



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117043173 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 10

(21) 申请号 202280019599.6

T·N·阮 S·辛格

(22) 申请日 2022.03.10

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

(30) 优先权数据

63/159217 2021.03.10 US

72001

专利代理师 罗文锋 彭昶

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.09.06

(51) Int.Cl.

C07K 1/16 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/019697 2022.03.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/192504 EN 2022.09.15

(71) 申请人 美国安进公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 N·索伊斯 J·S·康纳

G·M·亨特 K·舒梅克 B·怀利

J·B·弗林 N·卡奥尼尔

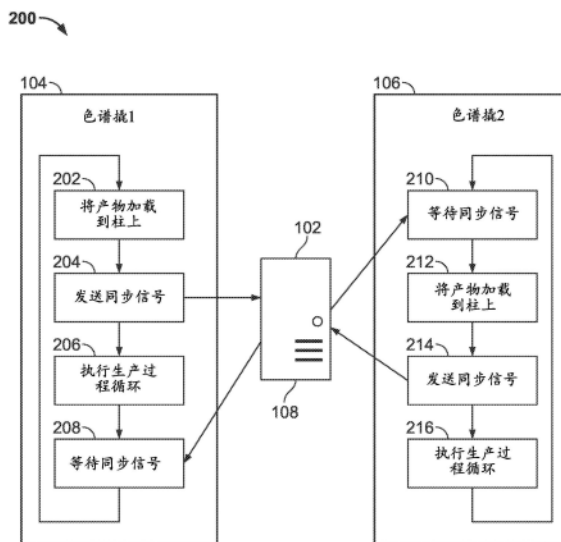
权利要求书2页 说明书42页 附图9页

(54) 发明名称

重组蛋白的纯化方法

(57) 摘要

本文描述了并行色谱系统和连续制造方法，该并行色谱系统和连续制造方法利用两个或更多个色谱柱橇，这些色谱柱橇具有在控制在给定时间加载哪个柱的自动化控制情况下并行操作的柱。



1. 一种从一种或多种污染物纯化重组蛋白的方法,该方法包括:  
对该蛋白进行亲和色谱单元操作,  
对来自该亲和色谱单元操作的洗脱池进行低pH病毒灭活和中和;以及  
对中和的池进行一个或多个精制色谱单元操作;  
其中该亲和色谱单元操作中的至少一个和/或该一个或多个精制色谱单元操作中的至少一个根据并行色谱过程来操作,该并行色谱过程被配置成通过色谱过程的一个或多个完整循环来控制多个色谱柱橧的操作,每个完整循环包括长步骤和多个较短步骤,该多个较短步骤中的每个的处理时间短于或等于该长步骤的处理时间,该并行色谱过程包括以下步骤:  
在并行色谱系统的控制电路处接收与该多个色谱柱橧的第一橧相关联的表示该长步骤已完成的同步信号;以及  
响应于该同步信号的接收,用该控制电路引导该多个色谱柱橧的第二橧的操作以开始该长步骤的操作。
2. 如权利要求1所述的方法,其中该亲和色谱单元操作根据该并行色谱过程进行。
3. 如权利要求2所述的方法,其中该长步骤包括加载这些色谱柱橧的柱,并且该多个较短步骤包括以下中的两个或更多个:平衡步骤、一个或多个洗涤步骤、洗脱步骤、再生步骤、或冲洗步骤。
4. 如权利要求1所述的方法,其中该一个或多个精制色谱单元操作中的至少一个根据该并行色谱过程进行。
5. 如权利要求4所述的方法,其中该长步骤包括洗脱这些色谱柱橧中的柱;并且该多个较短步骤包括以下中的两个或更多个:平衡步骤、加载步骤、一个或多个洗涤步骤、再生步骤、和冲洗步骤。
6. 如权利要求1所述的方法,其中该亲和色谱单元操作和该一个或多个精制色谱单元操作中的至少一个都根据该并行色谱过程进行。
7. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该并行色谱过程进一步包括以下步骤:在接收该同步信号之后,用该控制电路引导该多个色谱柱橧中的第一橧上的多个较短步骤的操作以完成其色谱过程的完整循环。
8. 如权利要求7所述的方法,其中该并行色谱过程进一步包括以下步骤:  
在该控制电路处接收与该多个色谱柱橧的第二橧相关联的表示该长步骤已完成的第二同步信号;以及  
响应于该第二同步信号的接收,用该控制电路引导该多个色谱柱橧的第一橧的操作以开始该长步骤的第二操作。
9. 如权利要求1所述的方法,其中该一个或多个精制色谱单元操作中的至少一个包括第一和第二精制色谱单元操作,其中第一捕获色谱柱与第二捕获色谱柱串联连接。
10. 如权利要求1所述的方法,其中该一个或多个精制色谱单元操作包括单独的第一和第二精制色谱单元操作。
11. 如权利要求9或10所述的方法,其中该第一精制色谱单元操作在该第二精制色谱单元操作之前或之后。
12. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中使用中和缓冲液系统来中和病毒灭活

的洗脱池,该中和缓冲液系统能够使病毒灭活的洗出液池的体积膨胀最小化,同时保持电导率小于或等于10ms/cm,其中该缓冲液系统包括在目标pH范围内不具有缓冲能力的滴定剂和在所期望pH下进行缓冲的缓冲剂。

13. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该病毒灭活是30分钟或更长时间。

14. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其进一步包括对该中和的池进行深度过滤操作。

15. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其进一步包括使对该一个或多个精制色谱单元操作的洗脱进行以下中的一个或多个:超滤/渗滤单元操作;或病毒过滤单元操作。

16. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该亲和色谱单元操作包括蛋白A色谱、蛋白G色谱或蛋白L色谱。

17. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该一个或多个精制色谱单元操作中的至少一个包括阳离子交换色谱、阴离子交换色谱、多模式色谱或疏水相互作用色谱。

18. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其包括用于产生分离的、纯化的、重组的目的蛋白的方法。

19. 如权利要求18所述的分离的、纯化的、重组的目的蛋白。

20. 一种药物组合物,其包含如权利要求18所述的分离的、纯化的、重组的目的蛋白。

21. 一种用于以最小的体积膨胀将病毒灭活池中和至目标pH的系统,该系统包括在目标pH范围内不具有缓冲能力的滴定剂,以及在目标pH下进行缓冲的缓冲剂,

其中经中和的病毒灭活洗脱池的电导率维持在小于或等于10ms/cm。

22. 如权利要求21所述的系统,其中该滴定剂具有大于7的pKa并且该缓冲剂具有在4.5至6.0范围内的pKa。

23. 如权利要求21所述的系统,其中该滴定剂是乙酸盐并且该缓冲剂是Tris碱。

24. 如权利要求21所述的系统,其中该滴定剂是大于0.1M至小于0.3M范围内的乙酸钠。

25. 如权利要求21所述的系统,其中该缓冲剂是大于0.00005M至小于0.2M范围内的Tris碱。

26. 如权利要求21所述的系统,其中该病毒灭活池通过使用包含pKa低于4的酸的缓冲液洗脱亲和色谱柱来获得,从而导致pH小于或等于 $3.6 \pm 0.1$ 的病毒灭活洗脱池。

27. 如权利要求21所述的系统,其中该病毒灭活池具有小于或等于 $3.6 \pm 0.1$ 的pH,并通过使用缓冲液洗脱亲和色谱柱获得,该缓冲液包含至少50mM至至少150mM的浓度、3.3至3.5的pH范围和2.1CV至7.7CV的亲和色谱池体积。

28. 如权利要求27所述的系统,其中该病毒灭活池具有小于或等于 $3.6 \pm 0.1$ 的pH,并通过使用缓冲液洗脱亲和色谱柱获得,该缓冲液包含100mM的浓度,3.3至3.5的pH范围,2.75CV至4.25CV的亲和色谱池体积。

29. 如权利要求21所述的系统,其中该中和缓冲液系统用于连续流动过程中以纯化目的蛋白。

30. 如权利要求21所述的系统,其中通过流入静态混合器中通过将一定比例的病毒灭活池材料与该中和缓冲液系统组合来实现中和。

## 重组蛋白的纯化方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年3月10日提交的美国临时专利申请号63/159,217的优先权,其全部内容特此通过引用明确并入本文。

### 技术领域

[0003] 本披露总体上涉及色谱系统,并且更具体地涉及半连续和连续制造色谱系统。

### 背景技术

[0004] 连续制造(CM),特别是连续纯化操作,是许多具有多于一个柱色谱操作的生物制造过程的目标。对于传统的色谱操作,整个批次在单个大型色谱柱(通常大于12,000L,柱直径大于1米)上进行多个循环处理。在单个大型色谱柱上进行处理并在下一个批次操作之前将整个产物质量收集在池罐中会增加处理时间和过程的持续时间,需要相对较大的、灵活性较差的设施占地面积,具有较高的色谱材料(诸如蛋白质A)成本,并且具有较大体积的缓冲液和其他试剂,这会增加总体成本并对环境产生更大的影响。

[0005] 为了克服这些挑战,已经开发了用于色谱操作的各种复杂的多柱循环策略,以提供更连续的材料输出,从而提高树脂利用率并在一定程度上改进杂质分辨率。其中一种方法是闭环模拟移动床多柱系统,需要复杂的阀配置和复杂的控制策略才能实现过程效益。为连续生产而开发的另一种多柱策略是连续多柱色谱,其中一个实例是周期性逆流色谱(PCC),其采用串联连接的多个柱,利用柱之间的流过配置中的柱过载,本质上是将批次色谱分离成更小的以连接的顺序方式进行处理单元。

[0006] 与传统的大规模单柱设置相比,这些多柱设置之间的一个区别在于,树脂材料可以通过第一柱的过载而得到更充分的加载,并且原料中的任何非结合蛋白都会突破并流向串联连接的下一个柱。当下一个连接的柱过载时,可以洗脱并再生过载的柱。然而,这些设置操作复杂且成本高昂,需要柱与阀系统之间的大量复杂的互连,以引导流体从一个相连的柱流向下一个柱,还需要另外的紫外线(UV)监视器以及泵和转换器来检测并处理这种连续的串联流。在更大规模的生物制药生产操作中,这些复杂性会降低过程的稳健性、清洁效率,并限制一次性技术的采用。例如,与传统的单柱色谱单元操作相比,在单个单元操作内PCC过程的配置会导致资产设备的利用效率低下,并导致灵活性损失,特别是对于采用实现一次性流动路径的设备而言。

[0007] 对于连接的多柱系统来说,容错也是一个问题,尤其是在两个或更多个单元操作已互连并包含在单个橇内的情况下。这些部件和流动路径的互连会对单元操作和整个制造过程产生重大影响。当该互连系统的任何部件受到影响时,整体的一个或多个单元操作可能会停止,并且到该点为止的整个运行可能会丢失。

[0008] 本文描述的本发明通过定义一种操作模式克服了这些缺陷,在该操作模式下,设备和软件配置规模较小、平台友好且模块化,各单元以并行而非串联配置的方式操作,从而产生灵活的、可扩展的、由外部控制操作并且不需要复杂的设置和材料流动的系统。此外,与

多柱串联单元相比,所描述的系统显示出卓越的容错能力,因为如果单个单元无法运行,则只有该单个柱受到影响,并且可以轻松地理和提取该柱,而不会导致整个运行中断和/或停止。

### 发明内容

[0009] 根据第一方面,本文描述了一种连续并行色谱系统,其包括多个色谱柱橧,其中每个色谱柱橧适合于独立的批次处理。每个色谱柱橧包括色谱柱、选择性地联接到上游源的入口、至少一个泵、至少一个过滤器和出口传感器。该系统进一步包括控制电路,该控制电路被配置成通过色谱过程的一个或多个完整循环来控制多个色谱柱橧的操作,其中每个完整循环包括长步骤和多个较短步骤,该多个较短步骤中的每个的处理时间短于或等于长步骤的处理时间。控制电路被配置成接收与多个色谱柱橧的第一橧相关联的表示长步骤已完成的同步信号,并且响应于同步信号的接收,引导多个色谱柱橧的第二橧的操作以开始长步骤的操作。

[0010] 在一些形式中,控制电路可以被配置成在接收到同步信号之后在多个色谱柱橧的第一橧上引导多个较短步骤的操作,以完成色谱过程的完整循环。在这些形式中,控制电路可以进一步被配置成接收与多个色谱柱橧的第二橧相关联的表示长步骤已完成的第二同步信号,并且响应于第二同步信号的接收,引导多个色谱柱橧的第一橧的操作以开始长步骤的第二操作。在更进一步的形式中,控制电路可以被配置成在接收到第二同步信号之后在多个色谱柱橧的第二橧上引导多个较短步骤的操作,以完成色谱过程的完整循环。

[0011] 在任何上述形式中,长步骤可以是色谱柱的洗脱步骤,其中多个较短步骤可以包括以下中的两个或更多个:平衡步骤、加载步骤、一个或多个洗涤步骤、再生步骤、或冲洗步骤和/或长步骤可以是色谱柱的加载步骤,其中多个较短步骤可以包括以下中的两个或更多个:平衡步骤、一个或多个洗涤步骤、洗脱步骤、再生步骤、或冲洗步骤。在长步骤为加载步骤的形式中,多个色谱柱橧的第一橧可以被配置成接收来自上游源的原料进料并且将同步信号发送至控制电路,从而指示多个色谱柱中的第一色谱柱的原料加载完成,并且响应于同步信号的接收,控制电路被配置成将原料的进料从上游源切换至多个色谱柱橧的第二橧,以执行其色谱柱的加载步骤。在这些形式中,控制电路可以被配置成将一种或多种加工原料的进料引导至多个色谱柱橧的第一橧,以在其加载的色谱柱上执行短步骤的处理,并且如果需要的话,在完成加载的色谱柱上的短步骤的处理后,多个色谱柱橧的第一橧可以被配置成等待与第二色谱柱橧相关联的其色谱柱的加载步骤已完成的第二同步信号的生成。在任何这些形式中,原料可以是蛋白质、抗体、多特异性蛋白质、双特异性蛋白质或双特异性T细胞接合剂和/或原料的上游源可以是以下之一:收获的细胞培养液的流或池、来自捕获色谱柱的洗脱流或池、来自捕获色谱柱的病毒灭活池、或来自捕获色谱柱的中和的病毒灭活池。

[0012] 在任何上述形式中,多个色谱橧的色谱柱可以是捕获色谱柱。捕获色谱柱可以是以下中的一种或多种:亲和色谱柱、尺寸排阻色谱柱、离子交换色谱柱、疏水相互作用色谱柱、多模式色谱柱、羟基磷灰石色谱柱或固定金属亲和色谱柱。捕获色谱柱可以由蛋白A色谱柱、蛋白G色谱柱或蛋白L色谱柱组成的亲和色谱柱。捕获色谱柱可以由阳离子交换色谱柱或阴离子交换色谱柱组成的离子交换色谱柱。

[0013] 在任何上述形式中,系统可包括在多个色谱柱橧下游流体连接的病毒过滤装置和/或超滤装置中的至少一个;控制电路可以是彼此通信的多个色谱柱橧中的每一个的多个控制器,或者是与多个色谱柱橧中的每一个通信的中央控制器;多个色谱柱橧中的色谱柱可以具有多个彼此不同的尺寸;或者多个色谱柱橧中的一个或多个色谱柱可以是一次性色谱柱。

[0014] 在上述形式中的任一种中,系统可包括在多个色谱柱橧下游流体联接的一个或多个收集罐和/或下游捕获色谱柱。在一些形式中,下游色谱柱可以是离子交换色谱柱、疏水相互作用色谱柱、多模式色谱柱或羟基磷灰石色谱柱。下游色谱柱可以是阳离子交换柱或阴离子交换柱。在进一步的形式中,下游色谱柱可以是第一下游色谱柱并且系统可以包括与第一下游色谱柱直接串联连接的第二下游色谱柱,其中第一下游色谱柱和第二下游色谱柱可以是阳离子和/或阴离子交换柱。在其他形式中,下游色谱柱可以是第一下游色谱柱,并且系统可以进一步包括第二下游色谱柱,其中第一下游色谱柱和第二下游色谱柱分别设置在第一下游色谱柱橧和第二下游色谱柱橧上,并且第一下游色谱柱橧和第二下游色谱柱橧各自适合于独立的批次处理以及入口、至少一个泵、至少一个过滤器和出口传感器。在这些形式中,控制电路可以被配置成:通过下游色谱过程的一个或多个完整循环来控制第一和第二下游色谱柱橧的操作,每个完整循环包括长洗脱步骤和多个较短步骤,多个较短步骤中的每个的处理时间短于或等于长洗脱步骤的处理时间;以及:接收与第一下游色谱柱橧相关联的表示长洗脱步骤已完成的同步信号,并且响应于同步信号的接收,引导第二色谱柱橧的操作以开始长洗脱步骤的操作。

[0015] 根据第二方面,描述了从一种或多种污染物纯化重组蛋白的方法,该方法包括使蛋白质经历亲和色谱单元操作、使来自亲和色谱单元操作的洗脱池经历低pH病毒灭活和中和,以及使经中和的池经历一个或多个精制色谱单元操作。亲和色谱单元操作中的至少一个或一个或多个精制色谱单元操作中的至少一个根据并行色谱过程来操作,该并行色谱过程被配置成通过色谱过程的一个或多个完整循环来控制多个色谱柱橧的操作,其中每个完整循环包括长步骤和多个较短步骤,并且该多个较短步骤中的每个的处理时间短于或等于长步骤的处理时间。并行色谱过程包括以下步骤:在并行色谱系统的控制电路处接收与多个色谱柱橧的第一橧相关联的表示长步骤已完成的同步信号,以及响应于同步信号的接收,利用控制电路引导多个色谱柱橧的第二橧的操作以开始长步骤的操作。

[0016] 在一些形式中,亲和色谱单元操作根据并行色谱过程进行,并且在进一步的形式中,长步骤可以是加载色谱柱橧的柱,并且多个较短步骤可以是以下中的两个或更多个:平衡步骤、一个或多个洗涤步骤、洗脱步骤、再生步骤、或冲洗步骤。在其他形式中,一个或多个精制色谱单元操作中的至少一个可以根据并行色谱过程进行,并且在进一步的形式中,长步骤可以是洗脱色谱柱橧的柱,并且多个较短步骤可以是以下中的两个或更多个:平衡步骤、加载步骤、一个或多个洗涤步骤、再生步骤、和冲洗步骤。在又进一步的形式中,亲和色谱单元操作和一个或多个精制色谱单元操作中的至少一个可根据并行色谱过程进行。

[0017] 在一些形式中,并行色谱过程可以包括以下步骤:在接收到同步信号后,利用控制电路引导多个色谱柱橧的第一橧上的多个较短步骤的操作,以完成色谱过程的完整循环,并且在进一步的形式中,并行色谱过程可以包括以下步骤:在控制电路处接收与多个色谱柱橧的第二橧相关联的表示长步骤已完成的同步信号,以及响应于第二同步信号的接收,

利用控制电路引导多个色谱柱橛的第一橛的操作以开始长步骤的第二操作。

[0018] 在一些形式中,该方法可以包括以下中的一项或多项:一个或多个精制色谱单元操作中的至少一个可以包括第一和第二精制色谱单元操作,其中第一捕获色谱柱与第二捕获色谱柱串联连接;一个或多个精制色谱单元操作可以包括单独的第一和第二精制色谱单元操作;第一精制色谱单元操作在第二精制色谱单元操作之前或之后;可以使用中和缓冲液系统来中和病毒灭活的洗脱池,该中和缓冲液系统能够使病毒灭活的洗出液池的体积膨胀最小化,同时保持电导率小于或等于10ms/cm,其中缓冲液系统包括在目标pH范围内不具有缓冲能力的滴定剂和和所需pH下进行缓冲的缓冲剂;病毒灭活时间可以是30分钟或更长时间;该方法可以包括对中和池进行深度过滤操作;该方法可以包括使一个或多个精制色谱单元操作的洗脱经历以下中的一个或多个:超滤/渗滤单元操作或病毒过滤单元操作;亲和色谱单元操作可以是蛋白A色谱、蛋白G色谱或蛋白L色谱;一个或多个精制色谱单元操作中的至少一个可以是阳离子交换色谱、阴离子交换色谱、多模式色谱或疏水相互作用色谱。

[0019] 任何上述形式都可以是用于产生分离的、纯化的、重组的目的蛋白的方法。根据第三和第四方面,披露了上述方法的分离的、纯化的、重组的目的蛋白,并且披露了包含上述方法的分离的、纯化的、重组的目的蛋白的药物组合物。

[0020] 根据第五方面,公开了一种用于以最小体积膨胀将病毒灭活的池中和至目标pH的系统,该系统包括在目标pH范围内不具有缓冲能力的滴定剂和和在目标pH下进行缓冲的缓冲剂,其中经中和的病毒灭活洗脱池的电导率保持在小于或等于10ms/cm。

[0021] 在某些形式中,该系统可以包括以下方面中的一个或多个:滴定剂可以具有大于7的pKa并且缓冲剂可以具有在4.5至6.0范围内的pKa;滴定剂可以是乙酸盐,缓冲剂可以是Tris碱;滴定剂可以是大于0.1M至小于0.3M范围内的乙酸钠;缓冲剂可以是大于0.00005M至小于0.2M范围内的Tris碱;病毒灭活池可以通过使用包含pKa低于4的酸的缓冲液洗脱亲和色谱柱来获得,导致病毒灭活洗脱池的pH小于或等于 $3.6 \pm 0.1$ ;病毒灭活池可具有小于或等于 $3.6 \pm 0.1$ 的pH,并且可通过使用包括至少50mM至至少150mM的浓度、3.3至3.5的pH范围和2.1CV至7.7CV的亲和色谱池体积的缓冲液洗脱亲和色谱柱来获得,并且在进一步的形式中,病毒灭活池可具有小于或等于 $3.6 \pm 0.1$ 的pH,并且可通过使用包括100mM的浓度、3.3至3.5的pH范围和2.75CV至4.25CV的亲和色谱池体积的缓冲液洗脱亲和色谱柱来获得;中和缓冲液系统可用于连续流动过程中以纯化目的蛋白质;或者可以通过将一定比例的病毒灭活池材料与中和缓冲液系统组合通过流入静态混合器中来实现中和。

## 附图说明

[0022] 图1是根据本披露的各种实施例的并行过程色谱系统的示意图;

[0023] 图2是根据第一并行循环策略使用两个亲和色谱橛来操作图1的并行过程色谱系统的流程图。

[0024] 图3是图2的并行循环策略的流程图,示出了使用至少第一和第二泵的两个亲和色谱橛的柱的步骤。

[0025] 图4是根据第二并行循环策略使用两个阳离子交换色谱橛来操作图1的并行过程色谱系统的流程图。

[0026] 图5是图4的并行循环策略的流程图,示出了使用至少第一和第二泵的两个阳离子

交换色谱撬的柱的步骤。

[0027] 图6是图1的并行过程色谱系统的示例色谱撬的示意图。

[0028] 图7是结合图1的并行过程色谱系统的系统的示意图。

[0029] 图8是用于在下游过程中使用并行过程色谱法的第一示例性配置的示意图。

[0030] 图9是用于在下游过程中使用并行过程色谱法的第二示例性配置的示意图。

[0031] 图10是用于在下游过程中使用并行过程色谱法的第三示例性配置的示意图。

[0032] 图11是深度过滤、流过精制和病毒过滤配置的示意图。

[0033] 图12是显示蛋白A洗脱池pH相比于收集的洗脱体积的图。

### 具体实施方式

[0034] 本文提供的披露涉及过程压缩,该过程压缩设计用于改善重组蛋白(特别是那些具有稳定性问题的重组蛋白)的纯化;最大限度地减少处理足迹;使用最小的设备和设施规模;并提供简单且稳健的过程,同时实现高通量和生产率,并促进半连续和/或连续生物制造,特别是小规模生物制造。本文描述了一种色谱系统,其采用非连接并行方法进行连续和半连续制造,该非连接并行方法利用两个或更多个单柱色谱撬(撬之间没有流动路径),或连接并行操作的撬,其中自动化控制系统独立地控制每个撬的处理。

[0035] 通过提供用于在并行操作的两个或更多个独立的、非连接的色谱撬上进行连续处理(加载或洗脱)的自动化并行处理系统,该系统和方法进一步追求半连续和连续制造过程,特别是在较小规模下。通过提供有利于具有稳定性问题的重组蛋白的纯化系统,所得系统比传统的大规模单柱系统和多柱流体连接系统具有优势。该系统还采用更小的柱,减少色谱材料的使用,提供更有效的柱填充和色谱材料的使用,与一次性技术兼容并有利地使用一次性技术,并且对于下游处理来说更高效、更省时且更灵活。并行撬的操作是同步的,离散事件触发撬之间的通信。所有上述优点都减少了资本投资,例如通过降低设备成本和/或处理时间,而不牺牲制造过程的稳健性。

[0036] 本文描述的并行色谱处理系统更有效地利用时间,例如通过在捕获和/或洗脱循环期间节省时间,如下文和附图中更详细地阐述,通过允许平行撬之间的重叠处理。并行系统是灵活的,例如,能够实现在一个撬上执行最后一步,同时在平行撬上执行倒数第二步,和/或通过在任何循环期间、特别是在最后循环期间增加速度来压缩处理时间。

[0037] 并行色谱处理系统支持色谱操作,这些色谱操作包括使用梯度进行加载、洗涤、洗脱和/或清洁步骤,以及稀释缓冲液浓缩物。这可能需要每个撬使用两个或更多个泵来有效地执行这些功能,这对于多柱串联系统来说很难适应和执行。

[0038] 并行色谱处理系统采用较小的柱,例如2000L或更小,减少色谱材料的使用,通过减轻柱的加载实现有效的柱填充和色谱树脂的使用,从而延长树脂的半衰期。该系统还能够有利地利用一次性技术。

[0039] 此外,并行色谱过程的自动化允许包含多个单柱撬单元的模块化系统,所有这些单柱撬单元均由中央自动化系统控制。根据制造活动的目标,可以快速有效地增加或减少撬的数量。由于柱的单独、并行操作,在单个撬故障的情况下,整个制造运行不会像在使用包括具有串联连接的流动路径的多个柱的系统的操作期间发生的情况一样中断或延迟。这一直是串行色谱系统(例如PCC)的一个问题,其中单个色谱柱故障可能会关闭包含流动路

径连接的柱(其包括一个或多个完整单元操作)的整个橇,从而延迟甚至破坏整个运行。这种故障会影响原料药的供应,从而导致成本增加并延迟向有需要的患者提供药物。

[0040] 与传统单克隆抗体疗法相比,工程改造的蛋白质具有治疗优势和改进,并且已成为理想的下一代生物治疗药物。因此,这些工程改造的蛋白正在以越来越多的各种形式构建,以满足更具挑战性的治疗适应症。工程改造的蛋白,例如多特异性蛋白,特别是双特异性抗体,由于其工程改造的结构,并且在某些情况下具有更高的滴度,因此比传统的单克隆抗体对制造过程更敏感。对于此类敏感蛋白质,在下游制造操作中使用本文描述的并行色谱处理系统提供了灵活性、柱效率和利用率以及期望的产物质量之间的良好折衷。并行色谱系统有利于在不增加处理时间的情况下以降低的滴度进行处理。使用当前的循环策略(例如PCC等串联色谱系统)纯化工程改造的蛋白可能会导致产物质量较差。与串联连接的系统相关的柱过载可能会增加柱上聚集,减少杂质的去除和/或导致杂质的形成,诸如高分子量(HMW)和/或低分子量(LMW)种类,其通常与工程改造的蛋白以及纯化柱上和过程池中的高蛋白质浓度有关。

[0041] 可以使用本文描述的并行色谱处理系统来执行下游制造过程中的一个或多个色谱操作。该系统适用于任何色谱操作。如本文和附图中所述,下游制造平台可包括一个或多个相同的色谱操作、一个或多个独特的色谱操作、和/或两者的组合。

[0042] 本文描述的并行色谱处理系统与半连续和连续处理操作兼容。来自并行色谱处理系统的输出可以选择性地联接到一个或多个下游单元操作。这可以通过直接连接、缓冲罐、储存罐、袋或适于接受来自至少一个色谱柱橇或另一单元操作的进料的其他合适的容器。还考虑了并行色谱处理系统与其他单元操作的组合以促进连续或半连续过程。这种组合最大限度地减少了处理时间、资源使用、设施占地面积和成本。例如,亲和纯化单元操作中采用的并行处理系统可以与设计用于优化处理并最小化缓冲液交换和调节的病毒灭活和中和单元操作相组合,特别是对于较小规模的制造操作。本文描述了亲和色谱洗脱缓冲液配制品,其获得处于病毒灭活所期望的pH的洗出液池。还描述了中和缓冲液系统,其能够进行稳健的团注pH调节,同时最小化中和的病毒灭活洗脱池的体积膨胀,从而实现期望的电导率。

[0043] 并行色谱系统100的一般图和示例操作流程图在图1-5中示出。系统100包括控制电路102,控制电路102被配置为控制第一色谱橇和第二色谱橇(“一个或多个橇”)104、106的操作。控制电路102可包括远离橇104、106的中央控制器108,以及对橇104、106中的每个操作的控制器110。控制器108、110之间的通信信号可以使用任何合适的网络,包括Wi-Fi、无线电、近场通信、蓝牙等,经由有线和/或无线连接来传输。因此,橇104、106中的每个、以及中央控制器108,可以包括相应的通信装置,包括发射器和接收器。在可替代形式中,控制电路102可仅包括对彼此通信的橇104、106中的每个操作的控制器110。在一个实例中,中央控制器108可以包括数据库服务器112、操作员接口114、批处理服务器116和一个或多个网络接口118。如此配置,控制电路102可操作以向橇104、106中的每个发送指令以控制其操作,并且反过来从橇104、106接收数据和其他信号。尽管示出了两个橇104、106,但是应当理解,系统100可以扩展为包括特定过程可能期望的任何数量的橇。

[0044] 如本文所使用的术语控制电路广泛地指代微控制器、计算机或基于处理器的装置与处理器、存储器和可编程输入/输出外围设备(其通常被设计为管理其他部件和装置的操作

作)的任何组合。还应理解为包括常见的附带附件装置,包括存储器、用于与其他部件和装置通信的收发器等。这些架构选项在本领域中是公知和理解的,并且在此不需要进一步描述。控制电路102可以被配置(例如,通过使用存储在存储器中的一组可执行指令/程序,如本领域技术人员将充分理解的)执行本文描述的步骤、动作和/或功能中的一个或多个。在一个实例中,可以利用诸如Python之类的开源语言来提供编程来执行本文描述的操作和功能。

[0045] 如本文所用,色谱过程的“完整循环”是指使用橇104、106之一上的柱120执行纯化蛋白质所需的步骤。例如,以结合和洗脱模式操作的色谱柱的完整循环中的典型步骤包括用与加载缓冲液相容的缓冲液平衡柱,然后将蛋白质加载到色谱介质上,并任选地用一种或多种洗涤缓冲液洗涤色谱介质。然后将结合的蛋白质从柱上洗脱。洗脱后,清洁柱,包括再生、剥离和/或冲洗的一个或多个步骤。每个完整循环包括“长步骤”,即完整循环中循环时间最长的步骤,以及一系列“较短的步骤”,它们的总循环时间较短,或者总循环时间不长于长步骤。长步骤的实例包括加载和/或洗脱步骤。此类步骤的持续时间可以更长,以最大化色谱介质上的蛋白质加载或从色谱介质完全洗脱结合的蛋白质。这一系列较短的处理步骤共同构成“生产过程循环”。较短步骤的实例包括平衡、一种或多种任选的洗涤和清洁步骤,其可包括再生、剥离和/或冲洗步骤中的一个或多个。当加载或洗脱步骤不作为长步骤操作时,它们也包含在较短步骤的集合中。可以选择构成生产过程循环的短步骤的流速,使得生产过程循环或者与长步骤循环一致地结束,或者在长步骤循环结束之前的某个点结束。在后一种情况下,可以将时间间隔添加到生产过程循环以使一个橇104、106上的生产过程循环与并行橇104、106上的长步骤循环同步。

[0046] 图2中示出了并行色谱系统100的第一示例性操作过程200,其中,例如对于亲和和色谱,最长步骤是加载柱。尽管参考两个橇104、106描述了该过程,但是将容易理解该过程可以根据需要扩展。

[0047] 在第一步骤202中,控制电路102引导从共同原料到第一橇104上的加载,直到预定量的原料被加载到第一橇104的柱上。例如,流量传感器、天平、定时器或其他传感器可以监测正在分配的原料以确定何时已经分配了适合于第一橇104的柱的预定体积的原料。当控制电路102确定预定量的原料已经加载到第一橇104上时,在第二步骤204中,控制电路102生成/发送/接收同步信号以开始将共同原料加载到第二橇106上。例如,第一橇104的控制器110可以生成同步信号并将其发送到中央控制器108。可替代地,第一橇104的控制器110可以生成同步信号并将其直接发送到第二橇106。如本文所使用的,同步信号可以是在两个或更多个单元之间通信的离散事件触发器。同步信号可用于开始对任何单元执行指定的一组自动处理。此后,在第三步骤206中,第一橇104执行生产过程循环(例如,洗涤、洗脱、剥离、再生、冲洗、平衡中的一者或多者),同时将预定量的原料加载并结合到第二橇106的柱上,并且在第四步骤208中,第一橇104等待从第二橇106生成表示加载完成的同步信号,并且可以在第一橇104的柱上开始加载。在第五步骤210中,当第一橇104被加载时,第二橇106等待根据第二步骤204的同步信号。当生成用于第一橇104的同步信号时,在第六步骤212中,控制电路102引导原料至第二橇106的加载,同时第一橇104执行生产过程循环。此后,当控制电路102确定预定量的原料已经加载到第二橇106中的柱上时,在第七步骤214中,控制电路102生成/发送/接收第二同步信号,并且在第八步骤216,第二橇106在第一橇104被加

载的同时执行生产过程循环。利用这种配置,原料的加载和生产过程循环的执行可以在两个或更多个橇104、106之间连续地切换,从而提供连续的并行处理方法。

[0048] 图3示出了使用两个或更多个配备有亲和色谱柱120的橇104、106的并行处理系统100的循环过程的流程图,其中色谱柱120的加载时间是单元操作中的长步骤。每个橇104、106被示出为包括两个泵122、124,一个专用于加载,另一个用于所有其他处理步骤。然而,应当理解,第一泵122和第二泵124可以是单个泵,或者如果需要,对于每个泵122、124可以包括一个或多个泵。可替代地,如果需要,泵122、124可以指可以选择性地联接到橇104、106中的每个的一个或多个泵。

[0049] 如下文更详细地描述,在第一橇104(柱1)上执行诸如收获的宿主细胞培养液(HCCF)等原料的加载的长步骤时,在刚刚完成加载循环的第二橇106(柱2)上执行处理循环的较小步骤(例如,洗涤、洗脱、剥离、再生和平衡步骤中的一者或多者)。在处理循环中,通过平衡步骤的洗涤全部在加载循环的时间长度内或更短的时间内进行。可以将时间间隔添加到处理循环以使处理循环时间与加载循环同步。例如,一旦所期望材料已从第二橇106(柱2)洗脱并且柱120已准备好重新加载,则第二橇106(柱2)要么刚刚完成处理循环,要么正在等待同步信号,以便在第一橇(柱1)加载完成时开始加载。

[0050] “完整循环”是指从原料加载到橇104、106之一上的柱120的冲洗/平衡的完整过程。例如,“完整并行循环”指的是并行操作的至少两个橇104、106中的每个的全完整循环,如图3所示。完整循环的步骤可以用两个或更多个泵来执行。可替代地,可以使用单个泵和定时阀切换来执行完整循环中的步骤,以从两个或三个入口通道提供受管理的计量液体溶液。

[0051] 图3显示了完整并行循环,包括柱1和柱2的完整循环,其中柱是以结合和洗脱模式运行的亲和色谱柱。加载步骤是长步骤,洗涤-平衡步骤是构成生产过程循环的短步骤。该过程开始于第一橇104的柱120的第二泵124执行平衡步骤220,之后第一泵122执行加载步骤222。在第一橇104的柱120的加载步骤222已经完成之后,并且在用第二泵124完成平衡步骤223之后,用第一泵122开始第二橇106的柱120的加载步骤224。这是通过如上所述的同步信号来实现的。当第二橇106的柱120正在加载时,第一橇104的第二泵124可以顺序地执行任选的第一、第二和第三洗涤步骤226、228、230、洗脱步骤232、再生步骤234和冲洗步骤236。这完成了第一橇104的柱120的完整循环。如果需要,为了解决过程200中较长的加载时间,第一橇104的第二泵124然后可以关闭238持续预定的时间间隔。然后,第二泵124执行平衡步骤240,该平衡步骤240通常例如在0-10分钟内,与第二橇106的柱120的加载步骤224同时结束,以开始第一橇104的后续循环。在第二橇106的柱120的加载步骤224完成之后,开始第一橇104的柱120的另一加载步骤242。这是通过如上所述的同步信号来实现的。当第一橇104的柱120正在加载时,第二橇106的第二泵124可以顺序地执行任选的第一、第二和第三洗涤步骤244、246、248、洗脱步骤250、再生步骤252和冲洗步骤254。这完成了第二橇106的柱120的完整循环。与第一橇104一样,如果需要,第二橇106的第二泵124然后可以关闭256持续预定的时间间隔,并且随后执行平衡步骤258,该平衡步骤258通常与第一橇104的柱120的加载步骤242同时结束。

[0052] 在一个实施例中,流速大于或等于50cm/小时。在一个实施例中,流速是至少1000cm/小时。在一个实施例中,流速是100至1000cm/小时。在一个实施例中,流速是200至

1000cm/小时。在一个实施例中,流速是300至1000cm/小时。在一个实施例中,流速是400至1000cm/小时。在一个实施例中,流速是500至1000cm/小时。在一个实施例中,流速是600至1000cm/小时。在一个实施例中,流速是700至1000cm/小时。在一个实施例中,流速是800至1000cm/小时。在一个实施例中,流速是900至1000cm/小时。在一个实施例中,流速是100至900cm/小时。在一个实施例中,流速是200至900cm/小时。在一个实施例中,流速是300至900cm/小时。在一个实施例中,流速是400至900cm/小时。在一个实施例中,流速是500至900cm/小时。在一个实施例中,流速是600至900cm/小时。在一个实施例中,流速是700至900cm/小时。在一个实施例中,流速是800至900cm/小时。在一个实施例中,流速是100至800cm/小时。在一个实施例中,流速是200至800cm/小时。在一个实施例中,流速是300至800cm/小时。在一个实施例中,流速是400至800cm/小时。在一个实施例中,流速是500至800cm/小时。在一个实施例中,流速是600至800cm/小时。在一个实施例中,流速是700至800cm/小时。在一个实施例中,流速是100至700cm/小时。在一个实施例中,流速是200至700cm/小时。在一个实施例中,流速是300至700cm/小时。在一个实施例中,流速是400至700cm/小时。在一个实施例中,流速是500至700cm/小时。在一个实施例中,流速是600至700cm/小时。在一个实施例中,流速是100至600cm/小时。在一个实施例中,流速是200至600cm/小时。在一个实施例中,流速是300至600cm/小时。在一个实施例中,流速是400至600cm/小时。在一个实施例中,流速是500至600cm/小时。在一个实施例中,流速是100至500cm/小时。在一个实施例中,流速是200至500cm/小时。在一个实施例中,流速是300至500cm/小时。在一个实施例中,流速是400至500cm/小时。在一个实施例中,流速是100至400cm/小时。在一个实施例中,流速是200至400cm/小时。在一个实施例中,流速是300至400cm/小时。在一个实施例中,流速是100至300cm/小时。在一个实施例中,流速是200至300cm/小时。在一个实施例中,流速是100至100cm/小时。在一个实施例中,流速是50至100cm/小时。在一个实施例中,流速是50至200cm/小时。在一个实施例中,流速是50至300cm/小时。在一个实施例中,流速是50至400cm/小时。在一个实施例中,流速是50至500cm/小时。在一个实施例中,流速是50至600cm/小时。在一个实施例中,流速是50至700cm/小时。在一个实施例中,流速是50至800cm/小时。在一个实施例中,流速是50至900cm/小时。在一个实施例中,流速是50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1000cm/小时。

[0053] 加载时间将取决于柱120的尺寸、原料中蛋白质的浓度、流速和/或所使用的色谱介质的结合容量。加载时间应短于允许的池保持时间(蛋白质在加载池中的稳定性)。加载时间应满足总体过程要求,例如,目标处理时间。例如,处理时间可以在24小时内或在单个轮换内。取决于原料中的重组蛋白浓度,加载时间可以是约2小时或更短至约24小时。

[0054] 在一个实施例中,加载时间是约1小时至约24小时。在一个实施例中,加载时间是约12小时至约24小时。在一个实施例中,加载时间是约8小时至约12小时。在一个实施例中,加载时间是约5小时至约8小时。在一个实施例中,加载时间是约1小时至约5小时。在一个实施例中,加载时间是约2小时至约5小时。在一个实施例中,加载时间是约3小时至约5小时。在一个实施例中,加载时间是约4小时至约5小时。在一个实施例中,加载时间是约1小时至约4小时。在一个实施例中,加载时间是约2小时至约4小时。在一个实施例中,加载时间是约3小时至约4小时。在一个实施例中,加载时间是约1小时至约3小时。在一个实施例中,加载

时间是约2小时至约3小时。在一个实施例中,加载时间是约1至2小时。在一个实施例中,加载时间是约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约16小时、约18小时或约24小时。加载后,亲和柱120通过使用第二泵124执行的洗涤、洗脱、再生、冲洗和平衡步骤进行处理。控制泵122、124的阀系统被配置为允许泵122、124的单独操作,如下文参考图11和12所讨论的。

[0055] 为了满足目标处理时间,流速可以在50至1000cm/小时内,并且加载时间可以在1至24小时内。

[0056] 完整并行循环可以是24小时或单个轮换。在一个实施例中,完整并行循环是约5小时至约24小时。在一个实施例中,完整并行循环是12至24小时。在一个实施例中,完整并行循环是8至12小时。在一个实施例中,完整并行循环是5至8小时。在一个实施例中,完整并行循环是5至7小时。在一个实施例中,完整并行循环是5至6小时。在一个实施例中,完整并行循环是6至8小时。在一个实施例中,完整并行循环是6至7小时。在一个实施例中,完整并行循环是5小时或更短。在一个实施例中,完整并行循环是1至5小时。在一个实施例中,完整并行循环是1至5小时。在一个实施例中,完整循环是2至5小时。在一个实施例中,完整循环是3至5个循环。在一个实施例中,完整循环是4至5小时。在一个实施例中,完整循环是2至5小时。在一个实施例中,完整循环是3至5小时。在一个实施例中,完整循环是4至5小时。在一个实施例中,完整循环是3至5小时。通常,每日并行循环数是1至5。

[0057] 当纯化重组蛋白时,捕获色谱通常在细胞培养物收获后进行,并且用于从源培养基(例如收获的细胞培养液)中分离和浓缩目的蛋白质。在此捕获阶段期间使用的色谱方法以结合和洗脱模式进行,条件是色谱介质(树脂或膜)对与色谱介质结合的目的蛋白质具有亲和力或选择性,而那些亲和力较弱的组分和/或杂质则流过或没有那么强的结合,并且可以通过在洗脱前洗涤色谱材料而被去除或至少减少。

[0058] 捕获色谱材料的实例包括但不限于亲和色谱(AC)、尺寸排阻色谱(SEC)、离子交换色谱(IEX)、疏水相互作用色谱(HIC)、多模式色谱(MMC)等。此类材料是本领域已知的并且可以是商购的。

[0059] 亲和色谱通常在生物制造过程中用作初始捕获步骤,以分离和浓缩具有Fc组分的目的重组蛋白。这种亲和色谱材料的示例包括那些利用以下的那些:葡萄球菌蛋白如蛋白A、蛋白G、蛋白A/G和蛋白L;底物结合性捕获机构;抗体或抗体片段结合性捕获机构;适体结合性捕获机构;辅因子结合性捕获机构;等等。固定化金属亲和色谱可用于捕获对金属离子具有亲和性或已经被工程改造为对金属离子具有亲和性的蛋白。

[0060] 在一个实施例中,两个或更多个色谱柱橧104、106各自包含单个捕获色谱柱120。在一个实施例中,捕获色谱柱120是亲和色谱柱。在一个实施例中,亲和色谱柱120是蛋白A、蛋白G或蛋白L色谱柱。在一个实施例中,亲和色谱柱120是蛋白A色谱柱。

[0061] 亲和色谱材料可从许多供应商处购买到。例如,MABSELECT™ SURE蛋白A、蛋白A Sepharose FAST FLOW™(赛提瓦公司(Cytiva),马尔堡(Marborough),马萨诸塞州),PROSEP-A™(默克密理博公司(Merck Millipore),英国),TOYOPEARL™650M蛋白A(托索哈斯公司(TosoHass Co.),费城,宾夕法尼亚州)。

[0062] 捕获色谱操作优选使用本文所述的连续处理色谱方法进行。该方法利用自动并行处理系统,该系统允许并行循环的两个或更多个色谱柱的连续处理(加载到洗脱以及任何

相关的柱处理和制备步骤)。这种循环策略允许连续处理传入的原料,通常是收获的宿主细胞培养液(HCCP),并使用较小的色谱柱。此过程允许模块化系统,该模块化系统包括至少两个且优选地多个单柱橇104、106,全部由中央自动化系统108控制,该中央自动化系统提供了根据制造目标快速有效地增加或减少橇104、106数量的灵活性。色谱柱切换可以节省捕获循环中的时间,并且该过程相对简单且稳健,并且不依赖于柱过载。

[0063] 色谱柱120可以在与含有待纯化的重组蛋白的原料接触之前用合适的缓冲液平衡。示例性平衡缓冲液包括HEPES、Tris、磷酸盐、柠檬酸盐、MES、BES、PIPES、Tricine、Bicine、TES、TAPSO、MOPS等,其浓度、电导率和/或pH对于待纯化的材料而言是适当的。

[0064] 一旦将原料加载到柱120上,则在洗脱步骤之前任选地用一种或多种洗涤溶液洗涤柱。可以执行洗涤步骤以结合仍然在柱上但还没有结合到色谱材料上的任何目的蛋白质,从间隙空间冲洗出加载材料,去除已经结合到色谱介质上和/或在色谱介质中的杂质,和/或准备用于洗脱的柱120。根据洗涤步骤的目的和数量,可以使用多种洗涤溶液。洗涤缓冲液可以包括使用平衡缓冲液和加载缓冲液。缓冲液配制品包括tris缓冲液或磷酸盐;盐,例如乙酸钠、柠檬酸钠或氯化钠;二价阳离子例如钙、镁或镍、洗涤剂聚合物、氨基酸、糖醇和/或离液剂等。当使用多种洗涤缓冲液时,洗涤缓冲液配制品的组成和/或浓度可以根据需要相同或不同。洗涤在适当的pH下进行,通常在中性pH下进行,但也可以根据需要在更高或更低的pH下进行。

[0065] 通过改变缓冲液条件,将结合的重组蛋白从柱120洗脱。洗脱可以是等度、梯度或其他合适的方法或方法的组合。洗脱通常在低pH条件下进行,洗脱缓冲液包括酸,例如酸性、柠檬酸、甲酸、磷酸,单独或与缓冲液、氨基酸、盐等组合。

[0066] 用于清洁和再生捕获色谱介质的合适方法和缓冲液是已知的。

[0067] 捕获色谱可以在细胞培养稳态期间连续运行。小型缓冲容器(缓冲袋)可用于缓冲在流方面的微小变化并在生物反应器和收获单元操作之间提供空气隔离。捕获色谱可以在收获单元操作期间连续运行或从收获保持容器运行。

[0068] 亲和纯化后,重组蛋白通常进行一个或多个另外的纯化步骤,以进一步从剩余的污染物和杂质中分离出目的蛋白。术语“精制”或“进行精制”在本文中用于指一个或多个色谱步骤,所述步骤用于除去残留的污染物和杂质,例如DNA、宿主细胞蛋白;产物相关的杂质、聚集体、病毒等,以及有利于pH、浓度和缓冲液配制品的变化,使目的重组蛋白更接近最终所期望的纯度。

[0069] 精制色谱单元操作采用色谱介质,诸如树脂和/或膜,其含有可用于以下的药剂:结合和洗脱模式(其中目的蛋白质与色谱介质结合并在污染物和杂质流过色谱介质或从色谱介质中洗去后洗脱)、前沿或过载模式(其中将含有目的蛋白质的溶液加载到柱上,直到吸附位点被占据并且对固定相具有最小亲和力的种类(目的蛋白质)开始洗脱)、流过模式(目的蛋白质流过色谱材料而不发生结合,并且污染物和杂质与色谱介质结合)或任何其他模式或模式组合。用于精制步骤的色谱模式的实例包括但不限于离子交换色谱(IEX),例如阴离子交换色谱(AEX)和阳离子交换色谱(CEX);疏水相互作用色谱(HIC);混合模式或多模式色谱(MMC)、羟基磷灰石色谱(HA);反相色谱、亲和色谱(AC)和凝胶过滤。

[0070] 每个精制色谱单元操作可以以相同或不同的配置和/或不同的模式运行。每个色谱单元可以作为单个未连接单元、多个连接单元和/或组合单元来运行。例如,单色谱柱可

以在交错循环系统、逆流加载(周期性逆流色谱)中运行,或者作为多柱逆流溶剂梯度纯化过程(MCSGP)运行。

[0071] 多个色谱单元操作(通常是一个、两个或三个,每个执行相同或不同的功能)根据制造过程的要求进行组合。离子交换色谱基于带电表面之间的静电相互作用,根据不同的吸收和解吸将目的蛋白质与杂质分离。“阳离子交换色谱”是指在带负电荷且具有游离阳离子的固相介质上进行的色谱用于与通过或穿过固相的水溶液中的阳离子交换。电荷可能是通过将一个或多个带电配体附接至该固相(例如通过共价连接)上来提供。可替代地或此外,电荷可以是该固相的固有特性(例如,对于硅胶而言,它带有总体的负电荷)。阳离子交换色谱通常以结合和洗脱模式运行,许多目的蛋白质的高等电点(pI)能够实现与色谱材料结合。阳离子交换色谱也可以在流过模式下运行。CEX色谱法通常用于去除高分子量(HMW)污染物、过程相关杂质和/或病毒清除。市售阳离子交换介质是可用的并且包括但不限于固定在琼脂糖上的磺丙基(SP)(例如SP-SEPHAROSE FAST FLOW™、SP-SEPHAROSE FAST FLOW XL™或SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™、CAPTO S™、CAPTO SP ImpRes™、CAPTO S ImpAct™(赛提瓦公司)、FRACTOGEL-SO3™, FRACTOGEL-SE HICAP™和FRACTOPREP™(EMD默克公司(EMD Merck), 达姆施塔特(Darmstadt), 德国)、TOYOPEARL® XS, TOYOPEARL® HS(托什生物科学公司(Tosh Bioscience), 普鲁士国王区(King of Prussia), 宾夕法尼亚州)、UNOsphere™(伯乐公司(BioRad), 海格立斯(Hercules), 加利福尼亚州)、S Ceramic Hyper D™F(颇尔公司(Pall), 华盛顿港, 纽约)、POROS™(赛默飞世尔公司(ThermoFisher), 沃尔瑟姆, 马萨诸塞州)。

[0072] “阴离子交换色谱”是指在带正电荷且具有游离阴离子的固相介质上进行的色谱用于与通过或穿过固相的水溶液中的阴离子交换。阴离子交换色谱通常以流过模式运行。由于许多目的蛋白质的高pI,它们不会与AEX色谱材料结合。例如,AEX色谱用于病毒清除和杂质去除。市售阴离子交换介质是可用的并且包括但不限于固定在琼脂糖上的磺丙基(SP)(Source 15Q、Capto™Q、Q-SEPHAROSE FAST FLOW™(赛提瓦公司)、FRACTOGEL EDM TMAE™、FRACTOGEL EDM DEAE™(EMD默克公司)、TOYOPEARL Super Q®(托什生物科学公司)、POROS HQ™、POROS XQ™(赛默飞世尔公司)。

[0073] 混合模式或多模式色谱(MMC)是指在固相介质上进行的色谱,它利用了相互作用机制的组合,例如离子交换(CEX或AEX)和疏水相互作用等。可以使用市售的多模式色谱介质,例如Capto™附着阴离子交换多模式(Capto™ Adhere Anion Exchange Multi Mode)。

[0074] 疏水相互作用色谱是指在固相介质上进行的色谱,该色谱利用疏水配体和目的蛋白质表面上的疏水残基之间的相互作用。市售疏水相互作用色谱介质包括但不限于苯基 Sepharose™、Tosoh己基和Capto™苯基。

[0075] 羟基磷灰石色谱是指在固相介质上进行的色谱,其利用带正电荷的钙和带负电荷的磷酸盐,并且根据蛋白质的pI和缓冲液的pH可以充当阳离子或阴离子。

[0076] 含有目的重组蛋白的洗出液流或池可以加载到精制色谱柱上,特别是以目的蛋白与色谱介质结合的方式。洗出液流可以以目的蛋白质不与色谱介质结合的方式加载到精制色谱柱上。洗出液流或池可以源自先前的单元操作,例如细胞培养收获液、亲和色谱、病毒灭活、病毒过滤、深度过滤和/或另一精制色谱操作。可以将另外的缓冲液添加到洗出液或

池中,使得最终加载处于期望的浓度和/或配制。

[0077] 用于精制单元操作的加载材料可以是来自病毒灭活单元操作、特别是来自低pH病毒灭活单元操作的池或洗出液,例如中和的病毒灭活池或洗出液。

[0078] 一方面,两个或更多个精制色谱柱可以串联连接并且作为一个精制色谱单元以流过模式运行。组合的柱可作为完整的精制色谱单元操作来操作,或与以结合和洗脱模式、前沿模式和/或流过模式运行的一个或多个另外精制色谱单元组合使用。

[0079] 如本文所述,一个或多个精制色谱单元操作可以使用本文所述的利用并行处理系统100的连续过程色谱方法来执行。

[0080] 两个或更多个相似的色谱柱橧104、106可以并行运行并且由如本文所述的连续并行色谱系统100控制。在一个实施例中,两个或更多个相似的色谱柱橧104、106各自包含相同类型的精制色谱柱120。图4示出了使用两个或更多个橧104、106的示例性系统的循环过程,每个橧配备有以结合和洗脱模式操作的阳离子交换色谱柱,其中色谱柱的洗脱时间是单元操作循环中的长步骤。

[0081] 图4中示出了并行色谱系统100的示例操作过程300,其中,例如对于精制色谱,最长步骤是洗脱柱。尽管参考两个橧104、106描述了该过程,但是将容易理解该过程可以根据需要扩展。

[0082] 在第一步骤302中,控制电路102引导第一橧104的加载柱的洗脱,直到从柱洗脱预定量的纯化蛋白质。例如,如下所述,流量传感器、天平、定时器或其他传感器可以监测洗出液以确定何时已洗脱所期望量的目的蛋白质。当控制电路102确定预定的蛋白质滴度已经从第一橧104洗脱时,在第二步骤304中,控制电路102生成/发送/接收同步信号以开始从第二橧106的柱洗脱蛋白质。例如,第一橧104的控制器110可以生成同步信号并将其发送到中央控制器108。可替代地,第一橧104的控制器110可以生成同步信号并将其直接发送到第二橧106。此后,在第三步骤306中,第一橧104执行生产过程循环(例如,剥离、再生、冲洗、平衡、加载和洗涤步骤中的一者或多者),同时预定的蛋白质滴度从第二橧106的柱洗脱,并且在第四步骤308中,第一橧104等待从第二橧106生成表示洗脱完成的同步信号,并且可以在第一橧104的柱上开始洗脱。在第五步骤310中,当第一橧104被洗脱时,第二橧106等待根据第二步骤304生成的同步信号。当生成第一橧104的同步信号时,在第六步骤312中,控制电路102引导蛋白质从第二橧106的柱洗脱,同时第一橧104执行第三步骤306中的生产过程循环。此后,当控制电路102确定预定的蛋白质滴度已经从第二橧106的柱洗脱时,在第七步骤314中,控制电路102生成/发送/接收第二同步信号,并且在第八步骤316,第二橧106在第一橧104被洗脱的同时执行生产过程循环。利用这种配置,蛋白质的洗脱和生产过程循环的执行可以在两个或更多个橧104、106之间连续地切换,从而提供连续的并行处理方法。

[0083] 图5示出了示出根据图4的过程300的橧104、106中的每个的处理步骤的流程图。每个橧104、106包括具有相关联的第一和第二泵122、124的色谱柱120,其中一个泵124专用于洗脱,而一个泵122用于所有其他处理步骤。然而,应当理解,第一泵122和第二泵124可以是单个泵,或者如果需要,对于每个泵122、124可以包括一个或多个泵。可替代地,如果需要,泵122、124可以指可以选择性地联接到橧104、106中的每个的一个或多个泵。

[0084] 在这种形式中,系统100以梯度洗脱的结合和洗脱模式操作。该过程开始于第一橧104的第一泵122执行平衡步骤320、加载步骤322和一个或多个任选的洗涤步骤324、326、

328.在完成第一橧104的柱120的洗涤步骤328之后,第一橧104的第二泵124开始柱120的洗脱步骤330。当第一橧104的柱120洗脱时,第二橧106的第一泵122顺序地执行平衡步骤332、加载步骤334以及第一、第二和第三任选的洗涤步骤336、338、340。此后,如果需要考虑过程300中较长的洗脱时间,则第二橧106的第一泵122然后可以关闭342持续预定的时间间隔。在第一橧104的洗脱步骤330完成后,第二橧106的第二泵124开始柱120的洗脱步骤344。这是通过如上所述的同步信号来实现的。当第二橧106的柱120洗脱时,第一橧104的第一泵122执行再生步骤346和冲洗步骤348以完成柱120的完整循环。然后,第一泵122开始新的循环,其中第一橧104的第一泵122执行平衡步骤350、加载步骤352、以及第一、第二和第三任选的洗涤步骤354、356、358,随后第一泵122关闭360持续预定的时间间隔(如果需要),以解释第二橧106的柱120的较长洗脱时间。在第二橧106的洗脱步骤344完成后,第一橧104的第二泵124开始柱120的另一洗脱步骤362。这是通过如上所述的同步信号来实现的。当第一橧104的柱120洗脱时,第二橧104的第一泵122执行再生步骤364和冲洗步骤366以完成柱120的完整循环。

[0085] 在处理循环中,再生步骤到洗涤步骤均在洗脱循环的时间长度内或更短的时间内进行。这样,可以将时间间隔添加到处理循环以使处理循环时间与洗脱循环同步。循环可以被定义为最适合过程基础设施中的任何参数,例如,柱120的尺寸、结合蛋白的浓度、所使用的色谱介质的结合容量、和/或洗脱池中的所期望滴度。

[0086] 洗脱时间将取决于色谱模式、结合的蛋白质的浓度、任何梯度的斜率或变化率、和/或所使用的色谱介质的结合容量。洗脱时间应满足总体过程要求,例如,目标处理时间。例如,这样的目标处理时间可以在24小时内或1个轮换内。通常,这样的洗脱时间是约2小时或更短,取决于与色谱介质结合的蛋白质的量。在一个实施例中,每个完整并行循环通常在5至8小时内完成。

[0087] 在一个实施例中,洗脱时间是约1小时至约24小时。在一个实施例中,洗脱时间是约12小时至约24小时。在一个实施例中,洗脱时间是约8小时至约12小时。在一个实施例中,加载时间是约5小时至约8小时。在一个实施例中,洗脱时间是约1小时至约5小时。在一个实施例中,洗脱时间是约2小时至约5小时。在一个实施例中,洗脱时间是约3小时至约5小时。在一个实施例中,洗脱时间是约4小时至约5小时。在一个实施例中,洗脱时间是约1小时至约4小时。在一个实施例中,洗脱时间是约2小时至约4小时。在一个实施例中,洗脱时间是约3小时至约4小时。在一个实施例中,洗脱时间是约1小时至约3小时。在一个实施例中,洗脱时间是约2小时至约3小时。在一个实施例中,洗脱时间是约1至2小时。在一个实施例中,洗脱时间是约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约16小时、约18小时或约24小时。洗脱之后,精制色谱柱120通过使用第一泵122执行的再生、冲洗、平衡、加载和洗涤步骤进行处理。

[0088] 流速应满足工程要求,例如,目标处理时间。例如,这样的目标流速可以在50至1000cm/小时内。在一个实施例中,流速大于或等于50cm/小时。在一个实施例中,流速是至少1000cm/小时。在一个实施例中,流速是100至1000cm/小时。在一个实施例中,流速是200至1000cm/小时。在一个实施例中,流速是300至1000cm/小时。在一个实施例中,流速是400至1000cm/小时。在一个实施例中,流速是500至1000cm/小时。在一个实施例中,流速是600至1000cm/小时。在一个实施例中,流速是700至1000cm/小时。在一个实施例中,流速是800

至1000cm/小时。在一个实施例中,流速是900至1000cm/小时。在一个实施例中,流速是100至900cm/小时。在一个实施例中,流速是200至900cm/小时。在一个实施例中,流速是300至900cm/小时。在一个实施例中,流速是400至900cm/小时。在一个实施例中,流速是500至900cm/小时。在一个实施例中,流速是600至900cm/小时。在一个实施例中,流速是700至900cm/小时。在一个实施例中,流速是800至900cm/小时。在一个实施例中,流速是100至800cm/小时。在一个实施例中,流速是200至800cm/小时。在一个实施例中,流速是300至800cm/小时。在一个实施例中,流速是400至800cm/小时。在一个实施例中,流速是500至800cm/小时。在一个实施例中,流速是600至800cm/小时。在一个实施例中,流速是700至800cm/小时。在一个实施例中,流速是100至700cm/小时。在一个实施例中,流速是200至700cm/小时。在一个实施例中,流速是300至700cm/小时。在一个实施例中,流速是400至700cm/小时。在一个实施例中,流速是500至700cm/小时。在一个实施例中,流速是600至700cm/小时。在一个实施例中,流速是100至600cm/小时。在一个实施例中,流速是200至600cm/小时。在一个实施例中,流速是300至600cm/小时。在一个实施例中,流速是400至600cm/小时。在一个实施例中,流速是500至600cm/小时。在一个实施例中,流速是100至500cm/小时。在一个实施例中,流速是200至500cm/小时。在一个实施例中,流速是300至500cm/小时。在一个实施例中,流速是400至500cm/小时。在一个实施例中,流速是100至400cm/小时。在一个实施例中,流速是200至400cm/小时。在一个实施例中,流速是300至400cm/小时。在一个实施例中,流速是100至300cm/小时。在一个实施例中,流速是200至300cm/小时。在一个实施例中,流速是100至100cm/小时。在一个实施例中,流速是50至100cm/小时。在一个实施例中,流速是50至200cm/小时。在一个实施例中,流速是50至300cm/小时。在一个实施例中,流速是50至400cm/小时。在一个实施例中,流速是50至500cm/小时。在一个实施例中,流速是50至600cm/小时。在一个实施例中,流速是50至700cm/小时。在一个实施例中,流速是50至800cm/小时。在一个实施例中,流速是50至900cm/小时。在一个实施例中,流速是50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1000cm/小时。

[0089] 为了满足目标处理时间,流速可以在50至1000cm/小时内,并且洗脱时间可以在1至24小时内。

[0090] 完整并行循环可以是24小时或单个轮换。在一个实施例中,完整并行循环是约5小时至约24小时。在一个实施例中,完整并行循环是12至24小时。在一个实施例中,完整并行循环是8至12小时。在一个实施例中,完整并行循环是5至8小时。在一个实施例中,完整并行循环是5至7小时。在一个实施例中,完整并行循环是5至6小时。在一个实施例中,完整并行循环是6至8小时。在一个实施例中,完整并行循环是6至7小时。在一个实施例中,完整并行循环是5小时或更短。在一个实施例中,完整并行循环是1至5小时。在一个实施例中,完整并行循环是1至5小时。在一个实施例中,完整循环是2至5小时。在一个实施例中,完整循环是3至5个循环。在一个实施例中,完整循环是4至5小时。在一个实施例中,完整循环是2至5小时。在一个实施例中,完整循环是3至5小时。在一个实施例中,完整循环是4至5小时。在一个实施例中,完整循环是3至5小时。通常,每日并行循环数是1至5。

[0091] 可以通过改变缓冲液条件,将结合的重组蛋白从柱120洗脱。洗脱可以是等度、梯度或其他合适的方法或方法的组合。

[0092] 梯度的速率或斜率可以测量为mM盐/洗脱缓冲液柱体积(CV)。例如,对于从0mM至1000mM的氯化钠梯度,用于洗脱的典型斜率范围为5mM盐/CV至50mM/CV。在一个实施例中,斜率是从5mM/CV至20mM/CV。洗脱持续时间通常大于0CV至100CV。在一个实施例中,洗脱持续时间大于0CV至20CV。

[0093] 色谱柱120可以在与含有待纯化的重组蛋白的原料接触之前用合适的缓冲液平衡。示例性平衡缓冲液包括HEPES、Tris、磷酸盐、柠檬酸盐、MES、BES、PIPES、Tricine、Bicine、TES、TAPSO、MOPS等,其浓度、电导率和/或pH对于待纯化的材料而言是适当的。

[0094] 一旦将原料加载到柱120上,则在洗脱步骤之前任选地用一种或多种洗涤溶液洗涤柱。可以执行洗涤步骤以结合仍然在柱上但还没有结合到色谱材料上的任何目的蛋白质,从间隙空间冲洗出加载材料,去除已经结合到色谱介质上和/或在色谱介质中的杂质,和/或准备用于洗脱的柱120。根据洗涤步骤的目的和数量,可以使用多种洗涤溶液。洗涤缓冲液可以包括使用平衡缓冲液和加载缓冲液。典型的缓冲液配制品包括tris缓冲液或磷酸盐;盐,例如乙酸钠、柠檬酸钠或氯化钠;二价阳离子例如钙、镁或镍、洗涤剂聚合物、氨基酸、糖醇和/或离液剂等。当使用多种洗涤缓冲液时,洗涤缓冲液配制品的组成和/或浓度可以根据需要不同。洗涤在适当的pH下进行,通常在中性pH下进行,但也可以根据需要在更高或更低的pH下进行。

[0095] 通过改变缓冲液条件,将结合的重组蛋白从柱120洗脱。洗脱可以是等度、梯度或其他合适的方法或方法的组合。洗脱在适合待洗脱的蛋白质的pH、盐和/或缓冲液条件下进行。典型的缓冲液配制品包括tris缓冲液或磷酸盐;盐,例如乙酸钠、柠檬酸钠或氯化钠;二价阳离子例如钙、镁或镍、洗涤剂聚合物、氨基酸、糖醇和/或离液剂等。

[0096] 用于清洁和再生精制色谱介质的合适方法和缓冲液是已知的。

[0097] 多个色谱单元操作,通常是一个、两个或三个(每个执行不同的功能),根据制造过程的要求进行组合。离子交换色谱基于带电表面之间的静电相互作用,根据不同的吸收和解吸将目的蛋白质与杂质分离。“阳离子交换色谱”是指在带负电荷且具有游离阳离子的固相介质上进行的色谱用于与通过或穿过固相的水溶液中的阳离子交换。电荷可能是通过将一个或多个带电配体附接至该固相(例如通过共价连接)上来提供。可替代地或此外,电荷可以是该固相的固有特性(例如,对于硅胶而言,它带有总体的负电荷)。阳离子交换色谱通常以结合和洗脱模式运行,许多目的蛋白质的高pI能够实现与色谱材料结合。阳离子交换色谱也可以在流过模式下运行。CEX色谱法通常用于去除高分子量(HMW)污染物、过程相关杂质和/或病毒清除。市售阳离子交换介质是可用的并且包括但不限于固定在琼脂糖上的磺丙基(SP)(例如SP-SEPHAROSE FAST FLOW™、SP-SEPHAROSE FAST FLOW XL™或SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™、CAPTO S™、CAPTO S ImpRes™、CAPTO S ImpAct™(赛提瓦公司)、FRACTOGEL-S03™, FRACTOGEL-SE HICAP™和FRACTOPREP™(EMD默克公司(EMD Merck),达姆施塔特(Darmstadt),德国)、TOYOPEARL® XS, TOYOPEARL® HS(托什生物科学公司(Tosh Bioscience),普鲁士国王区(King of Prussia),宾夕法尼亚州)、UNOsphere™(伯乐公司(BioRad),海格立斯(Hercules),加利福尼亚州)、S Ceramic Hyper D™F(颇尔公司(Pall),华盛顿港,纽约)、POROS™(赛默飞世尔公司(ThermoFisher),沃尔瑟姆,马萨诸塞州)。

[0098] “阴离子交换色谱”是指在带正电荷且具有游离阴离子的固相介质上进行的色谱

用于与通过或穿过固相的水溶液中的阴离子交换。阴离子交换色谱通常以流过模式运行。由于许多目的蛋白质的高pI,它们不会与AEX色谱材料结合。例如,AEX色谱用于病毒清除和杂质去除。市售阴离子交换介质是可用的并且包括但不限于固定在琼脂糖上的磺丙基(SP)(Source 15Q、Capto™Q、Q-SEPHAROSE FAST FLOW™(赛提瓦公司)、FRACTOGEL EDM TMAE™、FRACTOGEL EDM DEAE™(EMD默克公司)、TOYOPEARL Super Q®(托什生物科学公司)、POROS HQ™、POROS XQ™、(赛默飞世尔公司)。

[0099] 混合模式或多模式色谱(MMC)是指在固相介质上进行的色谱,它利用了相互作用机制的组合,例如离子交换(CEX或AEX)和疏水相互作用等。可以使用市售的多模式色谱介质,包括但不限于Capto™附着阴离子交换多模式、PPA Hypercel和HEA Hypercel。

[0100] 疏水相互作用色谱是指在固相介质上进行的色谱,该色谱利用疏水配体和目的蛋白质表面上的疏水残基之间的相互作用。市售疏水相互作用色谱介质包括但不限于苯基 Sepharose™、Tosoh己基和Capto™苯基。

[0101] 羟基磷灰石色谱是指在固相介质上进行的色谱,其利用带正电荷的钙和带负电荷的磷酸盐,并且根据蛋白质的pI和缓冲液的pH可以充当阳离子或阴离子。

[0102] 在一个实施例中,两个或更多个精制色谱柱串联连接并且作为一个精制色谱单元以流过模式运行。组合的柱可作为完整的精制色谱单元操作来操作,或与以结合和洗脱模式和/或流过模式运行的一个或多个另外精制色谱单元组合使用。

[0103] 含有目的蛋白的洗出液流或池可以加载到精制色谱柱上,特别是以目的蛋白与色谱介质结合的方式。洗出液流可以以目的蛋白质不与色谱介质结合的方式加载到精制色谱柱上。洗出液流或池可以源自先前的单元操作,例如细胞培养收获液、亲和色谱、病毒灭活、病毒过滤、深度过滤和/或另一精制色谱操作。可以将另外的缓冲液添加到洗出液或池中,使得蛋白质的最终加载处于期望的浓度和/或配制。

[0104] 用于精制单元操作的加载材料可以是来自病毒灭活单元操作、特别是来自低pH病毒灭活单元操作的池或洗出液,例如中和的病毒灭活池或洗出液。

[0105] 有利地,位于上文关于过程200、300讨论的橇104、106中的色谱柱可以在物理上彼此分开,即,不以串联或任何其他方式连接。色谱柱120并行循环,在加载期间没有柱连接性(无柱过载),来自一个柱120的溢流不直接加载到单独的橇中的任何另一色谱柱上。利用上述方法导致橇104、106的柱120不会过载,这将是诸如周期性逆流色谱法之类的系统中物理连接的串联柱之间的流过过程的结果。因此,本文描述的方法对于具有稳定性问题(例如柱上聚集或高浓度聚集)的重组蛋白特别有利。橇104、106可包括以下方面中的一个或多个。

[0106] 橇104、106中的色谱柱120可以是适合于捕获色谱的单个色谱柱。此类色谱柱利用介质,例如树脂、膜、凝胶等,在合适的条件下,目的重组蛋白将与色谱柱介质结合。将蛋白质“结合”至色谱介质是指在适当的条件(pH、电导率)或亲和力下将目的蛋白质暴露于色谱介质,从而通过目的蛋白质与色谱介质(诸如离子交换介质)的一个或多个带电基团或对目的蛋白质具有亲和力的配体或其他药剂(诸如蛋白A介质)之间的相互作用,将目的蛋白质可逆地固定在色谱介质中或色谱介质上。

[0107] 色谱模式的实例,例如亲和色谱(包括蛋白A、蛋白G或蛋白L色谱)、固定金属亲和色谱(IMAC)、尺寸排阻色谱(SEC)、离子交换色谱(IEX)(包括阳离子交换色谱(CEX)和阴离子交换色谱(AEX))、疏水相互作用色谱(HIC)、多模式色谱或混合模式色谱(MM)、羟基磷灰

石色谱 (HA) 等适用于本文所述的并行色谱系统。此类色谱材料是本领域已知的并且是可商购的。

[0108] 两个或更多个相似的色谱柱橇104、106可以并行运行并且由如本文所述的连续并行色谱系统100控制。当至少一个色谱橇正在执行具有最长循环时间的操作,例如,长步骤(诸如加载或洗脱)时,至少一个色谱橇正在执行生产过程循环,该生产过程循环包括具有较短循环时间的至少一个或多个过程步骤,这些步骤可以包括平衡、加载、洗涤、洗脱以及柱清洁和再生步骤(其可以包括柱剥离和冲洗)中的一者或多者。步骤以及步骤的顺序、数量和持续时间受到待纯化的蛋白质和制造活动的目标的影响。

[0109] 色谱柱橇104、106还可包括至少一个泵122、124。在一个实施例中,橇包括两个或更多个泵。一个或多个泵用于推动进料负载通过色谱柱,特别是在恒定流速下。此类泵包括例如蠕动泵、隔膜泵和离心泵。对于配备单个泵的橇,可使用定时阀切换来管理来自两个或三个入口通道的计量液体溶液。对于具有两个或更多个泵的橇,可以将独立的泵连接到入口。

[0110] 每个色谱柱橇104、106包括至少一个入口和一个出口,以引导进料流入柱并洗脱出柱。入口可以选择性地联接至上游源。上游源可以包括要进料至色谱橇的任何流体,即原料。上游源可包含在缓冲罐、储存罐、袋或适于向至少一个色谱柱橇提供进料的其他合适的容器中。

[0111] 原料包括供给到色谱柱上的任何流体。原料可以包括至少一种目的蛋白质。原料可以源自收集在缓冲罐、储存罐、袋或适合于这种收集和储存的其他合适容器中的池材料。此类容器可适合于向色谱柱橇提供原料。原料还可以是直接来自上游源的洗出液流的形式。

[0112] 在一些情况下,原料可包括收获的细胞培养液,其包含已收集在池中或洗出液流中的目的蛋白质。收获的细胞培养液可以从任何类型的收获单元操作中收集。原料可以包括从色谱柱收集的洗脱剂池或流,其包含目的蛋白质。色谱柱洗出液池或流可以从任何类型的捕获色谱单元操作中收集。色谱柱池或流的实例包括亲和色谱柱洗脱剂池,例如来自蛋白A、蛋白G或蛋白L。色谱池或流可以是固定金属亲和色谱洗脱剂池或流。色谱柱池可以是例如包含蛋白质组分的离子交换色谱洗脱剂池或流,例如阴离子交换色谱洗脱剂池或流或阳离子交换色谱洗脱剂池或流、多模式或混合模式色谱洗脱剂池或流、疏水相互作用色谱柱洗脱剂池或流、羟基磷灰石柱洗脱剂池或流、或尺寸排阻色谱柱洗脱剂池或流。

[0113] 原料可以包括来自上述任意的病毒灭活的洗出液池或流。原料还可以包括来自上述任意的中和的病毒灭活的洗脱剂池或流。原料还可以包括来自上述任意的中和的洗出液池或流。原料可以包括来自上述任何的病毒过滤的洗出液池或流。

[0114] 原料还可以包括一种或多种“处理原料”,例如储备溶液、盐溶液、酸溶液、缓冲溶液及其组合等,它们适合用于平衡、洗涤、洗脱、重构、剥离和/或冲洗橇上的色谱柱。

[0115] 一个或多个传感器可以位于入口和/或出口处,用于测量和/或监测诸如流入和流出橇的原料的流速、压力和/或体积之类的物理参数。传感器还可用于监测/测量洗出液中目的蛋白质、污染物和/或杂质的质量/数量。传感器还可用于监测/测量平衡、洗涤、重构、剥离和/或冲洗步骤的功效。传感器可以包括UV传感器和pH传感器。

[0116] 每个色谱柱橇104、106可包括多个阀。

[0117] 每个色谱柱橇104、106包括用于容纳和操作构成橇104、106的部件(例如色谱柱、泵、入口和出口、传感器、阀、过滤器等)的结构和支撑件。橇结构可以由适合该目的和用途、特别是在受控环境中的用途的任何合适的材料(例如不锈钢、铝和/或塑料)制成。橇可以具有某种移动机构,例如轮子或滚轴。

[0118] 图6中示出了示例性色谱橇104、106。色谱橇104、106可以包括:a)布置在至少两个入口阀歧管140上的任意数量的入口阀136;b)至少一个泵122、124;c)单个色谱柱120,其具有被绕过或被选择用于流动路径的适当阀136;d)至少一个仪器130,当目的重组蛋白加载和/或从柱上洗脱时,其能够感测目的重组蛋白;以及e)任意数量的出口阀138,用于引导原料和废物流进入合适的储存容器、废物容器和/或将洗出液流引导至其他下游处理单元。橇104、106还可包括另外的阀、过滤器和用于测量压力、流、pH、电导率、温度等的仪器。另外,橇104、106可具有用于截留原料加载流或缓冲液入口中的空气的气泡捕集器。用于泄压的单独的采样机构或安全机构的添加也可以被包括在橇104、106上,而不影响其参与并行色谱系统100的能力。

[0119] 在所示的形式中,每个橇104、106包括适合于独立批次处理的部件。因此,每个橇104、106包括色谱柱120、泵122、任选的第二泵124、入口126、出口127、至少一个过滤器128和出口传感器130。此外,所有部件均可安装在具有轮子/滚轴134的底座132上,轮子/滚轴134允许橇104、106在设施内容易地操纵至期望位置。这允许用户根据制造活动的需要容易地设置任何期望数量的橇104、106。流向橇104、106中的每个的入口126的流体流可以通过操作一个或多个阀136来控制,这些阀可以由相应的橇104、106承载或者可以根据需要位于橇104、106的上游,并且流向橇104、106中的每个的出口127的流体流可以通过操作一个或多个阀138来控制,这些阀可以由相应的橇104、106承载或者可以位于橇104、106的下游。如此配置,当用于橇104、106之一的阀136打开时,包含目的蛋白质的预定量的原料以结合和洗脱模式加载到柱120上。来自柱的输出可由阀138控制并由出口传感器130测量,具体地,测量可用于确定洗脱何时具有期望的质量。例如,出口传感器130可以是紫外线(UV)传感器以确定蛋白质浓度。有利地,系统100可以利用一次性柱,其允许柱120在使用之间更换。系统中的橇104、106的柱120也可具有彼此不同的尺寸/体积。

[0120] 加载和处理步骤可以使用单个泵122和阀136的定时切换来执行,以管理来自两个或三个入口通道的计量液体溶液。

[0121] 加载和处理步骤可以使用两个或更多个泵122、124来执行,所述泵122、124被配置为允许每个泵122、124单独操作。中央处理器108或者可替代地单个处理器110之一引导每个泵122、124的动作。如上文参考图2-5所讨论的,一个或多个泵122、124可用于操作过程200、300的初级循环,即,为系统100设定时间的最长循环(例如,对于亲和色谱是加载,对于精制色谱是洗脱),并且一个或多个泵122、124可用于操作次级循环,即,包括平衡、加载、洗涤、洗脱以及柱清洁和再生(其可以包括柱剥离和冲洗)的至少一个或多个步骤的生产过程循环。

[0122] 控制电路102使两个或更多个色谱橇104、106的动作同步。控制电路102引导橇104、106执行哪个循环,并且在该循环完成后同步切换以执行下一个循环。

[0123] 图7中示出了连续过程色谱系统400配置的实例,该配置包括原料源402,其提供要加载到色谱柱橇104、106上的原料。来自橇104、106的洗脱物被进料到一个或多个收集罐

404。例如,收集罐404可以是每个橇共享的共用罐,每个橇可以具有单独的收集罐,或者橇的组可以共享单独的罐。对于利用共享收集罐404的配置,罐404可以作为缓冲罐操作以维持整个系统的连续处理,而不管哪个橇104、106在任何给定时刻正在处理原料。然后收集罐304流体连接至下游处理单元406并最终连接至最终产物收集罐408。

[0124] 图8-10显示了将本文描述的连续处理色谱过程并入重组蛋白制造过程500中的几种示例性配置。过程500开始于细胞培养操作502,随后是收获操作504、亲和色谱操作506、病毒灭活和中和操作508以及第一和第二精制色谱操作510、512。最后,过程500可以继续到另外的处理单元操作514。

[0125] 在图8的下游过程500中,在收获操作504之后的亲和色谱操作506中,根据上文关于图2和图3描述的过程200,利用至少两个亲和色谱橇(AC) 104、106在并行处理系统100中进行操作。在这种形式中,例如,精制色谱操作510、512可以是任意数量的单柱独立单元操作或者串联连接以形成单个精制色谱单元操作的两个柱。

[0126] 在图9的下游过程500中,在亲和色谱操作506和亲和色谱洗出液的病毒灭活和中和操作508之后的第一精制色谱操作510中,根据上文关于图4和图5描述的过程300,利用至少两个精制色谱橇(PC1) 104、106在并行处理系统100中进行操作。在这种形式中,亲和色谱操作506和第二精制色谱操作512可以通过任意数量的单个独立色谱单元操作来执行。一方面,精制色谱步骤510和512的顺序可以颠倒,其中使用并行处理系统100执行的精制色谱操作作为第二精制色谱操作进行。一方面,精制色谱操作510也可以是唯一的精制操作。一方面,可以存在多于一个的精制色谱操作510和/或512。

[0127] 在图10的下游过程500中,在收获操作504之后的亲和色谱操作506中,根据上文关于图2和图3描述的过程200,利用至少两个亲和色谱橇(AC) 104、106在并行处理系统100中进行操作。进一步地,在亲和色谱操作506和亲和色谱洗出液的病毒灭活和中和操作508之后的第一精制色谱操作510中,根据上文关于图4和图5描述的过程300,利用至少两个精制色谱橇(PC1) 104、106在并行处理系统100中进行操作。在这种形式中,第二精制色谱操作512可以通过任意数量的单个独立色谱单元操作来执行。一方面,精制色谱步骤510和512的顺序可以颠倒,其中使用并行处理系统100执行的精制色谱操作作为第二精制色谱操作进行。一方面,精制色谱操作510可以是唯一的精制操作。一方面,可以存在多于一个的精制色谱操作510和/或512。

[0128] 加载和洗脱步骤的时间可以改变。例如,当使用蛋白A亲和色谱柱进行亲和色谱时,加载阶段优选是最长循环(参见图3)。例如,当使用阳离子交换色谱柱进行精制色谱时,洗脱阶段优选是最长循环(参见图5)。然而,对使用本文描述的并行色谱系统100执行的任何单元操作的最长循环的确定可以基于待纯化的蛋白质、制造活动目标和/或过程的任何其他所期望参数或目标来进行。

[0129] 图11中示出了用于处理中和的病毒灭活池(NVIP) 702的下游过程700。例如,NVIP 702可被中和至与至少一个后续下游处理操作更相容的pH。深度过滤器组704连接在NVIP 702的下游并且来自深度过滤器组704的渗透物可被收集在缓冲容器706中。

[0130] 然后,缓冲容器706可以用于提供流过精制和病毒过滤(VF)处理操作。如图所示,示例性精制和病毒过滤处理操作包括以流过配置直接连接至阳离子交换色谱柱(CEX) 710的阴离子交换色谱柱(AEX) 708,和病毒过滤器712。在一个实施例中,病毒过滤器712可以包

括预过滤器和病毒过滤器。

[0131] 柱阀714和共用阀716控制流向过程700的各个部件的流体流。据此,柱阀714可包括多个端口,包括进料入口端口718、柱入口端口720、柱出口端口722和进料出口端口724。类似地,共用阀716可包括多个端口,包括进料入口端口726、VF入口端口728、VF出口端口730和进料出口端口732。

[0132] 利用这种配置,缓冲容器706可以经由柱阀714的进料入口端口718和柱入口端口720流体连接到AEX柱708。此外,CEX柱710可经由柱阀714的柱出口端口722和进料出口端口732以及共用阀716的进料入口端口726和VF入口端口728流体连接至病毒过滤器712。最后,来自病毒过滤器712的进料可经由共用阀716的VF出口端口730和进料出口端口732供应至UV监测器734。来自UV监测器734的进料然后可以被供应到出口阀736并且最终供应到一个或多个收集容器。

[0133] 使用细胞培养过程制造重组蛋白存在传播病毒污染物的固有风险。此类污染物可能来自许多来源,包括起始材料、试剂(特别是动物源试剂)以及由于GMP过程失败而导致的生产系统污染。因而,监管机构推荐生物制造过程有专门的病毒灭活和病毒去除步骤,并要求制造商验证所有生物产品中病毒的去除和灭活。

[0134] 包膜病毒通常是灭活的。无包膜病毒更难在不会对正在生产的蛋白质治疗剂造成风险的情况下灭活;然而,此类病毒可以通过基于尺寸的过滤方法去除,例如使用小孔径过滤器去除病毒颗粒。可以使用微滤器或纳滤器进行病毒过滤,诸如可以从旭化成株式会社(Plavona<sup>®</sup>)和EDM Millipore(VPro<sup>®</sup>)获得的那些。

[0135] 病毒灭活是指包膜病毒被修饰以致其不能再感染细胞、复制和/或繁殖的过程。可以使用各种方法来灭活病毒并且这些方法包括热灭活/巴氏消毒法,UV和 $\gamma$ 射线照射,使用高强度广谱白光,添加化学灭活剂、表面活性剂、和溶剂/洗涤剂处理。在一个实施例中,病毒灭活是通过在低pH下孵育来完成的,这对于特异性灭活包膜病毒非常有效。

[0136] 低pH病毒灭活可以以批次模式进行,包括在规定的持续时间和温度下保持低pH。通过在低pH/高盐条件下洗涤结合的捕获色谱柱,可以将病毒灭活与捕获色谱相组合。已使用额外的缓冲液体积(这会增加成本,延长纯化时间,并可能导致蛋白质损失)并使用pH低得多的洗脱缓冲液(这可能会影响蛋白质完整性,特别是多组分工程改造的蛋白质)和/或更高的缓冲液浓度在适合于病毒灭活的条件下对捕获色谱柱进行了洗脱。

[0137] 同线连续低pH灭活方法的开发重点是使用执行任务的设备和方法,例如螺旋流逆变器或在目标低pH条件下维持流体流动最短停留时间的其他机制。然而,用于影响pH变化和中和的缓冲液和滴定剂的性质在很大程度上被忽视了。通常,使用乙酸盐缓冲液(pKa 4.8)和Tris碱(pKa 8.1)进行低pH病毒灭活,以影响所期望的pH变化。

[0138] 使用Tris碱浓缩溶液(>1M)可以减少中和过程中的稀释,但可能难以通过自动化和/或同线调节策略进行控制。此外,高浓度的缓冲液增加了过度滴定的机会。滴定剂浓度、pKa和组成决定了对体积变化(添加过量/不足)的敏感性,这对于高度自动化和/或同线滴定过程至关重要,特别是在半连续和连续单元操作和/或制造过程中使用的那些,包括本文描述的并行处理系统。过度滴定可能会通过脱酰胺、氧化或其他降解机制损坏目的产物,从而危及纯化的蛋白质和/或正在处理的整个批次/批号的质量。

[0139] 研究发现,在捕获色谱单元操作(诸如蛋白A)期间使用洗脱缓冲液(其pKa比中和

目标pH低1个pH单位以上(即,洗脱缓冲液在中和的目标pH下不会缓冲)适用于控制同线连续性低pH病毒灭活。如本文所述,特别是在下面的实例中,使用低pKa酸例如甲酸、磷酸或pKa小于或等于4的其他酸洗脱捕获色谱柱,导致pH为 $\leq 3.6 \pm 0.1$ 病毒灭活洗脱池。这是一种有效的洗脱/病毒灭活策略,可在有效pH下最小化缓冲液体积。洗脱缓冲液pH、洗脱缓冲液浓度和池收集体积之间也存在相互依赖性。在目标洗脱缓冲液浓度为100mM、缓冲液pH范围为pH 3.3至pH 3.5以及池收集体积范围为2.75CV至4.25CV时,导致所期望的目标pH范围为 $3.6 \pm 0.1$ 。收集的池体积、中和缓冲液的类型和量以及池蛋白质浓度可以通过改变洗脱缓冲液pH和浓度来优化,使池体积高达7.7CV和低至2.1CV。

[0140] 在一个实施例中,本发明提供了通过使用pKa比中和目标pH低超过1个pH单位的洗脱缓冲液洗脱亲和色谱柱而获得的病毒灭活池。在一个实施例中,通过使用包含pKa低于4的酸的缓冲液洗脱亲和色谱柱来获得病毒灭活池,从而得到 $pH \leq 3.6 \pm 0.1$ 的病毒灭活洗脱池。在一个实施例中,缓冲液的pH是3.3至3.6。在一个实施例中,缓冲液的pH是3.3至3.5。在一个实施例中,缓冲液的pH是3.3至3.4。在一个实施例中,缓冲液的pH是3.3至3.6。在一个实施例中,缓冲液的pH是3.4至3.5。在一个实施例中,缓冲液的pH是3.5至3.6。在一个实施例中,缓冲液的pH是 $3.3 \pm 0.1$ 、 $3.4 \pm 0.1$ 、 $3.5 \pm 0.1$ 或 $3.6 \pm 0.1$ 。在一个实施例中,缓冲液的pH是 $3.4 \pm 0.1$ 。在一个实施例中,pKa低于4的酸包括甲酸和磷酸。在一个实施例中,酸是pH 3.4的100mM甲酸以实现最终病毒灭活池 $pH 3.6 \pm 0.1$ 。在本发明的一个实施例中,亲和色谱是蛋白A、蛋白G、蛋白A/G或蛋白L亲和色谱。在一个实施例中,洗脱收集体积是2.1CV至7.7CV。在一个实施例中,洗脱收集体积是2.1CV至4.25CV。在一个实施例中,洗脱收集体积是2.1CV至2.75CV。在一个实施例中,洗脱收集体积是2.75CV至4.25CV。在一个实施例中,洗脱收集体积是2.75CV至7.7CV。在一个实施例中,洗脱收集体积是4.25CV至7.7CV。在一个实施例中,洗脱收集体积大于或等于2.1CV、2.75、3.5CV或4.25CV。在一个实施例中,洗脱收集体积是3.5CV。

[0141] 可以混合病毒灭活洗脱池以确保整个池处于所期望的pH。洗脱池可以包含在一次性袋、缓冲罐、储存罐或其他合适的容器中。在一个实施例中,洗脱池容器的体积比收获储存容器小10x至4x。在一个实施例中,洗脱池容器的体积比收获储存容器小10x至5x。在一个实施例中,洗脱池容器的体积比收获储存容器小10x至6x。在一个实施例中,洗脱池容器的体积比收获储存容器小10x至7x。在一个实施例中,洗脱池容器的体积比收获储存容器小10x至8x。在一个实施例中,洗脱池容器的体积比收获储存容器小10x至9x。在一个实施例中,洗脱池容器的体积比收获储存容器小9x至4x。在一个实施例中,洗脱池容器的体积比收获储存容器小9x至5x。在一个实施例中,洗脱池容器的体积比收获储存容器小9x至6x。在一个实施例中,洗脱池容器的体积比收获储存容器小9x至7x。在一个实施例中,洗脱池容器的体积比收获储存容器小9x至8x。在一个实施例中,洗脱池容器的体积比收获储存容器小8x至4x。在一个实施例中,洗脱池容器的体积比收获储存容器小8x至5x。在一个实施例中,洗脱池容器的体积比收获储存容器小8x至6x。在一个实施例中,洗脱池容器的体积比收获储存容器小8x至7x。在一个实施例中,洗脱池容器的体积比收获储存容器小7x至4x。在一个实施例中,洗脱池容器的体积比收获储存容器小7x至5x。在一个实施例中,洗脱池容器的体积比收获储存容器小7x至6x。在一个实施例中,洗脱池容器的体积比收获储存容器小6x至4x。在一个实施例中,洗脱池容器的体积比收获储存容器小6x至5x。在一个实施例中,洗脱池容

器的体积比收获储存容器小5x至4x。

[0142] 病毒灭活可以在预定时间内发生。本发明的一方面提供了在中和之前使洗脱池经受低pH条件至少30分钟或更长时间。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件24小时或更长时间。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少30分钟至约24小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少1小时至约24小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少2小时至约24小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少3小时至约24小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少4小时至约24小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少5小时至约24小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少6小时至约24小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少10小时至约24小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少12小时至约24小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少15小时至约24小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少18小时至约24小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少30分钟至至少6小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少30分钟至至少5.5小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少30分钟至至少5小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少30分钟至至少4.5小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少30分钟至至少4小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少30分钟至至少3.5小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少30分钟至至少3小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少30分钟至至少2.5小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少30分钟至至少2小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少30分钟至至少1.5小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少30分钟至至少1小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少1小时至约2小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少1小时至至少1.5小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少1.5小时至约2小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少30分钟。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少1小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少1.5小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少2小时。在一个实施例中,使洗脱池经受低pH条件至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时。

[0143] 在某些形式中,病毒灭活过程可以是自动化的。

[0144] 病毒灭活池可以被中和(中和的病毒灭活池(nVIP))至与至少一个后续下游处理操作更相容的pH。典型的中和过程使用高浓度缓冲液(例如1M Tris)将池滴定至所期望的目标pH。例如,当使用1M Tris时,pH迅速增加,这对于具有固定罐体积的批次模式来说是理想的。为了更精细地控制,将Tris浓度降低至0.5M可减缓pH变化,但代价是需要更大的缓冲液体积才能达到相同的目标pH。对于连续过程,在不限制罐体积的情况下,过量的缓冲液是可以接受的。然而,降低成本和非物质化制造过程的愿望正在推动向更小的设施规模和相应的最小设备和材料的使用转移,这导致中和缓冲液体积成为一些制造过程中的限制因素。压缩制造过程以最小化缓冲液交换和调节同时保持高产量和生产率将是有益的,特别是与本文描述的并行过程系统组合。

[0145] 开发了一种有效的中和策略,可以合理控制小规模过程中典型的缓冲液体积,而无需将中和池的电导率提高到10mS/cm以上。这种中和缓冲液系统包含在目标pH范围内不具有缓冲能力的滴定剂(缓冲能力的定义是pKa在目标pH的 $\pm 1$ 个pH单位内),诸如乙酸钠,

以及在所期望pH下进行缓冲的背景缓冲物质,诸如Tris碱。该背景缓冲液有助于防止由于滴定剂添加过量而导致的过度滴定。

[0146] 本文提供了一种中和缓冲液系统,其能够最小化病毒灭活洗出液池的体积膨胀,同时保持电导率小于或等于10mS/cm。中和缓冲液系统可以包括在目标pH范围内不具有缓冲能力的滴定剂和期望的pH下缓冲的缓冲剂。此外,当该中和缓冲液系统与具有pKa低于4的酸和小于3.7的池pH的捕获洗脱条件组合使用时,其最小化下游缓冲液的变化,并且有助于提高通量,同时保持纯化性能。在较小体积的系统中使用这种VI/中和策略可以在利用最小设备和设施尺寸的制造过程中纯化蛋白质。

[0147] 可以将中和缓冲液添加到混合容器中的病毒灭活洗脱池中,使用静态混合器或通过任何其他合适的方法同线混合。所得中和的病毒灭活池可以作为池储存、与其他池组合、和/或以半连续、连续或相连的方式向前处理。病毒灭活和中和单元操作可以自动化,包括定时病毒灭活,然后使用通过静态混合器的病毒灭活池与中和缓冲液流的比率进行中和。

[0148] 中和缓冲液系统可包括pKa大于目标pH的滴定剂。在一个实施例中,滴定剂的pKa大于7。在一个实施例中,滴定剂是碱。在本发明的一个实施例中,滴定剂选自柠檬酸、谷氨酸和乙酸钠。在本发明的一个实施例中,滴定剂是乙酸钠。在本发明的一个实施例中,滴定剂是浓度小于0.3M的乙酸钠。在一个实施例中,滴定剂是浓度大于0.1M至小于0.3M的乙酸钠。在一个实施例中,滴定剂是浓度0.17M至小于0.3M的乙酸钠。在一个实施例中,滴定剂是浓度0.238M至小于0.3M的乙酸钠。在一个实施例中,滴定剂是浓度大于0.1M至0.238M的乙酸钠。在一个实施例中,滴定剂是浓度0.17M至0.238M的乙酸钠。在一个实施例中,滴定剂是浓度大于0.1M、0.17M、0.238M或小于0.3M的乙酸钠。

[0149] 中和缓冲液系统可包括pKa为4.5至6.0的缓冲剂。在一个实施例中,缓冲剂的pKa是4.5至5.5。在一个实施例中,缓冲剂的pKa是4.5至5.0。在一个实施例中,缓冲剂的pKa是5.0至5.5。在一个实施例中,缓冲剂的pKa是5.0至6.0。在实施例中,缓冲剂具有5.5至6.0的pKa。在一个实施例中,缓冲剂的pKa是4.5、5.0、5.5或6.0。

[0150] 中和缓冲液系统可以包括选自以下的缓冲剂:2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)和Tris碱。中和缓冲液系统可以包括作为Tris碱的缓冲剂。在一个实施例中,中和缓冲液系统可包括浓度小于0.2M Tris碱的缓冲剂。在一个实施例中,缓冲剂具有浓度小于0.00005M至小于0.2M的Tris碱。在一个实施例中,缓冲剂具有浓度0.1075M至小于0.2M的Tris碱。在一个实施例中,缓冲剂具有浓度0.11M至小于0.2M的Tris碱。在一个实施例中,缓冲剂具有浓度0.115M至小于0.2M的Tris碱。在一个实施例中,缓冲剂具有浓度0.185M至小于0.2M的Tris碱。在一个实施例中,缓冲剂具有浓度0.1075M至0.185M的Tris碱。在一个实施例中,缓冲剂具有浓度0.11M至0.185M的Tris碱。在一个实施例中,缓冲剂具有浓度0.115M至0.185M的Tris碱。在一个实施例中,缓冲剂具有浓度0.1075M至0.115M的Tris碱。在一个实施例中,缓冲剂具有浓度0.11M至0.115M的Tris碱。在一个实施例中,缓冲剂具有浓度0.00005M、0.1075M、0.11M、0.115M、0.185M或小于0.2M的Tris碱。

[0151] 中和缓冲液系统可包括pKa大于7的滴定剂和pKa为4.5至6.0的缓冲剂。在一个实施例中,中和缓冲液系统可包括pKa大于7的滴定剂和pKa为4.5至5.0的缓冲剂。在一个实施例中,中和缓冲液系统可包括pKa大于7的滴定剂和pKa为4.5至5.5的缓冲剂。在一个实施例

中,中和缓冲液系统可包括pKa大于7的滴定剂和pKa为5.0至6.0的缓冲剂。在一个实施例中,中和缓冲液系统可包括pKa大于7的滴定剂和pKa为5.0至5.5的缓冲剂。在一个实施例中,中和缓冲液系统可包括pKa大于7的滴定剂和pKa为5.5至6.0的缓冲剂。在一个实施例中,中和缓冲液系统可包括pKa大于7的滴定剂和pKa为4.5、5.0、5.5或6.0的缓冲剂。

[0152] 中和缓冲液系统可包括作为乙酸钠的滴定剂和作为Tris碱的缓冲剂。在本发明的一方面,中和缓冲液系统可以包括浓度大于0.1M至小于0.3M乙酸钠的乙酸钠和浓度大于0.00005M至小于0.2M Tris碱的Tris碱。在一个实施例中,中和缓冲液系统可包括浓度为0.17M至0.238M的乙酸钠和浓度为0.1075M至0.185M的Tris碱。在一个实施例中,中和缓冲液系统可包括0.17M乙酸钠和0.1075M Tris碱。在一个实施例中,中和缓冲液系统可包括0.17M乙酸钠和浓度0.11M至0.115M的Tris碱。在一个实施例中,中和缓冲液系统可包括0.17M乙酸钠和0.1075M Tris碱。在一个实施例中,中和缓冲液可包括0.238M乙酸钠和0.185M Tris碱。在一个实施例中,中和缓冲液系统可包括0.17M乙酸钠和0.11M Tris碱。在一个实施例中,中和缓冲液系统包含0.17M乙酸钠和0.115M Tris碱。

[0153] 本文还提供了一种中和缓冲液系统,其能够使病毒灭活的洗出液池的体积膨胀最小化,同时保持电导率小于或等于10ms/cm,该中和缓冲液系统包含pKa大于7的滴定剂和pKa范围为4.5至6.0的缓冲剂。

[0154] 本文还提供了一种中和缓冲液系统,其能够使病毒灭活的洗出液池的体积膨胀最小化,同时保持电导率小于或等于10ms/cm,该中和缓冲液系统包含浓度范围为大于0.1M至小于0.3M的乙酸钠作为滴定剂以及浓度范围为大于0.00005M至小于0.2M的Tris碱作为缓冲剂。

[0155] 本文还提供了一种中和缓冲液系统,其能够使病毒灭活的洗出液池的体积膨胀最小化,同时保持电导率 $\leq$ 10ms/cm,该中和缓冲液系统包含浓度范围为0.17M至0.238M乙酸钠的乙酸钠以及范围为0.1075M至0.185M的Tris碱。

[0156] 用于连续流动过程中纯化目的蛋白质的这种中和缓冲液系统通过产生单一缓冲液提供了减少缓冲液需求(例如缓冲液交换和缓冲液调节)的额外好处。

[0157] 在本发明的一方面,通过在混合容器中将病毒灭活池与中和缓冲液系统组合来实现中和。在本发明的一方面,中和缓冲液系统和病毒灭活的洗脱池可以使用静态混合器同线混合。

[0158] 中和的病毒灭活池可以作为单个池存储,与其他中和池组合,或者以连续或相连的方式向前处理。

[0159] 中和的病毒灭活池可以进一步进行过滤,例如深度过滤和/或无菌过滤,以除去任何产生的浑浊或沉淀。

[0160] 术语“多核苷酸”或“核酸分子”在全文中可互换使用,并且包括单链和双链核酸、基因组DNA、RNA、mRNA、cDNA或合成来源的或与通常在自然界中发现的序列无关的一些其组合。术语“分离的多核苷酸”或“分离的核酸分子”具体是指合成来源的序列或自然界中通常不存在的序列。包含规定序列的分离的核酸分子除表达目的蛋白的序列以外还可以包括针对高达十种或甚至高达二十种其他蛋白或其部分的编码序列,或可以包括控制所叙述核酸序列的编码区的表达的可操作地连接的调节序列,和/或可以包括载体序列。包含核酸分子的核苷酸可以是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或者任一类型核苷酸的经修饰形式。所述修

饰包括碱基修饰,如溴尿苷及肌苷衍生物;核糖修饰,如2',3'-二脱氧核糖;及核苷酸间键修饰,如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯氨基硫代磷酸酯、苯氨基磷酸酯及氨基磷酸酯。

[0161] 术语“多肽”或“蛋白质”在全文中可互换使用,并且是指包括通过肽键彼此连结的两个或更多个氨基酸残基的分子。多肽和蛋白质还包括具有天然序列的氨基酸残基的一个或多个缺失、插入和/或取代的大分子,即包括由天然存在细胞和非重组细胞产生的多肽或蛋白质;或通过基因工程化细胞或重组细胞产生。蛋白质包括具有天然蛋白质的氨基酸序列的氨基酸残基的一个或多个缺失、插入和/或取代的分子。蛋白质包括工程改造的蛋白质,例如融合蛋白。多肽和蛋白质包括如下氨基酸聚合物,其中一种或多种氨基酸为对应天然存在的氨基酸和聚合物的化学类似物。多肽和蛋白质还包括修饰,该修饰包括但不限于糖基化、脂质附着、硫酸化、谷氨酸残基的 $\gamma$ -羧化、羟基化和ADP核糖基化。蛋白质可以是分泌型蛋白质、非分泌型蛋白质、胞内蛋白质、膜结合蛋白质。目的多肽和蛋白质可以通过原核和真核细胞系(例如重组动物细胞系)使用细胞培养方法产生,并且可以被称为“重组蛋白质”。所表达的(多种)蛋白可以在细胞内产生或被分泌到培养基中,从培养基中可以回收和/或收集所述蛋白。

[0162] 如本文所用,术语“分离的”意指(i)不含至少一些通常与其一起被发现的蛋白或多核苷酸,(ii)基本上不含来自相同来源的其他蛋白或多核苷酸,例如来自相同物种,(iii)与至少约50%的在自然界与其相关的多核苷酸、脂质、碳水化合物或其他物质分离,(iv)可操作地与在自然界与其不相关的多肽相关(通过共价或非共价相互作用),或(v)在自然界中不存在。术语“分离的蛋白质”或“分离的重组蛋白质”是指目的多肽或蛋白质,该目的多肽或蛋白质从会干扰其治疗、诊断、预防、研究或其他用途的蛋白质或多肽或其他污染物中纯化出来。

[0163] 多肽和蛋白质可以具有科学和/或商业意义,包括通过结合、刺激、中和或以任何方式与靶标(特别是下文列出的靶标,包括源自其的靶标、与其相关的靶标及其修饰)相互作用而发挥治疗效果的蛋白质。

[0164] 包括抗原结合蛋白,其包含对其所结合的另一分子(抗原)具有亲和力的抗原结合区或抗原结合部分。抗原结合蛋白包括包含一个或多个抗原结合区或部分的抗体、抗体片段、抗体衍生物、抗体类似物以及融合蛋白、工程改造的蛋白等。

[0165] 术语“抗体”包括任何同种型或亚类的糖基化免疫球蛋白和非糖基化免疫球蛋白,或者其与完整抗体竞争特异性结合的抗原结合区。除非另有说明,抗体包括人的、人源化的、嵌合的、多特异性的、单克隆的和多克隆的。抗体包括IgG1-、IgG2-、IgG3-和/或IgG4-型。

[0166] 还包括非天然存在的工程改造的蛋白质,例如多特异性蛋白质。

[0167] 本文使用的“多特异性”、“多特异性蛋白质”和“多特异性抗体”在本文中用于指重组工程化以同时与至少两种不同抗原或同一抗原上的至少两种不同表位结合、中和和/或相互作用的蛋白质。

[0168] 最常见和最多样化的多特异性蛋白是结合两种抗原的那些蛋白,在本文中称为“双特异性”、“双特异性蛋白”和“双特异性抗体”。双特异性蛋白可分为两大类:免疫球蛋白G(IgG)样分子和非IgG样分子。IgG样分子保留Fc介导的效应子功能,如抗体依赖性细胞介

导的细胞毒性 (ADCC)、补体依赖性细胞毒性 (CDC) 和抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP), Fc 区有助于改善溶解性和稳定性并且促进一些纯化操作。非 IgG 样分子是更小的、增加组织渗透性的。双特异性蛋白有时被用作具有对不同抗原或表位数目的结合特异性的另外组分的框架,增加了分子的结合特异性。

[0169] 包括双特异性抗体的双特异性蛋白的形式正在不断发展,并且包括但不限于四源杂交瘤 (quadromas)、杵臼结构 (knobs-in-holes)、交叉单克隆抗体 (cross-Mabs)、双可变结构域 IgG (DVD-IgG)、IgG-单链 Fv (scFv)、scFv-CH3 KIH、双功能 Fab (DAF)、半-分子交换、 $\kappa$   $\lambda$ -体、串联 scFv、scFv-Fc、双抗体、三抗体或四抗体、能够结合多个靶标的单链蛋白、单链双抗体 (sc 双抗体)、sc 双抗体-CH3、三抗体、微型抗体、微型体、TriBi 微型体、串联双抗体、sc 双抗体-HAS、串联 scFv-毒素、双亲和重定向分子 (dual-affinity retargeting molecule, DART)、纳米抗体、纳米抗体-HSA、对接和锁定 (DNL)、链交换工程改造结构域 SEED 体 (SEEDbody)、三功能抗体 (Triomab)、亮氨酸拉链 (LUZ-Y)、使用 **XmAb**<sup>®</sup> 平台产生的分子; Fab-臂交换、DutaMab、DT-IgG、电荷对 (charged pair)、Fcab、正交 Fab、IgG(H)-scFv、scFV-(H) IgG、IgG(L)-scFV、IgG(L1H1)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFV-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig、Zy 体、DVI-Ig4 (四位一体)、Fab-scFv、scFv-CH-CL-scFV、F(ab')<sub>2</sub>-scFv2、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四价 HCAb、sc 双抗体-Fc、双抗体-Fc、胞内抗体、ImmTAC、HSA 体 (HSABody)、IgG-IgG、Cov-X-体、scFv1-PEG-scFv2、三特异性抗体、四价双特异性抗体。

[0170] 还包括重新设计或工程改造的抗体,例如抗体-药物缀合物、二醇工程改造的抗体和含有足以赋予靶多肽特异性抗原结合的免疫球蛋白的至少一部分的多肽。

[0171] 其中包括基因工程改造的受体,例如嵌合抗原受体 (CAR 或 CAR-T)、TRUCKS (重定向 T 细胞以实现通用细胞因子介导的杀伤的嵌合抗原受体)、装甲 CAR (旨在调节免疫抑制环境) 和 T 细胞受体 (TCR)。

[0172] 还包括单链双特异性抗体构建体、双特异性 T 细胞接合剂、单链双特异性 T 细胞接合剂 (**BITE**<sup>®</sup>) 和半衰期延长的双特异性 T 细胞接合剂 (**HLEBiTE**<sup>®</sup>) (参见 WO 99/54440; WO 2005/040220; WO 2008/119567; US2014/0302037; US2014/0308285; WO 2014/151910; WO 2015/048272; WO 2013/128027; WO2014/140358; 和 WO 2017/134140 等)。

[0173] 还包括经修饰的蛋白,如经非共价键、共价键或者共价键和非共价键两者化学修饰的蛋白。还包括进一步包含一种或多种译后修饰的蛋白,其可以通过细胞修饰系统或由酶和/或化学方法离体引入或以其他方式引入的修饰制得。

[0174] 蛋白质还可以包括重组融合蛋白,其可以包括例如多聚化结构域,例如亮氨酸拉链或卷曲螺旋。末端多肽,例如 c-Myc、His 标签、“Flag”表位、聚乙二醇化等,可改善表达并帮助纯化。还包括包含分化抗原的全部或部分氨基酸序列的蛋白 (称为 CD 蛋白) 或其配体或与这些中的任一个基本上相似的蛋白。

[0175] 在一些实施例中,蛋白质包括集落刺激因子,如粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)。此类 G-CSF 试剂包括但不限于 **Neupogen**<sup>®</sup> (非格司亭) 和 **Neulasta**<sup>®</sup> (培非格司亭)。还包括红细胞生成刺激剂 (ESA), 如 **Epogen**<sup>®</sup> (依伯汀 $\alpha$ )、**Aranesp**<sup>®</sup> (达贝泊汀 $\alpha$ )、**Dynepo**<sup>®</sup> (依伯汀 $\delta$ )、**Mircera**<sup>®</sup> (甲基氧基聚乙二醇-依伯汀 $\beta$ )、**Hematide**<sup>®</sup>、MRK-2578, INS-22, **Retacrit**<sup>®</sup>

(依伯汀 $\zeta$ )、Neorecormon<sup>®</sup> (依伯汀 $\beta$ )、Silapo<sup>®</sup> (依伯汀 $\zeta$ )、Binocrit<sup>®</sup> (依伯汀 $\alpha$ )、依伯汀 $\alpha$ Hexal、Abseamed<sup>®</sup> (依伯汀 $\alpha$ )、Ratioepo<sup>®</sup> (依伯汀 $\theta$ )、Eporatio<sup>®</sup> (依伯汀 $\theta$ )、Biopoin<sup>®</sup> (依伯汀 $\theta$ )、依伯汀 $\alpha$ 、依伯汀 $\beta$ 、依伯汀 $\zeta$ 、依伯汀 $\theta$ 和依伯汀 $\delta$ 、依伯汀 $\omega$ 、依伯汀 $\iota$ 、组织纤溶酶原激活剂、GLP-1受体激动剂、以及前述任何内容的分子或其变体或类似物和生物仿制药。

[0176] 在一些实施例中,蛋白质包括与一种或多种CD蛋白、HER受体家族蛋白、细胞粘附分子、生长因子、神经生长因子、成纤维细胞生长因子、转化生长因子(TGF)、胰岛素样生长因子、骨诱导因子、胰岛素和胰岛素相关蛋白、凝血蛋白和凝血相关蛋白、集落刺激因子(CSF)、其他血液和血清蛋白血型抗原特异性结合的蛋白质;受体、受体相关蛋白、生长激素、生长激素受体、T细胞受体;神经营养因子、神经营养蛋白、松弛素(relaxin)、干扰素、白介素、病毒抗原、脂蛋白、整联蛋白、类风湿因子、免疫毒素、表面膜蛋白、转运蛋白、归巢受体、地址素、调节蛋白和免疫粘附素。

[0177] 在一些实施例中,蛋白质包括单独或以任何组合结合以下一种或多种蛋白质的蛋白质:5T4、17-A、ADAM 17、AFP、 $\alpha$ 叶酸受体、ART-4、BAGE、Brc-ab1、B7-H3、B7-H6、CAIX、CAMEL、CAP-1、碳酸酐酶IX、CASP-8、CDD27m、CD蛋白(包括但不限于CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD19、CD20、CD22、CD25、CD30、CD33、CD34、CD38、CD40、CD44、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD133、CD138、CD171和CD174)、CDK4/m、钙粘蛋白19、胎盘钙粘蛋白(CDH3)、P-钙粘蛋白、gpA33、B7H3、CEA、CLL-1、CSPG4、CT、Cyp-B、Dp-0、DDL3、EBV、HER受体家族蛋白(包括例如HER2、HER3、HER4和EGF受体)、EGFRvIII、EGP2、EGP40、ELF40、ErbB2、EpCAM、EphA2、ETV6-AML1、FPA、胎儿AchR、细胞粘附分子(例如,LFA-1、Mol、p150、95、VLA-4、ICAM-1、VCAM和 $\alpha$ v/ $\beta$ 3整联蛋白、生长因子(包括但不限于例如血管内皮生长因子(“VEGF”)); VEGFR2、生长激素、促甲状腺激素、卵泡刺激素、黄体生成素、生长激素释放因子、甲状旁腺激素、米勒管抑制物质(mullerian-inhibiting substance)、人巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1- $\alpha$ )、促红细胞生成素(EPO)、神经生长因子(如NGF- $\beta$ )、血小板源性生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(包括例如aFGF和bFGF)、表皮生长因子(EGF)、Cripto、转化生长因子(TGF)(尤其包括TGF- $\alpha$ 和TGF- $\beta$ (包括TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3、TGF- $\beta$ 4或TGF- $\beta$ 5))、胰岛素样生长因子-I和胰岛素样生长因子-II(IGF-I和IGF-II)、des(1-3)-IGF-I(脑IGF-I)和骨诱导因子、胰岛素和胰岛素相关蛋白(包括但不限于胰岛素、胰岛素A链、胰岛素B链、胰岛素原和胰岛素样生长因子结合蛋白);(凝血蛋白和凝血相关蛋白,尤其比如,VIII因子、组织因子、血管性血友病因子、蛋白C、 $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶、纤溶酶原激活剂(比如,尿激酶和组织纤溶酶原激活剂(“t-PA”))、邦巴辛(bombazine)、凝血酶、血小板生成素和血小板生成素受体、集落刺激因子(CSF)(尤其包括以下各者:M-CSF、GM-CSF和G-CSF)、其他血液和血清蛋白(包括但不限于白蛋白、IgE和血型抗原)、受体和受体相关蛋白(包括例如f1k2/f1t3受体、肥胖(OB)受体、生长激素受体和T细胞受体);(x)神经营养因子,包括但不限于骨源性神经营养因子(BDNF)和神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4、神经营养蛋白-5或神经营养蛋白-6(NT-3、NT-4、NT-5或NT-6);(xi)松弛素A链、松弛素B链和松弛素原、干扰素(包括例如干扰素 $\alpha$ 、干扰素 $\beta$ 和干扰素 $\gamma$ )、白介素(IL)(例如IL-1至IL-10、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-11 $\alpha$ 、IL-13 $\alpha$ 2、IL-12、IL-15、IL-17、IL-23、IL-12/IL-23、IL-2Ra、IL1-R1、IL-6受体、IL-4受体和/或IL-13受体、IL-13RA2或IL-17

受体、IL-1RAP、HER2/neu、HLA-A、HPV、HSP70、HST-2、hTERT、iCD、IgE、Kappa、KIAA0205、LAGE、Lambda、LDLR/FUT、Lewis-Y、(xiv) 病毒抗原,包括但不限于AIDS包膜病毒抗原、脂蛋白、降钙素、胰高血糖素、心钠素、肺表面活性剂、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和肿瘤坏死因子- $\beta$ 、脑啡肽酶、FLT3、FR $\alpha$ 、G250、GAGE、GC2、GD3、磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3)、GNT-V、GP-100、HAGE、HBV、HCV、BCMA、Ig $\kappa$ 、ROR-1、ERBB2、间皮素、RANTES (受激活调节的正常T细胞表达与分泌因子)、小鼠促性腺激素相关肽、DNA酶、FR- $\alpha$ 、抑制素和激活素、整合素、蛋白质A或D、类风湿因子、免疫毒素、骨形态发生蛋白质(BMP)、超氧化物歧化酶、表面膜蛋白、衰变加速因子(DAF)、AIDS包膜、转运蛋白、归巢受体、MIC (MIC-a、MIC-B)、ULBP 1-6、EPCAM、地址素、调节蛋白、免疫粘附素、抗原结合蛋白、生长激素、CTGF、CTLA4、嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)-1、MAGE、MAGE1、MAGE2B、MART-1、Melan-A、MC1R、MCSP、MUM-1、MUM-2、MUM-3、间皮素、MUC1、MUC16、肌球蛋白/m、NA88-A、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、P15、p150小bcr-abl、PML/RAR $\alpha$ 、PRAME、PSA、PSCA、PAMA、RAGE、ROR1、RU1、RU2、SAGE、CEA、c-MET、密蛋白(Claudin)-18、GPC-3、EPHA2、FPA、LMP1、MG7、NY-ESO-1、PSCA、神经节苷脂GD2、神经节苷脂GM2、BAFF、OPGL (RANKL)、肌生成抑制素、Dickkopf-1 (DKK-1)、Ang2、NGF、IGF-1受体、肝细胞生长因子(HGF)、TRAIL-R2、c-Kit、B7RP-1、PSMA、NKG2D-1、程序性细胞死亡蛋白1和配体、PD1和PDL1、甘露糖受体/hCG $\beta$ 、丙型肝炎病毒、间皮素dsFv [PE38缀合物、嗜肺军团菌(11y)、IFN  $\gamma$ 、 $\gamma$  干扰素诱导蛋白10 (IP10)、IFNAR、TALL-1、胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)、前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/Kexin 9型(PCSK9)、干细胞因子、降钙素基因相关肽(CGRP)、OX40L、 $\alpha$ 4 $\beta$ 7、血小板特异性(血小板糖蛋白Iib/IIb (PAC-1)、转化生长因子 $\beta$  (TGF $\beta$ )、透明带精子结合蛋白3 (ZP-3)、TWEAK、血小板衍生的生长因子受体 $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ )、SART、SSX-1、SSX-2、SSX-3、生存素、TAA、TAG72、TEL/AML1、TEMs、TPI、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、VEGFR2、WT1、硬化蛋白(sclerostin)以及任何前述内容的生物活性片段或变体。

[0178] 在另一个实施例中,蛋白包括阿昔单抗、阿达木单抗、阿地木单抗(adecatumumab)、阿柏西普、阿仑单抗、阿利木单抗、阿那白滞素、阿塞西普、阿基仑赛(axicabtagene ciloleucel)、巴利昔单抗、贝利木单抗、贝伐珠单抗、贝索珠单抗(biosozumab)、博纳吐单抗、本妥昔单抗(brentuximab vedotin)、布洛鲁单抗(brodalumab)、美坎组单抗(cantuzumab mertansine)、康纳单抗(canakinumab)、西妥昔单抗、赛妥珠单抗(certolizumab pegol)、可那木单抗(conatumumab)、达利珠单抗、地诺单抗、依库珠单抗、依决洛单抗、依法珠单抗、依帕珠单抗、艾图玛单抗(ertumaxomab)、依那西普、依伏库单抗、弗洛特单抗(floteuzmab)、格里西单抗(galiximab)、格尼图单抗(ganitumab)、吉妥珠单抗(gemtuzumab)、戈利木单抗、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)、英夫利昔、易普利姆玛、乐德木单抗(lerdelimumab)、鲁昔单抗(lumiliximab)、鲁克珠单抗(1xdkizumab)、里夫木单抗(lymphomun)、马帕木单抗(mapatumumab)、二磷酸莫替沙尼、莫罗单抗-CD3、那他珠单抗、奈西立肽、尼妥珠单抗、纳武单抗、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、奥马珠单抗(omalizumab)、奥普瑞白介素(oprelvekin)、帕利珠单抗、帕尼单抗、帕索珠单抗(pasotuxizumab)、帕布鲁珠单抗(pembrolizumab)、帕妥珠单抗、培克珠单抗、兰尼单抗、瑞罗木单抗(rilotumumab)、利妥昔单抗、罗米司亭、罗莫珠单抗(romosozumab)、萨格莫司(sargamostim)、索力图单抗(solitomab)、targomiRs、tisagenlecleucel、托珠单抗、托西莫单抗、曲妥珠单抗、优特克

单抗、韦得珠单抗(vedolizumab)、韦思珠单抗(visilizumab)、沃洛西单抗(volociximab)、扎木单抗(zanolimumab)、扎图木单抗(zalutumumab)、AMG211(MT111、Medi1565)、AMG330、AMG420、AMG-110、MDX-447、TF2、rM28、HER2Bi-aATC、GD2Bi-aATC、MGD006、MGD007、MGD009、MGD010、MGD011(JNJ64052781)、IMCgp100、钢标记的IMP-205、xm734、LY3164530、OMP-305BB3、REGN1979、COV322、ABT112、ABT165、RG-6013(ACE910)、RG7597(MEDH7945A)、RG7802、RG7813(R06895882)、RG7386、BITS7201A(RG7990)、RG7716、BFKF8488A(RG7992)、MCLA-128、MM-111、MM141、MOR209/ES414、MSB0010841、ALX-0061、ALX0761、ALX0141；BII034020、AFM13、AFM11、SAR156597、FBTA05、PF06671008、GSK2434735、MEDI3902、MEDI0700、MEDI7352或其变体或类似物,以及上述任何一种的生物仿制药。

[0179] 蛋白可包含以下蛋白中的一种或多种作为组分:CD28、CD28T、OX40、4-1BB/CD137、CD2、CD3( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、 $\xi$ )、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD16、CD22、CD27、CD30、CD 33、CD37、CD40、CD 45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1(CD1 1a/CD18)、CD247、CD276(B7-H3)、LIGHT(肿瘤坏死因子超家族成员14;TNFSF14)、NKG2C、Ig $\alpha$ (CD79a)、DAP-10、Fc  $\gamma$  受体、MHC I类分子、TNF、TNFr、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子、BTLA、Toll配体受体、ICAM-1、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、IL-2R $\beta$ 、IL-2R  $\gamma$ 、IL-7R $\alpha$ 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD1-1d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD1-1a、LFA-1、ITGAM、CD1-1b、ITGAX、CD1-1c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRT AM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、41-BB、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD83配体、或其片段或组合。

[0180] 蛋白质涵盖所有前述内容,并且进一步包括包含上述任何抗体或抗体结合蛋白的1、2、3、4、5或6个互补决定区(CDR)的抗体。还包括这样的变体,其包括与目的蛋白的参考氨基酸序列具有70%或更高、特别是80%或更高、更特别是90%或更高、再更特别是95%或更高、具体是97%或更高、更具体是98%或更高、再更具体是99%或更高同一性的氨基酸序列的区。在这方面的同一性可以使用多种熟知的且容易获得的氨基酸序列分析软件来确定。优选的软件包括实施史密斯-沃特曼(Smith-Waterman)算法的那些软件,所述软件被认为是搜索和比对序列问题的令人满意的解决方案。还可以采用其他算法,特别是在速度是重要考虑因素的情况下。可以用于此方面的用于DNA、RNA和多肽的比对和同源性匹配的常用程序包括FASTA、TFASTA、BLASTN、BLASTP、BLASTX、TBLASTN、PROSRCH、BLAZE和MPSRCH,后者是用于在MasPar制造的大规模并行处理器上执行的史密斯-沃特曼算法的实施方式。

[0181] 本文描述的多肽和蛋白质可以通过重组动物细胞系使用细胞培养方法产生,并且可以被称为重组蛋白质或目的重组蛋白质。一种或多种重组蛋白质可以在细胞内产生或被分泌到培养基中,从培养基中可以回收和/或收集所述蛋白。

[0182] 本文中还提供包含如上文所述的至少一种核酸分子的呈质粒、表达载体、转录盒或表达盒形式的表达系统和构建体,和包含此类表达系统或构建体的宿主细胞。如本文所用,“载体”意指适合用于将信息编码蛋白转移和/或转运至宿主细胞和/或特定位置和/或

宿主细胞内的区室的任何分子或实体(例如,核酸、质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体、病毒、病毒衣壳、病毒体、裸DNA、复合DNA等)。载体可以包括但不限于病毒和非病毒载体、非附加型哺乳动物载体。载体通常被称为表达载体,例如,重组表达载体或克隆载体。可以将载体引入宿主细胞以允许载体自身的复制,并从而扩增其中含有的多核苷酸的拷贝。克隆载体可含有序列组分,这些序列组分通常包括但不限于复制起点、启动子序列、转录起始序列、增强子序列和选择性标记。这些元件可以由本领域普通技术人员适当选择。

[0183] 一种或多种“细胞”包括任何原核或真核细胞。细胞可以是离体细胞、体外细胞或体内细胞,可以是单独的或作为高级结构(如组织或器官)的一部分。细胞包括“宿主细胞”,也称为“细胞系”,它们经基因工程化以表达具有商业或科学意义的多肽。宿主细胞典型地源自来自原代培养物的谱系,其可在培养中维持无限时间。基因工程化宿主细胞涉及用重组多核苷酸分子转染、转化或转导细胞,和/或以其他方式改变(例如,通过同源重组和基因激活或重组细胞与非重组细胞的融合)以引起宿主细胞表达所需的重组蛋白。用于遗传工程细胞和/或细胞系以表达目的蛋白质的方法和载体是本领域技术人员熟知的。

[0184] 宿主细胞可以是任何原核细胞(例如大肠杆菌)或真核细胞(例如酵母、昆虫或动物细胞(例如CHO细胞))。可经由常规转化或转染技术将载体DNA引入原核或真核细胞中。

[0185] 在一个实施例中,细胞是宿主细胞。宿主细胞当在适当条件下培养时表达目的蛋白,所述目的蛋白随后可以自培养基收集(若宿主细胞将其分泌至培养基中)或直接从产生它的宿主细胞收集(若其并非分泌的)。

[0186] 细胞培养能以分批、分批加料、连续、半连续和/或灌注模式进行。哺乳动物细胞(如CHO细胞)可以在生物反应器中以小于100ml至小于1000ml的较小规模培养。可替代地,可以使用1000ml至超过20,000升的更大规模生物反应器。在一个实施例中,使用1升至2000升。在一个实施例中,生物反应器是10升至2000升。在一个实施例中,生物反应器是10升至100升。在一个实施例中,生物反应器是30升至50升。在一个实施例中,生物反应器是30升至2000升。在一个实施例中,生物反应器是100升至2000升。在一个实施例中,生物反应器是500升至2000升。在一个实施例中,生物反应器是1000升至2000升。更大规模细胞培养,如用于蛋白治疗剂的临床和/或商业规模生物制造的细胞培养,可维持数周甚至数月,在此期间细胞产生所需的一种或多种蛋白。生物反应器可包含一次性部件。

[0187] 在生物反应器中培养后,可以从细胞培养基中收获所表达的重组目的蛋白。从悬浮细胞收获重组蛋白的方法是本领域已知的,并且包括但不限于酸沉淀、加速沉降(如絮凝)、使用重力分离、离心、声波分离、过滤(包括使用超滤器、微滤器、切向流过滤器、替代切向流过滤器、深度过滤器和冲积过滤器的膜过滤)。通过本领域已知的氧化还原折叠过程的方法,从细胞质中的包涵体中回收由原核生物表达的重组蛋白。

[0188] 收获的目的重组蛋白可以储存在缓冲罐、储存罐、袋或其他适合向色谱柱提供进料的容器中。收获的目的重组蛋白也可以作为洗出液流直接提供至色谱柱。

[0189] 然后使用一个或多个单元操作对收获的目的蛋白进行纯化或部分纯化,除去任何杂质和/或污染物,例如剩余的细胞培养基、细胞提取物、细胞碎片、宿主细胞蛋白、细菌、酵母、分枝杆菌、病毒、内毒素、DNA、RNA、产物相关杂质(如同二聚体、半抗体、聚集体、抗体片段和抗体片段的各种组合)、以及轻链错误组装(如2XLC、3XLC或4XLC)、高分子量(HMW)种类、低分子量(LMW)种类、脱氨基种类等。

[0190] 用于纯化目的重组蛋白的过程通常包括单元操作,其涵盖涉及捕获、批量和精制纯化、病毒减少/灭活、浓缩和/或配制的一个或多个过程。

[0191] 本文使用的术语单元操作或操作是指可以作为从液体培养基纯化目的重组蛋白的过程的一部分或组成部分进行的功能步骤。单元操作还可以包括处理步骤之间的贮存或存储步骤。可以将单一单元操作设计为在同一操作中完成多个目标,如捕获和病毒灭活。

[0192] 可以通过超滤和渗滤单元操作完成纯化的蛋白的浓缩和缓冲液交换成所需的配制品缓冲液用于原料药的大量储存。可以对配制的药物产品进一步进行无菌过滤,以确保药物产品不含活的微生物,然后进行灌装/成品处理,其中将药物产品引入无菌处理设施以灌装到初级药物产品容器或装置中,然后对该容器或装置进行密封、贴标签和包装,以供运输和分销。

[0193] 本文描述的某些实施例可以利用逻辑或多个部件、模块或机制。模块可以构成软件模块(例如,在机器可读介质上或在传输信号中具体化的代码)或者硬件模块。硬件模块是能够执行某些操作的有形单元并且可以按照某种方式进行配置或布置。在示例实施例中,可以通过软件(例如,应用或应用部分)将一个或多个计算机系统(例如,独立的客户端或服务器计算机系统)或计算机系统的一个或多个硬件模块(例如,处理器或一组处理器)配置为操作以执行如本文所描述的某些操作的硬件模块。

[0194] 除非另外具体说明,本文使用诸如“处理”、“计算(computing)”、“计算(calculating)”、“确定”、“呈现”、“显示”等词语进行的讨论可以指机器(例如,计算机)的动作或过程,所述机器在一个或多个接收、存储、传输或显示信息的存储器(例如,易失性存储器、非易失性存储器或其组合)、寄存器或其他机器部件内操纵或转换表示为物理(例如,电子、磁或光)量的数据。

[0195] 以下附加考虑适用于前述讨论。在整个说明书中,多个实例可以实施被描述为单个实例的部件、操作或结构。尽管一种或多种方法的各个操作被示出和描述为单独的操作,但是可以同时执行各个操作中的一个或多个,并且不需要以所展示的顺序执行操作。在示例配置中作为单独部件呈现的结构和功能可以实施为组合结构或部件。类似地,作为单个部件呈现的结构和功能可以实施为单独的部件。这些和其他变化、修改、添加和改进都落入本文主题的范围。

[0196] 将理解,图中的元件是为了简单和清楚而展示的,并不一定按比例绘制。例如,图中一些元件的尺寸和/或相对位置可能相对于其他元件被放大,以帮助改善对本发明的各种实施例的理解。而且,通常没有绘出在商业上可行的实施例中可用或必需的常用但易于理解的元件,以利于较少阻碍地查看这些各种实施例。相同的附图标记可以用于描述相同或相似的部分。进一步地,虽然本文已经披露了几个示例,但是来自任何示例的任何特征都可以与来自其他示例的其他特征组合或被其他特征替代。此外,虽然本文已经披露了几个示例,但是在不脱离权利要求的范围的情况下,可以对所披露的示例进行改变。

[0197] 尽管已经根据示例性实施例描述了系统、方法及其部件,但是它们不限于此。详细描述仅被解释为是示例性的并且未描述本发明的每个可能的实施例,因为描述每个可能的实施例将是不实际的,即使有可能的话。可以使用当前技术或在本专利申请日之后开发的技术来实施许多替代性实施例,这些实施例仍然落入限定本发明的权利要求的范围内。本领域技术人员将了解到,在不脱离本发明的范围的情况下,关于上文描述的实施例可以做

出各种各样的修改、改变和组合,并且可以将这样的修改、改变和组合视为在本发明构思的范围内。

[0198] 实例

[0199] 实例1.具有两柱循环捕获、自动团注病毒灭活以及连接的流过精制和病毒过滤的半连续过程

[0200] 该实验描述了一种半连续下游纯化过程,该过程使用两柱循环过程进行捕获色谱,见图3,然后是团注病毒灭活,然后是连接的流过精制色谱和病毒过滤过程。

[0201] 将表达重组单克隆抗体(mAb A)的灌注细胞培养物达到所期望的活细胞密度稳定状态,并将收获的细胞培养液(HCCF)收集到缓冲容器(一次性预灭菌袋)中,然后再经亲和色谱单元操作。

[0202] 亲和色谱单元操作包括两个独立的蛋白A色谱撬,“柱1”和“柱2”。每个撬都配备了500mL、8x 10cm柱,其中含有MABSELECT SURE™蛋白A树脂(思拓凡公司(Cytiva),马尔堡,马萨诸塞州),并连接到ÄKTA™纯蛋白纯化系统(思拓凡公司)。修改了ÄKTA™进样阀和柱阀的流动路径,以实现并行柱循环。通过使用交替循环重叠处理,在加载期间没有柱连接(没有柱过载)情况下,蛋白A亲和色谱柱并行循环。在此捕获柱循环策略中,循环的最长阶段(即加载步骤)使用了专用泵(泵1)。其余步骤(洗涤-平衡)使用单独的第二个泵(泵2)执行,从而能够在不同撬上的柱之间重叠柱循环操作,而无需创建柱连接。

[0203] 对于运行#1,柱1在最后一次运行完成时用Tris缓冲液(pH 7.4)进行平衡。中央处理器使用泵1将收获的细胞培养液(HCCF)以5至7.5分钟停留时间的速率加载到柱1上,达到35g/L的加载浓度。为了保持每个柱的独立性,HCCF进料通过共用HCCF进料端口进入ÄKTA™系统的进样阀,但通过直接连接到柱1的端口离开。加载完成后,剩余的进料从柱1离开,并通过仅与柱1直接连接的端口进入ÄKTA™系统的柱阀,然后通过共用废物端口离开,见图11。

[0204] 当HCCF进料完成加载到柱1上后,泵1收到信号以脱离,而泵2收到信号以接合。然后对柱1进行洗涤、洗脱、再生、冲洗并重新平衡。

[0205] 缓冲液通过ÄKTA™系统进样阀上的共用缓冲液进料端口进入,并通过仅直接连接到柱1的端口离开。离开柱1后,流体通过仅直接连接到柱1的端口进入柱阀,并从连接到UV检测器和出口阀的共用出口离开,见图12。冲洗缓冲液和平衡缓冲液是相同的,允许重新平衡柱,为下一个加载循环做准备。

[0206] 加载循环所需的时间长度决定了洗涤至平衡步骤循环的时间长度。确定处理步骤的流速,如果需要的话允许时间间隔,以实现柱1和柱2的并行处理。

[0207] 同时,一旦柱1完成HCCF加载,泵1就会收到信号,开始对柱2进行HCCF加载。HCCF原料通过ÄKTA™系统上的共用HCCF进料端口进入进样阀,但通过仅直接连接到柱2的端口离开。柱2加载完成后,洗出液从柱2离开,到达仅直接连接到柱2的端口处的柱阀,并通过共用废物端口离开。

[0208] 一旦柱2完成HCCF加载,泵1就会收到信号以脱离柱2的加载并再次开始加载柱1。泵2收到信号进行接合,并对柱2进行洗涤、洗脱、再生、冲洗和平衡。缓冲液通过ÄKTA™系统上的共用缓冲液进料端口进入进样阀,并且通过仅直接连接到柱2的端口离开。完成每

个步骤后,来自柱2的洗出液通过仅直接连接到柱2的端口进入柱阀,并在连接到UV检测器和出口阀的共用离开端口处离开柱阀。

[0209] 对于柱1和柱2,使用低pH缓冲液(pH 3.4的100mM甲酸盐)将mAb A从蛋白A树脂洗脱到共用缓冲容器中。洗脱体积为3.1CV,导致蛋白A洗脱池pH值为3.58。选择pH和洗脱体积以实现捕获池pH为 $3.6 \pm 0.1$ 。这使得捕获池在洗脱后立即处于所期望的病毒灭活条件。

[0210] 在将蛋白A捕获池保持在目标pH( $3.6 \pm 0.1$ )下至少15分钟,最多不超过2小时后,将池转移到一次性袋中,并使用静态混合器团注添加中和缓冲液进行同线中和,使目标pH达到5.0。以1份病毒灭活池比0.42份中和缓冲液的比例添加中和缓冲液、170mM乙酸盐、115mM Tris碱pH 8.5。中和缓冲液设计为使用在同线添加过程中可以轻松控制的添加体积,并包含在目标pH下缓冲的背景缓冲剂(乙酸盐)。所得中和病毒灭活池(NVIP)的pH为5.1。

[0211] 含有mAb A的HCCF的蛋白A捕获/病毒灭活/中和循环持续5天,并合并到单个NVIP池中。这个过程经20天总共重复了4次,产生了4个独立的NVIP池。

[0212] 然后通过深度过滤器MILLISTACK™ A1HC(密理博西格玛公司(MilliporeSigma),伯灵顿,马萨诸塞州)过滤池。使用前按照供应商的建议冲洗过滤器。深度过滤器以111LMH加载,并将渗透物收集在缓冲容器中。一旦收集到5升过滤的病毒灭活池(FVIP),就开始流过精制和病毒过滤步骤。

[0213] 将含有FVIP的缓冲容器连接到另一个ÄKTA™纯蛋白纯化系统(思拓凡公司),该系统含有两个连接的柱,阴离子交换色谱柱(AEX) 8x 10cm CAPTO™ Q(思拓凡公司)直接连接到阳离子交换色谱柱(CEX) 8x10cm ESHMUNO® CPX(密理博西格玛公司),然后是病毒过滤器(图13)。AEX-CEX连接柱以8.3分钟停留时间加载至290克/升树脂的加载密度。双柱输出直接转移到病毒过滤器操作中,即预过滤器(MILLISTACK™ A1HC,密理博西格玛公司),然后是VIRE SOLVE Pro病毒过滤器(VPro,密理博西格玛公司)。病毒过滤器(VF)以16LMH的通量加载,预过滤器比病毒过滤器面积的比率为1:4。然后收集VF池并表征产物质量。4个NVIP池中的每一个都进行了类似的处理。

[0214] VF池的进一步处理和配制可以使用已知的超滤和渗滤(UF/DF)方法进行,然后是聚山梨醇酯添加和原料药填充(DS Fill)或连接的UF/DF和DS Fill操作,从而实现完全连续的原料药过程。

[0215] 如上所述,使用mAb A进行第二次运行(运行#2)。在两次运行中,NVIP池每五天收集,然后通过深度过滤/精制/病毒过滤操作进行处理。该过程经20天重复,产生了4个独立的NVIP和VF池,如运行#1中所述。对于运行#2,将连接的AEX/CEX柱以8.3分钟停留时间,90LMH加载至600克/升树脂。

[0216] 运行#1和运行#2的中和的病毒灭活池和病毒过滤池的产物质量如下表1所示。产物质量与稳健的单亲和柱mAb过程一致,证明使用并行处理系统可清除和控制关键杂质。

[0217] 表1. 运行1和2中NVIP和VF池的产物质量属性

运行和样品详细信息		产物质量属性				
		HMW (%)	浸出的蛋白 质A (ppm)	DNA (ppb)	宿主细胞 蛋白 (ppm)	
[0218]	运行#1	NVIP池#1	3.1	NT	NT	214
	NVIP池#2	3.3	NT	NT	213	
	NVIP池#3	3.2	NT	NT	278	
	NVIP池#4	3.4	NT	NT	310	
	VF池#1	0.7	0.42	< 6.7	< 1	
	VF池#2	0.7	0.38	< 6.8	< 1	
	VF池#3	0.7	<0.25	< 6.6	< 1	
[0219]	运行#2	VF池#4	0.7	0.48	< 7.6	< 2
	NVIP池#1	4.7	5.9	5.9	598	
	NVIP池#2	3.8	3.6	7.3	308	
	NVIP池#3	5.7	3.9	< 2.6	201	
	NVIP池#4	3.2	3.6	5.0	79	
	VF池#1	0.9	NT	NT	1	
	VF池#2	0.9	NT	NT	< 1	
	VF池#3	0.8	NT	NT	< 2	
VF池#4	0.8	NT	NT	< 1		

[0220] NT=未测试NVIP=中和的病毒灭活池VF=病毒过滤

[0221] 除了关键杂质之外,还对NVIP池的电荷变体进行了表征。结果如下表2所示。每次运行中四个池的电荷变体都是一致的,并且满足产物质量预期。

[0222] 表2.运行1和2的中和的病毒灭活池中的电荷变体

运行和样品详细信息		电荷变体			
		主峰 (%)	酸性变体 (%)	碱性变体 (%)	
[0223]	运行#1	NVIP池#1	80.1	3.3	16.6
	NVIP池#2	79.4	3.3	17.3	
	NVIP池#3	78.8	3.5	17.7	
	NVIP池#4	79.0	3.7	17.3	
运行#2	NVIP池#1	81.7	3.7	14.6	
	NVIP池#2	81.8	4.0	14.2	
	NVIP池#3	81.0	4.9	14.1	
	NVIP池#4	80.6	3.7	14.8	

[0224] 实例2.用于蛋白A亲和色谱、自动团注病毒灭活/中和、两柱循环CEX精制色谱和流  
过式混合模式色谱的半连续过程

[0225] 实例1中描述的方法被修改为对一个精制色谱操作使用并行处理。该过程包括结合和洗脱模式下的两柱循环阳离子交换色谱(CEX)单元操作与流过模式下的单柱混合模式色谱(MM)单元操作组合。该过程使用双特异性抗体双特异性A进行了测试。

[0226] 双特异性A最初使用亲和色谱单元操作进行处理,该单元操作包括两个平行的蛋白A色谱柱(MABSELECT™ SURE, 思拓凡公司),如实例1中所述。使用pH 3.4的100mM甲酸盐缓冲液洗脱蛋白A柱。重复此操作,产生两个蛋白A洗脱池,一个pH为3.65,另一个pH为3.60。两个蛋白A洗脱池均处于目标pH,因此洗脱池保持 $\geq 30$ 分钟以灭活病毒。然后使用同线静态混合器并团注添加中和缓冲液来中和病毒灭活池。以1份病毒灭活池比0.23份中和缓冲液的比例添加中和缓冲液(170mM乙酸盐、115mM Tris碱pH 8.5)。所得中和病毒灭活池(NVIP)的pH为4.5。NVIP池通过深度过滤器(MILLISTACK A1HC, 密理博西格玛公司)进一步处理,生成经过滤的中和的病毒灭活池(FVIP)。

[0227] FVIP使用两柱阳离子交换单元操作进行处理,如图5所示。CEX色谱操作包括两个CEX色谱撬“柱1”和“柱2”。每个撬包含连接到ÄKTA™纯蛋白纯化系统(思拓凡公司)的500mL 8x 10cm ESHMUNO® CPX CEX色谱柱(密理博西格玛公司)。通过使用交替循环重叠处理,在加载期间没有柱连接(没有柱过载)情况下,CEX色谱柱并行循环。与实例1中描述的并行蛋白A循环策略(其中最长阶段是加载步骤)不同,在此CEX色谱并行循环策略中,循环的最长阶段是洗脱步骤,其使用两个专用泵(泵2A和2B)来控制洗脱梯度。生产过程步骤(再生-平衡)使用单独的泵(泵1)执行,这使得不同撬上的两个平行柱之间的柱循环操作能够重叠,而无需创建柱连接。修改了ÄKTA进样阀和柱阀的流动路径,以实现并行柱循环。

[0228] 平衡CEX柱1,然后使用泵1以150cm/h线速度加载经过滤的病毒灭活池(FVIP),达到5-20g/L的加载密度。选择流速是为了维持柱之间并行循环的时间,提供时间间隔以保持并行柱过程同步。为了保持每个柱的独立性,FVIP进料通过共用FVIP进料端口进入ÄKTA™系统的进样阀,并且通过仅直接连接到柱1的端口离开。加载完成后,剩余的废物从柱1离开,并通过仅与柱1直接连接的端口进入ÄKTA™系统的柱阀,然后通过共用端口离开。

[0229] 当FVIP进料完成加载到柱1上后,洗涤柱。洗涤缓冲液通过ÄKTA™系统进样阀上的共用缓冲液进料端口进入,并通过仅直接连接到柱1的端口离开。离开柱1后,流体通过仅直接连接到柱1的端口进入柱阀,并从连接到共用废物端口的共用离开出口离开。

[0230] 洗涤步骤完成后,泵1收到信号以脱离,泵2A和2B收到信号以开始梯度洗脱。通过氯化钠梯度从CEX柱洗脱双特异性A。

[0231] 并行地,当柱1开始洗脱步骤时,泵1收到信号以开始柱2的生产处理步骤。当洗脱柱1时,加载并洗涤柱2。为了使用单个阀保持每个柱的独立性,两个柱都不同时使用相同的共用端口,进入和离开柱1或柱2的端口直接通向该柱。

[0232] 一旦从柱1中收集到洗出液级分,泵2A和2B就会收到信号以脱离。泵1收到信号,再次开始柱1的生产处理步骤。

[0233] 泵2A和2B收到信号开始洗脱柱2。柱2的洗脱完成后,泵2A和2B收到信号以脱离,泵1收到信号以再次开始柱2的生产处理步骤(通过洗涤再生),泵2A和2B则开始洗脱柱1。

[0234] 然后将柱1和柱2的CEX洗脱池以流过模式加载到平衡混合模式色谱柱(MMC)

(Capto™ Adhere, 思拓凡公司) 上。

[0235] 收集MMC流过池,使其通过病毒去除过滤器,然后使用超滤和渗滤(UF/DF)进行浓缩和配制,得到最终的原料药配制品。

[0236] 产物质量和过程性能符合预期。主要结果如下表3所示。

[0237] 表3. 并行CEX色谱运行的产物质量。

	过程池	HMW (%)
	过滤病毒灭活池 (FVIP)	27% - 34%
[0238]	阳离子交换池 (CEX)	3.5% - 4.0%
	流过式混合模式 (MMC)	1.9%

[0239] 实例3. 蛋白A池中的低pH病毒灭活

[0240] 该实验描述了合适的蛋白A洗脱条件的开发,以实现低pH病毒灭活,而无需在洗脱后进行额外的调节步骤。为了获得pH为 $3.6 \pm 0.1$ 的蛋白A洗脱池,测试了各种洗脱缓冲液配制品。洗脱池体积和洗脱缓冲液强度(缓冲液浓度)通常决定最终收集的蛋白A洗脱池的pH。

[0241] 使最终池pH为 $3.6 \pm 0.1$ 所需的洗脱缓冲液浓度和pH通过筛选实验确定,其中使用浓度为50、75、100、125和150mM的pH为3.2、3.4和3.6甲酸盐洗脱缓冲液。使用ÄKTA™ Avant 150(思拓凡公司)系统将Mab A以36g/L的浓度加载到蛋白A树脂(MABSELECT SURE, 思拓凡公司)上,然后根据表4中的缓冲液条件进行洗脱并且在整个洗脱过程中收集级分。将级分混合以形成代表各种洗脱池收集体积的假池。然后测量假池pH,以确定洗脱缓冲液pH、浓度和收集体积对实现目标池pH  $3.6 \pm 0.1$ 的影响,如表4所示。

[0242] 表4. 实现pH 3.6的蛋白A池的蛋白A缓冲液pH和浓度。

	洗脱缓冲液浓度 (mM)	洗脱缓冲液pH	收集的洗脱体积 (CV)	洗脱结果 池pH
	100	3.4	2.75	3.64
	100	3.4	3	3.63
	100	3.4	3.25	3.62
	100	3.4	3.5	3.61
	100	3.4	3.75	3.6
	100	3.4	4	3.6
	100	3.4	4.25	3.59
	100	3.4	3.1	3.58
	100	3.3	3.21	3.6
[0243]	100	3.35	3.35	3.6
	100	3.4	3.5	3.6
	100	3.45	3.67	3.6
	100	3.5	3.87	3.6
	50	3.3	6.42	3.6
	50	3.35	6.69	3.6
	50	3.4	7	3.6
	50	3.45	7.34	3.6
	50	3.5	7.73	3.6
	75	3.3	4.28	3.6
	75	3.35	4.46	3.6
	75	3.4	4.67	3.6
	75	3.45	4.9	3.6
	75	3.5	5.15	3.6
	125	3.3	2.57	3.6
	125	3.35	2.68	3.6
	125	3.4	2.8	3.6
[0244]	125	3.45	2.94	3.6
	125	3.5	3.09	3.6
	150	3.3	2.14	3.6
	150	3.35	2.23	3.6
	150	3.4	2.33	3.6
	150	3.45	2.45	3.6
	150	3.5	2.58	3.6

[0245] 重复实验,蛋白A柱以36g/L MabA加载并用pH 3.4的100mM甲酸盐洗脱缓冲液洗脱,总共收集3.2个柱体积(CV),图12。这表示相比于洗脱目的重组蛋白所需的最少缓冲液(约1CV)大约2.5CV的额外洗脱缓冲液。最终池pH达到 $3.6 \pm 0.1$ 。

[0246] 结果发现,洗脱缓冲液pH、洗脱缓冲液浓度和池收集体积之间存在相互依赖性。在目标洗脱缓冲液浓度为100mM、缓冲液pH范围为pH 3.3至pH 3.5以及蛋白A池收集体积范围为2.75至4.25CV时,导致目标pH范围将为 $3.6 \pm 0.1$ 。表4显示,可以通过改变蛋白A洗脱缓冲液pH和浓度来优化收集的蛋白A池体积、所需的中和缓冲液以及池蛋白质浓度等参数,从而

使池体积高达7.7CV和低至2.1CV。

[0247] 实例4.mAb病毒灭活团注中和的开发

[0248] 在亲和色谱洗脱池的低pH孵育后,通常会调整池的pH,使其与任何后续的精制色谱步骤更加兼容。典型的中和过程利用高浓度缓冲液(例如1M Tris)将池滴定至目标pH。高浓度缓冲液用于最小化池体积膨胀(最小化滴定剂添加),使设施适合大规模生产。然而,对于更小体积、更强化的生产过程,使用高浓度缓冲液(>0.5M)会使滴定剂的团注添加更难以控制,因为所需的滴定剂体积较小。本实验描述了向病毒灭活的蛋白A洗脱池中团注添加中间浓度中和缓冲液的开发。

[0249] 测试了包含以下两种组分的中和缓冲液配制品:在适当pH下缓冲的缓冲组分和将pH值调节至目标值的滴定剂组分。对不同浓度的缓冲和滴定组分进行了测试,以鉴定那些导致池电导率 $\leq 10\text{mS/cm}$ 且池体积增加50%或更少的组分,这对于较小规模的制造过程更有用(数据未显示)。乙酸钠(NaOAc)和Tris碱的组合满足这些要求并进行了进一步测试。

[0250] 将含有乙酸钠和Tris碱的中和缓冲液配制品以团注量添加到两种不同的mAb A浓度(35g/Lr和17.5g/Lr)中,并测量所得池的pH。该实验模拟了同线静态混合器,其通过池相比于滴定液流速的比率来控制滴定剂的比率。团注中和实验的测试条件和结果如表5所示。

[0251] 表5.中和病毒灭活池至pH  $5.0 \pm 0.1$ 的滴定剂体积的确定

滴定剂说明	池说明	滴定剂体 积/池体积 (mL/L)	总滴定剂体 积 (Vol%池)	结果池 pH	池电导率 (mS/cm)
[0252] 0.238M NaOAc, 0.185 M Tris碱	ProA池 35 g/Lr加载 用pH 3.4甲酸盐洗脱	0	0	3.57	
		67	7	3.95	
		133	13	4.34	
		167	17	4.53	
		200	20	4.69	
		233	23	4.86	
		267	27	5.02	
		280	28	5.08	8.2
	ProA池 17.5 g/Lr加载 用pH 3.4甲酸盐洗脱	0	0	3.53	
		67	7	3.88	
		133	13	4.24	
		200	20	4.57	
		233	23	4.75	
		267	27	4.9	
300		30	5.04		
313	31	5.11	8.2		
0.17M NaOAc, 0.115 M Tris碱	ProA池 17.5 g/Lr加载 用pH 3.4甲酸盐洗脱	0	0	3.54	
		67	7	3.77	
		133	13	4.01	
		200	20	4.24	
		267	27	4.47	
		333	33	4.67	
		400	40	4.85	
		420	42	4.9	

[0253]		460	46	5	
		500	50	5.1	7.6
	ProA池 35 g/Lr加载 用pH 3.4甲酸盐洗脱	0	0	3.59	
		45	5	3.75	
		170	17	4.21	
		295	30	4.65	
		358	36	4.82	
		420	42	5	
		451	45	5.08	7.7

[0254] 优选的滴定剂配制品为17g/Lr和35g/Lr蛋白A加载池提供了pH 5.0±0.1且电导率≤10mS/cm的池,并导致池体积增加≤50%。

[0255] 实例5.小规模连接双柱精制和病毒过滤操作

[0256] 该实验提供了缩小规模的双柱连接精制和病毒过滤操作,在实验室规模上进行测试。表6描述了单元操作、规模和过程参数。该过程在代表性过滤病毒灭活池(FVIP)中使用mAb A进行了测试。对于平衡和洗涤缓冲液使用100mM乙酸钠、pH 5.0、约5mS/cm<sub>s</sub>执行该过程。病毒预过滤器(VIRESOLVE® (VPF) 密理博西格玛公司)和病毒过滤器(VIRESOLVE® Pro (VPro), 密理博西格玛公司)在与连接的CAPTO Q阴离子交换(AEX)柱和Eshmuno CPX阳离子交换(CEX)柱(均来自思拓凡公司)同线连接之前用水冲洗。

[0257] 使用改进的ÄKTA™ AVANT 150周期性逆流色谱(PCC)系统(思拓凡公司)将连接的色谱柱和病毒预过滤器/病毒过滤器一起同线平衡。对于整个单元操作,病毒过滤器的压力保持在10psi以下。双柱连接精制和病毒过滤的两次测试运行(运行#1和运行#2)的结果如表7所示。两次测试运行均显示出高分子量种类(HMW)和宿主细胞蛋白(CHOP)的良好去除效果,且整体步骤产率可接受(约80%)。

[0258] 表6.柱条件

单元操作	参数	实验室规模	过程规模
[0259] CAPTO Q 阴离子交换 (AEX) 流过色谱	柱尺寸 (cm)	0.66 x 6.7	8 x 10
	柱体积 (mL)	2.3	500

	流速 (mL/min)	0.46	100
	停留时间 (min)	5.0	5.0
	加载水平 (g/Lr)	600	600
[0260] ESHMUNO CPX 阳离子交换 (CEX) 前沿色谱	柱尺寸 (cm)	0.66 x 6.7	8 x 10
	柱体积 (mL)	2.3	500
	流速 (mL/min)	0.46	100
	停留时间 (min)	5.0	5.0
	加载水平 (g/Lr)	600	600
VPF/VPro 目的: 病毒清除	预过滤器装置	OptiScale-40	POD
	VPF 膜面积 (cm <sup>2</sup> )	5	1100
	病毒过滤器装置	Micro	Modus 1.2
	VF 膜面积 (cm <sup>2</sup> )	3.1	700
	VPro 通量 (LMH)	89	86

[0261] 表7. 实验室规模双柱连接精制和病毒过滤测试的结果

样品 ID	步骤产率 (%)	QSEC %HMW	rCE %LC+HC	CHOP (ppm)
加载	-	3.8	96.5	67
FVIP 池	80.5	1.2	97.6	5
[0262] mAb A 池 运行#1 AEX → CEX → VF	82.6	0.9	NT	≤ 7
mAb A 池 运行#2 AEX → CEX → VF	84.1	≤ 1.0	≥ 97	≤ 24

[0263] NT=未测试

[0264] 使用mAb A执行第三实验室规模测试运行(运行#3),以表征使用mAb A中和病毒灭活池(NVIP)使用上述相同条件的另外杂质去除情况。运行#3的结果如表7所示。该过程显示HMW、CHOP、DNA和浸出的蛋白质A的清除符合预期。过程产率也在预期范围内。

[0265] 表8. 表征另外杂质去除的实验室规模测试运行#3

样品ID	步骤产率 (%)	HMW (%)	CHOP (ppm)	DNA (ppb)	浸出的蛋白质A (ppm)
NVIP	-	5.0	228	5.3	5.6
[0266] mAb A池 运行#3 AEX → CEX → VF	82	0.8	17	< 1.9	2.1

[0267] 此外,在使用上述条件独立地运行的AEX和CEX柱上进行病毒去除测试,以表征AEX和CEX步骤的病毒清除能力。柱中掺入了嗜异性鼠白血病病毒(XMuLV)并加载至800g/Lr。AEX柱的产物产率为98%,XMuLV清除率为3.4Log。CEX柱的产物产率为84%,XMuLV清除率为4.0Log。

[0268] 实例6.使用双特异性B进行连接双柱流过精制。

[0269] 根据实例2中描述的程序使用双特异性抗体双特异性B生成蛋白A捕获池,不同的是在pH 3.9下进行洗脱。通过使用乙酸滴定至pH 3.6,然后用Tris碱滴定至pH 5.0并保持约1小时来进行病毒灭活。使用深层过滤器(Millistak A1HC,密理博西格玛公司)过滤中和的病毒灭活池,并将FVIP作为单个池收集并调节至5mM NaCl。

[0270] 经调节的FVIP池用于筛选两柱连接流过精制步骤的最佳条件,该步骤包括作为第一柱的阳离子交换(CEX)色谱柱(SP-ImpRes HiScreen 4.7mL,思拓凡公司),然后是混合模式(MMC)色谱柱(Capto Adhere HiScreen 4.7mL,通用健康医疗集团(GE Healthcare))。两个柱均用100mM乙酸盐(pH 5.0)、150mM和175mM NaCl进行平衡。所有过程步骤均以150cm/hr执行。为了便于取样,各柱独立操作,在加载到MMC柱之前对CEX洗出液池进行表征。将双特异性B以75g/L加载到CEX和MMC上,并用平衡缓冲液洗涤。

[0271] 过程条件及产物质量结果见表8。这两个精制步骤旨在一起工作以提供一致的结果。在150mM NaCl下,CEX柱去除了较多的具有预期较低产率的高分子量种类(HMW),而MMC柱进一步去除了具有较高产率的HMW。相反,在175mM NaCl下,CEX柱去除了较少的具有高产率的HMW,而MMC柱去除了较多的具有较低产率的HMW。组合的连接的精制的总产率将相似,约55%,所得池纯度相似,约1.6%HMW。

[0272] 表9.连接双柱精制的过程条件和产物质量

参数	150 mM NaCl pH 5.0	175 mM NaCl pH 5.0
加载(FVIP) HMW (%)	25.7	25.9
CEX产率 (%)	65	82
CEX HMW (%)	4.7	12.1
MMC产率 (%)	88	67
MMC HMW (%)	1.6	1.6
总体精制 步骤产率 (%)	57	55
[CEX产率 x MCC产率]		

[0273]

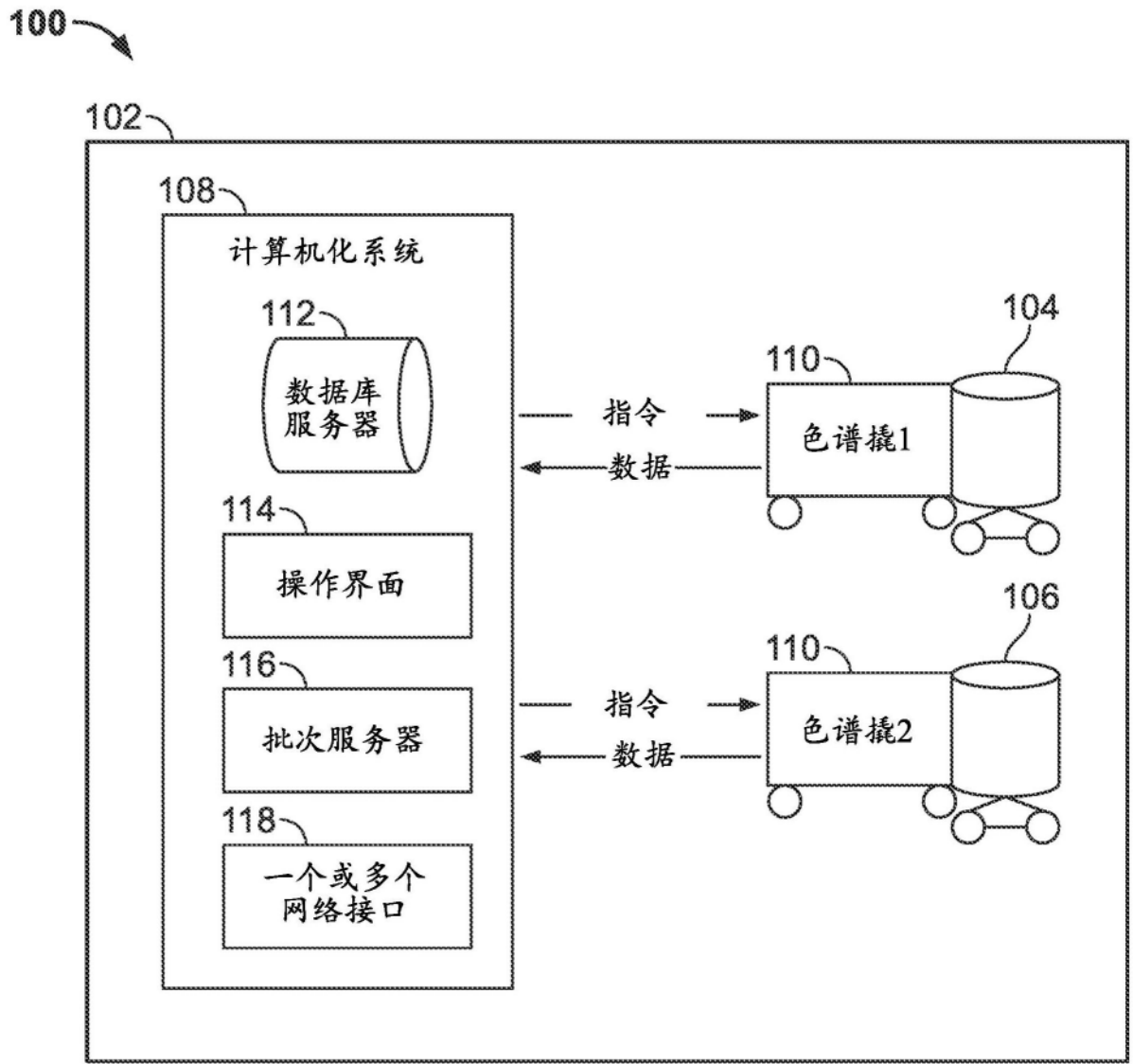


图1

200

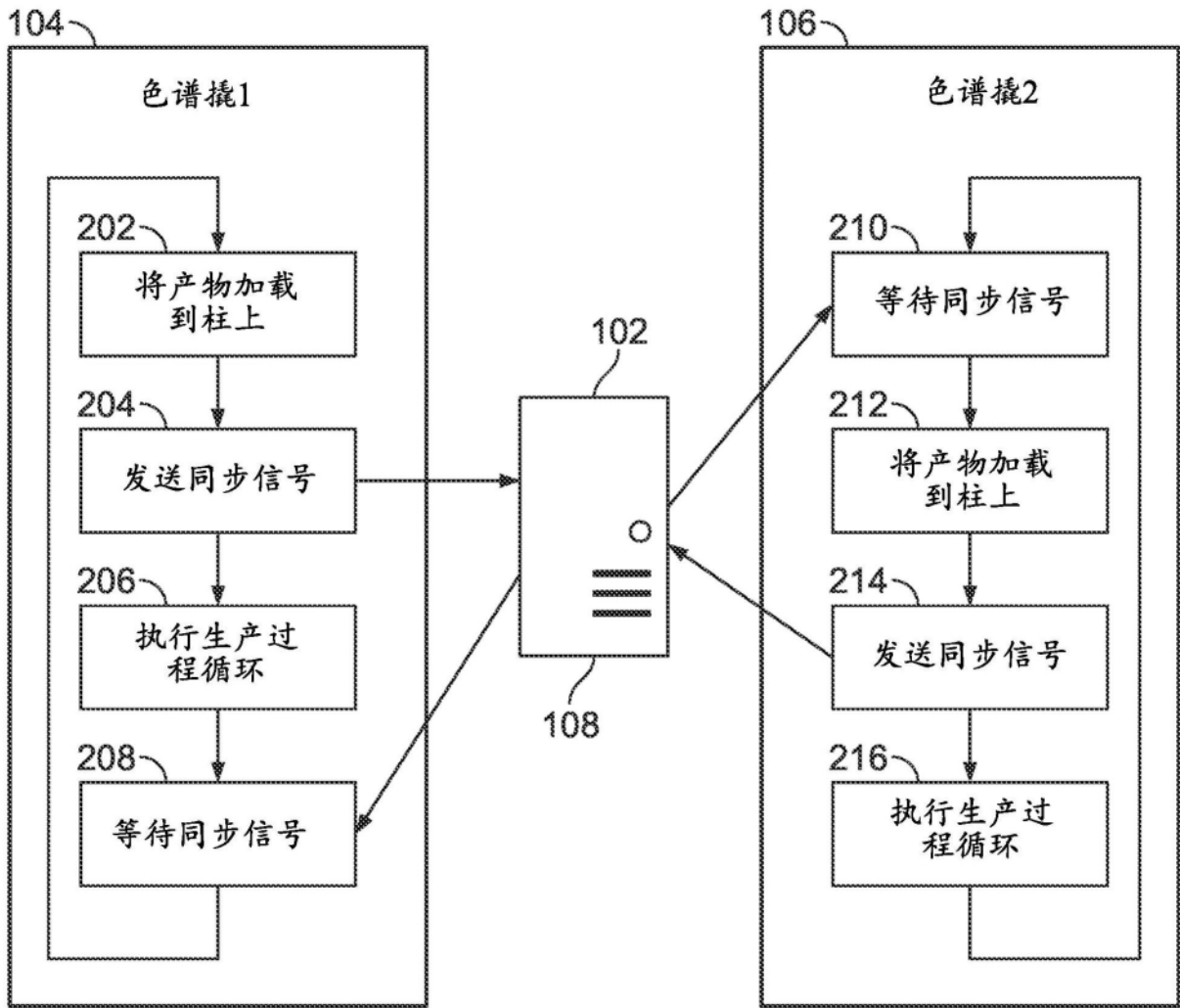


图2

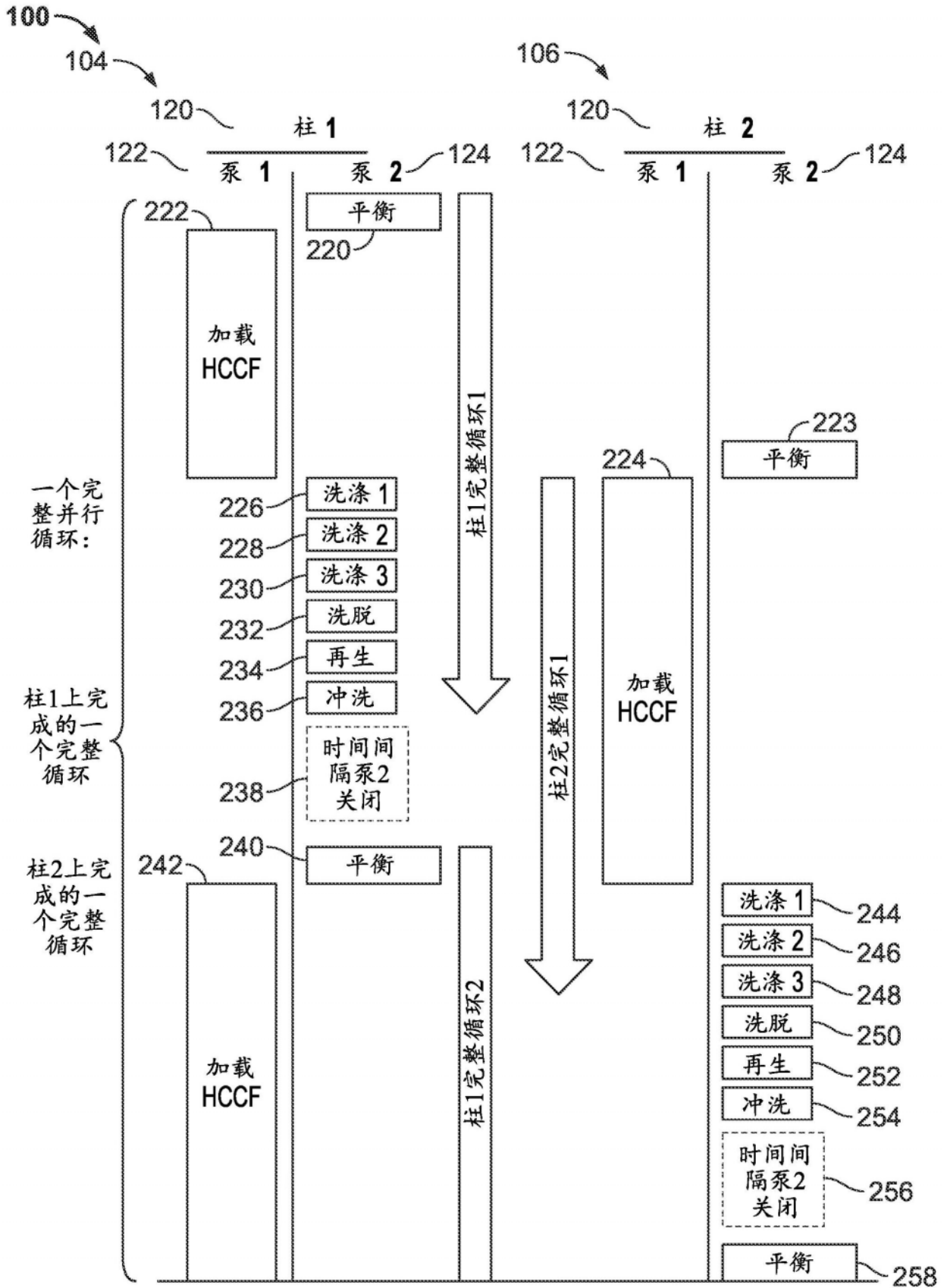


图3

300

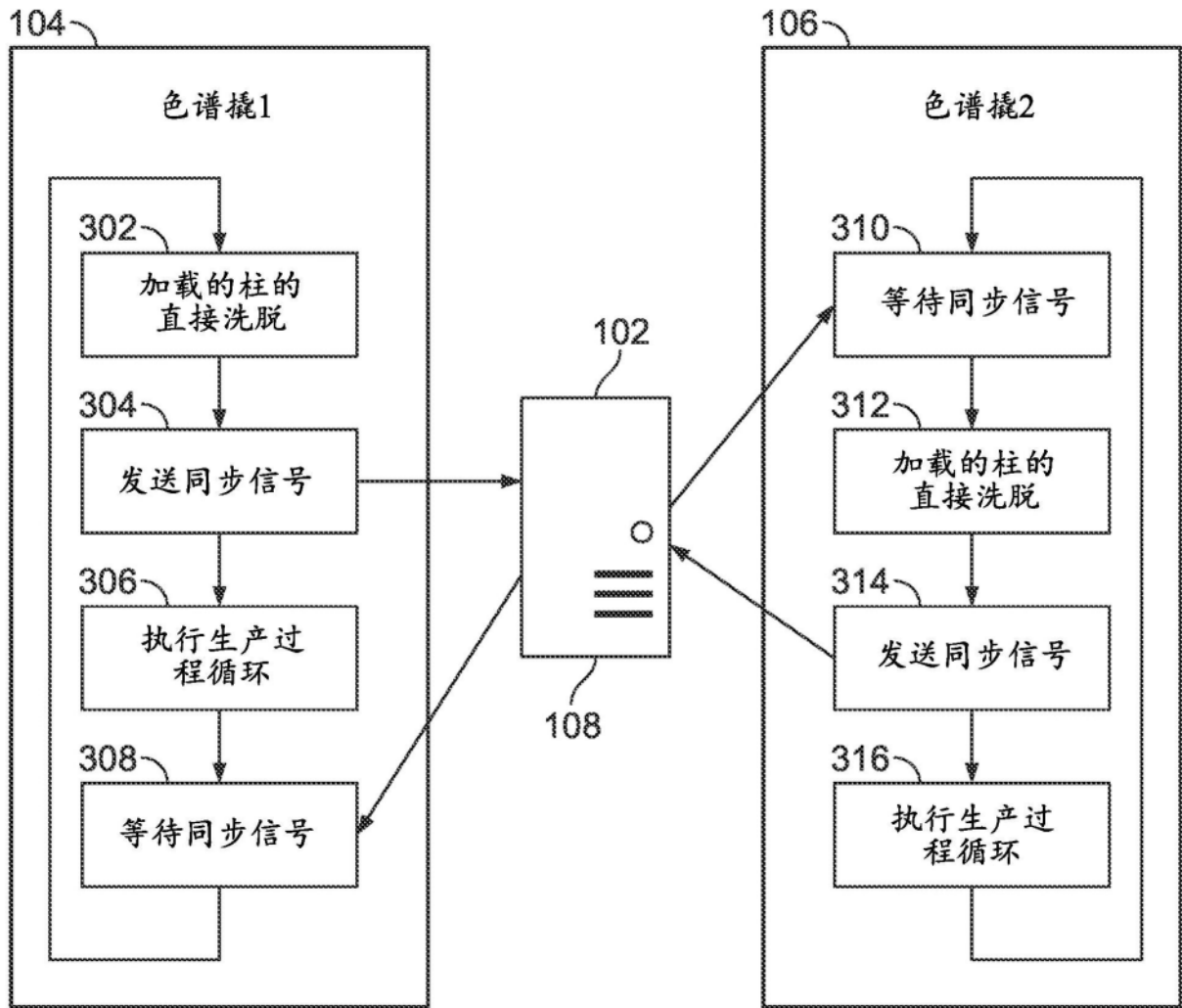


图4

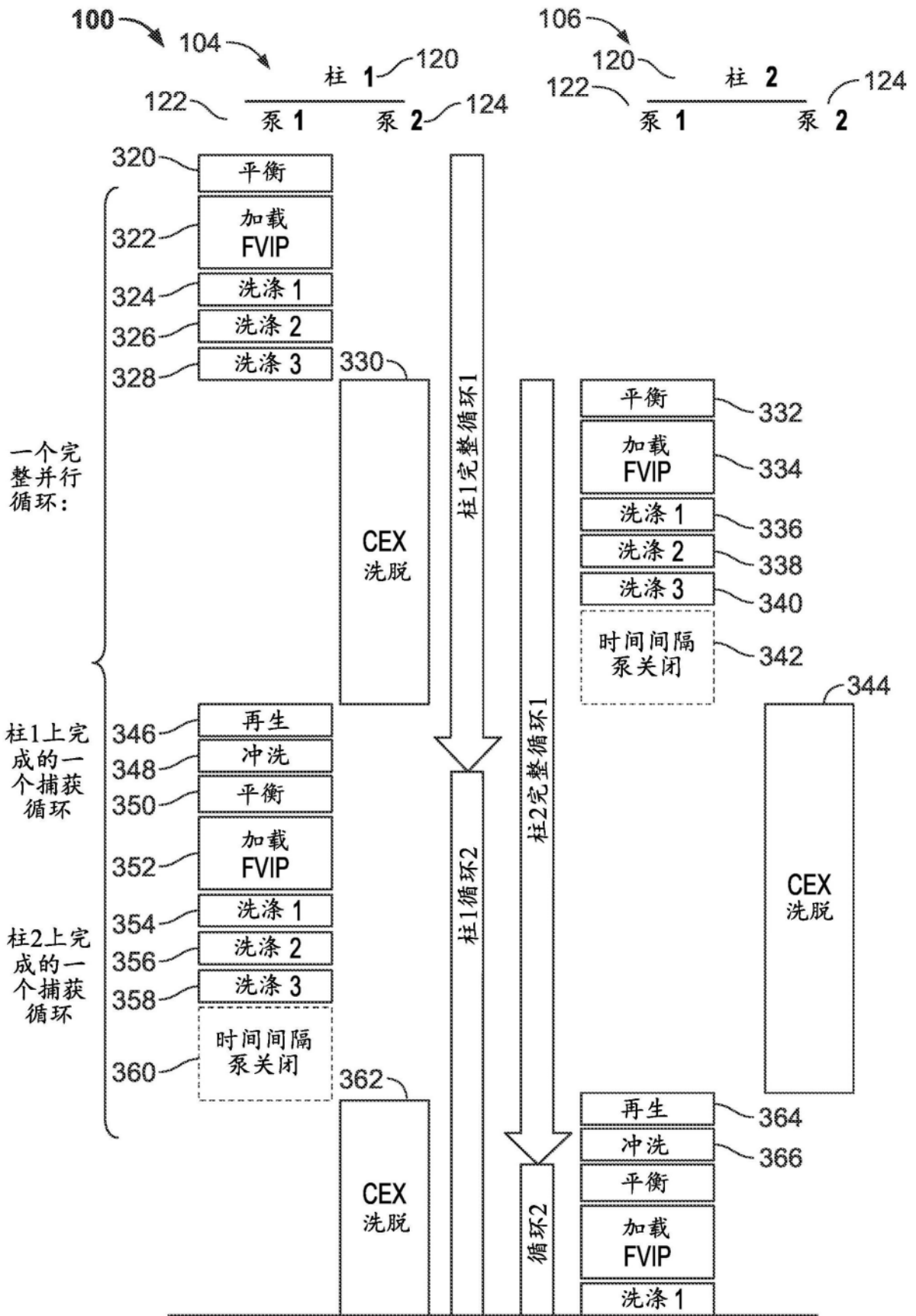


图5

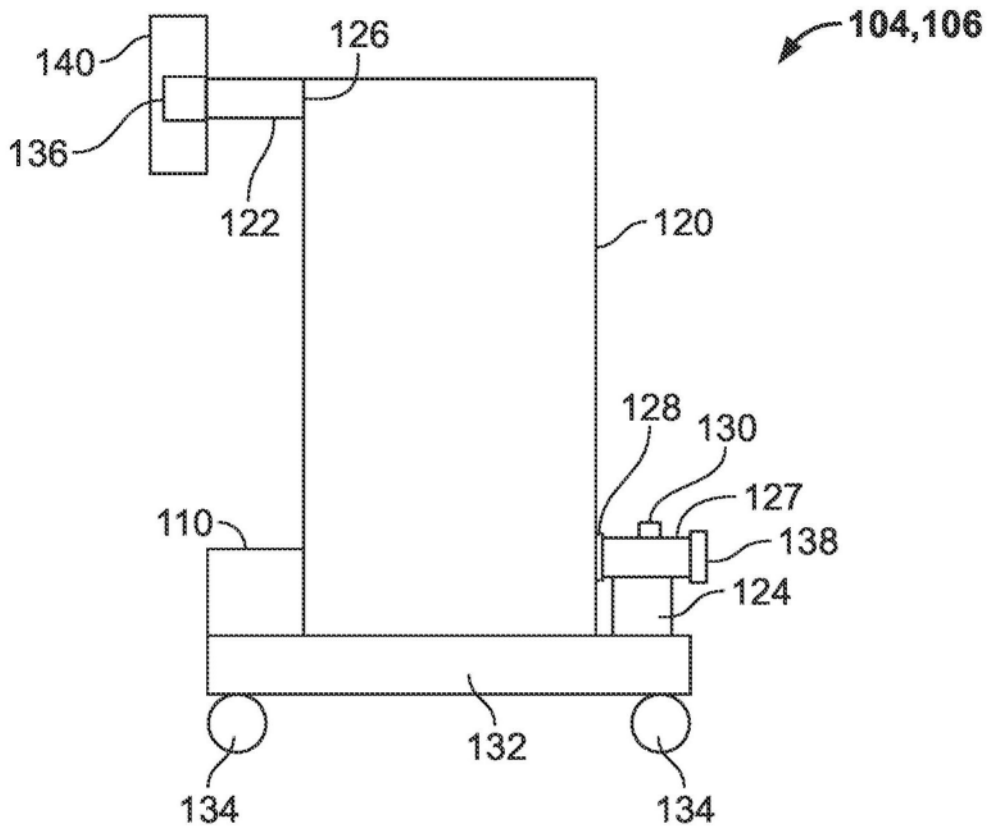


图6

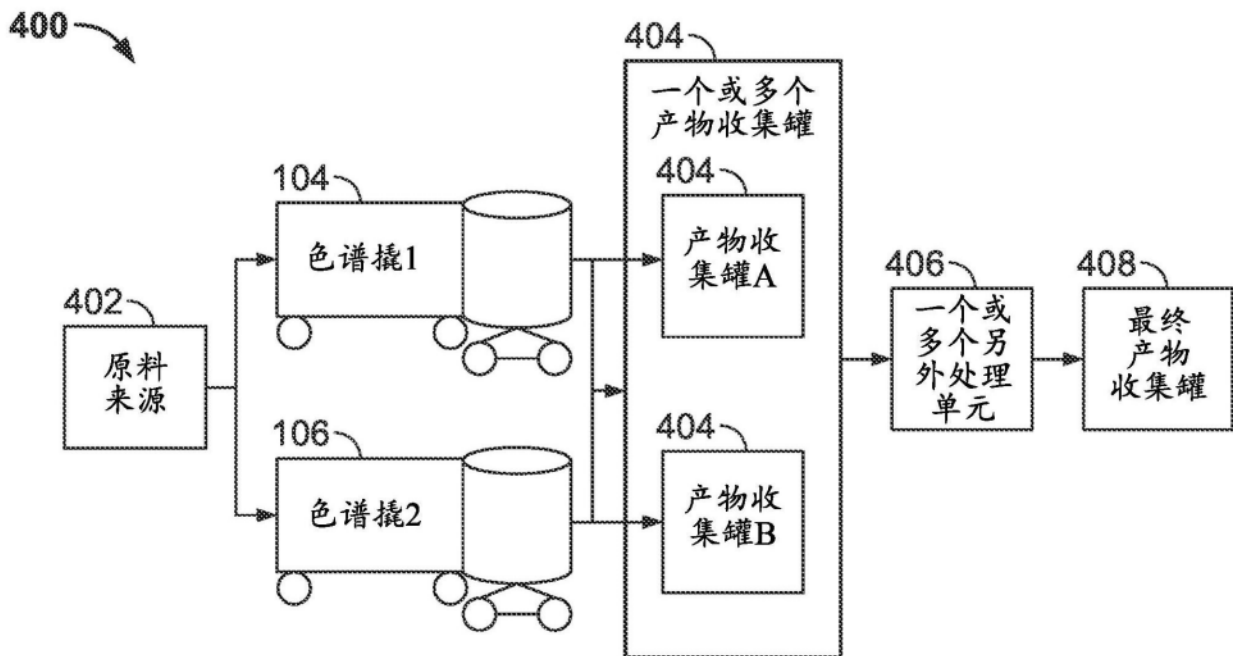


图7

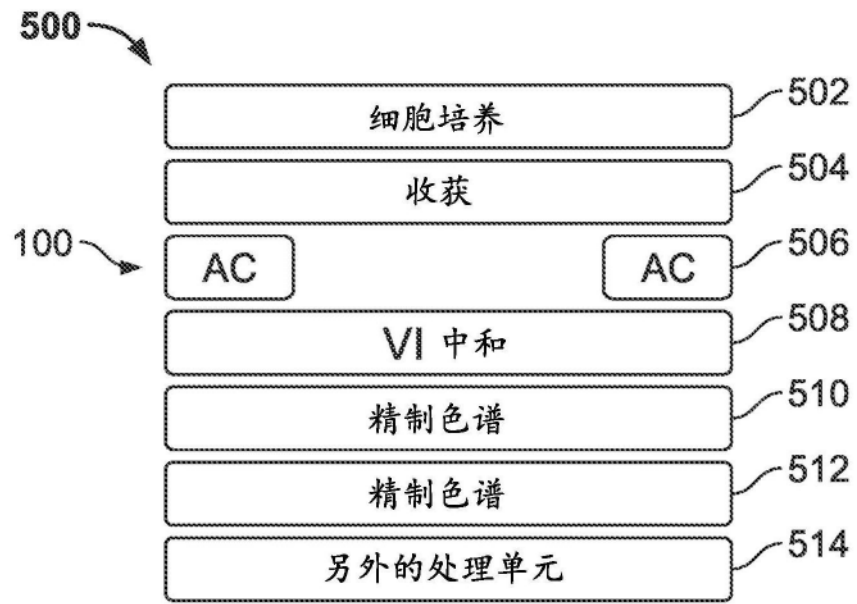


图8

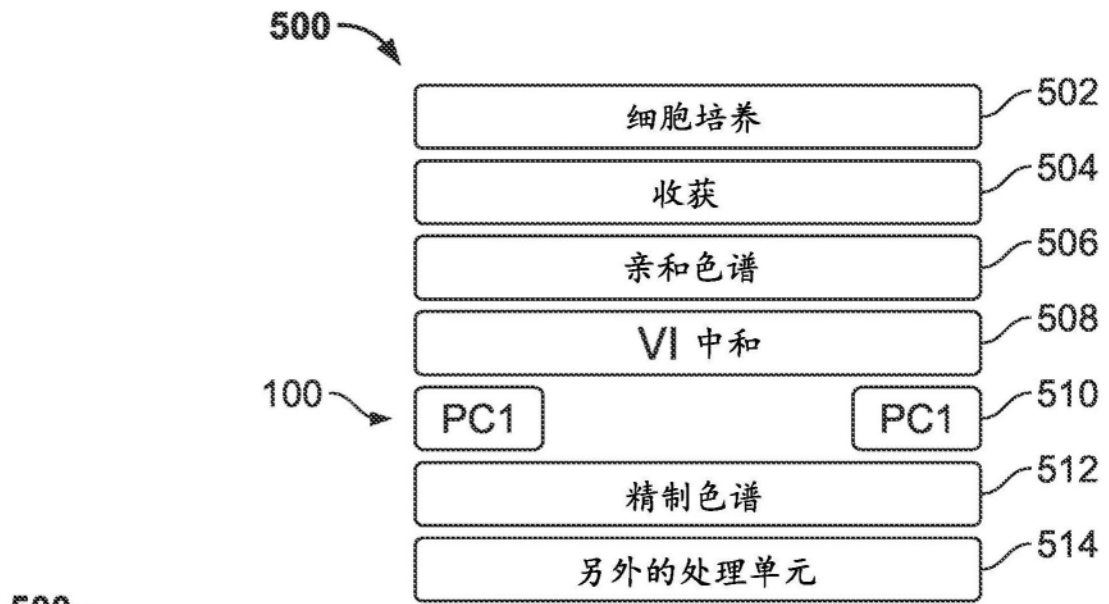


图 9

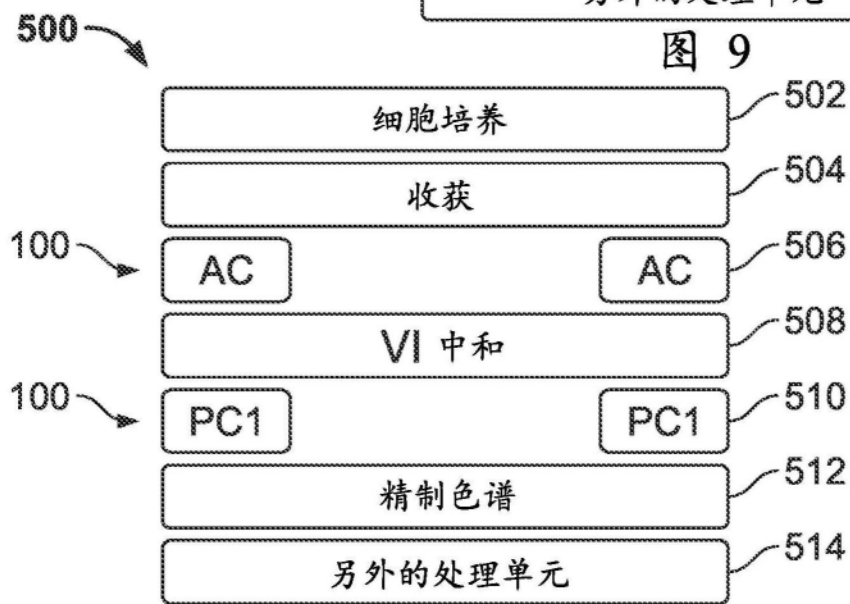


图 10

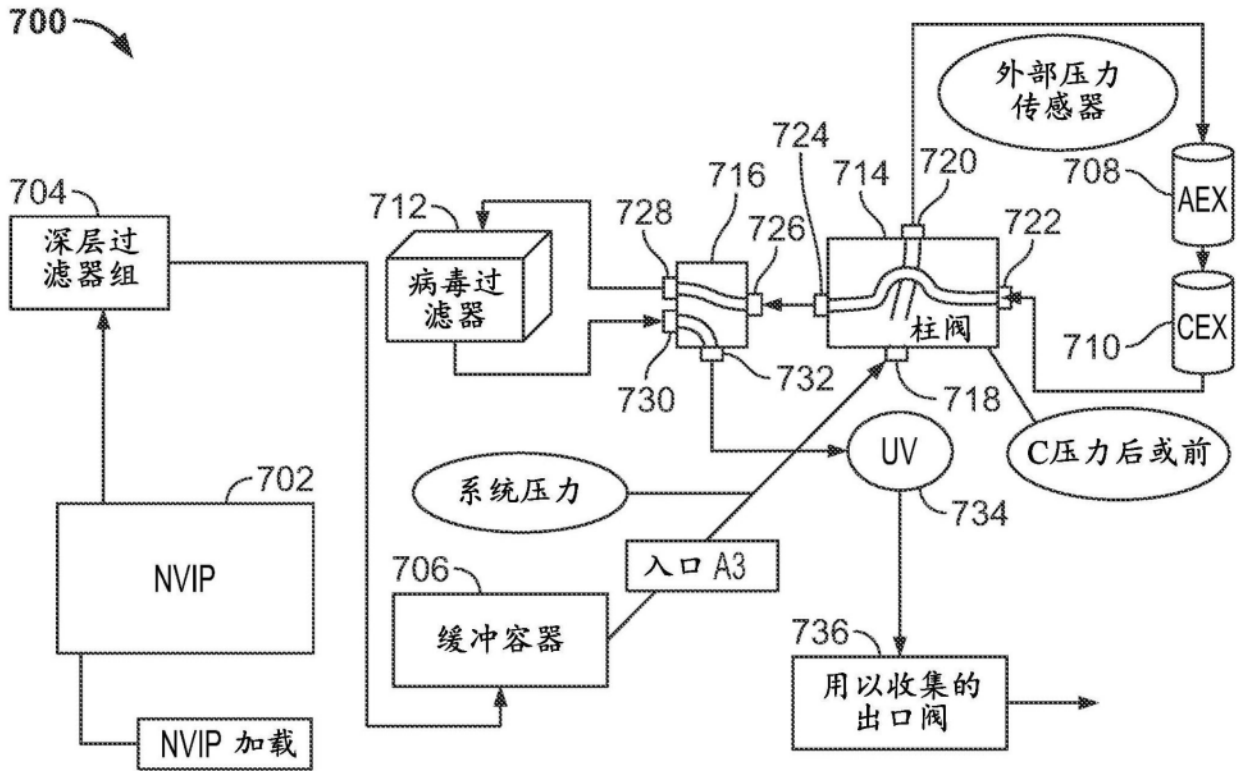


图11

洗脱缓冲液pH和池体积对ProA池pH的影响  
(36g/Lr, 100mM 甲酸盐)

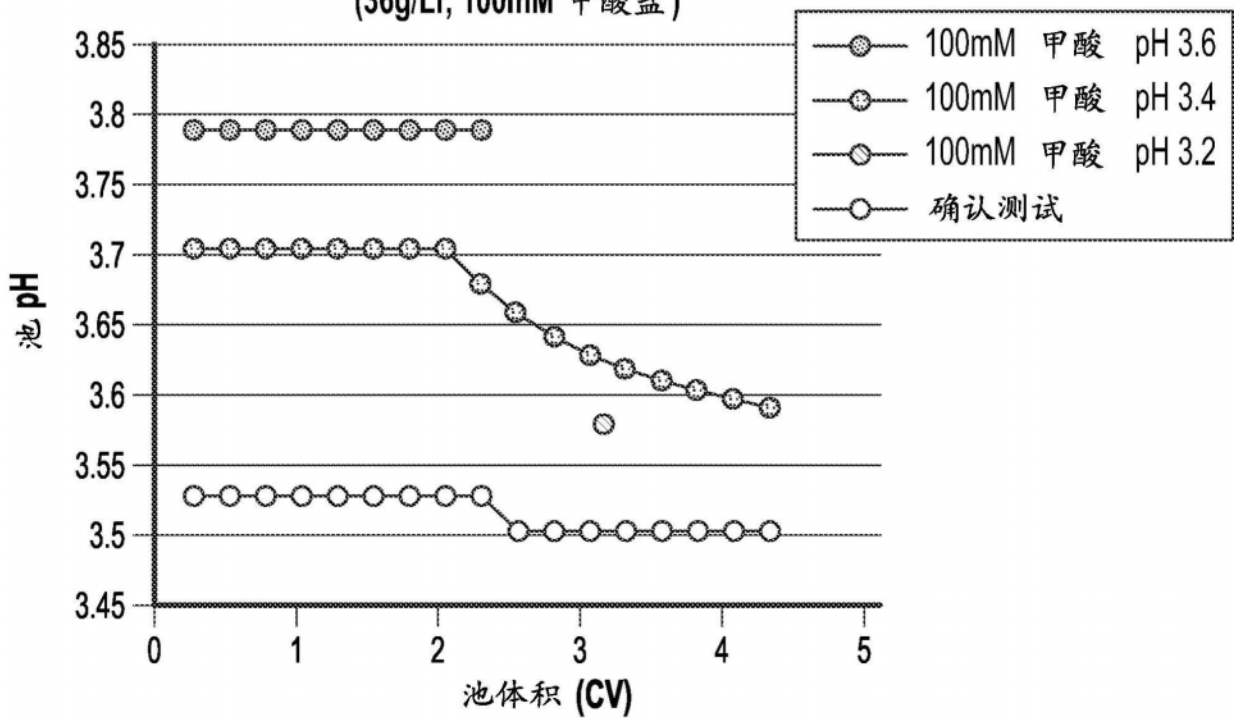


图12