(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0154908
(43) 공개일자 2023년11월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/16 (2006.01) *B01D 15/18* (2006.01)
B01D 15/38 (2006.01) *C07K 1/36* (2006.01)
G01N 30/60 (2006.01) *G01N 30/88* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 1/16 (2013.01)
B01D 15/1885 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7033301
(22) 출원일자(국제) 2022년03월10일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년09월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/019697
(87) 국제공개번호 WO 2022/192504
국제공개일자 2022년09월15일
(30) 우선권주장
63/159,217 2021년03월10일 미국(US)

(71) 출원인
암젠 인크
미국 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크, 원 암젠 센터 드라이브
(72) 발명자
소이스 닐
미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스, 메일 스탑 28-5-에이, 원 암젠 센터 드라이브, 씨/오 암젠 인크.
코너 제레미 에스.
미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스, 메일 스탑 28-5-에이, 원 암젠 센터 드라이브, 씨/오 암젠 인크.
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

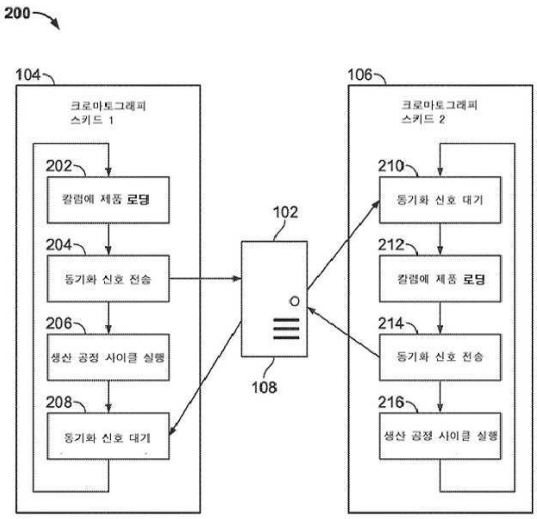
전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 **재조합 단백질의 정제 방법**

(57) 요 약

주어진 시간에 어떤 칼럼을 로딩할지 제어하는 자동화 제어와 병렬로 동작하는 칼럼을 갖는 2개 이상의 크로마토그래피 칼럼 스키드를 활용하는 병렬 크로마토그래피 시스템 및 연속 제조 방법이 본원에 기재되어 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
B01D 15/3804 (2013.01)
C07K 1/36 (2013.01)
G01N 30/6034 (2013.01)
G01N 30/88 (2020.05)
G01N 2030/8831 (2013.01)
(72) 발명자
헌터 글렌 엠.
미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스, 메일 스탑 28-5-에이, 원 암젠 센터 드라이브, 씨/오 암젠 인크.
슈메이커 케네스
미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스, 메일 스탑 28-5-에이, 원 암젠 센터 드라이브, 씨/오 암젠 인크.
와일리 브렛
미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스, 메일 스탑 28-5-에이, 원 암젠 센터 드라이브, 씨/오 암젠 인크.
플린 존 비.
미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스, 메일 스탑 28-5-에이, 원 암젠 센터 드라이브, 씨/오 암젠 인크.
캐오닐 나콘
미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스, 메일 스탑 28-5-에이, 원 암젠 센터 드라이브, 씨/오 암젠 인크.
웅우엔 투이 엔.
미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스, 메일 스탑 28-5-에이, 원 암젠 센터 드라이브, 씨/오 암젠 인크.
싱 싯다르스
미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스, 메일 스탑 28-5-에이, 원 암젠 센터 드라이브, 씨/오 암젠 인크.

명 세 서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 오염물로부터 재조합 단백질을 정제하기 위한 방법으로서,

상기 단백질에 친화성 크로마토그래피 단위 작업을 수행하는 단계;

상기 친화성 크로마토그래피 단위 작업으로부터의 용리 풀에 저 pH 바이러스 불활성화 및 중화를 수행하는 단계;

상기 중화된 풀에 하나 이상의 폴리싱 크로마토그래피 단위 작업을 수행하는 단계

를 포함하며,

상기 친화성 크로마토그래피 단위 작업 중 적어도 하나 및/또는 상기 하나 이상의 폴리시 크로마토그래피 단위 작업 중 적어도 하나는 크로마토그래피 공정의 하나 이상의 전체 사이클을 통해 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드의 동작을 제어하도록 구성된 병렬 크로마토그래피 공정에 따라 동작되고, 각각의 전체 사이클은 긴 단계 및 복수의 더 짧은 단계를 포함하고, 복수의 더 짧은 단계 각각은 상기 긴 단계의 처리 시간 이하의 처리 시간을 가지며, 상기 병렬 크로마토그래피 공정은,

상기 긴 단계가 완료되었음을 나타내는, 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 중 제1 크로마토그래피 칼럼 스키드와 연관된 동기화 신호를 병렬 크로마토그래피 시스템의 제어 회로에서 수신하는 단계; 및

상기 동기화 신호의 수신에 응답하여, 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 중 제2 크로파토그래피 칼럼 스키드의 동작을 상기 제어 회로를 이용하여 지시하여 상기 긴 단계의 동작을 개시하도록 하는 단계를 포함하는 것인, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 친화성 크로마토그래피 단위 작업은 상기 병렬 크로마토그래피 공정에 따라 수행되는 것인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 긴 단계는 상기 크로마토그래피 칼럼 스키드의 칼럼을 로딩하는 것을 포함하고, 상기 복수의 더 짧은 단계는, 평형화 단계, 하나 이상의 세척 단계, 용리 단계, 재생 단계, 또는 세척 단계 중 2개 이상을 포함하는 것인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 하나 이상의 폴리시 크로마토그래피 단위 작업 중 적어도 하나는 상기 병렬 크로마토그래피 공정에 따라 수행되는 것인, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 긴 단계는 상기 크로마토그래피 칼럼 스키드의 칼럼을 용리시키는 것을 포함하고, 상기 복수의 더 짧은 단계는, 평형화 단계, 로딩 단계, 하나 이상의 세척 단계, 재생 단계, 세척 단계 및 플러싱 단계 중 2개 이상을 포함하는 것인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 친화성 크로마토그래피 단위 작업과, 상기 하나 이상의 폴리시 크로마토그래피 단위 작업 중 적어도 하나는 모두 상기 병렬 크로마토그래피 공정에 따라 수행되는 것인, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 병렬 크로마토그래피 공정은 상기 동기화 신호를 수신한 후에 상기 크로마토그래피 공정의 전체 사이클을 완료하기 위해 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 중 상기 제1 크로마토그래피 칼럼 스키드에 대한 복수의 더 짧은 단계의 동작을 상기 제어 회로를 이용하여 지시하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 병렬 크로마토그래피 공정은,

상기 긴 단계가 완료되었다는 것을 나타내는, 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 중 제2 크로마토그래피 칼럼 스키드와 연관된 제2 동기화 신호를 상기 제어 회로에서 수신하는 단계; 및

상기 제2 동기화 신호의 수신에 응답하여, 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 중 제1 크로파토그래피 칼럼 스키드의 동작을 상기 제어 회로를 이용하여 지시하여 상기 긴 단계의 제2 동작을 개시하도록 하는 단계

를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 하나 이상의 폴리시 크로마토그래피 단위 작업 중 적어도 하나는 제2 포획 크로마토그래피 칼럼과 직렬로 접속된 제1 포획 크로마토그래피 칼럼을 이용한 제1 및 제2 폴리시 크로마토그래피 단위 작업을 포함하는 것인, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 하나 이상의 폴리시 크로마토그래피 단위 작업은 별도의 제1 및 제2 폴리시 크로마토그래피 단위 작업을 포함하는 것인, 방법.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서,

상기 제1 폴리시 크로마토그래피 단위 작업은 상기 제2 폴리시 크로마토그래피 단위 작업에 선행하거나 후속되는 것인, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 바이러스 불활성화 용리 풀은 전도도를 10 ms/cm 이하로 유지하면서 바이러스 불활성화 용리액 풀의 부피 팽창을 최소화할 수 있는 중화 완충액 시스템을 이용하여 중화되고, 상기 완충액 시스템은 목표 pH 범위에서 완충 능력을 갖지 않는 적정제 및 원하는 pH에서 완충이 이루어지는 완충제를 포함하는 것인, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 바이러스 불활성화는 30분 이상 소요되는 것인, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 중화된 풀에 심층 여과 작업을 수행하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 폴리시 크로마토그래피 단위 작업의 용리물에 대해, 한외여과/투석여과 단위 작업 또는 바이러스 여과 단위 작업 중 하나 이상을 수행하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 친화성 크로마토그래피 단위 작업은 단백질 A 크로마토그래피, 단백질 G 크로마토그래피 또는 단백질 L 크로마토그래피를 포함하는 것인, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 폴리시 크로마토그래피 단위 작업 중 적어도 하나는 양이온 교환 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피, 다중-모드 크로마토그래피 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피를 포함하는 것인, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

분리되고 정제된 관심 재조합 단백질을 생산하는 방법을 포함하는 방법.

청구항 19

제18항에 따른 분리되고 정제된 관심 재조합 단백질.

청구항 20

제18항에 따른 분리되고 정제된 관심 재조합 단백질을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 21

최소 부피 팽창으로 바이러스 불활성화 풀을 표적 pH로 중화하기 위한 시스템으로서,

표적 pH 범위에서 완충 능력을 갖지 않는 적정제; 및

표적 pH에서 완충이 이루어지는 완충제

를 포함하고,

상기 중화된 바이러스 불활성화 용리 풀의 전도도는 10 ms/cm 이하로 유지되는 것인, 시스템.

청구항 22

제21항에 있어서,

상기 적정제는 7보다 큰 pKa를 가지며, 상기 완충제는 4.5 내지 6.0 범위의 pKa를 갖는 것인, 시스템.

청구항 23

제21항에 있어서,

상기 적정제는 아세테이트이고, 상기 완충제는 트리스 염기인, 시스템.

청구항 24

제21항에 있어서,

상기 적정제는 0.1 M 초과 및 0.3 M 미만의 범위의 아세트산나트륨 내에 있는 것인, 시스템.

청구항 25

제21항에 있어서,

상기 완충제는 0.00005 M 초과 및 0.2 M 미만의 범위의 트리스 염기 내에 있는 것인, 시스템.

청구항 26

제21항에 있어서,

상기 바이러스 불활성화 풀은 pKa가 4 미만인 산을 포함하는 완충액을 사용하여 친화성 크로마토그래피 칼럼을 용리하여 pH가 3.6±0.1 이하인 바이러스 불활성화 용리 풀을 생성함으로써 얻어지는, 시스템.

청구항 27

제21항에 있어서,

상기 바이러스 불활성화 풀은 3.6±0.1 이하의 pH를 가지며, 적어도 50 mM 내지 적어도 150 mM의 농도, 3.3 내지 3.5 범위의 pH, 및 2.1 CV 내지 7.7 CV의 친화성 크로마토그래피 풀 양을 포함하는 완충액을 사용하여 친화성 크로마토그래피 칼럼을 용리함으로써 얻어지는, 시스템.

청구항 28

제27항에 있어서,

상기 바이러스 불활성화 풀은 3.6±0.1 이하의 pH를 가지며, 100 mM의 농도, 3.3 내지 3.5 범위의 pH, 2.75 CV 내지 4.25 CV의 친화성 크로마토그래피 풀 양을 포함하는 완충액을 사용하여 친화성 크로마토그래피 칼럼을 용리함으로써 얻어지는, 시스템.

청구항 29

제21항에 있어서,

상기 중화 완충액 시스템은 관심 단백질의 정제를 위한 연속 흐름 공정에서 사용되는 것인, 시스템.

청구항 30

제21항에 있어서,

상기 중화는 소정 비율의 바이러스 불활성화 풀 재료와 상기 중화 완충액 시스템을 정적 혼합기 내로의 유입에 의해 혼합함으로써 달성되는 것인, 시스템.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 2021년 3월 10일자로 출원된 미국 가출원 번호 제63/159,217호에 대한 우선권을 주장하며, 그 전체 내용은 본원에 참조로 명시적으로 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 개시내용은 일반적으로 크로마토그래피 시스템에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 반연속 및 연속 제조 크로마토그래피 시스템에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 연속 제조(CM), 특히 연속 정제 작업은 두 개 이상의 칼럼 크로마토그래피 작업(chromatography operation)을 갖는 많은 바이오 제조 공정의 목표이다. 전통적인 크로마토그래피 작업에서는, 통상적으로 12,000 L 이상, 칼럼 직경 1 m 이상의 단일 대형 크로마토그래피 칼럼에서, 전체 배치(batch)를 여러 사이클로 처리한다. 단일 대형 크로마토그래피 칼럼에서 처리하고, 다음 배치 작업 전에 풀 탱크(pool tank)에서 전체 제품 질량을 회수하는 것은 처리 시간과 공정 기간을 증대시키고, 상대적으로 크고 유연성이 떨어지는 시설 설치 공간(footprint)을 필요로 하며, 단백질 A와 같은 크로마토그래피 재료에 대한 비용을 증가시키고, 완충액 및 기타 시약의 양을 증대시켜, 전체 비용을 증대시키고 환경에 더 큰 영향을 미칠 수 있다.

[0006] 이러한 과제를 극복하기 위해, 크로마토그래피 작업을 위한 다양하고 복잡한 다중-칼럼 순환 전략(cycling strategy)이 개발되어 보다 연속적인 재료 생산을 제공함으로써, 수지 활용도를 개선하고 불순물 분해능의 일부 개선이 이루어졌다. 그러한 방법 중 하나인 폐쇄 루프 시뮬레이션 이동층 다중-칼럼 시스템(closed loop simulated moving bed multi-column system)은 공정 이점을 달성하기 위해 복잡한 밸브 구성과 정교한 제어 전략을 필요로 한다. 연속 제조를 위해 개발된 또 다른 다중-칼럼 전략은 순차적 다중-칼럼 크로마토그래피이며, 그 한 가지 예로 주기적 역류 크로마토그래피(periodic counter-current chromatography; PCC)가 있다. 이는 칼럼 사이의 관류 구성(flow-through configuration)에서 칼럼 오버로딩(overloading)을 활용하는 직렬 접속된 여러 칼럼을 채용하며, 본질적으로 배치 크로마토그래피를 더 작은 단위로 분리하여, 이를 연속적이고 순차적으로 처리한다.

[0007] 기존의 대규모 단일 칼럼 셋업과 비교하여 이러한 다중-칼럼 셋업의 한 가지 차이점은 제1 칼럼을 오버로딩함으로써 수지 재료가 더 완전히 로딩될 수 있고, 공급원료 내의 임의의 비결합 단백질이 파손되어, 직렬 접속된 다음 칼럼으로 흐른다는 것이다. 상기 오버로딩된 칼럼은, 다음의 접속된 칼럼이 오버로딩되는 동안, 용리되어 재생될 수 있다. 그러나 이러한 셋업은 작업이 복잡하고 비용이 많이 들며, 하나의 접속된 칼럼에서 다음 칼럼으로 유체 흐름을 안내하기 위해 칼럼과 밸브 시스템 사이에 수많은 복잡한 상호 접속을 필요로 하고, 이러한 연속적인 직렬 흐름을 모니터하고 처리하기 위해 추가로 자외선(UV) 모니터, 펌프 및 변환기를 필요로 한다. 대규모 바이오 의약품 제조 작업에서는, 이러한 복잡성으로 인해 공정 안정성, 세정 효율성이 떨어지고, 일회용 기술 채택이 제한될 수 있다. 예를 들어, 단일 단위 작업 내에서 PCC 공정을 구성하면, 특히 일회용 유로를 가능하게 하는 장비를 채택하는 경우, 기존 단일 칼럼 크로마토그래피 단위 작업에 비해 자본 장비의 비효율적인 활용과 유연성 손실이 발생한다.

[0008] 내결함성(fault tolerance)은 접속된 다중-칼럼 시스템에, 특히 두 개 이상의 단위 작업이 상호 접속되어 단일 스키드 내에 포함된 경우에도 문제가 된다. 이러한 구성 요소와 유로의 상호 접속은 단위 작업과 제조 공정 전체에 큰 영향을 미칠 수 있다. 상호 접속된 시스템의 구성 요소가 영향을 받으면, 전체 단위 작업이 중단될 수 있으며 이때까지의 전체 조업이 손실될 수 있다.

[0009] 이러한 단점을 극복하기 위해, 본원에 설명된 발명은, 장비 및 소프트웨어 구성이 소규모이고, 플랫폼 친화적이며, 모듈화되고, 유닛은 직렬 구성이 아닌 병렬로 동작되도록 동작 모드를 정의함으로써, 유연하고 확장 가능하고 외부 제어에 의해 동작되며 복잡한 셋업 및 재료 흐름을 필요로 하지 않는 시스템을 제공한다. 또한 설명된 시스템은 단일 유닛이 동작할 수 없는 경우, 전체 조업이 손실되는 일 및/또는 중단되는 일이 없이, 단일 칼럼만 영향을 받고 용이하게 격리 및 추출될 수 있다는 점에서 다중-칼럼 직렬 유닛에 비해 뛰어난 내결함성을 나타낸다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0010] 제1 양태에 따르면, 각각이 독립적인 배치 처리에 적합한 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드를 포함하는 연속 병렬 크로마토그래피 시스템이 본원에서 설명된다. 각각의 크로마토그래피 칼럼 스키드는 크로마토그래피 칼럼, 상류 공급원에 선택적으로 연결된 입구, 적어도 하나의 펌프, 적어도 하나의 필터 및 출구 센서를 포함한다. 상기 시스템은 크로마토그래피 공정의 하나 이상의 전체 사이클을 통해 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드

의 동작을 제어하도록 구성된 제어 회로를 추가로 포함하며, 여기서 각각의 전체 사이클은 긴 단계 및 복수의 더 짧은 단계를 포함하며, 복수의 더 짧은 단계 각각은 긴 단계의 처리 시간 이하의 처리 시간을 갖는다. 상기 제어 회로는 긴 단계가 완료되었음을 나타내는, 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 중 제1 크로마토그래피 칼럼 스키드와 연관된 동기화 신호를 수신하고, 이 동기화 신호의 수신에 응답하여, 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 중 제2 크로파토그래피 칼럼 스키드의 동작을 지시하여 상기 긴 단계의 동작을 개시하도록 구성된다.

[0011] 일부 형태에서, 상기 제어 회로는 상기 동기화 신호를 수신한 후에 상기 크로마토그래피 공정의 전체 사이클을 완료하기 위해 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 중 상기 제1 크로마토그래피 칼럼 스키드에 대한 복수의 더 짧은 단계의 동작을 지시하도록 구성될 수 있다. 이들 형태에서, 상기 제어 회로는 상기 긴 단계가 완료되었다는 것을 나타내는, 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 중 제2 크로마토그래피 칼럼 스키드와 연관된 제2 동기화 신호를 수신하고, 이 제2 동기화 신호의 수신에 응답하여, 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 중 제1 크로파토그래피 칼럼 스키드의 동작을 지시하여 상기 긴 단계의 제2 동작을 개시하도록 추가로 구성될 수 있다. 또 다른 형태에서, 상기 제어 회로는 상기 제2 동기화 신호를 수신한 후에 상기 크로마토그래피 공정의 전체 사이클을 완료하기 위해 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 중 상기 제2 크로마토그래피 칼럼 스키드에 대한 복수의 더 짧은 단계의 동작을 지시하도록 구성될 수 있다.

[0012] 상기 형태 중 임의의 형태에 있어서, 상기 긴 단계는 상기 크로마토그래피 칼럼에 대한 용리(eluting) 단계일 수 있으며, 여기서 상기 복수의 더 짧은 단계는, 평형화(equilibration) 단계, 로딩(loading) 단계, 하나 이상의 세척 단계, 재생 단계, 또는 플러싱(flushing) 단계 중 2개 이상을 포함할 수 있고, 및/또는 상기 긴 단계는 상기 크로마토그래피 칼럼에 대한 로딩 단계일 수 있으며, 여기서 상기 복수의 더 짧은 단계는, 평형화 단계, 하나 이상의 세척 단계, 용리 단계, 재생 단계, 또는 세척 단계 중 2개 이상을 포함할 수 있다. 상기 긴 단계가 로딩 단계인 형태에 있어서, 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 중 제1 크로마토그래피 칼럼 스키드는 상기 상류 공급원으로부터 공급원료의 공급을 수용하고, 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 중 제1 크로마토그래피 칼럼의 크로마토그래피 칼럼 내의 공급원료의 로딩이 완료되었음을 나타내는 동기화 신호를 상기 제어 회로에 전송하도록 구성될 수 있으며, 상기 동기화 신호의 수신에 응답하여, 상기 제어 회로는 상기 공급원료의 공급을 상류 공급원으로부터 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 중 제2 크로마토그래피 칼럼 스키드로 전환하여, 상기 크로마토그래피 칼럼에 대한 로딩 단계를 수행하도록 구성된다. 이러한 형태에서, 상기 제어 회로는 하나 이상의 처리 공급원료의 공급을 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 중 제1 크로마토그래피 칼럼 스키드로 보내어 상기 로딩된 크로마토그래피 칼럼에 대해 상기 짧은 단계의 처리를 수행하도록 구성될 수 있으며, 원한다면 상기 로딩된 크로마토그래피 칼럼에 대한 짧은 단계의 처리의 완료 후에, 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 중 제1 크로마토그래피 칼럼 스키드는 상기 크로마토그래피 칼럼에 대한 로딩 단계가 완료된 것을 나타내는, 상기 제2 크로마토그래피 칼럼 스키드와 연관된 제2 동기화 신호의 생성을 기다리도록 구성될 수 있다. 이들 형태 중 임의의 형태에 있어서, 상기 공급원료는 단백질, 항체, 다중특이적 단백질, 이중특이적 단백질 또는 이중특이적 T 세포 인게이저일 수 있고, 및/또는 상기 공급원료의 상류 공급원은, 채취 세포 배양액의 스트림 또는 풀, 포획 크로마토그래피 칼럼(capture chromatography column)으로부터의 용리 스트림 또는 풀, 포획 크로마토그래피 칼럼으로부터의 바이러스 불활성화 풀(viral inactivated pool), 또는 포획 크로마토그래피 칼럼으로부터의 중화된 바이러스 불활성화 풀 중 하나일 수 있다.

[0013] 상기 형태 중 임의의 형태에 있어서, 상기 복수의 크로마토그래피 스키드의 크로마토그래피 칼럼은 포획 크로마토그래피 칼럼일 수 있다. 상기 포획 크로마토그래피 칼럼은, 친화성(affinity) 크로마토그래피 칼럼, 크기 배제(size exclusion) 크로마토그래피 칼럼, 이온 교환 크로마토그래피 칼럼, 소수성 상호작용 크로마토그래피 칼럼, 다중-모드(multi-modal) 크로마토그래피 칼럼, 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite) 크로마토그래피 칼럼 또는 고정화 금속 친화성(immobilized metal affinity) 크로마토그래피 칼럼 중 하나 이상일 수 있다. 상기 포획 크로마토그래피 칼럼은 단백질 A 크로마토그래피 칼럼, 단백질 G 크로마토그래피 칼럼 또는 단백질 L 크로마토그래피 칼럼으로 구성된 친화성 크로마토그래피 칼럼일 수 있다. 상기 포획 크로마토그래피 칼럼은 양이온 교환 크로마토그래피 칼럼 또는 음이온 교환 크로마토그래피 칼럼으로 구성된 이온 교환 크로마토그래피 칼럼일 수 있다.

[0014] 상기 형태 중 임의의 형태에 있어서, 상기 시스템은 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드의 하류에 유체 접속된 바이러스 여과 장치 및/또는 한외여과(ultrafiltration) 장치 중 적어도 하나를 포함할 수 있으며; 상기 제어 회로는 서로 통신하는 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 각각의 복수의 컨트롤러 또는 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 각각과 통신하는 중앙 컨트롤러일 수 있으며; 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드의 크로마토그래피 칼럼은 서로에 대해 복수의 상이한 크기를 가질 수 있으며; 또는 상기 복수의 크로마토

그래피 칼럼 스키드의 하나 이상의 크로마토그래피 칼럼은 일회용 크로마토그래피 칼럼일 수 있다.

[0015] 상기 형태 중 임의의 형태에 있어서, 상기 시스템은 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드의 하류에 유체 연결된 하나 이상의 회수 탱크 및/또는 하류 포획 크로마토그래피 칼럼을 포함할 수 있다. 일부 형태에서, 상기 하류 크로마토그래피 칼럼은 이온 교환 크로마토그래피 칼럼, 소수성 상호작용 크로마토그래피 칼럼, 다중-모드 크로마토그래피 칼럼 또는 하이드록시아파타이트 크로마토그래피 칼럼일 수 있다. 상기 하류 크로마토그래피 칼럼은 양이온 교환 또는 음이온 교환 칼럼일 수 있다. 추가 형태에서, 상기 하류 크로마토그래피 칼럼은 제1 하류 크로마토그래피 칼럼일 수 있고, 상기 시스템은 상기 제1 하류 크로마토그래피 칼럼과 직렬로 직접 접속된 제2 하류 크로마토그래피 칼럼을 포함할 수 있으며, 여기서 상기 제1 및 제2 하류 크로마토그래피 칼럼은 양이온 및/또는 음이온 교환 칼럼일 수 있다. 다른 형태에서, 상기 하류 크로마토그래피 칼럼은 제1 하류 크로마토그래피 칼럼일 수 있고, 상기 시스템은 제2 하류 크로마토그래피 칼럼을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 상기 제1 및 제2 하류 크로마토그래피 칼럼은 각각 상기 제1 및 제2 하류 크로마토그래피 칼럼 스키드 상에 배치되고, 상기 제1 및 제2 하류 크로마토그래피 칼럼 스키드는 각각 독립적인 배치 처리에 적합하고, 입구, 적어도 하나의 펌프, 적어도 하나의 필터 및 출구 센서를 포함한다. 이들 형태에서, 상기 제어 회로는 하류 크로마토그래피 공정의 하나 이상의 전체 사이클을 통해 상기 제1 및 제2 하류 크로마토그래피 칼럼 스키드의 동작을 제어하도록 구성될 수 있고, 각각의 전체 사이클은 긴 용리 단계 및 복수의 더 짧은 단계를 포함하며, 복수의 더 짧은 단계 각각은 긴 용리 단계의 처리 시간 이하의 처리 시간을 가지며, 상기 제어 회로는, 상기 긴 용리 단계가 완료되었음을 나타내는, 상기 제1 하류 크로마토그래피 칼럼 스키드와 관련된 동기화 신호를 수신하고, 이 동기화 신호의 수신에 응답하여 상기 제2 크로마토그래피 칼럼 스키드의 동작을 지시하여 상기 긴 용리 단계의 동작을 개시하도록 구성될 수 있다.

[0016] 제2 양태에 따르면, 하나 이상의 오염물로부터 재조합 단백질을 정제하기 위한 방법이 기술되며, 상기 방법은 상기 단백질에 친화성 크로마토그래피 단위 작업을 수행하고, 상기 친화성 크로마토그래피 단위 작업으로부터의 용리 풀(elution pool)에 저 pH 바이러스 불활성화 및 중화를 수행하고, 상기 중화된 풀에 하나 이상의 폴리싱 크로마토그래피 단위 작업을 수행하는 것을 포함한다. 상기 친화성 크로마토그래피 단위 작업 중 적어도 하나 또는 상기 하나 이상의 폴리시 크로마토그래피 단위 작업 중 적어도 하나는 크로마토그래피 공정의 하나 이상의 전체 사이클을 통해 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드의 동작을 제어하도록 구성된 병렬 크로마토그래피 공정에 따라 동작되고, 각각의 전체 사이클은 긴 단계 및 복수의 더 짧은 단계를 포함하고, 복수의 더 짧은 단계 각각은 상기 긴 단계의 처리 시간 이하의 처리 시간을 갖는다. 상기 병렬 크로마토그래피 공정은, 상기 긴 단계가 완료되었음을 나타내는, 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 중 제1 크로마토그래피 칼럼 스키드와 연관된 동기화 신호를 병렬 크로마토그래피 시스템의 제어 회로에서 수신하는 단계와, 이 동기화 신호의 수신에 응답하여, 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 중 제2 크로파토그래피 칼럼 스키드의 동작을 상기 제어 회로를 이용하여 지시하여 상기 긴 단계의 동작을 개시하도록 하는 단계를 포함한다.

[0017] 일부 형태에서, 상기 친화성 크로마토그래피 단위 작업은 상기 병렬 크로마토그래피 공정에 따라 수행되고, 추가 형태에서, 상기 긴 단계는 상기 크로마토그래피 칼럼 스키드의 칼럼을 로딩하는 것일 수 있고, 상기 복수의 더 짧은 단계는, 평형화 단계, 하나 이상의 세척 단계, 용리 단계, 재생 단계, 또는 세척 단계 중 2개 이상을 포함할 수 있다. 다른 형태에서, 상기 하나 이상의 폴리시 크로마토그래피 단위 작업 중 적어도 하나는 상기 병렬 크로마토그래피 공정에 따라 수행될 수 있고, 추가 형태에서, 상기 긴 단계는 상기 크로마토그래피 칼럼 스키드의 칼럼을 용리시키는 것일 수 있고, 상기 복수의 더 짧은 단계는, 평형화 단계, 로딩 단계, 하나 이상의 세척 단계, 재생 단계, 세척 단계 및 플러싱 단계 중 2개 이상을 포함할 수 있다. 또 다른 형태에서, 상기 친화성 크로마토그래피 단위 작업과, 상기 하나 이상의 폴리시 크로마토그래피 단위 작업 중 적어도 하나는 모두 상기 병렬 크로마토그래피 공정에 따라 수행될 수 있다.

[0018] 일부 형태에서, 상기 병렬 크로마토그래피 공정은, 상기 동기화 신호의 수신 후에, 상기 제어 회로를 이용하여 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 중 제1 크로마토그래피 칼럼 스키드에 대하여 상기 복수의 더 짧은 단계의 동작을 지시하여 상기 크로마토그래피 공정의 전체 사이클을 완료하는 단계를 포함할 수 있고, 추가의 형태에서, 상기 병렬 크로마토그래피 공정은, 상기 긴 단계가 완료되었다는 것을 나타내는, 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 중 제2 크로마토그래피 칼럼 스키드와 연관된 제2 동기화 신호를 상기 제어 회로에서 수신하는 단계와, 이 제2 동기화 신호의 수신에 응답하여, 상기 복수의 크로마토그래피 칼럼 스키드 중 제1 크로파토그래피 칼럼 스키드의 동작을 상기 제어 회로를 이용하여 지시하여 상기 긴 단계의 제2 동작을 개시하도록 하는 단계를 포함할 수 있다.

[0019] 일부 형태에 있어서, 상기 방법은 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 상기 하나 이상의 폴리시 크로마토그래

피 단위 작업 중 적어도 하나는 제2 포획 크로마토그래피 칼럼과 직렬로 접속된 제1 포획 크로마토그래피 칼럼을 이용한 제1 및 제2 폴리시 크로마토그래피 단위 작업을 포함할 수 있고; 상기 하나 이상의 폴리시 크로마토그래피 단위 작업은 별도의 제1 및 제2 폴리시 크로마토그래피 단위 작업을 포함할 수 있으며; 상기 제1 폴리시 크로마토그래피 단위 작업은 상기 제2 폴리시 크로마토그래피 단위 작업에 선행하거나 후속되며; 상기 바이러스 불활성화 용리 풀은 전도도를 10 ms/cm 이하로 유지하면서 바이러스 불활성화 용리액 풀의 부피 팽창을 최소화할 수 있는 중화 완충액 시스템을 이용하여 중화될 수 있으며, 상기 완충액 시스템은 목표 pH 범위에서 완충 능력(buffer capacity)을 갖지 않는 적정제(titrant) 및 원하는 pH에서 완충이 이루어지는 완충제(buffering agent)를 포함하고; 상기 바이러스 불활성화는 30분 이상이 소요될 수 있으며; 상기 방법은 상기 중화된 풀에 심층 여과 작업을 수행하는 단계를 포함할 수 있으며; 상기 방법은 상기 하나 이상의 폴리시 크로마토그래피 단위 작업의 용리물(elution)에 대해, 한외여과/투석여과(diafiltration) 단위 작업 또는 바이러스 여과 단위 작업 중 하나 이상을 수행하는 것을 포함할 수 있으며; 상기 친화성 크로마토그래피 단위 작업은 단백질 A 크로마토그래피, 단백질 G 크로마토그래피 또는 단백질 L 크로마토그래피일 수 있으며; 상기 하나 이상의 폴리시 크로마토그래피 단위 작업 중 적어도 하나는 양이온 교환 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피, 다중-모드 크로마토그래피 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피일 수 있다.

[0020] 위의 형태 중 어느 것이든 분리되고 정제된 관심 재조합 단백질을 생산하는 방법이 될 수 있다. 제3 및 제4 양태에 따르면, 상기 방법의 분리되고 정제된 관심 재조합 단백질이 개시되고, 상기 방법의 분리되고 정제된 관심 재조합 단백질을 포함하는 약제학적 조성물이 개시된다.

[0021] 제5 양태에 따르면, 최소 부피 팽창으로 바이러스 불활성화 풀을 표적 pH로 중화하기 위한 시스템이 개시되며, 표적 pH 범위에서 완충 능력을 갖지 않는 적정제 및 표적 pH에서 완충이 이루어지는 완충제를 포함하며, 상기 중화된 바이러스 불활성화 용리 풀의 전도도는 10 ms/cm 이하로 유지된다.

[0022] 일부 형태에 있어서, 상기 시스템은 다음 양태 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 상기 적정제는 7보다 큰 pKa를 가질 수 있고, 상기 완충제는 4.5 내지 6.0 범위의 pKa를 가질 수 있으며; 상기 적정제는 아세테이트일 수 있고, 상기 완충제는 트리스 염기(Tris Base)일 수 있으며; 상기 적정제는 0.1 M 초과 및 0.3 M 미만의 범위의 아세트산나트륨 내에 있을 수 있으며; 상기 완충제는 0.00005 M 초과 및 0.2 M 미만의 범위의 트리스 염기 내에 있을 수 있으며; 상기 바이러스 불활성화 풀은 pKa가 4 미만인 산을 포함하는 완충액(buffer)을 사용하여 친화성 크로마토그래피 칼럼을 용리하여 pH가 3.6±0.1 이하인 바이러스 불활성화 용리 풀을 생성함으로써 얻을 수 있고; 상기 바이러스 불활성화 풀은 3.6±0.1 이하의 pH를 가질 수 있고, 적어도 50 mM 내지 적어도 150 mM의 농도, 3.3 내지 3.5 범위의 pH, 및 2.1 CV 내지 7.7 CV의 친화성 크로마토그래피 풀 양(pool volume)을 포함하는 완충액을 사용하여 친화성 크로마토그래피 칼럼을 용리함으로써 얻어질 수 있고, 추가 형태에서, 상기 바이러스 불활성화 풀은 3.6±0.1 이하의 pH를 가질 수 있고, 100 mM의 농도, 3.3 내지 3.5 범위의 pH, 2.75 CV 내지 4.25 CV의 친화성 크로마토그래피 풀 양을 포함하는 완충액을 사용하여 친화성 크로마토그래피 칼럼을 용리함으로써 얻어질 수 있으며; 상기 중화 완충액 시스템은 관심 단백질의 정제를 위한 연속 흐름 공정에서 사용될 수 있고; 또는 상기 중화는 소정 비율의 바이러스 불활성화 풀 재료와 중화 완충액 시스템을 정적 혼합기(static mixer) 내로의 유입에 의해 혼합함으로써 달성될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 개시내용의 다양한 일 실시형태에 따른 병렬 공정 크로마토그래피 시스템의 개략도이다.

도 2는 2개의 친화성 크로마토그래피 스키드를 이용하는 제1 병렬 순환 전략에 따라 도 1의 병렬 공정 크로마토그래피 시스템을 동작시키기 위한 흐름도이다.

도 3은 적어도 제1 및 제2 펌프를 활용하는 2개의 친화성 크로마토그래피 스키드의 칼럼에 대한 단계를 보여주는 도 2의 병렬 순환 전략에 대한 흐름도이다.

도 4는 2개의 양이온 교환 크로마토그래피 스키드를 이용하는 제2 병렬 순환 전략에 따라 도 1의 병렬 공정 크로마토그래피 시스템을 동작시키기 위한 흐름도이다.

도 5는 적어도 제1 및 제2 펌프를 활용하는 2개의 양이온 교환 크로마토그래피 스키드의 칼럼에 대한 단계를 보여주는 도 4의 병렬 순환 전략에 대한 흐름도이다.

도 6은 도 1의 병렬 공정 크로마토그래피 시스템에 대한 예시적인 크로마토그래피 스키드의 개략도이다.

도 7은 도 1의 병렬 공정 크로마토그래피 시스템을 통합한 시스템의 개략도이다.

도 8은 하류 공정에서 병렬 공정 크로마토그래피를 이용하기 위한 제1 예시적 구성의 개략도이다.

도 9는 하류 공정에서 병렬 공정 크로마토그래피를 이용하기 위한 제2 예시적 구성의 개략도이다.

도 10은 하류 공정에서 병렬 공정 크로마토그래피를 이용하기 위한 제3 예시적 구성의 개략도이다.

도 11은 심층 여과, 관류 폴리싱 및 바이러스 여과 구성의 개략도이다.

도 12는 단백질 A 용리 풀 pH vs 회수된 용리량(elution volume)을 보여주는 그래프이다.

[발명의 실시하기 위한 구체적인 내용]

본원에 제공되는 개시내용은 높은 처리량과 생산성을 달성하고 특히 소규모로 반연속 및/또는 연속 바이오 제조를 용이하게 하면서, 재조합 단백질, 특히 안정성 문제가 있는 단백질에 대한 정제를 개선하고; 처리 설치 공간을 최소화하고; 최소한의 장비와 시설 규모를 이용하며; 간단하고 안정된 공정을 제공하도록 설계된 공정 간소화에 관한 것이다. 본원에 개시된 것은 각 스키드의 처리를 독립적으로 제어하는 자동화 제어와 병렬로 동작되는 스키드 사이의 또는 스키드를 접속하는 유로를 갖지 않는 2개 이상의 단일 칼럼 크로마토그래피 스키드를 활용하는 연속 및 반연속 제조를 위한 비접속 병렬 접근법을 이용하는 크로마토그래피 시스템이다.

이 시스템 및 방법은 병렬로 동작하는 2개 이상의 독립적이고 접속되지 않은 크로마토그래피 스키드 상에서 연속 처리(로딩 또는 용리)를 위한 자동화된 병렬 처리 시스템을 제공함으로써 특히 소규모로 반연속 및 연속 제조 공정을 추구한다. 완성된 시스템은 안정성 문제가 있는 재조합 단백질에 유용한 정제 시스템을 제공함으로써 기존의 대규모의 단일 칼럼 시스템 및 다중-칼럼 유체 접속 시스템에 비해 이점을 갖는다. 또한 이 시스템은 더 작은 칼럼을 사용하고, 크로마토그래피 물질의 사용을 줄이고, 보다 효율적인 칼럼 패킹 및 크로마토그래피 물질의 사용을 제공하고, 일회용 기술과 호환성이 있어 그 기술을 유리하게 사용하며, 하류 처리에 대해 더 효율적이고 시간을 절약하며 유연하다. 병렬 스키드의 동작은 스키드 간의 통신을 트리거하는 개별 이벤트와 동기화된다. 위의 모든 장점은 제조 공정의 안정성을 손상시키지 않으면서 장비 비용 및/또는 처리 시간을 낮추는 등 자본 투자를 줄여준다.

본원에 기술된 병렬 크로마토그래피 처리 시스템은 예를 들어 이하에 그리고 도면에 더 자세히 설명된 바와 같이 병렬 스키드 사이의 중첩 처리를 허용함으로써 포획 및/또는 용리 사이클 동안 시간을 절약함으로써 시간을 보다 효율적으로 사용한다. 병렬 시스템은 유연하여, 예를 들어 평행 스키드에서 두 번째 단계를 수행하는 동안 하나의 스키드에서 최종 단계를 수행할 수 있도록 하고, 및/또는 임의의 사이클, 특히 최종 사이클 동안 속도를 높여 공정 시간을 단축할 수 있다.

병렬 크로마토그래피 처리 시스템은 로딩, 세척, 용리 및/또는 세정 단계에 대한 구배 사용은 물론 완충 농축물 희석을 포함하는 크로마토그래피 작업을 지원한다. 이러한 기능을 효율적으로 수행하려면 스키드당 2개 이상의 펌프를 사용해야 하며, 이는 다중-칼럼 직렬 시스템이 수용하고 실행하기 어려울 수 있다.

병렬 크로마토그래피 처리 시스템은 더 작은 칼럼(예: 2000L 이하)을 사용하고, 크로마토그래피 물질의 사용을 줄이고, 효율적인 칼럼 패킹을 가능하게 하며, 칼럼에의 로딩을 줄여 크로마토그래피 수지의 사용을 가능하게 하여, 수지 반감기를 연장시킨다. 상기 시스템은 또한 일회용 기술을 유리하게 사용할 수 있다.

또한, 병렬 크로마토그래피 공정의 자동화는 중앙 자동화 시스템에 의해 모두 제어되는 복수의 단일 칼럼 스키드 유닛을 포함하는 모듈형 시스템을 가능케 한다. 스키드의 수는 제조 캠페인의 목표에 따라 빠르고 효율적으로 늘리거나 줄일 수 있다. 칼럼이 별도로 병렬 동작되기 때문에, 직렬로 접속된 유로가 있는 여러 칼럼을 포함하는 스키드를 이용하는 시스템의 동작 중에 발생하는 것과 같이, 한 대의 스키드에서 고장이 발생하는 경우에도, 전체 제조 실행이 소실되거나 지연되지 않는다. 이는 PCC와 같은 직렬 크로마토그래피 시스템에서 문제가 되었는데, 이 시스템에서는 하나의 칼럼이 고장나면, 하나 이상의 전체 단위 작업을 포함하는 유로 접속 칼럼을 포함하는 스키드 전체가 셧다운되어 실행 전체를 지연시키거나 심지어 파괴시킬 수가 있다. 이러한 고장은 약물 물질(drug substance) 공급에 영향을 미쳐 비용을 증가시키고 필요한 환자에의 약물 전달을 지연시킬 수 있다.

조작된 단백질(engineered proteins)은 기존의 단일클론 항체 치료법에 비해 치료적 이점과 개선을 제공하며, 바람직한 차세대 바이오치료제가 되었다. 그 결과, 이러한 조작된 단백질은 점점 더 까다로운 치료 지표(therapeutic indication)를 충족하기 위해 점점 더 다양한 형식으로 구성되고 있다. 다중특이적 단백질, 특히 이중특이적 항체와 같은 조작된 단백질은 조작된 구조, 경우에 따라 더 높은 역가(titer)로 인해 기존 단일클론 항체보다 제조 공정에 더 민감할 수 있다. 이러한 민감한 단백질의 경우, 하류 제조 작업에서 본원에 설명된 병렬 크로마토그래피 처리 시스템을 사용하면 유연성, 칼럼 효율성 및 활용도, 원하는 제품 품질 사이에서 좋은

절충안을 제공할 수 있다. 병렬 크로마토그래피 시스템은 처리 시간을 늘리지 않으면서, 감소된 역가로 처리를 가능하게 하는 점에서 유리하다. PCC와 같은 직렬 접속된 크로마토그래피 시스템과 같은 현재의 순환 전략을 이용하여 조작된 단백질을 정제하면 제품 품질이 떨어질 수 있다. 직렬로 접속된 시스템과 관련된 칼럼 오버로딩은 칼럼 상의 응집(on-column aggregation)을 증가시키고, 제거를 감소시키며, 및/또는 통상 조작된 단백질과, 제조 칼럼 상 및 공정 풀 중의 높은 단백질 농도와 관련된 고분자량(HMW) 및/또는 저분자량(LMW) 종과 같은 불순물의 형성을 유발할 수 있다.

하류 제조 공정에서의 하나 이상의 크로마토그래피 작업은 본원에 설명된 병렬 크로마토그래피 처리 시스템을 이용하여 수행될 수 있다. 이 시스템은 임의의 크로마토그래피 작업에 적용 가능하다. 본원 및 도면에 설명된 바와 같이, 하류 제조 플랫폼은 하나 이상의 동일한 크로마토그래피 작업, 하나 이상의 독특한 크로마토그래피 작업 및/또는 이들의 조합으로 구성될 수 있다.

본원에 기술된 병렬 크로마토그래피 처리 시스템은 반연속 처리 작업 및 연속 처리 작업에 적합하다. 병렬 크로마토그래피 처리 시스템의 출력은 하나 이상의 하류 단위 작업에 선택적으로 연결될 수 있다. 이는 직접 접속, 서지 탱크, 보유 탱크, 백, 또는 적어도 하나의 크로마토그래피 칼럼 스키드 또는 다른 단위 작업으로부터 공급을 수용하도록 되어 있는 기타 적합한 용기를 통해 이루어질 수 있다. 연속 또는 반연속 공정을 용이하게 하기 위해 병렬 크로마토그래피 처리 시스템과 다른 단위 작업을 조합하는 것도 고려된다. 이러한 조합은 처리 시간, 자원 사용, 시설 설치 공간 및 비용을 최소화한다. 예를 들어, 친화성 정제 단위 작업에 채용되는 병렬 처리 시스템은, 특히 소규모 제조 작업을 위해, 처리를 최적화하고 버퍼 교환 및 컨디셔닝을 최소화하도록 설계된 바이러스 불활성화 및 중화 단위 작업과 조합될 수 있다. 바이러스 불활성화를 위해 원하는 pH에서 용리액 풀을 달성하는 친화성 크로마토그래피 용리 완충액 제제가 본원에 기술되어 있다. 또한, 원하는 전도성을 달성하는 중화된 바이러스 불활성화 용리 풀의 부피 확장을 최소화하면서 강력한 볼러스 pH 조정이 가능한 중화 완충액 시스템도 기술되어 있다.

병렬 크로마토그래피 시스템(100)에 대한 일반적인 다이어그램 및 예시적인 동작 흐름도가 도 1 내지 도 5에 도시되어 있다. 시스템(100)은 제1 및 제2 크로마토그래피 스키드("스키드(들)")(104, 106)의 동작을 제어하도록 구성된 제어 회로(102)를 포함한다. 제어 회로(102)는 스키드(104, 106)로부터 멀리 떨어져 있는 중앙 컨트롤러(108)뿐만 아니라 각각의 스키드(104, 106) 상에서 동작하는 컨트롤러(110)를 포함할 수 있다. 컨트롤러(108, 110) 사이의 통신 신호는 Wi-Fi, 라디오, 근거리 통신, 블루투스 등을 포함한 임의의 적절한 네트워크를 이용하여 유선 및/또는 무선 접속을 통해 전송될 수 있다. 따라서, 중앙 컨트롤러(108)뿐만 아니라 스키드(104, 106) 각각은 송신기 및 수신기를 포함하는 대응하는 통신 장치를 포함할 수 있다. 대안적인 형태에서, 제어 회로(102)는 서로 통신하는 각각의 스키드(104, 106) 상에서 동작하는 컨트롤러(110)만을 포함할 수 있다. 일례에서, 중앙 컨트롤러(108)는 데이터베이스 서버(112), 조작자 인터페이스(114), 배치 서버(116) 및 네트워크 인터페이스(들)(118)를 포함할 수 있다. 이렇게 구성되면, 제어 회로(102)는 각각의 스키드(104, 106)에 명령을 보내 그 동작을 제어하고 그 대답으로서 스키드(104, 106)로부터 데이터 및 기타 신호를 수신하도록 동작 가능하다. 2개의 스키드(104, 106)가 도시되어 있지만, 시스템(100)은 특정 공정에 대해 바람직할 수 있는 임의의 개수의 스키드를 포함하도록 확장될 수 있다는 것이 이해될 것이다.

본원에서 사용되는 용어 제어 회로는 마이크로컨트롤러, 컴퓨터 또는 프로세서 기반 장치와 프로세서, 메모리 및 프로그래밍 가능한 입력/출력 주변 장치의 모든 조합을 광범위하게 의미하며, 이는 일반적으로 다른 구성요소 및 장치의 동작을 제어하도록 설계된다. 또한 메모리, 다른 구성요소 및 장치와의 통신을 위한 트랜시버 등을 포함하는 공통 부속 장치를 포함하는 것으로 이해된다. 이러한 아키텍처 옵션은 해당 기술 분야에 잘 알려져 있고 이해되어 있으므로 본원에서는 추가 설명을 필요로 하지 않는다. 제어 회로(102)는 본원에서 설명하는 단계, 작용 및/또는 기능 중 하나 이상을 수행하도록 (예를 들어, 당업자가 잘 이해할 수 있듯이 메모리에 저장된 실행 가능한 명령/프로그래밍 세트를 이용하여) 구성될 수 있다. 일례로, Python과 같은 오픈 소스 언어를 활용하여 본원에 설명된 동작 및 기능을 수행하는 프로그래밍을 제공할 수 있다.

본원에 사용된, 크로마토그래피 공정의 "전체 사이클"은 스키드(104, 106) 중 하나의 스키드 상의 칼럼(120)을 이용하여 단백질을 정제하는 데 필요한 단계를 실행하는 것을 의미한다. 결합 및 용리 모드에서 동작되는 크로마토그래피 칼럼의 전체 사이클의 통상적인 단계에는, 예를 들면, 로딩 완충액에 적합한 완충액으로 칼럼을 평형화하는 것, 이어서 단백질을 크로마토그래피 매질에 로딩하는 것, 크로마토그래피 매질을 선택적으로 하나 이상의 세척 완충액으로 세척하는 것을 포함한다. 이어서, 결합된 단백질은 칼럼으로부터 용리된다. 용리 후, 칼럼은 하나 이상의 재생, 스트리핑 및/또는 플러싱 단계를 포함하여 세척된다. 각 전체 사이클에는 전체 사이클에서 가장 긴 사이클 시간을 갖는 단계인 "긴 단계"와, 사이클 시간이 전체적으로 더 짧거나 긴 단계보다 지속

시간이 더 길지 않은 집합적인 사이클 시간을 갖는 일련의 "더 짧은 단계"가 포함된다. 긴 단계의 예로는 로딩 및/또는 용리 단계가 있다. 이러한 단계는 크로마토그래피 매질에 대한 단백질의 로딩을 최대화하거나 크로마토그래피 매질로부터 결합된 단백질을 완전히 용리시키기 위해 지속 시간이 더 길 수 있다. 일련의 더 짧은 처리 단계는 집합적으로 "생산 공정 사이클"을 구성한다. 더 짧은 단계의 예에는 평형화, 하나 이상의 선택적인 세척 및 세정 단계가 포함되며, 여기에는 재생, 스트립 및/또는 플러시 단계 중 하나 이상이 포함될 수 있다. 로딩 또는 용리 단계는 긴 단계로서 동작되지 않는 경우 더 짧은 단계의 집합에도 포함된다. 생산 공정 사이클을 구성하는 짧은 단계의 유속은 생산 공정 사이클이 긴 단계 사이클과 동시에 종료되거나 긴 단계 사이클이 종료되기 전 어느 시점에 종료되도록 선택될 수 있다. 후자의 경우, 하나의 스키드(104, 106) 상의 생산 공정 사이클을 병렬 스키드(104, 106) 상의 긴 단계 사이클과 동기화하기 위해 생산 공정 사이클에 시간 간격이 추가될 수 있다.

병렬 크로마토그래피 시스템(100)에 대한 제1 예시적 동작 공정(200)이 도 2에 도시되어 있으며, 여기서 친화성 크로마토그래피의 경우와 같이 가장 긴 단계는 칼럼을 로딩하는 단계이다. 2개의 스키드(104, 106)를 참조하여 공정을 설명하지만, 공정은 원하는 대로 확장될 수 있다는 것이 쉽게 이해될 것이다.

제1 단계(202)에서, 제어 회로(102)는 미리 결정된 양의 공급원료가 제1 스키드(104) 상의 칼럼에 로딩될 때까지 공통 공급원료로부터 제1 스키드(104)에의 로딩을 지시한다. 예를 들어, 흐름 센서, 스케일, 타이머, 또는 기타 센서가 분배되는 공급원료를 모니터링하여 제1 스키드(104)의 칼럼에 적합한 미리 정해진 양의 공급원료가 분배된 시기를 결정할 수 있다. 제어 회로(102)가 미리 정해진 양의 공급원료가 제1 스키드(104)에 로딩되었다고 결정하면, 제2 단계(204)에서, 제어 회로(102)는 공통 공급원료를 제2 스키드(106)에 로딩하기 시작하기 위한 동기화 신호를 생성/송신/수신한다. 예를 들어, 제1 스키드(104)의 컨트롤러(110)는 동기화 신호를 생성하여 중앙 컨트롤러(108)에 전송할 수 있다. 대안적으로, 제1 스키드(104)의 컨트롤러(110)는 동기화 신호를 생성하여 제2 스키드(106)에 직접 전송할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 동기화 신호는 둘 이상의 유닛 사이에서 통신되는 개별 이벤트 트리거일 수 있다. 동기화 신호는 임의의 유닛 상에서의 지정된 자동화 처리 세트의 수행을 시작하는 데 사용될 수 있다. 그 후, 제3 단계(206)에서, 제1 스키드(104)는 미리 결정된 양의 공급원료가 제2 스키드(106)의 칼럼에 로딩되어 결합되는 동안 생산 공정 사이클(예를 들어, 세척, 용리, 스트립, 재생, 플러시, 평형화 중 하나 이상)을 실행하고, 제4 단계(208)에서, 제1 스키드(104)는 제2 스키드(106)로부터 로딩이 완료되었다는 것을 나타내는 동기화 신호가 생성될 때까지 대기하며, 제1 스키드(104)의 칼럼에서 로딩이 시작될 수 있다. 제5 단계(210)에서, 제1 스키드(104)가 로딩되고 있는 동안 제2 스키드(106)는 제2 단계(204)에 따른 동기화 신호를 기다린다. 제1 스키드(104)에 대한 동기화 신호가 생성되면, 제6 단계(212)에서, 제어 회로(102)는 제1 스키드(104)가 생산 공정 사이클을 실행하는 동안 제2 스키드(106)에의 공급원료의 로딩을 지시한다. 그 후, 제어 회로(102)가 미리 정해진 양의 공급원료가 제2 스키드(106)의 칼럼에 로딩되었다고 판단하면, 제7 단계(214)에서 제어 회로(102)는 제2 동기화 신호를 생성/송신/수신하고, 제8 단계에서 단계(216)에서, 제2 스키드(106)는 제1 스키드(104)가 로딩되는 동안 생산 공정 사이클을 실행한다. 이러한 구성으로, 공급원료의 로딩 및 생산 공정 사이클의 실행이 2개 이상의 스키드(104, 106) 사이에서 연속적으로 전환될 수 있어 연속적인 병렬 처리 방법이 제공된다.

도 3은 친화성 크로마토그래피 칼럼(120)이 장착된 2개 이상의 스키드(104, 106)를 이용하는 병렬 처리 시스템(100)에 대한 순환 공정의 흐름도를 도시하며, 여기서 크로마토그래피 칼럼(120)에 대한 로딩 시간은 단위 작업에서 긴 단계이다. 각각의 스키드(104, 106)는 2개의 펌프(122, 124)를 포함하는 것으로 도시되어 있는데, 하나는 로딩 전용이고 다른 하나는 다른 모든 처리 단계용이다. 그러나, 제1 및 제2 펌프(122, 124)는 단일 펌프일 수 있고, 또는 원하는 경우 각 펌프(122, 124)에 대해 하나 또는 복수의 펌프를 포함할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 대안적으로, 펌프(122, 124)는 원한다면 각각의 스키드(104, 106)에 선택적으로 연결될 수 있는 하나 이상의 펌프를 의미할 수 있다.

이하에서 더 자세히 설명하는 바와 같이, 채취 숙주 세포 배양액(harvested host cell culture fluid; HCCF)과 같은 공급원료를 로딩하는 긴 단계가 제1 스키드(104)(칼럼 1)에서 수행되는 반면, 처리 사이클의 더 작은 단계(예: 세척, 용리, 스트립, 재생 및 평형화 단계 중 하나 이상)가 로딩 사이클을 막 완료한 제2 스키드 106(칼럼 2)에서 수행된다. 처리 사이클에서, 세척부터 평형화 단계 모두 로딩 사이클 이하의 시간 내에 수행된다. 처리 사이클 타이밍을 로딩 사이클에 동기화하기 위해 시간 간격이 처리 사이클에 추가될 수 있다. 예를 들어, 일단 원하는 물질이 제2 스키드(106)(칼럼 2)로부터 용리되고 칼럼(120)이 재로딩을 위해 준비되면, 제2 스키드(106)(칼럼 2)는 처리 사이클을 막 완료하거나, 제1 스키드(칼럼 1)의 로딩이 완료된 때에 로딩을 개시하기 위한 동기화 신호를 기다린다.

"전체 사이클"은 공급원료 로딩으로부터 스키드(104, 106) 중 하나의 스키드의 칼럼(120)의 플러시/평형화까지의 완전한 공정을 의미한다. "전체 병렬 사이클"은 예를 들어 도 3에 도시된 바와 같이 병렬로 동작하는 적어도 2개의 스키드(104, 106) 각각에 대한 완전한 전체 사이클을 의미한다. 전체 사이클의 단계는 2개 이상의 펌프를 이용하여 수행할 수 있다. 대안적으로, 전체 사이클의 단계는 단일 펌프와, 2개 또는 3개의 입구 채널로부터 관리되고 계량된 액체 용액을 제공하기 위한 시간설정 밸브 스위칭(timed valve switching)을 이용하여 수행될 수 있다.

도 3은 칼럼 1과 칼럼 2에 대한 전체 사이클을 포함하는 전체 병렬 사이클을 보여주는데, 여기서 칼럼은 결합 및 용리 모드에서 실행되는 친화성 크로마토그래피 칼럼이다. 로딩 단계는 긴 단계이고, 세척-평형화 단계는 생산 공정 사이클을 구성하는 짧은 단계이다. 공정은 제1 스키드(104)의 칼럼(120)의 제2 펌프(124)가 평형화 단계(220)를 수행하는 것으로 시작되고, 그 후 제1 펌프(122)가 로딩 단계(222)를 수행한다. 제1 스키드(104)의 칼럼(120)에 대한 로딩 단계(222)가 완료된 후, 그리고 제2 펌프(124)에 의한 평형화 단계(223)가 완료된 후, 제2 스키드(106)의 칼럼(120)에 대한 로딩 단계(224)가 제1 펌프(122)를 이용하여 시작된다. 이는 상기한 동기화 신호를 통해 달성된다. 제2 스키드(106)의 칼럼(120)이 로딩되는 동안, 제1 스키드(104)의 제2 펌프(124)는 선택적인 제1, 제2, 및 제3 세척 단계(226, 228, 230), 용리 단계(232), 재생 단계(234) 및 플러싱 단계(236)를 순차적으로 수행할 수 있다. 이에 의해 제1 스키드(104)의 칼럼(120)에 대한 전체 사이클이 완료된다. 공정(200)에서 더 긴 로딩 시간을 고려해야 하는 경우, 제1 스키드(104)의 제2 펌프(124)는 미리 결정된 시간 간격 동안 차단(238)될 수 있다. 그 다음, 제2 펌프(124)는 일반적으로 예를 들어 0 내지 10분 내에, 제2 스키드(106)의 칼럼(120)에 대한 로딩 단계(224)와 동일한 시간에 종료하는 평형화 단계(240)를 수행하고, 제1 스키드(104)에 대한 후속 사이클을 시작한다. 제2 스키드(106)의 칼럼(120)에 대한 로딩 단계(224)가 완료된 후, 제1 스키드(104)의 칼럼(120)에 대한 다른 로딩 단계(242)가 시작된다. 이는 상기한 동기화 신호를 통해 달성된다. 제1 스키드(104)의 칼럼(120)이 로딩되는 동안, 제2 스키드(106)의 제2 펌프(124)는 선택적인 제1, 제2, 및 제3 세척 단계(244, 246, 248), 용리 단계(250), 재생 단계(252), 및 플러싱 단계(254)를 순차적으로 수행할 수 있다. 이에 의해 제2 스키드(106)의 칼럼(120)에 대한 전체 사이클이 완료된다. 제1 스키드(104)와 마찬가지로, 제2 스키드(106)의 제2 펌프(124)는 필요한 경우 미리 결정된 시간 간격 동안 차단(256)될 수 있고, 이어서, 일반적으로 제1 스키드(104)의 칼럼(120)에 대한 로딩 단계(242)와 동일한 시간에 종료되는 평형화 단계(258)를 수행할 수 있다.

일 실시형태에서, 유속은 50 cm/시간 이상이다. 일 실시형태에서, 유속은 적어도 1000 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 100 내지 1000 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 200 내지 1000 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 300 내지 1000 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 400 내지 1000 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 500 내지 1000 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 600 내지 1000 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 700 내지 1000 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 800 내지 1000 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 900 내지 1000 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 100 내지 900 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 200 내지 900 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 300 내지 900 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 400 내지 900 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 500 내지 900 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 600 내지 900 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 700 내지 900 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 800 내지 900 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 100 내지 800 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 200 내지 800 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 300 내지 800 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 400 내지 800 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 500 내지 800 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 600 내지 800 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 700 내지 800 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 100 내지 700 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 200 내지 700 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 300 내지 700 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 400 내지 700 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 500 내지 700 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 600 내지 700 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 100 내지 600 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 200 내지 600 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 300 내지 600 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 400 내지 600 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 500 내지 600 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 100 내지 500 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 200 내지 500 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 300 내지 500 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 400 내지 500 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 100 내지 400 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 200 내지 400 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 300 내지 400 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 100 내지 300 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 200 내지 300 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 100 내지 100 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 50 내지 100 cm/시간이다. 일 실시

형태에서, 유속은 50 내지 200 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 50 내지 300 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 50 내지 400 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 50 내지 500 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 50 내지 600 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 50 내지 700 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 50 내지 800 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 50 내지 900 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 또는 1000 cm/시간이다.

로딩 시간은 칼럼(120)의 크기, 공급원료 중 단백질의 농도, 유속 및/또는 사용되는 크로마토그래피 매질의 결합 용량(binding capacity)에 따라 달라질 것이다. 로딩 시간은 허용되는 풀 유지 시간(로딩 풀(load pool)에서의 단백질의 안정성)보다 짧아야 한다. 로딩 시간은 전체 공정 요구 사항, 예컨대 목표 처리 시간을 충족해야 한다. 예를 들어, 처리 시간은 24시간 이내 또는 단일 교대 이내일 수 있다. 공급원료 중의 재조합 단백질 농도에 따라, 로딩 시간은 약 2시간 이하 내지 약 24시간일 수 있다.

일 실시형태에서, 로딩 시간은 약 1시간 내지 약 24시간이다. 일 실시형태에서, 로딩 시간은 약 12시간 내지 약 24시간이다. 일 실시형태에서, 로딩 시간은 약 8시간 내지 약 12시간이다. 일 실시형태에서, 로딩 시간은 약 5시간 내지 약 8시간이다. 일 실시형태에서, 로딩 시간은 약 1시간 내지 약 5시간이다. 일 실시형태에서, 로딩 시간은 약 2시간 내지 약 5시간이다. 일 실시형태에서, 로딩 시간은 약 3시간 내지 약 5시간이다. 일 실시형태에서, 로딩 시간은 약 4시간 내지 약 5시간이다. 일 실시형태에서, 로딩 시간은 약 1시간 내지 약 4시간이다. 일 실시형태에서, 로딩 시간은 약 2시간 내지 약 4시간이다. 일 실시형태에서, 로딩 시간은 약 3시간 내지 약 4시간이다. 일 실시형태에서, 로딩 시간은 약 1시간 내지 약 3시간이다. 일 실시형태에서, 로딩 시간은 약 2시간 내지 약 3시간이다. 일 실시형태에서, 로딩 시간은 약 1시간 내지 2시간이다. 일 실시형태에서, 로딩 시간은 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 약 9시간, 약 10시간, 약 11시간, 약 12시간, 약 16시간, 약 18시간, 또는 약 24시간이다. 로딩에 이어, 친화성 칼럼(120)은 제2 펌프(124)를 이용하여 수행되는 세척, 용리, 재생, 플러시 및 평형화 단계로 처리된다. 펌프(122, 124)를 제어하는 밸브 시스템은 도 11 및 도 12를 참조하여 이하에서 설명하는 바와 같이 펌프(122, 124)를 개별 동작시킬 수 있도록 구성된다.

목표 처리 시간을 충족시키기 위해, 유속은 50 내지 1000 cm/시간 이내일 수 있고, 로딩 시간은 1시간 내지 24시간 이내일 수 있다.

전체 병렬 사이클은 24시간 또는 단일 교대일 수 있다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 약 5시간 내지 약 24시간이다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 12시간 내지 24시간이다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 8시간 내지 12시간이다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 5시간 내지 8시간이다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 5시간 내지 7시간이다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 5시간 내지 6시간이다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 6시간 내지 8시간이다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 6시간 내지 7시간이다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 5시간 이하이다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 1시간 내지 5시간이다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 1시간 내지 5시간이다. 일 실시형태에서, 전체 사이클은 2시간 내지 5시간이다. 일 실시형태에서, 전체 사이클은 3시간 내지 5사이클이다. 일 실시형태에서, 전체 사이클은 4시간 내지 5시간이다. 일 실시형태에서, 전체 사이클은 2시간 내지 5시간이다. 일 실시형태에서, 전체 사이클은 3시간 내지 5시간이다. 일 실시형태에서, 전체 사이클은 4시간 내지 5시간이다. 일 실시형태에서, 전체 사이클은 3시간 내지 5시간이다. 전형적으로, 일일 병렬 사이클의 수는 1 내지 5이다.

재조합 단백질을 정제하는 경우, 포획 크로마토그래피는 통상적으로 세포 배양 채취 후에 수행되며, 채취 세포 배양액과 같은 소스 매질로부터 관심 단백질을 분리하고 농축하기 위해 수행된다. 이 포획 단계 동안 이용되는 크로마토그래피 방법은, 크로마토그래피 매질(수지 또는 멤브레인)이 크로마토그래피 매질에 결합하는 관심 단백질에 대해 친화성 또는 선택성을 갖는 조건 하에서, 결합 및 용리 모드에서 수행되며, 친화성이 낮고 관통하여 흐르거나 강하게 결합되지 않은 성분 및/또는 불순물은 용리 전에 크로마토그래피 물질를 세척함으로써 제거, 또는 적어도 감소시킬 수 있다.

포획 크로마토그래피 물질의 예에는 친화성 크로마토그래피(AC), 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 이온 교환 크로마토그래피(IEX), 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 다중-모드 크로마토그래피(MMC) 등이 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 물질은 당분야에 알려져 있으며 상업적으로 이용 가능하다.

친화성 크로마토그래피는 Fc 성분을 갖는 관심 재조합 단백질을 분리하고 농축하기 위한 초기 포획 단계로서 바이오제조 공정에서 통상적으로 이용된다. 이러한 친화성 크로마토그래피 물질의 예로는 단백질 A, 단백질 G, 단

백질 A/G 및 단백질 L과 같은 포도상구균 단백질; 기질-결합 포획 메커니즘; 항체 또는 항체 단편(fragment)-결합 포획 메커니즘; 압타머(aptamer)-결합 포획 메커니즘; 보조인자(cofactor)-결합 포획 메커니즘 등을 이용하는 것이 있다. 금속 이온에 친화성을 가지거나 갖도록 조작된 단백질을 포착하는 데 고정화 금속 친화성 크로마토그래피를 이용할 수 있다.

일 실시형태에서, 2개 이상의 크로마토그래피 칼럼 스키드(104, 106)는 각각 단일 포획 크로마토그래피 칼럼(120)을 포함한다. 일 실시형태에서, 포획 크로마토그래피 칼럼(120)은 친화성 크로마토그래피 칼럼이다. 일 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피 칼럼(120)은 단백질 A, 단백질 G 또는 단백질 L 크로마토그래피 칼럼이다. 일 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피 칼럼(120)은 단백질 A 크로마토그래피 칼럼이다.

친화성 크로마토그래피 물질은 여러 공급업체로부터 상업적으로 구입할 수 있다. 예를 들어, MABSELECT™ SURE 단백질 A, 단백질 A Sepharose FAST FLOW™ (Cytiva, Marborough, 매사추세츠주), PROSEP-A™(영국, Merck Millipore), TOYOPEARL™ 650M Protein A (TosoHass Co., 필라델피아, 펜실베니아주).

포획 크로마토그래피 작업은 바람직하게는 본원에 기술된 것과 같은 연속 처리 크로마토그래피 방법을 이용하여 수행된다. 이 방법은 2개 이상의 크로마토그래피 칼럼을 병렬로 순환시키는 연속 처리(로딩으로부터 용리까지 그리고 임의의 관련된 칼럼 처리 및 제조 단계)를 가능케 하는 자동화된 병렬 처리 시스템을 이용한다. 이러한 순환 전략은 들어오는 공급원료, 통상적으로 채취 숙주 세포 배양액(HCCP)의 연속 처리 및 더 작은 크로마토그래피 칼럼의 사용을 가능케 한다. 이 공정에 의해 적어도 2개, 바람직하게는 다수의 단일 칼럼 스키드(104, 106)를 포함하는 모듈식 시스템이 가능하게 되는데, 상기 스키드는 모두, 제조 목적에 따라 스키드(104, 106)의 수를 신속하고 효율적으로 증가 또는 감소시키는 유연성을 제공하는 중앙 자동화 시스템(108)에 의해 제어된다. 칼럼 전환은 포획 사이클 동안 시간을 절약하며, 공정은 상대적으로 간단하고 견고하며 칼럼 오버로딩에 의존하지 않는다.

크로마토그래피 칼럼(120)은 정제될 재조합 단백질을 함유하는 공급원료와 접촉되기 전에 적합한 완충액으로 평형화될 수 있다. 예시적인 평형 완충액에는 정제되는 물질에 대한 적절한 농도, 전도도 및/또는 pH의 HEPES, 트리스, 인산염, 시트르산염, MES, BES, PIPES, Tricine, Bicine, TES, TAPSO, MOPS 등이 있다.

공급원료가 칼럼(120)에 일단 로딩되면, 칼럼은 선택적으로, 용리 단계 전에 하나 이상의 세척 용액으로 세척된다. 세척 단계는, 칼럼에 있지만 아직 크로마토그래피 물질에 결합되지 않은 관심 단백질을 결합하고, 틈새 공간으로부터 로딩 물질을 씻어내고, 크로마토그래피 매질에 결합되어 있거나, 및/또는 크로마토그래피 매질 내에 있는 불순물을 제거하고, 및/또는 용리를 위해 칼럼(120)을 준비하기 위해 수행될 수 있다. 세척 단계의 목적과 수에 따라 여러 세척액을 사용할 수 있다. 세척 완충액에는 평형화 완충액 및 로딩 완충액의 사용이 포함될 수 있다. 완충액 제제(buffer formulation)에는 특히, 트리스 완충액 또는 인산염; 아세트산나트륨, 시트르산나트륨 또는 염화나트륨과 같은 염; 칼슘, 마그네슘 또는 니켈과 같은 2가 양이온, 세제 폴리머, 아미노산, 당 알코올 및/또는 카오트로픽제(chaotropic agent)가 포함된다. 여러 세척 완충액이 사용되는 경우, 세척 완충액 제제의 조성 및/또는 농도는 필요에 따라 동일하거나 다를 수 있다. 세척은 적절한 pH, 전형적으로 중성 pH에서 수행되지만, 필요에 따라 더 높거나 낮은 pH에서 수행될 수도 있다.

결합된 재조합 단백질은 완충액 조건을 변경함으로써 칼럼(120)에서 용리된다. 용리는 이소크래틱(isocratic), 구배 또는 기타 적합한 방법이나 이들 방법의 조합으로 행할 수 있다. 용리는 전형적으로 저 pH 조건 하에서 수행되며, 용리 완충액에는 산성, 시트르산, 포름산, 인산과 같은 산, 단독으로 또는 완충액과 조합하여, 아미노산, 염 등이 포함된다.

포획 크로마토그래피 매질을 세정하고 재생하는 데 적합한 방법과 완충액이 알려져 있다.

포획 크로마토그래피는 세포 배양 정상 상태 동안 연속적으로 실행될 수 있다. 작은 서지 용기(서지 백(surge bag))는 흐름의 작은 변동을 완충하고, 바이오반응기와 채취 단위 작업 사이에 공기 차단을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 포획 크로마토그래피는 채취 단위 작업 동안 연속적으로 실행되거나 채취물 보관 용기로부터 실행될 수 있다.

친화성 정제에 이어, 재조합 단백질은 전형적으로, 잔여 오염물 및 불순물로부터 관심 단백질을 추가로 분해하기 위해 하나 이상의 추가 정제 단계를 거치게 된다. 용어 "폴리시(polish)" 또는 "폴리싱(polishing)"은 본원에서, DNA, 숙주 세포 단백질과 같은 잔여 오염물 및 불순물; 제품 관련 불순물, 응집체, 바이러스 등을 제거할 뿐만 아니라, pH, 농도 및 완충제 제제의 변화를 촉진하여 관심 재조합 단백질을 원하는 최종 순도에 더 가깝게

하기 위하여 수행되는 하나 이상의 크로마토그래피 단계를 지칭하는데 사용된다.

폴리시 크로마토그래피 단위 작업에서는 결합 및 용리 모드(관심 단백질이 크로마토그래피 매질에 결합되고 오염물 및 불순물이 크로마토그래피 매질을 통해 흐르거나 씻어내어진다), 정면(frontal) 또는 오버로딩 모드(관심 단백질을 함유한 용액은 흡착 부위가 채워지고 정지상(stationary phase)(관심 단백질)에 대한 친화력이 가장 낮은 종이 용리되기 시작할 때까지 칼럼에 로딩된다), 관류(flow-through) 모드(관심 단백질은 결합 없이 크로마토그래피 물질을 통해 흐르고 오염물과 불순물은 크로마토그래피 매질에 결합된다), 또는 다른 모드 또는 이들 모드의 조합에서 사용될 수 있는 작용제(agent)를 함유하는 수지 및/또는 멤브레인과 같은 크로마토그래피 매질을 사용한다. 상기 폴리시 단계에 사용되는 크로마토그래피 양태의 예는 음이온 교환 크로마토그래피(AEX) 및 양이온 교환 크로마토그래피(CEX)와 같은 이온 교환 크로마토그래피(IEX); 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC); 혼합모드 또는 다중-모드 크로마토그래피(MMC), 하이드록시아파타이트 크로마토그래피(HA); 역상(reverse phase) 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피(AC) 및 겔 여과를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

폴리시 크로마토그래피 단위 작업 각각은 동일하거나 다른 구성 및/또는 상이한 모드로 실행될 수 있다. 각 크로마토그래피 유닛은 단일의 접속되지 않은 유닛, 다중 접속된 유닛 및/또는 조합된 유닛으로서 실행될 수 있다. 단일 크로마토그래피 칼럼은 예를 들어 스태거식 순환 시스템(staggered cycling system), 역류 로딩(주기적 역류 크로마토그래피) 또는 다중-칼럼 역류 용매 구배 정제 공정(MCSGP)으로 실행될 수 있다.

통상, 하나, 둘 또는 세 개로서, 복수의 크로마토그래피 단위 작업은 각각이 동일하거나 다른 기능을 수행하고, 제조 공정의 요구 사항에 따라 조합된다. 이온 교환 크로마토그래피는 전하를 띤 표면 사이의 정전기적 상호작용을 기초하여, 차등적 흡수 및 탈착을 기반으로 관심 단백질을 불순물로부터 분리한다. 양이온 교환 크로마토그래피는, 음으로 하전되고, 고상을 지나치거나 또는 이를 통과한 수용액 중 양이온과의 교환을 위한 자유 양이온을 갖는 고상 매질 상에서 수행되는 크로마토그래피를 의미한다. 전하는, 예를 들어, 공유 결합에 의해, 고상에 하나 이상의 하전된 리간드를 부착함으로써 제공될 수 있다. 대안적으로, 또는 부가적으로, 전하는 (예를 들어, 전체 음전하를 갖는, 실리카의 경우에서와 같이) 고상의 내재적 특성일 수 있다. 양이온 교환 크로마토그래피는 통상적으로 결합 및 용리 모드에서 실행되며, 많은 관심 단백질의 높은 등전점(isoelectric point)(pI)으로 인해 크로마토그래피 물질에 대한 결합이 가능하다. 양이온 교환 크로마토그래피는 관류 모드에서도 실행될 수 있다. CEX 크로마토그래피는 통상적으로 고분자량(HMW) 오염물, 공정 관련 불순물 및/또는 바이러스 제거(viral clearance)를 제거하는 데 사용된다. 상업적으로 이용 가능한 양이온 교환 매질이 이용 가능하며, 아가로스에 고정된 설포프로필(sulphopropyl)(SP)(예: SP-SEPHAROSE FAST FLOW™, SP-SEPHAROSE FAST FLOW XL™ 또는 SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™), CAPTO S™, CAPTO SP ImpRes™, CAPTO S ImpAct™(Cytiva), FRACTOGEL-SO3™, FRACTOGEL-SE HICAP™ 및 FRACTOPREP™(EMD Merck, Darmstadt, Germany), TOYOPEARL® XS, TOYOPEARL® HS(Tosh Bioscience, King of Prussia, PA), UNOsphere™ (BioRad, Hercules, CA), S Ceramic Hyper D™F (Pall, Port Washington, NY), POROS™ (ThermoFisher, Waltham, MA)이 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

음이온 교환 크로마토그래피는, 양으로 하전되고, 고상을 지나치거나 또는 이를 통과한 수용액 중 음이온과의 교환을 위한 자유 음이온을 갖는 고상 매질 상에서 수행되는 크로마토그래피를 의미한다. 음이온 교환 크로마토그래피는 통상적으로 관류 모드에서 실행된다. 많은 관심 단백질의 높은 pI 때문에, 이들 단백질은 AEX 크로마토그래피 물질에 결합하지 않는다. 예를 들어 AEX 크로마토그래피는 바이러스 제거 및 불순물 제거에 이용된다. 상업적으로 이용 가능한 음이온 교환 매질이 이용 가능하며, 아가로스에 고정된 설포프로필(SP)(예: Source 15 Q, Capto™ Q, Q-SEPHAROSE FAST FLOW™(Cytiva), FRACTOGEL EDM TMAE™, FRACTOGEL EDM DEAE™(EMD Merck), TOYOPEARL SuperQ® (Tosh Bioscience), POROS HQ™, POROS XQ™, (ThermoFisher)가 있지만, 이에 제한되지 않는다.

혼합-모드 또는 다중-모드 크로마토그래피(MMC)는 이온 교환(CEX 또는 AEX) 및 소수성 상호작용 등과 같은 상호작용 메커니즘의 조합을 활용하는 고체상 매질에서 수행되는 크로마토그래피를 의미한다. 상업적으로 이용 가능한 다중-모드 크로마토그래피 매체가 이용 가능하고, 그 예는 Capto™ Adhere Anion Exchange Multi Mode이다.

소수성 상호작용 크로마토그래피는 관심 단백질 표면 상의 소수성 리간드와 소수성 잔기 사이의 상호작용을 활용하는 고체상 매질에서 수행되는 크로마토그래피를 의미한다. 상업적으로 이용 가능한 소수성 상호작용 크로마

토그래피 매질에는 Phenyl Sepharose™, Tosoh hexyl 및 Capto™ phenyl이 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

하이드록시아파타이트 크로마토그래피는, 양전하를 띤 칼슘과 음전하를 띤 인산염을 사용하고 단백질의 pI과 완충액의 pH에 따라 양이온 또는 음이온으로서 작용할 수 있는 고체상 매질에서 수행되는 크로마토그래피를 의미한다.

관심 재조합 단백질을 함유하는 용리액 스트림 또는 풀은, 특히 관심 단백질이 크로마토그래피 매질에 결합되는 방식으로 폴리시 크로마토그래피 칼럼에 로딩될 수 있다. 용리액 스트림은 관심 단백질이 크로마토그래피 매질에 결합되지 않는 방식으로 폴리시 크로마토그래피 칼럼에 로딩될 수 있다. 용리액 스트림 또는 풀은 세포 배양 채취액, 친화성 크로마토그래피, 바이러스 불활성화, 바이러스 여과, 심층 여과 및/또는 다른 폴리시 크로마토그래피 작업과 같은 이전 단위 작업에서 유래했을 수 있다. 추가적인 완충액은 최종 로딩이 요망되는 농도 및/또는 제제에 있도록 용리액 또는 풀에 첨가될 수 있다.

폴리시 단위 작업을 위한 로딩 물질은 바이러스 불활성화 단위 작업, 특히 저 pH 바이러스 불활성화 단위 작업으로부터의 풀 또는 용리액, 예를 들어 중화된 바이러스 불활성화 풀 또는 용리액일 수 있다.

한가지 양태에서, 2개 이상의 폴리시 크로마토그래피 칼럼은 직렬로 접속될 수 있고 하나의 폴리시 크로마토그래피 유닛으로서 관류 모드에서 실행될 수 있다. 결합된 칼럼은 완전한 폴리시 크로마토그래피 단위 작업으로서 동작되거나, 결합 및 용리 모드, 정면 모드 및/또는 관류 모드에서 실행되는 하나 이상의 추가 폴리시 크로마토그래피 유닛과 조합하여 이용될 수 있다.

본원에 설명된 바와 같이, 하나 이상의 폴리시 크로마토그래피 단위 작업은 병렬 처리 시스템(100)을 이용하는 본원에 설명된 연속 공정 크로마토그래피 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

2개 이상의 유사한 크로마토그래피 칼럼 스키드(104, 106)는 병렬로 실행될 수 있으며, 본원에 설명된 것과 같은 연속 병렬 크로마토그래피 시스템(100)에 의해 제어될 수 있다. 일 실시형태에서, 2개 이상의 유사한 크로마토그래피 칼럼 스키드(104, 106)는 각각 동일한 유형의 폴리시 크로마토그래피 칼럼(120)을 포함한다. 도 4는 결합 및 용리 모드에서 동작되는 양이온 교환 크로마토그래피 칼럼이 각각 장착된 2개 이상의 스키드(104, 106)를 이용하는 예시적 시스템에 대한 순환 공정을 도시하며, 여기서 크로마토그래피 칼럼에 대한 용리 시간은 단위 작업 사이클에서 긴 단계이다.

병렬 크로마토그래피 시스템(100)에 대한 예시적 동작 공정(300)이 도 4에 도시되어 있으며, 여기서 폴리시 크로마토그래피의 경우와 같이 가장 긴 단계는 칼럼을 용리시키는 것이다. 2개의 스키드(104, 106)를 참조하여 공정을 설명하지만, 공정은 원하는 대로 확장될 수 있다는 것이 쉽게 이해될 것이다.

제1 단계(302)에서, 제어 회로(102)는 미리 결정된 양의 정제된 단백질이 칼럼으로부터 용리될 때까지 제1 스키드(104)의 로딩된 칼럼의 용리를 지시한다. 예를 들어, 이하에서 설명하는 바와 같이, 흐름 센서, 스케일, 타이머 또는 기타 센서가 용리액을 모니터링하여 원하는 양의 관심 단백질이 용리된 시기를 결정할 수 있다. 제어 회로(102)가 미리 결정된 단백질 역가가 제1 스키드(104)로부터 용리되었다고 결정하면, 제2 단계(304)에서, 제어 회로(102)는 제2 스키드(106)의 칼럼으로부터 단백질 용리를 시작하기 위한 동기화 신호를 생성/송신/수신한다. 예를 들어, 제1 스키드(104)의 컨트롤러(110)는 동기화 신호를 생성하여 중앙 컨트롤러(108)에 전송할 수 있다. 대안적으로, 제1 스키드(104)의 컨트롤러(110)는 동기화 신호를 생성하여 제2 스키드(106)에 직접 전송할 수 있다. 그 후, 제3 단계(306)에서, 제1 스키드(104)는 미리 결정된 단백질 역가가 칼럼으로부터 용리되는 동안 생산 공정 사이클(예를 들어, 스트립, 재생, 플러시, 평형화, 로딩 및 세척 단계 중 하나 이상)을 실행하고, 제4 단계(308)에서, 제1 스키드(104)는 용리가 완료되고 제1 스키드(104)의 칼럼으로부터 용리가 시작될 수 있다는 것을 나타내는 동기화 신호가 제2 스키드(106)로부터 생성될 때까지 기다린다. 제5 단계(310)에서, 제2 스키드(106)는 제1 스키드(104)가 용리되는 동안 제2 단계(304)에 따라 생성되는 동기화 신호를 기다린다. 제1 스키드(104)에 대한 동기화 신호가 생성되면, 제6 단계(312)에서, 제어 회로(102)는 제1 스키드(104)가 제3 단계(306)에서 생산 공정 사이클을 실행하는 동안 제2 스키드(106)의 칼럼으로부터 단백질의 용리를 지시한다. 이후, 제어 회로(102)가 제2 스키드(106)의 칼럼으로부터 미리 정해진 단백질 역가가 용리되었다고 판단하면, 제7 단계(314)에서, 제어 회로(102)는 제2 동기화 신호를 생성/송신/수신하고, 제8 단계(316)에서, 제2 스키드(106)는 제1 스키드(104)가 용리되는 동안 생산 공정 사이클을 실행한다. 이러한 구성으로, 단백질의 용리와 생산 공정 사이클의 실행이 2개 이상의 스키드(104, 106) 사이에서 연속적으로 전환될 수 있어 연속적인 병렬 처리 방법을 제공한다.

도 4의 공정(300)에 따른 각각의 스키드(104, 106)에 대한 처리 단계를 보여주는 흐름도가 도 5에 도시되어 있

다. 각 스키드(104, 106)는 연관된 제1 및 제2 펌프(122, 124)를 갖는 크로마토그래피 칼럼(120)을 포함하며, 여기서 하나의 펌프(124)는 용리 전용이고 하나의 펌프(122)는 다른 모든 처리 단계에 이용된다. 그러나, 제1 및 제2 펌프(122, 124)는 단일 펌프일 수 있고, 또는 원하는 경우 각 펌프(122, 124)에 대해 하나 또는 복수의 펌프를 포함할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 대안적으로, 펌프(122, 124)는 원한다면 각각의 스키드(104, 106)에 선택적으로 연결될 수 있는 하나 이상의 펌프를 의미할 수 있다.

이러한 형태에서, 시스템(100)은 구배 용리가 있는 결합 및 용리 모드에서 동작한다. 공정은 제1 스키드(104)의 제1 펌프(122)가 평형화 단계(320), 로딩 단계(322), 및 하나 이상의 선택적 세척 단계(324, 326, 328)를 수행하는 것으로 시작된다. 제1 스키드(104)의 칼럼(120)에 대한 세척 단계(328)가 완료된 후, 제1 스키드(104)의 제2 펌프(124)는 칼럼(120)에 대해 용리 단계(330)를 시작한다. 제1 스키드(104)의 칼럼(120)이 용리되는 동안, 제2 스키드(106)의 제1 펌프(122)는 평형화 단계(332), 로딩 단계(334), 및 제1, 제2 및 제3 선택적 세척 단계(336, 338, 340)를 순차적으로 수행한다. 그 후, 공정(300)에서 더 긴 용리 시간을 고려해야 하는 경우, 제2 스키드(106)의 제1 펌프(122)는 미리 결정된 시간 간격 동안 차단(342)될 수 있다. 제1 스키드(104)에 대한 용리 단계(330)가 완료된 후, 제2 스키드(106)의 제2 펌프(124)는 칼럼(120)에 대해 용리 단계(344)를 시작한다. 이는 상기한 동기화 신호를 통해 달성된다. 제2 스키드(106)의 칼럼(120)이 용리되는 동안, 제1 스키드(104)의 제1 펌프(122)는 재생 단계(346) 및 플러싱 단계(348)를 수행하여 칼럼(120)에 대해 전체 사이클을 완료한다. 그 다음, 제1 펌프(122)는 제1 스키드(104)의 제1 펌프(122)가 평형화 단계(350), 로딩 단계(352), 제1, 제2, 및 제3 선택적 세척 단계(354, 356, 358)를 수행하는 것으로 새로운 사이클을 시작하고, 이어서 제1 펌프(122)는 제2 스키드(106)의 칼럼(120)에 대해 더 긴 용리 시간을 고려해야 하는 경우 미리 결정된 시간 간격 동안 차단(360)된다. 제2 스키드(106)에 대한 용리 단계(344)가 완료된 후, 제1 스키드(104)의 제2 펌프(124)는 칼럼(120)에 대해 다른 용리 단계(362)를 시작한다. 이는 상기한 동기화 신호를 통해 달성된다. 제1 스키드(104)의 칼럼(120)이 용리되는 동안, 제2 스키드(104)의 제1 펌프(122)는 재생 단계(364) 및 플러싱 단계(366)를 수행하여 칼럼(120)에 대해 전체 사이클을 완료한다.

처리 사이클에서, 재생 단계 내지 세척 단계는 모두 용리 사이클 시간 이하 내에 수행된다. 따라서, 처리 사이클 타이밍을 용리 사이클에 동기화하기 위해 시간 간격이 처리 사이클에 추가될 수 있다. 사이클은 예를 들어 칼럼(120)의 크기, 결합된 단백질의 농도, 사용되는 크로마토그래피 매질의 결합 용량 및/또는 용리 풀에 있어서 원하는 역가 등 공정 인프라(infrastructure)에 있어서의 임의의 파라미터에 가장 적합하도록 정의될 수 있다.

용리 시간은 크로마토그래피 모드, 결합된 단백질의 농도, 임의의 구배의 기울기 또는 변화율 및/또는 사용되는 크로마토그래피 매질의 결합 용량에 따라 달라진다. 용리 시간은 전체 공정 요구 사항, 예컨대 목표 처리 시간을 충족해야 한다. 예를 들어, 이러한 목표 처리 시간은 24시간 이내 또는 1교대 이내일 수 있다. 통상적으로, 이러한 용리 시간은 크로마토그래피 매질에 결합된 단백질의 양에 따라 약 2시간 이하이다. 일 실시형태에서, 각 전체 병렬 사이클은 통상적으로 5 내지 8시간 내에 완료된다.

일 실시형태에서, 용리 시간은 약 1시간 내지 약 24시간이다. 일 실시형태에서, 용리 시간은 약 12시간 내지 약 24시간이다. 일 실시형태에서, 용리 시간은 약 8시간 내지 약 12시간이다. 일 실시형태에서, 로딩 시간은 약 5시간 내지 약 8시간이다. 일 실시형태에서, 용리 시간은 약 1시간 내지 약 5시간이다. 일 실시형태에서, 용리 시간은 약 2시간 내지 약 5시간이다. 일 실시형태에서, 용리 시간은 약 3시간 내지 약 5시간이다. 일 실시형태에서, 용리 시간은 약 4시간 내지 약 5시간이다. 일 실시형태에서, 용리 시간은 약 1시간 내지 약 4시간이다. 일 실시형태에서, 용리 시간은 약 2시간 내지 약 4시간이다. 일 실시형태에서, 용리 시간은 약 3시간 내지 약 4시간이다. 일 실시형태에서, 용리 시간은 약 1시간 내지 약 3시간이다. 일 실시형태에서, 용리 시간은 약 2시간 내지 약 3시간이다. 일 실시형태에서, 용리 시간은 약 1시간 내지 2시간이다. 일 실시형태에서, 용리 시간은약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 약 9시간, 약 10시간, 약 11시간, 약 12시간, 약 16시간, 약 18시간, 또는 약 24시간이다. 용리에 이어, 폴리시 크로마토그래피 칼럼(120)은 제1 펌프(122)를 이용하여 수행되는 재생, 플러시, 평형화, 로딩 및 세척 단계로 처리된다.

유속은 공정 요구 사항, 예컨대 목표 처리 시간을 충족해야 한다. 예를 들어, 이러한 목표 유속은 50 내지 1000 cm/시간 이내일 수 있다. 일 실시형태에서, 유속은 50 cm/시간 이상이다. 일 실시형태에서, 유속은 적어도 1000 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 100 내지 1000 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 200 내지 1000 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 300 내지 1000 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 400 내지 1000 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 500 내지 1000 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 600 내지 1000 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 700 내지 1000 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 800 내지 1000

cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 900 내지 1000 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 100 내지 900 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 200 내지 900 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 300 내지 900 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 400 내지 900 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 500 내지 900 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 600 내지 900 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 700 내지 900 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 800 내지 900 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 100 내지 800 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 200 내지 800 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 300 내지 800 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 400 내지 800 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 500 내지 800 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 600 내지 800 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 700 내지 800 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 100 내지 700 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 200 내지 700 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 300 내지 700 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 400 내지 700 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 500 내지 700 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 600 내지 700 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 100 내지 600 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 200 내지 600 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 300 내지 600 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 400 내지 600 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 500 내지 600 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 100 내지 500 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 200 내지 500 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 300 내지 500 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 400 내지 500 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 100 내지 400 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 200 내지 400 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 300 내지 400 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 100 내지 300 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 200 내지 300 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 100 내지 100 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 50 내지 100 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 50 내지 200 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 50 내지 300 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 50 내지 400 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 50 내지 500 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 50 내지 600 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 50 내지 700 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 50 내지 800 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 50 내지 900 cm/시간이다. 일 실시형태에서, 유속은 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 또는 1000 cm/시간이다.

목표 처리 시간을 충족시키기 위해, 유속은 50 내지 1000 cm/시간 이내일 수 있고, 용리 시간은 1시간 내지 24시간 이내일 수 있다.

전체 병렬 사이클은 24시간 또는 단일 교대일 수 있다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 약 5시간 내지 약 24시간이다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 12시간 내지 24시간이다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 8시간 내지 12시간이다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 5시간 내지 8시간이다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 5시간 내지 7시간이다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 5시간 내지 6시간이다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 6시간 내지 8시간이다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 6시간 내지 7시간이다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 5시간 이하이다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 1시간 내지 5시간이다. 일 실시형태에서, 전체 병렬 사이클은 1시간 내지 5시간이다. 일 실시형태에서, 전체 사이클은 2시간 내지 5시간이다. 일 실시형태에서, 전체 사이클은 3시간 내지 5사이클이다. 일 실시형태에서, 전체 사이클은 4시간 내지 5시간이다. 일 실시형태에서, 전체 사이클은 2시간 내지 5시간이다. 일 실시형태에서, 전체 사이클은 3시간 내지 5시간이다. 일 실시형태에서, 전체 사이클은 4시간 내지 5시간이다. 일 실시형태에서, 전체 사이클은 3시간 내지 5시간이다. 전형적으로, 일일 병렬 사이클의 수는 1 내지 5이다.

결합된 재조합 단백질은 완충액 조건을 변경함으로써 칼럼(120)으로부터 용리될 수 있다. 용리는 이소크래틱 구배 또는 기타 적합한 방법이나 이들 방법의 조합으로 행할 수 있다.

구배의 속도 또는 기울기는 용리 완충액의 염의 mM/칼럼 부피(CV)로서 측정할 수 있다. 예를 들어, 0 mM 내지 1000 mM까지의 염화나트륨 구배의 경우, 용리를 위해 이용되는 통상적인 기울기 범위는 5 mM 염/CV 내지 50 mM/CV이다. 일 실시형태에서, 기울기는 5 mM/CV 내지 20 mM/CV이다. 용리 기간은 통상적으로 0 CV 내지 100 CV 사이이다. 일 실시형태에서, 용리 기간은 0 CV 초과 내지 20 CV이다.

크로마토그래피 칼럼(120)은 정제될 재조합 단백질을 함유하는 공급원료와 접촉되기 전에 적합한 완충액으로 평형화될 수 있다. 예시적 평형화 완충액에는 정제되는 물질에 대한 적절한 농도, 전도도 및/또는 pH의 HEPES, Tris, 인산염, 시트르산염, MES, BES, PIPES, Tricine, Bicine, TES, TAPSO, MOPS 등이 있다.

공급원료가 칼럼(120)에 일단 로딩되면, 칼럼은 선택적으로, 용리 단계 전에 하나 이상의 세척 용액으로 세척된

다. 세척 단계는, 칼럼에 있지만 아직 크로마토그래피 물질에 결합되지 않은 관심 단백질을 결합하고, 틈새 공간으로부터 로딩 물질을 씻어내고, 크로마토그래피 매질에 결합되어 있거나, 및/또는 크로마토그래피 매질 내에 있는 불순물을 제거하고, 및/또는 용리를 위해 칼럼(120)을 준비하기 위해 수행될 수 있다. 세척 단계의 목적과 수에 따라 여러 세척액을 사용할 수 있다. 세척 완충액에는 평형화 완충액 및 로딩 완충액의 사용이 포함될 수 있다. 통상적인 완충액 제제에는 특히, 트리스 완충액 또는 인산염; 아세트산나트륨, 시트르산나트륨 또는 염화나트륨과 같은 염; 칼슘, 마그네슘 또는 니켈과 같은 2가 양이온, 세제 폴리머, 아미노산, 당 알코올 및/또는 카오트로픽제가 포함된다. 여러 세척 완충액이 사용되는 경우, 세척 완충액 제제의 조성 및/또는 농도는 필요에 따라 다를 수 있다. 세척은 적절한 pH, 전형적으로 중성 pH에서 수행되지만, 필요에 따라 더 높거나 낮은 pH에서 수행될 수도 있다.

결합된 재조합 단백질은 완충액 조건을 변경함으로써 칼럼(120)에서 용리된다. 용리는 이소크래틱 구배 또는 기타 적합한 방법이나 이들 방법의 조합으로 행할 수 있다. 용리는 용리되는 단백질에 적합한 pH, 염 및/또는 완충액 조건 하에서 수행된다. 통상적인 완충액 제제에는 특히, 트리스 완충액 또는 인산염; 아세트산나트륨, 시트르산나트륨 또는 염화나트륨과 같은 염; 칼슘, 마그네슘 또는 니켈과 같은 2가 양이온, 세제 폴리머, 아미노산, 당 알코올 및/또는 카오트로픽제가 포함된다.

폴리시 크로마토그래피 매질을 세정하고 재생하는 데 적합한 방법과 완충액이 알려져 있다.

통상, 하나, 둘 또는 세 개로서, 복수의 크로마토그래피 단위 작업은 각각이 다른 기능을 수행하고, 제조 공정의 요구 사항에 따라 조합된다. 이온 교환 크로마토그래피는 전하를 띤 표면 사이의 정전기적 상호작용을 기초하여, 차등적 흡수 및 탈착을 기반으로 관심 단백질을 불순물로부터 분리한다. 양이온 교환 크로마토그래피는, 음으로 하전되고, 고상을 지나치거나 또는 이를 통과한 수용액 중 양이온과의 교환을 위한 자유 양이온을 갖는 고상 매질 상에서 수행되는 크로마토그래피를 의미한다. 전하는, 예를 들어, 공유 결합에 의해, 고상에 하나 이상의 하전된 리간드를 부착함으로써 제공될 수 있다. 대안적으로, 또는 부가적으로, 전하는 (예를 들어, 전체 음전하를 갖는, 실리카의 경우에서와 같이) 고상의 내재적 특성일 수 있다. 양이온 교환 크로마토그래피는 통상적으로 결합 및 용리 모드에서 실행되며, 많은 관심 단백질의 높은 등전점으로 인해 크로마토그래피 물질에 대한 결합이 가능하다. 양이온 교환 크로마토그래피는 관류 모드에서도 실행될 수 있다. CEX 크로마토그래피는 통상적으로 고분자량(HMW) 오염물, 공정 관련 불순물 및/또는 바이러스 제거(viral clearance)를 제거하는 데 사용된다. 상업적으로 이용 가능한 양이온 교환 매질이 이용 가능하며, 아가로스에 고정된 설포프로필(sulphopropyl)(SP)(예: SP-SEPHAROSE FAST FLOW™, SP-SEPHAROSE FAST FLOW XL™ 또는 SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™), CAPTO S™, CAPTO SP ImpRes™, CAPTO S ImpAct™(Cytiva), FRACTOGEL-SO3™, FRACTOGEL-SE HICAP™ 및 FRACTOPREP™(EMD Merck, Darmstadt, Germany), TOYOPEARL® XS, TOYOPEARL® HS(Tosh Bioscience, King of Prussia, PA), UNOsphere™ (BioRad, Hercules, CA), S Ceramic Hyper D™F (Pall, Port Washington, NY), POROS™ (ThermoFisher, Waltham, MA)이 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

음이온 교환 크로마토그래피는, 양으로 하전되고, 고상을 지나치거나 또는 이를 통과한 수용액 중 음이온과의 교환을 위한 자유 음이온을 갖는 고상 매질 상에서 수행되는 크로마토그래피를 의미한다. 음이온 교환 크로마토그래피는 통상적으로 관류 모드에서 실행된다. 많은 관심 단백질의 높은 pI 때문에, 이들 단백질은 AEX 크로마토그래피 물질에 결합하지 않는다. 예를 들어 AEX 크로마토그래피는 바이러스 제거 및 불순물 제거에 이용된다. 상업적으로 이용 가능한 음이온 교환 매질이 이용 가능하며, 아가로스에 고정된 설포프로필(SP)(예: Source 15 Q, Capto™ Q, Q-SEPHAROSE FAST FLOW™(Cytiva), FRACTOGEL EDM TMAE™, FRACTOGEL EDM DEAE™(EMD Merck), TOYOPEARL SuperQ® (Tosh Bioscience), POROS HQ™, POROS XQ™, (ThermoFisher)가 있지만, 이에 제한되지 않는다.

혼합-모드 또는 다중-모드 크로마토그래피(MMC)는 이온 교환(CEX 또는 AEX) 및 소수성 상호작용 등과 같은 상호작용 메커니즘의 조합을 활용하는 고체상 매질에서 수행되는 크로마토그래피를 의미한다. 상업적으로 이용 가능한 다중-모드 크로마토그래피 매질이 이용 가능하며, Capto™ Adhere Anion Exchange Multi Mode, PPA Hypercel 및 HEA Hypercel을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

소수성 상호작용 크로마토그래피는 관심 단백질 표면 상의 소수성 리간드와 소수성 잔류물 사이의 상호작용을 활용하는 고체상 매질에서 수행되는 크로마토그래피를 의미한다. 상업적으로 이용 가능한 소수성 상호작용 크로마토그래피 매질에는 Phenyl Sepharose™, Tosoh hexyl 및 Capto™ phenyl이 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

하이드록시아파타이트 크로마토그래피는, 양전하를 띤 칼슘과 음전하를 띤 인산염을 사용하고 단백질의 pI과 완충액의 pH에 따라 양이온 또는 음이온으로서 작용할 수 있는 고체상 매질에서 수행되는 크로마토그래피를 의미한다.

일 실시형태에서, 2개 이상의 폴리시 크로마토그래피 칼럼은 직렬로 접속되고 하나의 폴리시 크로마토그래피 유닛으로서 관류 모드에서 실행된다. 결합된 칼럼은 완전한 폴리시 크로마토그래피 단위 작업으로서 동작되거나, 결합 및 용리 모드, 및/또는 관류 모드에서 실행되는 하나 이상의 추가 폴리시 크로마토그래피 유닛과 조합하여 이용될 수 있다.

관심 단백질을 함유하는 용리액 스트림 또는 풀은, 특히 관심 단백질이 크로마토그래피 매질에 결합되는 방식으로 폴리시 크로마토그래피 칼럼에 로딩될 수 있다. 용리액 스트림은 관심 단백질이 크로마토그래피 매질에 결합되지 않는 방식으로 폴리시 크로마토그래피 칼럼에 로딩될 수 있다. 용리액 스트림 또는 풀은 세포 배양 채취액(harvest fluid), 친화성 크로마토그래피, 바이러스 불활성화, 바이러스 여과, 심층 여과 및/또는 다른 폴리시 크로마토그래피 작업과 같은 이전 단위 작업에서 유래했을 수 있다. 추가적인 완충액은 단백질의 최종 로딩이 요망되는 농도 및/또는 제제에 있도록 용리액 또는 풀에 첨가될 수 있다.

폴리시 단위 작업을 위한 로딩 물질은 바이러스 불활성화 단위 작업, 특히 저 pH 바이러스 불활성화 단위 작업으로부터의 풀 또는 용리액, 예를 들어 중화된 바이러스 불활성화 풀 또는 용리액일 수 있다.

유리하게는, 공정(200, 300)과 관련하여 위에서 논의한 스키드(104, 106)에 위치한 크로마토그래피 칼럼은 서로 물리적으로 독립된 것일 수 있다. 즉 직렬로 또는 임의의 다른 방식으로 접속되지 않을 수 있다. 크로마토그래피 칼럼(120)은 로딩 중에(칼럼 오버로딩 없음) 칼럼 접속 없이 병렬로 순환되며, 하나의 칼럼(120)으로부터의 오버플로우는 별도 스키드의 임의의 다른 크로마토그래피 칼럼에 직접 로딩되지 않는다. 상기 방법을 활용하면 주기적 역류 크로마토그래피와 같은 시스템에서 물리적으로 접속된 직렬 칼럼 사이의 관류 공정의 결과처럼 스키드(104, 106)의 칼럼(120)이 오버로딩되지 않는다. 따라서, 본원에 기술된 방법은 칼럼상 응집 또는 고농도 응집과 같은 안정성 문제가 있는 재조합 단백질에 특히 유리하다. 스키드(104, 106)는 다음과 같은 양태 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

스키드(104, 106)의 크로마토그래피 칼럼(120)은 포획 크로마토그래피에 적절한 단일 크로마토그래피 칼럼일 수 있다. 이러한 크로마토그래피 칼럼은, 적합한 조건 하에서 관심 재조합 단백질이 크로마토그래피 매질에 결합하는 수지, 멤브레인, 겔 등과 같은 매질을 이용한다. 크로마토그래피 매질에 단백질을 "결합"한다는 것은 적절한 조건(pH, 전도도) 또는 친화성 하에서 관심 단백질을 크로마토그래피 매질에 노출시켜 관심 단백질과, 이온 교환 매질과 같은 크로마토그래피 매질의 하전된 그룹(들) 또는 단백질 A 매질과 같은 관심 단백질에 친화성이 있는 리간드 또는 다른 작용제와의 상호 작용을 통해 관심 단백질이 크로마토그래피 매질 내에서 또는 크로마토그래피 매질 상에서 가역적으로 고정되는 것을 의미한다.

단백질 A, 단백질 G 또는 단백질 L 크로마토그래피를 포함하는 친화성 크로마토그래피, 고정화 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC), 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 양이온 교환 크로마토그래피(CEX) 및 음이온 교환 크로마토그래피(AEX)를 포함하는 이온 교환 크로마토그래피(IEX), 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 다중 모드 크로마토그래피 또는 혼합 모드 크로마토그래피(MM), 하이드록시아파타이트 크로마토그래피(HA) 등과 같은 크로마토그래피 양태의 예가 본원에 기술된 병렬 크로마토그래피 시스템에 사용하기에 적합하다. 이러한 크로마토그래피 물질은 당분야에 알려져 있으며 상업적으로 이용 가능하다.

2개 이상의 유사한 크로마토그래피 칼럼 스키드(104, 106)는 병렬로 실행될 수 있으며, 본원에 설명된 것과 같은 연속 병렬 크로마토그래피 시스템(100)에 의해 제어될 수 있다. 적어도 하나의 크로마토그래피 스키드가 가장 긴 사이클 시간, 예를 들어 긴 단계(예: 로딩 또는 용리)를 갖는 동작을 실행하는 동안, 적어도 하나의 크로마토그래피 스키드는, 평형화, 로딩, 세척, 용리, 칼럼 세정 및 재생 단계(칼럼 스트라이핑 및 플러싱이 포함될 수 있음) 중 하나 이상을 포함할 수 있는, 더 짧은 사이클을 갖는 적어도 하나 이상의 공정 단계를 포함하는 생산 공정 사이클을 실행한다. 단계와, 단계의 순서, 수 및 기간은 정제되는 단백질과 제조 캠페인의 목적에 영향을 받는다.

크로마토그래피 칼럼 스키드(104, 106)는 또한 적어도 하나의 펌프(122, 124)를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 스키드는 2개 이상의 펌프를 포함한다. 펌프(들)는 특히 일정한 유속으로 크로마토그래피 칼럼을 통해 공급 로딩물(feed load)을 밀어내는 데 사용된다. 이러한 펌프에는 예컨대, 연동 펌프, 다이어프램 펌프, 원심 펌프가 포함된다. 단일 펌프가 장착된 스키드의 경우, 시간설정 밸브 스위칭을 이용하여 2개 또는 3개의 입구 채널

로부터 계량된 액체 용액을 관리할 수 있다. 2개 이상의 펌프가 구비된 스키드의 경우, 독립 펌프를 입구에 접속할 수 있다.

각각의 크로마토그래피 칼럼 스키드(104, 106)는 공급물의 흐름을 칼럼 내로 향하게 하고 칼럼 밖으로 용리하기 위해 적어도 하나의 입구와 하나의 출구를 포함한다. 입구는 상류 공급원에 선택적으로 연결될 수 있다. 상류 공급원은 크로마토그래피 스키드에 공급되는 모든 유체, 즉 공급원료를 포함할 수 있다. 상류 공급원은 서지 탱크, 보유 탱크, 백, 또는 적어도 하나의 크로마토그래피 칼럼 스키드에 공급물을 제공하도록 되어 있는 기타 적합한 용기에 포함될 수 있다.

공급원료는 크로마토그래피 칼럼에 공급되는 임의의 유체로 구성된다. 공급원료는 적어도 하나의 관심 단백질을 포함할 수 있다. 공급원료는 서지 탱크, 보유 탱크, 백 또는 이러한 회수 및 보관에 적합한 기타 적합한 용기에 회수된 풀 재료로부터 유래할 수 있다. 이러한 용기는 크로마토그래피 칼럼 스키드에 공급원료를 제공하도록 되어 있을 수 있다. 공급원료는 또한 상류 공급원으로부터 직접 공급되는 용리액 스트림의 형태일 수도 있다.

일부 경우에, 공급원료는 풀 또는 용리액 스트림에서 회수된 관심 단백질을 포함하는 채취 세포 배양액을 포함할 수 있다. 채취 세포 배양액은 임의 유형의 채취 단위 작업으로부터 회수될 수 있다. 공급원료는 관심 단백질을 포함하는 크로마토그래피 칼럼으로부터 회수된 용리액 풀 또는 스트림을 포함할 수 있다. 크로마토그래피 칼럼 용리액 풀 또는 스트림은 임의 유형의 포획 크로마토그래피 단위 작업으로부터 회수될 수 있다. 크로마토그래피 칼럼 풀 또는 스트림의 예는 단백질 A, 단백질 G 또는 단백질 L로부터의 친화성 크로마토그래피 칼럼 용리액 풀을 포함한다. 크로마토그래피 풀 또는 스트림은 고정형 금속 친화성 크로마토그래피 용리액 풀 또는 스트림일 수 있다. 크로마토그래피 칼럼 풀은 예컨대, 음이온 교환 크로마토그래피 용리액 풀 또는 스트림 또는 양이온 교환 크로마토그래피 용리액 풀 또는 스트림과 같은 이온 교환 크로마토그래피 용리액 풀 또는 스트림, 다중-모드 또는 혼합 모드 크로마토그래피 용리액 풀 또는 스트림, 소수성 상호작용 크로마토그래피 칼럼 용리액 풀 또는 스트림, 하이드록시아파타이트 칼럼 용리액 풀 또는 스트림, 또는 단백질 성분을 포함하는 크기 배제 크로마토그래피 칼럼 용리제 풀 또는 스트림일 수 있다.

공급원료는 상기 중 임의의 것으로부터의 바이러스 불활성화 용리액 풀 또는 스트림을 포함할 수 있다. 공급원료는 또한 상기 중 임의의 것으로부터의 중화된 바이러스 불활성화 용리액 풀 또는 스트림을 포함할 수 있다. 공급원료는 또한 상기 중 임의의 것으로부터의 중화된 용리액 풀 또는 스트림을 포함할 수 있다. 공급원료는 상기 중 임의의 것으로부터의 바이러스 여과된 용리액 풀 또는 스트림을 포함할 수 있다.

공급원료는 또한 스키드의 크로마토그래피 칼럼의 평형화, 세척, 용리, 재구성, 스트리핑 및/또는 플러싱에 사용하기에 적합한 저장 용액, 염 용액, 산 용액, 완충 용액, 및 이들의 조합 등과 같은 하나 이상의 "처리 공급원료"를 포함할 수 있다.

스키드에 대하여 들어오고 나가는 공급원료의 유속, 압력 및/또는 부피와 같은 물리적 매개변수를 측정 및/또는 모니터링하기 위해 입구 및/또는 출구에 하나 이상의 센서가 위치할 수 있다. 센서는 또한, 용리액 내 관심 단백질, 오염물 및/또는 불순물의 품질/양을 모니터링/측정하는 데 사용될 수 있다. 센서는 또한 평형화, 세척, 재구성, 스트립 및/또는 플러시 단계의 효능을 모니터링/측정하는 데 사용될 수 있다. 센서는 UV 센서와 pH 센서를 포함할 수 있다.

각각의 크로마토그래피 칼럼 스키드(104, 106)는 복수의 밸브를 포함할 수 있다.

각 크로마토그래피 칼럼 스키드(104, 106)는 크로마토그래피 칼럼, 펌프, 입구 및 출구, 센서, 밸브, 필터 등과 같은 스키드(104, 106)를 구성하는 구성요소를 수용하고 동작시키기 위한 구조 및 지지대를 포함한다. 스키드 구조는 목적 및 사용, 특히 통제된 환경에서의 사용에 적합한 스테인레스 스틸, 알루미늄 및/또는 플라스틱과 같은 임의의 적합한 재료로 만들어질 수 있다. 스키드는 바퀴나 롤러와 같은 일부 이동 기구를 구비할 수 있다.

예시적인 크로마토그래피 스키드(104, 106)가 도 6에 도시되어 있다. 크로마토그래피 스키드(104, 106)는 a) 적어도 2개의 입구 밸브 매니폴드(140) 상에 배치된 임의의 수의 입구 밸브(136), b) 적어도 하나의 펌프(122, 124), c) 유로에 대해 바이패스되거나 선택되는 적절한 밸브(136)를 갖는 단일 크로마토그래피 칼럼(120), d) 관심 재조합 단백질이 칼럼에 대해 로딩 및/또는 용리될 때 관심 재조합 단백질을 감지할 수 있는 적어도 하나의 기기(130), 및 e) 공급원료 및 폐기물 스트림을 적절한 보유 용기, 폐기물 용기로 향하게 하거나, 및/또는 용리액 스트림을 다른 하류 처리 유닛으로 향하게 하기 위한 임의 개수의 출구 밸브(138)를 포함할 수 있다. 스키드(104, 106)는 또한 압력, 흐름, pH, 전도도, 온도 등을 측정하기 위해 추가의 밸브, 필터 및 기기를 포함할 수 있다. 추가로, 스키드(104, 106)는 공급원료 로딩 스트림 또는 완충액 입구에 공기를 포획하기 위한 버블 트

랩을 구비할 수 있다. 별도의 샘플링 기구 또는 압력 완화를 위한 안전 기구의 추가는 병렬 크로마토그래피 시스템(100)에 참여하는 능력에 영향을 주지 않으면서 스키드(104, 106)에 포함될 수 있다.

예시된 형태에서, 각각의 스키드(104, 106)는 독립적인 배치 처리에 적합한 구성요소를 포함한다. 이와 같이, 각각의 스키드(104, 106)는 크로마토그래피 칼럼(120), 펌프(122), 선택적인 제2 펌프(124), 입구(126), 출구(127), 적어도 하나의 필터(128) 및 출구 센서(130)를 포함한다. 또한, 모든 구성요소는 스키드(104, 106)가 시설 내에서 원하는 위치로 쉽게 이동할 수 있도록 하는 휠/롤러(134)를 갖는 베이스(132)에 설치될 수 있다. 이는 사용자가 제조 캠페인에 필요한 임의의 원하는 개수의 스키드(104, 106)를 쉽게 셋업할 수 있게 한다. 각각의 스키드(104, 106)의 입구(126)로의 유체 흐름은, 각각의 스키드(104, 106)에 의해 운반될 수 있거나 원하는 경우 스키드(104, 106)의 상류에 위치할 수 있는 하나 이상의 밸브(136)의 동작에 의해 제어될 수 있으며, 각각의 스키드(104, 106)의 출구(127)로의 유체 흐름은 각각의 스키드(104, 106)에 의해 운반될 수 있거나 스키드(104, 106)의 하류에 위치할 수 있는 하나 이상의 밸브(138)의 동작에 의해 제어될 수 있다. 이렇게 구성하면, 스키드(104, 106) 중 하나에 대한 밸브(136)가 개방되면, 관심 단백질을 포함하는 미리 결정된 양의 공급원료가 결합 및 용리 모드에서 칼럼(120)에 로딩된다. 칼럼으로부터의 출력은 밸브(138)에 의해 제어되고 출구 센서(130)에 의해 측정될 수 있으며, 특히 측정은 용리가 원하는 품질을 갖는 시기를 결정하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 출구 센서(130)는 단백질 농도를 결정하기 위한 자외선(UV) 센서일 수 있다. 유리하게는, 시스템(100)은 칼럼(120)을 사용 사이에 교체할 수 있게 하는 일회용 칼럼을 활용할 수 있다. 시스템의 스키드(104, 106)의 칼럼(120)은 또한 서로에 대해 다양한 크기/부피를 가질 수 있다.

로딩 및 처리 단계는 단일 펌프(122)와, 2개 또는 3개의 입구 채널로부터 계량된 액체 용액을 관리하는 밸브(136)의 시간설정 스위칭을 이용하여 수행될 수 있다.

로딩 및 처리 단계는 각 펌프(122, 124)의 개별 동작을 허용하도록 구성된 2개 이상의 펌프(122, 124)를 이용하여 수행될 수 있다. 중앙 프로세서(108), 또는 대안적으로 개별 프로세서(110) 중 하나는 각 펌프(122, 124)의 작용을 지시한다. 도 2 내지 도 5를 참조하여 상기한 바와 같이, 하나 이상의 펌프(122, 124)는 공정(200, 300)의 1차 사이클, 즉 시스템(100)에 대해 타이밍을 설정하는 가장 긴 사이클(예를 들어 친화성 크로마토그래피를 위한 로딩, 폴리시 크로마토그래피를 위한 용리)을 동작시키는 데 이용될 수 있고, 하나 이상의 펌프(122, 124)는 2차 사이클, 즉 평형화, 로딩, 세척, 용리, 칼럼 세척 및 재생(칼럼 스트라이핑 및 플러싱을 포함할 수 있음) 중 적어도 하나 이상의 단계를 포함하는 생산 공정 사이클을 동작시키는 데 이용될 수 있다.

제어 회로(102)는 2개 이상의 크로마토그래피 스키드(104, 106)의 작용을 동기화한다. 제어 회로(102)는 어느 사이클을 실행할 것인지에 관해 스키드(104, 106)에 지시하고, 사이클이 완료되면 스위치를 동기화하여 다음 사이클을 실행한다.

크로마토그래피 칼럼 스키드(104, 106)에 로딩될 공급원료를 제공하는 공급원료 공급원(402)를 포함하는 연속 공정 크로마토그래피 시스템(400) 구성의 예가 도 7에 도시되어 있다. 스키드(104, 106)로부터의 용리물은 하나 이상의 회수 탱크(404)에 공급된다. 예를 들어, 회수 탱크(404)는 각 스키드에 대해 공유된 공통 탱크일 수 있고, 각 스키드는 별도의 회수 탱크를 가질 수 있고, 또는 스키드 그룹이 별도의 탱크를 공유할 수 있다. 공유 회수 탱크(404)를 활용하는 구성의 경우, 탱크(404)는 임의의 주어진 순간에 어떤 스키드(104, 106)가 공급원료를 처리하는지에 관계없이 전체 시스템의 연속 처리를 유지하기 위해 서지 탱크로서 동작할 수 있다. 그런 다음 회수 탱크(304)는 하류 처리 유닛(406) 및 궁극적으로 최종 제품 회수 탱크(408)에 유체적으로 접속된다.

도 8 내지 도 10은 본원에 기술된 연속 처리 크로마토그래피 공정을 재조합 단백질 제조 공정(500)에 통합하는 여러 예시적인 구성을 보여준다. 공정(500)은 세포 배양 작업(502)으로 시작하여, 이어서 채취 작업(504), 친화성 크로마토그래피 작업(506), 바이러스 불활성화 및 중화 작업(508), 및 제1 및 제2 폴리시 크로마토그래피 작업(510, 512)으로 이어진다. 마지막으로, 공정(500)은 추가 처리 단위 작업(514)으로 계속될 수 있다.

도 8의 하류 공정(500)에서, 적어도 2개의 친화성 크로마토그래피 스키드(AC)(104, 106)는 채취 작업(504)에 이어 친화성 크로마토그래피 작업(506)에서 도 2 및 도 3과 관련하여 전술한 공정(200)에 따라 병렬 처리 시스템(100)에서 동작하도록 활용된다. 이러한 형태에서, 폴리시 크로마토그래피 작업(510, 512)은 임의의 수의 단일 칼럼 독립 단위 작업일 수 있거나, 예를 들어 단일 폴리시 크로마토그래피 단위 작업을 형성하기 위해 직렬로 접속된 2개의 칼럼일 수 있다.

도 9의 하류 공정(500)에서, 적어도 2개의 폴리시 크로마토그래피 스키드(PC1)(104, 106)는 친화성 크로마토그래피 단계(506) 및 친화성 크로마토그래피 용리액의 바이러스 불활성화 및 중화 단계(508)에 이은 제1 폴리시

크로마토그래피 단계(510)에서 도 4 및 도 5와 관련하여 전술한 공정(300)에 따라 병렬 처리 시스템(100)에서 동작하도록 활용된다. 이러한 형태에서, 친화성 크로마토그래피 작업(506) 및 제2 폴리시 크로마토그래피 작업(512)은 임의 개수의 단일 독립 크로마토그래피 단위 작업에 의해 수행될 수 있다. 일 양태에서, 폴리시 크로마토그래피 단계(510 및 512)의 순서는 역전될 수 있는데, 병렬 처리 시스템(100)을 이용하여 수행되는 폴리시 크로마토그래피 작업이 제2 폴리시 크로마토그래피 작업으로서 일어난다. 일 양태에서, 폴리시 크로마토그래피 작업(510)은 또한 유일한 폴리시 작업일 수 있다. 일 양태에서, 둘 이상의 폴리시 크로마토그래피 작업(510 및/또는 512)이 있을 수 있다.

도 10의 하류 공정(500)에서, 적어도 2개의 친화성 크로마토그래피 스키드(AC)(104, 106)는 수확 동작(504)에 이어 친화성 크로마토그래피 작업(506)에서 도 2 및 도 3과 관련하여 전술한 공정(200)에 따라 병렬 처리 시스템(100)에서

동작하도록 활용된다. 또한, 적어도 2개의 폴리시 크로마토그래피 스키드(PC1)(104, 106)는 친화성 크로마토그래피 단계(506) 및 친화성 크로마토그래피 용리액의 바이러스 불활성화 및 중화 단계(508)에 이은 제1 폴리시 크로마토그래피 단계(510)에서 도 4 및 도 5와 관련하여 전술한 공정(300)에 따라 병렬 처리 시스템(100)에서 동작하도록 활용된다. 이러한 형태에서, 제2 폴리시 크로마토그래피 작업(512)은 임의 개수의 단일 독립 크로마토그래피 단위 작업에 의해 수행될 수 있다. 일 양태에서, 폴리시 크로마토그래피 단계(510 및 512)의 순서는 역전될 수 있는데, 병렬 처리 시스템(100)을 이용하여 수행되는 폴리시 크로마토그래피 작업이 제2 폴리시 크로마토그래피 작업으로서 일어난다. 일 양태에서, 폴리시 크로마토그래피 작업(510)은 유일한 폴리시 작업일 수 있다. 일 양태에서, 둘 이상의 폴리시 크로마토그래피 작업(510 및/또는 512)이 있을 수 있다.

로딩 및 용리 단계의 타이밍은 변동될 수 있다. 예를 들어, 단백질 A 친화성 크로마토그래피 칼럼을 이용하여 친화성 크로마토그래피를 수행하는 경우, 로딩 단계는 바람직하게는 가장 긴 사이클이다(도 3 참조). 예를 들어 양이온 교환 크로마토그래피 칼럼을 이용하여 폴리시 크로마토그래피를 수행하는 경우, 용리 단계는 바람직하게는 가장 긴 사이클이다(도 5 참조). 그러나, 본원에 기술된 병렬 크로마토그래피 시스템(100)을 이용하여 수행되는 임의의 단위 작업에 대한 가장 긴 사이클의 결정은 정제될 단백질, 제조 캠페인 목적 및/또는 공정의 임의의 다른 원하는 매개변수 또는 목적을 기초로 이루어질 수 있다.

중화된 바이러스 불활성화 풀(NVIP)(702)을 처리하기 위한 하류 공정(700)이 도 11에 도시되어 있다. NVIP(702)는 예를 들어 적어도 하나의 다음 하류 처리 작업과 더 적합한 pH로 중화될 수 있다. 심층 필터 트레인(704)은 NVIP(702)의 하류에 접속되고 심층 필터 트레인(704)으로부터의 투과물은 서지 용기(706)에 회수될 수 있다.

이어서 서지 용기(706)는 관류 폴리싱 및 바이러스 여과(VF) 처리 작업을 공급하는 데 이용될 수 있다. 도시된 바와 같이, 예시적인 폴리싱 및 바이러스 여과 처리 작업은 관류 구성으로 양이온 교환 크로마토그래피 칼럼(CEX)(710)에 직접 접속된 음이온 교환 크로마토그래피 칼럼(AEX)(708), 및 바이러스 필터(712)를 포함한다. 일 실시형태에서, 바이러스 필터(712)는 사전-필터(pre-filter)와 바이러스 필터를 포함할 수 있다.

칼럼 밸브(714) 및 공통 밸브(716)가 공정(700)의 다양한 구성요소로의 유체 흐름을 제어한다. 이에 따라, 칼럼 밸브(714)는 공급물 입구 포트(718), 칼럼 입구 포트(720), 칼럼 출구 포트(722) 및 공급물 출구 포트(724)를 포함하는 복수의 포트를 포함할 수 있다. 마찬가지로, 공통 밸브(716)는 공급물 입구 포트(726), VF 입구 포트(728), VF 출구 포트(730) 및 공급물 출구 포트(732)를 포함하는 복수의 포트를 포함할 수 있다.

이러한 구성으로, 서지 용기(706)는 칼럼 밸브(714)의 공급 입구 포트(718) 및 칼럼 입구 포트(720)를 통해 AEX 칼럼(708)에 유체적으로 접속될 수 있다. 또한, CEX 칼럼(710)은 칼럼 밸브(714)의 칼럼 출구 포트(722) 및 공급물 출구 포트(732)와 공통 밸브(716)의 공급물 입구 포트(726) 및 VF 입구 포트(728)를 통해 바이러스 필터(712)에 유체적으로 접속될 수 있다. 마지막으로, 바이러스 필터(712)로부터의 공급물은 공통 밸브(716)의 VF 출구 포트(730) 및 공급물 출구 포트(732)를 통해 UV 모니터(734)에 공급될 수 있다. 그런 다음 UV 모니터(734)로부터의 공급물은 출구 밸브(736) 및 궁극적으로 하나 이상의 회수 용기에 공급될 수 있다.

세포 배양 공정을 이용하여 재조합 단백질을 제조하는 것은 바이러스 오염물을 전파할 고유의 위험을 수반한다. 이러한 오염물은 출발 물질, 시약(특히, 동물 기원 시약), 및 GMP 공정 실패로 인한 제조 시스템의 오염을 비롯한 많은 출처에서 발생할 수 있다. 따라서 규제 당국은 바이오제조 공정이 전용 바이러스 불활성화 단계 및 바이러스 제거 단계를 갖고 제조업체가 모든 생물학적 제품으로부터의 바이러스의 제거 및 불활성화를 검증하도록 요청할 것을 권장한다.

외피 바이러스(enveloped viruse)는 통상적으로 불활성화된다. 비외피 바이러스는 제조되는 단백질 치료제에 대

한 위험 없이 불활성화하기 더 어렵지만, 이러한 바이러스는 작은 공극 크기의 필터를 사용하여 바이러스 입자를 제거하는 것과 같은 크기 기반 여과 방법으로 제거할 수 있다. 바이러스 여과는 마이크로- 또는 나노-필터, 예컨대 Asahi Kasei(Plavona®) 및 EDM Millipore(VPro®)로부터 이용 가능한 필터를 이용하여 수행될 수 있다.

바이러스 불활성화는 외피 바이러스가 더 이상 세포를 감염시키거나 복제 및/또는 전파할 수 없도록 변형되는 과정을 의미한다. 다양한 방법이 바이러스 불활성화를 위해 사용될 수 있으며, 이는 열 불활성화/저온살균, UV 및 감마선 조사, 고강도 광범위 스펙트럼 백색광 사용, 화학적 불활성화제 첨가, 계면활성제 및 용매/세제 처리를 포함한다. 일 실시형태에서, 바이러스 불활성화는 낮은 pH에서의 인큐베이션에 의해 달성되며, 이는 외피 바이러스를 특이적으로 불활성화하는 데 매우 효과적이다.

낮은 pH 바이러스 불활성화는 정의된 기간과 온도 동안 낮은 pH 유지를 포함하는 배치 모드에서 수행될 수 있다. 낮은 pH/고염도 조건 하에서 결합된 포획 크로마토그래피 칼럼을 세척함으로써 바이러스 불활성화를 포획 크로마토그래피와 조합할 수 있다. 바이러스 불활성화에 적합한 조건 하에서 포획 크로마토그래피 칼럼을 용리하는 것은 여분의 완충액 용량(이는 비용을 추가시키고, 정제 시간을 연장시키며, 단백질 손실로 이어질 수 있다)과, 훨씬 낮은 pH의 용리 완충액(이는 특히 다성분의 조작된 단백질의 경우 단백질의 무결성에 영향을 줄 수 있다), 및/또는 더 높은 완충액 농도를 이용하여 수행되었다.

인-라인 연속 저 pH 불활성화 방법의 개발은 코일형 흐름 인버터 또는 목표 저 pH 조건 하에서 최소 체류 시간 동안 유체 흐름을 유지하는 기타 메커니즘과 같이, 역할을 수행하기 위한 장비 및 방법의 사용에 중점을 두었다. 그러나 pH 변화와 중화에 영향을 미치는 데 사용되는 완충액과 적정제의 특성은 대부분 무시되었다. 통상적으로, 원하는 pH 변화에 영향을 미치기 위해 아세테이트 완충액(pKa 4.8)과 트리스 염기(pKa 8.1)를 사용하여 저 pH 바이러스 불활성화를 수행하였다.

트리스 염기(>1M)의 농축 용액을 사용하면 중화 중 희석을 줄일 수 있지만, 자동화 및/또는 인-라인 컨디셔닝 전략으로 제어하기 어려울 수 있다. 또한, 완충액의 농도가 높으면 과잉 적정 가능성이 높아진다. 적정제 농도, pKa 및 조성은 고도로 자동화된 및/또는 인-라인 적정 공정, 특히, 본원에서 설명한 병렬 처리 시스템을 포함하는 반연속 및 연속 단위 작업 및/또는 제조 공정에 사용되는 것에 중요한 부피 변화(과첨가/과소 첨가)에 대한 민감도를 결정한다. 과잉 적정은 탈아미드화, 산화 또는 기타 분해 메커니즘을 통해 관심 제품을 손상시켜 정제된 단백질 및/또는 처리 중인 전체 배치/로트의 품질을 위험에 빠뜨릴 수 있다.

중화 목표 pH보다 1 pH 단위 이상 낮은 pKa를 갖는(즉, 용리 완충액은 중화 목표 pH에서 완충하지 않는다) 단백질 A와 같은 포획 크로마토그래피 단위 작업 중에 용리 완충액을 사용하는 것은 인-라인, 연속, 저 pH 바이러스 불활성화를 제어하는 데 적합하다는 것이 밝혀졌다. 본원, 특히 이하 실시예에 설명된 바와 같이, pKa가 4 이하인 포름산, 인산 또는 기타 산과 같은 저 pKa 산을 사용하여 포획 크로마토그래피 칼럼을 용리하면 3.6±0.1 이하의 pH를 갖는 바이러스 불활성화 용리 풀이 얻어졌다. 이는 효과적인 pH에서 완충액 부피를 최소화하는 효과적인 용리/바이러스 불활성화 전략이었다. 또한 용리 완충액 pH, 용리 완충액 농도 및 풀 회수량(collection volume) 사이에는 상호의존성이 있었다. 100 mM의 목표 용리 완충액 농도, pH 3.3 내지 pH 3.5의 완충액 pH 범위, 2.75 CV 내지 4.25 CV 범위의 풀 회수량에서, 원하는 목표 pH 범위는 3.6±0.1이 되었다. 회수된 풀 양, 중화 완충액의 유형 및 양, 풀 단백질 농도는 용리 완충액 pH 및 농도를 변경하여 최적화될 수 있어, 풀 양을 최대 7.7 CV, 최저 2.1 CV까지 가능하게 한다.

일 실시형태에서, 본 발명은 중화 목표 pH보다 1 pH 단위 이상 낮은 pKa를 갖는 용리 완충액을 이용하여 친화성 크로마토그래피 칼럼을 용리시켜 얻은 바이러스 불활성화 풀을 제공한다. 일 실시형태에서, 바이러스 불활성화 풀은 pKa가 4 미만인 산을 포함하는 완충액을 이용하여 친화성 크로마토그래피 칼럼을 용리함으로써 얻어지며, 그 결과 pH가 3.6±0.1 이하인 바이러스 불활성화 용리 풀이 생성된다. 일 실시형태에서, 완충액의 pH는 3.3 내지 3.6이다. 일 실시형태에서, 완충액의 pH는 3.3 내지 3.5이다. 일 실시형태에서, 완충액의 pH는 3.3 내지 3.4이다. 일 실시형태에서, 완충액의 pH는 3.3 내지 3.6이다. 일 실시형태에서, 완충액의 pH는 3.4 내지 3.5이다. 일 실시형태에서, 완충액의 pH는 3.5 내지 3.6이다. 일 실시형태에서, 완충액의 pH는 3.3±0.1, 3.4±0.1, 3.5±0.1 또는 3.6±0.1이다. 일 실시형태에서, 완충액의 pH는 3.4±0.1이다. 일 실시형태에서, 4 미만의 pKa를 갖는 산은 포름산 및 인산을 포함한다. 일 실시형태에서, 산은 3.6±0.1의 최종 바이러스 불활성화 풀 pH를 달성하기 위해 pH 3.4의 100 mM 포름산이다. 본 발명의 일 실시형태에서, 친화성 크로마토그래피는 단백질 A, 단백질 G, 단백질 A/G, 또는 단백질 L 크로마토그래피이다. 일 실시형태에서, 용리물 회수량(elution collection volume)은 2.1 CV 내지 7.7 CV이다. 일 실시형태에서, 용리물 회수량은 2.1 CV 내지 4.25 CV이다. 일 실시형태

에서, 용리물 회수량은 2.1 CV 내지 2.75 CV이다. 일 실시형태에서, 용리물 회수량은 2.75 CV 내지 4.25 CV이다. 일 실시형태에서, 용리물 회수량은 2.75 CV 내지 7.7 CV이다. 일 실시형태에서, 용리물 회수량은 4.25 CV 내지 7.7 CV이다. 일 실시형태에서, 용리물 회수량은 2.1 CV, 2.75, 3.5 CV 또는 4.25 CV 이상이다. 일 실시형태에서, 용리물 회수량은 3.5 CV이다.

바이러스 불활성화 용리 풀을 혼합하여 전체 풀이 원하는 pH에 있도록 할 수 있다. 용리 풀은 일회용 백, 서지 탱크, 저장 탱크 또는 기타 적절한 용기에 담을 수 있다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 10배 내지 4배 더 작은 부피를 갖는다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 10배 내지 5배 더 작은 부피를 갖는다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 10배 내지 6배 더 작은 부피를 갖는다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 10배 내지 7배 더 작은 부피를 갖는다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 10배 내지 8배 더 작은 부피를 갖는다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 10배 내지 9배 더 작은 부피를 갖는다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 9배 내지 4배 더 작은 부피를 갖는다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 9배 내지 5배 더 작은 부피를 갖는다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 9배 내지 6배 더 작은 부피를 갖는다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 9배 내지 7배 더 작은 부피를 갖는다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 9배 내지 8배 더 작은 부피를 갖는다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 8배 내지 4배 더 작은 부피를 갖는다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 8배 내지 5배 더 작은 부피를 갖는다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 8배 내지 6배 더 작은 부피를 갖는다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 8배 내지 7배 더 작은 부피를 갖는다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 7배 내지 4배 더 작은 부피를 갖는다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 7배 내지 5배 더 작은 부피를 갖는다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 7배 내지 6배 더 작은 부피를 갖는다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 6배 내지 4배 더 작은 부피를 갖는다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 6배 내지 5배 더 작은 부피를 갖는다. 일 실시형태에서, 용리 풀 용기는 채취물 저장 용기보다 5배 내지 4배 더 작은 부피를 갖는다.

바이러스 불활성화는 미리 결정된 시간에 걸쳐 일어날 수 있다. 본 발명의 한 양태는 용리 풀이 중화되기 전에 적어도 30분 이상 동안 저 pH 조건 하에 놓이는 것을 제공한다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 24시간 이상 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 30분 내지 약 24시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 1시간 내지 약 24시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 2시간 내지 약 24시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 3시간 내지 약 24시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 4시간 내지 약 24시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 5시간 내지 약 24시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 6시간 내지 약 24시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 10시간 내지 약 24시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 12시간 내지 약 24시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 15시간 내지 약 24시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 18시간 내지 약 24시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 30분 내지 적어도 6시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 30분 내지 적어도 5.5시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 30분 내지 적어도 5시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 30분 내지 적어도 4.5시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 30분 내지 적어도 4시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 30분 내지 적어도 3.5시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 30분 내지 적어도 3시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 30분 내지 적어도 2.5시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 30분 내지 적어도 2시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 30분 내지 적어도 1.5시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 30분 내지 적어도 1시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 1시간 내지 약 2시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 1시간 내지 적어도 1.5시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 1.5시간 내지 약 2시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 30분 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 1시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 1.5시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 2시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다. 일 실시형태에서, 용리 풀은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,

9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24시간 동안 저 pH 조건 하에 놓인다.

일부 형태에서, 바이러스 불활성화 공정은 자동화될 수 있다.

바이러스 불활성화 풀은 적어도 하나의 후속 하류 처리 작업과 더 적합한 pH로 중화될 수 있다(중화된 바이러스 불활성화 풀(nVIP)). 통상적인 중화 공정에서는 1M Tris와 같은 고농도 완충액을 사용하여 풀을 원하는 목표 pH로 적정한다. 예를 들어, 1M Tris를 사용하면 pH가 급격히 증가하며 이는 고정된 탱크 용량을 갖춘 배치 모드에 바람직하다. 보다 미세한 제어를 위해, Tris 농도를 0.5M로 줄이면 pH 변화가 느려지지만 동일한 목표 pH를 달성하기 위해 더 많은 완충액 용량이 필요하다. 연속 공정의 경우, 탱크 용량을 제한하지 않으면 과도한 완충액이 허용될 수 있다. 그러나 비용을 절감하고 제조 공정을 비물질화하려는 욕구로 인해 시설 크기가 더 작아지고 장비 및 재료의 사용이 최소화되어 일부 제조 공정에서 버퍼 용량을 중화하는 것이 제한 인자가 되었다. 높은 처리량과 생산성을 유지하면서 완충액 교환 및 컨디셔닝을 최소화하기 위해 제조 공정을 압축하는 것은 특히 본원에 설명된 병렬 공정 시스템과 조합하여 유익할 것이다.

중화 풀의 전도도를 10 mS/cm 이상으로 높이지 않고도 소규모 공정의 통상적인 완충액 용량을 합리적으로 제어할 수 있는 효과적인 중화 전략이 개발되었다. 이 중화 완충액 시스템은 목표 pH 범위에서 완충 능력을 갖지 않는 적정제를 포함하며, 완충 능력은, 트리스 염기와 같이 원하는 pH에서 완충이 이루어지는 배경 완충 종과 조합하여, 아세트산 나트륨과 같이 목표 pH의 ±1 pH 단위 내의 pKa를 갖는 것으로 정의된다. 이 배경 완충액은 적정제의 과도한 첨가로 인한 과도한 적정을 방지하는 데 도움이 된다.

본원에는 10 mS/cm 이하의 전도도를 유지하면서 바이러스 불활성화 용리액 풀의 부피 팽창을 최소화할 수 있는 중화 완충액 시스템이 제공된다. 중화 완충액 시스템은 목표 pH 범위에서 완충 능력을 갖지 않는 적정제와, 원하는 pH에서 완충이 이루어지는 완충제를 포함할 수 있다. 또한, 이 중화 완충액 시스템을 pKa가 4 미만 내지 풀 pH 3.7 미만인 산의 포획 용리 조건과 조합하여 사용하면, 정제 성능을 유지하면서 하류 완충액 변화를 최소화하고 처리량 향상에 기여한다. 더 작은 용량의 시스템에 이 VI/중화 전략을 이용하면 최소한의 장비와 시설 크기를 사용하는 제조 공정에서 단백질을 정제할 수 있다.

중화 완충액은 혼합 용기의 바이러스 불활성화 용리 풀에 첨가되거나, 정적 혼합기를 이용하여 인-라인으로 혼합되거나, 기타 적합한 방법으로 혼합될 수 있다. 결과적으로 얻어지는 중화된 바이러스 불활성화 풀은 풀로서 저장되거나, 다른 풀과 조합되거나, 및/또는 반연속, 연속 또는 연속 방식으로 처리될 수 있다. 바이러스 불활성화 및 중화 단위 작업은 자동화될 수 있으며, 이것에는 시간설정 바이러스 불활성화, 이어서 정적 혼합기를 통한 바이러스 불활성화 풀과 중화 완충액 흐름의 비율을 이용한 중화가 포함된다.

중화 완충액 시스템은 목표 pH보다 큰 pKa를 갖는 적정제를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 적정제는 7보다 큰 pKa를 갖는다. 일 실시형태에서, 적정제는 염기이다. 본 발명의 일 실시형태에서, 적정제는 시트르산, 글루탐산 및 아세트산나트륨으로부터 선택된다. 본 발명의 일 실시형태에서, 적정제는 아세트산나트륨을 포함한다. 본 발명의 일 실시형태에서, 적정제는 0.3 M 미만 농도의 아세트산나트륨이다. 일 실시형태에서, 적정제는 0.1 M 초과 내지 0.3 M 미만 농도의 아세트산나트륨이다. 일 실시형태에서, 적정제는 0.17 M 내지 0.3 M 미만 농도의 아세트산나트륨이다. 일 실시형태에서, 적정제는 0.238 M 내지 0.3 M 미만 농도의 아세트산나트륨이다. 일 실시형태에서, 적정제는 0.1M 초과 내지 0.238 M 농도의 아세트산나트륨이다. 일 실시형태에서, 적정제는 0.17 M 내지 0.238 M 농도의 아세트산나트륨이다. 일 실시형태에서, 적정제는 0.1M, 0.17 M, 0.238 M 초과 또는 0.3 M 미만 농도의 아세트산나트륨이다.

중화 완충액 시스템은 pKa가 4.5 내지 6.0인 완충제를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 완충제는 4.5 내지 5.5의 pKa를 갖는다. 일 실시형태에서, 완충제는 4.5 내지 5.0의 pKa를 갖는다. 일 실시형태에서, 완충제는 5.0 내지 5.5의 pKa를 갖는다. 일 실시형태에서, 완충제는 5.0 내지 6.0의 pKa를 갖는다. 실시형태에서, 완충제는 5.5 내지 6.0의 pKa를 갖는다. 일 실시형태에서, 완충제는 4.5, 5.0, 5.5 또는 6.0의 pKa를 갖는다.

중화 완충액 시스템은 2-(N-모르폴리노)에탄폰산(MES), (3-(N-모르폴리노)프로판술폰산)(MOPS), (4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산)(HEPES) 및 트리스 염기로부터 선택되는 완충제를 포함할 수 있다. 중화 완충액 시스템은 트리스 염기인 완충제를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 중화 완충액 시스템은 0.2 M 트리스 염기 미만의 농도를 갖는 완충제를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 완충제는 0.00005 M 미만 내지 0.2 M 미만의 트리스 염기 농도를 갖는다. 일 실시형태에서, 완충제는 0.1075 M 내지 0.2 M 미만의 트리스 염기 농도를 갖는다. 일 실시형태에서, 완충제는 0.11 M 내지 0.2 M 미만의 트리스 염기 농도를 갖는다. 일 실시형태에서, 완충제는 0.115 M 내지 0.2 M 미만의 트리스 염기 농도를 갖는다. 일 실시형태에서, 완충제는 0.185 M 내지 0.2 M

미만의 트리스 염기 농도를 갖는다. 일 실시형태에서, 완충제는 0.1075 M 내지 0.185 M의 트리스 염기 농도를 갖는다. 일 실시형태에서, 완충제는 0.11 M 내지 0.185 M의 트리스 염기 농도를 갖는다. 일 실시형태에서, 완충제는 0.115 M 내지 0.185 M의 트리스 염기 농도를 갖는다. 일 실시형태에서, 완충제는 0.1075 M 내지 0.115 M의 트리스 염기 농도를 갖는다. 일 실시형태에서, 완충제는 0.11 M 내지 0.115 M의 트리스 염기 농도를 갖는다. 일 실시형태에서, 완충제는 0.00005M, 0.1075M, 0.11M, 0.115M, 0.185M 또는 0.2 M 미만의 트리스 염기 농도를 갖는다.

중화 완충액 시스템은 pKa가 7보다 큰 적정제 및 pKa가 4.5 내지 6.0인 완충제를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 중화 완충액 시스템은 pKa가 7보다 큰 적정제 및 pKa가 4.5 내지 5.0인 완충제를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 중화 완충액 시스템은 pKa가 7보다 큰 적정제 및 pKa가 4.5 내지 5.5인 완충제를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 중화 완충액 시스템은 pKa가 7보다 큰 적정제 및 pKa가 5.0 내지 6.0인 완충제를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 중화 완충액 시스템은 pKa가 7보다 큰 적정제 및 pKa가 5.0 내지 5.5인 완충제를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 중화 완충액 시스템은 pKa가 7보다 큰 적정제 및 pKa가 5.5 내지 6.0인 완충제를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 중화 완충액 시스템은 pKa가 7보다 큰 적정제 및 pKa가 4.5, 5.0, 5.5 또는 6.0인 완충제를 포함할 수 있다.

중화 완충액 시스템은 아세트산 나트륨인 적정제와 트리스 염기인 완충제를 포함할 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 중화 완충액 시스템은 0.1 M 초과 내지 0.3 M 미만 농도의 아세트산나트륨 및 0.00005 M 초과 내지 0.2 M 농도의 트리스 염기를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 중화 완충액 시스템은 0.17 M 내지 0.238 M 농도의 아세트산나트륨 및 0.1075 M 내지 0.185 M 농도의 트리스 염기를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 중화 완충액 시스템은 0.17 M 아세트산 나트륨 및 0.1075 M 트리스 염기를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 중화 완충액 시스템은 0.17 M 아세트산나트륨 및 0.11 M 내지 0.115 M 농도의 트리스 염기를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 중화 완충액 시스템은 0.17 M 아세트산나트륨 및 0.1075 M 트리스 염기를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 중화 완충액은 0.238 M 아세트산나트륨 및 0.185 M 트리스 염기를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 중화 완충액 시스템은 0.17 M 아세트산나트륨 및 0.11 M 트리스 염기를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 중화 완충액 시스템은 0.17 M 아세트산나트륨 및 0.115 M 트리스 염기를 포함한다.

또한 본원에서 10 ms/cm 이하의 전도도를 유지하면서 바이러스 불활성화 용리액 풀의 부피 팽창을 최소화할 수 있는 중화 완충액 시스템이 제공되며, 이 시스템은 pKa가 7보다 큰 적정제와 4.5 내지 6.0 범위의 pKa를 갖는 완충제를 포함한다.

또한 본원에서 10 ms/cm 이하의 전도도를 유지하면서 바이러스 불활성화 용리액 풀의 부피 팽창을 최소화할 수 있는 중화 완충액 시스템이 제공되며, 이는 적정제로서 0.1 M 초과 내지 0.3 M 미만 농도의 아세트산나트륨과, 완충제로서 0.00005 M 초과 0.2 M 미만 범위의 농도의 트리스 염기를 포함한다.

또한 본원에서 10 ms/cm 이하의 전도도를 유지하면서 바이러스 불활성화 용리액 풀의 부피 팽창을 최소화할 수 있는 중화 완충액 시스템이 제공되며, 이 시스템은 0.17M 내지 0.238 M 범위의 농도의 아세트산나트륨 및 0.1075 M 내지 0.0.185 M 범위 내의 트리스 염기를 포함한다.

관심 단백질 정제를 위한 연속 흐름 공정에 사용하기 위한 이 중화 완충액 시스템은 단일 완충액을 생성함으로써 완충액 교환 및 완충액 컨디셔닝과 같은 완충액 요구 사항을 줄이는 추가적인 이점을 제공한다.

본 발명의 한 양태에서 중화는 혼합 용기에서 바이러스 불활성화 풀과 중화 완충액 시스템을 조합함으로써 달성된다. 본 발명의 한 양태에서, 중화 완충액 시스템 및 바이러스 불활성화 용리 풀은 정적 혼합기를 이용하여 인-라인으로 혼합될 수 있다.

중화된 바이러스 불활성화 풀은 단일 풀로서 저장되거나, 다른 중화된 풀과 조합되거나, 연속적이거나 연속적인 방식으로 전방으로 처리될 수 있다.

중화된 바이러스 불활성화 풀은 추가로 심층 여과 및/또는 멸균 여과와 같은 여과를 거쳐 결과적인 탁도 또는 침전물을 제거할 수 있다.

용어 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산 분자"는 명세서 전체에서 상호교환가능하게 사용되며, 단일 가닥 핵산 및 이중 가닥 핵산을 모두 포함하고, 게놈 DNA, RNA, mRNA, cDNA, 또는 자연에서 일반적으로 발견되는 서열과 관련되지 않은 이들의 일부 조합 또는 합성 기원을 포함한다. 용어 "단리된 폴리뉴클레오티드" 또는 "단리된 핵산 분자"는 구체적으로 합성 기원 서열 또는 자연에서 일반적으로 발견되지 않는 서열을 지칭한다. 명시된 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자는 관심 단백질을 발현하는 서열 외에, 최대 10개 또는 심지어 최대 20개의 다른 단

백질에 대한 코딩 서열 또는 이들의 일부를 포함할 수 있거나, 언급된 핵산 서열의 코딩 영역의 발현을 제어하는 동작가능하게 연결된 조절 서열을 포함할 수 있고/있거나, 벡터 서열을 포함할 수 있다. 핵산 분자에 포함되는 뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드, 또는 어느 한 유형의 뉴클레오티드의 변형된 형태일 수 있다. 변형은 브로모우리딘 및 이노신 유도체와 같은 염기 변형, 2',3'-디데옥시리보스와 같은 리보스 변형, 및 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로셀레노에이트, 포스포로디셀레노에이트, 포스포로아닐로티오에이트, 포스포르아닐라데이트, 및 포스포로아미데이트와 같은 뉴클레오티드간 연결 변형을 포함한다.

용어 "폴리펩티드" 또는 "단백질"은 명세서 전체에서 상호교환가능하게 사용되며, 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 분자를 지칭한다. 폴리펩티드 및 단백질은 또한 천연 서열의 아미노산 잔기로부터 하나 이상의 결실, 그 잔기에의 삽입 및/또는 그 잔기의 치환이 있는 거대분자, 즉 자연 발생 및 비재조합 세포에 의해 생성된 폴리펩티드 또는 단백질을 포함하며; 또는 유전적으로 조작된 세포나 재조합 세포에 의해 생산된다. 단백질은 천연 단백질의 아미노산 서열의 아미노산 잔기로부터 하나 이상의 결실, 그 잔기에의 삽입 및/또는 그 잔기의 치환을 갖는 분자를 포함한다. 단백질은 융합 단백질과 같은 조작된 단백질을 포함한다. 폴리펩티드 및 단백질은 하나 이상의 아미노산이 상응하는 자연 발생 아미노산과 중합체의 화학적 유사체인 아미노산 중합체를 포함한다. 폴리펩티드 및 단백질은 또한, 글리코실화, 지질 부착, 술페이트화, 글루탐산 잔기의 감마-카르복실화, 하이드록실화, 및 ADP-리보실화를 포함하지만 이에 한정되지 않는 변형을 포함한다. 단백질은 분비 단백질, 비분비 단백질, 세포내 단백질, 또는 멤브레인-결합 단백질을 포함한다. 관심 폴리펩티드 및 단백질은 세포 배양 방법을 이용하여 재조합 동물 세포주와 같은 원핵 및 진핵세포주에 의해 생산될 수 있으며, "재조합 단백질"로 지칭될 수 있다. 발현되는 단백질(들)은 이들이 회수되고/되거나 회수될 수 있는 배양 배지 내로 분비되거나 세포내 제조될 수 있다.

본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단리된"은 (i) 정상적으로 발견되는 적어도 일부의 다른 단백질 또는 폴리뉴클레오티드가 없거나, (ii) 동일한 공급원으로부터의, 예를 들어 동일한 종으로부터의 다른 단백질 또는 폴리뉴클레오티드가 본질적으로 없거나, (iii) 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 지질, 탄수화물 또는 천연에서 연관된 다른 물질의 적어도 약 50%로부터 분리되거나, (iv) 천연에서 연관되지 않은 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 (공유 또는 비공유 상호작용에 의해) 동작 가능하게 연관되거나, (v) 천연에서 생기지 않는다는 것을 의미한다. 용어 "단리된 단백질" 또는 "단리된 재조합 단백질"은 치료, 진단, 예방, 연구, 또는 기타 사용을 방해하는 단백질 또는 폴리펩티드 또는 기타 오염 물질로부터 분리 정제된 관심 폴리펩티드 또는 단백질을 지칭한다.

폴리펩티드 및 단백질은 과학적 및/또는 상업적 관심이 있는 것일 수 있고, 표적, 특히 아래 나열된 표적 중 하나와 결합, 자극, 중화 또는 어떤 방식으로든 상호작용함으로써 치료 효과를 발휘하는 단백질을 포함하고, 이들로부터 유도된 표적, 그에 관련된 표적 및 그 변형을 포함한다.

항원 결합 단백질이 포함되는데, 이는 결합하는 다른 분자(항원)에 대해 친화성을 갖는 항원 결합 영역 또는 항원 결합 부분을 포함한다. 항원 결합 단백질에는 하나 이상의 항원 결합 영역 또는 부분을 포함하는 항체, 항체 단편, 항체 유도체, 항체 유사체뿐만 아니라 융합 단백질, 조작된 단백질 등이 포함된다.

용어 "항체"는, 임의의 아이소타입 또는 서브클래스의 글리코실화 및 비글리코실화 이뮤노글로불린 모두에 대한 언급 또는 특이적 결합을 위해 온전한 항체와 경쟁하는 항원-결합 영역에 대한 언급을 포함한다. 달리 명시되지 않는 한, 항체에는 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 다중특이적 항체, 단클론 항체 및 다클론 항체가 포함된다. 항체는 lgG1-, lgG2-, lgG3-, 및/또는 lgG4-타입을 포함한다.

또한 다중특이적 단백질과 같은 비자연 발생 조작된 단백질도 포함된다.

"다중특이적", "다중특이적 단백질" 및 "다중특이적 항체"는, 본원에서, 동일한 항원 상의 적어도 2개의 상이한 항원 또는 적어도 2개의 상이한 에피토프에 동시에 결합하고 이를 중화하고, 및/또는 상호작용하도록 재조합적으로 조작된 단백질을 나타내기 위해 사용된다.

가장 일반적이고 가장 다양한 다중특이적 단백질은 "이중특이적", "이중특이적 단백질" 및 "이중특이적 항체"로서 본원에서 지칭되는 2개의 항원에 결합하는 것들이다. 이중특이적 단백질은 하기 2개의 광의의 범주: 면역글로불린 G(IgG)-유사 분자 및 비-IgG-유사 분자로 그룹화될 수 있다. IgG 유사 분자는 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC), 보체 의존적 세포독성(CDC) 및 항체 의존적 세포 포식작용(ADCP)과 같은 Fc 매개 효과기 기능을 보유하며, Fc 영역은 용해도 및 안정성을 개선하는 데 도움을 주며, 일부 정제 작업을 용이하게 한다. 비-IgG

유사 분자는 더 작아서 조직 침투를 향상시킨다. 이중특이성 단백질은 때때로 상이한 항원 또는 다수의 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 추가 성분에 대한 프레임워크로서 사용되어, 분자의 결합 특이성을 증가시킨다.

이중특이성 항체를 포함하는 이중특이성 단백질의 형식은 지속적으로 진화하고 있으며, 이하의 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 쿼드로마(quadromas), 놉-인-홀(knobs-in-holes), 크로스(cross)-Mab, 이중 가변 도메인 IgG(DVD-IgG), IgG-단일쇄 Fv(scFv), scFv-CH3 KIH, 이중 작용 Fab(DAF), 절반-분자 교환, κλ-바디, 탠덤 scFv, scFv-Fc, 디아바디(diabody), 트리아바디, 테트라바디, 다수의 표적과 결합할 수 있는 단일쇄 단백질, 단일쇄 디아바디(scDiabody), scDiabodies-CH3, 삼중 바디, 미니항체, 미니바디, TriBi 미니바디, 탠덤 디아바디, scDiabody-HAS, Tandem scFv-독소, 이중-친화성 재표적화 분자(DART), 나노바디, 나노바디-HSA, 덕 앤 락(DNL), 표준 교환 조작된 도메인 SEEDbody, Triomab, 류신 지퍼(LUZ-Y), XmAb® 플랫폼을 이용하여 제조한 분자; Fab-아암 교환, DutaMab, DT-IgG, 하전 쌍, Fcab, 직교 Fab, IgG(H)-scFv, scFV-(H)IgG, IgG(L)-scFV, IgG(L1H1)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFV-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybody, DVI-Ig4(four-in-one), Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFV, F(ab')2-scFv2, scFv-KIH, Fab-scFv-Fc, 4가 HCAb, scDiabody-Fc, 디아바디-Fc, 인트라바디, ImmTAC, HSABody, IgG-IgG, Cov-X-Body, scFv1-PEG-scFv2, 삼중특이성 항체, 4가 이중특이성 항체.

또한 표적 폴리펩티드에 특정 항원 결합을 부여하기에 충분한 면역글로불린의 적어도 일부를 함유하는 항체-약물 접합체, 글리콜 조작된 항체 및 폴리펩티드와 같은 재설계되거나 조작된 항체가 포함된다.

키메라 항원 수용체(CAR 또는 CAR-T), TRUCKS(보편적인 사이토카인 매개 살해를 위해 T 세포의 방향을 바꾸는 키메라 항원 수용체), 장갑형 CAR(면역억제 환경을 조절하도록 설계됨) 및 T 세포 수용체(TCR)와 같은 유전적으로 조작된 수용체가 포함된다.

또한 단일쇄 이중특이적 항체 구축물, 이중특이적 T 세포 인게이저, 단일쇄 이중특이적 T 세포 인게이저(BITE®) 및 반감기 연장된 이중특이적 T 세포 인게이저(HLE BiTE®)가 포함된다(특히, WO 99/54440; WO 2005/040220; WO 2008/119567; US 2014/0302037; US 2014/0308285; WO 2014/151910; WO 2015/048272; WO 2013/128027; WO2014/140358; 및 WO 2017/134140 참조).

또한, 비공유 결합, 공유 결합, 또는 공유 및 비공유 결합에 의해 화학적으로 변형된 단백질과 같은 변형된 단백질이 포함된다. 또한, 세포 변형 시스템에 의해 제조될 수 있는 하나 이상의 번역 후 변형 또는 효소적 및/또는 화학적 방법에 의해 생체외에 도입되거나 다른 방식으로 도입될 수 있는 변형을 추가로 포함하는 단백질이 포함된다.

단백질은 또한 예를 들어 류신 지퍼 또는 코일형 코일과 같은 다량체화 도메인을 포함할 수 있는 재조합 융합 단백질을 포함할 수 있다. 발현을 개선하고 정제를 돕기 위한 c-Myc, His 태그, 'Flag' 에피토프, 페길화 등과 같은 말단 폴리펩티드. 또한, 분화 항원(CD 단백질이라고 함) 또는 이의 리간드 또는 이들 중 어느 하나와 실질적으로 유사한 단백질의 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 단백질이 포함된다.

일부 실시형태에서, 단백질은 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF)와 같은 콜로니 자극 인자를 포함한다. 이러한 G-CSF 제제는 Neupogen®(필그라스팀) 및 Neulasta®(페그필그라스팀)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 또한, Epogen®(에포에틴 알파), Aranesp®(다르베포에틴 알파), Dynepo®(에포에틴 베타), Mircera®(메톡시 폴리에틸렌 글리콜-에포에틴 베타), Hematide®, MRK-2578, INS-22, Retacrit®(에포에틴 제타), Neorecormon®(에포에틴 베타), Silapo®(에포에틴 제타), Binocrit®(에포에틴 알파), 에포에틴 알파 헥살, Abseamed®(에포에틴 알파), Ratioepo®(에포에틴 세타), Eporatio®(에포에틴 세타), Biopoin®에포에틴 세타), 에포에틴 알파, 에포에틴 베타, 에포에틴 제타, 에포에틴 세타, 및 에포에틴 델타, 에포에틴 오메가, 에포에틴 이오타, 조직 플라스미노겐 활성화제, GLP-1 수용체 작용제, 및 전술한 것들 중 임의의 것의 분자 또는 변이체 또는 유사체 및 바이오시밀러 등의 적혈구 생성 자극제(ESA)가 포함된다.

일부 실시형태에서, 단백질은 하나 이상의 CD 단백질, HER 수용체 패밀리 단백질, 세포 부착 분자, 성장 인자, 신경 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자, 전환 성장 인자(TGF), 인슐린-유사 성장 인자, 골유도 인자, 인슐린 및 인슐린 관련 단백질, 응고 및 응고 관련 단백질, 콜로니 자극 인자(CSF), 기타 혈액 및 혈청 단백질 혈액형 항원, 수용체, 수용체 관련 단백질, 성장 호르몬, 성장 호르몬 수용체, T-세포 수용체, 신경영양 인자, 뉴로트로핀, 릴렉신, 인터페론, 인터류킨, 바이러스 항원, 지단백질, 인테그린, 류마티스 인자, 면역독소, 표면 막단백질, 수송 단백질, 호밍 수용체, 어드레신, 조절 단백질, 및 면역어드헤신에 특이적으로 결합하는 단백질을 포함할 수 있다.

일부 실시형태에서, 단백질은 단독으로 또는 임의의 조합으로 다음 중 하나 이상에 결합한다: 5T4, 17-A, ADAM 17, AFP, alpha folate receptor, ART-4, BAGE, Brc-abl, B7-H3, B7-H6, CAIX, CAMEL, CAP-1, carbonic anhydrase IX, CASP-8, CDD27m, CD 단백질(CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD44, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD133, CD138, CD171, 및 CD174를 포함하지만 이에 한정되지 않음), CDK4/m, cadherin 19, placental-cadherin(CDH3), P-cadherin, gpA33, B7H3, CEA, CLL-1, CSPG4, CT, Cyp-B, Dp-0, DDL3, EBV, HER 수용체 패밀리 단백질(예를 들어 HER2, HER3, HER4 포함), 및 EGF 수용체, EGFRvIII, EGP2, EGP40, ELF40, ErbB2, EpCAM, EphA2, ETV6-AML1, FPA, fetal AchR, 세포 부착 분자, 예를 들어 LFA-1, Mol, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, 및 알파 v/베타 3 인테그린, 성장 인자(예를 들어 혈관 내피 성장 인자(“VEGF”)를 포함하지만 이에 한정되지 않음); VEGFR2, 성장 호르몬, 갑상선 자극 호르몬, 여포 자극 호르몬, 황체형성 호르몬, 성장 호르몬 방출 인자, 부갑상선 호르몬, 뮬러관-억제 물질, 인간 대식세포 염증성 단백질(MIP-1-알파), 에리트로포이에틴(EPO), 신경 성장 인자, 예컨대 NGF-베타, 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), 섬유아세포 성장 인자(예를 들어 aFGF 및 bFGF 포함), 표피 성장 인자(EGF), 크립토, 전환 성장 인자(TGF)(특히 TGF-α 및 TGF-β(TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4, 또는 TGF-β5 포함)를 포함함), 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II(IGF-I 및 IGF-II), 데스(1-3)-IGF-I(뇌 IGF-I), 및 골유도 인자, 인슐린 및 인슐린 관련 단백질(인슐린, 인슐린 A-사슬, 인슐린 B-사슬, 프로인슐린, 및 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질을 포함하지만 이에 한정되지 않음); 응고 및 응고 관련 단백질, 예를 들어 특히, 인자 VIII, 조직 인자, 폰빌레브란트(von Willebrand) 인자, 단백질 C, 알파-1-항트립신, 플라스미노겐 활성제, 예를 들어 유로키나아제 및 조직 플라스미노겐 활성제("t-PA"), 봄바진, 트롬빈, 트롬보포이에틴, 및 트롬보포이에틴 수용체, 콜로니 자극 인자(CSF)(특히 하기 M-CSF, GM-CSF, 및 G-CSF 포함), 기타 혈액 및 혈청 단백질(알부민, IgE, 및 혈액형 항원을 포함하지만 이에 한정되지 않음), 수용체 및 수용체 관련 단백질(예를 들어 flk2/flt3 수용체, 비만(OB) 수용체, 성장 호르몬 수용체, 및 T-세포 수용체 포함); (x) 신경영양 인자(골-유래 신경영양 인자(BDNF) 및 뉴로트로핀-3, -4, -5, 또는 -6(NT-3, NT-4, NT-5, 또는 NT-6)을 포함하지만 이에 한정되지 않음); (xi) 릴렉신 A-사슬, 릴렉신 B-사슬, 및 프로릴렉신, 인터페론(예를 들어 인터페론-알파, -베타, 및 -감마 포함), 인터류킨(IL), 예를 들어 IL-1 내지 IL-10, IL-1α, IL-1β, IL-11Rα, IL-13Rα2, IL-12, IL-15, IL-17, IL-23, IL-12/IL-23, IL-2Ra, IL1-R1, IL-6 수용체, IL-4 수용체 및/또는 수용체에 대한 IL-13, IL-13RA2, 또는 IL-17 수용체, IL-1RAP, HER2/neu, HLA-A, HPV, HSP70, HST-2, hTERT, iCD, IgE, Kappa, KIAA0205, LAGE, Lambda, LDLR/FUT, Lewis-Y, (xiv) 바이러스 항원(AIDS 외피 바이러스 항원을 포함하지만 이에 한정되지 않음), 지단백질, 칼시토닌, 글루카곤, 심방나트륨이뇨 인자, 폐 계면활성제, 종양 괴사 인자-알파 및 -베타, 엔케팔리나아제, FLT3, FRα, G250, GAGE, GC2, GD3, Glypican-3(GPC3), GNT-V, GP-100, HAGE, HBV, HCV, BCMA, Ig카파, ROR-1, ERBB2, 메소텔린, RANTES(Regulated on Activation Normally T-cell Expressed and Secreted), 마우스 성선자극호르몬 관련 펩티드, Dnase, FR-알파, 인히빈, 및 액티빈, 인테그린, 단백질 A 또는 D, 류마티스 인자, 면역독소, 골형성 단백질(BMP), 수퍼옥사이드 디스뮤타아제, 표면 막단백질, 분해 가속 인자(DAF), AIDS 외피, 수송 단백질, 호밍 수용체, MIC(MIC-a, MIC-B), ULBP 1-6, EPCAM, 어드레신, 조절 단백질, 면역어드헤신, 항원 결합 단백질, 소마트로핀, CTGF, CTLA4, 에오탁신-1, MAGE, MAGE1, MAGE2B, MART-1, Melan-A, MC1R, MCSP, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Mesothelin, MUC1, MUC16, myosin/m, NA88-A, NCAM, NKG2D ligands, NY-ESO-1, P15, p150 minor bcr-abl, PML/RARa, PRAME, PSA, PSCA, PAMA, RAGE, ROR1, RU1, RU2, SAGE, CEA, c-MET, Claudin-18, GPC-3, EPHA2, FPA, LMP1, MG7, NY-ESO-1, PSCA, 강글리오시드 GD2, 강글리오시드 GM2, BAFF, OPGL(RANKL), 마이오스타틴, Dickkopf-1(DKK-1), Ang2, NGF, IGF-1 수용체, 간세포 성장 인자(HGF), TRAIL-R2, c-Kit, B7RP-1, PSMA, NKG2D-1, 세포예정사 단백질 1 및 리간드, PD1 및 PDL1, 만노스 수용체/hCGβ, C형 간염 바이러스, 메소텔린 dsFv-PE38 콘쥬게이트, 레지오넬라-뉴모필라(lly), IFN 감마, 인터페론 감마 유도 단백질 10(IP10), IFNAR, TALL-1, 흉선 기질상 림포포이에틴(TSLP), 프로단백질 컨버타아제 서브틸리신/켁신 타입 9(PCSK9), 줄기 세포 인자, 칼시토닌 유전자 관련 펩티드(CGRP), OX40L, α4β7, 혈소판 특이적(혈소판) 당단백질 Iib/IIIb(PAC-1), 전환 성장 인자 베타(TFGβ), 투명대 정자-결합 단백질 3(ZP-3), TWEAK, 혈소판-유래 성장 인자 수용체 알파(PDGFRα), SART, SSX-1, SSX-2, SSX-3, Survivin, TAA, TAG72, TEL/AML1, TEMs, TPI, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, VEGFR2, WT1, 스클레로스틴, 및 이들 중 임의의 것의 생물학적 활성 단편 또는 변이체.

다른 실시형태에서, 단백질은 압식시맙, 아달리무맙, 아데카투무맙, 애플리버셉트, 알렘투주맙, 알리로쿠맙, 아나킨라, 아타시셉트, 악시캅타겐 실로류셀, 바실릭시맙, 벨리무맙, 베바시주맙, 비오소주맙, 블리나투모맙, 브렌툭시맙 베도틴, 브로달루맙, 칸투주맙 메르탄신, 카나키눔맙, 세툭시맙, 세르톨리주맙 페골, 코나투무맙, 다클리주맙, 데노수맙, 에쿨리주맙, 에드레콜로맙, 에팔리주맙, 에프라투주맙, 에르투막소맙, 에타네르셉트, 에볼

로쿠맙, 플로테우즈맙, 갈릭시맙, 가니투맙, 젬투주맙, 골리무맙, 이브리투모맙 티욱세탄, 인플릭시맙, 이필리무맙, 레르델리무맙, 루미릭시맙, 익세키주맙, 림호문, 마파투무맙, 모테사닙 디포스페이트, 무로모나브-CD3, 나탈리주맙, 네시리타이드, 니모투주맙, 니볼루맙, 오크렐리주맙, 오파투무맙, 오말리주맙, 오프레베킨, 팔리비주맙, 파니투무맙, 파소툭시주맙, 펨브롤리주맙, 페르투주맙, 펙셀리주맙, 라니비주맙, 릴로투무맙, 리툭시맙, 로미플로스팀, 로모소주맙, 사르가모스팀, 솔리토맙, 타르고미르, 티사겐레클레우셀, 토실리주맙, 토시투모맙, 트라스투주맙, 우스테키누맙, 베돌리주맙, 비실리주맙, 볼록시시맙, 자놀리무맙, 잘루투무맙, AMG211(MT111, Medi1565,), AMG330, AMG420, AMG-110, MDX-447, TF2, rM28, HER2Bi-aATC, G D2Bi-aATC, MGD006, MGD007, MGD009, MGD010, MGD011(JNJ64052781), IMCgp100, 인듐 라벨 IMP-205, xm734, LY3164530, OMP-305BB3, REGN1979, COV322, ABT112, ABT165, RG-6 013(ACE910), RG7597(MEDH7945A), RG7802, RG7813(RO6895882), RG7386, BITS7201A(RG7990), RG7716, BFKF8488A(RG7992), MCLA-128, MM-111, MM141, MOR209/ES414, MSB0010841, ALX-0061, ALX0 761, ALX0141; BII034020, AFM13, AFM11, SAR156597, FBTA05, PF06671008, GSK2434735, MEDI3902, MEDI0700, MEDI7352 또는 이의 변종 또는 유사체, 그리고 전술한 것의 바이오시밀러.

단백질은 단백질의 하나 이상의 구성요소로서, CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD3(알파, 베타, 델타, 엡실론, 감마, 제타), CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD 33, CD37, CD40, CD 45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1(CD1 1a/CD18)), CD247, CD276(B7-H3), LIGHT(종양괴사인자 수퍼패밀리 구성원 14; TNFSF14), NKG2C, Ig 알파(CD79a), DAP-10, Fc 감마 수용체, MHC 클래스 I 분자, TNF, TNFr, 인테그린, 신호전달 림프구 활성화 분자, BTLA, 톨(Toll) 리간드 수용체, ICAM-1, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM(LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80(KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8알파, CD8베타, IL-2R 베타, IL-2R 감마, IL-7R 알파, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD1-1d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1-1a, LFA-1, ITGAM, CD1-1b, ITGAX, CD1-1c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1(CD226), SLAMF4(CD244, 2B4), CD84, CD96(Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9(CD229), CD160(BY55), PSGL1, CD100(SEMA4D), CD69, SLAMF6(NTB-A, Ly108), SLAM(SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME(SLAMF8), SELPLG(CD162), LTBR, LAT, 41-BB, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, CD83 리간드, 또는 이들의 단편 또는 조합을 포함할 수 있다.

단백질은, 전술한 모든 것을 포함하고, 전술한 항체들 중 임의의 항체의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 항체, 또는 항체 결합 단백질을 추가로 포함한다. 또한, 아미노산 서열이 관심 단백질의 기준 아미노산 서열과 70% 이상, 특별히 80% 이상, 더 특별히 90% 이상, 훨씬 더 특별히 95% 이상, 구체적으로는 97% 이상, 더 구체적으로는 98% 이상, 훨씬 더 구체적으로는 99% 이상 동일한 영역을 포함하는 변이체가 포함된다. 이와 관련하여 동일성은, 잘 알려져 있으며 쉽게 이용 가능한 다양한 아미노산 서열 분석 소프트웨어를 사용하여 결정될 수 있다. 선호되는 소프트웨어는, Smith-Waterman 알고리즘을 구현하는 소프트웨어를 포함하며, 이는 서열 검색 및 정렬 문제에 대한 만족스러운 해결책으로서 간주된다. 특히 속도가 중요한 고려 사항인 경우에는 다른 알고리즘도 사용할 수 있다. 이와 관련하여 사용될 수 있는 DNA, RNA, 및 폴리펩티드의 정렬 및 상동성 일치를 위해 일반적으로 사용되는 프로그램은, FASTA, TFASTA, BLASTN, BLASTP, BLASTX, TBLASTN, PROSRCH, BLAZE, 및 MPSRCH를 포함하며, 후자는 MasPar에서 제조한 대규모 병렬 프로세서에서 실행하기 위한 Smith-Waterman 알고리즘의 구현예이다.

본원에서 설명한 폴리펩티드 및 단백질은 세포 배양 방법을 이용하여 재조합 동물 세포주에 의해 생산될 수 있으며, 재조합 단백질 또는 관심 재조합 단백질로 지칭될 수 있다. 재조합 단백질(들)은 이들이 회수되고/되거나 회수될 수 있는 배양 배지 내로 분비되거나 세포내 제조될 수 있다.

전술한 바와 같은 적어도 하나의 핵산 분자를 포함하는 플라스미드, 발현 벡터, 전사 또는 발현 카세트 형태의 발현 시스템 및 작제물이 또한 본원에 제공되며, 이러한 발현 시스템 또는 작제물을 포함하는 숙주세포도 제공된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "벡터"는 단백질 코딩 정보를 숙주 세포 내로 및/또는 숙주 세포 내의 특정 위치 및/또는 구획으로 전달 및/또는 수송하는 데 사용하기에 적합한 임의의 분자 또는 엔티티(entity)(예를 들어, 핵산, 플라스미드, 박테리오파지, 트랜스포존, 코스미드, 염색체, 바이러스, 바이러스 캡시드, 비리온, 네이키드(naked) DNA, 복합 DNA 등)를 의미한다. 벡터는 바이러스 벡터, 비바이러스 벡터, 및 비에피솜 포유류 벡터를 포함할 수 있지만 이에 제한되는 것은 아니다. 벡터는 종종, 발현 벡터, 예를 들어 재조합 발현 벡터 또는 클로닝 벡터로 지칭된다. 벡터는 벡터 자체의 복제가 가능하도록 숙주세포에 도입되어, 벡터 안에 포함된 폴리뉴클레오티드의 카피를 증폭시킬 수 있다. 클로닝 벡터는 복제 원점, 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 인핸서 서열, 및 선발가능 마커를 제한 없이 일반적으로 포함하는 서열 구성요소를 포함할 수 있다. 이들 요소는 당업

자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

"세포" 또는 "세포들"은 임의의 원핵 세포 또는 진핵 세포를 포함한다. 세포는 별개로 또는 조직 또는 기관과 같은 고차 구조의 일부로서, 생체 외, 시험관 내, 또는 생체 내에 존재할 수 있다. 세포는 상업적 또는 과학적 관심 대상인 폴리펩티드를 발현하도록 유전자 조작되는 "세포주"라고도 하는 "숙주 세포"를 포함한다. 일반적으로 숙주 세포는 무한한 시간 동안 배양으로 유지될 수 있는 1차 배양물에서 발생하는 계통으로부터 유래된다. 숙주세포의 유전자 조작은 재조합 폴리뉴클레오티드 분자를 이용한 세포의 형질감염, 형질전환, 또는 형질도입, 및/또는 그 외에 숙주세포가 목적 재조합 단백질을 발현하도록 유도하는 (예를 들어, 상동 재조합 및 유전자 활성화 또는 재조합 세포와 비재조합 세포의 융합에 의한) 변경을 포함한다. 관심 단백질을 발현하도록 세포 및/또는 세포주를 유전적으로 조작하는 방법 및 벡터는 당업자에게 잘 알려져 있다.

숙주세포는 임의의 원핵세포(예를 들어, E. coli) 또는 진핵세포(예를 들어, 효모, 곤충, 또는 동물 세포(예를 들어, CHO 세포))일 수 있다. 벡터 DNA는 통상적인 형질전환 또는 형질감염 기법을 통해 원핵세포 또는 진핵세포에 도입될 수 있다.

일 실시형태에서, 세포는 숙주 세포이다. 숙주 세포는 적절한 조건 하에 배양되는 경우 관심 단백질을 발현하며, 상기 관심 단백질은 후속적으로 배양 배지로부터(숙주 세포가 이를 배지 내로 분비한다면) 또는 이를 생산하는 숙주 세포로부터 직접적으로(이것이 분비되지 않는다면) 회수될 수 있다.

세포 배양은 회분식, 유가식, 연속식, 반연속식, 및/또는 관류식으로 동작될 수 있다. CHO 세포와 같은 포유류 세포는 생물반응기에서 100 ml 미만 내지 1000 ml 미만의 더 소규모로 배양될 수 있다. 대안적으로, 1000 ml 내지 20,000 리터 초과의 더 대규모의 생물반응기가 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 1리터 내지 2000리터가 사용된다. 일 실시형태에서, 생물반응기는 10리터 내지 2000리터이다. 일 실시형태에서, 생물반응기는 10리터 내지 100리터이다. 일 실시형태에서, 생물반응기는 30리터 내지 50리터이다. 일 실시형태에서, 생물반응기는 30리터 내지 2000리터이다. 일 실시형태에서, 생물반응기는 100리터 내지 2000리터이다. 일 실시형태에서, 생물반응기는 500리터 내지 2000리터이다. 일 실시형태에서, 생물반응기는 1000리터 내지 2000리터이다. 단백질 치료제의 임상적 및/또는 상업적 규모의 바이오제조와 같은 대규모 세포 배양은 세포가 요망되는 단백질(들)을 생산하는 동안 수 주 및 심지어 수 개월 동안 유지될 수 있다. 생물반응기는 일회용 구성요소를 포함할 수 있다.

생물반응기에서의 배양에 이어, 결과적으로 얻어지는 발현된 관심 재조합 단백질은 세포 배양 배지로부터 채취될 수 있다. 현탁 세포로부터 단백질을 채취하는 방법은 당분야에 알려져 있으며, 산 침전, 가속화된 침강, 예컨대, 응집, 중력을 사용하는 분리, 원심분리, 음파 분리, 한외필터, 마이크로필터, 접선류 필터, 교대 접선류, 심층 필터, 및 충적 여과 필터를 사용하는 여과(멤브레인 여과 포함)가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 원핵생물에 의해 발현된 재조합 단백질은 당해 분야에 공지된 산화환원 접힘 공정에 의해 세포질에서 회수된 봉입체이다.

채취한 관심 재조합 단백질은 크로마토그래피 칼럼 스키드에 공급물을 제공하도록 되어 있는 서지 탱크, 보유 탱크, 백 또는 기타 용기에 저장될 수 있다. 채취한 관심 재조합 단백질은 또한 용리액 스트림으로서 크로마토그래피 칼럼 스키드에 직접 제공될 수도 있다.

그런 다음 채취한 관심 단백질은, 하나 이상의 단위 작업을 이용하여, 잔여 세포 배양 배지, 세포 추출물, 세포 잔해, 숙주 세포 단백질, 박테리아, 효모, 마이코박테리아, 바이러스, 내독소, DNA, RNA, 동종이량체, 절반 항체, 응집체, 항체 단편 및 항체 단편의 다양한 조합과 같은 제품 관련 불순물, 2XLC, 3XLC 또는 4XLC와 같은 경쇄 오조립, 고분자량(HMW) 종, 저분자량(LMW) 종, 탈아민 종 등과 같은 불순물 및/또는 오염물로부터 분리되거나 부분적으로 정제된다.

관심 재조합 단백질을 정제하는 공정은 일반적으로, 포획, 벌크 및 미세 정제, 바이러스 감소/불활성화, 농축 및/또는 제제화에 관련된 하나 이상의 공정을 포함하는 단위 작업을 포함한다.

본원에서 사용된 용어 단위 작업 또는 작업은 액체 배양 배지로부터 관심 재조합 단백질을 정제하기 위한 공정의 일부 또는 구성요소로서 수행될 수 있는 기능적 단계를 의미한다. 또한, 단위 작업은 처리 단계 사이에 유지 또는 저장 단계를 포함할 수 있다. 단일 단위 작업은 포획 및 바이러스 불활성화와 같은, 동일한 작업에서 다수의 목표를 달성하도록 설계될 수 있다.

정제된 단백질의 농도 및 약물 물질의 벌크 보관을 위해 요망되는 제형 완충액으로의 완충액 교환은 한외여과 및 투석여과 작업에 의해 달성될 수 있다. 제제화된 약물 제품은 추가로 멸균 여과를 거쳐 약물 제품에 생존 미생물이 없음을 확인한 다음, 약물 제품을 무균 처리 시설에 도입하여 일차 약물 제품 용기 또는 장치에 충전하

는 충전/완성 공정을 거칠 수 있고, 이는 배송 및 유통을 위해 밀봉, 라벨링 및 포장된다.

본원에 설명된 특정 실시형태는 로직 또는 다수의 구성요소, 모듈 또는 메커니즘을 활용할 수 있다. 모듈은 소프트웨어 모듈(예를 들어, 기계 판독 가능 매체에 구현되거나 전송 신호에 구현된 코드) 또는 하드웨어 모듈을 구성할 수 있다. 하드웨어 모듈은 특정 동작을 수행할 수 있는 실체적인 유닛이며, 특정 방식으로 구성되거나 배치될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 하나 이상의 컴퓨터 시스템(예를 들어, 독립형 클라이언트 또는 서버 컴퓨터 시스템), 또는 컴퓨터 시스템의 하나 이상의 하드웨어 모듈(예를 들어, 프로세서 또는 프로세서 그룹)은, 본원에 설명된 바와 같은 특정 동작을 수행하도록 동작되는 하드웨어 모듈로서 소프트웨어(예를 들어, 애플리케이션 또는 애플리케이션 일부)에 의해 구성될 수 있다.

달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 본원에서 "처리", "컴퓨팅", "계산", "결정", "제시", "표시" 등과 같은 단어를 사용한 논의는 하나 이상의 메모리(예를 들어, 휘발성 메모리, 비휘발성 메모리 또는 이들의 조합), 레지스터 또는 정보를 수신, 저장, 전송 또는 표시하는 다른 기계 성분 내에서 물리적(예를 들어, 전자, 자기 또는 광학) 양으로 표현된 데이터를 조작하거나 변환하는 기계(예를 들어, 컴퓨터)의 동작 또는 공정을 지칭할 수 있다.

이하의 추가적인 고려사항은 앞서 언급한 논의에 적용한다. 본원의 전반에 걸쳐, 복수의 예는 단수의 예로서 설명되는 구성요소, 작업 또는 구조를 구현할 수 있다. 하나 이상의 방법의 개별 작업이 별개의 작업으로 예시되고 설명되지만, 하나 이상의 개별 작업은 동시에 수행될 수 있으며, 예시된 순서로 작업이 수행될 필요는 없다. 예시적인 구성에서 별개의 구성요소로서 제시된 구조 및 기능은 조합된 구조 또는 구성요소로서 구현될 수 있다. 마찬가지로, 단일 구성요소로서 제시된 구조 및 기능은 별개의 구성요소로서 구현될 수 있다. 이들 및 다른 변경, 변형, 추가, 및 개선은 본원의 청구 대상의 범위 내에 속한다.

도면의 요소는 단순함과 명료함을 위해 도시되고, 반드시 축척에 맞게 그려진 것이 아니라는 것을 이해해야 한다. 예를 들어, 도면의 요소 중 일부 요소의 치수 및/또는 상대적 위치는 본 발명의 다양한 실시형태의 이해를 향상시키는 것을 돕기 위해 다른 요소에 비해 과장되었을 수 있다. 또한, 상업적으로 실현 가능한 실시형태에서 유용하거나 필요한, 일반적이지만 잘 이해되는 요소는 이러한 다양한 실시형태에 대한 이해를 덜 방해하도록 하기 위해 종종 도시되지 않는다. 동일한 참조 부호는 동일하거나 유사한 부분을 설명하는 데 사용될 수 있다. 또한, 여러 실시형태가 본원에 개시되었지만, 임의의 실시형태의 임의의 특징은 다른 실시형태의 다른 특징과 조합되거나 다른 특징으로 대체될 수 있다. 더욱이, 몇몇 실시형태들이 본원에 개시되었지만, 청구범위를 벗어남이 없이 개시된 실시형태에 변경이 이루어질 수 있다.

시스템, 방법, 및 이들의 구성 요소들은, 예시적인 실시형태들에 관하여 기재되었지만, 이에 한정되지는 않는다. 상세한 설명은 단지 예시적인 것으로 간주되어야 하며, 모든 가능한 실시형태를 기재하는 것은 불가능하지는 않지만, 비실용적이기 때문에 본 발명의 모든 가능한 실시형태를 기재하지는 않는다. 현재 기술 또는 본 발명을 규정하는 청구범위의 범주에 여전히 포함될 수 있는 본 특허의 출원일 이후에 개발될 기술을 이용하여 여러 대안적인 실시형태가 구현될 수 있다. 당업자는 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 전술한 실시형태에 대해 다양한 수정, 변경, 및 조합이 이루어질 수 있으며, 그러한 수정, 변경, 및 조합이 본 발명의 개념의 범위 내에 있는 것으로 간주되어야 함을 인식할 것이다.

실시예

실시예 1. 포획를 위한 2-칼럼 순환, 자동 볼러스 바이러스 불활성화, 및 접속된 관류 폴리싱 및 바이러스 여과를 갖춘 반연속 공정

실험에서는 포획 크로마토그래피를 위한 2-칼럼 순환 공정을 이용하고(도 3 참조), 이어서 볼러스 바이러스 불활성화와, 접속된 관류 폴리시 크로마토그래피 및 바이러스 여과 공정이 이어지는 반연속적 하류 정제 공정을 설명한다.

재조합 단일클론 항체(mAb A)를 발현하는 관류 세포 배양을 원하는 생존 세포 밀도 정상 상태로 만들고, 채취 세포 배양액(HCCF)을 친화성 크로마토그래피 단위 작업에 제공하기 전에, 서지 용기(일회용 사전 멸균 백)에 회수하였다.

친화성 크로마토그래피 단위 작업은 2개의 독립적인 단백질 A 크로마토그래피 스키드, 즉 "칼럼 1" 및 "칼럼 2"로 구성되었다. 각 스키드에는 ÄKTATM Pure Protein Purification System (Cytiva)에 접속된 MABSELECT

SURETM 단백질 A 수지(Cytiva, Marlborough, MA)가 포함된 500 mL, 8x10 cm 칼럼이 장착되었다. ÄKTATM 주입 및 칼럼 밸브의 유로는 병렬 칼럼 순환이 가능하도록 수정되었다. 단백질 A 친화성 크로마토그래피 칼럼은 교대 사이클을 이용하여 처리를 중첩하여 수행함으로써 로딩 중에(칼럼 오버로딩 없음) 칼럼 접속 없이 병렬로 순환시켰다. 이 포획 칼럼 순환 전략에서는, 순환 중 가장 긴 단계인 로딩 단계에서 전용 펌프(펌프 1)를 사용하였다. 나머지 단계(세척-평형화)는 별도의 제2 펌프(펌프 2)를 이용하여 실행하였으며, 따라서 칼럼 접속을 생성하지 않고도 서로 다른 스키드의 칼럼 간에 칼럼 순환 작업을 중첩하여 수행할 수 있었다.

실행 #1의 경우, 칼럼 1은 마지막 실행의 완료 시에 트리스 완충액(pH 7.4)으로 평형화하였다. 중앙 프로세서는 펌프 1을 사용하여 5 내지 7.5분 체류 시간의 속도로 채취 세포 배양액(HCCF)을 칼럼 1에 로딩하여 35 g/L의 로딩 농도가 되도록 지시하였다. 각 칼럼의 독립성을 유지하기 위해, HCCF 공급물은 공통 HCCF 공급 포트를 통해 ÄKTATM 시스템의 주입 밸브로 유입되지만 칼럼 1에 직접 접속된 포트를 통해 배출되었다. 로딩이 일단 완료되면, 남은 공급물은 칼럼 1에서 배출되어 칼럼 1에만 직접 접속된 포트를 통해 ÄKTA 시스템의 칼럼 밸브로 들어간 다음 공통 폐기물 포트를 통해 배출되었다(도 11 참조).

칼럼 1에의 HCCF 공급물 로딩이 완료되면, 펌프 1에는 작동 해제 신호가 보내지고 펌프 2에는 작동 신호가 보내진다. 그런 다음 칼럼 1을 세척하고, 용리하고, 재생하고, 플러시하고, 재평형화하였다.

완충액은 ÄKTATM 시스템의 주입 밸브의 공통 완충액 공급 포트를 통해 들어가고 칼럼 1에만 직접 접속된 포트를 통해 배출되었다. 칼럼 1에서 배출된 유체는 칼럼 1에만 직접 접속된 포트를 통해 칼럼 밸브로 들어가고 UV 검출기 및 출구 밸브에 접속된 공통 출구 포트를 통해 배출되었다(도 12 참조). 플러시 완충액과 평형화 완충액은 동일하여, 다음 로딩 사이클를 준비하기 위해 칼럼을 다시 평형화할 수 있었다.

로딩 사이클에 필요한 시간은 평형화 단계를 통한 세척이 순환되는 시간을 결정하였다. 처리 단계의 유속을 결정하여, 필요한 경우 칼럼 1과 2를 병렬로 처리할 수 있도록 필요한 경우 시간 간격을 허용하였다.

병행하여, 칼럼 1이 HCCF 로딩을 완료하면, 펌프 1에는 칼럼 2의 HCCF 로딩을 시작하도록 하는 신호가 보내진다. HCCF 공급원료는 ÄKTATM 시스템의 공통 HCCF 공급 포트를 통해 주입 밸브로 들어갔지만 칼럼 2에만 직접 접속된 포트를 통해서 배출되었다. 칼럼 2 로딩이 완료되면, 용리액은 칼럼 2에만 직접 접속된 포트에서 칼럼 2로부터 칼럼 밸브로 배출되었고, 공통 폐기물 포트를 통해 배출되었다.

칼럼 2가 HCCF 로딩을 완료하면, 펌프 1에 칼럼 2 로딩을 해제하고 칼럼 1 로딩을 다시 시작하도록 하는 신호가 보내진다. 펌프 2에 동작 신호가 보내지고, 칼럼 2는 세척, 용리, 재생, 플러시 및 평형화되었다. 완충액은 ÄKTATM 시스템의 공통 완충액 공급 포트를 통해 주입 밸브로 들어가고 칼럼 2에만 직접 접속된 포트를 통해서 배출되었다. 각 단계가 완료되면, 칼럼 2로부터의 용리액은 칼럼 2에만 직접 접속된 포트를 통해 칼럼 밸브로 들어가고 UV 검출기 및 출구 밸브에 접속된 공통 출구 포트의 칼럼 밸브에서 배출되었다.

칼럼 1과 2 양자에 대해, 저 pH 완충액인 pH 3.4의 100 mM 포름산염을 사용하여, 공통 서지 용기 내로 단백질 A 수지로부터의 mAb A의 용리를 수행하였다. 용리물의 부피는 3.1 CV였으며, 그 결과 단백질 A 용리 풀 pH는 3.58이 되었다. 3.6±0.1의 포획 풀 pH를 달성하기 위해 용리물의 pH 및 부피를 선택하였다. 이를 통해 포획 풀은 용리 직후 원하는 바이러스 불활성화 조건으로 되었다.

단백질 A 포획 풀을 적어도 15분 최대 2시간 동안 목표 pH(3.6 ±0.1)에서 유지한 후, 풀을 일회용 백으로 옮기고, 중화 완충액을 목표 pH 5.0까지 볼러스 첨가한 정적 혼합기를 사용하여 인-라인으로 중화하였다. 중화 완충액(170 mM 아세테이트, 115 mM 트리스 염기 pH 8.5)을 1부(1-part) 바이러스 불활성화 풀 대 0.42부(0.42-part) 중화 완충액의 비율로 첨가하였다. 중화 완충액은 인-라인 첨가시에 쉽게 제어할 수 있는 첨가량을 사용하도록 설계되었고, 목표 pH에서 완충되는 배경 완충제(아세테이트)를 함유하였다. 결과적으로 얻어지는 중화된 바이러스 불활성화 풀(NVIP)의 pH는 5.1이었다.

mAb A를 함유한 HCCF의 단백질 A 포획/바이러스 불활성화/중화 사이클을 5일 동안 계속하고 단일 NVIP 풀에 결합하였다. 이 공정을 20일 동안 총 4회 반복하여 4개의 별도 NVIP 풀이 생성되었다.

그런 다음 풀을 심층 필터 MILLISTACKTM A1HC(MilliporeSigma, Burlington, MA)를 통해 여과하였다. 사용하기 전에 공급업체 권장 사항에 따라 필터를 플러싱하였다. 심층 필터는 111 LMH로 로딩되었고 투과물은 서지 용기에 회수되었다. 5리터의 여과된 바이러스 불활성화 풀(FVIP)이 회수되면, 관류 폴리싱 및 바이러스 여과 단계를

시작하였다.

FVIP가 포함된 서지 용기는 2개의 접속된 칼럼, 즉 음이온 교환 크로마토그래피 칼럼(AEX, 8x10cm), 양이온 교환 크로마토그래피 칼럼(CEX, 8x10cm)(ESHMUNO® CPX(MilliporeSigma))에 직접 접속된 CAPTOTM Q(Cytiva)를 포함하는 다른 ÄKTATM 순수 단백질 정제 시스템(Cytiva)에 접속하고, 이어서 바이러스 필터를 접속하였다(도 13). AEX-CEX 접속된 칼럼은 8.3분의 체류 시간으로 290 g/리터 수지의 로딩 밀도로 로딩되었다. 이중 칼럼 출력은 바이러스 필터 동작, 사전 필터(MILLISTACKTM A1HC, MilliporeSigma), 이어서 VIRESOLVE Pro 바이러스 필터(VPro, MilliporeSigma)로 직접 전환되었다. 바이러스 필터(VF)는 16 LMH의 플럭스로 로딩되었으며 프리필터 대 바이러스 필터 면적의 비율은 1:4이었다. 그런 다음 VF 풀을 회수하고 제품 품질을 특성화하였다. 4개의 NVIP 풀 각각은 유사하게 처리되었다.

VF 풀의 추가 처리 및 제제화는 한외여과 및 투석여과(UF/DF)에 이어 폴리소르베이트 첨가 및 약물 물질 충전(DS Fill) 또는 완전히 연속적인 약물 물질 공정을 가능하게 하는 접속된 UF/DF 및 DS Fill 동작을 위한 공지의 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

제2 실행(실행#2)은 위에서 설명한 대로 mAb A를 사용하여 수행되었다. 두 실행 모두에서, NVIP 풀을 5일마다 회수한 후 심층 필터/폴리싱/바이러스 여과 작업을 통해 처리하였다. 이 공정을 20일 동안 반복하여, 실행 #1에서 설명한 대로 4개의 별도 NVIP 및 VF 풀이 생성되었다. 실행 #2의 경우, 접속된 AEX/CEX 칼럼에 600g/리터의 수지를 체류 시간 8.3분, 90 LMH에서 로딩하였다.

실행 #1 및 실행 #2에 대한 중화된 바이러스 불활성화 풀과 바이러스 여과 풀의 제품 품질을 표 1에 나타내었다. 제품 품질은 강력한 단일 친화성 칼럼 mAb 공정과 일치하였고, 이는 병렬 처리 시스템을 이용하여 중요한 불순물을 제거하고 제어하는 것을 입증하였다.

[표 1]

실행 1과 2로부터의 NVIP 및 VF 풀에 대한 제품 품질 속성

실행 및 샘플 세부정보		제품 품질 속성			
		HMW(%)	침출된 단백질 A ppm	DNA (ppb)	숙주 세포 단백질 ppm
실행 #1	NVIP 풀 #1	3.1	NT	NT	214
	NVIP 풀 #2	3.3	NT	NT	213
	NVIP 풀 #3	3.2	NT	NT	278
	NVIP 풀 #4	3.4	NT	NT	310
	VF 풀 #1	0.7	0.42	< 6.7	<1
	VF 풀 #2	0.7	0.38	< 6.8	<1
	VF 풀 #3	0.7	<0.25	< 6.6	<1
	VF 풀 #4	0.7	0.48	< 7.6	<2
실행 #2	NVIP 풀 #1	4.7	5.9	5.9	598
	NVIP 풀 #2	3.8	3.6	7.3	308
	NVIP 풀 #3	5.7	3.9	< 2.6	201
	NVIP 풀 #4	3.2	3.6	5.0	79
	VF 풀 #1	0.9	NT	NT	1
	VF 풀 #2	0.9	NT	NT	<1
	VF 풀 #3	0.8	NT	NT	<2
	VF 풀 #4	0.8	NT	NT	<1

NT = 테스트되지 않음 NVIP=중화 바이러스 불활성화 풀 VF=바이러스 여과

중요한 불순물 외에도 NVIP 풀은 전하 변이체(charge variant)에 대해 특성화하였다. 이 결과를 아래의 표 2에 나타내었다. 전하 변이체는 각 실행의 4개 풀에서 일관되었으며 제품 품질 기대치를 충족하였다.

[표 2]

실행 1 및 2에 대한 중화된 바이러스 불활성화 풀의 전하 변이체

실행 및 샘플 세부정보		전하 변이체		
		주 피크(%)	산성 변이체 (%)	염기 변이체 (%)
실행 #1	NVIP 풀 #1	80.1	3.3	16.6
	NVIP 풀 #2	79.4	3.3	17.3
	NVIP 풀 #3	78.8	3.5	17.7
	NVIP 풀 #4	79.0	3.7	17.3
실행 #2	NVIP 풀 #1	81.7	3.7	14.6
	NVIP 풀 #2	81.8	4.0	14.2
	NVIP 풀 #3	81.0	4.9	14.1
	NVIP 풀 #4	80.6	3.7	14.8

실시예 2. 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 위한 2-칼럼 순환, 자동화된 볼러스 바이러스 불활성화/중화, 2-칼럼 순환 CEX 폴리싱 크로마토그래피 및 관류 혼합 모드 크로마토그래피를 갖춘 반연속 공정

실시예 1에서 설명한 공정은 하나의 폴리시 크로마토그래피 작업에 대해 병렬 처리를 이용하도록 수정하였다. 이 공정은 결합 및 용리 모드에서 2-칼럼 순환 양이온 교환 크로마토그래피(CEX) 단위 작업과 관류 모드에서 단일 칼럼 혼합 모드 크로마토그래피(MM) 단위 작업의 조합으로 구성되었다. 이 공정은 이중특이적 항체인 이중특이적 A를 사용하여 테스트하였다.

이중특이적 A는 처음에, 실시예 1에서 설명한 것과 같이 2개의 병렬 단백질 A 크로마토그래피 칼럼(MABSELECT™ SURE, Cytiva)을 포함하는 친화성 크로마토그래피 단위 작업을 이용하여 처리되었다. 단백질 A 칼럼은 pH 3.4의 100 mM 포름산염 완충액을 이용하여 용리되었다. 이를 반복하여 2개의 단백질 A 용리액 풀(하나는 pH 3.65, 다른 하나는 pH 3.60)이 생성되었다. 두 단백질 A 용리액 풀 모두 목표 pH에 있었기 때문에, 용리액 풀은 바이러스 불활성화를 위해 30분 이상 유지하였다. 이어서, 바이러스 불활성화 풀을 중화 완충액을 볼러스 첨가한 인-라인 정적 혼합기를 이용하여 중화하였다. 중화 완충액(170 mM 아세테이트, 115 mM 트리스 염기 pH 8.5)을 1부 바이러스 불활성화 풀 대 0.23부 중화 완충액의 비율로 첨가하였다. 결과적으로 얻어지는 중화된 바이러스 불활성화 풀(NVIP)의 pH는 4.5이었다. NVIP 풀은 심층 필터(MILLISTACK A1HC, MilliporeSigma)를 통해 추가로 처리하여 여과된 중화 바이러스 불활성화 풀(FVIP)을 생성하였다.

FVIP는 도 5에 예시한 것과 같이 2-칼럼 양이온 교환 단위 작업을 이용하여 처리하였다. CEX 크로마토그래피 작업은 2개의 CEX 크로마토그래피 스키드 "칼럼 1"과 "칼럼 2"로 구성되었다. 각 스키드에는 ÄKTA™ 순수 단백질 정제 시스템(Cytiva)에 접속된 500 mL, 8x10 cm, ESHMUNO® CPX CEX 크로마토그래피 칼럼(MilliporeSigma)이 포함되었다. CEX 크로마토그래피 칼럼은 교대 사이클을 이용하여 처리를 중첩하여 수행함으로써 로딩 중에(칼럼 오버로딩 없음) 칼럼 연결 없이 병렬로 순환시켰다. 가장 긴 단계가 로딩 단계였던 실시예 1에서 설명한 병렬 단백질 A 순환 전략과 달리, 이 CEX 크로마토그래피 병렬 순환 전략에서는, 사이클의 가장 긴 단계가 용리 단계였으며, 이는 2개의 전용 펌프(펌프 2A 및 2B)를 사용하여 용리 구배를 제어하였다. 생산 공정 단계(재생 - 평형화)는 별도의 펌프(펌프 1)를 이용하여 실행하였으며, 이에 의해 칼럼 접속을 생성하지 않고도 서로 다른 스키드의 칼럼 간에 칼럼 순환 작업을 중첩하여 수행할 수 있었다. ÄKTA 주입 및 칼럼 밸브의 유로는 병렬 칼럼 순환이 가능하도록 수정되었다.

CEX 칼럼 1을 평형화한 후 여과된 바이러스 불활성화 풀(FVIP)을 펌프 1을 사용하여 150 cm/h 선속도의 속도로 5-20 g/L의 로딩 밀도까지 로딩하였다. 칼럼 사이의 병렬 순환의 타이밍을 유지하도록 유속을 선택하여, 병렬 칼럼 공정을 동기화 상태로 유지하는 시간 간격을 제공하였다. 각 칼럼의 독립성을 유지하기 위해, FVIP 공급물은 공통 FVIP 공급 포트를 통해 ÄKTA™ 시스템의 주입 밸브로 유입되고 칼럼 1에만 직접 접속된 포트를 통해 배출되었다. 로딩이 일단 완료되면, 남은 폐기물은 칼럼 1에서 배출되어 칼럼 1에만 직접 접속된 포트를 통해 ÄKTA™ 시스템의 칼럼 밸브로 들어간 다음 공통 포트를 통해 배출되었다.

칼럼 1에의 FVIP 피드 로딩이 완료되면 칼럼을 세척하였다. 세척 완충액은 ÄKTA™ 시스템의 주입 밸브의 공통

완충액 공급 포트를 통해 들어가고 칼럼 1에만 직접 접속된 포트를 통해 배출되었다. 칼럼 1에서 배출된 유체는 칼럼 1에만 직접 접속된 포트를 통해 칼럼 밸브로 들어가고 공통 폐기물 포트에 연결된 공통 출구 포트를 통해 배출되었다.

세척 단계가 일단 완료되면, 펌프 1에 작동 해제 신호가 보내지고 펌프 2A 및 2B에 구배 용리를 시작하는 신호가 보내진다. 이중특이적 A는 염화나트륨 구배에 의해 CEX 칼럼으로부터 용리되었다.

병행하여, 칼럼 1이 용리 단계를 시작하면, 펌프 1에 칼럼 2에 대한 생산 처리 단계를 시작하도록 하는 신호가 보내진다. 칼럼 1이 용리되는 동안, 칼럼 2를 로딩하고 세척하였다. 단일 밸브를 사용하여 각 칼럼의 독립성을 유지하기 위해, 어느 칼럼도 동일한 공통 포트를 동시에 사용하지 않았으며 칼럼 1 또는 칼럼 2에 들어가고 나가는 포트는 해당 칼럼에 직접 접속되었다.

용리액 분획물(eluate fraction)이 칼럼 1로부터 회수되면, 펌프 2A 및 2B에 작동 해제 신호가 보내진다. 펌프 1에는 칼럼 1에 대한 생산 처리 단계를 다시 시작하도록 하는 신호가 보내진다.

펌프 2A 및 2B에 칼럼 2의 용리를 시작하도록 하는 신호가 보내진다. 칼럼 2에 대한 용리가 완료된 후, 펌프 2A 및 2B에 작동 해제 신호가 보내지며, 펌프 1에 칼럼 2에 대한 생산 처리 단계(재생 내지 세척)를 다시 시작하도록 하는 신호가 보내지며, 펌프 2A 및 2B는 칼럼 1을 용리하도록 작동되었다.

그런 다음 칼럼 1과 2로부터의 CEX 용리 풀을 관류 모드에서, 평형화된 혼합 모드 크로마토그래피 칼럼(MMC)(Capto™ Adhere, Cytiva)에 로딩하였다.

MMC 관류 풀은 회수하였고, 바이러스 제거 필터를 통과시킨 후, 한외여과 및 투석여과(UF/DF)를 사용하여 농축 및 제제하여 최종 약물 물질 제제를 제조하였다.

제품 품질과 공정 성능은 예상했던 대로였다. 그 주요 결과를 아래의 표 3에 나타내었다.

[표 3]

병렬 CEX 크로마토그래피 실행에 대한 제품 품질

공정 풀	HMW(%)
필터 바이러스 불활성화 풀(FVIP)	27% 내지 34%
양이온 교환 풀 (CEX)	3.5% 내지 4.0%
관류 혼합 모드 (MMC)	1.9%

실시예 3. 단백질 A 풀에서의 저 pH 바이러스 불활성화

실험에서는 용리 후 추가 컨디셔닝 단계를 수행할 필요 없이 저 pH 바이러스 불활성화를 달성하기 위해 적합한 단백질 A 용리 조건의 개발을 설명한다. pH 3.6±0.1의 단백질 A 용리 풀을 달성할 목적으로 다양한 용리 완충액 제제를 테스트하였다. 용리 풀 양 및 용리 완충액 강도(완충액 농도)는 통상적으로 최종 회수된 단백질 A 용리 풀의 pH를 결정한다.

3.6±0.1의 최종 풀 pH를 가능하게 하는 데 필요한 용리 완충액 농도 및 pH는 pH 3.2, 3.4 및 3.6에서 50, 75, 100, 125 및 150 mM 농도의 포름산염 용리 완충액을 이용한 스크리닝 실험을 통해 결정하였다. Mab A는 ÄKTA™ Avant 150 (Cytiva) 시스템을 이용하여 단백질 A 수지(MABSELECT SURE, Cytiva)에 36g/L로 로딩되었고, 표 4의 완충액 조건에 따라 용리시킨 후 완전 용리에 걸쳐 분획물을 회수하였다. 분획물을 혼합하여 다양한 용리 풀 회수량을 나타내는 유사 풀(pseudo pool)을 형성하였다. 그런 다음 유사 풀 pH를 측정하여 3.6±0.1의 목표 풀 pH 달성에 대한 용리 완충액 pH, 농도 및 회수된 부피의 효과를 결정했으며 표 4에 나타내었다.

[표 4]

pH 3.6에서 단백질 A 풀을 가능하게 하는 단백질 A 완충액 pH 및 농도

용리 완충액 농도 (mM)	용리 완충액 pH	회수된 용리량 (CV)	결과적인 용리물 풀 pH
100	3.4	2.75	3.64
100	3.4	3	3.63
100	3.4	3.25	3.62
100	3.4	3.5	3.61
100	3.4	3.75	3.6
100	3.4	4	3.6
100	3.4	4.25	3.59
100	3.4	3.1	3.58
100	3.3	3.21	3.6
100	3.35	3.35	3.6
100	3.4	3.5	3.6
100	3.45	3.67	3.6
100	3.5	3.87	3.6
50	3.3	6.42	3.6
50	3.35	6.69	3.6
50	3.4	7	3.6
50	3.45	7.34	3.6
50	3.5	7.73	3.6
75	3.3	4.28	3.6
75	3.35	4.46	3.6
75	3.4	4.67	3.6
75	3.45	4.9	3.6
75	3.5	5.15	3.6
125	3.3	2.57	3.6
125	3.35	2.68	3.6
125	3.4	2.8	3.6
125	3.45	2.94	3.6
125	3.5	3.09	3.6
150	3.3	2.14	3.6
150	3.35	2.23	3.6
150	3.4	2.33	3.6
150	3.45	2.45	3.6
150	3.5	2.58	3.6

실험을 반복하였고, 단백질 A 칼럼에 36 g/L MabA를 로딩하고 pH 3.4에서 100 mM 포름산염 용리 완충액으로 용리하여 총 3.2 칼럼 부피(CV)를 회수하였다(도 12). 이는 관심 재조합 단백질을 용리하는 데 필요한 최소값(약 1 CV)보다 약 2.5 CV의 추가 용리 완충액을 나타낸다. 3.6±0.1의 최종 풀 pH가 달성되었다.

용리 완충액 pH, 용리 완충액 농도 및 풀 회수량 사이에는 상호의존성이 있는 것으로 나타났다. 100 mM의 목표 용리 완충액 농도, pH 3.3 내지 pH 3.5의 완충액 pH 범위, 2.75 내지 4.25 CV 범위의 단백질 A 풀 회수량에서, 목표 pH 범위는 3.6±0.1이 된다. 표 4는 단백질 A 풀 회수량, 필요한 중화 완충액 및 풀 단백질 농도 매개변수가 단백질 A 용리 완충액 pH 및 농도를 변화시켜 최적화될 수 있으며, 이에 의해 풀 양을 최대 7.7 CV, 그리고 2.1 CV까지 낮출 수 있음을 보여준다.

실시예 4. mAb 바이러스 불활성화 볼러스 중화 개발

친화성 크로마토그래피 용리 풀의 저 pH 인큐베이션에 이어, 풀의 pH는 통상적으로 임의의 다음 하류 폴리시 크로마토그래피 단계와 더 적합하도록 조정된다. 통상적인 중화 공정에서는 1M 트리스와 같은 고농도 완충액을 사용하여 풀을 목표 pH로 적정한다. 고농도 완충액을 활용하여 풀 양 확장을 최소화(적정제 추가 최소화)하여 대규모 생산에 적합한 설비를 가능케 한다. 그러나, 더 작은 부피, 더 집약적인 생산 공정의 경우, 고농도 완충액(> 0.5M)을 사용하면 필요한 적정제의 더 작은 부피로 인해 적정제의 볼러스 첨가를 제어하기가 더 어려워진다. 이 실험은 바이러스 불활성화 단백질 A 용리 풀에 중간 농도 중화 완충액을 볼러스 첨가하는 것의 개발을 설명

한다.

두 가지 구성요소, 즉 적절한 pH에서 완충이 이루어지는 완충 성분과 pH를 목표 값으로 조정하는 적정제 성분을 포함하는 중화 완충액 제제를 테스트하였다. 다양한 농도의 완충 성분 및 적정 성분을 테스트하여, 풀 전도도가 10 mS/cm 이하이고 풀 양이 50% 이하로 증가하는 성분을 확인했으며, 이는 소규모 제조 공정에 더 유용하였다(데이터는 표시되지 않음). 아세트산나트륨(NaOAc)과 트리스 염기의 조합은 이러한 요구 사항을 충족했으며 추가 테스트를 하였다.

아세트산나트륨과 트리스 염기를 볼러스 양으로 함유하는 중화 완충액 제제를 두 개의 서로 다른 mAb A 농도(35 g/Lr 및 17.5 g/Lr)에 첨가하고 생성된 풀 pH를 측정하였다. 이 실험은 풀 대 적정제 유속의 비율을 통해 적정제의 비율을 제어하는 인-라인 정적 혼합기를 모방하였다. 볼러스 중화 실험의 실험한 조건 및 결과를 표 5에 나타내었다.

[표 5]

바이러스 불활성화 풀을 pH 5.0 ±0.1로 중화하기 위한 적정제 양의 결정

적정제 설명	풀 설명	적정제 양/풀 양 (mL/L)	총 적정제 양 (볼륨% 풀)	결과적인 풀 pH	풀 전도도 (mS/cm)
0.238 M NaOAc, 0.185 M 트리스 염기	ProA 풀 35 g/Lr 로딩 pH 3.4의 포름산염으로 용리됨	0	0	3.57	
		67	7	3.95	
		133	13	4.34	
		167	17	4.53	
		200	20	4.69	
		233	23	4.86	
		267	27	5.02	
		280	28	5.08	8.2
	ProA 풀 17.5 g/Lr 로딩 pH 3.4의 포름산염으로 용리됨	0	0	3.53	
		67	7	3.88	
		133	13	4.24	
		200	20	4.57	
		233	23	4.75	
		267	27	4.9	
		300	30	5.04	
		313	31	5.11	8.2
0.17 M NaOAc, 0.115 M 트리스 염기	ProA 풀 17.5 g/Lr 로딩 pH 3.4의 포름산염으로 용리됨	0	0	3.54	
		67	7	3.77	
		133	13	4.01	
		200	20	4.24	
		267	27	4.47	
		333	33	4.67	
		400	40	4.85	
		420	42	4.9	
		460	46	5	
		500	50	5.1	7.6
	ProA 풀 35 g/Lr 로딩 pH 3.4의 포름산염으로 용리됨	0	0	3.50	
		45	5	3.75	
		170	17	4.21	
		295	30	4.65	
		358	36	4.82	
		420	42	5	
		451	45	5.08	7.7

바람직한 적정제 제제는 17 g/Lr 및 35 g/Lr 단백질 A가 로딩된 풀 모두에 대해 전도성이 10 mS/cm 이하인 5.0 ±0.1의 풀 pH를 제공했으며, 풀 양은 50% 이하로 증가하였다.

실시예 5. 소규모 접속 이중 칼럼 폴리시 및 바이러스 여과 작업

이 실험은 실험실 규모에서 테스트된 축소된 이중 칼럼의 접속 폴리싱 및 바이러스 여과 작업을 제공한다. 표 6에는 단위 작업, 스케일링 및 공정 매개변수가 설명되어 있다. 이 공정은 대표적인 여과된 바이러스 불활성화 풀(FVIP)에서 mAb A를 사용하여 테스트되었다. 평형화 및 세척 완충액에 대해 100 mM 아세트산나트륨, pH 5.0, 약 5 mS/cmas를 사용하여 공정을 실행하였다. 바이러스 사전 필터(VIRESOLVE®(VPF) MilliporeSigma) 및 바이러스 필터(VIRESOLVE® Pro(VPro), MilliporeSigma)는 접속된 CAPTO Q 음이온 교환(AEX) 칼럼 및 Eshmuno CPX 양이온 교환(CEX) 칼럼(둘 다 Cytiva 제품)와 인-라인으로 접속하기 전에 물로 세척하였다.

접속된 크로마토그래피 칼럼과 바이러스 사전 필터/바이러스 필터는 개량형 ÄKTA™ AVANT 150 주기적 역류 크로마토그래피(PCC) 시스템(Cytiva)를 사용하여 인-라인으로 함께 평형화하였다. 바이러스 필터의 압력은 전체 단위 작업 동안 10 psi 미만으로 유지하였다. 이중 칼럼, 접속된 폴리싱 및 바이러스 여과의 두 가지 테스트 실행(실행 #1 및 실행 #2)의 결과를 표 7에 나타내었다. 두 테스트 실행 모두 고분자량 종(HMW)과 숙주 세포 단백질(CHOP)의 우수한 제거를 허용 가능한 전체 단계 수율(약 80%)로 보여주었다.

[표 6]

칼럼 조건

단위 작업	매개변수	실험실 규모	공정 규모
CAPTO Q 음이온 교환(AEX) 관류 크로마토그래피	칼럼 치수(cm)	0.66x6.7	8x10
	칼럼 부피	2.3	500
	유속(mL/분)	0.46	100
	체류 시간(분)	5.0	5.0
	로딩 레벨(g/L)	600	600
ESHMUNO CPX 양이온 교환(CEX) 정면 크로마토그래피	칼럼 치수(cm)	0.66x6.7	8x10
	칼럼 부피	2.3	500
	유속(mL/분)	0.46	100
	체류 시간(분)	5.0	5.0
	로딩 레벨(g/L)	600	600
VPF/VPro 목적: 바이러스 제거	사전 필터 장치	옵티스케일-40	POD
	VPF 멤브레인 면적(cm^2)	5	1100
	바이러스 필터 장치	마이크로	방식(Modus) 1.2
	VF 멤브레인 면적(cm^2)	3.1	700
	VPro 플럭스(LMH)	89	86

[표 7]

실험실 규모 이중 칼럼, 접속된 폴리싱 및 바이러스 여과 테스트의 결과

샘플 ID	단계 수율(%)	QSEC %HMW	Rce %LC+HC	CHOP(ppm)
로딩	-	3.8	96.5	67
FVIP 풀	80.5	1.2	97.6	5
mAb A 풀 실행 #1 AEX → CEX → VF	82.6	0.9	NT	≤7
mAb A 풀 실행 #2 AEX → CEX → VF	84.1	≤1.0	≥97	≤24

NY = 테스트하지 않음

세 번째 실험실 규모 테스트 실행(실행 #3)은 mAb A 중화 바이러스 불활성화 풀(NVIP)을 사용하여 위에서 설명한 것과 동일한 조건을 이용하여 추가의 불순물 제거를 특성화하기 위해 mAb A를 이용하여 실행하였다. 실행 #3의 결과를 표 7에 나타낸다. 이 공정에서, 예상대로 HMW, CHOP, DNA 및 용출된 단백질 A가 제거되었다. 공정 수율도 예상 범위에 있었다.

[표 8]

추가 불순물 제거를 특성화하는 실험실 규모 테스트 실행 #3

샘플 ID	단계 수율 (%)	HMW(%)	CHOP(ppm)	DNA(ppb)	침출된 단백질 A(ppm)
NVIP	-	5.0	228	5.3	5.6
mAb A 풀 실행 #3 AEX → CEX → VF	82	0.8	17	< 1.9	2.1

또한, AEX 및 CEX 단계의 바이러스 제거 능력을 특성화하기 위하여, 위에서 설명한 조건을 이용하여 AEX 및 CEX 칼럼 상에서 바이러스 제거 테스트를 독립적으로 실행하였다. 칼럼에 이종성 쥐 백혈병 바이러스 (XMuLV)를 스파이크하고 800 g/Lr로 로딩하였다. AEX 칼럼은 98%의 제품 수율과 3.4 Log의 XMuLV 제거를 나타내었다. CEX 칼럼은 84%의 제품 수율과 4.0 Log의 XMuLV 제거를 나타내었다.

실시예 6. 이중특이적 B를 이용한 접속된 이중 칼럼 관류 폴리싱

용리가 pH 3.9에서 수행되었다는 점을 제외하고 이중특이적 항체인 이중특이적 B를 사용하여 실시예 2에 기술된 절차에 따라 단백질 A 포획 풀을 생성하였다. 아세트산을 사용하여 pH 3.6으로 적정하고, 이어서 트리스 염기로 pH 5.0으로 적정하고 대략 1시간 유지함으로써, 바이러스를 불활성화하였다. 중화된 바이러스 불활성화 풀을 심층 필터(Millistak A1HC, MilliporeSigma)를 사용하여 여과하고, FVIP를 단일 풀로서 회수하여 5 mM NaCl로 조정하였다.

조정된 FVIP 풀은 제1 칼럼으로서 양이온 교환(CEX) 크로마토그래피 칼럼(SP-ImpRes HiScreen 4.7 mL, Cytiva), 이어서 혼합 모드(MMC) 크로마토그래피 칼럼(Capto Adhere HiScreen 4.7mL, GE Healthcare)을 포함하는 2-칼럼 접속, 관류 폴리싱 단계에 대한 최적 조건을 스크리닝하는 데 사용되었다. 두 칼럼 모두 150 mM 및 175 mM NaCl에서 100 mM 아세테이트, pH 5.0으로 평형화하였다. 모든 공정 단계는 150 cm/hr로 실행하였다. 용이한 샘플링을 위해, 칼럼은 독립적으로 동작시켰으며, CEX 용리액 풀은 MMC 칼럼에 로딩하기 전에 특성화하였다. 이중특이적 B를 CEX 및 MMC에 75 g/L로 로딩하고 평형화 완충액으로 세척하였다.

공정 조건 및 제품 품질 결과를 표 8에 나타내었다. 두 폴리싱 단계는 함께 작동하여 일관된 결과를 제공하도록 설계되었다. 150 mM NaCl에서, CEX 칼럼은 예상대로 더 낮은 수율로 더 많은 고분자량 종(HMW)을 제거했으며, MMC 칼럼은 더 높은 수율로 HMW를 추가로 제거하였다. 반대로, 175 mM NaCl에서, CEX 칼럼은 높은 수율로 더 적

은 HMW를 제거했고, MMC 칼럼은 더 낮은 수율로 더 많은 HMW를 제거하였다. 조합되어 접속된 폴리싱에 대한 전체 수율은 55% 정도로 비슷하며, 결과적으로 얻어지는 풀 순도는 1.6% HMW 정도로 비슷하다.

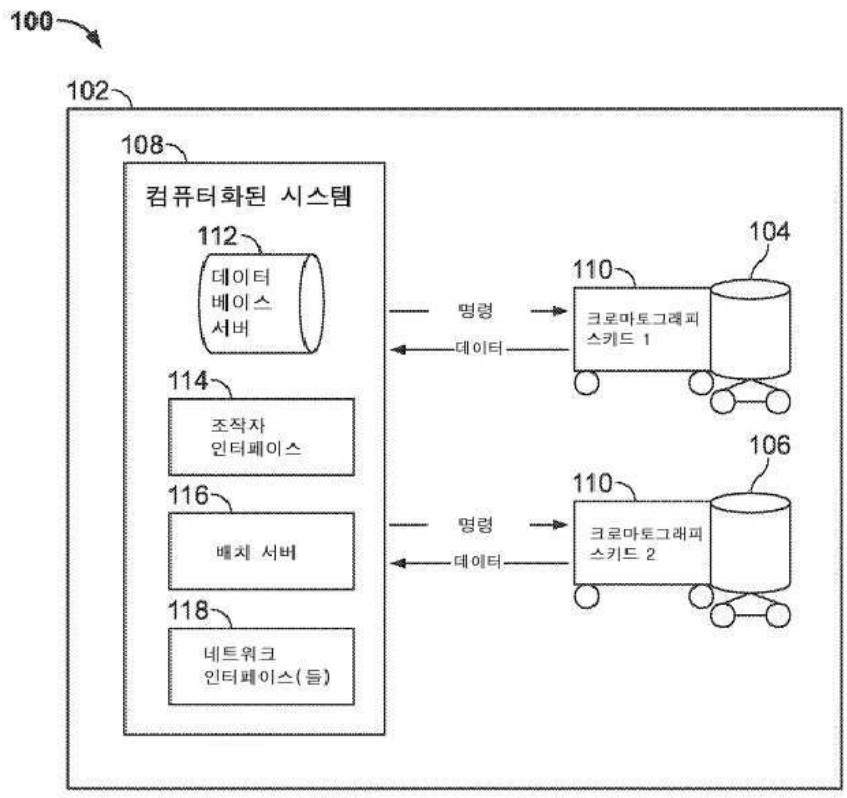
[표 9]

접속된 이중 칼럼 폴리싱을 위한 공정 조건 및 제품 품질

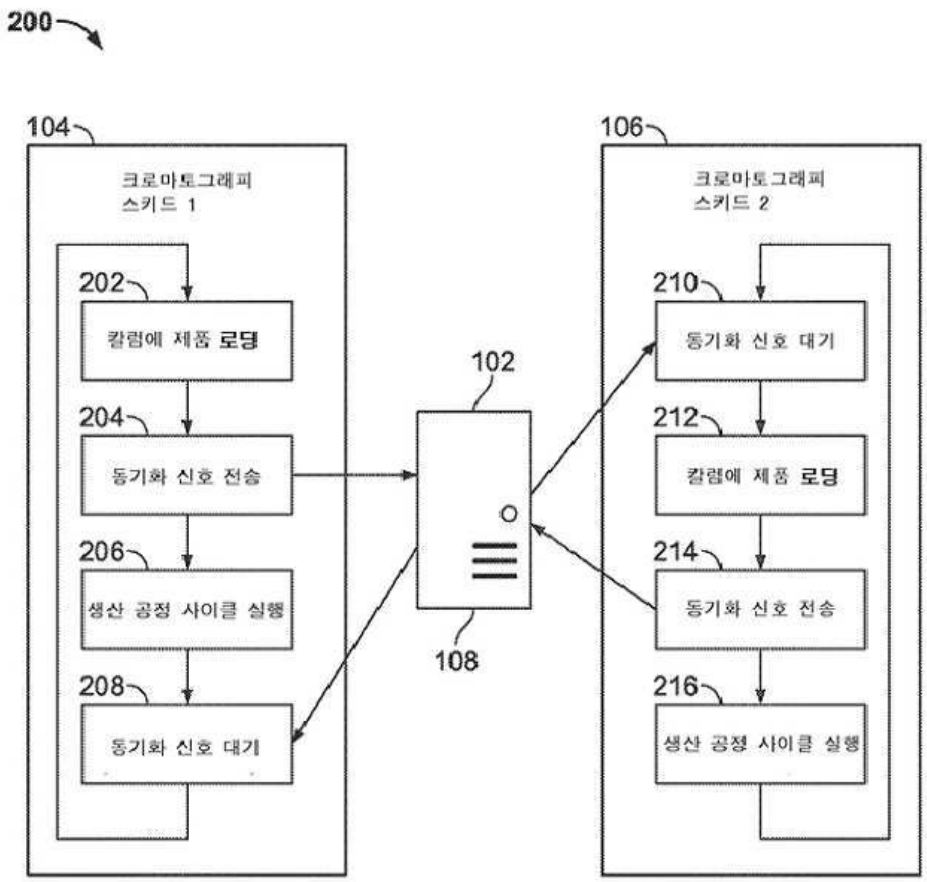
매개변수	150 mM NaCl pH 5.0	175 mM NaCl pH 5.0
로딩(FVIP) HMW(%)	25.7	25.9
CEX 수율(%)	65	82
CEX HMW (%)	4.7	12.1
MMC 수율(%)	88	67
MMC HMW (%)	1.6	1.6
전체 폴리싱 단계 수율(%) [CEX 수율 x MCC 수율]	57	55

도면

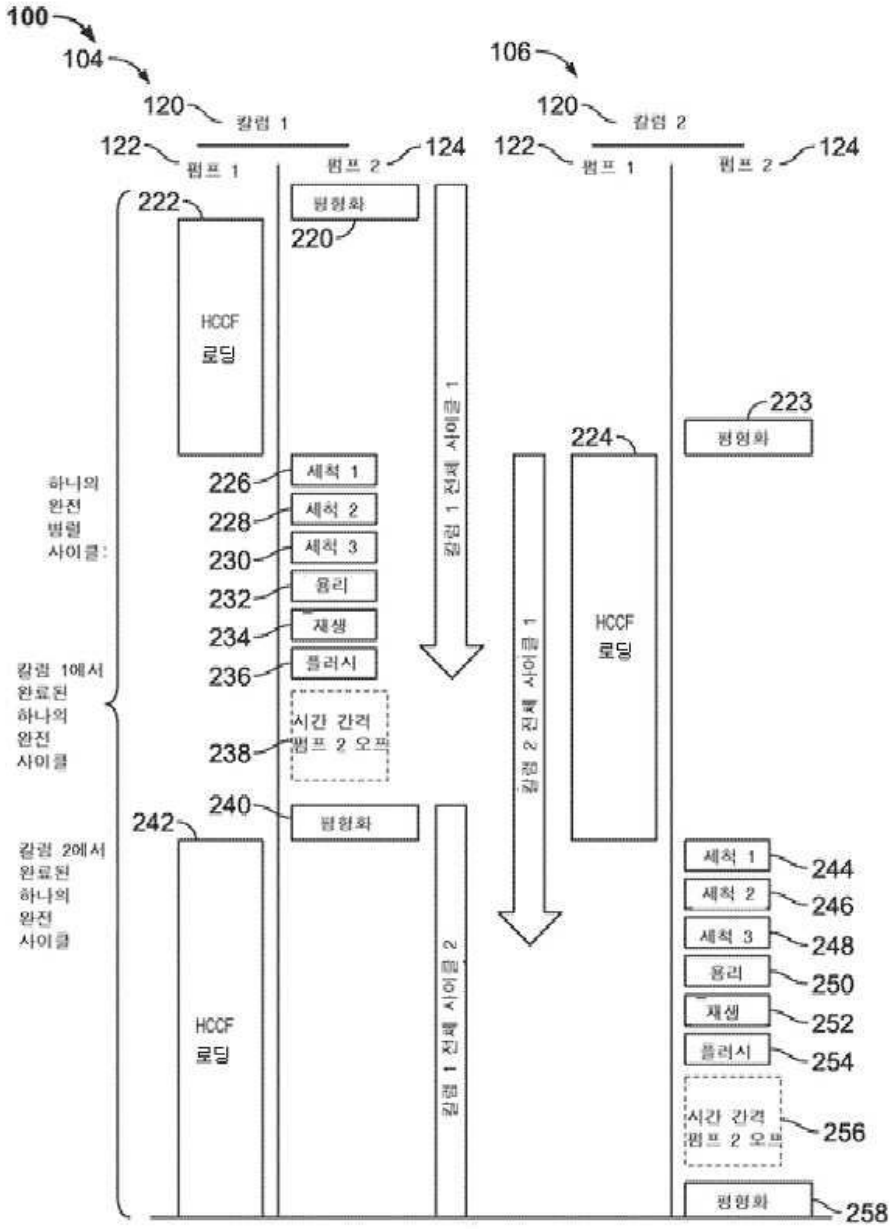
도면1



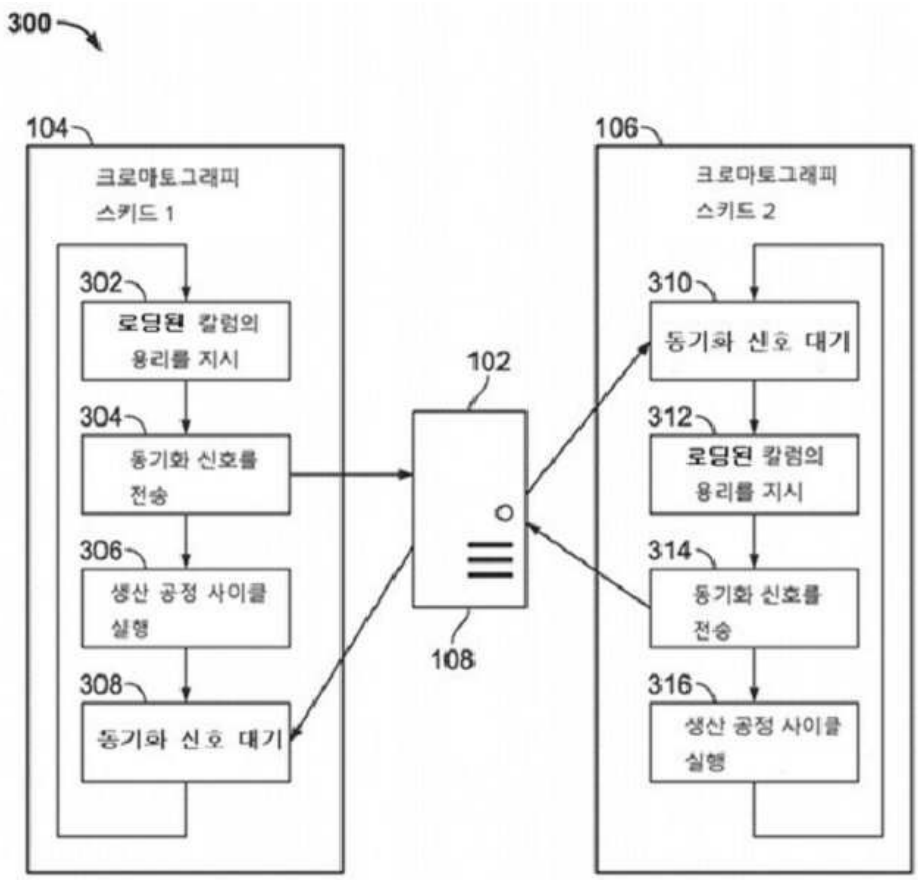
도면2


200
104
크로마토그래피
스키드 1
202
칼럼에 제품 로딩
204
동기화 신호 전송
206
생산 공정 사이클 실행
208
동기화 신호 대기
102
108
106
크로마토그래피
스키드 2
210
동기화 신호 대기
212
칼럼에 제품 로딩
214
동기화 신호 전송
216
생산 공정 사이클 실행

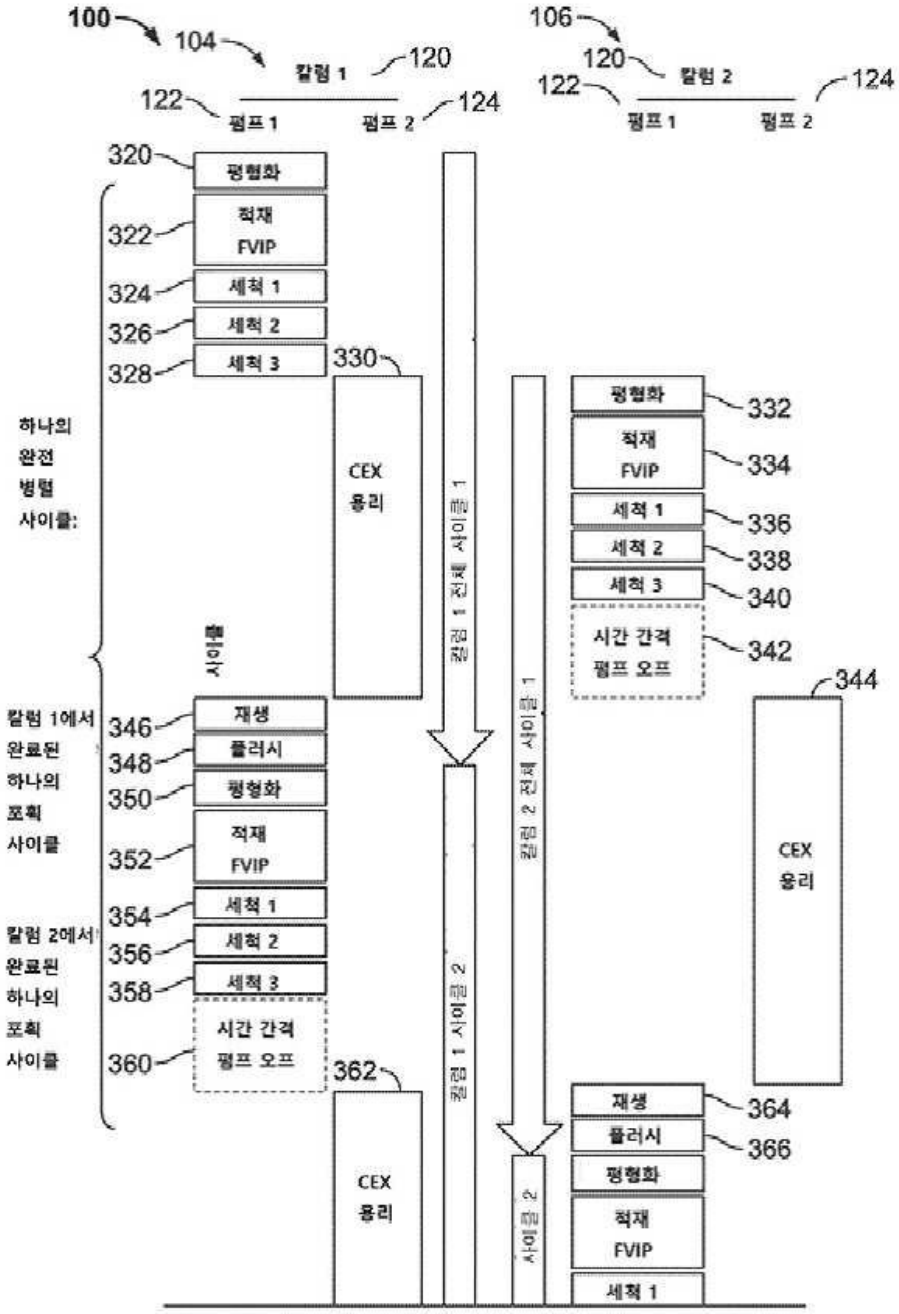
도면3


100
104
106
120
칼럼 1
120
칼럼 2
122
펌프 1
펌프 2
124
122
펌프 1
펌프 2
124
222
평형화
220
HCCF
로딩
223
평형화
224
226
세척 1
228
세척 2
230
세척 3
232
용리
234
재생
236
플러시
238
시간 간격
펌프 2 오프
240
평형화
242
HCCF
로딩
HCCF
로딩
세척 1
244
세척 2
246
세척 3
248
용리
250
재생
252
플러시
254
시간 간격
펌프 2 오프
256
평형화
258
칼럼 1 전체 사이클 1
칼럼 2 전체 사이클 1
칼럼 1 전체 사이클 2
하나의
완전
범럴
사이클
칼럼 1에서
완료된
하나의
완전
사이클
칼럼 2에서
완료된
하나의
완전
사이클

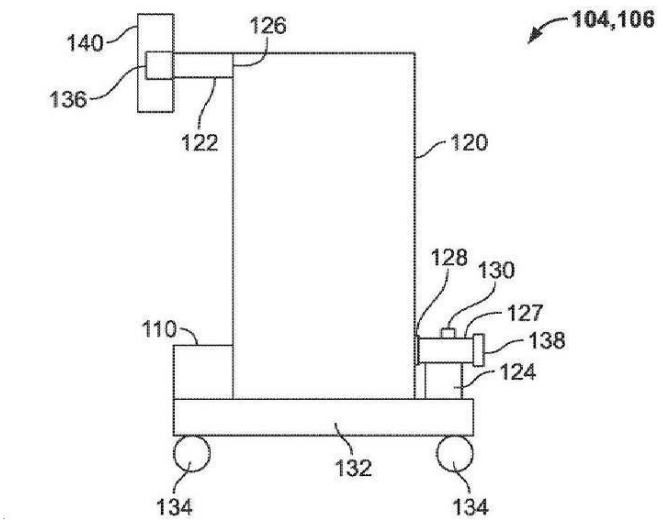
도면4


300
104
크로마토그래피
스키드 1
302
로딩된 칼럼의
용리를 지시
304
동기화 신호를
전송
306
생산 공정 사이클
실행
308
동기화 신호 대기
102
108
106
크로마토그래피
스키드 2
310
동기화 신호 대기
312
로딩된 칼럼의
용리를 지시
314
동기화 신호를
전송
316
생산 공정 사이클
실행

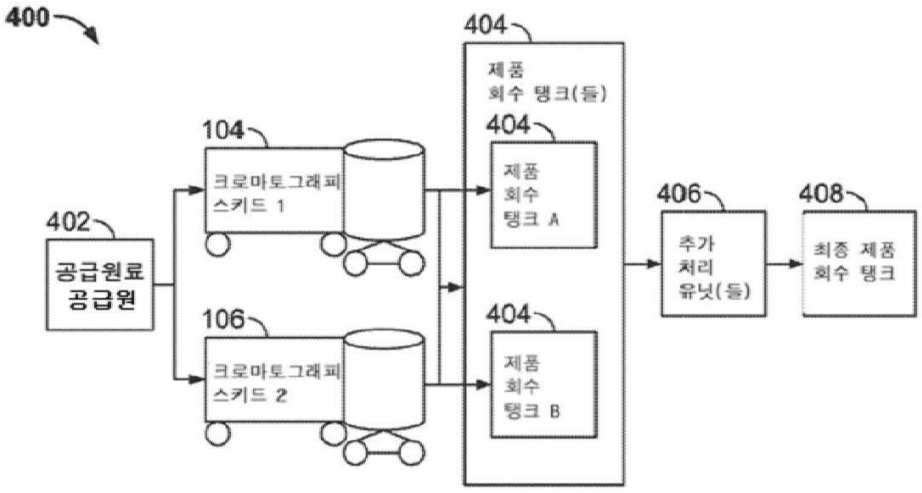
도면5


100
104
칼럼 1
120
122
펌프 1
펌프 2
124
106
120
칼럼 2
122
펌프 1
펌프 2
124
320
평형화
322
적재
FVIP
324
세척 1
326
세척 2
328
세척 3
330
CEX
용리
하나의
완전
병렬
사이클:
사이클
칼럼 1에서
완료된
하나의
포획
사이클
346
재생
348
플러시
350
평형화
352
적재
FVIP
354
세척 1
칼럼 2에서
완료된
하나의
포획
사이클
356
세척 2
358
세척 3
360
시간 간격
펌프 오프
362
CEX
용리
칼럼 1 전체 사이클 1
칼럼 1 사이클 2
칼럼 2 전체 사이클 1
사이클 2
평형화
332
적재
FVIP
334
세척 1
336
세척 2
338
세척 3
340
시간 간격
펌프 오프
342
344
CEX
용리
재생
364
플러시
366
평형화
적재
FVIP
세척 1

도면6


104,106
140
126
136
122
120
128
130
127
138
124
110
132
134
134

도면7


400
404
제품
회수 탱크(들)
104
404
크로마토그래피
스키드 1
제품
회수
탱크 A
406
408
402
추가
처리
유닛(들)
최종 제품
회수 탱크
공급원료
공급원
106
404
크로마토그래피
스키드 2
제품
회수
탱크 B

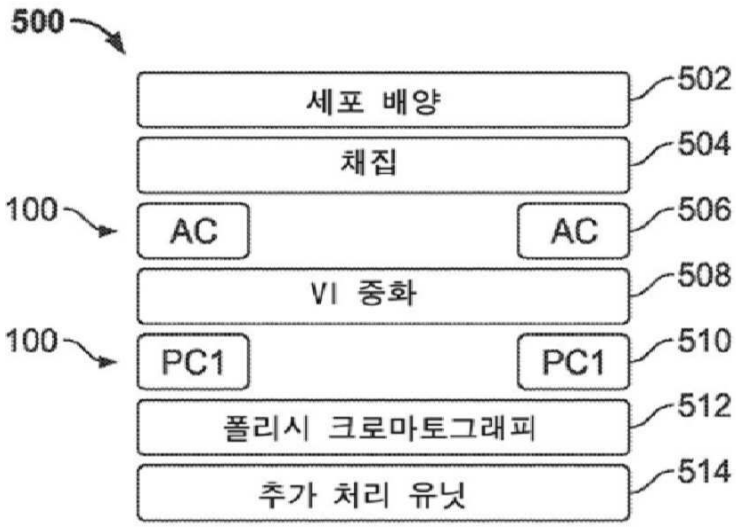
도면8


500
세포 배양
502
채집
504
100
AC
AC
506
VI 증화
508
폴리시 크로마토그래피
510
폴리시 크로마토그래피
512
추가 처리 유닛
514

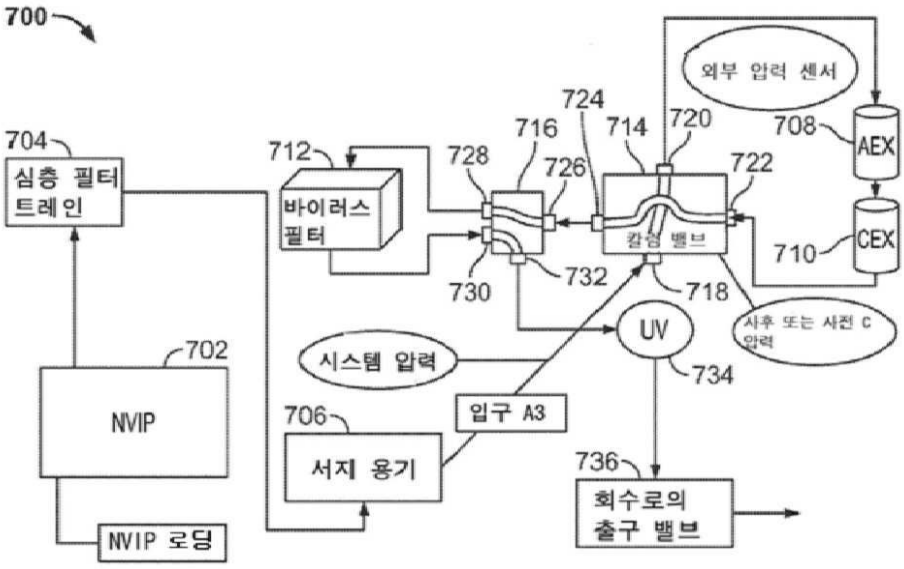
도면9


500
세포 배양
502
채집
504
친화성 크로마토그래피
506
VI 중화
508
100
PC1
PC1
510
폴리시 크로마토그래피
512
추가 처리 유닛
514

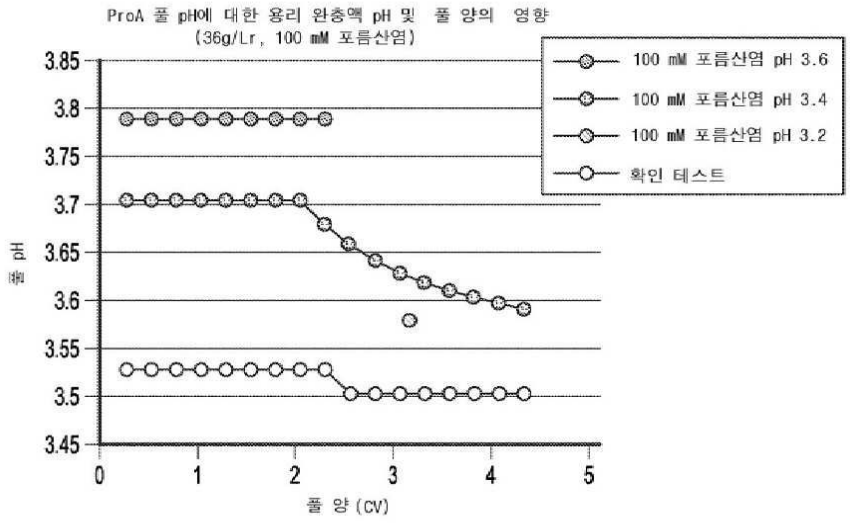
도면10


500
세포 배양
502
채집
504
100
AC
AC
506
VI 중화
508
100
PC1
PC1
510
폴리시 크로마토그래피
512
추가 처리 유닛
514

도면11


700
704
심층 필터 트레인
712
바이러스 필터
728
716
724
726
714
720
722
708
AEX
CEX
710
730
732
718
칼럼 밸브
외부 압력 센서
UV
734
시후 또는 사전 C 압력
시스템 압력
702
NVIP
NVIP 로딩
706
서지 용기
입구 A3
736
회수로의 출구 밸브

도면12


ProA 풀 pH에 대한 용리 완충액 pH 및 풀 양의 영향
(36g/Lr, 100 mM 포름산염)
100 mM 포름산염 pH 3.6
100 mM 포름산염 pH 3.4
100 mM 포름산염 pH 3.2
확인 테스트
3.85
3.8
3.75
3.7
3.65
3.6
3.55
3.5
3.45
0
1
2
3
4
5
풀 양 (CV)