전형적으로 배지의 밀리리터당 폴리펩티드의 밀리그램의 단위로 표현된다.
- [0040] 용어 "배지" 및 "세포 배양 배지"는 세포의 성장 또는 유지에 사용되는 영양소 공급원을 지칭한다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 영양소 공급원은 성장 및/또는 생존을 위해 세포가 요구하는 성분을 함유할 수 있거나 또는 세포 성장 및/또는 생존에 도움을 주는 성분을 함유할 수 있다. 비타민, 필수 또는 비필수 아미노산, 및 미량 원소가 배지 성분의 예이다.

- [0041] "화학적으로 규정된 세포 배양 배지" 또는 "CDM"은 동물-유래 생성물, 예컨대 동물 혈청 및 펩톤을 포함하지 않는 명시된 조성을 갖는 배지이다. 용어는 또한 규정되지 않은 또는 부분적으로 규정된 성분, 예를 들어 성분, 예컨대 동물 혈청, 동물 펩톤 및 식물 펩톤을 포함하는 않는 명시된 조성을 갖는 배지를 포괄한다. 당업자가 이해하는 바와 같이, CDM은 세포를 CDM과 접촉시키고 폴리펩티드를 CDM으로 분비시킴으로써 폴리펩티드를 생산하는 과정에 사용될 수 있다. 따라서, 조성물은 CDM 및 폴리펩티드 제품을 함유할 수 있고, 폴리펩티드 제품의 존재가 CDM을 화학적으로 규정되지 않도록 만드는 것은 아닌 것으로 이해된다.
- [0042] "화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지"는 그의 화학적 조성이 특정될 수 없고, 하나 이상의 동물-유래 제품, 예컨대 동물 혈청 및 펩톤을 함유할 수 있는 배지를 지칭한다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지는 영양소 공급원으로서 동물-유래 제품을 함유할 수 있다. 용어는 또한 규정되지 않은 또는 부분적으로 규정되지 않은 성분, 예를 들어 성분, 예컨대 동물 혈청, 동물 펩톤 및 식물 펩톤을 포함하는 세포 배양 배지를 포괄한다.
- [0043] 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 본원에서 교환가능하게 사용되며, 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 지칭한다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 변형된 아미노산을 포함할 수 있으며, 비-아미노산이 개재될 수 있다. 또한 이 용어는 자연적으로, 또는 간접, 예를 들어 디설파이드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화 또는 임의의 다른 조작 또는 변형, 예컨대 표지 성분과의 집합에 의해 변형된 아미노산 중합체를 포함한다. 또한 상기 정의에는, 예를 들어 하나 이상의 아미노산 유사체 (예를 들어, 비천연 아미노산 등 포함) 뿐만 아니라 당업계에 공지된 다른 변형을 함유하는 폴리펩티드가 포함된다. 본원에서 정의 내에 포괄되는 폴리펩티드의 예는 포유동물 단백질, 예컨대 예를 들어 레닌; 성장 호르몬, 예를 들어 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지단백질; 알파-1-항트립신; 인슐린 A-쇄; 인슐린 B-쇄; 프로인슐린; 여포 자극 호르몬; 칼시토닌; 황체화 호르몬; 글루카곤; 응고 인자, 예컨대 인자 VIIIC, 인자 IX, 조직 인자 및 폰 빌레브란트 인자; 항-응고 인자, 예컨대 단백질 C; 심방 나트륨이뇨 인자; 폐 계면활성제; 플라스미노겐 활성화인자, 예컨대 우로키나제 또는 인간 소변 또는 조직-유형 플라스미노겐 활성화제 (t-PA); 붓배신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 종양 괴사 인자-알파 및 -베타; 엔케팔리나제; RANTES (정상적으로 발현 및 분비된 T-세포의 활성화시에 조절됨); 인간 대식세포 염증성 단백질 (MIP-1-알파); 혈청 알부민, 예컨대 인간 혈청 알부민; 펠러-역제 물질; 렐라신 A-쇄; 렐라신 B-쇄; 프로렐라신; 마우스 고나도트로핀-연관 펩티드; 미생물 단백질, 예컨대 베타-락타마제; DNase; IgE; 세포독성 T-림프구 연관 항원 (CTLA), 예컨대 CTLA-4; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자 (VEGF); 호르몬 또는 성장 인자에 대한 수용체; 단백질 A 또는 D; 류마티스 인자; 신경영양 인자, 예컨대 골-유래 신경영양 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-유래 성장 인자 (PDGF); 섬유모세포 성장 인자, 예컨대 aFGF 및 bFGF; 표피 성장 인자 (EGF); 형질전환 성장 인자 (TGF), 예컨대 TGF-알파 및 TGF-베타, 예를 들어 TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 또는 TGF- β 5; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II (IGF-I 및 IGF-II); des(1-3)-IGF-I (너 IGF-I), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 (IGFBP); CD 단백질, 예컨대 CD3, CD4, CD8, CD19 및 CD20; 에리트로포이에틴; 골유도 인자; 면역독소; 골 형태발생 단백질 (BMP); 인터페론, 예컨대 인터페론-알파, -베타 및 -감마; 콜로니 자극 인자 (CSF), 예를 들어, M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF; 인터류킨 (IL), 예를 들어 IL-1 내지 IL-10; 슈퍼옥사이드 디스뮤타제; T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 붓괴 촉진 인자; 바이러스 항원, 예컨대 예를 들어 AIDS 외피 일부; 수송 단백질; 귀소 수용체; 어드레신; 조절 단백질; 인테그린, 예컨대 CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 및 VCAM; 종양 연관 항원, 예컨대 CA125 (난소암 항원) 또는 HER2, HER3 또는 HER4 수용체; 이뮤노어드헤신; 및 상기-열거된 단백질 중 임의의 것의 단편 및/또는 변이체, 뿐만 아니라 예를 들어 상기-열거된 단백질 중 임의의 것을 포함하는 단백질에 결합하는 항체, 예를 들어 항체 단편을 포함한다.
- [0044] "단리된 폴리펩티드"는 폴리펩티드가 발현되는 세포 또는 세포 배양물로부터 회수된 폴리펩티드를 의미한다.
- [0045] "핵산"은 본원에서 교환가능하게 사용되며, 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체를 지칭하고, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 변형 뉴클레오타이드 또는 염기 및/또는 그의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라제에 의해, 또는 합성 반응에 의해 중합체 내로 혼입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대 메틸화 뉴클레오타이드 및 그의 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 존재하는 경우에 중합체의 어셈블리 이전 또는 이후에 부여될 수 있다.
- [0046] "단리된 핵산"은 그의 통상의 컨텍스트의 외부의 또는 그로부터 분리된 비-자연 발생, 재조합 또는 자연 발생

서열을 의미하고, 이를 포괄한다.

- [0047] "정제된" 폴리펩티드는 폴리펩티드가 이들이 그의 천연 환경에서 존재하는 경우보다 더 순수한 형태로 존재하도록 및/또는 실험실 조건 하에 최초로 생산되고/거나 합성되고/거나 증폭되는 경우에 증가된 순도를 갖는 것을 의미한다. 순도는 상대적 용어이고, 반드시 절대 순도를 의미하지는 않는다.
- [0048] 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 모노클로날 항체 (전장 모노클로날 항체 포함), 폴리클로날 항체, 다중-특이적 항체 (예를 들어, 이중-특이적 항체) 및 항체 단편을 포함한다.
- [0049] "항체 단편"은 전장 항체의 일부, 일반적으로 그의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 단일-쇄 항체 분자; 디아바디; 선형 항체; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중 특이적 항체를 포함한다.
- [0050] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 즉 상기 집단에 포함된 개별 항체는 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이어서, 단일 항원 부위에 대해 지시된다. 추가로, 전형적으로 상이한 결정기 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 통상의 (폴리클로날) 항체 제제와는 반대로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대해 지시된다. 수식어 "모노클로날"은 항체의 특징이 실질적으로 동종의 항체 집단으로부터 수득된 것임을 나타내며, 임의의 특정한 방법에 의한 항체 생산이 필요하다는 것으로 해석되어서는 안 된다. 예를 들어, 본 개시내용에 따라 사용하고자 하는 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature 256:495 (1975)]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법에 의해 만들 수 있거나 또는 재조합 DNA 방법에 의해 만들 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조). "모노클로날 항체"는 또한 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) 및 Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리할 수 있다.
- [0051] "인간화" 항체는 비-인간 항체로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체인 비-인간 (예를 들어, 설치류) 항체의 형태이다. 대부분의 경우에, 인간화 항체는 수용자의 추가변 영역의 잔기가 목적하는 항체 특이성, 친화도 및 능력을 보유하는 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류와 같은 비-인간 종 (공여자 항체)의 추가변 영역의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기가 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에 없는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능이 추가로 개선되도록 한다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 추가변 루프는 비-인간 이뮤노글로불린의 것에 상응하며, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 것이다. 임의로, 인간화 항체는 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 것도 또한 포함할 것이다. 보다 상세한 내용은 문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조한다.
- [0052] "중-의존성 항체"는 제2 포유동물 종으로부터의 항원의 상동체에 대한 것보다, 제1 포유동물 종으로부터의 항원에 대해 더 강한 결합 친화도를 갖는 항체이다. 통상적으로, 중-의존성 항체는 인간 항원에 "특이적으로 결합" (즉, 약 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 이하, 약 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 이하 또는 약 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 이하의 결합 친화도 (Kd) 값을 가짐)하지만, 제2 비-인간 포유동물 종으로부터의 항원의 상동체에 대한 결합 친화도는 비-인간 항원에 대한 그의 결합 친화도보다 적어도 약 50배, 적어도 약 500배, 또는 적어도 약 1000배 더 약하다. 중-의존성 항체는 상기 정의된 바와 같은 임의의 다양한 유형의 항체일 수 있으나, 바람직하게는 인간화 또는 인간 항체이다.
- [0053] "오염물"은 바람직한 폴리펩티드 제품과 상이한 물질을 지칭한다. 오염물은 비제한적으로 숙주 세포 물질, 예컨대 CHOP; 침출된 단백질 A; 핵산; 바람직한 폴리펩티드의 변이체, 단편, 응집체 또는 유도체; 또 다른 폴리펩티드; 내독소; 바이러스 오염물; 세포 배양 배지 성분 등을 포함한다.
- [0054] 용어 "제약 제제"는 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적일도록 하는 형태로 존재하고, 제제가 투여될 대상체에 게 허용되는 않는 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다. 이러한 제제는 멸균된다.
- [0055] "멸균" 제제는 무균성이거나, 또는 모든 살아있는 미생물 및 그의 포자가 없거나, 실질적으로 없다.
- [0056] "무색 또는 약간 유색의" 액체는 정량적 및/또는 정성적 분석에 의해 측정된 폴리펩티드를 포함하는 액체 조성물을 지칭한다. 정성적 분석은 육안 검사, 예컨대 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 참조 표준에 비교하는 것을

포함한다.

[0057] 실시양태가 표현 "포함하는"을 사용하여 본원에 기재된 경우에, "~로 이루어진" 및/또는 "~로 본질적으로 이루어진"과 관련하여 기재된 다른 유사한 실시양태가 또한 제공되는 것으로 이해된다.

[0058] 본 발명의 측면 또는 실시양태를 마쿠쉬 군 또는 다른 대안적 그룹화의 방법으로 기재한 경우에, 본 발명은 전체로서 열거한 전체 군 뿐만 아니라 군의 각 구성원을 개별적으로, 및 주요 군의 모든 가능한 하위군 뿐만 아니라 하나 이상의 군 구성원이 없는 주요 군을 포괄한다. 본 발명은 또한 본 발명의 특허청구범위에서 하나 이상의 임의의 군 구성원이 명시적으로 배제된 것도 고려한다.

[0059] 세포 배양 배지

[0060] 본원에 제공된 세포 배양 배지는 본원에 상세히 기재된 바와 같은 방법 (예를 들어, 세포를 성장시키는 (즉, 세포를 배양하는) 방법 및 폴리펩티드를 생산하는 방법) 및 조성물에서 그의 용도가 발견될 수 있다. 배지 성분은 허용되는 품질 특성, 예컨대 (예를 들어, 주사가능한 약물 제품으로 사용하기 위해) 허용되는 색을 갖는 폴리펩티드 약물 제품을 제공할 수 있는 것으로 확인되었다. 특정 배지 성분은 상이한 배지에서 생산된 폴리펩티드와 비교하여 폴리펩티드 약물 제품의 색 강도를 감소시키며, 이는 100 mg/mL 또는 125 mg/mL 또는 150 mg/mL 중 어느 것 초과 농도에서 제제화된 폴리펩티드 제품의 경우에 특히 유의할 수 있다. 일부 측면에서, 폴리펩티드 약물 제품은 적어도 100 mg/mL, 적어도 125 mg/mL 또는 적어도 150 mg/mL 초과 농도이고, COC 검정에 의해 측정시에 B3, B4, B5, B6, B7, B8 또는 B9 초과 색 강도 값을 갖는다. 일부 측면에서, 폴리펩티드 약물 제품은 적어도 1 mg/mL, 적어도 10 mg/mL, 적어도 25 mg/mL, 적어도 50 mg/mL 또는 적어도 75 mg/mL 초과 농도이고, COC 검정에 의해 측정시에 B3, B4, B5, B6, B7, B8 또는 B9 초과 색 강도 값을 갖는다. 일부 측면에서, COC 검정에 의해 결정된 바와 같은 색 강도 값은 B, BY, Y, GY 또는 R 중 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되지는 않고, 여기서 보다 높은 값은 보다 밝은 색 강도를 나타낸다. 일부 측면에서, 폴리펩티드 약물 제품은 적어도 100 mg/mL, 적어도 125 mg/mL 또는 적어도 150 mg/mL 초과 농도이고, 색 검정 (예를 들어, 전체 색 검정 또는 NIFTY 검정)에 의해 측정시에 참조 용액의 색 강도 값보다 낮은 색 강도 값을 갖는다. 일부 측면에서, 폴리펩티드 약물 제품은 적어도 1 mg/mL, 적어도 10 mg/mL, 적어도 25 mg/mL, 적어도 50 mg/mL 또는 적어도 75 mg/mL 초과 농도이고, 색 검정 (예를 들어, 전체 색 검정 또는 NIFTY 검정)에 의해 측정시에 참조 용액의 색 강도 값보다 낮은 색 강도 값을 갖는다. 적합한 세포 배양 배지는 전반적으로, 예를 들어 본 발명의 간단한 개요 및 다른 곳에서 상세히 기재된다. 본원에 상세히 기재된 임의의 배지는 세포 성장, 유지 및 폴리펩티드 생산의 임의의 단계에서 사용될 수 있고, 기초 배지 및/또는 공급 배지에 사용될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 배지는 한 변형법에서 허용되는 세포 생존율 및 항체 역가 수준, 및 배지에서 성장한 세포 배양물로부터 단리된 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)의 허용되는 색 강도를 발생시킨다.

[0061] 하기 성분 중 하나 이상을 포함하는 세포 배양 배지가 제공된다: (a) 시스틴 및/또는 시스테인; (b) 비타민 B2, (c) 비타민 B6 (피리독신 및/또는 피리독살), (d) 비타민 B9, (e) 비타민 B12, (f) 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 및 (g) 히드로코르티손. 한 변형법에서, 세포 배양 배지는 성분 (a), (b), (c), (d), (e), (f) 및 (g) 중 2 또는 3 또는 4 또는 5 또는 6개 또는 각각을 포함한다. 본원에 제공된 세포 배양 배지는 각각의 모든 조합이 구체적이고 개별적으로 열거되는 것과 같이 성분 (a), (b), (c), (d), (e), (f) 및 (g)의 임의의 조합을 함유할 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 성분 (a), (b), (c), (d), (e), (f) 및 (g) 중 4개를 포함하는 세포 배양 배지는 성분 중 적어도 4개가 존재하는 한 성분의 임의의 조합을 포함할 수 있는 것으로 이해된다. 한 측면에서, 세포 배양 배지는 CDM이다. 또 다른 측면에서, 세포 배양 배지는 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지이다.

[0062] 배지 성분은 당업계에 공지된 형태로 조성물에 제공될 수 있다. 예를 들어, 비타민 B2는 리보플라빈 분말로 제공될 수 있고, 비타민 B6은 피리독신 HCl 또는 피리독살 HCl로 제공될 수 있고, 비타민 B9는 폴산 분말로 제공될 수 있고, 비타민 B12는 시아노코발라민 분말로 제공될 수 있고, 시스테인은 L-시스테인 모노히드로클로라이드 1수화물 분말로 제공될 수 있고, 시스틴은 이나트륨 염 1수화물 분말로 제공될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비타민 B6은 피리독살 HCl로 제공되지 않는다. 추가의 비제한적 예에서, 비타민 B1은 티아민 모노히드로클로라이드로 제공될 수 있고, 비타민 B3은 니아신아미드로 제공될 수 있고, 비타민 B5는 D-칼슘 판토테네이트로 제공될 수 있고, 비타민 B7은 비오틴으로 제공될 수 있다. 또 다른 비제한적 예로서, 철은 상이한 철 형태 또는 철 공급원으로 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 철 공급원은 시트르산제2철 또는 황산제1철이다. 본원에 기재된 배지 성분은 염, 수화물, 염 수화물의 형태로, 또는 용액, 추출물로서, 또는 고체 형태로 제공될 수 있다.

[0063] 한 변형법에서, 배지는 시스틴 및 각각의 비타민 B2, B6, B9 및 B12를 포함한다. 한 변형법에서, 배지는 시스틴, 비타민 B2, B6, B9, B12, 및 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철을 포함한다. 또 다른 변형법에서, 배지는 각각의 시스틴, 비타민 B2, B6, B9, B12, 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철, 및 히드로코르티손을 포함한다. 추가의 변형법에서, 배지는 시스틴, 히드로코르티손 및 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철을 포함한다. 또 다른 변형법에서, 배지는 시스틴, 히드로코르티손, 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철, 및 비타민 B2, B6, B9 및 B12 중 적어도 하나를 포함한다. 또 다른 변형법에서, 배지는 시스틴, 히드로코르티손, 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철, 및 비타민 B2, B6, B9 및 B12 중 적어도 2개를 포함한다. 또 다른 변형법에서, 배지는 시스틴, 히드로코르티손, 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철, 및 비타민 B2, B6, B9 및 B12 중 적어도 3개를 포함한다. 본원에 기재된 임의의 배지에서, 한 측면에서 배지는 CDM이다. 한 측면에서, 세포 배양 배지는 시스테인을 포함한다. 또 다른 변형법에서, 세포 배양 배지는 시스틴을 포함하고, 시스테인을 포함하지 않는다. 또 다른 변형법에서, 세포 배양 배지는 시스틴 및 시스테인을 둘 다 포함한다.

[0064] 한 변형법에서, 배지는 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴, 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2, 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6, 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9 및 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12를 포함하는 세포 배양 배지이다. 한 변형법에서, 비타민 B2는 약 0.05 mg/L 내지 약 0.50 mg/L의 농도이다. 또 다른 변형법에서, 비타민 B2는 약 0.05 mg/L 내지 약 0.40 mg/L의 농도이다. 또 다른 변형법에서, 비타민 B2는 약 0.05 mg/L 내지 약 0.30 mg/L의 농도이다. 한 변형법에서, 비타민 B6은 약 0.05 mg/L 내지 약 8.0 mg/L의 농도이다. 또 다른 변형법에서, 비타민 B6은 약 0.05 mg/L 내지 약 7.0 mg/L의 농도이다. 또 다른 변형법에서, 비타민 B6은 약 0.05 mg/L 내지 약 6.0 mg/L의 농도이다. 한 변형법에서, 세포 배양 배지는 철 공급원을 추가로 포함한다. 한 변형법에서, 철 공급원은 시트르산제2철 또는 황산제1철이다. 한 변형법에서, 세포 배양 배지는 약 2 μ M 내지 약 80 μ M의 농도의 시트르산제2철을 포함한다. 본원의 임의의 변형법에서, 세포 배양 배지는 히드로코르티손을 추가로 포함한다. 한 변형법에서, 히드로코르티손은 약 0.05 μ M 내지 약 0.25 μ M의 농도이다.

[0065] 또 다른 변형법에서, 세포 배양 배지는 하기 중 하나 이상을 포함한다: (a) 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴 및/또는 시스테인 (한 측면에서, 시스틴임); (b) 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2; (c) 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6 (한 측면에서, 피리독신임); (d) 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9; (e) 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12; (f) 약 2 μ M 내지 약 80 μ M의 철 공급원, 예컨대 질산철, 시트르산철 또는 황산철 (한 측면에서, 시트르산제2철 및/또는 황산제1철임); 및 (g) 약 0.05 μ M 내지 약 0.25 μ M 히드로코르티손. 또 다른 변형법에서, 세포 배양 배지는 하기 중 하나 이상을 포함한다: (a) 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 600 mg/L 시스틴 및/또는 시스테인 (한 측면에서, 시스틴임); (b) 약 0.05 mg/L 내지 약 0.5 mg/L 비타민 B2; (c) 약 2.0 mg/L 내지 약 8.0 mg/L 비타민 B6 (한 측면에서, 피리독신임); (d) 약 4.0 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9; (e) 약 1.0 내지 약 2.0 mg/L 비타민 B12; (f) 약 5 μ M 내지 약 25 μ M의 철 공급원, 예컨대 질산철, 시트르산철 또는 황산철 (한 측면에서, 시트르산제2철 및/또는 황산제2철임); 및 (g) 약 0.1 μ M 내지 약 0.2 μ M 히드로코르티손. 또 다른 변형법에서, 세포 배양 배지는 하기 중 하나 이상을 포함한다: (a) 약 400 mg/L 내지 약 500 mg/L 시스틴 및/또는 시스테인 (한 측면에서, 시스틴임); (b) 약 0.1 mg/L 내지 약 0.3 mg/L 비타민 B2; (c) 약 4.0 mg/L 내지 약 6.0 mg/L 비타민 B6 (한 측면에서, 피리독신임); (d) 약 7.0 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B9; (e) 약 1.5 내지 약 2.0 mg/L 비타민 B12; (f) 약 12 μ M 내지 약 20 μ M의 철 공급원, 예컨대 질산철, 시트르산철 또는 황산철 (한 측면에서, 시트르산제2철 및/또는 황산제2철임); 및 (g) 약 0.125 μ M 내지 약 0.175 μ M 히드로코르티손. 한 변형법에서, 세포 배양 배지는 본원에 언급된 농도의 성분 (a), (b), (c), (d), (e), (f) 및 (g) 중 2 또는 3 또는 4 또는 5 또는 6개 또는 각각을 포함한다. 세포 배양 배지는 본원에 제공된 각각의 모든 조합이 구체적이고 개별적으로 열거되는 것과 같이 농도 범위의 성분 (a), (b), (c), (d), (e), (f) 및 (g)의 임의의 조합을 함유할 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 배지는 한 변형법에서 성분 (a), (b), (c), (d) 및 (e)를 포함하고, 임의로 성분 (f) 및/또는 (g)를 포함할 수 있는 것으로 이해된다. 또한, 또 다른 변형법에서, 배지는 성분 (a), (f) 및 (g)를 포함하고, 임의로 성분 (b), (c), (d) 및 (e) 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있는 것으로 이해된다. 배지가 시스틴 또는 시스테인을 포함하는 임의의 변형법에서, 한 측면에서 배지는 시스틴을 포함한다 (및 추가의 변형법에서 시스테인을 포함하지 않음). 배지가 비타민 B6을 포함하는 임의의 변형법에서, 한 측면에서 배지는 피리독신을 포함하고, 배지가 철 공급원을 포함하는 임의의 변형법에서, 한 측면에서 철 공급원은 시트르산제2철이다. 따라서, 특정 변형법에서, 배지는 시스틴, 피리독신 및 시트르산제2철을 포함하는 것으로 이해된다. 한 측면에서, 세포 배양 배지는 CDM이다.

[0066] 한 변형법에서, 배지는 (a) 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴; (b) 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2; (c) 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6; (d) 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9; 및 (e) 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12를 포함한다. 한 변형법에서, 배지는 (a) 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴; (b) 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2; (c) 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6; (d) 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9; (e) 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12; 및 (f) 약 2 μ M 내지 약 80 μ M의 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 또는 황산제1철을 포함한다. 또 다른 변형법에서, 배지는 (a) 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴; (b) 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2; (c) 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6; (d) 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9; (e) 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12; (f) 약 2 μ M 내지 약 80 μ M의 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 또는 황산제1철; 및 (g) 약 0.05 μ M 내지 약 0.25 μ M 히드로코르티손 각각을 포함한다. 추가의 변형법에서, 배지는 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴; 약 2 μ M 내지 약 80 μ M의 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 또는 황산제1철; 및 약 0.05 μ M 내지 약 0.25 μ M 히드로코르티손을 포함한다. 또 다른 변형법에서, 배지는 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴; 약 2 μ M 내지 약 80 μ M의 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 또는 황산제1철; 약 0.05 μ M 내지 약 0.25 μ M 히드로코르티손, 및 적어도 1 또는 2 또는 3개의 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2; 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6; 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9; 및 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12를 포함한다. 본원에 기재된 임의의 배지에서, 한 측면에서 배지는 CDM이다. 본원에 기재된 임의의 배지에서, 한 측면에서 배지는 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지이다.

[0067] 일부 추가의 변형법에서, 세포 배양 배지는 시스테인을 표 1에 기재된 바와 같은 양으로 추가로 포함한다. 예를 들어, (a) 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴; (b) 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2; (c) 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6; (d) 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9; 및 (e) 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12를 포함하는 세포 배양 배지는 약 80 mg/L 내지 약 1500 mg/L 시스테인을 추가로 포함할 수 있는 것으로 이해된다. 한 변형법에서, (a) 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴; (b) 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2; (c) 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6; (d) 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9; (e) 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12; 및 (f) 약 2 μ M 내지 약 80 μ M의 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 또는 황산제1철을 포함하는 세포 배양 배지는 약 80 mg/L 내지 약 1500 mg/L 시스테인을 추가로 포함할 수 있다. 일부 변형법에서, (a) 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴; (b) 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2; (c) 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6; (d) 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9; (e) 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12; (f) 약 2 μ M 내지 약 80 μ M의 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 또는 황산제1철; 및 (g) 약 0.05 μ M 내지 약 0.25 μ M 히드로코르티손을 포함하는 세포 배양 배지는 약 80 mg/L 내지 약 1500 mg/L 시스테인을 추가로 포함할 수 있다. 또 다른 변형법에서, 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴; 약 2 μ M 내지 약 80 μ M의 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 또는 황산제1철; 약 0.05 μ M 내지 약 0.25 μ M 히드로코르티손, 및 적어도 1 또는 2 또는 3개의 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2; 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6; 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9; 및 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12를 포함하는 세포 배양 배지는 약 80 mg/L 내지 약 1500 mg/L 시스테인을 추가로 포함할 수 있다.

[0068] 개별 배지 성분은 하나 이상의 유리한 특성 (예컨대, 하나 이상의 허용되는 제품 품질 특성)을 나타내는 양으로 존재할 수 있다. 한 변형법에서, 본원에 제공된 바와 같은 세포 배양 배지는 표 1에 기재된 바와 같은 양의 배지 성분을 함유한다. 배지는 성분 및 양의 각각의 및 모든 조합이 구체적으로 개별적으로 열거되는 것과 같이 표 1의 배지 성분 중 어느 하나 이상 (예를 들어, 성분 (a)-(g) 중 어느 하나 이상, 예컨대 성분 (a), (b), (c), (d) 및 (e)를 포함하는 배지 또는 성분 (a), (f) 및 (g)를 포함하는 배지 또는 각각의 성분 (a)-(g)를 포함하는 배지)을 표 1에 열거된 임의의 양으로 포함할 수 있는 것으로 이해된다. 특정한 변형법에서, 배지는 CDM이다. 또 다른 특정한 변형법에서, 배지는 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지이다. 본원에 제공된 배지 (예를 들어, CDM)는 한 변형법에서 피리독신을 포함하고, 피리독살을 포함하지 않는다. 피리독살-무함유 배지는 기초 배지 및/또는 공급 배지에 사용될 수 있다. 한 변형법에서, 기초 배지는 피리독살을 포함하지 않고, 피리독신을 포함한다.

[0069] [표 1]

배지 성분의 예시적인 양

배지 성분	배지 중 성분의 양
(a) 시스틴 및/또는 시스테인 (한 변형법에서, 시스틴임)	약 80 mg/L 내지 약 1500 mg/L; 약 100 mg/L 내지 약 1500 mg/L; 약 200 mg/L 내지 약 1500 mg/L; 약 200 mg/L 내지 약 1400 mg/L; 약 200 mg/L 내지 약 1300 mg/L; 약 200 mg/L 내지 약 1200 mg/L; 약 300 mg/L 내지 약 1200 mg/L; 약 300 mg/L 내지 약 1100 mg/L; 약 300 mg/L 내지 약 1000 mg/L; 약 300 mg/L 내지 약 900 mg/L; 약 300 mg/L 내지 약 800 mg/L; 약 300 mg/L 내지 약 700 mg/L; 약 300 mg/L 내지 약 600 mg/L; 약 300 mg/L 내지 약 500 mg/L; 약 300 mg/L 내지 약 400 mg/L; 약 400 mg/L 내지 약 1500 mg/L; 약 500 mg/L 내지 약 1500 mg/L; 약 600 mg/L 내지 약 1500 mg/L; 약 700 mg/L 내지 약 1500 mg/L; 약 400 mg/L 내지 약 1200 mg/L; 약 500 mg/L 내지 약 1200 mg/L; 약 600 mg/L 내지 약 1200 mg/L; 약 700 mg/L 내지 약 1200 mg/L; 약 800 mg/L 내지 약 1200 mg/L; 약 900 mg/L 내지 약 1200 mg/L; 약 1000 mg/L 내지 약 1200 mg/L; 약 1100 mg/L 내지 약 1200 mg/L; 약 350 mg/L 내지 약 850 mg/L; 약 400 mg/L 내지 약 800 mg/L; 약 450 mg/L 내지 약 550 mg/L; 약 450 mg/L 내지 약 500 mg/L; 약 80 또는 81 또는 82 또는 83 또는 84 또는 85 또는 86 또는 87 또는 88 또는 90 또는 100 또는 120 또는 140 또는 160 또는 180 또는 200 또는 210 또는 220 또는 230 또는 240 또는 250 또는 260 또는 270 또는 280 또는 290 또는 300 또는 350 또는 375 또는 400 또는 425 또는 450 또는 475 또는 500 또는 525 또는 550 또는 575 또는 600 또는 625 또는 650 또는 675 또는 700 또는 725 또는 750 또는 765 또는 775 또는 785 또는 795 또는 800 또는 825 또는 850 또는 875 또는 900 또는 925 또는 950 또는 975 또는 1000 또는 1050 또는 1100 또는 1150 또는 1200 또는 1250 또는 1300 또는 1350 또는 1400 또는 1450 또는

[0070]

	또는 1500 mg/L; 적어도 약 80 또는 81 또는 82 또는 83 또는 84 또는 85 또는 86 또는 87 또는 88 또는 90 또는 100 또는 120 또는 140 또는 160 또는 180 또는 200 또는 210 또는 220 또는 230 또는 240 또는 250 또는 260 또는 270 또는 280 또는 290 또는 300 또는 350 또는 375 또는 400 또는 425 또는 450 또는 475 또는 500 또는 525 또는 550 또는 575 또는 600 또는 625 또는 650 또는 675 또는 700 또는 725 또는 750 또는 765 또는 775 또는 785 또는 795 또는 800 또는 825 또는 850 또는 875 또는 900 또는 925 또는 950 또는 975 또는 1000 또는 1050 또는 1100 또는 1150 또는 1200 또는 1250 또는 1300 또는 1350 또는 1400 또는 1450 또는 1500 mg/L.
(b) 비타민 B2	약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 0.9 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 0.8 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 0.7 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 0.6 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 0.5 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 0.4 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 0.3 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 0.2 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 0.1 mg/L; 약 0.1 mg/L 내지 약 1.0 mg/L; 약 0.2 mg/L 내지 약 1.0 mg/L; 약 0.3 mg/L 내지 약 1.0 mg/L; 약 0.4 mg/L 내지 약 1.0 mg/L; 약 0.5 mg/L 내지 약 1.0 mg/L; 약 0.6 mg/L 내지 약 1.0 mg/L; 약 0.7 mg/L 내지 약 1.0 mg/L; 약 0.8 mg/L 내지 약 1.0 mg/L; 약 0.9 mg/L 내지 약 1.0 mg/L; 약 0.1 mg/L 내지 약 0.6 mg/L; 약 0.2 mg/L 내지 약 0.4 mg/L; 약 0.2 mg/L 내지 약 0.3 mg/L; 약 0.05 또는 0.1 또는 0.15 또는 0.2 또는 0.25 또는 0.3 또는 0.35 또는 0.4 또는 0.45 또는 0.5 또는 0.55 또는 0.6 또는 0.65 또는 0.7 또는 0.75 또는 0.8 또는 0.85 또는 0.9 또는 0.95 또는 1.0 mg/L; 적어도 약 0.05 또는 0.1 또는 0.15 또는 0.2 또는 0.25 또는 0.3 또는 0.35 또는 0.4 또는 0.45 mg/L 및 0.7 또는 0.6 mg/L 이하.
(c) 비타민 B6 (한 측면에서, 피리독신임)	약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 9.5 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 9.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 8.5 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 8.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 7.5 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 7.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 6.5 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 6.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약

[0071]

	5.5 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 5.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 4.5 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 4.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 3.5 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 3.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 2.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 1.5 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L; 약 1.0 mg/L 내지 약 10.0 mg/L; 약 1.5 mg/L 내지 약 10.0 mg/L; 약 2.0 mg/L 내지 약 10.0 mg/L; 약 2.5 mg/L 내지 약 10.0 mg/L; 약 3.0 mg/L 내지 약 10.0 mg/L; 약 3.5 mg/L 내지 약 10.0 mg/L; 약 4.0 mg/L 내지 약 10.0 mg/L; 약 4.5 mg/L 내지 약 10.0 mg/L; 약 5.0 mg/L 내지 약 10.0 mg/L; 약 5.5 mg/L 내지 약 10.0 mg/L; 약 6.0 mg/L 내지 약 10.0 mg/L; 약 7.0 mg/L 내지 약 10.0 mg/L; 약 8.0 mg/L 내지 약 10.0 mg/L; 약 2.5 mg/L 내지 약 8.0 mg/L; 약 3.0 mg/L 내지 약 7.0 mg/L; 약 4.5 mg/L 내지 약 6.5 mg/L; 약 1.0 또는 2.0 또는 3.0 또는 3.5 또는 4.0 또는 4.5 또는 5.0 또는 5.5 또는 6.0 또는 6.5 또는 7.0 또는 8 mg/L; 적어도 약 2.0 또는 3.0 또는 4.0 또는 5.0 mg/L 및 7.0 또는 8.0 mg/L 이하.
(d) 비타민 B9	약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 11.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 9.5 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 9.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 8.5 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 8.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 7.5 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 7.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 6.5 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 6.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 5.5 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 5.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 4.5 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 4.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 3.5 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 3.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 2.0 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 1.5 mg/L; 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L; 약 1.0 mg/L 내지 약 12.0 mg/L; 약 1.5 mg/L 내지 약 12.0 mg/L; 약 2.0 mg/L 내지 약 12.0 mg/L; 약 2.5 mg/L 내지 약 12.0 mg/L; 약 3.0 mg/L 내지 약 12.0 mg/L; 약 3.5 mg/L 내지 약 12.0 mg/L; 약 4.0 mg/L 내지 약 12.0 mg/L; 약 4.5 mg/L 내지 약 12.0 mg/L; 약 5.0 mg/L 내지 약 12.0 mg/L; 약 5.5 mg/L 내지 약 12.0 mg/L; 약 6.0

[0072]

	mg/L 내지 약 12.0 mg/L; 약 7.0 mg/L 내지 약 12.0 mg/L; 약 8.0 mg/L 내지 약 10.0 mg/L; 약 3.0 mg/L 내지 약 10.0 mg/L; 약 4.0 mg/L 내지 약 9.0 mg/L; 약 7.0 mg/L 내지 약 10.0 mg/L; 약 1.0 또는 2.0 또는 3.0 또는 4.0 또는 4.5 또는 5.0 또는 5.5 또는 6.0 또는 6.5 또는 7.0 또는 7.5 또는 8 또는 8.5 또는 9.0 또는 9.5 또는 10 mg/L; 적어도 약 2.0 또는 3.0 또는 4.0 또는 5.0 또는 6.0 또는 7.0 또는 8.0 mg/L 및 12.0 또는 10.0 또는 9.0 mg/L 이하.
(e) 비타민 B12	약 0.05 내지 약 2.5 mg/L; 약 0.05 내지 약 2.25 mg/L; 약 0.05 내지 약 2.0 mg/L; 약 0.05 내지 약 1.75 mg/L; 약 0.05 내지 약 1.5 mg/L; 약 0.05 내지 약 1.25 mg/L; 약 0.05 내지 약 1.0 mg/L; 약 0.05 내지 약 0.75 mg/L; 약 0.05 내지 약 0.5 mg/L; 약 0.05 내지 약 0.25 mg/L; 약 0.5 내지 약 2.5 mg/L; 약 0.75 내지 약 2.5 mg/L; 약 1.0 내지 약 2.5 mg/L; 약 1.25 내지 약 2.5 mg/L; 약 1.5 내지 약 2.5 mg/L; 약 1.75 내지 약 2.5 mg/L; 약 2.0 내지 약 2.5 mg/L; 약 2.25 내지 약 2.5 mg/L; 약 0.5 내지 약 2.0 mg/L; 약 1.0 내지 약 2.0 mg/L; 약 1.25 내지 약 2.0 mg/L; 약 1.5 내지 약 2.25 mg/L; 약 0.75 내지 약 2.0 mg/L; 약 0.5 또는 1.0 또는 1.25 또는 1.5 또는 1.75 또는 2.0 또는 2.25 내지 약 2.5 mg/L; 적어도 약 0.5 또는 1.0 또는 1.25 또는 1.5, 및 2.25 또는 2.0 또는 1.75 mg/L 이하.
(f) 철 공급원, 예컨대 시트르산 제2철	약 2 μM 내지 약 80 μM; 약 2 μM 내지 약 40 μM; 약 2 μM 내지 약 30 μM; 약 2 μM 내지 약 25 μM; 약 2 μM 내지 약 20 μM; 약 2 μM 내지 약 15 μM; 약 2 μM 내지 약 10 μM; 약 10 μM 내지 약 50 μM; 약 15 μM 내지 약 50 μM; 약 20 μM 내지 약 50 μM; 약 25 μM 내지 약 50 μM; 약 30 μM 내지 약 50 μM; 약 40 μM 내지 약 50 μM; 약 10 μM 내지 약 40 μM; 약 10 μM 내지 약 30 μM; 약 10 μM 내지 약 25 μM; 약 15 μM 내지 약 25 μM; 약 15 μM 내지 약 20 μM; 약 5 또는

[0073]

	10 또는 15 또는 20 또는 25 또는 30 또는 35 또는 40 μM; 적어도 약 2 또는 5 또는 10 또는 12.5 또는 15 또는 17.5 및 약 30 또는 25 또는 20 μM 이하.
(g) 히드로코르티손	약 0.05 μM 내지 약 0.25 μM; 약 0.05 μM 내지 약 0.2 μM; 약 0.05 μM 내지 약 0.15 μM; 약 0.05 μM 내지 약 0.1 μM; 약 0.05 μM 내지 약 0.075 μM; 약 0.075 μM 내지 약 0.25 μM; 약 0.1 μM 내지 약 0.25 μM; 약 0.15 μM 내지 약 0.25 μM; 약 0.2 μM 내지 약 0.25 μM; 약 0.1 μM 내지 약 0.2 μM; 약 0.125 μM 내지 약 0.225 μM; 약 0.125 μM 내지 약 0.2 μM; 약 0.15 μM 내지 약 0.175 μM; 약 0.05 또는 0.1 또는 0.125 또는 0.15 또는 0.175 또는 0.2 또는 0.22 μM; 적어도 약 0.05 또는 0.1 또는 0.125 및 0.2 또는 0.175 μM 이하.

[0074]

[0075] 일부 측면에서, 본원의 발명은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하기 성분 중 하나 이상을 포함하는 세포 배양 배지를 제공한다: (a) 비타민 B1; (b) 비타민 B2; (c) 비타민 B3; (d) 비타민 B5; (e) 비타민 B6; (f) 비타민 B7; (g) 비타민 B9; (h) 비타민 B12; (i) 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철; 및 (j) 시스틴. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 성분 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i) 및 (j) 중 2 또는 3 또는 4 또는 5 또는 6 또는 7 또는 8 또는 9개 또는 각각을 포함한다. 본원에 제공된 세포 배양 배지는 각각의 모든 조합이 구체적이고 개별적으로 열거되는 것과 같이 성분 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i) 및 (j)의 임의의 조합을 함유할 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 성분 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) 및 (h) 중 8개를 포함하는 세포 배양 배지는 성분 중 적어도 8개가 존재하는 한 성분의 임의의 조합을 포함할 수 있는 것으로 이해된다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 세포 배양물은 성분 (b), (e), (g), (h) 및 (j)를 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 성분 (b), (e), (g), (h) 및 (j)를 포함하는 본원에 제공된 세포 배양물은 (a), (c), (d) 및 (f)를 추가로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 성분 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) 및 (j)를 포함하는 본원에 제공된 세포 배양물은 (i)를 추가로 포함한다.

[0076] 일부 측면에서, 본원에 제공된 바와 같은 세포 배양 배지는 표 1A에 기재된 바와 같은 양의 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 배지 성분을 함유한다: (a) 비타민 B1; (b) 비타민 B2; (c) 비타민 B3; (d) 비타민 B5; (e) 비타민 B6; (f) 비타민 B7; (g) 비타민 B9; (h) 비타민 B12; (i) 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철; 및 (j) 시스틴. 배지는 성분 및 양의 각각의 및 모든 조합이 구체적으로 개별적으로 열거되는 것과 같이 표 1A의 배지 성분 중 어느 하나 이상 (예를 들어, 성분 (a)-(j) 중 어느 하나 이상, 예컨대 성분 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) 및 (i)를 포함하는 배지, 또는 성분 (b), (e), (g), (h) 및 (j)를 포함하는 배지 또는 배지 성분 (a)-(j) 중 오직 1개를 포함하는 배지)을 표 1A에 열거된 임의의 양으로 포함할 수 있는 것으로 이해된다. 일부 측면에서, 세포 배양 배지는 성분 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) 및 (i)를 포함하고, 여기서 (a)는 약 2 μ M 내지 약 14 μ M 비타민 B1이고, (b)는 약 0.11 μ M 내지 약 0.72 μ M 비타민 B2이고, (c)는 약 11 μ M 내지 약 72 μ M 비타민 B3이고, (d)는 약 6.8 μ M 내지 약 44 μ M 비타민 B5이고, (e)는 약 4.5 μ M 내지 약 30 μ M 비타민 B6이고, (f)는 약 0.02 μ M 내지 약 0.14 μ M 비타민 B7이고, (g)는 약 3.4 μ M 내지 약 22 μ M 비타민 B9이고, (h)는 약 0.2 μ M 내지 약 1.5 μ M 비타민 B12이고, (i)는 약 11 μ M 내지 약 36 μ M 시트르산제2철이고, (j)는 약 0.9 mM 내지 약 1.5 mM 시스틴이다.

[0077] 일부 추가 측면에서, 세포 배양 배지는 시스테인을 표 1A에 기재된 바와 같은 양으로 추가로 포함한다. 예를 들어, (a) 약 2 μ M 내지 약 14 μ M 비타민 B1, (b) 약 0.11 μ M 내지 약 0.72 μ M 비타민 B2, (c) 약 11 μ M 내지 약 72 μ M 비타민 B3, (d) 약 6.8 μ M 내지 약 44 μ M 비타민 B5, (e) 약 4.5 μ M 내지 약 30 μ M 비타민 B6, (f) 약 0.02 μ M 내지 약 0.14 μ M 비타민 B7, (g) 약 3.4 μ M 내지 약 22 μ M 비타민 B9, (h) 약 0.2 μ M 내지 약 1.5 μ M 비타민 B12, (i) 약 11 μ M 내지 약 36 μ M 시트르산제2철, 및 (j) 약 0.7 mM 내지 약 2.0 mM 시스틴을 포함하는 세포 배양 배지는 (k) 약 0.5 mM 내지 약 2.0 mM 시스테인을 추가로 포함할 수 있는 것으로 이해된다.

[0078] [표 1A]

배지 성분의 예시적인 양

성분	배지 중 성분의 양
(a) 비타민 B1	약 1 μ M 내지 약 18 μ M; 약 1 μ M 내지 약 16 μ M; 약 1 μ M 내지 약 14 μ M; 약 1 μ M 내지 약 12 μ M; 약 1 μ M 내지 약 10 μ M; 약 1 μ M 내지 약 8 μ M; 약 1 μ M 내지 약 6 μ M; 약 1 μ M 내지 약 4 μ M; 약 1 μ M 내지 약 2 μ M; 약 2 μ M

[0079]

	내지 약 18 μM ; 약 4 μM 내지 약 18 μM ; 약 6 μM 내지 약 18 μM ; 약 8 μM 내지 약 18 μM ; 약 10 μM 내지 약 18 μM ; 약 12 μM 내지 약 18 μM ; 약 14 μM 내지 약 18 μM ; 약 16 μM 내지 약 18 μM ; 약 1.5 μM 내지 약 16 μM ; 약 2 μM 내지 약 14 μM ; 약 2.5 μM 내지 약 12 μM ; 약 3 μM 내지 약 10 μM ; 약 3.5 μM 내지 약 8 μM ; 약 4 μM 내지 약 6 μM ; 약 1 또는 2 또는 4 또는 6 또는 8 또는 10 또는 12 또는 14 μM ; 적어도 약 1 또는 2 또는 4 또는 6 μM 및 약 14 또는 12 또는 10 μM 이하.
(b) 비타민 B2	약 0.09 μM 내지 약 0.8 μM ; 약 0.09 μM 내지 약 0.6 μM ; 약 0.09 μM 내지 약 0.4 μM ; 약 0.09 μM 내지 약 0.2 μM ; 약 0.09 μM 내지 약 0.1 μM ; 약 0.1 μM 내지 약 0.8 μM ; 약 0.2 μM 내지 약 0.8 μM ; 약 0.4 μM 내지 약 0.8 μM ; 약 0.6 μM 내지 약 0.8 μM ; 약 0.1 μM 내지 약 0.7 μM ; 약 0.2 μM 내지 약 0.6 μM ; 약 0.3 μM 내지 약 0.5 μM ; 약 0.1 μM 내지 약 0.76 μM ; 약 0.11 μM 내지 약 0.72 μM ; 약 0.12 μM 내지 약 0.68 μM ; 약 0.13 μM 내지 약 0.64 μM ; 약 0.14 μM 내지 약 0.6 μM ; 약 0.1 또는 0.2 또는 0.3 또는 0.4 또는 0.5 또는 0.6 또는 0.7 μM ; 적어도 약 0.1 또는 0.2 또는 0.3 μM 및 약 0.8 또는 0.7 또는 0.6 μM 이하.
(c) 비타민 B3	약 8.5 μM 내지 약 86 μM ; 약 8.5 μM 내지 약 80 μM ; 약 8.5 μM 내지 약 70 μM ; 약 8.5 μM 내지 약 60 μM ; 약 8.5 μM 내지 약 50 μM ; 약 8.5 μM 내지 약 40 μM ; 약 8.5 μM 내지 약 30 μM ; 약 8.5 μM 내지 약 20 μM ; 약 8.5 μM 내지 약 10 μM ; 약 10 μM 내지 약 86 μM ; 약 20 μM 내지 약 86 μM ; 약 30 μM 내지 약 86 μM ; 약 40 μM 내지 약 86 μM ; 약 50 μM 내지 약 86 μM ; 약 60 μM 내지 약 86 μM ; 약 70 μM 내지 약 86 μM ; 약 80 μM 내지 약 86 μM ; 약 10 μM 내지 약 80 μM ; 약 20 μM 내지 약 70 μM ; 약 30 μM 내지 약 60 μM ; 약 40 μM 내지 약 50 μM ; 약 9.5 μM 내지 약 80 μM ; 약 11 μM 내지 약 72 μM ; 약 12.5 μM 내지 약 64 μM ; 약 14 μM 내지 약 56 μM ; 약 10

[0080]

	또는 11 또는 15 또는 20 또는 30 또는 40 또는 50 또는 60 또는 70 또는 72 μM ; 적어도 약 9 또는 10 또는 11 또는 12 또는 13 μM 및 약 80 또는 75 또는 72 또는 65 μM 이하.
(d) 비타민 B5	약 5.4 μM 내지 약 54 μM ; 약 5.4 μM 내지 약 50 μM ; 약 5.4 μM 내지 약 40 μM ; 약 5.4 μM 내지 약 30 μM ; 약 5.4 μM 내지 약 20 μM ; 약 5.4 μM 내지 약 10 μM ; 약 10 μM 내지 약 54 μM ; 약 20 μM 내지 약 54 μM ; 약 30 μM 내지 약 54 μM ; 약 40 μM 내지 약 54 μM ; 약 50 μM 내지 약 54 μM ; 약 6 μM 내지 약 50 μM ; 약 7 μM 내지 약 40 μM ; 약 8 μM 내지 약 30 μM ; 약 9 μM 내지 약 20 μM ; 약 6.1 μM 내지 약 50 μM ; 약 6.2 μM 내지 약 49 μM ; 약 6.3 μM 내지 약 48 μM ; 약 6.4 μM 내지 약 47 μM ; 약 6.5 μM 내지 약 46 μM ; 약 6.6 μM 내지 약 45 μM ; 약 6.8 μM 내지 약 44 μM ; 약 6 또는 6.8 또는 10 또는 20 또는 30 또는 40 또는 44 또는 50 μM ; 적어도 약 6 또는 6.8 또는 7 또는 8 또는 9 또는 10 μM 및 약 50 또는 44 또는 40 또는 35 μM 이하.
(e) 비타민 B6 (한 측면에서, 피리독신입)	약 4.0 μM 내지 약 32 μM ; 약 4.0 μM 내지 약 30 μM ; 약 4.0 μM 내지 약 25 μM ; 약 4.0 μM 내지 약 20 μM ; 약 4.0 μM 내지 약 15 μM ; 약 4.0 μM 내지 약 10 μM ; 약 10 μM 내지 약 32 μM ; 약 15 μM 내지 약 32 μM ; 약 20 μM 내지 약 32 μM ; 약 25 μM 내지 약 32 μM ; 약 30 μM 내지 약 32 μM ; 약 5.0 μM 내지 약 30 μM ; 약 10 μM 내지 약 25 μM ; 약 15 μM 내지 약 20 μM ; 약 4.5 μM 내지 약 30 μM ; 약 5.0 μM 내지 약 28 μM ; 약 5.5 μM 내지 약 26 μM ; 약 4.0 또는 4.5 또는 5.0 또는 10 또는 15 또는 20 또는 30 또는 32 μM ; 적어도 약 4.0 또는 4.5 또는 5.0 또는 6.0 μM 및 약 32 또는 30 또는 28 μM 이하.

[0081]

(f) 비타민 B7	약 0.016 μM 내지 약 0.18 μM; 약 0.016 μM 내지 약 0.15 μM; 약 0.016 μM 내지 약 0.10 μM; 약 0.016 μM 내지 약 0.05 μM; 약 0.05 μM 내지 약 0.18 μM; 약 0.10 μM 내지 약 0.18 μM; 약 0.15 μM 내지 약 0.18 μM; 약 0.018 μM 내지 약 0.16 μM; 약 0.02 μM 내지 약 0.14 μM; 약 0.022 μM 내지 약 0.12 μM; 약 0.024 μM 내지 약 0.10 μM; 약 0.026 μM 내지 약 0.08 μM; 약 0.028 μM 내지 약 0.06 μM; 약 0.030 μM 내지 약 0.04 μM; 약 0.016 또는 0.018 또는 0.02 또는 0.05 또는 0.10 또는 0.12 또는 0.14 또는 0.16 또는 0.18 μM; 적어도 약 0.016 또는 0.018 또는 0.02 또는 0.025 μM 및 약 0.18 또는 0.16 또는 0.14 또는 0.12 μM 이하.
(g) 비타민 B9	약 3.0 μM 내지 약 25 μM; 약 3.0 μM 내지 약 20 μM; 약 3.0 μM 내지 약 15 μM; 약 3.0 μM 내지 약 10 μM; 약 3.0 μM 내지 약 5.0 μM; 약 5.0 μM 내지 약 25 μM; 약 10 μM 내지 약 25 μM; 약 15 μM 내지 약 25 μM; 약 20 μM 내지 약 25 μM; 약 5.0 μM 내지 약 20 μM; 약 10 μM 내지 약 15 μM; 약 3.4 μM 내지 약 22 μM; 약 3.8 μM 내지 약 19 μM; 약 4.2 μM 내지 약 16 μM; 약 3.0 또는 3.4 또는 4.0 또는 5.0 또는 10 또는 15 또는 20 또는 22 또는 25 μM; 적어도 약 3 또는 3.4 또는 4.0 또는 5.0 μM 및 약 25 또는 22 또는 22 μM 이하.
(h) 비타민 B12	약 0.18 μM 내지 약 2.0 μM; 약 0.18 μM 내지 약 1.75 μM; 약 0.18 μM 내지 약 1.5 μM; 약 0.18 μM 내지 약 1.25 μM; 약 0.18 μM 내지 약 1.0 μM; 약 0.18 μM 내지 약 0.5 μM; 약 0.25 μM 내지 약 2.0 μM; 약 0.5 μM 내지 약 2.0 μM; 약 0.75 μM 내지 약 2.0 μM; 약 1.0 내지 약 2.0 μM; 약 1.25 μM 내지 약 2.0 μM; 약 1.5 μM 내지 약 2.0 μM; 약 1.75 μM 내지 약 2.0 μM; 약 0.25 μM 내지 약 1.75 μM; 약 0.5 μM 내지 약 1.5 μM; 약 0.75 μM 내지 약 1.25 μM; 약 0.2 μM 내지 약 1.5 μM; 약 0.4 μM 내지 약 1.0 μM; 약 0.18 또는 0.2 또는 0.5 또는 1.0 또는 1.5 또는 2.0 μM; 적어도 약 0.18 또는 0.2 또는 0.4 μM 및 약 2.0 또는 1.75 또는 1.5 또는 1.25 μM 이하.

[0082]

(i) 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철	약 2 μ M 내지 약 80 μ M; 약 2 μ M 내지 약 40 μ M; 약 2 μ M 내지 약 30 μ M; 약 2 μ M 내지 약 25 μ M; 약 2 μ M 내지 약 20 μ M; 약 2 μ M 내지 약 15 μ M; 약 2 μ M 내지 약 10 μ M; 약 10 μ M 내지 약 50 μ M; 약 15 μ M 내지 약 50 μ M; 약 20 μ M 내지 약 50 μ M; 약 25 μ M 내지 약 50 μ M; 약 30 μ M 내지 약 50 μ M; 약 40 μ M 내지 약 50 μ M; 약 10 μ M 내지 약 40 μ M; 약 10 μ M 내지 약 30 μ M; 약 10 μ M 내지 약 25 μ M; 약 15 μ M 내지 약 25 μ M; 약 15 μ M 내지 약 20 μ M; 약 5 또는 10 또는 15 또는 20 또는 25 또는 30 또는 35 또는 40 μ M; 적어도 약 2 또는 5 또는 10 또는 12.5 또는 15 또는 17.5 및 약 30 또는 25 또는 20 μ M 이하.
(j) 시스틴	약 0.7 mM 내지 약 2.5 mM; 약 0.7 mM 내지 약 2.0 mM; 약 0.8 mM 내지 약 2.5 mM; 약 0.8 mM 내지 약 2.25 mM; 약 0.8 mM 내지 약 2.0 mM; 약 0.8 mM 내지 약 1.75 mM; 약 0.8 mM 내지 약 1.5 mM; 약 0.8 mM 내지 약 1.25 mM; 약 0.8 mM 내지 약 1.0 mM; 약 1.0 mM 내지 약 2.5 mM; 약 1.0 mM 내지 약 1.6 mM; 약 1.2 mM 내지 약 1.4 mM; 약 1.25 mM 내지 약 2.5 mM; 약 1.5 mM 내지 약 2.5 mM; 약 1.75 mM 내지 약 2.5 mM; 약 2.0 mM 내지 약 2.5 mM; 약 2.25 mM 내지 약 2.5 mM; 약 0.9 mM 내지 약 2.0 mM; 약 0.8 mM 내지 약 1.75 mM; 약 0.9 mM 내지 약 1.5 mM; 약 1.0 mM 내지 약 1.25 mM; 약 0.7 또는 0.8 또는 0.9 또는 1.0 또는 1.1 또는 1.2 또는 1.3 또는 1.4 또는 1.5 또는 1.6 mM; 0.7 mM, 0.75 mM, 0.8 mM, 0.85 mM, 0.9 mM, 0.95 mM, 1.0 mM, 1.05 mM, 1.1 mM, 1.15 mM, 1.2 mM, 1.25 mM, 1.3 mM, 1.35 mM, 1.4 mM, 1.5 mM, 1.55 mM, 1.6 mM, 1.65 mM, 1.7 mM, 1.75 mM, 1.8 mM, 1.85 mM, 1.9 mM 또는 1.95 mM 또는 2.0 mM; 적어도 약 0.7 또는 0.8 또는 0.9 또는 1.0 또는 1.1 mM 및 약 2.0 또는 1.75 또는 1.6 또는 1.5 또는 1.4 mM 이하.

[0083]

(k) 시스테인	약 0.5 mM 내지 약 2.0 mM; 약 0.5 mM 내지 약 1.75 mM; 약 0.5 mM 내지 약 1.5 mM; 약 0.5 mM 내지 약 1.25 mM; 약 0.5 mM 내지 약 1.0 mM; 약 0.5 mM 내지 약 0.75 mM; 약 0.6 mM 내지 약 2.0 mM; 약 0.8 mM 내지 약 2.0 mM; 약 1.0 mM 내지 약 2.0 mM; 약 1.25 mM 내지 약 2.0 mM; 약 1.5 mM 내지 약 2.0 mM; 약 1.75 mM 내지 약 2.0 mM; 약 0.5 또는 0.6 또는 0.7 또는 0.8 또는 0.9 또는 1.0 또는 1.1 또는 1.2 또는 1.3 또는 1.4 또는 1.5 또는 1.6 또는 1.7 또는 1.8 또는 1.9 또는 2.0 mM; 0.5 mM, 0.55 mM, 0.6 mM, 0.65 mM, 0.7 mM, 0.75 mM, 0.8 mM, 0.85 mM, 0.9 mM, 0.95 mM, 1.0 mM, 1.05 mM, 1.1 mM, 1.15 mM, 1.2 mM, 1.25 mM, 1.3 mM, 1.35 mM, 1.4 mM, 1.5 mM, 1.55 mM, 1.6 mM, 1.65 mM, 1.7 mM, 1.75 mM, 1.8 mM, 1.85 mM, 1.9 mM, 1.95 mM, 또는 2.0 mM; 적어도 약 0.5 또는 0.6 또는 0.7 또는 0.8 또는 0.9 또는 1.0 또는 1.1 mM 및 약 2.0 또는 1.8 또는 1.75 또는 1.6 또는 1.5 또는 1.4 mM 이하.
----------	--

[0084]

[0085]

본원에 제공된 배지 (예를 들어, CDM 또는 화학적으로 규정되지 않은 배지)는 한 변형법에서 시스틴을 포함하고, 시스테인을 포함하지 않는다. 시스테인-무함유 배지는 기초 배지 또는 공급 배지에 사용될 수 있다. 한 변형법에서, 기초 배지는 시스테인을 포함하지 않고, 시스틴을 포함한다. 한 변형법에서, 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴; 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2; 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6 (한 측면에서, 피리독신임); 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9;

및 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12를 포함하는 기초 배지 (한 측면에서, 하기 중 어느 하나 이상을 추가로 포함할 수 있음: (1) 비타민 B1 (한 측면에서, 약 2.0 μ M 내지 약 14.0 μ M의 농도로 존재함), (2) 비타민 B3 (한 측면에서, 약 11.0 μ M 내지 약 72.0 μ M의 농도로 존재함), (3) 비타민 B5 (한 측면에서, 약 6.8 μ M 내지 약 44.0 μ M의 농도로 존재함), 및 (4) 비타민 B7 (한 측면에서, 약 0.02 μ M 내지 약 0.24 μ M의 농도로 존재함))는 시스테인을 포함하지 않는다. 또 다른 변형법에서, 약 0.8 mM (일부 실시양태에서, 0.7 mM) 내지 약 2.5 mM 시스틴; 약 0.11 μ M 내지 약 0.72 μ M 비타민 B2; 약 4.5 μ M 내지 약 30 μ M 비타민 B6 (한 측면에서, 피리독신임); 약 3.4 μ M 내지 약 22 μ M 비타민 B9; 및 약 0.2 μ M 내지 약 1.5 μ M 비타민 B12를 포함하는 기초 배지 (한 측면에서, 하기 중 어느 하나 이상을 추가로 포함할 수 있음: (1) 비타민 B1 (한 측면에서, 약 2.0 μ M 내지 약 14.0 μ M의 농도로 존재함), (2) 비타민 B3 (한 측면에서, 약 11.0 μ M 내지 약 72.0 μ M의 농도로 존재함), (3) 비타민 B5 (한 측면에서, 약 6.8 μ M 내지 약 44.0 μ M의 농도로 존재함), 및 (4) 비타민 B7 (한 측면에서, 약 0.02 μ M 내지 약 0.24 μ M의 농도로 존재함))는 시스테인을 포함하지 않는다. 본원의 임의의 변형법에서, 기초 배지는 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 또는 황산제1철 (한 측면에서, 약 11.0 μ M 내지 약 36.0 μ M의 농도로 존재함)을 추가로 포함할 수 있다. 본원의 임의의 변형법에서, 기초 배지는 히드로코르티손 (한 측면에서, 약 0.05 μ M 내지 약 0.5 μ M의 농도로 존재함)을 추가로 포함할 수 있다.

[0086] 본원에 제공된 배지 (예를 들어, CDM 또는 화학적으로 규정되지 않은 배지)는 한 변형법에서 시스테인을 포함하고, 시스틴을 포함하지 않는다. 시스틴-무함유 배지는 기초 배지 또는 공급 배지에 사용될 수 있다. 한 변형법에서, 공급 배지는 시스틴을 포함하지 않고, 시스테인을 포함한다. 한 변형법에서, 공급 배지는 약 80 mg/L 내지 약 1500 mg/L 시스테인을 포함한다. 또 다른 변형법에서, 공급 배지는 약 0.5 mM 내지 약 2.0 mM 시스테인을 포함한다. 예를 들어, 약 300 mg/L (일부 측면에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴; 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2; 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6 (한 측면에서, 피리독신임); 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9; 및 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12를 포함하는 기초 배지 (한 측면에서, 하기 중 어느 하나 이상을 추가로 포함할 수 있음: (1) 비타민 B1 (한 측면에서, 약 2.0 μ M 내지 약 14.0 μ M의 농도로 존재함), (2) 비타민 B3 (한 측면에서, 약 11.0 μ M 내지 약 72.0 μ M의 농도로 존재함), (3) 비타민 B5 (한 측면에서, 약 6.8 μ M 내지 약 44.0 μ M의 농도로 존재함), 및 (4) 비타민 B7 (한 측면에서, 약 0.02 μ M 내지 약 0.24 μ M의 농도로 존재함))는 약 80 mg/L 내지 약 1500 mg/L 시스테인 (일부 측면에서, 0.5 mM 내지 약 2.0 mM 시스테인)을 포함하는 공급 배지로 보충할 수 있다. 또 다른 변형법에서, 약 0.8 mM (일부 측면에서, 0.7 mM) 내지 약 2.5 mM 시스틴; 약 0.11 μ M 내지 약 0.72 μ M 비타민 B2; 약 4.5 μ M 내지 약 30 μ M 비타민 B6 (한 측면에서, 피리독신임); 약 3.4 μ M 내지 약 22 μ M 비타민 B9; 및 약 0.2 μ M 내지 약 1.5 μ M 비타민 B12를 포함하는 기초 배지 (한 측면에서, 하기 중 어느 하나 이상을 추가로 포함할 수 있음: (1) 비타민 B1 (한 측면에서, 약 2.0 μ M 내지 약 14.0 μ M의 농도로 존재함), (2) 비타민 B3 (한 측면에서, 약 11.0 μ M 내지 약 72.0 μ M의 농도로 존재함), (3) 비타민 B5 (한 측면에서, 약 6.8 μ M 내지 약 44.0 μ M의 농도로 존재함), 및 (4) 비타민 B7 (한 측면에서, 약 0.02 μ M 내지 약 0.24 μ M의 농도로 존재함))는 약 80 mg/L 내지 약 1500 mg/L 시스테인 (일부 측면에서, 0.5 mM 내지 약 2.0 mM 시스테인)을 포함하는 공급 배지로 보충할 수 있다. 본원의 임의의 변형법에서, 기초 배지는 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 또는 황산제1철 (한 측면에서, 약 11.0 μ M 내지 약 36.0 μ M의 농도로 존재함)을 추가로 포함할 수 있다. 본원의 임의의 변형법에서, 기초 배지는 히드로코르티손 (한 측면에서, 약 0.05 μ M 내지 약 0.5 μ M의 농도로 존재함)을 추가로 포함할 수 있다.

[0087] 본원에 제공된 배지 (예를 들어, CDM 또는 화학적으로 규정되지 않은 배지)는 한 변형법에서 시트르산제2철을 포함하고, 황산제1철을 포함하지 않는다. 황산제1철-무함유 배지는 기초 배지 또는 공급 배지에 사용될 수 있다. 한 변형법에서, 기초 배지는 황산제1철을 포함하지 않고, 시트르산제2철을 포함한다.

[0088] 특정한 변형법에서, 본원에 제공된 배지는 시스테인 및 황산제1철을 포함하지 않는다. 한 이러한 변형법에서, 배지는 시스테인 및 황산제1철을 포함하지 않고, 시스틴 및/또는 시트르산제2철을 포함한다.

[0089] 본원에 제공된 배지는 한 변형법에서 히드로코르티손을 포함하지 않는다. 또 다른 변형법에서, 배지는 히드로코르티손을 포함한다. 한 측면에서, 배지는 히드로코르티손을 포함하고, 시스테인 및/또는 황산제1철을 포함하지 않는다. 또 다른 측면에서, 배지는 히드로코르티손 및 시스틴 및 시트르산제2철을 포함한다. 특정한 변형법에서, 히드로코르티손을 포함하는 배지가 기초 배지이다. 한 변형법에서, 기초 배지는 약 0.8 mM (일부 측면에서, 0.7 mM) 내지 약 2.5 mM 시스틴; 약 2 μ M 내지 약 80 μ M 시트르산제2철; 약 0.05 μ M 내지 약 0.5 μ M 히드로코르티손을 포함하고, 여기서 기초 배지는 하기 성분 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다: (1) 비타민 B2 (한 측면에서, 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L의 농도로 존재함); (2) 비타민 B6 (한 측면에서, 약 0.05

mg/L 내지 약 10.0 mg/L의 농도로 존재함); (3) 비타민 B9 (한 측면에서, 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L의 농도로 존재함); 및 (4) 비타민 B12 (한 측면에서, 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L의 농도로 존재함). 또 다른 변형법에서, 기초 배지는 약 300 mg/L (일부 측면에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴; 약 2 μ M 내지 약 80 μ M 시트르산제2철; 및 약 0.05 μ M 내지 약 0.5 μ M 히드로코르티손을 포함하고, 여기서 기초 배지는 하기 성분 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다: (1) 비타민 B2 (한 측면에서, 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L의 농도로 존재함); (2) 비타민 B6 (한 측면에서, 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L의 농도로 존재함); (3) 비타민 B9 (한 측면에서, 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L의 농도로 존재함); 및 (4) 비타민 B12 (한 측면에서, 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L의 농도로 존재함). 본원의 임의의 변형법에서, 기초 배지는 하기 중 어느 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다: (1) 비타민 B1 (한 측면에서, 약 2.0 μ M 내지 약 14.0 μ M의 농도로 존재함), (2) 비타민 B3 (한 측면에서, 약 11.0 μ M 내지 약 72.0 μ M의 농도로 존재함), (3) 비타민 B5 (한 측면에서, 약 6.8 μ M 내지 약 44.0 μ M의 농도로 존재함), 및 (4) 비타민 B7 (한 측면에서, 약 0.02 μ M 내지 약 0.24 μ M의 농도로 존재함).

[0090]

(a) 시스틴 및/또는 시스테인; (b) 비타민 B2, (c) 비타민 B6 (피리독신 및/또는 피리독살), (d) 비타민 B9, (e) 비타민 B12, (f) 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 및 (g) 히드로코르티손으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 배지 성분을 합하는 것을 포함하는, 세포를 배양하는데 사용하기 위한 세포 배양 배지를 제조하는 방법이 또한 제공되며, 여기서 각각의 (a)-(g)는 표 1에 기재된 바와 같은 양으로 제공된다. 또한, (a) 비타민 B1; (b) 비타민 B2; (c) 비타민 B3; (d) 비타민 B5; (e) 비타민 B6; (f) 비타민 B7; (g) 비타민 B9; (h) 비타민 B12; (i) 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철; (j) 시스틴; 및 (k) 시스테인으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 배지 성분을 표 1A에 기재된 바와 같은 양으로 합하는 것을 포함하는, 세포를 배양하는데 사용하기 위한 세포 배양 배지를 제조하는 방법이 본원에 제공된다. 한 변형법에서, 방법은 본원 (예를 들어, 표 1 또는 표 1A)에 기재된 바와 같은 어느 하나 이상의 배지 성분을 세포 배양에 적합한 조성물에 첨가하는 것을 포함하며, 여기서 하나 이상 배지 성분은 조성물에 순차적으로 또는 동시에 첨가될 수 있다. 추가의 변형법에서, 방법은 제1 기간에서 세포 배양에 적합한 조성물에서 본원 (예를 들어, 표 1 또는 표 1A)에 기재된 바와 같은 어느 하나 이상의 배지 성분을 합하는 것을 포함하고, 여기서 방법은 소정의 양의 하나 이상의 배지 성분을 제2 기간에서, 예컨대 세포 배양 주기의 적어도 1배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배 등에서 첨가하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 주기는 적어도 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 또는 세포가 여전히 살아있는 상태를 유지하면서 세포 배양물에 존재할 수 있는 임의의 일수이다. 세포를 배양하는데 사용하기 위한 세포 배양 배지를 제조하는 방법의 한 변형법에서, 시스틴은 세포 배양 배지 중에 약 300 mg/L (일부 측면에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴을 제공하는 양으로 첨가되고, 비타민 B2는 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2를 제공하는 양으로 첨가되고, 비타민 B6은 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6을 제공하는 양으로 첨가되고, 비타민 B9는 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9를 제공하는 양으로 첨가되고, 비타민 B12는 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12를 제공하는 양으로 첨가된다. 세포를 배양하는데 사용하기 위한 세포 배양 배지를 제조하는 방법의 또 다른 변형법에서, 시스틴은 세포 배양 배지 중에 약 0.8 mM (일부 측면에서, 0.7 mM) 내지 약 2.5 mM 시스틴을 제공하는 양으로 첨가되고, 비타민 B2는 약 0.11 μ M 내지 약 0.72 μ M 비타민 B2를 제공하는 양으로 첨가되고, 비타민 B6은 약 4.5 μ M 내지 약 30.0 μ M 비타민 B6을 제공하는 양으로 첨가되고, 비타민 B9는 약 3.4 μ M 내지 약 22.0 μ M 비타민 B9를 제공하는 양으로 첨가되고, 비타민 B12는 약 0.2 μ M 내지 약 1.5 μ M 비타민 B12를 제공하는 양으로 첨가된다.

[0091]

본원의 일부 변형법에서, 세포 배양 배지는 기초 세포 배양 배지이다. 본원의 다른 변형법에서, 세포 배양 배지는 공급 세포 배양 배지이다. 본원의 일부 변형법에서, 세포 배양 배지는 (a) 시스틴; (b) 비타민 B2, (c) 비타민 B6 (피리독신 및/또는 피리독살), (d) 비타민 B9, (e) 비타민 B12, (f) 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 및 (g) 히드로코르티손으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 배지 성분을 표 1에 기재된 바와 같은 양으로 포함하는 기초 세포 배양 배지이며, 여기서 기초 세포 배양 배지는 (예를 들어, 세포 배양 주기 개시 후의 소정의 기간, 예컨대 세포 배양 주기의 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배 등 중 어느 하나에서) (a) 시스테인을 표 1에 기재된 바와 같은 양으로 포함하는 공급 세포 배양 배지로 보충된다. 본원의 일부 변형법에서, 세포 배양 배지는 (a) 비타민 B1; (b) 비타민 B2; (c) 비타민 B3; (d) 비타민 B5; (e) 비타민 B6; (f) 비타민 B7; (g) 비타민 B9; (h) 비타민 B12; (i) 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철; 및 (j) 시스틴으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 배지 성분을 표 1A에 기재된 바와 같은 양으로 포함하는 기초 세포 배양 배지이며, 여기서 기초 세포 배양 배지는 (예를 들어, 세포 배양 주기 개시 후의 소정의 기간, 예컨대 세포 배양 주기의 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배,

적어도 7배 등 중 어느 하나에서) (k) 시스테인을 표 1A에 기재된 바와 같은 양으로 포함하는 공급 세포 배양 배지로 보충된다

[0092] 당업자가 이해하는 바와 같이, 본원에 상세히 기재된 세포 배양 배지는 세포 배양에 유용한 다른 성분 (예를 들어, 또한 시스틴, 비타민 B1, 비타민 B2, 비타민 B3, 비타민 B5, 비타민 B6, 비타민 B7, 비타민 B9, 및 비타민 B12, 철, 및 임의로 히드로코르티손 중 하나 이상)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 세포 배양 배지는 추가의 성분, 예컨대 아미노산 (예를 들어, 글루타민, 아르기닌, 또는 아스파라긴), 비타민 (아스코르브산을 포함하나 이에 제한되지는 않음), 미량 원소, 전이 금속 (니켈, 구리 또는 아연을 포함하나 이에 제한되지는 않음), 및 다른 배지 성분, 예컨대 비제한적으로 동물 및/또는 식물로부터 유래된 가수분해물을 포함할 수 있는 것으로 이해된다. 본원에 제공된 임의의 배지는 또한 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대, 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 이온 (예컨대, 나트륨, 클로라이드, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제 (예컨대, HEPES), 뉴클레오시드 (예컨대, 아데노신 및 티미딘), 및 글루코스 또는 동등한 에너지원으로 보충될 수 있다. 추가의 세포 배양 배지 성분, 예컨대 본원에 열거된 것은 당업자에게 공지된 세포 배양 주기 동안 상이한 시점에 적절한 농도로 세포 배양 배지에 포함될 수 있다.

[0093] 본원에 제공된 배지는 한 측면에서 상이한 배지에서 생산된 경우에 폴리펩티드의 품질 특성과 비교하여 폴리펩티드를 생산하는 방법에 사용되는 경우에 하나 이상의 유리한 제품 품질 특성을 생성한다. 변경된 전하 변이체 분포를 갖는 단백질 제품 (예를 들어, 항체 제품)의 생산은 단백질 제품의 품질 특성, 예컨대 단백질 제품의 색에 영향을 미칠 수 있다. 또한, 특정 배지 성분의 사용을 통해 형성된 반응성 산소 종 (ROS)은 특정 아미노산을 산화시켜 산화 제품을 생산할 수 있다. 이러한 제품 변이체의 존재는 또한 단백질 제품의 제품 품질 특성, 예컨대 색을 변경시킬 수 있다. 본원에 상세히 기재된 배지로 생산한 폴리펩티드를 포함하는 조성물 (적어도 100 mg/mL 또는 125 mg/mL 또는 150 mg/mL의 폴리펩티드, 예컨대 항체를 포함하는 조성물 포함)의 색은 한 측면에서 표 2에 기재된 바와 같은 색 참조 표준 값을 갖는다. 특정한 변형법에서, 본원에 상세히 기재된 배지로 생산한 폴리펩티드를 포함하는 조성물 (적어도 100 mg/mL 또는 125 mg/mL 또는 150 mg/mL의 폴리펩티드, 예컨대 항체를 포함하는 조성물 포함)의 색은 한 측면에서 B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, BY3, BY4, BY5, BY6, BY7, Y3, Y4, Y5, Y6, Y7, GY3, GY4, GY5, GY6, GY7, R3, R4, R5, R6 및 R7로 이루어진 군으로부터 선택된 색 참조 표준 값을 갖는다. 또 다른 측면에서, 본원에 상세히 기재된 배지로 생산한 폴리펩티드를 포함하는 조성물 (적어도 1 mg/mL 또는 25 mg/mL 또는 50 mg/mL 또는 75 mg/mL의 폴리펩티드, 예컨대 항체를 포함하는 조성물 포함)의 색은 한 측면에서 표 2에 기재된 바와 같은 색 참조 표준 값을 갖는다. 일부 변형법에서, 본원에 상세히 기재된 배지로 생산한 폴리펩티드를 포함하는 조성물 (적어도 1 mg/mL 또는 25 mg/mL 또는 50 mg/mL 또는 75 mg/mL의 폴리펩티드, 예컨대 항체를 포함하는 조성물 포함)의 색은 한 측면에서 B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, BY3, BY4, BY5, BY6, BY7, Y3, Y4, Y5, Y6, Y7, GY3, GY4, GY5, GY6, GY7, R3, R4, R5, R6 및 R7로 이루어진 군으로부터 선택된 색 참조 표준 값을 갖는다. 색 참조 값 갈색 (B), 갈색빛-황색 (BY), 황색 (Y), 녹색빛-황색 (GY), 또는 적색 (R)의 기재에 대해 문헌 [USP-24 Monograph 631 Color and Achromaticity. United States Pharmacopoeia Inc., 2000, p. 1926-1927 및 Council of Europe. European Pharmacopoeia, 2008, 7th Ed. P.22]을 참조한다. 한 변형법에서, 본원에 제공된 바와 같은 배지는 폴리펩티드가 상이한 배지에서 생산된 경우에 수득한 전하 변이체 (예를 들어, 산성 전하 변이체)와 비교하여 폴리펩티드를 생산하는 방법에 사용되는 경우에 전하 변이체 (예를 들어, 산성 전하 변이체)의 존재를 감소시킨다. 또 다른 변형법에서, 배지는 폴리펩티드가 상이한 배지에서 생산된 경우에 수득한 반응성 산소 종과 비교하여 폴리펩티드를 생산하는 방법에 사용되는 경우에 반응성 산소 종의 존재를 감소시킨다. 또 다른 변형법에서, 배지는 폴리펩티드가 상이한 배지에서 생산된 경우에 수득한 오염물과 비교하여 폴리펩티드를 생산하는 방법에 사용되는 경우에 오염물의 존재를 감소시킨다.

[0094] 본원에 기재된 바와 같이, 본 섹션 및 다른 곳에서 기재된 세포 배양 배지를 사용하는 다양한 방법 (예컨대, 세포를 배양하는 방법 및 폴리펩티드를 생산하는 방법)이 제공된다.

[0095] 방법

[0096] 본원에 상세히 기재된 세포 배양 배지 (임의의 CDM 또는 화학적으로 규정되지 않은 본원에 상세히 기재된 배지 포함)는 폴리펩티드 (특정항 항체 포함)를 생산하기 위해 세포를 배양하는 방법에 사용될 수 있다. 배지는 회분 배양, 유가 회분 배양 또는 관류 배양 어느 것에 의해서든 세포를 배양하는 방법에 사용될 수 있고, 본원에 기재된 바와 같은 항체의 임의의 측면 또는 변형법 또는 실시양태를 포함하는 항체를 생산하는 방법에 사용될 수 있다.

[0097] 세포를 본원에 상세히 기재된 바와 같은 세포 배양 배지와 접촉시켜 세포를 성장시키는 (즉, 세포를 배양하는) 방법이 제공된다. 한 변형법에서, 방법은 세포를 표 1에 기재된 바와 같은 하나 이상의 배지 성분을 포함하는 세포 배양 배지 (예를 들어, 표 1에 열거된 임의의 양으로, 성분 (a), (b), (c), (d) 및 (e)를 포함하는 배지 또는 성분 (a), (f) 및 (g)를 포함하는 배지 또는 각각의 성분 (a)-(g)를 포함하는 배지)와 접촉시키는 것을 포함한다. 한 변형법에서, 방법은 세포를 표 1A에 기재된 바와 같은 하나 이상의 배지 성분을 포함하는 세포 배양 배지 (예를 들어, 표 1A에 열거된 임의의 양으로, 성분 (a)-(j)를 포함하는 배지 또는 성분 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) 및 (i)를 포함하는 배지 또는 성분 (b), (e), (g), (h) 및 (j)를 포함하는 배지 또는 성분 (a)-(j) 중 오직 1개를 포함하는 배지)와 접촉시키는 것을 포함한다. 세포를 성장시키는 (즉, 세포를 배양하는) 방법의 특정한 변형법에서, 세포 배양 배지는 CDM이다. 방법의 한 측면에서, 세포는 CDM 기초 배지에서 성장시킨다 (즉, 배양함). 세포를 성장시키는 (즉, 세포를 배양하는) 방법의 또 다른 특정한 변형법에서, 세포 배양 배지는 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지이다. 방법의 한 측면에서, 세포는 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 기초 배지에서 성장시킨다 (즉, 배양함). 일부 측면에서, 세포는 세포의 성장기 동안 세포 배양 배지와 접촉시킨다. 일부 측면에서, 세포는 세포의 생산기 동안 세포 배양 배지와 접촉시킨다. 일부 측면에서, 방법은 세포 배양 배지에 시스테인을 첨가하는 단계를 추가로 포함한다. 추가의 측면에서, 시스테인은 세포 배양 배지 중에 약 80 mg/L 내지 약 1500 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가된다. 또 다른 추가 측면에서, 시스테인은 세포 배양 배지 중에 약 1500 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가된다. 또 다른 추가 측면에서, 시스테인은 세포 배양 배지 중에 약 140 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가된다. 또 다른 추가 측면에서, 시스테인은 세포 배양 배지 중에 약 0.5 mM 내지 약 2.0 mM 시스테인을 제공하는 양으로 첨가된다. 또 다른 추가 측면에서, 시스테인은 세포 배양 배지 중에 약 0.8 mM 시스테인을 제공하는 양으로 첨가된다.

[0098] 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포를 세포 배양 배지에서 성장시킴으로써 (즉, 세포 배양 배지에서 배양함으로써) 폴리펩티드 생산하는 방법이 또한 제공되며, 여기서 (a) 세포는 폴리펩티드를 발현하고, (b) 화학적으로 규정된 세포 배양 배지는 표 1에 기재된 바와 같은 하나 이상 배지 성분을 포함한다 (예를 들어, 표 1에 열거된 임의의 양으로, 성분 (a), (b), (c), (d) 및 (e)를 포함하는 배지 또는 성분 (a), (f) 및 (g)를 포함하는 배지 또는 각각의 성분 (a)-(g)를 포함하는 배지). 또 다른 변형법에서, 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포를 세포 배양 배지에서 성장시킴으로써 (즉, 세포 배양 배지에서 배양함으로써) 폴리펩티드를 생산하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 (a) 세포는 폴리펩티드를 발현하고, (b) 세포 배양 배지는 표 1A에 기재된 바와 같은 하나의 이상 배지 성분을 포함한다 (예를 들어, 표 1A에 열거된 임의의 양으로, 성분 (a)-(j)를 포함하는 배지 또는 성분 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) 및 (i)를 포함하는 배지 또는 성분 (b), (e), (g), (h) 및 (j)를 포함하는 배지 또는 성분 (a)-(j) 중 오직 1개를 포함하는 배지). 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포를 세포 배양 배지에서 성장시킴으로써 (즉, 세포 배양 배지에서 배양함으로써) 폴리펩티드를 생산하는 방법의 특정한 변형법에서, 세포 배양 배지는 CDM이다. 방법의 한 측면에서, 세포는 CDM 기초 배지에서 성장시킨다 (즉, 배양함). 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포를 세포 배양 배지에서 성장시킴으로써 (즉, 세포 배양 배지에서 배양함으로써) 폴리펩티드를 생산하는 방법의 또 다른 특정한 변형법에서, 세포 배양 배지는 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지이다. 방법의 한 측면에서, 세포는 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 기초 배지에서 성장시킨다 (즉, 배양함). 일부 측면에서, 배양은 세포의 성장기 동안 수행한다. 일부 측면에서, 배양은 세포의 생산기 동안 수행한다. 일부 변형법에서, 방법은 세포 배양 배지에 시스테인을 첨가하는 단계를 추가로 포함한다. 추가의 변형법에서, 시스테인은 세포 배양 배지 중에 약 80 mg/L 내지 약 1500 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가된다. 또 다른 추가 변형법에서, 시스테인은 세포 배양 배지 중에 약 1500 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가된다. 또 다른 추가 변형법에서, 시스테인은 세포 배양 배지 중에 약 140 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가된다. 또 다른 추가 변형법에서, 시스테인은 세포 배양 배지 중에 약 0.5 mM 내지 약 2.0 mM 시스테인을 제공하는 양으로 첨가된다. 또 다른 추가 변형법에서, 시스테인은 세포 배양 배지 중에 약 0.8 mM 시스테인을 제공하는 양으로 첨가된다.

[0099] 본원에 상세히 기재된 바와 같은 폴리펩티드를 투여하는 방법이 또한 제공된다. 예를 들어, 개체에게 폴리펩티드를 포함하는 제제를 투여하는 방법이 제공되며, 여기서 제제는 적어도 100 mg/mL, 적어도 125 mg/mL 또는 적어도 150 mg/mL 초과 농도의 폴리펩티드를 갖고, COC 검정에 의해 측정시에 B3, B4, B5, B6, B7, B8 또는 B9 초과 색 강도 값을 갖는다. 일부 측면에서, COC 검정에 의해 결정된 바와 같은 색 강도 값은 B, BY, Y, GY 또는 R 중 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되지는 않고, 여기서 보다 높은 값은 보다 밝은 색 강도를 나타낸다. 또 다른 예에서, 개체에게 폴리펩티드를 포함하는 제제를 투여하는 방법이 제공되며, 여기서 제제는

적어도 100 mg/mL, 적어도 125 mg/mL 또는 적어도 150 mg/mL 초과 농도의 폴리펩티드를 갖고, 색 검정 (예를 들어, 전체 색 검정 또는 NIFTY 검정)에 의해 측정시에 참조 용액의 색 강도 값보다 낮은 색 강도 값을 갖는다. 폴리펩티드의 제제는 비경구, 폐내 및 비강내를 비롯한 임의의 적합한 수단에 의해 투여되며, 원하는 경우에 국소 치료, 병변내 투여를 위해 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 투여는 임의의 적합한 경로, 예를 들어 부분적으로는 투여가 단기적인지 장기적인지에 따라 정맥내 또는 피하 주사와 같은 주사에 의해 수행될 수 있다. 따라서, 본원에 제공된 바와 같은 폴리펩티드-함유 제제는 개체에 대한 주사, 예컨대 피하 주사 (예를 들어, 인간에 대한 피하 주사)에 적합할 수 있다. 일부 측면에서, 주사에 적합한 (예를 들어, 피하 주사에 적합한) 폴리펩티드-함유 제제는 적어도 100 mg/mL, 적어도 125 mg/mL 또는 적어도 150 mg/mL 초과 농도이고, COC 검정에 의해 측정시에 B3, B4, B5, B6, B7, B8 또는 B9 초과 색 강도 값을 갖는다. 일부 측면에서, COC 검정에 의해 결정된 바와 같은 색 강도 값은 B, BY, Y, GY 또는 R 중 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되지는 않고, 여기서 보다 높은 값은 보다 밝은 색 강도를 나타낸다. 일부 측면에서, 주사에 적합한 (예를 들어, 피하 주사에 적합한) 폴리펩티드-함유 제제는 적어도 100 mg/mL, 적어도 125 mg/mL 또는 적어도 150 mg/mL 초과 농도이고, 색 검정 (예를 들어, 전체 색 검정 또는 NIFTY 검정)에 의해 측정시에 참조 용액의 색 강도 값보다 낮은 색 강도 값을 갖는다. 다양한 시점 상에서의 단일 또는 다중 투여, 볼루스 투여 및 펄스 주입을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 투여 스케줄이 본원에 고려된다.

[0100] 다른 방법이 전반적으로, 예컨대 본 발명의 간단한 개요 및 다른 곳에서 제공된다.

[0101] 세포

[0102] 제공된 방법 및 조성물은 동물, 효모 또는 곤충 세포를 포함하여, 본원에 기재된 배지에서 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)의 성장 및/또는 생산에 적합한 임의의 세포를 이용할 수 있다. 한 측면에서, 방법 및 조성물의 세포는 세포 배양 및 폴리펩티드의 발현에 적합한 임의의 포유동물 세포 또는 세포 유형이다. 따라서, 본원에 제공된 방법 (예를 들어, 세포를 성장시키는 (즉, 세포를 배양하는) 방법 및/또는 폴리펩티드를 생산하는 방법) 및 조성물은 동물 세포를 포함하며 임의의 적합한 유형의 세포를 이용할 수 있다. 한 측면에서, 방법 및 조성물은 포유동물 세포를 이용한다. 방법 및 조성물은 또한 하이브리도마 세포를 이용할 수 있다. 한 변형법에서, 포유동물 세포는 비-하이브리도마 포유동물 세포이며, 이는 목적하는 폴리펩티드, 예컨대 항체, 항체 단편 (리간드-결합 단편 포함) 및 키메라 항체를 코딩하는 외인성 단리된 핵산으로 형질전환된다. 한 변형법에서, 방법 및 조성물은 인간 망막모세포 (PER.C6 (크루셀(CruCell), 네덜란드 라이덴)); SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (현탁액 배양물에서의 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)]); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이나이즈 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, 문헌 [Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1 587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HeLa, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 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 (문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간세포암 세포주 (Hep G2)로 이루어진 군으로부터 선택된 포유동물 세포를 이용한다. 특정한 변형법에서, 방법 및 조성물은 CHO 세포를 이용한다. 특정한 변형법에서, CHO 세포주의 배양 및 CHO 세포주로부터 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)의 발현이 이용된다. 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)는 폴리펩티드가 단리되고/거나 정제될 수 있는 배지 (예를 들어, CDM)로 분비될 수 있거나 또는 폴리펩티드는 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포의 용해에 의해 배지로 방출될 수 있다.

[0103] 재조합 척추동물 세포 배양에서 관심 폴리펩티드의 합성에 적용하기에 적합한 방법, 벡터 및 숙주 세포는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979)]; EP 117,060; 및 EP 117,058 (Levinson et al.)에 기재되어 있다. 폴리펩티드의 포유동물 세포 배양물 발현에 특히 유용한 플라스미드는 pRK5 (EP 공개 번호 307,247) 또는 pSVI6B (PCT 공개 번호 WO 91/08291, 1991년 6월 13일에 공개됨)이다.

[0104] 숙주 세포를 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양한다. 포유동물 세포의 경우에, 문헌 [Graham and van der Erb, Virology, 52:456-457 (1978)]의 인산칼슘 침전 방법 또는 문헌 [Method of Hawley-Nelson, Focus 15:73 (1993)]의 리포펙타민(lipofectamine)TM (깁코(Gibco) BRL)이 바람직하다. 포유동물 세포 숙주 시스템 형질전환의 일반적 측면은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 1983년 8

월 16일 허여된 미국 특허 번호 4,399,216 (Axel)에 기재되어 있다. 포유동물 세포를 형질전환시키는 다양한 기술에 대해, 예를 들어 문헌 [Keown et al., Methods in Enzymology (1989), Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990), 및 Mansour et al., Nature, 336:348-352 (1988)]을 참조한다.

[0105] 방법 및 조성물은 또한 세포 배양물에 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마의 사용을 포괄한다. 모노클로날 항체는 면역화된 동물로부터 면역 세포 (전형적으로, 비장 세포 또는 림프절 조직으로부터의 림프구)를 회수하고, 종래의 방식으로, 예를 들어 골수종 세포와의 융합에 의해 또는 엡스타인-바르(Epstein-Barr) (EB)-바이러스의 형질전환에 의해 세포를 면역화시키고, 목적하는 항체를 발현하는 클론을 스크리닝함으로써 제조된다. 문헌 [Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol., 6:511 (1976)]에서 최초로 기재되고, 또한 문헌 [Hammerling et al., In: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., pp. 563-681 (1981)]에 기재되어 있는 하이브리도마 기술이 다수의 특정 항원에 대해 높은 수준의 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리드 세포주를 생산하는데 광범위하게 적용되었다.

[0106] 폴리펩티드

[0107] 본원에 상세히 기재된 조성물 (세포) 및 방법에 의해 생산되고, 본원에 제공된 조성물에 존재하는 폴리펩티드는 숙주 세포에 대해 상동성일 수 있거나, 또는 바람직하게는 외인성일 수 있으며, 이는 이들이 사용된 숙주 세포에 대해 이중성, 즉 외래물질임을 의미하고, 예컨대 차이나이즈 햄스터 난소 세포에 의해 생산된 인간 단백질 또는 포유동물 세포에 의해 생산된 효모 폴리펩티드가 있다. 한 변형법에서, 폴리펩티드는 숙주 세포에 의해 배지로 직접 분비되는 포유동물 폴리펩티드 (예컨대, 항체)이다. 또 다른 변형법에서, 폴리펩티드는 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포의 용해에 의해 배지로 방출된다.

[0108] 한 변형법에서, 폴리펩티드는쇄 길이가 보다 높은 수준의 3차 및/또는 4차 구조를 생산하기에 충분한 아미노산의 서열이다. 한 측면에서, 폴리펩티드는 적어도 약 5-20 kD, 대안적으로 적어도 약 15-20 kD, 바람직하게는 적어도 약 20 kD의 분자량을 가질 것이다.

[0109] 숙주 세포에서 발현가능한 임의의 폴리펩티드가 본 개시내용에 따라 생산될 수 있으며, 제공된 조성물에 존재할 수 있다. 폴리펩티드는 숙주 세포에 내인성이 유전자로부터 또는 유전 공학을 통해 숙주 세포에 도입된 유전자로부터 발현될 수 있다. 폴리펩티드는 자연에서 발생하는 것일 수 있거나 또는 대안적으로 인간의 손에 의해 조작 또는 선택된 서열을 가질 수 있다. 조작된 폴리펩티드는 자연에서 개별적으로 발생하는 다른 폴리펩티드 성분으로부터 어셈블리될 수 있거나 또는 자연적으로 발생하지 않는 하나 이상의 절편을 포함할 수 있다.

[0110] 바람직하게는 본 발명에 따라 발현될 수 있는 폴리펩티드가 종종 관심있는 생물학적 또는 화학적 활성을 기초로 선택될 것이다. 예를 들어, 본 발명은 임의의 제약상 또는 상업적으로 관련된 효소, 수용체, 항체, 호르몬, 조절 인자, 항원, 결합제 등을 발현시키기 위해 이용될 수 있다.

[0111] 다양한 폴리펩티드가 본원에 제공된 방법에 따라 생산될 수 있고, 본원에 제공된 조성물에 존재할 수 있다. 박테리아 폴리펩티드의 예는 예를 들어 알칼리서 포스파타제 및 β -락타마제를 포함한다. 포유동물 폴리펩티드의 예는 분자, 예컨대 레닌, 성장 호르몬, 예를 들어 인간 성장 호르몬; 소 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지단백질; 알파-1-항트립신; 인슐린 A-쇄; 인슐린 B-쇄; 프로인슐린; 여포 자극 호르몬; 칼시토닌; 황체화 호르몬; 글루카곤; 응고 인자, 예컨대 인자 VIIIC, 인자 IX, 조직 인자 및 폰 빌레브란트 인자; 항-응고 인자, 예컨대 단백질 C; 심방성 나트륨이뇨 인자; 폐 계면활성제; 플라스미노겐 활성화제, 예컨대 우로키나제 또는 인간 소변 또는 조직-유형 플라스미노겐 활성화제 (t-PA); 붐베신; 트롬빈; 조절 성장 인자; 종양 괴사 인자-알파 및 -베타; 엔케팔리나제; RANTES (활성화시에 정상적으로 발현 및 분비된 T-세포를 조절함); 인간 대식세포 염증성 단백질 (MIP-1-알파); 혈청 알부민, 예컨대 인간 혈청 알부민; 필러-억제 물질; 텔락신 A-쇄; 텔락신 B-쇄; 프로텔락신; 마우스 고키도트로핀-연관 펩티드; 미생물 단백질, 예컨대 베타-락타마제; DNase; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자 (VEGF); 호르몬 또는 성장 인자에 대한 수용체; 인테그린; 단백질 A 또는 D; 류마티스 인자; 신경영양 인자, 예컨대 골-유래 신경영양 인자 (BDNF), 뉴로트로핀 -3, -4, -5, 또는 -6 (NT-3, NT-4, NT-5 또는 NT-6), 또는 신경 성장 인자, 예컨대 NGF- β ; 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF); 섬유모세포 성장 인자, 예컨대 aFGF 및 bFGF; 표피 성장 인자 (EGF); 형질전환 성장 인자 (TGF), 예컨대 TGF-알파 및 TGF-베타, 예를 들어 TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 또는 TGF- β 5; 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; CD 단백질, 예컨대 CD-3, CD-4, CD-8 및 CD-19; 에리트로포이에틴; 골유도 인자; 면역독소; 골 형태발생 단백질 (BMP); 인터페론, 예컨대 인터페론-알파, -베타 및 -감마; 콜로니 자극 인자 (CSF), 예를 들어 M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF; 인터류킨 (IL), 예를 들어 IL-1 내지 IL-10; 슈퍼옥사이드 디스무타제; T-세포 수용체; 표면 막

단백질; 붕괴 촉진 인자; 바이러스 항원, 예컨대 예를 들어 AIDS 외피의 일부; 수송 단백질; 귀소 수용체; 어드레신; 조절 단백질; 항체; 및 임의의 상가-열거된 폴리펩티드의 단편을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0112] 항체는 본원에 제공된 방법에 따라 생산되고 제공된 조성물에 존재할 수 있는 포유동물 폴리펩티드의 예이다. 항체는 특정 항원에 대한 결합 특이성을 나타내는 폴리펩티드의 바람직한 부류이다. 일반적으로, 천연 항체는 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된 약 150,000 달톤의 이종사량체 당단백질이다. 각각의 경쇄는 1개의 디설피드 공유 결합에 의해 중쇄에 연결되고, 디설피드 연결부의 수는 다양한 이뮤노글로불린 이소형의 중쇄마다 상이하다. 또한, 각각의 중쇄 및 경쇄는 일정하게 이격된쇄내 디설피드 가교를 갖는다. 각각의 중쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 (V_H)을 갖고, 그 뒤에 다수의 불변 도메인이 존재한다. 각각의 경쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 (V_L) 및 그의 다른쪽 말단에 불변 도메인을 갖고; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되며, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정한 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이의 인터페이스를 형성하는 것으로 여겨진다.

[0113] 항체는 모두 이뮤노글로불린 폴드를 기준으로 하여 하는 다양한 구조를 갖는 자연 발생 이뮤노글로불린 분자이다. 예를 들어, IgG 항체는 디설피드-결합된 2개의 "중"쇄 및 2개의 "경"쇄를 가져 기능적 항체를 형성한다. 각각의 중쇄 및 경쇄 자체는 "불변" (C) 및 "가변" (V) 영역을 포함한다. V 영역은 항체의 항원 결합 특이성을 결정하고, C 영역은 구조 지지체를 제공하고, 면역 이펙터와 비-항원-특이적 상호작용에서 기능한다. 항체 또는 항체의 항원-결합 단편의 항원 결합 특이성은 특정한 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 능력이다.

[0114] 항체의 항원 결합 특이성은 V 영역의 구조적인 특성에 의해 결정된다. 가변성이 가변 도메인의 110개 아미노산 범위에 걸쳐 고르게 분포되어 있는 것은 아니다. 대신, V 영역은 "초가변 영역"이라 불리는 극단적인 가변성의 더 짧은 영역 (각각 9-12개 아미노산 길이)으로 분리된 프레임워크 영역 (FR) (15-30개 아미노산)이라 불리는 비교적 불변성의 스트레치로 이루어진다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 3개의 초가변 영역에 의해 연결되고 주로 β -시트 배위를 취하는 4개의 FR을 각각 포함하며, 이들 초가변 영역은 상가 β -시트 구조를 연결하고 일부 경우에는 그의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각 쇠로부터의 초가변 영역은 FR에 의해 서로 근접하게 위치하고, 다른 쇠로부터의 초가변 영역과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] 참조). 불변 도메인은 항원에 대한 항체 결합에 직접 관여하지는 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체 의존성 세포 세포독성 (ADCC)에 있어서의 항체의 참여를 나타낸다.

[0115] 각각의 V 영역은 전형적으로 3개의 상보성 결정 영역 ("CDR", 이들은 각각 "초가변 루프"를 함유함) 및 4개의 프레임워크 영역을 포함한다. 따라서, 특정한 바람직한 항원에 실질적인 친화도로 결합하는데 요구되는 최소 구조 단위인 항체 결합 부위는 전형적으로 3개의 CDR, 및 CDR을 적절한 입체형태로 유지 및 존재하게 하는 이들 사이에 배치된 적어도 3개, 바람직하게는 4개의 프레임워크 영역을 포함할 것이다. 고전적인 4쇄 항체는 협력하여 V_H 및 V_L 도메인에 의해 정의되는 항원 결합 부위를 갖는다. 특정 항체, 예컨대 낙타 및 상어 항체는 경쇄가 결여되어 있고, 오직 중쇄에 의해 형성된 결합 부위에 의존한다. 결합 부위가 V_H 및 V_L 사이의 협력없이 중쇄 또는 경쇄만으로 형성된 단일 도메인 조작된 이뮤노글로불린을 제조할 수 있다.

[0116] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체마다 서열에서 광범위하게 상이하며, 각각의 특정한 항체의 그의 특정한 항원에 대한 결합 및 특이성에 이용된다는 사실을 지칭한다. 그러나, 가변성이 항체의 가변 도메인 전반에 걸쳐 고르게 분포되어 있는 것은 아니다. 이는 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 둘 다 내에 초가변 영역이라 지칭되는 3개의 절편에 집중되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)으로 지칭된다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 3개의 초가변 영역에 의해 연결되고 주로 β -시트 배위를 취하는 4개의 FR을 각각 포함하며, 이들 초가변 영역은 상가 β -시트 구조를 연결하고 일부 경우에는 그의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각 쇠로부터의 초가변 영역은 FR에 의해 서로 근접하게 위치하고, 다른 쇠로부터의 초가변 영역과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 참조). 불변 도메인은 항원에 대한 항체 결합에 직접 관여하지는 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체 의존성 세포 세포독성 (ADCC)에 있어서의 항체의 참여를 나타낸다.

[0117] 용어 "초가변 영역"은 본원에서 사용될 때, 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어, V_L 에서는 대략적으로 약 잔기 4-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 V_H 에서는 대략적으로 약 31-35B (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3)) (문헌

[Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] 및/또는 "초가변 루프"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어, VL에서는 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3), 및 VH에서는 26-32 (H1), 52A-55 (H2) 및 96-101 (H3)) (문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)])를 포함할 수 있다.

- [0118] "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.
- [0119] 항체를 파파인으로 소화시키면, "Fab" 단편으로 불리는, 각각 단일 항원-결합 부위를 갖는 2개의 동일한 항원-결합 단편 및 나머지 "Fc" 단편이 생성되며, 이러한 명칭은 그의 용이하게 결정화되는 능력을 반영한 것이다. 펩신 처리는 2개의 항원-결합 부위를 갖고 여전히 항원을 가교시킬 수 있는 F(ab')₂ 단편을 생성한다.
- [0120] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이러한 영역은 긴밀, 비-공유 회합된 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 이루어진다. 이러한 배위에서 각각의 가변 도메인의 3개의 초가변 영역은 상호작용하여 VH-VL 이량체 표면 상에서 항원-결합 부위를 한정한다. 총괄적으로, 6개의 초가변 영역은 항체에 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 심지어 단일 가변 도메인 (또는 단지 3개만의 항원에 특이적인 초가변 영역을 포함하는 Fv의 절반)은 전체 결합 부위보다 낮은 친화도에서도 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.
- [0121] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 수개의 잔기가 부가되었다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. 본원에서, Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 적어도 1개의 유리 티올 기를 보유하는 Fab'의 명칭이다. F(ab')₂ 항체 단편은 본래 가운데에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로 생성된다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.
- [0122] 임의의 척추동물 종으로부터의 항체 (이뮤노글로불린)의 "경쇄"는 불변 도메인의 아미노산 서열에 기반하여, 카파(κ) 및 람다(λ)로 불리는 명백하게 상이한 2가지 유형 중의 하나로 지정될 수 있다.
- [0123] 이들 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 항체는 상이한 부류로 지정될 수 있다. 5가지 주요 부류의 무손상 항체: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이중 몇 가지는 하위부류 (이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2로 추가로 나뉠 수 있다. 상이한 부류의 항체에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 지칭된다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 배위는 널리 공지되어 있다.
- [0124] "단일-쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드에 존재하는 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 바람직한 구조를 형성할 수 있도록 하는, VH 및 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 검토를 위해, 문헌 [Plueckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.
- [0125] 용어 "디아바디"는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 지칭하는데, 상기 단편은 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 동일 폴리펩티드 쇠 (VH - VL) 내에 포함한다. 동일 쇠 상의 2개의 도메인 사이에서 쌍형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 상기 도메인은 또 다른 쇠의 상보적 도메인과 쌍을 형성하게 되어 2개의 항원-결합 부위를 생성하게 된다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 보다 상세하게 기재되어 있다.
- [0126] 본원에서 목적을 위해, "무손상 항체"는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 뿐만 아니라 Fc 영역을 포함하는 것이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 바람직하게는, 무손상 항체는 하나 이상의 이펙터 기능을 갖는다.
- [0127] "천연 항체"는 통상적으로 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된 약 150,000 달톤의 이중 사량체 당단백질이다. 각각의 경쇄는 1개의 공유 디설피드 결합에 의해 중쇄에 연결되지만, 디설피드 연결의 수는 상이한 이뮤노글로불린 이소형의 중쇄마다 달라진다. 또한, 각각의 중쇄 및 경쇄는 일정하게 이격된 쇠내 디설피드 가교를 갖는다. 각각의 중쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 (VH)을 갖고, 그 뒤에는 수많은 불변 도메인이 존재한다. 각각의 경쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 (VL)을 다른쪽 말단에 불변 도메인을 갖고; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되며, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정한 아

미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이의 인터페이스를 형성한다고 여겨진다.

- [0128] "네이키드 항체"는 세포독성 모이어티 또는 방사성표지와 같은 이종 분자에 접합되지 않은 항체 (본원에 정의된 바와 같음)이다.
- [0129] 항체는 관심 항원에 대해 지시된다. 바람직하게는, 항원은 생물학적으로 중요한 폴리펩티드이고, 질환 또는 상태로 고통받는 개체에게 항체를 투여하는 것은 포유동물에서 치료 이익을 발생시킬 수 있다. 그러나, 비-폴리펩티드 항원 (예컨대, 종양-연관 당지질 항원; 미국 특허 번호 5,091,178 참조)에 대해 지시된 항체가 또한 사용될 수 있다.
- [0130] 항원이 폴리펩티드인 경우, 이는 막횡단 분자 (예를 들어, 수용체) 또는 리간드, 예컨대 성장 인자일 수 있다. 예시적인 항원은 분자, 예컨대 레닌; 성장 호르몬, 예를 들어 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지단백질; 알파-1-항트립신; 인슐린 A-쇄; 인슐린 B-쇄; 프로인슐린; 여포 자극 호르몬; 칼시토닌; 황체화 호르몬; 글루카곤; 응고 인자, 예컨대 인자 VIIIC, 인자 IX, 조직 인자 (TF) 및 폰 빌레브란트 인자; 항-응고 인자, 예컨대 단백질 C; 심방 나트륨이뇨 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 (정상적으로 발현 및 분비된 T-세포 활성화시에 조절됨); 인간 대식세포 염증성 단백질 (MIP-1-알파); 혈청 알부민, 예컨대 인간 혈청 알부민; 필러-억제 물질; 텔락신 A-쇄; 텔락신 B-쇄; 프로텔라신; 마우스 고나도트로핀-연관 펩티드; 미생물 단백질, 예컨대 베타-락타마제; DNase; IgE; 세포독성 T-림프구 관련 항원 (CTLA), 예컨대 CTLA-4; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자 (VEGF); 호르몬 또는 성장 인자에 대한 수용체; 단백질 A 또는 D; 류마티스 인자; 신경영양 인자, 예컨대 골-유래 신경영양 인자 (BDNF), 뉴로트로핀-3, -4, -5, 또는 -6 (NT-3, NT-4, NT-5 또는 NT-6), 또는 신경 성장 인자, 예컨대 NGF- β ; 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF); 섬유모세포 성장 인자, 예컨대 aFGF 및 bFGF; 표피 성장 인자 (EGF); 형질전환 성장 인자 (TGF), 예컨대 TGF-알파 및 TGF-베타, 예를 들어 TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 또는 TGF- β 5; 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; CD 단백질, 예컨대 CD3, CD4, CD8, CD18, CD19, CD20 및 CD40; 에리트로포이에틴; 골유도 인자; 면역독소; 골 형태형성 단백질 (BMP); 인터페론, 예컨대 인터페론-알파, -베타, 및 -감마; 콜로니 자극 인자 (CSF), 예를 들어 M-CSF, GM-CSF, 및 G-CSF; 인터류킨 (IL), 예를 들어 IL-1 내지 IL-10; 슈퍼옥사이드 디스뮤타제; T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 붕괴 촉진 인자; 바이러스 항원, 예컨대 예를 들어 AIDS 외피의 일부; 수송 단백질; 귀소 수용체; 어드레신; 조절 단백질; 인테그린, 예컨대 CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 및 VCAM; 종양 연관 항원, 예컨대 HER2, HER3 또는 HER4 수용체; 및 임의의 상기-열거된 폴리펩티드의 단편을 포함한다.
- [0131] 본원에 상세히 기재된 항체에 바람직한 분자 표적은 CD 단백질, 예컨대 예컨대 CD3, CD4, CD8, CD18, CD19, CD20, CD34 및 CD40; ErbB 수용체 패밀리를, 예컨대 EGF 수용체, HER2, HER3 또는 HER4 수용체의 구성원; 세포 부착 분자, 예컨대 LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, α 4/ β 7 인테그린, 및 α v/ β 3 인테그린 (그의 α 또는 β 서브유닛 포함) (예를 들어, 항-CD11a, 항-CD18 또는 항-CD11b 항체); 성장 인자, 예컨대 VEGF; 조직 인자 (TF); 알파 인터페론 (α -IFN); 인터류킨, 예컨대 IL-8; IgE; 혈액형 항원; f1k2/f1t3 수용체; 비만 (OB) 수용체; mp1 수용체; CTLA-4; 단백질 C 등을 포함한다.
- [0132] 본원의 방법에 의해 생산될 수 있는 항체 (그의 단편 포함, 다시 그의 항원-결합 단편 포함)는 항-HER2, 항체 2C4, 항-VEGF, 항체 C2B8, 항CD11a, 항-조직 인자, IgG4b, 항-CD40, 항-CD20, 항-IgE, E25, E26, 항-PCSK9 및 항-베타7을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0133] 세포 성장 및 폴리펩티드 생산
- [0134] 일반적으로, 세포는 임의의 세포 성장, 유지 및/또는 폴리펩티드 생산을 촉진하는 하나 이상의 조건 하에 본원에 기재된 임의의 세포 배양 배지와 합한다 (이와 접촉시킴). 세포를 성장시키는 (즉, 세포를 배양하는) 방법 및 폴리펩티드를 생산하는 방법은 세포 및 세포 배양 배지를 함유하는 배양 용기 (생물반응기)를 이용한다. 배양 용기는 세포를 배양하는데 적합한 임의의 물질, 예를 들어 유리, 플라스틱 또는 금속으로 구성될 수 있다. 전형적으로, 배양 용기는 적어도 1 리터일 것이며, 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10,000 리터 또는 그 초과일 수 있다. 배양 과정 동안 조정될 수 있는 배양 조건은 pH 및 온도를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0135] 세포 배양은 일반적으로 세포 배양물의 생존, 성장 및 생존율 (유지)에 도움이 되는 조건 하에 초기 성장기에서

유지된다. 정확한 조건은 세포 유형, 세포가 유래되는 유기체, 발현되는 폴리펩티드의 특성 및 특징에 따라 달라질 것이다.

- [0136] 초기 성장기에서 세포 배양의 온도는 주로 세포 배양물이 살아있는 상태로 유지되는 온도 범위에 기초하여 선택될 것이다. 예를 들어, 초기 성장기 동안, CHO 세포는 37℃에서 잘 성장하였다. 일반적으로, 대부분의 포유동물 세포는 약 25℃ 내지 42℃의 범위 내에서 잘 성장하였다. 바람직하게는, 포유동물 세포는 약 35℃ 내지 40℃의 범위 내에서 잘 성장하였다. 당업자는 세포의 요구 및 생산 요구사항에 따라 세포를 성장시키는데 적절한 온도 또는 온도들을 선택할 수 있을 것이다.
- [0137] 본 발명의 한 실시양태에서, 초기 성장기의 온도는 단일의 일정한 온도에서 유지된다. 또 다른 실시양태에서, 초기 성장기의 온도는 소정의 온도 범위 내에서 유지된다. 예를 들어, 온도는 초기 성장기 동안 꾸준히 증가 또는 감소될 수 있다. 대안적으로, 온도는 초기 성장기 동안 다양한 시점에서 불연속적인 양으로 증가 또는 감소될 수 있다. 당업자는 단일 또는 다중 온도가 사용되어야 하는지 여부, 및 온도가 꾸준히 증가 또는 불연속적인 양으로 조정되어야 하는지 여부를 결정할 수 있을 것이다.
- [0138] 세포는 보다 많거나 또는 보다 적은 양의 시간 동안 초기 성장기 동안에 성장할 수 있다. 한 변형법에서, 세포는 세포가 방해받지 않고 성장하도록 허용된 경우에 궁극적으로 달성하게 되는 최대 생존 세포 밀도의 주어진 백분율인 생존 세포 밀도를 달성하기에 충분한 기간 동안 성장한다. 예를 들어, 세포는 최대 생존 세포 밀도의 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 99 퍼센트의 목적하는 생존 세포 밀도를 달성하기에 충분한 기간 동안 성장할 수 있다.
- [0139] 또 다른 실시양태에서, 세포는 규정된 기간 동안 성장하도록 허용된다. 예를 들어, 세포 배양물의 출발 농도, 세포가 성장하는 온도, 및 세포의 고유 성장 속도에 따라, 세포는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20일 또는 그 초과 동안 성장할 수 있다. 일부 경우에, 세포는 1개월 또는 그 초과 동안 성장하도록 허용될 수 있다.
- [0140] 세포 배양물은 세포에 대한 산소화 및 영양소 분산을 증가시키기 위해 초기 배양기 동안 교반 또는 진탕시킬 수 있다. 본 발명에 따라, 당업자는 pH, 온도, 산소화 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 초기 성장기 동안의 생물반응기의 특징의 내부 조건을 제어하거나 또는 조절하는데 유익할 수 있을 것임을 이해할 것이다. 예를 들어, pH는 적절한 양의 산 또는 염기를 공급함으로써 제어될 수 있고, 산소화는 당업계에 널리 공지된 살포 장치로 제어될 수 있다.
- [0141] 초기 배양 단계는 성장기이며, 여기서 회분 세포 배양 조건은 재조합 세포의 성장을 증진시키도록 변형되어, 시드 트레인을 생산한다. 성장기는 일반적으로 세포가 일반적으로 급속하게 분할하는, 예를 들어 성장하는 지수적 성장 기간을 지칭한다. 이러한 기간 동안, 세포는 소정의 기간 동안, 통상적으로 1 내지 4일, 예를 들어 1, 2, 3 또는 4일 동안, 세포 성장이 최적인 이러한 조건 하에 배양된다. 숙주 세포를 위한 성장 주기의 결정은 당업자에게 공지된 방법에 의해 특정한 숙주 세포에 대해 결정될 수 있다.
- [0142] 성장기에서, 기초 배양 배지 및 세포는 배양 용기에 회분으로 공급될 수 있다. 배양 배지는 한 측면에서 약 5% 미만 또는 1% 미만 또는 0.1% 미만의 혈청 및 다른 동물-유래 단백질을 함유한다. 그러나, 혈청 및 동물-유래 단백질은 원하는 경우에 사용될 수 있다. 특정한 변형법에서, 기초 배지는 CDM이다. 아미노산, 비타민, 미량 원소 및 다른 배지 성분을 유럽 EP 307,247 또는 미국 특허 번호 6,180,401에서 규정된 범위의 1 또는 2배로 사용될 수 있으며, 이들 문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0143] 대안적으로, 상업적으로 입수가능한 배지, 예컨대 햄 F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 ([MEM], 시그마), RPMI-1640 (시그마), 및 돌베코의 변형된 이글 배지 ([DMEM], 시그마)가 동물 세포를 배양하는데 적합하며, 본원에 상세히 기재된 화학적으로 규정된 배지 구성성분으로 (예를 들어, 제공된 바와 같은 키트의 사용에 의해) 보충될 수 있다. 또한, 문헌 [Ham and Wallace, Meth. Enz., 58:44 (1979), Barnes and Sato, Anal. Biochem., 102:255 (1980)], 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 5,122,469 (이들 모두의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 임의의 배지는 숙주 세포에 대한 배양 배지로 사용될 수 있으며, 이들은 각각 본원에 상세히 기재된 화학적으로 규정된 배지 구성성분으로 (예를 들어, 제공된 바와 같은 키트의 사용에 의해) 보충될 수 있다. 한 측면에서, 배지가 동물-기재 제품을 함유하는 경우에, 배지는 CDM으로 보충될 수 있다.
- [0144] 본원에 제공된 임의의 배지는 또한 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대, 인슐린, 트랜스페린

또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대, 나트륨, 클로라이드, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제 (예컨대, HEPES), 뉴클레오시드 (예컨대, 아데노신 및 티미딘), 미량 원소 (통상적으로 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨) 및 글루코스 또는 등가의 에너지원으로 보충될 수 있다. 또한, 임의의 다른 필요한 보충물을 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함시킬 수 있다.

[0145] 그의 성장에서 특정한 시점에, 세포는 생산기에서의 배양 출발 시점에 배양 배지에 접종하기 위한 접종물을 형성할 수 있다. 대안적으로, 생산기는 성장기에 연속될 수 있다. 세포 생산기는 일반적으로 폴리펩티드 생산기에 이어진다.

[0146] 폴리펩티드 생산기 동안, 세포 배양물은 (성장기와 비교하여) 세포 배양물의 생존 및 생존율에 도움이 되고, 목적하는 폴리펩티드의 발현에 적절한 배양 조건의 제2의 세트 하에 유지될 수 있다. 예를 들어, 후속 생산기 동안, CHO 세포는 재조합 폴리펩티드 및 단백질을 25°C 내지 35°C 범위 내에서 잘 발현한다. 다중 불연속적 온도 이동이 세포 밀도 또는 생존율을 증가시키거나 또는 재조합 폴리펩티드 또는 단백질의 발현을 증가시키는데 사용될 수 있다. 한 측면에서, 본원에 제공된 바와 같은 배지는 폴리펩티드가 상이한 배지에서 생산되는 경우에 수득한 오염물과 비교하여 폴리펩티드 생산을 증가시키는 방법에 사용된 경우에 오염물의 존재를 감소시킨다. 한 변형법에서, 오염물은 전하 변이체 또는 반응성 산소 종이다. 한 측면에서, 본원에 제공된 바와 같은 배지는 폴리펩티드 제품이 상이한 배지에서 생산된 경우에 수득한 색 강도와 비교하여 폴리펩티드의 생산을 증가시키는 방법에 사용되는 경우에 폴리펩티드 제품의 색 강도를 감소시킨다. 한 변형법에서, 폴리펩티드 생산을 증가시키는 방법은 폴리펩티드 생산기 동안 온도 이동 단계를 포함한다. 추가의 변형법에서, 온도 이동 단계는 31°C로부터 37°C로, 32°C로부터 37°C로, 33°C로부터 37°C로, 34°C로부터 37°C로, 35°C로부터 37°C로, 36°C로부터 37°C로, 31°C로부터 32°C로, 31°C로부터 33°C로, 31°C로부터 34°C로, 31°C로부터 35°C로, 또는 31°C로부터 36°C로의 온도 이동을 포함한다.

[0147] 세포는 목적하는 세포 밀도 또는 생산 역가에 도달할 때까지 후속 생산기에서 유지될 수 있다. 한 실시양태에서, 세포는 재조합 폴리펩티드에 대한 역가가 최대에 도달할 때까지 후속 생산기에서 유지된다. 다른 실시양태에서, 배양물은 이 시지 전에 수확될 수 있다. 예를 들어, 세포는 최대 생존 세포 밀도의 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 99 퍼센트의 생존 세포 밀도를 달성하기에 충분한 기간 동안 유지될 수 있다. 일부 경우에, 생존 세포 밀도를 최대에 도달하도록 허용한 후에, 배양물을 수확하기 전에 생존 세포 밀도를 어느 정도 수준으로 감퇴시키는 것을 허용하는 것이 바람직할 수 있다.

[0148] 특정 경우에, 후속 생산기 동안 세포 배양물을 세포에 의해 고갈 또는 대사된 영양소 또는 다른 배지 성분으로 보충하는 것이 유익하거나 필요할 수 있다. 예를 들어, 세포 배양물에 세포 배양의 모니터링 동안 고갈되는 것으로 관찰된 영양소 또는 다른 배지 성분을 보충하는 것이 유리할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 후속 생산기 전에 세포 배양물을 보충하는 것은 유익하거나 필요할 수 있다. 비제한적 예로서, 세포 배양물을 호르몬 및/또는 다른 성장 인자, 특정한 이온 (예컨대, 나트륨, 클로라이드, 칼슘, 마그네슘, 및 포스페이트), 완충제, 비타민, 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드, 미량 원소 (보통 매우 낮은 최종 농도로 존재하는 무기 화합물), 아미노산, 지질, 또는 글루코스 또는 다른 에너지원으로 보충하는 것이 유익하거나 필요할 수 있다.

[0149] 폴리펩티드 정제

[0150] 관심 폴리펩티드는 또한 분비 신호 없이 직접 발현되는 경우에 숙주 세포 용해물로부터 회수될 수 있을지라도, 바람직하게는 분비된 폴리펩티드로서 배양 배지로부터 회수된다. 한 측면에서, 생산된 폴리펩티드는 항체, 예컨대 모노클로날 항체이다.

[0151] 배양 배지 또는 용해물을 원심분리하여 미립자 세포 잔해물을 제거할 수 있다. 그 후에 폴리펩티드는 적합한 정제 절차를 예시한 하기 절차로 오염물 가용성 단백질 및 폴리펩티드로부터 정제될 수 있다: 면역친화성 또는 이온-교환 칼럼 상의 분획화; 에탄올 침전; 역상 HPLC; 실리카 또는 양이온-교환 수지, 예컨대 DEAE 상의 크로마토그래피; 크로마토포커싱; SDS-PAGE; 황산암모늄 침전; 예를 들어 세파덱스(Sephadex) G-75를 사용하는 겔 여과; 및 오염물, 예컨대 IgG를 제거하기 위한 단백질 A 세파로스(Sepharose) 칼럼. 프로테아제 억제제, 예컨대 페닐 메틸 술폰 플루오라이드 (PMSF)는 또한 정제 동안 단백질분해적 분해를 억제하는데 유용할 수 있다. 당업자는 관심 폴리펩티드에 적합한 정제 방법이 재조합 세포 배양물에서의 발현시에 폴리펩티드의 특징 변화를 설명하기 위한 변형을 필요로 할 수 있다는 것을 알 것이다. 항체는 일반적으로 크로마토그래피 기술 (예를 들어, 낮은 pH 용리 단계를 갖는 단백질 A, 친화도 크로마토그래피 및 공정 불순물을 제거하기 위한 이온 교환 크로마토그래피)를 이용하여 정제될 수 있다. 정제된 단백질은 농축되어, 농축된 단백질 약물 제품, 예를 들어 적어도 100 mg/mL 또는 125 mg/mL 또는 150 mg/mL의 단백질 농도 또는 약 100 mg/mL 또는 125 mg/mL 또는 150

mg/mL의 농도를 갖는 것을 제공할 수 있다. 정제된 단백질은 또한 농축되어, 농축된 단백질 약물 제품, 예를 들어 적어도 1 mg/mL 또는 10 mg/mL 또는 25 mg/mL 또는 50 mg/mL 또는 75 mg/mL의 단백질 농도 또는 적어도 약 1 mg/mL 또는 10 mg/mL 또는 50 mg/mL 또는 75 mg/mL 내지 약 125 mg/mL 또는 내지 약 150 mg/mL 중 어느 하나의 농도를 갖는 것을 제공할 수 있다. 농축된 폴리펩티드 제품이 농축 조건 하에 허용가능한 수준까지, 예를 들어 폴리펩티드가 더 이상이 용액에서 가용성이지 않은 농도까지 농축될 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 폴리펩티드 정제 과정은 폴리펩티드-생산 세포로부터 세포 배양액을 수확하는 단계 및 단백질 A 친화도 크로마토그래피와 음이온 및 양이온 교환 크로마토그래피, 바이러스 제거를 위한 여과, 및 폴리펩티드 최종 제제화 및 농축을 위한 최종 한외여과 및 정용여과 단계를 통한 추가의 정제를 통해 폴리펩티드를 정제하는 단계를 포함할 수 있다. 약물 제제를 위한 폴리펩티드를 생산하고 정제하는 방법의 비제한적 예는 문헌 [Kelley, B. MAbs., 2009, 1(5):443-452] (그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0152] 폴리펩티드 색 평가

[0153] 본원에 상세히 기재된 방법에 의해 생산되고 제공된 조성물에 존재하는 폴리펩티드는 단백질 정제 공정의 임의의 단계에서 색에 대해 평가될 수 있다. 색을 평가하는 방법은 본원에 상세히 기재된 배지에서 성장한 세포로부터 세포 배양액을 수확하는 것, 세포 배양액으로부터 폴리펩티드를 정제하여 폴리펩티드를 포함하는 조성물 (예를 들어, 용액)을 수득하는 것 및 폴리펩티드를 포함하는 용액을 색에 대해 평가하는 것을 포함할 수 있다. 한 변형법에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 단백질 A 친화도 크로마토그래피로 정제한 후에 색에 대해 평가된다. 추가의 변형법에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제한 후에 색에 대해 평가된다. 또 다른 변형법에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 정제한 후에 색에 대해 평가된다. 또 다른 변형법에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의해 정제한 후에 색에 대해 평가된다. 또 다른 변형법에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제한 후에 색에 대해 평가된다. 한 변형법에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 마이크로여과 또는 한외여과를 포함하는 여과에 의해 정제한 후에 색에 대해 평가된다. 한 변형법에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 색에 대한 평가 전에 농축된다 (예를 들어, 조성물은 적어도 100 mg/mL, 125 mg/mL 또는 150 mg/mL 폴리펩티드, 예컨대 항체를 포함할 수 있음). 일부 변형법에서, 농축된 조성물은 색에 대한 평가 전에 적어도 1 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 또는 75 mg/mL 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)를 포함한다. 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 원심분리, 필터 장치, 반투과성 막, 투석, 침전, 이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의해 농축될 수 있다. 한 변형법에서, 폴리펩티드는 동결건조에 의해 농축되고, 색에 대한 평가 전에 재현탁될 수 있다. 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 본원에 상세히 기재된 기술 중 하나 이상으로 정제한 후에 색에 대해 평가될 수 있다. 조성물이 1회 이상의 동결 해동 순환(들)을 거친 후에 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색을 평가하는 것이 본원에서 고려된다. 폴리펩티드의 정제 또는 농축 전에 폴리펩티드를 함유하는 세포 배양액의 색을 평가하는 방법이 또한 본원에서 고려된다.

[0154] 본원에 기재된 배지로 본원에 상세히 기재된 방법에 의해 생산된 (또는 제공된 조성물에 존재하는) 폴리펩티드는 하나 이상의 시각적 색 표준의 사용에 의해 색에 대해 평가될 수 있다. 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색 평가를 위한 방법은 국제적 또는 국가적 색 표준, 예컨대 비제한적으로 미국 약전 색 표준 및 유럽 약전 색 표준의 사용을 포함한다. 문헌 [USP-24 Monograph 631 Color and Achromaticity, United States Pharmacopoeia Inc., 2000, p. 1926-1927 및 Council of Europe. European Pharmacopoeia, 2008, 7th Ed. P.22] (이들의 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)을 참조한다. 예를 들어, 색, 단백광 및 색조 (COC) 검정은 폴리펩티드를 함유하는 용액의 색을 평가하는데 이용될 수 있다. 한 변형법에서, 12 mm 외부 직경의 무색의 투명한 중성 유리의 동일 튜브가 2.0 mL의 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 2.0 mL의 물 또는 용매 또는 논문에 규정된 참조 용액과 비교하는데 사용될 수 있다. 색은 색 결정, 측정 또는 평가를 위해 산란된 주광에서 비교하고 백색 배경에 대해 수직으로 관찰한다. 또 다른 변형법에서, 편평한 바닥 및 15 mm 내지 25 mm의 내부 직경을 갖는 무색의 투명한 중성 유리의 동일 튜브가 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 물 또는 용매 또는 논문에 규정된 참조 용액과 비교하는데 사용되며, 이 때 층의 깊이는 40 mm이다. 색은 색 결정, 측정 또는 평가를 위해 산란된 주광에서 비교하고 백색 배경에 대해 수직으로 관찰한다. 한 변형법에서, 색 결정, 측정 또는 평가는 인간 육안 검사에 의해 수행될 수 있다. 또 다른 변형법에서, 색 결정, 측정 또는 평가는 자동화 공정을 이용함으로써 수행될 수 있다. 예를 들어, 튜브는 색을 결정, 측정 또는 평가하기 위한 알고리즘으로 영상을 처리하기 위해 튜브를 영상화하는 기계에 로딩될 수 있다. COC 검정에 대한 참조 표준은 갈색 (B), 갈색빛-황색 (BY), 황색 (Y), 녹색 빛-황색 (GY) 또는 적색 (R) 중 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되지는 않는 것으로 이해된다. 갈색 참조 표

준에 비교한 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 B1 (가장 어두움), B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 또는 B9 (가장 밝음)의 갈색 참조 표준 값이 제공될 수 있다. 갈색빛-황색 참조 표준에 비교한 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 BY1 (가장 어두움), BY2, BY3, BY4, BY5, BY6 또는 BY7 (가장 밝음)의 갈색빛-황색 참조 표준 값이 제공될 수 있다. 황색 참조 표준에 비교한 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 Y1 (가장 어두움), Y2, Y3, Y4, Y5, Y6 또는 Y7 (가장 밝음)의 황색 참조 표준 값이 제공될 수 있다. 녹색빛-황색 참조 표준에 비교한 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 GY1 (가장 어두움), GY2, GY3, GY4, GY5, GY6 또는 GY7 (가장 밝음)의 녹색빛-황색 참조 표준 값이 제공될 수 있다. 적색 참조 표준에 비교한 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 R1 (가장 어두움), R2, R3, R4, R5, R6 또는 R7 (가장 밝음)의 적색 참조 표준 값이 제공될 수 있다. 한 측면에서, 허용되는 색은 본원에 제공된 스케일 상에서 가장 어두움을 측정하는 것을 제외한 (예를 들어, 적색 참조 표준 값의 경우에 R1을 제외한) 임의의 색이다. 한 변형법에서, 본원에 상세히 기재된 배치에서 배양한 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색은 표 2에 기재된 바와 같은 참조 표준 값을 갖는다. 본원에 기재된 바와 같이, 한 측면에서 본원에 방법 및 조성물에 사용될 수 있는 배지는 B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, BY3, BY4, BY5, BY6, BY7, Y3, Y4, Y5, Y6, Y7, GY3, GY4, GY5, GY6, GY7, R3, R4, R5, R6 및 R7로 이루어진 군으로부터 선택된 참조 표준 색 값을 갖는 폴리펩티드 조성물 (한 변형법에서, 적어도 100 mg/mL 또는 125 mg/mL 또는 150 mg/ml 폴리펩티드를 포함하는 조성물임)을 생성하는 것으로 이해된다. 한 측면에서, 본원의 방법 및 조성물에 사용될 수 있는 배지는 B4, B5, B6, B7, B8, BY4, BY5, BY6, Y4, Y5, Y6, GY4, GY5, GY6, GY7, R3, R4, R5 및 R6 중 어느 하나 초과와 참조 표준 색 값을 갖는 폴리펩티드 조성물 (한 변형법에서, 적어도 100 mg/mL 또는 125 mg/mL 또는 150 mg/ml 폴리펩티드를 포함하는 조성물)를 생성한다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 참조 표준 색 값의 기재는 본원에 상세히 기재된 임의의 배치, 방법 또는 조성물의 기재에 적용될 수 있고, 이를 추가로 변형시킬 수 있다.

[0155]

[표 2]

예시적인 참조 표준 값

참조 표준	참조 표준 값
(a) 갈색	약 B1 내지 약 B9; 약 B1 내지 약 B8; 약 B1 내지 약 B7; 약 B1 내지 약 B6; 약 B1 내지 약 B5; 약 B1 내지 약 B4; 약 B1 내지 약 B3; 약 B1 내지 약 B2; 약 B2 내지 약 B9; 약 B3 내지 약 B9; 약 B4 내지 약 B9; 약 B5 내지 약 B9; 약 B6 내지 약 B9; 약 B7 내지 약 B9; 약 B8 내지 약 B9; 약 B2 내지 약 B8; 약 B3 내지 약 B7; 약 B4 내지 약 B6; 약 B5 내지 약 B7; 약 B6 내지 약 B8; 약 B1 또는 B2 또는 B3 또는 B4 또는 B5 또는 B6 또는 B7 또는 B8 또는 B9; 적어도 약 B1 또는 B2 또는 B3 또는 B4 또는 B5 또는 B6 또는 B7 또는 B8 또는 B9. 바람직하게는 B3 내지 B9. 가장 바람직하게는 B4 내지 B9.
(b) 갈색빛-황색	약 BY1 내지 약 BY7; 약 BY1 내지 약 BY6; 약 BY1 내지 약 BY5; 약 BY1 내지 약 BY4; 약 BY1 내지 약 BY3; 약 BY1 내지 약 BY2; 약 BY2 내지 약 BY7; 약 BY3 내지 약 BY7; 약 BY4 내지 약 BY7; 약 BY5 내지 약 BY7; 약 BY6 내지 약 BY7; 약 BY2 내지 약 BY6; 약 BY3 내지 약 BY5; 약 BY4 내지 약 BY6; 약 BY5 내지 약 BY6; 약 BY1 또는 BY2 또는 BY3 또는 BY4 또는 BY5 또는 BY6 또는 BY7; 적어도 약 BY1 또는 BY2 또는 BY3 또는 BY4 또는 BY5 또는 BY6 또는 BY7. 바람직하게는 BY3 내지 BY7. 가장 바람직하게는 BY4 내지 BY7.

[0156]

(c) 황색	약 Y1 내지 약 Y7; 약 Y1 내지 약 Y6; 약 Y1 내지 약 Y5; 약 Y1 내지 약 Y4; 약 Y1 내지 약 Y3; 약 Y1 내지 약 Y2; 약 Y2 내지 약 Y7; 약 Y3 내지 약 Y7; 약 Y4 내지 약 Y7; 약 Y5 내지 약 Y7; 약 Y6 내지 약 Y7; 약 Y2 내지 약 Y6; 약 Y3 내지 약 Y5; 약 Y4 내지 약 Y6; 약 Y5 내지 약 Y6; 약 Y1 또는 Y2 또는 Y3 또는 Y4 또는 Y5 또는 Y6 또는 Y7; 적어도 약 Y1 또는 Y2 또는 Y3 또는 Y4 또는 Y5 또는 Y6 또는 Y7. 바람직하게는 Y3 내지 Y7. 가장 바람직하게는 Y4 내지 Y7.
(d) 녹색빛-황색	약 GY1 내지 약 GY7; 약 GY1 내지 약 GY6; 약 GY1 내지 약 GY5; 약 GY1 내지 약 GY4; 약 GY1 내지 약 GY3; 약 GY1 내지 약 GY2; 약 GY2 내지 약 GY7; 약 GY3 내지 약 GY7; 약 GY4 내지 약 GY7; 약 GY5 내지 약 GY7; 약 GY6 내지 약 GY7; 약 GY2 내지 약 GY6; 약 GY3 내지 약 GY5; 약 GY4 내지 약 GY6; 약 GY5 내지 약 GY6; 약 GY1 또는 GY2 또는 GY3 또는 GY4 또는 GY5 또는 GY6 또는 GY7; 적어도 약 GY1 또는 GY2 또는 GY3 또는 GY4 또는 GY5 또는 GY6 또는 GY7. 바람직하게는 GY3 내지 GY7. 가장 바람직하게는 GY4 내지 GY7.
(e) 적색	약 R1 내지 약 R7; 약 R1 내지 약 R6; 약 R1 내지 약 R5; 약 R1 내지 약 R4; 약 R1 내지 약 R3; 약 R1 내지 약 R2; 약 R2 내지 약 R7; 약 R3 내지 약 R7; 약 R4 내지 약 R7; 약 R5 내지 약 R7; 약 R6 내지 약 R7; 약 R2 내지 약 R6; 약 R3 내지 약 R5; 약 R4 내지 약 R6; 약 R5 내지 약 R6; 약 R1 또는 R2 또는 R3 또는 R4 또는 R5 또는 R6 또는 R7; 적어도 약 R1 또는 R2 또는 R3 또는 R4 또는 R5 또는 R6 또는 R7. 바람직하게는 R3 내지 R7. 가장 바람직하게는 R4 내지 R7.

[0157]

[0158]

또 다른 예에서, 본원에 기재된 배지로 본원에 상세히 기재된 방법에 의해 생산된 (또는 제공된 조성물에 존재하는) 폴리펩티드는 정량적 검정으로 색에 대해 평가될 수 있다. 한 변형법에서, 정량적 검정은 자동화 고정을 이용하여 수행될 수 있다. 한 변형법에서, 정량적 검정은 본원에 기재된 정규화된 형광 강도 (NIFTY) 검정 또는 전체 색 검정이다. 예를 들어, 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 생산된 폴리펩티드를 함유하는 용액은 폴리펩티드를 포함하는 용액을 하기 단계에 적용함으로써 NIFTY 검정에 의해 색 강도에 대해 평가될 수 있다: 1) 폴리펩티드 시험 샘플을 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 적용하는 단계 (여기서, SEC를 위한 이동상은 특정 온도에서 유지되는 칼럼과 특정 pH의 완충제를 포함함); 2) SEC 용리액을 특정 파장 (예를 들어, 280nm)에서의 UV 흡광도 및 특정 여기 파장 (예를 들어, 350nm) 및 방출 파장 (예를 들어, 425nm)을 갖는 형광에 대해 모니터링하는 단계; 3) 폴리펩티드 종의 SEC 피크를 당업계에 공지된 소프트웨어 (예를 들어, 애질런트(Agilent) chemstation(Chemstation) 소프트웨어)를 이용하여 UV 흡광도 및 형광 방출 크로마토그램 상에 통합하고, 주요 피크의 형광 피크 면적을 주요 피크의 UV 흡광도 피크 면적으로 나누어 형광을 정규화하는 단계; 및 4) 본원에 개시된 임의의 참조 표준, 예컨대 갈색 (B), 갈색빛-황색 (BY), 황색 (Y), 녹색빛-황색 (GY) 또는 적색 (R)에 기초하여 공지된 COC 값을 함유하는 폴리펩티드 참조 샘플에 대한 폴리펩티드 시험 샘플의 정규화된 형광의 비를 계산하여 수치 값을 수득하는 단계 (여기서, 보다 높은 수치 값 (예를 들어, 보다 높은 NIFTY 값)은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 수치 값 (예를 들어, 보다 낮은 NIFTY 값)은 보다 낮은 색 강도를 나타냄). 또 다른 예에서, 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 생산된 폴리펩티드를 함유하는 용액은 본원에 기재된 바와 같은 전체 색 검정에 의해 색 강도에 대해 평가된다. 예를 들어, 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 생산된 폴리펩티드를 함유하는 용액은 폴리펩티드를 포함하는 용액을 하기 단계에 적용시킴으로써 전체 색 검정에 의해 색 강도에 대해 평가될 수 있다: 1) 분광광도계를 이용하여 가시 영역 (380-780nm)에서 샘플을 측정함으로써 폴리펩티드 시험 샘플의 흡수 스펙트럼을 수득하는 단계; 2) 흡수 스펙트럼을 문헌 [Standard Practice for Calculation of Color Tolerances and Color Differences from Instrumentally Measured Color Coordinates, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 06.01, (2011)]에 기재된 바와 같이 CIE L*a*b* 색 스케일로 전환시키는

단계; 3) 전체 색 측정값을 획득하는 단계 (여기서, 측정값은 3차원 CIE L*a*b* 색 공간에서 폴리펩티드 시험 샘플 및 물 사이의 유클리드 거리에 상응하는 델타 E를 나타냄); 및 4) 본원에 개시된 임의의 참조 표준, 예컨대 갈색 (B), 갈색빛-황색 (BY), 황색 (Y), 녹색빛-황색 (GY) 또는 적색 (R)에 기초하여 공지된 COC 값을 함유하는 폴리펩티드 참조 샘플에 대한 폴리펩티드 시험 샘플의 "전체 색" 측정값의 비를 계산함으로써 색 강도 값을 결정하는 단계 (여기서, 보다 높은 전체 색 값은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 전체 색 값은 보다 낮은 색 강도를 나타냄).

[0159] 본원에 상세히 기재된 색 검정은 본원에 제공된 폴리펩티드 조성물을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 용액 (예를 들어, 폴리펩티드-함유 용액)의 색을 평가하는데 있어 그의 용도가 발견될 수 있다.

[0160] 폴리펩티드 전하 변이체 평가

[0161] 전하 변이체 (예를 들어, 산성 전하 변이체)의 존재를 감소시키는 방법이 제공되며, 본원에 상세히 기재된 농도의 성분을 함유하는 배지는 폴리펩티드가 상이한 배지 (예를 들어, 본원에 상세히 기재된 바와 동일한 성분 및/또는 성분 농도를 포함하는 않는 것)에서 생산된 경우에 획득한 전하 변이체 (예를 들어, 산성 전하 변이체)와 비교하여 폴리펩티드를 생산하는 방법에 사용되는 경우에 전하 변이체 (예를 들어, 산성 전하 변이체)의 존재를 감소시킨다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 참조 전하 변이체의 기재는 본원에 상세히 기재된 임의의 배지, 방법 또는 조성물에 적용될 수 있고, 이러한 기재를 추가로 변형시킬 수 있다. 또한, 본 섹션에 제공된 배지의 임의의 변형법 또는 실시양태가 전반적으로 상세히 기재된 배지 기재에 동등하게 적용되는 것으로 이해된다. 본원에 사용된 용어 "전하 변이체의 존재를 감소시킨다"는 모든 유형의 전하 변이체 (예를 들어, 산성 전하 변이체, 염기성 전하 변이체 및 중성 전하 변이체)의 감소된 양 또는 존재 또는 특정 전하 변이체, 예컨대 산성 전하 변이체의 감소된 양 또는 존재를 지칭한다.

[0162] 전하 변이체 (예를 들어, 산성 전하 변이체)의 존재를 감소시키는 방법, 및 감소된 수준의 전하 변이체 (예를 들어, 산성 전하 변이체)를 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 본원에 상세히 기재된 배지는 폴리펩티드가 상이한 배지에서 생산된 경우에 획득한 전하 변이체와 비교하여 폴리펩티드를 생산하는 방법에 사용되는 경우에 전하 변이체의 존재를 감소시킨다. 한 변형법에서, 배지는 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴, 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2, 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6, 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9 및 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12를 포함하는 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지이다. 한 변형법에서, 비타민 B2는 약 0.05 mg/L 내지 약 0.50 mg/L의 농도이다. 또 다른 변형법에서, 비타민 B2는 약 0.05 mg/L 내지 약 0.40 mg/L의 농도이다. 또 다른 변형법에서, 비타민 B2는 약 0.05 mg/L 내지 약 0.30 mg/L의 농도이다. 한 변형법에서, 비타민 B6은 약 0.05 mg/L 내지 약 8.0 mg/L의 농도이다. 또 다른 변형법에서, 비타민 B6은 약 0.05 mg/L 내지 약 7.0 mg/L의 농도이다. 또 다른 변형법에서, 비타민 B6은 약 0.05 mg/L 내지 약 6.0 mg/L의 농도이다. 한 변형법에서, 화학적으로 규정되지 않은 배양 배지는 철 공급원을 추가로 포함한다. 한 변형법에서, 철 공급원은 시트르산제2철 또는 황산제1철이다. 한 변형법에서, 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지는 약 2 μ M 내지 약 80 μ M의 농도의 시트르산제2철을 포함한다. 본원의 임의의 변형법에서, 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지는 히드로코르티손을 추가로 포함한다. 한 변형법에서 히드로코르티손은 약 0.05 μ M 내지 약 0.25 μ M의 농도이다.

[0163] 전하 변이체 (예를 들어, 산성 전하 변이체)의 존재를 감소시키는 방법, 및 감소된 수준의 전하 변이체 (예를 들어, 산성 전하 변이체)를 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 본원에 상세히 기재된 배지는 폴리펩티드가 상이한 배지에서 생산된 경우에 획득한 전하 변이체와 비교하여 폴리펩티드를 생산하는 방법에 사용되는 경우에 전하 변이체의 존재를 감소시킨다. 한 변형법에서, 배지는 대략적으로 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴, 약 2 μ M 내지 약 80 μ M 시트르산제2철, 및 약 0.05 μ M 내지 약 0.5 μ M 히드로코르티손을 포함하는 화학적으로 규정된 세포 배양 배지이다. 한 변형법에서, 화학적으로 규정된 배양 배지는 비타민 B2, 비타민 B6, 비타민 B9 및 비타민 B12를 추가로 포함한다. 한 변형법에서 비타민 B2는 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L의 농도이다. 또 다른 변형법에서, 비타민 B2는 약 0.05 mg/L 내지 약 0.50 mg/L의 농도이다. 또 다른 변형법에서, 비타민 B2는 약 0.05 mg/L 내지 약 0.40 mg/L의 농도이다. 또 다른 변형법에서, 비타민 B2는 약 0.05 mg/L 내지 약 0.30 mg/L의 농도이다. 추가의 변형법에서 비타민 B6은 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L의 농도이다. 추가의 변형법에서, 비타민 B6은 약 0.05 mg/L 내지 약 8.0 mg/L의 농도이다. 추가의 변형법에서, 비타민 B6은 약 0.05 mg/L 내지 약 7.0 mg/L의 농도이다. 추가의 변형법에서, 비타민 B6은 약 0.05 mg/L 내지 약 6.0 mg/L의 농도이다. 본원의 임의의 변형법에서 비타민 B6은 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L, 약 0.05mg/L 내지 약 8.0 mg/L, 약 0.05 mg/L 내지 약 7.0 mg/L 또는 약 0.05mg/L 내지 약 6.0 mg/L의 농도이다. 추가의 변형법에서, 비타민 B9는 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L의 농도이다. 본원의

임의의 변형법에서, 비타민 B9는 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L의 농도이다. 추가의 변형법에서, 비타민 B12는 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L의 농도이다. 본원의 임의의 변형법에서, 비타민 B12는 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L의 농도이다.

[0164] 전하 변이체 (예를 들어, 산성 전하 변이체)의 존재를 감소시키는 방법, 및 감소된 수준의 전하 변이체 (예를 들어, 산성 전하 변이체)를 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 본원에 상세히 기재된 배지는 폴리펩티드가 상이한 배지에서 생산된 경우에 수득한 전하 변이체와 비교하여 폴리펩티드를 생산하는 방법에 사용되는 경우에 전하 변이체의 존재를 감소시킨다. 한 변형법에서, 배지는 대략적으로 약 300 mg/L (일부 실시양태에서, 200 mg/L) 내지 약 1200 mg/L 시스틴, 약 2 μ M 내지 약 80 μ M 시트르산제2철, 및 약 0.05 μ M 내지 약 0.5 μ M 히드로코르티손을 포함하는 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지이다. 한 변형법에서, 화학적으로 규정되지 않은 배양 배지는 비타민 B2, 비타민 B6, 비타민 B9 및 비타민 B12를 추가로 포함한다. 한 변형법에서, 비타민 B2는 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L의 농도이다. 또 다른 변형법에서, 비타민 B2는 약 0.05 mg/L 내지 약 0.50 mg/L의 농도이다. 또 다른 변형법에서, 비타민 B2는 약 0.05 mg/L 내지 약 0.40 mg/L의 농도이다. 또 다른 변형법에서, 비타민 B2는 약 0.05 mg/L 내지 약 0.30 mg/L의 농도이다. 추가의 변형법에서, 비타민 B6은 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L의 농도이다. 추가의 변형법에서, 비타민 B6은 약 0.05 mg/L 내지 약 8.0 mg/L의 농도이다. 추가의 변형법에서, 비타민 B6은 약 0.05 mg/L 내지 약 7.0 mg/L의 농도이다. 추가의 변형법에서, 비타민 B6은 약 0.05 mg/L 내지 약 6.0 mg/L의 농도이다. 본원의 임의의 변형법에서, 비타민 B6은 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L, 약 0.05mg/L 내지 약 8.0 mg/L, 약 0.05 mg/L 내지 약 7.0 mg/L 또는 약 0.05mg/L 내지 약 6.0 mg/L의 농도이다. 본원의 임의의 변형법에서, 비타민 B6은 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L의 농도이다. 추가의 변형법에서, 비타민 B9는 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L의 농도이다. 본원의 임의의 변형법에서, 비타민 B9는 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L의 농도이다. 추가의 변형법에서, 비타민 B12는 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L의 농도이다. 본원의 임의의 변형법에서, 비타민 B12는 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L의 농도이다.

[0165] 본원에 상세히 기재된 방법에 의해 생산된 폴리펩티드 (폴리펩티드를 포함하는 조성물 포함)는 단백질 정제 공정의 임의의 단계에서 전하 변이체의 존재에 대해 평가될 수 있다. 전하 변이체의 존재를 평가하는 방법은 본원에 상세히 기재된 배지에서 성장한 세포로부터 세포 배양액을 수확하는 것, 세포 배양액으로부터 폴리펩티드를 정제하여 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 수득하는 것, 및 폴리펩티드를 포함하는 조성물을 상이한 배지에서 생산된 경우에 폴리펩티드를 포함하는 조성물에서의 전하 변이체의 존재와 비교하여 전하 변이체의 감소된 존재에 대해 평가하는 것을 포함할 수 있다. 한 변형법에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 산성 전하 변이체 또는 염기성 전하 변이체를 함유할 수 있다. 또 다른 변형법에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 산성 전하 변이체를 포함한다. 전하 변이체는, 비제한적으로, 탈아미드화, 시알릴화, C-말단 리신 절단, 당화, C-말단 리신 아미드화, C-말단 글리신 아미드화, 숙신아미드 형성, 아미노산 산화, 시알산 제거 또는 그의 조합으로 인해 형성될 수 있다. 폴리펩티드의 정제 또는 농축 전에 폴리펩티드를 함유하는 세포 배양액에서 전하 변이체의 존재에 대해 평가하는 방법이 본원에서 추가로 고려된다. 폴리펩티드를 함유하는 용액에서 전하 변이체를 검출하는 방법은 크로마토그래피 기술, 예컨대 비제한적으로 이온 교환 크로마토그래피의 이용을 포함한다. 문헌 [Khawli, L.A., mAbs., 2010, 2(6):613-624] (그 전문이 본원에 참조로 포함됨)을 참조한다.

[0166] 본원에 제공된 조성물의 한 변형법에서, 전하 변이체 (한 측면에서, 산성 전하 변이체임)는 폴리펩티드 제품의 25% 또는 20% 또는 18% 또는 15% 또는 10% 이하를 구성한다. 본원에 제공된 조성물 및 방법의 또 다른 변형법에서, 폴리펩티드 제품의 적어도 75% 또는 80% 또는 85% 또는 90% 또는 95% 또는 그 초과는 주요 중 단백질이다. 본원에 사용된 용어 "주요 중 단백질"은 단백질의 아미노산 서열, 2차 구조 및/또는 3차 구조 뿐만 아니라 임의의 번역후 변형, 예컨대 글리코실화에 의해 확인된 바와 같이 정량적으로 우세한 단백질을 추가로 포함할 수 있다.

[0167] 키트

[0168] 세포 배양 배지를 화학적으로 규정된 구성성분으로 보충하기 위한 키트가 기재된다. 키트는 재구성될 건조된 구성성분을 함유할 수 있으며, 또한 사용을 위한 (예를 들어, 배지를 키트 구성성분으로 보충하는데 사용하기 위한) 지침서를 함유할 수 있다. 키트는 본원에 제공된 배지 구성성분을 세포 배양 배지를 보충하기에 적합한 양으로 함유할 수 있다. 한 변형법에서, 키트는 표 1의 배지 성분을 포함한다. 또 다른 변형법에서, 키트는 표 1A의 배지 성분을 포함한다. 다양한 예시적 키트 실시양태는 "예시적 실시양태" 섹션에 제공된다. 또한, 본 발명은 세포 배양 배지를 보충하기 위한 키트가 표 1 또는 표 1A의 배지 성분 중 어느 하나 이상을 세포 배양 배지 중에 표 1 또는 표 1A에 제시된 바와 같은 농도로 하나 이상의 배지 성분을 제공하는 양으로 포함하는

변형법을 또한 포함한다. 한 변형법에서, 배양 배지를 보충하기 위한 키트는 세포 배양 배지 중에 약 0.8 mM (한 측면에서, 0.7 mM) 내지 약 2.5 mM 시스틴을 제공하는 양의 시스틴; 세포 배양 배지 중에 약 0.11 μ M 내지 약 0.72 μ M 비타민 B2를 제공하는 양의 비타민 B2; 세포 배양 배지 중에 약 4.5 μ M 내지 약 30.0 μ M 비타민 B6을 제공하는 양의 비타민 B6; 세포 배양 배지 중에 약 3.4 μ M 내지 약 22.0 μ M 비타민 B9를 제공하는 양의 비타민 B9; 및 세포 배양 배지 중에 약 0.2 μ M 내지 약 1.5 μ M 비타민 B12를 제공하는 양의 비타민 B12를 포함한다. 본원의 임의의 변형법에서, 키트는 세포 배양 배지 중에 약 2 μ M 내지 약 80 μ M (일부 측면에서, 11.0 μ M 내지 약 36.0 μ M)을 제공하는 양의 철 공급원, 예컨대 시트르산제2철 또는 황산제1철을 추가로 포함할 수 있다.

[0169] 또 다른 변형법에서, 세포 배양 배지를 보충하기 위한 키트는 세포 배양 배지 중에 약 0.8 mM (일부 측면에서, 0.7 mM) 내지 약 2.5 mM 시스틴을 제공하는 양의 시스틴; 세포 배양 배지 중에 약 2 μ M 내지 약 80 μ M 시트르산제2철을 제공하는 양의 시트르산제2철; 세포 배양 배지 중에 약 0.05 μ M 내지 약 0.5 μ M 히드로코르티손을 제공하는 양의 히드로코르티손; 세포 배양 배지 중에 약 0.11 μ M 내지 약 0.72 μ M 비타민 B2를 제공하는 양의 비타민 B2; 세포 배양 배지 중에 약 4.5 μ M 내지 약 30.0 μ M 비타민 B6을 제공하는 양의 비타민 B6; 세포 배양 배지 중에 약 3.4 μ M 내지 약 22.0 μ M 비타민 B9를 제공하는 양의 비타민 B9; 및 세포 배양 배지 중에 약 0.2 μ M 내지 약 1.5 μ M 비타민 B12를 제공하는 양의 비타민 B12를 포함한다.

[0170] 본원의 임의의 변형법에서, 키트는 세포 배양 배지 중에 약 2.0 μ M 내지 약 14.0 μ M 비타민 B1을 제공하는 양의 비타민 B1; 세포 배양 배지 중에 약 11.0 μ M 내지 약 72.0 μ M 비타민 B3을 제공하는 양의 비타민 B3; 세포 배양 배지 중에 약 6.8 μ M 내지 약 44.0 μ M 비타민 B5를 제공하는 양의 비타민 B5; 및 세포 배양 배지 중에 약 0.02 μ M 내지 약 0.24 μ M 비타민 B7을 제공하는 양의 비타민 B7 중 어느 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0171] 본원의 임의의 변형법에서, 키트는 세포 배양 배지 중에 약 80 mg/L 내지 약 1500 mg/L 시스테인 (일부 측면에서, 0.5 mM 내지 약 2.0 mM)을 제공하는 양의 시스테인을 추가로 포함할 수 있다.

[0172] 본원의 임의의 변형법에서, 세포 배양 배지는 CDM 또는 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지일 수 있다.

[0173] 조성물

[0174] 세포 배양 배지 및 하나 이상의 다른 성분, 예컨대 세포 또는 바람직한 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)를 포함하는 조성물이 또한 제공된다. 한 변형법에서 (a) 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포; 및 (b) 본원에 제공된 바와 같은 세포 배양 배지를 포함하는 조성물이 제공된다. 또 다른 변형법에서, (a) 폴리펩티드; 및 (b) 본원에 제공된 바와 같은 세포 배양 배지를 포함하는 조성물이 제공되며, 이 때 한 측면에서 폴리펩티드는 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포에 의해 배지로 분비된다. 또 다른 변형법에서 (a) 폴리펩티드; 및 (b) 본원에 제공된 바와 같은 세포 배양 배지를 포함하는 조성물이 제공되며, 이 때 한 측면에서 폴리펩티드는 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포의 용해에 의해 배지로 방출된다. 조성물의 세포는 본원에 상세히 기재된 임의의 세포 (예를 들어, CHO 세포)일 수 있고, 조성물의 배지는 표 1 또는 표 1A에 상세히 기재된 바와 같은 배지 성분을 포함하는 본원에 상세히 기재된 임의의 배지, 예컨대 배지 (CDM일 수 있음)일 수 있다. 마찬가지로, 조성물의 폴리펩티드는 본원에 상세히 기재된 임의의 폴리펩티드, 예컨대 항체일 수 있다.

[0175] 한 변형법에서 조성물은 색을 가질 수 있다. 한 변형법에서 색은 하나 이상의 시각적 색 표준의 이용에 의해 결정되거나, 측정되거나 또는 평가될 수 있다. 시각적 색 표준은 국제적 또는 국가적 색 표준, 예컨대 비제한적으로 미국 약전 색 표준 및 유럽 약전 색 표준일 수 있다. 문헌 [USP-24 Monograph 631 Color and Achromaticity. United States Pharmacopoeia Inc., 2000, p. 1926-1927 및 Council of Europe. European Pharmacopoeia, 2008, 7th Ed. P.22] (이들은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)을 참조한다. 예를 들어, 조성물의 색은 색, 단색광 및 색조 (COC) 검정의 이용에 의해 결정되거나, 측정되거나 또는 평가될 수 있다. COC 검정에 대한 참조 표준은 갈색 (B), 갈색빛-황색 (BY), 황색 (Y), 녹색빛-황색 (GY) 또는 적색 (R) 중 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되지는 않는 것으로 이해된다. 갈색 참조 표준에 비교한 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 B1 (가장 어두움), B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 또는 B9 (가장 밝음)의 갈색 참조 표준 값이 제공될 수 있다. 갈색빛-황색 참조 표준에 비교한 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 BY1 (가장 어두움), BY2, BY3, BY4, BY5, BY6 또는 BY7 (가장 밝음)의 갈색빛-황색 참조 표준 값이 제공될 수 있다. 황색 참조 표준에 비교한 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 Y1 (가장 어두움), Y2, Y3, Y4, Y5, Y6 또는 Y7 (가장 밝음)의 황색 참조 표준 값이 제공될 수 있다. 녹색빛-황색 참조 표준에 비교한 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 GY1 (가장 어두움),

GY2, GY3, GY4, GY5, GY6 또는 GY7 (가장 밝음)의 녹색빛-황색 참조 표준 값이 제공될 수 있다. 적색 참조 표준에 비교한 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 R1 (가장 어두움), R2, R3, R4, R5, R6 또는 R7 (가장 밝음)의 적색 참조 표준 값이 제공될 수 있다. 본원에 상세히 기재된 바와 같은 조성물은 표 2에 기재되고 전반적으로 상세히 기재된 바와 같은 참조 표준 값을 가질 수 있다. 특정한 변형법에서, 본원에 제공된 바와 같은 조성물은 적어도 100 mg/mL 또는 125 mg/mL 또는 150 mg/mL의 농도의 또는 약 100 mg/mL 또는 125 mg/mL 또는 150 mg/mL 또는 175 mg/mL 또는 200 mg/mL의 농도의 폴리펩티드를 포함한다. 또 다른 변형법에서, 본원에 제공된 바와 같은 조성물은 적어도 1 mg/mL 또는 10 mg/mL 또는 25 mg/mL 또는 50 mg/mL 또는 75 mg/mL의 농도의 또는 약 1 mg/mL 또는 10 mg/mL 또는 25 mg/mL 또는 50 mg/mL 또는 75 mg/mL의 농도의 폴리펩티드를 포함한다. 또 다른 변형법에서, 본원에 제공된 바와 같은 조성물은 적어도 약 1 mg/mL 또는 10 mg/mL 또는 50 mg/mL 또는 75 mg/mL 내지 약 125 mg/mL 또는 내지 약 150 mg/mL 중 어느 하나의 농도의 폴리펩티드를 포함한다. 본원에 제공된 임의의 조성물은 폴리펩티드의 용해도 한계까지의 농도 또는 대상체에 투여된 경우에 치료 유효량의 폴리펩티드를 제공하는 농도의 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)의 "치료 유효량"은 폴리펩티드가 효과적인 치료를 위한 장애의 예방 또는 치료에 효과적인 양을 지칭한다. 추가의 변형법에서, 본원에 제공된 바와 같은 조성물은 B4-B9, BY4-BY7, Y4-Y7, GY4-GY7 및 R4-R7 중 어느 하나로부터 선택된 색 참조 표준 값을 갖는다. 적어도 100 mg/mL 또는 125 mg/mL 또는 150 mg/mL의 농도의 또는 약 100 mg/mL 또는 125 mg/mL 또는 150 mg/mL 또는 175 mg/mL 또는 200 mg/mL의 농도의 폴리펩티드를 포함하는 조성물이 또한 제공되며, 여기서 조성물은 B4-B9, BY4-BY7, Y4-Y7, GY4-GY7 및 R4-R7 중 어느 하나로부터 선택된 색 참조 표준 값을 갖는다. 또한 적어도 1 mg/mL 또는 10 mg/mL 또는 25 mg/mL 또는 50 mg/mL 또는 75 mg/mL의 농도의 또는 약 1 mg/mL 또는 10 mg/mL 또는 25 mg/mL 또는 50 mg/mL 또는 75 mg/mL 또는 적어도 약 1 mg/mL 또는 10 mg/mL 또는 50 mg/mL 또는 75 mg/mL 내지 약 125 mg/mL 또는 내지 약 150 mg/mL 중 어느 하나의 농도의 폴리펩티드를 포함하는 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 조성물은 B4-B9, BY4-BY7, Y4-Y7, GY4-GY7 및 R4-R7 중 어느 하나로부터 선택된 색 참조 표준 값을 갖는다.

[0176] 또 다른 예에서, 조성물의 색은 정량적 검정, 예컨대 NIFTY 검정 또는 전체 색 검정의 사용에 의해 결정되거나, 측정되거나 또는 평가될 수 있다. 한 변형법에서, 정량적 검정에 의해 수득한 보다 높은 수치 값은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 수치 값은 보다 낮은 색 강도를 나타낸다.

[0177] 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 생산된 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)의 조성물 (예를 들어, 제약 제제)는 바람직한 정도의 순도를 갖는 폴리펩티드를 하나 이상의 임의의 제약상 허용되는 담체 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)])와 혼합하여 동결건조 제제 또는 수용액의 형태로 제조한다. 제약상 허용되는 담체는 사용된 투여량 및 농도에서 일반적으로 수용자에게 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기 산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제 (예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대-이온, 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본원에서 예시적인 제약상 허용되는 담체는 간질성 약물 분산액 작용제, 예컨대 가용성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질 (sHASEGP), 예를 들어 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 예컨대 rHuPH20 (힐레넥스(HYLENEX)®, 백스터 인터내셔널, 인크.(Baxter International, Inc.))을 추가로 포함한다. rHuPH20을 포함하는, 특정의 예시적인 sHASEGP 및 사용 방법은 미국 특허 공개 번호 2005/0260186 및 2006/0104968에 기재되어 있다. 한 측면에서, sHASEGP는 하나 이상의 추가의 글리코사미노글리카나제, 예컨대 콘드로이티나제와 조합된다. 예시적인 동결건조된 폴리펩티드 제제는 미국 특허 번호 6,267,958에 기재되어 있다. 수성 폴리펩티드 제제는 미국 특허 번호 6,171,586 및 W02006/044908에 기재된 것을 포함하고, 후자의 제제는 히스티딘-아세테이트 완충제를 포함한다. 생체내 투여에 사용되는 제제는 일반적으로 멸균된다. 멸균은 예를 들어 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성할 수 있다. 특정한 변형법에서, 본원에 제공된 바와 같은 제약 제제는 적어도 100 mg/mL 또는 125 mg/mL 또는 150 mg/mL의 농도의 또는 약 100 mg/mL 또는 125 mg/mL 또는 150 mg/mL 또는 175 mg/mL 또는 200 mg/mL의 농도의 폴리펩티드를 포함한다. 또 다른 변형법에서, 본원에 제공된 바와 같은 제약 제제는 적어도 1 mg/mL 또는 10 mg/mL 또는 25 mg/mL 또는 50 mg/mL 또는 75 mg/mL의 농도의 또는 약 1 mg/mL 또는 10 mg/mL 또는 25

mg/mL 또는 50 mg/mL 또는 75 mg/mL의 농도의 폴리펩티드를 포함한다. 또 다른 변형법에서, 본원에 제공된 바와 같은 제약 제제는 적어도 약 1 mg/mL 또는 10 mg/mL 또는 50 mg/mL 또는 75 mg/mL 내지 약 125 mg/mL 또는 내지 약 150 mg/mL 중 어느 하나의 농도의 폴리펩티드를 포함한다. 한 변형법에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 제약 제제는 색 검정, 예컨대 비제한적으로 COC 검정, 전체 색 검정 또는 NIFTY 검정을 이용하여 색 강도에 대해 평가된다. 일부 측면에서, 본원에 제공된 바와 같은 제약 제제는 적어도 100 mg/mL, 적어도 125 mg/mL 또는 적어도 150 mg/mL 초과 농도의 폴리펩티드를 포함하고, COC 검정에 의해 측정시에 B3, B4, B5, B6, B7, B8 또는 B9 초과 색 강도 값을 갖는다. 일부 측면에서, 본원에 제공된 바와 같은 제약 제제는 적어도 1 mg/mL, 적어도 10 mg/mL, 적어도 25 mg/mL, 적어도 50 mg/mL 또는 적어도 75 mg/mL 초과 농도의 폴리펩티드를 포함하고, COC 검정에 의해 측정시에 B3, B4, B5, B6, B7, B8 또는 B9 초과 색 강도 값을 갖는다. 일부 측면에서, COC 검정에 의해 결정된 바와 같은 색 강도 값은 B, BY, Y, GY 또는 R 중 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되지는 않고, 여기서 보다 높은 값은 보다 밝은 색 강도를 나타낸다. 일부 측면에서, 본원에 제공된 바와 같은 제약 제제는 적어도 100 mg/mL, 적어도 125 mg/mL 또는 적어도 150 mg/mL 초과 농도의 폴리펩티드를 포함하고, 색 검정 (예를 들어, 전체 색 검정 또는 NIFTY 검정)에 의해 측정시에 참조 용액의 색 강도 값보다 낮은 색 강도 값을 갖는다. 일부 측면에서, 본원에 제공된 바와 같은 제약 제제는 적어도 1 mg/mL, 적어도 10 mg/mL, 적어도 25 mg/mL, 적어도 50 mg/mL 또는 적어도 75 mg/mL 초과 농도의 폴리펩티드를 포함하고, 색 검정 (예를 들어, 전체 색 검정 또는 NIFTY 검정)에 의해 측정시에 참조 용액의 색 강도 값보다 낮은 색 강도 값을 갖는다.

- [0178] 본원에 개시된 모든 참고문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0179] 예시적 실시양태
- [0180] 1. 약 200 mg/L 내지 약 1200 mg/L 시스틴;
- [0181] 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2;
- [0182] 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6;
- [0183] 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9; 및
- [0184] 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12
- [0185] 를 포함하는 세포 배양 배지와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포를 배양하는 방법.
- [0186] 2. 제1실시양태에 있어서,
- [0187] 약 0.7 mM 내지 약 2.5 mM 시스틴;
- [0188] 약 0.11 μ M 내지 약 0.72 μ M 비타민 B2;
- [0189] 약 4.5 μ M 내지 약 30.0 μ M 비타민 B6;
- [0190] 약 3.4 μ M 내지 약 22.0 μ M 비타민 B9; 및
- [0191] 약 0.2 μ M 내지 약 1.5 μ M 비타민 B12
- [0192] 를 포함하는 세포 배양 배지와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0193] 3. 제1실시양태 또는 제2실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 비타민 B1, 비타민 B3, 비타민 B5 및 비타민 B7 중 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0194] 4. 제3실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가
- [0195] 약 2.0 μ M 내지 약 14.0 μ M 비타민 B1;
- [0196] 약 11.0 μ M 내지 약 72.0 μ M 비타민 B3;
- [0197] 약 6.8 μ M 내지 약 44.0 μ M 비타민 B5; 및
- [0198] 약 0.02 μ M 내지 약 0.14 μ M 비타민 B7
- [0199] 중 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0200] 5. 제1실시양태 내지 제4실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 철 공급원을 추가로 포함하

는 것인 방법.

- [0201] 6. 제5실시양태에 있어서, 철 공급원이 시트르산제2철 또는 황산제1철인 방법.
- [0202] 7. 제1실시양태 내지 제6실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 약 2 μM 내지 약 80 μM 의 농도의 시트르산제2철을 포함하는 것인 방법.
- [0203] 8. 제1실시양태 내지 제8실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 약 11.0 μM 내지 약 36.0 μM 의 농도의 시트르산제2철을 포함하는 것인 방법.
- [0204] 9. 제1실시양태 내지 제8실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 히드로코르티손을 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0205] 10. 제9실시양태에 있어서, 세포 배양 배지 중의 히드로코르티손의 농도가 약 0.05 μM 내지 약 0.25 μM 인 방법.
- [0206] 11. 제1실시양태 내지 제10실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 화학적으로 규정된 세포 배양 배지인 방법.
- [0207] 12. 제1실시양태 내지 제10실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지인 방법.
- [0208] 13. 제1실시양태 내지 제12실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포를 세포의 성장기 동안 세포 배양 배지와 접촉시키는 것인 방법.
- [0209] 14. 제1실시양태 내지 제13실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포를 세포의 생산기 동안 세포 배양 배지와 접촉시키는 것인 방법.
- [0210] 15. 제14실시양태에 있어서, 세포 배양 배지에 시스테인을 첨가하는 단계를 추가로 포함 하는 방법.
- [0211] 16. 제15실시양태에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 80 mg/L 내지 약 1500 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.
- [0212] 17. 제15실시양태에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 1500 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.
- [0213] 18. 제15실시양태에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 140 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.
- [0214] 19. 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포를 세포 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함하며, 여기서
- [0215] (a) 세포 배양 배지는
- [0216] 약 200 mg/L 내지 약 1200 mg/L 시스틴;
- [0217] 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2;
- [0218] 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6;
- [0219] 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9;
- [0220] 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12
- [0221] 를 포함하고;
- [0222] (b) 세포는 폴리펩티드를 발현하는 것인,
- [0223] 폴리펩티드를 생산하는 방법.
- [0224] 20. 제19실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가
- [0225] 약 0.7 mM 내지 약 2.5 mM 시스틴;
- [0226] 약 0.11 μM 내지 약 0.72 μM 비타민 B2;

- [0227] 약 4.5 μM 내지 약 30.0 μM 비타민 B6;
- [0228] 약 3.4 μM 내지 약 22.0 μM 비타민 B9; 및
- [0229] 약 0.2 μM 내지 약 1.5 μM 비타민 B12
- [0230] 를 포함하는 것인 방법.
- [0231] 21. 제19실시양태 또는 제20실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 비타민 B1, 비타민 B3, 비타민 B5 및 비타민 B7 중 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0232] 22. 제21실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가
- [0233] 약 2.0 μM 내지 약 14.0 μM 비타민 B1;
- [0234] 약 11.0 μM 내지 약 72.0 μM 비타민 B3;
- [0235] 약 6.8 μM 내지 약 44.0 μM 비타민 B5; 및
- [0236] 약 0.02 μM 내지 약 0.14 μM 비타민 B7
- [0237] 중 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0238] 23. 제19실시양태 내지 제22실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 철 공급원을 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0239] 24. 제23실시양태에 있어서, 철 공급원이 시트르산제2철 또는 황산제1철인 방법.
- [0240] 25. 제19실시양태 내지 제24실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 약 2 μM 내지 약 80 μM 의 농도의 시트르산제2철을 포함하는 것인 방법.
- [0241] 26. 제19실시양태 내지 제25실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 약 11.0 μM 내지 약 36.0 μM 의 농도의 시트르산제2철을 포함하는 것인 방법.
- [0242] 27. 제19실시양태 내지 제26실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 히드로코르티손을 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0243] 28. 제27실시양태에 있어서, 세포 배양 배지 중의 히드로코르티손의 농도가 약 0.05 μM 내지 약 0.25 μM 인 방법.
- [0244] 29. 제19실시양태 내지 제28실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 화학적으로 규정된 세포 배양 배지인 방법.
- [0245] 30. 제19실시양태 내지 제28실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지인 방법.
- [0246] 31. 제19실시양태 내지 제30실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 배양을 세포의 성장기 동안 수행하는 것인 방법.
- [0247] 32. 제19실시양태 내지 제31실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 배양을 세포의 생산기 동안 수행하는 것인 방법.
- [0248] 33. 제32실시양태에 있어서, 세포 배양 배지에 시스테인을 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0249] 34. 제33실시양태에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 80 mg/L 내지 약 1500 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.
- [0250] 35. 제33실시양태에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 1500 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.
- [0251] 36. 제33실시양태에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 140 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.
- [0252] 37. 제19실시양태 내지 제36실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 폴리펩티드가 항체인 방법.

- [0253] 38. 제37실시양태에 있어서, 항체가 IgG1 항체인 방법.
- [0254] 39. 제37실시양태 또는 제38실시양태에 있어서, 항체가 항-VEGF, 항-메소텔린, 항-PCSK9 또는 항-베타7 항체인 방법.
- [0255] 40. 제19실시양태 내지 제39실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지로부터 폴리펩티드를 단리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0256] 41. 제40실시양태에 있어서, 단리된 폴리펩티드를 포함하는 조성물이 무색 또는 약간 유색의 액체로 나타나는 것인 방법.
- [0257] 42. 제41실시양태에 있어서, 조성물이 적어도 100 mg/mL의 농도의 단리된 폴리펩티드를 포함하는 것인 방법.
- [0258] 43. 제19실시양태 내지 제42실시양태 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 폴리펩티드.
- [0259] 44. 제43항의 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.
- [0260] 45. 세포 배양 배지 중에 약 200 mg/L 내지 약 1200 mg/L 시스틴을 제공하는 양의 시스틴;
- [0261] 세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2를 제공하는 양의 비타민 B2;
- [0262] 세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6을 제공하는 양의 비타민 B6;
- [0263] 세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9를 제공하는 양의 비타민 B9; 및
- [0264] 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12를 제공하는 양의 비타민 B12
- [0265] 를 포함하는, 세포 배양 배지를 화학적으로 규정된 구성성분으로 보충하기 위한 키트.
- [0266] 46. 제45실시양태에 있어서,
- [0267] 세포 배양 배지 중에 약 0.7 mM 내지 약 2.5 mM 시스틴을 제공하는 양의 시스틴;
- [0268] 세포 배양 배지 중에 약 0.11 μ M 내지 약 0.72 μ M 비타민 B2를 제공하는 양의 비타민 B2;
- [0269] 세포 배양 배지 중에 약 4.5 μ M 내지 약 30.0 μ M 비타민 B6을 제공하는 양의 비타민 B6;
- [0270] 세포 배양 배지 중에 약 3.4 μ M 내지 약 22.0 μ M 비타민 B9를 제공하는 양의 비타민 B9; 및
- [0271] 세포 배양 배지 중에 약 0.2 μ M 내지 약 1.5 μ M 비타민 B12를 제공하는 양의 비타민 B12
- [0272] 를 포함하는 키트.
- [0273] 47. 제45실시양태 또는 제46실시양태에 있어서, 비타민 B1, 비타민 B3, 비타민 B5 및 비타민 B7 중 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 키트.
- [0274] 48. 제47실시양태에 있어서,
- [0275] 세포 배양 배지 중에 약 2.0 μ M 내지 약 14.0 μ M 비타민 B1을 제공하는 양의 비타민 B1;
- [0276] 세포 배양 배지 중에 약 11.0 μ M 내지 약 72.0 μ M 비타민 B3을 제공하는 양의 비타민 B3;
- [0277] 세포 배양 배지 중에 약 6.8 μ M 내지 약 44.0 μ M 비타민 B5를 제공하는 양의 비타민 B5; 및
- [0278] 세포 배양 배지 중에 약 0.02 μ M 내지 약 0.14 μ M 비타민 B7을 제공하는 양의 비타민 B7
- [0279] 중 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 키트.
- [0280] 49. 제45실시양태 내지 제48실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 철 공급원을 추가로 포함하는 키트.
- [0281] 50. 제49실시양태에 있어서, 철 공급원이 시트르산제2철 또는 황산제1철인 키트.
- [0282] 51. 제45실시양태 내지 제50실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 히드로코르티손을 추가로 포함하는 키트.
- [0283] 52. 약 200 mg/L 내지 약 1200 mg/L 시스틴;
- [0284] 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L 비타민 B2;
- [0285] 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L 비타민 B6;

- [0286] 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L 비타민 B9; 및
- [0287] 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L 비타민 B12
- [0288] 를 포함하는 세포 배양 배지.
- [0289] 53. 제52실시양태에 있어서,
- [0290] 약 0.7 mM 내지 약 2.5 mM 시스틴;
- [0291] 약 0.11 μ M 내지 약 0.72 μ M 비타민 B2;
- [0292] 약 4.5 μ M 내지 약 30.0 μ M 비타민 B6;
- [0293] 약 3.4 μ M 내지 약 22.0 μ M 비타민 B9; 및
- [0294] 약 0.2 μ M 내지 약 1.5 μ M 비타민 B12
- [0295] 를 포함하는 배지.
- [0296] 54. 제52실시양태 또는 제53실시양태에 있어서, 비타민 B1, 비타민 B3, 비타민 B5 및 비타민 B7 중 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 배지.
- [0297] 55. 제54실시양태에 있어서,
- [0298] 약 2.0 μ M 내지 약 14.0 μ M 비타민 B1;
- [0299] 약 11.0 μ M 내지 약 72.0 μ M 비타민 B3;
- [0300] 약 6.8 μ M 내지 약 44.0 μ M 비타민 B5; 및
- [0301] 약 0.02 μ M 내지 약 0.14 μ M 비타민 B7
- [0302] 중 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 배지.
- [0303] 56. 제52실시양태 내지 제55실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 철 공급원을 추가로 포함하는 것인 배지.
- [0304] 57. 제56실시양태에 있어서, 철 공급원이 시트르산제2철 또는 황산제1철인 배지.
- [0305] 58. 제57실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 약 2 μ M 내지 약 80 μ M의 농도의 시트르산제2철을 포함하는 것인 배지.
- [0306] 59. 제58실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 약 11.0 μ M 내지 약 36.0 μ M의 농도의 시트르산제2철을 포함하는 것인 배지.
- [0307] 60. 제52실시양태 내지 제59실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 히드로코르티손을 추가로 포함하는 것인 배지.
- [0308] 61. 제60실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 약 0.05 μ M 내지 약 0.25 μ M의 농도의 히드로코르티손을 포함하는 것인 배지.
- [0309] 62. 약 200 mg/L 내지 약 1200 mg/L 시스틴;
- [0310] 약 2 μ M 내지 약 80 μ M 시트르산제2철; 및
- [0311] 약 0.05 μ M 내지 약 0.5 μ M 히드로코르티손
- [0312] 을 포함하는 세포 배양 배지와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포를 배양하는 방법.
- [0313] 63. 제62실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 비타민 B2, 비타민 B6, 비타민 B9 및/또는 비타민 B12를 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0314] 64. 제62실시양태 또는 제63실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L의 비타민 B2를 포함하는 것인 방법.
- [0315] 65. 제62실시양태 내지 제64실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 약 0.05 mg/L 내지 약

10.0 mg/L의 비타민 B6을 포함하는 것인 방법.

- [0316] 66. 제62실시양태 내지 제65실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L의 비타민 B9를 포함하는 것인 방법.
- [0317] 67. 제62실시양태 내지 제66실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L의 비타민 B12를 포함하는 것인 방법.
- [0318] 68. 제62실시양태 내지 제67실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 화학적으로 규정된 세포 배양 배지인 방법.
- [0319] 69. 제62실시양태 내지 제69실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지인 방법.
- [0320] 70. 제62실시양태 내지 제69실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포를 세포의 성장기 동안 세포 배양 배지와 접촉시키는 것인 방법.
- [0321] 71. 제62실시양태 내지 제70실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포를 세포의 생산기 동안 세포 배양 배지와 접촉시키는 것인 방법.
- [0322] 72. 제71실시양태에 있어서, 세포 배양 배지에 시스테인을 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0323] 73. 제72실시양태에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 80 mg/L 내지 약 1500 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.
- [0324] 74. 제72실시양태에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 1500 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.
- [0325] 75. 제72실시양태에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 140 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.
- [0326] 76. 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포를 세포 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함하며, 여기서
- [0327] (a) 세포 배양 배지는
- [0328] 약 200 mg/L 내지 약 1200 mg/L 시스틴;
- [0329] 약 2 μ M 내지 약 80 μ M 시트르산제2철; 및
- [0330] 약 0.05 μ M 내지 약 0.5 μ M 히드로코르티손
- [0331] 을 포함하고;
- [0332] (b) 세포는 폴리펩티드를 발현하는 것인,
- [0333] 폴리펩티드를 생산하는 방법.
- [0334] 77. 제76실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 비타민 B2, 비타민 B6, 비타민 B9 및/또는 비타민 B12를 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0335] 78. 제76실시양태 또는 제77실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L의 비타민 B2를 포함하는 것인 방법.
- [0336] 79. 제76실시양태 내지 제78실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L의 비타민 B6을 포함하는 것인 방법.
- [0337] 80. 제76실시양태 내지 제79실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L의 비타민 B9를 포함하는 것인 방법.
- [0338] 81. 제76실시양태 내지 제80실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L의 비타민 B12를 포함하는 것인 방법.
- [0339] 82. 제76실시양태 내지 제81실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 화학적으로 규정된 세포

배양 배지인 방법.

- [0340] 83. 제76실시양태 내지 제81실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지가 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지인 방법.
- [0341] 84. 제76실시양태 내지 제83실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 배양을 세포의 성장기 동안 수행하는 것인 방법.
- [0342] 85. 제76실시양태 내지 제84실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 배양을 세포의 생산기 동안 수행하는 것인 방법.
- [0343] 86. 제85실시양태에 있어서, 세포 배양 배지에 시스테인을 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0344] 87. 제86실시양태에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 80 mg/L 내지 약 1500 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.
- [0345] 88. 제86실시양태에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 1500 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.
- [0346] 89. 제86실시양태에 있어서, 시스테인을 세포 배양 배지 중에 약 140 mg/L 시스테인을 제공하는 양으로 첨가하는 것인 방법.
- [0347] 90. 제76실시양태 내지 제89실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 폴리펩티드가 항체인 방법.
- [0348] 91. 제90실시양태에 있어서, 항체가 IgG1 항체인 방법.
- [0349] 92. 제90실시양태 또는 제91실시양태에 있어서, 항체가 항-VEGF, 항-메소텔린, 항-PCSK9 또는 항-베타7 항체인 방법.
- [0350] 93. 제76실시양태 내지 제92실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지로부터 폴리펩티드를 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0351] 94. 제93실시양태에 있어서, 분리된 폴리펩티드를 포함하는 조성물이 무색 또는 약간 유색의 액체로 나타나는 것인 방법.
- [0352] 95. 제94실시양태에 있어서, 조성물이 적어도 100 mg/mL의 농도의 분리된 폴리펩티드를 포함하는 것인 방법.
- [0353] 96. 제76실시양태 내지 제95실시양태 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 폴리펩티드.
- [0354] 97. 제96항의 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.
- [0355] 98. 세포 배양 배지 중에 약 200 mg/L 내지 약 1200 mg/L 시스틴을 제공하는 양의 시스틴;
- [0356] 세포 배양 배지 중에 약 2 μ M 내지 약 80 μ M 시트르산제2철의 농도를 제공하는 양의 시트르산제2철; 및
- [0357] 세포 배양 배지 중에 약 0.05 μ M 내지 약 0.5 μ M 히드로코르티손의 농도를 제공하는 양의 히드로코르티손
- [0358] 을 포함하는, 세포 배양 배지를 화학적으로 규정된 구성성분으로 보충하기 위한 키트.
- [0359] 99. 제98실시양태에 있어서, 비타민 B2, 비타민 B6, 비타민 B9 및/또는 비타민 B12를 추가로 포함하는 키트.
- [0360] 100. 제98실시양태 또는 제99실시양태에 있어서, 세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L의 비타민 B2를 제공하는 양의 비타민 B2를 포함하는 키트.
- [0361] 101. 제98실시양태 내지 제100실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L의 비타민 B6을 제공하는 양의 비타민 B6을 포함하는 키트.
- [0362] 102. 제98실시양태 내지 제101실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L의 비타민 B9를 제공하는 양의 비타민 B9를 포함하는 키트.
- [0363] 103. 제98실시양태 내지 제102실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포 배양 배지 중에 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L의 비타민 B12를 제공하는 양의 비타민 B12를 포함하는 키트.
- [0364] 104. 약 200 mg/L 내지 약 1200 mg/L 시스틴;
- [0365] 약 2 μ M 내지 약 80 μ M 시트르산제2철; 및

- [0366] 약 0.05 μM 내지 약 0.5 μM 히드로코르티손
- [0367] 을 포함하는 세포 배양 배지.
- [0368] 105. 제104실시양태에 있어서, 비타민 B2, 비타민 B6, 비타민 B9 및/또는 비타민 B12를 추가로 포함하는 배지.
- [0369] 106. 제104실시양태 또는 제105실시양태에 있어서, 약 0.05 mg/L 내지 약 1.0 mg/L의 비타민 B2를 포함하는 배지.
- [0370] 107. 제104실시양태 내지 제106실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 약 0.05 mg/L 내지 약 10.0 mg/L의 비타민 B6을 포함하는 배지.
- [0371] 108. 제104실시양태 내지 제107실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 약 0.05 mg/L 내지 약 12.0 mg/L의 비타민 B9를 포함하는 배지.
- [0372] 109. 제104실시양태 내지 제108실시양태 중 어느 한 실시양태에 있어서, 약 0.05 mg/L 내지 약 2.5 mg/L의 비타민 B12를 포함하는 배지.
- [0373] 110. (a) 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포; 및 (b) 제52실시양태 내지 제61실시양태 및 제104실시양태 내지 제109실시양태 중 어느 한 항에 따른 배지를 포함하는 조성물.
- [0374] 111. (a) 폴리펩티드; 및 (b) 제52실시양태 내지 제61실시양태 및 제104실시양태 내지 제109실시양태 중 어느 한 항에 따른 배지를 포함하는 조성물.
- [0375] 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위해 제공되나 본 발명을 제한하지는 않는다.
- [0376] 실시예
- [0377] 허용되는 품질 특성, 예컨대 색을, 특히 단백질 제품이 (예를 들어, 적어도 100 mg/mL의 농도로) 농축된 용액으로 존재하는 경우에 갖는 단백질 약물 제품을 생산하는 배지가 확인되었다. 일부 측면에서, 단백질 제품은 적어도 1 mg/mL를 포함하는 조성물로서 존재한다. 본원에 제공된 배지에서 세포를 배양하는 방법, 및 이러한 배지를 사용하여 폴리펩티드를 생산하는 방법이 기재된다. 배지는 한 측면에서 시스틴 및/또는 시스테인 및 비타민 B2, B6, B9 및 B12를 첨가할 수 있으며, 철 공급원 및 히드로코르티손이 임의로 첨가된다. 배지는 또 다른 측면에서 시스틴 및/또는 시스테인, 히드로코르티손 및 철 공급원을 포함할 수 있으며, 비타민 B2, B6, B9 및 B12가 임의로 첨가된다. 시스틴 함유 조성물이 특히 고려된다. 각각의 배지 구성성분은 전반적으로 제공된 임의의 값으로 존재할 수 있다. 배지는 화학적으로 규정되거나 또는 화학적으로 규정되지 않은 것일 수 있다. 배지는 상이한 배지에서 생산된 폴리펩티드와 비교하여 폴리펩티드 생산의 방법에 사용된 경우에 폴리펩티드 전하 변이체의 존재를 감소시키고/거나 반응성 산소 종의 존재를 감소시킬 수 있다. 배지는 세포 배양 및 폴리펩티드 생산의 모든 기에 걸쳐 그의 용도가 발견되었으며, 기초 및/또는 공급 배지에 사용될 수 있다. 임의의 방법에 의해 생산된 폴리펩티드, 및 본원에 상세히 기재된 바와 같이 생산된 폴리펩티드를 포함하는 제약 조성물이 제공된다. 한 측면에서, 제약 조성물은 적어도 또는 약 100 mg/mL, 125 mg/mL 및 150 mg/mL 중 어느 것의 농도의 폴리펩티드를 포함한다. 또 다른 측면에서, 제약 조성물은 적어도 또는 약 1 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL 및 75 mg/mL 중 어느 것의 농도의 폴리펩티드를 포함한다. 항체를 제조하는 방법 및 항체를 포함하는 조성물이 특히 고려된다. 세포 배양 배지를 화학적으로 규정된 구성성분으로 보충하기 위한 키트가 또한 기재된다.
- [0378] 약물 물질의 공정 개발 전반에 걸쳐 제품 품질이 임상에 사용하기 위한 특성의 산업 표준을 충족시키는 것이 중요하다. 모노클로날 항체의 피하 전달에 대한 최근의 경향은 제제화된 약물 물질의 농도가 ≥ 100 mg/mL로 증가될 것을 요구한다. 그러나, 이러한 높은 농도에서, 약물 물질의 색이 더 강해져 제품의 색에 관한 확립된 품질 기대를 충족시키기 더 어려워진다. 본원에 기재된 바와 같이, 제품 품질 표준을 충족시키는 약물 물질의 색 강도를 감소시킬 수 있는 배지에 대한 몇몇 변형 (화학적으로 규정되지 않은 또는 CDM도 포함)이 확인되었다.
- [0379] 실시예에 기재된 CHO 세포주는 문헌 [Kaufman et al., Mol. Cell. Biol., 2(11):1304-1319 (1982)]에 이전에 기재된 방법과 유사한 디히드로폴레이트 리덕타제(dhfr)/메토타렉세이트 선택 방법을 이용하여 재조합 인간화 항체 (본원에서 IgG1 모노클로날 항체로 지칭됨)를 분비하도록 유전자 조작되었다. 본래 형질감염은 선택제로서 메티오닌 술폭시민 및 글루타민 무함유 배지를 사용하는 GS 선택 시스템을 이용하였다. 이후의 슈퍼-형질감염은 dhfr 선택 시스템 및 선택제로서 메토타렉세이트를 이용하였다. 2-리터 교반된 현탁액 생물반응기에서 성장을 시작하기 전에, 이러한 CHO 세포주의 극저온으로 동결된 애플을 해동시키고, 5% CO₂를 갖는 가슴 인큐베

이터 내에서 37℃에서 적어도 2주 동안 진탕기 플라스크 내의 화학적으로-규정된 배지에서 배양하여, 우수한 성장 및 생존 특성을 갖는 세포 배양 현탁액을 수득하였다.

[0380] 실시예 1: 항체-생산 세포주로부터 단리된 항체를 함유하는 제제에서 나타난 색 강도.

[0381] IgG1 모노클로날 항체 (항-베타7)를 생산할 수 있는 CHO 세포주를 펩톤을 함유한 화학적으로 규정되지 않은 배지에서 배양하였다. 단리된 항체를 정제하고, 표준 색, 단백광 및 색조 (COC) 검정 (문헌 [Council of Europe, European Pharmacopoeia., 2008, 7th Ed., p. 22]을 이용하여 색에 대해 검정하였다. 간략하게, COC 검정을 편평한 바닥 및 15 mm 내지 25 mm의 내부 직경을 갖는 무색의 투명한 중성 유리의 동일 튜브를 사용하여 수행하였다. 튜브를 분비된 IgG1 모노클로날 항체를 함유하는 정제 및 농축된 세포 배양액으로부터 제조된 150 g/L 단백질 용액으로 40 mm의 깊이까지 채웠다. 항체 용액을 함유하는 튜브를 산란된 주광에서 백색 배경에 대해 수직으로 관찰함으로써 각각 B1 (가장 어두움) 내지 B9 (가장 밝음) 범위의 참조 용액으로 채운 9개의 참조 튜브와 비교하였다. IgG1 모노클로날 항체 용액을 ≤ B5의 COC 값에서 측정하였다 (도 1; 제제 I).

[0382] IgG1 모노클로날 항체 (항-베타7)를 생산하는 CHO 세포주를 CDM에서 배양하였다. 세포 배지 제제의 경우에, 기초 CDM (배지 1) 및 공급 CDM (배지 2) 용액은 물에 용해되고 최적의 세포 성장을 보장하는 최종 pH 및 오스몰랄농도로 조정된 단일 맞춤 제제화된 블렌디드 분말에 성분을 합하여 제조하였다. 기초 배지 1 및 공급 배지 2는 각각 과량의 20가지 성분을 가졌으며 표 A에 관심 성분이 열거되어 있다. 일부 배지 성분, 예컨대 글루코스는 블렌디드 분말에 합하지 않았으나, 배지 제조 동안 개별적으로 첨가하였다. 세포 배양의 성장기를 개시하기 위해, CHO 세포를 1L의 기초 배지 1을 함유하는 2-리터 교반된 생물반응기 (애플리콘(Applikon), 캘리포니아주 포스터 시티) 중에 대략 1.0×10^6 개 세포/mL로 접종하였다. 세포를 생산기의 개시를 위해 3, 6 및 9일에 세포 배양액 리터당 100 mL의 공급 배지 2를 첨가하는 유가식 모드로 배양하였다. 글루코스의 농도를 매일 분석하고, 글루코스 농도가 3 g/L 아래로 떨어졌다면, 이는 글루코스 고갈 예방을 위해 500 g/L 글루코스 원액으로 보충하였다. 반응기에 보정된 용존 산소, pH 및 온도 프로브를 장착하였다. 용존 산소를 공기 및/또는 산소의 살포를 통해 온-라인 제어하였다. pH는 CO₂ 또는 Na₂CO₃의 첨가를 통해 제어하고, 소포체를 필요에 따라 배양물에 첨가하였다. 세포 배양물을 pH 7.0 및 0일에서 3일까지는 37℃의 온도, 이어서 3일 후에는 33℃에서 유지하였다. 세포 배양물을 275 rpm에서 교반하였고, 용존 산소 수준은 30%의 공기 포화도였다. 오스몰랄농도를 어드밴스드 인스트루먼트(Advanced Instruments) (메사추세츠주 노르우드)로부터의 삼투압계를 이용하여 모니터링하였다. 또한, 오프라인 pH 및 대사물 농도를 또한 노바 바이오프로파일(Nova Bioprofile) 400 (노바 바이오메디칼(Nova Biomedical), 메사추세츠주 월섬)을 이용하여 매일 결정하였다. 생존 세포 밀도 (VCC) 및 세포 생존율을 바이셀(ViCell)® 자동화 세포 계수기 (벤크만 쿨터(Beckman Coulter), 캘리포니아주 풀러튼)를 이용하여 매일 측정하였다. 눈금을 매긴 원심분리 튜브 (킴블 사이언스 프로덕츠(Kimble Science Products), 캘리포니아주 풀러튼)를 이용하여 10분 동안 700 x g 또는 836 x g에서의 세포 현탁액의 원심분리 후에 충전 세포 부피 (PCV)를 측정하였다. PCV를 전체 배양 부피의 퍼센트로 표현하였다. 제14일의 세포 배양 기간 말미에, 배양물 중 단백질의 양이 대략 2-10 g/L일 때, 세포 배양액을 원심분리에 의해 수확하였다. 수확된 세포 배양액 중의 모노클로날 항체를 단백질 A 친화도 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 정제 후에, 용리된 단백질 A 풀 중 단백질의 농도는 대략 5-10 g/L였다. 단백질 A 풀을 아미콘(Amicon) 센트리콘(Centricon) 원심분리 필터 장치 (밀리포어 코포레이션(Millipore Corporation), 메사추세츠주 빌러리카)를 이용하여 150 g/L로 추가로 농축시켰다. 색을 표준 COC 검정을 이용하여 농축된 단백질 A 풀에서 측정하였다. 대안적으로, 수확된 세포 배양액을 단백질 A 친화도 크로마토그래피를 통한 친화도 정제, 음이온 및 양이온 교환 크로마토그래피를 통한 추가의 정제, 바이러스 제거를 위한 여과, 및 항체의 최종 제제화 및 농축을 위한 최종 한외여과 및 정용여과 단계, 이어서 표준 COC 검정으로의 색 측정을 포함하는 표준 항체 정제 과정을 이용하여 정제하였다. 문헌 [Kelley, B. mAbs., 2009, 1(5):443-452]을 참조한다. 비록 약간 더 높을지라도, 농축된 단백질 A 풀에서의 색 측정은 기재된 표준 항체 정제 과정에 의해 생산된 최종 항체 제제에서 예상되는 색을 광범위하게 나타낸다. 세포 배양액을 1 mL의 세포 배양액을 원심분리한 후에 고성능 액체 크로마토그래피로 정제함으로써 항체 역가를 결정하기 위해 매일 수집하였다. COC 검정을 편평한 바닥 및 15 mm 내지 25 mm의 내부 직경을 갖는 무색의 투명한 중성 유리의 동일 튜브를 이용하여 수행하였다. 2개의 튜브를 각각 분비된 IgG1 모노클로날 항체를 함유하는 정제 및 농축된 세포 배양액으로부터 제조된 150 g/L 단백질 용액으로 40 mm의 깊이까지 채웠다. 항체 용액을 함유하는 각각의 튜브를 산란된 주광에서 백색 배경에 대해 수직으로 관찰함으로써 각각 B1 (가장 어두움) 내지 B9 (가장 밝음) 범위의 참조 용액으로 채운 9개의 참조 튜브와 비교하였다. 항체-함유 용액의 색 분석은 ≤ B4 또는 ≤ B3의 COC 값을 입증하였다 (도 1; 각각 제제 II 및 III).

[0383] [표 A]

관심 성분

배지 성분	배지 1 (기초)	배지 2 (공급)
황산제1철 (μM)	75	0
비타민 B2 (mg/L)	1.41	10
비타민 B6/ 피리독신 (mg/L)	15.42	7
비타민 B6/ 피리독살 (mg/L)	0	60
비타민 B9 (mg/L)	9.93	197
비타민 B12 (mg/L)	3.05	48
시스테인 (mg/L)	525	1500
시스틴 (mg/L)	0	0
히드로코르티손 (nM)	150	0

[0384]

[0385] 실시예 2: 항체-생산 세포주로부터 단리된 항체의 색 강도는 세포 배양 배지 중의 특정 성분의 변경에 의해 감소된다.

[0386] 기초 배지 1 및 공급 배지 2를 다시 제제화된 배지가 CHO 세포주에 의해 생산된 단리된 모노클로날 IgG1 항체 (항-베타7)의 색 강도를 감소시킬 수 있는지 결정하기 위한 세포 배양 실험에 사용하기 위해 감소된 농도의 여러 영양소를 함유하도록 다시 제제화하였다. 간략하게, 기초 CDM (배지 3) 및 공급 CDM (배지 4) 용액을 물에 용해되고 최적의 세포 성장을 보장하는 최종 pH 및 오스몰랄농도로 조정된 단일 맞춤 제제화된 블렌디드 분말에 성분을 합하여 제조하였다. 기초 배지 3 및 공급 배지 4는 각각 과량의 20가지 성분을 가졌으며, 관심 성분은 표 B에 열거되어 있다. 일부 배지 성분, 예컨대 글루코스는 블렌디드 분말에 합하지 않았으나, 배지 제조 동안 개별적으로 첨가하였다. 유사하게, 본 연구를 위해 변화된 배지 성분은 블렌디드 분말에 포함시키지 않았으나, 배지 제조 동안 적절한 수준에서 개별적으로 첨가하였다 (표 B). 시트르산제2철은 5 g/L 시트르산제2철 원액으로부터 첨가되고, 비타민 B2는 리보플라빈 분말로서 제공되고, 비타민 B6은 피리독신 HCl 또는 피리독살 HCl로서 제공되고, 비타민 B9는 폴산 분말로서 제공되고, 비타민 B12는 시아노코발라민 분말로서 제공되고, 시스테인은 L-시스테인 모노히드로클로라이드 1수화물 분말로서 제공되고, 시스틴은 이나트륨 염 1수화물 분말로서 제공되고, 히드로코르티손은 150 μM 원액으로부터 첨가되었다.

[0387] [표 B]

관심 성분

배지 성분	배지 1 (기초)	배지 2 (공급)	배지 3 (기초)	배지 4 (공급)
철 (μM)	75 ^a	0	18 ^b	0
비타민 B2 (mg/L)	1.41	10	0.25	0
비타민 B6/ 피리독신 (mg/L)	15.42	7	5.35	0
비타민 B6/ 피리독살 (mg/L)	0	60	0	0
비타민 B9 (mg/L)	9.93	197	8.61	0
비타민 B12 (mg/L)	3.05	48	1.76	0
시스테인 (mg/L)	525	1500	0	1500
시스틴 (mg/L)	0	0	480	0
히드로코르티손 (nM)	150	0	150	0

^a 철 공급원은 황산제1철임

^b 철 공급원은 시트르산제2철임

[0388]

[0389] 세포 배양의 성장기를 개시하기 위해, CHO 세포를 1L의 기초 배지 3을 함유하는 2-리터 교반된 생물반응기 (애플리콘, 캘리포니아주 포스터 시티) 중에 대략 1.0×10^6 개 세포/mL로 접종하였다. 세포를 생산기의 개시를 위해 3, 6 및 9일에 세포 배양액 리터당 100 mL의 공급 배지 4를 첨가하는 유가식 모드로 배양하였다. 글루코스의 농도를 매일 분석하고, 글루코스 농도가 3 g/L 아래로 떨어졌다면, 이는 글루코스 고갈 예방을 위해 500 g/L

글루코스 원액으로 보충하였다. 반응기에 보정된 용존 산소, pH 및 온도 프로브를 장착하였다. 용존 산소를 공기 및/또는 산소의 살포를 통해 온-라인 제어하였다. pH는 CO₂ 또는 Na₂CO₃의 첨가를 통해 제어하고, 소포제를 필요에 따라 배양물에 첨가하였다. 세포 배양물을 pH 7.0 및 0일에서 3일까지는 37℃의 온도, 이어서 3일 이후에는 35℃에서 유지하였다. 세포 배양물을 275 rpm에서 교반하였고, 용존 산소 수준은 30%의 공기 포화도였다. 오스몰랄농도를 어드밴스드 인스트루먼츠 (메사추세츠주 노르우드)로부터의 삼투압계를 이용하여 모니터링하였다. 또한, 오프라인 pH 및 대사물 농도를 또한 노바 바이오프로파일 400 (노바 바이오메디칼, 메사추세츠주 윌섬)을 이용하여 매일 결정하였다. 생존 세포 밀도 (VCC) 및 세포 생존율을 바이셀® 자동화 세포 계수기 (베크만 쿨터, 캘리포니아주 풀러튼)를 이용하여 매일 측정하였다. 눈금을 매긴 원심분리 튜브 (김블 사이언스 프로덕츠, 캘리포니아주 풀러튼)를 이용하여 10분 동안 700 x g 또는 836 x g에서의 세포 현탁액의 원심분리 후에 충전 세포 파괴 (PCV)를 측정하였다. PCV를 전체 배양 파괴의 퍼센트로 표현하였다. 제14일의 세포 배양 기간 말미에, 배양물 중 단백질의 양이 대략 2-10 g/L일 때, 세포 배양액을 원심분리에 의해 수확하였다. 수확된 세포 배양액 중의 모노클로날 항체를 단백질 A 친화도 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 정제 후에, 용리된 단백질 A 풀 중 단백질의 농도는 대략 5-10 g/L였다. 단백질 A 풀을 아미콘 센트리콘 원심분리 필터 장치 (밀리포어 코포레이션, 메사추세츠주 빌러리카)를 이용하여 150 g/L로 농축시켰다. 색을 표준 COC 검정을 이용하여 농축된 단백질 A 풀에서 측정하였다. 수확된 세포 배양액을 또한 단백질 A 친화도 크로마토그래피를 통한 친화도 정제, 음이온 및 양이온 교환 크로마토그래피를 통한 추가의 정제, 바이러스 제거를 위한 여과, 및 항체의 최종 제제화 및 농축을 위한 최종 한외여과 및 정용여과 단계, 이어서 표준 COC 검정으로의 색 측정을 포함하는 표준 항체 정제 과정을 이용하여 병행하여 정제하였다. 문헌 [Kelley, B. mAbs., 2009, 1(5):443-452]을 참조한다. 비록 약간 더 높을지라도, 농축된 단백질 A 풀에서의 색 측정은 기재된 표준 항체 정제 과정에 의해 생산된 최종 항체 제제에서 예상되는 색을 광범위하게 나타낸다. 세포 배양액을 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 항체 역가의 결정을 위해 1 mL의 세포 배양액을 원심분리함으로써 매일 수집하였다. COC 검정을 편평한 바닥 및 15 mm 내지 25 mm의 내부 직경을 갖는 무색의 투명한 중성 유리의 동일 튜브를 이용하여 수행하였다. 튜브를 분비된 IgG1 모노클로날 항체를 함유하는 정제 및 농축된 세포 배양액으로부터 제조된 150 g/L 단백질 용액으로 40 mm의 깊이까지 채웠다. 항체 용액을 함유하는 각각의 튜브를 산란된 주광에서 백색 배경에 대해 수직으로 관찰함으로써 각각 BY1 (가장 어두움) 내지 BY7 (가장 밝음) 범위의 참조 용액으로 채운 7개의 참조 바이알과 비교하였다. IgG1 모노클로날 항체 용액을 ≤ BY5의 COC 값에서 측정하였다 (도 1; 제제 VII). 충전 세포 파괴 (PCV)는 기초 배지 1 및 공급 배지 2에서 성장한 세포와 비교하여 기초 배지 3 및 공급 배지 4에서 성장한 세포 배양물에서 약간 감소하였다 (도 2A). 이러한 감소는 약간 감소된 항체 생산과 상관된다 (도 2B). 이러한 배지의 PCV 및 항체 역가에 대한 효과를 평가하기 위한 추가의 실험은 PCV가 기초 배지 1 및 공급 배지 2로 배양한 세포와 비교하여 세포를 기초 배지 3 및 공급 배지 4로 배양한 경우에 감소하였다는 것을 확인하였다 (도 2C). 이전과 같이, PCV의 감소는 감소된 항체 생산과 상관된다 (도 2D).

[0390] 이러한 결과는 CHO 세포를 기초 배지 3 및 공급 배지 4로 배양함으로써 생산된 모노클로날 IgG1 항체의 색 강도가 기초 배지 1 및 공급 배지 2에서 세포를 배양함으로써 생산된 모노클로날 IgG1 항체의 색 강도와 비교하여 감소한다는 것을 입증한다.

[0391] 실시예 3: 항체-생산 세포주로부터 분리된 항체의 색 강도는 세포 배양 배지 중의 비타민 B 수준의 변경에 의해 감소한다.

[0392] 기초 배지 3 및 공급 배지 4에서 변화하는 성분이 분리된 항체의 색 강도에 미치는 영향을 결정하기 위해, 다른 배지 성분 수준은 일정하게 유지하면서 비타민 B2, B6, B9 및 B12의 수준을 변화시켰다. 배지를 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조하였다. 본 연구에서 변화시킨 배지 성분은 블렌디드 분말에는 포함시키지 않았으나, 배지 제조 동안 적절한 수준에서 개별적으로 첨가하였다. 기초 배지 5를 비타민 수준은 기초 배지 3과 유사하게 감소되고 다른 모든 성분은 기초 배지 1과 유사하도록 제제화하였다 (표 C). CHO 세포로부터 모노클로날 IgG1 항체 (항-베타7)를 생산하기 위해, 세포 배양액에 초기 성장기를 위한 기초 배지 5를 공급하고, 3, 6 및 9일에 공급 배지 2 또는 공급 배지 4로 배양하였다. 세포 생존율 측정 및 모노클로날 IgG1 항체의 단리를 실시예 2에 기재된 바와 같이 수행하였다. 항체 정제 후에, 색 강도 및 항체 역가를 또한 실시예 2에 기재된 바와 같이 결정하였다. 기초 배지 5 및 공급 배지 2로 배양한 세포로부터 수득한 IgG1 모노클로날 항체 용액을 ≤ B4의 COC 값에서 측정하였다 (도 1; 제제 V). 기초 배지 5 및 공급 배지 4로 배양한 세포로부터 수득한 IgG1 모노클로날 항체 용액을 ≤ B4의 COC 값에서 측정하였다 (도 1; 제제 IV).

[0393] [표 C]

감소된 비타민 B2, B6, B9 및 B12 수준을 갖는 배지

배지 성분	배지 5 (기초)
황산제2철 (μM)	75
비타민 B2 (mg/L)	0.25
비타민 B6/ 피리독신 (mg/L)	5.35
비타민 B6/ 피리독살 (mg/L)	0
비타민 B9 (mg/L)	8.61
비타민 B12 (mg/L)	1.76
시스테인 (mg/L)	525
시스틴 (mg/L)	0
히드로코르티손 (nM)	150

[0394]

[0395]

단리된 항체의 색 강도에 대한 개별 비타민 B 성분 (비타민 B2, B6, B9 및 B12)의 기여를 평가하기 위해 완전 요인 연구를 수행하였다. 비타민 B2의 수준을 개별 요인으로 처리하고, 피록시딘 및 피리독살의 수준을 비타민 B6으로서 단일 요인으로 함께 합하여, 이들 2가지 영양소의 농도가 동시에 변화되도록 하였다. 유사하게, 비타민 B9 및 B12의 수준을 함께 단일 요인으로서 함께 변화시켜 이들 2가지 영양소의 농도가 동시에 변화되도록 하였다. 표 D, E 및 F에 열거된 배지를 포함하는 여러 배지 체제를 제조하였다. CHO 세포로부터 모노클로날 IgG1 항체 (항-베타7)를 생산하기 위해, 세포 배양물에 기초 배지 5 및 공급 배지 4, 기초 배지 6 및 공급 배지 7, 기초 배지 8 및 공급 배지 9, 또는 기초 배지 10 및 공급 배지 11을 유가식 모드로 공급하였다. 추가의 세포 배양물에 1.41 mg/L 비타민 B2 및/또는 15.42 mg/L 비타민 B6 (피리독신으로 공급됨)을 함유하는 기초 배지 및 10 mg/L 비타민 B2 및/또는 76 mg/L 비타민 B6 (7mg/L 피리독신 및 60 mg/L 피리독살)을 함유하는 공급 배지를 공급하였다. 세포 생존을 측정 및 모노클로날 IgG1 항체의 단리를 실시예 2에 기재된 바와 같이 수행하였다. 항체 정제 후에, 항체 역가를 실시예 2에 기재된 바와 같이 결정하였다. 색 강도를 색 검정으로 결정하였다 (여기서, 보다 높은 수치 값은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 수치 값은 보다 낮은 색 강도를 나타냄). 이러한 색 검정을 위해 (본원에서, 정규화된 형광 강도 (NIFTY) 검정으로 지칭됨), 약 50 내지 125 μg의 모노클로날 항체 샘플을 0.5mL/분의 등용매 용량으로 G3000SWXL 칼럼 (도소(TOSOH))을 이용하여 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 분석하였다. SEC에 대한 이동상은 0.2M 인산칼륨, 0.25M 염화칼륨, pH 6.2였다. 칼럼 온도를 15°C에서 수집하였다. SEC 용리액을 280nm에서 UV 흡광도 및 350nm의 여기 파장 및 425nm의 방출 파장에서의 형광에 대해 모니터링하였다. 모노클로날 항체 종의 SEC 피크를 UV 흡광도 및 형광 방출 크로마토그램에 대해 애길런트 켐스테이션 소프트웨어를 이용하여 통합시켰다. 각각의 모노클로날 항체 샘플에 대해, 정규화된 형광을 주요 피크의 형광 피크 영역을 주요 피크의 UV 흡광도 피크 영역으로 나누어 결정하였으며, 이는 항체 질량 기여에 의해 형광 반응과 상관된다. 이후에, 색 강도 값을 ≤ B5의 COC 판독을 함유하는 참조 모노클로날 항체 샘플의 정규화된 형광에 대한 시험 모노클로날 항체 샘플의 정규화된 형광의 비를 계산함으로써 결정하였다. JMP 8.0.2 통계 소프트웨어를 이용한 시간 경과에 따른 충전 세포 부피 (IVPCV) 및 항체 역가 수준의 분석은 세포 생존을 및 항체 역가 수준이 기초 및 공급 배지 둘 다에서의 비타민 B2 및 비타민 B6 수준의 변경에 의해 단지 약하게 영향을 받지만 (도 3A 및 B; 중앙 추세선), 세포 배양 배지 중의 이들 2가지 비타민의 증가된 수준은 단리된 항체에서 색 강도를 유의하게 증가시킨다는 것을 입증하였다 (도 4; 중앙 추세선). 대조적으로, 비타민 B9 및 비타민 B12의 증가된 수준은 세포 생존을, 항체 역가 수준 또는 색 강도에 대해 유의한 영향을 미치지 않았다 (도 3 및 4; 중앙 추세선). 추가로, 낮은 수준의 색 강도가 0.25 mg/L 비타민 B2 및 5.35 mg/L 비타민 B6 (피리독신으로 공급됨)을 함유하는 기초 배지 및 비타민 B2 및 비타민 B6을 함유하지 않는 공급 배지로 배양한 세포주로부터 단리된 항체에서 관찰되었다.

[0396]

비타민 B1, B3, B5 및 B7의 효과를 또한 연구하였으나; 항체-함유 용액의 색 강도에 대한 이들 영양소의 효과는 유의하지 않았다.

[0397] [표 D]

비타민 B2 변화가 있는 배지

배지 성분	배지 6 (기초)	배지 7 (공급)
황산제1철 (μM)	75	0
비타민 B2 (mg/L)	1.41	10
비타민 B6/ 피리독신 (mg/L)	5.35	0
비타민 B6/ 피리독살 (mg/L)	0	0
비타민 B9 (mg/L)	8.61	0
비타민 B12 (mg/L)	1.76	0
시스테인 (mg/L)	525	1500
시스틴 (mg/L)	0	0
히드로코르티손 (nM)	150	0

[0398]

[0399] [표 E]

비타민 B6 변화가 있는 배지

배지 성분	배지 8 (기초)	배지 9 (공급)
철 (μM)	75	0
비타민 B2 (mg/L)	0.25	0
비타민 B6/ 피리독신 (mg/L)	15.42	7
비타민 B6/ 피리독살 (mg/L)	0	60
비타민 B9 (mg/L)	8.61	0
비타민 B12 (mg/L)	1.76	0
시스테인 (mg/L)	525	1500
시스틴 (mg/L)	0	0
히드로코르티손 (nM)	150	0

[0400]

[0401] [표 F]

비타민 B9 및 B12 변화가 있는 배지

배지 성분	배지 10 (기초)	배지 11 (공급)
철 (μM)	75	0
비타민 B2 (mg/L)	0.25	0
비타민 B6/ 피리독신 (mg/L)	5.35	0
비타민 B6/ 피리독살 (mg/L)	0	0
비타민 B9 (mg/L)	9.93	197
비타민 B12 (mg/L)	3.05	48
시스테인 (mg/L)	525	1500
시스틴 (mg/L)	0	0
히드로코르티손 (nM)	150	0

[0402]

[0403] 실시예 4: 항체-생산 세포주로부터 단리된 항체의 색 강도는 세포 배양 배지 중의 철 공급원 및 수준의 변경에 의해 감소한다

[0404] 단리된 항체의 색 강도에 대한 철 수준의 기여를 평가하기 위해, 다른 배지 성분 수준은 일정하게 유지하면서 철의 수준을 변화시켰다. 배지를 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조하였다. 본 연구에서 변화시킨 배지 성분은 블렌디드 분말에는 포함되지 않았으나, 배지 제조 동안 적절한 수준에서 개별적으로 첨가하였다. 기초 배지

1은 18 μM 황산제1철을 함유하는 기초 배지 12 및 10 μM 황산제1철을 함유하는 기초 배지 13을 생산하기 위해 감소된 수준의 황산제1철을 갖도록 다시 제제화하였다. CHO 세포로부터 모노클로날 IgG1 항체 (항-베타7)를 생산하기 위해, 세포 배양물에 기초 배지 1 및 공급 배지 2, 기초 배지 12 및 공급 배지 2, 또는 기초 배지 13 및 공급 배지 2를 유가식 모드로 공급하였다. 세포 생존을 측정 및 모노클로날 IgG1 항체의 단리를 실시예 2에 기재된 바와 같이 수행하였다. 항체 정제 후에, 항체 역가를 실시예 2에 기재된 바와 같이 결정하였다. 색 강도를 색 검정으로 결정하였다 (여기서, 보다 높은 수치 값은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 수치 값은 보다 낮은 색 강도를 나타냄). 이러한 색 검정 (또한, NIFTY 검정으로 지칭됨)을 실시예 3에 기재된 바와 같이 구현하였다. JMP 8.0.2 통계 소프트웨어를 사용하는 시간 경과에 따른 충전 세포 부피 (IVPCV) 및 항체 역가 수준의 분석은 세포 생존을 및 항체 역가 수준이 75 μM 의 농도의 철과 비교하여 보다 낮은 철 농도 수준에서 감소되었을지라도 (도 5A 및 B), 세포 배양 배지에서 보다 낮은 철 농도가 단리된 항체에서의 색 강도를 유의하게 감소시켰다는 것을 입증하였다 (도 5C).

[0405] 색에 대한 세포 배양 조건의 관찰된 효과가 세포내 또는 세포외 현상으로 인한 것인지 연구하기 위해, 일련의 시험관내 인큐베이션 실험을 수행하였다. 1 g/L 정량의 모노클로날 항체를 새로 제조된 세포 배양 배지에 섞고, 33°C에서 최대 6일 동안 인큐베이션하였다. 시험관내 인큐베이션에 사용된 세포 배양 배지는 10, 18 및 75 μM 의 황산제1철 농도를 가졌다. 비타민 B 농도를 감소된 수준의 0.25 mg/L 비타민 B2, 5.35 mg/L 비타민 B6 (5.35 mg/L 피리독신 + 0 mg/L 피리독살), 8.61 mg/L 비타민 B9, 및 1.76 mg/L 비타민 B12에서 일정하게 유지하였다. 인큐베이션된 혼합물을 0, 3 및 6일에 샘플링하고, 항체를 단백질 A 크로마토그래피를 통해 정제하였다. 단리된 항체-함유 용액을 NIFTY 검정으로 색 강도에 대해 측정하였다. 색 강도의 증가가 각각 75, 18 또는 10 μM 황산제1철을 함유하는 배지에서 성장한 세포로부터 단리된 항체-함유 용액 중에서 0일에 1.0 유닛으로부터 6일에 1.8, 1.44 또는 1.27 유닛까지 관찰되었다 (도 5D). 보다 높은 철 농도에서 증가되는 색 형성은 세포의 메카니즘이 항체의 착색에서 역할을 수행한다는 것을 나타내는 세포 배양 실험으로부터의 결과를 반영한다.

[0406] 단리된 항체의 색 강도에 대한 철의 기여를 추가로 평가하기 위해, 다른 배지 성분 수준은 일정하게 유지하면서 철의 공급원 및 수준을 변화시켰다. 배지를 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조하였다. 본 연구에서 변화시킨 배지 성분은 블렌디드 분말에 포함되지 않았으나, 배지 제조 동안 적절한 수준에서 개별적으로 첨가하였다. 기초 배지 1을 18 μM 황산제1철을 함유하는 기초 배지 12 및 10 μM 황산제1철을 함유하는 기초 배지 13을 생산하기 위해 감소된 수준의 황산제1철을 갖도록 다시 제제화하였다. 추가로, 기초 배지 1을 18 μM 질산제2철을 함유하는 기초 배지 14, 18 μM 시트르산제2철을 함유하는 기초 배지 15 및 10 μM 시트르산제2철을 함유하는 기초 배지 16을 생산하기 위해 감소된 수준의 철 뿐만 아니라 상이한 철 공급원을 갖도록 다시 제제화하였다. CHO 세포로부터 모노클로날 IgG1 항체 (항-베타7)를 생산하기 위해, 세포 배양물에 기초 배지 1 및 공급 배지 2, 기초 배지 12 및 공급 배지 2, 기초 배지 13 및 공급 배지 2, 기초 배지 14 및 공급 배지 2, 기초 배지 15 및 공급 배지 2, 또는 기초 배지 16 및 공급 배지 2를 유가식 모드로 공급하였다. 세포 생존을 측정 및 모노클로날 IgG1 항체의 단리를 실시예 2에 기재된 바와 같이 수행하였다. 항체 정제 후에 항체 역가를 또한 실시예 2에 기재된 바와 같이 결정하였다. 색 강도를 색 검정으로 결정하였다 (여기서, 보다 높은 수치 값은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 수치 값은 보다 낮은 색 강도를 나타냄). 이러한 색 검정 (또한, NIFTY 검정으로 지칭됨)을 실시예 3에 기재된 바와 같이 구현하였다. JMP 8.0.2 통계 소프트웨어를 이용하는 시간 경과에 따른 충전 세포 부피 (IVPCV) 및 항체 역가 수준의 분석은 세포 생존을 및 항체 역가 수준이 75 μM 의 농도의 황산제1철과 비교하여 보다 낮은 황산제1철 농도 수준으로 감소한다는 것을 입증하였다 (도 6A 및 B). 18 μM 시트르산제2철을 함유하는 배지를 사용한 세포 배양액으로부터의 세포 생존을 및 항체 역가 수준은 75 μM 황산제1철을 함유하는 배지와 대등하였다 (도 6A 및 B). 그러나, 세포 배양 배지에서 18 μM 시트르산제2철의 사용은 시험된 모든 농도의 황산제1철과 비교하여 단리된 항체에서 색 강도를 유의하게 감소시켰다 (도 6C). 18 μM 질산제2철을 함유하는 배지에서 성장한 세포 배양액으로부터 단리된 항체의 세포 생존율, 항체 역가 및 색은 10 μM 또는 18 μM 황산제1철을 함유하는 배지를 사용하여 관찰된 것과 대등하였다 (도 6A-C).

[0407] 감소된 비타민 B 수준 및 감소된 철 농도를 합하여 비타민 및 철로 인한 색에 대한 유의한 효과가 부가적인지 여부를 시험하였다. 기초 배지 13, 배지 14, 배지 15 및 배지 16을 각각 기초 배지 21, 배지 22, 배지 23 및 배지 25를 생산하기 위해 감소된 수준의 비타민 B 수준을 갖도록 다시 제제화하였다. 또한, 기초 배지 1을 기초 배지 24를 생산하기 위해 감소된 비타민 B 수준 및 철 공급원으로서 10 μM 질산제2철을 갖도록 다시 제제화하였다. 배지 21 내지 25에서 감소된 비타민 수준은 다음과 같다: 0.25 mg/L 비타민 B2, 5.35 mg/L 비타민 B6 (5.35 mg/L 피리독신 + 0 mg/L 피리독살), 8.61 mg/L 비타민 B9, 및 1.76 mg/L 비타민 B12. CHO 세포로부터 모노클로날 IgG1 항체를 생산하기 위해, 세포 배양물에 기초 배지 21, 22, 23, 24 또는 25 및 공급 배지 2를 유

가식 모드로 공급하였다. 모노클로날 IgG1 항체의 단리 및 항체 역가의 측정을 실시예 2에 기재된 바와 같이 수행하였다. 색 강도를 NIFTY 검정으로 측정하였다. 항체 역가 수준 및 색 강도의 분석은 황산제1철 농도를 75 μM 으로부터 18 μM 으로 낮추고, 보다 낮은 비타민 농도와 합한 경우에, 생성된 색 및 역가가 요인 중 하나만을 감소시킨 경우보다 낮다는 것을 입증하였다 (도 6D 및 E, 플러스 기호). 그러나, 질산제2철 또는 황산제1철의 경우에 철 농도를 18 μM 으로부터 10 μM 으로 감소시키는 것에 추가의 이익은 없는 것으로 나타났다 (도 6D 및 E, 플러스 기호).

[0408] 항체 색 강도에 대한 반응성 산소 종 (ROS)의 기여를 연구하기 위해, 모노클로날 IgG1 항체의 2 g/L 샘플을 75 μM 또는 18 μM 황산제1철을 보충한 세포 배양 배지를 함유하는 바이알에 섞음으로써 시험관내 실험을 수행하였다. 모노클로날 IgG1 항체 (항-베타7)의 2 g/L 샘플을 1.41 mg/L 비타민 B2 또는 0.25 mg/L 비타민 B2를 보충한 세포 배양 배지를 함유하는 바이알에 섞음으로써 추가의 시험관내 실험을 수행하였다. 샘플을 203 U/ml 카탈라제의 부재 또는 존재 하에 어떠한 세포도 없이 37°C에서 5일 동안 인큐베이션하였다. 색 강도를 색 검정으로 결정하였다 (여기서, 보다 높은 수치 값은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 수치 값은 보다 낮은 색 강도를 나타냄). 이러한 색 검정 (또한, NIFTY 검정으로 지칭됨)을 실시예 3에 기재된 바와 같이 구현하였다. JMP 8.0.2 통계 소프트웨어를 사용한 색 수준의 분석은 증가된 수준의 철이 항체 용액의 색 강도를 증가시키며 (도 7A) 이러한 색의 증가는 카탈라제의 첨가에 의해 감소되었다는 것을 입증하였다 (도 7B; 중앙 추세선). 대조적으로, 증가된 수준의 비타민 B2가 항체 용액의 색 강도를 증가시키더라도, 색 강도는 카탈라제의 첨가에 의해 감소되지 않았다 (도 7A 및 B; 중앙 추세선).

[0409] 실시예 5: 항체-생산 세포주로부터 단리된 항체의 산성 전하 변이체의 형성은 세포 배양 배지 중의 특정 성분의 변경에 의해 감소한다.

[0410] CHO 세포로부터 모노클로날 IgG1 항체 (항-베타7)를 생산하기 위해, 세포를 각각 10 μM , 18 μM 또는 75 μM 황산제1철을 함유하는 3가지 다시 제제화된 기초 배지 1 용액 중 하나로 배양하였다. 추가의 세포 배양물에 각각 10 μM 또는 18 μM 시트르산제2철을 함유하는 2가지 다시 제제화된 기초 배지 3 용액 중 하나를 공급하였다 (즉, 이로 배양함). 모든 세포 배양물에 공급 철-무함유 공급 배지를 유가식 모드로 공급하였다. 모노클로날 IgG1 항체의 단리 및 항체 역가 결정을 실시예 2에 기재된 바와 같이 수행하였다. 색 강도를 색 검정으로 결정하였다 (여기서, 보다 높은 수치 값은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 수치 값은 보다 낮은 색 강도를 나타냄). 이러한 색 검정 (또한, NIFTY 검정으로 지칭됨)을 실시예 3에 기재된 바와 같이 구현하였다. 정제된 용액에서의 항체 산성 전하 변이체의 검출을 위해, 모노클로날 항체의 전하 이질성을 디오넥스(Dionex) 프로팩(ProPac) WCX-10 (4x250 mm) 칼럼을 사용하여 이온 교환 크로마토그래피 (IEC)에 의해 분석하였다. 분석은 용리액을 280 nm에서 모니터링하면서 애질런트 1100 HPLC 시스템 상에서 수행하였다. 이동상 A는 25 mM 인산나트륨 (pH 6.6)이고, 이동상 B는 이동상 A 중 150 mM 황산나트륨이다. 45분 내의 0 → 37% B 선형 구배와 0.5 mL/분의 유량을 이용하였다. 칼럼 온도를 40°C에서 제어하였다. 모노클로날 항체의 중쇄 상의 C-말단 리신 잔기를 카르복시펩티다제 B에 의해 제거한 후에 염기성 영역에서 전하 이질성의 복잡성을 감소시키기 위해 IEC 분석을 수행하였다. JMP 8.0.2 통계 소프트웨어를 이용하는 산성 전하 변이체의 존재에 대한 관련성으로서의 색 강도의 분석은 항체 용액에서 높은 색 강도 및 산성 전하 변이체의 증가된 수준 사이의 강한 상관관계를 입증하였다 (도 8A). 또한, 산성 전하 변이체의 존재는 변형된 배지 1 및 배지 2로 배양한 세포주와 비교하여 변형된 배지 3 및 배지 4로 배양한 세포주로부터 단리된 항체에서 유의하게 감소하였으며 최소 농도의 철에서 최대 감소가 관찰되었다 (도 8A).

[0411] 색 강도 및 산성 전하 변이체의 형성 사이의 상관관계를 변화하는 철 또는 비타민 B 수준을 함유하는 배지로 배양한 세포주로부터 수득한 항체-함유 용액에서 조사하였다. 모노클로날 IgG1 항체는 18 μM 의 철 농도를 유지하면서 18 μM 또는 75 μM 황산제1철을 함유하는 기초 배지 또는 낮은, 중간 또는 높은 수준 비타민 B 수준을 함유하는 기초 배지에서 배양한 CHO 세포로부터 생산되었다. 낮은 비타민 수준은 다음과 같다: 0.25 mg/L 비타민 B2, 5.35 mg/L 비타민 B6 (5.35 mg/L 피리독신 + 0 mg/L 피리독살), 8.61 mg/L 비타민 B9, 및 1.76 mg/L 비타민 B12. 중간 비타민 수준은 다음과 같다: 0.70 mg/L 비타민 B2, 7.7 mg/L 비타민 B6 (7.7 mg/L 피리독신 + 0 mg/L 피리독살), 4.9 mg/L 비타민 B9, 및 1.5 mg/L 비타민 B12. 높은 비타민 수준은 다음과 같다: 1.41 mg/L 비타민 B2, 15.42 mg/L 비타민 B6 (15.42 mg/L 피리독신 + 0 mg/L 피리독살), 9.93 mg/L 비타민 B9, 및 3.05 mg/L 비타민 B12. 모노클로날 IgG1 항체의 단리 및 항체 역가 결정을 실시예 2에 기재된 바와 같이 수행하였다. 색 강도를 전체 색 검정을 이용하여 결정하였다. 전체 색 검정의 위해, 샘플의 상대 색의 정량적 값을 문헌 [Berns et al., Billmeyer and Saltzman's Principles of Color Technology, 3rd Edition. New York, NY, John Wiley & Sons, Inc., (2000)]에 기재된 바와 같은 색 측정의 CIE 시스템을 이용하여 구하였다. 간략

하게, 물로 비운 후에, 순수한 시험 샘플의 흡수 스펙트럼을 HP8453A 분광광도계 (1cm 내경 큐벳)를 이용하여 가시 영역 (380-780nm)에서 측정하였다. 이어서, 흡수 스펙트럼을 문헌 [Standard Practice for Calculation of Color Tolerances and Color Differences from Instrumentally Measured Color Coordinates, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 06.01, (2011)]에 이전에 기재된 바와 같이 CIE L*a*b* 색 스케일로 전환시켰다. 이러한 계산을 위해, 가시 영역에서의 인공 평탄 스펙트럼을 발광물질로서 사용하였다. "전체 색"은 3차원 CIE L*a*b* 색 공간에서 시험 샘플 및 물 사이의 유클리드 거리에 해당하는 델타 E를 나타내었다. 또한, "전체 색"은 상이한 색상을 구별하지 않으면서 시험 모노클로날 항체 샘플의 전체 색을 나타낸다. 이후에, ≤ B5의 COC 판독을 함유하는 참조 모노클로날 항체 샘플에 대한 시험 모노클로날 항체 샘플의 "전체 색" 측정값의 비율 계산함으로써 색 강도 값을 결정하였다. 양성 상관관계는 증가된 철 농도 및 증가된 색 강도 사이에서 관찰되었다 (도 8B). 또한, 증가된 철 농도는 증가된 수준의 산성 전하 변이체를 생성하였다. 비교하면, 일정한 농도의 철을 함유하는 배지에서 비타민 B2, B6, B9 및 B12의 수준을 동시에 변화시키는 것은 산성 전하 변이체 및 색 강도 사이의 상관관계를 보여주지 않았다 (도 8C).

[0412] 변화하는 수준의 B2 및 B6을 함유하는 세포 배지로 배양한 세포주로부터 단리된 항체에서 색 강도 및 산성 전하 변이체 형성의 상관관계를 조사하였다. CHO 세포로부터 모노클로날 IgG1 항체 (항-베타7)를 생산하기 위해, 세포 배양물에 변화하는 수준의 비타민 B2 및 B6을 함유하는 기초 및 공급 배지를 유가식 모드로 공급하였다. 이후에, 항체를 단리하고, 산성 전하 변이체의 존재 뿐만 아니라 색 강도에 대해 실시예 3에 기재된 바와 같이 NIFTY 검정을 이용하여 측정하였다. JMP 8.0.2 통계 소프트웨어를 사용하는 산성 전하 변이체의 존재에 대한 관련성으로서의 색 강도의 분석은 1.41 mg/L 비타민 B2 및/또는 15.42 mg/L 비타민 B6 (피리독신으로 공급됨)을 함유하는 기초 배지 및 10 mg/L 비타민 B2 및/또는 76 mg/L 비타민 B6 (7mg/L 피리독신 및 60 mg/L 피리독살)을 함유하는 공급 배지에서 배양한 세포주로부터 단리된 항체에서 높은 색 강도 및 산성 전하 변이체의 증가된 수준 사이에 강한 상관관계를 입증하였다 (도 9A 및 B). 최저 수준의 색 강도 및 산성 전하 변이체가 0.25 mg/L 비타민 B2 및 5.35 mg/L 비타민 B6 (피리독신으로 공급됨)을 함유하는 기초 배지 및 비타민 B2 및 비타민 B6을 함유하지 않은 공급 배지에서 배양한 세포주로부터 단리된 항체에서 관찰되었다 (도 9A 및 B).

[0413] 완전 요인 연구를 수행하여 상이한 철 공급원의 존재 하에 변화하는 수준의 피리독살을 함유하는 세포 배지로 배양한 세포주로부터 단리된 항체에서 색 강도 및 산성 전하 변이체 형성의 상관관계를 결정하였다. CHO 세포로부터 모노클로날 IgG1 항체 (항-베타7)를 생산하기 위해, 세포를 변화하는 수준의 피리독살을 함유하는 기초 및 공급 배지로 배양하였다. 시트르산제2철 또는 황산제1철을 기초 배지에 제공하고, 세포 배양 과정을 유가식 모드로 수행하였다. 이후에, 항체를 단리하고, 산성 전하 변이체의 존재 뿐만 아니라 색 강도에 대해 전체 색 검정을 이용하여 측정하였다. JMP 8.0.2 통계 소프트웨어를 사용하는 산성 전하 변이체의 존재에 대한 관련성으로서의 색 강도의 분석은 0 mg/L 피리독살 및 18 μM 시트르산제2철을 함유하는 기초 배지 및 0 mg/L 또는 60 mg/L 피리독살을 함유하는 공급 배지로 배양한 세포주로부터 단리된 항체와 비교하여 0 mg/L 피리독살 및 18 μM 황산제1철을 함유하는 기초 배지 및 0 mg/L 또는 60 mg/L 피리독살을 함유하는 공급 배지로 배양한 세포주로부터 단리된 항체에서 보다 높은 색 강도 및 산성 전하 변이체의 증가된 수준 사이의 강한 상관관계를 입증하였다 (도 10A 및 B).

[0414] 상이한 철 공급원의 존재 하에 변화하는 수준의 비타민 B2, B6, B9 및 B12를 함유하는 세포 배지로 배양한 세포주로부터 단리된 항체에서 색 강도 및 산성 전하 변이체 형성의 상관관계를 조사하였다. CHO 세포로부터 모노클로날 IgG1 항체 (항-베타7)를 생산하기 위해, 세포를 1.41 mg/L 비타민 B2, 15.42 mg/L 피리독신, 0 mg/L 피리독살, 9.93 mg/L 비타민 B9, 및 3.05 mg/L 비타민 B12를 함유하는 기초 배지, 및 각각 변화하는 수준의 비타민 B2, B6, B9 및 B12를 함유하는 3가지 상이한 공급 배지 중 하나로 배양하였다. 시트르산제2철 또는 황산제1철이 기초 배지에 제공되고, 세포 배양 과정은 유가식 모드로 수행하였다. 이어서, 항체를 단리하고, 산성 전하 변이체의 존재 뿐만 아니라 색 강도에 대해 전체 색 검정을 이용하여 측정하였다. JMP 8.0.2 통계 소프트웨어를 사용하는 산성 전하 변이체의 존재에 대한 관련성으로서의 색 강도의 분석은 10 mg/L 비타민 B2, 7 mg/L 피리독신, 60 mg/L 피리독살, 197 mg/L 비타민 B9, 및 48 mg/L 비타민 B12를 함유하는 공급 배지와 비교하여 18 μM 황산제1철 또는 18 μM 시트르산제2철의 존재 하에 5 mg/L 비타민 B2, 3.5 mg/L 피리독신, 30 mg/L 피리독살, 98.5 mg/L 비타민 B9, 및 24 mg/L 비타민 B12를 함유하는 공급 배지로 배양한 세포주로부터 단리된 항체에서 감소된 색 강도를 입증하였다 (도 11A; 각각 비타민 수준 2 및 비타민 수준 3). 색 강도의 최대 감소가 비타민 B2, B6, B9 및 B12가 결핍된 공급 배지로 배양한 세포로부터 단리된 항체에서 나타났다 (도 11A; 비타민 수준 1). 감소된 농도의 비타민 B2, B6, B9 및 B12로 항체 색 강도의 유의한 감소가 존재할지라도, 예비 결과는 산성 전하 변이체의 존재 하에 유의한 변화가 없다는 것을 나타내었다 (도 11B).

- [0415] 상이한 공급원으로부터의 증가하는 농도의 철을 함유하는 세포 배지로 배양한 세포주로부터 단리된 항체에서 색 강도 및 산성 전하 변이체 형성의 상관관계를 조사하였다. CHO 세포로부터 모노클로날 IgG1 항체 (항-베타7)를 생산하기 위해, 세포를 75 μ M 황산제1철을 함유하는 기초 배지 1, 18 μ M 황산제1철을 함유하는 기초 배지 12 또는 10 μ M 황산제1철을 함유하는 기초 배지 13에서 유가식 모드로 배양하였다. 추가의 세포 배양물에 18 μ M 시트르산제2철을 함유하는 기초 배지 15 또는 10 μ M 시트르산제2철을 함유하는 기초 배지 16을 공급하였다. 모든 세포 배양물에 철-무함유 공급 배지를 유가식 모드로 공급하였다. 색 강도를 실시예 3에 기재된 바와 같이 NIFTY 검정을 이용하여 결정하였다. 색 강도의 최대 감소는 감소된 수준의 철을 함유하는 기초 배지로 배양한 세포로부터 단리된 항체에서 나타났다 (도 12A). 감소된 색 강도는 단리된 항체 용액에서 산성 전하 변이체의 감소된 존재와 상관된다 (도 12B).
- [0416] 증가하는 농도의 시트르산제2철을 함유하는 세포 배지로 배양한 세포주로부터 단리된 항체에서 색 강도 및 산성 전하 변이체 형성의 상관관계를 조사하였다. CHO 세포로부터 모노클로날 IgG1 항체 (항-베타7)를 생산하기 위해, 세포를 각각 18 μ M 시트르산제2철 또는 36 μ M 시트르산제2철을 함유하는 변형된 기초 배지 1 또는 변형된 기초 배지 3에서 배양하였다. 세포 배양물에 철-무함유 공급 배지를 유가식 모드로 공급하였다. 모노클로날 IgG1 항체를 33°C 또는 37°C에서 인큐베이션한 세포 배양물로부터 단리하였다. 색 강도를 색 검정, 구체적으로 전체 색 검정으로 결정하였다 (여기서, 보다 높은 수치 값은 보다 높은 색 강도를 나타내고, 보다 낮은 수치 값은 보다 낮은 색 강도를 나타냄). 색 강도의 최대 감소는 감소된 수준의 시트르산제2철을 함유하는 기초 배지로 배양한 세포로부터 단리된 항체에서 나타났다 (도 13A). 감소된 색 강도는 단리된 항체 용액에서 산성 전하 변이체의 감소된 존재와 상관된다. 33°C에서 배양한 세포로부터 단리된 항체는 산성 전하 변이체의 최대 감소를 입증하였다 (도 13B). 온도를 33°C로부터 37°C로 증가시키는 것은 변형된 기초 배지 1 또는 변형된 기초 배지 3에서 배양된 항체-생산 세포에 의해 항체 생산을 대략 2500 mg/L 내지 4250 mg/L로 유의하게 증가시켰다.
- [0417] 기초 배지 3을 CHO 세포주에 의해 생산된 단리된 모노클로날 IgG1 항체 (항-베타7)의 색 강도에 대한 시스템의 기여를 결정하기 위해 세포 배양 실험에 사용하기 위한 480 mg/L의 시스템 대신 525 mg/L의 시스템을 함유하도록 다시 제제화하였다. CHO 세포로부터 모노클로날 IgG1 항체를 생산하기 위해, 세포를 525 mg/L 시스템을 함유하는 변형된 기초 배지 3 및 공급 배지 4에서 유가식 모드로 배양하였다. 항체를 단리하고, 색을 표준 COC 검정을 이용하여 측정하였다. COC 검정을 편평한 바닥 및 15 mm 내지 25 mm의 내부 직경을 갖는 무색의 투명한 중성 유리의 동일 튜브를 사용하여 수행하였다. 2개의 튜브를 각각 분비된 IgG1 모노클로날 항체를 함유하는 정제 및 농축된 세포 배양액으로부터 제조된 150 g/L 단백질 용액으로 40 mm의 깊이까지 채웠다. 항체 용액을 함유하는 각각의 튜브를 백색 배경에 대해 수직으로 관찰된 산란된 주광에서 각각 BY1 (가장 어두움) 내지 BY7 (가장 밝음) 범위의 참조 용액으로 채운 7개의 참조 바이알 또는 각각 B1 (가장 어두움) 내지 B9 (가장 밝음) 범위의 참조 용액으로 채운 9개의 참조 바이알과 비교하였다. 항체-함유 용액의 색 분석은 $\leq$ B5 또는 $\leq$ BY5의 COC 값을 입증하였다 (도 1; 각각 제제 VI 및 VIII). 항체 제제 VI를 상기 기재된 바와 같은 전체 색 검정 및 실시예 3에 기재된 바와 같은 NIFTY 검정을 이용하여 색 강도에 대해 추가로 검정하였다. 항체 제제의 색 분석은 각각 NIFTY 검정 및 전체 색 검정으로 측정한 경우에 0.71 및 1.00의 색 강도 값을 입증하였다. 이러한 항체 제제는 항체 제제 III (실시예 1에 기재됨) 및 항체 제제 IV (실시예 3에 기재됨)에서 색 강도와 비교하여 색이 보다 밝았다. 항체 제제 III은 각각 NIFTY 검정 및 전체 색 검정으로 측정한 경우에 1.59 및 2.61의 색 강도 값을 입증하였다. 항체 제제 IV는 각각 NIFTY 검정 및 전체 색 검정으로 측정한 경우에 1.47 및 2.04의 색 강도 값을 입증하였다.
- [0418] 다변량 연구를 수행하여 시스템 또는 시스템의 존재 또는 부재 하에 및 히드로코르티손의 존재 또는 부재 하에 변화하는 농도의 비타민 B2, B6, B9 및 B12를 함유하는 세포 배지로 배양한 세포주로부터 단리된 항체에서 색 강도 및 산성 전하 변이체 형성의 상관관계를 결정하였다. CHO 세포로부터 모노클로날 IgG1 항체 (항-베타7)를 생산하기 위해, 세포를 1.41 mg/L 비타민 B2, 15.42 mg/L 피리독신, 0 mg/mL 피리독살, 9.93 mg/L 비타민 B9, 및 3.05 mg/L 비타민 B12를 함유하는 기초 배지 또는 0.7 mg/L 비타민 B2, 7.7 mg/L 피리독신, 0 mg/L 피리독살, 4.9 mg/L 비타민 B9, 및 1.5 mg/L 비타민 B12를 함유하는 기초 배지에서 배양하였다. 또한, 기초 배지는 525 mg/L 시스템 또는 480 mg/L 시스템을 함유하였다 (표 G). 추가의 기초 배지를 표 G에서와 같이 제조하고, 150 nM 히드로코르티손을 보충하였다. 모든 세포 배양물에 철-무함유 공급 배지를 유가식 모드로 공급하였다.

[0419] [표 G]

다변량 성분 실험

배지 성분	배지 17 (기초)	배지 18 (기초)	배지 19 (기초)	배지 20 (기초)
비타민 B2 (mg/L)	1.41	1.41	0.7	0.7
비타민 B6/ 피리독신 (mg/L)	15.42	15.42	7.7	7.7
비타민 B6/ 피리독살 (mg/L)	0	0	0	0
비타민 B9 (mg/L)	9.93	9.93	4.9	4.9
비타민 B12 (mg/L)	3.05	3.05	1.5	1.5
시스테인 (mg/L)	525	0	525	0
시스틴 (mg/L)	0	480	0	480

[0420]

[0421]

모노클로날 IgG1 항체를 세포 배양물로부터 분리하고, 색 강도 뿐만 아니라 산성 전하 변이체의 존재에 대해 측정하였다. 색 강도를 상기 기재된 바와 같이 전체 색 검정을 이용하여 결정하였다. JMP 8.0.2 통계 소프트웨어를 사용하는 산성 전하 변이체의 존재에 대한 관련성으로서의 색 강도의 분석은 시스테인과 비교하여 시스틴을 함유하는 기초 배지로 배양한 세포주로부터 분리된 항체에서 감소된 색 강도 및 감소된 수준의 산성 전하 변이체 사이의 상관관계를 입증하였다 (도 14A 및 B). 또한, 비타민 B 수준의 감소는 또한 색 강도 및 산성 전하 변이체 형성을 감소시켰으며 히드로코르티손의 첨가는 이러한 감소를 증진시켰다 (도 14A 및 B).

[0422]

실시예 6: 세포주로부터 분리된 모노클로날 IgG1 항체의 색 강도는 세포 배양 배지 중의 특정 성분의 변경에 의해 감소하였다.

[0423]

기초 세포 배양 배지에 사용된 경우에 시스틴의 색 강도 감소 효과를 추가로 상이한 모노클로날 IgG1 항체 (mAb10)를 생산하는 CHO 세포주로 연구하였다. 이 세포주를 2.6 mM (시스테인) 농도의 단량체 형태의 아미노산 시스테인 또는 1.3 mM (시스틴) 농도의 이량체 형태를 포함하는 규정되지 않은 기초 배지에서 배양하였다. mAb10의 생산을 규정되지 않은 기초 배지에 세포를 접종함으로써 세포 배양액에서 개시하고, 회분 공급 배지를 생물반응기에서 14일 세포 배양 주기 상에서 3일에 첨가하였다. 세포를 1일에 37°C에서 배양하고, 온도 이동을 세포 배양 주기 과정 상에서 개시하였다. 배지를 수확하고, mAb10을 조성물로서 회수한 후에 COC 검정으로 색 강도를 평가하였다. 시스테인을 함유하는 기초 배지에서 배양된 세포로부터 회수된 mAb10을 포함하는 조성물은 COC 검정에 의해 결정시에 B7의 색 강도 값을 갖는 무색 또는 약간 유색의 액체로 나타났다. 시스테인을 시스틴으로 대체한 기초 배지에서 배양한 세포로부터 회수된 mAb10을 포함하는 조성물은 B8의 개선된 색 강도 COC 값을 갖는 무색 또는 약간 유색의 액체로 나타났다.

[0424]

다변량 연구에서, CHO 세포로부터 mAb10을 생산하기 위한 4가지 상이한 프로토콜을 이용하여 세포 배양물로부터 회수된 항체를 포함하는 조성물의 색 강도에 대한 특정 배지 성분의 효과를 평가하였다 (표 H). 규정되지 않은 세포 배양 기초 배지 중의 철 뿐만 아니라 철 공급원의 수준은 프로토콜마다 상이하였다. 규정되지 않은 기초 배지 중의 비타민 B 수준 및 단량체 형태 (시스테인) 또는 이량체 형태 (시스틴)의 아미노산 시스테인이 또한 프로토콜마다 상이하였다. mAb10의 생산을 규정되지 않은 기초 배지에 세포를 접종함으로써 세포 배양물에서 개시하고, 회분 공급 배지를 생물반응기에서 14일 세포 배양 주기 상에서 3일에 첨가하였다. 배지를 수확하고, mAb10을 조성물로서 회수한 후에 COC 검정으로 색 강도를 평가하였다. 회수된 mAb를 포함하는 조성물의 색 강도의 분석은 프로토콜 1, 2 및 3이 프로토콜 4에서 수득한 항체 조성물의 색 강도 (B6의 COC 값)와 비교하여 감소된 색 강도 (B7의 COC 값)를 갖는 항체 조성물을 발생시킨다는 것을 입증하였다. 이러한 결과는 기초 배지에서 시스테인 대신 시스틴을 사용하는 것이 비타민 B 수준을 감소시키고/거나 철을 감소시킬 뿐만 아니라 mAb10 조성물에서 색 강도를 감소시키는 철 공급원의 변화를 발생시킨다는 것을 보여주었다 (표 H). 예를 들어, 프로토콜 4와 비교하여 프로토콜 3에서, 비타민 B 수준의 감소 및 보다 낮은 농도에서의 황산제1철의 시트르산제2철로의 치환은 시스틴 대신 시스테인을 사용하는 변화를 필요로 하지 않고 항체 조성물의 색 강도를 감소시켰다. 시트르산제2철을 보다 낮은 농도에서 황산제1철 대신 사용하고 비타민 B 수준을 변경시키지 않으면서 시스틴을 시스테인 대신 사용하는 경우에 프로토콜 2 대 프로토콜 4에서 색 강도의 감소에 대한 동일한 효과가 관찰되었다. 프로토콜 1에 나타난 바와 같이 비타민 B 수준의 감소, 철 수준의 감소 및 철 공급원의 변화 뿐만 아니라 시스테인을 대신한 시스틴의 사용은 또한 프로토콜 4로부터 수득한 mAb10 조성물과 비교하여 mAb10 조성물의 색 강도를 감소시켰다 (표 H).

[0425] [표 H]

기초 배지 성분의 개요

성분	프로토콜 1	프로토콜 2	프로토콜 3	프로토콜 4
철 (μM)	25% ^a	50% ^a	50% ^a	100% ^b
비타민 B1 (μM)	25%	100%	50%	100%
비타민 B2 (μM)	25%	100%	50%	100%
비타민 B3 (μM)	25%	100%	50%	100%
비타민 B5 (μM)	25%	100%	50%	100%
비타민 B6 (μM)	25%	100%	50%	100%
비타민 B7 (μM)	25%	100%	50%	100%
비타민 B9 (μM)	25%	100%	50%	100%
비타민 B12 (μM)	25%	100%	50%	100%
시스테인	0 mM	0 mM	2.6 mM	2.6 mM
시스틴	1.3 mM	1.3 mM	0 mM	0 mM
COC 값	B7	B7	B7	B6

^a 철 공급원으로서의 시트르산제2철을 나타냄; ^b 철 공급원으로서의 황산제1철을 나타냄

[0426]

[0427]

실시예 7: NIFTY 검정 및 전체 색 검정은 항체-함유 용액에서 색 강도의 측정을 위한 표준 COC 검정과 대등하다.

[0428]

높은 농도 제제에 대한 최근의 강세는 일반적으로 모노클로날 항체 액체 제제의 색 강도를 증가시켰다. 색은 제품 품질 특성으로 간주되고, 이에 따라 약물 물질의 색을 과정 변화를 개발 및 구현하는 동안 일관성에 대해 면밀히 모니터링하는 것이 중요하다. 색을 측정할 때 직면하는 도전 중 하나는 적절한 검정을 이용하는 것이다. 이것이 산업 표준일지라도, COC 검정은 완전히 정량적이지 않고, 검정을 수행하는 사람의 주관적 판단에 취약하다. 이러한 문제를 극복하기 위해, 색 측정을 위한 2가지 상이한 방법, 전체 색 검정 및 NIFTY 검정이 개발되었으며, 색 강도를 측정하기 위해 실시예에 기재된 바와 같이 사용되었다.

[0429]

이들 3가지 색 측정 검정 사이의 상관관계를 전체 색 및 NIFTY 검정에 의해 측정된 전체 색 값을 가로좌표 상에, NIFTY 값을 세로좌표 상에 플롯팅하고, 항체-함유 용액 상에서 수행된 실제 COC 측정값에 기초한 데이터 점을 이용하여 결정하였다 (도 15A). 전체 색 검정 및 NIFTY 검정으로부터의 정량적 측정값 사이에 우수한 상관관계가 존재하였다 ($R^2=0.75$). 또한, 이들 검정은 실제 COC 측정값과 타당하게 잘 상관되는 것으로 보일 수 있으며, 이는 전체 색 및 NIFTY 검정으로부터의 결과가 샘플의 색 강도의 유용한 예측인자임을 나타낸다.

[0430]

항체를 수확하고, 색 강도의 측정 전에 2가지 상이한 방법에 의해 세포 배양물로부터 정제하였다. 한 방법에서, 수확된 세포 배양액 중의 모노클로날 항체를 단백질 A 친화도 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 정제 후에, 용리된 단백질 A 폴에서의 단백질의 농도는 대략 5-10 g/L였다. 단백질 A 폴을 아미콘 센트리콘 원심분리 필터 장치를 이용하여 150 g/L로 추가로 농축시켰다. 색을 농축된 단백질 A 폴에서 표준 COC 검정, 전체 색 검정 또는 NIFTY 검정을 이용하여 측정하였다. 다른 방법에서, 수확된 세포 배양액을 단백질 A 친화도 크로마토그래피를 통한 친화도 정제, 음이온 및 양이온 교환 크로마토그래피를 통한 추가의 정제, 바이러스 제거를 위한 여과, 및 항체의 최종 제제화 및 농축을 위한 최종 한외여과 및 정용여과 단계, 이어서 표준 COC 검정, 전체 색 검정 또는 NIFTY 검정으로의 색 측정을 포함하는 표준 항체 정제 과정을 이용하여 정제하였다.

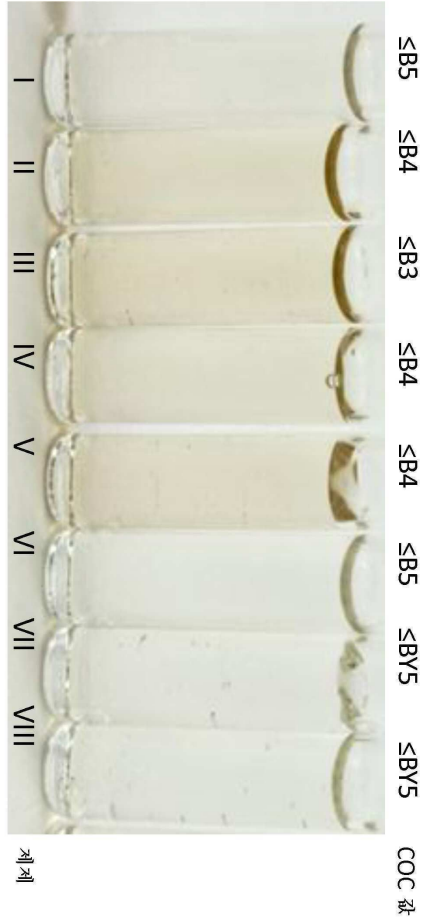
[0431]

실질적 고려사항으로 인해, 단백질 A 폴의 색을 실시예에 기재된 여러 시험에서 최종 약물 물질의 색에 대한 대용으로 사용하기로 결정하였다. 최종 완전 정제된 항체 제제로부터 수득될 색 강도에 대한 단백질 A 폴로부터 제조된 항체 제제에서 측정된 색 강도의 예측값을 평가하였다. 단백질 A 폴 대 최종 완전 정제된 항체 제제로부터 수득한 항체-함유 용액에서 NIFTY 검정 (도 15B) 또는 전체 색 검정 (도 15C)에 의해 측정된 색 강도의 비교는 전체 색 측정값 ($R^2=0.73$) 및 NIFTY 측정값 ($R^2=0.98$)에 대해 타당하게 우수한 상관관계를 입증하였다. 전체 색은 폴의 흡광도 스펙트럼으로부터 유래되며, 이에 따라 보다 높은 색 강도가 비-항체 불순물의 존재로

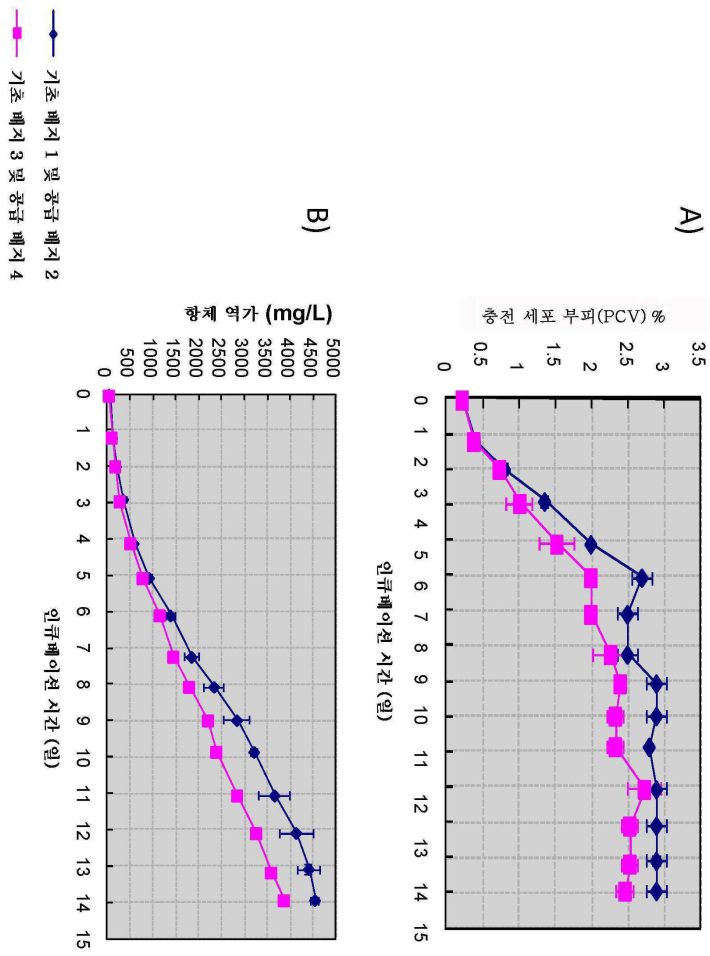
인해 또는 증가된 광 산란으로 인해 보다 이른 공정 중의 풀에서 예측될 수 있다. 대조적으로, NIFTY 값을 크기 배제 크로마토그램의 주요 피크로부터 측정하였으며, 이에 따라 착색되거나 또는 착색되지 않은 단백질 분자가 우선적으로 정제되지 않는다면 정제 과정을 통해 일정하게 유지되는 것으로 예측할 수 있다. 전체적으로, 타당한 상관관계가 단백질 A 풀 및 제제화된 약물 물질 사이의 색 측정값 사이에서 관찰되었다.

도면

도면1



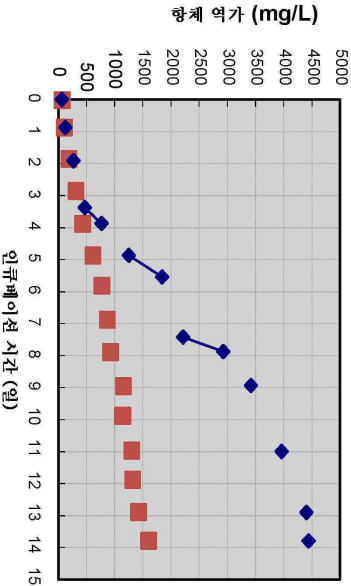
도면2i



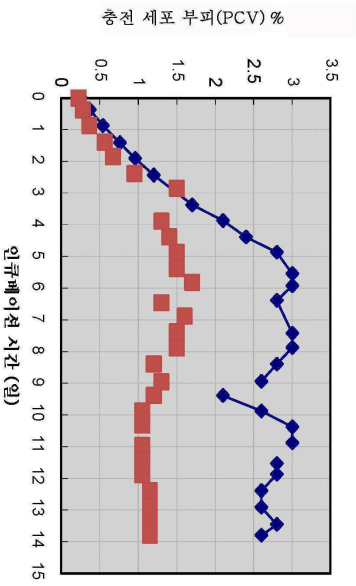
도면2ii

기초 배지 1 및 공급 배지 2
기초 배지 3 및 공급 배지 4

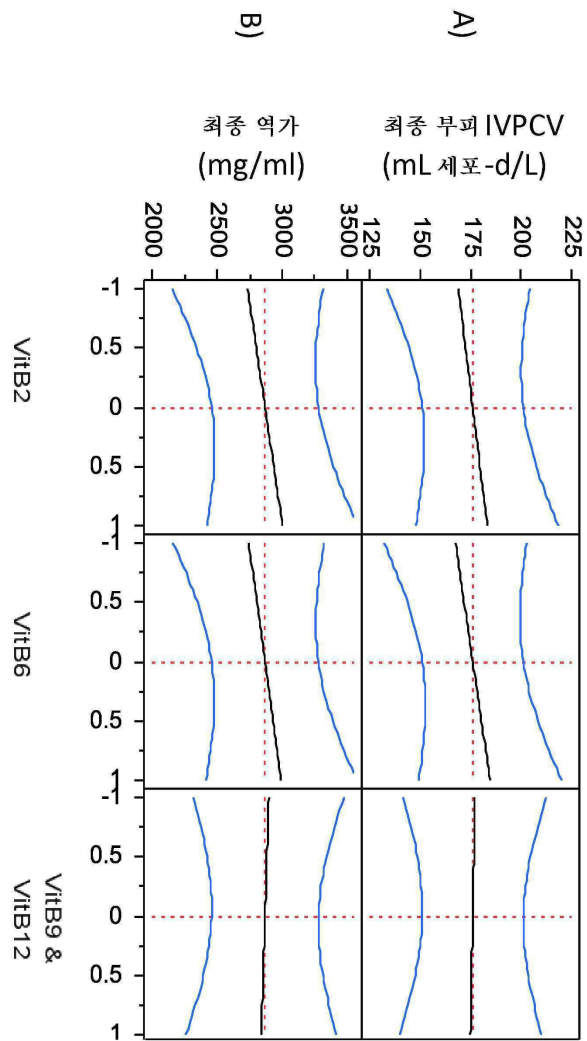
D)



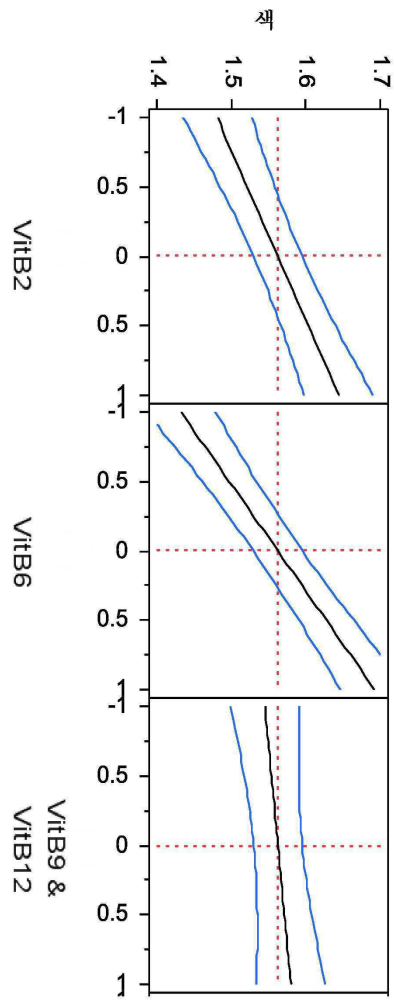
C)



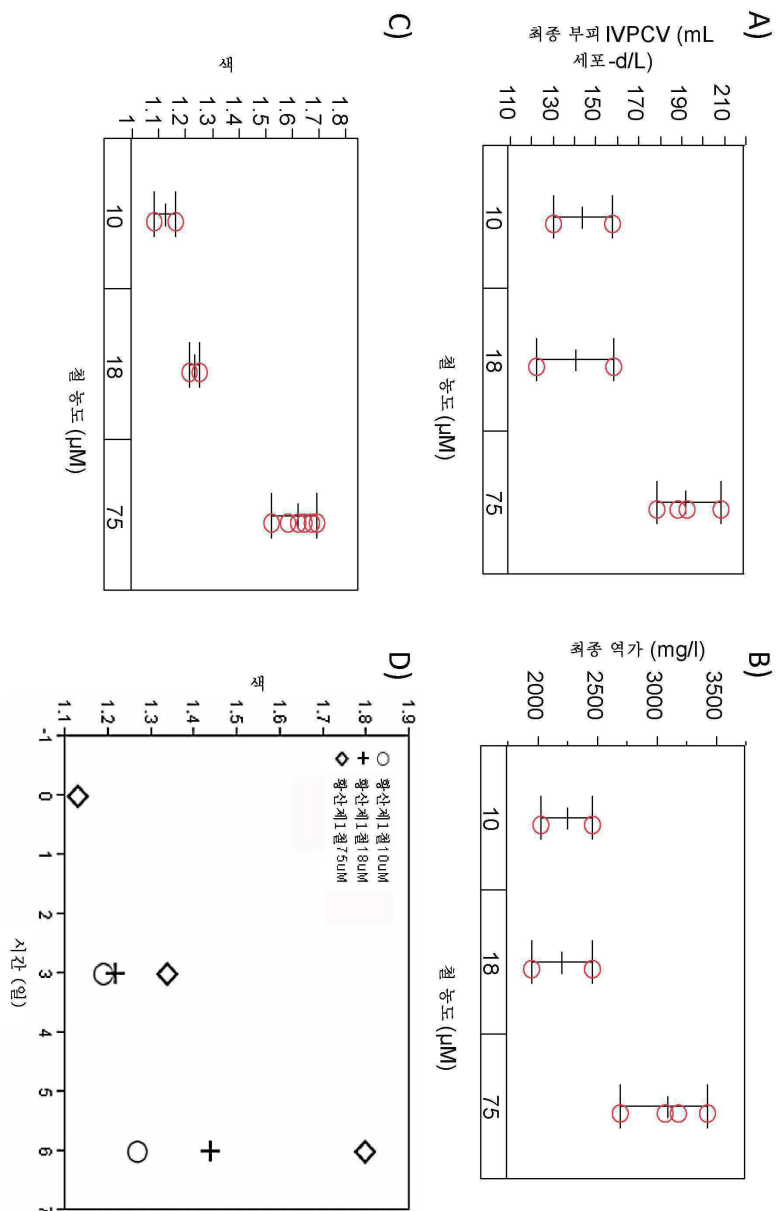
도면3



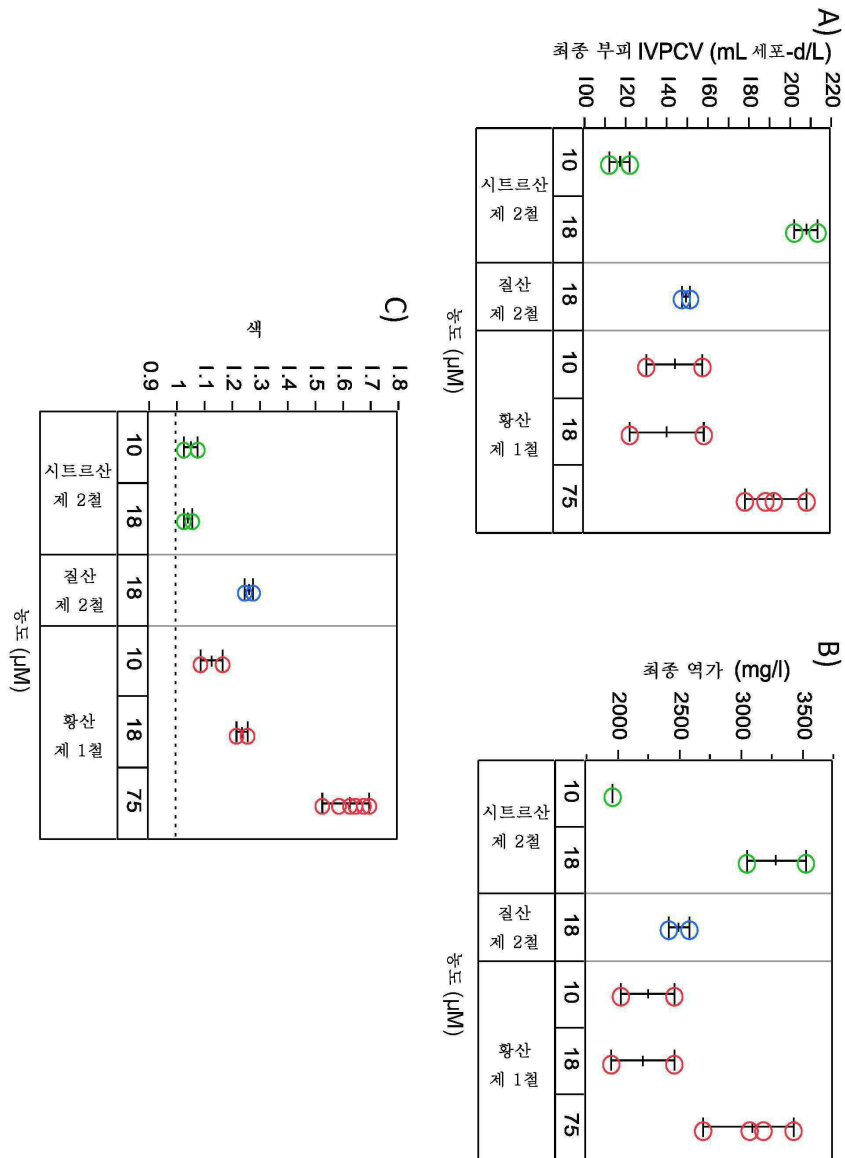
도면4



도면5

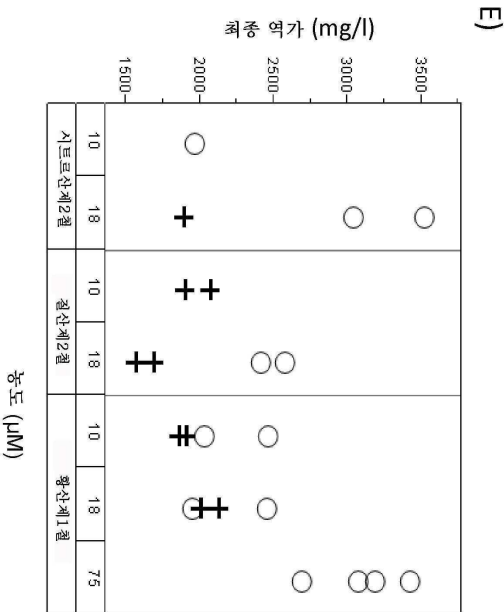
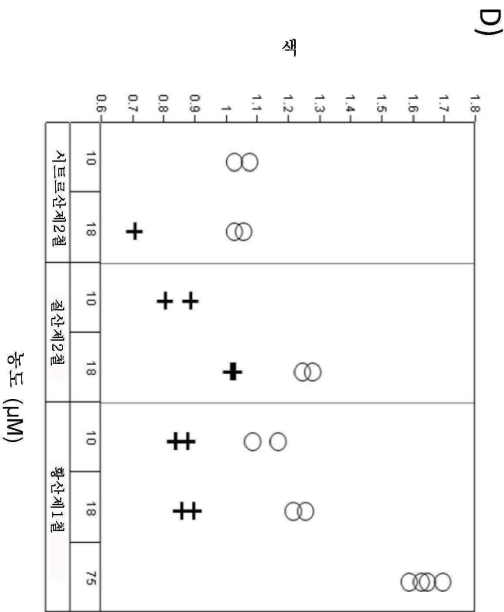


도면6i

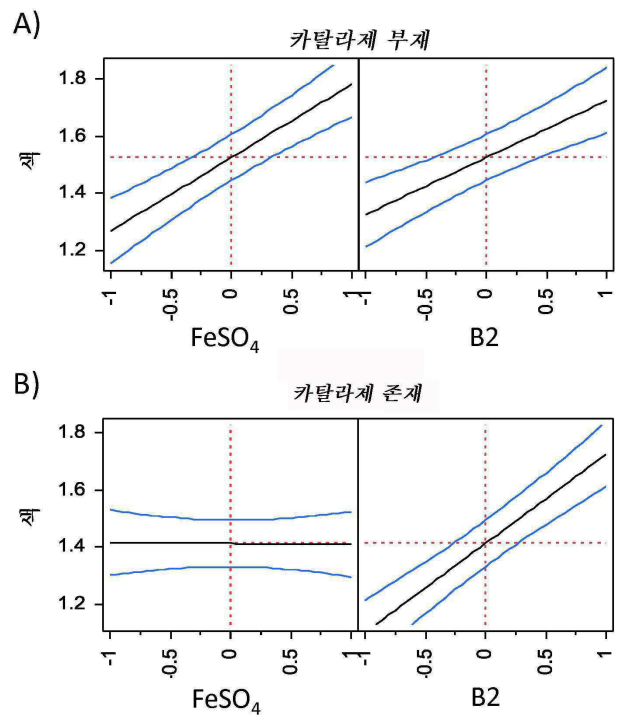


도면6ii

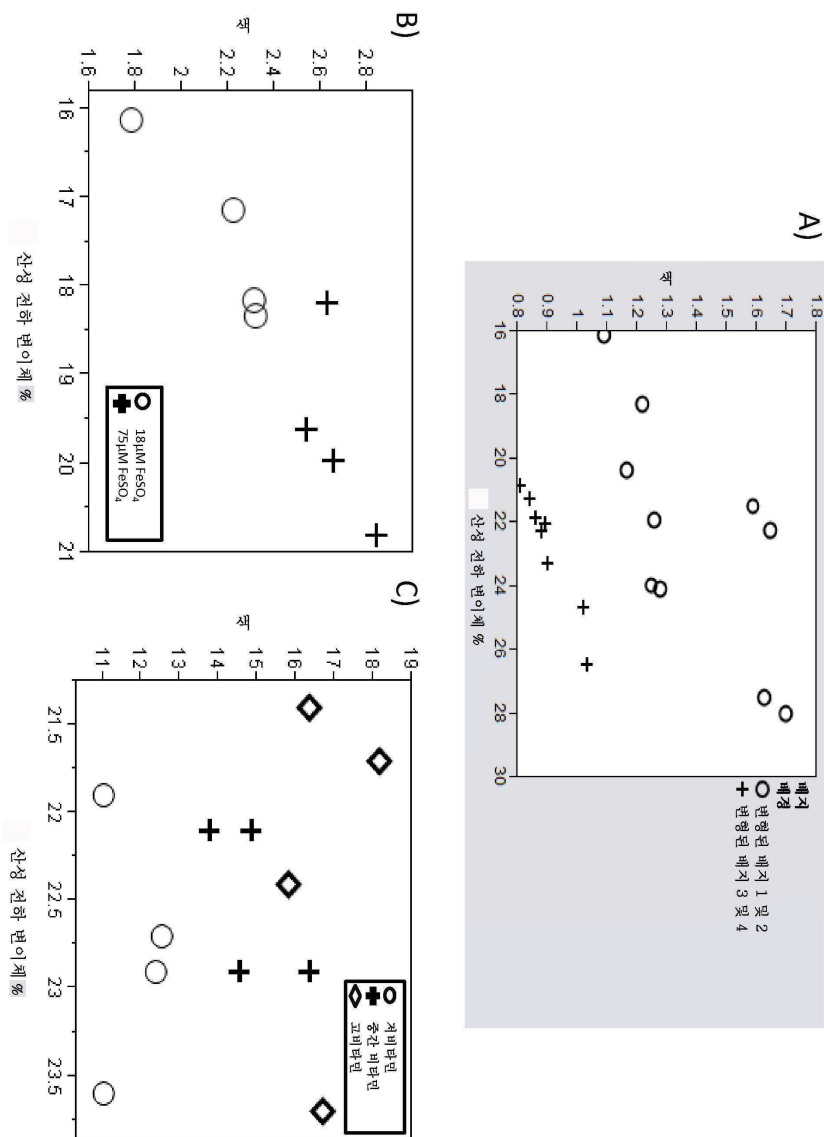
○ 고비타민 배지
+ 저비타민 배지



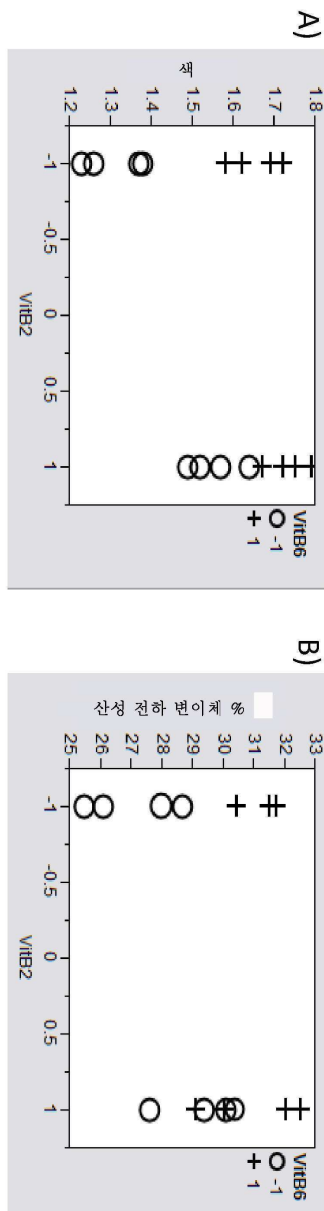
도면7



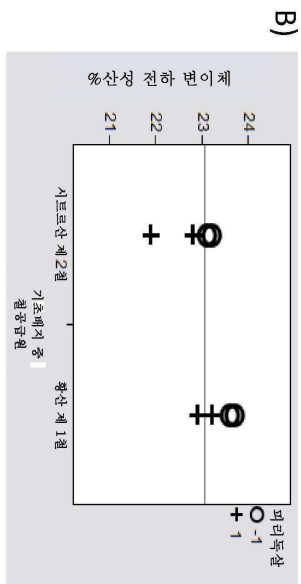
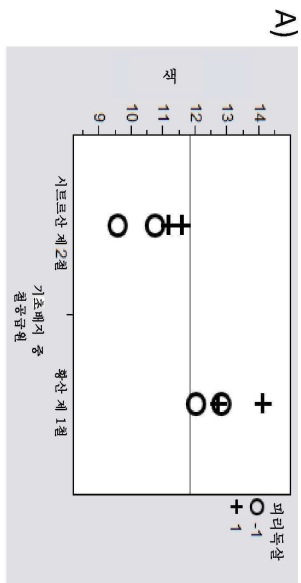
도면8



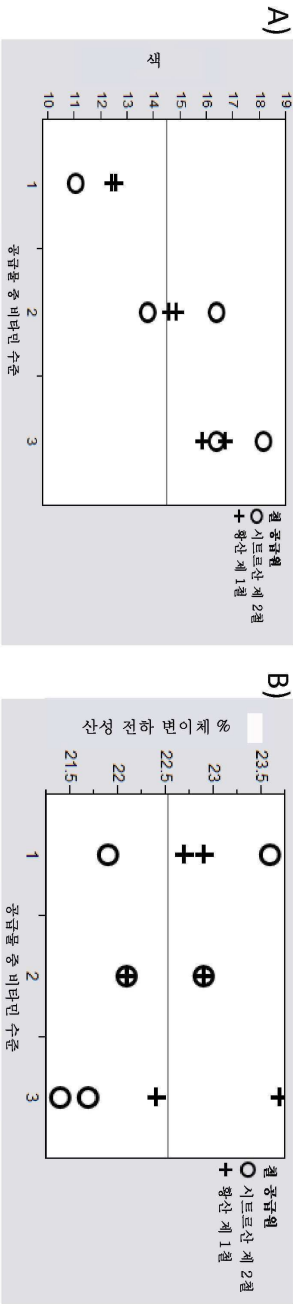
도면9



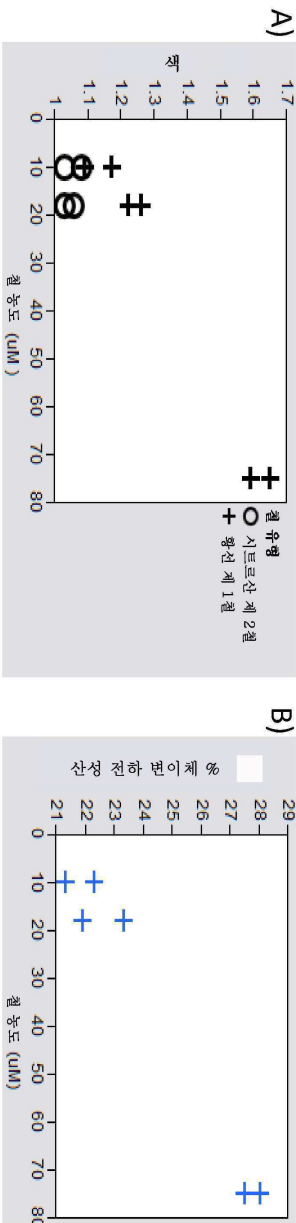
도면10



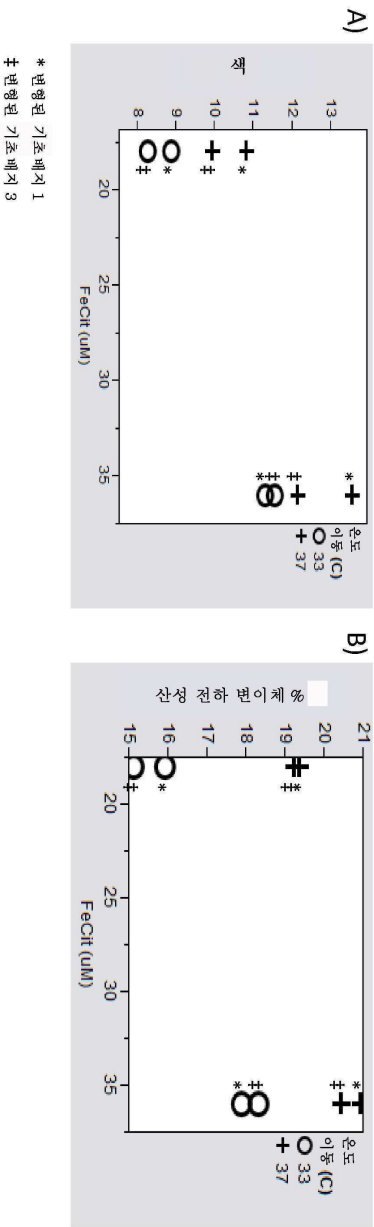
도면11



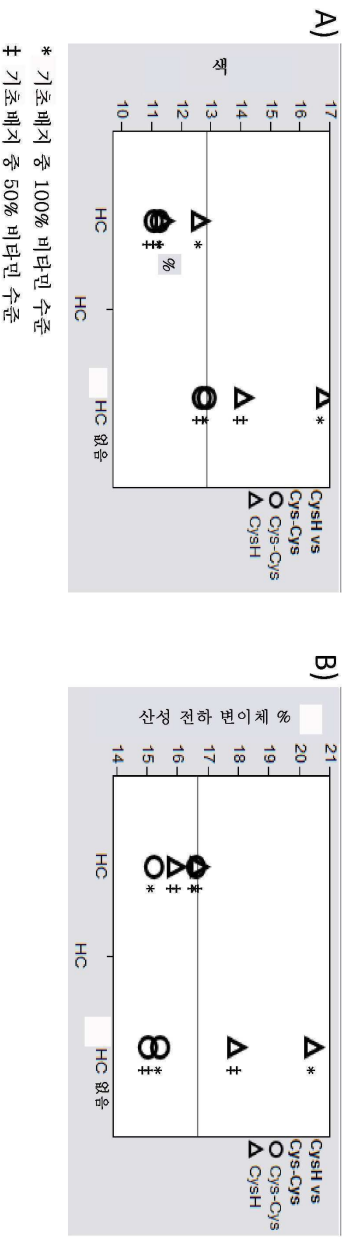
도면12



도면13



도면14



도면15

