(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114555794 A
(43)申请公布日 2022.05.27

(21)申请号 202080072139.0
(22)申请日 2020.08.06
(30)优先权数据
1911685.4 2019.08.15 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.04.14
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2020/051882 2020.08.06
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/028658 EN 2021.02.18
(71)申请人 富士胶片戴奥辛思生物技术英国有限公司
地址 英国比灵赫姆
(72)发明人 T·纳吉 J·黑格 C·黑斯 A·托平 J·普伦
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 李进 李唐
(51)Int.Cl.
C12N 7/04(2006.01)
C07K 1/16(2006.01)
C07K 1/34(2006.01)
C07K 1/36(2006.01)
B01D 15/36(2006.01)
B01D 15/38(2006.01)
B01D 61/14(2006.01)
G01N 30/34(2006.01)

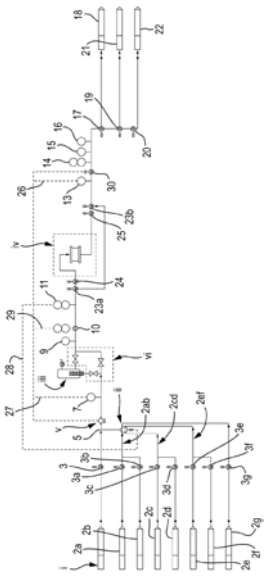
权利要求书3页 说明书14页 附图2页

(54)发明名称

用于纯化单克隆抗体的方法

(57)摘要

用于纯化包含单克隆抗体和杂质的液体原料的方法，所述方法包括使所述液体原料通过包含至少两个加工单元的仪器，每个这样的单元生产含有纯化的单克隆抗体的产物流和任选的包含至少一些所述杂质的废物流，其中每个单元包含规定的组件(i)至(v)，其包括多入口流量控制器，该多入口流量控制器包括两个或多个可变流量入口阀，用于通过以期望的比例组合至少两种液体来原位生产生物加工液体。一个单元进行色谱法，而另一个进行病毒灭活。除了它们包含的设备之外，单元可以基本上相同，导致在简单性、成本和操作容易性、较低的操作者错误风险、较容易维护和较低的备件库存方面的优点。



CN 114555794 A

1.用于纯化包含单克隆抗体和杂质的液体原料的方法,所述方法包括使所述液体原料通过包含至少两个加工单元的仪器,每个这样的单元生产含有纯化的单克隆抗体的产物流和任选的包含至少一些所述杂质的废物流,其中每个单元包含以下组件(i)至(v):

(i)用于所述液体原料的入口;

(ii)多个入口流量控制器,其包含两个或更多个可变流量入口阀,用于由将以期望的比率组合的至少两种其它液体来生产生物加工液体;

(iii)用于将所述液体原料与所述生物加工液体组合以生产设备进料和/或用于将所述至少两种其它液体组合以制备所述生物加工液体的装置;

(iv)用于对所述液体原料或对所述设备进料进行加工操作的设备,所述设备包含用于所述设备进料和/或所述液体原料的入口和用于产物流的出口;和

(v)用于赋予所述液体原料、所述至少两种液体、所述生物加工液体、所述设备进料、所述产物流和所述任选的废物流的流的装置;

其中:

(I)所述液体原料通过入口(i)进料并且在所述装置(iii)中与生物加工液体组合,并随后通过所述设备(iv)进料或在所述设备(iv)中与所述生物加工液体组合,在任一情况下,以得到离开所述单元的产物流和任选的废物流;

(II) 所述单元串联布置,使得用于所述第二单元和任何后续单元的所述液体原料包含来自前面的单元的所述产物流;

(III) 在至少两个加工单元的至少一个中的设备(iv)进行色谱法的加工操作;和

(IV) 在至少两个加工单元的至少一个中的设备(iv)进行病毒灭活的加工操作。

2.根据权利要求1所述的方法,其中病毒灭活的加工操作在色谱法的加工操作之后进行。

3.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述仪器包括包含组件(i)至(v)的另外的单元,用于进行mAb的另外的色谱纯化。

4.根据权利要求3所述的方法,其中在每个单元中进行的色谱纯化使用不同的条件和/或色谱柱,所述色谱柱填充有与所有其他单元中使用的那些的色谱柱不同的树脂。

5.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中每个色谱纯化独立地选自亲和色谱法、阳离子交换色谱法、阴离子交换色谱法、混合模式色谱法、疏水相互作用色谱法、反相色谱法、膨胀床色谱法、混合模式色谱法、膜色谱法和尺寸排阻色谱法。

6.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中每个单元在所述方法期间原位制备其混合的生物加工液体。

7.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述仪器进一步包含包含组件(i)至(v)的单元,用于从其液体原料中去除任何病毒。

8.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述仪器进一步包含包含组件(i)至(v)的单元,用于超滤其原料,以提供包含所述目标材料的浓缩物。

9.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述仪器进一步包含包含组件(i)至(v)的单元,用于渗滤其原料,以在所述目标材料稳定的pH下缓冲所述目标材料。

10.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述用于在每个单元中赋予流的装置包含单个泵,所述单个泵优选位于组件(ii)的下游和组件(iv)的上游。

11.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述仪器包含串联布置的以下单元,每个单元包含所述组件(i)至(v),并且其中每个单元的所述产物进料用作下一个单元的原料,或者如果不存在下一个单元,收集所述产物进料:

a.用于通过亲和色谱法进行mAb的色谱纯化的单元;

b.用于灭活可能存在于所述液体原料中的任何病毒的单元;和

c.用于通过离子交换色谱法进行mAb的色谱纯化的单元。

12.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述仪器包含串联布置的以下单元,每个单元包含所述组件(i)至(v),并且其中每个单元的所述产物进料用作下一个单元的原料,或者如果不存在下一个单元,收集所述产物进料:

a.用于通过亲和色谱法通过亲和色谱法进行mAb的色谱纯化的单元;

b.用于灭活可能存在于所述液体原料中的任何病毒的单元;

c.用于通过阳离子交换色谱法进行mAb的色谱纯化的单元;和

d.用于通过阴离子交换色谱法进行mAb的色谱纯化的单元。

13.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述仪器包含串联布置的以下单元,每个单元包含所述组件(i)至(v),并且其中每个单元的所述产物进料用作下一个单元的原料,或者如果不存在下一个单元,收集所述产物进料:

a.用于通过亲和色谱法进行mAb的色谱纯化的单元;

b.用于灭活可能存在于所述液体原料中的任何病毒的单元;

c.用于通过阳离子交换色谱法进行mAb的色谱纯化的单元;

d.用于通过阴离子交换色谱法进行mAb的色谱纯化的单元;和

e.用于去除任何灭活的病毒的单元。

14.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述仪器包含串联布置的以下单元,每个单元包含所述组件(i)至(v),并且其中每个单元的所述产物进料用作下一个单元的原料,或者如果不存在下一个单元,收集所述产物进料:

a.用于通过亲和色谱法进行mAb的色谱纯化的单元;

b.用于灭活可能存在于所述液体原料中的任何病毒的单元;

c.用于通过阳离子交换色谱法进行mAb的色谱纯化的单元;

d.用于通过阴离子交换色谱法进行mAb的色谱纯化的单元;和

e.用于浓缩和/或进行来自前面的单元的产物流的缓冲液交换的单元。

15.根据权利要求11-14中任一项所述的方法,其中所述单元以所列的顺序串联布置。

16.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述生物加工液体通过组合至少三个液体流来提供,所述至少三个液体流中的至少两个各自通过组合至少两个其它液体流来提供。

17.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述单元中的至少一个(优选至少一半单元,更优选所有单元)进一步包含用于从通过该单元的一种或多种液体中去除气泡的设备。

18.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述单元中的至少一个(优选至少一半单元,更优选所有单元)进一步包含位于组件(iv)的上游的压力传感器。

19.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述单元中的至少一个(优选至少一

半单元,更优选所有单元)进一步包含位于组件(iv)的下游的压力传感器。

20.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述单元中的至少一个(优选至少一半单元,更优选所有单元)进一步包含位于组件(iv)的下游的UV传感器。

21.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述单元中的至少一个(优选至少一半单元,更优选所有单元)进一步包含位于组件(iv)的下游的pH传感器。

22.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述单元中的至少一个(优选至少一半单元,更优选所有单元)进一步包含位于组件(iv)的下游的电导率传感器。

23.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述单元中的至少一个进一步包含至少一个可切换旁路组件(vi),其将所述液体原料和生物加工液体的流引导至(a)用于将所述液体原料与所述生物加工液体组合以生产设备进料的所述装置(iii),或者引导至(b)绕过所述装置(iii)并且替代地在不通过所述装置(iii)的情况下将所述液体原料和生物加工液体送至所述设备(iv)。

24.根据权利要求23中任一项所述的方法,其中所述可切换旁路组件(vi)存在于所有单元中。

25.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在至少一半单元(优选所有单元)中使用的流动路径具有基本上相同的构造。

26.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中除组件(iv)以外的每个单元的组件部件的至少75%与在所述仪器的其它单元的至少80%中使用的组件部件相同。

27.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中除组件(iv)外,每个单元的所有组件部件与在所述仪器的所有其它单元中使用的所有组件部件相同。

28.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中通过每个单元的所述流动路径与通过所有其它单元的流动路径基本上相同。

29.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在所述单元中的至少一个中使用的所述生物加工液体的组成在所述方法期间逐步或逐渐改变。

30.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中每个单元包含一个且仅包含一个泵。

31.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其进一步包括将所得纯化的单克隆抗体与一种或多种药学上可接受的载体混合以形成药物的步骤。

用于纯化单克隆抗体的方法

[0001] 本发明涉及纯化单克隆抗体的方法。

[0002] 单克隆抗体(“mAb”)近年来吸引了许多关注,特别是对于治疗应用。mAb通常通过培养重组宿主细胞来生产,所述重组宿主细胞已经被工程化以表达所需mAb。然后通过通常包括许多加工操作(有时称为“单元操作”)的方法从培养基中回收mAb。

[0003] 用于纯化mAb的仪器在本领域中是已知的,并且通常包含许多非常不同的串联布置的加工单元,其中每个单元进行单独的加工操作。加工单元通常包括至少两个泵以使液体移动通过该单元。通常,这些单元由不同的制造商提供,这些制造商专门用于进行特定的加工操作(例如,过滤、色谱法等)的设备。用于mAb的商业规模制造的仪器体积非常大,并且需要大量的占地面积和基础设施。另外,虽然可以对几个加工操作实现加工单元的一些通用性,用于某些单元操作(例如病毒灭活和/或超滤)的单元设计与例如色谱纯化的那些单元设计显著不同。这意味着需要更多的空间来容纳两组或更多组加工单元,或者用于各阶段的仪器的互操作性和控制非常复杂。此外,操作者需要对所采用的不同类型的加工单元中的每一个进行广泛训练,因为这些单元彼此如此不同。目前用于mAb制造的许多加工单元之间缺乏相似性意味着需要大量备件库存。再进一步地,许多单元之间缺乏相似性使得例行维护变得复杂,因为工程师需要学习如何维修结构非常不同的加工单元。如果在错误的阶段提供错误的、外部制备的生物加工液体,则需要用于不同的加工操作的不同的生物加工液体(例如缓冲液、洗脱剂等)的仪器也存在操作者错误的巨大风险,潜在地存在高价批次的mAb失败的风险。因此需要简化的且广泛适用的仪器,其具有较低的操作者错误风险。

[0004] 根据本发明的第一方面,提供了用于纯化包含单克隆抗体(mAb)和杂质的液体原料的方法,所述方法包括使所述液体原料通过包含至少两个加工单元的仪器,每个这样的单元生产含有纯化的单克隆抗体的产物流和任选的包含至少一些所述杂质的废物流,其中每个单元包含以下组件(i)至(v):

(i)用于所述液体原料的入口;

(ii)多个入口流量控制器,其包含两个或更多个可变流量入口阀,用于由将以期望的比率组合的至少两种其它液体来生产生物加工液体;

(iii)用于将所述液体原料与所述生物加工液体组合以生产设备进料和/或用于将所述至少两种其它液体组合以制备所述生物加工液体的装置;

(iv)用于对所述液体原料或对所述设备进料进行加工操作的设备,所述设备包含用于所述设备进料和/或所述液体原料的入口和用于产物流的出口;和

(v)用于赋予所述液体原料、所述至少两种液体、所述生物加工液体、所述设备进料、所述产物流和所述任选的废物流的流的装置;

其中:

(I)所述液体原料通过入口(i)进料并且在所述装置(iii)中与所述生物加工液体组合,并随后通过所述设备(iv)进料或在所述设备(iv)中与所述生物加工液体组合,在任一情况下,以得到离开所述单元的所述产物流和任选的废物流;

(II) 所述单元串联布置,使得用于所述第二单元和任何后续单元的所述液体原

料包含来自前面的单元的所述产物流；

(III) 在至少两个加工单元的至少一个中的设备(iv)进行色谱法的加工操作；和

(IV) 在至少两个加工单元的至少一个中的设备(iv)进行病毒灭活的加工操作。

[0005] 本发明提供了可以在制造规模上进行的方法，并且提供了优于现有方法的许多优点，特别是在简单性、成本和操作容易性、较低的操作者错误风险、较容易维护和较低的备件库存方面。

[0006] 在本说明书中，短语“加工单元”通常缩写为“单元”，并且两者可互换使用。为了简单起见，组件(iii)通常缩写为“混合器(iii)”。为了简单起见，组件(iv)通常称为“设备(iv)”。

附图说明

[0007] 在附图中：

图1说明本方法的实施方案的示意图。

[0008] 图2是可以用于进行加工操作的一个加工单元的示意图。

[0009] 图1说明如何通过根据本发明的方法可以纯化来自细胞培养收获物的原料。澄清的进料细胞培养收获物用作包含蛋白质A亲和色谱法设备的第一加工单元的原料。随后用于第二单元和每个后续单元的液体原料包含来自前面的单元的产物流。每个单元也可能生产废物流(未显示)，尽管情况不总是这样。例如，病毒灭活单元通常仅生产与原料不同的产物流，仅在于原料中存在的任何病毒已被灭活。此外，当杂质保留在该单元的过滤器上时，简单的过滤单元也可以仅生产产物流(即，没有废物流)。在病毒灭活单元2中灭活的病毒可以通过后面的单元(例如病毒过滤/去除单元)来去除。在根据本发明的优选的方法中的单元的顺序如步骤1.至6.所示。最后收集含有通过单元1.至6.纯化的含有mAb的产物流。

[0010] 图2在以下实施例部分中更详细地描述。

[0011] 每个单元通常进行一个加工操作。

[0012] 加工单元的数量没有特别限制，并且在很大程度上取决于将液体原料转化成适于期望目的形式(例如配制成药物)所需的纯化步骤。在一些实施方案中，仪器包含两个单元(例如，用于进行两个加工操作)。在其它实施方案中，仪器包含多于两个单元，例如(至少)三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或更多个单元，优选每个单元具有上述特征(i)至(v)。尽管所述方法可以进一步包括两个或更多个并联操作的单元，优选方法中使用的所有单元串联排列。在许多高度优选的实施方案中，在每个单元中进行的方法操作不同于在所有其它单元中使用的方法操作。因此，尽管仪器可以含有例如多于一个用于进行色谱法的单元，但是每个这样的色谱法单元或其使用的方式优选不同于用于进行色谱法的一个或多个其它单元。

[0013] 在某些实施方案中，每个单元包含与其它单元的至少一半(更优选全部)中的流动路径基本上相同的流动路径。

[0014] 优选每个单元在方法期间(原位)制备其混合的生物加工液体。这样，避免了操作者使用用于不同的方法操作的错误的外部制备的生物加工液体的风险。

[0015] 优选仪器进一步包含用于进行一个或多个以下方法操作的一个或多个单元，在每种情况下，所述单元含组件(i)至(v)：

-从其液体原料中去除任何病毒；

-超滤其原料以提供包含期望的mAb的浓缩物；

-渗滤其原料以在期望的mAb稳定的pH下缓冲目标材料；和

-切向流过滤，包括再循环和单程切向流过滤。

[0016] 在优选的实施方案中，仪器包含加工单元，所述加工单元包含用于优选地以所述顺序进行以下加工操作的设备：蛋白质A色谱法、病毒灭活、阳离子交换色谱法、阴离子交换色谱法、病毒过滤(去除灭活的病毒)和产物进料的浓缩(例如通过在单一单元或在分开的单元中进行的超滤和/或渗滤)。

[0017] 每个单元的尺寸没有特别限制。然而，对于工业规模的纯化，每个单元优选1-2.2米高(更优选1.5-2米高)，0.5-1.2米宽(更优选0.75-1米宽)且0.5-1米深(更优选0.6-0.9米深)。

[0018] 优选每个单元都配有轮子和任选的制动器，以防止单元不希望的移动。这使得单元能够容易地定位、移动和更换。

[0019] 优选地，仪器优选以所列的顺序包含串联布置的以下单元，每个单元包含组件(i)至(v)，并且其中每个单元的产物进料用作下一个单元的原料，或者如果不存在下一个单元，收集产物进料：

a.用于优选通过亲和色谱法进行mAb的第一色谱纯化的单元；

b.用于灭活可能存在于液体原料中的任何病毒的单元；

c.用于优选通过离子交换色谱法进行mAb的第二色谱纯化的单元；

d.用于优选通过离子交换色谱法进行mAb的第三色谱纯化的单元；

e.用于去除任何灭活的病毒的单元；和

f.用于浓缩和/或进行来自前面的单元的产物流的缓冲液交换的单元。

[0020] 在一些实施方案中，第二色谱纯化包括阴离子交换，并且第三色谱纯化包括阳离子交换。在其它实施方案中，第二色谱纯化包括阳离子交换，并且第三色谱纯化包括阴离子交换。

[0021] 因此，在一个优选的实施方案中，仪器包含优选以所列的顺序串联布置的以下单元，每个单元包含组件(i)至(v)，并且其中每个单元的产物进料用作下一个单元的原料，或者如果不存在下一个单元，收集产物进料：

a. 用于通过亲和色谱法进行mAb的色谱纯化的单元；

b. 用于灭活可能存在于所述液体原料中的任何病毒的单元；和

c. 用于通过离子交换色谱法进行mAb的色谱纯化的单元。

[0022] 在另一个优选的实施方案中，仪器包含优选以所列的顺序串联布置的以下单元，每个单元包含组件(i)至(v)，并且其中每个单元的产物进料用作下一个单元的原料，或者如果不存在下一个单元，收集产物进料：

a. 用于通过亲和色谱法进行mAb的色谱纯化的单元；

b. 用于灭活可能存在于所述液体原料中的任何病毒的单元；

c. 用于通过阳离子交换色谱法进行mAb的色谱纯化的单元；和

d. 用于通过阴离子交换色谱法进行mAb的色谱纯化的单元。

[0023] 在另一个优选的实施方案中，仪器包含优选以所列的顺序串联布置的以下单元，

每个单元包含组件(i)至(v),并且其中每个单元的产物进料用作下一个单元的原料,或者如果不存在下一个单元,收集产物进料:

a. 用于通过亲和色谱法进行mAb的色谱纯化的单元;

b. 用于灭活可能存在于所述液体原料中的任何病毒的单元;

c. 用于通过阳离子交换色谱法进行mAb的色谱纯化的单元;

d. 用于通过阴离子交换色谱法进行mAb的色谱纯化的单元;和

e. 用于去除任何灭活的病毒的单元。

[0024] 在另一个优选的实施方案中,仪器包含优选以所列的顺序串联布置的以下单元,每个单元包含组件(i)至(v),并且其中每个单元的产物进料用作下一个单元的原料,或者如果不存在下一个单元,收集产物进料:

a.用于通过亲和色谱法进行mAb的色谱纯化的单元;

b.用于灭活可能存在于液体原料中的任何病毒的单元;

c.用于通过阳离子交换色谱法进行mAb的色谱纯化的单元;

d.用于通过阴离子交换色谱法进行mAb的色谱纯化的单元;

e.用于去除任何灭活的病毒的单元;和

f.用于浓缩和/或进行来自前面的单元的产物流的缓冲液交换的单元。

[0025] 优选地,单元以本文所列的顺序串联布置,例如在包含单元a.-f.的仪器中,优选单元以a.,b.,c.,d.,e. 然后f. 的顺序串联布置。

[0026] 优选至少一个单元(优选至少一半单元,更优选所有单元)进一步包含位于组件(iv)的上游的压力传感器。

[0027] 优选至少一个单元(优选至少一半单元,更优选所有单元)进一步包含位于组件(iv)的下游的压力传感器。

[0028] 优选至少一个单元(优选至少一半单元,更优选所有单元)进一步包含位于组件(iv)的下游的UV传感器。

[0029] 优选至少一个单元(优选至少一半单元,更优选所有单元)进一步包含位于组件(iv)的下游的pH传感器。

[0030] 优选至少一个单元(优选至少一半单元,更优选所有单元)进一步包含位于组件(iv)的下游的电导率传感器。

[0031] 在优选的实施方案中,除组件(iv)以外的每个单元的组件部件的至少75%与在仪器的其它单元的至少80%中使用的组件部件相同。优选除组件(iv)以外的每个单元的组件部件的至少85%与在仪器的其它单元的至少80%中使用的组件部件相同。尤其是优选除组件(iv)以外的每个单元的组件部件的至少95%与在仪器的其它单元的至少80%,更优选至少90%中使用的组件部件相同。在特别优选的实施方案中,除了组件(iv)之外的每个单元的所有组件部件与在仪器的所有其它单元中使用的所有组件部件相同。为了避免疑惑,流过仪器的液体不是仪器的组件部件。这些实施方案是有利的,因为每个单元中的组件部件之间的大通用性程度意味着需要较少的备件库存。再进一步,由于各单元如此相似,简化了仪器的日常维护,并且由于每个单元与仪器的其它单元如此相似,仪器更容易操作。与使用来自多个制造商的非常不同的加工单元的现有技术相反,工程师避免了学习如何服务许多非常不同的加工单元的需要。每个单元中的组件(iv)通常不同于其它单元中的组件(iv) (使得

每个单元可以进行离散的加工操作),因此用词"除组件(iv)以外的"。

[0032] 在优选的实施方案中,除了设备(iv)之外,仪器的所有单元基本上相同。在该实施方案中,设备(iv)在两个或更多个单元中可以是相同的,但是更典型地,设备(iv)在一个单元与下一个单元不同,如在图1中说明的,使得每个单元可以进行离散的加工操作。

[0033] 在优选的实施方案中,在至少一半单元(优选所有单元)中使用的流动路径具有基本上相同的构造。

[0034] 流动路径优选由塑料材料构成。

[0035] 优选通过每个单元的流动路径与通过所有其它单元的流动路径基本上相同。

[0036] 在某些实施方案中,一个或多个单元(优选所有单元)包含由例如不锈钢的材料构造的多用途流动路径,该材料允许在需要更换之前进行大量的再利用。

[0037] 在某些实施方案中,一个或多个单元(优选所有单元)包含单次使用的流动路径,优选由通常选择为能够通过伽马辐射消毒的材料(例如塑料材料)构成,该材料通常设计为具有有限的寿命,例如用作一次性消耗品。

[0038] 在一个实施方案中,将来自除最后单元之外的每个单元的产物流直接进料至下一个单元。在许多实施方案中,通常方便的是将一个或多个单元的产物流进料至储存容器(例如"破袋")中,并随后用作下一个单元(如果有的话)的原料。这样,可以在产物流进入下一个单元之前测试产物流,暂停该过程等等。

[0039] 用于第一单元的原料也可以从储存容器提供,或者如果需要,它可以直接从细胞培养仪器(例如生物反应器)提供,优选在澄清后。合适的储存容器的实例包括罐和袋。

[0040] 用于液体原料的入口(i)通常包含管,优选配有阀(3)和止回阀以避免液体原料被从多个入口流量控制器(ii)流动的一种或多种液体污染。

[0041] 可通过本方法纯化的mAb不受特别限制,并且包括完整的单克隆抗体和具有生物活性的单克隆抗体片段,包括前述任何一种的多价和/或多特异性形式。

[0042] 天然存在的mAb通常包含四条多肽链,例如通过二硫键相互连接的两条相同的重(H)链和两条相同的轻(L)链。每条重链通常包含可变区(V_H)和恒定区(C_H),C_H区在其天然形式中包含三个结构域C_H1、C_H2和C_H3。每条轻链通常包含可变区(V_L)和包含一个结构域的恒定区C_L。

[0043] V_H和V_L区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其中散布有更保守的区域,称为框架区(FR)。每个V_H和V_L通常由三个CDR和四个FR组成,从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。

[0044] 单克隆抗体片段通常包含完整mAb的一部分,所述部分具有期望的生物活性。mAb片段通常包括至少一个抗原结合位点。mAb片段的实例包括:

(i)具有V_L、C_L、V_H和C_H1结构域的Fab片段;

(ii) Fab衍生物,例如在C_H1结构域的C-末端处具有一个或多个半胱氨酸残基的Fab'片段,其可以通过两个Fab衍生物之间的二硫键桥接形成二价片段;

(iii)具有V_H和C_H1结构域的Fd片段;

(iv) Fd衍生物,例如在C_H1结构域的C-末端处具有一个或多个半胱氨酸残基的Fd衍生物;

(v)具有抗体的单个臂的V_L和V_H结构域的Fv片段;

(vi)单链抗体分子,例如其中V_L和V_H结构域共价连接的单链Fv (scFv)抗体;

(vii)不含恒定区结构域的V_H或V_L结构域多肽,所述恒定区结构域与含有或不含恒定区结构域的另一个可变结构域(V_H或V_L结构域多肽)连接(例如,V_H-V_H、V_H-V_L或V_L-V_L);

(viii)结构域抗体片段,例如由V_H结构域或V_L结构域组成的片段,和V_H或V_L结构域的抗原结合片段,例如分离的CDR区;

(ix)所谓的"双抗体",其在同一条多肽链中包含两个抗原结合位点,例如与轻链可变结构域(V_L)连接的重链可变结构域(V_H);和

(x)所谓的线性抗体,其包含一对串联Fd区段,其与互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区。

[0045] 可以通过所述方法去除的杂质通常包括来自用于制备期望的mAb的方法的副产物、用于制备mAB的培养基的组分(例如营养物)、细胞、细胞、宿主细胞蛋白质、DNA、RNA、其它蛋白质、内毒素和病毒,它们存在于哺乳动物细胞中或从哺乳动物细胞中分泌。

[0046] 多个入口流量控制器(ii)优选包含可变流量(优选间歇流量)入口阀,其调节通过流量控制器的液体的流量。多个入口流量控制器包含至少2个入口阀,并且在许多情况下包含至多8个(例如,3个、4个、5个、6个或7个)入口阀(iia),但是如果需要,可以包括更多的入口阀。每个入口阀可以具有相同的尺寸,或者一个或多个入口阀可以具有与一些或所有其它入口阀不同的尺寸。在某些优选的实施方案中,从流量控制器(ii)的每个入口阀到出口测量的体积对于每个入口是相同的,并且高度优选从流量控制器(ii)的每个入口阀到出口测量的体积和路径长度两者对于每个入口是相同的。

[0047] 本发明中使用的多个入口流量控制器(ii)还包含至少一个出口,并且尽管可以存在两个或更多个出口,优选使用单个出口。

[0048] 多个入口流量控制器(ii)中的阀可以在其中液体保持能够流动的第一相对低的流速和至少第二较高的流速之间调节流量。在优选的实施方案中,多个入口流量控制器(ii)中的阀是间歇流量阀,其在第一位置阻止流动,但在至少第二位置允许流动。最优选地,所有的阀都是间歇流动阀。阀可以包含致动器,例如气动致动器,或更优选地,螺线管致动器。

[0049] 优选地,最优选通过可编程控制单元(在图中未显示)来控制多个入口流量控制器(ii)中的阀,以调节阀的打开和关闭,以实现流过多个入口流量控制器(ii)的输入液体的所需的相对量。这优选通过以预定的时间段或循环速率循环通过流量控制器中的入口阀并根据所需的循环时间比例来调节每个阀的打开或关闭以产生生物加工液体的期望组成来实现。循环速率可以是恒定的或变化的。最优选地,采用间歇流量入口阀,并且控制间歇流量入口阀,使得在操作中,在任何给定的时间仅一个阀打开。在许多实施方案中,多个入口流量控制器(ii)的循环速率保持恒定,并且用于制备生物加工液体的输入液体的期望的相对量保持一致。

[0050] 在许多实施方案中,所述方法包括通过多个入口流量控制器(ii)的多个流动循环。所采用的循环次数将取决于许多因素,例如方法的持续时间、被加工的液体原料的体积以及流速和仪器的最大操作压力。在某些实施方案中,可以使用至少10个循环,例如至少50个、100个、500个、750个、1000个、1500个、2000个、3000个、5000个、7500个、10000个或更多个循环。

[0051] 将认识到,可以采用一定范围的循环频率。在许多情况下,频率小于100Hz,通常小于50Hz,通常小于10Hz,并且优选小于5 Hz。在某些优选的实施方案中,频率为2Hz或更低,最优选1Hz或更低,例如0.05-0.5Hz。

[0052] 在优选的实施方案中,生物加工液体通过组合至少三个液体流(2ab)、(2cd)、(2ef)来提供,至少三个液体流中的至少两个(优选所有三个)各自通过组合至少两个另外的液体流(例如,使用阀(3a)和(3b)或(3c)和(3d))来提供。该混合优选在混合器(iii)中进行。至少三个液体流(2ab)、(2cd)、(2ef)可以通过分别组合液体流(2a)和(2b)、(2c)和(2d)以及(2e)和(2f)来制备。

[0053] 单元中使用的生物加工液体的组成在整个过程中可以保持相同,或者组成在过程期间可以改变。例如,生物加工液体的组成在过程期间可以逐渐或逐步改变,特别是当单元包含色谱柱并且生物加工液体充当洗脱剂时。

[0054] 可以用于制备生物加工液体(例如,作为如上提及的另外的液体流)的液体(例如,至少两种其它液体)包括本领域已知的用于进行适当的加工操作的那些。这样的液体的实例包括酸性、中性和碱性溶液,例如pH在2.5-14范围的那些。实例包括含有以下一种或多种的水性溶液:氢氧化钠、氢氧化钾或氢氧化铵、磷酸、硫酸、盐酸或乙酸;盐,例如盐浓度最高为约3M的水性溶液,包括钠、钙、钾和铵盐,例如磷酸盐、氯化物、乙酸盐、柠檬酸盐和硫酸盐;缓冲液,其实例是本领域公知的;还原剂(例如DTT (DL-二硫苏糖醇)和TCEP ((三(2-羧乙基)膦));氨基酸(例如组氨酸、精氨酸和甘氨酸);洗涤剂(例如,Tween™ 20和Triton™-X100);水混溶性有机溶剂,例如多元醇,例如甘油和聚乙二醇;和包含两种或更多种前述物质的混合物。

[0055] 虽然一些混合可能由来自入口(i)和流量控制器(ii)出口的流的在线组合,和/或在用于赋予流的装置(v)中引起,该模块进一步包含混合器(iii)。混合器(iii)提供用于将液体原料与用于形成生物加工液体的液体(2ab)、(2cd)、(2ef)和/或来自入口(2g)的液体组合的装置,如果需要,以生产设备进料。此外,混合器(iii)也可以用于组合至少两种其它液体(2ab)、(2cd)、(2ef)和/或(2g)以制备一种或多种生物加工液体(例如用于色谱法的洗脱剂),随后将其进料至设备(iv)。混合器(iii)可以是例如在线混合器,或更优选地,混合室。优选的混合器(iii)包含静态混合器,最优选延时分流静态混合器。在许多实施方案中,装置(iii)是位于用于赋予流的装置(v) (例如泵)的下游和用于实现加工操作的设备(iv)的上游的在线混合器。

[0056] 在许多实施方案中,混合器(iii)进一步包含用于捕集气泡的装置,例如气泡捕集器。

[0057] 在一个实施方案中,装置(iii)用于在存在或不存在液体原料的情况下,将从多个入口流量控制器(ii)接收的至少两种液体组合。在没有液体原料的情况下组合从多个入口流量控制器(ii)接收的至少两种液体可用于制备生物加工液体,在液体原料已经进入组件(iv)之前或之后,生物加工液体通过设备(iv)。例如,当设备(iv)包含色谱柱时,装置(iii)可以用于提供生物加工液体,用于在液体原料已经负载到色谱柱上之前调节柱,用于制备生物加工液体以洗涤色谱柱上的mAb,用于制备生物加工液体以从色谱柱洗脱mAb,以及用于制备生物加工液体以在mAb已成功地以纯化形式从柱洗脱之后去除保留在柱上的杂质。优选至少一个单元(优选至少一半单元,更优选所有单元)进一步包含用于从通过该单元的

一种或多种液体中去除气泡的设备。

[0058] 用于设备进料的入口还可以用于接收例如来自组件(ii)或(iii)的一种或多种生物加工液体。

[0059] 除了在(III)和(IV)中规定的用于进行色谱法和病毒灭活的方法操作的设备之外,仪器任选地进一步包含用于进行一个或多个以下加工操作的一个或多个单元:色谱法(其可以与在设备(III)中进行的色谱法操作相同或不同)、病毒灭活(其可以与在设备(IV)中进行的病毒灭活相同或不同)、过滤(例如,超滤、微滤、死端过滤和/或渗滤)、病毒去除、重折叠、絮凝和在线调节。

[0060] 可以使用设备(iv)进行的色谱法生物加工操作包括亲和色谱法(例如蛋白质A亲和色谱法)、离子交换(阴离子和阳离子交换中的任一种或两者)色谱法、疏水相互作用色谱法(HIC)、反相色谱法、膨胀床色谱法、混合模式色谱法、膜色谱法和尺寸排阻色谱法(SEC)。在许多实施方案中,至少一个单元进行蛋白质A亲和色谱法的加工操作。用于进行色谱法操作的设备包含适当的色谱法仪器,例如膜、纤维整料或树脂。进行色谱法的单元的数目和顺序将根据mAb的性质来选择。

[0061] 优选地,仪器包含至少两个(更优选三个)单元,所述单元包含用于进行mAb的色谱纯化的组件(i)至(v)。在这种情况下,在每个单元中进行的色谱纯化优选使用与在所有其它单元中使用的色谱柱不同的条件和/或填充有不同的材料(例如,不同的树脂、膜或整料)的色谱柱。在特别优选的实施方案中,至少一个单元进行亲和色谱法,至少一个单元进行阳离子交换色谱法,至少一个单元进行阴离子交换色谱法。

[0062] 用于在本发明的方法中进行病毒灭活方法的一个或多个设备(iv)通常包含储存容器,其中包含mAb的液体可以在灭活存在的任何病毒的条件下储存。在某些实施方案中,病毒灭活设备(iv)的出口和入口可以流体连接以产生再循环回路。在一个这样的实施方案中,仪器设置成具有在“设备”入口和“设备”出口之间流体连接的容器或袋,并且仪器出口之一流体连接到多个入口流量控制器(ii)入口之一。在设备(iv) “入口”和“出口”之间流体连接到液体原料入口(i)的容器或袋通过赋予流的装置(v) (通常为泵)填充,或通过其它多个入口流量控制器(ii)入口中的至少一个用至少一种其它液体调节。在某些实施方案中,容器或袋是混合容器或袋。当包含mAb的溶液被与多个入口流量控制器(ii)上的至少一个其它入口流体连接的至少一种另外的液体调节时,生物加工液体通过多个入口流量控制器(ii)的入口再循环到容器或袋并回到多个入口流量控制器(ii)的入口。

[0063] 病毒灭活可以通过许多技术使用本领域已知的条件进行。例如,使用色谱柱、色谱膜或存储槽,其能够孵育包含液体原料的流体,所述液体原料的pH小于约4.0,例如,pH在约3.0至约4.0之间,优选pH在约3.2至约3.9之间,尤其是pH在约3.4至约3.8之间,并且更尤其是pH在约3.45至约3.7之间。优选将液体原料在上述pH下保持至少25分钟的时间段,例如在约30分钟至1.5小时之间的时间段,优选在约30分钟至1.25小时之间的时间段,更优选在约0.75小时至1.25小时之间的时间段,并且尤其是约1小时的时间段。在每种情况下,选择的条件使得mAb不被损坏或破坏。

[0064] 灭活的病毒可以通过过滤去除,例如使用如在美国专利号6,365,395中描述中的正常流动过滤器(NFF)或切向流过滤(TFF)过滤器。在TFF模式或NFF模式中,通常使用平均孔径为20-100纳米(nm)的膜,在保留灭活的病毒的条件下进行过滤以去除灭活的病毒。这

样的膜将灭活的病毒保留在膜表面上,同时允许mAb通过膜。

[0065] 用于去除灭活的病毒的一个或多个单元还可以去除在病毒灭活步骤中存活的任何病毒。

[0066] 可以用于去除灭活的病毒(以及保持活性的任何病毒)的代表性合适的超滤膜包括由再生纤维素、聚醚砜、聚芳基砜、聚砜、聚酰亚胺、聚酰胺、聚偏二氟乙烯(PVDF)等形成的膜,并且称为VIRESOLVE.RTM.膜和RETROPORE™膜,可从EMD Millipore, Billerica, Mass获得。这些可以以盒(NFF)形式提供,例如VIRESOLVE ™ NFP病毒过滤器,或者作为盒(用于TFF),例如PELLICON™盒,可从EMD Millipore, Billerica, Mass获得。

[0067] 可以使用设备(iv)进行的过滤操作包括病毒过滤、深度过滤和绝对过滤、超滤、渗滤和微滤。在许多实施方案中,过滤设备(iv)包含在设备入口和设备出口之间的过滤器模块。过滤器模块可以使用附接到多个入口流量控制器入口(ii)的至少两个液体进料漂洗和追逐,并且包含目标mAb的原料可以流体连接到原料入口(i)。通过过滤设备(iv)对液体原料的加工通过用于赋予流的装置(v)来实现,所述装置(v)流体连接到多个入口流量控制器出口(ii)和原料入口(i)并定位在多个入口流量控制器出口(ii)和原料入口(i)的下游,以及过滤设备(iv)的上游。过滤器通常是模块形式,并且可以采用纯化生物分子领域中已知的构造。

[0068] 可以使用超滤和/或渗滤来浓缩或进行缓冲液交换。

[0069] 病毒过滤、深度过滤和绝对过滤方法操作是本领域已知的,并且可以使用可商购获得的过滤设备进行。在许多实施方案中,将一个或多个过滤设备放置在设备(iv)入口和出口之间,以进行过滤作为加工操作。在另一个实施方案中,将另外的过滤设备定位在仪器出口的下游,在某些实施方案中,这允许仪器进行大部分纯化步骤,例如色谱法、病毒灭活、切向流过滤、病毒过滤或深度过滤,随后在仪器外部进行二次过滤操作。

[0070] 可以使用本发明的仪器进行的切向流过滤(“TFF”)加工操作包括常规的再循环TFF和单程TFF (“SPTFF”)。在某些实施方案中,仪器的出口和入口可以流体连接以产生再循环回路,实例是再循环切向流过滤。

[0071] 在一个实施方案中,仪器包含包含TFF设备(iv)的单元,例如在设备(iv)入口和设备(iv)出口之间包含平板、中空纤维或螺旋缠绕膜的TFF设备,并且来自包含TFF设备(iv)的单元的渗余物可以从仪器出口之一引导至含有至少一个入口和一个出口的容器或袋上的流体连接的入口。容器或袋的出口可以流体连接到液体原料入口(i)。通过流体连接到容器或袋上的第二入口,使用辅助装置以将原料或液体供应到容器或袋中,可以将容器或袋保持在恒定水平。在另一个实施方案中,仪器设置成具有在设备入口和设备出口之间包含平板、中空纤维或螺旋缠绕膜的TFF设备(iv)的单元,并且来自包含TFF设备(iv)的单元的渗余物从仪器出口之一流体连接回到多个入口流量控制器阀(ii)的入口之一。在某些实施方案中,从仪器出口到其入口(i)的再循环回路含有破裂容器或袋。通过用于赋予流的装置(通常为泵),将包含mAb或液体的溶液通过液体原料入口吸入再循环回路。渗余物通过包含TFF设备(iv)的单元再循环,优选通过多个入口流量控制器入口之一。多个入口流量控制器(ii)可以用于将渗余物与至少一种其它液体混合。再循环TFF的操作在本领域中是已知的,并且可以通过设定交叉流速和跨膜压力来控制。

[0072] 在某些实施方案中,仪器包含包含SPTFF设备(iv)的单元。SPTFF设备优选在设备

(iv)入口和设备(iv)出口之间包含平板、中空纤维或螺旋缠绕膜，例如如在WO2017/118835中所述的。在一些实施方案中，可以使用SPTFF和(再循环) TFF的混合，其中使用设备(iv)下游的可变流量阀产生的渗余物返回到进料入口(i)。

[0073] 优选设备(iv)任选地包含用于废物流的出口。然而，这在许多实施方案中不是必需的，因为当存在废物流时，其可以使用与产物流相同的出口离开设备。例如，当设备(iv)包含色谱柱时，仅有一个流离开柱，并且该流通常作为含有杂质的废物流开始，直到从柱洗脱出期望的mAb。随后，在一段时间内，离开柱的流包含mAb减去许多杂质。最后，离开柱的mAb的量减少，并且离开设备的液体通常含有大量的杂质。

[0074] 用于本方法的加工单元和仪器优选包含气泡捕捉器、压力传感器、温度传感器、pH传感器、流速传感器、电导率传感器、空气传感器和/或UV传感器，例如UV/可见多波长传感器。可以存在前述每一种的一种或多种。

[0075] 赋予液体流动的装置(v)在本领域中是公知的，并且包括向液体施加气压，尤其是惰性气体，例如氮气或氦气。优选用于赋予液体流动的装置(v)包含一个或多个泵。可以使用的泵包括蠕动泵、隔膜泵、凸轮泵和离心泵。可以使用一次性的和可重复使用的泵两者。在许多优选的实施方案中，每个单元包含单个泵(v) (即，单元具有一个且仅具有一个泵)，优选位于组件(ii)的下游和组件(iv)的上游。所选择的泵(v)的类型和尺寸通常取决于适于仪器的规模和设计参数的流量和压力分布。在某些高度优选的实施方案中，泵(v)是四级隔膜泵。

[0076] 在本发明的一个特定实施方案中，一个或多个单元(优选所有单元)包含以下中的一个或多个：

(vii)用于制备用于形成生物加工液体的至少两种液体中的每一种的设备；

(viii)用于从通过单元的一种或多种液体中捕集气泡的设备；

(ix)位于设备(iv)出口的下游以调节压力的装置；

(x)多个适于监测加工操作的传感器(27)，所述传感器(27)位于设备(iv)入口和设备(iv)出口的上游和/或下游；和

(xi)与进料入口流体连接的至少一个出口。

[0077] 优选一个或多个单元(优选所有单元)进一步包含用于向流过设备(iv)的液体施加另外的压力的装置，该装置位于设备(iv)的下游。用于施加压力的装置在本领域中是已知的，并且包括夹管阀、隔膜阀，尤其是可变位置隔膜阀。

[0078] 在许多实施方案中，该方法在可编程控制单元(优选计算机)的控制下操作。在一些实施方案中，单个控制单元控制两个或更多个单元操作。在其它实施方案中，每个单元在单独的控制单元的控制下。在这些其它实施方案中，优选单元采用公共编程语言，这使得能够简化单元之间的通信。

[0079] 在一个实施方案中，仪器的单元中的至少一个(优选一半，更优选全部)进一步包含至少一个可切换旁路组件(vi)，其将液体原料和/或待组合以形成生物加工液体的液体的流引导至(a)用于组合液体原料和液体(2ab)、(2cd)、(2ef)和/或(2g)以生产设备进料的混合器(iii)或(b)绕过装置(iii)并且替代地将液体和/或原料在不通过装置(iii)的情况下送至设备(iv)。该实施方案的单元的优点是它们可以用于纯化易碎的mAb，其中在混合器(iii)中组合液体原料和生物加工液体可能或将破坏或降解mAb。

[0080] 当设备(iv)包含色谱柱时,可切换旁路(vi)特别有用。可切换旁路(vi)可以用于将mAb装入到色谱柱(iv)上而不通过混合器(iii),并且随后混合器(iii)可以用于制备生物加工液体,该生物加工液体充当已经存在于柱(iv)上的mAb的洗脱剂。此外,当设备(iv)进行超滤和/或渗滤的方法步骤时,有时绕过混合装置(iii)是有用的,否则滞留体积和产品稳定性可能是问题。

[0081] 可切换旁路组件(vi)优选包含管道和两个或三个阀,所述阀将液体原料和液体(2ab)、(2cd)、(2ef)和/或(2g)的流引导至混合器(iii)或引导至设备(iv)而不通过混合器(iii)。

[0082] 参考图2描述根据本发明的仪器的一个实施方案。提供第一加工单元,其包含用于液体原料的入口(i)和用于六个不同的缓冲液的入口(2a)至(2f)加上用于注射用水的入口(2g)。每个入口都配有一个阀,例如直通隔膜阀(3)和(3a)至(3g),以使流能够被打开或关闭。在所示的实施方案中,来自入口(2a)和(2b)、(2c)和(2d)以及(2e)和(2f)的缓冲液进料分别在阀(3a)和(3b)、(3c)和(3d)以及(3e)和(3f)的下游组合,以分别形成三个缓冲液进料管线(2ab)、(2cd)和(2ef),所述三个缓冲液进料管线与注射用水入口(2g)一起流体连接到多个入口流量控制器(ii)上的不同的入口,所述入口流量控制器(ii)包含具有单个出口的四阀歧管,所述单个出口具有快速作用的气动致动器。通过这种结构,并通过适当地打开和关闭阀(3a)和(3b)、(3c)和(3d)以及(3e)和(3f),允许在来自入口(2a)和(2b)、(2c)和(2d)或(2e)和(2f)的缓冲液之间进行选择,从而增加单元操作的灵活性。来自多个入口流量控制器(ii)的出口在泵(v)上游的位置(5)处与包含mAb的液体的进料流体连接,所述泵(v)赋予合并的进料的流通过配有气泡捕集器(8)的静态混合器(iii),并流至第一色谱柱(iv)的入口。将输出从泵(v)进料至色谱柱(iv)的管线配有压力传感器(7)、空气传感器(9)、流量计(10) (例如超声波流量计)和组合的温度和电导率传感器(11)。在一些实施方案中,响应于来自流量计(10)的反馈信号(29),经由可编程控制单元来控制泵(v)。

[0083] 在一些实施方案中,任选地,响应于来自电导率和温度传感器(11)的反馈信号(28),经由可编程控制单元来控制多入口流量控制器(ii)。来自色谱柱(iv)的出口管线提供有压力传感器(13)、组合的温度和电导率传感器(14)、UV检测器(例如UV/可见多波长检测器) (15)、pH传感器(16)和可变位置阀(30),如果需要,可以采用该可变位置阀来调节压力和施加背压。优选地,响应于来自压力传感器(7)和(13)的反馈信号(26)和(27),经由可编程控制单元来控制泵(v)和可变位置阀(30)的操作以及从而对仪器中的压力的调节。出口管线通过一系列阀(17)、(19)和(20),所述一系列阀能够在用于含有纯化的单克隆抗体的产物流的出口(18)、用于包含至少一些所述杂质的废物流的出口(21)或例如使得能够收集或取样的出口(22)之间控制流动。仪器进一步配有阀(23a)和(23b),其使得流动能够被转向以绕过柱(iv) (如果在操作期间需要的话)和另外的阀(24)和(25),其使得通过柱(iv)的流动能够被停止。随后,通过出口(18)的产物流可以用作在用于进行第二加工操作的第二单元中的包含mAb的原料,所述第二单元如在图2中说明的配置,但是其中优选地,色谱柱(iv)被用于进行加工操作的不同的装置代替,例如不同类型的色谱法或非色谱法单元操作,并且其中在用于进行第二加工操作的第二单元中,进料到入口(i)中的原料包含从出口(18)离开前面的单元的产物流。

[0084] 在一种操作方法中,打开阀(3),同时关闭阀(3a)至(3g),并通过泵(v)将包含单克

隆抗体和杂质的液体原料进料至柱(iv)，以使柱负载单克隆抗体和杂质(例如包含蛋白质A亲和树脂的柱)，使得单克隆抗体选择性结合到蛋白质A亲和树脂。在完成期望的负载时，关闭阀(3)，并打开阀(3a)至(3g)中的一个或多个，以使形成生物加工液体的来自入口(2a)至(2g)的一种或多种液体能够泵送通过柱(iv)。在一些实施方案中，最初仅打开阀(3a)，并且操作多入口阀(ii)以打开入口阀，将来自入口(2a)的缓冲液(其可以是洗涤缓冲液)供应至该入口阀，使得用来自入口(2a)的缓冲液洗涤负载的柱(iv)。在完成期望的洗涤阶段时，可以打开阀(3b)至(3g)中的一个或多个，阀(3a)保持打开或关闭。打开多个入口流量控制器(ii)上的入口阀，以允许来自入口(2b)至(2g)的液体或包含它们中的两种或更多种的混合物泵送通过柱(iv)。通过控制多个入口阀(ii)和/或阀(3a)至(3g)上的阀的打开和关闭，可以根据需要改变和控制进料至柱(iv)的生物加工液体的组成。例如，在阀(3b)、(3c)和(3e)打开的情况下，改变在多入口流量控制器(ii)中打开的入口阀并且关闭其它入口阀使得生物加工液体的组成能够以逐步或逐渐的方式改变。在另一个实例中，多入口流量控制器(ii)的两个或更多个入口阀可以以给定的频率打开和关闭，并且持续选定的时间段，以使得给定的液体混合物能够进料至柱(iv)。调节多个入口阀(ii)上的入口阀打开或关闭的时间和/或频率允许改变生物加工液体的组成。在时间和/或频率以逐步方式改变的情况下，生物加工液体的组成也以逐步方式改变。在时间和/或频率在一段时间内逐渐改变的情况下，生物加工液的组成也逐渐变化，使得能够对柱(iv)施加梯度。通过任何期望的方法，可以将进料至柱(iv)的生物加工液体的液体组成改变为引起mAb从柱(iv)洗脱的组成。在洗脱之前，从柱(iv)中离开的液体(其可能包含杂质)经由出口(22)收集，或送至废物(21)，并相应地设置阀(17)、(19)和(20)。当含有纯化的单克隆抗体mAb的产物流到达阀(17)时，将阀(19)和(20)关闭，而阀(17)打开，允许纯化的mAb通过出口(18)进入第二单元，并通过其入口(i)进入第二单元作为第二单元的液体原料。

[0085] 第二单元和任何其它单元的操作可以基本上如上文关于第一单元所述。应该认识到，通过第二单元的出口(18)离开第二单元的mAb可以被回收并原样使用，或者可以通过用作用于进一步加工操作的原料而被进一步纯化。这样的进一步加工操作可以采用常规仪器，或者根据在图2中或者另外根据本发明说明的构造的其它单元。

[0086] 根据本发明的方法进一步包括将所得纯化的单克隆抗体与一种或多种药学上可接受的载体混合以形成药物的步骤。

[0087] 权利要求的全部主题在此通过引用并入本说明书。

[0088] 本申请通过以下实施例进行说明而不受其限制。

[0089] 实施例

可以构建包括两个串联单元的仪器，其中每个单元具有图2所示的一般构造，每个单元包括图3所示的流动路径。第一单元中的设备(iv)包括色谱柱，第二单元中的设备(iv)包括进行病毒灭活的装置。

[0090] 第一和第二加工单元的构造

每个加工单元可以被构造成包括图2所示的部件，除了阀(23b)被简单的流体连接代替。每个单元包含基本上相同的流动路径。

[0091] 制备生物加工液体

如下所述的储备溶液SS1至SS7可以用作所示的入口(2a)至(2g)的流：

入口(2a)-1M氯化钠(SS1)；

入口(2b)-4M氯化钠(SS2)；

入口(2c)-250mM磷酸氢二钠(SS3)；

入口(2d)-100mM乙酸钠(SS4)；

入口(2e)-175mM磷酸二氢钠(SS5)；

入口(2f)-1M乙酸(SS6)；和

入口(2g)-蒸馏水(SS7)。

[0092] 七种储备溶液SS1至SS7可以使用多个入口流量控制器(ii)以表1中所示的比例组合以得到表1中所示的五种生物加工液体BPL1至BPL5：

表1. 生物加工液体

生物加工液体	储备溶液						
	SS1	SS2	SS3	SS4	SS5	SS6	SS7
	1M NaCl (%)	4M NaCl (%)	250M Na_2HPO_4 (%)	100mM $NaCH_3O_2$ (%)	175mM NaH_2PO_4 (%)	1M $C_2H_4O_2$ (%)	水 (%)
BPL1 (平衡)	15	-	7	-	2	-	76
BPL2 (洗涤 1)	-	13	7	-	1	-	79
BPL3 (洗涤 2)	-	-	2	-	26	-	72
BLP4 (洗脱)	-	-	-	3	-	5	92
BPL5 (strip)	-	-	-	-	-	10	90

第一加工单元-色谱法

加工单元包含色谱柱作为设备(iv) (2.5L mAbSelect SuRe树脂柱)。色谱柱(iv)通过入口(i)负载包含mAb和杂质的原料，并用2L预先制备的BPL1溶液追踪。

[0093] 使用多个入口流量控制器(ii)、下游泵(v)和静态混合器(iii)通过按比例选择储备溶液SS1至SS7中的每一个可以产生生物加工液体BPL1至BPL5。在建立正确的缓冲液组成作为生物加工液体期间，柱(iv)旁路通过阀(23a)，其中阀(24)和(25)关闭，将不需要的缓冲液引导至废物(21)。一旦缓冲液是均匀的，如通过来自上游电导率传感器(11)的稳定读数所指示的，通过打开阀(24)和(25)并关闭在阀(23a)处的旁通管线，将缓冲液作为生物加工液体供应至色谱柱(iv)。可以使用柱(iv)下游的电导率传感器(14)、UV传感器(15)和pH传感器(16)来监测方法条件。在调节柱(iv)期间在mAb与柱结合之前和用后水漂洗时，将液体引导至废物(21)。一旦用BPL1调节，色谱法树脂负载有包含单克隆抗体和通过原料入口(i)吸入的杂质的液体原料，通过泵(v)的作用，绕过静态混合器(iii)，使用可切换旁路组件(vi)，并且到柱(iv)上。通过离开出口(21)收集来自柱(iv)的流，同时通过出口(22)收集

第一缓冲液洗涤BPL2,和通过离开出口(21)收集第二缓冲液洗涤BPL3。使用作为生物加工液体的洗脱缓冲液BPL4从柱(iv)回收纯化的mAb,并通过出口(18)收集。最后,剩余的杂质随后可以使用strip缓冲液BPL5作为生物加工液体从柱(iv)中去除,并通过出口(22)收集。

[0094] 第二加工单元-病毒灭活

加工单元包含病毒灭活设备(iv) (具有叶轮驱动的50L Stedim Magmix™袋),其中出口(21)与入口(2g)连接以提供再循环回路。

[0095] 生物加工液体的制备

将如下所述的储备溶液SS1至SS2按以下顺序连接到入口(2a)至(2g):

入口(2a) -1M乙酸(SS1);

入口(2b) -无进料;

入口(2c) -1M Tris碱(SS2);

入口(2D) -无进料;

入口(2e) -无进料;

入口(2f) -无进料;以及

入口(2g) -设备袋(iv)。

[0096] 通过将来自第一加工单元的产物流通过入口(I)加载到第二加工单元的病毒灭活袋(IV)中,将来自第一加工单元的产物流用作第二加工单元的原料。因此,原料包括mAb和病毒(25L～7.5g/L mAb在50mM乙酸钠pH 4.6中)。使用可切换旁路组件(vi),原料通过泵(v)绕过设备(iii),并通过打开阀(24)和在阀(23a)和阀(25)处关闭旁路管线而被引导至设备(iv)。一旦设备(iv)被负载,阀(25)、(19)、(3g)和连接到(3g)的多流量控制器阀可以打开。阀(3)关闭,并且可切换旁路组件(vi)留在旁路模式中。打开病毒灭活袋中的叶轮驱动并将其速度设定为450rpm。通过(2ab)通过在连接到多入口流量控制器(ii)的(2a)处间歇加入1M乙酸将原料的pH降低至pH 3.6的目标。在pH滴定降至pH 3.6的持续时间内打开阀(3a),并且操作多入口流量控制器(ii)以每次通过阀的作用每30秒将约100 mL的1M乙酸定量进料至病毒灭活袋(iv)中。在八剂量的1M乙酸后,原料围绕流动路径再循环并在病毒灭活袋(iv)中混合15分钟。如上所述重复乙酸的定量给料,直到在15分钟再循环期间pH达到pH 3.6,如通过传感器(15)确定的。随后,pH滴定的原料围绕流动路径再循环,并在病毒灭活袋(iv)中混合60分钟。

[0097] 通过(2cd)通过在连接到多入口流量控制器(ii)的(2c)处间歇加入1M Tris碱将原料的pH提高至pH 5.0的目标。在pH滴定升高至pH 5.0的持续时间内打开阀(3c),并且操作多入口流量控制器(ii)以每30秒将约100 mL的1M Tris碱定量给料至病毒灭活袋(iv)中,每次通过阀的作用。在八剂量的1M Tris碱后,原料围绕流动路径再循环并在袋(iv)中混合15分钟。如上所述重复Tris碱的定量给料,直到在15分钟再循环期间pH达到pH 5.0,如通过传感器(15)确定的。最后,通过关闭出口(19)和打开阀(17)以通过出口进料(18)收集病毒灭活袋(iv)的内容物作为产物流,回收包含mAb的产物流和灭活的病毒。

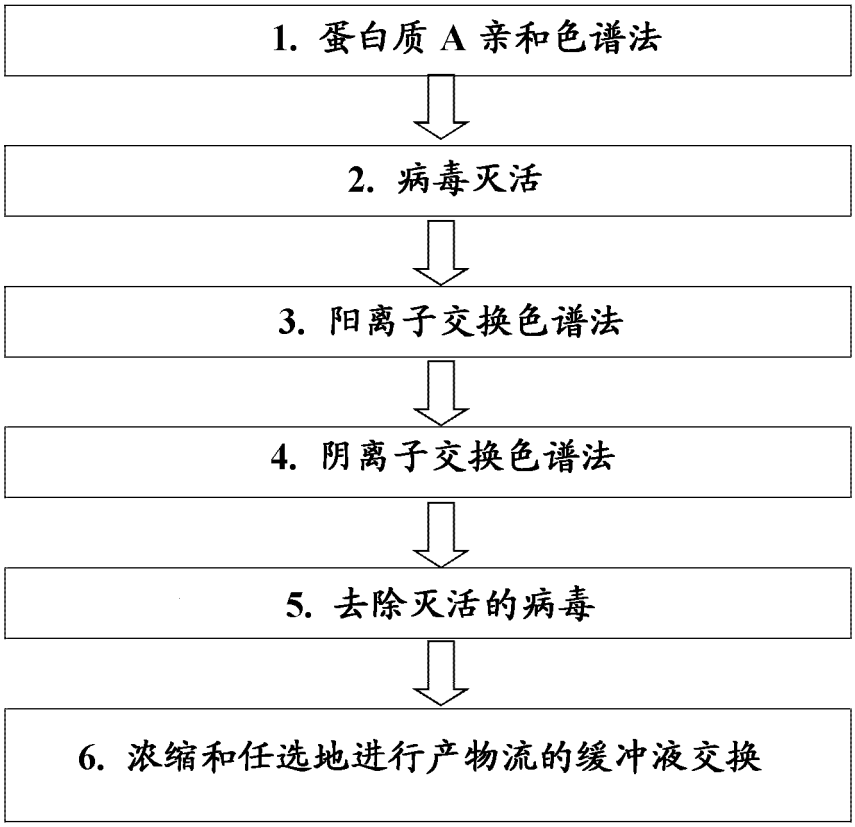

1. 蛋白质 A 亲和色谱法
2. 病毒灭活
3. 阳离子交换色谱法
4. 阴离子交换色谱法
5. 去除灭活的病毒
6. 浓缩和任选地进行产物流的缓冲液交换
收集的产物流

图 1

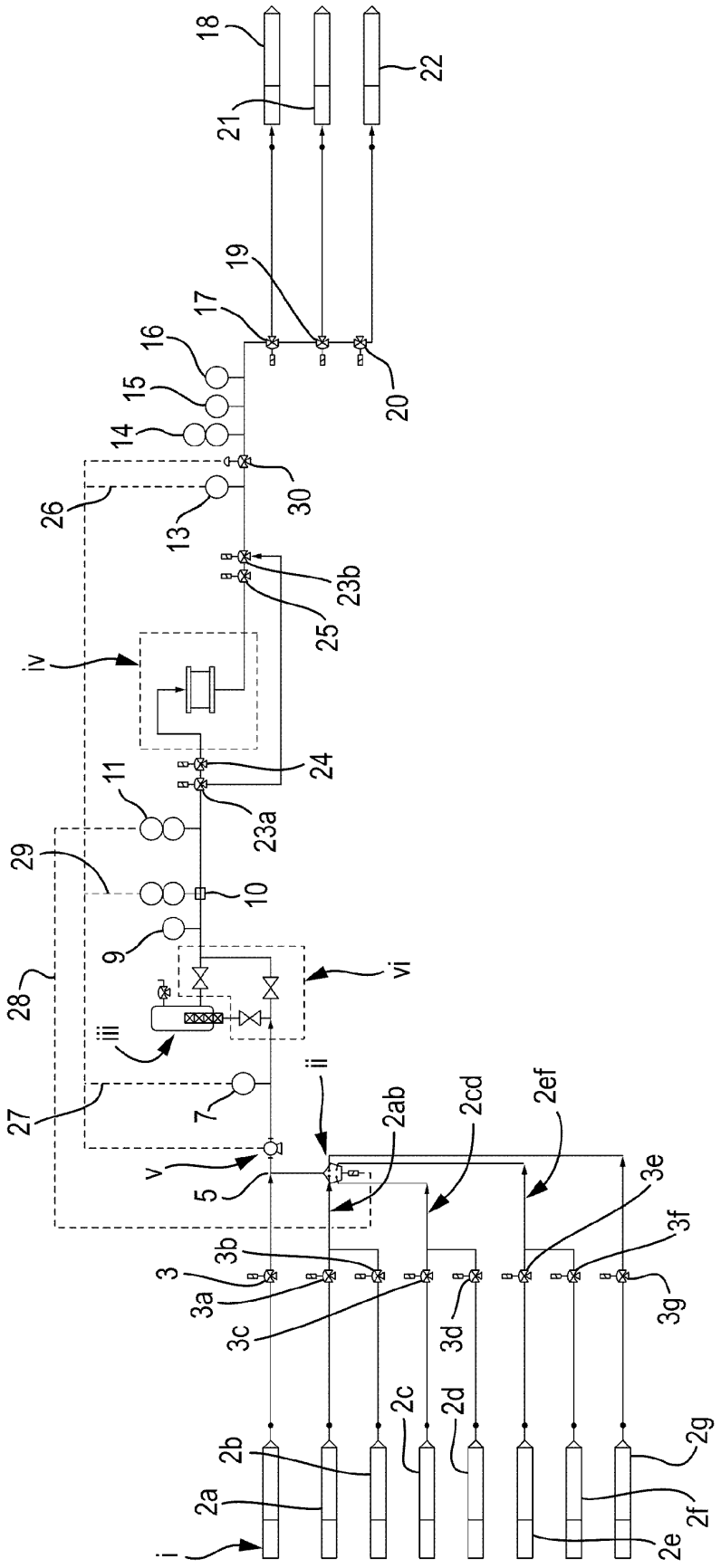

18
22
21
19
17
16
15
14
20
30
26
13
23b
25
iv
24
11
23a
29
10
9
vi
28
iii
ii
27
7
2ab
2cd
2ef
v
5
3e
3f
3b
3
3a
3c
3d
3g
2c
2d
2g
2b
2a
2f
i
2e

图 2