



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2020-0097287  
(43) 공개일자 2020년08월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*G01N 30/38* (2006.01) *B01D 15/18* (2006.01)  
*B01D 15/20* (2006.01) *B01J 20/26* (2006.01)  
*B01J 20/28* (2006.01) *G01N 30/52* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*G01N 30/38* (2013.01)  
*B01D 15/18* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7019108
- (22) 출원일자(국제) 2018년12월07일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년07월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2018/001561
- (87) 국제공개번호 WO 2019/111057  
 국제공개일자 2019년06월13일
- (30) 우선권주장  
 62/595,826 2017년12월07일 미국(US)

- (71) 출원인  
**이엠펜 바이오테크 게엠베하**  
 독일 13125 베를린 로베르트-외슬레-스트라쎄 10
- (72) 발명자  
**레비슨, 데렉, 더블유.케이.**  
 독일 10318 베를린 뮌히스스트라쎄 14  
**허스트, 알리스테어, 제이.**  
 스웨덴 에스이-218 41 분케플로스트란드 스코마카  
 레빈 1디
- (74) 대리인  
**양영준, 이윤기**

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **응용 방사형 기술 크로마토그래피의 시스템 및 방법**

**(57) 요약**

복수의 비드를 사용하는 응용 방사형 기술 크로마토그래피의 시스템 및 방법이 개시되며, 각 비드는 약 250 Å 내지 약 5000 Å의 직경을 갖는 하나 이상의 세공을 그 안에 포함하며, 각 비드는 약 100 pm 내지 약 250 pm 사이의 평균 반경을 가진다. 또한 방사형 유동 크로마토그래피 컬럼에서 사용하기 위한 비드의 선택 방법, 및 방사형 유동 크로마토그래피 컬럼을 사용한 비정화된 공급물 스트림의 정제 방법이 개시된다.

(52) CPC특허분류

*B01D 15/206* (2013.01)

*B01J 20/26* (2013.01)

*B01J 20/28004* (2013.01)

*B01J 20/28016* (2013.01)

*B01J 20/28052* (2013.01)

*B01J 20/28083* (2013.01)

*B01J 20/28085* (2013.01)

*G01N 30/52* (2013.01)

*G01N 2030/386* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

각 비드가 하나 이상의 세공을 그 안에 포함하는 복수의 비드, 및 비드 사이에 형성되는 간극 채널을 포함하며, 여기서 각 세공은 약 250 Å 내지 약 5000 Å의 직경을 갖고, 복수의 비드 중 적어도 약 80 %는 약 200 pm 내지 약 500 pm의 직경을 갖고, 비드는 약 100 pm 내지 약 250 pm의 평균 반경 R을 갖는 것인, 방사형 유동 크로마토그래피 컬럼.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 비드가 중합체, 유리, 알루미늄, 실리카, 조절된 세공의 유리 (CPG), 셀룰로스, 캡슐화된 철 입자, 캡슐화된 CPG 또는 캡슐화된 실리카로 구성되는 것인 방사형 유동 크로마토그래피 컬럼.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 비드가 중합체 비드인 방사형 유동 크로마토그래피 컬럼.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,  $r < 0.414 R$ 을 갖는 임의의 비드가 제거된 것인 방사형 유동 크로마토그래피 컬럼.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,  $r < 0.225 R$ 을 갖는 임의의 비드가 제거된 것인 방사형 유동 크로마토그래피 컬럼.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 간극 채널이 사면체 부위 반경  $r_{tet} = 0.225 R$ , 팔면체 부위 반경  $r_{oct} = 0.414 R$ , 또는 둘 다를 갖는 것인 방사형 유동 크로마토그래피 컬럼.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 간극 채널이 가장 좁은 채널 반경  $r_{cha} = 0.155 R$ 을 갖는 것인 방사형 유동 크로마토그래피 컬럼.

#### 청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 비드가 단분산성인 방사형 유동 크로마토그래피 컬럼.

#### 청구항 9

a) 공급물 스트림에 존재하는 구성요소에 기초하여, 좁은 바람직한 비드 반경 R 범위를 확인하는 것; b) 바람직한 비드 범위를 벗어나는 정해진 반경 r의 비드를 제거하는 것; 및 c) 바람직한 비드 범위 이내의 비드 반경 R의 백분율을 정하는 것을 포함하는, 방사형 유동 크로마토그래피 컬럼에서 사용하기 위한 비드의 선택 방법.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 비드가 중합체, 유리, 알루미늄, 금속 또는 다른 결정질, 반-결정질 또는 비정질 물질, 실리카, 조절된 세공의 유리 (CPG), 셀룰로스, 캡슐화된 철 입자, 캡슐화된 CPG 또는 캡슐화된 실리카로 구성되는 것인 방법.

**청구항 11**

제9항에 있어서, 비드가 중합체 비드인 방법.

**청구항 12**

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 반경  $r$ 의 비드가 습식 또는 건식 체질 및/또는 일루트리이션에 의해 제거되는 것인 방법.

**청구항 13**

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 반경  $r < 0.414 R$ 을 갖는 비드가 제거되는 것인 방법.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 반경  $r < 0.225 R$ 을 갖는 비드가 제거되는 것인 방법.

**청구항 15**

제1항의 방사형 유동 크로마토그래피 컬럼을 사용한 비정화된 공급물 스트림의 정제 방법이며,

- a. 방사형 유동 컬럼에 비드를 충전하는 단계;
  - b. 관심 입자를 함유하는 정화된 공급물 스트림을 처리하여 정제 조건을 보정하는 단계;
  - c. 단계 b의 결과로부터 관심 입자의 결합을 결정하는 단계;
  - d. 관심 입자를 포함하는 비정화된 공급물 스트림을 처리하는 단계
- 를 포함하는 방법.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 관심 입자가 단백질, 바이러스, VLP, DNA, RNA, 항원, 리포솜, 올리고당류 또는 다당류, 또는 이들의 임의의 조합인 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 개시내용은 방사형 유동 컬럼 크로마토그래피, 더 구체적으로는 비정화된 공급물 스트림의 여과를 강화하는 특정 크기 및 파라미터의 비드를 포함하는 방사형 유동 컬럼, 및 상기 비드의 선택 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 일반적으로 그것이 사용될 때의 크로마토그래피는 샘플 혼합물 중 다양한 성분의 분리를 위한 기술이다. 액체 크로마토그래피 시스템에서는, 샘플에 이어 용리 유체가 크로마토그래피 분리 컬럼에 주사된다. 분리 컬럼은 분리될 샘플 중 다양한 성분과 상호작용하는 충전물 또는 매트릭스 매질 또는 물질을 함유한다. 분리 매질의 조성은 원하는 분리를 수행하기 위하여 그를 통해 안내되는 유체에 따라 달라진다. 샘플과 용리 유체가 분리 매질로 통과할 때, 샘플 중 다양한 성분은 차별적인 상호작용의 결과로서 서로 다른 속도로 분리 매질을 통하여 이동한다. 이러한 성분은 분리 매질로부터의 유출구 또는 유출물에서 분리되어 출현한다.

[0003] 다양한 유형의 수직 및 수평 유동 분리 컬럼이 관련 기술분야에 알려져 있다. 고성능 크로마토그래피에 대한 필요성에 따라, 수평 유동 유형의 크로마토그래피 컬럼이 개발되었다. 그와 같은 수평 또는 방사형 유동 컬럼에 대해서는 예를 들면 U.S. 특허 제4,627,918호 및 4,676,898호에 기술되어 있다. 수평 또는 방사형 유동 유형의 컬럼에서, 샘플 및 용리 유체는 분배기를 통하여 분리 매질 또는 매트릭스의 외주 또는 원주 벽 또는 표면으로 도입되며, 중심 또는 수집 포트(port)를 향하여 내향 수평 또는 방사상으로 유체가 분리 매질을 통과한 다음, 서로 다른 시간 및 서로 다른 속도로 컬럼으로부터 용리된다.

[0004] 나중에는, 세포/발효 수확물, 조직 추출물, 조류, 식물 유래 세포 및 물질, 및 혈장/혈액을 포함한 생물학적으로 활성인 물질의 단리를 위한 조질 공급물의 직접적인 처리를 위한 크로마토그래피 컬럼 및 방법들이 개발되었

다. 대형 비드 크로마토그래피 매질이 말단-플레이트 스크린이 대형 세공 스크린 (60-180 pm 세공)으로 대체되어 있는 표준 저압 크로마토그래피 컬럼에 충전된다. 대형 세공은 컬럼 막힘을 방지한다. 입자 크기가 대형이기 때문에, 세포 물질은 입자간 간극(lumen)에서 비드 사이를 유동하는 반면, 가용성인 생성물은 비드상 관능기에 의해 포획된다.

- [0005] 통상적으로, 세포 배양/발효 수확물로부터의 생물학적 하류 처리는 하기 두 가지 주요 작업을 필요로 한다: i) 공급물 스트림 제조 및 ii) 회수 및 정제. 샘플은 컬럼에의 적용 전에 적절하게 제조되어야 한다. 이는 시간 소모성이면서, 상당히 비용이 들 수 있기도 하다. 샘플의 제조가 필요한 경우, 공급물 스트림은 일반적으로 세포 밀도, 점도 및 염 농도를 감소시키기 위하여 희석되는데, 모두 회수 및 정제를 개선하는 데에 유익하다. 회수는 원심분리 및/또는 미세여과는 물론, 최초 부피 감소 단계, 통상적으로는 한외여과에 의한 세포성 및 기타 미립자 물질의 제거를 포함한다. 통상적인 크로마토그래피 매질은 빠르게 세포 잔사에 의해 오염되므로, 정제 작업을 위해서는 무-입자 공급물이 제조되어야 한다.
- [0006] 원심분리 및 여과는 오래 걸리고 비용이 드는 작업일 뿐만 아니라, 그것이 품질을 훼손한다. 과열된 세포로부터 방출되는 프로테아제는 표적 단백질을 분해시킴으로써, 정제 방법 개발 임무를 더 복잡하게 하고 정제 비용을 증가시킬 수 있다. 농축된 세포 잔사와의 접촉 시간이 더 길수록, 더 많은 생성물이 소실될 수 있다.
- [0007] 비정화된 공급물로부터의 직접적인 단백질 생성물의 포획은 생성물 분해를 최소화하고 생성물 품질, 수율 및 공정 경제성을 개선하게 된다. 또한, 생성물 포획 및 세포 제거 단계가 단일 작업으로 조합될 경우, 자본-집약적인 회수 작업이 크게 단순화되게 된다.
- [0008] 세포 배양/발효 수확물 또는 다른 생물학적 샘플 (예컨대 혈장)과 같은 비정화된 공급물로부터 생성물을 직접적으로 포획하는 데에는 두 가지 접근법이 존재한다. 한 가지 접근법은 포획 수지 입자의 유동화를 제안한다. 유동화를 통하여, 개별 입자가 분리됨으로써, 잔사가 막힘 없이 컬럼 층으로부터 유출될 수 있다.
- [0009] 이와 같은 접근법은 몇 가지 문제점을 안고 있다. 유동화 층 시스템은 사전결정된 높은 유량으로 작동하며, 컬럼의 크기를 변화시키기 위한 작업 또는 수단에서의 유연성이 없다. 시스템의 완충제 소비는 충전 층 시스템에 비해 더 높은데, 이는 많은 것이 그의 정제용의 특수한 완충제를 필요로 하는 고가의 제약 생성물에 있어서 상당한 비용 인자가 된다. 고체 상 입자 부피에 대한 컬럼 부피의 비는 매우 높다. 이는 컬럼 내에서의 체류 시간 및 결합 용량에 부정적인 영향을 주게 되는데, 고체 상으로의 표적 분자의 완전한 확산을 위한 충분한 시간이 존재하지 않기 때문이다. 또한, 컬럼 층 내에서 입자가 충돌하게 되어 "미립자"로 불리우는 고체 상 단편이 생성됨으로써, 컬럼의 성능 및 재사용 둘 다를 감소시키게 된다. 유동화 층 작업은 특수한 비용이 드는 하드웨어 및 크로마토그래피 매질도 필요로 한다.
- [0010] 다른 접근법은 미립자 제거를 위한 충전 층 컬럼의 사용이다. 이와 같은 방식은 하기의 이유로 조사되지 않은 커다란 여지가 있다. 충전 층 컬럼상의 세포 잔사를 정화하는 것은 대형이며 바람직하게는 구형인 입자를 사용하는 것을 필요로 한다. 이러한 입자는 입자간 간극에 세포 또는 기타 유사 크기의 미립자가 컬럼으로부터 유출되도록 하기 위한 입자간 간극 내의 충분한 공간을 필요로 한다.
- [0011] 대형 입자 (비드)를 사용하는 것의 불리한 면은 단백질 결합 용량이 겔 층 단위 부피 당 가용 표면의 함수라는 것이다. 따라서, 입자 직경의 증가에 따라 결합 용량의 손실이 관찰된다. 조밀한 세포 현탁액을 취급하기 위하여 요구되는 바와 같이 입자 직경이 0.1 mm에서 1 mm로 증가할 때, 대략 90 %의 단백질 결합 용량이 상실된다. 이는 충전 층 컬럼이 조질 공정 공급물 스트림을 처리하는 데에 비실용적이 되게 한다.
- [0012] 그러나, 충전 층 컬럼 작업은 단순성, 효율성 및 경제성을 제공한다. 그것은 유연하며, 규모화하기가 상대적으로 용이하다. 특수한 입자, 장비 또는 작업자 훈련에 대한 필요성이 없다. 표준 크로마토그래피를 위한 생산 면적이 상대적으로 작으며, 유동화 층 장비를 수용하기 위한 생산 설비 높이의 변형에 대한 필요성이 없다.
- [0013] 생성물 적용 속도는 작업 처리량 면에서 또 다른 중요한 문제이다. 유동화 층 시스템의 경우 그것이 사전결정되지만, 충전 컬럼 시스템의 경우에는 반응 결합 동역학만이 속도 제한 인자이다. 이는 유동화 층 시스템에 비해 3-10배까지 더 높은 더 고도의 처리량을 가능하게 한다.
- [0014] 생성물 포획 후, 잔류 세포 물질은 간단한 고-속 세척 펄스에 의해 제거된다. 생성물은 이후 통상적인 용리 방법에 의해 용리된다. 따라서, 공지의 대형-비드 크로마토그래피 수지는 세포 제거를 동시적인 생성물 포획과 조합하는 것에 의한 충전 층 컬럼에서의 세포 배양물 또는 발효 브로쓰는 물론, 다른 비정화된 공급물의 직접적인 처리를 가능하게 한다.

[0015] U.S. 특허 제5,466,377호는 표준 저압 충전 층 크로마토그래피 컬럼에서의 비정화된 공정액으로부터의 원하는 생성물의 직접적인 포획을 위한 방법 및 대형 비드 크로마토그래피 입자를 제안한다.

[0016] 충전 층 컬럼에서 세포 배양/발효 수확물, 조직 추출물, 세포 단편, 바이러스, 혈장, 채소 또는 과일 추출물로부터 유래하는 폐 공급물 스트림, 또는 우유 가공으로부터 유래하는 폐 공급물 스트림, 또는 기타 천연 물질 공급원과 같은 조질 공급물의 직접적인 처리를 달성하기 위한 개선된 크로마토그래피 물질 및 방법에 대한 필요성이 남아 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

**과제의 해결 수단**

[0017] **[발명의 개요]**

[0018] 하기를 포함하는 방사형 유동 크로마토그래피 컬럼이 개시된다: 각 비드가 하나 이상의 세공을 그 안에 포함하는 복수의 비드, 및 비드 사이에 형성되는 간극 채널. 각 세공은 약 250 Å 내지 약 5000 Å의 직경을 갖고, 상기 복수의 비드 중 적어도 약 80 %는 약 200 pm 내지 약 500 pm의 직경을 갖고, 상기 비드는 약 100 pm 내지 약 250 pm 사이의 평균 반경 R을 가진다. 비드는 단분산성 (즉 모든 비드가 목표 또는 표지 반경의 ± 약 10 % 반경을 가짐)일 수 있거나, 또는  $r < 0.414 R$  또는  $r < 0.225 R$ 이 제거되었을 수 있다.

[0019] 방사형 유동 크로마토그래피 컬럼에서 사용하기 위한 비드의 선택 방법이 또한 개시된다. 상기 방법은 하기를 포함한다: a) 공급물 스트림에 존재하는 구성요소 (또는 관심 입자)에 기초하여, 좁은 바람직한 비드 반경 R 범위를 확인하는 것; b) 상기 바람직한 비드 범위를 벗어나는 정해진 반경 r의 비드를 제거하는 것; 및 c) 바람직한 비드 범위 이내의 비드 반경 R의 백분율을 정하는 것. 반경 r의 비드는 습식 또는 건식 체질 및/또는 일루트리이션에 의해 제거될 수 있다. 제거되는 비드는 반경  $r < 0.414 R$  또는  $r < 0.225 R$ 을 갖는 것일 수 있다.

[0020] 또한, 본원에서 개시되는 것은 각 비드가 하나 이상의 세공을 그 안에 포함하는 복수의 비드, 및 비드 사이에 형성되는 간극 채널을 포함하며, 여기서 각 세공은 약 250 Å 내지 약 5000 Å의 직경을 갖고, 상기 복수의 비드 중 적어도 약 80 %는 약 200 pm 내지 약 500 pm의 직경을 갖고, 상기 비드는 약 100 pm 내지 약 250 pm 사이의 평균 반경 R을 갖는 것인 방사형 유동 크로마토그래피 컬럼을 사용한 비정화된 공급물 스트림의 정제 방법이다. 상기 방법은 하기의 단계를 포함한다: a) 방사형 유동 컬럼에 비드를 충전하는 단계; b) 관심 입자를 함유하는 정화된 공급물 스트림을 처리하여 정제 조건을 보정하는 단계; c) 단계 b의 결과로부터 관심 입자의 결합을 결정하는 단계; 및 d) 관심 입자를 포함하는 비정화된 공급물 스트림을 처리하는 단계.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0021] 조질인 생물학적 공급물 스트림, 예컨대 비정화된 (즉 비-여과된) 세포 배양물의 직접적인 여과, 즉 처리를 위한, 방사형 유동 컬럼, 및 그의 제조 및 사용 방법이 제공된다. 본 개시내용은 특히 충전 층 크로마토그래피 및 확장 층 크로마토그래피와 같은 방법에 비해 실질적으로 더 낮은 비용 및 더 빠른 처리로 정제를 달성한다. 대표적인 적용분야에는 혈장의 분별; 단백질 (특히 헤르셉틴, 인슐린, 아바스틴 등과 같은 약제)을 단리 및 정제하기 위한 세포 배양물의 생물처리; 바이러스 및 바이러스-유사 입자 포획 및 정제; 채소 또는 과일 추출물로부터 유래하는 폐 공급물 스트림 및 우유 가공 또는 기타 천연 물질 공급원으로부터 유래하는 폐 공급물 스트림의 정제가 포함된다.

[0022] 본원에서 개시되는 크로마토그래피는 놀랍고도 유익하게도 전세포 또는 기타 입자가 겔 층을 막히게 하지 않으면서 손상없이 개시된 비드 주변 및 사이를 통과하는 것을 가능하게 하며, 전세포, 세포 단편, 천연 또는 재조합 식물 물질의 균질물, 나노-입자 용액 및/또는 기타 입자 (보통 소형 비드를 포함하는 컬럼을 막히게 함)를 함유하는 세포 배양물의 비정화된 (비-여과된) 공급물 스트림의 직접적인 통과를 가능하게 한다. 차후에 회수될 수 있는 공급물 스트림 중 관심 분자 표적을 선택적으로 결합시키는 것이 또한 가능하다. 예를 들어, IgG 정제의 경우, 비드는 비드의 표면에 단백질 A 또는 단백질 G를 공유 결합시키는 것에 의해 관능화되어, 가역적인 IgG 결합 후 이어지는 세척 및 후속 용리를 가능하게 할 수 있다. 바이러스 및 VLP 포획을 위해서는, 비드

가 고도의 외부 표면적 및 고도의 (양성) 전하 밀도를 갖도록 변형될 수 있다.

- [0023] 본원에서 개시되는 것은 각 비드가 하나 이상의 세공을 그 안에 포함하는 복수의 비드, 및 비드 사이에 형성되는 간극 채널을 포함하는 방사형 유동 크로마토그래피 컬럼이다.
- [0024] 상기 방사형 유동 컬럼은 비드, 겔 층, 세공 및 채널과 관련하여 본원에서 구체적으로 논의되는 차이 이외에는, 임의의 공지된 방사형 유동 컬럼과 마찬가지로 제조될 수 있다. 상기 방사형 유동 컬럼은 약 3 cm 내지 약 50 cm의 층 길이를 가질 수 있으며, 층 부피 (V)가 약 5 ml 내지 약 1000 리터 범위일 수 있다. 방사형 유동 컬럼은 "도넛" (직원 중공 원통의 형태를 갖는 완전 크기의 방사형 유동 컬럼), "케이크" 슬라이스 (사다리꼴 기둥, 즉 동일한 층 길이/반경 및 곡률을 갖지만 더 작은 부피를 갖는 도넛의 소형 절편 형태를 가짐), 또는 절두 "원추" (동일한 층 길이/반경 및 곡률을 가지나 "케이크"보다 더욱 더 작은 부피를 갖는, 케이크 또는 도넛으로부터 도출된 소형의 원통형 코어 부분으로부터 생성되는 절두체(frustrum) 또는 절두 원추의 형태를 가짐)로 성형될 수 있다.
- [0025] 컬럼은 하나 이상의 다공성 필터 프리트(frit)를 포함할 수 있다. 종종, 외부 프리트 및 내부 프리트가 존재한다. 각 프리트는 약 40 pm 내지 약 300 pm, 약 80 pm 내지 약 250 pm, 또는 약 100 pm 내지 약 200 pm 사이의 세공 크기를 갖도록 설계될 수 있다. 프리트는 임의의 통상적으로 알려져 있는 물질로 제조될 수 있다. 임의적으로, 그것은 스테인리스강, 또는 스테인리스강과 1종 이상의 중합체, 예컨대 비제한적으로 폴리에틸렌 (PE) 또는 폴리프로필렌 (PP)으로 제조될 수 있다.
- [0026] "도넛", "케이크" 또는 "원추" 형상의 방사형 유동 컬럼은 모두 일정한 외부 프리트 면적 대 내부 프리트 면적의 비를 가진다. 이와 같은 비는 1.5:1 내지 10:1의 범위일 수 있다. 바람직한 범위는 2:1 내지 4:1이다. 동일한 층 길이 및 외부 대 내부 프리트 면적 비를 갖는 상기 세 가지 서로 다른 형상의 유동 역학은 사실상 동일하다.
- [0027] 비드는 구형 또는 거의 구형일 수 있다. 비드는 중합체, 유리, 알루미늄, 금속 또는 다른 결정질, 반-결정질 또는 비정질 물질, 실리카, 조절된 세공의 유리 (CPG), 셀룰로스, 캡슐화된 철 입자, 캡슐화된 CPG, 캡슐화된 실리카 또는 이들의 임의의 조합으로 구성될 수 있다. 중합체 비드는 관련 기술분야에서 사용하기 위해 알려진 임의의 중합체, 예를 들면 폴리아크릴레이트, 예컨대 메타크릴레이트, 폴리스티렌, 또는 다당류, 예컨대 텍스트란, 폴룰란, 아가로스, 또는 천연 또는 결합된 폴리실리케이트로 구성될 수 있다. 비드는 2종 이상의 균질하거나 비균질하게 블렌딩된 중합체로 이루어질 수도 있다. 중합체 비드는 구형 (또는 거의 구형)의 다당류 비드일 수 있다.
- [0028] 비드는 약 200 pm 내지 약 1000 pm, 또는 약 200 pm 내지 약 500 pm 사이의 평균 직경을 가질 수 있다. 일 실시양태에서는, 중합체 비드 중 적어도 약 80 %가 약 200 pm 내지 약 500 pm의 직경을 가지거나, 또는 중합체 비드 중 적어도 약 85 % 또는 적어도 약 90 %가 약 200 pm 내지 약 500 pm의 직경을 가진다.
- [0029] 비드는 약 100 pm 내지 약 500 pm, 또는 약 100 pm 내지 약 250 pm 사이의 평균 반경 (R)을 가질 수 있다.
- [0030] 대부분의 비드는 일반적으로 단분산성 (모두 동일한 직경에 의해 동일한 크기)이 아니며, 오히려 주어진 범위를 넘어 확장되는 직경 범위를 가진다. 따라서, 예를 들면, 상기 측정치는 비드 총 질량 (또는 부피) 중 80 %가 200-500 pm에 속한다는 것을 의미한다. 다른 20 % (백분율이 어떻게 정해지는지와 관계없이)는 범위 밖에 있는, 더 작거나 또는 더 큰 것이다. 간극 채널이 막히지 않기 위해서는, 때로는 컬럼을 충전하기 전에 주어진 범위 밖의 20 %에서의 보다 작은 비드가 제거되거나, 또는 적어도 고갈되는 것이 중요하다. 채널의 직경과 거의 동일한 크기인 더 작은 비드가 고갈되거나 제거되지 않는 경우, 200-500 pm 사이 비드의 겔 층은 채널을 부분적으로 또는 완전히 차단하기에 충분한 소형 비드를 함유할 수 있다.
- [0031] 일부 크로마토그래피 비드는 시중에서 구입가능하며, 종종 비드 직경별로 판매된다. 그러나, 주어지는 직경은 비드 직경의 평균으로서; 그것이 모든 비드가 그 주어진 직경을 가지고 있음을 의미하지는 않는다. 다른 회사는 비드 직경의 범위를 열거하여 비드를 판매할 수도 있다. 그러나, 이는 때로는 정해지지 않은 특정 백분율의 비드가 거기에 속하는 범위이다. 이에 따라, 주어진 범위 밖에 속하는 직경을 갖는 비드의 총 백분율은 알려져 있지 않아서; 범위 상위 또는 하위에 속하는 비드의 백분율이 주어지는 것은 드물게 존재한다.
- [0032] 비드는 그것이 (잠재적인 후속 회수를 위하여) 관심 분자 표적에 선택적으로 결합하는 것을 가능하게 하는 관능화된 기 (예컨대 이온 교환 기, 소수성 상호작용 기 등)를 가질 수 있다. 잠재적인 표적에는 바이러스, 바이러스-유사 입자, 단백질 (특히 비제한적으로 IgG, IgM, IgY 및 혈액 단백질), DNA, RNA, 올리고뉴클레오타이드, 폴리펩티드 및 세포가 포함된다.

- [0033] 비드는 그 안에 하나 이상의 세공을 포함한다. 각 세공은 약 250 Å 내지 약 5000 Å의 직경을 가진다. 각 세공은 비드를 통하여 부분적으로 연장되어 폐쇄-단부를 초래할 수 있거나, 또는 또 다른 출구 지점까지 비드를 통하여 계속 진행할 수 있다.
- [0034] 간극 채널은 충전된 비드 사이에 형성되며, 부분적으로 공극 부피를 포함한다. 이러한 채널이 세포 및 세포 단편이 겔 층을 막히게 하지 않으면서 통과하는 것을 가능하게 하기에 충분하게 넓은 경우, 및 해당 크기로 인하여 세포 및 세포 단편의 통과를 제한하거나 차단할 수 있는 더 작은 비드가 채널에 없는 경우, 사용자는 크로마토그래피 정제 단계 전의 유해한 여과 또는 원심분리, 침전, 또는 다른 비용이 들며, 시간-소모성이고 잠재적으로 생성물-손실성인 단계를 피하는 충전 비드를 이용할 수 있다.
- [0035] 단분산성 구형 비드는 이상적으로는 육방 밀집 충전 (HCP) 또는 입방 밀집 충전 (CCP) 배열 중 어느 하나로 충전되게 된다. 두 충전 배열은 동일한 최대 비드 (구체) 밀도를 갖고, 둘 다 유사한 충전 에너지를 가짐으로써, 어느 것도 다른 것에 비해 분명하게 에너지상 선호되지는 않는다. 중합체, 예컨대 다당류 비드의 바람직한 충전 배열이 예측가능하지는 않지만, 둘 다의 충전 배열이 비드 사이에 채널 (간극 공간 또는 채널)을 형성하는데, 본원에서 개시되는 장치 및 시스템의 성공 또는 실패에는 그의 최소 크기가 중요하다.
- [0036] 간극 채널은: 1) 세포, 세포 단편 및 기타 방해 입자가 겔 층을 막힘 없이 통과하는 것을 가능하게 하기에 충분하게 대형이어야 하며; 2) 간극 채널 자체와 유사한 크기를 가지며 그에 따라 채널을 막히게 할 수 있는 더 작은 비드가 없어야 하고; 3) 가능한 한 좁은 비드 직경 범위를 갖는 비드 군집으로부터 형성되지만, 단분산성 비드가 가능한 한 이상적인 크기에 가까워야 한다.
- [0037] 또한, 간극 채널은 너무 좁게 압축되어서는 안 되며, 그것은 하기를 생성시킴으로써 간극 채널을 막히게 할 수 있다: i) 너무 고도인 유량, ii) 너무 높은 압력 또는 iii) 너무 고밀도인 비드 충전. 간극 채널은 공급물 스트림을 처리하기 위한 연속되는 경로를 제공하도록 개방형 (즉 막힘이 없음)이어야 한다. 또한, 너무 고도인 유량은 비-경질인 겔 층의 간극 채널을 좁아지게 하게 된다. 따라서, 겔 층은 (비드 압축을 통하여) 간극 채널을 좁아지게 하지 않으면서 분 당 0.1 컬럼 부피 내지 10 컬럼 부피의 유량을 가능하게 하기에 충분한 강성을 가짐으로써, 세포 및 세포 단편이 겔 층을 통과하는 것을 가능하게 해야 한다.
- [0038] 겔 층의 강성은 비드 자체의 강성에 따라서도 달라진다. 비드 사이 간극 채널의 직경/크기 변화를 최소화하기 위해서는 (모든 비드가 구형 또는 근-구형이며, 주어진 크기 분포를 갖는 것으로 가정), 비드의 형태구조가 유동 조건하에서 변화하지 않는 것이 중요하다.
- [0039] 한 가지 선택사항은 크로마토그래피 분리에 사용되는 완충제에 대하여 불활성이며 그에 따라 그의 크기 또는 형상의 변화를 나타내지 않게 되는 매우 강성인 비드를 사용하는 것이지만; 예를 들면 뛰어난 기계적 강성 및 안정성을 갖는 실리카 또는 CPG (조절된 세공의 유리)로부터 제조된 비드는 NaOH에 대해서는 내성을 적게 가지거나, 내성을 가지지 않는다.
- [0040] 비제한적으로 메타크릴레이트 또는 폴리스티렌 비드와 같은 중합체 비드는 더 반응물 안정성이고 강성을 보유하도록 제조될 수 있다. 비제한적으로 텍스트란 또는 아가로스 비드와 같은 다당류 비드는 덜 강성일기는 하지만, NaOH와 같은 반응물에 대하여 더 안정성이다. 그러나, 다당류 비드는 종종 다른 중합체 비드에 비해 "더 연질이며", 그에 따라 압축되기가 더 쉽다. 압축이 일어나는 정도는 충전된 겔 층으로 유동되는 액체로부터의 적용 압력에 따라 달라지게 된다. 너무 큰 압축은 유동이 가능하지 않은 비-다공성 층을 초래하게 된다 (내부 세공 네트워크 및 간극 공간 모두의 폐쇄). 보통 이와 같은 압력 및 압축의 증가로 이어지는 핵심 인자는 적용되는 액체의 유량 (보통 mL/분, CV/분 또는 cm/시간으로 표현됨), 및 액체의 점도이다.
- [0041] 더 연질인 다당류 비드의 기계적 안정성 및 강성은 특정 절차를 적용하는 것에 의해 강화될 수 있다. 예를 들면, 하기의 접근법이 비드의 기계적 안정성 및 강성을 향상시키게 된다:
- [0042] 1. 다당류 구조 내에서의 가교결합. 이는 비드가 압력에 대하여 더 내성이 되도록 하고, 그에 따라 비드 형태 구조를 보존하도록 한다. 그러나, 적용되는 가교결합 화학에 따라서는, 비드 구조 내 내부 세공의 크기가 영향을 받을 수 있다.
- [0043] 2. 비드의 배합에 사용되는 다당류 양의 밀도를 증가시키는 것. 이는 종종 아가로스-기계 입자에서 이루어진다. 표준의 시중에서 구입가능한 아가로스 비드는 약 2 내지 10 % (배합되는 비드 리터 당 20 내지 100 그램의 아가로스) 사이의 아가로스 백분율을 가진다. 증가된 밀도를 갖는 비드는  $\geq$  약 6 % 아가로스를 포함할 수 있다. 그러나, 이와 같은 밀도의 증가는 비드의 내부 세공 크기를 감소시킬 수 있다:

- [0044] · 4 % 비드는 대략 20,000,000 달톤의 평균 분자량 컷오프(cut-off)를 가짐
- [0045] · 6 % 비드는 대략 4,000,000 달톤의 평균 분자량 컷오프를 가짐.
- [0046] 비드 크기에 따라 달라지는 최적 간극 채널 크기는 궁극적으로 공급물 스트림 중에 존재하는 구성요소에 따라 달라진다. 구체적으로, 간극 채널의 최적 크기는 바람직하게 겔 층을 통과해야 하는 입자에 따라 달라진다. 최상의 간극 채널 크기를 결정하는 방법은 하기와 같을 수 있다:
- [0047] 1. 비드 크기의 결정: 겔 층을 통과해야 하는 세포 또는 단편의 반경으로부터, 3개의 비드에 의해 형성되는 필요 채널 반경 ("가장 좁은 채널 반경")을 추정하고, 필요한 최소 비드 크기를 계산한다.
- [0048] 2. 겔로부터 제거될 크기 분율의 결정: 비드의 반경 (단분산성 비드 반경 또는 다분산성 비드의 비드 반경 평균)으로부터, 사면체 및 팔면체 부위의 반경 길이를 계산한다. 이들 부위의 반경은 겔로부터 제거되어야 하는 최대 비드의 것이다.
- [0049] 다음에, 3개의 완전한 동일 구체 사이에 형성되는 최소 채널을 통하여 정합될 수 있는 소형 구체의 이론적 최대 직경을 계산한다. 채널의 상기 직경은 비정화된 공급물 스트림에 존재하는 최대 입자 (즉 세포, 세포 단편 또는 기타 입자)에 비해 약 3 내지 약 10-배 더 크거나, 또는 약 4 내지 약 6-배 더 클 수 있다.
- [0050] 단분산성 비드의 입방 밀집, 육방 밀집 또는 발로우(Barlow) 층진에 있어서, 완전히 침강시키고, 층진 밀도의 측정가능한 변화가 없을 때까지 진동시켰을 때 (케플러 추측(Kepler Conjecture), 하기가 유효하다:
- [0051] · 사면체 부위 반경  $r_{tet} = 0.225 R$ 임 ( $R$ 은 비드의 반경이며,  $r_{tet}$ 는 사면체-부위의 반경임).
- [0052] · 팔면체 부위 반경  $r_{oct} = 0.414 R$ 임 ( $R$ 은 비드의 반경이며,  $r_{oct}$ 는 팔면체-부위의 반경임).
- [0053] · 가장 좁은 채널 반경  $r_{cha} = 0.155 R$ 임 ( $R$ 은 비드의 반경이며,  $r_{cha}$ 은 채널의 반경임).
- [0054] ·  $x$ 의 반경을 갖고,  $0.155 R < x < 0.414 R$ 을 갖는 비드는 팔면체 부위에 정합되어 영구적으로 팔면체 부위를 점유할 수 있는 크기를 가짐.
- [0055] ·  $x$ 의 반경을 갖고,  $0.155 R < x < 0.225 R$ 을 갖는 비드는 사면체 부위에 정합되어 영구적으로 사면체 부위를 점유할 수 있는 크기를 가짐.
- [0056] 사면체 및 팔면체 "홀(hole)" 둘 다는 층진 비드의 층에 항상 존재한다. 홀은 홀을 둘러싸 그것을 형성시키는 비드의 수에 기초하여 사면체 또는 팔면체로 지칭된다.
- [0057] 다분산성 비드의 무작위 밀집 층진의 경우, 상기 값은 최소로서, 실제 값은 더 클 수 있다. 반경  $r_{cha} = 0.155 R$ 을 갖는 채널은 용이하게 겔 층을 통과할 세포, 단편 또는 미립자 반경의 최소 1.1-배 (바람직하게는 약 2 내지 약 4-배)이어야 한다.
- [0058] 단분산성 비드는 하기에 의해 제조될 수 있다:
- [0059] a. 최적의 반경을 가지며 더 작은 비드는 완전히 없는 단분산성 비드를 제조하는 것;
- [0060] b. 에멀션 공정 동안 조건을 신중하게 조절함으로써, 좁은 다분산도 범위의 비드를 제조하는 것. 이러한 조건으로는 하기가 포함된다: 모두 형성되는 비드의 크기 분포를 좁히는 데에 기여하는 최적 유형 및 양의 에멀션화제 첨가, 최적 교반 속도의 유지, 최적 온도의 유지.
- [0061] c. 선택된 크기에 비해 더 작은 (또는 더 큰) 입자의 분획을 제거하기 위한 습식 또는 건식 체질; 및/또는
- [0062] d. 결정된 크기에 비해 더 작은 입자의 분획을 제거하기 위한 일루트리이션.
- [0063] 여과를 개선하기 위하여, 간극 채널을 막히게 할 수 있는 더 작은 비드는 겔 층의 층진 전에 제거될 수 있다.
- [0064] 간극 채널은 하기 단계 중 일부 또는 전부를 수행하는 것에 의해 형태 및 기능이 개선될 수 있다:
- [0065] a. 예를 들면 하기 표 1-3에 나타낸 정보를 사용하여 세포, 세포의 단편 또는 기타 미립자가 통과하는 것을 가능하게 하는 바람직한 평균 비드 반경  $R$ 을 계산/결정하는 단계.
- [0066] b. 반경  $r < 0.414 R$ 을 갖는 비드가 제거된 겔 층을 형성시키는 단계.
- [0067] i. 반경  $r < 0.414 R$ 을 갖는 모든 비드의 제거는 최대 유동 및 다공성, 및 더 짧은 경로를 갖는 겔 층을 생성시

키게 된다. 그의 이점은 더 빠른 정제 처리이다.

- [0068] c. 반경  $r < 0.225 R$  을 갖는 비드가 제거된 겔 층을 형성시키는 단계.
- [0069] i. 반경  $r < 0.225 R$  을 갖는 모든 비드의 제거는 다소 감소된 다공성, 증가된 경로 길이, 및 증가된 체류 시간을 갖는 겔 층을 생성시키게 된다. 그의 이점은 더 효율적인 정제이다.
- [0070] d. 반경  $r < 0.225 R$  또는  $r < 0.414 R$  을 갖는 더 작은 비드의 제거 단계는 겔 층 중 간극 채널의 차단/막힘을 방지하게 된다. 이는 또한 정제 주기 사이에 필요한 겔 층 세척의 양을 감소시키게 된다.
- [0071] e. 제거될 비드의 반경  $r$  을 25 %까지 증가시키는 단계 (즉 제거되는 비드가 달리 표시되는 것에 비해 25 % 더 큰 반경  $r$  을 가짐).
- [0072] f. 비드 크기 분포를 가능한 한 많이 좁힘으로써, 감소된 무작위 밀접 충전 밀도를 달성하고, 입방 밀접/육방 밀접 충전 밀도에 접근시키는 단계.

[0073] <표 1>

평균 비드 직경 ( $\mu\text{m}$ )	간극 채널 직경 ( $\mu\text{m}$ )	
100	15.5	
150	23.2	
200	30.9	목표 채널 크기
250	38.7	
300	46.4	
350	54.1	
400	61.9	
450	69.6	
500	77.4	
750	116	
1000	154.7	

[0074]

[0075] <표 2>

세포/ 관심 입자	평균 직경 ( $\mu\text{m}$ )	정합하게 되는 간극 채널 ( $\mu\text{m}$ , 3-배 최대치)
이. 콜리 세포	2	6
HEK-293 세포	13	39
CHO 세포	15	45
효모 세포	5	15
담배 BY-2 세포	35 - 100	105 - 300
베로 세포	8	24
바이러스	0.017 - 0.5	0.05 - 1.5
플라스미드 DNA	0.001 - 0.003	0.003 - 0.010

[0076]

[0077] <표 3>

단백질/ 관심 입자	평균 직경 (Å)	정합하게 되는 비드 세공 (Å, 6-배 최대치)
IgG	120	720
IgM	350 - 600	2100 -3600
플라스미드 DNA	12 - 30	72
바이러스	170 - 2500	1020 -15000

[0078]

[0079]

또 다른 실시양태는 하기를 포함하는, 방사형 크로마토그래피 겔 층에서 사용하기 위한 비드의 선택 방법이다: a) 공급물 스트림에 존재하는 구성요소 (또는 관심 입자)에 기초하여, 좁은 바람직한 비드 직경 (또는 반경) 범위를 확인하는 것; b) 상기 바람직한 비드 직경 범위를 벗어나는 정해진 직경 (또는 반경)의 비드를 제거하는 것; 및 c) 바람직한 비드 직경 범위 이내의 비드 직경 (반경)의 백분율을 정하는 것.

[0080]

또 다른 실시양태는 하기의 단계를 포함하는, 상기에서 개시된 방사형 유동 컬럼을 사용한 비정화된 공급물 스트림의 여과 방법이다:

[0081]

a. 방사형 유동 컬럼에 비드를 충전하는 단계;

[0082]

b. 관심 입자를 함유하는 정화된 공급물 스트림을 처리하여 정제 조건을 보정하는 단계;

[0083]

c. 단계 b의 결과로부터 관심 입자의 결합을 결정하는 단계; 및

[0084]

d. 선택된 단백질을 포함하는 비정화된 공급물 스트림을 처리하는 단계.

[0085]

상기 관심 입자는 전세포, 세포 단편, 바이러스 또는 단백질일 수 있다. 그것은 VLP, DNA, RNA, 항원, 리포솜, 올리고당류 또는 다당류일 수 있다.

[0086]

비드를 사용하여 방사형 유동 컬럼을 충전한 후, 비정화된 공급물 스트림의 실제 일상적인 정제 전에 정화된 공급물 스트림이 최적의 정제 조건을 보정하는 데에 사용된다. 이는 어떻게 단백질과 같은 관심 입자가 컬럼 (RFC, 제타셀(Zetacell)<sup>TM</sup>)에 결합하는지에 대한 이해를 제공한다. 비정화된 스트림의 정제를 위해서는, 순방향 및 역방향 세척 둘 다 세포/세포 단편 잔사를 제거하는 데에 사용될 수 있다. 규모 증대/도넛 형상 사용 전의 소규모 최적화에는 케이크 또는 윈추 형상이 사용될 수 있다. 상기 방법은 "모의 이동 층" ("SMB")/연속 공정과 연계되어 사용될 수 있다.

[0087]

크로마토그래피 동안 사용되는 반응물 시스템에 따라, 중합체 비드는 수축 및 팽창함으로써, 내부 세공 직경은 물론, (구형) 비드 사이의 간극 공간 둘 다 증가 및 감소되게 된다. 이는 실리카 및 CPG 입자에서는 발생하지 않지만, 모든 중합체 및 다당류 입자-기재 겔 층에서는 발생한다. 팽창 및 수축의 효과는 컬럼을 충전하는 데에 사용되며 일상적인 작업 동안 사용되는 완충제 시스템에 대한 관련 기술분야 통상 기술자의 신중한 선택에 의해 전체적으로, 거의 전체적으로 또는 적어도 부분적으로 조절될 수 있다.

[0088]

겔 층으로 중합체 비드를 함유하는 소형 방사형 유동 크로마토그래피 컬럼에서 직접적으로 정화된 공급물 스트림을 사용하여 공정을 최적화한 후, 층 길이를 유지하는 것, 외부 대 내부 프릿 면적의 비를 유지하는 것, 및 각 공정 단계 (정화 또는 비정화된 공급물 스트림의 적재, 세포, 세포 잔사 및 비-결합 물질을 제거하기 위한 순방향 및 역방향 세척, 직접적으로 포획된 표적을 고체 상으로부터 방출시키기 위한 용리, 후속 재사용을 위하여 컬럼 및 고체 상을 세척하고 준비하는 재생)에 있어서의 모든 작동 파라미터 (유량, 단위 시간 당 컬럼 부피 수, 완충제 조성, 체류 시간, 고체 상, 압력 및 온도)를 유지하는 것에 의해, 더 큰 공정 규모로의 선형 규모 증대가 달성될 수 있다. 임의의 시점에 대규모 정제 시스템을 재-보정하거나, 재-최적화하거나, 또는 달리 변화시킬 필요가 있는 경우, 관리가능하고 소형인 RFC 컬럼으로의 선형 규모 축소가 또한 층 길이를 유지하는 것, 외부 대 내부 프릿 면적의 비를 유지하는 것, 및 각 공정 단계 (정화 또는 비정화된 공급물 스트림의 적재, 세포, 세포 잔사 및 비-결합 물질을 제거하기 위한 순방향 및 역방향 세척, 직접적으로 포획된 표적을 고체 상으로부터 방출시키기 위한 용리, 후속 재사용을 위하여 컬럼 및 고체 상을 세척하고 준비하는 재생)에 있어서의 모든 작동 파라미터 (유량, 단위 시간 당 컬럼 부피 수, 완충제 조성, 체류 시간, 고체 상, 압력 및 온도)를 유지하는 것에 의해 달성된다.

[0089]

전기는 본 발명을 실시하기 위한 가능성 중 일부를 예시한다. 따라서, 구체적인 예로서의 실시양태가 기술되기

는 하였지만, 본 발명의 더 넓은 영역에서 벗어나지 않고도 이들 실시양태에 대하여 다양한 변형 및 변화가 이루어질 수 있어서; 본 발명의 영역 및 기술사상 내에서 많은 다른 실시양태가 가능하다는 것은 분명할 것이다. 개시내용을 간소화할 목적으로 단일 실시양태에서 다양한 특징들을 함께 그룹화하였다. 이와 같은 개시내용의 방법이 청구되는 실시양태가 각 청구항에서 명시적으로 언급되는 것에 비해 더 많은 특징을 가지고 있음을 반영하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 오히려, 하기 청구범위가 반영하는 바와 같이, 본 발명의 주제는 개시되는 단일 실시양태의 모든 특징 미만으로 존재한다. 따라서, 하기 청구범위는 본 발명의 상기 상세한 설명에 의거 개재되며, 각 청구항은 별도의 예시적인 실시양태로서 그 자체를 자리매김한다.

[0090]

본 문서에서 긍정적으로 확인되는 임의의 특징 또는 요소가 청구범위에서 한정되는 바와 같은 본 발명 실시양태의 특징 또는 요소로서는 명확하게 배제될 수도 있음을 염두에 두어 유의해야 한다. 긍정적으로 확인되는 (또는 명확한 것 또는 함축적인 것 중 어느 하나로 배제되는) 임의의 특징 또는 요소가 긍정적으로 확인되는 (또는 명확한 것 또는 함축적인 것 중 어느 하나로 배제되는) 임의의 다른 특징 또는 요소와의 조합으로서 사용될 수 있음을 또한 염두에 두어 유의해야 한다.