



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년01월25일
(11) 등록번호 10-2206959
(24) 등록일자 2021년01월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01D 67/00 (2006.01) B01D 39/16 (2006.01)
B01D 71/54 (2006.01) C07K 1/34 (2006.01)
(52) CPC특허분류
B01D 67/0004 (2013.01)
B01D 39/1623 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7015000(분할)
(22) 출원일자(국제) 2016년02월17일
심사청구일자 2019년05월24일
(85) 번역문제출일자 2019년05월24일
(65) 공개번호 10-2019-0060884
(43) 공개일자 2019년06월03일
(62) 원출원 특허 10-2017-7024781
원출원일자(국제) 2016년02월17일
심사청구일자 2017년09월04일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/018146
(87) 국제공개번호 WO 2016/167871
국제공개일자 2016년10월20일
(30) 우선권주장
62/148,793 2015년04월17일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
EP01745808 A1
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 10 항

(73) 특허권자
이엠디 밀리포어 코포레이션
미국 매사추세츠 01803, 벨링턴, 서밋 드라이브 400
(72) 발명자
카탈도 윌리엄
미국 매사추세츠 01821 빌레리카 콘코드 로드 290
이엠디 밀리포어 코포레이션 내
코즈로브 미카일
미국 매사추세츠 01821 빌레리카 콘코드 로드 290
이엠디 밀리포어 코포레이션 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
백덕열

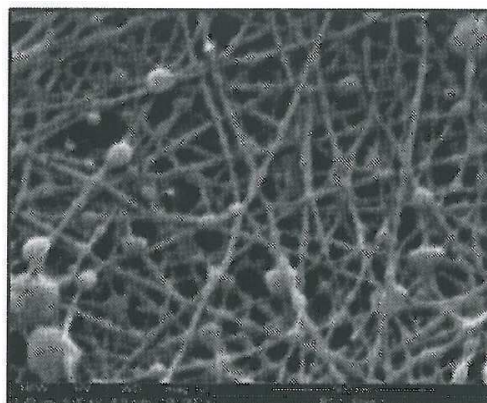
심사관 : 한상현

(54) 발명의 명칭 접선방향 유동 여과 모드에서 작동되는 나노섬유 한외여과막을 사용하여 샘플에서 목적하는 생물학적 물질을 정제하는 방법

(57) 요약

본 발명은 접선방향 여과 모드로 작동할 수 있는 전기방사된 나노섬유 한외여과막 조성물 및 그를 이용하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



NF UF의 100,000배율 SEM 사진

(52) CPC특허분류

B01D 71/54 (2013.01)

C07K 1/34 (2013.01)

B01D 2315/16 (2013.01)

B01D 2323/39 (2013.01)

(72) 발명자

제노폴로스 알렉스

미국 매사추세츠 01821 빌레리카 콘코드 로드 290
이엠디 밀리포어 코포레이션 내

아키노 테니스

미국 매사추세츠 01821 빌레리카 콘코드 로드 290
이엠디 밀리포어 코포레이션 내

나간 클리프톤

미국 매사추세츠 01821 빌레리카 콘코드 로드 290
이엠디 밀리포어 코포레이션 내

(56) 선행기술조사문헌

US20100316988 A1*

WO2011019686 A1

WO2014093345 A1

WO2014159124 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

하기 단계(a), (b) 및 (c)를 포함하는, 샘플에서 목적하는 생물학적 물질을 정제하는 방법:

(a) 분자량이 500 KDa 이상이고, 단백질, 콘주게이트된 폴리사카라이드 백신 및 바이러스-유사 입자로부터 선택되는 목적하는 생물학적 물질을 함유하는 샘플을 제공하는 단계;

(b) 접선방향 여과 모드에서 샘플을 평균 섬유 직경이 15 nm 미만인 나노섬유를 포함하는 전기방사된 나일론 나노섬유 막 조성물과 접촉시켜서 투과물 및 보유물을 생성시키는 단계; 및

(c) 목적하는 생물학적 물질을 함유하는 보유물을 수집하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 나노섬유가 6 내지 13 nm의 평균 섬유 직경을 갖는, 샘플에서 목적하는 생물학적 물질을 정제하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (c) 목적하는 생물학적 물질을 함유하는 보유물을 수집하는 단계가 목적하는 생물학적 물질의 농도를 증가시키는 공정을 포함하는, 샘플에서 목적하는 생물학적 물질을 정제하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 전기방사된 나노섬유 조성물이 용액 캐스팅 폴리에테르설폰(PES) 막에 비해 TFF 모드에서 더 높은 수분 투과율을 나타내는, 샘플에서 목적하는 생물학적 물질을 정제하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 전기방사된 나노섬유 막 조성물이 용액 캐스팅 폴리에테르설폰(PES) 막에 비해 TFF 모드에서 더 높은 플럭스를 나타내는, 샘플에서 목적하는 생물학적 물질을 정제하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 수집 단계가 다이아여과를 포함하는, 샘플에서 목적하는 생물학적 물질을 정제하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 전기방사된 나노섬유 막 조성물이 나일론-6으로 제조되는, 샘플에서 목적하는 생물학적 물질을 정제하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 전기방사된 나노섬유 막 조성물이 나일론-6,6으로 제조되는, 샘플에서 목적하는 생물학적 물질을 정제하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 정제된 목적하는 생물학적 물질이 90 % 수율 또는 90 % 초과 수율을 갖는, 샘플에서 목적하는 생물학적 물질을 정제하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 전기방사된 나노섬유 막 조성물이 TFF에 적합한 장치에 혼입되고, 상기 장치가 카세트 또는 나선형 권취장치인, 샘플에서 목적하는 생물학적 물질을 정제하는 방법.

청구항 11

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2015년 4월 17 일자로 출원된 미국 임시 특허출원 제 62/148,793 호의 우선권을 주장하며, 그 전체 내용은 본 명세서에서 참고로 인용된다.

[0002] 본 명세서에 기재된 실시형태는 접선방향 여과 모드에서 작동할 수 있는 나노섬유 한외여과 조성물 및 이를 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 막 여과는 생물학적 물질의 벤치 스케일 뿐만 아니라 프로세스 스케일의 정제 모두에 널리 사용되는 분리 기술이다. 여과에 사용되는 막에는 공극 크기(pore size)에 따라 미세여과(microfiltration) 막 또는 한외여과(ultrafiltration) 막으로 분류되는 상이한 유형이 있다. 미세여과 막은 일반적으로 0.1 μm 내지 10 μm 범위의 공극 크기를 갖는 반면, 한외여과막은 0.001 내지 0.1 μm 범위의 훨씬 작은 공극 크기를 갖는다. 공극 크기의 차이 때문에 이들 막은 다른 목적으로 사용된다. 예를 들면, 미세여과 막은 일반적으로 미세 입자의 정제, 멸균 및 제거 또는 세포 수확(harvesting)에 사용되고, 그리고 한외여과막은 일반적으로 분자(예를 들면, 단백질, 펩타이드, 핵산, 탄수화물 및 기타 생물학적 물질)의 분획 또는 농축에 사용된다. 한외여과막은 전형적으로 공극 크기보다는 분자량 컷오프(cutoff)에 의해 분류된다.

[0004] 미세여과 및 한외여과막에 일반적으로 이용되는 두 가지 주요 유형의 여과 모드가 있다. 그 여과 모드 중 하나는 일반적으로 소위 "데드-엔드(dead-end)" 여과라고도 알려진 일반 유동 여과(Normal Flow Filtration, NFF) 모드라고도 하며, 이 여과는 일반적으로 공급물 스트림을 막 면에 수직으로 적용하고 유체를 막을 통해 100% 통과시키는 것이다. 또 다른 여과 모드는 접선방향 유동여과(Tangential Flow Filtration, TFF)라고 불리우는데, 여기서 공급물 스트림은 막 면과 평행하며, 일부는 막을 통과하고(즉, 투과물), 나머지는 유지되고 공급물 저장소로 재순환될 수 있다(즉, 잔류물).

[0005] TFF 여과 모드는 특정 유형의 생물학적 물질, 예를 들면 500 kDa 또는 500 kDa보다 큰 크기를 갖는 생물학적 물질의 정제에 바람직하며, TFF는 농축 및 불순물 제거를 위해 사용된다. 대부분의 TFF 분야에서는 농축 및 완충액 교환 단계 등에 유용한 한외여과막을 사용한다. 특정 생물학적 물질(예를 들면, 단백질, 백신 및 바이러스-유사 입자)의 제조를 위해 TFF 모드에서 사용되는 한외여과막의 일례는 폴리에테르설폰(PES)으로 만든 용액 침지 캐스팅 한외여과막이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] TFF 모드에서 널리 사용되는 대부분의 한외여과막은 습윤 상태로 운반되어야하며, 또한 미생물에 의한 오염을 방지하기 위해 방부제를 필요로 한다. 그러나 막의 건조 및 동결을 방지하기 위해 환경 조건을 제어할 필요가 있기 때문에 습윤 상태에서의 운반이 어려울 뿐만 아니라 막 물질에 첨가된 방부제는, 최종 제품, 예를 들면 치료용 단백질 또는 백신을 함유한 샘플에 방부제가 들어가지 않도록 하기 위해서 종종 생물학적 물질의 정제에 사용하기 전에 제거되어야한다.

과제의 해결 수단

[0007] 발명의 요약

[0008] 본 명세서에 기재된 실시형태는, 예를 들면 바이러스-유사 입자, 단백질 및 콘주게이트된 폴리사카라이드 백신(일반적으로 약 500 kDa 이상의 분자량을 갖는 생물학적 물질)과 같은 생물학적 물질의 제조에서 전기방사된(electrospun) 나노섬유 막 조성물의 이용 가능성을 입증하고, 그리고 현재 사용되는 용액 침지 캐스팅 PES 막에 대한 대안 및 개선점을 제공한다. 특히, 용액 침지 캐스팅 PES 막과는 대조적으로, 전기방사된 나노섬유 막은 건조 상태로 운반될 수 있으며 방부제의 사용을 필요로 하지 않는다.

- [0009] 본 명세서에 기재된 실시형태에서 사용된 전기방사된 나노섬유 막은 접선방향 유동여과(TFF) 모드에서 용액 침지 캐스팅 PES 한외여과막과 동등하거나 개선된 성능을 갖는다.
- [0010] 다양한 실시형태에서, 샘플에서 목적하는 생물학적 물질을 정제하는 방법은 하기 단계(a), (b) 및 (c)를 포함한다:
- [0011] (a) 500 kDa 이상의 분자량을 갖는 목적하는 생물학적 물질을 함유하는 샘플을 제공하는 단계;
- [0012] (b) 접선방향 여과 모드에서 샘플을 평균 섬유 직경이 15 nm 미만인 나노섬유를 포함하는 전기방사된 나노섬유막 조성물과 접촉시켜서 투과물 및 보유물을 생성시키는 단계; 및
- [0013] (c) 목적하는 생물학적 물질을 함유하는 보유물을 수집하여 목적하는 생물학적 물질을 정제하는 단계.
- [0014] 일부 실시형태에서, 목적하는 생물학적 물질은 치료용 단백질, 콘쥬게이트된 폴리사카라이드 백신 및 바이러스-유사 입자로부터 선택된다.
- [0015] 일부 실시형태에서, 수집 단계는 목적하는 생물학적 물질의 농도를 증가시키는 단계를 포함한다. 다른 실시형태에서, 수집 단계는 다이아여과(diafiltration)를 포함한다.
- [0016] 일부 실시형태에서, 전기방사된 나노섬유 조성물은 용액 캐스팅 중합체 막에 비해 TFF 모드에서 더 높은 수분 투과율을 나타낸다.
- [0017] 일부 실시형태에서, 전기방사된 나노섬유 막 조성물은 용액 캐스팅 중합체 막에 비해 TFF 모드에서 더 높은 플럭스를 나타낸다.
- [0018] 일부 실시형태에서, 전기방사된 나노섬유 막 조성물은 나일론-6으로 제조된다.
- [0019] 일부 실시형태에서, 정제 방법은 목적하는 생물학적 물질의 90% 이상의 수율 또는 90 % 초과 수율을 가져온다.
- [0020] 다양한 실시형태에서, 전기방사된 나노섬유 막 조성물은 TFF에 적합한 장치, 예를 들면 카세트 또는 나선형 권취 장치에 혼입된다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 전기방사된 나일론-6 나노섬유 한외여과막("NF UF"라 칭함)의 100,000배 배율의 주사 전자 현미경 사진이다.
- 도 2는 용액 침지 캐스팅을 사용하여 제조된 폴리에테르 설펜 한외여과막("PES UF"라 칭함)의 100,000배 배율의 주사 전자 현미경 사진이다.
- 도 3은 NF UF 막 섬유의 직경을 측정하는 그래프이다. NF UF 랜덤 섬유 반경 측정은 도 1과 유사한 주사전자 현미경(SEM)과 Image Pro Plus v6.0 내에 맞춤형 유클리드 거리 맵(Euclidean Distance Map, EDM) 루틴(routine)을 사용하여 이루어진다. x-축은 나노미터 단위의 섬유 반경이다. y-축은 x-축상의 나노미터 단위의 각 반경에 대한 측정 빈도 또는 횟수이다.
- 도 4는 NF UF 막의 6개의 상이한 샘플 및 PES UF 막의 4개의 상이한 샘플에 대한 평균 유동 포점(mean flow bubble point)(psi)(x-축) 대 평균 수분 투과율(LMH/psi)(y-축)을 나타내는 그래프이다. 6개의 NF UF 막 샘플은, 표시 기호로 나타낸 바와 같이 다음과 같다 : NF UF 1,000 kDa (R1-1); (R1-2); (R2-1); (R2-2); 및 NF UF 1,500 kDa (R2-3); 및 (E2-1). 4개의 PES UF 막 샘플은, 표시 기호로 나타낸 바와 같이 다음과 같다 : PES UF 800 kDa; 1,200 kDa; 1,700 kDa; 및 4,800 kDa. 단위 kDa (킬로달톤) 앞의 숫자는 막이 kDa 값보다 큰 분자량을 갖는 텍스트란의 90%를 보유할 때, UF 막에 대한 텍스트란 체질(sievig) R90 컷오프를 나타낸다. y-축 상의 수분 투과율 단위는 막의 제곱 미터당 물의 리터 x 시간 x 적용 압력의 제곱인치당 파운드(LMH/psi)이다. 평균 유동 포점 단위는 용매 2-프로판올의 제곱인치당 파운드(psi)이다.
- 도 5는, 표시 기호로 나타낸 바와 같이, 각각 2개씩 800, 1,200, 1,700 및 4,800 kDa의 텍스트란 R90 값을 갖는 PES UF 막의 샘플 및 1,000 kDa의 텍스트란 R90 값을 갖는 NF UF 막의 4개의 샘플 및 1,500 kDa의 텍스트란 R90 값을 갖는 NF UF 막의 3개의 샘플에 대한 텍스트란 체질 곡선을 나타낸 그래프이다. 그래프 구성은 log₁₀ 대 log₁₀이며, 여기서 x-축은 달톤(Da) 단위의 텍스트란 분자량이고, y-축은 막 보유물 측의 초기 검사(challenge) 용액의 공급물 겔투과 크로마토그래피(GPC)에 대한 막 샘플 투과물 겔투과 크로마토그램을 비교하여 얻은

0.001-1의 텍스트란 체질 \log_{10} 스케일이다.

도 6은 NF UF 막의 6개의 샘플 및 4개의 상이한 PES UF 막 샘플에 대해 평균 유동 포점(psi)를 x-축, 그리고 평균 텍스트란 체질 R90 (kDa)을 y-축에 \log_{10} 스케일로 나타낸 그래프이다. 6개의 NF UF 막 샘플은, 표시 기호로 나타낸 바와 같이 다음과 같다: NF UF 1,000 kDa (R1-1); (R1-2); (R2-1); (R2-2) 및 NF UF 1,500 kDa (R2-3); 및 (E2-1). 4개의 PES UF 막 샘플은, 표시 기호로 나타낸 바와 같이 다음과 같다: PES UF 800 kDa; 1,200 kDa; 1,700 kDa; 및 4,800 kDa. 단위 kDa(킬로달톤) 앞의 숫자는 도 5의 막 텍스트란 체질 R90 컷오프를 나타낸다.

도 7은 NF UF 막의 6개의 샘플 및 PES UF 막의 4개의 상이한 샘플에 대해 평균 텍스트란 체질 R90 (kDa)을 \log_{10} 스케일로 x-축에, 그리고 평균 수분 투과율(LMH/psi)을 y-축에 나타내는 그래프이다. 6개의 NF UF 막 샘플은, 표시 기호로 나타낸 바와 같이 다음과 같다 : NF UF 1,000 kDa (R1-1); (R1-2); (R2-1); (R2-2); 및 NF UF 1,500 kDa (R2-3); 및 (E2-1). 4개의 PES UF 막 샘플은, 표시 기호로 나타낸 바와 같이 다음과 같다: PES UF 800 kDa; 1,200 kDa; 1,700 kDa 및 4,800 kDa. 단위 kDa(킬로달톤) 앞의 숫자는 도 5의 막 텍스트란 체질 R90 컷오프를 나타낸다.

도 8은 실시예 4의 pH 7.0, 50 mM 포스페이트 완충액에서의 공급물 A (0.0385 % w/w)의 겔투과 크로마토그램이다. x-축은 \log_{10} 스케일로서 텍스트란 분자량을 달톤(Da)으로 나타낸다. y-축의 영역은 GPC 분자량 표준과의 통합 후 굴절률 검출기 응답(밀리 볼트)으로부터 변환된다.

도 9는 실시예 4의 pH 7.0, 50 mM 포스페이트 완충액에서의 공급물 B(0.844 % w/w)의 겔투과 크로마토그램이다. x-축은 \log_{10} 스케일로서 텍스트란 분자량을 달톤(Da)으로 나타낸다. y-축의 영역은 GPC 분자량 표준과의 통합 후 굴절률 검출기 응답(밀리 볼트)으로부터 변환된다.

도 10은 실시예 5의 공급물 A에 대한 NF UF 막 및 PES UF 막의 2 샘플에 대한 트랜스-막 압력(TMP)을 psi로서 x-축에, 그리고 공급물 A의 평균 플럭스를 LMH로서 y-축에 나타낸 그래프이다. y-축상의 플럭스 단위는 막의 제곱미터당 공급물 A의 리터 x 시간(LMH)이다. x-축 상의 트랜스-막 압력(TMP)은 막을 가로지르는 압력의 제곱인 치당 파운드(psi)이다.

도 11은 실시예 5의 공급물 B에 대한 NF UF 막 및 PES UF 막의 2 샘플에 대한 트랜스-막 압력(TMP)을 psi로서 x-축에, 그리고 공급물 B의 평균 플럭스를 LMH로서 y-축에 나타낸 그래프이다. y-축상의 플럭스 단위는 막의 제곱미터당 공급물 B의 리터 x 시간(LMH)이다. x-축 상의 트랜스-막 압력(TMP)은 막을 가로지르는 압력의 제곱인 치당 파운드(psi)이다.

도 12는 실시예 5에 따른 공급물 C의 NF UF 막 및 PES UF 막의 2 샘플에 대한 트랜스-막 압력(TMP)을 psi로서 x-축에, 그리고 공급물 C의 평균 플럭스를 LMH로서 y-축에 나타낸 그래프이다. y-축상의 플럭스 단위는 막의 제곱미터당 공급물 C의 리터 x 시간(LMH)이다. x-축 상의 트랜스-막 압력(TMP)은 막을 가로지르는 압력의 제곱인 치당 파운드(psi)이다.

도 13은 각 TMP에서 실시예 5로부터 수집된 공급물 및 투과물 중 공급물 A(0.0385 % w/w) 샘플의 겔투과 크로마토그램을 나타낸다. 도 13에서, NF UF의 2개 중 1개와 이들의 공급물에 대한 공급물 A 투과물의 겔투과 크로마토그램을 나타낸다. x-축은 \log_{10} 스케일로서 텍스트란 분자량을 달톤(Da)으로 나타낸다. y-축의 영역은 GPC 분자량 표준과의 통합 후 굴절률 검출기 응답(밀리 볼트)으로부터 변환된다.

도 14는 각 TMP에서 실시예 5로부터 수집된 공급물 및 투과물 중 공급물 A(0.0385 % w/w) 샘플의 겔투과 크로마토그램을 나타낸다. 도 14는 PES UF 막 2개 중 1개를 통과하는 공급물 A의 겔투과 크로마토그램과 그 공급물을 나타낸다. x-축은 \log_{10} 스케일로서 텍스트란 분자량을 달톤(Da)으로 나타낸다. y-축의 영역은 GPC 분자량 표준과의 통합 후 굴절률 검출기 응답(밀리 볼트)으로부터 변환된다.

도 15는 실시예 5로부터의 플럭스 대 TMP(psi) 실험을 통해 공급물 A를 사용하는 NF UF 및 PES UF 막에 대한 y-축상의 D7250, D2000, D110의 평균 C_p/C_f 의 질량/농도 이동(transfort)을 나타내는 그래프이다. 실시예 6은 GPC 분석을 위해 x-축상의 각 TMP(psi)에서 공급물 및 투과물 샘플을 수집함으로써 실시예 5로부터 텍스트란 질량/농도 이동을 얻는 방법을 상세히 설명한다.

도 16은 실시예 5로부터의 플럭스 대 TMP(psi) 실험을 통해 공급물 B를 사용한 NF UF 및 PES UF 막에 대한 D7250, D2000, D110의 평균 C_p/C_f 또는 질량/농도 이동을 x-축 상에 나타낸 그래프이다. 도 15의 경우에서와 같

이, 실시예 6은 GPC 분석을 위해 x-축상의 각 TMP(psi)에서 공급물 및 투과물 샘플을 수집함으로써 실시예 5로부터 텍스트란 질량/농도 이동을 얻는 방법을 상세히 설명한다.

도 17은 실시예 5 및 6으로부터의 플럭스 대 TMP(psi) 실험에서 공급물 A를 사용하여 NF UF 및 PES UF 막에 대한 D110/D2000 및 D110/D7250의 평균 선택도 대 평균 플럭스를 LMH로 나타낸 그래프이다. 실시예 7은 D110/D2000 및 D110/D7250의 평균 통과 선택도를 결정하기 위해 y-축상의 식 $[(C_p/C_F)_{D110}/(C_p/C_F)_{D2000}$ 또는 $D7250]$ 으로부터 선택도 인자 대 x-축 상의 평균 플럭스(LMH)를 계산하는 방법을 상세히 설명한다.

도 18은 실시예 5 및 6으로부터의 플럭스 대 TMP(psi) 실험에서 공급물 B를 사용하여 NF UF 및 PES UF 막에 대한 D110/D2000 및 D110/D7250의 평균 선택도 대 평균 플럭스를 LMH로 나타낸 그래프이다. 실시예 7은 D110/D2000 및 D110/D7250의 평균 통과 선택도를 결정하기 위해 y-축 상의 식 $[(C_p/C_F)_{D110}/(C_p/C_F)_{D2000}$ 또는 $D7250]$ 으로부터 선택도 인자 대 x-축 상의 평균 플럭스(LMH)를 계산하는 방법을 상세히 설명한다.

도 19는 NF UF 막을 사용하여 30 LMH 및 640 RPM에서 공급물 A의 다이아여과 동안 공급물, 보유물 및 투과물의 겔투과 크로마토그램을 나타낸다. x-축은 \log_{10} 스케일로 달톤(Da) 단위의 텍스트란 분자량이다. y-축의 영역은 GPC 분자량 표준과의 통합 후 굴절률 검출기 응답(밀리 볼트)으로부터 변환된다. 도 19는 공급물을 가장 큰 피크로 나타내고, 감소하는 높이에서 각각의 증가하는 다이아볼륨(diavolume)에서 보유물을 실선으로 나타낸다. 투과물은 점선으로 표시되고, 여기서 다이아볼륨의 증가에 따라 피크가 낮아진다.

도 20은 PES UF 막을 사용하여 30 LMH 및 640 RPM에서 공급물 A의 다이아여과 동안 공급물, 보유물 및 투과물의 겔투과 크로마토그램을 나타낸다. x-축은 \log_{10} 스케일로 달톤(Da) 단위의 텍스트란 분자량이다. y-축의 영역은 GPC 분자량 표준과의 통합 후 굴절률 검출기 응답(밀리 볼트)으로부터 변환된다. 도 20은 공급물을 가장 큰 피크로 나타내고, 감소하는 높이의 각각의 증가하는 다이아볼륨(diavolume)에서 보유물을 실선으로 나타낸다. 투과물은 점선으로 표시되고, 여기서 다이아볼륨의 증가에 따라 피크가 낮아진다.

도 21은 실시예 8의 다이아여과(Diafiltration) 실험으로부터의 공급물 A를 사용하여 NF UF 및 PES UF 막에 대한 x-축상의 다이아볼륨 수 대 y-축상의 D7250, D2000, D110의 평균 보유물 C/C_0 을 나타낸 그래프이다. 공급물 A의 다이아여과는 640 RPM에서 교반하면서 30 LMH의 일정한 플럭스에서 이루어진다.

도 22는 실시예 8의 다이아여과 실험으로부터의 공급물 A를 사용하여 NF UF 및 PES UF 막에 대한 x-축상의 다이아볼륨 수 대 y-축상의 평균 보유물 선택도 D7250/D110 및 D2000/D110을 나타낸 그래프이다. 공급물 A의 다이아여과는 640 RPM에서 교반하면서 30 LMH의 일정한 플럭스에서 이루어진다. 평균 보유물 선택도는 도 21의 값으로부터 $D7250/D110 = (C/C_0)_{D7250}/(C/C_0)_{D110}$ 및 $D2000/D110 = (C/C_0)_{D2000}/(C/C_0)_{D110}$ 이다.

도 23은 실시예 8의 다이아여과 실험으로부터의 공급물 A를 사용하여 NF UF 및 PES UF 막에 대한 x-축상의 다이아볼륨 수 대 y-축상의 D7250, D2000, D110의 평균 보유물 C/C_0 를 나타내는 그래프이다. 공급물 A의 다이아여과는 320 RPM에서 교반하면서 60 LMH의 일정한 플럭스에서 실시된다.

도 24는 실시예 8의 다이아여과 실험으로부터의 공급물 A를 사용하여 NF UF 및 PES UF 막에 대한 x-축상의 다이아볼륨 수 대 y-축상의 D7250/D110 및 D2000/D110의 평균 보유물 선택도를 나타낸 그래프이다. 공급물 A의 다이아여과는 320 RPM에서 교반하면서 60 LMH의 일정한 플럭스에서 실시된다. 평균 보유물 선택도는 도 23의 값으로부터 $D7250/D110 = (C/C_0)_{D7250}/(C/C_0)_{D110}$ 및 $D2000/D110 = (C/C_0)_{D2000}/(C/C_0)_{D110}$ 이다.

도 25는 실시예 9의 일정한 TMP 0.5 psi 및 600 RPM에서 NF UF 및 PES UF 막에 대한 공급물 A의 2, 4 및 8배 한외여과 농축 동안 x-축상의 농축 인자 대 y-축상의 평균 플럭스를 LMH로 나타낸 그래프이다. y-축상의 플럭스 단위는 막의 제곱미터당 공급물 A의 리터 x 시간(LMH)이다. 시간 경과에 따른 투과물 부피는 플럭스를 결정하고 농축 인자를 추적한다.

도 26은 실시예 9의 일정한 TMP 0.5 psi 및 600 RPM에서 NF UF 및 PES UF 막에 대한 공급물 A의 2, 4 및 8배 한외여과 농축 동안 x-축상의 농축 인자 대 y-축상의 평균 C/C_{theo} 를 나타낸 그래프이다. 시간 경과에 따른 투과물 부피는 플럭스를 결정하고 및 농축 인자를 추적한다.

도 27은 실시예 9의 일정한 TMP 0.5 psi 및 600 RPM에서 NF UF 및 PES UF 막에 대한 공급물 A의 2, 4 및 8배 (좌측에서 우측) 한외여과 농축 동안 x-축상의 평균 공급물 플럭스(LMH) 대 y-축상의 평균 C/C_{theo} 를 나타낸 그래프이다. 시간 경과에 따른 투과물 부피는 플럭스를 결정하고 농축 인자를 추적한다. 보유물 샘플은, 실시예 4

에 기술된 바와 같이 GPC 분석을 위해 각 농축 인자에서 취하여 D7250, D2000 및 D110의 수율 및 선택도를 결정한다. 플럭스 단위는 y-축상의 막의 제곱미터당 공급물 A의 리터 x 시간(LMH)이다.

도 28은 실시예 9의 일정한 TMP 5 psi 및 600 RPM에서 NF UF 및 PES UF 막에 대한 공급물 B의 2, 4 및 8배(좌측에서 우측) 한외여과 농축 동안 x-축상의 평균 공급물 플럭스(LMH) 대 y-축상의 평균 C/C_{theo} 를 나타낸 그래프이다. 시간 경과에 따른 투과물 부피는 플럭스를 결정하고 농축 인자를 추적한다. 보유물 샘플은, 실시예 4에 기술된 바와 같이 GPC 분석을 위해 각 농축 인자에서 취하여 D7250, D2000 및 D110의 수율 및 선택도를 결정한다. y-축상의 플럭스 단위는 막의 제곱미터당 공급물 B의 리터 x 시간(LMH)이다.

도 29는 실시예 9의 일정한 TMP 7 psi 및 600 RPM에서 NF UF 및 PES UF 막에 대한 공급물 B의 2, 4 및 8배(좌측에서 우측) 한외여과 농축 동안 x-축상의 평균 공급물 플럭스(LMH) 대 y-축상의 평균 C/C_{theo} 를 나타낸 그래프이다. 시간 경과에 따른 투과물 부피는 플럭스를 결정하고 농축 인자를 추적한다. 보유물 샘플은, 실시예 4에 기술된 바와 같이 GPC 분석을 위해 각 농축 인자에서 취하여 D7250, D2000 및 D110의 수율 및 선택도를 결정한다. y-축상의 플럭스 단위는 막의 제곱미터당 공급물 B의 리터 x 시간(LMH)이다.

도 30은 실시예 9의 일정한 TMP 5 psi 및 300 RPM에서 NF UF 및 PES UF 막에 대한 공급물 C의 2 및 3배 한외여과 농축 동안 x-축상의 농축 인자에 대 y-축상의 평균 플럭스를 LMH로 나타낸 그래프이다. y-축상의 플럭스 단위는 막의 제곱미터당 공급물 A의 리터 x 시간(LMH)이다. 시간 경과에 따른 투과물 부피는 플럭스를 결정하고 농축 인자를 추적한다.

도 31은 실시예 9의 일정한 TMP 5 psi 및 300 RPM에서 NF UF 및 PES UF 막에 대한 공급물 C의 2 및 3배(좌측에서 우측) 한외여과 농축 동안 x-축상의 평균 공급물 플럭스(LMH) 대 y-축상의 평균 C/C_{theo} 를 나타낸 그래프이다. 시간 경과에 따른 투과물 부피는 플럭스를 결정하고 농축 인자를 추적한다. 보유물 샘플은, 실시예 4에 기술된 바와 같이, GPC 분석을 위해 각 농축 인자에서 취하여 D7250, D2000 및 D110의 수율 및 선택도를 결정한다. y-축상의 플럭스 단위는 막의 제곱미터당 공급물 C의 리터 x 시간(LMH)이다.

도 32는 실시예 9의 일정한 TMP 7 psi 및 300 RPM에서 NF UF 및 PES UF 막에 대한 공급물 C의 2 및 3배(좌측에서 우측) 한외여과 농축 동안 x-축상의 평균 공급물 플럭스 대 y-축상의 평균 C/C_{theo} 를 나타낸 그래프이다. 시간 경과에 따른 투과물 부피는 플럭스를 결정하고 농축 인자를 추적한다. 보유물 샘플은, 실시예 4에 기술된 바와 같이 GPC 분석을 위해 각 농축 인자에서 취하여 D7250, D2000 및 D110의 수율 및 선택도를 결정한다. y-축상의 플럭스 단위는 막의 제곱미터당 공급물 C의 리터 x 시간(LMH)이다.

도 33은 목적하는 생물학적 물질의 정제에 유용한 NF UF 막을 이용하는 TFF 시스템 또는 단위 조작의 개략도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 명세서에 기술된 실시형태는, PCT 공개 공보 제 WO 2014 093345 호에 이미 기재된 바와 같이, 예를 들면, 치료용 단백질, 바이러스-유사 입자 및 콘쥬게이트된 폴리사카라이드 백신과 같은 목적하는 생물학적 물질의 정제를 위한 TFF 모드에서 전기방사된 나노섬유 막 조성물을 이용한다. 본 명세서에 기술된 방법에 사용된 전기방사된 나노섬유 막 조성물은 예외적으로 높은 균일성을 가지며, 생물학적 물질의 정제에 전형적으로 사용되는 용액 침지 캐스팅 한외여과막에 비해 증가된 투과율 및 더 높은 공정 플럭스를 나타낸다.

[0023] 대부분의 통상적인 중합체성 한외여과막은 용액 상전환(solution phase inversion) 공정에 의해 제조된다. 이 공정은 2개 이상의 성분의 균일한(homogeneous) 중합체 용액을 강고한 막 구조를 형성하는 고휘 중합체-풍부(rich) 상 및 막 공극을 형성하는 액체, 중합체-부족(poor) 상을 갖는 2 상 시스템으로 전환시키는 것을 포함한다(참조: "Membranes and Membrane Processes". 1986 Springer US, Drioli, Enrico; Nakagaki, Masayuki, "Preparation of Microporous Membranes by Phase Inversion Processes", Strathmann, H., p 115-135). 이는 다양한 중합체 및 혼합물을 사용하여 수행할 수 있지만 원하는 특성의 막을 생성하는 데 필요한 민감한 운동학적 및 열역학적 조건 때문에 종종 어려움을 겪는다. 중합체 분자량, 농도, 온도, 혼합성, 용매 및 비-용매 특성 및 조성, 습도 및 기질을 비롯한 막 형성에 영향을 미칠 수 있는 여러 변수가 존재하며, 종종 복잡한 공정 및 환경 제어가 필요하다.

[0024] 그러나 전기방사된 나노섬유 한외여과막(예를 들면, 본 명세서에 기술된 NF UF)은 나일론-6과 같은 중합체를 사용하는 훨씬 간단한 제조 공정에 의해 제조될 수 있다. 나노섬유는 단순히 고전압 소스를 이용하여 중합체 용액

으로부터 제조된다. 전기방사는, 다양한 파라미터에 따라 달라지며 일반적으로 제어하기가 훨씬 더 어려운 상전환의 복잡성과 민감한 특성(예, 종래의 막)에 의존하지 않는다.

[0025] 본 명세서에 기술된 실시형태는, 전기방사된 나노섬유 막 조성물이 예를 들면 특정 치료 단백질, 바이러스-유사 입자 및 콘주게이트된 폴리사카라이드 백신 및 기타 유사한 크기의 생물학적 물질과 같은 적어도 500 KDa의 분자량을 갖는 생물학적 물질의 정제를 위해 TFF 모드에서 사용될 때, 상기 막 조성물이 폴리에테르설폰(PES)과 같은 중합체로부터 제조된 용액 침지 캐스팅 한외여과막과 유사하거나 더 우수하게 작용한다는 놀랍고도 예상치 못한 발견에 적어도 부분적으로 기초한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 실시형태에서 사용되는 전기방사된 나노섬유 조성물은 적어도 90 %, 또는 90 % 초과, 또는 적어도 95 %, 또는 95 % 초과와 생생물 수율을 가져온다.

[0026] NF UF 막은 TFF 모드에서 사용될 때 TFF 모드에서 사용되는 종래의 막, 예를 들면, 폴리에테르설폰 한외여과막으로 사용되는 종래의 막보다 더 높은 공정 플럭스 및 더 많은 양의 이동으로 변환하는 더 높은 수분 투과율을 나타낸다. 이는 또한 동일한 공급량을 처리하는데 필요한 더 빠른 처리시간과 더 적은 막 면적이 소요되므로, 그 결과 비용이 더 적게 든다. 본 발명의 실시예에 의해 입증된 바와 같이, NF UF 막의 경우 PES UF 막보다 약 30% 개선되는 것으로 나타났다.

[0027] 전기방사된 나노섬유 막 또는 매트 조성물은, 조성물의 "공극" 크기가 전기방사된 나노섬유의 섬유 직경에 정비례하는 높은 다공성 중합체 물질인 반면, 막 또는 매트와 다공성은 섬유 직경과는 비교적 독립적이며 통상 85-90% 정도로 좁은 범위에 있다.

[0028] 전기방사된 나노섬유 매트 또는 막 형성의 랜덤한 성질은 이러한 조성물이 액체 스트림의 임의의 입계 여과에 일반적으로 부적합하다는 일반적인 가정을 유도한다. 통상적인 여과를 이용하는 용액으로부터 비교적 큰 입자(예, 박테리아)를 제거하기 위한 전기방사된 조성물의 응용은 최근에 문헌[예를 들면, 국제 PCT 공보 WO 2010/107503; Wang et al, "Electrospun nanofibrous membranes for high flux microfiltration", Journal of Membrane Science, 392-393(2012) 167-174]]에 나타나기 시작하였다. 그러나, 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 목적하는 생물학적 물질의 정제를 위해 전기방사된 나노섬유 매트/막을 TFF 모드에 사용하는 기술에 대한 보고는 없다.

[0029] 이하, 본 명세서에 기재된 실시형태를 보다 쉽게 이해할 수 있도록, 특정 용어를 먼저 정의한다. 추가적인 정의는 상세한 설명을 통해 이루어진다.

[0030] **I. 용어의 정의**

[0031] "접선방향 유동 여과(Tangential Flow Filtration)" 또는 "TFF"라는 용어는 생물학적 물질, 예를 들면 단백질 및 백신의 정화, 농축 및 정제에 유용한 여과 방식을 의미한다. 여과의 접선방향 유동 여과(TFF) 모드에서, 유체는 막의 표면을 따라 접선방향으로 펌핑된다. 가해진 압력은 샘플의 일부를 막을 통해 여과물 측(투과물이라 함)으로 강제적으로 이동하게 하는 역할을 한다. 막 공극을 통과하기에 너무 큰 생물학적 물질 및 미립자(보유물이라고 함)는 상류 측에 보유된다. 그러나, 정상적인 여과 모드와 달리, 보유된 물질은 막의 표면에 축적되지 않는다. 그 대신에 보유된 물질은 유체의 접선방향 유동에 의해 막의 먼을 따라 스쳐 지나간다. TFF는 또한 "교차-유동 여과(cross-flow filtration)"라고도 정의할 수 있다.

[0032] "트랜스막 압력" 또는 "TMP"라는 용어는 공급물로부터 막의 여액 측으로 가해진 평균 압력을 의미한다. TMP는 다음과 같이 계산된다: $TMP [바아] = [(P_f + P_r)/2] - P_f$, 여기서 [바아]는 100,000 파스칼과 정확히 일치하는 압력의 미터법 단위이며, 파스칼은 제곱미터당 1 뉴턴으로 정의되고, P_f 는 공급물에 가해진 압력이고; P_r 은 보유물의 압력이고, 그리고 P_r 은 여액의 압력이다.

[0033] "한외여과" 또는 "UF"란 용어는 제어된 공극, 반투막을 사용하여 용해된 분자를 농축 또는 분별하는 막 여과 기술을 의미한다. 그 공극보다 훨씬 큰 분자는 공급 용액에 유지되고 막을 통과하는 액체의 부피와 정비례로 농축된다. 막의 공극 크기에 가까운 크기를 갖는 분자는 투과물에서 막을 통과하는 일부 분자보다 더 적은 정도로 농축된다. 샘플에서 자유롭게 투과할 수 있는 분자(염)의 농도는 본질적으로 변하지 않는다. 한외여과에 적합한 막(한외여과 또는 UF 막이라 함)은 사용된 막의 분자량 컷오프(MWCO)로 정의된다. 한외여과는 교차-유동 여과 또는 데드-엔드 여과 모드에 적용될 수 있다.

[0034] "다이하여과(diafiltration)"란 용어는 한외여과 막을 사용하여 단백질, 펩타이드, 핵산 및 기타 생체 분자가 함유된 용액으로부터 염 또는 용매의 농도를 완전히 제거, 교체 또는 낮추는 공정을 의미한다. 이 공정은 투과

성(다공성) 막 필터를 선택적으로 사용하여 분자 크기에 따라 용액 및 현탁액의 성분을 분리한다. 한외여과막은 막의 공극보다 더 큰 분자를 보유하고, 100 % 투과성인 염, 용매 및 물과 같이 더 작은 분자는 자유롭게 막을 통과한다. 다이하여과 동안 완충액은 단위 조작에서 제거됨과 동시에 재순환 탱크로 도입된다. 생성물이 보유물에 있는 공정에서 다이하여과는 생성물 풀에서 성분을 여액으로 씻어내어 완충액을 교환하고 바람직하지 않은 종류의 농도를 감소한다. 생성물이 여액에 있을 때, 다이하여과는 생성물로 하여금 막을 통해 수집 용기 내부로 씻어낸다.

- [0035] "다이하볼륨(diavolume)"이란 용어는 다이하여과 동안 실시된 세척의 정도를 측정하는 것을 의미한다. 이는 보유물 부피와 비교하여 단위 조작에 도입된 다이하여과 완충액의 부피를 기준으로 한다. 일정한 부피의 다이하여과가 수행되는 경우, 보유물의 부피가 일정하게 유지되고, 다이하여과 완충액은 여액이 떠나는 동일한 속도로 유입되면, 다이하볼륨은 다음과 같이 계산된다: $DV = \text{다이하여과 동안안 조작에 도입된 총 완충액 부피} / \text{보유물 부피}$.
- [0036] "농축 인자(concentration factor)"라는 용어는 생성물이 공급 스트림에 농축된 양을 의미한다.
- [0037] "농도"란 용어는 용액 내 또는 특정 공간의 부피에 함유된 주어진 물질의 상대적 양 또는 용액의 단위 부피당 용질의 양을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 농도는 용액 부피당 목적하는 생물학적 분자 또는 물질의 수에 의해 측정된다.
- [0038] "중합체"라는 용어는 반복된 많은 서브 유닛으로 구성된 큰 분자 또는 거대 분자를 의미한다. 중합체는 폴리스티렌과 같이 익숙한 합성 플라스틱으로부터 생물학적 구조와 기능에 기본이 되는 DNA 및 단백질과 같은 천연 생물고분자에 이르기까지 다양하다. 천연 중합체 및 합성 중합체 모두는 일반적으로 단량체로 알려진 작고 많은 분자의 중합을 통해 생성된다. 본 명세서에 기재된 실시형태에서 사용되는 나노섬유 조성물을 형성하는데 사용하기에 적합한 중합체는 열가소성 및 열경화성 중합체를 포함한다. 하기에 기술하는 바와 같이, 나노섬유 조성물을 제조하기 위해 추가의 예시적인 중합체가 사용될 수 있다.
- [0039] 본 명세서에서 사용된 "나일론"이란 용어는 나일론-6, 나일론-6,6, 나일론 6,6-6,10 및 이들의 공중 합체, 유도체 화합물, 블렌드 및 조합물을 의미한다.
- [0040] "나노섬유"란 용어는 수십 nm에서 수백 nm까지 변하지만, 일반적으로 1 μm 보다 작은 직경을 갖는 섬유를 의미한다.
- [0041] 본 명세서에서 사용된 "나노섬유 조성물"이란 용어는 매트 또는 막의 형태로 다수의 나노섬유의 집합을 말하며, 매트 또는 막의 두께는 단일 섬유의 직경보다 적어도 약 10배 더 크다. 나노섬유는 매트 또는 막에서 랜덤하게 배치되거나 또는 하나 또는 다수의 축을 따라 정렬될 수 있다.
- [0042] 본 명세서에서 사용된 "전기방사(electrospinning)"란 용어는 상기 용액에 전위를 가함으로써 중합체 용액 또는 용융물로부터 나노섬유를 제조하는 정전기 방사 공정을 의미한다. 정전기 방사 공정을 수행하기에 적합한 장치를 포함하여, 여과 매체용 전기방사된 나노섬유 매트 또는 막을 제조하기 위한 정전기 방사 공정은, 본원에서 참고로 하는 국제특허출원 공개 WO 2005/024101, WO 2006/131081 및 WO 2008/106903에 상세히 기재되어 있다. 일부 실시형태에서, 나노섬유 조성물은 단일 나노섬유로부터 제조되며, 단일 나노섬유는 공정을 통해 방사 드럼과 수집기 사이에 위치한 이동 수집 장치의 단일 통과에 의해 제조된다. 나노섬유의 섬유 웹은 동일한 이동 수집 장치 위에서 동시에 작동하는 하나 이상의 방사 드럼에 의해 형성될 수 있다.
- [0043] 일부 실시형태에서, 섬유질 매트/막은 나일론 용액으로부터 나노섬유(들)를 퇴적함으로써 제조된다. 나노섬유 매트/막은 건식, 즉 잔류 용매가 증발되거나 제거된 후에 측정된 바와 같이, 약 5 g/m² 내지 약 15 g/m²의 기본 중량을 갖는다.
- [0044] "전기방사된 나노섬유 조성물" 또는 "전기방사된 나노섬유 막 조성물"이라는 용어는 전기방사 공정을 이용하여 중합체로부터 제조된 다공성 나노섬유 매트 또는 막을 의미한다. 전기방사된 나노섬유 조성물은 일반적으로 약 80 % 내지 약 95 % 범위의 다공성, 약 1 μm 내지 약 500 μm 또는 약 50 μm 내지 약 200 μm 의 두께, 및 약 300 LMH/psi 보다 큰 액체 투과율을 갖는다. 본 명세서에 기술된 일부 실시형태에서, 전기방사된 나노섬유는 평균 직경이 15 nm 미만인 것으로 제조된다. 일부 실시형태에서, 전기방사된 나노섬유의 평균 직경은 6 nm 내지 13 nm이다.
- [0045] 일부 실시형태에서, 전기방사된 나노섬유 조성물은 적합한 TFF 장치 또는 예를 들면 Millipore Pellicon[®] 3 카세트와 같은 카세트, 나선형 권취 장치 또는 중공 섬유 장치와 같은 모듈 내로 도입된다. NF UF 막은 나선형 권

취 또는 편평한 카세트와 같은 장치에 혼입하기가 더 쉬울 수 있으며, 더 높은 생성물 회수율 및 농축 인자를 나타낼 수 있으며, 작동에 필요한 장비 및 에너지가 적고, 더 작은 제조 공간과 펌핑 용량을 요하고, 공기-액체 계면이 적고 오염 위험이 낮으며, 생성물 품질이 더 좋다.

- [0046] 일반적으로, TFF 모드에서 나노섬유 조성물을 사용하면, 더 높아진 생성물 회수율(90 %초과의 수율 또는 95 % 초과 수율), 더 커진 농축 인자, 작동에 필요한 적은 장비 및 에너지, 더 작은 제조 공간과 펌핑 용량을, 더 적은 공기-액체 계면뿐만 아니라 낮은 잠재적 오염의 위험 및 보다 우수한 생성물 품질을 가져온다.
- [0047] 스크린은 종종 나선형으로 권취되고 편평한 플레이트 또는 카세트 모듈 내의 공급물 및/또는 여액 채널에 삽입되어 채널의 난류를 증가시키고 농도 분극을 감소시킨다. 그러나 중공 섬유 모듈을 사용할 수 없다. 중공 섬유 모듈에서, 공급 스트림은 튜브의 루멘(내측)으로 펌핑되고 여액은 막을 통해 셀 측으로 통과하여 제거된다. 매우 개방된 공급 유로 때문에, 적당한 교차흐름 속도에서도 낮은 전단력이 발생한다. 이것은 고도의 전단에 민감한 생성물에 유용할 수 있지만, 일반적으로 경쟁력 있는 플럭스를 달성하기 위해서는 매우 높은 펌핑 용량을 요하기 때문에 모듈의 효율을 감소시킨다.
- [0048] "플럭스" 및 "유속"이라는 용어는 유체의 부피가 본 명세서에 기재된 전기방사된 나노섬유 조성물을 통과하는 속도를 지칭하기 위해 본 명세서에서 상호 교환적으로 사용된다.
- [0049] 본 명세서에서 상호 교환적으로 사용되는 용어 "여액" 또는 "투과물"은 필터 또는 막을 통과한 용액, 예를 들면, 본 명세서에서 사용된 전기방사된 나노섬유 조성물뿐만 아니라 이미 필터 또는 막을 통과한 용액을 의미한다.
- [0050] 본 명세서에서 사용된 용어 "보유물"은 필터 또는 막, 예를 들면, 본원에서 사용된 전기방사된 나노섬유 조성물을 통과하지 못하고 남아있는 성분 또는 용액 부분뿐만 아니라 필터 또는 막을 아직 통과하지 못한 성분이나 용액 부분을 의미한다. 교반된 셀(Stirred Cell)이 사용되는 경우, 교반된 셀의 필터 또는 막의 상류 측에 잔류하는 용질을 함유한 액체를 보유물이라고 정의한다. TFF 카세트 또는 나선형 장치의 경우, 카세트나 나선형 장치의 공급물/보유물 채널을 통해 흐르고 장치로부터 공급 탱크로 역순환되는 액체를 보유물이라고 정의한다.
- [0051] 본 명세서에서 사용된 용어 "교반된 셀"이란 용어는 기체 압력이 교반된 셀에 직접적으로 가해지는 막의 보유물 측에 교차 흐름을 발생시키도록 교반하면서 접선방향 유동 여과를 모의 또는 생성하는 장치를 의미한다. 막의 분자량(MW) 컷오프 이상의 용질은 셀에 유지되는 반면, 컷오프 아래의 물 및 용질은 여액 내부로 및 셀로부터 통과한다.
- [0052] 본 명세서에서 사용된 용어 "유효 공극 크기"란 용어는 시각적 방법보다는 기능적 방법으로 평가된 다공성 물질의 구조적 특성을 의미한다. 다공성 물질을 용액-캐스팅 막 및 나노섬유 매트/막과 같이 크게 다른 구조와 비교하기 위해서, 현미경 검사와 같은 시각적 방법은 일반적으로 이러한 물질이 동일한 용도로 유사하게 수행될 것으로 예상되는지 여부를 예측하는 데 부적합하다. 그러나, 포점 측정, 액체-액체 공극 측정, 침입 투과성 측정, 거대 분자 및/또는 주어진 크기의 입자의 체질과 같은 기능적 방법은 당업자로 하여금 상이한 물질의 특성을 비교할 수 있게 한다. 따라서, 기능 시험에서 실시하는 방법에 따라 "더 작거나", "더 크거나", "유사한" 유효 공극 크기를 갖는 상이한 물질들 간에 비교가 가능하다.
- [0053] 본 명세서에서 사용된 "텍스트란"이란 용어는 다양한 길이의 사슬(3 내지 10,000 킬로달톤)로 이루어진 복합, 분지형 글루칸(많은 글루코스 분자로 이루어진 폴리사카라이드)을 의미한다.
- [0054] "폴리사카라이드" 또는 "폴리사카라이드류"라는 용어는 글리코시드 결합 및 가수 분해에 의해 함께 결합된 모노사카라이드 단위의 긴 사슬로 이루어진 중합체성 탄수화물 분자로서 성분 모노사카라이드 또는 올리고사카라이드를 제공한다. 폴리사카라이드(다당류)는 선형으로부터 고도로 분지화된 것까지의 구조를 갖는다. 그 예로는 전분 및 글리코겐과 같은 저장 폴리사카라이드 및 셀룰로오스 및 키틴과 같은 구조적 다당폴리사카라이드가 있다.
- [0055] 폴리사카라이드는 종종 반복 단위가 약간 변형되고 매우 이종적(heterogeneous)이다. 구조에 따라, 이들 거대 분자는 모노사카라이드 빌딩 블록과 차별화된 특성을 가질 수 있다. 이들은 비정질이거나 심지어는 물에 불용성일 수도 있다. 폴리사카라이드의 모든 모노사카라이드가 동일한 유형인 경우, 폴리사카라이드는 호모폴리사카라이드 또는 호모글리칸으로 불리우지만, 한 종류 이상의 모노사카라이드가 존재할 경우 이들은 헤테로폴리사카라이드 또는 헤테로글리칸이라 불리운다.
- [0056] 본 명세서에서 사용된 "컨쥬게이트된 폴리사카라이드 백신"이란 용어는 담체(carrier) 단백질(바람직하게는 동일한 미생물로부터)에 항원(예, 폴리사카라이드 또는 폴리사카라이드 기본 유기체)을 공유 결합시킴으로써 생성

되고, 그에 따라 부착된 항원에 담체의 면역학적 특성을 부여하는 백신을 의미한다. 비콘주게이트된 폴리사카라이드 항원은 펩타이드만을 결합할 수 있는 MHC 복합체 상에 담지될 수 없으며, 따라서 제시되는 B 세포의 활성화 위해 T 세포에 제공되지 않을 것이다. 콘주게이트된 폴리사카라이드 백신의 경우, 폴리사카라이드 표적 항원에 연결된 담체 펩타이드는 MHC 분자 상에 제공될 수 있다. 담체 펩타이드를 인식하는 T 세포는 B 세포를 활성화시켜 원래 결합되어 있던 폴리사카라이드 항원에 대한 항체를 생성시킨다. 효과적인 면역원을 생성하기 위한 이 기술은 침입성 박테리아 질병의 예방을 위해 박테리아 폴리사카라이드에 가장 많이 사용된다. 당 업계에 공지된 콘주게이트된 폴리사카라이드 백신의 예로는 해모필러스 인플루엔자 B (*Haemophilus influenzae B*) (Hib; 박테리아 수막염 및 폐렴) [Merck, Sanofi, GSK], 네이세라 메닝자이티드(*Neissera meningitides*) (수막염), [Wyeth Pharmaceuticals, Inc., Pfizer Inc.의 자회사], 스트렙토코쿠스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumonia*)(세균성 폐렴)에는 13-가 폐렴 구균 백신 (PCV13 [Pevnar 13, Wyeth Pharmaceuticals, Inc., Pzizer Inc.의 자회사])이 있다. 에스. 아우레우스(*S. aureus*)와 피. 아에루기노사(*P. aeruginosa*)에 대한 바이오콘주게이트 백신은 또한 개발 중에 있다.

[0057] "바이러스-유사 입자"란 용어는 바이러스와 유사하지만 바이러스성 유전물질을 함유하지 않기 때문에 비-감염성인 생물학적 물질을 의미한다. 엔벨롭(Envelope) 또는 캡시드(Capsid)와 같은 바이러스성 구조 단백질의 발현은 바이러스-유사 입자(VLPs)의 자가 구축(self-assembly)을 초래할 수 있다. B형 간염 바이러스에서 유래되고 작은 HBV 유래 표면 항원(HBsAg)으로 이루어진 VLPs는 40년 전에 환자 혈청으로부터 기술되었다. 보다 최근에, VLPs는 파보비리다에(Parvoviridae) (예: 아데노-관련 바이러스), 레트로비리다에(Retroviridae) (예: HIV) 및 플라비리다에(Flaviviridae) (예: C형 간염 바이러스)를 비롯한 다양한 바이러스 계열의 성분으로부터 생성되었다. VLPs는 포유류 세포주, 곤충 세포주, 효모 및 식물 세포를 비롯한 다양한 세포 배양 시스템에서 생성될 수 있다.

[0058] 본 명세서에서 사용된 "목적하는 생물학적 물질"이라는 문구는 단백질, 바이러스-유사 입자 및 백신, 특히 콘주게이트된 폴리사카라이드 백신을 지칭하는데, 이들은 본 명세서에서 기재된 실시형태를 사용하여 정제될 수 있다. 이러한 관심의 대상이 되는 생물학적 물질은 전형적으로 약 500,000 달톤 또는 50,000 달톤 이상의 분자량을 갖는다.

[0059] **II. 예시적인 나노섬유 고분자 재료**

[0060] 본 명세서에서 기술된 방법에 사용되는 나노섬유 조성물을 제조하기 위해 사용될 수 있는 중합체는 열가소성 및 열경화성 중합체이다.

[0061] 적당한 중합체의 비제한적인 예는 다음과 같다: 나일론, 폴리이미드, 지방족 폴리아미드, 방향족 폴리아미드, 폴리설폰, 셀룰로오스, 셀룰로스 아세테이트, 폴리에테르설폰, 폴리우레탄, 폴리(우레아 우레탄), 폴리벤즈이미다졸, 폴리에테리미드, 폴리아크릴로니트릴, 폴리(에틸렌테레프탈레이트), 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리아닐린, 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(에틸렌 나프탈레이트), 폴리(부틸렌 테레프탈레이트), 스티렌 부타디엔 고무, 폴리스티렌, 폴리(비닐클로라이드), 폴리비닐알콜, 폴리(비닐아세테이트), 폴리(비닐리덴 플루오라이드), 폴리(비닐부틸렌), 이들의 공중합체, 유도체 화합물, 블렌드 및 조합물. 적합한 폴리아미드 축합 중합체는 나일론-6; 나일론-4,6; 나일론-6,6; 나일론 6,6-6,10; 이들의 공중 합체, 및 기타 선형의 일반적인 지방족 나일론 조성물 등이다.

[0062] **III. 섬유질 매트/막을 형성하기 위한 예시적인 방법**

[0063] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 다양한 실시형태에서 사용되는 나노섬유 조성물은 당업계에 이미 공지된 전기방사법을 이용하여 제조된다.

[0064] 일부 실시형태에서, 섬유질 매트/막은 나일론 용액으로부터 나노섬유(들)를 퇴적함으로써 제조된다. 나노섬유 매트/막은 건조 중량을 기준으로 (즉, 잔류 용매가 증발되거나 제거된 후) 약 0.1 g/m² 내지 약 10 g/m²의 기본 중량을 갖는다.

[0065] 다른 실시형태에서, 나일론은 포름산, 황산, 아세트산, 2,2,2-트리플루오로 에탄올, 2,2,2,3,3,3-헥사플루오로 프로판올 및 물을 포함하는 용매의 혼합물에 용해되며, 그러나 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0066] 일부 실시형태에서, 나일론 용액은 건조 나일론 중합체를 하나의 용매 군에 용해함으로써, 즉 원(stock) 용액을 먼저 제조한 다음, 용액을 전기방사 준비 상태로 만들기 위해서 다른 용매를 첨가하여 제조된다.

[0067] 일부 실시형태에서, 나일론 중합체(즉, 출발 용액)는 용액 제조 과정에서 부분적으로 가수 분해되어 부분적으로

가수분해된 나일론 중합체(즉, 말단 용액)의 평균 분자량은 출발 나일론 중합체의 평균 분자량보다 적다.

[0068] 본 발명의 추가 실시형태에서, 나일론 용액의 전도도는 주어진 용매 중에서 적합한 이온화 가능한 화합물로 조절된다. 상기 적합한 이온화 가능한 화합물의 예는 유기 및 무기 염, 산 및 염기가 있으나 이에 한정되지는 않는다. 나일론 용액의 전도도를 조절하기 위해 사용되는 바람직한 화합물의 예는 포름산 암모늄이다.

[0069] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 전기방사 챔버 내부의 환경은 주위 습도가 약 12 °C 이상의 이슬점에서 유지 되도록 제어된다.

[0070] 본 발명의 일 실시형태에서, 다양한 다공성의 단일 또는 다층 기질 또는 지지체가 이동식 또는 고정형 수집 벨트 상에 배치되어 전기방사된 나노섬유 매트 매체를 수집 및 혼합하여 복합 여과 장치를 형성한다.

[0071] **IV. TFF 여과 모드에서 막을 사용하는 방법**

[0072] 본 명세서에 기술된 다양한 실시형태에서, 전기방사된 나노섬유 조성물은 TFF 모드에서 약 500 KDa 또는 그 이상의 분자량을 갖는 목적하는 생물학적 물질(예를 들면, 단백질, 콘쥬게이트된 폴리사카라이드 백신 또는 바이러스-유사 입자)를 정제하기 위해 사용된다.

[0073] TFF 모드에서 작동하는 경우, 펌프는 일반적으로 2개의 막 표면 사이의 채널을 통해 공급물 스트림의 흐름을 발생시키는데 사용된다. 막 표면 위로 유체가 통과할 때마다, 가해진 압력으로 인해 유체의 일부를 막을 통해 여액 스트림 내부로 흐르게 한다. 그 결과 채널 중앙의 벌크 조건으로부터 막 표면의 보다 농축된 벽 조건에 이르기까지 공급 원료 농도의 구배가 형성된다. 더 많은 유체가 여액 측으로 점진적으로 통과함에 따라 유입구로부터 유출구까지 공급물 채널의 길이를 따라 농도 구배가 존재하게 된다.

[0074] 일부 실시형태에서, 전기방사된 나일론-6 나노섬유 한외여과 막(NF UF)은 PES UF 막과 유사한 몇몇 포맷 유형의 접선방향 유동 여과 모듈에 혼입될 수 있다. 접선방향 유동 여과에 사용되는 가장 일반적인 포맷은 평판 카세트(예 : Pellicon[®] 3) 또는 나선형 권취 장치이다. NF UF는 막, 보유물 및 투과물 스크린 및 보유물 및 투과물 포트를 갖는 외부 중합체 필름을 함유하는 층상 구조의 편평한 시트 접선방향 유동 여과 패킷으로 제조된 다음, 이어서 보유물 및 투과물 포트를 갖는 편평한 카세트 장치로 오버몰딩 또는 사출성형될 수 있다. 대안적으로, NF UF는 보유물 및 투과물 스크린을 갖는 나선형으로 권취될 수 있고 보유물 및 투과물 유동 경로를 제공하기 위해 모서리에 밀봉된 다음, 밀폐된 유동 경로를 갖는 원통형 홀더에 보유물 및 투과물 포트를 분리하도록 배치될 수 있다. 중합체 스크린은 나선형 권취 및 평판 모듈의 보유물 및/또는 투과물 채널내에 삽입되어 채널의 난류를 증가시키고 농도 분극을 감소시킨다. 난류 촉진 채널은 더 낮은 교차 유속에서보다 높은 물질 전달 계수를 가지며, 이는 더 높은 플럭스가 더 낮은 펌핑 요건으로 달성된다는 것을 의미한다. 따라서 난류-촉진된 보유물 채널은 열린 채널보다 더 효율적이다. 평판 모듈에 매달린 스크린을 사용하면 개방형 및 난류 촉진형 채널의 장점 중 일부를 얻을 수 있다.

[0075] NF UF 막을 사용하는 접선방향 유동 여과는 백신 생성물의 농도를 20 mg/mL로 증가시키기 위해서 더 작은 불순물을 투과하고 부피를 감소함으로써 콘쥬게이트된 폴리사카라이드 백신과 같이 목적하는 생물학적 물질을 더 높은 순도로 농축 및 정제할 수 있다. 또한 NF UF 막은 추가적인 정제 단계 또는 최종 제형을 위해 생물학적 물질 및 다이아필터를 유지하거나 작은 염 또는 pH 완충제 염의 완충액 교환을 수행할 수 있다. 하기 실시예에 기재된 실험은 본 명세서에서 사용된 텍스트란 모델과 동일한 방식으로 목적하는 콘쥬게이트된 폴리사카라이드 백신 또는 생물학적 분자를 정제, 농축 또는 완충교환하는데 사용될 수 있다.

[0076] 실시형태는 하기 실시예에 의해 더욱 설명되며, 이들 실시예는 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 도면뿐만 아니라 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고 문헌, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 본 명세서에서 참고로 한다.

[0077] (실시예)

[0078] 실시예 1: 나노섬유 매트/막의 제조

[0079] 전기방사된 나일론-6 나노섬유 복합 파보바이러스 보유물 매트는, 본 명세서에서 참고로 인용하는 PCT 특허출원 공개 제 WO 2014093345 호에 기술된 바와 같이 제조되고 NF UF(즉, 나노섬유 UF 막)로 지칭된다. 'Ultramid B24' (BASF Corp., Florham Park, NJ, USA)란 상표로 시판되는 나일론-6은 부드러운 Hirose 부직포 기질(Hirose Paper Manufacturing Co., Ltd., 일본 고치 토사시, 부품 번호 # HOP-60HCF) 위에 용액으로부터 이중층 복합베이스 및 활성 보유층 나노섬유 매트를 전기방사하기 위해 사용된다. 기층은 아세트산과 포름산 혼합물

(2 : 1) 중 10.3 % w/w 나일론-6으로부터 전기방사되며, 평균 섬유 직경은 70 nm 이고, 두께는 약 25 내지 30 마이크로미터이다. 평균 섬유 직경이 10 nm인 활성 보유층을 아세트산 : 포름산 : 물 : 2,2,2-트리 플루오로에탄올 (TFE) : 포름산암모늄의 혼합물(혼합비, 20.5 : 20.5 : 10.3 : 40 : 0.7) 중 8.0 % w/w 나일론-6의 용액으로부터 전기방사하고, 두께는 수 마이크로미터가 될 것으로 추정된다. 전기방사된 나노섬유 UF 막은 60 Hz, 거리 140 mm, 10° 내지 16° 이슬점에서 제어된 습도, 전압 60 Kv 및 선속도 2 cm/분에서 3개의 회전 전극을 사용하여 Elmarco (Liberec, 체코공화국)로부터 파일럿 규모의 전기방사 장치로 생성된다.

[0080] 실시예 2: 폴리에테르설폰 한외여과 막의 제조

[0081] 폴리에테르설폰 한외여과막(PES UF)은 맞춤형(custom) 막 캐스팅 장비(EMD Millipore, Jaffrey, NH 미국)를 사용하여 폴리에테르설폰 부직포 기질에 용액 침지 캐스팅을 사용하여 맞춤 제조된다.

[0082] 일반적으로, 용액 침지 공정은 2개 이상의 성분의 균일한 중합체 용액을 강성의 막 구조를 형성하는 고휘 중합체-풍부(rich) 상 및 막 공극을 형성하는 액체 중합체-부족(poor) 상을 갖는 2-상 시스템으로 전환시키는 것을 포함한다 (Membranes and Membrane Processes, 1986 Springer US, Drioli, Enrico, Nakagaki, Masayuki, Preparation of Microporous Membranes by Phase Inversion Processes, Strathmann, H., p115-135 참조).

[0083] 실시예 3 : 막 특성화에 대한 조사

[0084] 2개의 막, NF UF 및 PES UF의 특성은 하기 기술된 다양한 기술을 사용하여 조사된다.

[0085] 1. SEM 이미지와 섬유 직경

[0086] 전기방사된 나일론-6 나노섬유 한외여과막(NF UF)과 폴리에테르설폰 한외여과막(PES UF)의 대표적인 주사 전자 현미경 사진(SEM 이미지)은 도 1 및 도 2에 각각 나타나 있다. 도 1에서, 샘플을 디스크로부터 잘라내어 양면 전도성 카본 테이프가 있는 알루미늄 SEM 스테르브에 장착한다. 그 다음, Cressington 208HR 고해상도 스퍼터 코터를 사용하여 5 nm의 이리듬으로 코팅한다. 샘플은 5kV에서 FEI Quanta 200F 전계 방출 주사전자 현미경 (FESEM)으로 이미지화된다. 이미지는 나일론-6 나노섬유가 500 nm 스케일 바에 대해 약 10 nm 정도의 직경을 갖는 중합체 섬유의 랜덤 중첩 부직포 매트임을 나타낸다. 전기방사된 나일론 NF UF의 다공성은 중첩된 섬유들 사이의 공간에 기인한다.

[0087] 도 2는 용액 상전환 공정을 이용하여 제조된 폴리에테르설폰 한외여과막(PES UF)의 다공성을 나타낸다. 샘플을 막 디스크로부터 잘라낸 다음, 양면 전도성 카본 테이프가 있는 알루미늄 SEM 스테르브에 장착한다. 그 다음, Cressington 208HR 고해상도 스퍼터 코터를 사용하여 5 nm의 이리듬으로 코팅한다. 샘플 이미지는 5kV에서 FEI Quanta 200F 전계 방출 주사전자 현미경 (FESEM)으로 촬영된다.

[0088] 도 2의 PES UF를 도 1의 전기방사된 나일론-6 NF UF과 비교하면, 이들이 3 차원 구조 또는 형태학 면에서 얼마나 다른지를 나타낸다.

[0089] 도 3에 도시한 바와 같이, 섬유 반경은 Image Pro Plus v6.0 내에서 맞춤형 개발된 Euclidean Distance Map(EDM) 루틴을 이용하여 측정된다. 각 나노섬유 층 샘플의 평균 섬유 직경을 계산하고 최종 직경을 SEM 용 샘플 제조 중에 적용된 금속 코팅 5 nm를 뺀 값으로 결정한다. 전기방사된 나일론-6 나노섬유 한외여과막(NF UF)의 평균 섬유 직경은 평균 반지름의 2배이며, SEM용 샘플 준비물의 금속 코팅 5 nm를 뺀다.

[0090] 2. 평균 유동 포점 및 수분 투과율

[0091] 이 실험에서는, NF UF 및 PES UF 막에 대해 측정된 평균 포점 및 수분 투과율의 측정을 기술한다. 본 명세서에 예시되고, 도 4에 도시한 바와 같이, NF UF 막 샘플은 벤치마킹을 위해 사전 스크린된 PES UF 막의 4가지 상이한 샘플과 유사하거나 그보다 더 높은 평균 유동 포점에서 더 높은 수분 투과율을 나타낸다.

[0092] 평균 유동 포점은 ASTM E1294-89, "자동화된 액체 다공도 측정기를 사용하는 막 필터의 공극 크기 특성에 대한 표준 시험법"에 따라 측정된다. 맞춤형 모세관 유동 다공도 측정기를 사용하는 ASTM F316에 따른 자동 포점 방법은 원칙적으로 Porous Materials, Inc. (Ithaca, N.Y, USA)의 시중 상품의 장치와 유사하다.

[0093] 폴리에테르설폰 부직포 기질로부터 직경 25mm로 절단된 나노섬유 UF (NF UF) 막 샘플을 3M 사(미국, 미네소타, 세인트폴)로부터 입수 가능한 퍼플루오로헥산 "Fluorinert™ FC-72" (10 dynes/cm)으로 습윤시킨다. 각 샘플을 홀더에 넣고 공기의 차압을 가하고 샘플에서 유체를 제거한다. 습윤 유동이 건조 유동(습윤 용매가 없는 유동)의 절반과 동일한 차압은 제공된 소프트웨어를 사용하여 평균 유동 공극 크기를 계산하는 데 사용된다.

- [0094] 폴리에테르설폰 UF (PES UF) 막의 평균 유동 포점은 2-프로판올을 사용하여 측정된다. NF UF 막 평균 유동 포점은, 도 4에 나타낸 바와 같이, PES UF 샘플과의 비교를 위해 2-프로판올의 표면 장력(21.4 dynes/cm)으로 조절된다. 도 4는 텍스트란 체질 R90 컷오프를 갖는 1,000 kDa의 전기방사된 나일론-6 NF UF 막의 4개 샘플이 1,200 kDa의 텍스트란 체질 R90 컷오프를 갖는 PES UF 막보다 더 큰 수분 투과율 및 더 높은 평균 유동 포점을 갖고 있다는 것을 나타낸다.
- [0095] 수분 투과율(LMH/psi)는 13.4 cm²의 필터 면적 및 3 psi에서 0.5 mL 보유 부피를 갖는 50 mL의 교반된 셀(Model 8050, EMD Millipore, Billerica, MA)에서 44.5 mm 직경의 막 디스크를 사용하여 측정된다. 폴리올레핀 부직포 기질로 절단된 NF UF 막을 제2 폴리올레핀 부직포 기질 위에 건식 위치시키고 교반된 셀 내부에 고정한다. PES UF 막을 에탄올로 적신 다음, 물로 교환하고 제2 폴리올레핀 부직포 디스크 상의 교반된 셀 내부에 고정한다. 샘플을 물에 적서 5 psi의 물 50 mL로 2회 세척하여 모든 공기를 제거한다.
- [0096] 3. 텍스트란 R90 컷오프
- [0097] 이 실험에서는, 도 5에 나타낸 바와 같이, NF UF 및 PES UF 막에 대한 텍스트란 R90 컷오프를 측정하기 위해서 텍스트란 거부(rejection) 측정이 이용된다. NF UF 샘플은 1,000 및 1,500 kDa의 텍스트란 R90 컷오프를 포함하였다. 4개의 상이한 PES UF 막 샘플은 800, 1,200, 1,700 및 4,800 kDa의 텍스트란 R90 컷오프를 갖는다. 4개의 PES UF 막은, 거대분자의 한외여과를 위해 업계에서 일반적인 것이며, 도 5에 나타낸 바와 같이, NF UF 막 샘플의 것과 유사한 텍스트란 보유 곡선을 보여준다. 도 5는, 1,000 kDa의 텍스트란 체질 R90 컷오프를 갖는 전기방사된 나일론-6의 NF UF 막 4개의 샘플은 x-축 및 y-축 모두에서 유사한 텍스트란 체질 곡선을 갖고 있음을 나타내고, 또한 1,200 kDa의 텍스트란 체질 R90 컷오프를 갖는 PES UF 막의 2 샘플에 대한 상대적인 기울기로 나타낸다.
- [0098] NF UF 막은, 도 6에 입증된 바와 같이, 텍스트란 R90 및 평균 유동 포점에서 PES UF 막과 유사하고, 그리고 도 7에 도시한 바와 같이 유사한 텍스트란 R90에서 보다 높은 수분 투과율을 나타낸다.
- [0099] 도 6은, 1,000 kDa의 텍스트란 체질 R90 컷오프를 갖는 전기방사된 나일론-6 NF UF 막 샘플 4개가 1,200 kDa의 텍스트란 체질 R90 컷오프를 갖는 PES UF 막 샘플보다 낮은 텍스트란 체질 R90 컷오프 및 더 높은 평균 유동 포점을 갖는다는 것을 나타낸다. 전기방사된 나일론-6 나노섬유 한외여과막(NF UF)은 포점이 더 높고 텍스트란 체질 R90 컷오프가 더 낮고 작은 평균 공극 크기를 갖는다.
- [0100] 도 7은 1,000 kDa의 텍스트란 체질 R90 컷오프를 갖는 전기방사된 나일론-6 NF UF 막 샘플의 4개가 1,200 kDa의 더 높은 텍스트란 체질 R90 컷오프를 갖는 PES UF 막 샘플보다 더 큰 수분 투과율 및 더 낮은 텍스트란 체질 R90 컷오프를 갖고 있다는 것을 나타낸다.
- [0101] NF UF 및 PES UF 막의 텍스트란 분자량 체질 측정은 맞춤형 텍스트란 보유 시험을 이용하여 이루어진다. 모든 막 샘플을 교반된 셀에서 제조하고 실시예 3-2에 설명된 바와 같이 미리 플러싱한다. 공급물 및 투과물 샘플의 분석 크기-배제 크로마토그래피를 이용하여 텍스트란 R90 컷오프가 각 막에 대해 결정되는 분자량(MW) 거부 및 체질 곡선을 생성한다.
- [0102] pH 7.0 및 50 mM 인산염 완충액 중 0.75 % w/w 텍스트란의 혼합된 텍스트란 공급물을 사용하여 NF UF 또는 PES UF 막을 시험한다. 텍스트란은 Pharmacosmos A/S 사(Roervangsvej 30, DK-4300, Holbaek, 덴마크)로부터 구입한다. 사용된 텍스트란의 평균 분자량(Mw)은 다음과 같다: 1,000 Da (텍스트란 T1, 5510 0001 4000); 3,500 Da (텍스트란 T3.5, 5510 0003 4007); 10,000 Da (텍스트란 T10, 5510 0010 4007); 40,000 Da (텍스트란 T40, 5510 0040 4007); 70,000 Da (텍스트란 T70, 5510 0070 4007); 500,000 Da (텍스트란 T500, 5510 0500 4006); 및 2,000,000 Da (텍스트란 T2000, 5510 2000 4007).
- [0103] 40 mL의 혼합된 텍스트란 공급물을 교반된 셀에 붓는다. 표준 마그네틱 교반 바를 셀에 넣고 마그네틱 교반 플레이트에서 320 RPM으로 교반하도록 고정한다. 연동 펌프에 부착된 PVC 튜빙 1/16" ID (Fisher 과학 카탈로그 번호 14-190-118)는 0.22 mL/min의 일정한 유속으로 액체를 흡입하기 위해 투과물 측에 연결된다. 10 LMH의 일정한 플럭스 하에서 처음 2~3 ml를 버린 다음, 평형을 유지하기 위해 약 1 시간 동안 재순환시키고, 겔투과 크로마토그래피(GPC)를 이용하여 추가 분석을 위해 투과물 샘플을 수집한다.
- [0104] 텍스트란의 분석용 크기-배제 크로마토그래피는 Phenomenex Shodex OH pak 13 μm SB-806 M HQ 겔 여과 칼럼(부품 번호 : SB-806 MHQ, 칼럼 크기 : 300 x 8 mm, Phenomenex Inc., Torrance, CA)을 사용하여 Waters 2695 분리 모듈 및 Waters 2414 굴절률 검출기로 실시한다. 등용매(isocratic) 이동 상은 pH 7.0의 50 mM 인산 칼륨과

10 mg/L의 나트륨 아지드로 구성된다. 칼럼은 35 °C의 온도에서 20 분 동안 1.0 mL/min의 유속으로 작동된다.

[0105] 체류 시간으로부터 분자량을 보정(calibrate)하기 위해 사용되는 분자량 텍스트란 표준은 다음과 같다: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Glucose, MW = 180 Da (# 158968), Maltoheptaose, MW = 1,153 Da (# 284017) 및 미국 중합체 표준 (Mentor, OH) Dextran: Mp = 2,800 Da (DXT3K), Mp = 6,300 Da (DXT7K), Mp = 20,500 Da (DXT25K), Mp = 43,000 Da (DXT47K), Mp = 85,000 Da (DXT97K), Mp = 245,000 Da (DXT325K), Mp = 350,000 Da (DXT550K), Mp = 1,465,000 Da (DXT2100K), Mp = 6,300,000 Da (DXT5900K), 및 Mp = 9,110,000 Da (DXT 8035K). 여기서 Mp는 평균 피크 분자량이다.

[0106] 실시예 4 : 맞춤형 공급물을 사용한 TFF (UF/DF) 막 적용 비교

[0107] R90 = 1,000 kDa을 갖는 나노섬유 UF 및 R90 = 1,200 kDa를 갖는 PES UF 막은 하기 표 1에 요약된 맞춤형 텍스트란 공급물을 사용하는 TFF(UF/DF) 모드에서 막 비교를 위해 선택된다. 상기 막은 NF UF 및 PES UF로 지칭되고, 도 4 내지 도 7에 예시된 물리적 특성을 갖는다.

[0108] 전기방사된 NF UF 막은 접선방향 유동 여과(TEF) 모드에서 용액 침지 캐스팅 PES UF 막과 동등하거나 개선된 성능을 갖는다. 텍스트란 농도와 저 분자량 클리어런스(clearance)에 대한 한외여과 및 다이아여과 모드는, 표 1에 요약한 바와 같이, 수율, 선택도 및 여과 플럭스와 관련하여 한외여과 막처럼 거동하는 것으로 나타났다.

[0109] [표 1]

실시예 #	모дел 공급물	물		공급물 A(0.0385 % w/w)		공급물 B(0.844 % w/w)		공급물 C(8.44 % w/w)	
		NF UF	PES UF	NF UF	PES UF	NF UF	PES UF	NF UF	PES UF
5,6,7	이동 vs 선택도	TMP = 3 psi		TMP = 0.25-7 psi		TMP = 3-20 psi		TMP = 3-20 psi	
3-2	수분 투과율	NF UF > PES UF		N/A		N/A		N/A	
5	플럭스 vs TMP	N/A		NF UF > PES UF		NF UF > PES UF		NF UF > PES UF	
6	물질이동 vs TMP			NF UF > PES UF		NF UF > PES UF		NF UF > PES UF	
7	선택도 vs 플럭스			NF UF = PES UF		NF UF = PES UF		NF UF = PES UF	
8	다이아여과	N/A		1) 30 LMH @ 640 RPM 2) 60 LMH @ 320 RPM		N/A		N/A	
8	수율	N/A		NF UF = PES UF		N/A		N/A	
8	선택도	N/A		NF UF = PES UF		N/A		N/A	
9	한외여과	N/A		1) 0.5 psi @ 600 RPM Concentrate 2, 4, and 8x		1) 5 psi @ 600 RPM 2) 7 psi @ 900 RPM Concentrate 2, 4, 8x		1) 5 psi @ 300 RPM 2) 7 psi @ 300 RPM Concentrate 2 and 3x	
9	수율	N/A		NF UF = PES UF		NF UF = PES UF		NF UF = PES UF	
9	선택도	N/A		NF UF = PES UF		NF UF = PES UF		NF UF = PES UF	
9	플럭스	N/A		NF UF > PES UF		NF UF > PES UF		NF UF > PES UF	

[0110]

[0111] 막은 이동 및 선택도, 다이아여과 및 한외여과를 위해 TFF 모드에서 2개씩 나란히 조사된다. 표 1과 나머지 실시예는 실험 비교를 요약한다. 이동 및 선택도는 플럭스 대 TMP, 물질이동 대 TMP, 선택도 대 플럭스를 플럭스 대 TMP 실험을 통해 보유물 및 투과물을 샘플링하여 측정한다.

[0112] 콘쥬게이트된 폴리사카라이드 백신 산업에서 사용된 농축 및 분리 단계를 모의실험하도록 NF UF 및 PES UF TFF(UF/DF) 막 평가를 위해 3가지 맞춤형 텍스트란 공급물을 제조한다.

[0113] 사용된 텍스트란은 Pharmacosmos A/S사 (Roervangsvej 30, DK-4300, Holbaek, Denmark)로부터 입수할 수 있는 2,000,000 Da 텍스트란 (T2000, 5510 2000 9007) 및 110,000 Da 텍스트란 (T110, 5510 0110 9006)이며, 이들의 중량 평균 분자량 (Mw)은 1,950,000 및 112,000 Da이다. 크기가 3 단계인 3가지 공급물 A, B 및 C는 표 2에 나타낸 바와 같이 다음과 같다: pH 7.0의 50 mM 포스페이트 완충액에서 0.0385; 0.844; 및 8.44 % w/w의 총 텍스트란 질량 퍼센트. 표 2는 각 Pharmacosmos 스탁 번호의 질량 %, 질량비 및 20 °C 점도를 상세히 나타낸다.

[0114] [표 2] TFF(UF/DF) 막 적용 비교의 요약

공급물	총 텍스트란(% w/w)	$\mu, 20^{\circ}\text{C}$ (cP)	질량비 (T2000:T110)	T2000 (% w/w)	T110 (% w/w)
A	0.0385	3.1	10:1	0.0350	0.0035
B	0.844	4.5	18:1	0.800	0.044
C	8.44	27.4	18:1	8.00	0.44

[0115]

[0116] 3개의 공급물은, 도 8에 나타낸 바와 같이, 0.0385 % w/w 텍스트란을 사용하는 공급물 A의 겔투과

크로마토그램, 도 9에 나타난 바와 같이, 0.844 % 및 8.44 % w/w 텍스트란을 사용하는 공급물 B 및 C의 겔투과 크로마토그램에서 알 수 있듯이 10,000 내지 10,000,000 Da의 3 자릿수에 걸쳐 매우 다분산된 분자량 분포를 갖고, 여기서 공급물 C는 10배의 공급물 B이거나, 도 9에 나타난 바와 같이, 완충액과 1:10의 비율로 희석될 때의 크로마토그램을 초래한다.

[0117] 3개의 분자량 7,250,000 Da (D7250), 2,000,000 Da (D2000) 및 110,000 Da (D110)은 다음의 한외여과 및 다이아여과 비교예를 위해 선택된다.

[0118] 도 8의 크로마토그램은 공급물 A가 10,000으로부터 10,000,000 달톤까지 3 자릿수를 커버하는 매우 다분산된 분자량 분포를 갖는다는 것을 나타낸다. 표 3의 3 분자량 7,250,000 Da (D7250), 2,000,000 Da (D2000) 및 110,000 Da (D110)의 백분율(%)은 전체 면적에 대한 각 분자량(MW)의 피크 면적으로부터 나온 것이다.

[0119] 도 9의 크로마토그램은 공급물 B가 10,000으로부터 10,000,000 달톤까지의 3 자릿수를 커버하는 매우 다분산된 분자량 분포를 갖는다는 것을 나타낸다. 표 3의 3 분자량 7,250,000 Da (D7250), 2,000,000 Da (D2000) 및 110,000 Da (D110)의 백분율(%)은 전체 면적에 대한 각 분자량(MW)의 피크 면적으로부터 나온 것이다. 표 2 및 표 3의 공급물 C는 10배의 공급물 B이거나 완충액과 1 : 10의 비율로 희석될 때 도 9와 동일하다.

[0120] 표 3은 3개의 공급물 각각에서 7,250,000 Da (D7250), 2,000,000 Da (D2000) 및 110,000 Da (D110)의 분자량(MW)을 갖는 텍스트란의 실제 피크 높이 백분율을 요약한다. 공급물에서 7,250,000 Da (D7250), 2,000,000 Da (D2000) 및 110,000 Da (D110)의 피크 높이 백분율 및 0.0385, 0.844 및 8.44 %의 총 텍스트란 질량 퍼센트에 기초하여, 표 3에 요약된 바와 같이 D7250, D2000 및 D110의 실제 백분율이 계산된다.

[0121] [표 3] 맞춤형 텍스트란 공급물

공급물	총 텍스트란(% w/w)	실제(% w/w)					
		D7250 (%)	D2000 (%)	D110 (%)	D7250	D2000	D110
A	0.0385	0.475	0.941	0.854	1.829×10^4	3.623×10^4	3.288×10^4
B	0.844	0.402	0.768	1.046	3.393×10^3	6.482×10^3	8.828×10^3
C	8.44				3.393×10^2	6.482×10^2	8.828×10^2

[0122] 후속 실험에서, 농도, 수율 및 선택도는 모두, 도 8 및 9에 의해 입증된 바와 같이, 공급물 크로마토그램 대 각 분자량(MW)에서의 실제 피크 높이를 기준으로, 그리고 D7250, D2000 및 D110의 검사하에 선택된 3개의 분자량에 대한 표 3의 백분율을 기준으로 계산된다.

[0124] 샘플은 GPC 굴절률 검출기의 스케일 상에 유지되도록 필요에 따라 희석되고 희석될 필요가 있을 때 조절된다. 실시예 9에서 상세히 설명한 바와 같이, 한외여과 농축 실험에서 각 분자량(MW)의 농도를 계산하기 위해서 D7250, D2000 및 D110에 대한 농도 방정식을 도출하도록 일련의 공급물 A 및 B의 희석을 이용한다.

[0125] 실시예 5 : 공급물 플럭스 대 TMP의 측정

[0126] 표 2 및 표 3에 예시된 맞춤형 텍스트란 공급물 A, B 및 C를 사용하여 평균 플럭스 대 트랜스-막 압력(TMP) 곡선을 생성한다. 공급물 A, B 및 C 각각에 대한 도 10, 11 및 12는 NF UF 막이 유사한 텍스트란 R90 컷오프를 갖는 PES UF 막보다 더 높은 평균 텍스트란 공급 플럭스 대 TMP를 갖는다는 것을 입증한다. 공급물 A, B, C에 대한 평균 플럭스는 도 10, 11, 12에서 각각 나타난 바와 같이, 3 자릿수의 LMH를 커버하며, 도 12에 도시된 바와 같이, NF UF 및 PES UF 막 모두의 경우에 고농도 공급물 C에 대한 물질 이동 분극이 존재한다.

[0127] NF UF 막은 도 10, 11 및 12에 예시된 바와 같이 더 높은 평균 텍스트란 공급물 플럭스 대 TMP 뿐만 아니라 도 7에 도시된 바와 같이, 더 높은 물 플럭스를 갖는다.

[0128] 실험은 실시예 3에 기재된 바와 같이 교반된 셀에서 실시된다. 공급물을 320 RPM에서 교반하고 실내 공기를 사용하여 가압한다. GPC 분석을 위해 공급물 및 투과물 샘플을 각 압력에서 수집한다.

[0129] 도 10은, 1,000 kDa의 텍스트란 체질 R90 컷오프를 갖는 전기방사된 나일론-6 NF UF 막이 1,200 kDa의 더 높은 텍스트란 체질 R90 컷오프를 갖는 PES UF 막과 비교하여 동일한 TMP에서 공급물 A의 플럭스가 더 크다는 것을 나타낸다.

[0130] 도 11은, 1,000 kDa의 텍스트란 체질 R90 컷오프를 갖는 전기방사된 나일론-6 NF UF 막이 1,200 kDa의 더 높은

텍스트란 체질 R90 컷오프를 갖는 PES UF 막보다 TMP 대 공급물 B의 플럭스가 더 크다는 것을 나타낸다.

[0131] 도 12는, 1,000 kDa의 텍스트란 체질 R90 컷오프를 갖는 전기방사된 나일론-6 NF UF 막이 1,200 kDa의 더 높은 텍스트란 체질 R90 컷오프를 갖는 PES UF 막보다 TMP 대 공급물 C의 플럭스가 더 크다는 것을 나타낸다.

[0132] 실시예 6 : 물질 이동 대 TMP의 측정

[0133] 텍스트란 질량/농도 이동은 GPC 분석을 위해 각 압력에서 실시예 5로부터의 공급물 및 투과물 샘플을 수집함으로써 측정된다. 도 13 및 도 14는 NF UF 및 PES UF 막의 2 샘플 중 하나에 대한 공급물 A의 겔투과 크로마토그램을 나타낸다. D7250, D2000 및 D110의 이동은 비율 C_p/C_f 에 의해 결정되며, 여기서 C_p 및 C_f 는 각 압력에서 공급물 및 투과물의 농도이다.

[0134] 도 13 및 도 14는 공급물 A의 농도가 플럭스 대 TMP 실험을 통해 약간 증가하는 방법을 나타낸다.

[0135] 도 13에서, 크로마토그램 오버레이(overlay)는 투과물 내의 공급물 A의 농도가 초기에 더 높고, 이어서 플럭스 대 TMP 실험을 통해 다시 증가하기 전에 약간 감소하는데, 이는 표면 농도 분극 평형이 형성되기 전에 막이 초기에 D7250, D2000 및 D110 의 더 많은 부분을 통과함을 나타내는 것이다.

[0136] 도 14에서, 크로마토그램 오버레이는 투과물 내의 공급물 A의 농도가 초기에 더 높고, 이어서 플럭스 대 TMP 실험을 통해 다시 증가하기 전에 약간 감소하는데, 이는 표면 농도 분극 평형이 형성되기 전에 막이 초기에 D7250, D2000 및 D110 의 더 많은 부분을 통과함을 나타내는 것이다.

[0137] 도 15의 경우, D7250, D2000 및 D110의 이동은 C_p/C_f 의 비이며, 여기서 C_p 및 C_f 는 각각의 TMP(psi)에서 공급물 및 투과물의 농도이다. 도 15는 PES UF 막에 비해 전기방사된 나일론-6 NF UF에 대해 공급물 A의 텍스트란의 평균 질량/농도 이동이 TMP보다 더 크다는 것을 나타낸다.

[0138] 도 16의 경우, D7250, D2000 및 D110의 이동은 C_p/C_f 비이며, 여기서 C_p 및 C_f 는 각각의 TMP(psi)에서 공급물 및 투과물의 농도이다. 도 16은 PES UF 막보다 전기방사된 나일론-6 NF UF 막에 대해 공급물 B의 텍스트란에 대한 평균 질량/농도 이동이 TMP보다 더 크다는 것을 나타낸다.

[0139] 요약하면, 관찰된 바와 같이, NF UF 막(도 13에 도시)에 대한 텍스트란 D7250, D2000 및 D110의 물질 이동 또는 농도 통과는 PES UF 막(도 14에 도시)보다 높다. 평균 C_p/C_f 는 공급물 A에 대해 계산되고 TMP와 비교하여 그래프로 표시된다(도 15 참조). NF UF 및 PES UF 막은 모두 표면 농도 분극 평형이 형성되기 전에 D7250, D2000 및 D110 의 더 많은 부분을 초기에 통과한다(도 13, 14 및 15 참조). 공급물 B에서 텍스트란의 평균 질량/농도 이동은 PES UF 막에 비해 NF UF 막의 경우가 더 크다(도 16 참조).

[0140] 실시예 7: 선택도 대 플럭스의 측정

[0141] D7250, D2000, 및 D110에 대한 실시예 6으로부터의 물질 이동 관계 C_p/C_f 는 상기 TMP 데이터 대 플럭스로부터 플럭스 대 선택도 인자를 생성하는데 사용된다. 플럭스 대 D110/D2000 및 D110/D7250의 평균 통과 선택도를 결정하기 위해 식 $[(C_p/C_f)_{D110}/(C_p/C_f)_{D2000}$ 또는 $_{D7250}]$ 을 사용하여 선택도 인자(계수)를 결정한다.

[0142] 공급물 A 및 B를 사용하는 NF UF 및 PES UF 막에 대한 평균 선택도 인자 대 플럭스가 각각 도 17 및 18에 도시된다. 관찰된 바와 같이, PES UF 막은 TMP/Flux가 증가함에 따라 NF UF 막보다 더 높은 선택도 인자를 갖지만, NF UF 및 PES UF 막 모두에 대해 공급물 A 및 B를 사용하는 경우 평균 선택도는 1에 근접한다(각각 도 17 및 18 참조). 두 막 모두 낮은 일정한 플럭스에서 최상의 선택도를 갖는다. 50 mL의 교반된 셀에서 0.5 mL의 유지 부피는 TMP와 플럭스에 비해 실제 데이터에서 약간의 희석과 이동을 일으킨다.

[0143] 도 17은, 전기방사된 나일론-6 NF UF 및 PES UF 막이 공급물 A 대 평균 플럭스(LMH)를 사용하여 D110/D2000 및 D110/D7250의 유사한 선택도를 갖고, 이들 모두가 1보다 크고 유사한 플럭스에서 1에 근접한다는 것을 나타낸다.

[0144] 도 18은, 전기방사된 나일론-6 NF UF 및 PES UF 막이 공급물 B 대 평균 플럭스(LMH)를 사용하여 D110/D2000 및 D110/D7250의 유사한 선택도를 갖고, 이들 모두가 1보다 크고 유사한 플럭스에서 1에 근접한다는 것을 나타낸다.

[0145] 실시예 8 : 일정한 플럭스에서의 다이아여과의 측정

- [0146] 공급물 A를 사용하여 NF UF 및 PES UF 막을 비교하기 위해 2 회의 일정한 부피의 다이아여과 실험을 실시하였다. 막 샘플을 갖는 교반된 셀을 상술한 바와 같이 제조한다. 30 또는 60 LMH(0.68 또는 1.36 mL/min)에 해당하는 유속을 가진 연동 펌프를 사용하여 투과물로부터 추출하고 보유물에 완충액을 공급한다. 보유물 및 투과물 샘플은 GPC 분석을 위해 각 40 mL 다이아볼륨에서 취한다. 30 LMH 실험은 640 RPM에서, 그리고 60 LMH 실험은 320 RPM에서 교반함으로써 실시된다.
- [0147] 도 19 및 도 20은 30 LMH 및 640 RPM 실험 실시로부터의 NF UF 및 PES UF 막 샘플에 대한 복제물 중 하나에 대해 1 내지 6의 각 다이아볼륨에서의 보유물 및 투과물 샘플의 겔투과 크로마토그램을 나타낸다. NF UF 및 PES UF 막 모두는, 도 21 및 도 22에서 나타낸 바와 같이, 상위 분자량(MW) 텍스트란(D7250, D2000)을 선택적으로 유지하고 하위 분자량(MW) 텍스트란(D110)을 투과시키는 것과 유사하게 거동한다.
- [0148] 도 19의 크로마토그램 오버레이는 공급물 A의 농도가 초기에 얼마나 높은지를 보여 주며, 이어서 다이아볼륨이 증가함에 따라, 보유물 분자량(MW) 분포는 고 분자량(MW)을 향해 좌측으로 이동하는 반면, 투과물은 저 분자량(MW)을 향해 우측으로 이동한다는 것을 나타낸다.
- [0149] 도 20의 크로마토그램 오버레이는 공급물 A의 농도가 초기에 얼마나 높은지를 보여 주며, 이어서 다이아볼륨이 증가함에 따라, 보유물 분자량(MW) 분포는 고 분자량(MW)을 향해 좌측으로 이동하는 반면, 투과물은 저 분자량(MW)을 향해 우측으로 이동한다는 것을 나타낸다.
- [0150] 공급물 A의 평균 보유물 C/C_0 대 다이아볼륨은 30 LMH 및 640 RPM(도 21에 도시) 및 60 LMH 및 320 RPM(도 23에 도시)에서의 다이아여과에 대해 계산된다. 두 다이아여과 조건하에서, NF UF 및 PES UF 막은 D7250, D2000 및 D110에 대해 다이아볼륨에 비해 유사한 평균 보유물 수율을 갖는다(도 21 및 23 참조).
- [0151] 도 21은 NF UF 및 PES UF 막이 D7250, D2000 및 D110에 대한 다이아볼륨에 비해 유사한 평균 보유물 수율을 갖는다는 것을 나타낸다.
- [0152] 도 22는 NF UF 및 PES UF 막이 다이아볼륨에 비해 D7250/D110 및 D2000/D110에 대해 유사한 평균 보유물 선택도를 갖는다는 것을 나타낸다.
- [0153] 도 23은, NF UF 및 PES UF 막이 D7250, D2000 및 D110에 대한 다이아볼륨에 비해 유사한 평균 보유물 수율을 갖는다는 것을 나타낸다. 두 막 모두는 도 21에서 관찰된 것보다 더 높은 플럭스 및 더 낮은 교반에서 유사하게 낮은 보유량을 갖는다.
- [0154] 도 21 및 도 23에서 NF UF 및 PES UF 막에 대한 평균 보유물 선택도는 $D7250/D110 = (C/C_0)_{D7250}/(C/C_0)_{D110}$ 및 $D2000/D110 = (C/C_0)_{D2000}/(C/C_0)_{D110}$ 을 사용하여 계산되고, 다이아볼륨에 대해 작도된다(도 22 및 24에 도시).
- [0155] 도 24는, NF UF 및 PES UF 막이 다이아볼륨에 비해 D7250/D110 및 D2000/D110에 대해 유사한 평균 보유물 선택도를 갖는다는 것을 나타낸다. 두 막은 도 22에서 관찰된 것보다 높은 플럭스 및 더 낮은 교반에서 비슷하게 낮은 평균 보유물 선택도를 갖는다.
- [0156] 평균 D7250/D110 및 D2000/D110은 640 RPM에서 30 LMH 및 320 RPM에서 60 LMH 모두에서 NF UF 및 PES UF 막 모두에 대해 매우 유사하다. 두 막 모두는 더 높은 플럭스 및 더 낮은 교반에서 낮은 보유율 (도 23 참조) 및 선택도 (도 24 참조)를 갖는다.
- [0157] 실시예 9 : 일정한 TMP에서의 한외여과
- [0158] 5개의 한외여과 농축 실험은 NF UF 및 PES UF 막을 일정한 TMP의 상이한 조건에서 공급물 A, B 및 C를 사용하여 교반함으로써 비교하기 위해 2회 실시된다. 1 조건 하에서 공급물 A(도 25, 도 26, 도 27에 도시), 2 조건하에서 공급물 B(도 28 및 29에 도시) 및 2 조건 하에서 공급물 C(도 30, 31, 32에 도시).
- [0159] 모든 5가지 UF 농축 실험에 의해, NF UF 및 PES UF 막이 유사한 평균 수율 및 선택도를 제공하는 반면, NF UF 막은 모든 공급물 및 조건에 대해 UF 농축 인자에 대해 지속적으로 더 높은 평균 플럭스를 갖는다는 것이 밝혀졌다.
- [0160] 각각의 조건에 대한 막 샘플을 갖는 교반된 셀을 실시예 3-2에서 기술된 바와 같이 2회 제조된다. 플럭스 및 트랙 농축 인자를 결정하기 위해 시간 경과에 따른 투과물 부피를 측정한다. 상술한 바와 같이, GPC 분석을 위해 각 농축 인자에서 보유물 샘플을 취하여 D7250, D2000 및 D110의 수율 및 선택도를 결정한다.
- [0161] 0.0385 및 0.844 % w/w 총 텍스트란 질량 %(표 2에 기재됨)를 갖는 공급물 A 및 B를 초기 50 mL 부피로부터 2,

4 및 8배로 농축시킨다. 공급물 A는 일정한 TMP = 0.5 psi 및 600 RPM에서 농축된다(도 25, 도 26, 도 27 참조). 도 25는, NF UF 막이 PES UF 막에 비해 초기 평균 공급물 플럭스가 높고, 2, 4 및 8배 농축 실험 전반에 걸쳐 이를 유지한다는 것을 나타낸다. 도 26은 2, 4 및 8배 한외여과 농축실험 동안 농축 인자에 대한 C/C_{theo} 대 D7250, D2000 및 D110에 대한 유사한 평균 수율 및 선택도를 나타낸다. 도 27은, NF UF와 PES UF 막이 비슷한 평균 수율과 선택도를 갖는 2, 4, 8배(왼쪽에서 오른쪽) 한외여과 농축 동안 평균 C/C_{theo} 대 평균 플럭스를 나타내지만 NF UF 막은 2, 4 및 8배 농축 실험동안 지속적으로 높은 평균 플럭스를 나타낸다.

[0162] 공급물 B는 5 psi 및 600 RPM(도 28에 도시) 및 7 psi 및 600 RPM(도 29에 도시)에서 농축된다. 낮은 압력에서 NF UF 및 PES UF 막 모두에 대해 더 나은 수율과 선택도가 관찰되지만(도 28 및 29 참조), 7 psi에서 약간 높은 평균 플럭스가 예상된다(도 29 참조).

[0163] 8.44 % w/w 총 텍스트란 질량 퍼센트(표 2에 기재됨)를 갖는 공급물 C를 초기 부피 40 mL로부터 2 및 3배로 농축시킨다. 공급물 C는 5 psi 및 300 RPM(도 30 및 31에 도시) 및 7 psi 및 300 RPM(도 32에 도시)에서 농축된다. 공급물 C의 경우에, 2배 농축 후, 압력은 12 psi로 증가하고, 모든 경우에 NF UF 및 PES UF 막의 플럭스 및 수율 감소가 관찰된다. 도 30은 5 psi에서 NF UF 및 PES UF 막 모두의 플럭스 감소를 나타낸다.

[0164] 수율 및 선택도는 NF UF 및 PES UF 막에 대해 유사하지만, NF UF 막은 2 및 3배 농축실험 동안 일관되게 높은 평균 플럭스를 갖는다(도 31 및 32에 도시).

[0165] 실시예 10 : NF UF 막을 사용한 생물학적 물질의 정제를 위한 TFF 시스템

[0166] 대표적인 예에서, NF UF 막은 500 KDa 보다 큰 분자량을 갖는 목적하는 생물학적 물질을 정제하기 위해 TFF 모드에서 사용된다. 이러한 생물학적 물질의 예로는 콘주게이트된 폴리사카라이드 백신, 기타 유형의 백신, 바이러스-유사 입자 및 MW > 500,000 달톤을 갖는 단백질이 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0167] NF UF 막을 사용하여 목적하는 생물학적 물질의 정제에 사용되는 TFF 시스템의 개략도가 도 33에 도시되어있다. 목적하는 생물학적 물질은 공급물 저장 탱크 또는 용기에 존재한다. 사용된 일반적인 장비는 추가 완충액 탱크 또는 용기, 공급 펌프, 공급 밸브, 공급 압력 게이지, 홀더가 있는 평판 카세트 또는 피팅이 있는 나선형 권선 장치와 같은 NF UF 막이 들어있는 TFF 모듈, 보유물 압력 게이지, 압력을 제어하기 위한 보유물 밸브, 및 투과물 용기이다. 공급물이 한외여과에 의해 농축되는 경우, 보유물은 공급 탱크로 순환되고, 다이아여과가 수행되는 경우 별도의 용기가 보유물을 수집하고 다이아여과 완충액 용기가 공급 펌프에 관으로 연결된다.

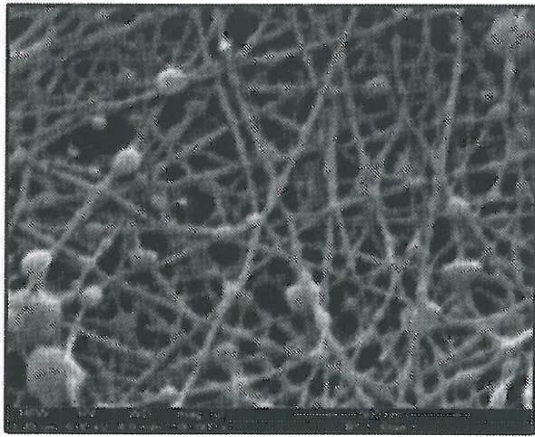
[0168] 본 명세서는 본 명세서에 인용된 참고 문헌의 교시에 비추어 가장 철저하게 이해되며, 그 참고문헌은 본 명세서에 참고로 포함된다. 명세서 내의 실시형태는 실시예를 제공하며 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 당업자는 많은 다른 실시형태가 본 개시 내용에 포함되는 것을 쉽게 인식할 것이다. 모든 간행물과 참고 문헌은 전체적으로 참고로 포함된다. 본 명세서에 포함된 물질이 본 명세서와 모순되거나 일치하지 않는 한, 본 명세서에서는 그러한 물질을 대신할 것이다. 본원에서 모든 인용 문헌의 인용은 그러한 참고 문헌이 선행 기술임을 인정하는 것은 아니다

[0169] 달리 지시되지 않는한, 청구 범위를 포함하여, 명세서에서 사용되는 성분의 양, 세포 배양, 처리 조건 등을 나타내는 모든 숫자는 모든 경우에서 "약"이라는 용어로 변형된 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 다르게 지시되지 않는 한, 수치 파라미터는 근사값이며, 본 명세서에 개시된 실시예에 의해 얻고자 하는 요구되는 특성에 따라 변할 수 있다. 달리 지시되지 않는 한, 일련의 요소들에 선행하는 "적어도"라는 용어는 그 시리즈의 모든 요소를 지칭하는 것으로 이해되어야한다. 당업자는 일상적인 실험만을 사용하여 본원에 기재된 특정 실시형태에 대한 다수의 균등물을 인식할 수 있거나 또는 확인할 수 있을 것이다. 이러한 균등물은 하기 청구 범위에 포함된다.

[0170] 당업자에게 명백한 바와 같이, 본 명세서에 기재된 실시형태는 그 사상 및 범위를 벗어나지 않고 많은 수정 및 변형이 이루어질 수 있다. 본 명세서에 기술된 특정 실시형태는 단지 예로서 제공되며 어떤 방식으로든 제한하려는 것은 아니다. 명세서 및 실시예는 단지 예시적인 것으로 고려되어야 하며, 본 발명의 진정한 범위 및 사상은 다음의 청구 범위에 의해 표시된다.

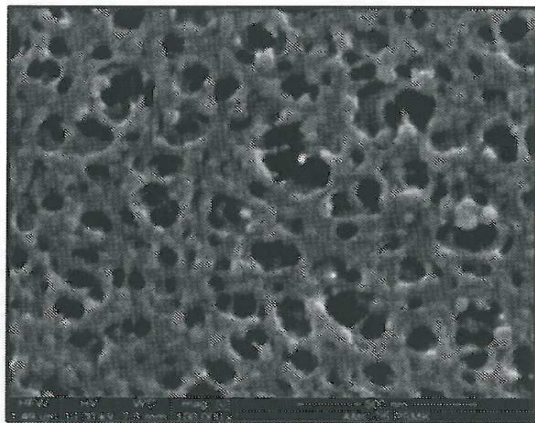
도면

도면1



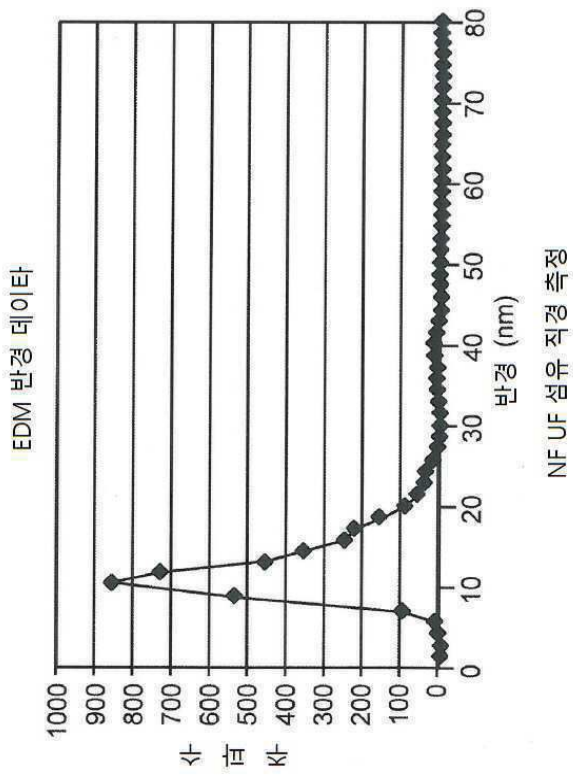
NF UF의 100,000배을 SEM 사진

도면2

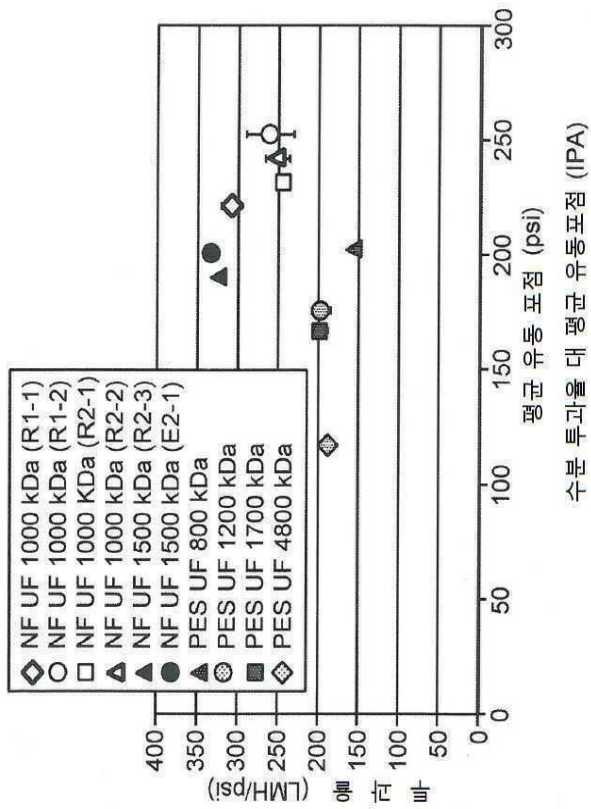


PES UF의 100,000배을 SEM 사진

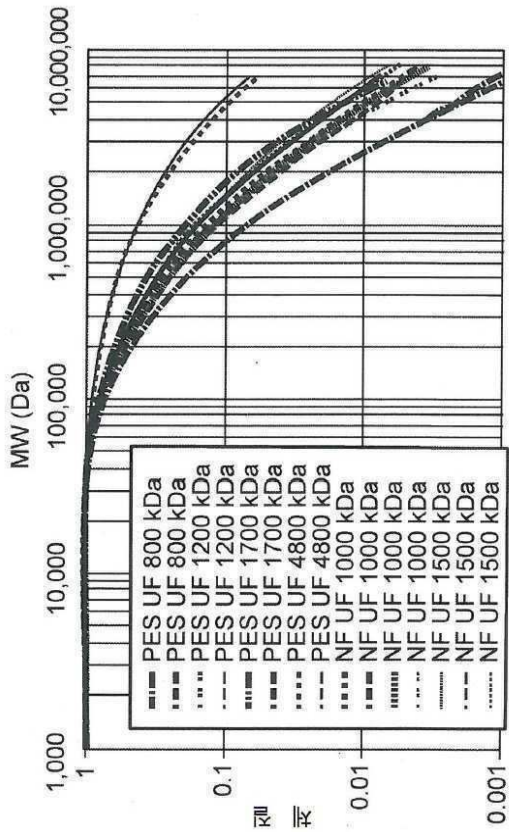
도면3



도면4

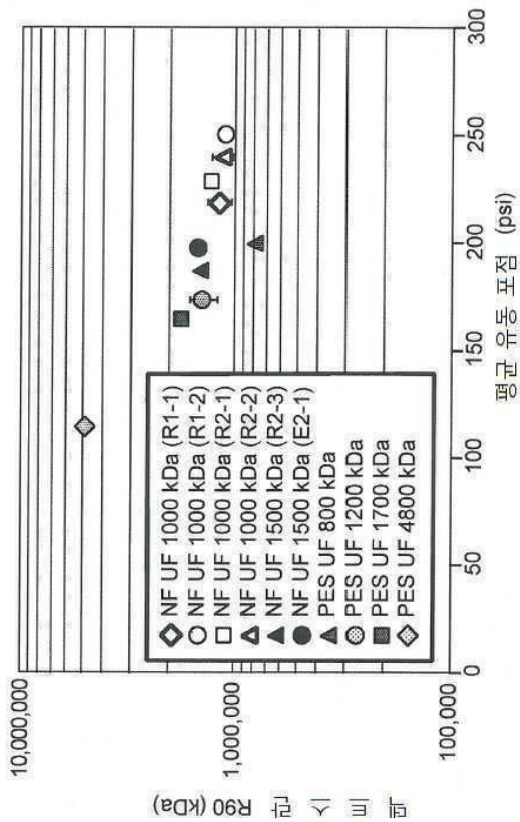


도면5



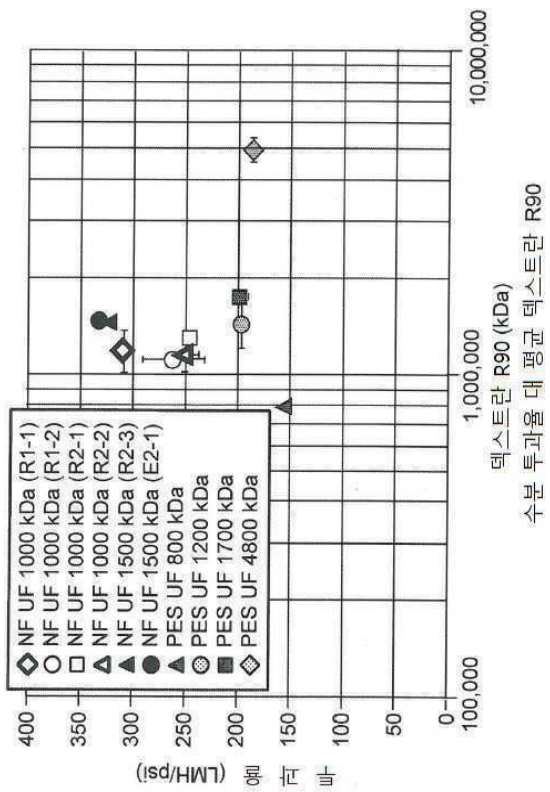
NF UF 및 PES UF에 대한 텍스트란 R90 컷오프를 측정하기 위해 사용된 텍스트란 체질 곡선

도면6

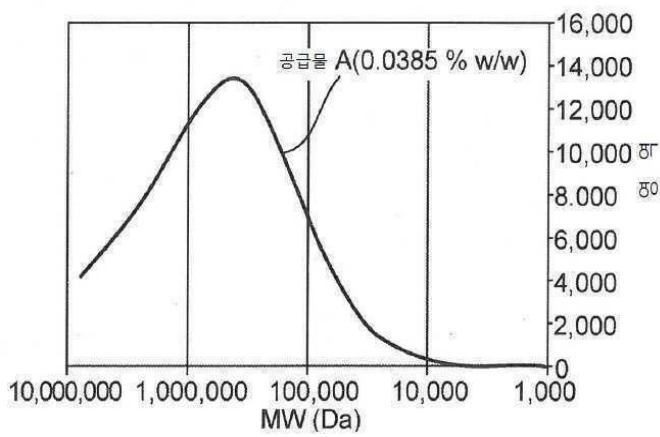


평균 텍스트란 R90 대 평균 유동포짐 (IPA)

도면7

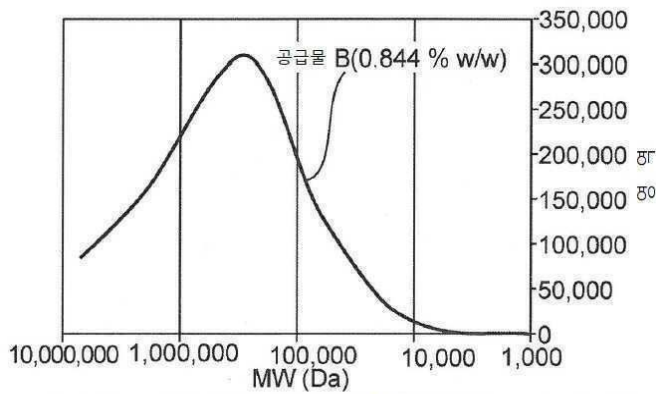


도면8



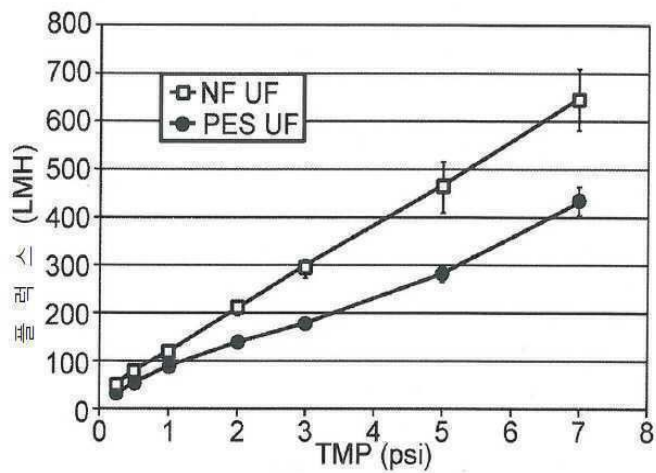
pH 7.0, 50mM 포스페이트 완충액에서의 공급물 A (0.0385 % w/w)의 겔투과 크로마토그램

도면9



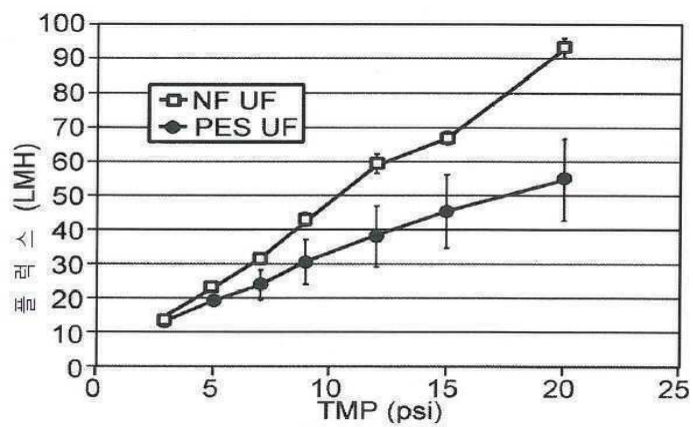
pH 7.0, 50mM 포스페이트 완충액에서의 공급물 B (0.844 % w/w)의 겔투과 크로마토그램

도면10



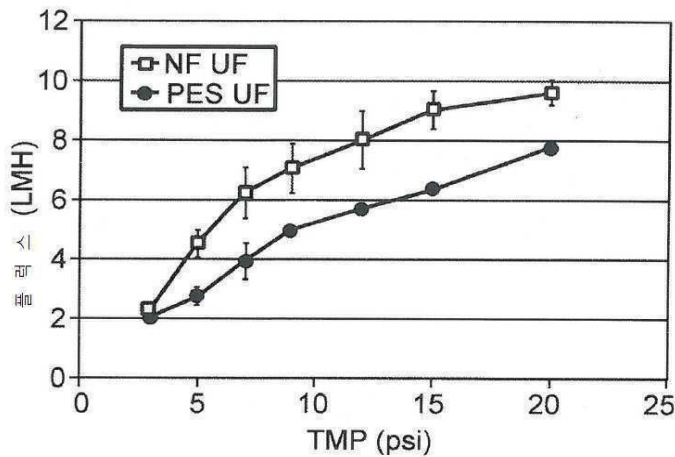
공급물 A(0.0385 % w/w)에 대한 NF UF 및 PES UF의 플럭스 대 TMP

도면11



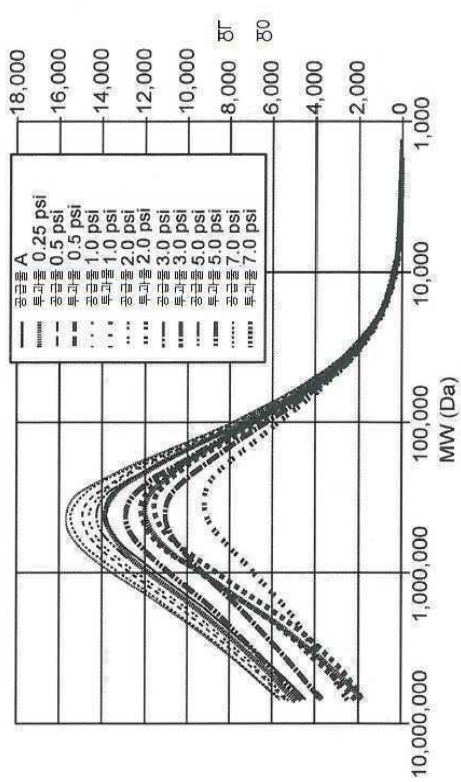
공급물 B(0.844 % w/w)에 대한 NF UF 및 PES UF의 플럭스 대 TMP

도면12



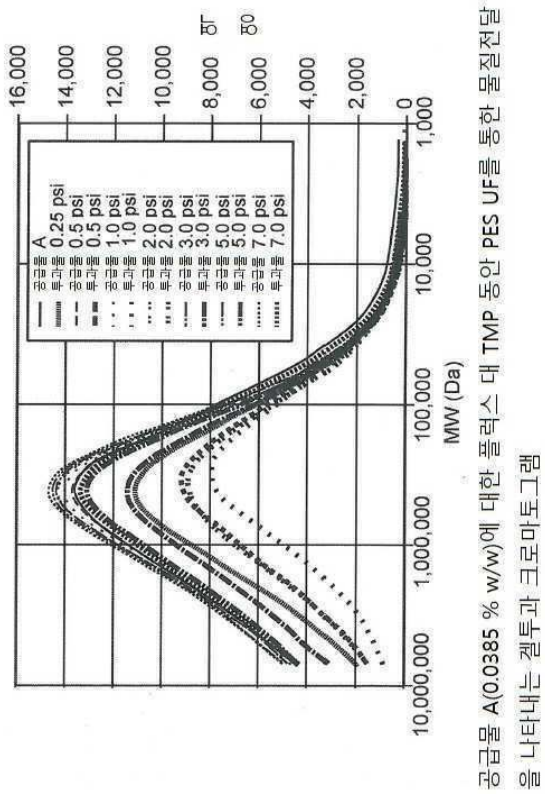
공급물 C(8.44 % w/w)에 대한 NF UF 및 PES UF의 플럭스 대 TMP

도면13

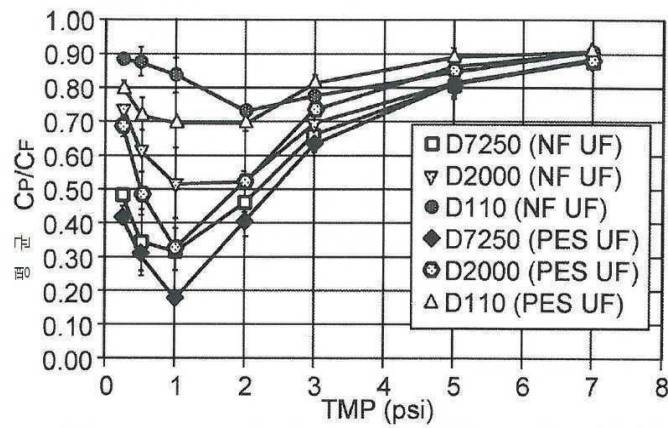


공급물 A(0.0385 % w/w)에 대한 TMP 대 플럭스 동인 NF UF를 통한 물질전달을 나타내는 겔투과 크로마토그램

도면14

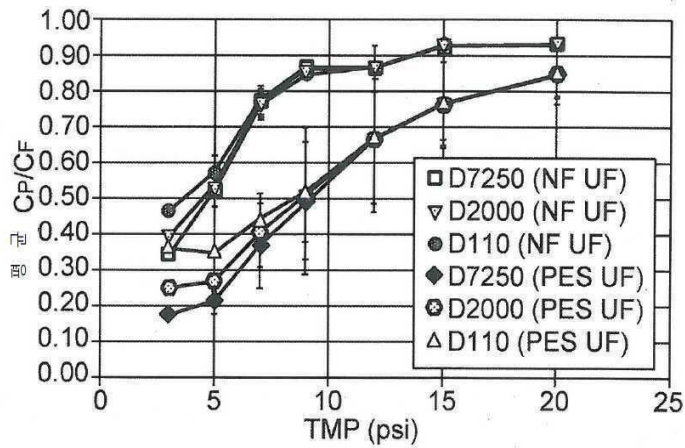


도면15



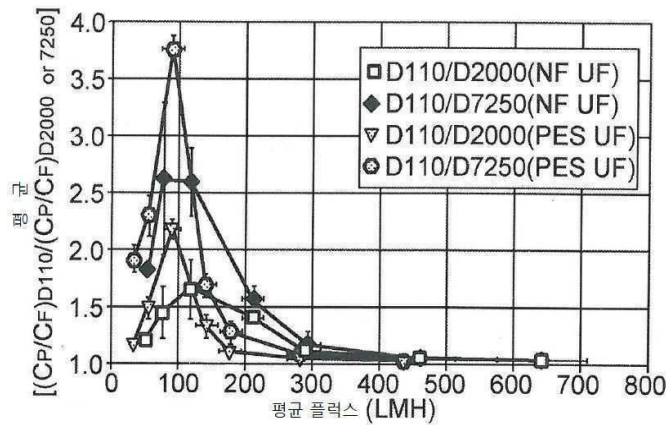
공급물 A(0.0385 % w/w)의 플럭스 대 TMP 실험을 통한 NF UF 및 PES UF에 대한 D7250, D2000, D110의 질량/농도 이동

도면16



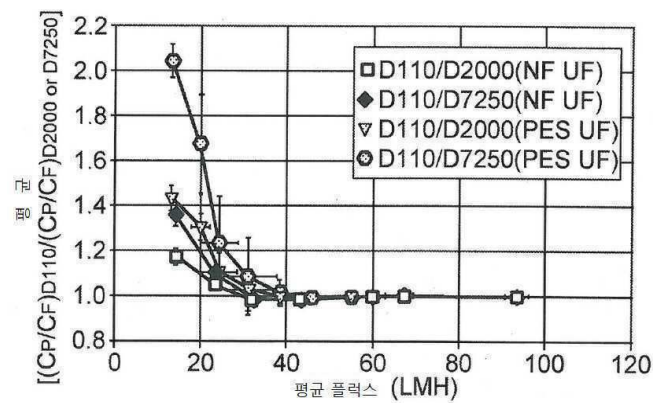
공급물 B(0.844 % w/w)의 플럭스 대 TMP 실험을 통한 NF UF 및 PES UF에 대한 D7250, D2000, D110의 질량/농도 이동

도면17



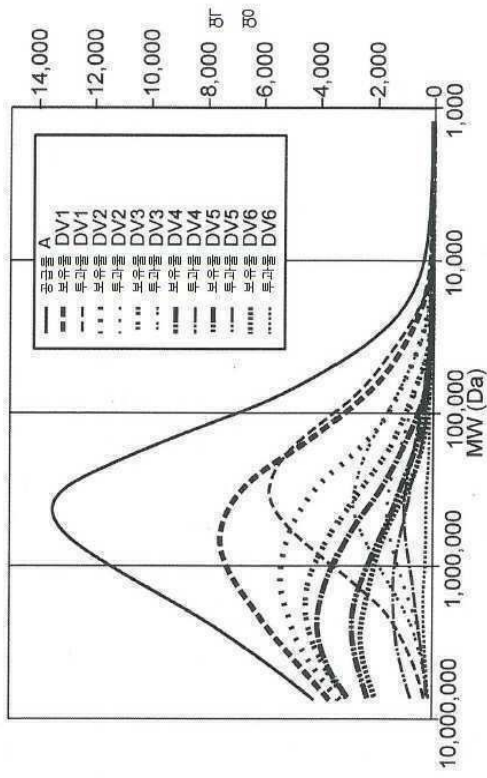
공급물 A(0.0385 % w/w)의 플럭스 대 TMP 실험을 통한 NF UF 및 PES UF의 플럭스에 대한 D110/D2000 및 D110/D7250의 선택도

도면18



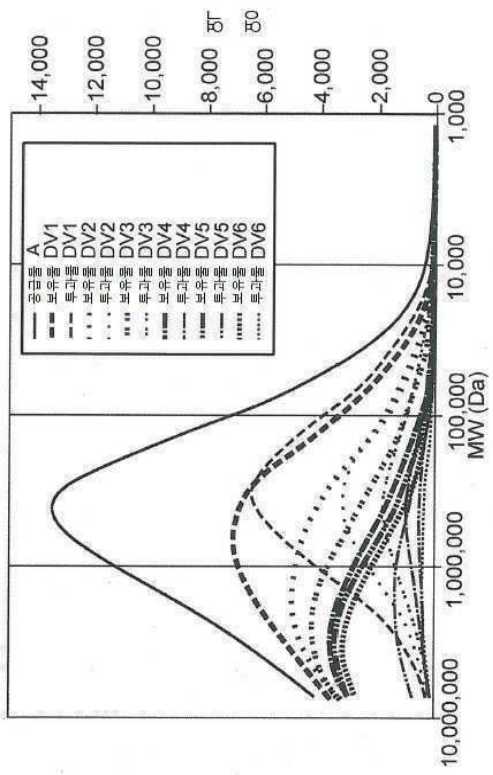
공급물 B(0.844 % w/w)의 플럭스 대 TMP 실험을 통한 NF UF 및 PES UF의 플럭스에 대한 D110/D2000 및 D110/D7250의 선택도

도면19



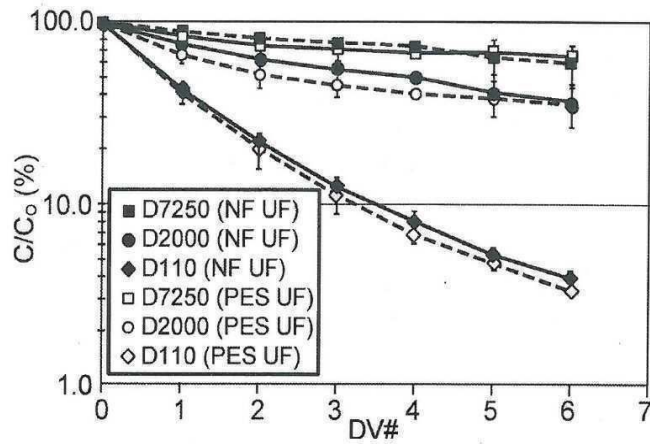
30 LMH 및 640 RPM에서 NF UF 를 사용하여 다이아여과하는 동안 공급물 A(0.0385 % w/w)의 공급물, 보유물 및 투과물의 겔투과 크로마토그램

도면20



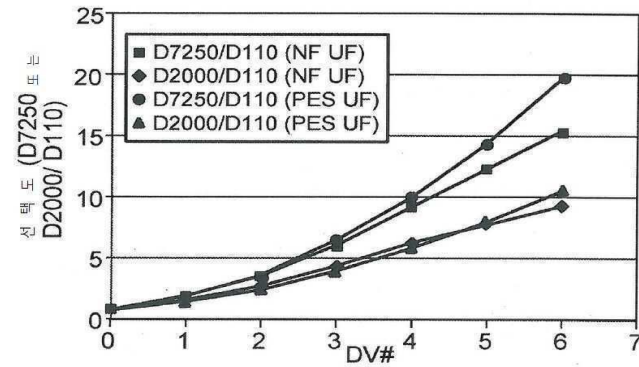
30 LMH 및 640 RPM에서 PES UF를 사용하여 다이아여과하는 동안 공급물 A(0.0385 % w/w)의 공급물, 보유물 및 투과물의 겔투과 크로마토그램

도면21



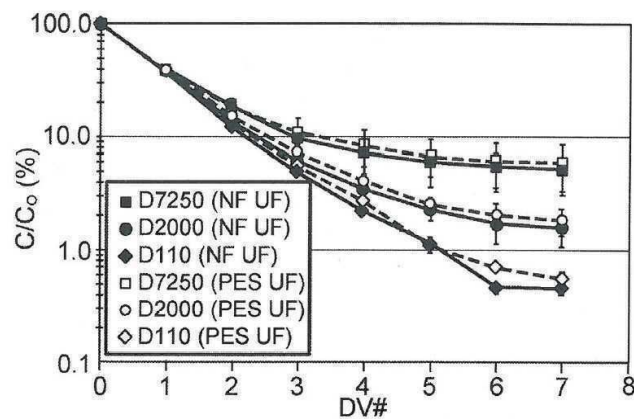
30 LMH 및 640 RPM에서 다이아여과하는 동안 NF UF 및 PES UF에 대한 공급물 A(0.0385 % w/w)의 다이아볼륨 대 보유물 C/C_0

도면22



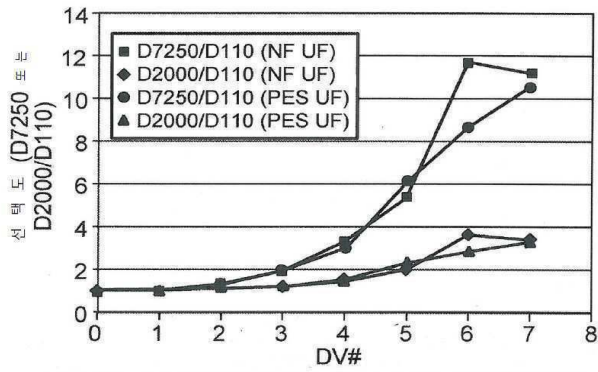
30 LMH 및 640 RPM에서 다이아여과하는 동안 NF UF 및 PES UF에 대한 다이아볼륨 대 보유물 D7250/D110 및 D2000/D110의 선택도

도면23



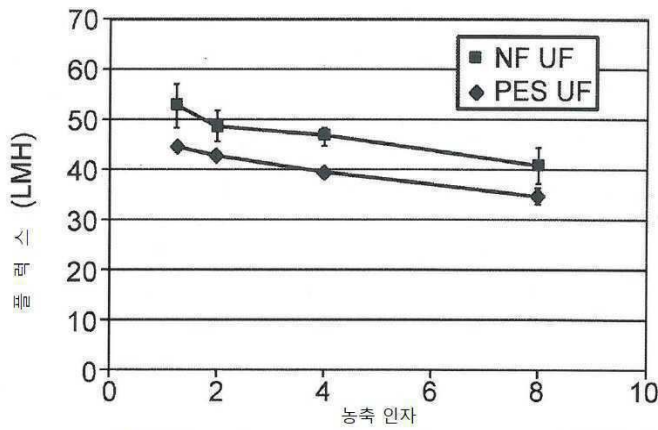
60 LMH 및 320 RPM에서 다이아여과하는 동안 NF UF 및 PES UF에 대한 공급물 A(0.0385 % w/w)의 다이아볼륨 대 보유물 C/C_0

도면24



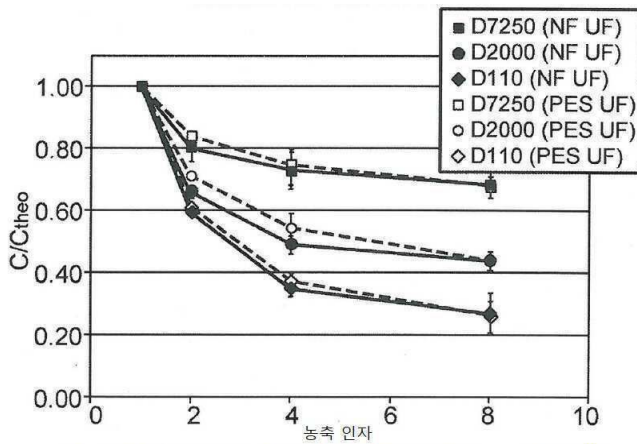
60 LMH 및 320 RPM에서 다이아여과하는 동안 NF UF 및 PES UF에 대한 다이아 볼륨 대 보유물 D7250/D110 및 D2000/D110의 선택도

도면25



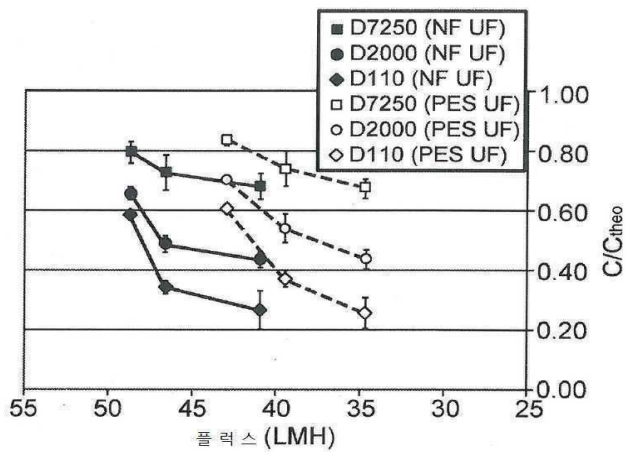
0.5 psi의 일정한 TMP 및 600 RPM에서 공급물 A(0.0385 % w/w)의 한외여과 농축동안 NF UF 및 PES UF에 대한 농축 인자 대 플럭스

도면26



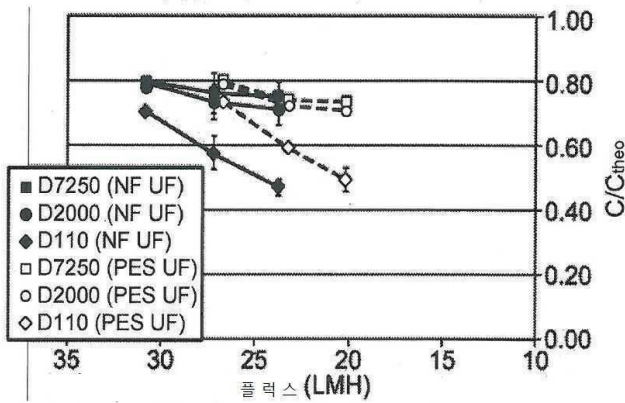
0.5 psi의 일정한 TMP 및 600 RPM에서 공급물 A(0.0385 % w/w)의 2, 4, 8배 한외여과 농축동안 NF UF 및 PES UF에 대한 농축 인자 대 C/Ctheo

도면27



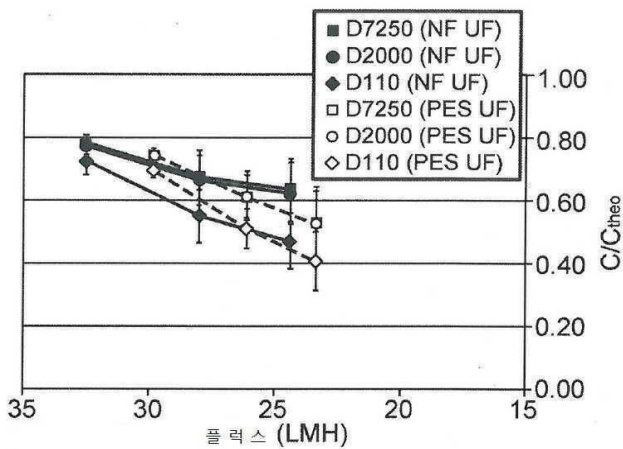
0.5 psi의 일정한 TMP 및 600 RPM에서 공급물 A(0.0385 % w/w)의 2, 4, 8배 (좌측에서 우측) 한외여과 농축동안 NF UF 및 PES UF에 대한 플럭스 대 C/C_{theo}

도면28



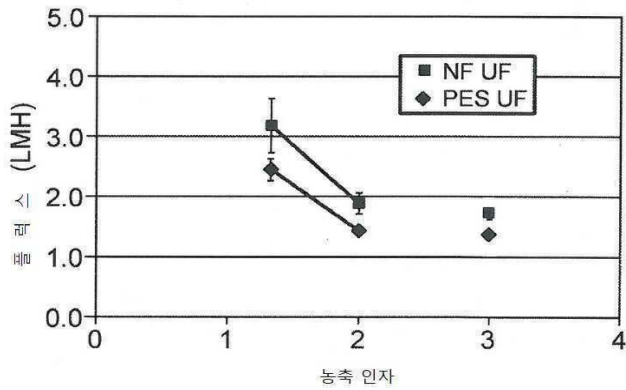
5 psi의 일정한 TMP 및 600 RPM에서 공급물 B(0.844 % w/w)의 2, 4, 8배 (좌측에서 우측) 한외여과 농축동안 NF UF 및 PES UF에 대한 플럭스 대 C/C_{theo}

도면29



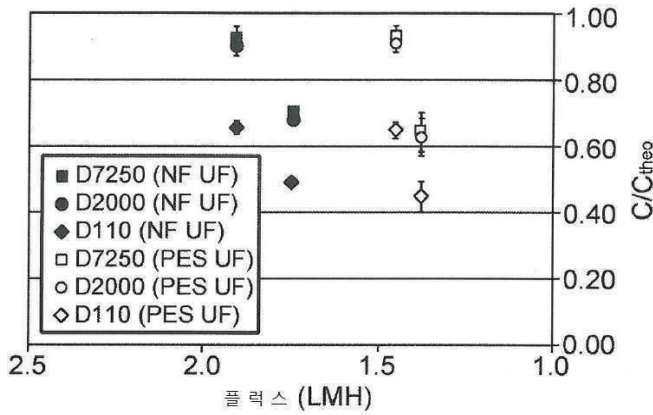
7 psi의 일정한 TMP 및 600 RPM에서 공급물 B(0.844 % w/w)의 2, 4, 8배 (좌측에서 우측) 한외여과 농축동안 NF UF 및 PES UF에 대한 플럭스 대 C/C_{theo}

도면30



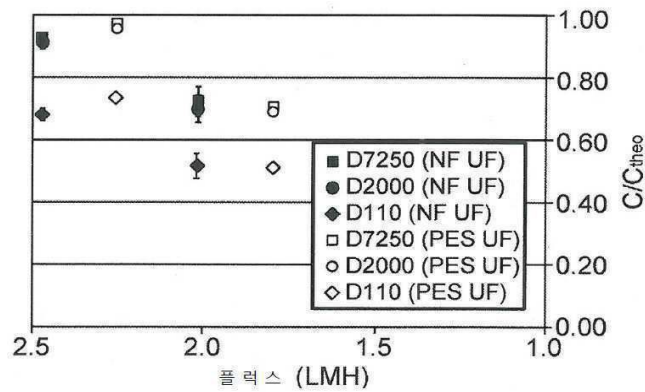
5 psi의 일정한 TMP 및 300 RPM에서 공급물 C(8.44 % w/w)의 한외여과 농축 동안 NF UF 및 PES UF에 대한 농축 인자 대 플럭스. TMP는 2배 농축점 후에 12 psi까지 증가되었음.

도면31



5 psi의 일정한 TMP 및 300 RPM에서 공급물 C(8.44 % w/w)의 2, 4, 8배 (좌측에서 우측) 한외여과 농축동안 NF UF 및 PES UF에 대한 플럭스 대 C/Ctheo. TMP는 2배 농축점 후에 12psi까지 증가되었음.

도면32



7 psi의 일정한 TMP 및 300 RPM에서 공급물 C(8.44 % w/w)의 2, 4, 8배 (좌측에서 우측) 한외여과 농축동안 NF UF 및 PES UF에 대한 플럭스 대 C/Ctheo. TMP는 2배 농축점 후에 12 psi까지 증가되었음.

도면33

