



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년12월03일  
(11) 등록번호 10-1335936  
(24) 등록일자 2013년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12P 21/06 (2006.01) C12M 1/24 (2006.01)  
C12M 1/00 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2012-7030406(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2005년09월30일  
심사청구일자 2012년12월18일  
(85) 번역문제출일자 2012년11월20일  
(65) 공개번호 10-2013-0003025  
(43) 공개일자 2013년01월08일  
(62) 원출원 특허 10-2007-7008684  
원출원일자(국제) 2005년09월30일  
심사청구일자 2010년09월30일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/035364  
(87) 국제공개번호 WO 2006/039588  
국제공개일자 2006년04월13일  
(30) 우선권주장  
60/614,995 2004년09월30일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
US20040167320 A1\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
바이엘 헬스케어, 엘엘씨  
미국 뉴욕주 10591 테리타운 화이트 플레인즈 로드 555  
(72) 발명자  
보겔, 옌스  
미국 94804 캘리포니아 리치몬드 쇼어라인 코트 189  
지오반니니, 로베르토  
미국 94610 캘리포니아 오클랜드 버논 스트리트 655  
(74) 대리인  
(뒷면에 계속)  
특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 5 항

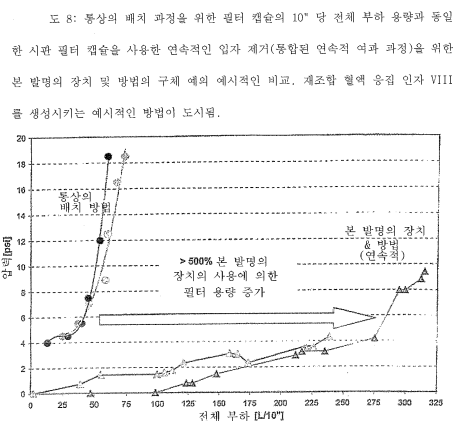
심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 생물학적 분자의 통합된 연속 제조를 위한 장치 및 방법

(57) 요약

본 발명은 이질성 정화된 유체 혼합물로부터 목적 분자를 정제하는 방법 및 장치에 관한 것이다. 본 발명의 장치는 일반적으로 연속적인 관류 발효 시스템, 관류 발효 시스템과 통합된 연속적인 입자 제거 시스템; 및 입자 제거 시스템과 통합된 연속적인 정제 시스템을 포함하며, 무균 조건하에 유지된다. 본 발명의 방법은 유속 대 TMP 곡선의 압력 의존적 영역 내의 목적 분자의 전이점 아래의 비유속에서 연속적인 한외여과에 의해서 이질성의 정화된 유체 혼합물을 여과함을 포함하며, 비유속은 연속적인 한외여과 전체에 걸쳐서 실질적으로 일정하게 유지된다.

대표도 - 도8



(72) 발명자

**콘스탄티노브, 콘스탄틴, 비.**

미국 94597 캘리포니아 월넛 크릭 폭스글로브 엘  
엔. 116

**구엔, 홍**

미국 94112 캘리포니아 샌 프란시스코 메이플 스트  
리트 751

**우, 폴**

미국 94563 캘리포니아 오린다 베이트스 블러바드  
79

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

이질성 정화된 유체 혼합물로부터 목적 분자를 정제하는 방법으로서,

유속 대 경막 압력(TMP) 곡선의 압력 의존 영역중의 목적 분자의 전이점 아래이고, 보유물 농도의 20% 미만으로 초과하는 벽 농도를 생성하는 비유속(specific flow rate)에서

연속적인 한외여과에 의해서 이질성의 정화된 유체 혼합물을 여과함을 포함하며, 비유속이 연속적인 한외여과 전체에 걸쳐서 일정하게 유지되는 방법.

### 청구항 2

삭제

### 청구항 3

제 1항에 있어서,

정화된 유체 혼합물이 비유속에서 여과되어 보유물 농도의 15% 미만으로 초과하는 벽 농도가 생성되는 방법.

### 청구항 4

제 1항에 있어서,

정화된 유체 혼합물이 비유속에서 여과되어 보유물 농도의 10% 미만으로 초과하는 벽 농도가 생성되는 방법.

### 청구항 5

제 1항에 있어서,

정화된 유체 혼합물이 정화된 유체 혼합물의 용적 유속(리터/시간(h))의 0.1 내지 2 배와 동일한 면적( $m^2$ )을 지니는 한외여과 막을 통해서 여과되는 방법.

### 청구항 6

제 5항에 있어서,

한외여과 막이 정화된 유체 혼합물의 용적 유속(리터/시간(h))의 0.3 내지 1 배와 동일한 면적( $m^2$ )을 지니는 방법.

## 명세서

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 이질성 분자 혼합물로부터 목적하는 분자를 정제하는 개선된 방법 및 시스템에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 연속적인 관류 발효 공정으로부터 조직 배양액 공급스트림의 일부를 정제하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 최근에 연속적 관류 과정(continuous perfusion process)이라 일컬어지는 몇 가지 연속적 세포 배양 과정이 상당한 상업적 성공으로 확립되었음이 본 기술분야의 전문가에게는 공지되어 있다. 그러나, 연속적인 관류 발효 후의 분리 과정은 일반적으로 배치식 과정(batch process)이며, 연속적 업스트림(upstream) 공정으로부터 물리적으로 및 논리적으로 분리된다. 이러한 과정에서, 분리 단계의 주된 목적은 대량의 비교적 묽은 배양 상등물로부터 생성물을 포획하고자 하는 것이다. 생성물의 농축은 과정 논리와 공간 요건과 관련하여 강조되어야 하며, 오염물의 동시 제거(정제)는 추가의 요구되는 다운스트림 정제 단계의 수를 최소화하는데 중요하다.

- [0003] 도 1은 연속적인 관류 발효로부터의 전형적인 종래의 분리과정에 대한 개략도이며, 이는 본 기술분야의 전문가에게는 공지되어 있다. 연속적인 관류 발효 시스템은 발효 시스템에서 생성물을 생산하는 대부분의 세포를 보유하는 세포 보유 장치(1)를 포함한다. 일부의 세포, 세포 조각 및 그 밖의 입자를 여전히 함유하는 연속적인 관류 시스템으로부터의 연속적 수거 스트림은 수거 펌프(2)에 의해서 큰 수거 용기(3), 예컨대, 스테인리스 스틸 탱크내로 펌핑된다. 이들 저장 용기는 일반적으로는 분해에 의한 생성물 손실을 가능한 범위 내로 유지시키기 위해서 냉각되어야 한다.
- [0004] 전형적으로 1 내지 4일 이상 걸리는 특정의 양이 수거되면, 수거 용기는 무균의 발효 용기로부터 분리되고 수거된 물질은 하나의 수거 배치로서 지정된다. 다음 단계는 세포, 세포조각 및 입자를 제거하는 것이다(단계 2). 산업적 규모에서, 이러한 단계는 원심분리(4)에 이어지는 전량 막 여과(dead-end membrane filtration: 5), 또는 전량 침층 여과(dead-end depth-filtration: 6)에 이어지는 전량 막 여과(7)에 의해서 전형적으로 이루어진다. 때때로 사용되는 또 다른 기술은 접선흐름(tangential flow)(또는 "크로스플로우(crossflow)") 정밀여과이다. 어떠한 경우에, 입자 제거 과정의 생성물은 정화된 조직 배양액, 또는 cTCF(8)의 배치(batch)이다. 생물공학적 생성물에 대한 입자 분리에 대한 보다 상세한 사항은 표준 교재, 예컨대, 문헌[Biotechnology, Vol. 3, Bioprocessing, Wiley-VCH, 2 edition (1996), ISBN: 3527283137]을 참조할 수 있다.
- [0005] 다음 단계(단계 3)에서, 정제된 조직 배양액의 배치는 생성물이 농축 및 가능하게는 정제되도록 추가로 처리된다. 이러한 처리는 전형적으로는 크로스플로우 한외여과(ultrafiltration) 또는 충전층 크로마토그래피에 의해서 수행된다.
- [0006] 크로스플로우 한외여과의 경우에, cTCF는 시스템의 재순환 탱크(9)로 펌핑된다. 펌프는 크로스플로우 한외여과 필터를 통해서 물질을 압박하는데 사용(10)된다. 생성물은 막에 의해서 보유되고 보유물로서 재순환 탱크 내로 재순환되고, 물 및 작은 오염물은 한외여과 모듈내의 압력 강하에 의해서 생성되는 경막압으로 인해서 막을 통해 투과물(11) 내로 가압된다. 필터를 통한 각각의 통과에서, cTCF는 더 농축되고, 요구된 농축 인자가 달성될 때까지 전체 cTCF 용적이 감소된다. 요구된 농축 인자가 달성되면, 과정은 정지되고, 잔류 농축물(분리물)이 시스템으로부터 배출되어 수거된다. 생물공학적 생성물의 농축을 위한 크로스플로우 한외여과에 대한 보다 상세한 사항은 표준 교재, 예컨대, 문헌[Biotechnology, Vol. 3, Bioprocessing, Wiley-VCH, 2 edition(1996), ISBN: 3527283137]을 참조할 수 있다.
- [0007] 충전층 크로마토그래피의 경우에, cTCF는 충전된 수지층을 함유하는 크로마토그래피 컬럼(12)상에 펌핑된다. 생성물은 수지에 결합하고, 이어서 적합한 용리 완충액(14)를 사용함으로써 일반적으로 농축되고 정제된 형태(분리물, 13)로 용리되며, 그 후에 컬럼이 충분한 완충액 및 세정 용액(14)을 사용함으로써 세정되고 재생된다.
- [0008] cTCF의 농축/정제를 위해서 제안되는 그 밖의 크로마토그래피는 유동상 크로마토그래피와 막 크로마토그래피이다. 유동상 크로마토그래피는 입자 함유 용액을 처리할 수 있다. 그러나, 여과 면적이 감소되기는 하지만, 크로마토그래피 후의 분리물의 여과가 여전히 요구된다. 막 크로마토그래피는 충전된 수지층 대신 변경된 정밀여과(microfiltration) 막의 적층체를 이용한다. 이점은 질량 전달이 대부분 확산 보다는 대류에 의하며 그러한 전달은 더 신속한 분리를 가능하게 한다는 것이다. 달리, 과정은 전형적으로는 표준 충전층 크로마토그래피와 동일하다. 생물공학적 생성물의 농축 및 정제를 위한 크로마토그래피에 대한 보다 상세한 사항은 표준 교재, 예컨대, 문헌[Protein Purification, Principles, High-Resolution Methods, and Applications, Wiley-VCH, 2. Edition (1998), ISBN 0-471-18626-0]을 참조할 수 있다.
- [0009] 종종, 벌크 분리물은 추가의 다운스트림 정제 단계에서의 이후 사용을 위해서 동결되고 저장된다.
- [0010] 따라서, 상기된 바와 같이, 분리 과정은 일반적으로 배치식 과정이며, 연속적인 업스트림 과정으로부터 물리적으로 및 논리적으로 분리된다. 또한, 발효는 무균하에 수행되어야 하고, 분리(즉, 입자 제거 및 농축/정제)는 기본적으로는 무균은 아니지만 깨끗하게 수행된다.
- [0011] 상기된 바와 같은 종래기술의 과정은 많은 문제를 지니고 있다:
- [0012] 문제 1. 높은 생성물 채류 시간으로 인한 수율 감소 및 가능한 질의 저하. 연속적인 관류 발효로부터의 수거물은 분리 배치가 처리될 수 있기 전에 상기 개괄된 바와 같이 상당한 기간 동안 수거되고 저장되어야 한다. 수거된 수거물은 냉각되기는 하지만 복잡하고 본래 불안정한 단백질 생성물에 여전히 유해한 환경을 제공한다. 따라서, 상당한 생성물이 손실되며, 이는 플랜트 용량을 감소시키고 제품의 비용을 상승시킨다. 게다가, 생성물의 품질은 역으로 영향을 받을 수 있다.

- [0013] 문제 2. 다량의 수거물의 중간저장을 위한 대규모 냉장실 또는 냉각된 용기가 요구되어 많은 자본을 요하고 관류 발효기의 언급된 컴팩트성 및 이동성 이점이 저감된다.
- [0014] 문제 3. 통상의 농축/정제 기술(예, 한외여과, 증진층 크로마토그래피)은 비교적 저용적 출력, 상당한 총 처리 시간 및 비교적 노동 집약적이다. 그 결과, 전형적으로 하루에 1 배치 과정 이하로 수행된다.
- [0015] 문제 4. 게다가, 종래의 분리 과정 및 방법은 하나 이상의 발효기와 관련된 발효 플랜트에서 다양한 과정 용적을 처리하는데 논리적인 어려움이 있다. 대규모 연속 관류 플랜트에서, 가변적인 수의 발효기가 작동된다.
- [0016] 문제 5. 또한, 종래기술의 분리 과정은 깨끗하게 작동되기는 하지만, 무균적으로는 작동될 수 없다. 이러한 상황은 종종 미생물 오염 문제에 기인한 상당한 수의 배치가 거부된다.
- [0017] 문제 6. (예를 들어, 세정 및 세정 확인 및 그 밖의 문제를 피하기 위해서) 사람 비경구영양 생산에서 아주 바람직하기는 하지만, 일회용품, 예를 들어, 일회용 필터, 어셈블리, 백(bag) 등의 사용은 비용이 아주 많이 들며, 사실 종종 경제성이 없다.
- [0018] 따라서, 본 발명의 목적은 무균의 상태하에 장시간 동안 작동할 수 있는 통합된 연속적인 단백질 분리 방법을 제공하는 것이다.

### 발명의 내용

- [0019] 발명의 요약
- [0020] 본 발명은 이질성 유체 혼합물로부터 분자를 정제하는 신규한 장치 및 방법에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 미립자 오염물이 제거되는 이질성의 정화된 유체 혼합물로부터 목적 분자를 정제하는 방법에 관한 것이다. 그러한 방법은 이질성의 정화된 유체 혼합물을 유속 대 TMP 곡선의 압력 의존 영역에서 목적 생성물의 전이점(transition point) 아래에서 비유속(specific flow rate)으로 연속적으로 한외여과함으로써 여과하는 단계를 포함하며, 여기서, 비유속은 연속적인 한외여과 전체에 걸쳐서 실질적으로 일정하게 유지된다.
- [0021] 특정의 구체 예에서, 본 발명의 방법은 정화된 유체 혼합물의 리터/시간의 용적 유속의 0.1 내지 2배와 거의 동일한 평방 미터의 면적을 지나는 한외여과 막을 통해서 정화된 유체 혼합물을 여과함을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 본 발명의 과정은 정화된 유체 혼합물의 리터/시간의 용적 유속의 0.3 내지 1배와 거의 동일한 평방 미터의 면적을 지나는 한외여과 막을 통해서 정화된 유체 혼합물을 여과함을 포함한다.
- [0022] 본 발명의 방법은 유리하게는 감지 가능한 농도 극성화 없이 보유물 농도보다 약 20% 미만, 15% 미만 또는 10% 미만으로 더 높은 웰(wall) 농도를 생성시키는 비유속(specific flow rate)으로 정화된 혼합물을 여과하는 것을 가능하게 한다.
- [0023] 더욱 특정의 구체 예에서, 본 발명은 연속적인 관류 발효, 미립자 제거 및 정제/농축을 위한 통합된 연속 및 무균 방법에 관한 것이다. 본 발명의 한 관점에서, 본 발명의 방법은 유속 대 TMP 곡선의 압력 의존 영역에서 단백질 전이점 아래의 작동 설정 점에서 혼합물로부터 목적 단백질을 선택적으로 분리하여 무균의 무-입자 농축 및 부분 정제된 분리 생성물을 생성시키는 분리 방법에 의해서 조직 배양 혼합물을 여과함을 포함하며, 분리과정을 통한 비유속은 단백질의 전이점 보다 낮은 수준으로 실질적으로 일정하게 유지된다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 관점에서, 본 발명의 방법은 이질성 조직 배양액 혼합물로부터 목적 단백질을 정제하는 연속적인 방법으로서,
- [0025] (a) 목적 단백질을 함유하는 이질성 조직 배양액 혼합물을 연속적인 관류 발효 과정으로 생성시키고,
- [0026] (b) 연속적인 관류 발효 과정과 통합된 연속적인 입자 제거 과정에 조직 배양액 혼합물을 전달하고,
- [0027] (c) 연속적인 입자 제거 과정 중의 조직 배양액으로부터 미립자 오염물을 제거하여 목적 단백질을 함유하는 정화된 조직 배양액을 생성시키고,
- [0028] (d) 연속적인 입자 제거 과정과 통합된 연속적인 정제 과정으로 정화된 조직 배양액을 전달하고,
- [0029] (e) 연속적인 정제 과정중의 정화된 조직 배양액으로부터 목적 단백질을 정제함을 포함하며,
- [0030] 연속적인 관류 발효 과정, 연속적인 입자 제거 과정 및 연속적인 정제 과정을 통한 혼합물의 비유속이 실질적으로 일정하게 유지되는 방법이다.

- [0031] 본 발명의 또 다른 관점에서, 본 발명의 방법은 이질성 조직 배양액 혼합물로부터 목적 단백질을 정제하는 반-연속적 방법으로서,
- [0032] (a) 목적 단백질을 함유하는 이질성 조직 배양액 혼합물을 연속적 관류 발효 과정에 의해서 생성시키고,
- [0033] (b) 연속적 관류 발효 시스템과 통합된 연속적 입자 제거 과정에 조직 배양액 혼합물을 전달하고,
- [0034] (c) 연속적 입자 제거 과정 중의 조직 배양액으로부터 미립자 오염물을 제거하여 목적 단백질을 함유하는 정화된 조직 배양액을 생성시키고,
- [0035] (d) 연속적 입자 제거 과정과 통합된 보조 용기(surge vessel)에 정화된 조직 배양액을 전달하고,
- [0036] (e) 보조 용기와 통합된 정제 과정에 정화된 조직 배양액을 간헐적으로 전달하고,
- [0037] (f) 정제 시스템중의 정화된 조직 배양액으로부터 목적 단백질을 정제하여 목적 단백질을 함유하는 무균의 무입자 농축 및 부분 정제된 분리 생성물을 생성시킴을 포함하며,
- [0038] 연속적 관류 발효 과정 및 연속적 입자 제거 과정을 통한 혼합물의 비유속이 실질적으로 일정하게 유지되는 방법이다.
- [0039] 본 발명은 또한 이질성 조직 배양액 혼합물로부터 목적 단백질을 분리하는 장치에 관한 것이다. 본 발명의 한 관점에서, 본 발명의 장치는 (a) 연속적 관류 발효 시스템; (b) 관류 발효 시스템과 통합된 연속적 입자 제거 시스템; 및 (c) 입자 제거 시스템과 통합된 연속적 정제 시스템을 포함하며, 이러한 장치는 무균 조건이 유지되도록 조정된다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 관점에서, 본 발명의 장치는 (a) 연속적 관류 발효 시스템; (b) 관류 발효 시스템과 통합된 연속적 입자 제거 시스템; 및 (c) 입자 제거 시스템과 통합된 간헐적인 정제 시스템을 포함하며, 이러한 장치는 무균 조건이 유지되도록 조정된다.
- [0041] 정제 시스템은, 예를 들어, 한외여과 시스템 또는 대류 흡착/탈착 시스템, 또는 본원에 기재된 바와 같이 통합된 연속적 또는 반-연속적 무균 시스템에서 이질성 혼합물로부터 목적 단백질을 정제 또는 부분적으로 정제할 수 있는 어떠한 그 밖의 시스템일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 방법 및 장치는 이질성 유체 혼합물, 예컨대, 세포 배양액을 실질적으로 일정한 유속으로 연속적으로 처리하도록 조정된다. 본 발명의 특징의 관점에서, 본 발명의 방법 및 장치는 연속적인 기간 동안 및 정제 과정 전체에 걸쳐서 유속 대 TMP 곡선의 압력 의존 영역 중의 단백질 전이점 아래에서 실질적으로 일정한 유속으로 이질성 세포 또는 조직 배양액 혼합물을 연속적으로 처리하도록 조정된다.
- [0043] 본 발명의 이들 관점 및 그 밖의 관점이 하기 본 발명의 상세한 설명에서 이하 상세히 설명되고 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0044] 명세서에 통합되고 있으며 명세서의 일부를 구성하는 첨부된 도면은 본 발명의 구체 예를 예시하고 있으며, 구체 예의 상세한 설명과 함께 본 발명의 원리 및 그 이점을 설명하고 있다.
- 도 1: 통상적인 연속적 관류 과정과 그에 이어지는 3회의 물리적 및 논리적 분리 과정 단계(배치 수거물 수거, 배치 입자 제거 및 배치 농축/정제)에 대한 개략도.
- 도 2: 연속적 통합된 및 무균 제조를 위한 본 발명의 장치 A의 2 가지 구체예의 개략도. 좌측에 도시된 구체 예 A1의 개략도 및 우측에 도시된 구체 예 A2의 개략도.
- 도 3: 연속적 통합된 및 무균 제조를 위한 본 발명의 장치 B의 2 가지 구체예의 개략도. 좌측에 도시된 구체 예 B1의 개략도 및 우측에 도시된 구체 예 B2의 개략도.
- 도 4: 본 발명의 통합된 연속적 입자 제거 시스템(100)의 구체 예, 즉, 본 발명의 장치 A 및 발명의 장치 B의 엘리먼트(element)의 개략도.
- 도 5: 다수의 구성요소를 조합하여 전체 플랜트의 용량(A3) 또는 농축 및 분리 성능(A4)을 향상시키는 본 발명의 장치 A의 추가적인 구체 예의 개략도.



도 6: 본 발명의 장치 B의 추가의 구체 예의 개략도.

도 7: 장치 A 및 장치 B의 엘리먼트를 직렬로 조합하여 전체 농축 및 분리 성능을 향상시키는 본 발명의 장치의 추가의 구체 예.

도 8: 통상의 배치 과정을 위한 필터 캡슐의 10" 당 전체 부하 용량과 동일한 시판 필터 캡슐을 사용한 연속적인 입자 제거(통합된 연속적 여과 과정)을 위한 본 발명의 장치 및 방법의 구체 예의 예시적인 비교. 재조합 혈액 응집 인자 VIII를 생성시키는 예시적인 방법이 도시됨.

도 9: 압력-유속 곡선(경막 압력하 LMH=리터/시간(h)/m<sup>2</sup>의 비투과유속) 및 작동점의 측정에 대한 예. 원은 통상의 배치 과정에 대한 TMP를 통해서 조정될 수 있는 전형적인 작동점을 나타낸다. 사각형은 본 발명의 장치 A를 사용하는 방법에 관한 투과 펌프를 통해서 조정될 수 있는 바람직한 작동점을 나타낸다.

도 10: 본 발명의 장치 A를 사용하는 방법에 관한 통합된 연속 UF 시스템(300)의 체류시간 분포 및 평균 체류시간의 예. 290cm<sup>2</sup> 모듈(62.5cm 길이), 120LMH 크로스플로우(crossflow), 0.2LMH 보유물 흐름, 2 LMH 투과물 흐름이 있는 일회용의 연속 시스템에 대해서 측정됨.

도 11: 본 발명의 장치 A의 구체 예를 사용한 플라스마-단백질 없는 연속적인 관류 발효로부터의 rFVIII의 분리 예. 1의 표준 편차를 포함한 배치 분리의 평균 수율에 비한 본 발명의 연속적 방법의 평균 분리 수율의 비교. 3개의 연속적인 배치를 배치 수율을 결정하기 위해서 사용하였으며, 3 개의 연속점(일)을 연속적 과정을 위해서 이용하였다.

도 12: 본 발명의 장치 A의 성능에 대한 예. 3개의 상이한 예에 대한 연속적인 과정 시간의 함수로서 나타낸 통합된 한외여과 시스템(300)의 경막 압력 및 비유속(specific flux). 삼각형=100kD 막, 재조합 혈액 응집 인자 VIII(rFVIII); 사각=10kD 막, 재조합 인트루킨-2; 원=50kD 막, 유전조작된 당단백질(Mr>100kD). 나타낸 모든 예는 혈장 단백질 없는 연속적 관류 발효로부터의 예이다.

도 13: 세포주 공동-발현 2 단백질 생성물(그린 형광 단백질 GFP 및 IL-2SA)의 연속적 관류 발효에 직접 결합된 본 발명의 장치 A의 장시간 성능의 예. 연속적 과정 시간의 함수로서 나타낸 본 발명의 연속적 한외여과 시스템(300)의 경막 압력 및 비유속(specific flux). 10kD 막이 사용되었다.

도 14: 세포주 공동-발현 2 단백질 생성물(그린 형광 단백질 GFP 및 IL-2SA)의 연속적 관류 발효에 직접 결합된 본 발명의 장치 A의 장시간 성능의 예. 10kD 막을 사용하였다. 특정의 검정에 의해서 측정된 단백질 생성물들 모두의 농도 인자, 및 연속적 과정 시간의 함수로 나타낸 용적 농축 인자.

도 15: 본 발명의 장치 B의 성능 예. 대류 흡착제를 사용한 100회에 가까운 연속적 흡착/탈착 사이클에 걸친 수율 및 압력 강하(표적 단백질: 유전 조작된 혈액 응집 인자 FVIII 변이체; 대류 흡착제: 시판중의 흡착제, 무스탕 Q(Mustang Q, Pall Corporation)).

도 16: 본 발명의 장치 B의 성능 예. 대류 흡착제를 사용한 전형적인 흡착/탈착 사이클 동안 UV 및 전도성 프로필(표적 단백질: 유전 조작된 혈액 응집 인자 FVIII 변이체; 대류 흡착제: 시판중의 흡착제, 무스탕 Q(Mustang Q, Pall Corporation)).

도 17: 본 발명의 장치 B의 성능 예. 부하=입자 제거 시스템(100)에서 연속적으로 수거되며 대류 흡착제 시스템(400) 내로 반-연속적으로 부하되는 정화된 수거물의 SDS-파아지 겔(은(silver) 염색됨) 및 전형적인 흡착/탈착 용리물. (표적 단백질: 유전 조작된 혈액 응집 인자 FVIII 변이체; 대류 흡착제: 시판중의 흡착제, 무스탕 Q(Mustang Q, Pall Corporation)). 용리물은 겔상에서 작동전에 부하 농도로 다시 희석되었다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### 정의

본원에서 명시적으로 정의한 바를 제외하고는, 본원에서 사용된 용어는 본 기술분야내에서의 표준이다. 특정의 용어에 대한 하기 정의는 특허청구범위의 의미의 명확성과 정의를 확실히 하기 위해서 제공되고 있다.

단위, 두문자, 및 기호는 이들의 SI 허용 형태로 정의될 수 있다. 본원에서 인용된 수치 범위는 범위를 한정하는 수치를 포함하며 정의된 범위내의 각각의 정수를 포함 및 지지한다. 달리 명시되지 않는 한, 일반적인 단수로의 표시는 "하나 이상"을 의미하는 것이다. 본원에 사용된 소재명은 단지 구성을 위한 것이며, 목적물을 제

한하고자 하는 것이 아니다. 이로 한정되는 것은 아니지만, 특허, 특허원, 문헌, 교재 및 논문을 포함하여 본원에 인용된 모든 서류, 또는 서류의 일부는 특정의 목적을 위해서 이들 전체를 참조로 명시적으로 인용하고 있는 것이다.

- [0048] 용어 "정화" 및 "정화된"은 잔류 용액이 0.2 $\mu$ m 막을 통해 통과하도록 용액으로부터의 미립자를 제거함을 의미한다.
- [0049] 용어 "연속적인 관류 발효"는 중단없이 작동되며 세포 또는 미생물이 바이오리액터(bioreactor)로부터의 세포 현탁액 제거에 의해서 균형되는 신선한 배지의 연속적인 첨가에 의해서 지수 성장기에서 배지에 유지되는 지속된 상태의 발효 시스템 또는 방법을 나타낸다.
- [0050] 용어 "재배", "배양", "성장", "유지", "지지", 및 "팽창"은 세포를 생존시키고 후대 개체를 생산할 수 있음을 의미하는 동의어이다.
- [0051] 동사형태로 용어 "농축"은 잔류 용액의 용적 당 목적 분자의 양이 증가하도록 용액으로부터 물을 제거함을 의미한다.
- [0052] 용어 "농도 극성화"는 인자: 경막압, 크로스플로우 속도, 샘플 점도, 및 용리액 농도의 조합에 의해서 야기된 막의 표면상의 유지된 분자(겔 층)의 축적을 의미한다.
- [0053] 용어 "연속적"은 장시간 동안의 시간, 시퀀스 및/또는 작동의 비중단을 의미한다. 본 발명의 발효, 정화 및 여과 과정을 참조로 사용된 "연속적"은 목적 단백질을 함유하는 무균의 무입자(particle-free)의 농축 및 부분적 정제된 분리 생성물을 생성시키기에 충분한 장시간 동안 중단 없이 작동되도록 과정이 물리적으로 논리적으로 통합됨을 의미한다. 본 발명의 과정들을 참조로 사용된 용어 연속적은 과정이 배치식 방법으로 또는 실질적으로 연속적인 방법으로 수행되지 않음을 의미하는 것으로 또한 이해된다. 본 발명의 과정은 과정의 작동 또는 시퀀스를 중단함이 없이 1일 내지 수 개월의 범위로 장시간 동안 연속적으로 작동할 수 있다. 본 발명에서 이용된 바와 같이, 과정은 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일, 또는 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8주 이상, 또는 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의 개월보다 더 긴 연속적인 기간 동안 작동된다.
- [0054] 용어 "반-연속적" 및 "간헐적"은 통합된 시스템의 하나 이상의 과정 또는 엘리먼트가 불연속적 또는 배치식 방법으로 작동하며, 통합된 시스템의 그 밖의 과정 또는 엘리먼트는 연속적 방법으로 작동함을 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 일부 구체 예에서, 정제 과정은 대류 흡착/탈착 과정이며, 이는 전형적으로 흡착 기질의 이질성 혼합물의 흡착을 필요하여서, 결국 기질의 포화를 유발시키고, 흡착과정의 종결 및 결합된 분획의 탈착 또는 방출을 필요로 한다. 그러한 과정은 본래 간헐적이지만, 연속적인 업스트림 과정과 통합될 수 있기는 하다.
- [0055] 용어 "대류 흡착/탈착"은 일차적으로 대류에 의해서 질량 전달이 발생하는 크로마토그래피 과정을 의미한다. 대류 흡착/탈착은 목적 분자를 함유하는 혼합물의 분획이 기질에의 한 분획의 흡착 및 이에 이어지는 기질로부터의 그 분획의 탈착에 의해서 혼합물의 다른 분획으로부터 분리되는 과정이다.
- [0056] 용어 "크로스플로우" 또는 "유체 크로스플로우"는 막 표면의 상부를 가로지른 유체의 흐름을 의미한다.
- [0057] 다중 시스템 및/또는 과정에서 사용된 용어 "통합된"은 시스템 및/또는 과정이 연속적으로 작동될 수 있는 통합형 시스템을 구성하도록 물리적으로 및 논리적으로 연결됨을 의미한다. 목적하는 무입자(particle-free)의 농축 및 부분 정제된 단백질을 생성시키는 통합된 연속 또는 반-연속 시스템에 관한 본 발명의 시스템의 구성에서, 통합된 시스템은 상이한 부품을 직접 연결시키고 시스템의 상이한 부품 사이의 무균의 상태를 유지시키기에 충분한 방법으로 연결시킬 것이다.
- [0058] 용어 "배지들"(복수) 및 "배지"(단수)는 동의어이며, 본원에서 서로 대체가능하게 사용되며, 한 형태의 사용은 다른 형태의 사용을 배제시키고자 하는 것이 아니다.
- [0059] 용어 "혼합물"은 목적 분자, 예컨대, 단백질, 및 다양한 오염물을 함유하는 분자 및 화합물의 이질성 조합을 의미한다. 본 발명의 바람직한 혼합물은 일차적으로 연속적인 관류 발효과정으로부터 얻어지는 목적하는 외래 단백질을 포함하는 단백질의 이질성 혼합물로 구성된 조직 배양액이다.
- [0060] 용어 "겔 층"은 막의 상부 상에 형성될 수 있는 미시적으로 얇은 분자층을 의미한다. 막의 표면이 막힘으로써 분자의 보유에 영향을 받을 수 있으며, 그 결과, 여액 흐름을 감소시키거나, 일정한 흐름 작동에서 TMP를 증가시킬 수 있다.
- [0061] 용어 "목적 분자"는 유체(예, 액체)중의 용액 또는 현탁액으로부터 분리되어야 하는 입자 또는 그 밖의 분자 중



을 의미한다. 목적 입자 또는 분자는 유체로부터 분리되며, 대부분의 경우에, 유체 중의 다른 입자 또는 분자로부터 분리된다. 분리되어야 하는 목적 분자의 크기는 사용되는 막의 기공 크기를 결정할 것이다. 바람직한 체계는, 목적 분자는 생물학적 또는 생화학적 기원의 분자이거나 형질전환에 의하거나 시험관 내 과정에서 생성된 분자이며, 단백질, 펩티드, 폴리펩티드, 항체 또는 항체 단편을 포함한다. 바람직한 공급 스트림 기원물의 예는 포유동물 세포배양물 및 미생물 세포 배양물, 예컨대, 박테리아, 균류, 및 효모를 포함한다. 여과되는 종은, 글리코실화되거나 그렇지 않은, 바람직하지 않은 폴리펩티드, 단백질, 세포 성분, DNA, 콜로이드, 미코플라즈마, 내독소, 바이러스, 탄수화물, 및 그 밖의 생물학적 분자를 포함한다.

- [0062] 용어 "투과물"은 여액과 동의어로 사용된다.
- [0063] 용어 "분리 생성물"은 목적 단백질을 함유하는 무입자(particle-free)의 농축 및 부분 정제된 생성물을 의미한다. 분리 생성물은 한외여과 또는 대류 흡착/탈착 과정에 의해서 달성된 물질에 견줄만한 정제 및 농축도를 달성하는 생성물이다. 분리 생성물은 반드시 균질성일 필요는 없으나, 발효 과정에 의해서 생성된 초기 벌크 생성물에 비해서 실질적으로 정제될 것이다.
- [0064] 용어 "비유속(specific flow rate)"은 여액에 관한 경우 용어 "여액 유속"과 서로 대체 가능하게 사용된다. 비 보유물유속(specific retentate flow rate)은 사용된 막 면적에 대해서 표정된 보유물의 흐름 속도이다.
- [0065] 유속을 참조로 사용되는 용어 "실질적으로 일정한"은 유속이 여과 과정 동안의 실질적인 기간 동안 일반적으로 일정한 수준으로 유지됨을 의미한다.
- [0066] \*용어 "조직 배양액"는 조직 배양 배지로부터 유도된 성분의 이질성 혼합물을 의미한다. 본 발명의 바람직한 관점에서, 조직 배양액은 연속적인 관류 발효 과정으로부터 유도된다. "정화된" 조직 배양액은 세포 조각과 그 밖의 큰 거대분자가 제거되도록 예비 여과되는 조직 배양액이다.
- [0067] 용어 "경막 압력(transmembrane pressure)" 및 이의 두문자어 "TMP"는 막의 공급측으로부터 여액측으로 가압되는 평균 압력을 의미한다. TMP는  $TMP[bar] = (PF + PR) / 2 - P_f$ 에 의해서 계산되며, 여기서, PF는 공급 압력이며, PR은 보유물 압력이고,  $P_f$ 는 여액 압력이다.
- [0068] 용어 "회수"는 과정 후에 회수될 수 있는 목적 분자의 양을 의미한다. 일반적으로 출발물질에 대한 백분율 또는 수율로서 표현된다.
- [0069] 용어 "보유물"은 농축물로도 공지된 막을 통과하지 못하는 샘플 부분을 의미한다.
- [0070] 용어 "한외여과"는 크기 또는 분자량 차이를 근거로 하여 유체 또는 이온을 우선적으로 분리하는 미세기공 막 또는 반투막을 이용하는 여과의 형태를 의미한다. 한외여과는 전형적으로는 약 10,000 달톤 이상의 분자량을 지니는 분자를 여과해내는데 사용된다.
- [0071] 본 발명은 연속적인 관류 발효, 미립자 제거 및 정제/농축을 포함하는 통합된 연속의 무균 방법에 관한 것이다. 본 발명의 한 관점에서, 방법은 유속 대 TMP 곡선의 압력-의존적 영역내의 단백질의 전이점 아래의 작동 설정점에서 혼합물로부터 단백질을 선택적으로 분리하는 분리 과정에 의해서 조직 배양 혼합물을 여과하여 무균의 무입자(particle-free) 농축 및 부분 정제된 분리 생성물을 생성시키는데, 분리 과정을 통한 비유속이 단백질의 전이점 미만의 수준에서 실질적으로 일정하게 유지되도록 하여 무균의 무입자(particle-free) 농축 및 부분 정제된 분리 생성물을 생성시킴을 포함한다.
- [0072] 본 발명의 또 다른 관점으로, 본 발명의 방법은 (a) 목적 단백질을 함유하는 이질성 조직 배양액 혼합물을 연속적인 관류 발효에 의해서 연속적으로 생성시키고; (b) 연속적인 관류 발효 시스템과 통합된 입자 제거 과정에 조직 배양액 혼합물을 연속적으로 전달하고; (c) 입자 제거 과정중의 조직 배양액으로부터 미립자 오염물을 연속적으로 제거하여 목적 단백질을 함유하는 정화된 조직 배양액을 연속적으로 생성시키고; (d) 입자 제거 시스템과 통합된 정제 과정에 정화된 조직 배양액을 연속적으로 전달하고; (e) 정제 시스템내의 정화된 조직 배양액으로부터 목적 단백질을 연속적으로 분리하여 목적 단백질을 함유하는 무균의 무입자(particle-free) 농축 및 부분 정제된 분리 생성물을 연속적으로 생성시킴을 포함하는 연속적인 방법이다.
- [0073] 본 발명의 또 다른 관점에서, 본 발명의 방법은 (a) 목적 단백질을 함유하는 이질성 조직 배양액 혼합물을 연속적인 관류 발효에 의해서 연속적으로 생성시키고; (b) 연속적인 관류 발효 시스템과 통합된 입자 제거 과정에 조직 배양액 혼합물을 연속적으로 전달하고; (c) 입자 제거 과정중의 조직 배양액으로부터 미립자 오염물을 연

속적으로 제거하여 목적 단백질을 함유하는 정화된 조직 배양액을 연속적으로 생성시키고; (d) 입자 제거 과정과 통합된 보조 용기에 정화된 조직 배양액을 연속적으로 전달하고; (e) 보조 용기와 통합된 정제 과정에 정화된 조직 배양액을 간헐적으로 전달하고; (f) 정제 시스템중의 정화된 조직 배양액으로부터 목적 단백질을 분리하여 목적 단백질을 함유하는 무균의 무입자(particle-free) 농축 및 부분 정제된 분리 생성물을 생성시킴을 포함하는 반-연속적인 방법으로서, 연속적인 관류 발효과정 및 연속적인 입자 제거 과정을 통한 혼합물의 비유속이 실질적으로 일정하게 유지되며, 통합된 반-연속적 정제 과정의 시간-평균 출력과 평균적으로 동일한 반-연속적 방법이다.

[0074] 본 발명의 방법을 수행하는 장치

[0075] 본 발명은 또한 이질성 조직 배양액 혼합물로부터 목적 단백질을 분리하는 장치에 관한 것이다. 일반적으로, 장치는 (a) 연속적인 관류 발효 시스템; (b) 관류 발효 시스템과 통합된 연속적인 입자 제거 시스템; 및 (c) 입자 제거 시스템과 통합된 연속적 정제 시스템을 포함하며, 무균 조건이 유지되도록 조정되는 장치이다. 본 발명의 또 다른 관점으로, 본 발명의 장치는 (a) 연속적인 관류 발효 시스템; (b) 관류 발효 시스템과 통합된 연속적인 입자 제거 시스템; 및 (c) 입자 제거 시스템과 통합된 간헐적인 정제 시스템을 포함하며, 무균 조건이 유지되도록 조정되는 장치이다. 정제 시스템은, 예를 들어, 한외여과 시스템 또는 대류 흡착/탈착 시스템, 또는 본원에 기재된 통합된 연속 또는 반-연속 무균 시스템에서 이질성 혼합물로부터 목적 단백질을 정제 또는 부분적으로 정제할 수 있는 그 밖의 어떠한 시스템일 수 있다.

[0076] 본 발명의 방법 및 장치는 실질적으로 일정한 유속으로 이질성 조직 배양액 혼합물을 연속적으로 처리하도록 조정된다. 본 발명의 특징의 관점에서, 본 발명의 방법 및 장치는 연속적인 시간 동안 및 정제 과정 전체에 걸쳐서 유속 대 TMP 곡선의 압력 의존 영역에서 단백질의 전이점 아래의 실질적으로 일정한 유속에서 이질성 조직 배양액 혼합물을 연속적으로 처리하도록 조정된다.

[0077] 특징의 구체 예에서, 본 발명은 각각 완전히 통합된 3개의 별도의 엘리먼트로 구성되는 신규한 두 장치(A,B)를 제공하며, 이러한 엘리먼트 모두는 기본적인 역할을 하며 상기된 종래기술의 문제점을 해소시키는 특정 효과의 연속적 단백질 분리 시스템 플랫폼을 함께 형성한다.

[0078] 각각의 장치의 3개의 구별되는 엘리먼트는 첫째로 통합된 연속적 입자 제거 시스템(100), 두 번째로 무균의 보조 용기(200) 및 세 번째로 통합된 농축/정제 시스템(각각 300, 400)이다. 모든 이들 세 개의 엘리먼트 및 개발된 신규의 장치 및 이들 장치를 사용하는 방법이 이하 상세히 기재된다.

[0079] 단백질 생성물의 통합된 연속 또는 반-연속적 농축/정제를 위해서, 본 발명의 장치 A(두 개의 구체 예가 도 2에 도시되어 있다)는 통합된 연속의 무균 한외여과 시스템(300)을 포함하며, 본 발명의 장치 B(2개의 구체 예가 도 3에 도시되어 있다)는 통합된 반-연속적 대류 흡착/탈착 시스템(400)을 포함한다.

[0080] 본 발명의 장치는 하나 이상의 연속적 관류 발효기(들)과 직접적으로 통합되며, 신규의 연속적 통합된 제조 플랫폼을 형성한다.

[0081] 장치 A

[0082] 통합된 연속적 입자 제거 시스템

[0083] 도 2는 본 발명의 장치 A의 두 가지 구체 예를 도시하고 있다. 통합된 연속적 입자 제거 시스템(100)은 연속적 관류 발효 시스템(1)의 수거 측에 직접 연결되어 있다.

[0084] 도 4는 펌프(101), 압력 게이지 또는 트랜스미터(transmitter) (각각 107), 연결 매니폴드(connection manifold: 102) 및 몇 개의 필터 트레이의 어셈블리(103)로 구성되는 본 발명의 통합된 연속적 입자 제거 시스템(100)의 구체예에 대한 보다 상세한 개략도이다. 모든 부품은 가요성 튜브 및/또는 경질 파이프에 연결되어 있다.

[0085] 펌프(101)는 통상의 튜브연동식 펌프이며, 이는 무균의 생성물과 접하는 어떠한 회전부 또는 밀봉부 없이 세포 배양 수거물을 완만하게 펌핑한다. 펌프 및 펌프 튜브는 일일당 15 바이올리액터 용적까지, 예를 들어, 15 리터 발효기의 경우 9.4 리터/시간(h)까지 및 200 리터 발효기의 경우 125 리터/시간(h)까지에 이르는 세포 배양 발효 시스템의 유속으로 요구된 수거물을 전달한다.

[0086] \*압력 게이지 또는 압력 트랜스미터(107)은 압열 멸균 또는 조사(irradiation)에 의해서 무균화될 수 있도록 설

계된다. 현재의 디자인에서는, 스테인리스 스틸 하우징내의 재사용 가능한 압전 트랜스미터 또는 재사용 가능한 스테인리스 스틸 압력 게이지중 하나가 사용된다. 그러나, 추가의 개선은 조사(irradiation)에 의해서 용이하게 무균화될 수 있는 일회용 트랜스미터의 사용을 포함할 수 있다.

[0087] 본 발명의 구체 예에서, 연결 매니폴드(102)는 시스템 무균성에 영향을 주지 않으면서 추가의 여과 트레인 어셈블리의 연결을 가능하게 하는 튜브 클램프(또는 밸브) 및 적절한 무균 연결기와 함께 가요성 튜브로 구성된다. 바람직하게는, 튜브 직경은 요구되는 유속으로 약 2m/s 이하의 선형의 유체 속도가 유도되어 높은 역압(backpressure) 및 진단력을 피하도록 하는 직경이다. 또 다른 본 발명의 구체 예에서, 무균 연결기 대신에, 무균성에 영향을 주지 않으면서 시판중인 튜브 용접기로 용접될 수 있는 특성의 가요성 튜브 조각이 사용된다. 그러한 튜브 조각은 PVC 또는 그 밖의 적합한 폴리머로 제조된다.

[0088] 필터 트레인 어셈블리(103)는 도 4에 예로 나타낸 바와 같이 어떠한 주어진 시점에서 필터 트레인 중 하나의 필터 트레인(105)만이 개방되는 구성으로 둘 이상, 바람직하게는 다수의 동일한 필터 트레인(개략적으로 도시됨)으로 구성된다.

[0089] 각각의 필터 트레인은 하나 이상의 필터, 바람직하게는 하나의 예비-필터와 하나의 최종 필터가 직렬로 구성된다(도 4에 도시됨). 특성의 적용을 위해서 용량을 증가시키는 것이 요구되는 경우, 각각의 필터 트레인(105, 106 등)은 그 자체가 또한 병렬의 다수의 필터 또는 필터 트레인으로 구성될 수 있다.

[0090] 도 4에 도시된 본 발명의 구체 예에서, 어셈블리의 두 번째 필터 트레인(106)은 압력 감지 파열판(rupture disc) 또는 파열판(각각 104)에 의해서 폐쇄된다. 작동시에, 파열판 또는 파열판의 기능은 첫 번째 필터 트레인(105)에서의 압력이 특성의 한계에 도달하면 두 번째 필터 트레인(107)으로 흐름 경로를 자동적으로 개방하여, 여과 과정의 중단없는 연속을 가능하게 하는 것이다. 시판중인 파열판 또는 파열판이 본 발명의 시스템에 이용되며, 이들은 달리 안전하게 압력을 해제시키는데 사용된다. 본 발명의 구체 예에서, 16 PSI 미만의 특성의 파열 압력 한계를 지니는 파열판 또는 파열판이 사용되며, 이는 아주 유용한 것으로 입증되었다. 그러나, 특성의 압력 한계의 범위가 가능하다.

[0091] 필터 트레인 어셈블리의 각각의 추가의 필터 트레인이 또한 수동 또는 자동 밸브 및 또다른 파열판 또는 파열판에 의해서 분리된다. 두 번째 필터 트레인(106)이 작동되면, 각각 다음 파열판 또는 파열판에 대한 밸브가 개방되어 다음 필터 트레인이 백업 등으로서 작동할 수 있다.

[0092] 대안적인 구체 예에서, 자동 작동 밸브가 배타적으로 사용되며, 작동시에, 조절 시스템이 압력 멸균에 의해서 무균화될 수 있는 압전 압력 센서(107)의 입력을 근거로 하는 밸브를 작동시킨다. 그러나, 본 발명의 발명자들은 각각 파열판 또는 파열판을 포함하는 본 발명의 디자인이 장시간 작동에서 아주 강하게 견디게 함을 발견하였다.

[0093] 최종 필터 등급은 3 $\mu$ m이하, 바람직하게는 0.45 $\mu$ m이하, 더욱 바람직하게는, 0.2 $\mu$ m이하이다. 따라서, 작동 필터 트레인(6)은 모든 잔류 세포뿐만 아니라, 관련 세포 조각 및 그 밖의 입자를 보유하여 무입자(particle-free) 출력 스트림(9), 즉, 정화된 조직 배양액(cTCF)을 생성시킨다.

[0094] 상이한 시판 필터 물질이 사용될 수 있다. 현재의 디자인에서, 압력 멸균 또는 조사(irradiation)에 의해서 무균화될 수 있는 일회용 필터 캡슐, 예컨대, 사르토포어(Sartopure) 또는 사르토포어 예비-필터 캡슐(Sartorius, Goettingen) 및사르토포란(Sartobran) 최종 필터 캡슐(Sartorius, Goettingen)이 사용된다.

[0095] 1 리터/분의 유속으로 디자인된 본 발명의 장치의 구체 예의 예로서, 어셈블리(103)의 각각의 필터 트레인(105, 106 등)은 3 30" 예비-필터 캡슐(Kleenpak Ultipleat, Pall Corp., 4.5 $\mu$ m 등급, 각각 0.75m<sup>2</sup>)과 이에 이어지는 3 20" 최종 필터 캡슐(Sartobran P. Sartorius, 0.45  $\mu$ m/0.2 $\mu$ m 등급, 각각 1.3m<sup>2</sup>)로 구성된다. 이러한 특성의 구체 예는 재조합 혈액 응집 인자 VIII 뿐만 아니라 B-도메인 삭제된 FVIII를 포함하는 유전 조작된 FVIII 변이체의 대규모 제조에 특히 유용한 것으로 밝혀졌다.

[0096] 그러나, 본 발명의 발명자들은 본 발명의 장치와 방법을 이용하는 경우에 상이한 제조자들(Pall, Sartorius, Cuno)로부터의 다양한 시판 필터 물질 및 배열에 의한 입자 제거의 효율이 각각의 종래의 배치 과정에 비해서 지속적이고 현저하게 개선됨을 발견하였다.

[0097] 따라서, 신규한 본 발명의 장치 및 방법은 신규한 필터 타입 및 구조, 예를 들어, 캡슐당 이용가능한 필터 면적을 증가시키는 필터 타입 뿐만 아니라, 케이브 형성을 최소화하는 크로스-플로우 패턴 또는 그 밖의 수단, 예컨

대, 진동 또는 여과 엘리먼트 회전을 제공하는 필터 타입으로 사용되기에 유익할 것이다.

[0098] 본 발명의 과정의 또 다른 구체 예에서, 필터 트레인 어셈블리(103)는 여전히 작동을 위한 다수의 필터 트레인 이 있지만 파열판 또는 파열핀에 의해서 폐쇄된 단지 하나의 무균의 백업 필터 트레인을 포함한다. 어셈블리의 첫 번째 필터 트레인은 특정의 예정된 부하 용적이 처리될 때까지 작동되며, 그 후에 작동은 어셈블리중의 다음 필터 트레인으로 전환(수동 또는 자동)된다. 특정의 부하 용적은 표준 작동 조건하에서 파열판 또는 파열핀의 압력 한계가 초과되지 않도록 특정화된다. 그러나, 예를 들어, 수거물의 특정의 저여과성으로 인해서 압력이 여과동안 일반적인 압력보다 상승되면, 특정의 압력이 초과되는 경우에 백업 필터 트레인이 개방됨으로써 중단 되지 않는 연속적인 여과를 가능하게 한다. 백업 필터 트레인의 개방 후에, 여과는 어셈블리의 또 다른 필터 트레인으로 전환되고 파열판 또는 파열핀이 있는 또 다른 백업 여과 트레인이 시스템의 무균성에 영향을 주지 않으면서 설치된다.

[0099] 배치 입자 제거 과정을 위한 필터 비용 및 처리 시간 둘 모두를 최소로 유지시키기 위해서 배치 필터 트레인은 요구되는 절대 유속(리터/시간(h)) 및 최대 압력을 제공하는데 요구되는 최소의 가능한 필터 면적을 지니도록 제작될 필요가 있다. 요구되는 절대 유속은 또한 요구된 배치 용적에 실현 가능한 처리 시간을 제공하기에 아주 충분해야 한다. 이는 본질적으로 높은 비유속(리터/시간/필터면적<sup>2</sup>)으로 필요로 한다.

[0100] 비교 가능한 최적의 배치 여과 시스템과는 대조적으로, 본 발명의 장치는 몇 배 더 낮은 비유속으로 디자인되고, 이러한 비유속은 일정하게 유지되어(리터/시간(h)/설치된 필터 면적 m<sup>2</sup>으로), 절대 유속이 연속적인 관류 발효의 수거물 유속과 동일하게 한다.

[0101] 본 발명의 발명자들은 그러한 낮은 비유속에서 필터를 통해서 처리될 수 있는 용적이 배치 과정에서 조절된 유속에서 보다 더 불균형되게 높다는 것을 예상치 못하게 발견하였다.

[0102] 통상의 배치 분리 과정에서 그러한 낮은 비유속은 극도의 여과 면적(및 그에 따른 비용), 또는 너무 낮은 절대 유속으로 인해서 실현 불가능함을 주지하는 것이 중요하다. 그 이유는 일차적으로 종종 배치 입자 제거 장치 사이트가 느리고 수거물이 다음 배치를 위해서 수거되기 때문이다. 게다가, 본 발명의 방법의 달성 가능한 필터 용량에서의 놀랄만한 불균형적 증가는 필터 소모의 현저한 감소 및 그에 따른 제조비용의 감소를 가능하게 한다.

[0103] 보조 용기(200)

[0104] 통합된 연속적 입자 제거 시스템의 출구는 도 2에 도시된 바와 같이 보조 용기(201)에 직접 및 영구적으로 연결 되어 있다. 이러한 보조 용기는 하나 이상의 유입구와 하나 이상의 출구가 있는 무균의 용기, 예를 들어, 일회 용 백 또는 스테인리스 스틸 용기이며, 출구는 가능하게는 용기의 바닥에 위치한다. 광범위한 용기 크기 및 디자인이 이용될 수 있다. 그러나, 보조 용기는 바람직하게는 시스템의 용적 출력에 비해서 작아서 용기내의 생성물을 체류시간을 최소, 즉 24 시간 미만, 바람직하게는 8 시간 미만, 더욱 바람직하게는 4 시간 미만으로 유지되게 제작된다.

[0105] 본 발명의 발명자들은 특별히 가능하게는 본 발명의 장치에 기인한 그러한 짧은 생성물 체류시간이 본래 불안정한 단백질 생성물의 수율을 현저하게 증가시키서, 종래 기술의 문제점 중 하나를 해소시킴을 발견하였다.

[0106] 본 발명의 장치의 일부 구체 예에서, 보조 용기는 도 3중 장치 B1 및 B2에 대해서 도시된 바와 같이 밸런스 또는 부하 셀(202)에 위치된다. 이러한 밸런스 또는 부하 셀은 중량 신호를 컴퓨터 제어 시스템(도시되지 않음)에 제공한다.

[0107] 또한, 본 발명의 장치(B2)의 구체 예에서, 완충액 용기(204)가 튜브연동 펌프(203)를 통해서 보조 용기에 연결 되어 있다. 작동시에, 이러한 셋업(set-up)은 적합한 완충액 또는 희석제를 첨가함으로써 무입자(particle-free) 수거 스트림의 성질, 예컨대, 전도성(이온강도) 또는 pH를 조정하는데 이용된다. 이러한 경우에, 임의의 혼합 시스템(205) 및 요구되는 조건(206), 예컨대, pH 또는 전도성을 모니터링하는 센서가 사용된다. 본 디자인에서, 자기 결합된 교반기가 사용되지만; 그 밖의 혼합 시스템, 예컨대, 셰이커(shaker) 또는 펄스 발생 장치 가 또한 사용될 수 있다.

[0108] 통합된 연속적 농축/정제(300)

[0109] 두 개의 구체 예가 도 2에 도시되어 있는 장치 A는 통합된 연속적 무균 한외여과 시스템(300)을 포함한다. 연속적 무균 한외여과 시스템의 구체 예는 재순환 펌프(301)와 재순환 루프(306), 하나 이상의 무균의 크로스플로



우 한외여과 모듈(303), 투과물 펌프(305), 밸런스 또는 부하 셀(309) 상의 무균의 투과물 수용 용기(307) 및 보유물 펌프(311)를 포함한다. 또한, 이러한 구체 예는 유입구 압력 게이지 또는 트랜스미터(302), 투과물 압력 게이지 또는 트랜스미터(304), 출구 압력 게이지 또는 트랜스미터(308) 뿐만 아니라, 재순환 흐름 미터(310) 형태의 장치를 포함한다. 작동시에, 시스템 출구(312)는 연속적으로 수거되거나, 동결되거나 추가로 처리될 수 있는 농축 및 부분 정제된 단백질 생성물의 연속적인 스트림을 제공한다.

[0110] 본 발명의 구체 예 A2는 완충액 또는 희석제 용기(314), 튜브연동 완충액/희석제 첨가 펌프(313), 뿐만 아니라, 재순환 루프내의 농축물의 상태 조절을 모니터링하는 흐름 센서, 예컨대, pH 및 전도성(315, 316)에 대한 센서를 추가로 포함한다. 작동시에, 이러한 셋업은 적합한 완충액 또는 희석제를 첨가함으로써 무입자(particle-free) 수거물 스트림의 성질, 예컨대, 전도성(이온 강도) 또는 pH를 조정하는데 사용된다. 이러한 셋업은 또한 단백질 안정화제를 첨가하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 구체 예 A2에서 재순환 루프 그 자체가 혼합 챔버로서 작용하지만, 상태 조절은 다르게는 본원에서 이후에 기재(참조: 장치 B의 설명)되고 있는 부품(203, 204, 205, 206)을 포함하는 장치 B(구체 예 B2)에 대해 도시된 보조 용기 셋업을 이용함으로써 수행될 수 있다.

[0111] \*본 발명의 장치의 구체 예는 데이터 로깅(data-logging) 및 프로그램 가능한 조절 시스템을 포함하며, 그러한 시스템은 장치로부터의 유입 데이터 신호(예컨대, 이로 제한되는 것은 아니지만, 압력, 유속, 용기 중량, pH, 전도성)를 기록하고 예정된 제어 알고리즘에 따라서 펌프 속도를 제어한다.

[0112] 모든 펌프(301, 305, 311, 313)는 튜브 연동식 펌프이며, 이러한 펌프는 무균의 생성물 스트림과 접촉하는 어떠한 회전부 또는 밀봉부 없이 각각의 유체 스트림을 펌핑시킨다. 본 발명의 발명자들은 이러한 펌프가 무균의 강력한 장시간 작동을 제공하기에 바람직함을 발견하였다. 그러나, 그 밖의 무균의 펌프 디자인이 일반적으로 사용될 수 있다. 재순환 펌프(301) 및 이의 펌프 튜빙은 사용된 한외여과 모듈의 질량 전달 특성에 따라서 설치된 막 면적  $m^2$  당 80 내지 800리터/시간(h)의 요구된 크로스플로우 속도의 강력한 조절(robust adjustment)이 가능하게 선택된다. 투과물 펌프는 연속적인 관류 발효로부터의 수거물 유속의 90% 내지 99% 사이의 비투과물 유속의 강력하고 정밀한 조절이 가능하게 선택된다. 보유물 펌프는 연속적 관류 발효로부터의 수거물 유속의 1% 내지 10%의 보유물 유속을 강력하고 정밀한 조절이 가능하게 선택된다.

[0113] 캡슐화된 한외여과 모듈(303)은 강력한 무균 작동이 가능하게 사용되며, 압열멸균 또는 조사(irradiation)에 의해서 무균화된다. 최적의 명목 분자량 컷오프는 목적하는 단백질의 분자량을 근거로 하여 선택되며, 본 기술분야의 전문가에게는 공지된 표준 실험에 의해서 확인되어야 한다. 전체 막 모듈이 막에 손상을 주지 않으면서 조사 또는 압열멸균에 의해서 무균화될 수 있는 한, 다양한 막 물질, 예컨대, 폴리에테르설폰, 친수화된 폴리에테르설폰 또는 재생된 셀룰로오스가 사용될 수 있다. 친수성 물질이 이들의 낮은 오염 성향으로 인해서 효율을 증가시킬 수 있는 것으로 예상된다.

[0114] 본 발명의 발명자들은 평방미터로의 설치된 전체 한외여과 막 면적이 리터/시간으로의 연속적 관류 발효로부터의 수거물의 용적 유속의 0.1 내지 2 배의 범위와 동일한 경우에 장치 A가 특히 효율적임을 발견하였다. 예를 들어, 1 리터/시간(h)의 관류 수거물 유속에 대해서, 설치된 전체 막 면적은 0.1 내지 2 평방미터이어야 한다. 본 발명의 발명자들은 설치된 한외여과 막의 평방미터 면적이 연속적 관류 발효로부터의 수거물의 리터/시간(h)의 용적 유속의 0.3 내지 1 배의 범위와 동일한 경우에 장치 A가 특히 더 효율적임을 발견하였다.

[0115] 본 발명의 한 구체 예에서, 시판중인 "일회용" 중공 섬유 막 모듈(GE Healthcare, 구 명칭: Amersham Biosciences)이 사용된다. 그러나, 다양한 캡슐화된 막 및 모듈 디자인, 예컨대, 2차 흐름 패턴(예, 와류)에 기인한 향상된 질량 전달이 있는 나선상으로 감긴 모듈, 캡슐화된 카세트 또는 캡슐, 회전 부재(예, 다이내믹 디스크 필터) 또는 진동 필터가 사용될 수 있다. 특별히 캡슐화된 한외여과 카세트가 본 발명의 장치에서 유익하게 사용될 수 있는 것으로 예측되는데, 그 이유는 이들이 비교적 낮게 요구되는 크로스플로우 속도로 높은 질량 전달 계수를 제공하여, 펌프 용량을 감소시키면서, 시스템 복잡성과 투자 비용은 낮게 유지시키기 때문이다.

[0116] 본 발명의 장치는 종래의 무균 작동과는 대조적으로 연속적일 뿐만 아니라 실질적인 무균작동을 가능하게 한다. 본 발명자들은 이러한 사항을 모든 생성물-접촉 시스템 부품이 정화뿐만 아니라 적소에서 압열 멸균, 스티밍(steaming) 또는 감마선 조사에 의한 무균화에 견디도록 설계함으로써 달성시켰다. 본 발명의 구체 예에서, 일회용 캡슐화 모듈은 연속적인 입자 제거(100) 뿐만 아니라 연속적인 한외여과(300)에 사용된다. 튜브연동식 펌프는 어떠한 생성물이 회전 부재 및 기계적인 밀봉부와 접촉되는 것을 피하기 위해서 사용된다. 게다가, 본 구체 예에서, 일회용 튜빙 및 백 어셈블리가 경질 파이프 대신 사용된다. 일회용 생성물 접촉 부품(예, 튜빙,

백, 모듈) 또는 부품군은 미리 조립되고 함께 무균화되어 시동과 작동을 단순하게 한다. 시스템은 샘플링, 백 또는 계측기기 교환에 의한 경우와 같은 환경(예, 층류 후드)으로의 무균 시스템의 어떠한 가능한 개방을 최소로 유지시키도록 설계된다. 본 장치의 구체 예에서, 매니폴드는 하나의 무균 부품(예, 생성물 수용 백)으로부터 다음 부품으로 개방 없이 전환되게 하기에 충분하게 디자인된다. 튜빙, 모듈 또는 백의 추가의 교환은 바람직하게는 무균 연결기 보다는 무균의 튜빙 용접을 이용함으로써 수행된다.

[0117] 본 발명의 장치의 그 밖의 추가의 구체 예는 또한 부품, 예컨대, 적소에서 무균화될 수 있는 스테인리스 스틸 용기, 필터 하우징 또는 파이프를 단독으로 포함하거나, 장시간 작동시에 강력함과 무균성이 보장되는 한, 일회용 부품과 함께 포함할 수 있다.

[0118] 본 발명의 장치 A의 추가의 구체 예는 보다 큰 제조 플랜트(A3)에서 다중 발효기로부터의 물질을 처리하도록 디자인된다. 예가 도 5에 개략적으로 도시되어 있다. 추가의 구체 예는 연속적인 한외여과 시스템(300)의 2 단계를 직렬로 조합시킴으로써 전체 농축 인자 및 분리 성능을 증가시키도록 디자인된다(A4, 도 5에 개략적으로 도시됨).

[0119] 장치 A를 사용하는 방법의 설명

[0120] 연속적인 관류 발효는 장시간(한 회전), 전형적으로는 2주 내지 6개월 이상에 걸쳐서 작동된다. 생성물, 세포 및 세포 조각을 함유하는 조직 배양액(TCF)은 장치 A를 사용함으로써 연속적으로 처리된다. 무균의 무입자(particle-free) 농축 및 부분 정제된 생성물 스트림("분리 생성물")이 생성되며 장치의 출구(312)에서 연속적으로 배출된다. 연속적인 무균의 입자 제거 시스템(100)의 펌프(101)를 사용함으로써, 수거물은 요구된 관류 발효 수거물 유속  $Q_h$ 로 여과 어셈블리(103)를 통해서 연속적으로 펌핑된다.

[0121] 연속적 여과 시스템, 즉, 정화된 조직 배양액(cTCF)의 출력 스트림은 보조 용기(201)로 연속적으로 유입된다. 보조 용기로부터 cTCF는 연속적 관류 발효로부터 유입되는 유속과 동일한 유속으로 연속적 무균 한외여과 시스템(300)에 의해서 연속적으로 처리된다. 조절된 유속에 비해서 작은 사이즈의 보조 용기로 인해서, 용기내 생성물의 평균 체류 시간은 최소, 즉, 12 시간 미만, 바람직하게는 4 시간 미만, 더욱 바람직하게는 2 시간 미만으로 유지된다.

[0122] 충분한 크로스플로우 및 그에 따른 질량 전달이 한외여과 모듈에서 재순환 펌프(301)를 통해서 조절된다. 보유물 유속은 보유물 펌프(311)를 사용함으로써 조절되고 제어되어, 장치의 출구에서 장치 A로부터 배출되는 농축된 생성물 분리물의 일정하고 연속적인 유속  $Q_i$ 가 유도된다. 투과물 펌프(305)는 투과물의 유속  $Q_p$ 를 조절하고 제어하도록 사용되며, 그러한 투과물은 한외여과 모듈(들)의 투과측으로부터 연속적으로 유도되고 한외여과 막을 통과하기에 충분히 작은 물 및 용액 성분(예, 염, 작은 단백질)로 구성된다.

[0123] 투과물( $Q_p$ ) 및 보유물/분리물( $Q_i$ )의 유속은 하기 식이 만족되도록 발효 수거물 유속( $Q_h$ )과 부합되게 조절되고 제어된다:

[0124]  $Q_p + Q_i = Q_h$

[0125] 동시에, 유속은 하기 식을 만족시킴으로써 요구된 농축 인자  $cf$ 가 달성되도록 조절되고 제어된다:

[0126]  $Q_i = 1/cf * Q_h$

[0127] 예를 들어, 초기 수거물 농축 동안의 분리물 중의 10 배의 요구된 농축 인자를 달성하기 위해서,  $Q_i$ 는 보유물/분리물 펌프(311)를 사용함으로써  $Q_i = 1/10 * Q_h$ 로 조절되고,  $Q_p$ 는 투과물 펌프(305)를 사용함으로써  $Q_p = 0.9 * Q_h$ 로 조절된다.

[0128] 유출 속도는 펌프(305) 및 (311)에 의해서 조절되기 때문에, 한외여과 시스템은 자동적으로 작은 보조 용기(201)로부터  $Q_p + Q_i$ 의 흐름을 유도한다.

[0129] 구체 예 A2(도 2의 우측)를 사용하는 경우에, 용기 (314)로부터의 주입을 위한 완충액 또는 물의 무균 스트림은 완충액 추가 펌프(313)를 사용함으로써 일정한 유속  $Q_b$ 로 연속적인 한외여과 시스템에 연속적으로 첨가된다. 따라서, 분리물의 상태는, 예를 들어, 이온 강도, pH, 안정화제의 첨가 등의 면에서 자유롭게 연속적으로 조절된다. 유속은 따라서  $Q_p + Q_i = Q_h + Q_b$ 로 제어된다. 또한, 유속비는 요구된 농축 인자  $cf$ 가  $Q_i = 1/cf * (Q_h + Q_b)$ 를 만족시킴으로써 달성되도록 선택될 수 있다. 대안적으로는, 이러한 과정은  $Q_i = Q_h + Q_b$ 를 설정함으로써 상태(예, pH, 전도성)을 단지 변경시키도록 이용될 수 있다.

[0130] 장치 A를 사용하는 신규의 방법은 한외여과 자체의 작동 설정 점의 면에서 UF 배치 방법(종래기술)과 대비된다.



통상의 배치 UF 방법은 짧은 시간 내에 작은 막 면적을 통한 특정의 출력을 위해서 디자인된다. 배치 UF는 따라서 질량 전달 제어된 영역에 따라서 압력의 전이점에서 일반적으로 작동된다(도 9). 이러한 방법은 바람직하게 높은 초기 비유속을 유도하고, 이러한 유속은 그러나 농도 극성화가 역삼투압과 제한 겔 층(이차 막)의 형성을 신속하게 유도함에 따라서 수 초 내지 수 분의 과정에 걸쳐서 현저하고 신속하게 강화된다. 거대분자의 그러한 높은 벽 농도는 또한 내부 및 외부 막 표면에 대한 화합물의 증가된 흡착, 즉, 막 오염을 유도한다. 이러한 오염은 시간이 지남에 따라서 투과물 유속을 추가로 감소시킬 수 있다.

[0131] 본 발명의 발명자들은 놀랍게도 장치 A에 의하면 설치된 한외여과 막의 면적당 여러 배로 더 높은 전체 부하 용량이 압력-유속 곡선의 하단에서 작동시킴으로써 달성됨을 발견하였다(도 9).

[0132] 완전히 보유된 성분의 표정된 벽 농도  $c_{wall}$ 이 다음과 같이 기재될 수 있다:

$$c_{wall} = e^{\frac{J}{k_d}} \cdot c_{bulk}$$

[0134] 상기 식에서,

[0135]  $J$  = 리터/시간(h)/m<sup>2</sup>으로의 비투과유속,

[0136]  $k_d$  = 리터/시간(h)/m<sup>2</sup>으로의 질량전달계수,

[0137]  $c_{bulk}$  = 용액 벌크 중의 성분의 농도

[0138] 배치 UF에서와 유사하게, 연속적 UF는 최적화된 질량 전달 계수로 작동하여 농도 극성화를 최소로 한다. 그러나, 배치 한외여과와는 대조적으로, 본 발명의 발명자들은 투과물 유속  $J$ 가 압력-플럭스 곡선의 하단에 있도록 조절한다(도 9). 지수적 관계의 결과로, 막 표면에서의 벽 농도  $c_{wall}$ 은 그에 따라서 배치 한외여과에서의 농도보다 현저하게 낮다. 예를 들어, 본 발명의 방법의 구체 예는 달성 가능한 질량 전달 계수의 약 1/10의 표적 비투과물유속을 조절하여, 벽 농도를 조절된 벌크(또는 보유물) 농도의 단지 10% 이상으로 조절한다.

[0139] 하기 표 1은 개발 규모의 발효기로부터의 단백질 생성물의 연속적 분리를 위한 장치 A(구체 예 A1)을 사용하는 방법의 예를 나타내고 있다:

### 표 1

[0140] 연속적인 관류 발효로부터의 단백질 생성물의 연속적인 분리를 위한 장치 A의 구체 예를 이용하는 방법의 예

작동 파라미터	표적
연속적인 관류로부터의 수거물 유속 $Q_h$ (펌프(101)로 제어됨)	5 리터/시간(h)(120 리터/일)
투과물 유속 $Q_P$ (펌프(305)로 제어됨)	4.75 리터/시간(h)
보유물(분리 생성물) 유속 $Q_i$ (펌프(311)로 제어됨)	0.25 리터/시간(h)
비투과물유속 $J$	2 리터/시간(h)/m <sup>2</sup>
농축 인자 $cf$	20 배

[0141] 각각 개별적인 생성물 분자의 경우에, 수명 기준은, 예를 들어, 경막 압력을 기준으로 무균의 연속적 한외여과 셋업에 대해서 정의될 수 있다. 경막 압력 한계가 초과되는 경우, 연속적인 무균의 한외여과 셋업은 시스템의 통합성과 무균성에 영향을 주지 않으면서 또 다른 동일한 셋업으로 대체된다. 이러한 과정은 매니폴드 및 무균의 연결기를 사용함으로써 또는 일회용 가요성 튜빙 및 무균의 튜빙 용접을 이용함으로써 연속적인 무균 여과 셋업에 유사하게 수행될 수 있다.

[0142] 장치 B

[0143] 통합된 연속적 입자 제거 시스템(100)

[0144] 도 3은 본 발명의 장치 B의 2 가지 구체 예를 나타낸다. 통합된 연속적 입자 제거 시스템(100)은 연속적 관류 발효 시스템(1)의 수거물 측에 직접 연결되어 있다. 장치 B의 이러한 부분은 장치 A와 동일하다(장치 A의 상세

한 설명 및 도 4).

[0145] 보조 용기(200)

[0146] 통합된 연속적 입자 제거 시스템의 출구는 도 3에 도시된 바와 같이 보조 용기(201)에 직접 및 영구적으로 연결되어 있다. 이러한 보조 용기는 하나 이상의 유입구와 하나 이상의 출구가 있는 무균 용기, 예컨대, 일회용 백 또는 스테인리스 스틸 용기이며, 상기 용기에서 출구는 바람직하게는 용기의 바닥에 있다. 광범위한 범위의 용기 크기 및 디자인이 이용될 수 있다. 그러나, 보조 용기는 바람직하게는 시스템의 용적 출력에 비해서 작게 구성되어 용기 중의 생성물의 체류 시간을 적게, 즉, 26 시간 미만, 바람직하게는 12 시간 미만, 더욱 바람직하게는 4 시간 미만으로 유지시킨다.

[0147] 장치 B에서, 보조 용기는 도 3의 구체 예 B1 및 B2에 대해서 도시된 바와 같이 밸런스 또는 부하 셀(202) 상에 위치한다. 이러한 밸런스 또는 부하 셀은 중량 신호를 컴퓨터 제어 시스템(도시되지 않음)에 제공한다.

[0148] 또한, 본 발명의 장치(B2)의 구체 예에서, 완충액 용기(204)는 튜브연동식 펌프(203)를 통해서 보조 용기에 연결된다. 작동시에, 이러한 셋업은 입자 제거 시스템으로부터 수용된 배양 정화된 조직의 성질을 조절하는 성분, 예컨대, 적합한 완충제 또는 희석제, 또는 적합한 단백질 안정화제를 첨가함으로써 무입자(particle-free) 수거물 스트림의 성질, 예컨대, 전도성(이온 강도) 또는 pH를 조절하는데 이용된다. 이러한 경우에, 본 구체 예는 또한 혼합 시스템(205)을 포함하며, 요구된 상태(206), 예컨대, pH 또는 전도성을 모니터링 하는 센서가 사용된다. 이러한 본 구체 예에서, 자기 결합 교반기가 사용되지만; 그 밖의 혼합 시스템, 예컨대, 셰이커 또는 펄스 발생 장치가 또한 사용될 수 있다.

[0149] 본 발명의 장치의 또 다른 구체 예에서, 2 개의 보조 용기가 사용된다. 주어진 시점에서, 하나의 보조 용기는 연속적인 입자 제거 시스템(100)에 직접적으로 연결되어, 정화된 유체를 수용하고, 다른 하나는 반-연속적 농축/정제 시스템(400)에 연결되어, 대류 흡착/탈착 사이클에 공급한다. 이 두 용기 사이의 전환은 수용 용기가 최대의 충전량에 도달되는 경우에 수용 용기의 중량을 이용하여 스위치를 작동시키는 제어 시스템을 통해서 실현시킨다.

[0150] 통합된 반-연속적 농축/정제(400)

[0151] 두 가지의 구체 예가 도 3에 도시되어 있는 장치 B는 통합된 반-연속적 대류 흡착/탈착 시스템(400)을 포함한다.

[0152] 통합된 반-연속적 대류 흡착/탈착 시스템은 시스템의 부하 유속( $Q_{load}$ )이 연속적 관류 수거 및 연속적 여과 과정의 유속( $Q_h$ ) 보다 현저하게 높도록 디자인되고 구성된다(즉,  $Q_{load} \gg Q_h$ ).

[0153] 통합된 반-연속적 농축/정제 시스템(400)의 구체 예는 부하 펌프(401), 멀티-포트(multi-port) 밸브 어셈블리(402) 및 몇 개의 완충액 용기(404), 무균 폐기물 수용 용기(413)와 하나 이상의 대류 흡착제 모듈(들)(406)에 연결된 3-웨이-밸브(3-way-valve)(403), 유입구- 및 출구-압력 게이지 또는 트랜스미터(405, 408), 추가의 계측기기, 예컨대, UV 센서(409), pH 및 전도성 센서(409, 410), 유량계(412), 및 폐기물 용기(413)와 생성물 용리 출구(414)에 연결된 또 다른 3-웨이 밸브(407)를 포함한다.

[0154] 본 발명의 장치의 구체 예는 또한 데이터-로깅 및 프로그램 가능한 제어 시스템(도시되지 않음)을 포함하며, 이러한 시스템은 계측기로부터의 유입 데이터 신호(예컨대, 이로 한정되는 것은 아니지만, UV, pH, 전도성, 유속, 보조 용기 중량)를 기록하고 프로그램된 원안에 따라서 자동화된 밸브 및 펌프를 제어한다.

[0155] 부하 펌프(401)는 바람직하게는 생성물 또는 무균 완충액이 어떠한 밀봉부 또는 기계적인 부분과 직접 접촉되지 않게 하는 튜브연동식 펌프이다. 본 발명의 발명자들은 이러한 펌프가 무균의 장시간의 강력한 작동을 제공하는데 바람직함을 발견하였다. 그러나, 그 밖의 무균 펌프 디자인이 일반적으로 사용될 수 있다. 부하 펌프는 대류 흡착제(406)의 설치된 매트릭스 용적에 따라서 12 매트릭스 용적/분 이상의 강력한 조절이 가능하게 구성된다. 예를 들어, 한 구체 예에서, 약 0.3리터의 매트릭스 용적을 지니는 무스탕 막 흡착제 캡슐(Pall Corp.)이 사용된다. 따라서, 부하 펌프는 3.6 리터/분까지의 부하 유속이 가능하도록 구성된다.

[0156] 멀티-포트 밸브 어셈블리(402)의 기능은 보조 용기(201)로부터 유도된 생성물 함유 부하와 무균의 완충액 용기(404)로부터의 각각의 무균의 완충액 및 세정 용액 사이의 전환을 가능하게 하는 것이다. 장치 B의 본 구체 예는 일련의 자동 작동 핀치 밸브(pinch valve)를 이용하며, 이러한 밸브는 외부로부터의 각각의 완충액 용기에 연결된 가요성 튜빙을 조여서 각각의 라인을 차단하고 개방한다. 본 발명의 발명자들은 이들 핀치 밸브가 장치 B에 특별히 유리한 용액을 제공하는데, 그 이유는 이들 핀치 밸브가 어떠한 생성물 접촉을 억제하고 그에 따라

서 세정되거나 무균화될 필요가 없기 때문임을 발견하였다. 그러나, 본 기술분야의 전문가에게는 공지되어 있으며 무균 처리에 적합한 광범위한 범위의 시판 밸브, 예컨대, 구동 막 밸브가 사용될 수 있다.

[0157] 본 구체 예에서, 3-웨이 밸브(403, 407)은 압열멸균 가능한 구동 막 밸브이다. 그러나, 무균 처리에 적합한 다수의 시판 밸브가 일반적으로 사용될 수 있으며, 그러한 밸브에는, 예를 들어, 핀치 밸브가 포함된다.

[0158] 대류 흡착제 모듈(406)은 흡착성 표면에 생성물을 우선적으로 대류 질량 전달하는 크로마토그래피 매트릭스를 함유하며, 통상의 크로마토그래피와는 대조적으로, 압열멸균, 스티밍 또는 조사에 의해서 작동 전에 무균화된다. 우선적인 대류 질량 전달은, 통상의 충전층 크로마토그래피와는 대조적으로, 아주 짧은 흡착/용리/재생 사이클 시간을 가능하게 하며, 본 발명의 발명자들은 이를 이용하여 반-연속적 작동을 실현시키고 있다.

[0159] 본 발명의 장치의 본 구체 예에서, 대류 흡착제(406)은 이온 교환 화학에 의한 하나 이상의 시판중인 막 흡착제 캡슐(들)로 구성된다(Mustang, Pall corporation or Sartobind, Sartorius). 그러나, 장치는 그 밖의 막 흡착제 물질 및 기하구조물 및 신규의 대류 매트릭스, 예컨대, 모놀리스성 매트릭스를 이용할 수 있으며, 그 이유는 통상의 크로마토그래피와는 대조적으로 수지 충전이 생략되며 매트릭스가 일반적으로 사용 준비 모듈에서 캡슐화될 수 있기 때문이다.

[0160] 게다가, 특정의 생성물-결합 리간드를 포함하는 대류 친화성 매트릭스를 포함한 그 밖의 화학물질이 또한 본 발명의 장치에서 특별히 유익한 성능을 유도할 것이다.

[0161] 본 발명의 한 구체 예에서, 다중 대류 흡착제 모듈이 연속적인 입자 제거 시스템(100)과 유사하게 장치에서 대류 흡착제-트레인의 어셈블리 형태로 병렬로 사용된다. 모든 흡착제 트레인을 포함한 전체 어셈블리는 함께 무균화되어서, 예정된 기준, 예컨대, 부하 동안의 역압 또는 수행된 작동 사이클의 최대 횟수에 의해서 결정되는 유효 수명으로서, 첫 번째 하나의 흡착제 트레인이 그 유효 수명을 다하는 경우 하나의 흡착제 트레인으로부터 새로운 하나의 흡착제 트레인으로 전환되는 작동을 가능하게 한다. 각각의 흡착제 트레인은 병렬 및/또는 직렬의 하나의 개별적인 모듈 또는 다중 대류 흡착제 모듈 중 하나로 구성되어 결합 용량을 증가시키고/거나 용량 이용을 향상시킨다.

[0162] 본 발명의 장치는 종래의 무균 작동과는 대조적으로 연속적일 뿐만 아니라 실질적으로 무균의 작동을 가능하게 함을 강조하는 것이 중요하다. 본 발명의 발명자들은 이러한 사항을 모든 생성물-접촉 시스템 부품이 정화뿐만 아니라 적소에서 압열 멸균, 스티밍(steaming) 또는 감마선 조사에 의한 무균화에 견디도록 설계함으로써 달성시켰다. 본 발명의 구체 예에서, 일회용 캡슐화 모듈은 연속적인 입자 제거(100) 뿐만 아니라 반-연속적 무균 대류 흡착/탈착(400)에 사용된다. 튜브연동식 펌프는 어떠한 생성물이 회전 부재 및 기계적인 밀봉부와 접촉되는 것을 피하기 위해서 사용된다. 게다가, 본 구체 예에서, 일회용 튜빙 및 백 어셈블리가 경질 파이프 대신 사용된다. 일회용 생성물 접촉 부품(예, 튜빙, 백, 모듈) 또는 부품군은 미리 조립되고 함께 무균화되어 시동과 작동을 단순하게 한다. 시스템은 샘플링, 백 또는 계측기기 교환에 의한 경우와 같은 환경(예, 층류 후드)으로의 무균 시스템의 어떠한 가능한 개방을 최소로 유지시키도록 설계된다. 본 발명의 장치의 본 구체 예에서, 매니폴드는 하나의 무균 부품(예, 생성물 수용 백)으로부터 다음 부품으로 개방 없이 전환되게 하기에 충분하게 디자인된다. 튜빙, 모듈 또는 백의 추가의 교환은 바람직하게는 무균 연결기 보다는 무균의 튜빙 용접을 이용함으로써 수행된다.

[0163] \*본 발명의 장치의 그 밖의 추가의 구체 예는 또한 부품, 예컨대, 적소에서 무균화될 수 있는 스테인리스 스틸 용기, 필터 하우징 또는 파이프를 단독으로 포함하거나, 장시간 작동시에 강력함과 무균성이 보장되는 한, 일회용 부품과 함께 포함할 수 있다.

[0164] 본 발명의 장치 B의 추가의 구체 예는 보다 큰 제조 플랜트(B3)에서 다중 발효기로부터의 물질을 처리하도록 디자인된다. 예가 도 6에 개략적으로 도시되어 있다. 본 발명의 장치 B의 추가의 구체 예는 직렬의 다중 대류 흡착/탈착 시스템(400)을 (200) 사이에 있는 각각의 무균 보조 용기들과 조합함으로써 전체 농축 인자와 분리 성능을 향상시키도록 디자인된다(도 6, B4).

[0165] 본 발명의 장치의 추가의 구체 예는 연속적인 한외여과 시스템(300)을 직렬로 반-연속적 대류 흡착/탈착 시스템(400)과 추가의 보조 용기를 통해서 조합시킴으로써 전체 농축 인자 및 분리 성능이 향상되도록 디자인된다. 구체 예의 예가 도 7에 도식적으로 도시되어 있다.

[0166] 장치 B를 사용하는 방법의 설명

- [0167] 연속적인 관류 발효는 장시간(1 회전), 전형적으로는 2주 내지 6개월 이상에 걸쳐서 작동된다. 생성물, 세포 및 세포 조각을 함유하는 조직 배양액(TCF)은 장치 B를 사용함으로써 연속적으로 처리된다. 무균의 무입자 (particle-free) 농축 및 부분 정제된 생성물 스트림("분리 생성물")이 생성되며 장치의 출구(414)에서 연속적으로 배출된다. 연속적인 무균의 입자 제거 시스템(100)의 펌프(101)를 사용함으로써, 수거물은 요구된 관류 발효 수거물 유속  $Q_h$ 로 여과 어셈블리(103)를 통해서 연속적으로 펌핑된다.
- [0168] 연속적 여과 시스템의 출구 스트림, 즉, 정화된 조직 배양액(cTCF)은 보조 용기(201)로 연속적으로 유입된다.
- [0169] 보조 용기가 예정된 수준으로 충전되면, 증량 또는 수준 신호는 통합된 무균 반-연속적 농축/정제 시스템의 흡착/탈착 사이클을 자동적으로 개시시킨다. 보조 용기내에 수거된 물질은 흡착제 셋업 상으로 신속하게, 즉, 4 시간 이내에, 바람직하게는 2 시간 이내에, 더욱 바람직하게는 1 시간 이내에 부하되어서, 보조 용기를 비운다.
- [0170] 도 3에 도시된 본 구체 예에서, 무입자(particle-free) 정화된 조직 배양액(cTCF)의 수거는 동일한 소형의 보조 용기 중에 전 시간에 걸쳐서 계속된다. 따라서 소형의 보조 용기중의 용적은 최소 밸브와 최대 밸브 사이에서 다양하다. 앞서 기재된 또 다른 구체 예에서, 수거는 2 개의 동일한 보조 용기 사이에서 전후로 전환된다.
- [0171] cTCF가 보조 용기 중에 계속 수거되면서, 부하된 흡착제는 농축 정제된 형태의 표적 생성물을 탈착시키고 다음 부하 사이클에 흡착제를 준비시키도록 디자인된 예정된 크로마토그래피 원안의 더 많은 단계로 진행된다. 따라서, 전체 사이클은 각각 하나 이상의 적합한 완충액과 함께 부하, 세척, 용리, 재생 및 재평형을 포함한다.
- [0172] 이들 단계 동안 유속은 대류 흡착제의 특성으로 인해서 높기 때문에, 전체 사이클 시간은 적게, 즉, 6시간(h) 이내, 바람직하게는 3 시간(h) 이내, 더욱 바람직하게는 1.5 시간(h) 이내로 유지된다. 따라서, 통합된 시스템은 보조 용기가 충전되기 전에 다음 부하 사이클에 준비되어서, 반-연속적 작동이 가능하도록 디자인된다.
- [0173] 다음 표 2는 제조할 사람 혈액 응집 인자 VIII(대규모 데이터가 기재됨)의 분리를 위한 본 발명의 장치 B의 본 구체 예를 사용하는 방법의 예가 기재되어 있다. 본 발명은 특히 유익한 것으로 입증되었다. 각각의 흡착/탈착 사이클의 수율 및 성능은 전체 생성물 수율이 작은 생성물 체류 시간으로 인해서 10% 이상 증가하고 그에 의해서 생성물 분해를 최소화 하면서 배치와 유사하였다. 동일한 방법이 또한 크기 및 다른 특성 면에서 전장 FVIII과는 현저하게 상이한 B-도메인 삭제된 FVIII을 포함한 유전 조작된 FVIII 변이체의 분리에 아주 유리한 것으로 입증되었다. 이러한 방법은 다른 단백질 및 생분자의 생산에 유용한 것으로 기재된다.
- [0174] 크로마토그래피 원안 자체(완충액 화학구성 및 시퀀스, 부하 용적, 및 유속)가 각각의 개별적인 분자에 대해서 배치 크로마토그래피 실험에서 개발될 수 있으며, 본 발명의 장치의 구체 예와 함께 사용되도록 용이하게 전용될 수 있다.

## 표 2

- [0175] 연속적 관류 발효로부터 FVIII 및 FVIII 변이체를 연속적으로 분리하는 장치 B의 본 구체 예를 사용하는 방법의 예

파라미터	표적
연속적 관류의 수거물 유속 $Q_h$ [l/d]	2000
보조 용기: 최대 작업 용적 $V_s$ [l]	200
부하 용적[매트릭스 용적]	600
장치 B에 설치된 흡착제 매트릭스 용적[ml]	260
부하 유속[매트릭스 용적/분]	12
부하 용적[l]	156
부하 시간[분]	50
전체 크로마토그래피 시간[h](부하, 세척, 용리 및 몇 회의 재생/재평형 단계)	1.5
흡착제의 휴지시간/사이클[h]	0.372
사이클/24 시간	12.8
수거 시간[h]	1.872
장치에서의 대략적인 평균 생성물 체류시간(수거 시간 + 부하 시간 + 용리 시간)	2.7

- [0176] 각각의 개별적인 생성물 분자의 경우에, 수명 기준은, 예를 들어, 부하 동안의 압력, 또는 수거율을 기준으로



대류 흡착제 셋업에 대해서 정의된다. 전형적으로는, 최대 사이클 수  $n_{max}$ 가 특정화되고 입증된다. 흡착제 셋업이  $n_{max}$  사이클을 통해서 반-연속적 작동에서 이용되는 경우에, 시스템의 일체성 및 무균성에 영향을 주지 않으면서 또 다른 동일한 흡착제 셋업으로 대체된다. 본 구체 예에서, 이러한 대체는 매니폴드 및 무균 연결기를 사용함으로써, 또는 일회용 가요성 튜빙 및 무균 튜빙 용접을 이용함으로써 연속적인 무균 여과 셋업과 동일하게 수행된다.

[0177] 도 3의 우측에 도시된 본 발명의 장치의 구체 예를 이용하는 경우에, 무균의 완충 스트림, pH 조정 용액, 안정화제 용액 또는 주입용 물이 완충액 첨가 펌프(203)를 이용함으로써 무균 용기로부터 연속적으로 또는 간헐적으로 첨가된다. 따라서, cTCF의 조건은, 예를 들어, 이온 강도, pH, 안정화제의 첨가 등의 면에서 자유롭게 조절될 수 있다.

[0178] 본 발명의 이점

[0179] 본 발명의 장치 및 이러한 장치를 사용하는 방법은 앞서 개괄된 통상의 분리 방법의 문제를 해소시키고 있다(본 발명의 일반적인 배경).

[0180] 장치 A 및 B의 모든 구체 예 및 그러한 장치를 사용하는 각각의 방법에서, 가능한 유해 환경에서의 생성물 체류 시간은 특별히 최소화되며, 이는 본래 불안정한 복잡한 생물학적 생성물의 수율 및 품질을 현저하게 향상시킨다. 플랜트 용량이 증가될 수 있으며, 제품의 가격이 저하될 수 있다.

[0181] 또한, 장치 및 각각의 방법은 대량의 냉실 설비 또는 대량의 수거물 용적의 중간 저장을 위한 냉각된 용기를 필요로 하지 않아서, 플랜트 투자 비용을 감소시키고, 관류 발효의 콤팩트성 및 이동성 이점을 완전히 실현시킨다.

[0182] 본 발명의 장치 및 각각의 방법의 구체 예들은 본래의 높은 자동화도에 기인하여 통상의 노동 집약적 배치 과정에 비해서 노동력을 감소시킨다. 신규의 장치는 장시간에 걸쳐서 연속적인 작동, 즉 하루 24 시간 작동을 가능하게 하여, 용적 출력 및 장치 이용을 최대화한다.

[0183] 또한, 본 발명의 장치는 하나 이상의 발효기의 플랜트들에서의 논리적인 어려움이 없다. 구체 예는 하나 이상의 관류 발효로부터의 물질을 처리할 수 있다.

[0184] 중요하게는, 신규의 장치 및 방법은 완전하게 무균 작동되기 때문에, 미생물 부하 문제, 및 내독소 문제가 제거되는데, 이러한 사항은 무균 처리와 이에 이어지는 단순한 무균 여과에 의해서는 달성될 수 없다.

[0185] 또한, 본 발명의 장치는 일회용품의 사용으로 인해서 세정 확인의 요건을 피하거나 최소로 할 수 있다. 본 발명의 방법 및 장치의 독특한 특징에 의해서, 일회용 모듈, 및 튜빙, 백, 및 어셈블리가 장시간 동안(전체 회전의 시간까지) 각각 사용되고 있어서, 비용을 극적으로 저감시키고 경제적인 견지에서 아주 매력적인 일회용품의 사용을 가능하게 하고 있다.

[0186] 본 발명의 장치 A 및 B의 구체 예 및 각각의 방법은 재조합 혈액 응집 인자 VIII, 및 FVIII의 유전 조작된 변형, 예를 들어, 이로 한정되는 것은 아니지만, B-도메인 삭제된 FVIII의 제조에 특히 유용한 것으로 입증되었다. 그러나, 본 발명은 다른 단백질 및 생물학적 분자, 특히 복잡하고 본래 불안정한 단백질, 예컨대, 인자 VII, 인자 IX, 인자 X, 및 그 밖의 인자의 생산에 유사하게 유용한 것으로 명백하게 예상될 수 있다.

[0187] 장치 A 및 각각의 방법의 이점

[0188] 도 8은 통합된 연속적 입자 제거 엘리먼트(100)에 대해서 발명된 놀라운 필터 용량 증가 적용의 예를 도시하고 있다.

[0189] 도 10은, 전형적인 조건하에 모델 단백질에 의한 280nm에서의 보유물의 UV 흡착에 의해서 측정되는, 장치 A의 구체 예의 연속적인 UF 시스템(300)에서의 생성물의 전형적인 체류시간 분포 및 평균 체류시간을 나타내고 있다. 도면으로부터 알 수 있는 바와 같이, 시스템에서의 생성물의 평균 체류시간은 단지 약 40분이다. 따라서, 발효기 수거물 라인으로부터 최종 농축된 보유물(분리물)에 이르는, 장치 A의 본 구체 예에서의 생성물의 전체 체류시간은 1 내지 2 시간 이하로 유지된다. 이는 생성물(수거물)이 24시간 이상(몇 일까지) 동안 수거되고 그 후에 생성물이 통상적으로 4 내지 10 시간 이상 동안 처리되는 통상의 배치 분리 방법에서의 28 시간(h) 이상의 체류시간의 1/10 미만이다.

[0190] 도 11은 본 발명의 장치 A와 각각의 방법을 이용하여 혈장-단백질 유리 연속 관류 발효로부터의 재조합 혈액 응집 인자(rFVIII)의 생성되는 전체 분리 수율을 통상의 배치 분리 방법(배치 여과 및 배치 UF) 둘 모두에 대해서

비교하고 있다. 도면으로부터 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 방법은 현저하게 더 높은 생성물 수율을 달성시키고 있으며, 이는 증가된 제조 용량 및 감소된 제조 비용을 유도할 수 있다.

[0191] 장치 A를 이용하는 본 발명의 방법 동안에, 통합된 연속적인 한외여과 경막압은 시간에 따라서 증가하며, 비막유속(specific membrane flux)(리터/시간(h)/m<sup>2</sup>/bar)은 일정한 용적 출력으로 감소한다. 이는 모든 한외여과 과정에서 일반적이며, 농도 극성화, 겔층 형성 및 오염(fouling)과 같은 영향에 기인한다. 그러나, 배치 한외여과와는 대조적으로, 도 12에 도시된 예로부터 알 수 있는 바와 같이, 압력 및 비유속의 변화는 장치 A에서 극히 완만하여, 막이 세정되거나 교체될 필요가 있기 전에 한 번에 몇 주일 동안 연속적인 작동을 가능하게 한다. 또한, 시스템의 변화 속도와 전체 성능이 연속적인 관류 발효에서 생성된 생성물 또는 그에 사용된 세포주에 아주 민감하다(도 12). 따라서, 본 발명의 장치 A 및 각각의 방법은 또한 다양한 단백질의 신속한 생성에 대한 일반적인 플랫폼으로서 이상적으로 적합한데, 그 이유는 본 발명의 장치 A 및 각각의 방법이 상이한 세포주로부터의 다양한 표적 단백질로 강력하고 예측가능하게 수행되기 때문이다.

[0192] 놀랍게도, 본 발명의 발명자들은 겔 층 형성 및 오염의 부정적 영향이 사실 장치 A에 의해서 최소화되어서, 필터의 세정 또는 교체가 요구되기 전에, 설치된 한외필터 면적 당 더 많은 전체 용적이 처리될 수 있음을 발견하였다. 도 13은 장시간 작동에서의 본 발명의 장치 A의 높은 성능을 도시하고 있다. 약 25일 후에, 경막압은 놀랍게도 준정상 상태로 안정화된 듯하여, 더 긴 장시간 성능을 제시하고 있다. 27 일째에, 보유물 유속을 의도적으로 두 배로 하여 더 높은 출력 효과를 시험하였다. 34일 후에, 시스템의 개방 없이, 그로 인해서 완전한 시스템 통합성 및 무균성을 유지하면서, 무균 0.5M NaOH로 짧은 플러시(flush)를 수행하였다. 그 후에, TMP가 다시 안정화되거나 단지 극히 낮은 속도로 적어도 상승되었다. 70일의 연속적인 무균 작동 후에, 재순환 유속을 의도적으로 절반으로 저하시켜서 시스템 성능에 대한 효과를 시험하였다. 예측된 바와 같이, TMP는 감소된 질량 전달에 기인하여 다소 높은 속도로 증가하기 시작하였으며, 그 결과 막 표면에서의 벽 농도를 증가시키기 시작하였다. 그러나, 시스템을 중단시키기 전에 95일의 작동이 성공적으로 및 강력하게 완료되었다. 4500 리터에 달하는 전체 양이 최소의 수작업(단지 매일 샘플링하는 작업)으로 막 면적 m<sup>2</sup>당 처리되었다. 반면, 동일한 적용을 위한 최적화된 통상의 배치 한외여과 방법은 약 100 L/m<sup>2</sup>으로 45배 적은 부하 용량을 나타내며, 적어도 1 내지 2명의 상근 작업자를 요한다.

[0193] 또한 놀랍게도, 본 발명의 장치 A, 특히, 이의 통합된 연속 한외여과 시스템(300)의 선택성은 통상의 배치 과정의 선택성보다도 현저하게 더 높은 것으로 입증되었다. 당업자에게는 통상의 배치 한외여과의 경우에 과정의 초기 단계 동안에 보유된 거대분자에 의해서 명백한 분자량 컷 오프를 감소시키는 이차 막(겔 층)이 형성됨이 공지되어 있다. 결과는 표적 분자와 오염성의 작은 분자가 보유되어 동시 정제를 실질적으로 현저하게 불가능하게 하는 것으로 나타난다. 따라서, 통상의 배치 한외여과로는, 분자량 면에서 10배 작은 단백질을 분리하는 것이 거의 불가능하다. 그러나, 도 14로부터 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 통합된 연속적 한외 방법에 의하면, IL-2SA(약 16kD) 및 그런 형광 단백질 GFP(27-30kD)를 효율적으로 분리하도록 조건을 조절하는 것이 가능하다. 이러한 더 높은 예상 분리 성능은 동시 농축 및 정제를 가능하게 한다.

[0194] 장치 B와 각각의 방법의 이점

[0195] 도 15는 본 발명의 장치 B의 성능을 예시하고 있다. 시판중의 대류 흡착제(무스탕 Q, Pall Corporation, 15층 모듈)를 사용함으로써, 약 100 연속 흡착/탈착 사이클을 수행하여, 연속적인 관류 배양물로부터의 재조합 FVIII 변이체를 농축 및 정제하였다. 달성된 평균 수율은 약 95%(검정 변화의 합산 결과)이며, 압력은 수행된 전체 사이클에 걸쳐서 비교적 일정하게 유지되었다. 따라서, 적어도 100 연속 사이클이 흡착제 셋업을 교환하기 전에 수행될 수 있다는 것이 특징일 수 있다.

[0196] 본 발명의 장치 B를 사용하는 방법에 대한 상세한 설명에서 알 수 있는 바와 같이, 생성물이 적절한 완충액 중에 농축, 정제 및 안정화된 형태로 용리되기 전에, 본 구체 예에서의 생성물의 전체 평균 체류 시간은 3 시간 미만이다. 이는 매일 수행된 통상의 배치 분리 방법에서의 24 시간(h) 이상보다 현저하게 짧아서, 본래 불안정한 단백질 생성물의 현저하게 더 높은 수율을 유도한다. 상기된 본 구체 예에서, 약 13 사이클이 하루에 수행되며, 이는 도 15를 참조하면 반-연속적 흡착제 어셈블리가 작동의 무균성 및 연속성에 영향을 주지 않으면서 단지 7 내지 8일 마다 교체되어야 함을 의미한다.

[0197] 도 16은 장치 B에 의한 단일의 전형적인 흡착/탈착 및 재생 사이클에 대한 UV 및 전도성 프로파일의 예를 도시하고 있다. 450 초과의 흡착제 용적(CVs)이 부하될 수 있지만, 생성물은 아주 예리한 피크로 용리됨을 알 수 있



다. 오염물은 부하 단계 동안, 및 세척 및 스트립(재생 단계) 동안 흐름에서 현저하게 제거된다.

[0198] 도 17은 반-연속적 대류 흡착/탈착을 포함하는 본 발명의 방법의 정제 성능을 예시하고 있다. FVIII 변이체 분리물의 예시적인 SDS 파아지 겔이 나타나고 있다. 도면으로부터 알 수 있는 바와 같이, 95%의 부하된 FVIII 변이체(분리 활성 검정에 의해서 측정된 비율)를 포함하는 용리물 분획이 부하된 단백질보다 현저하게 더 적은 단백질을 함유하며, 그로 인해서 정제된다. 추가의 분해 밴드가 용리물(분리물)에서 보이지 않아서, 우수한 생성물 품질을 나타내고 있다.

[0199] 요약하면, 본 발명의 장치 B는 비교 가능한 배치 방법과 유사한 정제 성능을 달성할 수 있으며, 동시에 생성물 체류 시간을 최소화함으로써 인해서 본래 불안정한 단백질 생성물의 수율 손실을 최소화할 뿐만 아니라 생성물 품질 문제를 최소화 하고 있다. 동시에, 최소의 작업자 개입을 요하는 본 발명의 방법의 높은 자동화도에 기인하여 노동 비용이 현저하게 감소된다.

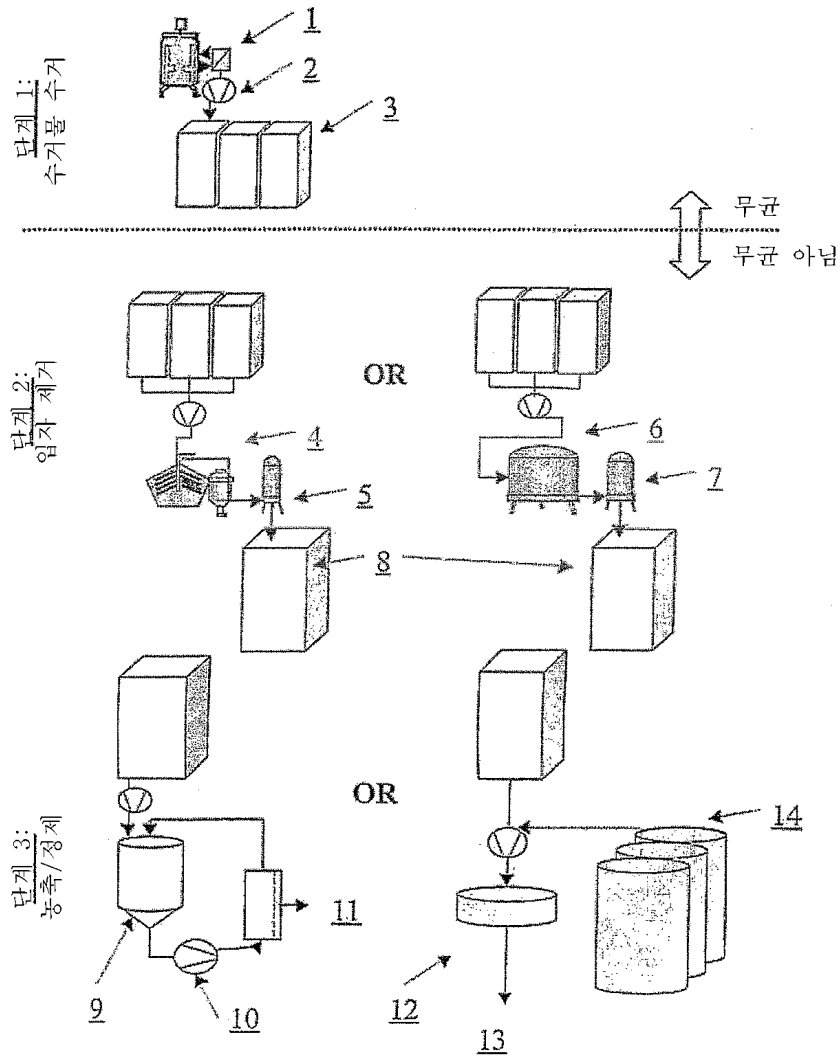
[0200] 상기 본 발명이 이해 목적으로 예시 및 예를 들어서 다소 상세하게 기재되어 있지만, 당업자에게는 특정의 변화 및 변경이 있을 수 있다는 것이 자명할 것이다. 따라서, 설명 및 예는 첨부된 청구범위에 의해서 정의되는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 구성되지 않아야 한다.

[0201] 따라서, 주어진 공급 스트림으로부터 목적 분자의 높은 수율을 유도하는 개선된 여과 방법을 제공하는 본 발명의 구체 예는 본 발명의 원리의 적용을 단지 예시하는 것으로 이해되어야 한다. 상기 설명으로부터 개시된 엘리먼트의 형태, 사용 방법 및 적용에서의 변화가 본 발명의 사상 및 첨부된 특허청구범위의 범위를 벗어나지 않으면서 가능할 수 있다는 것은 명백할 것이다.

도면

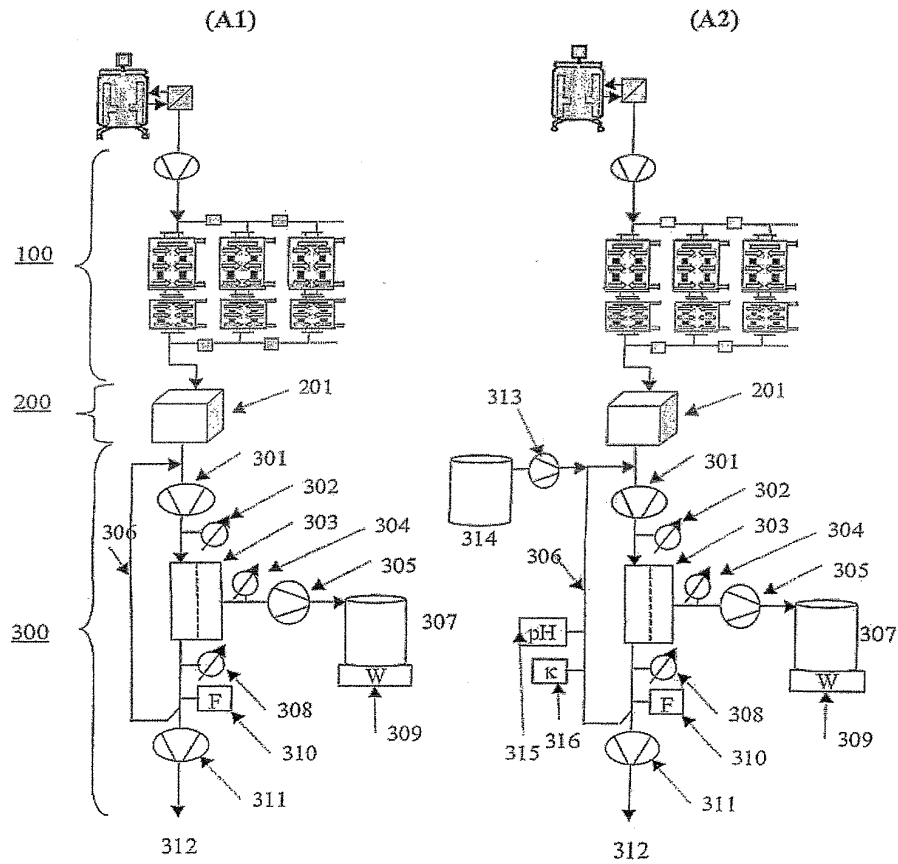
도면1

도 1: 통상적인 연속적 관류 과정과 그에 이어지는 3회의 물리적 및 논리적 분리 과정 단계(배치 수거물 수거, 배치 입자 제거 및 배치 농축/정제)에 대한 개략도.



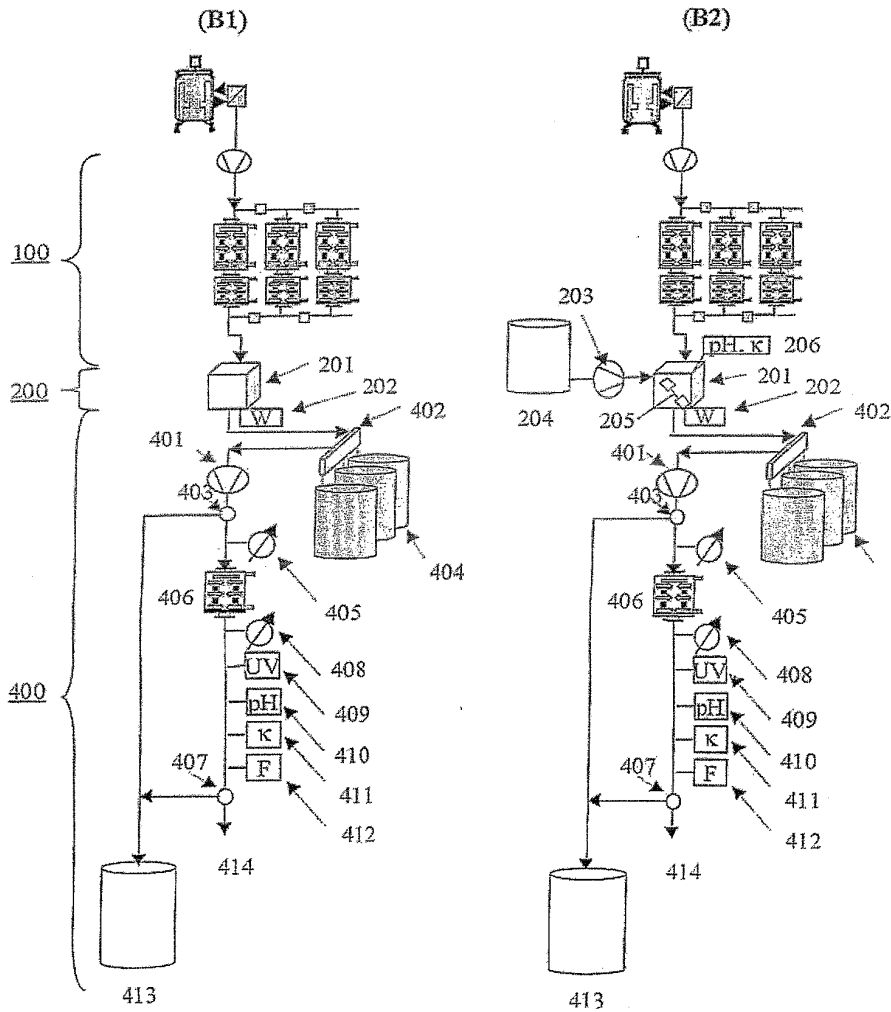
도면2

도 2: 연속적 통합된 및 무균 제조를 위한 본 발명의 장치 A의 2 가지 구체예의 개략도. 좌측에 도시된 구체예 A1의 개략도 및 우측에 도시된 구체예 A2의 개략도.



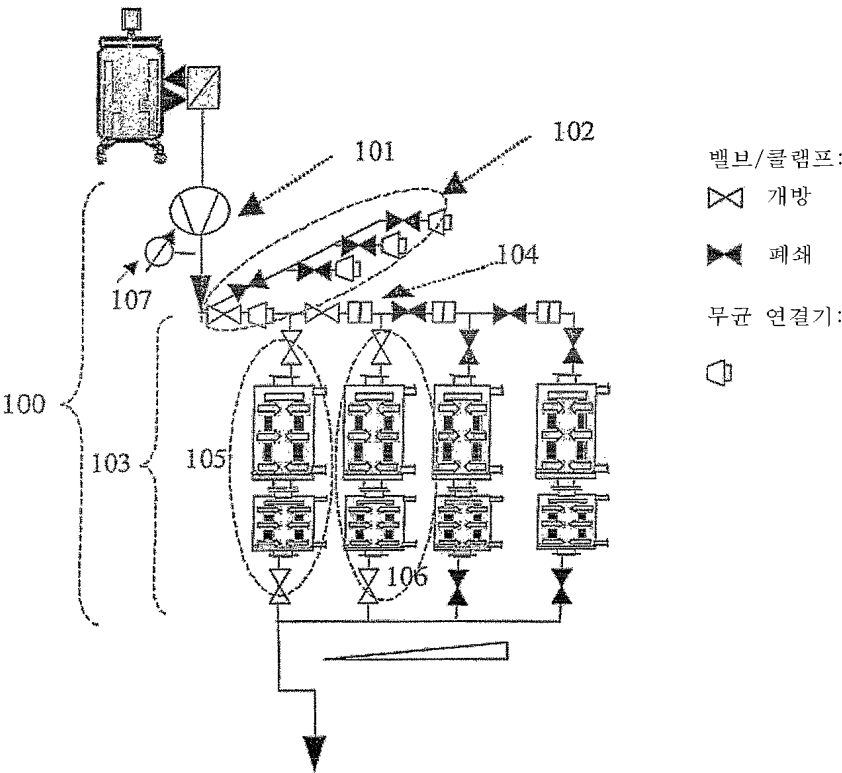
도면3

도 3: 연속적 통합된 및 무균 제조를 위한 본 발명의 장치 B의 2 가지 구체예의 개략도. 좌측에 도시된 구체예 B1의 개략도 및 우측에 도시된 구체예 B2의 개략도.



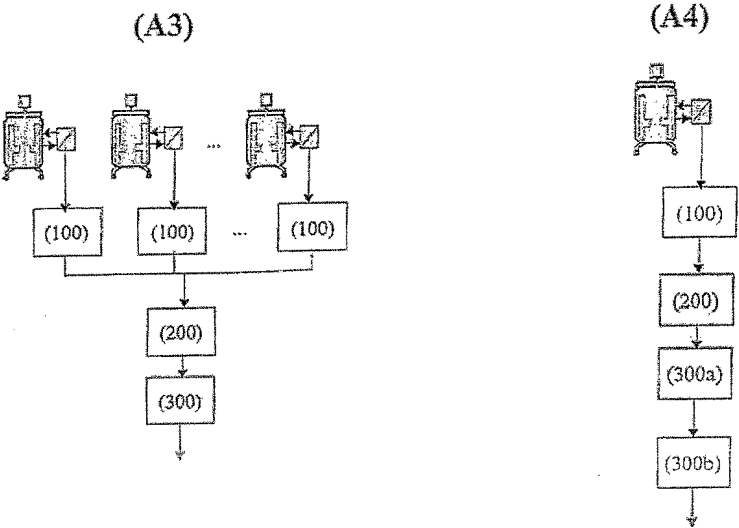
도면4

도 4: 본 발명의 통합된 연속적 입자 제거 시스템(100)의 구체 예, 즉, 본 발명의 장치 A 및 발명의 장치 B의 엘리먼트(element)의 개략도.



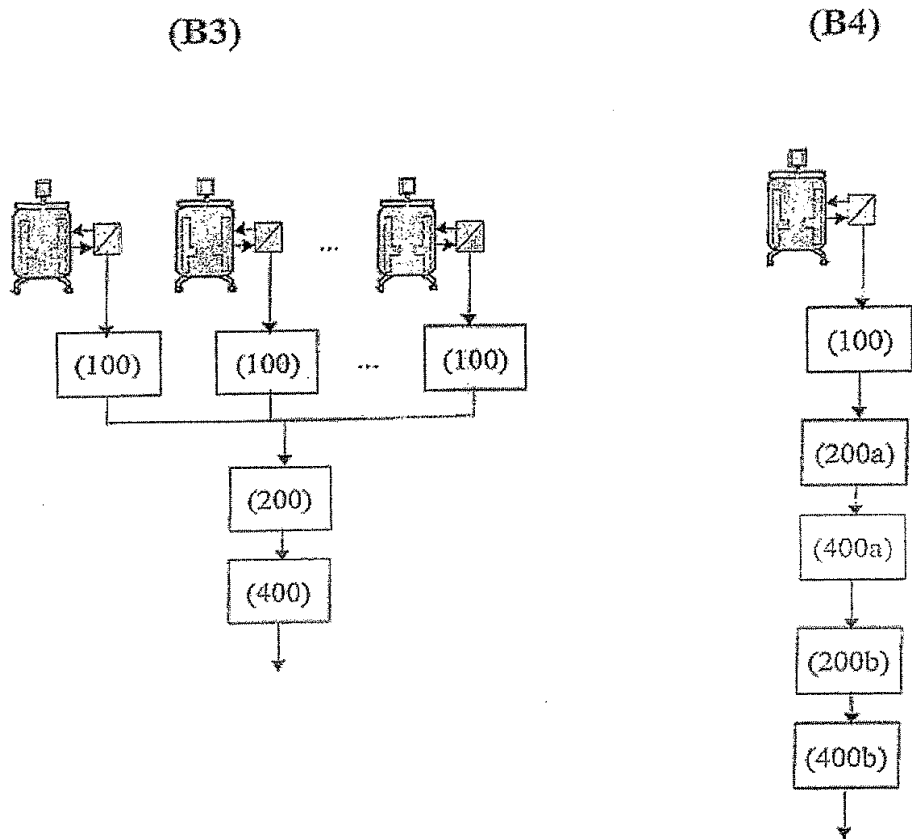
도면5

도 5: 다수의 구성요소를 조합하여 전체 플랜트의 용량(A3) 또는 농축 및 분리 성능(A4)을 향상시키는 본 발명의 장치 A의 추가적인 구체 예의 개략도.



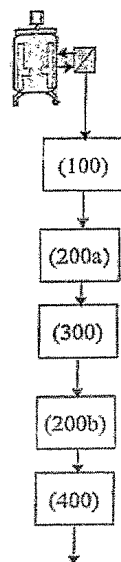
도면6

도 6: 본 발명의 장치 B의 추가의 구체 예의 개략도.



도면7

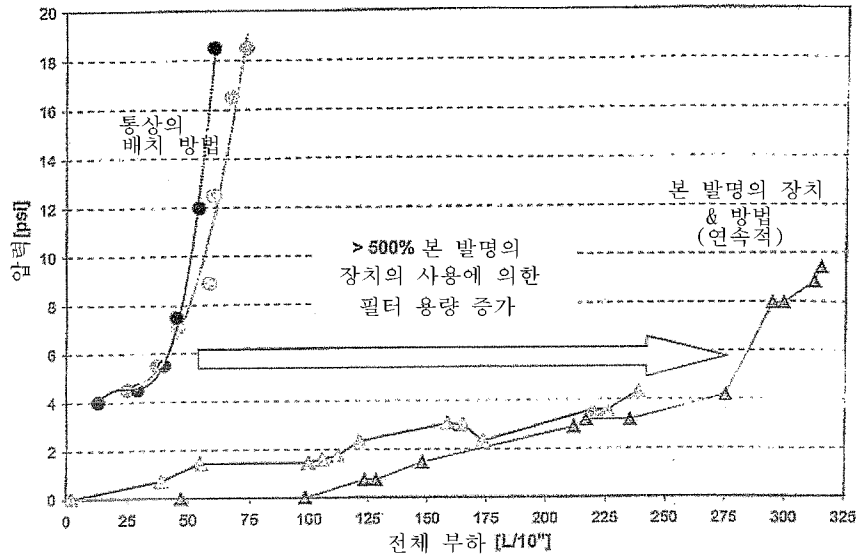
도 7: 장치 A 및 장치 B의 엘리먼트를 직렬로 조합하여 전체 농축 및 분리 성능을 향상시키는 본 발명의 장치의 추가의 구체 예.



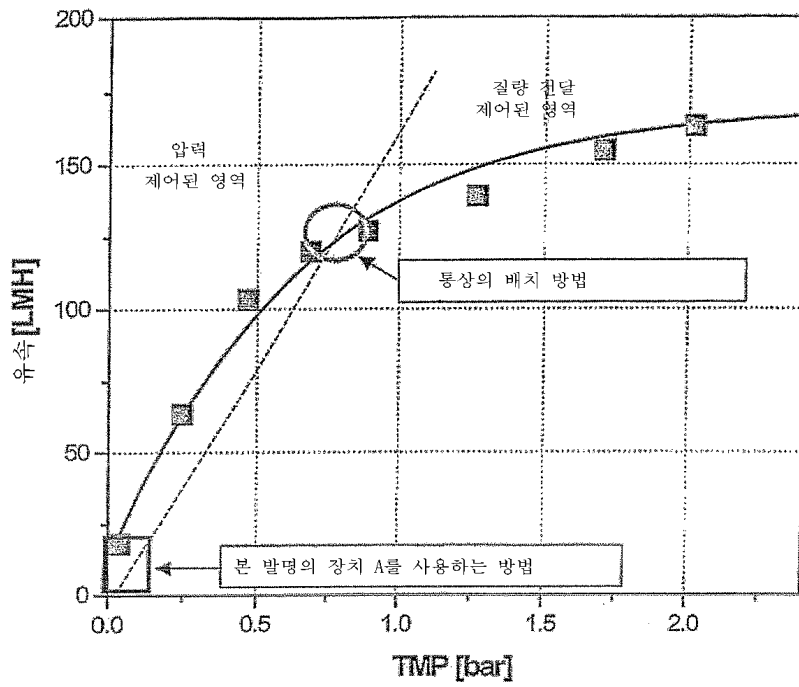


도면8

도 8: 통상의 배치 과정을 위한 필터 캡슐의 10" 당 전체 부하 용량과 동일한 시판 필터 캡슐을 사용한 연속적인 입자 제거(통합된 연속적 여과 과정)을 위한 본 발명의 장치 및 방법의 구체 예의 예시적인 비교. 제조함 혈액 응집 인자 VIII를 생성시키는 예시적인 방법이 도시됨.

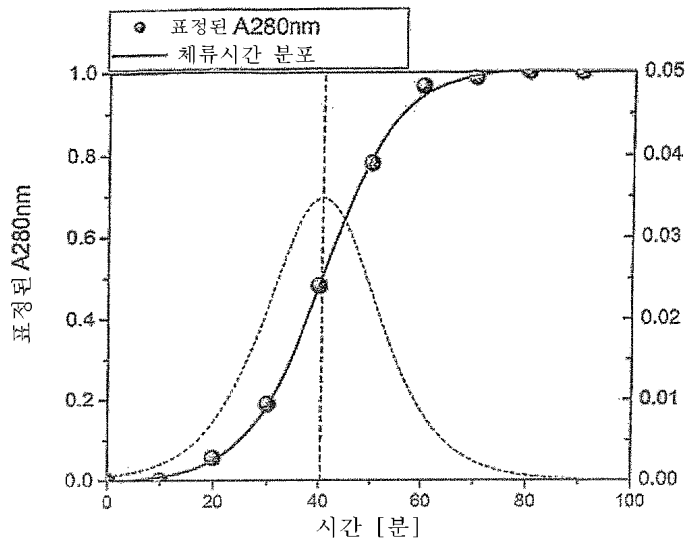


도면9



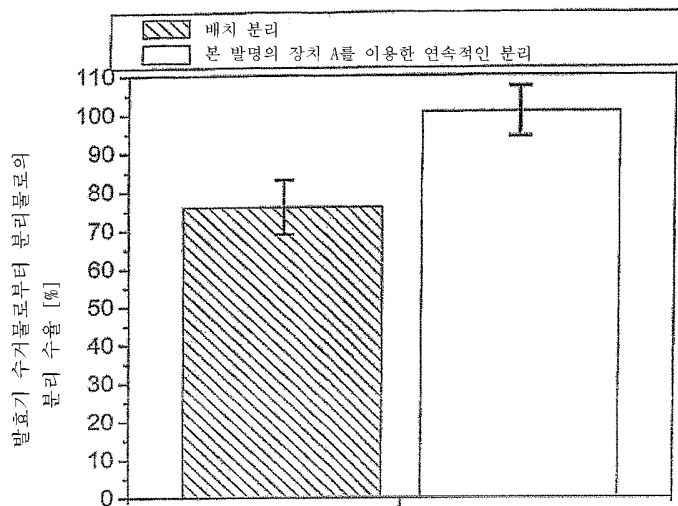
도 9: 압력-유속 곡선(경막 압력하 LMH=리터/시간(h)/m<sup>2</sup>의 비투과유속) 및 작동점의 측정에 대한 예. 원은 통상의 배치 과정에 대한 TMP를 통해서 조정될 수 있는 전형적인 작동점을 나타낸다. 사각형은 본 발명의 장치 A를 사용하는 방법에 관한 투과 펌프를 통해서 조정될 수 있는 바람직한 작동점을 나타낸다.

도면10



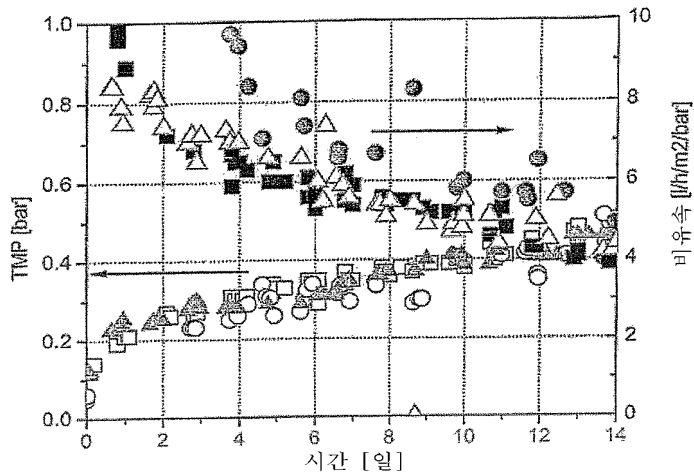
도 10: 본 발명의 장치 A를 사용하는 방법에 관한 통합된 연속 UF 시스템 (300)의 체류시간 분포 및 평균 체류시간의 예. 290cm<sup>2</sup> 모듈(62.5cm 길이), 120LMH 크로스플로우(crossflow), 0.2LMH 보유물 흐름, 2 LMH 투과물 흐름이 있는 일회용의 연속 시스템에 대해서 측정됨.

도면11



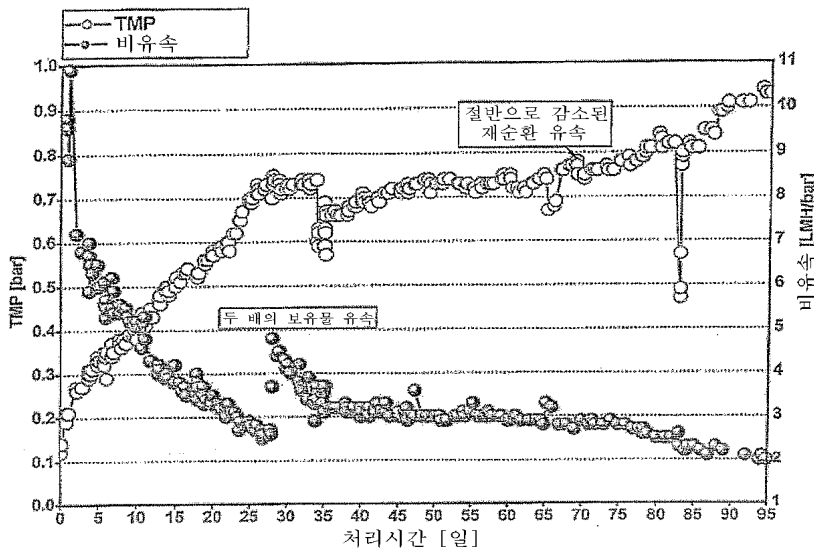
도 11: 본 발명의 장치 A의 구체 예를 사용한 플라즈마-단백질 없는 연속적인 관류 발효로부터의 rFVIII의 분리 예. 1의 표준 편차를 포함한 배치 분리의 평균 수율에 비한 본 발명의 연속적 방법의 평균 분리 수율의 비교. 3개의 연속적인 배치를 배치 수율을 결정하기 위해서 사용하였으며, 3 개의 연속점(일)을 연속적 과정을 위해서 이용하였다.

도면12



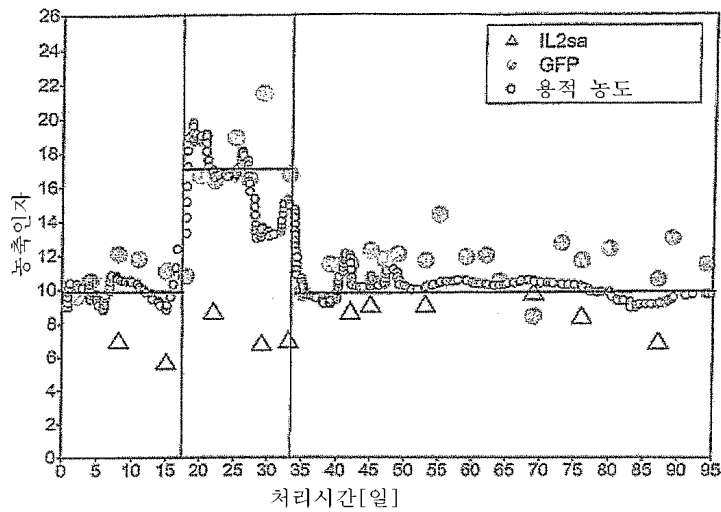
도 12: 본 발명의 장치 A의 성능에 대한 예. 3개의 상이한 예에 대한 연속적인 과정 시간의 함수로서 나타낸 통합된 한외여과 시스템(300)의 경막 압력 및 비유속(specific flux). 삼각형=100kD 막, 재조합 혈액 응집 인자 VIII(rFVIII); 사각=10kD 막, 재조합 인터루킨-2; 원=50kD 막, 유전조작된 당단백질(Mr>100kD). 나타낸 모든 예는 혈장 단백질 없는 연속적 관류 발효로부터의 예이다.

도면13



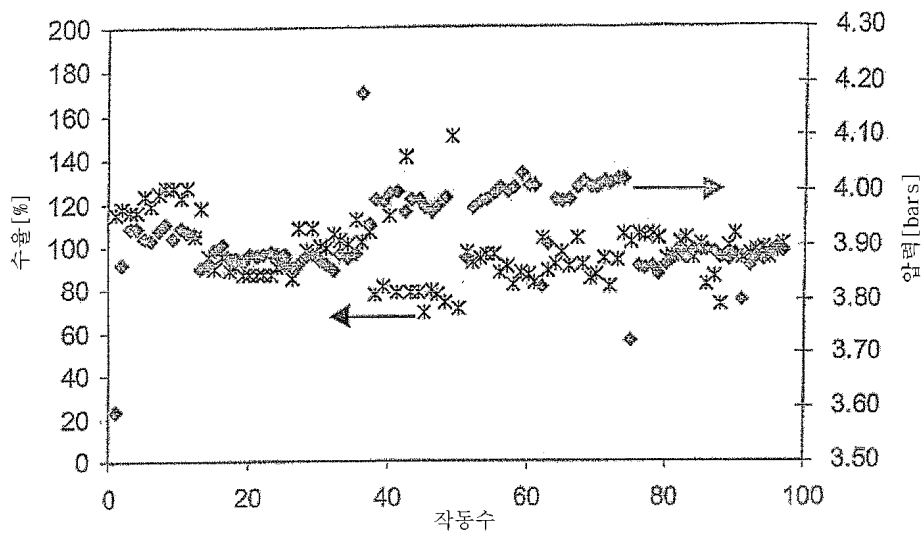
도 13: 세포주 공동-발현 2 단백질 생성물(그린 형광 단백질 GFP 및 IL-2SA)의 연속적 관류 발효에 직접 결합된 본 발명의 장치 A의 장시간 성능의 예. 연속적인 과정 시간의 함수로서 나타낸 본 발명의 연속적 한외여과 시스템(300)의 경막 압력 및 비유속(specific flux). 10kD 막이 사용되었다.

도면14



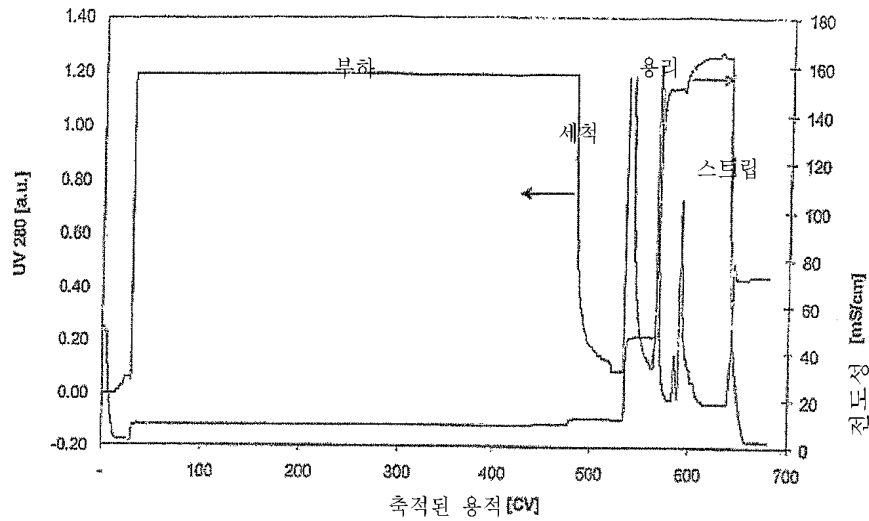
도 14: 세포주 공동-발현 2 단백질 생성물(그린 형광 단백질 GFP 및 IL-2SA)의 연속적 관류 발효에 직접 결합된 본 발명의 장치 A의 장시간 성능의 예. 10kD 막을 사용하였다. 특정의 검정에 의해서 측정된 단백질 생성물 둘 모두의 농도 인자, 및 연속적 과정 시간의 함수로 나타낸 용적 농축 인자.

도면15



도 15: 본 발명의 장치 B의 성능 예. 대류 흡착제를 사용한 100회에 가까운 연속적 흡착/탈착 사이클에 걸친 수율 및 압력 강하(표적 단백질: 유전 조작된 혈액 응집 인자 FVIII 변이체; 대류 흡착제: 시판중의 흡착제, 무스탕 Q(Mustang Q, Pall Corporation)).

도면16



도 16: 본 발명의 장치 B의 성능 예. 대류 흡착제를 사용한 전형적인 흡착/탈착 사이클 동안 UV 및 전도성 프로파일(표적 단백질: 유전 조작된 혈액 응집 인자 FVIII 변이체; 대류 흡착제: 시판중의 흡착제, 무스탕 Q(Mustang Q, Pall Corporation)).



도면17

도 17: 본 발명의 장치 B의 성능 예. 부하=입자 제거 시스템(100)에서 연속적으로 수거되며 대류 흡착제 시스템(400) 내로 반-연속적으로 부하되는 정화된 수거물의 SDS-파이지 겔(은(silver) 염색됨) 및 전형적인 흡착/탈착 용리물. (표적 단백질: 유전 조작된 혈액 응집 인자 FVIII 변이체; 대류 흡착제: 시판중의 흡착제, 무스탕 Q(Mustang Q, Pall Corporation)). 용리물은 겔상에서 작동전에 부하 농도로 다시 회석되었다.

