



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월11일

(11) 등록번호 10-2794486

(24) 등록일자 2025년04월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01D 61/18 (2006.01) *B01D 61/20* (2006.01)
B01D 61/22 (2006.01) *C07K 1/14* (2006.01)
C12N 15/10 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
B01D 61/18 (2013.01)
B01D 61/20 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7022653
- (22) 출원일자(국제) 2016년12월19일
 심사청구일자 2021년12월06일
- (85) 번역문제출일자 2018년08월06일
- (65) 공개번호 10-2018-0100411
- (43) 공개일자 2018년09월10일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2016/053981
- (87) 국제공개번호 WO 2017/118836
 국제공개일자 2017년07월13일
- (30) 우선권주장
 1600290.9 2016년01월07일 영국(GB)
- (56) 선행기술조사문헌
 WO2015164511 A1*
 US04492531 A*
 WO2015133972 A1
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 후지필름 다이오신쓰 바이오테크놀로지스 유케 리미티드
 영국 티에스23 1엘에이치 빌링햄 벨라시스 애비뉴
- (72) 발명자
 헤이즈 찰스
 영국 티에스23 1엘에이치 빌링햄 벨라시스 애비뉴
 너지 티보어
 영국 티에스23 1엘에이치 빌링햄 벨라시스 애비뉴
- (74) 대리인
 리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 16 항

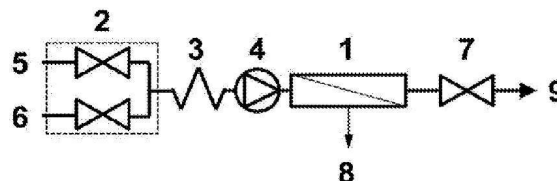
심사관 : 이소진

(54) 발명의 명칭 생체분자의 용액을 처리하는 방법

(57) 요약

생체분자-함유 액체를 인-라인으로 액체 교환하기 위한 장치가 제공된다. 상기 장치는 다수의 주입 유동-컨트롤러(2)를 포함하는 적어도 2개의 액체를 혼합하는 수단(3)을 포함하고, 상기 혼합 수단은 또한 단일-통과 모드로 구성된 접선방향 유동 여과 장치(1)와 유체 연결되는 출구를 포함한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

B01D 61/22 (2013.01)

C07K 1/145 (2013.01)

C12N 15/1017 (2013.01)

B01D 2313/18 (2013.01)

B01D 2313/19 (2013.01)

B01D 2313/243 (2013.01)

B01D 2315/16 (2013.01)

B01D 2319/022 (2013.01)

B01D 2321/2066 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

생체분자 (biomolecule)-함유 액체를 인-라인으로 액체 교환 (in-line liquid exchanging)하기 위한 장치로서, 적어도 2개의 액체를 혼합하기 위한 둘 이상의 가변 유동 주입 밸브 (variable flow inlet valves)를 더 포함하는 다수의 주입 유동-컨트롤러 (inlet flow-controller)를 포함하는 혼합 수단을 포함하고,

상기 가변 유동 주입 밸브는, 상기 액체가 유동할 수 있는 제1의, 상대적으로 낮은 유량을 달성하거나 또는 유동이 방지되는 위치와, 적어도 제2의, 더 높은 유량을 달성하는 위치 사이에서 사이클되도록 제어되며,

상기 혼합 수단은 또한 단일-통과 모드 (single-pass mode)로 구성된 접선방향 유동 여과 장치 (tangential flow filtration device)와 유체 연결되는 출구 (outlet)를 포함하는 것인 장치.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 접선방향 유동 여과 장치로부터의 잔류물 (retentate)은 적어도 2개의 액체를 혼합하기 위한 제2 혼합 수단과 유체 연결되고 및 상기 제2 혼합 수단은 단일-통과 모드로 구성된 제2 접선방향 유동 여과 장치와 유체 연결되는 출구를 포함하는 것인 장치.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 가변 유동 주입 밸브는 간헐식 유동 밸브 (intermittent flow valves)인 것인 장치.

청구항 4

생체분자-함유 액체를 액체 교환하기 위한 장치로서,

a) 다수의 주입 유동-컨트롤러로서:

- i) 생체분자를 포함하는 제1 액체 매질 (medium)을 위한 제1 주입구;
- ii) 제2 액체 매질을 위한 적어도 제2 주입구;
- iii) 접선방향 유동 여과 장치와 유체 연결되는 출구를 포함하는 것인 다수의 주입 유동-컨트롤러;

b) 상기 접선방향 유동 여과 장치 및 상기 유동-컨트롤러를 통해 액체의 유동을 부여하는 수단; 및

c) 상기 액체가 유동할 수 있는 제1의, 상대적으로 낮은 유량을 달성하거나 또는 유동이 방지되는 위치와, 적어도 제2의, 더 높은 유량을 달성하는 위치 사이에서 사이클되도록, 상기 접선방향 유동 여과 장치를 통한 유동을 제어하는 수단;을 포함하는 장치.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 유동을 부여하는 수단은 상기 다수의 주입 유동-컨트롤러의 출구와 상기 접선방향 유동 여과 장치 사이에 위치한 펌프 (pump)를 포함하는 것인 장치.

청구항 6

청구항 4 또는 5에 있어서, 상기 접선방향 유동 여과 장치의 다운스트림에 억제기 (restrictor)를 더 포함하는 것인 장치.

청구항 7

청구항 4에 있어서,

i) 상기 접선방향 유동 여과 장치로부터의 잔류물과 유체 연결되는 제1 주입구;

ii) 제3 액체 매질을 위한 제2 주입구; 및

iii) 제2 접선방향 유동 여과 장치와 유체 연결되는 출구를 포함하는 제2 다수의 주입 유동-컨트롤러를 더 포함하는 것인 장치.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 제2 다수의 주입 유동-컨트롤러는 역제기로서 기능하는 것인 장치.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 제2 다수의 주입 유동-컨트롤러는 둘 이상의 가변 유동 주입 밸브를 더 포함하는 것인 장치.

청구항 10

생체분자를 제조하는 방법으로서, 상기 생체분자를 포함하는 액체 매질을 청구항 1에 따른 장치를 사용하여 액체 교환함으로써 처리하는 (processing) 단계를 포함하는 방법.

청구항 11

생체 분자를 제조하는 방법으로서, 상기 생체분자를 포함하는 액체 매질을 청구항 4에 따른 장치를 사용하여 액체 교환함으로써 처리하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 12

청구항 10 또는 11에 있어서, 적어도 10회의 사이클이 사용되는 것인 방법.

청구항 13

청구항 10 또는 11에 있어서, 상기 사이클 주파수 (cycle frequency)는 100Hz 미만인 것인 방법.

청구항 14

청구항 10 또는 11에 있어서, 상기 사이클 주파수는 0.05 내지 0.5Hz인 것인 방법.

청구항 15

청구항 10 또는 11에 있어서, 상기 처리하는 단계는 버퍼 교환을 포함하는 것인 방법.

청구항 16

청구항 10 또는 11에 따른 방법을 포함하는 생체분자를 생산하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생체분자 (biomolecules), 구체적으로 재조합 폴리펩티드 및 핵산의 용액을 처리하는 방법 및 상기 방법을 수행하기 위한 장치에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 많은 생체분자들, 특히 재조합 폴리펩티드 및 핵산, 예컨대 플라스미드 (pDNA)는 구체적으로 치료 용도를 위해 많은 주목을 받아왔다. 이러한 생체분자는 일반적으로 원하는 생체분자를 발현하도록 조작되어진 재조합 숙주 세포를 배양하여 생산된다. 상기 생체분자는 그 다음에 상기 배양 배지로부터 통상적으로 원심분리, 여과, 및 크로마토그래피 정제를 포함하는 방법에 의해 회수된다. 상기 생체분자의 회수는 일반적으로 상기 생체분자가 용해 또는 현탁되어 있는 액체 배지의 특성 및 성질의 조정을 포함한다. 이러한 조정은 불순물로부터 생체분자의 정제 및/또는, 상기 생체분자가 예를 들어 사용되거나 또는 사용준비된 제제로 최종 전환될 때까지 보관될 수 있는 매질로 상기 생체분자의 제제화를 용이하게 할 수 있다. 이러한 조정은 일반적으로 하나의 액체 매질 (medium), 일반적으로 버퍼를 다른 것으로 대체하는 것을 포함하고, 또한 어느 경우에도 잠재적으로 상기 생체

분자의 농도 변화를 수반하는 부피의 변화를 포함하거나 또는 포함하지 않을 수 있다.

[0003] 기존의 액체 교환은 상기 생체분자를 포함하는 초기 매질을 적절한-크기의 분자량 커트-오프 (cut-off) 다공성 필터를 구비한 접선방향 유동 여과 장치 (tangential flow filtration device)를 통과시키는 것을 포함하고, 상기 커트-오프는 상기 생체분자가 잔류물 (retentate) 중에 유지되지만, 상기 매질 중의 더 작은 성분들의 부분, 예를 들어 버퍼, 용매, 및 상기 커트-오프보다 작은 분자량을 갖는 용질은 상기 필터를 통해 투과물 (permeate)로 전달된다. 상기 잔류물은 저장 탱크 (holding tank)로 재순환되고, 여기서 상기 잔류물은 대체물과 혼합되고, 상기 재순환 과정은 상기 생체분자를 포함하는 매질이 원하는 조성을 가질 때까지 계속된다. 이러한 과정의 단점은 상기 생체분자의 제조 스케일이 커지면, 필요로 하는 액체의 부피, 보관 규모 및 혼합 탱크가 증가되어 설비의 크기 및/또는 비용이 과중해진다는 것이다. 대안으로서, 투석이 사용될 수 있고, 여기서 요구되는 분자량 커트 오프를 갖는 다공성 백 (porous bag)이 대량의 대체 액체 매질 중에 보관되므로, 이는 상기와 유사한 단점을 겪는다.

[0004] 기존의 과정의 부가의 단점은 상기 과정이 상대적으로 느려서, 상기 생체분자의 처리과정이 느려진다는 것이다. 또한, 상기 공정이 진행됨에 따라 상기 생체분자가 펌프 헤드 (pump head)를 반복적으로 통과하고, 광범위한 용질 및 버퍼 농도에 걸쳐 전단력을 경험함으로써 생체분자의 불안정성 및/또는 불용성 예컨대 응집 및 변성이 발생할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 제1 양상에 따르면, 생체분자-함유 액체를 인-라인으로 액체 교환 (in-line liquid exchanging)하기 위한 장치가 제공되고, 상기 장치는 적어도 2개의 액체를 혼합하기 위한 둘 이상의 가변 유동 주입 밸브 (variable flow inlet valves)를 더 포함하는 다수의 주입 유동-컨트롤러 (inlet flow-controller)를 포함하는 혼합 수단을 포함하고, 상기 유동-컨트롤러는 또한 단일-통과 모드로 구성된 접선방향 유동 여과 장치 (TFF 장치)와 유체 연결되는 출구를 포함한다.

[0006] 상기 혼합 수단은 바람직하게 상기 TFF 장치에 직접 부착되고, 즉 중간 처리 단계가 그 사이에 포함되지 않는다.

[0007] 본 발명의 제1 양상의 특정 구체예에서, 상기 TFF 장치로부터의 잔류물은 적어도 2개의 액체들을 혼합하는 제2 혼합 수단과 유체 연결되어 있다. 다른 구체예에서, 상기 다수의-주입 유동 컨트롤러 중 다수의 주입구들 중 하나는 TFF 장치로부터의 잔류물과 유체 연결되어 있고, 상기 TFF 장치는 선택적으로 적어도 2개의 액체들을 혼합하기 위한 제2 혼합 수단으로부터의 출구에 의해 공급된다. 다른 구체예에서, 상기 제2 혼합 수단은 제1 혼합 수단과 다른 타입일 수 있거나, 또는 동일한 타입일 수 있다.

[0008] 본 발명의 제1 양상의 부가의 구체예에서, 상기 제2 혼합 수단은 제2 TFF 장치와 유체 연결되는 출구를 포함한다. 상기 제2 TFF 장치는 제1 TFF 장치와 다른 타입을 가질 수 있지만, 그러나 다수의 구체예에서, 상기 제1 및 제2 TFF 장치는 동일한 타입을 갖는다.

[0009] 본 발명의 제1 양상의 더 부가의 구체예에서, 상기 제2 TFF 장치로부터의 잔류물은 적어도 2개의 액체들을 혼합하는 제3 혼합 수단과 유체 연결되어 있다. 상기 제3 혼합 수단은 상기 제1 및 제2 혼합 수단과 다른 타입을 가질 수 있거나, 또는 이중 어느 하나 또는 둘 다와 동일할 수 있다. 상기 제3 혼합 수단은 제3 TFF 장치와 유체 연결되는 출구를 포함할 수 있다. 상기 제3 TFF 장치는 상기 제1 및 제2 TFF 장치와 다른 타입을 가질 수 있지만, 그러나 다수의 구체예에서, 상기 제1, 제2 및 제3 TFF 장치는 동일한 타입을 갖는다.

[0010] 선택적으로 TFF 장치와 유체 연결되는 출구를 가지며, 적어도 2개의 액체들을 위한 추가의 혼합 수단이 또한 포함될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0011] 다수의 구체예에서, 사용된 각 TFF 장치는 단일 통과 모드로 구성되어 있고, 상기 잔류물의 어느 것도 재순환되지 않는다.

[0012] 특정 구체예에서, 상기 장치는 잔류물을 재순환 접선방향 유동 여과 단계로 처리하는 수단을 포함한다. 이러한 수단은 재순환 모드로 작동하도록 구성된 저장 용기 (holding vessel) 및 개별의 TFF 장치를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 재순환 모드로 작동하도록 구성된 개별의 TFF 장치와 둘 이상의 저장 용기가 사용된다. 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 장치에 사용된 TFF 장치들 중 하나 이상이 단일 통과 모드에 대한 대안으로서 재순

환 접선방향 유동 여과 모드로 작동하도록 하는 수단이 제공된다. 이러한 재순환 접선방향 유동 여과 단계는 생산되는 제품이 cGMP와 같은 엄격한 규제 요건으로 처리될 때 유익할 수 있는 불연속 배치 (discrete batch)를 정의하는데 유익할 수 있다.

- [0013] 둘 이상의 TFF 장치가 사용되는 경우, 각 TFF 장치는 바람직하게 연속으로 위치한다.
- [0014] 다수의 주입 유동-컨트롤러를 포함하는 혼합 수단은 바람직하게 둘 이상의 가변 유동, 바람직하게 간헐식 유동 (intermittent flow) 주입 밸브를 포함하고, 이는 상기 액체의 유동을 상기 유동-컨트롤러를 통해 조절한다.
- [0015] 사용될 수 있는 제2 및 추가의 혼합 수단은, 2개의 튜브들 사이에서 간단한 합류를 포함하는, 인-라인 믹서를 포함하고, 상기 튜브는 동일하거나 또는 상이한 직경을 가질 수 있다. 상기 혼합 수단은 배플 (baffles) 또는 와동 (vortex) 믹서를 포함할 수 있다. 각 튜브는 유동을 부여하는 수단, 예컨대 펌프에 고정될 수 있다. 상기 유동을 부여하는 수단은 상기 튜브들의 치수와 결합하여 작동가능할 수 있어서 상기 적어도 2개의 액체들의 상이한 유량이 획득될 수 있다. 다수의 구체예에서, 상기 제2 및 후속하는 혼합 수단은 다수의 주입 유동-컨트롤러를 포함하고, 바람직하게 둘 이상의 가변 유동, 바람직하게 간헐식 유동 주입 밸브를 포함하고, 이는 상기 액체의 유동을 상기 유동-컨트롤러를 통해 조절한다.
- [0016] 본 발명의 제2 양상에 따르면, 생체분자-함유 액체를 액체 교환하기 위한 장치가 제공되고, 상기 장치는:
- [0017] a) 다수의 주입 유동-컨트롤러로서:
- [0018] i) 생체분자를 포함하는 제1 액체 매질을 위한 제1 주입구;
- [0019] ii) 제2 액체 매질을 위한 적어도 제2 주입구;
- [0020] iii) 접선방향 유동 여과 장치 (TFF 장치)와 유체 연결되는 출구를 포함하는 것인 다수의 주입 유동-컨트롤러; 및
- [0021] b) 상기 유동-컨트롤러 및 상기 접선방향 유동 여과 장치를 통해 액체의 유동을 부여하는 수단을 포함한다.
- [0022] 상기 액체의 유동을 부여하는 수단은 당 분야에 잘 알려져 있고, 상기 액체에 기체 압력, 특히 비활성 기체, 예컨대 질소 또는 헬륨을 인가하는 것을 포함한다. 바람직하게 상기 액체의 유동을 부여하는 수단은 펌프이다. 사용될 수 있는 펌프는 연동 (peristaltic), 격막 (diaphragm), 로브 (lobe) 및 원심 (centrifugal) 펌프를 포함한다. 일회용 (disposable) 및 재사용가능한 (re-usable) 펌프 디자인 모두 사용될 수 있다. 펌프가 사용되는 경우에, 다수의 바람직한 구체예에서, 상기 펌프는 다수의 주입 유동-컨트롤러의 출구와 상기 TFF 장치 사이에 위치한다. 둘 이상의 펌프가 사용될 수 있고, 동일하거나 또는 상이한 유량으로 작동할 수 있다. 특정 구체예에서 각 펌프에 의해 획득된 동일한 유량은 상기 펌프 헤드를 물리적으로 연결하고 동일한 튜브 구멍 크기를 사용하거나 또는 상기 펌프들을 외부 제어를 통해 동일한 유량으로 전달하도록 하는 동기화 (synchronising)를 통해 획득될 수 있다.
- [0023] 상기 장치에서 사용될 수 있는 TFF 장치는 당 분야에 잘 알려져 있고 (예를 들어 Filtration in the Biopharmaceutical Industry, ed. T.H. Meltzer and M.W. Jornitz, 1998 참조) 및 평면 시트 (flat sheet), 중공 섬유 (hollow fibre) 및 환상 감김 (annular wound) 장치를 포함한다. 바람직하게, 상기 TFF 장치는 중공-섬유 여과 장치이다.
- [0024] 상기 TFF 장치는 상기 생체분자의 특성에 적합한 커트-오프를 가져서, 상기 생체분자가 배리어 (barrier)를 통과하지 못하고, 반면에 상기 액체 중의 더 작은 성분들은 상기 배리어를 통과하여 투과물로 갈 수 있도록 선택된다.
- [0025] 상기 다수의 주입 유동-컨트롤러는 둘 이상의 가변 유동, 바람직하게 간헐식 유동 주입 밸브를 포함하고, 이는 상기 액체의 유동을 상기 유동-컨트롤러를 통해 조절한다. 상기 다수의 주입 유동-컨트롤러는 적어도 2개의 주입 밸브를 포함하고, 다수의 예에서 최대 8, 예컨대 3, 4, 5, 6 또는 7개의 주입 밸브를 포함한다. 상기 주입 밸브들은 각각 동일한 치수를 가질 수 있거나, 또는 상기 주입 밸브들 중 하나 이상은 다른 치수를 가질 수 있다. 특정 바람직한 구체예에서, 각 주입 밸브로부터 상기 유동-컨트롤러의 출구까지 측정된 부피는 각 주입구에 대해 동일하고, 각 주입 밸브로부터 상기 유동-컨트롤러의 출구까지 측정된 부피 및 통로 길이 모두가 각 주입구에 대해 동일한 것이 매우 바람직하다.
- [0026] 본 발명에 사용된 유동-컨트롤러는 또한 적어도 하나의 출구를 포함하고, 둘 이상의 출구들이 존재할 수 있고, 단일 출구를 사용하는 것이 바람직하다.

- [0027] 상기 가변 유동 밸브는 상기 액체가 유동할 수 있는 제1의, 상대적으로 낮은 유량과 적어도 제2의, 더 높은 유량 사이에서 유동을 조절할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 상기 가변 유동 밸브는 간헐식 유동 밸브이고, 이는 제1 위치에서 유동을 방지하지만, 적어도 제2 위치에서 유동을 허용한다. 가장 바람직하게, 모든 밸브는 간헐식 유동 밸브이다.
- [0028] 바람직하게, 상기 가변 유동 밸브는, 상기 다수의 주입 유동-컨트롤러를 통해 흐르는 주입 액체의 요구되는 상대 정량을 달성하기 위해 상기 밸브의 개방 (opening) 및 폐쇄 (closing)를 조절하는, 프로그램가능한 제어 유닛 (programmable control unit)에 의해 제어되는 것이 가장 바람직하다. 이는, 선정된 (pre-determined) 시간 또는 사이클 율로 사이클링을 통해, 상기 유동-컨트롤러에서 주입 밸브를 통해 및 원하는 조성을 생성하기 위한 사이클 시간의 요구되는 비율에 따라 상기 밸브의 개방 또는 폐쇄를 조절하여 달성된다. 상기 사이클 율은 일정하거나 또는 가변될 수 있다. 가장 바람직하게, 간헐식 유동 주입 밸브가 사용되고, 작동 시에 단 하나의 밸브만이 임의의 주어진 시간에 개방되도록 제어된다. 다수의 구체예에서, 상기 다수의 주입 유동-컨트롤러의 사이클 율은 일정하게 유지되고 및 상기 주입 액체의 원하는 상대 정량도 일정하게 유지된다.
- [0029] 다수의 구체예에서, 다수의 사이클이 사용된다. 사용된 사이클의 수는 공정 기간, 농축되는 액체의 부피, 유량, 상기 장치의 최대 작동 압력, 상기 TFF 장치의 길이 및/또는 면적 및 상기 TFF 장치에 대한 분자량 컷트-오프와 같은 수많은 요인에 따라 좌우될 것이다. 특정 구체예에서, 적어도 10회 사이클, 예컨대 적어도 50, 100, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 5000, 7500, 10000 또는 초과 사이클이 사용될 수 있다.
- [0030] 사이클 주파수 (cycle frequencies)의 범위가 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 다수의 예에서, 상기 주파수는 100Hz 미만, 통상적으로 50Hz 미만, 일반적으로 10Hz 미만, 및 바람직하게 5 Hz 미만이다. 특정 바람직한 구체예에서, 상기 주파수는 2Hz 이하, 가장 바람직하게 1Hz 이하, 예컨대 0.05 내지 0.5Hz이다.
- [0031] TFF 장치의 작동 중에, 생체분자를 포함하는 겔 층 (gel layer)이 상기 필터 표면의 잔류물 층에 형성되는 것이 일반적이다. 상기 겔 층은 통상적으로 상기 TFF 장치로부터 상기 작업 마지막에 플러싱으로 제거되고, 이러한 플러싱 단계 (flush step)는 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 상기 작업 마지막에 플러싱 단계는 생체분자의 농도에서 상당한 상승 (spike)을 유도할 수 있으므로, 기대된 생체분자 농도보다 더 높게 생성될 수 있다. 본 발명의 특정 구체예에서, 플러싱 단계는 상기 공정을 통해 간격을 두고 포함된다. 플러싱 단계는 상기 액체가 상기 TFF 장치를 더 낮은 압력에서 통과하는 시간을 연장시키는 것을 포함할 수 있고, 및 바람직하게 상기 플러싱 기간 동안, 모든 유동은 투과물 라인에서 밸브를 폐쇄하는 것과 같이 잔류물로 통과되도록 투과물 유동의 방지를 추가로 포함할 수 있다. 상기 플러싱 단계의 기간은 종종 실질적으로 모든 겔 층을 상기 잔류물로의 전달을 달성하도록 선택된다. 상기 작업 마지막에 플러싱 단계는 최대 5의 TFF 장치 부피를 통과시키는 것을 포함할 수 있다. 상기 공정 중에 간격을 두고 포함되는 플러싱 단계들은 더 적은 TFF 장치 부피, 예컨대 0.25, 0.5, 0.75 또는 1 TFF 장치 부피를 통과시키는 것을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 플러싱 단계는 사이클링 작업 후에 1 TFF 장치 부피, 2 TFF 장치 부피, 5 TFF 장치 부피, 10 TFF 장치 부피 또는 초과를 위해 사용되고, 그 후 사이클링 작업으로 되돌아간다. 1회 이상의 플러싱 단계가 상기 농축 공정 중에 간격을 두고 포함되는 다수의 구체예에서, 상기 플러싱 단계는 예컨대 투과물 라인에서, 바람직하게 상기 플러싱 기간 동안 밸브의 폐쇄에 의해 투과물 유동의 방지를 수반한다.
- [0032] 상기 장치는 일반적으로 상기 TFF 장치의 다운스트림에 유동-억제 (flow-restricting) 오리피스 (orifice) 또는 핀치 (pinch) 밸브와 같은 억제기 (restrictor)를 포함한다. 상기 억제기는 유동을 제한하고 그러므로 역-압력 (back-pressure)을 제공하여 상기 TFF 장치의 분자량 컷트-오프보다 작은 분자량을 갖는 액체 및 용질이 상기 멤브레인을 통과하여 투과물로 가도록 구성되어 있다. 바람직하게, 상기 억제기는 핀치 밸브 (pinch valve)를 포함하고, 이는 본 발명의 일 양상에 따라 제어가능할 수 있다. 특정 구체예에서, 상기 억제기는 바람직하게 가변 유동 밸브를 포함하는, 제2 다수의 주입 유동-컨트롤러를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 억제기는 상기 TFF 장치의 다운스트림에 펌프를 포함하고, 이는 상기 TFF 장치로의 유량보다 더 낮은 유속으로 작동하여, 이로 인해 역-압력을 생성하도록 구성되어 있다.
- [0033] 상기 억제기가 가변 유동 밸브를 포함하는 제2 다수의 주입 유동 컨트롤러를 포함하는 경우, 사이클링이 바람직하게 사용된다. 사용된 사이클 횟수 및 주파수는 가변 유동 밸브를 포함하는 상기 제1 다수의 주입 유동 컨트롤러에 대해 상기에 개시된 바와 같을 수 있다.
- [0034] 본 발명의 제2 양상에 따른 장치는 선택적으로 인-라인 믹서 (in-line mixer)를 포함하고, 이는 상기 밸브와 농축기 사이에 위치할 수 있고, 바람직하게 상기 밸브와 펌프 사이에 위치한다. 인-라인 믹서의 예로는 당분야에 잘 알려져 있다. 바람직한 인-라인 믹서는 스태틱 믹서 (static mixers) 예컨대 배플드 믹서 (baffled

mixers) 및 와동 믹서 (vortex mixers)이다. 상기 믹서의 치수는 바람직하게 주입 액체가 상기 TFF 장치로 진입하기 전에 적절하게 혼합되도록 선택된다.

[0035] 상기 유동-컨트롤러를 통한 상기 액체들의 조합으로 상기 제1 액체 중의 생체분자의 농도를 희석시키는 것을 인식할 것이다. 상기 희석의 정도는 주입구를 통과하는 액체의 상대적 부피에 의해 제어되고, 이는 결국 상기 주입구의 상대적 치수 및/또는 상기 주입구가 그의 더 높은 유량 및 그의 더 낮은 유량에서 유지되는 상대적 시간에 의해 제어된다. 상기 액체들의 혼합에 의해 수행되는 생체분자의 희석은 적어도 부분적으로 오프-셋 (offset)될 수 있고, 또한 상기 TFF 장치를 통한 조합된 액체들의 통과에 의해 완전히 오프-셋되거나, 또는 심지어 더 오프-셋될 수 있다. 상기 장치는 잔류물로서 상기 TFF 장치를 통과하는 조합된 액체들의 상대적 부분이 투과물로 통과되는 부분보다 더 크거나, 동일하거나, 또는 더 적도록 구성될 수 있다. 잔류물로서 통과하는 부피에 대한 투과물로 통과하는 액체의 부피의 비율이 상기 생체분자를 포함하는 제1 액체의 부피에 대해 조합되는 제2 및 부가의 액체의 부피의 비율과 동일한 경우, 상기 잔류물 중에 생체분자의 농도는 제1 액체 중에 초기 농도와 동일할 것이다. 잔류물에 대한 투과물의 부피 비율이 상기 제1 액체에 대한 제2 및 부가의 액체의 부피 비율보다 더 높게 증가하면 상기 제1 액체 중의 농도에 대한 잔류물 중에 생체분자의 농도를 증가시킬 것이고, 반면에 잔류물에 대한 투과물의 부피 비율을 상기 제1 액체에 대한 제2 및 부가의 액체들의 부피 비율보다 더 낮게 감소시키면 상기 제1 액체 중의 농도에 대한 생체분자의 농도를 감소시킬 것이다. 예를 들어, 생체분자를 포함하는 제1 액체를 제2 액체로, 제1 대 제2 액체의 1 : 9의 비율을 사용하여, 10배로 희석되고, 그 다음에 투과물 대 잔류물의 부피 비율이 9 : 1인 경우, 상기 생체분자는 그의 원래 농도로 되돌아가고, 상기 제1 액체의 90% 청소율 (clearance) $[(10-1)/10 \times 100]$ 이 수득된다. 제2 단계 교환에서 상기 과정을 반복하여 상기 제1 액체의 99% 청소율 $[9((10 \times 10) - 1)/(10 \times 10) \times 100]$ 을 제공할 수 있지만, 원래 생체분자 농도를 유지하였다. 그러나, 상기 투과물 대 잔류물의 부피 비율이 농축기에서 19 : 1이고 또한 희석은 1 : 9로 유지되는 경우, 상기 생체분자의 농도는, 제1 액체와 동일한 90%의 청소율로, 제1 단계를 통해 2배로 증가될 수 있고, 제1 액체와 동일한 99%의 청소율로, 제2 단계를 통해 4배로 증가될 수 있는 반면에, 투과물 대 잔류물의 부피 비율이 농축기에서 4 : 1이고 또한 희석이 1 : 9로 유지되는 경우, 생체분자의 농도는 제1 액체와 동일한 90% 청소율로 제1 단계를 통해 2배로 감소될 수 있고, 제1 액체와 동일한 99%의 청소율로 제2 단계를 통해 4배로 감소될 수 있다.

[0036] 다수의 구체예에서, 상기 유동-컨트롤러를 통해 흐르는 제1 액체 대 제2 및 후속하는 액체의 부피 비율은 관련 액체의 유동을 조절하는 제어가능한 간헐식 유동 밸브의 개방 시간을 제어함으로써 제어된다. 바람직하게 상기 유동-컨트롤러의 다운스트림에 위치하는 펌프는 상기 유동-컨트롤러를 통해 유량을 제어하고, 또한 상기 밸브로부터 출구까지의 유동 통로가 동일한 부피를 갖는 경우, 상대 부피는 상기 밸브의 개방 시간에 의해 결정된다. 모든 다른 것은 동일하지만, 상기 제1 액체 밸브가 다른 밸브에 대해 개방되는 시간이 더 작아지면, 상기 제2 및 부가의 액체에 대한 교환이 더 커진다.

[0037] 특정 구체예에서, 바람직하게 본 발명에 따라 구성된 제2 TFF 장치는 상기 제1 TFF 장치의 다운스트림에 위치한다. 다수의 이러한 예에서, 상기 제2 TFF 장치에 대한 다수의 주입 유동-컨트롤러는 제1 TFF 장치에 대한 액체기로 제공된다. 바람직하게 본 발명에 따라 구성된 부가의 TFF 장치는 상기 제2 TFF 장치의 다운스트림에 위치할 수 있다. 본 발명에 따라 구성된 제2 또는 부가의 TFF 장치가 사용되는 경우, 다수의 주입 유동-컨트롤러에 대한 주입구는 상기 TFF 장치 업스트림으로부터의 잔류물과 유체 연결, 바람직하게 직접 연결되어 있다. 본 발명에 따라 구성된 제2 또는 부가의 TFF 장치에 있어서, 해당하는 제2 액체 매질에 대한 주입구는 상기 제1 TFF 장치에서와 동일한 액체 매질에 대한 주입구를 포함할 수 있거나, 또는 다른 액체 매질에 대한 주입구를 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명에 따른 장치는 생체분자의 용액 또는 현탁액, 예를 들어 공급물 스트림을 컨디셔닝 (conditioning)하는데, 예컨대 전도도 및/또는 pH의 변경, 버퍼 교환, 구성성분 용질의 변경, 및 부피를 변경하는데 사용되어, 다운스트림 유닛 작업의 처리 시간, 예를 들어 크로마토그래피 로딩 시간을 변경, 바람직하게 감소시킬 수 있다. 특정 예에서, 본 발명에 따른 장치는 폴리펩티드의 리폴딩 (refolding), 또는 pDNA 추출을 위해 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명에 따른 장치를 사용하여, 액체 교환은 상기 잔류물의 재순환 없이 달성될 수 있다.

[0040] 본 발명에서 사용된 액체는 정제 방법 (예를 들어, 크로마토그래피 컬럼, 기존의 TFF 단계, 여과/정화 (clarification) 단계, 원심분리 상층액/농축물 또는 슬러리, 컨디셔닝/희석 단계)으로부터 용리되고, 생물반응기 및 발효기로부터 산출되고, 및 세포 파괴 공정 (cell disruption processes)으로부터 산출될 수 있다.

- [0041] 본 발명의 장치 및 방법으로 생산된 액체는 추가의 처리 없이 "그대로" 사용될 수 있거나, 또는 하나 이상의 추가의 처리 단계, 예컨대 정제, 또는 처리 단계, 예를 들어 크로마토그래피 단계, 예컨대 친화도 크로마토그래피, 음이온 및/또는 양이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 크기-배제 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피; 및/또는 부가의 여과, 정화, 컨디셔닝, 희석 또는 기타 제제화 (formulation) 단계로 처리될 수 있다.
- [0042] 본 발명에 따른 장치는 생체분자, 예를 들어 pDNA, 혼입체 (inclusion bodies), 구체적으로 폴리펩티드, 및 특히 재조합 폴리펩티드를 포함하는 혼입체를 포함하는 액체를 농축하는데 사용될 수 있다.
- [0043] pDNA는 하나 이상의 다수의 형태, 예컨대 초나선 (supercoiled), 직쇄형 (linear) 및 개방-원형 (open-circular) (즉 틸 (nicked) 또는 이완된 (relaxed)) 이소형태 (isoforms)일 수 있다. 초나선 pDNA 이소형태는 공유적으로 폐쇄된 원형 형태를 가지며, 상기 pDNA는 숙주 세포에서 숙주 효소 시스템의 작용으로 네가티브하게 초나선으로 되어 있다. 개방-원형 이소형태에서, 상기 pDNA 이중가닥 중 한 가닥이 하나 이상의 위치에서 파괴되어 있다.
- [0044] pDNA를 생산하는 방법은 당분야에 잘 알려져 있다. pDNA는 천연 (natural) 또는 인공 (artificial), 예를 들어, 외래 DNA 삽입물을 운반하는 클로닝 벡터 (cloning vectors)일 수 있다. 다수의 구체예에서, 상기 pDNA는 1 킬로베이스 (kilobase) 내지 50 킬로베이스 범위의 크기이다. 예를 들어 발현된 간섭하는 (interfering) RNA를 코딩하는 pDNA는 통상적으로 3 킬로베이스 내지 4 킬로베이스 범위의 크기이다.
- [0045] 폴리펩티드, 특히 재조합 폴리펩티드는 치료적 단백질 및 펩티드를 포함하고, 시토킨, 성장 인자, 항체, 항체 단편, 면역글로불린 예컨대 폴리펩티드, 효소, 백신, 펩티드 호르몬, 케모킨, 수용체, 수용체 단편, 키나제 (kinases), 포스파타제, 이소머라제, 히드롤리아제 (hydrolyases), 전사 인자 및 융합 폴리펩티드를 포함한다.
- [0046] 항체는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체 및 생물학적 활성을 갖는 항체 단편을 포함하고, 상기 중 어느 것의 다가 (multivalent) 및/또는 다중-특이적 형태를 포함한다.
- [0047] 자연 발생하는 항체는 통상적으로, 2개의 동일한 중쇄 (H) 및 2개의 동일한 경쇄 (L)가 디설피드 결합 (disulfide bonds)으로 내부-연결된, 4개의 폴리펩티드 사슬을 포함한다. 각 중쇄는 가변 영역 (V_H) 및 불변 영역 (C_H)을 포함하고, 상기 C_H 영역은 그의 네이티브 형태의 3개의 도메인인, C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3} 을 포함한다. 각 경쇄는 가변 영역 (V_L) 및 하나의 도메인 C_L 을 포함하는 불변 영역을 포함한다.
- [0048] 상기 V_H 및 V_L 영역은, 프레임워크 영역 (framework regions: FR)으로 불리우는 더 보존된 영역으로 산재된 상보성 결정 영역 (complementarity determining regions: CDR)으로 불리는 초가변 영역으로 더 세분화될 수 있다. 각 V_H 및 V_L 은 3개의 CDRs 및 4개의 FRs로 이루어지고, 아미노-말단으로부터 카르복시-말단까지 하기 순서로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.
- [0049] 발현될 수 있는 항체 단편은 온전한 (intact) 항체의 일부를 포함하고, 상기 일부는 원하는 생물학적 활성을 갖는다. 항체 단편은 일반적으로 적어도 하나의 항원 결합 부위를 포함한다. 항체 단편의 예로는 하기를 포함한다: (i) V_L , C_L , V_H 및 C_{H1} 도메인을 갖는 Fab 단편; (ii) 2개의 Fab 유도체 사이에서 디설피드 결합에 의해 2가 단편을 형성할 수 있는, C_{H1} 도메인의 C-말단에서 하나 이상의 시스테인 잔기를 갖는 Fab' 단편과 같은 Fab 유도체; (iii) V_H 및 C_{H1} 도메인을 갖는 Fd 단편; (iv) C_{H1} 도메인의 C-말단에서 하나 이상의 시스테인 잔기를 갖는 Fd 유도체와 같은 Fd 유도체; (v) 항체의 단일 암 (arm)의 V_L 및 V_H 도메인을 갖는 Fv 단편; (vi) V_L 및 V_H 도메인이 공유적으로 연결된 단쇄 Fv (single chain Fv: scFv) 항체와 같은 단쇄 항체 분자; (vii) 불변 영역 도메인을 갖거나 또는 갖지 않는 다른 가변 도메인 (V_H 또는 V_L 도메인 폴리펩티드)에 연결된 불변 영역 도메인을 갖지 않는 V_H 또는 V_L 도메인 폴리펩티드 (예컨대, V_H - V_H , V_H - V_L , 또는 V_L - V_L); (viii) V_H 도메인, 또는 V_L 도메인, 및 V_H 또는 V_L 도메인의 항원-결합 단편, 예컨대 단리된 CDR 영역으로 구성된 단편과 같은 도메인 항체 단편; (ix) 예를 들어 동일한 폴리펩티드 사슬 중에 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)의 2개의 항원 결합 부위를 포함하는 소위 "디아바디 (diabodies)"; 및 (x) 상보적 경쇄 폴리펩티드와 함께, 한 쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한 쌍의 탠덤 (tandem) Fd 세그먼트를 포함하는 소위 직쇄형 항체.
- [0050] 혼입체는 *이. 콜리* (*E. coli*)와 같은 박테리아 세포의 세포질에서 형성되고, 가장 일반적으로 폴리펩티드 및 특

히 제조합 폴리펩티드를 포함하는 불용성 응집체를 포함한다.

[0051] 표적 생체분자 이외에, 상기 생체분자-함유 액체 중의 다른 성분들로는 버퍼 염 (buffer salts)을 포함하는 염, 배양 배지 및 공급 성분들, 용매, 일반적으로 물, 보조-용매 (co-solvents), 예컨대 C₁₋₆ 폴리올, 예컨대 프로필렌 글리콜 및 소르비톨, 이온성 액체, 양쪽성물질 (zwittergens), 계면활성제 (surfactants), 이미다졸 또는 다른 경쟁적 리간드 결합제 (competitive ligand binders), 아미노산, 키오트로픽제 (chaotropic agents), 예컨대 우레아, 환원제, 산화제, 폐길화 콘쥬게이션 시약 (PEGylation conjugation reactants) (기질, 부산물 및 활성제), 당, 지질, 핵산 및 대사산물 및 소 (small) 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 상기 제1 생체분자-함유 액체와 혼합된 액체는 상기 표적 생체분자가 존재하지 않고, 및 다수의 구체예에서 단백질 및 핵산이 존재하지 않는다. 상기 생체분자-함유 액체와 혼합된 액체들 중 성분들은 일반적으로 버퍼 염을 포함하는 염, 배양 배지 및 공급 성분들, 용매, 일반적으로 물, 보조-용매, 예컨대 C₁₋₆ 폴리올, 예컨대 프로필렌 글리콜 및 소르비톨, 이온성 액체, 양쪽성물질, 계면활성제, 이미다졸 또는 다른 경쟁적 리간드 결합제, 아미노산, 키오트로픽제, 예컨대 우레아, 환원제, 산화제 및 당을 포함한다.

[0052] 본 발명에 따른 장치의 일 예가 도 1에 도시되어 있다. TFF 장치(1)는 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(2), 스테틱 믹서(3), 및 펌프(4)의 다운스트림에 위치하고, 이는 액체 공급물을 상기 TFF 장치(1)에 공급한다. 상기 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(2)는 생체분자를 포함하는 제1 액체(5) 및 제2 액체(6)의 상기 TFF 장치(1)로의 공급을 제어한다. 역제기(7)은 상기 TFF 장치(1)로부터의 잔류물 라인 상에 위치한다. 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(2)에서 폐쇄 위치와 개방 위치 사이에서 각 간헐식 유동 밸브의 사이클링으로 상기 생체물질을 희석시킨다. 상기 TFF 장치(1)를 통과할 때, 상기 펌프(4) 및 역제기(7)의 작용으로 유도된 압력은 상기 TFF 장치(1)의 분자량 커트-오프 미만의 액체의 부분을 투과물(8)로 통과시키고, 잔류물(9)에서 상기 생체분자의 농축을 증가시킨다.

[0053] 본 발명에 따른 장치의 다른 예가 도 2에 도시되어 있다. TFF 장치(10)는, 액체 공급물을 상기 TFF 장치(10)에 공급하는 펌프(11)의 다운스트림에, 또한 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(12), 스테틱 믹서 (13), 및 제2 펌프 (14)의 업스트림에 위치한다. 상기 TFF 장치(10)를 통과할 때, 펌프(11) 및 상기 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(12)의 작용으로 유도된 압력은 상기 TFF 장치(10)의 분자량 커트-오프 미만의 액체의 부분을 투과물(15)로 통과시키고, 상기 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(12)로 진입하는 생체분자의 농축을 증가시킨다. 상기 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(12)에서 간헐식 유동 밸브는 생체분자를 포함하는 제1 액체(16) 및 제2 액체(17)의 공급을 제어한다. 상기 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(12)에서 폐쇄 위치와 개방 위치 사이에서 각 간헐식 유동 밸브의 사이클링으로 상기 TFF 장치(10)로부터 잔류물 라인(18)에 위치한 제2 펌프(14)의 작용을 통해 농축된 생체분자의 희석을 유도한다. 상기 제2 펌프(14)의 업스트림에 있는 상기 스테틱 믹서(13)는 상기 잔류물 (18)이 제2 액체와 생체분자에 대한 조성이 균일하게 한다.

[0054] 2개의 TFF 장치를 사용하는 본 발명의 부가의 예가 도 3에 도시되어 있다. 제1 TFF 장치(19)는 제1 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(20), 스테틱 믹서(21), 및 펌프(22)의 다운스트림에 위치하고, 이는 액체 공급물을 상기 제1 TFF 장치(19)에 공급한다. 제2 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(23)는 상기 제1 TFF 장치(19)로부터의 잔류물 라인 상의 다운스트림에 위치한다. 상기 제1 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(20)는 생체분자를 포함하는 제1 액체(24), 및 제2 액체(25)의 상기 TFF 장치(19)로의 공급을 제어한다. 상기 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(20)에서, 폐쇄된 위치와 개방된 위치 사이에 각 간헐식 유동 밸브의 사이클링으로 상기 생체분자의 희석을 유도한다. 상기 제1 TFF 장치(19)를 통과할 때, 상기 펌프(22) 및 제2 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(23)의 작용으로 유도된 압력은 상기 제1 TFF 장치(19)의 분자량 커트-오프 미만의 액체의 부분을 상기 투과물(26)로 통과시키고, 상기 제2 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(23)로 진입하는 생체분자의 농도를 증가시킨다. 상기 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(23)에서 제2 간헐식 유동 밸브는 상기 제1 TFF 장치(19)로부터의 농축된 생체분자, 및 제3 액체(27)의 공급을 제어한다. 상기 제2 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(23)에서, 폐쇄된 위치와 개방된 위치 사이에서 각 간헐식 유동 밸브의 사이클링으로, 제2 스테틱 믹서(29)와 제2 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(23), 출구 둘 다의 다운스트림에 위치한, 제2 펌프(28)의 작용을 통해 상기 농축된 생체분자의 희석을 유도한다. 상기 제2 펌프(28)는 제2 TFF 장치(30)의 다운스트림에 액체 공급물을 공급한다. 역제기(31)는 상기 제2 TFF 장치(30)로부터의 잔류물 라인 상에 위치한다. 상기 제2 TFF 장치(30)를 통과할 때, 제2 펌프 (28) 및 역제기(31)의 작용으로 유도된 압력은 상기 TFF 장치(30)의 분자량 커트-오프 미만의 액체의 부분을 투과물(32)로 통과시키고, 상기 잔류물(33)에서 상기 생체분자의 농도를 증가시켰다.

[0055] 2개의 TFF 장치를 사용하는 본 발명의 다른 부가의 예가 도 4에 도시되어 있다. 제1 TFF 장치(34)는 2개의 공

급 펌프(35 및 36), 및 스테틱 믹서(37)의 다운스트림에 위치하고, 이는 액체 공급물을 상기 제1 TFF 장치(34)에 공급한다. 상기 제1 TFF 장치(34)로, 상기 제1 펌프(35)는 생체분자를 포함하는 제1 액체(38)의 공급을 제어하고, 또한 제2 펌프(36)는 제2 액체(39)의 공급을 제어한다. 상기 2개의 펌프들(35 및 36)의 작용으로 상기 생체분자의 희석을 유도한다. 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(40)는 제1 TFF 장치(34)로부터의 잔류물 라인 상의 다운스트림에 위치한다. 상기 제1 TFF 장치(34)를 통과할 때, 상기 펌프들(35 및 36) 및 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(40)의 작용으로 유도된 압력은 상기 제1 TFF 장치(34)의 분자량 컷-오프 미만의 액체의 부분을 상기 투과물(41)로 통과시키고, 상기 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(40)로 진입하는 생체분자의 농도를 증가시킨다. 상기 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(40)에서 간헐식 유동 밸브는 상기 제1 TFF 장치(34)로부터의 농축된 생체분자, 및 제3 액체(42)의 공급을 제어한다. 상기 제2 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(40)에서 폐쇄된 위치와 개방된 위치 사이에서 각 간헐식 유동 밸브의 사이클링으로, 제2 스테틱 믹서(44)와 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러(40), 출구 둘 다의 다운스트림에 위치한, 제3 펌프(43)의 작용을 통해 상기 농축된 생체분자의 희석을 유도한다. 상기 제3 펌프(43)는 제2 TFF 장치(45)의 다운스트림에 액체 공급물을 공급한다. 억제기(46)는 상기 제2 TFF 장치(45)로부터의 잔류물 라인 상에 위치한다. 상기 제2 TFF 장치(45)를 통과할 때, 제2 펌프(43), 및 억제기(46)의 작용으로 유도된 압력은 상기 TFF 장치(45)의 분자량 컷-오프 미만의 액체의 부분을 투과물(47)로 통과시키고, 상기 잔류물(48)에서 상기 생체분자의 농도를 증가시킨다.

[0056] 본 출원은 하기 실시예에 의해 한정되지 않고 예시된다.

[0057] **약어**

[0058] DV 투석부피 (Diavolumes)

[0059] mPES 변형된 폴리에틸렌설포네 (modified Polyethylenesulfone)

[0060] rhLactoferrin 재조합 인간 락토페린 (recombinant human Lactoferrin)

[0061] TFF 접선방향 유동 여과 (Tangential Flow Filtration)

[0062] **단백질 모델:**

[0063] 50mM의 소듐 포스페이트 pH 7.5 중에 1mg/mL의 초기 농도로 정제된 rhLactoferrin을 실험 연구에서 사용하였다.

[0064] 버퍼 (A) 50mM 소듐 포스페이트, 0.1M NaCl, pH 7.0

[0065] 버퍼 (B) 50mM 소듐 포스페이트, pH 7.5

[0066] 버퍼 (C) 50mM 소듐 포스페이트, 0.1M NaCl, 10% 소르비톨, pH 7.0

[0067] 버퍼 (D) 50mM 소듐 포스페이트, 0.1M NaCl, 10% 소르비톨, 6% 프로판-1,2-디올, pH 7.0

[0068] **실시예 1**

[0069] pH 7.5에서 1mg/mL의 rhLactoferrin의 적어도 400mL의 원료를, 버퍼 (A)를 15mL/분의 일정한 유량으로 A1 펌프 (75%)를 통해 공급하면서, GE Healthcare AKTA™ Explorer 시스템의 B1 펌프에서 rhLactoferrin의 25% 구매의 사용을 통해 버퍼 (A)로 체적으로 4-배로 희석하였다. 상기 희석된 rhLactoferrin은 그 다음에 AKTA™ Explorer V2 밸브 상에 위치 2를 통해 다운 플로우 모드 (down flow mode)로 표면적이 370cm²인, 65cm 길이의, 10kDa mPES Spectrum Labs MidiKros™ 중공 섬유로 연결되었다. 상기 중공 섬유 잔류물 라인은 결국 다운스트림의 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러에 직접 연결되었다. 상기 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러는 맞춤형 (Gemu) 플라스틱으로, Raspberry Pi 미니컴퓨터의 제어하에 급속 작동하는 솔레노이드 작동기 (fast acting solenoid actuator)와 2mm의 내부 구멍을 갖는 단일 출구를 갖는 2개의 밸브 매니폴드 (valve manifold)를 포함하고, 이는 상기 매니폴드를 통해 액체의 유동을 제어한다. 상기 매니폴드는 밸브로부터 출구까지 동일한 유동 통로 부피를 갖도록 구성되어 있다. 상기 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러의 사이클 시간은 2초로 설정되어 있고, 및 잔류물 제어 밸브는 상기 사이클의 25% 동안 개방되어 상기 rhLactoferrin 용액의 초기 개시 부피를 수득하는데 필요로 하는 4-배 체적 농축 계수를 수득하였다. 상기 다수의 주입 유동-컨트롤러에서 제2 밸브 위치는, 상기 제1 밸브가 폐쇄되었을 때, 상기 사이클의 75% 동안 개방되어서 버퍼 (B)로 중공 섬유 잔류물을 두 번째로 4-배 희석시켰다. 상기 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러로부터의 출구는 AKTA™ Explorer에서 위치 2의 밸브 V3으로 되돌아가기 전에 길이 10cm 및 직경 5mm의 스테틱 믹서를 통과하여 전도도, pH 및 280nm 흡광도 테

이터를 수집하였다. 상기 AKTA™ Explorer 밸브 V4로부터의 F8 출구 라인을 15mL/분으로 실행되는 제2 GE Healthcare AKTA™ Explorer 시스템의 A1 펌프의 A11 공급 라인에 연결하였다. 상기 시스템은 결국 다시 위치 2에서 AKTA™ Explorer 컬럼 밸브 V2를 통해 370cm²의 표면적을 갖는 제2 65cm 길이의, 10kDa mPES Spectrum Labs MidiKros™ 중공 섬유에 연결되었다. 상기 중공 섬유 중의 잔류물을 제2 10mm 내부 구멍 크기의 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러로 직접 공급하였다. 상기 밸브는 10초의 사이클 시간을 사용하여, 잔류물 제어 밸브는 상기 사이클의 4% 동안 개방되어 상기 rhLactoferrin 용액의 초기 개시 부피를 다시 한번 수득하기 위해 4배 체적 농축 계수를 수득하였다. 상기 다수의 주입 가변 유동-컨트롤러로부터의 출구는 위치 2의 밸브 3에서 AKTA™ explorer로 되돌아가기 전에 길이 10cm 및 직경 5mm의 제2 스태틱 믹서를 통해 연결되어 전도도, pH 및 280nm 흡광도 데이터를 수집하였다. 인-라인으로 버퍼 교환된 rhLactoferrin 용액을 AKTA™ Explorer 밸브 V4에서 출구 라인 F8을 통해 수집하였다. 제1 AKTA™ Explorer 시스템으로부터의 데이터는 인-라인 시스템을 사용하여 성공적으로 빠른 버퍼 교환을 나타내었고, 제2 AKTA™ Explorer 시스템을 통한 트레이스 (trace)는 상기 공급에 대해 단백질 농도가 유지되었음을 보여주었다.

[0070] 상기 인-라인으로 버퍼 교환된 rhLactoferrin의 흡광도, 전도도 및 pH 트레이스를 버퍼 (B)로 버퍼 (A)의 ~95% 교환으로 유도되는 2번의 4배 희석 및 농축을 사용하여 나타내었다. 버퍼 (B) 전도도 6.9mS/cm 및 pH 7.47은, 전도도 7.2mS/cm 및 pH 7.43을 갖는 최종 버퍼 교환된 Lactoferrin과 잘 비교되었다. 상기 단백질 농도는 약 45mAU로 유지되었다.

[0071] 실시예 2 내지 8

[0072] 실시예 1의 방법을 반복하였지만, 조건들을 하기 표 1에 명시된 바와 같이 변경하여서, 제1 및 제2 농축기들 사이에서 작동 시간 및 다양한 농축/희석 비율에 있어서 버퍼 점도 (10 % 소르비톨 및/또는 6 % 프로판-1,2-디올)를 변경하는 버퍼 성분의 첨가 또는 버퍼 교환을 역전하는 효과를 조사하였다. 실시예 2 및 3은 희석을 위해 버퍼 (A)를 사용하였고, 실시예 4는 버퍼 (B)를 사용하였고, 실시예 5, 6 및 7은 버퍼 (C)를 사용하였고 및 실시예 8은 버퍼 (D)를 사용하였다.

[0073] 표 1에 제공된 결과로부터, 일련의 희석 및 농축으로 기존의 재순환 회분식 TFF 시스템에 있어서 최대 3의 투석 부피와 동등한 버퍼 교환을 달성하였음을 보여주었다. 더 높은 버퍼 교환 효율은, 실시예 6 및 7에 개시된 바와 같이, 더 큰 희석 비율로 수행함으로써 수득될 수 있다.

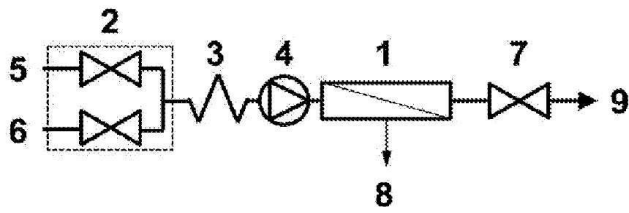
표 1

[0074]

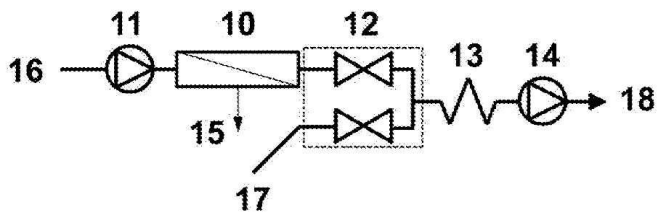
실시예	조합된 희석 비율	전도도					공급물 (mL)	잔류물 (mL)
		공급물 (mS/cm)	버퍼 (mS/cm)	잔류물 (mS/cm)	효율 (%)	당량 DV		
1	1:16	3.57	16.49	16.14	97.9	3.9	65.7	243
2	1:16	3.64	16.49	14.48	87.8	2.1	67.5	48
3	1:16	3.64	16.49	14.76	89.5	2.3	345	550
4	1:16	14.20	7.02	7.96	86.6	2.0	350	770
5	1:16	9.34	15.15	14.70	97.0	3.5	159	220
6	1:16	9.42	15.54	14.63	94.1	2.8	154	224
	1:32			14.90	95.9	3.2		
7	1:12	9.42	15.54	14.36	92.4	2.6	242	251
	1:16			14.64	94.2	2.8		
	1:24			14.88	95.8	3.2		
	1:32			14.99	96.5	3.4		
8	1:16	14.82	11.44	12.56	-	-	126	157

도면

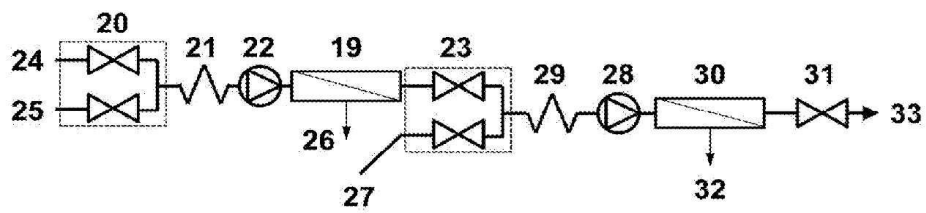
도면1



도면2



도면3



도면4

