



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0101184
(43) 공개일자 2022년07월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/30 (2006.01) C07K 1/34 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 1/30 (2013.01)
C07K 1/34 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7020996
- (22) 출원일자(국제) 2020년11월20일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년06월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2020/082806
- (87) 국제공개번호 WO 2021/099529
국제공개일자 2021년05월27일
- (30) 우선권주장
201904386 2019년11월20일 오스트레일리아(AU)
- (71) 출원인
체세스엘 베링 아게
스위스 베른 3014 방크도르프슈트라세 10
- (72) 발명자
엘 메나위 이브라힘
스위스 3008 베른 솔로쓰슈트라세 117
폰 노르트하임 마르쿠스
스위스 3012 베른 닥셀호페르슈트라세 3
- (74) 대리인
장훈

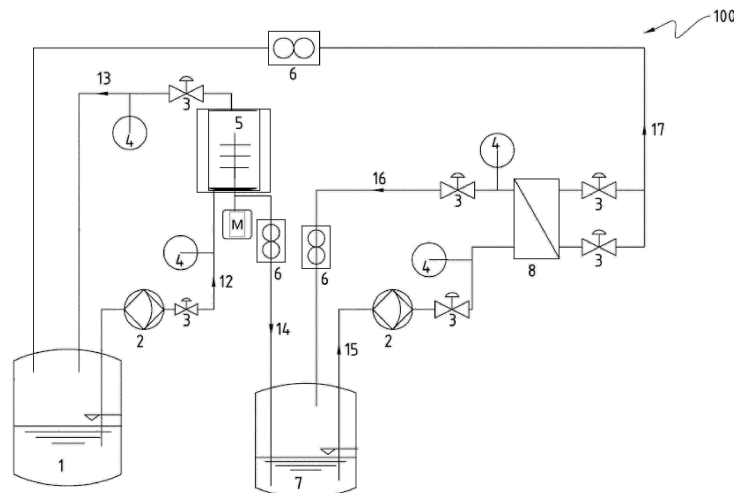
전체 청구항 수 : 총 68 항

(54) 발명의 명칭 침전물로부터 단백질을 추출하는 방법 및 불순물을 침전시키는 방법

(57) 요약

본 발명은, 침전물로부터 단백질을, 특히 면역글로불린 G(IgG)와 같은 면역글로불린(Ig)을 포함하는 재조합 및/또는 혈장 유래 단백질을 추출하는 방법 및 시스템에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 16/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

침전물로부터 관심 단백질을 추출하는 방법으로서,

- 상기 관심 단백질을 포함하는 상기 침전물을 제1 탱크에서 액체와 혼합하여, 제1 희석 계수(dilution factor)를 갖는 제1 현탁액을 형성하는 단계;
- 상기 관심 단백질이 고갈된 제1 잔류물(retentate) 및 상기 관심 단백질이 풍부한 제1 투과물(permeate)을 생성하도록 구성된 동적 필터 요소(dynamic filter element)를 포함하는 제1 여과 유닛에 상기 제1 현탁액을 공급하는 단계;
- 액체를 첨가하여, 임의로는 상기 제1 잔류물을 상기 제1 탱크 내로 스트리밍(streaming)하여, 상기 제1 탱크 내의 상기 제1 현탁액을 제2 희석 계수로 희석하는 단계;
- 제2 탱크에서 상기 관심 단백질이 풍부한 제1 투과물을 회수하는 단계;
- 상기 관심 단백질이 풍부한 제1 투과물 중의 하나 이상의 불순물을 침전시켜 제2 현탁액을 생성하는 단계 및
- 상기 제2 현탁액으로부터 침전된 불순물을 제거하여 상기 관심 단백질을 함유하는 용액을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 방법이, 상기 제1 투과물 중의 하나 이상의 불순물을 침전시키는 단계 이전에 상기 관심 단백질이 풍부한 제1 투과물을 농축시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제2 현탁액으로부터 침전된 불순물을 제거하는 단계가

- 상기 하나 이상의 침전된 불순물을 함유하는 제2 잔류물 및 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 투과물을 생성하도록 구성된 동적 필터 요소를 포함하는 제2 여과 유닛에 상기 제2 현탁액을 공급하는 단계;
- 임의로, 상기 제2 잔류물을 상기 제2 현탁액을 포함하는 탱크 내로 스트리밍하는 단계 및
- 추가 탱크 내의 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 투과물을 회수하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 제2 현탁액으로부터 침전된 불순물을 제거하는 단계가

- 상기 추가 탱크 내의 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 투과물을, 십자류 필터 요소(cross flow filter element)를 포함하는 제3 여과 유닛에서 연속 농축 공정에 적용하여, 관심 단백질이 풍부한 제3 잔류물 및 관심 단백질이 고갈된 제3 투과물을 생성하는 단계;
- 임의로, 상기 제3 투과물을 상기 제2 현탁액을 포함하는 상기 탱크로 스트리밍하여 상기 제2 현탁액을 포함하는 상기 탱크 내의 현탁액을 희석하는 단계로서, 상기 현탁액을 제3 희석 계수로 희석하는, 상기 희석 단계 및
- 상기 관심 단백질이 풍부한 제3 잔류물을 제3 탱크로 반송하고/하거나 상기 관심 단백질이 풍부한 제3 잔류물을 수집하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 5

침전물로부터 관심 단백질을 추출하는 방법으로서,

- 상기 침전물을 제1 탱크에서 액체와 혼합하여, 제1 희석 계수를 갖는 제1 현탁액을 형성하는 단계;

- b) 상기 관심 단백질이 고갈된 제1 잔류물 및 상기 관심 단백질이 풍부한 제1 투과물을 생성하도록 구성된 동적 필터 요소를 포함하는 제1 여과 유닛에 상기 제1 현탁액을 공급하는 단계;
- c) 액체를 첨가하여, 임의로는 상기 제1 잔류물을 상기 제1 탱크 내로 스트리밍하여, 상기 제1 탱크 내의 상기 제1 현탁액을 제2 회석 계수로 회석하는 단계;
- d) 제2 탱크에서 상기 관심 단백질이 풍부한 제1 투과물을 회수하는 단계;
- d1) 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 잔류물 및 상기 관심 단백질이 고갈된 제2 투과물을 생성하도록 구성된 십자류 필터 요소를 포함하는 제2 여과 유닛에서 상기 제2 탱크 내의 제1 투과물을 연속 농축 공정에 적용하는 단계;
- d2) 임의로, 상기 제2 투과물을 상기 제1 탱크로 스트리밍하여 상기 제1 탱크 내의 상기 제1 현탁액을 회석하는 단계로서, 상기 현탁액을 제2 회석 계수로 회석하는, 상기 회석 단계;
- d3) 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 잔류물을 상기 제2 탱크로 반송하고/하거나 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 잔류물을 수집하는 단계;
- e) 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 잔류물로부터 하나 이상의 불순물을 침전시켜 제2 현탁액을 생성하는 단계 및
- f) 상기 제2 현탁액으로부터 침전된 불순물을 제거하여 상기 관심 단백질을 함유하는 용액을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 제2 현탁액으로부터 침전된 불순물을 제거하는 단계가

- a) 상기 하나 이상의 침전된 불순물을 함유하는 제3 잔류물 및 상기 관심 단백질이 풍부한 제3 투과물을 생성하도록 구성된 동적 필터 요소를 포함하는 제3 여과 유닛에 상기 제2 현탁액을 공급하는 단계;
- b) 임의로, 상기 제2 현탁액을 포함하는 탱크 내로 상기 제3 잔류물을 스트리밍하여 제3 회석 계수가 되도록 하는 단계 및
- c) 추가의 탱크 내의 상기 관심 단백질이 풍부한 제3 투과물을 회수하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 제2 현탁액으로부터 침전된 불순물을 제거하는 단계가

- a) 상기 추가의 탱크 내의 상기 제3 투과물을, 십자류 필터 요소를 포함하는 제4 여과 유닛에서 연속 농축 공정에 적용하여, 상기 관심 단백질이 풍부한 제4 잔류물 및 상기 관심 단백질이 고갈된 제4 투과물을 생성하는 단계;
- b) 임의로, 상기 제4 투과물을 상기 제2 현탁액을 포함하는 상기 탱크로 스트리밍하여 상기 제2 현탁액을 포함하는 상기 탱크 내의 현탁액을 회석하는 단계로서, 상기 현탁액을 제3 회석 계수로 회석하는, 상기 회석 단계 및
- c) 상기 관심 단백질이 풍부한 제4 잔류물을 상기 추가의 탱크로 반송하고/하거나 상기 관심 단백질이 풍부한 제4 잔류물을 수집하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 8

침전물로부터 고수율로 관심 단백질을 추출하기 위한 산업적 규모의 방법으로서,

- a) 상기 침전물을 제1 탱크에서 액체와 혼합하여, 제1 회석 계수를 갖는 현탁액을 형성하는 단계;
- b) 평균 공극 크기가 5 내지 5,000nm인 세라믹 막을 갖는 필터 디스크를 포함하는 회전 십자류 필터 요소를 포함하는 제1 여과 유닛에 제1 현탁액을 공급하는 단계로서, 상기 필터 요소는 상기 관심 단백질이 고갈된 제1 잔류물 및 상기 관심 단백질이 풍부한 제1 투과물을 생성하도록 구성된, 상기 제1 현탁액을 공급하는 단계;
- c) 액체를 첨가하여, 부분적으로는 상기 제1 잔류물을 상기 제1 탱크 내로 스트리밍하여, 상기 제1 탱크 내의

상기 제1 현탁액을 제2 회석 계수로 회석하는 단계;

d) 제2 탱크에서 상기 관심 단백질이 풍부한 상기 제1 투과물을 회수하는 단계;

e) 십자류 필터 요소를 포함하는 제2 여과 유닛에서 상기 제2 탱크 내의 상기 제1 투과물을 연속 농축 공정에 적용하여, 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 잔류물 및 상기 관심 단백질이 고갈된 제2 투과물을 생성하는 단계;

f) 임의로, 상기 제2 투과물을 상기 제1 탱크로 스트리밍하여 상기 제1 탱크 내의 상기 제1 현탁액을 회석하는 단계로서, 상기 현탁액을 상기 제2 회석 계수로 회석하는, 상기 회석 단계;

g) 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 잔류물을 제2 탱크로 반송하고/하거나 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 잔류물을 수집하는 단계;

h) 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 잔류물 중의 하나 이상의 불순물을 침전시켜 제2 현탁액을 생성하는 단계 및

i) 상기 제2 현탁액으로부터 침전된 불순물을 제거하여 상기 관심 단백질을 함유하는 용액을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 하나 이상의 침전된 불순물을 함유하는 제3 잔류물 및 상기 관심 단백질이 풍부한 제3 투과물을 생성하도록 구성된 동적 필터 요소를 포함하는 제3 여과 유닛에 상기 제2 현탁액을 공급함으로써; 임의로는 상기 제2 현탁액을 포함하는 탱크 내로 제3 잔류물을 스트리밍함으로써; 추가의 탱크에서 관심 단백질이 풍부한 제3 여과물을 회수함으로써, 상기 침전된 불순물이 상기 제2 현탁액으로부터 제거되는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 제2 현탁액으로부터 침전된 불순물을 제거하는 단계가, 상기 추가의 탱크 내의 제3 투과물을, 십자류 필터 요소를 포함하는 제4 여과 유닛에서 연속 농축 공정에 적용하여, 관심 단백질이 풍부한 제4 잔류물 및 관심 단백질이 고갈된 제4 투과물을 생성하는 단계; 임의로, 상기 제4 투과물을 상기 제2 현탁액을 포함하는 상기 탱크로 스트리밍하여 상기 제2 현탁액을 포함하는 상기 탱크 내의 현탁액을 회석하는 단계로서, 상기 현탁액을 제3 회석 계수로 회석하는, 상기 회석 단계; 및 상기 관심 단백질이 풍부한 제4 잔류물을 상기 추가의 탱크로 반송하고/하거나 상기 관심 단백질이 풍부한 제4 잔류물을 수집하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 잔류물 및 상기 제2 투과물을 상기 제1 탱크로 연속적으로 스트리밍하여 상기 현탁액을 상기 제2 회석 계수로 회석하고/하거나 상기 제3 잔류물 및 상기 제4 투과물을 상기 제2 현탁액을 포함하는 상기 탱크로 연속적으로 스트리밍하여 상기 제2 현탁액을 제3 회석 계수로 회석하는, 방법.

청구항 12

제8항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 관심 단백질이 풍부한 투과물을 생성하도록 구성된 상기 여과 유닛이, 상기 투과물을 수집하도록 구성된 하나 초과와 중공 샤프트를 포함하고, 각각의 샤프트는 세라믹 막을 포함하는 적어도 하나의 필터 디스크와 연결되는, 방법.

청구항 13

제8항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 농축 공정을 수행하기 위한 상기 여과 유닛이 동적 십자류 필터 요소를 포함하는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 관심 단백질이 풍부한 투과물 또는 상기 관심 단백질이 풍부한 잔류물로부터 상기 하나 이상의 불순물을 침전시키는 단계가 용매의 용매화 전위를 변경함에 의한 단계인, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 용매의 상기 용매화 전위를 변경함이 시약(reagent)을 첨가하고/첨가하거나 상기 용액의 pH 또는 전도도를 조정함으로써 상기 하나 이상의 불순물의 용해도를 낮춤을 포함하는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 하나 이상의 불순물을 침전시키기 위한 상기 시약이 이온화 가능한 유기 첨가제인, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 이온화 가능한 유기 첨가제가 지방산 또는 이의 염 또는 에스테르인, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 지방산이 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ 의 화학식을 포함하고, 바람직하게는 상기 지방산이 C7 내지 C10 카복실산 또는 이의 염 또는 에스테르인, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 지방산이 에난트산(헵탄산), 카프릴산(옥탄산), 옥텐산, 펠라르곤산(노난산), 노넨산 또는 카프르산(데칸산) 및 이들의 염 및 에스테르로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 지방산이 카프릴산(옥탄산), 이의 염 또는 에스테르인, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 카프릴산(옥탄산)이 약 0.1g/g 총 단백질, 약 0.25g/g 총 단백질, 약 0.5g/g 총 단백질, 약 0.75g/g 총 단백질, 약 1.0g/g 총 단백질, 약 1.5g/g 총 단백질, 약 2.0g/g 총 단백질, 약 2.5g/g 총 단백질, 약 3.0g/g 총 단백질, 약 3.5g/g 총 단백질 또는 약 4.0g/g 총 단백질의 최종 농도로 첨가되고, 바람직하게는 상기 지방산, 바람직하게는 카프릴산(옥탄산)의 양이 약 0.275g/g 총 단백질, 약 0.280g/g 총 단백질, 약 0.285g/g 총 단백질, 약 0.290g/g 총 단백질, 약 0.300g/g 총 단백질 또는 약 0.325g/g 총 단백질인, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 카프릴산이 약 22 내지 약 40℃, 바람직하게는 약 25 내지 약 38℃, 바람직하게는 약 27 내지 약 37℃, 보다 바람직하게는 약 32℃의 온도에서 상기 관심 단백질이 풍부한 투과물 또는 상기 관심 단백질이 풍부한 잔류물에 첨가되어 함께 인큐베이션되는, 방법.

청구항 23

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 관심 단백질이 풍부한 투과물 또는 상기 관심 단백질이 풍부한 잔류물로부터 상기 하나 이상의 불순물을 침전시키기 위한 시약이 비이온성 유기 중합체인, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 비이온성 유기 중합체가 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리비닐피롤리돈, 텍스트란, 셀룰로오스 및 기타 중합체로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 침전물이 상기 관심 단백질을 포함하는 불용성 고체인, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 불용성 고체가 펠렛 또는 페이스트 형태인, 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 관심 단백질을 포함하는 침전물이 알콜 분획화 공정의 중간

생성물인, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 알콜 분획화가 인간 혈장의 알콜 분획화인, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 침전물이 콘(Cohn) 분획인, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 혈장 분획이 콘 분획 I(Fr I), 콘 분획 II+III(Fr II+III), 콘 분획 I+II+III(Fr I+II+III), 콘 분획 II(Fr II), 콘 분획 III(Fr III), 콘 분획 IV(Fr IV), 콘 분획 V(Fr V), 키슬러/니치만(Kistler/Nitschmann) 침전물 A(KN A), 키슬러/니치만 침전물 B(KN B) 및 키슬러/니치만 침전물 C(KN C) 및 이들 중 하나 이상의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 31

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 침전물이 상기 관심 단백질을 포함하는 동결건조물 및/또는 결정화된 고체 형태인, 방법.

청구항 32

제1항 내지 제26항 및 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질-포함 침전물이 배양 상청액, 발효 생성물 또는 밀크(milk) 또는 유청 분획으로부터 유래된 물질로부터 얻어지는, 방법.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 관심 단백질이 면역글로불린, 바람직하게는 인간 면역글로불린 G(IgG)인, 방법.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 현탁액이, 상기 단백질-포함 침전물을 액체와 혼합하여 생성되어 출발 조성물에 제1 희석 계수를 제공하는, 방법.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 현탁액이 상기 제1 여과 유닛에 연속적으로 공급되고, 바람직하게는, 상기 제1 현탁액이 적어도 상기 제2 희석 계수로 희석될 때까지 상기 제1 현탁액이 상기 제1 여과 유닛에 연속적으로 공급되는, 방법.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 현탁액이 추가의 여과 유닛에 연속적으로 공급되고, 바람직하게는, 상기 제2 현탁액이 적어도 상기 제3 희석 계수로 희석될 때까지 상기 제2 현탁액이 상기 추가의 여과 유닛에 연속적으로 공급되는, 방법.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 잔류물 및 상기 관심 단백질이 풍부한 제1 투과물을 생성하도록 구성된 동적 필터 요소를 포함하는 여과 유닛이 회전 십자류 필터 요소를 포함하는, 방법.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동적 필터 요소가 동적 십자류 필터 요소, 바람직하게는 회전 십자류 필터 요소이고, 바람직하게는, 적어도, 상기 제1 필터 유닛의 상기 동적 필터 요소가 회전 십자류 필터 요소인, 방법.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 필터 요소들 중 하나 이상이 세라믹 막을 포함하는, 방법.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동적 필터 요소가, 평균 공극 크기가 5nm 이상 2 μ m 이하의 범위인 필터 막을 포함하는, 방법.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 여과 유닛들 중 하나 이상이 가압 용기를 포함하고, 바람직하게는, 적어도, 상기 제1 여과 유닛이 가압 용기를 포함하는, 방법.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 여과 유닛들 중 하나 이상의 온도가 2 내지 25℃의 온도로 제어되는, 방법.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 여과 유닛들 중 하나 이상에서 막 관통 여과 압력이 0.1 내지 2.5bar인, 방법.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 상기 현탁액 또는 상기 용액의 상기 필터 유닛으로의 유속 및/또는 상기 필터 유닛 내에서의 체류 시간, 및/또는 불순물/침전물을 포함하는 상기 잔류물/라피네이트의 유속, 및/또는 상기 관심 단백질이 풍부한 제1 투과물/여과물의 유속을 조정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 주기적인 백플러싱(backflusing) 간격을 포함하고, 상기 여과 유닛을 통과하는 액체의 유동은 규칙적인 간격으로 그리고 정의된 시간 기간 동안 역전되는, 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 여과 유닛에서 상기 액체의 탁도 및 단백질 농도가 감소함에 따라 백플러싱 간격들 사이의 시간 기간이 증가하는, 방법.

청구항 47

제45항 또는 제46항에 있어서, 상기 백플러싱 간격의 지속 시간이 상기 여과 간격의 지속 시간보다 짧고, 바람직하게는, 상기 백플러싱 간격의 지속 시간이 상기 여과 간격의 지속 시간의 적어도 1/4, 1/8, 1/10, 1/16이거나 또는 상기 여과 간격의 지속 시간보다 더 짧은, 방법.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 상기 단백질-포함 침전물 중 상기 관심 단백질의 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 일반적으로 적어도 98%를 회수하는, 방법.

청구항 49

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 농축 공정을 수행하기 위한 상기 필터 요소가 한외 여과(ultrafiltration) 및/또는 정용 여과(diafiltration)에 적합한 평균 공극 크기를 갖는 여과 막을 포함하는, 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 공극 크기가 2 내지 200nm, 바람직하게는 3 내지 50nm인, 방법.

청구항 51

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 농축 공정을 수행하기 위한 상기 필터 요소가, 연속 농축 공정을 수행하도록 구성된 회전 십자류 필터 요소인, 방법.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 농축 공정을 수행하기 위한 상기 필터 요소가 상기 관심 단백질의 분자량보다 작은 분자량 컷오프를 갖는 막을 포함하고, 바람직하게는, 막 컷오프는 상기 관심 단백질의 분자량보다 적어도 3배 낮아서 상기 관심 단백질이 상기 잔류물에 유지되는, 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 막의 분자량 컷 값이 50kDa 미만, 바람직하게는 30kDa 미만, 보다 바람직하게는 10kDa 미만, 가장 바람직하게는 5kDa 미만인, 방법.

청구항 54

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 농축 공정을 수행하기 위한 상기 필터 요소가 중합체 막 형태, 예를 들면, 폴리에테르설폰 또는 재생 셀룰로오스의 막을 포함하는 한외 여과 장치를 포함하는, 방법.

청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 농축 공정을 수행하기 위한 상기 필터 요소가 세라믹 디스크를 포함하는, 방법.

청구항 56

제1항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법의 생성물이, 최종 생성물이 대상체에게 투여하기에 적합하도록, 크로마토그래피 단계들, 바이러스 불활성화 단계들, 농축 및 제형화 단계들 중 하나 이상을 포함하는 추가의 처리에 적용되는, 방법.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 침전물이 필터 조제(filter aid)를 포함하는, 방법.

청구항 58

관심 단백질을 함유하는 용액으로부터 하나 이상의 불순물을 침전시키는 방법으로서,

- 관심 단백질 및 하나 이상의 불순물을 함유하는 용액을 제공하는 단계로서, 상기 용액은 전도도가 6 내지 9mS/cm이고, pH가 4.7 내지 5.2이고, 총 단백질 농도가 15 내지 17g/L인, 상기 제공 단계 및
- 상기 용액에 지방산을 첨가하여 하나 이상의 불순물을 침전시키는 단계로서, 상기 지방산은 약 0.1 내지 약 0.4g 지방산/g 총 단백질의 양으로 첨가되는, 상기 침전 단계를 포함하는, 방법.

청구항 59

관심 단백질을 함유하는 용액으로부터 하나 이상의 불순물을 제거하는 방법으로서,

- 관심 단백질 및 하나 이상의 불순물을 함유하는 용액을 제공하는 단계로서, 상기 용액은 전도도가 6 내지 9mS/cm이고, pH 4.7 내지 5.2이고, 총 단백질 농도가 15 내지 17g/L인, 상기 제공 단계;
- 상기 용액에 지방산을 첨가하여 하나 이상의 불순물을 침전시키는 단계로서, 상기 지방산은 약 0.1 내지 약 0.4g 지방산/g 총 단백질의 양으로 첨가되는, 상기 침전 단계 및
- 상기 하나 이상의 침전된 불순물을 제거하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 60

제58항 또는 제59항에 있어서, 상기 지방산이 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ 의 화학식을 포함하는, 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 지방산이 C7 내지 C10 카복실산이고, 바람직하게는 상기 지방산이 에난트산(헵탄산), 카프릴산(옥탄산), 옥텐산, 펠라르곤산(노난산), 노넨산 또는 카프르산(데칸산) 및 이들의 염 또는 에스테르를 포함하는, 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 상기 지방산이 카프릴산(옥탄산) 또는 이의 염 또는 에스테르인, 방법.

청구항 63

제58항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 카프릴산(옥탄산)이 약 0.1g/g 총 단백질, 약 0.25g/g 총 단백질, 약 0.5g/g 총 단백질, 약 0.75g/g 총 단백질, 약 1.0g/g 총 단백질, 약 1.5g/g 총 단백질, 약 2.0g/g 총 단백질, 약 2.5g/g 총 단백질, 약 3.0g/g 총 단백질, 약 3.5g/g 총 단백질 또는 약 4.0g/g 총 단백질의 농도로 첨가되고, 바람직하게는, 상기 지방산, 바람직하게는 카프릴산(옥탄산)의 양이 약 0.275g/g 총 단백질, 약 0.280g/g 총 단백질, 약 0.285g/g 총 단백질, 약 0.290g/g 총 단백질, 약 0.300g/g 총 단백질 또는 약 0.325g/g 총 단백질의 농도로 첨가되는, 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 상기 카프릴산이, 약 22 내지 약 40℃, 바람직하게는 약 25 내지 약 38℃, 보다 바람직하게는 약 32℃의 온도에서 상기 관심 단백질이 풍부한 투과물 또는 잔류물에 첨가되어 함께 인큐베이션되는, 방법.

청구항 65

제58항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용액이 혈장 분획화 공정으로부터의 분획인, 방법.

청구항 66

제58항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용액이 제5항에 기재된 단계 a) 내지 d)(임의로 단계 d1) 내지 d3)을 포함함)로부터 수득되거나 수득될 수 있는, 방법.

청구항 67

제58항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용액이 필터 조제를 함유하지 않는, 방법.

청구항 68

제58항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 관심 단백질이 면역글로불린, 바람직하게는 인간 면역글로불린 G(IgG), 예를 들면, 인간 혈장으로부터의 면역글로불린 G 또는 재조합적으로 생성된 면역글로불린 G인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

기술분야

[0002]

본 발명은, 침전물로부터 단백질을, 특히 면역글로불린 G(IgG)와 같은 면역글로불린(Ig)을 포함하는 재조합 및/또는 혈장 유래 단백질을 추출하는 방법 및 시스템에 관한 것이다.

[0003]

관련 출원

[0004]

본 출원은 호주 가특허출원 AU2019904386에 대해 우선권을 주장하며, 이의 내용은 전문이 인용에 의해 본원에 포함된다.

배경 기술

[0005]

특정 항체와 같은 정제된 단백질에 대한 수요가 상당히 증가해 왔다. 이러한 정제된 단백질은 치료 및/또는 진

단 목적으로 사용될 수 있다.

- [0006] 인간 혈장은, 예를 들면, 인간 알부민(HSA), 면역글로불린(IgG), 응고 인자 농축물(응고 인자 VIII, 응고 인자 IX, 프로트롬빈 복합체 등) 및 억제제(항트롬빈, C1-억제제 등)와 같은 널리 확립되고 용인된 혈장-단백질 제품의 생산을 위해 수십 년 동안 산업적으로 사용되어 왔다. 이러한 혈장-유래 약물의 개발 과정에서, 혈장 분획화 방법이 확립되어, 특정 단백질 분획이 풍부한 중간 생성물이 생성되었으며, 이후 상기 중간 생성물은 혈장-단백질 제품/들을 위한 출발 조성물로서의 역할을 한다. 일반적인 공정이 예를 들면, 문헌[Molecular Biology of Human Proteins (Schultze H.E., Heremans J.F.; Volume I: Nature and Metabolism of Extracellular Proteins 1966, Elsevier Publishing Company; p. 236-317)]에 검토되어 있다. 이러한 종류의 분리 기술은 동일한 혈장 기증자 풀로부터 여러 치료학적 혈장-단백질 제품을 생산할 수 있게 한다. 이는 하나의 기증자 풀로부터 하나의 혈장-단백질 제품만을 생산하는 것보다 경제적으로 유리하며, 따라서 혈장 분획화에서 산업 표준으로 채택되어 있다.
- [0007] 이러한 유형의 분획화 방법의 하나의 예인 혈장의 냉 에탄올 분획화는 주로 알부민의 정제를 위해 2차 세계 대전 동안 E.J 콘(E.J. Cohn)과 그의 팀에 의해 개척되었다(참조; Cohn EJ, et al. 1946, J. Am. Chem. Soc. 62: 459-475). 콘 분획화 공정은 에탄올 농도를 0%로부터 40%로 단계적으로 높이면서 pH를 중성(pH 7)으로부터 약 4.8로 낮추어 알부민의 침전을 야기함을 포함한다. 콘 분획화는 지난 70여년에 걸쳐 발달해 왔지만, 대부분의 상업적 혈장 분획화 공정은, 혈장을 일련의 주요 침전 단백질 분획들(예를 들면, 콘의 분획 I 내지 V)로 분리하기 위해 pH, 이온 강도, 용매 극성 및 알콜 농도의 차이를 활용하는 원래의 공정 또는 이의 변형(예를 들면, 키슬러/니치만(Kistler/Nitschmann))을 기반으로 한다.
- [0008] 콘 분획화 공정에 대한 변형은 다가 IgG의 회수를 개선하는 것을 목표로 개발되어 왔다. 예를 들면, 온클레이(Oncley)와 동료들은 활성 면역글로불린 혈청 분획을 생산하기 위해, 콘에 의해 기술된 것과는 상이한 냉 에탄올, pH, 온도 및 단백질 농도의 조합으로 콘 분획 II + III를 출발 물질로서 사용하였다(Oncley et al., (1949) J. Am. Chem. Soc. 71, 541-550). 오늘날, 온클레이 방법은 다가 IgG 생산에 사용되는 고전적인 방법이다. 그럼에도 불구하고, 감마 글로불린(항체-풍부 부분)의 대략 5%가 분획 I과 공동-침전되고, 혈장에 존재하는 총 감마-글로불린의 약 15%가 분획 II + III 단계에 의해 손실되는 것으로 알려져 있다(문헌[Table III, Cohn EJ, et al. 1946, J. Am. Chem. Soc. 62: 459-475] 참조). 키슬러/니치만 방법은 일부 침전 단계(침전 B vs 분획 III)의 에탄올 함량을 감소시킴으로써 IgG의 회수를 개선하는 것을 목표로 하였다. 그러나, 순도를 희생해야 수율이 증가된다(Kistler & Nitschmann, (1962) Vox Sang. 7, 414-424).
- [0009] 초기에 이러한 분획화 공정으로부터 유래된 면역글로불린 G(IgG) 제제는 다양한 감염성 질환의 예방 및 치료에 성공적으로 사용되었다. 그러나, 에탄올 분획화는 비교적 조악한 공정이기 때문에, IgG 제품은 근육내로만 투여될 수 있을 정도로 불순물 및 응집체를 함유했다. 그 이후로 정제 공정의 추가의 개선으로 정맥내(IVIg라고 함) 및 피하(SCIg라고 함) 투여에 적합한 IgG 제제가 생성되었다.
- [0010] 2010년 전세계적으로 대략 3천만 리터의 혈장이 가공되어 약 500톤의 알부민 및 100톤의 IVIg를 포함하여 다양한 치료 제품을 제공한 것으로 추정된다. IVIg 시장은 전체 혈장 분획화 시장의 약 40 내지 50%를 차지한다(P. Robert, Worldwide supply and demand of plasma and plasma derived medicines (2011) J. Blood and Cancer, 3, 111-120). 따라서, IVIg에 대한 수요가 (SCIg에 대한 수요의 증가와 함께) 여전히 강하며, 혈장 및 관련 분획으로부터 면역글로불린의 회수를 개선해야 할 필요성이 남아 있다. 바람직하게는, 이는 다른 혈장 유래 치료 단백질의 회수가 부정적인 영향을 받지 않도록 보장하는 방식으로 달성되어야 한다.
- [0011] 상업적 관점에서, 초기 분획화 공정은 치료 단백질, 특히 혈장 유래 단백질의 생산과 관련된 전체 생산 시간 및 비용에 있어서 중요한데, 이는 후속 정제 단계가 상기 초기 분획 내의 관심 단백질(들)의 수율 및 순도에 따라 좌우되기 때문이다. 보다 더 낮은 운영 비용으로 단백질 수율을 개선하기 위해 혈장 유래 단백질에 대한 냉 에탄올 분획화 공정의 몇 가지 변형이 개발되었지만, 높은 단백질 수율은 일반적으로 낮은 순도와 관련된다.
- [0012] 예를 들면, 혈장 또는 혈청으로부터 유래된 면역글로불린-포함 침전 물질로부터 면역글로불린과 같은 단백질을 산업적 규모로 생산하기 위한 개선된 방법 및 시스템이 필요하며, 이는 엄격한 안전 기준을 충족해야 한다. 현재 사용되는 다운스트림 기술은 비교적 비용이 많이 들고 수율이 최적이지 않다. 따라서, 단백질 함유 현탁액으로부터 면역글로불린과 같은 단백질을 추출 및 정제하기 위한 보다 효율적이고 경제적인 방법을 개발해야 할 중대한 필요성이 있다.
- [0013] 명세서의 선행 기술에 대한 언급은, 상기 선행 기술이 모든 관할권에서 일반적인 일반 지식의 일부를 형성하거

나, 상기 선행 기술이 이해되고/이해되거나, 관련성이 있는 것으로 간주되고/되거나 당업자에 의해 선행 기술의 다른 부분과 조합되는 것으로 쉽게 예상된다는 인정하거나 시사하는 것이 아니다.

발명의 내용

- [0014] 본 발명의 제1 측면에 따르면, 침전물로부터 관심 단백질을 추출하는 방법으로서,
- [0015] a) 침전물을 제1 탱크에서 액체와 혼합하여, 제1 희석 계수(dilution factor)를 갖는 제1 현탁액을 형성하는 단계;
- [0016] b) 상기 관심 단백질이 고갈된 제1 잔류물(retentate) 및 상기 관심 단백질이 풍부한 제1 투과물(permeate)을 생성하도록 구성된 동적 필터 요소(dynamic filter element)를 포함하는 제1 여과 유닛에 상기 제1 현탁액을 공급하는 단계;
- [0017] c) 액체를 첨가하여, 임의로는 상기 제1 잔류물을 상기 제1 탱크 내로 스트리밍(streaming)하여, 상기 제1 탱크 내의 상기 제1 현탁액을 제2 희석 계수로 희석하는 단계;
- [0018] d) 제2 탱크에서 상기 관심 단백질이 풍부한 제1 투과물을 회수하는 단계;
- [0019] e) 상기 관심 단백질이 풍부한 제1 투과물 중의 하나 이상의 불순물을 침전시켜 제2 현탁액을 생성하는 단계 및
- [0020] f) 상기 제2 현탁액으로부터 침전된 불순물을 제거하여 상기 관심 단백질을 함유하는 용액을 생성하는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다.
- [0021] 본 발명의 상기 측면의 임의의 양태에서, 상기 제1 투과물 중의 하나 이상의 불순물을 침전시키는 단계 이전에 상기 관심 단백질이 풍부한 제1 투과물을 농축시키는 단계가 제공된다.
- [0022] 본 발명의 제1 측면의 임의의 양태에서, 관심 단백질을 함유하는 용액을 생성하기 위해 제2 현탁액으로부터 침전된 불순물을 제거하는 단계는
- [0023] a) 상기 하나 이상의 침전된 불순물을 함유하는 제2 잔류물 및 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 투과물을 생성하도록 구성된 동적 필터 요소를 포함하는 제2 여과 유닛에 상기 제2 현탁액을 공급하는 단계;
- [0024] b) 임의로, 상기 제2 잔류물을 상기 제2 현탁액을 포함하는 탱크 내로 스트리밍하는 단계 및
- [0025] c) 추가의 탱크 내의 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 투과물을 회수하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0026] 바람직하게는, 관심 단백질을 함유하는 용액을 생성하기 위해 제2 현탁액으로부터 침전된 불순물을 제거하는 단계는
- [0027] a) 상기 추가의 탱크 내의 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 투과물을, 십자류 필터 요소(cross flow filter element)를 포함하는 제3 여과 유닛에서 연속 농축 공정에 적용하여, 관심 단백질이 풍부한 제3 잔류물 및 관심 단백질이 고갈된 제3 투과물을 생성하는 단계;
- [0028] b) 임의로, 상기 제3 투과물을 상기 제2 현탁액을 포함하는 상기 탱크로 스트리밍하여 상기 제2 현탁액을 포함하는 상기 탱크 내의 현탁액을 희석하는 단계로서, 상기 현탁액을 제3 희석 계수로 희석하는, 상기 희석 단계 및
- [0029] c) 상기 관심 단백질이 풍부한 제3 잔류물을 제3 탱크로 반송하고/하거나 상기 관심 단백질이 풍부한 제3 잔류물을 수집하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0030] 본 발명의 제2 측면에 따르면, 침전물로부터 관심 단백질을 추출하는 방법으로서,
- [0031] a) 상기 침전물을 제1 탱크에서 액체와 혼합하여, 제1 희석 계수를 갖는 제1 현탁액을 형성하는 단계;
- [0032] b) 상기 관심 단백질이 고갈된 제1 잔류물 및 상기 관심 단백질이 풍부한 제1 투과물을 생성하도록 구성된 동적 필터 요소를 포함하는 제1 여과 유닛에 상기 제1 현탁액을 공급하는 단계;
- [0033] c) 액체를 첨가하여, 임의로는 상기 제1 잔류물을 상기 제1 탱크 내로 스트리밍하여, 상기 제1 탱크 내의 상기 제1 현탁액을 제2 희석 계수로 희석하는 단계;
- [0034] d) 제2 탱크에서 상기 관심 단백질이 풍부한 제1 투과물을 회수하는 단계;
- [0035] d1) 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 잔류물 및 상기 관심 단백질이 고갈된 제2 투과물을 생성하도록 구성된 십

자류 필터 요소를 포함하는 제2 여과 유닛에서 상기 제2 탱크 내의 제1 투과물을 연속 농축 공정에 적용하는 단계;

- [0036] d2) 임의로, 제2 투과물을 상기 제1 탱크로 스트리밍하여 상기 제1 탱크 내의 상기 제1 현탁액을 희석하는 단계로서, 상기 현탁액을 제2 희석 계수로 희석하는, 상기 희석 단계;
- [0037] d3) 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 잔류물을 상기 제2 탱크로 반송하고/하거나 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 잔류물을 수집하는 단계;
- [0038] e) 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 잔류물로부터 하나 이상의 불순물을 침전시켜 제2 현탁액을 생성하는 단계 및
- [0039] f) 상기 제2 현탁액으로부터 침전된 불순물을 제거하여 상기 관심 단백질을 함유하는 용액을 생성하는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다.
- [0040] 본 발명의 제2 측면의 임의의 양태에서, 관심 단백질을 함유하는 용액을 생성하기 위해 제2 현탁액으로부터 침전된 불순물을 제거하는 단계는
- [0041] a) 상기 하나 이상의 침전된 불순물을 함유하는 제3 잔류물 및 상기 관심 단백질이 풍부한 제3 투과물을 생성하도록 구성된 동적 필터 요소를 포함하는 제3 여과 유닛에 상기 제2 현탁액을 공급하는 단계;
- [0042] b) 임의로, 상기 제2 현탁액을 포함하는 탱크 내로 상기 제3 잔류물을 스트리밍하여 제3 희석 계수가 되도록 하는 단계 및
- [0043] c) 임의로, 추가의 탱크 내의 상기 관심 단백질이 풍부한 제3 투과물을 회수하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0044] 바람직하게는, 관심 단백질을 함유하는 용액을 생성하기 위해 제2 현탁액으로부터 침전된 불순물을 제거하는 단계는
- [0045] a) 상기 추가의 탱크 내의 상기 제3 투과물을, 십자류 필터 요소를 포함하는 제4 여과 유닛에서 연속 농축 공정에 적용하여, 상기 관심 단백질이 풍부한 제4 잔류물 및 상기 관심 단백질이 고갈된 제4 투과물을 생성하는 단계;
- [0046] b) 임의로, 상기 제4 투과물을 상기 제2 현탁액을 포함하는 상기 탱크로 스트리밍하여 상기 제2 현탁액을 포함하는 상기 탱크 내의 현탁액을 희석하는 단계로서, 상기 현탁액을 제3 희석 계수로 희석하는, 상기 희석 단계 및
- [0047] c) 상기 관심 단백질이 풍부한 제4 잔류물을 상기 추가의 탱크로 반송하고/하거나 상기 관심 단백질이 풍부한 제4 잔류물을 수집하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0048] 본 발명의 제1 또는 제2 측면의 임의의 양태에서, 단계 e)에서 하나 이상의 불순물을 침전시키는 단계(예를 들면, 본 발명의 제1 측면에 따른 제1 투과물 또는 본 발명의 제2 측면의 제2 잔류물로부터 불순물을 침전시키는 단계)는 용매의 용매화 전위를 변경함, 보다 구체적으로는 시약의 첨가 및/또는 (예를 들면, pH 또는 전도도와 같은) 조건의 조정에 의한 하나 이상의 불순물의 용해도를 낮춤에 의할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 제1 또는 제2 측면의 임의의 양태에서, 제1 투과물로부터 하나 이상의 불순물을 침전시키기 위한 시약은 이온화 가능한 유기 첨가제, 예를 들면, 지방산이다. 바람직하게는, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ 의 화학식을 포함하는 지방산이다. 바람직하게는, 지방산은 C 4 내지 C 10 카복실산이다. 지방산은 포화될 수 있거나 불포화될 수 있다. 보다 바람직하게는, 지방산은 에난트산(헵탄산), 카프릴산(옥탄산), 옥텐산, 펠라르곤산(노난산), 노넨산 또는 카프르산(데칸산)을 포함한다. 가장 바람직하게는, 지방산은 카프릴산(옥탄산)이다. 시약으로서 본원에 기재된 임의의 지방산의 염 또는 에스테르, 예를 들면, 카프릴레이트도 고려된다.
- [0050] 임의의 양태에서, 지방산, 바람직하게는 카프릴산(옥탄산)의 양은 약 0.1g/g 총 단백질, 약 0.5g/g 총 단백질, 약 0.75g/g 총 단백질, 약 1g/g 총 단백질, 약 1.5g/g 총 단백질, 약 2.0g/g 총 단백질, 약 2.5g/g 총 단백질, 약 3.0g/g 총 단백질, 약 3.5g/g 총 단백질 또는 약 4.0g/g 총 단백질이다. 바람직하게는, 지방산, 바람직하게는 카프릴산(옥탄산)의 양은 약 0.275g/g 총 단백질, 약 0.280g/g 총 단백질, 약 0.285g/g 총 단백질, 약 0.290g/g 총 단백질, 약 0.300g/g 총 단백질 또는 약 0.325g/g 총 단백질이다.
- [0051] 임의의 양태에서, 지방산, 바람직하게는 카프릴산(옥탄산)의 양은 0.1g/g 총 단백질, 0.5g/g 총 단백질, 0.75g/g 총 단백질, 1.0g/g 총 단백질, 1.5g/g 총 단백질, 2.0g/g 총 단백질, 2.5g/g 총 단백질, 3.0g/g 총 단

백질, 3.5g/g 총 단백질을 또는 4.0g/g 총 단백질이다. 바람직하게는, 지방산, 바람직하게는 카프릴산(옥탄산)의 양은 0.275g/g 총 단백질, 0.280g/g 총 단백질, 0.285g/g 총 단백질, 0.290g/g 총 단백질, 0.300g/g 총 단백질 또는 0.325g/g 총 단백질이다.

- [0052] 본 발명의 제1 또는 제2 측면의 임의의 양태에서, 제1 투과물로부터 하나 이상의 불순물을 침전시키기 위한 시약은 비이온성 유기 중합체이다. 비이온성 유기 중합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리비닐피롤리돈, 텍스트란, 셀룰로오스 또는 기타 중합체일 수 있다.
- [0053] 본 발명의 제1 또는 제2 측면의 임의의 양태에서, 단계 e)에서 하나 이상의 불순물을 침전시키는 단계는 상이한 양의 침전 시약으로의 순차적 침전을 사용하여 수행할 수 있다.
- [0054] 일반적으로, 관심 단백질을 포함하는 침전물은 관심 단백질을 포함하는 불용성 고체이다. 이는 종종 펠릿 또는 페이스트 형태이다. 종종 침전물이 현탁액으로서 생겨날 수 있다. 그후 고체 부분을 예를 들면, 여과 및/또는 원심분리에 의해 수집할 수 있다. 다르게는 이러한 현탁액을 제1 탱크에 직접 첨가하여 제1 회석 계수를 형성할 수 있다. 또 다른 옵션은 제1 탱크에 현탁액을 첨가한 다음 제1 탱크에 액체를 첨가하여 제1 회석 계수를 형성하는 것이다. 따라서 특정 양태에서, 관심 단백질을 포함하는 침전물은 제1 탱크에 첨가될 때 현탁액의 형태이다.
- [0055] 본 발명의 임의의 측면에서, 관심 단백질을 포함하는 침전물은 바람직하게는 혈장의, 보다 바람직하게는 인간 혈장의 알콜 분획화 공정의 중간 생성물이다. 바람직한 양태에서, 침전물은 인간 혈장 출발 물질로부터 수득된다. 보다 더 바람직하게는 침전물은 2,500 내지 6,000L의 인간 혈장 출발 물질로부터 수득된다.
- [0056] 본 발명의 임의의 측면에서, 관심 단백질을 포함하는 침전물은 혈장 분획(중간체)이다. 특정 양태에서, 분획은 콘 분획이다. 바람직한 양태에서, 혈장 분획은, 콘 분획 I(Fr I), 콘 분획 II+III(Fr II+III), 콘 분획 I+II+III(Fr I+II+III), 콘 분획 II(Fr II), 콘 분획 III(Fr III), 콘 분획 IV(Fr IV), 콘 분획 V(Fr V), 키슬러/니치만 침전물 A(KN A), 키슬러/니치만 침전물 B(KN B), 키슬러/니치만 침전물 C(KN C)로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다. 특히 바람직한 양태에서, 혈장 분획은, 콘 분획 I(Fr I), 콘 분획 II+III(Fr II+III), 콘 분획 I+II+III(Fr I+II+III) 또는 키슬러/니치만 침전물 A(KN A)로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다. 혈장 분획은 상이한 분획들의 조합일 수 있다. 예를 들면, 혈장 분획은 KN A와, Fr I, Fr II+III 및 Fr I+II+III 중 하나 이상과의 조합일 수 있다.
- [0057] 본 발명의 일 측면에 따른 방법은 다른 단백질-함유 고체로부터 관심 단백질을 추출하는데 적합하다. 예는 관심 단백질을 포함하는 동결 건조물 및 결정화된 고체 형태를 포함한다.
- [0058] 본 발명의 임의의 측면에서, 단백질-포함 침전물은 배양 상청액 또는 발효 출발 물질로부터 수득된다. 일부 양태에서, 출발 물질은 관심 단백질을 포함하는 밀크 또는 유청-함유 조성물이다. 다른 양태에서, 출발 물질은 밀크가 아니다.
- [0059] 본 발명의 임의의 측면에서, 관심 단백질은 면역글로불린, 바람직하게는 인간 면역글로불린 G(IgG), 예를 들면, 인간 혈장으로부터의 면역글로불린 G 또는 재조합적으로 생성된 면역글로불린 G이다.
- [0060] 본 발명의 임의의 측면에서, 관심 단백질은 알부민, 바람직하게는 인간 알부민(HSA)이다.
- [0061] 본 발명의 임의의 측면에서, 제1 현탁액은 단백질-포함 침전물을 액체, 예를 들면, 완충액 또는 물과 혼합함으로써 생성되며, 이에 의해 출발 조성물에 제1 회석 계수가 제공된다. 단백질-포함 침전물이 거의 고체(예를 들면, 매우 농후한(thick) 페이스트, 펠릿 등)인 경우, 단백질-포함 침전물에 액체를 첨가하면 현탁액이 출발 조성물로서 형성될 수 있다.
- [0062] 단계 a)의 제1 회석 계수를 갖는 제1 현탁액은 종종 본원에서 고체로 나타내는 용질-유사 입자가 용액에 존재하는 혼합물이다. 입자의 크기는 다양할 수 있으며, 용액이 혼합되지 않으면 결국 침전되는 더 큰 입자 또는 침전되지 않는(즉, 콜로이드 형태) 더 작은 크기의 입자를 포함할 수 있다.
- [0063] 제1 회석 계수는 종종 고체 중량 퍼센트(% w/v)로 나타낼 수 있다. 이는 주어진 용적의 현탁액 중의 건조 고체의 중량을, 상기 현탁액 용적의 총 중량으로 나누고 100을 곱한 값으로 정의된다. 특정 양태에서, 단계 a)의 현탁액 중량당 고체 퍼센트는 적어도 5%(즉, 약 1:20의 제1 회석 계수), 적어도 7.5%, 적어도 10%, 적어도 12.5%, 적어도 15%, 적어도 17.5%, 적어도 20%, 적어도 22.5%, 적어도 25%, 적어도 27.5%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40% 또는 적어도 50%이다. 일부 양태에서, 단계 a)의 현탁액 중량당 고체 퍼센트는 10 내지 30%이다. 일부 양태에서, 단계 a)의 현탁액 중량당 고체 퍼센트는 15 내지 25%이다. 바람직한 양태에서, 단계 a)의

현탁액 중량당 고체 퍼센트는 17.5 내지 22.5%이다. 특정 양태에서, 단계 a)의 현탁액 중량당 고체 퍼센트는 20%이다.

- [0064] 본 발명의 임의의 측면에서, 제1 회석 계수는 적어도 3(1:3; 침전물의 부(part):전체 부), 바람직하게는 1 내지 10, 바람직하게는 3 내지 9, 바람직하게는 3 내지 5, 바람직하게는 약 3, 5, 6, 7, 9 또는 10이다. 예를 들면, 단백질-포함 침전물이 펠릿 또는 페이스트, 특히 (매우 높은 점도를 가진) 매우 농후한 페이스트인 경우, 상기 페이스트 또는 펠릿을 현탁시키기 위해 액체가 필요하다.
- [0065] 예를 들면, 제1 회석 계수가 3(1:3; 1부의 단백질-포함 침전물:전체 3부)인 경우, 이는 1:2(1 단위 용적의 용질(회석시키고자 하는 물질)과 2 단위 용적의 회석제로 총 3 단위의 총 용적을 제공함)의 회석비와 같다.
- [0066] 본 발명의 임의의 측면에서, 제1 탱크에서의 제1 회석 계수(단백질-포함 침전물:전체)는, 적어도 40, 적어도 30, 적어도 20, 적어도 17.5, 적어도 15, 적어도 12.5, 적어도 10, 적어도 9, 적어도 8, 적어도 7, 적어도 6, 적어도 5.5, 적어도 5, 적어도 4.5, 적어도 4, 적어도 3.5, 적어도 3, 적어도 2.5, 적어도 2, 적어도 1.5 또는 적어도 1.25이다. 바람직하게는 제1 탱크에서의 제1 회석 계수(단백질-포함 침전물:전체)는 적어도 4이다.
- [0067] 일부 양태에서, 제1 탱크에서의 제1 회석 계수(단백질-포함 침전물:전체)는 1:1 내지 1:20, 1:2 내지 1:20, 1:3 내지 1:20, 1:4 내지 1:20, 1:5 내지 1:20, 1:6 내지 1:20, 1:7 내지 1:20, 1:8 내지 1:20, 1:10 내지 1:20, 1:1 내지 1:15, 1:2 내지 1:15, 1:3 내지 1:15, 1:4 내지 1:15, 1:5 내지 1:15, 1:6 내지 1:15, 또 1:7 내지 1:15, 1:8 내지 1:15, 1:10 내지 1:15, 1:1 내지 1:10, 1:2 내지 1:10, 1:3 내지 1:10, 1:4 내지 1:10, 1:5 내지 1:10, 1:6 내지 1:10, 1:7 내지 1:10, 1:8 내지 1:10, 1:9 내지 1:10, 1:3 내지 1:7, 1:3 내지 1:8, 1:3 내지 1:9, 1:4 내지 1:7, 1:4 내지 1:8, 1:4 내지 1:9, 1:5 내지 1:7, 1:5 내지 1:8, 1:5 내지 1:9, 1:3.5 내지 1:5, 1:4 내지 1:5 또는 1:1 내지 1:3, 바람직하게는 1:9, 1:7, 1:5, 보다 바람직하게는 1:3 또는 1:1이다.
- [0068] 적절하게는, 재현탁 후의 단백질-포함 침전물 중의 단백질은 약 5 내지 100g/L, 바람직하게는 10 내지 50g/L, 보다 바람직하게는 25 내지 45g/L의 농도이다. 이는 5g/L, 10g/L, 15g/L, 20g/L, 25g/L, 30g/L, 35g/L, 40g/L, 45g/L, 50g/L, 55g/L, 60g/L, 65g/L, 70g/L, 75g/L, 80g/L, 85g/L, 90g/L, 95g/L 및 100g/L 및 상기 양들 사이의 임의의 범위를 포함한다. 다른 양태에서, 단백질은 약 5 내지 20g/L, 예를 들면, 약 8 내지 12g/L의 농도일 수 있다.
- [0069] 바람직한 양태에 따르면, 제1 탱크 내의 제1 현탁액 또는 (제2 탱크 또는 제3 탱크 내의) 제2 현탁액의 pH는 약 3.0 내지 9.0, 바람직하게는 약 4.0 내지 7.0, 약 4.0 내지 6.0, 약 4.0 내지 5.0, 약 4.3 내지 4.9, 약 4.4 내지 4.8, 보다 바람직하게는 약 5.0이다. 일반적으로, pH는 단백질 침전물을 용액에 첨가하기 전에 또는 단백질 침전물을 용액과 혼합한 직후에 용액에서 측정된다. 일반적으로, 용액의 pH는 전구체 성분들을 혼합한 직후에 측정된다. 다르게는, pH는 혼합물 중의 성분들의 예상된 양 및 농도를 기준으로 계산함으로써 측정될 수도 있다.
- [0070] 특정 양태에서, 제1 현탁액 및 제2 현탁액(및/또는 단백질 농축물)의 전도도가 조정될 수 있다. 일반적으로, 단백질 현탁액 또는 농축물의 전도도는, pH가 약 4.7 내지 5.2의 범위에 있는 경우 대략 6 내지 9mS/cm이거나, 여과 전에 유사한 전도도로 조정된다.
- [0071] 본 발명의 임의의 측면에서, 제1 현탁액은 제1 여과 유닛으로 연속적으로 공급될 수 있다. 바람직한 양태에서, 제1 현탁액이 적어도 제2 회석 계수로 회석될 때까지 제1 현탁액이 제1 여과 유닛으로 연속적으로 공급된다.
- [0072] 본 발명의 제1 측면에서, 제2 현탁액은 제2 여과 유닛으로 연속적으로 공급될 수 있다. 바람직한 양태에서, 제2 현탁액이 적어도 제3 회석 계수로 회석될 때까지 제2 현탁액이 제2 여과 유닛에 연속적으로 공급된다.
- [0073] 본 발명의 제2 측면에서, 제2 현탁액은 제3 여과 유닛으로 연속적으로 공급될 수 있다. 바람직한 양태에서, 제2 현탁액이 적어도 제3 회석 계수로 회석될 때까지 제2 현탁액이 제3 여과 유닛에 연속적으로 공급된다.
- [0074] 본 발명의 또 다른 양태에서, (예를 들면, 제1 현탁액 및 제2 현탁액으로부터) 관심 단백질이 풍부한 투과물/여과물을 얻는 방법은 연속 분리 공정을 통한다. 상기 공정은 제1 현탁액으로부터 불순물을 분리하여 관심 단백질이 풍부한 여과물 및 하나 이상의 불순물을 포함하는 잔류물을 생성하도록 조정된다. 또한, 상기 공정은 제2 현탁액으로부터 침전물을 분리하여 관심 단백질이 풍부한 추가의 여과물(예를 들면, 본 발명의 제1 측면의 제2 여과물, 본 발명의 제2 측면의 제3 여과물)을 생성하도록 조정된다. 바람직하게는, 연속 분리 공정은 하나 이상의 여과 막 또는 상이한 유형의 여과 막이 사용될 수 있는 연속 여과 공정이다. 동적 십자류 여과와 같은 연속 여과 공정은 여과 부재가 차단될 위험을 최소화할 수 있다.

- [0075] 본 발명의 일 측면의 방법은 제1 탱크에서 현탁액에 추가의 액체를 첨가하는 단계를 포함할 수 있기 때문에, 제2 회석 계수는 제1 회석 계수보다 크다.
- [0076] 본 발명의 일 측면의 양태에 따르면, 제2 회석 계수 및 제3 회석 계수(총 재순환 액체의 용적에 대한 단백질-포함 침전물의 용적)는, 6 내지 70, 10 내지 70, 약 10, 약 20, 약 30, 약 40, 바람직하게는 약 20 내지 50이다. 다른 양태에서, 제2 회석 계수 및 제3 회석 계수는 약 60 또는 약 70(1:70; 단백질-포함 침전물의 부:전체의 부)이다. 특정 양태에서, 제2 회석 계수 및 제3 회석 계수는, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 60 또는 적어도 70이다. 본 발명의 발명자는 이러한 높은 회석 계수가 추출 효율을 향상시켜 개선된 수율을 제공할 수 있음을 발견하였다.
- [0077] 또 다른 양태에서, 제1 현탁액 중의 단백질 농도의 사전결정된 값은, 0.1g/L 미만, 바람직하게는 약 0.001 내지 0.1g/L; 일반적으로 약 0.05 내지 0.1g/L이다. 이러한 값은 비효율적인 추출 및 여과 공정을 피하기 위해, 이러한 역치에 도달될 때 즉시 분리 공정이 종료될 수 있도록 제공된다. 예를 들면, 제1 현탁액 중의 총 단백질 농도가 0.1g/L 미만인 경우, IgG의 총량은 약 40 내지 50mg/L 미만인 것으로 추정되므로, 관심 생성물의 연속 추출 및 여과를 계속하는 것이 덜 경제적이게 된다.
- [0078] 본 발명의 임의의 측면에서, 관심 단백질이 풍부한 투과물을 (즉, 제1 현탁액 또는 제2 현탁액으로부터) 생성하도록 구성된 여과 유닛의 동적 필터 요소는 동적 십자류 필터 요소이다. 제1 필터 유닛 및 제2 필터 유닛은 본 발명의 제1 측면에서 상기 필터 요소를 구성하고, 제1 필터 유닛 및 제3 필터 유닛은 본 발명의 제2 측면에서 상기 필터 요소를 구성한다는 것이 이해될 것이다.
- [0079] 바람직한 양태에서, 동적 십자류 필터 요소는 회전 십자류 필터 요소이다. 보다 바람직하게는, 회전 십자류 필터 요소는 필터 디스크를 포함한다. 필터 디스크는 일반적으로 샤프트 부재(shaft member)에 장착된다. 일 양태에서, 회전 십자류 필터 요소는 적어도 하나의 필터 디스크 및 적어도 하나의 샤프트 부재를 포함한다.
- [0080] 본 발명의 임의의 측면의 바람직한 양태에 따르면, 필터 디스크 막은 세라믹 막이다. 보다 바람직하게는, 세라믹 막은 공극 크기가 5nm 이상 2 μ m 이하의 범위이다. 특정 양태에서, 세라믹 막은 공극 크기가 약 0.2 내지 2 μ m이다. 특정 양태에서, 세라믹 필터 막은 평균 공극 크기가 5nm 이상 200nm(0.2 μ m) 이하의 범위이다. 특정 양태에서, 세라믹 필터 막은 공극 크기가 50nm 이상 내지 100nm 이하의 범위이다. 이러한 필터 디스크는 Kerafol 및 Flowserve에 의해 공급된다.
- [0081] 바람직한 양태에서, 여과 유닛은 가압 용기를 포함한다. 제1 탱크로부터의 현탁액은 유입구 포트를 통해 가압 용기로 지속적으로 공급될 수 있다. 용기 내의 현탁액의 균일한 분배는 분배 매니폴드를 사용하여 달성될 수 있다. 따라서, 특정 양태에서, 가압 용기는 분배 매니폴드를 포함한다.
- [0082] 일부 양태에서, 제1 현탁액 및/또는 제2 현탁액으로부터 관심 단백질이 풍부한 투과물을 생성하도록 구성된 여과 유닛은 회전 십자류 필터 요소를 포함한다. 바람직하게는, 필터 요소는 적어도 하나의 중공 중심 수집 샤프트를 따라 균일한 간격으로 떨어져 있는 하나 이상의 필터 디스크를 포함한다. 필터 디스크는 수평 또는 수직으로 배열될 수 있다. 이들은, 수평으로 배열된 경우, 수직 배열된 중공 수집 샤프트를 따라 간격을 두고 떨어져 있다. 수집 샤프트 및 디스크는 회전 가능하다. 그후 가압 용기 내의 현탁액은 회전 필터 디스크의 외막을 관통할 수 있어 디스크의 중공 중심 부분을 통과하여 중심 수집 샤프트로 보내진다. 그후 일반적으로 여과물(즉, 관심 단백질이 풍부한 투과물)이 플랜지 포트를 통해 여과 유닛의 샤프트 부분으로부터 제거될 수 있는 반면, 가압 하우징에 남아있는 잔류물(즉, 관심 단백질이 고갈된 잔류물)은 유출구 포트를 통해 용기 밖으로 공급될 수 있다. 일반적으로 잔류물은 제1 탱크로 또는 제2 현탁액을 포함하는 탱크로 재순환되어 현탁액을 회석한다. 이러한 방식으로, 제1 여과 유닛으로부터의 잔류물은 제1 탱크 내의 현탁액을 제2 회석 계수로 회석하는데 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 제1 측면에 따르면, 제2 여과 유닛으로부터의 잔류물은 제2 현탁액을 포함하는 탱크 내에서 현탁액을 회석하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 제2 측면에 따르면, 제3 여과 유닛으로부터의 잔류물은 제2 현탁액을 포함하는 탱크 내에서 현탁액을 회석하기 위해 사용될 수 있다.
- [0083] 동적 십자류 여과, 예를 들면, 회전 여과는 최대 필터 효율을 제공한다. 십자류 효과(필터 표면의 접선 유동 세정)는, 통상적인 (정적) 십자류 여과 시스템에서 사용되는 바와 같이 고정된 막을 통해 많은 용적을 펌핑하는 것이 아니라, 필터 디스크를 회전시킴으로써 발생된다. 회전 필터 디스크의 표면에서 발생하는 극한의 십자류 속도는 통상적인 십자류 기술에 비해 매우 적은 양의 에너지를 소비하면서 필터 표면의 매우 효율적인 세정을 보장한다.
- [0084] 온도는 단백질 용액의 점도, 현탁액에서 단백질의 용해 및 막을 사용한 여과시 플럭스(flux)에도 영향을

미친다.

- [0085] 본 발명의 방법에 사용하고자 하는 출발 현탁액은 바람직하게는 0℃ 내지 관련 단백질이 변성되는 온도 이하의 범위 내의 온도를 갖는다. 온도는 적절하게는 약 10 내지 약 50℃ 이하의 범위 내에 있다. 특정 양태에서, 온도는 약 18 내지 약 35℃ 이하, 바람직하게는 약 18 내지 약 22℃의 범위 내에 있다.
- [0086] 단계 e에서 하나 이상의 불순물을 침전시키기 위한 제제를 포함하는 현탁 탱크의 온도는 바람직하게는 약 4 내지 약 40℃의 온도를 갖는다. 바람직하게는 제제는 지방산, 보다 바람직하게는 카프릴산(옥탄산)이다.
- [0087] 따라서, 임의의 양태에서, 지방산, 바람직하게는 카프릴산(옥탄산)은 약 4 내지 약 40℃의 온도에서 본 발명의 제1 측면에 따른 제1 투과물 또는 본 발명의 제2 측면의 제2 잔류물과 조합되어 제2 현탁액이 발생된다. 특정 양태에서, 지방산, 바람직하게는 카프릴산(옥탄산)은 약 25 내지 약 38℃, 약 27 내지 약 37℃, 임의로 약 27℃, 약 32℃ 또는 약 37℃의 온도에서 본 발명의 제1 측면에 따른 제1 투과물과 또는 (예를 들면, 제2 현탁 탱크 내에서) 본 발명의 제2 측면의 제2 잔류물과 조합된다. 임의로, 본 발명의 제1 측면에 따른 제1 투과물 또는 본 발명의 제2 측면의 제2 잔류물 및 지방산 둘 다는 이들을 조합시 약 4 내지 약 40℃, 바람직하게는 약 25 내지 약 38℃, 약 27 내지 약 37℃, 보다 바람직하게는 약 32℃의 온도에 있다.
- [0088] 필터 유닛의 온도는 바람직하게는 2 내지 25℃, 보다 바람직하게는 약 2 내지 15℃로 제어된다. 이러한 온도는 공정 전반에 걸쳐 관심 단백질의 생체-반응성을 유지하면서 최적의 추출 공정 및 분리 공정을 보장한다.
- [0089] 현탁 탱크의 온도는 여과 유닛의 온도와 동일할 수 있거나 상이할 수 있음이 이해될 것이다. 예를 들면, 투과물은 하나의 온도의 필터 유닛에서 순환할 수 있지만, 출발 현탁액의 온도는 여과가 수행되는 온도보다 높을 수 있다. 유사하게는, 투과물의 온도는 제2 현탁 탱크에서 지방산과 함께 인큐베이션하기 전 및/또는 인큐베이션 기간 동안 증가될 수 있다.
- [0090] 일 양태에서, 제1 현탁액 및 제2 현탁 탱크 및 여과 유닛의 온도는 동일하다. 대안적인 양태에서, 제1 현탁 탱크 및 여과 유닛의 온도는 제2 현탁 탱크의 온도보다 낮다.
- [0091] 여과는 본원에서 사용되는 막의 재료에 따라 막이 견딜 수 있는 수준과 동일하거나 그 이하인 막 관통 여과 압력으로, 예를 들면, 약 0.2 내지 약 3bar의 압력으로 수행된다. 막 관통 압력은 일반적으로 0.1 내지 2.5bar, 바람직하게는 0.2 내지 2.4bar, 보다 바람직하게는 0.4 내지 2.0bar, 0.5 내지 1.8bar, 0.6 내지 1.6bar, 0.6 내지 1.5bar, 0.7 내지 1.5bar, 가장 바람직하게는 0.8 내지 1.5bar이다. 또 다른 양태에 따르면, 2bar 이하, 바람직하게는 0.1 내지 2.0bar 또는 약 1.5bar, 1.0bar 또는 0.5bar의 압력이 필터 유닛에 제공된다.
- [0092] 또 다른 양태에 따르면, 제1 현탁액 및 제2 현탁액으로부터 불순물/침전제를 분리하도록 구성된 필터 유닛에서의 연속 추출 공정은, 필터 유닛으로의 현탁액 또는 용액의 유속 및/또는 체류 시간 및/또는 불순물/침전제를 포함하는 잔류물/라피네이트(raffinate)의 유속 및/또는 관심 단백질이 풍부한 제1 투과물/여과물의 유속을 조정함으로써 추가로 지원된다. 예를 들면, 일 양태에서, 가압 용기(여과 공정 유닛)로의 현탁액 또는 용액의 선속도(linear velocity)는 약 0.27 내지 1.66m/s일 수 있다. 또 다른 예에서, 불순물/침전제를 포함하는 잔류물의 선속도는 0.25 내지 1.33m/s일 수 있다. 또 다른 예에서, 관심 단백질이 풍부한 투과물/여과물의 선속도는 0.03 내지 0.33m/s일 수 있다. 선속도와 단면적을 곱하여 체적 유속을 제공한다. 또한, 회전 필터 디스크의 속도의 결과로서 제1 공정 유닛에서 난류가 생성될 수 있으며, 여기서, 속도(종종 점선 속도로 나타냄)는 약 1 내지 7m/s일 수 있다. 본 발명의 양태에 따르면, 회전 디스크 필터의 속도는 1 내지 10m/s이다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 회전 디스크 필터의 속도는 5 내지 7m/s이다. 보다 바람직하게는, 회전 디스크 필터의 속도는 60Hertz(800rpm)에서 7m/s이다. 회전 십자류 요소의 회전 속도는 약 600rpm(50Hz) 내지 약 1,600rpm(100Hz), 바람직하게는 약 800rpm(60Hz) 내지 약 1,200rpm(80Hz), 바람직하게는 약 800rpm(60Hz), 약 1,000rpm(70Hz) 또는 약 1,200rpm(80Hz)이다. 본원에서 사용되는 Hz 단위의 회전 속도는 모터의 속도를 나타내 고자 한다. 이는 적절한 감정 곡선을 사용하여 rpm 단위의 속도와 상관될 수 있다.
- [0093] 상기 방법은 출발 침전물/물질(즉, 제1 현탁액)로부터 또는 제2 현탁액으로부터 관심 단백질의 회수를 최대화하기 위한 연속 추출 및 분리 공정이 실현될 수 있게 한다. 추출 공정 덕분에, 거의 모든 관심 단백질이 단백질-포함 침전물로부터 추출되고, 후속 단계에서 회수된다. 상기 방법은 또한 액체 또는 희석제, 예를 들면, 완충액 또는 물이 폐쇄 시스템(closed system)에서 재순환되게 하며, 이에 따라 액체의 양은 공정 전반에 걸쳐 유지되는 반면, 풋프린트(footprint)(즉, 큰 탱크 용적)는 감소될 수 있다.
- [0094] 또 다른 양태에서, 본 발명은 동적 십자류 여과와 함께 백플러싱(backflushing) 단계를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "백플러싱"은 시스템에 축적될 수 있는 오염물을 플러싱하기 위해, 여과 시스템으로의 액체의 유동

이 역전되는 공정을 나타내는 것으로 이해된다. 바람직하게는, 백플러싱은 제1 현탁액 또는 제2 현탁액에 포함된 동일한 완충액으로 수행된다. 본원에 추가로 설명되는 바와 같이, 백플러싱의 빈도, 지속 시간 및 유속은 여과 효율을 최대화하기 위해 조정될 수 있으며, 백플러싱 전의 여과 기간이 요구되는 것이 이해된다.

- [0095] 본원에 개시된 방법 및 시스템은 단백질을 포함 침전물 중의 관심 단백질의 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 일반적으로 적어도 98%를 회수하는 것으로 추정된다. 따라서 본 발명의 제1 측면의 특정 양태에서, 본 발명의 방법은 침전물로부터 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 관심 단백질의 회수를 제공한다. 바람직한 양태에서, 회수는 침전물로부터 적어도 97%의 관심 단백질이다.
- [0096] 관심 단백질이 풍부한 제1 투과물/여과물은 제1 투과물에서 불순물을 침전시키는 단계 이전에 농축 단계를 거칠 수 있다. 농축 공정은 예를 들면, 본 발명의 제2 측면의 단계 d1 내지 d3에 요약된 바와 같이 제2 여과 유닛에서 수행되는 한외 여과일 수 있다. 다르게는, 농축 과정은 투석, 여과(한외 여과 포함), 크로마토그래피 또는 침전을 포함하는 임의의 표준 농축 기술을 사용할 수 있다.
- [0097] 본 발명의 제1 측면의 일 양태에 따르면, 상기 방법은 (제2 탱크 내의) 관심 단백질이 풍부한 제2 투과물을 제3 여과 유닛에서의 연속 농축 공정에 적용하여, 관심 단백질이 풍부한 제3 잔류물 및 관심 단백질이 고갈된 제3 투과물을 생성하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0098] 본 발명의 제2 측면의 일 양태에 따르면, 상기 방법은 관심 단백질이 풍부한 제3 투과물을 제4 여과 유닛에서의 연속 농축 공정에 적용하여, 관심 단백질이 풍부한 제4 잔류물 및 관심 단백질이 고갈된 제4 투과물을 생성하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0099] 본 발명의 제1 측면 및 제2 측면의 일 양태에 따르면, 연속 농축 공정을 수행하기 위한 여과 유닛은 동적 한외 여과 필터 장치를 포함하는 동적 십자류 필터 요소를 포함한다. 다르게는, 상기 공정은 정적 한외 여과 장치를 포함한다.
- [0100] 본 발명의 바람직한 양태에서, 농축 공정을 수행하기 위한 동적 십자류 필터 요소 또는 한외 여과 필터 장치는 관심 단백질의 분자량보다 작은 분자량 컷오프를 갖는 막을 포함한다. 이러한 양태에서, 막의 컷오프는 농축 공정 동안 관심 단백질을 보유하도록 선택된다. 일반적인 가이드로서, 단백질이 잔류물에 보유됨을 보장하기 위해, 관심 단백질의 분자량보다 적어도 3배 낮은 공칭 막 컷오프가 선택될 수 있다.
- [0101] 하나의 다른 양태에서, 농축 공정을 수행하기 위한 동적 십자류 필터 요소 또는 정적 한외 여과 필터 요소는 관심 단백질의 분자량보다 큰 분자량 컷오프를 갖는 막을 포함한다. 이러한 양태에서, 관심 단백질이 막을 통과하여 제2 잔류물 또는 제4 잔류물보다 제2 투과물 또는 제4 투과물에(본 발명의 제2 측면의 경우) 또는 제3 잔류물보다 제3 투과물에(본 발명의 제1 측면의 경우) 수집됨을 보장하도록 공칭 막 컷오프가 선택된다.
- [0102] 십자류 필터 요소가 동적인 양태에서, 바람직하게 상기 요소는 연속 농축 공정을 수행하도록 구성된 회전 십자류 필터 요소이다.
- [0103] 추가의 바람직한 양태에 따르면, 연속 농축 공정을 수행하기 위한 여과 요소는 평균 공극 크기가 5 내지 5,000nm, 바람직하게는 5 내지 2,000nm, 5 내지 1,000nm, 5 내지 500nm, 5 내지 200nm, 7 내지 1,000nm, 보다 바람직하게는 7 내지 500nm, 보다 더 바람직하게는 7 내지 100nm, 가장 바람직하게는 7 내지 80nm인 여과 막을 포함한다. 물론, 평균 공극 크기는 상기 주어진 범위의 다른 조합일 수 있다. 필터 제조업체는 종종 공칭 또는 평균 공극 크기 등급과 같은 용어를 상용 필터에 부여하는데, 이는 일반적으로 실제 공극의 기하학적 크기보다는 입자 또는 미생물에 대한 특정 보유 기준을 충족함을 나타낸다.
- [0104] 특정 양태에서, 연속 농축 공정을 수행하기 위한 회전 십자류 필터 요소는 필터 디스크(예를 들면, 세라믹 디스크)를 포함한다. 일부 양태에서, 필터 디스크는 마이크로필터의 평균 공극 크기를 갖는 막을 포함한다. 다른 양태에서, 필터 디스크는 한외 필터의 평균 공극 크기를 갖는 막을 포함한다. 추가의 양태에서, 필터 디스크는 정용 필터의 평균 공극 크기를 갖는 막을 포함한다. 일 양태에서, 필터 디스크 막의 평균 공극 크기는 5nm 이상 2 μ m 이하의 범위이다. 특정 양태에서, 필터 디스크 막의 평균 공극 크기는 50nm 이상 0.5 μ m 이하의 범위이다. 일부 양태에서, 필터 디스크 막의 평균 공극 크기는 50nm 이상 100nm 이하의 범위, 60nm 이상 90nm 이하의 범위 또는 60nm 이상 80nm 이하의 범위이다. 일부 양태에서, 필터 디스크 막은 평균 공극 크기가 60nm 또는 80nm이다.
- [0105] 특히 바람직한 양태에서, 연속 농축 공정을 수행하기 위한 회전 십자류 필터 요소는 한외 여과 및/또는 정용 여

과에 적합한 공극 크기를 갖는 복수의 세라믹 디스크를 포함한다. 예를 들면, 요소는 바람직하게는 공극 크기가 3nm인 적어도 하나의 세라믹 막을 포함한다. 다르게는, 요소는 바람직하게는 공극 크기가 5nm인 적어도 하나의 세라믹 막을 포함한다. 다르게는, 요소는 바람직하게는 공극 크기가 7nm인 적어도 하나의 세라믹 막을 포함한다. 다르게는, 요소는 바람직하게는 공극 크기가 30nm인 적어도 하나의 세라믹 막을 포함한다. 요소는 공극 크기가 3nm 및 5nm인 것을 포함하여 다양한 공극 크기를 갖는 복수의 세라믹 디스크를 포함할 수 있다. 요소는 공극 크기가 5nm 및 7nm인 것을 포함하여 다양한 공극 크기를 갖는 복수의 세라믹 디스크를 포함할 수 있다. 요소는 공극 크기가 3nm 및 30nm인 것을 포함하여 다양한 공극 크기를 갖는 복수의 세라믹 디스크를 포함할 수 있다. 요소는 공극 크기가 3nm, 5nm, 7nm 및 30nm인 것을 포함하여 다양한 공극 크기를 갖는 복수의 세라믹 디스크를 포함할 수 있다.

- [0106] 또 다른 바람직한 양태에 따르면, 연속 농축 공정을 수행하기 위한 여과 요소는 중합체 막 형태의 막, 예를 들면, 폴리에테르설폰 또는 재생 셀룰로오스를 포함하는 한외 여과 장치를 포함한다. 이러한 막은 바람직하게는 평균 분자량 컷오프 값이 50kDa 미만, 바람직하게는 30kDa 미만, 보다 바람직하게는 10kDa 미만, 가장 바람직하게는 5kDa 미만이다.
- [0107] 본 발명의 제1 측면의 일 양태에 따르면, 본 발명의 방법은, 관심 단백질이 고갈된 제2 투과물 및/또는 제2 잔류물을 제2 현탁액을 포함하는 탱크로 연속적으로 스트리밍하여 상기 현탁액이 제3 회석 계수로 회석되는데 기여함에 의한 제2 현탁액을 포함하는 탱크에서 현탁액을 회석하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0108] 유사하게는, 본 발명의 제2 측면의 양태에 따르면, 본 발명의 방법은 관심 단백질이 고갈된 제3 투과물 및/또는 제3 잔류물을 제2 현탁액을 포함하는 탱크로 연속적으로 스트리밍하여 상기 현탁액이 제3 회석 계수로 회석되는데 기여함에 의한 제2 현탁액을 포함하는 탱크에서 현탁액을 회석하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0109] 본 발명의 일 측면의 일 양태에 따르면, 본 발명의 방법은, 제1 여과 유닛으로부터의 잔류물 및 제2 여과 유닛으로부터의 제2 투과물을 제1 탱크로 연속적으로 스트리밍하여 현탁액을 제2 회석 계수로 회석함으로써 제1 탱크 내의 현탁액을 회석하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0110] 본 발명의 제1 측면의 또 다른 바람직한 양태에 따르면, 제1 투과물을 수용하도록 제2 탱크가 제공되고, 여기서 제1 투과물의 유속은 제2 탱크에서 실질적으로 일정한 생성물 용적이 유지되도록 제어된다. 특정 양태에서, 제1 투과물 이외에 새로운 완충액이 제1 탱크에 첨가된다.
- [0111] 본 발명의 제2 측면의 또 다른 바람직한 양태에 따르면, 제1 투과물 및/또는 제2 잔류물을 수용하도록 제2 탱크가 제공되고, 여기서 제1 투과물 및 제2 잔류물의 유속은 제2 탱크에서 실질적으로 일정한 생성물 용적이 유지되도록 제어된다. 특정 양태에서, 제1 투과물 및/또는 제2 잔류물 이외에 새로운 완충액이 제1 탱크에 첨가된다.
- [0112] 본 발명의 제2 측면의 또 다른 바람직한 양태에 따르면, 제3 투과물 및/또는 제4 잔류물을 수용하도록 추가의 (제4) 탱크가 제공되고, 여기서 제3 투과물 및 제4 잔류물의 유속은 제2 현탁액을 포함하는 탱크에서 실질적으로 일정한 생성물 용적이 유지되도록 제어된다.
- [0113] 본 발명의 일 측면의 양태에 따르면, 제1 투과물/추출물/여과물이 보유 탱크(제2 탱크)에 수집되고, 제1 탱크의 현탁액이 완전히 여과/추출되면, 보유 탱크로부터의 제1 투과물/추출물이 연속 농축 공정에 적용된다. 이러한 방법 단계는 생산 장비 및 배관의 불용 체적(dead volume)이 관심 단백질의 수율에 상당한 영향을 미칠 수 있는 보다 작은 산업적 규모의 공정에 특히 적합하다. 예로는 고면역(hyperimmune) 면역글로불린 제품이다.
- [0114] 본 발명의 제2 측면의 바람직한 양태에 따르면, 침전물로부터 고수율로 관심 단백질을 추출하기 위한 산업적 규모의 방법으로서,
- [0115] a) 상기 침전물을 제1 탱크에서 액체와 혼합하여, 제1 회석 계수를 갖는 현탁액을 형성하는 단계;
- [0116] b) 평균 공극 크기가 5 내지 5,000nm인 세라믹 막을 갖는 필터 디스크를 포함하는 회전 십자류 필터 요소를 포함하는 제1 여과 유닛에 제1 현탁액을 공급하는 단계로서, 상기 필터 요소는 상기 관심 단백질이 고갈된 제1 잔류물 및 상기 관심 단백질이 풍부한 제1 투과물을 생성하도록 구성된, 상기 제1 현탁액을 공급하는 단계;
- [0117] c) 액체를 첨가하여, 부분적으로는 상기 제1 잔류물을 상기 제1 탱크 내로 스트리밍하여, 상기 제1 탱크 내의 상기 제1 현탁액을 제2 회석 계수로 회석하는 단계;
- [0118] d) 제2 탱크에서 상기 관심 단백질이 풍부한 상기 제1 투과물을 회수하는 단계;

- [0119] e) 십자류 필터 요소를 포함하는 제2 여과 유닛에서 상기 제2 탱크 내의 상기 제1 투과물을 연속 농축 공정에 적용하여, 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 잔류물 및 상기 관심 단백질이 고갈된 제2 투과물을 생성하는 단계;
- [0120] f) 임의로, 상기 제2 투과물을 상기 제1 탱크로 스트리밍하여 상기 제1 탱크 내의 상기 제1 현탁액을 회석하는 단계로서, 상기 현탁액을 상기 제2 회석 계수로 회석하는, 상기 회석 단계;
- [0121] g) 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 잔류물을 제2 탱크로 반송하고/하거나 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 잔류물을 수집하는 단계;
- [0122] h) 상기 관심 단백질이 풍부한 제2 잔류물 중의 하나 이상의 불순물을 침전시켜 제2 현탁액을 생성하는 단계 및
- [0123] i) 상기 제2 현탁액으로부터 침전된 불순물을 제거하여 상기 관심 단백질을 함유하는 용액을 생성하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0124] 하나 이상의 침전된 불순물을 함유하는 제3 잔류물 및 관심 단백질이 풍부한 제3 투과물을 생성하도록 구성된 동적 필터 요소를 포함하는 제3 여과 유닛에 상기 제2 현탁액을 공급함에 의함; 임의로는 상기 제2 현탁액을 포함하는 탱크 내로 제3 잔류물을 스트리밍함에 의함; 추가의 탱크에서 관심 단백질이 풍부한 제3 여과물을 회수함에 의함을 포함하는 본원에 기재된 방법에 따라 상기 침전된 불순물이 상기 제2 현탁액으로부터 제거될 수 있다.
- [0125] 바람직하게는, 상기 제2 현탁액으로부터 침전된 불순물을 제거하여 상기 관심 단백질을 함유하는 용액을 생성하는 단계가, 상기 추가의 탱크 내의 제3 투과물을, 십자류 필터 요소를 포함하는 제4 여과 유닛에서 연속 농축 공정에 적용하여, 관심 단백질이 풍부한 제4 잔류물 및 관심 단백질이 고갈된 제4 투과물을 생성하는 단계; 임의로, 상기 제4 투과물을 상기 제2 현탁액을 포함하는 상기 탱크로 스트리밍하여 상기 제2 현탁액을 포함하는 상기 탱크 내의 현탁액을 회석하는 단계로서, 상기 현탁액을 제3 회석 계수로 회석하는, 상기 회석 단계; 및 상기 관심 단백질이 풍부한 제4 잔류물을 상기 추가의 탱크로 반송하고/하거나 상기 관심 단백질이 풍부한 제4 잔류물을 수집하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0126] 본 발명의 상기 측면의 바람직한 양태에 따르면, 상기 제1 잔류물 및 상기 제2 투과물은 상기 제1 탱크로 연속적으로 스트리밍하여 상기 현탁액을 상기 제2 회석 계수로 회석된다. 또한, 상기 제3 잔류물 및 상기 제4 투과물은 상기 제2 현탁액을 포함하는 상기 탱크로 연속적으로 스트리밍되어 상기 제2 현탁액을 제3 회석 계수로 회석할 수 있다.
- [0127] 본 발명의 일 양태에 따르면, 관심 단백질이 풍부한 투과물을 생성하도록 구성된 여과 유닛이, 투과물을 수집하도록 구성된 하나 초과와 중공 샤프트를 포함하고, 각각의 샤프트는 세라믹 막을 포함하는 적어도 하나의 필터 디스크와 연결된다.
- [0128] 본 발명의 양태에 따르면, 농축 공정을 수행하기 위한 여과 유닛은 동적 십자류 필터 요소를 포함한다. 또 다른 양태에서, 여과 유닛은 정적 십자류 필터 요소를 포함한다. 바람직한 양태에서, 정적 십자류 필터 요소는 잔류물에 관심 단백질을 보유하는 막을 포함하는 한의 여과 장치이다.
- [0129] 본 발명의 일 양태에 따르면, 제1 탱크 내의 현탁액 또는 용액의 제2 회석 계수가 또는 단백질 농도의 사전결정된 값이 달성될 때까지 상기 단계 b) 내지 c) 또는 상기 단계 b) 내지 f)가 반복된다. 제1 현탁액을 포함하는 탱크의 단백질 농도의 사전결정된 값을 사용하여 측정될 수도 있는 이러한 사전결정된 제2 회석 계수(종종 최종 회석 계수라고 함)는, 추출 공정을 계속하는 것이 너무 비경제적이 되기 전에 최적 수율이 수확될 수 있음을 보장한다. 단백질 농도는 예를 들면, 280nm에서의 UV 흡광도를 포함하여 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제1 현탁액을 포함하는 탱크에서 모니터링될 수 있다.
- [0130] 임의로, 필터 조제(filter aid)가 공정의 적절한 단계에서 사용될 수 있다. 필터 조제는, 예를 들면, 침전물의 제조와 관련된 하나 이상의 단계에서 사용될 수 있다. 따라서, 일 양태에서, 침전물은 필터 조제를 포함한다. 일 양태에서, 침전물은 필터 조제를 포함하지 않는다. 이러한 양태에서, 필터 조제는 (임의의 사전 단계를 포함하여) 공정에서 전혀 사용되지 않을 수 있거나, 또는 존재하는 경우, 침전물을 포함하는 현탁액을 제1 여과 유닛에 공급하기 전에, 즉, 단계 b) 전에 제거된다. 바람직하게는, 필터 조제는 단계 b) 전에 제거된다.
- [0131] 그후, 상기 방법의 생성물은, 최종 생성물이 대상체, 바람직하게는 인간 대상체에게 투여하기에 적합하도록 크로마토그래피 단계들, 바이러스 불활성화 단계들, 농축 및 제형화 단계들 중 하나 이상을 포함하는 추가의 처리에 적용될 수 있다.

- [0132] 본 발명의 측면의 일 양태에 따르면, 관심 단백질이 풍부한 투과물을 생성하도록 구성된 여과 유닛(즉, 본 발명의 제1 측면에서의 제1 필터 유닛 및 제2 필터 유닛 또는 본 발명의 제2 측면에서의 제1 필터 유닛 및 제3 필터 유닛)은 필터 조제의 층(bed) 높이를 제어하고/하거나 필터 디스크 막의 외부 표면 상에 물질을 침전시키도록 구성된 스크레이퍼 장치를 추가로 포함한다. 상기 장치는 또한 여과 플럭스 속도를 제어하는데 도움이 되고/되거나 필터 차단을 방지할 수 있다. 일부 양태에서, 스크레이핑 장치는 필터 디스크 막의 표면까지의 거리에 대해 높이 조절이 가능하다. 특정 양태에서, 스크레이핑 장치는 필터 디스크 막으로부터 적어도 20cm, 적어도 15cm, 적어도 10cm, 적어도 9cm, 적어도 8cm, 적어도 7cm, 적어도 6cm, 적어도 5cm, 적어도 4cm, 적어도 3cm, 적어도 2.5cm, 적어도 2cm, 적어도 1.5cm, 적어도 1cm, 적어도 0.5cm 또는 적어도 0.25cm에 위치한다.
- [0133] 추가의 양태에 따르면, 여과 공정 유닛에는 회전 필터 디스크(동적 필터 요소) 및 임의로 제1 필터 유닛의 내용물의 난류 혼합을 위한 배플이 장착되며, 바람직하게는 디스크의 접선 속도는 약 1 내지 7m/sec이다. 관심 단백질의 추출이 증가될 수 있도록 배플에 의해 난류가 생성될 수 있고, 이에 의해 높은 단백질 회수 수율이 달성된다.
- [0134] 본 발명의 바람직한 양태에서, 회전 십자류 필터 요소는 세라믹 막을 포함하는 하나 이상의 필터 디스크를 포함한다.
- [0135] 세라믹 필터는, 예를 들면 Al_2O_3 또는 ZrO_3 , TiO_2 또는 $MgAl_2O_4$ 로 구성될 수 있다. 세라믹 디스크 필터는 일반적으로 외부로부터 세라믹 막을 통해 여과물이 수집될 수 있는 중공 내부 채널로 여과물이 이동되도록 설계된다.
- [0136] 세라믹 디스크 필터는 374mm(표면적 $0.2m^2$), 312mm(표면적 $0.14m^2$) 및 152mm(표면적 $360cm^2$)의 외경을 포함하는 다양한 크기로 이용 가능하다. 일반적으로 세라믹 디스크 필터의 두께는 약 4.5 내지 6mm의 범위이다.
- [0137] 본 발명의 양태에서, 제1 유닛 및 제3 유닛의 필터 용량은 필터 표면적 m^2 당 적어도 25kg, 적어도 50kg, 적어도 75kg, 적어도 100kg, 적어도 200kg, 적어도 300kg, 적어도 350kg, 적어도 400kg, 적어도 450kg, 적어도 500kg, 적어도 550kg, 적어도 600kg, 적어도 650kg, 적어도 700kg, 적어도 750kg 또는 적어도 1,000kg의 출발 침전물이다.
- [0138] 추가의 측면에서, 본 발명은 관심 단백질을 함유하는 용액으로부터 하나 이상의 불순물을 침전시키는 방법으로서,
- [0139] a) 관심 단백질 및 하나 이상의 불순물을 함유하는 용액을 제공하는 단계로서, 상기 용액은 전도도가 6 내지 9mS/cm이고, pH가 4.7 내지 5.2이고, 총 단백질 농도가 15 내지 17g/L인, 상기 제공 단계 및
- [0140] b) 상기 용액에 지방산을 첨가하여 하나 이상의 불순물을 침전시키는 단계로서, 상기 지방산은 약 0.1 내지 약 0.4g 지방산/g 총 단백질의 양으로 첨가되는, 상기 침전 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0141] 추가의 측면에서, 본 발명은 관심 단백질을 함유하는 용액으로부터 하나 이상의 불순물을 제거하는 방법으로서,
- [0142] a) 관심 단백질 및 하나 이상의 불순물을 함유하는 용액을 제공하는 단계로서, 상기 용액은 전도도가 6 내지 9mS/cm이고, pH 4.7 내지 5.2이고, 총 단백질 농도가 15 내지 17g/L인, 상기 제공 단계;
- [0143] b) 상기 용액에 지방산을 첨가하여 하나 이상의 불순물을 침전시키는 단계로서, 상기 지방산은 약 0.1 내지 약 0.4g 지방산/g 총 단백질의 양으로 첨가되는, 상기 침전 단계 및
- [0144] c) 하나 이상의 침전된 불순물을 제거하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0145] 또 다른 측면에서, 본 발명은 관심 단백질을 함유하는 용액으로부터 하나 이상의 불순물을 제거하는 방법으로서,
- [0146] a) 관심 단백질 및 하나 이상의 불순물을 함유하는 용액을 제공하는 단계로서, 상기 용액은 전도도가 6 내지 9mS/cm이고, pH 4.7 내지 5.2이고, 총 단백질 농도가 15 내지 17g/L인, 상기 제공 단계;
- [0147] b) 임의로, 회전 십자류 필터 요소를 포함하는 여과 장치에서 용액을 여과에 적용하여 관심 단백질이 풍부한 투과물을 얻는 단계;
- [0148] c) 상기 용액에, 바람직하게는 상기 관심 단백질이 풍부한 투과물에 지방산을 첨가하여 하나 이상의 불순물을 침전시키는 단계로서, 상기 지방산은 약 0.1 내지 약 0.4g 지방산/g 총 단백질의 양으로 첨가되는, 상기 침전 단계 및

- [0149] c) 하나 이상의 침전된 불순물을 제거하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0150] 유리하게는, 상기 방법은 약 1%, 약 2%, 약 3%, 약 4%, 약 5%, 약 6%, 약 7%, 약 8%, 약 9%, 약 10% 미만 또는 약 20% 미만의 관심 단백질이 하나 이상의 불순물을 제거하는 과정에서 손실되면서 관심 단백질의 회수를 가능하게 한다.
- [0151] 바람직하게는, 지방산은 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ 의 화학식을 포함한다. 보다 바람직하게는, 지방산은 C7 내지 C10 카복실산이다. 보다 바람직하게는, 지방산은 에난트산(헵탄산), 카프릴산(옥탄산), 옥텐산, 펠라르곤산(노난산), 노넨산 또는 카프르산(데칸산)을 포함한다. 가장 바람직하게는, 지방산은 카프릴산(옥탄산)이다. 시약으로서 본원에 기재된 임의의 지방산의 염 또는 에스테르도 고려된다.
- [0152] 본 발명의 측면의 임의의 양태에서, 지방산, 바람직하게는 카프릴산(옥탄산)의 양은 약 0.1g/g 총 단백질, 약 0.5g/g 총 단백질, 약 0.75g/g 총 단백질, 약 1g/g 총 단백질, 약 1.5g/g 총 단백질, 약 2.0g/g 총 단백질, 약 2.5g/g 총 단백질, 약 3.0g/g 총 단백질, 약 3.5g/g 총 단백질 또는 약 4.0g/g 총 단백질이다. 바람직하게는, 지방산, 바람직하게는 카프릴산(옥탄산)의 양은 약 0.275g/g 총 단백질, 약 0.280g/g 총 단백질, 약 0.285g/g 총 단백질, 약 0.290g/g 총 단백질, 약 0.300g/g 총 단백질, 약 0.325g/g 총 단백질 또는 약 0.35g/g 총 단백질이다.
- [0153] 본 발명의 일 측면의 임의의 양태에서, 지방산, 바람직하게는 카프릴산(옥탄산)의 양은 0.1g/g 총 단백질, 0.5g/g 총 단백질, 0.75g/g 총 단백질, 1.0g/g 총 단백질, 1.5g/g 총 단백질, 2.0g/g 총 단백질, 2.5g/g 총 단백질, 3.0g/g 총 단백질, 3.5g/g 총 단백질 또는 4.0g/g 총 단백질이다. 바람직하게는, 지방산, 바람직하게는 카프릴산(옥탄산)의 양은 0.275g/g 총 단백질, 0.280g/g 총 단백질, 0.285g/g 총 단백질, 0.290g/g 총 단백질, 0.300g/g 총 단백질, 0.325g/g 총 단백질 또는 약 0.35g/g 총 단백질이다.
- [0154] 본 발명의 일 측면의 임의의 양태에서, 용액은 혈장 분획화 공정으로부터의 분획일 수 있다. 바람직하게는, 용액은 본 발명의 방법에 기재된 바와 같이 단계 a) 내지 d)(임의로 단계 d1 내지 d3을 포함함)에서 얻어지거나 얻을 수 있다.
- [0155] 본 발명의 일 측면의 임의의 양태에서, 용액은 필터 조제를 함유하지 않는다.
- [0156] 본 발명의 일 측면의 임의의 양태에서, 관심 단백질은 면역글로불린, 바람직하게는 인간 면역글로불린 G(IgG), 예를 들면, 인간 혈장으로부터의 면역글로불린 G 또는 재조합적으로 생성된 면역글로불린 G이다.
- [0157] 본 발명의 일 측면의 임의의 양태에서, 용액은 IgG를 함유한다.
- [0158] 본 발명의 일 측면의 임의의 양태에서, 용액은 다음 불순물들 중 하나 이상을 함유한다: IgA, IgM, 알부민, α (알파)-2 마크로글로불린, α (알파)-1 항-트립신, 지질 및 지단백질.
- [0159] 문맥상 달리 요구되는 경우를 제외하고, 본원에서 사용되는 용어 "포함하다(comprise)" 및 상기 용어의 변형, 예를 들면, "포함하는(comprising)", "포함하다(comprises)" 및 "포함되는(comprised)"은 추가의 첨가제, 성분, 정수 또는 단계를 배제하고자 하지 않는다.
- [0160] 본 발명의 추가의 측면 및 선행 단락에서 설명된 측면들의 추가의 양태는 첨부 도면을 참조하여 예시로서 제공되는 다음 설명으로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0161] 하기 도면들은 반드시 축척에 따라 작성된 것은 아니며, 대신 일반적으로 다양한 양태의 원리를 예시하는데 강조를 둔다. 하기 설명에서, 본 발명의 다양한 양태가 다음 도면을 참조하여 기술된다:

도 1은 본 발명의 시스템의 개략적인 순서도 개요이며, 이하에 보다 상세히 기술된다.

도 1은 본 발명의 하나의 바람직한 양태에 따르는 시스템(100) 및 방법의 개략적인 순서도 개요를 예시한다. 예를 들면, 현탁액 형태 또는 페이스트 또는 침전물 형태의 단백질-포함 침전물을 액체, 예를 들면 완충액으로 현탁시킨다. 완충액의 조성 및 농도는 예를 들면 3 내지 10(1:3 내지 1:10)의 제1 희석 계수를 갖는 현탁액과 같은 출발 조성물을 발생시키기 위해 상기 방법에 따른다. 현탁액은 제1 탱크(1)에 수용된다. 현탁액은 펌프(2)를 통해 제1 여과 유닛(5)에 공급될 수 있으며, 몇몇 유형의 펌프(예를 들면, 피스톤 펌프, 회전 펌프, 원심 펌프 및 막 펌프)가 사용될 수 있으며, 파이프(12)의 조정 밸브(3)로 유동 조절될 수 있다. 제1 여과 유닛(5)에는 필터 디스크가 마운팅된 회전 중공 샤프트가 장착된다(여과물은 중공 샤프트의 외부로부터 내부로 유동한

다). 제1 여과 유닛(5)에는 필터 케이크의 두께를 일정하게 유지하고 이에 따라 일정한 여과물 유동을 달성하기 위해 높이 조정 가능한 스크레이퍼가 추가로 설치된다. 원하는 여과 압력은 오버플로우 밸브(여과되지 않은 현탁액 유출구)에 의해 제어되고 조정된다. 사용되는 필터 디스크는 세라믹 막, 심부 필터 층 및 소결된 다공성 금속 필터 디스크일 수 있다. 제1 여과 유닛(5)의 용기가 현탁액으로 충전되면, 연속적인 압력 추출 및 분리가 개시될 수 있다. 압력 유닛/용기를 포함할 수 있는 제1 여과 유닛(5)에는 추출 효율 및 여과 공정을 동시에 증가시키기 위한 적절한 내부 셋팅 및 조건이 제공된다. 추출 효율은 혼합기를 포함하지 않고도 유닛(5)에서 난류 혼합을 통해 증가된다. 그럼에도 불구하고, 난류를 생성함으로써 추출 공정을 지지하기 위해 추가의 혼합기가 제공될 수 있음을 예측할 수 있다. 또한, 본원에 개시된 더 높은, 예를 들면 40 또는 70의 최종 회석 계수도 추출 효율을 증가시켜 높은 단백질(예를 들면, IgG) 수율을 야기한다. 물론, 임의의 다른 더 높은 최종 회석 계수(70 이상)도 고려할 수 있다.

여과물은 파이프(또는 채널)(14)에 설치된 유속계(6)를 통과하여 유동하며 제2 탱크(7)에 수집된다. 여과되지 않은 현탁액은 탱크(1)의 파이프(13)에 설치된 조정 유출구(3)를 통과하여 역류한다. 제2 탱크(7)의 한정된 용적에 도달하면, UF(8) 농축 공정이 제2 여과 유닛에서 개시될 수 있다. 제2 탱크(7)의 여과물은 파이프(15)를 통과하여 한외 여과(UF) 시스템(8)으로 유동한다. 막 관통 압력은 투과물 유속(17)이 파이프(14)의 제1 여과물 유속과 동일하거나 거의 동일하도록 설정된다. UF 시스템(8)의 투과물은 파이프(또는 라인 또는 채널)(17)를 통과하여 제1 탱크(1)로 다시 유동하는 반면, UF 시스템의 잔류물(= 농축된 단백질)은 파이프(16)를 통과하여 제2 탱크(7)로 다시 유동한다.

본 발명에 따르면, 제1 공정 유닛(5)에는 제1 잔류물 및 제1 투과물을 생성하기 위해 제1 공정 유닛(5)의 내용물을 난류 혼합하기 위한, 제1 필터 요소 중 하나 이상을 포함하는 하나 이상의 회전 필터 디스크가 제공된다. 제1 잔류물은 제어 밸브(3)를 통해 채널(13)을 통과하여 제1 탱크(1)로 다시 공급될 수 있는 반면, 제1 투과물은 또 다른 채널(14)을 통해 제2 탱크(7)로 공급될 수 있다. 제1 필터 요소는 공극 직경이 약 5 내지 5,000nm, 바람직하게는 20 내지 100nm, 보다 바람직하게는 30 내지 80nm인 세라믹 물질을 기본으로 하는 여과 막일 수 있다. 또한, 무기 막 또는 임의의 다른 적합한 막이 세라믹 기반 막과 유사한 효과를 제공할 수 있음을 예측할 수 있다. 제1 여과 유닛(5)에는 내부의 압력을 조정하기 위해 압력계와 같은 압력 조정 장치(4)가 공급될 수 있다. 유사하게는, 현탁액 또는 용액의 유속을 측정하기 위해 유속계(6)가 본 발명의 시스템에 설치될 수 있다.

그후 제2 탱크(7)로부터의 공급스트림은 제2 분리 공정이 수행되게 하기 위해 채널(15)을 통과하여 제2 여과 유닛(8)에 공급될 수 있다. 제2 분리 공정은 연속 농축 공정(예를 들면, UF)일 수 있다. 제2 여과 유닛(8)에는 하나 이상의 제2 집자류 필터 요소/들이 제공되며, 상기 제2 집자류 필터 요소는 평균 분자량 컷오프 값이 50kD 미만인 한외 여과 막을 포함할 수 있다. 그러나, 막은 10kD 미만, 보다 바람직하게는 5kD 미만일 수도 있다. 따라서, 한외 여과 막은 채널(16)을 통과하여 제2 탱크(7)로 다시 돌아가는 제2 잔류물을 생성하는 반면, 제2 투과물은 채널(17)을 통과하여 제1 탱크(1)에 공급된다. 이를 위해, 제2 여과 유닛(10)의 압력은 채널(14 및 17)의 유속이 실질적으로 동일하도록 농축 단계(한외 여과) 동안 조정될 수 있음을 주지한다.

도 2는 본 발명의 또 다른 시스템의 개략도이며, 이하에 보다 자세히 설명된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0162] 지금부터 본 발명의 특정 양태를 상세히 참조한다. 본 발명은 양태들과 관련하여 설명되지만, 본 발명을 이러한 양태들로 제한하고자 하는 것이 아님이 이해될 것이다. 반대로, 본 발명은 청구범위에 의해 정의되는 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있는 모든 대안, 수정 및 균등물을 포함하고자 한다.
- [0163] 당업자는 본 발명의 실시예에 사용될 수 있는, 본원에 기재된 것과 유사하거나 등가인 많은 방법 및 재료를 인식할 것이다. 본 발명은 기술된 방법 및 재료에 결코 제한되지 않는다. 본원에 개시되고 정의된 본 발명은 텍스트 또는 도면으로부터 언급되거나 명백한 개별 특징적인 구성들 중 둘 이상의 모든 대안적인 조합으로 확장된다는 것을 이해할 것이다. 이러한 상이한 조합들 모두는 본 발명의 다양한 대안적인 측면을 구성한다.
- [0164] 본원을 해석할 목적으로, 단수로 사용되는 용어는 복수도 포함하고, 그 반대의 경우도 마찬가지이다.
- [0165] 본 발명은, 신규한 제1 공정 유닛을 또는 추가로 제2 공정 유닛 및 하나 이상의 불순물을 제거하기 위한 침전 단계를 사용함으로써 단백질 회수 및 수율을 최대화하는 시스템 및 방법에 관한 것이다. 침전 단계를 함께 포함하는 추출 방법과 분리 방법의 조합이 고체 단백질-포함 침전물, 즉, 중간 물질(예를 들면, 출발 물질로부터 유래된 페이스트)을 가공하기 위해 본 발명에서 사용되며, 여기서 출발 침전물은 액체 또는 회석제, 예를 들면

물 또는 완충액에 현탁되어 현탁액을 형성할 수 있다.

[0166] 본 발명의 방법의 한 가지 이점은 관심 단백질의 전체 회수가 최대화되어 불순물 및 관심 대상이 아닌 기타 단백질을 제거하는 데 필요한 단계 동안 상기 단백질의 손실을 최소화한다는 것이다. 이러한 이점은 부분적으로 후속 침전 단계와 조합된 연속 추출 여과 방법의 적용에서 발생한다. 연속 추출 방법은 예를 들면 불순물 또는 관심 대상이 아닌 단백질을 침전시키는 데 필요한 시약의 총량을 감소시킴으로써 관심 단백질의 손실을 최소화하는 조건을 사용하여 다운스트림 공정을 용이하게 한다.

[0167] 일반적인 단백질 함유 침전물은, 에탄올과 같은 침전제에 노출된 후 단백질의 정제 동안 형성된다. 고체는 종종 침전물 또는 페이스트로 불린다. 침전물은 액체와 혼합되어, 고체 입자가 액체 전체에 분포되어 있는 현탁액을 형성할 수 있다. 특정 추출 조건하에, 이러한 입자에 함유된 단백질은 점진적으로 액체상(phase)으로 용해될 수 있다.

[0168] 산업적 규모의 제조 공정에서 용해비는 큰 용적의 물 또는 완충액이 필요하기 때문에 문제가 된다. 알부민 및 면역글로불린과 같은 단백질을 제조하는데 사용되는 혈장 분획화 공정의 경우, 상기 단계는 수천 리터를 포함할 수 있다. 탱크가 이러한 큰 용적을 보유하여 큰 용해비를 사용할 수 있는 경우에도 고수율의 원하는 효과가 실현되지 못할 수 있는데, 이는 용액에 용해된 단백질과 침전물 또는 페이스트에 남아있는 단백질 간의 평형(샤틀리에의 원리) 때문이다. 침전물에 포착된(trapped) 이러한 단백질은 최종 생성물로의 추가의 가공을 위해 회수 가능하지 않을 수 있다. 이러한 현상은 부분적으로 용해도 평형과 관련이 있다. 알려진 용해도 평형은 고체상의 화합물이 용액에 용해된 화합물과 화학적 평형일 때 존재한다. 평형은 일부 개별 분자가 용해 속도 및 침전 속도가 서로 동일하도록 고체상과 액체상 사이를 이동한다는 점에서 동적 평형의 예이다.

[0169] 본 발명은 (a) 용해도 평형을 지속적으로 이동시킴으로써 그리고 (b) 하나 이상의 불순물을 침전시킴으로써 침전물로부터 단백질 회수의 문제를 해결하는 것을 목표로 한다. 용해도 평형을 지속적으로 이동시킴은 1) 반복적인 방식으로 긴밀한 상 접촉을 허용하기 위해 내장된 구성 요소로 (중공 회전 디스크 필터 요소를 포함할 수 있는 동적 여과 시스템을 사용하여) 추출 효율을 증가시킴으로써; 2) 단백질 함유 침전물로부터 용해된 단백질을 지속적으로 제거함으로써 (르 샤틀리에의 원리 - 평형 상태의 임의의 시스템이 농도(예를 들면, 용적), 온도 또는 압력의 변화를 겪을 때, 적용된 변화의 효과를 (부분적으로) 상쇄하도록 시스템이 재조정되고 새로운 균형이 수립됨 - 를 적용함으로써) 달성된다. 이는 제한된 부위의 용적을 지속적으로 증가시키고 동적 필터를 통해 용해된 단백질을 지속적으로 제거함으로써 르 샤틀리에의 원리가 침전물로부터 액체상으로 최대의 단백질 전달을 보장하는데 사용될 수 있음을 의미한다. 일부 경우에, 증가된 용적은, 단백질의 연속 농축 단계 동안 투과물을 재순환시켜 완충액의 소모를 감소시킴으로써 실현될 수 있다. 또한, 하나 이상의 불순물을 침전시킴은 용매의 용매화 전위를 변경함으로써 달성되고, 보다 구체적으로는, 시약의 첨가에 의해 하나 이상의 불순물의 용해도를 낮춤으로써 그리고/또는 조건(예를 들면, pH 또는 전도도 등)을 조정함으로써 달성된다. 결과는 동일하거나, 실질적으로 동일하거나 감소된 불순물의 성질 및/또는 양을 갖는 관심 단백질의 더 큰 회수이다. 다시 말해서, 본 발명의 맥락에서 하나 이상의 불순물을 침전시키는 단계는, 불순물의 성질 및/또는 양이 동일하거나 실질적으로 동일하거나 감소된 관심 단백질의 침전 단계가 수행되지 않은 경우보다 더 큰 회수를 초래한다.

[0170] 또한, 본 발명은 또한 상당히 감소된 양의 하나 이상의 불순물의 용해도를 낮추는 시약을 사용하여 관심 단백질을 함유하는 용액으로부터 하나 이상의 불순물을 침전시킬 수 있다는 인지에 관한 것이다. 특히, 관심 단백질을 함유하는 용액이 특정 특성을 갖는 경우 더 적은 양의 시약을 사용할 수 있다. 이점은 하나 이상의 불순물과 함께 공동 침전되는 관심 단백질의 양이 감소함에 따라 더 적은 양의 시약을 사용하고 관심 단백질의 더 큰 회수를 사용함으로써 공정 비용이 감소될 수 있다는 것이다.

[0171] 정의

[0172] 용어 "단백질-포함 침전물"은 관심 단백질을 함유하는 임의의 물질을 나타내고자 한다. 관심 단백질로서의 면역글로불린의 맥락에서, 상기 용어는 혈장, 혈청, 혈장 또는 혈청으로부터 생성된 침전물, 발효 브로스(broth), 봉입체, 세포 배양 상청액 또는 이러한 물질로부터 생성된 침전물을 나타낼 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 맥락에서, 이는 혈장으로부터의 침전물, 예를 들면, 콘 또는 온클레이 에탄올 침전물 또는 키슬러-니치만 침전물을 나타낸다.

[0173] 용어 "출발 조성물"은 일반적으로 (제1) 희석 계수에 따라 물 또는 완충액으로 희석함으로써 단백질-포함 침전물로부터 생성되는 현탁액 또는 용액을 나타낸다. 일부 경우에, 단백질-포함 침전물의 희석이 필요하지 않은 경우, 단백질-포함 침전물이 출발 현탁액일 수 있다.

- [0174] "고 수율"이란 관심 단백질, 예를 들면, 면역글로불린 G(및 기타 단백질 및 면역글로불린)의 수율이 단백질-포함 침전물 중의 관심 단백질의 양의 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 96%, 보다 바람직하게는 적어도 98%, 가장 바람직하게는 98% 이상임을 의미한다.
- [0175] 샘플 중의(예를 들면, 침전물 중의 또는 이의 약제학적 등급의 정제된 제제 중의) 면역글로불린의 농도는 당업계의 숙련자에게 공지된 임의의 수단에 의해 측정될 수 있다. 면역글로불린을 측정하는데 사용되는 방법은 샘플의 성질에 따라 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들면, 샘플이 면역글로불린-함유 침전물인 경우, 측정 전에 침전물(또는 이의 샘플)을 적합한 완충액에 용해시킬 필요가 있을 수 있음을 이해할 것이다. 관심 단백질을 측정하기 위한 적합한 검정의 예는 고압 액체 크로마토그래피(HPLC; 예를 들면, 크기 배제 HPLC), 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA) 및 정량적 면역 비탁 측정을 포함한다.
- [0176] 백분율, pH, 양 또는 시간 기간 또는 기타 언급에 대한 주어진 수치와 관련하여 "약" 또는 "대략"이란 명시된 값의 10% 이내의 수치를 포함하는 것을 의미한다.
- [0177] 대규모 또는 산업적 규모의 공정 또는 시스템
- [0178] 본 발명과 관련하여 대규모 또는 산업적 규모는 적어도 200L, 바람직하게는 적어도 500L, 보다 더 바람직하게는 적어도 2,000L의 인간 혈장과 같은 출발 물질에 기초한 생산 절차를 나타낸다. 예를 들면, 산업적 규모의 단백질 제조에 사용되는 일반적인 상업적 혈장 기증자 풀 크기는 배취당 2,500 내지 6,000L의 혈장의 범위이다. 본 발명의 특정 양태에서, 침전물은 2,500 내지 6,000L의 혈장으로부터 얻어진다. 일부 상업적 제조 공정은 최대 7,500L, 최대 10,000L 및/또는 최대 15,000L의 혈장을 포함하는 훨씬 더 큰 혈장 기증자 풀 크기를 사용할 수 있다.
- [0179] 본 발명의 방법 및 시스템은 또한, 대형 산업적 규모 적용을 위해 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 보다 작은 생산 규모 적용을 위한 독립형(stand-alone) 시스템 및/또는 방법으로도 사용될 수 있다(여기서, 출발 물질은 200L 미만일 수 있음).
- [0180] 침전물 및 관심 단백질
- [0181] 용액으로부터 단백질을 선택적으로 침전시키기 위해 많은 상이한 방법들이 사용될 수 있으며, 예를 들면, 염, 알콜 및/또는 폴리에틸렌 글리콜의 첨가를 pH 조정 및/또는 냉각 단계와 조합하여 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명은, 대부분의 단백질 침전물, 예를 들면 면역글로불린 G-함유 단백질 침전물에, 이들이 초기에 어떻게 제조되는지에 관계없이 적용될 수 있는 것으로 예상된다. 본 발명은 또한, 알부민, 각각의 유형의 면역글로불린 단독 또는 이들의 혼합물로서의 IgA, IgD, IgE 또는 IgM과 같은 면역글로불린(Ig)을 포함하는 기타 유형의 단백질을 분리하는데 있어 구현될 수 있음을 주지해야 한다. 이와 관련하여 재조합 단백질도 적합한 것으로 예측된다.
- [0182] 이를 위해, IgG를 생산하기 위해 상기 방법이 적용되는 경우, 단백질-포함 침전물이(예를 들면, 페이스트, 침전물 또는 봉입체 형태의) 임의의 IgG-함유 물질일 수 있거나, 또는 예를 들면, 인간 또는 동물 기원의 혈장 또는 혈청, 발효 브로스, 세포 배양물, 단백질 현탁액, 밀크 또는 기타 본래 공급원으로부터인지에 관계없이 상기 설명된 방법들 중 하나 이상에 의해 IgG가 침전될 수 있는 용액과 같은 출발 물질로부터 유래될 수 있는 것이 주지된다. 면역글로불린-함유 물질 또는 용액은 단클론 또는 다중클론 면역글로불린(들)을 함유할 수 있다. 일부 양태에서, 면역글로불린-함유 출발 물질은 다중클론 항체를 포함하는 용액이다. 다른 양태에서, 출발 물질은 단클론 항체 또는 이의 단편을 포함한다. 따라서, 본원에서 사용되는 용어 "면역글로불린"은 천연 또는 재조합인 단클론 항체 또는 다중클론 항체를 포함하는 항체로서 동정될 수도 있다는 것은 숙련자의 지식 범위 내에 있다.
- [0183] 예를 들면, 면역글로불린(예를 들면, IgG)은 인간 또는 동물 혈액으로부터 분리될 수 있거나, 기타 수단, 예를 들면, 재조합 DNA 기술 또는 하이브리도마 기술에 의해 생성될 수 있다. 바람직한 양태에서, 면역글로불린은 혈장으로부터, 일반적으로는 다수의 기증자로부터 유래된 혈장 풀로부터 얻어진다. 혈장으로부터 면역글로불린을 얻기 위해, 혈장은 일반적으로 알콜 분획화에 적용되며, 상기 알콜 분획화는 크로마토그래피, 흡착 또는 침전과 같은 다른 정제 기술과 조합될 수 있다. 그러나, 다른 공정도 사용될 수 있다. 예를 들면, 콘의 방법, 예를 들면, 단백질-포함 침전물은 문헌[Method 6, Cohn et. al. J. Am; Chem. Soc., 68 (3), 459-475 (1946), Method 9, Oncley et al. J. Am; Chem. Soc., 71, 541-550 (1946)]에 따른 II+III 침전물, 또는 I+II+III 침전물, 문헌[Method 10, Cohn et.al. J. Am; Chem. Soc., 72, 465-474 (1950)], 및 문헌[Deutsch et.al. J. Biol. Chem. 164, 109-118 (1946)] 또는 문헌[Nitschmann and Kistler Vox Sang. 7, 414-424 (1962); Helv.

Chim. Acta 37, 866-873 (1954)]의 침전물-A일 수 있다. 관심 단백질을 포함하는 다른 침전물은, 미국 특허 3,301,842에서 술츠(Schulze) 등에 의해 기술된 혈장으로부터의 다른 면역글로불린 G-함유 온클레이 분획, 콘 분획, 황산암모늄 침전물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 관심 단백질을 포함하는 추가의 다른 침전물은, 예를 들면, EP893450에 기술된 바와 같이 옥탄산 침전물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0184] "정상 혈장", "고면역 혈장"(예를 들면 고면역 항-D, 과상풍 또는 B형 간염 혈장) 또는 이와 동등한 임의의 혈장이 본원에 기술된 냉 에탄올 분획화 공정에서 출발 물질로서 사용될 수 있다.

[0185] 용어 '동결 상청액(cryosupernatant)'(크라이오-제거(cryo-poor) 혈장, 동결 침전물(cryoprecipitate) 고갈된 혈장 등으로도 불림)은 동결 침전물이 제거된 (전혈 기증 또는 혈장 반출로부터 유래된) 혈장을 나타낸다. 동결 침전(cryoprecipitation)은 혈장 단백질 치료제의 대규모 생산을 위해 오늘날 사용되는 대부분의 혈장 단백질 분획화 방법의 첫 번째 단계이다. 상기 방법은 일반적으로 냉동된 혈장의 풀링을 포함하며, 이를 제어된 조건(예를 들면, 6°C 이하) 하에 해동한 다음 여과 또는 원심분리에 의해 침전물을 수집한다. 당업계 숙련자들에게 "동결 상청액"으로 알려진 상청액 분획은 일반적으로 사용을 위해 보유된다. 생성된 크라이오-제거 혈장은 감소된 수준의 인자 VIII(FVIII), 폰 빌레브란트 인자(VWF), 인자 XIII(FXIII), 피브리노겐 및 피브리노겐을 갖는다. FVIII의 수준은 크게 감소되지만, 피브리노겐의 수준은 원래 수준의 70% 정도일 수 있다. 동결 상청액은 알파 1-항트립신(AAT), 아포지단백 A-I(APO), 피브리노겐, 항트롬빈 III(ATIII), 응고 인자(II, VII, IX 및 X)를 포함하는 프로트롬빈 복합체, 알부민(ALB) 및 면역글로불린, 예를 들면 면역글로불린 G(IgG)를 포함하는 다양한 치료 단백질을 제조하는데 사용되는 일반적인 공급원료를 제공한다.

[0186] 8% 에탄올-침전물의 상청액(문헌[Cohn et al.; Schultze et al.(상기 참조), p. 251]의 방법), 침전물 II+III(문헌[Onclay et al.; Schultze et al.(상기 참조) p. 253]의 방법) 또는 침전물 B(문헌[Kistler and Nitschmann; Schultze et al.(상기 술츠 참조), p. 253]의 방법)가 산업적 규모의 혈장 분획화와 상용성인 IgG 공급원의 예이다. 고 수율로 IgG를 얻기 위한 정제 공정의 출발 물질은 다르게는 발효 및 세포 배양물 또는 기타 단백질 현탁액과 같은 상이한 공급원들로부터의 임의의 다른 적합한 물질일 수 있다.

[0187] 콘 분획화 방법에서, 제1 분획화 단계는 주로 피브리노겐 및 피브리노겐을 포함하는 분획 I을 생성한다. 상기 단계로부터의 상청액을 추가로 가공하여 분획 II+III에 이어 분획 III 및 II를 침전 유출시킨다. 일반적으로, 분획 II+III은 대략 60%의 IgG를 불순물, 예를 들면, 피브리노겐, IgM 및 IgA와 함께 함유한다. 그 후 이러한 불순물의 대부분은 분획 III에서 제거되며 이는 폐기물 분획으로 간주되어 일반적으로 폐기된다. 그 후 상청액이 처리되어 90% 초과 IgG를 함유할 수 있는 주요 IgG-함유 분획인 분획 II를 침전시킨다. 상기 % 값은 IgG의 % 순도를 나타낸다. 순도는 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들면, 겔 전기영동 또는 면역-비탁법에 의해 측정될 수 있다. 키슬러 & 니치만 방법에서, 분획 I은 콘 방법의 분획 I과 동등하다. 다음의 침전물/분획을 침전물 A(분획 A)로 나타낸다. 상기 침전물은 콘 분획 II+III과 동일하지는 않지만 대체로 동등하다. 그 후 침전물을 재용해시키고 조건을 조정하여 침전물 B(분획 B)를 침전 유출시키며, 이는 콘 분획 III에 상응한다. 다시, 이는 폐기물 분획으로 간주되며, 일반적으로 폐기된다. 그 후 침전물 B 상청액을 추가로 가공하여 콘 분획 II에 상응하는 침전물 II를 생성한다.

[0188] 특정 단백질-포함 침전물은 혈장 단백질, 펩티드 호르몬, 성장 인자, 사이토카인 및 다중클론 면역글로불린 단백질, 피브리노겐, 프로트롬빈, 트롬빈, 프로트롬빈 복합체, FX, FXa, FIX, FIXa, FVII, FVIIa, FXI, FXIa, FXII, FXIIa, FXIII 및 FXIIIa를 포함하는 인간 및 동물 혈액 응고 인자로부터 선택되는 혈장 단백질, 폰 빌레브란트 인자, 알부민, 트랜스페린, 세룰로플라스민, 합도글로빈, 헤모글로불린 및 헤모팩신을 포함하는 수송 단백질, β -항트롬빈, α -항트롬빈, α -2-마크로글로불린, C1-억제제, 조직 인자 경로 억제제(TFPI), 헤파린 보조 인자 II, 단백질 C 억제제(PAI-3), 단백질 C 및 단백질 S, α -1 에스테라제 억제제 단백질, α -1 항트립신을 포함하는 프로테아제 억제제, 잠복성 항트롬빈을 포함하는 항혈관신생 단백질, α -1-산 당단백질, 항키모트립신, 인터- α -트립신 억제제, α -2-HS 당단백질 및 C-반응성 단백질을 포함하는 고 당화 단백질, 및 히스티딘-풍부 당단백질, 만난 결합 력틴, C4-결합 단백질, 피브리노겐, GC-글로불린, 플라스미노겐을 포함하는 기타 단백질, 혈액 인자, 예를 들면, 에리트로포이에틴, 인터페론, 종양 인자, tPA, γ CSF를 포함할 수 있다.

[0189] 특정 양태에서, 단백질-포함 침전물은 면역글로불린, 예를 들면, 면역글로불린 G, 알부민, 피브린, 트롬빈, 프로트롬빈 복합체, 피브리노겐, 플라스미노겐, 알파 1-항트립신, C1-억제제, 아포지단백 A1, 알파 산 당단백질, 합도글로빈, 헤모팩신, 트랜스페린 및 응고 인자, 예를 들면, 인자 VII, 인자 VIII 및 인자 IX를 포함하는 혈장으로부터 유래된 치료 단백질의 제조에 사용된다.

[0190] 동적 필터 요소

- [0191] 본 발명의 임의의 측면에서, 제1 현탁액으로부터 불순물을 제거하도록 또는 제2 현탁액으로부터 침전물을 제거하도록 구성된 동적 필터 요소 여과 유닛은 동적 십자류 필터 요소이다. 바람직한 양태에서, 동적 십자류 필터 요소는 회전 십자류 필터 요소이다. 보다 바람직하게는, 회전 십자류 필터 요소는 필터 디스크를 포함한다. 필터 디스크는 일반적으로 샤프트 부재에 마운팅된다. 일 양태에서, 회전 십자류 필터 요소는 적어도 하나의 필터 디스크 및 적어도 하나의 샤프트 부재를 포함한다.
- [0192] 본 발명의 임의의 측면의 바람직한 양태에 따르면, 필터 디스크 막은 세라믹 막이다. 보다 바람직하게는, 세라믹 막은 공극 크기가 5nm 이상 2 μ m 이하의 범위이다. 특정 양태에서, 세라믹 막은 공극 크기가 약 0.2 내지 2 μ m이다. 특정 양태에서, 세라믹 필터 막은 평균 공극 크기가 5nm 이상 200nm(0.2 μ m) 이하의 범위이다. 특정 양태에서, 세라믹 필터 막은 공극 크기가 50nm 이상 내지 100nm 이하의 범위이다. 이러한 필터 디스크는 Kerafol 및 Flowserve에 의해 공급된다.
- [0193] 복수의 필터 디스크 막이, 제1 현탁액으로부터 불순물을 제거하도록 그리고 또는 제2 현탁액으로부터 침전물을 제거하도록 구성된 동적 필터 요소 여과 유닛에 포함될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 이와 같이, 본 발명의 방법은 제1 현탁액으로부터 불순물을 제거하고/하거나 제2 현탁액으로부터 침전물을 제거하기 위한 1, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 그 이상의 필터 디스크 막을 사용하는 것을 고려한다. 복수의 필터 디스크 막은 공극 크기가 동일할 수 있거나 상이할 수 있다.
- [0194] 바람직한 양태에서, 제1 현탁액으로부터 불순물을 제거하도록 또는 제2 현탁액으로부터 침전물을 제거하도록 구성된 여과 유닛은 가압 용기를 포함한다. 제1 탱크로부터의 현탁액은 유입구 포트를 통해 가압 용기에 지속적으로 공급될 수 있다. 분배 매니폴드를 사용하여 용기 내의 현탁액을 균일하게 분배할 수 있다. 따라서, 특정 양태에서, 가압 용기는 분배 매니폴드를 포함한다. 일부 양태에서, 제1 여과 유닛은 회전 십자류 필터 요소를 포함한다. 바람직하게는, 필터 요소는 적어도 하나의 중공 중심 수집 샤프트를 따라 균일한 간격으로 떨어져 있는 하나 이상의 필터 디스크를 포함한다. 필터 디스크는 수평 또는 수직으로 배열될 수 있다. 이들은, 수평으로 배향된 경우, 수직 배향된 중공 수집 샤프트를 따라 간격을 두고 떨어져 있다. 수집 샤프트 및 디스크는 회전 가능하다. 그 후 가압 용기 내의 현탁액은 회전 필터 디스크의 외막을 관통할 수 있어 디스크의 중공 중심 부분을 통과하여 중심 수집 샤프트로 보내진다. 그 후 일반적으로 여과물(즉, 관심 단백질이 풍부한 제1 투과물)이 플랜지 포트를 통해 제1 여과 유닛의 샤프트 부분으로부터 제거될 수 있다. 반면, 가압 하우징에 남아있는 잔류물은 유출구 포트를 통해 용기 밖으로 공급될 수 있다. 일반적으로 잔류물은 현탁액을 희석하기 위해 제1 탱크로 재순환된다. 이러한 방식으로, 제1 여과 유닛으로부터의 잔류물은 제1 탱크 내의 현탁액을 제2 희석 계수로 희석하는데 사용될 수 있다.
- [0195] 동적 십자류 여과, 예를 들면, 회전 여과는 최대 필터 효율을 제공한다. 십자류 효과(필터 표면의 접선 유동 세정)는, 통상적인 (정적) 십자류 여과 시스템에서 사용되는 바와 같이 고정된 막을 통해 많은 용적을 펌핑하는 것이 아니라, 필터 디스크를 회전시킴으로써 발생된다. 회전 필터 디스크의 표면에서 발생하는 극한의 십자류 속도는 통상적인 십자류 기술에 비해 매우 적은 양의 에너지를 소비하면서 필터 표면의 매우 효율적인 세정을 보장한다.
- [0196] 동적 필터 요소는 또한 본 발명의 제1 측면의 제3 여과 유닛 및/또는 본 발명의 제2 측면의 제2 또는 제4 여과 유닛에서, 즉 연속 농축 공정을 수행하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 동적 필터 요소는 일반적으로 하나 이상의 한외 여과 또는 정용 여과 막을 포함한다.
- [0197] 연속 농축 공정을 수행하기 위한 십자류 필터 요소는 동적 한외 여과 필터 장치를 포함할 수 있다. 다르게는, 공정은 정적 한외 여과 장치를 포함한다.
- [0198] 본 발명의 바람직한 양태에서, 농축 공정을 수행하기 위한 동적 십자류 필터 요소 또는 한외 여과 필터 장치는 관심 단백질의 분자량보다 작은 분자량 컷오프를 갖는 막을 포함한다. 이러한 양태에서, 막의 컷오프는 농축 공정 동안 관심 단백질을 보유하도록 선택된다. 일반적인 가이드로서, 단백질이 잔류물에 보유됨을 보장하기 위해, 관심 단백질의 분자량보다 적어도 3배 낮은 공칭 막 컷오프가 선택될 수 있다.
- [0199] 하나의 다른 양태에서, 농축 공정을 수행하기 위한 동적 십자류 필터 요소 또는 정적 한외 여과 필터 요소는 관심 단백질의 분자량보다 큰 분자량 컷오프를 갖는 막을 포함한다. 이러한 양태에서, 관심 단백질이 막을 통과하여 제2 잔류물 또는 제4 잔류물보다 제2 투과물 또는 제4 투과물에(본 발명의 제2 측면의 경우) 또는 제3 잔류물보다 제3 투과물에(본 발명의 제1 측면의 경우) 수집됨을 보장하도록 공칭 막 컷오프가 선택된다.
- [0200] 십자류 필터 요소가 동적인 양태에서, 바람직하게 상기 요소는 연속 농축 공정을 수행하도록 구성된 회전 십자

류 필터 요소이다.

[0201] 추가의 바람직한 양태에 따르면, 연속 농축 공정을 수행하기 위한 여과 요소는 평균 공극 크기가 5 내지 5,000nm, 바람직하게는 5 내지 2,000nm, 5 내지 1,000nm, 5 내지 500nm, 5 내지 200nm, 7 내지 1,000nm, 보다 바람직하게는 7 내지 500nm, 보다 더 바람직하게는 7 내지 100nm, 가장 바람직하게는 7 내지 80nm인 여과 막을 포함한다. 물론, 평균 공극 크기는 상기 주어진 범위의 다른 조합일 수 있다. 필터 제조업체는 종종 공칭 또는 평균 공극 크기 등급과 같은 용어를 상용 필터에 부여하는데, 이는 일반적으로 실제 공극의 기하학적 크기보다는 입자 또는 미생물에 대한 특정 보유 기준을 충족함을 나타낸다.

[0202] 특정 양태에서, 연속 농축 공정을 수행하기 위한 회전 십자류 필터 요소는 필터 디스크(예를 들면, 세라믹 디스크)를 포함한다. 일부 양태에서, 필터 디스크는 마이크로필터의 평균 공극 크기를 갖는 막을 포함한다. 다른 양태에서, 필터 디스크는 한외 필터의 평균 공극 크기를 갖는 막을 포함한다. 추가의 양태에서, 필터 디스크는 정용 필터의 평균 공극 크기를 갖는 막을 포함한다. 일 양태에서, 필터 디스크 막의 평균 공극 크기는 5nm 이상 2 μ m 이하의 범위이다. 특정 양태에서, 필터 디스크 막의 평균 공극 크기는 50nm 이상 500nm(즉 0.5 μ m) 이하의 범위이다. 일부 양태에서, 필터 디스크 막의 평균 공극 크기는 50nm 이상 100nm 이하의 범위, 60nm 이상 90nm 이하의 범위 또는 60nm 이상 80nm 이하의 범위이다. 일부 양태에서, 필터 디스크 막은 평균 공극 크기가 60nm 또는 80nm이다.

[0203] 특히 바람직한 양태에서, 연속 농축 공정을 수행하기 위한 회전 십자류 필터 요소는 한외 여과 및/또는 정용 여과에 적합한 공극 크기를 갖는 복수의 세라믹 디스크를 포함한다. 예를 들면, 요소는 바람직하게는 공극 크기가 3nm인 적어도 하나의 세라믹 막을 포함한다. 다르게는, 요소는 바람직하게는 공극 크기가 5nm인 적어도 하나의 세라믹 막을 포함한다. 다르게는, 요소는 바람직하게는 공극 크기가 7nm인 적어도 하나의 세라믹 막을 포함한다. 다르게는, 요소는 바람직하게는 공극 크기가 30nm인 적어도 하나의 세라믹 막을 포함한다. 요소는 공극 크기가 3nm 및 5nm인 것을 포함하여 다양한 공극 크기를 갖는 복수의 세라믹 디스크를 포함할 수 있다. 요소는 공극 크기가 5nm 및 7nm인 것을 포함하여 다양한 공극 크기를 갖는 복수의 세라믹 디스크를 포함할 수 있다. 요소는 공극 크기가 3nm 및 30nm인 것을 포함하여 다양한 공극 크기를 갖는 복수의 세라믹 디스크를 포함할 수 있다. 요소는 공극 크기가 3nm, 5nm, 7nm 및 30nm인 것을 포함하여 다양한 공극 크기를 갖는 복수의 세라믹 디스크를 포함할 수 있다.

[0204] 또 다른 바람직한 양태에 따르면, 연속 농축 공정을 수행하기 위한 여과 요소는 중합체 막 형태의 막, 예를 들면, 폴리에테르설폰 또는 재생 셀룰로오스를 포함하는 한외 여과 장치를 포함한다.

[0205] 단백질 회수

[0206] 샘플 중의(예를 들면, 침전물 중의 또는 이의 후속 정제된 제제 중의) 단백질(들)의 농도는 당업계의 숙련자에게 공지된 임의의 수단에 의해 측정될 수 있다. 적합한 검정의 예는 고압 액체 크로마토그래피(HPLC; 예를 들면, 크기 배제 HPLC), 효소-결합 면역 흡착 검정(ELISA) 및 면역 비탁 측정을 포함한다. 이러한 기술은 샘플의 순도를 평가하는데 사용될 수 있다. 또한, SDS-PAGE와 같은 겔 전기 영동과 염색 및 밀도 측정이 샘플의 순도를 평가하고 오염 단백질의 존재를 검출하는데 사용될 수 있다. 환원제, 예를 들면, 디티오프레이톨을 SDS-PAGE와 함께 사용하여 임의의 디설파이드-연결된 중합체를 절단할 수 있다.

[0207] 면역글로불린 G-함유 출발 물질의 총 단백질 농도는 바람직하게는 약 0.5 내지 6.5% w/v, 보다 바람직하게는 약 1.0 내지 4.0% w/v, 보다 더 바람직하게는 약 1.5 내지 3.0% w/v, 가장 바람직하게는 약 1.8 내지 2.5% w/v, 예를 들면 약 2.0% w/v이다.

[0208] 일 양태에서, 액체는, 나트륨 아세테이트, 포스페이트 및 시트르산 중 하나 이상을 포함하는 완충액을 포함한다. 일 양태에서, 포스페이트는 나트륨 포스페이트, 예를 들면, 나트륨 디하이드로젠 포스페이트 테하이드레이트이다. 바람직하게는, 전도도가 낮은 완충액, 예를 들면, 전도도가 5mS/cm 미만, 바람직하게는 4mS/cm 미만, 보다 바람직하게는 0.01mS/cm 내지 4mS/cm인 완충액이 사용된다.

[0209] 임의의 양태에서, 용액의 전도도가 측정되는 온도는 약 4 내지 37°C일 수 있고, 바람직하게는 온도는 약 20 내지 25°C(실온)이다.

[0210] 본 발명에 따르는 방법은 관심 단백질이 단백질-포함 침전물(예를 들면, 페이스트)로부터 고수율로 회수되게 한다. 농축후 단계에서 회수되는 수율(한외 여과된 생성물)은 일반적으로 적어도 75% (w/w), 적어도 80% (w/w), 적어도 85% (w/w), 적어도 90% (w/w), 적어도 95% (w/w), 바람직하게는 적어도 96% (w/w), 보다 바람직하게는 적어도 97% (w/w), 가장 바람직하게는 98% (w/w) 이하이며, 출발 물질 중의 면역글로불린 G의 총량과 비교한 최

중 여과된 용액 중의 면역글로불린 G의 총량으로 정의된다.

[0211] 다음은 본 발명에 따라 면역글로불린 G 함량의 회수율의 계산이 얻어질 수 있는 방법을 입증하는 예이다. 제1 단계는 출발 물질(즉, 단백질-포함 침전물; 총 용해) 중의 IgG 함량의 측정을 포함하고, 이어지는 제2 단계는 본 발명의 연속 추출 방법 또는 시스템을 사용하는 경우 얻어지는 IgG 회수의 측정을 포함한다.

[0212] 제1 단계로서, 단백질-포함 침전물(각각의 실험당 약 50g)을 완충액(예를 들면, 0.12 내지 0.25M 포스페이트 완충액, pH 7.6 내지 8.0)에 용해시켜 20의 최종 희석 계수(1:20 또는 중량 기준으로 1:19의 최종 희석비)를 제공한다. 임펠러 혼합기를 사용한 2시간의 재현탁 기간 후, 현탁액을 4,500G에서 원심분리한다. 이는 제1 상청액 및 제1 침전물을 생성한다. 상청액의 용적은 표준 방법에 의해 측정될 수 있고, 상청액의 IgG 함량은, 예를 들면, 비탁법에 의해 측정될 수 있다. 생성된 침전물을 상기한 바와 동일한 완충액을 사용하여 재현탁하고 다시 처리하여 20(수득된 상청액 1부:새로운 완충액 19부)의 최종 희석 계수를 제공한다. 생성된 상청액의 용적 및 IgG 함량을 다시 측정한다. 이 공정은 예를 들면 5회 반복하거나, 또는 마지막 상청액의 IgG 함량이 10mg/L 미만인 되도록 필요한만큼 자주 반복한다(정량화 한계는 대략 3.6mg/L이다). 이 절차는 단백질-포함 침전물 중의 IgG 함량이 완충액에 의해 완전히 또는 최적으로 용해되거나 추출됨을 보장한다. 이 실험을 수 회 반복한다(본 발명의 경우 12회의 개별 실험이 반복되었다). 이 공정을, 유사한 신뢰할 수 있는 결과를 제공하는 공급원 혈장의 분획화로부터 발생한 상이한 출발 침전물들로 반복하였다. 하기 표 1은 단백질-포함 침전물로부터 회수된 총 단백질 및 IgG의 함량을 보여준다.

표 1

표 1: 단백질-포함 침전물 중 IgG 함량의 측정 (총 용해).

	누적 희석 계수 (페이스트:완충액)	총 단백질의 회수 (g/kg 페이스트)	IgG의 회수 (g/kg 페이스트)
	중량:중량	(최소 - 최대)	(최소 - 최대)
1 차 추출 후	1:20	131.8 – 158.9	68.7 – 72.8
2 차 추출 후	1:40	16.2 – 23.1	7.1 – 10.5
3 차 추출 후	1:60	3.5 – 7.4	0.6 – 1.8
4 차 추출 후	1:80	1.1 – 2.3	0.05 – 0.2
5 차 추출 후	1:100	0.2 – 0.4	0.01 – 0.03
총 추출		152.8 – 192.1	76.5 – 85.3

[0213]

[0214] 제2 단계에서, 동일한 단백질-포함 침전물이 본 발명에 따른 연속 추출 및 분리 방법 또는 시스템을 사용하는 실험에 대해 사용된다. 총 1kg의 양의 단백질-포함 침전물(침전물 A)을 완충액(예를 들면, 10mM 포스페이트, 10mM 아세테이트 및 2mM 시트르산)에 30분 동안 용해시켜 5(중량 기준 1:6 또는 제1 희석 계수 6(1:6)과 동일)의 제1 희석비를 갖는 출발 현탁액을 제공한다. 현탁액의 pH는 4.6이다. 현탁액을, 연속 추출 및 분리 공정을 위해 제1 탱크로부터 제1 여과 공정 유닛으로 이송한다. 각각 100 내지 200ml의 수집된 여과물에 대해, 여과된 현탁액의 용적이 제1 탱크에서 일정하게 유지되도록 100 내지 200ml의 새로운 완충액(또는 UF 단계 후 재순환된 완충액(즉, 제2 투과물))을 제1 탱크에 첨가한다. 여과는 4시간 후에 종료되며, 이로써 현탁액 중의 총 단백질 농도는 0.1g/L 미만이고/이거나 IgG 농도는 50mg/L 미만으로 예상된다.

[0215] 하기 표 2는 IgG의 회수율을 보여준다.

표 2

표 2: 본 발명의 연속 추출 여과 시스템을 사용하는 IgG 회수의 측정

사용된 출발 침전물	침전물 A
출발 침전물의 양 (kg)	1.0
제 1 회석 계수 (페이스트: 총 중량 기준)	1:6
(제 1 회석 계수에서의) 총 단백질 양 (g/kg 페이스트)	116.4
(제 1 회석 계수에서의) IgG 양 (g/kg 페이스트)	61.7
최종 회석 계수 (연속 추출 & 여과 말기)	1:31
(최종 회석 계수에 도달한 후의) 총 단백질 양 (g/kg 페이스트)	168
(최종 회석 계수에 도달한 후의) IgG 양 (g/kg 페이스트)	78.9
(한외 여과 후의) IgG 양 (g/kg 페이스트)	78.6

[0216]

[0217]

상기 예에서, 실험은 연속 추출 여과 유닛을 사용하여 총 단백질 및 IgG의 증가된 수율을 보여주기 위해 오프-라인으로 수행된다. "오프-라인"은 첨가된 완충액이 제2 여과 유닛으로부터 수득되지 않음을 의미한다. 제2 여과 유닛에서의 한외 여과는 별도로 수행된다. 또한, IgG의 양은 최종 (제2) 회석 계수의 말기에서의 IgG 양 (1:31 = 78.9g/kg)에 비해 제1 회석 계수에서 더 낮은 (1:6 = 61.7g/kg) 것으로 표 2에 나타나 있다. 이는 모든 IgG가 완충액에서 한 번에 추출되거나 용해되는 것이 아니라 일정 기간 또는 반복적인 용해 과정에 걸쳐 추출되거나 용해된다는 사실로 인한 것이다. 따라서, IgG 수율은 본 발명에 따른 연속 추출 및 여과 공정을 통해 증가된다.

[0218]

본 발명에 따른 면역글로불린 G의 수율은 적어도 95%의 회수율로 상기 표 1 및 표 2에 나타난 바와 같이 달성된다. (본 발명에 따른 연속 추출 및 여과의) 회수율은 비(연속 여과물 중의 IgG의 총 양:표 1로부터의 총 용해에 의한 IgG의 평균 양)에 100을 곱하여 계산된다.

[0219]

총 IgG 양 (최종 회석 계수에 도달한 후) = 78.9g/kg

[0220]

평균 총 IgG 추출 (표 1) = $(76.5+85.3)/2 = 80.9\text{g/kg}$

[0221]

IgG의 수율 (회수율) = $78.9/80.9 \times 100\% = 97.53\%$

[0222]

따라서, 여기에서는 본 발명에 따라 적어도 95% 또는 대략 98%의 IgG 회수율이 달성될 수 있는 것으로 나타나 있다.

[0223]

이러한 초기 공정 단계(추가 다운스트림 가공 단계 전)에서의 높은 회수는 최종 벌크 단계에서 보다 더 고수율을 달성하기 위한 전제 조건이다. 본 발명은 단백질-포함 침전물(예를 들면, 페이스트)이 사실상 높은 회석 계수(예를 들면, 40 내지 70; 1:40 내지 1:70)로 현탁되는 추출 공정을 사용한다. 예로서, 1kg의 단백질-포함 침전물(예를 들면, 페이스트)을 3kg의 액체(예를 들면, 완충액)에 재현탁하여, 4(1:4)의 제1 회석 계수를 갖는 출발 현탁액을 생성한다. 66kg의 완충액 공급스트림의 재순환은 70(1:70)의 최종 회석 계수를 생성한다. 본 발명에서 사용되는 추출 공정은 더 많은 양의 면역글로불린 G가 현탁액/용액으로 방출되게 하여 (이하에 논의되는 바와 같이) 평형을 이동시켜, 현탁액으로부터 면역글로불린 G를 보다 효율적으로 분리할 수 있게 한다.

[0224]

바람직한 양태에서, 조 면역글로불린 G-함유 단백질 침전물(즉, 단백질-포함 침전물)을 완충액에 현탁시켜 출발

현탁액을 생성한다. 완충액은 일부 양태에서, 아세테이트 또는 포스페이트 또는 추가로 시트르산을 함유할 수 있다.

[0225] 가장 바람직한 양태에서, 면역글로불린 G 풍부 현탁액 또는 용액의 추출된 및 여과된 생성물은 인간 면역글로불린을 포함하며, 여기서, 적어도 95% 최대 98%의 면역글로불린 G 함량이 출발 침전물로부터 회수되거나, 0.1mg/ml 미만, 바람직하게는 0.05mg/ml 미만의 면역글로불린 G 단백질 농도가 제2 회석 계수에 도달한 후의 최종 현탁액에서 검출될 수 있다. 면역글로불린 G 서브클래스의 대략적인 분포는 일반적으로 인간 혈장에서의 평균 서브클래스 분포와 유사할 것이다.

[0226] 또한, 일반적으로 1kg의 침전물 A(단백질-포함 침전물)는 대략 170g의 총 단백질을 함유한다(범위: 150 내지 190g 단백질/kg 침전물). 총 단백질은 대략 50 내지 60%의 IgG로 구성된다(따라서 75 내지 95g/kg 침전물의 범위). 본 발명의 하나의 방법에 따르면, 대략 98%의 IgG의 회수율이 달성되는 경우, 이는 단백질-포함 침전물(침전물 A)로부터 총 73.5 내지 93.1g/kg의 양의 IgG가 수득됨을 의미한다.

[0227] IgG 회수 백분율을 계산하기 위한 상기 방법은 침전 전에 제2 탱크에 제1 여과물을 수집하고 추가의 후속적인 연속 추출 및 분리를 포함하는 것을 포함하여 본 발명에 추가로 적용될 수 있다.

[0228] 화학에서, 예를 들면 단백질 분리에서, 르 샤틀리에의 원리 또는 "평형 법칙"이 조건의 변화가 화학 평형에 미치는 영향을 예측하는데 사용될 수 있다. 평형 상태에 있는 임의의 시스템이 온도, 온도, 용적 또는 압력의 변화를 겪으면, 상기 시스템은 적용된 변화의 영향을 (부분적으로) 상쇄하기 위해 자체적으로 재조정되어 새로운 평형이 수립된다. 즉, 평형 상태에 있는 시스템이 방해받을 때마다 시스템은 변화의 영향이 무효화되게 하는 방식으로 자체적으로 조정될 것이다. 예를 들면, 평형 상태에서, 양측의 현탁액 중의 면역글로불린의 농도는 일정하다. 평형 상태에서 면역글로불린 농도의 변화로 인해 반응으로부터 소량의 면역글로불린이 제거되면, 이는 농도의 변화를 감소시키는 쪽으로 평형을 이동시킬 것이다. 르 샤틀리에의 원리에 따르면, 시스템은 원래의 평형 상태에 영향을 미치는 변화에 부분적으로 반대하려고 할 것이다. 결국, 반응 속도, 생성물의 규모 및 수율은 시스템에 미치는 영향에 따라 변경된다.

[0229] 시스템이 평형 상태에 있고 반응에 관련된 종들 중 하나의 농도가 증가되는 경우, 그 종의 농도를 감소시키도록 시스템이 재조정된다. 따라서, 반응은 증가된 농도의 일부를 소비하도록 하는 방식으로 진행된다. 유사하게는, 일부 물질의 농도가 감소되면, 농도 손실을 보충하도록 반응이 진행된다.

[0230] 즉, 시스템으로부터 면역글로불린(예를 들면, IgG)을 지속적으로 제거하는 동시에 회석을 통해 현탁액의 용매 중의 면역글로불린의 농도를 감소시키면, 현탁액의 하나의 상, 즉, 침전물로부터 액체상으로 면역글로불린의 제거가 증가한다. 이 절차의 반복을 통해 현탁액의 침전물에 포함된 모든 면역글로불린이 단백질-포함 침전물로부터 본질적으로 추출될 수 있으며, 특히 본 발명은, 적어도 30, 바람직하게는, 예를 들면 40(1:40) 이상의 높은 최종 회석 계수를 개시하며, 예를 들면 제안된 완충액 조성물을 사용하여 추가로 지원될 수 있거나, 또는 단백질-포함 침전물로부터의 면역글로불린 G 회수를 최대화하기 위해 더 높은 pH를 사용하여 추가로 지원될 수 있다. 종래 기술과 비교하여, 본 발명의 방법 및 시스템은 단백질-포함 침전물(예를 들면, 페이스트 또는 침전물)로부터 거의 모든 면역글로불린 G가 회수될 수 있게 한다.

[0231] 이후에, 한의 여과된 생성물은, 최종 생성물이 예를 들면 인체에 투여될 수 있도록, 추가의 가공, 예를 들면, 크로마토그래피 단계, 바이러스 불활성화 단계, 농축 및 제형화에 적용될 수 있다. 최종 생성물은 면역 병태, 특정 자가 면역 질환 및 특정 신경 질환의 치료에 사용될 수 있다. 이러한 병태는 류마티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스(SLE), 항인지질 증후군, 면역 혈소판 감소증(ITP), 가와사키병, 길랭 바레 증후군(GBS), 다발성 경화증(MS), 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(CIDP), 다초점 운동 신경병증(MMN), 중증 근무력증(MG), 피부 수포 질환, 경피증, 피부근염, 다발근염, 알츠하이머병, 파킨슨병, 다운 증후군과 관련된 알츠하이머병, 대뇌 아밀로이드 혈관병증, 루이소체 치매, 전측두엽 변성 또는 혈관 치매를 포함한다. 또한, 최종 IVIg 및 SCIG 생성물은 다른 의료 절차에서, 예를 들면, 세포 및 장기 이식에서 사용될 수 있다.

[0232] 이를 위해, 본 발명에 따른 제1 공정 유닛(및/또는 본 발명의 제2 측면에 따른 제3 공정 유닛)은 이의 고유한 디자인 덕분에 연속 추출 및 분리 공정, 특히 여과 공정을 제공하는 것을 반복한다. 제1 공정 유닛에는 예를 들면 세라믹-기반 막 디스크를 포함하는 동적 회전 여과 요소가 제공될 수 있다. 회전 여과는 (필터 표면의 고효율 세정으로 인해) 극단적인 십자류 유속을 허용하며, 종래의 십자류 기술에 비해 매우 낮은 에너지 소모를 갖는다. 십자류 효과(필터 표면의 접선 유동 세정)는 큰 용적의 펌핑에 의해서가 아니라 필터 디스크의 회전에 의해 발생된다. 세라믹 필터 디스크는 화학적 응력 및 열적 응력에 대한 보다 우수한 내성, 높은 여과 플럭스

및 매우 긴 수명을 가지며, 백플러싱 또는 고온 증기 멸균에 의해 재생될 수 있다.

[0233] 동적 십자류 여과 유닛 및 시스템

[0234] 동적 십자류 여과, 예를 들면, 회전 여과는 최대 필터 효율을 제공한다. 십자류 효과(필터 표면의 접선 유동 세정)는, 통상적인 (정적) 십자류 여과 시스템에서 사용되는 바와 같이 고정된 막을 통해 많은 용적을 펌핑하는 것이 아니라, 필터 디스크를 회전시킴으로써 발생된다. 회전 필터 디스크의 표면에서 발생하는 극한의 십자류 속도는 통상적인 십자류 기술에 비해 매우 적은 양의 에너지를 소비하면서 필터 표면의 매우 효율적인 세정을 보장한다.

[0235] 본 발명의 동적 십자류 여과 유닛 및 시스템에서, 회전 세라믹 필터 디스크는 일반적으로 가압 하우징에 어셈블링된다. 디스크의 디자인은 내부의 배수 채널을 보여준다. 여과물은 외부로부터 디스크의 내부로 이동한다. 디스크의 회전은 막 표면에 전단력을 발생시킨다. 이 기술로 필터 케이브의 증가가 방지되어 높은 여과 플럭스가 생성된다. 회전 여과의 주요 파라미터 중 일부는 세라믹 필터 디스크를 회전시키기 위한 회전 속도 및 고체 함량(여과물의 제거로 인한 액체의 농도)이다.

[0236] 온도는 단백질 용액의 점도에 영향을 미치므로 막으로 여과시 플럭스에도 영향을 미친다. 본 발명의 방법에 사용되는 출발 현탁액은 바람직하게는 0°C 내지 관련 단백질이 변성되는 온도 이하의 범위 내의 온도를 갖는다. 온도는 일반적으로 약 10 내지 약 50°C 이하의 범위 내에 있다. 특정 양태에서, 온도는 약 18 내지 약 35°C 이하의 범위 내에 있다. 바람직한 일 양태에 따르면, 제2 현탁 탱크(즉, 둘 다 관심 단백질이 풍부한, 본 발명의 제1 측면의 제1 투과물 또는 본 발명의 제2 측면의 제2 잔류물에서 하나 이상의 불순물을 침전시키기 위해 지방산, 바람직하게는 카프릴산(옥탄산)을 포함하는 탱크)의 온도는 약 4 내지 약 40°C의 온도에 있다. 보다 바람직하게는, 지방산, 바람직하게는 카프릴산(옥탄산)은 약 25 내지 약 38°C, 임의로 약 27°C, 약 32°C 또는 약 37°C의 온도의 제2 현탁 탱크에서 본 발명의 제1 측면에 따른 제1 투과물과 또는 본 발명의 제2 측면의 제2 잔류물과 조합된다. 임의로, 둘 다 관심 단백질이 풍부한 투과물 또는 관심 단백질이 풍부한 잔류물, 및 지방산은 이들을 조합시 약 4 내지 약 40°C, 바람직하게는 약 25 내지 약 38°C, 보다 바람직하게는 약 32°C의 온도에 있다. 다시 말해서, 투과물이 하나의 온도의 필터 유닛에서 순환할 수 있는 동안, 투과물의 온도는 제2 현탁 탱크에서 지방산과의 인큐베이션 이전 및/또는 인큐베이션 기간 동안 증가될 수 있다.

[0237] 추가의 바람직한 양태에 따르면, 필터 유닛의 온도는 바람직하게는 2 내지 25°C, 보다 바람직하게는 약 2 내지 10°C로 제어된다. 이러한 온도는 공정 전반에 걸쳐 관심 단백질의 생체 반응성을 유지하면서 최적의 추출 공정 및 분리 공정을 보장한다.

[0238] 여과는 본원에서 사용되는 막의 재료에 따라, 막이 견딜 수 있는 수준과 동일하거나 그 미만인 막 관통 여과 압력으로, 예를 들면 약 0.2 내지 약 3bar의 압력으로 수행된다. 막 관통 압력은 일반적으로 0.1 내지 2.5bar, 바람직하게는 0.2 내지 2.4bar, 보다 바람직하게는 0.4 내지 2.0bar, 0.5 내지 1.8bar, 0.6 내지 1.6bar, 0.6 내지 1.5bar, 0.7 내지 1.5bar, 가장 바람직하게는 0.8 내지 1.5bar이다. 또 다른 양태에 따르면, 최대 2bar, 바람직하게는 0.1 내지 2.0bar 또는 약 1.5bar, 1.0bar 또는 0.5bar의 압력이 필터 유닛에 제공된다.

[0239] 또 다른 양태에 따르면, 제1 현탁액 및 제2 현탁액으로부터 불순물/침전제를 분리하도록 구성된 필터 유닛에서의 연속 추출 공정은, 필터 유닛으로의 현탁액 또는 용액의 유속 및/또는 체류 시간 및/또는 불순물/침전제를 포함하는 잔류물/라피네이트의 유속 및/또는 관심 단백질이 풍부한 제1 투과물/여과물의 유속을 조정함으로써 추가로 지원된다. 예를 들면, 일 양태에서, 가압 용기(여과 공정 유닛)로의 현탁액 또는 용액의 선 속도는 약 0.27 내지 1.66m/s일 수 있다. 또 다른 예에서, 불순물/침전제를 포함하는 잔류물의 선 속도는 0.25 내지 1.33m/s일 수 있다. 또 다른 예에서, 관심 단백질이 풍부한 투과물/여과물의 선 속도는 0.03 내지 0.33m/s일 수 있다. 선 속도와 단면적을 곱하여 체적 유속을 제공한다. 또한, 회전 필터 디스크의 속도의 결과로서 제1 공정 유닛에서 난류가 생성될 수 있으며, 여기서, 속도(종종 접선 속도로 나타냄)는 약 1 내지 7m/s일 수 있다. 본 발명의 양태에 따르면, 회전 디스크 필터의 속도는 1 내지 10m/s이다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 회전 디스크 필터의 속도는 5 내지 7m/s이다. 보다 바람직하게는, 회전 디스크 필터의 속도는 60Hertz(800rpm)에서 7m/s이다. 회전 십자류 요소의 회전 속도는 약 600rpm(50Hz) 내지 약 1,600rpm(100Hz), 바람직하게는 약 800rpm(60Hz) 내지 약 1,200rpm(80Hz), 바람직하게는 약 800rpm(60Hz), 약 1,000rpm(70Hz) 또는 약 1,200rpm(80Hz)이다. 본원에서 사용되는 Hz 단위의 회전 속도는 모터의 속도를 나타내고자 한다. 이는 적절한 검정 곡선을 사용하여 rpm 단위의 속도와 상관될 수 있다.

[0240] 상기 방법은 출발 침전물/물질(즉, 제1 현탁액)로부터 또는 제2 현탁액으로부터 관심 단백질의 회수를 최대화하

기 위한 연속 추출 및 분리 공정이 실현될 수 있게 한다. 추출 공정 덕분에, 거의 모든 관심 단백질이 단백질-포함 침전물로부터 추출되고, 후속 단계에서 회수된다. 상기 방법은 또한 액체 또는 희석제, 예를 들면, 완충액 또는 물이 폐쇄 시스템에서 재순환되게 하며, 이에 따라 액체의 양은 공정 전반에 걸쳐 유지되는 반면, 풋프린트(즉, 큰 탱크 용적)는 감소될 수 있다.

[0241] 또 다른 양태에서, 본 발명은 동적 십자류 여과와 함께 백플러싱 단계를 포함한다. 일반적으로, 본 발명의 방법 및 시스템은 백플러싱 기간이 규칙적인 간격으로 발생하는 동안 여과가 일시적으로 중지되도록(즉, 공급 펌프가 정지되도록) 여과 및 백플러싱의 교대를 포함한다. 여기서 여과 시스템으로의 액체의 유동이 역전된다.

[0242] 여과 효율을 최대화하기 위해 백플러싱의 빈도, 지속 시간 및 유속이 조정될 수 있으며, 백플러싱 전의 여과 기간이 요구되는 것이 이해된다.

[0243] 특정 바람직한 양태에서, 백플러싱의 빈도(및 결과적으로 여과 기간)는 출발 물질 중 총 단백질 농도 또는 불순물의 수에 기초하여 측정된다. 결과적으로, 제1 현탁액이 여과될 때, 제2 현탁액(상대적으로 더 적은 불순물을 가짐)이 여과될 때에 비해 백플러싱이 더 빈번하게 필요하다는 것을 이해할 것이다. 즉, 여과물의 총 단백질 농도 및 탁도가 감소함에 따라 백플러싱 간격의 빈도도 감소한다(즉, 백플러싱들 사이의 시간 기간이 증가하고, 백플러싱이 필요하기 전에 여과가 더 긴 시간 기간 동안 진행될 수 있음).

[0244] 여과물의 단백질 농도 및 탁도는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 모니터링될 수 있다. 특정 양태에서, 본 발명의 방법 및 본 발명의 시스템은 여과물이 여과 유닛 내로 그리고/또는 밖으로 통과할 때 단백질 농도 및/또는 탁도를 측정할 수 있는 인-라인 검출 유닛의 사용을 포함한다. 추가의 양태에서, 이중 파장 광도계가 단백질 농도(단백질 농도를 검출하기에 적합한 파장, 예를 들면, 260 내지 280nm의 범위, 바람직하게는 약 280nm에서의 용액의 흡광도를 검출함에 의함) 및 용액 탁도(미립자 물질의 존재에 의해 야기된 광 산란을 검출하기에 적합한 파장에서의 용액의 흡광도, 예를 들면, 400 내지 900nm, 바람직하게는 약 600 내지 약 880nm 범위의 파장에서의 흡광도를 검출함에 의함)의 동시 평가를 용이하게 하기 위해 사용될 수 있다. 크로마토그래피 및 여과 장치와 함께 사용하기 위한 이중 파장 측광 장치는 당업계에 널리 공지되어 있다.

[0245] 특정 예에서, 백플러싱의 빈도는 15초, 30초, 45초, 60초, 75초, 90초, 105초, 120초, 135초, 150초, 200초, 230초, 260초, 300초, 330초, 360초, 400초, 1,000초, 2,000초, 3,000초, 4,000초 또는 그 이상의 간격이다.

[0246] 백플러싱 간격의 기간은 백플러싱을 필요로 하는 여과 면적 및 디스크의 수에 따라 달라진다. 여과 면적이 클수록, 일반적으로 백플러싱 동안 필요한 백플러싱 완충액의 용적이 커지고, 따라서 백플러싱 동안의 유속에 의해서도 영향을 받는다. 당업자는 사용되는 시스템의 크기 및 디스크의 수에 따라 백플러싱을 위한 적절한 기간, 빈도 및 유속을 잘 측정할 수 있다. 특정 예에서, 백플러싱의 기간은 대략 5초, 대략 10초, 대략 15초, 대략 30초, 대략 45초, 대략 60초 또는 그 이상이다.

[0247] 실제적인 이유로 (그리고 여과 효율을 최대화하기 위해) 백플러싱 간격의 기간은 일반적으로 여과 간격의 기간보다 짧다. 특정 양태에서, 백플러싱 간격의 지속 시간은 여과 간격의 기간보다 적어도 1/4, 1/8, 1/10, 1/16 이거나 또는 여과 간격의 지속 시간보다 더 짧다.

[0248] 백플러싱 동안 사용되는 유속은 여과에 사용되는 유속과 동일할 수 있거나 상이할 수 있음이 추가로 이해될 것이다. 특정 양태에서, 동적 여과 동안의 유속은 약 15 내지 100L/hour의 범위, 바람직하게는 약 20 내지 50L/hour의 범위(약 200ml/분 내지 약 1L/min, 바람직하게는 약 300 내지 약 900ml/min, 보다 바람직하게는 약 300 내지 600ml/min)이다. 바람직하게는, 백플러싱의 유속은 여과에 사용되는 유속보다 낮아, 특정 양태에서 백플러싱의 유속은 여과에 사용되는 유속보다 약 100 내지 약 400배의 범위로 더 느리다.

[0249] 특정 양태에서, 백플러싱은 제1 현탁액 또는 제2 현탁액에 포함된 동일한 완충액으로 수행된다. 다르게는, 백플러싱은 농축 과정 동안 얻은 투과물을 사용하여 수행될 수 있다(예를 들면, 동적 십자류 여과에 결합된 한외여과를 사용하여 동적 십자류 여과에서 얻은 여과물을 농축시키는 경우).

[0250] 실시예

[0251] 실시예 1

[0252] 공정 단계 1

[0253] 제1 현탁액을 제조하는 데 사용되는 출발 물질은 침전물 I+II+III 또는 침전물 A이다. 최적의 여과는 가장 짧은 시간량에 현탁액 중에 필터 조제를 유지하는 반면, IgG는 페이스트로부터 완전히 추출되고 여과물에 회수되

는 것으로 정의된다. 공정 1은 필터 조제가 없는 여과물을 생성한다. 그러나 불순물, 예를 들면, IgA, IgM 및 알부민은 여전히 존재한다. 이들은 공정 단계 2에서 옥탄산(OA)을 사용하여 상당 부분 제거된다.

[0254] 임펠러 믹서를 사용하여 출발 물질을 원하는 완충액(1:5)에 재현탁한 다음 탱크 1(현탁 탱크)로 옮긴다. 현탁액은 연속 추출(CE) 공정을 시작하기 위해 제1 가공 유닛으로 펌핑된다. 여과되지 않은 현탁액은 잔류물로서 현탁 탱크로 반송된다. 이러한 순환은 용해된 단백질이 세라믹 디스크를 가로질러 여과되는 동안 유지된다. IgG 및 각종 불순물이 포함된 여과물은 2차 탱크(여과물 탱크)에 수집된다. 제2 탱크의 한정된 용적에 도달하면 시스템 2 및 3(한외 여과 및 정용 여과 막으로 구성됨)을 사용하여 농축 공정이 시작된다. 막 관통 압력(TMP)은 시스템 2와 3의 결합된 투과물 유동이 시스템 1의 여과물 유동과 동일함을 보장하도록 조정되어, 추출 공정 동안 현탁 탱크의 일정한 용적을 보장한다. 여과물의 단백질 농도가 정의된 임계값 미만이면 여과 장치가 정지된다. 이 시점에서 $\geq 1:25$ 의 최종 희석비에 도달한다. 농축은 수집 탱크의 단백질 농도가 17 내지 20g/L에 도달할 때까지 계속된다. 이러한 최종 농축 동안 투과물은 폐기물로 유동한다.

[0255] 공정 단계 2

[0256] IgG를 포함하는 제1 농축물(여과물/농축물)은 OA 처리가 수행되는 탱크로 옮겨진다. 이는 출발 물질의 현탁에 사용된 것과 동일한 탱크(즉, 현탁 탱크)일 수 있지만, 탱크를 세척한 후에 사용할 수 있다. 농축된 단백질에 OA를 첨가한 후, OA의 우수한 분산 및 IgG의 우수한 추출을 가능하게 하기 위해 OA-현탁액을 시스템 1을 통해 재순환시킨다. OA-현탁액을 제1 가공 유닛으로 펌핑하여 연속 추출 공정을 시작한다. 여과되지 않은 현탁액은 잔류물로서 현탁 탱크로 반송된다. 이러한 순환은 IgG가 세라믹 디스크를 통해 여과되는 동안 유지된다. IgG를 포함하는 OA-여과물은 제2 탱크(여과물 탱크)에 수집된다. 제2 탱크의 한정된 용적에 도달하면, 시스템 2 및 3(한외 여과 및 정용 여과막으로 구성됨)을 사용하여 농축 공정이 시작된다. 막 관통 압력(TMP)은 시스템 2 및 3의 결합된 투과물 유동이 시스템 1의 여과물 유동과 동일함을 보장하도록 조정되어, 추출 공정 동안 현탁 탱크의 일정한 용적을 보장한다. 여과물 중 단백질 농도가 정의된 임계값 미만이면 여과 장치가 정지된다.

[0257] OA-여과물의 농축은 수집 탱크의 단백질 농도가 $20 \pm 2\text{g/L}$ 에 도달할 때까지 계속된다. 이러한 최종 농축 동안 투과물은 폐기물로 유동한다. 정용 여과는 최종 농축과 동시에 수행할 수 있다.

[0258] 공정 단계 1(단백질의 연속 추출 및 여과)은 연속 추출 시스템에 성공적으로 적용되었다. 개발 비용을 감소시키고 IgG 회수를 최대화하기 위해, 불순물을 침전시키는 동시에 IgG 손실 가능성을 줄이는 데 필요한 OA의 최소량을 먼저 실험실 실험을 통해 측정해야 한다. 이러한 이유로, 제1 농축물(단계 1)은 실시예 1에 설명된 바와 같이 준비된다. CE 시스템에서 얻어진 제1 농축물을 실험실 규모의 OA 실험을 위한 출발 물질로서 사용하였다.

[0259] 실시예 2

[0260] 불순물 제거 및 IgG 회수를 위한 옥탄산(OA)의 감소

[0261] 본 실시예는 공정 단계 1에 따라 생성된 여과된 IgG 조성물로부터 불순물을 제거하는 데 필요한 OA의 최소량을 측정하는 공정을 설명한다. 침전에 사용되는 OA의 최소량에 대한 두 가지 중요한 기준은 1) 높은 IgG 수율 달성 및 2) 높은 품질 속성(QAT)의 유지이다.

[0262] 실험 1

[0263] 본 실험을 위해, 콘 I+II+III 페이스트(240g의 Celpure C100을 함유하여 2kg)를, 제1 탱크에서 4°C에서 pH 4.3 내지 4.4의 완충액인 10mM 나트륨 아세테이트 및 10mM 나트륨 디하이드로젠 포스페이트 이수화물에 1:6의 제1 희석비로 현탁시켰다. 제1 탱크의 현탁액을 대략 4시간 동안 패들 교반기로 4°C에서 교반하였다. 실험을 시작하기 전에, 제1 여과 유닛(0.2 μm 막을 갖는 6개의 세라믹 필터 AD 152mm를 포함함; 필터 면적 = 0.216m^2)을 냉수(1°C)에 밤새 저장하였다. 실험의 시작시 물을 유닛으로부터 배수하고 현탁액을 유닛에 공급하였다. 그후 여과 공정을 시작하기 전에, 현탁액을 제1 탱크와 제1 공정 유닛 사이에서 몇 분 동안 재순환시켰다. 제1 공정 유닛의 세라믹 필터는 80Hz, 1,200rpm의 회전 속도 및 2.2bar의 공급물 압력에서 작동되었고, 오버-플로우(over-flow) 압력은 0.4 내지 0.8bar였다. 제1 공정 유닛으로부터의 투과물을 제2 탱크에 수집한 다음, UF/DF(한외 여과/정용 여과) 유닛으로 나타내는 제2 유닛에 공급하였다. UF/DF 유닛은 7.0nm 막, 필터 면적 0.5m²을 갖는 15개의 세라믹 디스크를 포함하는 Novoflow 동적 여과 장치이다. UF/DF 시스템의 투과물 유속은 125 내지 180mL/min이었다. 제1 여과물이 제2 탱크에 수집될 때 UF/DF 시스템이 개시되었다. UF/DF 시스템의 잔류물은 제2 탱크로 다시 유동되는 반면, 투과물은 제1 탱크로 다시 유동되었다. 제1 탱크로 다시 공급된 투과물의 용적은 페이스트와 혼합된 액체의 전체 용적(즉, 최종 희석 계수)에 기여하였다. 이 실험에서, 전체 재순환 용적

은 페이스트 kg당 $\geq 25\text{L}$ 였다(즉, 1:25의 최종 희석 계수).

이 실험의 제1 농축물은 전도도가 1.2mS/cm 이다. 단백질 용액의 전도도는 3.15M 나트륨 아세테이트(NaAc) 완충액을 사용하여 8.0mS/cm 로 조정되었다. LF 조정 후에는 더 이상 단백질 용액을 희석할 필요가 없었다.

표 3

표 3은 제 1 농축물의 결과를 보여준다.

출발 물질	콘 분획 I+II+III
침전물 I+II+III 양 (kg)	2
초기 용해비 (페이스트 + 완충액)	1+5
초기 용해비에서의 총 단백질 (g)	258.8
최종 용해비 (페이스트 + 완충액)	1 + 24
최종 용해비에서의 총 단백질	284.8
제 1 농축물의 총 중량 (kg)	19
총 공정 시간 (h)	6

실험 2 내지 7

필요한 최소 OA 양을 측정하기 위해, 1kg 의 (실험 1로부터의) 제1 농축물을 상이한 농도의 OA(0.1 , 0.2 , 0.25 , 0.30 , 0.35 내지 0.4g OA/g 단백질)로의 후속 처리에 사용했다.

제1 농축물의 전도도는 3.15M 나트륨 아세테이트 완충액을 사용하여 8.0mS/cm 로 조정하였다. Ultraturax(고속 혼합기, 속도 $7,000\text{rpm}$)를 사용하여 약 5분 동안 균질화하면서 OA 첨가를 수행하였다. 이어서, 용액을 Ultraturax로 추가로 10분 동안 균질화하고, 패들 교반기로 120분 동안 교반하였다. 그후 단백질 용액을 0.6g 의 인산칼슘(CaPO)과 함께 30분 동안 인큐베이션하고, 용액 kg당 18g 의 Celpure 100과 함께 15분 동안 인큐베이션했다. 여과는 CH9 필터 층을 사용하여 수행하였다. 후속 세척은 출발 용적의 19 내지 20%의 용해 완충액을 사용하여 수행하였다.

실험 8에 기술된 방법에 따라 추가의 정제를 수행하였다.

실험 8

CE 여과를 사용하여 얻은 IgG 수율 및 순도(실험 2 내지 7)를 CE 여과를 사용하지 않은 본 실험실 공정과 비교하기 위한 실험을 수행했다. 간단히 말해서, 본 실험실 공정은 침전물 I+II+III 또는 침전물 A의 OA 침전에 이어 CH 9 필터 시트에 대한 필터 조제의 존재하에 침출 여과를 명확히 하고 후속적인 한외/정용 여과 및 저 pH에서의 인큐베이션을 포함한다. 보다 더 자세하게는,

침전물의 동일한 샘플(즉, 실험 1의 출발 물질)을 본 실험에서 사용하였으며, 침전물의 일부는 완충액에 재현탁하였다. 재현탁 후 pH의 범위는 4.8 ± 0.2 pH 단위였다.

OA를, $\sim 0.12\text{mol/L}$ 로 재현탁된 침전물에 첨가하고 OA-현탁액을 교반하면서 추가로 인큐베이션하였다.

OA-현탁액을 후속적으로 pH 4.8에서 필터 조제(0.25kg Celpure C100/ m^2 필터 면적, Advanced Minerals)의 존재하에 Purafix CH 9 P(Filtrox) 필터 시트를 통해 정화 침출 여과에 적용했다.

용액을 20g/L 의 단백질 농도로 희석하고, pH를 폴리소르베이트 80(P80)의 존재 하에 대략 pH 4.0으로 조정하였다. 용액을 추가의 명확한 침출 여과에 적용하였다.

표 4

표 4: OA 침전 및 저 pH에서의 인큐베이션(공정 중간) 후의 총 단백질 및 IgG의 수율.
상이한 OA 농축물을 사용한 결과를 나타낸다.

공정	g OA/g 단백질	단백질 수율 (g/g 페이스트)	IgG (g/g 페이스트)
실험 8	0.70	0.047	0.043
실험 2	0.10	0.074	0.067
실험 3	0.20	0.070	0.064
실험 4	0.25	0.068	0.062
실험 5	0.30	0.067	0.061
실험 6	0.35	0.055	0.050
실험 7	0.40	0.053	0.048

[0276]

[0277]

총 단백질의 g당 OA의 양이 감소함에 따라(실험 2 내지 7), IgG의 수율은 실험 8의 공정에 따라 얻어진 수율에 비해 증가하였다. 따라서, 단백질 g당 더 적은 OA를 사용하는 실험 2 내지 7의 공정은 실험 8의 공정에 비해 더 큰 수율의 IgG를 제공한다.

[0278]

또한, 실험 2 내지 7의 공정의 불순물 프로파일은 실험 8을 사용하여 얻은 불순물 프로파일보다 우수하였다.

[0279]

불순물, 예를 들면, IgA, IgM 및 알부민의 양, 프로테아제 활성 및 항-보체 활성, 및 QAT 파라미터, 예를 들면, 서브클래스 분포, 분자 크기 분포에 대한 세부 정보가 표 5, 6, 7 및 8에 제공된다.

표 5

표 5: 저 pH 인큐베이션(공정 중간) 후 불순물로서 존재하는 IgA, IgM 및 알부민. 상이한 OA 농축물을 사용한 결과를 나타낸다.

공정	g OA/g 단백질	IgA (g/g 페이스트)	IgM (g/g 페이스트)	알부민 (g/g 페이스트)
실험 8	0.70	0.0040	0.0018	<0.0009
실험 2	0.10	0.0068	0.0032	0.0057
실험 3	0.20	0.0059	0.0025	0.0040
실험 4	0.25	0.0056	0.0015	0.0040
실험 5	0.30	0.0051	0.0011	<0.0009
실험 6	0.35	0.0051	0.0010	<0.0010
실험 7	0.40	0.0047	0.0010	<0.0009

[0280]

표 6

표 6: 저 pH 인큐베이션(공정 중간) 후의 단백질 분해 활성 및 ACA. 상이한 OA 농축물을 사용한 결과를 나타낸다.

공정	g OA/g 단백질	단백질 분해 활성 (nkat/g 단백질)	ACA (%)
실험 8	0.70	3	20
실험 2	0.10	454	15
실험 3	0.20	181	13
실험 4	0.25	34	8
실험 5	0.30	3	7
실험 6	0.35	3	4
실험 7	0.40	3	7

[0281]

표 7

표 7: 감마-글로불린 순도. 상이한 OA 농축물을 사용한 결과를 나타낸다.

공정	g OA/g 단백질	γ-글로불린 [%]	α/β-글로불린 [%]	알부민 [%]
실험 8	0.70	99.3	0.6	0.1
실험 2	0.10	90.3	2	7.7
실험 3	0.20	93.3	0.6	6.1
실험 4	0.25	91.7	0.7	7.6
실험 5	0.30	99.4	0.3	0.3
실험 6	0.35	99.5	0.3	0.2
실험 7	0.40	99.5	0.3	0.2

[0282]

표 8

표 8: 저 pH 인큐베이션(공정 중간) 후의 분자 크기 분포. 상이한 OA 농축물을 사용한 결과를 나타낸다.

공정	g OA/g 단백질	Agg (%)	Dim. (%)	Frag. (%)	Mono. (%)
실험 8	0.70	4.5	3.7	<0.1	91.7
실험 2	0.10	10.7	7.9	7.2	74.2
실험 3	0.20	4.4	7.2	4.4	84
실험 4	0.25	5	9.5	1.3	84.2
실험 5	0.30	2.8	7.4	<0.1	89.7
실험 6	0.35	2.3	7.5	<0.1	90.1
실험 7	0.40	2.1	6.7	<0.1	91.1

[0283]

[0284] 실험 1의 방법에 따라 수득된 농축물의 상이한 배치를 사용하고, 추가로 단백질 g당 감소된 OA 양(0.25, 0.30, 0.35 또는 0.40g의 OA) 및 음이온 교환 크로마토그래피를 포함하는 추가의 정제를 사용하여 추가의 실험을 수행하였다.

[0285] 다음 실시예에 대해 실험 1 내지 8과 동일한 절차를 사용하여 Zeta+ 여과 및 음이온 교환 크로마토그래피를 포함하도록 저 pH 인큐베이션 용액의 추가의 정제를 확장하였다.

- [0286] 간단히 말해서, 추가의 단계는 다음과 같다.
- [0287] 필터 조제를 중간 Ig-용액에 현탁하고, 후속 Cuno Z⁺ 90 LP 여과와 결합된 Purafix CH 9 P 필터 시트를 통과시킨다. 필터 조제의 존재하의 CH 9 여과는 병원체, 예를 들면, PRV 및 피코르나바이러스를 효율적으로 제거하는 것으로 나타난 침출 여과를 나타낸다. CH 9 필터에 이어지는 Z⁺는 불순물을 줄이기 위한 것이다.
- [0288] 단백질 용액은 최종적으로 Pall Ultipor N66 0.1 μ m 막 필터에 이어 Pall Ultipor VF FTK DV20 바이러스 필터 (약 20nm로 작은 바이러스를 포함하는 입자를 제거할 수 있는 필터)를 통해 중간 산성 pH에서 인라인 여과된다.
- [0289] 실험 9:
- [0290] 상기 참조(실험 1)
- [0291] 실험 10; 11; 12; 13(실험 2 내지 7 참조)
- [0292] 단백질 g당 0.25, 0.30, 0.35 및 0.40g의 OA 농도를 사용한 다음, Zeta⁺ 여과 및 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 추가로 정제했다.
- [0293] 실험 14
- [0294] 실험 8 참조
- [0295] 상기 실험들의 결과는 표 9 내지 11에 제공된다.

표 9

표 9: 제 1 농축물 실험 9의 결과

출발 물질	콘 분획 I+II+III
침전물 I+II+III 양 (kg)	2
초기 용해비 (페이스트 + 완충액)	1+5
초기 용해비에서의 총 단백질 (g)	253
최종 용해비 (페이스트 + 완충액)	1 + 24
최종 용해비에서의 총 단백질	267.4
제 1 농축물의 총 중량 (kg)	19
총 공정 시간 (h)	5

[0296]

표 10

표 10: 총 단백질 및 IgG의 수율: 실험 10 내지 14. 상이한 OA 농축물을 사용한 결과를 나타낸다.

공정	g OA/ g 단백질	단백질 수율 (g/g 페이스트)	IgG (g/g 페이스트)
실험 14	0.70	0.043	0.041
실험 10	0.25	0.067	0.064
실험 11	0.30	0.063	0.060
실험 12	0.35	0.061	0.058
실험 13	0.40	0.060	0.057

[0297]

[0298]

OA 수준이 감소함에 따라, 본 공정에 비해 IgG 수율이 증가한다(표 10). 중요한 불순물, 예를 들면, IgA, IgM 및 알부민, 프로테아제 활성 및 항보체 활성, 및 QAT 파라미터, 예를 들면, 서브클래스 분포 및 분자 크기 분포가 표 11, 12, 13 및 14에 제공된다.

표 11

표 11: 크로마토그래피 후 불순물로서의 IgA, IgM 및 알부민. 상이한 OA 농축물을 사용한 결과를 나타낸다.

공정	g OA/g 단백질	IgA (g/g 페이스트)	IgM (g/g 페이스트)	알부민 (g/g 페이스트)
실험 14	0.70	< 0.0007	< 0.0006	<0.0012
실험 10	0.10	< 0.0009	< 0.0008	<0.0015
실험 11	0.20	< 0.0007	< 0.0006	<0.0012
실험 12	0.25	< 0.0008	< 0.0007	<0.0014
실험 13	0.30	< 0.0007	< 0.0006	<0.0012

[0299]

표 12

표 12: 크로마토그래피 후 단백질 분해 활성 및 ACA. 상이한 OA 농축물을 사용한 결과를 나타낸다.

공정	g OA/g 단백질	단백질 분해 활성 (nkat/g 단백질)	ACA (%)
실험 14	0.70	5	8
실험 10	0.25	65	5
실험 11	0.30	3	6
실험 12	0.35	3	4
실험 13	0.40	2	5

[0300]

표 13

표 13: 크로마토그래피 후의 분자 크기 분포. 상이한 OA 농축물을 사용한 결과를 나타낸다.

공정	g OA/g 단백질	Agg (%)	Dim. (%)	Frag. (%)	Mono. (%)
실험 14	0.70	< 0.1	1.5	< 0.1	98.3
실험 10	0.25	< 0.1	1.2	< 0.1	98.6
실험 11	0.30	< 0.1	1.7	< 0.1	98.1
실험 12	0.35	< 0.1	1.7	< 0.1	98.1
실험 13	0.40	< 0.1	1.5	< 0.1	98.3

[0301]

표 14

표 14: 크로마토그래피 후의 서브클래스 분포. 상이한 OA 농축물을 사용한 결과를 나타낸다.

공정	g OA/g 단백질	IgG1(%)	IgG2 (%)	IgG3 (%)	IgG 4 (%)
실험 14	0.70	74.8	22.8	0.6	1.7
실험 10	0.25	70.1	23.9	2.4	3.2
실험 11	0.30	73.2	23.2	1.2	2.5
실험 12	0.35	74.1	23.1	0.7	2.1
실험 13	0.40	73.7	23.7	0.6	2.1

[0302]

[0303] 실시예 3: 정제된 생성물 중 프로테아제 수준에 대한 온도의 영향

[0304]

침전물을 실시예 1에 기재된 바와 같이 공정 1 및 공정 2에 따른 정제에 적용했다. 간략하게는, 출발 물질(침전물 I+II+III 또는 침전물 A)을 임펠러 믹서를 사용하여 18 내지 22℃의 온도에서 재현탁 완충액(1:5)에 재현탁한 다음, 현탁 탱크로 옮긴다.

[0305]

현탁액을 제1 가공 유닛으로 펌핑하여 연속 추출 공정을 시작한다. 여과되지 않은 현탁액은 잔류물로서 현탁 탱크로 반송된다. 이러한 순환은 용해된 단백질이 세라믹 디스크를 통해 여과되는 동안 유지된다. IgG를 함유하는 여과물은 제2 탱크(여과물 탱크)에 수집된다. 제2 탱크(여과물 탱크)의 한정된 용적에 도달하면, 한외 여과 및 정용 여과 막(시스템 2 및 3)을 사용하여 농축 공정이 시작된다. 막 관통 압력(TMP)은 시스템 2와 3의 결합된 투과 유동이 시스템 1의 여과물 유동보다 약간 높도록 조정되어, 추출 공정 동안 현탁 탱크의 일정한 용적을 보장한다. 투과물은 백플러시 탱크를 충전하기 위해서도 사용된다. 여과물 중 단백질 농도가 정의된 임계값 미만이면 여과 장치가 정지된다.

[0306]

제1 농축물(여과물/농축물)은 총 단백질 농도가 약 15 내지 18g/L이 되도록 조정된다. 필요에 따라 상기 농축물의 전도도를 (8 ± 1 mS/cm)로 조정하고, pH는 약 4.75 내지 약 4.85이 된다.

[0307]

조정된 농축물은 옥탄산(OA)으로의 침전을 위해 탱크로 옮겨진다. 이는 출발 물질의 현탁액에 사용된 것과 동일한 탱크(즉, 현탁 탱크)일 수 있지만, 탱크를 세척한 후에 사용할 수 있다.

[0308]

OA 첨가 및 인큐베이션은 일련의 실험에서 상이한 온도들에서, 예를 들면, 22℃, 27℃, 32℃ 및 그 이상에서 수행되었다. 프로테아제 활성의 감소에 대한 온도 효과를 연구하기 위해 OA 첨가 기간, 혼합 강도 및 기타 모든 파라미터를 일정하게 유지했다.

[0309]

OA 양을 추가한 후 OA-현탁액은 OA의 분산 및 IgG의 추출을 가능하게 하기 위해 시스템(1)을 통해 재순환된다.

[0310]

OA-현탁액을 제1 가공 유닛으로 펌핑하여 연속 추출-여과 공정을 시작한다. 여과되지 않은 현탁액은 잔류물로서 현탁 탱크로 반송된다. 이러한 순환은 IgG 및 기타 글로불린이 세라믹 디스크를 통해 여과되는 동안 유지된다. OA-여과물은 제2 탱크에 수집된다. 제2 탱크(여과물 탱크)의 한정된 용적에 도달하면, 시스템 2 및 3을 사용하여 농축 공정이 시작된다. 시스템 2 및 3이 완충액으로 충전되면 농축 단계를 즉시 시작할 수도 있다.

[0311]

막 관통 압력(TMP)은 시스템 2와 3의 결합된 투과 유동이 시스템 1의 여과물 유동보다 약간 높도록 조정되어, 추출 공정 동안 현탁 탱크의 일정한 용적을 보장한다.

[0312]

시스템 2와 3에서 결합된 투과물의 유속은 시스템 1의 여과물 유동보다 약간 높기 때문에, 상기 투과물을 백플러시 완충액으로서 사용하기 용이하게 한다.

[0313] 여과물 중 단백질 농도가 정의된 임계값 미만이면 여과 장치가 정지된다.

[0314] OA-여과물의 농도는 수집 탱크의 단백질 농도가 $20 \pm 2\text{g/L}$ 에 도달할 때까지 계속된다. 이러한 최종 농축 동안 투과물은 폐기물로 유동한다. 최종 농축 동안 투석 여과를 동시에 수행할 수 있다.

[0315] 최종 농축물의 농도 및 프로테아제 활성 정도는 표준 방법을 사용하여 측정한다. 간략하게는, 세린 프로테아제 활성은 발색 기질 Ile-Pro-Arg-pNA(S-2288)를 절단하는 단백질 농축물의 능력에 의해 측정된다. 이러한 반응 동안 p-니트로아닐린(pNA)이 방출되며, 이는 405nm에서 광도계로 측정되었다. 세린 프로테아제 활성은 37°C에서 pH가 8.4인 조건에서 측정되었다. 칼리크레인(Kallikrein)-유사 활성은 발색 기질 H-D-Pro-Phe-Arg-pNA(S-2302)의 절단에 의해 측정되었다. 이러한 반응 동안 p-니트로아닐린(pNA)이 방출되며, 이는 405nm에서 광도계에 의해 키네틱 모드로 측정된다.

[0316] IgA, IgM 및 IgG 서브클래스의 정량적 평가는 표준 기술을 사용하여 측정되었다.

[0317] 결과

[0318] 하기 표 15 및 17에 요약된 바와 같이, 결과는 22°C 초과, 바람직하게는 25 내지 37°C, 바람직하게는 25 내지 32°C 또는 27 내지 32°C의 범위, 가장 바람직하게는 약 32°C의 온도에서 OA-현탁액의 인큐베이션이 최종 단백질 제제에 존재하는 프로테아제의 양을 감소시킴을 나타낸다. 표 16 및 18은 시험된 모든 온도에서 Ig 및 서브클래스의 높은 수준의 회수를 확인한다.

표 15

표 15: OA 침전, 여과 및 UF/DF 후에 측정된 프로테아제 불순물에 대한 온도의 영향. 출발 물질 침전물 A.

옥탄산 인큐베이션 온도 (°C)	예비-칼리크레인 활성제 (PA) (nkat/L)	칼리크레인 (KK) (ng/mL)
27	476	255
37	105	75

[0319]

표 16

표 16: 출발 물질 침전물 A

		옥탄산 인큐베이션 온도 (°C)			
		<u>22°C</u>	<u>27°C</u>	<u>32°C</u>	<u>37°C</u>
<u>IgA (ELISA) mg/L</u>		747.46	1015.25	739.48	854
<u>IgA (Nephelometric) mg/L</u>		700	700	740	1100
<u>IgM (ELISA) mg/L</u>		1031	1308.74	868.1	1244.8
<u>IgM (Nephelometric) mg/L</u>		1010	1130	1043.8	1153
<u>IgG 서브클래스 (%)</u>	<u>IgG1</u>	69.3	62.7	64.9	62.6
	<u>IgG2</u>	25.3	30.4	28.12	29
	<u>IgG3</u>	1	0.9	1.44	2.15
	<u>IgG4</u>	4.4	6	5.56	6.25

[0320]

표 17

표 17: OA 침전, 여과 및 UF/DF 후에 계측된 프로테아제 불순물에 대한 온도의 영향. 출발 물질 분획 I+II+III.

옥탄산 인큐베이션 온도 (°C)	예비-칼리크레인 활성제 (PA) (nkat/L)	칼리크레인 (KK) (ng/mL)
20	873	276
32	65	< 3.9
37	56	< 3.9

[0321]

표 18

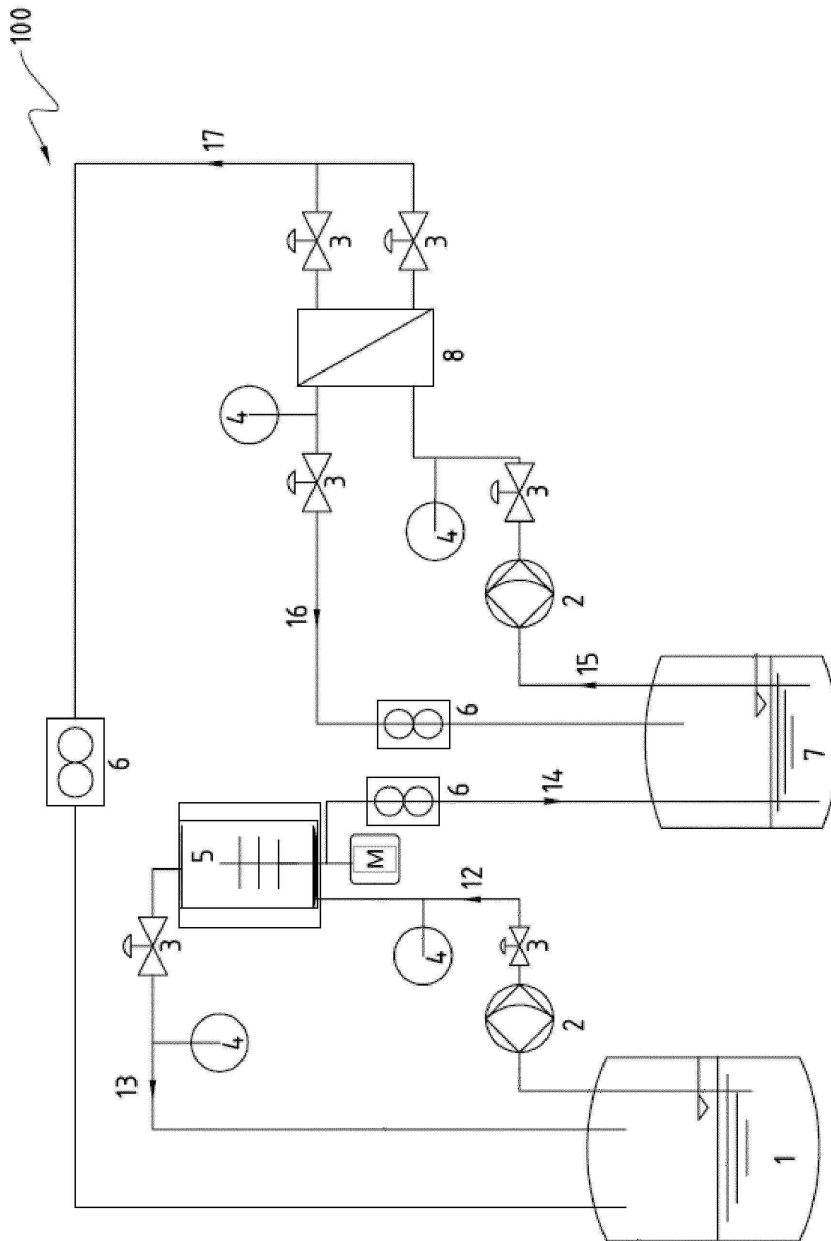
표 18: 출발 물질 분획 I+II+III

		옥탄산 인큐베이션 온도 (°C)				
		20°C	22°C	27°C	32°C	37°C
IgA (ELISA) mg/L		1490	1225.7	1044	1072	1054
IgA (Nephelometric) mg/L		1400	1200	1150	1080	966
IgM (ELISA) mg/L		882.45	737.26	660	649	797
IgM (Nephelometric) mg/L		746	651	290	628.8	657
IgG 서브클래스 (%)	IgG1	69.1	69.9	70.7	71.52	74.8
	IgG2	22.1	22.2	21.45	22.5	19.9
	IgG3	3.5	3.2	2.7	1.54	1.3
	IgG4	5.3	4.8	5.2	4.34	3.97

[0322]

[0323] 본원에 개시되고 정의된 본 발명은 텍스트 또는 도면으로부터 언급되거나 명백한 개별 특징들 중 둘 이상의 모든 대안적인 조합으로 확장된다는 것을 이해할 것이다. 이들 상이한 조합 모두는 본 발명의 다양한 대안적 측면을 구성한다.

도면
도면1



도면2

공정 단계 1

공정 단계 2

