



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0037745
(43) 공개일자 2021년04월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0018 (2013.01)
C07K 16/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7009254(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2014년03월14일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2015-7028514
원출원일자(국제) 2014년03월14일
심사청구일자 2019년03월14일
- (85) 번역문제출일자 2021년03월29일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/029772
- (87) 국제공개번호 WO 2014/145098
국제공개일자 2014년09월18일
- (30) 우선권주장
61/799,602 2013년03월15일 미국(US)

- (71) 출원인
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
- (72) 발명자
비자야산카란, 나타라잔
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디
엔에이 웨이 1 제넨테크 인크. 내
마이어, 스티븐, 제이.
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디
엔에이 웨이 1 제넨테크 인크. 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장덕순, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **항산화제를 함유하는 세포 배양 조성물 및 폴리펩티드 생산 방법**

(57) 요약

항산화제를 포함하는 세포 배양 배지, 및 세포 배양 및 세포로부터의 폴리펩티드 생산을 위해 배지를 사용하는 방법이 본원에 제공된다. 본원의 방법에 의해 생산된 폴리펩티드, 예컨대 치료 폴리펩티드를 포함하는 조성물이 또한 제공된다.

(52) CPC특허분류

C07K 2317/14 (2013.01)

C12N 2500/30 (2013.01)

C12N 2500/33 (2013.01)

C12N 2500/44 (2013.01)

C12N 2500/46 (2013.01)

(72) 발명자

마르마, 샤라트

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

양, 이

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

명세서

청구범위

청구항 1

명세서에 기재된 세포 배양 배지의 용도.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본원은 2013년 3월 15일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 61/799,602를 우선권 주장하고, 그의 내용은 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0003] 발명의 분야
- [0004] 본 발명은 항산화제를 포함하는 세포 배양 배지, 세포 배양 및 폴리펩티드 생산을 위해 배지를 사용하는 방법, 뿐만 아니라 본원에 제공된 방법에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물 및 키트에 관한 것이다.

배경 기술

- [0005] 세포 배양 제조 기술은 단백질-기반 제품, 예컨대 치료 단백질의 제약 제제의 생산에 광범위하게 사용된다. 단백질-기반 제품, 예컨대 항체 제품의 상업적 생산은, 세포가 제조 요구량을 충족시키기에 충분한 단백질 제품을 생산하도록 하기 위한 세포 배양 파라미터의 최적화를 필요로 한다. 그러나, 단백질 제품의 생산성을 개선시키기 위해 세포 배양 파라미터를 최적화하는 경우에, 제품의 바람직한 품질 속성, 예컨대 글리코실화 프로파일, 응집체 수준, 진하 이질성 및 아미노산 서열 완전성을 유지하는 것이 또한 필요하다 (Li et al., mAbs, 2010, 2(5):466-477). 관심 대상의 또 다른 품질 속성은 단백질 제품의 색상이다. 인간 사용을 위한 치료 제품의 액체 제제에 대해 허용되는 색상 수준에 관한 규제 요건이 충족되어야 한다 (United States Pharmacopoeia Inc., 2000, p. 1926-1927 및 Council of Europe. European Pharmacopoeia, 2008, 7th Ed. p. 22). 따라서, 허용되는 색상을 갖는 단백질 제품을 생산하는 것은 치료 단백질 생산의 중요한 측면이다.
- [0006] 치료 단백질, 예컨대 모노클로날 항체의 피하 전달에 관한 최근의 추세는 제제화된 단백질 물질의 농도 증가 (예를 들어 약 100 mg/mL 이상의 농도)를 동반한다 (Daugherty et al., Adv Drug Deliver Rev, 2006, 58(5-6):686-706). 증가하는 양의 치료 단백질을 포함하는 조성물에서의 색상 강도 증가 사이에서 상관관계가 관찰되었고, 이 관계는 제제화된 제품의 색상 강도를 모니터링하는 표준 방법에 의해 이전에는 관찰 불가능했던 저-수준 단백질 제품 변이체로 인한 것일 수 있다.
- [0007] 산화는 단백질 제약에 대한 주요 화학적 분해 경로이다. 예를 들어, 메티오닌, 시스테인, 히스티딘, 트립토판 및 티로신은 반응성 산소 종 (ROS)과의 그의 반응성으로 인해 산화되기 쉬운 아미노산 잔기이며, 이러한 산화는 저장 동안에 제약 단백질 제제에서 종종 관찰된다. 세포 배양 조건이 단백질 제품의 품질 속성, 예컨대 대규모 제조에 충분한 양의 생산에 영향을 미칠 수 있다는 것이 공지되어 있음에도 불구하고, 최종 단백질 제품의 색상 강도에 대한 이들 조건의 영향은 아직도 불명확하다.
- [0008] 허용되는 제품 품질 속성, 예컨대 색상 강도를 갖는 단백질 (예를 들어, 항체)을 생산하는, 개선되고 비용-효율적인 방법을 제공하는 것이 계속 요구되고 있다. 바람직한 단백질 농도 (예를 들어, ≥ 100 mg/mL)를 유지하면서 보다 낮은 색상 강도의 단백질 제품을 지속적으로 전달하는 성분을 갖는 세포 배양 배지는, 화학적으로 규정되지 않은 것이든 화학적으로 규정된 것이든 관계없이 단백질 제품, 예컨대 항체의 개발에 있어서 유용할 것이다.

발명의 내용

- [0009] 일부 측면에서, 본원에서 본 발명은, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하지 않는

세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도와 비교하여 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도를 감소시키는 것인, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 배양하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물과 비교하여 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도를 적어도 약 0.1% 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물과 비교하여 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도를 약 5% 내지 약 50% 감소시킨다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 적어도 약 0.0001 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 약 0.0001 mM 내지 약 500.0 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 약 1.0 mM 내지 약 40.0 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 약 1.0 mM 내지 약 10.0 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체는 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 시스테인, 시스테인술폰산 및 타우린으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본원의 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지는 화학적으로 규정된 세포 배양 배지이다. 본원의 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지는 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지이다. 본원의 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지는 기초 세포 배양 배지이다. 본원의 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지는 공급 세포 배양 배지이다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포는 세포의 성장기 동안 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지와 접촉된다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포는 세포의 생산기 동안 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지와 접촉된다. 본원의 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체는 세포 배양 사이클의 적어도 제1일에 세포 배양 배지에 첨가된다. 본원의 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체는 14일 세포 배양 사이클의 제0일에 세포 배양 배지에 첨가된다. 본원의 임의의 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체는 세포 배양 사이클 중 임의의 날에 세포 배양 배지에 첨가될 수 있다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포이다. 본원의 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포이다. 본원의 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 항체 또는 그의 단편이다.

[0010] 다른 측면에서, 본원에서 본 발명은, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 세포 배양 배지와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 세포 배양 배지는 하기 성분 (a)-(h): (a) 하이포타우린; (b) s-카르복시메틸시스테인; (c) 카르노신; (d) 안세린; (e) 부틸화 히드록시아니솔; (f) 리포산; (g) 퀘르시트린 수화물; 및 (h) 아미노구아니딘 중 하나 이상을 포함하고, 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하는 세포 배양 배지는 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물과 비교하여 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도를 감소시키는 것인, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 배양하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하는 세포 배양 배지는 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물과 비교하여 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도를 적어도 약 0.1% 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하는 세포 배양 배지는 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물과 비교하여 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도를 약 5% 내지 약 75% 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하는 세포 배양 배지는 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물과 비교하여 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도를 약 5% 내지 약 50% 감소시킨다. 본원의 일부 실시양태에서, 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하는 세포 배양 배지는 하나 이상의 성분 (a)-(h)를 (a) 적어도 약 0.0001 mM 농도의 하이포타우린; (b) 적어도 약 0.0001 mM 농도의 s-카르복시메틸시스테인; (c) 적어도 약 0.0001 mM 농도의 카르노신; (d) 적어도 약 0.0001 mM 농도의 안세린; (e) 적어도 약 0.0001 mM 농도의 부틸화 히드록시아니솔; (f) 적어도 약 0.0001 mM 농도의 리포산; (g) 적어도 약 0.0001 mM 농도의 퀘르시트린 수화물; 및 (h) 적어도 약 0.0003 mM 농도의 아미노구아니딘으로부터 선택된 양으로 포함한다. 추가 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하이포타우린을 약 2.0 mM 내지 약 50.0 mM의 농도로 포함한다. 본

원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 s-카르복시메틸시스테인을 약 8.0 mM 내지 약 12.0 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 카르노신을 약 8.0 mM 내지 약 12.0 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 안세린을 약 3.0 mM 내지 약 5.0 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 부틸화 히드록시아니솔을 약 0.025 mM 내지 약 0.040 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 리포산을 약 0.040 mM 내지 약 0.060 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 퀘르시트린 수화물을 약 0.010 mM 내지 약 0.020 mM의 농도로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 아미노구아니딘을 약 0.0003 mM 내지 약 245 mM의 농도로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 아미노구아니딘을 약 0.0003 mM 내지 약 10 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 화학적으로 규정된 세포 배양 배지이다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지이다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 기초 세포 배양 배지이다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 공급 세포 배양 배지이다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 세포 배양 배지와 접촉된다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 세포 배양 배지와 접촉된다. 본원의 일부 실시양태에서, 성분 (a)-(h) 중 하나 이상은 세포 배양 사이클의 적어도 제1일에 세포 배양 배지에 첨가된다. 본원의 일부 실시양태에서, 성분 (a)-(h) 중 하나 이상은 14일 세포 배양 사이클의 제0일에 세포 배양 배지에 첨가된다. 본원의 일부 실시양태에서, 성분 (a)-(h) 중 하나 이상은 세포 배양 사이클 중 임의의 날에 세포 배양 배지에 첨가될 수 있다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 포유동물 세포이다. 본원의 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포이다. 본원의 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 항체 또는 그의 단편이다.

[0011]

일부 측면에서, 본원에서 본 발명은 또한, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함하며, 여기서 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도와 비교하여 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도를 감소시키는 것인, 폴리펩티드를 생산하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물과 비교하여 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도를 적어도 약 0.1% 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물과 비교하여 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도를 약 5% 내지 약 50% 감소시킨다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 적어도 약 0.0001 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 약 0.0001 mM 내지 약 500.0 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 약 1.0 mM 내지 약 40.0 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 약 1.0 mM 내지 약 10.0 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체는 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 시스테아민, 시스테아민올핀산 및 타우린으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 화학적으로 규정된 세포 배양 배지이다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지이다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 기초 세포 배양 배지이다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 공급 세포 배양 배지이다. 본원의 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체는 세포 배양 사이클의 적어도 제1일에 세포 배양 배지에 첨가된다. 본원의 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체는 14일 세포 배양 사이클의 제0일에 세포 배양 배지에 첨가된다. 본원의 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체는 세포 배양 사이클 중 임의의 날에 세포 배양 배지에 첨가될 수 있다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포이다. 본원의 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG1 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지 내로 분비된다. 일부 실시양태에서, 방법은 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지로부터 폴리펩티드를 회수하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 회수한 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 액체 조성물 또는 비-액체 조성물이다. 일부 실시양태에서, 회수한 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 무색 또는 약간 유색의 액체로 나타난다.

[0012] 일부 측면에서, 본 발명은, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 세포 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함하며, 여기서 세포 배양 배지는 하기 성분 (a)-(h): (a) 하이포타우린; (b) s-카르복시메틸시스테인; (c) 카르노신; (d) 안세린; (e) 부틸화 히드록시아니솔; (f) 리포산; (g) 퀘르시트린 수화물; 및 (h) 아미노구아니딘 중 하나 이상을 포함하고, 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하는 세포 배양 배지는 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물과 비교하여 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도를 감소시키는 것인, 폴리펩티드를 생산하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하는 세포 배양 배지는 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물과 비교하여 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도를 적어도 약 0.1% 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하는 세포 배양 배지는 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물과 비교하여 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도를 약 5% 내지 약 50% 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하는 세포 배양 배지는 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물과 비교하여 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도를 약 5% 내지 약 75% 감소시킨다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하나 이상의 성분 (a)-(h)를 (a) 적어도 약 0.0001 mM 농도의 하이포타우린; (b) 적어도 약 0.0001 mM 농도의 s-카르복시메틸시스테인; (c) 적어도 약 0.0001 mM 농도의 카르노신; (d) 적어도 약 0.0001 mM 농도의 안세린; (e) 적어도 약 0.0001 mM 농도의 부틸화 히드록시아니솔; (f) 적어도 약 0.0001 mM 농도의 리포산; (g) 적어도 약 0.0001 mM 농도의 퀘르시트린 수화물; 및 (h) 적어도 약 0.0003 mM 농도의 아미노구아니딘으로부터 선택된 양으로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하이포타우린을 약 2.0 mM 내지 약 50.0 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 s-카르복시메틸시스테인을 약 8.0 mM 내지 약 12.0 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 카르노신을 약 8.0 mM 내지 약 12.0 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 안세린을 약 3.0 mM 내지 약 5.0 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 부틸화 히드록시아니솔을 약 0.025 mM 내지 약 0.040 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 리포산을 약 0.040 mM 내지 약 0.060 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 퀘르시트린 수화물을 약 0.010 mM 내지 약 0.020 mM의 농도로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 아미노구아니딘을 약 0.0003 mM 내지 약 245 mM의 농도로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 아미노구아니딘을 약 0.0003 mM 내지 약 10 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 화학적으로 규정된 세포 배양 배지이다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지이다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 기초 세포 배양 배지이다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 공급 세포 배양 배지이다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포는 세포의 성장기 동안 세포 배양 배지와 접촉된다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포는 세포의 생산기 동안 세포 배양 배지와 접촉된다. 본원의 일부 실시양태에서, 성분 (a)-(h) 중 하나 이상은 세포 배양 사이클의 적어도 제1일에 세포 배양 배지에 첨가된다. 본원의 일부 실시양태에서, 성분 (a)-(h) 중 하나 이상은 14일 세포 배양 사이클의 제0일에 세포 배양 배지에 첨가된다. 본원의 임의의 실시양태에서, 성분 (a)-(h) 중 하나 이상은 세포 배양 사이클 중 임의의 날에 세포 배양 배지에 첨가될 수 있다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 세포는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포이다. 본원의 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 항체 또는 그의 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG1 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 세포 배양 배지 내로 분비된다. 본원의 일부 실시양태에서, 방법은 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하는 세포 배양 배지로부터 폴리펩티드를 회수하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 회수한 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 액체 조성물 또는 비-액체 조성물이다. 일부 실시양태에서, 회수한 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 무색 또는 약간 유색의 액체로 나타난다. 본원의 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 생산될 수 있다.

[0013] 일부 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 생산된 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0014] 일부 측면에서, 본 발명은, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 적어도 약 0.0001 mM의 농도로 포함하며, 여기서 하이포타우린 또는 유사체 또는 전구체는 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 시스테인, 시스테인술폰산 및 타우린으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 세포 배양 배지를 화학적으로 규정된 구성성분으로 보충하기 위한 키트를 제공한다.

- [0015] 다른 측면에서, 본 발명은 또한, (a) 세포 배양 배지에 적어도 약 0.0001 mM 하이포타우린을 제공하는 양의 하이포타우린; (b) 세포 배양 배지에 적어도 약 0.0001 mM s-카르복시메틸시스테인을 제공하는 양의 s-카르복시메틸시스테인; (c) 세포 배양 배지에 적어도 약 0.0001 mM 카르노신을 제공하는 양의 카르노신; (d) 세포 배양 배지에 적어도 약 0.0001 mM 안세린을 제공하는 양의 안세린; (e) 적어도 약 0.0001 mM 부틸화 히드록시아니솔을 제공하는 양의 부틸화 히드록시아니솔; (f) 세포 배양 배지에 적어도 약 0.0001 mM 리포산을 제공하는 양의 리포산; (g) 세포 배양 배지에 적어도 약 0.0001 mM 퀘르시트린 수화물을 제공하는 양의 퀘르시트린 수화물; 및 (h) 세포 배양 배지에 적어도 약 0.0003 mM 아미노구아니딘을 제공하는 양의 아미노구아니딘 중 하나 이상을 포함하는, 세포 배양 배지를 화학적으로 규정된 구성성분으로 보충하기 위한 키트를 제공한다.
- [0016] 일부 측면에서, 본원에서 본 발명은 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 시스테아민, 시스테아민술피산 및 타우린으로 이루어진 군으로부터 선택된, 적어도 약 0.0001 mM의 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 다른 측면에서, 하기 성분 (a)-(h): (a) 적어도 약 0.0001 mM의 하이포타우린; (b) 적어도 약 0.0001 mM의 s-카르복시메틸시스테인; (c) 적어도 약 0.0001 mM의 카르노신; (d) 적어도 약 0.0001 mM의 안세린; (e) 적어도 약 0.0001 mM의 부틸화 히드록시아니솔; (f) 적어도 약 0.0001 mM의 리포산; (g) 적어도 약 0.0001 mM의 퀘르시트린 수화물; 및 (h) 적어도 약 0.0003 mM의 아미노구아니딘 중 하나 이상을 포함하는 세포 배양 배지가 본원에 제공된다.
- [0018] 일부 측면에서, 본원에서 본 발명은 (a) 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포; 및 (b) 본원에 기재된 임의의 세포 배양 배지를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일부 측면에서, (a) 폴리펩티드; 및 (b) 본원에 기재된 임의의 세포 배양 배지를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포에 의해 세포 배양 배지 내로 분비된다.
- [0020] 본 명세서는 통상의 기술자가 본 발명을 실시할 수 있도록 하기에 충분한 것으로 여겨진다. 본원에 제시되고 기재된 것들 이외에도 본 발명의 다양한 변형이 상기 기재내용으로부터 통상의 기술자에게 명백해질 것이고, 이는 첨부된 청구범위의 범주 내에 속할 것이다. 본원에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 항체를 함유하는 대표적인 세포 배양 배지에서의 색상 강도에 대한 영향에 대해 스크리닝한 대표적인 화합물의 그래프이다. 수치 결과는 양성 대조군에 대한 값을 색상 강도에서의 0% 변화로 설정하여 양성 대조군에 대해 정규화하였다. 0% 초과 값은 증가된 색상 강도를 나타낸다. 0% 미만의 값은 감소된 색상 강도를 나타낸다.
- 도 2는 항체를 함유하는 대표적인 세포 배양 배지에서 색상 강도를 감소시킨 화합물을 보여주는 도 1의 서브플롯이다. 수치 결과는 양성 대조군에 대한 값을 색상 강도에서의 0% 변화로 설정하여 양성 대조군에 대해 정규화하였다. 0% 미만의 값은 감소된 색상 강도를 나타낸다.
- 도 3은 진탕기 플라스크 세포 배양 모델이 상응하는 더 큰 규모의 2L 세포 배양 모델과 대등하다는 것을 보여주는 일련의 그래프이다. a) 생존 세포 밀도 (VCC)에 의해 측정하여 세포 배양 부피당 세포의 수로 표현한, 인큐베이션의 기간에 걸친 배양물에서의 세포 성장. b) 생존 세포의 수에 의해 측정된 세포의 총 개수의 백분율로서의, 인큐베이션의 기간에 걸친 세포 배양물에서의 세포 생존율. c) 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정하여 항체 역가로 표현한, 인큐베이션의 기간에 걸친 세포 배양물에서의 항체 생산. SF는 진탕기 플라스크 세포 배양 모델을 나타낸다. 2L은 더 큰 규모의 세포 배양 모델을 나타낸다.
- 도 4는 세포 배양 배지에 대한 하이포타우린의 첨가가 세포 성장, 세포 생존율 또는 항체 생산을 손상시키지 않았다는 것을 보여주는 일련의 그래프이다. a) VCC에 의해 측정하여 세포 배양 부피당 세포의 수로 표현한, 인큐베이션의 기간에 걸친 배양물에서의 세포 성장. b) 생존 세포의 수에 의해 측정된 세포의 총 개수의 백분율로서의, 인큐베이션의 기간에 걸친 세포 배양물에서의 세포 생존율. c) 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정하여 항체 역가로 표현한, 인큐베이션의 기간에 걸친 세포 배양물에서의 항체 생산.
- 도 5는 하이포타우린으로 보충된 배지에서 성장시킨 세포 배양물로부터 단리된 항체 조성물의 색상 강도를 보여주는 그래프이다. 100%, 50% 또는 25%는 각각 9.16 mM, 4.58 mM 또는 2.29 mM 하이포타우린으로 보충된 기초

배지 1을 나타낸다. ●은 세포 배양 실험에 대한 색상 강도 값을 나타낸다. ○은 인큐베이션 스크리닝 실험에 대한 색상 강도 값을 나타낸다. 수치 결과는 양성 대조군에 대한 값을 색상 강도에서의 0% 변화로 설정하여 양성 대조군에 대해 정규화하였다. 0% 미만의 값은 감소된 색상 강도를 나타낸다.

도 6은 하이포타우린으로 보충된 배지에서 성장시킨 세포 배양물로부터 단리된 항체 조성물의 색상 강도를 보여주는 그래프다. 3X, 2X 또는 1X는 각각 38.85 mM, 25.9 mM 또는 12.95 mM 하이포타우린으로 보충된 기초 배지 3을 나타낸다. ●은 세포 배양 실험에 대한 색상 강도 값을 나타낸다. 수치 결과는 양성 대조군에 대한 값을 색상 강도에서의 0% 변화로 설정하여 양성 대조군에 대해 정규화하였다. 0% 미만의 값은 감소된 색상 강도를 나타낸다.

도 7은 배지에 대한 하이포타우린 또는 카르복시 메틸 시스테인의 첨가가 세포 성장 또는 세포 생존율을 손상시키지 않았다는 것을 보여주는 그래프를 포함한다. a) VCC에 의해 측정하여 세포 배양 부피당 세포의 수로 표현한, 인큐베이션의 기간에 걸친 배양물에서의 세포 성장. b) 총 배양 부피의 퍼센트로 표현한, 인큐베이션의 기간에 걸친 배양물에서의 세포 생존율.

도 8은 배지에 대한 하이포타우린 또는 카르복시 메틸 시스테인의 첨가가 항체 생산을 유의하게 감소시키지 않았다는 것을 보여주는 그래프이다. 인큐베이션의 기간에 걸친 세포 배양물에서의 항체 생산은 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정하여, 항체 역가로 표현하였다.

도 9는 하이포타우린 또는 카르복시 메틸 시스테인으로 보충된 배지에서 성장시킨 세포 배양물로부터 단리된 항체 조성물의 색상 강도를 보여주는 그래프이다. a 및 b)는 색상 강도를 측정하는데 이용된 2가지 상이한 색상 검정을 나타낸다. 수치 결과는 양성 대조군에 대한 값을 색상 강도에서의 0% 변화로 설정하여 양성 대조군에 대해 정규화하였다. 0% 미만의 값은 감소된 색상 강도를 나타낸다.

도 10은 타우린, 카르노신, 아미노구아니딘, 음성 대조군 또는 양성 대조군으로 보충된 배지에서의 세포 배양물로부터 단리된 항체 조성물의 상대적 색상 강도를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] I. 정의
- [0023] 용어 "배지" 및 "세포 배양 배지"는 세포의 성장 또는 유지에 사용되는 영양소 공급원을 지칭한다. 통상의 기술자가 이해하는 바와 같이, 영양소 공급원은 성장 및/또는 생존을 위해 세포가 필요로 하는 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.
- [0024] "화학적으로 규정된 세포 배양 배지" 또는 "CDM"은 동물 또는 식물로부터 유래된 생성물, 예컨대 동물 혈청 및 식물 펩톤을 함유하지 않는, 명시된 조성을 갖는 배지이다. 통상의 기술자가 이해하는 바와 같이, CDM은 세포를 CDM과 접촉시키고 폴리펩티드를 CDM 내로 분비하도록 함으로써 폴리펩티드를 생산하는 과정에 사용될 수 있다. 따라서, 조성물은 CDM 및 폴리펩티드 제품을 함유할 수 있으며 폴리펩티드 제품의 존재가 CDM을 화학적으로 규정되지 않도록 만드는 것이 아니라는 것을 이해한다.
- [0025] "화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지"는 화학적 조성이 특정될 수 없으며 동물 또는 식물로부터 유래된 하나 이상의 생성물, 예컨대 동물 혈청 및 식물 펩톤을 함유할 수 있는 배지를 지칭한다. 통상의 기술자가 이해하는 바와 같이, 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지는 영양소 공급원으로서 동물 또는 식물로부터 유래된 생성물을 함유할 수 있다.
- [0026] 세포를 "배양하는 것"은 세포의 생존 및/또는 성장 및/또는 증식에 적합한 조건 하에 세포를 세포 배양 배지와 접촉시키는 것을 지칭한다.
- [0027] "회분 배양"은 세포 배양을 위한 모든 성분 (세포 및 모든 배양 영양소 포함)이 배양 과정의 시작 시점에 배양 용기에 공급되는 배양을 지칭한다.
- [0028] 본원에 사용된 어구 "유가식 세포 배양"은 세포 및 배양 배지가 처음에 배양 용기에 공급되고, 추가의 배양 영양소가 배양 종결 전에 세포 및/또는 제품을 주기적으로 수확하거나 또는 수확하지 않으면서 배양 과정 동안 배양물에 연속적으로 또는 불연속적 증분으로 공급되는 회분 배양을 지칭한다.
- [0029] "관류 배양"은 세포가, 예를 들어 여과, 캡슐화, 마이크로담체에 대한 고정 등에 의해 배양물에서 제한되는 배

양이고, 배양 배지는 배양 용기로부터 연속적으로 또는 간헐적으로 도입되고 제거된다.

- [0030] "배양 용기"는 세포를 배양하는데 사용되는 용기를 지칭한다. 배양 용기는 세포 배양에 유용하지만 하면 임의의 크기일 수 있다.
- [0031] 본원에 사용된 "하이포타우린 유사체"는 하이포타우린과 구조적으로 유사하지만 화학적 조성에서 하이포타우린과 상이한 (예를 들어, 하이포타우린 코어 상의 관능기 또는 치환기의 수, 위치 또는 화학적 특성이 상이한) 화학적 화합물을 지칭한다. 하이포타우린 유사체는 하이포타우린과 상이한 화학적 또는 물리적 특성을 가질 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있고, 하이포타우린과 비교하여 세포 배양 배지에서 개선된 활성을 가질 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있으며, 예를 들어 하이포타우린과 비교하여 세포 배양 배지에서 생산된 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)의 색상 강도를 추가로 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 하이포타우린 유사체는 보다 친수성일 수 있거나, 또는 이는 하이포타우린과 비교하여 변경된 반응성을 가질 수 있다. 하이포타우린 유사체는 하이포타우린의 화학적 및/또는 생물학적 활성을 모방할 수 있거나 (즉, 이는 유사하거나 동일한 활성을 가질 수 있음), 또는 일부 경우에 하이포타우린과 비교하여 증가된 또는 감소된 활성을 가질 수 있다.
- [0032] 본원에 사용된 용어 "역가"는 세포 배양에 의해 생산된 재조합적으로 발현된 폴리펩티드의 총량을 주어진 양의 배지 부피로 나눈 것을 지칭한다. 역가는 전형적으로 배지의 밀리리터당 폴리펩티드의 밀리그램의 단위로 표현된다.
- [0033] 본원에서 교환가능하게 사용되는 "핵산"은 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 지칭하고, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 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. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화 뉴클레오티드 및 그의 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 존재하는 경우에 중합체의 어셈블리 전 또는 후에 부여될 수 있다.
- [0034] "단리된 핵산"은 그의 통상의 환경의 외부의 또는 그로부터 분리된 비-자연 발생, 재조합 또는 자연 발생 서열을 의미하고, 이를 포괄한다. 단리된 핵산 분자는 자연에서 발견되는 형태 또는 환경 이외의 것이다. 따라서, 단리된 핵산 분자는 천연 세포에 존재하는 것과 같은 핵산 분자와 구별된다. 그러나, 단리된 핵산 분자는 단백질을 통상적으로 발현하는 세포 내에 함유되어 있는, 예를 들어 천연 세포의 염색체 위치와는 상이한 염색체 위치에 있는 핵산 분자를 포함한다.
- [0035] "단리된" 단백질 (예를 들어, 단리된 항체)은 그의 자연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 것이다. 그의 자연 환경의 오염 성분은 단백질에 대한 연구, 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 이는 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 단리된 단백질은 단백질 자연 환경의 적어도 한 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포 내의 계내 단백질을 포함한다. 그러나, 통상적으로, 단리된 단백질은 적어도 1회의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.
- [0036] "정제된" 폴리펩티드는, 폴리펩티드가 그의 자연 환경에서 존재하는 경우보다 및/또는 실험실 조건 하에 처음 생산 및/또는 합성 및/또는 증폭된 경우보다 더 순수한 형태로 존재하도록, 폴리펩티드의 순도가 증가된 것을 의미한다. 순도는 상대적 용어이고, 반드시 절대 순도를 의미하지는 않는다.
- [0037] "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.
- [0038] 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 본원에서 교환가능하게 사용되며, 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 지칭한다. 이러한 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 변형된 아미노산을 포함할 수 있으며, 비-아미노산이 개재될 수 있다. 상기 용어는 또한 자연적으로 또는 개입, 예를 들어 디설피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화 또는 임의의 다른 조작 또는 변형, 예컨대 표지 성분과의 접합에 의해 변형된 아미노산 중합체를 포괄한다. 또한 상기 정의에는, 예를 들어 하나 이상의 아미노산 유사체 (예를 들어, 비천연 아미노산 등 포함) 뿐만 아니라 관련 기술분야에 공지된 다른 변형을 함유하는 폴리펩티드가 포함된다. 본원의 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 나

트롬비노 인자; 폐 계면활성제; 플라스미노겐 활성화인자, 예컨대 우로키나제 또는 인간 소변 또는 조직-유형 플라스미노겐 활성화제 (t-PA); 붐베신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 중앙 피사 인자-알파 및 -베타; 엔케팔리나제; RANTES (활성화시에 정상 T-세포 발현 및 분비 조절); 인간 대식세포 염증성 단백질 (MIP-1-알파); 혈청 알부민, 예컨대 인간 혈청 알부민; 필러-억제 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-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 또는 TGF-β5; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II (IGF-I 및 IGF-II); des(1-3)-IGF-I (뇌 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; 슈퍼옥시드 디스무타제; T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 붕괴 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; 중앙 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.

[0039] 용어 "항체"는 본원에서 가장 광범위한 의미로 사용되고, 구체적으로 모노클로날 항체 (예를 들어, 전장 모노클로날 항체), 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함한다. 항체는 인간, 인간화 및/또는 친화도 성숙 항체일 수 있다.

[0040] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체들의 집단으로부터 수득한 항체를 지칭하며, 즉 집단을 구성하는 개별 항체는 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대해 지시되어 고도로 특이적이다. 또한, 상이한 결정기 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 반대로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대해 지시된다. 그의 특이성 이외에도, 모노클로날 항체는 다른 항체에 의해 오염되지 않고 합성될 수 있다는 점에서 유리하다. 수식어 "모노클로날"은 임의의 특정한 방법에 의해 항체 생산을 필요로 하는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는, 예를 들어 하이브리도마 방법 (예를 들어, 문헌 [Kohler and Milstein, Nature, 256:495-97 (1975); Hongo et al., Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)], 박테리아, 진핵 동물 또는 식물 세포에서의 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조); 파지-디스플레이 기술 (예를 들어, 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004)] 참조), 및 인간 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 인간 이뮤노글로불린 유전자좌 또는 유전자의 일부 또는 전부를 갖는 동물에서 인간 또는 인간-유사 항체를 생산하는 기술 (예를 들어, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993)]; 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016; 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996); 및 Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)] 참조)을 비롯한 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0041] 용어 "제약 제제"는 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이도록 하는 형태로 존재하며 제제를 투여할 대상체에 게 허용되는 양의 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다. 이러한 제제는 멸균된다.

[0042] "제약상 허용되는" 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 그에 노출되는 세포 또는 포유동

물에게 비독성인 것이다 (Remington's Pharmaceutical Sciences (20th edition), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). 종종, 생리학상 허용되는 담체는 수성 pH 완충 용액이다. 생리학상 허용되는 담체의 예는 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산; 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 덱스트린; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당 알콜, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 트윈(Tween)TM, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 플루로닉스(Pluronic)TM를 포함한다.

- [0043] "평균" 제제는 무균이거나, 또는 모든 살아있는 미생물 및 그의 포자가 없거나, 실질적으로 없다.
- [0044] "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.
- [0045] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태는 내용상 달리 명백히 지시되지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "화합물"에 대한 언급은 2개의 이상의 상기 화합물의 조합 등을 포함한다.
- [0046] 본원에 기재된 본 발명의 측면 및 실시양태는 측면 및 실시양태를 "포함하는", 이들로 "이루어진" 및 이들로 "본질적으로 이루어진" 것을 포함하는 것으로 이해된다.
- [0047] 본원에서 "약" 값 또는 파라미터에 대한 언급은 값 또는 파라미터 그 자체에 대한 실시양태를 포함 (및 기재)한다. 예를 들어, "약 X"를 언급하는 기재는 "X"의 기재를 포함한다. 수치 범위는 그 범위를 규정하는 숫자를 포함한다.
- [0048] 본 발명의 측면 또는 실시양태가 마쿠쉬(Markush) 군 또는 다른 대안적 분류의 관점에서 기재되는 경우, 본 발명은 총괄적으로 열거된 전체 군, 뿐만 아니라 상기 군의 개별적인 각각의 구성원, 및 주요 군의 모든 가능한 하위군, 뿐만 아니라 군 구성원 중 하나 이상이 부재하는 주요 군을 포괄한다. 본 발명은 또한 청구된 발명에서 임의의 군 구성원 중 하나 이상의 명확한 배제를 고려한다.
- [0049] II. 세포 배양 배지
- [0050] 본원에 제공된 세포 배양 배지는 본원에 상술된 바와 같은 방법 (예를 들어, 세포를 배양하는 방법 및 폴리펩티드를 생산하는 방법) 및 조성물 (예를 들어, 제약 제제)에서 유용할 수 있다. 배지 성분은 허용되는 품질 속성, 예컨대 허용되는 색상 강도를 갖는 폴리펩티드 제품 (예를 들어, 치료 단백질)을 제공할 수 있는 것으로 확인되었다. 이들 확인된 배지 성분 중 하나 이상은 허용되는 색상 강도를 갖는 폴리펩티드 제품을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은, 폴리펩티드 제품 (예를 들어, 폴리펩티드를 포함하는 조성물)의 "허용되는 색상 강도"는 폴리펩티드 제품의 규제 승인에 요구되는 색상 강도 또는 로트별 회분의 폴리펩티드 제품에서 일관성을 평가하는데 사용하기에 바람직한 색상 강도를 지칭할 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 배지 성분은 항산화제이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 배지 성분은 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 안세린, 부틸화 히드록시아니솔, 카르노신, 리포산, 퀘르시트린 수화물 및 아미노구아니딘으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 배지 성분은 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체이다. 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체는 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 시스테아민, 시스테인술피산 및 타우린으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 배지 성분은 타우린, 환원형 리포산 또는 카르베딜롤이다.
- [0051] 배지 성분은 관련 기술분야에 공지된 형태로 세포 배양 배지에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 하이포타우린은 CAS 번호 300-84-5로 확인되는 화합물로서 제공될 수 있고, s-카르복시메틸시스테인은 CAS 번호 638-23-3으로 확인되는 화합물로서 제공될 수 있고, 안세린은 CAS 번호 10030-52-1로 확인되는 화합물로서 제공될 수 있고, 부틸화 히드록시아니솔은 CAS 번호 25013-16-5로 확인되는 화합물로서 제공될 수 있고, 카르노신은 CAS 번호 305-84-0으로 확인되는 화합물로서 제공될 수 있고, 리포산은 CAS 번호 1200-22-2로 확인되는 화합물로서 제공될 수 있고, 퀘르시트린 수화물은 CAS 번호 522-12-3으로 확인되는 화합물로서 제공될 수 있다. 또 다른 예로서, 하이포타우린의 유사체 또는 전구체, 예컨대 s-카르복시메틸시스테인, 시스테아민, 시스테인술피산 및/또는 타우린이 제공될 수 있다. 일부 실시양태에서, s-카르복시메틸시스테인은 CAS 번호 638-23-3으로 확인되는 화

합물로서 제공되고, 시스테인은 CAS 번호 60-23-1로 확인되는 화합물로서 제공되고, 시스테인술폰산은 CAS 번호 1115-65-7로 확인되는 화합물로서 제공되고, 타우린은 CAS 번호 107-35-7로 확인되는 화합물로서 제공된다. 일부 실시양태에서, 표 4에 열거된 화합물, 예컨대 CAS 번호 462-20-4로 확인되는 환원형 리포산 또는 CAS 번호 72956-09-3으로 확인되는 카르베딜롤이 제공된다. 일부 실시양태에서, 아미노구아니딘은 CAS 번호 1937-19-5로 확인되는 아미노구아니딘 히드로클로라이드로서 제공된다. 본원에 제공된 배지 성분은 염, 수화물 또는 염 수화물, 또는 통상의 기술자에게 공지된 임의의 다른 형태로 세포 배양 배지에 제공될 수 있다. 배지 성분은 또한 용액, 추출물, 또는 고체 형태로 세포 배양 배지에 제공될 수 있다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 화학적으로 규정된 배지이다. 본원의 다른 실시양태에서, 세포 배양 배지는 화학적으로 규정되지 않은 배지이다.

[0052] 일부 측면에서, 본원에서 본 발명은 하기 성분: (a) 하이포타우린; (b) s-카르복시메틸시스테인; (c) 카르노신; (d) 안세린; (e) 부틸화 히드록시아니솔; (f) 리포산; (g) 퀘르시트린 수화물; 및 (h) 아미노구아니딘 중 하나 이상을 포함하는 세포 배양 배지를 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 성분 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) 및 (h) 중 2개 또는 3개 또는 4개 또는 5개 또는 6개 또는 각각을 포함한다. 본원에 제공된 세포 배양 배지는 각각의 및 모든 조합이 구체적으로 및 개별적으로 열거되는 것과 같이 성분 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) 및 (h)의 임의의 조합을 함유할 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 성분 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) 및 (h) 중 4개를 포함하는 세포 배양 배지는 상기 성분 중 적어도 4개가 존재하는 한 성분의 모든 조합을 포함할 수 있는 것으로 이해된다.

[0053] 일부 측면에서, 본원에 제공된 세포 배양 배지는 (a) 하이포타우린; (b) s-카르복시메틸시스테인; (c) 카르노신; (d) 안세린; (e) 부틸화 히드록시아니솔; (f) 리포산; (g) 퀘르시트린 수화물; 및 (h) 아미노구아니딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 배지 성분을 표 1에 기재된 양으로 함유한다. 배지는 성분 및 양의 각각의 및 모든 조합이 구체적으로 및 개별적으로 열거되는 것과 같이, 표 1의 배지 성분 중 어느 하나 이상 (예를 들어, 성분 (a)-(h) 중 어느 하나 이상, 예컨대 성분 (a), (b), (c), (d) 및 (e)를 포함하는 배지 또는 성분 (a), (b) 및 (g)를 포함하는 배지 또는 성분 (a)-(h) 중 단 1개를 포함하는 배지)을 표 1에 열거된 임의의 양으로 포함할 수 있는 것으로 이해된다. 한 측면에서, 세포 배양 배지는 화학적으로 규정된 배지이다. 또 다른 측면에서, 세포 배양 배지는 화학적으로 규정되지 않은 배지이다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하며, 여기서 (a)는 적어도 약 0.0001 mM의 하이포타우린이고; (b)는 적어도 약 0.0001 mM의 s-카르복시메틸시스테인이고; (c)는 적어도 약 0.0001 mM의 카르노신이고; (d)는 적어도 약 0.0001 mM의 안세린이고; (e)는 적어도 약 0.0001 mM의 부틸화 히드록시아니솔이고; (f)는 적어도 약 0.0001 mM의 리포산이고; (g)는 적어도 약 0.0001 mM의 퀘르시트린 수화물이고; (h)는 적어도 약 0.0003 mM의 아미노구아니딘이다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하며, 여기서 (a)는 약 2.0 mM 내지 약 50.0 mM의 하이포타우린이고; (b)는 약 8.0 mM 내지 약 12.0 mM의 s-카르복시메틸시스테인이고; (c)는 약 8.0 mM 내지 약 12.0 mM의 카르노신이고; (d)는 약 3.0 mM 내지 약 5.0 mM의 안세린이고; (e)는 약 0.025 mM 내지 약 0.040 mM의 부틸화 히드록시아니솔이고; (f)는 약 0.040 mM 내지 약 0.060 mM의 리포산이고; (g)는 약 0.010 mM 내지 약 0.020 mM의 퀘르시트린 수화물이고; (h)는 약 0.0003 mM 내지 약 10 mM의 아미노구아니딘이다.

[0054] 표 1. 배지 성분의 예시적인 양

성분	배지 중 성분의 양
(a) 하이포타우린	약 0.0001 mM 내지 약 920 mM; 약 0.001 mM 내지 약 920 mM; 약 0.01 mM 내지 약 920 mM; 약 0.1 mM 내지 약 920 mM; 약 0.5 mM 내지 약 920 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 820 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 720 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 620 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 520 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 420 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 320 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 220 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 120 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 20 mM; 약 1.0 mM 내지 약 920 mM; 약 10.0 mM 내지 약 920 mM; 약 20.0 mM 내지 약 920 mM; 약 40.0 mM 내지 약 920 mM; 약 80.0 mM 내지 약 920 mM; 약 160.0 mM 내지 약 920 mM; 약 320 mM 내지 약 920 mM; 약 640 mM 내지 약 920 mM; 약 800 mM 내지 약 920 mM; 약 0.75 mM 내지 약 700 mM; 약 1.0 mM 내지 약 500 mM; 약 1.25 mM 내지 약 300 mM; 약 1.5 mM 내지 100 mM; 약 1.6 mM 내지 약 90 mM; 약 1.7 mM 내지 약 80 mM; 약 1.8 mM 내지 약 70 mM; 약 1.8 mM 내지 약 60 mM; 약 1.8 mM 내지 약 50 mM; 약 2 mM 내지 약 50 mM; 약 5 mM 내지 약 50 mM; 약 10 mM 내지 약 50 mM; 약 15 mM 내지 약 50 mM; 약 20 mM 내지 약 50 mM; 약 30 mM 내지 약 50 mM; 약 40 mM 내지 약 50 mM; 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.1 또는 1.0 또는 2.0 또는 3.0 또는 4.0 또는 5.0 또는 9.0 또는 12 또는 25 또는 38 또는 45 또는 50 mM 중 어느 하나; 적어도 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.1 또는 1.0 또는 2.0 또는 3.0 또는 4.0 또는 5.0 또는 9.0 또는 12 mM 중 어느 하나 및 약 60 또는 55 또는 50 또는 45 또는 40 mM 이하.

[0055]

<p>(b) s- 카르복시메틸 시스테인</p>	<p>약 0.0001 mM 내지 약 120 mM; 약 0.001 mM 내지 약 120 mM; 약 0.01 mM 내지 약 120 mM; 약 0.1 mM 내지 약 120 mM; 약 0.5 mM 내지 약 120 mM; 약 0.0001 mM 내지 100 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 80 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 60 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 40 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 20 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 10 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 120 mM; 약 10 mM 내지 약 120 mM; 약 20 mM 내지 약 120 mM; 약 40 mM 내지 약 120 mM; 약 60 mM 내지 약 120 mM; 약 80 mM 내지 약 120 mM; 약 100 mM 내지 약 120 mM; 약 1.0 mM 내지 약 100 mM; 약 2.0 mM 내지 약 75 mM; 약 3.0 mM 내지 약 50 mM; 약 4.0 mM 내지 약 25 mM; 약 5.0 mM 내지 약 15 mM; 약 6.0 mM 내지 약 14 mM; 약 7.0 mM 내지 약 13 mM; 8.0 mM 내지 약 12 mM; 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.1 또는 1.0 또는 2.0 또는 3.0 또는 4.0 또는 5.0 또는 10 또는 15 또는 20 mM 중 어느 하나; 적어도 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.1 또는 1.0 또는 2.0 또는 3.0 또는 4.0 또는 5.0 또는 8.0 또는 10 또는 12 mM 중 어느 하나 및 약 25 또는 20 또는 15 mM 이하.</p>
<p>(c) 카르노신</p>	<p>약 0.0001 mM 내지 약 20 mM; 약 0.001 mM 내지 약 20 mM; 약 0.01 mM 내지 약 20 mM; 약 0.1 mM 내지 약 20 mM; 약 0.5 mM 내지 약 20 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 15 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 10 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 5.0 mM; 약 1.0 mM 내지 약 20 mM; 약 5.0 mM 내지 약 20 mM; 약 10 mM 내지 약 20 mM; 약 15 mM 내지 약 20 mM; 약 2.0 mM 내지 약 18 mM; 약 4.0 mM 내지 약 16 mM; 약 6.0 mM 내지 약 14 mM; 약 8.0 mM 내지 약 12 mM; 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.1 또는 1.0 또는 2.0 또는 3.0 또는 4.0 또는 5.0 또는 6.0 또는 7.0 또는 8.0 또는 9.0 또는 10 또는 11 또는 12 또는 13 또는 14 mM 중 어느 하나; 적어도 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.1 또는 1.0 또는 2.0 또는 3.0 또는 4.0 또는 5.0 또는 6.0 또는 7.0 또는 8.0 또는 9.0 또는 10 또는 11 중 어느 하나 및 15 또는 14 또는 13 mM 이하.</p>

[0056]

(d) 안제린	<p>약 0.0001 mM 내지 약 20 mM; 약 0.001 mM 내지 약 20 mM; 약 0.01 mM 내지 약 20 mM; 약 0.1 mM 내지 약 20 mM; 약 0.5 mM 내지 약 20 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 15 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 10 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 5.0 mM; 약 1.0 mM 내지 약 20 mM; 약 5.0 mM 내지 약 20 mM; 약 10 mM 내지 약 20 mM; 약 15 mM 내지 약 20 mM; 약 1.0 mM 내지 약 15 mM; 약 2.0 mM 내지 약 10 mM; 약 3.0 mM 내지 약 5.0 mM; 약 3.2 mM 내지 약 5.0 mM; 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.1 또는 1.0 또는 2.0 또는 3.0 또는 4.0 또는 5.0 또는 6.0 또는 7.0 또는 8.0 mM 중 어느 하나; 적어도 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.1 또는 1.0 또는 2.0 또는 3.0 또는 4.0 또는 5.0 mM 중 어느 하나 및 9.0 또는 8.0 또는 7.0 또는 6.0 mM 이하.</p>
(e) 부틸화 히드록시아니솔	<p>약 0.0001 mM 내지 약 0.2 mM; 약 0.001 mM 내지 약 0.2 mM; 약 0.005 mM 내지 약 0.2 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 0.15 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 0.1 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 0.05 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 0.04 mM; 약 0.01 mM 내지 약 0.2 mM; 약 0.05 mM 내지 약 0.2 mM; 약 0.1 mM 내지 약 0.2 mM; 약 0.15 mM 내지 약 0.2 mM; 약 0.01 mM 내지 약 0.15 mM; 약 0.015 mM 내지 약 0.1 mM; 약 0.02 mM 내지 약 0.05 mM; 약 0.025 mM 내지 약 0.04 mM; 약 0.03 mM 내지 약 0.04 mM; 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.015 또는 0.02 또는 0.025 또는 0.03 또는 0.035 또는 0.04 또는 0.045 또는 0.05 또는 0.055 또는 0.06 mM 중 어느 하나; 적어도 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.015 또는 0.02 또는 0.025 또는 0.03 또는 0.035 또는 0.04 mM 중 어느 하나 및 0.06 또는 0.055 또는 0.05 mM 이하.</p>

[0057]

<p>(f) 리포산</p>	<p>약 0.0001 mM 내지 약 1.5 mM; 약 0.001 mM 내지 약 1.5 mM; 약 0.01 mM 내지 약 1.5 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 1.25 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 1.0 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 0.75 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 0.5 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 0.25 mM; 약 0.05 mM 내지 약 1.5 mM; 약 0.1 mM 내지 약 1.5 mM; 약 0.25 mM 내지 약 1.5 mM; 약 0.5 mM 내지 약 1.5 mM; 약 0.75 mM 내지 약 1.5 mM; 약 1.0 mM 내지 약 1.5 mM; 약 1.25 mM 내지 약 1.5 mM; 약 0.02 mM 내지 약 1.25 mM; 약 0.03 mM 내지 약 1.0 mM; 약 0.032 mM 내지 약 0.1 mM; 약 0.034 mM 내지 약 0.09 mM; 약 0.036 mM 내지 약 0.08 mM; 약 0.038 mM 내지 약 0.07 mM; 약 0.04 mM 내지 약 0.06 mM; 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.02 또는 0.03 또는 0.04 또는 0.05 또는 0.06 또는 0.07 또는 0.08 또는 0.09 mM 중 어느 하나; 적어도 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.02 또는 0.03 또는 0.04 또는 0.05 mM 중 어느 하나 및 0.09 또는 0.08 또는 0.07 mM 이하.</p>
<p>(g) 퀘르시트린 수화물</p>	<p>약 0.0001 mM 내지 약 0.04 mM; 약 0.001 mM 내지 약 0.04 mM; 약 0.005 mM 내지 약 0.04 mM; 약 0.001 mM 내지 약 0.035 mM; 약 0.001 mM 내지 약 0.03 mM; 약 0.001 mM 내지 약 0.025 mM; 약 0.001 mM 내지 약 0.02 mM; 약 0.001 mM 내지 약 0.015 mM; 약 0.001 mM 내지 약 0.01 mM; 약 0.01 mM 내지 약 0.04 mM; 약 0.015 mM 내지 약 0.04 mM; 약 0.02 mM 내지 약 0.04 mM; 약 0.025 mM 내지 약 0.04 mM; 약 0.03 mM 내지 약 0.04 mM; 약 0.035 mM 내지 약 0.04 mM; 약 0.0075 mM 내지 약 0.035 mM; 약 0.01 mM 내지 약 0.03 mM; 약 0.015 mM 내지 약 0.025 mM; 약 0.01 mM 내지 약 0.02 mM; 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.011 또는 0.012 또는 0.013 또는 0.014 또는 0.015 또는 0.016 mM 중 어느 하나; 적어도 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.011 또는 0.012 또는 0.013 또는 0.014 mM 중 어느 하나 및 0.02 또는 0.019 또는 0.018 mM 이하.</p>

[0058]

<p>(h) 아미노구아니딘</p>	<p>약 0.0003 내지 약 245 mM; 약 0.0003 내지 약 200 mM; 약 0.0003 내지 약 150 mM; 약 0.0003 내지 약 125 mM; 약 0.0003 내지 약 100 mM; 약 0.0003 내지 약 75 mM; 약 0.0003 내지 약 50 mM; 약 0.0003 내지 약 40 mM; 약 0.0003 내지 약 30 mM; 약 0.0003 내지 약 25 mM; 약 0.0003 내지 약 20 mM; 약 0.0003 내지 약 15 mM; 약 0.0003 내지 약 10 mM; 약 0.0003 내지 약 7.5 mM; 약 0.0003 내지 약 5 mM; 약 0.0003 내지 약 2.5 mM; 약 0.0003 내지 약 1 mM; 약 0.003 내지 약 100 mM; 약 0.03 내지 약 100 mM; 약 0.3 내지 약 100 mM; 약 0.003 내지 약 10 mM; 약 0.03 내지 약 10 mM; 약 0.3 내지 약 10 mM; 약 0.0003, 0.003, 0.03, 0.3, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 및 10 mM 중 어느 하나.</p>
--------------------	--

[0059]

[0060] 일부 측면에서, 본원에서 본 발명은 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 시스테아민, 시스테인술폰산 및 타우린으로 이루어진 군으로부터 선택된 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지를 제공한다. 일부 측면에서, 세포 배양 배지는 하기 성분: (a) 하이포타우린; (b) s-카르복시메틸시스테인; (c) 시스테아민; (d) 시스테인술폰산; 및 (e) 타우린 중 하나 이상을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 성분 (a), (b), (c), (d) 및 (e) 중 2개 또는 3개 또는 4개 또는 각각을 포함한다. 본원에 제공된 세포 배양 배지는 각각의 및 모든 조합이 구체적으로 및 개별적으로 열거되는 것과 같이, 성분 (a), (b), (c), (d) 및 (e)의 임의의 조합을 함유할 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 성분 (a), (b), (c), (d) 및 (e) 중 3개를 포함하는 세포 배양 배지는 성분 중 적어도 3개가 존재하는 한 성분의 모든 조합을 포함할 수 있는 것으로 이해된다. 하이포타우린 유사체는 예를 들어 s-카르복시메틸시스테인, 시스테아민, 시스테인술폰산 및 타우린을 포함한다. 하이포타우린 전구체의 예는 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있고, 일부 측면에서 하이포타우린 전구체는 하이포타우린 유사체일 수 있다.

[0061] 일부 측면에서, 본원에 제공된 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 표 2에 기재된 양으로 함유한다. 배지는 성분 및 양의 각각의 및 모든 조합이 구체적으로 및 개별적으로 열거되는 것과 같이, 표 2의 배지 성분 중 어느 하나 이상 (예를 들어, 성분 (a)-(e) 중 어느 하나 이상, 예컨대 성분 (a), (b), (c) 및 (d)를 포함하는 배지 또는 성분 (a), (b) 및 (c)를 포함하는 배지 또는 성분 (a)-(e) 중 단 1개를 포함하는 배지)을 표 2에 열거된 임의의 양으로 포함할 수 있는 것으로 이해된다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체, 예컨대 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 시스테아민, 시스테인술폰산 및/또는 타우린을 적어도 약 0.0001 mM의 농도로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체, 예컨대 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 시스테아민, 시스테인술폰산 및/또는 타우린을 약 0.5 mM 내지 약 500.0 mM의 농도로 포함한다.

[0062] 표 2. 배지 성분의 예시적인 양

성분	배지 중 성분의 양
(a) 하이포타우린	약 0.0001 mM 내지 약 920 mM; 약 0.001 mM 내지 약 920 mM; 약 0.01 mM 내지 약 920 mM; 약 0.1 mM 내지 약 920 mM; 약 0.5 mM 내지 약 920 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 820 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 720 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 620 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 520 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 420 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 320 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 220 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 120 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 20 mM; 약 1.0 mM 내지 약 920 mM; 약 10.0 mM 내지 약 920 mM; 약 20.0 mM 내지 약 920 mM; 약 40.0 mM 내지 약 920 mM; 약 80.0 mM 내지 약 920 mM; 약 160.0 mM 내지 약 920 mM; 약 320 mM 내지 약 920 mM; 약 640 mM 내지 약 920 mM; 약 800 mM 내지 약 920 mM; 약 0.75 mM 내지 약 700 mM; 약 1.0 mM 내지 약 500 mM; 약 1.25 mM 내지 약 300 mM; 약 1.5 mM 내지 100 mM; 약 1.6 mM 내지 약 90 mM; 약 1.7 mM 내지 약 80 mM; 약 1.8 mM 내지 약 70 mM; 약 1.8 mM 내지 약 60 mM; 약 1.8 mM 내지 약 50 mM; 약 2 mM 내지 약 50 mM; 약 5 mM 내지 약 50 mM; 약 10 mM 내지 약 50 mM; 약 15 mM 내지 약 50 mM; 약 20 mM 내지 약 50 mM; 약 30 mM 내지 약 50 mM; 약 40 mM 내지 약 50 mM; 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.1 또는 1.0 또는 2.0 또는 3.0 또는 4.0 또는 5.0 또는 9.0 또는 12 또는 25 또는 38 또는 45 또는 50 mM 중 어느 하나; 적어도 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.1 또는 1.0 또는 2.0 또는 3.0 또는 4.0 또는 5.0 또는 9.0 또는 12 mM 중 어느 하나 및 약 60 또는 55 또는 50 또는 45 또는 40 mM 이하.

[0063]

<p>(b) s-카르복시메틸시스테인</p>	<p>약 0.0001 mM 내지 약 120 mM; 약 0.001 mM 내지 약 120 mM; 약 0.01 mM 내지 약 120 mM; 약 0.1 mM 내지 약 120 mM; 약 0.5 mM 내지 약 120 mM; 약 0.0001 mM 내지 100 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 80 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 60 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 40 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 20 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 10 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 120 mM; 약 10 mM 내지 약 120 mM; 약 20 mM 내지 약 120 mM; 약 40 mM 내지 약 120 mM; 약 60 mM 내지 약 120 mM; 약 80 mM 내지 약 120 mM; 약 100 mM 내지 약 120 mM; 약 1.0 mM 내지 약 100 mM; 약 2.0 mM 내지 약 75 mM; 약 3.0 mM 내지 약 50 mM; 약 4.0 mM 내지 약 25 mM; 약 5.0 mM 내지 약 15 mM; 약 6.0 mM 내지 약 14 mM; 약 7.0 mM 내지 약 13 mM; 8.0 mM 내지 약 12 mM; 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.1 또는 1.0 또는 2.0 또는 3.0 또는 4.0 또는 5.0 또는 10 또는 15 또는 20 mM 중 어느 하나; 적어도 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.1 또는 1.0 또는 2.0 또는 3.0 또는 4.0 또는 5.0 또는 8.0 또는 10 또는 12 mM 중 어느 하나 및 약 25 또는 20 또는 15 mM 이하.</p>
<p>(c) 시스테인</p>	<p>약 0.0001 mM 내지 약 300 mM; 약 0.001 mM 내지 약 300 mM; 약 0.01 mM 내지 약 300 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 250 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 200 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 150 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 100 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 50 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 1 mM; 약 1 mM 내지 약 300 mM; 약 50 mM 내지 약 300 mM; 약 100 mM 내지 약 300 mM; 약 150 mM 내지 약 300 mM; 약 200 mM 내지 약 300 mM; 약 250 mM 내지 약 300 mM; 약 0.02 mM 내지 약 300 mM; 약 0.03 mM 내지 약 200 mM; 약 0.04 mM 내지 약 100 mM; 약 0.05 mM 내지 약 50 mM; 약 0.02 mM 내지 약 1 mM; 약 0.04 mM 내지 약 0.8 mM; 약 0.06 mM 내지 약 0.6 mM; 약 0.08 mM 내지 약 0.4 mM; 약 0.1 mM 내지 약 0.2 mM; 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.02 또는 0.05 또는 0.1 또는 0.25 또는 0.5 또는 1 또는 5 또는 10 또는 25 또는 50 또는 100 또는 200 또는 300 mM 중 어느 하나; 적어도 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.02 또는 0.05 또는 0.1 또는 0.25 mM 및 약 50 또는 40 또는 30 mM 이하.</p>

[0064]

(d) 시스테인술폰산	약 0.0001 mM 내지 100 mM; 약 0.001 mM 내지 100 mM; 약 0.01 mM 내지 100 mM; 약 0.1 mM 내지 100 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 80 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 60 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 40 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 20 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 1 mM; 약 1 내지 100 mM; 약 20 mM 내지 약 100 mM; 약 40 mM 내지 약 100 mM; 약 60 mM 내지 약 100 mM; 약 80 mM 내지 약 100 mM; 약 0.1 mM 내지 약 50 mM; 약 0.2 mM 내지 약 10 mM; 약 0.3 mM 내지 약 1 mM; 약 0.1 mM 내지 약 1 mM; 약 0.2 mM 내지 약 0.8 mM; 약 0.3 mM 내지 약 0.6 mM; 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.1 또는 0.2 또는 0.3 또는 0.4 또는 0.5 또는 0.6 또는 0.7 또는 1 또는 10 또는 25 또는 50 또는 100 mM 중 어느 하나; 적어도 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.1 또는 0.1 또는 0.2 또는 0.3 또는 0.4 mM 및 20 또는 10 또는 15 mM 이하.
(e) 타우린	약 0.0001 mM 내지 500 mM; 약 0.001 mM 내지 500 mM; 약 0.01 mM 내지 500 mM; 약 0.1 mM 내지 500 mM; 약 0.5 mM 내지 500 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 450 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 400 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 350 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 300 mM; 약 0.0001 mM 내지 250 mM; 약 0.0001 mM 내지 200 mM; 약 0.0001 mM 내지 150 mM; 약 0.0001 mM 내지 100 mM; 약 0.0001 mM 내지 약 50 mM; 약 1 mM 내지 약 500 mM; 약 50 mM 내지 약 500 mM; 약 100 mM 내지 약 500 mM; 약 150 mM 내지 약 500 mM; 약 200 mM 내지 약 500 mM; 약 250 mM 내지 약 500 mM; 약 300 mM 내지 약 500 mM; 약 350 mM 내지 약 500 mM; 약 400 mM 내지 약 500 mM; 약 450 mM 내지 약 500 mM; 약 1.0 mM 내지 약 400 mM; 약 2.0 mM 내지 약 300 mM; 약 3.0 mM 내지 약 200 mM; 약 4.0 mM 내지 약 100 mM; 약 1.0 mM 내지 약 10 mM; 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.1 또는 1 또는 2 또는 3 또는 4 또는 5 또는 6 또는 7 또는 8 또는 9 mM 중 어느 하나; 적어도 약 0.0001 또는 0.001 또는 0.01 또는 0.1 또는 1 또는 2 또는 3 또는 4 또는 5 또는 6 중 어느 하나 및 13 또는 12 또는 11 mM 이하.

[0065]

[0066]

일부 측면에서, 본원에 제공된 세포 배양 배지는 환원형 리포산을 약 0.0001 mM 내지 약 0.5 mM의 농도로 포함한다. 일부 측면에서, 본원에 제공된 세포 배양 배지는 카르베딜롤을 약 0.0001 mM 내지 약 1.5 mM의 농도로 포함한다.

[0067]

본원에 제공된 개별 배지 성분은 세포 배양 및/또는 세포 배양물로부터의 폴리펩티드 생산에 유리한 하나 이상의 특성을 유도하는 양으로 존재할 수 있다. 유리한 특성은 세포 배양물에서의 폴리펩티드 산화 감소 및/또는 본원에 제공된 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도 감소를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에 제공된 세포 배양 배지의 유리한 특성은 또한, 하나 이상의 제품 속성, 예컨대 세포에 의해 생산된 폴리펩티드의 양 (예를 들어, 항체 역가), 폴리펩티드의 글리코실화 (예를 들어, N-글리코실화) 프로파일, 조성물에서의 폴리펩티드 전하 이질성 또는 폴리펩티드의 아미노산 서열 완전성에 영향을 미치지 않는, 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도의 감소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 세포 배양 배지에서 세포를 배양하는데 유리한 하나 이상의 특성은, 세포 생존율, 세포에 의해 생산된 폴리펩티드의 양, 폴리펩티드의 글리코실화 (예를 들어, N-글리코실화) 프로파일, 조성물에서의 폴리펩티드 전하 이질성 및/또는 폴리펩티드의 아미노산 서열 완전성에

영향을 미치지 않는, 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도 감소이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 세포 배양 배지에서 세포를 배양하는데 유리한 하나 이상의 특성은 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도 감소 및 세포 배양물에서의 폴리펩티드의 산화 감소이다. 이들 유리한 특성은 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 배양하는 방법 및 관심 폴리펩티드를 본원에 기재된 세포 배양물에서 생성하는 방법에 적용가능하다.

[0068] 일부 측면에서, 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 안세린, 부틸화 히드록시아니솔, 카르노신, 리포산, 퀘르시트린 수화물 및 아미노구아니딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 배지 성분은 본원에서 세포 배양 및/또는 세포 배양물로부터의 폴리펩티드 생산에 유리한 하나 이상의 특성을 유도하는 양으로 제공된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유리한 특성을 유도하는, 세포 배양 배지 중 하이포타우린의 양은 약 0.5 mM 내지 약 100 mM, 약 1.6 mM 내지 약 90 mM, 약 1.7 mM 내지 약 80 mM, 약 1.8 mM 내지 약 70 mM, 약 1.9 mM 내지 약 60 mM, 약 2.0 mM 내지 약 50 mM, 또는 약 1.75 mM 내지 약 50 mM이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유리한 특성을 유도하는, 세포 배양 배지 중 s-카르복시메틸시스테인의 양은 약 0.5 mM 내지 약 120 mM, 약 5.0 mM 내지 약 15 mM, 약 6.0 mM 내지 약 14 mM, 약 7.0 mM 내지 약 13 mM, 또는 8.0 mM 내지 약 12 mM이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유리한 특성을 유도하는, 세포 배양 배지 중 안세린의 양은 약 0.5 mM 내지 약 20 mM, 약 2.0 mM 내지 약 10 mM, 또는 약 3.0 mM 내지 약 5.0 mM이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유리한 특성을 유도하는, 세포 배양 배지 중 부틸화 히드록시아니솔의 양은 약 0.005 mM 내지 약 0.2 mM, 약 0.02 mM 내지 약 0.05 mM, 또는 약 0.025 mM 내지 약 0.04 mM이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유리한 특성을 유도하는, 세포 배양 배지 중 카르노신의 양은 약 0.5 mM 내지 약 20 mM, 약 6.0 mM 내지 약 14 mM, 또는 약 8.0 mM 내지 약 12 mM이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유리한 특성을 유도하는, 세포 배양 배지 중 리포산의 양은 약 0.01 mM 내지 약 1.5 mM 리포산, 약 0.036 mM 내지 약 0.08 mM, 약 0.038 mM 내지 약 0.07 mM 또는 약 0.04 mM 내지 약 0.06 mM이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유리한 특성을 유도하는, 세포 배양 배지 중 퀘르시트린 수화물의 양은 약 0.005 mM 내지 약 0.04 mM, 약 0.01 mM 내지 약 0.03 mM, 약 0.015 mM 내지 약 0.025 mM 또는 약 0.01 mM 내지 약 0.02 mM이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유리한 특성을 유도하는, 세포 배양 배지 중 아미노구아니딘의 양은 약 0.0003 mM 내지 약 245 mM, 약 0.003 mM 내지 약 150 mM, 약 0.03 mM 내지 약 100 mM, 약 0.03 mM 내지 약 50 mM, 약 0.03 mM 내지 약 25 mM, 약 0.03 mM 내지 약 10 mM이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유리한 특성을 유도하는, 세포 배양 배지 중 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 안세린, 부틸화 히드록시아니솔, 카르노신, 리포산, 퀘르시트린 수화물 및 아미노구아니딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 배지 성분의 양은 표 1에 제공된다.

[0069] 일부 측면에서, 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 시스테아민, 시스테인술펜산 및 타우린으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 배지 성분은 본원에서 세포 배양 및/또는 세포 배양물로부터의 폴리펩티드 생산에 유리한 하나 이상의 특성을 유도하는 양으로 제공된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유리한 특성을 유도하는, 세포 배양 배지 중 하이포타우린의 양은 약 0.5 mM 내지 약 100 mM, 약 1.6 mM 내지 약 90 mM, 약 1.7 mM 내지 약 80 mM, 약 1.8 mM 내지 약 70 mM, 약 1.9 mM 내지 약 60 mM, 약 2.0 mM 내지 약 50 mM, 또는 약 1.75 mM 내지 약 50 mM이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유리한 특성을 유도하는, 세포 배양 배지 중 s-카르복시메틸시스테인의 양은 약 0.5 mM 내지 약 120 mM, 약 5.0 mM 내지 약 15 mM, 약 6.0 mM 내지 약 14 mM, 약 7.0 mM 내지 약 13 mM, 또는 약 8.0 mM 내지 약 12 mM이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유리한 특성을 유도하는, 세포 배양 배지 중 시스테아민의 양은 약 0.01 mM 내지 약 300 mM, 약 0.02 mM 내지 약 1 mM, 약 0.04 mM 내지 약 0.8 mM, 약 0.06 mM 내지 약 0.6 mM, 약 0.08 mM 내지 약 0.4 mM, 또는 약 0.1 mM 내지 약 0.2 mM이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유리한 특성을 유도하는, 세포 배양 배지 중 시스테인술펜산의 양은 약 0.1 mM 내지 100 mM, 약 0.2 mM 내지 약 10 mM, 약 0.3 mM 내지 약 1 mM, 약 0.1 mM 내지 약 1 mM, 약 0.2 mM 내지 약 0.8 mM, 또는 약 0.3 mM 내지 약 0.6 mM이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유리한 특성을 유도하는, 세포 배양 배지 중 타우린의 양은 약 0.5 mM 내지 500 mM, 약 4.0 mM 내지 약 100 mM, 또는 약 1.0 mM 내지 약 10 mM이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유리한 특성을 유도하는, 세포 배양 배지 중 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 시스테아민, 시스테인술펜산 및 타우린으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 배지 성분의 양은 표 2에 제공된다.

[0070] 본원에 제공된 세포 배양 배지는 한 측면에서, 세포 배양물에서 폴리펩티드를 생산하는 방법에 사용되는 경우에, 상이한 배지에서 생산된 폴리펩티드의 품질 속성과 비교하여 하나 이상의 유리한 제품 품질 속성을 유도한다. 특정한 배지 성분의 사용을 통해 형성된 반응성 산소 종 (ROS)은 폴리펩티드 상의 특정 아미노산을 산화시켜 산화된 폴리펩티드 생성물을 생산할 수 있다. 이러한 산화된 단백질 종의 존재는 또한 임의의 농도, 예컨대 비제한적으로 약 1 mg/mL, 약 10 mg/mL, 약 25 mg/mL, 약 50 mg/mL 또는 약 75 mg/mL 내지 100 mg/mL 중

어느 하나 초과 농도로 제제화된 폴리펩티드 제품에 있어서 특히 중요할 수 있는 단백질 제품의 제품 품질 속성, 예컨대 색상 강도를 변경시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 산화된 단백질 종의 존재는 약 100 mg/mL, 약 125 mg/mL, 약 150 mg/mL, 약 175 mg/mL, 약 200 mg/mL 또는 약 250 mg/mL 중 어느 하나 초과 농도로 제제화된 폴리펩티드 제품에 있어서 특히 중요할 수 있는 단백질 제품의 제품 품질 속성, 예컨대 색상 강도를 변경시킬 수 있다. 본원에 상술된 배지를 사용하여 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물 (적어도 약 1 mg/mL, 약 10 mg/mL, 약 50 mg/mL, 약 100 mg/mL, 약 150 mg/mL, 200 mg/mL 또는 약 250 mg/mL의 폴리펩티드, 예컨대 항체를 포함하는 조성물 포함)의 색상 강도는, 본원에 또는 비제한적으로 미국 약전 색상 표준 및 유럽 약전 색상 표준에 기재 것과 같은 색상 검정을 이용하여 평가될 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]를 참조하며, 이들은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 본원의 임의의 실시양태에서, 본원에 제공된 세포 배양 배지는 색상 검정에 의해 측정시에 참조 용액과 비교하여 감소된 색상 강도를 갖는, 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 제조에 사용될 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 세포 배양 배지를 사용하여 생산된 폴리펩티드 (예를 들어, 치료 폴리펩티드)를 포함하는 조성물 (예를 들어, 제약 제제)의 색상 강도는 표 1 또는 표 2의 성분 중 하나 이상을 포함하지 않는 세포 배양 배지를 사용하여 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물과 비교하여 적어도 약 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% 또는 그 초과를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 양만큼 감소될 수 있다.

[0071] 세포를 배양하는데 적합한 상업적으로 입수가능한 배지, 예컨대 비제한적으로 햄 F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 ([MEM], 시그마), RPMI-1640 (시그마), 돌베코 변형 이글 배지 ([DMEM], 시그마), 루리아 브로쓰 (LB) 및 테리픽 브로쓰 (TB)는 본원에 상술된 임의의 배지 성분으로 (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), Vijayasankaran et al., Biomacromolecules., 6:605:611 (2005), Patkar et al., J Biotechnology, 93:217-229 (2002)], 미국 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 또는 4,560,655; WO 90/03430; WO 87/00195; 미국 특허 등록 번호 30,985; 또는 미국 특허 번호 5,122,469 (이들 모두의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 임의의 배지가 본원에 상술된 임의의 배지 성분으로 (예를 들어, 제공된 바와 같은 키트의 사용에 의해) 보충될 수 있다.

[0072] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 세포 배양 배지는 시스테인을 포함하고, 시스테인을 함유하지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 세포 배양 배지는 시트르산제2철을 포함하고, 황산제1철을 함유하지 않는다. 본원의 일부 실시양태에서, 제공된 세포 배양 배지는 시스테인 및 황산제1철을 함유하지 않는다. 일부 실시양태에서, 배지는 시스테인 및 황산제1철을 함유하지 않고, 시스테인 및/또는 시트르산제2철을 포함한다. 본원의 임의의 실시양태에서, 세포 배양 배지는 기초 배지 또는 공급 배지일 수 있다. 아미노산, 비타민, 미량 원소 및 다른 배지 성분을 유럽 특허 EP 307,247 또는 미국 특허 번호 6,180,401에 명시된 범위의 1 또는 2배로 사용될 수 있으며, 이들 문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0073] 본원에 제공된 임의의 배지는 또한 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대, 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 이온 (예컨대, 나트륨, 칼로라이드, 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. 일부 측면에서, 본원에 제공된 세포 배양 배지는 식물 또는 동물로부터 유래된 단백질을 함유한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 세포 배양물은 식물 또는 동물로부터 유래된 단백질을 함유하지 않는다. 임의의 다른 필요한 보충제가 또한 통상의 기술자에게 공지된 적합한 농도로 포함될 수 있다.

[0074] III. 본 발명의 방법 및 용도

[0075] 관심 폴리펩티드의 생산을 위해 본원에 제공된 세포 배양 배지에서 세포를 배양하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 측면에서, 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 세포 배양 배지와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 세포 배양 배지는 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 카르노신, 안세린, 부틸화 히드록시아니솔, 리포산 및 퀘르시트린 수화물로 이루어진 군으로부터 선택된 성분 중 하나 이상을 포함하는 것인, 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 배양하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 세포 배양 배지와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 세포 배양 배지는 (a) 하이포타우린, (b) s-카르복시메틸시스테인, (c) 카르노신, (d) 안세린, (e) 부틸화 히드록시아니솔, (f) 리포산; (g) 퀘르시트린 수화물; 및 (h) 아미노구아니딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 성분 중 하나 이

상을 포함하고, 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하는 세포 배양 배지는 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물과 비교하여 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도를 감소시키는 것인, 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 배양하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도는 적어도 약 0.1% 감소된다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도는 적어도 약 5% 감소된다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도는 약 10% 내지 약 30% 감소된다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도는 약 5% 내지 약 75% 감소된다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하나 이상의 성분을 (a) 약 2.0 mM 내지 약 50.0 mM 농도의 하이포타우린; (b) 약 8.0 mM 내지 약 12.0 mM 농도의 s-카르복시메틸시스테인; (c) 약 8.0 mM 내지 약 12.0 mM 농도의 카르노신; (d) 약 3.0 mM 내지 약 5.0 mM 농도의 안세린; (e) 약 0.025 mM 내지 약 0.040 mM 농도의 부틸화 히드록시아니솔; (f) 약 0.040 mM 내지 약 0.060 mM 농도의 리포산; (g) 약 0.010 mM 내지 약 0.020 mM 농도의 퀘르시트린 수화물; 및 (h) 약 0.0003 mM 내지 약 20 mM 농도의 아미노구아니딘으로부터 선택된 양으로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, (a) 하이포타우린, (b) s-카르복시메틸시스테인, (c) 카르노신, (d) 안세린, (e) 부틸화 히드록시아니솔, (f) 리포산; (g) 퀘르시트린 수화물; 및 (h) 아미노구아니딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 성분은 14일 세포 배양 사이클의 제0일에 세포 배양 배지에 첨가된다.

[0076] 일부 다른 측면에서, 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지와 접촉시키는 단계를 포함하는, 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 배양하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도와 비교하여 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도를 감소시키는 것인, 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 배양하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도는 적어도 약 0.1% 감소된다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도는 적어도 약 5% 감소된다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도는 약 10% 내지 약 30% 감소된다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 적어도 약 0.0001mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 약 0.5 mM 내지 약 500 mM의 농도로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 약 1.0 mM 내지 약 40 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체는 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 시스테아민, 시스테인술폰산 및 타우린으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본원의 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체는 14일 세포 배양 사이클의 제0일에 세포 배양 배지에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체는 세포 배양 사이클의 과정에 걸쳐 증분적으로 세포 배양 배지에 첨가되지 않는다.

[0077] 또한, 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 세포 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함하며, 여기서 세포 배양 배지는 (a) 하이포타우린, (b) s-카르복시메틸시스테인, (c) 카르노신, (d) 안세린, (e) 부틸화 히드록시아니솔, (f) 리포산, (g) 퀘르시트린 수화물 및 (h) 아미노구아니딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 성분 중 하나 이상을 포함하는 것인, 관심 폴리펩티드를 생산하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 세포 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함하며, 여기서 세포 배양 배지는 (a) 하이포타우린, (b) s-카르복시메틸시스테인, (c) 카르노신, (d) 안세린, (e) 부틸화 히드록시아니솔, (f) 리포산, (g) 퀘르시트린 수화물 및 (h) 아미노구아니딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 성분 중 하나 이상을 포함하고, 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하는 세포 배양 배지는 성분 (a)-(h) 중 하나 이상을 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물과 비교하여 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도를 감소시키는 것인, 관심 폴리펩티드를 생산하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도는 적어도 약 0.1% 감소된다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도는 적어도 약 5% 감소된다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도는 약 10% 내지 약 30% 감소된다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도는 약 5% 내지 약 75% 감소된다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하나 이상의 성분을 (a) 약 2.0 mM 내지 약 50.0 mM 농도의 하이포타우린; (b) 약 8.0 mM 내지 약 12.0 mM 농도의 s-카르복시메틸시스테인; (c) 약 8.0 mM 내지 약 12.0 mM 농도의 카르노신;

(d) 약 3.0 mM 내지 약 5.0 mM 농도의 안세린; (e) 약 0.025 mM 내지 약 0.040 mM 농도의 부틸화 히드록시아니솔; (f) 약 0.040 mM 내지 약 0.060 mM 농도의 리포산; (g) 약 0.010 mM 내지 약 0.020 mM 농도의 퀘르시트린 수화물; 및 (h) 약 0.0003 mM 내지 약 20 mM 농도의 아미노구아니딘으로부터 선택된 양으로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, (a) 하이포타우린, (b) s-카르복시메틸시스테인, (c) 카르노신, (d) 안세린, (e) 부틸화 히드록시아니솔, (f) 리포산; (g) 퀘르시트린 수화물; 및 (h) 아미노구아니딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 성분은 14일 세포 배양 사이클의 제0일에 세포 배양 배지에 첨가된다.

[0078] 또 다른 측면에서, 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 세포 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 관심 폴리펩티드를 생산하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 관심 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 세포 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함하며, 여기서 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하고, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하는 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도와 비교하여 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도를 감소시키는 것인, 관심 폴리펩티드를 생산하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도는 적어도 약 0.1% 감소된다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도는 적어도 약 5% 감소된다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도는 약 10% 내지 약 30% 감소된다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 적어도 약 0.0001mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 약 0.5 mM 내지 약 500 mM의 농도로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 약 1.0 mM 내지 약 40 mM의 농도로 포함한다. 본원의 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체는 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 시스테인, 시스테인술피산 및 타우린으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본원의 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체는 14일 세포 배양 사이클의 제0일에 세포 배양 배지에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체는 세포 배양 사이클의 과정에 걸쳐 증분적으로 세포 배양 배지에 첨가되지 않는다.

[0079] 본원의 임의의 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 사용된 세포 배양 배지는 화학적으로 규정된 세포 배양 배지 또는 화학적으로 규정되지 않은 세포 배양 배지일 수 있다. 본원에 제공된 세포 배양 배지는 기초 세포 배양 배지 또는 공급 세포 배지로서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 세포 배양 배지는 세포의 성장기 동안 세포를 배양하는 방법에 사용된다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 세포 배양 배지는 세포의 생산기 동안 세포를 배양하는 방법에 사용된다. 본원의 임의의 방법에서, 세포는 포유동물 세포, 예컨대 CHO 세포일 수 있다. 일부 실시양태에서, 관심 폴리펩티드는 항체 또는 그의 단편이다.

[0080] 본원의 추가 실시양태에서, 관심 폴리펩티드는 회수된다. 회수한 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 본원에 기재된 정량적 또는 정성적 색상 검정을 이용하여 색상 강도를 평가하기 전에 적어도 하나의 정제 단계에 적용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 회수한 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 액체 조성물 또는 비-액체 조성물이다. 일부 실시양태에서, 회수한 폴리펩티드를 포함하는 액체 조성물 또는 비-액체 조성물은 본원에 기재되거나 관련 기술분야에 공지된 색상 검정을 이용하여 색상 강도에 대해 평가될 수 있다. 예를 들어, 회수한 폴리펩티드를 포함하는 비-액체 조성물은 색상 강도의 측정 전에 후속적으로 재구성되는 동결건조된 조성물일 수 있다. 본원의 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도는 본원에 기재된 배지 성분 (예를 들어, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체)을 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산한 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 강도와 비교하여 적어도 0.1% 감소된다. 일부 실시양태에서, 색상 강도는 적어도 약 0.1%, 적어도 약 0.2%, 적어도 약 0.3%, 적어도 약 0.4%, 적어도 약 0.5%, 적어도 약 0.6%, 적어도 약 0.7%, 적어도 약 0.8%, 적어도 약 0.8%, 또는 적어도 약 0.9% 내지 약 1.0% 감소된다. 일부 실시양태에서, 색상 강도는 적어도 약 1%, 적어도 약 2%, 적어도 약 3%, 적어도 약 4%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90% 내지 약 100% 감소된다. 일부 실시양태에서, 색상 강도는 약 0.1%, 약 0.2%, 약 0.3%, 약 0.4%, 약 0.5%, 약 0.6%, 약 0.7%, 약 0.8%, 약 0.9% 내지 약 1.0% 감소된다. 일부 실시양태에서, 색상 강도는 약 1%, 약 2%, 약 3%, 약 4%, 약 5%, 약 6%, 약 7%, 약 8%, 약 9%, 약 10%, 약 11%, 약 12%, 약 13%, 약 14%, 약 15%, 약 16%, 약 17%, 약 18%, 약 19%, 약 20%, 약 21%, 약 22%, 약 23%, 약 24%, 약 25%, 약 26%, 약 27%, 약 28%, 약 29%, 약 30%, 약 31%, 약 32%, 약 33%, 약 34%, 약 35%, 약 45%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 내지 약 100% 감소된다. 일부 실시양태에서, 색상 강도는 약 1% 내지 약

10%, 약 5% 내지 약 15%, 약 5% 내지 약 20%, 약 5% 내지 약 25%, 약 5% 내지 약 30%, 약 5% 내지 약 35%, 약 5% 내지 약 40%, 약 5% 내지 약 45%, 약 5% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 20%, 또는 약 15% 내지 약 25% 감소된다. 일부 실시양태에서, 회수한 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 무색 또는 약간 유색의 액체 또는 조성물로 나타난다. 액체 또는 조성물은 본원에 기재된 색상 검정 또는 통상의 기술자에게 공지되어 있는 색상 검정을 이용하여 무색 또는 약간 유색인 것으로 결정될 수 있다. 추가 실시양태에서, 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 제약상 허용되는 담체를 임의로 추가로 포함하는 제약 조성물이다.

[0081] 본원에 상술된 바와 같은 폴리펩티드를 투여하는 방법이 또한 제공된다. 예를 들어, 개체에 폴리펩티드를 포함하는 제제를 투여하는 방법이 제공되며, 여기서 제제는 적어도 약 100 mg/mL, 적어도 약 125 mg/mL 또는 적어도 약 150 mg/mL 초과 농도의 폴리펩티드를 갖고, COC 검정에 의해 측정시에 B3, B4, B5, B6, B7, B8 또는 B9 초과 색상 강도 값을 갖는다. 일부 측면에서, COC 검정에 의해 결정된 색상 강도 값은 B, BY, Y, GY 또는 R 중 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되지는 않으며, 여기서 보다 높은 값은 보다 밝은 색상 강도를 나타낸다. 관심 폴리펩티드를 포함하는 제제는 개체로의 주사, 예컨대 피하 주사 (예를 들어, 인간으로의 피하 주사)에 적합할 수 있다. 일부 측면에서, 주사에 적합한 (예를 들어, 피하 주사에 적합한) 관심 폴리펩티드를 포함하는 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 색상 강도 값을 갖는다. 일부 측면에서, COC 검정에 의해 결정된 바와 같은 색상 강도 값은 B, BY, Y, GY 또는 R 중 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되지는 않으며, 여기서 보다 높은 값은 보다 밝은 색상 강도를 나타낸다.

[0082] 다른 방법이 전반에 걸쳐, 예컨대 본 발명의 간단한 개요 및 다른 곳에서 제공된다.

[0083] 폴리펩티드 생산

[0084] 본원에 상술된 세포 배양 배지는 특정한 항체를 비롯한 폴리펩티드를 생산하기 위해 세포를 배양하는 방법에 사용될 수 있다. 배지는 회분 배양, 유가식 배양 또는 관류 배양 어느 것에 의해서든 세포를 배양하는 방법에 사용될 수 있고, 본원에 기재된 폴리펩티드의 임의의 측면 또는 실시양태를 비롯한 임의의 폴리펩티드를 생산하는 방법에 사용될 수 있다. 본원에 상술된 조성물 (예를 들어, 본원에 제공된 세포 배양 배지에서 배양된 세포) 및 방법에 의해 생산되고 본원에 제공된 조성물 (예를 들어, 생산된 폴리펩티드를 포함하는 세포 배양 배지)에 존재하는 폴리펩티드는 숙주 세포에 상동성일 수 있거나, 또는 바람직하게는 외인성일 수 있고, 이는 이들이 이용되는 숙주 세포에 대해 이중성, 즉 외래 물질임을 의미한다 (예컨대 차이나이즈 햄스터 난소 세포에 의해 생산되는 인간 단백질, 또는 포유동물 세포에 의해 생산되는 효모 폴리펩티드). 한 변형법에서, 폴리펩티드는 숙주 세포에 의해 배지로 직접 분비되는 포유동물 폴리펩티드 (예컨대, 항체)이다. 또 다른 변형법에서, 폴리펩티드는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포의 용해에 의해 배지 내로 방출된다.

[0085] 숙주 세포에서 발현가능한 임의의 폴리펩티드가 본 개시내용에 따라 생산될 수 있으며, 제공된 조성물에 존재할 수 있다. 폴리펩티드는 숙주 세포에 내인성인 유전자로부터 또는 유전 공학을 통해 숙주 세포 내로 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 절편들로부터 어셈블리될 수 있거나 또는 자연적으로 발생하지 않는 하나 이상의 절편을 포함할 수 있다.

[0086] 본 발명에 따라 바람직하게 발현될 수 있는 폴리펩티드가 종종 관심있는 생물학적 또는 화학적 활성을 기초로 선택될 것이다. 예를 들어, 본 발명은 임의의 제약적 또는 상업적으로 관련된 효소, 수용체, 항체, 호르몬, 조절 인자, 항원, 결합제 등을 발현시키기 위해 이용될 수 있다.

[0087] 세포 배양물에서 폴리펩티드, 예컨대 항체를 생산하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 세포 배양물에서 항체 (예를 들어, 전장 항체, 항체 단편 및 다중특이적 항체)를 생산하기 위한 비제한적 예시적인 방법이 본원에 제공된다. 본원의 방법은 다른 단백질, 예컨대 단백질-기반 억제제의 생산을 위해 통상의 기술자에 의해 적합화될 수 있다. 단백질 (예를 들어, 치료 단백질)의 생산을 위해 일반적으로 널리 이해되며 통상적으로 이용되는 기술 및 절차에 대해서는 문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al., 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al. eds., 2003); Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., J. Wiley and Sons, 2002); Current Protocols in Protein Science, (Horswill et al., 2006); Antibodies, A Laboratory Manual (Harlow and Lane, eds., 1988); Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (R.I. Freshney, 6th ed., J. Wiley and Sons, 2010)]을 참조

하며, 이들 모두는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

- [0088] (A) 항체 제조
- [0089] 본원에 제공된 세포 배양 배지를 사용하여 세포 배양물에서 생산된 항체는 관심 항원에 대해 지시된다. 바람직하게는, 항원은 생물학적으로 중요한 폴리펩티드이고, 장애를 앓는 포유동물에게 항체를 포함하는 조성물을 투여하는 것은 상기 포유동물에서 치료 이익을 유도할 수 있다.
- [0090] (i) 항원 제조
- [0091] 임의로 다른 분자에 접합된 가용성 항원 또는 그의 단편은 항체를 생성하기 위한 면역원으로 사용될 수 있다. 막형단 분자, 예컨대 수용체의 경우에는, 이들의 단편 (예를 들어 수용체의 세포외 도메인)이 면역원으로 사용될 수 있다. 대안적으로, 막형단 분자를 발현하는 세포가 면역원으로 사용될 수 있다. 이러한 세포는 천연 공급원 (예를 들어 암 세포주)으로부터 유래될 수 있거나, 또는 막형단 분자를 발현하도록 재조합 기술에 의해 형질전환된 세포일 수 있다. 항체의 제조에 유용한 다른 항원 및 그의 형태는 통상의 기술자에게 명백할 것이다.
- [0092] (ii) 특정 항체-기반 방법
- [0093] 관심 모노클로날 항체는, 문헌 [Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975)]에 처음 기재되고 예를 들어 문헌 [Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995)], [Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)]; [Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)] 및 [Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006)] (인간-인간 하이브리도마에 관한)에 추가로 기재된 하이브리도마 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 추가의 방법은, 예를 들어 하이브리도마 세포주로부터의 모노클로날 인간 천연 IgM 항체의 생산에 관하여 미국 특허 번호 7,189,826에 기재된 방법을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술 (트리오마 기술)은 문헌 [Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) 및 Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)]에 기재되어 있다.
- [0094] 다양한 다른 하이브리도마 기술에 대해서는, 예를 들어 US 2006/258841; US 2006/183887 (완전 인간 항체), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; 및 미국 특허 번호 7,078,492 및 7,153,507 을 참조한다. 하이브리도마 방법을 사용하여 모노클로날 항체를 생산하는 예시적인 프로토콜은 하기와 같이 기재된다. 한 실시양태에서, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터를 면역화시킴으로써, 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 발생시킨다. 관심 폴리펩티드 또는 그의 단편 및 아주반트, 예컨대 모노포스포릴 지질 A (MPL)/트레할로스 디크리노미콜레이트 (TDM) (리비 이뮤노켄. 리서치, 인크.(Ribi Immunochem. Research, Inc.), 몬타나주 해밀턴)의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 항체를 유도한다. 면역화된 동물로부터의 혈청을 항-항원 항체에 대해 검정하고, 부스터 면역화를 임의로 투여한다. 항-항원 항체를 생산하는 동물로부터 림프구를 단리한다. 대안적으로, 림프구를 시험관내에서 면역화시킬 수 있다.
- [0095] 이어서, 림프구를 적합한 용제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성한다. 예를 들어, 문헌 [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]을 참조한다. 효율적으로 융합되며, 선택된 항체-생산 세포에 의한 항체의 안정한 고-수준 생산을 지지하고, HAT 배지와 같은 배지에 감수성인 골수종 세포가 사용될 수 있다. 예시적인 골수종 세포주는 뮤린 골수종 세포주, 예컨대 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center; 미국 캘리포니아주 샌디에고)로부터 입수가 가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양, 및 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection; 미국 메릴랜드주 록빌)으로부터 입수가 가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포주로부터 유래된 것들을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 또한 인간 모노클로날 항체의 생산에 대해 기재된 바 있다 (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).
- [0096] 이와 같이 제조한 하이브리도마 세포는 적합한 배양 배지, 예를 들어 융합되지 않은 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 배지에 접종하여 성장시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포에 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT) 효소가 결핍된 경우에, 하이브리도마용 배양 배지는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이며 (HAT 배지), 이러한 물질들은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다. 바람직하게는, 예를 들어 문헌 [Even et al., *Trends in Biotechnology*,

24(3), 105-108 (2006)]에 기재된 바와 같이, 태아 소 혈청과 같은 동물-유래 혈청의 사용을 감소시키기 위해 무-혈청 하이브리도마 세포 배양 방법을 사용한다.

- [0097] 문헌 [Franek, Trends in Monoclonal Antibody Research, 111-122 (2005)]에는 하이브리도마 세포 배양의 생산성을 개선하기 위한 도구로서의 올리고펩티드가 기재되어 있다. 구체적으로, 표준 배양 배지를 특정 아미노산 (알라닌, 세린, 아스파라긴, 프롤린) 또는 단백질 가수분해물 분획으로 풍부화시키면, 3 내지 6개의 아미노산 잔기로 구성된 합성 올리고펩티드에 의해 아포토시스가 유의하게 억제될 수 있다. 펩티드는 밀리몰 또는 더 높은 농도로 존재한다.
- [0098] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 모노클로날 항체의 생산에 대해 검정할 수 있다. 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침전 또는 시험관내 결합 검정, 예컨대 방사성면역검정 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 결정될 수 있다. 모노클로날 항체의 결합 친화도는, 예를 들어 스캐차드 분석에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)]을 참조한다.
- [0099] 원하는 특이성, 친화도 및/또는 활성을 갖는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 클론을 한계 희석 절차에 의해 서브클로닝하고, 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 문헌 [Goding]을 참조한다. 이러한 목적에 적합한 배양 배지는, 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 하이브리도마 세포는 본원에 제공된 세포 배양 배지에서 배양된다. 일부 실시양태에서, 하이브리도마 세포는 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 안세린, 부틸화 히드록시아니솔, 카르노신, 리포산 및 퀘르시트린 수화물로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 배지 성분을 포함하는 세포 배양 배지에서 배양된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 배지 성분은 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체이다. 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체는 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 시스테아민, 시스테인솔핀산 및 타우린으로 이루어진 균으로부터 선택된다.
- [0100] 항체는 재조합 방법을 이용하여 생산될 수 있다. 항-항원 항체의 재조합 생산을 위해, 항체를 코딩하는 핵산을 단리하여, 추가의 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제가능한 벡터 내로 삽입한다. 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 단리하고 서열분석될 수 있다. 다수의 벡터가 이용 가능하다. 벡터 성분은 일반적으로 다음: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0101] (iii) 특정 라이브러리 스크리닝 방법
- [0102] 조합 라이브러리의 사용에 의해 항체를 제조하여 원하는 활성 또는 활성들을 갖는 항체에 대해 스크리닝할 수 있다. 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고 원하는 결합 특성을 보유하는 항체에 대해 상기 라이브러리를 스크리닝하는 다양한 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 이러한 방법은 문헌 [Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, N.J., 2001)]에 일반적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 관심 항체를 생성하는 하나의 방법은 문헌 [Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93]에 기재된 바와 같은 파지 항체 라이브러리를 사용하는 것을 통한다.
- [0103] 원칙적으로, 파지 코트 단백질에 융합된 항체 가변 영역 (Fv)의 다양한 단편을 디스플레이하는 파지를 함유하는 파지 라이브러리를 스크리닝함으로써 합성 항체 클론이 선택된다. 목적하는 항원에 대한 친화성 크로마토그래피에 의해 이러한 파지 라이브러리가 패닝된다. 목적하는 항원에 결합할 수 있는 Fv 단편을 발현하는 클론이 항원에 흡착되고, 따라서 라이브러리 내의 비결합 클론으로부터 분리된다. 이후에, 결합 클론이 항원으로부터 용리되고, 항원 흡착/용리의 추가적인 사이클에 의해 추가로 풍부화될 수 있다. 본 발명의 임의의 항체는, 관심 파지 클론에 대해 선택하기 위해 적합한 항원 스크리닝 절차를 설계한 후에 관심 파지 클론으로부터의 Fv 서열 및 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md. (1991), vols. 1-3]에 기재된 적합한 불변 영역 (Fc) 서열을 사용하여 전장 항체 클론을 구축함으로써 수득될 수 있다.
- [0104] 특정 실시양태에서, 항체의 항원-결합 도메인은 약 110개 아미노산의 2개의 가변 (V) 영역 (경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH) (둘 다 3개의 초가변 루프 (HVR) 또는 상보성-결정 영역 (CDR)을 제시)로부터 각각 하나씩)으로부터 형성된다. 문헌 [Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이, VH 및 VL이 짧은 가요성 펩티드를 통해 공유적으로 연결된 단일-쇄 Fv (scFv) 단편으로서, 또는 이들이 불변 도메인에 각각 융합

되어 비공유적으로 상호작용하는 Fab 단편으로서, 가변 도메인이 파지 상에 기능적으로 디스플레이될 수 있다. 본원에 사용된 scFv 코딩 파지 클론 및 Fab 코딩 파지 클론은 통칭하여 "Fv 파지 클론" 또는 "Fv 클론"으로 지칭된다.

- [0105] VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 개별적으로 클로닝되어 파지 라이브러리에서 무작위로 재조합될 수 있고, 그 후에 문헌 [Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 항원-결합 클론을 조사할 수 있다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 구축할 필요 없이 면역원에 대한 고-친화도 항체를 제공한다. 대안적으로, 문헌 [Griffiths et al., *EMBO J*, 12: 725-734 (1993)]에 기재된 바와 같이 나이브(naive) 레퍼토리를 클로닝하여, 어떠한 면역화도 없이 광범위한 비-자가 항원 및 또한 자가 항원에 대한 인간 항체의 단일 공급원을 제공할 수 있다. 마지막으로, 문헌 [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이, 고도로 가변성인 CDR3 영역을 코딩하고 시험관내 재배열을 달성하기 위해 줄기 세포로부터의 재배열되지 않은 V-유전자 절편을 클로닝하고 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써, 나이브 라이브러리를 또한 합성적으로 제조할 수 있다.
- [0106] 특정 실시양태에서, 소수 외피 단백질 pIII에의 융합에 의해 항체 단편을 디스플레이하기 위해 필라멘트형 파지가 사용된다. 항체 단편은, 예를 들어 문헌 [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)]에 기재된 바와 같이, VH 및 VL 도메인이 가요성 폴리펩티드 스페이서에 의해 동일한 폴리펩티드 쇠 상에 연결된 단일 쇠 Fv 단편으로서, 또는 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991)]에 기재된 바와 같이, 하나의 쇠는 pIII에 융합되고 다른 것은 박테리아 숙주 세포 주변세포질 내로 분비되고, 여기서 일부 야생형 외피 단백질을 대체함으로써 Fab-외피 단백질 구조의 어셈블리가 파지 표면 상에 디스플레이되게 되는 Fab 단편으로서 디스플레이될 수 있다.
- [0107] 일반적으로, 항체 유전자 단편을 코딩하는 핵산은 인간 또는 동물로부터 수확된 면역 세포로부터 취득된다. 항-항원 클론에 유리하게 편향된 라이브러리가 바람직한 경우, 대상을 항체 반응을 생성하도록 항원으로 면역화시키고, 비장 세포 및/또는 순환 B 세포, 다른 말초 혈액 림프구 (PBL)를 라이브러리 구축을 위해 회수한다. 한 실시양태에서, 항-항원 클론에 유리하게 편향된 인간 항체 유전자 단편 라이브러리는, 항원 면역화가 항원에 대한 인간 항체를 생산하는 B 세포를 유도하도록 기능적 인간 이뮤노글로불린 유전자 어레이를 보유하는 (기능적 내인성 항체 생산 시스템이 결핍된) 트랜스제닉 마우스에서 항-항원 항체 반응을 일으킴으로써 취득된다. 인간 항체-생산 트랜스제닉 마우스의 생성은 하기에 기재된다.
- [0108] 항-항원 반응성 세포 집단에 대한 추가의 풍부화는, 예를 들어 항원 친화성 크로마토그래피 또는 형광색소-표지된 항원에 대한 세포의 흡착 후 유동-활성화 세포 분류 (FACS)를 사용하는 세포 분리에 의해, 항원-특이적 막 결합 항체를 발현하는 B 세포를 단리하는 적합한 스크리닝 절차를 이용하여 달성할 수 있다.
- [0109] 대안적으로, 비면역화 공여자로부터의 비장 세포 및/또는 B 세포 또는 다른 PBL의 사용은 가능한 항체 레퍼토리의 보다 우수한 제시를 제공하고, 또한 항원이 항원성이 아닌 임의의 동물 (인간 또는 비-인간) 종을 사용한 항체 라이브러리의 구축을 허용한다. 시험관내 항체 유전자 구축이 혼입된 라이브러리의 경우에는, 대상으로부터 줄기 세포를 수확하여 재배열되지 않은 항체 유전자 절편을 코딩하는 핵산을 제공한다. 관심 대상 면역 세포는 다양한 동물 종, 예컨대 인간, 마우스, 래트, 토끼목, 이리, 개, 고양이, 돼지, 소, 말, 및 조류 종 등으로부터 취득될 수 있다.
- [0110] 항체 가변 유전자 절편 (VH 및 VL 절편 포함)을 코딩하는 핵산을 관심 대상 세포로부터 회수하여, 증폭시킨다. 재배열된 VH 및 VL 유전자 라이브러리의 경우, 림프구로부터 게놈 DNA 또는 mRNA를 단리한 다음, 문헌 [Orlandi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989)]에 기재된 바와 같은 재배열된 VH 및 VL 유전자의 5' 및 3' 말단을 매칭시키는 프라이머를 사용한 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 수행하여 발현을 위한 다양한 V 유전자 레퍼토리를 제조함으로써, 목적하는 DNA를 수득할 수 있다. V 유전자는 문헌 [Orlandi et al. (1989) 및 Ward et al., *Nature*, 341: 544-546 (1989)]에 기재된 바와 같이, 성숙 V-도메인을 코딩하는 엑손의 5' 말단에서의 역방향 프라이머 및 J-절편을 기초로 하는 정방향 프라이머를 사용하여 cDNA 및 게놈 DNA로부터 증폭시킬 수 있다. 그러나, cDNA로부터의 증폭을 위해, 역방향 프라이머가 또한 문헌 [Jones et al., *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991)]에 기재된 바와 같이 리더 엑손을 기초로 할 수 있고, 정방향 프라이머가 문헌 [Sastry et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989)]에 기재된 바와 같이 불변 영역을 기초로 할 수 있다. 상보성을 최대화하기 위해, 문헌 [Orlandi et al. (1989) 또는 Sastry et al. (1989)]에 기재된 바와 같이 프라이머 내에 축중성을 혼입시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 라이브러리 다양성은 예를 들어

문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)]의 방법에 기재된 바와 같이 또는 문헌 [Orum et al., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993)]의 방법에 기재된 바와 같이, 면역 세포 핵산 샘플 내에 존재하는 모든 이용가능한 VH 및 VL 배열을 증폭시키기 위해 각각의 V-유전자 패밀리에 표적화된 PCR 프라이머를 사용함으로써 최대화된다. 증폭된 DNA를 발현 벡터 내로 클로닝하기 위해, 희귀 제한 부위가 문헌 [Orlandi et al. (1989)]에 기재된 바와 같이 한 말단에서 태그로서, 또는 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]에 기재된 바와 같이 태그가 부착된 프라이머를 사용하는 추가의 PCR 증폭에 의해 PCR 프라이머 내에 도입될 수 있다.

[0111] 합성적으로 재배열된 V 유전자의 레퍼토리가 시험관내에서 V 유전자 절편으로부터 유래될 수 있다. 대부분의 인간 VH-유전자 절편이 클로닝 및 서열분석되어 있고 (문헌 [Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)]에 보고됨), 맵핑되어 있으며 (문헌 [Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993)]에 보고됨); 이들 클로닝된 절편들 (H1 및 H2 루프의 모든 주요 입체형태 포함)은 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이 다양한 서열 및 길이의 H3 루프를 코딩하는 PCR 프라이머로 다양한 VH 유전자 레퍼토리를 생성시키는데 사용될 수 있다. 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992)]에 기재된 바와 같이 모든 서열 다양성이 단일 길이의 긴 H3 루프에 집중된 VH 레퍼토리가 또한 제조될 수 있다. 인간 V_K 및 V_λ 절편이 클로닝 및 서열분석되어 있고 (문헌 [Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)]에 보고됨), 합성 경쇄 레퍼토리를 제조하는데 사용될 수 있다. 광범위한 VH 및 VL 폴드, 및 L3 및 H3 길이를 기초로 하는 합성 V 유전자 레퍼토리는 상당한 구조적 다양성의 항체를 코딩할 것이다. V-유전자 코딩 DNA의 증폭에 이어서, 배선 V-유전자 절편이 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]의 방법에 따라 시험관내에서 재배열될 수 있다.

[0112] 항체 단편의 레퍼토리는 VH 및 VL 유전자 레퍼토리를 함께 다양한 방식으로 조합하여 구축할 수 있다. 각각의 레퍼토리는 상이한 벡터 내에 생성될 수 있고, 벡터는 예를 들어 문헌 [Hogrefe et al., Gene, 128: 119-126 (1993)]에 기재된 바와 같이 시험관내 재조합되거나, 또는 조합 감염, 예를 들어 문헌 [Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993)]에 기재된 loxP 시스템에 의해 생체내 재조합될 수 있다. 생체내 재조합 접근법은 이. 콜라이(E. coli) 형질전환 효율로 인한 라이브러리 크기의 한계를 극복하기 위해 Fab 절편의 2쇄 특성을 이용한다. 나이브 VH 및 VL 레퍼토리를 하나는 파지미드 내로, 다른 하나는 파지 벡터 내로 개별적으로 클로닝한다. 이어서, 2개의 라이브러리를 파지미드-함유 박테리아의 파지 감염에 의해 조합하여 각각의 세포가 상이한 조합을 함유하도록 하고, 라이브러리 크기는 존재하는 세포의 개수로만 한정된다 (약 10¹² 개 클론). 벡터는 둘 다, VH 및 VL 유전자가 단일 레플리콘에서 재조합되어 파지 비리온 내에 공동패키징되도록 하는 생체내 재조합 신호를 함유한다. 이러한 거대 라이브러리는 우수한 친화도 (약 10⁻⁸ M의 K_d⁻¹)를 갖는 다양한 항체를 대량으로 제공한다.

[0113] 대안적으로, 레퍼토리들은 예를 들어 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991)]에 기재된 바와 같이 동일 벡터 내로 순차적으로 클로닝될 수 있거나, 또는 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]에 기재된 바와 같이 PCR에 의해 함께 어셈블리된 후에 클로닝될 수 있다. VH 및 VL DNA를 가요성 펩티드 스페이서를 코딩하는 DNA로 연결시켜 단일 쇠 Fv (scFv) 레퍼토리를 형성시키는데 PCR 어셈블리가 또한 사용될 수 있다. 또 다른 기술에서, 문헌 [Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992)]에 기재된 바와 같이, VH 및 VL 유전자를 림프구 내에서 PCR에 의해 조합시킨 후, 연결된 유전자들의 레퍼토리를 클로닝하는데 "세포내 PCR 어셈블리"가 사용된다.

[0114] 나이브 라이브러리 (천연 또는 합성)에 의해 생산된 항체는 중등도의 친화도 (약 10⁶ 내지 10⁷ M⁻¹의 K_d⁻¹)일 수 있지만, 친화도 성숙은 또한 상기 문헌 [Winter et al. (1994)]에 기재된 바와 같이 시험관내에서 2차 라이브러리로부터의 구축 및 재선택에 의해 모방될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992)]의 방법 또는 문헌 [Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580 (1992)]의 방법으로 오류-유발 폴리머라제 (문헌 [Leung et al., Technique 1: 11-15 (1989)]에서 보고됨)를 사용하여 시험관내에서 돌연변이를 무작위로 도입시킬 수 있다. 추가로, 친화도 성숙은, 예를 들어 선택된 개별 Fv 클론에서 관심 대상 CDR에 이르는 무작위 서열을 보유하는 프라이머를 사용한 PCR을 이용하여 하나 이상의 CDR을 무작위로 돌연변이시키고, 친화도가 더 높은 클론을 스크리닝함으로써 수행될 수 있다. WO 9607754 (1996년 3월 14일 공개)에는 이뮤노글로불린 경쇄의 상보성 결정 영역에서 돌연변이유발을 유도하여 경쇄 유전자의 라이브러리를 생성시키는 방법이 기재되어 있다. 또 다른 효과적인 접근법은, 면역화되지 않은 공여자로부터 수득한 자연 발생 V 도메인 변이체의 레퍼토리를 사용한 파지 디스플레이에 의해 선택된 VH 또는 VL 도메인을 재조합하고, 문

현 [Marks et al., *Biotechnol.*, 10:779-783 (1992)]에 기재된 바와 같이 여러 라운드의 쇠 재서플링으로 보다 높은 친화도에 대해 스크리닝하는 것이다. 상기 기술을 통해 친화도가 약 10^{-9} M 이하인 항체 및 항체 단편을 생산할 수 있다.

- [0115] 라이브러리의 스크리닝은 관련 기술분야에 공지된 다양한 기술로 달성할 수 있다. 예를 들어, 항원은 흡착 플레이트의 웰을 코팅하기 위해 사용되거나, 흡착 플레이트에 고정된 숙주 세포 상에 발현되거나, 세포 분류에서 사용되거나, 스트렙타비딘-코팅된 비드로 포획하기 위해 비오틴에 접합되거나, 파지 디스플레이 라이브러리를 패닝하기 위한 임의의 다른 방법에서 사용될 수 있다.
- [0116] 파지 라이브러리 샘플을 파지 입자의 적어도 일부를 흡착제에 결합시키는데 적합한 조건하에 고정화된 항원과 접촉시킨다. 일반적으로, pH, 이온 강도, 온도 등을 포함하는 조건은 생리학적 조건을 모방하도록 선택된다. 고체상에 결합된 파지를 세척한 후, 예를 들어 문헌 [Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991)]에 기재된 바와 같이 산에 의해, 또는 예를 들어 문헌 [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)]에 기재된 바와 같이 알칼리에 의해, 또는 예를 들어 문헌 [Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991)]의 항원 경쟁 방법과 유사한 절차로 항원 경쟁에 의해 용리시킨다. 단일 라운드의 선택으로 파지가 20-1,000배 풍부화될 수 있다. 또한, 풍부화된 파지가 박테리아 배양에서 성장되어, 추가적인 선택 라운드에 적용될 수 있다.
- [0117] 선택 효율은 세척 동안의 해리 동역학, 및 단일 파지 상의 다중 항체 단편들이 동시에 항원과 맞물릴 수 있는지 여부를 비롯한 다수의 인자에 따라 달라진다. 빠른 해리 동역학 (및 약한 결합 친화도)을 갖는 항체는 단시간 세척, 다가 파지 디스플레이 및 고체상 내의 항원의 높은 코팅 밀도를 사용함으로써 유지될 수 있다. 높은 밀도는 다가 상호작용을 통해 파지를 안정화시킬 뿐만 아니라, 해리된 파지의 재결합을 돕는다. 느린 해리 동역학 (및 우수한 결합 친화도)을 갖는 항체의 선택은 문헌 [Bass et al., *Proteins*, 8: 309-314 (1990)] 및 WO 92/09690에 기재된 바와 같은 1가 파지 디스플레이 및 장시간 세척, 및 문헌 [Marks et al., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992)]에 기재된 바와 같은 항원의 낮은 코팅 밀도를 사용함으로써 증진될 수 있다.
- [0118] 항원에 대한 상이한 친화도, 심지어 근소하게 상이한 친화도를 갖는 파지 항체 사이에서의 선택이 가능하다. 그러나, 선택된 항체의 무작위 돌연변이 (예를 들어, 일부 친화도 성숙 기술로 수행되는 것)는, 대부분은 항원에 결합하고 몇몇은 보다 고친화도를 갖는 다수의 돌연변이체를 생성하기 쉽다. 항원을 제한하여, 희귀 고친화도 파지를 경쟁시킬 수 있다. 보다 높은 친화도의 돌연변이체를 모두 보유하기 위해, 파지를 과량의 비오틴화된 항원과 함께 인큐베이션시킬 수 있지만, 비오틴화된 항원은 항원에 대한 표적 몰 친화도 상수보다 더 낮은 몰농도의 농도로 사용된다. 이후에, 고친화도-결합 파지가 스트렙타비딘-코팅된 상자성 비드에 의해 포획될 수 있다. 이러한 "평형 포획"은 친화도가 더 낮은 과량의 파지로부터 친화도가 2배 정도 더 높은 돌연변이체 클론의 단리를 허용하는 감도로 항체가 이들의 결합 친화도에 따라 선택되도록 한다. 고체 상에 결합된 파지를 세척하는데 사용된 조건이 또한 해리 동역학을 기초로 구별되도록 조작될 수 있다.
- [0119] 항-항원 클론은 활성을 기초로 선택될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 자연적으로 항원을 발현하는 살아있는 세포에 결합하거나, 또는 다른 세포 구조에 부착된 항원 또는 유리 부유 항원에 결합하는 항-항원 항체를 제공한다. 이러한 항-항원 항체에 대응하는 Fv 클론은 (1) 상기 기재된 파지 라이브러리로부터 항-항원 클론을 단리하고, 임의로 파지 클론의 단리된 집단을 적합한 박테리아 숙주에서 집단을 성장시킴으로써 증폭시키고; (2) 각각 차단 및 비-차단 활성이 요망되는 항원 및 제2 단백질질을 선택하고; (3) 항-항원 파지 클론을 고정화된 항원에 흡착시키고; (4) 과량의 제2 단백질질을 사용하여 제2 단백질질의 결합 결정자와 겹치거나 공유되는 항원-결합 결정자를 인식하는 임의의 바람직하지 않은 클론을 용리시키고; (5) 단계 (4) 이후에 흡착되어 남아있는 클론을 용리시킴으로써 선택될 수 있다. 임의로, 본원에 기재된 선택 절차를 1회 이상 반복함으로써 원하는 차단/비차단 특성을 갖는 클론을 추가로 풍부화시킬 수 있다.
- [0120] 관심 대상의 하이브리도마-유래 모노클로날 항체 또는 파지 디스플레이 Fv 클론을 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어, 하이브리도마 또는 파지 DNA 주형으로부터 관심 대상의 중쇄 및 경쇄 코딩 영역을 특이적으로 증폭시키도록 설계된 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용함으로써) 용이하게 단리되고 서열분석된다. 단리되면, DNA를 발현 벡터 내로 넣고, 그 후 이를 달리 이뮤노글로불린 단백질을 생산하지 않는 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염시켜, 재조합 숙주 세포에서 원하는 모노클로날 항체의 합성물을 수득할 수 있다. 항체-코딩 DNA의 박테리아에서의 재조합 발현에 대한 검토 논문은 문헌 [Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993) 및 Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151 (1992)]을 포함한다.

- [0121] Fv 클론을 코딩하는 DNA를 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역을 코딩하는 공지된 DNA 서열 (예를 들어 적절한 DNA 서열은 상기 문헌 [Kabat et al.]으로부터 수득될 수 있음)과 조합하여, 전장 또는 부분적인 길이의 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 클론을 형성할 수 있다. IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE 불변 영역을 비롯한 임의의 이소형의 불변 영역이 이러한 목적에 사용될 수 있으며, 이러한 불변 영역이 임의의 인간 또는 동물 종으로부터 수득될 수 있음을 인지할 것이다. 하나의 동물 (예를 들어, 인간) 종의 가변 도메인 DNA로부터 유래된 후에 또 다른 동물 종의 불변 영역 DNA에 융합되어 "하이브리드" 전장 중쇄 및/또는 경쇄에 대한 코딩 서열(들)을 형성하는 Fv 클론은 본원에 사용된 "키메라" 및 "하이브리드" 항체의 정의에 포함된다. 특정 실시양태에서, 인간 가변 DNA로부터 유래된 Fv 클론은 인간 불변 영역 DNA에 융합되어 전장 또는 부분적인 길이의 인간 중쇄 및/또는 경쇄에 대한 코딩 서열(들)을 형성한다.
- [0122] 하이브리도마로부터 유래된 항-항원 항체를 코딩하는 DNA는 또한 (예를 들어, [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)]의 방법에서와 같이), 예를 들어 하이브리도마 클론으로부터 유래된 상동성 뮤린 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열로 치환함으로써 변형될 수 있다. 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열 전부 또는 일부를 이뮤노글로불린 코딩 서열에 공유적으로 연결시킴으로써 하이브리도마- 또는 Fv 클론-유래 항체 또는 단편을 코딩하는 DNA를 추가로 변형시킬 수 있다. 이러한 방식으로, 관심 대상의 Fv 클론 또는 하이브리도마 클론-유래 항체의 결합 특이성을 갖는 "키메라" 또는 "하이브리드" 항체가 제조된다.
- [0123] (iv) 인간화 및 인간 항체
- [0124] 비-인간 항체를 인간화하는 다양한 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간화 항체에는 비-인간 공급원으로부터의 하나 이상의 아미노산 잔기가 도입되어 있을 수 있다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "유입" 잔기라 지칭되고, 전형적으로는 "유입" 가변 도메인으로부터의 것이다. 인간화는 설치류 CDR 또는 CDR 서열을 인간 항체의 상응하는 서열로 치환함으로써 본질적으로 윈터(Winter) 및 동료들의 방법 (문헌 [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)])에 따라 수행될 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 실질적으로 무손상 인간 가변 도메인 이외의 부분이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체이다 (미국 특허 번호 4,816,567). 실제로, 전형적으로 인간화 항체는 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.
- [0125] 인간화 항체의 제조에 사용될 인간 가변 도메인 경쇄 및 중쇄 둘 다의 선택은 항원성 감소에 매우 중요하다. 소위 "최적-적합" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인 서열을 공지의 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 서열이 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크 (FR)로서 수용된다 (문헌 [Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)]). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정한 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정한 프레임워크를 이용한다. 여러 상이한 인간화 항체에 대해 동일한 프레임워크를 사용할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)]).
- [0126] 또한, 항체가 항원에 대한 높은 친화도 및 다른 유리한 생물학적 특성을 보유하도록 인간화하는 것이 중요하다. 이러한 목적을 달성하기 위해, 한 실시양태의 방법에 따라, 인간화 항체는 모 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하는 모 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물의 분석 과정에 의해 제조된다. 3차원 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 입수가능하고, 통상의 기술자에게 친숙하다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3차원 입체형태적 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이들 디스플레이들의 검사로 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능화에 있어서 잔기들의 가능한 역할을 분석할 수 있으며, 즉, 자신의 항원에 결합하는 후보 이뮤노글로불린의 능력에 영향을 미치는 잔기를 분석할 수 있다. 이러한 방식으로, 바람직한 항체 특성, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도가 달성되도록 수용자 및 유입 서열로부터 FR 잔기들을 선택하고 조합시킬 수 있다. 일반적으로, 항원 결합에 대한 영향에는 초가변 영역 잔기가 직접적이고 가장 실질적으로 관여한다.
- [0127] 관심 대상의 인간 항체는 인간-유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열(들)을 상기 기재된 바와 같은 공지된 인간 불변 도메인 서열(들)과 조합함으로써 구축될 수 있다. 대안적으로, 관심 대상의 인간 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가, 예를 들어 문헌 [Kozbor J. Immunol., 133: 3001

(1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 및 Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)]에 기재되어 있다.

[0128] 면역화시에 내인성 이뮤노글로불린의 생산 없이 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)을 생산하는 것이 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 배선 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역 (J_H) 유전자를 동형접합 결실시키면 내인성 항체의 생산이 완전히 억제된다는 것이 기재된 바 있다. 인간 배선 이뮤노글로불린 유전자 어레이를 이러한 배선 돌연변이체 마우스에게 전달하면, 항원 접종시에 인간 항체가 생산될 것이다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); 및 Duchosal et al. *Nature* 355:258 (1992)]을 참조한다.

[0129] 유전자 서플링은 또한 비-인간, 예를 들어 설치류 항체로부터 인간 항체를 유도하는데 사용될 수 있고, 이때 인간 항체는 출발 비-인간 항체와 유사한 친화도 및 특이성을 갖는다. "에피토프 임프린팅"이라고도 불리는 이러한 방법에 따라, 본원에 기재된 바와 같은 파지 디스플레이 기술에 의해 수득된 비-인간 항체 단편의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역이 인간 V 도메인 유전자의 레퍼토리로 대체되어 비-인간 쇠/인간 쇠 scFv 또는 Fab 키메라의 집단을 생성한다. 항원에 의한 선택 결과로서, 인간 쇠에 의해 1차 파지 디스플레이 클론에서 상응하는 비-인간 쇠의 제거시에 파괴된 항원 결합 부위가 복원된 비-인간 쇠/인간 쇠 키메라 scFv 또는 Fab가 단리되며, 즉 에피토프가 인간 쇠 파트너의 선택을 좌우 (임프린팅)한다. 나머지 비-인간 쇠를 대체하기 위해 프로세스가 반복될 때, 인간 항체가 수득된다 (1993년 4월 1일 공개된 PCT WO 93/06213 참조). CDR 이식에 의한 비-인간 항체의 전통적인 인간화와는 달리, 이러한 기술은 비-인간 기원의 FR 또는 CDR 잔기가 없는 완전 인간 항체를 제공한다.

[0130] (v) 항체 단편

[0131] 항체 단편은 전통적인 수단, 예컨대 효소적 소화, 또는 재조합 기술에 의해 생성될 수 있다. 특정 상황에서는, 전체 항체가 아닌 항체 단편을 사용하는 것이 유리하다. 단편의 크기가 작을수록 신속한 제거가 가능하고, 고형 종양에 대한 접근을 개선시킬 수 있다. 특정 항체 단편의 검토에 대해서는, 문헌 [Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134]을 참조한다.

[0132] 항체 단편의 생산을 위하여 다양한 기술이 개발되어 왔다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체의 단백질분해적 소화를 통해 유래되었다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); 및 Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 현재 이러한 단편들은 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생산될 수 있다. Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편은 모두가 이. 콜라이에서 발현되어 분비될 수 있고, 이에 의해 다량의 이들 단편을 용이하게 생산할 수 있다. 항체 단편은 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다 (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). 또 다른 접근법에 따라, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리될 수 있다. 셀비지 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하는, 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 F(ab')₂ 단편이 미국 특허 5,869,046에 기재되어 있다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술들이 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 특정 실시양태에서, 항체는 단일 쇠 Fv 단편 (scFv)이다. WO 93/16185; 미국 특허 번호 5,571,894; 및 5,587,458을 참조한다. Fv 및 scFv는 불변 영역이 결여된 무손상 결합 부위를 갖는 유일한 중이고; 따라서 생체내 사용 동안 비특이적 결합의 감소에 적합할 수 있다. scFv 융합 단백질은 scFv의 아미노 또는 카르복시 말단에 이펙터 단백질의 융합체를 생성시키도록 구축될 수 있다. 상기 문헌 [Antibody Engineering, ed. Borrebaeck]을 참조한다. 또한, 항체 단편은 예를 들어, 미국 특허 번호 5,641,870에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체는 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

[0133] (vi) 다중특이적 항체

[0134] 다중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖고, 여기서 에피토프는 통상적으로 상이한 항원으로부터의 것이다. 이러한 분자는 일반적으로 2개의 상이한 에피토프에만 결합할 것이지만 (즉, 이중특이적 항체, BsAb), 추가의 특이성이 있는 항체, 예컨대 삼중특이적 항체가 본원에 사용되는 경우에 이러한 표현에 포괄된다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, F(ab')₂ 이중특이적 항체)으로 제조될 수 있다.

- [0135] 이중특이적 항체의 제조 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 전장 이중특이적 항체의 통상의 생산은 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공발현을 기초로 하며, 여기서 2개의 쇠는 상이한 특이성을 갖는다 (문헌 [Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)]). 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 편성으로 인해, 이들 하이브리도마 (퀴드로마)는 10가지 상이한 항체 분자의 잠재적 혼합물을 생산하고, 이중 하나만이 올바른 이중특이적 구조를 갖는다. 통상적으로 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 이루어지는 올바른 분자의 정제는 다소 번거롭고, 산물 수율이 낮다. 유사한 절차가 WO 93/08829, 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.
- [0136] 다른 접근법에 따르면, 목적하는 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)을 갖는 항체 가변 도메인이 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 바람직하게는, 융합체는 적어도 일부의 힌지, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인을 갖는다. 융합체 중 적어도 하나에 존재하는, 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)을 갖는 것이 전형적이다. 이뮤노글로불린 중쇄 융합체 및 원하는 경우에 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 개별 발현 벡터 내로 삽입하고, 적합한 숙주 유기체 내로 공동-형질감염 시킨다. 이는, 구축에 사용된 3종의 폴리펩티드 쇠의 동일하지 않은 비가 최적의 수율을 제공하는 경우의 실시양태에서 상기 3종의 폴리펩티드 단편의 상호 비를 조정하는데 있어서 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 동일한 비의 적어도 2종의 폴리펩티드 쇠의 발현으로 높은 수율이 달성되는 경우에, 또는 비가 특정한 유의성을 갖지 않는 경우에, 2종 또는 모든 3종의 폴리펩티드 쇠에 대한 코딩 서열을 1개의 발현 벡터에 삽입할 수 있다.
- [0137] 이러한 접근법의 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한쪽 아암 내에 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄, 및 다른쪽 아암 내의 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공함)으로 구성된다. 이중특이적 분자의 한쪽 절반에만 이뮤노글로불린 경쇄가 존재하는 것이 용이한 분리 방식을 제공하기 때문에, 이러한 비대칭 구조는 원치 않는 이뮤노글로불린 쇠 조합물로부터의 바람직한 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 한다는 것이 밝혀졌다. 이러한 접근법이 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체의 생성에 대한 추가의 상세내용에 대해서는 예를 들어 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)]을 참조한다.
- [0138] WO96/27011에 기재된 또 다른 접근법에 따르면, 한 쌍의 항체 분자 사이의 인터페이스를 조작하여 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이중이량체의 백분율을 최대화할 수 있다. 하나의 인터페이스는 항체 불변 도메인의 C_H3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 인터페이스로부터 하나 이상의 소형 아미노산 측쇄가 보다 대형의 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 대형 아미노산 측쇄를 보다 소형의 것 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체함으로써 대형 측쇄(들)에 대해 동일하거나 유사한 크기의 보상성 "함몰부"가 제2 항체 분자의 인터페이스 상에 생성된다. 이는 동중이량체와 같은 다른 원치 않는 최종-산물에 비해 이중이량체의 수율을 증가시키는 메카니즘을 제공한다.
- [0139] 이중특이적 항체는 가교된 또는 "이중접합체" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이중접합체 내의 항체들 중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 하나는 비오틴에 커플링될 수 있다. 이러한 항체는 예를 들어 면역계 세포의 원치 않는 세포로의 표적화 (미국 특허 번호 4,676,980) 및 HIV 감염의 치료 (WO 91/00360, WO 92/200373, 및 EP 03089)를 위해 제안된 바 있다. 임의의 편리한 가교 방법을 이용하여 이중접합체 항체를 제조할 수 있다. 적합한 가교제는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 수많은 가교 기술과 함께 미국 특허 번호 4,676,980에 개시되어 있다.
- [0140] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성시키는 기술이 또한 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 화학적 연결을 이용하여 이중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)]에는 무손상 항체를 단백질분해적으로 절단하여 F(ab')₂ 단편을 생성하는 절차가 기재되어 있다. 이들 단편을 디티올 착화제인 아비산나트륨의 존재 하에 환원시켜, 이웃자리 디티올을 안정화시키고 분자간 디설피드 형성을 방지한다. 그 후 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 그 후 Fab'-TNB 유도체 중 하나를 메르캅토포에틸아민으로의 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환시키고 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합하여 이중특이적 항체를 형성시킨다. 생산된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 작용체로서 사용될 수 있다.
- [0141] 최근의 진보는 이중특이적 항체를 형성하도록 화학적으로 커플링될 수 있는, 이. 콜라이로부터의 Fab'-SH 단편의 직접 회수를 용이하게 하였다. 문헌 [Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992)]에는 완전 인간화 이중특이적 항체 F(ab')₂ 분자의 생산이 기재되어 있다. 각각의 Fab' 단편을 이. 콜라이로부터 개별적으로

분비시키고, 이중특이적 항체를 형성하도록 시험관내에서 유도 화학 커플링에 적용한다.

[0142] 재조합 세포 배양물로부터 직접적으로 이중특이적 항체 단편을 제조 및 단리하기 위한 다양한 기술이 또한 기재되었다. 예를 들어, 류신 지퍼를 사용하여 이중특이적 항체가 생산되었다. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드가 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 유전자 융합에 의해 연결되었다. 항체 동종이량체가 힌지 영역에서 환원되어 단량체가 형성된 후, 다시 산화되어 항체 이종이량체가 형성되었다. 이러한 방법은 항체 동종이량체의 생산에 또한 이용될 수 있다. 문헌 [Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편의 제조를 위한 대안적인 메카니즘을 제공한다. 상기 단편은 동일쇄 상의 2개의 도메인 사이의 쌍 형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함한다. 따라서, 한 단편의 V_H 및 V_L 도메인이 또 다른 단편의 상보적인 V_L 및 V_H 도메인과 쌍을 이루게 되어, 2개의 항원-결합 부위가 형성된다. 단일-쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 또 다른 전략이 또한 보고되었다. 문헌 [Gruber et al., *J. Immunol*, 152:5368 (1994)]을 참조한다.

[0143] 2가 초과인 원자가를 갖는 항체가 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체가 제조될 수 있다. Tuft et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

[0144] (vii) 단일-도메인 항체

[0145] 일부 실시양태에서, 관심 항체는 단일-도메인 항체이다. 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 단일 폴리펩티드 쇠이다. 특정 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다 (도만티스, 인크.(Domantis, Inc.), 매사추세츠주 윌섬; 예를 들어 미국 특허 번호 6,248,516 B1 참조). 한 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부로 이루어진다.

[0146] (viii) 항체 변이체

[0147] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 적절한 변화를 도입하거나 펩티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구축물에 도달하기 위해 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어질 수 있으며, 단 최종 구축물은 목적하는 특징을 보유해야 한다. 아미노산 변경은 서열이 제조되는 시점에 대상 항체 아미노산 서열에 도입될 수 있다.

[0148] (B) 벡터, 숙주 세포 및 재조합 방법

[0149] 본원에 제공된 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 항체는 또한 재조합 방법을 이용하여 생산될 수 있다. 항-항원 항체의 재조합 생산을 위해, 항체를 코딩하는 핵산을 단리하고, 추가의 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위한 복제가능한 벡터 내로 삽입한다. 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 단리되고 서열분석될 수 있다. 다수의 벡터가 이용가능하다. 벡터 성분은 일반적으로 다음: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0150] (i) 신호 서열 성분

[0151] 항체는 직접적으로, 뿐만 아니라 바람직하게는 성숙한 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 신호 서열 또는 다른 폴리펩티드인 이중 폴리펩티드와의 융합 폴리펩티드로서 재조합적으로 생산될 수 있다. 바람직하게는, 선택된 이중 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식 및 프로세싱 (예를 들어, 신호 펩티다제에 의해 절단)되는 것이다. 천연 항체 신호 서열을 인식 및 프로세싱하지 못하는 원핵 숙주 세포의 경우에는, 신호 서열을 예를 들어 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, lpp 또는 열-안정성 엔테로톡신 II 리더의 군으로부터 선택된 원핵 신호 서열로 치환한다. 효모 분비의 경우에, 천연 신호 서열은 예를 들어 효모 인버타제 리더, 인자 리더 (사카로미세스(Saccharomyces) 및 클루이베로미세스(Kluyveromyces) α-인자 리더 포함), 또는 산 포스파타제 리더, 썬. 알비칸스(C. albicans) 글루코아밀라제 리더, 또는 WO 90/13646에 기재된 신호에 의해 치환될 수 있다. 포유동물 세포 발현시에는, 포유동물 신호 서열 뿐만 아니라 바이러스 분비 리더, 예를 들어 단순 헤르페스 gD 신호가 이용가능하다.

- [0152] (ii) 복제 기점
- [0153] 발현 벡터 및 클로닝 벡터는 둘 다 벡터가 하나 이상의 선택된 숙주 세포 내에서 복제될 수 있게 하는 핵산 서열을 함유한다. 일반적으로, 클로닝 벡터에서 상기 서열은 벡터가 숙주 염색체 DNA와 독립적으로 복제될 수 있게 하는 것이고, 복제 기점 또는 자율 복제 서열을 포함한다. 이러한 서열은 다양한 박테리아, 효모 및 바이러스에 대해 널리 공지되어 있다. 플라스미드 pBR322로부터의 복제 기점은 대부분의 그람-음성 박테리아에 적합하고, 2 μ 플라스미드 기점은 효모에 적합하고, 다양한 바이러스 기점 (SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, VSV 또는 BPV)은 포유동물 세포에서의 클로닝 벡터에 유용하다. 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에서는 필요하지 않다 (단지 SV40 기점이 초기 프로모터를 함유하기 때문에, 전형적으로 이것이 사용될 수 있음).
- [0154] (iii) 선택 유전자 성분
- [0155] 발현 및 클로닝 벡터는 선택 마커라고도 불리는 선택 유전자를 함유할 수 있다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토티렉세이트 또는 테트라시클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 영양요구성 결핍을 보완하거나, 또는 (c) 복합 배지로부터 얻을 수 없는 중요 영양분을 공급하는 단백질을 코딩하고, 예를 들어 바실루스의 경우에는 D-알라닌 라세마제를 코딩하는 유전자이다.
- [0156] 선택 계획의 한 예는 숙주 세포의 성장을 정지시키는 약물을 이용한다. 이중 유전자로 성공적으로 형질전환된 이들 세포는 약물 내성을 부여하는 단백질을 생산하고, 따라서 선택 요법에서 생존한다. 이러한 우성 선택의 예는 약물 네오마이신, 미코페놀산 및 히그로마이신을 사용한다.
- [0157] 포유동물 세포에 적합한 선택 마커의 또 다른 예는 항체-코딩 핵산을 받아들이는데 적격인 세포의 확인을 가능하게 하는 것들, 예컨대 DHFR, 글루타민 신태타제 (GS), 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영양류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 데카르복실라제이다.
- [0158] 예를 들어, DHFR 유전자로 형질전환시킨 세포는 형질전환체를 DHFR의 경쟁적 길항제인 메토티렉세이트 (Mtx)를 함유하는 배양 배지에서 배양함으로써 확인한다. 이들 조건 하에서, DHFR 유전자를 임의의 다른 공동 형질전환된 핵산과 함께 증폭시킨다. 내인성 DHFR 활성이 결핍된 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포주 (예를 들어, ATCC CRL-9096)를 사용할 수 있다.
- [0159] 대안적으로, GS 유전자로 형질전환시킨 세포는 형질전환체를 GS의 억제제인 L-메티오닌 슬록시민 (Msx)을 함유하는 배양 배지에서 배양함으로써 확인한다. 이들 조건 하에서, GS 유전자를 임의의 다른 공동-형질전환시킨 핵산과 함께 증폭시킨다. GS 선택/증폭 시스템을 상기 기재된 DHFR 선택/증폭 시스템과 조합하여 이용할 수 있다.
- [0160] 대안적으로, 관심 항체, 야생형 DHFR 유전자 및 또 다른 선택 마커, 예컨대 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스퍼라제 (APH)를 코딩하는 DNA 서열로 형질전환되거나 공동-형질전환된 숙주 세포 (특히, 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)는 선택 마커에 대한 선택제, 예컨대 아미노글리코시드계 항생제, 예를 들어 카나마이신, 네오마이신 또는 G418을 함유하는 배지에서의 세포 성장에 의해 선택될 수 있다. 미국 특허 번호 4,965,199를 참조한다.
- [0161] 효모에 사용하기 적합한 선택 유전자는 효모 플라스미드 YRp7에 존재하는 trp1 유전자이다 (Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979)). trp1 유전자는 트립토판에서 성장할 수 있는 능력이 결여된 효모의 돌연변이체 균주. 예를 들어 ATCC 번호 44076 또는 PEP4-1에 대한 선택 마커를 제공한다. Jones, Genetics, 85:12 (1977). 이어서, 효모 숙주 세포 계능 내의 trp1 병변의 존재는 트립토판의 부재 하의 성장에 의해 형질전환을 검출하는데 효과적인 환경을 제공한다. 유사하게, Leu2-결핍 효모 균주 (ATCC 20,622 또는 38,626)는 Leu2 유전자를 보유하는 공지된 플라스미드에 의해 보완된다.
- [0162] 또한, 1.6 μm 원형 플라스미드 pKD1로부터 유래된 벡터는 클루이베로미세스 효모의 형질전환에 사용될 수 있다. 대안적으로, 재조합 송아지 키모신의 대규모 생산을 위한 발현 시스템이 케이. 락티스(K. lactis)에 대해 보고되었다. Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990). 클루이베로미세스의 산업적 균주에 의한 성숙 재조합 인간 혈청 알부민의 분비를 위한 안전한 다중-카피 발현 벡터가 또한 개시된 바 있다. Flier et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991).
- [0163] (iv) 프로모터 성분
- [0164] 발현 및 클로닝 벡터는 일반적으로, 숙주 유기체에 의해 인식되고 항체를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결되

는 프로모터를 함유한다. 원핵 숙주와 함께 사용하기 적합한 프로모터는 *phoA* 프로모터, β -락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 알칼리성 포스파타제 프로모터, 트립토판 (*trp*) 프로모터 시스템, 및 하이브리드 프로모터, 예컨대 *tac* 프로모터를 포함한다. 그러나, 다른 공지된 박테리아 프로모터도 적합하다. 박테리아 시스템에 사용하기 위한 프로모터는 또한, 항체를 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된 샤인-달가노 (S.D.) 서열을 함유할 것이다.

- [0165] 프로모터 서열은 진핵생물에 대해 공지되어 있다. 실질적으로 모든 진핵 유전자는 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30개 염기 상류에 위치하는 AT-풍부 부위를 갖는다. 다수의 유전자의 전사 출발점으로부터 70 내지 80개 염기 상류에서 발견되는 또 다른 서열은 CNCAAT 영역 (여기서, N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있음)이다. 코딩 서열의 3' 말단에 폴리 A 꼬리를 부가하기 위한 신호일 수 있는 AATAAA 서열이 대부분의 진핵 유전자의 3' 말단에 존재한다. 이들 모든 서열들이 진핵 발현 벡터 내로 적합하게 삽입된다.
- [0166] 효모 숙주와 사용하기에 적합한 프로모터 서열의 예는 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 당분해 효소, 예컨대 엔올라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 헥소키나제, 피루베이트 데카르복실라제, 포스포프рук토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오스포스페이트 이소머라제, 포스포글루코스 이소머라제 및 글루코키나제에 대한 프로모터를 포함한다.
- [0167] 성장 조건에 의해 제어되는 전사의 추가의 이점을 갖는 유도성 프로모터인 다른 효모 프로모터는 알콜 데히드로게나제 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사와 연관된 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 및 말토스 및 갈락토스 이용을 담당하는 효소에 대한 프로모터 영역이다. 효모 발현에 사용하기에 적합한 벡터 및 프로모터는 EP 73,657에 추가로 기재되어 있다. 또한, 효모 인헨서는 효모 프로모터와 함께 유리하게 사용된다.
- [0168] 포유동물 숙주 세포에서 벡터로부터의 항체 전사는, 예를 들어 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스 (예컨대 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 시토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스, 원숭이 바이러스 40 (SV40)과 같은 바이러스 계놈으로부터 수득한 프로모터, 이종 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 이뮤노글로불린 프로모터, 및 열 쇼크 프로모터에 의해 제어될 수 있는데, 단 이들 프로모터는 숙주 세포 시스템과 상용성이어야 한다.
- [0169] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스성 복제 기점을 또한 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 수득된다. 인간 시토메갈로바이러스의 극초기 프로모터가 HindIII E 제한 단편으로 편리하게 수득된다. 소 유두종 바이러스를 벡터로 사용하여 포유동물 숙주에서 DNA를 발현시키기 위한 시스템이 미국 특허 번호 4,419,446에 개시되어 있다. 이 시스템의 변형이 미국 특허 번호 4,601,978에 기재되어 있다. 또한, 단순 헤르페스 바이러스로부터의 티미딘 키나제 프로모터의 제어 하에 마우스 세포에서 인간 β -인터페론 cDNA를 발현시키는 것에 대해서는 또한 문헌 [Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982)]을 참조한다. 대안적으로, 라우스 육종 바이러스의 긴 말단 반복부를 프로모터로 사용할 수 있다.
- [0170] (v) 인헨서 요소 성분
- [0171] 고등 진핵생물에 의해 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA를 전사하는 것은 종종, 인헨서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가된다. 다수의 인헨서 서열이 현재 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α -태아단백질 및 인슐린)로부터 공지되어 있다. 그러나, 전형적으로는 진핵 세포 바이러스로부터의 인헨서를 사용할 것이다. 그 예는 복제 기점의 하류 쪽 (bp 100-270)의 SV40 인헨서, 시토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 복제 기점 하류 쪽의 폴리오마 인헨서 및 아데노바이러스 인헨서를 포함한다. 또한, 진핵 프로모터의 활성화를 위한 인헨서 요소에 대해 문헌 [Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)]을 참조한다. 인헨서는 항체-코딩 서열에 대해 위치 5' 또는 3'에서 벡터 내로 스플라이싱될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 부위 5'에 위치한다.
- [0172] (vi) 전사 종결 성분
- [0173] 진핵 숙주 세포 (효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 다른 다세포 유기체로부터의 유핵 세포)에 사용되는 발현 벡터 역시 전사의 종결 및 mRNA의 안정화에 필요한 서열을 함유할 것이다. 이러한 서열은 통상적으로 진핵 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때때로 3' 비번역 영역으로부터 이용가능하다. 이들 영역은 항체를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사된 뉴클레오티드 절편을 함유한다. 유용한 전사 종결 성분 중 하나는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다. W094/11026 및 그에 개시된 발현 벡터를 참조한다.

- [0174] (vii) 숙주 세포의 선택 및 형질전환
- [0175] 본원에서 벡터에 DNA를 클로닝하거나 발현시키기에 적합한 숙주 세포는 상기 기재된 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포이다. 이러한 목적에 적합한 원핵생물은 유박테리아(eubacteria), 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어 엔테로박테리아세아에(Enterobacteriaceae), 예컨대 에스케리키아(*Escherichia*), 예를 들어 이. 콜라이, 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 예를 들어 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아(*Serratia*), 예를 들어 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*) 및 시겔라(*Shigella*) 뿐만 아니라 바실루스(*Bacilli*), 예컨대 비. 서브틸리스(*B. subtilis*) 및 비. 리케니포르미스(*B. licheniformis*) (예를 들어, 1989년 4월 12일에 공개된 DD 266,710에 개시된 비. 리케니포르미스 41P), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 예컨대 피. 아에루기노사(*P. aeruginosa*) 및 스트렙토미세스(*Streptomyces*)를 포함한다. 한 바람직한 이. 콜라이 클로닝 숙주는 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446)이지만, 다른 균주 예컨대 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 X1776 (ATCC 31,537), 및 이. 콜라이 W3110 (ATCC 27,325)도 적합하다. 이러한 예들은 제한적이기보다는 예시적이다.
- [0176] 전장 항체, 항체 융합 단백질, 및 항체 단편은, 특히 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않은 경우, 예를 들어 치료 항체를 그 자체만으로도 종양 세포 파괴에 있어서 효과적인 것으로 나타나는 세포독성제 (예를 들어, 독소)와 접합시키는 경우에 박테리아에서 생산될 수 있다. 전장 항체는 순환 반감기가 더 길다. 이. 콜라이에서의 생산은 보다 신속하고 보다 비용 효율적이다. 박테리아에서의 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 대해서는, 예를 들어 발현 및 분비 최적화를 위한 번역 개시 영역 (TIR) 및 신호 서열이 기재되어 있는 미국 특허 번호 5,648,237 (Carter et al.), 미국 특허 번호 5,789,199 (Joly et al.) 및 미국 특허 번호 5,840,523 (Simmons et al.)을 참조한다. 또한, 이. 콜라이에서의 항체 단편의 발현이 기재되어 있는 문헌 [Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254]을 참조한다. 발현 후에, 항체를 가용성 분획 중의 이. 콜라이 세포 페이스트로부터 단리할 수 있고, 예를 들어 이소형에 따라 단백질 A 또는 G 칼럼을 통해 정제할 수 있다. 최종 정제는 예를 들어 CHO 세포 내에서 발현된 항체를 정제하는 방법과 유사하게 수행될 수 있다.
- [0177] 원핵생물 이외에도, 진핵 미생물, 예컨대 사상 진균 또는 효모가 항체-코딩 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로미세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 통상적인 제빵 효모는 하등 진핵 숙주 미생물 중에서 가장 통상적으로 사용된다. 그러나, 다수의 다른 속, 종, 및 균주, 예컨대 쉬조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*) 숙주, 예를 들어 케이. 락티스(*K. lactis*), 케이. 프라길리스(*K. fragilis*) (ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045), 케이. 위케라미이(*K. wickeramii*) (ATCC 24,178), 케이. 왈티이(*K. waltii*) (ATCC 56,500), 케이. 드로스필라룸(*K. drosophilaram*) (ATCC 36,906), 케이. 써모톨러란스(*K. thermotolerans*), 및 케이. 마르시아누스(*K. marxianus*); 야로위아(*yarrowia*) (EP 402,226); 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) (EP 183,070); 칸디다(*Candida*); 트리코더마 레에시아(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*); 슈완니오미세스(*Schwanniomyces*), 예컨대 슈완니오미세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*); 및 사상 진균, 예컨대 예를 들어 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*), 및 아스페르길루스(*Aspergillus*) 숙주, 예를 들어 에이. 니둘란스(*A. nidulans*) 및 에이. 니저(*A. niger*)가 통상적으로 이용가능하며 본원에서 유용하다. 치료 단백질의 생산을 위해 효모 및 사상 진균을 사용하는 것에 관한 논의를 검토하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004)]을 참조한다.
- [0178] 글리코실화 경로가 "인간화"됨으로써 부분 또는 완전 인간 글리코실화 패턴을 갖는 항체를 생산하는 특정 진균 및 효모 균주가 선택될 수 있다. 예를 들어 문헌 [Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)] (피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)에서의 글리코실화 경로의 인간화 기재); 및 상기 문헌 [Gerngross et al.]을 참조한다.
- [0179] 글리코실화 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 유기체 (무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) (모충), 아에테스 아에깃티(*Aedes aegypti*) (모기), 아에테스 알보픽투스(*Aedes albopictus*) (모기), 드로스필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*) (과실파리), 및 봄빅스 모리(*Bombyx mori*)와 같은 숙주로부터의 수많은 바큇바이러스 균주 및 변이체, 및 상응하는 허용 곤충 숙주 세포가 확인되어 있다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주, 예를 들어 아우토그라파 칼리포르니카(*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체, 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주가 공개적으로 이용가능하고, 이러한 바이러스는 특히 스포도프테라 프루기페르다 세

포의 형질감염을 위해 본 발명에 따라 본원의 바이러스로서 사용될 수 있다.

- [0180] 목화, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토, 좁개구리밥 (렘나세아에 (*Lemnaceae*)), 알팔파 (엔. 트룬카툴라 (*M. truncatula*)), 및 담배의 식물 세포 배양물을 또한 숙주로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 및 6,417,429 (트랜스제닉 식물에서 항체를 생산하기 위한 플랜티바디스(PLANTIBODIES)TM 기술을 기재함)를 참조한다.
- [0181] 척추동물 세포를 숙주로서 사용할 수 있고, 척추동물 세포를 배양하여 증식시키는 것이 (조직 배양) 통상적인 절차가 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (현탁 배양에서의 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); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 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 (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간세포암 세포주 (Hep G2)이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 예를 들어 DHFR⁻ CHO 세포 (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); 및 골수종 세포주, 예컨대 NS0 및 Sp2/0을 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토를 위해서는, 예를 들어 문헌 [Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 255-268]을 참조한다.
- [0182] 숙주 세포는 항체 생산을 위해 상기 기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환되고, 프로모터를 유도하거나 형질전환체를 선택하거나 또는 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기에 적절하게 변형된 본원에 제공된 세포 배양 배지에서 배양된다.
- [0183] 세포 성장 및 폴리펩티드 생산
- [0184] 일반적으로, 세포는 임의의 세포 성장, 유지 및/또는 폴리펩티드 생산을 촉진하는 하나 이상의 조건 하에 본원에 기재된 임의의 세포 배양 배지와 조합된다 (접촉된다). 세포를 배양하고 폴리펩티드를 생산하는 방법은 세포 및 세포 배양 배지를 담기 위해 배양 용기 (생물반응기)를 사용한다. 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 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 기존에 사용된 것들이고, 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 배양 과정 동안 조정될 수 있는 배양 조건은 pH 및 온도를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0185] 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.
- [0186] 초기 성장기에서 세포 배양물의 온도는 주로 세포 배양물이 살아있는 상태로 유지되는 온도 범위에 기초하여 선택될 것이다. 예를 들어, 초기 성장기 동안, CHO 세포는 37°C에서 잘 성장한다. 일반적으로, 대부분의 포유동물 세포는 약 25°C 내지 42°C의 범위 내에서 잘 성장한다. 바람직하게는, 포유동물 세포는 약 35°C 내지 40°C의 범위 내에서 잘 성장한다. 통상의 기술자는 세포의 요구 및 생산 요건에 따라 세포를 성장시키는데 적절한 온도 또는 온도들을 선택할 수 있을 것이다.
- [0187] 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 꾸준하게 증가 또는 감소될 수 있다. 대안적으로, 온도는 초기 성장기 동안 다양한 시점에서 불연속적인 양으로 증가 또는 감소될 수 있다. 통상의 기술자는 단일 또는 다중 온도가 사용되어야 하는지 여부, 및 온도가 꾸준하게 또는 불연속적인 양으로 조정되어야 하는지 여부를 결정할 수 있을 것이다.
- [0188] 세포는 보다 길거나 짧은 시간 동안 초기 성장기 동안 배양될 수 있다. 한 변형법에서, 세포는 세포가 방해받지 않고 성장하도록 허용된 경우에 세포가 최종적으로 도달하는 최대 생존 세포 밀도의 백분율인 생존 세포 밀도를 달성하기에 충분한 기간 동안 배양된다. 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 배양될 수 있다.

- [0189] 또 다른 실시양태에서, 세포는 규정된 기간 동안 성장하도록 허용된다. 예를 들어, 세포 배양물의 출발 농도, 세포가 배양되는 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 배양될 수 있다. 일부 경우에, 세포는 1개월 또는 그 초과 동안 성장하도록 허용될 수 있다.
- [0190] 세포 배양물은 세포에 대한 산소화 및 영양소 분산을 증가시키기 위해 초기 배양기 동안 교반 또는 진탕될 수 있다. 본 발명에 따라, 통상의 기술자는 pH, 온도, 산소화 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 초기 성장기 동안의 생물반응기의 특정의 내부 조건을 제어하거나 또는 조절하는 것인 유익할 수 있을 것임을 이해할 것이다. 예를 들어, pH는 적절한 양의 산 또는 염기를 공급함으로써 제어될 수 있고, 산소화는 관련 기술분야에 널리 공지된 살포 장치로 제어될 수 있다.
- [0191] 초기 배양 단계는 성장기이며, 여기서 회분 세포 배양 조건은 재조합 세포의 성장을 증진시키도록 변형되어, 시드 트레인을 생산한다. 성장기는 일반적으로, 세포가 일반적으로 급속하게 분열하는, 예를 들어 성장하는 지수적 성장 기간을 지칭한다. 이러한 기간 동안, 세포는 소정의 기간 동안, 통상적으로, 그러나 비제한적으로 1 내지 4일, 예를 들어 1, 2, 3 또는 4일 동안, 세포 성장이 최적인 조건 하에 배양된다. 숙주 세포를 위한 성장 주기의 결정은 통상의 기술자에게 공지된 방법에 의해 특정한 숙주 세포에 대해 결정될 수 있다.
- [0192] 성장기에서, 본원에 제공된 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, 원하는 경우에 혈청 및 동물-유래 단백질이 사용될 수 있다. 그의 성장에서 특정한 시점에, 세포는 생산기에서의 배양 출발 시점에 배양 배지에 집중하기 위한 집중물을 형성할 수 있다. 대안적으로, 생산기는 성장기에 연속될 수 있다. 세포 성장기는 일반적으로 폴리펩티드 생산기에 이어진다.
- [0193] 폴리펩티드 생산기 동안, 세포 배양물은 (성장기와 비교하여) 세포 배양물의 생존 및 생존율에 도움이 되며 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 38°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 배지는 폴리펩티드가 상이한 배지에서 생산되었을 때 얻어진 오염물과 비교하여 폴리펩티드 생산을 증가시키는 방법에 사용되는 경우에 대사 부산물의 존재를 감소시킨다. 한 변형법에서, 오염물은 반응성 산소 종이다. 한 측면에서, 본원에 제공된 배지는 폴리펩티드 제품이 상이한 배지에서 생산되었을 때 얻어진 색상 강도와 비교하여 폴리펩티드의 생산을 증가시키는 방법에 사용되는 경우에 폴리펩티드 제품의 색상 강도를 감소시킨다. 한 변형법에서, 폴리펩티드 생산을 증가시키는 방법은 폴리펩티드 생산기 동안 온도 이동 단계를 포함한다. 추가의 변형법에서, 온도 이동 단계는 31°C로부터 38°C로, 32°C로부터 38°C로, 33°C로부터 38°C로, 34°C로부터 38°C로, 35°C로부터 38°C로, 36°C로부터 38°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.
- [0194] 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 상기 시점 이전에 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 밀도가 최대에 도달하도록 한 후에, 배양물을 수확하기 전에 생존 세포 밀도를 어느 정도 수준으로 감소되도록 하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0195] 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 것이 유익하거나 필요할 수 있다. 비제한적 예로서, 세포 배양물을 호르몬 및/또는 다른 성장 인자, 특정한 이온 (예컨대, 나트륨, 칼로라이드, 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.
- [0196] 본원에 제공된 성분 (예를 들어, 하이포타우린, 그의 유사체 또는 전구체)은 세포 배양 사이클 동안 임의의 시

점에 세포 배양 배지에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 하이포타우린은 14일 세포 배양 사이클 동안 0-14일 중 어느 한 시점 이상에서 (예를 들어, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일 중 어느 한 시점 이상에서), 본원에 제공된 농도 (예를 들어, 적어도 0.0001 mM)의 하이포타우린을 포함하는 세포 배양 배지를 제공하기 위한 임의의 양으로 첨가될 수 있다. 따라서, 14일 세포 배양 사이클 동안, 하이포타우린을 0-14일 중 어느 한 시점 이상에서 (예를 들어, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일 중 어느 한 시점 이상에서) 임의의 양으로 첨가할 수 있다는 것이 인지된다. 본원에 사용된 "제0일"은 세포 배양 배지를 세포 배양에 적용하기 전에 본원에 제공된 성분 (예를 들어, 하이포타우린)으로 보충된 세포 배양 배지를 지칭할 수 있다. 세포 배양 사이클은 세포가 살아있는 상태로 유지되고/거나 충분한 수준의 폴리펩티드가 생산되는 한 임의의 양의 일수일 수 있으며 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다는 것을 이해한다. 예를 들어, 세포 배양 사이클은 적어도 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일 또는 20일 기간일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 성분 (예를 들어, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체)은 세포 배양 사이클의 적어도 제1일에 세포 배양 배지에 첨가된다.

[0197] 폴리펩티드 정제

[0198] 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.

[0199] 배양 배지 또는 용해물을 원심분리하여 미립자 세포 파편을 제거할 수 있다. 그 후에 폴리펩티드는 적합한 정제 절차를 예시하는 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 술폰일 플루오라이드 (PMSF)는 또한 정제 동안 단백질분해적 분해를 억제하는데 유용할 수 있다. 통상의 기술자는 관심 폴리펩티드에 적합한 정제 방법이 재조합 세포 배양물에서의 발현시에 폴리펩티드의 특징 변화를 설명하기 위한 변형을 필요로 할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 폴리펩티드는 일반적으로 크로마토그래피 기술 (예를 들어, 낮은 pH 용리 단계를 갖는 단백질 A, 친화성 크로마토그래피 및 공정 불순물을 제거하기 위한 이온 교환 크로마토그래피)를 이용하여 정제될 수 있다. 항체에 대하여, 친화성 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체 내에 존재하는 임의의 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소형에 따라 달라진다. 단백질 A는 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$ 또는 $\gamma 4$ 중체를 기초로 하는 항체를 정제하는데 사용될 수 있다 (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 $\gamma 3$ 에 대해 권장된다 (Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)). 정제된 단백질은 농축되어, 본원에 기재된 농축된 단백질 약물 제품, 예를 들어 적어도 1 mg/mL 또는 10 mg/mL 또는 50 mg/mL 또는 75 mg/mL 또는 100 mg/mL 또는 125 mg/mL 또는 150 mg/mL의 단백질 농도 또는 약 1 mg/mL 또는 10 mg/mL 또는 50 mg/mL 또는 75 mg/mL 또는 100 mg/mL 또는 125 mg/mL 또는 150 mg/mL의 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 친화성 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 정제하기 위한 방법의 비제한적 예는 문헌 [Kelley, B. MAbs., 2009, 1(5):443-452]에 기재되어 있으며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0200] 폴리펩티드 색상 평가

[0201] 본원에 상술된 방법에 의해 생산되고 제공된 조성물에 존재하는 폴리펩티드는 단백질 정제 공정의 임의의 단계에서 색상에 대해 평가될 수 있다. 색상을 평가하는 방법은 본원에 상술된 배지에서 배양된 세포로부터 세포 배양액을 수확하는 것, 세포 배양액으로부터 폴리펩티드를 정제하여 폴리펩티드를 포함하는 조성물 (예를 들어, 용액)을 수득하는 것 및 폴리펩티드를 포함하는 용액을 색상에 대해 평가하는 것을 포함할 수 있다. 한 변형법에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 단백질 A 친화성 크로마토그래피로 정제한 후에 색상에 대해 평가된다. 추가의 변형법에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제한 후에 색상에 대해 평가된다. 또 다른 변형법에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 정제한 후에 색상에 대해 평가된다. 또 다른 변형법에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 소수성 상호작용 크로마

토그래피에 의해 정제한 후에 색상에 대해 평가된다. 또 다른 변형법에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제한 후에 색상에 대해 평가된다. 한 변형법에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 마이크로여과 또는 한외여과를 비롯한 여과에 의해 정제한 후에 색상에 대해 평가된다. 한 변형법에서, 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 색에 대한 평가 전에 농축된다 (예를 들어, 조성물은 적어도 1 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL, 75 mg/mL, 100 mg/mL, 125 mg/mL 또는 150 mg/mL 폴리펩티드, 예컨대 항체를 포함할 수 있음). 폴리펩티드를 포함하는 조성물은 원심분리, 필터 장치, 반투과성 막, 투석, 침전, 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 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 상술된 기술 중 하나 이상으로 정제한 후에 색상에 대해 평가될 수 있다. 조성물이 1회 이상의 동결 해동 사이클(들)을 거친 후에 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상을 평가하는 것이 본원에서 고려된다. 폴리펩티드의 정제 또는 농축 전에 폴리펩티드를 함유하는 세포 배양액의 색상을 평가하는 방법이 또한 본원에서 고려된다.

[0202]

본원에 기재된 배지로 본원에 상술된 방법에 의해 생산된 (또는 제공된 조성물에 존재하는) 폴리펩티드는 하나 이상의 시각적 색상 표준의 사용에 의해 색상에 대해 평가될 수 있다. 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상 평가를 위한 방법은 국제적 또는 국가적 색상 표준, 예컨대 비제한적으로 미국 약전 색상 표준 및 유럽 약전 색상 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]을 참조하며, 이들은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 예를 들어, 색상, 단백광 및 색조 (COC) 검정이 폴리펩티드를 함유하는 용액의 색상을 평가하는데 이용될 수 있다. 한 변형법에서, 12 mm 외부 직경의 무색의 투명한 중성 유리의 동일 튜브가 폴리펩티드를 포함하는 조성물 2.0 mL를 물 또는 용매 또는 논문에 규정된 참조 용액 2.0 mL와 비교하는데 사용된다. 색상은 색상 결정, 측정 또는 평가를 위해 산란된 주광에서 비교하고 백색 배경에 대해 수직으로 조망한다. 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. 색상은 색상 결정, 측정 또는 평가를 위해 산란된 주광에서 비교하고 백색 배경에 대해 수직으로 조망한다. 한 변형법에서, 색상 결정, 측정 또는 평가는 인간 육안 검사에 의해 수행될 수 있다. 또 다른 변형법에서, 색상 결정, 측정 또는 평가는 자동화 공정을 이용함으로써 수행될 수 있다. 예를 들어, 튜브는 색상을 결정, 측정 또는 평가하기 위한 알고리즘으로 영상을 처리하기 위해 튜브를 영상화하는 기계에 로딩될 수 있다. COC 검정에 대한 참조 표준은 갈색 (B), 갈색 빛-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 주어질 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 주어질 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 주어질 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 주어질 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 주어질 수 있다. 한 측면에서, 허용되는 색상은 본원에 제공된 척도 상에서 가장 어두운 것으로 측정된 것을 제외한 (예를 들어, 적색 참조 표준 값의 경우에 R1을 제외한) 임의의 색상이다. 한 변형법에서, 본원에 상술된 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 색상은 표 3에 기재된 바와 같은 참조 표준 값을 갖는다. 본원에 기재된 바와 같이, 한 측면에서 본원의 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 색상 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 초과 참조 표준 색상 값을 갖는 폴리펩티드 조성물 (한 변형법에서, 적어도 100 mg/mL 또는 125 mg/mL 또는 150 mg/mL 폴리펩티드를 포함하는 조성물임)을 생성한다. 통상의 기술자가 이해하는 바와 같이, 참조 표준 색상 값의 기재는 본원에 상술된 임의의 배지, 방법 또는 조성물의 기재에 적용될 수 있고, 이를 추가로 변형시킬 수 있다.

[0203]

일부 실시양태에서, 색상 강도는 전체 색상 검정을 이용하여 결정된다. 예를 들어, 문헌 [Vijayasankaran et

al., Biotechnol. Prog. 29:1270-1277, 2013]을 참조하며, 이는 본원에 참조로 포함된다. 전체 색상 검정을 위해, 샘플의 상대적 색상의 정량적 값은 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 색상 측정의 CIE 시스템을 이용하여 도출한다. 간략하게, 물로 블랭킹 후에, 순수한 시험 샘플의 흡수 스펙트럼을 HP8453A 분광광도계 (1cm 경로길이 큐벳)를 이용하여 가시 영역 (380-780nm)에서 측정한다. 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* 색상 척도로 전환시킨다. L*a*b*는 시지각에서 대략 균일한 간격을 갖는 3차원 색 공간이다. L*a*b* 색 공간은 색상의 시각적 판단에서의 차이를 정량화할 수 있다. 예를 들어, 매우 상이한 색상을 갖는 것으로 시각적으로 판단된 2개의 용액은 L*a*b* 색 공간 내에 함께 보다 가까이에 있는 유사한 색상을 갖는 2개의 용액과 비교했을 때 L*a*b* 색 공간에서 더 떨어져 있을 것이다. 3차원 L*a*b* 공간 내에서 점 사이의 거리는 점 사이의 유클리드 (델타 E)로서 계산된다. 이것은, L*a*b* 색 공간에서 점 사이의 델타 E를 측정하고 이 거리와, 색차의 시지각 판단과의 상관관계를 분석하는 것을 가능하게 하며, 큰 델타 E는 매우 상이한 색상의 2개의 용액을 나타내고, 작은 델타 E는 유사한 색상의 2개의 용액을 나타낸다. 흡수 스펙트럼의 L*a*b* 색 공간으로의 변환은 규정된 발광물을 필요로 한다. 예를 들어, 가시 영역에서의 인공 평탄 스펙트럼이 발광물로서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, "전체 색상"은 3차원 CIE L*a*b* 색 공간에서 시험 샘플과 물 사이의 유클리드 거리에 해당하는 델타 E를 나타낼 수 있다. 또한, "전체 색상"은 상이한 색조 사이의 구별 없이 시험 모노클로날 항체 샘플의 전체 색상을 나타낼 수 있다. 전체 색상 측정은 참조 표준물에 대해 측정된 값에 대해 정규화될 수 있다. 예를 들어, 후속으로 색상 강도 값은 시험 모노클로날 항체 샘플의 "전체 색" 측정치 대 ≤ B5의 COC 판독을 함유하는 참조 모노클로날 항체 샘플의 측정치의 비를 계산함으로써 결정된다.

[0204] 색상 강도는 또한 NIFTY (노란색/갈색 단백질에 대한 정규화된 고유 형광 도구) 검정을 이용하여 결정될 수 있다. 상기 검정에서, 단백질 A 풀에서 색상 강도 및 형광 강도가 매우 상관관계를 갖는 것으로 밝혀졌기 때문에 (R²=0.84), 항체 분자의 형광은 색상에 대한 대용물로서 사용된다. 문헌 [Vijayasankaran et al., Biotechnol Prog 27:1270-1277 (2013)]을 참조한다. 더 높은 수치의 NIFTY 값은 더 높은 색상 강도를 나타내고, 더 낮은 수치의 NIFTY 값은 더 낮은 색상 강도를 나타낸다. 약 50 내지 125 μg의 모노클로날 항체 샘플이, 0.5mL/분의 등용매 유량으로 G3000SWXL 칼럼 (TOSOH)를 사용하여 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 분석된다. SEC에 대한 이동상은 0.2M 인산칼륨, 0.25M 염화칼륨, pH 6.2이다. 칼럼 온도는 15°C에서 제어된다. 예를 들어, SEC 용리액은 280 nm에서 UV 흡수에 대해, 350 nm의 여기 파장 및 425 nm의 방출 파장으로 형광에 대해 모니터링될 수 있다. 이들 파장은 이들 파장으로 관찰된 최대 형광 반응 뿐만 아니라 강한 상관관계를 기초로 하여 선택된다. 모노클로날 항체 중의 SEC 피크를 애질런트 кем스테이션(Agilent Chemstation) 소프트웨어를 이용하여 UV 흡광도 및 형광 방출 크로마토그램 상에서 적분한다. 각각의 모노클로날 항체 샘플에 대해, 주요 피크의 형광 피크 면적을 주요 피크의 UV 흡광도 피크 면적으로 나누어 정규화된 형광을 결정하며, 이는 항체 질량 기여에 의한 형광 반응을 보정한다. 이후에, 시험 모노클로날 항체 샘플의 정규화된 형광 대 참조 모노클로날 항체 샘플 (예를 들어, ≤ B5의 COC 판독을 함유하는 샘플)의 형광의 비를 계산함으로써 색상 강도 값을 결정한다. NIFTY에 대한 샘플 요구량은 소량이기 때문에, 이는 배양 부피가 제한되는 경우에 색상에 대한 대용물로서 유용하다.

[0205] NIFTY 값은 하기 나타낸 바와 같이 계산될 수 있다. F= 형광 크로마토그램 상의 피크 면적; U= UV 흡수 크로마토그램 상의 피크 면적; i=변수; S= 샘플; R=참조.

$$\frac{F_i}{U_i} = \text{항체 농도에 대해 정규화된 형광}$$

$$\frac{F_S}{U_S} / \frac{F_R}{U_R} = \text{상대적 형광 (NIFTY 값)}$$

[0206]

[0207] 표 3. 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 중 어느 하나; 적어도 약 B1 또는 B2 또는 B3 또는 B4 또는 B5 또는 B6 또는 B7 또는 B8 또는 B9 중 어느 하나. 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 중 어느 하나; 적어도 약 BY1 또는 BY2 또는 BY3 또는 BY4 또는 BY5 또는 BY6 또는 BY7 중 어느 하나. 바람직하게는 BY3 내지 BY7. 가장 바람직하게는 BY4 내지 BY7.
(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 중 어느 하나; 적어도 약 Y1 또는 Y2 또는 Y3 또는 Y4 또는 Y5 또는 Y6 또는 Y7 중 어느 하나. 바람직하게는 Y3 내지 Y7. 가장 바람직하게는 Y4 내지 Y7.

[0208]

(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 중 어느 하나; 적어도 약 GY1 또는 GY2 또는 GY3 또는 GY4 또는 GY5 또는 GY6 또는 GY7 중 어느 하나. 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 중 어느 하나; 적어도 약 R1 또는 R2 또는 R3 또는 R4 또는 R5 또는 R6 또는 R7 중 어느 하나. 바람직하게는 R3 내지 R7. 가장 바람직하게는 R4 내지 R7.

[0209]

[0210]

또 다른 예에서, 본원에 기재된 배지로 본원에 상술된 방법에 의해 생산된 (또는 제공된 조성물에 존재하는) 폴리펩티드는 정량적 검정으로 색상에 대해 평가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 정량적 검정은 자동화 공정을 이용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 정량적 검정에 의해 제공된 더 높은 값 (예를 들어, 더 높은 수치)은 더 높은 색상 강도를 나타내고, 더 낮은 값 (예를 들어, 더 낮은 수치)은 더 낮은 색상 강도를 나타낸다.

[0211]

본원에 상술된 색상 검정은 본원에 제공된 폴리펩티드 조성물을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 용액 (예를 들어, 폴리펩티드-함유 용액)의 색상을 평가하는데 유용할 수 있다.

[0212]

IV. 조성물 및 제약 제제

[0213]

세포 배양 배지 및 하나 이상의 다른 성분, 예컨대 세포 또는 목적하는 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)를 포함하는 조성물이 또한 제공된다. 관심 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포는 세포 배양 동안 본 발명의 세포 배양 배지 내로 폴리펩티드를 분비할 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물은 폴리펩티드를 생산하는 세포, 및 폴리펩티드가 내부로 분비되는 본원에 제공된 세포 배양 배지를 포함할 수 있다. 생산된 폴리펩티드, 및 본원에 제공된 세포 배양 배지를 포함하는 조성물이 또한 고려된다. 본 발명의 일부 측면에서, (a) 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 세포; 및 (b) 세포 배양 배지를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 (a) 폴리펩티드; 및 (b) 본원에 제공된 세포 배양 배지를 포함하며, 여기서 폴리펩티드는 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포에 의해 배지 내로 분비된다. 다른 측면에서, 조성물은 (a) 폴리펩티드; 및 (b) 본원에 제공된 세포 배양 배지를 포함하며, 여기서 폴리펩티드는 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 포함하는 세포의 용해에 의해 배지 내로 방출된다. 조성물의 세포는 본원에 상술된 임의의 세포 (예를 들어, CHO 세포)일 수 있고, 조성물의 배지는 본원에 상술된 임의의 배지, 예컨대 표 1 또는 표 2에 상술된 하나 이상의 화합물을 포함하는 배지일 수 있다. 마찬가지로, 조성물의 폴리펩티드는 본원에 상술된 임의의 폴리펩티드, 예컨대 항체일 수 있다. 일부 측면에서, 조성물은 색상을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 색상은 하나 이상의 시각적 색상 표준의 사용에 의해 결정, 측정 또는 평가된다. 시각적 색상 표준은 국제적 또는 국가적 색상 표준, 예컨대 비제한적으로 미국 약전 색상 표준 및 유럽 약전 색상 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]을 참조한다. 따라서, 일부 실시양태에서, (a) 폴리펩티드; 및 (b) 본원에 제공된 세포 배양 배지를 포함하는 조성물은 색상 강도에 대해 평가된다. 추가 실시양태에서, 폴리펩티드는 색상 강도의 평가 전에 단리 및/또는 정제된다. 일부 실시양태에서, (a) 폴리펩티드; 및 (b) 본원에 제공된 세포 배양 배지를 포함하는 조성물의 색상 강도는 최종 단백질 조성물의 색상 강도를 예측하는데 사용된다. 예를 들어, 폴리펩티드 및 본원에 제공된 세포 배양 배지를 포함하는 조성물은 본원에 기재된 COC 검정을 이용하여 색상 강도에 대해 측정된다. 색상 강도 값이 B3, B4,

B5, B6, B7, B8 또는 B9 초과인 경우에, 최종 단백질 조성물이 B3, B4, B5, B6, B7, B8 또는 B9 초과인 색상 강도 값을 가질 가능성이 증가한다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 및 세포 배양 배지를 포함하는 조성물은 색상 강도의 측정 전에 하나 이상의 정제 단계를 거친다. 일부 실시양태에서, 최종 단백질 조성물은 제약 제제이다. 일부 측면에서, 본원에 제공된 조성물은 폴리펩티드를 적어도 약 1 mg/mL, 10 mg/mL 또는 25 mg/mL 또는 50 mg/mL 또는 75 mg/mL 내지 약 100 mg/mL의 농도 또는 약 1 mg/mL, 10 mg/mL 또는 25 mg/mL 또는 50 mg/mL 또는 75 mg/mL 내지 약 100 mg/mL의 농도로 포함한다. 일부 측면에서, 본원에 제공된 조성물은 폴리펩티드를 적어도 100 mg/mL 또는 125 mg/mL 또는 150 mg/mL의 농도 또는 약 100 mg/mL 또는 125 mg/mL 또는 150 mg/mL 또는 175 mg/mL 또는 200 mg/mL의 농도로 포함한다.

[0214] 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 생산된 폴리펩티드 (예를 들어, 치료 폴리펩티드)의 조성물 (예를 들어, 제약 제제)은 목적하는 정도의 순도를 갖는 폴리펩티드를 하나 이상의 임의의 제약상 허용되는 담체 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))와 혼합함으로써 동결건조 제제 또는 수용액의 형태로 제조된다. 제약상 허용되는 담체는 일반적으로, 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이며, 완충제, 항산화제, 보존제, 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드, 단백질; 친수성 중합체; 아미노산; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 다른 탄수화물, 킬레이트화제, 당, 염-형성 반대-이온, 금속 착물 (예를 들어 Zn-단백질 착물), 및/또는 비-이온성 계면활성제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 예시적인 동결건조된 폴리펩티드 제제는 미국 특허 번호 6,267,958에 기재되어 있다. 수성 폴리펩티드 제제는 미국 특허 번호 6,171,586 및 WO2006/044908에 기재된 것들을 포함하고, 후자의 제제는 히스티딘-아세테이트 완충제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제약 제제는 포유동물 예컨대 인간에게 투여된다. 폴리펩티드 (예를 들어, 항체)의 제약 제제는 비경구, 폐내 및 비강내를 비롯한 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있고, 원하는 경우에 국부 치료를 위해 병변내 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 투여는 임의의 적합한 경로에 의해, 예를 들어 주사, 예컨대 부분적으로는 투여가 단기적인지 장기적인지에 따라 정맥내 또는 피하 주사에 의해 수행될 수 있다. 따라서, 본원에 제공된 바와 같은 폴리펩티드-함유 제제는 개체로의 주사, 예컨대 피하 주사 (예를 들어, 인간으로의 피하 주사)에 적합할 수 있다. 생체내 투여에 사용되는 제약 제제는 일반적으로 멸균된다. 멸균은 예를 들어 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성될 수 있다.

[0215] 일부 측면에서, 본원에 제공된 조성물 (예를 들어, 제약 제제)은 폴리펩티드 (예를 들어, 치료 폴리펩티드)를 적어도 약 1 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL 또는 75 mg/mL의 농도 또는 약 1 mg/mL, 약 10 mg/mL, 약 25 mg/mL, 약 50 mg/mL 또는 약 75 mg/mL 내지 약 100 mg/mL의 농도로 포함한다. 다른 측면에서, 본원에 제공된 조성물 (예를 들어, 제약 제제)은 폴리펩티드 (예를 들어, 치료 폴리펩티드)를 적어도 약 100 mg/mL, 125 mg/mL, 150 mg/mL, 200 mg/mL 또는 250 mg/mL의 농도 또는 약 100 mg/mL, 약 125 mg/mL, 약 150 mg/mL, 약 175 mg/mL, 약 200 mg/mL, 또는 약 250 mg/mL의 농도로 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 제약 제제는 폴리펩티드를 적어도 약 1 mg/mL, 적어도 약 10 mg/mL, 적어도 약 25 mg/mL, 적어도 약 50 mg/mL, 또는 적어도 약 75 mg/mL 초과인 농도로 포함하고, COC 검정에 의해 측정시에 B3, B4, B5, B6, B7, B8 또는 B9 초과인 색상 강도 값을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 제약 제제는 폴리펩티드를 적어도 약 100 mg/mL, 적어도 약 125 mg/mL, 적어도 약 150 mg/mL, 또는 적어도 약 200 mg/mL 초과인 농도로 포함하고, COC 검정에 의해 측정시에 B3, B4, B5, B6, B7, B8 또는 B9 초과인 색상 강도 값을 갖는다. 일부 측면에서, COC 검정에 의해 결정된 색상 강도 값은 B, BY, Y, GY 또는 R 중 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되지는 않으며, 여기서 더 높은 값은 더 밝은 색상 강도를 나타낸다. 일부 측면에서, 본원에 제공된 제약 제제는 폴리펩티드를 적어도 약 1 mg/mL, 적어도 약 10 mg/mL, 적어도 약 25 mg/mL, 적어도 약 50 mg/mL, 또는 적어도 약 75 mg/mL 초과인 농도로 포함하고, 색상 검정에 의해 측정시에 참조 용액의 색상 강도 값 미만의 색상 강도 값을 갖는다. 일부 측면에서, 본원에 제공된 제약 제제는 폴리펩티드를 적어도 약 100 mg/mL, 적어도 약 125 mg/mL, 적어도 약 150 mg/mL, 또는 적어도 약 200 mg/mL 초과인 농도로 포함하고, 색상 검정에 의해 측정시에 참조 용액의 색상 강도 값 미만의 색상 강도 값을 갖는다. 예를 들어, 폴리펩티드 (예를 들어, 치료 폴리펩티드)를 포함하는 조성물 (예를 들어, 제약 제제)의 색상 강도는 표 1 또는 표 2의 성분 중 하나 이상을 포함하지 않는 세포 배양 배지에서 배양된 세포에 의해 생산된 폴리펩티드를 포함하는 조성물과 비교하여 적어도 0.1% 또는 약 5% 내지 약 50% 감소될 수 있다.

[0216] V. 제조품 또는 키트

[0217] 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 포함할 수 있다. 키트는 본원에 제공된 구성성분을 세포 배양 배지를 보충하기에 적합한 양으로 함유할 수 있다. 일부 측면에서, 키트는 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 안세린, 부틸화 히드록시아니솔, 카르노신, 리포산 및 퀘르시트린 수화물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 구성성분을 표 1 또는 표 2에 제공된 구성성분 농도로 세포 배양 배지를 보충하기 위한 양으로 함유한다. 일부 실시양태에서, 키트는 (a) 세포 배양 배지에 약 2.0 mM 내지 약 50.0 mM 하이포타우린을 제공하는 양의 하이포타우린; (b) 세포 배양 배지에 약 8.0 mM 내지 약 12.0 mM s-카르복시메틸시스테인을 제공하는 양의 s-카르복시메틸시스테인; (c) 세포 배양 배지에 약 8.0 mM 내지 약 12.0 mM 카르노신을 제공하는 양의 카르노신; (d) 세포 배양 배지에 약 3.0 mM 내지 약 5.0 mM 안세린을 제공하는 양의 안세린; (e) 약 0.025 mM 내지 약 0.040 mM 부틸화 히드록시아니솔을 제공하는 양의 부틸화 히드록시아니솔; (f) 세포 배양 배지에 약 0.040 mM 내지 약 0.060 mM 리포산을 제공하는 양의 리포산; (g) 세포 배양 배지에 약 0.010 mM 내지 약 0.020 mM 퀘르시트린 수화물을 제공하는 양의 퀘르시트린 수화물; 및 (h) 세포 배양 배지에 약 0.0003 mM 내지 약 10 mM 아미노구아니딘을 제공하는 양의 아미노구아니딘 중 하나 이상을 포함한다. 일부 측면에서, 키트는 하나 이상의 구성성분을 포함하며, 여기서 하나 이상의 구성성분은 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체이다. 일부 실시양태에서, 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체는 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 시스테아민, 시스테인술피산 및 타우린으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지를 화학적으로 규정된 구성성분으로 보충하기 위한 키트는 하이포타우린 또는 그의 유사체 또는 전구체를 적어도 약 0.0001 mM의 농도로 포함하고, 여기서 하이포타우린 또는 유사체 또는 전구체는 하이포타우린, s-카르복시메틸시스테인, 시스테아민, 시스테인술피산 및 타우린으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0218] 본 발명의 또 다른 측면에서, 본 발명의 세포 배양 배지를 보유하며 임의로 그의 용도에 대한 지침서를 제공하는 용기를 포함하는 제조품이 제공된다. 적합한 용기는 예를 들어 병 및 백을 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 세포 배양 배지, 및 용기 상에 있거나 용기에 결합되어 있는 라벨을 보유하며, 용기는 사용을 위한 (예를 들어, 세포를 배양하는데 사용하기 위한) 지시를 나타낼 수 있다. 제조품은 상업적 및 사용자 입장에서 바람직한 다른 물질, 예를 들어 다른 완충제, 희석제 및 사용 지침서가 있는 포장 삽입물을 추가로 포함할 수 있다.

[0219] 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위해 제공되나 본 발명을 제한하지는 않는다.

[0220] 실시예

[0221] 특히 단백질 제품이 (예를 들어, 적어도 약 1 mg/mL 또는 적어도 약 100 mg/mL의 농도로) 농축된 용액으로 제공되는 경우에, 허용되는 품질 속성, 예컨대 감소된 색상 강도를 갖는 단백질 제품 (예를 들어, 단백질 약물 제품)을 생산하는 배지가 확인되었다. 본원에 제공된 배지에서 세포를 배양하는 방법, 및 상기 배지를 사용하여 폴리펩티드를 생산하는 방법이 기재된다. 배지는 한 측면에서 하이포타우린을 포함할 수 있다. 본원에 제공된 일부 측면에서, 배지는 하나 이상의 하이포타우린 유사체 또는 그의 전구체, 예컨대 카르복시메틸시스테인을 포함한다. 각각의 배지 구성성분은 전반에 걸쳐 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 반응성 산소 종의 존재를 감소시킬 수 있다. 배지는 세포 배양 및 폴리펩티드 생산의 모든 시기에 걸쳐 유용하며, 기초 및/또는 공급 배지로 사용될 수 있다. 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 생산된 폴리펩티드, 및 본원에 상술된 바와 같이 생산된 폴리펩티드를 포함하는 제약 조성물이 제공된다. 한 측면에서, 제약 조성물은 폴리펩티드를 적어도 또는 약 100 mg/mL, 125 mg/mL 또는 150 mg/mL 중 어느 하나의 농도로 포함한다. 제조 방법 및 항체를 포함하는 조성물이 구체적으로 고려된다. 세포 배양 배지를 화학적으로 규정된 구성성분으로 보충하기 위한 키트가 또한 기재된다.

[0222] 실시예 1: 항체 조성물에서 색상을 감소시킬 수 있는 항산화제 화합물의 확인.

[0223] 산화제와 반응하는 것으로 보고된 화합물을 단백질 함유 조성물의 색상을 감소시키는 그의 능력에 대해 스크리닝하였다 (표 4). 항산화제 스크리닝을 위해, 세포 배양 조건에 사용되는 배지의 대표적인 비를 반영하여 1부의 기초 배지 1 및 0.3부의 공급 배지 2를 혼합함으로써 총 부피 40 mL의 배지를 제조하였다 (표 5). 항체-생산 세포를 배양하는데 사용된 경우에 항체-함유 용액의 색상 강도를 증가시키는 것으로 이전에 밝혀진 배지 1 및 배지 2의 혼합물을 30종의 항산화제 화합물 중 하나로 보충하고, 2 g/L IgG1 모노클로날 항체로 스파이킹하였다. 샘플을 5일 인큐베이션 기간 동안 250 rpm으로 진탕시키면서 37°C에서 인큐베이션하였다. 2개의 대조 샘플을 스크리닝 검정에 포함시켰다: 1) 2g/L IgG1 모노클로날 항체를 함유하는 배지 1 및 배지 2 혼합물의 40 mL 샘플 - 항산화제 없이 250 rpm으로 진탕시키면서 37°C에서 5일 동안 인큐베이션함 (양성 대조군), 및 2) 항

체-생산 세포를 배양하는데 사용된 경우에 항체-함유 용액의 색상 강도를 감소시키는 것으로 이전에 밝혀진, 1 부의 기초 배지 3 및 0.3부의 공급 배지 4 (표 5)를 혼합함으로써 제조된 배지 혼합물의 40 mL 샘플 - 2g/L IgG1 모노클로날 항체로 스파이킹하고, 항산화제 없이 250 rpm으로 진탕시키면서 37°C에서 5일 동안 인큐베이션 함 (음성 대조군).

[0224]

표 4. 색상의 감소에 대해 스크리닝된 대표적인 화합물

항산화제	IUPAC	CAS #	IX 시험 농도
2,3-tert-부틸-4-히드록시아니솔	2-tert-부틸-4-메톡시페놀	25013-16-5	34.68 µM
2,6-디-tert-부틸-4-메틸페놀	2,6-디-tert-부틸-4-메틸페놀	97123-41-6	102.11 µM
3-아미노프로판-1-술폰산	3-아미노프로판-1-술폰산	3687-18-1	9.16 mM
아데노실호모시스테인	S-(5'-데옥시아데노스-5'-일)-L-호모시스테인	979-92-0	10.41 µM
안세린	(2S)-2-(3-아미노프로판아미도)-3-(1-메틸-1H-이미다졸-5-일)프로판산; 질산	10030-52-1	4.12 mM
B-알라닌	3-아미노프로판산	107-95-9	9.16 mM
B-카로틴	1,3,3-트리메틸-2-[(1E,3E,5E,7E,9E,11E,13E,15E,17E)-3,7,12,16-테트라메틸-18-(2,6,6-트리메틸시클로헥스-1-엔-1-일)옥타데카-1,3,5,7,9,11,13,15,17-노나엔-1-일]시클로헥스-1-엔	7235-40-7	9.31 µM
부틸화 히드록시아니솔	2-tert-부틸-4-메톡시페놀	25013-16-5	31.62 µM
부틸화 히드록시톨루엔	2,6-디-tert-부틸-4-메틸페놀	128-37-0	124.80 µM
카르노신	(2S)-2-(3-아미노프로판아미도)-3-(1H-이미다졸-5-일)프로판산	305-84-0	10.00 mM
카르베딜롤	[3-(9H-카르바졸-4-일옥시)-2-히드록시프로필][2-(2-메톡시페녹시)에틸]아민	72956-09-3	21.53 µM
쿠르쿠민	(1E,4Z,6E)-5-히드록시-1,7-비스(4-히드록시-3-메톡시페닐)헵타-1,4,6-트리엔-3-온	458-37-7	49.95 µM
시스테인	2-아미노에탄-1-티올	60-23-1	12.00 mM
시스테인 히드로클로라이드	히드로젠 2-아미노에탄-1-티올 클로라이드	156-57-0	10.00 mM
텍사메타손	(1R,2S,10S,11S,13R,14R,15S,17S)-1-플루오로-14,17-디히드록시-14-(2-히드록시아세틸)-2,13,15-트리메틸테트라시클로[8.7.0.0 ^{2,7} .0 ^{11,15}]헵타데카-3,6-디엔-5-온	50-02-2	9.56 µM
디알릴디설피드	3-(프로프-2-엔-1-일술폰닐)프로프-1-엔	592-88-1	1.00 mM
DL-란티오닌	2-아미노-3-[(2-아미노-2-카르복시에틸)술폰닐]프로판산	3183-08-2	97.96 µM
DL-티오르판	2-(2-벤질-3-술폰닐프로판아미도)아세트산	76721-89-6	0.10 mM

[0225]

에톡시퀸	6-에톡시-2,2,4-트리메틸-1,2-디히드로퀴놀린	91-53-2	49.99 μM
갈산	3,4,5-트리히드록시벤조산	149-91-7	14.11 μM
젬티스산 나트륨 염 수화물	소듐 2,5-디히드록시벤조에이트	4955-90-2	2.84 mM
글루타티온	2-아미노-4-((1-[(카르복시메틸)카르바모일]-2-술폰닐에틸)카르바모일)부탄산	70-18-8	2.0 mM
글루타티온 디술폰드	2-아미노-4-[(2-((2-(4-아미노-4-카르복시부탄아미도)-2-[(카르복시메틸)카르바모일]에틸)디술폰닐)-1-[(카르복시메틸)카르바모일]에틸)카르바모일)부탄산	27025-41-8	2.0 mM
환원형 글루타티온 에틸 에스테르	(2S)-2-아미노-4-(((1R)-1-[(카르복시메틸)카르바모일]-2-술폰닐부틸)카르바모일)부탄산	92614-59-0	0.93 mM
글리신	2-아미노아세트산	56-40-6	13.32 mM
히드로코르티손	(1S,2R,10S,11S,14R,15S,17S)-14,17-디히드록시-14-(2-히드록시아세틸)-2,15-디메틸테트라시클로[8.7.0.0 ^{2,7} .0 ^{11,15}]헵타데스-6-엔-5-온	50-23-7	55.03 mM
하이포타우린	2-아미노에탄-1-술폰네이트	300-84-5	9.16 mM
이세티온산 암모늄 염	암모늄 2-히드록시에탄-1-술폰네이트	57267-78-4	9.16 mM
L-시스테인-글루타티온 디술폰드	(2S)-2-아미노-4-(((1R)-2-(((2R)-2-아미노-3,3-디히드록시프로필)술폰닐)-1-[(카르복시메틸)카르바모일]-2-술폰닐리덴에틸)카르바모일)부탄산	13081-14-6	0.73 mM
L-시스테인술폰산 1 수화물	(2R)-2-아미노-3-[(R)-술폰노]프로판산 수화물	207121-48-0	9.15 mM
리포산	5-[(3R)-1,2-디티올란-3-일]펜탄산	1200-22-2	50.40 μM
환원형 리포산	6,8-디술폰닐옥탄산	462-20-4	48.00 μM
메르캅토프로피오닐 글리신	2-(2-술폰닐프로판아미도)아세트산	1953-02-2	10.00 mM
메티오닌	2-아미노-4-(메틸술폰닐)부탄산	59-51-8	5.00 mM
메틸렌비스(3-티오프로피온산)	3-(((2-카르복시에틸)술폰닐)메틸)술폰닐)프로판산	4265-57-0	0.99 mM
옥살산	옥살산	144-62-7	500.94 μM

[0226]

퀘르세트린 수화물	2-(3,4-디히드록시페닐)-5,7-디히드록시-3- {(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-트리히드록시-6- 메틸옥산-2-일}옥시}-4H-크로멘-4-온	522-12-3	13.94 μ M
레스베라트롤	5-[(E)-2-(4-히드록시페닐)에테닐]벤젠-1,3- 디올	501-36-0	98.58 μ M
레티노산	(2E,4E,6E,8E)-3,7-디메틸-9-(2,6,6- 트리메틸시클로헥스-1-엔-1-일)노나-2,4,6,8- 테트라엔산	302-79-4	2.0 μ M
S-카르복시메틸-L- 시스테인	(2R)-2-아미노-3- [(카르복시메틸)술폰닐]프로판산	638-23-3	10.00 mM
셀레늄	셀레닐리덴	7782-49-2	1.40 μ M
셀레노메티오닌	(2S)-2-아미노-4-(메틸셀라닐)부탄산	3211-76-5	30.09 μ M
은 다에틸디티오카르 바메이트	은(1+) 이온 (다에틸카르바모티오일)술폰나이드	1470-61-7	0.10 mM
타우린	2-아미노에탄-1-술폰산	107-35-7	5.00 mM
티오락트산	2-술폰닐프로판산 아민	79-42-5	10.00 mM
트리신	2-{{1,3-디히드록시-2- (히드록시메틸)프로판-2- 일}아미노}아세트산	5704-04-1	4.46 mM
비타민 C	2-(1,2-디히드록시에틸)-4,5-디히드록시-2,3- 디히드로푸란-3-온	50-81-7	9.82 μ M
비타민 E	(2R)-2,5,7,8-테트라메틸-2-[(4R,8R)-4,8,12- 트리메틸트리데실]-3,4-디히드로-2H-1- 벤조피란-6-올	10191-41-0	27.86 μ M

1X 시험 농도는 배지 중 최종 농도를 나타냄

[0227]

[0228]

인큐베이션 후에, 모노클로날 항체를 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 농축된 항체 조성물의 색상 강도를 검정을 이용하여 정제된 풀에서 측정하였으며, 여기서 더 높은 수치는 더 높은 색상 강도를 나타내고, 더 낮은 수치는 더 낮은 색상 강도를 나타낸다. 수치 결과를, 양성 대조군에 대한 값을 색상 강도에 서의 0% 변화로 설정하여 양성 대조군에 대해 정규화하였다. 시험된 30종의 항산화제 화합물 중에서 몇몇 화합물, 예컨대 겐티스산, 시스테인, 히드로코르티손 및 메르캅토프로피오닐 글리신이 항체 조성물의 색상을 증가시키는 것으로 확인되었다 (도 1). 그에 비해, 하이포타우린, 안세린, 부틸화 히드록시아니솔, 카르노신, 리포산 및 퀘르세트린 수화물과 같은 6종의 화합물은 항체 조성물의 색상을 감소시키는 것으로 확인되었다 (도 2). 색상 강도를 감소시킨 항산화제 중에서, 하이포타우린은 항체-함유 조성물의 색상 강도를 대략 25% 감소시킴으로써 최대 효과를 나타내었다. 하이포타우린의 유사체인 타우린이 또한 색상 강도를 대략 5% 감소시켰다.

[0229] 표 5. 시험된 배지 조성물 내의 대표적인 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 황산제 1 철임

^b 철 공급원은 시트르산제 2 철임

[0230]

[0231]

실시에 2: 항체-생산 세포주로부터 단리된 항체 조성물에서 색상 강도를 감소시킬 수 있는 항산화제 화합물의 특성화.

[0232]

세포 배양으로부터 직접적으로 수득한 항체 함유 조성물에서 색상 강도를 감소시키는 하이포타우린의 능력을 평가하였다. 이들 연구를 위해, 보다 큰 규모의 2L 세포 배양을 대표하는 것으로 밝혀진 진탕기 플라스크 세포 배양 모델을 이용하였다. 간략하게, 진탕기 플라스크 세포 배양 모델의 경우에, 항체 생산 CHO 세포를 100 mL의 기초 배지 1 또는 기초 배지 3을 함유하는 250 mL 플라스크에 대략 1.0×10^6 개 세포/mL로 접종하였다. 보다 큰 규모의 2L 세포 배양의 경우에, 항체 생산 CHO 세포를 1L의 기초 배지 1 또는 기초 배지 3을 함유하는 2-리터 교반 생물반응기 (애플리콘(Applikon), 캘리포니아주 포스터 시티)에 대략 1.0×10^6 개 세포/mL로 접종하였다. 보다 큰 규모의 세포 성장 모델의 경우에, 생산기의 개시를 위해 제3일, 제6일 및 제9일에 세포 배양액의 리터당, 기초 배지 1에서 배양하는 경우에 100 mL의 공급 배지 2를 또는 기초 배지 3에서 배양하는 경우에 100 mL의 공급 배지 4를 첨가하여 유가식으로 세포를 배양하였다. 진탕기 플라스크 세포 배양 모델의 경우에, 생산기의 개시를 위해 제3일, 제6일 및 제9일에 세포 배양액의 리터당, 기초 배지 1에서 배양하는 경우에 10 mL의 공급 배지 2를 또는 기초 배지 3에서 배양하는 경우에 10 mL의 공급 배지 4를 첨가하여 유가식으로 세포를 배양하였다. 글루코스의 농도를 매일 분석하고, 글루코스 농도가 3 g/L 아래로 떨어지면, 글루코스 고갈 방지를 위해 이를 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. 보다 큰 규모의 2L 세포 배양의 경우에, CO₂ 또는 Na₂CO₃의 첨가를 통해 pH를 제어하고, 필요에 따라 배양물에 소포제를 첨가하였다. 세포 배양물을 pH 7.0 및 0일에서 3일까지는 37°C의 온도, 이어서 제3일 이후에는 35°C에서 유지하였다. 세포 배양물을 275 rpm에서 교반하였고, 용존 산소 수준은 30%의 공기 포화도였다. 진탕기 플라스크 세포 배양의 경우에, 배양물을 진탕기 플랫폼 상에 두고, 세포 배양 사이클의 제0일에서 제3일까지는 37°C의 온도였다가 제4일에 35°C로 온도를 변화시켜 세포 배양 사이클의 마지막 제14일까지 5% CO₂ 인큐베이터에서 150 rpm으로 교반하였다. 오스몰랄농도를 어드밴스드 인스트루먼트(Advanced Instruments) (메사추세츠주 노르우드)로부터의 삼투압계를 이용하여 모니터링하였다. 또한, 오프라인 pH 및 대사물 농도를 노바 바이오프로파일 400(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 (베크만 쿨터(Beckman Coulter), 캘리포니아주 플러톤)를 이용하여 매일 측정하였다. 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 항체 역가를 결정하기 위해 1 mL의 세포 배양액을 원심분리함으로써 세포 배양액을 매일 수집하였다. 세포 배양 기간의 마지막 제14일에, 모든 샘플로부터의 세포 배양액을 원심분리에 의해 수확하였다. 수확된 세포 배양액 중의 모노클로날 항체를 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 농축된 항체 조성물의 색상 강도를 검정을 이용하여 정제된 풀에서 측정하였으며, 여기서 더 높은 수치는 더 높은 색상 강도를 나타내고 더 낮은 수치는 더 낮은 색상 강도를 나타낸다. VCC (도 3a) 및 세포 생존율 (도 3b)에 의해 측정된 성장은 사용된 배지에 상관없이 보다 큰 규모

(2L) 및 진탕기 플라스크 (SF) 세포 배양 모델 사이에서 대등하였다. 항체 생산은 진탕기 플라스크 세포 배양 모델에서 약간 낮았으며, 가장 높은 항체 생산은 배지 1 및 배지 2에서 인큐베이션된 보다 큰 규모의 세포 배양 모델에서 관찰되었다 (도 3c). 배지 1 및 배지 2에서 배양했을 때 진탕기 플라스크 세포 배양 조성물로부터 수득한 항체 조성물이 2.25의 값을 가졌던 것과 비교하여, 진탕기 플라스크 세포 배양 모델로부터 수득한 항체 조성물의 색상 강도는 배지 3 및 배지 4에서 배양했을 때 1.07의 값으로 낮아졌다. 이들 실험으로 진탕기 플라스크 모델이 2L 세포 배양 모델과 대등하고, 후속 실험에 사용하기에 적합하는 것이 확립되었다.

[0233] 항산화제 하이포타우린으로 보충된 세포 배양 배지 조성물을 사용한 실험을 위해, 항체 생산 CHO 세포를 100 mL의 기초 배지 1을 함유하는 250 mL 플라스크에 대략 1.0×10^6 개 세포/mL로 접종하였다. 배지 1을 제0일에 세포 배양에 사용하기 위해 9.16 mM (100%), 4.58 mM (50%) 또는 2.29 mM (25%) 하이포타우린으로 보충하였다. 생산기의 개시를 위해 제3일, 제6일 및 제9일에 세포 배양액의 리터당 10 mL의 공급 배지 2를 첨가하여 유가식으로 세포를 배양하였다. 추가의 실험 샘플은 세포 배양 기간에 걸친 9.16 mM 하이포타우린의 증분 첨가를 포함하였다. 구체적으로, 2.29 mM (25%) 하이포타우린을 기초 배지 1에 세포 배양의 제0일에 첨가하고, 25%를 공급 배지 2에 제3일, 제6일 및 제9일에 첨가하였다. 하이포타우린 보충 없이 배지 1 및 2에서 세포를 배양하여 양성 대조군을 포함시켰다. 하이포타우린 보충 없이 배지 3 및 배지 4에서 배양된 세포를 배양하여 음성 대조군을 포함시켰다. 상기 기재된 바와 같이, 글루코스의 농도를 매일 분석하고, 글루코스 농도가 3g/L 아래로 떨어지면, 글루코스 고갈 방지를 위해 이를 500g/L 글루코스 원액으로 보충하였다. 세포 배양물을 pH 7.0 및 0일에서 3일까지는 37°C의 온도, 이어서 제3일 이후에는 35°C에서 유지하였다. 세포 배양물을 275rpm으로 교반하였고, 용존 산소 수준은 30%의 공기 포화도였다. VCC 및 세포 생존율을 바이셀® 자동화 세포 계수기 (베크만 쿨터, 캘리포니아주 풀러튼)를 이용하여 매일 측정하였다. 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 항체 역가를 결정하기 위해 1 mL의 세포 배양액을 원심분리함으로써 세포 배양액을 매일 수집하였다. 세포 배양 기간의 마지막 제14일에, 모든 샘플로부터의 세포 배양액을 원심분리에 의해 수확하였다. 수확된 세포 배양액 중의 모노클로날 항체를 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 농축된 항체 조성물의 색상 강도를 검정을 이용하여 정제된 풀에서 측정하였으며, 여기서 더 높은 수치는 더 높은 색상 강도를 나타내고 더 낮은 수치는 더 낮은 색상 강도를 나타낸다. 양성 대조군에 대한 값을 색상 강도에서의 0% 변화로 설정하여 수치 결과를 양성 대조군에 대해 정규화하였다. VCC (도 4a) 및 세포 생존율 (도 4b)에 의해 측정된 성장은 시험된 모든 세포 배양물 사이에서 대등하였다. 또한, 하이포타우린의 증분 첨가를 제외하고는, 하이포타우린으로 보충된 배지에서 배양된 세포 배양물은 하이포타우린을 함유하지 않는 배지에서 배양된 세포 배양과 동일한 수준의 항체 역가를 생산하였다 (도 4c). 색상 강도는 하이포타우린의 농도가 높을수록 감소되는 것으로 밝혀졌으며, 최대 감소는 9.16 mM 하이포타우린을 함유하는 배지에서 관찰되었다 (도 5). 색상 강도의 이러한 감소는 하이포타우린을 세포 배양 인큐베이션의 과정에 걸쳐 증분적으로 첨가하기보다는 제1일에 볼루스로서 첨가한 경우에 최적이었다. 세포 배양 실험 및 인큐베이션 실험으로부터 수득한 색상 강도 값의 비교 (실시예 1 참조)는 인큐베이션 스크리닝 실험의 결과 (도 5, ○)가 세포 배양 실험으로부터 결과 (도 5, ●)와 매우 상관관계를 갖는다는 것을 나타낸다.

[0234] 하이포타우린의 색상 감소 효과가 다른 세포 배양 배지로 확장되는지 여부를 결정하기 위해, 기초 배지 3 및 배지 4에서 수확된 세포 배양물로부터 단리된 항체 조성물에 대해 유사한 실험을 수행하였다. 간략하게, 상기와 같이, 항체 생산 CHO 세포를 100 mL의 기초 배지 3을 함유하는 250 mL 플라스크에 대략 1.0×10^6 개 세포/mL로 접종하였다. 배지 3을 제0일에 세포 배양에 사용하기 위해 12.95 mM (1X), 25.9 mM (2X) 또는 38.85 mM (3X) 하이포타우린으로 보충하였다. 생산기의 개시를 위해 제3일, 제6일 및 제9일에 세포 배양액의 리터당 10 mL의 공급 배지 4를 첨가하여 유가식으로 세포를 배양하였다. 하이포타우린 보충 없이 배지 1 및 2에서 세포를 배양하여 양성 대조군을 포함시켰다. 배양물을 진탕기 플랫폼 상에 두고, 세포 배양 사이클의 제0일에서 제3일까지는 37°C의 온도였다가 제4일에 35°C로 온도를 변화시켜 세포 배양 사이클의 마지막 제14일까지 5% CO₂ 인큐베이터에서 150 rpm으로 교반하였다. 오스몰랄농도, 오프라인 pH 및 대사물 농도를 상기 기재된 바와 같이 측정하였다. VCC 및 세포 생존율을 바이셀® 자동화 세포 계수기 (베크만 쿨터, 캘리포니아주 풀러튼)를 이용하여 매일 측정하였다. 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 항체 역가를 결정하기 위해 1 mL의 세포 배양액을 원심분리함으로써 세포 배양액을 매일 수집하였다. 세포 배양 기간의 마지막 제14일에, 모든 샘플로부터의 세포 배양액을 원심분리에 의해 수확하였다. 수확된 세포 배양액 중의 모노클로날 항체를 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 농축된 항체 조성물의 색상 강도를 검정을 이용하여 정제된 풀에서 측정하였으며, 여기서 더 높은 수치는 더 높은 색상 강도를 나타내고 더 낮은 수치는 더 낮은 색상 강도를 나타낸다. 양성 대조군에 대한 값을 색상 강도에서의 0% 변화로 설정하여 수치 결과를 양성 대조군에 대해 정규화하였다. 색상 강도

는 하이포타우린의 농도가 높을수록 감소되는 것으로 밝혀졌으며, 최대 감소는 38.85 mM 하이포타우린을 함유하는 배지에서 관찰되었다 (도 6).

[0235] 실시예 3: 항체-생산 세포주로부터 단리된 항체 조성물에서의 색상 감소에 대한 하이포타우린 유사체의 특성화.

[0236] 하이포타우린 유사체가 조성물을 함유하는 항체에서 색상 감소 효과를 나타내는지 여부를 평가하기 위해 하이포타우린 유사체를 시험하였다. 항체 생산 CHO 세포를 12.95 mM 하이포타우린 또는 10 mM 카르복시메틸시테인 (CAS 번호 638-23-3)으로 보충된 1L의 기초 배지 1을 함유하는 2-리터 교반 생물반응기 (애플리콘, 캘리포니아주 포스터 시티)에 대략 1.0×10^6 개 세포/mL로 접종하였다. 생산기의 개시를 위해 제3일, 제6일 및 제9일에 세포 배양액의 리터당 100 mL의 공급 배지 2를 첨가하여 유가식으로 세포를 배양하였다. 하이포타우린 보충 없이 배지 1 및 2에서 세포를 배양하여 양성 대조군을 포함시켰다. 글루코스의 농도를 매일 분석하고, 글루코스 농도가 2 g/L 아래로 떨어지면, 글루코스 고갈 방지를 위해 이를 1.5 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. CO₂ 또는 Na₂CO₃의 첨가를 통해 pH를 제어하고, 필요에 따라 배양물에 소포체를 첨가하였다. 세포 배양물을 pH 7.0 및 0일에서 3일까지는 37°C의 온도, 이어서 제3일 이후에는 35°C에서 유지하였다. 세포 배양물을 275 rpm에서 교반하였고, 용존 산소 수준은 30%의 공기 포화도였다. 오스몰랄농도를 어드밴스드 인스트루먼트즈 (메사추세츠주 노르우드)로부터의 삼투압계를 이용하여 모니터링하였다. 또한, 오프라인 pH 및 대사물 농도를 노바 바이오프로파일 400 (노바 바이오메디칼, 메사추세츠주 윌섬)을 이용하여 매일 결정하였다. VCC 및 세포 생존율을 바이셀® 자동화 세포 계수기 (베크만 쿨터, 캘리포니아주 풀러튼)를 이용하여 매일 측정하였다. 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 항체 역가를 결정하기 위해 1 mL의 세포 배양액을 원심분리함으로써 세포 배양액을 매일 수집하였다. 세포 배양 기간의 마지막 제14일에, 배양물 중 단백질의 양이 대략 2-10g/L이면, 모든 샘플로부터의 세포 배양액을 원심분리에 의해 수확하였다. 수확된 세포 배양액 중의 모노클로날 항체를 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 단백질 A 풀을 아미콘 센트리콘(Amicon Centricon) 원심분리 필터 장치 (밀리포어 코포레이션, 메사추세츠주 빌러리카)를 이용하여 150 g/L로 농축시켰다. 농축된 항체 조성물의 색상 강도를 농축된 단백질 A 풀에서 2가지 상이한 검정을 이용하여 측정하였고, 여기서 더 높은 수치는 더 높은 색상 강도를 나타내고, 더 낮은 수치는 더 낮은 색상 강도를 나타낸다. VCC (도 7a) 및 세포 생존율 (도 7b)에 의해 측정된 성장은 시험된 모든 세포 배양액 사이에서 대등하였다. 하이포타우린 또는 카르복시메틸시테인으로 보충된 배지에서 배양된 세포 배양물은 대등한 수준의 항체 역가를 생산하였다 (도 8). 특정 색상 검정을 이용하여, 단리된 항체 조성물의 색상 강도가, 항체-생산 세포를 하이포타우린 및 카르복시메틸시테인으로 보충된 배지에서 배양한 경우에 각각 27 % 및 13% 감소된 것을 확인하였다 (도 9a). 이러한 색상 강도 감소를 제2 색상 검정을 이용하여 확인하였으며, 상기 검정은 하이포타우린 및 카르복시메틸시테인으로 보충된 배지에서 배양된 세포로부터 단리된 항체 조성물에서 각각 대략 17% 및 13% 색상 강도 감소를 검출하였다 (도 9b).

[0237] 실시예 4: 항체-생산 세포주로부터 단리된 항체 조성물에서의 색상 감소에 대한 아미노구아니딘의 특성화.

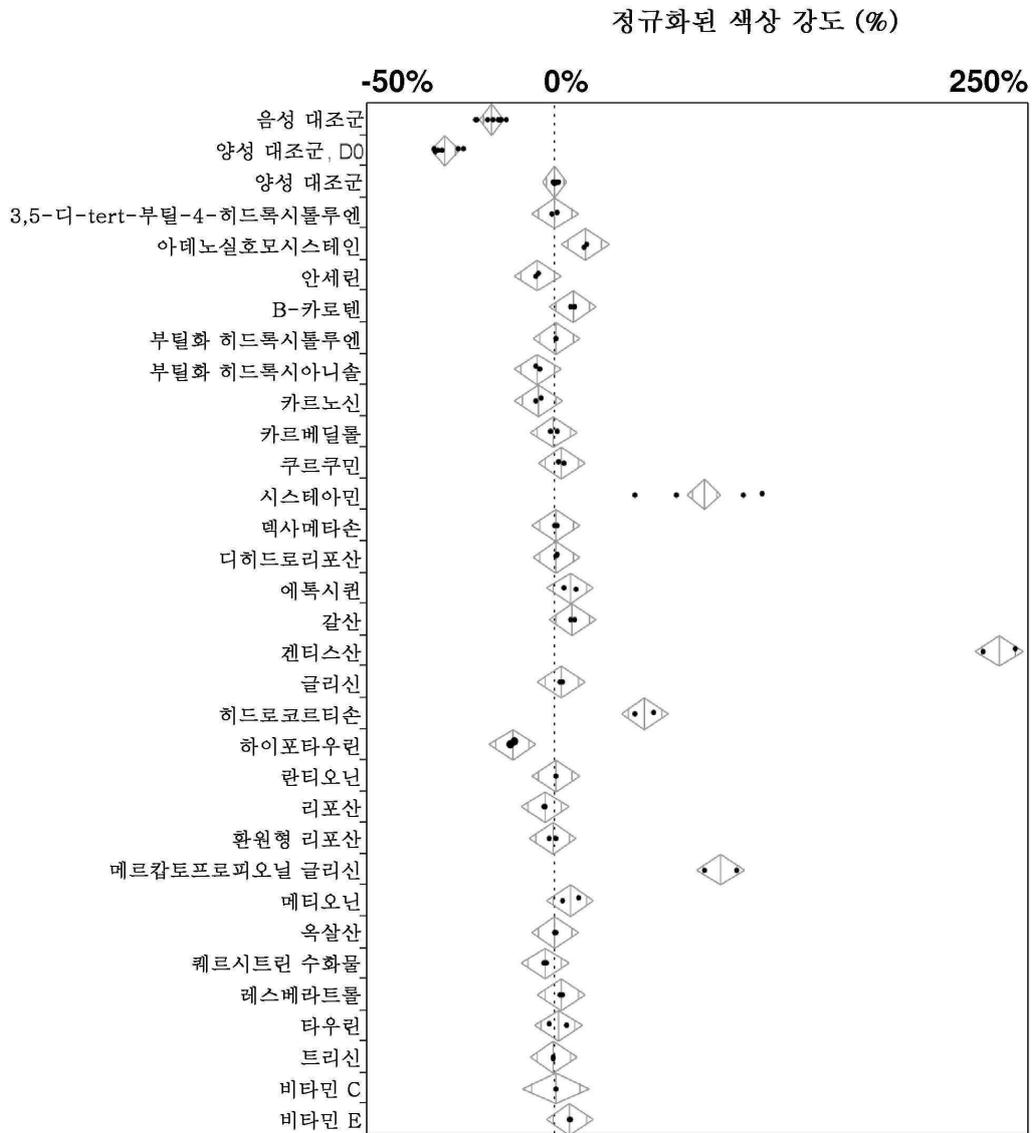
[0238] 항체 조성물에서 감소를 일으키고 세포 배양 조건 하에 작용하는 화합물을 확인하기 위해, 세포 무함유 배지에서 스크린 검정을 수행하였다. 타우린, 카르노신 및 아미노구아니딘을 스크리닝에 대해 선택하였다. 이들 화합물을 25 mL 배양 배지 중에 1.2 g/L (타우린), 13.6 g/L (카르노신) 및 27.2 g/L (아미노구아니딘 히드로클로라이드)의 농도로 용해시켰다. 6.8 내지 7.2 범위의 pH 조정 및 스테리플립(Steriflip) 필터 유닛 (밀리포어, 메사추세츠주 빌러리카)을 이용한 멸균 여과 후에, 튜브스핀(TubeSpin) 마개 (TPP 테크노 플라스틱 프로덕츠 AG(TPP Techno Plastic Products AG), 스위스 트라자딩겐)가 구비된 50 mL 팔콘(Falcon) 튜브 (BD 바이오사이언시스(BD Biosciences), 캘리포니아주 산호세)에서 용액을 인큐베이션하였다. CHO 세포를 광으로부터의 보호 없이 37°C 및 250 rpm에서 수분 제어된 세포 배양 인큐베이터에서 7일 동안 인큐베이션하여 모노클로날 항체를 생산하였다.

[0239] 수확된 세포 배양액 (HCCF) 및 인큐베이션 브로쓰 내의 모노클로날 항체를 친화성 크로마토그래피에 의해 추가로 정제하였다. 농축된 항체 조성물의 색상 강도를 검정을 이용하여 정제된 풀에서 측정하였으며, 여기서 더 높은 수치는 더 높은 색상 강도를 나타내고, 더 낮은 수치는 더 낮은 색상 강도를 나타낸다.

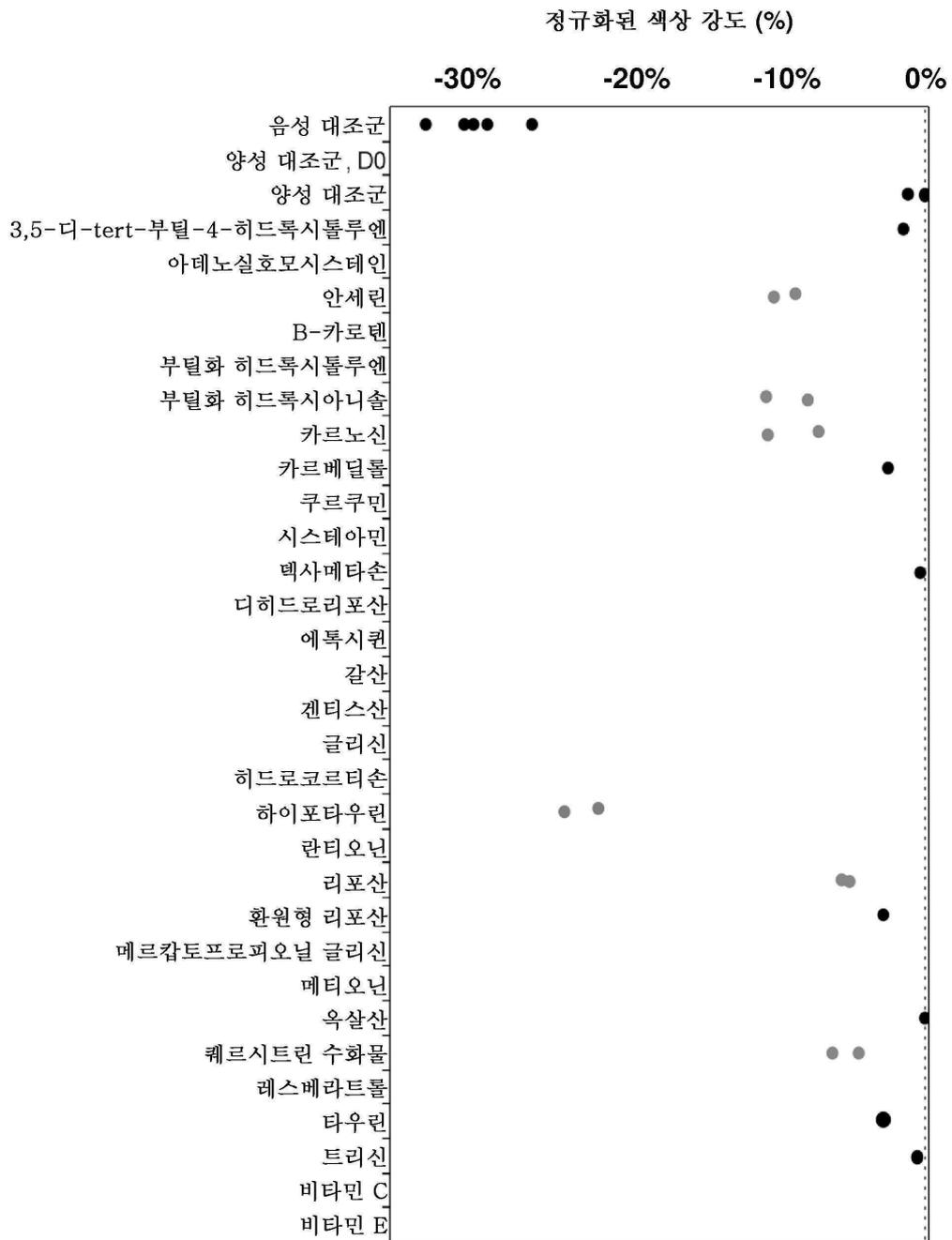
[0240] 타우린, 카르노신 또는 아미노구아니딘을 함유하는 배양 배지에서 생산된 항체에 대한 상대적 색상 강도를 도 10에 나타내었다. 테이터는 아미노구아니딘이 색상을 약 71% 감소시킬 수 있었고, 항체를 임의의 글루코스 없이 인큐베이션한 음성 대조군의 값보다 상대적 색상 강도 값이 심지어 낮아졌음을 나타내었다.

도면

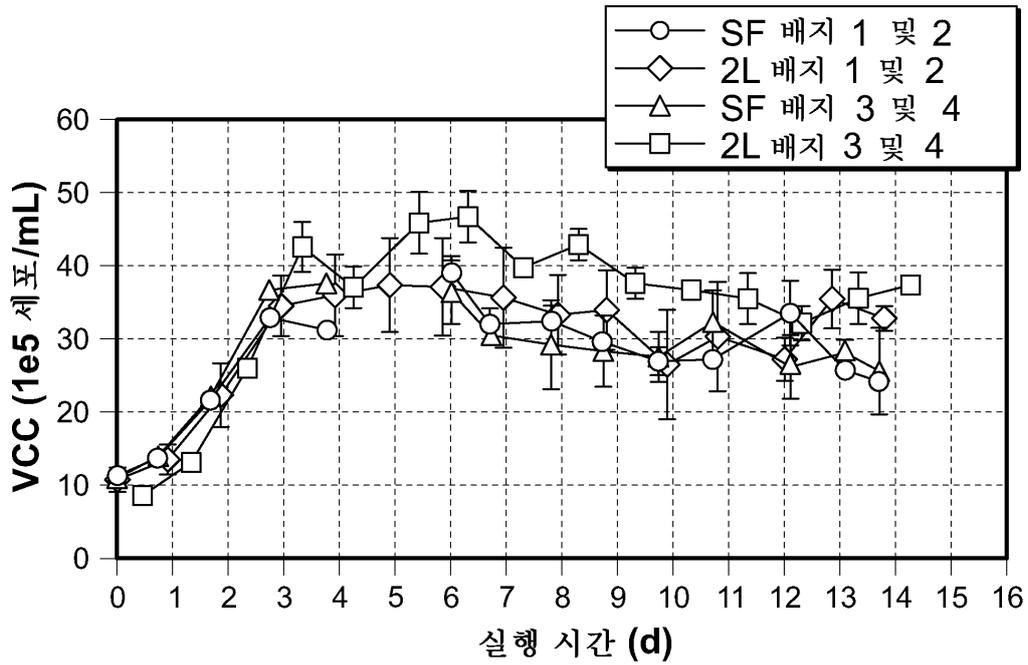
도면1



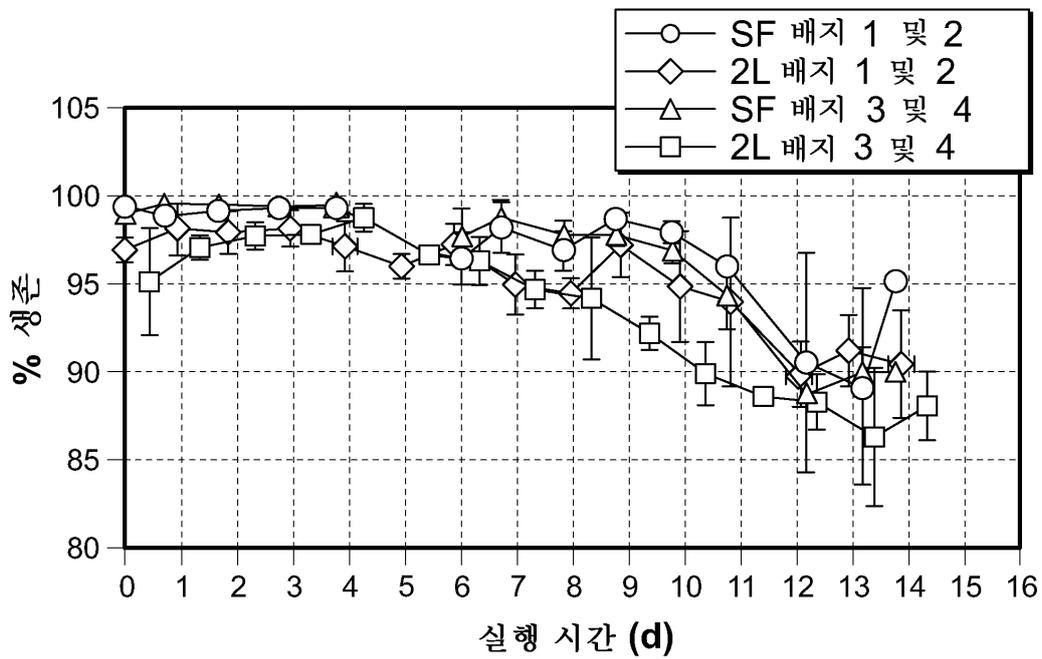
도면2



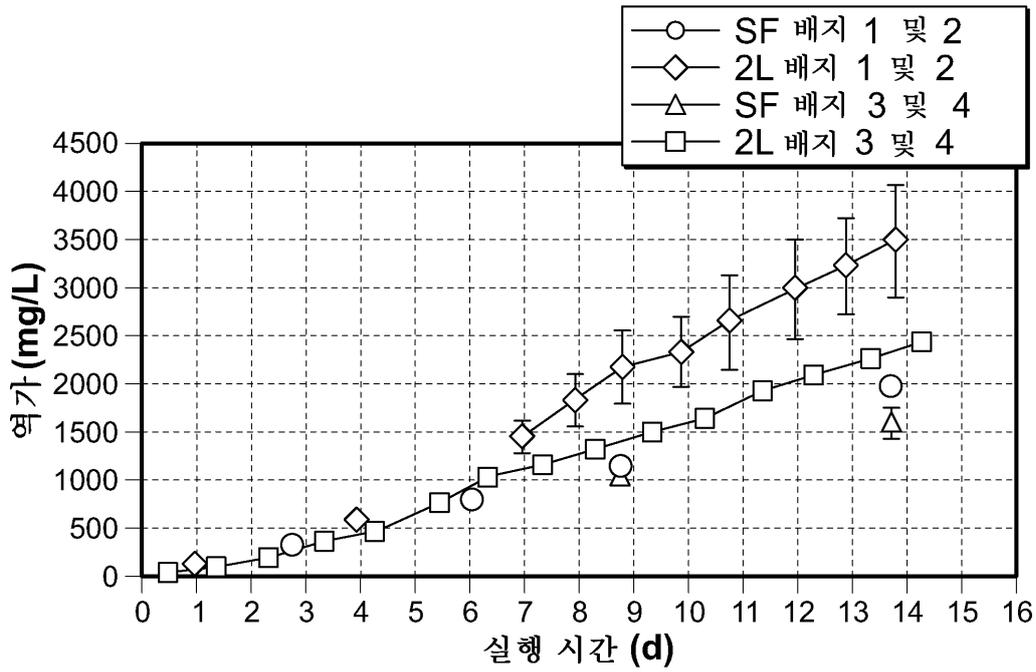
도면3a



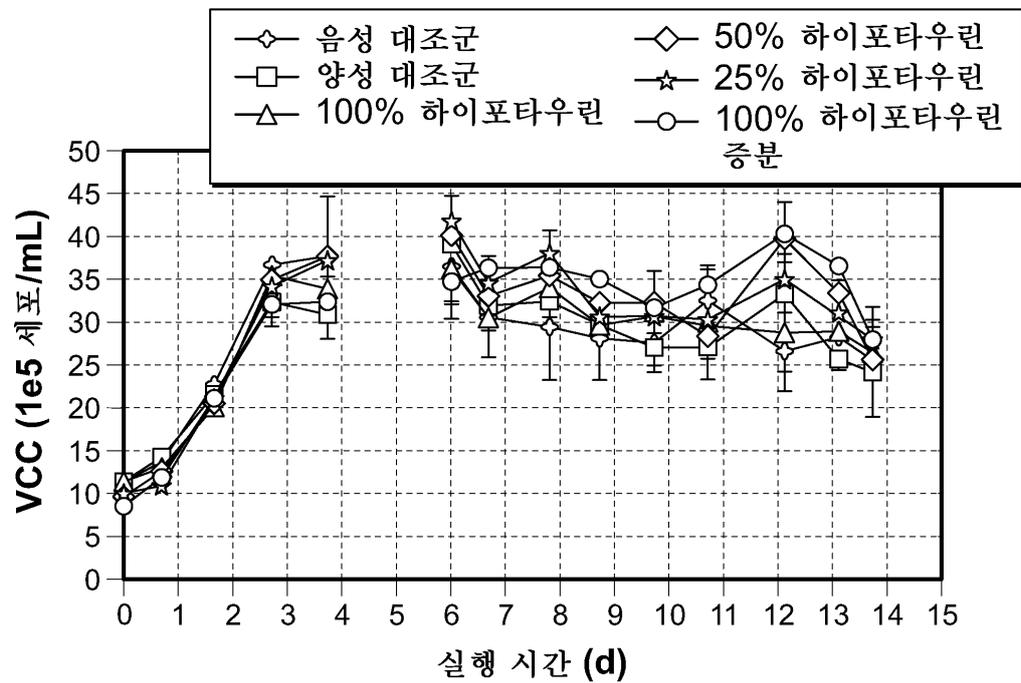
도면3b



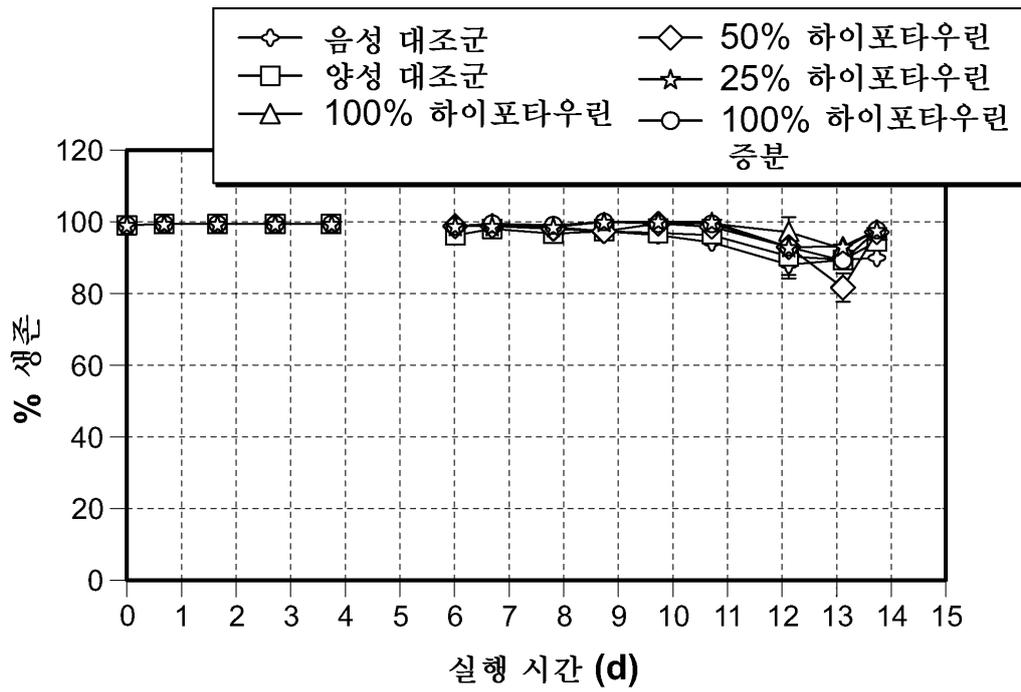
도면3c



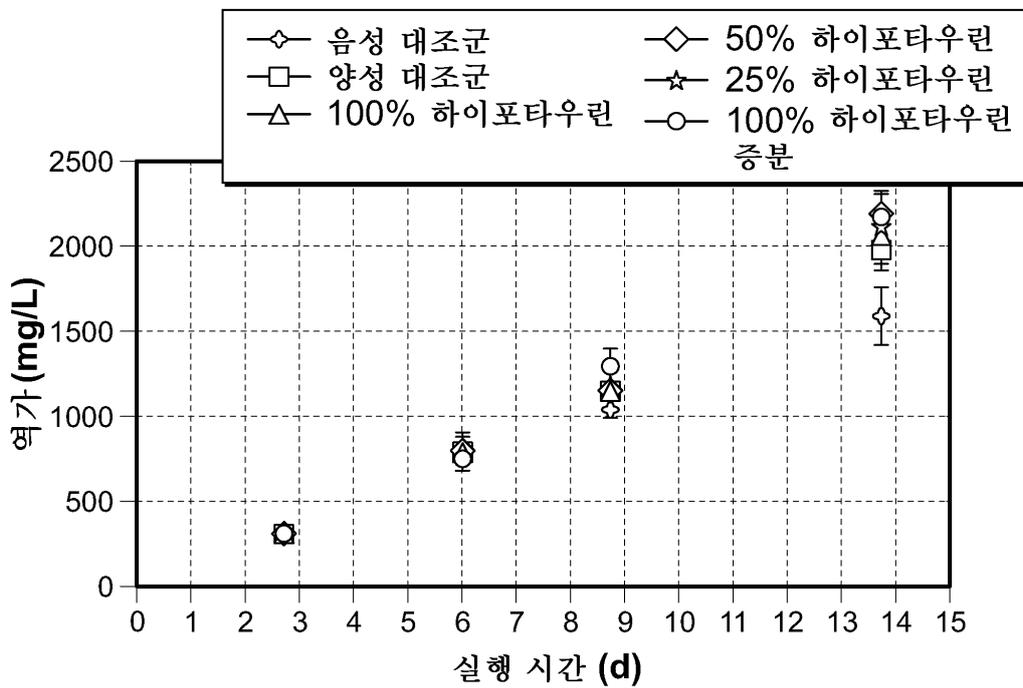
도면4a



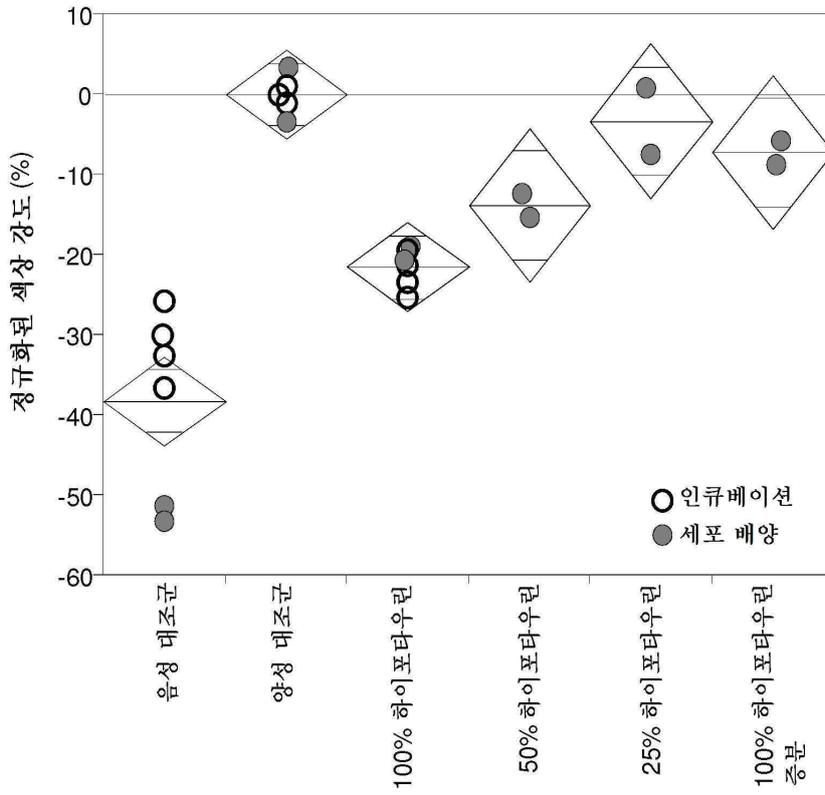
도면4b



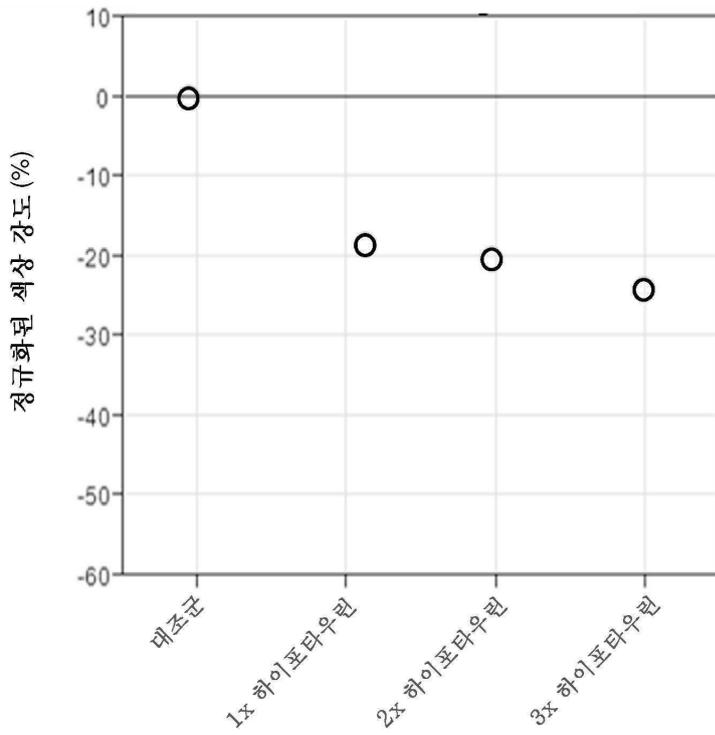
도면4c



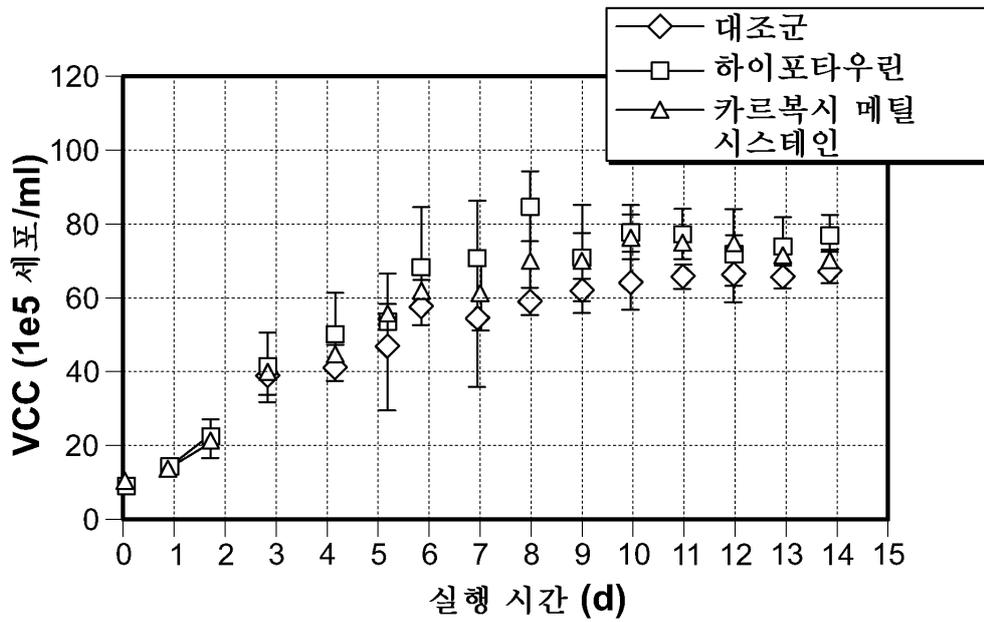
도면5



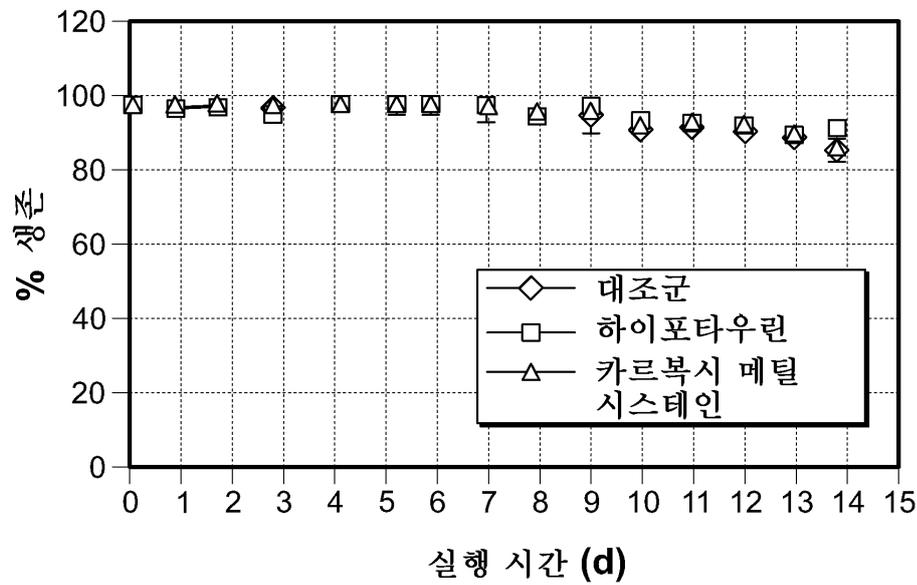
도면6



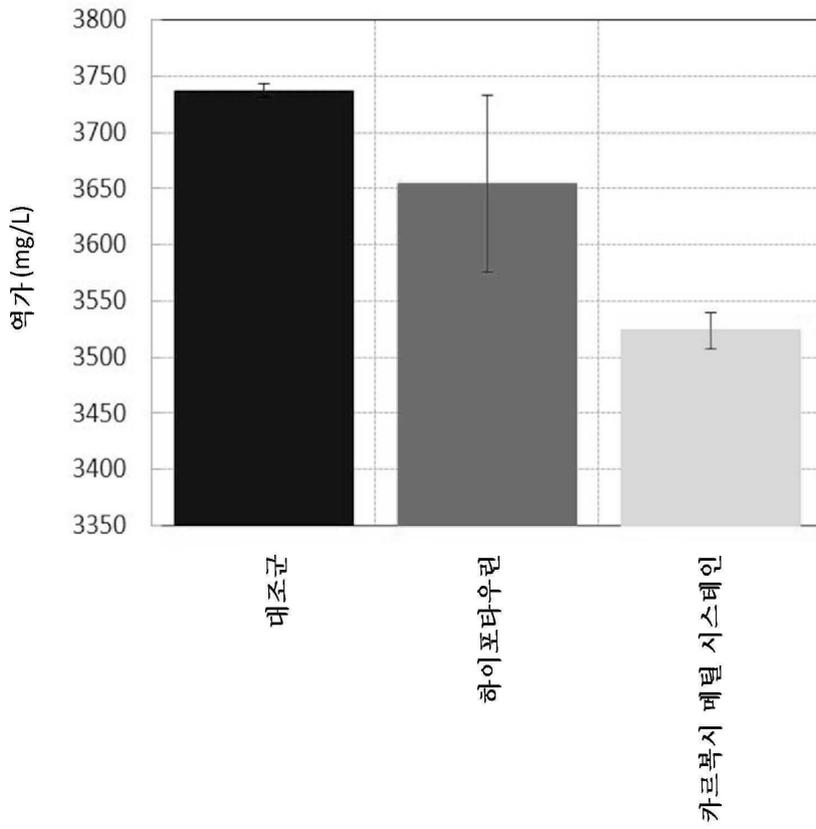
도면7a



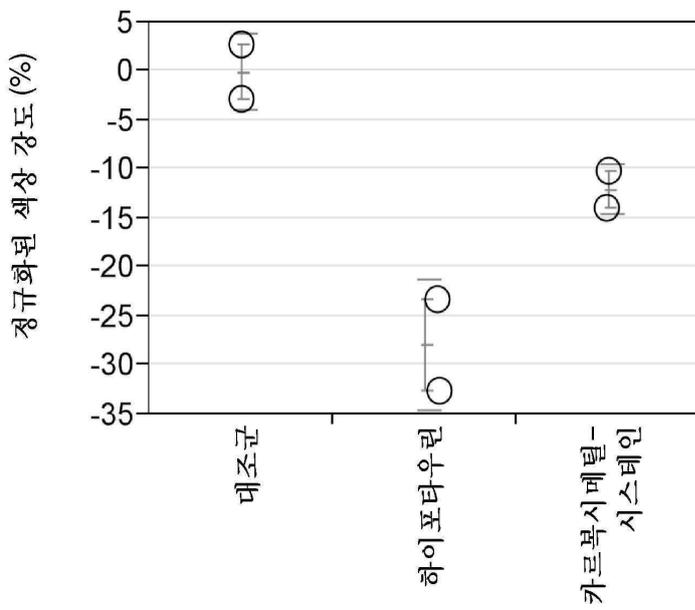
도면7b



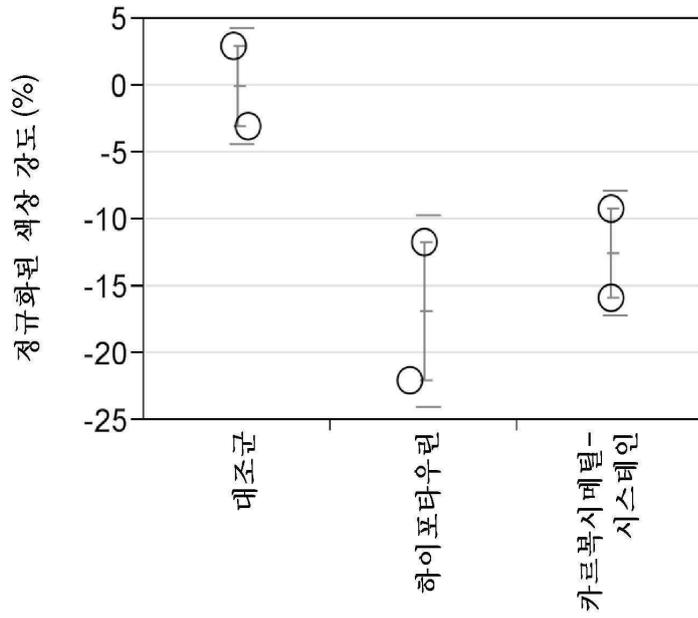
도면8



도면9a



도면9b



도면10

