



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201827830 A

(43)公開日：中華民國 107 (2018) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：106135849

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 10 月 19 日

(51)Int. Cl. : G01N33/569 (2006.01)

C12N7/04 (2006.01)

(30)優先權：2016/10/21 歐洲專利局

16194959.9

(71)申請人：美商拜耳保健有限責任公司(美國) BAYER HEALTHCARE LLC (US)
美國

(72)發明人：麥瑟 班傑明 MAISER, BENJAMIN (DE)；史旺 彼得 SCHWAN, PETER (DE)；
哈特曼 勞拉 HOLTSMANN, LAURA (DE)；羅貝登 馬丁 LOBEDANN, MARTIN (DE)

(74)代理人：何愛文；王仁君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：11 項 圖式數：6 共 23 頁

(54)名稱

連續性病毒清除之驗證

VALIDATION OF CONTINUOUS VIRAL CLEARANCE

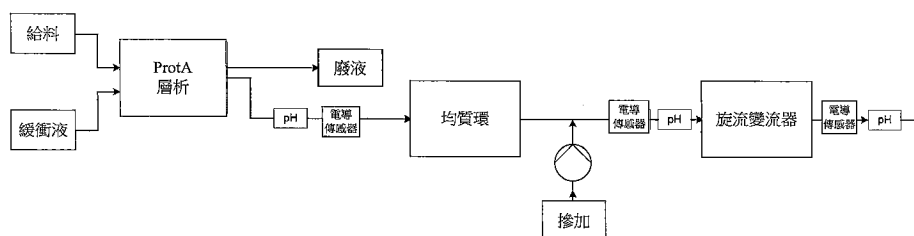
(57)摘要

本文係揭示用於驗證連續病毒清除之方法，其包括下列步驟：提供一所欲驗證的探針，以一有效的方式摻加(spiking)探針，進行病毒清除，採取摻加探針之樣本以及分析步驟 d)之摻加探針樣本。

Disclosed herein is a method for validation of continuous viral clearance comprising the steps of providing a probe to be validated, spiking the probe in a valid manner, performing viral clearance, sampling the spiked probe and analyzing the sample of the spiked probe of step d).

指定代表圖：

圖 1



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

連續性病毒清除之驗證

VALIDATION OF CONTINUOUS VIRAL CLEARANCE

【技術領域】

本文係揭示用於驗證連續病毒清除之方法，其包括下列步驟：提供一所欲驗證的探針，以一有效的方式摻加探針，進行病毒清除，採取摻加探針之樣本以及分析步驟d)之摻加探針樣本。

【先前技術】

用於製造治療性蛋白之連續方法越來越重要並浮現供實現真正連續系統之首要解決辦法。用於製造治療性蛋白之連續方法的一必要部分為病毒滅活。Klutz 等人導入旋流變流器(CFI)作為連續低 pH 病毒滅活之工具(Klutz, S. et al. 2015, *Journal of Biotechnology* 213, pp. 120–130)。其提供了緊迫及既定滯留時間分布以適應連續方法之批式概念(Klutz, S. et al. (2015) *Chemical Engineering Research and Design* 95, pp. 22–33)。此外，能使用一次性技術之製造治療性蛋白的連續方法為特別有利的。

然而，為了使用連續方法來製造治療性蛋白，根據指南和標準，例如 GMP(ICH 三方協調指南)，FDA(CBER, 2/28/1997 指南)和 EMEA (CPMP/BWP/268/95, 1996 指南或 EMEA/CHMP/BWP/398498, 2009 指南)其不僅需要確認已確實移除任何的病毒汙染，而且亦須驗證。

因此，對於試驗中新藥(IND)的提請主管當局要求要有病毒清除試驗，且其在(尤其是)抗體(單株抗體)、重組蛋白和糖蛋白以及組織和血液衍生的產品之製程開發上特別重大。

換言之，有效的病毒清除對於所有的生物醫藥製造過程為必要的以保證病患的安全。對於單株抗體(mAb)之製造，例如二個正交專注病毒清除之步驟為必須的。每個步驟必須達到 ≥ 4 之對數下降值(LRV)。

【發明內容】

因此，本發明之目的係提供新穎、簡單及低廉的驗證病毒汙染已確實清除，亦即移除或滅活之解決方法。

本發明係藉由提供驗證連續病毒清除之方法來達成此目的，該方法係包括下列步驟：

- a) 提供一待驗證的探針，
- b) 以有效的方式摻加探針，
- c) 進行病毒清除，
- d) 採取摻加探針之樣本，及
- e) 分析步驟 d) 之摻加探針樣本。

此方法具有得以簡單及低廉驗證連續病毒清除之優點。

如文中所用，術語「驗證」係指建立證據之過程或高度確保一特定程序、方法或系統將持續地製造一符合預定驗收準則之結果。

在醫藥產業中，例如，確保本身適合製造之方法將持續產生預期結果為非常重要的。

如文中所用，術語「連續」係指當探針運作時該驗證係連續地進行之事實。相反地，在「批式」方法中，完成工作的探針，例如產品，將於一定的時間點被驗證。換言之，連續方法如文中所用係指進行至少二個連續的程序步驟之方法，其中第二個程序步驟係在第一個程序步驟完成之前即開始處理探針。

如文中所用，術語「清除」係指移除病毒粒子或使病毒粒子滅活。

因此，進行病毒清除之步驟使得存在探針中的病毒粒子減少及/或病毒粒子不再能感染細胞，特別是宿主細胞，亦即其為滅活的。

如文中所用，術語「探針」係指可能含有病毒之物質。

如文中所用，術語「摻加」係指慎重地增加實質上病毒的負荷量。

如文中所用，術語「病毒」係與術語「病毒粒子」交換使用且係指小於細菌及僅可在感染宿主後進行複製之因子。

在許多病毒清除研究的案例中，所給予樣本中的病毒濃度為極低的。在其他的萃取方法中，低量的污染物可能為微不足道的，但因為病毒為感染性污染物，即使一個病毒可能足以毀掉整條處理鏈。基於此因素，必須採用特別的措施來測定任何類型的病毒已從任何類型的探針中提取出之適當移除或滅活的方法。

就此目的特別制立一摻加研究。摻加研究為一種為了測定病毒移除，亦即清除或滅活之可能方法所做的研究。其係仰賴將探針之病毒數(活性量)增加至原來 10^4 或 10^5 倍將僅改變一個量級數之病毒移除/滅活比率的原理。此該學理中，以創立了先進技術中已知的摻加研究，其中該病毒數(或活化量)係經增加或摻加為原來探針之 10^4 或 10^5 倍。然後將帶有此新的高數目或活化量的探針進行所選擇之清除方法。在先進技術中，係在所選擇之清除方法開始時及在結束時採取病毒數或活化量並用於計算衰減係數。用於病毒移除或滅活步驟之習用研究的衰減係數(RF)係使用下列方程式來計算：

$$RF_{\text{步驟}} = \log_{10} [(V1 \times T1)/(V2 \times T2)]$$

其中：

- V1 = 病毒清除步驟前參入的原料量；
- T1 = 清除步驟前參入原料的病毒濃度；
- V2 = 清除步驟後原料的量；及
- T2 = 清除步驟後原料的病毒濃度。

如文中所用，術語「有效方式」係指需要可再生地進行摻加以及必須一直確保所欲的病毒粒子負荷量之事實。

換言之，必須確保係以毒粒子負荷持續達到所欲的量之方式選擇摻加點，與病毒清除之前的單元操作為相互獨立的。

因此，病毒清除法需要將連續方法之特定性質納入考慮，例如不同的 pH 程度，滯留時間、溫度、添加物濃度、溶液的均質性和電導率。

在用於驗證此探針之方法的一實施例中，此探針為一流體及/或產物流。

如文中所用，術語「流體」係指連續的液體流及/或氣體流。

如文中所用，術語「產物流」係指包括產物的流體。

在一用於文中所述之驗證方法的實施例中，此探針為一產物流。此產物流，例如係從一單元操作流向另一單元操作，直到產物達到所預的特質。

在一用於文中所述之驗證方法的替代實施例中，此探針為一流體。此流體，例如可為進入一生產製程之流體。

相同的生產製程可包括其中此探針為一產物流之文中所述的驗證法，以及其中此探針為一流體之文中所述的驗證法二者。

特定流體及/或產物流所需的衰減係數係依照許多不同的因素而定，其中有些係包括：

- 預計的病毒起始濃度，及/或
- 所欲純化的產物，及/或
- 病毒的感染量(供活體內使用)，及/或
- 不管滅活是否為完全移除之可行選擇，且若是在該狀況下，則為滅活條件。

就添加摻加物質，可使用幫浦或注射器。

在一用於文中所述之驗證方法的較佳實施例中，以有效的方式摻加探針之步驟係使用連接頭來進行，例如 Y 接頭及/或 T 接頭。

在一用於文中所述之驗證方法的較佳實施例中，並無使用混合元件來混合流體及/或產物流和摻加物質。

在一替代的實施例中，係使用靜態混合器及/或混合容器或無混合之容器來混合流體及/或產物流和摻加物質。

在一用於文中所述之驗證方法的較佳實施例中，步驟 d)之採取摻加探針樣本係包括在一段預定的時間內採樣。

當將於連續生產製程中產物流可能在不同的單元操作處於週期性波動條件，例如有關 pH 值、電導率或產物濃度納入考量時，此實施例為有利的。

當提到下文所述的實例時，此實施例的優點變得特別清楚。在此實例中，產物流為一連續層析之溶離液且係使用旋流變流器(CFI)進行病毒滅活。在此實施例中，在一段預定的時間內採樣，亦即固定的取樣持續時間具有排除因連續層析所造成的 pH 波動影響之效應。在此較佳的實施例中，取樣的持續時間設定在一個切換時間，為更佳的。

如文中所用，術語「切換時間」係指其中連續層析溶離一特定管柱之後切換至下個管柱進行溶離之時間。

經由將取樣持續時間設定在一個切換時間，可完整收集到源自連續層析之預計的 pH 值。換言之，經由在一段預定的時間內，例如一個切換時間內採樣，係將週期性波動條件納入考量。否則—例如在連續層析後測量 pH 之情況下—依照樣本是否在產物流離開連續層析係處於高 pH 值的當下，相較於當產物流離開連續層析係處於低 pH 值的當下所採集，結果可能為虛偽的或不可再現。

因此，為了提供在相同的條件下確實給予相同結果之方法，亦即其適用於驗證連續病毒滅活製程，較佳的採取摻加探針樣本之步驟係包括在一段預定的時間內，亦即一個切換時間採樣，無論任何時候當此單元操作進行病毒滅活具有週期性波動狀況時。

在一用於文中所述之驗證方法的較佳實施例中，此探針係包括至少一種選自下列組成之群的組份：胜肽、蛋白、小分子藥物、核酸。

如文中所用，術語「胜肽」係指長度相當短的胺基酸聚合物(例如少於 50 個胺基酸)。聚合物可為直鏈或支鏈，其可包括修飾的胺基酸，且其可插入非胺基酸。此述語亦涵蓋經修飾，例如藉由形成雙硫鍵、糖基化、脂質化、乙醯化、磷酸化或任何其他操縱，例如與標定組份，例如但不限於螢光標記、粒子、生物素、微珠、蛋白、放射性標記、化學發光標籤等等接合之胺基酸聚合物。

如文中所用，術語「蛋白」係指胺基酸的多肽。此述語係涵蓋可能為全長、野生型或其片段之蛋白。此蛋白可為人類、非人類，以及對應天然生成胺基酸之人工或化學模擬物，以及天然生成的胺基酸聚合物及非天然生成的胺基酸聚合物。

較佳的蛋白為治療性蛋白。

如文中所用，術語「治療性蛋白」係指可投予生物用以引發該生物體之組織、器官或系統的生物或醫療反應之蛋白。

甚佳地，此蛋白為抗體。

術語「抗體」如文中所用係指一結合分子，例如免疫球蛋白或免疫球

蛋白之免疫學上活化的部分，亦即含有抗原結合位置之分子。

如文中所用，術語「小分子藥物」係指可幫助調節生物過程之低分子量(<900 道爾頓)化合物。

如文中所用，術語「核酸」係指單股或雙股形式之去氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。除非有特別限制，否則此術語係涵蓋含有天然核苷酸類似物，具有與參照核酸相類似的結合性質且係以類似天然生成核苷酸之方式代謝的核酸。除非另有指出，否則一特定的核酸序列亦隱含其保守性修飾變體(例如簡併密碼子取代)和互補序列以及明確指出的序列。

在下述實例中，係使用旋流變流器(CFI)進行病毒滅活。係其建構用來傳遞一既定的最小滯留時間。

如文中所用，術語「最小滯留時間」係指單一病毒/病毒粒子至少留在一特定裝置，例如 CFI 中之時間。

在一用於文中所述之驗證方法的實施例中，以有效的方式摻加樣本之步驟係包括在均質後摻加樣本。

如文中所用，術語「均質」係指確保一或多種對於病毒清除為重要的探針之特性係與此探針一致之單元操作。

例如，若此探針為一產物流，則在病毒清除前此單元操作為連續層析且對於病毒清除重要的探針特性為 pH 值，此均質係確保整個產物流在離開均質時係處於相同的 pH 程度。

在一較佳的實施例中，此均質係在均質環中進行。

如文中所用，術語「均質環」係指一由管道建構的連續攪拌槽反應器(CSTR)。換言之，均質環並非由帶有攪拌裝置之大桶槽所組成，而是環狀排列之管道經由該裝置抽吸流體。因為內部體積流高於入口和出口液流，使得流進的流體達到良好的混合。

當使用均質環作為連續攪拌槽反應器(CSTR)用以調整連續層析的 pH 程度時，其係在 pH 3 至 pH 7 之間變動，無法辨識一特定樣本係源自哪個固定層析管柱。因此，取樣的量應包括連續層析系統的一或甚至二個非特定管柱之溶離液。為了排除不同層析管柱之影響，CFI 內某些樣品點係取樣二次。

在下文論述的實例中，摻加點係設定在均質環之後。

當 CFI 為實際低 pH 病毒滅活裝置時，即是如此。因此，均質環之前的摻加應會造成最大 LRV 之潛在喪失，因為在實際單元操作(UO)，亦即 CFI 中低 pH 病毒滅活之前，均質環中探針在低 pH 程度時具有特定的滯留時間。

在一用於文中所述之驗證方法的實施例中，步驟 c)之病毒清除為病毒滅活。

此病毒滅活較佳地係在 pH 值 ≤ 4 下進行。在這些條件下的病毒滅活具有給予一適合滯留時間確實使大的套膜病毒滅活之效應。

在一用於文中所述之驗證方法的實施例中，步驟 c)之病毒清除為病毒滅活，其係在旋流變流器(CFI)中進行。

此病毒滅活例如係在 CFI 中於 pH 值 ≤ 4 下進行。使用 CFI 為有利的，因為其確保了病毒滅活所需的滯留時間可靠地及可還原地確定。

較佳地，病毒滅活係於 pH 值 ≤ 4 下進行。

然而，病毒滅活亦可使用溶劑及/或清潔劑例如三(正丁基)磷酸酯和 Tween 或 Triton X-100 或其他滅活化學品，例如碘或 β -丙內酯來進行。此外，使用 CFI 之病毒滅活亦可經由放射線照射及/或沉澱，例如使用辛酸來進行。

再者，可進行經由低 pH 處理及使用溶劑及/或清潔劑及/或放射線照射及/或沉澱之病毒滅活組合。

在另一用於文中所述之驗證方法的實施例中，步驟 c)之毒清除係在塞流式反應器中進行，外加一直管及/或直螺旋或取代 CFI。

又在另一用於文中所述之驗證方法的實施例中，採取摻加探針樣本之步驟係包括顛倒取樣。

如文中所用，術語「顛倒取樣」係指在製程結束時開始採樣及然後繼續往前開始該製程。

例如，在 CFI 中病毒滅活之情況下，顛倒取樣係指第一樣本係在或靠近 CFI 的出口處採集，然後繼續往 CFI 入口取樣，亦即與 CFI 中流體方向相反。

在病毒滅活作為連續方法之情況下，顛倒取樣具有在連續方法開始時不需停止流體或產物流以便於採樣之優點。在下述實例之情況下，此連續產物流之暫停可能會扭曲分析，因病毒滅活在 ≤ 4 之低 pH 應連續，而產物流不應前進通過 CFI。因此，病毒滅活的程度不再與產物流在 CFI 中前進之距離相關。此外，在每次取樣後所需的 CFI 部分應必須注滿並最先達到穩態，使實驗持續時間大大增加。

再者，CFI 內的取樣造成混亂的內部液流模式。因此，又基於此因素，取樣方法必須小心選擇以確保有效的結果。因此，在下述樣本中，取樣係以 XM18 開始並以 XM12 結束(參照圖 3)。

又在另一用於文中所述之驗證方法的實施例中，採取摻加探針樣本之步驟係包括當其進入取樣容器時，立即中和每滴探針。

當其進入取樣容器時，立即中和每滴探針可經由在容器中填入立即改變 pH 值至 $\sim$ pH 7 之緩衝劑，例如 2 M Tris 緩衝劑來進行。因此，其係確保在使用低 pH 值之病毒滅活的情況下(其為高度時間依賴的反應)，在取樣後反應確實停止，藉此防止樣品內低 pH 值之不均勻的滯留時間。

較佳地係經由三向活塞採取樣本。再者，可使用任何抽取樣本的方法，只要在不打斷製程下得以採樣即可，例如可使用 T 接頭或可連續縮短 CFI 之管道。

又在另一用於文中所述之驗證方法的實施例中，步驟 d)-分析摻加探針樣本係包括測定是否有病毒粒子存在。

此測定係經由讓病毒粒子數目增加之方法及其測定例如使用本項技術中已知的標準方法，例如次世代定序及/或其他 PCR-為基準的方法結合定序法來進行。

在另一用於文中所述之驗證方法的實施例中，步驟 d)-分析摻加探針之樣本-係包括病毒粒子之定量。

一般而言，病毒定量係涉及計算特定體積中的病毒數目，經由例如以溶斑分析法、病灶形成分析法、終點滴定法-亦稱為終點稀釋分析-蛋白為基準的病毒定量分析、穿透式電子顯微鏡、可調式阻性脈衝感測、定量的 PCR 及/或大量平板培養法來測定病毒濃度。

較佳得該病毒粒子的定量係經由終點滴定及/或大量平板培養來進行。

終點滴定—亦稱為終點稀釋—係定量出殺死 50%受感染宿主所需要的病毒量，或在 50%的接種組織培養細胞中產生細胞病變效應之病毒量。因此，其係關於組織感染量(TCID₅₀)為感染病毒效價之測量值。當用於組織培養的情況時，係接種宿主細胞並加入連續稀釋的病毒。培養後，以人工觀察細胞死亡的百分比(亦即受感染的細胞)並記錄各病毒的稀釋度，及使用結果以數學計算 TCID₅₀ 結果。二種常用於計算 TCID₅₀ 的方法為史丕曼—卡伯法(Spearman-Kärber)和里德—明奇法(Reed-Muench)。

大量平板培養(LVP)係指與 TCID₅₀ 分析相同之偵測法。與終點滴定相反的，係使用更大量的液體來進行 LVP，而產生更低的偵測限制。

甚佳地該病毒粒子之定量係經由終點滴定和大量平板培養之組合來進行。

較佳地，所清除的病毒為大的套膜病毒。再者，亦可經由病毒過濾器清除小的非套膜病毒。

較佳地，係應用一次性設備來進行文中所述的驗證方法。

較佳地，係應用拋棄式設備來進行文中所述的驗證方法。

在一較佳的實施例中，此設備為一次性及拋棄式。

在不同的方面，本發明係關於文中所述之驗證方法在製造治療性蛋白之連續法中的用途。

因此，整個文中所述的驗證方法首次係克服先進技術中病毒清除應以批式法來進行以便確保所既定的滯留時間之偏見。

再者，文中所述的驗證方法首次驗證了下列各項為可能的

- 將一既定的批式滯留時間轉變為連續法，
- 在連續法中確定有效的摻加程序，
- 在無擾亂製程條件中此製程本身，經由選擇有效的摻加點，進行驗證，
- 在考量所有變動和測量困難的同時，例如吸抽的波動、pH、病毒濃度、濃度波動、流體狀況的測量，採取代表性樣本，
- 在無擾亂後面取樣點之下，創立一有效的取樣程序。

【圖式簡單說明】

圖 1 係顯示前病毒研究之方法流程的示意概略圖。

圖 2 係顯示 RTD 測量之實驗設置

Cond =電導傳感器，設置 A 用於 HL 之 RTD 測量，設置 B 用於 CFI 之 RTD 測量，設置 C 用於 UO 二者一起之 RTD 測量。

圖 3 係顯示取樣點以及最終 CFI 之示意概略圖。

圖 4 係描繪滯留時間分布示性之結果。

圖 4 的左上圖係顯示由 CFI 所產生的 RTD 示性。平均滯留時間經測定係在 145 min，其中相對寬度 R_w 為 0.819。因此，在 CFI 內所實現的 10 臂中的每一臂係提供 14.5 min 的滯留時間。CFI 內的 RTD 非常窄，導致每個單一流體元素，亦即病毒粒子的滯留時間減至最低。

圖 4 的左下圖係顯示 HL 之結果。其係顯示典型的 CSTR RTD 行為。平均滯留時間為 8.12 min， R_w 為 0.027。圖 4 的右上圖係顯示 HL 和 CFI 組合之測量值。相較於左上圖所顯示的 CFI 結果，平均滯留時間增加到 154 min，相對寬度增加為 0.739。圖 4 的右下圖係顯示實驗結果的整體比較以及直管層流和直螺旋層流之計算圖。HL 和 CFI 之組合比單獨使用 CFI 產生明顯較寬的滯留時間分布。然而，二者匯集比替代物，直管層流和直螺旋層流，顯現明顯較佳的 RTD。

圖 5 係描繪前病毒研究連續法之結果

二個實驗的病毒效價和 LRV 結果可參見圖 5。圖式的右上部係顯示以 A 模式的連續層析單一取樣之結果。前二支管柱係代表負載樣本和保持樣本之病毒效價結果。因為在保持樣本中並未見到病毒效價減低，因此處理條件(例如溫度和緩衝液組成物)以及試驗品項本身(mAB)對於病毒穩定性並無影響。因此，病毒滅活係單獨由低 pH 條件所致。圖式中間的管柱係顯示來自滴定樣本之病毒效價和對應的 LRV 值。所有樣本中的病毒效價皆下降至偵測極限，導致「>」LRV 值。樣本 1M17 和 1M18 中 LRV 從 4.12 (1M16) 下降至 4.01 係由不同的稀釋倍數所造成，因為樣本 1M17 和 1M18 係另外經由大量平板培養做分析。因此，分析量從 33.33 μ L (1M16)變成 44.44 μ L (1M17 和 1M18)。在圖式的右手邊，可看到來自樣本 1M17 和 1M18 之 LVP

結果。即使用了 2133.33 μL 的分析量，仍未發現受感染的孔槽，使得 LRV 值 > 5.82 。

圖 5 的中間和下方圖係顯示 B 模式 ProtA 層析的二個取樣結果。取樣程序由 3M18 開始為 17.31 min。暫停 8.66 min 後，抽取樣本 4M18。同樣成對地進行其他取樣。

圖 6 係顯示 CFI 中病毒效價對滯留時間之對數下降值 (LRV) 的示意圖，其在 CFI 的情況下係等於 CFI 中的特定位置。換言之，由於 CFI 中的反應動能，因此在 CFI 內相同的位置應能達到一特定的病毒效價之對數下降值。因此，在給予的時間點 1 之 LRV 應能反應在 CFI 內特定取樣點的該 LRV，例如在本案例中，架構 1 後的取樣點。同樣地，在本實例中，時間點 6 的 LRV 將相當於架構 6 後的取樣點之 LRV。因此，摻加探針之取樣為位置特異性的而不是如批式條件之情況為時間特異性的。

【實施方式】

實例

下列係描述一用於進行驗證連續病毒清除之示例方法。

就所有的實驗係使用 Tarpon Biosystems BioSMB 層析單元之原型。所有實驗的分析係包括在 pH 電極及一次性導電度感測器的幫助下之 pH 和電導率測量，以及病毒濃度測定之分析。

再者，係使用旋流變流器 (CFI) 進行病毒滅活。其係經建構用於傳遞 120 min 的最小滯留時間。因此，平均滯留時間係大於 120 min 且係藉由如下所述之 RTD (滯留時間分布) 示性來測定。最終的 CFI 設置之照片可參見圖 3。

整體的工廠設置可參見圖 1。在此設定下，低 pH 病毒滅活步驟係放在層析單元之後。Tarpon BioSMB 層析單元之溶離性質係顯示介於溶離緩衝液 (pH 3.1) 和清洗緩衝液 (pH 7.0) 之間的週期性變動 pH 值。因為就低 pH 病毒滅活而言，所有的 pH 應低於 4，均質環即是用於使 pH 均等。換言之，均質環 (HL) 應了解為一連續攪拌槽反應器 (CSTR)，使得 pH 值恆定在 4 以下。HL 之後，在旋流變流器 (CFI) 內進行實際的 pH 低病毒滅活。

為了定出二種單元操作 HL 和 CFI 之特性，係進行滯留時間分布研究。測量 MilliQ 水和 1M NaCl 溶液之間的電導率變化。詳言之，流速係設定在 4.8 mL/min。在三向活塞的幫助下進行階梯函數。調查三種不同的設置：HL(A)、CFI (B)以及 HL 和 CFI (C)之組合。以二種可能的方向進行階梯函數。因此，在以 1 M NaCl 溶液填滿後，藉由填入 UO，亦即以 4.8 mL/min 恆流量的 MilliQ 水填充 CFI 或 HL，以另一方向重覆此實驗。將濃度測量值以正常化至 1 並限制在最大值的 0.5%至 99.5%之間的值。以數值積分使用梯形法測定平均滯留時間。然後在平均滯留時間的幫助下將此滯留時間正常化至 1。根據方程式 1 計算相對寬度 R_w 。 $\theta_{0.005}$ 和 $\theta_{0.995}$ 以此係代表無量綱時間點為達到最大無量綱濃度之 0.5%和 99.5%。相對寬度因此係顯示 RTD 為狹窄的。

$$R_w = \frac{\theta_{0.005}}{\theta_{0.995}} \quad (1)$$

檢測二種不同的連續層析法以調查用於低 pH 病毒滅活之二種不同的平均 pH 值。用於二種方法之實驗程序為相同的。詳言之，啟動 CFI 及 CIP(就地清除)與層析無關。在第一次病毒實驗之前，讓 CFI 注滿緩衝液並以 0.1 M NaOH 溶液進行 CIP。之後，注入另外的緩衝液，讓整個系統內部無氣泡。並行的，啟動連續層析，其首輪需要 2.5 h，之後讓第一管柱跑過所有的循環一次。注滿及 CIP 程序之後，於開始階段期間將 HL 和 CFI 系統與連續層析連接。第一次 2.5 h 的連續層析之後，CFI 必須以摻加的層析溶離液填滿 3 h 以便達到穩態。從對應的 RTD 實驗測定出必須 3 h 的持續時間。第一次病毒實驗後，將 CFI 以 5 M NaOH 進行 CIP 至少 1 h。

必須開發出用於連續法之新穎的摻加程序。為了達到 5%的標準摻加量，必須將 230 μ L/min 摻加物質加到 4.6 mL/min 層析溶離液流中。使用 Gilson Minipuls 3 幫浦經由一連接器將摻加液流加到層析液流中。並無使用內部混合元件。摻加點係設定在均質環之後。

為了在 CFI 內，從不同的時間點抽取樣本，係將三向活塞置放在特定的架構之間。取樣點及最終的 CFI 可參見圖 3。藉由測定完整 CFI 內的平均滯留時間來測定不同取樣點所代表的時間點。因為低 pH 病毒滅活為高時間

依賴的，因此在取樣程序期間反應必須停止。因此，各取樣容器在取樣之前係填入 4.13 mL 的 2 M Tris 緩衝液。在此方法的幫助下，每滴樣本的 pH 在進入取樣容器時立即被中和。此項係預防在樣本內低 pH 值時滯留時間不均勻。

為了排除變動 pH 之影響，取樣時間係設定在一個連續層析的切換時間 (17.3 min)。此舉能完整的收集來自連續層析的預期 pH 值。

當使用均質環作為連續攪拌槽反應器(CSTR)以便調整連續層析的 pH 值(其係在 pH 3 至 pH 7 之間變動)時，無法辨識 CFI 中所採取的特定樣本係源自哪個固定層析管柱。因此，取樣的量應包括連續層析系統的一或甚至二個非特定管柱之溶離液。為了排除不同層析管柱之影響，CFI 內某些樣品點係取樣二次。第一樣本係在一個切換時間(17.3 min)內所採集。之後，中斷半個切換時間(8.65 min)，然後再繼續採取另一個切換時間的樣本。在取樣中斷期間，三向活塞的位置並未改變。將通過樣品點的連續液流入料至廢液容器中。以此程序，在取樣系統內不會留有殘餘液體。殘餘液體可能會暴露於低 pH 值一段長的滯留時間且因而歪曲了結果。

在為了定出使用均質環(HL)和旋流變流器(CFI)特質所進行的水和 NaCl 溶液實驗之結果的幫助下，測定出對應取樣點的滯留時間。RTD 測量結果可參見圖 4。

如上所提及的，CFI 係設計用來傳遞 120 min 的最小滯留時間。

在進行實驗之前，係進行細胞毒性和干擾分析。必要的最終樣本稀釋度經測定為 1:54。在此稀釋倍數下，對於細胞生長並無影響並可觀察到病毒複製。

二種連續層析模式之 pH 和電導率之測量值顯示為周期性波動行為。再者，可看到 HL 以及部分 CFI 的阻滯效應(dampening effect)。

參考文獻

Klut, S.; Magnus, J.; Lobedann, M.; Schwan, P.; Maiser, B.; Niklas, J.; Temming, M.; Schembecker, G. (2015): *Developing the biofacility of the future based on continuous processing and single-use technology. In Journal of Biotechnology 213, pp. 120–130*

Klutz, S.; Kurt, S. K.; Lobedann, M.; Kockmann, N. (2015): Narrow residence time distribution in tubular reactor concept for Reynolds number range 10-100. In Chemical Engineering Research and Design 95, pp. 22–33

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

無

【序列表】 (請換頁單獨記載)

無

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

連續性病毒清除之驗證

VALIDATION OF CONTINUOUS VIRAL CLEARANCE

【中文】

本文係揭示用於驗證連續病毒清除之方法，其包括下列步驟：提供一所欲驗證的探針，以一有效的方式摻加(spiking)探針，進行病毒清除，採取摻加探針之樣本以及分析步驟d)之摻加探針樣本。

【英文】

Disclosed herein is a method for validation of continuous viral clearance comprising the steps of providing a probe to be validated, spiking the probe in a valid manner, performing viral clearance, sampling the spiked probe and analyzing the sample of the spiked probe of step d).

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

1. 一種用於驗證連續病毒清除之方法，其係包括下列步驟
 - a) 提供一所欲驗證的探針，
 - b) 以有效的方式摻加探針，
 - c) 進行病毒清除，
 - d) 採取摻加探針的樣本及
 - e) 分析步驟 d)之摻加探針的樣本。
2. 根據請求項 1 之方法，其中該探針為一流體及/或產物流。
3. 根據請求項 1 或 2 之方法，其中步驟 d)之採取摻加探針樣本係包括取樣一段預定的時間。
4. 根據前述請求項中任一項之方法，其中步驟 b)之以有效的方式摻加樣本係包括在均質後摻加樣本。
5. 根據前述請求項中任一項之方法，其中在步驟 c)中病毒清除為病毒滅活。
6. 根據前述請求項中任一項之方法，其中在步驟 c)中病毒清除為在 CFI 中進行之病毒滅活。
7. 根據前述請求項中任一項之方法，其中採取摻加探針樣本之步驟係包括顛倒(back to front)取樣。
8. 根據前述請求項中任一項之方法，其中採取摻加探針樣本之步驟係包括當每滴探針進入取樣容器時立即將其中和。
9. 根據前述請求項中任一項之方法，其中步驟 d)之分析摻加探針係包括測定是否有病毒粒子存在。
10. 根據前述請求項中任一項之方法，其中步驟 d)之分析摻加探針係包括定量出病毒粒子。
11. 根據請求項 1 至 10 中任一項之方法的用途，係用於製造治療性蛋白之連續方法中。

圖式

圖 1

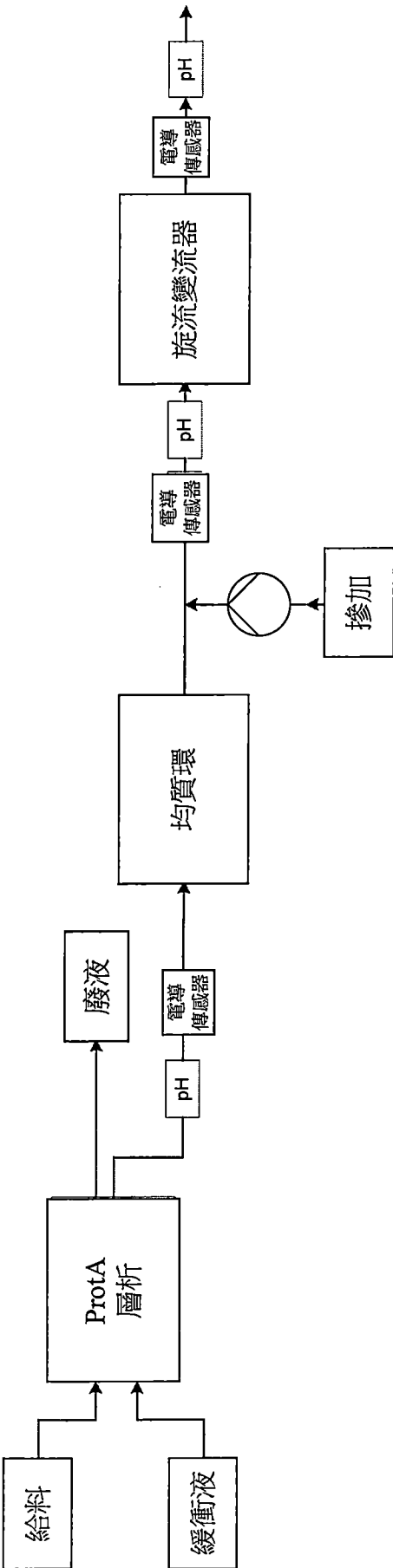


圖 2

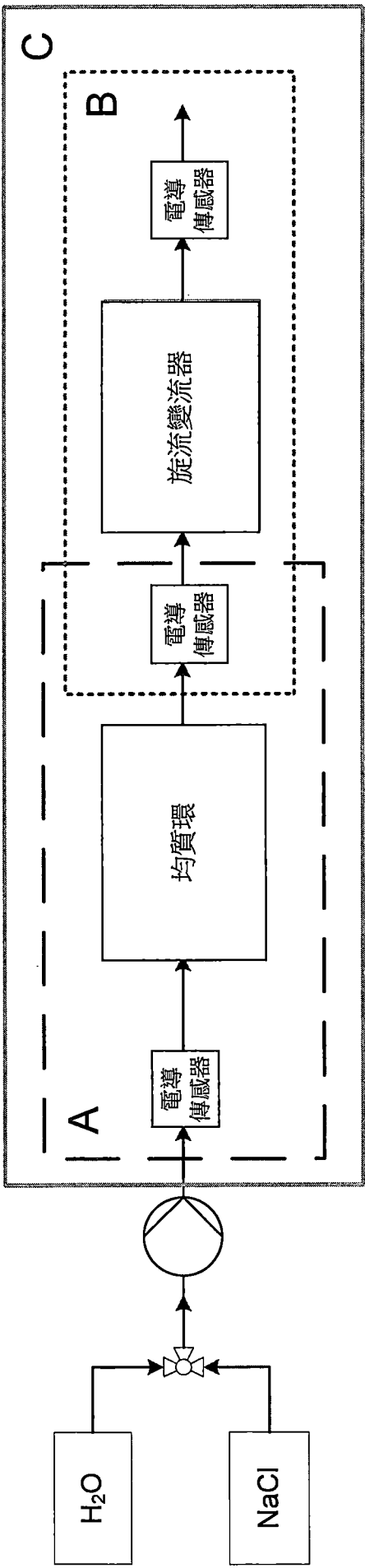


圖 4

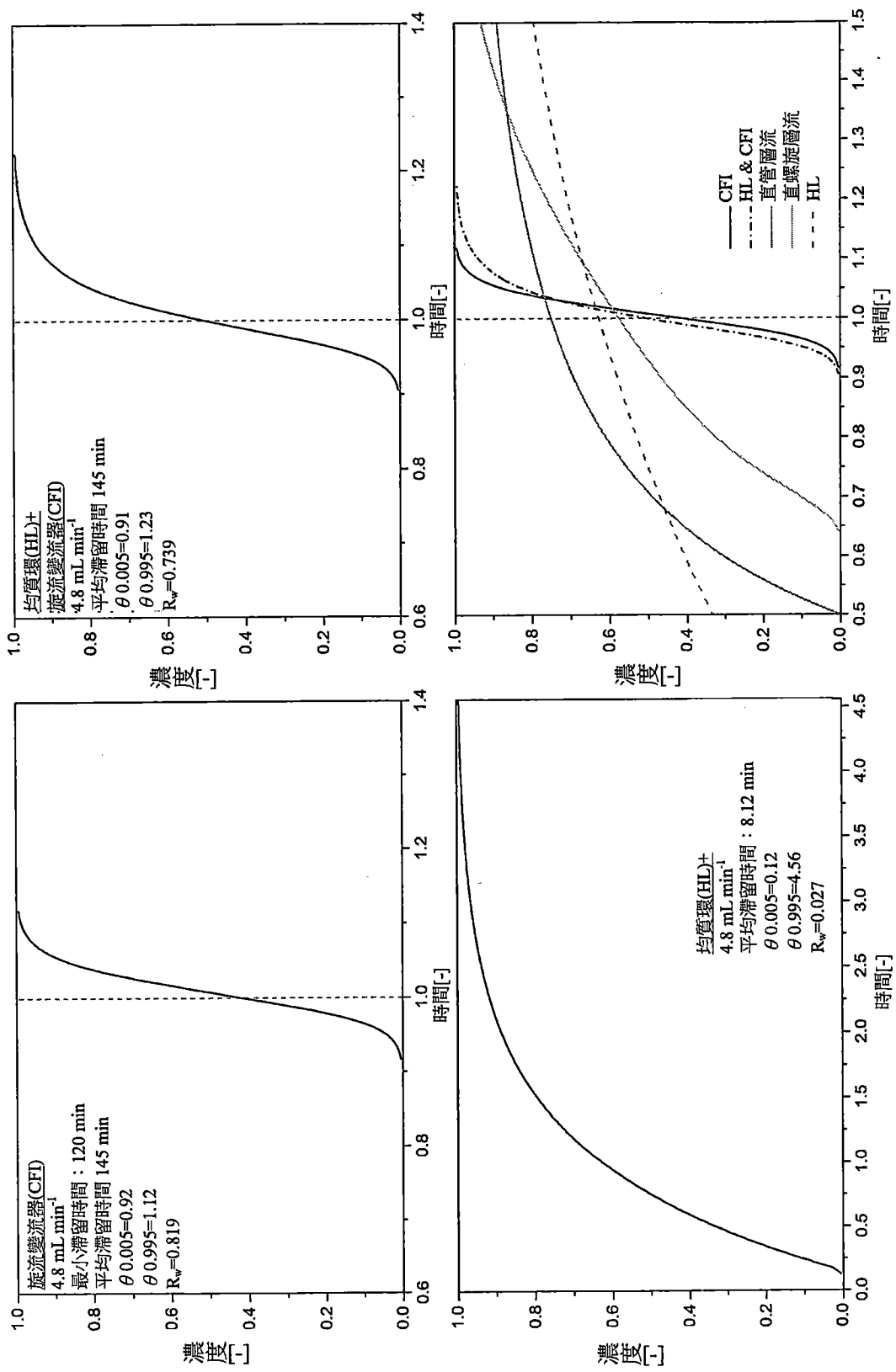


圖 6

