I740417

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I740417 B**

(45)公告日： 中華民國 110 (2021) 年 09 月 21 日

(21)申請案號：109108985 (22)申請日： 中華民國 104 (2015) 年 10 月 22 日

(51)Int. Cl.： *A61L2/20 (2006.01)* *C12M1/12 (2006.01)*

C07K1/14 (2006.01)

(30)優先權：2014/10/24 美國 62/068,181

(71)申請人：美商健臻公司 (美國) GENZYME CORPORATION (US)

美國

(72)發明人：史諾 羅伯特 SNOW, ROBERT (US)

(74)代理人：陳彥希；何愛文

(56)參考文獻：

TW	I691342	EP	1498475A1
US	2014/0123777A1	US	2014/0295532A1

審查人員：許瑞峰

申請專利範圍項數：33 項 圖式數：2 共 47 頁

(54)名稱

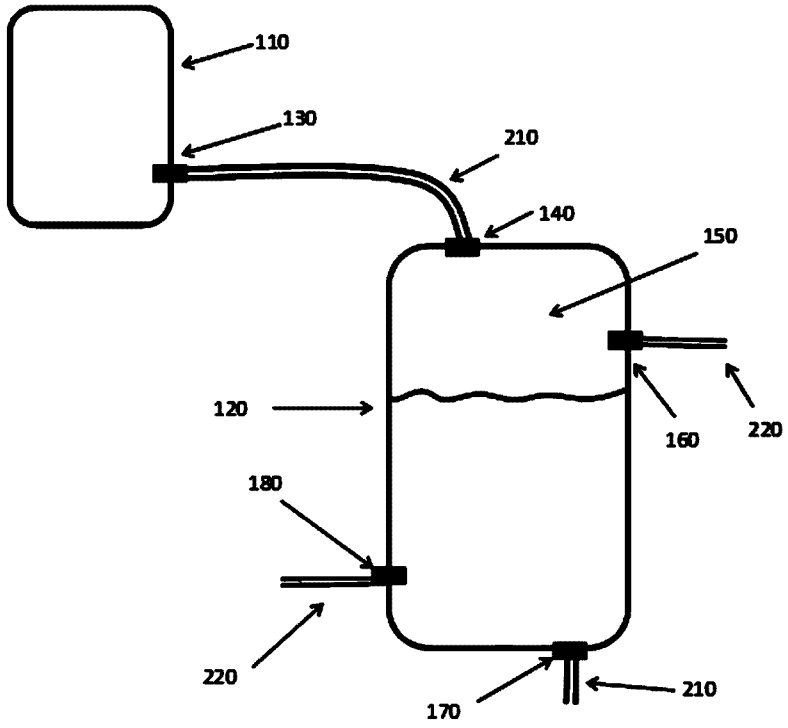
製造一重組治療性蛋白的方法

(57)摘要

本發明提供隔離方法和相關硬體以允許從含有無菌過程的滅菌系統(sterilized system)(例如，無菌製程容器)隔離流體流。本文描述的隔離方法允許從滅菌系統(例如，生物製造系統)連續移出流體流(例如，廢料流，含有重組治療性蛋白的液體)，其提供對該滅菌系統較少的手動操作和降低污染該滅菌系統的風險。

Provided herein are isolation processes and the associated hardware to allow fluid streams to be isolated from a sterilized system (e.g., a sterile process vessel) that contains a sterile process. The isolation processes described herein allow for continuous removal of fluid streams (e.g., waste streams, liquid containing recombinant therapeutic proteins) from a sterilized system (e.g., a biological manufacturing system), which provides for less manual manipulation of the sterilized system and a decreased risk of contaminating the sterilized system.

指定代表圖：



【圖2】

符號簡單說明：

110:無菌過程容器

130:流體出口

120:隔離容器

210:流體管道

150:頂部空間

140:流體入口

180:氣體入口

220:氣體管道

160:氣體出口

專利案號：109108985
原申請案號：104134623
公告本
I740417

【發明摘要】

【中文發明名稱】　製造一重組治療性蛋白的方法

【英文發明名稱】 METHOD OF MANUFACTURING A RECOMBINANT THERAPEUTIC PROTEIN

【中文】

本發明提供隔離方法和相關硬體以允許從含有無菌過程的滅菌系統(sterilized system)(例如，無菌製程容器)隔離流體流。本文描述的隔離方法允許從滅菌系統(例如，生物製造系統)連續移出流體流(例如，廢料流，含有重組治療性蛋白的液體)，其提供對該滅菌系統較少的手動操作和降低污染該滅菌系統的風險。

【英文】

Provided herein are isolation processes and the associated hardware to allow fluid streams to be isolated from a sterilized system (e.g., a sterile process vessel) that contains a sterile process. The isolation processes described herein allow for continuous removal of fluid streams (e.g., waste streams, liquid containing recombinant therapeutic proteins) from a sterilized system (e.g., a biological manufacturing system), which provides for less manual manipulation of the sterilized system and a decreased risk of contaminating the sterilized system.

【指定代表圖】　　圖2。

【代表圖之符號簡單說明】

110　無菌過程容器

130　流體出口

120　隔離容器

210　流體管道

150　頂部空間

140　流體入口

180　氣體入口

220　氣體管道

160　氣體出口

【發明說明書】

【中文發明名稱】　製造一重組治療性蛋白的方法

【英文發明名稱】 METHOD OF MANUFACTURING A RECOMBINANT THERAPEUTIC PROTEIN

【技術領域】

【0001】 本發明涉及重組蛋白的生物技術和生物製造方法。

【先前技術】

【0002】 含有編碼重組蛋白的核酸的哺乳動物細胞通常用於產生治療上或商業上重要的蛋白質。在當前多樣化產品線的環境中，生物技術公司越來越多地受到驅動去開發創新的解決方案用於高度靈活且成本有效地製造治療劑(例如，治療蛋白藥物物質)。

【0003】 在連續生物製造過程中，通常有必要從無菌過程容器(sterile process vessel)去除流體。這種流體的去除基於一些預定的觸發方式可以是連續流或間歇流。去除需要以一種保護從其中去除流體的容器的無菌性的方式來進行。當流體流有促進生物生長的潛力(其最終能夠長回無菌過程容器)時，這在生物製造中可能是富於挑戰的。如今使用的主流方法是分批傳輸方法，其中在第二無菌容器中收集廢料流，並且當該容器達到容量時，再將其與無菌過程容器斷開，然後丟棄廢料。但這並不理想，因為這是分批的過程(非連續的)，並且要花費許多時間操作和許多滅菌容器。這些操作還創造了過程的風險，如果任何步驟失敗的話。或者，相同

的過程也可以使用預滅菌袋來完成，然而袋的成本可能阻礙了進行連續過程，並且袋的使用並沒有消除過程中風險。

【發明內容】

【0004】 本發明(部分)基於開發了隔離過程和相關硬件以允許從含有無菌過程的滅菌系統(sterilized system)(例如，無菌製程容器(sterile process vessel))週期性或連續地隔離流體流。所述隔離過程利用隔離容器來將無菌製程與環境和廢料流分開。隔離容器僅部分填充且保留了容器內的頂部空間，其中所述頂部空間含有滅菌劑。所述滅菌劑(例如，滅菌氣體(例如，含有臭氧、環氧乙烷、二氧化氮或汽化過氧化氫的氣體))可以噴射入所述容器或直接引入所述容器的頂部空間。所述滅菌劑保持了所述容器的頂部空間內的滅菌氣氛(sterilizing atmosphere)，其提供了在輸入無菌工藝流和輸出流體流(例如，廢料流)之間的隔離。在容器的頂部空間內滅菌劑(例如，滅菌氣體)的濃度受到控制，以提供必要的滅菌氣氛。

【0005】 在一態樣中，本發明提供抑制滅菌系統的污染的方法，所述方法包括提供一系統，其包含第一容器，其中所述第一容器包含液體；使第一體積的所述液體流出所述第一容器，並通過一體積的滅菌氣體，再流入第二容器。本發明考慮的滅菌系統包括但不限於生物製造系統和藥物製造系統。所述第一容器是滅菌的容器。以示例性實施方案中，所述第一容器包含生物製造系統的部件。例如，所述第一容器可以是(例如，本文描述的或本領域已知的任何示例性生物反應器)：層析系統

(chromatography system)的一個或多個部件(例如，層析柱)，微濾系統的一個或多個部件，或超濾/滲濾(UF/DF)系統的一個或多個部件。對於生物製造系統，第一容器的液體可以是液體培養基和/或包含重組治療性蛋白的液體。在一些實施方案中，第一容器的液體包含含有重組治療性蛋白的細胞。重組治療性蛋白可以是從細胞分泌的蛋白質或不從細胞分泌的蛋白質。

【0006】 在一些態樣中，滅菌氣體選自以下的群組：臭氧、環氧乙烷、二氧化氮或汽化過氧化氫(例如，含有臭氧的氣體，含有環氧乙烷的氣體，含有氮氧化物(nitrogen oxide)的氣體，和含有過氧化氫的氣體)。

【0007】 自第一容器流至第二容器的第一體積的液體可以是廢料流。在另一態樣中，自第一容器流至第二容器的所述第一體積的液體包含重組治療性蛋白。或者，自第一容器流至第二容器的第一體積的液體不含重組治療性蛋白(即，所述第一體積的液體是廢料流或包含細胞培養開始前的培養基)。所述第一體積的液體可以包含發酵副產物。

【0008】 在一態樣中，本文公開的方法進一步包括使第二體積的液體從第二容器流入用於純化和精製重組蛋白的裝置。例如，本文公開的方法可進一步包括使第二體積的液體從第二容器流入第一多柱層析系統(MCCS1)，使用MCCS1捕獲液體培養基中的所述重組治療性蛋白，其中將含有所述重組治療性蛋白的MCCS1的流出液連續進料至第二多柱層析系統(MCCS2)，和使用MCCS2純化和精製所述重組治療性蛋白，其中來自MCCS2的洗出液是重組治療性蛋白；並且其中所述過程是整合的並且

從第一容器中的所述液體連續運行至來自MCCS2的洗出液，所述來自MCCS2的洗出液是重組治療性蛋白。在一些實施方案中，第二體積的液體包含重組蛋白。

【0009】 在一態樣中，本文公開的方法進一步包括使來自第二容器的第二體積的液體流入用於放置生物廢料流的容器。例如，所述容器可以是用於放置廢料的水槽，或用於儲存和/或去除廢液的燒杯或其他容器。

【0010】 本發明還提供了一種用於從非無菌環境隔離無菌工藝流的系統。在一態樣中，所述系統包含含有流體出口的第一容器；和至少一個第二容器，所述第二容器包含與所述第一容器的流體出口流體連通並配置成使得進入第二容器的流體流過所述第二容器內的滅菌氣體填充的頂部空間的流體入口，配置成使得離開所述第二容器的液體自所述第二容器內滅菌氣體填充的頂部空間之下移出的流體出口，至少一個氣體入口，和至少一個氣體出口。在一些實例中，所述第一容器是滅菌容器。在示例性實施方案中，所述第一容器是生物製造系統的部件。例如，所述第一容器是流體管道(例如，本文描述的或本領域已知的任何示例性生物反應器)，層析系統的一個或多個部件(例如，層析柱)，微濾系統的一個或多個部件，或超濾/滲濾系統的一個或多個部件。例如，所述生物反應器是灌注生物反應器、補料分批生物反應器、生產生物反應器或種子生物反應器。在一些實施方案中，第二容器流體出口與用於純化和精製重組蛋白的裝置流體連通。在示例性實施方案中，所述第一容器和第二容器置於滑架上。

【0011】在一些態樣中，本文公開的系統進一步包含置於所述第一容器和第二容器之間的流體管道，和任選地進一步包含置於所述第一容器和第二容器之間的流體管道中並配置成從流體管道中的流體去除顆粒物質的過濾器。本文公開的系統可以還包括泵系統(例如，泵)，其中所述泵系統置於流體管道中。在一些實例中，本文公開的系統包含與第一容器的流體出口流體連通的泵，與第二容器的流體出口流體連通的泵，或二者兼有。在一個實施方案中，所述泵系統配置成從容器出口去除一體積的流體並使所述體積流入第二容器的流體入口。

【0012】在一態樣中，本文公開的系統包含第二容器內的滅菌氣體填充的頂部空間。例如，所述滅菌氣體可以是選自下組的氣體：臭氧、環氧乙烷、二氧化氮或汽化過氧化氫。在一些實施方案中，所述至少一個氣體入口與允許氣體排入第二容器並供應至頂部空間的一個或多個氣體噴射元件連接。術語“噴射元件”指有孔元件(例如，過濾器、開口管或燒結玻璃(frit))，其用於通過液體鼓出氣泡。為了填充頂部空間，所述第二容器包含至少一個氣體入口，所述至少一個氣體入口與用於生成或遞送滅菌氣體的系統，或用於生成和遞送滅菌氣體的系統氣體連通。在一些實施方案中，用於生成或遞送滅菌氣體的系統是臭氧生成或遞送系統，或臭氧生成和遞送系統。在一些實施方案中，用於遞送滅菌氣體的系統是瓶裝氣體。另外，在一些實施方案中，所述第二容器包含至少一個氣體出口，所述至少一個氣體出口配置成連續或週期性地從所述第二容器排出氣體。對於使用臭氧的系統，氣體出口與臭氧破壞單元氣體連通。為了控制第二容

器中含有的滅菌氣體的濃度或量，所述系統可以包括例如溶解氣體探測器或用於監測所述第二容器的頂部空間內的滅菌氣體濃度的傳感器。

【0013】 在一態樣中，所述第一容器包含與第二容器的流體入口流體連通的流體出口。在示例性的實施方案中，所述第二容器包含配置成使得進入第二容器的所述體積的液體通過頂部空間的流體入口(例如，位於第二容器上在液面之上位置的流體入口)、配置成使得離開第二容器的液體自所述滅菌氣體填充的頂部空間之下流過的流體出口(例如，位於第二容器上在液面之下位置的流體出口)、至少一個氣體入口和至少一個氣體出口，其中所述流體入口與所述第一容器流體連通。有利地，將所述體積的滅菌氣體置於第二容器的頂部空間內。為了填充頂部空間，可以將所述滅菌氣體噴射入第二容器或直接引入第二容器的頂部空間。在一些實例中，所述第二容器至少部分填充有液體。

【0014】 在一些實施方案中，第一容器中的液體包含重組治療性蛋白。

【0015】 如用於本文，詞語“一/一個/一種”用於名詞前代表一個或多個/一種或多種該特定名詞。例如，短語“一/一個/一種重組哺乳動物細胞”代表“一個或多個/一種或多種重組哺乳動物細胞”。

【0016】 術語“容器”是本領域已知並且意指任何形狀或大小的裝置(例如，容器)，其具有適合於容納一體積的液體或氣體的內部容積。所述容器可以是開放的(即，直接與其外部環境相互作用的裝置)或封閉的(即，與其外部環境沒有相互作用的隔離的裝置)。術語“容器”包括，例如，具

有適合於在液體培養基(culture medium)中於一組受控的允許維持或增殖細胞的物理條件下培養多個細胞(例如，重組哺乳動物細胞)的內部容積的裝置。容器的非限制性實例是流體管道、生物反應器(例如，本文描述的或本領域已知的任何示例性生物反應器)、層析系統的一個或多個部件(例如，層析柱)、微濾系統的一個或多個部件、超濾/滲濾的一個或多個部件、燒杯、水槽或管。

【0017】 術語“滅菌”是本領域已知的並且指任何用於使組合物無菌的確證的方法，例如，消除(去除)或殺死所有生命形式的過程，所述生命形式包括表面存在的、流體中含有的、藥品中的或化合物如生物培養基中的傳染性物質(transmissible agent) (如真菌、細菌、病毒、孢子形式等)。滅菌可以通過施加熱、化學(例如氣體)、輻照、高壓或過濾或其組合實現。

【0018】 術語“滅菌氣體”如用於本文指能夠使組合物無菌的氣體或氣態組合物，例如，消除(去除)或殺死所有生命形式的過程，所述生命形式包括表面存在的、流體中含有的、藥品中的或化合物如生物培養基中的傳染性物質(如真菌、細菌、病毒、孢子形式等)。

【0019】 “絕對無菌性”或“絕對無菌”是用於描述完全沒有自複製性生物污染物的組合物或過程的術語。例如，所述術語可用於γ-輻照過的容器、容器的內表面和內容物和/或緩衝液。絕對無菌組合物或過程可以是潔淨的(如該術語在本領域所知那樣)。

【0020】 “無菌”或“無菌性”是用於描述具有約或小於1.0×10^{-6} (例如，約或小於1.0×10^{-7}，約或小於1.0×10^{-8}，約或小於1.0×10^{-9}或1×10^{-10})

的無菌保證水平的組合物或過程。決定某個組合物或過程是否無菌可以使用多種本領域已知的確證的生產方法來測試。例如，無菌組合物或過程可以完全沒有活的自複製性生物污染物(例如，本文描述的任何自複製性生物污染物)。無菌組合物或過程也可以是潔淨的(如該術語在本領域所知那樣)。無菌細胞培養物不含污染。

【0021】 術語“無菌保證水平”或“SAL”是本領域已知的並且意指在經處理單元的批次內實現絕對無菌性的置信水平。概率通常基於在確證過程中進行的的失活研究的結果計算並以1×10^{-n}的形式表示。

【0022】 術語“滅菌容器”和“無菌過程容器”可以互換，並且指已經經歷了滅菌過程的容器。如用於本文，術語“滅菌容器”或“無菌過程容器”包括，例如，含有生物負載受控的單一培養物(bioburden controlled monoculture) (例如，重組哺乳動物細胞的生物負載受控的單一培養物)的容器。如用於本文，術語“滅菌系統”指包括一個或多個(例如，兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個或更多)無菌過程容器的集合，其配合發揮實現特定結果的功能(例如，從液體培養基表達和純化重組蛋白)。“滅菌系統”指總共兩個或更多個相互連接或切換的容器的系統，其中所述系統中的至少一個或多個容器是滅菌容器。

【0023】 如用於本文，術語“生物製造系統”或“生物-製造系統”指用於生產生物藥物的系統。術語“藥物製造系統”指用於生產小分子藥物(例如，藥物、前藥或藥物產品)的系統。本文涵蓋的生物製造系統和藥物系統的部件包括，例如，一種或多種用於培養起始和生產的生物反應器、燒

瓶、流體管道、容器、層析系統的一個或多個部件(例如，層析柱、泵、過程容器)、過濾系統的一個或多個部件(例如，微濾系統的一個或多個部件，或超濾/滲濾系統的一個或多個部件)，和其他用於藥物隔離和純化的裝置。所述系統可以是開放的、封閉的、整合的或連續的，如本文所限定的或如以其他方式為本領域技術人員所通常理解的。

【0024】 術語“生物藥物”如用於本文指從活生物體或其產物製備或獲得的任何治療性物質，其用於預防、診斷或治療病理。因此，生物藥或生物藥物是使用生物技術產生的醫學藥物，例如，蛋白質(例如，重組治療性蛋白)，或核酸(DNA、RNA或反義寡核苷酸)，其用於治療或體內診斷目的。

【0025】 術語“小分子藥物”如用於本文指具有低分子量的、用於預防、診斷或治療病理的治療劑。治療劑通常通過有機化學合成，但也可以隔離自天然來源如植物、真菌和微生物。

【0026】 如用於本文，當第一和第二容器經由允許容器之間的氣體流動或連通的裝置或管道連接時，第一容器與第二容器“氣體連通”。類似地，當第一和第二容器經由允許容器之間的流體流動或連通的裝置或管道連接時，第一容器與第二容器“流體連通”。與本發明的教導一致，術語流體連通和氣體連通擬是同義術語。在這方面，流體擬包括有流動傾向或符合其容器的輪廓的物質，無論液體或氣體。在這方面，不僅液體符合流體的定義，氣體也符合，因為氣體能夠流動並且符合其所處容器的輪廓。

【0027】 術語“灌注生物反應器”是本領域已知的，並且意指具有內部容積用於在液體培養基中培養多個細胞(例如，重組哺乳動物細胞)的生物反應器，並且具有用於週期性或連續去除生物反應器中的液體培養基的手段(例如，出口、入口、泵或其他這樣的裝置)，並且具有用於向所述生物反應器添加基本上相同體積的替換液體培養基的手段(例如，出口、入口、泵或其他這樣的裝置)。添加替換液體培養基可以在從生物反應器去除液體培養基的基本上同時或稍後進行。用於從生物反應器去除液體培養基的手段和用於添加替換液體培養基的手段可以是單一裝置或系統。

【0028】 術語“生產生物反應器”是本領域術語，並且意指大規模生物反應器(例如，具有超過500 L、1,000 L、5,000 L、10,000 L、20,000 L、50,000L或100,000 L的內部容積)。例如，生產生物反應器可以是灌注生物反應器。

【0029】 術語“補料分批生物反應器”是本領域的術語，並且意指在第一液體培養基中包括多個細胞(例如，重組哺乳動物細胞)的生物反應器，其中培養存在於生物反應器中的細胞包括週期性或連續地添加第二液體培養基至所述第一液體培養基而不實質性或顯著地從細胞培養物去除所述第一液體培養基或第二液體培養基。所述第二液體培養基可以與所述第一液體培養基相同。在一些補料分批培養的實例中，所述第二液體培養基是第一液體培養基的濃縮形式。在一些補料分批培養的實例中，所述第二液體培養基作為乾粉添加。

【0030】術語“多柱層析系統”或“MCCS”意指總共兩個或更多個相互連接的或切換的層析柱和/或層析膜的系統。多柱層析系統的非限制性實例是週期逆流層析系統(PCC)，包括總共兩個或更多個相互連接的或切換的層析柱和/或層析膜。多柱層析系統的其他實例在本文描述並且是本領域已知的。

【0031】術語“哺乳動物細胞”意指任何來自或源自任何哺乳動物(例如，人、倉鼠、小鼠、綠猴、大鼠、豬、牛或兔)的細胞。例如，哺乳動物細胞可以是永生化細胞。在一些實施方案中，所述哺乳動物細胞是分化的細胞。在一些實施方案中，所述哺乳動物細胞是未分化的細胞。哺乳動物細胞的非限制性實例在本文描述。哺乳動物細胞的其他實例是本領域已知的。

【0032】術語“培養”或“細胞培養”意指在一組受控的物理條件下維持或增殖哺乳動物細胞(例如，重組哺乳動物細胞)。

【0033】術語“哺乳動物細胞的培養物”或“細胞培養物”意指含有多個哺乳動物細胞的液體培養基，所述哺乳動物細胞在一組受控的物理條件下維持或增殖。

【0034】術語“液體培養基”或“培養基”意指含有允許細胞(例如，哺乳動物細胞)在體外生長或增殖的充足營養物的流體。例如，液體培養基可以含有下列中的一種或多種：氨基酸(例如，20種氨基酸)、嘌呤(例如次黃嘌呤)、嘧啶(例如胸腺嘧啶)、膽鹼、肌醇、硫胺素、葉酸、生物素、鈣、煙鹼醯胺、吡哆醇、核黃素、胸苷、氰鈷胺、丙酮酸、硫辛酸、鎂、葡萄

糖、鈉、鉀、鐵、銅、鋅和碳酸氫鈉。在一些實施方案中，液體培養基可含有來自哺乳動物的血清。在一些實施方案中，液體培養基不含來自哺乳動物的血清或另外的提取物(限定的液體培養基)。在一些實施方案中，液體培養基可含有微量金屬、哺乳動物生長激素和/或哺乳動物生長因子。液體培養基的另一個實例是基本培養基(minimal medium)(例如只含有無機鹽類、碳源和水的培養基)。本文描述了液體培養基的非限制性實例。液體培養基的其他實例為本領域已知且為商業上可購得。液體培養基可含有任何密度的哺乳動物細胞。例如，如本文所用，從生產生物反應器移出的一體積的液體培養基可以基本上不含哺乳動物細胞。

【0035】 術語“重組治療性蛋白”或“重組蛋白”是本領域已知並且意指包括任何經由重組DNA技術獲得的治療性蛋白。如用於本文，“重組治療性蛋白”包括，例如，抗體或抗體片段、酶、工程化蛋白或免疫原性蛋白或蛋白片段。

【0036】 術語“蛋白片段”或“多肽片段”意指長度為至少或約4個氨基酸、至少或約5個氨基酸、至少或約6個氨基酸、至少或約7個氨基酸、至少或約8個氨基酸、至少或約9個氨基酸、至少或約10個氨基酸、至少或約11個氨基酸、至少或約12個氨基酸、至少或約13個氨基酸、至少或約14個氨基酸、至少或約15個氨基酸、至少或約16個氨基酸、至少或約17個氨基酸、至少或約18個氨基酸、至少或約19個氨基酸、或至少或約20個氨基酸，或超過20個氨基酸的多肽序列的一部分。重組蛋白片段可以使用任何本文描述的方法產生。

【0037】 術語“工程化蛋白”意指一種多肽，其並非由存在於生物體(例如哺乳動物)中的內源性核酸天然編碼。工程化蛋白的實例包括酶(例如，帶有一個或多個氨基酸取代、缺失、插入或添加，其使得工程化酶的穩定性和/或催化活性增強)、融合蛋白、抗體(例如二價抗體、三價抗體或雙抗體)和含有至少一個重組骨架序列的抗原-結合蛋白。

【0038】 術語“整合的過程”表示一種過程，其使用功能上相配合以達到特定結果(例如，從液體培養基生成隔離的重組蛋白)的結構元件實施。

【0039】 術語“連續的過程”表示一種過程，其連續地進料流體通過系統的至少一部分。

【0040】 術語“過濾”意指從液體(例如，本文描述的任何系統或過程中存在的液體培養基或流體)去除至少部分(例如，至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)不想要的生物污染物(例如，哺乳動物細胞、細菌、酵母細胞、病毒或分枝桿菌)和/或顆粒物質(例如，沉澱的蛋白)。

【0041】 術語“灌注培養”是本領域術語，並且意指在容器(例如，生物反應器)中培養細胞培養物，其中在容器中培養細胞培養物包括週期性或連續地去除容器中存在的液體培養基(例如，基本上不含細胞的液體培養基)，並且在同時或稍後向所述容器添加基本上相同體積的替換液體培養基。在一些實例中，在培養期間，在遞增的時間段期間(例如，約24小時時間段、約1分鐘至約24小時之間的時間段或超過24小時的時間段)，在去除的液體培養基體積和添加的替換培養基體積方面存在遞增變化(例如，增加或減少) (例如，以每日為基礎的培養基再補料速率)。每日去除

和替換的培養基所占分數可以依賴於所培養的特定細胞、初始接種密度和特定時間的細胞密度而變化。“RV”或“反應器體積”表示在培養過程開始時存在的培養基體積(例如，在接種後存在的培養基總體積)。

【0042】 術語“補料分批培養”是本領域的術語，並且意指在液體培養基中包括多個細胞(例如，哺乳動物細胞)的容器(例如，生產生物反應器)，其中培養存在於容器(例如，生產生物反應器)中的細胞包括在培養過程中週期性或連續添加新鮮液體培養基至所述容器，而沒有實質性或顯著地從容器移出液體培養基。新鮮液體培養基可以與培養開始時容器中存在的液體培養基相同。在補料分批培養的一些實例中，新鮮液體培養基是培養開始時容器中存在的液體培養基的濃縮形式。在補料分批培養的一些實例中，新鮮液體培養基作為乾粉添加。

【0043】 “滑架(skid)”是本領域的術語，並且如本文所用指可用作本文所述系統的平臺或支撐體的三維固體結構。若滑架包含一個或多個使移動成為可能的結構(例如輪、滑輪或類似物)，則其可為系統或系統的一部分賦予移動性。本文描述了滑架的非限制性實例。滑架的其他實例為本領域已知。

【0044】 除非另有定義，否則本文使用的所有技術與科學術語的意思與本發明所屬領域的普通技術人員的一般理解相同。本文描述了用於本發明的方法和材料；還可使用本領域已知的其他適宜方法與材料。材料、方法和實施例僅用於說明而非意在限制。本文提及的所有公開、專利申

請、專利、序列、數據庫條目和其他參考文獻通過提述以其整體併入。在衝突的情況下，以本說明書(包括定義)為准。

【0045】 本發明的其他特徵和優勢將根據下列詳述和附圖以及由權利請求範圍而顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0046】

圖1是描繪示例系統的示意圖，所述示例系統用於根據本發明從非無菌環境隔離無菌製程流(process flow)。001廢料；002廢料泵；003氧氣；004臭氧生成器；005臭氧破壞單元；006大氣臭氧檢測器；007排氣口；100臭氧分離容器。

圖2是描繪示例系統的示意圖，所述示例系統用於根據本發明從非無菌環境隔離無菌製程流。

【實施方式】

【0047】 本文提供隔離方法和相關硬件以允許從含有無菌過程的滅菌系統(例如，無菌過程容器)隔離流體流。本文描述的隔離方法提供多種益處。例如，所述隔離方法允許週期性或連續地從滅菌系統移出流體流，其提供對該滅菌系統較少的手動操作和降低污染該滅菌系統的風險。例如，本文描述的隔離方法提供從生物反應器週期性或連續地移出液體(例如、廢料流、含有重組治療性蛋白的液體)，其繼而提供對細胞培養物較

少的手動操作和降低污染細胞培養物的風險。本文描述了這些隔離方法的非限制性態樣，並且這些態樣可以任意組合使用。

【0048】 本文描述的方法包括使流體體積從第一容器流動至第二容器，使流體體積從第三容器流動至第四容器，或使流體體積從第五容器流動至第六容器。如本領域所理解的，有許多方法使液體體積從第一容器流動至第二容器，例如重力流動或藉助於泵。如此，在一些態樣中，本文描述的系統還可包括一個或多個(例如，兩個、三個、四個或五個)泵(例如自動的泵，例如，自動蠕動泵)。所述一個或多個泵可以置於設置在第一容器和第二容器之間的流體管道中。例如，本文描述的系統還可以包括一個或多個泵，將其配置成將一體積的流體從第一容器出口移出並使該體積流動至第二容器。在一些實例中，所述一個或多個泵配置成將一體積的流體從無菌過程容器出口移出並使該體積流動至隔離容器流體入口，如本文所述。在一些實例中，一個或多個泵至少與隔離容器的至少一個流體出口流體連通。可以將所述流體從無菌過程容器移出，移出可以通過泵系統(例如，交替切向流(ATF)過濾系統或切向流體過濾(TFF))進行。

【0049】 在一些實例中，本文描述的系統可以包括一個或多個(例如兩個、三個、四個或五個)過濾器，用於從液體(例如，本文描述的任何系統或過程中存在的液體培養基或流體)去除不想要的生物污染物(例如，哺乳動物細胞、細菌、酵母細胞、病毒或分枝桿菌)和/或顆粒物質(例如，沉澱的蛋白質)。

【0050】在一些態樣中，本公開提供抑制對滅菌系統的污染的方法，包括提供包含第一容器的系統，其中所述第一容器包含液體，使第一體積的液體從所述第一容器流出並通過一體積的滅菌氣體並流入第二容器。

【0051】在一些態樣中，本發明提供對滅菌系統抑制污染的方法，包括提供包含第一容器的系統，其中所述第一容器包含液體，使第一體積的液體從所述第一容器流出並通過一體積的滅菌氣體並流入第二容器。在一些實例中，所述第一容器是無菌過程容器，其中所述無菌過程容器包含流體出口，所述流體出口與第二容器的流體入口流體連通。在一些實例中，所述第二容器是如本文所述的隔離容器，並且所述體積的滅菌氣體置於隔離容器的頂部空間內。

【0052】在一些態樣中，本發明提供從無菌環境隔離無菌工藝流的系統。對於一些實例，所述系統包含含有流體出口的無菌過程容器(例如，第一容器)，和至少一個隔離容器(例如，第二容器)，所述至少一個隔離容器包含(i)流體入口，其與第一容器的流體出口流體連通並且配置成使得進入第二容器的流體通過第二容器內滅菌氣體填充的頂部空間，(ii)流體出口，其配置成使得離開第二容器的流體自所述第二容器內滅菌氣體填充的頂部空間之下移出，(iii)至少一個氣體入口；和(iv)至少一個氣體出口。在一些實例中，本文公開的系統進一步包括置於第一容器和第二容器之間的流體管道。

【0053】 本文公開的隔離方法利用容器(即，“隔離容器”)將無菌過程與環境和廢料流分開。在一些實例中，所述隔離容器包含(i)流體入口，其與無菌過程容器的流體出口流體連通並且配置成使得進入所述隔離容器的流體通過所述隔離容器內的滅菌氣體填充的頂部空間，(ii)流體出口，其配置成使得離開隔離容器的流體自所述隔離容器內的滅菌氣體填充的頂部空間之下移出，(iii)至少一個氣體入口；和(iv)至少一個氣體出口。

【0054】 如本領域中能夠理解的，所述隔離容器可以具有多種不同的體積/容積。例如，所述隔離容器可以具有約0.20 L至約20 L之間(例如，約0.20 L至約18 L之間，約0.20 L至約16 L之間，約0.20 L至約14 L之間，約0.20 L至約12 L之間，約0.20 L至約10 L之間，約0.20 L至約9.0 L之間，約0.20 L至約8.0 L之間，約0.20 L至約7.0 L之間，約0.20 L至約6.0L之間，約0.20 L至約5.0L之間，約0.20 L至約4.0 L之間，約0.20 L至約3.0 L之間，約0.20 L至約2.0 L之間，約0.20 L至約1.0 L之間，約0.50 L至約18 L之間，約0.50 L至約16 L之間，約0.50 L至約14 L之間，約0.50 L至約12 L之間，約0.50 L至約10 L之間，約0.50 L至約9.0 L之間，約0.50 L至約8.0 L之間，約0.50 L至約7.0 L之間，約0.50 L至約6.0L之間，約0.50 L至約5.0L之間，約0.50 L至約4.0 L之間，約0.50 L至約3.0 L之間，約0.50 L至約2.0 L之間，約0.50 L至約1.0 L之間，約1.0 L至約20 L之間，約1.0 L至約18 L之間，約1.0 L至約16 L之間，約1.0 L至約14 L之間，約1.0 L至約12 L之間，約1.0 L至約10 L之間，約1.0 L至約9.0 L之間，約1.0 L至約8.0 L之間，約1.0 L至約7.0 L之間，約1.0 L至約6.0L之間，約1.0 L至約5.0L之間，約1.0 L至約4.0

L之間，約1.0 L至約3.0 L之間，約1.0 L至約2.0 L之間，約1.0 L至約1.0 L之間)，或約0.20 L，約0.50 L，約1.0 L，約2.0 L，約3.0 L，約4.0 L，約5.0 L，約6.0 L，約7.0 L，約8.0 L，約9.0 L，約10.0 L，約12.0 L，約14.0 L，約16.0 L，約18.0 L或約20.0 L的內部容積。

【0055】所述隔離容器僅部分填充並且保留了容器內的頂部空間。所述頂部空間可以包括滅菌劑(例如，滅菌氣體)。在一些實例中，隔離容器內含有的滅菌氣體填充的頂部空間佔據隔離容器總內部容積的約3%至約97%；隔離容器總內部容積的約5%至約95%, 例如, 隔離容器總內部容積的約10%至約90%；隔離容器總內部容積的約15%至約85%；隔離容器總內部容積的約20%至約80%；隔離容器總內部容積的約25%至約75%；隔離容器總內部容積的約30%至約70%；隔離容器總內部容積的約35%至約65%；隔離容器總內部容積的約40%至約60%；隔離容器總內部容積的約45%至約55%；或隔離容器總內部容積的約5%；隔離容器總內部容積的約10%；隔離容器總內部容積的約15%；隔離容器總內部容積的約20%；隔離容器總內部容積的約25%；隔離容器總內部容積的約30%；隔離容器總內部容積的 約35%；隔離容器總內部容積的約40%；隔離容器總內部容積的約45%；隔離容器總內部容積的約50%；隔離容器總內部容積的約55%；隔離容器總內部容積的約60%；隔離容器總內部容積的約65%；隔離容器總內部容積的約75%；隔離容器總內部容積的約80%；隔離容器總內部容積的約85%；隔離容器總內部容積的約90%；或隔離容器總內部容積的約95%。

【0056】 用於本文描述的系統和方法中的示例性滅菌氣體包括，例如，臭氧氣體、環氧乙烷氣體、二氧化氮氣體和汽化過氧化氫(例如，含有臭氧的氣體、含有環氧乙烷的氣體、含有氮氧化物的氣體和含有過氧化氫的氣體)，或這些氣體的任何合適的混合物。在一些實例中，所述隔離容器的頂部空間內所含的滅菌氣體可以保持在，例如，約15 °C 至約70 °C，約20°C 至約65 °C，約25 °C 至約60 °C，約30 °C 至約55 °C，約35 °C 至約50 °C，或約40 °C 至約45 °C。

【0057】 臭氧作為滅菌氣體可提供許多優勢。臭氧是非常有效的滅菌劑，因為其強氧化性質，這能夠破壞範圍廣泛的病原體，包括朊病毒(prion)。臭氧的高反應性意味著廢棄的臭氧能夠通過使臭氧通過將臭氧回復成氧氣的簡單催化劑而被破壞。這也意味著循環時間相對較短。在一些實例中，所述頂部空間含有臭氧，例如，含有臭氧的氣體，所述氣體具有至少約3000 ppm，例如，至少約4000 ppm，至少約5000 ppm，至少約6000 ppm，至少約7000 ppm，至少約8000 ppm，至少約9000 ppm，至少約10,000 ppm，至少約15,000 ppm，至少約20,000 ppm，至少約50,000 ppm，至少約100,000 ppm，至少約500,000 ppm或至少約1,000,000 ppm的臭氧濃度。

【0058】 環氧乙烷具有殺微生物性質，並且能夠殺死所有已知的病毒、細菌和真菌，包括細菌孢子，並且與大多數材料兼容(例如，生物製造過程中使用的無菌過程容器)。在一些實例中，所述頂部空間含有環氧乙烷，例如，含有環氧乙烷的氣體，所述氣體具有至少約500 ppm，例如，至少約850 ppm，至少約1000 ppm，至少約2000 ppm，至少約3000 ppm，

至少約4000 ppm，至少約5000 ppm，至少約6,000 ppm，至少約7,000 ppm，至少約8,000 ppm，至少約9,000 ppm，至少約10,000 ppm，至少約15,000 ppm，至少約20,000 ppm，至少約50,000 ppm，至少約100,000 ppm，至少約500,000 ppm或至少約1,000,000 ppm的環氧乙烷濃度。

【0059】 二氧化氮(NO_2)氣體是有效的針對範圍廣泛的微生物的殺菌劑(sterilant)，這些微生物包括常見細菌、病毒和孢子。在一些實例中，所述頂部空間含有二氧化氮，例如，含有二氧化氮的氣體，所述氣體具有至少約500 ppm，至少約850 ppm，至少約1000 ppm，至少約2000 ppm，至少約3000 ppm，至少約4000 ppm，至少約5000 ppm，至少約6,000 ppm，至少約7,000 ppm，至少約8,000 ppm，至少約9,000 ppm，至少約10,000 ppm，至少約15,000 ppm，至少約20,000 ppm，至少約50,000 ppm，至少約100,000 ppm，至少約500,000 ppm或至少約1,000,000 ppm的二氧化氮濃度。

【0060】 過氧化氫(H_2O_2)具有良好的滅菌性質，並且能夠分解成水和氧氣。在一些實例中，所述頂部空間含有過氧化氫，例如，含有過氧化氫的氣體，所述氣體具有至少約5 ppm, 至少約5 ppm，至少約10 ppm，至少約50 ppm，至少約100 ppm，至少約250 ppm，至少約500 ppm，至少約850 ppm，至少約1000 ppm，至少約2000 ppm，至少約3000 ppm，至少約4000 ppm，至少約5000 ppm，至少約6,000 ppm，至少約7,000 ppm，至少約8,000 ppm，至少約9,000 ppm，至少約10,000 ppm，至少約15,000 ppm，至少約20,000 ppm，至少約50,000 ppm，至少約100,000 ppm，至少約500,000 ppm或至少約1,000,000 ppm的過氧化氫濃度。

【0061】 所述隔離容器可進一步包括用於監測所述容器頂部空間內的滅菌劑(例如，滅菌氣體)濃度的部件以檢測滅菌氣氛。例如，隔離容器可以包括用於監測頂部空間內滅菌氣體濃度的傳感器，或用於監測隔離容器中所含液體的溶解氣體濃度的傳感器(例如，溶解氣體探測器)。

【0062】 在一些實例中，隔離容器內液體填充的空間佔據隔離容器總容積的約3%至約97%；隔離容器總容積的約5%至約95%；隔離容器總容積的約10%至約90%；隔離容器總容積的約15%至約85%；隔離容器總容積的約20%至約80%；隔離容器總容積的約25%至約75%；隔離容器總容積的約30%至約70%；隔離容器總容積的約35%至約65%；隔離容器總容積的約40%至約60%；隔離容器總容積的約45%至約55%；或隔離容器總容積的約5%；隔離容器總容積的約10%；隔離容器總容積的約15%，隔離容器總容積的約20%；隔離容器總容積的約25%；隔離容器總容積的約30%；隔離容器總容積的約35%；隔離容器總容積的約40%；隔離容器總容積的約45%；隔離容器總容積的約50%；隔離容器總容積的約55%；隔離容器總容積的約60%；隔離容器總容積的約65%；隔離容器總容積的約75%；隔離容器總容積的約80%；隔離容器總容積的約85%；隔離容器總容積的約90%；或隔離容器總容積的約95%。

【0063】 隔離容器可以包括至少一個用於將滅菌氣體引入隔離容器頂部空間的氣體入口。如本領域能夠理解的，有多種方式可以將氣體引入容器的頂部空間。例如，可以將氣體噴射入容器或直接引入容器的頂部空間。如此，可以將所述至少一個氣體入口與允許氣體排入隔離容器的一個

或多個氣體噴射元件連接。所述氣體入口可以經由與用於生成或遞送滅菌氣體的或用於生成和遞送滅菌氣體(例如，臭氧、環氧乙烷、二氧化氮或汽化過氧化氫)的系統氣體連通。例如，所述氣體入口可以與用於生成臭氧的系統氣體連通，如本領域所公知的。

【0064】 所述隔離容器可以包括至少一個氣體出口，其配置成連續或週期性地從隔離容器的頂部空間排出氣體。如本領域能夠理解的，所述氣體出口可以配置成自動排出氣體，如若所述頂部空間氣壓超量。所述氣體出口可以與配置用於容納、破壞或削弱(attenuate)滅菌氣體的單元氣體連通。例如，所述氣體出口可以與臭氧破壞單元氣體連通。所述臭氧破壞單元是本領域已知的，並且可以是催化性、熱的、熱-催化性的或活化的碳。催化單元可以使用二氧化錳或塗覆有鈀的鋁，並在約50 °C的溫度破壞臭氧。熱破壞單元通常在約120 °C的溫度下操作。

【0065】 在一些實例中，本文描述的隔離容器包含至少一個流體入口，其與無菌過程容器的至少一個流體出口流體連通，並且配置成使得進入隔離容器的流體通過隔離容器內滅菌氣體填充的頂部空間。在一些態樣中，隔離容器的至少一個流體入口與無菌過程容器的至少一個流體出口經由流體管道流體連通。

【0066】 在一些實例中，本文描述的隔離容器包含至少一個流體出口。對於一些示例性系統配置，所述隔離容器的至少一個流體出口與用於純化和精製重組蛋白的裝置流體連通。因此，在一些態樣中，本文公開的

方法包括使一體積的液體從隔離容器(例如，第二容器)流入用於純化和精製重組蛋白的裝置。

【0067】 術語“純化”意指為了將重組蛋白(例如，重組治療性蛋白)從存在於含有重組蛋白的流體中的一種或多種其他雜質(例如，大塊雜質)或組分(例如液體培養基蛋白或一種或多種存在於哺乳動物細胞或自哺乳動物細胞分泌的其他組分(例如DNA、RNA、其他蛋白、內毒素、病毒等)隔離而實施的步驟。例如，純化可以在初始捕獲步驟期間或在初始捕獲步驟後實施。純化可以使用本領域已知的任何方法進行，例如使用結合重組蛋白或污染物的樹脂、膜或任何其他固體支持物實施(例如通過使用親和層析、疏水性相互作用層析、陰離子或陽離子交換層析或分子篩層析)。重組蛋白可以從含有該重組蛋白的流體使用至少一個層析柱和/或層析膜(例如，本文所述的任何層析柱或層析膜)來進行純化。

【0068】 術語“精製”是本領域的術語且意指為了從接近最終想要純度的含有重組治療性蛋白的流體中移出剩餘微量或少量污染物或雜質而實施的步驟。例如，精製可以藉由使含有所述重組治療性蛋白的流體通過選擇性結合至存在於含有重組治療性蛋白的流體中的目標重組治療性蛋白或少量污染物或雜質的(多個)層析柱或(多個)膜吸收材料實施。在這樣的實例中，(多個)層析柱或(多個)膜吸收材料的洗出液/濾液含有所述重組治療性蛋白。

【0069】 例如，本公開提供如下方法，所述方法包括使包含重組蛋白的一體積的液體從隔離容器(例如，第二容器)流入第一多柱層析系統

(MCCS1)，使用MCCS1捕獲液體培養基中的所述重組治療性蛋白，其中將含有所述重組治療性蛋白的MCCS1的洗出液連續進料至第二多柱層析系統(MCCS2)；並使用所述MCCS2純化和精製所述重組治療性蛋白，其中來自MCCS2的洗出液是重組治療性蛋白；並且其中所述過程是整合的並且從所述第一容器連續運行至來自MCCS2的洗出液，所述來自MCCS2的洗出液是重組治療性蛋白。

【0070】 術語“多柱層析系統”或“MCCS”表示具有總共兩個或多個相互連接或切換的層析柱和/或層析膜的系統。多柱層析系統的非限制性實例為週期性逆流層析系統(PCC)，其含有總共兩個或多個相互連接或切換的層析柱和/或層析膜。多柱層析系統的其他實例在本文描述且為本領域已知。

【0071】 術語“捕獲”意指為了從存在於液體培養基或經稀釋液體培養基中的一種或多種其他組分(例如培養基蛋白或存在於哺乳動物細胞中或從哺乳動物細胞分泌的一種或多種其他組分(例如DNA、RNA或其他蛋白))部分純化或隔離(例如以重量計至少或約5%，例如至少或約10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%，或至少或約95%純的)、濃縮並穩定重組蛋白(例如，重組治療性蛋白)而實施的步驟。通常，捕獲使用結合重組蛋白的樹脂實施(例如，通過使用親和層析)。本文描述了用於從液體培養基或經稀釋液體培養基捕獲重組蛋白的非限制性方法且其他方法本領域已知。重組蛋白可以

由液體培養基使用至少一個層析柱和/或層析膜(例如，本文所述的任何層析柱和/或層析膜)捕獲。

【0072】 術語“洗出液/濾液”是本領域的術語且意指一種由層析柱或層析膜排出的流體，其含有可檢測量的重組蛋白(例如，重組治療性蛋白)。

【0073】 術語”過濾”表示從液體(例如，存在於本文所述的任何系統或過程中的液體培養基或流體)移出至少一部分(例如至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)不想要的生物污染物(例如哺乳動物細胞、細菌、酵母細胞、病毒或分枝桿菌)和/或顆粒物質(例如，沉澱的蛋白質)。

【0074】 術語“分泌的蛋白”或“分泌的重組蛋白”表示一種蛋白(例如，一種重組蛋白)，當其在哺乳動物細胞內翻譯時最初至少含有一個分泌信號序列，且至少在某種程度上通過酶在哺乳動物細胞中切割分泌信號序列使蛋白的至少一部分被分泌至細胞外空間(例如液體培養基)。本領域的技術人員將會理解“分泌的”蛋白不需要與細胞完全解離才視為是分泌的蛋白。

【0075】 對於一些示例性系統配置，所述隔離容器的至少一個流體出口與用於接收和/或放置廢料的容器(receptacle)(例如，容器(vessel)、水槽或本領域技術人員已知的用於放置生物過程流體材料的單元)流體連通。

【0076】 所述隔離方法和系統允許流體流得以從含有無菌過程的滅菌系統的容器(例如，無菌過程容器)中隔離。在一些實例中，所述無菌過程容器含有無菌過程並且包含用於從容器移出流體的至少一個流體出

口。對於本文描述的過程和系統，所述至少一個流體出口與隔離容器的至少一個流體入口流體連通，其中所述隔離容器的流體入口配置成使得進入所述隔離容器的流體通過隔離容器內滅菌氣體填充的頂部空間。

【0077】 如本領域能夠理解的，所述無菌過程容器可以具有多種不同的體積/容積。例如，步驟中的無菌過程容器可以具有約0.50 L至約200 L之間的(例如，約0.50 L至約180 L之間，約0.50 L至約160 L之間，約0.50 L至約140 L之間，約0.50 L至約120 L之間，約0.50 L至約100 L之間，約0.50 L至約90 L之間，約0.50 L至約80 L之間，約0.50 L至約70 L之間，約0.50 L至約60 L之間，約0.50 L至約50 L之間，約0.50 L至約40 L之間，約0.50 L至約30 L之間，約0.50 L至約20 L之間，約0.50 L至約10 L之間，約0.50 L至約5.0 L之間，約1.0 L至約200 L之間，約1.0 L至約180 L之間，約1.0 L至約160 L之間，約1.0 L至約140 L之間，約1.0 L至約120 L之間，約1.0 L至約100 L之間，約1.0 L至約90 L之間，約1.0 L至約80 L之間，約1.0 L至約70 L之間，約1.0 L至約60 L之間，約1.0 L至約50 L之間，約1.0 L至約40 L之間，約1.0 L至約30 L之間，約1.0 L至約20 L之間，約1.0 L至約10 L之間，約1.0 L至約5.0 L之間，約1.5 L至約200 L之間，約1.5 L至約180 L之間，約1.5 L至約160 L之間，約1.5 L至約140 L之間，約1.5 L至約120 L之間，約1.5 L至約100 L之間，約1.5 L至約90 L之間，約1.5 L至約80 L之間，約1.5 L至約70 L之間，約1.5 L至約60 L之間，約1.5 L至約50 L之間，約1.5 L至約40 L之間，約1.5 L至約30 L之間，約1.5 L至約20 L之間，約1.5 L至約10 L之間，約1.5 L至約5.0 L之間，約2.0 L至約200 L之間，約2.0 L至約180

L之間，約2.0 L至約160 L之間，約2.0 L至約140 L之間，約2.0 L至約120 L之間，約2.0 L至約100 L之間，約2.0 L至約90 L之間，約2.0 L至約80 L之間，約2.0 L至約70 L之間，約2.0 L至約60 L之間，約2.0 L至約50 L之間，約2.0 L至約40 L之間，約2.0 L至約30 L之間，約2.0 L至約20 L之間，約2.0 L至約10 L之間，約2.0 L至約5.0 L之間，約2.5 L至約200 L之間，約2.5 L至約180 L之間，約2.5 L至約160 L之間，約2.5 L至約140 L之間，約2.5 L至約120 L之間，約2.5 L至約100 L之間，約2.5 L至約90 L之間，約2.5 L至約80 L之間，約2.5 L至約70 L之間，約2.5 L至約60 L之間，約2.5 L至約50 L之間，約2.5 L至約50 L之間，約2.5 L至約40 L之間，約2.5 L至約30 L之間，約2.5 L至約20 L之間，約2.5 L至約10 L之間，約2.5 L至約5.0 L之間，約5.0 L至約200 L之間，約5.0 L至約180 L之間，約5.0 L至約160 L之間，約5.0 L至約140 L之間，約5.0 L至約120 L之間，約5.0 L至約100 L之間，約5.0 L至約90 L之間，約5.0 L至約80 L之間，約5.0 L至約70 L之間，約5.0 L至約60 L之間，約5.0 L至約50 L之間，約5.0 L至約40 L之間，約5.0 L至約30 L之間，約5.0 L至約20 L之間，或約5.0 L至約10 L之間)的內部容積。

【0078】 在一些實例中，含有無菌過程的容器是生物製造系統的部件。本文考慮的生物製造系統的部件包括，例如，燒瓶、流體管道、生物反應器、層析系統的一個或多個部件(例如，層析柱)、微濾系統的一個或多個部件、或超濾/滲濾系統的一個或多個部件。

【0079】 在一些實施方案中，所述生物反應器是灌注生物反應器、補料分批生物反應器或生產生物反應器。所述灌注生物反應器可以是任何

本文所述的或本領域已知的示例性灌注生物反應器。例如，灌注生物反應器可以由不銹鋼或塑料(例如，塑料無菌袋)製成。灌注生物反應器的內表面可以具有至少一層塗料(例如至少一層明膠、膠原蛋白、聚-L-鳥胺酸、聚苯乙烯和層粘連蛋白塗料)，且如同本領域已知的，一個或多個用於將O_2、CO_2和N_2噴射入液體培養基的端口，和用於攪動液體培養基的攪拌機制。灌注生物反應器也可裝配有能夠將一體積的流體(例如，液體培養基)從生物反應器移出的機械裝置，和任選的在所述機械裝置內在將所述流體移出生物反應器的過程中從所述流體移除細胞的過濾器(例如，交替切向流(ATF)、切向流過濾(TFF)系統或美國臨時專利申請號61/878,502中描述的過濾系統)。所述生物反應器可以裝配有一個或多個泵，和一個或多個用於容納移出的流體的儲器。

【0080】 所述體積的液體可以例如使用機械系統和/或通過使所述體積滲過或重力流過具有排除該體積中存在的哺乳動物細胞的分子量截留的無菌膜而被移出。

【0081】 如本領域能夠理解的，含有無菌過程的容器可以是本領域用於培養哺乳動物細胞的目的的任何裝置(例如，燒瓶(例如，旋轉搖瓶)、搖管或生物反應器)。例如，含有無菌過程的容器可以是本領域用於培養重組哺乳動物細胞的目的的任何裝置。所述容器可以包括用於攪拌的內部裝置(例如，葉輪)或所述容器可以外部攪拌(例如，通過使用旋轉和/或傾斜平臺)。所述容器可以由不銹鋼或塑料(例如，塑料無菌袋)製成。在一些實施方案中，所述容器可以是可丟棄的一次性生物反應器(例如，

Millipore™ Mobius® Cellready 3L可丟棄生物反應器、Pierre Guerin ATM1 NucleoTM 20 L可丟棄生物反應器、Sartorius Cultibag STRTM 50 L可丟棄生物反應器、Sartorius Cultibag RMTM 20 L、Sartorius Cultibag OrbitalTM 50 L、GE Wave生物反應器2/10 System 5 L、GE Wave生物反應器20/50 System 25 L、GE Wave生物反應器200 System 200 L或GE Wave生物反應器500/1000 System 500 L)。所述容器的內表面可以具有至少一種塗料(例如至少一層明膠、膠原蛋白、聚-L-鳥胺酸、聚苯乙烯和層粘連蛋白塗料)，且如同本領域已知的，一個或多個用於將O_2、CO_2和N_2噴射入第一液體培養基的端口。所述容器可以裝配有一個或多個感應探針。當所述容器由非剛性塑料材料構成時(例如，塑料無菌袋)，所述容器可以與環繞並支持所述容器的外部支撐物連接。

【0082】 重組哺乳動物細胞可以是人、小鼠、倉鼠或猴細胞。例如，重組哺乳動物細胞可以是細胞系，例如，中國倉鼠卵巢(CHO)細胞(例如，CHO DG44細胞、CHO-K1s細胞、C02.31克隆細胞、A14.13克隆細胞、C02.57克隆細胞和F05.43克隆細胞)、Sp2.0、骨髓瘤細胞(例如，NS/0)、B-細胞、雜交瘤細胞、T-細胞、人胚腎(HEK)細胞(例如，HEK 293E和HEK 293F)、非洲綠猴腎上皮細胞(Vero)細胞或Madin-Darby犬(可卡犬)腎上皮細胞(MDCK)細胞。

【0083】 可以使用分子生物學和分子遺傳學中已知的廣泛多樣的方法將編碼重組蛋白的核酸引入哺乳動物細胞以產生重組哺乳動物細胞。非限制性實例包括轉染(例如脂轉染)、轉導(例如慢病毒、腺病毒或逆轉錄病

毒感染)和電穿孔。在一些情況中，編碼重組蛋白的核酸不會穩定地整合入重組哺乳動物細胞的染色體中(瞬時轉染)，而在其他重組哺乳動物細胞中核酸是整合的。可替換地或此外，編碼重組蛋白的核酸可以存在於質粒中和/或存在於哺乳動物人工染色體(例如人的人工染色體)中。可替換地或此外，該核酸可使用病毒載體(例如慢病毒、逆轉錄病毒或腺病毒載體)引入哺乳動物細胞中。可將該核酸可操作地連接至啟動子序列(例如強啟動子，如β-肌動蛋白啟動子和CMV啟動子，或誘導型啟動子)。含有核酸的載體(若需要的話)還可包含可選擇標記(例如賦予哺乳動物細胞潮黴素、嘌呤黴素或新黴素抗性的基因)。

【0084】 液體培養基(培養基)為本領域已知。液體培養基可補充有哺乳動物血清(例如，胎牛血清和牛血清)和/或生長激素或生長因子(例如胰島素、轉鐵蛋白和表皮生長因子)。本文描述的任何液體培養基可以選自下組：無動物衍生組分液體培養基、無血清液體培養基、含血清液體培養基、化學限定的液體培養基和無蛋白質液體培養基。化學限定的液體培養基的非限制性實例、無動物衍生組分液體培養基、無血清液體培養基和含血清液體培養基是商業上可購得的。

【0085】 液體培養基通常包括能量來源(例如，碳水化合物，如葡萄糖)、必須氨基酸(例如二十種氨基酸加上半胱胺酸的基本組合)、維生素和/或以低濃度需要的其他有機化合物、遊離脂肪酸和/或微量元素。液體培養基(例如，第一和/或第二液體培養基)可(若需要的話)補充有例如哺乳動物激素或生長因子(例如胰島素、轉鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽和緩衝液

(例如，鈣、鎂和磷酸鹽)、核苷和堿基(例如腺苷、胸苷和次黃嘌呤)、蛋白質和組織水解物和/或這些添加劑的任意組合。

【0086】 可用於在本文所述任何方法的任何步驟的培養細胞(例如哺乳動物細胞)的廣泛多種不同液體培養基為本領域已知。可用於本方法中的培養基組分包括但不限於化學限定的(CD)水解物，例如CD蛋白胨、CD多肽(兩個或多個氨基酸)和CD生長因子。液體組織培養基和培養基組分的其他實例為本領域已知。

【0087】 獲得自重組哺乳動物細胞培養物的液體培養基可以經過濾或澄清以獲得基本上不含細胞和/或病毒的液體培養基。用於過濾或澄清液體培養基以移除細胞的方法為本領域已知(例如，0.2-μm過濾，使用交替切向流(ATF™)系統、切向流過濾(TFF)系統或美國臨時專利申請號61/878,502中描述的任何系統的過濾)。重組細胞也可以從液體培養基中使用離心並且移出本身是基本上無細胞的液體培養基的上清液來移除，或通過允許細胞沉積至含有液體培養基的容器(container)(例如，容器(vessel))的重力底部，並且移出與沉積的重組哺乳動物細胞遠離的液體培養基(基本上無細胞的液體培養基)來移除。在一些實施方案中，第一培養基、第二培養基、第三培養基和第四培養基中的一種或多種(例如，兩種、三種或全部)是相同的。

【0088】 在本文所述的任何方法的任何步驟中使用的液體培養基可以是本文所述或本領域已知任何類型的液體培養基。在本文所述用於隔離

重組蛋白的任何示例性方法中，從生產細胞培養物獲得的液體培養基可以通過添加第二流體(例如，緩衝液)來稀釋。

【0089】 含有重組蛋白(例如，重組治療性蛋白)的基本上無細胞的液體培養基可以在將重組蛋白隔離之前(例如，將液體培養基進料入第一MCCS(例如，第一PCCS)之前)儲存(例如，在低於約15℃的溫度(例如低於約10℃、低於約4℃、低於約0℃、低於約-20℃、低於約-50℃、低於約-70℃或低於約-80℃)至少1天(例如至少約2天、至少約5天、至少約10天、至少約15天、至少約20天或至少約30天)。或者，在一些實例中，將含有重組蛋白的基本上不含細胞的液體培養基進料入用於隔離重組蛋白的系統。

【0090】 重組蛋白可以是重組治療性蛋白。能夠通過本文提供的方法產生的重組治療性蛋白的非限制性實例包括免疫球蛋白(包括輕鏈與重鏈免疫球蛋白、抗體或抗體片段(例如，本文所述的任何抗體片段))、酶(例如，半乳糖苷酶(例如α-半乳糖苷酶)、Myozyme®或Cerezyme®)、蛋白質(例如人紅血球生成素、腫瘤壞死因子(TNF)或幹擾素α或β)，或免疫原性或抗原性蛋白或蛋白片段(例如，用於疫苗中的蛋白質)。重組治療性蛋白可以是工程化抗原結合多肽，其含有至少一個多功能重組蛋白框架(參見，例如，Gebauer et al., *Current Opin. Chem. Biol.* 13:245-255, 2009和美國專利申請公開號2012/0164066(在本文通過提述以其全文併入)中所述的重組抗原-結合蛋白)。本身為抗體的重組治療性蛋白的非限制性實例為：帕尼單抗(panitumumab)、奧馬珠單抗(omalizumab)、阿巴伏單抗(abagovomab)、阿昔單抗(abciximab)、阿妥蘇單抗(actoxumab)、阿達木單抗(adalimumab)、

阿德木單抗(adecatumumab)、阿非莫單抗(afelimomab)、阿托珠單抗(afutuzumab)、培化阿珠單抗(alacizumab)、培化阿珠單抗(alacizumab)、阿來組單抗(alemtuzumab)、阿羅古單抗(alirocumab)、阿妥莫單抗(altumomab)、阿馬妥昔單抗(amatuximab)、阿馬妥昔單抗、安那莫單抗(anatumomab)、安廬珠單抗(anrukinzumab)、阿泊珠單抗(apolizumab)、阿西莫單抗(arcitumomab)、提諾單抗(atinumab)、托珠單抗(tocilizumab)、巴昔李單抗(basiizimab)、貝妥莫單抗(bectumomab)、貝利木單抗(belimumab)、貝伐單抗(bevacizumab)、貝西索單抗(besilesomab)、貝羅托昔單抗(bezlotoxumab)、比西單抗(biciromab)、卡那單抗(canakinumab)、賽妥珠單抗(certolizumab)、西妥昔單抗(cetuximab)、西妥木單抗(cixutumumab)、達利珠單抗(daclizumab)、地諾單抗(denosumab)、登蘇單抗(densumab)、依庫珠單抗(eculizumab)、依決洛單抗(edrecolomab)、依法利珠單抗(efalizumab)、依芬古單抗(efungumab)、依帕珠單抗(epratuzumab)、厄馬索單抗(ertumaxomab)、埃達珠單抗(etaracizumab)、芬妥木單抗(figitumumab)、戈利木單抗(golimumab)、替伊莫單抗(ibritumomab tiuxetan)、伊戈伏單抗(igovomab)、引戈妥單抗(imgatuzumab)、英利昔單抗(infliximab)、伊諾莫單抗(inolimomab)、伊諾妥珠單抗(inotuzumab)、拉貝珠單抗(labetuzumab)、萊比其佐單抗(lebrikizumab)、美妥莫單抗(moxetumomab)、那他珠單抗(natalizumab)、奧濱佐單抗(obinutuzumab)、奧戈伏單抗(oregovomab)、帕利珠單抗(palivizumab)、帕尼單抗(panitumumab)、帕妥珠單抗(pertuzumab)、藍尼單抗(ranibizumab)、利妥昔

單抗(rituximab)、托珠單抗(tocilizumab)、托西莫單抗(tositumomab)、他洛奇諾單抗(tralokinumab)、圖可佐單抗(tucotuzumab)、曲妥珠單抗(trastuzumab)、維妥珠單抗(veltuzumab)、劄魯木單抗(zalutumumab)和劄妥昔單抗(zatuximab)。可由本文所述方法生產的重組治療性抗體的其他實例為本領域已知。可由本發明方法生產的重組治療性蛋白的其他非限制性實例包括：重組阿葡糖苷酶α、拉隆酶(laronidase)、阿巴西普、加硫酶、促黃體素α、抗血友病因子、半乳糖苷酶β、幹擾素β-1a、達貝泊汀α、替奈普酶、依那西普、凝血因子IX、濾泡刺激素、幹擾素β-1a、依米格西酶、鏈道酶α、依伯汀α、胰島素或胰島素類似物、美卡舍明、因子VIII、因子VIIa、抗凝血酶III、蛋白C、人白蛋白、紅血球生成素、粒細胞集落刺激因子、粒細胞巨噬細胞集落刺激因子、白介素-11、拉隆酶、艾杜硫酶、加硫酶、α-1-蛋白酶抑制劑、乳糖酶、腺苷去胺酶、組織胞漿原活化劑、甲狀腺促激素α(例如Thyrogen®)和阿替普酶。可由本發明方法生產的重組蛋白的其他實例包括酸性α-葡萄糖苷酶、重組阿葡糖苷酶α(例如Myozyme®和Lumizyme®)、α-L-艾杜糖醛酸酶(例如Aldurazyme®)、艾杜糖醛酸硫酸酯酶、乙醯肝素N-硫酸酯酶、半乳糖-6-硫酸酯酶、酸性β-半乳糖苷酶、β-葡萄糖醛酸酶、N-乙醯基葡萄糖胺-1-磷酸轉移酶、α-N-乙醯基半乳糖胺酶、酸性脂酶、溶酶體酸性神經醯胺酶、酸性鞘磷脂酶、β-葡萄糖苷酶(例如Cerezyme®和Ceredase®)、半乳糖基神經醯胺酶、α-半乳糖苷酶-A (例如Fabrazyme®)、酸性β-半乳糖苷酶、β-半乳糖苷酶、神經胺酸酶、己糖胺酶A和己糖胺酶B。

【0091】 分泌的可溶性重組蛋白可以從液體培養基藉由移出或以其他方式在物理上將液體培養基與細胞(例如哺乳動物細胞)隔離而回收。用於將液體培養基從細胞(例如哺乳動物細胞)移出的各種不同方法為本領域已知，包括例如離心、過濾、吸取和/或抽吸。隨後可回收分泌的重組治療性蛋白並使用各種生化技術從液體培養基中隔離，所述生化技術包括各種類型層析(例如親和層析、分子篩層析、陽離子交換層析、疏水相互作用層析或陰離子交換層析)和/或過濾(例如分子量截留過濾)。

【0092】 可以藉由連續或週期性的移出方式將流體從無菌過程容器移出。在一些實例中，從無菌過程容器移出的流體包含重組蛋白。在一些實例中，從無菌過程容器移出的流體包含培養基。在一些實例中，從無菌過程容器移出的流體不包含重組蛋白。

實施例

【0093】 本發明在以下實施例中進一步描述，以下實施例不限制本發明的範圍，本發明的範圍在申請專利範圍中描述。

實施例1

【0094】 圖2描述了用於根據本發明從非無菌環境隔離無菌製程流的示例系統。所述系統可以是任何無菌過程，包括，例如，生物製造製程流的部件。如圖2中所示，所述系統包含無菌過程容器(110)(例如，第一容器)，其包含流體出口(130)。對於生物製造製程流，所述第一容器可以是例如用於使液體培養基流動的流體管道、生物反應器(例如，本文描述的或本領域已知的任何示例性生物反應器)、層析系統的一個或多個部件(例

如，層析柱)、微濾系統的一個或多個部件、超濾/滲濾系統的一個或多個部件。圖2中描述的系統進一步包括隔離容器(120) (例如，第二容器)，所述隔離容器(120)包含經由流體管道(210)與第一容器(110)的流體出口(130)流體連通並且配置成使得進入第二容器的流體通過第二容器(120)內滅菌氣體填充的頂部空間(150)的流體入口(140)、配置成使得離開第二容器的流體自所述第二容器(120)內的所述滅菌氣體填充的頂部空間(150)之下移出的流體出口(130)。所述第二容器包括至少一個氣體入口(180)，以經由氣體管道(220)供應滅菌氣體以填充第二容器的頂部空間。所述第二容器還包括至少一個氣體出口(160)，其配置成連續或週期性地從隔離排出氣體。

【0095】 圖1提供用於根據本發明從非無菌環境隔離無菌製程流的示例性實施方案。對於圖1中描述的系統，來自無菌過程容器(例如，第一容器，未顯示)的廢料流與隔離容器(例如，第二容器)流體連通，所述隔離容器配置成使得流體進入第二容器的頂部並通過第二容器內滅菌氣體填充的頂部空間。第二容器進一步包含流體出口，所述流體出口配置成使得離開第二容器的流體從第二容器內滅菌氣體填充的頂部空間之下移出(即，在第二容器的流體填充部分之下)。圖2進一步展示了泵系統，所述泵系統包含泵，其被配置成將一體積的流體從第二容器出口移出並使所述體積流入用於放置生物廢料流的容器。所述第二容器包括至少一個氣體入口，其與用於生成或遞送滅菌氣體的或用於生成和遞送滅菌氣體的系統(例如，生成臭氧的系統)氣體連通以填充第二容器的頂部空間。根據這一

實施方案，將滅菌氣體噴射入第二容器。所述第二容器還包括至少一個氣體出口，其配置成連續或週期性地從隔離過程排出氣體。

其他實施方案

【0096】 要理解的是，儘管本發明已經結合實施方式進行了描述，但是前述說明書擬在闡釋而非限制本發明的範圍，本發明的範圍由所附申請專利範圍來限定。其他態樣、優勢和修改形式在以下申請專利範圍的範圍之內。

【符號說明】

【0097】

001 廢料

002 廢料泵

003 氧氣

004 臭氧生成器

005 臭氧破壞單元

006 大氣臭氧檢測器

007 排氣口

100 臭氧分離容器

110 無菌過程容器

120 隔離容器

130 流體出口

140 流體入口

150 頂部空間

160 氣體出口

180 氣體入口

210 流體管道

220 氣體管道

109 年 12 月 07 日修正

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種製造一重組治療性蛋白的方法，該方法包括：

提供一包含一第一容器的系統，其中該第一容器包含一液體；

使該液體的一第一體積流出該第一容器且通過滅菌氣體的一體積並流入一第二容器；以及

使該液體的一第二體積從該第二容器流入一用於放置一生物廢料流的容器，

其中該液體的該第一體積是一廢料流。

【請求項2】 如請求項1所述的方法，其中該滅菌氣體的該體積係置於該第二容器的一頂部空間。

【請求項3】 如請求項2所述的方法，其中該第二容器進一步包含：

(i) 一流體入口，其配置成使得進入該第二容器的該液體的體積通過該頂部空間，

(ii) 一流體出口，其配置成使得離開該第二容器的液體自該滅菌氣體填充的該頂部空間之下流過，

(iii) 至少一氣體入口；以及

(iv) 至少一氣體出口，

其中該流體入口與該第一容器流體連通且該流體出口係與該用於放置該生物廢料流的容器流體連通。

【請求項4】 如請求項3所述的方法，其中該第一容器包含與該第二容器的流體入口流體連通的一流體出口。

【請求項5】 如請求項1所述的方法，其中在該方法中，該第二容器至少部分填充有一液體。

【請求項6】 如請求項1所述的方法，其中該滅菌氣體被噴射入該第二容器。

【請求項7】 如請求項2所述的方法，其中該滅菌氣體被直接引入該第二容器的該頂部空間。

【請求項8】 如請求項1所述的方法，其中該第一容器是一滅菌容器。

【請求項9】 如請求項1所述的方法，其中該系統是一生物製造系統。

【請求項10】 如請求項1所述的方法，其中該第一容器是一生物反應器、一層析系統、一微濾(MF)系統、或一超濾及/或滲濾(UF/DF)系統。

【請求項11】 如請求項1所述的方法，其中該第一容器中的該液體包含一細胞，其包含一重組治療性蛋白。

【請求項12】 如請求項1所述的方法，其中該第一容器中的該液體包含一重組治療性蛋白。

【請求項13】 如請求項12所述的方法，其中該重組治療性蛋白是從一細胞分泌。

【請求項14】 如請求項1所述的方法，其中該第一容器中的該液體不包含一重組治療性蛋白。

【請求項15】 如請求項1所述的方法，其中該液體的該第一體積不包含一重組治療性蛋白。

【請求項16】 如請求項1所述的方法，其中該第一容器中的該液體包含發酵副產物。

【請求項17】如請求項1所述的方法，其中該液體的該第二體積包含一重組治療性蛋白。

【請求項18】如請求項1至請求項17中之任一項所述的方法，其中該重組治療性蛋白是一抗體或抗體片段。

【請求項19】如請求項1至請求項17中之任一項所述的方法，其中該重組治療性蛋白是一酶。

【請求項20】如請求項19所述的方法，其中該酶是α-半乳糖苷酶(galactosidase)-A。

【請求項21】如請求項19所述的方法，其中該酶是J-葡萄糖苷酶(J-glucosidase)。

【請求項22】如請求項19所述的方法，其中該酶是重組阿葡糖苷酶(alglucosidase)。

【請求項23】如請求項1至請求項17中之任一項所述的方法，其中該滅菌氣體包含臭氧。

【請求項24】如請求項1至請求項17中之任一項所述的方法，其中該滅菌氣體包含環氧乙烷。

【請求項25】如請求項1至請求項17中之任一項所述的方法，其中該滅菌氣體包含二氧化氮。

【請求項26】如請求項1至請求項17中之任一項所述的方法，其中該滅菌氣體包含汽化過氧化氫(vaporized hydrogen peroxide)。

【請求項27】如請求項1所述的方法，其中該第一容器是一生物反應器。

【請求項28】 如請求項27所述的方法，其中該生物反應器是一灌注生物反應器。

【請求項29】 如請求項27所述的方法，其中該生物反應器是一補料分批生物反應器。

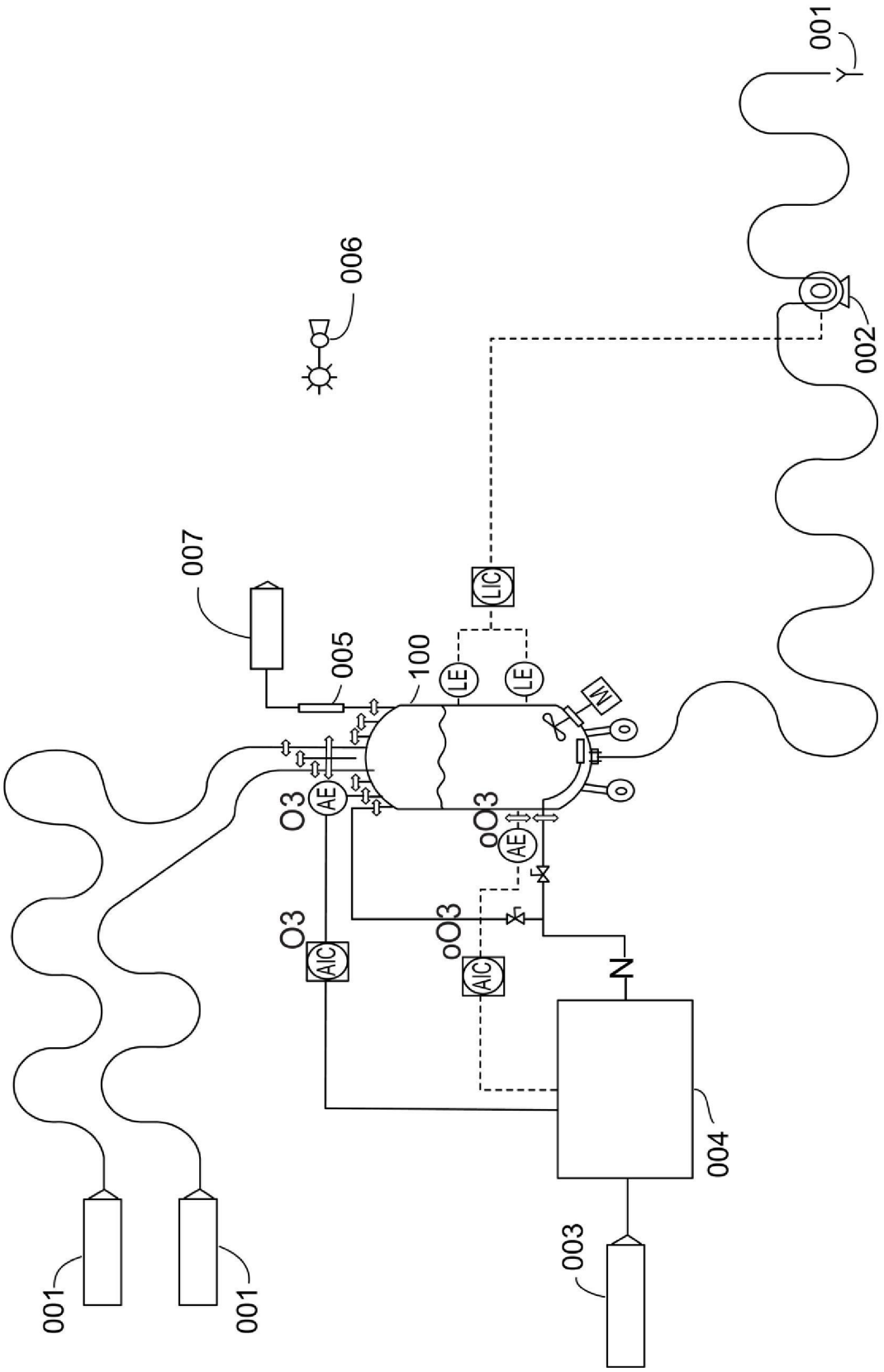
【請求項30】 如請求項27所述的方法，其中該生物反應器是一生產生物反應器。

【請求項31】 如請求項1所述的方法，其中該第一容器是一層析系統。

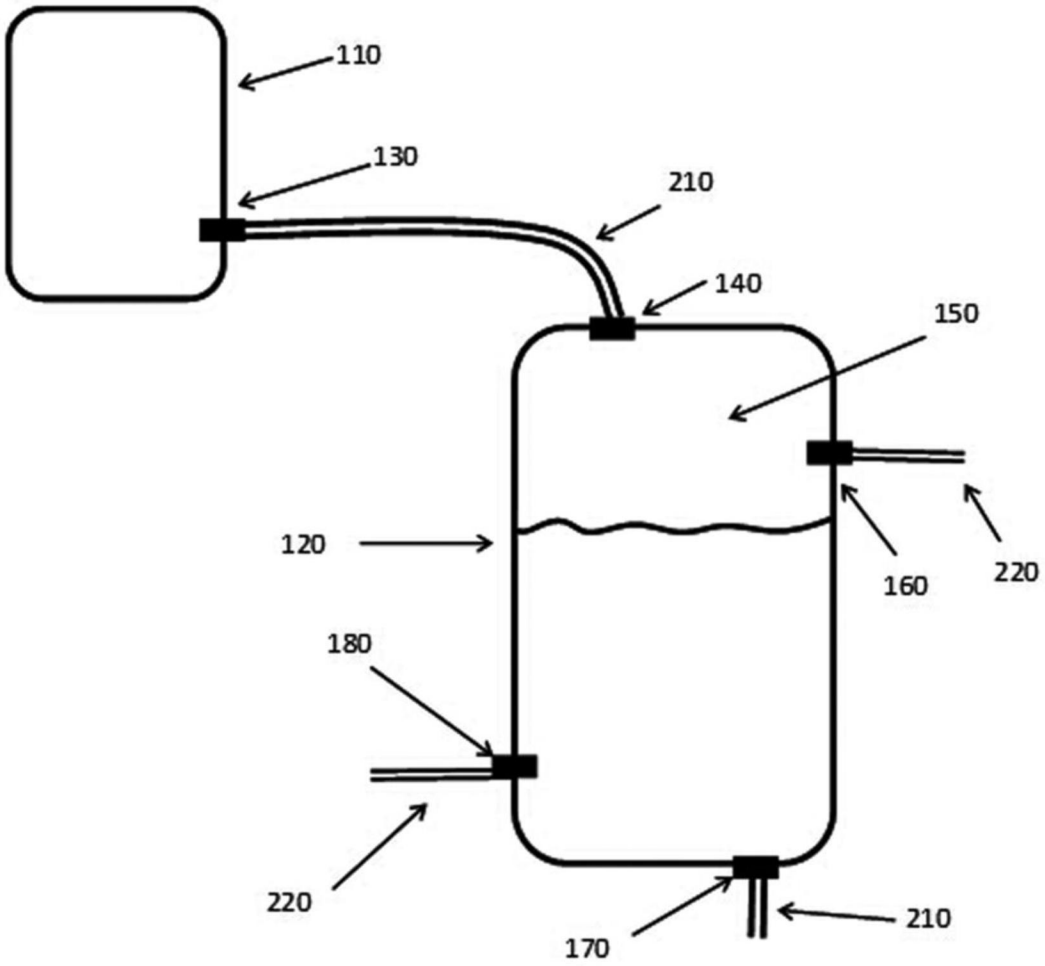
【請求項32】 如請求項1所述的方法，其中該第一容器是一超濾及/或滲濾(UF/DF)系統。

【請求項33】 如請求項1所述的方法，其中該液體的第一體積是一液體培養基，其基本上不含哺乳動物細胞。

【發明圖式】


001
002
003
004
005
006
007
100
LIC
LE
LE
W
AE
AE
AIC
AIC
O3
O3
O3
N
001
001

【圖1】



【圖2】