

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호
WO 2011/136533 A2

(43) 국제공개일
2011년 11월 3일 (03.11.2011)

PCT

- (51) 국제특허분류: C07K 1/16 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/003015
- (22) 국제출원일: 2011년 4월 26일 (26.04.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2010-0038745 2010년 4월 27일 (27.04.2010) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **셀트리온 (CELLTRION, INC.)** [KR/KR]; 인천광역시 연수구 송도동 13-6, 406-840 Incheon (KR).
- (72) 발명자; **김진일**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **전수희 (JEON, Su Hi)** [KR/KR]; 인천광역시 연수구 송도동 2-7 풍림 아이원 APT 105-102, 406-734 Incheon (KR). **김진일 (KIM, Jin-II)** [KR/KR]; 인천광역시 서구 가좌 2동 30-83 번지, 404-808 Incheon (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

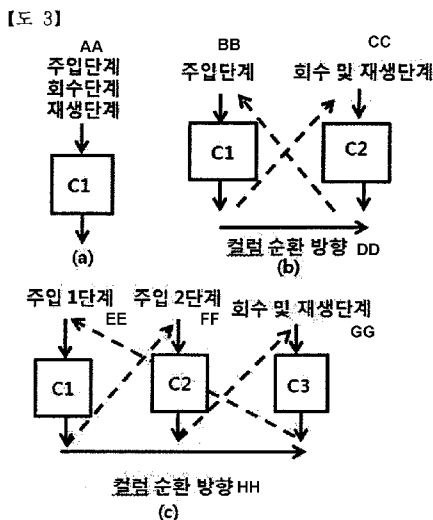
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: CHROMATOGRAPHY APPARATUS AND METHOD

(54) 발명의 명칭 : 크로마토그래피 장치 및 방법



AA ... Injection step, Collection step, Regeneration step
 BB ... Injection step
 CC, GG ... Collection and regeneration steps
 DD, HH ... Circulation direction of column
 EE ... First injection step
 FF ... Second injection step

(57) Abstract: The present invention relates to a chromatography apparatus comprising: an initial column and a final column for chromatography for obtaining a target protein in which the injection step of loading a sample, the collection step comprising washing and elution, and the regeneration step are carried out in each column; an inlet for the initial column and an inlet for the final column provided at the initial column and the final column, respectively, for loading a sample; a distributor for the initial column for distributing the sample which is loaded through the inlet for the initial column to pass through the initial column; and a sample distributor for the final column for loading the sample which is loaded through the inlet for the final column to pass through the final column, on the initial column, and a chromatography method using the same.

(57) 요약서: 본 발명은 목적 단백질 획득을 위한 크로마토그래피용 시작 컬럼 및 말단 컬럼;으로서, 각각에서, 시료를 로딩 (loading) 하는 주입 단계, 세척 및 용출을 포함하는 회수 단계 및 재생 단계가 행해지는 시작 컬럼 및 말단 컬럼; 시료 로딩을 위해 시작 컬럼 및 말단 컬럼 각각에 구비된 시작 컬럼용 주입구 및 말단 컬럼용 시료 주입구; 시작 컬럼용 주입구를 통해 로딩되어 시작 컬럼을 거친 시료를 분배시키는 시작 컬럼용 분배기; 그리고, 말단용 시료 주입구를 통해 로딩되어 말단용 컬럼을 거친 시료를 시작 컬럼에 로딩하는 말단용 시료 분배기;를 포함하는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 장치 및 이를 이용하는 크로마토그래피 방법에 관한 것이다.

WO 2011/136533 A2

명세서

발명의 명칭: 크로마토그래피 장치 및 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 흡착제의 효율을 향상시킨 크로마토그래피 장치 및 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근에 치료용 단일클론 항체 시장이 매우 빠르게 성장하고 있으며 따라서 생산성 또한 급격히 증가하고 있는 데 특히 세포주 공학 기술 및 세포 배양 기술의 발달에 힘입어 상업 생산 규모로 세포 배양액의 역가가 약 10 g/L까지 증가했다.
- [3] 일반적으로 바이오 의약품 산업에서 단일클론 항체를 정제하는 데 가장 빈번히 사용하는 크로마토그래피 공정 세 단계는 하기와 같다: 1) 첫 번째 단계: 세포 배양액에서 단일클론 항체를 선택적으로 포집하는 단계인 단백질 A(protein A) 크로마토그래피, 2) 두 번째 단계: 중간 정제 단계로서 양이온 교환 수지 크로마토그래피; 및 3) 세 번째 단계: 마지막 정제 단계로서 음이온 교환 수지 크로마토그래피(도 1 참조).
- [4] 이 중, 단백질 A 크로마토그래피는 세포 배양액 안에 있는 단일클론 항체에 대해 매우 강력한 친화력을 갖고 있어서 단 한 번의 정제로 수율은 90% 이상, 순도는 SEC(Size Exclusion Chromatography) 기준으로 99% 이상을 직접 얻을 수 있기 때문에 단일클론 항체 크로마토그래피 정제에서 가장 강력한 무기가 되어 왔다.
- [5] 고 역가의 세포 배양 공정을 통한 치료용 단일클론 항체 생산에 있어서 가장 큰 병목(bottle neck)은 정제 공정 특히 단백질 A 크로마토그래피 공정인데, 전통적으로 회분식 방식으로 실시되고 있으며, 단점들이 있다:
- [6] 1) 시장에서 구입할 수 있는 단백질 A 레진 가격이 매우 고가이며, 리간드가 단백질이므로 다른 레진 보다 상대적으로 수명이 짧고, 회분식으로 운영할 경우 단백질 흡착의 반응 속도론적 한계 때문에 충전된 레진의 약 30 ~ 50 %까지 밖에 활용을 하지 못한다. 만약 상기 컬럼이 평형 상태에서 운영되었을 때 요구되는 부피의 두 배 또는 세 배의 컬럼 부피를 필요로 한다;
- [7] 2) 보통 회분식으로는 단 하나의 충전된 컬럼이 사용되며 평형, 시료 주입, 세척, 용출, 그리고 재생 및 소독이 순차적으로 진행되어 상대적으로 긴 공정 시간을 갖고 상당히 낮은 배치(batch) 처리 속도를 보인다(도 2 참조); 및
- [8] 3) 회분식 크로마토그래피에서 세척 및 용출 공정은 상당히 많은 부피의 완충액을 필요로 하는 데 이 완충액들은 모두 주사용수(Water for Injection)로 조제되는 것이어서 경제적으로 부담이 된다.
- [9] 이러한 회분식 크로마토그래피 공정의 단점을 극복하고 세포 배양 공정에서의

고역가 문제를 해결하기 위해 모사 이동상 크로마토그래피(Simulated Moving Bed(SMB) chromatography)를 치료용 항체 생산에 적용하려는 연구들이 최근에 많이 이루어지고 있다.

- [10] 모사 이동상 크로마토그래피는 석유 화학 및 광물 산업에서 많이 이용되어 왔으며 회분식 크로마토그래피와 비교하여 완충액 소모량, 높은 생산성, 및 높은 최종 제품 농도의 장점을 갖기 때문에 최근 들어 바이오 물질을 분리하는 데 적용하려는 연구가 많이 이루어지고 있다.
- [11] 상기 모사 이동상 크로마토그래피 기술을 생물 공학 제품 특별히 단백질을 정제하는 데 적용하기 위해서는 아래와 같이 해결해야 할 문제들이 있다:
- [12] 1) 초기 가동 및 마지막 공정 마감 시 제품의 손실이 불가피하다. 이런 이유로 짧은 기간의 생산에 적용하면 제품 손실이 회분식에 비해 상대적으로 훨씬 크다;
- [13] 2) 바이오 의약품 생산에서 중요하게 여기는 배치(batch) 구분이 어렵다. 특히 공정 원리 상 세포 배양액을 연속적으로 처리해야 효율이 유지되는 방식이어서 근본적으로 배치 구분이 어렵다;
- [14] 3) 짧은 기간 동안 여러 제품을 생산 시 적합하지 않다. 보통 모사 이동상 크로마토그래피 공정은 최소한 4개의 컬럼을 사용하며, Biogen Idec.이 보유한 특허의 경우 최대 20개의 동일한 컬럼을 사용한다. 바이오 의약품 생산 시 한 제품의 생산을 끝내고 다음 제품 생산하기 전에 제품간 교차 오염을 방지할 목적으로 제품 교체 작업(Product change over)을 수행하는 데 보통 제품과 접촉한 모든 고무 또는 플라스틱 재질의 부품들을 교체하고 또 컬럼의 레진을 바꾸어 균일하게 충진을 해야 하는데, 모사 이동상 크로마토그래피의 경우 시스템이 복잡하고 컬럼 개수가 많아 많은 시간과 인력을 요한다.
- [15] 4) 모사 이동상 크로마토그래피는 여러 개의 컬럼, 펌프와 밸브들을 구성하여 제어하는 시스템이 복잡하고 펌프 또는 밸브에 고장이 발생할 경우 공정 운전 계수들을 안정되게 유지하기가 어렵다.

[16] 참고문헌

- [17] 미국특허공보 제7,220,356호
- [18] Comparison of protein A affinity sorbent II Mass Transfer properties , Alios Jungbauer et al, Journal of chromatography A, 1093(2005) pp.98-110.

[19]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [20] 본 발명의 목적은 기존 회분식 크로마토그래피에 사용되는 흡착제의 저조한 사용효율을 증대시키는 것이다.

[21]

과제 해결 수단

- [22] 본 발명의 일 태양에 의하면, 목적 단백질 획득을 위한 크로마토그래피용 시작

컬럼 및 말단 컬럼;으로서, 각각에서, 시료를 로딩(loading)하는 주입 단계, 세척 및 용출을 포함하는 회수 단계 및 재생 단계가 행해지는 시작 컬럼 및 말단 컬럼; 시료 로딩을 위해 시작 컬럼 및 말단 컬럼 각각에 구비된 시작 컬럼용 주입구 및 말단 컬럼용 시료 주입구; 시작 컬럼용 주입구를 통해 로딩되어 시작 컬럼을 거친 시료를 분배시키는 시작 컬럼용 분배기; 그리고, 말단용 시료 주입구를 통해 로딩되어 말단용 컬럼을 거친 시료를 시작 컬럼에 로딩하는 말단용 시료 분배기;를 포함하는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 장치가 제공된다.

- [23] 본 발명의 다른 태양에 의하면, 각각에서, 시료의 주입 과정, 세척 과정, 용출 과정 및 재생 과정이 행해지는 n 개($n > 1$, n 은 정수)의 컬럼으로써, n 개의 컬럼이 시작 컬럼부터 말단 컬럼으로 이루어지며, 시료의 흐름 상에서 앞 컬럼으로부터 뒷 컬럼으로의 시료의 흐름이 가능하고, 말단 컬럼으로부터 시작 컬럼으로의 시료의 흐름이 가능한(시작 컬럼은 말단 컬럼의 뒷 컬럼이 됨) n 개의 컬럼을 이용하여 목적 단백질을 획득하는 크로마토그래피 방법에 있어서, 1) 시작 컬럼을 앞 컬럼으로 하여, 앞 컬럼에 시료를 로딩하는 단계; 2) 앞 컬럼을 거친 시료를 뒷 컬럼에 로딩하는 단계; 3) 앞 컬럼의 세척 과정에 앞서, 뒷 컬럼으로의 로딩을 차단하고, 뒷 컬럼에 직접 시료를 로딩하는 단계; 4) 뒷 컬럼을 거친 시료를 다음 컬럼에 로딩하는 단계; 그리고, 5) 뒷 컬럼의 세척 과정에 앞서, 다음 컬럼으로의 로딩을 차단하고, 이 다음 컬럼에 직접 시료를 로딩하는 단계;를 포함하며, 시작 컬럼으로부터 말단 컬럼에 이르기까지 다시 말단 컬럼으로부터 시작 컬럼으로 단계 1) ~ 5)를 반복하면서, 뒷 컬럼으로의 시료의 로딩이 차단된 앞 컬럼에서는 세척 과정, 용출 과정 및 재생 과정이 행해지는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 방법이 제공된다.

[24]

발명의 효과

- [25] 본 발명의 크로마토그래피 장치 및 크로마토그래피 방법에 의하면, 흡착제(레진) 사용 효율이 증가하여 공정 시간을 단축시키며, 동일 부피의 단일 회분식 컬럼 대비 컬럼 운전 횟수가 감소되고, 레진의 사용량 또한 동일 비율로 감소하여, 고효율로 목적하는 단백질을 정제함으로 경제적이다.

[26]

도면의 간단한 설명

- [27] 도 1은 치료용 단일클론 항체 생산 공정도이다.
 [28] 도 2는 단백질 A 회분식 크로마토그래피 공정도이다.
 [29] 도 3은 1 컬럼 회분식 크로마토그래피 개념도 및 2 컬럼 크로마토그래피 장치 및 3 컬럼 크로마토그래피 장치의 개념도를 비교한 것이다:
 [30] (a) 전통적인 1 컬럼 회분식 크로마토그래피 장치;
 [31] (b) 2 컬럼 크로마토그래피 장치; 및
 [32] (c) 3 컬럼 크로마토그래피 장치.

- [33] 도 4는 각 장치 별 레진 사용 효율 비교 결과이다.
- [34] 도 5는 각 장치 별 레진 사용 효율 및 생산성 비교 결과이다.
- [35] 도 6은 2 컬럼 크로마토그래피 장치의 운전 개념도이다.
- [36] 도 7은 3 컬럼 크로마토그래피 장치의 운전 개념도이다.
- [37] 도 8은 2 컬럼 크로마토그래피 장치의 모식도이다.
- [38] 도 9는 3 컬럼 크로마토그래피 장치의 모식도이다.
- [39] 도 10은 1 컬럼 회분식 크로마토그래피 그래프이다.
- [40] 도 11은 2 컬럼 크로마토그래피 장치 그래프이다.
- [41] 도 12는 3 컬럼 크로마토그래피 장치 그래프이다.
- [42]

발명의 실시를 위한 형태

- [43] 이하에서 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [44] 본 발명자들은 1 컬럼 회분식 크로마토그래피의 단점을 보완하기 위하여 복수 컬럼(예: 2 컬럼 또는 3 컬럼) 크로마토그래피 시스템을 고안하였으며, 실제로 1 컬럼 단백질 A 크로마토그래피 시스템과 2 컬럼 또는 3 컬럼 크로마토그래피 시스템의 정제 결과를 계산하였다.
- [45] 그 결과, 2 컬럼 크로마토그래피 시스템은 바이오리액터(bioreactor) 역가 1.0 g/L ~ 10.0 g/L 범위에서 배치 당 공정시간에 있어서 대조군보다 동등하거나 더 짧았으며 흡착제(레진) 사용 효율이 최대로 증가하여 운전 실시 횟수가 30~50% 감소하는 것으로 나타났다.
- [46] 3 컬럼 크로마토그래피 시스템의 경우 바이오리액터 역가 범위 3.0 g/L ~ 10 g/L에서 배치 당 공정 시간이 대조군보다 동등하거나 더 짧았으며 흡착제(레진) 사용 효율이 최대로 증가하여 운전 실시 횟수가 30~50% 감소하는 것으로 나타났다.
- [47] 결론적으로 고역가의 세포 배양액 배치를 고처리 용량 및 고효율로 정제하여야 하는 수요를 충족시킬 수 있는 대안적인 크로마토그래피 시스템이 될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [48] 본 발명의 크로마토그래피 장치는 하기와 같다.
- [49] 크로마토그래피 장치에는 각 컬럼들에 대해 각각 독립된 두 개의 주입구가 있다. 하나는 세포 배양액 주입 전용이고 나머지 하나는 단백질 A 배치 공정에서 사용되는 여러 완충 용액들을 전용으로 주입하는 주입구이다(도 8 및 도 9).
- [50] 세포 배양액의 주입은 연속적으로 이루어지며 버퍼의 주입은 배치 공정의 각 단계에 따라 순차적으로 바뀐다.
- [51] 컬럼들은 직렬로 연결되어 있고 분배기가 컬럼에서 나오는 유체의 흐름을 폐수 처리구, 제품 수집 탱크 또는 또 다른 컬럼의 주입구로 분배해 준다.
- [52] 본 발명의 2 컬럼 크로마토그래피 장치의 운전은 하기와 같이 실행된다.
- [53] 2 컬럼 크로마토그래피 장치(도 6)는 세포 배양액의 역가가 3.0 g/L 미만인

경우를 위해 설계되었으나 그 이상에도 적용 가능하다.

- [54] 주입 단계에 여과된 세포 배양액은 평형 상태의 최대 결합 능력(binding capacity)까지 주입되고 첫 컬럼으로부터 누출되어 나오는 제품은 연속적으로 두 번째 컬럼에 주입된다.
- [55] 일단 그 첫 컬럼은 제품을 최대까지 흡착한 다음 두 번째 컬럼으로부터 분리되어 회수 단계에 들어가게 된다.
- [56] 이때 세포 배양액은 두 번째 컬럼에 최대까지 주입되며 컬럼의 교대는 세포 배양액이 고갈될 때까지 반복된다.
- [57] 회수 단계 동안 제품은 회수되고 컬럼은 다음 사이클을 위해 재생된다.
- [58] 3 컬럼 크로마토그래피 장치(도 7)는 정상적으로 세포 배양액 역가가 3.0 g/L 이상인 공정을 위해 설계되었는데 이 시스템에서는 바이오리액터의 크기가 동일할 경우 세포 배양액 역가가 낮을 경우에 비해 상대적으로 짧은 시료 주입 시간을 갖는다.
- [59] 시료 주입 단계에서 여과된 세포 배양액은 평형 상태에서 최대 결합 능력(binding capacity)까지 주입되고 첫 번째 컬럼에서 흡착되지 않고 흘러나온 시료는 두 번째 컬럼에 연속적으로 주입된다.
- [60] 일단 첫 번째 컬럼이 제품을 최대로 흡착한 다음 그 컬럼은 두 번째 컬럼으로부터 분리되고 회수 단계에 들어간다. 이 순간에 세포 배양액은 두 번째 컬럼에 최대한 주입되고 두 번째 컬럼에 흡착되지 않고 흘러나온 시료는 미리 형평화 되어 있는 세 번째 컬럼에 연속적으로 주입된다.
- [61] 다음번 컬럼의 교대는 두 번째 컬럼의 주입이 완료될 때 일어나며 이때 첫 번째 컬럼은 다음 사이클을 위한 재생 단계에 들어간다. 세포 배양액이 고갈될 때까지 이 사이클은 계속된다(도 7).
- [62] 이하에서, 본 발명의 다양한 실시형태에 대해 설명한다.
- [63] 본 발명의 크로마토그래피 장치는, 목적 단백질 획득을 위한 크로마토그래피용 중간 컬럼;으로서, 시료를 로딩하는 주입 단계, 세척 및 용출을 포함하는 회수 단계 및 재생 단계가 행해지며, 시작 컬럼용 분배기로부터 시료를 로딩받을 수 있는 중간 컬럼; 시료 로딩을 위해 중간 컬럼에 구비된 중간 컬럼용 주입구; 그리고, 중간 컬럼용 주입구를 통해 로딩되어 중간 컬럼을 거친 시료를 분배시키는 중간 컬럼용 분배기;를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [64] 본 발명의 크로마토그래피 장치는, 시작 컬럼용 분배기가 시작 컬럼을 거친 시료를 말단 컬럼으로 로딩하는 것을 특징으로 한다.
- [65] 본 발명의 크로마토그래피 장치는, 중간 컬럼용 분배기가 중간 컬럼을 거친 시료를 말단 컬럼으로 로딩하는 것을 특징으로 한다.
- [66] 본 발명에 있어서, 바람직하게는 시료를 로딩하는 단계의 목적 단백질은 단일클론 항체, 면역글로블린 및 재조합 단백질이나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [67] 본 발명에 있어서, 바람직하게는 시료를 로딩하는 단계의 고체상은 단백질 A(protein A) 또는 단백질 G(protein G)이다.

- [68] 본 발명에 있어서, 바람직하게는 세척 완충 용액은 낮은 염 농도 또는 높은 염 농도일 수 있으며, 보다 바람직하게는 낮은 염 농도는 10 mM에서 50 mM 버퍼에 0.001 mM에서 100 mM의 NaCl이 첨가된 경우이고, 세척 완충 용액의 높은 염 농도는 50 mM에서 100 mM 버퍼에 0.001 mM에서 1 M의 NaCl이 첨가된 경우이다.
- [69] 본 발명에 있어서, 바람직하게는 용출 완충액은 산성 완충액을 포함한다.
- [70] 본 발명에 있어서, 바람직하게는 재생 완충액은 CIP(Clean in place) 용액이며, 보다 바람직하게 상기 CIP 용액은 인산(phosphoric acid) 또는 구연산(citric acid)을 포함한다.
- [71] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 상세히 설명한다.
- [72] 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로서 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.
- [73] 실시예
- [74] 본 발명자들은 본 발명의 유효성을 입증하기 위해 하기 표 1과 같이 산업 현장에서 사용중인 컬럼 규격 및 레진의 스펙을 정하였고, 레진의 결합 능력(binding capacity)을 결정짓는 흡착 등은 방정식(Adsorption isotherm)의 값들은 이미 공개된 문헌(R.Halm *et al.*, *J. Chromatogr, A* 1093(2005), pp. 98-100)의 값을 적용하여 계산하였다.
- [75] 바이오리액터의 세포 배양액 역가는 IBC 2008에서 미국의 Genentech사가 인용한 Keck Graduate Institute의 Matt Crougham 교수의 정보를 반영하여, 0.3 g/L, 1.0 g/L, 3.0 g/L 및 10.0 g/L를 적용하였고, 바이오리액터의 사용 부피는 생산 스케일에서 흔히 사용되는 12,500 L로 설정하였다. 컬럼의 직경은 생산 스케일의 여러 대표적인 컬럼의 직경을 선택하였고 컬럼 베드 높이 또한 생산 스케일에서 흔히 사용되는 높이인 22.2 cm를 선택하였다. 완충 용액의 유속은 실시예에서 적용한 MabSelect Xtra[®] 레진의 운전 가능한 최대의 유속인 선속도로 300 cm/hr을 적용하였다. 크로마토그래피 횟수당 주입 목표는 대조군인 1 컬럼 회분식 컬럼의 경우 MabSelect Xtra[®] 레진의 최대 역동적 결합 능력(dynamic binding capacity)의 90%인 35 g/L로 정하였으며, 실험군인 2 컬럼 크로마토그래피 장치와 3 컬럼 크로마토그래피의 경우 크로마토그래피 횟수당 주입 목표는 MabSlect Xtra[®] 레진의 최대 정적 결합 능력(static binding capacity)인 q_m 의 80%로 정하였다.
- [76] 표 1

[Table 1]
 모델 공정 계수들(Model Process parameters)

카테고리	단계 파라미터
세포배양액 부피(Cell culture fluid volume)	12,000 L
항체 역가(Antibody titer)	0.3, 1.0, 3.0, 10.0 g/L
단백질 A 레진(protein A resin)	Mabselect Xtra [®]
컬럼 베드 높이(Column bed height)	22.2 cm
선속도(Linear flow rate)	300 cm/hr
대조군 컬럼 내경(Control Column ID)	45, 60, 100, 140, 200 cm
최대역동적 결합 능력(DBC _m)	40 (mg/mL)
등온 흡착식	Langmuir($q=qmd(c+Kd)$)
최대 결합 능력(q_m)	68.3(mg/mL)
평형 해리상수(Equilibrium Dissociation constant: K_d)	0.088(mg/mL)
1 컬럼 대조군에 대한 주입 능력	90% DBC _m
2 컬럼 또는 3 컬럼 CFCSC에 대한 주입 능력	80% q_m
레진 입자 직경(d_p)	75 μ m
총 공극율(ϵ_b)	0.92
레진 입자 내부 공극율(ϵ_a)	0.87

[77] 각 바이오투터의 역가 당 대조군과 실험군의 컬럼 직경 및 컬럼 부피와 개수는 하기 표 2와 같다.

[78] 표 2

[Table 2]

주입 역가(g/L)	1 컬럼 배치		2 컬럼		3 컬럼	
	컬럼 ID(cm)	컬럼 부피(L)	컬럼 ID(cm)	컬럼 부피(L)	컬럼 ID(cm)	컬럼 부피(L)
0.3	45	34.7	31.6	17.4×2	25.8	11.6×3
1.0	60	62.8	42.4	31.4×2	34.6	20.9×3
3.0	100	174.4	70.7	87.2×2	57.7	58.1×3
10.0	140	341.7	99.0	170.9×2	80.8	113.9×3
	200	697	141.4	38.7×2	115.4	232.3×3

[79] 각 조건별로 최적의 크로마토그래피 실시 횟수 및 그 결과 레진의 사용량, 완충 용액의 사용량 및 공정 시간을 계산하여 표 3과 같이 생산 현장에서 흔히 적용되는 공정 순서 및 완충 용액 종류를 설정하여 계산하였다.

[80] 표 3

[Table 3]

크로마토그래피 단위 단계 및 완충액 부피

단위 단계	완충액 부피(컬럼 부피)	유속(cm/hr)
사전 살균(Pre Sanitization)	4.01 CV	300
사전 재생(Pre Regeneration)	4.01 CV	300
평형(Equilibration)	5.01 CV	300
주입>Loading)	1,2500 / Cycle no. ¹⁾ (L)	300
재 평형(Re Equilibration)	4.01 CV	300
세척(Wash)	6.01 CV	300
용출(Elution)	3 CV	200
재생(Regeneration)	4.01 CV	300
살균(Sanitization)	4.01 CV	300
중화(Nuetralization)	3.01 CV	300
저장(Storage)	4.01 CV	300

[81] ¹⁾ 1 컬럼 회분식의 경우,

[82] $Cycle\ no = RoundUp(Titer(g/L) / 0.9\ DBCm/column\ vol.(L))$ 으로 계산되고,

[83] 2 컬럼 또는 3 컬럼 크로마토그래피 장치의 경우

[84] $Cycle\ no = RoundUp(Titer(g/L) / 0.8\ DBCm/column\ vol.(L))$ 으로 계산된다.

[85] 계산 결과, 표 4와 같이 각 바이오리액터 세포 배양액의 역가당 대조군과 실험군 각각의 최적 크로마토그래피 실시 횟수가 계산되었다. 실험군들의 경우 모든 조건에서 대조군 대비 33% 내지 50%의 실시 횟수 감소가 있었다.

[86] 표 4

[Table 4]

실험군별 계산된 크로마토그래피 실시 횟수

시플레이션 조건	바이오리액터 역가(g/L)	컬럼 내경(mm)	컬럼 부피(L)	횟수/배치(Cycle/Batch)		
				1 컬럼(대조군)	2 컬럼	3 컬럼
1	0.3	450	35	4	2	2
2	1.0	600	63	6	4	4
3	1.0	1,000	174	3	2	2
4	3.0	1,400	342	4	2	2
5	10.0	2,000	697	6	4	4

[87] 계산된 실험군별 레진 소모량은 표 5에 나타나 있으며 두 실험군들이 모든 조건에서 대조군 대비 33%에서 50%까지 감소함을 나타냈다.

[88] 레진은 한 번 충전한 레진을 최대 200회까지 사용할 수 있는 것으로 가정하였고 연간 생산량은 60 배치(batch)를 가정하였다.

[89] 표 5

[Table 5]

계산된 레진 연간 소비량

시플레이션 조건	바이오리액터 역가(g/L)	컬럼 내경(mm)	컬럼 부피(L)	레진 연간 사용량(L/year)		
				1 컬럼(대조군)	2 컬럼	3 컬럼
1	0.3	450	35	42	21	21
2	1.0	600	63	113	75	75
3	1.0	1,000	174	157	105	105
4	3.0	1,400	342	410	205	205
5	10.0	2,000	697	1255	836	836

[90] 실험군별 계산된 배치당 완충액 사용량은 표 6에 나타나 있으며 2 컬럼 크로마토그래피 장치의 경우 대조군 대비 22%에서 42%의 감소가 나타났고 3 컬럼 크로마토그래피 장치의 경우 바이오리액터 역가 기준 3.0 g/L 에서 10.0 g/L 범위에서 29%에서 40%까지 감소하는 것으로 나타났다.

[91] 표 6

[Table 6]

시플레이션 조건	바이오리액터 역가(g/L)	컬럼 내경(mm)	컬럼 부피(L)	배치당 완충액 소모량 (L/year)		
				1 컬럼(대조군)	2 컬럼	3 컬럼
1	0.3	450	35	4,995	3,452	4,066
2	1.0	600	63	11,773	9,235	10,223
3	1.0	1,000	174	16,524	12,557	13,150
4	3.0	1,400	342	40,364	23,458	24,052
5	10.0	2,000	697	116,666	82,340	83,352

[92] 각 조건별 계산된 공정 시간은 표 7에 나타나 있으며 2 컬럼 크로마토그래피 장치의 경우 1.0 g/L 바이오리액터 역가에서 대조군과 동등한 결과를 얻었으며 이후 3.0g/L에서는 최대 48%의 감소율을 보였다. 3 컬럼 크로마토그래피 장치의 경우 1.0g/L 이하에서는 대조군 대비 최대 123% 증가하였으나 3.0g/L에서는 18% 그리고 10.0g/L에서는 63% 감소하는 것으로 계산되었다.

[93] 표 7

[Table 7]

계산된 실험군 별 배치당 공정 시간

시플레이션 조건	바이오리액터 역가(g/L)	컬럼 내경(mm)	컬럼 부피(L)	배치당 공정 시간(hr/batch)		
				1 컬럼(대조군)	2 컬럼	3 컬럼
1	0.3	450	35	38	55	84
2	1.0	600	63	30	31	48
3	1.0	1,000	174	14	12	20
4	3.0	1,400	342	14	7	12
5	10.0	2,000	697	17	11	6

[94]

청구범위

- [청구항 1] 목적 단백질 획득을 위한 크로마토그래피용 시작 컬럼 및 말단 컬럼;으로서, 각각에서, 시료를 로딩(loading)하는 주입 단계, 세척 및 용출을 포함하는 회수 단계 및 재생 단계가 행해지는 시작 컬럼 및 말단 컬럼;
시료 로딩을 위해 시작 컬럼 및 말단 컬럼 각각에 구비된 시작 컬럼용 주입구 및 말단 컬럼용 시료 주입구;
시작 컬럼용 주입구를 통해 로딩되어 시작 컬럼을 거친 시료를 분배시키는 시작 컬럼용 분배기; 그리고,
말단용 시료 주입구를 통해 로딩되어 말단용 컬럼을 거친 시료를 시작 컬럼에 로딩하는 말단용 시료 분배기;를 포함하는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 장치.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 목적 단백질 획득을 위한 크로마토그래피용 중간 컬럼;으로서, 시료를 로딩하는 주입 단계, 세척 및 용출을 포함하는 회수 단계 및 재생 단계가 행해지며, 시작 컬럼용 분배기로부터 시료를 로딩받을 수 있는 중간 컬럼;
시료 로딩을 위해 중간 컬럼에 구비된 중간 컬럼용 주입구; 그리고,
중간 컬럼용 주입구를 통해 로딩되어 중간 컬럼을 거친 시료를 분배시키는 중간 컬럼용 분배기;를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 장치.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 시작 컬럼용 분배기는 시작 컬럼을 거친 시료를 말단 컬럼으로 로딩하는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 장치.
- [청구항 4] 제 2항에 있어서, 중간 컬럼용 분배기는 중간 컬럼을 거친 시료를 말단 컬럼으로 로딩하는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 장치.
- [청구항 5] 각각에서, 시료의 주입 과정, 세척 과정, 용출 과정 및 재생 과정이 행해지는 n 개($n > 1$, n 은 정수)의 컬럼으로써, n 개의 컬럼이 시작 컬럼부터 말단 컬럼으로 이루어지며, 시료의 흐름 상에서 앞 컬럼으로부터 뒷 컬럼으로의 시료의 흐름이 가능하고, 말단 컬럼으로부터 시작 컬럼으로의 시료의 흐름이 가능한(시작 컬럼은 말단 컬럼의 뒷 컬럼이 됨) n 개의 컬럼을 이용하여 목적 단백질을 획득하는 크로마토그래피 방법에 있어서,
1) 시작 컬럼을 앞 컬럼으로 하여, 앞 컬럼에 시료를 로딩하는 단계;
2) 앞 컬럼을 거친 시료를 뒷 컬럼에 로딩하는 단계;
3) 앞 컬럼의 세척 과정에 앞서, 뒷 컬럼으로의 로딩을 차단하고,

뒷 컬럼에 직접 시료를 로딩하는 단계;

4) 뒷 컬럼을 거친 시료를 다음 컬럼에 로딩하는 단계; 그리고,

5) 뒷 컬럼의 세척 과정에 앞서, 다음 컬럼으로의 로딩을 차단하고, 이 다음 컬럼에 직접 시료를 로딩하는 단계;를 포함하며,

시작 컬럼으로부터 말단 컬럼에 이르기까지 다시 말단

컬럼으로부터 시작 컬럼으로 단계 1) ~ 5)를 반복하면서, 뒷

컬럼으로의 시료의 로딩이 차단된 앞 컬럼에서는 세척 과정, 용출 과정 및 재생 과정이 행해지는 것을 특징으로 하는

크로마토그래피 방법.

[청구항 6] 제 5항에 있어서, n 이 2인 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 방법.

[청구항 7] 제 5항에 있어서, n 이 3인 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 방법.

[청구항 8] 제 5항에 있어서, 목적 단백질은 단일클론 항체, 면역글로블린 및 재조합 단백질인 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 방법.

[청구항 9] 제 5항에 있어서, 시료를 로딩하는 고체상은 단백질 A(protein A) 또는 단백질 G(protein G)인 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 방법.

[청구항 10] 제 5항에 있어서, 세척 완충 용액은 낮은 염 농도를 가지는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 방법.

[청구항 11] 제 5항에 있어서, 세척 완충 용액은 높은 염 농도를 가지는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 방법.

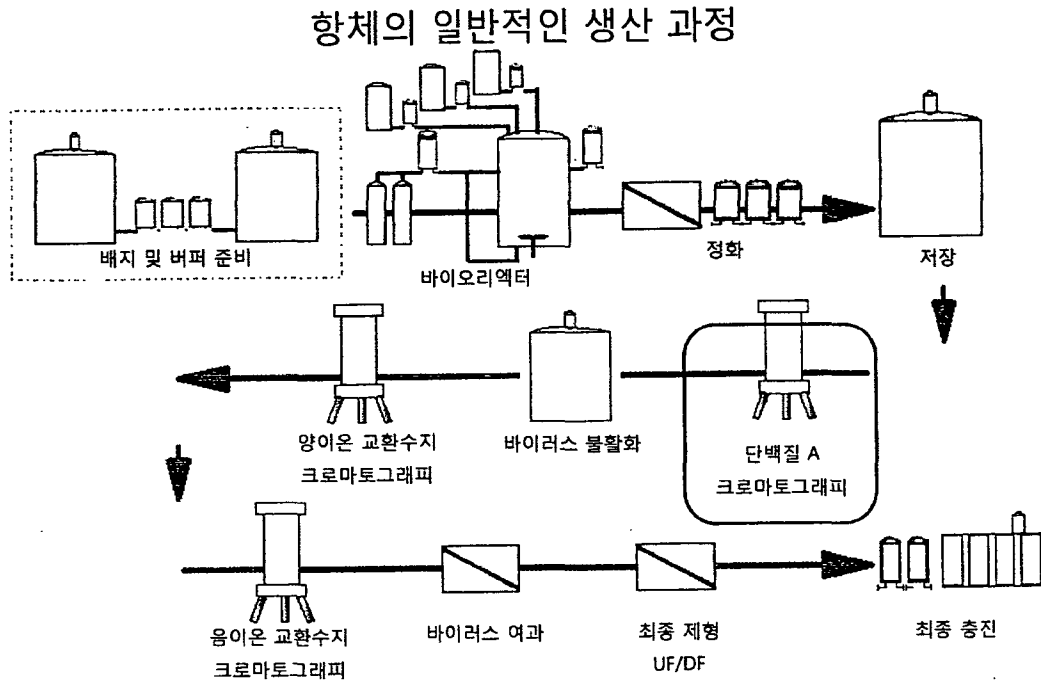
[청구항 12] 제 5항에 있어서, 용출 완충액은 산성 완충액을 포함하는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 방법.

[청구항 13] 제 5항에 있어서, 재생 완충액은 CIP(Clean in place) 용액인 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 방법.

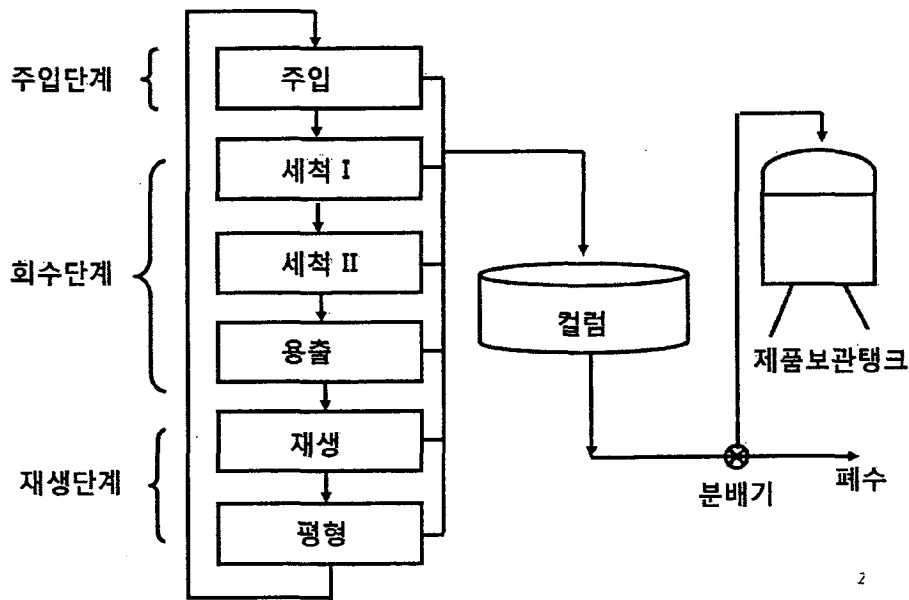
[청구항 14] 제 13항에 있어서, 상기 CIP 용액은 인산(phosphoric acid) 또는 구연산(citric acid)을 포함하는 것을 특징으로 하는 크로마토그래피 방법.

【도면】

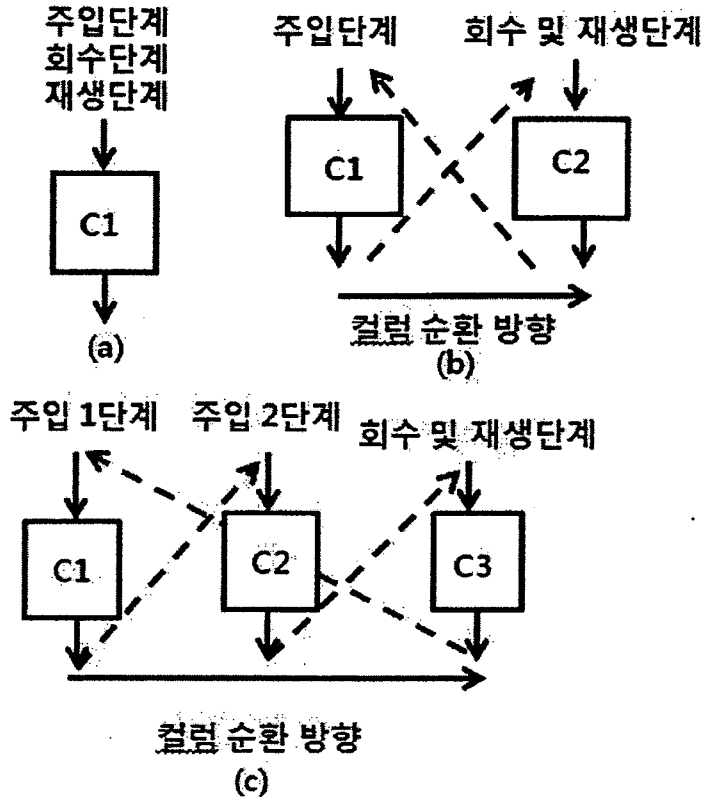
【도 1】



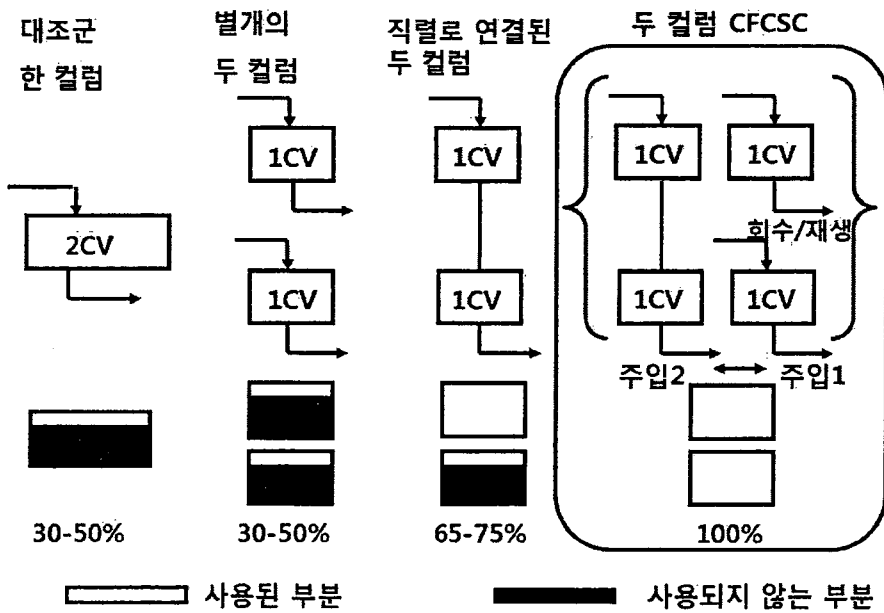
【도 2】



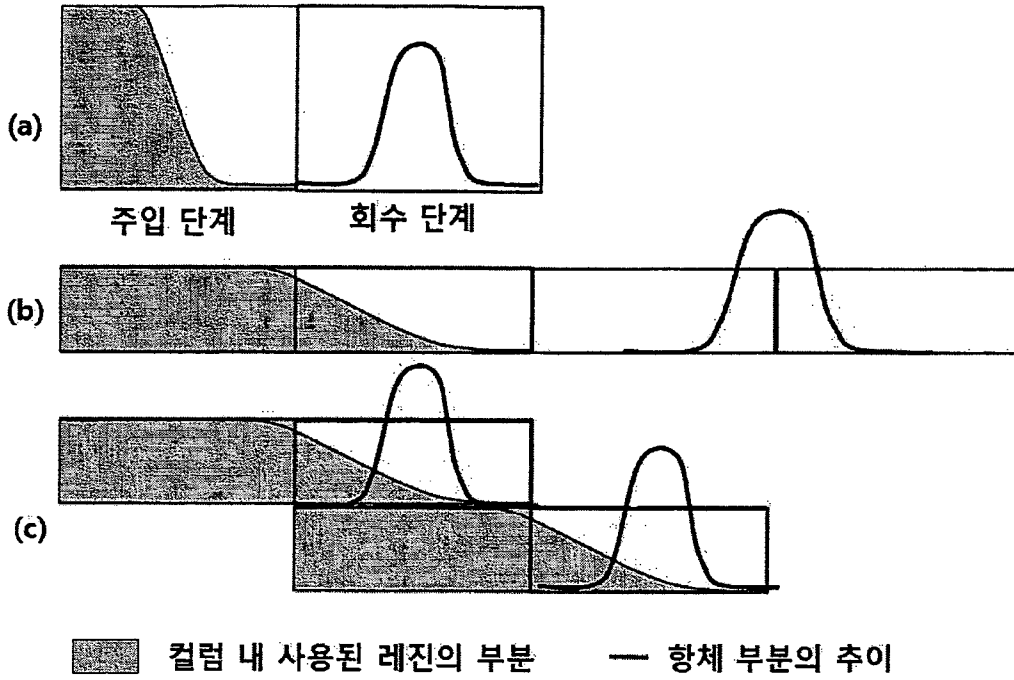
【도 3】



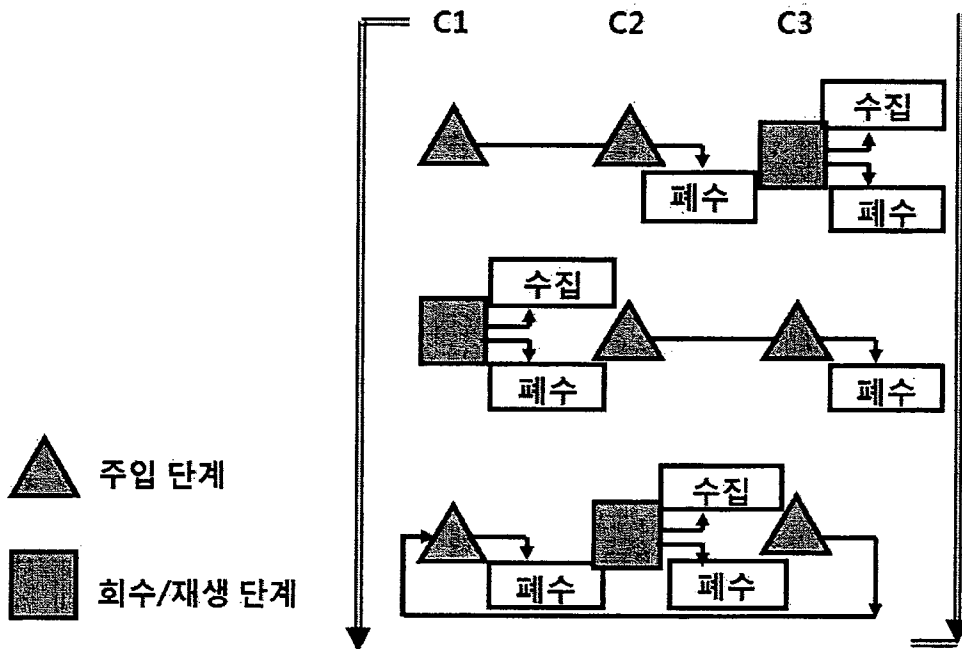
【도 4】



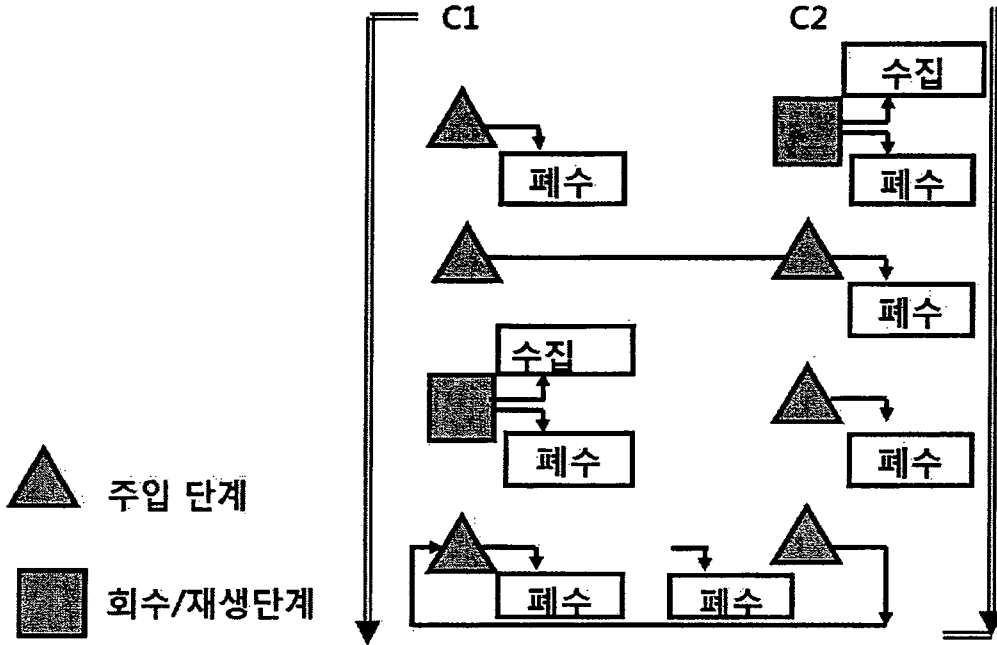
【도 5】



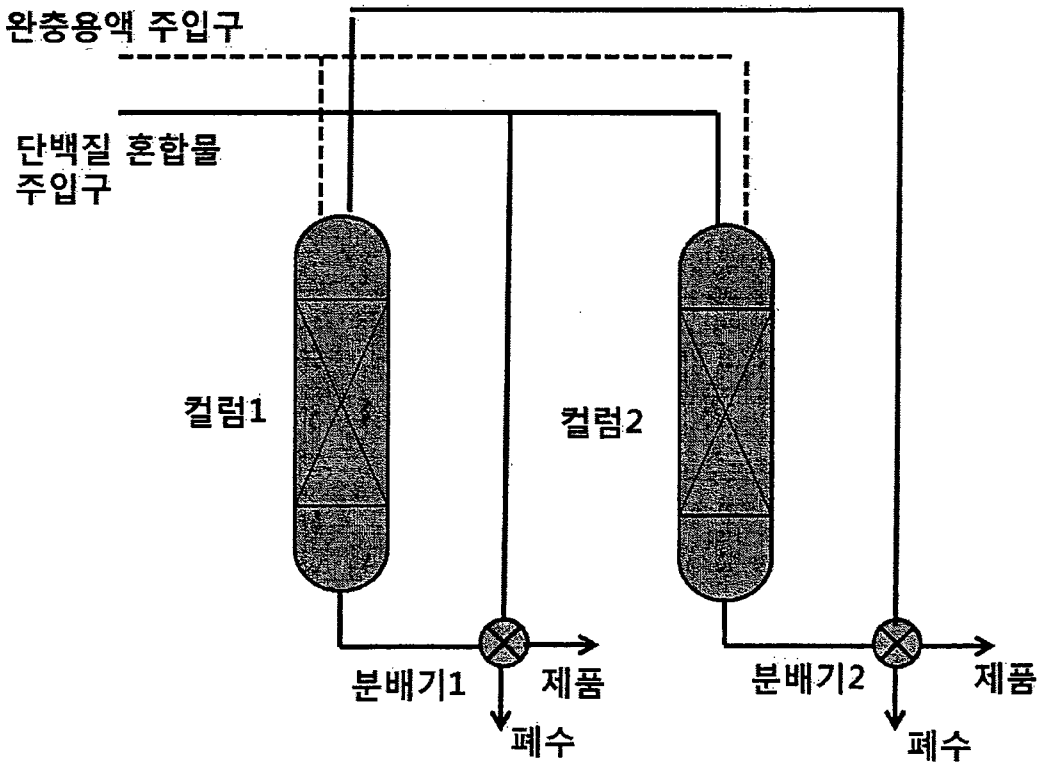
【도 6】



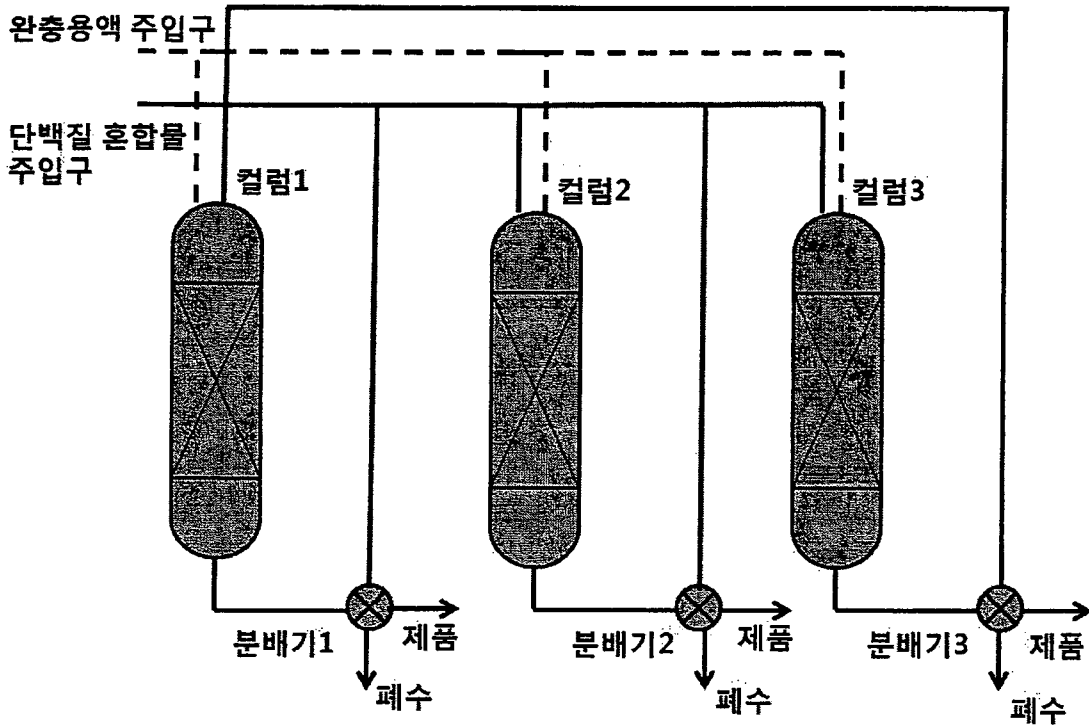
【도 7】



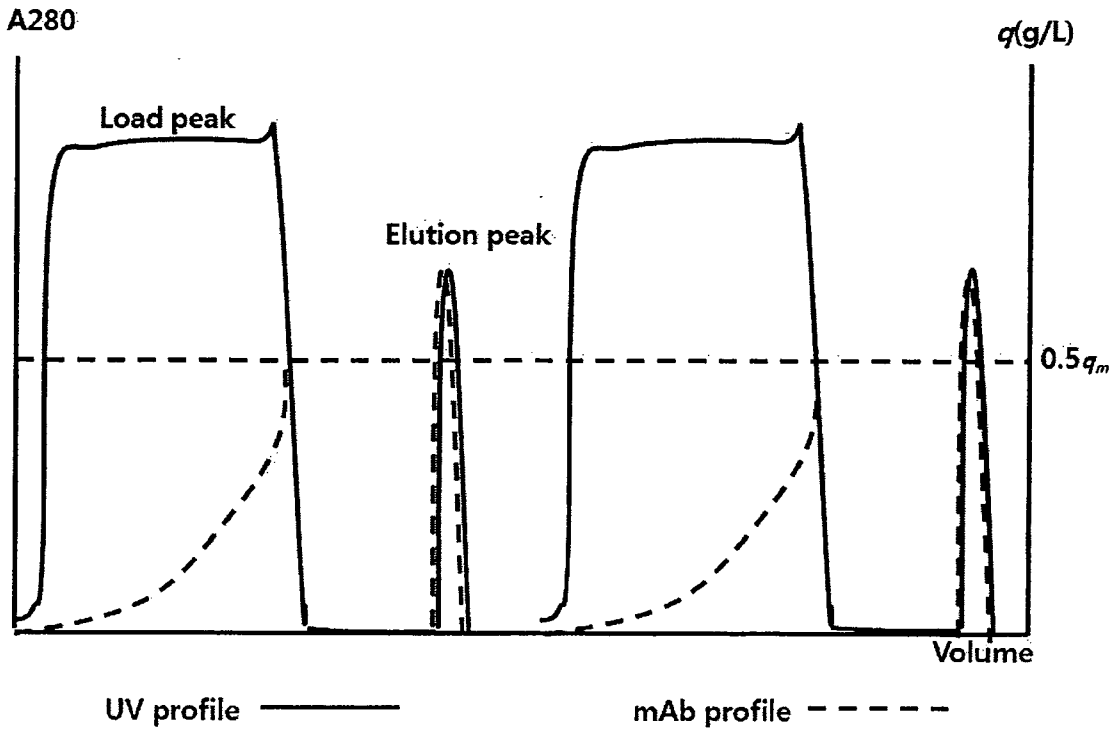
【도 8】



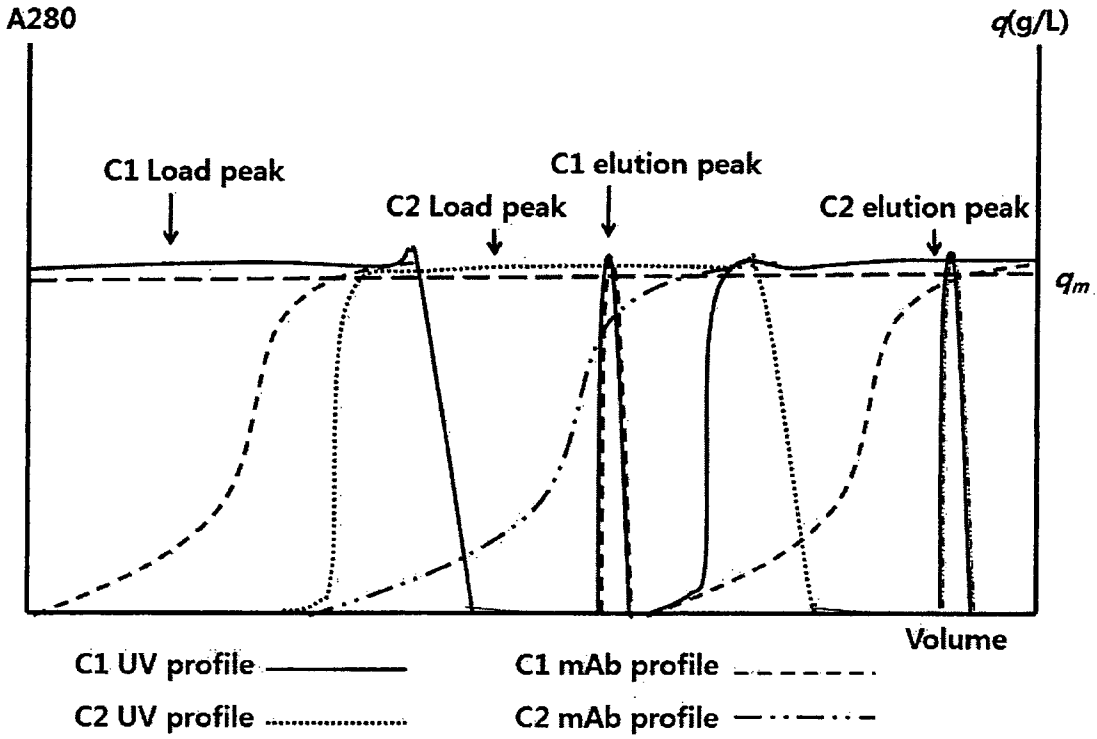
【도 9】



【도 10】



【도 11】



【도 12】

