(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0091923
(43) 공개일자 2018년08월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/22 (2006.01) *B01J 8/18* (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/22 (2013.01)
B01J 8/1845 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7020525
(22) 출원일자(국제) 2016년12월16일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2018년07월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/067374
(87) 국제공개번호 WO 2017/106783
국제공개일자 2017년06월22일
(30) 우선권주장
62/269,031 2015년12월17일 미국(US)

(71) 출원인
라이프 테크놀로지스 코포레이션
미국 캘리포니아 92008 칼스베드 뉴톤 드라이브 5823
(72) 발명자
펠프스 엠위타
미국 92008 캘리포니아주 칼스베드 뉴톤 드라이브 5823
굴드 파울
미국 92008 캘리포니아주 칼스베드 뉴톤 드라이브 5823
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김윤기

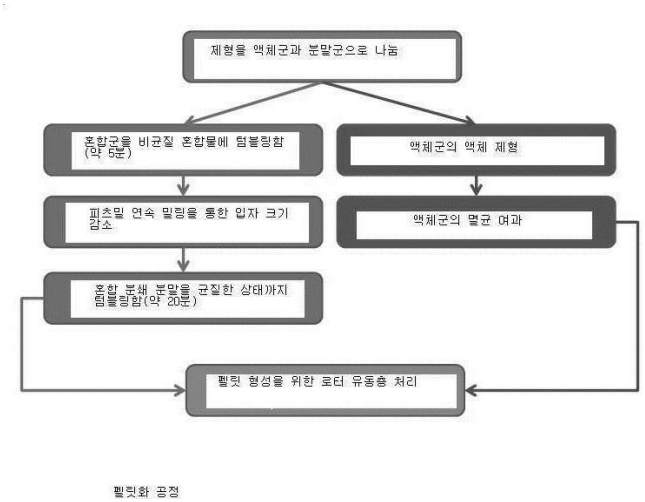
전체 청구항 수 : 총 62 항

(54) 발명의 명칭 **세포 배양에 이용되는 펠릿 및 이의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 일반적으로 시험관 내에서 세포를 배양하기 위하여 액체 배지 내로 재구성될 수 있는 펠릿 제형의 건조 세포 배양 배지 또는 공급물을 대상으로 한다. 각 펠릿 조성물은 동일하거나 상이한 조성물을 포함할 수 있다; 예를 들어, 상이한 비타민, 아미노산, 완충액, 미량 염, pH, 철 킬레이트제 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명은 상이한 펠릿 조성물의 비율을 바꾸어 건조 세포 배양 배지를 제조하는 방법, 또는 모듈식 건조 세포 배양 배지의 제조 방법, 또는 펠릿을 이용하여 세포 유형을 성장시키기 위한 맞춤형 배지 제형에 관한 것이다. 배지 펠릿은 재구성 전, 운송 및 취급 중, 그리고/또는 재구성 중에 다루기가 더 용이할 수 있다. 배지 펠릿은 배지 제형을 제조하기 위한 멸균 1회용 봉지를 포함한 봉지같은 임의의 용기에서 사용할 수 있다. 본 발명은 또한 배지 펠릿을 이용하는 키트 및 배양 시스템에 관한 것이다.

대 표 도



펠릿화 공정

(52) CPC특허분류
C12N 5/0018 (2013.01)
C12N 2500/32 (2013.01)
C12N 2500/34 (2013.01)
C12N 2500/60 (2013.01)
(72) 발명자
파이크 리차드
미국 14031 뉴욕주 클라렌스 헌팅 밸리 놀스 9310
레이놀즈 메리
미국 92008 캘리포니아주 칼스베드 뉴톤 드라이브 5823
해제트 리차드
미국 92008 캘리포니아주 칼스베드 뉴톤 드라이브 5823
캠벨 앤드류
미국 92008 캘리포니아주 칼스베드 뉴톤 드라이브 5823

명 세 서

청구범위

청구항 1

펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법으로서,

a) 제1 건조 분말을 유동층 장치의 기체가 상향 이동하는 컬럼 내의 현탁액에 제시하고, 디스크 로터에서 회전시키는 단계;

b) 용매 및/또는 제2 건조 분말을 단계 (a)의 유동층 장치에 도입하여 펠릿을 형성하는 단계; 및

c) 펠릿을 건조하는 단계를 포함하며,

제1 건조 분말, 제2 건조 분말, 또는 용매는 결합제, 부형제, 또는 둘 다를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 단계 (a)의 제1 건조 분말은 사전 습윤되고, 선택적으로, 어떠한 용매도 단계 (b)에서 주입되지 않는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 제1 건조 분말과 제2 건조 분말이 동일한 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 제1 건조 분말과 제2 건조 분말이 상이한 방법.

청구항 5

상기 어느 한 항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 제1 건조 분말은 기초 배지 분말, 완전 배지 분말, 공급물, 보충물, 배지 또는 공급 농축물 및 배양액 중에서 세포의 배양을 지지할 수 있는 아미노산 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 6

상기 어느 한 항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 제2 건조 분말은 기초 배지 분말, 완전 배지 분말, 공급물, 보충물, 배지 또는 공급 농축물 및 배양액 중 세포의 배양을 지지할 수 있는 아미노산 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 7

상기 어느 한 항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 결합제 또는 부형제는 당, 천연 물질, 합성 물질 및 반합성 물질로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 8

제7항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 천연 물질은 미세결정 셀룰로스인 방법.

청구항 9

제7항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 당은 글루코스, 수크로스, 트레할로스, 단당류, 이당류 및 올리고당류로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 10

제9항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 펠릿 중 글루코스의 % 조성은 약 0.1 내지 약 100%인 방법.

청구항 11

상기 어느 한 항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 상기 펠릿 크기는 약 0.05 ㎜ 내지 7 ㎜인 방법.

청구항 12

제11항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 상기 펠릿 크기는 약 0.05 ㎜ 내지 약 0.5 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 1 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 2 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 3 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 4 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 5 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 6 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 0.1 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 0.2 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 0.3 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 0.4 ㎜, 또는 약 0.1㎜ 내지 약 1 ㎜, 또는 약 0.1 ㎜ 내지 약 2 ㎜, 또는 약 0.1 ㎜ 내지 약 3 ㎜, 또는 약 0.1 ㎜ 내지 약 4 ㎜, 또는 약 0.1 ㎜ 내지 약 5 ㎜, 또는 약 0.1 ㎜ 내지 약 6 ㎜, 또는 약 0.5 ㎜ 내지 약 1 ㎜, 또는 약 0.5 ㎜ 내지 약 2 ㎜, 또는 약 0.5 ㎜ 내지 약 3 ㎜, 또는 약 0.5 ㎜ 내지 약 4 ㎜, 또는 약 0.5 ㎜ 내지 약 5 ㎜, 또는 약 0.5 ㎜ 내지 약 6 ㎜, 또는 약 0.5 ㎜ 내지 약 7 ㎜, 또는 약 1 ㎜ 내지 약 2 ㎜, 또는 약 1 ㎜ 내지 약 3 ㎜, 또는 약 1 ㎜ 내지 약 4 ㎜, 또는 약 1 ㎜ 내지 약 5 ㎜, 또는 약 1 ㎜ 내지 약 6 ㎜, 또는 약 1 ㎜ 내지 약 7 ㎜인 방법.

청구항 13

상기 어느 한 항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 상기 펠릿 크기는 약 0.1 ㎜ 초과, 또는 약 0.2 ㎜ 초과, 또는 약 0.3 ㎜ 초과, 또는 약 0.4 ㎜ 초과, 또는 약 0.5 ㎜ 초과, 또는 약 0.6 ㎜ 초과, 또는 약 0.7 ㎜ 초과, 또는 약 0.8 ㎜ 초과, 또는 약 0.9 ㎜ 초과, 또는 약 1 ㎜ 초과, 또는 약 2 ㎜ 초과인 방법.

청구항 14

상기 어느 한 항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 디스크 로터는 가변적인 속도로 회전하는 방법.

청구항 15

상기 어느 한 항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 용매는 접선 분무(tangential spray), 상부 분무, 또는 하부 분무를 통해 단계 (a)로 주입되는 방법.

청구항 16

상기 어느 한 항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 단계 (a)로 주입되는 용매의 속도는 약 1 gm/분 내지 약 30 gm/분 사이인 방법.

청구항 17

제16항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 단계 (a)로 주입되는 용매의 속도는 약 5 gm/분인 방법.

청구항 18

상기 어느 한 항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 유입구 기체의 온도는 약 20℃ 내지 30℃인 방법.

청구항 19

제18항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 유입구 기체의 온도는 약 25℃인 방법.

청구항 20

상기 어느 한 항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 펠릿 온도는 약 20℃ 내지 30℃로 유지되는 제조 방법.

청구항 21

상기 어느 한 항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 펠릿을 건조시키기 위한 온도는 약 50℃ 내지 60℃인 제조 방법.

청구항 22

상기 어느 한 항의 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법에 있어서, 펠릿은 약 0.5% 내지 3%의 수분 함량까지 건조되는 제조 방법.

청구항 23

펠릿화된 베이스 분말 모듈의 제조 방법으로,

a) 제1 건조 분말을 유동층 장치의 기체가 상향 이동하는 컬럼 내의 현탁액에 제시하고, 디스크 로터에서 회전시키는 단계;

b) 용매 및 선택적으로 제2 건조 분말을 단계 (a)의 유동층 장치로 도입하여, 베이스 분말 모듈의 펠릿을 형성하는 단계; 및

c) 펠릿을 건조하는 단계를 포함하며,

제1 건조 분말, 제2 건조 분말, 또는 용매는 결합제, 부형제, 또는 둘 다를 포함하는 방법.

청구항 24

제23항의 펠릿화된 베이스 분말 모듈의 제조 방법에 있어서, 모듈은 1종 이상의 수용성 비타민, 1종 이상의 산 가용성 비타민, 1종 이상의 중성 가용성 비타민, 1종 이상의 산 가용성 아미노산, 1종 이상의 염기 가용성 아미노산, 1종 이상의 중성 수용성 아미노산, 1종 이상의 수용성 무기 염, 1종 이상의 무기 산 가용성 염, 1종 이상의 당, 1종 이상의 산 가용성 미량 원소, 1종 이상의 알코올 가용성 폴리아민, 1종 이상의 알코올 가용성 지질 및 1종 이상의 완충 염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 25

제23항 내지 제24항의 펠릿화된 베이스 분말 모듈의 제조 방법에 있어서, 수용성 또는 산 또는 염기 또는 중성 가용성 비타민 모듈, 수용성 또는 산 또는 염기 또는 중성 가용성 아미노산 모듈, 또는 수용성 또는 산 또는 염기 또는 중성 가용성 염 모듈은 적어도 1종의 수불용성 부형제 또는 수불용성 결합제 또는 둘 다를 포함하는 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 의해 수득된 펠릿.

청구항 27

1종 이상의 아미노산, 1종 이상의 결합제 및 1종 이상의 미량 구성성분을 포함하는, 펠릿화된 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 첨가물.

청구항 28

제27항에 있어서, 비타민을 더 포함하는, 펠릿화된 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 첨가물.

청구항 29

제27항 내지 제28항에 있어서, 비타민은 비타민 B12, 비오틴, 콜린, 엽산, 니아신아미드, 피리독신, 리보플라빈, 티아민, 아스코르브산, 파라-아미노벤조산(PABA) 등 중 1종 이상으로부터 선택되는, 펠릿화된 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 첨가물.

청구항 30

제27항 내지 제29항에 있어서, 염을 추가로 포함하는, 펠릿화된 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 첨가물.

청구항 31

제30항에 있어서, 염은 완충 염, 철, 아연, 칼슘, 구리, 마그네슘, 망간, 암모늄, 바나듐 염 등 중 1종 이상으로부터 선택되는, 펠릿화된 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 첨가물.

청구항 32

제27항 내지 제31항에 있어서, 아미노산은 20종의 아미노산, 그 염 또는 그 유도체 중 1종 이상으로부터 선택되는, 펠릿화된 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 첨가물.

청구항 33

제27항 내지 제31항에 있어서, 아미노산은 글리신, 알라닌, 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산, 히스티딘, 아이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 하이드록시프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 발린, 티로신, 시스테인 및 라이신 중 1종 이상으로부터 선택되는, 펠릿화된 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 첨가물.

청구항 34

제27항 내지 제31항에 있어서, 결합제는 당, 천연 물질, 합성 물질 및 반합성 물질, 미세결정 셀룰로스, 글루코스, 수크로스, 트레할로스, 단당류, 이당류 및 올리고당류, 부형제 및/또는 붕해제로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 펠릿화된 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 첨가물.

청구항 35

제27항 내지 제34항에 있어서, 결합제는 미세결정 셀룰로스 및 글루코스인, 펠릿화된 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 첨가물.

청구항 36

제27항 내지 제35항에 있어서, 펠릿 중 결합제(들)의 % 조성은 약 0.1 내지 약 100%인, 펠릿화된 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 첨가물.

청구항 37

제27항 내지 제36항에 있어서, 펠릿 중 결합제(들)의 % 조성은 약 30 내지 약 60%인, 펠릿화된 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 첨가물.

청구항 38

제27항 내지 제37항에 있어서, 25~40% 아미노산, 20~65% 결합제, 1~5% 비타민, 2~10% 염, 0.01~0.05% 미량 구성성분 중 1종 이상을 포함하는, 펠릿화된 세포 배양 공급물.

청구항 39

제38항에 있어서, 31~32% 아미노산, 59~60% 결합제, 25% 비타민, 6~7% 염, 0.01~0.05% 미량 구성성분 중 1종 이상을 포함하는, 펠릿화된 세포 배양 공급물.

청구항 40

제39항에 있어서, 결합제는 D-글루코스인, 펠릿화된 세포 배양 공급물.

청구항 41

영양 배지 펠릿, 영양 배지 보충물 펠릿, 영양 배지 하위군 펠릿 또는 완충액 펠릿의 제조 방법으로, 상기 방법은 건조 분말 배지, 보충물, 배지 하위군, 또는 배지 완충액을 용매 및/또는 분말과 함께 투입하고, 유동층의 회전 디스크를 이용하여 펠릿을 형성하는 단계를 포함하며, 상기 펠릿은 결합제 또는 부형제를 포함하는 방법.

청구항 42

제41항의 영양 배지 펠릿, 영양 배지 보충물 펠릿, 영양 배지 하위군 펠릿 또는 완충액 펠릿의 제조 방법에 있어서, 상기 결합제 또는 부형제는 용매를 통해 분무되거나, 건조 분말 내에 혼합되는 방법.

청구항 43

제41항 내지 제42항의 영양 배지 펠릿, 영양 배지 보충물 펠릿, 영양 배지 하위군 펠릿 또는 완충액 펠릿의 제조 방법에 있어서, 상기 건조 분말은 1종 이상의 수용성 군, 1종 이상의 염기 가용성 군, 1종 이상의 산 가용성 군, 1종 이상의 산 가용성 반응성 군, 1종 이상의 알코올 가용성 군, 1종 이상의 알코올 가용성 반응성 군 및 1종 이상의 pH 조절제 군으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 44

제41항 내지 제43항의 영양 배지 펠릿, 영양 배지 보충물 펠릿, 영양 배지 하위군 펠릿 또는 완충액 펠릿의 제조 방법에 있어서, 수용성 군은 비타민, 벌크 무기 염 및 당으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 45

제41항 내지 제44항의 영양 배지 펠릿, 영양 배지 보충물 펠릿, 영양 배지 하위군 펠릿 또는 완충액 펠릿의 제조 방법에 있어서, 당은 D-글루코스인 방법.

청구항 46

제41항 내지 제45항의 방법에 의해 수득된 펠릿.

청구항 47

세포 배양을 위한 펠릿의 제조 방법으로,

건조 분말 배지 또는 모듈의 미세현탁액을 제조하는 단계;

미세현탁액을 압출 장치를 통해 압출하여 액적을 형성하는 단계;

액적을 펠릿으로 건조하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 48

제47항의 방법에 의해 수득된 펠릿.

청구항 49

세포 배양을 위한 제1항 내지 제48항 중 어느 한 항의 방법으로부터 수득된 펠릿의 용도.

청구항 50

제49항의 용도에 있어서, 세포는 진핵세포, 원핵세포, 동물, 식물, 진균류, 조류, 곤충, 효모로 이루어지는 군으로부터 선택되거나, 세포는 바이러스 또는 바이러스 입자의 배양을 위한 용도.

청구항 51

제49항 내지 제50항의 용도에 있어서, 세포는 동물 세포인 용도.

청구항 52

제49항 내지 제51항의 용도에 있어서, 세포는 포유동물 세포인 용도.

청구항 53

제52항에 있어서, 포유동물 세포는 CHO, BHK, HEK, 293, VERO 등으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 용도.

청구항 54

제26항 내지 제40항, 제46항, 또는 제48항 중 어느 한 항의 펠릿으로부터 재구성된 액체에서 세포를 배양하는 방법으로,

i) 펠릿을 적합한 액체 또는 완충액에 재구성하는 단계로서, 상기 펠릿은 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 농축물인 단계;

ii) 세포의 성장에 유리한 조건하에서 재구성된 액체에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 55

제54항의 방법에 있어서, 세포는 진핵세포, 원핵세포, 동물, 식물, 진균류, 조류, 곤충, 효모로 이루어지는 군으로부터 선택되거나, 세포는 바이러스 또는 바이러스 입자의 배양을 위해 이용되는 방법.

청구항 56

제54항 내지 제55항의 세포를 배양하는 방법에 있어서, 세포 배양은 증가된 양의 폴리펩타이드를 생산하는 데 이용되는 방법.

청구항 57

제56항의 세포를 배양하는 방법에 있어서, 폴리펩타이드는 재조합 폴리펩타이드인 방법.

청구항 58

제54항 내지 제55항의 세포를 배양하는 방법에 있어서, 배양은 펠릿으로부터 제조되지 않은 액체 배지로의 배양물과 비교하여 생성물 생산을 증가시키고 세포 성장을 증가시키는 방법.

청구항 59

키트로서,

i) 제26항 내지 제40항, 제46항, 또는 제48항에 따른 1종 이상의 펠릿을 포함하는 제1 용기;

ii) 펠릿 사용에 대한 지침을 포함하는 키트

청구항 60

제26항 내지 제40항, 제46항, 또는 제48항에 따른 펠릿 및 세포로부터 재구성된 액체 배지를 포함하는 시스템.

청구항 61

제60항의 시스템에 있어서, 세포는 진핵세포, 원핵세포, 동물, 식물, 진균류, 조류, 곤충, 효모로 이루어지는 군으로부터 선택되거나, 세포는 바이러스 또는 바이러스 입자의 배양을 위해 이용되는 시스템.

청구항 62

제60항 및 제61항의 시스템에 있어서, 재구성된 액체 배지는 재조합 폴리펩타이드, 바이러스, 분비된 단백질을 생산하는 세포, 또는 현탁액 중 세포 또는 부착된 세포를 배양하는 데 사용되는 시스템.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **상호 참조**

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2015년 12월 17일에 출원된 미국 가특허출원 제62/269,031호의 이익을 주장한다. 전술된 출원의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 발명은 세포 배양 및 기타 이러한 적용에 유용한, 펠릿화된 건조 세포 배양 배지, 공급물, 보충물, 농축물

또는 배지 완충액에 관한 것이다. 본 발명은 이러한 펠릿화된 조성물의 제조 방법 및 펠릿을 원하는 입자 크기로 조정하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 단백질과 폴리펩타이드 생산, 그리고 그에 의한 세포 성장 및 단백질 역가 증가를 위한 이러한 펠릿 제제의 용도에 관한 것이다.

발명의 내용

[0005] **발명의 간단한 개요**

[0006] 본 발명의 제1 양태는 펠릿화된 세포 배양 배지의 제조 방법으로서, a) 제1 건조 분말을 유동층 장치의 기체가 상향 이동하는 컬럼 내의 현탁액에 투입하고, 디스크 로터에서 회전시키는 단계; b) 용매 및/또는 제2 건조 분말을 단계 (a)의 유동층 장치에 주입하여 펠릿을 형성하는 단계; 및 c) 펠릿을 건조하는 단계를 포함하며, 제1 건조 분말, 제2 건조 분말, 또는 용매는 결합제, 부형제, 또는 둘 다를 포함하는 것인, 방법을 대상으로 한다.

[0007] 추가적인 양태에서, 단계 (a)의 제1 건조 분말은 사전 습윤될 수 있고, 선택적으로, 어떠한 용매도 단계 (b)에서 주입되지 않을 수 있다.

[0008] 일부 양태에서, 제1 및 제2 건조 분말은 동일할 수 있고, 다른 양태에서, 제1 및 제2 건조 분말은 상이할 수 있다.

[0009] 특정 양태에서, 제1 건조 분말은 기초 배지 분말, 완전 배지 분말, 공급물, 보충물, 배지 또는 공급물 농축물, 및 배양액 중 세포의 배양을 지지할 수 있는 아미노산 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. 또 다른 양태에서, 제2 건조 분말은 기초 배지 분말, 완전 배지 분말, 공급물, 보충물, 배지 또는 공급물 농축물, 및 배양액 중 세포의 배양을 지지할 수 있는 아미노산 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0010] 본 발명의 제2 양태는 제1 분말, 제2 분말, 용매, 또는 임의의 것에 존재하며 기술된 방법에 사용되는, 결합제 또는 부형제 또는 둘 다를 제공한다. 또 다른 양태에서, 결합제 또는 부형제는 당, 천연 물질, 합성 물질 및 반합성 물질로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. 특정 양태에서, 천연 물질은 예를 들어, 미세결정 셀룰로스일 수 있다.

[0011] 특정 양태에서, 본 발명은 제1 분말, 제2 분말, 용매 또는 임의의 것에 존재하며 기술된 방법에 사용되는 당을 제공하고, 당은 글루코스, 수크로스, 트레할로스, 단당류, 이당류 및 올리고당류으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. 추가적인 양태에서, 당은 글루코스일 수 있고, 펠릿 중 글루코스는 펠릿 조성물의 0.1 내지 100%의 농도일 수 있다. 특정 구현예에서, 당은 D-글루코스를 포함한다.

[0012] 일 구현예에서, 본 발명은 제1 분말, 제2 분말, 용매 또는 임의의 것에 존재하며 기술된 방법에 사용되는 비타민을 제공한다. 특정 구현예에서, 비타민은 비타민 B12, 비오틴, 콜린, 엽산, 니아신아미드, 피리독신, 리보플라빈, 티아민, 아스코르브산, 파라-아미노벤조산(PABA) 등 중 1종 이상으로부터 선택된다.

[0013] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 제1 분말, 제2 분말, 또는 용매에 존재할 수 있으며 기술된 방법에 사용되는 염을 제공한다. 일 구현예에서, 염은 완충 염, 철, 아연, 칼슘, 구리, 마그네슘, 망간, 암모늄, 바나듐 염 등 중 1종 이상으로부터 선택된다.

[0014] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 제1 분말, 제2 분말, 용매 또는 임의의 것에 존재하며 기술된 방법에 사용되는 아미노산을 제공한다. 일 구현예에서, 아미노산은 잘 알려져 있는 20종의 아미노산, 그것들의 염 또는 이의 유도체 중 1종 이상으로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, 아미노산은 글리신, 알라닌, 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산, 히스티딘, 아이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 하이드록시프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 발린, 티로신, 시스테인 및 라이신 중 1종 이상으로부터 선택된다.

[0015] 또 다른 양태에서, 본 발명은 제1 분말, 제2 분말, 용매 또는 임의의 것에 존재하며 기술된 방법에 사용되는 결합제를 제공한다. 일부 구현예에서, 결합제 또는 부형제는 명세서 전체에 걸쳐 서로 교환 가능하게 또는 함께 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 결합제 또는 부형제는 당, 천연 물질, 합성 물질 및 반합성 물질, 미세결정 셀룰로스, 글루코스, 수크로스, 트레할로스, 단당류, 이당류 및 올리고당류, 부형제 및/또는 붕해제로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일 특정 구현예에서, 결합제는 미세결정 셀룰로스 및 글루코스이다. 또 다른 구현예에서, 펠릿 중 결합제(들)의 퍼센트 조성은 약 0.1 내지 약 100%일 수 있다. 특정 구현예에서, 펠릿 중 결합제(들)의 % 조성은 약 30 내지 약 60%일 수 있다.

[0016] 본 발명의 제3 양태는 다양한 크기의 펠릿 제조 방법을 제공한다. 경우에 따라, 펠릿은 약 0.05㎜ 내지 7 ㎜의 크기를 갖는다. 특정 양태에서, 본 발명은 약 0.05 ㎜ 내지 약 0.5 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 1 ㎜, 또는

약 0.05 ㎜ 내지 약 2 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 3 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 4 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 5 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 6 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 0.1 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 0.2 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 0.3 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 0.4 ㎜, 또는 약 0.1㎜ 내지 약 1 ㎜, 또는 약 0.1 ㎜ 내지 약 2 ㎜, 또는 약 0.1 ㎜ 내지 약 3 ㎜, 또는 약 0.1 ㎜ 내지 약 4 ㎜, 또는 약 0.1 ㎜ 내지 약 5 ㎜, 또는 약 0.1 ㎜ 내지 약 6 ㎜, 또는 약 0.5 ㎜ 내지 약 1 ㎜, 또는 약 0.5 ㎜ 내지 약 2 ㎜, 또는 약 0.5 ㎜ 내지 약 3 ㎜, 또는 약 0.5 ㎜ 내지 약 4 ㎜, 또는 약 0.5 ㎜ 내지 약 5 ㎜, 또는 약 0.5 ㎜ 내지 약 6 ㎜, 또는 약 0.5 ㎜ 내지 약 7 ㎜, 또는 약 1 ㎜ 내지 약 2 ㎜, 또는 약 1 ㎜ 내지 약 3 ㎜, 또는 약 1 ㎜ 내지 약 4 ㎜, 또는 약 1 ㎜ 내지 약 5 ㎜, 또는 약 1 ㎜ 내지 약 6 ㎜, 또는 약 1 ㎜ 내지 약 7 ㎜의 크기를 갖는 펠릿을 제공한다. 특정 구현예에서, 본 발명은 주로 펠릿 크기가 약 0.1 ㎜ 초과, 또는 약 0.2 ㎜ 초과, 또는 약 0.3 ㎜ 초과, 또는 약 0.4 ㎜ 초과, 또는 약 0.5 ㎜ 초과, 또는 약 0.6 ㎜ 초과, 또는 약 0.7 ㎜ 초과, 또는 약 0.8 ㎜ 초과, 또는 약 0.9 ㎜ 초과, 또는 약 1 ㎜ 초과, 또는 약 2 ㎜ 초과일 수 있는 펠릿 제제를 제공한다.

[0017] 본 발명의 펠릿 제조의 다른 양태에서, 방법은 가변적인 속도로 회전하는, 프로세스 챔버 내의 디스크 로터의 사용을 대상으로 할 수 있다.

[0018] 다른 양태에서, 제1 건조 분말을 유동층 장치의 기체가 상향 이동하는 컬럼 내의 현탁액에 투입하고, 디스크 로터에서 회전시킬 때, 단계 (a)로 주입되는 용매는, 접선 분무(tangential spray), 상부 분무, 또는 하부 분무를 통해 주입된다. 추가적인 양태에서, 단계 (a)로 주입되는 용매의 속도는 약 1 gm/분 내지 약 30 gm/분 사이일 수 있다. 특정 양태에서, 단계 (a)로 주입되는 용매의 속도는 약 5 gm/분일 수 있다.

[0019] 본 발명의 제5 양태는 펠릿의 제조 방법으로서, 유입구 기체의 온도는 약 20℃ 내지 30℃일 수 있는, 방법을 제공한다. 특정 양태에서, 유입구 기체의 온도는 약 25℃일 수 있다. 추가적인 양태에서, 펠릿 온도는 약 20℃ 내지 30℃로 유지될 수 있다. 또 다른 양태에서, 펠릿을 건조시키기 위한 온도는 약 50℃ 내지 60℃일 수 있다. 그리고 일 양태에서, 펠릿은 약 0.5% 내지 3%의 수분 함량까지 건조될 수 있다.

[0020] 본 발명의 제6 양태는 펠릿화된 베이스 분말 모듈의 제조 방법으로, a) 제1 건조 분말을 유동층 장치의 기체가 상향 이동하는 컬럼 내의 현탁액에 투입하고, 디스크 로터에서 회전시키는 단계; b) 용매 및 선택적으로 제2 건조 분말을 단계 (a)의 유동층 장치로 주입하여, 베이스 분말 모듈의 펠릿을 형성할 수 있는 단계; 및 c) 펠릿을 건조하는 단계를 포함하며, 제1 건조 분말, 제2 건조 분말, 또는 용매는 결합제, 부형제, 또는 둘 다를 포함하는, 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 추가적인 양태는 펠릿화된 베이스 분말 모듈의 제조 방법으로, 모듈은 1종 이상의 수용성 비타민, 1종 이상의 산 가용성 비타민, 1종 이상의 중성 가용성 비타민, 1종 이상의 산 가용성 아미노산, 1종 이상의 염기 가용성 아미노산, 1종 이상의 중성 수용성 아미노산, 1종 이상의 수용성 무기 염, 1종 이상의 무기 산 가용성 염, 1종 이상의 당, 1종 이상의 산 가용성 미량 원소, 1종 이상의 알코올 가용성 폴리아민, 1종 이상의 알코올 가용성 지질 및 1종 이상의 완충 염으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있는 것인, 방법을 제공한다. 본 발명의 일 양태에서, 수용성 또는 산 또는 염기 또는 중성 가용성 비타민 모듈, 수용성 또는 산 또는 염기 또는 중성 가용성 아미노산 모듈, 또는 수용성 또는 산 또는 염기 또는 중성 가용성 염 모듈은 적어도 1종의 수 불용성 부형제 또는 수 불용성 결합제 또는 둘 다를 포함한다.

[0022] 또 다른 양태에서, 펠릿화된 베이스 분말 모듈은 1종 이상의 수용성 군, 1종 이상의 염기 가용성 군, 1종 이상의 산 가용성 군, 1종 이상의 산 가용성 반응성 군, 1종 이상의 알코올 가용성 군, 1종 이상의 알코올 가용성 반응성 군 및 1종 이상의 pH 조절제 군으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. 특정 양태에서, 수용성 군은 비타민, 벌크 무기 염 및 당으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0023] 본 발명의 제7 양태는 위에 기술된 방법들 중 임의의 하나에 의해 수득된 또는 수득될 수 있는 펠릿을 제공한다.

[0024] 제8 양태에서, 본 발명은 1종 이상의 아미노산, 1종 이상의 결합제 또는 부형제 및 1종 이상의 미량 구성성분을 포함하는, 펠릿화된 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 첨가물을 대상으로 할 수 있다.

[0025] 일 구현예에서, 펠릿화된 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 첨가물은 비타민을 더 포함한다. 특정 구현예에서, 비타민은 비타민 B12, 비오틴, 콜린, 엽산, 니아신아미드, 피리독신, 리보플라빈, 티아민, 아스코르브산, 파라-아미노벤조산(PABA) 등 중 1종 이상으로부터 선택된다.

[0026] 또 다른 양태에서, 펠릿화된 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 첨가물은 염을 더 포함한다. 일 구현예에서,

염은 완충 염, 철, 아연, 칼슘, 구리, 마그네슘, 망간, 암모늄, 바나듐 염 등 중 1종 이상으로부터 선택된다.

[0027] 또 다른 양태에서, 펠릿화된 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 첨가물은 잘 알려져 있는 20종의 아미노산, 그것들의 염 또는 이의 유도체 중 1종 이상으로부터 선택된 아미노산을 포함한다. 일 구현예에서, 아미노산은 글리신, 알라닌, 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산, 히스티딘, 아이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 하이드록시프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 발린, 티로신, 시스테인 및 라이신 중 1종 이상으로부터 선택된다.

[0028] 제9 양태에서, 본 발명은 결합제 또는 부형제를 포함하는 청구항의 펠릿화된 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 첨가물을 대상으로 할 수 있는데, 결합제 또는 부형제는 본 명세서 전반에 걸쳐 상호 교환 가능하게 또는 함께 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 결합제 또는 부형제는 당, 천연 물질, 합성 물질 및 반합성 물질, 미세결정 셀룰로스, 글루코스, 수크로스, 트레할로스, 단당류, 이당류 및 올리고당류, 부형제 및/또는 붕해제로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일 특정 구현예에서, 결합제는 미세결정 셀룰로스 및 글루코스이다. 또 다른 구현예에서, 펠릿 중 결합제(들)의 % 조성은 약 0.1 내지 약 100%일 수 있다. 특정 구현예에서, 펠릿 중 결합제(들)의 % 조성은 약 30 내지 약 60%일 수 있다.

[0029] 제10 양태에서, 본 발명 전반에 걸쳐 기술된 조성물은 25~40% 아미노산, 20~65% 결합제, 1~5% 비타민, 2~10% 염, 0.01~0.05% 미량 구성성분 중 1종 이상을 포함하는 청구항의 펠릿화된 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 첨가물을 대상으로 할 수 있다. 특정 구현예에서, 펠릿 조성물은 31~32% 아미노산, 59~60% 결합제, 25% 비타민, 6~7% 염, 0.01~0.05% 미량 구성성분 중 1종 이상을 포함한다. 바람직한 조성물에서, 결합제는 D-글루코스이다.

[0030] 제11 양태에서, 본 발명은 영양 배지 펠릿, 영양 배지 보충물 펠릿, 영양 배지 하위군 펠릿 또는 완충액 펠릿의 제조 방법으로, 건조 분말 배지, 보충물, 배지 하위군, 또는 배지 완충액을 용매와 응집시키고, 유동층의 회전 디스크를 이용하여 펠릿을 형성하는 단계를 포함하며, 펠릿은 결합제 또는 부형제를 포함하는 것인, 방법을 제공한다.

[0031] 본 발명의 또 다른 양태는 영양 배지 펠릿, 영양 배지 보충물 펠릿, 영양 배지 하위군 펠릿 또는 완충액 펠릿의 제조 방법으로, 결합제 또는 부형제는 용매를 통해 분무될 수 있거나, 펠릿화 전에 건조 분말에 혼합될 수 있는, 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 결합제는 당일 수 있고, 바람직한 구현예에서, 당은 D-글루코스를 포함한다. 결합제, 예컨대, 글루코스의 퍼센트는 차별적인 펠릿 크기, 또는 가변적인 벌크 밀도, 또는 가변적인 안식각, 또는 가변적인 점착성 또는 건조도를 달성하도록 변화될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 원하는 특성을 달성하기 위해 양은 0~60%, 또는 10~16%, 또는 20~60%, 바람직하게는 30~40%, 40~50%, 30~35%, 30~45%, 40~50%, 40~55% 등으로 달라질 수 있다.

[0032] 또 다른 양태에서, 본 발명은 위에 기술된 모든 변형에서, 위의 방법들 중 임의의 하나에 의해 수득되거나 수득될 수 있는 펠릿을 대상으로 할 수 있다.

[0033] 제12 양태에서, 본 발명은 건조 분말 배지 또는 모듈의 미세현탁액을 제조하는 단계; 미세현탁액을 압출 장치를 통해 압출하여 액적을 형성하는 단계; 액적을 펠릿으로 건조하는 단계를 포함하는, 세포 배양을 위한 펠릿의 제조 방법을 제공한다. 양태는 그에 의해 수득된 펠릿을 대상으로 할 수 있다.

[0034] 제13 양태는 세포 배양을 위한 위의 청구항 중 임의의 것의 방법으로 수득된 펠릿의 용도를 대상으로 할 수 있다. 구현예에서, 세포는 진핵세포, 원핵세포, 동물, 식물, 진균류, 조류, 곤충, 효모로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있거나, 세포는 바이러스 또는 바이러스 입자의 배양을 위해 이용될 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 동물 세포일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 세포는 포유동물 세포일 수 있다. 특정 구현예에서, 포유동물 세포는 CHO, BHK, HEK, 293, VERO 등으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0035] 제14 양태에서, 본 발명은 위에 기술된 방법에 의해 수득되거나 수득될 수 있는 펠릿 중 임의의 것으로부터 재구성된 액체에서 세포를 배양하는 방법으로, i) 펠릿을 적합한 액체 또는 완충액에 재구성하는 단계로서, 상기 펠릿은 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 농축물일 수 있는, 단계; ii) 세포의 성장에 유리한 조건 하에서 재구성된 액체에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 세포는 진핵세포, 원핵세포, 동물, 식물, 진균류, 조류, 곤충, 효모로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있거나, 세포는 바이러스 또는 바이러스 입자의 배양을 위해 이용될 수 있다. 또 다른 양태에서, 배양은 증가된 양의 폴리펩타이드를 생산하기 위해 이루어질 수 있다. 바람직한 구현예에서, 폴리펩타이드는 재조합 폴리펩타이드일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 배양은 펠릿으로부터 제조되지 않은 액체 배지로의 배양물과 비교하여 생성물 생산을 증가시키고 세포 성장을 증가시킨다.

[0036] 제14 양태에서, 본 발명은 i) 위에 기술된 방법으로 수득되거나 수득될 수 있는 펠릿을 포함하는 제1 용기로서, 상기 펠릿은 세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 농축물일 수 있는, 제1 용기; ii) 펠릿 사용에 대한 지침을 포함하는 키트를 제공한다. 다른 양태에서, 키트는 각각이 배양을 위한 세포, 완충액, 및 기타 배지(액체 또는 건조 분말, AGT 제형), 첨가물, 공급물, 항생제 등을 포함하는 기타 구성성분을 포함할 수 있는 추가적인 용기를 더 포함할 수 있다.

[0037] 제15 양태에서, 본 발명은 위에 기술된 방법들 중 임의의 하나에 의해 수득될 수 있는, 위에 기술된 펠릿으로부터 재구성된 액체 배지/공급물/보충물/첨가물, 및 세포를 포함하는 시스템을 제공한다. 일 구현예에서, 세포는 진핵세포, 원핵세포, 동물, 식물, 진균류, 조류, 곤충, 효모로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있거나, 세포는 바이러스 또는 바이러스 입자의 배양을 위해 이용될 수 있다. 또 다른 양태에서, 펠릿으로부터 재구성된 액체 배지/공급물/보충물/첨가물은 재조합 폴리펩타이드, 바이러스, 분비된 단백질을 생산하는 세포, 또는 현탁액 중 세포 또는 부착된 세포를 배양하는 데 사용될 수 있다.

[0038] **참조 포함**

[0039] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은, 각각의 개별적인 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 참조로서 포함되도록 표시된 것처럼, 동일한 정도로 본원에 참조로서 포함된다. 충돌이 발생하는 경우, 정의를 비롯한 본 명세서가 좌우할 것이다. 본 출원에서 임의의 참조 문헌의 인용 또는 확인은 이러한 참조 문헌이 본 발명에 대한 선행 기술로 이용될 수 있음을 인정하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

도면의 간단한 설명

[0040] 본 발명의 신규한 특징은 첨부된 청구범위에 상세하게 기재되어 있다. 본 발명의 특징 및 이점에 대한 더 나은 이해는 본 발명의 원리가 이용되는 예시적인 실시예를 기술하는 다음의 상세한 설명을 참조하여 얻어질 것이다. 당업자는 여기서 설명되는 도면이 단지 설명적인 목적을 위한 것이며, 어떠한 방식으로든 본 발명의 교시의 범위를 제한하고자 하는 것은 아님을 이해할 것이다.

도 1a: 수동으로 제조된 펠릿 또는 비드인 펠릿 공급물 1이 여기에 도시되어 있다. 상세한 제조 방법은 실시예 1에 기술되어 있다. 도 1b: 펠릿 공급물 1의 시각적 크기 추정. 도 1c: 펠릿 또는 비드 공급물 1의 시각적 크기 비교.

도 2a: 수동으로 제조된 펠릿 공급물 1 보충물 대 액체 보충물의 세포 생존능력 분석 비교. 수동으로 제조된 펠릿 공급물 1(시험 샘플)의 생존능력을 곡선으로 비드 1, 2, 3으로 도시하였다. 액체(양성 대조군)의 생존능력을 액체 1, 2, 3으로 도시하였다. 비 보충 (음성 대조군)의 생존능력을 음성 대조군 1, 2, 3으로 도시하였다. 펠릿 공급물 1로 보충한 세포 배양물(3 회: 1, 2, 3으로 수행됨)은 특히 8일부터 16일까지, 액체가 보충된 세포 배양물(3 회: 1, 2, 3)과 비교하여 더 우수한 % 생존능력을 보여주었다.

도 2b: 수동으로 제조된 펠릿 공급물 1 보충물 대 액체 보충물의 세포 성장 분석 비교. 펠릿 공급물 1로 보충한 세포 배양물(3 회: 1, 2, 3)은 액체로 보충한 세포 배양물(3 회: 1, 2, 3)과 비교하여 배양액 중에서 15일의 기간에 걸쳐 비슷한 세포 성장을 보여주었다.

도 2c: 항체 생산을 위해 수동으로 제조된 펠릿 공급물 1 보충물 대 액체 보충물의 세포 성능 또는 단백질 역가 분석 비교. 수동 펠릿의 단백질 역가(세포 성능)을 곡선으로 비드 1, 2, 3으로 도시하였다. 액체(양성 대조군)의 단백질 역가를 액체(3 회: 1, 2, 3)로 도시하였다. 비 보충(음성 대조군)의 단백질 역가를 음성 대조군(3 회: 1, 2, 3)으로 도시하였다. 비드/펠릿 1, 2, 3으로 보충된 세포 배양물은, 배양액 중 15일의 기간에 걸쳐 양성 액체 대조군 EFB(3 회: 1, 2, 3)로 약 425 μg/ml로 생산된 IgG보다 약간 더 적은 IgG 생산량인 약 325 μg/ml(생산량)을 보여주었다. 비 보충 음성 대조군은 공급물 1 비드로 보충된 세포 배양물(시험)과 비교하여 훨씬 더 적은 IgG 생산량(약 100 μg/ml)을 보여주었다.

도 3a: 분쇄된 분말(출발물질)로부터 가끔 도면/본원에서 공급물 2로도 지칭되는, 로터 디스크 기술을 이용하여 제조된, 펠릿 공급물 2로의 자동화 펠릿 제제 또는 비드의 현미경 확대 영상. 상세한 제조 방법은 실시예에 기술되어 있다.

도 3b: 로터 디스크 기술로 제조된 펠릿 공급물 2의 입자 크기 추정.

도 3c: 자동화 펠릿 공급물 2 대 액체 보충물의 세포 성장 분석 비교. 비드/펠릿으로 보충된 세포 배양물은 액체로 보충된 세포 배양물과 비교하여 배양물 중에서 15일의 기간에 걸쳐 비슷한 세포 성장을 보여주었다. 펠릿

공급물 2는 양성 대조군 공급물로 보충된 세포 배양물(약 8 x 10 e^{6}개)보다 약간 더 많은 생존 세포 수인 약 10 x 10 e^{6}개 세포/ml(성장)을 보여주었다.

도 4a: 분쇄된 분말(출발물질)로부터 가끔 도면/본원에서 공급물 3으로도 지칭되는, 로터 디스크 기술을 이용하여 제조된, 펠릿 공급물 3으로의 자동화 펠릿 제제 또는 비드의 현미경 확대 영상. 상세한 제조 방법은 실시예에 기술되어 있다.

도 4b: 로터 디스크 기술로 제조된 펠릿 공급물 3의 입자 크기 추정.

도 4c: 자동화 펠릿 공급물 3 대 액체 보충물의 세포 성장 분석 비교. 펠릿 공급물 3으로 보충된 세포 배양물은 특히 음성 대조군(7일부터 계속)과 비교하여, 배양물 중에서 14일의 기간에 걸쳐 양성 대조군과 비슷한 세포 성장을 보여주었다. 펠릿 공급물 3은 양성 대조군 공급물로 보충된 세포 배양물(약 8 x 10 e^{6}개)보다 약간 더 많은 생존 세포 수인 약 9 x 10 e^{6}개 세포/ml(성장)을 보여주었다.

도 5a: 분쇄된 분말(출발물질)로부터 로터 디스크 기술을 이용하여 제조된, 펠릿 공급물 4로의 자동화 펠릿 제제 또는 비드의 현미경 확대 영상으로, 여기서 출발 건조 베이스 분말은 셀룰로스 결합제를 포함하였다. 펠릿 공급물 4는 가끔 도면/본원에서 공급물 4로도 지칭된다. 상세한 제조 방법은 실시예에 기술되어 있다.

도 5b: 로터 디스크 기술로 제조된 펠릿 공급물 4의 입자 크기 추정으로, 여기서 출발 건조 베이스 분말은 셀룰로스 결합제를 포함하였다. 펠릿 공급물 4의 그래프는 출발 조성물이 (수용성을 감소시키기 위해) 셀룰로스로 화학적으로 변경될 때의 결과를 보여준다. 펠릿 입자 크기는 공급물 2와 3과 비교하여 더 작았다.

도 5c: 자동화 펠릿 공급물 4 대 액체 보충물의 세포 성장 분석 비교. 펠릿 공급물 4로 보충된 세포 배양물은 특히 음성 대조군(7일부터 계속)과 비교하여, 배양물 중에서 14일의 기간에 걸쳐 양성 대조군과 비슷한 세포 성장을 보여주었다.

도 6a: 분쇄된 분말(출발물질)로부터 로터 디스크 기술을 이용하여 제조된, 펠릿 공급물 5로의 자동화 펠릿 제제 또는 비드의 현미경 확대 영상으로, 여기서 출발 건조 베이스 분말은 펠릿화 공정에 사용되기 전에 먼저 더 작은 입자 크기로 미분화되었다. 펠릿 공급물 5는 가끔 도면/본원에서 공급물 5로도 지칭된다. 상세한 제조 방법은 실시예에 기술되어 있다.

도 6b: 로터 디스크 기술로 제조된 펠릿 공급물 5의 입자 크기 추정으로, 여기서 출발 건조 베이스 분말은 먼저 더 작은 입자 크기로 미분화되었다. 그래프는 출발 조성물이 물리적으로 변경될 때(감소된 입자 크기)의 결과를 보여준다. 입자 크기는 더 균일하였다.

도 7a: 펠릿 공급물의 생물학적 평가. 펠릿 공급물 2, 3 및 4에 대해 생존능력 분석을 수행하고, 양성 대조군(액체 공급물 보충 있음) 또는 음성 대조군(액체 또는 펠릿 보충 없음)과 비교하였다. 그래프에서 알 수 있듯, 공급물 2, 3 및 4는 양성 대조군에 상당히 필적했고, 특히 6일 이후에는는 음성 대조군보다 우수했다. 펠릿 공급물 5에 대한 세포 생존능력 분석은 공급물 2, 3 및 4와 마찬가지로 비슷한 결과를 내놓았다(데이터 미도시).

도 7b: 펠릿 공급물의 생물학적 평가. 펠릿 공급물 2, 3 및 4에 대해 세포 성능(항체 생산) 분석을 수행하고, 양성 대조군(액체 공급물 보충 있음) 또는 음성 대조군(액체 또는 펠릿 보충 없음)과 비교하였다. 그래프에서 알 수 있듯, 공급물 2, 3 및 4는 양성 대조군에 상당히 필적했고, 특히 4일 이후에는 음성 대조군보다 우수했다. 펠릿 공급물 2로 보충된 세포 배양물(약 229 ㎍/ml)은, 양성 대조군 공급물로 약 228 ㎍/ml(14일)로 생산된 IgG와 비슷한 IgG 생산량을 나타내었다. 펠릿 공급물 3으로 보충된 세포 배양물(약 243 ㎍/ml)은 양성 대조군 공급물보다 약간 더 많은 IgG 생산량을 나타내었다. 펠릿 공급물 4로 보충된 세포 배양물(약 200 ㎍/ml)은 양성 대조군 공급물보다 약간 더 적은 IgG 생산량을 나타내었다. 비 보충 세포 배양 분석(음성 대조군)은 임의의 펠릿 공급물 2, 3 또는 4로 보충된 세포 배양물과 비교하였을 때 훨씬 더 적은 IgG(약 100 ㎍/ml)를 나타내었다. 펠릿 5에 대한 세포 성능(항체 생산) 분석은 공급물 2, 3 및 4와 마찬가지로 비슷한 결과를 내놓았다(데이터 미도시).

도 8: 펠릿 제조 공정: 펠릿화는 유동화 로터에서 건조 분말의 습윤을 통해 일어난다. 예시적인 펠릿 공정에서, 전처리 상호 작용을 제한하기 위해 배지 구성성분을 칭량하여 별도의 군으로 분류한다. 건조 분말에 사용되는 군을 유동화 분말로 분무될 구성성분들로부터 분리한다. 건조 분말, 또는 분무 용액, 또는 둘 다는 결합제를 함유할 것이다. 분무된 용액을 제형화하고, 건조 분말 구성성분을 분쇄하고, 균일하게 혼합한다. 여기서, 분말로

부터의 직접적인 펠릿화는 로터 기술을 이용하였다.

도 9a 및 도 9b: 모듈 배지, 공급물 또는 보충물 펠릿 제조를 위한 예시적인 구성성분 또는 군. 용해도와 같은 성질 또는 다른 구성성분들과 반대로 반응하는 경향을 기초로 하여 카테고리를 만든다. 일반적으로, 침전을 방지하기 위하여, 또는 펠릿이 최종적으로 액체로 재구성될 때 (생성물을 쓸모없게 만들) 부가물 형성을 방지하기 위하여, 그것들을 조심스럽게 함께 첨가할 때, 반대의 반응물질은 최종 단계까지 계속 분리되도록 한다. 예시적인 카테고리는 중성 가용성 구성성분, 염기 가용성 구성성분, 산 가용성 구성성분이다.

도 10: 예시적인 모듈 배지 제조 공정으로, 여기서, 산 가용성 (벌크) 품목이 먼저 첨가되고, 이어서 염기, 중성 품목, 마지막으로 미량 금속 품목이 첨가된다. 일 구현예에서, 각각의 품목(산 가용성, 염기 가용성 또는 중성 가용성)은 개별적으로 펠릿화될 수 있다. 다른 구현예에서, 품목들은 분말로서 순차적으로 첨가되고, 다음으로 함께 펠릿화되어 복합 펠릿을 형성한다. 또 다른 구현예에서, 개별적인 산 가용성 품목 또는 산 가용성 품목의 조합은, 특정 산 가용성 아미노산, 또는 아미노산의 조합, 또는 개별적인 염기 가용성 품목 또는 이의 조합, 또는 개별적인 중성 가용성 또는 이의 조합처럼, 펠릿으로 형성될 수 있다. 본원에 기술된 순차적인 첨가 순서(산 가용성 먼저, 염기 가용성 다음 또는 중성 가용성 마지막)는 단지 예시임을 주의할 것. 첨가 또는 혼합의 순서는 필요에 따라 변경될 수 있고, 반대로 반응하는 구성성분의 형성 또는 존재에 따라 결정될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 본 발명은 건조 분말 배지의 제조 방법에 관한 것이다. 건조 분말 배지는 본 개시에 언급될 때 건조 분말 배지(기초 배지 또는 완전 배지), 건조 농축 세포 배양 배지, 건조 분말 공급물 또는 보충물, 건조 분말 농축 공급물 또는 보충물, 건조 완충액 분말을 지칭할 수 있고, 조합하여, 또는 부분적으로, 또는 단독으로 (완전 배지일 때), 세포를 배양하는 데 사용될 수 있다. 일반적으로, 배양은 시험관 내(in vitro)에서 세포를 배양하는 것을 지칭한다. 본 발명에 따른 배지 또는 공급물의 펠릿화 방법은 이하에서 설명된다.

[0042] 세포 배양 생물치료제 생산의 일반적인 작업 흐름은 외기 투여조제(open air dispensing), 건조 분말 배지의 재구성, 추가적인 제형화 단계에 이어지는 pH/삼투압 조정, 여과 및 생물반응기로의 이송을 필요로 한다. 이 다단계 공정은 잘못된 제형화 또는 원치 않는 우발적인 작용제(예컨대, 박테리아, 바이러스, 마이코플라스마 등)에 의한 오염을 통해 위험을 초래할 가능성이 있다.

[0043] 위의 문제에 대한 바람직한 해결책은 완전 세포 배양 배지 또는 건조 제형에서의 보충을 위한 공급물을 제공하여 배지 또는 공급물이 생물반응기에 첨가되기 전에 "닫힌계"에서 수화될 수 있도록 하는 것이다. 본 발명은 이러한 '닫힌계'에서 용이하게 이용할 수 있는 펠릿 또는 마이크로펠릿 제형의 제조를 위한, 유동층 펠릿화 기초 또는 완전 세포 배양 배지 분말, 공급물 분말, 보충물 분말, 완충액 분말, 비타민 분말, 첨가제 분말 등에 관한 것이다. 분말화된 세포 배양 배지 분말의 소형의 크기, 양호한 유동성을 가진 "마이크로펠릿"으로서의 적용은, 주변으로 날아가서 물질의 손실을 초래하는 미세한 분말 입자들이 있는 건조 분말보다 생물약제 생산에 사용하기 위한 액체 내로 재구성하기가 훨씬 용이할 수 있다.

[0044] 유동층 펠릿화 공정은 제약 산업으로부터 개조될 수 있다. 약제학적 조성물은 조성물 내에 두 개 내지 수 개의 성분들을 포함한다. 예를 들어, 약제학적 조성물은 1개 내지 최대 10개의 성분들을 포함할 수 있다. 반면, 세포, 구체적으로는 동물 세포, 더욱 구체적으로는 포유동물 세포, 훨씬 더 구체적으로는 재조합 단백질 및 백신의 생산을 위한 재조합 세포의 배양에 사용되는 세포 배양 배지 분말, 공급물 분말, 보충물 분말은 80개 내지 100개의 개별적인 구성성분들을 일반적으로 포함하며 각각의 구성성분은 정확한 양으로 필요하다는 점에서 매우 복잡하다. 염 또는 금속 이온과 같은 일부 배지 구성성분은 제조 공정 중에 반응성을 나타낼 수 있고, 생성된 조성물 내에서 부가물 또는 세포 배양을 위한 기타 바람직하지 않은 물질을 형성할 수 있다. 따라서, 임의의 제조 공정 후의 생성된 배지는 물리적, 화학적 및 생물학적 평가(세포 배양물 성장 및 성능)에 대해 엄격하게 평가될 수 있다. 따라서, 제약 산업으로부터 세포 배양 배지 조성물로의 임의의 펠릿화 공정의 개조는 간단하지 않았다. 수동적으로든 또는 자동화 공정에 의해서든 세포 배양 배지 펠릿 또는 마이크로펠릿의 제조는 공정과 관련된 이러한 복잡성 때문에 이전에는 이루어지지 않았다. 실제로, 배지 펠릿화에 대한 본 발명자들의 초기 시도에서조차 바람직하지 않은 끈적끈적한 엿과 유사한 물질, 유동성이 좋지 않은 과습윤 배지 물질이 생성되었다. (더 적은 화학물질, 약물을 위해 설계된) 약제학적 펠릿 공정의 정확한 사용은, 양호한 마이크로펠릿/펠릿은 가능하지만, 펠릿이 세포 생존능력 및 성장을 유지할 수 없거나, 세포 성능을 지속/향상시킬 수 없다면, 최종 목적이 달성되지 않는다는 점에서, 생성된 배지 또는 공급물을 쓸모없게 만들 수 있다. 따라서, 본 발명에 이르기까지, 펠릿 배지 조성물 및 펠릿화된 세포 배양 조성물(배지, 공급물, 보충물, 첨가물 등)의 제조

방법에 대한 필요성이 여전히 존재했다.

[0045] 본원에 기술된 펠릿화된 배지는 아미노산, 당, 비타민, 미량 금속 염, 완충액을 포함하는 혼합 분말화된 배지 구성성분을 회전할 수 있는 공정 챔버 내에서 과립화하여 수득할 수 있는데, 여기서, 추가적인 분말화된 배지 구성성분 및/또는 용매가 온화한 온도에서 서서히 주입될 수 있다. 과립화하는 혼합 분말화된 배지 구성성분으로 도입되는 용매는 옅은 안개, 증기, 이슬, 분무, 미세 액적의 형태, 또는 액체-기체 계면으로서의 형태일 수 있다.

[0046] 일 구현예에서, 배지/공급물 펠릿은 수동 공정으로 제조될 수 있다. 예시적인 수동적인 방법은 실시예 1과 실시예 2에 기술되어 있으며, 이는 단지 본 발명의 교시의 예일 수 있고, 배지/공급물 펠릿이 어떻게 수동으로 제조될 수 있는지의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0047] 또 다른 구현예에서, 배지/공급물 펠릿은 자동화 공정으로 제조될 수 있다. 자동화 공정에서, 로터 기술이 본원에서 공정 챔버로도 지칭되는 유동층 장치에서 사용될 수 있다. 당업자에게 명백한 바와 같이, 임의의 로터/스피닝 수단이 유동 공정 챔버에 사용되거나 적용될 수 있다. 용어 "로터 디스크" 또는 "로터 기술" 또는 "애터마이저 로터(atomizer rotor)"의 사용은 제한된 방식으로 해석되어서는 안 된다. 다수의 균등한 기술이 비슷한 결과를 달성할 수 있다. 예를 들어, "스피닝 디스크", "스피닝 디스크 여과", "고속 스피닝 펠릿화 디스크" 등도 적용될 수 있고 당업자는 그에 맞추어 원리를 적용할 것이다. 회전을 가능하게 하는 "로터"의 구성도 제한된 방식으로 해석되어서는 안 된다. 비슷한 결과를 달성하기 위해 임의의 방식으로 롤러가 유동층 장치에 장착될 수 있다.

[0048] 이론에 얽매이지 않고, 유동화 시스템은 유동 챔버(또는 공정 챔버) 내에 솜털 같은(fluffy) 배지/공급물 입자를 형성할 수 있다. 배지 시드(seed) 입자로 펠릿 형성을 개시하는 것은 필수적이지는 않으나, 필요한 경우 이용할 수 있다. 챔버에서 입자의 추가적인 스피닝 단계는 입자가 베슬(vessel) 벽 및/또는 베슬의 칸막이(baffle)와 접촉하게 하고, 솜털 같은 입자 상에 분말을 축적시켜 펠릿을 형성하게 한다. 이것은 언덕에서 굴러떨어져서 눈사태에서 더욱 가루같은 눈을 모아 점점 더 쌓아올려 크기가 커지는 눈덩이의 불어남과 비슷하다. 건조 분말 입자가 회전하면, 적절한 조건이 수반될 때 양호한 크기의 펠릿이 형성된다. 예시적인 구현예에서, 미국 뉴저지 주 글래트 테크놀로지스(Glatt Technologies)의 유동 로터 챔버를 사용하여 배지/공급물 펠릿을 제조하였다. 로터/유동층 챔버를 이용하는 펠릿화 기술은 제약 산업에서 잘 알려져 있다. 그러나 앞서 표현한 바와 같이, 약제학적 조성물은 조성물 내에 두 개 내지 수 개의 성분들을 포함한다. 예를 들어, 약제학적 조성물은 두어 개 내지 수개의 성분들을 포함한다. 예를 들어, 약제학적 조성물은 1개 내지 최대 10개의 구성성분들을 포함할 수 있다. 반면, 세포, 구체적으로는 동물 세포, 더욱 구체적으로는 포유동물 세포, 훨씬 더 구체적으로는 재조합 단백질 및 백신의 생산을 위한 재조합 세포의 배양에 사용되는 세포 배양 배지 분말, 공급물 분말, 보충물 분말은 80개 내지 100개의 개별적인 구성성분들을 일반적으로 포함하며 각각의 구성성분이 정확한 양으로 필요하다는 점에서 매우 복잡하다. 염 또는 금속 이온과 같은 일부 배지/공급물 구성성분은 제조 공정 중에 반응성을 나타낼 수 있어, 부가물, 기타 바람직하지 않은 물질을 형성할 수 있다. 따라서, 제약 산업으로부터 세포 배양 배지 조성물로의 임의의 펠릿화 공정의 개조는 간단하지 않았다. 수동적으로든 또는 자동화 공정에 의해서든 세포 배양 배지 펠릿 또는 마이크로펠릿의 제조는 공정과 관련된 이러한 복잡성 때문에 이전에는 이루어지지 않았다. 실제로, 배지 펠릿화에 대한 본 발명자들의 초기 시도에서조차 바람직하지 않은 끈적끈적한 엿과 유사한 물질 또는 유동성이 좋지 않은 과습윤 배지 물질이 생성되었다. 더구나, (더 적은 화학물질, 약물을 위해 설계된) 약제학적 펠릿 공정은, 양호한 마이크로펠릿/펠릿을 수득할 수 있지만, 펠릿이 세포 생존능력 및 성장을 유지할 수 없거나, 세포 성능을 지속/향상시킬 수 없다면, 최종 목적이 달성되지 않는다는 점에서, 생성된 배지 또는 공급물을 쓸모없게 만들 수 있다. 따라서, 본 발명에 이르기까지, 펠릿 배지 조성물 및 펠릿화된 세포 배양 조성물의 제조 방법에 대한 필요성이 여전히 존재했다.

[0049] 본원에 기술된 펠릿화된 배지/공급물은 칸막이 및 입자 크기 증가 공정을 증진시키는 기타 수단을 구비하거나 구비하지 않은 스피닝 챔버에서의 로터 기술(스피닝, 입자 크기 증가)로 인해 펠릿화된다는 점에서 위에 기술된 응집된 배지 및 다른 곳에서 언급된 (그리고 참조로 포함된) 개시 내용의 응집된 배지와 상이하다.

[0050] 본원에 기술된 펠릿 조성물을 위한 결합제는 점착성이 있을 수 있고 펠릿에 결합 특성을 제공할 수 있다. 결합제는 당, 임의의 천연 결합제, 또는 합성 또는 반합성 고분자일 수 있다. 당은 건조 형태 또는 액체 형태로 이용될 수 있고, 나아가 글루코스(임의의 이성질체, D- 또는 L-글루코스), 수크로스(임의의 이성질체, D- 또는 L-수크로스), 임의의 단당류, 이당류, 올리고당류, 락토스, 말토스, 트레할로스, 또는 임의의 방향성 당을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 천연 결합제는 건조 형태, 습윤 형태 또는 페이스트 형태로 이용될 수 있고, 셀룰로

스, 전분, 전호화 전분, 아카시아, 젤라틴, 알긴산, 트래거캔스 같은 비당(non-sugar), 및 당해 분야에 공지된 기타를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 합성 또는 반합성 고분자는 메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리딘, 폴리에틸렌 글리콜 및 당해 분야에 공지된 기타를 포함하나 이에 한정되지 않는다(결합제는 http://www.pharmainfo.net/binders에 기술되어 있으며, 본원에 의해 상호 교환적으로 사용될 수 있고, 참조로서 포함된다). 일부 예에서, 펠릿을 제조하기 전에 "부형제"가 베이스 분말에 첨가될 수 있다. 부형제는 배지 내의 다른 유용한 물질을 세포에 공급하기 위해 비히클로서 작용할 수 있는 불활성 물질이다(즉, 부형제는 세포 성장 또는 배양에 영향을 미치지 않는다). 부형제는 가용성 개질제, 붕해제, 배지 입자를 코팅하기 위한 장벽(예컨대, 필름 코팅, 비활성 물질 등)으로도 작용할 수 있다. 부형제의 예에는 고분자 또는 미세결정 셀룰로스, 결정질 염, 당, 완충액 등이 포함되나 이에 한정되지 않는다. 일부 물질은 결합제로 또는 부형제로 간주될 수 있으며, 따라서 용어 결합제와 부형제는 본 개시에서 상호 교환적으로 사용될 수 있지만, 당업자라면 이해할 것이다. 특정 구현예에서, 붕해제는 건조 분말 또는 용매를 통해 펠릿으로 도입될 수 있고; 펠릿 입자의 1 내지 10%를 형성할 수 있다. 붕해제는 크로스포비돈, 크로스 카르복시메틸 셀룰로스 나트륨, 저치환도 하이드록시프로필셀룰로스 등을 포함할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0051] 일부 구현예에서, 분무 속도는 건조 분말 배지 또는 공급물로부터 펠릿의 형성을 위한 요인일 수 있다. 세포 배양 공급물, 특히 배지는 여러 가지 성분(최대 100가지 구성성분)을 가지고 있다. 이들 성분 중 일부는 수용성이 매우 큰 반면 다른 것들은 수용성이 적고 또 다른 것들은 점착성이 있거나 접착성이 있다. 이러한 화학적 성질들의 조합은 (제약에서 더 적은 수의 조합과는 반대로) 공급물 또는 배지의 펠릿 형성에 대해 과제를 제시한다. 예를 들어, 일부 제형의 경우, 너무 많은 물이 건조 배지/공급물 분말로 분무될 수 있을 때, 또는 다른 제형에서는, 분무 속도가 너무 빠를 수 있는 경우, 내부의 높은 수용성 화합물이 용해되기 시작할 수 있고, 이것은 펠릿 형성을 막을 수 있다. 최적 수준의 초기 용해가 펠릿 형성에 필수적일 수 있지만, 초기에 혼합물을 적시는 것은 분말을 끈적끈적하게 할 수 있다. 다시 말하면, 최적의 경우, 끈적거림은 좋은 펠릿을 생성할 수 있다. 그러나 경우에 따라 (과량의 용매, 또는 빠른 분무 속도 등으로 인해, 일부 제형에만 적용될 수 있는) 너무 과도한 점착성은 그 대신 펠릿보다는 건조 세포 배양 구성성분들의 엿과 유사한 농도를 초래할 수 있음이 관찰되었다. 예를 들어, 하나의 실패한 구현예에서, 미세결정 셀룰로스(40%)를 포함하는 베이스 분말은 40 gm/분의 분무 속도를 이용하였고, 펠릿보다는 건조 세포 배양 구성성분들의 엿과 유사한 농도를 초래하였다. 본원에 기술된 교시에 기초하여, 당업자는 제한 사항을 이해하고, 상세히 설명되고 예시된 교시를 이용하여 배지/공급물의 펠릿화된 형태를 수득할 수 있을 것이다.

[0052] 결합제 및/또는 부형제는 베이스 분쇄 분말에 혼합될 수 있고/있거나 분말과 함께 공정 챔버 내로 분무될 수 있다. 제한하는 것으로 간주되지 않을 수 있는 본원에 제공된 예에서, 펠릿을 수득하기 위해 다양한 조건을 이용하였다. 예를 들어, 펠릿 공급물 2, 펠릿 공급물 3, 펠릿 공급물 4 및 펠릿 공급물 5를 아래에 상술한 바와 같이 수득하였다. 이렇게 하여 수득된 펠릿을 다음의 분석법으로 평가하였다: 1) 물리적 특성(현미경 사진 및 입자 크기 분포 참조: 예를 들어, 도 3a 및 3b, 도 4a 및 도 4b, 도 5a 및 도 5b, 도 6a 및 도 6b 참조); 2) 펠릿화 전과 펠릿화 후의 분석적 함량. 이것은 HPLC 분석에 의해 이루어졌다. 즉, 아미노산 함량, 수용성 비타민 함량, 소수성 아미노산 함량 등과 같은 배지 구성성분을 펠릿화 전과 펠릿화 후에 분석하였다(데이터 미도시). 공급물 2, 3, 4 및 5 각각에 대한 분석적 데이터가 매우 비슷해서, 펠릿화 전과 펠릿화 후의 분석적 데이터는 유의미한 변화를 나타내지 않았다; 3) 세포 배양에서의 생물학적 활성, 성능(도 3 내지 도 7 참조; 각각의 공급물 펠릿에 대해, 해당될 경우 세부 항목 c 참조).

[0053] 배지 또는 공급물 펠릿은 세포 배양에서 다양하게 적용될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 입자 크기가 0 내지 약 500 미크론 미만인 펠릿은 세포 배양용 수성 배지/공급물 현탁액의 제조에 이용될 수 있다. 다른 구현예에서, 입자 크기가 약 800 내지 약 500 미크론 범위인 펠릿은 세포 배양용 다중 입자성 배지/공급물 정제의 제조에 이용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 입자 크기가 약 500 내지 약 2000 미크론 범위인 펠릿은 세포 배양용 배지/공급물 캡슐의 제조에 이용될 수 있다.

[0054] 적용: 본 발명의 펠릿/마이크로펠릿은 광범위한 진핵세포 및 미생물 세포 배양에서 잠재적인 유용성을 갖는다. 본 발명의 펠릿/마이크로펠릿은 예컨대, 유가식 시스템용 단일 단위 투여 형태를 제공하는 능력; 관류 시스템용 영양소의 계량 투여 능력; 여러 그룹의 펠릿화된 영양소(예컨대, 비타민 펠릿, 아미노산 펠릿 등)로 구성된 모듈식 키트를 생산하는 신규한 능력; 또는 방출 조절 적용 분야에 사용하기 위한 펠릿 조성물의 (고분자 필름으로) 표면 코팅되는 능력과 같은 몇 가지 신규한 전달 옵션을 제공한다. 일부 구현예에서, 펠릿 입자 크기는 다양한 적용 분야를 위해 조절될 수 있다. 예를 들어, 0 내지 약 500 미크론 미만인 펠릿은 세포 배양용 수성 배지/공급물 현탁액의 제조에 이용될 수 있다. 다른 구현예에서, 입자 크기가 약 800 내지 약 500 미크론 범위인

펠릿은 세포 배양용 다중 입자성 배지/공급물 정제의 제조에 이용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 입자 크기가 약 500 내지 약 2000 미크론 범위인 펠릿은 세포 배양용 배지/공급물 캡슐의 제조에 이용될 수 있다.

[0055] 본 발명의 일 양태는 펠릿화를 거친 건조 분말 제형을 제공한다. 본 발명의 또 다른 양태는 세포의 시험관 내 배양을 촉진하는 필수적인 영양 인자 전부를 포함하는 세포 배양 배지 제형을 제공한다. 본 발명의 일부 구현예는 이러한 펠릿화된 배지 제형을 생산하는 방법 및 수단을 제공한다. 본 발명의 일부 구현예는 이들 및 기타 배지 제형을 보충하는 방법 및 수단을 제공한다.

[0056] 본 발명에 따른 세포 배양 배지는 세포의 시험관 내 성장을 유지하고/유지하거나 지지하는 구성성분들의 임의의 혼합물일 수 있다. 세포 배양 배지는 세포의 시험관 내 성장을 유지하고/유지하거나 지지하는 데 필수적인 구성성분 약간, 일부, 또는 전부를 포함할 수 있다. 세포 배양 배지가 약간의 구성성분만을 가지고 있을 경우, 추가적인 구성성분이 별도로 첨가된다. 본 발명에 따른 세포 배양 배지의 예는 세포의 시험관 내 성장을 유지하고/유지하거나 지지하는 데 필수적인 구성성분 전부, 배지 보충물 또는 공급물을 포함하는 완전 배지이다. 바람직한 구현예에서, 세포 배양 배지는 완전 배지일 수 있다. 건조 분말 배지의 새로운 제형에 대한 필요성이 있다.

[0057] 본 발명의 세포 배양 배지는 접시, 플라스크, 생물반응기, 또는 임의의 세포 배양 시스템 또는 용기, 예컨대, 일회용 봉지에서 세포의 성장을 유지하고/유지하거나 지지할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 세포 배양 배지는 화학적으로 정의된 세포 배양 배지일 수 있다. 화학적으로 규정된 세포 배양 배지는 임의의 화학적으로 규정되지 않은 물질은 포함하지 않는 세포 배양 배지이다. 그것은 배지를 생산하는 데 사용되는 각각의 화학 물질의 화학적 조성 및 구조는 양(amount)과 정체(identity)가 공지될 수 있음을 의미한다. 화학적으로 규정된 배지는 식물, 동물, 효모, 균류 기원의 추출물 또는 가수분해물을 포함하지 않는다. 또는 혈청, 혈청 분획, 조정 배지, 소화물, 세포 추출물, 배양보조세포, 또는 배지 내의 임의의 구성성분의 화학적 정체가 불명확한 데 기여할 수 있는 구성성분을 포함하지 않는다. 때때로, 화학적으로 규정된 배지는 추적 가능한 기원의, 공지된 양의, 규정된 펩타이드 또는 규정된 단백질을 포함하는 것으로 정의될 수 있다.

[0058] 정의

[0059] 용어

[0060] 본원에 사용된 용어 "펠릿" 또는 "마이크로펠릿"은 외관, 혼합성을 개선하기 위해, 입자 크기를 증가시키기 위해, 먼지를 방지하기 위해, 더 조밀한 물질을 제조하기 위해, 배지 구성성분의 분리를 감소시키기 위해, 전반적으로 미세 배지 분말의 물리적 및 화학적 성질을 개선하기 위해, 임의의 펠릿화 공정에 의해 압축된 "세포 배양 배지 조성물"을 지칭한다. 건조 펠릿은 또한, 분말 유동성을 개선할 수 있고, 임의의 배지 용기, 예를 들어, 생물반응기, 배지 봉지, 배지 셔틀 또는 배지 혼합 장치 등의 유입구 및 배출구 포트의 막힘과 같은 바람직하지 않은 성질을 제거할 수 있다.

[0061] 본원에 사용된 용어 "분말" 또는 "건조 분말"은 전체적인 외관이 자유 유동성일 수 있는, 건조 과립 형태로 존재하는 세포 배양을 위한 배지 분말 또는 분말화된 배지 조성물을 지칭한다. 용어 "분말"은 응집된 분말을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "베이스 분말" 또는 "건조 베이스 분말"은 일반적으로 펠릿화될 수 있기 전의 출발 건조 분말 조성물을 지칭한다. 용어 "베이스 분말" 또는 "건조 베이스 분말" 또는 "건조 분말"은 상호 교환적으로 사용될 수 있고, 문맥에 따라, 펠릿화될 수 있기 전의 출발 건조 분말을 지칭할 수 있다. 또는 심지어, 그러나 본원에 사용된 "건조 분말"은 단순히 그것을 지칭한다. 달리 명시되지 않는 한, 물질이 복합되거나 응집된 용매를 완전히 함유하지 않을 수 있음을 의미하지는 않을 수 있다.

[0062] 용어 "세포 배양 배지 조성물" 또는 "분말화된 배지 조성물" 또는 "배지 분말" 또는 "건조 분말 제형" 또는 "배지 제형"은 상호 교환적으로 사용될 수 있고, 광범위하게는 예컨대, 본 발명의 배지, 배지 보충물, 배지 하위군 또는 완충액을 포함하며, 기초 배지, 완전 배지, 배지 공급물, 배지 보충물, 배지 첨가물, 농축 배지, 농축 보충물 및 공급물, 아미노산 또는 아미노산군, 짧은 펩타이드, 비타민, 완충액, 염, 미량 구성성분 등에 한정되지 않을 수 있다. 이러한 용어는 일반적으로 세포 배양 중에 첨가된 구성성분을 지칭하며, 당업자는 이러한 용어가 언제 또는 어떻게 사용되는지를 명백하게 이해할 것이다.

[0063] 용어 "성분"은 화학적 기원이든 생물학적 기원이든, 세포의 증식의 성장을 유지하거나 촉진하기 위해 세포 배양 배지에 사용될 수 있는 임의의 화합물을 지칭한다. 용어 "구성성분", "영양소" 및 "성분"은 상호 교환적으로 사용될 수 있고, 모두 이러한 화합물을 지칭한다. 세포 배양 배지에 사용되는 전형적인 성분에는 아미노산, 염, 금속, 당, 탄수화물, 지질, 핵산, 호르몬, 비타민, 지방산, 단백질 등이 포함된다. 생체 외에서 세포의 배양을 촉진하거나 유지하는 다른 성분은 특별한 필요에 따라 당업자에 의해 선택될 수 있다.

[0064] 표현 "세포 배양 배지", "배양 배지" 및 "배양 제형"은 세포의 배양 및/또는 성장을 지지하는 영양소 용액을 지칭한다. 이들 표현은 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 세포 배양 배지는 기초 배지(세포 성장을 지지하기 위해 추가적인 성분들을 필요로 하는 일반적인 배지) 또는 세포 성장을 지지하기 위해 모든 구성성분 또는 거의 모든 구성성분이 있는 완전 배지일 수 있다. 세포 배양 배지는 무혈청, 무단백질일 수 있고(두 가지 중 하나 또는 둘 다일 수 있음), 효율적이고 활발한 세포 성능을 위해, 성장 인자, 첨가물, 공급물, 보충물 같은 추가적인 구성성분들을 필요로 할 수 있거나 필요로 하지 않을 수 있다.

[0065] 용어 "조합"은 세포 배양 배지 제형에서 성분들의 혼합 또는 혼화를 지칭한다. 조합은 액체 또는 분말 형태로 일어날 수 있거나, 하나 이상의 분말 및 하나 이상의 액체와 조합이 일어날 수 있다. 또 다른 예에서, 둘 이상의 분말화된 구성성분들이 혼합될 수 있고, 그런 다음 응집되어 배지, 배지 보충물, 배지 하위군 또는 완충액과 같은 복잡한 혼합물을 생산할 수 있다.

[0066] 용어 "접촉"은 세포가 배양될 배지가 있는 배양 베슬 내로 배양될 세포를 놓는 것을 지칭한다. 용어 "접촉"은 그 중에서도, 세포를 배지와 혼합하는 것, 세포에 배지를 관류하는 것, 배양 베슬 내의 세포 위로 배지를 피펫팅하는 것, 그리고 배양 배지에 세포를 잠기게 하는 것을 포함한다. "유가식"은 시약의 농도가 시약의 개별적인 첨가분을 더한 것이 되도록 본 발명의 조성물을 세포에 공급하는 방법을 정의한다.

[0067] 공급물 또는 보충물은 표준적인 배양에서 세포에 첨가될 때 세포의 유지, 또는 확장, 또는 성장, 또는 생존능력에 유익할 수 있거나, 세포 성능에 영향을 미치거나, 배양 수명을 증가시키거나, 생성물 발현이 계속되거나 최종 생성물 역가의 유의미한 증가를 초래하는 유사고정상(pseudo-stationary phase)에서 세포를 유지시킨다. 공급물 또는 보충물은 본 개시에서 상호 교환적으로 사용될 수 있고, 배양물 또는 세포 배양 시스템에서 세포의 성장 또는 성능을 균형 재조정 또는 보충 또는 조절하는 데 필요한, 1종 이상의 아미노산, 당, 비타민, 완충액, 때때로, 펩타이드, 가수분해물, 분획, 성장 인자, 호르몬 등을 포함하는 배양 구성성분의 분말화 및 (응집화된 제형을 포함하는) 액체 제형을 지칭한다. 공급물 또는 보충물은 세포를 배양할 수 있는 세포 배양 배지에 첨가된다는 점에서 세포 배양 배지와 구별될 수 있다. 당업자에 의해 이해될 바와 같이, 때때로 공급물/보충물은 주로 배양물 또는 세포 배양 시스템에서 세포의 성장 또는 성능을 균형 재조정 또는 보충 또는 조절하는 데 필요한 아미노산, 당, 비타민, 완충액 등을 포함할 수 있다. 공급물 또는 보충물은 농축될 수 있거나 농축되지 않을 수 있고, 또는 일부 구성성분에 대해서만 부분적으로 농축될 수 있다. 용어 "공급물" 또는 "보충물"은 표준적인 세포 배양 배지에 첨가될 때, 세포 성장, 배양 수명 및 생성물 발현을 증진시킨다. 보충물이 항체 생산에 특히 효과적일 수 있는 예가 제공된다. 대안적으로, 공급물 또는 보충물은 하이브리도마 세포주, 백신 생산을 위한 바이러스를 배양하는 세포주 등에 사용될 수 있다.

[0068] 용어 "세포 성능"은 시험관 내에서 세포를 배양하고, 세포 생존능력, 세포 수, 단백질 발현, DNA 평가치, 단백질 역가 측정, 재조합 폴리펩타이드 또는 단백질 생산, 폴리펩타이드 또는 단백질 생산 분비, 바이러스 또는 바이러스 입자 생산, 분비된 단백질, 세포가 관심 있는 단백질을 생산/분비하는지, 세포 마커의 검출, 세포가 현탁액 중에 있는지 부착된 세포인지 등등 중 하나 이상의 측정을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 당업자에게 공지된 임의의 표준적인 매개변수로 평가하는 것을 의미한다. 일반적으로, 세포 성능은 제형의 첨가 또는 변화(예컨대, 대조군(액체) 제형에 대한 펠릿; 공급물 존재 시 또는 공급물 부재 시의 배양 등)로 인해 최종 생성물이 증가될 수 있을 때로 평가된다.

[0069] 용매는 물(증류수 및/또는 탈이온수, 세포 배양용 깁코 주사용수(Gibco® Water for Injection (WFI) for Cell Culture)는 고품질이며, 미국 약전(USP)과 유럽 약전(EP)에 부합하는 세포 배양 등급수일 수 있다), 완충액, 산 또는 염기(pH 조절제)를 의미하며, 이들 중 임의의 것은 1종 이상의 추가적인 구성성분(예컨대, 염, 다당류, 이온, 세제, 안정화제 등)를 함유할 수 있다.

[0070] 펠릿의 입자 크기는 레이저 광 산란 또는 상대 메쉬 크기 보정 스크린에 대한 기계적인 분리에 의해 정량화될 수 있다. 일반적으로 입자 크기는 표준화된 미국 측정법에 따라 미크론, 밀리미터 또는 메쉬 크기로 표현될 수 있다. 비교 변환표를 아래에 제공하였다. 본 개시에 기술된 방법에 의해 수득된 펠릿은 크기가 다양할 수 있다. 일부 예에서, 펠릿은 크기가 약 0.05 ㎜ 내지 7 ㎜이다. 특정 양태에서, 본 발명은 크기가 약 0.05 ㎜ 내지 약 0.5㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 1 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 2 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 3 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 4 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 5 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 6 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 0.1 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 0.2 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 0.3 ㎜, 또는 약 0.05 ㎜ 내지 약 0.4 ㎜, 또는 약 0.1㎜ 내지 약 1 ㎜, 또는 약 0.1㎜ 내지 약 2 ㎜, 또는 약 0.1㎜ 내지 약 3 ㎜, 또는 약 0.1㎜ 내지 약 4 ㎜, 또는 약 0.1㎜ 내지 약 5 ㎜, 또는 약 0.1㎜ 내지 약 6 ㎜, 또는 약 0.5 ㎜ 내지 약 1

mm, 또는 약 0.5 mm 내지 약 2 mm, 또는 약 0.5mm 내지 약 3 mm, 또는 약 0.5mm 내지 약 4 mm, 또는 약 0.5 mm 내지 약 5 mm, 또는 약 0.5mm 내지 약 6 mm, 또는 약 0.5 mm 내지 약 7 mm, 또는 약 1 mm 내지 약 2 mm, 또는 약 1 mm 내지 약 3 mm, 또는 약 1 mm 내지 약 4 mm, 또는 약 1 mm 내지 약 5 mm, 또는 약 1 mm 내지 약 6 mm, 또는 약 1 mm 내지 약 7 mm인 펠릿을 제공한다. 특정 구현예에서, 본 발명은 대개, 펠릿 크기가 약 0.1 mm 초과, 또는 약 0.2 mm 초과, 또는 약 0.3 mm 초과, 또는 약 0.4mm 초과, 또는 약 0.5 mm 초과, 또는 약 0.6 mm 초과, 또는 약 0.7 mm 초과, 또는 약 0.8 mm 초과, 또는 약 0.9 mm 초과, 또는 약 1 mm 초과, 또는 약 2 mm 초과일 수 있는, 크기를 갖는 펠릿 제제를 제공한다.

표 1

[0071] **미국 입자 크기**

미크론	미국 메쉬	인치
2000	10	0.0787
1680	12	0.0661
1410	14	0.0555
1190	16	0.0469
1000	18	0.0394
841	20	0.0331
707	25	0.028
595	30	0.0232
500	35	0.0197
420	40	0.0165
354	45	0.0138
297	50	0.0117
250	60	0.0098
210	70	0.0083
177	80	0.007
149	100	0.0059
125	120	0.0049
105	140	0.0041
88	170	0.0035
74	200	0.0029
63	230	0.0024
53	270	0.0021
44	325	0.0017
37	400	0.0015

[0072] 펠릿화될 배지, 배지 공급물/보충물 및 배지 하위군 뿐만 아니라, 여러 가지 기타 공통적으로 사용되는 동물 세포 배양 배지의 제형은 당해 분야에 잘 알려져 있고, 예를 들어 GIBCO/BRL 카탈로그 및 참고 가이드(인비트로젠 코포레이션(Invitrogen Corporation), 미국 캘리포니아 주 칼스배드) 및 시그마 동물 세포 카탈로그(시그마(Sigma); 미국 미주리 주 세인트루이스)에서 찾아볼 수 있다.

[0073] 특히, 세포 배양에 사용하기 위한, 응집화된 배지 및 이의 제조는 잘 기술되어 있다. 유동층 기술은 출발물질로부터 변화된 특성(구체적으로, 예를 들어, 용해도)을 갖는 응집화된 분말을 생산한다. 이 기술의 일반적인 적용에서, 분말을 기체가 상향 이동하는 컬럼에 현탁시키고, 이와 동시에, 조절되고 정의된 양의 액체를 분말 흐름으로 주입하여 촉촉해진 상태의 분말을 생산할 수 있다. 그런 다음, 중간 정도의 열을 이용하여 물질을 건조시켜, 응집화된 분말을 생성할 수 있다. 응집화된 배지/공급물, 영양소 분말, 보충물 등의 제조, 이의 성질, 자동 pH 및 자동 삼투압의 응집화된 배지/공급물, 영양소 분말, 보충물 등의 제조 방법은 이전의 출원/특허, 예를 들어, 미국 출원 제09/023,790호; 제11/669,827호; 제13/984,263호; PCT/US 2012/024194; EP 출원 10175914.0; EP 공개공보 2778221에 상세하게 기술된 바 있고, 이의 개시 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 포함된다. 응집화된 배지의 부피 밀도, 안식각, 입자 크기의 분석 방법은 예를 들어, 전체가 참조로서 본원에 포함된, 미국 출원 제11/669,827호에 잘 기술되어 있다.

[0074] 펠릿화될 배지/공급물은 액체 배지의 pH를 조정할 필요 없이 세포 배양 또는 성장의 뒷받침에 최적일 수 있는 pH를 가질 수 있다. 따라서, 본원에서 "자동적으로 pH를 조절하는 배지"라 정의되는 이러한 유형의 배지는 재구

성한 후 배지에 완충액(들)을 첨가하고 완충액(들)의 용해 후에 배지의 pH를 조절하는 시간 소모적이고 오류가 발생하기 쉬운 단계를 필요없게 하며, 전체가 본원에 참조로서 포함되는 미국 출원 제11/669,827호에 잘 기술된 바 있다. 예를 들어, 이러한 방법에 따라 제조된 포유동물 세포 배양 배지는 재구성 시, 약 7.1 내지 약 7.5, 더욱 바람직하게는 약 7.1 내지 약 7.4, 가장 바람직하게는 약 7.2 내지 약 7.4 또는 약 7.2 내지 약 7.3의 pH를 나타낸다. 자동 pH 배지는 배지 그 자체 내에 존재하는 완충 시스템, 예를 들어, 반대되는 형태의 짝산-염기 아미노산을 조절하여 제공될 수 있다. 배지 내에서 이러한 완충액의 pH 반대 형태를 조절함으로써, 본 발명은 자동 pH 배지의 생산을 제공하여, 배지를 재구성하기 전 또는 재구성할 때 및 사용하기 전에 적절한 pH 수준을 달성하기 위해 추가적인 완충액 또는 pH 조절제를 첨가할 필요가 없다. 예를 들어, HEPES 나트륨(pH 상승) 및 HEPES-HCl(pH 저하)은 pH 반대 구성성분의 예이다. 일염기성, 이염기성 및/또는 삼염기성 완충 염은 pH 반대 구성성분의 다른 예이다. 전형적으로, 일염기성, 이염기성 및 삼염기성 인산염이 사용되지만, 다른 염도 적절한 비율로 사용될 수 있다.

[0075] "미세현탁액": 세포 배양 배지 구성성분(들) 또는 베이스 분말은 펠릿화를 위해 사용 전에 원하는 농도로 용매 내로 용해, 현탁, 콜로이드화 또는 그렇지 않으면 주입될 수 있다(실시예 1 참조).

[0076] 본원에 기술된 배지 보충물이 배양의 개시 시에 배지에 포함될 수 있거나 유가식으로 또는 연속적인 방식으로 첨가될 수 있도록 본원에 기술된 배지 보충물을 사용하는 세포 성장 방법. 생성된 배지는 회분식, 유가식, 화학조절식(chemostat) 및 관류식을 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 배양 방법에서, 그리고 고정식 플라스크, 교반 플라스크, 스피너 플라스크, 교반 발효조, 에어리프트형 발효조, (중공 섬유, 평판 막 플레이트, 외부 루프 관류를 포함하는) 막 반응기, 고체 지지체 상에 보유되었거나 미세다공성 비드에서와 같이 고정화/포획된 세포가 있는 반응기, 및 원하는 세포주의 성장 또는 유지에 적절한 임의의 기타 구성을 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 세포 배양 하드웨어와 함께 이용될 수 있다.

[0077] 펠릿으로부터 재구성된 액체 배지에서 성장시킬 수 있는 세포주는 진핵생물, 원핵생물, 동물, 식물, 진균류, 조류, 곤충, 또는 효모 세포 또는 바이러스 또는 바이러스 입자의 배양에 사용되는 세포일 수 있다. 예시적인 세포는 케라틴세포, 내피세포, 간세포, 멜라닌 세포, CHO 세포, BHK 세포, VERO, 293 세포, PerC6, 하이브리도마, 조혈세포, 배아세포, 신경세포 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0078] 예를 들어, 혈청 또는 혈청 분획, 성장 인자(예컨대, EGF, aFGF, bFGF, KGF, HGF, IGF-1, IGF-2, NGF, 인슐린 등), 인터루킨, 콜로니 자극 인자, 인터페론, 부착 인자, 세포 외 기질 구성성분(예컨대, 콜라겐, 라미닌, 프로테오글리칸, 글리코사미노글리칸, 피브로넥틴, 비트로넥틴 등), 지질(예컨대, 인지질, 콜레스테롤, 소 콜레스테롤 농축물, 지방산, 스핑고지질 등), 펩타이드(예를 들어, 디펩타이드, 트리펩타이드, 테트라펩타이드), 정제된 또는 재조합 발현된 단백질(예컨대, 재조합 알부민, 재조합 인슐린), 가수분해물(예컨대, 쌀, 효모, 옥수수, 감자와 같은 식물) 등, 본 발명의 배양 배지에 낮은 양으로 첨가되는 추가적인 구성성분은 필요에 따라 첨가될 수 있거나 첨가되지 않을 수 있다.

[0079] **실시예**

[0080] 본 발명의 신규한 특징은 첨부된 청구범위에 상세하게 기재되어 있다. 본 발명의 특징 및 장점에 대한 더 나은 이해는 본 발명의 원리가 이용되는 다음의 실시예를 참조하여 얻어질 것이다. 당업자는 본원에 기술된 실시예가 본 발명의 교시의 양태일 뿐이며 본 발명의 교시의 범위를 어떤 방식으로든 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다는 점을 이해할 것이다.

[0081] **세포 배양 배지, 공급물, 보충물 또는 완충액의 펠릿 제조**

[0082] 세포 배양 배지, 공급물, 완충액 또는 보충물의 건조 분말로부터 펠릿을 제조하는 예시적인 프로토콜이 본원에 기술된다. 이러한 절차에 사용된 원리 및 본원에 언급된 장치는 임의의 펠릿 조성물을 수득하기 위하여 당업자에 의해 광범위하게 적용될 수 있다.

[0083] **실시예 1: 미세현탁액으로부터 펠릿을 제조하는 수동적 방법**

[0084] 압출 공정을 이용하여 공급물을 펠릿화하는 수동적인 방법이 본원에 제시된다.

[0085] 1) 본 실시예에서는, (도 1 및 도 2에서 공급물 1이라고도 지칭되는) 카탈로그 제품 에피션트 피드(Efficient Feed) B AGT가 출발 베이스 분쇄 분말이었다. 에피션트 피드 B AGT(여기서는 인산나트륨 불포함 제품을 사용하였음) 30 g을 칭량하여 막자사발에 넣는다. 인산염은 제형에 포함될 수 있다.

[0086] 2) 12.5 ml WFI(물)을 첨가한다.

[0087] 3) 녹색 플라스틱의 유연한 스파튤러를 이용하여 분말이 습윤되고 물을 "흡수"하여 페이스트를 형성하기 시작할 때까지 혼합한다. 페이스트를 균일하게 될 때까지 신속하게 완전하게 혼합한다.

[0088] 4) 점성이 있으나 유동성이 있는 혼합물을 만들기 위해 필요한 경우, 미세현탁액에 WFI를 첨가하고 완전히 혼합한다. 필요한 경우 막자사발과 막자로 습식 분쇄한다. 습식 분쇄는 미세현탁액을 더욱 균일하게 만들고, 격렬한 혼합으로 인한 기포를 감소시킨다.

[0089] 5) 용기에 모은다; 스파튤러를 이용하여 미세현탁액의 마지막 양을 용기에 닦아넣는다(부피는 약 29~30 ml이 될 것임).

[0090] 6) 가위로 끝을 약 1/64인치 절단하되, 완전히 눌렸을 때 절단부가 플런저 끝의 위치까지 이르지 않게 확실히 하여 준비한 0.5 ml 시린지와 함께 에펜도르프 리피터-플러스(Eppendorf Repeater-Plus)를 준비한다.

[0091] 7) 위치 0.5(5 ㎕)로 설정한 0.5 ml 시린지가 달린 에펜도르프 리피터-플러스를 이용하여, 미세현탁액을 서서히 시린지 내로 끌어올린다. 공기가 시린지 내로 흡인되면 점성의 미세현탁액에 머물러 전달되는 부피를 바꿀 것이므로 공기가 시린지 내로 흡인되지 않도록 한다.

[0092] 8) 에펜도르프 레버를 여러 차례 눌러 시린지를 채운다. 미세현탁액이 시린지 끝에서 흘러나온 후, 시린지 끝을 닦아낸다. 그런 다음, 고체 소수성 표면(예컨대, 파라필름 또는 왁스지)에 가깝게 주사기 끝을 수직으로 쥐고, 레버를 눌러 액적을 조심스럽게 표면 위에 위치시킨다. 즉시 들어올리고, 레버를 다시 누르고 반복한다. 매우 신속한 방식으로 반복 실험을 수행할 수 있다.

[0093] 9) 흄 후드 아래에 18 내지 24시간을 둔다. 도 1a, 도 1b, 도 1c 및 범례 참조.

[0094] 10) 펠릿을 수집하고, 칭량통에 놓고 $CaSO_4$ 위의 진공 건조 챔버에 넣는다.

[0095] 11) 펠릿을 48~72시간 건조시킨다. 수득된 펠릿을 때때로 상호 교환적으로 사용되는 펠릿 공급물 1, 또는 공급물 1, 또는 공급물 1 펠릿으로 지칭한다. 에피션트 피드 B 보충물 3.0 ml로부터 0.156 g 비드가 생산되었다. 펠릿의 사진은 도 1a, 도 1b, 및 도 1c 참조. 비드의 크기는 균일하게 보였고, 밀리미터 범위에서 측정되었다. 비드를 실시예 4에 기술된 바와 같이 생존능력, 성장 및 성능(단백질 역가) 분석에 이용하였다.

[0096] **실시예 2: 수동으로 제조한 공급물 1 펠릿의 생물학적 평가**

[0097] 공급물 1 비드를 제조하고(실시예 1 참조) 세포 생존능력, 성장 및 성능(단백질 역가) 분석에 이용하였다. 공급물 1 펠릿/비드 결과를 액체 보충물(양성 대조군; 즉 액체에 재구성하고 사용 전에 멸균 여과한 #A2530)과 비교하였다. 분석을 위해, DG44-IgG 세포주를 CD- OptiCHO 배지(써모 피셔(Thermo Fisher) 카탈로그 # 12681)에 성장시켰다. 배양물을 펠릿 제형(때때로 비드라 지칭됨) 또는 액체(양성 대조군)로서 에피션트 피드 B(EFB)(써모 피셔 카탈로그 #A2530) 또는 공급물 1로 (지시된 바와 같이) 보충하였거나 보충하지 않았다. 세포를 3일 동안 3회 계대배양하였고, 각각의 계대배양에서 세포를 3 x 10 e^5개 생존세포/ml로 분할하였다. 네 번째 계대배양에서, 매일의 세포 수를 측정하였다. 각각의 조건을 3 회 반복하여 수행하였다(즉, 곡선 1, 2, 3은 각 유형의 보충물에 대해 3 회 반복이다). 도 2a에서, 수동으로 제조한 펠릿(시험 샘플)의 생존능력을 곡선으로 비드 1, 2, 3으로 도시하였다. 액체(양성 대조군)의 생존능력을 액체 1, 2, 3으로 도시하였다. 비 보충(음성 대조군)의 생존능력은 음성 대조군 1, 2, 3으로 도시하였다. EFB 비드/팰릿 농도는 EFB 액체 제형과 비교하여 등몰 농도였다. 도 2a에서 보는 바와 같이, 비드/펠릿 EFB(1, 2, 3)로 보충된 세포 배양물은 액체 EFB(1, 2, 3)로 보충된 세포 배양물과 비교하여 특히 8일부터 16일까지 더 나은 % 생존능력을 보여주었다.

[0098] 세포 성장 분석에서 공급물 1 펠릿/비드를 액체 보충물(양성 대조군)과 비교하였다 - 도 2b. 여기에서도 CD-OptiCHO 배지(써모 피셔 카탈로그 # 12681) 중의 DG44-IgG 세포주를 사용하였다. 2a에 대해 위에서 기술한 바와 같이 세포를 계대배양하고 분할하였다. 네 번째 계대배양에서, 매일의 세포 수를 측정하였다. 각각의 조건을 3회 반복하여 수행하였다(즉, 곡선 1, 2, 3은 각 유형의 보충물에 대한 3 회 반복이다). 도 2b에서, 수동 펠릿(시험 샘플)의 성장을 곡선으로 비드 1, 2, 3으로 도시하였다. 액체(양성 대조군)의 성장 곡선을 액체 1, 2, 3으로 도시하였다. 비 보충(음성 대조군)의 성장 곡선은 음성 대조군 1, 2, 3으로 도시하였다. EFB 비드/팰릿 농도는 EFB 액체 제형과 비교하여 등몰 농도였다. 도 2b에서 보는 바와 같이, 비드/펠릿(1, 2, 3)로 보충된 세포 배양물은 액체(1, 2, 3)로 보충된 세포 배양물과 비교하여 15일의 기간에 걸쳐 비슷한 세포 성장을 보여주었다.

[0099] 세포 성능 또는 단백질 역가 분석(항체 생산을 측정함)에서 공급물 1 펠릿/비드를 액체 보충물(양성 대조군)과

비교하였다 - 도 2c. 여기에서도 CD- OptiCHO 배지(써모 피셔 카탈로그 # 12681) 중의 DG44-IgG 세포주를 사용하였다. 2a에 대해 위에서 기술한 바와 같이 세포를 계대배양하고 분할하였다. 네 번째 계대배양에서, 매일의 세포 수를 측정하고 IgG 생산을 모니터하였다. 각각의 조건을 3 회 반복하여 수행하였다(즉, 곡선 1, 2, 3은 각 유형의 보충물에 대한 3 회 반복이다). 도 2c에서 보는 바와 같이, 수동 펠릿의 단백질 역가(세포 성능)를 곡선으로 비드 1, 2, 3으로 도시하였다. 액체(양성 대조군)의 단백질 역가를 액체 1, 2, 3으로 도시하였다. 비 보충(음성 대조군)의 단백질 역가를 음성 대조군 1, 2, 3으로 도시하였다. 도 2c에서 보는 바와 같이, 비드/펠릿 1, 2, 3으로 보충된 세포 배양물은, 배양물 중에서 15일의 기간에 걸쳐 양성 액체 대조군 EFB(1, 2, 3)으로 약 425 μg/ml으로 생산된 IgG보다 약간 더 적은 IgG 생산량 약 325 μg/ml(생산량)을 보여주었다. 비 보충 음성 대조군은 EFB 비드(시험)로 보충된 세포 배양물과 비교할 때 훨씬 더 적은 IgG인 약 100 μg/ml을 보여주었다.

[0100] **실시예 3: 예시적인 자동 유동층 펠릿화 공정**

[0101] 펠릿 제조를 위한 예시적인 자동화된 공정을 본원에 제시한다. 여기서, 로터 기술이 유동층 장치/공정 챔버(예컨대, 미국 뉴저지 주 글래트 테크놀로지스)에서 이용되었다. 유동층 부착물이 있는 임의의 스피닝 공정 챔버가 세포 배양 배지 펠릿 제조를 위해 개조될 수 있다. 출발 건조 분말(세포 배양 배지, 공급물 등)을 스피닝에 의해 움직이는 유동층 장치의 로터 디스크에 충전하고, 공기를 유동층 장치 내로 유입시켰다. 이 경우, 액체(예컨대, 미세 분무, 안개, 증기, 이슬, 응축체, 또는 미세 액적)를 조심스럽게 제어된 속도로, 때때로 간헐적으로, 제어된 온도에서 도입하여, 건조 분말의 펠릿 형성이 일어났다. 전형적으로, 기타 자동 장치도 펠릿 제조에 이용될 수 있다. 여기에는 분쇄 장치, 초미 분쇄기(micronizer), 유동층 프로세서, 스피닝 디스크 로터, 용매 분무기 등이 포함되나 이에 한정되지 않는다. 배지의 펠릿화에 대한 예시적인 작업 흐름은 도 8 참조. 특정 구현예에서, 펠릿을 다음과 같이 형성하였다:

[0102] a. (과립화되지 않은) 분쇄된 건조 베이스 분말로 시작한다. 선택적으로, 베이스 분말은 적합한 용매로 사전 습윤될 수 있다. 건조 분말은 결합제 및/또는 부형제를 함유할 수 있거나 함유하지 않을 수 있다. 또한, 분무될 용매는 결합제 및/또는 부형제를 함유할 수 있거나 함유하지 않을 수 있다.

[0103] b. 결합제 및/또는 부형제가 건조 베이스 분말에 전혀 존재하지 않을 경우, 또는 대안적으로, (베이스 분말에 존재하는 것보다) 더 많은 결합제 및/또는 부형제가 펠릿 형성에 필요한 경우, 분무될 용매 용액은 적당한 양의 및/또는 부형제를 함유할 것이다.

[0104] c. 세포 배양 공급물 펠릿 수득을 위한 예시적인 공정 매개변수를 본원에 기술한다. 이러한 매개변수는 시험한 제형에 대해 선택되었다.

[0105] i. 분무 속도: 가장 바람직하게는 5 gm/분(분무 속도 범위: 제형에 따라 약 1 gm/분 내지 약 30 gm/분)

[0106] ii. 유입구 온도 - 25℃(20~25℃)

[0107] iii. 생성물 온도 - (20~30℃)(배지/공급물이 온도에 민감한 구성성분을 함유하기 때문임)

[0108] iv. 공기 부피 (30~40 m^3/시간)

[0109] v. 미립화(atomization) 공기압 - 2 바

[0110] vi. 유동층 프로세서에서 펠릿 건조 온도 (50~60℃)(배지가 온도에 민감한 구성성분을 함유하기 때문임).

[0111] **실시예 4: 자동화된 펠릿화 공정에 사용되는 예시적인 배지 제제**

[0112] 다음의 배지 조성물을 자동화 시스템에서 펠릿을 제조하는 데 이용하였다. 이들 조성물은 단지 예로서 작용하며, 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0113] 써모 피셔 카탈로그 제품인 PL002616P1이 펠릿 공급물 2, 펠릿 공급물 3, 펠릿 공급물 4 및 펠릿 공급물 5를 제조하기 위한 출발 건조 베이스 분말이었다. 아래에 기술된 예시적인 공급물을 펠릿화를 위해 시험하였다:

아미노산	25~35%
덱스트로스	40~65%
비타민	1~5%
염	3~5%
미량 구성성분	0.01~0.05%
전체	100%

[0114]

[0115] 펠릿은 결합제 및/또는 부형제를 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있고, 결합제 및/또는 부형제는 베이스 분쇄 분말에 혼합될 수 있고/있거나 분말과 함께 공정 챔버 내로 분무될 수 있다. 아래에 상술된 바와 같이, 펠릿: 펠릿 공급물 2, 펠릿 공급물 3, 펠릿 공급물 4 및 펠릿 공급물 5을 수득하기 위해 다양한 조건을 이용하였다. 이렇게 하여 수득된 펠릿을 세 가지 유형의 분석법으로 평가하였다: 1) 물리적 특성(현미경 사진 및 입자 크기 분포 참조: 예를 들어, 도 3a 및 3b, 도 4a 및 도 4b, 도 5a 및 도 5b, 도 6a 및 도 6b 참조); 2) 펠릿화 전과 펠릿화 후의 분석적 함량. 공급물 펠릿을 화학적 조성에 대해 HPLC로 시험하고, 분쇄 분말 출발물질과 비교하였다. 아미노산 함량, 수용성 비타민 함량, 소수성 아미노산 함량 등과 같은 배지 구성성분에 대한 HPLC 분석(데이터 미도시) 결과는 공급물 배지 중의 여러 성분들이 펠릿화하는 동안 진행 중인 공정과 건조 단계 후에 허용 가능한 범위 내에서 남아 있음을 나타냈다. 공급물 2, 3, 4 및 5 각각에 대한 펠릿화 전과 펠릿화 후의 분석적 데이터가 비슷하였다; 3) 세포 배양물에서의 생물학적 활성, 성능(도 3 내지 도 7 참조; 각각의 공급물 펠릿에 대해, 해당될 경우 세부 항목 c 참조).

[0116] 배지 또는 공급물 펠릿은 세포 배양에서 다양하게 적용될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 0 내지 약 500 미크론 미만의 펠릿 입자 크기는 세포 배양용 수성 배지/공급물 현탁액의 제조에 이용될 수 있다. 다른 구현예에서, 입자 크기가 약 800 내지 약 500 미크론 범위인 펠릿은 세포 배양용 다중 입자성 배지/공급물 정제의 제조에 이용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 입자 크기가 약 500 내지 약 2000 미크론 범위인 펠릿은 세포 배양용 배지/공급물 캡슐의 제조에 이용될 수 있다. 이러한 펠릿화된 공급물의 제조를 위한 예시적인 제형을 아래에 제안한다:

아미노산	20.710%
덱스트로스	28.610%
비타민	0.010%
염	36.480%
유기물	13.150%
미량 구성성분	0.001%
전체	98.961%

[0117]

[0118] **실시예 5: 분말의 물리적 특성을 측정하는 예시적인 방법**

[0119] **유동 분석 절차에 대한 예시적인 방법**

[0120] 본 절차는 유동 분석에 이용될 수 있고, 결정될 수 있는 측정치는 FRI(Flow Rate Index, 유동 속도 지수); FDI(Feed Density Index, 공급물 밀도 지수); BDI(Bin Density Index, 빈 밀도 지수); 및 SPI(Spring Density Index, 스프링 밀도 지수)를 포함한다.

[0121] 1. 샘플 컵의 바닥에 지지 인서트 상에 고정시킨 적합한 메쉬 스크린을 위치시켜 인디사이저(indicizer, 임의의 유동 속도 인디사이저 시스템, 예를 들어, 미국 캘리포니아 주 샌루이스 오비스포 소재의 요한슨 이노베이션스 주식회사(Johanson Innovations, Inc)의 유동 속도 인디사이저 시스템) 샘플 용기를 조립한다.

[0122] 2. 적당한 저울에서 인디사이저 샘플 용기의 무게를 단다.

[0123] 3. 적합한 용기에 대략 100 그램의 샘플을 넣고, 스푼 또는 거품기로 샘플을 혼합하여 공기를 함유시킨다.

[0124] 4. 스파튤라를 이용하여 샘플 일부분을 제거하고, 샘플을 조립된 인디사이저 샘플 용기에 조심스럽게 넣어, 샘플이 압축되는 것을 막는다.

[0125] 5. 펠릿 샘플이 인디사이저 샘플 용기 위로 넘칠 때까지 샘플 첨가를 반복한다.

[0126] 6. 초과분을 떨어내어 펠릿 샘플을 인디사이저 샘플 용기의 상단까지 살살 고르게 한다.

[0127] 7. 이미 용기 중량을 공제한 저울을 이용하여 인디사이저 샘플 용기의 펠릿 샘플의 샘플 중량을 재고 기록한다.

[0128] 8. 샘플 용기를 인디사이저 위에 놓고, 공기 배관을 샘플 용기에 부착한다.

[0129] 9. 빈 각도(bin angle), 배출구 직경 및 빈 직경에 대해 인디사이저에 처리 매개변수를 설정한다. 시험이 완료된 후, 인디사이저 출력 내용을 기록한다.

[0130] **안식각 측정을 위한 예시적인 절차**

[0131] 1. 대략 50 그램의 샘플을 적합한 용기에 넣고, 스푼 또는 거품기로 샘플을 혼합하여 공기를 함유시킨다.

[0132] 2. 지지 플랫폼 위에 직사각형의 분말 층 박스를 놓는다.

[0133] 3. 플랫폼의 바닥에서 확인하여 0(영)도 각도로 지지 플랫폼이 설정되었는지 확인한다.

[0134] 4. 물질이 박스의 측벽 중 적어도 하나에 닿아 원뿔을 형성하기 시작할 때까지 직사각형의 분말 층 박스 안으로 깔때기를 통해 물질을 붓는다.

[0135] 5. 가능한 한 부드럽게 이행하도록 하면서 지지 나사를 이용하여 서서히 그리고 끊임없이 샘플 층 박스와 플랫폼을 들어올린다.

[0136] 6. 물질의 피크가 이동하자마자, 지지 나사의 회전을 멈추고, 장치의 각도기를 이용하여 안식각을 측정하고, 지지 플랫폼의 맨 아랫 부분에서 각도기의 각을 판독한다.

[0137] **실시예 6: 로터 기술을 이용한 유동층 자동 펠릿화 - 펠릿 공급물 2의 생산**

[0138] 공급물 2 펠릿/비드를 아래에 기술된 바와 같이 자동화된 공정으로 제조하였다:

[0139] 1. (과립화되지 않은) 분쇄된 건조 베이스 분말인 써모 피셔 카탈로그 # PL002616P1- 950.0 g(순중량)으로 시작하였다. 선택적으로, 베이스 분말은 일부 구현예에서 사전 습윤될 수 있다. 여기서는 하지 않았다.

[0140] 2. 로터 디스크가 구비된 유동층 프로세서 내로 분말을 적재하였다.

[0141] 3. 유동층 프로세서를 (개발 작업 중에 확인된) 사전 설정된 조건으로 켜서 분말로부터 직접적인 펠릿화를 개시한다. 매개변수(예컨대, 공기 부피, 미립자화 공기 압력, 유동 속도, 유입구 온도, 배출구 온도, 생성물 온도, 용매 분무 속도, 로터 디스크 속도, 디스크 갭, 디스크 형상 등)를 조절한다.

[0142] 4. 공정이 완료되는 시기를 결정하기 위해 공정 중의 샘플 측정(예컨대, 현미경 검사 도 3a; 기타 물리적 성질 = 표 2; 입자 크기 도 3b 및 아래 표 3)을 수행하여 펠릿 형성을 모니터한다.

[0143] 5. 유동층 프로세서로부터 젖은 펠릿(총 중량 805.0 g)을 배출시킨다.

[0144] 6. 젖은 펠릿을 건조시키고, 물리적 성질 분석을 수행한다(표 2).

[0145] 7. 입자 크기 측정(표 3)을 위해 대략 50.0 g의 펠릿을 제거한다.

[0146] **자동화 방법 펠릿 공급물 2의 물리적 특징 평가**

표 2

[0147]

펠릿 공급물 2: 물리적 특징				
물질	중량(g)	건조 시 손실(%)	벌크 밀도(g/cc)	안식각
분쇄된 분말	950	-	0.719	37.8
젖은 펠릿	805	-	-	-
건조 펠릿	800.4	2.07	0.53	34.7

[0148] 50° 미만의 안식각(34.7)은 펠릿 공급물 2가 양호한 유동성을 가짐을 나타낸다. 벌크 밀도는 필요한 경우 입자가 압축될 수 있음을 나타낸다.

표 3

[0149]

펠릿 공급물 2: 입자 크기 분석			
메쉬 #	유지된 크기(미크론)	유지된 양(g)	유지된 퍼센트
20	840	8.9	17.8
30	600	21.4	42.8
40	420	13.6	27.2
60	250	3.6	7.2
80	177	0.7	1.4
100	150	0.9	1.8
pan	<150	0.9	1.8
전체	-	50	-

[0150] 공급물 2에 대한 입자 크기 분석은 입자의 약 95%가 60 메쉬보다 크고, 입자의 약 87.8%가 40 메쉬보다 크거나, 약 87.8% > 0.4 mm임을 나타낸다.

[0151] 그런 다음, 공급물 2 비드를 세포 생존능력, 성장 및 성능(단백질 역가) 분석에서 평가하였다. 공급물 2 펠릿/비드 결과를, 액체에 재구성하고 사용 전에 멸균 여과한 써모 피셔 카탈로그 # PL002616P1인, 액체 보충물(양성 대조군)과 비교하였다. 분석을 위해, DG44-IgG 세포주를 CD-CHO 배지(써모 피셔 카탈로그 # 12490)에서 성장시켰다. 배양물을 (때때로 비드라 지칭되는) 펠릿 제형 또는 액체(양성 대조군)의 써모 피셔 카탈로그 # PL002616P1과 (표시된 바와 같이) 보충하였거나 보충하지 않았다. 세포는 3일 동안 3회 계대배양하였고, 각 계대배양에서, 세포를 3 x 10 e^{5}개 생존 세포/ml로 분할하였다. 네 번째 계대배양에서, 매일 세포 수를 측정하였다.

[0152] 세포 성장 분석에서 자동화된 공급물 2 펠릿/비드를 액체 보충물(양성 대조군)과 비교하였다 - 도 3c. 비드/펠릿으로 보충된 세포 배양물은 액체로 보충된 세포 배양물과 비교하여 배양물 중에서 15일의 기간에 걸쳐 비슷한 세포 성장을 보여주었다. 펠릿 공급물 2는 양성 대조군 공급물로 보충된 세포 배양물(약 8 x 10 e^{6}개)보다 약간 더 많은 생존 세포 수인 약 10 x 10 e^{6}개 세포/ml(성장)을 보여주었다.

[0153] 펠릿 공급물 2에 대해 생존능력 분석을 수행하고, 양성 대조군(액체 공급물 보충 있음) 또는 음성 대조군(액체 또는 펠릿 보충 없음)과 비교하였다 - 도 7a. 도 7a의 그래프에서 보는 바와 같이, 공급물 2, 3 및 4는 양성 대조군에 상당히 필적하였고, 특히 6일 이후에는 음성 대조군보다 우수했다.

[0154] 펠릿 공급물 2에 대해 세포 성능(항체 생산) 분석을 수행하고, 양성 대조군(액체 공급물 보충 있음) 또는 음성 대조군(액체 또는 펠릿 보충 없음)과 비교하였다 - 도 7b. 그래프 7b에서 보는 바와 같이, 공급물 2는 양성 대조군에 필적하였고, 특히 4일 이후에는 음성 대조군보다 우수했다. 펠릿 공급물 2로 보충된 세포 배양물(약 229 μg/ml)은, 양성 대조군 공급물로 약 228 μg/ml(14일)로 생산된 IgG와 비슷한 IgG 생산량을 나타내었다. 비 보충 세포 배양 분석(음성 대조군)은 펠릿 공급물 2로 보충된 세포 배양물과 비교하였을 때 훨씬 더 적은 IgG(약 100 μg/ml)를 나타내었다.

[0155] **실시예 7: 로터 기술을 이용한 유동층 자동 펠릿화 - 펠릿 공급물 3의 생산**

[0156] 공급물 3 펠릿/비드를 아래에 기술된 바와 같이 자동화된 공정으로 제조하였다:

[0157] 1. (과립화되지 않은) 분쇄된 건조 베이스 분말인 써모 피셔 카탈로그 # PL002616P1- 950.0 g(순중량)으로 시작하였다. 선택적으로, 베이스 분말은 일부 구현예에서 사전 습윤될 수 있다. 여기서는 하지 않았다.

[0158] 2. 로터 디스크가 구비된 유동층 프로세서 내로 분말을 적재하였다.

[0159] 3. 유동층 프로세서를 (개발 작업 중에 확인된) 사전 설정된 조건으로 켜서 분말로부터 직접적인 펠릿화를 개시한다(예컨대, 공기 부피, 미립자화 공기 압력 유동 속도, 유입구 온도, 배출구 온도, 생성물 온도, 용매 분무

속도, 로터 디스크 속도, 디스크 갭, 디스크 형상 등).

[0160] 4. 공정이 완료되는 시기를 결정하기 위해 공정 중의 샘플 측정(예컨대, 현미경 검사 도 4a; 기타 물리적 성질 = 표 4; 입자 크기 도 4b 및 아래 표 5)을 수행하여 펠릿 형성을 모니터한다. 유동층 프로세서로부터 젖은 펠릿(총 중량 770.0 g)을 배출시킨다.

[0161] 5. 젖은 펠릿을 건조시키고, 물리적 성질 분석을 수행한다(표 4).

[0162] 6. 입자 크기 측정(표 5)을 위해 대략 50.0 g의 펠릿을 제거한다.

표 4

[0163]

펠릿 공급물 3: 물리적 특징				
물질	중량(g)	건조 시 손실(%)	벌크 밀도(g/cc)	안식각
분쇄된 분말	950	-	0.719	37.8
젖은 펠릿	770	-	-	-
건조 펠릿	744.25	2.58	0.56	34.9

[0164] 50° 미만의 안식각(34.9)은 펠릿 공급물 3이 양호한 유동성을 가짐을 나타낸다. 벌크 밀도는 필요한 경우 입자가 압축될 수 있음을 나타낸다.

표 5

[0165]

펠릿 공급물 3: 입자 크기 분석			
메쉬 #	유지된 크기(미크론)	유지된 양(g)	유지된 퍼센트
20	840	6.4	12.7
30	600	14.1	27.9
40	420	14.8	29.3
60	250	9.5	18.8
80	177	3.5	6.9
100	150	1.7	3.4
pan	<150	0.5	1.0
전체	-	50.5	-

[0166] 공급물 3에 대한 입자 크기 분석은 입자의 약 88.7%가 60 메쉬보다 크고, 입자의 약 69.9%가 40 메쉬보다 크거나, 약 69.9% > 0.4 mm임을 나타낸다.

[0167] 그런 다음, 공급물 3 비드를 공급물 2와 같이 세포 생존능력, 성장 및 성능(단백질 역가) 분석에서 평가하였다. 공급물 3 펠릿/비드 결과를 액체 보충물(양성 대조군; 즉, 액체에 재구성하고 사용 전에 멸균 여과한 써모 피셔 카탈로그 # PL002616P1)과 비교하였다. 분석을 위해, 공급물 2와 같이 DG44-IgG 세포주를 CD-CHO 배지(써모 피셔 카탈로그 # 12490)에서 성장시켰다(공급물 2 펠릿 = 펠릿화 시험 1; 공급물 3 펠릿 = 펠릿화 시험 2). 세포는 3일 동안 3회 계대배양하였고, 각 계대배양에서, 세포를 3 x 10 e^5개 생존 세포/ml로 분할하였다. 네 번째 계대배양에서, 매일 세포 수를 측정하였다.

[0168] 세포 성장 분석에서 자동화된 공급물 3 펠릿/비드를 액체 보충물(양성 대조군)과 비교하였다 - 도 4c. 펠릿 공급물 3으로 보충된 세포 배양물은 특히 음성 대조군(7일부터 계속)과 비교하여, 배양물 중에서 14일의 기간에 걸쳐 양성 대조군과 비슷한 세포 성장을 보여주었다. 펠릿 공급물 3은 양성 대조군 공급물로 보충된 세포 배양물(약 8 x 10 e^6개)보다 약간 더 많은 생존 세포 수인 약 9 x 10 e^6개 세포/ml(성장)을 보여주었다.

[0169] 펠릿 공급물 3에 대해 생존능력 분석을 수행하고, 양성 대조군(액체 공급물 보충 있음) 또는 음성 대조군(액체 또는 펠릿 보충 없음)과 비교하였다 - 도 7a. 도 7a의 그래프에서 보는 바와 같이, 공급물 2, 3은 양성 대조군에 상당히 필적하였고, 특히 6일 이후에는 음성 대조군보다 우수했다.

[0170] 펠릿 공급물 2, 3 및 4에 대해 세포 성능(항체 생산) 분석을 수행하고, 양성 대조군(액체 공급물 보충 있음) 또는 음성 대조군(액체 또는 펠릿 보충 없음)과 비교하였다 - 도 7b. 그래프에서 보는 바와 같이, 공급물 3은 양성 대조군에 상당히 필적하였고, 특히 4일 이후에는 음성 대조군보다 우수했다. 펠릿 공급물 3으로 보충된 세포

배양물(약 243 ㎍/ml)은 양성 대조군 공급물보다 약간 더 많은 IgG 생산량을 나타내었다. 비 보충 세포 배양물 분석(음성 대조군)은 임의의 펠릿 공급물 3으로 보충된 세포 배양물과 비교할 때 훨씬 더 낮은 IgG(약 100 ㎍/ml)를 보여주었다.

[0171] **실시예 8: 로터 기술을 이용한 유동층 자동 펠릿화 - 펠릿 공급물 4의 생산**

[0172] 공급물 4 펠릿/비드를 아래에 기술된 바와 같이 자동화된 공정으로 제조하였다:

[0173] 1. 결합제, 예를 들어, 아비셀(Avicel®) 미세결정 셀룰로스(400.0 g 순중량) FMC 바이오폴리머(BioPolymer) 유형 PH-101, 로트 번호 P114826548과 혼합된, (과립화되지 않은) 분쇄된 건조 베이스 분말인 써모 피셔 카탈로그 # PL002616P1- 600.0 g(순중량)으로 시작하였다.

[0174] 2. 로터 디스크가 구비된 유동층 프로세서 내로 혼합된 분말을 적재하였다.

[0175] 7. 유동층 프로세서를 (개발 작업 중에 확인된) 사전 설정된 조건으로 켜서 분말로부터 직접적인 펠릿화를 개시한다. (예컨대, 공기 부피, 미립자화 공기 압력 유동 속도, 유입구 온도, 배출구 온도, 생성물 온도, 용매 분무 속도, 로터 디스크 속도, 디스크 갭, 디스크 형상 등).

[0176] 3. 공정이 완료되는 시기를 결정하기 위해 공정 중의 샘플 측정(예컨대, 현미경 검사 도 5a; 기타 물리적 성질 = 표 6; 분석론; 입자 크기 도 5b 및 아래 표 7)을 수행하여 펠릿 형성을 모니터한다.

[0177] 4. 유동층 프로세서로부터 젖은 펠릿(총 중량 824.1 g)을 배출시킨다.

[0178] 5. 젖은 펠릿을 건조시키고, 물리적 성질 분석을 수행한다(표 6).

[0179] 6. 입자 크기 측정(표 7)을 위해 대략 50.0 g의 펠릿을 제거한다.

표 6

[0180]

펠릿 공급물 4: 물리적 특징				
물질	중량(g)	건조 시 손실(%)	벌크 밀도(g/cc)	안식각
분쇄된 분말	950	-	0.719	37.8
젖은 펠릿	824.1	-	-	-
건조 펠릿	788.1	4.37	0.5	43

[0181] 50° 미만의 안식각(43)은 펠릿 공급물 4가 양호한 유동성을 가짐을 나타낸다. 벌크 밀도는 필요한 경우 입자가 압축될 수 있음을 나타낸다.

표 7

[0182]

펠릿 공급물 4: 입자 크기 분석			
메쉬 #	유지된 크기(미크론)	유지된 양(g)	유지된 퍼센트
20	840	2.9	5.8
30	600	1	2.0
40	420	2.6	5.2
60	250	12.7	25.5
80	177	17.1	34.3
100	150	13	26.1
pan	<150	0.5	1.0
전체	-	49.8	-

[0183] 공급물 4에 대한 입자 크기 분석은 입자의 약 38.5% 만이 60 메쉬보다 크고, 입자의 약 15% 만이 40 메쉬보다 크거나, 약 15%만 > 0.4 mm임을 나타낸다. 입자 크기의 확산은 더 컸고, 더 많은 입자들이 더 작은 입자 크기를 나타냈다.

[0184] 그런 다음, 공급물 4 비드를 공급물 2 및 공급물 3과 같이 세포 생존능력, 성장 및 성능(단백질 역가) 분석에서 평가하였다. 공급물 4 펠릿/비드 결과를 액체 보충물(양성 대조군; 즉, 액체에 재구성하고 사용 전에 멸균 여과한 써모 피셔 카탈로그 # PL002616P1)과 비교하였다. 분석을 위해, DG44-IgG 세포주를 CD-CHO 배지(써모 피셔

카탈로그 # 12490)에서 성장시켰다. 세포는 3일 동안 3회 계대배양하였고, 각 계대배양에서, 세포를 3 x 10 e^5 개 생존 세포/ml로 분할하였다. 네 번째 계대배양에서, 매일 세포 수를 측정하였다.

[0185] 세포 성장 분석에서 추가적인 결합제(결정형 셀룰로스)를 포함하는 자동화된 공급물 4 펠릿/비드를 액체 보충물(양성 대조군)과 비교하였다 - 도 5c. 펠릿 공급물 4로 보충된 세포 배양물은 특히 음성 대조군(7일부터 계속)과 비교하여, 배양물 중에서 14일의 기간에 걸쳐 양성 대조군과 비슷한 세포 성장을 보여주었다.

[0186] 펠릿 공급물 4에 대해 생존능력 분석을 수행하고, 양성 대조군(액체 공급물 보충 있음) 또는 음성 대조군(액체 또는 펠릿 보충 없음)과 비교하였다 - 도 7a. 도 7a의 그래프에서 보는 바와 같이, 공급물 2, 3 및 4는 양성 대조군에 상당히 필적하였고, 특히 6일 이후에는 음성 대조군보다 우수했다.

[0187] (결합제인 셀룰로스를 포함하는) 펠릿 공급물 4에 대해 세포 성능(항체 생산) 분석을 수행하고, 양성 대조군(액체 공급물 보충 있음) 또는 음성 대조군(액체 또는 펠릿 보충 없음)과 비교하였다 - 도 7b. 그래프에서 보는 바와 같이, 공급물 4는 양성 대조군에 상당히 필적했고, 특히 4일 이후에는 음성 대조군보다 유의미하게 우수했다. 펠릿 공급물 4로 보충된 세포 배양물(약 200 ㎍/ml)은 양성 대조군 공급물보다 약간 더 적은 IgG 생산량을 나타내었지만, 양성 대조군 공급물과 비슷했다. 한편, 비 보충 세포 배양물 분석(음성 대조군)은 임의의 펠릿 공급물 4로 보충된 세포 배양물과 비교할 때 훨씬 더 낮은 IgG(약 100 ㎍/ml)를 보여주었다.

[0188] **실시예 9: 로터 기술을 이용한 유동층 자동 펠릿화 - 펠릿 공급물 5의 생산**

[0189] 공급물 5 펠릿/비드를 아래에 기술된 바와 같이 자동화된 공정으로 제조하였다:

[0190] 1. 미립화된 건조 베이스 분말 써모 피셔 카탈로그 # PL002616P1- 950.0 g(순중량)으로 시작하였다.

[0191] 2. 로터 디스크가 구비된 유동층 프로세서 내로 분말을 적재하였다.

[0192] 3. 유동층 프로세서를 (개발 작업 중에 확인된) 사전 설정된 조건으로 켜서 분말로부터 직접적인 펠릿화를 개시한다. (예컨대, 공기 부피, 미립자화 공기 압력 유동 속도, 유입구 온도, 배출구 온도, 생성물 온도, 용매 분무 속도, 로터 디스크 속도, 디스크 갭, 디스크 형상 등).

[0193] 4. 공정이 완료되는 시기를 결정하기 위해 공정 중의 샘플 측정(예컨대, 현미경 검사 도 6a; 기타 물리적 성질 = 표 8; 입자 크기 도 6b 및 아래 표 9)을 수행하여 펠릿 형성을 모니터한다.

[0194] 5. 유동층 프로세서로부터 젖은 펠릿(총 중량 824.1 g)을 배출시킨다.

[0195] 6. 젖은 펠릿을 건조시키고, 물리적 성질 분석을 수행한다(표 8).

[0196] 7. 입자 크기 측정(표 9)을 위해 대략 50.0 g의 펠릿을 제거한다.

표 8

[0197]

펠릿 공급물 5: 물리적 특징				
물질	중량(g)	건조 시 손실(%)	벌크 밀도(g/cc)	안식각
분쇄된 분말	950	-	0.719	37.8
젖은 펠릿	728.8	-	-	-
건조 펠릿	716.2	3.31	0.57	34.9

[0198] 50° 미만의 안식각(34.9)은 펠릿 공급물 5가 양호한 유동성을 가짐을 나타낸다. 벌크 밀도는 필요한 경우 입자가 압축될 수 있음을 나타낸다.

표 9

[0199]

펠릿 공급물 5: 입자 크기 분석			
메쉬 #	유지된 크기(미크론)	유지된 양(g)	유지된 퍼센트
20	840	4.4	8.8
30	600	1.1	2.2
40	420	8.1	16.3
60	250	28.1	56.4
80	177	6.4	12.9
100	150	0.3	0.6

pan	<150	1.4	2.8
전체	-	49.8	-

[0200] 공급물 5에 대한 입자 크기 분석은 입자의 약 83.7%가 60 메쉬보다 크고, 입자의 약 27.3%가 40 메쉬보다 크거나, 약 27.3% > 0.4 mm임을 나타낸다.

[0201] 그런 다음, 공급물 5 비드를 공급물 2, 3, 4와 같이 세포 생존능력, 성장 및 성능(단백질 역가) 분석에서 평가하였다(데이터 미도시). 분석을 위해, DG44-IgG 세포주를 CD-CHO 배지(써모 피셔 카탈로그 # 12490)에서 성장시켰다. 세포는 3일 동안 3회 계대배양하였고, 각 계대배양에서, 세포를 3 x 10 e^5개 생존 세포/ml로 분할하였다. 네 번째 계대배양에서, 매일 세포 수를 측정하였다. 공급물 5 펠릿/비드 결과를 액체 보충물(양성 대조군: 액체에 재구성하고 사용 전에 멸균 여과한 써모 피셔 카탈로그 # PL002616P1)과 비교하였다.

[0202] 펠릿 공급물 5로 보충한 세포 배양물은 공급물 2, 3 및 4와 같은 결과와 비슷하게, 배양물 중에서 14일의 기간에 걸쳐 양성 대조군과 비슷한, 세포 성장 분석, 세포 생존능력 분석, 세포 성능(항체 생산) 분석을 가져왔다(데이터 미도시).

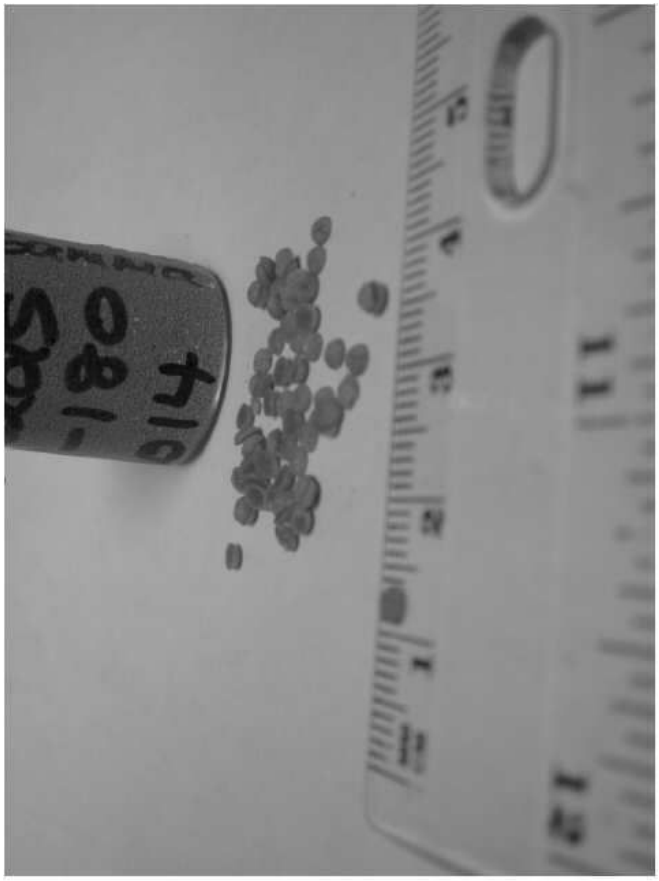
[0203] 본 발명의 바람직한 구현예를 본원에 도시하고 설명하였지만, 이러한 구현예는 단지 예로서 제공된다는 점은 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명으로부터 벗어나지 않고 이제 다양한 변형, 변경 및 교체가 당업자에게 일어날 것이다. 본원에 기술된 본 발명의 구현예에 대한 다양한 대안이 본 발명을 실시하는 데 이용될 수 있음이 이해되어야 한다. 다음의 청구범위는 본 발명의 범위를 정의하고, 이러한 청구범위 및 이의 균등물 범위 내의 방법 및 구조가 이에 의해 포함되는 것으로 의도된다.

도면

도면1a



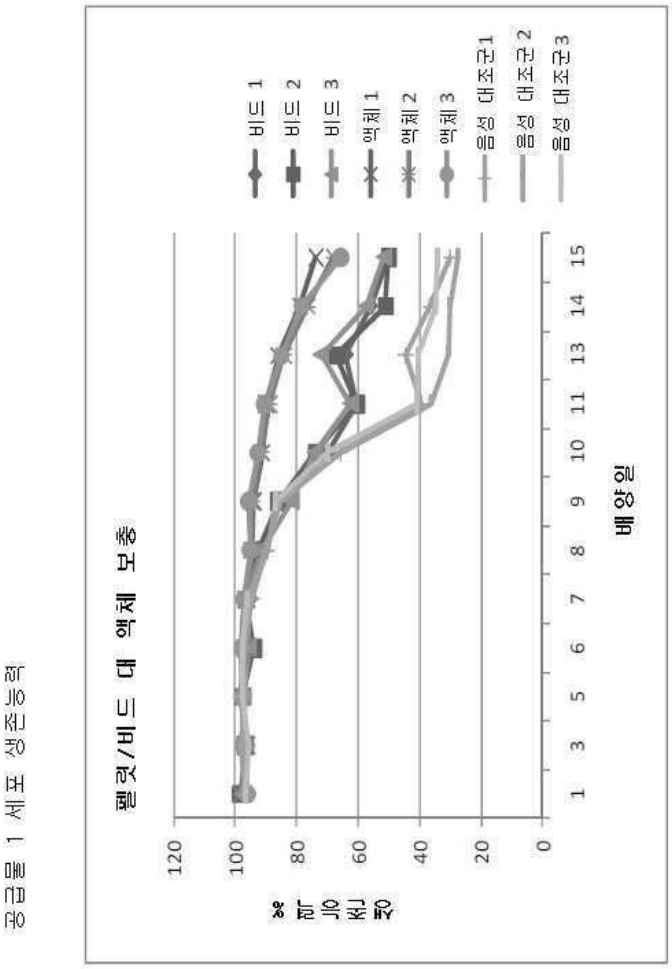
도면1b



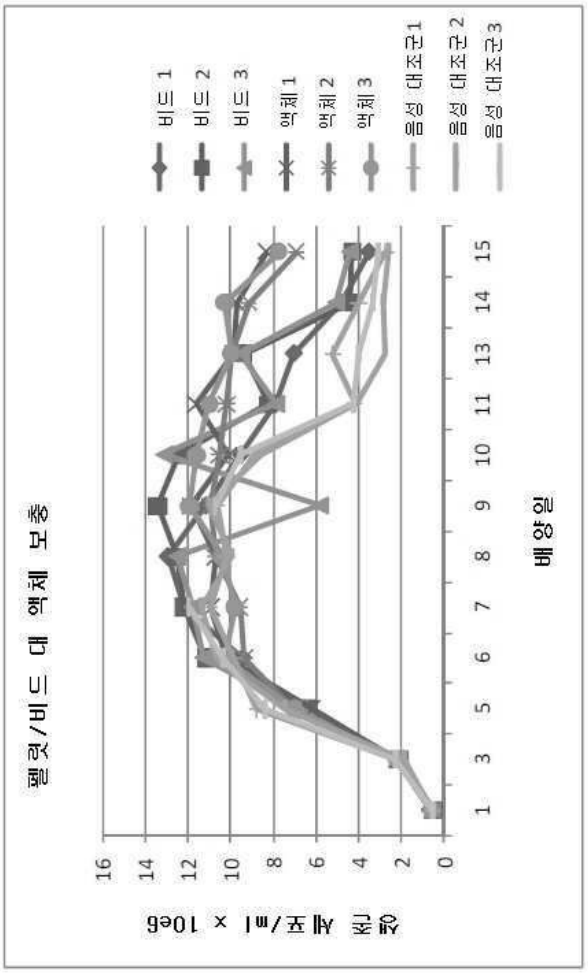
도면1c



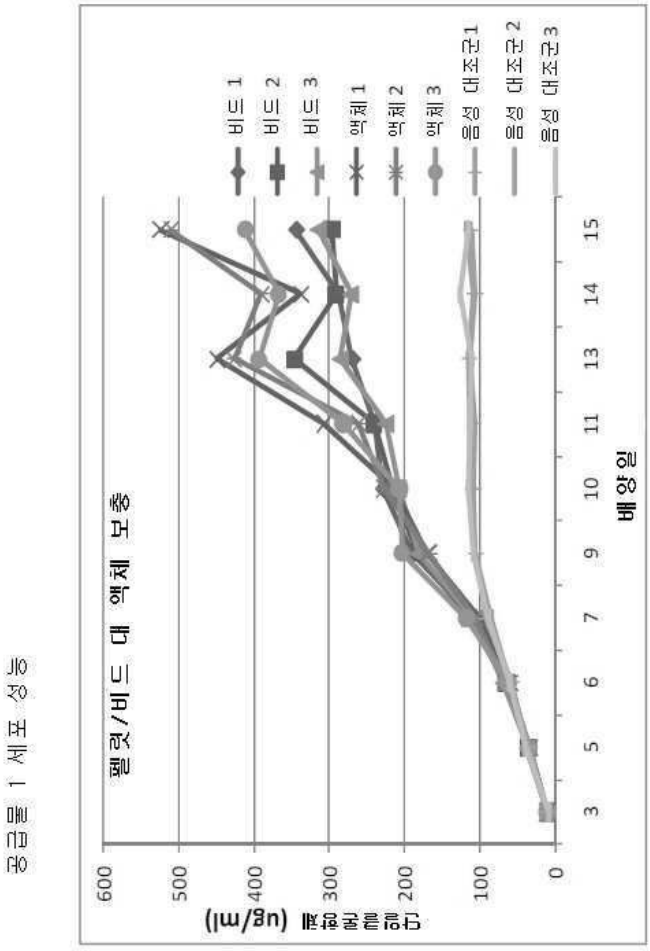
도면2a


공급물 1 세포 생존능력
펠렛/비드 대 액체 보충
% 생존 세포
120
100
80
60
40
20
0
1 3 5 6 7 8 9 10 11 13 14 15
배양일
비드 1
비드 2
비드 3
액체 1
액체 2
액체 3
음성 대조군1
음성 대조군2
음성 대조군3

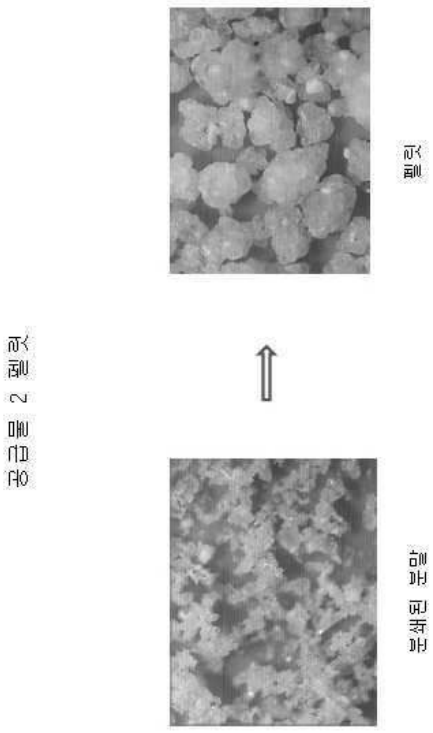
도면2b


공급물 1 세포 성장
펠릿/비드 대 액체 보충
생존 세포/ml x 10e6
0
2
4
6
8
10
12
14
16
1
3
5
6
7
8
9
10
11
13
14
15
배양일
비드 1
비드 2
비드 3
액체 1
액체 2
액체 3
음성 대조군 1
음성 대조군 2
음성 대조군 3

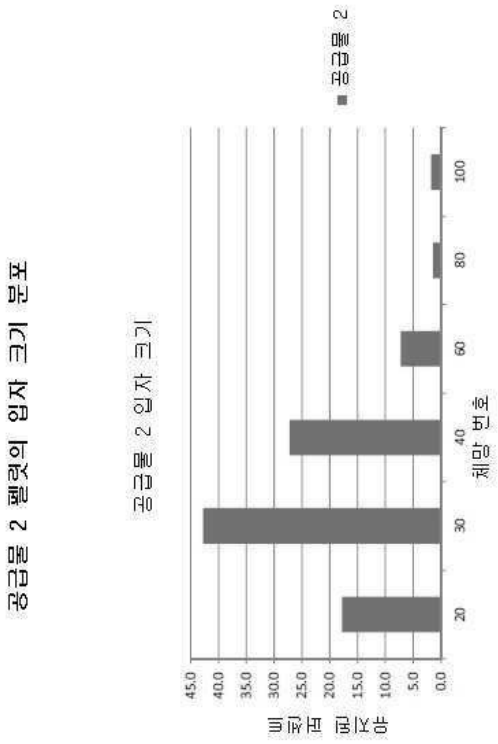
도면2c


공급물 1 세포 성능
펠렛/비드 대 액체 보충
단일클론항체 (ug/ml)
600
500
400
300
200
100
0
3
5
6
7
9
10
11
13
14
15
배양일
비드 1
비드 2
비드 3
액체 1
액체 2
액체 3
음성 대조군1
음성 대조군 2
음성 대조군3

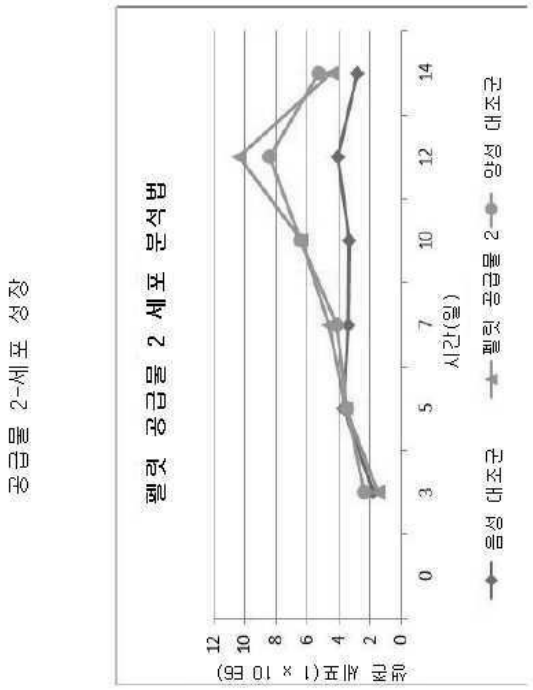
도면3a



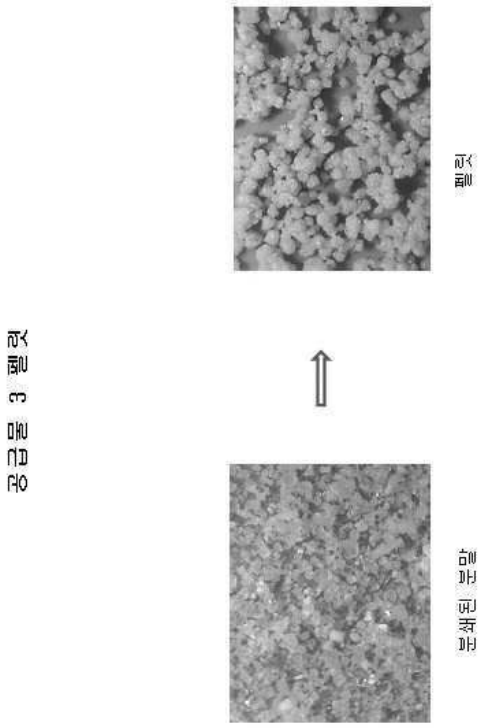
도면3b


공급물 2 펠릿의 입자 크기 분포
공급물 2 입자 크기
공급물 2
유지된 퍼센트
45.0
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
20
30
40
60
80
100
체망 번호

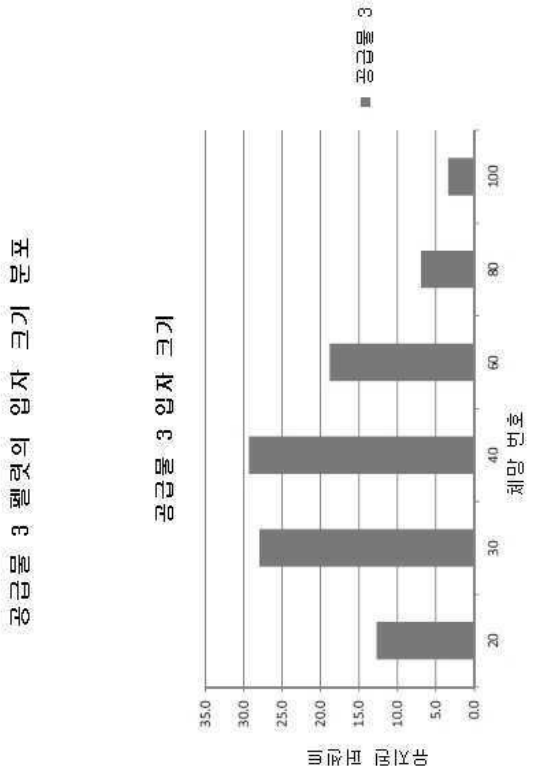
도면3c


공급물 2-세포 성장
펠릿 공급물 2 세포 분석법
생존 세포(1 × 10 E6)
0
2
4
6
8
10
12
0
3
5
7
10
12
14
시간(일)
음성 대조군
펠릿 공급물 2
양성 대조군

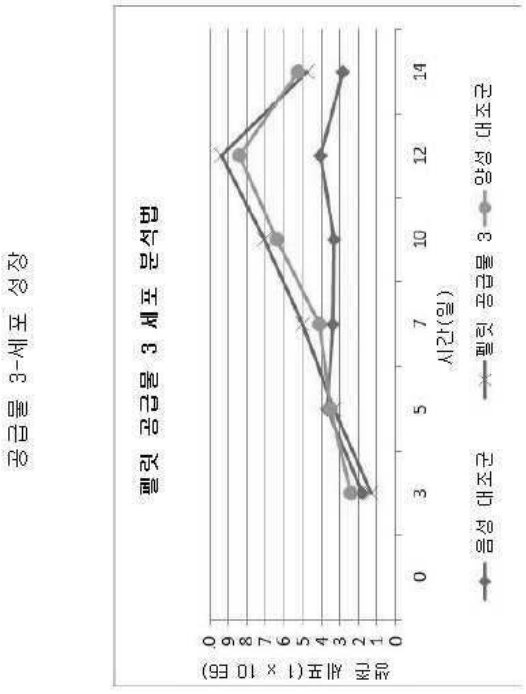
도면4a


공급물 3 펠릿
분쇄된 분말
펠릿

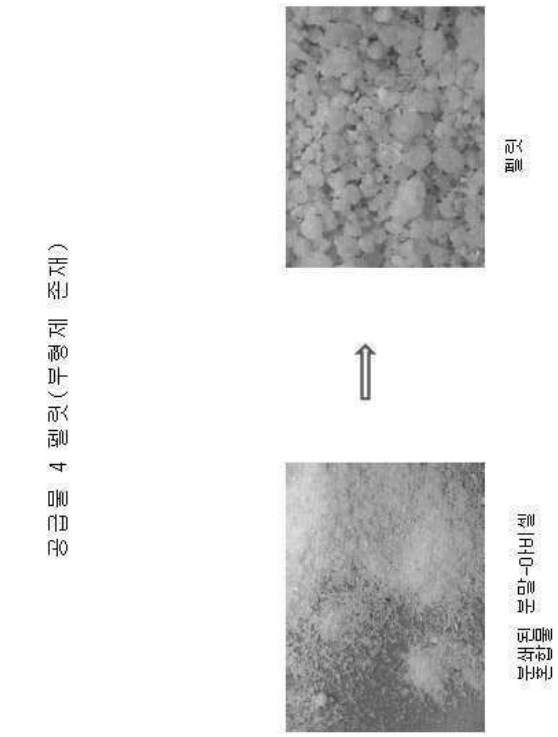
도면4b


공급물 3 펠릿의 입자 크기 분포
공급물 3 입자 크기
유지된 퍼센트
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
20
30
40
60
80
100
체망 번호
공급물 3

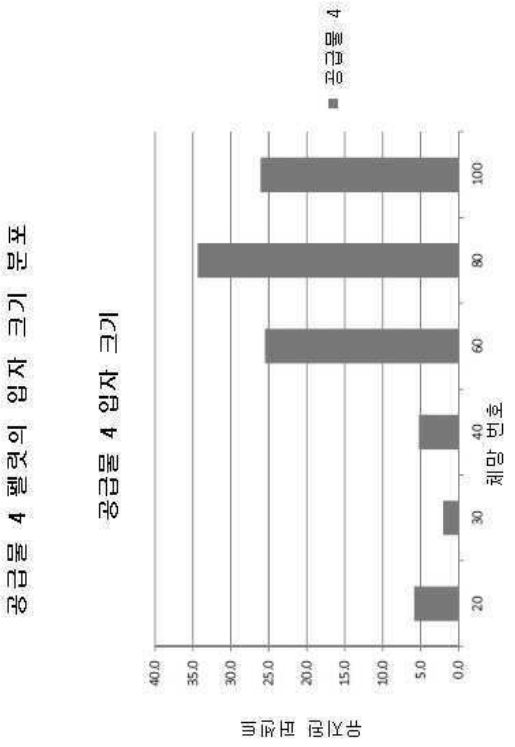
도면4c


공급물 3-세포 성장
펠릿 공급물 3 세포 분석법
세포(1 x 10 E6)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
0
0
3
5
7
10
12
14
시간(일)
음성 대조군
펠릿 공급물 3
양성 대조군

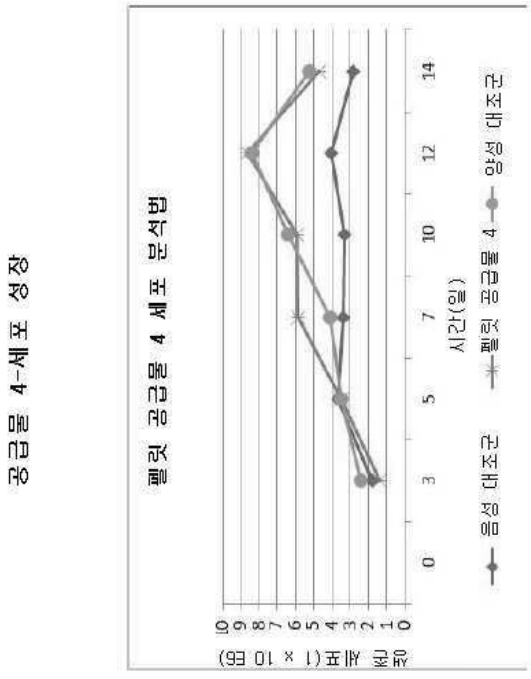
도면5a



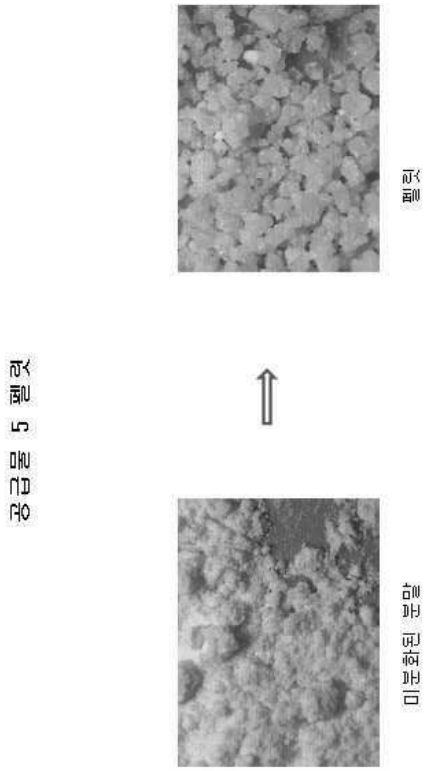
도면5b


공급물 4 펠릿의 입자 크기 분포
공급물 4 입자 크기
공급물 4
체망 번호
유지된 퍼센트
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
20
30
40
60
80
100

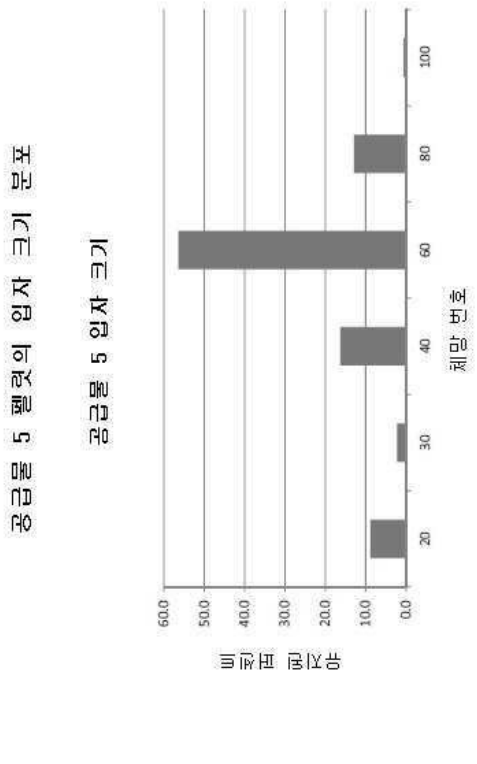
도면5c


공급물 4-세포 성장
펠릿 공급물 4 세포 분석법
세포 세포(1 × 10 E6)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
0
3
5
7
10
12
14
시간(일)
음성 대조군
펠릿 공급물 4
양성 대조군

도면6a

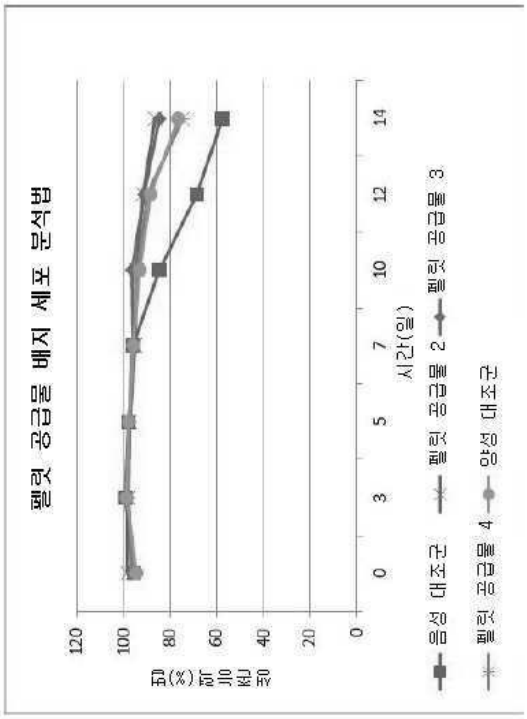


도면6b


공급물 5 펠렛의 입자 크기 분포
공급물 5 입자 크기
유지된 퍼센트
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
20
30
40
60
80
100
체망 번호

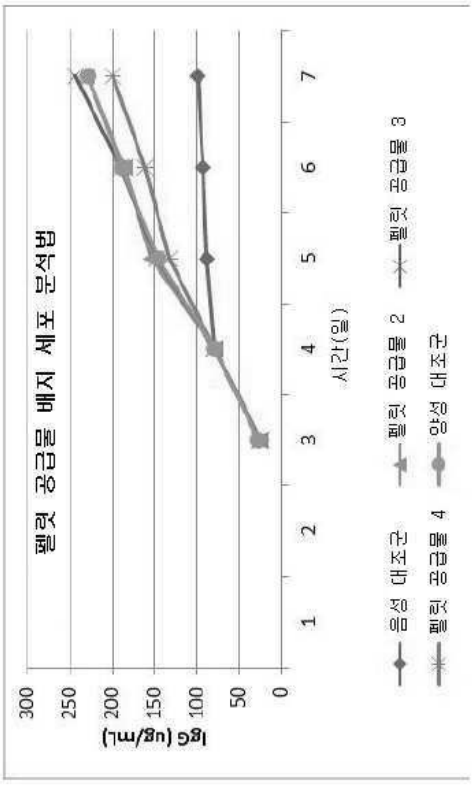
도면7a

공급물 2, 3, 4
세포생존능력 분석

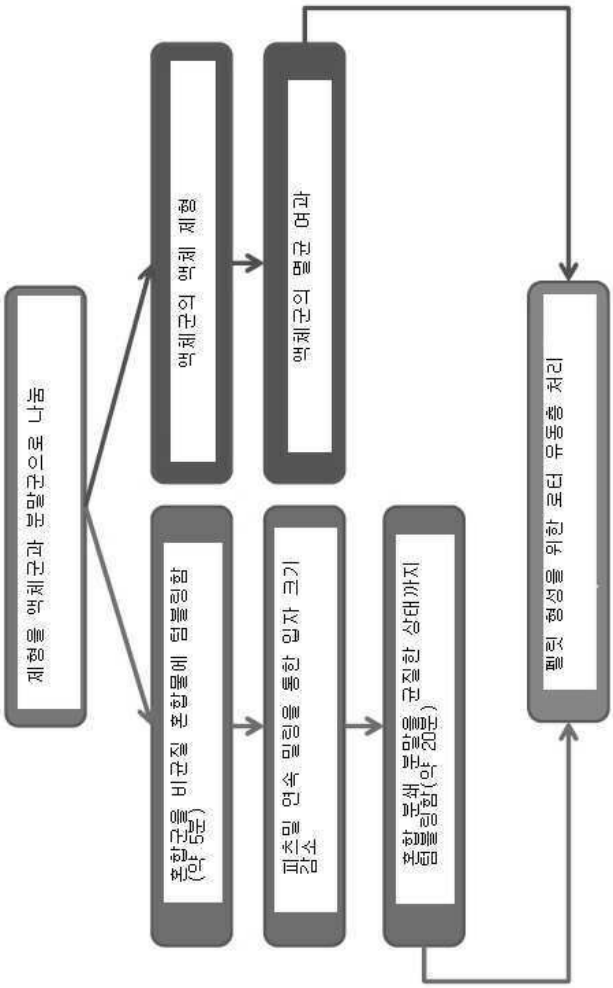


도면7b

공급물 2, 3 및
4-단백질 역가

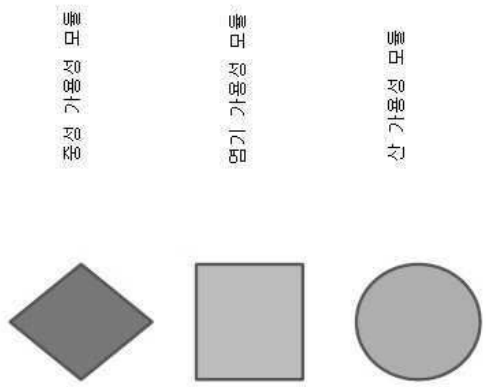


도면8

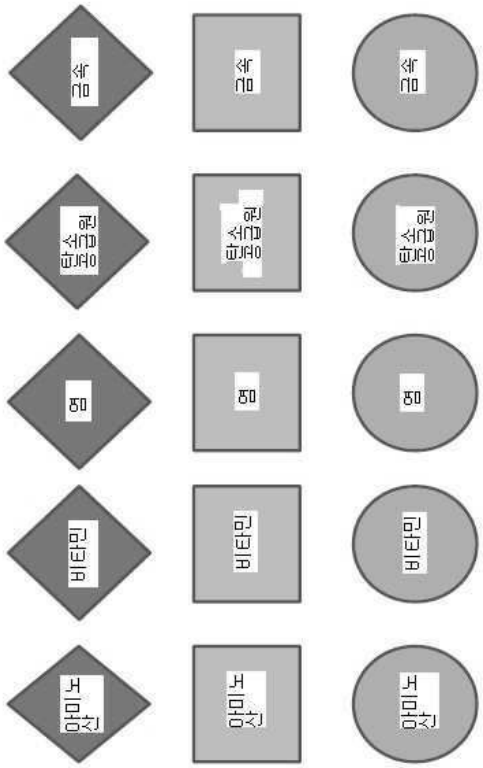

제형을 액체군과 분말군으로 나눔
액체군의 액체 제형
액체군의 멸균 여과
혼합군을 비균질 혼합물에 텀블링함 (약 5분)
피츠밀 연속 밀링을 통한 입자 크기 감소
혼합 분쇄 분말을 균질한 상태까지 텀블링함(약 20분)
펠릿 형성을 위한 코터 유동층 처리

펠릿화 공정

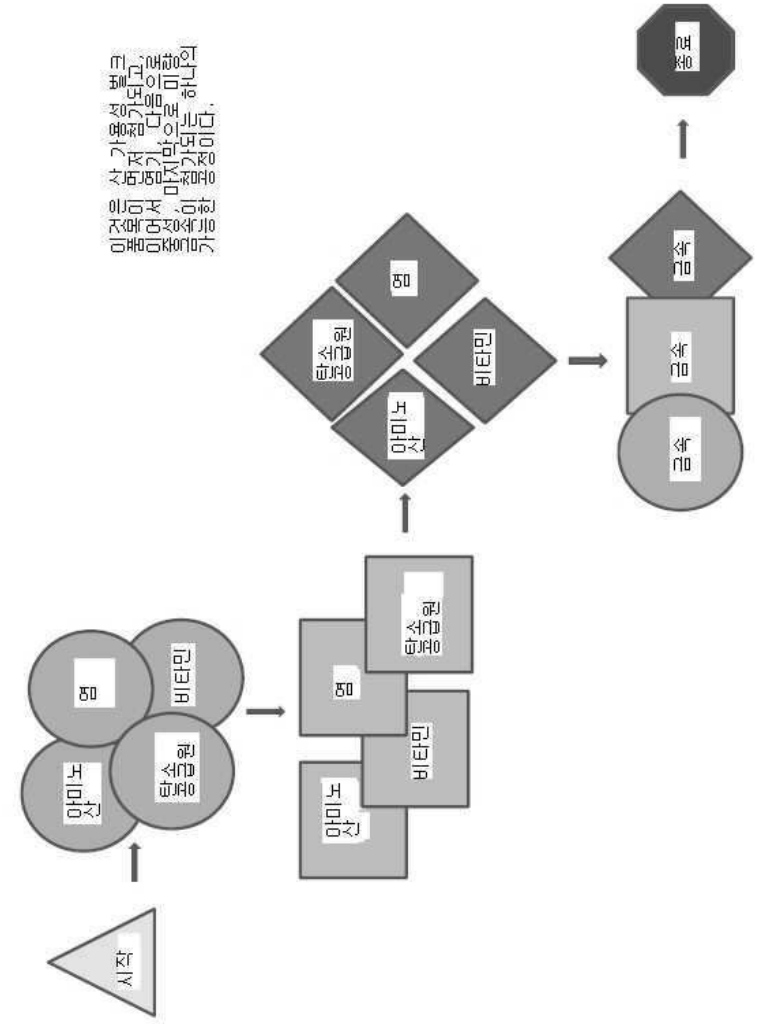
도면9a


중성 가용성 모듈
염기 가용성 모듈
산 가용성 모듈

도면9b


금속
탄소급원
염
비타민
아미노산
금속
탄소급원
염
비타민
아미노산
금속
탄소급원
염
비타민
아미노산

도면10


이것은 산 가용성 벌크 품목이 먼저 첨가되고, 이어서 염기, 다음으로 중성 마지막으로 미량 금속이 첨가되는 하나의 가능한 공정이다.
시작
염
비타민
아미노산
탄소급원
금속
종료