



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107995924 B

(45) 授权公告日 2021.09.07

(21) 申请号 201680039860.3

(22) 申请日 2016.04.29

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107995924 A

(43) 申请公布日 2018.05.04

(30) 优先权数据

15166686.4 2015.05.07 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.01.05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/059700 2016.04.29

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2016/177650 DE 2016.11.10

(73) 专利权人 拜耳股份公司

地址 德国莱沃库森

(72) 发明人 B.迈泽 P.施万 M.洛贝丹

V.默尔勒

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

(51) Int.Cl.

C12M 1/12 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 1/20 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104395341 A, 2015.03.04

CN 103026220 A, 2013.04.03

CN 101171331 A, 2008.04.30

US 2014284271 A1, 2014.09.25

CN 102647929 A, 2012.08.22

US 2009084267 A1, 2009.04.02

CN 104284676 A, 2015.01.14

US 2013344535 A1, 2013.12.26

CN 102498381 A, 2012.06.13

审查员 汪毅

权利要求书1页 说明书13页 附图4页

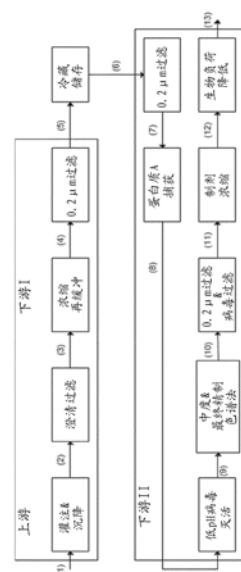
### (54) 发明名称

用于连续且微生物减少地生产和/或处理产品的模块化设备和方法

### (57) 摘要

本发明提供由非均质细胞培养液混合物连续且微生物减少地生产和/或处理生物制药的生物大分子产品的方法,其包含步骤:(a)以产品料流的形式提供来自含所述产品的非均质细胞培养液混合物的无粒子流体,(b)至少一次过滤,以提供滤液,(c)至少两个用于提纯所述产品的色谱步骤,(d)至少一次病毒耗减,(e)步骤(b)、(c)和/或(d)的产品料流的至少一次超滤和/或至少一次渗滤,其特征在于来自(c)的所述至少两个色谱步骤包含经由至少各两个色谱柱和/或膜吸附器的提纯并且所述方法以封闭和模块化的方式进行。本发明进一步提供进行所述方法的相应

模块化设备。



1. 由非均质细胞培养液混合物连续且微生物减少地生产和/或处理生物制药的生物大分子产品的方法,其包含步骤:

(a) 以产品料流 (26) 的形式提供来自含所述产品的非均质细胞培养液混合物的无粒子流体,

(b) 至少一次过滤,以提供滤液,

(c) 至少两个用于提纯所述产品的色谱步骤,

(d) 至少一次病毒耗减,

(e) 步骤 (b)、(c) 和/或 (d) 的产品料流 (26) 的至少一次超滤和/或至少一次渗滤,

其特征在于来自 (c) 的所述至少两个色谱步骤包含经由至少各两个色谱柱 (4) 和/或膜吸附器 (5) 的提纯,并且

所述方法以封闭和模块化的方式进行,并且

其特征在于借助合适的微生物减少方法对步骤 (a) 至 (e) 中使用的与产品接触的所有元件施以微生物减少,其中所述微生物减少方法选自  $\gamma$  辐射、 $\beta$  辐射、高压灭菌、环氧乙烷 (ETO) 处理、臭氧处理 ( $O_3$ )、过氧化氢处理 ( $H_2O_2$ ) 和原位蒸汽灭菌 (SIP) 处理,

对步骤 (a) 至 (e) 中使用的所有液体、气体和固体施以微生物减少,其中所述微生物减少通过经具有  $\leq 0.45\mu m$  的孔径的过滤器 (13) 过滤实现,并且在所述方法的过程中不进行进程内灭菌,

并且其中所述方法的特征在于在步骤 (a) 至 (e) 之间和/或此后进行包含至少一个过滤器 (13) 的至少一个过滤步骤,其中在微生物减少条件下自动更换所述至少一个过滤器 (13),所述自动过滤器更换包含下列步骤:

(i) 在流路关闭下在超过非滤液侧上的压力传感器 (18) 处的阈值且其中通过气体或液体将旧过滤器 (17) 中的产品推入滤液侧的情况下,或在超过流路中的旧过滤器 (17) 的最大时间的情况下,或在超过经过旧过滤器 (17) 的滤液的最大体积的情况下,将流路切换至新过滤器 (16),

(ii) 经由新过滤器 (16) 的排气阀 (20) 处的具有  $\leq 0.25\mu m$  的孔径的空气过滤器 (19) 将新过滤器 (16) 排气,借助进料泵 (21) 将产品传送至新过滤器 (16) 或以微生物减少方式连接的封闭袋 (29),

(iii) 在非滤液侧上借助压力传感器 (18) 或料位传感器 (22) 或天平 (23) 或液体检测器 (28) 检测新过滤器 (16) 的排气结束,

(iv) 借助阀 (24) 打开滤液出口和关闭在排气阀 (20) 和空气过滤器 (19) 之间的流路,和

(v) 将旧过滤器 (17) 换成新过滤器 (16)。

## 用于连续且微生物减少地生产和/或处理产品的模块化设备 和方法

[0001] 本发明涉及用于由非均质细胞培养液混合物连续且微生物减少地生产和/或处理产品的模块化设备和方法。

[0002] 在生物技术生产中,蛋白质通常分批提纯。这意味着各生产周期以分批方式不连续操作,其中在生产周期结束后取出整个产品。为了再生产,必须然后单独启动新生产周期或批次。

[0003] 近年来,越来越证实,在生物技术生产中也可以进行连续程序,其中不同于分批法,该方法可以无中断地运行。

[0004] 高度管制的制药生产要求在时间、技术和人员方面大量支出以提供清洁且无菌的生物反应器并确保无菌产品。为可靠地避免在多功能设备中或在两个产品批次之间的产品更换时的交叉污染,除清洁外还需要非常复杂的清洁验证,其在工艺调适时任选地必须重复。

[0005] 这既适用于上游处理(USP),即发酵器中的生物产品的生产,又适用于下游处理(DSP),即发酵产品的提纯。

[0006] 恰好在发酵时,无菌环境对成功培养而言是基本的。为了将分批发酵器或补料分批发酵器灭菌,通常使用SIP技术(SIP = 原位灭菌)。

[0007] 由准备程序造成的反应器停工期可能位于反应器可利用性的数量级,尤其是在短使用期和频繁产品更换的情况下。这在生物技术生产的USP中例如影响培养基制备和发酵的工艺步骤并在DSP中影响溶解、冷冻、解冻、pH调节、产品分离(例如通过色谱法、沉淀或结晶)、再缓冲(Umpuffern)和病毒灭活。

[0008] 在下游区域中,法规要求是贫微生物的工艺管理。因此,在分批操作的情况下不需要无菌工艺。但是,在连续工艺中,蛋白质的提纯经较长时间且尽可能无清洁步骤地进行。这优选在提纯过程中没有灭菌步骤的情况下进行。但是在此,微生物污染风险比纯分批操作的情况下高许多倍。

[0009] W02012/078677描述了借助色谱法连续处理生物制药产品的方法和设备及其集成在生产设备中,特别在一次性设备中。尽管W02012/078677提供连续生产生物制药产品和生物产品的方法,但所公开的解决方案在实践中不够胜任。W02012/078677也没有公开灭菌色谱柱的使用。

[0010] US 2014/0255994 A1公开了用于生产治疗性蛋白质的集成连续方法。但是,US 2014/0255994 A1没有公开在这种方法中可以使用灭菌色谱柱的特征。

[0011] EP 2 182 990 A1公开了通过使用热水蒸气将色谱柱灭菌的方法。

[0012] 首先,更详细定义一些术语。

[0013] 在本发明中,连续法是指连续进行至少两个工艺步骤的各种方法,在所述方法中将上游步骤的输出料流传送至下游步骤。在上游步骤结束前,下游步骤开始处理产品料流。通常,在连续法中,在生产设备中始终传送一部分产品料流并被称作“连续产品料流”。相应地,产品料流从上游单元连续传送或转移至下游单元意味着在上游单元停止运行之前下游

单元已经工作,即两个依次连接的单元同时处理流经它们的产品料流。

[0014] 在本发明中,术语“微生物减少”是指通过合适的微生物减少方法可实现的微生物计数减少的状态,即每单位面积或单位体积的微生物计数几乎为0,其中所述微生物减少方法可以选自 $\gamma$ 辐射、 $\beta$ 辐射、高压灭菌、环氧乙烷(ETO)处理和“原位蒸汽灭菌”(SIP)处理。

[0015] 在本发明中,术语“一次性制品”是指与产品接触的相关部分,特别是装置、容器、过滤器和连接元件,其适合于一次性使用并随后弃置,其中所述容器既可以由塑料也可以由金属制成。在本发明中,该术语也包括在本发明的方法中仅使用一次并且随后在该方法中不再使用的可重复使用制品,其例如由钢制成。在本发明中,由例如钢制成的所述可重复使用制品此时也被称作“用作一次性制品的物体”。如此使用的一次性制品此时在根据本发明的方法中也可被称作“用后即弃”或“单次使用(Single-Use)”制品(“SU技术”)。由此还进一步改进本发明的方法和模块化设备的微生物减少状态。

[0016] 在本发明中,术语“产品料流”是指来自含产品的非均质细胞培养液混合物的无粒子流体,以及本发明的方法的各其它方法步骤的产品,即过滤后、色谱法后、病毒耗减(Virenabreicherung)后、超滤后、渗滤后或本发明的方法的进一步步骤后的产品料流,其中所述产品料流随后可以具有不同浓度和纯度。

[0017] 在本发明中,术语“病毒耗减”是指待处理的流体的每单位体积活性病毒浓度降低,直至待处理的流体中所含的病毒完全灭活和/或清除。

[0018] 在本发明中,术语“杀微生物剂”是指可以减慢或完全抑制微生物生长的物质,其中所述杀微生物剂可以以含杀微生物剂的缓冲液形式使用,尤其是在本发明的方法中在超滤过程中。

[0019] 在本发明中,术语“气泡收集器”是指用于收集气泡的装置,其中相关流体在此过程中脱气。

[0020] 在本发明中,术语“模块化”是指本发明的方法的各步骤可以在互相连接的单独模块中进行,其中该模块是预配置和微生物减少的,并可以以封闭方式且以不同的组合互相连接。

[0021] 在本发明中,术语“模块化设备”是指用于进行至少两个下游和/或上游步骤的一系列互相连接的模块(“单元”),其中可传送流体(“产品料流”)。根据本发明,这些单元适用于连续进行一个步骤并可以用连续流体料流(“产品料流”)运行。在此,“模块化设备”的各模块可以以各种组合互相连接。在本发明中,模块的实例是过滤模块2、色谱模块3、超滤模块6、渗滤模块7和渗析模块8。

[0022] 在本发明中,术语“封闭”是指本发明的方法和本发明的模块化设备的运行模式,它们的运行使得通过所述方法和所述模块化设备生产和/或处理的产品不暴露在室内环境下。材料、物体、缓冲液等可从外部添加到本发明的封闭方法和相应的本发明的封闭模块化设备中,但是这种添加以避免生产和/或处理的产品暴露在室内环境下的方式进行。

[0023] 现有技术中已知的常见方法具有下文涉及的一系列缺点。

[0024] 用于生产生物制药和生物产品的已知方法通常包含互相连接的下列生产步骤:

[0025] 1. 灌注培养

[0026] 2. 细胞截留系统,

[0027] 作为步骤1和2的替代,也可以使用补料分批培养,

- [0028] 3. 细胞分离 (Abtrennung)
- [0029] 4. 缓冲液或培养基更换, 优选伴随着浓缩
- [0030] 5. 生物负荷降低, 优选通过无菌过滤
- [0031] 6. 捕获色谱法。
- [0032] 通常, 进行用于进一步提纯产品料流的进一步步骤, 特别是:
- [0033] 7. 病毒灭活
- [0034] 8. 中和, 和
- [0035] 9. 任选进一步深度过滤, 生物负荷降低 (无菌过滤)。
- [0036] 考虑到生物药品生产中的高质量标准, 通常另外接着进行下列步骤:
- [0037] 10. 色谱中间-和精细提纯
- [0038] 11. 生物负荷降低, 例如无菌过滤
- [0039] 12. 病毒过滤
- [0040] 13. 缓冲液更换, 并优选浓缩, 和
- [0041] 14. 无菌过滤。
- [0042] 在上述生产中, 含营养液的发酵器中的细胞产生生物产品, 例如蛋白质, 例如治疗性蛋白质。该营养液也是微生物如细菌和孢子的理想生长培养基, 由于此类微生物的这种生长不合意, 由此出现问题。微生物的所述不合意生长在较长运行时间的情况下尤其成问题, 因为随着该方法的运行时间增加, 营养液越来越受到污染, 直至微生物的指数级生长和因此生产的生物产品批次的完全损失。
- [0043] 为了在保持最大洁净度和无菌性的同时应付对该生产设备的快速和灵活再装料的要求, 优选使用一次性技术的连续生产概念在市场上引起不断增长的兴趣。
- [0044] 但是, 对于这种方法的较长运行时间 (从数小时经数天至数周), 常规消毒措施是不足的, 例如常规“原位清洗” (CIP) 措施, 如例如借助 1 M NaOH 消毒。在数小时以上的运行时间的情况下, 此类常规方法和设备的缺点因此在于它们非常容易发生可能的污染和/或可能的微生物生长。
- [0045] 因此, 需要从非均质细胞培养液混合物中连续提纯产品的方法, 其由于其基本上贫化微生物而实现高达数周的连续运行模式。
- [0046] 因此本发明的一个目的是开发可经数小时至数周的时间段连续提纯产品, 例如蛋白质的方法和相应设备。
- [0047] 本发明通过提供由非均质细胞培养液混合物连续且微生物减少地生产和/或处理生物制药的生物大分子产品的方法实现这一目的, 该方法包含步骤:
- [0048] (a) 以产品料流的形式提供来自含所述产品的非均质细胞培养液混合物的无粒子流体,
- [0049] (b) 至少一次过滤, 以提供滤液,
- [0050] (c) 至少两个用于提纯所述产品的色谱步骤,
- [0051] (d) 至少一次病毒耗减,
- [0052] (e) 步骤 (b)、(c) 和/或 (d) 的产品料流的至少一次超滤和/或至少一次渗滤,
- [0053] 其特征在于来自 (c) 的所述至少两个色谱步骤包含经由至少各两个色谱柱和/或膜吸附器的提纯并且所述方法以封闭和模块化的方式进行。

[0054] 本发明的方法的基础原理基于其四个核心原理和因此核心特征：

[0055] 生物制药的生物大分子产品的

[0056] 1. 连续

[0057] 2. 微生物减少

[0058] 3. 封闭且

[0059] 4. 模块化的生产。

[0060] 这四个特征一起极大减少常常出现的微生物不合意生长的问题，以实现本发明的方法在连续运行模式下高达8周的运行时间。

[0061] 在步骤a) 中由非均质细胞培养液混合物提供的无粒子流体可优选源自连续灌注和发酵法，例如细胞培养或组织培养，或灌注反应器。甚至可以并列运行多于一个灌注反应器，例如两个灌注反应器。

[0062] 该流体可以首先经合适的细胞截留系统，例如斜板分离器(沉降器)连续排出，借此可截留大部分细胞。然后通过后续过滤和/或离心步骤或其它合适的分离方法从该流体中除去该流体中所含的粒子，由此产生含有生物制药的生物大分子产品的无粒子流体。

[0063] 过滤步骤(b) 可以例如是在步骤(a) 后获得的无粒子流体的过滤，以产生滤液。但是，本发明的方法还可在该方法的合适位置包含附加过滤步骤。

[0064] 过滤步骤b) 可通过合适的过滤器方法，例如0.2  $\mu\text{m}$ 过滤器，或并列运行的多个过滤器实现。适用于过滤步骤的过滤器是例如Sartoguard NF 0.2  $\mu\text{m}$ 过滤器，可并列运行其中多个。

[0065] 在本发明的方法的进一步实施方案中，过滤步骤(b) 包含另外有可能耗减污染物，如DNA、蛋白质A、HCP的深度过滤器。这些可以是具有足够的 $\zeta$ 电位的深度过滤器(Zetapor 3M, Posidyne, Pall)或具有活性炭的深度过滤器(Millistak Merck Millipore)。

[0066] 步骤c) 的所述至少两个用于提纯所述产品的色谱步骤包含经由至少各两个色谱柱和/或膜吸附器的提纯。在此，该色谱柱和/或膜吸附器可显示出各种合适的结合原理，例如产品对配体的亲和力、离子相互作用、金属螯合物结合、疏水相互作用或范德华力。例如，所述至少两个色谱步骤的第一色谱步骤可以是亲和色谱法(例如对产品具有亲和力的配体，例如蛋白质A、蛋白质G、蛋白质L、IgM、IgG和不同于蛋白质A、蛋白质G、蛋白质L、IgM、IgG并对产品具有亲和力的重组蛋白)。这之后接着进一步(第二)色谱步骤，例如借助离子相互作用的色谱法。

[0067] 本发明的方法在此是灵活的，并可以在步骤c) 中根据要实现的产品纯度和浓度以各种顺序包含各种合适的色谱原理。

[0068] 根据步骤c) 使用经由至少各两个色谱柱和/或膜吸附器的至少两个色谱步骤的技术效果在于，单个色谱步骤通常无法确保充分提纯污染物，例如宿主细胞杂质、聚集体、DNA、蛋白质A等。

[0069] 此外，由此实现在一个色谱步骤中连续生产，因为可以向至少一个色谱柱和/或膜吸附器加载未提纯的产品，而至少另一个色谱柱和/或膜吸附器可以再生或洗脱，从而能够实现该方法的连续且高效的运行模式。

[0070] 在本发明的方法的另一个实施方案中，在(c) 中的所述至少两个色谱步骤之间和/

或在步骤(d)中的病毒灭活之后进行一个或多个用于调节pH值和/或用于调节电导率的附加步骤和/或过滤步骤和/或浓缩步骤和/或缓冲液更换。这使该方法的运行模式能够与条件匹配。

[0071] 步骤d)的所述至少一次病毒耗减尤其可通过调节无粒子流体的pH值进行,优选调节至pH值  $\leq 4.0$ 。可以例如通过添加HCl溶液将待灭活的无粒子流体的pH值调节至 $\leq 4.0$ 。这种添加通常在用于病毒耗减的装置的准备阶段(Vorfeld)中进行。通常,使用碱,例如氢氧化钠溶液(NaOH)将pH值调节至 $> 4$ ,以结束该病毒耗减。

[0072] 但是,步骤d)的所述至少一次病毒耗减也可以借助溶剂/清洁剂步骤进行,其中通过溶剂/清洁剂实现病毒耗减。

[0073] 在另一个实施方案中,也可以通过UV处理和/或通过热处理实现该病毒耗减。

[0074] 步骤d)的所述至少一次病毒耗减尤其可以在停留段中进行,可向其中引入分段的(segmentiert)产品料流。

[0075] 在本发明的方法的另一个实施方案中,借助合适的微生物减少方法对步骤(a)至(e)中使用的与产品接触的所有元件施以微生物减少。

[0076] 该微生物减少方法可以优选选自 $\gamma$ 辐射、 $\beta$ 辐射、高压灭菌、环氧乙烷(ETO)处理、臭氧处理( $O_3$ )、过氧化氢处理( $H_2O_2$ )和原位蒸汽灭菌(SIP)处理。

[0077] 相应地,本发明的方法中使用的模块的与产品料流接触的物体和元件也优选是可微生物减少和/或可灭菌的,优选可高压灭菌,可 $\gamma$ 辐射,可用环氧乙烷(ETO)吹扫,可用臭氧( $O_3$ )处理,可用过氧化氢( $H_2O_2$ )处理或可用原位蒸汽灭菌(SIP)处理法处理的,这实现本发明的方法的微生物减少的或甚至无菌的运行。

[0078] 在本发明的方法的另一个实施方案中,从过滤步骤(b)开始使用的与产品接触的所有元件是一次性制品或用作一次性制品。所用的这样的一次性制品此时在本发明的方法中也可被称作“用后即弃”或“单次使用”制品(“SU技术”)。由此改进该方法的微生物减少状态。

[0079] 在根据本发明的方法的另一个实施方案中,所有入口流体经微生物减少过滤器,例如Sartorius公司的Sartoguard NF过滤器过滤。

[0080] 在此,所有出口可优选被微生物屏障保护,其防止微生物反向生长(Rückwachstum)。例如,在此也可以使用Sartorius公司的Sartoguard NF过滤器作为微生物屏障。可通过过滤器和/或废物管线的转换连接(Wechselschaltung)实现微生物屏障11的额外可靠性。可通过用例如NaOH溶液定期消毒废物管线(优选在过滤后),实现确保微生物减少条件的另一措施。另外的方法可能是UV辐射和热处理。

[0081] 在另一个实施方案中,本发明的方法的模块化方法步骤优选在模块中进行,其中这些模块互相连接。

[0082] 优选地,可通过焊接或通过无菌连接器将模块互相连接。为了焊接模块,例如可以使用Sartorius公司的“TC Welder”仪器。

[0083] 在本发明的方法的另一个实施方案中,在步骤(a)至(e)中对所有使用的液体、气体和固体施以微生物减少。在此,优选通过经具有优选 $\leq 0.45 \mu m$ 的孔径的过滤器过滤实现微生物减少。在这种情况下,在该方法中优选不进行进程内灭菌(Inprocess-Sterilisierung)。在另一些实施方案中,也可以通过经具有优选 $\leq 0.20 \mu m$ 的孔径的过滤

器过滤实现微生物减少。

[0084] 在本发明的方法的另一个优选实施方案中,在色谱步骤(c)之前对到达所述至少两个色谱柱的所有流体进行脱气,其中该脱气优选通过至少一个气泡收集器和/或通过至少一个疏水微滤膜(借助真空)和/或通过用超声处理和/或通过用难溶气体,例如氦气鼓泡实现。

[0085] 在此,优选使用疏水微滤膜(借助真空)以保持本发明的方法和本发明的设备的连续运载中的无菌性,因为这已被发现与气泡收集器相比尤其有利。所用的疏水微滤膜特别可以是Membrana公司的MicroModule。

[0086] 在本发明的方法的一个尤其优选的实施方案中,对来自步骤a)的无粒子流体施以至少一次对着含杀微生物剂的缓冲液的超滤。由于该超滤,流体中所含的营养素被含杀微生物剂的缓冲液替代,由此应使微生物失去在流体中的生长基础。这另外改进该方法的微生物减少。

[0087] 在此使用的杀微生物剂或一种或多种杀微生物剂可优选选自咪唑、苯甲酸、山梨酸、对羟基苯甲酸酯、亚硫酸盐、焦亚硫酸盐(Disulfite)、叠氮化物、邻苯基苯酚、乳酸链球菌素、纳他霉素、六亚甲基四胺、二碳酸二甲酯、亚硝酸盐、硝酸盐、乙酸、抗坏血酸、异抗坏血酸、L-乳酸、丙酸、硼酸和溶菌酶。

[0088] 含杀微生物剂的缓冲液中所含的杀微生物剂还可以是选自下列的一种或多种杀微生物剂:

[0089] E210至E213: 苯甲酸及其盐,在酸性环境中在溶剂中0.05-0.1%,在溶剂中2-3 g/kg;

[0090] E200至E203: 山梨酸及其盐,300-2000 mg/kg;

[0091] E214至E219: PHB酯(对羟基苯甲酸酯,Parabene)、对羟基苯甲酸丁酯和对羟基苯甲酸丙酯;

[0092] E220至E228: 亚硫酸盐和焦亚硫酸盐;

[0093] E231和E232: 邻苯基苯酚,12 mg/kg;

[0094] E234: 乳酸链球菌素;

[0095] E235: 纳他霉素;

[0096] E239: 六亚甲基四胺,25 mg/kg;

[0097] E242: 二碳酸二甲酯;

[0098] E249-E252: 亚硝酸盐和硝酸盐,300 mg/kg;

[0099] E260: 乙酸,0.5-3%;

[0100] E300-E302: 抗坏血酸,300 mg/kg;

[0101] E315-E316: 异抗坏血酸,1500 mg/kg;

[0102] E261-E263: 乙酸盐;

[0103] E270: L-乳酸;

[0104] E280至E283: 丙酸及其盐,1-3 g/kg;

[0105] E284和E285: 硼酸,最多4 g/kg;

[0106] E1105: 溶菌酶;和

[0107] 叠氮化物。



[0108] 在本发明的方法的一个优选实施方案中,该生物制药的生物大分子产品是蛋白质或肽,其选自单克隆抗体、多克隆抗体、重组蛋白和疫苗,优选DNA和RNA疫苗。

[0109] 步骤c)中所用的色谱柱和/或膜吸附器可显示出各种合适的结合原理,例如产品对配体的亲和力、离子相互作用、金属螯合物结合、疏水相互作用或纯范德华力。例如,所述至少两个色谱步骤的第一色谱步骤可以是亲和色谱法(例如对产品具有亲和力的配体,例如蛋白质A、蛋白质G、蛋白质L、IgM、IgG和不同于蛋白质A、蛋白质G、蛋白质L、IgM、IgG并对产品具有亲和力的重组蛋白)。这之后接着进一步(第二)色谱步骤,例如借助离子相互作用的色谱法。

[0110] 在此,本发明的方法是灵活的,并可以在步骤c)中根据要实现的产品纯度和浓度以各种顺序包含各种合适的色谱原理。

[0111] 在本发明的方法的一个特别优选的实施方案中,步骤(c)的所述至少两个色谱柱和/或膜吸附器包含优选选自蛋白质A、蛋白质G、蛋白质L、IgM、IgG和不同于蛋白质A、蛋白质G、蛋白质L、IgM、IgG并对产品具有亲和力的重组蛋白的配体。

[0112] 在本发明的方法的一个优选实施方案中,步骤(a)至(e)的方法具有至少4小时,优选至少8小时,优选至少12小时,优选至少24小时,更优选至少48小时,更优选至少7天,更优选至少4周,特别优选至少8周的运行时间。连续运行数周的如此长的运行时间只能用该方法的封闭、模块化,尤其是微生物减少的运行模式才可实现。

[0113] 在本发明的方法的一个优选实施方案中,在步骤a)至e)之间和/或此后进行包含至少一个过滤器的至少一个过滤步骤。

[0114] 在本发明的方法的一个特别优选的实施方案中,在微生物减少条件下自动更换过滤器,其中该自动过滤器更换优选包含下列步骤:

[0115] (i) 在超过非滤液侧上的压力传感器处的阈值的情况下在流路关闭下将流路切换至新过滤器,其中优选通过气体或液体将旧过滤器中的产品推入滤液侧,

[0116] 或在超过流路中的旧过滤器的最大时间的情况下或在超过经过旧过滤器的滤液的最大体积的情况下,

[0117] (ii) 在新过滤器的排气阀处经由具有优选 $\leq 0.25\ \mu\text{m}$ 的孔径的空气过滤器将新过滤器排气,优选借助进料泵将产品传送至新过滤器或以微生物减少方式连接的封闭袋,

[0118] (iii) 在非滤液侧上借助压力传感器或料位传感器或天平或液体检测器检测新过滤器的排气结束,

[0119] (iv) 借助阀打开滤液出口和关闭在排气阀和空气过滤器之间的流路,和

[0120] (v) 将旧过滤器换成新过滤器。

[0121] 可以例如借助进料泵将产品同时或下游传送至新过滤器。

[0122] 这意味着,在本发明的方法的另一个实施方案中,可以自动进行过滤器更换(从旧过滤器元件换成新的)。在此发现成问题的是过滤器排气,但是其是必要的并且在目前可得的情况下必须手动进行。首先,借助任选的ETO、高压灭菌或 $\gamma$ 辐射对过滤器施以微生物减少法,然后连接到该方法上。此后,可以在非滤液侧填充过滤器,同时该排气阀是打开的,这一阀必须在成功排气后关闭以便可以进行实际过滤。在分批法中,非滤液侧上的严格微生物减少操作是不必要的,这是因为在短时间段中重要的仅仅是尽可能微生物减少的滤液。但是,在连续法中,也要求非滤液侧的尽可能无菌的操作,以防止该方法的微生物

污染。在现有技术中,在填充过滤器后必须通过旋转运动来手动关闭排气阀,以便可以进行实际过滤。所述旋转运动极其难以自动化,因为其也需要旋转体的轴向运动。由于旋转体与安装在其上的密封件一起轴向运动,边界移动。在与事前进行的微生物减少组合时,出现如下问题:在关闭排气阀的情况下进行微生物减少时,在打开该排气阀时微生物边界移动。这将含微生物的区域引入微生物减少的区域,因此使微生物减少失效。不推荐在过滤器阀打开下的微生物减少,因为打开位置没有固定位置,并由此可能容易对阀造成破坏。此外,打开位置通常摇摆不定,因此可由于过滤器的正常操作而发生微生物边界的移动。

[0123] 对于自动过滤器排气而言有利的是,在开始运行过程中避免排气阀的旋转运动,以可仅通过简单措施进行排气。然后可以修改排气阀,以使其甚至在关闭状态下也可透,但仍可靠地对于环境而言密封。因此,该阀在安全状态下“关闭”,这以紧密配合(festen Sitz)为特征。“开放”状态通常没有明确界定,因为阀体在运行过程中非常摇摆不定并使边界可能移动。将末端为疏水的 $\leq 0.2 \mu\text{m}$ 空气过滤器的一段管材安装到该旋转体的插嘴(Tülle)上。随后优选通过ETO、 $\gamma$ 辐射、高压灭菌或臭氧( $\text{O}_3$ )处理或通过过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )处理对这一布置施以微生物减少。因此,直至排气阀上的空气过滤器的整个非滤液侧都是微生物减少或贫微生物的。在排气阀和空气过滤器之间,将这段管材插入能够可靠地夹紧这段管材的管夹阀中。由此可以以完全自动化和贫微生物的方式实现排气。填充过滤器直至液体经由排气阀和这段管材进入空气过滤器。该疏水排气过滤器阻挡液体。同时,该工艺设备借助滤液侧上的阀阻挡生产料流,因此在过滤器前方出现升压。借助合适的传感器检测所述升压。如果超过一定的压力阈值,关闭排气管的夹阀,并打开滤液侧上的阀。以这种程序,可以使用改良排气阀以自动化的方式改良过滤器而不用手动干预。

[0124] 这种自动过滤器更换例如显示在图2中,其示意性说明该方法和该设备的过滤步骤的操作原理,其中通过焊接新过滤器16替换旧过滤器17。

[0125] 在该方法结束时,来自非均质细胞培养液混合物的最终提纯的生物制药的生物大分子产品可以通过最终过滤,优选经由具有 $0.2 \mu\text{m}$ 的孔径的过滤器最后一次过滤。最终过滤可以例如经过经 $\gamma$ 辐射的Sartopore 2胶囊(Midicap size 7,  $0.05 \text{ m}^2$ )进入经 $\gamma$ 辐射的5升GE ReadCircuit袋中实现。当最终袋的料位足够时,可随后脱开(abgeschweißt)所述袋并可新的袋焊接到该方法上。

[0126] 本发明进一步通过提供用于由非均质细胞培养液混合物连续且微生物减少地生产和/或处理生物制药的生物大分子产品的模块化设备实现所述目的,其包含下列模块:

[0127] (a) 至少一个过滤模块,

[0128] (b) 至少一个色谱模块,其包含至少各两个色谱柱和/或膜吸附器,

[0129] (c) 至少一个超滤模块和/或至少一个渗滤模块和/或至少一个渗析模块,和

[0130] (d) 至少一个用于连续病毒耗减的模块,

[0131] 其特征在于所述模块化设备是封闭的和微生物减少的。

[0132] 但是,所述至少一个色谱模块也可包含多于两个色谱柱和/或膜吸附器,例如三个或四个色谱柱和/或膜吸附器。

[0133] 在本发明的模块化设备的进一步实施方案中,借助微生物减少方法对用于模块(a)至(d)中并与产品接触的所有元件施以微生物减少,其中该微生物减少方法优选选自 $\gamma$ 辐射、 $\beta$ 辐射、高压灭菌、环氧乙烷(ETO)处理、臭氧处理( $\text{O}_3$ )、过氧化氢处理( $\text{H}_2\text{O}_2$ )和原位

蒸汽灭菌(SIP)处理。

[0134] 优选地,该模块化设备本身以及与产品料流接触的模块元件可施以微生物减少和/或可灭菌,优选可高压灭菌,可 $\gamma$ 辐射,可用环氧乙烷(ETO)冲洗,可用臭氧( $O_3$ )处理,可用过氧化氢( $H_2O_2$ )处理或可用原位蒸汽灭菌(SIP)处理法处理,这实现本发明的模块化设备的贫微生物的或甚至无菌的运行。

[0135] 在本发明的模块化设备的另一个实施方案中,模块(a)至(d)中使用的与产品接触的所有物体是一次性制品或用作一次性制品。在此,优选通过焊接或通过无菌连接器将模块互相连接。例如,GE公司的无菌“ReadyMate”连接器是在本发明的模块化设备中优选使用的无菌连接器。

[0136] 优选使用即用型一次性制品(“用后即弃”、“即可使用”)作为经 $\gamma$ 辐射的元件。

[0137] 在本发明的模块化设备的一个优选实施方案中,所有入口流体经过微生物减少过滤器,而所有出口优选被防止反向生长的微生物屏障保护。

[0138] 在该模块化设备的最后,来自非均质细胞培养液混合物的最终提纯的生物制药的生物大分子产品可以通过最终过滤,优选经由具有 $0.2\ \mu m$ 的孔径的过滤器最后一次过滤。最终过滤可以例如经过经 $\gamma$ 辐射的Sartopore 2胶囊(Midicap size 7, $0.05\ m^2$ )进入经 $\gamma$ 辐射的5升GE ReadCircuit袋中进行。当最终袋的料位足够时,可随后脱开所述袋并可新的袋焊接到该方法上。

[0139] 结合下列附图和实施例解释本发明,包括优选实施方案,但不限于此。如果从上下文中没有清楚看出相反的意思,这些实施方案可以任意地互相组合。

[0140] 下面显示:

[0141] 图1示意性显示本发明的方法的一个实施方案的工艺图。括号中的数字是参考如实施例1和表1中所列的质量平衡。

[0142] 图2示意性显示该方法和该设备的过滤步骤的操作原理,其中通过焊接新过滤器16替换旧过滤器17。

[0143] 图3示例性显示两个方法步骤病毒灭活和中和 - 以模块化方式装配的两个单元,其中将pH探针pH0501和pH0502高压灭菌,并 $\gamma$ 辐射其余部分。然后将pH探针pH0501和pH0502焊接到组装件中。经由无菌GE ReadyMate® 连接器将所述袋连接。首先焊接封闭(zugeschweißt)与蛋白质A和过滤单元的连接(Verbindung),然后焊接到各单元上。

[0144] 图4示例性显示该设备的模块化结构,其中所有入口料流和出口料流经由微生物屏障10、13与环境连接。示例性模块化设备1由三个过滤模块2(具有各两个彼此交替(wechselseitig)运行的过滤器13)、两个色谱模块3(具有两个色谱柱4或两个膜吸附器5)、病毒耗减步骤(例如病毒灭活9)、超滤模块6和渗滤模块7构成。经由疏水过滤器15或气泡收集器14从缓冲液中除去气泡。

[0145] 表1显示图1中所示的位置的平均流速和抗体浓度。

[0146] 所用标号是:

[0147] 1 = 模块化设备

[0148] 2 = 过滤模块

[0149] 3 = 色谱模块

[0150] 4 = 色谱柱

- [0151] 5 = 膜吸附器
- [0152] 6 = 超滤模块
- [0153] 7 = 渗滤模块
- [0154] 8 = 渗析模块
- [0155] 9 = 病毒耗减
- [0156] 10 = 微生物减少过滤器
- [0157] 11 = 微生物屏障
- [0158] 12 = 无菌连接器
- [0159] 13 = 具有优选 $\leq 0.45 \mu\text{m}$ 的孔径的过滤器
- [0160] 14 = 气泡收集器
- [0161] 15 = 疏水微滤膜
- [0162] 16 = 新过滤器
- [0163] 17 = 旧过滤器
- [0164] 18 = 压力传感器
- [0165] 19 = 空气过滤器, 孔径优选  $\leq 0.25 \mu\text{m}$
- [0166] 20 = 新过滤器16的排气阀
- [0167] 21 = 进料泵
- [0168] 22 = 料位传感器
- [0169] 23 = 天平
- [0170] 24 = 阀
- [0171] 25 = 废物料流
- [0172] 26 = 产品料流
- [0173] 27 = 缓冲液
- [0174] 28 = 液体检测器
- [0175] 29 = 袋。

[0176] 实施例1

[0177] 为了以连续和微生物减少的方式从非均质细胞培养液混合物中提纯蛋白质, 构造具有下列模块和相关方法步骤的小型装置:

[0178] 除非另行指明, 在该方法中使用具有EasyLoad II泵头的MasterFlex蠕动泵。所用管材是Masterflex LS16或Cflex或Sanipure。对与产品接触的所有使用的部件施以25 kGy  $\gamma$  辐射。在 $\gamma$  辐射在材料技术方面不被允许的例外情况下, 组件在121°C下高压灭菌20分钟。具有pH探针或病毒过滤器的分组装件(Teilassemblies)。如果可能, 使用即用型一次性制品(“用后即弃”、“即可使用”)作为经 $\gamma$  辐射的模块。毫无例外, 所有袋都是如此。所述袋通常使用来自General Electric (GE) 公司的ReadyMate®连接器连接到模块上。在各模块之间, 安置经 $\gamma$  辐射的单次使用的袋(ReadyCircuit 1升, GE)作为模块n-1的出口料流和模块n的入口料流之间的补偿容器。通常, 在各模块中的该时间点存在入口料流和出口料流。在产品液体的排气是有益之处, 经由疏水0.2  $\mu\text{m}$ 过滤器将这些容器与环境隔绝。

[0179] A. 上游

[0180] i) 灌注反应器

[0181] 为了连续生产IgG单克隆抗体,使用10升灌注反应器。在稳态下,活细胞密度为6-7千万个细胞/毫升。滴定度为~115 mg/l。使用两个并行灌注反应器进行生产28天。

[0182] ii) 细胞截留系统

[0183] 产品经斜板分离器(沉降器)连续排出,借此截留大部分细胞。

[0184] B. 下游DSP-1

[0185] i) 细胞澄清过滤

[0186] 使用并联运行的Sartoguard NF 0.2  $\mu\text{m}$ 过滤器(T-style, MaxiCap, 0.65  $\text{m}^2$ )进行澄清过滤。图2显示如何在此实现封闭的贫微生物法。过滤器和管组零件都经 $\gamma$ 辐射。入口和出口管线经无菌连接器与经 $\gamma$ 辐射的袋(GE ReadyCircuit 1升)连接,其用作波动流速的补偿体积。为了排气,将过滤器偶联到疏水0.2  $\mu\text{m}$ 空气过滤器上,由此,该模块在本发明的意义上是封闭的(图2)。该空气过滤器是Pall Corp.的Emflon II或Sartorius Stedim公司的Midisart 2000。修改排气阀以使它们甚至在关闭状态下也可透,但始终仍可靠地对于环境而言密封。为此,在Sartoguard NF上移除排气阀的内密封圈,并在 $\gamma$ 辐射前关闭该阀。另外防止所述阀打开。因此,该阀在安全状态下“关闭”,这以紧密配合为特征。该排气阀经一段管材与接空气过滤器连接。在排气阀和空气过滤器之间,将这段管材插入管夹阀中。填充过滤器直至液体经由排气阀和管材进入空气过滤器。该疏水排气过滤器随后阻挡液体。同时,该工艺设备借助滤液侧上的阀阻挡生产料流,因此在过滤器前方出现升压。借助Pendotech压力传感器检测所述升压。如果超过0.5巴的阈值,关闭该排气管的夹阀,并打开滤液侧上的阀。

[0187] ii) 浓缩和再缓冲

[0188] 来自i) 细胞澄清过滤的滤液首先使用超滤中空纤维膜(GE Healthcare ReadytoProcess, 0.2  $\text{m}^2$ , 经 $\gamma$ 辐射)连续浓缩10倍。所用循环泵是用后即弃的QuattroFlow 1200 SU泵,将其泵头在 $\gamma$ 辐射前集成到所述管组零件上。

[0189] 然后经过Gambro Revaclear 300透析膜将浓缩产品的培养基成分换成50 mM咪唑/NaCl缓冲液。该模块由制造商无菌包装提供,并在生物安全柜(Sterilbank)中与经 $\gamma$ 辐射的管组零件连接。将来自该浓缩的渗透液和含培养基的废物料流导入经 $\gamma$ 辐射的200升Sartorius Flexboy。通过使用Sartorius焊机再焊接而更换Flexboy。

[0190] 0.2  $\mu\text{m}$ 过滤

[0191] 在填充前,该产品使用交替运行的经 $\gamma$ 辐射的Sartoguard NF过滤器(MaxiCap size 8)连续过滤到200升Flexboy中。构造和运行类似于“B. 下游DSP-1 - i) 细胞澄清过滤”。

[0192] C. 下游DSP-II

[0193] 0.2  $\mu\text{m}$ 过滤

[0194] 在储存后,将来自DSP-I的产品再过滤,以保护下游色谱柱免受粒子影响。

[0195] 1. 捕获色谱法

[0196] 使用Mabselect Sure (GE) 作为蛋白质A树脂以分离IgG。将IgG浓缩最多10倍并除去大部分污染物。使用Tarpon Biosystems, Inc.公司的连续BioSMB设备,其具有12个柱(ID 16 mm, L 80 mm),其中8个柱在加载区中(2个柱串联,4个并联)。通过消毒或 $\gamma$ 辐射使包括这些柱的整个流路变为贫微生物。每个周期的负荷(Beladung)为32个柱体积/柱。所用

缓冲液是具有不同摩尔浓度、pH和电导率的乙酸盐缓冲液。所有缓冲液使用经 $\gamma$ 辐射的或高压灭菌的0.2  $\mu\text{m}$ 过滤器过滤到经 $\gamma$ 辐射的袋中。将缓冲液袋的出口管焊接到BioSMB设备的入口上。所述设备在其入口分别具有经 $\gamma$ 辐射的脱气器膜(Liquicell Micro Module, Membrana)。同样地,将产品管线经由这样的脱气器焊接到BioSMB设备的入口上。所有入口料流随后借助真空泵在50毫巴下脱气。

[0197] 1. 病毒灭活和中和

[0198] 病毒灭活和中和由三个模块构成并位于捕获色谱法和0.2  $\mu\text{m}$ 过滤之间:(a) 具有蠕动泵M0502的均质化回路;(b) 示意性显示为盘管的停留时间回路(Verweilzeitschleife);(c) 中和袋,其中可将pH值调节至7.5。所述模块根据图3中的焊接点独立地预制并 $\gamma$ 辐射,其中末端在每种情况下焊接封闭。

[0199] 将具有pH探针(在这种情况下为pH0501和pH0502)的管线段高压灭菌。然后将pH探针段焊接到组装件中。如所示,经由无菌GE ReadyMate®连接器将袋连接。首先焊接封闭与蛋白质A洗出液管线和过滤模块的连接,然后焊接到各模块上。

[0200] 0.2  $\mu\text{m}$ 过滤

[0201] 蛋白质可能在pH变化后沉淀,其中滤出沉淀的蛋白质。

[0202] 色谱法(中度和最终精制)

[0203] 来自上述0.2  $\mu\text{m}$ 过滤的产品经由两个色谱步骤借助首先四个依序(4-PCC)运行的2.5 ml Capto Adhere(2.5 ml GE)和随后两个彼此交替运行的20 ml阴离子交换器(Pall Hypercel StarAX)提纯。在此,除去蛋白质A可浸出物(Leachables)、DNA、HCP和聚集体。这两个色谱步骤经由经 $\gamma$ 辐射的袋(GE ReadyCircuit®1升)互相连接,其中根据阴离子交换器的要求通过供水将电导率调节至7.5 mS/cm。

[0204] 将包括这些柱的整个流路消毒或 $\gamma$ 辐射。每个周期的负荷为50个柱体积/柱。所用缓冲液是具有不同摩尔浓度、pH和电导率的乙酸盐缓冲液。所有缓冲液使用经 $\gamma$ 辐射的或高压灭菌的0.2  $\mu\text{m}$ 过滤器过滤到经 $\gamma$ 辐射的袋中。将缓冲液袋的出口管焊接到BIO的入口上。所述设备在其入口分别具有经 $\gamma$ 辐射的脱气膜(Liquicell Micro Module, Membrana)。同样地,将上述0.2  $\mu\text{m}$ 过滤的产品管线经由这样的脱气器焊接到BioSMB设备的入口上。所有入口料流随后借助真空泵在50毫巴下脱气。将废物料流导入经 $\gamma$ 辐射的200升Sartorius Flexboy。通过使用Sartorius焊机再焊接而更换Flexboy。

[0205] 将产品料流再收集在经 $\gamma$ 辐射的产品袋(GE ReadyCircuit 1升)中。

[0206] 预过滤

[0207] 从最终精制色谱法的产品袋中,首先使用0.1  $\mu\text{m}$ 胶囊(Sartopore2, MidiCap size 9, 0.2  $\text{m}^2$ )预过滤产品溶液。实施和构造类似于“B. 下游DSP-1 - i) 细胞澄清过滤”。

[0208] 病毒过滤

[0209] 来自预过滤的出口管线经由蠕动泵直接与来自“C. 下游DSP-II”的病毒过滤的入口通过焊接连接。在其它方面,来自“C. 下游DSP-II”的病毒过滤的构造和运行类似于“C. 下游DSP-II - 0.2  $\mu\text{m}$ 过滤”。但是,所用病毒过滤器是Virosart CPV过滤器(MidiCap size 9, 0.2  $\text{m}^2$ ),其已根据制造商的指示冲洗并高压灭菌。又将过滤器焊接到该组装件上。将产品料流又泵入经 $\gamma$ 辐射的产品袋(GE ReadyCircuit 1升)。

[0210] 最终浓缩和再缓冲

[0211] 最终浓缩和再缓冲类似于上述“B. DSP-I - ii) 浓缩和再缓冲”构造并且区别仅在于,将高压灭菌的UV皿集成到浓缩回路上以监测产品浓度。再缓冲同样类似于上述“B. DSP-I - ii) 浓缩和再缓冲”进行,其中在此使用50 mM磷酸盐缓冲液pH 7.5。将产品料流又泵入经 $\gamma$ 辐射的产品袋(GE ReadyCircuit 1升)。

[0212] 0.2  $\mu\text{m}$ 过滤

[0213] 如上文在“B. DSP-1 i)”中所述,经过经 $\gamma$ 辐射的Sartopore 2胶囊(Midicap size 7,0.05  $\text{m}^2$ )进行最终过滤到经 $\gamma$ 辐射的5升GE ReadCircuit袋中。当最终袋的料位足够时,脱开所述袋并可将新的袋焊接到该方法上。

[0214] 如实施例1中示例性所述的本发明的方法的定期执行的运行时间为3天而无微生物生长,其中色谱柱通过40%异丙醇 + 0.5 M NaOH消毒。在本发明的方法的运行时间超过3天的情况下,对色谱柱施以 $\gamma$ 辐射。

[0215] 图1中所示位置的平均流速和抗体浓度概括在表1中。

[0216] 表1

	工艺料流	体积流速	抗体浓度	抗体流速
	-	$\text{mL min}^{-1}$	$\text{g L}^{-1}$	$\text{g d}^{-1}$
I 罐上 & 罐下	1	33.3	0.0	0.00
	2	33.3	0.1	5.5
	3	33.3	0.1	5.5
	4	5.3	0.7	5.4
	5	5.3	0.7	5.4
II 罐下	6	30	0.7	30.0
	7	30	0.7	30.0
	8	4.2	4.6	28.0
	9	4.6	4.2	28.0
	10	9.3	1.8	23.6
	11	9.3	1.7	23.3
	12	2.0	8.0	22.8
	13	2.0	8.0	22.7

[0218] 依据欧洲区域发展基金(EFRE)的背景下的“Bio.NRW: MoBiDiK -模块化有机生产-一次性和连续”拨款协议,资助得出本申请的工作。

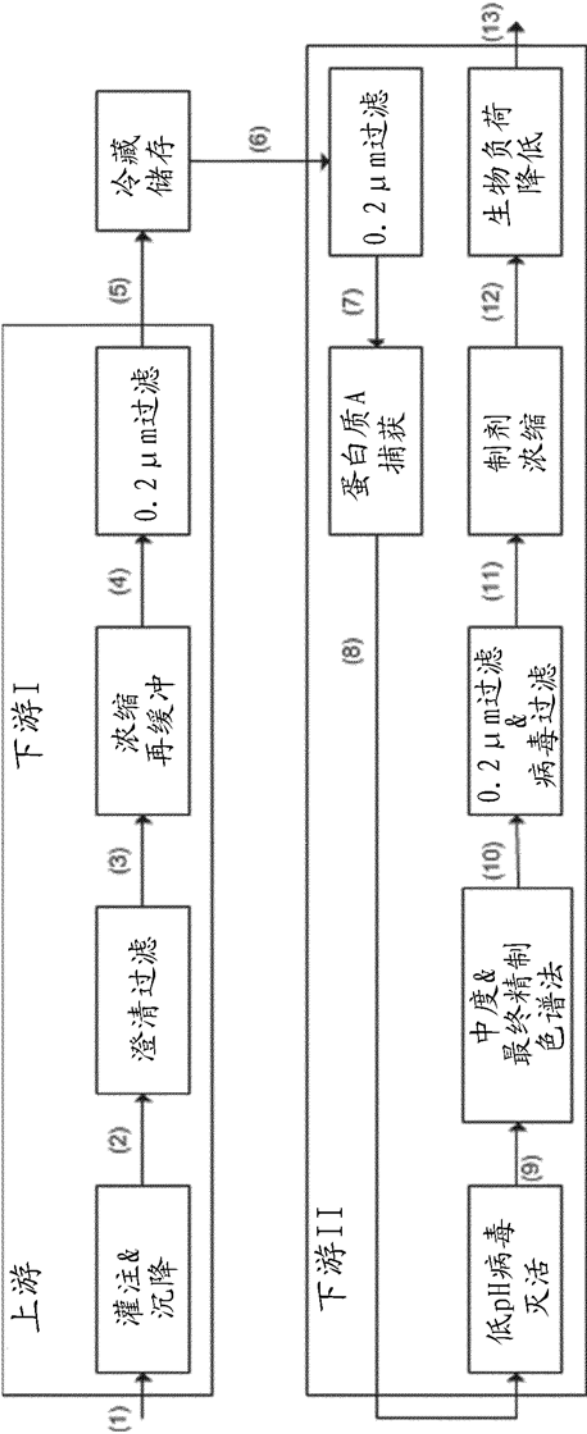


图 1



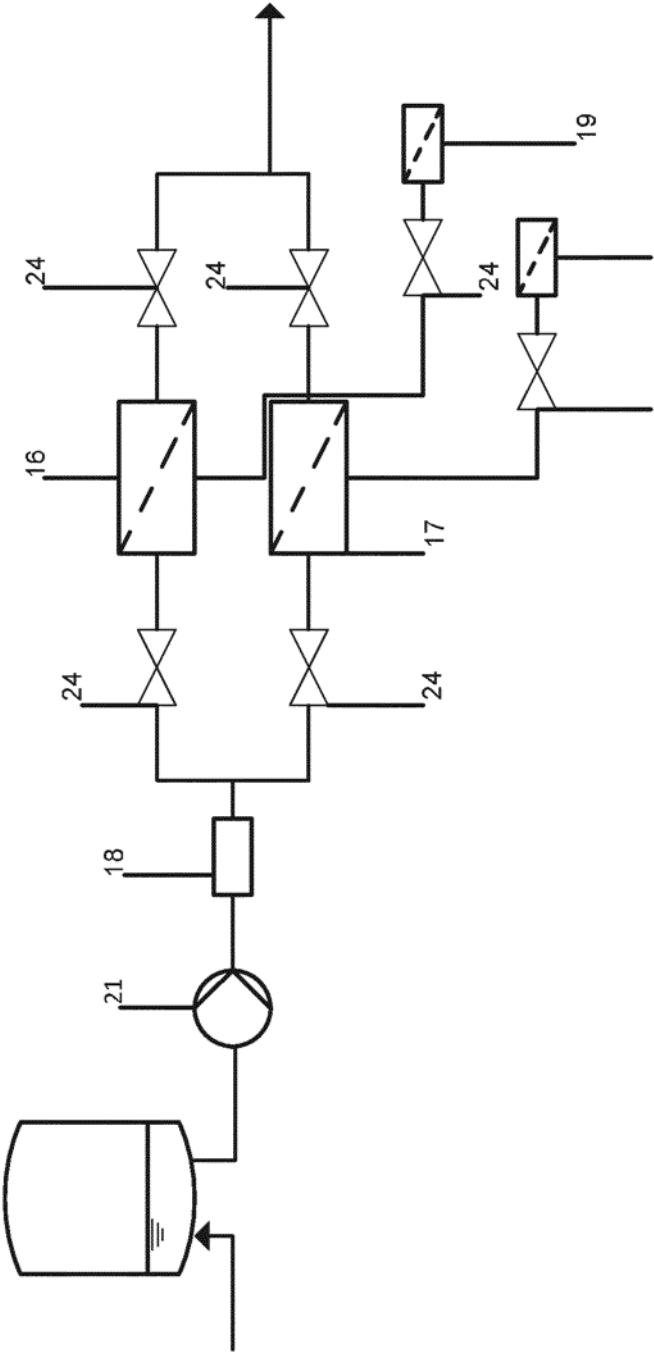


图 2

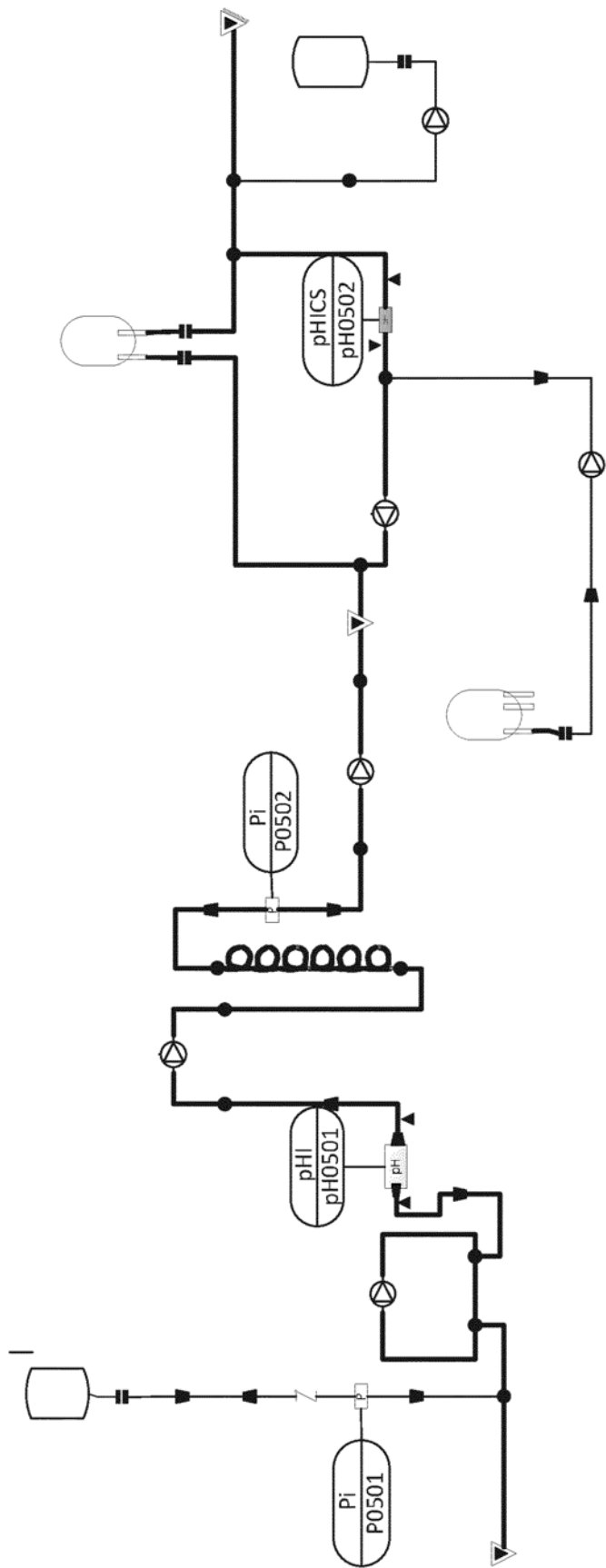


图 3

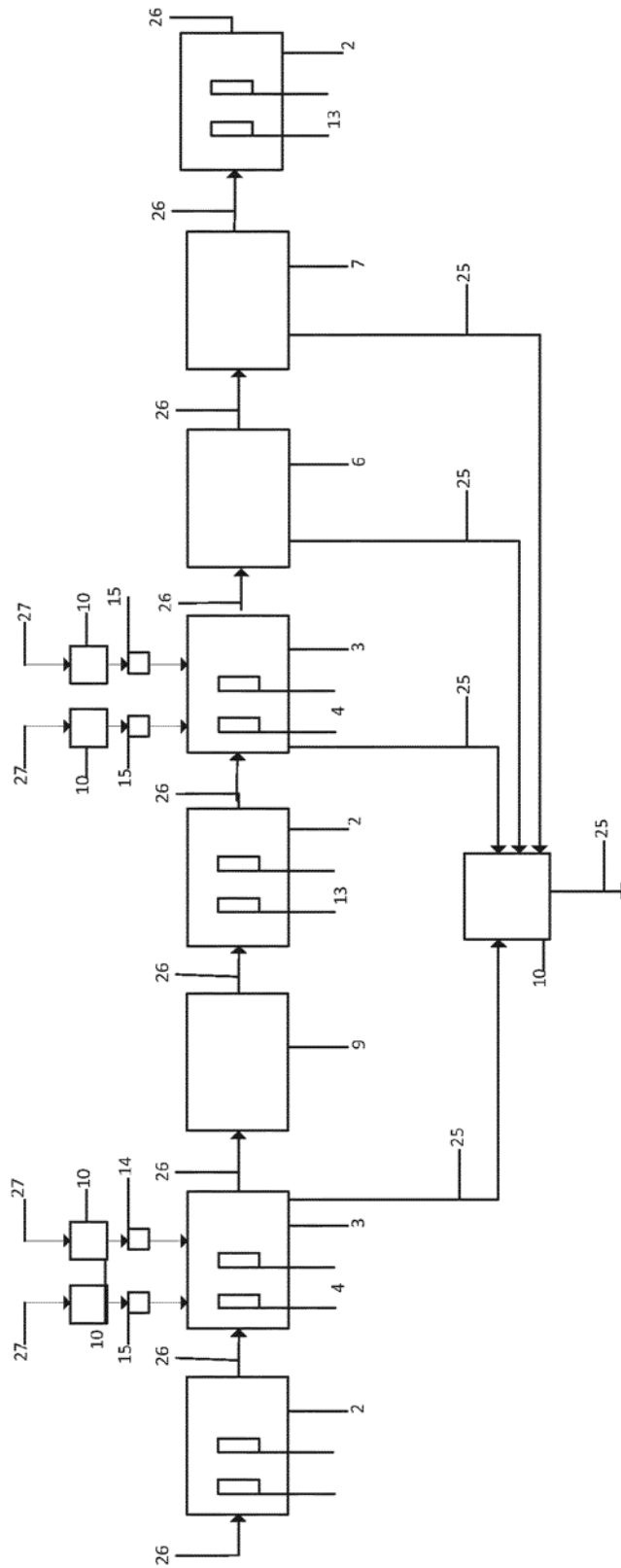


图 4