



등록특허 10-2369211



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월03일  
(11) 등록번호 10-2369211  
(24) 등록일자 2022년02월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12M 1/00* (2006.01) *C07K 1/34* (2006.01)  
*C07K 14/475* (2006.01) *C07K 14/52* (2006.01)  
*C07K 16/00* (2006.01) *C12M 1/26* (2006.01)  
*C12M 1/34* (2006.01) *C12N 9/00* (2006.01)

- (52) CPC특허분류  
*C12M 29/04* (2013.01)  
*C07K 1/34* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7009570

(22) 출원일자(국제) 2014년09월16일  
심사청구일자 2019년09월02일

(85) 번역문제출일자 2016년04월12일

(65) 공개번호 10-2016-0055866

(43) 공개일자 2016년05월18일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/055897

(87) 국제공개번호 WO 2015/039115

국제공개일자 2015년03월19일

(30) 우선권주장

61/878,502 2013년09월16일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

JP05031335 A\*

US04885087 A\*

US20110111486 A1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
젠자임 코포레이션

미국 메사추세츠주 02142 캠브리지 50 비니 스트리트

- (72) 발명자

조우, 항

중국 201323 상하이 푸동 뉴 디스트릭트 퀴안후이로드 1000 빌딩 103-301

라이트, 벤자민

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일 코드: 55에이-505에이 코포레이트 드라이브 55 사노피 내(뒷면에 계속)

- (74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 26 항

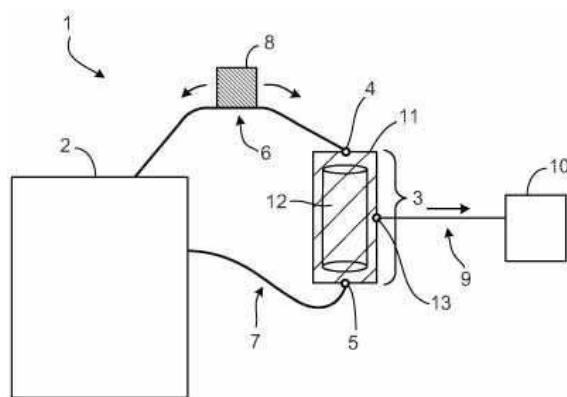
심사관 : 조상진

(54) 발명의 명칭 세포 배양물을 가공하는 방법 및 시스템

**(57) 요 약**

본원에는 세포 배양물을 가공하는 방법, 및 개방 회로 여과 시스템이 제공된다. 여과 시스템은 세포 배양물 생물반응기에 연결된 독립적인 유입구 포트 및 유출구 포트를 갖는 접선 흐름 여과(TFF) 유닛 및 여과 유닛을 통해 유체의 흐름을 역전시키도록 구성된 펌프를 포함한다.

**대 표 도 - 도1**



(52) CPC특허분류

*C07K 14/475* (2013.01)

*C07K 14/52* (2013.01)

*C07K 16/00* (2013.01)

*C12M 29/10* (2013.01)

*C12M 29/18* (2013.01)

*C12M 33/14* (2013.01)

*C12M 41/00* (2013.01)

*C12M 47/12* (2013.01)

*C12N 9/00* (2013.01)

(72) 발명자

**유, 마르셀라**

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

**원, 진**

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

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

(a) 개방 회로 여과 시스템(open circuit filtration system)을 제공하는 단계이며,

개방 회로 여과 시스템은

포유류 세포 배양물을 포함하는 생물반응기,

제1 유입구 및 제2 유입구를 갖는 접선 흐름 여과(tangential flow filtration; TFF) 유닛,

생물반응기와 TFF 유닛 제1 유입구 간에 유체 소통하는 제1 도관,

생물반응기와 TFF 유닛 제2 유입구 간에 유체 소통하는 제2 도관, 및

시스템을 통해 유체를 흘르게 하기 위해 시스템 내에 배치된 적어도 하나의 펌프

를 포함하고,

상기 시스템은, 유체가 시스템을 통해 생물반응기로부터 또는 생물반응기로 적어도 하나의 펌프를 경유하여 제1 도관 및 제2 도관 및 TFF 유닛을 통해 가역적으로 흐를 수 있고 여액이 TFF 유닛으로부터 수집될 수 있도록 구성되는 것인 단계,

(b) 포유류 세포 배양물을 제1 기간 동안 생물반응기로부터 TFF 유닛을 통해 제1 흐름 방향으로 흘르게 하는 단계,

(c) 제1 흐름 방향을 역전시키고 포유류 세포 배양물을 제2 기간 동안 TFF 유닛을 통해 제2 흐름 방향으로 흘르게 하는 단계,

(d) 제2 흐름 방향을 역전시키고 포유류 세포 배양물을 제3 기간 동안 TFF 유닛을 통해 제1 흐름 방향으로 흘르게 하는 단계,

(e) 단계 (c) 및 단계 (d)를 적어도 2회 반복하는 단계, 및

(f) 여액을 수집하는 단계

를 포함하며,

여기서 제1 기간, 제2 기간, 및 제3 기간은 각각 20초 내지 15분인 것인,

포유류 세포 배양물을 가공하는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 제1 도관 및 제2 도관 중 하나 또는 2개 모두가 생체적합성 배관을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, TFF 유닛이 단일 직교류 필터(single cross-flow filter)를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 단일 직교류 필터가 튜브형 직교류 필터인 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, TFF 유닛이 2개 이상의 직교류 필터를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 시스템이 제1 도관 또는 제2 도관, 또는 2개 모두에 배치된 하나 이상의 추가 TFF 유닛을 포함

하는 것인 방법.

#### 청구항 7

제3항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 직교류 필터(들)가 0.2 마이크로미터의 평균 기공 크기를 갖는 것인 방법.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 적어도 하나의 펌프가 제1 도관 또는 제2 도관, 또는 2개 모두에 배치된 것인 방법.

#### 청구항 9

제6항에 있어서, 적어도 하나의 펌프가 시스템에서 2개의 TFF 유닛들 사이에 배치된 것인 방법.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 적어도 하나의 펌프가 생물반응기에 그리고 제1 유체 도관 또는 제2 유체 도관에 대해 근위에 배치된 것인 방법.

#### 청구항 11

제1항 및 제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 펌프가 저 난류 펌프(low turbulence pump; LTP)인 방법.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, LTP가 연동 펌프인 방법.

#### 청구항 13

제11항에 있어서, 시스템이 제1 LTP 및 제2 LTP를 포함하며,

제1 LTP가 포유류 세포 배양물을 제1 방향으로 흐르게 하고,

제2 LTP가 포유류 세포 배양물을 제2 방향으로 흐르게 하는 것인

방법.

#### 청구항 14

제11항에 있어서, 시스템이 단일 LTP를 포함하며, 단일 LTP가 제1 기간 및 제3 기간 동안 포유류 세포 배양물을 제1 방향으로 흐르게 하고 제2 기간 동안 포유류 세포 배양물을 제2 방향으로 흐르게 하는 것인 방법.

#### 청구항 15

제1항에 있어서, 제1 기간, 제2 기간, 및 제3 기간이 1분 내지 15분인 방법.

#### 청구항 16

제1항에 있어서, 포유류 세포 배양물이 (a), (b) 및 (c) 중 하나 이상에서 0.5 L/분 내지 80 L/분의 속도로 흐르게 되는 것인 방법.

#### 청구항 17

제16항에 있어서, 포유류 세포 배양물이 (a), (b) 및 (c) 중 하나 이상에서 3.0 L/분 내지 60 L/분의 속도로 흐르게 되는 것인 방법.

#### 청구항 18

제1항에 있어서, (b) 및 (c)의 1회 반복이 50% 초과의 교환 분율(exchange fraction)을 야기하는 것인 방법.

#### 청구항 19

제1항에 있어서, 여액이 포유류 세포를 함유하지 않는 것인 방법.

#### 청구항 20

제1항에 있어서,

포유류 세포 배양물이 분비된 재조합 단백질을 함유하고,

여액이 분비된 재조합 단백질을 함유하는 것인

방법.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 분비된 재조합 단백질이 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 성장 인자, 사이토카인, 또는 효소, 또는 이들의 조합인 방법.

#### 청구항 22

제20항에 있어서,

여액으로부터 상기 분비된 재조합 단백질을 단리시키는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 23

제22항에 있어서, 단리시키는 단계가, 적어도 하나의 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템(MCCS)을 통해 단리시키는 것을 포함하는 통합 및 연속 공정을 사용하여 수행되는 것인 방법.

#### 청구항 24

제22항에 있어서,

단리된 재조합 단백질을 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 완충제와 혼합함으로써 치료 약물 물질을 제형화하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 25

제1항에 있어서, 포유류 세포 배양물 또는 여액, 또는 2개 모두가 멸균 상태인 방법.

#### 청구항 26

제1항에 있어서, 14일 내지 80일의 기간 동안 연속적으로 수행되는 방법.

#### 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

**발명의 설명****기술 분야****[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조**

본 출원은 2013년 9월 16일에 출원된 미국 특허 가출원 제61/878,502호를 우선권으로 주장하며, 이의 전체 내용은 본원에서 참고로 포함된다.

**[0003] 기술 분야**

본 발명은 세포 배양물을 가공하는 방법 및 생명공학기술, 및 보다 상세하게, 관류 생물반응기(perfusion bioreactor)에서 세포 배양물을 연속적으로 가공하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0005] 포유류 세포는 종종 치료 단백질을 형성시키기 위해 사용된다. 몇몇 가공 방법에서, 포유류 세포는 관류 생물반응기에서 배양되며, 재조합 단백질을 함유한 소정 부피의 세포 배양물은 생물반응기로부터 제거되며, 새로운 배양 배지가 첨가되어 그러한 부피를 대체한다. 이러한 관류 배양 방법에서, 제거된 세포 배양물은 종종 추가 재조합 단백질 생산을 위해 생물반응기에서 포유류 세포를 보유하기 위해 여과되면서, 재조합 단백질을 함유한 배양 배지(때때로, "소비된 배지"로서 지칭됨)가 회수된다.

[0006] 관류 생물반응기로부터 세포 배양물을 여과하기 위한 통상적인 방법 및 디바이스는 여러 가지 단점을 갖는다. 예를 들어, 단한 시스템 교번 접선 흐름 여과(alternating tangential flow filtration; ATF)는 성장 조건이 제어된 생물반응기 외측에서 긴 시간을 보내는 세포 배양물을 야기하며(긴 외부 체류 시간), 전통적인 단방향 접선 흐름 여과(traditional unidirectional tangential flow filtration; TFF)는 역류 없이, 필터 오염을 야기한다. 이와 같이, 통상적인 관류 생물반응기 방법은 종종 성장 조건이 제어된 생물반응기의 외측에서 오랜 시간을 보내는 세포 배양물을 포함하여, 생존 세포 밀도(viable cell density), 생존 백분율(percent viability), 및 배양물 비 및 부피 생산성(culture specific and volumetric productivity)의 감소를 야기한다. 또한, 종래 방법은 종종 시스템 필터의 불완전한 수세(flush)를 야기하여 필터 오염을 초래한다.

**선행기술문헌****특허문헌**

(특허문헌 0001) US 2011/0111486 A

(특허문헌 0002) WO 2014/051503

(특허문헌 0003) US 6,544,424 B

**비특허문헌**

(비특허문헌 0001) "Conversion of bioreactors to continuous perfusion using hollow fiber cell separators," Spectrum (1989)

**발명의 내용**

[0007] 본 출원인은 통상적인 단방향 개방 회로 또는 양방향 단한 회로 여과 시스템과는 상반되게, 직교류 필터(cross-flow filter)의 표면을 가로질러 가역적 접선 유체 흐름을 제공하는 개방 회로 여과 시스템이 증가된 생존 세포 밀도, 증가된 생존 세포 백분율, 증가된 비(specific) 및/또는 부피 생산성, 증가된 글루코오스 비소비

(specific glucose consumption), 및 감소된 필터 오염을 제공한다는 것을 발견하였다.

[0008] 본원에 제공된 개방 회로 여과 시스템은 예를 들어, 다른 단방향 개방 회로 여과 시스템(예를 들어, 단방향 TFF 시스템) 또는 양방향 닫힌 회로 여과 시스템(닫힌 회로 ATF™ 시스템)과 비교하여, 재조합 단백질 생산 및 수율을 위한 최적의 조건, 예를 들어, 세포 배양물의 감소된 외부 부피(저장소의 외측), 증가된 교환 분율(exchange fraction)(예를 들어, 제1 도관, TFF 유닛, 및 제2 도관 내), 세포 배양물의 감소된 외부 체류 시간(저장소 외측), 세포 배양물 여과 동안 감소된 전단 응력, 세포 배양물 중에서 개선된 세포 생존능력, 세포 배양물 중에서 상승된 생존 세포 밀도, 및/또는 (필터(들)의 보다 양호한 수세로 인한) 감소된 필터 오염 중 하나 이상을 제공한다. 이에 따라, 본원에는 저장소(예를 들어, 생물반응기), 제1 유입구 및 제2 유입구를 갖는 접선 흐름 여과(TFF) 유닛, 저장소와 TFF 유닛 제1 유입구 간에 유체 소통하는 제1 도관, 및 저장소와 TFF 유닛 제2 유입구 간에 유체 소통하는 제2 도관, 및 시스템 내에 배치된 적어도 하나의 펌프를 포함하고 적어도 하나의 펌프를 작동시켜 저장소로부터 제1 도관, TFF 유닛, 제2 도관을 통해 그리고 다시 저장소로, 시스템을 통해 유체를 가역적으로 흐르게 하는, 개방 회로 여과 시스템이 제공된다. 또한, (a) 개방 회로 여과 시스템(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 개방 회로 여과 시스템)을 제공하는 단계, (b) 세포 배양물을 제1 기간 동안 저장소로부터 TFF 유닛을 통해 제1 흐름 방향으로 흐르게 하는 단계, (c) 제1 흐름 방향을 역전시키고 세포 배양물을 제2 기간 동안 TFF 유닛을 통해 제2 흐름 방향으로 흐르게 하는 단계, (d) 제2 흐름 방향을 역전시키고 배양물을 제3 기간 동안 TFF 유닛을 통해 제1 흐름 방향으로 흐르게 하는 단계, (e) 단계 (c) 내지 단계 (d)를 적어도 2회 반복하는 단계, 및 (f) 여액을 수집하는 단계를 포함하는 세포 배양물을 가공하는 방법이 제공된다.

[0009] 본원에는 세포 배양물을 가공하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 (a) 세포 배양물을 포함하는 저장소, 제1 유입구 및 제2 유입구를 갖는 접선 흐름 여과(TFF) 유닛, 저장소와 TFF 유닛 제1 유입구 간에 유체 소통하는 제1 도관, 및 저장소와 TFF 유닛 제2 유입구 간에 유체 소통하는 제2 도관, 및 유체를 시스템을 통해 흐르게 하기 위해 시스템 내에 배치된 적어도 하나의 펌프를 포함하고 유체가 시스템을 통해 저장소로부터 또는 저장소로 그리고 적어도 하나의 펌프를 경유하여 제1 도관 및 제2 도관 및 TFF 유닛을 통해 가역적으로 흐르게 될 수 있도록 구성되고 여액이 TFF 유닛으로부터 수집될 수 있는 개방 회로 여과 시스템을 제공하는 단계, (b) 세포 배양물을 제1 기간 동안 저장소로부터 TFF 유닛을 통해 제1 흐름 방향으로 흐르게 하는 단계, (c) 제1 흐름 방향을 역전시키고 세포 배양물을 제2 기간 동안 TFF 유닛을 통해 제2 흐름 방향으로 흐르게 하는 단계, (d) 제2 흐름 방향을 역전시키고 배양물을 제3 기간 동안 TFF 유닛을 통해 제1 흐름 방향으로 흐르게 하는 단계, (e) 단계 (c) 내지 단계 (d)를 적어도 2회 반복하는 단계, 및 (f) 여액을 수집하는 단계를 포함한다. 일부 예에서, 저장소는 생물반응기 또는 냉동 보유 탱크(refrigerated holding tank)이다. 일부 예에서, 제1 도관 및 제2 도관 중 하나 또는 2개 모두는 생체적합성 배관을 포함한다. TFF 유닛은 단일 직교류 필터(예를 들어, 튜브형 직교류 필터)를 포함할 수 있거나, 2개 이상의 직교류 필터를 포함할 수 있다.

[0010] 일부 예에서, 본 시스템은 제1 도관, 제2 도관, 또는 2개 모두에 배치된 하나 이상의 추가 TFF 유닛을 포함한다. 일부 예에서, 직교류 필터(들)는 약 0.2 마이크로미터의 평균 기공 크기를 갖는다.

[0011] 일부 예에서, 적어도 하나의 펌프는 제1 도관 또는 제2 도관, 또는 2개 모두에 배치된다. 추가 예에서, 적어도 하나의 펌프는 시스템에서 임의의 2개의 TFF 유닛들 사이에 배치된다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 펌프는 저장소에 그리고 제1 유체 도관 또는 제2 유체 도관에 대해 근위에 배치된다. 본원에 기술된 모든 방법들의 일부 구현예에서, 적어도 하나의 펌프는 저 난류 펌프(low turbulence pump; LTP)(예를 들어, 연동 펌프)이다. 일부 예에서, 시스템은 제1 LTP 및 제2 LTP를 포함하며, 여기서, 제1 LTP는 세포 배양물을 제1 방향으로 흐르게 하며, 제2 LTP는 세포 배양물을 제2 방향으로 흐르게 한다. 일부 구현예에서, 시스템은 단일 LTP를 포함하며, 여기서, 단일 LTP는 제1 기간 및 제3 기간 동안 세포 배양물을 제1 방향으로 흐르게 하고, 제2 기간 동안 세포 배양물을 제2 방향으로 흐르게 한다.

[0012] 본원에 기술된 임의의 방법에서, 제1 기간, 제2 기간 및 제3 기간은 약 30초 내지 약 15분이다. 일부 구현예에서, 세포 배양률은 (a), (b) 및 (c) 중 하나 이상에서 약 0.5 L/분 내지 약 80 L/분(예를 들어, 약 3.0 L/분 내지 약 60 L/분) 속도로 흐르게 된다.

[0013] 일부 구현예에서, (b) 및 (c)의 1회 반복은 50% 초과의 교환 분율을 야기한다. 일부 예에서, 여액은 포유류 세포를 함유하지 않는다. 일부 구현예에서, 세포 배양률은 분비된 재조합 단백질을 함유하며, 여액은 분비된 재조합 단백질을 함유한다. 일부 구현예에서, 분비된 재조합 단백질은 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 성장 인자, 사이토카인, 또는 효소, 또는 이들의 조합물이다. 일부 구현예는 여액으로부터 분비된 재조합 단백질을 단리시키는 단계를 추가로 포함한다. 예를 들어, 단리(isolating)는 적어도 하나의 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템

(multi-column chromatography system, MCCS)을 통한 단리를 포함하는 통합 및 연속 공정을 이용하여 수행될 수 있다. 일부 구현예는 단리된 재조합 단백질을 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 완충제와 혼합시킴으로써 치료 약물 물질을 제형화하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 배양물 또는 여액, 또는 2개 모두는 멸균된 것이다. 일부 예에서, 본 방법은 약 14일 내지 약 80일의 기간 동안 연속적으로 수행된다.

[0014] 또한, 저장소, 제1 유입구 및 제2 유입구를 갖는 접선 흐름 여과(TFF) 유닛, 저장소와 TFF 유닛 제1 유입구 간에 유체 소통하는 제1 도관, 및 저장소와 TFF 유닛 제2 유입구 간에 유체 소통하는 제2 도관, 및 시스템 내에 배치된 적어도 하나의 펌프를 포함하고, 적어도 하나의 펌프를 작동시켜, 유체를 저장소로부터 제1 도관, TFF 유닛, 제2 도관을 통해, 그리고 다시 저장소로, 시스템을 통해 가역적으로 흐르게 하는 개방 회로 여과 시스템이 제공된다. 일부 예에서, 저장소는 생물반응기 또는 냉동 보유 탱크이다. 일부 구현예에서, 제1 도관 및 제2 도관 중 하나 또는 2개 모두는 생체적합성 배관을 포함한다. 일부 구현예에서, TFF 유닛은 단일 직교류 필터(예를 들어, 튜브형 직교류 필터)를 포함한다. 일부 구현예에서, TFF 유닛은 2개 이상의 직교류 필터를 포함한다. 일부 예에서, 본 시스템은 제1 도관, 제2 도관, 또는 2개 모두에 배치된 하나 이상의 추가 TFF 유닛을 포함한다. 일부 시스템에서, 직교류 필터(들)는 약 0.2 마이크로미터의 평균 기공 크기를 갖는다.

[0015] 본원에 기술된 시스템의 일부 구현예에서, 적어도 하나의 펌프는 제1 도관 또는 제2 도관, 또는 2개 모두에 배치된다. 다른 구현예에서, 적어도 하나의 펌프는 시스템에서 임의의 2개의 TFF 유닛 사이에 배치된다. 다른 예에서, 적어도 하나의 펌프는 저장소에 그리고 제1 유체 도관 또는 제2 유체 도관에 대해 근위에 배치된다. 본원에 기술된 임의의 시스템에서, 적어도 하나의 펌프는 저 난류 펌프(LTP)(예를 들어, 연동 펌프)이다. 일부 구현예에서, 본 시스템은 제1 LTP 및 제2 LTP를 포함하며, 여기서, 제1 LTP는 세포 배양물을 제1 흐름 방향으로 흐르게 하도록 구성되며, 제2 LTP는 제1 흐름 방향을 역전시키고 세포 배양물을 제2 흐름 방향으로 흐르게 하도록 구성된다. 다른 구현예에서, 본 시스템은 세포 배양물을 제1 흐름 방향 및 제2 흐름 방향으로 가역적으로 흐르게 하도록 구성된 단일 LTP를 포함한다. 일부 구현예에서, 연동 펌프는 약 20 mL 내지 약 250 mL의 펌프 헤드 부피를 갖는다.

[0016] 본원에 기술된 시스템의 일부 구현예는 여액 보유 탱크, 및 TFF 유닛과 여액 보유 탱크 간에 유체 소통하는 여액 도관을 추가로 포함한다. 본원에 기술된 시스템의 일부 구현예는 적어도 하나의 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템(MCCS) 및 유입구 및 유출구 및 생물학적 제조 시스템의 유입구와 TFF 유닛 간에 유체 소통하는 여액 도관을 포함하는 생물학적 제조 시스템을 추가로 포함하며, 여기서 본 디바이스는 여액이 적어도 하나의 MCCS를 통해 생물학적 제조 시스템의 유입구로 진행되고 생물학적 제조 시스템의 유출구를 통해 디바이스에서 배출되도록 구성된다. 본원에 기술된 임의의 시스템에서, TFF 유닛은 하우징(housing)에 배치된다.

[0017] 본원에서 사용되는 단수 명사 또는 명사 앞의 단어 "복수"는 하나 이상의 특정 명사를 나타낸다. 예를 들어, 구 "포유류 세포"는 "하나 이상의 포유류 세포"를 나타내며, 구 "복수의 마이크로 캐리어(microcarrier)"는 "하나 이상의 마이크로 캐리어"를 의미한다.

[0018] 용어 "포유류 세포"는 임의의 포유동물(예를 들어, 인간, 햄스터, 마우스, 녹색 원숭이(green monkey), 랙트, 돼지, 소, 또는 토끼)로부터의 또는 이로부터 유래하는 임의의 세포를 의미한다. 일부 구현예에서, 포유류 세포는 예를 들어, 무한증식 세포, 분화 세포, 또는 미분화 세포일 수 있다.

[0019] 용어 "세포 배양물"은 액체 배양 배지(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 액체 배양 배지)에 혼탁된 복수의 포유류 세포(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 포유류 세포)를 의미한다. 세포 배양물은 약  $0.1 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과(예를 들어, 약  $1 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과, 약  $5 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과, 약  $10 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과, 약  $15 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과, 약  $20 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과, 약  $25 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과, 약  $30 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과, 약  $35 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과, 약  $40 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과, 약  $45 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과, 약  $50 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과, 약  $55 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과, 약  $60 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과, 약  $65 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과, 약  $70 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과, 약  $75 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과, 약  $80 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과, 약  $85 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과, 약  $90 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과, 약  $95 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과, 또는  $100 \times 10^6$  개의 세포/mL 초과)의 세포 밀도를 가질 수 있다. 일부 예에서, 세포 배양물에 존재하는 포유류 세포는 마이크로 캐리어(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 마이크로 캐리어)에 부착된다.

- [0020] 용어 "생물반응기"는 당해 분야에 공지되어 있고, 액체 배양 배지에서 포유류 세포의 유지 또는 성장을 가능하게 하는 물리적 조건의 제어된 세트 하에서 세포 배양물을 인큐베이션 할 수 있는 용기를 의미한다. 예를 들어, 생물반응기는 세포 배양물 중의 포유류 세포가 재조합 단백질을 형성시키고 분비시킬 수 있는 조건하에서 세포 배양물을 인큐베이션 할 수 있다. 예를 들어, 생물반응기는 통상적으로 O<sub>2</sub> 및 N<sub>2</sub> 살포(sparge), 열 재킷, 하나 이상의 유체 포트, 및 교반 시스템을 포함한다. 생물반응기의 비 제한적인 예는 본원에 기술된다. 생물반응기의 추가 예는 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0021] 용어 "개방 회로 여과 시스템(open circuit filtration system)"은 저장소(예를 들어, 생물반응기) 및 저장소에서 시작하고 저장소에서 종결되는 연속적인 닫힌 유체 루프를 의미하고, 닫힌 유체 루프에서의 유체(예를 들어, 세포 배양물)가 저장소로 그리고 저장소로부터(제1 흐름 방향 또는 제2 흐름 방향 중 어느 하나로) TFF 유닛을 통해 그리고 다시 저장소로 진행할 수 있게 하는 TFF 유닛을 포함한다. 개방 회로 여과 시스템은 또한, 유체(예를 들어, 세포 배양물)를 저장소로 및/또는 저장소로부터 TFF 유닛을 통해 그리고 다시 저장소로 펌핑하기에 적합한 적어도 하나의 펌프를 포함한다.
- [0022] 용어 "접선 흐름 여과 유닛(tangential flow filtration unit)" 또는 "TFF 유닛"은 당해 분야에 공지되어 있고, 적어도 하나의 하우징(예를 들어, 실린더) 및 필터 표면의 대부분이 유닛을 통한 유체(예를 들어, 세포 배양물)의 흐름에 대해 평행하게 정위되도록 하우징에 정위된 적어도 하나의 직교류 필터를 포함하는 디바이스를 의미한다. TFF 유닛은 당해 분야에 널리 공지되어 있고 상업적으로 입수 가능하다. 예시적인 상업적으로 입수 가능한 TFF 유닛은 Minimate™ TFF 캡슐(Pall Corporation), Vivaflow® 50 및 200 시스템(Sartorius), BioCap 25, E0170, E0340, 및 E1020 캡슐(3M), 및 ATF4 필터(Refine Technology)를 포함한다. 하우징은 예를 들어, 유체를 제1 유입구/유출구를 통해, 적어도 하나의 직교류 필터를 가로질러, 및 제2 유입구/유출구를 통해 진행시키도록 정위된 제1 유입구/유출구 및 제2 유입구/유출구를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 개방 회로 여과 시스템은 예를 들어, 직렬 및/또는 병렬로 연결된 다수의 TFF 유닛을 포함할 수 있다. 예를 들어, 2개 이상의 TFF 유닛을 포함하는 시스템은 시스템에서 TFF 유닛의 이웃하는 쌍을 유체적으로 연결하는 유체 도관을 포함할 수 있다. 다른 예에서, 시스템은 유체 도관에 의해 유체적으로 연결된 2개 이상의 TFF 유닛의 2개 이상의 세트를 포함할 수 있다. 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 TFF 유닛은 유체를 제1 흐름 방향 및 제2 흐름 방향으로 수용할 수 있다.
- [0023] 용어 "직교류 필터(cross-flow filter)"는 당해 분야에 공지되어 있는 것으로서, 필터 표면의 대부분이 유체(예를 들어, 세포 배양물)의 흐름(예를 들어, 제1 흐름 방향 및 제2 흐름 방향)에 대해 평행하도록 TFF 유닛에 정위될 수 있게 설계된 필터를 의미한다. 예를 들어, 직교류 필터는 접선 흐름 여과를 가능하게 하는 임의의 형상, 예를 들어, 튜브형 또는 직사각형 형상을 가질 수 있다. 특히 유용한 직교류 필터는 유체가 직교류 필터의 표면을 가로질러 제1 방향 및 제2 방향으로 흐를 때, 유체(예를 들어, 세포 배양물)에서 적은 양의 유체 난류 또는 전단 응력을 야기하도록 설계된다. 직교류 필터는 예를 들어, Sartorius, MembraPure, Millipore, 및 Pall Corporation으로부터 상업적으로 입수 가능하다.
- [0024] 용어 "저 난류 펌프(low turbulence pump)" 또는 "LTP"는 당해 분야에 공지된 것으로서, 유체(예를 들어, 세포 배양물)에서 실질적인 양의 전단 응력 또는 유체 난류를 유발시키지 않으면서, 시스템 내에서 유체(예를 들어, 세포 배양물)를 단일 방향(예를 들어, 제1 흐름 방향 또는 제2 흐름 방향)으로 이동시킬 수 있거나 시스템 내에서 유체(예를 들어, 세포 배양물)를 두 가지 방향(제1 흐름 방향 및 제2 흐름 방향)으로 가역적으로 흐르게 할 수 있는 디바이스를 의미한다. LTP가 유체(예를 들어, 세포 배양물)를 교번하는 제1 흐름 방향 및 제2 흐름 방향으로 흐르게 하기 위해 사용될 때, 제2 흐름 방향은 제1 흐름 방향에 대해 대략 반대이다. LTP의 예는 연동 펌프이다. LTP의 다른 예는 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0025] 용어 "흐름을 역전시키는" 또는 "흐름 방향을 역전시키는"은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 숙련된 기술자는 유체의 흐름을 역전시키는 것이 유체의 전체 흐름 방향을 일반적으로 반대의 전체 흐름 방향(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 방법 또는 시스템에서 세포 배양물의 흐름 방향)으로 변경시키는 것을 의미하는 것으로 인식할 것이다.
- [0026] 용어 "교환 분율(exchange fraction)"은 유체를 제1 기간 동안 저장소 외측의 개방 회로 여과 시스템의 구성요소들을 통해(예를 들어, 제1 도관, 적어도 하나의 TFF 유닛, 및 제2 도관을 통해) 제1 방향으로 흐르게 하고 유체를 제2 기간 동안 제2 방향으로 흐르게 한 후에 저장소로 되돌아오는 유체(예를 들어, 세포 배양물)의 백분율을 의미한다.

- [0027] 용어 "실질적으로 부재인"은 특정 물질(예를 들어, 포유류 세포 또는 숙주 포유류 세포 단백질 또는 핵산)의 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 또는 고체)을 의미한다. 예를 들어, 본원에 기술된 방법을 이용하여 형성되는 여액에는 포유류 세포 또는 마이크로 캐리어가 실질적으로 존재하지 않을 수 있다. 다른 예에서, 본원에 기술된 임의의 공정들을 이용하여 단리된 재조합 단백질에는 숙주 포유류 세포 단백질, 핵산, 및/또는 오염 바이러스가 실질적으로 존재하지 않을 수 있다.
- [0028] 용어 "배양하는" 또는 "세포 배양하는"은 조절된 물리적 조건 세트 하에 액체 배양 배지에서의 포유류 세포의 유지 또는 성장을 의미한다.
- [0029] 용어 "액체 배양 배지"는 시험관 내에서 배지 중에서 포유류 세포를 성장시킬 수 있는 충분한 영양소를 함유하는 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, 소듐, 칼륨, 철, 구리, 아연, 셀레늄, 및 다른 필수적인 미량 금속, 및 소듐 비카보네이트 중 하나 이상을 함유할 수 있다. 액체 배양 배지는 포유동물로부터의 혈청을 함유할 수 있다. 일부 예에서, 액체 배양 배지는 포유동물로부터의 혈청 또는 다른 추출물을 함유하지 않는다(규정된 액체 배양 배지). 액체 배양 배지는 미량 금속, 포유류 성장 호르몬, 및/또는 포유류 성장 인자를 함유할 수 있다. 액체 배양 배지의 비-제한적인 예는 본원에 기술되어, 추가 예는 당해 분야에 공지되고 상업적으로 입수 가능하다.
- [0030] 용어 "마이크로 캐리어"는 포유류 세포(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 포유류 세포)의 부착을 가능하게 하거나 증진시키는 표면을 함유한 20  $\mu\text{m}$  내지 약 1000  $\mu\text{m}$ 의 크기를 갖는 입자(예를 들어, 유기 폴리머)를 의미한다. 마이크로 캐리어는 하나 이상의 기공(예를 들어, 약 10  $\mu\text{m}$  내지 약 100  $\mu\text{m}$ 의 평균 직경을 갖는 기공)을 함유할 수 있다. 마이크로 캐리어의 비-제한적인 예는 본원에 기술되어 있다. 마이크로 캐리어의 추가 예는 당해 분야에 공지되어 있다. 마이크로 캐리어는 예를 들어, 폴리머(예를 들어, 셀룰로오스, 폴리에틸렌 글리콜, 또는 폴리-(락틱-코-글리콜산))를 함유할 수 있다.
- [0031] 용어 "동물-유래 성분이 존재하지 않는 액체 배양 배지"는 동물로부터 유래된 임의의 성분들(예를 들어, 단백질 또는 혈청)을 함유하지 않는 액체 배양 배지를 의미한다.
- [0032] 용어 "혈청-부재 액체 배양 배지"는 동물 혈청을 함유하지 않는 액체 배양 배지를 의미한다.
- [0033] 용어 "혈청-함유 액체 배양 배지"는 동물 혈청을 함유하는 액체 배양 배지를 의미한다.
- [0034] 용어 "화학적으로 규정된 액체 배양 배지"는 실질적으로 모든 화학적 성분들이 알려진 액체 배양 배지를 의미한다. 예를 들어, 화학적으로 규정된 액체 배양 배지는 우태아 혈청, 소 혈청 알부민, 또는 인간 혈청 알부민을 함유하지 않는데, 왜냐하면, 이러한 제조물은 통상적으로 알부민 및 지질의 복잡한 혼합물을 함유하기 때문이다.
- [0035] 용어 "단백질-부재 액체 배양 배지"는 임의의 단백질(예를 들어, 임의의 검출 가능한 단백질)을 함유하지 않는 액체 배양 배지를 의미한다.
- [0036] 용어 "면역글로불린"은 적어도 15개의 아미노산(예를 들어, 적어도 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100 개의 아미노산)의 면역글로불린 단백질의 아미노산 서열(예를 들어, 가변 도메인 서열, 프레임워크 서열, 또는 불변 도메인 서열)을 함유하는 폴리펩티드를 의미한다. 면역글로불린은 예를 들어, 적어도 15개의 아미노산의 경쇄 면역글로불린 및/또는 적어도 15개의 아미노산의 중쇄 면역글로불린을 포함할 수 있다. 면역글로불린은 단리된 항체(예를 들어, IgG, IgE, IgD, IgA, 또는 IgM)일 수 있다. 면역글로불린은 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 함유한 조작된 단백질(예를 들어, 융합 단백질)일 수 있다. 면역글로불린의 비-제한적인 예는 본원에 기술되어 있으며, 면역글로불린의 추가 예는 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0037] 용어 "단백질 단편" 또는 "폴리펩티드 단편"은 길이가 적어도 또는 약 4개의 아미노산, 예를 들어, 적어도 또는 약 5개의 아미노산, 적어도 또는 약 6개의 아미노산, 적어도 또는 약 7개의 아미노산, 적어도 또는 약 8개의 아

미노산, 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 아미노산 또는 길이가 20개를 초과하는 아미노산인 폴리펩티드 서열의 일부를 의미한다. 재조합 단백질 단편은 본원에 기술된 임의의 방법을 이용하여 형성될 수 있다.

[0038] 용어 "조작된 단백질"은 유기체(예를 들어, 포유동물) 내에 존재하는 내인성 핵산에 의해 자연적으로 인코딩되지 않는 폴리펩티드를 의미한다. 조작된 단백질의 예는 효소(예를 들어, 조작된 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 함유한 항원-결합 단백질을 포함한다.

[0039] 특정 문맥에서 용어 "단리하다" 또는 "단리하는"은 여액(예를 들어, 본 발명에서 기술된 방법을 이용하여 형성된 여액)에 존재하는 하나 이상의 다른 성분, 예를 들어, 여액에 존재하는 DNA, RNA 및/또는 다른 단백질의 하나 이상의 성분으로부터 재조합 단백질을 적어도 일부 정제하거나 정제하는 것(예를 들어, 적어도 또는 약 5 중량%, 예를 들어, 적어도 또는 약 10 중량%, 15 중량%, 20 중량%, 25 중량%, 30 중량%, 40 중량%, 45 중량%, 50 중량%, 55 중량%, 60 중량%, 65 중량%, 70 중량%, 75 중량%, 80 중량%, 85 중량%, 90 중량%, 또는 적어도 또는 약 95 중량% 순도)을 의미한다. 여액으로부터 단백질을 단리시키기 위한 비-제한적인 방법은 본원에 기술되며, 다른 것들은 당해 분야에 공지되어 있다.

[0040] 용어 "분비된 단백질" 또는 "분비된 재조합 단백질"은 포유류 세포 내에서 번역될 때 본래 적어도 하나의 분비 신호 서열을 함유하고, 적어도 일부, 포유류 세포에서 분비 신호 서열의 효소적 분열을 통해, 적어도 일부 세포의 공간(예를 들어, 액체 배양 배지)으로 방출되는 단백질 또는 재조합 단백질을 의미한다.

[0041] 구 "구배 관류(gradient perfusion)"는 당해 분야에 공지되어 있고, 제거되고 배양 기간(예를 들어, 일일 기준으로 배양 배지 재공급 속도) 동안 점진적 기간(예를 들어, 약 24시간 기간, 약 1분 내지 약 24시간의 기간, 또는 24시간 초과의 기간)에 걸쳐 초기 배양물 부피에 첨가되는 배양 배지의 부피의 점진적 변화(incremental change)(예를 들어, 증가 또는 감소)를 지칭한다. 날마다 제거되고 대체되는 배지의 분율은 특정 시간에 배양되는 특정 세포, 초기 시딩 밀도, 및 세포 밀도에 따라 달라질 수 있다.

[0042] 본원에서 사용되는 "비생산율(specific productivity rate)" 또는 "SPR"은 일일 당 포유류 세포 당 형성된 재조합 단백질의 질량 또는 효소적 활성을 지칭한다. 재조합 항체에 대한 SPR은 대개 질량/세포/일로서 측정된다. 재조합 효소에 대한 SPR은 대개 단위/세포/일 또는 (단위/질량)/세포/일로서 측정된다.

[0043] 본원에서 사용되는 "부피 생산율(volume productivity rate)" 또는 "VPR"은 일일 당 배양물의 부피당(예를 들어, 생물반응기, 용기 또는 튜브 부피의 L 당) 형성된 재조합 단백질의 질량 또는 효소적 활성을 지칭한다. 재조합 항체에 대한 VPR은 대개 질량/L/일로서 측정된다. 재조합 효소에 대한 VPR은 대개 단위/L/일 또는 질량/L/일로서 측정된다.

[0044] 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 기술된다. 당해 분야에 공지된 다른 적합한 방법 및 물질이 또한 사용될 수 있다. 물질, 방법, 및 예는 오로지 예시적인 것으로서, 제한적인 것으로 의도되지 않는다. 본원에 언급된 모든 공개문, 특허출원, 특허, 서열, 데이터베이스 번호(database entry), 및 다른 참조문헌은 이의 전문이 참고로 포함된다. 상충되는 경우에, 정의를 포함하는 본 명세서가 지배적이다.

[0045] 본 발명의 다른 특징 및 장점들은 하기 상세한 설명 및 도면으로부터, 그리고 청구항들로부터 명백하게 될 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 세포 배양물을 가공하기 위해 사용될 수 있는 예시적 개방 회로 여과 시스템을 도시한 도식적 다이어그램이다. 도시된 시스템은 제1 도관(6)에 배치된 단일 펌프(8)를 포함한다.

도 2는 제2 도관(7)에 배치된 단일 펌프(8)를 포함하는 예시적 개방 회로 여과 시스템을 도시한 도식적 다이어그램이다.

도 3은 저장소(2)(예를 들어, 생물반응기)에 배치되고 제1 도관(6)에 대해 근위에 배치된 단일 펌프(8)를 포함하는 예시적 개방 회로 여과 시스템을 도시한 도식적 다이어그램이다.

도 4는 각각이 2개의 직교류 필터(12)를 포함한 2개의 TFF 유닛(3)을 포함하는 예시적 개방 회로 여과 시스템을 도시한 도식적 다이어그램이며, 여기서, 2개의 TFF 유닛(3)은 제3 도관(14)에 의해 유체적으로 연결되며, 단일 펌프(8)는 제3 도관(14)에 배치된다.

도 5는 제2 도관(7)에 배치된 단일 펌프(8)를 포함하고 여러 개의 압력 센서(14) 및 유량계(15)를 포함하는 예시적 개방 회로 여과 시스템을 도시한 도식적 다이어그램이다.

도 6은 제1 도관(6)에 배치된 펌프(8) 및 제2 도관(7)에 배치된 펌프(8)를 포함하는 예시적 개방 회로 여과 시스템을 도시한 도식적 다이어그램이다.

도 7은 저장소(2) 및 제1 서브시스템 및 제2 서브시스템(19)을 포함하는 예시적 개방 회로 여과 시스템을 도시한 도식적 다이어그램이다.

도 8은 예시적 시스템에서 제1 흐름 방향을 도시한 도식적 다이어그램이다.

도 9는 제1 기간에 걸쳐 제1 흐름 방향의 세포 배양물의 흐름, 기간( $t_{r1}$ )에 걸쳐 제1 흐름 방향의 역전, 제2 기간( $t_{r2}$ )에 걸쳐 제2 흐름 방향으로 세포 배양물의 흐름, 기간( $t_{r3}$ )에 걸쳐 제2 흐름 방향의 역전, 및 제3 기간( $t_3$ ) 동안 제1 흐름 방향으로 세포 배양물의 흐름을 도시한 다이어그램이다. 본 다이어그램에서, F는 세포 배양물 유량(L/분)을 나타낸다.

도 10은 본원에 제공된 방법을 사용하거나(GC2008 Set6 TFF V24; 회색) ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology) 여과(GC2008 Set5 ATF<sup>TM</sup> V21; 검은색)를 사용하여 가공된 세포 배양물 중의 생존 세포 밀도의 그래프이다.

도 11은 본원에 제공된 방법(회색)을 사용하거나 ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology) 여과(검정색)를 사용하여 가공된 세포 배양물에서 생존 세포의 백분율의 그래프이다.

도 12는 본원에 제공된 방법(회색)을 사용하거나 ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology) 여과(검정색)를 사용하여 가공된 세포 배양물의 커패시턴스(capacitance)(pF)의 그래프이다.

도 13은 본원에 제공된 방법(회색)을 사용하거나 ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology) 여과(검정색)를 사용하여 가공된 세포 배양물의 생존 세포의 평균 직경의 그래프이다.

도 14는 본원에 제공된 방법(회색)을 사용하거나 ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology) 여과(검정색)를 사용하여 가공된 세포 배양물에서 검출된 분비된 면역글로불린(IgG)의 그래프이다.

도 15는 본원에 제공된 방법(회색)을 사용하거나 ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology) 여과(검정색)를 사용하여 가공된 세포 배양물의 부피 생산성(g/L/d)의 그래프이다.

도 16은 본원에 제공된 방법(회색)을 사용하거나 ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology) 여과(검정색)를 사용하여 가공된 세포 배양물의 비생산성(pg/세포/일)의 그래프이다.

도 17은 본원에 제공된 방법(회색)을 사용하거나 ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology) 여과(검정색)를 사용하여 가공된 세포 배양물의 시빙 계수 백분율(percentage sieving coefficient)의 그래프이다.

도 18은 본원에 제공된 방법(GC2008 Set6 TFF V24)(회색)을 사용하거나 ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology) 여과(검정색)를 사용하여 가공된 세포 배양물의 글루코오스 비소비(ng/세포/일)의 그래프이다.

도 19는 본원에 제공된 방법(회색)을 사용하거나 ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology) 여과(검정색)를 사용하여 가공된 세포 배양물의 락테이트 비생산(ng/세포/일)의 그래프이다.

도 20은 본원에 제공된 방법(회색)을 사용하거나 ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology) 여과(검정색)를 사용하여 가공된 세포 배양물의 호기성 글루코오스 비소비(cpmol/세포/시간)의 그래프이다.

도 21은 본원에 제공된 방법(회색)을 사용하거나 ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology) 여과(검정색)를 사용하여 가공된 세포 배양물의 글루코오스로부터의 락테이트 수율(mol/mol)의 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047]

본원에는 저장소, 제1 유입구 및 제2 유입구를 갖는 TFF 유닛, 저장소와 TFF 유닛 제1 유입구 간에 유체 소통하는 제1 도관, 및 저장소와 TFF 유닛 제2 유입구 간에 유체 소통하는 제2 도관, 및 시스템 내에 배치된 적어도 하나의 펌프를 포함하는 개방 회로 여과 시스템으로서, 적어도 하나의 펌프를 작동시켜 유체를 저장소로부터 유체 도관, TFF 유닛, 제2 도관을 통해 그리고 다시 저장소로, 시스템을 통해 가역적으로 흐르게 하는 개방 회로 여과 시스템이 제공된다. 또한, 개방 회로 여과 시스템(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 개방 회로 여과 시스템)을 사용하는 것을 포함하는 세포 배양물을 가공하는 방법이 제공된다. 본원에 기술된 시스템 및 방법은 예를 들어, 세포 배양물 가공 동안 높은 세포 생존능력 및/또는 세포 생존능력 백분율을 제공한다. 본원에 제공된 시스템 및 방법의 추가 이점은 하기에 기술된다.

[0048]

### 개방 회로 여과 시스템

[0049]

본 명세서는 본원에 기술된 방법을 수행하기 위해 유용한 예시적 개방 회로 여과 시스템을 제공한다. 이러한 시스템은 (시스템에서) 적어도 하나의 펌프를 작동시켜 유체를 저장소로부터, 제1 도관, TFF 유닛, 제2 도관을 통해, 그리고 다시 저장소로, 시스템을 통해 가역적으로 흐르게 하도록 설계된다.

[0050]

### 예시적 단일 펌프 시스템

[0051]

시스템(1)의 비-제한적인 예는 도 1에 제공된다. 시스템(1)은 저장소(2), 예를 들어, 생물반응기, 제1 도관(6), 제2 도관(7), 및 하우징(11) 및 단일 직교류 투브형 필터(12), 제1 유입구(4), 및 제2 유입구(5)를 포함하는 TFF 유닛(3)을 포함한다. 단일 직교류 투브형 필터(12)는 예를 들어, 약 0.2  $\mu\text{m}$ 의 기공 크기를 가질 수 있다. 제1 도관(6)은 저장소(2)와 제1 유입구(4) 간에 유체 소통한다. 제2 도관(7)은 저장소(2)와 제2 유입구(5) 간에 유체 소통한다. 유체 도관(6) 및 유체 도관(7)은 임의의 타입의 생체적합성 배관, 예를 들어, 실리콘 배관일 수 있다. TFF 유닛(3)은 도 1에 도시된 바와 같이, 단일 직교류 투브형 필터(12), 또는 2개 이상의 직교류 필터를 포함할 수 있다.

[0052]

도 1에서의 시스템(1)은 또한, 제1 도관(6)에 배치된, 펌프(8), 예를 들어, 저 난류 펌프(LTP), 예를 들어, 연동 펌프를 포함한다. 작동할 때에, 펌프(8)는 저장소(2)로부터 제1 도관(6), TFF 유닛(3), 제2 도관(7)을 통해, 그리고 다시 저장소(2)로 시스템을 통해 유체를 가역적으로 흐른다. TFF 유닛(3)의 하우징(11)은 여액 유출구(13)를 포함한다. 시스템(1)은 또한, 여액 보유 탱크(10), 및 여액 유출구(13)와 여액 보유 탱크(10) 간에 유체 소통하는 여액 도관(9)을 포함한다. 여액 보유 탱크(10)는 예를 들어, 냉동 보유 탱크일 수 있다. 여액 도관(9)은 임의의 타입의 생체적합성 배관, 예를 들어 실리콘 배관일 수 있다.

[0053]

다른 예시적인 시스템(1)은 도 2에 도시되어 있는데, 이는 적어도, LTP가 시스템의 상이한 부분에 위치되는 것을 제외하고 도 1에 도시된 것과 유사하다. 시스템(1)은 저장소(2), 예를 들어, 생물반응기, 제1 도관(6), 제2 도관(7), 및 하우징(11) 및 단일 직교류 투브형 필터(12), 제1 유입구(4), 및 제2 유입구(5)를 포함하는 TFF 유닛(3)을 포함한다. 단일 직교류 투브형 필터(12)는 예를 들어, 약 0.2  $\mu\text{m}$ 의 기공 크기를 가질 수 있다. 제1 도관(6)은 저장소(2)와 제1 유입구(4) 간에 유체 소통시킨다. 제2 도관(7)은 저장소(2)와 제2 유입구(5) 간에 유체 소통시킨다. 유체 도관(6) 및 유체 도관(7)은 임의의 타입의 생체적합성 배관, 예를 들어, 실리콘 배관일 수 있다. TFF 유닛(3)은 도 2에 도시된 바와 같이, 단일 직교류 투브형 필터(12)를 포함할 수 있거나, 2개 이상의 직교류 필터 세트를 포함할 수 있다.

[0054]

도 2에서의 시스템(1)은 또한, 제2 도관(7)에 배치된, 펌프(8), 예를 들어, 저 난류 펌프(LTP), 예를 들어, 연동 펌프를 포함한다. 작동할 때에, 펌프(8)는 저장소(2)로부터, 제1 도관(6), TFF 유닛(3), 제2 도관(7)을 통해, 그리고 다시 저장소(2)로, 시스템을 통해 유체를 가역적으로 흐른다. TFF 유닛(3)의 하우징(11)은 여액 유출구(13)를 포함한다. 시스템(1)은 또한, 여액 보유 탱크(10), 및 여액 유출구(13)와 여액 보유 탱크(10) 간에 유체 소통하는 여액 도관(9)을 포함한다. 여액 보유 탱크(10)는 예를 들어, 냉동 보유 탱크일 수 있다. 여액 도관(9)은 임의의 타입의 생체적합성 배관, 예를 들어, 실리콘 배관일 수 있다.

[0055]

추가 예시적인 시스템(1)은 도 3에 도시되어 있다. 시스템(1)은 저장소(2), 예를 들어, 생물반응기, 제1 도관(6), 제2 도관(7), 및 하우징(11) 및 단일 직교류 투브형 필터(12), 제1 유입구(4) 및 제2 유입구(5)를 포함하는 TFF 유닛(3)을 포함한다. 단일 직교류 투브형 필터(12)는 예를 들어, 약 0.2  $\mu\text{m}$ 의 기공 크기를 가질 수

있다. 제1 도관(6)은 저장소(2)와 제1 유입구(4) 간에 유체 소통시킨다. 제2 도관(7)은 저장소(2)와 제2 유입구(5) 간에 유체 소통시킨다. 유체 도관(6) 및 유체 도관(7)은 임의의 타입의 생체적합성 배관, 예를 들어, 실리콘 배관일 수 있다. TFF 유닛(3)은 도 3에 도시된 바와 같이, 단일 직교류 투브형 필터(12)를 포함할 수 있거나, 2개 이상의 직교류 필터 세트를 함유할 수 있다.

[0056] 도 3에서의 시스템(1)은 또한, 저장소(2), 예를 들어 생물 반응기에 배치되고 제1 도관(6)에 대해 근위에 배치된, 단일 펌프(8), 예를 들어, 저 난류 펌프(LTP), 예를 들어, 연동 펌프를 포함한다. 작동할 때에, 단일 펌프(8)는 저장소(2)로부터, 제1 도관(6), TFF 유닛(3), 제2 도관(7)을 통해 그리고 다시 저장소(2)로, 시스템을 통해 유체를 가역적으로 흐르게 한다. TFF 유닛(3)의 하우징(11)은 여액 유출구(13)를 포함한다. 시스템(1)은 또한, 여액 보유 탱크(10), 및 여액 유출구(13)와 여액 보유 탱크(10) 간에 유체 소통하는 여액 도관(9)을 포함한다. 여액 보유 탱크(10)는, 예를 들어, 냉동 보유 탱크일 수 있다. 여액 도관(9)은 임의의 타입의 생체적합성 배관, 예를 들어, 실리콘 배관일 수 있다.

[0057] 예시적인 시스템(1)은 도 4에 도시된 것으로서, 이는 적어도 시스템이 다수의 TFF 유닛을 포함하는 것을 제외하고 도 1 내지 도 3에 예시된 것과 유사하다. 시스템(1)은 저장소(2), 예를 들어, 생물반응기, 제1 도관(6), 제2 도관(7), 및 각각이 하우징(11), 제1 유입구(4), 제2 유입구(5) 및 2개의 직교류 필터(12)를 포함하는 2개의 TFF 유닛(3)을 포함한다. 2개의 TFF 유닛(3)은 제3 도관(14)에 의해 유체적으로 연결된다. 직교류 필터(12) 각각은 예를 들어, 약 0.2  $\mu\text{m}$ 의 기공 크기를 가질 수 있다. 제1 도관(6)은 저장소(2)와 2개의 TFF 유닛(3) 중 하나의 제1 유입구(4)와 유체 소통하며, 제2 도관(7)은 저장소(2)와 2개의 TFF 유닛(3) 중 다른 하나의 제2 유입구(5)와 유체 소통한다. 제3 도관은 예를 들어, 도 4에 도시된 바와 같이, TFF 유닛(3)의 제2 유입구(5)와 다른 TFF 유닛(3)의 제1 유입구(4) 간에 유체 소통한다. 유체 도관(6, 7, 및 14)은 임의의 타입의 생체적합성 배관, 예를 들어, 실리콘 배관일 수 있다. 당업자에 의해 인식될 수 있는 바와 같이, TFF 유닛(3)은 대안적으로, 단일 직교류 필터, 예를 들어, 투브형 직교류 필터를 함유할 수 있다.

[0058] 도 4에서의 시스템(1)은 또한, 제3 도관(14)에 배치된, 단일 펌프(8), 예를 들어, 저 난류 펌프(LTP), 예를 들어, 연동 펌프를 포함한다. 작동할 때, 단일 펌프(8)는 저장소(2)로부터, 제1 도관(6), TFF 유닛(3), 제3 도관(14), 다른 TFF 유닛(3), 제2 도관(7)을 통해, 그리고 다시 저장소(2)로, 시스템을 통해 유체를 가역적으로 흐르게 한다. 2개의 TFF 유닛(3) 각각의 하우징(11)은 여액 유출구(13)를 포함한다. 시스템(1)은 또한 2개의 여액 보유 탱크(10) 및 2개의 여액 도관(9)을 포함한다. 각 단일 여액 보유 탱크(10)는 여액 도관(9)에 의해 TFF 유닛(3)에서의 여액 유출구(13)에 유체적으로 연결된다. 여액 보유 탱크(10)는 예를 들어, 냉동 보유 탱크일 수 있다. 여액 도관(9)은 임의의 타입의 생체적합성 배관, 예를 들어, 실리콘 배관일 수 있다.

[0059] 추가 예시적인 시스템(1)은 도 5에 도시되어 있다. 시스템(1)은 저장소(2), 예를 들어, 생물반응기, 제1 도관(6), 제2 도관(7), 및 하우징(11) 및 단일 직교류 투브형 필터(12), 제1 유입구(4) 및 제2 유입구(5)를 포함하는 TFF 유닛(3)을 포함한다. 직교류 필터(12)는 예를 들어, 약 0.2  $\mu\text{m}$ 의 기공 크기, 약 830개의 섬유/필터의 섬유 개수(fiber count)를 가지고, 1 mm의 ID 및 30 cm의 길이를 갖는 섬유를 포함하고, 0.77 mm의 여과 면적을 가질 수 있다. 제1 도관(6)은 저장소(2)와 제1 유입구(4) 간에 유체 소통한다. 제2 도관(7)은 저장소(2)와 제2 유입구(5) 간에 유체 소통한다. 유체 도관(6, 7)은 임의의 타입의 생체적합성 배관, 예를 들어 실리콘 배관일 수 있다. 유체 도관(6, 7)은 0.5 인치 내부 직경(ID) 이동 배관(transfer tubing)일 수 있다.

[0060] 도 5에서의 시스템(1)은 또한, 제2 도관(7)에 배치된, 단일 펌프(8), 예를 들어, 저 난류 펌프(LTP), 예를 들어, 연동 펌프를 포함한다. 펌프(8)는 트윈 채널 GORE Sta-Pure 배관(16 mm ID, 4 mm 벽)이 장착된 왓슨-말로(Watson-Marlow) 연동 펌프(620) Du일 수 있다. 작동할 때, 단일 펌프(8)는 저장소(2)로부터, 제1 도관(6), TFF 유닛(3), 제2 도관(7)을 통해, 그리고 다시 저장소(2)로, 시스템을 통해 유체를 가역적으로 흐르게 한다. TFF 유닛(3)의 하우징(11)은 여액 유출구(13)를 포함한다. 시스템(1)은 또한, 여액 보유 탱크(10), 및 여액 유출구(13)와 여액 보유 탱크(10) 간의 유체 소통하는 여액 도관(9)을 포함한다. 여액 보유 탱크(10)는 예를 들어, 냉동 보유 탱크일 수 있다. 여액 도관(9)은 임의의 타입의 생체적합성 배관, 예를 들어, 실리콘 배관일 수 있다. 시스템(1)은 또한, 제1 도관(6), 여액 도관(9), 및 제2 도관(7) 각각에 배치된 압력 센서(14)를 포함한다. 압력 센서(14)는 PendoTECH PressureMAT™ 압력 센서일 수 있다. 시스템(1)은 또한, 제2 도관(7)에 배치된 유량계(15)를 포함한다. 유량계(15)는 EM-TEC BioProTT, 비-침습성, 실시간 유량계일 수 있다.

[0061] 도 5에서의 시스템(1)은 또한, 포트 도관(16) 및 포트(17)를 포함하며, 여기서, 포트 도관(16)은 제1 도관(6)과 포트(17) 간에 유체 소통한다. 시스템(1)은 또한, 포트 도관(16)에 배치된 클램프(18)를 포함할 수 있다. 포트(17) 및 포트 도관(16)은 유체를 제1 도관(6)을 통해 시스템(1)에 첨가하기 위해 사용될 수 있다.

## [0062] 예시적인 다중 펌프 시스템

2개의 펌프(8)를 포함하는 시스템(1)의 비-제한적인 예는 도 6에 도시되어 있다. 시스템(1)은 저장소(2), 예를 들어, 생물반응기, 제1 도관(6), 제2 도관(7), 및 하우징(11) 및 단일 직교류 투브형 필터(12), 제1 유입구(4) 및 제2 유입구(5)를 포함하는 TFF 유닛(3)을 포함한다. 단일 직교류 투브형 필터(12)는 약 0.2  $\mu\text{m}$ 의 기공 크기를 가질 수 있다. 제1 도관(6)은 저장소(2)와 제1 유입구(4) 간에 유체 소통한다. 제2 도관(7)은 저장소(2)와 제2 유입구(5) 간에 유체 소통한다. 유체 도관(6 및 7)은 임의의 타입의 생체적합성 배관, 예를 들어, 실리콘 배관일 수 있다. TFF 유닛(3)은 도 6에 도시된 바와 같이, 단일 직교류 투브형 필터(12)를 포함할 수 있거나, 2개 이상의 직교류 필터 세트를 포함할 수 있다.

도 6에서의 시스템(1)은 또한, 제1 도관(6)에 배치된, 펌프(8), 예를 들어, 저 난류 펌프(LTP), 예를 들어, 연동 펌프, 및 제2 도관(7)에 배치된, 펌프(8), 저 난류 펌프(LTP), 예를 들어, 연동 펌프를 포함한다. 작동할 때, 제1 도관(6)에 배치된 펌프(8)는 저장소(2)로부터, 제1 도관(6), TFF 유닛(3), 제2 도관(7)을 통해, 그리고 다시 저장소(2)로, 시스템을 통해 유체를 제1 방향으로 흐르게 한다. 작동할 때, 제2 도관(7)에 배치된 펌프(8)는 저장소(2)로부터, 제2 도관(7), TFF 유닛(3), 제1 도관(6)을 통해, 그리고 다시 저장소(2)로, 시스템을 통해 유체를 제2 방향(제1 방향과 반대 방향)으로 흐르게 한다. TFF 유닛(3)의 하우징(11)은 여액 유출구(13)를 포함한다. 시스템(1)은 또한, 여액 보유 탱크(10), 및 여액 유출구(13)와 여액 보유 탱크(10) 간에 유체 소통하는 여액 도관(9)을 포함한다. 여액 보유 탱크(10)는 예를 들어, 냉동 보유 탱크일 수 있다. 여액 도관(9)은 임의의 타입의 생체적합성 배관, 예를 들어, 실리콘 배관일 수 있다.

## [0065] 2개 이상의 서브시스템을 포함하는 예시적인 시스템

숙련된 기술자는 다수의 서브시스템이 시스템에 부가될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 2개 이상의 서브시스템(19)을 포함한 예시적인 시스템(1)은 도 7에 도시되어 있다. 시스템(1)은 저장소(2); 및 제1 서브시스템 및 제2 서브시스템(19)을 포함하며, 각 서브시스템(19)은 도 7에 도시된 바와 같이, 제1 도관(6), 제2 도관(7), 및 하우징(11) 및 단일 직교류 투브형 필터(12), 제1 유입구(4), 및 제2 유입구(5)를 포함하는 TFF 유닛(3)을 포함한다. 단일 직교류 투브형 필터(12)는 약 0.2  $\mu\text{m}$ 의 기공 크기를 가질 수 있다. 각 서브시스템에서, 제1 도관(6)은 저장소(2)와 제1 유입구(4) 간에 유체 소통한다. 제2 도관(7)은 각 서브시스템에서, 저장소(2)와 제2 유입구(5)와 유체 소통한다. 유체 도관(6 및 7)은 임의의 타입의 생체적합성 배관, 예를 들어, 실리콘 배관일 수 있다. TFF 유닛(3)은 도 7에 도시된 바와 같이, 각각 단일 직교류 투브형 필터(12)를 포함할 수 있거나, 각각 2개 이상의 직교류 필터 세트를 포함할 수 있다. 단일 직교류 투브형 필터(12)는 약 0.2  $\mu\text{m}$ 의 기공 크기를 가질 수 있다.

도 7에서의 각 서브시스템(19)은 또한, 제1 도관(6)에 배치된, 단일 펌프(8), 예를 들어, 저 난류 펌프(LTP), 예를 들어, 연동 펌프를 포함한다. 작동할 때, 각 서브시스템(19)에서 단일 펌프(8)는 저장소(2)로부터, 제1 도관(6), TFF 유닛(3), 제2 도관(7)을 통해, 그리고 다시 저장소(2)로, 시스템을 통해 유체를 가역적으로 흐르게 한다. 2개의 TFF 유닛(3) 각각의 하우징(11)은 여액 유출구(13)를 포함한다. 각 서브시스템(19)은 또한, 여액 보유 탱크(10), 및 TFF 유닛(3)과 여액 보유 탱크(10) 간에 유체 소통하는 여액 도관(9)을 포함한다. 여액 보유 탱크(10)는 예를 들어, 냉동 보유 탱크일 수 있다. 여액 도관(9)은 임의의 타입의 생체적합성 배관, 예를 들어, 실리콘 배관일 수 있다.

## [0068] 추가 예시적인 시스템 구조 및 특징

저장소, 도관, TFF 유닛(들), 펌프(들), 여액 보유 탱크(들), 유량계(들), 압력 센서(들), 클램프(들), 포트(들), 및 생물학적 제조 시스템(들)을 위해 사용될 수 있는 비-제한적인 예시적 구조는 하기에 기술된다.

## [0070] 저장소

저장소는 생물반응기일 수 있다. 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 5,000 L, 약 500 L 내지 약 10,000 L, 약 5,000 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 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. 본원에 기술된 임의의 생물반응기는 관류 생물반응기일 수 있다. 예시적인 생물반응기는 다수의 상이한 상업 회사(commercial vendor)(예를 들어, Xcellerex(Marlborough, MA) 및 Holland Applied Technologies(Burr Ridge, IL))로부터 구매될 수 있다.

[0072] 대안적으로 또는 추가로, 저장소는 보유 탱크(holding tank)일 수 있다. 예를 들어, 이러한 냉동 보유 탱크는 약 5분 내지 약 1주(예를 들어, 약 5분 내지 약 6일, 약 5분 내지 약 5일, 약 5분 내지 약 4일, 약 5분 내지 약 3일, 약 5분 내지 약 2일, 약 5분 내지 약 36시간, 약 5분 내지 약 24시간, 약 5분 내지 약 12시간)의 기간 동안 재조합 단백질을 함유한 세포 배양물을 보유할 수 있다. 보유 탱크에서의 세포 배양물은 약 15°C 내지 약 37°C, 약 20°C 내지 약 37°C, 약 25°C 내지 약 37°C, 약 30°C 내지 약 37°C, 또는 약 20°C 내지 약 30°C의 온도에서 보유될 수 있다.

### [0073] 도관

[0074] 본원에 기술된 도관은 단순 배관, 예를 들어, 생체적합성 배관일 수 있다. 유용한 배관의 비-제한적인 예는 실리콘 고무, 폴리우레탄, 폴리디옥사논(PDO), 폴리하이드록시알카노에이트, 폴리하이드록시부티레이트, 폴리(글리세롤 세바케이트), 폴리글리콜라이드, 폴리락타이드, 폴리카프롤اكتون, 또는 폴리언하이드라이드, 또는 이러한 폴리머 및/또는 다른 폴리머를 포함한 코폴리머 또는 유도체를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 본원에 기술된 임의의 도관은 폴리비닐 클로라이드를 포함할 수 있다. 임의의 도관은 예를 들어, 약 5 mm 내지 약 50 mm(예를 들어, 약 10 mm 내지 약 40 mm, 약 10 mm 내지 약 35 mm, 또는 약 10 mm 내지 약 30 mm, 약 10 mm 내지 약 20 mm)의 내부 직경(ID)을 가질 수 있다. 도관은 용접 가능한 이동 배관일 수 있다. 본 디바이스 및 방법에서 사용될 수 있는 도관의 추가적인 예 및 도관의 성질은 당업자에 의해 널리 공지되어 있다.

### [0075] TFF 유닛 및 직교류 필터

[0076] 본원에 기술된 임의의 시스템 또는 서브시스템, 또는 방법에서 사용되는 TFF 유닛은 하나 이상의 직교류 필터를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 TFF 유닛은 단일 직교류 필터(예를 들어, 튜브형 직교류 필터)를 포함할 수 있다. 다른 예에서, TFF 유닛은 2개 이상(예를 들어, 3개, 4개, 5개, 또는 6개)의 직교류 필터(예를 들어, 튜브형 직교류 필터)를 포함할 수 있다. TFF 유닛에서의 2개 이상의 직교류 필터는 동일할 수 있거나 상이 할 수 있다(예를 들어, 수, 타입, 형상, 표면적, 또는 기공 크기가 상이함). 특정 예에서, TFF 유닛은 2개의 튜브형 직교류 필터를 포함할 수 있다. TFF 유닛에 존재하는 2개 이상의 직교류 필터는 구부러진 직사각형의 형상을 가질 수 있다.

[0077] 직교류 필터(들)는 약 0.1  $\mu\text{m}$  내지 약 0.45  $\mu\text{m}$ (예를 들어, 약 0.15  $\mu\text{m}$  내지 약 0.40  $\mu\text{m}$ , 약 0.15  $\mu\text{m}$  내지 약 0.35  $\mu\text{m}$ , 약 0.15  $\mu\text{m}$  내지 약 0.30  $\mu\text{m}$ , 약 0.15  $\mu\text{m}$  내지 약 0.25  $\mu\text{m}$ ), 또는 약 0.20  $\mu\text{m}$ 의 평균 기공 크기를 가질 수 있다. 직교류 필터(들)는 폴리에테르설론(PES)으로 이루어진 스펙트럼 필터일 수 있다.

[0078] 직교류 필터(들)는 약 0.1  $\text{m}^2$  내지 약 5  $\text{m}^2$ (예를 들어, 약 0.5  $\text{m}^2$  내지 약 4.5  $\text{m}^2$ , 약 0.5  $\text{m}^2$  내지 약 4.0  $\text{m}^2$ , 약 0.5  $\text{m}^2$  내지 약 3.5  $\text{m}^2$ , 약 0.5  $\text{m}^2$  내지 약 3.0  $\text{m}^2$ , 약 0.5  $\text{m}^2$  내지 약 2.5  $\text{m}^2$ , 약 0.5  $\text{m}^2$  내지 약 2.0  $\text{m}^2$ , 약 0.5  $\text{m}^2$  내지 약 1.5  $\text{m}^2$ , 또는 약 0.5  $\text{m}^2$  내지 약 1.0  $\text{m}^2$ )의 표면적(여과 면적)을 가질 수 있다. 직교류 필터는 약 500개의 섬유/필터 내지 약 2500개의 섬유/필터(예를 들어, 약 500개의 섬유/필터 내지 약 2400개의 섬유/필터, 약 500개의 섬유/필터 내지 약 2300개의 섬유/필터, 약 500개의 섬유/필터 내지 약 2200개의 섬유/필터, 약 500개의 섬유/필터 내지 약 2100개의 섬유/필터, 약 500개의 섬유/필터 내지 약 2000개의 섬유/필터, 약 500개의 섬유/필터 내지 약 1900개의 섬유/필터, 약 500개의 섬유/필터 내지 약 1800개의 섬유/필터, 약 500개의 섬유/필터 내지 약 1700개의 섬유/필터, 약 500개의 섬유/필터 내지 약 1600개의 섬유/필터, 약 500개의 섬유/필터 내지 약 1500개의 섬유/필터, 약 500개의 섬유/필터 내지 약 1400개의 섬유/필터, 약 500개의 섬유/필터 내지 약 1300개의 섬유/필터, 약 500개의 섬유/필터 내지 약 1200개의 섬유/필터, 약 500개의 섬유/필터 내지 약 1100개의 섬유/필터, 약 500개의 섬유/필터 내지 약 1000개의 섬유/필터, 약 500개의 섬유/필터 내지 약 900개의 섬유/필터, 약 600개의 섬유/필터 내지 약 900개의 섬유/필터, 약 700개의 섬유/필터 내지 약 900개의 섬유/필터, 또는 약 800개의 섬유/필터 내지 약 900개의 섬유/필터)의 필터당 섬유의 총 개수를 가질 수 있다. 일부 예에서, 직교류 필터(들) 내의 섬유는 약 0.05 mm 내지 약 10 mm(예를 들어, 약 0.1 mm 내지 약 9 mm, 약 0.1 mm 내지 약 8 mm, 약 0.1 mm 내지 약 7 mm, 약 0.1 mm 내지 약 6 mm, 약 0.1 mm 내지 약 5 mm, 약 0.1 mm 내지 약 4 mm, 약 0.1 mm 내지 약 3 mm, 약 0.1 mm 내지 약 2.5 mm, 약 0.1 mm 내지 약 2.0 mm, 약 0.1 mm 내지 약 1.5 mm, 약 0.5 mm 내지 약 1.5 mm, 또는 약 0.75 mm 내지 약 1.25 mm)의 내부 직경을 갖는다. 직교류 필터(들)에 존재하는 섬유는 약 0.2 cm 내지 약 200 cm(예를 들어, 약 0.2 cm 내지 약 190 cm, 약 0.2 cm 내지 약 180 cm, 약 0.2 cm 내지 약 170 cm, 약 0.2 cm 내지 약 160 cm, 약 0.2 cm 내지 약 150 cm, 약 0.2 cm 내지 약 140 cm, 약 0.2 cm 내지 약 130 cm, 약 0.2 cm 내지 약 120 cm, 약 0.2 cm 내지 약 110 cm, 약 0.2 cm 내지 약 100 cm, 약 0.2 cm 내지 약 90 cm, 약 0.2 cm 내지 약 80 cm, 약 0.2 cm 내지 약 70 cm, 약 0.2 cm 내지 약 60 cm, 약 0.2 cm 내지 약 55 cm, 약 0.2 cm 내지 약 50 cm, 약 1 cm 내지 약 45 cm, 약 1 cm 내지 약 40 cm,

약 1 cm 내지 약 35 cm, 약 1 cm 내지 약 35 cm, 약 1 cm 내지 약 30 cm, 약 1 cm 내지 약 25 cm, 약 1 cm 내지 약 20 cm, 약 1 cm 내지 약 15 cm, 약 1 cm 내지 약 10 cm, 약 0.1 cm 내지 약 5 cm, 약 20 cm 내지 약 40 cm, 또는 약 25 cm 내지 약 35 cm)의 길이를 가질 수 있다. 직교류 필터(들)는 필터(들)의 표면적의 대부분이 시스템에서 유체(예를 들어, 세포 배양물)의 흐름에 대해 평행하게 정위되도록, 임의의 형상을 가질 수 있다. 예를 들어, 직교류 필터(들)는 튜브형 형상 또는 구부러진 직사각형 또는 도넛-형상을 가질 수 있다. 본원에 기술된 시스템에서 사용될 수 있는 직교류 필터의 예는 ATF4 필터(Refine Technology)이다. 추가 직교류 필터는 본원에 기술되어 있고 당해 분야에 공지되어 있다.

당업자에 의해 인식될 수 있는 바와 같이, TFF 유닛에서의 직교류 필터(들)는 케이싱(예를 들어, 경질 플라스틱 또는 금속 케이싱)에 하우징될 수 있다. 하우징은 임의의 형상, 실린더형 또는 직사각형일 수 있고, 하나 이상의 직교류 필터를 보유할 수 있도록 설계된다. 하우징은 하우징으로부터 하나 이상의 직교류 필터의 삽입 또는 제거를 가능하게 하는 표면을 함유할 수 있다.

일부 시스템은 직렬로 또는 병렬로 배열된 2개 이상의 TFF 유닛을 포함한다. 예를 들어, 2개 이상의 TFF 유닛이 직렬로 배열되는 시스템에서, 유체 도관은 2개의 이웃한 TFF 유닛(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 예시적인 TFF 유닛)을 유체적으로 연결하기 위해 사용될 수 있다. 시스템에서 2개의 TFF 유닛의 하나의 이러한 예시적인 장치(arrangement)는 도 4에 도시되어 있다. 직렬로 배열된 2개 이상의 TFF 유닛은 시스템에서 적어도 하나의 펌프의 작동이 저장소, 예를 들어 생물반응기로부터 제1 도관, 2개 이상의 TFF 유닛, 이웃하는 TFF 유닛(들) 사이에 정위된 하나 이상의 도관, 제2 도관을 통해, 그리고 다시 저장소(예를 들어, 생물반응기)로 세포 배양물의 가역적 흐름을 야기하는 한, 임의의 방식으로 설계될 수 있다. 2개 이상의 TFF 유닛은 동일하거나(예를 들어, 동일한 수 및 타입의 직교류 필터) 상이할 수 있다(예를 들어, 상이한 수 및 타입의 직교류 필터). 일부 예에서, 2개 이상의 TFF 유닛 각각은 단일 튜브형 직교류 필터를 함유한다. 각 TFF 유닛은 TFF 유닛에서 배출되는 여액을 여액 보유 탱크(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 여액 보유 탱크)로 훌러들어가게 할 수 있는 여액 도관에 유체적으로 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 TFF 유닛은 단일 하우징(예를 들어, 본원에 기술되거나 당해 분야에 공지된 임의의 예시적인 타입의 하우징)에 배치될 수 있다.

편드

본원에 기술된 시스템은 하나 이상의 펌프를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 하나 이상의 펌프는 저 난류 펌프(LTP)이다. LTP는 유체(예를 들어, 세포 배양물)를 단일 방향(예를 들어, 제1 또는 제2 흐름 방향)으로 이동시키거나 유체(예를 들어, 세포 배양물)에서 실질적인 양의 전단 응력 및/또는 유체 난류를 유발시키지 않으면서 가역적으로 유체(예를 들어, 세포 배양물)를 두 가지 방향(제1 흐름 방향 및 제2 흐름 방향)으로 이동시킬 수 있는 펌프이다. LTP가 유체(예를 들어, 세포 배양물)를 교변하는 제1 흐름 방향 및 제2 흐름 방향으로 흐르게 하기 위해 사용될 때, 제2 흐름 방향은 제1 흐름 방향에 대해 거의 반대이다.

LTP 펌프의 예는 연동 펌프이다. 연동 펌프는 약 20 mL 내지 약 250 mL(예를 들어, 약 20 mL 내지 약 240 mL, 약 20 mL 내지 약 220 mL, 약 20 mL 내지 약 200 mL, 약 20 mL 내지 약 180 mL, 약 20 mL 내지 약 160 mL, 약 20 mL 내지 약 140 mL, 약 20 mL 내지 약 120 mL, 약 20 mL 내지 약 100 mL, 약 20 mL 내지 약 80 mL, 약 20 mL 내지 약 60 mL, 약 20 mL 내지 약 50 mL, 약 20 mL 내지 약 40 mL, 약 20 mL 내지 약 30 mL, 약 30 mL 내지 약 240 mL, 약 30 mL 내지 약 220 mL, 약 30 mL 내지 약 200 mL, 약 30 mL 내지 약 180 mL, 약 30 mL 내지 약 160 mL, 약 30 mL 내지 약 140 mL, 약 30 mL 내지 약 120 mL, 약 30 mL 내지 약 100 mL, 약 30 mL 내지 약 80 mL, 약 30 mL 내지 약 60 mL, 약 40 mL 내지 약 250 mL, 약 40 mL 내지 약 240 mL, 약 40 mL 내지 약 220 mL, 약 40 mL 내지 약 200 mL, 약 40 mL 내지 약 180 mL, 약 40 mL 내지 약 160 mL, 약 40 mL 내지 약 140 mL, 약 40 mL 내지 약 120 mL, 약 40 mL 내지 약 100 mL, 약 40 mL 내지 약 80 mL, 약 40 mL 내지 약 60 mL, 약 50 mL 내지 약 250 mL, 약 50 mL 내지 약 240 mL, 약 50 mL 내지 약 220 mL, 약 50 mL 내지 약 200 mL, 약 50 mL 내지 약 180 mL, 약 50 mL 내지 약 160 mL, 약 50 mL 내지 약 140 mL, 약 50 mL 내지 약 120 mL, 약 50 mL 내지 약 100 mL, 약 50 mL 내지 약 80 mL, 약 50 mL 내지 약 75 mL, 약 60 mL 내지 약 250 mL, 약 60 mL 내지 약 240 mL, 약 60 mL 내지 약 220 mL, 약 60 mL 내지 약 200 mL, 약 60 mL 내지 약 180 mL, 약 60 mL 내지 약 160 mL, 약 60 mL 내지 약 140 mL, 약 60 mL 내지 약 120 mL, 약 60 mL 내지 약 100 mL, 약 60 mL 내지 약 80 mL, 약 70 mL 내지 약 250 mL, 약 70 mL 내지 약 240 mL, 약 70 mL 내지 약 220 mL, 약 70 mL 내지 약 200 mL, 약 70 mL 내지 약 180 mL, 약 70 mL 내지 약 160 mL, 약 70 mL 내지 약 140 mL, 약 70 mL 내지 약 120 mL, 약 70 mL 내지 약 100 mL, 약 80 mL 내지 약 250 mL, 약 80 mL 내지 약 240 mL, 약 80 mL 내지 약 220 mL, 약 80 mL 내지 약 200 mL, 약 80 mL 내지 약 180 mL, 약 80 mL 내지 약 160 mL, 약 80 mL 내지 약 140 mL, 약 80 mL 내지 약 120 mL, 약 80 mL 내지 약 100 mL, 약 90 mL 내지 약 250 mL, 약 90 mL 내지 약 240 mL, 약 90 mL 내지

약 220 mL, 약 90 mL 내지 약 200 mL, 약 90 mL 내지 약 180 mL, 약 90 mL 내지 약 160 mL, 약 90 mL 내지 약 140 mL, 약 90 mL 내지 약 120 mL, 약 90 mL 내지 약 100 mL, 약 100 mL 내지 약 250 mL, 약 100 mL 내지 약 240 mL, 약 100 mL 내지 약 220 mL, 약 100 mL 내지 약 200 mL, 약 100 mL 내지 약 180 mL, 약 100 mL 내지 약 160 mL, 약 100 mL 내지 약 140 mL, 또는 약 100 mL 내지 약 120 mL)의 부피를 갖는 펌프 헤드를 가질 수 있다. 연동 펌프는 약 5 mm 내지 약 400 mm(예를 들어, 약 5 mm 내지 약 380 mm, 약 5 mm 내지 약 360 mm, 약 5 mm 내지 약 340 mm, 약 5 mm 내지 약 320 mm, 약 5 mm 내지 약 300 mm, 약 5 mm 내지 약 280 mm, 약 5 mm 내지 약 260 mm, 약 5 mm 내지 약 240 mm, 약 5 mm 내지 약 220 mm, 약 5 mm 내지 약 200 mm, 약 5 mm 내지 약 180 mm, 약 5 mm 내지 약 160 mm, 약 5 mm 내지 약 140 mm, 약 5 mm 내지 약 120 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 55 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 5 mm 내지 약 30 mm, 약 5 mm 내지 약 25 mm, 약 5 mm 내지 약 20 mm, 약 5 mm 내지 약 15 mm, 약 5 mm 내지 약 10 mm, 약 1 mm 내지 약 10 mm, 약 10 mm 내지 약 60 mm, 약 10 mm 내지 약 35 mm, 약 10 mm 내지 약 25 mm, 약 10 mm 내지 약 20 mm, 약 20 mm 내지 약 60 mm, 약 20 mm 내지 약 50 mm, 또는 약 30 mm 내지 약 50 mm)의 내부 직경을 갖는 배관을 가질 수 있다. 연동 펌프 내의 배관은 약 1 mm 내지 약 30 mm(예를 들어, 약 1 mm 내지 약 25 mm, 약 1 mm 내지 약 20 mm, 약 1 mm 내지 약 18 mm, 약 1 mm 내지 약 16 mm, 약 1 mm 내지 약 14 mm, 약 1 mm 내지 약 12 mm, 약 1 mm 내지 약 10 mm, 약 1 mm 내지 약 8 mm, 약 1 mm 내지 약 6 mm, 또는 약 1 mm 내지 약 5 mm)의 벽 직경을 가질 수 있다. 본 시스템 및 방법에서 사용될 수 있는 연동 펌프(들)의 예는 Watson Marlow 620 및 Watson Marlow 800 펌프이다. 본원에 기술된 임의의 연동 펌프는 트윈 채널을 가지고/거나 GORE Sta-Pure 배관(예를 들어, 16 mm의 내부 직경 및 4 mm 벽을 갖는 배관)을 함유할 수 있다.

[0084]

LTP 펌프의 추가 예는 미국특허 제4,037,984호; 제5,033,943호; 및 제5,458,459호; 미국특허출원공개 제2009/0199904호, 및 국제특허출원 WO 06/021873호에 기술되어 있다. LTP 펌프의 다른 예는 회전 양변위 펌프(rotary positive displacement pump), 로브 펌프(lobe pump), 내부 기어 펌프(internal gear pump), 및 진행형 공동 펌프(progressive cavity pump)를 포함한다. 당업자는, 다른 타입의 LTP가 상업적으로 입수 가능하고, 본원에 기술된 임의의 시스템 및 방법에서 사용될 수 있는 것으로 인식할 것이다.

[0085]

일부 예에서, 적어도 하나의 펌프는 제1 도관 또는 제2 도관, 또는 2개 모두에 배치된다. 다른 예에서, 적어도 하나의 펌프는 저장소에 그리고 제1 유체 도관 또는 제2 유체 도관에 대해 근위에 배치된다. 2개 이상의 TFF 유닛을 포함하는 시스템에서, 적어도 하나의 펌프는 2개의 이웃하는 TFF 유닛들 사이에 배치된 도관(예를 들어, 도 4에 도시된 도관(14))에 배치될 수 있다. 적어도 하나의 펌프는 적어도 하나의 펌프의 작동 시에 저장소로부터, 제1 도관, TFF 유닛, 제2 도관을 통해 그리고 다시 저장소로, 시스템을 통해 유체를 가역적으로 흐르게 하는 한 본원에 제공된 시스템에서의 임의의 곳에, 또는 저장소로부터, 제1 도관, 2개 이상의 TFF 유닛, 이웃하는 TFF 유닛들 사이의 하나 이상의 도관, 제2 도관을 통해, 그리고 다시 저장소로, 시스템을 통해 유체를 가역적으로 흐르게 하는, 2개 이상의 TFF 유닛을 함유한 시스템에 배치될 수 있다.

[0086]

### 여액 보유 탱크

[0087]

예를 들어, 여액을 저장하기 위해 시스템에 여액 보유 탱크가 선택적으로 포함될 수 있다. 예를 들어, 여액은 약 1시간 내지 약 1주(예를 들어, 약 1시간 내지 약 6일, 약 1시간 내지 약 5일, 약 1시간 내지 약 4일, 약 1시간 내지 약 3일, 약 1시간 내지 약 2일, 약 1시간 내지 약 36시간, 약 1시간 내지 약 24시간, 약 1시간 내지 약 20시간, 약 1시간 내지 약 16시간, 약 1시간 내지 약 12시간, 또는 약 1시간 내지 약 6시간)의 시간 동안 저장될 수 있다. 여액 보유 탱크는 약 50 mL 내지 약 50 L(예를 들어, 약 50 mL 내지 약 45 L, 약 50 mL 내지 약 40 L, 약 50 mL 내지 약 35 L, 약 50 mL 내지 약 30 L, 약 50 mL 내지 약 25 L, 약 50 mL 내지 약 20 L, 약 50 mL 내지 약 18 L, 약 50 mL 내지 약 16 L, 약 50 mL 내지 약 14 L, 약 50 mL 내지 약 12 L, 약 50 mL 내지 약 10 L, 약 50 mL 내지 약 9 L, 약 50 mL 내지 약 8 L, 약 50 mL 내지 약 7 L, 약 50 mL 내지 약 6 L, 약 50 mL 내지 약 5 L, 약 50 mL 내지 약 4.5 L, 약 50 mL 내지 약 4.0 L, 약 50 mL 내지 약 3.5 L, 약 50 mL 내지 약 3.0 L, 약 50 mL 내지 약 2.5 L, 약 50 mL 내지 약 2.0 L, 약 50 mL 내지 약 1.5 L, 약 50 mL 내지 약 1.0 L, 약 100 mL 내지 약 1.0 L, 또는 약 500 mL 내지 약 1.0 L)의 내부 부피를 가질 수 있다. 여액 보유 탱크의 내부 표면은 생체적합성 물질(예를 들어, 당해 분야에 공지된 임의의 생체적합성 물질)을 함유할 수 있다. 여액 보유 탱크는 여액을 약 10°C 내지 약 35°C(예를 들어, 약 10°C 내지 약 30°C, 약 10°C 내지 약 25°C, 약 10°C 내지 약 20°C, 약 10°C 내지 약 15°C, 또는 약 15°C 내지 약 25°C)의 온도에서 저장할 수 있는 냉동 보유 탱크일 수 있다. 당업자가 인식할 수 있는 바와 같이, 다수의 상이한 상업적으로 입수 가능한 보유 탱크는 본원에 기술된 시스템 및 방법에서 여액 보유 탱크로서 사용될 수 있다.

## [0088] 유량계

본원에 기술된 시스템의 일부 예는 하나 이상(예를 들어, 2개, 3개, 4개, 또는 5개)의 유량계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 유량계는 시스템에서 임의의 도관들 중 하나 이상(예를 들어, 제1 도관, 제2 도관, 이웃하는 TFF 유닛들 사이의 하나 이상의 도관, 및/또는 여액 도관)에 배치될 수 있다. 예를 들어, 유량계는 2개의 이웃하는 TFF 유닛들 사이에 배치될 수 있다. 일부 예에서, 유량계(들)는 비-침습적이다. 당업자는 본 시스템 및 방법에서 사용될 수 있는 매우 다양한 상업적으로 입수 가능한 유량계를 이해할 것이다. 예를 들어, EM-TEC BioProTT 비-침습적, 실시간 유량계, PT878 Ultrasonic 유량계(Rshydro), 및 Sono-Trak 초음파 비-침습적 유량계(EMCO)는 본 시스템 및 방법에서 사용될 수 있는 상업적으로 입수 가능한 유량계이다.

## [0090] 압력 센서

본원에 기술된 시스템은 하나 이상의 압력 센서를 포함할 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 압력 센서는 시스템에서의 임의의 도관(예를 들어, 제1 도관, 제2 도관, 이웃하는 TFF 유닛들 사이의 하나 이상의 도관, 및/또는 여액 도관)에 배치될 수 있다. 예를 들어, 압력 센서는 시스템에서 2개의 이웃하는 TFF 유닛들 사이에 배치될 수 있다. 당업자는 본 시스템 및 방법에서 사용될 수 있는 매우 다양한 상업적으로 입수 가능한 압력 센서를 이해할 것이다. 본원에 기술된 시스템 및 방법에서 사용될 수 있는 압력 센서의 비-제한적인 예는 PendoTECH PressureMAT 압력 센서이다.

## [0092] 클램프/포트

본원에 기술된 임의의 시스템은 제1 도관 또는 제2 도관을 각각 포트로 유체적으로 연결하는 포트와 제1 도관 또는 제2 도관 사이에 포트 도관을 선택적으로 포함할 수 있다. 포트는 유체(예를 들어, 세포 배양물 또는 세척 용액)를 시스템으로부터 (각각 제1 도관 또는 제2 도관을 통해) 전달하거나 제거하기 위해 사용될 수 있다. 클램프는 포트 도관에 배치될 수 있다. 매우 다양한 적합한 클램프는 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 스크루 클램프). 포트 도관은 도관에 대해 상술된 특징들의 임의의 조합을 가질 수 있다. 포트는 당해 분야에 통상적으로 공지된 임의의 타입의 포트일 수 있다. 예를 들어, 포트는 주입 포트일 수 있거나, 리브 구조 쓰레딩(ribbed threading)을 가질 수 있다.

## [0094] 생물학적 제조 시스템

본원에 기술된 임의의 디바이스는 유입구 및 유출구를 갖는 적어도 하나의(예를 들어, 2개, 3개, 또는 4개의) 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템(MCCS), 및 TFF 유닛 또는 여액 보유 탱크 사이의 여액 도관을 포함하는 생물학적 제조 시스템을 포함할 수 있으며, 여기서, 디바이스는 여액이 적어도 하나의 MCCS를 통해 생물학적 제조 시스템의 유입구로 진행되고 생물학적 제조 시스템의 유출구를 통해 디바이스에서 배출되도록 수행된다. MCCS는 2개 이상의 크로마토그래피 컬럼, 2개 이상의 크로마토그래피 맴브레인, 또는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼과 적어도 하나의 크로마토그래피 맴브레인의 조합을 포함할 수 있다. 비-제한적인 예에서, MCCS는 4개의 크로마토그래피 컬럼, 3개의 크로마토그래피 컬럼 및 크로마토그래피 맴브레인, 3개의 크로마토그래피 컬럼, 2개의 크로마토그래피 컬럼, 2개의 크로마토그래피 맴브레인, 및 2개의 크로마토그래피 컬럼 및 하나의 크로마토그래피 맴브레인을 포함할 수 있다. 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 맴브레인의 조합의 추가 예는 제한 없이 당업자에 의해 MCCS에서 사용하기 위해 고려될 수 있다. MCCS에 존재하는 개개 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 맴브레인은 동일할 수 있거나(예를 들어, 동일한 형상, 부피, 수지, 포집 메커니즘, 및 유닛 작동을 가짐), 상이할 수 있다(예를 들어, 상이한 형상, 부피, 수지, 포집 메커니즘, 및 유닛 작동 중 하나 이상을 가짐). MCCS에 존재하는 개개 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 맴브레인(들)은 동일한 유닛 작동(예를 들어, 포집하거나, 정제하거나, 폴리싱하거나, 바이러스를 비활성화시키거나, 재조합 치료 단백질을 함유한 유체의 이온 농도 및/또는 pH를 조절하거나, 여과하는 유닛 작동) 또는 상이한 유닛 작동(예를 들어, 포집하거나, 정제하거나, 폴리싱하거나, 바이러스를 비활성화시키거나, 재조합 치료 단백질을 함유한 유체의 이온 농도 및/또는 pH를 조절하거나, 여과하는 것의 군으로부터 선택된 상이한 유닛 작동)을 수행할 수 있다.

[0096] 하나 이상의(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24개의) 상이한 타입의 완충제가 본원에 기술된 임의의 생물학적 제조 디바이스에서 하나 이상의 MCCS(들)의 사용 동안 사용될 수 있다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 본원에 기술된 생물학적 제조 시스템에서 사용되는 하나 이상의 MCCS에서 사용되는 하나 이상의 타입의 완충제는 하나 이상의 MCCS(예를 들어, 제1 MCCS 및 제2 MCCS)의 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 맴브레인(들)에 존재하는 수지, 재조합 치료 단백질,

및 하나 이상의 MCCS의 특정 크로마토그래피 컬럼(들) 및/또는 크로마토그래피 멤브레인에 의해 수행된 유닛 작동(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 예시적 유닛 작동)에 의존적일 것이다. 본원에 기술된 임의의 생물학적 가공 디바이스에서 하나 이상의 MCCS의 사용 동안 사용되는 완충제의 부피 및 타입은 또한, 당업자에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 임의의 공정들에서 하나 이상의 MCCS의 사용 동안 사용되는 완충제의 부피 및 타입(들)은 얹어진 단리된 재조합 단백질(예를 들어, 약물 제품)에서 하기 기술된 것들 중 하나 이상을 최적화하기 위해 선택될 수 있다: 재조합 치료 단백질의 전체 수율, 재조합 치료 단백질의 활성, 재조합 치료 단백질의 순도의 수준, 및 재조합 치료 단백질을 함유한 유체로부터 생물학적 오염물의 제거(예를 들어, 활성 바이러스, 마이코박테리아, 효모, 박테리아, 또는 포유류 세포의 부재).

[0097] 하나 이상의 MCCS는 주기적 역류 크로마토그래피 시스템(periodic counter current chromatography system; PCCS)일 수 있다. PCCS는 예를 들어, 2개 이상의 크로마토그래피 컬럼으로부터 재조합 치료 단백질의 연속 용리를 가능하게 하기 위해 스위칭 되는 2개 이상의 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, 3개의 컬럼 또는 4개의 컬럼)을 포함할 수 있다. PCCS는 2개 이상의 크로마토그래피 컬럼, 2개 이상의 크로마토그래피 멤브레인, 또는 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 및 적어도 하나의 크로마토그래피 멤브레인을 포함할 수 있다. 컬럼 작동은 일반적으로, 로드(load), 세척, 용리, 및 재생 단계로 이루어진다. PCCS에서, 다수의 컬럼은 동일한 단계를 순환 방식으로 별도로 및 연속적으로 진행시키기 위해 사용된다. 컬럼들이 직렬로 작동되기 때문에, 하나의 컬럼을 통한 흐름 및 하나의 컬럼으로부터의 세척은 다른 컬럼에 의해 캡처된다. PCCS의 이러한 독특한 특징은 배치 모드 크로마토그래피 동안 통상적이기 때문에, 동적 결합 용량 대신에 이의 정적 결합 용량에 대해 밀접한 수지의 로딩을 가능하게 한다. 연속 사이클링 및 용리의 결과로서, PCCS에 진입하는 유체는 연속적으로 가공되며, 재조합 치료 단백질을 함유한 용리물은 연속적으로 형성된다.

[0098] 생물학적 제조 시스템에서 적어도 하나의 MCCS에 의해 수행될 수 있는 하나 이상의 단위 작업은 예를 들어, 재조합 치료 단백질을 포집하는 것, 재조합 치료 단백질을 함유한 유체에 존재하는 바이러스를 비활성화시키는 것, 재조합 치료 단백질을 정제하는 것, 재조합 치료 단백질을 폴리싱하는 것, 재조합 치료 단백질을 함유한 유체를 (예를 들어, 브레이크 탱크(break tank)를 사용하여) 보유하는 것, 재조합 치료 단백질을 함유한 유체로부터 미립자 물질을 여과하거나 제거하는 것, 및 재조합 치료 단백질을 함유한 유체의 이온 농도 및/또는 pH를 조절하는 것을 포함한다.

[0099] 포집하는 단위 작업은 예를 들어, 포집 메커니즘(capture mechanism)을 사용하는, 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 및/또는 크로마토그래피 수지를 포함하는 하나 이상의 MCCS를 사용하여 수행될 수 있다. 포집 메커니즘의 비-제한적인 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. 포집하는 것은 또한, 양이온 교환 또는 음이온 교환 크로마토그래피, 또는 분자체 크로마토그래피를 수행하기 위해 사용될 수 있는 수지를 사용하여 수행될 수 있다. 재조합 치료 단백질을 포집하기 위해 사용될 수 있는 수지의 예는 당해 분야에 공지되어 있다.

[0100] 재조합 치료 단백질을 함유하는 유체에 존재하는 바이러스를 비활성화시키는 단위 작업은 예를 들어, 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, 내지 약 3.75)의 pH에서 적어도 30분(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)의 기간 동안 재조합 치료 단백질을 함유한 유체를 인큐베이션 할 수 있는 크로마토그래피 컬럼, 크로마토그래피 멤브레인, 또는 보유 탱크를 포함한 하나 이상의 MCCS를 사용하여 수행될 수 있다.

[0101] 재조합 단백질을 정제하는 단위 작업은 예를 들어, 포집 시스템을 사용하는 수지를 함유한 예를 들어, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 포함하는 하나 이상의 MCCS를 사용하여 수행될 수 있다. 포집 메커니즘의 비-제한적인 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. 정제하는 것은 또한, 양이온 교환 또는 음이온 교환, 또는 분자체 크로마토그래피를 수행하기 위해 사용될 수 있는 수지를 사용하여 수행될 수 있다. 재조합 치료 단백질을 정제하기 위해 사용될 수 있는 수지의 예는 당해 분야에 공지되어 있다.

[0102] 재조합 단백질을 폴리싱하는 단위 작업은 예를 들어, 양이온 교환, 음이온 교환, 또는 분자체 크로마토그래피를 수행하기 위해 사용될 수 있는 수지를 함유한, 예를 들어 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 포함한 하나 이상의 MCCS를 사용하여 수행될 수 있다. 재조합 치료 단백질을 폴리싱하기 위해 사용될 수 있는

수지의 예는 당해 분야에 공지되어 있다.

[0103]

재조합 치료 단백질을 함유한 유체를 보유하기 위한 단위 작업은 생물학적 제조 시스템에서 하나의 이상의 MCCS(들)에 적어도 하나의 저장소(예를 들어, 브레이크 탱크), 또는 최대 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 저장소(들) (예를 들어, 브레이크 탱크(들))를 포함한 MCCS를 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 이러한 단위 작업을 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, 및 약 10 mL 내지 약 100 mL)의 부피를 갖는다. 본원에 기술된 생물학적 제조 시스템에서 사용되는 저장소(들)(예를 들어, 브레이크 탱크(들))는 예를 들어, 1 mL 내지 약 300 mL, (경계값 포함), 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(경계값 포함)인 용량을 가질 수 있다. 생물학적 제조 시스템에서 저장소(들)(예를 들어, 브레이크 탱크(들))는 각각 재조합 치료 단백질을 함유한 유체를 적어도 10분(예를 들어, 적어도 20분, 적어도 30분, 적어도 1시간, 적어도 2시간, 적어도 4시간, 또는 적어도 6시간) 동안 보유할 수 있다. 다른 예에서, 생물학적 제조 시스템에서 저장소(들)(예를 들어, 브레이크 탱크(들))는 단지 치료 단백질을 예를 들어, 약 5분 내지 약 6시간 미만, (경계값 포함), 예를 들어, 약 5분 내지 약 5시간, 약 4시간, 약 3시간, 약 2시간, 약 1시간, 또는 약 30분(경계값 포함)의 전체 시간 동안 보유한다. 생물학적 제조 시스템에서 저장소(들)(예를 들어, 브레이크 탱크(들))는 재조합 치료 단백질을 함유한 유체를 보유 및 냉동(예를 들어, 25°C 미만, 15°C 미만, 또는 10°C 미만의 온도에서) 2개 모두를 위해 사용될 수 있다. 저장소는 원형 실린더, 타원형 실린더, 또는 대략 직사각형의 시일링되고 비침투성인 백을 포함하는 임의의 형상을 가질 수 있다.

[0104]

재조합 치료 단백질을 함유한 유체를 여과하는 단위 작업은 예를 들어, 필터, 또는 분자체 수지를 함유한 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인을 포함한 MCCS를 사용하여 수행될 수 있다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 매우 다양한 서브마이크론 필터(예를 들어, 1 μm 미만, 0.5 μm 미만, 0.3 μm 미만, 약 0.2 μm 미만, 0.2 μm 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, 풀딩되지 않은 단백질; 침전된, 원치 않는 숙주 세포 단백질; 침전된 지질; 박테리아; 효모 세포; 진균 세포; 및/또는 마이코박테리아)를 제거할 수 있다. 약 0.2 μm 또는 0.2 μm 미만의 기공 크기를 갖는 필터는 재조합 치료 단백질을 함유한 유체로부터 박테리아를 효과적으로 제거하기 위해 공지되어 있다. 당해 분야에 공지되어 있는 바와 같이, 분자체 수지를 함유한 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 멤브레인은 또한, 재조합 치료 단백질을 함유한 유체를 여과하는 단위 작업을 수행하기 위해 MCCS에서 사용될 수 있다.

[0105]

재조합 치료 단백질을 함유한 유체를 이온 농도 및/또는 pH를 조절하는 단위 작업은 (예를 들어, 단일 MCCS 내의 컬럼들 사이에, 또는 끝에서 두 번째의 MCCS에서 마지막 컬럼 이후에 그리고 재조합 치료 단백질을 함유한 유체가 다음 MCCS(예를 들어, 제2 MCCS)의 제1 컬럼에 공급되기 전에) 재조합 치료 단백질을 함유한 유체에 신규한 완충제 용액을 첨가하는 완충제 조절 저장소(예를 들어, 인라인 완충제 조절 저장소)를 포함하고 사용하는 MCCS를 사용하여 수행될 수 있다. 당해 분야에 인지될 수 있는 바와 같이, 인라인 완충제 조절 저장소는 임의의 크기(예를 들어, 100 mL 초과)일 수 있고, 임의의 완충된 용액(예를 들어, 재조합 치료 단백질을 함유한 유체와 비교하여 증가되거나 감소된 pH, 재조합 치료 단백질을 함유한 유체와 비교하여 증가되거나 감소된 이온(예를 들어, 염) 농도, 및/또는 MCCS(예를 들어, 제1 또는 제2 MCCS)에서 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 적어도 하나의 크로마토그래피 멤브레인에 존재하는 수지에 결합하기 위해 재조합 치료 단백질과 경쟁하는 제제의 증가되거나 감소된 농도 중 하나 이상을 갖는 완충된 용액)을 함유할 수 있다.

[0106]

MCCS는 2개 이상의 단위 작업을 수행할 수 있다. 예를 들어, MCCS는 적어도 하기 단위 작업을 수행할 수 있다: 재조합 치료 단백질을 포집하고 재조합 치료 단백질을 함유한 유체에 존재하는 바이러스를 비활성화시키는 것; 재조합 치료 단백질을 포집하고 재조합 치료 단백질을 함유한 유체에 존재하는 바이러스를 비활성화시키고 재조합 치료 단백질을 함유한 액체의 이온 농도 및/또는 pH를 조절하는 것; 재조합 치료 단백질을 정제하고 재조합 치료 단백질을 풀리싱하는 것; 재조합 치료 단백질을 정제하고 재조합 치료 단백질을 풀리싱하고 재조합 치료 단백질을 함유한 유체를 여과하거나 재조합 치료 단백질을 함유한 유체로부터 침전물 및/또는 미립자 물질을 제거하는 것; 및 재조합 치료 단백질을 정제하고 재조합 치료 단백질을 풀리싱하고 재조합 치료 단백질을 함유한 유체를 여과하거나 재조합 치료 단백질을 함유한 유체로부터 침전물 및/또는 미립자 물질을 제거하고 재조합 치료 단백질을 함유한 액체의 이온 농도 및/또는 pH를 조절하는 것.

[0107] 본 디바이스 및 방법에서 사용될 수 있는 생물학적 제조 시스템의 추가의 예시적인 특징은 2013년 3월 8일에 출원된 미국특허출원 제61/775,060호, 및 2013년 7월 19일에 출원된 미국특허출원 제61/856,390호에 기술된다.

#### 본 시스템에 의해 제공된 이점

[0109] 본원에 기술된 시스템은 하기 이점들 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개)을 갖는 세포 배양물의 연속 여과를 제공한다: 세포 배양물의 감소된 외부 부피(저장소의 외측), 증가된 교환 분율(제1 도관, TFF 유닛, 및 제2 도관 내), 세포 배양물의 감소된 외부 체류 시간(저장소의 외측), 세포 배양물 여과 동안 감소된 전단 응력, 세포 배양물에서의 개선된 세포 생존능력, 세포 배양물에서의 상승된 생존 세포 밀도, 및 다른 단방향 개방 회로 여과 시스템(예를 들어, 단방향 TFF 시스템) 또는 양방향 닫힌 회로 여과 시스템(닫힌 회로 ATF™ 시스템)과 비교하여 감소된 필터 오염.

[0110] 본원에 기술된 시스템의 교환 분율 및 외부 체류 시간은 하기 방정식 1 및 2를 이용하여 계산될 수 있다.

$$\text{교환 분율} = \frac{\text{교환 부피}}{\text{외부 부피}} \quad (\text{방정식 } 1)$$

$$\text{외부 체류 시간} = \frac{\text{외부 부피}}{\frac{\text{교환율} \times \text{교환 분율}}{}} \quad (\text{방정식 } 2)$$

[0111]

[0112] 예를 들어, 본 시스템은 단지, 저장소, 제1 도관, 제2 도관, 및 TFF 유닛에서 세포 배양물의 총 부피의 약 1% 내지 약 7%(예를 들어, 약 1.0% 내지 약 6.5%, 약 1% 내지 약 6.0%, 약 1% 내지 약 5.5%, 또는 약 1% 내지 약 5.0%)인 세포 배양물의 총 외부 부피를 가질 수 있다. 본원에 제공된 시스템은 또한, 약 1초 내지 약 60초(예를 들어, 약 1초 내지 약 55초, 약 1초 내지 약 50초, 약 1초 내지 45초, 약 1초 내지 약 30초, 약 1초 내지 약 25초, 약 1초 내지 약 20초, 약 1초 내지 약 15초, 약 1초 내지 13초, 약 1초 내지 10초, 약 1초 내지 약 8초, 약 1초 내지 약 5초, 또는 약 10초 내지 14초)의 저장소 외측의 세포 배양물의 감소된 체류 시간(감소된 외부 체류 시간)을 제공할 수 있다. 하기 표 1은 실시예에 기술된 예시적 시스템의 외부 체류 시간과 닫힌 시스템 교번 접선 여과 시스템(ATF4)의 외부 체류 시간을 비교한 것이다.

[0113] [표 1] 본원에 제공된 예시적 시스템 및 닫힌 시스템 ATF4의 외부 체류 시간 및 외부 분율의 비교

	외부 부피	외부 분율	체류 시간
ATF4	0.756 L	19%	71 s
TFF	0.550 L	78%	12 s

[0114]

[0115] 본 시스템은 약 50 초과%(예를 들어, 약 55% 초과, 약 60% 초과, 약 65% 초과, 약 70% 초과, 약 75% 초과, 약 80% 초과, 또는 약 85% 초과)의 개선된 교환 분율을 제공할 수 있다. 본원에 기술된 시스템은 세포 배양물에서 높은 생존 세포 밀도, 예를 들어, 약  $30 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $32 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $34 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $36 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $38 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $40 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $42 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $44 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $46 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $48 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $50 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $52 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $54 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $56 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $58 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 또는 약  $60 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과의 생존 세포 밀도를 제공할 수 있다. 본원에 기술된 시스템은 약  $65 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $70 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $75 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $80 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $85 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $90 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $95 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $100 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $105 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $110 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $115 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $120 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $125 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $130 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $135 \times$

$10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $140 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $145 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $150 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $155 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $160 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $165 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $170 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $175 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $180 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $185 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $190 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $200 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $210 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $220 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $230 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $240 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 또는 약  $250 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과의 생존 세포 밀도를 제공할 수 있다.

[0116]

본원에 제공된 시스템은 최적화된 교환율(또는 본원에서 유량이라 불림)을 제공한다. 당업자에 의해 인식될 수 있는 바와 같이, 너무 높은 교환율은 세포 성장 및 세포 배양 성능에 악영향을 미치는 전단 응력의 수준을 야기할 수 있으며, 너무 낮은 교환율은 필터 오염 및 세포 배양물의 보다 긴 외부 체류 시간을 야기할 수 있다. 본원에 제공된 시스템은 본원에 기술된 임의의 예시적인 유량의 달성을 제공한다.

[0117]

본원에 제공된 시스템은 또한, 최적화된 관류율(PR)에 대한 교환율(XR) 비율을 제공한다. 당업자가 인식할 수 있는 바와 같이, 증가된 비의 XR:PR을 제공하는 시스템 및 방법은 더욱 효율적인 세포 배양물 생산 방법을 야기한다(예를 들어, 관류 공정 동안 보다 낮은 세포 배양 배지를 사용한다). 일부 예에서, 본원의 예시적인 디바이스 및 방법은 약 2 초과(예를 들어, 약 3 초과, 약 4 초과, 약 5 초과, 약 6 초과, 약 7 초과, 약 8 초과, 약 9 초과, 약 10 초과, 약 11 초과, 약 12 초과, 약 13 초과, 약 14 초과, 약 15 초과, 약 16 초과, 약 17 초과, 약 18 초과, 약 19 초과, 약 20 초과, 약 21 초과, 약 22 초과, 약 23 초과, 약 24 초과, 약 25 초과, 약 50 초과, 약 75 초과, 약 100 초과, 약 125 초과, 약 150 초과, 약 175 초과, 약 200 초과, 약 225 초과, 약 250 초과, 약 275 초과, 약 300 초과, 약 325 초과, 약 350 초과, 약 375 초과, 약 400 초과, 약 425 초과, 약 450 초과, 약 475 초과, 약 500 초과, 약 525 초과, 약 550 초과, 약 575 초과, 또는 약 600 초과), 또는 약 5 내지 약 600(예를 들어, 약 10 내지 약 550, 약 10 내지 약 500, 약 10 내지 약 450, 약 10 내지 약 400, 약 10 내지 약 350, 약 10 내지 약 300, 약 10 내지 약 250, 약 10 내지 약 200, 약 10 내지 약 150, 약 10 내지 약 100, 또는 약 10 내지 약 50)의 XR:PR 비율을 제공한다.

[0118]

### 세포 배양물을 가공하는 방법

[0119]

또한, (a) 개방 회로 여과 시스템(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 개방 회로 여과 시스템)을 제공하는 단계, (b) 세포 배양물을 제1 기간 동안 저장소로부터 TFF 유닛을 통해 제1 흐름 방향으로 흐르게 하는 단계, (c) 제1 흐름 방향을 역전시키고 세포 배양물을 제2 기간 동안 TFF 유닛을 통해 제2 흐름 방향으로 흐르게 하는 단계, (d) 제2 흐름 방향을 역전시키고 배양물을 제3 기간 동안 TFF 유닛을 통해 제1 흐름 방향으로 흐르게 하는 단계, (e) 단계 (c) 및 (d)를 적어도 2회(예를 들어, 적어도 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 15회, 20회, 30회, 40회, 50회, 60회, 70회, 80회, 90회, 또는 100회, 또는 100회 초과) 반복하는 단계, 및 (f) 여액을 수집하는 단계를 포함하는 세포 배양물을 가공하는 방법이 제공된다. 이러한 방법의 다양한 예시적인 양태는 하기에 기술된다.

[0120]

### 세포 배양물

[0121]

본원에 제공된 방법에서 가공될 세포 배양물은 액체 배양 배지에서 복수의 임의 타입의 포유류 세포를 함유할 수 있다. 본원에 기술된 모든 방법의 일부 예에서, 포유동물은 혼탁 배양물에서 성장하는 세포이다. 다른 예에서, 포유류 세포는 부착 세포(예를 들어, 관류 생물반응기에서 성장시키기 위해 고체 기질, 예를 들어, 마이크로 캐리어를 필요로 하는 세포)이다. 세포 배양물에 존재할 수 있는 포유류 세포의 비-제한적인 예는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포(예를 들어, CHO DG44 세포, CHO-K1s 세포, Sp2.0, 골수종 세포(예를 들어, NS/0), B-세포, 혼성 세포, T-세포, 인간 배아 신장(HEK) 세포(예를 들어, HEK 293E 및 HEK 293F), 아프리카 사바나 원숭이 신장 상피 세포(Vero) 세포, 및 Madin-Darby Canine(Cocker Spaniel) 신장 상피 세포(MDCK) 세포를 포함한다. 세포 배양물에 존재할 수 있는 추가 포유류 세포는 당해 분야에 공지되어 있다.

[0122]

본원에 기술된 임의의 방법을 사용하여 가공된 세포 배양물은 약  $0.5 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $1.0 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $5.0 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $10.0 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $15.0 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $20.0 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $25.0 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $30.0 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $35.0 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $40.0 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과, 약  $45.0 \times 10^6$ 개의 세포/mL 초과,



시스템(여액 도관 및 여액 보유 탱크를 제외함)에서 세포 배양물의 총량은 0.2 L 내지 약 10,000 L(예를 들어, 약 0.2 L 내지 약 9,500 L, 약 0.2 L 내지 약 9,000 L, 약 0.2 L 내지 약 8,500 L, 약 0.2 L 내지 약 8,000 L, 약 0.2 L 내지 약 7,500 L, 약 0.2 L 내지 약 7,000 L, 약 0.2 L 내지 약 6,500 L, 약 0.2 L 내지 약 6,500 L, 약 0.2 L 내지 약 6,000 L, 약 0.2 L 내지 약 5,500 L, 약 0.2 L 내지 약 5,000 L, 약 0.2 L 내지 약 4,500 L, 약 0.2 L 내지 약 4,000 L, 약 0.2 L 내지 약 3,500 L, 약 0.2 L 내지 약 3,000 L, 약 0.2 L 내지 약 2,500 L, 약 0.2 L 내지 약 2,000 L, 약 0.2 L 내지 약 1,500 L, 약 0.2 L 내지 약 1,000 L, 약 0.2 L 내지 약 500 L, 약 0.2 L 내지 약 400 L, 약 0.2 L 내지 약 300 L, 약 0.2 L 내지 약 200 L, 약 0.2 L 내지 약 150 L, 약 0.2 L 내지 약 100 L, 약 0.2 L 내지 약 50 L, 또는 약 0.2 L 내지 약 10 L)일 수 있다.

[0124]

세포 배양물에 존재하는 포유류 세포는 재조합 단백질(예를 들어, 포유류 세포에 의해 분비된 재조합 단백질)을 인코딩하는 재조합 핵산(예를 들어, 포유류 세포의 게놈에 안정적으로 통합된 핵산)을 함유할 수 있다. 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산은 분자 생물학 및 분자 유전학에 공지된 매우 다양한 방법을 사용하여 포유류 세포에 도입될 수 있다. 비-제한적인 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 않으며(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. 가용성 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 재조합 단백질의 N- 또는 C-말단에서 분비 신호 웨პ티드를 인코딩하는 서열을 함유할 수 있는데, 이는 포유류 세포에 존재하는 효소에 의해 분열되고, 후속하여, 배양 배지로 방출된다. 핵산을 함유한 벡터는 요망되는 경우에, 또한, 선택 가능한 마커(예를 들어, 포유류 세포에 히그로마이신, 푸로마이신, 또는 네오마이신 내성을 제공하는 유전자)를 함유할 수 있다.

[0125]

세포 배양물에서 포유류 세포에 의해 분비될 수 있는 재조합 단백질의 비-제한적인 예는 면역글로불린(경쇄 및 중쇄 면역글로불린을 포함), 항체 또는 항체 단편(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 항체 단편), 효소(예를 들어, 갈락토시다제(예를 들어, 알파-갈락토시다제), Myozyme, 또는 Cerezyme), 단백질(예를 들어, 인간 에리스로포이에틴(erythropoietin), 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. 일부 구현예에서, 재조합 단백질은 적어도 하나의 다기능성 재조합 단백질 스캐폴드를 함유한 조작된 항원-결합 폴리펩티드이다[예를 들어, 문헌[Gebauer et al., *Current Opin. Chem. Biol.* 13:245-255, 2009] 및 미국특허출원공개 제2012/0164066호(이러한 문헌은 이의 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 기술된 재조합 항원-결합 단백질 참조]. 항체인 재조합 단백질의 비-제한적인 예는 파니투무맙(panitumumab), 오말리주맙(omalizumab), 아바고보맙(abagovomab), 아바식시맙(abciximab), 악톡수맙(actoxumab), 아달리무맙(adalimumab), 아데카투무맙(adecatumumab), 아펠리모맙(afelimomab), 아푸투주맙(afutuzumab), 알라시주맙(alacizumab), 알라시주맙(alacizumab), 알렘투주맙(alemtuzumab), 알리로쿠맙(alirocumab), 알투모맙(altumomab), 아마툭시맙(amatuximab), 아나투모맙(anatumomab), 아폴리주맙(apolizumab), 아티누맙(atinumab), 토실리주맙(tocilizumab), 바실리지맙(basilizimab), 벡투모맙(bectumomab), 벨리무맙(belimumab), 베바시주맙(bevacizumab), 비시로맙(biciromab), 카나키누맙(canakinumab), 세톡시맙(cetuximab), 다클리주맙(daclizumab), 덴수맙(densumab), 에쿨리주맙(eculizumab), 에드레콜로맙(edrecolomab), 에팔리주맙(efalizumab), 에푼구맙(efungumab), 에르투막소맙(ertumaxomab), 에타라시주맙(etaracizumab), 골리무맙(golimumab), 인플릭시맙(infliximab), 나탈리주맙(natalizumab), 팔리비주맙(palivizumab), 파니투무맙(panitumumab), 페르투주맙(pertuzumab), 라니비주맙(ranibizumab), 리툭시맙(rituximab), 토실리주맙(tocilizumab), 및 트라스투주맙(trastuzumab)을 포함한다. 본원에 기술된 방법에 의해 형성될 수 있는 치료 항체의 추가 예는 당해 분야에 공지되어 있다. 세포 배양물에서 포유류 세포에 의해 분비될 수 있는 재조합 단백질의 추가의 비-제한적인 예는 알글루코시다제 알파, 라로니다제, 아바타셉트, 갈슐파제, 루트로핀 알파, 항혈우병 인자, 아갈시다제 베타, 인터페론 베타-1a, 다르베포에틴 알파, 테넥테플라제, 에타네르셉트, 응고 인자 IX, 난포 자극 호르몬, 인터페론 베타-1a, 이미글루세라제, 도르나제 알파, 에포에틴 알파, 및 알테플라제를 포함한다.

[0126]

액체 배양 배지는 당해 분야에 공지되어 있다. 액체 배양 배지에는 포유류 혈청(예를 들어, 태아 송아지 혈청 및 우태아 혈청), 및/또는 성장 호르몬 또는 성장 인자(예를 들어, 인슐린, 트랜스페린, 및 상피 성장 인자가 보충될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 액체 배양 배지는 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 예는 상업적으로 입수 가능하다.

[0127]

액체 배양 배지는 통상적으로 에너지원(예를 들어, 탄수화물, 예를 들어, 글루코오스), 필수 아미노산(예를 들어, 20개의 아미노산의 기본 세트 및 시스테인), 비타민 및/또는 저 농도로 요구되는 다른 유기 화합물, 자유지방산, 및/또는 미량 원소를 함유한다. 액체 배양 배지에는 요망되는 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), 뉴클레오시드 및 염기(예를 들어, 아데노신, 티미딘, 및 하이폭산틴), 단백질 및 조직 가수분

해물, 및/또는 이들의 임의의 조합 또는 다른 첨가제를 함유한다.

[0128] 액체 배양 배지의 비-제한적인 예는 예를 들어, CD CHO, Opti CHO, 및 Forti CHO(모두는 Life Technologies(Grand Island, NY)로부터 입수 가능함), Hycell CHO 배지(Thermo Fisher Scientific, Inc.; Waltham, MA), Ex-cell CD CHO 융합 배지(Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, MO), 및 PowerCHO 배지(Lonza Group, Ltd.; Basel, Switzerland)를 포함한다. 또한, 액체 배양 배지에 존재할 수 있는 배지 성분들은 화학적으로 규정된(CD) 가수분해물, 예를 들어, CD 텁톤, CD 폴리펩티드(2개 이상의 아미노산), 및 CD 성장 인자를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 액체 조직 배양 배지 및 배지 성분의 추가 예는 당해 분야에 공지되어 있다.

[0129] 부착 포유류 세포를 함유한 세포 배양물은 예를 들어, 마이크로 캐리어를 사용하여 관류 생물반응기에서 성장될 수 있다. 사용될 수 있는 비-제한적인 예시적 마이크로 캐리어는 CytoPore™ 1 및 CytoPore™ 2(GE Healthcare, Life Sciences(Piscataway, New Jersey))를 포함한다. 사용될 수 있는 마이크로 캐리어의 추가 예는 공개적으로 입수 가능하고, 당해 분야에 공지되어 있다.

#### 예시적 개방 회로 여과 시스템의 용도

[0130] 본원에 기술된 임의의 개방 회로 여과 시스템은 세포 배양물을 가공하는 제공된 방법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 방법에서 사용되는 개방 회로 여과 시스템에서의 생물반응기는 생물반응기(예를 들어, 당해 분야에 공지된 임의의 관류 생물반응기) 또는 냉동 보유 탱크일 수 있다. 본 방법에서 사용되는 개방 회로 여과 시스템은 생체적합성 배관인 하나 이상의 도관(예를 들어, 제1 도관, 제2 도관, 이웃하는 TFF 유닛들 사이의 하나 이상의 도관, 및/또는 여액 도관)을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 개방 회로 여과 시스템은 (본원에 기술된 바와 같은) 저장소 및 2개 이상의 서브시스템을 함유한다.

[0132] 본 방법에서 사용되는 개방 회로 여과 시스템은 본원에 기술된 단일 직교류 필터(예를 들어, 투브형 직교류 필터) 또는 2개 이상의(예를 들어, 2, 3, 4 또는 5개의) 직교류 필터(예를 들어, 투브형 직교류 필터)를 갖는 TFF 유닛을 포함할 수 있다. 다른 예에서, 사용되는 개방 회로 여과 시스템은 2개 이상의(예를 들어, 2, 3 또는 4개의) TFF 유닛을 포함할 수 있으며, 여기서, 이웃하는 TFF 유닛들의 각 쌍은 유체 도관에 의해 유체적으로 연결된다. TFF 유닛은 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 150 m<sup>2</sup>(예를 들어, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 145 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 140 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 135 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 130 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 125 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 120 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 115 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 110 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 105 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 100 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 95 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 90 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 85 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 80 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 75 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 70 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 65 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 60 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 55 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 50 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 45 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 40 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 35 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 30 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 25 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 20 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 15 m<sup>2</sup>, 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 10 m<sup>2</sup>, 또는 약 0.1 m<sup>2</sup> 내지 약 5 m<sup>2</sup>)의 전체 여과 면적을 제공할 수 있다. TFF 유닛에 존재하는 필터(들)는 본원에 기술된 기공 크기(예를 들어, 약 0.2 μm), 형상, 섬유 내부 직경, 및/또는 섬유 길이의 임의의 조합을 가질 수 있다.

[0133] 본원에서 사용되는 개방 회로 여과 시스템은 제1 도관 또는 제2 도관, 또는 2개 모두에 배치된 적어도 하나의 펌프를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 펌프는 또한, 시스템에서의 도관(예를 들어, 제1 도관, 제2 도관 중 하나 이상, 및/또는 이웃하는 TFF 유닛들 사이의 하나 이상의 도관) 중 하나 이상에 배치될 수 있다. 사용되는 시스템은 저장소에 그리고 제1 도관 또는 제2 도관에 대해 근위(예를 들어, 펌프에서 제1 도관 또는 제2 도관이 생물반응기와 연결되어 있는 위치까지 0.01 cm 내지 5 cm(예를 들어, 0.01 cm 내지 4 cm, 0.01 cm 내지 3 cm, 0.01 cm 내지 2 cm, 또는 0.01 cm 내지 1 cm)의 거리)에 배치된 적어도 하나의 펌프를 포함할 수 있다. 일부 시스템은 단지, 제1 기간 및 제3 기간 동안 세포 배양물을 제1 방향으로 흐르게 하고 제2 기간 동안 세포 배양물을 제2 방향으로 흐르게 하는 단일 펌프를 포함한다. 다른 시스템은 제1 펌프 및 제2 펌프를 포함하며, 여기서, 제1 펌프는 세포 배양물을 제1 방향으로 흐르게 하며, 제2 펌프는 세포 배양물을 제2 방향으로 흐르게 한다.

[0134] 본 방법에서 사용되는 임의의 시스템에서, 적어도 하나의 펌프(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개의 펌프)는 LTP(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 LTP, 예를 들어, 연동 펌프)일 수 있다. 본 방법에서 사용되는 시스템에 존재하는 적어도 하나의 펌프(예를 들어, 적어도 하나의 LTP)는 본원에 기술된 펌프(예를 들어, LTP)의 특징 또는 특성의 임의의 조합(예를 들어, 펌프 헤드 부피, 타입, 및/또는 배관)을 가질 수 있다. 몇몇 방법에서, 적어도 하나의 펌프는 약 10 RPM 내지 약 100 RPM(예를 들어, 약 10 RPM 내지 약 95 RPM, 약 10 RPM 내지 약 90 RPM, 약 10 RPM 내지 약 85 RPM, 약 10 RPM 내지 약 80 RPM, 약 10 RPM 내지 약 75 RPM, 약 10 RPM 내지 약 70 RPM, 약 10 RPM 내지 약 65 RPM, 약 10 RPM 내지 약 60 RPM, 약 10 RPM 내지 약 55 RPM, 약 10 RPM 내지 약 50 RPM, 약

10 RPM 내지 약 45 RPM, 약 10 RPM 내지 약 40 RPM, 약 10 RPM 내지 약 35 RPM, 약 10 RPM 내지 약 30 RPM, 약 10 RPM 내지 약 25 RPM, 또는 약 10 RPM 내지 약 20 RPM)의 펌프 속도(RPM)에서 사용된다. 일부 예에서, 본 방법은 약  $0.5 \text{ L/m}^3/\text{시간}$  내지 약  $40 \text{ L/m}^3/\text{시간}$ , 약  $0.5 \text{ L/m}^3/\text{시간}$  내지 약  $35 \text{ L/m}^3/\text{시간}$ , 약  $0.5 \text{ L/m}^3/\text{시간}$  내지 약  $30 \text{ L/m}^3/\text{시간}$ , 약  $0.5 \text{ L/m}^3/\text{시간}$  내지 약  $25 \text{ L/m}^3/\text{시간}$ , 약  $0.5 \text{ L/m}^3/\text{시간}$  내지 약  $20 \text{ L/m}^3/\text{시간}$ , 약  $0.5 \text{ L/m}^3/\text{시간}$  내지 약  $15 \text{ L/m}^3/\text{시간}$ , 약  $0.5 \text{ L/m}^3/\text{시간}$  내지 약  $10 \text{ L/m}^3/\text{시간}$ , 약  $0.5 \text{ L/m}^3/\text{시간}$  내지 약  $9 \text{ L/m}^3/\text{시간}$ , 약  $0.5 \text{ L/m}^3/\text{시간}$  내지 약  $8 \text{ L/m}^3/\text{시간}$ , 약  $0.5 \text{ L/m}^3/\text{시간}$  내지 약  $7 \text{ L/m}^3/\text{시간}$ , 약  $0.5 \text{ L/m}^3/\text{시간}$  내지 약  $6 \text{ L/m}^3/\text{시간}$ , 약  $0.5 \text{ L/m}^3/\text{시간}$  내지 약  $5 \text{ L/m}^3/\text{시간}$ , 약  $0.5 \text{ L/m}^3/\text{시간}$  내지 약  $4 \text{ L/m}^3/\text{시간}$ , 약  $0.5 \text{ L/m}^3/\text{시간}$  내지 약  $3 \text{ L/m}^3/\text{시간}$ , 약  $0.5 \text{ L/m}^3/\text{시간}$  내지 약  $2 \text{ L/m}^3/\text{시간}$ , 또는 약  $0.8 \text{ L/m}^3/\text{시간}$  내지 약  $1.2 \text{ L/m}^3/\text{시간}$ 의 관류 플럭스 속도(perfusion flux rate)를 야기한다. 일부 예에서, 적어도 하나의 펌프의 사용은 시스템에서 약  $50 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $1000 \text{ s}^{-1}$ (예를 들어, 약  $50 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $950 \text{ s}^{-1}$ , 약  $50 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $900 \text{ s}^{-1}$ , 약  $50 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $850 \text{ s}^{-1}$ , 약  $50 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $800 \text{ s}^{-1}$ , 약  $50 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $750 \text{ s}^{-1}$ , 약  $50 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $700 \text{ s}^{-1}$ , 약  $50 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $650 \text{ s}^{-1}$ , 약  $50 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $600 \text{ s}^{-1}$ , 약  $50 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $550 \text{ s}^{-1}$ , 약  $50 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $500 \text{ s}^{-1}$ , 약  $50 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $450 \text{ s}^{-1}$ , 약  $50 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $400 \text{ s}^{-1}$ , 약  $50 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $350 \text{ s}^{-1}$ , 약  $50 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $300 \text{ s}^{-1}$ , 약  $50 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $250 \text{ s}^{-1}$ , 약  $50 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $200 \text{ s}^{-1}$ , 약  $50 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $150 \text{ s}^{-1}$ , 또는 약  $50 \text{ s}^{-1}$  내지 약  $100 \text{ s}^{-1}$ )의 전 단율을 야기한다. 이러한 방법에서 사용될 수 있는 펌프의 특정 예는 16 mm 배관을 갖는 왓슨-말로 620 연동 펌프 또는 40 mm 배관을 갖는 왓슨-말로 800 연동 펌프이다.

당업자가 인식할 수 있는 바와 같이, 시스템에서 세포 배양물의 총 부피(여액 도관 및 여액 보유 탱크에서 여액의 부피 제외), 적어도 하나의 TFF 유닛에 의해 제공된 총 여과 면적, 및 유량(예를 들어, 제2 기간 및 제3 기간에)은 본 발명에서 제공된 시스템 및 방법의 하나 이상의 이점을 가능하게 하는 적절한 비율(예를 들어, 본원에 기술된 예시적 수치 및 파라미터)로 수행될 필요가 있다.

### 흐름 사이클(Flow Cycle)

본원에 기술된 방법에서, 제1 기간, 제2 기간 및/또는 제3 기간은 약 20초 내지 약 15분(예를 들어, 약 30초 내지 약 15분, 약 20초 내지 약 14분, 약 20초 내지 약 13분, 약 20초 내지 약 12분, 약 20초 내지 약 11분, 약 20초 내지 약 10분, 약 20초 내지 약 9분, 약 20초 내지 약 8분, 약 20초 내지 약 7분, 약 20초 내지 약 6분, 약 20초 내지 약 5분, 약 20초 내지 약 4분, 약 20초 내지 약 3분, 약 20초 내지 약 2분, 약 20초 내지 약 115초, 약 20초 내지 약 110초, 약 20초 내지 105초, 약 20초 내지 약 100초, 약 20초 내지 약 95초, 약 20초 내지 약 90초, 약 20초 내지 약 85초, 약 20초 내지 약 80초, 약 20초 내지 약 75초, 약 20초 내지 약 70초, 약 20초 내지 약 65초, 약 20초 내지 약 60초, 약 20초 내지 약 55초, 약 20초 내지 약 50초, 약 20초 내지 약 45초, 약 20초 내지 약 40초, 약 20초 내지 약 35초, 약 20초 내지 약 30초, 약 20초 내지 약 25초, 약 30초 내지 약 90초, 약 35초 내지 약 85초, 약 40초 내지 약 80초, 약 45초 내지 약 75초, 약 50초 내지 약 70초, 약 55초 내지 약 65초, 약 30초 내지 14분, 약 30초 내지 13분, 약 30초 내지 12분, 약 30초 내지 약 11분, 약 30초 내지 약 10분, 약 30초 내지 약 9분, 약 30초 내지 약 8분, 약 30초 내지 약 7분, 약 30초 내지 약 6분, 약 30초 내지 약 5분, 약 30초 내지 약 4분, 약 30초 내지 약 3분, 약 30초 내지 약 2분, 약 30초 내지 약 90초, 약 30초 내지 약 1분, 약 1분 내지 약 15분, 약 1분 내지 약 14분, 약 15분 내지 약 13분, 약 1분 내지 약 12분, 약 1분 내지 약 11분, 약 1분 내지 약 10분, 약 1분 내지 약 9분, 약 1분 내지 약 8분, 약 1분 내지 약 7분, 약 1분 내지 약 6분, 약 1분 내지 약 5분, 약 1분 내지 약 4분, 약 1분 내지 약 3분, 약 1분 내지 약 2분, 또는 약 1분 내지 약 90초)일 수 있다. 일부 예에서, 제1 기간, 제2 기간, 및 제3 기간은 대략 동일하다. 다른 예에서, 제1 기간, 제2 기간, 및 제3 기간은 동일하지 않다.

일부 예에서, 제1 기간에 제1 흐름 방향은 세포 배양물을 저장소로부터 적어도 하나의 펌프(예를 들어, 단일 펌프)가 배치된 제1 도관 또는 제2 도관을 통해, 이후에 적어도 하나의 TFF 유닛을 통해, 이후에 다른 도관을 통해 저장소로 흘르게 한다(예를 들어, 약 30초 내지 약 60분, 약 30초 내지 약 50분, 약 30초 내지 약 40분, 약 30초 내지 약 30분, 약 30초 내지 약 20분, 약 30초 내지 약 15분, 약 30초 내지 약 10분, 또는 약 30초 내지 약 5분의 기간 동안). 이러한 예에서, 제1 기간 동안 흘르는 것은 시스템에서 적어도 하나의 TFF 유닛(및 여기에서 적어도 하나의 직교류 필터)을 평형을 유지시키기 위해 사용된다. 도 8은 시스템에서 적어도 하나의 TFF 유닛을 평형을 유지시킬 목적을 위하여 세포 배양물을 제1 흐름 방향으로 흘르는 것을 도시한 도식적 다이어그램이다.

도 9는 세포 배양물을 제1 기간( $t_1$ ) 동안 저장소로부터 TFF 유관을 통해 제1 흐름을 방향으로 흘르게 하고 수질

기간( $t_{r_1}$ )에 걸쳐 제1 흐름 방향을 역전시키고 세포 배양물을 제2 기간( $t_2$ ) 동안 TFF 유닛을 통해 제2 흐름 방향으로 흐르게 하고 제2 흐름 방향을 소정 기간( $t_{r_2}$ )에 걸쳐 역전시키고 배양물을 제3 기간( $t_3$ ) 동안 TFF 유닛을 통해 제1 흐름 방향으로 흐르게 하는 일 예를 도시한 것이다. 예를 들어,  $t_{r_1}$  및/또는  $t_{r_2}$ 는 약 1초 내지 약 1분(예를 들어, 약 1초 내지 약 55초, 약 1초 내지 약 50초, 약 1초 내지 약 45초, 약 1초 내지 약 40초, 약 1초 내지 약 35초, 약 1초 내지 약 30초, 약 1초 내지 약 25초, 약 1초 내지 약 20초, 약 1초 내지 약 15초, 약 1초 내지 약 10초, 약 1초 내지 약 5초, 약 5초 내지 약 60초, 약 5초 내지 약 55초, 약 5초 내지 약 50초, 약 5초 내지 약 45초, 약 5초 내지 약 40초, 약 5초 내지 약 35초, 약 5초 내지 약 30초, 약 5초 내지 약 25초, 약 5초 내지 약 20초, 약 5초 내지 약 15초, 약 5초 내지 약 10초, 또는 약 2초 내지 약 10초, 약 2초 내지 약 8초, 약 2초 내지 약 6초, 또는 약 2초 내지 약 4초)일 수 있다.

[0140] 제1 방향 및/또는 제2 방향으로 흐르는 것(예를 들어, 임의의 제1 기간, 제2 기간, 및/또는 제3 기간)은 약 0.5 L/분 내지 약 120 L/분(예를 들어, 약 0.5 L/분 내지 약 115 L/분, 약 0.5 L/분 내지 약 110 L/분, 약 0.5 L/분 내지 약 105 L/분, 약 0.5 L/분 내지 약 100 L/분, 약 0.5 L/분 내지 약 95 L/분, 약 0.5 L/분 내지 약 90 L/분, 약 0.5 L/분 내지 약 85 L/분, 약 0.5 L/분 내지 약 80 L/분, 약 0.5 L/분 내지 약 75 L/분, 약 0.5 L/분 내지 약 70 L/분, 약 0.1 L/분 내지 약 65 L/분, 약 0.1 L/분 내지 약 60 L/분, 약 0.1 L/분 내지 약 55 L/분, 약 0.1 L/분 내지 약 50 L/분, 약 0.1 L/분 내지 약 45 L/분, 약 0.1 L/분 내지 약 40 L/분, 약 0.1 L/분 내지 약 35 L/분, 약 0.1 L/분 내지 약 30 L/분, 약 0.1 L/분 내지 약 25 L/분, 약 0.1 L/분 내지 약 20 L/분, 약 0.1 L/분 내지 약 15 L/분, 약 0.1 L/분 내지 약 10 L/분, 또는 약 0.1 L/분 내지 약 5 L/분)의 유량을 야기할 수 있다.

[0141] (i) 세포 배양물을 제1 기간에 걸쳐 제1 흐름 방향으로 흐르게 하고 (ii) 세포 배양물을 제2 기간에 걸쳐 제2 흐름 방향으로 흐르게 하는 1회 반복은 약 40% 내지 약 95%(예를 들어, 약 40% 내지 약 90%, 약 40% 내지 약 85%, 약 40% 내지 약 80%, 약 40% 내지 약 75%, 약 45% 내지 약 80%, 약 50% 내지 약 80%, 약 55% 내지 약 75%, 약 60% 내지 약 85%, 약 70% 내지 약 95%, 또는 약 70% 내지 약 85%)의 교환 분율을 야기할 수 있다.

[0142] 본원에 제공된 방법에서, 시스템에서 세포 배양물의 부피(여액 도관, 여액 보유 탱크 및/또는 생물학적 제조 시스템을 제외함)는 약 0.1 L 내지 약 50 L(예를 들어, 약 0.1 L 내지 약 45 L, 약 0.1 L 내지 약 40 L, 약 0.1 L 내지 약 35 L, 약 0.1 L 내지 약 30 L, 약 0.1 L 내지 약 25 L, 약 0.1 L 내지 약 20 L, 약 0.1 L 내지 약 18 L, 약 0.1 L 내지 약 16 L, 약 0.1 L 내지 약 14 L, 약 0.1 L 내지 약 12 L, 약 0.1 L 내지 약 10 L, 약 0.1 L 내지 약 8 L, 약 0.1 L 내지 약 6 L, 약 0.1 L 내지 약 4 L, 약 0.1 L 내지 약 3 L, 약 0.1 L 내지 약 2 L, 또는 약 0.1 L 내지 약 1 L)일 수 있다. 본원에 기술된 방법에서 저장소 외측(예를 들어, 관류 생물반응기)에서 소비되는 세포 배양물의 시간의 양은 5초 내지 45초(예를 들어, 약 5초 내지 약 40초, 약 5초 내지 약 35 초, 약 5초 내지 약 30초, 약 5초 내지 약 25초, 약 5초 내지 약 20초, 약 5초 내지 약 15초, 약 5초 내지 약 10초)일 수 있다.

[0143] 본원에 제공된 방법의 일부 구현에는 포유류 세포를 함유하지 않는 여액을 형성시킨다. 본원에 제공된 방법은 또한, 분비된 재조합 단백질을 함유한 세포 배양물로부터 분비된 재조합 단백질(예를 들어, 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 성장 인자, 사이토카인, 또는 효소)을 함유한 여액을 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 배양물 및/또는 여액은 멸균된 상태이다.

[0144] 본 방법은 단위 시간당 보다 큰 세포 배양물 부피를 여과하기 위해 스케일-업 또는 스케일-다운될 수 있다. 당업자에 의해 인식될 수 있는 바와 같이, 단위 시간당 보다 큰 부피의 세포 배양물은 보다 큰 펌프 헤드 부피를 갖는 적어도 하나의 펌프 및 TFF 유닛(들) 또는 보다 큰 수의 TFF 유닛에서 보다 큰 배관 및/또는 보다 큰 수의 직교류 필터(예를 들어, 보다 큰 총 여과 면적)를 도입함으로써 가공될 수 있다. 이러한 변화는 본원에 기술된 방법을 수행하기 위해 사용되는 개방 회로 여과 시스템에서 실행될 수 있고, 보다 큰 스케일의 시스템이 하기 이점들 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개)을 가짐을 보장하기 위해 시험될 수 있다: 다른 단방향 개방 회로 여과 시스템(예를 들어, 단방향 TFF 시스템) 또는 양방향 닫힌 회로 여과 시스템(닫힌 회로 ATF<sup>TM</sup> 시스템)과 비교하여, 세포 배양물의 감소된 외부 부피(저장소 외측), 증가된 교환 분율(예를 들어, 제1 도관, TFF 유닛, 및 제2 도관 내), 세포 배양물의 감소된 외부 체류 시간(저장소 외측), 세포 배양물 여과 동안 감소된 전단 응력, 세포 배양물에서 개선된 세포 생존능력, 세포 배양물에서 상승된 생존 세포 밀도, 및 감소된 필터 오염. 세 가지의 상이한 예시적 방법 및 각 방법을 수행하기 위해 사용되는 개방 회로 여과 시스템의 물리적 및 기능적 파라미터의 예는 표 2(하기)에 기술되어 있다.

[0145]

본원에 기술된 임의의 방법은 약 14일 내지 약 100일(예를 들어, 약 14일 내지 약 90일, 약 14일 내지 약 80일, 약 14일 내지 약 70일, 약 14일 내지 약 60일, 약 14일 내지 약 50일, 약 14일 내지 약 40일, 약 14일 내지 약 30일, 약 14일 내지 약 20일, 약 20일 내지 약 100일, 약 20일 내지 약 90일, 약 20일 내지 약 80일, 약 20일 내지 약 70일, 약 20일 내지 약 60일, 약 20일 내지 약 50일, 약 20일 내지 약 40일, 약 20일 내지 약 30일, 약 30일 내지 약 100일, 약 30일 내지 약 90일, 약 30일 내지 약 80일, 약 30일 내지 약 70일, 약 30일 내지 약 60일, 약 30일 내지 약 50일, 약 40일 내지 약 100일, 약 50일 내지 약 90일, 약 50일 내지 약 80일, 약 50일 내지 약 70일, 약 50일 내지 약 60일, 약 60일 내지 약 100일, 약 60일 내지 약 90일, 약 60일 내지 약 80일, 또는 약 60일 내지 약 70일)의 기간 동안 연속적으로 수행될 수 있다.

[0146]

[표 2] 3개의 상이한 예시적 방법 및 각 방법을 수행하기 위해 사용되는 시스템의 파라미터

필터	작업 부피 (L)	첨유 길이 (cm)	여과 면적 (m <sup>2</sup> )	Xr 타겟 (E6 세포/mL)	관류 속도 (L/d)	교환율 (L/min)	외부 부피 (L)	교환 분율 (%)	외부 체류 시간 (s)	전단율 (1/s)	관류 플럭스 (L/m <sup>2</sup> /hr)	펌프	펌프 속도 (RPM)
ATF4	10	30	0.77	40-80	20	3.5	0.55	78	12	716	252	1.08  Watson-Marlow 620 w/ 16mm 배관	68
2x ATF6 or ATF8	50	60	5	40-80	200	8	3.5	50	25	543	58	1.67  Watson-Marlow 800 w/ 25mm 배관	25
4x ATF10	500	60	40	40-80	2000	60	15	70	15	509	43	2.08  Watson-Marlow 800 w/ 40mm 배관	45

[0147]

일부 구현예에서, 적어도 하나의 TFF 유닛에서 하나 이상의 직교류 필터(들)에서의 필터 첨유를 따르는 압력의 변화 및/또는 적어도 하나의 TFF 유닛에서 하나 이상의 직교류 필터(들)에서의 필터 맴브레인을 가로지르는 압력의 변화는 예를 들어, 약 1시간 내지 약 100일(예를 들어, 약 1시간 내지 약 95일, 약 1시간 내지 약 90일, 약 1시간 내지 약 90일, 약 1시간 내지 약 85일, 약 1시간 내지 약 80일, 약 1시간 내지 약 75일, 약 1시간 내지 약 70일, 약 1시간 내지 약 65일, 약 1시간 내지 약 60일, 약 1시간 내지 약 55일, 약 1시간 내지 약 50일, 약 1시간 내지 약 45일, 약 1시간 내지 약 40일, 약 1시간 내지 약 35일, 약 1시간 내지 약 30일, 약 1시간 내지 약 25일, 약 1시간 내지 약 20일, 약 1시간 내지 약 15일, 약 1시간 내지 약 10일, 약 1시간 내지 약 5일, 약 1일 내지 약 100일, 약 1일 내지 약 90일, 약 1일 내지 약 85일, 약 1일 내지 약 80일, 약 1일 내지 약 75일, 약 1일 내지 약 70일, 약 1일 내지 약 65일, 약 1일 내지 약 60일, 약 1일 내지 약 55일, 약 1일 내지 약 50일, 약 1일 내지 약 45일, 약 1일 내지 약 40일, 약 1일 내지 약 35일, 약 1일 내지 약 30일, 약 1일 내지 약 25일, 약 1일 내지 약 20일, 약 1일 내지 약 15일, 약 1일 내지 약 10일, 약 5일 내지 약 100일, 약 5일 내지 약 95일, 약 5일 내지 약 90일, 약 5일 내지 약 85일, 약 5일 내지 약 80일, 약 5일 내지 약 75일, 약 5일 내지 약 70일, 약 5일 내지 약 65일, 약 5일 내지 약 60일, 약 5일 내지 약 55일, 약 5일 내지 약 50일, 약 5일 내지 약 45일, 약 5일 내지 약 40일, 약 5일 내지 약 35일, 약 5일 내지 약 30일, 약 5일 내지 약 25일, 약 5일 내지 약 20일, 약 5일 내지 약 15일, 약 5일 내지 약 10일, 약 10일 내지 약 100일, 약 10일 내지 약 95일, 약 10일 내지 약 90일, 약 10일 내지 약 85일, 약 10일 내지 약 80일, 약 10일 내지 약 75일, 약 10일 내지 약 70일, 약 10일 내지 약 65일, 약 10일 내지 약 60일, 약 10일 내지 약 55일, 약 10일 내지 약 50일, 약 10일 내지 약 45일, 약 10일 내지 약 40일, 약 10일 내지 약 35일, 약 10일 내지 약 30일, 약 10일 내지 약 25일, 약 10일 내지 약 20일, 약 15일 내지 약 100일, 약 15일 내지 약 95일, 약 15일 내지 약 90일, 약 15일 내지 약 85일, 약 15일 내지 약 80일, 약 15일 내지 약 75일, 약 15일 내지 약 70일, 약 15일 내지 약 65일, 약 15일 내지 약 60일, 약 15일 내지 약 55일, 약 15일 내지 약 50일, 약 15일 내지 약 45일, 약 15일 내지 약 40일, 약 15일 내지 약 35일, 약 15일 내지 약 30일, 약 15일 내지 약 25일, 또는 약 15일 내지 약 20일)의 기간 동안 본 방법의 성능 동안 실질적으로 동일하게 유지된다(예를 들어, 본 방법의 개시에서 필터 첨유를 가로지르거나 필터 맴브레인을 가로지르는 압력의 초기 변화의 약 ± 20% 내, 약 ± 19% 내, 약 ± 18% 내, 약 ± 17% 내, 약 ± 16% 내, 약 ± 15% 내, 약 ± 14% 내, 약 ± 13% 내, 약 ± 12% 내, 약 ± 11% 내, 약 ± 10% 내, 약 ± 9% 내, 약 ± 8% 내, 약 ± 7% 내, 약 ± 6% 내, 약 ± 5% 내, 약 ± 4% 내, 약 ± 3% 내, 약 ± 2.5% 내, 약 ± 2.0% 내, 약 ± 1.5% 내, 약 ± 1.0% 내, 또는 약 ± 0.5% 내). 필터 첨유 또는 필터 맴브레인을 가로지르는 압력 변화의 유의미한 증가는 시스템에서 적어도 하나의 TFF 유닛에서의 적어도 하나의 직교류 필터의 오염을 지시한다.

[0149]

저장소에서 세포 배양물을 인큐베이션 함

[0150]

일부 구현예는 포유류 세포가 재조합 단백질을 조직 배양 배지로 분비하게 하는 조건하에서 세포 배양물을 저장

소(예를 들어, 관류 생물반응기)에서 인큐베이션 하는 것을 추가로 포함한다. 예를 들어, 저장소에서의 세포 배양물은 약 32°C 내지 약 39°C의 온도에서 인큐베이션 될 수 있다. 숙련된 실무자는 온도가 인큐베이션 동안 특정 시점(들)(예를 들어, 시간 또는 일일 기준)에 변화될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 예를 들어, 온도는 세포 배양물을 저장소에 배치한 후에 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 또는 약 20일 이상에 변경되거나 이동(예를 들어, 증가 또는 감소)될 수 있다. 예를 들어, 온도는 상향 이동될 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, 또는 10.0°C)의 변화). 예를 들어, 온도는 하향 이동될 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, 또는 10°C의 변화). 저장소에서 세포 배양물의 인큐베이션은 또한, 최대 또는 약 1% 내지 15% CO<sub>2</sub>(예를 들어, 최대 또는 약 14% CO<sub>2</sub>, 12% CO<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 8% CO<sub>2</sub>, 6% CO<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 4% CO<sub>2</sub>, 3% CO<sub>2</sub>, 2% CO<sub>2</sub>, 또는 최대 또는 약 1% CO<sub>2</sub>)를 함유한 대기에서 수행될 수 있다. 또한, 본원에 기술된 임의의 방법은 세포 배양물을 습윤화된 대기(예를 들어, 적어도 또는 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 85%, 80%, 85%, 90%, 또는 적어도 또는 약 95% 습도, 또는 약 100% 습도)에서 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다.

[0151]

제1 기간, 제2 기간, 및 제3 기간의 반복 동안 세포 배양물을 저장소(예를 들어, 관류 생물반응기)에서 인큐베이션 하는 것은 소정 부피의 액체 배양 배지를 생물반응기에 첨가하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 소정 부피의 액체 배양 배지를 생물반응기에 첨가하는 것은 시스템에서 여액으로써 배출되는 액체 배양 배지의 손실을 상쇄시킬 수 있다. 액체 배양 배지를 저장소에 첨가하는 것은 연속적으로 또는 주기적으로(예를 들어, 3일에 1회, 격일에 1회, 하루에 1회, 하루에 2회, 하루에 3회, 하루에 4회, 하루에 5회, 또는 하루에 5회 초과), 또는 이의 임의의 조합으로 수행될 수 있다. 저장소에 첨가되는 액체 배양 배지의 부피는 일부 경우에, 시스템에서 세포 배양물의 출발 부피(여액 도관 및 여액 보유 탱크에 존재하는 여액의 부피를 배제)가 각 24시간 기간에 걸쳐 또는 본 방법이 수행되는 전체 기간에 걸쳐 대략 동일하도록 수행될 수 있다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 액체 배양 배지가 시스템으로부터 여액으로서 제거되는 속도(부피/단위시간) 및 소정 부피의 액체 배양 배지가 저장소에 첨가되는 속도(부피/단위시간)가 달라질 수 있다. 액체 배양 배지가 시스템으로부터 여액으로서 제거되는 속도(부피/단위 시간) 및 소정 부피의 액체 배양 배지가 첨가되는 속도(부피/단위 시간)는 대략 동일할 수 있거나 상이할 수 있다.

[0152]

대안적으로, 시스템으로부터 여액으로서 제거되는 부피 및 저장소에 첨가되는 부피는 본 방법의 수행 동안, 각 24시간 기간(또는 대안적으로, 0.1시간 내지 약 24시간의 증가 기간 또는 24시간 초과의 증가 기간)에 걸쳐 변할 수 있다(예를 들어, 점진적으로 증가할 수 있다). 예를 들어, 시스템으로부터 여액으로서 제거되는 액체 배양 배지의 부피, 및 본 방법의 수행에 걸쳐 각 24-시간 기간(또는 대안적으로, 약 1시간 내지 약 24시간의 증가 기간 또는 24시간 초과의 증가 기간) 내에 첨가되는 액체 배양 배지의 부피는 예를 들어, 저장소 부피의 0.5% 내지 약 20%인 부피 또는 본 방법의 수행의 개시 시에 세포 배양물의 전체 부피에서 저장소의 부피의 약 25% 내지 약 150% 또는 본 방법의 성능의 개시 시에 세포 배양물의 전체 부피로(예를 들어, 점차적으로 또는 상당한 증가를 통해) 증가될 수 있다. 당업자에 의해 인식될 수 있는 바와 같이, 각 24-시간 기간 내에, 시스템으로부터 여액으로서 제거된 부피 및 저장소에 첨가되는 부피는 바람직하게 저장소의 부피 또는 본 방법의 수행의 개시 시에 세포 배양물의 전체 부피의 약 100% 내지 약 400%(예를 들어, 약 100% 내지 약 350%, 약 100% 내지 약 300%, 약 100% 내지 약 250%, 약 100% 내지 약 200%, 약 100% 내지 약 150%, 약 150% 내지 약 400%, 약 150% 내지 약 350%, 약 150% 내지 약 300%, 약 150% 내지 약 250%, 약 150% 내지 약 200%, 약 200% 내지 약 400%, 약 200% 내지 약 350%, 약 200% 내지 약 300%, 또는 약 200% 내지 약 250%)이다.

[0153]

숙련된 실무자는, 시스템으로부터 여액으로서 제거된 액체 배양 배지 및 저장소에 첨가된 액체 배양 배지가 동일한 타입의 배지일 수 있다는 것을 인식할 것이다. 다른 경우에, 시스템으로부터 여액으로서 제거된 액체 배양 배지 및 저장소에 첨가된 액체 배양 배지는 실질적으로 상이할 수 있다. 액체 배양 배지의 부피는 수작업으로 또는 자동화 시스템을 이용하여, 예를 들어 관류 펌프에 의해 첨가될 수 있다.

[0154]

#### **여액으로부터 재조합 단백질을 단리시킴**

[0155]

본원에 기술된 임의의 방법은 여액으로부터 분비된 재조합 단백질(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 재조합 단백질)을 단리시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 유체로부터 폴리펩티드(예를 들어, 분비된 폴리펩티드)를 단리시키는 여러 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 재조합 단백질을 단리시키는 방법은 재조합 단백질을 함유한 유체를 포집, 정제, 폴리싱, 및/또는 여과하는 단계들 중 하나 이상의 단계를 포함할 수 있다.

당해 분야에 널리 공지되어 있는 바와 같이, 재조합 단백질을 단리시키기 위해 사용되는 특정 방법은 재조합 단백질의 생물물리학적 성질에 따른 것이다. 예를 들어, 재조합 항체는 일부, 단백질 A 수지를 사용하여 항체를 포집하는 단계를 사용하여 정제될 수 있다.

[0156] 일부 예에서, 여액에 존재하는 재조합 단백질은 적어도 하나의 다중-컬럼 크로마토그래피 시스템(MCCS)(예를 들어, 본원에 기술된 임의의 하나 이상의 MCCS)을 통해 단리시키는 것을 포함하는 통합 및 연속 공정을 사용하여 단리된다. 통합 및 연속 공정은 본원에 기술된 임의의 예시적 생물학적 제조 시스템을 사용하여 수행될 수 있다. 이러한 공정에서 사용되는 재조합 단백질 및 생물학적 제조 시스템을 단리시키기 위한 예시적인 통합 및 연속 공정은 2013년 3월 8일에 출원된 미국특허출원 제61/775,060호, 및 2013년 7월 19일에 출원된 미국특허출원 제61/856,390호에 기술된다.

[0157] 얻어진 단리된 재조합 단백질은 적어도 또는 약 50 중량% 순도, 예를 들어, 적어도 또는 약 55 중량% 순도, 적어도 60 중량% 순도, 적어도 65 중량% 순도, 적어도 70 중량% 순도, 적어도 75 중량% 순도, 적어도 80 중량% 순도, 적어도 85 중량% 순도, 적어도 90 중량% 순도, 적어도 95 중량% 순도, 적어도 96 중량% 순도, 적어도 97 중량% 순도, 적어도 98 중량% 순도, 또는 적어도 또는 약 99 중량% 순도, 또는 99 중량% 초과의 순도일 수 있다.

[0158] 일부 방법은 단리된 재조합 단백질을 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 완충제와 혼합함으로써 치료 약물 물질을 제형화하는 단계를 추가로 포함한다. 혼합은 단리된 재조합 단백질을 함유한 유체를 완충된 용액과 혼합함으로써 수행될 수 있다. 다른 예에서, 혼합은 고체 완충제를 완충된 용액과 함께 단리된 재조합 단백질을 함유한 유체에 첨가함으로써 수행될 수 있다. 본원에 포함되는 바와 같이, 다른 형태의 혼합은 단리된 재조합 단백질을 함유한 고체 조성물(예를 들어, 동결건조된 분말 또는 케이크)을 완충된 용액(예를 들어, 주사 가능한 멸균 염수)로 용해시킨다. 치료 약물 물질은 당해 분야에 공지된 임의 투여 경로(예를 들어, 경구 투여, 정맥내 투여, 동맥내 투여, 근육내 투여, 복강내 투여, 피하 투여, 척추 강내 투여, 또는 흡입)를 위해 제형화될 수 있다.

#### 실시예

[0160] 본 발명은 하기 실시예에서 추가로 기술되며, 이러한 실시예는 청구범위에 기술된 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

#### 실시예 1. ATF<sup>TM</sup>(정제 기술)에 의해 달성된 가공에 대한 본원에 제공된 개방 회로 여과 시스템에 의해 달성된 가공의 비교

[0162] 본원에 제공된 개방 회로 여과 시스템에 의해 달성된 세포 배양물 가공을 ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology)(닫힌 회로 교번 흐름 접선 여과 시스템)에 의해 달성된 세포 배양 가공과 비교하기 위해 한 세트의 실험을 수행하였다. 이러한 실험을 수행하기 위해 사용되는 디바이스는 일반적으로 도 5에 도시되어 있다. 상세하게, 개방 회로 여과 시스템에서 사용되는 저장소는 Broadly-James 15L 생물반응기이며, 제1 도관 및 제2 도관은 0.5 인치의 내부 직경을 갖는 생체적합성이고 용접 가능한 이동 배관이며, TFF 유닛은 단일 투브형 직교류 필터(30 cm의 길이 및 1 mm의 내부 직경을 가지고, 0.2  $\mu$ m의 평균 기공 크기 및 830개의 섬유/필터의 섬유 밀도 및 0.77 m<sup>2</sup>의 여과 면적을 갖는 폴리에테르설론 섬유로 이루어짐)를 함유하며, 적어도 하나의 펌프는 유체를 제1 흐름 방향 및 제2 흐름 방향으로 흐르게 할 수 있는 단일 앗순-말로 연동 펌프로서, 16 mm의 내부 직경 및 4 mm의 벽 직경을 갖는 트윈 채널 GORE Sta-Pure 배관을 갖는 50 mL 내지 100 mL의 펌프 헤드 부피를 갖는다.

#### 물질 및 방법

[0164] 본 발명에 제공된 개방 회로 여과 시스템 및 Refine Technology에 의한 ATF<sup>TM</sup>에 의해 달성된 가공의 비교를 위해 사용되는 실험 파라미터의 개요는 표 3 및 표 4(하기)에 요약되어 있다. 이러한 실험을 수행하기 위해 사용되는 본 방법의 추가의 상세한 요약은 하기에 제공된다.

[0165]

[표 3] 실험 파라미터

파라미터	상세한 설명	
	TFF	ATF4
세포주	GC2008 클론 A61, 고밀도 “뱅크” $45 \times 10^7$ 세포/바이러스	GC2008 A61 HD WAVE.”
배지	글루타민을 갖는 CD CHO	
생물반응기	Broadly James 15 L 생물반응기	
작업 부피	10 L	
생물반응기 접종물	플라스크 시드 트레인을 혼들어줌	
접종 밀도	$0.5 - 1 \times 10^6$ 세포/mL	
세포 밀도 타겟	2 반응기 부피(RV)/일을 갖는 $40 \times 10^6$ 세포/mL에 도달할 수 있도록 하고 유지시키기 위해 불리딩함	
세포 비판류율	0.05 mL/cell-d	
바이오매스 제거(필요한 경우)	케페시턴스(Aber) 대 세포 밀도 보정이 양호한 경우에, 대조 블리드 속도에 대한 캐페시턴스를 사용함. 대안적으로, O <sub>2</sub> 살포물을 사용	
온도	37 °C	
교반	120 RPM	
DO	≥ 40%	
염기	1M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (소듐 카보네이트)	
소포	Invitrogen Foam Away 3% Simethicone (30,000 PPM) 작업 모액: 3000PPM (WF1 종의 회석물)	
pCO <sub>2</sub>	<120 mmHg, >120 mmHg 인 경우 N <sub>2</sub> 를 살포	
pH	6.95 ± 0.1	
가스 첨가	살포물: 산소, CO <sub>2</sub> (필요한 경우), N <sub>2</sub> (필요한 경우) 오버레이: 100 ccpm에서 공기	
O <sub>2</sub> 살포기	20 μm 소결됨	
N <sub>2</sub> 살포기	1 mm 천공된 흡	
세포 분리 디바이스	620L 펌프헤드를 갖는 Watson-Marlow 620Du 연동 펌프로의 TFF, 16mm ID Gore sta-pure 배관 ATF4 필터 (0.2 μm)	Refine ATF4
ATF/TFF 교환율	3.5 L/min (65-70 rpm), 1 분 마다 역전	3.5 L/min, 7 초 마다 역전

[0166]

[표 4] 파라미터들의 비교

	교환율 (L/min)	이동배관 ID (in)	외부부피(L)	교환 분율(%)	외부 체류 시간(초)	펌프 RPM	전단율 (1/s)	교환율:판류율 비	펌프 역전 시간(초)
ATF4	3.5	0.375	0.756	19	71	N/A	716	252	7
TFF	3.5	0.500	0.550	78	12.1	68.5	716	252	60

[0168]

[0169] 판류 생물반응기를 작동시키기 위해 사용되는 조건은 표 3에 나열되어 있다. 생물반응기를 10 mL 작업 부피를 갖는  $40 \times 10^6$  개의 세포/mL 및 CD-CHO 배양 배지로의 2 반응기 부피/일 교체에서 유지시켰다. 본원에 제공된 시험된 개방 회로 여과 시스템은 ATF4와 동일한 필터 및 하우징을 함유하였지만, 시스템(도 5에 도시됨) 및 개방 회로 시스템(ATF4에서 사용되는 닫힌 시스템에 비해)을 통해 세포 배양물을 가역적으로 흐르게 하기 위해 배양 재순환 펌프로서 50 mL 내지 100 mL의 펌프 헤드 부피를 갖는 애슬-말로 연동 펌프 620 Du를 사용하였다. ATF4 생물반응기 판류율을 배양 20일에 2 반응기 부피/일 내지 1 반응기 부피/일로 변경하였으며, 본원에 제공된 시험된 개방 회로 여과 시스템을 32일에 2 반응기 부피/일의 판류율에서 1 반응기 부피/일로 변경하였으며, 10% 효율적인 공급물 B(Gibco, Invitrogen)를 또한 공급하였다.

[0170] 결과

[0171]

본원에 제공된 시험된 개방 회로 여과 시스템은 9일 및 10일에  $40 \times 10^6$  개의 세포/mL의 생존 세포 밀도에 도달하였고, 상응하는 ATF 시스템보다 이전에  $40 \times 10^6$  개의 세포/mL의 세포 밀도에 도달하였다(도 10). 본원에 제공된 시험된 개방 회로 여과 시스템의 생존 세포의 백분율은 배양물이  $40 \times 10^6$  개의 세포/mL에 도달한 직후에 약 90%였고, 3주에 걸쳐 70%에서 안정화될 때까지 계속 감소하였다(도 11). 본원에 제공된 시험된 개방 회로 여과 시스템에서의 세포 배양물의 용량은 ATF 시스템에서 세포 배양물과 비교하여 상승하였으며(도 12), 본원에 제공된 시험된 개방 회로 여과 시스템의 세포 배양물 및 ATF 시스템의 세포 배양물로부터의 중간 생존 세포

경은 유사하다(도 13).

[0172] 본원에 제공된 개방 회로 여과 시스템에서의 세포 배양물 및 ATF 시스템의 세포 배양물의 생산성 프로필은 도 14, 도 15, 도 16 및 도 17에 도시되어 있다. 본원에 제공된 개방 회로 여과 시스템에서 세포 배양물에 의해 형성된 IgG의 농도는 ATF 시스템과 비교하여 후속 시점에 증가하였다(도 14). 본원에 제공된 개방 회로 여과 시스템에서 세포 배양물의 용적 생산성 및 비 생산성은 ATF 시스템에서 세포 배양물과 비교하여 증가하였다(각각, 도 15 및 도 16). 본원에 제공된 시험된 개방 회로 여과 시스템에서 세포 배양물의 시빙 계수(sieving coefficient)는 3주의 배양 후에 약 90%로 잔류하고, ATF 시스템에서 세포 배양물의 시빙 계수보다 크다(도 17).

[0173] 각 시험 시스템의 글루코오스 및 락테이트 생산 프로필은 도 18, 도 19, 도 20, 및 도 21에 도시되어 있다. 본원에 제공된 시험된 개방 회로 여과 시스템에서 세포 배양물의 글루코오스 비소비율 및 락테이트 비생산율은 ATF 시스템에서 세포 배양물의 글루코오스 비소비율 및 락테이트 비생산율보다 더욱 높다(각각 도 18 및 도 19). 또한, 호기성 글루코오스 비소비율 및 글루코오스로부터의 락테이트 수율은 ATF 시스템에서 세포 배양물에서의 호기성 글루코오스 비소비율 및 글루코오스로부터의 락테이트 수율보다는 본원에 제공된 시험된 개방 회로 여과 시스템에서의 세포 배양물에서 더욱 높다(각각 도 20 및 도 21).

[0174] 이러한 데이터는 본 발명의 제공된 개방 회로 여과 시스템이 다른 닫힌 회로 접선 여과 시스템(Refine Technology에 의한 ATF<sup>TM</sup> 시스템)과 비교하여 개선되거나 유사한 세포 배양물 성질, 예를 들어, 증가되거나 유사한 용량, 증가되거나 유사한 용적 및 비생산성, 증가되거나 유사한 시빙 계수, 및 증가되거나 유사한 글루코오스 비소비를 갖는 세포 배양물을 제공함을 지시하였다.

#### 0175] 실시예 2. 개방 회로 여과 시스템에서 관찰된 생존 세포 밀도

[0176] 본원에 제공된 개방 회로 여과 시스템을 사용하여 달성되는 가장 높은 생존 세포 밀도를 결정하고, 선택적으로 유사한 조건하에서 ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology)(닫힌 회로 교번 흐름 접선 여과 시스템)을 사용하여 달성되는 생존 세포 밀도와 결정된 생존 세포 밀도를 비교하기 위해 실험을 수행하였다. 이러한 실험에서 사용되는 디바이스는 일반적으로 도 5에 도시되어 있다. 상세하게, 개방 회로 여과 시스템에 사용되는 저장소는 Broadly-James 15L 생물반응기이며, 제1 도관 및 제2 도관은 0.5 인치의 내부 직경을 갖는 생체적합적이고 용접 가능한 이동 배관이며, TFF 유닛은 단일 투브형 직교류 필터(30 cm의 길이 및 1 mm의 내부 직경을 가지고 0.2 μm의 평균 기공 크기, 830개의 섬유/필터 및 0.77 m<sup>2</sup>의 여과 면적을 갖는 폴리에테르실론 섬유로 이루어짐)를 함유하며, 적어도 하나의 펌프는 16 mm의 내부 직경 및 4 mm의 벽 직경을 갖는 트윈 채널 GORE Sta-Pure 배관과 함께 50 mL 내지 100 mL의 펌프 헤드 부피를 갖는, 유체를 제1 흐름 방향 및 제2 흐름 방향으로 흐르게 할 수 있는 단일 왓슨-말로 연동 펌프이다.

#### 0177] 물질 및 방법

[0178] 본 발명에 제공된 개방 회로 여과 시스템(및 선택적으로 Refine Technology에 의한 ATF<sup>TM</sup>)을 사용하여 달성될 수 있는 가장 높은 세포 밀도를 결정하기 위한 실험 파라미터의 요약은 표 5에 기술되어 있다. 이러한 실험에서 사용되는 본 방법의 추가의 상세한 요약은 하기에 제공된다.

[0179]

[표 5] 실험 파라미터

파라미터	상세한 설명	
	TFF	ATF4
세포주	GC2008 클론 A61, HD 뱅크 “GC2008 A61 HD WAVE,” $45 \times 10^7$ 세포/바이알	
배지	글루타민을 함유한 CD CHO	
생물반응기	Broadly James 15 L 생물반응기	
작업 부피	10 L	
생물반응기 접종물	플라스크 시드 트레인을 흔들어줌	
접종 밀도	$0.5 - 1 \times 10^6$ 세포/mL	
세포 밀도	세포 밀도를 유지시키기 위해 일정한 블리드(bleed) 없이, 또는 낮은 일정한 블리드와 함께, 0.05 nL/cell-d의 CSPR을 매칭시키기 위해 관류율을 증가시키면서 세포를 계속 성장시킴.	
세포 비관류율 (CSPR)	0.05 nL/cell-d	
온도	37 °C	
교반	120 RPM	
DO	≥ 40%	
염기	1M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (소듐 카보네이트)	
소포제	Invitrogen Foam Away 3% Simethicone (30,000 PPM) 작업 모액: 3000PPM (WFI 중의 허석물)	
pCO <sub>2</sub>	<120 mmHg, >120 mmHg 인 경우 N <sub>2</sub> 로 살포	
pH	6.95 ± 0.1	
가스 첨가	살포물: 산소, CO <sub>2</sub> (필요한 경우), N <sub>2</sub> (필요한 경우) 오버레이: 100 CCPM에서 공기	
O <sub>2</sub> 살포기	20 μm 소결됨	
N <sub>2</sub> 살포기	1 mm 천공된 홀	
세포 분리 디바이스	620L 펌프헤드를 갖는 Watson-Marlow 620Du 연동 펌프로의 TFF, 16mm ID Gore sta-pure 배관 ATF4 필터 (0.2 μm)	Refine ATF4
ATF/TFF 교환율	3.5 L/min (65–70 rpm), 1 분 마다 역전	3.5 L/min, 7 초 마다 역전

[0180]

[0181]

관류 생물반응기를 구동시키기 위해 사용되는 조건은 표 5에 나열되어 있다. 세포 0.05 nL/cell-d의 세포 비관류율을 유지시키기 위해 CD-CHO 배양 배지로의 충분한 교체, 및 10-L 작업 부피를 갖는 생물반응기에서 성장시킬 수 있다. 개방 회로 여과 시스템은 ATF4와 동일한 필터 및 하우징을 함유하지만, 시스템(도 5에 도시됨) 및 (ATF4에서 사용되는 닫힌 시스템보다는) 개방 회로 시스템을 통해 세포 배양물을 가역적으로 흐르게 하기 위해 배양물 재순환 펌프로서 50 mL 내지 100 mL의 펌프 헤드 부피를 갖는 왓슨-말로 연동 펌프 620 Du를 사용한다. 세포 배양물의 생존 세포 밀도는 세포 배양물 가공 구동의 기간 동안 하루에 한번 결정된다.

[0182]

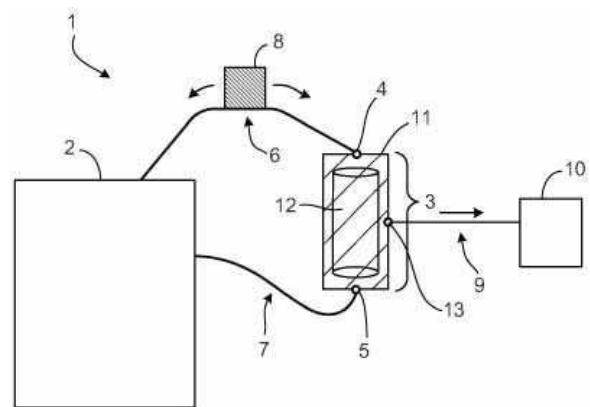
#### 다른 구현예

[0183]

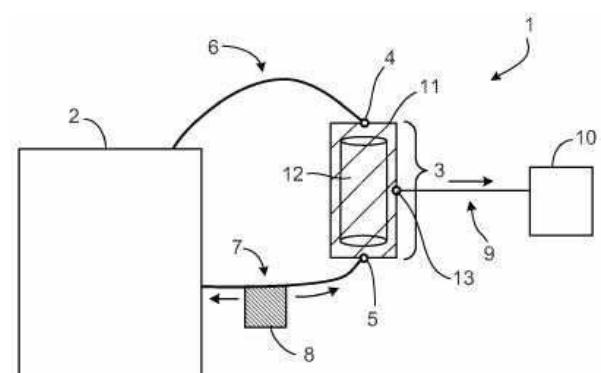
본 발명이 이의 상세한 설명과 함께 기술되었지만, 상기 설명이 예시를 위해 의도되고 본 발명의 범위를 한정하기 위해 의도되지 않으며, 본 발명의 범위는 첨부된 청구범위에 의해 규정된다. 다른 양태, 장점, 및 개질은 하기 청구범위 내에 속한다.

## 도면

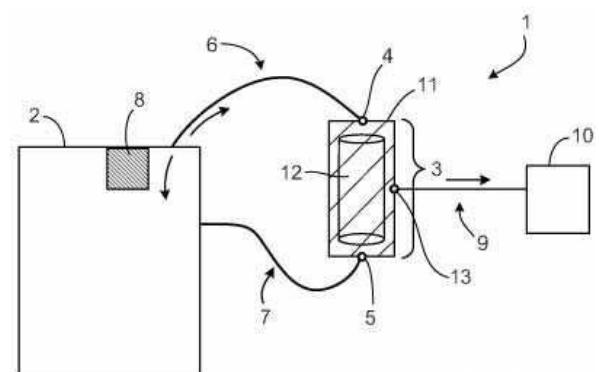
## 도면1



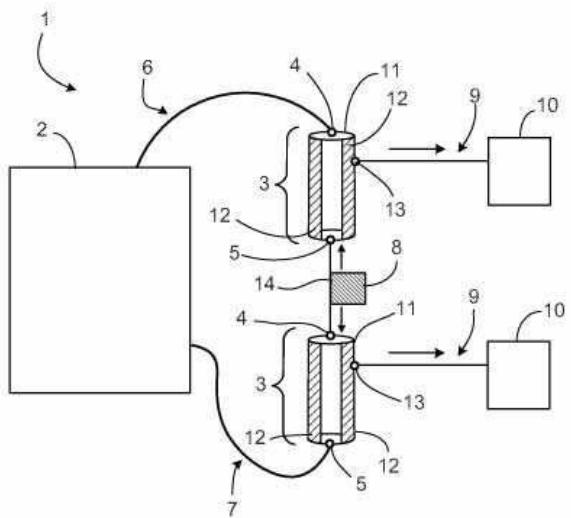
## 도면2



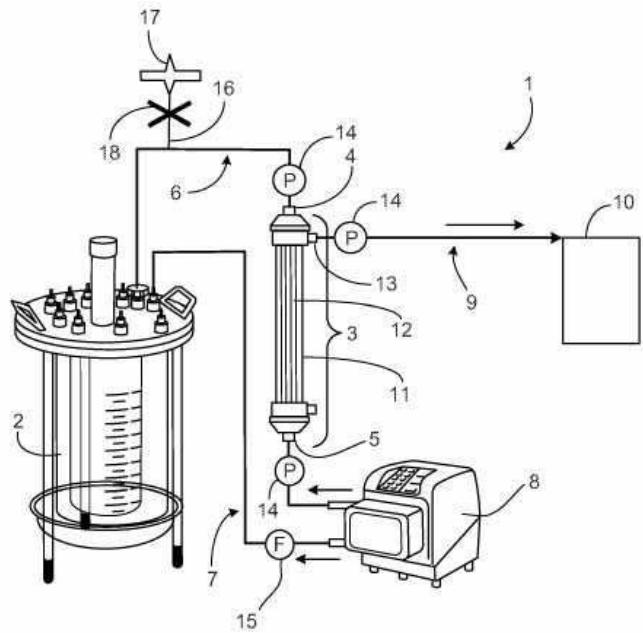
## 도면3



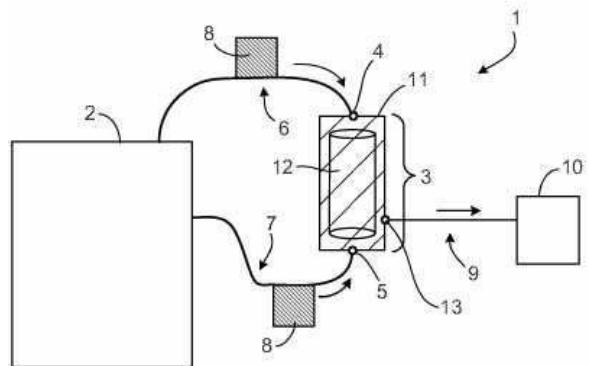
도면4



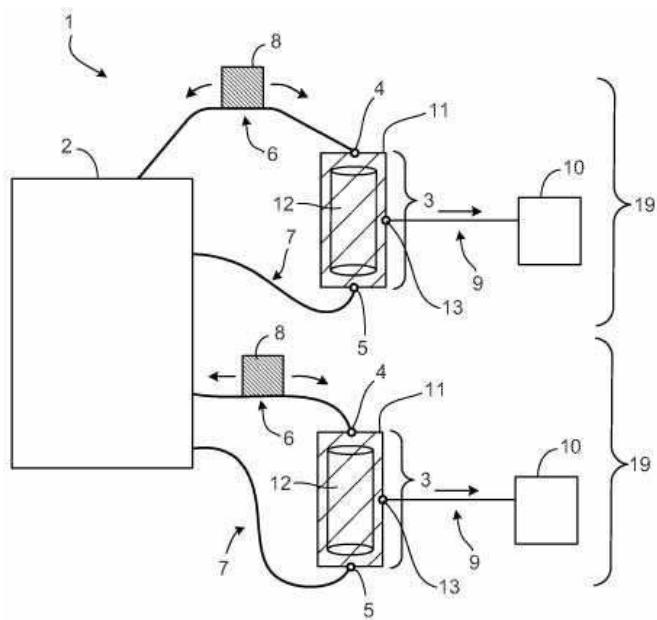
도면5



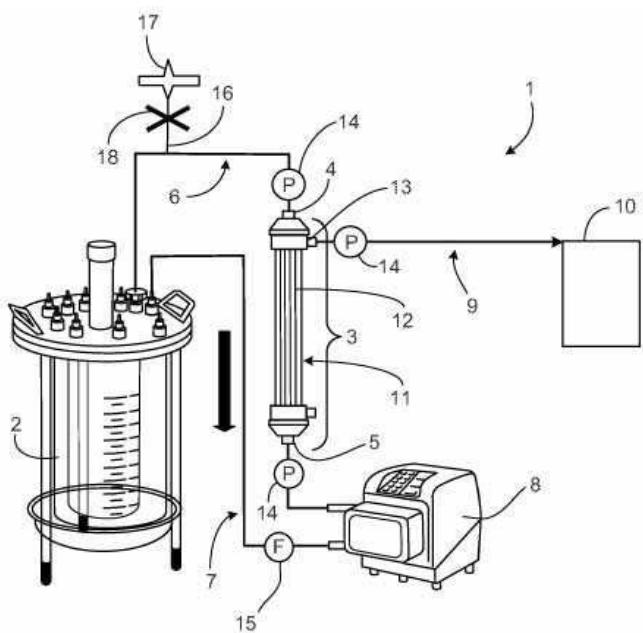
도면6



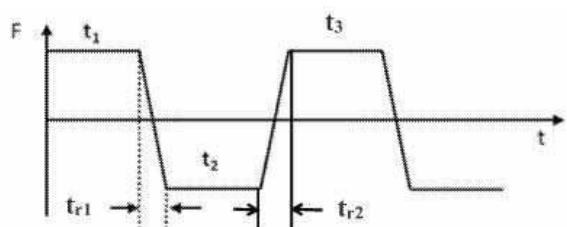
도면7



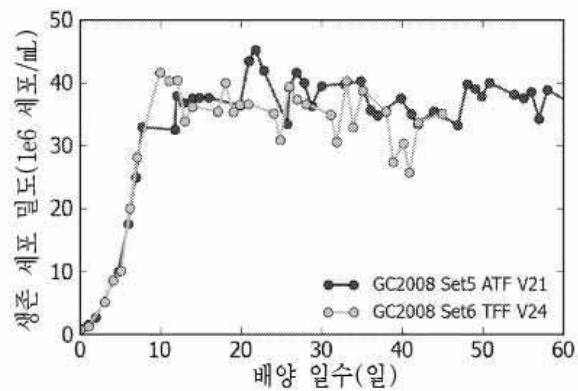
도면8



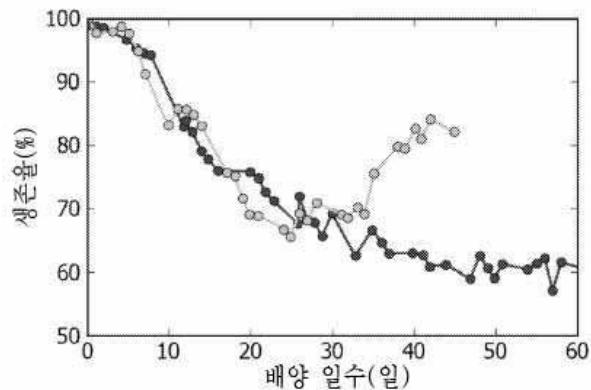
도면9



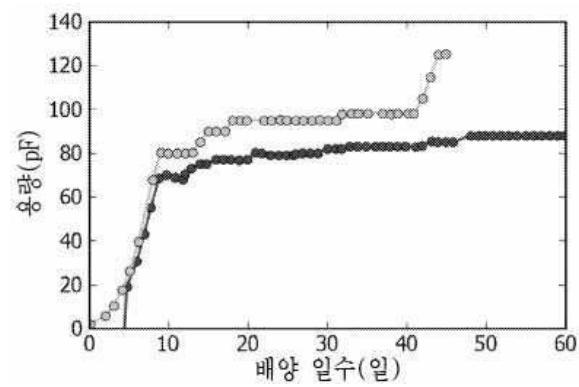
도면10



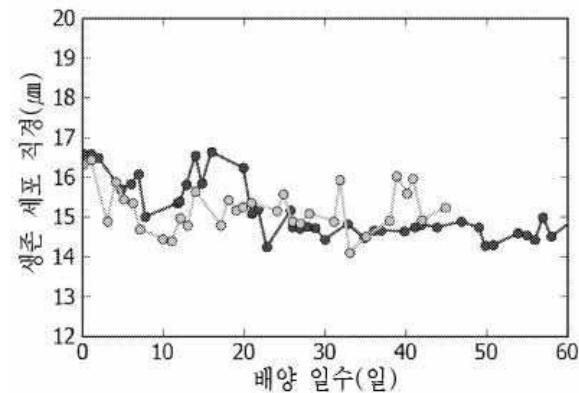
도면11



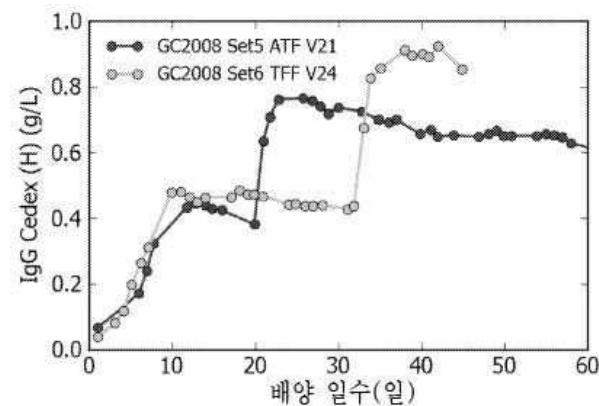
도면12



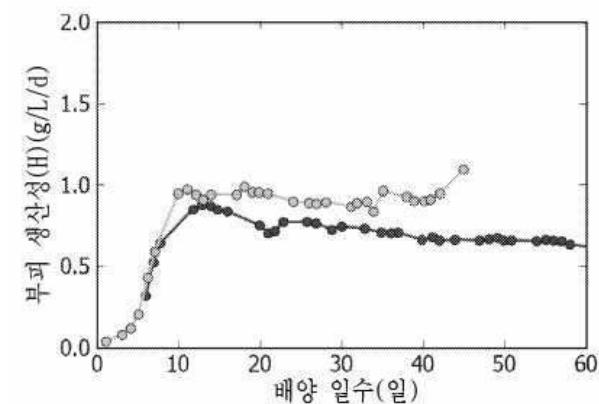
도면13



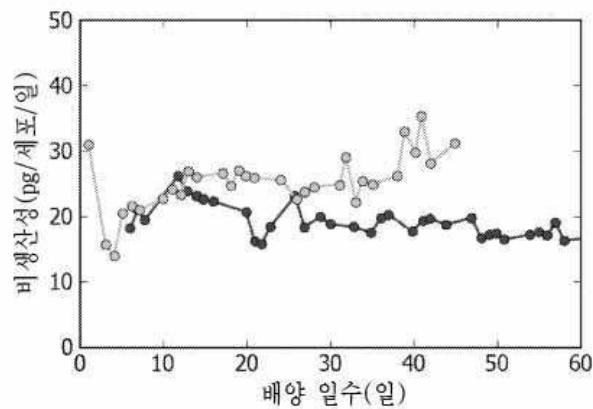
도면14



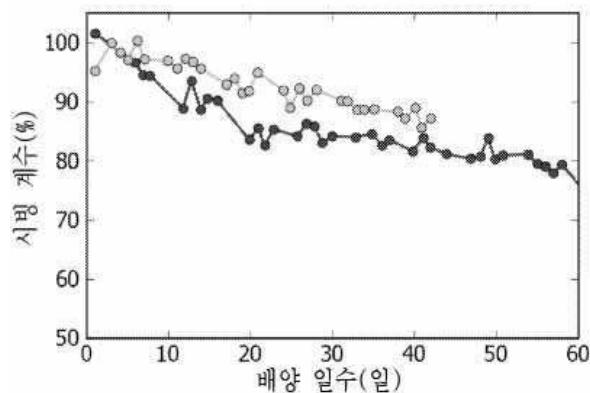
도면15



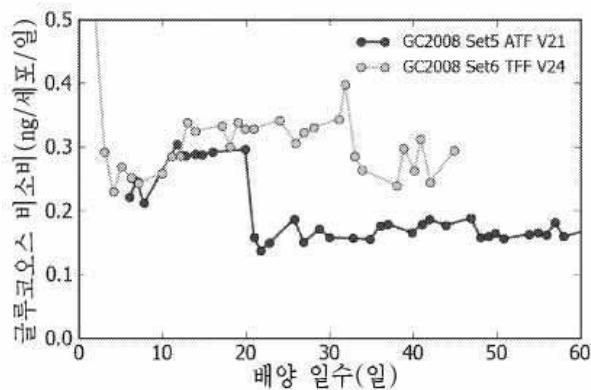
도면16



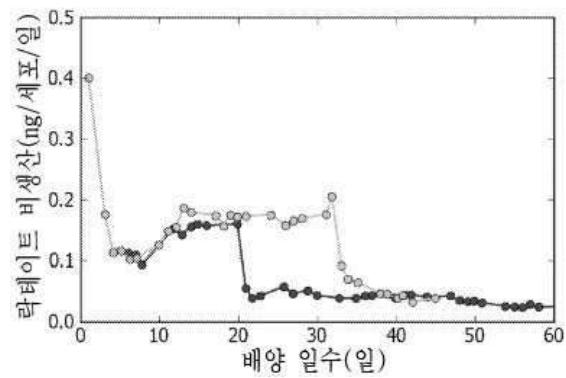
도면17



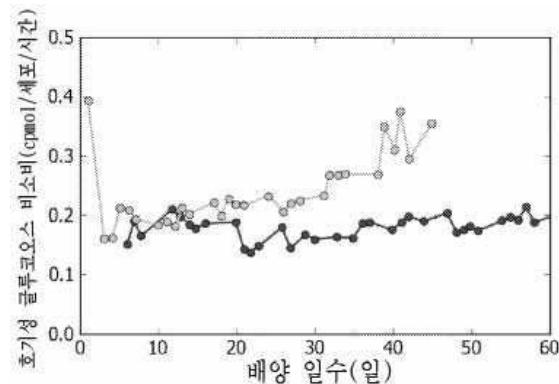
도면18



도면19



도면20



도면21

