



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102574026 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 07

(21) 申请号 201080043193. 9

(22) 申请日 2010. 09. 20

(30) 优先权数据

12/566701 2009. 09. 25 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 03. 23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/SE2010/051003 2010. 09. 20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/037522 EN 2011. 03. 31

(73) 专利权人 通用电气医疗集团生物科学公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 A·M·威廉斯 A·卡莱特斯基

L·斯塔克 D·G·戈

J·克拉斯南斯基 D·A·瓦雷海姆

B·林

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 李强 谭祐祥

(51) Int. Cl.

B01D 15/10(2006. 01)

B01J 47/02(2006. 01)

G01N 30/46(2006. 01)

G01N 30/60(2006. 01)

C07K 16/00(2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2008127087 A1, 2008. 10. 23,

US 2007039375 A1, 2007. 02. 22,

US 2009050567 A1, 2009. 02. 26,

W0 2007043874 A1, 2007. 04. 19,

审查员 陈茵

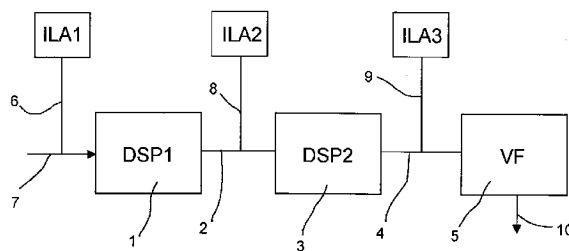
权利要求书1页 说明书11页 附图4页

(54) 发明名称

分离系统和方法

(57) 摘要

一种分离系统包括:(i) 至少两个分离单元,各个分离单元包括流体入口和流体出口,其中,分离单元以出口对入口的方式串联连接,以形成分离单元排;以及(ii) 感测和调节器件,其顺列地设置在各个分离单元之间,以持续地监测和调节从分离单元排中的一个分离单元流到后面的分离单元的流体的至少一个环境属性参数。还公开了分离系统的使用和用于使用分离单元和对流体流或多个流体流的顺列调节来纯化包含期望的物质的液体的方法。



1. 一种用于分离和纯化生物分子的分离系统,包括:

至少两个分离单元,各个分离单元包括流体入口和流体出口,其中,所述分离单元以出口对入口的方式串联连接,以形成分离单元排;以及

感测和调节器件,其顺列地设置在各个分离单元之间,以持续地监测和调节从所述分离单元排中的一个分离单元流到后面的分离单元的流体的至少一个环境属性参数,

其中,所述感测和调节器件包括以闭环的方式连接到流体输送装置上的顺列传感器和控制器。

2. 根据权利要求1所述的分离系统,其特征在于,所述分离系统包括至少三个分离单元。

3. 根据权利要求1所述的分离系统,其特征在于,所述分离单元选自柱和过滤器。

4. 根据权利要求1所述的分离系统,其特征在于,所述流体输送装置包括至少一个泵。

5. 根据权利要求4所述的分离系统,其特征在于,所述分离系统包括至少两个色谱柱。

6. 根据权利要求1所述的分离系统,其特征在于,至少一个环境属性参数选自pH值、导电率和物质浓度。

7. 根据权利要求6所述的分离系统,其特征在于,用于监测和调节物质浓度的所述感测和调节器件包括UV传感器。

8. 根据权利要求3所述的分离系统,其特征在于,所述分离系统用于蛋白质纯化并且包括两个色谱柱和病毒移除过滤器。

9. 根据权利要求8所述的分离系统,其特征在于,所述色谱柱包括阳离子交换柱和阴离子交换柱。

10. 根据权利要求9所述的分离系统,其特征在于,设置在所述阳离子交换柱和所述阴离子交换柱之间的所述感测和调节器件包括用于监测和调节导电率和pH值中的至少一个的感测和调节器件。

11. 根据权利要求9所述的分离系统,其特征在于,设置在所述阴离子交换柱和所述病毒移除过滤器之间的所述感测和调节器件包括用于监测和调节UV吸收率的感测和调节器件。

12. 根据权利要求1所述的分离系统,其特征在于,所述分离系统包括用于所述分离系统的运行的计算机化的控制和数据分析系统。

13. 一种用于纯化包含至少一种期望的物质的液体的方法,包括以下步骤:

使所述液体流到第一分离单元,以从中获得包含所述期望的物质的纯化流体流出物;

在线监测所述流体流出物的至少一个环境属性参数且将其调节成期望值;

将所述流出物引导到第二分离单元,以从中获得包含所述期望的物质的纯化流体流出物;以及

回收包含所述期望的物质的所述纯化流出物。

14. 根据权利要求13所述的方法,其特征在于,所述方法包括使来自所述第二分离单元的流出物经历至少一个额外的分离单元,其中,监测通往各个额外的分离单元的流体入口流的至少一个环境属性参数且将其调节成期望值。

分离系统和方法

发明领域

[0001] 本发明涉及分离和纯化化合物,尤其是生物分子,并且更具体而言,涉及执行多个分离步骤的分离系统。

[0002] 发明背景

[0003] 在过去的十年里,对于药物研制和治疗应用,在蛋白质(例如单克隆抗体)的使用方面已经有了巨大的发展。但是,大规模生产药用级单克隆抗体是复杂的工艺,其需要多个色谱步骤和过滤步骤来满足严格的规章要求。

[0004] 制造生物分子始于在生物衍生系统中合成期望的生物材料。典型地通过特殊地设计和定制而成的一系列物理分离技术来完成期望的材料的制备。

[0005] 例如,单克隆抗体的制造工艺典型地包括在重组哺乳动物细胞培养中的表达。在进行离心分离之后,使培养产物经历下游纯化(DSP),下游纯化大体包括“捕捉”阶段、“中间纯化”阶段和“精制(polishing)”阶段。捕捉阶段通常以蛋白质 A 亲合色谱法为基础。然后典型地使用阳离子交换和阴离子交换色谱步骤来对得到的产物进行进一步的纯化和精制,以移除降解产物和杂质。最后,通过所包括的过滤步骤来移除病毒物质。

[0006] 但是,蛋白质 A 亲合色谱法会有若干缺点,包括蛋白质 A 泄漏,并且因此开发出了简化的纯化工艺,其中,阳离子交换捕捉阶段代替蛋白质 A 亲合色谱法。然后阳离子捕捉步骤移除与工艺有关的污染物,达到单个精制步骤就足以清洁残余物的低水平。因而单克隆抗体的这种下游纯化工艺包括阳离子交换色谱步骤、阴离子交换色谱步骤和病毒移除过滤步骤。

[0007] 通过使用在不同的色谱步骤和过滤步骤之间的滞留槽,用批量工艺来执行迄今使用的下游纯化工艺。各个工艺步骤使用某个 pH 值和导电率的缓冲剂或多个缓冲剂以及工艺后清洁和存储液体。在各个步骤之前,常常必须调节产物流的诸如 pH 值和蛋白质浓度的状况,然后将这些调节步骤作为单独的中间批量操作来执行。

[0008] 在现有技术中已经提出了至少在某种程度上允许对洗脱液进行自动的和在线的调节的分离系统和工艺。

[0009] US 2009-0149638 公开了用于大规模地进行下游蛋白质纯化且允许自动化的系统和工艺,这些工艺能够高产量且持续地运行。在这些工艺中,一个色谱步骤接着另一个,没有中间超滤/渗滤步骤,来自一个槽的洗脱液通过中间滞留槽传递到另一个槽,洗脱液可呈酸性或碱性。

[0010] US 2009-0126466 公开了一种多维高性能液体色谱法(HPLC),其中,用第一流动相在第一 pH 值处执行第一色谱分离,并且使从中收集到的馏分或多个馏分经历用第二流动相在第二个不同的 pH 值处进行的第二色谱分离。在使馏分或多个馏分经历第二色谱分离模式之前,可使从第一分离中收集到的馏分或多个馏分可选地在线浓缩或稀释。

[0011] 本发明的目标在于提供一种改进的自动化分离系统,它能够进一步减小研制时间、处理时间和货物成本,并且不需要中间滞留槽。

[0012] 发明概述

[0013] 根据本发明,以上和其它目标与优点通过这样的分离或纯化系统来实现:该系统包括串联连接而形成单个运行单元的若干分离单元,以及其中,在各个分离单元之间顺列(in-line)提供用于测量和调节分离单元之间的流体流的被测参数的器件,优选闭环器件。这种系统将缩短运行时间,并且消除例如单克隆抗体制造所需的中间滞留与中间测试要求。

[0014] 但是,以上有创造性的概念不局限于下游纯化(DSP)或呈色谱柱或过滤器的形式的分离单元和蛋白质(例如抗体)的纯化。相反,本发明大体能够应用于在化学或生物化学物质的生产的下游与上游的化学或生物化学物质的任何分离或纯化。

[0015] 因此,在一方面,本发明提供了一种如权利要求1中所限定的分离系统。

[0016] 此分离系统包括多个分离单元,各个分离单元包括流体入口和流体出口。分离单元以出口对入口的方式串联连接,以形成分离单元排。在各个分离单元之间,顺列地提供感测和调节器件,以监测和调节从分离单元排中的一个分离单元流到后面的分离单元的流体的至少一个环境属性参数。

[0017] 要宽泛地理解如本文所用的用语“分离单元”,而且它包括例如色谱装置(包括柱和隔膜)、过滤器、离心机、两相分离装置等。

[0018] 而且,要宽泛地理解如本文所用且涉及在系统中流动的流体的用语“环境属性参数”,而且它包括例如流体的物理参数(例如导电率、压力、粘度、温度、折射率、浊度、流率)和化学参数,例如物质(例如产物、盐)的pH值、浓度、总的有机碳(TOC)。

[0019] 分离系统优选包括用于分离系统的运行的计算机化的控制 and 数据分析系统。

[0020] 在另一方面,本发明包括一种如权利要求14中所限定的纯化方法。

[0021] 这个用于纯化包含至少一种期望的物质的液体方法包括以下步骤:(i)使液体流到第一分离单元,以从中获得包含期望的物质的纯化流体流出物;(ii)在线监测流体流出物的至少一个环境属性参数且将其调节成期望值;(iii)将流出物引导到第二分离单元,以从中获得包含期望的物质的纯化流体流出物;以及(iv)回收包含期望的物质的纯化流出物。

[0022] 在一个优选实施例中,该方法包括使来自第二分离单元的流出物经历至少一个额外的分离单元,其中,监测通往各个额外的分离单元的流体入口流的至少一个环境属性参数,并且将其调节成期望值。

[0023] 优选地,通过计算机化的控制 and 数据分析系统来控制方法步骤。

[0024] 在另外的另一方面,如权利要求16中所限定,本发明包括使用根据首先提到的方面的分离系统来研究生物分子。

[0025] 在又一方面,如权利要求17中所限定,本发明包括使用根据首先提到的方面的分离系统来发展分离方法。

[0026] 在从属权利要求中阐述了本发明的上述方面的其它优选实施例。

[0027] 参照以下描述和附图,将获得对本发明的更完整的理解,以及本发明的另外的特征与优点。

[0028] 附图简述

[0029] 图1是根据本发明的、具有三个分离单元的基本分离系统构造的概略图。

[0030] 图2是根据本发明的一个实施例的色谱系统构造的图示。

[0031] 图 3 是用于测试图 2 的色谱系统的特征的色谱系统测试平台构造的图示。

[0032] 图 4 是用于测试图 2 的色谱系统的特征的另一个色谱系统测试平台构造的图示。

[0033] 发明详述

[0034] 如上面提到的那样,本发明大体涉及分离或纯化系统,其中多个分离单元串联连接,以形成单个运行单元,而且该分离或纯化系统包括在各个分离单元之间的顺列感测和调节器件。在下文中,关于呈用于抗体(尤其是单克隆抗体)的下游纯化系统的形式的本发明的非限制性实施例,将仅以实例的方式来更加详细地描述本发明。

[0035] 可称为直通处理(STP)系统的分离系统在单个连续的工艺中结合了多个色谱步骤和病毒过滤步骤。STP 系统的基本特征在于其设计成优选以闭环的方式执行对工艺参数的控制,包括(但不限于)产物流的 pH 值、导电率和 UV 吸收率。

[0036] 图 1 概略性地显示了根据本发明的 STP 系统的基本构造,在这里为了说明且无限制,该系统具有三个分离单元。

[0037] 在图 1 中,第一分离单元 1(这里称为 DSP1)通过其出口被直接管道或管 2 连接到第二分离单元 3(这里称为 DSP2)的入口。然后第二分离单元 3 的出口通过直接管道 4 而连接到第三分离单元 5(这里称为 VF)的输入上,使得三个分离单元形成连续的分离单元排。

[0038] 在各个分离单元 1、3 和 5 之间,提供了用于进行顺列调节(ILA)的器件,以进行监测和控制(向上或向下,即提高或降低)。第一顺列调节器件 6 联接到第一分离单元 1 的入口管道 7 上,第二顺列调节器件 8 联接到第一分离单元 1 和第二分离单元 3 之间的管道 2 上,而第三顺列调节器件 9 联接到第二分离单元 3 和第三分离单元 5 之间的管道 4 上。要理解,这些顺列调节器件代替用于传统的基于批量的处理装备中的过程中的采样和工艺参数测试。经由闭环(反馈环),使用传感器来进行顺列调节,从而产生在异常发生时立刻对异常进行响应的能力,如下面更加详细地描述的那样。

[0039] 通过出口管道 10 从病毒移除过滤器 5 中回收包含流体流的纯化产物。

[0040] 典型地将不同的系统单元安装在平台或滑道上。另外,典型地通过计算机化的控制 and 数据分析系统来操作 STP 系统。

[0041] 在示出的分离系统例如将打算对蛋白质(例如单克隆抗体)进行下游纯化(DSP)的情况下,三个分离单元例如将包括串联的两个色谱柱和病毒移除过滤器,在图 1 中分别标为 DSP1、DSP2 和 VF。然后第一柱 DSP1 可为阳离子交换色谱(CIEX)柱,第二柱 DSP2 可为阴离子交换色谱(AIEX)柱,而病毒移除过滤器 VF 可为例如隔膜过滤器。备选地,可使用三个不同的色谱柱。

[0042] 在这种情况下,顺列环境调节例如可包括对进入第一柱(DSP1)的产物流进行离子强度(导电率)调节。在第一柱(DSP1)和第二柱(DSP2)之间,顺列调节可包括 pH 值和/或导电率的改变。在第二柱(DSP2)和病毒过滤器(VF)之间,顺列调节可包括稀释(产物的浓度),以及可选地还可包括 pH 值。可在具有预先制备的溶液的槽中提供所使用的缓冲剂和其它液体,或者可使用例如与本申请相伴提交的共同未决的“Method and system for preparation of liquid mixtures(用于制备液体混合物的方法和系统)”中描述的类型顺列制备(顺列稀释)系统来实时地制备缓冲剂和其它液体。

[0043] 与单克隆抗体的传统的基于批量的下游纯化相比,本发明的自动化的直通方法提供这样的流线工艺流程:它具有较迅速的批量周转时间,改进制造设施利用和产量,消除在

各步骤之间的容器和那些容器的附加物,并且降低处理成本。它还通过基于传感器的顺列调节来提供较稳定可靠的工艺。

[0044] 本发明的分离系统将具有广泛的应用。因而,除了直接产物纯化之外,与现有的劳力密集型系统相比,其它应用将得到非常大的促进。这样的应用包括例如对生物分子的研究和分离方法的开发。其它应用包括对例如介质和 / 或装置寿命的按比例缩放研究、清洁率研究、清洁研究,在此仅列举几项。

[0045] 分离系统将容许获得高的精确性以及高重复性。

[0046] 要理解,分离系统不仅将提供对分离环境的控制,而且还影响被分离的分子的环境。例如,使用低 pH 值可使病毒失去活性,可使 pH 值、离子强度和蛋白质浓度达到这样的水平:在该水平处,期望的产物稳定,蛋白酶无活性和 / 或不可形成有害聚集物。

[0047] 如上面提到的那样,通过闭环(反馈环),使用传感器来进行顺列调节。设计简单的闭环控制系统包括联接成闭环的工艺和控制器。工艺受其输入信号(控制信号)的影响。测量信号(即工艺输出信号)提供关于待被控制的工艺的信息。控制器具有两个输入信号,即测量信号和指示测量信号的期望值的设定值。这两个信号之间的差异启动将导致工艺的实际响应接近期望的响应的动作。这又向零驱动差异信号。较复杂的控制系统具有多个测量信号和多个控制信号。闭环控制系统是众所周知的,并且不需要在本文中对其进行详细描述。

[0048] 常用的闭环控制器是 PID(比例积分微分)控制器。PID 控制器计算三个单独的参数,即比例值、积分值和微分值。比例值确定对当前误差的反应,积分值基于最近的误差的总和确定反应,而微分值则基于误差变化的速率确定反应。使用这三个动作的加权总和来调节控制值的一部分。

[0049] 在上面略述的顺列调节器件中,以闭环的方式将顺列感测装置或传感器(检测器)联接到控制器和液体输送装置(典型地是泵或用于进行流体输送的其它原动力)上,使得在感测到的系统参数值和设定值之间的差异控制泵的促动。

[0050] 基本上,可使用可检测系统流体和流的具体参数以及输出可测量的(模拟的或数字的)信号的任何传感器,例如基于光谱度量(例如近 IR、UV)或离子量度(导电率、pH 值)的传感器。

[0051] 顺列调节器件典型地由计算机化的控制器操作,计算机化的控制器可为单独的形式,或者与用来操作 STP 系统的计算机化的控制和数据分析系统相同。关于上面提到的蛋白质纯化的情况,例如,顺列调节将对 pH 值、导电率和 UV 执行闭环控制,同时这些参数在工艺进料流中发生阶梯式、陡坡式和浅坡式的改变。

[0052] 图 2 显示了根据本发明而针对蛋白质(特别是单克隆抗体)的下游纯化所设计的色谱系统的一个实施例的构造。

[0053] 色谱系统包括串联连接的三个分离单元,即阳离子交换柱 21、阴离子交换柱 22 和病毒移除过滤器 23。具体而言,柱 21 通过管道 24 而联接到柱 22 上,而柱 22 则通过管道 25 经由阀、减压 (pressure break) 槽 26 和泵 27 而联接到病毒移除过滤器 23 上。

[0054] 色谱柱 21 的入口通过管道 28 经由阀和气泡收集器 30 连接到第一色谱泵 29 上,并且通过管道 31 连接到第二色谱泵 33 上,管道 31 在 T 形接头 32 处连接到管道 28 上。第一泵 29 具有(这里)带有四个入口阀 35 的入口管路 34,入口阀 35 中的一个用作取样阀。

同样,第二泵 33 具有(这里)带有四个入口和取样阀 37 的入口管路 36。

[0055] 闭环控制回路(PID)控制色谱泵 29 和 33 的运行,并且包括用于感测入口管道 28 的导电率且连接到控制器 39 上的顺列导电率传感器 38,控制器 39 又连接到泵 29 和 33 上。控制器 39 还以闭环的方式连接顺列流量传感器 40,顺列流量传感器 40 联接到连接色谱柱 21 和 22 的管道 24 上。

[0056] 色谱泵 29 和 33 对应于传统上在色谱法中使用的梯度泵,而上面描述的闭环控制回路则对应于在梯度系统上提供的标准的导电率反馈调节逻辑。

[0057] 示出的色谱系统包括四个顺列调节组件。

[0058] 第一顺列调节组件用于调节来自色谱柱 21 的流出物的导电率,并且包括缓冲泵 41,缓冲泵 41 经由管道 42 在下游混合器 44 附近的 T 形接头 43 处连接到管道 24 上。提供 PID 闭环控制回路来控制泵 41 的运行,该 PID 闭环控制回路包括在管道 24 的下游联接到混合器 44 上的顺列导电率传感器 45。导电率传感器 45 连接到控制器 46 上,控制器 46 又连接到泵 41 上。PID 环从传感器 45 中读取导电率,并且调节泵 41,以达到和保持期望的设定点。

[0059] 第二顺列调节组件调节来自色谱柱 21 的流出物的 pH 值,并且包括经由管道 48 在下游混合器 50 附近的 T 形接头 49 处连接到管道 24 上的缓冲泵 47。提供 PID 闭环控制回路来控制泵 47 的运行,该 PID 闭环控制回路包括在混合器 50 的下游联接到管道 24 上的顺列 pH 值传感器 51。pH 值传感器 51 连接到控制器 52 上,控制器 52 又连接到泵 47 上。PID 环从传感器 51 中读取 pH 值,并且调节泵 47,以达到和保持期望的设定点。

[0060] 第三顺列调节组件调节来自管道 25 中的第二色谱柱 22 的流出物的 UV 吸收率(产物浓度),并且包括经由管道 54 在下游混合器 56 附近的 T 形接头 55 处连接到管道 25 上的缓冲泵 53。PID 闭环控制回路控制泵 53 的运行,该 PID 闭环控制回路包括在混合器 56 的下游联接到管道 25 上的顺列 UV 传感器 57。UV 传感器 57 连接到控制器 58 上,控制器 58 又连接到泵 53 上。PID 环从传感器 57 中读取 UV 吸收率,并且调节泵 53,以达到和保持期望的设定点。

[0061] 提供第四顺列调节组件来对减压槽 26 的下游的管道 25 中的产物流的 UV 吸收率(产物浓度)进行最终调节。这个顺列调节组件包括稀释缓冲泵 27 和控制泵 27 的运行的 PID 闭环控制回路,该 PID 闭环控制回路包括在泵 27 和病毒移除过滤器 23 之间联接到管道 25 上的顺列 UV 传感器 59,以及控制器 60。PID 环从传感器 59 中读取 UV 吸收率,并且调节泵 27,以达到和保持期望的设定点,期望的设定点经选择成对应于在过滤之前进行的仅避免过滤器堵塞所必要的程度的稀释。

[0062] 在加载在第一柱上的期间对产物流的导电率和/或 pH 值的顺列调节可由色谱泵 29 和 33 以及相关 PID 控制回路 38、39 共同提供,而且可选地,可认为该顺列调节是第五顺列调节组件。

[0063] 示出的色谱系统进一步包括在气泡收集器 30 的上游的顺列压力传感器 61,以及分别在柱 21 的下游但在接头 43 的上游的顺列的导电率传感器 62、pH 值传感器 63 和 UV 传感器 64。

[0064] 病毒移除过滤器 23 可为例如隔膜过滤器。

[0065] 在色谱系统中的不同的泵例如可选自蠕动泵、活塞泵和膜片泵。

[0066] 混合器 44、50、56 可为静态混合器,例如增加直径且然后减小内径从而在流中产生湍流的导管的管内大小节段。

[0067] 色谱系统由控制软件控制。示例性的这种控制软件包括 UNICORN™控制系统(瑞典乌普萨拉 GE Healthcare Bio-Sciences AB),它以具有计算机图形用户接口(它是控制系统的组成部分)的控制器和 I/O 接口为基础。

[0068] 可用各种方式执行图 2 中显示的和上面描述的系统。在下面,将描述三个示例性使用来进行说明:

[0069] 1. 处于结合-洗脱模式的第一柱(21)和最终病毒过滤(23)

[0070] 2. 处于结合-洗脱模式的第一柱(21)、处于捕捉模式(流过)的第二柱(22),以及最终病毒过滤(23)

[0071] 3. 处于结合-洗脱模式的第一柱(21)、处于结合-洗脱模式的第二柱(22),以及最终病毒过滤(23)

[0072] 1. 处于结合-洗脱模式的第一柱和最终病毒过滤

[0073] 或者用预先制备的溶液或者用使用顺列缓冲剂制备单元或组件(例如上面提到的共同未决的申请“Method and system for preparation of liquid mixtures(用于制备液体混合物的方法和系统)”中公开的那个)而实时制备的缓冲剂来平衡第一柱 21。然后或者直接地或者通过经由泵 33 和控制回路 38、39、40 对导电率或 pH 值的调节来将样本装载到柱 21 上。在样本结合且对未结合样本的冲洗完成之后,蛋白质就被洗脱。

[0074] 或者用预先制备的溶液供应的或者用使用顺列缓冲剂制备单元(如果分离系统这样配备了的话)制备的缓冲剂供应的洗脱可为等度的(isocratic),具有固定的 pH 值或导电率。备选地,流的梯度洗脱或导电率可用泵 29、33 和控制回路 39、38、40 来施加。梯度洗脱允许在泵之间的混合的目标设定以线性速率改变,并且系统控制的控制算法使该混合遵从这个变化的线性设定点。

[0075] 可选地,在从柱 21 中洗脱出时,可在洗脱期间通过包括泵 41、管道 42、T 形接头 43、混合器 44 和导电率控制回路 45、46 的第一顺列调节组件来将导电率顺列地调节到指定值。同样,可通过包括泵 47、管道 48、T 形接头 49、混合器 50 和 pH 值控制回路 51、52 的第二顺列调节组件来顺列地调节 pH 值;并且可通过包括泵 53、管道 54、T 形接头 55、混合器 56 和 UV 控制回路 57、58 的第三顺列调节组件来顺列地调节蛋白质浓度。

[0076] 使用泵 27 和 UV 控制回路 59、60 来使浓度经调节的产物持续以恒定的压力通过过滤器 23。

[0077] 2. 处于结合-洗脱模式的第一柱、处于捕捉模式(流过)的第二柱,以及最终病毒过滤

[0078] 或者用预先制备的溶液或者用使用系统的顺列缓冲剂制备能力(如果这样配备了的话)而实时制备的缓冲剂来平衡第一柱 21 和第二柱 22。如果平衡溶液对于两个柱是相同的,则这可彼此顺列地执行;否则,将在绕过另一个柱的情况下按顺序执行平衡。

[0079] 然后或者直接地或者通过对导电率 33、38 或 pH 值 39、40 的调节来将样本装载到柱 21 上。在这个操作期间,第二柱 22 可为成顺列或被绕过,这取决于工艺要求。在样本结合且对未结合样本的冲洗完成之后,蛋白质就被洗脱。

[0080] 在洗脱期间,如果还没有顺列的话,则使第二柱 22 顺列。或者从预先制备的溶液

供应的或者用使用系统的顺列缓冲剂制备能力（如果这样配备了的话）制备的缓冲剂供应的洗脱可为等度的，具有固定的 pH 值或导电率。备选地，流的梯度洗脱或导电率可用泵 29、33 和控制回路 39、38、40 施加。梯度洗脱允许在泵之间的混合的目标设定点以线性速率改变，并且控制算法系统控制使混合遵从这个变化的线性设定点。

[0081] 可选地，在从第一柱 21 中洗脱出时，可顺列地调节导电率和 / 或 pH 值，以使其满足第二柱 22 的应用要求，通过包括泵 41、管道 42、T 形接头 43、混合器 44 和控制回路 45、46 的第一顺列调节组件来调节导电率，并且通过包括泵 47、管道 48、T 形接头 49、混合器 50 和控制回路 51、52 的第二顺列调节组件来调节 pH 值。

[0082] 可通过包括泵 53、管道 54、T 形接头 55、混合器 56 和控制回路 57、58 的第三顺列调节组件来将离开第二柱 22 的蛋白质浓度顺列地调节成指定值。

[0083] 使用泵 27 和控制回路 59、60 来使浓度经调节的产物持续以恒定的压力通过过滤器 23。

[0084] 要注意，如果满足工艺要求需要的话，还可在运行之前（或在增加了额外的阀的运行期间）将系统容易地构造成改变中间导电率调节环 41、42、43、44、45、46（第一顺列调节组件）和 pH 值调节环 47、48、49、50、51、52（第二顺列调节组件）的位置，以允许在第二柱 22 之后进行调节。

[0085] 3. 处于结合-洗脱模式的第一柱、处于结合-洗脱模式的第二柱，以及最终病毒过滤

[0086] 或者用预先制备的溶液或者使用系统的顺列缓冲剂制备能力（如果这样配备了的话）实时制备的缓冲剂来平衡第一柱 21 和第二柱 22。如果平衡溶液对于两个柱是相同的，则这可彼此顺列地执行；否则，将在绕过另一个柱的情况下按顺序执行平衡。过滤器 23 在此时不成顺列。

[0087] 或者直接地或者通过泵 33 和控制回路 38、39、40 对导电率或 pH 值的调节来将样本装载到柱 21 上。在这个操作期间，第二柱 22 被绕过。在样本结合且未结合样本的冲洗完成之后，蛋白质就被洗脱。

[0088] 或者从预先制备的溶液供应的或者用使用系统的顺列缓冲剂制备能力（如果这样配备了的话）制备的缓冲剂供应的洗脱可为等度的，具有固定的 pH 值或导电率。备选地，流的梯度洗脱或导电率可由泵 29、33 和控制回路 39、38、40 施加。梯度洗脱允许在泵之间的混合的目标设定点以线性速率改变，并且系统控制的控制算法使该混合遵从这个变化的线性设定点。

[0089] 在从第一柱 21 中洗脱出的期间，第二柱 22 成顺列，并且来自第一柱 21 的洗脱液结合到第二柱 22 上。可选地，在从第一柱 21 中洗脱出时，可顺列地调节导电率和 / 或 pH 值，以满足关于结合到第二柱 22 上的应用要求，通过包括泵 41、管道 42、T 形接头 43、混合器 44 和控制回路 45、46 的第一顺列调节组件来调节导电率，并且通过包括泵 47、管道 48、T 形接头 49、混合器 50、和控制回路 51、52 的第二顺列调节组件来调节 pH 值。

[0090] 在来自第一柱 21 的所有蛋白质都结合到第二柱 22 上之后，第一柱 21 被绕过，并且冲洗掉第二柱 22 的未结合样本。当第二柱 22 的冲洗完成之后，使过滤器 23 顺列，开始对第二柱 22 进行洗脱。

[0091] 或者从预先制备的溶液中供应的或者用使用系统的顺列缓冲剂制备能力（如果

这样配备了的话)制备的缓冲剂供应的洗脱可为等度的,具有固定的 pH 值或导电率。备选地,流的梯度洗脱或导电率可由泵 29、33 和控制回路 39、38、40 施加。梯度洗脱允许在泵之间的混合的目标设定点以线性速率改变,并且系统控制的控制算法使该混合遵从这个变化的线性设定点。

[0092] 可使用包括泵 53、管道 54、T 形接头 55、混合器 56 和控制回路 57、58 的第三顺列调节组件来将离开第二柱 22 的蛋白质浓度顺列地调节成指定值。泵 27 通过控制回路 59、60 以恒定的压力将洗脱产物持续地泵送通过过滤器 23。

[0093] 要注意,如果满足工艺要求需要的话,还可在运行之前(或在增加了额外的阀的运行期间)将系统容易地构造成改变中间导电率调节环 41、42、43、44、45、46(第一顺列调节组件)和 pH 值调节环 47、48、49、50、51、52(第二顺列调节组件)的位置,以允许在第二柱 22 之后进行调节。

[0094] 在下面,将描述用展示了本发明的功能性的测试平台来执行的实验。

[0095] 实例

[0096] 将在下面以实例的方式公开本发明,实例仅意图为说明性目的,并且不应理解为限制在所附权利要求中限定的本发明。在下面或本申请的其它地方提到的所有参考均以引用的方式包括在本文中。

[0097] 通过在两个测试平台(各自包括单个柱而无病毒过滤器)上用两种模型单克隆抗体(Mab)产物执行的测试来展示了本发明的 STP 系统(包括串联的两个柱和病毒过滤器)的上面描述的实施例的功能性。

[0098] 两个测试平台以有许多额外的特征设计到系统中的标准 10mm 生物工艺聚丙烯系统(瑞典乌普萨拉的 GE Healthcare Bio-Sciences AB)为基础。

[0099] 测试平台 I

[0100] 图 3 显示了第一测试平台的色谱系统构造,其用于第一模型单克隆抗体 DPC(直接产物捕捉)产物,在下面称为“Mab 1”。

[0101] 色谱柱 71 的入口通过包含气泡收集器 73 的管道 72 而连接到第一膜片色谱泵 74(德国莱昂伯格的 Lewa GmbH)上,并且通过连接到管道 72 上的管道 75 而连接到第二膜片色谱泵 76(Lewa GmbH)上。泵 74 具有(这里)带有四个入口阀 78 的入口管道 77,入口阀 78 中的一个用作取样阀。同样,泵 76 具有(这里)带有四个入口和取样阀 80 的入口管道 79。柱 71 的出口通过管道 81 而连接到(这里)四个出口阀 82 上,它们中的一个用于废料。

[0102] 第一蠕动滴定缓冲泵 83(美国马萨诸塞州威尔明顿的 Watson-Marlow 公司的 Watson-Marlow 604IU IP55)通过管道 84 在 T 形接头 85 处连接到柱出口管道 81 上。在接头 85 的下游提供管内静态混合器 86。第二蠕动滴定缓冲泵 87(Watson-Marlow 520DU IP31)通过管道 88 在 T 形接头 89 处连接到出口管道 81 上,并且在接头 89 的下游提供静态混合器 90。

[0103] 第一 PID 闭环控制回路控制色谱泵 74 和 76 的运行,并且包括用于感测入口管道 72 的导电率且连接到控制器 92(GE Healthcare Bio-Sciences AB 的 UNICORN™)上的顺列导电率传感器 91(GE Healthcare Bio-Sciences AB 的 CMC-DN8、CM-P),控制器 92 又连接到泵 74 和 76 上。联接到柱出口管道 81 上的顺列流量传感器 93(瑞士雷纳赫的

Endress+Hauser 的 PROMASS™ M、60MT-AUG00A00B2B) 也以闭环的方式连接到控制器 92 上。

[0104] 第二 PID 闭环控制回路控制滴定缓冲泵 83 的运行, 并且包括在混合器 86 和 T 形接头 89 之间联接到柱出口管道 81 上的顺列 UV 传感器 94 (用以感测产物浓度) (GE Healthcare Bio-Sciences AB 的光学单元 UV1、UV-P)。UV 传感器 94 连接到控制器 95 (GE Healthcare Bio-Sciences AB 的 UNICORN™) 上, 控制器 95 又连接到泵 83 上。

[0105] 第三 PID 闭环控制回路控制滴定缓冲泵 87 的运行, 并且包括在混合器 90 的下游联接到柱出口管道 81 上的顺列 pH 值传感器 96 (Endress+Hauser 的 pH 值传感器、GE Healthcare Bio-Sciences AB 的 Transmitter pH-P)。pH 值传感器 96 连接到控制器 97 (GE Healthcare Bio-Sciences AB 的 UNICORN™) 上, 控制器 97 又连接到泵 87 上。

[0106] 示出的色谱测试平台进一步包括在柱 71 的上游的顺列压力传感器 98、分别在柱 71 的下游但在混合器 86 的上游的顺列导电率传感器 99、pH 值传感器 100 和 UV 传感器 101, 以及在 pH 值传感器 96 的下游的顺列导电率传感器 102。

[0107] 仅有缓冲剂的运行

[0108] 在对实际蛋白质执行任何运行之前, 执行一系列的仅有缓冲剂的运行, 以校验结合到系统中的控制环的运行, 以及分析在过渡状态和固定状态中关于控制导电率、pH 值和 UV (蛋白质浓度) 的能力。使用相应的控制回路来在设定值处控制工艺流。

[0109] Mab 1 产物实验

[0110] 然后用 Mab 1 单克隆抗体产物来进行实验, 目标是 (i) 在装载期间关于目标导电率展示样本的顺列稀释, (ii) 在洗脱期间展示对 pH 值的柱后调节, 以及 (iii) 在洗脱期间展示对蛋白质浓度 (UV) 的柱后调节。

[0111] 柱 71 是填充有 SP SEPHAROSE™ XL 阳离子色谱树脂 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) 的 25 厘米的色谱柱 (瑞典乌普萨拉的 GE Healthcare Bio-Sciences AB 的 BPG™)。对于所有步骤, 除了以 150 厘米 / 小时执行的洗脱, 流率为 200 厘米 / 小时。

[0112] 对阳离子交换色谱工艺使用以下缓冲剂:

[0113] 卫生处理: 1.0mM NaOH

[0114] 关于基线的平衡 / 冲洗: 30mM 磷酸钠、pH 值 6.5

[0115] 洗脱缓冲剂: 30mM 磷酸钠、50mM NaCl、pH 值 6.5

[0116] 剥离缓冲剂: 50mM 三氨基甲烷盐酸、

[0117] 1.0M NaCl、pH 值 8.0

[0118] 存储缓冲剂: 0.1mM NaOH

[0119] 用于样本装载的柱前导电率调节由包括导电率传感器 91 和控制器 92 的反馈控制环执行。

[0120] 在柱后, 将被蠕动泵 83 馈送到 T 形接头 85 中且然后通过混合器 86 (增加内径然后减小内径的导管的大小变化节段) 混合的洗脱缓冲剂用作稀释剂来调节 UV。联接到泵 83 上的包括传感器 94 和控制器 95 的 PID 环从在混合器 86 的下游的传感器 94 中读取 UV, 并且调节泵 83, 以达到设定点。

[0121] 在 UV 调节之后进行 pH 值调节, 并且将三氨基甲烷盐酸缓冲剂用作调节缓冲剂, 该三氨基甲烷盐酸缓冲剂由蠕动泵 87 通过在混合器 86 的下游的 T 形接头 89 而馈送到出口管道 81 中, 以及馈送到流中的管内静态混合器 90, 从而产生湍流。联接到泵 87 上的 PID 环

从在混合器 90 的下游的传感器 96 中读取 pH 值,并且调节泵 87,以达到设定点。

[0122] 测试平台 II

[0123] 图 4 显示了第二测试平台的色谱系统构造,其用于第二模型单克隆抗体 DPC(直接产物捕捉)产物,下面称为“Mab 2”。

[0124] 色谱柱 121 的入口通过包含气泡收集器 123 的管道 122 而连接到第一膜片色谱泵 124(德国莱昂伯格的 Lewa GmbH)上,并且通过连接到管道 122 上的管道 125 而连接到第二膜片色谱泵 126(Lewa GmbH)上。泵 124 具有(这里)带有四个入口阀 128 的入口管道 127,入口阀 128 中的一个用作取样阀。同样,泵 126 具有(这里)带有四个入口和取样阀 130 的入口管道 129。柱 121 的出口通过管道 131 而连接到(这里)四个出口阀 132 上,出口阀 132 中的一个用于废料。

[0125] 第一活塞蠕动滴定缓冲泵 133(瑞典乌普萨拉的 GE Healthcare Bio-Sciences AB 的泵 P900)通过管道 134 在气泡收集器 123 的下游的 T 形接头 135 处连接到柱入口管道 122 上。在接头 85 的下游提供管内静态混合器 136。第二蠕动滴定缓冲泵 137(Watson-Marlow 604U IP55)通过管道 138 在 T 形接头 139 处连接到柱出口管道 131 上,并且在接头 139 的下游提供管内静态混合器 140。

[0126] 第一 PID 闭环控制回路控制色谱泵 124 和 126 的运行,并且包括用于感测入口管道 122 的导电率且连接到控制器 142 上的顺列导电率传感器 141(GE Healthcare Bio-Sciences AB 的 CMC-DN8、CM-P),控制器 142 又连接到泵 124 和 126 上。联接到柱出口管道 131 上的顺列流量传感器 143 也以闭环的方式连接到控制器 142 上。

[0127] 第二 PID 闭环控制回路控制滴定缓冲泵 133 的运行,并且包括在混合器 136 和柱 121 之间联接到柱入口管道 122 上的顺列 UV 传感器 144(Endress+Hauser 的 pH 值传感器、GE Healthcare Bio-Sciences AB 的 Transmitter pH-P)。pH 值传感器 144 连接到控制器 145 上,控制器 145 又连接到泵 133 上。

[0128] 第三 PID 闭环控制回路控制滴定缓冲泵 137 的运行,并且包括在混合器 140 的下游联接到柱出口管道 131 上的顺列 UV 传感器 146(GE Healthcare Bio-Sciences AB 的光学单元 UV1、UV-P)。UV 传感器 146 连接到控制器 147 上,控制器 147 又连接到泵 137 上。

[0129] 示出的色谱测试平台进一步包括在气泡收集的上游的顺列压力传感器 148、分别在柱 121 和 T 形接头 139 之间的顺列导电率传感器 149、pH 值传感器 150 和 UV 传感器 151,以及在 UV 传感器 146 的下游的顺列导电率传感器 152。

[0130] Mab 2 产物实验

[0131] 然后用 Mab 2 单克隆抗体产物来进行实验,目标是 (i) 在样本装载期间展示对 pH 值的顺列柱前调节(向下),以及 (ii) 在洗脱期间展示对蛋白质浓度(UV)的柱后调节。

[0132] 柱 121 是填充有 SP SEPHAROSE™XL 阳离子色谱树脂(GE Healthcare Bio-Sciences AB)的 25 厘米色谱柱(瑞典乌普萨拉的 GE Healthcare Bio-Sciences AB 的 BPG™)。对于所有步骤,流率为 250 厘米/小时。

[0133] 对阳离子交换色谱工艺使用以下缓冲剂:

[0134] MMC 装载 pH 值调节: 2.0M 醋酸盐

[0135] 卫生处理: 1.0mM NaOH

[0136] 关于基线的平衡/冲洗:100mM 醋酸盐、pH 值 5.0

- [0137] 中间冲洗： 25mM 柠檬酸盐、200mM NaCl、
[0138] pH 值 5.0
[0139] 洗脱缓冲剂： 25mM 柠檬酸盐、225mM NaCl、
[0140] pH 值 5.6
[0141] 剥离缓冲剂： 25mM 柠檬酸盐、1.0M NaCl、
[0142] pH 值 5.4
[0143] 存储缓冲剂： 0.1M NaOH

[0144] 将被 P900 正位移泵（瑞典乌普萨拉的 GE Healthcare Bio-SciencesAB）馈送到 T 形接头 135 中的 2M 醋酸用作调节缓冲剂来进行柱前 pH 值调节，在流中有静态混合器 136，从而产生湍流。包括控制器 145 的 PID 环从在 pH 值静态混合器 136 的下游的传感器 144 中读取 pH 值，并且调节泵 133，以达到设定点。

[0145] 在柱后，将被蠕动泵馈送到导管 T 形节段接头 139 和用以提供混合机制的混合器 140 中的洗脱缓冲剂用作稀释剂来调节 UV。包括控制器 147 的 PID 环从在 T 形接头 139 的下游的传感器 146 中读取 UV，并且调节泵 137，以达到设定点。

[0146] 结果 / 结论

[0147] 缓冲剂运行显示了该系统能够响应于许多动态状况，只要泵在它们的线性操作范围内运行。

[0148] Mab 2 样本运行展示了系统可响应于具有不同的起始导电率的样本，并且成功地装载和结合到柱上。具有顺列稀释的样本装载展示了装载参数的自动调节，确保恰当的装载状况得到满足，而不管样本批次的起始导电率或 pH 值的差异如何。因此该技术能够调节状况来确保装载成功，而不需要人工操作来调节批次。基于装载期间的 UV 度量，没有损失产物。

[0149] 还展示了成功的柱后 pH 值调节以及柱后蛋白质浓度控制。pH 值调节显示了调节从柱洗脱出的 pH 值的能力，这可使其准备装载到第二柱或其它分离装置上。执行顺列调节允许系统对洗脱流的变化状况作出反应，从而确保为下一个柱恰当地制备抗体或蛋白质，或者在不稳定的状况下花费最少时间。这在槽批量调节模式中是不可能实现的。因而，STP 系统消除了对在所讨论的类型的抗体纯化系统中、在柱 1 和柱 2 之间的容器的需要。

[0150] 样本浓度调节对于确保浓度保持在可能导致在抗体纯化系统中在第二柱的下游的病毒过滤器过早阻塞的水平之下是有效的。再一次，顺列调节允许系统作出反应，节省运行后的稀释的时间和劳动力，从而使得能够在消毒过滤步骤中直通地应用流，以及通过去除人工交互来改进质量。因而，STP 系统消除了对用以在抗体纯化系统中、在柱 2 和病毒过滤器之间进行调节的容器的需要。

[0151] 本发明不限于上面描述的优选实施例。可使用各种备选方案、改良和等效方案。因此，上面的实施例不应理解为限制本发明的范围，本发明的范围由所附权利要求限定。

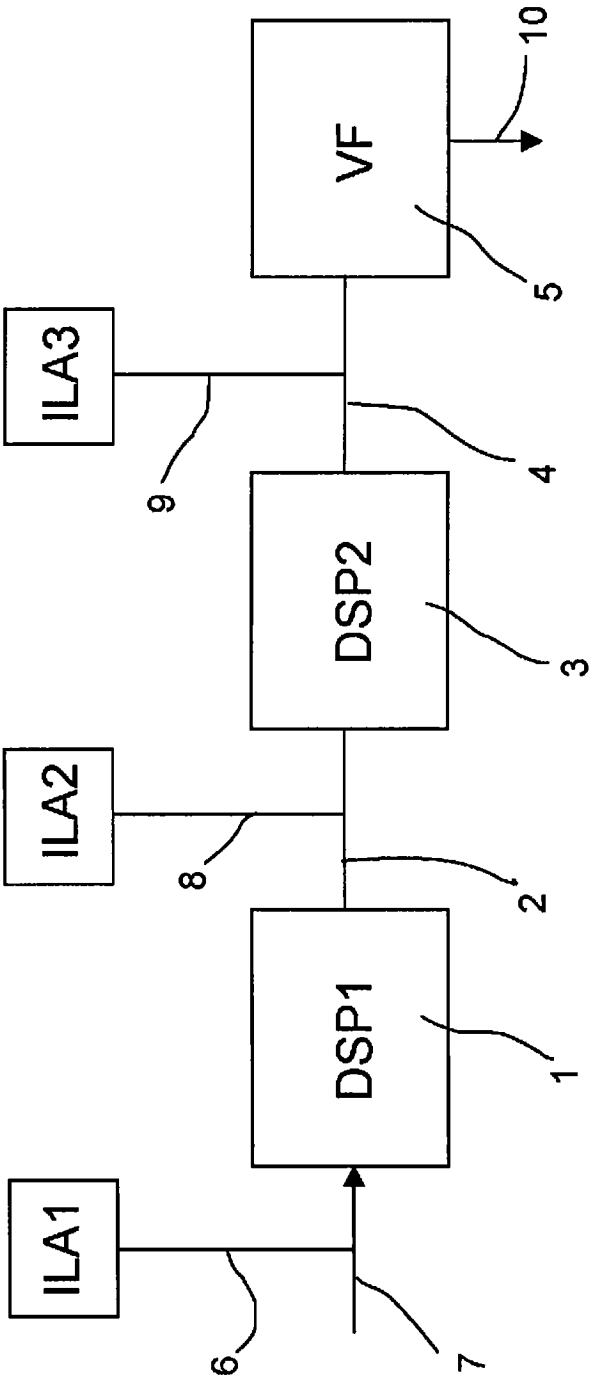


图 1

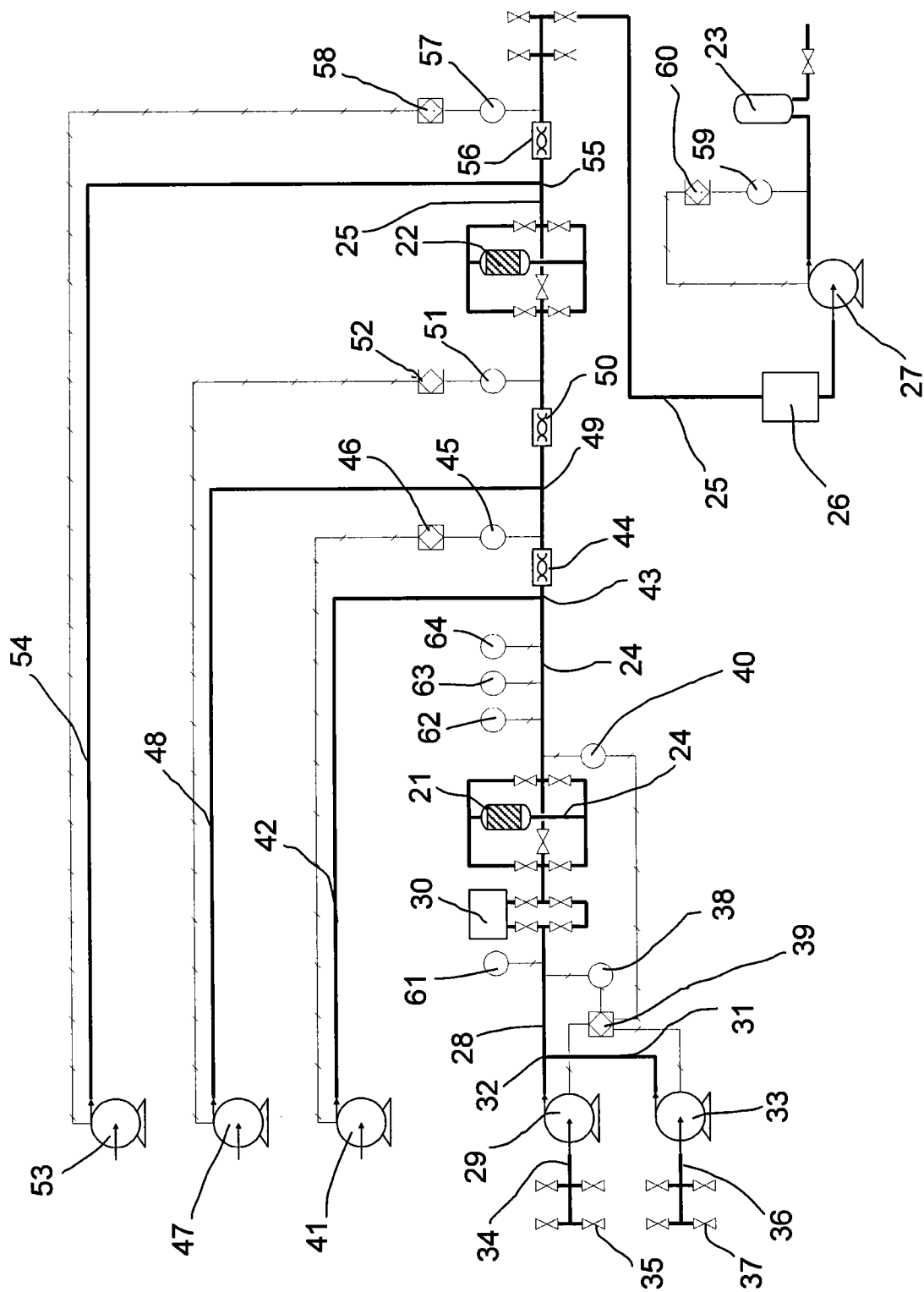


图 2

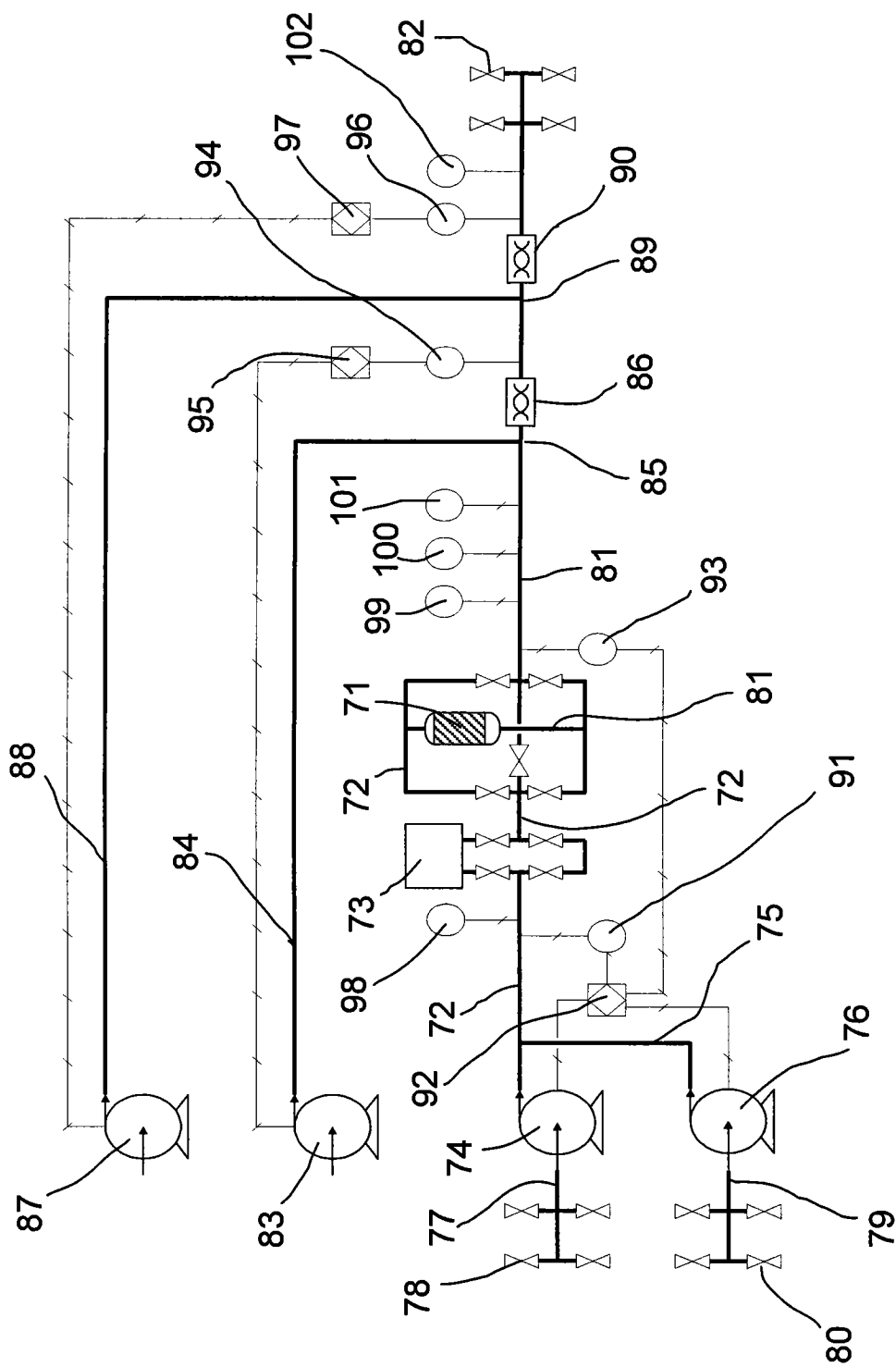


图 3

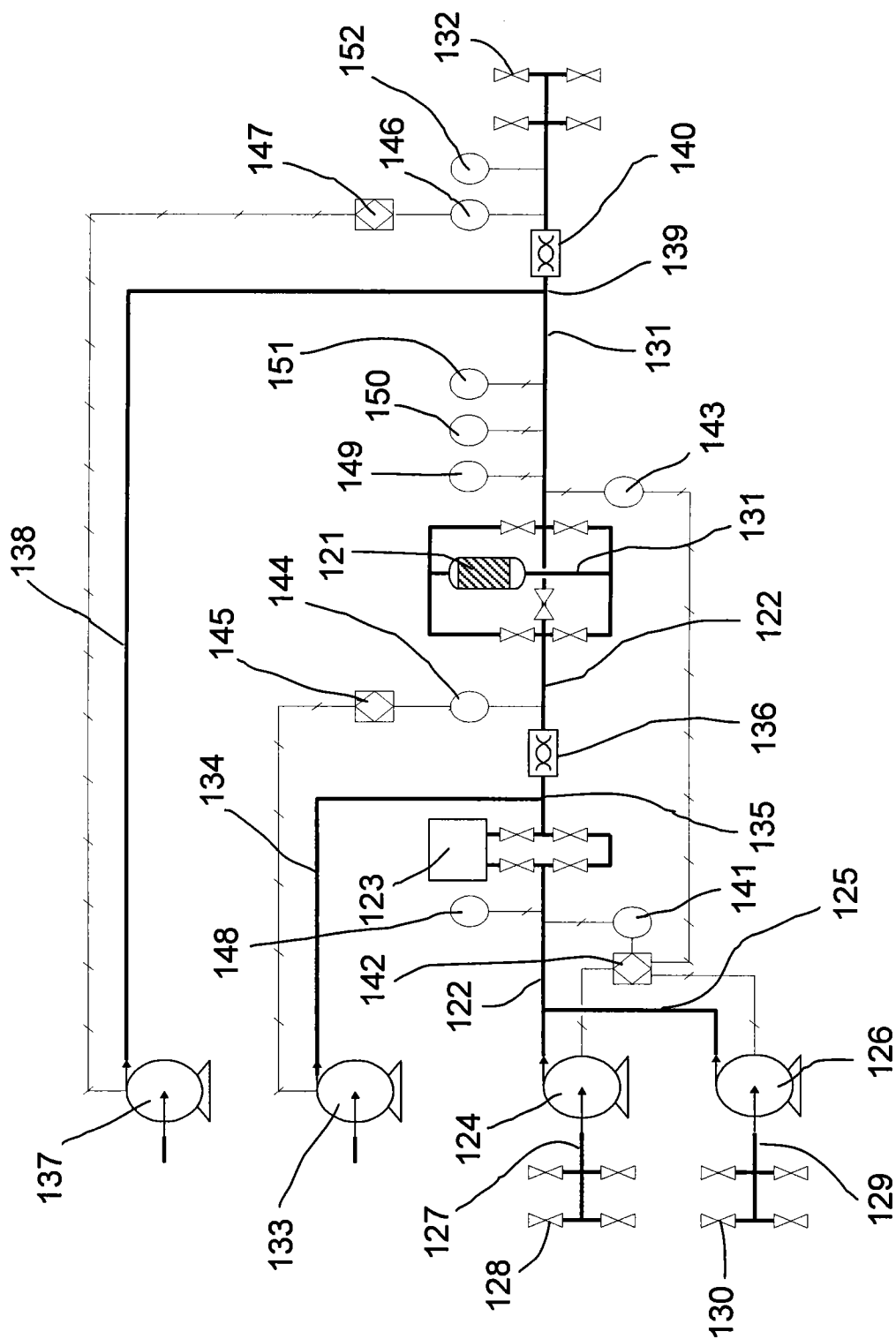


图 4