



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년09월30일

(11) 등록번호 10-2306419

(24) 등록일자 2021년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*B01D 15/18* (2006.01) *A61L 2/08* (2006.01)  
*B01D 15/20* (2006.01) *B01D 15/32* (2006.01)  
*B01D 15/34* (2006.01) *B01D 15/36* (2006.01)  
*B01D 15/38* (2006.01) *B01J 20/26* (2006.01)  
*B01J 20/281* (2006.01) *B01J 20/34* (2006.01)

(52) CPC특허분류

*B01D 15/1864* (2013.01)  
*A61L 2/081* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7022274

(22) 출원일자(국제) 2015년01월16일

심사청구일자 2020년01월15일

(85) 번역문제출일자 2016년08월16일

(65) 공개번호 10-2016-0111427

(43) 공개일자 2016년09월26일

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/011705

(87) 국제공개번호 WO 2015/109151

국제공개일자 2015년07월23일

(30) 우선권주장

61/928,929 2014년01월17일 미국(US)

62/001,498 2014년05월21일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

W02003045546 A1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

젠자임 코포레이션

미국 메사추세츠주 02142 캠프리지 50 비니 스트리트

(72) 발명자

고다왓, 라홀

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일 코드: 55에이-505에이 코포레이트 드라이브 55 사노피 내

워리쿠, 비나

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일 코드: 55에이-505에이 코포레이트 드라이브 55 사노피 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 조성호

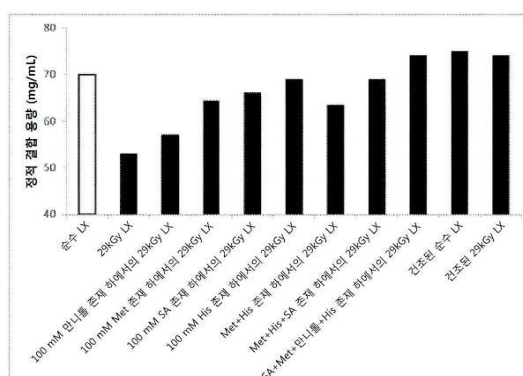
(54) 발명의 명칭 **멸균 크로마토그래피 수지 및 제조 공정에서 그 용도**

## (57) 요약

본원에서는, 크로마토그래피 수지의 바이오버든 저감(예를 들어, 멸균) 방법으로서, 크로마토그래피 수지 및 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제를 포함하는 조성물을 포함하는 용기를, 용기 및 크로마토그래피 수지의 바이오버든을 저감하기에 충분한 양의 감마선 조사에 노출시키는 단계를 포함하되, 적어도 하나의 항산화제

(뒷면에 계속)

**대표도** - 도14



및/또는 킬레이트제는 이러한 양의 감마선 조사에 노출 후/시의 크로마토그래피 수지의 결합 용량 손실을 개선하기에 충분한 양으로 존재하는, 방법이 제공된다. 또한, 저장된 바이오버든 크로마토그래피 수지를 포함하는 저장된 바이오버든 크로마토그래피 컬럼, 크로마토그래피 수지 및 적어도 하나의 킬레이트제 및/또는 항산화제를 포함하는 조성물, 이러한 저장된 바이오버든 크로마토그래피 컬럼들 중 하나를 사용하여 저장된 바이오버든 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 방법, 및 정제된 재조합 단백질의 저장된 바이오버든 제조를 위한 통합형 단힌 연속 공정이 제공된다.

(52) CPC특허분류

**B01D 15/20** (2013.01)  
**B01D 15/327** (2013.01)  
**B01D 15/34** (2013.01)  
**B01D 15/362** (2013.01)  
**B01D 15/363** (2013.01)  
**B01D 15/3804** (2013.01)  
**B01J 20/265** (2013.01)  
**B01J 20/281** (2013.01)  
**B01J 20/3441** (2013.01)

(72) 발명자

**파틸, 로한**

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일 코드: 55에  
 이-505에이 코포레이트 드라이브 55 사노피 내

**콘스탄티노브, 콘스탄틴**

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일 코드: 55에  
 이-505에이 코포레이트 드라이브 55 사노피 내

**르야칼라, 벤캣 키쇼어**

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일 코드: 55에  
 이-505에이 코포레이트 드라이브 55 사노피 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

크로마토그래피 수지의 바이오버든 저감 방법으로서,

- (i) 크로마토그래피 수지, 및
- (ii) 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제를 포함하는 액체

를 포함하는 조성물을 포함하는 용기를, 상기 용기 및 상기 크로마토그래피 수지의 바이오버든을 저감하기에 충분한 양의 감마선 조사에 노출시키는 단계

를 포함하며,

적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제가, 상기 양의 감마선 조사에 노출된 후의 크로마토그래피 수지의 결합 용량 손실을 개선하기에 충분한 양으로 존재하는 것인 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 용기가 저장 베셀인 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 용기가 크로마토그래피 컬럼인 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 용기는 충전된 크로마토그래피 컬럼인 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물이 상기 액체 중 상기 크로마토그래피 수지의 슬러리인 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 액체가 완충 용액인 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 액체가 환원 글루타티온, 환원 티오레독신, 환원 시스테인, 카로티노이드, 멜라토닌, 리코펜, 토코페롤, 환원 유비퀴논, 아스코르브산염, 빌리루빈, 요산, 리포산, 플라보노이드, 페놀프로파노이드산, 리도카인, 나린제닌, 플러렌, 글루코오스, 만니톨, 4-하이드록시-2,2,6,6-테트라메틸피페리딘-1-옥실, 및 디메틸메톡시 크로마놀로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 항산화제를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 액체가 만니톨, 아스코르브산 나트륨, 히스티딘, 및 메티오닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 항산화제를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 액체가 만니톨, 아스코르브산 나트륨, 히스티딘, 및 메티오닌을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 상기 액체가

- (i) 75 mM 내지 125 mM의 만니톨,

- (ii) 75 mM 내지 125 mM의 메티오닌,
- (iii) 75 mM 내지 125 mM의 아스코르브산 나트륨,
- (iv) 75 mM 내지 125 mM의 히스티딘,
- (v) 30 mM 내지 70 mM의 메티오닌, 및  
30 mM 내지 70 mM의 히스티딘,
- (vi) 10 mM 내지 50 mM의 메티오닌,  
10 mM 내지 50 mM의 히스티딘, 및  
10 mM 내지 50 mM의 아스코르브산 나트륨, 또는
- (vii) 5 mM 내지 45 mM의 아스코르브산 나트륨,  
5 mM 내지 45 mM의 메티오닌,  
5 mM 내지 45 mM의 만니톨, 및  
5 mM 내지 45 mM의 히스티딘

을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 액체가 15 mM 내지 35 mM의 만니톨, 15 mM 내지 35 mM의 아스코르브산 나트륨, 15 mM 내지 35 mM의 히스티딘, 및 15 mM 내지 35 mM의 메티오닌을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 상기 액체가 20 mM 내지 30 mM의 만니톨, 20 mM 내지 30 mM의 아스코르브산 나트륨, 20 mM 내지 30 mM의 히스티딘, 및 20 mM 내지 30 mM의 메티오닌을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 13

제1항에 있어서, 상기 액체가 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 2,3-디메르캅토-1-프로판설폰산 나트륨(DMPs), 디메르캅토숙신산(DMSA), 금속티오닌, 및 데스페록사민으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 킬레이트제를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 14

제1항에 있어서, 상기 조성물이 음이온 교환 크로마토그래피 수지, 양이온 교환 크로마토그래피 수지, 친화성 크로마토그래피 수지, 소수성 상호작용 크로마토그래피 수지, 및 크기 배제 크로마토그래피 수지로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 크로마토그래피 수지를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 조성물이 음이온 교환 크로마토그래피 수지를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 상기 음이온 교환 크로마토그래피 수지가 N-벤질-N-메틸-에탄올아민기를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 17

제1항에 있어서, 상기 감마선 조사의 양이 15 kGy 내지 45 kGy인 방법.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, 상기 감마선 조사의 양이 20 kGy 내지 30 kGy인 방법.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, 상기 감마선 조사의 양이 23 kGy 내지 27 kGy인 방법.

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

**청구항 23**

삭제

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

삭제

**청구항 26**

삭제

**청구항 27**

삭제

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

삭제

**청구항 31**

삭제

**청구항 32**

삭제

**청구항 33**

삭제

**청구항 34**

삭제

**청구항 35**

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83



삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2014년 1월 17일에 출원된 미국 특허 가출원 제61/928,929호 및 2014년 5월 21일에 출원된 미국 특허 가출원 제62/001,498호의 우선권을 주장하며, 이들 각각은 그 전체로 본원에 참조로 통합된다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 생명공학기술의 방법 및 재조합 단백질의 바이오 제조에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0005] 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 포유류 세포는 치료상 또는 상업적으로 중요한 단백질을 제조하기 위해 흔히 사용된다. 다양한 제품 경로의 현재 상황에서, 생명공학 회사들은 치료 단백질 의약품 물질의 매우 유연하고 비용 효과적인 제조를 위한 혁신적 해결책을 점점 더 개발해야 하는 상황에 놓여있다. 재조합 단백질을 효율적으로 분리시키기 위한 전략 중 하나는(예를 들어, 단힌 시스템을 이용한) 연속 크로마토그래피를 포함하는 공정을 통한 것이다. 연속 크로마토그래피의 알려진 하나의 한계는 시스템 내 오염 제제의 존재(예를 들어, 바이오버든의 증가)이며, 이는 오염된 제품, 제품 수율의 저하, 및 시스템 내 유량의 감소(또는 압력 증가)를 초래한다. 예를 들어, 시스템 내에서 증가된 바이오버든은 시스템을 완전히 중단시킬 수 있다.

## 발명의 내용

[0006]

본 발명은 적어도 일부, 크로마토그래피 수지에 대한 감마선 조사가 크로마토그래피 수지의 결합 용량을 저하시킨다는 발견에 기반을 두고 있다. 이 발견의 관점에서, 본원에서는 크로마토그래피 수지의 바이오버든 저감 방법으로서, 크로마토그래피 수지 및 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제를 포함하는 조성물을 포함하는 용기를, 용기 및 크로마토그래피 수지의 바이오버든을 저감하기에 충분한 양의 감마선 조사에 노출시키는 단계를 포함하되, 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제는 이러한 양의 감마선 조사에 노출 후/시의 크로마토그래피 수지의 결합 용량 손실을 개선하기에 충분한 양으로 존재하는, 방법이 제공된다. 또한, 크로마토그래피 수지의 바이오버든 저감 방법으로서, 크로마토그래피 수지(및 선택적으로 감마선 조사에 노출 후/시의 크로마토그래피 수지의 결합 용량 손실을 개선하기에 충분한 양의 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제)를 포함하는 조성물을 포함하는 용기를, 용기 및 크로마토그래피 수지의 바이오버든을 저감하기에 충분한 양의 감마선 조사를 위해, 약 0.1 kGy/시간 내지 약 6 kGy/시간의 속도 및/또는 약 4℃ 내지 약 25℃의 온도에서 감마선 조사에 노출시키는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다. 또한, 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 저장된 바이오버든 크로마토그래피 수지를 함유하는 저장된 바이오버든 크로마토그래피 컬럼, 크로마토그래피 수지 및 적어도 하나의 킬레이트제 및/또는 항산화제를 포함하는 조성물, 이러한 저장된 바이오버든 크로마토그래피 컬럼들 중 적어도 하나를 사용하여 저장된 바이오버든 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 방법, 및 이러한 저장된 바이오버든 크로마토그래피 컬럼들 중 적어도 하나의 사용을 포함하는 정제된 제조할 단백질의 저장된 바이오버든 제조를 위한 통합형, 단힌 또는 실질적으로 단힌, 연속 공정이 제공된다. 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 임의의 크로마토그래피 수지, 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 임의의 충전된 크로마토그래피 컬럼, 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 임의의 방법, 및 본원에 기술된 임의의 공정은 멸균, 완전 멸균, 무균, 또는 저장된 바이오버든 상태일 수 있다. 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 임의의 크로마토그래피 수지, 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 임의의 크로마토그래피 컬럼, 및 본원에 기술된 임의의 공정은 무균 및 멸균, 완전 멸균, 무균, 또는 저장된 바이오버든 상태일 수 있다.

[0007]

크로마토그래피 수지의 바이오버든 저감 방법으로서, 크로마토그래피 수지 및 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제를 포함하는 조성물을 포함하는 용기를, 용기 및 크로마토그래피 수지의 바이오버든을 저감하기에 충분한 양의 감마선 조사에 노출시키는 단계를 포함하되, 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제는 이러한 양의 감마선 조사에 노출 후의 크로마토그래피 수지의 결합 용량 손실을 개선하기에 충분한 양으로 존재하는, 방법이 본원에 제공된다. 이러한 방법의 일부 구현에는, 노출 이전에, 조성물을 용기 안에 배치하는 단계를 더 포함한다. 일부 예에서, 조사는 약 0.1 kGy/시간 내지 약 6 kGy/시간의 속도 및/또는 약 4℃ 내지 약 25℃의 온도에서 수행된다. 임의의 이러한 방법의 일부 예에서, 용기는 저장 베셀(vessel), 크로마토그래피 컬럼, 또는 충전된 크로마토그래피 컬럼이다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 예에서, 조성물은 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제를 포함하는 액체에 침전된 크로마토그래피 수지의 슬러리이다. 일부 예에서, 액체는, (i) 75 mM 내지 약 125 mM(예를 들어, 80 mM 내지 약 120 mM, 약 85 mM 내지 약 115 mM, 약 90 mM 내지 약 110 mM, 또는 약 95 mM 내지 약 105 mM)의 만니톨; (ii) 75 mM 내지 약 125 mM(예를 들어, 약 80 mM 내지 약 120 mM, 약 85 mM 내지 약 115 mM, 약 90 mM 내지 약 110 mM, 또는 약 95 mM 내지 약 105 mM)의 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온); (iii) 75 mM 내지 약 125 mM(예를 들어, 약 80 mM 내지 약 120 mM, 약 85 mM 내지 약 115 mM, 약 90 mM 내지 약 110 mM, 또는 약 95 mM 내지 약 105 mM)의 아스코르브산 나트륨; (iv) 75 mM 내지 약 125 mM(예를 들어, 약 80 mM 내지 약 120 mM, 약 85 mM 내지 약 115 mM, 약 90 mM 내지 약 110 mM, 또는 약 95 mM 내지 약 105 mM)의 히스티딘; (v) 30 mM 내지 약 70 mM(예를 들어, 약 35 mM 내지 약 65 mM, 약 40 mM 내지 약 60 mM, 또는 약 45 mM 내지 약 55 mM)의 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온) 및 약 30 mM 내지 약 70 mM(예를 들어, 약 35 mM 내지 약 65 mM, 약 40 mM 내지 약 60 mM, 또는 약 45 mM 내지 약 55 mM)의 히스티딘; (vi) 약 10 mM 내지 약 50 mM(예를 들어, 약 15 mM 내지 약 45 mM, 약 20 mM 내지 약 40 mM, 또는 약 25 mM 내지 약 35 mM)의 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온), 약 10 mM 내지 약 50 mM(예를 들어, 약 15 mM 내지 약 45 mM, 약 20 mM 내지 약 40 mM, 또는 약 25 mM 내지 약 35 mM)의 히스티딘, 및 약 10 mM 내지 약 50 mM(예를 들어, 약 15 mM 내지 약 45 mM, 약 20 mM 내지 약 40 mM, 또는 약 25 mM 내지 약 35 mM)의 아스코르브산 나트륨; 또는 (vii) 약 5 mM 내지 약 45 mM(예를 들어, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 또는 약 20 mM 내지 약 30 mM)의 아스코르브산 나트륨, 약 5 mM 내지 약 45 mM(예를 들어, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 또는 약 20 mM 내지 약 30 mM)의 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온), 약 5 mM 내지 약 45 mM(예를 들어, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 또는 약 20 mM 내지 약 30 mM)의 만니톨, 및 약 5 mM 내지 약 45 mM(예를 들어, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 또는 약 20 mM 내지 약 30 mM)의 히스티딘을 포함한다. 일부 예에서, 액체는 완충 용액(예를 들어, 인산염 완충 용액, 예를 들어, pH 6.0의 50 mM 인산 나트륨과 같은 인산 나트

를 완충 용액)이다.

[0008] 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 예에서, 조성물은 고체 혼합물이다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 조성물은 환원 글루타티온, 환원 티오레독신, 환원 시스테인, 카로티노이드, 멜라토닌, 리코펜, 토코페롤, 환원 유비퀴논, 아스코르브산염, 빌리루빈, 요산, 리포산, 플라보노이드, 페놀프로파노이드산, 리도카인, 나린제닌, 플러렌, 글루코오스, 만니톨, 4-하이드록시-2,2,6,6-테트라메틸피페리딘-1-옥실, 및 디메틸메톡시 크로마놀의 군으로부터 선택된 적어도 하나의 항산화제를 포함한다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 조성물은 만니톨, 아스코르브산 나트륨, 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온), 및 히스티딘으로부터 선택된 적어도 하나(1, 2, 3, 또는 4개)의 항산화제를 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 만니톨, 아스코르브산 나트륨, 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온), 및 히스티딘을 포함한다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 조성물은 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 2,3-디메르캅토-1-프로판설폰산 나트륨(DMPS), 디메르캅토숙신산(DMSA), 금속티오닌, 및 테스페룩사민의 군으로부터 선택된 적어도 하나의 킬레이트제를 포함한다.

[0009] 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 예에서, 조성물은 음이온 교환 크로마토그래피 수지, 양이온 교환 크로마토그래피 수지, 친화성 또는 유사-친화성 크로마토그래피 수지, 소수성 상호작용 크로마토그래피 수지, 및 크기 배제 크로마토그래피 수지(또는 이들의 임의의 조합)의 군으로부터 선택된 적어도 하나의 크로마토그래피 수지를 포함한다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 예에서, 크로마토그래피 수지는 다중 모드(예를 들어, 이중 모드) 크로마토그래피 수지(예를 들어, 음이온 교환기 및 소수성 상호작용기를 가진 크로마토그래피 수지, 또는 양이온 교환기 및 소수성 상호작용기 둘 다 가진 크로마토그래피 수지)일 수 있다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 예에서, 조성물은 단백질 리간드(예를 들어, 단백질 A 또는 단백질 G)를 포함하는 친화성 크로마토그래피 수지를 포함한다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 예에서, 조성물은 음이온 교환 크로마토그래피 수지(예를 들어, N-벤질-N-메틸-에탄올아민기를 포함하는 음이온 교환 크로마토그래피 수지)를 포함한다.

[0010] 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 예에서, 조사량은 약 2 kGy 내지 약 45 kGy(예를 들어, 약 20 kGy 내지 약 30 kGy, 약 23 kGy 내지 약 27 kGy, 약 2 kGy 내지 약 40 kGy, 약 2 kGy 내지 약 35 kGy, 약 2 kGy 내지 약 30 kGy, 약 2 kGy 내지 약 25 kGy, 약 10 kGy 내지 약 45 kGy, 약 10 kGy 내지 약 40 kGy, 약 10 kGy 내지 약 35 kGy, 약 10 kGy 내지 약 30 kGy, 또는 약 10 kGy 내지 약 25 kGy)일 수 있다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 노출은 약 -25℃ 이상 약 0℃ 이하, 또는 약 0℃ 이상 약 25℃ 이하(예를 들어, 약 4℃ 내지 약 25℃)의 온도에서 수행된다.

[0011] 또한, 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 저감된 바이오버든 크로마토그래피 수지가 제공된다. 일부 예에서, 본원에 제공된 임의의 저감된 바이오버든 크로마토그래피 수지는 약  $1 \times 10^{-8}$  내지 약  $1 \times 10^{-5}$ (예를 들어, 약  $1 \times 10^{-7}$  내지 약  $1 \times 10^{-6}$ )의 평균 보증 수준(SAL)을 갖는다. 예를 들어, 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 크로마토그래피 수지는 저감된 바이오버든을 가질 수 있거나, 멸균, 무균, 또는 완전 멸균 상태이다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 크로마토그래피 수지는 무균 상태이고 저감된 바이오버든을 가질 수 있거나, 멸균되거나 완전 멸균된 것일 수 있다. 본원에 제공된 임의의 저감된 바이오버든 크로마토그래피 수지의 일부 예는 음이온 교환 크로마토그래피 수지, 양이온 교환 크로마토그래피 수지, 친화성 또는 유사-친화성 크로마토그래피 수지, 소수성 상호작용 크로마토그래피 수지, 및 크기 배제 크로마토그래피 수지의 군으로부터 선택된 적어도 하나의 수지를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 저감된 바이오버든 크로마토그래피 수지는 단백질 리간드(예를 들어, 단백질 A 또는 단백질 G)를 포함하는 친화성 크로마토그래피 수지를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 저감된 바이오버든 크로마토그래피 수지는 음이온 교환 크로마토그래피 수지(예를 들어, N-벤질-N-메틸-에탄올아민기를 포함하는 음이온 교환 크로마토그래피 수지)를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 저감된 바이오버든 크로마토그래피 수지는 다중 모드 크로마토그래피 수지(예를 들어, 이중 모드 크로마토그래피 수지)이다.

[0012] 또한, 저감된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼을 제조하는 방법으로서, 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 임의의 저감된 바이오버든 크로마토그래피 수지를 제공하는 단계; 및 무균 환경에서 크로마토그래피 수지를 저감된 바이오버든 컬럼에 충전시키는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다. 또한, 크로마토그래피 컬럼 내에 포함된 충전된 크로마토그래피 수지 및 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제를 포함하는 조성물(예를 들어, 본원에 제공된 임의의 예시적 조성물)에 감마선을 조사하여 제조된 저감된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼이 제공된다. 본원에 제공된 임의의 저감된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼은 약  $1 \times 10^{-8}$  내지

약  $1 \times 10^{-5}$  (예를 들어, 약  $1 \times 10^{-7}$  내지 약  $1 \times 10^{-6}$ )의 멸균 보증 수준(SAL)을 가질 수 있다. 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 임의의 크로마토그래피 컬럼은 저장된 바이오버튼을 갖거나, 멸균, 완전 멸균, 또는 무균 상태일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 임의의 크로마토그래피 컬럼은 무균 상태일 수 있고, 저장된 바이오버튼을 갖거나, 멸균, 또는 완전 멸균된 것일 수 있다.

[0013] 본원에 제공된 임의의 저장된 충전 크로마토그래피 컬럼의 일부 구현예에서, 충전된 컬럼 내 수지는 음이온 교환 크로마토그래피 수지, 양이온 교환 크로마토그래피 수지, 친화성 크로마토그래피 수지, 소수성 상호작용 크로마토그래피 수지, 및 크기 배제 크로마토그래피 수지의 군으로부터 선택된 적어도 하나의 수지를 포함한다. 본원에 제공된 임의의 저장된 바이오버튼 충전 크로마토그래피 컬럼의 일부 구현예에서, 수지는 단백질 리간드 (예를 들어, 단백질 A 또는 단백질 G)를 포함하는 친화성 크로마토그래피 수지를 포함한다. 본원에 제공된 임의의 저장된 바이오버튼 충전 크로마토그래피 컬럼의 일부 예에서, 수지는 음이온 교환 크로마토그래피 수지를 포함한다(예를 들어, 음이온 교환 크로마토그래피 수지는 N-벤질-N-메틸-에탄올아민기를 포함한다).

[0014] 또한, 크로마토그래피 수지 및 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제를 포함하되, 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제는 조성물의 바이오버튼을 저장하기에 충분한 양의 감마선 조사로 처리할 때의 크로마토그래피 수지의 결합 용량 손실을 개선하기에 충분한 양으로 존재하는, 조성물이 제공된다. 본원에 제공된 임의의 조성물의 일부 예에서, 조성물은 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제를 포함하는 액체에 침전된 크로마토그래피 수지의 슬러리이다. 일부 예에서, 액체는, (i) 75 mM 내지 약 125 mM(예를 들어, 80 mM 내지 약 120 mM, 약 85 mM 내지 약 115 mM, 약 90 mM 내지 약 110 mM, 또는 약 95 mM 내지 약 105 mM)의 만니톨; (ii) 75 mM 내지 약 125 mM(예를 들어, 약 80 mM 내지 약 120 mM, 약 85 mM 내지 약 115 mM, 약 90 mM 내지 약 110 mM, 또는 약 95 mM 내지 약 105 mM)의 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온); (iii) 75 mM 내지 약 125 mM(예를 들어, 약 80 mM 내지 약 120 mM, 약 85 mM 내지 약 115 mM, 약 90 mM 내지 약 110 mM, 또는 약 95 mM 내지 약 105 mM)의 아스코르브산 나트륨; (iv) 75 mM 내지 약 125 mM(예를 들어, 약 80 mM 내지 약 120 mM, 약 85 mM 내지 약 115 mM, 약 90 mM 내지 약 110 mM, 또는 약 95 mM 내지 약 105 mM)의 히스티딘; (v) 30 mM 내지 약 70 mM(예를 들어, 약 35 mM 내지 약 65 mM, 약 40 mM 내지 약 60 mM, 또는 약 45 mM 내지 약 55 mM)의 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온) 및 약 30 mM 내지 약 70 mM(예를 들어, 약 35 mM 내지 약 65 mM, 약 40 mM 내지 약 60 mM, 또는 약 45 mM 내지 약 55 mM)의 히스티딘; (vi) 약 10 mM 내지 약 50 mM(예를 들어, 약 15 mM 내지 약 45 mM, 약 20 mM 내지 약 40 mM, 또는 약 25 mM 내지 약 35 mM)의 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온), 약 10 mM 내지 약 50 mM(예를 들어, 약 15 mM 내지 약 45 mM, 약 20 mM 내지 약 40 mM, 또는 약 25 mM 내지 약 35 mM)의 히스티딘, 및 약 10 mM 내지 약 50 mM(예를 들어, 약 15 mM 내지 약 45 mM, 약 20 mM 내지 약 40 mM, 또는 약 25 mM 내지 약 35 mM)의 아스코르브산 나트륨; 또는 (vii) 약 5 mM 내지 약 45 mM(예를 들어, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 또는 약 20 mM 내지 약 30 mM)의 아스코르브산 나트륨, 약 5 mM 내지 약 45 mM(예를 들어, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 또는 약 20 mM 내지 약 30 mM)의 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온), 약 5 mM 내지 약 45 mM(예를 들어, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 또는 약 20 mM 내지 약 30 mM)의 만니톨, 및 약 5 mM 내지 약 45 mM(예를 들어, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 또는 약 20 mM 내지 약 30 mM)의 히스티딘을 포함한다. 일부 예에서, 액체는 완충 용액(예를 들어, 인산염 완충 용액, 예를 들어, pH 6.0의 50 mM 인산 나트륨과 같은 인산 나트륨 완충 용액)이다.

[0015] 본원에 제공된 임의의 조성물의 일부 예에서, 조성물은 고체 혼합물이다.

[0016] 본원에 제공된 임의의 조성물의 일부 구현예는 환원 글루타티온, 환원 티오레독신, 환원 시스테인, 카로티노이드, 멜라토닌, 리코펜, 토코페롤, 환원 유비퀴논, 아스코르브산염, 빌리루빈, 요산, 리포산, 플라보노이드, 페놀프로파노이드산, 리도카인, 나린제닌, 플러렌, 글루코오스, 만니톨, 4-하이드록시-2,2,6,6-테트라메틸피페리딘-1-옥실, 및 디메틸메톡시 크로마놀의 군으로부터 선택된 적어도 하나의 항산화제를 포함할 수 있다. 본원에 제공된 임의의 조성물의 일부 구현예는 만니톨, 아스코르브산 나트륨, 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온), 및 히스티딘으로부터 선택된 적어도 하나(1, 2, 3, 또는 4개)의 항산화제를 포함할 수 있다. 본원에 제공된 임의의 조성물의 일부 예는 만니톨, 아스코르브산 나트륨, 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온), 및 히스티딘을 포함한다. 본원에 제공된 임의의 조성물의 일부 예는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 2,3-디메르캅토-1-프로판설폰산 나트륨(DMPS), 디메르캅토숙신산(DMSA), 금속티오닌, 및 데스페록사민의 군으로부터 선택된 적어도 하나의 킬레이트제를 포함할 수 있다. 본원에 제공된 임의의 조성물의 일부 예에서, 크로마토그래피 수지는 음이온 교환 크로마토그래피 수지, 양이온 교환 크로마토그래피 수지, 친화성 크로마토그래피 수지, 소수성 상호작용 크로마토그래피 수지, 및 크기 배제 크로마토그래피 수지의 군으로부터 선택



된 적어도 하나의 수지를 포함할 수 있다. 본원에 제공된 임의의 조성물의 일부 예에서, 수지는 단백질 리간드(예를 들어, 단백질 A 또는 단백질 G)를 포함하는 친화성 크로마토그래피 수지를 포함한다.

[0017] 또한, 저장된 바이오버든 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 방법으로서, (a) 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 임의의 저장된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼을 제공하는 단계; 및 (b) 닫힌 시스템에서 저장된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼 및 저장된 바이오버든 완충액을 사용하여 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 예에서, 저장된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼을 사용하는 저장된 바이오버든 컬럼 크로마토그래피는 적어도 4일(예를 들어, 적어도 5일, 적어도 7일, 적어도 14일, 적어도 28일, 또는 적어도 60일)의 기간 동안 연속적으로 수행된다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, (a) 단계의 저장된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼 내의 수지는 감마선 조사 처리되지 않은 동일한 수지에 비해 약 65% 내지 약 100%(예를 들어, 약 75% 내지 약 100%)의 백분율 결합 용량을 갖는다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 저장된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼 내의 수지는 음이온 교환 크로마토그래피 수지, 양이온 교환 크로마토그래피 수지, 친화성 또는 유사-친화성 크로마토그래피 수지, 소수성 상호작용 크로마토그래피 수지, 및 크기 배제 크로마토그래피 수지의 군으로부터 선택된 적어도 하나의 수지를 포함한다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 예에서, 수지는 단백질 리간드(예를 들어, 단백질 A 또는 단백질 G)를 포함하는 친화성 크로마토그래피 수지를 포함한다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, 수지는 음이온 교환 크로마토그래피 수지를 포함한다.

[0018] 또한, 정제된 재조합 단백질의 저장된 바이오버든 제조를 위한 통합형, 닫힌 또는 실질적으로 닫힌, 연속 공정으로서, (a) 세포가 실질적으로 존재하지 않는 재조합 단백질을 포함하는 액체 배양 배지를 제공하는 단계; 및 (b) 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 임의의 저장된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼들 중 적어도 하나를 포함하는 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템(MCCS)에 액체 배양 배지를 연속적으로 공급하는 단계를 포함하되, 저장된 바이오버든 완충액을 사용하고, 통합형이며, 액체 배양 배지부터 정제 재조합 단백질인 MCCS로부터의 용출액까지 연속적으로 진행되는 공정이 제공된다. 본원에 기술된 임의의 공정의 일부 구현예에서, MCCS는 적어도 두 개의 상이한 단위 조작(unit operation)을 수행한다. 본원에 기술된 임의의 공정의 일부 구현예에서, 공정은 컬럼 스위칭을 포함한다. 본원에 기술된 임의의 공정의 일부 예에서, MCCS는 재조합 단백질 포집 및 바이러스 비활성화의 단위 조작을 수행하거나, 재조합 단백질 포집 및 정제의 단위 조작을 수행한다.

[0019] 본원에 기술된 임의의 공정의 일부 구현예에서, MCCS는 적어도 두 개의 저장된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼을 포함한다. 본원에 기술된 임의의 공정의 일부 예에서, MCCS는 주기적 역류 크로마토그래피 시스템(periodic counter current chromatography system)이다. 본원에 기술된 임의의 공정의 일부 예에서, MCCS는 친화성 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피, 또는 크기 배제 크로마토그래피, 또는 이들의 임의의 조합에 대한 복수의 컬럼을 포함한다. 본원에 기술된 임의의 방법의 일부 구현예에서, MCCS는 친화성 크로마토그래피에 대한 컬럼을 포함하고, 친화성 크로마토그래피는 공정에서 단백질 A-결합 포집 메커니즘, 기질-결합 포집 메커니즘, 항체- 또는 항체 단편-결합 포집 메커니즘, 아프타머-결합 포집 메커니즘, 및 공동 인자-결합 포집 메커니즘의 군으로부터 선택된 포집 메커니즘을 이용하여 수행된다. 본원에 기술된 임의의 공정의 일부 예에서, 친화성 크로마토그래피는 공정에서 단백질 A-결합 포집 메커니즘을 이용하여 수행되고, 재조합 단백질은 항체 또는 항체 단편이다.

[0020] 또한, 정제된 재조합 단백질의 저장된 바이오버든 제조를 위한 통합형, 닫힌 또는 실질적으로 닫힌, 연속 공정으로서, (a) 세포가 실질적으로 존재하지 않는 재조합 단백질을 포함하는 액체 배양 배지를 제공하는 단계; (b) 액체 배양 배지를 제1 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템(MCCS1)에 연속적으로 공급하는 단계; (c) MCCS1을 이용하여 액체 배양 배지에서 재조합 단백질을 포집하는 단계; (d) 재조합 단백질을 포함하는 MCCS1으로부터 용출액을 제조하고 용출액을 제2 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템(MCCS2)에 연속적으로 공급하는 단계; 및 (e) 용출액으로부터의 재조합 단백질을 MCCS2에 연속적으로 공급한 후 재조합 단백질을 용출시켜 정제된 재조합 단백질을 제조하는 단계를 포함하되, 저장된 바이오버든 완충액을 사용하고, 통합형이며, 액체 배양 배지부터 정제 재조합 단백질까지 연속적으로 진행되며, MCCS1 및/또는 MCCS2의 적어도 하나의 컬럼은 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 임의의 저장된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼들 중 적어도 하나를 포함하는, 공정이 제공된다. 본원에 기술된 임의의 공정의 일부 구현예에서, MCCS1 및/또는 MCCS2는 적어도 두 개의 상이한 단위 조작을 수행한다. 본원에 기술된 임의의 공정의 일부 예는 컬럼 스위칭을 포함한다. 본원에 기술된 임의의 공정의 일부 예에서, MCCS1은 재조합 치료 단백질 포집 및 바이러스 비활성화의 단위 조작을 수행한다. 본원에 제공된 임의의 공정의 일부 구현예에서, MCCS2는 재조합 단백질 정제 및 폴리싱의 단위 조작을 수행한다. 본원에 제공된 임의의 공정의 일부 구현예에서, MCCS1 및/또는 MCCS2는 적어도 두 개의 크로마토그래피 컬럼을 포함한다.

본원에 기술된 임의의 공정의 일부 예에서, MCCS1은 제1 주기적 역류 크로마토그래피 시스템(PCCS1)이다. 본원에 기술된 임의의 공정의 일부 예에서, 포집은 친화성 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피, 또는 크기 배제 크로마토그래피, 또는 이들의 임의의 조합을 이용하여 수행된다. 본원에 기술된 임의의 공정의 일부 예에서, 친화성 크로마토그래피는 단백질 A-결합 포집 메커니즘, 기질-결합 포집 메커니즘, 항체- 또는 항체 단편-결합 포집 메커니즘, 아프타머-결합 포집 메커니즘, 및 공동 인자-결합 포집 메커니즘의 군으로부터 선택된 포집 메커니즘을 이용하여 수행된다. 본원에 기술된 임의의 공정의 일부 구현예에서, 친화성 크로마토그래피는 단백질 A-결합 포집 메커니즘을 이용하여 수행되고, 재조합 단백질은 항체 또는 항체 단편이다.

[0021] 본원에 기술된 임의의 공정의 일부 구현예에서, MCCS2는 제2 주기적 역류 크로마토그래피 시스템(PCCS2)이다. 본원에 기술된 임의의 공정에서, 재조합 단백질은 치료 재조합 단백질이다. 본원에 기술된 임의의 공정의 일부 구현예는 정제된 치료 재조합 단백질을 약학 조성물로 제형화하는 단계를 더 포함한다. 본원에 기술된 임의의 공정의 일부 구현예는 적어도 4일(예를 들어, 적어도 5일, 적어도 7일, 적어도 14일, 또는 적어도 28일)의 기간 동안 연속적으로 수행될 수 있다.

[0022] 또한, 크로마토그래피의 바이오버든 저감 방법으로서, (a) 실질적으로 건조된 크로마토그래피 수지를 포함하는 용기를, 용기 및 크로마토그래피 수지의 바이오버든을 저감하기에 충분한 양의 감마선 조사에 노출시키는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다. 이러한 방법의 일부 구현예는 (a) 단계 이전에 크로마토그래피 수지를 건조하여 크로마토그래피 수지로부터 액체를 제거하는 단계를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 실질적으로 건조된 크로마토그래피 수지는 상당량의 항산화제 또는 상당량의 킬레이트제를 함유하지 않는다. 일부 구현예에서, 용기는 저장 베셀이다. 일부 구현예에서, 크로마토그래피 수지는 물품(예를 들어, 칩, 멤브레인, 또는 카세트)의 표면에 공유 부착된다. 일부 구현예에서, 크로마토그래피 수지는 단백질 리간드(예를 들어, 단백질 A 또는 단백질 G)를 포함한다. 일부 구현예에서, 크로마토그래피 수지는 음이온 교환 크로마토그래피 수지(예를 들어, N-벤질-N-메틸-에탄올아민기를 포함하는 크로마토그래피 수지)이다. 일부 구현예에서, 조사량은 약 15 kGy 내지 약 45 kGy(예를 들어, 약 20 kGy 내지 약 30 kGy)이다. 또한, 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 저감된 바이오버든 크로마토그래피 수지가 제공된다. 일부 구현예에서, 제조된 저감된 바이오버든 크로마토그래피 수지는 약  $1 \times 10^{-8}$  내지 약  $1 \times 10^{-5}$ 의 평균 보증 수준(SAL)(예를 들어, 약  $1 \times 10^{-7}$  내지 약  $1 \times 10^{-6}$ 의 SAL)을 갖는다. 일부 구현예에서, 저감된 크로마토그래피 수지는 음이온 교환 크로마토그래피 수지, 양이온 교환 크로마토그래피 수지, 친화성 크로마토그래피 수지, 소수성 상호작용 크로마토그래피 수지, 및 크기 배제 크로마토그래피 수지의 군으로부터 선택된 적어도 하나의 수지를 포함한다. 일부 구현예에서, 저감된 크로마토그래피 수지는 단백질 리간드(예를 들어, 단백질 A)를 포함하는 친화성 크로마토그래피 수지를 포함한다. 일부 구현예에서, 저감된 크로마토그래피 수지는 음이온 교환 크로마토그래피 수지(예를 들어, N-벤질-N-메틸-에탄올아민기를 포함하는 음이온 교환 크로마토그래피 수지)를 포함한다. 또한, 저감된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼을 제조하는 방법으로서, 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 저감된 바이오버든 크로마토그래피 수지를 제공하는 단계; 및 무균 환경에서 크로마토그래피 수지를 저감된 바이오버든 컬럼에 충전시키는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다. 또한, 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 저감된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼이 제공된다.

[0023] 또한, 정제된 재조합 단백질의 저감된 바이오버든 제조를 위한 통합형 단힌 연속 공정으로서, (a) 세포가 실질적으로 존재하지 않는 재조합 단백질을 포함하는 액체 배양 배지를 제공하는 단계; 및 (b) 본원에 제공된 임의의 방법에 의해 제조된 적어도 하나의 저감된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼을 포함하는 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템(MCCS)에 액체 배양 배지를 연속적으로 공급하는 단계를 포함하되, 저감된 바이오버든 완충액을 사용하고, 통합형이며, 액체 배양 배지부터 정제 재조합 단백질인 MCCS로부터의 용출액까지 연속적으로 진행되는, 공정이 제공된다. 또한, 정제된 재조합 단백질의 저감된 바이오버든 제조를 위한 통합형 단힌 연속 공정으로서, (a) 세포가 실질적으로 존재하지 않는 재조합 단백질을 포함하는 액체 배양 배지를 제공하는 단계; (b) 액체 배양 배지를 제1 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템(MCCS1)에 연속적으로 공급하는 단계; (c) MCCS1을 이용하여 액체 배양 배지에서 재조합 단백질을 포집하는 단계; (d) 재조합 단백질을 포함하는 MCCS1으로부터 용출액을 제조하고 용출액을 제2 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템(MCCS2)에 연속적으로 공급하는 단계; 및 (e) 용출액으로부터의 재조합 단백질을 MCCS2에 연속적으로 공급한 후 재조합 단백질을 용출시켜 정제된 재조합 단백질을 제조하는 단계를 포함하되, 저감된 바이오버든 완충액을 사용하고, 통합형이며, 액체 배양 배지부터 정제된 재조합 단백질까지 연속적으로 진행되며, MCCS1 및/또는 MCCS2의 적어도 하나의 컬럼은 본원에 제공된 임의의 방법에 의해 제조된 저감된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼을 포함하는, 공정이 제공된다.

- [0024] 본원에서 사용된 단수 명사는 하나 이상의 특정 명사를 나타낸다. 예를 들어, 어구 "저감된 바이오버든 크로마토그래피 컬럼"은 "하나 이상의 저감된 바이오버든 크로마토그래피 컬럼"을 의미한다.
- [0025] 용어 "바이오버든"은 당해 분야에 공지되어 있으며, 조성물(예를 들어, 고체 또는 액체) 및/또는 물품(들)의 표면(예를 들어, 외부 표면 및/또는 내부 표면)에 존재하는 자기 복제 생물학적 오염물의 수준을 의미한다. 예를 들어, 바이오버든은 크로마토그래피 수지 또는 충전된 크로마토그래피 수지를 함유한 조성물에 존재하는 자기 복제 생물학적 오염물(예를 들어, 충전된 크로마토그래피 컬럼에 충전된 크로마토그래피 수지에 존재하는 자기 복제 생물학적 오염물)을 의미할 수 있다. 다른 예에서, 바이오버든은 크로마토그래피 컬럼의 내면 및/또는 크로마토그래피 컬럼 내의 크로마토그래피 수지 내에 존재하는 자기 복제 생물학적 오염물(예를 들어, 크로마토그래피 컬럼의 내면에 존재하는 생물학적 오염물 및 크로마토그래피 컬럼 내에 충전된 크로마토그래피 수지에 존재하는 생물학적 오염물)을 의미할 수 있다. 바이오버든은 액체(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 방법 또는 공정에 사용되는 완충액) 내에 존재하는 자기 복제 생물학적 오염물을 의미할 수도 있다. 자기 복제 생물학적 오염물의 비제한적 예는 박테리아(예를 들어, 그람 양성 또는 그람 음성의 박테리아, 또는 세균 포자), 마이코박테리아, 바이러스(예를 들어, 베시바이러스, 캐시 밸리 바이러스, 파보바이러스, 헤르페스 바이러스, 및 분야바이러스(bunyavirus)), 기생충, 진균, 효모, 및 원생동물일 수 있다. 바이오버든을 측정하기 위한 예시적 방법은 본원에 기술되어 있다. 바이오버든을 측정하기 위한 다른 방법은 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0026] 용어 "바이오버든의 저감"은 당해 분야에 공지되어 있으며, 조성물(예를 들어, 고체 또는 액체) 및/또는 물품(들)의 표면(예를 들어, 외부 표면 및/또는 내부 표면)에 존재하는 자기 복제 생물학적 오염물 수준의 감소(예를 들어, 검출 가능한 감소)를 의미한다. 크로마토그래피 수지(예를 들어, 충전된 크로마토그래피 수지), 완충액, 및/또는 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, 충전된 크로마토그래피 컬럼)의 바이오버든 저감을 위한 방법의 비제한적 예는 본원에 기술되어 있다. 본원에 기술된 임의의 조성물의 바이오버든 저감을 위한 다른 방법은 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0027] 용어 "저감된 바이오버든 크로마토그래피 수지"는 크로마토그래피 수지에 존재하는 자기 복제 생물학적 오염물의 수준을 감소(예를 들어, 크로마토그래피 수지를 함유한 조성물, 예를 들어 슬러리에 존재하는 자기 복제 생물학적 오염물 수준의 검출 가능한 감소)시키도록 처리된 크로마토그래피 수지를 의미한다. 예를 들어, 저감된 바이오버든 크로마토그래피 수지는 크로마토그래피 수지 내 자기 복제 생물학적 오염물의 수준을 감소시키기에 충분한 양의 감마선 조사에 노출된 수지(예를 들어, 크로마토그래피 수지 내 자기 복제 생물학적 오염물의 수준을 감소시키기에 충분한 양의 감마선 조사에 노출된 크로마토그래피 수지를 함유한 조성물)일 수 있다. 예를 들어, 저감된 바이오버든 크로마토그래피 수지는 약 1 kGy 내지 약 15 kGy의 조사량, 약 1 kGy 내지 약 20 kGy 감마선 조사량, 약 1 kGy 내지 약 25 kGy 감마선 조사량, 약 1 kGy 내지 약 30 kGy 감마선 조사량, 또는 약 1 kGy 내지 약 35 kGy 감마선 조사량에 노출된 수지일 수 있다. 크로마토그래피 수지의 바이오버든 저감을 위한 예시적 방법은 본원에 기술되어 있다. 크로마토그래피 수지의 바이오버든 저감을 위한 다른 방법은 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0028] 용어 "저감된 바이오버든 크로마토그래피 컬럼"은 미처리 크로마토그래피 수지를 포함하는 동일한 크로마토그래피 컬럼에 존재하는 자기 복제 생물학적 오염물 수준 미만의 자기 복제 생물학적 오염물 수준을 갖는, 처리된 크로마토그래피 수지(예를 들어, 감마선 조사 크로마토그래피 수지)를 포함하는 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, 충전된 크로마토그래피 컬럼)을 의미한다. 예를 들어, 저감된 바이오버든 크로마토그래피 컬럼은 적어도 또는 약  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-9}$ , 또는  $1 \times 10^{-10}$ 의 평균 보증 수준을 갖는 처리된 크로마토그래피 수지를 포함할 수 있다.
- [0029] 용어 "저감된 바이오버든 완충액"은 당해 분야에 공지되어 있으며, 동일한 미처리 액체에서 확인되는 자기 복제 오염 제제(들) 수준 미만의 자기 복제 오염 제제(들) 수준을 갖는, 처리된(예를 들어, 여과, 고압증기멸균, 및/또는 감마선 조사된) 액체(예를 들어, 처리된 완충 용액)를 의미한다. 예를 들어, 저감된 바이오버든 완충액은 적어도 또는 약  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-9}$ , 또는  $1 \times 10^{-10}$ 의 평균 보증 수준을 가질 수 있다.
- [0030] "완전한 멸균 상태" 또는 "완전 멸균"은 자기 복제 생물학적 오염물이 전혀 존재하지 않는 조성물 또는 공정을 기술하기 위해 사용되는 용어이다. 예를 들어, 이 용어는 감마선 조사 크로마토그래피 수지, 크로마토그래피 컬럼의 내면 및 내용물(예를 들어, 크로마토그래피 수지), 및/또는 완충액에 적용될 수 있다. 완전히 멸균된 조성물 또는 공정은 (용어가 당해 분야에 공지된 바와 같이) 깨끗할 수 있다.
- [0031] "멸균" 또는 "멸균 상태"는 약  $1 \times 10^{-6}$  이하(예를 들어, 약  $1 \times 10^{-7}$  이하, 약  $1 \times 10^{-8}$  이하, 약  $1 \times 10^{-9}$



이하, 또는  $1 \times 10^{-10}$ )의 멸균 보증 수준을 갖는 조성물 또는 공정을 기술하기 위해 사용되는 용어이다. 조성물 또는 공정이 멸균된 것인지 여부의 결정은 당해 분야에 공지된 다수의 검증된 제조 공정을 이용하여 시험될 수 있다. 예를 들어, 멸균된 조성물 또는 공정은 생존할 수 있는 자기 복제 생물학적 오염물(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 자기 복제 생물학적 오염물)이 전혀 존재하지 않을 수 있다. 멸균된 조성물 또는 공정은 또한 (용어가 당해 분야에 공지된 바와 같이) 깨끗할 수 있다.

[0032] 용어 "멸균화"는 조성물을 (본원에 규정된) 멸균된 상태로 하기 위해 사용되는 검증된 공정을 의미한다. 조성물에 대해 (본원에 규정된) 멸균 상태가 이루어졌는지 결정하기 위해 처리 공정 시 저항력 있는 지표인 자기 복제 생물학적 오염물(예를 들어, 박테리아)의 비활성화 속도가 측정될 수 있다.

[0033] 용어 "멸균 보증 수준" 또는 "SAL"은 당해 분야에 공지되어 있으며, 처리된 단위들의 배치 내에서 완전 멸균 상태를 얻었다고 신뢰할 수 있는 수준을 의미한다. 개연성은 일반적으로 검증 시 수행되는 비활성화 시험의 결과를 기초로 계산되며  $1 \times 10^{-n}$  형태로 표현된다.

[0034] 용어 "무균"은 질병을 유발하거나 증상을 유발하는 자기 복제 생물학적 오염물(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 자기 복제 생물학적 오염물)이 존재하지 않는 조성물 또는 공정을 기술하기 위해 사용된다. 무균 조성물 또는 공정은 또한 (용어가 당해 분야에 공지된 바와 같이) 깨끗할 수 있다.

[0035] 용어 "단위 조작"은 당해 분야의 용어로서, 액체 배양 배지로부터 재조합 단백질을 정제하는 공정에서 수행될 수 있는 기능 단계를 의미한다. 예를 들어, 조작의 단위는 여과(예를 들어, 재조합 단백질을 포함하는 유체로부터 오염 박테리아, 효모, 바이러스, 및/또는 마이코박테리아, 및/또는 입자상 물질의 제거), 포집, 에피토프 태그 제거, 정제, 수송 또는 저장, 폴리싱, 바이러스 비활성화, 재조합 단백질을 포함하는 유체의 이온 농도 및/또는 pH 조절, 및 원치 않는 염의 제거일 수 있다.

[0036] 용어 "포집"은, 액체 배양 배지 또는 희석된 액체 배양 배지(예를 들어, 배양 배지 단백질 또는 포유류 세포에 존재하거나 포유류 세포에서 분비되는 하나 이상의 기타 성분(예를 들어, DNA, RNA, 또는 기타 단백질))에 존재하는 하나 이상의 기타 성분으로부터 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 치료 단백질)을 부분적으로 정제하거나 단리시키고(예를 들어, 중량으로 적어도 또는 약 5%, 예를 들어, 적어도 또는 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 적어도 또는 약 95% 순도), 농축하기 위해 수행되는 단계를 의미한다. 일반적으로, 포집은 재조합 단백질과 결합하는 크로마토그래피 수지를 사용하여(예를 들어, 친화성 크로마토그래피를 사용하여) 수행된다. 액체 배양 배지 또는 희석된 액체 배양 배지로부터 재조합 단백질을 포집하기 위한 비제한적 방법은 본원에 기술되어 있으며, 다른 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 재조합 단백질은 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인)을 사용하여 액체 배양 배지로부터 포집될 수 있다.

[0037] 용어 "정제"는, 재조합 단백질을 포함하는 유체(예를 들어, 액체 배양 배지 단백질 또는 포유류 세포에 존재하거나 포유류 세포에서 분비되는 하나 이상의 기타 성분(예를 들어, DNA, RNA, 기타 단백질, 내독소, 바이러스 등))에 존재하는 하나 이상의 기타 불순물(예를 들어, 벌크 불순물) 또는 성분들로부터 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 치료 단백질)을 단리시키기 위해 수행되는 단계를 의미한다. 예를 들어, 정제는 초기 포집 단계 중 또는 그 후에 수행될 수 있다. 정제는 재조합 단백질 또는 오염물 중 어느 하나와 결합하는 크로마토그래피 수지, 멤브레인, 또는 임의의 기타 고체 담체를 사용하여(예를 들어, 친화성 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 또는 분자체 크로마토그래피를 사용하여) 수행될 수 있다. 재조합 단백질은 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인)을 사용하여 재조합 단백질을 포함하는 유체로부터 정제될 수 있다.

[0038] 용어 "폴리싱"은 당해 분야의 용어로서, 원하는 최종 순도에 가까운 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 치료 단백질)을 포함하는 유체로부터 남아있는 미량 또는 소량의 오염물 또는 불순물을 제거하기 위해 수행되는 단계를 의미한다. 예를 들어, 폴리싱은 재조합 단백질을 포함하는 유체에 존재하는 표적 재조합 단백질 또는 소량의 오염물이나 불순물 중 어느 하나와 선택적으로 결합하는 크로마토그래피 컬럼(들) 또는 멤브레인 흡수체(들)에 재조합 단백질을 포함하는 유체를 통과시켜 수행될 수 있다. 이러한 예에서, 크로마토그래피 컬럼(들) 또는 멤브레인 흡수체(들)의 용출액/여과액은 재조합 단백질을 포함한다.

[0039] 용어 "여과"는, 액체(예를 들어 본원에 기술된 임의의 공정에 존재하는 액체 배양 배지 또는 유체)로부터 원치



않는 생물학적 오염물(예를 들어, 포유류 세포, 박테리아, 효모 세포, 바이러스, 또는 마이코박테리아) 및/또는 입자상 물질(예를 들어, 침전된 단백질)의 적어도 일부(예를 들어, 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%)를 제거하는 것을 의미한다.

- [0040] 용어 "용출액/여과액"은 당해 분야의 용어로서, 검출 가능한 양의 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 치료 단백질)을 포함하는 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인으로부터 방출되는 유체를 의미한다.
- [0041] 용어 "통합형 공정"은, 특정 결과(예를 들어, 액체 배양 배지로부터 재조합 단백질의 정제)를 달성하기 위해 공동으로 기능하는 구성 요소들을 사용하여 수행되는 공정을 의미한다.
- [0042] 용어 "연속 공정"은 시스템의 적어도 일부를 통해 유체를 연속적으로 공급하는 공정을 의미한다. 예를 들어, 연속 공정은 MCCS를 통해 생물반응기로부터 재조합 단백질을 포함하는 액체 배양 배지를 연속적으로 공급하는 공정이다. 연속 공정의 또 다른 예는 제1 및 제2 MCCS(MCCS1 및 MCCS2)를 통해 생물반응기로부터 재조합 단백질을 포함하는 액체 배양 배지를 연속적으로 공급하는 공정이다. 추가 예는 MCCS를 통해 재조합 단백질을 포함하는 액체 배양 배지를 연속적으로 공급하는 공정, MCCS1 및 MCCS2를 통해 재조합 단백질을 포함하는 액체 배양 배지를 연속적으로 공급하는 공정, 또는 MCCS2를 통해 재조합 단백질을 포함하는 유체를 연속적으로 공급하는 공정을 포함한다.
- [0043] 용어 "단힌 공정"은 당해 분야의 용어로서, 재조합 단백질 또는 재조합 단백질을 포함하는 액체와 접촉하는 공정의 성분(예를 들어, 크로마토그래피 수지 및/또는 완충액)이 상당한 기간 동안 오염 제거에 의도적으로 노출되지 않도록(예를 들어, 상당한 기간 동안 공기에 의도적으로 노출되지 않도록) 수행되는 공정을 의미한다.
- [0044] 용어 "치료 단백질 의약 물질"은, 오염 단백질, 지질, 및 핵산(예를 들어, 액체 배양 배지에 존재하거나 숙주 세포(예를 들어, 포유류, 효모, 또는 박테리아 숙주 세포)에 존재하는 오염 단백질, 지질, 및 핵산) 및 생물학적 오염물(예를 들어, 바이러스 또는 박테리아 오염물)로부터 충분히 정제되었거나 분리되었고, 더 이상의 실질적 정제 및/또는 오염 제거 단계 없이 약제로 제형화될 수 있는 재조합 단백질(예를 들어, 면역글로불린, 단백질 단편, 조각된 단백질, 또는 효소)을 의미한다.
- [0045] 용어 "다중-컬럼 크로마토그래피 시스템" 또는 "MCCS"는 총 둘 이상의 상호 연결 또는 스위칭 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인을 가진 시스템을 의미한다. 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템의 비제한적 예는 총 둘 이상의 상호 연결 또는 스위칭 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인을 포함하는 주기적 역류 크로마토그래피 시스템(PCC)이다. 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템의 추가 예는 본원에 기술되어 있으며 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0046] 용어 "실질적으로 존재하지 않는"은 특정 물질(예를 들어, 포유류 세포 또는 포유류 세포에서 얻은 오염 단백질, 핵산, 탄수화물, 또는 지질)이 적어도 또는 약 90% 존재하지 않는(예를 들어, 적어도 또는 약 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 적어도 또는 약 99% 존재하지 않는, 또는 약 100% 존재하지 않는) 조성물(예를 들어, 액체 배양 배지)을 의미한다.
- [0047] 용어 "포유류 세포"는 임의의 포유동물(예를 들어, 인간, 햄스터, 마우스, 녹색 원숭이, 랫트, 돼지, 소, 또는 토끼)에서 얻거나 이로부터 유래하는 임의의 세포를 의미한다. 예를 들어, 포유류 세포는 무한증식 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, 포유류 세포는 분화 세포이다. 일부 구현예에서, 포유류 세포는 미분화 세포이다. 포유류 세포의 비제한적 예는 본원에 기술되어 있다. 포유류 세포의 추가 예는 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0048] 용어 "배양" 또는 "세포 배양"은 제어된 물리적 조건의 세트 하에서 포유류 세포의 유지 또는 증식을 의미한다.
- [0049] 용어 "포유류 세포의 배양물"은 제어된 물리적 조건의 세트 하에서 유지되거나 증식된 복수의 포유류 세포를 포함하는 액체 배양 배지를 의미한다.
- [0050] 용어 "액체 배양 배지"는 시험관 내에서 세포(예를 들어, 포유류 세포)를 성장시키거나 증식시킬 수 있는 충분한 영양소를 포함하는 유체를 의미한다. 예를 들어, 액체 배양 배지는 아미노산(예를 들어, 20개 아미노산), 푸린(예를 들어, 하이포크산틴), 피리미딘(예를 들어, 티미딘), 콜린, 이노시톨, 티아민, 폴산, 바이오틴, 칼슘, 니아신아미드, 피리독신, 리보플라빈, 티미딘, 시아노코발라민, 피루베이트, 리포산, 마그네슘, 글루코오스, 나트륨, 칼륨, 철, 구리, 아연, 및 중탄산나트륨 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 포유류로부터의 혈청을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 포유동물로부터의 혈청 또는 다른 추출물을 포함하지 않는다(규정된 액체 배양 배지). 일부 구현예에서, 액체 배양 배지는 미량 금속, 포유류 성장 호르몬, 및/또는 포유류 성장 인자를 포함할 수 있다. 액체 배양 배지의 다른 예는 최소 배지(예를 들

어, 무기염, 탄소원, 및 물만을 포함하는 배지)이다. 액체 배양 배지의 비제한적 예는 본원에 기술되어 있다. 액체 배양 배지의 추가 예는 당해 분야에 공지되어 있으며 상업적으로 입수 가능하다. 액체 배양 배지는 임의의 밀도의 포유류 세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원에 사용된 바와 같이, 생물반응기로부터 제거된 소정 부피의 액체 배양 배지에는 포유류 세포가 실질적으로 존재하지 않을 수 있다.

- [0051] 용어 "동물-유래 성분이 존재하지 않는 액체 배양 배지"는 포유동물로부터 유래된 임의의 성분들(예를 들어, 단백질 또는 혈청)을 포함하지 않는 액체 배양 배지를 의미한다.
- [0052] 용어 "혈청-부재 액체 배양 배지"는 포유류 혈청을 포함하지 않는 액체 배양 배지를 의미한다.
- [0053] 용어 "혈청-함유 액체 배양 배지"는 포유류 혈청을 포함하는 액체 배양 배지를 의미한다.
- [0054] 용어 "화학적으로 규정된 액체 배양 배지"는 당해 분야의 용어로서, 모든 화학적 성분들이 알려진 액체 배양 배지를 의미한다. 예를 들어, 화학적으로 규정된 액체 배양 배지는 우태아 혈청, 소 혈청 알부민, 또는 인간 혈청 알부민을 포함하지 않는데, 왜냐하면, 이러한 제조물은 통상적으로 알부민과 지질의 복합 혼합물을 포함하기 때문이다.
- [0055] 용어 "단백질-부재 액체 배양 배지"는 임의의 단백질(예를 들어, 임의의 검출 가능한 단백질)을 포함하지 않는 액체 배양 배지를 의미한다.
- [0056] 용어 "면역글로불린"은 적어도 15개의 아미노산(예를 들어, 적어도 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100개의 아미노산)의 면역글로불린 단백질의 아미노산 서열(예를 들어, 가변 도메인 서열, 프레임워크 서열, 및/또는 불변 도메인 서열)을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. 면역글로불린은 예를 들어, 적어도 15개의 아미노산의 경쇄 면역글로불린, 예를 들어 적어도 15개의 아미노산의 중쇄 면역글로불린을 포함할 수 있다. 면역글로불린은 단리된 항체(예를 들어, IgG, IgE, IgD, IgA, 또는 IgM), 예를 들어 IgG의 서브클래스(subclass)(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4)일 수 있다. 면역글로불린은 항체 단편, 예를 들어, Fab 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, 또는 scFv 단편일 수 있다. 면역글로불린은 또한, 이중-특이적 항체 또는 삼중-특이적 항체, 또는 다이머, 트라이머, 또는 멀티머 항체, 또는 디아바디(diabody), Affibody®, 또는 Nanobody®일 수 있다. 면역글로불린은 또한, 적어도 하나의 면역글로불린 도메인을 포함하는 조각된 단백질(예를 들어, 융합 단백질)일 수 있다. 면역글로불린의 비제한적 예는 본원에 기술되어 있으며, 면역글로불린의 추가 예는 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0057] 용어 "단백질 단편" 또는 "폴리펩티드 단편"은 길이가 적어도 또는 약 4개의 아미노산, 적어도 또는 약 5개의 아미노산, 적어도 또는 약 6개의 아미노산, 적어도 또는 약 7개의 아미노산, 적어도 또는 약 8개의 아미노산, 적어도 또는 약 9개의 아미노산, 적어도 또는 약 10개의 아미노산, 적어도 또는 약 11개의 아미노산, 적어도 또는 약 12개의 아미노산, 적어도 또는 약 13개의 아미노산, 적어도 또는 약 14개의 아미노산, 적어도 또는 약 15개의 아미노산, 적어도 또는 약 16개의 아미노산, 적어도 또는 약 17개의 아미노산, 적어도 또는 약 18개의 아미노산, 적어도 또는 약 19개의 아미노산, 또는 적어도 또는 약 20개의 아미노산이거나 길이가 20개를 초과하는 아미노산인 폴리펩티드 서열의 일부를 의미한다. 재조합 단백질 단편은 본원에 기술된 임의의 공정을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0058] 용어 "조각된 단백질"은 유기체(예를 들어, 포유동물) 내에 존재하는 내인성 핵산에 의해 자연적으로 인코딩되지 않는 폴리펩티드를 의미한다. 조각된 단백질의 예는 효소(예를 들어, 조각된 효소의 안정성 및/또는 촉매 활성의 증가를 야기하는 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 삽입 또는 첨가를 가짐), 융합 단백질, 항체(예를 들어, 2가 항체, 3가 항체, 또는 디아바디), 및 적어도 하나의 재조합 스캐폴딩 서열(recombinant scaffolding sequence)을 포함하는 항원-결합 단백질을 포함한다.
- [0059] 용어 "분비 단백질" 또는 "분비 재조합 단백질"은 포유류 세포 내에서 번역될 때 본래 적어도 하나의 분비 신호 서열을 포함하고, 적어도 일부, 포유류 세포에서 분비 신호 서열의 효소적 분열을 통해, 적어도 일부 세포 외 공간(예를 들어, 액체 배양 배지)으로 분비되는 단백질(예를 들어, 재조합 단백질)을 의미한다.
- [0060] 용어 "관류 생물반응기(perfusion bioreactor)"는 제1 액체 배양 배지에 복수의 세포(예를 들어, 포유류 세포)를 포함하되, 생물반응기에 존재하는 세포의 배양이 제1 액체 배양 배지의 주기적 또는 연속 제거 및 동시에 또는 직후에 실질적으로 동일한 부피의 제2 액체 배양 배지를 생물반응기에 첨가하는 것을 포함하는, 생물반응기를 의미한다. 일부 예에서, 배양 기간 동안 점진적 기간(예를 들어, 약 24시간의 기간, 약 1분 내지 약 24시간의 기간, 또는 24시간 초과인 기간)에 걸쳐 제거되고 첨가되는 제1 액체 배양 배지의 부피의 점진적 변화(예를 들어, 증가 또는 감소)가 있다(예를 들어, 일일 기준으로 배양 배지 재공급 속도). 날마다 제거되고 대체되는

배지의 분율은 배양되는 특정 세포, 초기 시딩 밀도, 및 특정 시간의 세포 밀도에 따라 달라질 수 있다. "RV" 또는 "반응기 부피"는 배양 공정의 초기에 존재하는 배양 배지의 부피(예를 들어, 시딩 후 존재하는 배양 배지의 총 부피)를 의미한다.

[0061] 용어 "유가 생물반응기(fed-batch bioreactor)"는 당해 분야의 용어로서, 제1 액체 배양 배지에 복수의 세포(예를 들어, 포유류 세포)를 포함하되, 생물반응기에 존재하는 세포의 배양이 세포 배양물로부터 제1 액체 배양 배지 또는 제2 액체 배양 배지의 실질적 또는 상당한 제거 없이 제2 액체 배양 배지를 제1 액체 배양 배지에 주기적으로 또는 연속적으로 첨가하는 것을 포함하는, 생물반응기를 의미한다. 제2 액체 배양 배지는 제1 액체 배양 배지와 동일할 수 있다. 유가 배양의 일부 예에서, 제2 액체 배양 배지는 제1 액체 배양 배지의 농축된 형태이다. 유가 배양의 일부 예에서, 제2 액체 배양 배지는 건조 분말로 첨가된다.

[0062] 용어 "정화된 액체 배양 배지"는 박테리아 또는 효모 세포가 실질적으로 존재하지 않는(예를 들어, 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 또는 99% 존재하지 않는) 박테리아 또는 효모 세포 배양물로부터 얻은 액체 배양 배지를 의미한다.

[0063] 달리 규정하지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 발명에서 사용하기 위한 방법 및 물질은 본원에 기술되어 있으며, 당해 분야에 공지된 다른 적합한 방법 및 물질이 또한 사용될 수 있다. 물질, 방법, 및 예는 오로지 예시적인 것으로서, 제한적인 것으로 의도된 것은 아니다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허출원, 특허, 서열, 데이터베이스 항목, 및 다른 참조문헌은 그 전체가 참조로 통합된다. 상충되는 경우에, 정의를 포함하는 본 명세서에 따른다.

[0064] 본 발명의 다른 특징 및 장점들은 하기 상세한 설명 및 도면으로부터, 그리고 청구범위로부터 명백해질 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0065] 도 1은 미처리 GE Mab Select SuRe™ 수지, 25 kGy 감마선이 조사된 GE Mab Select SuRe™ 수지, 15 kGy 감마선이 조사된 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지, 및 15 kGy 감마선이 조사된 Kaneka KanCap A 수지에 대한 수지의 정적 결합 곡선(mg/mL 단백질)을 나타낸 그래프이다.

도 2는 30 kGy 감마선 조사 후 GE Mab Select SuRe™ 수지 및 30 kGy 감마선 조사 후 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지로부터의 상청액의 280 nm 흡광도(단백질 A 흡광도)를 나타내는 표이다.

도 3은 미처리 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지(순수 용출액) 또는 15 kGy 감마선이 조사된 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지(감마 용출액)를 사용하여 수행된 크로마토그래피의 여러 사이클에 걸쳐 용출액 내 단백질의 양을 나타낸 그래프이다.

도 4는 미처리 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지를 사용하여 수행된 연속 크로마토그래피 중에 사이클 7 및 사이클 11의 용출 프로필을 나타낸 크로마토그래프이다.

도 5는 15 kGy 감마선이 조사된 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지를 사용하여 수행된 연속 크로마토그래피 중에 사이클 7 및 사이클 11의 용출 프로필을 나타낸 크로마토그래프이다.

도 6은 미처리 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지(순수) 또는 15 kGy 감마선이 조사된 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지(감마)를 사용하여 수행된 연속 크로마토그래피의 여러 사이클에 걸쳐 용출액 내 단백질의 양을 나타낸 그래프이다.

도 7은 미처리 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지(순수) 또는 15 kGy 감마선이 조사된 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지(감마)를 사용하여 수행된 크로마토그래피의 여러 사이클에 걸쳐 결합 단백질을 나타낸 그래프이다.

도 8은 미처리 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지(순수) 또는 29 kGy 감마선이 조사된 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지(감마)를 사용하여 수행된 크로마토그래피의 여러 사이클에 걸쳐 용출액 내 단백질의 양을 나타낸 그래프이다.

도 9는 미처리 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지(순수), 15 kGy 감마선이 조사된 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지(15 kGy), 또는 29 kGy 감마선이 조사된 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지(29 kGy)를 사용하여 수행된 크로마토그래피의 여러 사이클에 걸쳐 용출액 내 단백질(항-αβTCR (IgG1) 또는

항-TGF $\beta$  (IgG4))의 양을 나타낸 그래프이다.

도 10은 인간의 특정 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있는 효소인 예시적 재조합 단백질 목록이다.

도 11은 각 수지를 로딩하기 위해 단일 클론 IgG1을 함유한 배양 배지가 사용된 경우 여러 크로마토그래피 사이클에 걸쳐 미처리(순수) 및 29 kGy 감마선이 조사된 GE Mab Select SuRe™ 수지의 용출액 내 단백질을 나타낸 그래프이다.

도 12는 각 수지를 로딩하기 위해 단일 클론 IgG1을 함유한 배양 배지가 사용된 경우 여러 크로마토그래피 사이클에 걸쳐 미처리(순수) 및 29 kGy 감마선이 조사된 GE Mab Select SuRe™ 수지에 결합된 단백질의 양을 나타낸 그래프이다.

도 13은 상이한 평형 농도의 단일 클론 IgG4 항체와 함께 로딩한 후 미처리(순수) 및 29 kGy 감마선이 조사된 GE Mab Select SuRe™ LX 수지에 결합된 단백질의 양(결합 단백질 mg/수지 mL)을 나타낸 그래프이다.

도 14는 미처리 GE Mab Select SuRe™ LX 수지(순수 LX), 29-kGy 감마선이 조사된 GE Mab Select SuRe™ LX 수지(29kGy LX), 건조된 미처리 GE Mab Select SuRe™ LX 수지, 및 건조된 29-kGy 감마선이 조사된 GE Mab Select SuRe™ LX 수지, 및 적어도 하나의 항산화제를 함유한 7개의 상이한 시험 완충액 중 하나의 존재 하에서 29 kGy의 양으로 감마선이 조사된 GE Mab Select SuRe™ LX 수지의 2 mg/mL의 평형 IgG4 항체 농도에서의 정적 결합 용량(단백질 mg/수지 mL)을 나타낸 그래프이다.

도 15는 미처리 GE Mab Select SuRe™ LX 수지(순수) 또는 25 mM 만니톨, 25 mM 히스티딘, 25 mM 아스코르브산 나트륨, 25 mM 메티오닌, pH 6.0의 50 mM 인산 나트륨의 존재 하에서 29 kGy의 양으로 감마선이 조사된 GE Mab Select SuRe™ LX 수지를 사용하여 수행된 여러 크로마토그래피 사이클에 걸쳐 용출액 내 단백질의 양을 나타낸 그래프이다.

도 16은 미처리 GE Mab Select SuRe™ LX 수지(순수) 또는 25 mM 만니톨, 25 mM 히스티딘, 25 mM 아스코르브산 나트륨, 25 mM 메티오닌, pH 6.0의 50 mM 인산 나트륨의 존재 하에서 29 kGy의 양으로 감마선이 조사된 GE Mab Select SuRe™ LX 수지를 사용하여 수행된 여러 크로마토그래피 사이클에 걸쳐 결합 단백질의 양을 나타낸 그래프이다.

도 17은 미처리 GE Mab Select SuRe™ LX 수지(순수 LX) 및 25 mM 만니톨, 25 mM 히스티딘, 25 mM 아스코르브산 나트륨, 25 mM 메티오닌, pH 6.0의 50 mM 인산 나트륨의 존재 하에서 29 kGy의 양으로 감마선이 조사된 GE Mab Select SuRe™ LX 수지를 사용한 여러 크로마토그래피 사이클에 걸쳐 IgG1 항체 용출액을 보여주는 비환원 도데실황산나트륨 폴리아크릴아미드 겔이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066]

본원에서는 크로마토그래피 수지의 바이오버든 저감 방법으로서, 크로마토그래피 수지 및 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제를 포함하는 조성물을 포함하는 용기를, 용기 및 크로마토그래피 수지의 바이오버든을 저감하기에 충분한 양의 감마선 조사에 노출시키는 단계를 포함하되, 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제는 이러한 양의 감마선 조사에 노출 후/시의 크로마토그래피 수지의 결합 용량 손실을 개선하기에 충분한 양으로 존재하는, 방법이 제공된다. 또한, 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 저감된 바이오버든 크로마토그래피 수지를 함유하는 저감된 바이오버든 크로마토그래피 컬럼, 크로마토그래피 수지 및 적어도 하나의 킬레이트제 및/또는 항산화제를 포함하는 조성물, 이러한 저감된 바이오버든 크로마토그래피 컬럼들 중 적어도 하나를 사용하여 저감된 바이오버든 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 방법, 및 이러한 저감된 바이오버든 크로마토그래피 컬럼들 중 적어도 하나의 사용을 포함하는 정제된 재조합 단백질의 저감된 바이오버든 제조를 위한 통합형, 단한 또는 실질적으로 단한, 연속 공정이 제공된다. 이러한 방법 및 공정의 비제한적 양태를 이하 설명한다. 당해 분야에서 이해될 수 있는 바와 같이, 이하 설명되는 다양한 양태는 제한 없이 임의의 조합으로 사용될 수 있다.

[0067]

크로마토그래피 수지 및 항산화제 및/또는 킬레이트제를 함유한 조성물



[0068] 크로마토그래피 수지(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 크로마토그래피 수지) 및 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 항산화제 및/또는 킬레이트제)를 포함하되, 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제는 조성물의 바이오버튼을 저장하기에 충분한 양의 감마선 조사로 처리할 때의 크로마토그래피 수지의 결합 용량 손실을 개선하기에 충분한 양으로 존재하는, 조성물이 제공된다. 예를 들어, 크로마토그래피 수지는 음이온 교환 크로마토그래피 수지, 양이온 교환 크로마토그래피 수지, 친화성 또는 유사-친화성 크로마토그래피 수지, 소수성 상호작용 크로마토그래피 수지, 및 크기 배제 크로마토그래피 수지 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 일부 예에서, 크로마토그래피 수지는 단백질 또는 펩티드 리간드를 포함하는 수지(예를 들어, 단백질 또는 펩티드 리간드를 가진 친화성 크로마토그래피 수지, 예를 들어, 단백질 A 또는 단백질 G 크로마토그래피 수지)이다.

[0069] 조성물은, 예를 들어, 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제를 포함하는 액체에 침전된 크로마토그래피 수지의 슬러리일 수 있다. 예를 들어, 액체는 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온), 아스코르브산 나트륨, 히스티딘, 및 만니톨 중 적어도 하나(예를 들어, 1, 2, 3, 또는 4개)를 함유할 수 있다. 일부 예에서, 액체는 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온), 아스코르브산 나트륨, 히스티딘, 및 만니톨을 함유한다. 일부 예에서, 액체는, (i) 75 mM 내지 약 125 mM(예를 들어, 80 mM 내지 약 120 mM, 약 85 mM 내지 약 115 mM, 약 90 mM 내지 약 110 mM, 또는 약 95 mM 내지 약 105 mM)의 만니톨; (ii) 75 mM 내지 약 125 mM(예를 들어, 약 80 mM 내지 약 120 mM, 약 85 mM 내지 약 115 mM, 약 90 mM 내지 약 110 mM, 또는 약 95 mM 내지 약 105 mM)의 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온); (iii) 75 mM 내지 약 125 mM(예를 들어, 약 80 mM 내지 약 120 mM, 약 85 mM 내지 약 115 mM, 약 90 mM 내지 약 110 mM, 또는 약 95 mM 내지 약 105 mM)의 아스코르브산 나트륨; (iv) 75 mM 내지 약 125 mM(예를 들어, 약 80 mM 내지 약 120 mM, 약 85 mM 내지 약 115 mM, 약 90 mM 내지 약 110 mM, 또는 약 95 mM 내지 약 105 mM)의 히스티딘; (v) 약 30 mM 내지 약 70 mM(예를 들어, 약 35 mM 내지 약 65 mM, 약 40 mM 내지 약 60 mM, 또는 약 45 mM 내지 약 55 mM)의 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온) 및 약 30 mM 내지 약 70 mM(예를 들어, 약 35 mM 내지 약 65 mM, 약 40 mM 내지 약 60 mM, 또는 약 45 mM 내지 약 55 mM)의 히스티딘; (vi) 약 10 mM 내지 약 50 mM(예를 들어, 약 15 mM 내지 약 45 mM, 약 20 mM 내지 약 40 mM, 또는 약 25 mM 내지 약 35 mM)의 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온), 약 10 mM 내지 약 50 mM(예를 들어, 약 15 mM 내지 약 45 mM, 약 20 mM 내지 약 40 mM, 또는 약 25 mM 내지 약 35 mM)의 히스티딘, 및 약 10 mM 내지 약 50 mM(예를 들어, 약 15 mM 내지 약 45 mM, 약 20 mM 내지 약 40 mM, 또는 약 25 mM 내지 약 35 mM)의 아스코르브산 나트륨; 또는 (vii) 약 5 mM 내지 약 45 mM(예를 들어, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 또는 약 20 mM 내지 약 30 mM)의 아스코르브산 나트륨, 약 5 mM 내지 약 45 mM(예를 들어, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 또는 약 20 mM 내지 약 30 mM)의 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온), 약 5 mM 내지 약 45 mM(예를 들어, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 또는 약 20 mM 내지 약 30 mM)의 만니톨, 및 약 5 mM 내지 약 45 mM(예를 들어, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 또는 약 20 mM 내지 약 30 mM)의 히스티딘을 포함한다. 일부 예에서, 액체는 완충 용액(예를 들어, 인산염 완충 용액, 예를 들어, pH 6.0의 50 mM 인산 나트륨과 같은 인산 나트륨 완충 용액)이다. 일부 예에서, 액체는 완충 용액(예를 들어, 인산 나트륨 완충 용액(예를 들어 pH 6.0의 50 mM 인산 나트륨)과 같은 인산염 완충 용액)이다.

[0070] 일부 예에서, 조성물은 고체 혼합물(예를 들어, 건조 고체 혼합물 또는 습윤 또는 젖은 고체 혼합물)일 수 있다. 고체 혼합물은 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온), 아스코르브산 나트륨, 히스티딘, 및 만니톨 중 적어도 하나(예를 들어, 1, 2, 3, 또는 4개)를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 고체 혼합물은 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온), 아스코르브산 나트륨, 히스티딘, 및 만니톨을 함유한다. 일부 예에서, 조성물은 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제를 포함하는 액체에 충전된 크로마토그래피 수지이다. 이러한 액체의 비제한적 예는 본원에 기술되어 있다.

[0071] 또한, 크로마토그래피 수지(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 크로마토그래피 수지) 및 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제(예를 들어 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 항산화제 및/또는 킬레이트제)를 포함하되, 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제는 조성물의 바이오버튼을 저장하기에 충분한 양의 감마선 조사로 처리할 때의 크로마토그래피 수지의 결합 용량 손실을 개선하기에 충분한 양으로 존재하는, 용기(예를 들어, 예를 들어, 플라스틱 용기 또는 크로마토그래피 컬럼)가 본원에 제공된다. 예를 들어, 용기(예를 들어, 플라스틱 용기 또는 크로마토그래피 컬럼)는 예를 들어, 적어도 약 1 mL, 5 mL, 적어도 약 10 mL, 적어도 약 20 mL, 적어도 약 30 mL, 적어도 약 40 mL, 적어도 약 50 mL, 적어도 약 60 mL, 적어도 약 70 mL, 적어도 약 80 mL, 적어도 약 90 mL, 적어도 약 100 mL, 적어도 약 110 mL, 적어도 약 120 mL, 적어

도 약 130 mL, 적어도 약 140 mL, 적어도 약 150 mL, 적어도 약 160 mL, 적어도 약 170 mL, 적어도 약 180 mL, 적어도 약 190 mL, 적어도 약 200 mL, 적어도 약 210 mL, 적어도 약 220 mL, 적어도 약 230 mL, 적어도 약 240 mL, 적어도 약 250 mL, 적어도 300 mL, 적어도 350 mL, 적어도 400 mL, 또는 적어도 500 mL의 내부 부피를 가질 수 있다. 예를 들어, 용기는, 예를 들어, 약 1 mL 내지 약 500 mL, 약 1 mL 내지 약 50 mL, 약 5 mL 내지 약 500 mL, 약 5 mL 내지 약 400 mL, 약 5 mL 내지 약 350 mL, 약 5 mL 내지 약 300 mL, 약 5 mL 내지 약 250 mL, 약 5 mL 내지 약 200 mL, 약 5 mL 내지 약 150 mL, 약 5 mL 내지 약 100 mL, 또는 약 5 mL 내지 약 50 mL의 내부 부피를 가질 수 있다. 일부 예에서, 용기 내 크로마토그래피 수지는 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제를 포함하는 액체에 침전된 크로마토그래피 수지의 슬러리이다. 일부 예에서, 용기는 충전된(예를 들어, 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제를 포함하는 액체에 충전된) 크로마토그래피 수지를 포함한다.

[0072] 본원에 제공된 임의의 조성물은 적어도 하나(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 항산화제 및/또는 적어도 하나(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 킬레이트제를 함유할 수 있다. 본원에 제공된 임의의 조성물에 포함된 임의의 항산화제(들)는 하나 이상의 다음과 같은 활성 산소 및/또는 질소 화합물을 억제할 수 있는 능력을 가질 수 있다: 하이드록실 라디칼, 탄산 라디칼, 초산화물 음이온, 퍼옥실 라디칼, 과산화질산염, 이산화질소, 및 일산화질소. 본원에 제공된 임의의 조성물에 포함될 수 있는 항산화제의 비제한적 예는 환원 글루타티온, 환원 티오레독신, 환원 시스테인, 카로티노이드, 멜라토닌, 리코펜, 토코페롤, 환원 유비퀴논, 아스코르브산염, 빌리루빈, 요산, 리포산, 플라보노이드, 페놀프로파노이드산, 리도카인, 나린제닌, 플러렌, 글루코오스, 만니톨, 4-하이드록시-2,2,6,6-테트라메틸피페리딘-1-옥실, 및 디메틸메톡시 크로마놀을 포함한다. 항산화제의 추가의 비제한적 예는 항산화 효소(예를 들어, 초산화물 디스무타아제, 글루타티온 과산화효소, 글루타티온 환원효소, 카탈라아제, 및 티오레독신 환원효소)를 포함한다. 본원에 제공된 임의의 조성물에 포함될 수 있는 항산화제의 추가 예는 만니톨, 아스코르브산 나트륨, 메티오닌, 및 히스티딘을 포함한다. 항산화제의 다른 예는 시스테인, 타우린, 메르캅토프로피오닐글리신, N-아세틸시스테인, 마늘 기름, 디알릴설파이드, 디하이드로리포산, 및 디알릴트리스설파이드를 포함한다. 항산화제로서 항산화 효소를 포함하는 일부 구현예는 효소에 대한 하나 이상의 기질을 더 포함할 수 있다. 항산화제는 당해 분야에 공지된 많은 방법, 예를 들어 스핀 포획, 산화 환원에 민감한 염료, 및 화학발광 분석법을 이용하여 식별될 수 있다.

[0073] 본원에 제공된 임의의 조성물에 포함된 임의의 킬레이트제(들)는 높은 친화도(예를 들어, 약 1  $\mu\text{M}$  이하, 약 800 nM 이하, 약 700 nM 이하, 약 600 nM 이하, 약 500 nM 이하, 약 400 nM 이하, 약 300 nM 이하, 약 250 nM 이하, 약 200 nM 이하, 약 150 nM 이하, 약 100 nM 이하, 약 80 nM 이하, 약 60 nM 이하, 약 40 nM 이하, 약 20 nM 이하, 또는 약 1 nM 이하)로 산화 환원 활성 금속(예를 들어,  $\text{Cu}^{2+}$  및  $\text{Fe}^{2+}$ )과 결합할 수 있는 능력을 가질 수 있다. 본원에 제공된 임의의 조성물에 포함될 수 있는 킬레이트제(들)의 비제한적 예는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 2,3-디메르캅토-1-프로판설포산 나트륨(DMPS), 디메르캅토숙신산(DMSA), 금속티오닌, 및 테스페록사민을 포함한다.

[0074] 본원에 제공된 임의의 조성물에서 각각의 킬레이트제(들) 및/또는 항산화제(들)의 농도는 약 0.1 mM 내지 약 150 mM(예를 들어, 약 0.1 mM 내지 약 150 mM, 약 0.1 mM 내지 약 125 mM, 약 0.1 mM 내지 약 100 mM, 약 0.1 mM 내지 약 80 mM, 약 0.1 mM 내지 약 60 mM, 약 0.1 mM 내지 약 50 mM, 약 0.1 mM 내지 약 40 mM, 약 0.1 mM 내지 약 30 mM, 약 0.1 mM 내지 약 25 mM, 약 0.1 mM 내지 약 20 mM, 약 0.1 mM 내지 약 10 mM, 약 0.1 mM 내지 약 5.0 mM, 약 0.5 mM 내지 약 150 mM, 약 0.5 mM 내지 약 100 mM, 약 0.5 mM 내지 약 50 mM, 약 0.5 mM 내지 약 25 mM, 약 0.5 mM 내지 약 15 mM, 약 0.5 mM 내지 약 10 mM, 약 0.5 mM 내지 약 5 mM, 약 1 mM 내지 약 125 mM, 약 1 mM 내지 약 120 mM, 약 1 mM 내지 약 100 mM, 약 1 mM 내지 약 80 mM, 약 1 mM 내지 약 60 mM, 약 1 mM 내지 약 50 mM, 약 1 mM 내지 약 40 mM, 약 1 mM 내지 약 30 mM, 약 1 mM 내지 약 25 mM, 약 5 mM 내지 약 150 mM, 약 5 mM 내지 약 125 mM, 약 5 mM 내지 약 100 mM, 약 5 mM 내지 약 80 mM, 약 5 mM 내지 약 60 mM, 약 5 mM 내지 약 50 mM, 약 5 mM 내지 약 40 mM, 약 5 mM 내지 약 30 mM, 약 5 mM 내지 약 25 mM, 약 10 mM 내지 약 150 mM, 약 10 mM 내지 약 125 mM, 약 1 mM 내지 약 100 mM, 약 10 mM 내지 약 80 mM, 약 10 mM 내지 약 60 mM, 약 10 mM 내지 약 50 mM, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 10 mM 내지 약 30 mM, 약 10 mM 내지 약 25 mM, 약 20 mM 내지 약 150 mM, 약 20 mM 내지 약 125 mM, 약 20 mM 내지 약 100 mM, 약 20 mM 내지 약 80 mM, 약 20 mM 내지 약 60 mM, 약 20 mM 내지 약 50 mM, 약 20 mM 내지 약 40 mM, 약 20 mM 내지 약 30 mM, 약 30 mM 내지 약 150 mM, 약 30 mM 내지 약 125 mM, 약 30 mM 내지 약 100 mM, 약 30 mM 내지 약 80 mM, 약 30 mM 내지 약 60 mM, 약 30 mM 내지 약 50 mM, 약 30 mM 내지 약 40 mM, 약 40 mM 내지 약 150 mM, 약 40 mM 내지 약 125 mM, 약 40 mM 내지 약 100 mM, 약 40 mM 내지 약 90 mM, 약 40 mM 내지 약 80 mM, 약 40 mM 내지 약 70 mM, 약 40 mM 내지 약 60 mM, 약 50 mM 내지 약 150 mM, 약 50 mM 내지 약 125 mM, 약 50 mM 내지 약 100

mM, 약 50 mM 내지 약 80 mM, 약 50 mM 내지 약 60 mM, 약 80 mM 내지 약 150 mM, 약 80 mM 내지 약 125 mM, 약 80 mM 내지 약 100 mM, 약 100 mM 내지 약 150 mM, 또는 약 100 mM 내지 약 125 mM)일 수 있다.

[0075]

일부 예에서, 본원에 제공된 조성물은 5 mM 내지 약 150 mM의 만니톨(예를 들어, 약 10 mM 내지 약 150 mM, 약 20 mM 내지 약 150 mM, 약 30 mM 내지 약 150 mM, 약 40 mM 내지 약 150 mM, 약 50 mM 내지 약 150 mM, 약 60 mM 내지 약 140 mM, 약 70 mM 내지 약 130 mM, 약 80 mM 내지 약 120 mM, 약 90 mM 내지 약 110 mM, 약 95 mM 내지 약 105 mM, 약 5 mM 내지 약 50 mM, 약 5 mM 내지 약 45 mM, 약 5 mM 내지 약 40 mM, 약 5 mM 내지 약 35 mM, 약 10 mM 내지 약 35 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 또는 약 20 mM 내지 약 30 mM의 만니톨); 5 mM 내지 약 150 mM(예를 들어, 약 10 mM 내지 약 150 mM, 약 20 mM 내지 약 150 mM, 약 30 mM 내지 약 150 mM, 약 40 mM 내지 약 150 mM, 약 50 mM 내지 약 150 mM, 약 60 mM 내지 약 140 mM, 약 70 mM 내지 약 130 mM, 약 80 mM 내지 약 120 mM, 약 90 mM 내지 약 110 mM, 약 95 mM 내지 약 105 mM, 약 30 mM 내지 약 70 mM, 약 35 mM 내지 약 65 mM, 약 40 mM 내지 약 60 mM, 약 45 mM 내지 약 55 mM, 약 20 mM 내지 약 50 mM, 약 25 mM 내지 약 45 mM, 약 30 mM 내지 약 40 mM, 약 30 mM 내지 약 35 mM, 약 5 mM 내지 약 45 mM, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 약 20 mM 내지 약 30 mM, 또는 약 20 mM 내지 약 25 mM)의 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온); 5 mM 내지 150 mM의 아스코르브산 나트륨(예를 들어, 약 10 mM 내지 약 150 mM, 약 20 mM 내지 약 150 mM, 약 30 mM 내지 약 150 mM, 약 40 mM 내지 약 150 mM, 약 50 mM 내지 약 150 mM, 약 60 mM 내지 약 140 mM, 약 70 mM 내지 약 130 mM, 약 80 mM 내지 약 120 mM, 약 90 mM 내지 약 110 mM, 약 95 mM 내지 약 105 mM, 약 10 mM 내지 약 50 mM, 약 15 mM 내지 약 45 mM, 약 20 mM 내지 약 40 mM, 약 25 mM 내지 약 35 mM, 약 30 mM 내지 약 35 mM, 약 5 mM 내지 약 45 mM, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 약 20 mM 내지 약 30 mM, 또는 약 20 mM 내지 약 25 mM)의 아스코르브산 나트륨; 및 5 mM 내지 약 150 mM(예를 들어, 약 10 mM 내지 약 150 mM, 약 20 mM 내지 약 150 mM, 약 30 mM 내지 약 150 mM, 약 40 mM 내지 약 150 mM, 약 50 mM 내지 약 150 mM, 약 60 mM 내지 약 140 mM, 약 70 mM 내지 약 130 mM, 약 80 mM 내지 약 120 mM, 약 90 mM 내지 약 110 mM, 약 95 mM 내지 약 105 mM, 약 30 mM 내지 약 70 mM, 약 35 mM 내지 약 65 mM, 약 40 mM 내지 약 60 mM, 약 45 mM 내지 약 55 mM, 약 20 mM 내지 약 50 mM, 약 25 mM 내지 약 45 mM, 약 30 mM 내지 약 40 mM, 약 30 mM 내지 약 35 mM, 약 5 mM 내지 약 45 mM, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 약 20 mM 내지 약 30 mM, 또는 약 20 mM 내지 약 25 mM)의 히스티딘 중 하나 이상을 함유한다.

[0076]

임의의 조성물의 비제한적 예는 (i) 약 75 mM 내지 약 125 mM(예를 들어, 약 80 mM 내지 약 120 mM, 약 85 mM 내지 약 115 mM, 약 90 mM 내지 약 110 mM, 또는 약 95 mM 내지 약 105 mM)의 만니톨(예를 들어, 완충 용액, 예를 들어, pH 6.0의 50 mM 인산 나트륨과 같은 인산염 완충액에서); (ii) 약 75 mM 내지 약 125 mM(예를 들어, 약 80 mM 내지 약 120 mM, 약 85 mM 내지 약 115 mM, 약 90 mM 내지 약 110 mM, 또는 약 95 mM 내지 약 105 mM)의 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온)(예를 들어, 완충 용액, 예를 들어, pH 6.0의 50 mM 인산 나트륨과 같은 인산염 완충액에서); (iii) 약 75 mM 내지 약 125 mM(예를 들어, 약 80 mM 내지 약 120 mM, 약 85 mM 내지 약 115 mM, 약 90 mM 내지 약 110 mM, 또는 약 95 mM 내지 약 105 mM)의 아스코르브산 나트륨(예를 들어, 완충 용액, 예를 들어, pH 6.0의 50 mM 인산 나트륨과 같은 인산염 완충액에서); (iv) 약 75 mM 내지 약 125 mM(예를 들어, 약 80 mM 내지 약 120 mM, 약 85 mM 내지 약 115 mM, 약 90 mM 내지 약 110 mM, 또는 약 95 mM 내지 약 105 mM)의 히스티딘(예를 들어, 완충 용액, 예를 들어, pH 6.0의 50 mM 인산 나트륨과 같은 인산염 완충액에서); (v) 약 30 mM 내지 약 70 mM(예를 들어, 약 35 mM 내지 약 65 mM, 약 40 mM 내지 약 60 mM, 또는 약 45 mM 내지 약 55 mM)의 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온) 및 약 30 mM 내지 약 70 mM(예를 들어, 약 35 mM 내지 약 65 mM, 약 40 mM 내지 약 60 mM, 또는 약 45 mM 내지 약 55 mM)의 히스티딘(예를 들어, 완충 용액, 예를 들어, pH 6.0의 50 mM 인산 나트륨과 같은 인산염 완충액에서); (vi) 약 10 mM 내지 약 50 mM(예를 들어, 약 15 mM 내지 약 45 mM, 약 20 mM 내지 약 40 mM, 약 25 mM 내지 약 35 mM, 또는 약 30 mM 내지 약 35 mM)의 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온), 약 10 mM 내지 약 50 mM(예를 들어, 약 15 mM 내지 약 45 mM, 약 20 mM 내지 약 40 mM, 약 25 mM 내지 약 35 mM, 또는 약 30 mM 내지 약 35 mM)의 히스티딘, 및 약 10 mM 내지 약 50 mM(예를 들어, 약 15 mM 내지 약 45 mM, 약 20 mM 내지 약 40 mM, 약 25 mM 내지 약 35 mM, 또는 약 30 mM 내지 약 35 mM)의 아스코르브산 나트륨(예를 들어, 완충 용액, 예를 들어, pH 6.0의 50 mM 인산 나트륨과 같은 인산염 완충액에서); 또는 (vii) 약 5 mM 내지 약 45 mM(예를 들어, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 약 20 mM 내지 약 30 mM, 또는 약 23 mM 내지 약 27 mM)의 아스코르브산 나트륨, 약 5 mM 내지 약 45 mM(예를 들어, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 약 20 mM 내지 약 30 mM, 또는 약 23 mM 내지 약 27 mM)의 메티오닌(또는 대안적으로 시스테인 또는 글루타티온), 약 5 mM 내지 약 45 mM(예를 들어, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 약 20 mM 내지 약 30 mM, 또는 약 23 mM 내지 약 27 mM)의 만니톨, 및 약 5 mM 내지 약 45 mM(예를 들어, 약 10 mM 내지 약

40 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 약 20 mM 내지 약 30 mM, 또는 약 23 mM 내지 약 27 mM)의 히스티딘(예를 들어, 완충 용액, 예를 들어, pH 6.0의 50 mM 인산 나트륨과 같은 인산염 완충액에서)을 함유한다.

[0077] 본원에 제공된 임의의 조성물의 바이오버든을 저감하기에 충분한 비제한적 감마선 조사량을 이하 설명한다. 본원에 제공된 임의의 조성물의 바이오버든을 저감하기에 충분한 다른 양의 감마선 조사는 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 감마선 조사를 수행하기 위한 임의의 조사량, 임의의 감마선 조사 속도, 및/또는 임의의 온도에서(임의의 조합으로) 본원에 기술된 임의의 조성물에 감마선이 조사될 수 있다. 조성물의 바이오버든은, 예를 들어 조성물로부터 조성물에 존재하는 자기 복제 생물학적 오염물(들)을 함유하는 샘플을 채취하여, 예를 들어, 스토마킹, 초음파처리, 세이킹, 와류 혼합, 플러싱, 혼합, 또는 표본채취, 및 (예를 들어, 샘플을 생물학적 오염물의 자기 복제를 가능케 하는 성장 배지에 두거나, 예를 들어, 샘플을 페트리 접시에 도포하거나, 또는 샘플을 멤브레인에 통과시켜) 샘플에 존재하는 자기 복제 생물학적 오염물(들)의 수준을 정성 또는 정량화함으로써 결정될 수 있다.

[0078] 조성물의 바이오버든을 저감하기에 충분한 양의 감마선 조사로 처리할 때의 크로마토그래피 수지의 결합 용량 손실을 개선하기에 충분한 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제의 양은, 예를 들어 실시예에 기술된 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 예를 들어, 소정량의 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제의 존재 하에서 감마선 조사로 처리된 크로마토그래피 수지의 결합 용량의 저하 수준이 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제 부재 하에서 동일한 양의 감마선 조사로 처리된 크로마토그래피 수지의 결합 용량의 저하 수준과 비교될 수 있고, 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제 부재 하에서 감마선 조사된 크로마토그래피 수지 대비 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제의 존재 하에서 감마선 조사된 크로마토그래피 수지의 결합 용량의 저하 수준의 감소는, 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제가 감마선 조사로 처리할 때의 크로마토그래피 수지의 결합 용량 손실을 개선하기에 충분한 양으로 존재했음을 나타낸다. 크로마토그래피 수지의 결합 용량을 측정하기 위한 예시적 방법은 실시예에 설명되어 있다. 크로마토그래피 수지의 결합 용량을 측정하기 위한 방법의 추가 예는 당해 분야에 공지되어 있다.

[0079] **크로마토그래피 수지의 바이오버든 저감 방법**

[0080] 크로마토그래피 수지의 바이오버든 저감 방법이 본원에 제공된다. 이러한 방법은 크로마토그래피 수지 및 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제를 포함하는 조성물을 포함하는 용기를, 용기 및 크로마토그래피 수지의 바이오버든을 저감하기에 충분한 양의 감마선 조사에 노출시키는 단계를 포함하며, 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제는 이러한 양의 감마선 조사에 노출 후(또는 노출 시)의 크로마토그래피 수지의 결합 용량 손실을 개선하기에 충분한 양으로 존재한다.

[0081] 또한, 크로마토그래피 수지의 바이오버든 저감 방법으로서, 크로마토그래피 수지(및 감마선 조사에 노출 후/시의 크로마토그래피 수지의 결합 용량 손실을 개선하기에 충분한 양의 선택적으로 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제)를 포함하는 조성물을 포함하는 용기를, 용기 및 크로마토그래피 수지의 바이오버든을 저감하기에 충분한 양의 감마선 조사를 위해, 약 0.1 kGy/시간 내지 약 6 kGy/시간(예를 들어, 약 0.1 kGy/시간 내지 약 5.5 kGy/시간, 약 0.1 kGy/시간 내지 약 5.0 kGy/시간, 약 0.1 kGy/시간 내지 약 4.5 kGy/시간, 약 0.1 kGy/시간 내지 약 4.0 kGy/시간, 약 0.1 kGy/시간 내지 약 3.5 kGy/시간, 약 0.1 kGy/시간 내지 약 3.0 kGy/시간, 약 0.1 kGy/시간 내지 약 2.5 kGy/시간, 약 0.1 kGy/시간 내지 약 2.0 kGy/시간, 약 0.1 kGy/시간 내지 약 1.5 kGy/시간, 약 0.1 kGy/시간 내지 약 1.0 kGy/시간, 약 0.5 kGy/시간 내지 약 6 kGy/시간, 약 0.5 kGy/시간 내지 약 5.5 kGy/시간, 약 0.5 kGy/시간 내지 약 5.0 kGy/시간, 약 0.5 kGy/시간 내지 약 4.5 kGy/시간, 약 0.5 kGy/시간 내지 약 4.0 kGy/시간, 약 0.5 kGy/시간 내지 약 3.5 kGy/시간, 약 0.5 kGy/시간 내지 약 3.0 kGy/시간, 약 0.5 kGy/시간 내지 약 2.5 kGy/시간, 약 0.5 kGy/시간 내지 약 2.0 kGy/시간)의 속도 및/또는 약 4℃ 내지 약 25℃(예를 들어, 약 4℃ 내지 약 20℃, 약 4℃ 내지 약 15℃, 약 4℃ 내지 약 10℃, 약 10℃ 내지 약 25℃, 약 10℃ 내지 약 20℃, 약 10℃ 내지 약 15℃, 또는 약 15℃ 내지 약 25℃)의 온도에서 감마선 조사에 노출시키는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다. 본 단락에서 기술된 방법에서, 이러한 방법에 의해 제조된 감마선 조사 크로마토그래피 수지의 결합 용량의 수준은 6.1 kGy/시간을 초과하는 속도 및/또는 25℃를 초과하는 온도에서 감마선이 조사된 감마선 조사 크로마토그래피 수지의 결합 용량의 수준보다 더 크다.

[0082] 크로마토그래피 수지는 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 감마선 조사에 노출될 수 있다. 예를 들어, 코발트-60 또는 세슘-137과 같은 동위원소가 감마선의 소스로 사용될 수 있다. 크로마토그래피 수지는 약 -25℃ 이상 약 0℃ 이하, 또는 약 0℃ 이상 약 25℃ 이하의 온도에서 감마선 조사에 노출될 수 있다. 크로마토그래피 수지는 약 0.1 kGy 내지 약 100 kGy, 약 1 kGy 내지 약 100 kGy, 약 1 kGy 내지 약 90 kGy, 약 1 kGy 내지 약 80



kGy, 약 1 kGy 내지 약 70 kGy, 약 1 kGy 내지 약 65 kGy, 약 5 kGy 내지 약 65 kGy, 약 10 kGy 내지 약 60 kGy, 약 10 kGy 내지 약 55 kGy, 약 10 kGy 내지 약 50 kGy, 약 10 kGy 내지 약 45 kGy, 약 10 kGy 내지 약 40 kGy, 약 10 kGy 내지 약 35 kGy, 약 10 kGy 내지 약 30 kGy, 약 15 kGy 내지 약 50 kGy, 약 15 kGy 내지 약 45 kGy, 약 15 kGy 내지 약 40 kGy, 약 15 kGy 내지 약 35 kGy, 약 20 kGy 내지 약 30 kGy, 또는 약 23 kGy 내지 약 27 kGy의 감마선 조사량에 노출될 수 있다. 크로마토그래피 수지는 약  $1 \times 10^{-6}$  이하, 약  $1 \times 10^{-7}$  이하, 약  $10 \times 10^{-8}$  이하, 약  $1 \times 10^{-11}$  이하, 또는 약  $1 \times 10^{-12}$  이하, 또는 약  $1 \times 10^{-6}$  내지 약  $1 \times 10^{-12}$ , 약  $1 \times 10^{-6}$  내지 약  $1 \times 10^{-11}$ , 약  $1 \times 10^{-6}$  내지 약  $1 \times 10^{-10}$ , 약  $1 \times 10^{-6}$  내지 약  $1 \times 10^{-9}$ , 약  $1 \times 10^{-6}$  내지 약  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  내지 약  $1 \times 10^{-7}$ , 약  $1 \times 10^{-7}$  내지 약  $1 \times 10^{-12}$ , 약  $1 \times 10^{-7}$  내지 약  $1 \times 10^{-11}$ , 약  $1 \times 10^{-7}$  내지 약  $1 \times 10^{-10}$ , 약  $1 \times 10^{-7}$  내지 약  $1 \times 10^{-9}$ , 약  $1 \times 10^{-7}$  내지 약  $1 \times 10^{-8}$ , 약  $1 \times 10^{-8}$  내지 약  $1 \times 10^{-12}$ , 약  $1 \times 10^{-8}$  내지 약  $1 \times 10^{-11}$ , 약  $1 \times 10^{-8}$  내지 약  $1 \times 10^{-10}$ , 또는 약  $1 \times 10^{-9}$  내지 약  $1 \times 10^{-9}$ 의 크로마토그래피 수지의 평균 보증 수준을 나타내기에 충분한 양으로 감마선 조사에 노출될 수 있다.

[0083] 크로마토그래피 수지의 바이오버든을 저감하기에 충분한 감마선 조사의 양은 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 소정량의 감마선 조사로 처리된 크로마토그래피 수지의 바이오버든 수준이 미처리(예를 들어, 대조군, 감마선 조사되지 않은) 크로마토그래피 수지의 바이오버든 수준과 비교될 수 있고, 미처리 크로마토그래피 수지 대비 감마선 조사 크로마토그래피 수지에서의 바이오버든 수준의 감소는, 감마선 조사량이 크로마토그래피 수지의 바이오버든을 저감하기에 충분하다는 것을 나타낸다. 조성물(예를 들어, 크로마토그래피 수지) 내 바이오버든의 수준을 결정하기 위한 예시적 방법이 본원에 기술되어 있다. 조성물(예를 들어, 크로마토그래피 수지) 내 바이오버든의 수준을 결정하기 위한 다른 방법은 당해 분야에 공지되어 있다.

[0084] 임의의 이러한 방법에서 크로마토그래피 수지는 음이온 교환 크로마토그래피 수지, 양이온 교환 크로마토그래피 수지, 크기 배제 크로마토그래피 수지, 소수성 상호작용 크로마토그래피 수지, 또는 친화성 크로마토그래피 수지, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 친화성 크로마토그래피 수지의 비제한적 예는 단백질 또는 펩티드 리간드(예를 들어, 약 5개 아미노산 내지 약 100개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 90개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 80개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 70개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 60개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 50개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 40개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 30개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 25개 아미노산, 또는 약 5개 아미노산 내지 약 20개 아미노산), 효소의 소분자 기질 또는 공동 인자, 아프타머, 억제제(예를 들어, 경쟁적 단백질 억제제) 또는 금속을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 친화성 크로마토그래피 수지는 단백질 리간드(예를 들어, 단백질 A)를 포함한다. 친화성 크로마토그래피 수지의 추가 예는 공동 인자 리간드, 기질 리간드, 금속 리간드, 생성물 리간드, 또는 아프타머 리간드를 포함한다. 일부 예에서, 크로마토그래피 수지는 이중 모드 크로마토그래피 수지(예를 들어, 음이온 교환 크로마토그래피 수지 및 소수성 상호작용 크로마토그래피 수지)이다. 크로마토그래피 수지는 음이온 교환 크로마토그래피 수지(예를 들어, N-벤질-N-메틸-에탄올아민기를 포함하는 음이온 교환 크로마토그래피 수지)일 수 있다.

[0085] 크로마토그래피 수지를 포함하는 용기는 플라스틱 용기(예를 들어, 실린더형 튜브, 밀봉되거나 클램핑된 박스, 또는 밀봉된 백)일 수 있다. 이러한 방법에 사용되는 용기의 비제한적 예는 저장 베셀 또는 크로마토그래피 컬럼을 포함한다. 예를 들어, 크로마토그래피 수지 및 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제를 포함하는 조성물은 밀봉된 용기에 존재할 수 있다(예를 들어, 밀봉된 용기 내 슬러리 또는 밀봉된 용기(예를 들어, 크로마토그래피 컬럼)에 충전된 크로마토그래피 수지). 본원에 기술된 방법에 사용되는 용기는 일회용 크로마토그래피 컬럼일 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 방법에 사용되는 용기는 블리스터 팩에 놓인 일회용 크로마토그래피 컬럼이다. 용기(예를 들어, 저장 베셀 또는 크로마토그래피 컬럼)는 약 1 mL 내지 약 1 L(예를 들어, 약 1 mL 내지 약 900 mL, 약 1 mL 내지 약 800 mL, 약 1 mL 내지 약 700 mL, 약 1 mL 내지 약 600 mL, 약 1 mL 내지 약 500 mL, 약 1 mL 내지 약 450 mL, 약 1 mL 내지 약 400 mL, 약 1 mL 내지 약 350 mL, 약 1 mL 내지 약 300 mL, 약 1 mL 내지 약 250 mL, 약 1 mL 내지 약 200 mL, 약 1 mL 내지 약 150 mL, 약 1 mL 내지 약 100 mL, 약 1 mL 내지 약 75 mL, 약 1 mL 내지 약 50 mL, 약 1 mL 내지 약 40 mL, 약 1 mL 내지 약 30 mL, 또는 약 1 mL 내지 약 20 mL)의 내부 총 부피를 가질 수 있다.

[0086] 용기에 포함된 크로마토그래피 수지 및 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제를 함유한 조성물은 고체 혼합물(예를 들어, 건조 또는 습윤 고체 혼합물)로 존재할 수 있다. 예를 들어, 용기는 적어도 하나의 항산화제

및/또는 킬레이트제를 함유한 액체(예를 들어, 완충 용액)에 침전된 크로마토그래피 수지의 슬러리를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 용기는 충전된 크로마토그래피 수지를 포함할 수 있다. 예를 들어, 크로마토그래피 수지 및 적어도 하나의 항산화제 및/또는 크로마토그래피 수지를 포함하는 조성물을 포함하는 용기는 충전된 크로마토그래피 컬럼이다(예를 들어, 수지는 적어도 하나의 항산화제 및/또는 크로마토그래피 수지를 함유한 액체(예를 들어, 완충 용액)에 충전된다). 일부 구현예는, 노출 이전에, 크로마토그래피 수지 및 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제를 함유한 조성물을 용기 안에 배치하는 단계를 포함한다.

[0087] 본원에 기술된 임의의 항산화제 및/또는 킬레이트제는 본원에 기술된 예시적 농도의 임의의 조합을 이용하여 임의의 조합으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 환원 글루타티온, 환원 티오레독신, 환원 시스테인, 카로티노이드, 멜라토닌, 리코펜, 토코페롤, 환원 유비퀴논, 아스코르브산염, 빌리루빈, 요산, 리포산, 플라보노이드, 페놀프로파노이드산, 리도카인, 나린제닌, 플러렌, 글루코오스, 만니톨, 4-하이드록시-2,2,6,6-테트라메틸피페리딘-1-옥실, 및 디메틸메톡시 크로마놀로부터 선택된 적어도 하나의 항산화제, 및/또는 EDTA, DMPs, DMSA, 금속티오닌, 및 테스페록사민으로부터 선택된 적어도 하나의 킬레이트제를 포함할 수 있다.

[0088] 조성물의 바이오버튼을 저장하기 위해 충분한 양의 감마선 조사로 처리할 때의 크로마토그래피 수지의 결합 용량 손실을 개선하기 위해 충분한 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제의 양을 결정/확인하기 위한 예시적 방법은 본원에 기술되어 있다. 조성물의 바이오버튼을 저장하기 위해 충분한 양의 감마선 조사로 처리할 때의 크로마토그래피 수지의 결합 용량 손실을 개선하기 위해 충분한 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제의 양을 결정/확인하기 위한 다른 방법은 당해 분야에 공지되어 있다.

[0089] 또한, 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 저장된 바이오버튼 크로마토그래피 수지(예를 들어, 저장 용기, 예를 들어, 밀봉된 저장 용기에 제공된 저장된 바이오버튼 크로마토그래피 수지)가 본원에 제공된다. 본원에 기술된 임의의 방법을 이용하여 생성된 저장된 바이오버튼 크로마토그래피 수지는 약  $1 \times 10^{-6}$  이하, 약  $1 \times 10^{-7}$  이하, 약  $10 \times 10^{-8}$  이하, 약  $1 \times 10^{-11}$  이하, 또는 약  $1 \times 10^{-12}$  이하, 또는 약  $1 \times 10^{-6}$  내지 약  $1 \times 10^{-12}$ , 약  $1 \times 10^{-6}$  내지 약  $1 \times 10^{-11}$ , 약  $1 \times 10^{-6}$  내지 약  $1 \times 10^{-10}$ , 약  $1 \times 10^{-6}$  내지 약  $1 \times 10^{-9}$ , 약  $1 \times 10^{-6}$  내지 약  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  내지 약  $1 \times 10^{-7}$ , 약  $1 \times 10^{-7}$  내지 약  $1 \times 10^{-12}$ , 약  $1 \times 10^{-7}$  내지 약  $1 \times 10^{-11}$ , 약  $1 \times 10^{-7}$  내지 약  $1 \times 10^{-10}$ , 약  $1 \times 10^{-7}$  내지 약  $1 \times 10^{-9}$ , 약  $1 \times 10^{-7}$  내지 약  $1 \times 10^{-8}$ , 약  $1 \times 10^{-8}$  내지 약  $1 \times 10^{-12}$ , 약  $1 \times 10^{-8}$  내지 약  $1 \times 10^{-11}$ , 약  $1 \times 10^{-8}$  내지 약  $1 \times 10^{-10}$ , 또는 약  $1 \times 10^{-8}$  내지 약  $1 \times 10^{-9}$ 의 평균 보증 수준을 가질 수 있다. 본원에 기술된 방법에 의해 제조된 크로마토그래피 수지 및 대조군 미처리 크로마토그래피 수지 모두의 결합 용량을 시험하기 위해 동일한 단백질이 사용된 경우, 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 저장된 바이오버튼 크로마토그래피 수지는, 바이오버튼을 저장 하도록 처리되지 않은(예를 들어, 감마선이 조사되지 않은) 동일한 크로마토그래피 수지의 결합 용량의 적어도 74%(예를 들어, 적어도 76%, 적어도 78%, 적어도 80%, 적어도 82%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%) 또는 약 74% 내지 95%, 약 74% 내지 약 95%, 약 76% 내지 약 95%, 약 78% 내지 약 95%, 약 80% 내지 약 95%, 또는 약 74% 내지 약 90%, 약 76% 내지 약 90%, 약 78% 내지 약 90%, 또는 약 80% 내지 약 90%의 결합 용량을 가질 수 있다.

[0090] **저장된 바이오버튼 충전 크로마토그래피 컬럼의 제조 방법**

[0091] 또한, 저장된 충전 크로마토그래피 컬럼을 제조하는 방법으로서, 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 저장된 바이오버튼 크로마토그래피 수지를 제공하는 단계; 및 무균 또는 저장된 바이오버튼 환경에서 크로마토그래피 수지를 저장된 바이오버튼 컬럼에 충전시키는 단계를 포함하는, 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 저장된 바이오버튼 충전 크로마토그래피 컬럼은, 충전된 크로마토그래피 수지 및 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제를 포함하는 컬럼을 컬럼 및 충전된 크로마토그래피 수지의 바이오버튼을 저장하기 위해 충분한 양의 감마선 조사에 노출시켜 제조될 수 있으며, 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제는 이러한 양의 감마선 조사에 노출 후의 충전된 크로마토그래피 수지의 결합 용량 손실을 개선하기 위해 충분한 양으로 존재한다.

[0092] 또한, 본원에 기술된 방법에 의해 제조된 저장된 바이오버튼 충전 크로마토그래피 컬럼(들)이 제공된다. 본원에 기술된 방법에 의해 제조된 임의의 저장된 바이오버튼 충전 크로마토그래피 컬럼(들)은 약  $1 \times 10^{-6}$  이하, 약  $1$

$\times 10^{-7}$  이하, 약  $10 \times 10^{-8}$  이하, 약  $1 \times 10^{-11}$  이하, 또는 약  $1 \times 10^{-12}$  이하, 또는 약  $1 \times 10^{-6}$  내지 약  $1 \times 10^{-12}$ , 약  $1 \times 10^{-6}$  내지 약  $1 \times 10^{-11}$ , 약  $1 \times 10^{-6}$  내지 약  $1 \times 10^{-10}$ , 약  $1 \times 10^{-6}$  내지 약  $1 \times 10^{-9}$ , 약  $1 \times 10^{-6}$  내지 약  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  내지 약  $1 \times 10^{-7}$ , 약  $1 \times 10^{-7}$  내지 약  $1 \times 10^{-12}$ , 약  $1 \times 10^{-7}$  내지 약  $1 \times 10^{-11}$ , 약  $1 \times 10^{-7}$  내지 약  $1 \times 10^{-10}$ , 약  $1 \times 10^{-7}$  내지 약  $1 \times 10^{-9}$ , 약  $1 \times 10^{-7}$  내지 약  $1 \times 10^{-8}$  내지 약  $1 \times 10^{-12}$ , 약  $1 \times 10^{-8}$  내지 약  $1 \times 10^{-11}$ , 약  $1 \times 10^{-8}$  내지 약  $1 \times 10^{-10}$ , 또는 약  $1 \times 10^{-8}$  내지 약  $1 \times 10^{-9}$ 의 평균 보증 수준을 가질 수 있다. 본원에 기술된 방법에 의해 제조된 임의의 저장된 바이오버든 증진 크로마토그래피 컬럼(들)은 음이온 교환 크로마토그래피 수지, 양이온 교환 크로마토그래피 수지, 친화성 크로마토그래피 수지(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 친화성 크로마토그래피 수지), 소수성 상호작용 크로마토그래피 수지, 및 크기 배제 크로마토그래피 수지의 군으로부터 선택된 적어도 하나의 크로마토그래피 수지를 함유할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 임의의 저장된 바이오버든 증진 크로마토그래피 컬럼은 단백질 리간드(예를 들어, 단백질 A)를 포함하는 친화성 크로마토그래피 수지를 포함할 수 있다. 본원에 기술된 저장된 바이오버든 증진 크로마토그래피 컬럼은 음이온 교환 크로마토그래피 수지(예를 들어, N-벤질-N-메틸-에탄올아민기를 포함하는 음이온 교환 크로마토그래피 수지)를 포함할 수 있다.

#### [0093] 저장된 바이오버든 크로마토그래피를 수행하는 방법

[0094] 본원에 기술된 방법은 본원에 제공된 저장된 바이오버든 증진 크로마토그래피 컬럼의 사용을 포함하고, 본원에 기술된 공정은 본원에 제공된 적어도 하나의 저장된 바이오버든 증진 크로마토그래피 컬럼을 포함하는 하나 또는 두 개의 MCCS의 사용을 포함한다. 감마선 조사 크로마토그래피 수지는 본원에 기술된 임의의 타입의 수지(또는 당해 분야에 공지된 임의의 타입의 크로마토그래피 수지)일 수 있다.

[0095] 저장된 바이오버든 증진 크로마토그래피 컬럼은 본원에 기술된 임의의 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 저장된 바이오버든 증진 크로마토그래피 컬럼은, 크로마토그래피 수지(들) 및 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제를 포함하는 조성물(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 이러한 조성물)로 크로마토그래피 컬럼을 충전시키고, 충전된 컬럼을(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 노출 및 조건을 사용하여) 감마선 조사에 노출시켜 제조될 수 있다. 다른 예에서, 저장된 바이오버든 증진 크로마토그래피 컬럼은, 크로마토그래피 수지 및 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제를 포함하는 용기를 소정량의 감마선 조사에 노출시키고, 크로마토그래피 컬럼을 생성된 저장된 바이오버든 크로마토그래피 수지로 충전시켜 제조될 수 있다. 이러한 방법에서, (감마선 조사에 노출 시 용기에 존재하는) 크로마토그래피 수지는 용기 내 슬러리로 존재할 수 있고, 크로마토그래피 컬럼은 저장된 바이오버든 후드에서 충전된다. 다른 방법에서, 적어도 하나의 항산화제 및/또는 킬레이트제와 함께 용기에 존재하는 크로마토그래피 수지는 용기에서 고체 혼합물로서 감마선 조사에 노출될 수 있고, 생성된 저장된 바이오버든 크로마토그래피 수지의 슬러리는 저장된 바이오버든 완충액을 사용하여(예를 들어, 저장된 바이오버든 후드에서) 제조될 수 있으며, 생성된 슬러리는 저장된 바이오버든 후드에서 크로마토그래피 컬럼을 충전시키기 위해 사용된다. 일부의 이러한 예에서, 크로마토그래피 컬럼은, 충전 이전에, 바이오버든을 저장하도록(예를 들어, 고압증기멸균, 감마선 조사, 또는 에틸렌 산화물에 노출) 처리될 수 있다.

[0096] 본원에 기술된 임의의 방법에 사용되는 저장된 바이오버든 증진 크로마토그래피 컬럼은 약  $1 \times 10^{-12}$  이상 약  $1 \times 10^{-3}$  이하, 약  $1 \times 10^{-12}$  이상 약  $1 \times 10^{-4}$  이하, 약  $1 \times 10^{-11}$  이상  $1 \times 10^{-5}$  이하, 약  $1 \times 10^{-10}$  이상 약  $1 \times 10^{-5}$  이하, 약  $1 \times 10^{-9}$  이상 약  $1 \times 10^{-5}$  이하, 약  $1 \times 10^{-9}$  이상 약  $1 \times 10^{-6}$  이하, 또는 약  $1 \times 10^{-8}$  이상 약  $1 \times 10^{-6}$  이하의 평균 보증 수준(SAL)을 가질 수 있다.

#### [0097] 저장된 바이오버든 완충액

[0098] 본원에 기술된 방법 및 공정은 하나 이상의 저장된 바이오버든 완충액을 사용하여 수행될 수 있다. 당해 분야에서 이해될 수 있는 바와 같이, 저장된 바이오버든 완충액은 크로마토그래피의 사이클에 사용되는 임의의 타입의 완충액(예를 들어, 크로마토그래피의 사이클에서 임의의 단계에서 또는 본원에 기술된 임의의 단위 조작에서 사용되는 완충액)일 수 있다. 완충액의 바이오버든 저감을 위한 예시적 방법은 여과( $0.2 \mu\text{m}$  기공 크기 여과), 고압증기멸균, 및 감마선 조사를 포함한다. 완충액의 바이오버든 저감을 위한 다른 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 저장된 바이오버든 완충액은 약  $1 \times 10^{-12}$  이상 약  $1 \times 10^{-3}$  이하, 약  $1 \times 10^{-12}$  이상 약  $1 \times 10^{-4}$  이하, 약  $1 \times 10^{-11}$  이상  $1 \times 10^{-5}$  이하, 약  $1 \times 10^{-10}$  이상 약  $1 \times 10^{-5}$  이하, 약  $1 \times 10^{-9}$  이상 약  $1 \times 10^{-6}$  이하, 또는 약  $1 \times 10^{-8}$  이상 약  $1 \times 10^{-6}$  이하의 평균 보증 수준(SAL)을 가질 수 있다.

<sup>5</sup> 이하, 약  $1 \times 10^{-9}$  이상 약  $1 \times 10^{-6}$  이하, 또는 약  $1 \times 10^{-8}$  이상 약  $1 \times 10^{-6}$  이하의 평균 보증 수준을 가질 수 있다.

[0099] **재조합 치료 단백질**

[0100] 본원에 기술된 재조합 단백질은 재조합 치료 단백질일 수 있다. 본원에 제공된 방법에 의해 제조될 수 있는 재조합 치료 단백질의 비제한적 예는 면역글로불린(경쇄 및 중쇄 면역글로불린을 포함), 항체, 또는 항체 단편(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 항체 단편), 효소(예를 들어, 갈락토시다아제(예를 들어, 알파-갈락토시다아제), Myozyme®, 또는 Cerezyme®), 단백질(예를 들어, 인간 에리스로포이에틴, 종양 괴사 인자(TNF), 또는 인터페론 알파 또는 베타), 또는 면역원성 또는 항원성 단백질 또는 단백질 단편(예를 들어, 백신에서 사용하기 위한 단백질)을 포함한다. 다양한 리소좀 축적 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있는 재조합 치료 효소의 비제한적 예들 도 10에 나타내었다. 재조합 치료 단백질은 적어도 하나의 다기능성 재조합 단백질 스캐폴드를 포함하는 조작된 항원-결합 폴리펩티드일 수 있다(예를 들어, (그 전체가 본원에 참조로 통합된) Gebauer et al., *Current Opin. Chem. Biol.* 13:245-255, 2009, 및 미국 특허 출원 공개 제2012/0164066호에 기술된 재조합 항원-결합 단백질 참조). 항체인 재조합 치료 단백질의 비-제한적인 예는 파니투무맙(panitumumab), 오말리주맙(omalizumab), 아바고보맙(abagovomab), 아바시시맙(abciximab), 악톡수맙(actoxumab), 아달리주맙(adalimumab), 아테카투무맙(adecatumumab), 아펠리모맙(afelimomab), 아프투주맙(afutuzumab), 알라시주맙(alacizumab), 알라시주맙(alacizumab), 알렘투주맙(alemtuzumab), 알리로쿠맙(alirocumab), 알투모맙(altumomab), 아마투시맙(amatuximab), 아나투모맙(anatumomab), 아폴리주맙(apolizumab), 아티누맙(atinumab), 토실리주맙(tocilizumab), 바실리지맙(basilizimab), 벡투모맙(bectumomab), 벨리무맙(belumab), 베바시주맙(bevacizumab), 비시로맙(bicirumab), 카나키누맙(canakinumab), 세톡시맙(cetuximab), 다클리주맙(daclizumab), 덴수맙(densumab), 에쿨리주맙(eculizumab), 에드레콜로맙(edrecolomab), 에팔리주맙(efalizumab), 에펴구맙(efungumab), 에르투막소맙(ertumaxomab), 에타라시주맙(etaracizumab), 골리무맙(golimumab), 인플릭시맙(infliximab), 나탈리주맙(natalizumab), 팔리비주맙(palivizumab), 파니투무맙(panitumumab), 페르투주맙(pertuzumab), 라니비주맙(ranibizumab), 리톡시맙(rituximab), 토실리주맙(tocilizumab), 및 트라스투주맙(trastuzumab)을 포함한다. 본원에 기술된 방법에 의해 제조될 수 있는 재조합 치료 항체의 추가 예는 당해 분야에 공지되어 있다. 본 방법에 의해 제조/정제될 수 있는 재조합 치료 단백질의 추가의 비제한적 예는 알글루코시다제 알파, 라로니다제, 아바타셉트, 갈솔파제, 루트로핀 알파, 항혈우병 인자, 아갈시다제 베타, 인터페론 베타-1a, 다르베포에틴 알파, 테넥테플라제, 에타네르셉트, 웅고 인자 IX, 난포 자극 호르몬, 인터페론 베타-1a, 이미글루세라제, 도르나제 알파, 에포에틴 알파, 및 알테플라제를 포함한다.

[0101] 분비 가용성 재조합 치료 단백질은 세포(예를 들어, 포유류 세포)로부터 액체 배양 배지를 제거하거나 달리 물리적으로 분리하여 액체 배양 배지(예를 들어, 제1 및/또는 제2 액체 배양 배지)로부터 회수될 수 있다. 세포(예를 들어, 포유류 세포)로부터 액체 배양 배지를 제거하기 위한 여러 상이한 방법은, 예를 들어, 원심분리, 여과, 피펫팅, 및/또는 흡인을 포함하여, 당해 분야에 공지되어 있다. 분비 재조합 치료 단백질은 이후 여러 타입의 크로마토그래피(예를 들어, 친화성 크로마토그래피, 분자체 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피, 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피, 또는 이들의 임의의 조합) 및/또는 여과(예를 들어, 분획 분자량 여과)를 포함한 다양한 생화학 기술을 이용하여 액체 배양 배지로부터 회수되고 더 정제될 수 있다.

[0102] **크로마토그래피의 사이클**

[0103] 당해 분야에 주지된 바와 같이, 크로마토그래피의 사이클에서의 단계들은 크로마토그래피 수지, 사이클의 각 단계를 수행하기 위해 사용된 완충액, 및 표적 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 치료 단백질)의 생물물리학적 성질에 따라 다를 수 있다. 예를 들어, 친화성 크로마토그래피 컬럼은 표적 재조합 단백질을 포함하는 유체와 함께 친화성 크로마토그래피 컬럼을 로딩하는 단계, 컬럼을 세척하여 원치 않는 생물학적 물질(예를 들어, 오염 단백질 및/또는 소분자)을 제거하는 단계, 컬럼에 결합된 표적 재조합 단백질을 용출시키는 단계, 및 컬럼을 재평형화하는 단계를 포함할 수 있다. 로딩 단계에서 표적 재조합 단백질이 크로마토그래피 수지에 결합하는, 양이온 및/또는 음이온 교환 크로마토그래피 컬럼을 사용한 크로마토그래피의 사이클은, 표적 단백질을 포함하는 유체와 함께 컬럼을 로딩하는 단계, 컬럼을 세척하여 원치 않는 생물학적 물질을 제거하는 단계, 컬럼에 결합된 표적 재조합 단백질을 용출시키는 단계, 및 컬럼을 재평형화하는 단계를 포함할 수 있다. 다른 예에서, 로딩 단계 시 원치 않는 생물학적 물질이 크로마토그래피 수지에 결합하는 반면 표적 재조합 단백질은 결합하지 않는,



양이온 및/또는 음이온 교환 크로마토그래피 컬럼을 사용한 크로마토그래피의 사이클은, 표적 단백질을 포함하는 유체와 함께 컬럼을 로딩하는 단계, 통과 유체에서 표적 재조합 단백질을 수집하는 단계, 및 컬럼을 재평형화하는 단계를 포함할 수 있다. 당해 분야에 주지된 바와 같이, 크로마토그래피 사이클의 임의의 단일 단계는 하나의 완충액 또는 여러 개의 완충액(예를 들어, 둘 이상의 완충액)을 포함할 수 있고, 크로마토그래피 사이클의 하나 이상의 임의의 단일 단계는 완충액 구배를 포함할 수 있다. 크로마토그래피의 하나의 사이클에 대한 주지의 다양한 양태의 임의의 조합이 이러한 방법에서 임의의 조합(예를 들어, 상이한 크로마토그래피 수지(들), 유량(들), 완충액(들), 컬럼의 공극 부피(들), 컬럼의 충전층 부피(들), 각 단계에 사용된 완충액의 부피(들), 표적 단백질을 포함하는 유체의 부피(들), 및 각 단계에 사용된 완충액(들)의 개수 및 타입)으로 사용될 수 있다.

[0104] **저감된 바이오버든 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 방법**

[0105] 저감된 바이오버든 크로마토그래피를 수행하는 방법이 본원에 제공된다. 이러한 방법은 본원에 기술된 임의의 방법을 이용하여 제조된 저감된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼을 제공하는 단계, 및 저감된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 컬럼 크로마토그래피를 수행하는 단계를 포함한다. 저감된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼은 본원에 기술된 적어도 하나의 임의의 크로마토그래피 수지를 임의의 조합으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 저감된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼에 존재하는 크로마토그래피 수지는 단백질 리간드(예를 들어, 단백질 A)를 포함하는 친화성 수지일 수 있거나, 음이온 교환 크로마토그래피 수지를 포함할 수 있다. 저감된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼은 본원에 기술된 임의의 예시적인 내부 부피를 가질 수 있다. 저감된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼은 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 형상(예를 들어, 실린더, 실린더에 가까운 형상, 또는 타원 형상)을 가질 수 있다. 이러한 방법에서 수행되는 컬럼 크로마토그래피는 재조합 단백질을(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 재조합 치료 단백질을) 정제하거나 분리시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 예에서, 저감된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼은 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템(MCCS)의 일부이며, 예를 들어, 주기적 역류 크로마토그래피 시스템(PCCS)의 일부일 수 있다.

[0106] 수행되는 컬럼 크로마토그래피는 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 크로마토그래피의 적어도 하나의 사이클을 포함할 수 있다. 예를 들어, 크로마토그래피의 적어도 하나의 사이클은 재조합 단백질을 포함하는 액체에 크로마토그래피 수지를 노출시켜 재조합 단백질을 포집하는 단계; 세척 완충액에 크로마토그래피 수지를 노출시켜 크로마토그래피 수지를 세척하는 단계; 용출 완충액에 크로마토그래피 수지를 노출시켜 재조합 단백질을 용출시키는 단계; 및 재생 완충액에 크로마토그래피 수지를 노출시켜 크로마토그래피 수지를 재생시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 재조합 단백질을 포함하는 액체는 액체 배양 배지(예를 들어, 관류 또는 회분 배양물로부터 수집된 액체 배양 배지) 또는 회석된 액체 배양 배지(예를 들어, 완충액에 회석된 배양 배지)이다.

[0107] 컬럼 크로마토그래피는 단한 통합형 시스템(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 예시적인 단한 통합형 시스템)을 이용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 컬럼 크로마토그래피는, 완충액이 저감된 바이오버든 완충액인, 단한 통합형 시스템을 이용하여 수행될 수 있다. 당해 분야에 주지된 바와 같이, 저감된 바이오버든 완충액은 여러 상이한 방법을 이용하여(예를 들어, 여과, 고압증기멸균, 또는 열처리에 의해) 제조될 수 있다.

[0108] 컬럼 크로마토그래피는 둘 이상(예를 들어, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 11 이상, 12 이상, 13 이상, 14 이상, 15 이상, 20 이상, 25 이상, 30 이상, 35 이상, 40 이상, 45 이상, 50 이상, 55 이상, 60 이상, 65 이상, 70 이상, 75 이상, 80 이상, 85 이상, 90 이상, 95 이상, 또는 100 이상)의 크로마토그래피 사이클을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 컬럼 크로마토그래피는 적어도 3일(예를 들어, 적어도 4일, 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 7일, 적어도 8일, 적어도 9일, 적어도 10일, 적어도 11일, 적어도 12일, 적어도 13일, 적어도 14일, 적어도 15일, 적어도 16일, 적어도 17일, 적어도 18일, 적어도 19일, 적어도 20일, 적어도 21일, 적어도 22일, 적어도 23일, 적어도 24일, 적어도 25일, 적어도 30일, 적어도 35일, 적어도 40일, 적어도 45일, 적어도 50일, 적어도 55일, 적어도 60일, 적어도 65일, 적어도 70일, 적어도 75일, 적어도 80일, 적어도 85일, 적어도 90일, 적어도 95일, 또는 적어도 100일)의 기간에 걸쳐 연속적으로 수행된다.

[0109] 일부 구현예에서, (양 수지의 결합 용량을 시험하기 위해 동일한 단백질이 사용된 경우)(예를 들어, 감마선 조사 직후 평가된) 저감된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼 내 크로마토그래피 수지는 감마선 조사 처리되지 않은 동일한 수지에 비해 약 75% 내지 약 100%(예를 들어, 약 76% 내지 약 98%, 약 76% 내지 약 96%, 약 76%

내지 약 94%, 약 76% 내지 약 92%, 약 76% 내지 약 90%, 약 78% 내지 약 100%, 약 78% 내지 약 98%, 약 78% 내지 약 96%, 약 78% 내지 약 94%, 약 78% 내지 약 92%, 약 78% 내지 약 90%, 약 80% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 98%, 약 80% 내지 약 96%, 약 80% 내지 약 94%, 약 80% 내지 약 92%, 약 80% 내지 약 90%, 약 82% 내지 약 100%, 약 82% 내지 약 98%, 약 82% 내지 약 96%, 약 82% 내지 약 94%, 약 82% 내지 약 92%, 약 82% 내지 약 90%, 약 84% 내지 약 100%, 약 84% 내지 약 98%, 약 84% 내지 약 96%, 약 84% 내지 약 94%, 약 84% 내지 약 92%, 약 84% 내지 약 90%, 약 86% 내지 약 100%, 약 86% 내지 약 98%, 약 86% 내지 약 96%, 약 86% 내지 약 94%, 약 86% 내지 약 92%, 약 88% 내지 약 100%, 약 88% 내지 약 98%, 약 88% 내지 약 96%, 약 88% 내지 약 94%, 약 90% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 98%, 약 90% 내지 약 96%, 약 92% 내지 약 100%, 또는 약 92% 내지 약 98%)의 백분을 결합 용량을 갖는다.

[0110] **재조합 단백질을 제조를 위한 통합형, 단힌 또는 실질적으로 단힌, 연속 공정**

[0111] 정제된 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 치료 단백질)을 제조하기 위한 통합형, 단힌 또는 실질적으로 단힌, 연속 공정이 본원에 제공된다. 이러한 공정은 세포가 실질적으로 존재하지 않는 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 치료 단백질)을 포함하는 액체 배양 배지를 제공하는 단계를 포함한다.

[0112] 일부 공정은 본원에 제공된 적어도 하나의 저장된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼을 포함하는 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템(MCCS)에 액체 배양 배지를 연속적으로 공급하는 단계를 포함하며, 이러한 공정은 저장된 바이오버든 완충액을 사용하고, 통합형이며, 액체 배양 배지부터 정제된 재조합 단백질(예를 들어, 치료 단백질의 약 물질)인 MCCS로부터의 용출액까지 연속적으로 진행된다.

[0113] 일부 공정은 액체 배양 배지를 제1 MCCS(MCCS1)에 연속적으로 공급하는 단계, MCCS1을 이용하여 액체 배양 배지에서 재조합 단백질을 포집하는 단계, 재조합 단백질을 포함하는 MCCS1으로부터 용출액을 제조하고 용출액을 제2 MCCS(MCCS2)에 연속적으로 공급하는 단계, 및 용출액으로부터의 재조합 단백질을 MCCS2에 연속적으로 공급한 후 재조합 단백질을 용출시켜 정제된 재조합 단백질을 제조하는 단계를 포함하며, MCCS1 및/또는 MCCS2의 적어도 하나의 컬럼은 본원에 제공된 저장된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼이고, 이러한 공정은 저장된 바이오버든 완충액을 사용하고, 통합형이며, 액체 배양 배지부터 정제된 재조합 단백질까지 연속적으로 진행된다.

[0114] 일부 예에서, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2에 사용되는 각각의 크로마토그래피 컬럼은 본원에 제공된 저장된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼이다. 일부 구현에는 정제된 재조합 단백질을 약학 조성물로 제형화하는 단계를 더 포함한다.

[0115] 본원에 기술된 공정은 재조합 단백질을 포함하는 액체 배양 배지로부터 정제된 재조합 단백질의 연속적이고 시간 효율적인 제조를 제공한다. 예를 들어, 치료 단백질을 포함하는 액체 배양 배지를 MCCS 또는 MCCS1에 공급하는 단계와 MCCS 또는 MCCS2로부터 재조합 단백질을 용출시키는 단계 사이의 경과 시간은 각각, 예를 들어 약 4시간 이상 약 48시간 이하, 예를 들어, 약 4시간 이상 약 40시간 이하, 약 4시간 이상 약 35시간 이하, 약 4시간 이상 약 30시간 이하, 약 4시간 이상 약 28시간 이하, 약 4시간 이상 약 26시간 이하, 약 4시간 이상 약 24시간 이하, 약 4시간 이상 약 22시간 이하, 약 4시간 이상 약 20시간 이하, 약 4시간 이상 약 18시간 이하, 약 4시간 이상 약 16시간 이하, 약 4시간 이상 약 14시간 이하, 약 4시간 이상 약 12시간 이하, 약 6시간 이상 약 12시간 이하, 약 8시간 이상 약 12시간 이하, 약 6시간 이상 약 20시간 이하, 약 6시간 이상 약 18시간 이하, 약 6시간 이상 약 14시간 이하, 약 8시간 이상 약 16시간 이하, 약 8시간 이상 약 14시간 이하, 약 8시간 이상 약 12시간 이하, 약 10시간 이상 20시간 이하, 약 10시간 이상 18시간 이하, 약 10시간 이상 16시간 이하, 약 10시간 이상 14시간 이하, 약 12시간 이상 약 14시간 이하, 약 10시간 이상 약 40시간 이하, 약 10시간 이상 약 35시간 이하, 약 10시간 이상 약 30시간 이하, 약 10시간 이상 약 25시간 이하, 약 15시간 이상 약 40시간 이하, 약 15시간 이상 약 35시간 이하, 약 15시간 이상 약 30시간 이하, 약 20시간 이상 약 40시간 이하, 약 20시간 이상 약 35시간 이하, 또는 약 20시간 이상 약 30시간 이하일 수 있다. 다른 예에서, 치료 단백질을 포함하는 액체 배양 배지를 MCCS 또는 MCCS1에 공급하는 단계와 MCCS 또는 MCCS2로부터 재조합 단백질을 용출시키는 단계 사이의 경과 시간은 각각, 예를 들어 약 4시간 이상 약 40시간 이하, 예를 들어, 약 4시간 이상 약 39시간, 약 38시간, 약 37시간, 약 36시간, 약 35시간, 약 34시간, 약 33시간, 약 32시간, 약 31시간, 약 30시간, 약 29시간, 약 28시간, 약 27시간, 약 26시간, 약 25시간, 약 24시간, 약 23시간, 약 22시간, 약 21시간, 약 20시간, 약 19시간, 약 18시간, 약 17시간, 약 16시간, 약 15시간, 약 14시간, 약 13시간, 약 12시간, 약 11시간, 약 10시간, 약 9시간, 약 8시간, 약 7시간, 약 6시간, 약 5시간, 또는 약 4.5시간 이하이다.

[0116] 임의의 이러한 공정에 사용될 수 있는 MCCS의 비제한적 양태(MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2)는 미국 특허 가출원 제61/775,060호 및 제61/856,390호(각각은 본원에 참조로 통합됨)에 기술되어 있다.

- [0117] 일부 예시적 공정은 수용 단계를 사용하지 않는다(예를 들어, 전체 공정에서 저장소(예를 들어, 브레이크 탱크)를 사용하지 않는다). 다른 공정은 전체 공정에서 최대 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 저장소(예를 들어, 브레이크 탱크)를 사용할 수 있다. 본원에 기술된 임의의 공정은 전체 공정에서 최대 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 저장소(예를 들어, 브레이크 탱크)를 사용할 수 있고, 각 브레이크 탱크는, 예를 들어 약 5분 이상 약 6시간 이하, 예를 들어, 약 5분 이상 약 5시간, 약 4시간, 약 3시간, 약 2시간, 약 1시간, 또는 약 30분 이하의 총 기간 동안 재조합 단백질을 단지 수용한다.
- [0118] 일부 공정은 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 저장소(예를 들어, 브레이크 탱크)를 사용하고, 예를 들어 1 mL 이상 약 300 mL 이하, 예를 들어, 1 mL 내지 약 280 mL, 약 260 mL, 약 240 mL, 약 220 mL, 약 200 mL, 약 180 mL, 약 160 mL, 약 140 mL, 약 120 mL, 약 100 mL, 약 80 mL, 약 60 mL, 약 40 mL, 약 20 mL, 또는 약 10 mL(경계 값 포함)인 용량을 가질 수 있다. 유체가 MCCS 또는 MCCS1에 공급되기 전에 유체를 수용하기 위해 (본원에 기술된 임의의 공정에) 사용되는 임의의 저장소(들)(예를 들어, 브레이크 탱크(들))는, 예를 들어, 1 mL 이상 MCCS 또는 MCCS1의 제1 컬럼 로딩 부피의 약 100% 이하, 예를 들어, 1 mL 이상 MCCS 또는 MCCS1의 제1 컬럼 로딩 부피의 약 90%, 약 80%, 약 70%, 약 60%, 약 50%, 약 40%, 약 30%, 약 20%, 약 10%, 또는 약 5% 이하인 용량을 가질 수 있다. 저장소(들)(예를 들어, 브레이크 탱크(들))는 MCCS1으로부터의 용출액이 MCCS2에 유입되기 전에 MCCS1으로부터의 용출액을 수용하기 위해 사용될 수 있으며, 예를 들어, 1 mL 이상 MCCS2의 제1 컬럼 로딩 부피의 약 100% 이하, 예를 들어, 1 mL 이상 MCCS2의 제1 컬럼 로딩 부피의 약 90%, 약 80%, 약 70%, 약 60%, 약 50%, 약 40%, 약 30%, 약 20%, 약 10%, 또는 약 5% 이하인 용량을 가질 수 있다.
- [0119] 이러한 공정의 다양한 추가적 양태가 이하 상세히 설명되며, 본원에 제공된 공정에서 제한 없이 임의의 조합으로 사용될 수 있다. 제공된 공정의 예시적 양태를 이하 설명한다. 그러나, 당업자는 본원에 기술된 공정에 추가 단계가 추가될 수 있다는 것과 본원에 기술된 임의의 단계를 수행하기 위해 다른 물질이 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다.
- [0120] **액체 배양 배지**
- [0121] 세포가 실질적으로 존재하지 않는 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 치료 단백질)을 포함하는 액체 배양 배지는 임의의 소스에서 유래할 수 있다. 예를 들어, 액체 배양 배지는 재조합 세포 배양물(예를 들어, 재조합 박테리아, 효모, 또는 포유류 세포 배양물)로부터 얻을 수 있다. 액체 배양 배지는 유가 세포(예를 들어, 포유류 세포) 배양물(예를 들어, 재조합 단백질을 분비하는 포유류 세포의 배양물을 포함하는 유가 생물반응기) 또는 관류 세포(예를 들어, 포유류 세포) 배양물(예를 들어, 재조합 단백질을 분비하는 포유류 세포의 배양물을 포함하는 관류 생물반응기)로부터 얻을 수 있다. 액체 배양 배지는 또한 재조합 단백질을 분비하는 박테리아 또는 효모 세포의 배양물로부터 정화된 액체 배양 배지일 수 있다.
- [0122] 재조합 세포 배양물로부터 얻은 액체 배양 배지는 세포 및/또는 바이러스가 실질적으로 존재하지 않는 액체 배양 배지를 얻기 위해 여과되거나 정화될 수 있다. 세포를 제거하기 위해 액체 배양 배지를 여과 또는 정화하기 위한 방법은 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 0.2  $\mu\text{m}$  여과 및 교번 접선 유동(Alternating Tangential Flow; ATF<sup>TM</sup>) 시스템을 이용한 여과). 재조합 세포는 또한 원심분리기를 이용하여 세포가 실질적으로 존재하지 않는 액체 배양 배지인 상청액을 제거하거나, 액체 배양 배지를 포함하는 용기(예를 들어, 생물반응기)의 중력 바닥에 세포를 가라앉도록 하여, 가라앉은 재조합 세포로부터 떨어진 액체 배양 배지(세포가 실질적으로 존재하지 않는 액체 배양 배지)를 제거함으로써 액체 배양 배지로부터 제거될 수 있다.
- [0123] 액체 배양 배지는 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 치료 단백질)을 생성하는 재조합 세포(예를 들어, 재조합 박테리아, 효모, 또는 포유류 세포)의 배양물로부터 얻을 수 있다. 본원에 기술된 임의의 공정의 일부 예는 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 치료 단백질)을 생성하는 재조합 세포(예를 들어, 재조합 박테리아, 효모, 또는 포유류 세포)를 배양하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0124] 액체 배양 배지는 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 타입의 액체 배양 배지일 수 있다. 예를 들어, 액체 배양 배지는 동물-유래 성분이 존재하지 않는 액체 배양 배지, 혈청-부재 액체 배양 배지, 혈청-함유 액체 배양 배지, 화학적으로 규정된 액체 배양 배지, 및 단백질-부재 액체 배양 배지의 군으로부터 선택될 수 있다. 본원에 기술된 임의의 공정에서, 배양물로부터 얻은 액체 배양 배지는 MCCS 또는 MCCS1에 공급되기 전에 제2 유체(예를 들어, 완충액)의 첨가에 의해 희석될 수 있다.
- [0125] 세포가 실질적으로 존재하지 않는 재조합 단백질을 포함하는 액체 배양 배지는, 액체 배양 배지를 MCCS 또는 MCCS1에 공급하기 전에, 예를 들어, 약 15°C 미만(예를 들어, 약 10°C 미만, 약 4°C 미만, 약 0°C 미만, 약 -20

℃ 미만, 약 -50℃ 미만, 약 -70℃ 미만, 또는 약 -80℃ 미만)의 온도에서 적어도 1일(예를 들어, 적어도 약 2 일, 적어도 약 5일, 적어도 약 10일, 적어도 약 15일, 적어도 약 20일, 또는 적어도 약 30일) 동안 저장될 수 있다. 대안적으로, 일부 예에서 액체 배양 배지는 생물반응기로부터 직접 MCCS 또는 MCCS1에 공급된다(예를 들어, 여과 또는 정화 단계 후 생물반응기로부터 직접 MCCS 또는 MCCS1에 공급된다).

[0126] **다중-컬럼 크로마토그래피 시스템**

[0127] 본원에 기술된 공정은 하나의 MCCS 또는 둘 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 또는 6개)의 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템(MCCS)(예를 들어, MCCS1 및 MCCS2)의 사용을 포함한다. MCCS는 둘 이상의 크로마토그래피 컬럼, 둘 이상의 크로마토그래피 멤브레인, 또는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼과 적어도 하나의 크로마토그래피 멤브레인의 조합을 포함할 수 있다. 비제한적 예에서, MCCS(예를 들어, 본원의 임의의 공정에서의 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2)는 4개의 크로마토그래피 컬럼, 3개의 크로마토그래피 컬럼과 1개의 크로마토그래피 멤브레인, 3개의 크로마토그래피 컬럼, 2개의 크로마토그래피 컬럼, 2개의 크로마토그래피 멤브레인, 및 2개의 크로마토그래피 컬럼과 1개의 크로마토그래피 멤브레인을 포함할 수 있다. 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인의 조합에 대한 추가 예는 MCCS(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 공정에서의 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2)에서의 사용을 위해 당업자에 의해 제한 없이 구상될 수 있다. MCCS에 존재하는 개별 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인은 동일하거나(예를 들어, 동일한 형상, 부피, 수지, 포집 메커니즘, 및 단위 조작을 갖거나), 상이할 수 있다(예를 들어, 하나 이상의 상이한 형상, 부피, 수지, 포집 메커니즘, 및/또는 단위 조작을 가질 수 있다). MCCS(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 공정에서의 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2)에 존재하는 개별 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)은 동일한 단위 조작(예를 들어, 포집, 정제, 또는 폴리싱의 단위 조작) 또는 상이한 단위 조작(예를 들어, 포집, 정제, 폴리싱, 바이러스 비활성화, 재조합 단백질을 포함하는 유체의 이온 농도 및/또는 pH 조절, 및 여과의 균으로부터 선택되는, 예를 들어 상이한 단위 조작)을 수행할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 공정의 예에서, MCCS 또는 MCCS1의 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인은 재조합 단백질을 포집하는 단위 조작을 수행한다.

[0128] MCCS에 존재할 수 있는(예를 들어, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2에 존재할 수 있는) 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼은, 예를 들어 약 1 mL 이상 약 2 mL, 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 약 25 mL, 약 30 mL, 약 35 mL, 약 40 mL, 약 45 mL, 약 50 mL, 약 55 mL, 약 60 mL, 약 65 mL, 약 70 mL, 약 75 mL, 약 80 mL, 약 85 mL, 약 90 mL, 약 95 mL, 또는 약 100 mL 이하의 수지 부피를 가질 수 있다. MCCS에 존재할 수 있는(예를 들어, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2에 존재할 수 있는) 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼은 약 2 mL 내지 약 100 mL, 약 2 mL 내지 약 90 mL, 약 2 mL 내지 약 80 mL, 약 2 mL 내지 약 70 mL, 약 2 mL 내지 약 60 mL, 약 2 mL 내지 약 50 mL, 약 5 mL 내지 약 50 mL, 약 2 mL 내지 약 45 mL, 약 5 mL 내지 약 45 mL, 약 2 mL 내지 약 40 mL, 약 5 mL 내지 약 40 mL, 약 2 mL 내지 약 35 mL, 약 5 mL 내지 약 35 mL, 약 2 mL 내지 약 30 mL, 약 5 mL 내지 약 30 mL, 약 2 mL 내지 약 25 mL, 약 5 mL 내지 약 25 mL, 약 15 mL 내지 약 60 mL, 약 10 mL 내지 약 60 mL, 약 10 mL 내지 약 50 mL, 및 약 15 mL 내지 약 50 mL의 수지 부피를 가질 수 있다.

[0129] 본원에 기술된 임의의 공정에 사용되는 MCCS(예를 들어, MCCS, MCCS1 및/또는 MCCS2)의 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼은 실질적으로 동일한 수지 부피를 갖거나 상이한 수지 부피를 가질 수 있다. MCCS(예를 들어, MCCS, MCCS1 및/또는 MCCS2)의 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼에 사용되는 유량은, 예를 들어 약 0.2 mL/분 내지 약 25 mL/분(예를 들어, 약 0.2 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.2 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 10 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 14 mL/분, 약 1.0 mL/분 내지 약 25.0 mL/분, 또는 약 1.0 mL/분 내지 약 15.0 mL/분)일 수 있다.

[0130] MCCS(예를 들어, MCCS, MCCS1 및/또는 MCCS2)의 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼은 실질적으로 동일한 형상을 갖거나 실질적으로 상이한 형상을 가질 수 있다. 예를 들어, MCCS(예를 들어, MCCS, MCCS1 및/또는 MCCS2)의 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼은 실질적으로 원형 실린더 형상을 갖거나 실질적으로 타원형 실린더와 동일한 형상을 가질 수 있다.

[0131] MCCS에 존재할 수 있는(예를 들어, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2에 존재할 수 있는) 하나 이상의 크로마토그래피 멤브레인은, 예를 들어 약 1 mL 내지 약 500 mL(예를 들어, 약 1 mL 내지 약 475 mL, 약 1 mL 내지 약 450 mL, 약 1 mL 내지 약 425 mL, 약 1 mL 내지 약 400 mL, 약 1 mL 내지 약 375 mL, 약 1 mL 내지 약 350 mL, 약 1 mL 내지 약 325 mL, 약 1 mL 내지 약 300 mL, 약 1 mL 내지 약 275 mL, 약 1 mL 내지 약 250 mL, 약 1 mL 내지 약 225 mL, 약 1 mL 내지 약 200 mL, 약 1 mL 내지 약 175 mL, 약 1 mL 내지 약 150 mL, 약 1 mL 내지 약 125 mL,



약 1 mL 내지 약 100 mL, 약 2 mL 내지 약 100 mL, 약 5 mL 내지 약 100 mL, 약 1 mL 내지 약 80 mL, 약 2 mL 내지 약 80 mL, 약 5 mL 내지 약 80 mL, 약 1 mL 내지 약 60 mL, 약 2 mL 내지 약 60 mL, 약 5 mL 내지 약 60 mL, 약 1 mL 내지 약 40 mL, 약 2 mL 내지 약 40 mL, 약 5 mL 내지 약 40 mL, 약 1 mL 내지 약 30 mL, 약 2 mL 내지 약 30 mL, 약 5 mL 내지 약 30 mL, 약 1 mL 내지 약 25 mL, 약 2 mL 내지 약 25 mL, 약 1 mL 내지 약 20 mL, 약 2 mL 내지 약 20 mL, 약 1 mL 내지 약 15 mL, 약 2 mL 내지 약 15 mL, 약 1 mL 내지 약 10 mL, 또는 약 2 mL 내지 약 10 mL)의 충전층 부피를 가질 수 있다.

[0132] 본원에 기술된 임의의 공정에서 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2의 사용 시 하나 이상(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24개)의 상이한 타입의 저장된 바이오버든 완충액이 사용될 수 있다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 본원에 기술된 공정에서 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2에 사용되는 하나 이상의 타입의 저장된 바이오버든 완충액은 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2의 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)에 존재하는 수지, 재조합 단백질의 생물물리학적 성질, 및 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2의 특정 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인들에 의해 수행되는 단위 조작(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 예시적 단위 조작)에 따라 달라질 것이다. 본원에 기술된 임의의 공정에서 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2의 사용 시 사용되는 완충액의 부피 및 타입은 또한 (예를 들어, 이하 더 상세히 설명되는 바와 같이) 당업자에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 임의의 공정에서 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2의 사용 시 사용되는 완충액의 부피 및 타입(들)은 정제된 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 단백질 의약 제품)에서 다음 중 하나 이상을 최적화하기 위해 선택될 수 있다: 재조합 단백질의 전체 수율, 재조합 단백질의 활성, 재조합 단백질의 순도의 수준, 및 재조합 단백질을 포함하는 유체(예를 들어, 액체 배양 배지)로부터 생물학적 오염물의 제거(예를 들어, 활성 바이러스, 마이코박테리아, 효모, 박테리아, 또는 포유류 세포의 부재).

[0133] MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2는 주기적 역류 크로마토그래피 시스템(PCCS)일 수 있다. PCCS는 예를 들어, 둘 이상의 크로마토그래피 컬럼으로부터 재조합 단백질의 연속 용출을 가능하게 하기 위해 스위칭 되는 둘 이상의 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, 3개의 컬럼 또는 4개의 컬럼)을 포함할 수 있다. PCCS는 둘 이상의 크로마토그래피 컬럼, 둘 이상의 크로마토그래피 멤브레인, 또는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼과 적어도 하나의 크로마토그래피 멤브레인을 포함할 수 있다. 컬럼 작동(사이클)은 일반적으로, 로딩, 세척, 용출, 및 재생 단계로 이루어진다. PCCS에서, 다수의 컬럼은 동일한 단계들을 따로따로 그리고 순환 방식으로 연속적으로 진행시키기 위해 사용된다. 컬럼들은 직렬로 작동되기 때문에, 하나의 컬럼을 통한 흐름 및 하나의 컬럼으로부터의 세척은 다른 컬럼에 의해 포집된다. PCCS의 이러한 독특한 특징은 일괄 모드 크로마토그래피에서는 일반적인 것으로, 동적 결합 용량 대신에 정적 결합 용량에 가까운 수지의 로딩을 가능하게 한다. 연속 사이클링 및 용출의 결과로서, PCCS에 유입되는 유체는 연속적으로 처리되며, 재조합 단백질을 포함하는 용출액이 연속적으로 생성된다.

[0134] 컬럼 스위칭 방식은 PCCS 사이클에서 하나의 단계로부터 다른 단계까지 진행시키기 위해 사용된다. PCCS에 사용될 수 있는 컬럼 스위칭의 예는 미국 특허 가출원 제61/775,060호 및 제61/856,390호에 기술되어 있다. 예를 들어, 컬럼 스위칭 방법은 컬럼 당 두 개의 자동 스위칭 작동을 사용할 수 있으며, 그 첫 번째 작동은 초기 생성물 누출(breakthrough)과 관련되는 반면, 그 두 번째 작동은 컬럼 포화와 일치한다. 컬럼 스위칭 작동이 언제 이루어져야 하는지에 대한 결정은 PCCS에 존재하는 각 크로마토그래피 컬럼으로부터의 용출액 내 재조합 단백질 농도를 모니터링(예를 들어, UV 모니터링에 의해 수행되는 모니터링)하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 컬럼 스위칭은 피드백 제어로 재조합 단백질 농도의 인라인 측정을 할 수 있는 임의의 PAT 도구에 의해 결정될 수 있다. PAT 도구는 피드백 제어로 재조합 단백질 농도의 실시간 인라인 측정을 할 수 있다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 컬럼 스위칭은 또한 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2의 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인을 통과한 유체(예를 들어, 완충액)의 양 또는 시간을 기초로 설계될 수 있다.

[0135] PCCS에서, 제1 컬럼/멤브레인으로부터의 누출이 PCCS의 다른 컬럼/멤브레인 상에 포집될 수 있기 때문에, PCCS에 존재하는 각 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인 상에서의 재조합 단백질의 체류 시간(RT)은 컬럼/멤브레인 크기를 증가시키지 않고 감소될 수 있다. 연속 공정 시스템은  $V = D * RT$ 의 식을 이용하여 컬럼/멤브레인 부피(V) 및 RT를 변화시킴으로써 임의의 관류 속도(D)로 액체 배양 배지를 처리하도록 설계될 수 있다.

[0136] 본원에 기술된 공정에 사용되는 MCCS 또는 MCC1 및/또는 MCCS2에 의해 수행될 수 있는 하나 이상의 단위 조작은, 예를 들어 재조합 단백질의 포집, 재조합 단백질을 포함하는 유체에 존재하는 바이러스의 비활성화, 재조합 단백질의 정제, 재조합 단백질의 폴리싱, (예를 들어, 본원에 기술된 임의의 예시적 브레이크 탱크(들)를 사용한) 재조합 단백질을 포함하는 유체의 수율, 재조합 단백질을 포함하는 유체로부터 미립자 물질 및/또는 세

포의 여과 또는 제거, 및 재조합 단백질을 포함하는 유체의 이온 농도 및/또는 pH 조절을 포함한다.

[0137] 일부 구현예에서, MCCS 또는 MCCS1은 재조합 단백질을 포집하는 단위 조작을 수행하는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인을 포함한다. 포집의 단위 조작은, 예를 들어 포집 메커니즘을 이용하는, 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 수지를 사용하여 수행될 수 있다. 포집 메커니즘의 비제한적 예는 단백질 A-결합 포집 메커니즘, 항체- 또는 항체 단편-결합 포집 메커니즘, 기질-결합 포집 메커니즘, 아프타머-결합 포집 메커니즘, 태그-결합 포집 메커니즘(예를 들어, 폴리-His 태그-기반 포집 메커니즘), 및 공동 인자-결합 포집 메커니즘을 포함한다. 포집은 또한, 양이온 교환 또는 음이온 교환 크로마토그래피, 분자체 크로마토그래피, 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행하기 위해 사용될 수 있는 수지를 사용하여 수행될 수 있다. 재조합 단백질을 포집하기 위해 사용될 수 있는 비제한적 수지는 본원에 기술되어 있다. 재조합 단백질을 포집하기 위해 사용될 수 있는 수지의 추가 예는 당해 분야에 공지되어 있다.

[0138] 재조합 단백질을 포함하는 유체에 존재하는 바이러스를 비활성화시키는 단위 조작은, (예를 들어 크로마토그래피 컬럼, 크로마토그래피 멤브레인, 또는 약 3.0 내지 5.0(예를 들어, 약 3.5 내지 약 4.5, 약 3.5 내지 약 4.25, 약 3.5 내지 약 4.0, 약 3.5 내지 약 3.8, 또는 약 3.75)의 pH에서 적어도 30분의 기간(예를 들어, 약 30분 내지 1.5시간의 기간, 약 30분 내지 1.25시간의 기간, 약 0.75시간 내지 1.25시간의 기간, 또는 약 1시간의 기간) 동안 재조합 단백질을 포함하는 유체를 배양할 수 있는 수용 탱크를 포함하는) MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2를 사용하여 수행될 수 있다.

[0139] 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작은, 예를 들어 포집 시스템을 이용하는, 예를 들어 수지를 포함하는 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 포함하는 하나 이상의 MCCS(예를 들어, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2)를 사용하여 수행될 수 있다. 포집 메커니즘의 비제한적 예는 단백질 A-결합 포집 메커니즘, 항체- 또는 항체 단편-결합 포집 메커니즘, 기질-결합 포집 메커니즘, 아프타머-결합 포집 메커니즘, 태그-결합 포집 메커니즘(예를 들어, 폴리-His 태그-기반 포집 메커니즘), 및 공동 인자-결합 포집 메커니즘을 포함한다. 정제는 또한, 양이온 교환 또는 음이온 교환 크로마토그래피, 분자체 크로마토그래피, 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행하기 위해 사용될 수 있는 수지를 사용하여 수행될 수 있다. 재조합 단백질을 정제하기 위해 사용될 수 있는 비제한적 수지는 본원에 기술되어 있다. 재조합 단백질을 정제하기 위해 사용될 수 있는 수지의 추가 예는 당해 분야에 공지되어 있다.

[0140] 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작은, 예를 들어 양이온 교환, 음이온 교환, 분자체 크로마토그래피, 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행하기 위해 사용될 수 있는, 예를 들어 수지를 포함하는 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 포함하는 하나 이상의 MCCS(예를 들어, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2)를 사용하여 수행될 수 있다. 재조합 단백질을 폴리싱하기 위해 사용될 수 있는 비제한적 수지는 본원에 기술되어 있다. 재조합 단백질을 폴리싱하기 위해 사용될 수 있는 수지의 추가 예는 당해 분야에 공지되어 있다.

[0141] 재조합 단백질을 포함하는 유체를 수용하는 단위 조작은, MCCS 또는 결합된 MCCS1과 MCCS2에 적어도 하나의 저장소(예를 들어, 브레이크 탱크), 또는 최대 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 저장소(예를 들어, 브레이크 탱크)를 포함하는 MCCS(예를 들어, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2)를 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 이러한 단위 조작을 달성하기 위해 사용될 수 있는 저장소(들)(예를 들어, 브레이크 탱크(들))는 각각 약 1 mL 내지 약 1 L(예를 들어, 약 1 mL 내지 약 800 mL, 약 1 mL 내지 약 600 mL, 약 1 mL 내지 약 500 mL, 약 1 mL 내지 약 400 mL, 약 1 mL 내지 약 350 mL, 약 1 mL 내지 약 300 mL, 약 10 mL 내지 약 250 mL, 약 10 mL 내지 약 200 mL, 약 10 mL 내지 약 150 mL, 또는 약 10 mL 내지 약 100 mL)의 부피를 가질 수 있다. 본원에 기술된 공정에 사용되는 저장소(들)(예를 들어, 브레이크 탱크(들))는, 예를 들어 1 mL 이상 약 300 mL 이하, 예를 들어 1 mL 이상 약 280 mL, 약 260 mL, 약 240 mL, 약 220 mL, 약 200 mL, 약 180 mL, 약 160 mL, 약 140 mL, 약 120 mL, 약 100 mL, 약 80 mL, 약 60 mL, 약 40 mL, 약 20 mL, 또는 약 10 mL 이하인 용량을 가질 수 있다. 유체가 MCCS 또는 MCCS1에 유입되기 전에 유체를 수용하기 위해 (본원에 기술된 임의의 공정에) 사용되는 임의의 저장소(들)(예를 들어, 브레이크 탱크(들))는, 예를 들어 1 mL 이상 MCCS 또는 MCCS1의 제1 컬럼 로딩 부피의 약 100% 이하, 약 1 mL 이상 MCCS 또는 MCCS1의 제1 컬럼 로딩 부피의 약 90%, 약 80%, 약 70%, 약 60%, 약 50%, 약 40%, 약 30%, 약 20%, 약 10%, 또는 약 5% 이하인 용량을 가질 수 있다. (재조합 단백질을 포함하는) MCCS1으로부터의 용출액이 MCCS2에 유입되기 전에 MCCS1으로부터의 용출액을 수용하기 위해 사용되는 임의의 저장소(들)(예를 들어, 브레이크 탱크(들))는, 예를 들어 1 mL 이상 MCCS2의 제1 컬럼 로딩 부피의 약 100% 이하, 예를 들어, 약 1 mL 이상 MCCS2의 제1 컬럼 로딩 부피의 약 90%, 약 80%, 약 70%, 약 60%, 약 50%, 약 40%, 약 30%, 약 20%, 약 10%, 또는 약 5% 이하인 용량을 가질 수 있다.

- [0142] 저장소(들)(예를 들어, 브레이크 탱크(들))는 각각 재조합 단백질을 포함하는 유체를 적어도 10분(예를 들어, 적어도 20분, 적어도 30분, 적어도 1시간, 적어도 2시간, 적어도 4시간, 또는 적어도 6시간) 동안 수용할 수 있다. 다른 예에서, 저장소(들)(예를 들어, 브레이크 탱크(들))는, 예를 들어 약 5분 이상 약 6시간 이하, 예를 들어, 약 5분 이상 약 5시간, 약 4시간, 약 3시간, 약 2시간, 약 1시간, 또는 약 30분 이하의 총 기간 동안 재조합 단백질을 단지 수용한다. 저장소(들)(예를 들어, 브레이크 탱크(들))는 재조합 단백질을 포함하는 유체를 (예를 들어, 25℃ 미만, 15℃ 미만, 또는 10℃ 미만의 온도에서) 수용도 하고 냉동도 하기 위해 사용될 수 있다. 저장소는 원형 실린더, 타원형 실린더, 또는 대략 직사각형의 밀봉된 비침투성 백을 포함하는 임의의 형상을 가질 수 있다.
- [0143] 재조합 단백질을 포함하는 유체를 여과하는 단위 조작용, 예를 들어 필터, 또는 분자체 수지를 포함하는 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 포함하는 MCCS(예를 들어, MCCS, MCCS1 및/또는 MCCS2)를 사용하여 수행될 수 있다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 매우 다양한 서브마이크론 필터(예를 들어, 1  $\mu\text{m}$  미만, 0.5  $\mu\text{m}$  미만, 0.3  $\mu\text{m}$  미만, 약 0.2  $\mu\text{m}$ , 0.2  $\mu\text{m}$  미만, 100 nm 미만, 80 nm 미만, 60 nm 미만, 40 nm 미만, 20 nm 미만, 또는 10 nm 미만의 기공 크기를 갖는 필터)는 당해 분야에서 입수 가능한 것으로서, 임의의 침전된 물질 및/또는 세포(예를 들어, 침전된, 폴딩되지 않은 단백질; 침전된, 원치 않는 숙주 세포 단백질; 침전된 지질; 박테리아; 효모 세포; 진균 세포; 마이코박테리아 및/또는 포유류 세포)를 제거할 수 있다. 약 0.2  $\mu\text{m}$  또는 0.2  $\mu\text{m}$  미만의 기공 크기를 갖는 필터는 재조합 단백질을 포함하는 유체로부터 박테리아를 효과적으로 제거하는 것으로 알려져 있다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 분자체 수지를 포함하는 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인은 또한, 재조합 단백질을 포함하는 유체를 여과하는 단위 조작용을 수행하기 위해 MCCS(예를 들어, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2)에서 사용될 수 있다.
- [0144] 재조합 단백질을 포함하는 유체의 이온 농도 및/또는 pH를 조절하는 단위 조작용 (예를 들어, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2 내의 컬럼들 사이에, 또는 끝에서 두 번째 MCCS(예를 들어, MCCS1)의 마지막 컬럼 이후에 그리고 재조합 단백질을 포함하는 유체가 다음 MCCS(예를 들어, MCCS2)의 제1 컬럼에 공급되기 전에) 새로운 완충 용액을 재조합 단백질을 포함하는 유체에 첨가하는 완충액 조절 저장소(예를 들어, 인라인 완충액 조절 저장소)를 포함 및 사용하는 MCCS(예를 들어, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2)를 사용하여 수행될 수 있다. 당해 분야에서 이해될 수 있는 바와 같이, 인라인 완충액 조절 저장소는 임의의 크기(예를 들어, 100 mL 초과)일 수 있고, 임의의 완충 용액(예를 들어, 재조합 단백질을 포함하는 유체에 비해 증가되거나 감소된 pH, 재조합 단백질을 포함하는 유체에 비해 증가되거나 감소된 이온(예를 들어, 염) 농도, 및/또는 MCCS(예를 들어, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2)의 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 적어도 하나의 크로마토그래피 멤브레인에 존재하는 수지에 결합하기 위해 재조합 단백질과 경쟁하는 제제의 증가되거나 감소된 농도 중 하나 이상을 갖는 완충 용액)을 포함할 수 있다.
- [0145] MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2는 둘 이상의 단위 조작용을 수행할 수 있다. 예를 들어, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2 각각은 적어도 다음의 단위 조작용을 수행할 수 있다: 재조합 단백질의 포집 및 재조합 단백질을 포함하는 유체에 존재하는 바이러스의 비활성화; 재조합 단백질의 포집, 재조합 단백질을 포함하는 유체에 존재하는 바이러스의 비활성화, 및 재조합 단백질을 포함하는 액체의 이온 농도 및/또는 pH 조절; 재조합 단백질의 정제 및 재조합 단백질의 폴리싱; 재조합 단백질의 정제, 재조합 단백질의 폴리싱, 및 재조합 단백질을 포함하는 유체의 여과 또는 재조합 단백질을 포함하는 유체로부터 침전물 및/또는 미립자 물질 제거; 및 재조합 단백질의 정제, 재조합 단백질의 폴리싱, 재조합 단백질을 포함하는 유체의 여과 또는 재조합 단백질을 포함하는 유체로부터 침전물 및/또는 미립자 물질 제거, 및 재조합 단백질을 포함하는 액체의 이온 농도 및/또는 pH 조절.
- [0146] **재조합 단백질의 포집**
- [0147] 본 공정은 MCCS 또는 MCCS1을 이용하여 재조합 단백질을 포집하는 단계를 포함한다. 당해 분야에서 이해될 수 있는 바와 같이, 재조합 단백질을 포함하는 액체 배양 배지는 여러 상이한 수단을 이용하여 MCCS 또는 MCCS1에 연속적으로 공급될 수 있다. 예를 들어, 액체 배양 배지는 MCCS 또는 MCCS1에 능동적으로 펌핑될 수 있거나, 액체 배양 배지는 중력을 이용하여 MCCS 또는 MCCS1에 공급될 수 있다. 액체 배양 배지는 MCCS 또는 MCCS1에 공급되기 전에 저장소(예를 들어, 수용 탱크)에 저장될 수 있거나, 액체 배양 배지는 세포(예를 들어 배양 배지에 재조합 단백질을 분비하는 포유류 세포)의 배양물을 포함하는 생물반응기로부터 MCCS 또는 MCCS1에 능동적으로 펌핑될 수 있다.
- [0148] 액체 배양 배지는 약 0.2 mL/분 내지 약 25 mL/분(예를 들어, 약 0.2 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.2 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 10

mL/분, 약 0.5 mL 분 내지 약 14 mL/분, 약 1.0 mL/분 내지 약 25.0 mL/분, 약 1.0 mL/분 내지 약 15.0 mL/분)의 유량으로 MCCS 또는 MCCS1에 공급(로딩)될 수 있다. 제조합 단백질을 포함하는 액체 배양 배지는 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 예시적 소스에서 유래할 수 있다.

[0149] 일부 예는 액체 배양 배지가 MCCS 또는 MCCS1에 공급되기 전에 액체 배양 배지를 여과하는 선택적 단계를 더 포함한다. 제조합 단백질을 포함하는 액체 배양 배지가 MCCS 또는 MCCS1에 공급되기 전에 그 액체 배양 배지를 여과하기 위해, 본원에 기술된 액체 배양 배지 또는 제조합 단백질을 포함하는 유체를 여과하는 임의의 예시적 수단, 또는 당해 분야에 공지된 임의의 여과 수단이 사용될 있다.

[0150] 본원에 기술된 공정에서, 액체 배양 배지로부터 제조합 단백질을 포집하는 단계는 MCCS 또는 MCCS1을 이용하여 수행된다. 당해 분야에서 이해될 수 있는 바와 같이, 제조합 단백질의 포집을 달성하기 위해, MCCS 또는 MCCS1의 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 적어도 하나의 크로마토그래피 멤브레인은 포집 메커니즘(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 예시적 포집 메커니즘)을 이용하는 수지를 포함해야 하거나, 양이온 교환, 음이온 교환, 분자체, 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행할 수 있는 수지를 포함한다. 예를 들어, 제조합 단백질이 항체 또는 항체 단편인 경우, 포집 시스템은 단백질 A-결합 포집 메커니즘 또는 (제조합 항체 또는 항체 단편에 의해 포집 항원이 특이적으로 인식되는) 항원-결합 포집 메커니즘일 수 있다. 제조합 단백질이 효소인 경우, 포집 메커니즘은 제조합 효소를 포집하기 위해 효소에, 제조합 효소를 포집하기 위해 효소의 기질에, 제조합 효소를 포집하기 위해 효소의 공동 인자에, 또는 제조합 효소가 태그를 포함하는 경우, 제조합 효소에 존재하는 태그에 특이적으로 결합하는 단백질, 금속 킬레이트, 또는 항체(또는 항체 단편)에, 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체 단편을 이용할 수 있다. 제조합 단백질을 포집하기 위해 사용될 수 있는 비제한적 수지는 본원에 기술되어 있으며, 제조합 단백질을 포집하기 위해 사용될 수 있는 추가적 수지는 당해 분야에 공지되어 있다. 단백질 A-결합 포집 메커니즘을 이용하는 수지의 비제한적 일례는 Mab Select SuRe<sup>TM</sup> 수지(GE Healthcare, Piscataway, NJ), JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 (Sunnyvale, CA), 및 Kaneka KanCap A (Osaka, Japan)이다.

[0151] 제조합 단백질을 포집하기 위해 사용될 수 있는 MCCS 또는 MCCS1에 존재하는 크로마토그래피 컬럼(들) 또는 크로마토그래피 멤브레인(들)의 예시적인 비제한적 크기 및 형상이 본원에 기술되어 있다. MCCS 또는 MCCS1에 공급(로딩)되는 액체 배양 배지는, 예를 들어 약 0.05 mg/mL 내지 약 100 mg/mL의 제조합 단백질(예를 들어, 약 0.1 mg/mL 내지 약 90 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 80 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 70 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 60 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 50 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 40 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 30 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 20 mg/mL, 0.5 mg/mL 내지 약 20 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 15 mg/mL, 약 0.5 mg/mL 내지 약 15 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 10 mg/mL, 또는 약 0.5 mg/mL 내지 약 10 mg/mL의 제조합 단백질을 포함할 수 있다. 제조합 단백질이 포집의 단위 조작을 수행하기 위해 사용되는 수지에 결합하는 데 필요한 평균 시간은, 예를 들어 약 5초 내지 약 10분(예를 들어, 약 10초 내지 약 8분, 약 10초 내지 약 7분, 약 10초 내지 약 6분, 약 10초 내지 약 5분, 약 30초 내지 약 5분, 약 1분 내지 약 5분, 약 10초 내지 약 4분, 약 30초 내지 약 4분, 또는 약 1분 내지 약 4분)일 수 있다.

[0152] 당해 분야에서 이해될 수 있는 바와 같이, MCCS 또는 MCCS1에 존재하는 크로마토그래피 컬럼(들) 또는 크로마토그래피 멤브레인(들)을 사용하여 제조합 단백질을 포집하기 위해서는, MCCS 또는 MCCS1에 존재하는 크로마토그래피 컬럼(들) 또는 크로마토그래피 멤브레인(들)을 로딩하고, 세척하고, 용출시키고, 재생시키는 순차적 크로마토그래피 단계를 수행해야 한다. 하나 이상의 이러한 상이한 순차적 크로마토그래피 단계(예를 들어, 제조합 단백질을 포집하기 위해 사용되는 MCCS 또는 MCCS1에 존재하는 크로마토그래피 컬럼(들) 또는 크로마토그래피 멤브레인(들)을 로딩하고, 세척하고, 용출시키고, 재생시키는 하나 이상의 순차적 크로마토그래피 단계)에서, 본원에 기술된 각 순차적 크로마토그래피 단계에 할당된 임의의 예시적 유량, 완충액 부피, 및/또는 시간의 길이가 사용될 수 있다. MCCS 또는 MCCS1(예를 들어, PCCS 또는 PCCS1)의 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)을 포집하기 위해 사용될 수 있는 각 순차적 크로마토그래피 단계에 할당된 비제한적 유량, 완충액 부피, 및/또는 시간의 길이를 이하 제공한다. 또한, MCCS 및/또는 MCCS1에 사용될 수 있는 예시적 완충액을 이하 설명한다.

[0153] 포집의 단위 조작을 수행할 수 있는 수지(예를 들어, 본원에 기술된 포집을 위해 사용될 수 있는 임의의 예시적 수지)를 포함하는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인을 포함하는 MCCS 또는 MCCS1은 전술한 임의의 로딩 유량(공급 속도)을 사용하여 제조합 단백질을 포함하는 액체 배양 배지와 함께 로딩될 수 있다. 일부 예에서, 포집의 단위 조작을 수행할 수 있는 수지를 포함하는 하나의 크로마토그래피 컬럼



또는 하나의 크로마토그래피 멤브레인은, 예를 들어 약 10분 내지 약 90분(예를 들어, 약 15분 내지 약 90분, 약 20분 내지 80분, 약 30분 내지 80분, 약 40분 내지 약 80분, 약 50분 내지 약 80분, 및 약 60분 내지 80분) 내에 로딩된다. MCCS 또는 MCCS1이 포집의 단위 조작을 직렬로 수행할 수 있는 수지를 포함하는 적어도 두 개의 크로마토그래피 컬럼을 포함하는 일부 예에서, 직렬로 두 개의 크로마토그래피 컬럼을 로딩하는 데 필요한 시간은, 예를 들어 약 50분 내지 약 180분(예를 들어, 약 60분 내지 약 180분, 약 70분 내지 약 180분, 약 80분 내지 약 180분, 약 90분 내지 약 180분, 약 100분 내지 약 180분, 약 110분 내지 150분, 및 약 125분 내지 약 145분)이다.

[0154] 포집의 단위 조작을 수행할 수 있는 수지를 포함하는 MCCS 또는 MCCS1의 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인에 재조합 단백질을 로딩한 후, 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인은 적어도 하나의 세척 완충액으로 세척된다. 당해 분야에서 이해될 수 있는 바와 같이, 적어도 하나(예를 들어, 2, 3, 또는 4개)의 세척 완충액은, 수지로 재조합 단백질의 상호작용을 방해하지 않으면서, 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인으로부터의 재조합 단백질이 아닌 모든 또는 대부분의 단백질을 용출시키고자 하는 것이다.

[0155] 세척 완충액은 약 0.2 mL/분 내지 약 25 mL/분(예를 들어, 약 0.2 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.2 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 10 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 14 mL/분, 약 1.0 mL/분 내지 약 25.0 mL/분, 약 1.0 mL/분 내지 약 15.0 mL/분)의 유량으로 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 통과할 수 있다. 사용되는 세척 완충액의 부피(예를 들어, 둘 이상의 세척 완충액이 사용될 때 사용된 세척 완충액의 합쳐진 총 부피)는, 예를 들어 약 1X 컬럼 부피(CV) 내지 약 15X CV(예를 들어, 약 1X CV 내지 약 14X CV, 약 1X CV 내지 약 13X CV, 약 1X CV 내지 약 12X CV, 약 1X CV 내지 약 11X CV, 약 2X CV 내지 약 11X CV, 약 3X CV 내지 약 11X CV, 약 4X CV 내지 약 11X CV, 약 5X CV 내지 약 11X CV, 또는 약 5X CV 내지 약 10X CV)일 수 있다. 세척의 총 시간은, 예를 들어 약 2분 내지 약 3시간(예를 들어, 약 2분 내지 약 2.5시간, 약 2분 내지 약 2.0시간, 약 5분 내지 약 1.5시간, 약 10분 내지 약 1.5시간, 약 10분 내지 약 1.25시간, 약 20분 내지 약 1.25시간, 또는 약 30분 내지 약 1시간)일 수 있다.

[0156] 포집의 단위 조작을 수행할 수 있는 수지를 포함하는 MCCS 또는 MCCS1의 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인의 세척 후, 포집의 단위 조작을 수행할 수 있는 수지를 포함하는 MCCS 또는 MCCS1의 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인에 용출 완충액을 통과시켜 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인으로부터 재조합 단백질이 용출된다. 용출 완충액은 포집의 단위 조작을 수행할 수 있는 수지를 포함하는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을, 약 0.2 mL/분 내지 약 25 mL/분(예를 들어, 약 0.2 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.2 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 10 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 6.0 mL/분, 약 1.0 mL/분 내지 약 5.0 mg/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 14 mL/분, 약 1.0 mL/분 내지 약 25.0 mL/분, 또는 약 1.0 mL/분 내지 약 15.0 mL/분)의 유량으로 통과할 수 있다. 정제의 단위 조작을 수행할 수 있는 수지를 포함하는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인 각각으로부터 재조합 단백질을 용출시키기 위해 사용되는 용출 완충액의 부피는, 예를 들어 약 1X 컬럼 부피(CV) 내지 약 15X CV(예를 들어, 약 1X CV 내지 약 14X CV, 약 1X CV 내지 약 13X CV, 약 1X CV 내지 약 12X CV, 약 1X CV 내지 약 11X CV, 약 2X CV 내지 약 11X CV, 약 3X CV 내지 약 11X CV, 약 4X CV 내지 약 11X CV, 약 5X CV 내지 약 11X CV, 또는 약 5X CV 내지 약 10X CV)일 수 있다. 용출의 총 시간은, 예를 들어 약 2분 내지 약 3시간(예를 들어, 약 2분 내지 약 2.5시간, 약 2분 내지 약 2.0시간, 약 2분 내지 약 1.5시간, 약 2분 내지 약 1.5시간, 약 2분 내지 약 1.25시간, 약 2분 내지 약 1.25시간, 약 2분 내지 약 1시간, 약 2분 내지 약 40분, 약 10분 내지 약 40분, 또는 약 20분 내지 약 40분)일 수 있다. 이 방법에 사용될 수 있는 용출 완충액의 비제한적 예는 포집 메커니즘 및/또는 재조합 단백질에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 용출 완충액은 상이한 염 농도(예를 들어, 증가된 염 농도), 상이한 pH(예를 들어, 증가되거나 감소된 염 농도), 또는 포집의 단위 조작을 수행할 수 있는 수지에 결합하기 위한 재조합 단백질과 경쟁하는 분자를 포함할 수 있다. 본원에 기술된 각각의 예시적 포집 메커니즘을 위한 이러한 용출 완충액의 예는 당해 분야에 잘 알려져 있다.

[0157] 포집의 단위 조작을 수행할 수 있는 수지를 포함하는 MCCS 또는 MCCS1의 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인으로부터 재조합 단백질을 용출시킨 후, 그 다음의 부피의 액체 배양 배지가 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인에 로딩될 수 있기 전에, 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인은 재생 완충액을 사용하여 평형화되어야 한다. 재생 완충액은 포집의

단위 조작을 수행할 수 있는 수지를 포함하는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을, 예를 들어, 약 0.2 mL/분 내지 약 25 mL/분(예를 들어, 약 0.2 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.2 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 10 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 6.0 mL/분, 약 1.0 mL/분 내지 약 5.0 mg/분, 약 0.5 mL 분 내지 약 14 mL/분, 약 1.0 mL/분 내지 약 25.0 mL/분, 약 5.0 mL/분 내지 약 15.0 mL/분, 또는 약 1.0 mL/분 내지 약 15.0 mL/분)의 유량으로 통과할 수 있다. 포집의 단위 조작을 수행할 수 있는 수지를 포함하는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 평형화하기 위해 사용되는 재생 완충액의 부피는, 예를 들어 약 1X 컬럼 부피(CV) 내지 약 15X CV(예를 들어, 약 1X CV 내지 약 14X CV, 약 1X CV 내지 약 13X CV, 약 1X CV 내지 약 12X CV, 약 1X CV 내지 약 11X CV, 약 2X CV 내지 약 11X CV, 약 3X CV 내지 약 11X CV, 약 2X CV 내지 약 5X CV, 약 4X CV 내지 약 11X CV, 약 5X CV 내지 약 11X CV, 또는 약 5X CV 내지 약 10X CV)일 수 있다.

[0158] 본원에 기술된 일부 공정에서 MCCS 또는 MCCS1은, 낮은 pH(예를 들어, 4.6 미만, 4.4 미만, 4.2 미만, 4.0 미만, 3.8 미만, 3.6 미만, 3.4 미만, 3.2 미만, 또는 3.0 미만의 pH)에서, 예를 들어 약 1분 내지 1.5시간(예를 들어, 약 1시간) 동안 재조합 단백질을 포함하는 유체를 수용하고, 재조합 단백질을 포함하는 유체에 존재하는 바이러스를 비활성화시키는 저장소를 포함한다. 바이러스 비활성화의 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 저장소의 예는, 예를 들어 재조합 단백질을 포함하는 유체가 MCCS2에 공급되기 전에, 예를 들어 약 1분 내지 1.5시간 동안, 재조합 단백질을 포함하는 유체를 수용할 수 있는 교반 플라스크(예를 들어, 500 mL 교반 플라스크, 예를 들어 프로그래밍된 교반 플레이트를 가진 500 mL 교반 플라스크)이다. 바이러스 비활성화의 단위 조작을 수행하기 위해 사용되는 저장소는 프로그래밍된 교반 플레이트(예를 들어, 저장소 내의 유체를, 예를 들어 매 4시간 마다, 혼합(예를 들어, 주기적으로 혼합)하도록 프로그래밍된 교반 플레이트)를 가진 500 mL 교반 플라스크일 수 있다. 바이러스 비활성화의 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 저장소의 또 다른 예는, 예를 들어 재조합 단백질을 포함하는 유체가 MCCS2에 공급되기 전에, 예를 들어 약 1분 내지 1.5시간 동안, 재조합 단백질을 포함하는 유체를 수용할 수 있는 플라스틱 백(예를 들어, 500 mL 플라스틱 백)이다. 일부 예에서, 재조합 단백질을 포함하는 유체는, 바이러스 비활성화의 단위 조작을 수행하기 위해 사용되는 저장소에 공급될 때 이미 낮은 pH(예를 들어, 4.6 미만, 4.4 미만, 4.2 미만, 4.0 미만, 3.8 미만, 3.6 미만, 3.4 미만, 3.2 미만, 또는 3.0 미만의 pH)를 가질 수 있다. 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 바이러스 비활성화의 단위 조작을 수행하기 위해 다양한 기타 수단이 사용될 수 있다. 예를 들어, 재조합 단백질을 포함하는 유체의 UV 조사가 바이러스 비활성화의 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수도 있다. 재조합 단백질을 포함하는 유체에 존재하는 바이러스를 비활성화시키는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 저장소의 비제한적 예는 본원에 기술되어 있다.

[0159] MCCS 또는 MCCS1은, 네 개의 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 세 개가 (예를 들어, 포집의 단위 조작을 수행할 수 있는 수지를 포함하는 임의의 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼(예를 들어 본원에 기술된 임의의 크로마토그래피 컬럼)을 포함하는 MCCS를 이용하여) 액체 배양 배지로부터 재조합 단백질을 포집하는 단위 조작을 수행하는, 네 개의 크로마토그래피 컬럼을 포함하는 PCCS를 포함할 수 있다. 이러한 예에서, PCC의 네 번째 컬럼은 재조합 단백질을 포함하는 유체 내 바이러스를 비활성화시키는 단위 조작을 수행할 수 있다(예를 들어, 재조합 단백질을 포함하는 유체의 바이러스 비활성화를 달성하기 위해 사용될 수 있는, 본원에 기술된 임의의 예시적 컬럼).

[0160] 일부 예에서, 재조합 단백질을 포함하는 유체는 MCCS1(예를 들어, PCCS1)으로부터 연속적으로 용출되어, MCCS2(예를 들어, PCCS2)에 연속적으로 공급된다. MCCS 또는 MCCS1(예를 들어, PCCS 또는 PCCS1)의 용출액에서 회수된 재조합 단백질의 비율은, 예를 들어 적어도 70%, 적어도 72%, 적어도 74%, 적어도 76%, 적어도 78%, 적어도 80%, 적어도 82%, 적어도 84%, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 또는 적어도 98%일 수 있다. MCCS1(예를 들어, PCCS1)으로부터의 용출액은 당해 분야에 공지된 다양한 수단(예를 들어, 관(tubing))을 이용하여 MCCS2(예를 들어, PCCS2)에 공급될 수 있다. MCCS1(예를 들어, PCCS1)으로부터의 용출액은, 예를 들어 예를 들어, 약 0.2 mL/분 내지 약 25 mL/분(예를 들어, 약 0.2 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.2 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 10 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 6.0 mL/분, 약 1.0 mL/분 내지 약 5.0 mg/분, 약 0.5 mL 분 내지 약 14 mL/분, 약 1.0 mL/분 내지 약 25.0 mL/분, 약 5.0 mL/분 내지 약 15.0 mL/분, 약 15 mL/분 내지 약 25 mL/분, 또는 약 1.0 mL/분 내지 약 15.0 mL/분)의 유량으로 MCCS2(예를 들어, PCCS2)에 공급될 수 있다.

[0161] 본원에 기술된 일부 공정은 MCCS1(예를 들어, PCCS1)으로부터의 용출액이 MCCS2(예를 들어, PCCS2)에 공급되기 전에 용출액의 이온 농도 및/또는 pH를 조절하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, MCCS1

(예를 들어, PCCS1)으로부터의 용출액의 이온 농도 및/또는 pH는 (예를 들어, 인라인 완충액 조절 저장소를 사용하여) 용출액에 완충액을 첨가함으로써 (MCCS2에 공급되기 전에) 조절될 수 있다. 완충액은, 예를 들어 약 0.1 mL/분 내지 약 15 mL/분(예를 들어, 약 0.1 mL/분 내지 약 12.5 mL/분, 약 0.1 mL/분 내지 약 10.0 mL/분, 약 0.1 mL/분 내지 약 8.0 mL/분, 약 0.1 mL/분 내지 약 6 mL/분, 약 0.1 mL/분 내지 4 mL/분, 또는 약 0.5 mL/분 내지 약 5 mL/분)의 유량으로 MCCS1으로부터의 용출액에 첨가될 수 있다.

[0162] 본원에 기술된 공정은 MCCS1으로부터의 용출액을 MCCS2에 공급하기 전에 MCCS1으로부터의 용출액을 수용하거나 저장하는(및 선택적으로 냉동도 하는) 단계를 더 포함할 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 이러한 수용 또는 저장 단계는 본원에 기술된 임의의 저장소(예를 들어, 백업 탱크)를 사용하여 수행될 수 있다.

[0163] 본원에 기술된 공정은 또한, MCCS1으로부터의 용출액이 MCCS2에 공급되기 전에 용출액을 여과하는 단계를 포함할 수 있다. MCCS1으로부터의 용출액이 MCCS2에 공급되기 전에 용출액을 여과하기 위해 본원에 기술된 임의의 예시적 필터 또는 여과 방법이 사용될 수 있다.

#### [0164] **제조합 단백질의 폴리싱 및 정제**

[0165] MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2는 제조합 단백질 정제 및 폴리싱의 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, MCCS2는 제조합 단백질의 정제 및 폴리싱 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있으며, MCCS2로부터의 용출액은 단백질 의약 물질이다. MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2는 제조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나(예를 들어, 2, 3, 또는 4개)의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인, 및 제조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나(예를 들어, 2, 3, 또는 4개)의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 포함할 수 있다.

[0166] 제조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인은, 포집 메커니즘(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 포집 메커니즘)을 이용하는 수지, 또는 음이온 교환, 양이온 교환, 분자체, 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행하기 위해 사용될 수 있는 수지를 포함할 수 있다. 제조합 단백질을 폴리싱하는 조작 단위를 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인은 음이온 교환, 양이온 교환, 분자체, 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행하기 위해 사용될 수 있는 수지(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 음이온 교환, 양이온 교환, 분자체, 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행하기 위한 임의의 예시적 수지)를 포함할 수 있다.

[0167] 제조합 단백질을 정제하는 조작 단위를 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인의 크기, 형상, 및 부피, 및/또는 제조합 단백질을 폴리싱하는 조작 단위를 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 멤브레인의 크기 및 형상은 본원에 기술된 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인의 예시적 크기, 형상, 및 부피의 임의의 조합일 수 있다. 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 제조합 단백질의 정제 또는 폴리싱 단계는, 예를 들어 제조합 단백질을 정제하거나 폴리싱하는 조작 단위를 수행하기 위해 사용되는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 로딩하고, 세척하고, 용출시키고, 평형화하는 단계를 포함할 수 있다. 일반적으로, 정제의 단위 조작을 수행하기 위해 사용되는 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인에서 나온 용출 완충액은 제조합 단백질을 포함한다. 일반적으로, 폴리싱의 단위 조작을 수행하기 위해 사용되는 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인의 로딩 및/또는 여기에서 나온 세척 완충액은 제조합 단백질을 포함한다.

[0168] 예를 들어, 제조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인의 크기는, 예를 들어 약 2.0 mL 내지 약 200 mL(예를 들어, 약 2.0 mL 내지 약 180 mL, 약 2.0 mL 내지 약 160 mL, 약 2.0 mL 내지 약 140 mL, 약 2.0 mL 내지 약 120 mL, 약 2.0 mL 내지 약 100 mL, 약 2.0 mL 내지 약 80 mL, 약 2.0 mL 내지 약 60 mL, 약 2.0 mL 내지 약 40 mL, 약 5.0 mL 내지 약 40 mL, 약 2.0 mL 내지 약 30 mL, 약 5.0 mL 내지 약 30 mL, 또는 약 2.0 mL 내지 약 25 mL)의 부피를 가질 수 있다. 제조합 단백질을 포함하는 유체가 제조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 적어도 하나의 크로마토그래피 멤브레인에 로딩될 때 유체의 유량은, 예를 들어 약 0.1 mL/분 내지 약 25 mL/분(예를 들어, 약 0.1 mL/분 내지 약 12.5 mL/분, 약 0.1 mL/분 내지 약 10.0 mL/분, 약 0.1 mL/분 내지 약 8.0 mL/분, 약 0.1 mL/분 내지 약 6 mL/분, 약 0.1 mL/분 내지 4 mL/분, 약 0.1 mL/분 내지 약 3 mL/분, 약 0.1 mL/분 내지 약 2 mL/분, 또는 약 0.2 mL/분 내지 약 4 mL/분)일 수 있다. 제조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인에 로딩된 유체 내 제조합 단백질의 농도는, 예를 들어 약 0.05

mg/mL 내지 약 100 mg/mL의 재조합 단백질(예를 들어, 약 0.1 mg/mL 내지 약 90 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 80 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 70 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 60 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 50 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 40 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 30 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 20 mg/mL, 0.5 mg/mL 내지 약 20 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 15 mg/mL, 약 0.5 mg/mL 내지 약 15 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 10 mg/mL, 또는 약 0.5 mg/mL 내지 약 10 mg/mL의 재조합 단백질)일 수 있다. 정제의 단위 조작을 수행하기 위해 사용되는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인 내 수지는 음이온 교환 또는 양이온 교환 크로마토그래피를 수행하기 위해 사용될 수 있는 수지일 수 있다. 정제의 단위 조작을 수행하기 위해 사용되는 적어도 하나의 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인 내 수지는 양이온 교환 수지(예를 들어, Capto-S 수지, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ)일 수 있다.

[0169] 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인에 재조합 단백질을 로딩한 후, 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인은 적어도 하나의 세척 완충액으로 세척된다. 당해 분야에서 이해될 수 있는 바와 같이, 적어도 하나(예를 들어, 2, 3, 또는 4개)의 세척 완충액은, 수지로 재조합 단백질의 상호작용을 방해하거나 재조합 단백질을 용출시키지 않으면서, 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인으로부터의 재조합 단백질이 아닌 모든 단백질을 용출시키고자 하는 것이다.

[0170] 세척 완충액은 약 0.2 mL/분 내지 약 25 mL/분(예를 들어, 약 0.2 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.2 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 10 mL/분, 약 0.5 mL 분 내지 약 14 mL/분, 약 1.0 mL/분 내지 약 25.0 mL/분, 또는 약 1.0 mL/분 내지 약 15.0 mL/분)의 유량으로 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 통과할 수 있다. 사용되는 세척 완충액의 부피(예를 들어, 둘 이상의 세척 완충액이 사용될 때 사용된 세척 완충액의 합쳐진 총 부피)는, 예를 들어 약 1X 컬럼 부피(CV) 내지 약 15X CV(예를 들어, 약 1X CV 내지 약 14X CV, 약 1X CV 내지 약 13X CV, 약 1X CV 내지 약 12X CV, 약 1X CV 내지 약 11X CV, 약 2X CV 내지 약 11X CV, 약 3X CV 내지 약 11X CV, 약 4X CV 내지 약 11X CV, 약 2.5X CV 내지 약 5.0X CV, 약 5X CV 내지 약 11X CV, 또는 약 5X CV 내지 약 10X CV)일 수 있다. 세척의 총 시간은, 예를 들어 약 2분 내지 약 3시간(예를 들어, 약 2분 내지 약 2.5시간, 약 2분 내지 약 2.0시간, 약 5분 내지 약 1.5시간, 약 10분 내지 약 1.5시간, 약 10분 내지 약 1.25시간, 약 20분 내지 약 1.25시간, 약 30분 내지 약 1시간, 약 2분 내지 10분, 약 2분 내지 15분, 또는 약 2분 내지 30분)일 수 있다.

[0171] 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용된 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 세척한 후, 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용된 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인에 용출 완충액을 통과시킴으로써 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인으로부터 재조합 단백질이 용출된다. 용출 완충액은 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을, 약 0.2 mL/분 내지 약 25 mL/분(예를 들어, 약 0.2 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.2 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 10 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 6.0 mL/분, 약 1.0 mL/분 내지 약 5.0 mg/분, 약 0.5 mL 분 내지 약 14 mL/분, 약 1.0 mL/분 내지 약 25.0 mL/분, 또는 약 1.0 mL/분 내지 약 15.0 mL/분)의 유량으로 통과할 수 있다. 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인 각각으로부터 재조합 단백질을 용출시키기 위해 사용되는 용출 완충액의 부피는, 예를 들어 약 1X 컬럼 부피(CV) 내지 약 25X CV(예를 들어, 약 1X CV 내지 약 20X CV, 약 15X CV 내지 약 25X CV, 약 1X CV 내지 약 14X CV, 약 1X CV 내지 약 13X CV, 약 1X CV 내지 약 12X CV, 약 1X CV 내지 약 11X CV, 약 2X CV 내지 약 11X CV, 약 3X CV 내지 약 11X CV, 약 4X CV 내지 약 11X CV, 약 5X CV 내지 약 11X CV, 또는 약 5X CV 내지 약 10X CV)일 수 있다. 용출의 총 시간은, 예를 들어 약 2분 내지 약 3시간(예를 들어, 약 2분 내지 약 2.5시간, 약 2분 내지 약 2.0시간, 약 2분 내지 약 1.5시간, 약 2분 내지 약 1.5시간, 약 2분 내지 약 1.25시간, 약 2분 내지 약 1.25시간, 약 2분 내지 약 1시간, 약 2분 내지 약 40분, 약 10분 내지 약 40분, 약 20분 내지 약 40분, 또는 약 30분 내지 1.0시간)일 수 있다. 이러한 방법에 사용될 수 있는 용출 완충액의 비제한적 예는 수지 및/또는 재조합 단백질의 생물물리학적 성질에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 용출 완충액은 상이한 염 농도(예를 들어, 증가된 염 농도), 상이한 pH(예를 들어, 증가되거나 감소된 염 농도), 또는 수지에 결합하기 위한 재조합 단백질과 경쟁하는 분자를 포함할 수 있다. 본원에 기술된 각각의 예시적 포집 메커니즘을 위한 이러한 용출 완충액의 예는 당해 분야에 잘 알려져 있다.



[0172] 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용된 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인으로부터 재조합 단백질을 용출시킨 후, 재조합 단백질을 포함하는 그 다음의 부피의 유체가 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인에 로딩될 수 있기 전에, 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인은 재생 완충액을 사용하여 평형화되어야 한다. 재생 완충액은 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용된 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을, 예를 들어, 약 0.2 mL/분 내지 약 25 mL/분(예를 들어, 약 0.2 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.2 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 10 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 6.0 mL/분, 약 1.0 mL/분 내지 약 5.0 mg/분, 약 0.5 mL 분 내지 약 14 mL/분, 약 1.0 mL/분 내지 약 25.0 mL/분, 약 5.0 mL/분 내지 약 15.0 mL/분, 또는 약 1.0 mL/분 내지 약 15.0 mL/분)의 유량으로 통과할 수 있다. 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 수지를 포함하는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 평형화하기 위해 사용되는 재생 완충액의 부피는, 예를 들어 약 1X 컬럼 부피(CV) 내지 약 15X CV(예를 들어, 약 1X CV 내지 약 14X CV, 약 1X CV 내지 약 13X CV, 약 1X CV 내지 약 12X CV, 약 1X CV 내지 약 11X CV, 약 2X CV 내지 약 11X CV, 약 3X CV 내지 약 11X CV, 약 2X CV 내지 약 5X CV, 약 2.5X CV 내지 약 7.5X CV, 약 4X CV 내지 약 11X CV, 약 5X CV 내지 약 11X CV, 또는 약 5X CV 내지 약 10X CV)일 수 있다. 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용된 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인의 용출액 내 재조합 단백질의 농도는, 예를 들어 약 0.05 mg/mL 내지 약 100 mg/mL의 재조합 단백질(예를 들어, 약 0.1 mg/mL 내지 약 90 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 80 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 70 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 60 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 50 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 40 mg/mL, 약 2.5 mg/mL 내지 약 7.5 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 30 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 20 mg/mL, 0.5 mg/mL 내지 약 20 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 15 mg/mL, 약 0.5 mg/mL 내지 약 15 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 10 mg/mL, 또는 약 0.5 mg/mL 내지 약 10 mg/mL의 재조합 단백질)일 수 있다.

[0173] 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인은 양이온 교환, 음이온 교환, 또는 분자체 크로마토그래피를 수행하기 위해 사용될 수 있는 수지를 포함할 수 있다. 당해 분야에서 이해될 수 있는 바와 같이, 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 사용하여 재조합 단백질을 폴리싱하는 단계는, 예를 들어 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 로딩하고, 추적하고, 재생시키는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 로딩, 추적, 및 재생 단계가 폴리싱을 수행하기 위해 사용되는 경우, 재조합 단백질은 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용되는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인 내 수지와 결합하지 않으며, 재조합 단백질은 로딩 및 추적 단계에서 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인으로부터 용출되고, 재생 단계는 재조합 단백질을 포함하는 추가 유체가 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인에 로딩될 수 있기 전에 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인으로부터 임의의 불순물을 제거하기 위해 사용된다. 로딩, 추적, 및 재생의 각 단계에서 사용될 예시적 유량 및 완충액 부피를 이하 설명한다.

[0174] 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인의 크기, 형상, 및 부피, 및/또는 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 멤브레인의 크기 및 형상은 본원에 기술된 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인의 예시적 크기, 형상, 및 부피의 임의의 조합일 수 있다. 예를 들어, 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인의 크기는, 예를 들어 약 0.5 mL 내지 약 200 mL(예를 들어, 약 0.5 mL 내지 약 180 mL, 약 0.5 mL 내지 약 160 mL, 약 0.5 mL 내지 약 140 mL, 약 0.5 mL 내지 약 120 mL, 약 0.5 mL 내지 약 100 mL, 약 0.5 mL 내지 약 80 mL, 약 0.5 mL 내지 약 60 mL, 약 0.5 mL 내지 약 40 mL, 약 5.0 mL 내지 약 40 mL, 약 0.5 mL 내지 약 30 mL, 약 5.0 mL 내지 약 30 mL, 약 0.5 mL 내지 약 25 mL, 약 0.2 mL 내지 약 10 mL, 또는 약 0.2 mL 내지 약 5 mL)의 부피를 가질 수 있다. 재조합 단백질을 포함하는 유체가 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인에 로딩될 때 유체의 유량은, 예를 들어 약 0.1 mL/분 내지 약 25 mL/분(예를 들어, 약 0.1 mL/분 내지 약 12.5 mL/분, 약 0.1 mL/분 내지 약 10.0 mL/분, 약 0.1 mL/분 내지 약 8.0 mL/분, 약 0.1 mL/분 내지 약 6 mL/분, 약 0.1 mL/분 내지 4 mL/분, 약 0.1 mL/분 내지 약 3 mL/분, 약 2 mL/분 내지 약 6 mL/분, 약 0.1 mL/분 내지 약 2 mL/분, 또는 약 0.2 mL/분 내지 약 4 mL/분)일 수 있다. 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수

행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인에 로딩된 재조합 단백질을 포함하는 유체의 총 부피는, 예를 들어 약 1.0 mL 내지 약 250 mL(예를 들어, 약 1.0 mL 내지 약 225 mL, 약 1.0 mL 내지 약 200 mL, 약 1.0 mL 내지 약 175 mL, 약 1.0 mL 내지 약 150 mL, 약 100 mL 내지 약 125 mL, 약 100 mL 내지 약 150 mL, 약 1.0 mL 내지 약 150 mL, 약 1.0 mL 내지 약 125 mL, 약 1.0 mL 내지 약 100 mL, 약 1.0 mL 내지 약 75 mL, 약 1.0 mL 내지 약 50 mL, 또는 약 1.0 mL 내지 약 25 mL)일 수 있다. 폴리싱을 수행하기 위해 사용되는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인 내 수지는 음이온 교환 또는 양이온 교환 수지일 수 있다. 폴리싱의 단위 조작을 수행하기 위해 사용되는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인 내 수지는 양이온 교환 수지(예를 들어, Sartobind® Q 수지, Sartorius, Goettingen, Germany)일 수 있다.

[0175]

로딩 단계 후, 추적 단계가 수행된다(예를 들어, 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인에 실질적으로 결합되지 않은 재조합 단백질을 수집하기 위해 추적 완충액은 적어도 하나의 크로마토그래피 멤브레인 또는 크로마토그래피 멤브레인을 통과한다). 이러한 예에서, 추적 완충액은 약 0.2 mL/분 내지 약 50 mL/분(예를 들어, 약 1 mL/분 내지 약 40 mL/분, 약 1 mL/분 내지 약 30 mL/분, 약 5 mL/분 내지 약 45 mL/분, 약 10 mL/분 내지 약 40 mL/분, 약 0.2 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.2 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 10 mL/분, 약 0.5 mL 분 내지 약 14 mL/분, 약 1.0 mL/분 내지 약 25.0 mL/분, 또는 약 1.0 mL/분 내지 약 15.0 mL/분)의 유량으로 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 통과할 수 있다. 추적 완충액의 부피는, 예를 들어 약 1X 컬럼 부피(CV) 내지 약 100X CV(예를 들어, 약 1X CV 내지 약 90X CV, 약 1X CV 내지 약 80X CV, 약 1X CV 내지 약 70X CV, 약 1X CV 내지 약 60X CV, 약 1X 내지 약 50X CV, 약 1X CV 내지 약 40X CV, 약 1X CV 내지 약 30X CV, 약 1X CV 내지 약 20X CV, 약 1X CV 내지 약 15X CV, 약 5X CV 내지 약 20X CV, 약 5 X CV 내지 약 30X CV, 약 1X CV 내지 약 14X CV, 약 1X CV 내지 약 13X CV, 약 1X CV 내지 약 12X CV, 약 1X CV 내지 약 11X CV, 약 2X CV 내지 약 11X CV, 약 3X CV 내지 약 11X CV, 약 4X CV 내지 약 11X CV, 약 2.5X CV 내지 약 5.0X CV, 약 5X CV 내지 약 11X CV, 또는 약 5X CV 내지 약 10X CV)일 수 있다. 추적의 총 시간은, 예를 들어 약 1 분 내지 약 3시간(예를 들어, 약 1분 내지 약 2.5시간, 약 1분 내지 약 2.0시간, 약 1분 내지 약 1.5시간, 약 2 분 내지 약 1.5시간, 약 1분 내지 약 1.25시간, 약 2분 내지 약 1.25시간, 약 1분 내지 약 5분, 약 1분 내지 약 10분, 약 2분 내지 약 4분, 약 30분 내지 약 1시간, 약 2분 내지 약 10분, 약 2분 내지 약 15분, 또는 약 2분 내지 약 30분)일 수 있다. 로딩 단계 및 추적 단계에서 컬럼을 통해 나온 용출액에 존재하는 재조합 단백질의 합친 농도는, 예를 들어 약 0.1 mg/mL 내지 약 100 mg/mL의 재조합 단백질(예를 들어, 약 0.1 mg/mL 내지 약 90 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 80 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 70 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 60 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 50 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 40 mg/mL, 약 2.5 mg/mL 내지 약 7.5 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 30 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 20 mg/mL, 0.5 mg/mL 내지 약 20 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 15 mg/mL, 약 0.5 mg/mL 내지 약 15 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 약 10 mg/mL, 약 0.5 mg/mL 내지 약 10 mg/mL, 또는 약 1 mg/mL 내지 약 5 mg/mL의 재조합 단백질)일 수 있다.

[0176]

추적 단계 후, 재조합 단백질을 포함하는 그 다음의 부피의 유체가 폴리싱의 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인에 로딩될 수 있기 전에, 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인은 재생 완충액을 사용하여 재생되어야 한다. 재생 완충액은 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을, 예를 들어 약 0.2 mL/분 내지 약 50 mL/분(예를 들어, 약 1 mL/분 내지 약 40 mL/분, 약 1 mL/분 내지 약 30 mL/분, 약 5 mL/분 내지 약 45 mL/분, 약 10 mL/분 내지 약 40 mL/분, 약 0.2 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 0.2 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 15 mL/분, 약 0.5 mL/분 내지 약 10 mL/분, 약 0.5 mL 분 내지 약 14 mL/분, 약 1.0 mL/분 내지 약 25.0 mL/분, 또는 약 1.0 mL/분 내지 약 15.0 mL/분)의 유량으로 통과할 수 있다. 폴리싱의 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 재생시키기 위해 사용되는 재생 완충액의 부피는, 예를 들어 약 1X 컬럼 부피(CV) 내지 약 500X CV(예를 들어, 약 1X CV 내지 약 450X CV, 약 1X CV 내지 약 400X CV, 약 1X CV 내지 약 350X CV, 약 1X CV 내지 약 300X CV, 약 1X CV 내지 약 250X CV, 약 1X CV 내지 약 200X CV, 약 1X CV 내지 약 150X CV, 약 1X CV 내지 약 100 X CV, 약 1X CV 내지 약 90X CV, 약 1X CV 내지 약 80X CV, 약 1X CV 내지 약 70X CV, 약 1X CV 내지 약 60X CV, 약 1X 내지 약 50X CV, 약 1X CV 내지 약 40X CV, 약 1X CV 내지 약 30X CV, 약 1X CV 내지 약 20X CV, 약 1X CV 내지 약 15X CV, 약 5X CV 내지 약 20X CV, 약 5 X CV 내지 약 30X CV, 약 1X CV 내지 약 14X CV, 약 1X CV 내지 약 13X CV, 약 1X CV 내지 약 12X CV, 약 1X CV 내지 약 11X CV, 약 2X CV 내지 약 11X CV, 약 3X CV 내지 약 11X CV, 약 4X

CV 내지 약 11X CV, 약 2.5X CV 내지 약 5.0X CV, 약 5X CV 내지 약 11X CV, 또는 약 5X CV 내지 약 10X CV)일 수 있다.

[0177] 다른 예에서, 폴리싱의 단위 조작을 수행하기 위해 사용되는 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인은 재조합 단백질을 포함하는 유체에 존재하는 불순물에 선택적으로 결합하거나 유지하는 수지를 포함하며, 하나 이상의 컬럼 및/또는 멤브레인 내 수지의 결합 용량이 도달했거나 실질적으로 가까이 도달되면, 하나 이상의 컬럼 및/또는 멤브레인을 재생시키는 대신, 하나 이상의 컬럼 및/또는 멤브레인이 대체된다 (예를 들어, 실질적으로 유사한 컬럼(들) 및/또는 멤브레인(들)으로 대체된다).

[0178] 본원에 기술된 이러한 공정의 일부 예에서, MCCS2는, 예를 들어, PCCS의 세 개의 크로마토그래피 컬럼이 (예를 들어, 단백질을 정제하는 조작 단위를 수행하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼을 사용하여) 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하고 PCCS의 크로마토그래피 멤브레인이 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하는, 세 개의 크로마토그래피 컬럼과 하나의 크로마토그래피 멤브레인을 포함하는 PCCS를 포함한다. 이러한 예에서, 치료 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 PCCS의 크로마토그래피 멤브레인은 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 본원에 기술된 임의의 예시적 크로마토그래피 멤브레인일 수 있다. 이 예에서 PCCS의 첫 번째 세 개의 크로마토그래피 컬럼 및 크로마토그래피 멤브레인이 언제 스위칭될 수 있는지 결정하기 위해 본원에 기술된 임의의 컬럼 스위칭 방법이 사용될 수 있다.

[0179] 이러한 예의 일부 구현에는, 용출액이 PCCS의 크로마토그래피 멤브레인에 공급되기 전에 PCCS의 세 개의 크로마토그래피 컬럼으로부터의 용출액의 이온 농도 및/또는 pH를 조절하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, PCCS의 세 개의 크로마토그래피 컬럼으로부터의 용출액의 이온 농도 및/또는 pH는 (이 예에서 PCCS의 크로마토그래피 멤브레인에 용출액이 공급되기 전에) (예를 들어, 인라인 완충액 조절 저장소를 사용하여) PCCS의 세 개의 크로마토그래피 컬럼의 용출액에 완충액을 첨가함으로써 조절될 수 있다. 완충액은, 예를 들어 약 0.1 mL/분 내지 약 15 mL/분(예를 들어, 약 0.1 mL/분 내지 약 12.5 mL/분, 약 0.1 mL/분 내지 약 10.0 mL/분, 약 0.1 mL/분 내지 약 8.0 mL/분, 약 0.1 mL/분 내지 약 6 mL/분, 약 0.1 mL/분 내지 4 mL/분, 또는 약 0.5 mL/분 내지 약 5 mL/분)의 유량으로 용출액에 첨가될 수 있다.

[0180] 이러한 예는 크로마토그래피 멤브레인(재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 크로마토그래피 멤브레인)에 용출액을 공급하기 전에 이 예에서 PCCS의 세 개의 크로마토그래피 컬럼으로부터의 용출액을 수용하거나 저장하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 이러한 수용 또는 저장 단계는 본원에 제공된 임의의 저장소(예를 들어, 백업 탱크)를 사용하여 수행될 수 있다.

[0181] 이러한 예는 또한 예시적 PCCS 시스템의 크로마토그래피 멤브레인으로부터의 용출액(재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 크로마토그래피 멤브레인의 용출액)을 여과하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 예시적 PCCS의 크로마토그래피 멤브레인으로부터의 용출액(재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하기 위해 사용될 수 있는 크로마토그래피 멤브레인의 용출액)을 여과하기 위해 본원에 기술된 임의의 예시적 필터 또는 여과 방법이 사용될 수 있다.

[0182] 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 정제된 재조합 단백질은 본원에 기술된 임의의 공정을 이용하여 MCCS 또는 MCCS2로부터 주기적으로 용출될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 임의의 공정은, 예를 들어 MCCS 또는 MCCS1 및 MCCS2에 사용된 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)에 따라, 예를 들어 약 1분 내지 약 6시간(예를 들어, 약 1분 내지 약 5시간, 약 1분 내지 약 4시간, 약 1분 내지 약 3시간, 약 1분 내지 2시간, 약 1분 내지 1시간, 또는 약 1분 내지 30분)의 빈도로, 예를 들어 약 30초 내지 약 5시간(예를 들어, 약 1분 내지 약 4시간, 약 1분 내지 약 3시간, 약 1분 내지 약 2시간, 약 1분 내지 약 1.5시간, 약 1분 내지 약 1시간, 또는 약 1분 내지 약 30분)의 기간 동안, 정제된 재조합 단백질을 용출시킬 수 있다.

## [0183] 배양 방법

[0184] 본원에 기술된 일부 공정은 액체 배양 배지를 포함하는 생물반응기(예를 들어, 관류 또는 유가 생물반응기)에서 재조합 단백질을 분비하는 세포(예를 들어, 재조합 포유류 세포)를 배양하는 단계로서, 세포(예를 들어, 포유류 세포)가 실질적으로 존재하지 않는 소정 부피의 액체 배양 배지가 생물반응기(예를 들어, 관류 생물반응기)로부터 연속적으로 또는 주기적으로 제거되고 MCCS 또는 MCCS1에 공급되는, 단계를 더 포함한다. 생물반응기는, 예를 들어 약 1 L 내지 약 10,000 L(예를 들어, 약 1 L 내지 약 50 L, 약 50 L 내지 약 500 L, 약 500 L 내지 약 1000 L, 500 L 내지 약 5000L, 약 500 L 내지 약 10,000 L, 약 5000 L 내지 약 10,000 L, 약 1 L 내지 약

10,000 L, 약 1L 내지 약 8,000 L, 약 1 L 내지 약 6,000 L, 약 1 L 내지 약 5,000 L, 약 100 L 내지 약 5,000 L, 약 10 L 내지 약 100 L, 약 10 L 내지 약 4,000 L, 약 10 L 내지 약 3,000 L, 약 10 L 내지 약 2,000 L, 또는 약 10 L 내지 약 1,000 L)의 부피를 가질 수 있다. 생물반응기에 존재하는 액체 배양 배지의 양은, 예를 들어 약 0.5 L 내지 약 5,000 L(예를 들어, 약 0.5 L 내지 약 25 L, 약 25 L 내지 약 250 L, 약 250 L 내지 약 500 L, 250 L 내지 약 2500 L, 약 250 L 내지 약 5,000 L, 약 2500 L 내지 약 5,000 L, 약 0.5 L 내지 약 5,000 L, 약 0.5 L 내지 약 4,000 L, 약 0.5 L 내지 약 3,000 L, 약 0.5 L 내지 약 2,500 L, 약 50 L 내지 약 2,500 L, 약 5 L 내지 약 50 L, 약 5 L 내지 약 2,000 L, 약 5 L 내지 약 1,500 L, 약 5 L 내지 약 1,000 L, 또는 약 5 L 내지 약 500 L)일 수 있다. 세포를 배양하는 단계는, 예를 들어 유가 생물반응기 또는 관류 생물반응기를 사용하여 수행될 수 있다. 세포를 배양하는(예를 들어, 포유류 세포를 배양하는) 비제한적 예 및 상이한 양태를 이하 설명하며 이들은 임의의 조합으로 사용될 수 있다.

[0185] **세포**

[0186] 본원에 기술된 일부 공정에서 배양되는 세포는 박테리아(예를 들어, 그람 음성 박테리아), 효모(예를 들어, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, 또는 *Arxula adeninivorans*), 또는 포유류 세포일 수 있다. 포유류 세포는 현탁액 또는 부착 세포에서 성장하는 세포일 수 있다. 본원에 기술된 임의의 공정에서 배양될 수 있는 포유류 세포의 비제한적 예는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포(예를 들어, CHO DG44 세포 또는 CHO-K1s 세포), Sp2.0, 골수종 세포(예를 들어, NS/O), B-세포, 혼성 세포, T-세포, 인간 배아 신장(HEK) 세포(예를 들어, HEK 293E 및 HEK 293F), 아프리카 녹색 원숭이 신장 상피 세포(Vero) 세포, 및 Madin-Darby Canine(Cocker Spaniel) 신장 상피 세포(MDCK) 세포를 포함한다. 부착 세포가 배양되는 일부 예에서, 배양물은 복수의 마이크로 캐리어(예를 들어, 하나 이상의 기공을 포함하는 마이크로 캐리어)를 포함할 수도 있다. 본원에 기술된 임의의 공정에서 배양될 수 있는 추가 포유류 세포는 당해 분야에 공지되어 있다.

[0187] 포유류 세포는 재조합 단백질(예를 들어, 재조합 단백질)을 인코딩하는 재조합 핵산(예를 들어, 포유류 세포의 게놈에 안정적으로 통합된 핵산)을 포함할 수 있다. 본원에 기술된 방법을 이용하여 제조될 수 있는 재조합 단백질인 예시적 재조합 단백질을 인코딩하는 재조합 핵산의 비제한적 예를 이하 설명한다. 일부 경우에, 생물반응기(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 생물반응기)에서 배양되는 포유류 세포는 더 큰 배양물에서 유래되었다.

[0188] 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산은 분자 생물학 및 분자 유전학에 공지된 매우 다양한 방법을 이용하여 포유류 세포에 도입될 수 있다. 비제한적인 예는 트랜스펙션(예를 들어, 리포펙션), 형질도입(예를 들어, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 또는 레트로바이러스 감염증), 및 전기영동을 포함한다. 일부 경우에, 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산은 포유류 세포의 염색체에 안정적으로 통합되지 않는 반면(일시적 트랜스펙션), 다른 경우에, 핵산은 통합된다. 대안적으로 또는 추가로, 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산은 플라스미드 및/또는 포유류 인공 염색체(예를 들어, 인간 인공 염색체)에 존재할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 핵산은 바이러스 벡터(예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 또는 아데노바이러스 벡터)를 사용하여 세포에 도입될 수 있다. 핵산은 프로모터 서열(예를 들어, 강한 프로모터, 예를 들어,  $\beta$ -액틴 프로모터 및 CMV 프로모터, 또는 유도성 프로모터)에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 핵산을 포함하는 벡터는 원하는 경우, 선택 가능한 마커(예를 들어, 포유류 세포에 히그로마이신, 푸로마이신, 또는 네오마이신 내성을 제공하는 유전자)를 포함할 수도 있다.

[0189] 일부 경우에, 재조합 단백질은 분비 단백질이며, 포유류 세포에 의해 세포 외 배지(예를 들어, 제1 및/또는 제2 액체 배양 배지)으로 방출된다. 예를 들어, 가용성 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 재조합 단백질의 N- 또는 C-말단에서 분비 신호 펩티드를 인코딩하는 서열을 포함할 수 있으며, 이는 포유류 세포에 존재하는 효소에 의해 분열되어, 그 후에 세포 외 배지(예를 들어, 제1 및/또는 제2 액체 배양 배지)로 방출된다.

[0190] **배양 배지**

[0191] 액체 배양 배지는 당해 분야에 공지되어 있다. 액체 배양 배지(예를 들어, 제1 및/또는 제2 조직 배양 배지)는 포유류 혈청(예를 들어, 태아 송아지 혈청 및 우태아 혈청), 및/또는 성장 호르몬 또는 성장 인자(예를 들어, 인슐린, 트랜스페린, 및 상피 성장 인자)로 보충될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 액체 배양 배지(예를 들어, 제1 및/또는 제2 액체 배양 배지)는 화학적으로 규정된 액체 배양 배지, 동물-유래 성분 부재 액체 배양 배지, 혈청-부재 액체 배양 배지, 또는 혈청-함유 액체 배양 배지일 수 있다. 화학적으로 규정된 액체 배양 배지, 동물-유래 성분 부재 액체 배양 배지, 혈청-부재 액체 배양 배지, 및 혈청-함유 액체 배양 배지의 비제한적 예는 상업적으로 이용 가능하다.



- [0192] 액체 배양 배지는 일반적으로 에너지원(예를 들어, 탄수화물, 예를 들어, 글루코오스), 필수 아미노산(예를 들어, 20개의 아미노산의 기본 세트 및 시스테인), 비타민 및/또는 저 농도로 요구되는 기타 유기 화합물, 자유 지방산, 및/또는 미량 원소를 포함한다. 액체 배양 배지(예를 들어, 제1 및/또는 제2 액체 배양 배지)는, 원하는 경우, 예를 들어, 포유류 호르몬 또는 성장 인자(예를 들어, 인슐린, 트랜스페린, 또는 상피 성장 인자), 염 및 완충제(예를 들어, 칼슘, 마그네슘, 및 포스페이트 염), 뉴클레오타이드 및 염기(예를 들어, 아데노신, 티미딘, 및 하이폭산틴), 단백질 및 조직 가수분해물, 및/또는 이 첨가제들의 임의의 조합으로 보충될 수 있다.
- [0193] 본원에 기술된 임의의 방법에서 세포(예를 들어, 포유류 세포)를 배양하기 위해 사용될 수 있는 매우 다양한 상이한 액체 배양 배지는 당해 분야에 공지되어 있다. 본 공정에 유용할 수도 있는 배지 성분들은 화학적으로 규정된(CD) 가수분해물, 예를 들어, CD 펩톤, CD 폴리펩티드(2개 이상의 아미노산), 및 CD 성장 인자를 포함하지만, 이들로 한정되는 것은 아니다. 액체 조직 배양 배지 및 배지 성분의 추가 예는 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0194] 당업자는 본원에 기술된 제1 액체 배양 배지 및 제2 액체 배양 배지가 동일한 타입의 배지이거나 상이한 배지일 수 있다는 것을 이해할 것이다.
- [0195] **예시적 생물반응기의 추가적 특징**
- [0196] 본원에 기술된 임의의 생물반응기의 내면은 적어도 하나의 코팅(예를 들어, 젤라틴, 콜라겐, 폴리-L-오르니틴, 폴리스티렌, 및 라미닌의 적어도 하나의 코팅), 및 당해 분야에 공지된 바와 같이, 액체 배양 배지에  $O_2$ ,  $CO_2$ , 및  $N_2$ 를 살포하기 위한 하나 이상의 포트, 및 액체 배양 배지를 교반하기 위한 교반 기구를 가질 수 있다. 생물 반응기는 제어된 가습 분위기(예를 들어, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가 넘는 습도, 또는 100%의 습도)에서 세포 배양물을 배양할 수 있다. 생물반응기는 또한 생물반응기로부터 소정 부피의 액체 배양 배지를 제거할 수 있는 기계 장치를 구비할 수 있고, 액체 배양 배지를 생물반응기 밖으로 옮기는 공정 중에 액체 배양 배지로부터 세포를 제거하는 기계 장치 내 필터(예를 들어, ATF 시스템 또는 미국 특허 가출원 제61/878,502호에 기술된 세포 여과 시스템)를 선택적으로 구비할 수 있다.
- [0197] **온도**
- [0198] 포유류 세포의 배양 단계는 약 31°C 내지 약 40°C의 온도에서 수행될 수 있다. 당업자는 배양 단계 중에 특정 시점(들)에, 예를 들어 매 시간 또는 매일, 온도가 변경될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 생물반응기를 세포(예를 들어, 포유류 세포)로 초기 시딩한 후 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 또는 약 20일 또는 그 후에 온도가 변경되거나 달라질 수 있다(예를 들어, 높아지거나 낮아질 수 있다). 예를 들어, 온도는 높아질 수 있다(예를 들어, 최대 또는 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 최대 또는 약 20°C의 변화). 예를 들어, 온도는 낮아질 수 있다(최대 또는 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 최대 또는 약 20°C의 변화).
- [0199]  **$CO_2$**
- [0200] 본원에 기술된 배양 단계는 생물반응기 내 액체 배양 배지를 최대 또는 약 15%의  $CO_2$ (예를 들어, 최대 또는 약 14%의  $CO_2$ , 12%의  $CO_2$ , 10%의  $CO_2$ , 8%의  $CO_2$ , 6%의  $CO_2$ , 5%의  $CO_2$ , 4%의  $CO_2$ , 3%의  $CO_2$ , 2%의  $CO_2$ , 또는 최대 또는 약 1%의  $CO_2$ )를 포함하는 분위기에 노출시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0201] **관류 생물반응기**
- [0202] 본원에 기술된 배양 단계는 관류 생물반응기를 사용하여 수행될 수 있다. 관류 생물반응기에서 세포(예를 들어, 포유류 세포)를 배양하는 단계는 제1 부피의 제1 액체 배양 배지(예를 들어, 임의의 농도의 포유류 세포를 포함하는, 예를 들어 세포가 실질적으로 존재하지 않는 제1 부피의 제1 액체 배양 배지)를 생물반응기로부터 제거하는 단계, 및 제1 액체 배양 배지에 제2 부피의 제2 액체 배양 배지를 첨가하는 단계를 포함한다. 제거 및 첨가는 동시에 또는 순차적으로, 또는 둘의 조합으로 수행될 수 있다. 또한, 제거 및 첨가는 연속적으로(예를 들어, 임의의 주어진 기간에 걸쳐(예를 들어, 24시간의 기간에 걸쳐, 약 1시간 내지 약 24시간의 점진적 기간에 걸쳐, 또는 24시간 초과와 점진적 기간에 걸쳐) 생물반응기의 부피 또는 제1 액체 배양 배지 부피의 0.1% 내지 800% (예를 들어, 1% 내지 700%, 1% 내지 600%, 1% 내지 500%, 1% 내지 400%, 1% 내지 350%, 1% 내지 300%, 1% 내지



250%, 1% 내지 100%, 100% 내지 200%, 5% 내지 150%, 10% 내지 50%, 15% 내지 40%, 8% 내지 80%, 또는 4% 내지 30%)의 부피를 제거하고 대체하는 속도로), 또는 주기적으로(예를 들어, 3일에 한번, 이틀에 한번, 하루에 한번, 하루에 두 번, 하루에 세 번, 하루에 네 번, 또는 하루에 다섯 번), 또는 이들의 조합으로 수행될 수 있다. 주기적으로 수행되는 경우, (예를 들어, 약 24시간의 기간 내에, 약 1시간 내지 약 24시간의 점진적 기간 내에, 또는 24시간 초과와 점진적 기간 내에) 제거되거나 대체되는 부피는, 예를 들어 생물반응기의 부피 또는 제1 액체 배양 배지 부피의 0.1% 내지 800%(예를 들어, 1% 내지 700%, 1% 내지 600%, 1% 내지 500%, 1% 내지 400%, 1% 내지 300%, 1% 내지 200%, 1% 내지 100%, 100% 내지 200%, 5% 내지 150%, 10% 내지 50%, 15% 내지 40%, 8% 내지 80%, 또는 4% 내지 30%)일 수 있다. 제거되는 제1 액체 배양 배지의 제1 부피 및 첨가되는 제2 액체 배양 배지의 제2 부피는 일부 경우에 배양 기간의 전체 또는 일부에 걸쳐 매 24시간의 기간(또는, 대안적으로 약 1시간 내지 약 24시간의 점진적 기간 또는 24시간 초과와 점진적 기간) 동안 거의 동일하게 유지될 수 있다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 제1 부피의 제1 액체 배양 배지가 제거되는 속도(부피/단위 시간) 및 제2 부피의 제2 액체 배양 배지가 첨가되는 속도(부피/단위 시간)는 변할 수 있다. 제1 부피의 제1 액체 배양 배지가 제거되는 속도(부피/단위 시간) 및 제2 부피의 제2 액체 배양 배지가 첨가되는 속도(부피/단위 시간)는 거의 동일하거나 상이할 수 있다.

[0203] 대안적으로, 제거되고 첨가되는 부피는 배양 기간 동안 매 24시간의 기간(또는, 대안적으로 약 1시간 내지 약 24시간의 점진적 기간 또는 24시간 초과와 점진적 기간)에 걸쳐 변할 수 있다(예를 들어, 점진적으로 증가할 수 있다). 예를 들어, 배양 기간에 걸쳐 매 24시간의 기간(또는, 대안적으로 약 1시간 내지 약 24시간의 점진적 기간 또는 24시간 초과와 점진적 기간) 내에 제거되는 제1 액체 배양 배지의 부피 및 첨가되는 제2 액체 배양 배지의 부피는 배양 기간에 걸쳐 생물반응기 부피 또는 제1 액체 배양 배지 부피의 0.5% 내지 약 20%인 부피로부터 생물반응기 부피 또는 제1 액체 배양 배지 부피의 약 25% 내지 약 150%로 (예를 들어, 점진적으로 또는 시차를 둔 증가를 통해) 증가될 수 있다.

[0204] 당업자는 제1 액체 배양 배지 및 제2 액체 배양 배지가 동일한 타입의 배지일 수 있다는 것을 이해할 것이다. 다른 경우에, 제1 액체 배양 배지 및 제2 액체 배양 배지는 상이할 수 있다.

[0205] 제1 부피의 제1 액체 배양 배지는, 예를 들어 생물반응기로부터 제1 부피의 제1 액체 배양 배지를(예를 들어, 생물반응기로부터 세포가 실질적으로 존재하지 않는 제1 부피의 제1 액체 배양 배지를) 제거할 수 있는 기계 시스템에 의해 제거될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 제1 부피의 제1 액체 배양 배지는 세포(예를 들어, 포유류 세포)를 차단하는 분획 분자량을 이용한 멸균 멤브레인을 통한 제1 부피의 제1 액체 배양 배지의 삼출(seeping) 또는 중력 유동에 의해 제거될 수 있다.

[0206] 제2 부피의 제2 액체 배양 배지는 자동화 방식으로, 예를 들어 관류 펌프에 의해 제1 액체 배양 배지에 첨가될 수 있다.

[0207] 일부 경우에, 제1 부피의 제1 액체 배양 배지(예를 들어, 포유류 세포가 실질적으로 존재하지 않는 제1 부피의 제1 액체 배양 배지)를 제거하는 단계 및 제1 액체 배양 배지에 제2 부피의 제2 액체 배양 배지를 첨가하는 단계는, 생물반응기를 포유류 세포로 시딩하고 적어도 1시간 내에(예를 들어, 2시간 내에, 3시간 내에, 4시간 내에, 5시간 내에, 6시간 내에, 7시간 내에, 8시간 내에, 9시간 내에, 10시간 내에, 12시간 내에, 14시간 내에, 16시간 내에, 18시간 내에, 24시간 내에, 36시간 내에, 48시간 내에, 72시간 내에, 96시간 내에, 또는 96시간 후에) 일어나지 않는다.

# [0208] **유가 생물반응기**

[0209] 본원에 기술된 배양 단계는 유가 생물반응기를 사용하여 수행될 수 있다. 유가 생물반응기에서 세포를 배양하는 단계는, 배양 기간의 대부분에 걸쳐, 제1 액체 배양 배지에 제2 부피의 제2 액체 배양 배지를 첨가(예를 들어, 주기적 또는 연속 첨가)하는 단계를 포함한다. 제2 액체 배양 배지의 첨가는 연속적으로(예를 들어, 임의의 주어진 기간에 걸쳐(예를 들어, 24시간의 기간에 걸쳐, 약 1시간 내지 약 24시간의 점진적 기간에 걸쳐, 또는 24시간 초과와 점진적 기간에 걸쳐) 생물반응기의 부피 또는 제1 액체 배양 배지 부피의 0.1% 내지 300%(예를 들어, 1% 내지 250%, 1% 내지 100%, 100% 내지 200%, 5% 내지 150%, 10% 내지 50%, 15% 내지 40%, 8% 내지 80%, 또는 4% 내지 30%)의 부피를 첨가하는 속도로), 또는 주기적으로(예를 들어, 3일에 한번, 이틀에 한번, 하루에 한번, 하루에 두 번, 하루에 세 번, 하루에 네 번, 또는 하루에 다섯 번), 또는 이들의 조합으로 수행될 수 있다. 주기적으로 수행되는 경우, (예를 들어, 약 24시간의 기간 내에, 약 1시간 내지 약 24시간의 점진적 기간 내에, 또는 24시간 초과와 점진적 기간 내에) 첨가되는 부피는, 예를 들어 생물반응기의 부피 또는 제1 액체 배양 배지 부피의 0.1% 내지 300%(예를 들어, 1% 내지 200%, 1% 내지 100%, 100% 내지 200%, 5% 내지 150%, 10%

내지 50%, 15% 내지 40%, 8% 내지 80%, 또는 4% 내지 30%)일 수 있다. 첨가되는 제2 액체 배양 배지의 제2 부피는 일부 경우에 배양 기간의 전체 또는 일부에 걸쳐 매 24시간의 기간(또는, 대안적으로 약 1시간 내지 약 24시간의 점진적 기간 또는 24시간 초과와 점진적 기간) 동안 거의 동일하게 유지될 수 있다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 제2 부피의 제2 액체 배양 배지가 첨가되는 속도(부피/단위 시간)는 배양 기간의 전체 또는 일부에 걸쳐 변할 수 있다. 예를 들어, 첨가되는 제2 액체 배양 배지의 부피는 배양 기간 동안 매 24시간의 기간(또는, 대안적으로 약 1시간 내지 약 24시간의 점진적 기간 또는 24시간 초과와 점진적 기간)에 걸쳐 변할 수 있다(예를 들어, 점진적으로 증가할 수 있다). 예를 들어, 배양 기간에 걸쳐 매 24시간의 기간(또는, 대안적으로 약 1시간 내지 약 24시간의 점진적 기간 또는 24시간 초과와 점진적 기간) 내에 첨가되는 제2 액체 배양 배지의 부피는 배양 기간에 걸쳐 생물반응기 부피 또는 제1 액체 배양 배지 부피의 0.5% 내지 약 20%인 부피로부터 생물반응기 부피 또는 제1 액체 배양 배지 부피의 약 25% 내지 약 150%로 (예를 들어, 점진적으로 또는 시차를 둔 증가를 통해) 증가될 수 있다. 제2 부피의 제2 액체 배양 배지가 첨가되는 속도(부피/단위 시간)는 배양 기간의 전체 또는 일부에 걸쳐 거의 동일할 수 있다.

[0210] 당업자는 제1 액체 배양 배지 및 제2 액체 배양 배지가 동일한 타입의 배지일 수 있다는 것을 이해할 것이다. 다른 경우에, 제1 액체 배양 배지 및 제2 액체 배양 배지는 상이할 수 있다. 제2 액체 배양 배지의 부피는 자동화 방식으로, 예를 들어 관류 펌프에 의해 제1 액체 배양 배지에 첨가될 수 있다.

[0211] 일부 경우에, 제1 액체 배양 배지에 제2 부피의 제2 액체 배양 배지의 첨가는, 생물반응기를 포유류 세포로 시딩하고 적어도 1시간 내에(예를 들어, 2시간 내에, 3시간 내에, 4시간 내에, 5시간 내에, 6시간 내에, 7시간 내에, 8시간 내에, 9시간 내에, 10시간 내에, 12시간 내에, 14시간 내에, 16시간 내에, 18시간 내에, 24시간 내에, 36시간 내에, 48시간 내에, 72시간 내에, 96시간 내에, 또는 96시간 후에) 일어나지 않는다. 유가 배양물의 세포 배양 배지는 일반적으로 배양 기간의 종료 시 채취되어 본원에 기술된 임의의 공정에 사용되지만, 유가 배양물의 세포 배양 배지는 배양 기간 동안 하나 이상의 시점에 채취되어 본원에 기술된 임의의 공정에 사용될 수도 있다.

[0212] 당업자는 이러한 방법을 수행하기 위해 임의의 다양한 배양 파라미터(예를 들어, 용기, 부피, 배양물 부피를 대체하는 속도 또는 빈도, 교반 주파수, 온도, 배지, 및 CO<sub>2</sub> 농도)가 임의의 조합으로 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 또한, 재조합 단백질을 제조하기 위해 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 포유류 세포가 사용될 수 있다.

### [0213] 예시적 생물학적 제조 시스템

[0214] 본원에 기술된 공정을 수행하기에 유용하고 MCCS 또는 MCCS1 및 MCCS2를 포함하는 생물학적 제조 시스템의 예는 (참조로 통합된) 미국 특허 가출원 제61/775,060호 및 제61/856,390호에 기술되어 있다. 이러한 예시적 시스템에서, 본원에 제공된 적어도 하나(예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6개)의 저장된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼이 MCCS 또는 MCCS1 및/또는 MCCS2에 존재한다. 예를 들어, 전체 시스템은 총 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 또는 20개의 본원에 제공된 저장된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼을 포함할 수 있다. 예를 들어, MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2는(또는 각각은) 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개의 본원에 제공된 저장된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼을 포함할 수 있다.

[0215] 예를 들어, 유용한 시스템은 입구를 포함하는 MCCS1 및 출구를 포함하는 MCCS2, 또는 입구와 출구를 포함하는 MCCS를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, MCCS1 및 MCCS2는 서로 유체 연통되어 있다. 이러한 시스템은 유체가 MCCS1 및 MCCS2를 통해 입구 안으로 통과하여 출구를 통해 제조 시스템을 빠져 나가도록 구성될 수도 있다. 이러한 시스템은 액체 배양 배지로부터 치료 의약 물질의 연속적이고 시간 효율적인 제조를 제공한다. 예를 들어, 치료 단백질을 포함하는 유체(예를 들어, 액체 배양 배지)를 MCCS1에 공급하는 단계와 MCCS2의 출구로부터 정제 재조합 단백질을(예를 들어, 치료 단백질 의약 물질)을 용출시키는 단계 사이의 경과 시간은, 예를 들어 약 4시간 이상 약 48시간 이하일 수 있다.

[0216] 일부 예시적 시스템은 브레이크 탱크를 포함하지 않는다. 다른 예에서, 시스템은 전체 시스템에 (예를 들어, 각 브레이크 탱크가, 예를 들어 약 5분 이상 약 6시간 이하의, 총 기간 동안 치료 단백질을 단지 수용하는) 최대 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 브레이크 탱크를 포함할 수 있다. 브레이크 탱크(들)는 1 mL 이상 약 300 mL 이하인 용량을 가질 수 있다. 유체가 MCCS1 또는 MCCS에 유입되기 전에 브레이크 탱크(들)에 유입되도록 시스템에 배치된 임의의 브레이크 탱크(들)는, 각각 1 mL 이상 MCCS1 또는 MCCS의 제1 컬럼 로딩 부피의 약 100% 이하인 용량을 가질 수 있다. 유체가 MCCS2에 유입되기 전 (및 MCCS1을 빠져 나간 후) 브레이크 탱크(들)에 유입되도록 시스템

에 배치된 임의의 브레이크 탱크(들)는, 1 mL 이상 MCCS2의 제1 컬럼 로딩 부피의 약 100% 이하인 용량을 가질 수 있다.

[0217] **추가적 예시적 시스템 구조 및 특징**

[0218] MCCS 또는 MCCS1은 각각 유체(예를 들어, 세포가 실질적으로 존재하지 않는 액체 배양 배지)가 MCCS 또는 MCCS1 안으로 통과될 수 있는 입구를 포함할 수 있다. 입구는 이러한 목적을 위한 당해 분야에 공지된 임의의 구조일 수 있다. 입구는, 예를 들어, 입구에 유체 도관을 삽입한 후 유체가 입구 밖으로 심각하게 누출되지 않고 입구를 통해 MCCS 또는 MCCS1에 유입되도록, 유체 도관이 삽입되도록 할 수 있는 스레딩(threading), 리빙(ripping), 또는 시일(seal)을 포함할 수 있다. 본 시스템에 사용될 수 있는 비제한적 입구는 공지되어 있고 당업자에 의해 이해될 것이다.

[0219] MCCS 또는 MCCS1은 적어도 두 개의 크로마토그래피 컬럼, 적어도 두 개의 크로마토그래피 멤브레인, 또는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼과 적어도 하나의 크로마토그래피 멤브레인, 및 입구를 포함할 수 있다. MCCS 또는 MCCS1은 본원에 기술된 임의의 예시적 MCCS이거나, 본원에 기술된 (임의의 조합의) MCCS의 하나 이상의 임의의 예시적 특징을 가질 수 있다. MCCS 또는 MCCS1에 존재하는 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)은 본원에 기술된 하나 이상의 임의의 예시적 형상, 크기, 부피(충진층 부피), 및/또는 단위 조작용을 가질 수 있다.

[0220] MCCS 또는 MCCS1에 존재하는 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)은 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 하나 이상의 임의의 예시적 수지를 포함할 수 있다. 예를 들어, MCCS 또는 MCCS1에 존재하는 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인에 포함된 수지는 포집 메커니즘(예를 들어, 단백질 A-결합 포집 메커니즘, 단백질 G-결합 포집 메커니즘, 항체- 또는 항체 단편-결합 포집 메커니즘, 기질-결합 포집 메커니즘, 공동 인자-결합 포집 메커니즘, 아프타머-결합 포집 메커니즘, 및/또는 태그-결합 포집 메커니즘)을 이용하는 수지일 수 있다. MCCS 또는 MCCS1의 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인에 포함된 수지는 양이온 교환 수지, 음이온 교환 수지, 분자체 수지, 또는 소수성 상호작용 수지, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 재조합 단백질을 정제하기 위해 사용될 수 있는 수지의 추가 예는 당해 분야에 공지되어 있고, MCCS 또는 MCCS1에 존재하는 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인에 포함될 수 있다. MCCS 또는 MCCS1에 존재하는 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인들은 동일한 수지 및/또는 상이한 수지(예를 들어, 재조합 단백질 정제에 사용하기 위한 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 수지)를 포함할 수 있다.

[0221] MCCS 또는 MCCS1에 존재하는 둘 이상의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 수지는 하나 이상의 단위 조작(예를 들어, 재조합 단백질의 포집, 재조합 단백질의 정제, 재조합 단백질의 폴리싱, 바이러스의 비활성화, 재조합 단백질을 포함하는 유체의 이온 농도 및/또는 pH 조절, 또는 재조합 단백질을 포함하는 유체의 여과)을 수행할 수 있다. 비제한적 예에서, MCCS 또는 MCCS1은 유체(예를 들어, 액체 배양 배지)로부터 재조합 단백질을 포집하는 단위 조작 및 재조합 단백질을 포함하는 유체에 존재하는 바이러스를 비활성화시키는 단위 조작을 수행할 수 있다. MCCS 또는 MCCS1은 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 둘 이상의 단위 조작의 임의의 조합을 수행할 수 있다.

[0222] MCCS 또는 MCCS1에 존재하는 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)은 스위칭 메커니즘(예를 들어, 컬럼-스위칭 메커니즘)에 의해 연결되거나 서로에 대해 이동될 수 있다. MCCS 또는 MCCS1은 또한 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 또는 5개)의 펌프(예를 들어, 자동, 예를 들어, 자동 연동 펌프)를 포함할 수 있다. 컬럼-스위칭 사건은 MCCS 또는 MCCS1을 통과하는 유체 내 재조합 단백질(예를 들어, MCCS 또는 MCCS1의 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인으로의 입력 및/또는 그로부터의 용출)의 특정 수준에 해당하는 UV 흡광도, 액체(예를 들어, 완충액)의 특정 부피, 또는 특정 경과 시간에 의해 검출되는 재조합 단백질 수준의 검출에 의해 작동될 수 있다. 컬럼 스위칭은 일반적으로 MCCS 또는 MCCS1의 적어도 두 개의 상이한 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(예를 들어, MCCS1 또는 MCCS2에 존재하는 둘 이상의 상이한 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인)이 공정의 적어도 일부 동안 실질적으로 동일한 시간에 상이한 단계(예를 들어, 평형화, 로딩, 용출, 또는 세척)를 통과하도록 허용되는 메커니즘을 의미한다.

[0223] MCCS 또는 MCCS1은 주기적 역류 크로마토그래피 시스템(PCCS)일 수 있다. 예를 들어, MCCS 또는 MCCS1인 PCCS(즉, 각각 PCCS 또는 PCCS1)는, 첫 번째 세 개의 컬럼이 유체(예를 들어, 액체 배양 배지)로부터 재조합 단백질을 포집하는 단위 조작을 수행하고 PCCS의 네 번째 컬럼이 재조합 단백질을 포함하는 유체 내 바이러스를 비활

성화시키는 단위 조작을 수행하는, 네 개의 크로마토그래피 컬럼을 포함할 수 있다. MCCS 또는 MCCS1인 PCCS는 컬럼-스위칭 메커니즘을 이용할 수 있다. PCC 시스템은 최대, 예를 들어 4, 5, 6, 7, 또는 8개의 컬럼, 또는 그 이상을 작동시킬 수 있는 수정된 AEKTA 시스템(GE Healthcare, Piscataway, NJ)을 사용할 수 있다.

[0224] MCCS 또는 MCCS1은 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 UV 모니터, 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 밸브, 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 pH 측정기, 및/또는 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 전도도 측정기를 구비할 수 있다. MCCS 또는 MCCS1은 또한 (예를 들어, UV 흡광도, 액체의 부피, 또는 경과 시간에 기초하여) 컬럼-스위칭이 일어나야 하는 때를 감지하여 컬럼-스위칭 사건을 유발하기 위한(작동시키기 위한) 소프트웨어(예를 들어, 유니콘 기반 소프트웨어, GE Healthcare, Piscataway, NJ)를 이용하는 작동 시스템을 구비할 수 있다.

[0225] MCCS 또는 MCCS1은 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24개의) 인라인 완충액 조절 저장소 및/또는 완충액 저장소를 더 포함할 수 있다. 다른 예에서, MCCS 또는 MCCS1은 MCCS 또는 MCCS1의 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인 안으로 용이하게 통과할 수 없는 유체를 수용할 수 있는 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의) 브레이크 탱크를 포함할 수 있다. 본원에 기술된 시스템은 MCCS, MCCS1, 및/또는 MCCS2에 하나 이상의 브레이크 탱크(예를 들어, 본원에 기술된 브레이크 탱크)를 포함할 수 있다. 본원에 기술된 시스템의 다른 예는 MCCS, MCCS1, 또는 MCCS2에 브레이크 탱크를 포함하지 않거나, 전체 시스템에 브레이크 탱크를 포함하지 않는다. 본원에 기술된 시스템의 다른 예는 전체 시스템에 최대 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 브레이크 탱크(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 브레이크 탱크)를 포함한다.

## [0226] 제2 MCCS

[0227] 예시적 시스템에서 제2 MCCS(MCCS2)는 적어도 두 개의 크로마토그래피 컬럼, 적어도 두 개의 크로마토그래피 멤브레인, 또는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼과 적어도 하나의 크로마토그래피 멤브레인, 및 출구를 포함한다. MCCS2는 본원에 기술된 임의의 예시적 MCCS이거나, 본원에 기술된 (임의의 조합의) MCCS의 하나 이상의 임의의 예시적 특징을 가질 수 있다. MCCS2에 존재하는 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)은 본원에 기술된 하나 이상의 임의의 형상, 크기, 부피(충진층 부피), 및/또는 단위 조작을 가질 수 있다. 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)은 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 예시적 수지를 포함할 수 있다. 예를 들어, MCCS2에 존재하는 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인에 포함된 수지는 포집 메커니즘(예를 들어, 단백질 A-결합 포집 메커니즘, 단백질 G-결합 포집 메커니즘, 항체- 또는 항체 단편-결합 포집 메커니즘, 기질-결합 포집 메커니즘, 공동 인자-결합 포집 메커니즘, 태그-결합 포집 메커니즘, 및/또는 아프타머-결합 포집 메커니즘)을 이용하는 수지일 수 있다. 유용한 수지는, 예를 들어 양이온 교환 수지, 음이온 교환 수지, 분자체 수지, 및 소수성 상호작용 수지를 포함한다. 수지의 추가 예는 당해 분야에 공지되어 있다. MCCS2에 존재하는 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)은 동일한 수지 및/또는 상이한 수지(예를 들어, 제조할 단백질 정제에 사용하기 위한 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 수지)를 포함할 수 있다.

[0228] MCCS2에 존재하는 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)은 하나 이상의 단위 조작(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 단위 조작 또는 본원에 기술된 단위 조작의 임의의 조합)을 수행할 수 있다. 비제한적 예에서, MCCS2는 유체로부터 제조할 단백질을 정제하는 단위 조작 및 제조할 단백질을 포함하는 유체에 존재하는 제조할 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행할 수 있다. 다른 비제한적 예에서, MCCS2는 유체에 존재하는 제조할 단백질을 정제하는 단위 조작, 유체에 존재하는 제조할 단백질을 폴리싱하는 단위 조작, 및 제조할 단백질을 포함하는 유체를 여과하는 단위 조작을 수행할 수 있다. 다른 예에서, MCCS2는 유체에 존재하는 제조할 단백질을 정제하는 단위 조작, 유체에 존재하는 제조할 단백질을 폴리싱하는 단위 조작, 제조할 단백질을 포함하는 유체를 여과하는 단위 조작, 및 제조할 단백질을 포함하는 유체의 이온 농도 및/또는 pH를 조절하는 단위 조작을 수행할 수 있다. MCCS2는 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 둘 이상의 단위 조작의 임의의 조합을 수행할 수 있다.

[0229] MCCS2에 존재하는 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인(들)은 스위칭 메커니즘(예를 들어, 컬럼-스위칭 메커니즘)에 의해 연결되거나 서로에 대해 이동될 수 있다. MCCS2는 또한 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 또는 5개)의 펌프(예를 들어, 자동, 예를 들어, 자동 연동 펌프)를 포함할 수 있다. 컬럼-스위칭 사건은 MCCS2를 통과하는 유체 내 제조할 단백질(예를 들어, MCCS2의 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인)으로의 입력 및/또는 그로부터의 용출)의 특정 수준에 해당하는 UV 흡광도, 액체(예를



들어, 완충액)의 특정 부피, 또는 특정 경과 시간에 의해 검출되는 재조합 단백질 수준의 검출에 의해 작동될 수 있다.

[0230] MCCS2는 주기적 역류 크로마토그래피 시스템(PCCS2)일 수 있다. 예를 들어, PCCS2는 유체로부터 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하는 세 개의 컬럼, 및 유체에 존재하는 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 조작을 수행하는 크로마토그래피 멤브레인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 유체로부터 재조합 단백질을 정제하는 단위 조작을 수행하는 세 개의 컬럼은, 예를 들어 양이온 교환 수지를 포함할 수 있으며, 폴리싱의 단위 조작을 수행하는 크로마토그래피 멤브레인은 양이온 교환 수지를 포함할 수 있다. PCCS2는 컬럼-스위칭 메커니즘을 이용할 수 있다. PCCS2는 최대, 예를 들어 4, 5, 6, 7, 또는 8개의 컬럼, 또는 그 이상을 작동시킬 수 있는 수정된 AEKTA 시스템(GE Healthcare, Piscataway, NJ)을 사용할 수 있다.

[0231] MCCS2는 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 UV 모니터, 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 펄브, 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 pH 측정기, 및/또는 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 전도도 측정기를 구비할 수 있다. MCCS2는 또한 (예를 들어, UV 흡광도, 액체의 부피, 또는 경과 시간에 기초하여) 컬럼-스위칭이 일어나야 하는 때를 감지하여 컬럼-스위칭 사건을 유발하기 위한 소프트웨어(예를 들어, 유니콘 기반 소프트웨어, GE Healthcare, Piscataway, NJ)를 이용하는 작동 시스템을 구비할 수 있다.

[0232] MCCS2는 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24개의) 인라인 완충액 조절 저장소 및/또는 완충액 저장소를 더 포함할 수 있다. 다른 예에서, MCCS2는 MCCS2의 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 멤브레인 안으로 용이하게 통과할 수 없는 유체를 수용할 수 있는 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의) 브레이크 탱크(예를 들어, 본원에 기술된 브레이크 탱크)를 포함할 수 있다.

[0233] MCCS2는 치료 단백질 의약품 물질이 시스템을 빠져 나갈 수 있는 출구를 포함한다. 출구는, 예를 들어 유체 도관이 삽입되도록 할 수 있는 스테딩, 리빙, 또는 시일, 또는 정제된 재조합 단백질(예를 들어, 치료 단백질 의약품 물질)을 수용하거나 저장하도록 설계된 유리병을 포함할 수 있다. 저장된 바이오버든 유리병 또는 저장 용기 내로 정제 재조합 단백질(예를 들어, 치료 단백질 의약품 물질)이 직접 흐를 수 있게 하기 위해, 출구는 저장된 바이오버든 유리병 또는 기타 이러한 저장 용기를 출구에 밀봉시키기 위해 사용될 수 있는 표면을 포함할 수 있다. 본 시스템에 사용될 수 있는 비제한적 출구는 공지되어 있고 당업자에 의해 이해될 것이다.

[0234] 본원에 기술된 시스템은 또한, MCCS1과 MCCS2 사이에 배치된 유체 도관을 포함할 수 있다. 본원에 기술된 임의의 유체 도관은, 예를 들어 폴리에틸렌, 폴리카보네이트, 또는 플라스틱으로 만든, 예를 들어 튜브일 수 있다. MCCS1과 MCCS2 사이에 배치된 유체 도관은 다음 중 하나 이상을 임의의 조합으로 더 포함할 수 있다: 유체 도관과 유체 연통되고 인라인 완충액 조절 저장소(들) 내에 저장된 완충액이 유체 도관에 존재하는 유체에 첨가되도록 위치한 하나 이상의 인라인 완충액 조절 저장소; 유체 도관과 유체 연통되고 MCCS2에 용이하게 공급될 수 없는 유체 도관에 존재하는 임의의 과잉 유체를 수용할 수 있도록 위치한 브레이크 탱크(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 브레이크 탱크(들)); 및 유체 도관에 존재하는 유체를 여과(예를 들어, 박테리아를 제거)할 수 있도록 유체 도관 내에 배치된 하나 이상의 필터. 임의의 인라인 완충액 조절 저장소는, (예를 들어, 25°C, 15°C, 또는 10°C 이하의 온도에서), 예를 들어 약 0.5 L 내지 50 L 부피의 완충액을 포함할 수 있다.

[0235] 본원에 기술된 시스템은 MCCS2의 마지막 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인과 출구 사이에 배치된 유체 도관을 선택적으로 포함할 수 있다. 본원에 기술된 시스템은, 필터가 MCCS2의 마지막 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인과 출구 사이에 배치된 유체 도관에 존재하는 유체로부터, 예를 들어 침전 물질, 미립자 물질, 또는 박테리아를 제거할 수 있도록, MCCS2의 마지막 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인과 출구 사이에 배치된 유체 도관과 유체 연결된 하나 이상의 필터를 더 포함할 수 있다.

[0236] 본원에 제공된 시스템의 일부 예는 또한, MCCS 또는 MCCS1의 입구와 유체 연결된 생물반응기를 포함한다. 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 예시적 생물반응기가 본 시스템에 사용될 수 있다.

[0237] 본원에 제공된 시스템의 일부 예는 또한 펌프 시스템을 포함한다. 펌프 시스템은 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 펌프(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 펌프), 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 또는 5개의) 필터(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 필터), 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개)의 UV 검출기, 및, 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 또는 5개)의 브레이크 탱크(예를 들어 본원에 기술된 임의의 브레이크 탱크).



이크 탱크). 본원에 제공된 시스템의 일부 예는 펌프와 MCCS 또는 MCCS1의 입구 사이에 배치된 유체 도관(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 예시적 유체 도관)을 더 포함한다. 일부 예에서, 이러한 특정 유체 도관은 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 또는 4개)의 펌프(본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 펌프) 및/또는 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 또는 4개)의 브레이크 탱크(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 예시적 브레이크 탱크)를 포함할 수 있으며, 이 펌프(들) 및/또는 브레이크 탱크(들)는 유체 도관에 존재하는 유체와 유체 연결된다.

[0238] 본원에 기술된 시스템의 일부 예는 펌프와 입구 사이의 유체 도관에 연결된 추가 유체 도관을 더 포함하며, 추가 유체 도관의 일단은 생물반응기에 유체적으로 연결되고, 타단은 펌프와 입구 사이의 유체 도관에 유체적으로 연결된다. 이러한 추가 유체 도관은 생물반응기로부터 제거된 액체 배양 배지로부터 세포를 제거할 수 있는 필터(예를 들어, ATF 세포 유지 시스템)를 포함할 수 있다.

[0239] 본원에 제공된 시스템은 정제된 재조합 단백질(예를 들어, 치료 단백질 의약 물질)의 연속 제조를 가능하게 한다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 시스템은 정제된 재조합 단백질(예를 들어, 치료 단백질 의약 물질)의 주기적 용출을 제공할 수 있다. 본원에 기술된 시스템은 또한, 적어도 약 5일, 적어도 약 10일, 적어도 약 15일, 적어도 약 20일, 적어도 약 25일, 적어도 약 30일, 적어도 약 40일, 적어도 약 50일, 적어도 약 60일, 적어도 약 70일, 적어도 약 80일, 적어도 약 90일, 또는 적어도 100일의 연속 기간에 걸쳐 적어도 약 5 g/일, 적어도 약 10 g/일, 적어도 약 15 g/일, 적어도 약 20 g/일, 적어도 약 30 g/일, 또는 적어도 약 40 g/일의 정제된 재조합 단백질(예를 들어, 치료 단백질 의약 물질)의 순 수율을 발생시킬 수 있다.

[0240] **실질적으로 건조된 크로마토그래피 수지의 사용을 포함하는 크로마토그래피 수지의 바이오버든 저감 방법**

[0241] 또한, 크로마토그래피 수지의 바이오버든을 저감하는 방법으로서, (a) 실질적으로 건조된 크로마토그래피 수지를 포함하는 용기를 용기 및 크로마토그래피 수지의 바이오버든을 저감하기에 충분한 양의 감마선 조사에 노출시키는 단계를 포함하는, 방법이 본원에 제공된다. 이러한 방법의 일부 구현예는 (a) 단계 이전에 크로마토그래피 수지를 건조하여 크로마토그래피 수지로부터 액체를 제거하는 단계를 더 포함한다. 크로마토그래피 수지를 건조하는 단계는 열처리(예를 들어, 오븐) 또는 데시케이터를 이용하여 수행될 수 있다. 크로마토그래피 수지를 건조하기 위한 다른 방법은 당해 분야에 공지되어 있다.

[0242] 본원에 기술된 임의의 조건 및 감마선 조사량이 이러한 방법에 사용될 수 있다. 예를 들어, 감마선 조사량은 약 15 kGy 내지 약 45 kGy(예를 들어, 약 20 kGy 내지 약 30 kGy)일 수 있다. 본원에 기술된 임의의 용기 및 크로마토그래피 수지가 이러한 방법에 사용될 수 있다. 예를 들어, 용기는 저장 베셀 또는 크로마토그래피 컬럼일 수 있다. 이러한 방법에서 크로마토그래피 수지는 단백질 리간드(예를 들어, 단백질 A 또는 단백질 G)를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 크로마토그래피 수지는 음이온 교환 크로마토그래피 수지(예를 들어, N-벤질-N-메틸-에탄올아민기를 포함하는 크로마토그래피 수지)를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 크로마토그래피 수지는 물품(예를 들어, 칩, 멤브레인, 또는 카세트)의 표면에 공유 부착된다. 일부 구현예에서, 실질적으로 건조된 크로마토그래피 수지는 상당량의 항산화제 또는 상당량의 킬레이트제를 함유하지 않는다. 또한, 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 저감된 바이오버든 크로마토그래피 수지가 제공된다.

[0243] 일부 예에서, 제조된 저감된 바이오버든 크로마토그래피 수지는 약  $1 \times 10^{-8}$  내지 약  $1 \times 10^{-5}$ 의 멸균 보증 수준(SAL)(예를 들어, 약  $1 \times 10^{-7}$  내지 약  $1 \times 10^{-6}$ 의 SAL)을 갖는다. 제조된 저감된 크로마토그래피 수지는 음이온 교환 크로마토그래피 수지, 양이온 교환 크로마토그래피 수지, 친화성 크로마토그래피 수지, 소수성 상호작용 크로마토그래피 수지, 및 크기 배제 크로마토그래피 수지로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 수지를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 제조된 저감된 크로마토그래피 수지는 단백질 리간드(예를 들어, 단백질 A)를 포함하는 친화성 크로마토그래피 수지를 포함한다. 일부 예에서, 제조된 저감된 크로마토그래피 수지는 음이온 교환 크로마토그래피 수지(예를 들어, N-벤질-N-메틸-에탄올아민기를 포함하는 음이온 교환 크로마토그래피 수지)를 포함한다. 또한, 저감된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼을 제조하는 방법으로서, 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 저감된 바이오버든 크로마토그래피 수지를 제공하는 단계; 및 무균 환경에서 크로마토그래피 수지를 저감된 바이오버든 컬럼에 충전시키는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다. 또한, 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 제조된 저감된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼이 제공된다.

[0244] 또한, 정제된 재조합 단백질의 저감된 바이오버든 제조를 위한 통합형, 단한 또는 실질적으로 단한, 연속 공정으로서, (a) 세포가 실질적으로 존재하지 않는 재조합 단백질을 포함하는 액체 배양 배지를 제공하는 단계; (b) 본원에 제공된 임의의 방법에 의해 제조된 적어도 하나의 저감된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼을 포함

하는 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템(MCCS)에 액체 배양 배지를 연속적으로 공급하는 단계를 포함하되, 저장된 바이오버든 완충액을 사용하고, 통합형이며, 액체 배양 배지부터 정제 재조합 단백질인 MCCS로부터의 용출액까지 연속적으로 진행되는, 공정이 제공된다. 또한, 정제된 재조합 단백질의 저장된 바이오버든 제조를 위한 통합형 단한 연속 공정으로서, (a) 세포가 실질적으로 존재하지 않는 재조합 단백질을 포함하는 액체 배양 배지를 제공하는 단계; (b) 액체 배양 배지를 제1 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템(MCCS1)에 연속적으로 공급하는 단계; (c) MCCS1을 이용하여 액체 배양 배지에서 재조합 단백질을 포집하는 단계; (d) 재조합 단백질을 포함하는 MCCS1으로부터 용출액을 제조하고 용출액을 제2 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템(MCCS2)에 연속적으로 공급하는 단계; 및 (e) 용출액으로부터의 재조합 단백질을 MCCS2에 연속적으로 공급한 후 재조합 단백질을 용출시켜 정제된 재조합 단백질을 제조하는 단계를 포함하되, 저장된 바이오버든 완충액을 사용하고, 통합형이며, 액체 배양 배지부터 정제된 재조합 단백질까지 연속적으로 진행되며, MCCS1 및/또는 MCCS2의 적어도 하나의 컬럼은 본원에 제공된 임의의 방법에 의해 제조된 저장된 바이오버든 충전 크로마토그래피 컬럼을 포함하는, 공정이 제공된다. 본원에 기술된 정제된 재조합 단백질의 저장된 바이오버든 제조를 위한 통합형 단한 연속 공정의 임의의 예시적 양태가 이러한 공정에서 사용될 수 있다.

[0245] **저장된 바이오버든 멤브레인, 수지, 코팅된 물질, 칩, 및 카세트를 제조하는 방법**

[0246] 또한, 저장된 바이오버든 멤브레인, 수지, 코팅된 물질, 칩, 또는 카세트를 제조하는 방법으로서, 멤브레인, 수지, 코팅된 물질, 칩, 또는 카세트(예를 들어, 셀룰로오스-, 아가로오스-, 또는 당-기반 멤브레인, 수지, 코팅된 물질, 칩, 또는 카세트), 및 적어도 하나의 향산화제 및/또는 킬레이트제를 포함하는 조성물을 포함하는 용기를, 용기 및 멤브레인, 수지, 코팅된 물질, 칩, 또는 카세트의 바이오버든을 저장하기에 충분한 양의 감마선 조사에 노출시키는 단계를 포함하되, 적어도 하나의 향산화제 및/또는 킬레이트제는 이러한 양의 감마선 조사에 노출 후의 멤브레인, 수지, 코팅된 물질, 칩, 및 카세트의 손상을 개선하기에 충분한 양으로 존재하는, 방법이 본원에 제공된다. 일부 예에서, 카세트는 수지-함유 카세트(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 예시적 수지)일 수 있다. 일부 구현예에서, 멤브레인, 수지, 코팅된 물질, 칩, 또는 카세트는 그 표면의 적어도 하나 또는 일부에 공유 부착된 단백질 A 또는 단백질 G 리간드를 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 멤브레인, 수지, 코팅된 물질, 칩, 또는 카세트, 및 적어도 하나의 향산화제 및/또는 적어도 하나의 킬레이트제를 포함하는 액체를 포함한다. 본원에 기술된 향산화제(들) 및/또는 킬레이트제(들)의 임의의 예시적 조합 및 농도가 임의의 이러한 방법에 사용될 수 있다. 본원에 기술된 임의의 예시적 액체가 임의의 이러한 방법에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 건조된 물질이다. 또한, 본원에 기술된 임의의 방법을 이용하여 제조된 저장된 바이오버든 멤브레인, 수지, 코팅된 물질, 칩, 또는 카세트가 본원에 제공된다. 일부 예에서, 용기는 밀봉된 저장 용기 또는 베셀이다.

[0247] 또한, 저장된 바이오버든 멤브레인, 수지, 코팅된 물질, 칩, 및 카세트를 제조하는 방법으로서, 실질적으로 건조된 멤브레인, 수지, 코팅된 물질, 칩, 또는 카세트(예를 들어, 셀룰로오스-, 아가로오스-, 또는 당-기반 멤브레인, 수지, 코팅된 물질, 칩, 또는 카세트)를 포함하는 용기를, 용기 및 멤브레인, 수지, 코팅된 물질, 칩, 또는 카세트의 바이오버든을 저장하기에 충분한 양의 감마선 조사에 노출시키는 단계를 포함하는, 방법이 본원에 제공된다. 일부 예는 노출 단계 이전에 멤브레인, 수지, 코팅된 물질, 칩, 또는 카세트를 건조하는 단계를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 멤브레인, 수지, 코팅된 물질, 칩, 또는 카세트는 그 표면에 공유 부착된 단백질 A 또는 단백질 G 리간드를 포함한다. 일부 예에서, 카세트는 수지-함유 카세트(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 예시적 수지)이다. 또한, 본원에 기술된 임의의 방법을 이용하여 제조된 저장된 바이오버든 멤브레인, 수지, 코팅된 물질, 칩, 또는 카세트가 본원에 제공된다.

[0248] 본 발명은 하기 실시예에서 추가로 기술되며, 이러한 실시예는 청구범위에 기술된 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

[0249] **실시예**

[0250] **실시예 1. 상이한 크로마토그래피 수지의 정적 결합 용량에 미치는 감마선 조사의 영향**

[0251] 세 가지 상이한 단백질 A 친화성 크로마토그래피 수지인, GE Mab Select SuRe™ (85  $\mu$ m의 입자 크기 및 단백질 A를 아가로오스에 연결하는 에폭시 작용기를 갖는 고도로 가교된 아가로오스 수지), JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203(약 50  $\mu$ m의 입자 크기 및 단백질 A를 폴리-메타크릴레이트에 연결하는 에폭시 작용기를 갖는 다공성 폴리-메타크릴레이트 수지), 및 Kaneka KanCap A(단백질 A가 환원적 아민화를 통해 셀룰로오스에 연결된, 65 내지 85  $\mu$ m의 입자 크기를 갖는 고도로 가교된 셀룰로오스)의 정적 결합 용량에 미치는 감마선 조사의 영향을

시험하기 위해 한 세트의 실험을 수행하였다. 예외적으로 Mab Select SuRe™ 은 25 kGy의 조사량으로 처리하였고, GE Mab Select SuRe™ 수지의 대조군 샘플은 미처리 상태로 둔 것을 제외하고, 세 가지 수지 각각을 15 kGy의 감마선 조사로 처리하였으며, 항-TGFβ 항체(IgG4)와 함께 로딩하였고, 용출액 내 항-TGFβ 항체의 수준을 측정하였다. 이 실시예에서 각 수지에 대한 감마선 조사는 pH 7.0의 50 mM 인산염에서 수행하였다. 감마선 조사 수지 및 미처리 대조군 수지 각각의 정적 결합 곡선을 도 1에 나타내었다. 이들 데이터는 감마선 조사가 세 가지 시험된 단백질 A 크로마토그래피 수지 각각의 결합 용량을 저하시키며, JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지가 15 kGy 감마선 조사에 대한 대응하여 가장 적은 결합 용량의 감소를 나타내고 있음을 보여준다.

[0252] JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지 또는 GE Mab Select SuRe™ 수지에 대한 감마선 조사가 크로마토그래피 수지로부터 단백질 A의 분열(또는 방출)을 초래하는지 여부를 결정하기 위해 그 다음 실험을 수행하였다. 이 실험에서, JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지 또는 GE Mab Select SuRe™ 수지를 30 kGy의 감마선 조사로 처리하고 나서, 280 nm에서 흡광도를 측정하여 상청액 내 단백질 A의 수준을 결정하였다. 이 실험에서 얻은 데이터는 감마선 조사로 처리 후 이들 두 가지 시험된 수지 어느 것으로부터도 단백질 A가 거의 방출되지 않는다는 것을 보여준다(도 2).

[0253] 이들 데이터는 감마선 조사가 친화성 크로마토그래피 수지의 결합 용량의 순간적인 감소를 초래하며, 결합 용량의 이러한 손실은 수지로부터 단백질 리간드의 분열로 인한 것이 아니라는 것을 보여준다.

#### [0254] 실시예 2. 크로마토그래피의 여러 사이클에 걸쳐 수지의 결합 용량에 미치는 감마선 조사의 영향

[0255] 크로마토그래피의 여러 사이클에 걸쳐 크로마토그래피 수지의 결합 용량에 미치는 감마선 조사의 영향을 시험하기 위해 그 다음 세트의 실험을 수행하였다. 이 실험은 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지를 사용하여 수행하였는데, 이는 이 수지가 실시예 1에서 감마선 조사에 대응하여 가장 적은 양의 결합 용량 손실을 나타내었기 때문이다. 이 실시예에서 각 수지에 대한 감마선 조사는 pH 7.0의 50 mM 인산염에서 수행하였다.

[0256] 크로마토그래피의 여러 사이클에 걸쳐 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지가 항-TGFβ 항체(IgG4)에 결합하는 능력에 미치는 15 kGy 감마선 조사의 영향을 시험하기 위해 첫 번째 실험을 수행하였다. 양성 대조군으로서, 크로마토그래피의 여러 사이클을 수행하기 위해 미처리 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지를 또한 사용하였다. 각 사이클의 종료 시, 수지를 0.1 N NaOH로 세척하였다. 각 사이클로부터의 용출액 내 항-TGFβ 항체의 양을 측정하였다. 15 kGy 감마선 조사가 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지의 결합 용량의 순간적인, 약 20% 내지 25%의, 감소를 초래하지만(즉, 첫 번째 사이클), 크로마토그래피의 여러 추가 사이클에 걸쳐 결합 용량은 단지 매우 느린 속도로(즉, 미처리 수지의 결합 용량 감소 속도에 필적하는 속도로) 감소하는 것을 데이터가 보여준다(도 3, 도 6, 및 도 7).

[0257] 15 kGy 감마선이 조사된 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지의 크로마토그래피의 초기 사이클 후 결합 용량의 최소한의 감소는 이 실험에서 사이클 7과 사이클 11에서의 크로마토그래피 비교로부터 또한 명백하다(도 4 및 도 5). 도 4 및 도 5는 미처리 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지 및 15 kGy 감마선이 조사된 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지 모두에 대해 크로마토그래피의 여러 사이클에 걸쳐 이들 수지의 결합 용량의 관찰 가능한 변화는, 존재한다 하더라도, 단지 완만하다는 것을 보여준다.

[0258] 미처리 상태로 두거나 29 kGy 감마선 조사로 처리된 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지의 크로마토그래피의 여러 사이클에 걸쳐 결합 용량의 변화를 시험하기 위해 추가 실험을 수행하였다. 이 실험에서, 각 사이클의 종료 시 수지를 0.1 N NaOH로 세척하였고, 각 사이클의 시작 시 항-αβTCR 단일 클론 항체(IgG1)와 함께 수지를 로딩하였다. 결과 데이터는 29 kGy 감마선이 조사된 수지의 결합 용량에 있어서 미처리 수지 대비 약 20% 내지 25% 초기 감소를 다시 보여준다(도 8). 미처리 수지 및 29 kGy 감마선이 조사된 수지의 결합 용량은 크로마토그래피의 여러 추가 사이클에 걸쳐 (미처리 수지 및 29 kGy 감마선이 조사된 수지에 대해 거의 동일한 속도로) 단지 완만하게 감소하였다(도 8).

[0259] 크로마토그래피의 여러 사이클에 걸쳐, 미처리 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지, 15 kGy 감마선이 조사된 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지, 및 29 kGy 감마선이 조사된 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지의 결합 용량을 시험하기 위해 마지막 세트의 실험을 수행하였다. 각 사이클의 종료 시, 수지를 0.1 N NaOH로 세척하였고, 단일 클론 항-TGFβ(IgG4) 항체 또는 단일 클론 항-αβTCR(IgG1) 항체(abTCR) 중 하나와 함께 수지를 로딩하였다. 15 kGy 및 29 kGy의 감마선 조사는 JSR LifeSciences Amsphere ProA

JWT203 수지의 결합 용량에 있어서 실질적으로 동일한 수준의 감소를 유발하며, 15 kGy 및 29 kGy 감마선이 조사된 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 수지의 결합 용량의 수준은 크로마토그래피의 여러 사이클에 걸쳐 미처리 수지와 동일한 속도로 완만히 감소하는 것을 데이터가 보여준다(도 9).

[0260] 이들 데이터, 단백질 리간드를 가진 크로마토그래피 수지에 대한 감마선 조사는 결합 용량의 순간적인 감소를 유발하며 결합 용량의 손실이 크로마토그래피의 여러 순환에 걸쳐 비교적 안정하게 유지된다는 것을 보여준다. 이들 데이터는, 감마선 조사 시 감마선 조사가 크로마토그래피 수지(예를 들어, 친화성 크로마토그래피 수지와 같이 단백질 또는 펩티드 리간드를 함유한 크로마토그래피 수지)에 산화적 손상을 초래하며, 적어도 하나의 킬레이트제 및/또는 항산화제의 존재 하에서 크로마토그래피 수지에 감마선을 조사함으로써, 감마선 조사 시 크로마토그래피 수지(예를 들어, 친화성 크로마토그래피 수지와 같이 단백질 또는 펩티드 리간드를 함유한 크로마토그래피 수지)의 결합 용량 손실이 방지, 개선, 또는 감소될 수 있음을 시사한다.

### [0261] 실시예 3. GE Mab Select SuRe™ 수지의 결합 용량에 미치는 감마선 조사의 영향

[0262] 크로마토그래피의 여러 사이클에 걸쳐 다른 단백질 리간드 크로마토그래피 수지(GE Mab Select SuRe™ 수지)의 결합 용량에 미치는 감마선 조사의 영향을 결정하기 위해 한 세트의 실험을 수행하였다. 수지를 pH 7.0의 50 mM 인산 나트륨으로 교체한 후 30 mL Nalgene 병에서 29 kGy 감마선 조사로 처리하였다. 이후 3 cm의 충전층 높이를 가진 0.66 cm 직경의 컬럼(1 mL 컬럼)에 수지를 충전시켰다. 이후 이 컬럼을 사용하여 크로마토그래피의 여러 사이클에 걸쳐 세포 배양 배지에서 단일 클론 IgG1 항체를 포집하였다. 양성 대조군으로서 크로마토그래피의 여러 사이클을 수행하기 위해 미처리 GE Mab Select SuRe™ 수지를 또한 사용하였다. 각 사이클의 종료 시, 수지를 0.1 N NaOH로 세척하였다. 각 사이클로부터 용출액 내 IgG1의 양을 측정하였다. 데이터는 29 kGy 감마선 조사가 GE Mab Select SuRe™ 수지의 결합 용량의 순간적인, 약 25% 내지 30%의, 감소를 초래하는 것을 보여준다(도 11 및 도 12). 크로마토그래피의 첫 번째 사이클 후, 29 kGy 감마선이 조사된 GE Mab Select SuRe™ 수지는 크로마토그래피의 여러 추가 사이클에 걸쳐 결합 용량의 매우 느린 감소 속도(즉, 여러 크로마토그래피 사이클에 걸쳐 미처리 수지의 결합 용량 감소 속도에 필적하는 속도)만을 나타내었다(도 11 및 도 12). 이들 데이터는 실시예 2에 기술된 JSR 단백질 A 수지에 대해 얻은 데이터와 유사하며, 감마선 조사로 인한 수지 결합 용량의 손실에 대한 메커니즘은 유사하게 나타난다.

### [0263] 실시예 4. Mab Select SuRe™ LX 수지의 정적 결합 용량에 미치는 감마선 조사의 영향

[0264] 실시예 1에 기술된 데이터는 감마선 조사가 세 가지 상이한 단백질 A 크로마토그래피 수지(GE Mab Select SuRe™, JSR LifeSciences Amsphere™ ProA JWT203, 및 Kaneka KanCapA™)의 정적 결합 용량을 저하시키는 것을 보여준다. 다른 단백질 A 크로마토그래피 수지인 GE Mab Select SuRe™ LX로 감마선 조사를 시험하였다. GE Mab Select SuRe™ LX 수지는 아가로오스 골격 및 Mab Select SuRe™ 수지와 유사한 단백질 A 리간드를 가지고 있으나, Mab Select SuRe™ 수지에 비해 더 높은 리간드 밀도를 가진다. 수지 완충액을 20% 에탄올로부터 pH 6.0의 50 mM 인산 나트륨으로 교체하고 나서, 29 kGy 감마선 조사에 노출시켰다. 수지의 정적 결합은 실시예 1에 기술된 것과 같이 측정하였다(감마선 조사 전후에 수지의 정적 결합 용량 측정). 데이터는 감마선 조사 후 수지의 정적 결합 용량에 있어서 유사한 감소를 나타낸다(도 13). 이러한 감마선 조사로 인한 GE Mab Select SuRe™ LX 수지의 정적 결합 용량의 감소는 감마선 조사 후 실시예 1에서 시험한 세 가지 단백질 A 크로마토그래피 수지에 대해 관찰된 정적 결합 용량의 감소와 유사하다(도 1). 도 13의 데이터는 Mab Select SuRe™ LX에 대한 감마선 조사가 수지의 정적 결합 용량의 순간적인 감소를 초래하는 것을 보여준다.

### [0265] 실시예 5. 감마선 조사로 인한 크로마토그래피 수지의 결합 용량의 감소의 저감

[0266] 이전 실시예의 데이터는 크로마토그래피 수지에 수지의 바이오버튼을 저장하는 양으로 감마선을 조사하면 수지의 결합 용량 감소(대조군인 미처리 수지의 결합 용량에 비해 약 20% 내지 약 40%의 수지 결합 용량의 감소)를 또한 초래한다는 것을 보여준다. 감마선 조사에 의한 결합 용량의 감소 정도는 수지에 부착된 단백질 A 리간드 및/또는 수지의 비드 화학적 성질에 의존하는 것으로 보이지 않는다. 감마선 조사 시 발생하는 크로마토그래피 수지의 결합 용량 손실을 방지할 완충 용액을 식별하기 위해 본 추가 세트의 실험을 수행하였다. 이 실험에서는 GE Mab Select SuRe™ LX를 크로마토그래피 수지로 사용하였다. GE Mab Select SuRe™ LX는 각 비드의 다공성 매



트릭스에 공유적으로 고정된 단백질 A를 가진다. 수지를 우선 20% 에탄올로부터 하나 이상의 항산화제를 포함하는 상이한 완충액 또는 어떠한 항산화제도 포함하지 않는 대조군 완충액으로 완충액 교체하였다. 시험된 완충용액을 아래 표 1에 나타내었다. 대조군 실험에서는, 항산화제 부재 하에서 건조된 조성물로서 수지에 감마선을 조사하였다. 감마선 조사 시 수분 함량이 최소화되도록 이들 수지를 23℃ 오븐에서 2일 동안 건조하였다. 표 1에 나타낸 각 수지 샘플에 대해 30 mL Nalgene 병에서 29 kGy의 양으로 감마선을 조사하였다. 감마선 조사 수지 샘플 및 미처리(조사 처리되지 않은) 수지 샘플에 대해 실시예 1에 기술된 방법을 이용하여 정적 결합 용량을 측정하였다.

표 1

[0267]

시험된 GE Mab Select SuRe™ LX 수지 샘플 및 완충 용액

수지	기본 완충액	억제제
순수 MabSelect SuRe LX	50 mM 인산 나트륨, pH 6.0	없음
29kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 인산 나트륨, pH 6.0	없음
29kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 인산 나트륨, pH 6.0	100 mM 만니톨
29kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 인산 나트륨, pH 6.0	100 mM 메티오닌
29kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 인산 나트륨, pH 6.0	100 mM 아스코르브산 나트륨
29kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 인산 나트륨, pH 6.0	100 mM 히스티딘
29kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 인산 나트륨, pH 6.0	50 mM 메티오닌 + 50 mM 히스티딘
29kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 인산 나트륨, pH 6.0	33 mM 메티오닌 + 33 mM 히스티딘 + 33 mM 아스코르브산 나트륨
29kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 인산 나트륨, pH 6.0	25 mM 아스코르브산 나트륨 + 25 mM 메티오닌 + 25 mM 만니톨 + 25 mM 히스티딘
건조된 순수 MabSelect SuRe LX	없음	없음
건조된 29kGy MabSelect SuRe LX	없음	없음

[0268]

데이터는 하나 이상의 항산화제 존재 하에서 크로마토그래피 수지에 감마선을 조사하면 감마선 조사에 의한 결합 용량의 손실을 감소시켰다는 것을 보여준다(도 14 및 표 2). 25 mM 아스코르브산 나트륨, 25 mM 메티오닌, 25 mM 만니톨, 25 mM 히스티딘, pH 6.0의 50 mM 인산 나트륨의 완충액(이하, "SMMH" 완충액이라 함)은 감마선 조사로 인한 수지의 결합 용량 손실을 완전히 완화시켰다(즉, 미처리 대조군 수지와 SMMH 완충액의 존재 하에서 29 kGy의 양으로 감마선 조사된 수지 사이에 결합 용량 손실이 관찰되지 않았다)(도 14 및 표 2). 29 kGy 감마선이 조사된 건조된 수지 샘플은 미처리 수지 샘플과 동일한 결합 용량을 가졌다. 이들 데이터는 건조된 크로마토그래피 수지에 감마선을 조사하는 것이 감마선 조사로 인한 수지 결합 용량의 손실 정도를 감소시키는 또 다른 방법임을 나타낸다.

표 2

[0269]

시험된 GE Mab Select SuRe™ LX 수지 샘플에 대한 구체적 결합 용량

수지	기본 완충액	억제제	SBC (mg/mL)
순수 MabSelect SuRe	50 mM 인산 나트륨, pH 7.0	없음	50
29kGy MabSelect SuRe	50 mM 인산 나트륨, pH 7.0	없음	32.8
순수 MabSelect SuRe LX	50 mM 인산 나트륨, pH 6.0	없음	70
29kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 인산 나트륨, pH 6.0	없음	53
29kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 인산 나트륨, pH 6.0	100 mM 만니톨	57
29kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 인산 나트륨, pH 6.0	100 mM 메티오닌	64.5
29kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 인산 나트륨, pH 6.0	100 mM 아스코르브산 나트륨	66
29kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 인산 나트륨, pH 6.0	100 mM 히스티딘	69
29kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 인산 나트륨, pH 6.0	50 mM 메티오닌 + 50 mM 히스티딘	63.5
29kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 인산 나트륨, pH 6.0	33 mM 메티오닌 + 33 mM 히스티딘 + 33 mM 아스코르브산 나트륨	69



29kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 인산 나트륨, pH 6.0	25 mM 아스코르브산 나트륨 + 25 mM 메티오닌 + 25 mM 만니톨 + 25 mM 히스티딘	74
건조된 순수 MabSelect SuRe LX	없음	없음	75
건조된 29kGy MabSelect SuRe LX	없음	없음	74

[0270] SMMH 완충액의 존재 하에서 29 kGy의 양으로 감마선 조사된 수지 및 미처리 수지의 성능을 여러 크로마토그래피 사이클에 걸쳐 시험하기 위해 추가 실험을 수행하였다. 각 시험 수지를 0.66 cm 직경 및 3 cm 높이의 컬럼에 충전시켰다. 컬럼을 단일 클론 IgG1 항체를 함유한 세포 배양 배지와 함께 로딩하였다. 정적 결합 용량 실험에서 관찰된 바와 같이(도 14), 미처리 수지와 SMMH 완충액의 존재 하에서 29 kGy의 양으로 감마선 조사된 수지 간 동적 결합 용량은 모든 사이클에 대해 대등하였다(도 15 및 도 16). 또한, 다른 주요 성질 및 공정 성능 지표, 즉 크기 배제 크로마토그래피-고성능 액체 크로마토그래피(SEC-HPLC)에 의해 측정된 고분자량 화합물의 비율 및 용출액 내 숙주 세포 단백질(HCP)의 농도 또한 대등하였다(표 3). 도 17은 미처리 수지 및 SMMH 완충액의 존재 하에서 29 kGy의 양으로 감마선 조사된 수지로부터 여러 사이클에 걸쳐 얻은 용출액의 대등한 순도를 나타내는 비변성 도데실황산나트륨 폴리아크릴아미드 겔이다.

### 표 3

[0271] 미처리 GE Mab Select SuRe<sup>TM</sup> LX 수지 및 SMMH 완충액의 존재 하에서 감마선 조사된 GE Mab Select SuRe<sup>TM</sup> LX 수지의 용출액 내 고분자량 화합물의 비율 및 숙주 세포 단백질

단백질 A 용출액	% HMMS	HCP (ng/mg)	단백질 A 용출액	% HMWS	HCP (ng/mg)
순수 용출액 사이클 1	1.55	173	SMMH 용출액 사이클 1	1.82	107.6
순수 용출액 사이클 3	1.73	247.2	SMMH 용출액 사이클 2	1.75	없음
순수 용출액 사이클 5	1.89	289.5	SMMH 용출액 사이클 3	1.59	146.2

[0272] 고분자량 화합물의 비율은 Tosoh G3000 SWx1 컬럼을 사용한 크기 배제 크로마토그래피 고성능 액체 크로마토그래피(SEC-HPLC)에 의해 측정되었고, 숙주 세포 단백질 농도는 ELISA 분석법을 이용하여 측정됨.

[0273] 감마선 조사로 인한 크로마토그래피 수지의 결합 용량 손실을 감소시키는 추가 완충 용액의 능력에 대해 시험하였다. 이들 실험에서, 동적 모드에서의 결합 용량을 측정하기 위해 단일 크로마토그래피 사이클을 수행하였다. 시험된 각 완충액에 대해, 전술한 것과 유사한 컬럼(0.66 cm 직경 × 3 cm 높이)을 충전시키고 단일 클론 IgG1을 함유한 세포 배양 배지와 함께 로딩하였다. 정적 결합 용량 실험에서 관찰된 바와 같이(도 14), 적어도 하나의 항산화제를 함유한 각 완충액은 감마선 조사에 의한 수지 결합 용량의 손실을 감소시켰다(표 4). 이들 데이터는 적어도 하나의 항산화제의 존재가 감마선 조사에 의한 수지 결합 용량의 손실을 줄일 수 있다는 것을 보여준다. 게다가, 이들 데이터는 (산화 환원 활성 금속에 결합하여 활성 산소 및 질소 화합물을 생성하는 것을 방지하는) 킬레이트제 또한 감마선 조사에 의한 수지 결합 용량의 손실을 감소시킬 수 있음을 또한 시사한다.

### 표 4

[0274] IgG1을 함유한 세포 배양 채취물과 함께 GE MabSelect SuRe<sup>TM</sup> LX 수지(미처리된 수지 및 억제제의 존재 또는 부재 하에서 29 kGy로 조사된 수지)에 대해 단일 크로마토그래피 사이클로부터 얻은 데이터

수지 조건	용출액 내 단백질 (mg)	결합 단백질 (mg)
순수 MabSelect SuRe LX	70	68
SMMH 존재 하에서의 29kGy MabSelect SuRe LX	69	67
100 mM 히스티딘 존재 하에서의 29kGy MabSelect SuRe LX	68	67
100 mM 메티오닌 존재 하에서의 29kGy MabSelect SuRe LX	64	63
100 mM SA 존재 하에서의 29kGy MabSelect SuRe LX	62	61
29kGy MabSelect SuRe LX	51	51

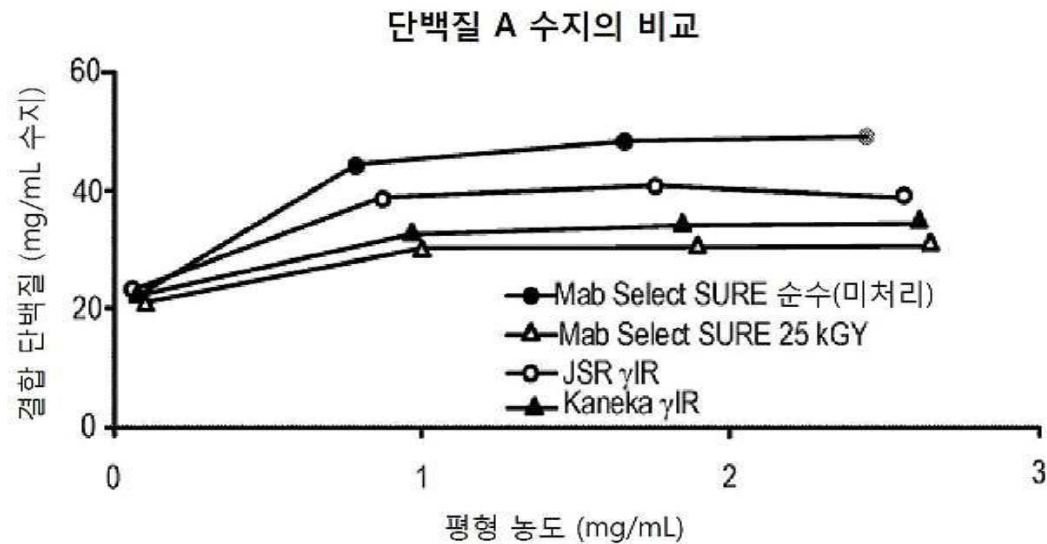
[0275] 종합적으로, 이들 테이터는 적어도 하나의 항산화제 및/또는 적어도 하나의 킬레이트제의 존재 하에서 크로마토그래피 수지에 감마선을 조사하면 감마선 조사에 의한 수지 결합 용량의 손실을 감소시킬 수 있음을 시사한다. 테이터는 또한, 적어도 하나의 항산화제 및/또는 적어도 하나의 킬레이트제의 존재가 감마선 조사 시 형성되는 유리기(free radical)에 의한 손상으로부터 수지 기본 매트릭스뿐만 아니라 고정화된 단백질 A 리간드를 보호한다는 것을 시사한다. 적어도 하나의 항산화제 및/또는 적어도 하나의 킬레이트제는 매트릭스 및/또는 작용기에 손상을 야기할 수 있는 양으로 물질에 감마선을 조사하는 것을 포함하는 다른 바이오가공 응용분야에 또한 이용될 수 있다. 예를 들어, 적어도 하나의 항산화제 및/또는 적어도 하나의 킬레이트제를 함유한 조성물은 셀룰로오스 멤브레인 및 기타 셀룰로오스-, 아가로오스-, 또는 당-기반 수지, 멤브레인, 또는 물질에 대한 감마선 조사로 인한 손상을 방지하기 위해 사용될 수 있다.

[0276] 다른 구현예

[0277] 본 발명이 이의 상세한 설명과 함께 기술되었지만, 상기 설명은 본 발명의 범위를 예시하고자 하는 것이며 이를 한정하고자 하는 것이 아니며, 본 발명의 범위는 첨부된 청구범위에 의해 정해지는 것으로 이해되어야 한다. 다른 양태, 장점, 및 수정은 하기 청구범위 내에 속한다.

## 도면

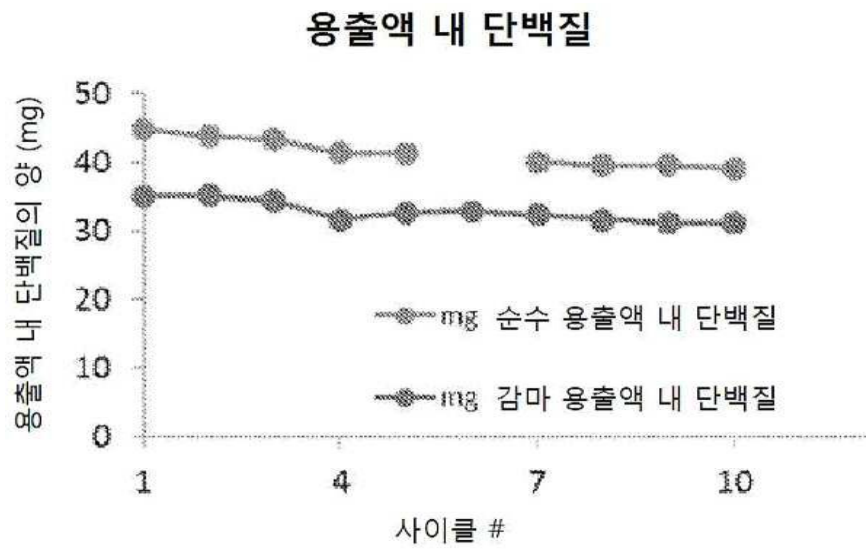
### 도면1



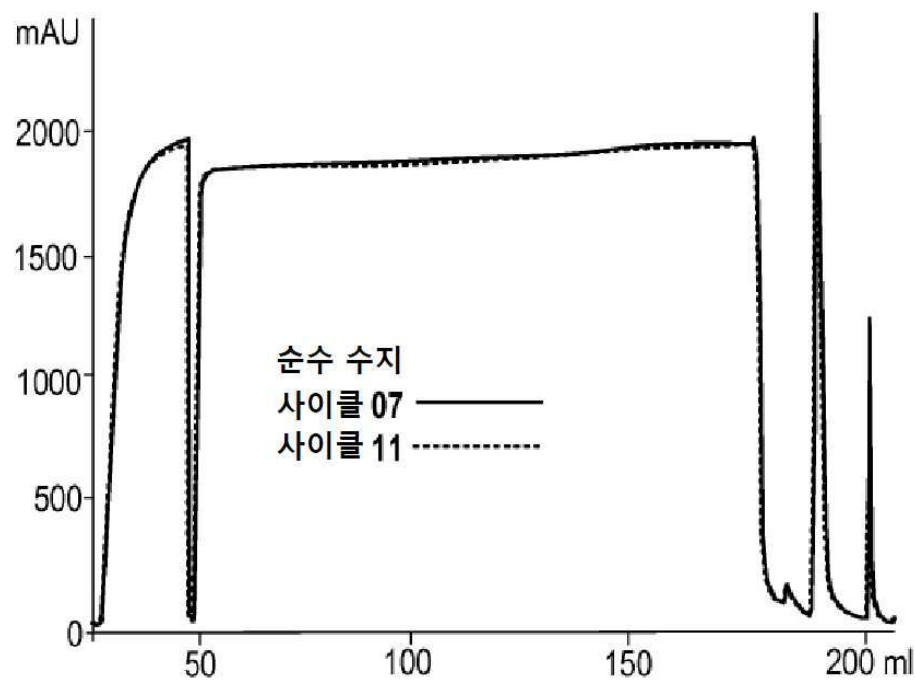
### 도면2

수지	A <sub>280</sub>
Mab Select SuRe (30 kGY)	0.07
JSR Amsphere (30 kGY)	0.14

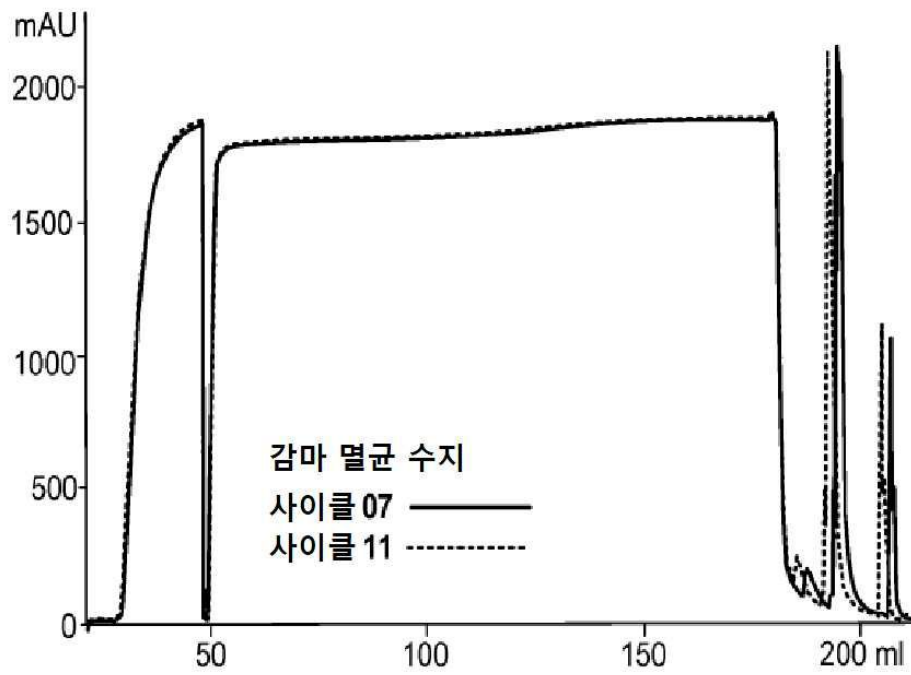
도면3



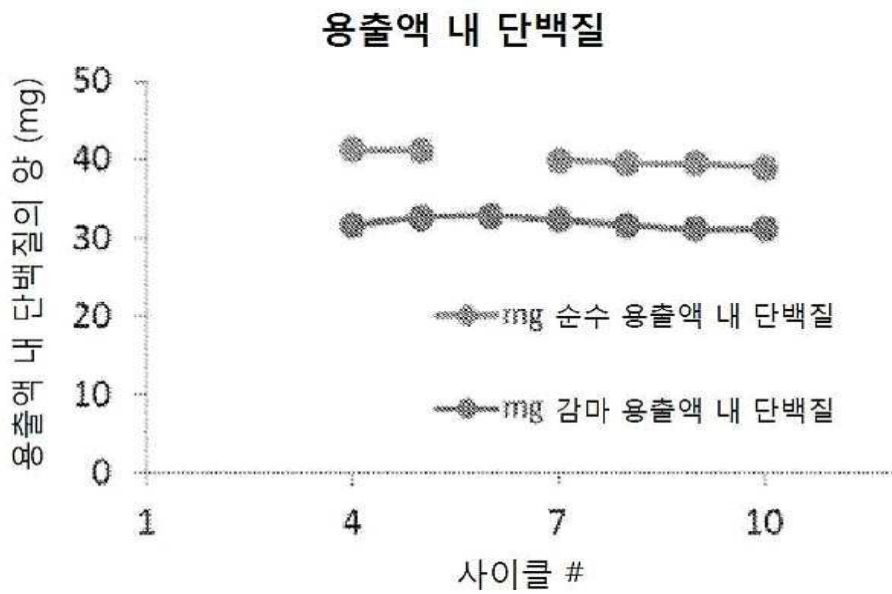
도면4



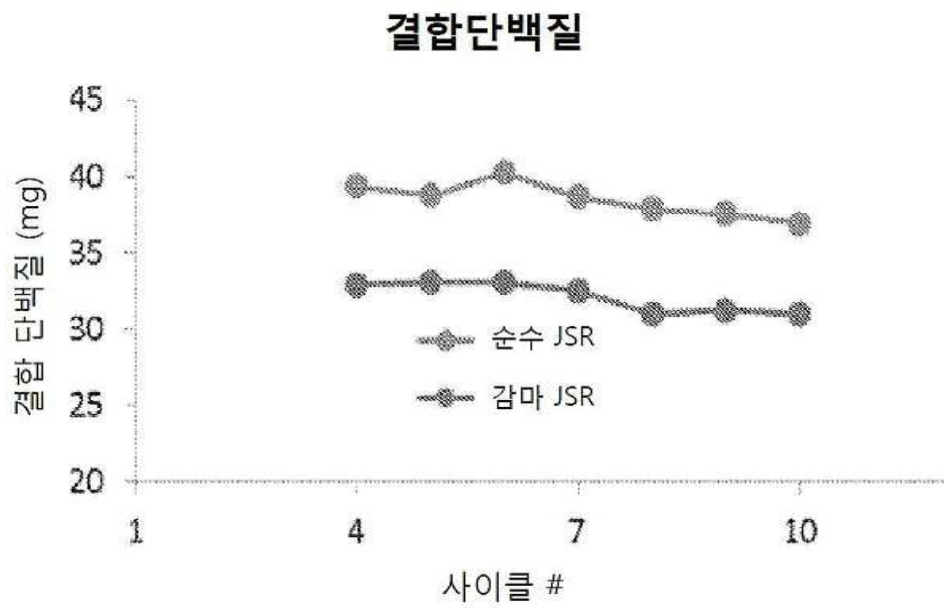
도면5



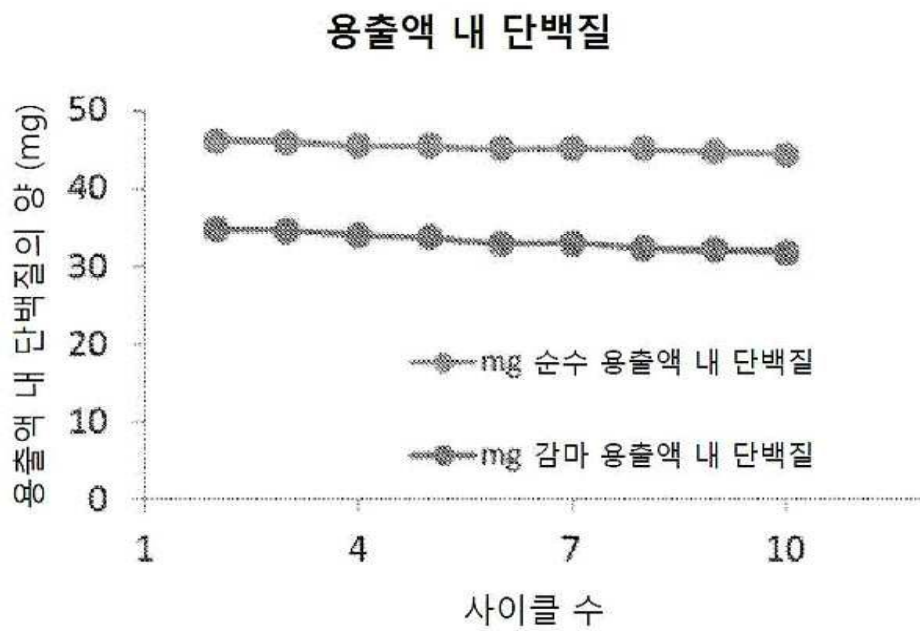
도면6



도면7

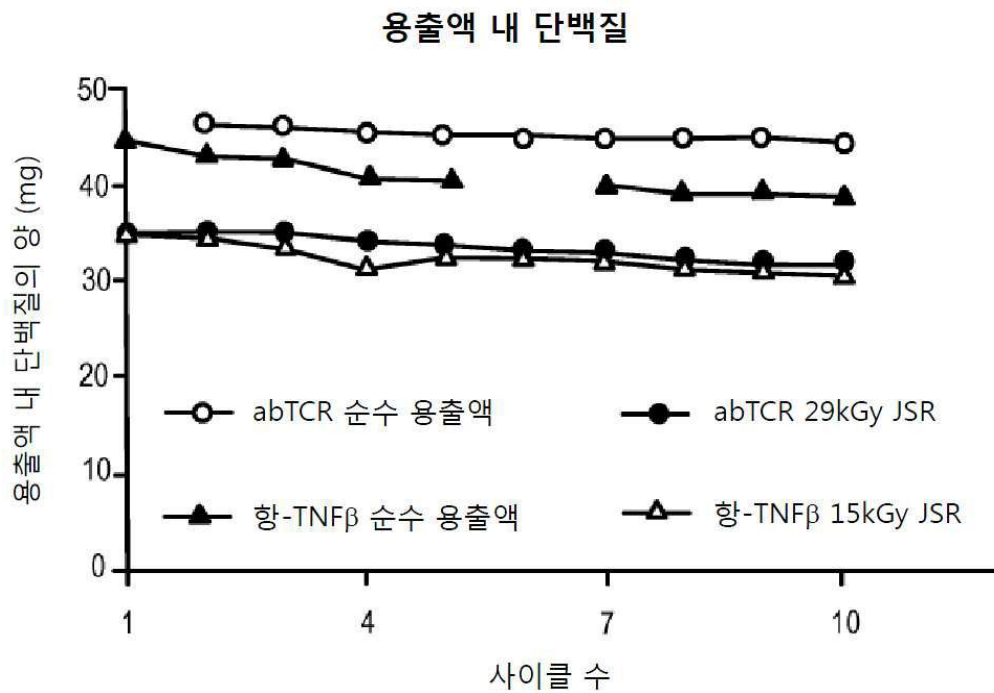


도면8





도면9



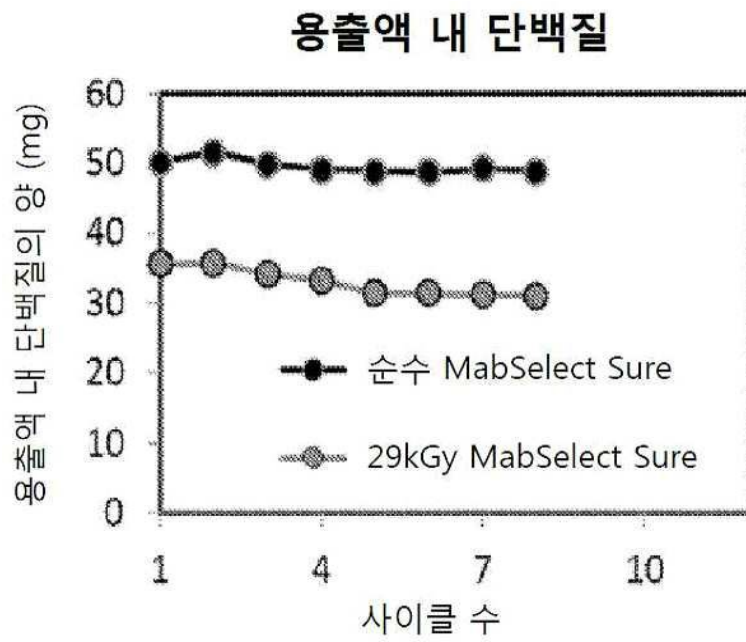
도면10

리소좀 축적 질환 및 관련 효소 결함

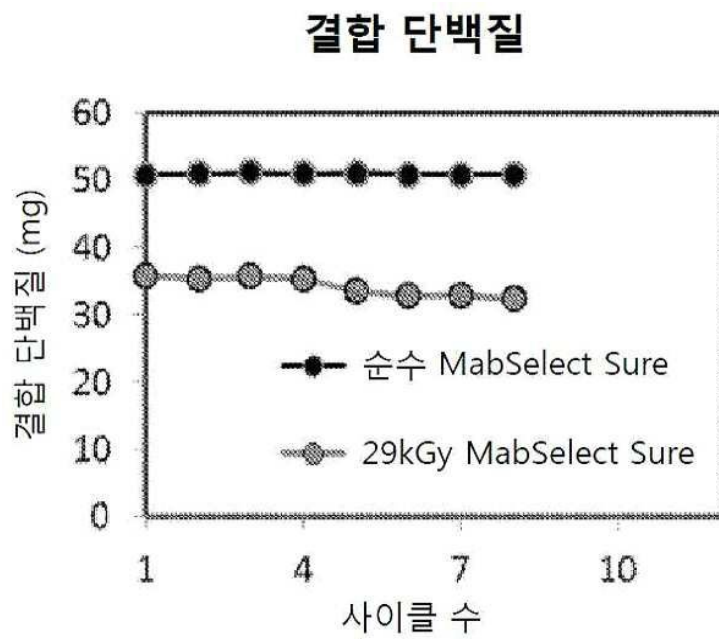
질환	효소 결함
포페병	산 α-글루코시다아제(예를 들어, Myozyme®, Lumizyme®)
MPSI* (헨러병)	α-L-이두로니다아제(예를 들어, Aldurazyme®)
MPSII (헌터병)	이두로네이트 설파타아제
MPSIII (산필립포)	헤파란 N-설파타아제
MPS IV (모르quio A)	갈락토오스-6-설파타아제
MPS IV (모르quio B)	산 β-갈락토시다아제
MPS VII (슬라이병)	β-글루쿠로니다아제
I-세포병	N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스퍼라아제
신들러병	α-N-아세틸갈락토사미니다아제(α-갈락토시다아제 B)
월만병	산 리파아제
콜레스트롤 에스테르 축적 질환	산 리파아제
파버병	리소좀 산 세라미다아제
니만-피크병	산 스팅고미엘리나아제
고쉐병	β-글루코시다아제(예를 들어, Cerezyme®, Ceredase®)
크라베병	갈락토실세라미다아제
파브리병	α-갈락토시다아제 A
GM1 강글리오시도시스	산 β-갈락토시다아제
갈락토시알리도시스	β-갈락토시다아제 및 뉴라미니다아제
타이-삭스병	헥소사미니다아제 A
샌드호프병	헥소사미니다아제 A 및 B

\*MPS = 점액성 다당류증

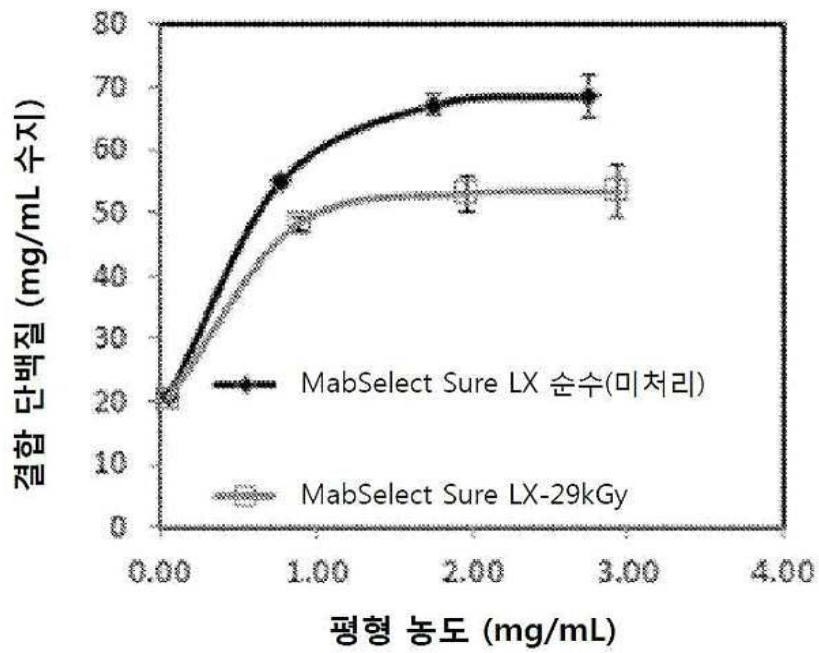
도면11



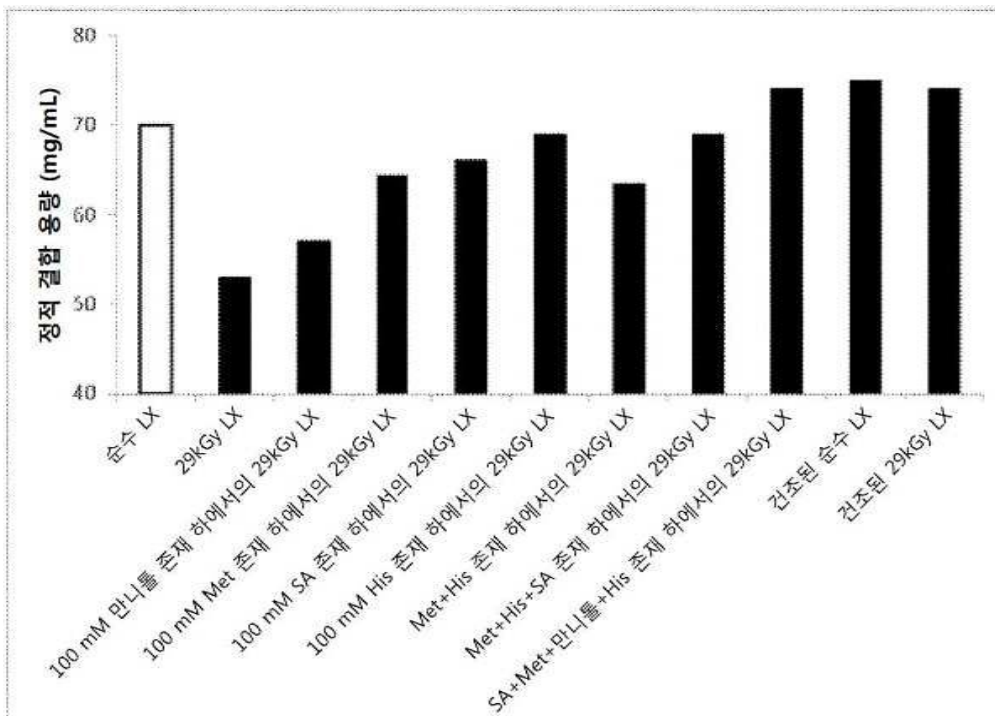
도면12



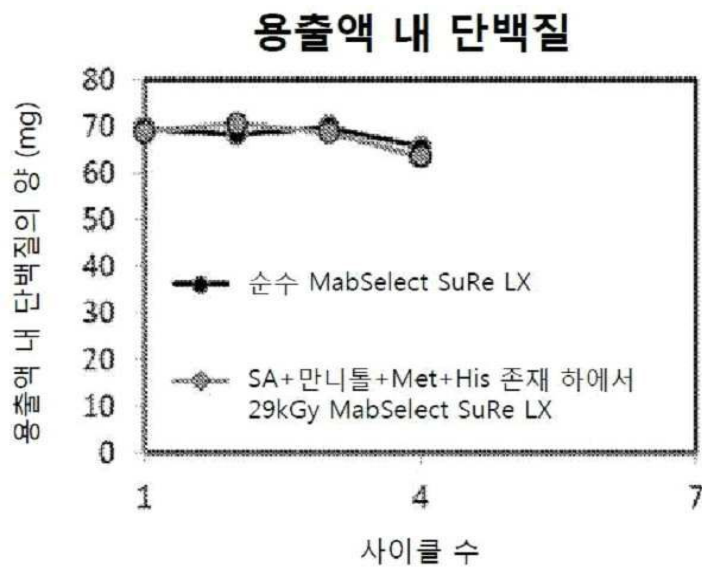
도면13



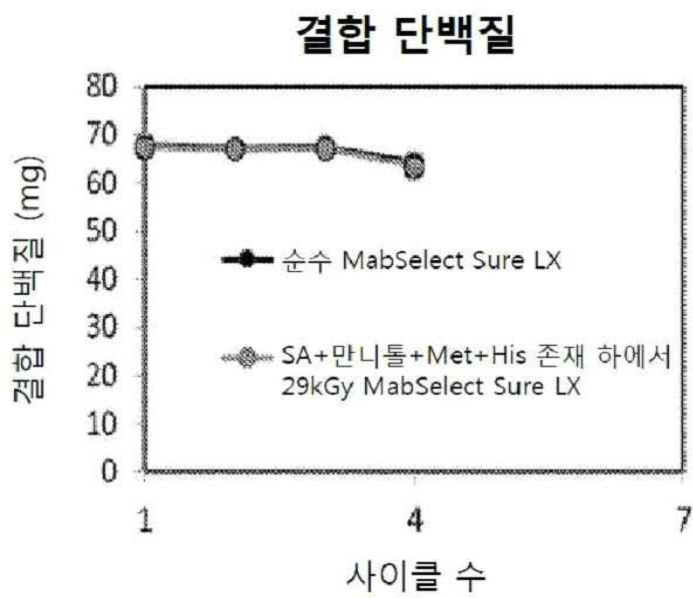
도면14



도면15



도면16



도면17

레인	샘플
1	마커
2	순수 LX 용출액 사이클 2
3	순수 LX 용출액 사이클 3
4	순수 LX 용출액 사이클 6
5	29 kGy SMMH 사이클 2
6	29 kGy SMMH 사이클 3
7	순수 LX 사이클 1
8	29 kGy SMMH 사이클 1

