(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119630776 A
(43)申请公布日 2025.03.14

(21)申请号 202380057331.6
(22)申请日 2023.06.19
(30)优先权数据
2022-120666 2022.07.28 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.27
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2023/022644 2023.06.19
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/024336 JA 2024.02.01
(71)申请人 株式会社大赛璐
地址 日本大阪府
(72)发明人 昌子弘一 佐藤浩志 中冢修志 内村诚一
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 杨薇
(51)Int.Cl.
C12M 1/00(2006.01)
C07K 1/16(2006.01)
C07K 1/34(2006.01)
C12M 1/12(2006.01)
C12N 5/071(2006.01)
C12N 15/10(2006.01)

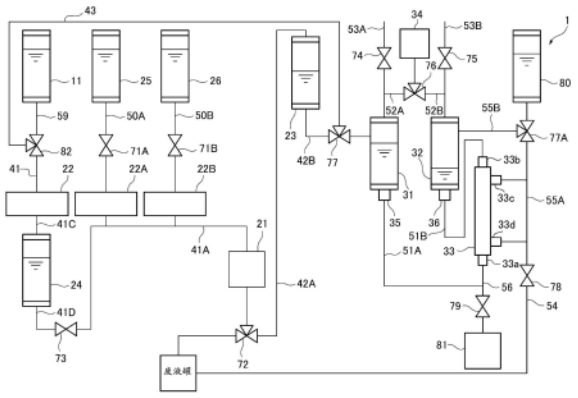
权利要求书6页 说明书33页 附图14页

(54)发明名称

包含微小有用物质的液体的纯化浓缩装置、以及使用了该装置的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法

(57)摘要

本发明提供能够制造以高纯度且高浓度包含微小有用物质的液体(微小有用物质的纯化浓缩液)、并且能够更有效地制备上述纯化浓缩液的包含微小有用物质的液体的纯化浓缩装置、以及使用了该装置的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法。该包含微小有用物质的液体的纯化浓缩装置包含:供给包含微小有用物质的液体的原料供给部、去除上述液体中的杂质的去除部、利用中空纤维膜对从上述原料供给部或上述去除部供给的上述液体进行纯化并进行浓缩的纯化浓缩部、以及控制上述液体从上述原料供给部向上述纯化浓缩部的流通或上述液体从上述去除部向上述纯化浓缩部的流通的时机的第一控制部。



CN 119630776 A

1.一种包含微小有用物质的液体的纯化浓缩装置,其包含:

供给包含微小有用物质的液体的原料供给部、

去除所述液体中的杂质的去除部、

利用中空纤维膜对从所述原料供给部或所述去除部供给的所述液体进行纯化并进行浓缩的纯化浓缩部、以及

控制所述液体从所述原料供给部向所述纯化浓缩部的流通或所述液体从所述去除部向所述纯化浓缩部的流通的时机的第一控制部。

2.根据权利要求1所述的纯化浓缩装置,其中,

所述去除部具备去除所述液体内的杂质的载体柱,该载体柱与将去除杂质后的所述液体供给至所述纯化浓缩部的流路连接。

3.根据权利要求1或2所述的纯化浓缩装置,其中,

所述去除部具备去除所述液体内的杂质的过滤构件,

所述过滤构件插装在将所述液体从所述原料供给部供给至所述去除部的流路中。

4.根据权利要求2所述的纯化浓缩装置,其中,

所述去除部具备贮存通过所述载体柱进行了处理后的所述液体的第一罐,

所述第一罐配置在将所述液体从所述载体柱供给至所述纯化浓缩部的流路中,且连接有将罐内的所述液体供给至所述纯化浓缩部的流路,

所述第一控制部控制将所述罐内的所述液体供给至所述纯化浓缩部的时机。

5.根据权利要求1或2所述的纯化浓缩装置,其中,

所述中空纤维膜的平均内径为0.2~1.4mm,截留分子量为1万~100万。

6.根据权利要求1所述的纯化浓缩装置,其中,

所述纯化浓缩部具备在具有所述液体的出入口的容器内容纳有多个所述中空纤维膜的中空纤维膜组件,

所述容器至少具有用于将所述液体供给至所述中空纤维膜的第一液体的出入口及第二液体的出入口、和用于将透过所述中空纤维膜后的所述液体排出的第三液体的出入口。

7.根据权利要求6所述的纯化浓缩装置,其中,

所述中空纤维膜组件为内压式。

8.根据权利要求6所述的纯化浓缩装置,其中,

所述纯化浓缩部具备:

第二罐,其贮存从所述原料供给部或所述去除部供给的所述液体,连接有将所述液体供给至所述中空纤维膜组件的所述第一液体的出入口的流路;

第三罐,其贮存从所述原料供给部或所述去除部供给的所述液体,连接有将所述液体供给至所述中空纤维膜组件的所述第二液体的出入口的流路;

加压装置,其选择性地对所述第二罐或所述第三罐中的任意罐进行加压;以及

第二控制部,其以通过所述加压装置选择性地对所述第二罐或所述第三罐内进行加压而将所述第二罐及所述第三罐内的所述液体交替地供给至所述中空纤维膜组件的方式进行控制。

9.根据权利要求8所述的纯化浓缩装置,其中,

所述第二控制部设定所述第二罐及所述第三罐内的液量,以使所述第二罐及所述第三

罐内的液量达到设定的值的方式通过所述加压装置对所述第二罐及所述第三罐交替地进行加压。

10.根据权利要求9所述的纯化浓缩装置,其中,

所述第二罐及所述第三罐分别在罐底部的所述液体的出入口具备包含光传感器的罐内液量监测装置,

所述罐内液量监测装置以通过所述光传感器对所述液体的出入口内照射光并检测光的透过率、基于所述透过率的变化监测罐内的液量的方式构成,

所述第二控制部通过所述罐内液量监测装置判断所述第二罐及所述第三罐内的液量,确定通过所述加压装置进行加压的罐。

11.根据权利要求9所述的纯化浓缩装置,其中,

所述纯化浓缩部具备监测所述第二罐及所述第三罐内的液面位置的照相机,

所述第二控制部基于从所述照相机输出的所述第二罐及所述第三罐内的液面位置的信息确定通过所述加压装置进行加压的罐。

12.根据权利要求8所述的纯化浓缩装置,其中,

所述纯化浓缩部具备:

第四罐,其贮存稀释液,连接有将所述稀释液供给至所述中空纤维膜组件的所述第三液体的出入口的流路;和

第三控制部,其控制将所述第四罐内的所述稀释液供给至所述中空纤维膜组件的所述第三液体的出入口的时机,

在所述第二罐及所述第三罐内的液量的合计达到由所述第二控制部设定的值以下的情况下,所述第三控制部从所述中空纤维膜组件的所述第三液体的出入口供给所述第四罐内的所述稀释液。

13.根据权利要求8所述的纯化浓缩装置,其中,

所述纯化浓缩部具备:

第五罐,其通过流路与所述中空纤维膜组件的所述第一液体的出入口或所述第二液体的出入口连接,回收所述第二罐及所述第三罐内的所述液体;和

第四控制部,其控制所述液体向所述第五罐的回收。

14.根据权利要求13所述的纯化浓缩装置,其中,

所述第二罐及所述第三罐分别在罐底部的所述液体的出入口具备包含光传感器的罐内液量监测装置,

所述罐内液量监测装置以通过所述光传感器对所述液体的出入口内照射光并检测光的透过率、基于所述透过率的变化监测罐内的液量的方式构成,

所述第四控制部通过所述加压装置选择性地对所述第二罐或所述第三罐内进行加压,将所述第二罐及所述第三罐内的所述液体回收至所述第五罐,通过所述罐内液量监测装置判断所述第二罐及所述第三罐内的液量,使所述加压装置停止。

15.根据权利要求13所述的纯化浓缩装置,其中,

所述纯化浓缩部具备监测所述第二罐及所述第三罐内的液面位置的照相机,

所述第四控制部通过所述加压装置选择性地对所述第二罐或所述第三罐内进行加压,将所述第二罐及所述第三罐内的所述液体回收至所述第五罐,基于从所述照相机输出的所

述第二罐及所述第三罐内的液面位置的信息使所述加压装置停止。

16.根据权利要求1或2所述的纯化浓缩装置,其成为包含所述原料供给部、所述去除部及所述纯化浓缩部的要素配置于罩内的构成,且具备管理所述罩内的清洁度的管理部,

所述管理部具备将过滤空气供给至所述罩内的风扇过滤器装置。

17.根据权利要求16所述的纯化浓缩装置,其中,

所述管理部进一步具备UV灯。

18.根据权利要求2所述的纯化浓缩装置,其中,

所述去除部具备:

第六罐,其贮存对所述载体柱进行清洗的清洗液;和

第七罐,其贮存使所述载体柱平衡化的平衡化液。

19.根据权利要求3所述的纯化浓缩装置,其中,

所述过滤构件配置于所述原料供给部的下部,通过所述液体的自重进行从所述原料供给部向所述过滤构件的所述液体的供给。

20.根据权利要求8所述的纯化浓缩装置,其以所述第二罐及所述第三罐的长度方向的侧面与所述中空纤维膜组件的长度方向平行的方式配置。

21.根据权利要求20所述的纯化浓缩装置,其中,

所述去除部具备:

载体柱,其去除所述液体内的杂质,连接有将去除了杂质之后的所述液体供给至所述纯化浓缩部的流路;和

第一罐,其贮存通过所述载体柱进行了处理后的所述液体,

所述第二罐及所述第三罐通过流路与所述载体柱及所述第一罐连接,且配置于所述载体柱及所述第一罐的上方位置。

22.根据权利要求1或2所述的纯化浓缩装置,其中,

所述微小有用物质选自细胞外囊泡、抗体、病毒、蛋白质、酶及核酸。

23.一种微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其是使用权利要求1或2所述的纯化浓缩装置制造微小有用物质纯化浓缩而成的所述液体的方法,该方法包括:

将包含所述微小有用物质的原料液供给至所述纯化浓缩装置,将所述液体中的杂质去除的步骤;和/或,通过中空纤维膜将所述液体纯化并浓缩的步骤。

24.根据权利要求23所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,

将所述液体中的杂质去除的步骤包括:通过载体柱将所述液体中的杂质吸附去除。

25.根据权利要求23所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,

通过中空纤维膜将所述液体纯化、浓缩的步骤包括:通过中空纤维膜组件对所述液体进行交替切向流过滤。

26.根据权利要求23所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,

通过所述中空纤维膜将所述液体纯化、浓缩的步骤包括:一边回收沉积于所述中空纤维膜的表面的所述微小有用物质,一边通过中空纤维膜组件对所述液体进行交替切向流过滤。

27.根据权利要求23所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,

通过所述中空纤维膜将所述液体纯化、浓缩的步骤包括:将稀释液供给至经浓缩后的

所述液体,进一步进行纯化、浓缩,

在所述经浓缩后的所述液体的量(B)相对于所述原料液的量(A)(B/A)达到1/2～1/200的情况下,将所述稀释液供给至所述液体。

28.根据权利要求24所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,

并行地进行通过所述载体柱将所述液体中的杂质去除的步骤和通过所述中空纤维膜进行纯化、浓缩的步骤。

29.根据权利要求23所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,

所述微小有用物质为选自细胞外囊泡、抗体、病毒、蛋白质、酶及核酸中的至少一种。

30.一种包含微小有用物质的液体的纯化浓缩装置,其包含:

供给包含微小有用物质的液体的原料供给部、和

通过中空纤维膜组件对从所述原料供给部供给的所述液体进行纯化、浓缩的纯化浓缩部,

所述中空纤维膜组件具有用于将所述液体供给至中空纤维膜的第一液体的出入口及第二液体的出入口、和用于将透过所述中空纤维膜后的所述液体排出的第三液体的出入口,

所述纯化浓缩部具备:

第二罐,其贮存从所述原料供给部供给的所述液体,连接有将所述液体供给至所述中空纤维膜组件的所述第一液体的出入口的流路;

第三罐,其贮存从所述原料供给部供给的所述液体,连接有将所述液体供给至所述中空纤维膜组件的所述第二液体的出入口的流路;

送液装置,其选择性地将所述第二罐及所述第三罐内的任意的所述液体送液至所述中空纤维膜组件;

第二控制部,其以选择性地将所述第二罐及所述第三罐内的所述液体供给至所述中空纤维膜组件的方式控制所述送液装置;以及

监测装置,其监测所述第二罐及所述第三罐内的所述液体的量,

所述第二控制部设定所述第二罐及所述第三罐内的液量,以在所述第二罐及所述第三罐内的液量达到设定的值的情况下使所述送液装置选择性地从所述第二罐或所述第三罐送液至所述中空纤维膜组件的方式进行控制,

所述第二罐及所述第三罐内的所述液量基于所述监测装置的信息进行判断。

31.根据权利要求30所述的纯化浓缩装置,其中,

所述中空纤维膜的平均内径为0.2～2.0㎜,截留分子量为5000～300万。

32.根据权利要求30或31所述的纯化浓缩装置,其中,

所述监测装置具备监测所述第二罐及所述第三罐内的液面位置的照相机。

33.根据权利要求30或31所述的纯化浓缩装置,其中,

所述监测装置具备光传感器,其分别设置于所述第二罐及所述第三罐的底部的所述液体的出入口,对所述液体的出入口内照射光并检测光的透过率,基于所述透过率的变化监测罐内的所述液体的量。

34.根据权利要求30或31所述的纯化浓缩装置,其中,

所述中空纤维膜组件为内压式。

35.根据权利要求30所述的纯化浓缩装置,其中,

所述纯化浓缩部具备:

第四罐,其贮存稀释液,连接有将所述稀释液供给至所述中空纤维膜组件的所述第三液体的出入口的流路;和

第三控制部,其控制将所述第四罐内的所述稀释液供给至所述中空纤维膜组件的所述第三液体的出入口的时机,

在所述第二罐及所述第三罐内的所述液量的合计达到由所述第一控制部设定的值以下的情况下,所述第三控制部从所述中空纤维膜组件的所述第三液体的出入口供给所述第四罐内的所述稀释液。

36.根据权利要求30或31所述的纯化浓缩装置,其中,

所述纯化浓缩部具备:

第五罐,其通过流路与所述中空纤维膜组件的所述第一液体的出入口或所述第二液体的出入口连接,回收所述第二罐及所述第三罐内的所述液体;和

第四控制部,其控制所述液体向所述第五罐的回收。

37.根据权利要求36所述的纯化浓缩装置,其中,

所述送液装置具备加压装置,

所述第四控制部通过所述加压装置选择性地对所述第二罐或所述第三罐内进行加压而将所述第二罐及所述第三罐内的所述液体回收至所述第五罐,通过所述监测装置判断所述第二罐及所述第三罐内的所述液量,使所述加压装置停止。

38.根据权利要求30或31所述的纯化浓缩装置,其中,

所述微小有用物质选自电活性高分子、稀有金属胶体粒子、颜料、染料、无机或有机纳米粒子、蛋白质、激素、细胞因子、增殖因子、血管新生因子、生长因子、酶、抗体、血浆蛋白、病毒、细胞外囊泡、酵母、酵母菌、细胞、多糖类及微细藻类。

39.根据权利要求1、2、30或31所述的纯化浓缩装置,其中,

在所述中空纤维膜的至少一部分附着有与所述微小有用物质不同种类的生物分子。

40.根据权利要求12或35所述的纯化浓缩装置,其中,

所述中空纤维膜组件具有至少2个所述第三液体的出入口,

所述第三控制部在停止了所述中空纤维膜组件的所述第一液体的出入口及所述第二液体的出入口的所述液体的流通的状态下从所述中空纤维膜组件所具有的至少2个所述第三液体的出入口中的1个供给所述第四罐内的所述稀释液,然后,在使所述第一液体的出入口及所述第二液体的出入口处于能够进行所述液体的流通的状态下从所述中空纤维膜组件所具有的至少2个所述第三液体的出入口中的至少1个供给所述第四罐内的所述稀释液。

41.一种微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其是在从包含微小有用物质和杂质的原料的液体中去除了杂质之后将所述液体纯化浓缩而制造微小有用物质的纯化浓缩液的方法,其中,

将所述液体纯化浓缩的步骤包括:使用中空纤维膜组件将所述液体纯化浓缩,并且包括:在所述纯化浓缩的过程中从所述中空纤维膜组件的透过液侧压入稀释液对所述中空纤维膜进行逆清洗处理。

42.根据权利要求41所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,

容纳于所述中空纤维膜组件的所述中空纤维膜由包含乙酸纤维素的树脂材料构成。

43.根据权利要求41所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,

容纳于所述中空纤维膜组件的所述中空纤维膜的截留分子量为10万～100万。

44.根据权利要求41或42所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,

将所述液体中的杂质去除的步骤包括:通过载体柱将所述液体中的杂质吸附去除。

45.根据权利要求41或42所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,

使用所述中空纤维膜组件将所述液体纯化浓缩的步骤包括:对所述液体进行交替切向流过滤。

46.根据权利要求41或42所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,

使用所述中空纤维膜组件将所述液体纯化浓缩的步骤包括:将稀释液供给至经纯化浓缩后的所述液体并进一步纯化浓缩,在所述经纯化浓缩后的所述液体的量(B)相对于所述原料的液体的量(A)(B/A)达到1/2～1/200的情况下,将所述稀释液供给至所述液体。

47.根据权利要求44所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,

并行地进行通过所述载体柱将所述液体中的杂质去除的步骤、和使用所述中空纤维膜组件将所述液体纯化浓缩的步骤。

48.根据权利要求41或42所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,

所述微小有用物质为选自细胞外囊泡、抗体、病毒、蛋白质、酶、及核酸中的至少一种。

49.根据权利要求41或42所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,

在所述中空纤维膜的至少一部分附着有与所述微小有用物质不同种类的生物分子。

50.根据权利要求41或42所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,该方法包括:

在进行所述逆清洗处理之前对所述中空纤维膜组件进行冲洗处理。

包含微小有用物质的液体的纯化浓缩装置、以及使用了该装置的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法

技术领域

[0001] 本公开涉及包含微小有用物质的液体的纯化浓缩装置、和使用了该装置的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法。

背景技术

[0002] 作为从包含细胞外囊泡、抗体、病毒、蛋白质、核酸等微小有用物质的液体分离纯化上述微小有用物质的方法,已知有例如使用了分离膜的方法。

[0003] 专利文献1中记载了一种回收有用物质的方法的发明,该方法包括:从细胞的培养槽排出培养液,并将与排出的培养液等量的新鲜培养基加入上述培养槽的渗出工序;和使用实质上不具有致密层的多孔膜将从上述培养槽提取出的培养液进行过滤的过滤工序,上述过滤工序中的过滤为切向流过滤,上述过滤工序中的透过液的速度为1.0LMH以下。专利文献1中记载了上述微小有用物质可以选自蛋白质、病毒、外泌体及核酸。

[0004] 另外,专利文献2中记载了能够有效且大量地采集作为细胞外囊泡的1种的外泌体的外泌体提取装置及外泌体提取方法。专利文献2中记载的外泌体提取装置将从原料供给部供给的包含外泌体的原料液体送液至第一贮存部之后,使其从上述第一贮存部起在包含作用各自不同的第一过滤器及第二过滤器的循环路径中循环,将液体内的外泌体进行了浓缩。

[0005] 专利文献1:日本特开2018-76291号公报

[0006] 专利文献2:日本特开2021-145649号公报

发明内容

[0007] 通常,在包含微小有用物质的原料液体中大多包含有杂质。因此,要求能够制备以高纯度且高浓度包含微小有用物质的液体(微小有用物质的纯化浓缩液)的纯化浓缩装置。另外,也要求能够更有效地制备上述纯化浓缩液的纯化浓缩装置。

[0008] 本发明是鉴于上述情况而完成的,目的在于提供能够制造以高纯度且高浓度包含微小有用物质的液体(微小有用物质的纯化浓缩液)、并且能够更有效地制备上述纯化浓缩液的包含微小有用物质的液体的纯化浓缩装置以及使用了该装置的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法。

[0009] 为了解决上述课题,本公开可以采用以下的方式。

[0010] [1]一种包含微小有用物质的液体的纯化浓缩装置,其包含:供给包含微小有用物质的液体的原料供给部、去除上述液体中的杂质的去除部、利用中空纤维膜对从上述原料供给部或上述去除部供给的上述液体进行纯化并进行浓缩的纯化浓缩部、以及控制上述液体从上述原料供给部向上述纯化浓缩部的流通或上述液体从上述去除部向上述纯化浓缩部的流通的时机的第一控制部。

[0011] [2]根据[1]所述的纯化浓缩装置,其中,上述去除部具备去除上述液体内的杂质

的载体柱,该载体柱与将去除杂质后的上述液体供给至上述纯化浓缩部的流路连接。

[0012] [3]根据[1]或[2]所述的纯化浓缩装置,其中,上述去除部具备去除上述液体内的杂质的过滤构件,上述过滤构件插装在将上述液体从上述原料供给部供给至上述去除部的流路中。

[0013] [4]根据[2]或[3]所述的纯化浓缩装置,其中,上述去除部具备贮存通过上述载体柱进行了处理后的上述液体的第一罐,上述第一罐配置在将上述液体从上述载体柱供给至上述纯化浓缩部的流路中,且连接有将罐内的上述液体供给至上述纯化浓缩部的流路,上述第一控制部控制将上述罐内的上述液体供给至上述纯化浓缩部的时机。

[0014] [5]根据[1]~[4]中任一项所述的纯化浓缩装置,其中,上述中空纤维膜的平均内径为0.2~1.4mm,截留分子量为1万~100万。

[0015] [6]根据[1]~[5]中任一项所述的纯化浓缩装置,其中,上述纯化浓缩部具备在具有上述液体的出入口的容器内容纳有多个上述中空纤维膜的中空纤维膜组件,上述容器至少具有用于将上述液体供给至上述中空纤维膜的第一液体的出入口及第二液体的出入口、和用于将透过上述中空纤维膜后的上述液体排出的第三液体的出入口。

[0016] [7]根据[6]所述的纯化浓缩装置,其中,上述中空纤维膜组件为内压式。

[0017] [8]根据[6]或[7]所述的纯化浓缩装置,其中,上述纯化浓缩部具备:第二罐,其贮存从上述原料供给部或上述去除部供给的上述液体,连接有将上述液体供给至上述中空纤维膜组件的上述第一液体的出入口的流路;第三罐,其贮存从上述原料供给部或上述去除部供给的上述液体,连接有将上述液体供给至上述中空纤维膜组件的上述第二液体的出入口的流路;加压装置,其选择性地对上述第二罐或上述第三罐中的任意罐进行加压;以及第二控制部,其以通过上述加压装置选择性地对上述第二罐或上述第三罐内进行加压而将上述第二罐及上述第三罐内的上述液体交替地供给至上述中空纤维膜组件的方式进行控制。

[0018] [9]根据[8]所述的纯化浓缩装置,其中,上述第二控制部以设定上述第二罐及上述第三罐内的液量、使上述第二罐及上述第三罐内的液量达到设定的值的方式通过上述加压装置对上述第二罐及上述第三罐交替地进行加压。

[0019] [10]根据[9]所述的纯化浓缩装置,其中,上述第二罐及上述第三罐分别在罐底部的上述液体的出入口具备包含光传感器的罐内液量监测装置,上述罐内液量监测装置以通过上述光传感器对上述液体的出入口内照射光并检测光的透过率、基于上述透过率的变化监测罐内的液量的方式构成,上述第二控制部通过上述罐内液量监测装置判断上述第二罐及上述第三罐内的液量,确定通过上述加压装置进行加压的罐。

[0020] [11]根据[9]或[10]所述的纯化浓缩装置,其中,上述纯化浓缩部具备监测上述第二罐及上述第三罐内的液面位置的照相机,上述第二控制部基于从上述照相机输出的上述第二罐及上述第三罐内的液面位置的信息确定通过上述加压装置进行加压的罐。

[0021] [12]根据[8]~[11]中任一项所述的纯化浓缩装置,其中,上述纯化浓缩部具备:第四罐,其贮存稀释液,连接有将上述稀释液供给至上述中空纤维膜组件的上述第三液体的出入口的流路;和第三控制部,其控制将上述第四罐内的上述稀释液供给至上述中空纤维膜组件的上述第三液体的出入口的时机,在上述第二罐及上述第三罐内的液量的合计达到由上述第二控制部设定的值以下的情况下,上述第三控制部从上述中空纤维膜组件的上述第三液体的出入口供给上述第四罐内的上述稀释液。

[0022] [13]根据[8]～[12]中任一项所述的纯化浓缩装置,其中,上述纯化浓缩部具备:第五罐,其通过流路与上述中空纤维膜组件的上述第一液体的出入口或上述第二液体的出入口连接,回收上述第二罐及上述第三罐内的上述液体;和第四控制部,其控制上述液体向上述第五罐的回收。

[0023] [14]根据[13]所述的纯化浓缩装置,其中,上述第二罐及上述第三罐分别在罐底部的上述液体的出入口具备包含光传感器的罐内液量监测装置,上述罐内液量监测装置以通过上述光传感器对上述液体的出入口内照射光并检测光的透过率、基于上述透过率的变化监测罐内的液量的方式构成,上述第四控制部通过上述加压装置选择性地对上述第二罐或上述第三罐内进行加压,将上述第二罐及上述第三罐内的上述液体回收至上述第五罐,通过上述罐内液量监测装置判断上述第二罐及上述第三罐内的液量,使上述加压装置停止。

[0024] [15]根据[13]或[14]所述的纯化浓缩装置,其中,上述纯化浓缩部具备监测上述第二罐及上述第三罐内的液面位置的照相机,上述第四控制部通过上述加压装置选择性地对上述第二罐或上述第三罐内进行加压,将上述第二罐及上述第三罐内的上述液体回收至上述第五罐,基于从上述照相机输出的上述第二罐及上述第三罐内的液面位置的信息使上述加压装置停止。

[0025] [16]根据[1]～[15]中任一项所述的纯化浓缩装置,其成为包含上述原料供给部、上述去除部及上述纯化浓缩部的要素配置于罩内的构成,且具备管理上述罩内的清洁度的管理部,上述管理部具备将过滤空气供给至上述罩内的风扇过滤器装置。

[0026] [17]根据[16]所述的纯化浓缩装置,其中,上述管理部进一步具备UV灯。

[0027] [18]根据[2]～[17]中任一项所述的纯化浓缩装置,其中,上述去除部具备:第六罐,其贮存对上述载体柱进行清洗的清洗液;和第七罐,其贮存使上述载体柱平衡化的平衡化液。

[0028] [19]根据[3]～[18]中任一项所述的纯化浓缩装置,其中,上述过滤构件配置于上述原料供给部的下部,通过上述液体的自重进行从上述原料供给部向上述过滤构件的上述液体的供给。

[0029] [20]根据[8]～[19]中任一项所述的纯化浓缩装置,其以上述第二罐及上述第三罐的长度方向的侧面与上述中空纤维膜组件的长度方向平行的方式配置。

[0030] [21]根据[20]所述的纯化浓缩装置,其中,上述去除部具备:载体柱,其去除上述液体内的杂质,连接有将去除了杂质之后的上述液体供给至上述纯化浓缩部的流路;和第一罐,其贮存通过上述载体柱进行了处理后的上述液体,上述第二罐及上述第三罐通过流路与上述载体柱及上述第一罐连接,且配置于上述载体柱及上述第一罐的上方位置。

[0031] [22]根据[1]～[21]中任一项所述的纯化浓缩装置,其中,上述微小有用物质选自细胞外囊泡、抗体、病毒、蛋白质、酶及核酸。

[0032] [23]一种微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其是使用[1]～[22]中任一项所述的纯化浓缩装置制造微小有用物质纯化浓缩而成的上述液体的方法,该方法包括:将包含上述微小有用物质的原料液供给至上述纯化浓缩装置,将上述液体中的杂质去除的步骤;和/或,通过中空纤维膜将上述液体纯化并浓缩的步骤。

[0033] [24]根据[23]所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,将上述液体

中的杂质去除的步骤包括:通过载体柱将上述液体中的杂质吸附去除。

[0034] [25]根据[23]或[24]所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,通过中空纤维膜将上述液体纯化、浓缩的步骤包括:通过中空纤维膜组件对上述液体进行交替切向流过滤。

[0035] [26]根据[23]~[25]中任一项所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,通过上述中空纤维膜将上述液体纯化、浓缩的步骤包括:一边回收沉积于上述中空纤维膜的表面的上述微小有用物质,一边通过中空纤维膜组件对上述液体进行交替切向流过滤。

[0036] [27]根据[23]~[26]中任一项所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,通过上述中空纤维膜将上述液体纯化、浓缩的步骤包括:将稀释液供给至经浓缩后的上述液体,进一步进行纯化、浓缩,在上述经浓缩后的上述液体的量(B)相对于上述原料液的量(A)(B/A)达到1/2~1/200的情况下,将上述稀释液供给至上述液体。

[0037] [28]根据[24]~[27]中任一项所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,并行地进行通过上述载体柱将上述液体中的杂质去除的步骤和通过上述中空纤维膜进行纯化、浓缩的步骤。

[0038] [29]根据[23]~[28]中任一项所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,上述微小有用物质为选自细胞外囊泡、抗体、病毒、蛋白质、酶及核酸中的至少一种。

[0039] [30-1]一种包含微小有用物质的液体的纯化浓缩装置,其包含:供给包含微小有用物质的液体的原料供给部、和通过中空纤维膜组件对从上述原料供给部供给的上述液体进行纯化、浓缩的上述纯化浓缩部,上述中空纤维膜组件具有用于将上述液体供给至中空纤维膜的第一液体的出入口及第二液体的出入口、和用于将透过上述中空纤维膜后的上述液体排出的第三液体的出入口,上述纯化浓缩部具备:第二罐,其贮存从上述原料供给部供给的上述液体,连接有将上述液体供给至上述中空纤维膜组件的上述第一液体的出入口的流路;第三罐,其贮存从上述原料供给部供给的上述液体,连接有将上述液体供给至上述中空纤维膜组件的上述第二液体的出入口的流路;加压装置,选择性地对上述第二罐及上述第三罐中的任意罐进行加压;第二控制部,其以通过上述加压装置选择性地对上述第二罐或上述第三罐内进行加压、将上述第二罐及上述第三罐内的上述液体交替地供给至上述中空纤维膜组件的方式进行控制;以及监测装置,其检测上述第二罐及上述第三罐内的上述液体的量,上述第二控制部以设定上述第二罐及上述第三罐内的液量、使上述第二罐及上述第三罐内的液量达到设定的值的方式通过上述加压装置对上述第二罐及上述第三罐交替进行加压,上述第二罐及上述第三罐内的上述液量基于上述监测装置的信息而判断。

[0040] [30-2]一种包含微小有用物质的液体的纯化浓缩装置,其包含:

[0041] 供给包含微小有用物质的液体的原料供给部、和

[0042] 通过中空纤维膜组件对从上述原料供给部供给的上述液体进行纯化、浓缩的纯化浓缩部,上述中空纤维膜组件具有:用于将上述液体供给至中空纤维膜的第一液体的出入口及第二液体的出入口、和用于将透过上述中空纤维膜后的上述液体排出的第三液体的出入口,上述纯化浓缩部具备:第二罐,其贮存从上述原料供给部的供给的上述液体,连接有将上述液体供给至上述中空纤维膜组件的上述第一液体的出入口的流路;第三罐,其贮存从上述原料供给部的供给的上述液体,连接有将上述液体供给至上述中空纤维膜组件的上

述第二液体的出入口的流路;送液装置,其选择性地将上述第二罐及上述第三罐内的任意的上述液体送液至上述中空纤维膜组件;第二控制部,其以选择性地将上述第二罐及上述第三罐内的上述液体供给至上述中空纤维膜组件的方式控制上述送液装置;以及监测装置,其监测上述第二罐及上述第三罐内的上述液体的量,上述第二控制部以设定上述第二罐及上述第三罐内的液量、并在上述第二罐及上述第三罐内的液量达到设定的值的情况下上述送液装置选择性地从上述第二罐或上述第三罐送液至上述中空纤维膜组件的方式进行控制,

[0043] 上述第二罐及上述第三罐内的上述液量基于上述监测装置的信息进行判断。

[0044] [31]根据[30-1]或[30-2]所述的纯化浓缩装置,其中,上述中空纤维膜的平均内径为0.2~2.0㎜,截留分子量为5000~300万。

[0045] [32]根据[30-1]~[31]中任一项所述的纯化浓缩装置,其中,上述监测装置具备监测上述第二罐及上述第三罐内的液面位置的照相机。

[0046] [33]根据[30-1]~[32]中任一项所述的纯化浓缩装置,其中,上述监测装置具备光传感器,其分别设置于上述第二罐及上述第三罐的底部的上述液体的出入口,对上述液体的出入口内照射光并检测光的透过率,基于上述透过率的变化监测罐内的上述液体的量。

[0047] [34]根据[30-1]~[33]中任一项所述的纯化浓缩装置,其中,上述中空纤维膜组件为内压式。

[0048] [35]根据[30-1]~[34]中任一项所述的纯化浓缩装置,其中,上述纯化浓缩部具备:第四罐,其贮存稀释液,连接有将上述稀释液供给至上述中空纤维膜组件的上述第三液体的出入口的流路;和第三控制部,其控制将上述第四罐内的上述稀释液供给至上述中空纤维膜组件的上述第三液体的出入口的时机,在上述第二罐及上述第三罐内的上述液量的合计达到由上述第一控制部设定的值以下的情况下,上述第三控制部从上述中空纤维膜组件的上述第三液体的出入口供给上述第四罐内的上述稀释液。

[0049] [36]根据[30-1]~[35]中任一项所述的纯化浓缩装置,其中,上述纯化浓缩部具备:第五罐,其通过流路与上述中空纤维膜组件的上述第一液体的出入口或上述第二液体的出入口连接,回收上述第二罐及上述第三罐内的上述液体;和第四控制部,其控制上述液体向上述第五罐的回收。

[0050] [37]根据[36]所述的纯化浓缩装置,其中,上述第四控制部通过上述加压装置选择性地对上述第二罐或上述第三罐内进行加压而将上述第二罐及上述第三罐内的上述液体回收至上述第五罐,通过上述监测装置判断上述第二罐及上述第三罐内的上述液量,使上述加压装置停止。

[0051] [38]根据[30-1]~[37]中任一项所述的纯化浓缩装置,其中,上述微小有用物质选自电活性高分子、稀有金属胶体粒子、颜料、染料、无机或有机纳米粒子、蛋白质、激素、细胞因子、增殖因子、血管新生因子、生长因子、酶、抗体、血浆蛋白、病毒、细胞外囊泡、酵母、酵母菌、细胞、多糖类及微细藻类。

[0052] [39]根据[1]~[38]中任一项所述的纯化浓缩装置,其中,在上述中空纤维膜的至少一部分附着有与上述微小有用物质不同种类的生物分子。

[0053] [40]根据[12]~[22]或[35]~[39]中任一项所述的纯化浓缩装置,其中,上述中

空纤维膜组件具有至少2个第三液体的出入口,上述第三控制部在停止了上述中空纤维膜组件的上述第一液体的出入口及上述第二液体的出入口的上述液体的流通的状态下从上述中空纤维膜组件所具有的至少2个上述第三液体的出入口中的1个供给上述第四罐内的上述稀释液,然后,在使上述第一液体的出入口及上述第二液体的出入口处于能够进行上述液体的流通的状态下从上述中空纤维膜组件所具有的至少2个上述第三液体的出入口中的至少1个供给上述第四罐内的上述稀释液。

[0054] [41]一种微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其是在从包含微小有用物质和杂质的原料的液体中去除了杂质之后将上述液体纯化浓缩而制造微小有用物质的纯化浓缩液的方法,其中,将上述液体纯化浓缩的步骤包括:使用中空纤维膜组件将上述液体纯化浓缩,并且包括:在上述纯化浓缩的过程中从上述中空纤维膜组件的透过液侧压入稀释液对上述中空纤维膜进行逆清洗处理。

[0055] [42]根据[41]所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,容纳于上述中空纤维膜组件的上述中空纤维膜由包含乙酸纤维素的树脂材料构成。

[0056] [43]根据[42]所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,容纳于上述中空纤维膜组件的上述中空纤维膜的截留分子量为10万~100万。

[0057] [44]根据[41]~[43]中任一项所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,将上述液体中的杂质去除的步骤包括:通过载体柱将上述液体中的杂质吸附去除。

[0058] [45]根据[41]~[44]中任一项所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,使用上述中空纤维膜组件将上述液体纯化浓缩的步骤包括:对上述液体进行交替切向流过滤。

[0059] [46]根据[41]~[45]中任一项所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,使用上述中空纤维膜组件将上述液体纯化浓缩的步骤包括:将稀释液供给至经纯化浓缩后的上述液体并进一步纯化浓缩,在上述经纯化浓缩后的上述液体的量(B)相对于上述原料的液体的量(A)(B/A)达到1/2~1/200的情况下,将上述稀释液供给至上述液体。

[0060] [47]根据[44]~[46]中任一项所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,并行地进行通过上述载体柱将上述液体中的杂质去除的步骤、和使用上述中空纤维膜组件将上述液体纯化浓缩的步骤。

[0061] [48]根据[41]~[47]中任一项所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,上述微小有用物质为选自细胞外囊泡、抗体、病毒、蛋白质、酶及核酸中的至少一种。

[0062] [49]根据[41]~[48]中任一项所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,其中,在上述中空纤维膜的至少一部分附着有与上述微小有用物质不同种类的生物分子。

[0063] [50]根据[41]~[49]中任一项所述的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法,该方法包括:在进行上述逆洗处理之前对上述中空纤维膜组件进行冲洗处理。

[0064] 根据本公开,可以提供能够制造以高纯度且高浓度包含微小有用物质的液体(微小有用物质的纯化浓缩液)、并且能够更有效地制备上述纯化浓缩液的包含微小有用物质的液体的纯化浓缩装置以及使用了该装置的微小有用物质的纯化浓缩液的制造方法。另外,本公开的纯化浓缩装置作为能够通过自动控制对微小有用物质进行纯化浓缩的装置也是有用的。

附图说明

[0065] 图1是示出第一实施方式的纯化浓缩装置的一例的概要构成图。

[0066] 图2是示出第一实施方式的去除部的一例的概要构成图。

[0067] 图3是示出第一实施方式的去除部的一例的概要构成图。

[0068] 图4是示出第一实施方式的去除部的一例的概要构成图。

[0069] 图5是示出第一实施方式的去除部的一例的概要构成图。

[0070] 图6是示出第一实施方式的去除部的一例的概要构成图。

[0071] 图7是示出本公开的纯化浓缩装置中的中空纤维膜组件的一例的概要剖面图。

[0072] 图8是示出第一实施方式的纯化浓缩部的一例的概要构成图。

[0073] 图9是示出第一实施方式的纯化浓缩部的一例的概要构成图。

[0074] 图10是示出第一实施方式的纯化浓缩部的一例的概要构成图。

[0075] 图11是示出第一实施方式的纯化浓缩部的一例的概要构成图。

[0076] 图12是示出第一实施方式的纯化浓缩装置的一例的概要构成图。

[0077] 图13是示出第一实施方式的纯化浓缩装置的整体构成的一例的概要构成图。

[0078] 图14是示出第二实施方式的纯化浓缩装置的整体构成的一例的概要构成图。

[0079] 图15是用于测定中空纤维膜的γ-球蛋白透过率的装置的一例。

[0080] 图16是示出使用了第一实施方式的纯化浓缩装置的纯化浓缩处理的一例的流程图。

[0081] 图17是示出通过BCA assay对实施例4及比较例3中得到的浓缩液进行测定的结果的坐标图。

[0082] 图18是实施例4及比较例3中得到的浓缩液的吸光度曲线图。

[0083] 符号说明

[0084] 1、2纯化浓缩装置、10原料供给部、11容器、20去除部、21载体柱、22过滤构件、23第一罐(粗纯化液贮存罐)、24罐(前处理液贮存罐)、25第六罐(清洗液贮存罐)、26第七罐(平衡化液贮存罐)、30纯化浓缩部、31第二罐、32第三罐、33中空纤维膜组件、33a第一液体的出入口、33b第二液体的出入口、33c,33d第三液体的出入口、34加压装置、35,36罐内液量监测装置、41～43流路、80第四罐(稀释液贮存罐)、81第五罐(回收罐)、91风扇过滤器装置、92UV灯、110第一控制部

具体实施方式

[0085] 以下,使用附图对本公开的一例进行说明,各实施方式中的各构成及它们的组合等为一例,在不脱离本公开的主旨的范围内可以适当进行构成的添加、省略、替换及其它变更。本公开并不受实施方式限定,仅受权利要求书限定。另外,对于特定的参数,在记载了多个上限值及下限值的情况下,在这些上限值及下限值中,可以将任意的上限值和下限值组合而设为优选的数值范围。

[0086] [包含微小有用物质的液体的纯化浓缩装置]

[0087] 本公开涉及包含微小有用物质的液体的纯化浓缩装置。本公开的纯化浓缩装置具有第一实施方式及第二实施方式。以下,使用附图对本公开的纯化浓缩装置的第一实施方式进行说明。

[0088] [第一实施方式]

[0089] 图1是示出本公开的第一实施方式的一例的纯化浓缩装置1(以下记载为“纯化浓缩装置1”)的概要构成图。本公开的纯化浓缩装置1包含:供给包含微小有用物质的原料的原料供给部10、去除液体中的杂质的去除部20、利用中空纤维膜对从原料供给部10或去除部20供给的液体进行纯化并进行浓缩的纯化浓缩部30、以及控制从原料供给部10向纯化浓缩部30的液体的流通或从去除部20向纯化浓缩部30的液体的流通的时机的第一控制部110。原料供给部10的液体经由流路41被供给至去除部20、或者经由流路43被供给至纯化浓缩部30。另外,去除部20的液体经由流路42被供给至纯化浓缩部30。本公开的纯化浓缩装置1能够制造以高纯度且高浓度包含微小有用物质的液体(微小有用物质的纯化浓缩液),而且能够更有效地制备上述纯化浓缩液。另外,作为能够通过自动控制将微小有用物质纯化浓缩的装置也是有用的。需要说明的是,在本公开中,“流路”是指液体流动的管路。

[0090] <原料供给部>

[0091] 原料供给部10中贮存包含微小有用物质的液体的原料液(以下记载为“原料液”)。原料供给部10内的原料液根据其纯度、即原料液内的杂质的浓度而被供给至去除部20或纯化浓缩部30。在原料液内的杂质的浓度高的情况下,可以设定为原料液被供给至去除部20,在原料液内的杂质的浓度低的情况下,可以设定为原料液被供给至纯化浓缩部30。原料供给部10连接有用于将原料液供给至去除部20的流路41和用于将原料液供给至纯化浓缩部30的流路43。

[0092] 原料供给部10具有贮存原料液的容器。上述容器可以固定于纯化浓缩装置1,也可以以能够容易地拆卸的方式设置。在容器以能够容易地拆卸的方式设置情况下,原料供给部10可以包含用于固定容器的固定构件等各种设备。

[0093] 贮存原料液的容器的形状及其容积没有特别限定,可以根据微小有用物质的种类、原料液的量等而确定。在一个实施方式中,在对包含选自细胞外囊泡、抗体、病毒、蛋白质、酶及核酸等微小有用物质的原料液进行纯化浓缩的情况下,上述容器的容积可以为50~5000mL,也可以为200~2000mL。

[0094] <去除部>

[0095] 去除部20将经由流路41从原料供给部10供给的原料液内的杂质去除。根据该构成,能够有效地制备微小有用物质的纯化浓缩液。以下,将通过去除部20去除了杂质的液体记载为“粗纯化液”。

[0096] 图2~6示出了去除部20的一些代表性的的概要构成例。

[0097] 图2所示的去除部20设有去除原料液内的杂质的载体柱21。载体柱21的一头与流路41连接,另一头与用于将粗纯化液供给至纯化浓缩部30的流路42连接。出自载体柱21的流路42可以连接有将用于将液体排出至(后述的)废液罐的(后述的)流路。

[0098] 去除部20中也可以设有具备填充有能够吸附去除原料液内的杂质的吸附材料的容器的装置来代替载体柱21。在这些容器内,可以通过搅拌、振动/振荡等的作用使原料液内的杂质吸附于吸附材料来去除/减少杂质。作为这样的装置,也可以使用旋转器。吸附了杂质的填充剂可以通过任意的过滤单元而去除。

[0099] 图3所示的去除部20具备载体柱21、和贮存通过载体柱21进行了处理的粗纯化液的第一罐23。第一罐23配置在流路42中。即,流路42夹着第一罐23分成位于载体柱21侧的流

路42A和位于纯化浓缩部侧的流路42B而配置。粗纯化液从载体柱21经由流路42A被贮存于第一罐23,贮存于第一罐23的粗纯化液经由流路42B被供给至纯化浓缩部30。流路42B设有三通阀77。第一控制部110根据纯化浓缩部30的粗纯化液的处理状况而将流路42B内的三通阀77打开至纯化浓缩部30侧,将第一罐23内的粗纯化液供给至纯化浓缩部30。根据该构成,能够将粗纯化液暂时贮存于第一罐23之后供给至纯化浓缩部30,因此,能够并行地进行去除部20的杂质去除处理和纯化浓缩部30的纯化浓缩处理。其结果是,能够有效地进行纯化浓缩处理。图4～6所示的去除部20的构成在后面说明。

[0100] (载体柱)

[0101] 载体柱21中填充有能够去除原料液内的微小有用物质以外的杂质的材料。上述材料优选为能够吸附去除原料液内的杂质的吸附材料。

[0102] 作为吸附材料,优选为能够吸附保持上述杂质的多孔粒状物。多孔粒状物是指在其表面及内部具有大量细孔的粒状的物质,可以使用高分子的多孔粒状物、无机材料的多孔粒状物。在纯化浓缩装置1中处理的原料液所包含的微小有用物质为细胞外囊泡、抗体、病毒、蛋白质、酶及核酸等生物物质的情况下,作为上述多孔粒状物,优选细孔内部带正电。

[0103] 这些多孔粒状物可以使用一种,或者组合使用具有不同的吸附性能的多种多孔粒状物。

[0104] 具有不同的吸附性能的多种多孔粒状物可以示例出:细孔直径不同的多孔粒状物、多孔粒状物的比表面积不同的多孔粒状物、多孔粒状物的平均粒径不同的多孔粒状物、构成多孔粒状物的基材的种类不同的多孔粒状物、存在于多孔粒状物的细孔内部表面的官能团的种类、密度不同的多孔粒状物等。

[0105] 作为这样的多孔粒状物,可以列举例如以纤维素、琼脂糖、淀粉、直链淀粉、葡聚糖、普鲁兰多糖、葡甘露聚糖等多糖类、聚丙烯酸或其衍生物、聚乙烯醇、尼龙、聚砜、聚丙烯腈、聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯等合成高分子、玻璃、多孔玻璃、硅胶、羟基磷灰石等作为基材的多孔粒状物。这些可以单独使用1种,也可以组合使用2种以上。另外,可以为具有离子交换和尺寸排阻的混合模式载体,优选可以为具有阳离子交换和尺寸排除的混合模式载体。

[0106] 上述多孔粒状物可以根据原料液中所含的杂质的种类等而从平均细孔直径为0.1～1000nm的范围的多孔粒状物中选择。需要说明的是,上述平均细孔直径可以通过压汞法、逆尺寸排阻色谱法进行测定。

[0107] 另外,上述多孔粒状物可以根据原料液中所含的杂质的种类等而从平均粒径为1～1000μm的范围的多孔粒状物中选择。上述平均粒径可以通过激光衍射散射法进行测定。

[0108] 在一个实施方式中,在纯化浓缩装置1中处理的原料液所包含的微小有用物质为细胞外囊泡、抗体、病毒、蛋白质、酶及核酸等生物物质的情况下,载体柱21可以包括抗体柱。“抗体柱”是指填充了固定有能够与抗原(杂质)结合的抗体的载体的柱。在原料液包含上述的生物物质的情况下,可以采用填充了固定有能够与上述生物物质以外的杂质结合(吸附)的抗体的载体的抗体柱。需要说明的是,在包含上述的生物分子作为微小有用物质的原料液中,由于很多情况下包含多种杂质,因此可以使用与杂质的种类相应的多个抗体柱。

[0109] 另外,也可以采用将多根载体柱组合而组件化的装置(柱组件)来代替载体柱21。在使用柱组件的情况下,各载体柱中内包的吸附材料的种类可以相同,也可以不同。另外,

载体柱的内径、长度可以相同,也可以不同。

[0110] 图4所示的去除部20具备:贮存用于清洗载体柱21的清洗液的第六罐25(清洗液贮存罐)、和贮存用于将载体柱21平衡化的平衡化液的第七罐26(平衡化液贮存罐)。在图4的去除部20中,第六罐25以能够经由流路50A将清洗液供给至流路41的方式构成。另外,第七罐26以能够经由流路50B将平衡化液供给至流路41的方式构成。流路50A及50B配置有开关阀71A及71B。从载体柱21将粗纯化液供给至纯化浓缩部30的流路42设有三通阀72。

[0111] 在一个实施方式中,优选将对一批次量的原料液进行处理而达到吸附饱和的载体柱21进行清洗、平衡化处理,进一步进行下一批次的原料液的处理。载体柱21的清洗、平衡化处理可以通过将设于流路50A及50B的开关阀71A及71B打开、将清洗液及平衡化液从第六罐25及第七罐26供给至载体柱21而实施。优选以使对载体柱21进行了处理后的清洗液及平衡化液从设于流路42的三通阀72排出至(后述的)废液罐的方式构成。

[0112] (清洗液及平衡化液)

[0113] 作为对载体柱21进行清洗的清洗液,可以采用例如:氯化钠水溶液、盐酸、柠檬酸、次氯酸钠水溶液、氢氧化钠水溶液等。从安全性的观点出发,优选使用氯化钠水溶液。清洗液流入载体柱21内时,附着于载体柱21内的吸附材料的杂质被去除。在用清洗液去除之后,进行载体柱21的平衡化。作为平衡化液,可以采用例如:生理盐水、磷酸缓冲液(PBS)、Tris盐酸缓冲液、柠檬酸钠缓冲液、柠檬酸磷酸缓冲液、乙酸缓冲液、硼酸缓冲液等。

[0114] 需要说明的是,作为贮存清洗液及平衡化液的第六罐25、第七罐26的材质,没有特别限定,例如,可以设为与后述的第二罐31及第三罐32相同的构成。从易于通过肉眼观察确认罐内的贮存液的量的观点考虑,优选第六罐25、第七罐26具有透明性。

[0115] 图5所示的去除部20具有在将液体供给至载体柱21之前将液内的杂质去除的过滤构件。图5所示的去除部20为在流路41中插装有过滤构件22的构成。通过过滤构件22进行了过滤处理后的原料液从流路41中夹隔着过滤构件22而位于载体柱21侧的流路41A被供给至载体柱21。根据该构成,能够将通过过滤构件22进行了前处理后的原料液供给至载体柱21。以下,将通过过滤构件22进行了处理后的原料液记载为“前处理液”。需要说明的是,图5中的去除部20为具有过滤构件22和载体柱21的构成,但也可以为仅具有过滤构件22的构成。

[0116] 图6所示的去除部20具备贮存来自过滤构件22的前处理液的罐24(前处理液贮存罐)。来自过滤构件22的前处理液经由流路41C而贮存于罐24。贮存于罐24的前处理液经由流路41D被供给至载体柱21。第一控制部110(未图示)可以根据载体柱21的杂质去除处理的进展而打开流路41D内的开关阀73将罐24内的前处理液供给至载体柱21。根据该构成,能够将前处理液暂时贮存于罐24后供给于载体柱21,因此能够并行地进行过滤构件22的过滤处理和载体柱21的杂质去除处理,可以有效地进行纯化浓缩处理,因此优选。

[0117] 在图6中,过滤构件22为配置于原料供给部10的下部的构成。根据该构成,从原料供给部10向过滤构件22的原料液的供给通过原料液的自重而进行,因此,可以省略用于从原料供给部10将原料液供给至过滤构件22的送液构件(泵等)。因此,能够制成更紧凑的纯化浓缩装置,因此优选。

[0118] (过滤构件)

[0119] 过滤构件22是对原料液进行过滤处理的构件。在原料液所包含的微小有用物质包含细胞外囊泡的情况下,过滤构件22优选为具备精密过滤膜(精密过滤膜组件)的过滤器。

从有效地过滤去除原料液中的细胞等比目标的细胞外囊泡大的生物分子等杂质的观点出发,精密过滤膜(精密过滤膜组件)的平均孔径优选为0.10～0.50μm、进一步优选为0.15～0.30μm。另外,作为精密过滤膜的材料,优选为聚醚砜、聚偏氟乙烯等。另外,精密过滤膜可以使用由这些材料构成的市售品。

[0120] (第一控制部)

[0121] 接下来,使用图16的流程图对第一控制部的详细情况进行说明。

[0122] 图16是使用图13所示的纯化浓缩装置1进行纯化浓缩处理的情况的基本的流程图。图16的流程图中示出了各控制部中的液体的流通控制的一例。

[0123] 第一控制部110基于根据原料供给部10内的原料液的杂质浓度而设定的结果将原料液供给至去除部20或纯化浓缩部30。在原料液的杂质浓度高的情况下,以原料供给部10内的原料液被供给至去除部20的方式进行设定。在该情况下,第一控制部110将配置于图13的容器11的下部的三通阀82打开至流路41一侧,将原料液供给至去除部20(图13中为过滤构件22)。在原料液的杂质浓度低的情况下,以原料供给部10内的原料液被供给至纯化浓缩部30的方式进行设定。在该情况下,第一控制部110可以将上述三通阀82打开至流路43一侧,将原料液向纯化浓缩部30送液。通过过滤构件22进行了处理的液体(前处理液)被供给至罐24。第一控制部110可以将液体从罐24向载体柱21供给,直至第一罐23(粗纯化液贮存罐)内的粗纯化液的量达到设定的值。具体而言,可以打开设置于罐24的下部的开关阀73,将前处理液供给至载体柱21。

[0124] 第一罐23内的粗纯化液的量达到预先设定的值时,被送液至第二罐31。此时,第一控制部110也可以确认第二罐31及第三罐32内的液量。第一控制部110在基于利用后述的罐内液量监测装置35、36和/或照相机进行的液面监测而判断第二罐31及第三罐32内的液量为预先设定的液量的情况下,可以将连接于流路42B的三通阀77打开至第二罐31一侧,将第一罐23内的粗纯化液供给至第二罐31。

[0125] 连接于图13的第一罐23的流路42B设有判断罐内的液量的水平传感器(未图示)。第一控制部110可以基于上述水平传感器的信息而判断在第一罐23内是否残留有粗纯化液。在判断为第一罐23内的粗纯化液被全部供给至第二罐31时,第一控制部110可以打开开关阀73将罐24内的前处理液再次供给至载体柱21。通过这样地控制液体的流动,可以在每一批次的处理结束时进行载体柱21的清洗、平衡化处理。

[0126] ＜纯化浓缩部＞

[0127] 纯化浓缩部30通过中空纤维膜将从原料供给部10或去除部20供给的液体纯化并浓缩。由于使用中空纤维膜进行纯化浓缩,因此能够制备以高纯度且高浓度包含微小有用物质的液体。

[0128] (中空纤维膜)

[0129] 本公开的中空纤维膜的材质可以根据本公开的使用目的、包含微小有用物质的液体的性质等而适当设计。

[0130] 具体而言,可以采用聚偏氟乙烯(PVDF)、聚醚砜(PES)、聚砜(PSf)、聚烯烃(PE、PP、PTFE等)、聚酰胺、聚丙烯腈、乙酸纤维素(CA)等有机高分子类材料及它们的改性体。

[0131] 此外,也可以采用由选自上述中的多种成分形成的复合中空纤维膜。

[0132] 其中,在微小有用物质为外泌体等生物分子的情况下,优选使用乙酸纤维素(CA)

制的中空纤维膜(即,优选由包含乙酸纤维素的树脂材料构成)。通过使用乙酸纤维素制的中空纤维膜,能够抑制纯化浓缩处理时的过滤速度的降低,且进一步提高沉积在中空纤维膜的膜表面的微小有用物质的回收效果。作为其理由,可以举出以下原因等:生物分子的表面电荷为弱的负电荷,乙酸纤维素膜也为弱的负电荷,因此,生物分子与乙酸纤维素膜不会以强的库仑力相互吸引,通过适当控制循环线速度即易于使切向流过滤的剪切力发挥功能。另外,通过使用乙酸纤维素膜,能够利用后述的方法更有效地回收沉积在中空纤维膜的膜表面的微小有用物质。

[0133] 本公开的中空纤维膜的材质可以根据本公开的使用目的、包含微小有用物质的原料液的性质等而适当设计,在此基础上,也可以根据包含微小有用物质的原料液的性质,为了提高中空纤维膜表面的耐污垢性而进行适当物质的涂敷处理。

[0134] 涂敷处理例如可以通过与日本专利6081290号公报中记载的使阳离子性聚合物结合于由磺化聚醚砜和聚醚砜形成的中空纤维膜表面的方法相同的方法来实施。

[0135] 即,可以使用如下方法:将中空纤维膜浸渍于涂敷物质的水溶液(水分散液)中的方法;通过在中空纤维膜、中空纤维膜组件的状态下将涂敷物质的水溶液(水分散液)向中空纤维膜通液,使其吸附结合于中空纤维膜表面,然后,仅将只是沉积在涂敷物质的薄层上的涂敷物质进行水洗而去除的方法。

[0136] 在进行某种培养上清液中的某种细胞外囊泡的浓缩纯化的情况下,从提高纯化浓缩效率和细胞外囊泡等微小有用物质的回收率的观点出发,有时优选进行对乙酸纤维素制的中空纤维膜涂敷某种生物分子的处理。

[0137] 作为一例,可以使用如下方法:以200mL/分的通液速度使溶解于磷酸缓冲液(PBS)的1.3mg/mL的脱脂奶粉溶液相对于乙酸纤维素制中空纤维膜组件(截留分子量30万、膜面积0.062m^2)通液10分钟,实施了用于使脱脂奶粉中的酪蛋白等生物分子以薄层的形式吸附结合于中空纤维膜表面的涂敷处理,然后,为了仅将只是沉积在薄层上的多余的成分去除,用250mL的磷酸缓冲液(PBS)进行膜通水清洗。

[0138] 在一个实施方式中,从提高中空纤维膜的耐污垢性的观点考虑,优选在中空纤维膜的至少一部分区域附着有与上述微小有用物质不同种类的生物分子。生物分子更优选附着于中空纤维膜的表面的一半以上的区域,优选附着于整个区域。在一个实施方式中,优选在中空纤维膜的至少一部分表面形成有包含与上述微小有用物质不同种类的生物分子的层。“包含生物分子的层”是指在中空纤维膜的至少一部分区域以一定程度扩散的方式附着有包含生物分子的物质。包含生物分子的层优选形成在中空纤维膜的表面的一半以上的区域,更优选形成在整个区域。在一个实施方式中,优选中空纤维膜的至少一部分表面被与上述微小有用物质不同种类的生物分子涂敷。

[0139] 作为与微小有用物质不同种类的生物分子,为从血液、乳液、软骨等动物细胞组织、其它生物细胞组织得到的生物分子,作为代表例,可以列举:脱脂乳、脱脂奶粉等中包含的生物分子(例如酪蛋白);血清等中包含的生物分子(例如,血清球蛋白、血清白蛋白);明胶(例如鱼明胶)等,可以为选自其中的一种以上。

[0140] (中空纤维膜的平均内径)

[0141] 本公开的中空纤维膜的平均内径可以根据本公开的使用目的、包含微小有用物质的液体的性质等而适当设计。在一个实施方式中,可以采用具有0.2㎜～1.4㎜的平均内径

的中空纤维膜。在另一个实施方式中,可以采用具有0.2mm～2.0mm的平均内径的中空纤维膜。需要说明的是,本公开中的“中空纤维膜的平均内径”是将1根中空纤维膜以相对于长度方向垂直的任意的面切断,根据与该切断面的中空部内切的最小的圆的直径而计算出的值。在本公开中,测定上述的切断面中的任意10个部位以上且100个部位以下的上述直径,将其平均值作为“平均内径”。

[0142] 需要说明的是,本公开的中空纤维膜的平均外径可以为0.3mm～2.0mm。在一个实施方式中,中空纤维膜的平均内径为0.2mm～1.0mm时的平均外径可以为0.3mm～1.4mm。另外,在其它实施方式中,中空纤维膜的平均内径为1.0mm～1.4mm时的平均外径可以为1.5mm～2.0mm。需要说明的是,“中空纤维膜的平均外径”是在通过与上述的中空纤维膜的平均内径相同的方法切断的中空纤维膜中,根据内包其切断面的外缘的最小的圆的直径而计算出的值。在本公开中,测定上述的切断面中的任意10个部位以上且100个部位以下的上述直径,将其平均值作为“平均外径”。

[0143] 对于本公开的使用目的而言,从易于确保中空纤维膜不会变得过度柔软的膜厚、且易于提高沉积在中空纤维膜的膜表面的微小有用物质的回收效率的观点出发,中空纤维膜的平均内径可以为0.6mm～1.4mm。

[0144] 此外,可以根据包含微小有用物质的液体的运行时的液体粘度而调整上述平均内径。在液体粘度高的情况(例如,液温20℃、剪切速度25s^{-1}时的液体粘度为10～30mPa·s的情况)下,优选使用平均内径为1.0mm～1.4mm的粗径中空纤维膜。另外,在包含微小有用物质的液体的运行时的液体粘度低的情况(例如,液温20℃、剪切速度25s^{-1}时的液体粘度小于10mPa·s的情况)下,优选使用平均内径为0.6mm～1.0mm的中空纤维膜。需要说明的是,中空纤维膜的平均内径增大时,在使用上述中空纤维膜作为中空纤维膜组件的情况下,有效膜面积容易降低。因此,从易于抑制制成中空纤维膜组件的情况下的有效膜面积的降低的观点出发,优选使用平均内径为0.2mm～1.0mm的中空纤维膜。

[0145] (中空纤维膜的截留分子量)

[0146] 本公开的中空纤维膜的截留分子量可以根据本公开的使用目的、包含微小有用物质的原料液的性质等而适当设计。在一个实施方式中,上述截留分子量可以为5000～300万,也可以为1万～100万。在微小有用物质为特定的蛋白质的情况下,优选使用比上述蛋白质的分子量稍低的截留分子量的中空纤维膜(例如,具有比蛋白质的分子量低10～50%左右的截留分子量的中空纤维膜等)。在一个实施方式中,在微小有用物质为外泌体的情况下,中空纤维膜的截留分子量优选为5万～100万、更优选为7万～80万、进一步优选为10万～50万。

[0147] 在微小有用物质为细胞外囊泡的情况下,从纯化浓缩的效率性的观点考虑,本公开的中空纤维膜组件的γ-球蛋白透过率优选为5～90%、更优选为10～80%。在本公开中,对包含上述的γ-球蛋白的包含微小有用物质的液体内的杂质的透过率进行测定的方法没有特别限定,可以采用现有公知的方法。具体而言,可以采用对与上述杂质相似的分子结构、且具有相同程度的分子量的标准物质的透过率进行测定的方法等。上述透过率的测定的情况下,有时使用中空纤维膜组件,或者有时直接使用上述中空纤维膜组件所用的一根中空纤维膜。此外,也可以用通过用一根中空纤维膜从中空纤维膜外侧施加压力向内侧透过的方法进行测定而得到的透过率来代替内压式中空纤维膜组件的上述透过率。

[0148] (中空纤维膜组件)

[0149] 本公开中的纯化浓缩部30可以为具备中空纤维膜组件的构成,所述中空纤维膜组件在具有液体的出入口的容器内容纳有多个上述中空纤维膜。另外,上述容器至少具有:用于将上述中空纤维膜供给至液体的第一液体的出入口33a及第二液体的出入口33b、和用于将透过上述中空纤维膜后的液体排出的第三液体的出入口33c、33d。

[0150] 本公开的中空纤维膜组件中使用的中空纤维膜的根数没有特别限定。可以根据本公开的使用目的及纯化浓缩的微小有用物质的重量等而适当设计装入组件内的根数,以便获得所需的有效膜面积。

[0151] 中空纤维膜优选通过粘接剂等集束而收纳于上述容器内。在本公开中,从中空纤维膜组件的第一液体的出入口33a和/或第二液体的出入口33b供给包含微小有用物质的液体时,液体流入容器内的中空纤维膜束的一侧(中空纤维膜束的内侧或外侧),在中空纤维膜束中被纯化、浓缩。透过了中空纤维膜束的液体向中空纤维膜束的另一侧(中空纤维膜束的外侧或内侧)流出,从第三液体的出入口33c、33d排出。此时,没有透过而滞留在中空纤维膜束的内侧或外侧的液体可以从第一液体的出入口和/或第二液体的出入口向中空纤维膜组件外排出(回收)。以下,在本公开中,将透过了中空纤维膜的液体记载为“透过液”,将未透过中空纤维膜而在中空纤维膜中滞留的液体记载为“浓缩液”。需要说明的是,“浓缩液”是指通过中空纤维膜进行了纯化、浓缩处理后的全部液体。

[0152] 将包含微小有用物质的液体向中空纤维膜束的内侧供给的中空纤维膜组件是内压式中空纤维膜组件,向中空纤维膜束的外侧供给的中空纤维膜组件是外压式中空纤维膜组件。以下,作为本公开中的中空纤维膜组件的一个实施方式,对于内压式中空纤维膜组件的一例进行说明。

[0153] 图7是示出内压式的中空纤维膜组件33的一例的概要剖面图。中空纤维膜组件33在筒状容器61内容纳有多个中空纤维膜集束而成的中空纤维膜束60。上述多个中空纤维膜通过具有生物相容性的密封粘接剂(例如,聚氨酯类密封粘接剂等)集束而构成中空纤维膜束60,且成为通过由上述密封粘接剂形成的粘接剂层62a、62b粘接固定于筒状容器61内的长度方向的两端的构成。从透明性的观点出发,筒状容器61可以由聚碳酸酯、聚(甲基)丙烯酸酯、聚砜等材料构成。需要说明的是,筒状容器61的两端面61a、61b处于多个中空纤维膜开口的状态。在中空纤维膜组件33的长度方向的两端部设有第一液体的出入口33a及第二液体的出入口33b。另外,在中空纤维膜组件33的长度方向的侧面部设有第三液体的出入口33c、33d。从第一液体的出入口33a和/或第二液体的出入口33b供给的液体被送液至中空纤维膜束60的内侧而被纯化、浓缩。另外,透过至中空纤维膜束60的外侧的透过液从设置在筒状容器61的侧面的第三液体的出入口33c、33d排出。需要说明的是,第三液体的出入口优选设置在筒状容器34的侧面上部及侧面下部的至少2个部位。在图7中为第三液体的出入口33c、33d仅设置在中空纤维膜组件33的一个侧面部的构成,但并不限定于此。第三液体的出入口33c、33d可以分开设置在一个侧面部和另一个侧面部。

[0154] 图7示例出了内压式的中空纤维膜组件,但如上所述,本公开的中空纤维膜组件也可以为外压式。在外压式的情况下,需要适当设计第一至第三液体的出入口的设置部位及设置方法。

[0155] (中空纤维膜组件的填充率)

[0156] 本公开的中空纤维膜组件中的填充率优选为5～55％、更优选为20～55％、进一步优选为25～55％。上述填充率是指中空纤维膜束的外径部的截面积的总和占中空纤维膜组件的一般而言筒状容器的短边方向的截面积的百分率。上述填充率为5～55％时，能够将中空纤维膜组件的大小最优化，并且更有效地回收沉积在中空纤维膜的膜表面的微小有用物质。

[0157] 以下，使用附图对本公开的纯化浓缩部30具备中空纤维膜组件33的方式进行说明。

[0158] 图8～11中示出了纯化浓缩部30的一些代表性的概要构成图。需要说明的是，本公开的纯化浓缩装置1中有时包含概要构成图中省略的阀门、自动阀、逆流防止阀、孔口、流量计、压力计、液位计、破裂板等安全装置等。

[0159] 图8所示的纯化浓缩部30具备：第二罐31及第三罐32、连接于第二罐31及第三罐32的中空纤维膜组件33、以及对第二罐31及第三罐32进行加压的加压装置34。加压装置34经由气体供给路52与三通阀76连接。

[0160] 第二罐31是贮存从原料供给部10或去除部20供给的液体、即原料液或粗纯化液的罐，经由流路51A与中空纤维膜组件33的第一液体的出入口33a连接。另外，第三罐32与第二罐31同样地为贮存原料液或粗纯化液的罐，经由流路51B与中空纤维膜组件33的第二液体的出入口33b连接。第二罐31及第三罐32的上部连接于加压装置34。第二控制部120(未图示)以如下方式进行控制：通过使加压装置34工作，进行三通阀76的切换，从而选择性地对第二罐31或第三罐32中的任一者加压，将第二罐31或第三罐32内的原料液或粗纯化液交替(选择性)地供给至中空纤维膜组件33。从第二罐31或第三罐32排出的液体通过中空纤维膜组件33进行了纯化、浓缩之后被送液至另一个罐。以下，将贮存于第二罐31内的纯化浓缩处理完成之前的液体记载为“第二贮存液”，将贮存于第三罐32内的纯化浓缩处理完成之前的液体记载为“第三贮存液”。需要说明的是，在图8中形成了流路42、43连接于第二罐31的构成，但也可以为流路42、43连接于第三罐32的构成。需要说明的是，关于第二控制部120的详细情况，在后面说明。

[0161] (加压装置)

[0162] 本公开的加压装置34将来自气体供给源的气体供给至第二罐31及第三罐32内。用于加压的气体通过第二控制部120(未图示)切换三通阀76而从具备压力计(未图示)的气体供给路52A、52B被供给至第二罐31或第三罐32。作为气体，可以选自氮、氩、氦等非活性气体、二氧化碳、过滤空气等。

[0163] 在通过加压装置34将第二罐31加压的情况下，第二控制部120(未图示)将来自气体供给源(未图示)的气体供给至气体供给路52，并切换三通阀76而送至气体供给路52A。此时，将连接排气路53A的开关阀74、流路42、43的三通阀77关闭，将排气路53B的开关阀75打开。另一方面，在通过加压装置34将第三罐32加压的情况下，第二控制部120将来自气体供给源(未图示)的气体供给至气体供给路52，并切换三通阀76而送至气体供给路52B。此时，将排气路53B的开关阀75、三通阀77关闭，将排气路53A的开关阀74打开。通过这些操作，可以通过加压装置34选择性地对第二罐31及第三罐32进行加压。

[0164] (第二罐及第三罐)

[0165] 在本公开的纯化浓缩装置1中，优选第二罐31及第三罐32具有透明性，以便能够通

过肉眼、后述的照相机而观察第二贮存液及第三贮存液的液面位置。另外,从防止第二贮存液或第三贮存液附着、残留于罐的内壁面的观点出发,更优选由具有拒水性的材料构成。具体而言,第二罐31及第三罐32优选由包含聚丙烯腈、聚(甲基)丙烯酸酯等聚(甲基)丙烯酸酯、聚碳酸酯、氟树脂等的材料构成。需要说明的是,在通过后述的罐内液量监测装置等管理第二罐31或第三罐32的液体的出入口的透明部分的液位的情况下,第二罐31及第三罐32的原材料可以使用不透明的材料、例如金属制、纤维增强树脂制的罐。

[0166] 在图8所示的纯化浓缩部30中,第二贮存液经由流路51A从第一液体的出入口33a进入中空纤维膜组件33内,通过中空纤维膜束60进行了纯化、浓缩之后,从第二液体的出入口33b被排出,送液至第三罐32。在该情况下,通过液体相对于中空纤维膜束60的长度方向的膜表面平行地流动的切向流过滤将第二贮存液纯化、浓缩。另外,透过了中空纤维膜束60后的透过液从连接于中空纤维膜组件33的第三液体的出入口33c、33d的流路54被排出至(后述的)废液罐。

[0167] 同样地,第三贮存液经由流路51B从第二液体的出入口33b进入中空纤维膜组件33内,通过中空纤维膜束60进行了纯化、浓缩之后,从第一液体的出入口33a被排出而送至第二罐31。在该情况下,通过液体相对于中空纤维膜束60的长度方向的膜表面平行地流动的切向流过滤将第三贮存液纯化、浓缩。通过交替重复该操作,微小有用物质、杂质不易沉积于中空纤维膜表面。其结果是,可以抑制液体的透过速度的降低,能够保持高处理效率。即,通过对液体进行交替切向流过滤,能够更有效地制造以更高纯度且更高浓度包含微小有用物质的液体。

[0168] 第二控制部120可以设定第二贮存液及第三贮存液的量,并以使这些第二及第三贮存液达到设定的值的方式控制加压装置34和开关阀,交替地对第二罐31或第三罐32进行加压。

[0169] 图8的纯化浓缩部30可以为具备监测第二罐31及第三罐32内的液量的装置的构成。根据该构成,能够掌握第二罐31及第三罐32内的液量,因此能够更有效地进行交替切向流过滤。

[0170] 图9所示的纯化浓缩部30具有与图8所示的纯化浓缩部30相同的构成,并且第二罐31及第三罐32分别进一步在罐底部的液体的出入口具有包含光传感器(未图示)的罐内液量监测装置35、36。罐内液量监测装置35、36以如下方式构成:通过光传感器对第二罐31及第三罐32的液体的出入口照射光,检测液体的出入口的光的透过率,基于上述透过率的变化监测罐内的液量。第二控制部120(未图示)通过罐内液量监测装置35、36判断第二罐31及第三罐32内的第二贮存液及第三贮存液的液量,确定通过加压装置34进行加压的罐。

[0171] (罐内液量监测装置)

[0172] 本公开的罐内液量监测装置35、36具备光传感器。光传感器具备投光元件及受光元件,从投光元件向罐底部的液体的出入口照射光,通过受光元件检测光的透过光的强度(透过率)。需要说明的是,罐底部的液体的出入口的被光照射的部分由透明的原材料构成。检测到的透过率进一步被发送至检测部。在检测部检测到透过率的变化时,第二控制部120改变通过加压装置34进行加压的罐。

[0173] 对于罐内液量监测装置与第二控制部的关系更具体地进行说明。

[0174] 在第二罐31通过加压装置34被加压而将第二贮存液供给至第三罐32的情况下,如

果第二罐31内的第二贮存液的量降低,则从加压装置34供给的气体从第二罐31的液体的出入口被排出,液体的出入口内的光的透过率发生变化。在罐内液量监测装置35检测到透过率的变化时,第二控制部120(未图示)切换三通阀76将通过加压装置34进行加压的罐从第二罐31改变为第三罐32。同样地,在设置有第三罐32的液体的出入口的罐内液量监测装置36检测到透过率的变化时,第二控制部120切换三通阀76将通过加压装置34进行加压的罐从第三罐32改变为第二罐31。罐内液量监测装置35、36可以为纤维传感器。这样,第二控制部120可以控制将第二罐31及第三罐32内的液体交替地供给至中空纤维膜组件。

[0175] 在另一个实施方式中,可以以配置在纯化浓缩部30内的照相机的影像为基础监测罐内的液量。即,纯化浓缩部30具备监测第二罐31及第三罐32内的液面位置的照相机,第二控制部120可以根据由上述照相机输出的第二罐31及第三罐32内的液面位置的信息掌握罐内的液量,确定通过加压装置34进行加压的罐。具体而言,纯化浓缩部30在能够观察第二罐31及第三罐32的液面的位置具备照相机,由上述照相机输出的液面位置的影像被传送至检测部。检测部根据液面位置的信息判断第二罐31及第二罐31内的液量。例如,在检测部根据照相机的液面位置的信息判断第二罐31内的第二贮存液的量达到预先设定的量以下的情况下,第二控制部120切换三通阀76,将通过加压装置34进行加压的罐从第二罐31变更为第三罐32。同样地,在检测部判断第三罐32内的第三贮存液的量达到预先设定的量以下的情况下,第二控制部120切换三通阀76,将通过加压装置34进行加压的罐从第三罐32变更为第二罐31。

[0176] (第二控制部)

[0177] 图16的流程图示出了第二控制部120的液体的流通控制中的判断的一例。如图16所示,为了使液体(粗纯化液或原料液)主要在第二罐31与第三罐32之间流通,第二控制部120可以操作开关阀、加压装置。另外,第二控制部120可以基于由罐内液量监测装置35、36和/或照相机获得的信息来判断第二罐31及第三罐32内的液量,使罐内的液体流通。此外,第二控制部120也可以设定第二罐31和/或第三罐32内的液量。关于罐内的液量的设定方法的一例(管理液面位置C的设定),在后面说明。

[0178] 图10的纯化浓缩部30具备清洗罐,其将稀释液供给至中空纤维膜组件33而对中空纤维膜束60内的多个中空纤维膜进行清洗。图10所示的纯化浓缩部30具备:第四罐80,其贮存稀释液,连接有将上述稀释液供给至中空纤维膜组件33的第三液体的出入口33c、33d的流路55A;和第三控制部130(未图示),其控制将第四罐80内的上述稀释液供给至中空纤维膜组件33的第三液体的出入口33c、33d的时机。第四罐80连接有将罐内的稀释液直接供给至第三罐32(或第二罐31)的流路55B。

[0179] (第三控制部)

[0180] 第三控制部130控制第四罐80内的稀释液的流通。图16的流程图中示出了第三控制部130的液体的流通控制中的判断的一例。第三控制部130能够在液体的纯化浓缩处理时从第四罐80向第三罐32或中空纤维膜组件33中的任一者供给稀释液。以下,将向第三罐32供给稀释液的步骤称为“稀释处理”,将向中空纤维膜组件33供给稀释液的步骤称为“逆清洗处理”。

[0181] (稀释液)

[0182] 稀释液可以根据本公开的目的、微小有用物质的种类而使用例如纯水、自来水、地

下水、海水或河水等的过滤水、各种水溶液等。在微细有用物质为外泌体的情况下,优选为生理盐水、医疗用或生化学用的缓冲液。作为上述缓冲液,可以使用例如磷酸缓冲液(PBS)、Tris盐酸缓冲液、柠檬酸钠缓冲液、柠檬酸磷酸缓冲液、乙酸缓冲液、硼酸缓冲液等。

[0183] 根据本公开的目的,稀释液优选不含杂质,但在难以获得不含杂质的稀释液的情况下,可以使用杂质浓度低的稀释液(例如,杂质浓度低于500ppm)。

[0184] 在第二罐31(或第三罐32)内的经浓缩后的液体的量(B)相对于包含微小有用物质的原料液的量(A)的(B/A)达到1/2～1/200的情况下,可以将上述稀释液供给至存在于第二罐31(或第三罐32)内的浓缩液。此时,上述浓缩液的量(B)可以设为与通过后述的方法设定的管理液面位置C的液量相等。

[0185] 此外,在将粗纯化液从第一罐23供给至第二罐31(或者将原料液经由流路43供给至第二罐31)时,第三控制部130可以进行稀释处理。第三控制部130可以基于罐内液量监测装置35和/或照相机的液面位置信息而判断粗纯化液或原料液被供给至了第二罐31内。在一个实施方式中,第三控制部130可以在进行了交替切向流过滤并浓缩纯化而使粗纯化液的量达到1/2～1/200的液量之后,实施稀释处理(或逆清洗处理)直至达到设定液量,供给稀释液。在进行稀释处理的情况下,第三控制部130将三通阀77A打开至流路55B一侧,将第四罐80内的稀释液供给至第三罐32。

[0186] 在第三控制部130判断第二罐31及第三罐32内的液体的合计量达到了预先设定的液量以下(例如,通过后述的方法设定的管理液面位置C以下)的情况下,可以进行逆清洗处理。在进行逆清洗处理的情况下,第三控制部130将三通阀77A打开至流路55A一侧。第四罐80内的稀释液经由流路55A从中空纤维膜组件33的第三液体的出入口33c及33d被供给至组件内。然后,稀释液从中空纤维膜束60的透过液一侧朝向浓缩液一侧流动。在中空纤维膜组件33为内压式的情况下,从第三液体的出入口33c及33d向组件内供给的稀释液从中空纤维膜束60的外侧朝向内侧流动。由此,可以将在中空纤维膜的膜表面、特别是在中空纤维膜内部的膜表面沉积的微小有用物质从第一液体的出入口33a和/或第二液体的出入口33b回收至第二罐31和/或第三罐32。通过该处理,沉积于中空纤维膜表面的微小有用物质、杂质被剥离,液体的透过速度基本上恢复至原来的值。另外,通过用稀释液对液体进行稀释,杂质均匀地分散,去除效率提高。其结果是,可以进一步提高液体的纯化、浓缩的效率。

[0187] 需要说明的是,在实施逆清洗之前,为了防止中空纤维膜组件中残留的透过液混入逆清洗液而流入浓缩液一侧,可以预先用清洗液(稀释液)进行冲洗处理,并任选进行用清洗液(稀释液)置换中空纤维膜组件中残留的透过液的操作。

[0188] 此时,清洗液(稀释液)的用量优选为中空纤维膜组件中残留的透过液容量的1～8倍量、更优选为2～6倍量。

[0189] 在进行某种培养上清液中的某种细胞外囊泡的浓缩纯化的情况下,在逆清洗之前实施了冲洗操作的情况与不实施冲洗操作的情况相比,有时能够使杂质蛋白质残留量达到一半以下。

[0190] 在中空纤维膜组件33为内压式的情况下,可以进行以图7中的第三液体的出入口33c或33d中的任一者为入口、以另一者为出口用清洗液(稀释液)置换中空纤维膜组件中残留的透过液的操作。

[0191] 由于中空纤维膜中存在通液阻力,因此,如果从第三液体的出入口33c及33d中的

任一者供给稀释液,则能够在向膜侧的泄漏较少的状态下,用稀释液置换中空纤维膜组件33中残留的透过液。

[0192] 另一方面,例如,通过在第一液体的出入口33a及第二液体的出入口33b的出口附近的流路上设置未图示的开关阀、并关闭该开关阀,也可以停止第一液体的出入口33a及第二液体的出入口33b的上述液体的流通。在该状态下,通过从第三液体的出入口33c及33d中的任一者供给稀释液,稀释液被从另一个第三液体的出入口33c或33d排出。由此,能够用稀释液置换中空纤维膜组件33中残留的透过液。

[0193] 冲洗处理的时机通过上述第三控制部进行控制。例如,对于在第一液体的出入口33a及第二液体的出入口33b的出口附近的流路中设有未图示的开关阀的情况进行说明,对于第三控制部而言,在第二罐31及上述第三罐32内的上述液量的合计达到由上述第二控制部设定的值以下的情况下,可以以将设置在上述第一液体的出入口33a及上述第二液体的出入口33b的附近的开关阀关闭而使上述液体的流通停止的状态,从中空纤维膜组件33所具有的至少2个上述第三液体的出入口33c及33d中的任一者供给上述第四罐80内的稀释液。此时,设置于与废液罐连接的流路54的开关阀78开放。然后,可以打开设置在上述第一液体的出入口33a及上述第二液体的出入口33b的附近的开关阀,使上述第一液体的出入口33a及上述第二液体的出入口33b处于可流通的状态,从中空纤维膜组件33所具有的至少2个上述第三液体的出入口33c及33d中的任一者供给上述第四罐80内的稀释液,由此进行逆清洗。

[0194] 此时,设置于与废液罐连接的流路54的开关阀78闭合。

[0195] 图11所示的纯化浓缩部30具备回收罐,其回收通过中空纤维膜组件33进行了纯化、浓缩的浓缩液。图11的纯化浓缩部30具备:第五罐81,其通过流路56与中空纤维膜组件33的第一液体的出入口33a连接;和第四控制部140(未图示),其控制第二罐31及第三罐32内的液体向第五罐81的回收。需要说明的是,第五罐81可以连接于中空纤维膜组件33的第二液体的出入口33b。在图11中,流路56为经由流路51A而连接于中空纤维膜组件33的构成。在通过第二罐31及第三罐32进行基于交替切向流过滤的纯化浓缩处理的期间,开关阀79闭合。在纯化浓缩处理后,打开开关阀79并使加压装置34工作,从而将第二罐31及第三罐32内的浓缩液回收至第五罐81。需要说明的是,也可以设为回收浓缩液的罐不配置在纯化浓缩部30内而配置在纯化浓缩装置外的构成。

[0196] (第四控制部)

[0197] 第四控制部140控制对第二罐31、第三罐32内的浓缩液进行回收的时机。图16的流程图中示出了第四控制部140的液体的流通控制中的判断的一例。

[0198] 第四控制部通过罐内液量监测装置35、36和/或照相机判断第二罐31及第三罐32内的浓缩液的液量。浓缩液的液量可以根据后述的管理液面位置C进行判断。在判断纯化浓缩处理结束的情况下,第四控制部140通过加压装置34对第二罐31及第三罐32进行加压。此时,预先关闭排气路53A的开关阀74、排气路53B的开关阀75、开关阀78、三通阀77、77A,打开开关阀79。在罐内液量监测装置35、36检测到透过率的变化的情况下、或者根据上述照相机的影像判断第二罐31及第三罐32内的浓缩液的量为零的情况下,第四控制部140停止加压装置34,结束浓缩液向第五罐81的回收。具体而言,第四控制部140可以通过设置于第五罐81上部的液体的出入口的纤维传感器(未图示)监测流路56内的浓缩液量,在判断上述液量

为零的情况下结束浓缩液的回收。或者,也可以由人手动操作流路56内部的浓缩液回收操作。此外,流路56可以通过气动夹具等固定保持。

[0199] 图12中示出了第一实施方式的纯化浓缩装置的构成例。图12的纯化浓缩装置1中,包含原料供给部10、去除部20及纯化浓缩部30的要素被配置于罩内。在图12的纯化浓缩装置1中,罩的尺寸没有特别限定。另外,纯化浓缩装置1具备管理罩内的清洁度的管理部(未图示)。根据该构成,可以将纯化浓缩装置1内保持清洁,能够防止包含微小有用物质的液体的污染。另外,形成了向罩内供给过滤空气的风扇过滤器装置91配置于罩100的上部(顶部),UV灯92配置于罩100内的构成。通过这些组合,能够进一步提高罩100内的清洁度。

[0200] (风扇过滤器装置)

[0201] 风扇过滤器装置91具有能够将过滤空气供给至罩内的构成。风扇过滤器装置91可以设为内置有预过滤器的带有风扇的过滤器单元。作为预过滤器,可以根据罩100内的清洁度而采用HEPA过滤器、ULPA过滤器、化学过滤器、纤维活性炭过滤器等。

[0202] (UV灯)

[0203] UV灯92只要能够照射UV(紫外线)对罩100内进行灭菌即可,没有特别限定。另外,配置在罩100内的UV灯92的数量也没有特别限定,可以根据罩100内的清洁度而配置2个以上的UV灯。

[0204] (清洁度)

[0205] 在将纯化浓缩装置1设为在各要素配置于罩100内的构成的情况下,可以通过上述的管理部来提高罩100内的清洁度。在一个实施方式中,对于罩100内的清洁度而言,在ISO 14644-1:2015所规定的清洁度等级中,可以管理至达到等级8以下,也可以管理至达到等级5以下。

[0206] (微小有用物质)

[0207] 作为微小有用物质,没有特别限定。在一个实施方式中,可以为平均粒径小于100μm的微小有用物质。另外,在另一个实施方式中,可以为平均分子量为5000以上的微小有用物质。其中,可以采用作为医药品、化妆品、健康食品而有用的所有物质。

[0208] 作为微小有用物质的具体例,可以列举例如:蛋白质(例如,热休克蛋白、细胞骨架蛋白质、膜运输蛋白、跨膜蛋白、胶原蛋白、透明质酸、硫酸软骨素等)、激素、细胞因子、增殖因子、血管新生因子、生长因子、酶、抗体、血浆蛋白、病毒(包含病毒样粒子)、细胞外囊泡(例如,外泌体、微泡(microvesicle)、凋亡小体等)、酵母、酵母菌细胞及微细藻类等生物分子、褐藻糖胶(fucoidan)等多糖类等。

[0209] 此外,也可以举出作为生物分子的一种且可用于生物燃料等的特定的微生物。

[0210] 其中,微小有用物质可以选择细胞外囊泡、抗体、病毒、蛋白质、酶及核酸。

[0211] [微小有用物质纯化浓缩而成的液体的制造方法:第一实施方式]

[0212] 以下,使用图13对使用了本公开的纯化浓缩装置1的微小有用物质纯化浓缩而成的液体的制造方法进行说明。本公开的第一实施方式的制造方法是使用纯化浓缩装置1制造微小有用物质纯化浓缩而成的上述液体的方法,该方法包括:将包含上述微小有用物质的原料液供给至上述纯化浓缩装置而将上述液体中的杂质去除的步骤;和/或,用中空纤维膜将上述液体纯化并浓缩的步骤。

[0213] 图13是示出了本公开的纯化浓缩装置1的整体构成的一例的构成图。原料供给部

10为配置有贮存包含微小有用物质的液体的原料液的容器11的构成。使本装置启动时,三通阀82开放,容器11内的原料液通过基于自重的落下及设于流路41A的泵(未图示)等而被供给至流路59。通过操作三通阀82,原料液被供给至流路41或流路43。第一控制部110基于通过原料液中的杂质的浓度而设定的信息将原料液供给至去除部20或纯化浓缩部30。第一控制部110将三通阀82打开至流路43一侧,将上述培养液从流路43送液至纯化浓缩部30。

[0214] 供给至流路41的原料液在通过过滤构件22被进行了前处理之后,经由流路41C被供给至罐24。罐24内的液量可以通过基于水平传感器(未图示)的液面位置监测进行控制。打开开关阀73时,罐24内的前处理液从流路41D被供给至流路41A。

[0215] (杂质去除处理)

[0216] 供给至载体柱21的前处理液通过载体柱21内的吸附材料将液体内的杂质吸附去除而制成粗纯化液,然后,经由流路42A而被供给至第一罐23。基于载体柱21的杂质去除处理可以将原料液或前处理液内的杂质的浓度降低至1000ppm以下、优选降低至500ppm以下。

[0217] 在一个实施方式中,杂质去除处理可以重复以下步骤:对通过一批次量的原料液处理而达到吸附饱和的载体柱21进行清洗、平衡化处理后,进一步对下一批次量的原料液进行处理。

[0218] 图13的纯化浓缩装置1为具备第六罐25和第七罐26的构成。在对达到吸附饱和的载体柱21进行清洗、平衡化处理的情况下,首先,打开开关阀71A(电磁阀等),经由流路50A将第六罐25内的清洗液供给至过滤构件22A。在通过过滤构件22A去除了清洗液内的杂质之后,从流路41A将清洗液供给至载体柱21。将载体柱21清洗后的清洗液可以通过打开三通阀72而排出至废液罐。需要说明的是,过滤构件22A可以采用与过滤构件22相同的过滤构件。在清洗处理后,打开开关阀71B(电磁阀等),将第七罐26内的平衡化液供给至过滤构件22B。在通过过滤构件22B去除了平衡化液内的杂质之后,从流路41A将平衡化液供给至载体柱21。将载体柱21平衡化后的平衡化液可以通过打开三通阀72而排出至废液罐。需要说明的是,过滤构件22B也可以采用与过滤构件22相同的构件。

[0219] 载体柱21的清洗及平衡化可以通过利用载体柱21进行了处理的原料液的量而任意设定。在一个实施方式中,在处理了载体柱21容量的5~100倍的原料液的情况下,可以进行载体柱21的清洗、平衡化。例如,在处理1000mL的原料液的情况下,可以在每当用载体柱21处理原料液20~150mL时进行载体柱21的清洗、平衡化处理,也可以在每当处理50~100mL时进行清洗、平衡化处理。

[0220] 本公开的制造方法中,优选并行地进行通过载体柱21去除原料液中的杂质的步骤及通过纯化浓缩部30的中空纤维膜将液体纯化、浓缩的步骤。在该情况下,能够更有效地制造微小有用物质纯化浓缩而成的液体。

[0221] 在图13中,粗纯化液经由流路42A而贮存于第一罐23。在判断第二罐31及第三罐32内的第二贮存液及第三贮存液的量达到预先设定的液量的情况下,上述的第一控制部110将贮存于第一罐23的粗纯化液送液至流路42B。通过切换三通阀77的方向,粗纯化液从流路42B被供给至第二罐31。粗纯化液被供给至第二罐31内(或第三罐32内)时,第二控制部120(未图示)使加压装置34工作而开始基于交替切向流过滤的纯化浓缩处理。

[0222] 如上所述,本公开的第一实施方式的纯化浓缩装置1以并行地进行去除部20的杂质去除处理和纯化浓缩部30的纯化浓缩处理的方式构成。在该情况下,优选设为配置有多

个贮存通过各工序进行了处理后的液体的罐的构成。从使纯化浓缩装置1为更紧凑的构成的观点考虑,可以调整各罐的配置位置。例如,在图13的纯化浓缩装置1中,为贮存粗纯化液的第一罐23配置在第二罐31及第三罐32的上方位置的构成,但也可以配置成第二罐31及第三罐32为第一罐23的上方位置。另外,如图13所示,可以以第二罐31及第三罐32的长度方向的侧面与中空纤维膜组件33的长度方向平行的方式配置。

[0223] 以下,对于通过纯化浓缩部30将粗纯化液(或原料液)进行交替切向流过滤时的优选操作进行说明。在一个实施方式中,粗纯化液的纯化浓缩处理优选分为第一处理至第二处理、及第三处理而进行。需要说明的是,在进行第一处理之前,进行罐内的液量的设定。以下,对于设定管理液面位置C之后进行第一处理的例子进行说明。

[0224] (管理液面位置C的设定)

[0225] 在进行第一处理之前,设定管理液面位置C的量。

[0226] 第一罐23内贮存有通过抗体柱21进行了处理后的粗纯化液。管理液面位置C的液量预先设定为与待开始逆清洗处理的液量相等、且成为第一罐23内贮存的粗纯化液的最大容量的1/2～1/200的液量。第二罐31内的粗纯化液达到预先设定的管理液面位置C的量时,可以将第一罐23内的粗纯化液供给至第二罐31。进一步,在粗纯化液被供给至第二罐31之后,第三控制部130将三通阀77A打开至流路55B一侧,将第二罐31从第四罐80供给至稀释液。

[0227] 在设定了管理液面位置C之后,设定第二罐31及第三罐32的液面控制位置。通过加压装置34将第二罐31加压而将第三罐32内的稀释液送液至第二罐31。此时,第二控制部120设定第三罐32的低液面位置(L3),将稀释液供给至第二罐31,直至第三罐32内的稀释液达到L3为止。此外,第二控制部120将第三罐32内的稀释液达到L3时的第二罐31的第二贮存液(粗纯化液与稀释液的混合液)的液面位置设定为高液面位置(H2)。另外,从防止第二贮存液从第二罐31的上部溢出的观点考虑,将高-高液面位置(HH2)设定于高液面位置的上方。接着,第二控制部120通过加压装置34将第二罐31加压而将第二贮存液送液至第三罐32。此时,第二控制部120设定第二罐31的低液面位置(L2),将第二贮存液供给至第三罐32,直至第二罐31内的第二贮存液达到L2为止。此外,第二控制部120将第二罐31达到L2时的第三罐32的液面位置设定为高液面位置(H3)。从防止第三罐32泄漏的观点出发,设定HH3。第二控制部120根据H2及L3、H3及L2的合计液量设定管理液面位置C,在管理液面位置C的范围内使液体移动而进行第二罐31及第三罐32间的交替切向流过滤。需要说明的是,L2、L3可以基于由上述的罐内液量监测装置35、36得到的罐的液体的出入口的透过率的变化而设定,可以基于由照相机得到的液面位置的影像而设定。

[0228] 另外,L2、L3、H2、H3、HH2及HH3的位置可以根据第二罐31、第三罐32的容量及粗纯化液的量而适当设定。

[0229] (纯化浓缩处理:第一处理)

[0230] 接下来,对于纯化浓缩处理中的第一处理进行说明。第二控制部120通过加压装置34对第二罐31及第三罐32交替加压,将第二贮存液及第三贮存液交替供给至中空纤维膜组件33,使得管理液面位置C的液量不降低。通过这样地进行交替切向流过滤,由此实施包含微小有用物质的液体的浓缩纯化操作。透过液经由流路54从第三液体的出入口33c、33d被废弃至废液罐。

[0231] 可以确认第二罐31或第三罐32的液量达到了设定值,将适量的粗纯化液追加供给至第二罐31或第三罐32。

[0232] 此外,优选在第二罐31或第三罐32的液量与管理液面位置C的液量相等时进行逆清洗处理。

[0233] 作为逆清洗处理所使用的稀释液量,可以设为管理液面位置C的液量的2倍～200倍。作为上述的稀释液量,从第二罐31或第三罐32的容积不大于需要量以上的观点出发,优选为管理液面位置C的液量的2倍～20倍。另外,逆清洗处理所使用的稀释液量也可以在每次逆清洗操作时适当变更。此外,作为实施逆清洗处理的时机,在第二罐31或第三罐32的液量与管理液面位置C的液量相等的情况以外也可以适当实施。作为其一例,可以举出:根据压力变动、流量变动的状况而存在透过速度降低的隐患的情况;或者能够判断透过速度的降低倾向的情况、实施用于提前防止中空纤维膜的堵塞的安全操作的情况等。

[0234] 另外,作为稀释处理,也可以将上述稀释液的一部分直接送液至第二罐31或第三罐32。

[0235] 稀释处理所使用的稀释液的量可以在每次稀释操作时适当变更。

[0236] 在一个实施方式中,第二罐31及第三罐32优选以使中空纤维膜组件33的膜面的线速度达到0.3m/秒～2m/秒的方式通过加压装置34进行加压。需要说明的是,“膜面的线速度”是指相对于1m^{2}膜面流动的包含微小有用物质的液体的每1秒钟的流量(m^3),单位为m/秒。通过以使膜面的线速度达到0.3～2.0m/秒的方式利用加压装置34对罐进行加压,易于提高纯化浓缩效率,另外,不会使用于提高膜面速度的压力水平变得过高,施加于微小有用物质的剪断力不会过大,易于防止微小有用物质发生变形。利用加压装置34进行的罐内的加压可以在上述膜面的线速度达到0.5～1.5m/秒的范围内进行。

[0237] 中空纤维膜组件33的运行压力优选调整成液体的入口压力为0.01MPa～0.2MPa,更优选调整为0.02MPa～0.15MPa,进一步优选调整为0.03MPa～0.12MPa。

[0238] 另外,包含微小有用物质的液体的运行时的液体粘度是液温20℃、剪切速度25s^{-1}下的液体粘度,在为10～30mPa·s的情况下,可以使用中空纤维膜的平均内径为1.0mm～1.4mm的粗径中空纤维膜,以便能够使膜面的线速度为0.7～1.4m/秒。对于此时的运行压力而言,优选将液体的入口压力调整为0.08MPa～0.2MPa。

[0239] 为了提高中空纤维膜表面的耐污垢性,和/或,为了提高微小有用物质的回收率,中空纤维膜可以涂敷处理有适当的物质。关于涂敷处理的方法,如上所述。

[0240] 在第一处理中,优选进行纯化浓缩处理,使得粗纯化液的量达到与通过上述的方法预先设定的管理液面位置C的量相等的液量。在纯化浓缩处理之后,第三控制部130从第四罐80供给稀释液。稀释液可以供给至达到管理液面位置C的液量的2倍～200倍的值。即,在第一处理中,可以包括将浓缩液稀释2倍～20倍的步骤。

[0241] 稀释液可以直接供给至第三罐32(稀释处理),也可以从中空纤维膜组件33供给至第二罐31及第三罐32(逆清洗处理)。在进行逆清洗处理的情况下,在图13的纯化浓缩装置1中,将三通阀77A的方向打开至流路55A一侧,从中空纤维膜组件33的第三液体的出入口33c、33d供给稀释液。从中空纤维膜组件33供给的稀释液被供给至第二罐31及第三罐32。通过进行逆清洗处理,可以在回收沉积于中空纤维膜的膜表面的微小有用物质的同时对经浓缩后的液体也进行稀释,因此优选。以下,将通过第一处理得到的液体记载为“第一处理

液”。

[0242] (纯化浓缩处理:第二处理)

[0243] 将第一处理液进一步进行第二处理而得到微小有用物质进一步纯化浓缩而成的液体。

[0244] 由于通过上述的第一处理而降低了第一处理液内的杂质浓度,因此,第二处理优选以使第一处理液内的杂质的量进一步减少(即,提高微小有用物质的纯度)的方式进行处理。在一个实施方式中,第二处理优选重复进行如下的纯化浓缩操作:对于浓缩液的量而言,相对于通过管理液面位置C设定的值,通过逆清洗处理、稀释处理而加入了管理液面位置C的液量的2倍～200倍的稀释液之后,进一步使其达到管理液面位置C的液量。即,在第二处理中,可以包括将浓缩液稀释2倍～20倍的步骤。与第一处理相同,稀释液可以直接供给至第三罐32(稀释处理),也可以从中空纤维膜组件33供给至第二罐31及第三罐32(逆清洗处理)。将纯化浓缩处理和稀释处理组合而成的第二处理优选进行2～20组,更优选进行2～10组。以下,将通过上述的第二处理得到的浓缩液记载为“第二处理液”。

[0245] (纯化浓缩处理:第三处理)

[0246] 也可以将第二处理液进一步进行第三处理而得到微小有用物质进一步纯化浓缩而成的液体。在第三处理中,可以根据需要的程度不使用稀释液而仅实施交替切向流过滤操作。以下,将通过上述的第三处理得到的浓缩液记载为“第三处理液”。

[0247] (回收处理)

[0248] 本公开的制造方法可以包括回收第二处理液或第三处理液的步骤。第二罐31、第三罐32及中空纤维膜组件33内的第二处理液可以通过利用加压装置34进行加压而经由流路56回收至第五罐81。第四控制部140在通过加压装置34进行加压时预先将开关阀79打开,并关闭开关阀74、75、78、三通阀77、77A。如上所述,第四控制部140可以通过设置于第五罐81的上部的液体的出入口的纤维传感器而监测流路56内的浓缩液量,在判断上述液量为零的情况下,可以结束浓缩液的回收。或者,也可以由人手动操作流路56内部的浓缩液回收操作。此外,流路56可以通过气动夹具等固定保持。

[0249] (冲洗处理)

[0250] 在实施逆清洗之前,为了防止中空纤维膜组件中残留的透过液混入逆清洗液而流入浓缩液侧,可以预先用清洗液(稀释液)进行冲洗处理,任选进行用清洗液(稀释液)置换中空纤维膜组件中残留的透过液的操作。关于冲洗处理的方法,如上所述。

[0251] (即将进行回收处理之前的沉积于中空纤维膜面的微小有用物质洗出操作)

[0252] 本公开的制造方法可以包括即将进行回收处理之前的沉积于中空纤维膜面的微小有用物质洗出操作。

[0253] 作为一例,在进行某种培养上清液中的某种细胞外囊泡的浓缩纯化的情况下,在中空纤维膜面比较牢固地沉积的细胞外囊泡不会分散于浓缩液,因此,在上述回收处理中回收率有时降低。因此,可以在即将进行回收处理之前的时机实施通过少量的逆清洗液(稀释液)使沉积于中空纤维膜面的细胞外囊泡再分散于浓缩液中的操作工序。此时,优选充分实施冲洗操作,将所使用的逆清洗液(稀释液)设为少量,作为一例,所使用的逆清洗液(稀释液)容量优选为第一流路的容量的一半量至2倍量。

[0254] 此时的通液速度可以设为与纯化浓缩工序中的通液速度同等。

[0255] [其它实施方式:包含微小有用物质的液体的分步纯化浓缩]

[0256] 本公开的第一实施方式的制造方法中的其它实施方式为一种纯化浓缩液的制造方法,该方法包括包含微小有用物质的液体的分步纯化浓缩。作为分步实施包含微小有用物质的液体的纯化浓缩的方法,可以示例出使用两种以上平均内径的中空纤维膜组件进行两步以上的纯化浓缩处理的情况。具体可以举出如下方法:使用本公开的平均内径为0.6mm～1.0mm的中空纤维膜组件33得到第一步的纯化浓缩液,接着,使用平均内径为1.0mm～1.4mm的中空纤维膜组件装置得到最终的纯化浓缩液。

[0257] [第二实施方式]

[0258] 接下来,使用附图对本公开的纯化浓缩装置的第二实施方式进行说明。需要说明的是,在以下的记载中,具有与第一实施方式相同构成的部分使用相同的符号,省略其详细的说明。

[0259] 图14为示出本公开的第二实施方式的纯化浓缩装置2(以下记载为“纯化浓缩装置2”)的一例的概要构成图。本公开的纯化浓缩装置2包含:原料供给部10、和通过中空纤维膜组件33对从原料供给部10供给的液体进行纯化、浓缩的纯化浓缩部30,中空纤维膜组件33具有用于将上述液体供给至中空纤维膜的第一液体的出入口33a及第二液体的出入口33b、和用于将透过上述中空纤维膜后的上述液体排出的第三液体的出入口33c、33d,纯化浓缩部30具备:第二罐31,其贮存从原料供给部10供给的上述液体,连接有将上述液体供给至上述中空纤维膜组件33的第一液体的出入口33a的流路;第三罐32,其贮存从原料供给部10供给的上述液体,连接有将上述液体供给至中空纤维膜组件33的第二液体的出入口33b的流路;加压装置34,其选择性地对第二罐31及第三罐32中的任一者进行加压;第二控制部(未图示),其以通过加压装置34选择性地对第二罐31或第三罐32内进行加压、将第二罐31及第三罐32内的上述液体交替地供给至中空纤维膜组件33的方式进行控制;监测装置(未图示),其监测第二罐31及第三罐32内的上述液体的量,上述第二控制部以设定第二罐31及第二罐31内的液量、并使第二罐31及第三罐32内的液量达到设定的值的方式通过加压装置34对第二罐31及第三罐32交替地进行加压,第二罐31及第三罐32内的上述液量基于上述监测装置的信息而判断。

[0260] 本公开的纯化浓缩装置2有时包含概要构成图中省略的阀门、自动阀、逆流防止阀、孔口、流量计、压力计、液位计、破裂板等安全装置、有害物处理设备、压力调整设备、中间槽、可用于取样、多步分子量分离操作等的截除设备等。

[0261] 此外,纯化浓缩装置2中的监测装置可以根据装置尺度(规模)等而适当地单独使用机械式或反射式等的公知的液面计(液位计)、测力传感器等重量监测装置、累计流量计装置,或者组合使用多种。

[0262] 图14的纯化浓缩装置2为不具有纯化浓缩装置1的去除部20的构成。纯化浓缩装置2作为能够通过自动控制将微小有用物质纯化浓缩的装置也是有用的。根据该构成,原料供给部10内的原料液经由流路201被直接供给至纯化浓缩部30的第二罐31(或第三罐32)。图14的纯化浓缩装置2作为原料液中的杂质浓度非常低的包含高纯度的微小有用物质的原料液的纯化浓缩装置是有用的。图1～图13所示的纯化浓缩装置1具有去除部20和纯化浓缩部30,且可以并行地进行去除部20的杂质去除处理和纯化浓缩部30的纯化浓缩处理。即,纯化浓缩装置1是能够更有效地制备微小有用物质纯化浓缩而成的浓缩液的装置。另一方面,纯

化浓缩装置2不具有去除部20,可以将原料液从原料供给部10直接供给至纯化浓缩部30而进行原料液的纯化浓缩处理。因此,纯化浓缩装置2作为用于将由纯化浓缩装置1制备的纯化浓缩液进一步进行纯化浓缩的装置也是有用的。

[0263] 另外,通过连接2个纯化浓缩装置2,能够进行3种分子量分级。“能够进行3种分子量分级”是指看,能够将第一膜的透过液和第一膜的浓缩液送至第二膜,分级成透过液和浓缩液。第二膜的透过液可以通过第一膜进行浓缩,第一膜的透过液可以通过另外的膜、另外的浓缩装置进行浓缩。在一个实施方式中,纯化浓缩装置2可以作为用于将由纯化浓缩装置1制备的纯化浓缩液分级成低分子量(例如,截留分子量为1万~10万的微小有用物质)和高分子量(截留分子量为大于10万的微小有用物质)的装置而使用。

[0264] 在图14的纯化浓缩装置2中,第二罐31及第三罐32可以设为与纯化浓缩装置1相同的构成。对于纯化浓缩装置2而言,例如,从设想使用通过纯化浓缩装置1这样的装置制备的浓缩液作为原料液的方面出发,第二罐31及第三罐32的容积可以设为小于纯化浓缩装置1的第二罐31、第三罐32。另外,上述罐可以设为大于纯化浓缩装置1的罐。另外,也可以省略第一罐23。此外,在与纯化浓缩装置1同样地通过纤维传感器等管理第二罐31或第三罐32的液体的出入口的透明部分的液位的情况下,第二罐31及第三罐32的原材料可以使用不透明的材料、例如金属制、纤维增强树脂制的罐。

[0265] 在图14的纯化浓缩装置2中,移液装置不仅仅限定于通过加压装置34进行,也可以通过单独或组合使用了泵送液、利用势能的送液的送液装置来进行。

[0266] 为了在移液中使用势能,也可以经由升降装置等控制第二罐31及第三罐32内的液面的高度、适当变更液体的出入口的高度的位置。

[0267] 图14的纯化浓缩装置2中,为了抑制第二罐31或第三罐32的液体的起泡,在液体的入口的高度的位置高于液面的情况下,可以以不卷入罐上部的气体的方式适当调整配管径、送液流量、或设置能够自动调整配管出口距液面的高度的设备、消泡/脱泡设备等,也可以根据情况而添加适当的消泡剂。

[0268] 在图14的纯化浓缩装置2中,为了提高中空纤维膜表面的耐污垢性、和/或提高纯化浓缩效率、细胞外囊泡的回收率,中空纤维膜组件33内的中空纤维膜可以通过与纯化浓缩装置1相同的方法用适当的物质进行涂敷处理。

[0269] 在图14的纯化浓缩装置2中,中空纤维膜组件33内的中空纤维膜的平均内径可以通过液体的粘度而适当调整。在一个实施方式中,中空纤维膜的平均内径可以为0.2~2.0mm。与上述的纯化浓缩装置1同样地,在液体粘度高的情况(例如,液温20℃、剪切速度25s^{-1}下的液体粘度为10~30mPa·s的情况)下,优选使用平均内径为1.0mm~1.4mm的粗径中空纤维膜。另外,在包含微小有用物质的液体的运行时的液体粘度低的情况(例如,液温20℃、剪切速度25s^{-1}下的液体粘度低于10mPa·s的情况)下,优选使用平均内径为0.2mm~1.0mm的中空纤维膜。需要说明的是,如果中空纤维膜的平均内径大,则在使用上述中空纤维膜作为中空纤维膜组件的情况下,有效膜面积容易降低。因此,从易于抑制制成中空纤维膜组件时的有效膜面积的降低的观点出发,优选使用平均内径为0.2mm~1.0mm的中空纤维膜。

[0270] 在图14的纯化浓缩装置2中,除了图示的要素以外,可以具有与图1~13的纯化浓缩装置1相同的要素。例如,在图14的纯化浓缩装置2中,监测第二罐31及第三罐32内的液量

的监测装置可以具备上述的罐内液量监测装置35、36和/或照相机。纯化浓缩装置2的第二控制部也可以设为与纯化浓缩装置1的第二控制部120相同的构成。即,第二控制部可以基于罐内液量监测装置35、36所具备的光传感器检测到的光的透过率的变化来掌握罐内的液量,确定通过加压装置34进行加压的罐。另外,第二控制部可以根据由照相机输出的液面位置的信息来掌握罐内的液量,确定通过加压装置34进行加压的罐。在纯化浓缩装置2中,上述监测装置优选具备罐内液量监测装置35、36。

[0271] 如上所述,在纯化浓缩装置2中,移液装置不仅仅限定于加压装置,也可以单独或组合使用利用泵送液、势能的送液来进行。在该情况下,第二控制部可以以经由升降装置等控制第二罐31及第三罐32内的液面的高度的方式构成,也可以以控制液体的出入口的高度的位置的方式构成。通过这样的构成,第二控制部可以以将上述第二罐及上述第三罐内的上述液体选择性地供给至上述中空纤维膜组件的方式控制送液装置。

[0272] 图14的纯化浓缩装置2中的纯化浓缩部30可以设为具备清洗罐的构成,该清洗罐将稀释液供给至中空纤维膜组件33而对中空纤维膜束60内的多个中空纤维膜进行清洗。即,纯化浓缩装置2的纯化浓缩部30可以具备第四罐(图10的符号80),其贮存稀释液,连接有从中空纤维膜组件33的第三液体的出入口33c、33d供给上述稀释液的流路。另外,可以具备与纯化浓缩装置1相同的第三控制部130。即,在第二罐31及第三罐32内的液量的合计为通过第二控制部设定的值以下的情况下,纯化浓缩装置2中的第三控制部可以从中空纤维膜组件33的第三液体的出入口33c、33d供给第四罐的稀释液。根据该构成,能够一边回收沉积于中空纤维膜内部的膜表面的微小有用物质,一边将原料液进行纯化浓缩。另外,第四罐可以与第二罐31或第三罐32连接。

[0273] 在纯化浓缩装置2中,与纯化浓缩装置1同样地,在将稀释液供给(逆清洗)至中空纤维膜组件33之前,为了防止中空纤维膜组件33中残留的透过液混入逆清洗液而流入浓缩液一侧,可以任意地进行用清洗液(稀释液)预先进行冲洗、用清洗液(稀释液)置换中空纤维膜组件中残留的透过液的操作。

[0274] 图14的纯化浓缩装置2中的纯化浓缩部30可以具备用于回收第二罐31、第三罐32及中空纤维膜组件33内的浓缩液的第五罐81。另外,可以具备控制浓缩液向第五罐81的回收的第四控制部。这些第五罐81及第四控制部的构成可以设为与纯化浓缩装置1相同的构成。

[0275] 作为通过第二实施方式的纯化浓缩装置纯化浓缩的微小有用物质,可以与纯化浓缩装置1中说明的物质相同,也可以不同。通过第二实施方式的纯化浓缩装置纯化浓缩的微小有用物质可以包含电活性高分子、稀有金属胶体粒子、颜料、染料、无机或有机纳米粒子等工业用途中的微小有用物质。一般而言,在对包含这些工业用途中的微小有用物质的液体进行纯化浓缩处理的情况下,不需要进行液体内的杂质去除处理。因此,可以适宜地使用本公开的第二实施方式的装置。

[0276] [微小有用物质纯化浓缩而成的液体的制造方法:第二实施方式]

[0277] 作为使用了本公开的纯化浓缩装置2的微小有用物质纯化浓缩而成的液体的制造方法,可以示例出在使用了上述的纯化浓缩装置1的情况的制造方法中省略了杂质去除处理的工序的方法。需要说明的是,纯化浓缩装置2为不具有去除部20的构成,但有时包括使用了精密过滤膜等的预过滤处理、凝聚沉淀处理等前处理工序。

[0278] 在图14的纯化浓缩装置2中,将原料液投入原料供给部10内的容器等之后打开开关阀210时,原料液经由流路201被供给至第二罐31(或第三罐32)。供给至第二罐31(或第三罐32)内的原料液通过交替切向流过滤而被纯化浓缩。在纯化浓缩处理之后,将罐内及中空纤维膜组件内的浓缩液回收至第五罐81。

[0279] [其它实施方式:微小有用物质的分子量分级及纯化浓缩]

[0280] 本公开的第二实施方式的制造方法中的其它实施方式为一种纯化浓缩液的制造方法,该方法包括微小有用物质的分子量分级及纯化浓缩处理。作为实施将微小有用物质分子量分级为两种以上成分、和进行各液体的浓缩纯化的方法,可以示例出将2个以上具备两种以上截留分子量的中空纤维膜组件的本公开的纯化浓缩装置2连接的方法、或者进行两步以上的纯化浓缩处理的方法。

[0281] 具体而言,在制造包含分子量分布宽广的硫酸软骨素的液体的纯化浓缩液的情况下,可以通过连接截留分子量1万的装置和截留分子量7万的装置、或进行两步以上的纯化浓缩操作,从而得到具有3个分子量分布的硫酸软骨素的纯化(分子量纯化)浓缩液。在该情况下,截留分子量小于1万的成分的浓缩可以对在截留分子量1万的装置的透过液利用膜分离装置以外的装置进行浓缩,也可以利用NF膜浓缩装置(例如,使用了日本专利7021400号公报所记载的膜的装置)进行浓缩。

[0282] 实施例

[0283] 以下,示出实施例对本发明详细地进行说明,但本发明不受以下记载的限定。

[0284] <中空纤维膜组件33的制作>

[0285] 将平均内径0.8mm、平均外径1.3mm、截留分子量30万的乙酸纤维素(CA)制的中空纤维膜(DAICEN MEMBRANE-SYSTEMS公司制)75根集束而成的中空纤维膜束60容纳于聚碳酸酯制的筒状容器61,制成了图7中记载的内压式中空纤维膜组件。中空纤维膜组件33的0.1MPa下的纯水透过流量为28.8L/Hr。另外,通过以下的测定方法测得的γ-球蛋白透过率为54%,中空纤维膜的有效长度为17cm,有效膜面积为0.0312m^2,中空纤维膜的填充率为30%。

[0286] (γ-球蛋白透过率测定)

[0287] 使用图15的γ-球蛋白透过率测定装置300、通过以下的操作测定了γ-球蛋白透过率。

[0288] 1)将γ-球蛋白水溶液(γ-球蛋白浓度100ppm)投入罐302。

[0289] 2)将中空纤维膜303连接于流路305。

[0290] 3)从阀门V-1注入氮气,对罐302施加了0.1MPa的压力。从中空纤维膜303的内表面朝向外表面对上述水溶液进行过滤,将过滤液废弃至容器307,将透过液回收至容器306。需要说明的是,废弃初期的透过液(约100mL),将随后排出的透过液作为透过率测定用样品。

[0291] 通过装置300制成透过液的样品之后,通过以下的方法测定了γ-球蛋白透过率。

[0292] 4)使用分光光度计(株式会社岛津制作所制、产品名"UV2450")测定γ-球蛋白水溶液(100ppm)的280nm的吸光度(A1)和透过液的280nm的吸光度(A2),通过计算式(A2/A1×100)计算出了γ-球蛋白透过率(%)。

[0293] <纯化浓缩装置1>

[0294] 以下,对使用了图13的纯化浓缩装置1的情况的具体操作进行说明。

[0295] 将包含原料供给部10、去除部20、纯化浓缩部30的要素配置于宽度800mm、深度350mm、高度1745mm的罩100(未图示)内。

[0296] 在纯化浓缩装置1的顶部配置风扇过滤器装置91(AS ONE公司制、产品名“PURE SPACE 01”、带有ULPA过滤器单元、风量1m^3/min)(未图示),设为过滤空气向下流动至罩100内的构成。

[0297] 另外,在罩100内安装4盏UV灯92(大和电机产业株式会社制、辉光式灭菌灯)(未图示)。

[0298] 在纯化浓缩装置1的底部安装带有自由挡块的移动脚轮(未图示)。

[0299] 在纯化浓缩装置1的前面配置门(未图示),在上述门安装管理纯化浓缩装置1的工序的触摸面板(KEYENCE公司制、产品名“触摸面板显示器型号:VT-W4M”)(未图示)。

[0300] 在纯化浓缩装置1配置压缩空气的导入口(未图示)和DC电源(未图示)。压缩空气通过调节器减压至0.05MPa,为了进行载体柱21的清洗、平衡化处理、杂质去除处理、纯化浓缩处理、逆清洗处理,经由多个开关阀(二通电磁阀)、三通阀(三通电磁阀)、电磁阀歧管进行液体的供给目的地的切换、供给的控制。另外,通过调节器减压至0.3MPa的压缩空气也用于回收浓缩液时的气动夹具。

[0301] (原料供给部10)

[0302] 配置贮存原料液的容器11。

[0303] (去除部20)

[0304] 载体柱21设为在内径25mmφ的柱内封入有吸附材料载体(Cytiva制、产品名“CaptoTMCore 700”(17548101))5mL的构成。

[0305] 作为过滤构件22,使用精密过滤膜(Millipore公司制、产品名“Millex-GP”、材质:聚醚砜、孔径:0.22μm)。

[0306] 将作为清洗液的2M氯化钠水溶液投入第六罐25。

[0307] 将作为平衡化液的50mM Tris-HCl(pH7.2)溶液投入第七罐26。

[0308] 如图13所示,以经由多个开关阀(电磁阀)从罐24、第六罐25、第七罐26经过流路41A向载体柱21供给液体的方式构成。在流路41A中配置管泵(未图示)。

[0309] (纯化浓缩部30)

[0310] 作为中空纤维膜,使用上述制作的中空纤维膜组件33。

[0311] 第二罐31、第三罐32使用了聚(甲基)丙烯酸酯制的透明容器(容量120mL)。在第二罐31及第二罐31底部的液体的出入口配置包含光传感器的罐内液量监测装置35、36(KEYENCE公司制、管路安装型液面检测纤维单元(型号:FU-95S))。

[0312] 将作为稀释液的磷酸缓冲液(PBS)投入第四罐80。

[0313] [实施例1]

[0314] 作为原料液,将通过下述方法制备的包含外泌体的间充质干细胞的培养上清液800mL投入容器11。

[0315] ＜包含外泌体的间充质干细胞的培养上清液的制备＞

[0316] 对于人脂肪组织来源的间充质干细胞而言,使用Ultra ExoMCulture Medium for Extracellular Vesicles(FK-K0204024,Santeja)进行培养。

[0317] 在细胞覆盖了培养容器贴壁面的约80％的状态下,更换为不含酚红的Ultra ExoM

CultureMedium,进行48小时培养。

[0318] 然后,将培养上清液以离心力2000×g在10分钟、4℃的条件下进行离心,去除细胞碎片,制备培养上清液。

[0319] 将容器11内的原料液供给至过滤构件22进行全部量的前处理,然后贮存于罐24(前处理液贮存罐)。

[0320] 接着,从第六罐25(清洗液贮存罐)以5mL/分将清洗液50mL供给至载体柱21,对载体柱21进行了清洗之后,将清洗液排出至废液罐。然后,从第七罐26(平衡化液贮存罐)以5mL/分将平衡化液50mL供给至载体柱21,将载体柱21进行了平衡化之后,将平衡化液排出至废液罐。

[0321] ＜杂质去除处理＞

[0322] 将罐24内的前处理液50mL供给至载体柱21,通过载体吸附去除前处理液中的宿主来源蛋白质(HCPs)、DNA等。将得到的粗纯化液经由流路42A供给至第一罐23。然后,在与上述相同的条件下实施第2次载体柱21的清洗、平衡化处理。第2次清洗、平衡化处理之后,将罐24内的前处理液50mL供给至载体柱21实施第2次杂质去除处理。然后,同样地进行第3次载体柱21的清洗、平衡化处理和第3次杂质去除处理。接着,进行第4～16次载体柱21的清洗、平衡化处理和第4～16次杂质去除处理。

[0323] ＜纯化浓缩处理＞

[0324] 并行地进行杂质去除处理和纯化浓缩处理。

[0325] 首先,利用0.05MPa的压缩空气将通过第1～4次杂质去除处理而贮存的第一罐23内的粗纯化液(约200mL)送液至第二罐31。此时,首先将第1次的粗纯化液(约50mL)送液至第二罐31后,通过加压装置34对第二罐31进行加压,将管理液面位置C的液量设定为10mL,以使第二罐31的液量不低于10mL的方式实施基于交替切向流过滤(TFF)的纯化浓缩处理。然后,依次将第2～4次的粗纯化液送液至第二罐31,并且以使第二罐31的液量不低于10mL的方式继续进行基于交替切向流过滤(TFF)的纯化浓缩处理。

[0326] 接下来,进行逆清洗处理。逆清洗处理使用稀释液90mL。另外,稀释液使用磷酸缓冲液(PSB)。利用稀释液进行了逆清洗处理之后,以第二罐31的液量不低于10mL的方式进行基于交替切向流过滤(TFF)的纯化浓缩处理。然后,将通过第5～8次的杂质去除处理得到的粗纯化液、第9～12次的粗纯化液、以及第13～16次的粗纯化液分别注满第二罐31,并且进行纯化浓缩处理和逆清洗处理。需要说明的是,每当上述的逆清洗处理后的粗纯化液的送液量得到200mL时实施逆清洗处理,纯化浓缩处理以第二罐31的液量不低于10mL的方式进行交替切向流过滤(TFF)。在进行共计800mL的粗纯化液的纯化浓缩处理及逆清洗处理、第二罐31的液量达到10mL之后,重复3次将稀释液量设为90mL(10倍稀释)的逆清洗处理和纯化浓缩处理,得到外泌体的纯化浓缩液。

[0327] ＜回收处理＞

[0328] 得到的外泌体的纯化浓缩液经由流路56被全部量回收至第五罐81。浓缩液的回收处理通过设置于第五罐81的上部的液体的出入口的纤维传感器监测流路56内的浓缩液量,在纤维传感器探测到气泡的阶段之前将2个罐内的浓缩液回收至第五罐81。此时得到的外泌体纯化浓缩液的产量为0.8～80mL,外泌体回收率为50～100％。另外,设想蛋白质去除率为80％以上。

[0329] [实施例2]

[0330] 作为原料液,使用了人脂肪组织来源的间充质干细胞培养上清液800mL。分别通过Bradford法、ELISA法对培养上清液中的蛋白质浓度、CD9/CD63阳性细胞外囊泡进行了定量,结果是蛋白质浓度为0.49mg/mL、152pg/mL。

[0331] 相对于上述培养上清液,添加使用50mM Tris-HCl(pH 7.2)溶液进行了平衡化的具有阳离子交换和尺寸排除的混合模式载体80mL,分注于50mL管后,使用旋转器在室温下以10rpm/min的旋转速度倾倒混合10分钟。然后,在室温下以10000xg离心5分钟,进一步使用0.22μm过滤单元对上清液进行过滤,由此去除了载体。得到的完成了载体处理后的培养上清液790mL中的蛋白质浓度为0.06mg/mL,外泌体浓度为144pg/mL。

[0332] 接着,将经载体处理后的培养上清液从容器11经由流路43供给至第二罐31,将加压装置34的加压条件设为氮气气压0.04MPa,进行了交替切向流过滤。在残留量达到10mL时,为了进行逆清洗,由第四罐80将90mL的磷酸缓冲液(PBS)从中空纤维膜组件33一侧供给。然后,进一步重复2次交替切向流过滤和90mL的磷酸缓冲液的供给之后,通过交替切向流过滤而得到了12.9mL的纯化浓缩液。得到的纯化浓缩液的蛋白质浓度为0.09mg/mL,外泌体浓度为7149pg/mL。根据浓度和液量计算出的蛋白质去除率为99%以上,回收率为76%。

[0333] [比较例1]

[0334] 作为比较例1,使用蛋白质浓度0.52mg/mL、外泌体浓度130pg/mL的培养上清液800mL作为原料液,从容器11经由流路43将上述原料液供给至第二罐31,进行了基于交替切向流过滤的纯化浓缩处理。需要说明的是,在比较例1中,通过顺清洗而不是逆清洗进行了过程中的清洗工序,除此以外,在与实施例2相同的条件下进行了纯化浓缩处理。顺清洗通过将第四罐80内的稀释液经由流路55B供给至第三罐32后将稀释液供给至中空纤维膜组件33对中空纤维膜进行清洗而实施。最终得到了11mL的纯化浓缩液。另外,纯化浓缩液中的蛋白质浓度为0.02mg/mL以下,外泌体浓度为2595pg/mL。根据浓度和液量计算出的蛋白质去除率为99%以上,回收率为27%。根据该结果可知,通过进行逆清洗可提高回收率。

[0335] [实施例3]

[0336] 这里,对于通过在纯化浓缩工序中用生物分子对中空纤维膜的表面进行涂敷处理而进一步提高微小有用物质的回收率的方法进行了探讨。

[0337] 作为原料液,使用了蛋白质浓度0.49mg/mL、外泌体浓度166.4pg/mL的间充质干细胞的培养上清液790mL。

[0338] 外泌体的浓度是相当于用CD9/CD63 ELISA法(EXH0102EL、Cosmo Bio)进行定量分析时制作校准曲线所使用的CD9/CD63融合标准蛋白的量。

[0339] 相对于培养上清液790mL,添加用50mM Tris-HCl(pH 7.2)溶液进行了平衡化的载体(细孔内部为带正电的多孔粒状物,能够吸附保持除细胞外囊泡以外的带负电的不需要物质的吸附剂)79mL,使用旋转器在室温下倒置混合10分钟。然后,使用0.22μm过滤单元(S2GPU11RE,Merck Millipore)从载体-细胞上清混合液去除载体,得到了经载体处理后的培养上清液。

[0340] 接下来,通过过滤压力30~40kPa的交替切向流方式对经载体处理后的培养上清液进行了过滤、纯化及浓缩。过滤膜使用了乙酸纤维素制中空纤维膜组件(截留分子量30万、膜面积0.062m^2)。上述过滤膜使用了用生物分子对膜表面进行了涂敷处理的过滤膜。涂

敷处理通过使溶解于PBS的1.3mg/mL的脱脂乳溶液以200mL/分的通液速度对上述过滤膜通液10分钟而进行。由此,得到了在膜表面以薄层的形式吸附结合有脱脂乳中的某种生物分子的涂敷处理膜。然后,用250mL的PBS对过滤膜进行通水清洗,将仅在薄层上沉积的多余的脱脂乳去除。

[0341] 这里,对于上述过滤膜与脱脂乳中的某种生物分子的结合状态而言,牢固地结合至了在水洗及运行操作条件下不会脱落、且即使进一步长期运行也基本上没有过滤性能降低的程度。

[0342] 重复交替切向流过滤直至浓缩液的液量达到10mL为止,然后,将90mL的PBS供给至中空纤维膜组件,由此对浓缩液进行了稀释。进一步重复2次该浓缩过滤/稀释工序之后,通过交替切向流过滤得到了11.9mL的纯化浓缩液(细胞外囊泡纯化物)。通过CD9/CD63 ELISA法(EXH0102EL、Cosmo Bio)对最终得到的外泌体的浓缩液中的细胞外囊泡进行了定量分析,结果是以相当于制作校准曲线所使用的CD9/CD63融合标准蛋白的量计为3746.7pg/mL,回收率为33.9%。

[0343] [比较例2]

[0344] 使用未进行基于脱脂乳的涂敷的中空纤维膜进行了同样的操作,结果是回收率为7.4%。

[0345] 根据实施例3及比较例2的结果可知,通过使用利用生物分子进行了涂敷处理的中空纤维膜(即,在至少一部分区域上附着有与微小有用物质不同种类的生物分子的中空纤维膜),微小有用物质的回收率提高。

[0346] [实施例4]

[0347] 这里,对于进一步提高在纯化浓缩工序中得到的纯化浓缩液中的微小有用物质的纯度的方法进行了探讨。

[0348] 作为原料液,使用了蛋白质浓度1.49mg/mL、外泌体浓度196pg/mL的羊膜来源的间充质干细胞的培养上清液40mL。使用搭载有乙酸纤维素制中空纤维膜组件33(截留分子量30万、膜面积0.01m^2、透过侧容积(即中空纤维外部空间(ECS:Extracapillary Space)10mL)的纯化浓缩装置,以过滤压力30~40kPa的交替切向流方式对培养上清液中的外泌体进行了分离纯化及浓缩。将培养上清液浓缩至约10mL之后,将稀释液(PBS)40mL从中空纤维膜组件的第三液体的出入口33c注入,向第三液体的出入口33d排出。由此,通过PBS对滞留在ECS内的透过液中的杂质进行了冲洗。然后,将相同的稀释液(PBS)90mL从中空纤维膜组件33的透过侧压入浓缩侧,进行了逆压清洗(逆洗)。再次以相同的条件进行分离纯化操作,进一步实施了2次在培养上清液达到约10mL的时刻进行同样的冲洗和逆洗的操作。进行了3次逆洗之后,将培养上清液浓缩至5.5mL。通过BCA assay测定了得到的纯化浓缩液中的蛋白质残留量,结果是蛋白质浓度为0.16mg/mL。将结果示于图17。另外,对于得到的纯化浓缩液,使用TECAN制吸光酶标仪Infinite M Nano+测定了吸光度。将结果示于图18。

[0349] [比较例3]

[0350] 在与实施例4相同的分离纯化操作中,不进行基于PBS的ECS内的冲洗操作,将培养上清液浓缩至了5.2mL。通过BCA assay测定了得到的纯化浓缩液中的蛋白质残留量,结果是蛋白质浓度为0.36mg/mL。将结果示于图17。另外,对于得到的纯化浓缩液,与实施例4同样地测定了吸光度。将结果示于图18。

[0351] 在图17、18中,“Before”是指纯化浓缩处理前的试样,“有ECF”表示通过实施例4的方法得到的纯化浓缩液,“无ECS”表示通过比较例3的方法得到的纯化浓缩液。根据图17可以明确,根据实施例4的方法,作为杂质的蛋白质浓度进一步降低,能够进一步提高外泌体的纯度。在图18中,波长557nm附近的峰是来自于作为pH指示剂而包含在培养液中的酚红的峰,相当于纯化浓缩液中的杂质。如图18所示,根据实施例4的方法,作为杂质的酚红的浓度进一步降低,能够进一步提高外泌体的纯度。

[0352] 根据这些结果可知,通过在中空纤维膜组件的逆清洗工序之前用PBS、生理盐水等稀释液清洗(冲洗)ECS内而将残留在ECS内的杂质去除,能够进一步降低得到的纯化浓缩液中的杂质的浓度,其结果是可以进一步提高微小有用物质的纯度。作为非限定的理由,可以认为其原因在于,通过进行冲洗,能够防止在随后的利用稀释液进行的逆洗工序中ECS内的杂质再混入纯化浓缩液。

[0353] [实施例5]

[0354] 作为原料液,使用了蛋白质浓度1.25mg/mL、外泌体浓度138pg/mL的羊膜来源的间充质干细胞的培养上清液200mL。使用搭载有乙酸纤维素制中空纤维膜组件(截留分子量30万、膜面积0.01m^2、ESC10mL)的纯化浓缩装置,通过交替切向流方式对培养上清液中的外泌体进行了分离纯化及浓缩。将培养上清液浓缩至约17mL之后,将稀释液(PBS)40mL从中空纤维膜组件的第三液体的出入口33c注入,向第三液体的出入口33d排出。由此,通过PBS对滞留在ECS内的透过液中的杂质进行了冲洗。然后,将相同的稀释液(PBS)160mL从中空纤维膜组件33的透过侧压入浓缩侧,进行了逆压清洗(逆洗)。再次以同样的条件进行分离纯化操作,进一步实施了2次在培养上清液达到约17mL的时刻进行同样的冲洗和逆洗的操作。将逆洗后的培养上清液浓缩至17mL。再次进行逆洗,在纯化浓缩液中洗出附着于中空纤维膜表面的微小有用物质,回收了纯化浓缩液50mL。通过CD9/CD63 ELISA法(EXH0102EL、Cosmo Bio)对得到的纯化浓缩液中的细胞外囊泡进行了定量分析,结果是以相当于制作校准曲线所使用的CD9/CD63融合标准蛋白的量计为486pg/mL,回收率为88%。根据该结果可知,通过在即将回收纯化浓缩液之前向中空纤维膜组件进一步供给稀释液而进行微小有用物质的洗出操作,能够使微小有用物质的回收率达到80%以上。

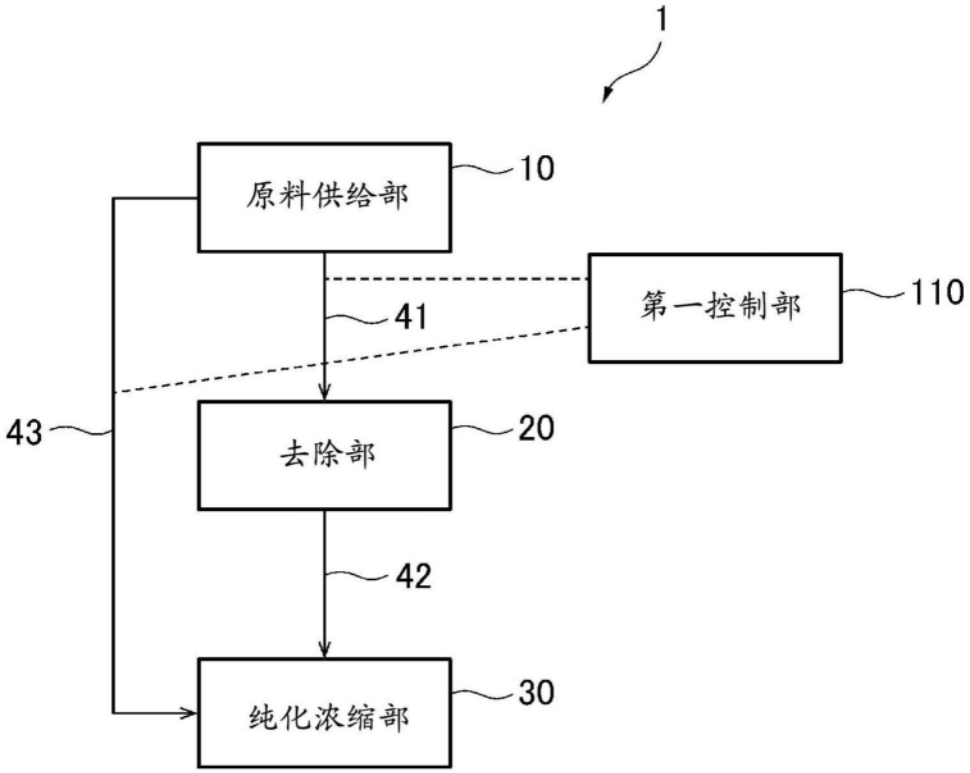


图1

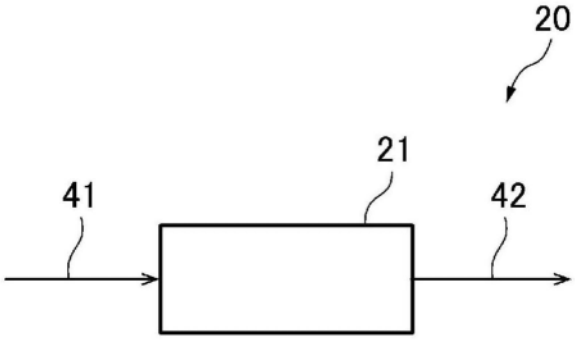


图2

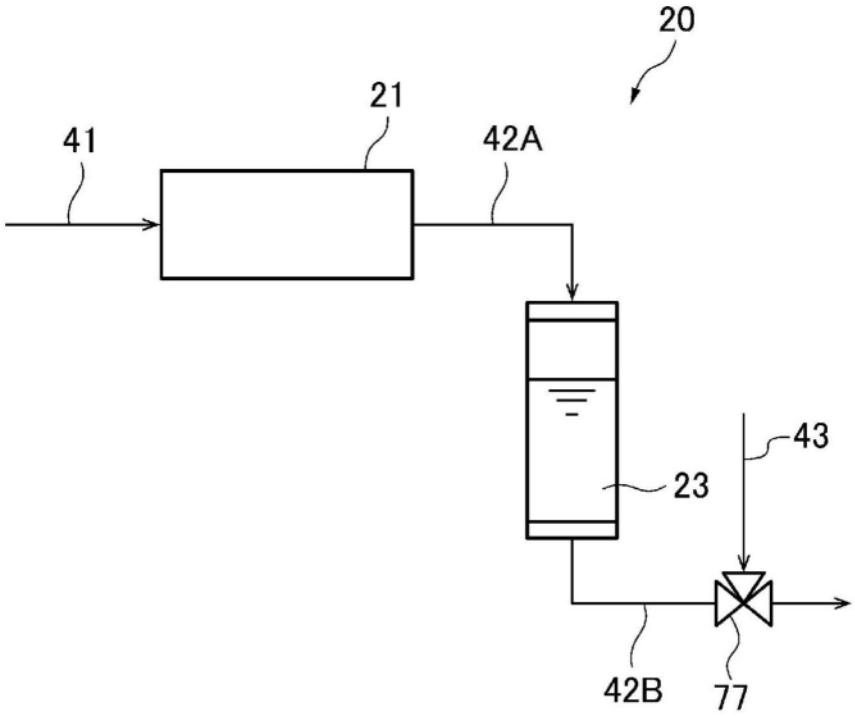


图3

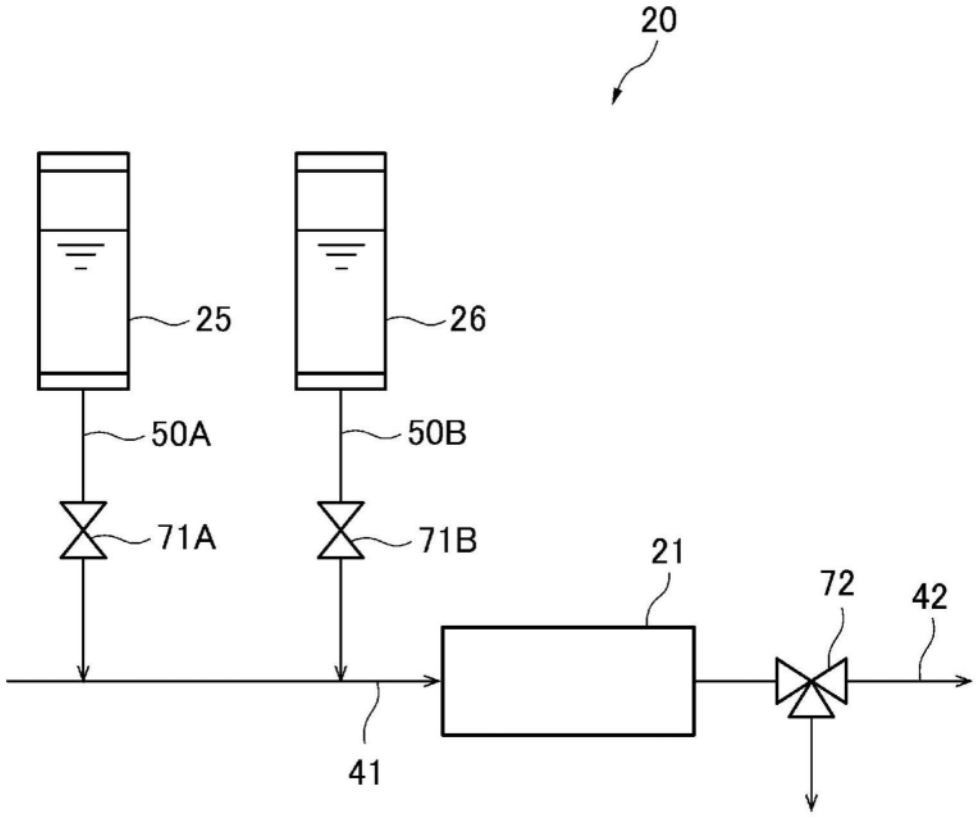


图4

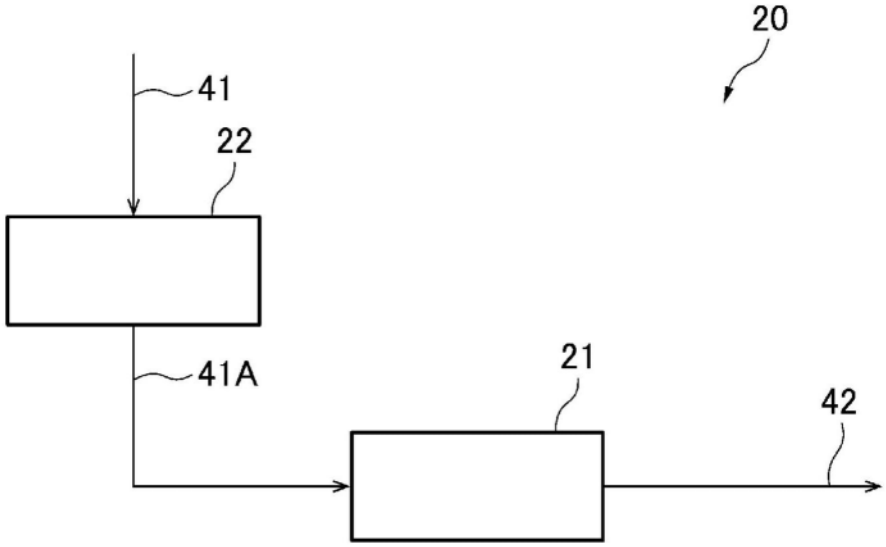


图5

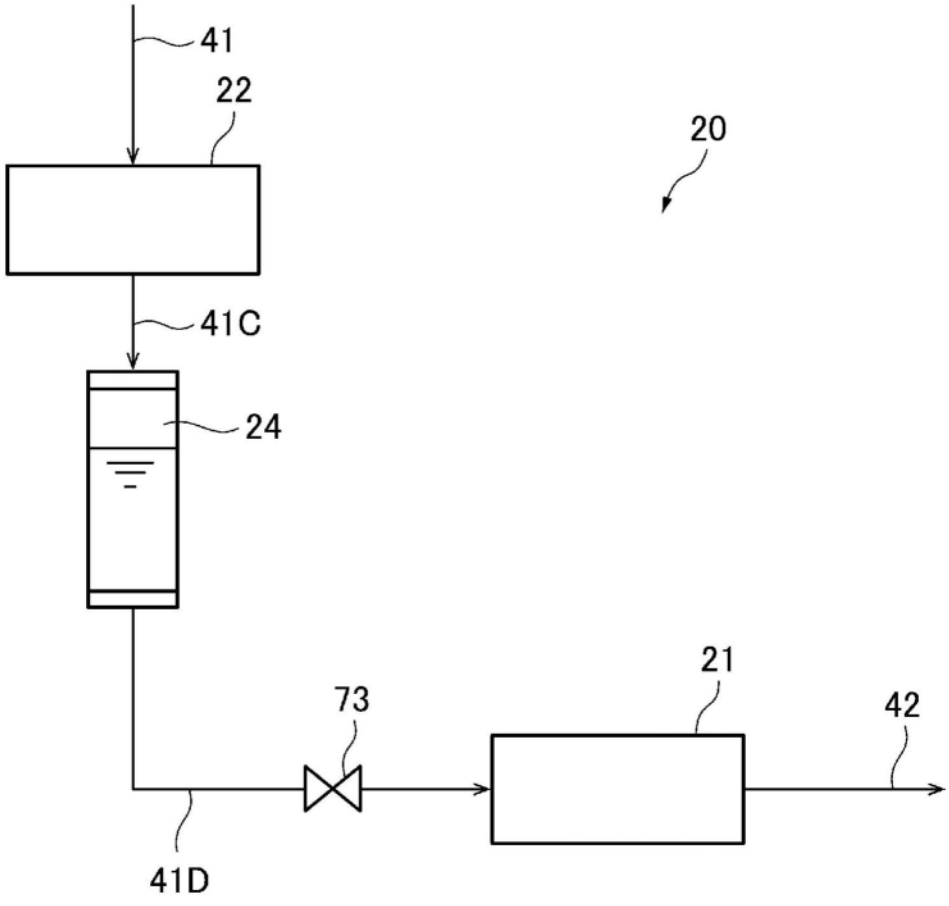


图6

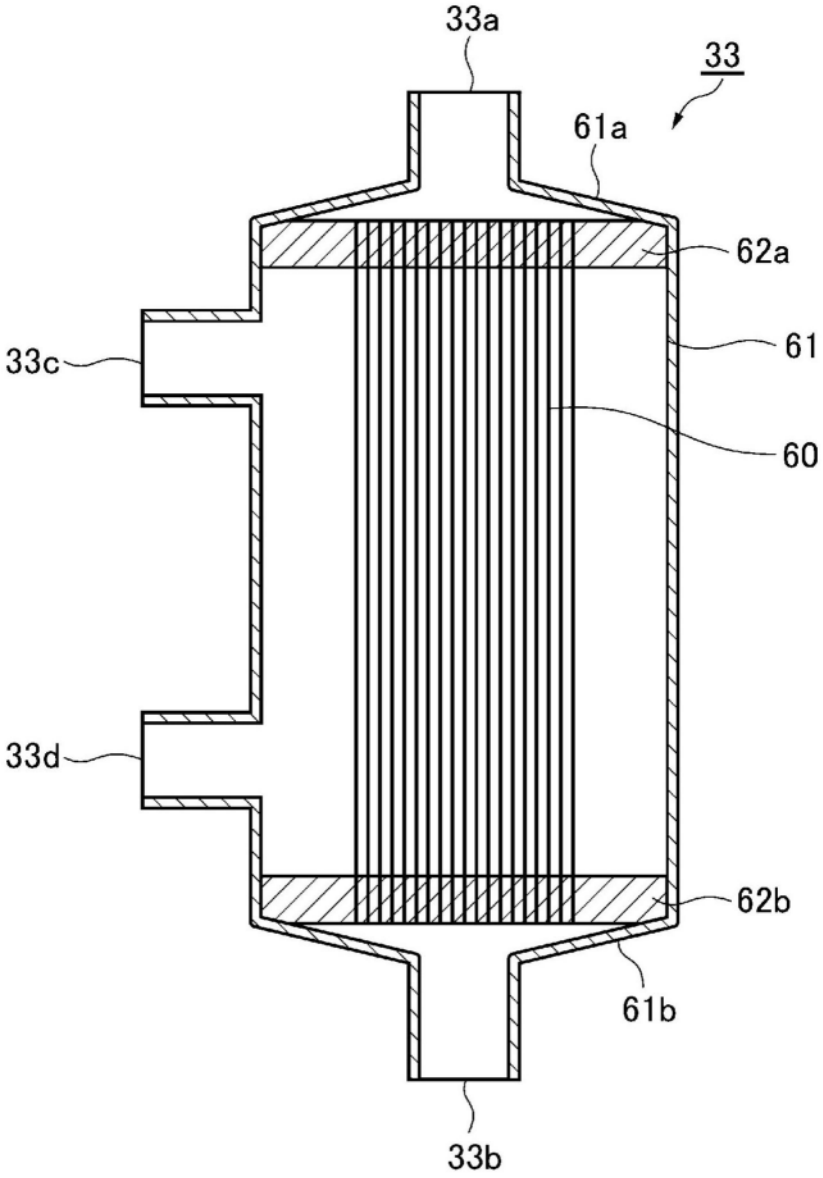


图7

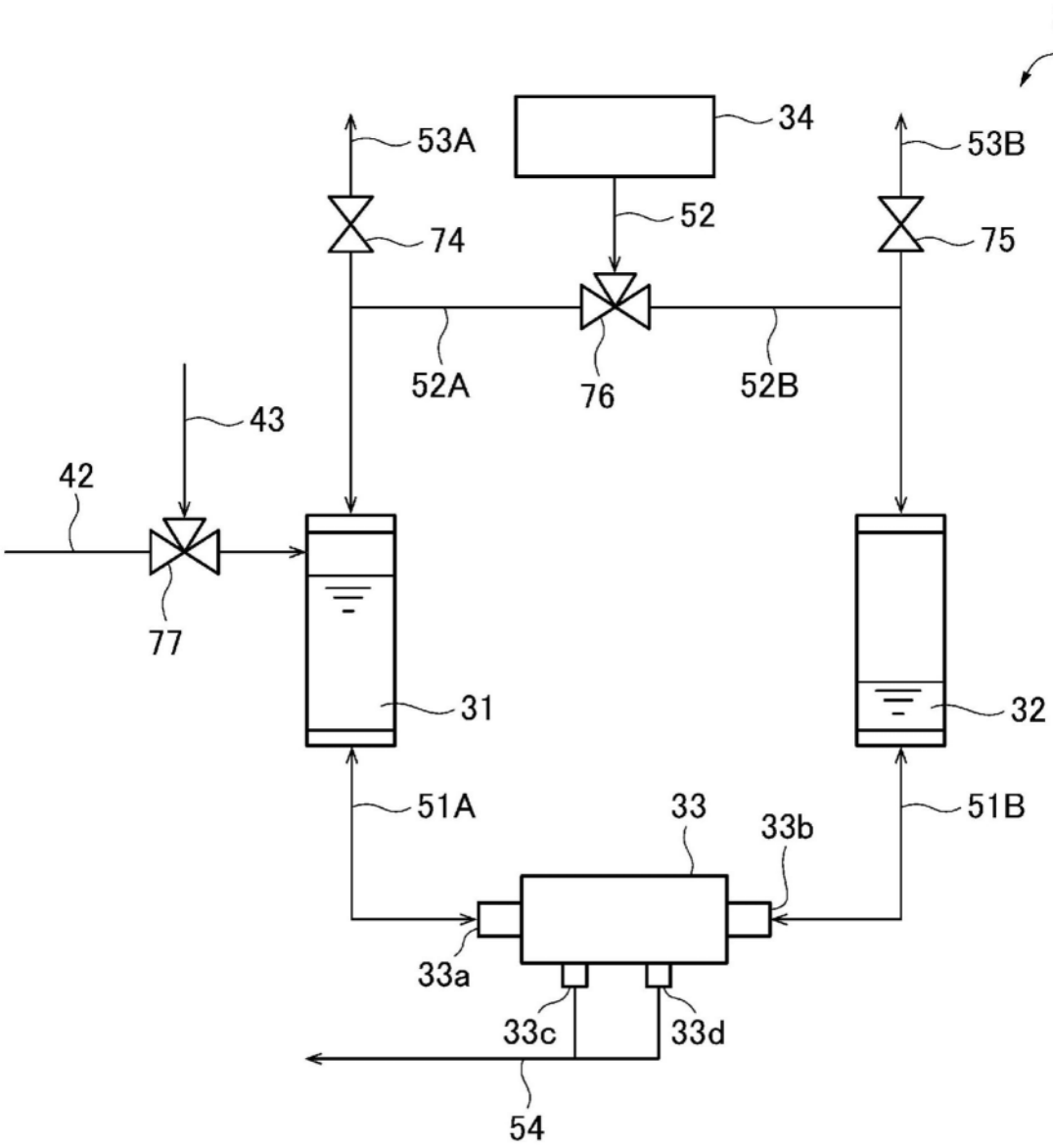

30
34
53A
53B
74
75
52
52A
76
52B
43
42
77
31
32
51A
51B
33
33b
33a
33c
33d
54

图8

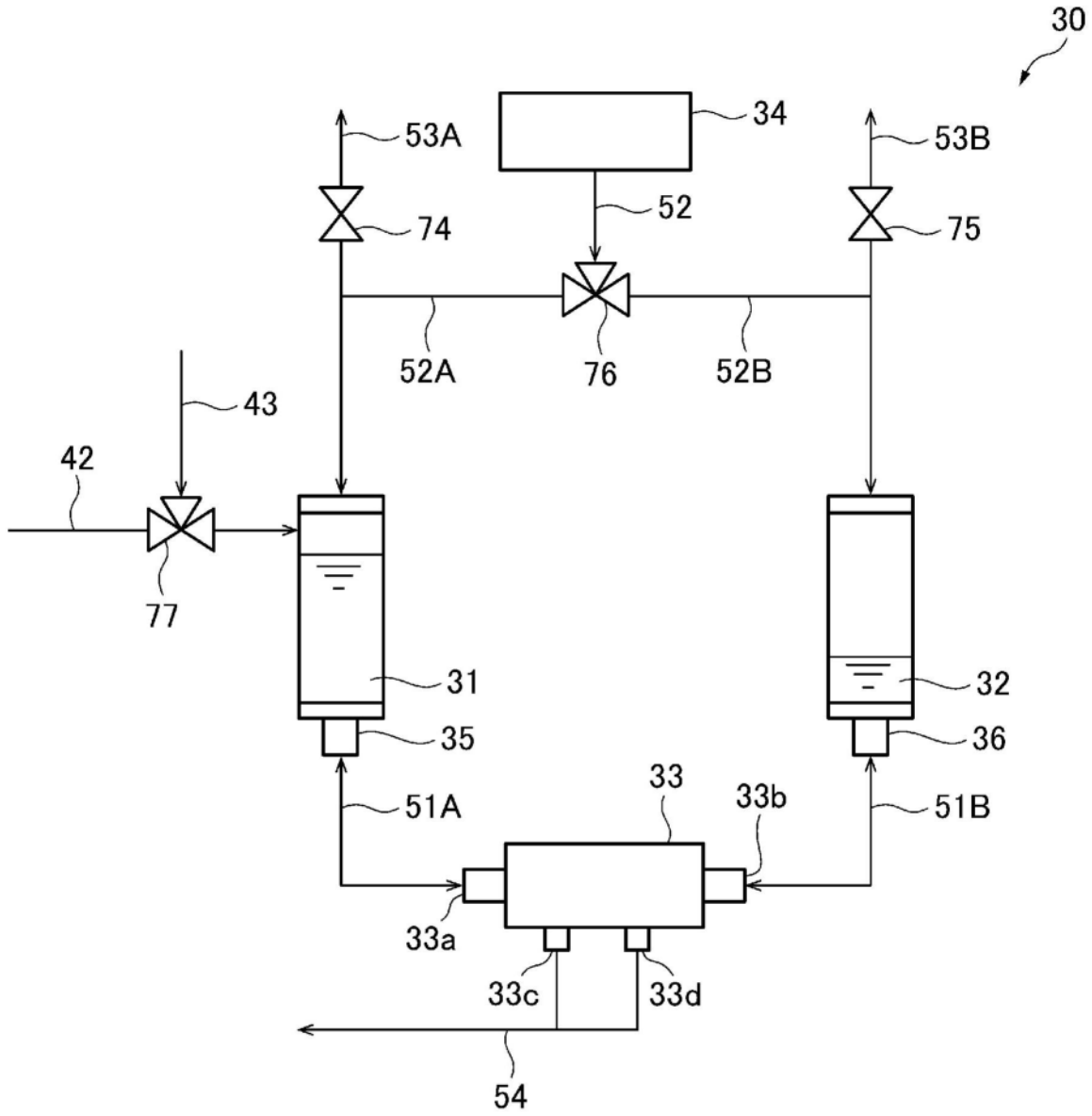

30
34
53A
53B
74
52
75
52A
76
52B
43
42
77
31
32
35
36
33
33b
51A
51B
33a
33c
33d
54

图9

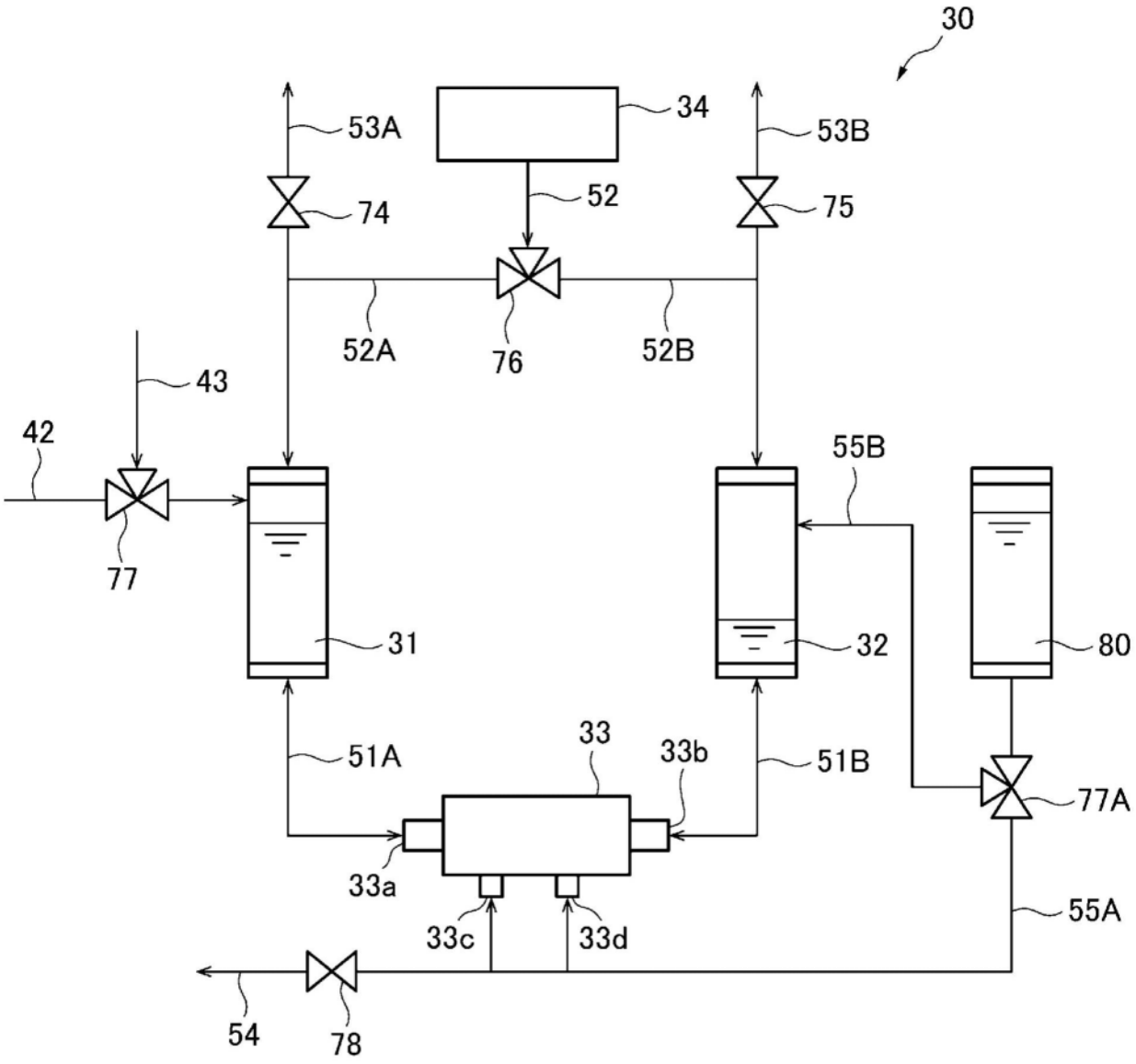

30
34
53A
53B
74
75
52
52A
76
52B
43
42
77
55B
31
32
80
51A
33
33b
51B
77A
33a
33c
33d
55A
54
78

图10

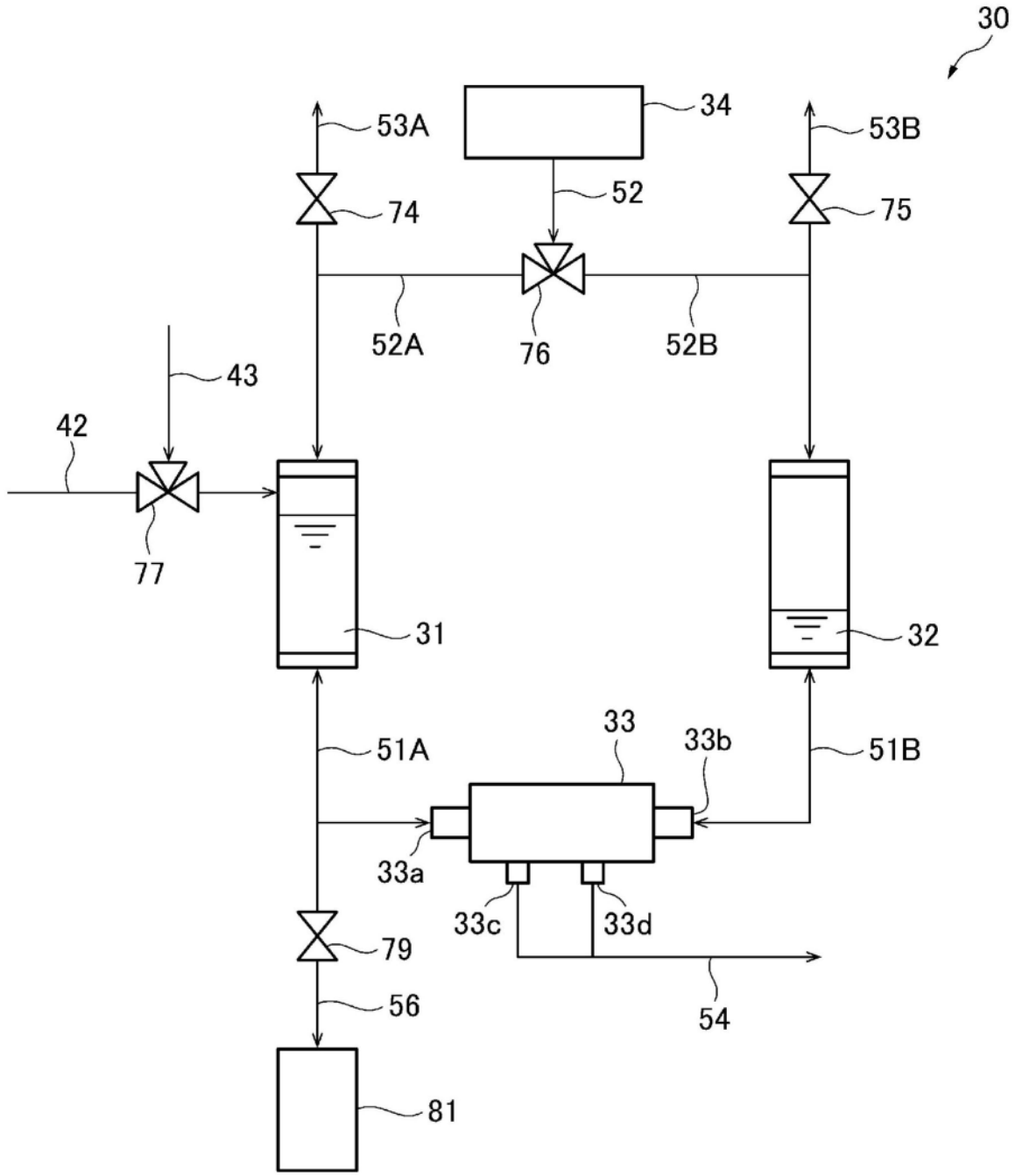

30
34
53A
53B
74
75
52
52A
76
52B
43
42
77
31
32
51A
33
33b
51B
33a
33c
33d
79
54
56
81

图11

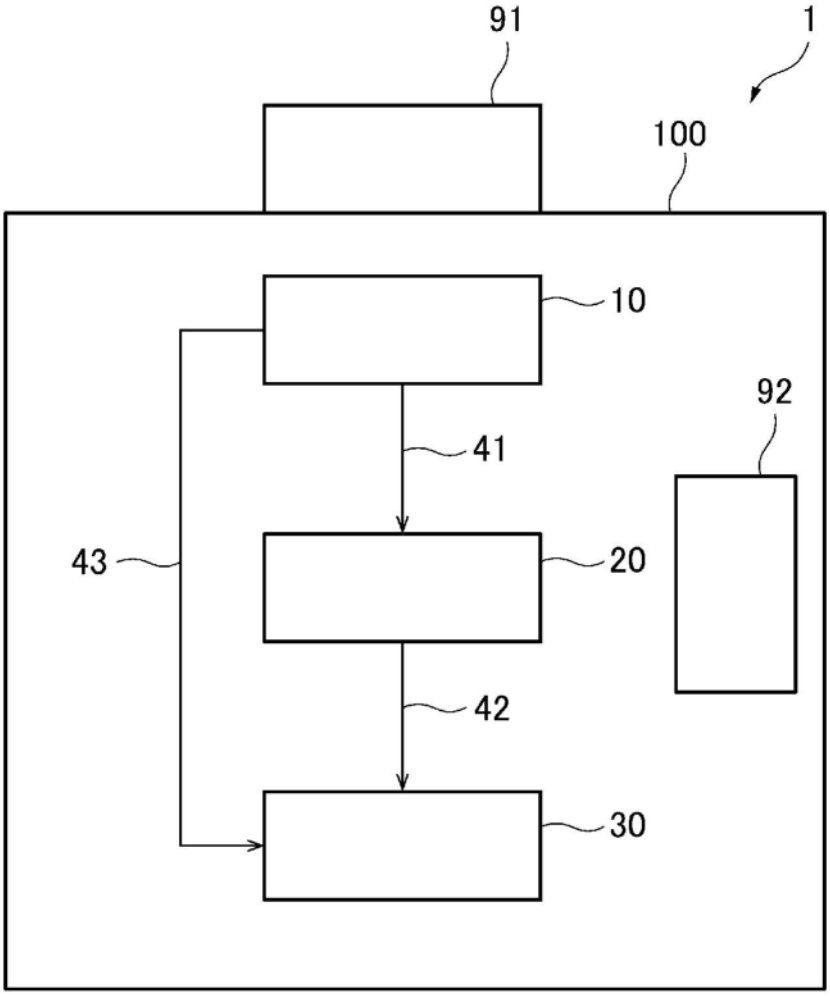


图12

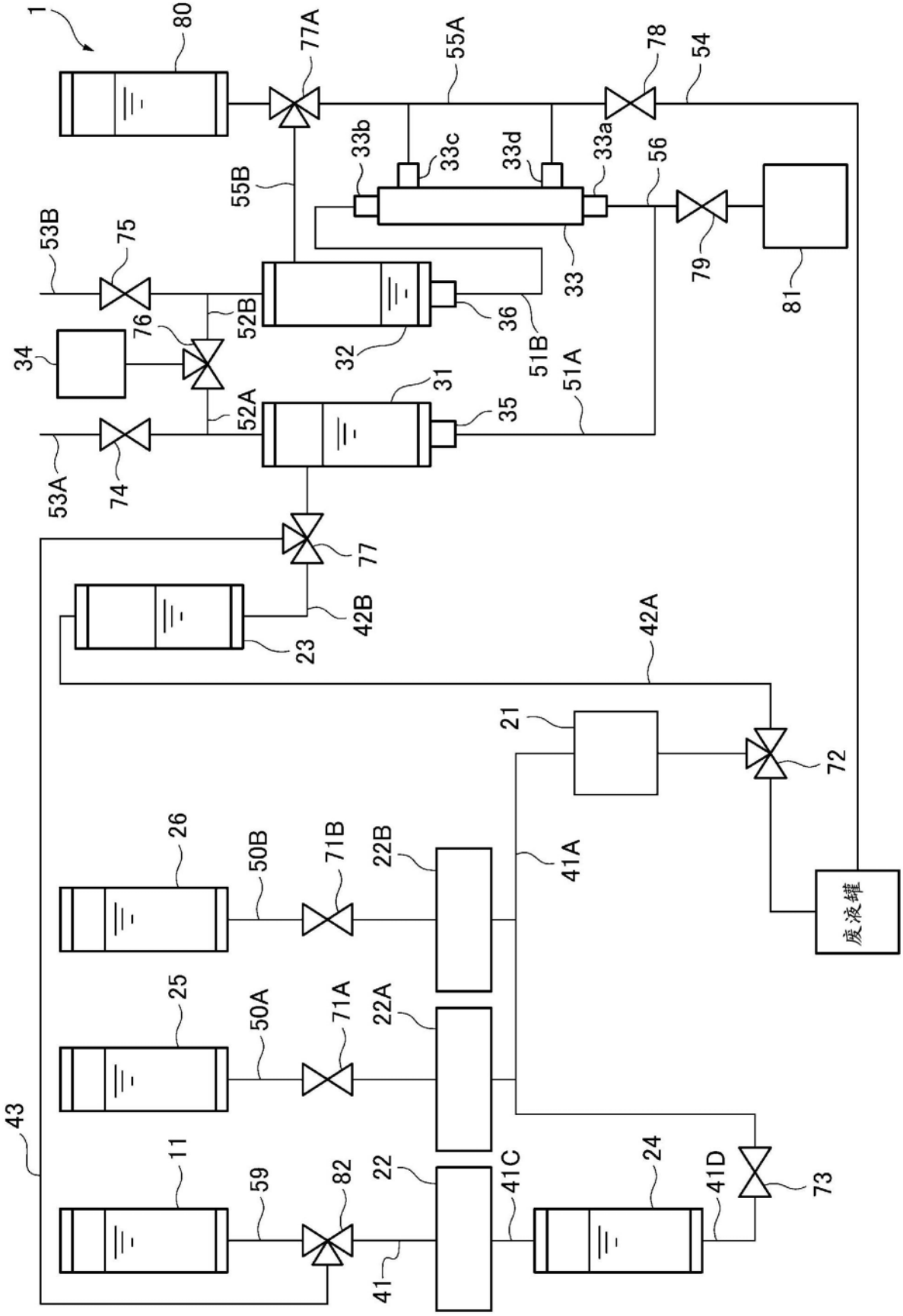

1
80
77A
55A
78
54
33b
33c
33d
33a
56
55B
53B
75
33
79
81
76
52B
36
34
32
51B
31
51A
52A
35
53A
74
77
42B
23
42A
21
72
26
50B
71B
22B
41A
废液罐
25
50A
71A
22A
43
11
59
82
22
41C
24
41D
73
41

图13

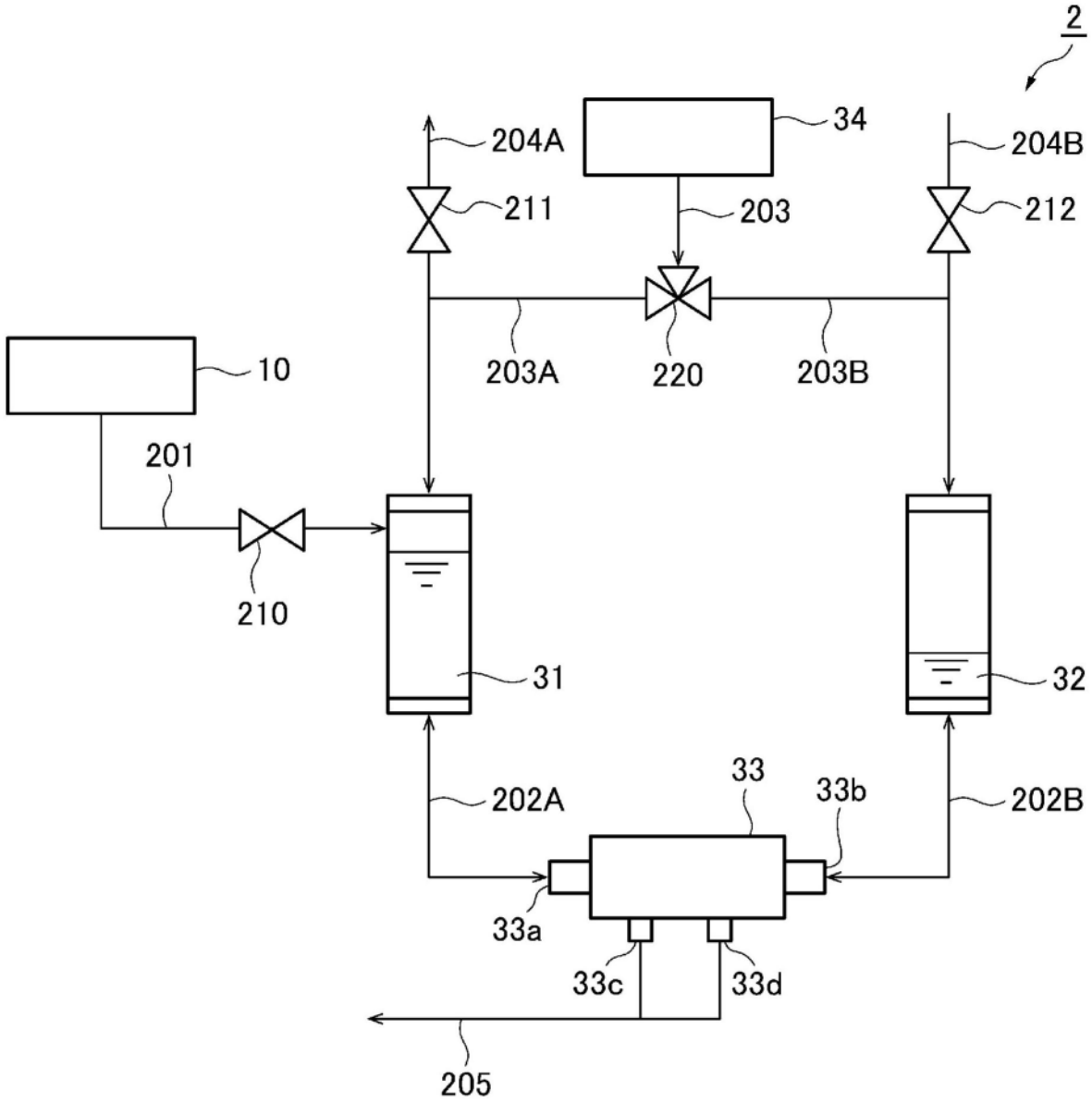

2
34
204A
204B
211
203
212
10
203A
220
203B
201
210
31
32
33
33b
202A
202B
33a
33c
33d
205

图14

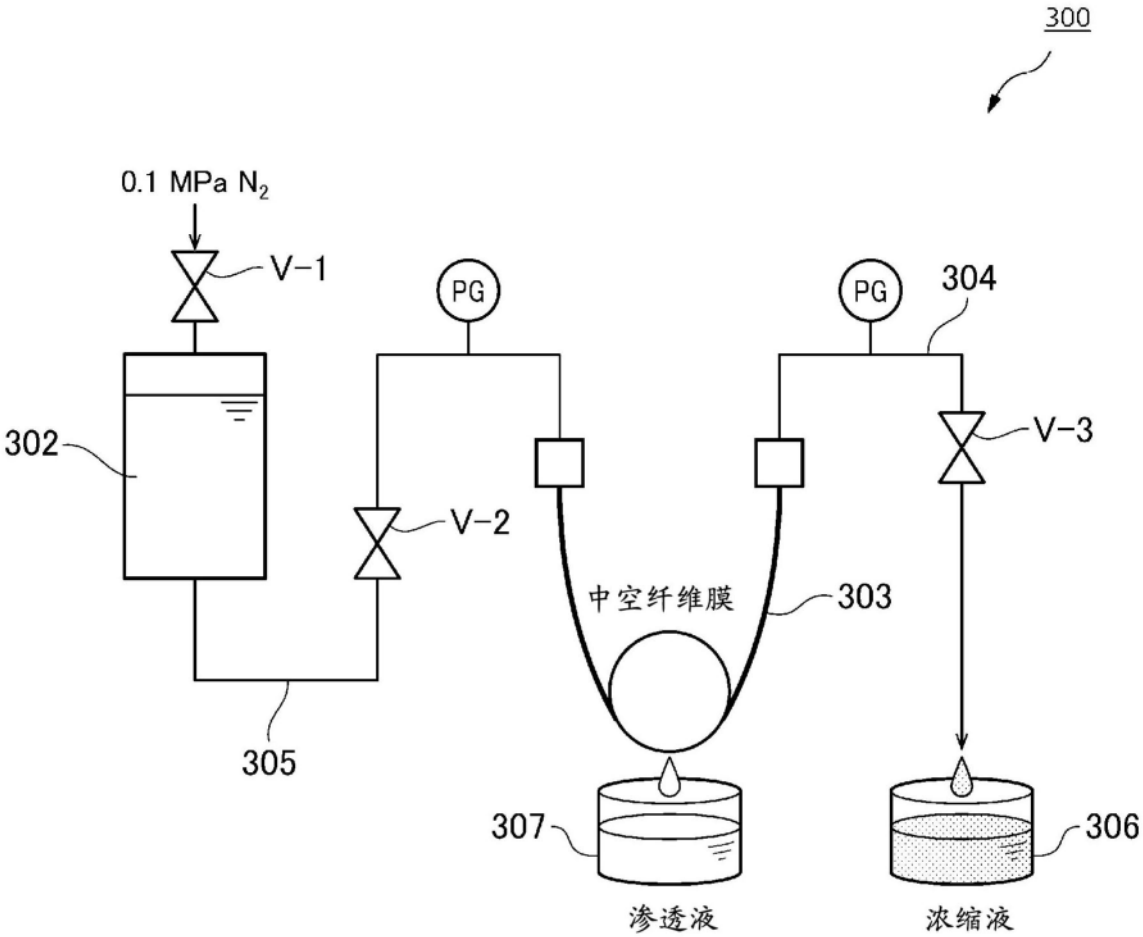


图15

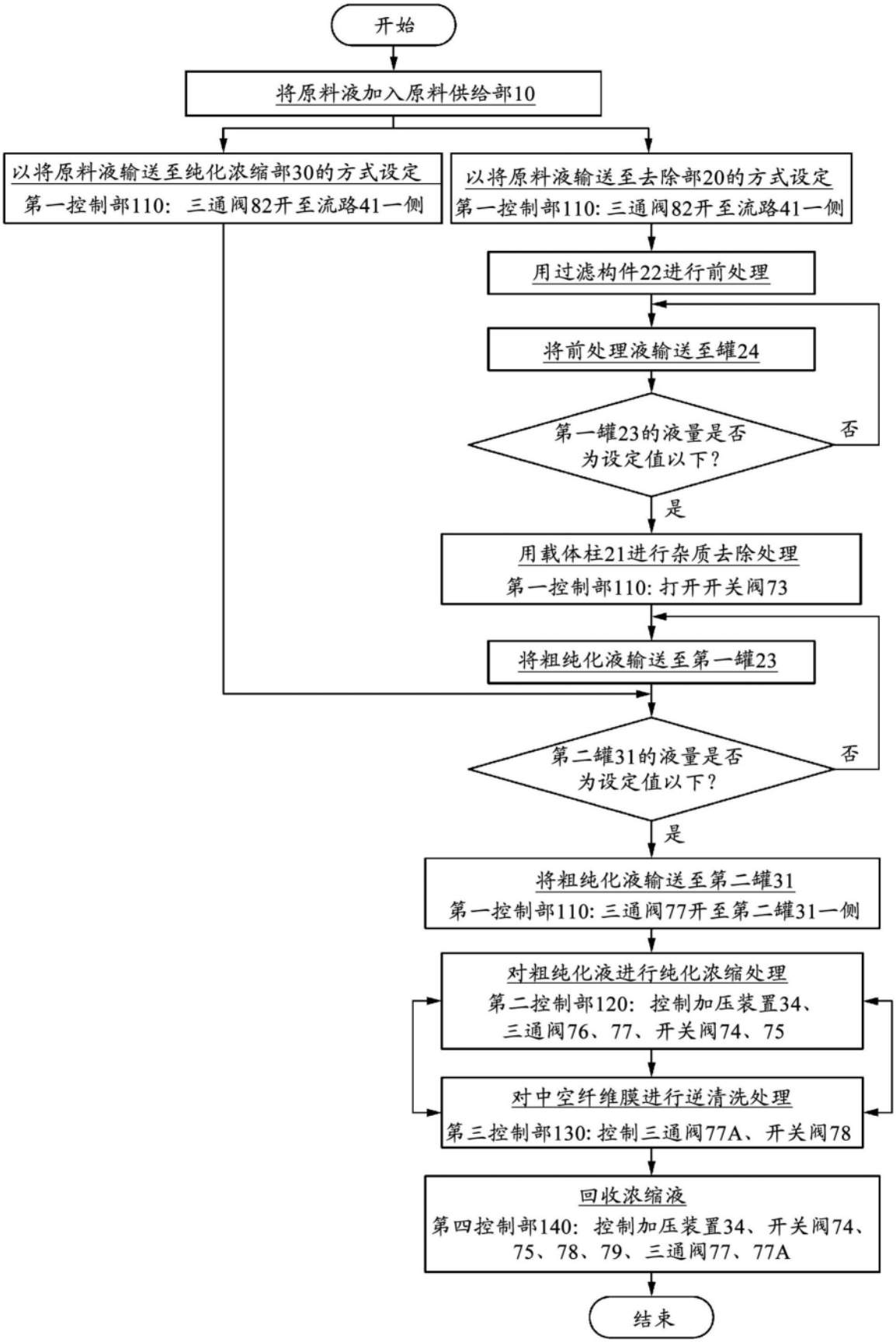

开始
将原料液加入原料供给部10
以将原料液输送至纯化浓缩部30的方式设定
第一控制部110: 三通阀82开至流路41一侧
以将原料液输送至去除部20的方式设定
第一控制部110: 三通阀82开至流路41一侧
用过滤构件22进行前处理
将前处理液输送至罐24
第一罐23的液量是否
为设定值以下?
否
是
用载体柱21进行杂质去除处理
第一控制部110: 打开开关阀73
将粗纯化液输送至第一罐23
第二罐31的液量是否
为设定值以下?
否
是
将粗纯化液输送至第二罐31
第一控制部110: 三通阀77开至第二罐31一侧
对粗纯化液进行纯化浓缩处理
第二控制部120: 控制加压装置34、
三通阀76、77、开关阀74、75
对中空纤维膜进行逆清洗处理
第三控制部130: 控制三通阀77A、开关阀78
回收浓缩液
第四控制部140: 控制加压装置34、开关阀74、
75、78、79、三通阀77、77A
结束

图16

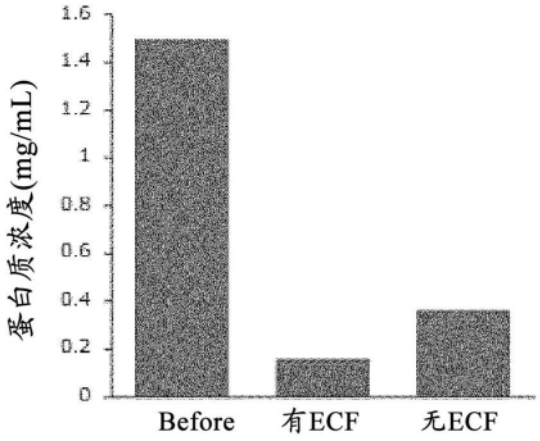

蛋白质浓度(mg/mL)
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Before
有ECF
无ECF

图17

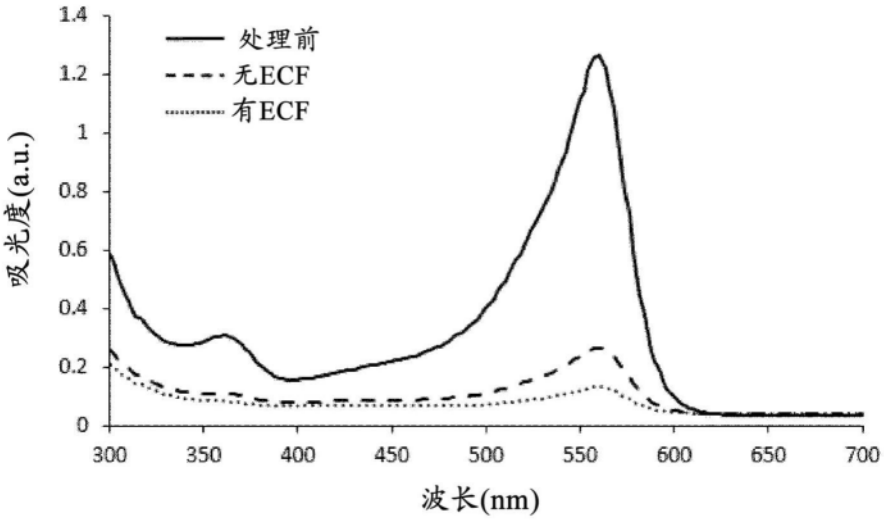

处理前
无ECF
有ECF
吸光度(a.u.)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
300
350
400
450
500
550
600
650
700
波长(nm)

图18