(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월03일
(11) 등록번호 10-2370714
(24) 등록일자 2022년02월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01D 61/14 (2006.01) *B01D 61/18* (2006.01)
B01D 61/22 (2006.01) *C07K 1/34* (2006.01)
(52) CPC특허분류
B01D 61/145 (2013.01)
B01D 61/142 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7031077
(22) 출원일자(국제) 2015년05월13일
심사청구일자 2020년05월13일
(85) 번역문제출일자 2016년11월07일
(65) 공개번호 10-2017-0004989
(43) 공개일자 2017년01월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/030599
(87) 국제공개번호 WO 2015/175679
국제공개일자 2015년11월19일
(30) 우선권주장
61/992,595 2014년05월13일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US06296770 B1
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 25 항

(73) 특허권자
암겐 인코포레이티드
미국 캘리포니아 91320-1799 싸우전드 오크스 원 암겐센터 드라이브
(72) 발명자
제프로 에바
미국 98056 워싱턴주 뉴캐슬 126쓰 피아이 에쓰이 8122
쉐이카트 란돌프 더블유.
미국 98073 워싱턴주 우딘빌 엔이 145쓰 플레이스 13258
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

심사관 : 김경미

(54) 발명의 명칭 **필터 및 여과 공정과 함께 사용하기 위한 공정 제어 시스템 및 방법**

(57) 요 약

접선 유동 여과를 제어하기 위해 사용되는 시스템 및 방법이 제공되고, 이는 접선 유동 여과 공정 유닛과 유체 소통되는, 업스트림 공정 유닛, 예컨대 크로마토그래피 공정 유닛을 갖는 연결식 시스템과 함께 사용되는 제어 시스템 및 방법을 포함한다. 또한, 투과물 유동 제어와 함께 단일-통과 접선 유동 여과를 사용하는 연속식 농축을 수행하기 위한 제어 시스템 및 방법을 포함한다.

(52) CPC특허분류
B01D 61/18 (2013.01)
B01D 61/22 (2013.01)
C07K 1/34 (2013.01)
B01D 2311/04 (2013.01)
B01D 2311/06 (2013.01)
B01D 2313/18 (2013.01)
B01D 2313/243 (2013.01)
B01D 2315/10 (2013.01)

(72) 발명자
페티 크리스타
미국 91320 캘리포니아주 뉴베리 파크 아파트 7 힐크레스트 드라이브 1710 더블유.
프랭크 그레고리
미국 91320 캘리포니아주 싸우전드 옥스 레드 로빈스 플레이스 1758
샐스트롬 텔스마 크리스틴
미국 98028 워싱턴주 켄모어 58쓰 에비뉴 엔이 18242
휴위그 아서 씨. 3세
미국 91320 캘리포니아주 뉴베리 파크 레밍턴 플레이스 951
셜츠 조셉 에드워드
스위스 체하-4102 비닌겐 바슐러스트라쎄 5에이

(56) 선행기술조사문헌
US05164092 A
JP07004224 B2
KR1020080031684 A
US20130001142 A1

명 세 서

청구범위

청구항 1

공정 제어 시스템으로서,

(a) 각각 유량을 가동시키는 하나 이상의 업스트림 공정 유닛;

(b) 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛에 연결되는 탱크;

(c) 상기 탱크에 연결되는 유입구, 투과물 유출구 및 잔류물 유출구를 갖는 필터;

(d) 상기 탱크에 연결된 유입구 및 상기 필터의 유입구에 연결된 유출구를 갖는 공급물 펌프;

(e) 상기 투과물 유출구에서의 유량을 결정하기 위해 상기 투과물 유출구에 배치되는 센서;

(f) 하기 (i) 내지 (iv) 중 하나인 제어 시스템

을 포함하는, 공정 제어 시스템:

(i) 상기 센서 및 상기 업스트림 공정에 연결되고, 그리고 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량을 제어하기 위해 적용되는 제어 시스템,

(ii) 상기 센서 및 상기 공급물 펌프에 연결되고, 그리고 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 공급물 펌프를 제어하기 위해 적용되는 제어 시스템,

(iii) 상기 센서 및 상기 공급물 펌프에 연결되고, 그리고 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달될 때까지 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 공급물 펌프를 제어하기 위해, 그리고 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달된 이후 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량을 제어하기 위해 적용되는 제어 시스템, 또는

(iv) 상기 센서 및 상기 공급물 펌프에 연결되고, 그리고 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달될 때까지 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 공급물 펌프를 제어하기 위해, 그리고 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달된 이후 상기 공급물 펌프의 유량과 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛의 유량 사이의 불일치를 가능하게 하기 위해 적용되는 공정 제어 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제어 시스템은 (i) 상기 센서 및 상기 업스트림 공정에 연결되고, 그리고 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량을 제어하기 위해 적용되는 것인, 공정 제어 시스템.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 제어 시스템은 상기 투과물 유출구에서의 유량의 감소에 따라 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량을 감소시키기 위해 적용되는 것인, 공정 제어 시스템.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제어 시스템은 (ii) 상기 센서 및 상기 공급물 펌프에 연결되고, 그리고 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 공급물 펌프를 제어하기 위해 적용되는 것인, 공정 제어 시스템.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 제어 시스템은 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량에 일치되는 상기 투과물 유출구에서의 유량을 유지시키기 위해 상기 공급물 펌프를 제어하도록 적용되는 것인, 공정 제어 시스템.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 제어 시스템은 (iii) 상기 센서 및 상기 공급물 펌프에 연결되고, 그리고 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달될 때까지 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 공급물 펌프를 제어하기 위해, 그리고 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달된 이후 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량을 제어하기 위해 적용되는 것인, 공정 제어 시스템.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 제어 시스템은 (iv) 상기 센서 및 상기 공급물 펌프에 연결되고, 그리고 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달될 때까지 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 공급물 펌프를 제어하기 위해, 그리고 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달된 이후 상기 공급물 펌프의 유량과 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛의 유량 사이의 불일치를 가능하게 하기 위해 적용되는 것인, 공정 제어 시스템.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 예정된 유량은 최대 시스템 유량인 것인, 공정 제어 시스템.

청구항 9

각각 유량을 갖는 하나 이상의 업스트림 공정 유닛, 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛에 연결된 탱크, 및 상기 탱크에 연결되는 유입구, 투과물 유출구 및 잔류물 유출구를 갖는 필터와 함께 사용하기 위한 공정 제어 방법으로서,

(a) 투과물 유출구에서 유량을 감지하는 단계; 및

(b) 하기 (i) 내지 (iv) 중 하나를 수행하는 단계를 포함하는 공정 제어 방법:

(i) 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량을 제어하는 단계,

(ii) 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 탱크로부터 물질을 상기 필터로 펌핑하는 단계,

(iii) 예정된 펌핑 유량이 도달될 때까지 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 탱크로부터의 물질을 상기 필터로 펌핑하고, 그리고 후속하여 예정된 펌핑 유량이 도달하면 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량을 제어하는 단계, 또는

(iv) 예정된 펌핑 유량이 도달될 때까지 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 탱크로부터의 물질을 상기 필터로 펌핑하고, 그리고 후속하여 예정된 펌핑 유량에 따라 상기 탱크로부터의 물질을 상기 필터로 펌핑하여 이에 의해 상기 탱크에서의 용적을 변화시키는 단계.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 (b)의 (i) 단계가 수행되는 것인, 공정 제어 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량이 상기 투과물 유출구에서의 유량의 감소에 따라 감소되는 것인, 공정 제어 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 (b)의 (ii) 단계가 수행되는 것인, 공정 제어 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 투과물 유출구에서의 유량이 상기 하나 이상의 업스트림 공정 중 하나 이상의 유량과 일치되는 것인, 공정 제어 방법.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 (b)의 (iii) 단계가 수행되는 것인, 공정 제어 방법.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 (b)의 (iv) 단계가 수행되는 것인, 공정 제어 방법.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 예정된 유량이 최대 시스템 유량인 것인, 공정 제어 방법.

청구항 17

각각 유량을 갖는 하나 이상의 업스트림 공정 유닛, 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛에 연결된 탱크, 및 상기 탱크에 연결되는 유입구, 투과물 유출구 및 잔류물 유출구를 갖는 필터를 이용하는 단백질의 정제 방법으로서,

(a) 상기 단백질이 상기 잔류물 유출구로부터 다시 상기 탱크로 유동하는 경우 상기 투과물 유출구에서의 유량을 감지하는 단계;

(b) 하기 (i) 내지 (iv) 중 하나를 수행하는 단계:

(i) 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량을 제어하는 단계로서, 상기 유량은 적어도 부분적으로 상기 단백질을 포함하는 물질의 유량인 것인 단계,

(ii) 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 탱크로부터의 상기 단백질을 적어도 부분적으로 포함하는 물질을 상기 필터로 펌핑하는 단계,

(iii) 예정된 펌핑 유량이 도달될 때까지 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 탱크로부터의 상기 단백질을 적어도 부분적으로 포함하는 물질을 상기 필터로 펌핑하는 단계, 그리고 후속하여 예정된 펌핑 유량이 도달하면 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량을 제어하는 단계, 또는

(iv) 예정된 펌핑 유량이 도달될 때까지 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 탱크로부터의 상기 단백질을 적어도 부분적으로 포함하는 물질을 상기 필터로 펌핑하는 단계, 그리고 후속하여 예정된 펌핑 유량에 따라 상기 탱크로부터의 물질을 상기 필터로 펌핑하여 이에 의해 상기 탱크에서의 용적을 변화시키는 단계; 및

(c) 용리액에서 상기 단백질을 정제하는 단계

를 포함하는, 단백질의 정제 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 단백질을 약제학적으로 허용가능한 부형제에서 제형화하는 단계를 더 포함하는, 단백질의 정제 방법.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 (b)의 (i) 단계가 수행되는 것인, 단백질의 정제 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량이 상기 투과물 유출구에서의 유량의 감소에 따라 감소되는 것인, 단백질의 정제 방법.

청구항 21

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 (b)의 (ii) 단계가 수행되는 것인, 단백질의 정제 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 투과물 유출구에서의 유량은 상기 하나 이상의 업스트림 공정 중 하나 이상의 유량과 일치되는 것인, 단백질의 정제 방법.

청구항 23

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 (b)의 (iii) 단계가 수행되는 것인, 단백질의 정제 방법.

청구항 24

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 (b)의 (iv) 단계가 수행되는 것인, 단백질의 정제 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 예정된 유량은 최대 시스템 유량인 것인, 단백질의 정제 방법.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 상호 참조

[0002] 2014년 5월 13일에 출원된 미국 가출원번호 61/992,595에 대한 우선권을 주장하고, 이의 전체 내용은 본원에 참조로 포함되어 있다.

[0003] 본 특허는 공정 제어 시스템 및 방법, 특히, 필터 및 여과 공정과 함께 사용하기 위한 공정 제어 시스템 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0004] 수많은 생성물 - 예를 들면, 항체, 및 더 상세하게는 단일클론 항체-는 세포로부터 유도된다. 세포-유도 생성물을 제조하기 위해, 하나 이상의 초기 유닛 작동이 세포 및 정제될 수 있는 임의의 관련 세포 잔해를 제거하기 위해 수행될 수 있다. 정제 이후, 하나 이상의 후속 유닛 작동이 투여를 위한 생성물을 제조하기 위해 수행될

수 있다. 세포-유도 생성물을 제조하는 전반적인 공정의 일반적인 설명의 맥락에서 하기에 설명되어 있는 바와 같이, 여과는 초기 및 후속 유닛 작동 모두에 포함될 수 있다.

[0005] 치료-용 세포외-발현 생성물, 예컨대 항체 또는 면역글로불린을 제조하기 위해 사용될 수 있는 상업적-규모의 유닛 작동과 관련하여, 초기 분리 작업 예컨대 원심분리 또는 여과는 세포 및 세포 잔해를 제거하기 위해 사용될 수 있다. 원심분리는 축으로부터 떨어져 이동되는 액체 용액 또는 현탁액 중의 고밀도 성분, 및 축을 향하여 이동되는 (또는 적어도 보다 밀도가 높은 성분보다 축으로부터 더 조금 이동되는) 액체 용액 또는 현탁액 중의 저밀도 성분을 야기하도록 (축에 대한) 원심력을 액체 용액 또는 현탁액에 인가하는 것과 관련된다. 여과는 성분들 사이의 크기 차이에 따라 액체 용액 또는 현탁액 중의 성분을 분리하기 위해 멤브레인을 사용하는 압력-유도식 공정이다. 세포 분리 수집 응용시 사용되는 경우, 여과는 미세여과로서 지칭될 수 있다. 용액 또는 현탁액 중에서의 초기 세포 및/또는 세포 잔해의 양 또는 원심분리 또는 주요 여과 공정이 세포 및/또는 세포 잔해를 분리하는 정도에 좌우되어, 상기 언급되는 원심분리 또는 여과는 하나 이상의 (추가의) 여과 유닛 작동에 선행되거나 후속될 수 있다.

[0006] 세포 및 세포 잔해가 만족스럽게 제거된 경우, 크로마토그래피로 공지된 공정을 사용하여 하나 이상의 장치(이는 하나 이상의 칼럼의 형태일 수 있음)에서 정제가 수행될 수 있다. 크로마토그래피는 이동상으로 지칭되는 제1 단계에서의 상호작용, 및 고정상으로 지칭되는 제2 단계를 수반한다. 대개, 이동상에서의 관심대상의 생성물은 고정상에 결합되고, 그 다음 용매 (용리액으로서 지칭됨)가 고정상으로부터 생성물을 분리하기 위해 사용된다. 다른 경우에서, 관심대상의 생성물은 이동상을 통해 유동하고, 한편 오염물이 고정상에 결합한다.

[0007] 이동상 및 고정상 사이의 상호작용의 정확한 특성은 사용되는 크로마토그래피의 유형으로 차별된다. 이온 교환 크로마토그래피는 관심대상의 생성물 (또는 오염물질)의 하전된 분자와 반대로 하전된 고체상 사이의 인력에 의거한다. 예를 들면, 양이온 교환 크로마토그래피에서, 양전하로 하전된 분자는 음전하로 하전된 고체상에 이끌려진다. 친화성 크로마토그래피는 생성물 (즉, 표적 분자) 또는 오염물질에 특이적으로 결합하는 리간드의 사용을 수반한다. 관심대상의 항체 또는 면역글로불린 생성물과 관련하여, 리간드는 관련된 항원일 수 있다.

[0008] 정제가 완료되는 경우, 크로마토그래피 장치로부터 용리된 생성물은, 예를 들면, 약제학적으로 허용가능한 부형제 중에서 단백질을 제형화하고/하거나 여과를 실시하는 단계를 포함하는, 환자에게 투여 이전의 추가의 가공을 위해 이송될 수 있다. 예를 들면, 여과는 존재하는 임의의 바이러스를 제거하기 위해 수행되어 바이오기술-유래 치료의 바이러스 안전성을 보장할 수 있다. 추가로, 여과는 생성물에 대해 수행되어 생성물을 치료 수준으로 농축하여 생성물을 탈염시킬 수 있다. 여과의 목적은 큰 성분을 작은 성분으로부터 분리하는 것인 한편, 생성물로부터 세포 및 세포 잔해를 제거하기 위해 수행되는 예비-정제 여과와 달리, 정제후 여과는 생성물의 농도를 증가시키기 위해 생성물로부터 작은 폡타이드 및 염을 제거한다. 이러한 여과는 또한 생성물을 탈염시키거나, 또는 충전 (즉, 버퍼 교환 또는 대체) 이전에 생성물을 보관하기 위한 안정한 약물 물질 제제를 주입하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 맥락으로 사용되는 경우, 여과는 한외여과로 지칭될 수 있다.

[0009] 상기 기재된 여과는 막힘형 공정(dead-end process) 또는 교차유동, 또는 접선 유동 공정일 수 있다. 막힘형 필터에서, 분리되는 액체 용액 또는 현탁액 (또는 공급물)의 유동은 막에 수직하다. 교차유동 필터에서의 대다수의 공급물 유동은 멤브레인의 표면에 접선방향이거나 이에 가로방향이다.

[0010] 접선 유동 여과 (또는 TFF)는 막힘형 여과에 대해 특정 장점을 제공한다. 특히, 멤브레인 표면에 구축된 물질 (또한 정체 필름층으로 지칭됨)은 접선 유동 여과 과정에서 최소화되고, 이는 필터가 수행될 수 있는 시간의 기한을 증가시킨다. 결과적으로, 접선 유동 여과는 연속식 공정 응용에 적용될 수 있고, 즉 공급물은 필터를 통과하여 이에 연속식으로 공급될 수 있다.

[0011] 단일-통과 접선 유동 여과 (또는 SPTFF)로서 지칭되는 접선 유동 여과의 특정 유형이 특정 응용분야에 사용될 수 있다. 종래의 TFF는 필터 장치 (또는 평행하게 배치되는 다중 필터 장치)를 통해 공급물 유동을 다중 통과로 유도하는 단계를 수반하고, SPTFF는 필터 장치를 통한 공급물 유동을 단일 통과로 유도하는 단계를 수반한다. 특정 구현예에 따르면, SPTFF 필터 장치는 단일 멤브레인을 포함할 수 있다. 다른 구현예에 따라, SPTFF 필터 장치는 공급물 유동으로서 연속식 단계로 유도되는 일단계의 잔류물(retentate)을 연속적으로 연결하는 복수개의 멤브레인 카세트로 정의될 수 있다. 상기 카세트는 다중 홀더 또는 유동 변환 플레이트에 연결될 수 있다. 대안적으로, 하우징은 복수개의 멤브레인을 수용하도록 설계될 수 있고, 하우징은 개개의 멤브레인을 연결하기 위한 경로를 제공한다.

[0012] 하기에 상세히 기재된 바와 같이, 본 개시물은 필터 및 여과에 대해 개선된 공정 제어 시스템 및 방법, 특히 종

래의 장치 및 방법에 대한 유리한 대안을 구체화하는 접선 유동 필터 및 여과를 기재하고 있다.

발명의 내용

[0013] 요약

[0014] 본 개시물의 일 양태에 따라, 공정 제어 시스템은 각각 유량을 가동시키는 하나 이상의 업스트림 공정 유닛, 하나 이상의 업스트림 공정 유닛에 연결되는 탱크, 탱크에 연결되는 유입구, 투과물 유출구 및 잔류물 유출구를 갖는 필터, 탱크에 연결된 유입구 및 필터의 유입구에 연결된 유출구를 갖는 공급물 펌프, 및 투과물 유출구에서 유량을 결정하기 위한 투과물 유출구에 배치된 센서를 포함한다. 본 시스템은 센서 및 업스트림 공정에 연결되고, 투과물 유출구에서 유량에 따라 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량을 제어하기 위해 적용되는 제어 시스템을 포함한다.

[0015] 본 개시물의 다른 양태에 따라, 공정 제어 방법이 하나 이상의 업스트림 공정 유닛, 하나 이상의 업스트림 공정 유닛에 연결된 탱크, 및 탱크에 연결되는 유입구, 투과물 유출구 및 잔류물 유출구를 갖는 접선 유동 필터와 함께 사용하기 위해 제공된다. 본 방법은 투과물 유출구에서 유량을 감지하는 단계, 그리고 투과물의 유출구에서의 유량에 따라 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량을 제어하는 단계를 포함한다.

[0016] 본 개시물의 또 다른 양태에 따라, 공정 제어 시스템은 각각 유량을 가동시키는 하나 이상의 업스트림 공정 유닛, 하나 이상의 업스트림 공정 유닛에 연결되는 탱크, 탱크에 연결되는 유입구, 투과물 유출구 및 잔류물 유출구를 갖는 필터, 탱크에 연결된 유입구 및 필터의 유입구에 연결된 유출구를 갖는 공급물 펌프, 및 투과물 유출구에서 유량을 결정하기 위한 투과물 유출구에 배치된 센서를 포함한다. 본 시스템은 또한 센서 및 공급물 펌프에 연결되고, 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 공급물 펌프를 제어하기 위해 적용되는 제어 시스템을 포함한다.

[0017] 본 개시물의 추가의 양태에 따라, 공정 제어 방법은 하나 이상의 업스트림 공정 유닛, 하나 이상의 업스트림 공정 유닛에 연결된 탱크, 및 탱크에 연결된 유입구, 투과물 유출구 및 잔류물 유출구를 갖는 접선 유동 필터와 함께 사용하기 위해 제공된다. 본 방법은 투과물 유출구에서의 유량을 감지하는 단계, 그리고 투과물 유출구에서의 유량에 따라 필터로 탱크로부터의 물질을 펌핑하는 단계를 포함한다.

[0018] 본 개시물의 다른 추가의 양태에 따라, 공정 제어 시스템은 각각 유량을 가동시키는 하나 이상의 업스트림 공정 유닛, 하나 이상의 업스트림 공정 유닛에 연결되는 탱크, 탱크에 연결되는 유입구, 투과물 유출구 및 잔류물 유출구를 갖는 필터, 탱크에 연결된 유입구 및 필터의 유입구에 연결된 유출구를 갖는 공급물 펌프, 및 투과물 유출구에서 유량을 결정하기 위한 투과물 유출구에 배치된 센서를 포함한다. 또한, 본 시스템은 또한 센서 및 공급물 펌프에 연결되고, 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달될 때까지 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 공급물 펌프를 제어하기 위해, 그리고 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달된 이후 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량을 제어하기 위해 적용되는 제어 시스템을 포함한다.

[0019] 본 개시물의 다른 양태에 따라, 공정 제어 방법은 하나 이상의 업스트림 공정 유닛, 각각의 업스트림 공정 유닛이 유량을 갖는 하나 이상의 업스트림 공정 유닛에 연결된 탱크, 및 탱크에 연결된 유입구, 투과물 유출구 및 잔류물 유출구를 갖는 필터와 함께 사용하기 위해 제공된다. 본 방법은 투과물 유출구에서 유량을 감지하는 단계, 예정된 펌핑 유량이 도달될 때까지 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 필터로 탱크로부터의 물질을 펌핑하는 단계, 그리고 후속하여 예정된 펌핑 유량이 도달되는 경우 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량을 제어하는 단계를 포함한다.

[0020] 본 개시물의 또 다른 양태에 따라, 공정 제어 시스템은 각각 유량을 가동시키는 하나 이상의 업스트림 공정 유닛, 하나 이상의 업스트림 공정 유닛에 연결되는 탱크, 탱크에 연결되는 유입구, 투과물 유출구 및 잔류물 유출구를 갖는 필터, 탱크에 연결된 유입구 및 필터의 유입구에 연결된 유출구를 갖는 공급물 펌프, 및 투과물 유출구에서 유량을 결정하기 위한 투과물 유출구에 배치된 센서를 포함한다. 또한, 본 시스템은 또한 센서 및 공급물 펌프에 연결되고, 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달될 때까지 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 공급물 펌프를 제어하기 위해, 그리고 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달된 이후 하나 이상의 업스트림 공정 유닛의 유량과 공급물 펌프의 유량 사이의 불일치를 가능하게 하기 위해 적용되는 제어 시스템을 포함한다.

[0021] 본 개시물의 추가의 양태에 따라, 공정 제어 방법은 하나 이상의 업스트림 공정 유닛, 하나 이상의 업스트림 공

정 유닛에 연결되는 탱크, 및 탱크에 연결되는 유입구, 투과물 유출구 및 잔류물 유출구를 갖는 필터와 함께 사용하기 위해 제공된다. 본 방법은 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달될 때까지 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 탱크로부터의 물질을 상기 필터로 펌핑하는 단계, 그리고 후속하여 예정된 펌핑 유량에 따라 상기 탱크로부터의 물질을 상기 필터로 펌핑하고, 그에 의해 탱크에서의 용적이 변화되게 하는 단계를 포함한다.

[0022] 본 개시물의 또 다른 추가의 양태에 따라, 공정 제어 시스템은 미세여과 유닛, 유입구, 투과물 유출구 및 잔류물 유출구를 갖는 단일-통과 접선 유동 필터, 미세여과 유닛에 연결된 유입구 및 필터의 유입구에 연결된 유출구를 갖는 공급물 펌프, 및 필터의 투과물 유출구에 연결된 유입구를 갖는 투과물 펌프를 포함한다. 본 시스템은 또한 투과물 펌프에 연결되고, 유동 감소 인자(flow reduction factor)를 변화시키기 위해 상기 투과물 펌프를 제어하기 위해 적용되는 제어 시스템을 포함하고, 여기서 유동 감소 인자는 공급물 유동 대 잔류물 유동의 비이다.

[0023] 본 개시물의 다른 양태에 따라, 공정 제어 방법은 유입구, 투과물 유출구 및 잔류물 유출구를 갖는 단일-통과 접선 유동 필터를 통해 물질을 펌핑하는 단계, 그리고 유동 감소 인자를 변화시키기 위해 필터의 투과물 유출구로부터의 투과물을 펌핑하는 단계를 포함하고, 여기서 유동 감소 인자는 공급물 유동 대 잔류물 유동의 비이다.

[0024] 본 개시물의 다른 양태에 따라, 단백질을 정제하는 공정이 제공된다. 본 공정은 하나 이상의 업스트림 공정 유닛, 하나 이상의 업스트림 공정 유닛에 연결되는 탱크 및 탱크에 연결된 유입구, 투과물 유출구 및 잔류물 유출구를 갖는 접선 유동 필터를 이용한다. 본 공정은 단백질이 상기 잔류물 유출구로부터 다시 상기 탱크로 유동하는 경우 상기 투과물 유출구에서의 유량을 감지하는 단계를 포함한다. 이후, 본 공정은 (i) 내지 (iv) 중 하나를 수행하는 단계를 포함한다. (i)에 따라, 본 공정은 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량을 제어하는 단계를 포함하고, 상기 유량은 적어도 부분적으로 상기 단백질을 포함하는 물질의 유량이다. (ii)에 따라, 본 공정은 예정된 펌핑 유량이 도달될 때까지 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 탱크로부터의 상기 단백질을 적어도 부분적으로 포함하는 물질을 상기 필터로 펌핑하는 단계를 포함할 수 있다. (iii)에 따라, 본 공정은 예정된 펌핑 유량이 도달될 때까지 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 탱크로부터의 상기 단백질을 적어도 부분적으로 포함하는 물질을 상기 필터로 펌핑하는 단계, 그리고 후속하여 예정된 펌핑 유량이 도달하면 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량을 제어하는 단계를 포함한다. (iv)에 따라, 본 공정은 예정된 펌핑 유량이 도달될 때까지 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 탱크로부터의 상기 단백질을 적어도 부분적으로 포함하는 물질을 상기 필터로 펌핑하는 단계, 그리고 후속하여 예정된 펌핑 유량에 따라 상기 탱크로부터의 물질을 상기 필터로 펌핑하여 이에 의해 상기 탱크에서의 용적을 변화시키는 단계를 포함할 수 있다. 마지막으로, (i) 내지 (iv) 중 임의의 하나의 것 이후, 본 공정은 용리액에서의 단백질을 정제하는 단계, 그리고 단백질을 임의로 약학적으로 허용가능한 부형제에서 제형화하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0025] 본 개시물은 수반되는 도면과 결합하여 이루어지는 하기 설명으로부터 보다 완전하게 이해될 것으로 여겨진다. 일부 도면은 다른 구성요소를 보다 명확하게 보여주기 위해 선택된 구성요소의 생략에 의해 단순화된 것일 수 있다. 일부 도면에서의 이러한 구성요소의 생략은 대응되는 기재된 설명에 명백하게 기술된 것을 제외하고, 예시적인 구현예 중 임의의 것에서 특정 구성요소의 존재 또는 부재를 본질적으로 나타내는 것은 아니다. 도면 중 어느 것도 본질적으로 실제 치수인 것은 아니다.

도 1은 연속식 단일-통과 접선 유동 여과 (SPTFF)와 조합되어 사용되는 제어 시스템의 개략도이고;

도 2는 도 1의 제어 시스템에 의해 실시되는 단계식 또는 체계화된 제어 방법의 블록 선도이고;

도 3은 도 2의 구현예에 따른 단계적 제어 방법의 예에 대한 시간에 따른 용적 감소 인자 (VRF)의 그래프이고;

도 4는 단계적 제어 방법 및 연속적으로 변화가능한 제어 방법의 예에 대한 시간에 따른 용적 감소 인자 (VRF)의 그래프이고;

도 5는 연결식 공정 시스템과 조합되어 사용되는 제어 시스템의 개략도이고;

도 6은 도 5의 제어 시스템에 의해 실시가능한 가변 유동 제어 방법(variable flow control method)의 블록 선도이고;

도 7은 도 5의 제어 시스템에 의해 실시가능한 일정 유동 제어 방법(constant flow control method)의 블록 선도이고;

도 8은 도 5의 제어 시스템에 의해 실시가능한 하이브리드 제어 방법의 블록 선도이고;

도 9는 도 5의 제어 시스템에 의해 실시가능한 서지 제어 방법(surge control method)의 블록 선도이고;

도 10은 도 5의 제어 시스템에 의해 실시가능한 고용적(high volume) 설정치, 고정 플럭스 제어 방법의 블록 선도이고;

도 11은 연마 단계로서 컬럼 2 및 3을 갖는 3개의 컬럼 mAb 정제 공정을 예시하고 있고, 여기서 컬럼 2는 통상적으로 결합 및 용리 방식으로 작동되는 양이온 교환 크로마토그래피이고, 컬럼 3은 일반적으로 관류 방식으로 작동되는 음이온 교환 크로마토그래피로서 명시되고, 그리고 여기서 박스는 연결식 공정에서 동시에 작동되는 단계들을 나타내고, 대집단(large pool) 탱크는 연결식 공정에서 작은 서지 용기로 전환될 수 있고;

도 12는 연결식 공정 설계의 개략적 도면이고, 이는 작업 순서, 단계들의 연결성, 서지 용기의 위치, 스플릿 스트림 샘플링, 및 인라인 적정을 예시한다.

도 13은 연결식 다운스트림 공정에 대한 TFF 제어 전략을 나타내는 표이고;

도 14a는 STIC 멤브레인 크로마토그래피 (mAb A)에 걸친 CHOp 제거의 장입 전도도의 영향을 예시하는 데이터의 그래프이고, 여기서 대조군 염 및 고염(high salt) 실험이 각각 16 및 28 mS/cm의 장입 전도도를 가지며, 이는 집단 (수직 바) 및 % CHOp 감소 (기울어진 선)에서의 CHOp 수준에 대한 장입 전도도의 최소 영향을 보여주고;

도 14b는 mAb A의 STIC 멤브레인 크로마토그래피에 걸친 CHOp 감소에 대한 pH의 영향을 예시하는 데이터의 그래프이고, 여기서 이러한 4개의 실험에 대한 장입 물질은 이의 해당 pH에 대해 2 M Tris에 의한 CEX 집단 (pH 5.0, 전도도 16 mS/cm) 의 적정에 의해 준비하였고, 이는 집단 (수직 바) 및 % CHOp 감소 (곡선)에서의 CHOp 수준에 대한 결과는 더 나은 숙주 세포 단백질 제거가 STIC에 대해 더 높은 pH에서 달성되는 것을 보여주는 것을 나타내고;

도 15는 0.1의 용적비에서 400mM Tris pH 8.3의 적정제를 사용한 pH 5.0 내지 pH 8.0의 mAb A CEX 용리 스트림의 인라인 pH 적정을 예시하는 데이터의 그래프이고, 이는 표적 pH (직선 수평선)는 용리 피크 (단백질 농도, 종형 곡선; 전도도, 기울어진 선)를 통해 달성된 결과를 보여주고;

도 16은 mAb D와 함께 Viresolve Pro에 대해 2개의 상이한 프리필터를 사용하는 회분식 방식에서의 장입 pH의 영향을 평가하는 데이터(상부 패널: Viresolve Shield; 하부 패널: Viresolve Prefilter)의 2개의 그래프를 나타내고, 여기서 시험 조건은 25 g/L 단백질 농도, 0.1M NaAcetate 0.15M NaCl, 30psi 정압에서의 것이고, 여기서 조건은 하기와 같이 도시되고: pH 5.0 (다이아몬드형), pH 6.5 (사각형), pH 7.5 (삼각형);

도 17a 및 17b는 17a) 5 분 및 17b) 25 분의 중간 서지 용기에서의 체류 시간으로의 mAb C (0.1M NaAcetate pH 5 중)를 사용하는 연결식 CEX-VF(VPF-VPro) 작업에 대한 바이알 여과 프로파일을 나타내는 그래프이고, 여기서 단백질 농도 (다이아몬드형), 전도도 (사각형), 압력 (삼각형), 투과도 (Xs)에 대한 경향을 나타내고;

도 18은 mAb C (0.1M NaAcetate pH 5 중)와 함께 VPF-VPro를 사용하는 회분식 대 연결식 (CEX-VF) 방식에 대한 VF 투과도 경향의 비교를 예시하는 그래프이고, 여기서 연결식 데이터는 대각선에 따라 클러스터링되는 것을 나타내고, 회분식 데이터는 클러스터링된 선 아래에 위치하는 사각형, 원, 및 다이아몬드로 나타나고, 여기서 회분식 데이터는 각각의 독립적인 실험에 대한 평균 VPro 투과도로서 나타나고; 사각형은 고압을 나타고, 원은 저압, 다이아몬드는 중심점 및 개방형은 저염 조건을 나타내고, 한편 채워진 형태는 고염 조건을 나타내고;

도 19는 mAb C를 사용한 저염 및 고염 조건 (100mM 아세테이트 pH 5 중, 개방형 기호에서 저염 30mM NaCl 또는 폐쇄형 기호에서 고염 150 mM NaCl)에 대한 20 psi TMP에서의 TFF 투과물 플럭스 대 농도를 예시하는 그래프이고, 여기서 데이터 지점은 기호에 의해 표시되고, 선은 모델 최적화를 나타내고, 화살표는 연결식 공정의 종료(UF1a의 종료)까지 38 LMH의 일정한 투과물 플럭스를 유지하는데 필요한 공급물 교차유동 증가속도를 나타내고;

도 20은 개발되는 연결식 공정의 예의 표를 나타내고;

도 21a는 작업: CEX 결합/용리 크로마토그래피 (CEX), HIC 관류 크로마토그래피 (HIC FT), 바이알 여과 (VF), 및 TFF (UF1a)의 순서로 상기 단계를 사용하는 mAb B 연결식 다운스트림 공정을 통한 물질 전달을 예시하는 데이터의 그래프이고, 여기서 공정의 연결 부분은 UF1a에서 종료하고; UF1b, DF, 및 OC는 개별 방식으로

작업되고;

도 21b는 연결식 바이알 여과 경향을 예시하는 데이터의 그래프로서, 여기서 설정치 (파선) 주변에서의 유동 변화 (다이아몬드형), 및 이에 따른 Viresolve Pro에 걸친 압력 강하 (삼각형)는 TFF 잔류물 탱크에 대한 자동 수준 제어의 결과이고, 그리고 VPro 필터 투과도 (사각형)에서의 하락은 필터 상의 피크 단백질 농도 (Xs)에서의 증가에 상응하고;

도 21c는 연결식 TFF 경향 (도 20, 표 2에 나타낸 실시 파라미터)를 나타내는 데이터의 그래프로서, 여기서 공급물 교차유동 (삼각형) 및 TMP (사각형)은 일정한 투과물 유량 (*s)을 유지시키기 위해 UF1a 과정에서 증가되고, 그리고 VF 유량 설정치 및 TFF 투과물 유량 설정치는 일치되어 8 LPM 보다 약간 위에 위치한 수평 파선에 의해 나타나고, VF 유량 (+s) 및 TFF 탱크 수준 (Xs)에서의 약간의 진동은 자동화 제어에 기인한 것이고; 그리고

도 22는 100L 서지 탱크의 연결식 공정 사용과 비교되는 개별 방식으로 작동되는 mAb A - E에 대한 B/E (3개의 각각의 클러스터 중 가장 왼쪽의 수직 바), FT (3개의 각각의 클러스터 중 중간 수직 바), 및 VF (3개의 각각의 클러스터 중 가장 오른쪽의 수직 바) 단계에 관한 추정 집단 용적을 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 개시물은 하기 정의에 따르는 하기 용어를 사용한다.

[0027] 여과: 성분들 사이의 크기 차이에 따라 액체 용액 또는 현탁액에서 성분을 분리하기 위한 멤브레인을 사용하는 압력-유도 분리 공정.

[0028] 공급물: 필터로 유입되는 액체 용액 또는 현탁액.

[0029] 여과물: 멤브레인을 통과하는 성분 또는 성분들. 또한 투과물로서 지칭됨.

[0030] 잔류물: 멤브레인을 통과하지 못하고, 그러나 대신 멤브레인에 의해 보유되는 성분 또는 성분들.

[0031] 접선 유동 여과 (TFF): TFF에서, 액체 용액 또는 현탁액이 멤브레인의 표면에 따라 접선방향으로 펌핑된다. 또한, 교차-유동 여과(cross-flow filtration)로 지칭됨.

[0032] 단일-통과 접선 유동 여과 (SPTFF): 공급물 유동이 재순환 없이 단일 통과로 필터 장치를 통해 유도되는 TFF의 유형.

[0033] 미세여과: 성분들의 잔류물, 예컨대 콜로이드성 물질, 단백질 (관심대상의 생성물 포함) 및 염으로부터의 무손상 세포 및 상대적으로 큰 세포 잔해/용해물을 분리하기 위해 사용되는 여과. 이러한 유형의 분리를 위한 멤브레인 기공 크기는 예를 들면 0.05 μm 내지 1.0 μm 범위로 존재할 수 있다. 미세여과 공정으로부터의 여과물 또는 투과물은 미세여과 수집 유체로 지칭될 수 있다.

[0034] 한외여과: 예컨대 탈염 또는 농축 과정에서와 같은 예를 들면, 상대적으로 작은 펩타이드 및 버퍼 성분으로부터의 단백질 (관심대상의 생성물 포함)을 분리하기 위해 사용되는 여과. 이러한 유형의 분리에 대한 멤브레인의 등급은 명목상 분자량 제한으로 표현될 수 있고, 이는 예를 들면 1kD 내지 1000 kD 범위일 수 있다.

[0035] 정용여과: 예를 들면, 생성물 수율 또는 순도를 증가시키기 위해 다른 카테고리의 분리와 조합하여 실시될 수 있는 여과 공정. 버퍼는 재순환 탱크로 도입되고 한편 여과물은 유닛 작동으로부터 제거된다.

[0036] 막통과 압력 (TMP): TMP는 공급물로부터 멤브레인의 여과면으로의 인가된 평균 압력이다.

[0037] 연결식 공정: 업스트림 공정 및 다운스트림 공정이 연결되며, 여기서 다운스트림 공정은 업스트림 공정과 동시에 사용된다. 즉, 업스트림 및 다운스트림 공정의 작동이 적어도 일시적으로 중복된다.

[0038] 본 개시물은 필터 및 여과 시스템에 대한 다양한 공정 제어 방법 및 시스템에 관한 것이다. 앞서 공정 제어 방법 및 시스템이 여과물 (투과물) 유동 제어와 함께 단일-통과 접선 유동 여과를 사용하는 미세여과 수집 유체의 농도에 관하여 기재되어 있다. 추가로, 공정 제어 방법 및 시스템은 하나 이상의 업스트림 유닛 작동과 함께 동시에 사용되는 (즉, 연결되는) 한외여과 구성요소의 작동에 대해 본원에 기재되어 있다.

[0039] 상기 언급된 바와 같이, 미세여과는 관심대상의 생성물로부터의 세포 및 세포 잔해를 분리하기 위해 사용된다. 특히, 미세여과 구성요소는 생물반응기로부터의 수집 스트림과 일렬로 배치된다. 미세여과 구성요소는 생물반응기로 세포 및 세포 잔해를 복귀시키고, 한편 여과물은 추가의 다운스트림 공정을 위해 수집된다.

[0040] 미세여과는 생성물 수율을 증가시키기 위해 정용여과와 조합될 수 있다. 그러나, 정용여과는 미세여과 구성요소로부터 수집되는 여과물의 액체 용적을 증가시킨다. 80-90% 초과의 생성물 수율을 얻기 위해, 미세여과 구성요소로부터 수집되는 여과물의 액체 용적은 생물반응기의 작업 용적의 적어도 3배일 수 있다. 수집된 상당한 양의 액체 용적은 규모가 커질수록 정용여과의 유용성을 제한할 수 있다.

[0041] 대규모 작업에서 생성물 수율을 증가시키기 위해서 미세여과와 함께 정용여과를 사용하기 위해서, 공정 제어 방법 및 시스템은 미세여과 구성요소로부터의 투과물 (본원에서 미세여과 수집 유체로서 지칭됨)의 농도에 대해 기재하고 있다. 특히, 이러한 공정 제어 방법 및 시스템은 투과물 유동 제어와 함께 단일-통과 접선 유동 여과 (SPTFF)를 사용한다.

[0042] 일정한 용적의 정용여과 방식으로의 미세여과의 작업 과정에서, 생성물 농도는 생산 단계 과정에서 생물반응기에서의 생성물의 축적으로 인해 높게 출발된다. 즉, 생성물 농도가 높게 출발되고, 이는 아직 생성물의 제거가 없고, 버퍼가 정용여과 공정의 일부로서 추가되지 않았기 때문이다. 생물반응기에서의 (그리고 미세여과 구성요소의 여과물에서의) 생성물 농도는 생성물이 미세여과 구성요소를 통과하고 배지가 정용여과 공정의 일부로서 첨가됨에 따라 감소될 것이다. 생성물 농도를 변화시키는 것은 미세여과 수집 유체를 농축시키기 위한 SPTFF 다운스트림의 용도에 대해 영향을 줄 것이고, 이는 공급물의 투과물로의 SPTFF 전환이 공급물 농도뿐 아니라 교차-유동 속도 및 막통과 압력에 좌우될 것이기 때문이다. 미세여과 구성요소 여과물에서 생성물 농도를 변화시키는 것은 SPTFF에서 공급물로부터 투과물로의 전환을 변화시킬 것이다.

[0043] 본 개시물에 따라, 단일-통과 접선 유동 여과 (SPTFF)는 미세여과 수집 유체의 농도를 달성하기 위해 제어 시스템 및 방법과 조합하여 사용된다.

[0044] 장치와 관련하여, 도 1은 미세여과 유닛(51), 미세여과 유닛(51)로부터의 여과물을 수용하는 선택적인 제1 탱크(52), 공급물 펌프(54)(이는 다른 구현예에 따라 미세여과 유닛(51)에 직접적으로 연결되어, 미세여과 유닛(51)로부터의 여과물을 제거하고 다운스트림 구성요소 예컨대 SPTFF(56)에 걸쳐 공급물 유동을 유도하는 이중 목적을 수행함), SPTFF(56), 투과물 (또는 여과물) 펌프(58) 및 잔유물을 보유하는 제2 탱크(60)를 포함하는 공정 시스템(50)을 예시하고 있다. 라인(62)은 제1 탱크(52)의 유출구(64)를 공급물 펌프(54)의 유입구(66)에 연결하고, 라인(68)은 공급물 펌프(54)의 유출구(70)를 SPTFF(56)의 유입구(72)와 연결한다. 라인(74)은 잔류물 유출구(76)를 제2 탱크(60)에 연결하고, 한편 라인(78)은 투과물 유출구(80)를 투과물 펌프(58)의 유입구에 연결한다. 배압 제어 밸브(82)는 잔류물 유출구(76)와 제2 탱크(60) 사이의 라인(74)에 배치될 수 있다. 라인(62, 68, 74, 및 78)은 추가로 도 1에 예시되지 않은 다른 장비, 클램프 및 커넥터를 포함할 수 있다.

[0045] 도 1에 예시되어 있는 바와 같이, 제어 시스템(120)이 제공된다. 공급물 펌프(54) 및 밸브(82)는 수동적으로 고정될 수 있고, 한편 투과물 펌프(58)는 도 2에 예시된 제어 방법에 따라 제어 시스템(120)에 의해 제어된다. 다른 구현예에 따라, 제어 시스템(120)은 공급물 펌프(54), 투과물 펌프(58) 및 밸브(82)에 연결될 수 있고, 이는 공급물 펌프(54), 투과물 펌프(58) 및 밸브(82)를 제어하기 위해 구성되거나 적용될 수 있다.

[0046] 특정 구현예에 따라, 제어 시스템(120)은 하나 이상의 프로세서(122) 및 메모리(124)를 포함할 수 있고, 메모리(124)는 하나 이상의 프로세서(122)에 연결된다. 하나 이상의 프로세서(122)는 프로그래밍되어 투과물 펌프(58), 경우에 따라 도 2에 예시된 제어 방법에 따라 공급물 펌프(54) 및 밸브(82)를 제어할 수 있다. 하나 이상의 프로세서(122)에 의해 실행된 명령어는 메모리(124)에 저장될 수 있고, 이러한 메모리(124)는 유형의 비-일시적 컴퓨터-판독가능한 매체 또는 저장 매체, 예컨대 다양한 형태(예를 들면, 하드 디스크, 광학적/자기 매체, 등)로의 읽기 전용 메모리 (ROM) 또는 랜덤 액세스 메모리 (RAM)를 포함할 수 있다.

[0047] 본 개시물에 따른 제어 시스템 및 방법은 표적 용적 감소 인자 (VRF)를 달성하기 위한 가변 유동 감소 인자 (FRF)의 전략을 이용한다. FRF는 공급물 유동 대 잔류물 유동(공급물 유동/잔류물 유동)의 비로서 정의된다. VRF는 공급물 용적 대 누적 잔류물 용적 (공급물 용적/잔류물 용적)의 비로서 정의된다. 가변 유동 전환으로 원하는 표적 VRF를 달성하기 위해, 본 개시물에 따른 제어 시스템 및 방법은 수집 과정에 걸친 FRF에서의 변화와 함께 투과물 유동 제어 전략을 실시한다. 특히, 더 낮은 표적 FRF는 생성물 농도가 높은 경우에 (즉, 수집 공정 초기에) 이용된다. 반면, 더 높은 표적 FRF는 생성물 농도가 낮은 경우에 사용된다. 생성물 농도가 높은 것으로부터 낮은 것으로 변화함에 따라 표적 FRF가 변화된다.

[0048] 본 개시물의 제1 구현예에 따라, 표적 FRF는 일련의 단계적 변화로 변화된다. 투과물 유동 제어 전략은 하기와 같이 표현될 수 있다:

[0049] $VRF\ 합계 = \Delta T_{합계} / (\Delta t_1/FRF_1 + \ldots \Delta t_n/FRF_n)$ (식 1)

[0050] 여기서 VRF 합계는 누적 용적 감소 인자이고;

[0051] $\Delta T_{합계}$는 총 공정 시간이고;

[0052] Δt는 단계의 시간 간격이고; 그리고

[0053] FRF는 단계의 용적 감소 인자이다.

[0054] 도 2는 제어 방법(150)으로서 표시되는 제어 방법의 구현예를 예시하고 있다. 본 방법(150)은 블록(152)으로 시작되고, 여기서 공급물 펌프(54)는 요구되는 생물반응기 관류 속도에서 실시되도록 설정된다. 본 방법(150)은 블록(154)까지 지속되고, 여기서 배압 제어 밸브(82)는 SPTFF(56)에 대해 요구되는 배압에 대해 설정된다. 블록(152, 154)에서의 작동은 연속적으로 또는 동시에 수행될 수 있는 것으로 인식될 수 있다. 본 방법(150)은 블록(156)까지 통과되고, 여기서 투과물 펌프(58)의 작동이 표적 FRF를 달성하기 위한 표시된 펌프 속도로 설정된다. 본 방법(150)은 이후 블록(158)까지 지속되고, 여기서 투과물 펌프(58)는 표시된 펌프 속도로 수행된다. 본 방법은 블록(160)까지 개발되고, 여기서 투과물 펌프(58)가 표적 FRF를 변화시키기 위해 조정되어야 하는지 여부를 결정한다. 표적 FRF가 변화되도록 (그리고 특정 구현예를 참조하면 증가되도록) 투과물 펌프 속도를 변화시키는 시점이 아닌 것으로 블록(160)에서 결정이 이루어지는 경우, 본 방법(150)은 블록(158)로 되돌아간다. 펌프 속도가 변화되어야 하는 것으로 블록(160)에서 결정이 이루어지는 경우, 본 방법(150)은 블록(162)까지 통과되고, 여기서 펌프 속도는 신규 표적 FRF를 달성하도록 변화된다.

[0055] 도 3은 단계적 제어 시스템 및 방법과 조합하는 본 개시물에 따라 SPTFF 시스템의 사용을 통해 달성가능한 FRF의 예를 예시하고 있다. 본 방법이 72시간의 기간에 걸쳐 3개의 단계에서 실시된 것을 인식할 수 있을 것이다. 각각의 단계를 24 시간의 기간 동안 수행한다. 상기 논의와 일치되게, 제1 단계를 위해 사용되는 FRF는 생성물 농도가 높은 경우에 낮고, 제3 및 최종 단계에 대해 사용된 FRF는 생성물 농도가 낮은 경우 높다. 특히, 제1 단계에 대해 사용되는 FRF는 2.1이고, 제2 단계에 대해 사용되는 FRF는 2.7이고, 제3 단계에 대해 사용되는 FRF는 3.4이다. 상기 식 1을 사용하는 경우, 결과로서의 VRF 합계는 2.6이다.

[0056] 도 3의 예가 3개의 단계를 포함하는 한편, 더 적거나 많은 수의 단계(예를 들면 2개의 단계, 4개의 단계)가 사용될 수 있는 것으로 인식될 수 있을 것이다. 사실상, 도 4는 본 개시물의 구현예를 예시하고, 여기서 FRF가 단계적인 방식으로 수행되는 구현예가 FRF가 지속하여 변화되는 구현예와 비교된다. 또한, 각각의 단계가 동일한 기간에 걸쳐 수행되는 한편, 투과물 펌프 속도가 표적 FRF를 달성하기 위해 유지될 수 있는 기간은 제1 단계가 연속적인 단계보다 더 길거나 그 반대이도록 변화될 수 있다. 또한, 표적 FRF에서의 변화(이러한 경우 증가)가 실질적으로 도 3의 예에서와 실질적으로 동일한 것인 경우, 이는 연속 단계들에 대한 표적 FRF들 사여기에서의 차이가 실질적으로 동일할 것을 요구하지 않음이 인식될 수 있을 것이다.

[0057] 표적 VRF는 공급물 유동에 따라 멤브레인 면적을 크기화하고, 그리고 본 시스템의 압력 제한 내에서 FRF를 지정함으로써 달성될 수 있다. FRF에서의 각각의 단계적인 변화는 특정 막통과 압력 (TMP) 윈도우 내에서 작동하도록 지정되어 원하는 총 VRF를 제공할 수 있다.

[0058] 미세여과 수집 유체의 농도에 대해 공정 제어 시스템 및 방법을 논의한 바와 같이, 한외여과 및 연결된 공정과 함께 사용되는 다른 공정 제어 시스템 및 방법은 도 5-10을 참조하여 논의될 수 있다. 특히, 도 5는 도 6-10의 방법을 실시할 수 있는 연결된-공정 시스템(제어 시스템과 관련됨)을 예시하고 있다.

[0059] 상기에서 논의된 바와 같이, 한외여과는 예를 들면 더 작은 펩타이드 및 염으로부터 관심대상의 생성물, 단백질을 분리하기 위해 멤브레인을 사용하는 분리 공정이다. 한외여과의 경우, 잔류물은 추가의 공정, 패키징 등을 위해 수집되고, 한편 투과물 또는 여과물이 제거된다. 한외여과는 더 낮은 염 함량과 함께 농축된 생성물을 생성한다. 따라서, 한외여과는 탈염 공정으로서 지칭될 수 있다.

[0060] 예컨대 단일클론 항체 (mAb)에 대한 전형적인 한외여과 공정에서, 예를 들면, 한외여과 공정은 고정된 공급물 교차유동 속도로 회분식으로 별개의 유닛 작동으로서 실시된다. 상기 유닛이 업스트림 또는 다운스트림 공정에 직접적으로 연결되지 않고, 그러나 대신 회분식으로 작동되는 의미에서 본 공정은 별개의 것이다. 선택되는 고정된 공급물 교차유동 속도는 통상적으로 공정 효율을 최대화하기 위한 시스템 설계에 의해 허용되는 최대 공급물 교차유동 속도이다.

[0061] 생성물 농도가 증가함에 따라, 투과물 플럭스가 감소한다. 이러한 감소는 일반적으로 농도 분극 구배

(concentration polarization gradient)에 기여한다. 즉, 여과 공정이 진행됨에 따라, 물질의 실질적 고농도의 경계층이 멤브레인의 표면 상이나 근처에서 축적(builds up)을 유지하고 있다. 경계층은 멤브레인을 통해 물질의 유동을 방해하고, 그리하여 투과물의 생성에 영향을 미친다.

[0062] 사실상, 한외여과 공정이 필터에 부착된 공급물 탱크를 사용하여 회분식으로 작동되는 경우, 공급물 탱크로부터 필터로의 유입구 유량은 전형적으로 투과물 유량과 일치하도록 감소되어 단위 시간당 일정한 잔류물 용적을 유지할 것이다. 한외여과가 별개의 유닛 작동으로서 작동되기 때문에, 이러한 유량 감소로 인해 임의의 다른 유닛 작동에 영향을 미치지 않는다.

[0063] 그러나, 도 5는 한외여과 공정 유닛(202)이 업스트림 공정 유닛(204) (예를 들면, 크로마토그래피 공정 유닛, 바이러스 여과 공정 유닛)에 연결되는 시스템(200)을 예시하고 있다. 한외여과 공정 유닛(202)은 업스트림 공정의 생성물이 공급되는 탱크 (또는 재순환 용기)(206), 공급물 펌프(208), 접선 유동 필터 (TFF)(210), 및 배압 밸브(212)를 포함한다. 라인(214)은 공급물 탱크(206)의 유출구(216) 및 필터(210)의 유입구(218)에 연결된다. 추가의 라인(220)은 펌프(208)의 유출구(222) 및 필터(210)의 유입구(224)에 연결된다. 추가의 잔류물은 리턴 라인(226)은 필터(210)의 유출구(228) 및 공급물 탱크(206)에 연결된다. 투과물은 필터(210)의 투과물 유출구(230)에서 한외여과 공정 유닛(202)으로부터 배출된다.

[0064] 한외여과 공정 유닛(202)이 도 5에서와 같이 업스트림 공정에 연결되는 경우, 투과물 유량(즉, 유출구(230)에서의)에 있어서의 임의의 감소는 업스트림 작업에 영향을 미칠 것이다. 즉, 투과물 유량에서의 감소와 일치시키기 위해 필터로의 유입구 유량을 감소시키는 것은 통상적인 것이다. 다른 한편, 업스트림 공정 작업 예컨대 크로마토그래피 및 바이러스 여과는 통상적으로 일정한 유량으로 실시된다. 업스트림 공정 작업이 한외여과 공정 유닛(202)과 연결되는 경우, 용액이 한외여과 공정 유닛(202)과 업스트림 작업(204) 사이의 작업에 있어서의 차이를 다루기 위해 제공되어야 한다. 본 개시물의 구현예에 따라, 제어 시스템과 방법은 일정한 유량으로 업스트림 공정(204) (예를 들면, 크로마토그래피 공정 유닛)을 실시하고, 가변적인 투과물 유량을 갖는 한외여과 공정 유닛(202)에 대해 공정들을 (직접적으로 또는 바이러스 여과 공정 유닛을 통해 간접적으로) 연결하기 위한 요구사항을 다룰 것이 요구된다.

[0065] 도 5에 예시된 바와 같이, 제어 시스템(240)이 제공될 수 있다. 제어 시스템(240)은 업스트림 공정(204) 및/또는 공급물 펌프(208)에 연결될 수 있다. 제어 시스템(240)은 도 6-10에 기재된 제어 방법 중 하나 이상을 실시하기 위해 업스트림 공정(204) 및/또는 펌프(208)를 제어하도록 구성되거나 적용될 수 있다. 제어 시스템(240)은 또한 투과물 유량을 결정할 수 있는 하나 이상의 센서(246)에 연결될 수 있다.

[0066] 특정 구현예에 따라, 제어 시스템(240)은 하나 이상의 프로세서(242) 및 메모리(244)를 포함할 수 있고, 메모리(244)는 하나 이상의 프로세서(242)에 연결된다. 하나 이상의 프로세서(242)는 도 6-10 중 하나 이상에 예시된 제어 방법에 따라 업스트림 공정(204) 및 펌프(208)를 제어하기 위해 구성되거나 적용될 수 있다. 하나 이상의 프로세서(242)에 의해 실행된 명령어가 메모리(244)에 저장될 수 있고, 이러한 메모리(244)는 유형의 비-일시적 컴퓨터-판독가능한 매체 또는 저장 매체, 예컨대 다양한 형태(예를 들면, 하드 디스크, 광학적/자기 매체, 등)로의 읽기 전용 메모리 (ROM) 또는 랜덤 액세스 메모리 (RAM)를 포함할 수 있다.

[0067] 도 6에 예시되고 가변 유동 전략으로서 지칭되는 제1 방법(250)에 따라, 제어 시스템(240)은 업스트림 공정(204)의 작업을 변화시킨다. 특히, 방법(250)은 블록(252)에서 시작되며, 여기서 제어 시스템(240)은 예를 들면 센서(246)으로부터 수신된 신호에 대한 반응으로 투과물 유량이 감소하고 있는지를 결정한다. 방법(250)은 블록(254)까지 지속되며, 여기서 업스트림 공정에서의 변화가 투과물 유량에 있어서의 감지된 감소에 따라 결정된다. 다른 관점에 있어서, 방법(250)은 투과물 유량에서의 감지된 변화에 대하여 블록(254)에서의 적절한 반응을 결정한다. 예를 들면, 결정된 변화는 일정한 잔류물 용적을 유지하기 위한 업스트림 공정(204)의 유량(예를 들면, 크로마토그래피 공정 유닛의 유량)에 대한 예정된 감소일 수 있다. 다른 구현예에 따라, 상기 변화는 투과물 유량을 업스트림 공정(204)의 유량과 관련되는 식에 따라 계산된 감소일 수 있다. 방법(252)은 이후 블록(254)에서 결정되는 변화에 따른 블록(256)에서의 업스트림 공정(204)을 제어한다.

[0068] 도 7에서 예시되고, 일정 유동 전략(constant flow strategy)으로 지칭되는 제2 방법(260)에 따라, 제어 시스템(240)은 펌프(208)의 작업을 변화시킨다. 특히, 방법(260)은 블록(262)에서 시작되며, 여기서 제어 시스템(240)은 예를 들면 센서(246)으로부터 수신된 신호에 대한 반응으로 투과물 유량이 감소하고 있는지를 결정한다. 방법(260)은 블록(264)까지 지속되며, 여기서 펌프(208)의 작업에서의 변화(즉, 펌프(208)의 유출구에서의 유량에서의 증가 또는 감소)가 투과물 유량에서의 감지된 감소에 따라 결정된다. 예를 들면, 변화는 일정한 유량으로 투과물 유량을 변화시키기 위한 공급물 교차유동 속도에서의 변화일 수 있고, 이러한 속도는 업스트림 공정

(204)의 유량과 일치되고, 이는 또한 탱크(206)에서의 일정한 용적을 위해 제공되어야 한다. 이와 관련하여, 투과물 유량은 공급물 교차유동 속도에 매우 의존적이며; 공급물 교차유동 속도가 높을수록 더 높은 물질 전달 계수를 야기하고, 이에 따라 더 높은 투과물 플럭스에 영향을 준다는 것을 주지하여야 한다. 방법(260)은 이후 블록(266)까지 지속되며, 여기서 제어 시스템(240)은 블록(264)에서 결정된 변화에 따라 펌프(208)의 작업을 제어한다.

[0069] 상기 쟁점을 다루기 위한 추가의 방법은 또한 업스트림 공정(204)과 유출구(230)로부터의 투과물의 유량을 불일치되게 할 수 있다. 가변 용적 전략으로도 지칭되는 본 방법에 따라, 탱크(206)는 적절하게 크기화되어 불일치에 의해 야기된 잔류물 용적에 있어서의 서지(surge) (즉, 증가 또는 감소)를 수용하여야 한다. 도 6 및 7에 기재된 방법(250, 260)과 달리, 이러한 방법은 활성 제어 방법이 아닌 수동 제어 방법이다.

[0070] 도 8-10은 제어 시스템(240)에 의해 실시될 수 있는 3개의 추가적인 제어 방법을 예시하고 있고, 도 8의 제어 방법은 하이브리드 전략으로서 지칭되고, 도 9의 제어 방법은 서지 전략 (이는 탱크(206)에서 발생된 서지를 단순히 허용하는 것과는 상이함)으로 지칭되고, 도 10의 제어 방법은 고용적 설정치, 고정 플럭스 전략(high volume setpoint, fixed flux strategy)으로 지칭된다.

[0071] 도 8에 예시된 방법(270)에 따라, 방법(270)은 초기에 방법(260)의 단계를 사용한다. 즉, 방법(270)은 블록(272)에서의 투과물 유량에 있어서의 변화가 존재하는지를 결정하고, 블록(274)에서의 펌프(208)에 대한 변화를 결정하고, 그리고 블록(276)에서의 변화를 실현한다. 방법(270)은 이후 블록(278)에서 예정된 유량이 펌프(208)의 작업을 위해 도달되었는지 여부를 결정하고, 방법(270)은 블록(280, 282, 284)까지 진행되고, 여기서 방법(270)은 투과물 유량에서의 감소가 있었는지 여부를 결정하고, 업스트림 공정(204)에 대한 변화를 결정하고, 그리고 변화를 실현한다. 특정 구현예에 따라, 예정된 유량은 최대 시스템 유량일 수 있다. 예정된 유량 (및 특히, 최대 시스템 유량)에 따라 펌프(208)의 작업을 제한한 결과, 블록(282)에서 결정되고 블록(284)에서 실현된 변화는 방법(250)에 비해 감소된다. 추가로, 고정된 잔류물 용적이 유지되고, 이는 더 작은 탱크 요건을 가능하게 한다.

[0072] 도 9에 예시된 방법(290)에 따라, 방법(290)은 또한 초기에 방법(260)의 단계를 사용한다. 즉, 방법(290)은 블록(292)에서의 투과물 유량에 있어서의 변화가 존재하는지를 결정하고, 블록(294)에서의 펌프(208)에 대한 변화를 결정하고, 그리고 블록(296)에서의 변화를 실현한다. 방법(290)은 이후 예정된 유량이 펌프(208)의 작업을 위해 도달되었는지 여부를 결정하고, 방법(270)은 탱크 용적이 상기 기재된 수동 방법에 따라 서지될 수 있는 블록(300)까지 진행된다. 특정 구현예에 따라, 예정된 유량은 최대 시스템 유량일 수 있다. 방법(290)은 업스트림 공정(204)이 일정한 유량으로 작업을 지속할 수 있게 하는 장점을 가진다.

[0073] 도 10에 예시된 방법(310)에 따라, 더 큰 탱크(206)는 한외여과 공정 유닛(202)에서 농도를 최소화하기 위해 사용된다. 상기에서 언급된 바와 같이, 생성물 농도는 분극 구배 형성에 대한 주요 원인이다. 종래의 TFF 회분식 한외여과 공정 유닛에 비해 유닛(202)에서의 최대 농도를 제한함으로써, 달성될 수 있는 최대 투과물 유속은 종래의 회분식 공정 유닛에 비해 증가한다. 더 높은 최대 투과물 유속의 결과는 업스트림 공정 유닛이 이의 성능을 최적화하기에 바람직한 일정한 유량에서 유지될 수 있는 것이다.

[0074] 따라서, 도 10에 예시된 방법(310)에 따라, 제어 시스템(240)은 펌프(208)의 작업을 변화시킨다. 특히, 방법(310)은 블록(312)에 시작되며, 여기서 제어 시스템(240)은 센서(246)으로부터 수신된 신호에 대한 반응으로 투과물 유량이 감소되었는지를 결정한다. 방법(310)은 블록(314)까지 지속되고, 여기서 펌프(208)의 작업에서의 변화가 투과물 유량에서의 감지된 감소에 따라 결정된다. 예를 들면, 변화는 일정한 유량으로 투과물 유량을 변화시키기 위한 공급물 교차유동 속도에 있어서의 변화이고, 이 속도는 업스트림 공정(204)의 유량과 일치되고, 이는 또한 일정한 용적에 대해 제공되어야 한다. 그러나, 변화는 또한 도 8에서의 방법(260)에 의해 유지되는 용적보다 더 큰 탱크(206)에서의 용적을 유지하는 것에 좌우된다. 방법(310)은 이후 블록(316)까지 지속될 수 있고, 여기서 제어 시스템(240)은 블록(314)에서 결정된 변화에 따라 펌프(208)의 작업을 제어한다.

[0075] 업스트림 공정 유닛(204)가 연결된 시스템(200)의 작업 전반에 걸쳐 지속적으로 사용하기 위해 도 6-10에 예시된 방법에 대한 공정 유닛(204)의 각각의 사이클에 대해 충분한 양을 제공할 수 없다는 것이 추가로 인식될 수 있다. 대신, 상기 기재된 가변 용적 전략은 탱크(206)에서의 용적이 서지되게 하고, 이에 의해 업스트림 공정 유닛(204)으로부터의 다중 연결식 사이클을 집결시켜 조합하기 위해 사용될 수 있다.

[0076] 인식된 바와 같이, 본 개시물에 따른 시스템 및 방법은 상기 설명된 바와 같이 종래의 기술에 비해 하나 이상의 장점을 가질 수 있다. 하나 이상의 임의의 이들 장점은 본 구현예에 포함된 본 개시물의 특징에 따라 특정 구현

예에 존재할 수 있다. 본원에 상세되지 않은 다른 장점이 또한 존재할 수 있다.

[0077] **실험적 시험**

[0078] 예로써, 다양한 장점 및 이점이 하기 실험을 통해 구현하였다. 구체적으로, 하기 설명은 최종 접선 유동 여과(TFF) 단계를 걸쳐 연마 컬럼(polishing column)로부터 연결되는 하나의 실험적 mAb 다운스트림 공정을 나타낸다. 통상적인 mAb 플랫폼 공정이 도 11에 기재되어 있고, 이는 수집으로 시작되고, 이는 포집을 위한 단백질 A 친화성 크로마토그래피, 낮은 pH 바이알 불활성화 단계, 연마를 위한 최대 2개의 추가적인 크로마토그래피 단계, 바이알 여과 (VF) 단계, 및 최종적으로 제형화를 위한 한외여과/정용여과 (UF/DF)를 수행하기 위한 TFF 단계가 후속된다. 연마 컬럼, 이러한 경우, 결합/용리(B/E) 및 관류 (FT) 단계, 및 TFF 사이의 중간체 집단은 보통 대부분 희석물 집단이고, 따라서 집단 탱크의 크기를 초과하기 위한 이들의 용적에 대한 최대 잠재성을 가진다. B/E 컬럼, FT 컬럼, VF, 및 TFF 단계를 연결함으로써, 3개의 큰 집단 탱크가 감소되거나 제거될 수 있다. 본 문헌 레포트는 유닛 작업의 연결을 가능하게 하는 유동 제어 전략 및 연결식 공정의 구조를 제안하였다. 상세한 설명이 연결식 공정의 개발 방법 및 추가의 공정 모니터링 요건에 대한 고려사항에 대해 제공된다.

[0079] **방법 및 재료**

[0080] **재료**

[0081] 5개의 mAb 생성물 (mAb A, mAb B, mAb C, mAb D, mAb E)을 표준 CHO 세포 배양 방법으로 제조하였다.

[0082] 작고 큰 크기로 사용되는 크로마토그래피 수지는 Fractogel® EMD SO_3^- (EMD Millipore 사제, Billerica, MA) 및 Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow High Sub (GE Healthcare 사제, Piscataway, NJ)를 포함한다. 소규모 크로마토그래피 컬럼을 1.15 cm EMD Millipore Vantage™ L 실험실용 컬럼, 및 대규모 GE Healthcare Axichrom 60 또는 80 cm 컬럼 내에 팩킹시켰다. AEX 멤브레인 Sartobind STIC® (Sartorius Stedim, Goettingen, Germany)이 Nano (1 mL) 또는 10" (180 mL) 크기로 사용되었다. Viresolve® Prefilter ($5cm^2$, $0.55m^2$ 및 $1.1m^2$) , Viresolve Shield ($3.1cm^2$ 및 $0.51m^2$) , Viresolve Pro ($3.1cm^2$ 및 $0.51m^2$), 및 Pellicon® 3 Ultracel® 30kDa ($0.0088m^2$ 및 $1.14m^2$) 필터를 EMD Millipore로부터 구입하였다.

[0083] 소규모 크로마토그래피 및 연결식 공정 실험을 GE Healthcare AKTAexplorer™ 100 시스템 상에서 수행하였다. 연결식 공정 실험을 위해, 다중 AKTA를 P-900 펌프의 후면 상의 원격 연결을 통해 서로 연결하여 보조 입력 및 출력 신호가 장치들 사이를 통과할 수 있게 하였다. 소규모 프리-필터 및 바이러스 필터의 압력 모니터링을 SciPres® (SciLog, Madison, WI) 압력 센서 및 압력 모니터를 사용하여 수행하였다. EMD Millipore Amicon® 교반 셀 (50 mL)을 서지 용기(surge vessel)로서 사용하였고, 상기 용기를 상부 두껑 및 멤브레인 없이 사용하였고, 그리하여 연속적 교반 셀이 자성 교반 플레이트 상에 배치된 채로 대기압에 개방되어 작동될 수 있었다.

[0084] 소규모 개별 바이알 여과 실험을 정압 설정으로 수행하였고, 이는 압력 레귤레이터, 압력 용기 (300 또는 600 mL 폴리카보네이트), 압력 게이지, 데이터 수집을 위해 컴퓨터에 순차적으로 연결된 밸런스, 및 압축 공기 공급을 포함한다. 소규모 TFF 실험을 AKTAcrossflow™ 시스템 상에서 수행하였다.

[0085] 대규모 실시를 주문-제작 자동화 크로마토그래피, 바이알 여과 및 TFF 스키드 상에서 수행하였다. 크로마토그래피 스키드는 구배 및 희석 용량을 위한 3차 펌프, 압력, 유동, pH, 전도도, 및 UV의 인라인 모니터링을 포함하였다. 또한 생성물 집단의 유사-집단 샘플을 수집하기 위한 스플릿 스트림 밸브 및 펌프를 스키드에 구비시켰다. 바이알 여과 스키드는 프리-필터 및 바이러스 필터에 대한 홀더, 및 압력, 유동, pH, 전도도, UV의 인라인 모니터링을 포함하였다. TFF 스키드는 200L 잔류물 탱크, 시스템 공급물에 대한 다이어그램 펌프, 및 정용여과 버퍼에 대한 연동 펌프, 자동화 TMP 제어 밸브, 압력, 유동, pH, 전도도의 인라인 모니터링, 및 잔류물 탱크에 대한 레벨 감지(level sensing)를 포함하였다. 서지 탱크에 레벨 감지를 구비시켰다.

[0086] **방법**

[0087] **Sartobind STIC 멤브레인 크로마토그래피**

[0088] Sartobind STIC 실험을 우회된 믹서를 갖는 AKTAexplorer 상에서 실시하였다. 인라인 필터(0.2 μm Sartorius Minisart)를 AKTA 펌프에 의해 잠재적으로 발생된 입자의 여과에 의해 압력 증강을 방지하기 위해 STIC 멤브레인의 업스트림에 사용하였다. 장입 물질은 여과된 낮은 pH 바이알 비활성화 집단 (FVIP) 또는 CEX 집단이었다. 생성물 집단을 단일 주요 분획으로서 또는 관류 및 세정 과정에서의 다중 분획으로서 수집하였다. STIC 집단에

대해 실시된 분석은 CHOp ELISA (CHO 숙주 세포 단백질의 경우), DNA QPCR 및 농축 UV A280을 포함한다.

[0089] **인라인 pH 적정(Inline pH titration)**

[0090] CEX 용리 분획을 자동화 프로그램을 통해 전체 CEX 작업 순서를 실시하는 AKTAexplorer에 의해 생성하였다. 각각의 분획을 이후 사용하여 수작업으로 pH 적정제를 선별하였다. 적합한 적정제를 발견한 이후, 2개의 AKTAexplorer를 이용하는 실험을 실시하여 선택된 적정제가 표적에 대해 정확한 인라인 pH 적정을 제공할 수 있는지를 확인하였다. 제1 AKTA는 CEX를 실시하였고, 이의 용출물을 5분 체류 시간으로 서지 용기로서의 비이커에 수집하였다. 제2 AKTA는 펌프 A로 비이커로부터의 생성물을 그리고 펌프 B로 적정제를 장입하였다. 2개의 스트림을 믹서에서 혼합하고, 이후 제2 AKTA에 대한 인라인 pH 프로브에 의해 pH에 대해 측정하였다. 제2 AKTA는 또한 분획화를 실시하고, 각각의 분획의 pH를 Orion Dual Star 오프라인 pH 미터 (Thermo Scientific, Waltham, MA)를 사용하여 입증하였다.

[0091] **바이알 여과**

[0092] 바이알 필터 시험을 연결되어 배치된 프리-필터 및 바이알 필터를 사용하여 개별 또는 연결식 방식으로 수행하였다. 개별 시험을 재료 부분에 기재되어 있는 정압 설정을 사용하여 수행하였고, 필터 상에 장입된 균질한 공급물을 사용하여 시간에 걸쳐 여과된 용적을 수집하였다. 별개의 AKTA에 대한 선행된 크로마토그래피 단계(들)에 연결된 하나의 AKTA에 대한 프리-필터 및 바이알 필터 및 각 단계들 사이의 서지 용기를 사용하여, 연결식 시험을 연결된 AKTAexplorer 설정을 사용하여 수행하였다. 서지 용기를 고정된 체류 시간 및 그에 따른 용적에서, 통상적으로 5 - 7분으로 작동시켰다. 유니콘 방법(unicorn method)을 장입 및 용리를 시작하고 종료하기 위해 AKTA 사이의 자동화된 신호전달을 가능하게 하기 위해 프로그래밍하였다. 인라인 적정, 컨디셔닝, 또는 희석을 AKTA B-펌프를 사용하여 수행하고, AKTA A-펌프 상에 장입된 공급물 스트림으로 혼합하였다. 대규모 작업과 비슷한 중간 연결된 유닛 작업에 대한 표적화된 장입 및 유량을 달성하기 위해 소규모 설정이 상업적 이용가능성에 기초하는 고정된 컬럼 직경 및 필터 면적을 사용하기 때문에, 스플릿 스트림(split stream)을 크로마토그래피 단계 이후 그리고 서지 용기 이전에 AKTA 샘플 펌프를 사용하여 취하였다. 스플릿 스트림은 후속 유닛 작업에 대한 유량의 제어를 가능하게 하고, 질량 및 유량이 연결식 공정에서 연결되기 때문에, 대량 장입이 또한 제어된다. 스플릿 스트림으로부터 수집된 물질을 각각의 연결된 단계의 수율 및 불순물 제거 성능을 평가하기 위한 유사-생성물 집단을 생성하기 위해 사용하였다.

[0093] **TFF 플럭스 이동 (TFF Flux Excursions)**

[0094] 플럭스 이동 시험을 단백질 농도 (통상적으로 10 - 80 g/L), 공급물 교차 유동 (1 - 6 L/min/m^2 또는 LMM), 및 TMP (10 - 25 psi)의 범위에서 투과물 플럭스 측정값을 수득하여 AKTA교차유동에 대해 수행하여 정체 필름 모델 파라미터(stamnant film model parameter)를 실험적으로 결정하였다 (하기 식 참조). 플럭스 이동을 연결된 UF 단계 (UF1a) 과정에서 선행 유닛 작업으로부터 최적 성능 모델까지의 염 버퍼 중의 단백질을 사용하여 수행하였다. 안정한 투과물 플럭스 및 델타 압력 (공급물 - 잔류물)이 달성될 때까지, 생성물을 각각의 농도, TMP, 및 공급물 교차유동으로 재순환시켰다. 투과물 압력이 4psi를 초과하는 데이터 지점을 분석으로부터 배제하였다. TMP 측정의 각각의 설정 이후, 멤브레인을 폐쇄된 투과물 유출구를 사용하여 재순환시킴으로써 탈분극화시켰다. 이러한 데이터를 이후 플럭스 (J) 대 C_b(시험의 단백질 농도)의 자연 로그와 관련하여 그래프화하였다.

[0095] **필터 크기화(Filter Sizing)**

[0096] 바이알 필터 면적 크기화는 연결식 공정 유량 및 최대 허용가능한 작업 압력에 좌우된다. 관측된 최저의 바이알 필터 투과도 (압력 강하에 대해 정규화된 필터 플럭스)는 단백질 농도의 최고점에서 발생된다. 이러한 관측된 최저의 투과도 ($k_{VF,min}$)는 $J_{VF,max} = k_{VF,min} \times P_{VF,max}$에 의해 기재된 바와 같이 최대 압력 제한 ($P_{VF,max}$) 내에서 작동될 수 있는 최대 플럭스 ($J_{VF,max}$)를 설정하기 위해 사용될 수 있다. 요구되는 필터 면적 (A_{VF})은 하기 식 1에 의해 결정될 수 있고, 여기서 Q_{VF}는 공정 유량이다.

[0097] $$A_{VF} = \frac{Q_{VF}}{k_{VF,min} \cdot P_{VF,max}} \quad \text{(식 1)}$$

[0098] TFF 모델링에 대해, 문헌[Ng P, Lundblad J, Mitra G. 1976. Optimization of solute separation by diafiltration. Separation Science 11(5):499-502]의 업적은 정체 필름 모델에 기초하는 TFF 투과물 플럭스를 기술하고 있다. 정체 필름 모델은 물질 전달 계수 ($k = k_o v^n$)에서의 공급물 교차 유동 의존성을 포함시키기 위해

변형될 수 있고, 여기서 k_o는 실험 상수(empirical constant)이고, v는 공급물 교차 유동이고, 그리고 n은 공급물 교차 유동 의존성에 대한 누승 항목(power term)이다. 이러한 변형된 정체 필름 모델은 식 2에 나타나 있고, 여기서 J_{TFF}는 투과물 플럭스이고, C_w는 멤브레인 벽 근처의 단백질의 농도이고, C_b는 벌크 단백질 농도이다.

[0099] $$J_{TFF} = k_o v^n \ln \frac{C_w}{C_b} \quad \text{(식 2)}$$

[0100] 공정으로부터의 입력 파라미터와 조합되는 플럭스 이동으로부터 유도된 파라미터들을 사용하여 C_b에 대한 식 2를 풀어 공정의 연결된 부분의 종료시(UF1a의 종료) 표적에 대한 최적의 최종 농도를 결정한다. 원하는 투과물 플럭스를 유입구 공정 유량 및 TFF 필터 면적으로부터 결정한다. 공급물 교차 유량을 시스템 및 멤브레인의 용량 상한값, 통상적으로 6 LMM으로 설정한다. 식 3을 이후 사용하여 공정, m에 대한 총 예상된 질량에 기초한 표적 잔류물 탱크 수준 설정치를 결정할 수 있다.

[0101] $$V_{end,UF1a} = \frac{m}{C_{b,end\ UF1a}} \quad \text{(식 3)}$$

[0102] **결과**

[0103] **연결식 공정의 설계 및 유동 제어**

[0104] 연결식 시스템의 고-수준 설계는 개별 시스템에 대해 유사하고, 여기에서 표준 유닛 작업의 주요 성분 및 기능성이 대개 동일하게 유지된다. 연결식 시스템에서, 대집단 용기를 짧은 체류 시간 (통상적으로 5 - 7 분)을 가진 작은 서지 탱크로 대체하고, 이는 유닛 작업 사이의 압력 중단으로서 작용한다(도 12). 배치(batch) 희석 및 적정을 인라인 부가로 대체한다. 연결식 시스템의 공정 제어를 설계하는데 있어서의 중요점은 유닛 작업들 사이의 유동 차이를 관리하는 방법을 결정하는 것이다. 최종 TFF 단계에서, 생성물은 초기에 정용여과를 수행하기 위한 원하는 종점(endpoint)으로 농축된다. 극복과제는 물질이 잔류물 탱크로 부가됨에 따른 생성물 농도에 있어서의 증가로 발생되는 투과물 플럭스에서의 감소를 관리하는 것에서 발생되고; 투과물 플럭스에서의 이러한 감소는 멤브레인에 대한 농도 분극의 영향에 기여한다. 개별적인 공급-배치 TFF에 대해, 잔류물 탱크에 대한 유입구 유량은 일정한 잔류물 용적을 유지시키기 위해 투과물 유량과 일치되도록 감소될 것이다. TFF 단계가 개별적인 유닛 작업으로서 작업되기 때문에, 이러한 유량 감소로 인한 임의의 다른 유닛 작업에 대한 영향이 존재하지 않는다. 그러나, 연결식 공정에서는, 유입구 스트림은 이전 업스트림 작업에 직접적으로 연결되어, 투과물 유량에 있어서의 임의의 감소는 유동 차이를 야기할 것이다. 가변 투과물 플럭스 TFF 단계와 함께 정류 크로마토그래피 단계를 연결하는 공정 순서에 대해, 직접적으로 또는 바이알 여과 단계를 통해서이던지 간에 불일치된 유동은 능동적으로 관리될 필요가 있다. 이는 하기 3개의 별개의 전략을 사용하여 TFF 작업 과정에서 달성될 수 있다: 1) 가변 유동 전략, 2) 일정 유동 전략, 또는, 3) 서지 전략 (도 13, 표 1). 생성물 물질이 잔류물 탱크에 가득 채워지는 경우, 정용여과 및 최종 농축 단계의 나머지들이 표준 개별 공정으로서 개발될 수 있기 때문에, 초기 농도는 최종 TFF 단계에서 연결되는 유일한 단계인 것을 주지하여야 한다.

[0105] 가변 유동 전략에서, TFF는 개별 공급-배치 작업과 유사하게 작업되고, 여기에서 투과물 플럭스는 물질이 잔류물 탱크에 축적됨에 따라 감소한다. 시스템 유동을 균형화하기 위해, 업스트림 유닛 작업의 유량은 또한 투과물 플럭스를 일치시키기 위해 감소된다. 이는 일정한 잔류물 용적을 유지시키나, 크로마토그래피 단계 상에서 가변 유동을 생성한다. 유동 변화의 규모는 적어도 2배 감소를 야기할 것이고, 이는 크로마토그래피 단계의 성능에 대해 잠재적 영향을 미칠 수 있다.

[0106] 대안책은 일정 유동 전략이고, 여기에서 투과물 및 유입구 유동 모두는 선행된 유닛 작업에 걸쳐 일정 잔류물 용적 및 일정 유동 모두를 유지시키기 위해 일정한 값으로 유지된다. 일정한 투과물 및 유입구 유동을 달성하기 위해서, 신규한 전략이 투과물 플럭스를 능동적으로 제어하기 위해 TFF 공급물 교차유동 및 막통과 압력 (TMP) 모두를 사용하여 개발되었다. TFF 공급물 교차유동은 물질 전달 속도 및 이에 따른 멤브레인을 통한 플럭스에 직접적으로 영향을 줄 수 있다. 막통과 압력 (TMP)은 또한 투과물 플럭스를 제어하지만, 이러한 파라미터는 플럭스-제한 방식이 달성되는 경우에서 더 높은 단백질 농도 및 더 높은 TMP에서 감소된 제어를 가진다. 이러한 제어 전략에서, 일정한 투과물 유량을 유지하기 위해 생성물 농도가 증가됨에 따른 두 파라미터들 사이의 점진적 증가와 함께 더 낮은 교차유동 및 TMP는 탱크에서의 생성물 농도가 낮은 경우 연결식 공정의 시작점에서 사용된다. 본 방법론은 자동화된 제어 시스템에서 개발되었고, 이는 공급물 교차유동의 입력 파라미터 및 TMP 모두를 동시에 조절하여 일정한 투과물 유출구 유동을 달성하고, 이에 따라 연결식 공정 시스템을 유동 차이 없이

작업할 수 있었다.

[0107] 최종 제어 전략, 서지 전략(Surge Strategy)은 능동 유동 제어의 부재로서 대부분 기재될 수 있다. 이러한 전략에서, 투과물 플럭스가 감소를 나타내는 경우, 유입구 유동은 일정한 속도로 유지되고, 이는 이후 TFF 잔류물 탱크에서 용적 변동을 유도한다. 실제로, TFF 시스템은 일부 자가-조절을 나타낼 것이고, 여기에서 용적이 탱크에서 변동되기 때문에, 생성물 농도에서의 증가 속도가 플럭스에서의 감소에 따라 느려질 것이다.

[0108] 이러한 3개의 기술된 제어 전략은 유동 제어에 대한 이용가능한 선택을 나타내나, 궁극적으로는, 이러한 전략의 혼합이 사용되어 멤브레인 면적 및 공정 시간, 선행 유닛 작업에 영향을 주는 유량 저하, 및 잔류물 용기의 용적에 대한 요건을 균형화하는 전체 공정의 최적화를 달성할 수 있을 것이다. 하기 부분은 연결식 공정에 대해 독특한 양태 및 파라미터에 대해 중점적으로 일정 유동 전략을 사용하는 연결식 공정의 개발을 기술하고 있다. 이러한 전략은 이의 작업 및 공정 개발에 있어서의 간소화에 대해 선택되었고, 이는 이것이 크로마토그래피 및 바이알 여과 단계에 대한 일정 유동을 유지하고, 연구에 필요한 동적 영향의 수를 최소화하기 때문이다.

[0109] **연결식 공정의 개발**

[0110] 2개의 연마 컬럼, 바이알 여과 및 TFF을 연결하는 공정의 개발은 이러한 유닛 작업을 개별적으로 개발하는 것과 비교하여 추가적인 고려사항을 필요로 한다. 이러한 고려사항은 하기를 포함한다: 1) 후속 단계에 대한 B/E 컬럼 용리의 영향을 평가하는 것; 2) 후속 단계가 B/E 집단의 것과 상이한 pH에서 작업될 필요가 있는 경우 인라인 pH 적정 방법을 개발하는 것; 3) 가변 공급 조성물을 사용한 유동 유도 바이알 여과 단계를 개발하는 것; 4) 연결식 공정 과정에서 일정한 투과물 플럭스를 사용하여 TFF 단계를 개발하는 것.

[0111] ***제1 크로마토그래피 단계의 개발***

[0112] 연결식 공정 트레인(connected process train)에서의 제1 단계가 균일한 하중으로, 여과된 바이알 불활성화된 단백질 A 생성물 집단을 나타내기 때문에, 이는 별개의 공정으로서 독립적으로 개발될 수 있고, 이에 따라 이는 본원에서 상세하게 논의되지 않을 것이다. 그러나, 연결식 공정에 대한 2개의 중요한 고려사항이 존재한다. 우선, 기울기 용리(gradient elution)를 사용하는 B/E 단계 (예를 들면, CEX)가 연결식 공정의 제1 단계로서 역할을 하는 경우, 모든 후속 단계는 제1 단계 용리에 의하여 생성된 생성물 농도 피크 및 염 농도 기울기를 경험한다. 달성되는 최대 생성물 농도에 따라, 이러한 농도 피크는 특히 바이알 여과 단계에 대해 다운스트림 문제를 초래할 수 있을 것이다. 후속 단계에 대한 높은 피크 농도의 영향을 경감시키기 위해, 저염 용리 기울기가 적용될 수 있다. 이는 피크 농도를 감소시킬 것이고, 생성물이 허용가능한 배압으로 나머지 단계를 통과할 수 있게 한다. 둘째로, 모든 단계가 연결되기 때문에, 제1 단계 용리 용적 유량이 나머지 단계의 용량에 기초하여 최적화하기 위해 필요로 된다.

[0113] ***제2 크로마토그래피 단계의 개발***

[0114] 연결식 공정 개략에 상세된 제2 단계가 관류 방식으로 작업되고, 이는 수지-기반 또는 멤브레인-기반 크로마토그래피일 수 있다. 이러한 제2 단계는 전체 다운스트림 공정에 대한 보통 제3 및 최종 크로마토그래피 단계이나, 이는 2개의 컬럼 공정은 충분한 불순물 및 바이러스 제거 용량을 나타내는 경우에 필요하지 않을 수 있다. 통상적인 mAb 정제 공정에 대한 이러한 단계의 목적은 숙주 세포 단백질을 제거하고, 잠재적으로는 추가로 고분자량 (HMW) 및 DNA를 감소시키기 위한 것이다. 이러한 관류 단계가 제1 단계로서 B/E 단계에 연결되는 경우, 이의 공급물은 개별 방식으로 작동되기 때문에 더 이상 균질한 것이 아니라, 단백질 농도 및 전도도의 관점에서 동적인 것이다. 관류 단계 공급물 스트림의 전도도는 장입 과정에서 선행되는 염 기울기 용리로 인해 증가하고, 이는 장입 종료시 최대치에 도달된다. 이로 인하여, 광범위한 전도도에 걸쳐 우수한 불순물 청소율을 유지하는 수지 또는 흡착 멤브레인을 선택하는 것이 중요하고; AEX 멤브레인 STIC 크로마토그래피는 내염성 흡착 매트릭스의 하나의 예이다. 숙주 세포 단백질 제거에 대한 장입물 전도도의 영향을 평가하기 위해, 장입물 전도도에 있어서의 변화를 사용하는 몇몇 개별적 관류 실험이 그 영향을 평가하기에 충분하다. 도 14a는 관류 STIC 단계에 걸친 CHOp 제거에 대한 장입물 전도도 영향을 비교한다. 그 결과는 전도도는 본 장치에 대해 최적화된 리간드의 높은 내염성에 기초하여 예상되는 바와 같이 CHOp 제거의 관점에서 중요한 역할을 하지 않았다. 따라서, 제1 단계로부터의 용리액은 희석하지 않고 제2 연결식 단계로 직접적으로 공급될 수 있다.

[0115] 숙주 세포 단백질을 보다 효과적으로 제거하기 위해, 관류 단계는 예컨대 AEX FT 단계에 대한 것과 같은 B/E 단계의 것보다 더 높은 pH에서 작업될 것을 필요로 한다. 몇몇 개별적 pH 탐색 실험이 이러한 관류 단계에 대한 최적 작업 pH를 찾기 위해 필요로 된다. 도 14b는 더 높은 pH에서의 AEX 멤브레인 크로마토그래피를 통한 숙주 세포 단백질 제거가 더 높은 청소율을 제공한다는 것을 보여준다. 이러한 실시예에 대해, 모든 4개의 시험된 pH

값이 허용가능한 청소율을 제공하기 때문에, 연결식 공정 과정에서의 적정 단계를 회피하는 장점으로 인해 STIC 작업에 대해 pH 5를 선택하였다. 그러나, pH 적정이 원하는 숙주 세포 단백질 제거를 달성하기 위해 요구되는 경우에, 인라인 pH 적정 방법이 요구된다.

[0116] ***인라인 pH 적정 단계의 개발***

[0117] 선행 단계가 후속 단계와 차별되는 작업 pH를 사용하는 경우 중간 생성물 집단의 pH 적정이 요구된다. 개별적인 방식에서, pH 적정은 표적 pH를 달성하기 위해 균질한 생성물 집단으로 적정제의 특정량을 부가함으로써 용이하게 수행될 수 있다. 그러나, 연결식 공정의 경우, 인라인 pH 적정이 이전 단계에서 발생된 생성물 스트림의 pH를 변화시키기 위해 필요하고, 이는 생성물이 연속적으로 다음 단계에 장입되기 때문이다. 연결식 공정에서 잠재적으로 pH 적정을 요구하는 생성물 스트림은 관류 또는 바이알 여과 및 경우에 따라 UF 단계에 대한 장입을 위한 공급물 스트림이다. 각각의 단계에 대해 사용되는 스키드 또는 시스템이 수동 믹서를 통한 후속 혼합 단계와 함께 공급물 및 적정제 스트림을 동시에 전달하기 위한 이중-펌프 디자인을 가지는 경우, 관류 및 바이알 여과 단계에 대한 공급물 스트림의 인라인 pH 적정은 추가의 펌프를 사용하지 않고 제공될 수 있다. 추가적인 펌프는 UF 장입이 적정을 필요로 하는 경우 TFF 잔류물 탱크로 적정제를 전달하기 위해 필요로 될 수 있다.

[0118] 인라인 pH 적정이 도입되는 위치와 무관하게, 결합 및 용리 단계로부터의 용리액에서의 단백질 농도 및 전도도에 있어서의 변화가 적정제 선택시 고려될 필요가 있다. 또한, 공정 및 시스템 디자인은 적정제가 용적 비를 생성하는 일정한 적정제로 생성물 스트림으로 도입되는 경우 간소화된다. 이러한 용적 비는 생성물 스트림의 과-희석화를 피하기 위해 낮아야 하나, 이는 또한 펌프 유량 선형 범위 내에서 충분히 높아야 한다. 이에 기초하여, 0.1 - 0.2의 용적 또는 유동 비가 통상적으로 추천된다.

[0119] 인라인 pH 적정 개발은 결합 및 용리 단계의 용리에 걸친 다중 분획의 오프라인 pH 적정을 사용하여 시작된다. 적정된 분획의 생성물 농도 및 pH는 각각의 분획이 동일한 용적 비에서의 적정제의 부가를 사용한 표적 pH에 도달되도록 보장하기 위해 선별된다. 적정제가 확인된 이후, 벤치 스케일의 연결식 실시(bench scale connected run)가 결과를 입증하기 위해 이용된다. 도 15는 0.1의 용적 비로의 400mM Tris pH 8.3의 적정제를 사용한 CEX 용리액의 pH 5.0 내지 pH 8.0의 인라인 pH 적정을 나타낸다. 인라인 적정 이후, 생성물 스트림을 분획화하였고, 각각의 분획을 오프라인 pH 프로브를 사용하여 분석하였다. 표적 pH가 도 15에 나타난 바와 같은 용리 피크에 전반에 걸쳐 달성된다.

[0120] ***바이알 여과 단계의 개발***

[0121] 연결된 바이알 여과 단계의 초기 개발은 별개의 단계의 개발과 유사하며, 여기에서 분자 및 용액 특성은 적절한 바이알 필터 및 프리필터의 선별을 유도하고, 멤브레인의 수압 투과 성능에 영향을 준다. 바이알 필터가 필터를 통해 유량에 영향을 주는 선행 유닛 작업에 연결되기 때문에, 요구되는 멤브레인 면적을 감소시키기 위해 높은 멤브레인 투과도를 가진 바이알 필터를 선택하는 것이 유리하다. 추가적으로, 바이알 필터는 시간에 걸쳐 생성물 농도 및 전도도 모두가 변화되는 가변 압력 및 공급 조성물에 노출되는 경우에 효과적으로 작업될 수 있어야 한다. 본원에서, Viresolve Pro (VPro) 필터가 예로서 사용된다. 이러한 필터는 높은 멤브레인 투과도를 가지고, 일반적으로 분자, 공급 조성물, 및 압력 변화와 무관하게 우수한 작업을 나타낸다. 일반적으로 사용되는 프리필터는 뎁스 필터(depth filter) 및 전하-기반 프리필터를 포함한다 (문헌 [Ng P, Lundblad J, Mitra G. 1976. Optimization of solute separation by diafiltration. Separation Science 11(5):499-502; Brown A, Bechtel C, Bill J, Liu H, Liu J, McDonald D, Pai S, Radhamohan A, Renslow R, Thayer B, Yohe S, Dowd C. 2010. Increasing parvovirus filter throughput of monoclonal antibodies using ion exchange membrane adsorptive pre-filtration. Biotechnol and Bioeng 106(4):627-637] 참조).

[0122] 균일한 공급물을 사용하는 배치 여과 실험(Batch filtration experiment)은 상이한 흡착력 특성을 갖는 프리필터 사이에 상대적인 성능 비교를 제공할 수 있다. 추가적으로, 배치 실험은 바이알 필터 장입물의 최적 pH 설정치를 선별하기 위해 사용될 수 있다. 도 16은 하기 2개의 상이한 프리필터가 사용되는 경우 VPro 플럭스에 대한 pH의 영향을 나타낸다: 1) 충전된 결합제와 함께 규조토로 구성된 Viresolve Prefilter (VPF), 및 2) 음전하로 하전된 멤브레인으로 구성된 Viresolve Shield. mAb D에 대해, 음전하로 하전된 쉴드 프리필터(Shield prefilter)는 mAb의 높은 pI, 또는 보다 상세하게는 mAb 응집 불순물, 및 상호작용의 양이온 교환 메커니즘에 기초하여 예상되는 바와 같이 낮은 pH에서 더 우수한 성능을 나타낸다. 반대로, VPF 프리필터는 높은 pH에서 우수한 성능을 나타낸다. 이는 분자의 pI에 대해 더 근접한 pH에서 그리고 고염 용액 조건 하에서 더 소수성인 상호작용 메커니즘을 나타낸다. 이러한 예는 프리필터의 상대적 성능 및 pH 조건을 평가하기 위한 회분식 연구 수행의 장점을 나타낸다.

[0123] 연결식 공정에 대한 바이알 필터의 성능을 평가하기 위해서, 2개의 상이한 방법이 고려될 수 있다. 선행 실시예에서와 같이, 실험은 바이알 필터 단독에 대해 회분식 방식으로 수행될 수 있고; 이는 생성물 및 염 농도를 변화시키면서 다중 공급물 물질을 생성하여 달성될 수 있다. 이러한 실험은 멤브레인 성능에 대한 단백질 농도, 염 농도, 및 심지어 압력 또는 유동의 상대적인 영향을 연구하기 위해 실험의 설계(design of experiment, DoE)로서 실시될 수 있다. 선행 크로마토그래피 단계로부터 관찰된 생성물 및 염 농도에 있어서의 극한값을 평가하고, 바이알 필터에 의해 실험되는 압력의 범위의 범주를 구하기 위해 범위를 선택할 수 있다. 연결식 공정을 평가하기 위한 제2 방법은 크기-축소한 시스템을 사용하여 실제 연결식 공정을 시뮬레이션하는 것이다. 이러한 방법은 바이알 필터 상에 직접적으로 장입되는 선행 크로마토그래피 단계로부터의 단백질 및 염 농도를 변화시키는 대표적인 시간-가변 공급물을 생성할 것이다. 프리필터를 갖는 VPro에 연결되는 CEX 기울기 용리를 사용하는 연결식 실시의 예는 도 17a에 나타나 있다. 바이알 필터 상의 단백질 농도 및 전도도에 있어서의 변화는 CEX 기울기로부터의 용리의 결과이고, 서지 용기의 배출로 인한 장입의 종료시 안정하다. 프리필터를 갖는 VPro에 연결되는 CEX 기울기 용리를 사용하는 연결식 실시의 예가 도 17a에 나타나 있다. 바이알 필터에 대한 단백질 농도 및 전도도에서의 변화는 CEX 기울기로부터의 용리의 결과이고, 서지 용기의 배출로 인한 장입의 종료시 안정하다. 본 실시가 일정 유동에서 작업되기 때문에, 단백질 농도에서의 증가가 바이알 필터에 대한 압력에 있어서의 증가를 야기하고, 이는 멤브레인 투과도에 있어서의 초기의 감소 및 단백질 농도가 강하됨에 따른 투과도의 후속 회복에 대응된다. 최종 투과도는 초기 투과도와 유사하고, 이는 실시 과정에서의 최소 오염을 나타낸다.

[0124] 연결식 방식 및 회분식 방식으로의 바이알 필터 성능을 비교하는 결과는 도 18에 나타나 있다. 두 일련의 실험을 VPF 및 VPro 필터를 사용하여 mAb C로 실시하였다. 10회 실시를 갖는 회분식 인자 설계 실험(batch factorial design experiment) (2개의 중심점을 갖는 듀플리케이트)을 하기 파라미터의 중간-지점에서 듀플리케이트 중심점을 갖는 5 또는 40 g/L의 단백질 농도, 0 또는 250 mM의 염화나트륨 농도, 및 15 또는 45 psi의 압력에서 실시된다. 연결된 실험을 도 17a에 예시된 것과 유사하게 실시하였고, 그 데이터를 단백질 순간 농도의 함수로서 VPro 투과도를 나타내도록 변형시켰다. 회분식 조건들을 연결식 공정에 보여지는 조건들의 범위를 포함하도록 선택하였다 (도 17a). 회분식 결과(batch result)는 시험된 범위 내의 염 농도 및 압력이 투과도에 대한 영향이 거의 없고, 반면 증가된 단백질 농도는 감소된 투과도의 분명한 경향을 보여주는 것을 나타낸다. 연결식 실험으로부터의 결과들은 회분식 실험과 유사한 투과도 경향을 따르나, 회분식 방식에서의 필터 투과도는 연결식 방식의 투과도 보다 전반적으로 더 낮았다. CEX 및 VF 단계의 동시 작업이 CEX 집단이 유지되어 이에 따라 바이알 필터 오염 성분의 형성을 최소화하는 기간을 감소시키는 것을 고려하면 이러한 결과는 예상치 못한 것은 아니다. 이러한 결과는 회분식 실험이 작업 파라미터의 상대적인 영향 및 단백질 농도의 함수로서의 최소의 멤브레인 예상 투과도의 초기 표시에 대한 직접적인 경향을 제공할 수 있다는 것을 입증한다. 궁극적으로, 대표적인 연결식 실시는 최종 공정 표준에 대해 사용되어야 할 것이다.

[0125] 바이알 필터의 멤브레인 수압 투과도 특성이 결정되는 경우, 바이알 필터 면적은 연결식 공정에 대해 적절하게 크기화될 수 있다. 바이알 필터를 통한 유량은 선행 크로마토그래피 단계의 유량 설정치에 의해 예정된다. 작업 방식이 일정 유동이기 때문에, 바이알 필터의 크기화는 특정 최대 제한 미만으로 공급물 압력을 유지하는 것에 기초한다. 이러한 제한은 바이러스 필터, 프리필터, 또는 심지어 작업 시스템에 의해 영향을 받을 수 있다. 예를 들면, 제조자에 의해 설정된 VPro 필터의 최대 압력 제한은 60 psi이고, VPF는 50 psi이며, 따라서 바이알 필터에 대한 40 - 45 psi의 작업 압력 제한은 프리필터 제한을 충족시키기 위해 도입될 필요가 있다. 회분식 또는 연결식 방식으로 실시된 실험들은 예상된 최대 단백질 농도에 기초하여 최소의 예상 투과도를 제공할 수 있다. 유량에 대한 공지된 입력, 최대 압력, 및 최소 투과도를 사용하여, 바이알 필터 면적은 식 1을 사용하여 계산될 수 있다. 다양한 연결식 공정에 대한 바이알 필터 크기화는 도 20, 표 2에 예시되어 있다.

[0126] 개별적 바이알 여과 공정에서, 일반적인 작업 범위 내에서 공급 조성물에서의 변화값을 평가하여 강인성(robustness)을 판단한다. 바이알 필터 상에 장입되는 공급물 프로파일에 영향을 줄 수 있는 연결식 공정에서의 하나의 파라미터는 바이알 필터에 선행하는 서지 용기의 체류 시간이다. 서지 용기 체류 시간의 최소화는 바이알 필터 상에서의 선행되는 크로마토그래피 용리 프로파일의 거의 직접적인 전파(propagation)를 야기할 것이다. 반면, 서지 용기 체류 시간의 최대화는 전체 크로마토그래피 용리 집단의 수집을 야기하여 이에 따라 본질적으로 바이알 여과 단계를 별개의 작업이 되게 한다. 5 및 25 분 (각각 도 17a 및 17b)의 서지 용기 체류 시간을 비교하기 위해 실험을 수행하였다. 예상된 바와 같이, 짧은 체류 시간은 관측된 최대 피크 변화에 상응하고, 반면 긴 체류 시간은 상대적으로 균질한 집단을 생성한다.

[0127] ***연결된 접선 유동 여과 단계의 개발***

[0128] 서론에 기재된 바와 같이, 선행되는 다운스트림 유닛 작업을 접선 유동 여과 (TFF) 단계에 연결하기 위해 사용될 수 있는 하나의 제어 전략은 일정 유동 전략이고, 여기에서 TFF 잔류물 탱크 용적 및 투과물 플럭스 모두가 전체 연결식 작업 과정에서 일정하게 유지된다. 물질이 연결식 공정 과정 동안 TFF 잔류물 탱크에서 축적되고, 그리고 모든 물질이 연결식 공정의 종료시에 TFF 잔류물 탱크에 존재하는 경우에 최고 단백질 농도가 달성된다. 연결식 공정의 종료시 일정한 투과물 플럭스를 유지하기 위해, TFF 잔류물 용적 설정치 및 멤브레인 면적이 연결된 유입구 유량 및 예상된 최고 단백질 농도를 제공하기 위해 특정될 필요가 있다. 변화하는 공급물 교차유동, 막통과 압력 (TMP), 및 공급물 농도, 및 정체 필름 모델 (식 2)에 대한 최적화 모델 파라미터에 대한 TFF 투과물 플럭스의 반응을 맵핑하기 위해 벤치-스케일 플럭스 이동 연구가 수행된다. 이러한 모델은 연결식 공정에 대한 특정 파라미터를 계산하기 위해 사용될 수 있다.

[0129] 예시적인 플럭스 이동 데이터세트가 선행하는 유닛 작업으로부터의 염 버퍼에서의 mAb C에 대해 도 19에 나타나 있다. 플럭스 이동을 저염 (30 mM NaCl) 및 고염(150 mM NaCl) 조건 모두를 사용하여 수행하여, 선행하는 CEX 염 기울기 용리로 인한 염 농도에 있어서의 변화의 영향을 평가하였다. 이러한 플럭스 이동 연구를 위해, 9 - 88 g/L의 농도 범위를 5 - 20 psi의 TMP 범위 및 1 - 6 LMM의 공급물 교차유동 범위로 표적화하였고; 20 psi TMP 데이터가 도 19에 나타나 있다. Pellicon 3 30kDa 재생된 셀룰로오스 멤브레인을 본 실시예 및 후속 실시예에 대해 사용하였다. 그 결과는 고염 및 저염 조건 사여기에서 비슷한 성능을 나타내고, 이는 TFF 멤브레인의 성능이 가변되는 염 농도에 의해 최소로 영향을 받는다는 것을 나타낸다. 이러한 동일한 경향이 다수의 분자 (데이터 미도시)에 대해 관찰되었다. 도 19에서의 고염 플럭스 이동 데이터에 기초한 투과물 플럭스 모델 파라미터는 하기이다: k_o= 8.47, C_w= 175, 및 n= 0.73. 연결식 공정에 대해, 상기 모델 파라미터와 함께 식 2 및 3이 사용되어 투과물 플럭스 (연결된 유입구 유동 / TFF 면적)에 대한 공지된 입력에 기초한 TFF 잔류물 용적 설정치, 펌프 또는 시스템 압력 제한에 기초한 최대 공급물 교차유동, 및 예상된 최대 질량을 계산할 수 있다. 서론 부분에 기재된 바와 같이, 연결식 TFF 공정은 설정치 잔류물 용적이 도달되는 경우 개시된다. 공급물 교차유동 및 TMP는 낮은 단백질 농도에서의 일정한 투과물 플럭스 목표를 달성하기 위해 초기에 낮게 설정된다. 물질이 축적되고 단백질 농도가 증가함에 따라, 공급물 교차유동 및 TMP는 시스템 제한 미만으로 유지되는 최대 공급물 교차유동과 함께 일정한 플럭스 목표를 유지하기 위해 증가된다. 공급물 교차유동의 증가는 개념상 도 19에 놓여진 화살표에 의해 예시되고; 38 LMH의 일정한 투과물 플럭스에서, 공급물 교차유동이 대략 120 LMH에서 시작되고, 연결식 공정의 종료(UF1a의 종료)시 대략 300 LMH에서 종료된다. 각각의 분자 공정(미도시)에 대한 정체 필름 모델 파라미터 및 식 2를 사용하여 계산되는, 다양한 연결식 공정에 대한 UF1a 단백질 농도의 표적화된 최종값이 도 20, 표 2에 나타나 있다.

[0130] 초기 충전 용적 파라미터가 TFF 단계에 대해 결정되는 경우, 유닛 작업 개발의 나머지, 예컨대 정용여과 및 과농축/생성물 회수 단계가 표준 회분식 TFF 공정에 대한 것과 동일하고, 따라서 이는 본 논의에 포함되지 않는다. TFF 단계의 연결 부분에 대한 공정 강건성이 다수의 방식으로 평가될 수 있다. 예상된 질량 또는 단백질 농도, 공급물 교차유동, TMP, 및 유입구 유동에서의 변수의 영향이 입력 조건 하에서의 모델 최적화 파라미터 및 변수를 사용하여, 민감도 분석을 통해 연구될 수 있다. 일반적으로, 안전성 인자는 입력 조건에서의 변수에 대해 허용되어 일정한 투과물 플럭스가 여전히 유지되도록 사용되어야 하고, 즉, 보다 보전적이거나 더 높은 잔류물 용적 설정치 사양을 설정한다. 투과물 플럭스는 또한 본래의 멤브레인 투과도 및 작업 온도에 영향을 받을 수 있고; 이러한 입력 파라미터 부근에서 실험이 수행될 수 있다.

[0131] **공정 모니터링**

[0132] 개별 방식과 비교하여, 연결식 공정에서의 유닛 작업은 유닛 작업 이행을 용이하게 하고, 압력 제어를 보조하고, 그리고 실시 그 자체의 성능에 대한 필요한 정보를 제공하기 위한 추가적인 모니터링 공정이 요구된다. 서지 탱크 수준 모니터링은 해당하는 유닛 작업에 대해 실시간 통신되는 중요한 이행 신호를 제공하다. 예를 들면, CEX 크로마토그래피-후 서지 탱크 수준이 이의 예정된 값에 도달되는 경우, 제어 시스템은 신호를 관류 크로마토그래피 스키드에 전송하여 서지 탱크로부터의 장입을 시작한다. CEX 크로마토그래피-후 서지 탱크 수준이 제로에 도달되는 경우, 관류 스키드에 대한 장입 단계는 정지되고 세정 단계가 시작된다. 바이알 여과 단계에 대해, 일정 유동에서 작업이 수행되고 필터 유입구 압력이 모니터링된다. 유입구 압력은 생성물 피크 농도가 바이알 필터를 통과하는 경우 변동된다. 최대 압력 제한에 도달되는 경우, 이는 제어 시스템이 바이알 여과 유량을 감소시키고, 관류 서지 탱크 수준을 증가시키도록 유발한다. TFF 단계에서, 플럭스 정보를 제공할뿐 아니라, 공급물 교차유동 및 TMP를 조정하는 것에 의해 사전 설정값에서 투과물 플럭스를 유지시키기 위해 제어 시스템과 통신되는 연결식 공정 과정에서, 투과물 유량이 유량 미터기에 의해 측정된다. 또한, 제어 시스템은 TFF 잔류물 탱크 수준을 모니터링하여 유입구 또는 바이알 여과 단계 유량을 조정함으로써 일정한 용적을 유지

시킨다.

[0133] 개별 공정에 대한 단계 수율 정보는 일반적으로 균일한 전체 생성물 집단의 생성물 농도를 측정하고 해당하는 용적에 따라 균일한 공급물에 대해 이를 비교함으로써 얻어진다. 연결식 유닛 작업의 동시 작업이 수집된 전체 집단에 대해 허용되지 않기 때문에, 작은 스플릿 스트림은 집단 수집 과정에서 주요 생성물 스트림으로부터 취해진다. 이러한 유사 집단은 이후 농도 측정값 및 생성물 품질 분석을 위한 샘플을 제공한다. 수율 정보는 또한 UV A280nm 또는 A300nm 신호의 통합에 의해 그리고 실험적으로 결정된 생성물-특이적 흡광 계수(extinction coefficient)를 사용하여 스키드에 대해 실시간으로 수득될 수 있다. UV 통합 방법(UV integration method)은 연결식 공정의 종료의 TFF 잔류물 탱크에서의 축적된 질량을 계산하기 위해 TFF 단계의 바로 직전에 VF 단계 상에서 사용될 수 있다. 이 축적된 질량은 별개의 방식으로 작업시의 TFF 장입량과 동일하고, 이는 정용여과 및 과농축화(overconcentration)에 대한 잔류물 탱크 용적 수준의 결정을 위한 중요한 파라미터이다.

[0134] **대규모 성능(Large-Scale Performance)**

[0135] 전술된 부분에 기재된 바와 같이, 연결식 공정에서의 각각의 유닛 작업은 주로 개별적 방식으로 개발되고, 이후 시험 및 추가의 최적화를 위한 벤치 스케일에서 함께 연결된다. 본 공정은 이후 대규모화되고, 입증 및 확인을 위해 파일럿 플랜트로 이송된다. 표 2는 연결식 공정 CEX-AEX(FT)-VF-UF 및 파일럿 플랜트에서 성공적으로 시행된 이의 변형예를 사용하여 5개의 상이한 분자에 대한 실시 파라미터를 열거하고 있다. 서지 탱크는 크로마토그래피 단계들 사이 그리고 100 L의 크기로 VF의 정면에 배치되고, 5 - 7 분의 체류 시간 설정값에서 작업된다. 도 20, 표 2에 열거된 수율은 파일럿-규모에서 입증되고 있고, 이는 개별 방식의 작업과 유사하다 (개별 데이터를 나타내지 않음).

[0136] 작업 경향의 예는 mAb B 연결식 다운스트림 공정 (CEX-HIC(FT)-VF-UF)에 대해 도 21에서 나타나 있다. 도 21a는 70분에 걸친 연결식 다운스트림 공정에 걸친 생성 물질의 시간 진행을 보여주고 있다. 나머지의 UF 단계를 개별 방식으로 수행하고, 이 시간 과정에서, 다른 유닛 작업은 후속되는 연결 사이클에 대해 준비하기 위한 이의 세정 및 평형화 단계를 완료하였다. HIC(FT) 및 VF 단계에 대한 농도 프로파일은 장입물의 인라인 적정/희석으로 인한 HIC(FT) 단계에서의 더 낮은 농도, 및 라인 고정 및 서지 탱크 혼합 용적으로 인한 VF 단계에서의 약간 낮은 농도와 함께, CEX 단계로부터의 용리 피크에 상응하였다. HIC(FT) 및 VF 단계에 대한 농도 프로파일의 후단 부분은 변동이 없고; 이는 선행되는 연결식 유닛 작업이 완료되어 서지 탱크가 비워지는 경우에서의 작업의 단계를 나타낸다.

[0137] 도 21b는 유동 설정값, 유량, 투과도, Vpro 압력 강하 (dP) 및 단백질 농도를 포함하는 연결식 VF 프로파일을 나타낸다. VF 유량은 HIC(FT) 단계로부터의 유동에 상응하는 8.1 L/min으로 설정되었고, 그러나 UF 단계가 개시되는 경우, VF 유량을 일정한 UF 잔류물 탱크 수준을 유지시키기 위해 이의 설정값으로부터 변화시켰다 (도 21b). VF에 걸친 압력 강하는 유량 변화에 해당하고, 그러나, 유량이 압력 강하에 의해 정규화되는 경우, 필터 투과도 프로파일은 상대적으로 편평하다. 단백질 농도가 필터 상에서 증가함에 따라 투과도에 있어서의 약간의 하락이 존재하고, 이후 이는 단백질 농도가 감소함에 따라 초기 투과도로 회복된다.

[0138] 도 21c는 연결식 UF1a 경향 및 UF1b에 대한 개별 경향 (DF 설정치에 대한 배치 농도) 및 작업의 DF 단계들을 보여주고 있다. 전술된 바와 같이, VF 유량은 이의 설정값 근처에서 변화되어 잔류물 탱크 수준 설정치를 유지하고; 이러한 공정 제어 결과는 도 21c에서 관찰될 수 있다. UF 투과물 유동 설정치는 VF 유동 설정치와 동일하고, 공급물 교차유동 및 TMP는 UF 투과물 유동을 제어한다. 공급물 교차유동 및 TMP 모두는 탱크에서의 단백질 농도가 증가함에 따라 점진적으로 증가하는 것으로 관찰되고, 제어 전략은 이의 설정치에서 투과물 유량을 유지할 수 있다.

[0139] 서론에서 논의된 바와 같이, 다운스트림 유닛 작업을 연결하는 주요 장점 중 하나는 중간 집단 탱크 용적, 및 이에 따른 제조 플랜트에서의 점유면적(footprint)의 감소이다. 도 22는 도 20, 표 2에 기재된 공정 각각에 대한 개별적인 공정 대 연결식 공정에 대한 탱크 용적 요건의 비교를 예시하고 있다. 제조 플랜트는 예상된 최대 집단 용적을 위해 집단 탱크 크기를 설계할 필요가 있기 때문에, 개별 공정은 적어도 1000 L 탱크를 필요로 할 것이다. 이는 연결식 공정에 대해 5 - 7 분 체류 시간으로 작동되는 100 L 서지 탱크보다 상당하게 크다. 또한, VF 집단 탱크는 연결식 공정에서 완전하게 제거되고, 이는 이것이 UF 잔류물 탱크에 직접적으로 연결될 수 있기 때문이다.

[0140] **논의 및 결론**

[0141] 전술된 실험 연구는 최종 TFF 단계를 통한 연마 크로마토그래피 단계로부터 연결되는 다운스트림 공정의 개념을

개괄하고 있고, 이는 이의 파일럿 규모에서의 이의 성공적인 실시를 입증한다. 다중 유동 제어 전략이 유닛 작업들, 상세하게는 크로마토그래피 단계들 간의 유동 차이 및 TFF 단계에 대한 가변 투과물 유량을 유지하기 위해 사용될 수 있다. 일정 유동 전략은 일정한 TFF 투과물 유량, 및 이에 따른 크로마토그래피 및 바이알 여과 단계에 대한 일정 유동을 유지하기 수단으로서 제시되었다. 이는 연결식 공정 개발 과정에서 연구될 필요가 있는 동적 영향의 수를 최소화한다. 이러한 제어 전략은 또한 연결식 작업 과정에 걸쳐 일정한 서지 탱크 및 TFF 잔류물 탱크 용적을 야기하고, 이는 더 간소화된 공정, 장비 및 자동화된 디자인을 가능하게 한다.

[0142] 연결식 다운스트림 공정의 개발은 개별 공정의 개발과 다수의 관점에서 유사하다. 수지 선택, 바이알 및 프리필터 선택, 및 장입 조건, 예컨대 pH, 전도도, 및 생성물 농도가 모두 표준 회분식 실험에 걸쳐 연구될 수 있다. 그러나, 연결식 공정을 개발함에 있어 고려해야 할 특유의 관점이 다수 존재한다. 하나의 예로서, 제1 연결식 공정이 염 기울기 용리를 사용하는 B/E 크로마토그래피 단계인 경우, 공정 전반에 걸쳐 전파되는 피크 생성물 농도를 관리하기 위해, 더 낮은 경사 기울기가 후속 유닛 작업, 예컨대 바이알 필터에 대해 유리할 수 있다. 더 낮은 경사 기울기를 사용하는 경우 발생되는 하나의 장점은 B/E 크로마토그래피 단계 상에서의 향상된 불순물 분리의 선택도이고; 탱크 용적 한계값이 제한 이외 공정 조건들에 기초하여 경사 기울기를 선택하는데 있어서 융통성이 있을 수 있다. 제1 크로마토그래피 단계가 또한 전체적인 연결식 공정에 대한 유량을 설정하는데 중요하고, 따라서 이는 여과 단계의 보다 경제적인 크기화를 달성하기 위해 최적화될 것이 요구될 수 있다. 중간 크로마토그래피 단계에 대해, 기울기 용리의 영향이 평가될 필요가 있다. 단계 성능에 대한 전도도의 영향을 연구하기 위해 실험을 수행하여야 한다. 데이터가 본 문헌에 나타나지 않지만, 추가의 실험이 기울기 용리로부터 생성되는 생성물 농도 및 불순물 프로파일에 있어서의 변화의 영향을 연구하기 위해 실시될 수 있다. 작업 pH가 또한 선별될 수 있고, 유닛 작업들 사이의 pH가 변화되는 경우, 인라인 pH 적정이 연결식 공정을 위해 개발되고 실행될 수 있다.

[0143] 본원에서 나타낸 예들은 연결식 여과 단계의 개발에 대한 경로를 예시한다. 프리필터 및 바이알 필터가 선택되는 경우, 공급물 조건이 결정되고, 상대적으로 소수의 연결식 공정 실험들이 필터 크기화 요건을 결정하여 공급 조성물에서의 변화에 대한 바이알 필터의 강인성을 평가할 것이 요구된다. TFF 단계에 대해, 자동화 제어 전략의 개발 및 실시는 일정한 투과물 유동 작업을 관리할 것이 요구되나, 단계의 개발은 대개 개별 실험들을 통해 완성될 수 있다. 해당하는 플럭스 모델에 따라 벤치-스케일로 수행되는 플럭스 이동 연구는 일정한 플럭스 방식으로 연결식 단계를 작동하기 위해 필요로 되는 파라미터를 특정하기 위해 사용된다. 이는 소규모 연결식 실시를 우회하여, 규모-확대 연결식 공정에 직접적으로 적용될 수 있다.

[0144] 추가적인 공정 모니터링 능력이 연결식 공정 예를 들면 유닛 작업의 장입을 시작하고 종료하는 서지 탱크의 수준 제어에 대해 고려되어야 한다. 온라인 UV 통합이 실시되어 TFF 단계에 대한 물질 입력을 결정하고, 이에 따라 용적 표적이 정용여과 및 과농축화, 및 단계 수율의 결정에 대해 설정될 수 있게 한다. 스플릿 스트림 펌프는 또한 개개의 단계 성능 및 불순물 청소의 평가를 가능하게 하기 위해 스키드 설계에 편입되어야 한다.

[0145] 전체 수집물을 다량으로 처리하는 단계가 연결식 공정에서 다중 크로마토그래피 사이클을 필요로 하고, 각각의 연결식 사이클은 기재된 바와 같이 1-2 시간이 소요된다. 크로마토그래피 단계는 일반적으로 컬럼 크기 요건 및 수지 비용을 감소시키기 위해 순환되고, TFF 멤브레인은 통상적으로 세정되거나 재사용되어, 이러한 단계에 대한 연결식 공정에서의 다중 사이클의 사용을 간소화한다. 반면, 바이알 필터는 통상적으로 개별 공정에서 단일 버퍼 수세처리(flush)가 후속되는 생성물 장입의 단일 사이클에 대해 이용된다. 연결식 공정에 대해, 바이알 필터에 대한 장입은 단일 연결식 사이클에 대해 충분히 이용되지 않는다. 도 20, 표 2에 나타낸 예는 2 - 4 kg/m^2의 장입이 연결식 바이알 여과 단계에 대해 통상적인 것이고, 반면 적어도 20 kg/m^2의 장입이 이러한 필터 유형에 대해 달성될 수 있음을 나타낸다 (문헌 [Bolton G, Basha J, LaCasse D. 2010. Achieving high mass-throughput of therapeutic proteins through parvovirus retentive filters. Biotech Progress 26(6):1671-1677] 참조). 연결식 공정에 대한 바이알 필터 사용의 효율을 개선하기 위해, 동일한 바이알 필터가 각각의 연속적 사이클에 대한 버퍼 수세처리 단계가 후속되는 생성물 장입 단계와 함께 전체 수집물 롯트에 대해 사용될 수 있다. 바이알 필터는 생성물 및 버퍼의 교대적 사이클이 일어날 수 있으나, 필터 성능은 모든 사이클로부터의 총 생성물 장입량에 의해 좌우될 것으로 예상된다. 사용후 필터 무결성 시험(integrity testing)은 모든 사이클이 완료된 이후에 수행되어 필터가 여전히 완전한지 여부를 확인하는 것이다. 이러한 접근법은 필터 면적 요건 및 이에 의해 상품의 비용을 감소시킴으로써 중요한 장점을 제공하고, 필터 대체와 관련된 시간 소모 설치 및 준비 단계를 제거하고, 그리고 바이알 필터 이후 시스템 폐쇄를 유지함으로써 공정 스트림으로의 우발적인 물질 유입의 위험을 최소화한다. 플랜트 계획 및 장비 활용의 복잡성이 다중 사이클 연결식 공정을 사용하여 증

가되기 때문에, 플랜트 자원 모델링이 장비 소요 시간 제한 내에서 적합한 시설 최적화를 보장하기 위해 요구될 것이다. 추가적으로, 바이알 필터의 사이클링을 비롯하여 연결식 공정에서의 개개의 단계의 바이알 청소 능력을 평가하는 것이 신중한 고려사항을 보장한다. 정량화된 규모-축소 모델의 개발 및 연결식 공정으로의 바이러스 스파이크(virus spike)의 도입과 같은 관점이 후속 문헌의 주제로서 다루어질 것이다.

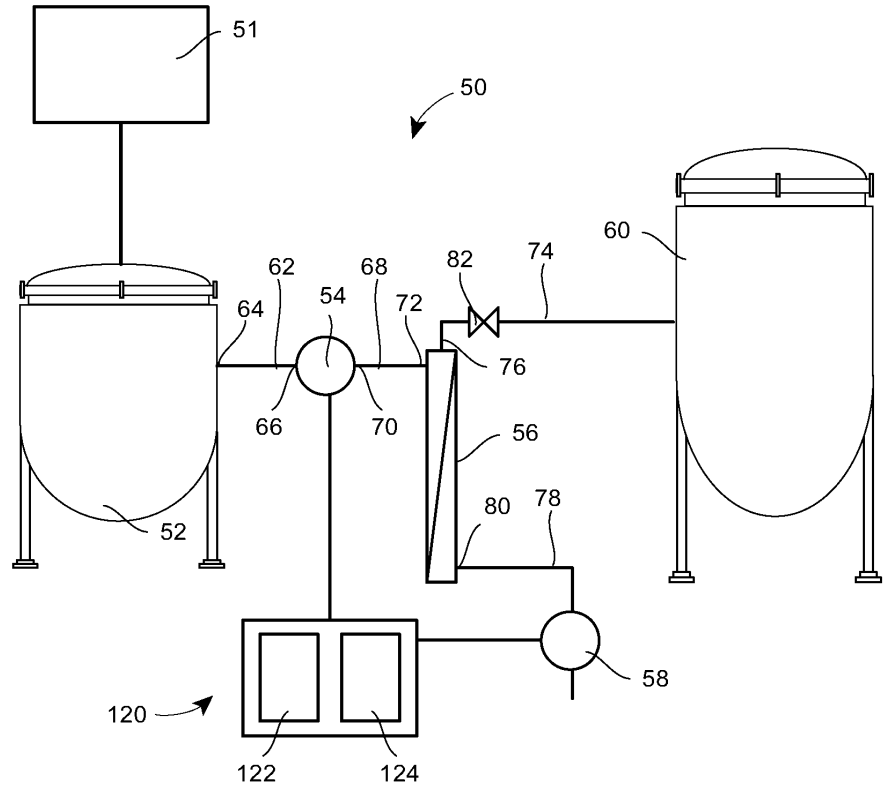
[0146] 본원에 나타난 연결식 다운스트림 공정은 집단 탱크 용적 감소의 당면한 장점을 제공하고, 이에 따라 보다 현대식의 시설 설계를 초래한다. 탱크 크기의 감소는 이동식 탱크의 사용 가능성을 열 수 있고, 이는 상이한 공정 요건을 가진 다수의 제품에 대해 용이하게 재구성될 수 있다. 이는 자본 경비의 감소를 유도하고, 제조시 융통성을 제공한다. 궁극적인 목적은 완전한 연속식 제조를 위해 수집, 단백질 A 및 다운스트림 단계를 완전하게 연결하는 것이다. 이는 연속식 단백질 A 포획 단계의 시행을 요구하고, 이는 후속 다중-컬럼 컬럼 크로마토그래피(SMCC) 또는 모사 이동층(SMB) 기술, 저 pH 바이알 불활성화 회분식 작업에 대한 대안의 개발, 및 모든 관류 연마 단계의 실시를 이용한다. 이는 연속식 제조 및 공정 통합에 초점을 맞춘 최근 연구 기사에 의해 입증된 바와 같이 가까운 미래에 실현될 수 있다 (문헌 [Konstantinov K and Cooney C. 2014. White paper on continuous bioprocessing. J Pharm Sci DOI: 10.1002/jps.24268; Jungbauer A. 2013. Continuous downstream processing of biopharmaceuticals. Trends in biotechnology 31(8):479-492] 참조). 최종 TFF 단계에 걸쳐 다운스트림 연마 단계를 연결하는 본 문헌에 나타낸 개념 및 제어 전략은 본 기술의 다른 단계를 본 목적에 근접하게 이동시킨다.

[0147] 선행 텍스트에서 본 발명의 상이한 구현예의 상세한 설명을 기재하고 있지만, 본 발명의 법적 범위가 본 특허의 후미에 기재된 청구항의 문구에 의해 한정되는 것으로 이해되어야 한다. 상세한 설명은 단지 예시적으로 해석되어야 하고, 모든 가능한 구현예를 기술하는 것은 불가능은 아니지만 실현불능이기 때문에 본 발명의 모든 가능한 구현예를 기재하지 않는다. 수많은 대안적인 구현예가 현재 기술 또는 본 특허의 출원일 이후의 개발될 기술을 사용하여 실시될 수 있고, 이는 본 발명을 정의한 청구항의 범위 내에 포함될 것이다.

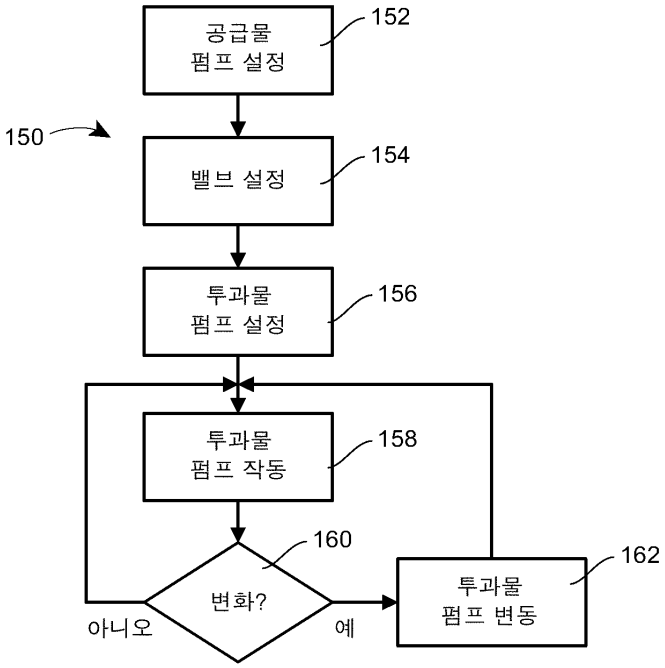
[0148] 용어가 문장 "본원에 사용되는 용어 '___'가 ...을 의미하는 것으로 본원에 정의됨" 또는 유사한 문장을 사용하여 본 특허에서 표현적으로 정의되지 않는 한, 이의 본연의 또는 보통 의미를 넘어 표현적으로 또는 함축적으로 이 용어의 의미를 제한하는 것으로 의도되지 않고, 이러한 용어는 본 특허의 임의의 다른 부분(청구항의 언어 이외의 부분)에서 이루어진 임의의 설명에 기초한 범위로 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 특허의 후미에서의 청구항에 인용된 임의의 용어가 단일 의미와 일치되는 방식으로 본 특허에서 언급되는 범위에서, 단지 독자를 혼동시키지 않기 위해 명확성을 위해 지칭되고, 그 단일 의미에 대해 함축적이거나 그와 다르게 이러한 청구항 용어를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 마지막으로, 청구항 구성요소가 단어 "의미함" 및 임의의 구조의 설명 없는 기능을 인용하여 정의되지 않는 한, 이는 임의의 청구항 구성요소의 범위가 35 U.S.C. §112, 여섯 번째 문단의 적용에 기초하여 해석되는 것을 의도되지 않는다.

도면

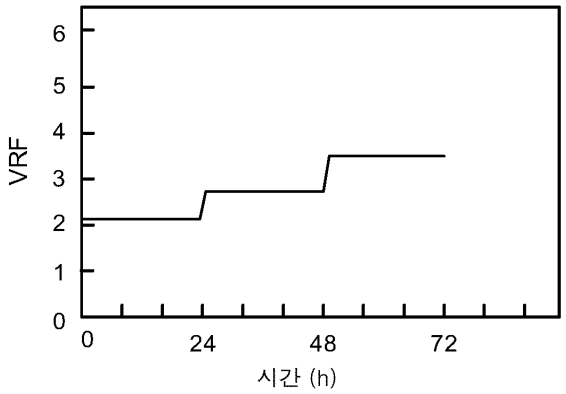
도면1


51
50
60
62
68
82
74
64
54
72
76
66
70
56
80
78
52
58
120
122
124

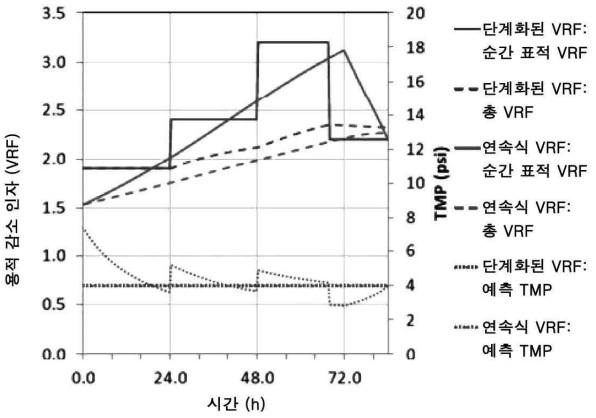
도면2


공급물
펌프 설정
152
150
밸브 설정
154
투과물
펌프 설정
156
투과물
펌프 작동
158
160
변화?
162
투과물
펌프 변동
아니오
예

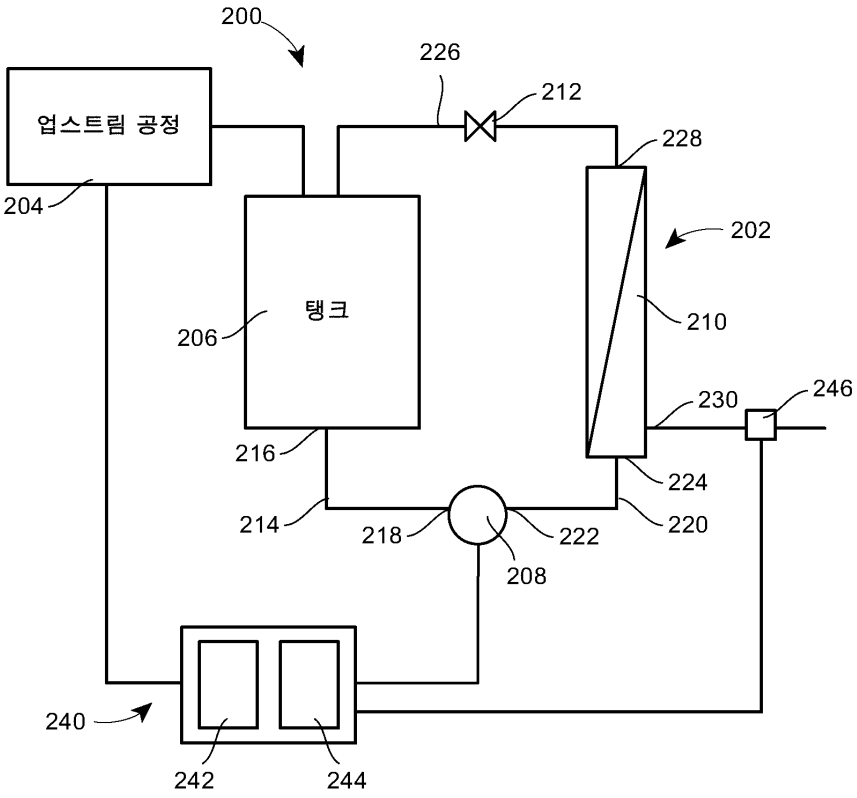
도면3


VRF
0
1
2
3
4
5
6
0
24
48
72
시간 (h)

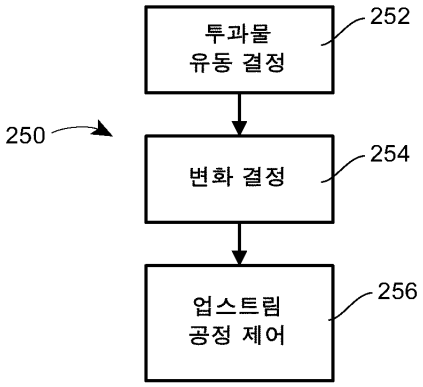
도면4


용적 감소 인자 (VRF)
TMP (psi)
시간 (h)
0.0
24.0
48.0
72.0
단계화된 VRF: 순간 표적 VRF
단계화된 VRF: 총 VRF
연속식 VRF: 순간 표적 VRF
연속식 VRF: 총 VRF
단계화된 VRF: 예측 TMP
연속식 VRF: 예측 TMP

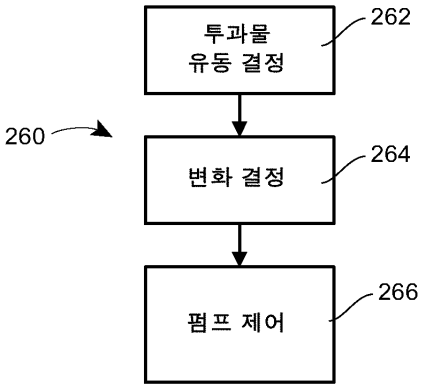
도면5


200
226
212
228
업스트림 공정
204
202
탱크
206
210
230
246
216
224
214
218
222
220
208
240
242
244

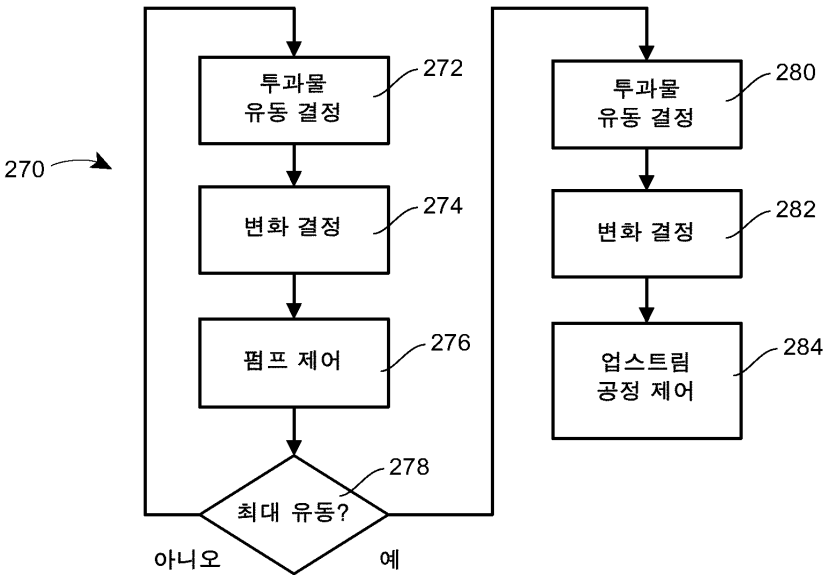
도면6


투과물
유동 결정
252
250
변화 결정
254
업스트림
공정 제어
256

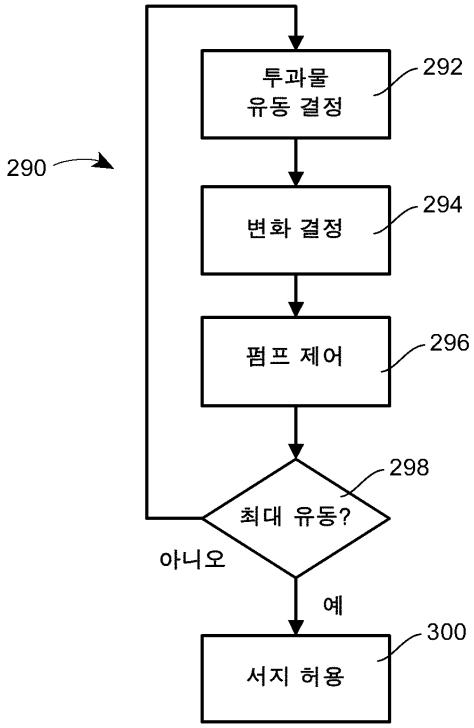
도면7


투과물
유동 결정
262
260
변화 결정
264
펌프 제어
266

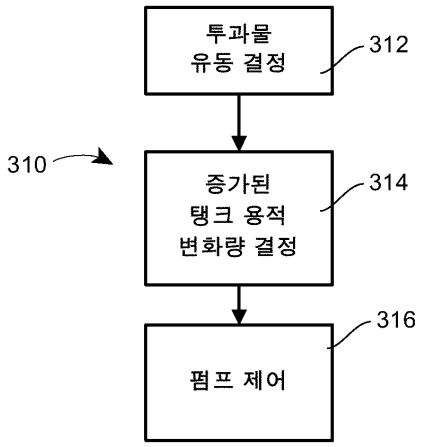
도면8


270
투과물
유동 결정
272
변화 결정
274
펌프 제어
276
최대 유동?
278
아니오
예
투과물
유동 결정
280
변화 결정
282
업스트림
공정 제어
284

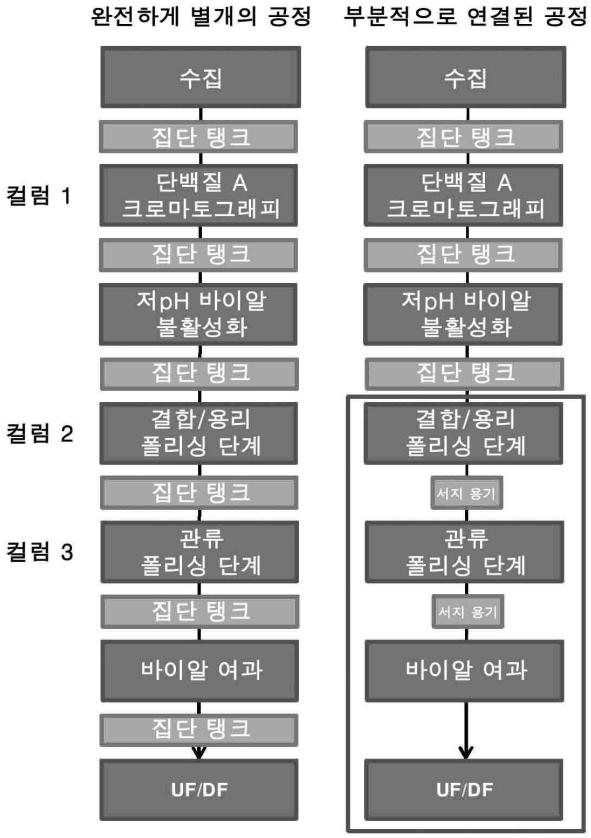
도면9


290
투과물
유동 결정
292
변화 결정
294
펌프 제어
296
298
최대 유동?
아니오
예
300
서지 허용

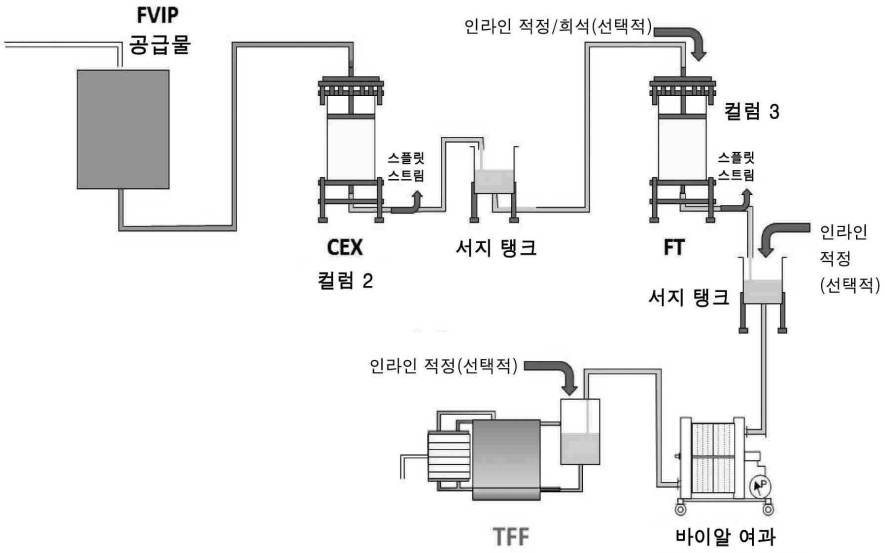
도면10


310
투과물
유동 결정
312
증가된
탱크 용적
변화량 결정
314
펌프 제어
316

도면11


완전하게 별개의 공정
부분적으로 연결된 공정
수집
집단 탱크
단백질 A 크로마토그래피
저pH 바이알 불활성화
결합/용리 폴리싱 단계
관류 폴리싱 단계
바이알 여과
UF/DF
서지 용기
컬럼 1
컬럼 2
컬럼 3

도면12

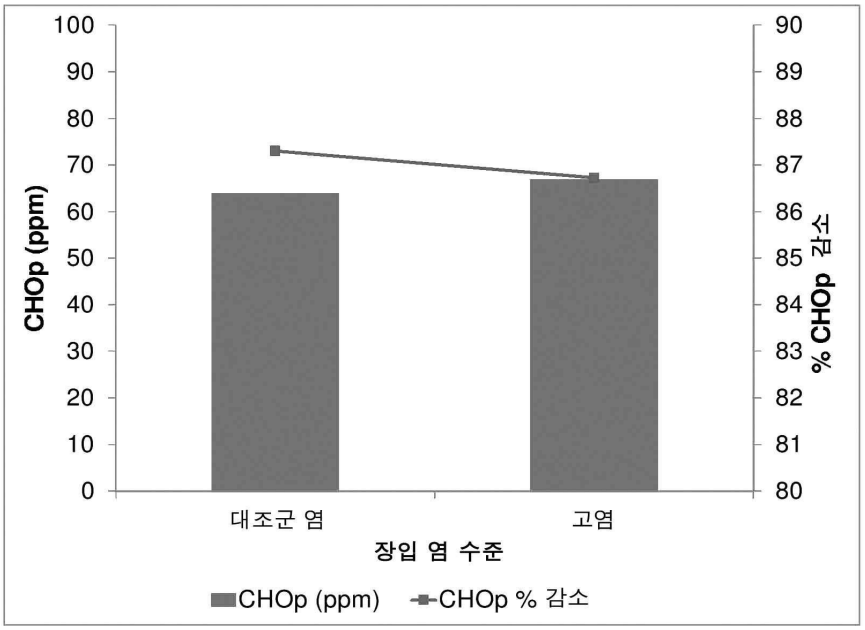

FVIP
공급물
인라인 적정/희석(선택적)
스플릿 스트림
CEX
컬럼 2
서지 탱크
컬럼 3
FT
서지 탱크
인라인 적정 (선택적)
인라인 적정(선택적)
TFF
바이알 여과

도면13

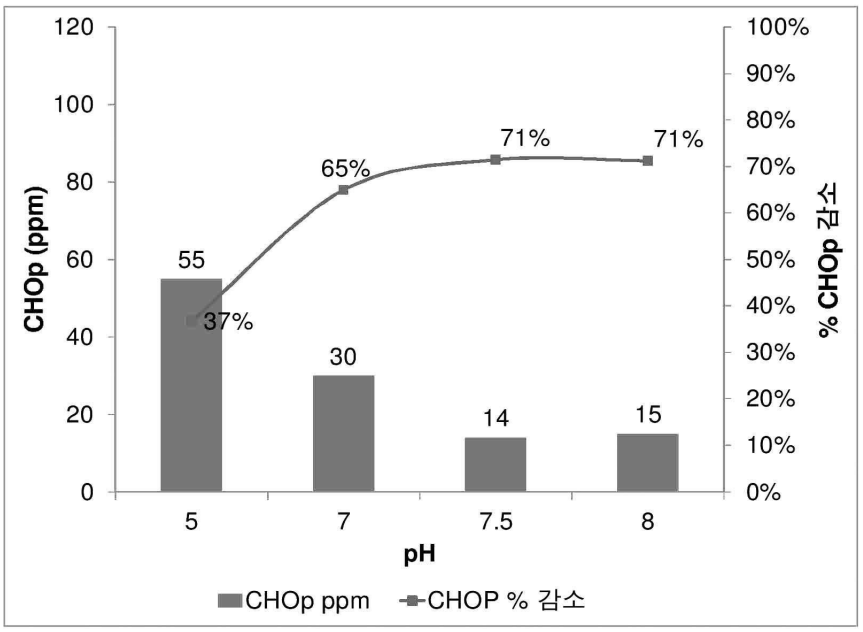
표 1. 연결식 다운스트림 공정에 대한 TFF 제어 전략

전략	유입구 유동	투과물 유동	탱크 용적	공급물 교차유동
가변 유동 전략	가변 (↓플럭스 사용)	가변 (일치)	일정	일정 (최대 교차유동)
일정 유동 전략	일정	일정	일정	가변 (플럭스 제어)
서지 전략	일정	가변	가변 (서지)	일정 (최대 교차유동)

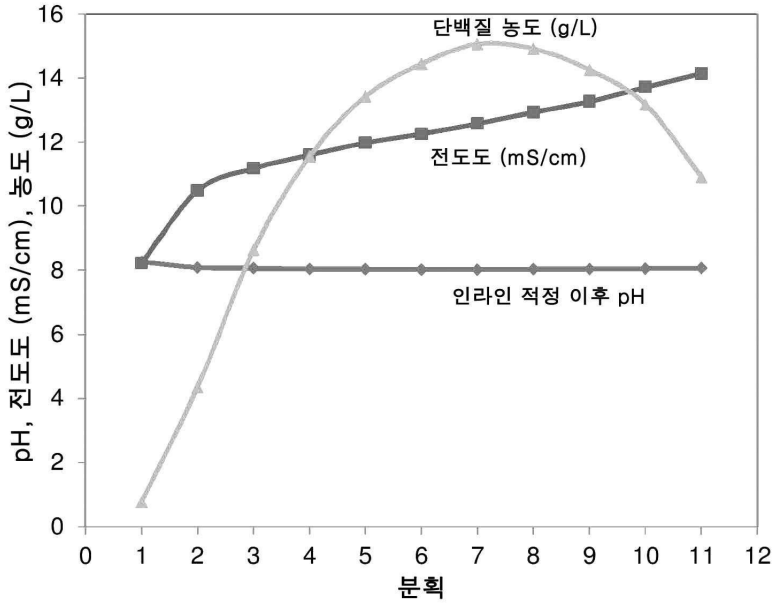
도면14a



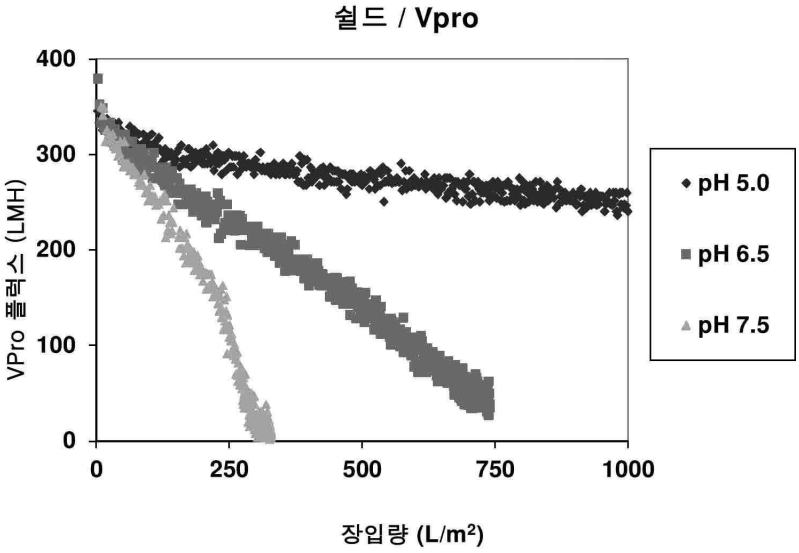
도면14b

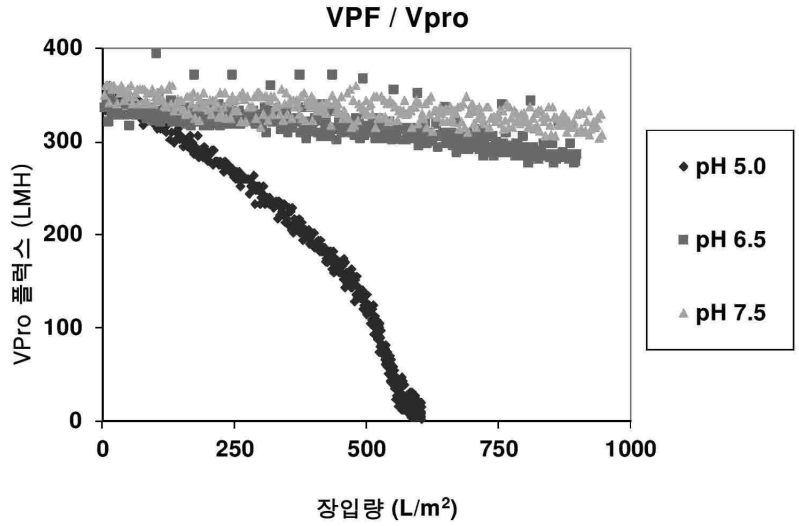


도면15

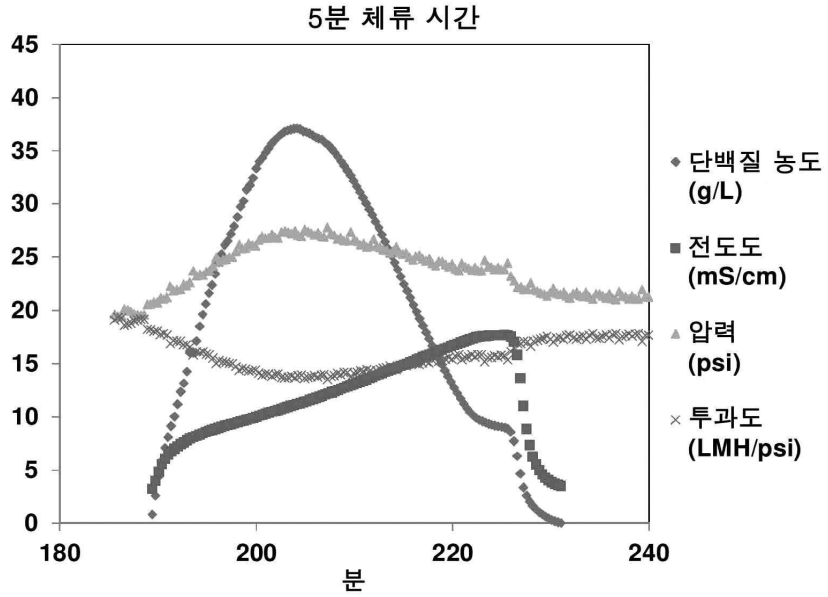

단백질 농도 (g/L)
전도도 (mS/cm)
인라인 적정 이후 pH
pH, 전도도 (mS/cm), 농도 (g/L)
분획
0
2
4
6
8
10
12
14
16
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

도면16

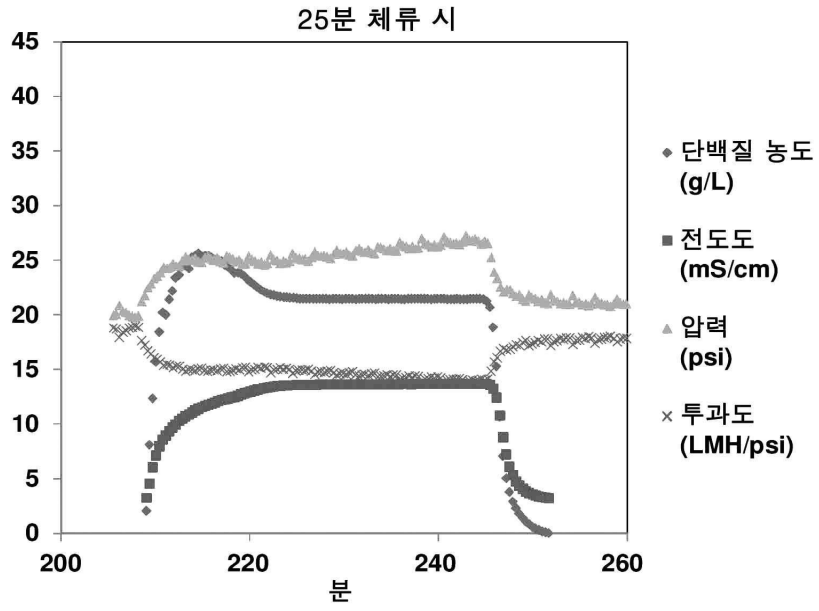

쉴드 / Vpro
VPro 플럭스 (LMH)
400
300
200
100
0
0
250
500
750
1000
장입량 (L/m²)
pH 5.0
pH 6.5
pH 7.5


VPF / Vpro
VPro 플럭스 (LMH)
400
300
200
100
0
0
250
500
750
1000
장입량 (L/m²)
pH 5.0
pH 6.5
pH 7.5

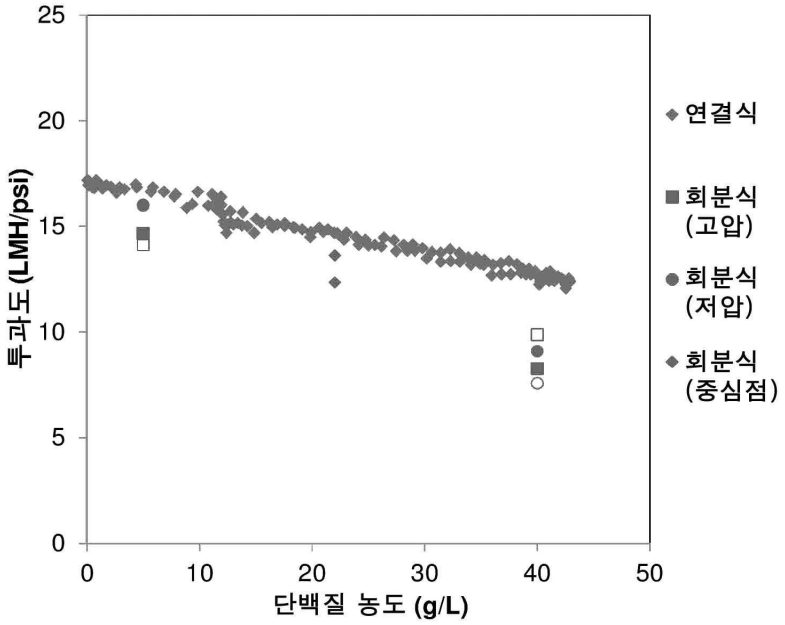
도면17a


5분 체류 시간
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
180
200
220
240
분
단백질 농도 (g/L)
전도도 (mS/cm)
압력 (psi)
투과도 (LMH/psi)

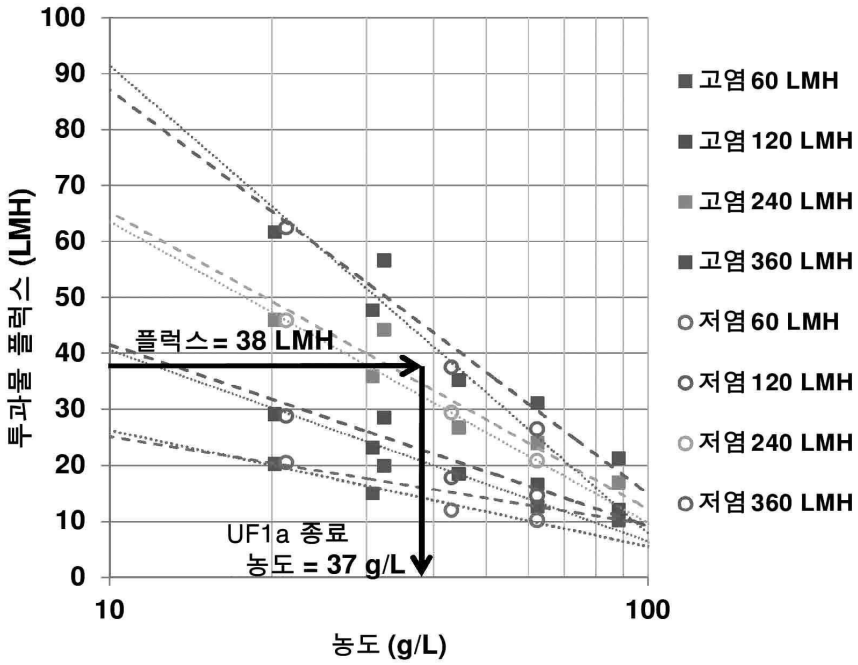
도면17b


25분 체류 시
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
200
220
240
260
분
단백질 농도 (g/L)
전도도 (mS/cm)
압력 (psi)
투과도 (LMH/psi)

도면18


25
20
15
10
5
0
투과도 (LMH/psi)
0
10
20
30
40
50
단백질 농도 (g/L)
연결식
회분식 (고압)
회분식 (저압)
회분식 (중심점)

도면19


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
투과물 플럭스 (LMH)
플럭스 = 38 LMH
UF1a 종료
농도 = 37 g/L
10
100
농도 (g/L)
고염 60 LMH
고염 120 LMH
고염 240 LMH
고염 360 LMH
저염 60 LMH
저염 120 LMH
저염 240 LMH
저염 360 LMH

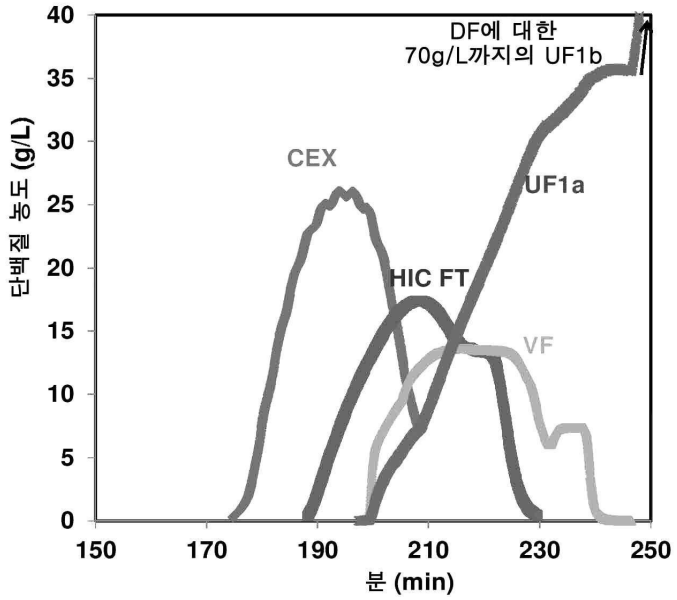
도면20

표 2. 진행된 연결식 공정의 예

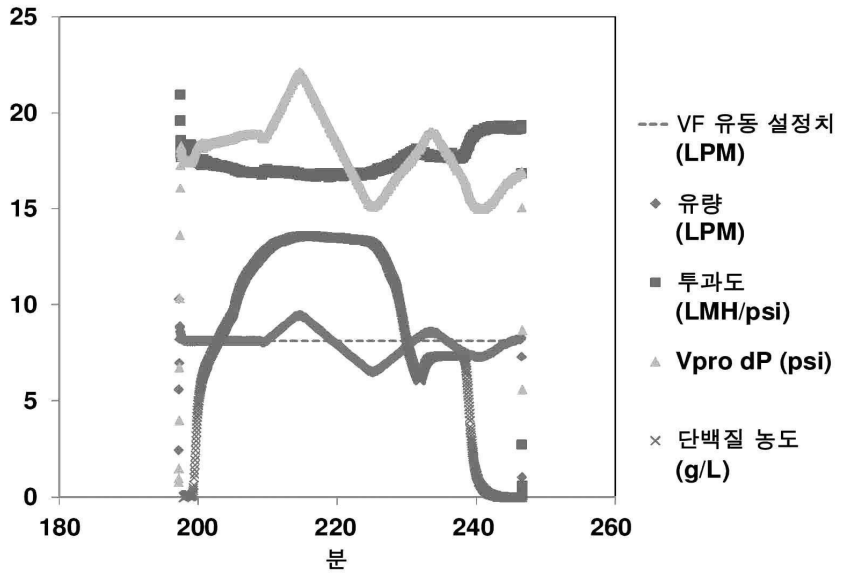
공정 파라미터		단위	CEX-AEX(FT)-VF-UF	CEX-HIC(FT)-VF-UF	CEX-VF-UF	HIC(BE)-VF-UF	HIC(FT)-VF-UF
분자			(mAb A)	(mAb B)	(mAb C)	(mAb D)	(mAb E)
CEX 또는 HIC (BE)	크기	cm-D		60	60	80	
	장입 용량	g/L_r	80	80	80	35	NA
	선형 유동	cm/hr	140	140	120	90	
인라인 적정	% 희석	% v/v	NA	20%	NA	NA	18%
AEX (FT) 멤브레인 또는 HIC (FT)	크기	cm-D	180 mL	60	NA	NA	60
	장입량	g/L_r	10.7 kg/L_m	72			104
	선형 유동	cm/hr	16.3 MV/min	174			180
VF	필터 면적	m^2	1.0	1.5	1.0	1.0	2.0
	장입량	g/m^2	1900	2550	4210	3670	3430
	여과물 플럭스	LMH	172	320	333	444	249
UF	필터 면적	m^2	4.6	9.1	9.1	9.1	16
	장입량	g/m^2	412	421	471	410	438
	투과물 플럭스	LMH	39	54	38	50	32
	UF1a 농도*	g/L	40	38	37	26	47
수율			94%	82%	89%	80%	89%

* UF1a 농도는 모든 물질이 탱크에 축적된 시점에서 연결식 단계의 종료시의 잔류물 탱크에서의 농도를 지칭한다

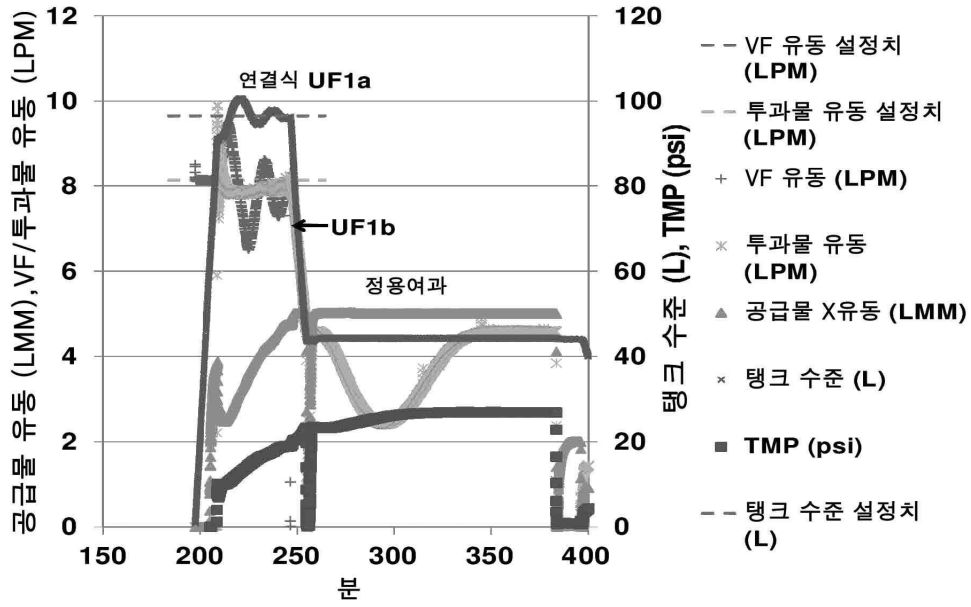
도면21a



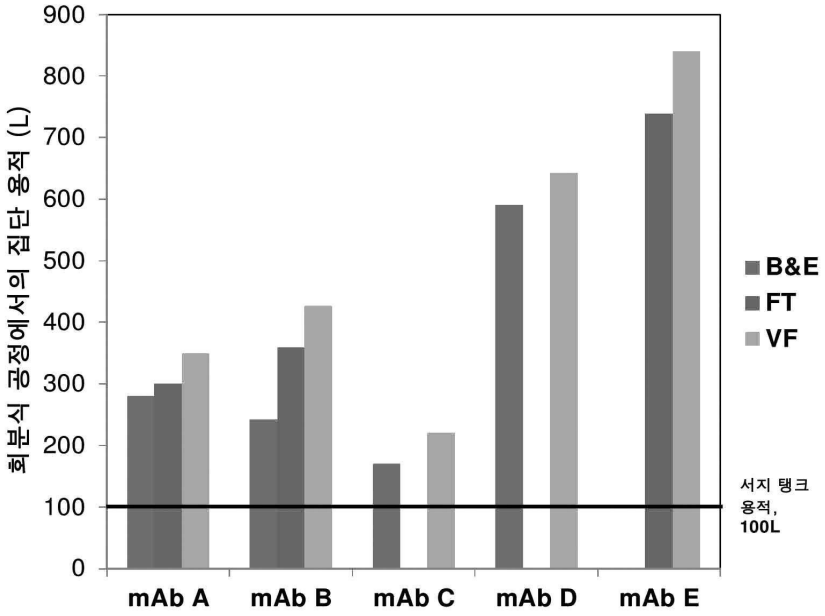
도면21b


25
20
15
10
5
0
180
200
220
240
260
분
VF 유동 설정치 (LPM)
유량 (LPM)
투과도 (LMH/psi)
Vpro dP (psi)
단백질 농도 (g/L)

도면21c


12
10
8
6
4
2
0
120
100
80
60
40
20
0
150
200
250
300
350
400
분
공급물 유동 (LMM), VF/투과물 유동 (LPM)
탱크 수준 (L), TMP (psi)
연결식 UF1a
UF1b
정용여과
VF 유동 설정치 (LPM)
투과물 유동 설정치 (LPM)
VF 유동 (LPM)
투과물 유동 (LPM)
공급물 X유동 (LMM)
탱크 수준 (L)
TMP (psi)
탱크 수준 설정치 (L)

도면22



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

공정 제어 시스템으로서,

(a) 각각 유량을 가동시키는 하나 이상의 업스트림 공정 유닛;

(b) 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛에 연결되는 탱크;

(c) 상기 탱크에 연결되는 유입구, 투과물 유출구 및 잔류물 유출구를 갖는 필터;

(d) 상기 탱크에 연결된 유입구 및 상기 필터의 유입구에 연결된 유출구를 갖는 공급물 펌프;

(e) 상기 투과물 유출구에서의 유량을 결정하기 위해 상기 투과물 유출구에 배치되는 센서;

(f) 하기 (i) 내지 (iv) 중 하나인 제어 시스템

을 포함하는, 공정 제어 시스템:

(i) 상기 센서 및 상기 업스트림 공정에 연결되고, 그리고 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량을 제어하기 위해 적용되는 제어 시스템,

(ii) 상기 센서 및 상기 공급물 펌프에 연결되고, 그리고 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 공급물 펌프를 제어하기 위해 적용되는 제어 시스템,

(iii) 상기 센서 및 상기 공급물 펌프에 연결되고, 그리고 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달될 때까지 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 공급물 펌프를 제어하기 위해, 그리고 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달된 이후 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량을 제어하기 위해 적용되는 제어 시스템, 또는

(iv) 상기 센서 및 상기 공급물 펌프에 연결되고, 그리고 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달될 때까지 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 공급물 펌프를 제어하기 위해, 그리고 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달된 이후 상기 공급물 펌프의 유량과 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛의 유량 사이의 불일치를 가능하게 하기 위해 적용되는 제어 시스템.

【변경후】

공정 제어 시스템으로서,

(a) 각각 유량을 가동시키는 하나 이상의 업스트림 공정 유닛;

(b) 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛에 연결되는 탱크;

(c) 상기 탱크에 연결되는 유입구, 투과물 유출구 및 잔류물 유출구를 갖는 필터;

(d) 상기 탱크에 연결된 유입구 및 상기 필터의 유입구에 연결된 유출구를 갖는 공급물 펌프;

(e) 상기 투과물 유출구에서의 유량을 결정하기 위해 상기 투과물 유출구에 배치되는 센서;

(f) 하기 (i) 내지 (iv) 중 하나인 제어 시스템

을 포함하는, 공정 제어 시스템:

(i) 상기 센서 및 상기 업스트림 공정에 연결되고, 그리고 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량을 제어하기 위해 적용되는 제어 시스템,

(ii) 상기 센서 및 상기 공급물 펌프에 연결되고, 그리고 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 공급물 펌프를 제어하기 위해 적용되는 제어 시스템,

(iii) 상기 센서 및 상기 공급물 펌프에 연결되고, 그리고 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달될 때까지 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 공급물 펌프를 제어하기 위해, 그리고 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달된 이후 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛 중 하나 이상의 유량을 제어하기 위해 적용되는 제어 시스템, 또는

(iv) 상기 센서 및 상기 공급물 펌프에 연결되고, 그리고 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달될 때까지 상기 투과물 유출구에서의 유량에 따라 상기 공급물 펌프를 제어하기 위해, 그리고 예정된 유량이 상기 공급물 펌프에 대해 도달된 이후 상기 공급물 펌프의 유량과 상기 하나 이상의 업스트림 공정 유닛의 유량 사이의 불일치를 가능하게 하기 위해 적용되는 공정 제어 시스템.