



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113444620 B

(45) 授权公告日 2024.03.29

(21) 申请号 202110234907.4

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(22) 申请日 2014.09.16

专利代理人 封新琴

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113444620 A

(51) Int.CI.

C12M 1/12 (2006.01)

(43) 申请公布日 2021.09.28

C12M 1/00 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

(30) 优先权数据

61/878,502 2013.09.16 US

(56) 对比文件

CN 1713951 A, 2005.12.28

(62) 分案原申请数据

201480062402.2 2014.09.16

US 2011011486 A1, 2011.01.20

(73) 专利权人 建新公司

US 6022742 A, 2000.02.08

地址 美国马萨诸塞州

US 6544424 B1, 2003.04.08

审查员 王碧燕

(72) 发明人 周航 B·赖特 M·于 尹进

K·康斯坦丁诺夫

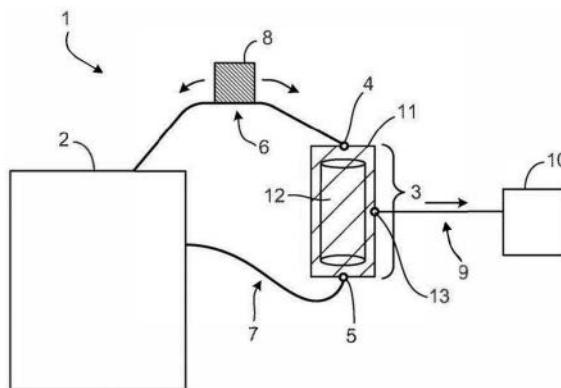
权利要求书3页 说明书34页 附图13页

## (54) 发明名称

用于处理细胞培养物的方法和系统

## (57) 摘要

本文提供了处理细胞培养物的方法和开放回路过滤系统。所述过滤系统包含具有独立入口和出口端口的切向流过滤(TFF)单元，其与细胞培养生物反应器和经调试使得通过所述过滤单元的流体流逆转的泵相连。



1. 一种处理细胞培养物的方法,所述方法包括:
  - (a) 提供开放回路过滤装置,其包括含有细胞培养物的冷藏储存罐,具有第一和第二入口的切向流过滤单元,流体连通所述冷藏储存罐和所述切向流过滤单元第一入口间的第一导管,流体连通所述冷藏储存罐和所述切向流过滤单元第二入口间第二导管,和至少一个置于所述装置中用于使流体流通所述装置的泵,其中配置所述装置进而流体经由所述至少一个泵从所述冷藏储存罐可逆地流通所述装置并流通所述第一和第二导管和所述切向流过滤单元,并从切向流过滤单元收集滤液;
  - (b) 使细胞培养物以第一流动方向持续第一时间段从所述冷藏储存罐流通所述第一和第二导管和所述切向流过滤单元;
  - (c) 逆转所述第一流动方向并使所述细胞培养物以第二流动方向持续第二时间段流通所述第一和第二导管和所述切向流过滤单元;
  - (d) 逆转所述第二流动方向并使所述培养物以第一流动方向持续第三时间段流通所述第一和第二导管和所述切向流过滤单元;
  - (e) 重复步骤(c) - (d) 至少两次;并
  - (f) 收集滤液。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一和第二导管之一或两者包括生物相容性管。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述切向流过滤单元包括单交叉流过滤器。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述单交叉流过滤器是管状交叉流过滤器。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述切向流过滤单元包括两个或更多个交叉流过滤器。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述装置包括置于所述第一导管、所述第二导管或两者中的一个或多个额外的切向流过滤单元。
7. 根据权利要求3-5任一项所述的方法,其中所述交叉流过滤器具有0.2微米的平均孔径。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一个泵置于所述第一导管或所述第二导管或两者中。
9. 根据权利要求6所述的方法,其中所述至少一个泵置于任何两个切向流过滤单元间的装置中。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一个泵置于所述冷藏储存罐中并接近所述第一导管或所述第二导管。
11. 根据权利要求1和8-10任一项所述的方法,其中所述至少一个泵是低湍流泵。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述低湍流泵是蠕动泵。
13. 根据权利要求11所述的方法,其中所述装置包括第一和第二低湍流泵,其中所述第一低湍流泵以第一方向使所述细胞培养物流动,且所述第二低湍流泵以第二方向使所述细胞培养物流动。
14. 根据权利要求11所述的方法,其中所述装置包括单低湍流泵,其中所述单低湍流泵

在第一和第三时间段使所述细胞培养物以第一方向流动且在第二时间段使所述细胞培养物以第二方向流动。

15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一、第二和第三时间段为30秒至15分钟。
16. 根据权利要求1所述的方法,其中所述细胞培养物以0.5 L/分钟至80 L/分钟的速率在(a)、(b)和(c)的一步或多步中流动。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述细胞培养物以3.0 L/分钟至60 L/分钟的速率在(a)、(b)和(c)的一步或多步中流动。
18. 根据权利要求1所述的方法,其中(b)和(c)的单次重复导致多于50%的交换百分数。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中(b)和(c)的单次重复后的交换百分数多于60%。
20. 根据权利要求19所述的方法,其中(b)和(c)的单次重复后的交换百分数多于75%。
21. 根据权利要求1所述的方法,其中所述滤液不包含哺乳动物细胞。
22. 根据权利要求1所述的方法,其中所述细胞培养物包含分泌重组蛋白且所述滤液包含分泌重组蛋白。
23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述分泌重组蛋白是抗体或其抗原结合片段、生长因子、细胞因子或酶,或其组合。
24. 根据权利要求22所述的方法,其进一步包括从所述滤液分离所述分泌重组蛋白。
25. 根据权利要求24所述的方法,其中分离使用包括通过至少一个多重柱层析系统的分离的整合和连续步骤实施。
26. 根据权利要求24所述的方法,其进一步包括通过将分离的重组蛋白与药物上可接受的赋形剂或缓冲剂混合配制治疗性药物物质。
27. 根据权利要求1所述的方法,其中所述细胞培养物或滤液或两者是无菌的。
28. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法连续实施14天至80天的时间段。
29. 根据权利要求1所述的方法,其中(b)和(c)的单次重复后的外部停留时间为1秒至20秒。
30. 根据权利要求29所述的方法,其中(b)和(c)的单次重复后的外部停留时间为1秒至13秒。
31. 一种开放回路过滤装置,其包括冷藏储存罐、具有第一和第二入口的切向流过滤单元,流体连通所述冷藏储存罐和所述切向流过滤单元第一入口的第一导管,和流体连通所述冷藏储存罐和所述切向流过滤单元第二入口的第二导管,和至少一个置于所述装置中的泵,其中驱动所述至少一个泵使流体可逆地从所述冷藏储存罐流通所述装置、流通所述第一导管、所述切向流过滤单元、所述第二导管并流回至所述冷藏储存罐。
32. 根据权利要求31所述的开放回路过滤装置,其中所述第一和第二导管之一或两者包括生物相容性管。
33. 根据权利要求31所述的开放回路过滤装置,其中所述切向流过滤单元包括单交叉流过滤器。
34. 根据权利要求33所述的开放回路过滤装置,其中所述单交叉流过滤器是管状交叉流过滤器。
35. 根据权利要求31所述的开放回路过滤装置,其中所述切向流过滤单元包括两个或更多个交叉流过滤器。

36. 根据权利要求31所述的开放回路过滤装置,其中所述装置包括置于所述第一导管、所述第二导管或两者中的一个或多个额外的切向流过滤单元。

37. 根据权利要求33-35任一项所述的开放回路过滤装置,其中所述交叉流过滤器具有0.2微米的平均孔径。

38. 根据权利要求31所述的开放回路过滤装置,其中所述至少一个泵置于所述第一导管或所述第二导管或两者中。

39. 根据权利要求36所述的开放回路过滤装置,其中所述至少一个泵置于任何两个切向流过滤单元间的装置中。

40. 根据权利要求31所述的开放回路过滤装置,其中所述至少一个泵置于所述冷藏储存罐中并接近所述第一导管或所述第二导管。

41. 根据权利要求31和38-40任一项所述的开放回路过滤装置,其中所述至少一个泵是低湍流泵。

42. 根据权利要求41所述的开放回路过滤装置,其中所述低湍流泵是蠕动泵。

43. 根据权利要求41所述的开放回路过滤装置,其中所述装置包括第一和第二低湍流泵,其中所述第一低湍流泵适于使细胞培养物以第一流动方向流动,且所述第二低湍流泵适于逆转所述第一流动方向并使细胞培养物以第二流动方向流动。

44. 根据权利要求41所述的开放回路过滤装置,其中所述装置包括适于可逆地使细胞培养物以第一和第二流动方向流动的单低湍流泵。

45. 根据权利要求42所述的开放回路过滤装置,其中所述蠕动泵具有20 mL至250 mL的泵头体积。

46. 根据权利要求31所述的开放回路过滤装置,其进一步包括滤液储存罐和流体连通所述切向流过滤单元和所述滤液储存罐间的滤液导管。

47. 根据权利要求31所述的开放回路过滤装置,其进一步包括生物制造系统,所述生物制造系统包括至少一个多重柱层析系统和入口和出口和流体连通所述切向流过滤单元和所述生物制造系统入口间的滤液导管,其中配置所述装置进而滤液流入所述生物制造系统的入口,通过所述至少一个多重柱层析系统并通过所述生物制造系统的出口排出所述装置。

48. 根据权利要求31所述的开放回路过滤装置,其中所述切向流过滤单元置于外罩中。

## 用于处理细胞培养物的方法和系统

[0001] 本申请是申请日为2014年9月16日、申请号为201480062402.2、发明名称为“用于处理细胞培养物的方法和系统”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关文献的交叉引用

[0003] 本申请要求保护2013年9月16日提交的美国临时专利申请号61/878,502的优先权，其全部内容在本文通过提述并入。

### 技术领域

[0004] 本发明涉及处理细胞培养物的方法和生物技术，且更具体地，涉及连续处理灌注生物反应器中细胞培养物的方法。

### 背景

[0006] 哺乳动物细胞经常用于产生治疗性蛋白。在一些处理方法中，哺乳动物培养在灌注生物反应器中，将一定体积的包括重组蛋白的细胞培养物从生物反应器去除，并添加新的培养基以替换所述体积。在这种灌注培养方法中，经常过滤去除细胞培养物以保持哺乳动物细胞在生物反应器中用于进一步重组蛋白的生产，同时回收包括重组蛋白的培养基（有时称为“耗竭的培养基”）。

[0007] 用于从灌注生物反应器过滤细胞培养物的常规方法和装置具有数项劣势。举例来说，改变切向流过滤(ATF)的封闭系统导致细胞培养物在控制生长条件的生物反应器外花费一段较长的时间（长外部停留时间），且无逆向流动的传统的单向切向流过滤(TFF)引起过滤器结垢。由此，常规灌注生物反应器方法经常涉及在控制生长条件的生物反应器外花费一段较长时间的细胞培养物，导致活细胞密度、百分比活力以及培养比生产率和体积生产率的减少。此外，之前的方法经常导致系统过滤器的不完全冲洗，使得过滤器结垢。

### 发明概述

[0009] 申请人发现了开放回路过滤系统（与常规单向开放回路或双向闭合回路过滤系统相对，其提供穿过交叉流过滤器的表面的可逆切向流体流动）提供了增加的活细胞密度、增加的百分比活细胞、增加的比生产率和/或体积生产率，增加的比葡萄糖消耗和减少的过滤器结垢。

[0010] 本文给出的开放回路过滤系统提供了用于产生和收获重组蛋白的最佳条件，例如，如与其他单向开放回路过滤系统（例如单向TFF系统）或双向闭合回路过滤系统（闭合回路ATF<sup>TM</sup>系统）相比，减少细胞培养物外部体积（贮液器外）、增加交换百分数（例如第一导管、TFF单元和第二导管内）、减少细胞培养物的外部停留时间（贮液器外）、减少细胞培养物过滤过程中的剪切应力、改善细胞培养物中的细胞活力、提高细胞培养物中的活细胞密度和/或减少过滤器结垢（由于过滤器的更佳冲洗）中的一种或多种。相应地，本文提供了开放回路过滤系统，其包括贮液器（例如生物反应器）、具有第一和第二入口的切向流过滤(TFF)单元，流体连通所述贮液器和所述TFF单元第一入口间的第一导管，和流体连通所述贮液器和所述TFF单元第二入口间的第一导管，和至少一个置于系统中的泵，进而驱动至少一个泵使流体可逆地从所述贮液器流通所述系统、流通所述第一导管、TFF单元、第二导管，并流回至

储液器。还提供了处理细胞培养物的方法,其包括(a)提供开放回路过滤系统(例如任何本文所述的开放回路过滤系统),(b)使细胞培养物从贮液器以第一流动方向持续第一时间段流通TFF单元,(c)逆转所述第一流动方向并使细胞培养物以第二流动方向持续第二时间段流通TFF单元,(d)逆转第二流动方向并使培养物以第一流动方向持续第三时间段流通TFF单元,(e)重复步骤(c)-(d)至少两次;并(f)收集滤液。

[0011] 本文提供了处理细胞培养物的方法。这些方法包括下列步骤:a)提供开放回路过滤系统,其包括含有细胞培养物的贮液器、具有第一和第二入口的切向流过滤(TFF)单元,流体连通所述贮液器和所述TFF单元第一入口间的第一导管,和流体连通所述贮液器和所述TFF单元第二入口间的第一导管,和至少一个置于所述系统用于使流体流通所述系统的泵,其中配置所述系统进而使流体能够经由所述至少一个泵可逆地从或至贮液器流通所述系统,并流通第一和第二导管和TFF单元,并可从TFF单元收集滤液;(b)使细胞培养物从所述贮液器以第一流动方向持续第一时间段流通TFF单元,(c)逆转所述第一流动方向并使细胞培养物以第二流动方向持续第二时间段流通TFF单元;(d)逆转所述第二流动方向并使所述培养物以第一流动方向持续第三时间段流通TFF单元;(e)重复步骤(c)-(d)至少两次;并(f)收集所述滤液。在一些实例中,所述贮液器是生物反应器或冷藏储存罐。在一些实例中,第一和第二导管之一或两者包括生物相容性管。TFF单元可包括单交叉流过滤器(例如管状交叉流过滤器)或可包括两个或多个交叉流过滤器。

[0012] 在一些实例中,所述系统包括置于所述第一导管、所述第二导管,或两者中的一个或多个额外的TFF单元。在一些实例中,所述交叉流过滤器具有约0.2微米的平均孔径。

[0013] 在一些实例中,所述至少一个泵置于所述第一导管或所述第二导管或两者中。在其他实例中,所述至少一个泵置于任何两个TFF单元间的系统中。在一些实施方案中,所述至少一个泵置于所述贮液器中并接近所述第一或所述第二流体导管。在本文所述的全部方法的一些实施方案中,所述至少一个泵是低湍流泵(LTP)(例如蠕动泵)。在一些实例中,所述系统包括第一和第二LTP,其中所述第一LTP以第一方向使细胞培养物流动且所述第二LTP以第二方向使细胞培养物流动。在一些实施方案中,所述系统包括单LTP,其中所述单LTP在第一和第三时间段使所述细胞培养物以第一方向流动且在第二时间段使所述细胞培养物以第二方向流动。

[0014] 在本文所述的任何方法中,所述第一、第二和第三时间段为约30秒至约15分钟。在一些实施方案中,所述细胞培养物以约0.5L/分钟至约80L/分钟(例如约3.0L/分钟至约60L/分钟)的速率在(a)、(b)和(c)的一步或多步中流动。

[0015] 在一些实施方案中,(b)和(c)的单次重复导致多于50%的交换百分数。在一些实例中,所述滤液不包含哺乳动物细胞。在一些实施方案中,所述细胞培养物包含分泌重组蛋白且所述滤液包含分泌重组蛋白。在一些实施方案中,所述分泌重组蛋白是抗体或其抗原结合片段、生长因子、细胞因子或酶,或其组合。一些实施方案进一步包括从所述滤液分离所述分泌重组蛋白的步骤。举例来说,分离可以使用包括通过至少一个多重柱层析系统(MCCS)的分离的整合和连续步骤实施。一些实施方案进一步包括通过将分离的重组蛋白与药物上可接受的赋形剂或缓冲剂混合配制治疗性药物物质的步骤。在一些实施方案中,所述细胞培养物或滤液或两者是无菌的。在一些实例中,所述方法连续实施约14天至约80天的时间段。

[0016] 还提供了开放回路过滤系统,其包括贮液器、具有第一和第二入口的切向流过滤(TFF)单元,流体连通所述贮液器和所述TFF单元第一入口间的第一导管,和流体连通所述贮液器和所述TFF单元第二入口间的第一导管,和至少一个置于系统中的泵,其中驱动所述至少一个泵使流体可逆地从所述贮液器流通所述系统、流通所述第一导管、所述TFF单元、所述第二导管,并流回所述贮液器。在一些实例中,所述贮液器是生物反应器或冷藏储存罐。在一些实施方案中,所述第一和第二导管之一或两者包括生物相容性管。在一些实施方案中,所述TFF单元包括单交叉流过滤器(例如管状交叉流过滤器)。在一些实施方案中,所述TFF单元包括两个或多个交叉流过滤器。在一些实例中,所述系统包括置于所述第一导管、所述第二导管,或两者中的一个或多个额外的TFF单元。在一些系统中,所述交叉流过滤器具有约0.2微米的平均孔径。

[0017] 在本文所述的系统的一些实施方案中,所述至少一个泵置于所述第一导管或所述第二导管或两者中。在其他实施方案中,所述至少一个泵置于任何两个TFF单元间的系统中。在其他实例中,所述至少一个泵置于所述贮液器中并接近所述第一或所述第二流体导管。在本文所述的任何系统中,所述至少一个泵是低湍流泵(LTP)(例如蠕动泵)。在一些实施方案中,所述系统包括第一和第二LTP,其中所述第一LTP适于使细胞培养物以第一流动方向流动且所述第二LTP适于逆转所述第一流动方向并使细胞培养物以第二流动方向流动。在其他实施方案中,所述系统包括适于可逆地使细胞培养物以第一和第二流动方向流动的单LTP。在一些实施方案中,所述蠕动泵具有约20mL至约250mL的泵头体积。

[0018] 本文所述系统的一些实施方案进一步包括滤液储存罐和流体连通所述TFF单元和所述滤液储存罐的滤液导管。本文所述系统的一些实施方案进一步包括生物制造系统,所述生物制造系统包括至少一个多重柱层析系统(MCCS)和入口和出口和流体连通TFF单元和所述生物制造系统入口间的滤液导管,其中配置所述装置进而滤液流入所述生物制造系统的入口,通过所述至少一个MCCS并通过所述生物制造系统的出口排出所述装置。在本文所述的任何系统中,所述TFF单元置于外罩中。

[0019] 如本文使用的名词前的词语“一个”或“多个”表示一个或多个特定的名词。举例来说,短语“一个哺乳动物细胞”表示“一个或多个哺乳动物细胞”,且短语“多个微载体”意为“一个或多个微载体”。

[0020] 术语“哺乳动物细胞”意为任何来自或源自任何哺乳动物(例如人、仓鼠、小鼠、绿猴、大鼠、猪、牛或兔)的细胞。在一些实施方案中,所述哺乳动物细胞可以是例如永生细胞、分化细胞或未分化的细胞。

[0021] 术语“细胞培养物”意为悬浮于液体培养基(例如本文所述的任何液体培养基)中的多个哺乳动物细胞(例如任何本文所述的哺乳动物细胞)。细胞培养物可具有多于约 $0.1 \times 10^6$ 细胞/mL(例如多于约 $1 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $5 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $10 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $15 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $20 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $25 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $30 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $35 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $40 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $45 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $50 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $55 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $60 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $65 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $70 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $75 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $80 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $85 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $90 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $95 \times 10^6$ 细胞/mL或多于 $100 \times 10^6$ 细胞/mL)的细胞密度。在一些实例中,细胞培养物中存在的哺乳动物细胞附着至微载体(例如任何本文所述的或

本领域已知的微载体)。

[0022] 术语“生物反应器”为本领域已知且意为在允许哺乳动物细胞在液体培养基中维持或生长的一组受控的物理条件下温育细胞培养物的容器。举例来说，所述生物反应器可在允许哺乳动物细胞在细胞培养物中产生并分泌重组蛋白的条件下温育细胞培养物。举例来说，生物反应器通常包括O<sub>2</sub>和N<sub>2</sub>喷射器、热护套、一个或多个流体端口和搅拌系统。本文描述了生物反应器的非限制性实例。生物反应器的其他实例为本领域已知。

[0023] 术语“开放回路过滤系统”意为贮液器(例如生物反应器)和在贮液器初始并结束的连续闭合流体回路，并包括TFF单元，通过该TFF单元在闭合流体回路中的流体(例如细胞培养物)可传至和来自贮液器(以第一或第二流动方向)，通过TFF单元并流回贮液器。开放回路过滤系统还包括至少一个适于将流体(例如细胞培养物)泵至贮液器和/或从贮液器泵出并通过TFF单元并流回至所述贮液器的泵。

[0024] 术语“切向流过滤单元”或“TFF单元”为本领域已知且意为包括至少一个外罩(如圆筒)和至少一个置于外罩中的交叉流过滤器进而大部分的过滤表面处于与通过所述单元的流体(例如细胞培养物)流平行位置的装置。TFF单元为本领域已知且可商业获得。示例性的商业可获得的TFF单元包括Minimate™ TFF胶囊(Pall Corporation)、Vivaflow®50和200系统(Sartorius)、BioCap 25、E0170、E0340和E1020胶囊(3M)和ATF4过滤器(Refine Technology)。外罩可包括第一入口/出口和第二入口/出口，其处于例如允许流体通过第一入口/出口、穿过至少一个交叉流过滤器并通过第二入口/出口的位置。在一些实例中，开放回路过滤系统可包括多重TFF单元，例如串联和/或平行连接。举例来说，包括两个或多个TFF单元的系统可包括流体性连接系统中邻近的TFF单元对的流体导管。在其他实例中，系统可包括两组或多组由流体导管流体性连接的两个或多个TFF单元。任何本文所述或本领域已知的TFF单元能够接受第一流动方向和第二流动方向的流体。

[0025] 术语“交叉流过滤器”为本领域已知且意为经设计进而其可位于TFF单元中进而大部分的过滤器表面与流体(例如细胞培养物)的流动(例如第一和第二流动方向)平行的过滤器。举例来说，交叉流过滤器可具有任何允许切向流过滤的形状，例如管状或矩形形状。特别有用的交叉流过滤器经设计使得当流体以第一和第二方向流过交叉流过滤器的表面时，导致流体(例如细胞培养物)中具有少量的流体湍流或剪切应力。交叉流过滤器为商业可获得，例如来自Sartorius、MembraPure、Millipore和Pall Corporation。

[0026] 术语“低湍流泵”或“LTP”为本领域已知且意为可在系统内以单方向(例如第一或第二流动方向)移动流体(例如细胞培养物)或使流体在系统内以两个方向(第一和第二流动方向)可逆流动但不在流体(例如细胞培养物)中诱导大量的剪切应力或流体湍流的装置。当将LTP用于使流体(例如细胞培养物)以交替的第一和第二流动方向流动时，第二流动方向与第一流动方向大致相反。LTP的一个实例是蠕动泵。LTP的其他实例为本领域已知。

[0027] 术语“逆转流动”或“逆转流动方向”为本领域的技术人员已知。举例来说，本领域的技术人员将理解的是逆转流体的流动意为改变流体的整体流动方向以大体上使整体流动方向相反(例如本文所述的任何方法或系统中的细胞培养物的流动方向)。

[0028] 术语“交换百分数”意为使流体以第一方向持续第一时间段流通贮液器外的开放回路过滤系统组件(例如通过第一导管、至少一个TFF单元和第二导管)并使流体以第二方向持续第二时间段流动后返回至贮液器的流体(例如细胞培养物)百分比。

[0029] 术语“基本上没有/不含”意为至少或约90%没有(例如至少或约95%、96%、97%、98%，或至少或约99%没有或约100%没有)特定物质(例如哺乳动物细胞或宿主哺乳动物细胞蛋白或核酸)的组合物(例如液体或固体)。举例来说,使用本文所述的方法生成的滤液可基本上没有哺乳动物细胞或微载体。在另一实例中,使用任何本文所述的方法分离的重组蛋白可基本上没有宿主哺乳动物细胞蛋白、核酸和/或污染病毒。

[0030] 术语“培养”或“细胞培养”意为在液体培养基中在一组受控的物理条件下哺乳动物细胞的维持和生长。

[0031] 术语“液体培养基”意为包括足够营养以允许哺乳动物细胞在体外培养中生长的流体。举例来说,液体培养基可包括一种或多种的:氨基酸(例如20种氨基酸)、嘌呤(例如次黄嘌呤)、嘧啶(例如胸腺嘧啶)、胆碱、肌醇、硫胺素、叶酸、生物素、钙、烟酰胺、吡哆醇、核黄素、胸腺嘧啶、氰钴胺素、丙酮酸、硫辛酸、镁、葡萄糖、钠、钾、铁、铜、锌、硒和其它必需的痕量金属,和碳酸氢钠。液体培养基可包括来自哺乳动物的血清。在一些实例中,液体培养基不包括来自哺乳动物的血清或另一提取物(限定的液体培养基)。液体培养基可包括痕量金属、哺乳动物生长激素和/或哺乳动物生长因子。液体培养基的非限制性实例描述于本文且其他实例为本领域已知且为商业可获得。

[0032] 术语“微载体”意为具有 $20\mu\text{m}$ 至约 $1000\mu\text{m}$ 大小、包括允许或促进哺乳动物细胞(例如任何本文所述或本领域已知的哺乳动物细胞)附着的表面的颗粒(例如有机聚合物)。微载体可包括一个或多个孔(例如具有约 $10\mu\text{m}$ 至约 $100\mu\text{m}$ 的平均直径的孔)。微载体的非限制性实例描述于本文。微载体的其他实例为本领域已知。微载体可包括例如聚合物(例如纤维素、聚乙二醇或聚(乳酸-共-乙醇酸))。

[0033] 术语“没有源自动物的组分的液体培养基”意为不包括任何源自动物的组分(例如蛋白或血清)的液体培养基。

[0034] 术语“没有血清的液体培养基”意为不包括动物血清的液体培养基。

[0035] 术语“包括血清的液体培养基”意为包括动物血清的液体培养基。

[0036] 术语“化学上限定的液体培养基”意为其中基本上全部化学组分为已知的液体培养基。举例来说,化学上限定的液体培养基不包括胎牛血清、牛血清白蛋白或人血清白蛋白,由于这些制剂通常包括白蛋白和脂质的复杂混合物。

[0037] 术语“没有蛋白的液体培养基”意为不包括任何蛋白的液体培养基(例如任何可检测的蛋白)。

[0038] 术语“免疫球蛋白”意为包括免疫球蛋白(例如可变结构域序列、框架序列或恒定结构域序列)的至少15个氨基酸(例如至少20、30、40、50、60、70、80、90或100个氨基酸)的氨基酸序列的多肽。免疫球蛋白可举例来说包括轻链免疫球蛋白的至少15个氨基酸和/或重链免疫球蛋白的至少15个氨基酸。免疫球蛋白可以是分离的抗体(例如IgG、IgE、IgD、IgA或IgM)。免疫球蛋白可以是IgG的亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)。免疫球蛋白可以是抗体片段,例如Fab片段、 $\text{F(ab')}_2$ 片段或scFv片段。免疫球蛋白还可以是双特异性抗体或三特异性抗体或二聚体、三聚体或多聚体抗体,或双抗体、Affibody®或Nanobody®。免疫球蛋白还可以是工程化的包括至少一个免疫球蛋白结构域的蛋白(例如融合蛋白)。免疫球蛋白的非限制性实例描述于本文且其他免疫球蛋白的实例为本领域已知。

[0039] 术语“蛋白片段”或“多肽片段”意为多肽序列的一部分,其长度为至少或约4个氨

基酸，例如至少或约5个氨基酸、至少或约6个氨基酸、至少或约7个氨基酸、至少或约8个氨基酸、至少或约9个氨基酸、至少或约10个氨基酸、至少或约11个氨基酸、至少或约12个氨基酸、至少或约13个氨基酸、至少或约14个氨基酸、至少或约15个氨基酸、至少或约16个氨基酸、至少或约17个氨基酸、至少或约18个氨基酸、至少或约19个氨基酸或至少或约20个氨基酸或长度多于20个氨基酸。重组蛋白片段可使用本文所述的任何方法产生。

[0040] 术语“工程化蛋白”意为并非天然由在生物体(例如哺乳动物)内存在的内源核酸编码的多肽。工程化蛋白的实例包括酶(例如具有一个或多个导致工程化酶的稳定性和/或催化活性增加的氨基酸取代、缺失、插入或添加)、融合蛋白、抗体(例如二价抗体、三价抗体或双抗体)和包括至少一个重组支架序列的抗原结合蛋白。

[0041] 术语“分离”或“分离的”在一些背景中意为从滤液(例如使用当前所述的方法生成的滤液)中存在的一种或多种其他组分(举例来说一种或多种DNA、RNA和/或其他存在于滤液中的蛋白组分)至少部分纯化或纯化(例如按重量至少或约5%，例如至少或约10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或至少或约95%纯的)重组蛋白。用于从滤液分离蛋白的非限制性方法描述于本文且其他为本领域已知。

[0042] 术语“分泌的蛋白”或“分泌重组蛋白”意为当在哺乳动物细胞中翻译时原始包括至少一个分泌信号序列的，且在哺乳动物细胞中至少部分通过酶裂解分泌信号序列至少部分释放入胞外空间(例如液体培养基)的蛋白或重组蛋白。

[0043] 短语“梯度灌注”为本领域已知且指代在培养期过程中(例如以每日为基础的培养基再补给速率)在渐进的时间段中(例如约24-小时的时段，约1分钟至约24小时的时段或多于24小时的时段)去除或添加至初始培养体积的培养基体积的渐进改变(例如增加或减少)。每天去除或替换的培养基百分数可取决于培养的特定细胞、最初的接种密度和在特定时间的细胞密度改变。

[0044] 如本文使用的“比生产率”或“SPR”指每哺乳动物细胞每日产生的重组蛋白的质量或酶活性。重组抗体的SPR经常以质量/细胞/天测量。重组酶的SPR经常以单位/细胞/天或(单位/质量)/细胞/天测量。

[0045] 如本文使用的“体积生产率”或“VPR”指每体积的培养物(例如每L的生物反应器、容器或管体积)每天产生的重组蛋白的质量或酶活性。重组抗体的VPR经常以质量/L/天测量。重组酶的VPR经常以单位/L/天或质量/L/天测量。

[0046] 除非另外限定，本文使用的全部技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员所理解相同的含义。本文描述了用于本发明的方法和材料；也可使用其他适当的本领域已知的方法和材料。材料、方法和实例仅为阐述性的且并非意在限制。本文提及的全部公开、专利申请、专利、序列、数据库条目和其他参考文献通过提述以其整体并入本文。在冲突的情况下，以本说明书(包括定义)为准。

[0047] 本发明的其他特征和优势由下文详述和附图以及从权利要求将显而易见。

[0048] 附图简述

[0049] 图1是显示可用于处理细胞培养物的示例性开放回路过滤系统的示意图。显示的系统包括置于第一导管6中的单泵8。

[0050] 图2是显示包括置于第二导管7中的单泵8的示例性开放回路过滤系统的示意图。

[0051] 图3是显示包括置于贮液器2(例如生物反应器)中并与第一导管6接近的单泵8的示例性开放回路过滤系统的示意图。

[0052] 图4是显示包括分别包括两个交叉流过滤器12的两个TFF单元3的示例性开放回路过滤系统的示意图,其中所述两个TFF单元3通过第三导管14流体性连接,且单泵8置于第三导管14中。

[0053] 图5是显示包括置于第二导管7中的单泵8,并包括数个压力传感器14和流量计15的示例性开放回路过滤系统的示意图。

[0054] 图6是显示包括置于第一导管6中的泵8和置于第二导管7中的泵8的示例性开放回路过滤系统的示意图。

[0055] 图7是显示包括贮液器2和第一和第二亚系统19的示例性开放回路过滤系统的示意图。

[0056] 图8是显示示例性系统中第一流动方向的示意图。

[0057] 图9是显示细胞培养物经过第一时间段以第一流动方向的流动、经过时间段( $t_{r1}$ )的第一流动方向的逆转、细胞培养物以第二流动方向经过第二时间段( $t_2$ )的流动、经过时间段( $t_{r2}$ )的第二流动方向的逆转和细胞培养物以第一流动方向持续第三时间段的流动( $t_3$ )的示意图。在示意图中,F代表细胞培养物流速(L/分钟)。

[0058] 图10是使用本文提供的方法(GC2008 Set6 TFF V24;灰色)或使用ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology)过滤(GC2008 Set5 ATF<sup>TM</sup> V21;黑色)处理的细胞培养物中活细胞密度的图。

[0059] 图11是使用本文提供的方法(灰色)或使用ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology)过滤(黑色)处理的细胞培养物中百分比活细胞的图。

[0060] 图12是使用本文提供的方法(灰色)或使用ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology)过滤(黑色)处理的细胞培养物的容量(pF)的图。

[0061] 图13是使用本文提供的方法(灰色)或使用ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology)过滤(黑色)处理的细胞培养物的活细胞平均直径的图。

[0062] 图14是使用本文提供的方法(灰色)和使用ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology)过滤(黑色)处理的细胞培养物中检测的分泌免疫球蛋白(IgG)的图。

[0063] 图15是使用本文提供的方法(灰色)和使用ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology)过滤(黑色)处理的细胞培养物的体积生产率(g/L/d)的图。

[0064] 图16是使用本文提供的方法(灰色)和使用ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology)过滤(黑色)处理的细胞培养物的比生产率(pg/细胞/天)的图。

[0065] 图17是使用本文提供的方法(灰色)或使用ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology)过滤(黑色)处理的细胞培养物的百分比筛分系数的图。

[0066] 图18是使用本文提供的方法(GC2008 Set6 TFF V24)(灰色)或使用ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology)过滤(黑色)处理的细胞培养物的比葡萄糖消耗(ng/细胞/天)的图。

[0067] 图19是使用本文提供的方法(灰色)或使用ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology)过滤(黑色)处理的细胞培养物的比乳酸盐产生(ng/细胞/天)的图。

[0068] 图20是使用本文提供的方法(灰色)或使用ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology)过滤(黑色)处理的细胞培养物的比有氧葡萄糖消耗(cpmol/细胞/小时)的图。

[0069] 图21是使用本文提供的方法(灰色)或使用ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology)过滤(黑色)

处理的细胞培养物的从葡萄糖收获的乳酸盐收率 (mol/mol) 的图。

[0070] 发明详述

[0071] 本文提供了开放回路过滤系统，其包括贮液器、具有第一和第二入口的TFF单元，流体连通所述贮液器和所述TFF单元第一入口间的第一导管，和流体连通所述贮液器和所述TFF单元第二入口间的第二导管，和至少一个置于系统中的泵，其中驱动所述至少一个泵使流体可逆地从贮液器流通所述系统、流通所述流体导管、TFF单元、第二导管，并流回至贮液器。还提供了处理细胞培养物的方法，其包括使用开放回路过滤系统（例如任何本文所述的开放回路过滤系统）。本文所述的系统和方法在细胞培养物处理过程中提供了举例来说高细胞活力和/或百分比细胞活力。本文提供的系统和方法的其他益处描述于下文。

[0072] 开放回路过滤系统

[0073] 本说明书提供了用于实施本文所述方法的示例性开放回路过滤系统。这些系统经设计以驱动至少一个泵（在系统中）使流体从贮液器可逆流通所述系统、流通第一导管、TFF单元、第二导管，并流回至贮液器。

[0074] 示例性单泵系统

[0075] 系统1的非限制性实例提供于图1中。系统1包括贮液器2，例如生物反应器，第一导管6，第二导管7和包括外罩11和单交叉流管状过滤器12、第一入口4和第二入口5的TFF单元3。所述单交叉流管状过滤器12可具有例如为约0.2μm的孔径。第一导管6流体连通贮液器2和第一入口4间。第二导管7流体连通贮液器2和二入口5间。流体导管6可流体导管7可以是任何类型的生物相容性管，例如硅胶管。TFF单元3可包括单交叉流管状过滤器12，如图1所示，或两个或多个交叉流过滤器。

[0076] 图1中的系统1还包括泵8，例如低湍流泵（LTP），如蠕动泵，其置于第一导管6中。当驱动时，泵8使流体可逆地从贮液器2流通系统，流通第一导管6、TFF单元3、第二导管7，并流回至贮液器2。TFF单元3的外罩11包括滤液出口13。系统1还包括滤液储存罐10和流体连通滤液出口13和滤液储存罐10间的滤液导管9。滤液储存罐10可以是例如冷藏储存罐。滤液导管9可以是任何类型的生物相容性管，例如硅胶管。

[0077] 另一示例性系统1示于图2中，其与示于图1中的相似，除至少LTP在系统的不同部分驱动之外。系统1包括贮液器2，例如生物反应器、第一导管6、第二导管7和包括外罩11和单交叉流管状过滤器12、第一入口4和第二入口5的TFF单元3。单交叉流管状过滤器12可具有例如约0.2μm的孔径。第一导管6流体连通贮液器2和第一入口4间。第二导管7流体连通贮液器2和第二入口5间。流体导管6和流体导管7可以是任何类型的生物相容性管，例如硅胶管。TFF单元3可包括单交叉流管状过滤器12，如图2所示，或可包括一组两个或多个的交叉流过滤器。

[0078] 图2中的系统1还包括泵8，例如低湍流泵（LTP），如蠕动泵，其置于第二导管7中。当驱动时，泵8使流体可逆地从贮液器2流通所述系统、流通第一导管6、TFF单元3、第二导管7，并流回至贮液器2。TFF单元3的外罩11包括滤液出口13。系统1还包括滤液储存罐10和流体连通滤液出口13和滤液储存罐10间的滤液导管9。滤液储存罐10可以是例如冷藏储存罐。滤液导管9可以是任何类型的生物相容性管，例如硅胶管。

[0079] 额外的示例性系统1示于图3中。系统1包括贮液器2例如生物反应器，第一导管6、第二导管7和包括外罩11和单交叉流管状过滤器12、第一入口4和第二入口5的TFF单元3。单

交叉流管状过滤器12可具有例如约 $0.2\mu\text{m}$ 的孔径。第一导管6流体连通贮液器2和第一入口4间。第二导管7流体连通贮液器2和第二入口5间。流体导管6和流体导管7可以是任何类型的生物相容性管，例如硅胶管。TFF单元3可包括单交叉流管状过滤器12，如图3所示，或可包括一组两个或多个的交叉流过滤器。

[0080] 图3中的系统1还包括单泵8，例如低湍流泵(LTP)如蠕动泵，其置于贮液器2中，例如生物反应器，且接近第一导管6。当驱动时，单泵8使流体从贮液器2可逆流通所述系统、流通第一导管6、TFF单元3、第二导管7，并流回至贮液器2。TFF单元3的外罩11包括滤液出口13。系统1还包括滤液储存罐10和流体连通滤液出口13和滤液储存罐10间的滤液导管9。滤液储存罐10可以是例如冷藏储存罐。滤液导管9可以是任何类型的生物相容性管，例如硅胶管。

[0081] 图4所示的示例性系统1与图1-3中阐述的那些相似，除至少在于所述系统包括多重TFF单元。系统1包括贮液器2例如生物反应器，第一导管6、第二导管7和两个TFF单元3，其分别包括：外罩11、第一入口4、第二入口5和两个交叉流过滤器12。两个TFF单元3通过第三导管14流体性连接。每个交叉流过滤器12可具有例如为约 $0.2\mu\text{m}$ 的孔径。第一导管6流体连通贮液器2和两个TFF单元3之一的第一入口4间，且第二导管7流体连通贮液器2和两个TFF单元3中另一个的第二入口5间。第三导管流体连通TFF单元3的第二入口5和另一TFF单元3的一入口4间，如例如在图4中所示。流体导管6、7和14可以是任何类型的生物相容性管，例如硅胶管。如可由本领域的技术人员所理解，TFF单元3能够可替换地包括单交叉流过滤器例如管状交叉流过滤器。

[0082] 图4中的系统1还包括单泵8，例如低湍流泵(LTP)如蠕动泵，其置于第三导管14中。当驱动时，单泵8使流体从贮液器2可逆地流通所述系统，流通第一导管6、TFF单元3、第三导管14、另一TFF单元3、第二导管7，并流回至贮液器2。两个TFF单元3每一个的外罩11包括滤液出口13。系统1还包括两个滤液储存罐10和两个滤液导管9。每个单滤液储存罐10通过滤液导管9流体性连接至TFF单元3中的滤液出口13。滤液储存罐10可以是例如冷藏储存罐。滤液导管9可以是任何类型的生物相容性管，例如硅胶管。

[0083] 额外的示例性系统1示于图5中。系统1包括贮液器2例如生物反应器，第一导管6、第二导管7和包括外罩11和单交叉流管状过滤器12、第一入口4和第二入口5的TFF单元3。交叉流过滤器12可具有例如为约 $0.2\mu\text{m}$ 的孔径、约830纤维/过滤器的纤维支数，包括具有1mm ID和30cm长度并具有 $0.77\text{m}^2$ 的过滤面积的纤维。第一导管6流体连接贮液器2和第一入口4间。第二导管7流体连接贮液器2和第二入口5间。流体导管6和7可以是任何类型的生物相容性管例如硅胶管。流体导管6和7可以是0.5英寸内径(ID)的输送管。

[0084] 图5中的系统1还包括单泵8，例如低湍流泵(LTP)如蠕动泵，其置于第二导管7中。泵8可以是配备了双通道的GORE Sta-Pure管(16mm ID, 4mm壁)的Watson-Marlow蠕动泵620Du。当驱动时，单泵8使流体从贮液器2可逆性地流通所述系统、流通第一导管6、TFF单元3、第二导管7，并流回至贮液器2。TFF单元3的外罩11包括滤液出口13。系统1还包括滤液储存罐10和流体连通滤液出口13和滤液储存罐10间的滤液导管9。滤液储存罐10可以是例如冷藏储存罐。滤液导管9可以是任何类型的生物相容性管，例如硅胶管。系统1还包括置于第一导管6、滤液导管9和第二导管7的每一个中的压力传感器14。压力传感器14可以是PendoTECH PressureMAT<sup>TM</sup>压力传感器。系统1还包括置于第二导管7中的流量计15。流量计

15可以是EM-TEC BioProTT、非侵入性、实时流量计。

[0085] 图5中的系统1还包括端口导管16和端口17,其中端口导管16流体连通第一导管6和端口17间。系统1还可包括置于端口导管16中的夹持物18。端口17和端口导管16可用于通过第一导管6将流体添加入系统1。

[0086] 示例性多重泵系统

[0087] 包括两个泵8的系统1的非限制性实例示于图6中。系统1包括贮液器2例如生物反应器、第一导管6、第二导管7和包括外罩11和单交叉流管状过滤器12、第一入口4和第二入口5的TFF单元3。单交叉流管状过滤器12可具有例如为约 $0.2\mu\text{m}$ 的孔径。第一导管6流体连通贮液器2和第一入口4间。第二导管7流体连通贮液器2和第二入口5间。流体导管6和7可以是任何类型的生物相容性管,例如硅胶管。TFF单元3可包括单交叉流管状过滤器12,如图6所示,或可包括一组两个或多个交叉流过滤器。

[0088] 图6中所示的系统1还包括泵8,例如低湍流泵(LTP)如蠕动泵,其置于第一导管6中,和泵8(低湍流泵(LTP)如蠕动泵),其置于第二导管7中。当驱动时,置于第一导管6中的泵8使流体以第一方向从贮液器2流通系统,流通第一导管6、TFF单元3、第二导管7,并流回至贮液器2。当驱动时,置于第二导管7中的泵8使流体以第二方向(与第一方向相反)从贮液器2流通所述系统、流通第二导管7、TFF单元3、第一导管6,并流回至贮液器2。TFF单元3的外罩11包括滤液出口13。系统1还包括滤液储存罐10和流体连通滤液出口13和滤液储存罐10间的滤液导管9。滤液储存罐10可以是例如冷藏储存罐。滤液导管9可以是任何类型的生物相容性管,例如硅胶管。

[0089] 包括两个或多个亚系统的示例性系统

[0090] 本领域的技术人员将理解的是多重亚系统可添加至所述系统。包括两个或多个亚系统19的示例性系统1示于图7中。系统1包括贮液器2;和第一和第二亚系统19,每个亚系统19包括第一导管6、第二导管7和包括外罩11和单交叉流管状过滤器12、第一入口4和第二入口5的TFF单元3,如图7中所示。单交叉流管状过滤器12可具有例如为约 $0.2\mu\text{m}$ 的孔径。在每个亚系统中,第一导管6流体连通贮液器2和第一入口4间。每个亚系统中的第二导管7流体连通贮液器2和第二入口5。流体导管6和7可以是任何类型的生物相容性管,例如硅胶管。TFF单元3可分别包括单交叉流管状过滤器12,如图7所示,或可各包括一组两个或多个的交叉流过滤器。单交叉流管状过滤器12可具有例如为约 $0.2\mu\text{m}$ 的孔径。

[0091] 图7中的每个亚系统19还包括单泵8,例如低湍流泵(LTP)如蠕动泵,其置于第一导管6中。当驱动时,每个亚系统19中的单泵8使流体可逆地从贮液器2流通所述系统、流通第一导管6、TFF单元3、第二导管7,并流回至贮液器2。两个TFF单元3中每一个的外罩11包括滤液出口13。每个亚系统19还包括滤液储存罐10和流体连接TFF单元3和滤液储存罐10的滤液导管9。滤液储存罐10可以是例如冷藏储存罐。滤液导管9可以是任何类型的生物相容性管,例如硅胶管。

[0092] 额外的示例性系统结构和特征

[0093] 下文描述了可用于贮液器、导管、TFF单元、泵、滤液储存罐、流量计、压力传感器、夹持物、端口和生物制造系统的非限制性示例性结构。

[0094] 贮液器

[0095] 贮液器可以是生物反应器。生物反应器可具有下列体积:例如约1L至约10,000L

(例如约1L至约50L、约50L至约500L、约500L至约1000L、500L至约5000L、约500L至约10,000L、约5000L至约10,000L、约1L至约10,000L、约1L至约8,000L、约1L至约6,000L、约1L至约5,000L、约100L至约5,000L、约10L至约100L、约10L至约4,000L、约10L至约3,000L、约10L至约2,000L或约10L至约1,000L)。本文所述的任何生物反应器可以是灌注生物反应器。示例性生物反应器可购自多个不同的商业供应商(例如Xcellerex (Marlborough, MA) 和 Holland Applied Technologies (Burr Ridge, IL))。

[0096] 可替换地或此外,贮液器可以是储存罐。举例来说,这种冷藏储存罐可容纳包括重组蛋白的细胞培养物持续约5分钟至约一周的时段(例如约5分钟至约6天,约5分钟至约5天,约5分钟至约4天、约5分钟至约3天、约5分钟至约2天、约5分钟至约36小时、约5分钟至约24小时、约5分钟至约12小时)。储存罐中的细胞培养物可在约15°C和约37°C、约20°C和约37°C、约25°C和约37°C、约30°C和约37°C或约20°C和约30°C的温度保存。

[0097] 导管

[0098] 本文所述的导管可以是简单的管例如生物相容性管。有用的管的非限制性实例包括硅橡胶、聚氨酯、聚二噁烷酮(PDO)、聚羟基烷酸酯、聚羟基丁酸酯、聚(癸二酸甘油酯)、聚乙醇酸交酯、聚交酯、聚己酸内酯或聚酸酐,或包括这些和/或其它聚合物的共聚物或衍生物。可替换地或此外,任何本文所述的导管可包括聚氯乙烯。任何导管可具有举例来说约5mm至约50mm的内径(ID)(例如约10mm至约40mm、约10mm至约35mm或约10mm至约30mm,约10mm至约20mm)。导管可以是可焊接输送管。可用于本装置和方法的额外的导管实例和导管特征由本领域的技术人员熟知。

[0099] TFF单元和交叉流过滤器

[0100] 用于任何本文所述的系统或亚系统或方法的TFF单元可包括一个或多个交叉流过滤器。举例来说,本文所述的TFF单元可包括单交叉流过滤器(例如管状交叉流过滤器)。在其他实例中,TFF单元可包括两个或多个(例如三个、四个、五个或六个)交叉流过滤器(例如管状交叉流过滤器)。TFF单元中的两个或多个交叉流过滤器可相同或可不同(例如区别在于数目、类型、形状、表面积或孔径)。在特定的实例中,TFF单元可包括两个管状交叉流过滤器。TFF单元中出现的两个或多个交叉流过滤器形状上可以是弯曲矩形。

[0101] 交叉流过滤器可具有约0.1 $\mu\text{m}$ 至约0.45 $\mu\text{m}$ (例如约0.15 $\mu\text{m}$ 至约0.40 $\mu\text{m}$ 、约0.15 $\mu\text{m}$ 至约0.35 $\mu\text{m}$ 、约0.15 $\mu\text{m}$ 至约0.30 $\mu\text{m}$ 、约0.15 $\mu\text{m}$ 至约0.25 $\mu\text{m}$ )或约0.20 $\mu\text{m}$ 的平均孔径。交叉流过滤器可以是由聚醚砜(PES)组成的光谱过滤器。

[0102] 交叉流过滤器可具有约0.1 $\text{m}^2$ 至约5 $\text{m}^2$ 的表面积(过滤面积)(例如约0.5 $\text{m}^2$ 至约4.5 $\text{m}^2$ 、约0.5 $\text{m}^2$ 至约4.0 $\text{m}^2$ 、约0.5 $\text{m}^2$ 至约3.5 $\text{m}^2$ 、约0.5 $\text{m}^2$ 至约3.0 $\text{m}^2$ 、约0.5 $\text{m}^2$ 至约2.5 $\text{m}^2$ 、约0.5 $\text{m}^2$ 至约2.0 $\text{m}^2$ 、约0.5 $\text{m}^2$ 至约1.5 $\text{m}^2$ 或约0.5 $\text{m}^2$ 至约1.0 $\text{m}^2$ )。交叉流过滤器可具有总数为约500纤维/过滤器至约2500纤维/过滤器的纤维每过滤器(例如约500纤维/过滤器至约2400纤维/过滤器、约500纤维/过滤器至约2300纤维/过滤器、约500纤维/过滤器至约2200纤维/过滤器、约500纤维/过滤器至约2100纤维/过滤器、约500纤维/过滤器至约2000纤维/过滤器、约500纤维/过滤器至约1900纤维/过滤器、约500纤维/过滤器至约1800纤维/过滤器、约500纤维/过滤器至约1700纤维/过滤器、约500纤维/过滤器至约1600纤维/过滤器、约500纤维/过滤器至约1500纤维/过滤器、约500纤维/过滤器至约1400纤维/过滤器、约500纤维/过滤器至约1300纤维/过滤器、约500纤维/过滤器至约1200纤维/过滤器、约500纤维/过滤器至约1100纤维/过滤器)。

至约1100纤维/过滤器、约500纤维/过滤器至约1000纤维/过滤器、约500纤维/过滤器至约900纤维/过滤器、约600纤维/过滤器至约900纤维/过滤器、约700纤维/过滤器至约900纤维/过滤器或约800纤维/过滤器至约900纤维/过滤器)。在一些实例中,交叉流过滤器内的纤维具有约0.05mm至约10mm的内径(例如约0.1mm至约9mm、约0.1mm至约8mm、约0.1mm至约7mm、约0.1mm至约6mm、约0.1mm至约5mm、约0.1mm至约4mm、约0.1mm至约3mm、约0.1mm至约2.5mm、约0.1mm至约2.0mm、约0.1mm至约1.5mm、约0.5mm至约1.5mm或约0.75mm至约1.25mm)。交叉流过滤器中给出的纤维可具有约0.2cm至约200cm的长度(例如约0.2cm至约190cm、约0.2cm至约180cm、约0.2cm至约170cm、约0.2cm至约160cm、约0.2cm至约150cm、约0.2cm至约140cm、约0.2cm至约130cm、约0.2cm至约120cm、约0.2cm至约110cm、约0.2cm至约100cm、约0.2cm至约90cm、约0.2cm至约80cm、约0.2cm至约70cm、约0.2cm至约60cm、约0.2cm至约55cm、约0.2cm至约50cm、约1cm至约45cm、约1cm至约40cm、约1cm至约35cm、约1cm至约35cm、约1cm至约30cm、约1cm至约25cm、约1cm至约20cm、约1cm至约15cm、约1cm至约10cm、约0.1cm至约5cm、约20cm至约40cm或约25cm至约35cm)。交叉流过滤器可具有任何形状,由此过滤器的大部分表面积处于与系统中流体(例如细胞培养物)的流动平行的位置。举例来说,交叉流过滤器可具有管状形状或为弯曲矩形或圆环形。可用于本文所述系统的交叉流过滤器的实例是ATF4过滤器(Refine Technology)。其他交叉流过滤器描述于本文且为本领域已知。

[0103] 本领域的技术人员可以理解的是TFF单元中的交叉流过滤器可容纳在壳体中(例如硬质塑料或金属壳)。外罩可以是任何形状,圆柱形或矩形且经设计进而其可容纳一个或多个交叉流过滤器。外罩可包括允许来自外罩的一个或多个交叉流过滤器插入或去除的表面。

[0104] 一些系统包括两个或多个串联或平行排列的TFF单元。举例来说,在两个或多个TFF单元以串联排列的系统中,流体导管可用于流体性连接两个相邻的TFF单元(例如本文所述或本领域已知的任何示例性的TFF单元)。系统中两个TFF单元的一个这种示例性排列示于图4。两个或多个串联排列的TFF单元可以任何方式设计只要系统中至少一个泵的驱动导致细胞培养物从贮液器例如生物反应器可逆流动,流通第一导管、两个或多个TFF单元、一个或多个位于相邻TFF单元间的导管、第二导管,并流回至贮液器例如所述生物反应器。所述两个或多个TFF单元可以相同(例如相同数目或类型的交叉流过滤器)或不同(例如不同数目和类型的交叉流过滤器)。在一些实例中,两个或多个TFF单元各包括单管状交叉流过滤器,每个TFF单元可流体性连接至滤液导管,其允许滤液离开TFF单元以流入滤液储存罐(例如本文所述的任何滤液储存罐)。在一些实施方案中,两个或多个TFF单元可置于单个外罩中(例如本文所述或本领域已知的任何示例性类型的外罩)。

[0105] 泵

[0106] 本文所述的系统可包括一个或多个泵。在一些实例中,所述一个或多个泵是低湍流泵(LTP)。LTP是可以单个方向(例如第一或第二流动方向)移动流体(例如细胞培养物)或以两个方向(第一和第二流动方向)可逆移动流体(例如细胞培养物)而不在流体(例如细胞培养物)中诱导大量的剪切应力和/或流体湍流的泵。当LTP用于使流体(例如细胞培养物)以交替的第一和第二流动方向中流动时,第二流动方向与第一流动方向大致相反。

[0107] LTP泵的实例是蠕动泵。蠕动泵可具有约20mL至约250mL体积的泵头(例如约20mL

至约240mL、约20mL至约220mL、约20mL至约200mL、约20mL至约180mL、约20mL至约160mL、约20mL至约140mL、约20mL至约120mL、约20mL至约100mL、约20mL至约80mL、约20mL至约60mL、约20mL至约50mL、约20mL至约40mL、约20mL至约30mL、约30mL至约240mL、约30mL至约220mL、约30mL至约200mL、约30mL至约180mL、约30mL至约160mL、约30mL至约140mL、约30mL至约120mL、约30mL至约100mL、约30mL至约80mL、约30mL至约60mL、约40mL至约250mL、约40mL至约240mL、约40mL至约220mL、约40mL至约200mL、约40mL至约180mL、约40mL至约160mL、约40mL至约140mL、约40mL至约120mL、约40mL至约100mL、约40mL至约80mL、约40mL至约60mL、约50mL至约250mL、约50mL至约240mL、约50mL至约220mL、约50mL至约200mL、约50mL至约180mL、约50mL至约160mL、约50mL至约140mL、约50mL至约120mL、约50mL至约100mL、约50mL至约80mL、约50mL至约75mL、约60mL至约250mL、约60mL至约240mL、约60mL至约220mL、约60mL至约200mL、约60mL至约180mL、约60mL至约160mL、约60mL至约140mL、约60mL至约120mL、约60mL至约100mL、约60mL至约80mL、约70mL至约250mL、约70mL至约240mL、约70mL至约220mL、约70mL至约200mL、约70mL至约180mL、约70mL至约160mL、约70mL至约140mL、约70mL至约120mL、约70mL至约100mL、约80mL至约250mL、约80mL至约240mL、约80mL至约220mL、约80mL至约200mL、约80mL至约180mL、约80mL至约160mL、约80mL至约140mL、约80mL至约120mL、约80mL至约100mL、约90mL至约250mL、约90mL至约240mL、约90mL至约220mL、约90mL至约200mL、约90mL至约180mL、约90mL至约160mL、约90mL至约140mL、约90mL至约120mL、约90mL至约100mL、约100mL至约250mL、约100mL至约240mL、约100mL至约220mL、约100mL至约200mL、约100mL至约180mL、约100mL至约160mL、约100mL至约140mL或约100mL至约120mL)。蠕动泵可具有内径为约5mm至约400mm的管(例如约5mm至约380mm、约5mm至约360mm、约5mm至约340mm、约5mm至约320mm、约5mm至约300mm、约5mm至约280mm、约5mm至约260mm、约5mm至约240mm、约5mm至约220mm、约5mm至约200mm、约5mm至约180mm、约5mm至约160mm、约5mm至约140mm、约5mm至约120mm、约5mm至约100mm、约5mm至约80mm、约5mm至约60mm、约5mm至约55mm、约5mm至约50mm、约5mm至约45mm、约5mm至约40mm、约5mm至约35mm、约5mm至约30mm、约5mm至约25mm、约5mm至约20mm、约5mm至约15mm、约5mm至约10mm、约1mm至约10mm、约10mm至约60mm、约10mm至约35mm、约10mm至约25mm、约10mm至约20mm、约20mm至约60mm、约20mm至约50mm,或约30mm至约50mm)。蠕动泵内的管可具有约1mm至约30mm的壁径(例如约1mm至约25mm、约1mm至约20mm、约1mm至约18mm、约1mm至约16mm、约1mm至约14mm、约1mm至约12mm、约1mm至约10mm、约1mm至约8mm、约1mm至约6mm或约1mm至约5mm)。可用于本系统和方法的蠕动泵的实例为Watson Marlow 620和Watson Marlow 800泵。任何本文所述的蠕动泵可具有双通道和/或包括GORE Sta-Pure管(例如具有16mm内径和4mm壁的管)。

[0108] LTP泵的其他实例描述于美国专利号4,037,984;5,033,943和5,458,459;美国专利申请号2009/0199904和国际专利申请号W0 06/021873。其他LTP泵的实例包括回转容积式泵(rotary positive displacement pump)、凸轮泵(lobe pump)、内啮合齿轮泵(internal gear pump)和渐进式空腔泵(progressive cavity pump)。本领域的技术人员可以理解的是其他类型的LTP可商业获得且可用于任何本文所述的系统和方法。

[0109] 在一些实例中,所述至少一个泵置于第一或第二导管或两者中。在其他实例中,所述至少一个泵置于贮液器中且接近第一或第二流体导管。在包括两个或多个TFF单元的系统中,所述至少一个泵可置于在两个相邻TFF单元间的导管中(例如示于图4中的导管14)。

所述至少一个泵可置于本文给出的系统中的任意处,只要当驱动所述至少一个泵时,导致流体从贮液器可逆流通所述系统,流通第一导管、TFF单元、第二导管,并流回至贮液器,或在包括两个或多个TFF单元的系统中,流体可逆地从贮液器流通所述系统、流通第一导管、两个或多个TFF单元、一个或多个在相邻的TFF单元间的导管、第二导管,并流回至贮液器。

[0110] 滤液储存罐

[0111] 滤液储存罐可任选地包括在系统中,例如以保存滤液。举例来说,滤液可保存约1小时至约一周的时间段(例如约1小时至约6天、约1小时至约5天、约1小时至约4天、约1小时至约3天、约1小时至约2天、约1小时至约36小时、约1小时至约24小时、约1小时至约20小时、约1小时至约16小时、约1小时至约12小时或约1小时至约6小时)。滤液储存罐可具有约50mL至约50L的内部体积(例如约50mL至约45L、约50mL至约40L、约50mL至约35L、约50mL至约30L、约50mL至约25L、约50mL至约20L、约50mL至约18L、约50mL至约16L、约50mL至约14L、约50mL至约12L、约50mL至约10L、约50mL至约9L、约50mL至约8L、约50mL至约7L、约50mL至约6L、约50mL至约5L、约50mL至约4.5L、约50mL至约4.0L、约50mL至约3.5L、约50mL至约3.0L、约50mL至约2.5L、约50mL至约2.0L、约50mL至约1.5L、约50mL至约1.0L、约100mL至约1.0L或约500mL至约1.0L)。滤液储存罐的内表面可包括生物相容材料(例如任何本领域已知的生物相容材料)。滤液储存罐可以是能够在约10°C至约35°C(例如约10°C至约30°C、约10°C至约25°C、约10°C至约20°C、约10°C至约15°C或约15°C至约25°C)的温度保存滤液的冷藏储存罐。如本领域的技术人员可以理解的是,多种不同的商业可获得的储存罐可用作本文所述系统和方法中的滤液储存罐。

[0112] 流量计

[0113] 本文所述系统的一些实例可包括一个或多个(例如两个、三个、四个或五个)流量计。举例来说,所述一个或多个流量计可置于系统中任何导管的一个或多个中(例如第一导管、第二导管、相邻TFF单元间的一个或多个导管,和/或滤液导管)。举例来说,流量计可置于两个相邻的TFF单元间。在一些实例中,流量计是非侵入性的。本领域的技术人员将理解大量商业上可获得的流量计可用于本系统和方法中。举例来说,EM-TEC BioProTT非侵入性、实时流量计、PT878超声流量计(Rshydro)和Sono-Trak超声非侵入性流量计(EMCO)是可用于本系统和方法中的商业获得的流量计。

[0114] 压力传感器

[0115] 本文所述的系统可包括一个或多个压力传感器。举例来说,所述一个或多个压力传感器可置于系统中的任何导管中(例如第一导管、第二导管、相邻TFF单元间的一个或多个导管和/或滤液导管)。举例来说,压力传感器可置于系统中两个相邻的TFF单元间。本领域的技术人员将理解大量可商业获得的压力传感器可用于本系统和方法中。可用于本文所述系统和方法中的压力传感器的非限制性实例是PendoTECH PressureMAT压力传感器。

[0116] 夹持物/端口

[0117] 任何本文所述的系统可任选地包括第一或第二导管和端口间的端口导管,其分别流体性连接所述第一或第二导管至所述端口。所述端口可用于从系统(分别通过第一或第二导管)递送或去除流体(例如细胞培养物或洗涤溶液)。夹持物可置于端口导管中。大量适当的夹持物为本领域已知(例如螺丝夹)。端口导管可具有上述导管特征的任何组合。端口可以是任何类型的本领域公知的端口。举例来说,端口可以是注射端口或可具有棱形螺纹

(ribbed threading)。

[0118] 生物制造系统

[0119] 本文所述的任何装置可包括生物制造系统,其包括至少一个(例如两个、三个或四个)具有入口和出口的多重柱层析系统(MCCS),和在TFF单元或滤液储存罐间的滤液导管,其中配置所述装置进而滤液流入生物制造系统的入口,流通至少一个MCCS,并通过生物制造系统的出口流出所述装置。MCCS可包括两个或多个层析柱、两个或多个层析膜或至少一个层析柱和至少一个层析膜的组合。在非限制性实例中,MCCS可包括四个层析、三个层析柱和一个层析膜、三个层析柱、两个层析柱、两个层析膜,和两个层析柱和一个层析膜。层析柱和/或层析膜组合的其他实例可设想用于在MCCS中由本领域的技术人员使用而不受限制。存在于MCCS中的单个层析柱和/或层析膜可以相同(例如具有相同的形状、体积、树脂、捕获机制和单元操作)或可不同(例如具有一种或多种不同的形状、体积、树脂、捕获机制和单元操作)。存在于MCCS中的单个层析柱和/或层析膜可实施相同的单元操作(例如捕获、纯化、精制、失活病毒、调整包括重组治疗性蛋白的流体的离子浓度和/或pH或过滤的单元操作)或不同的单元操作(例如选自下组的不同单元操作:例如捕获、纯化、精制、失活病毒、调整包括重组治疗性蛋白的流体的离子浓度和/或pH和过滤)。

[0120] 在任何本文所述的生物制造装置中的一个或多个MCCS的使用过程中可采用一种或多种(例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24种)不同类型缓冲剂。如本领域已知,在本文所述的生物制造系统中的一个或多个MCCS中使用的一种或多种类型的缓冲剂将取决于在一个或多个MCCS(例如第一和第二MCCS)的层析柱和/或层析膜中存在的树脂、重组治疗性蛋白和由一个或多个MCCS的特定层析柱和/或层析膜实施的单元操作(例如本文所述的任何示例性单元操作)。本领域技术人员也能够确定在任何本文所述的生物处理装置中一个或多个MCCS的使用过程中采用的缓冲剂的类型和体积。例如,可选择在任何本文所述的生物处理装置中的一个或多个MCCS使用过程中采用的缓冲剂的体积和类型进而优化获得的分离重组蛋白(例如药物产品)的下列一种或多种特征:重组治疗性蛋白的整体产量、重组治疗性蛋白的活性、重组治疗性蛋白的纯度水平和从包括重组治疗性蛋白的流体中对生物污染物的去除(例如去除活性病毒、分枝杆菌、酵母、细菌或哺乳动物细胞)。

[0121] 一个或多个MCCS可以是周期逆流层析系统(PCCS)。PCCS可以例如包括两个或多个切换以允许重组治疗性蛋白从所述两个或多个层析柱连续洗脱的层析柱(例如三个层析柱或四个层析柱)。PCCS可包括两个或多个层析柱,两个或多个层析膜,或至少一个层析柱和至少一个层析膜。柱操作一般由装载、洗涤、洗脱和再生步骤组成。在PCCS中,将多重柱用于以循环的方式离散和连续地运行相同的步骤。由于串联操作柱,通过另一个柱捕获来自一个柱的流通物和洗涤物。PCCS的该特有特征允许树脂的装载接近其静态结合容量而非动态结合容量,如通常在批次模式层析过程中那样。作为连续循环和洗脱的结果,连续处理进入PCCS的流体,且连续产生包括重组治疗性蛋白的洗脱物。

[0122] 可由生物制造系统中至少一个MCCS实施的一个或多个单元操作包括举例来说,捕获重组治疗性蛋白、失活存在于包括重组治疗性蛋白的流体中的病毒、纯化重组治疗性蛋白、精制重组治疗性蛋白、保存包括重组治疗性蛋白的流体(例如使用中断罐(break tank))、从包括重组治疗性蛋白的流体过滤或去除特定材料和调整包括重组治疗性蛋白的

流体的离子浓度和/或pH。

[0123] 捕获的单元操作可使用一个或多个至少包括一个层析柱和/或层析树脂的MCCS实施,例如利用捕获机制。捕获机制的非限制性实例包括蛋白A结合捕获机制、抗体或抗体片段结合捕获机制、底物结合捕获机制、适体结合捕获机制、标签结合捕获机制(例如基于多聚His标签的捕获机制)和辅助因子结合捕获机制。捕获还可使用用于实施阳离子交换或阴离子交换层析的树脂或分子筛层析实施。可用于捕获重组治疗性蛋白的树脂的实例为本领域已知。

[0124] 存在于包括重组治疗性蛋白的流体中的失活病毒的单元操作可使用一个或多个MCCS实施,所述MCCS包括例如层析柱、层析膜或能够在约3.0至5.0的pH(例如约3.5至约4.5、约3.5至约4.25、约3.5至约4.0、约3.5至约3.8或约3.75)温育包括重组治疗性蛋白的流体至少30分钟的时间段(例如约30分钟至1.5小时的时间段、约30分钟至1.25小时的时间段、约0.75小时至1.25小时的时间段或约1小时的时间段)的储存罐。

[0125] 纯化重组蛋白的单元操作可使用一个或多个MCCS实施,所述MCCS包括例如包括树脂的层析柱或层析膜,例如利用捕获系统。捕获机制的非限制性实例包括蛋白A结合捕获机制、抗体或抗体片段结合捕获机制、底物结合捕获机制、适体结合捕获机制、标签结合捕获机制(例如基于多聚His标签的捕获机制)和辅助因子结合捕获机制。纯化还可使用用于实施阳离子交换或阴离子交换层析的树脂或分子筛层析实施。可用于纯化重组治疗性蛋白的树脂的实例为本领域已知。

[0126] 精制重组蛋白的单元操作可使用一个或多个MCCS实施,所述MCCS包括例如层析柱或包括树脂的层析膜,例如其可用于实施阳离子交换、阴离子交换或分子筛层析。可用于精制重组治疗性蛋白的树脂的实例为本领域已知。

[0127] 保存包括重组治疗性蛋白的流体的单元操作可在生物制造系统的一个或多个MCCS中使用包括至少一个贮液器(例如中断罐)或最多1、2、3、4、5个贮液器(例如中断罐)的MCCS实施。举例来说,可用于实现该单元操作的贮液器(例如中断罐)可各具有约1mL至约1L的体积(例如约1mL至约800mL、约1mL至约600mL、约1mL至约500mL、约1mL至约400mL、约1mL至约350mL、约1mL至约300mL、约10mL至约250mL、约10mL至约200mL、约10mL至约150mL和约10mL至约100mL)。用于本文所述的生物制造系统的贮液器(例如中断罐)可具有例如1mL至约300mL(含端点)的容量,例如1mL至约280mL、约260mL、约240mL、约220mL、约200mL、约180mL、约160mL、约140mL、约120mL、约100mL、约80mL、约60mL、约40mL、约20mL或约10mL(含端点)的容量。生物制造系统中的贮液器(例如中断罐)可各保存包括重组治疗性蛋白的流体至少10分钟(例如至少20分钟、至少30分钟、至少1小时、至少2小时、至少4小时或至少6小时)。在其他实例中,生物制造系统中的贮液器(例如中断罐)仅保存治疗性蛋白例如约5分钟并少于约6小时(含端点)的总时间段,例如约5分钟至约5小时、约4小时、约3小时、约2小时、约1小时或约30分钟(含端点)的总时间段。生物制造系统中的贮液器(例如中断罐)可用于保存并冷藏(例如以低于25℃、低于15℃或低于10℃的温度)包括重组治疗性蛋白的流体。贮液器可具有任何形状,包括圆筒、椭圆筒或大致长方形密封和不可渗透的包。

[0128] 过滤包括重组治疗性蛋白的流体的单元操作可使用MCCS实施,所述MCCS包括例如过滤器或包括分子筛树脂的层析柱或层析膜。如本领域已知,本领域已有多种亚微米过滤器(例如具有小于1μm、小于0.5μm、小于0.3μm、约0.2μm、小于0.2μm、小于100nm、小于80nm、

小于60nm、小于40nm、小于20nm或小于10nm的孔径的过滤器),其能够去除任何沉淀的材料和/或细胞(例如沉淀的、未折叠的蛋白;沉淀的不想要的宿主细胞蛋白;沉淀的脂质;细菌;酵母细胞;真菌细胞和/或分枝杆菌)。具有约0.2μm或小于0.2μm的孔径的过滤器已知可有效从包括重组治疗性蛋白的流体去除细菌。如本领域已知,包括分子筛树脂的层析柱或层析膜也可用于MCCS以实施过滤包括重组治疗性蛋白的流体的单元操作。

[0129] 调整包括重组治疗性蛋白的流体的离子浓度和/或pH的单元操作可使用MCCS实施,所述MCCS包括并利用将新的缓冲溶液添加入包括重组治疗性蛋白的流体(例如在单MCCS内的柱间,或倒数第二个MCCS中最后柱之后和在将包括重组治疗性蛋白的流体补入下一MCCS(例如第二MCCS)的第一柱前)的缓冲剂调整贮液器(例如在线缓冲调整贮液器)。本领域将理解的是,在线缓冲调整贮液器可以是任何尺寸(例如大于100mL)且可包括任何缓冲溶液(例如具有下列一种或多种的缓冲溶液:与包括重组治疗性蛋白的流体相比增加或减少的pH,与包括重组治疗性蛋白的流体相比增加或减少的离子(例如盐)浓度和/或增加或减少的作用剂(其与重组治疗性蛋白竞争结合存在于MCCS(例如第一或第二MCCS)中至少一个层析柱或至少一个层析膜中的树脂)浓度)。

[0130] MCCS可实施两种或多种单元操作。举例来说,MCCS可实施至少下列单元操作:捕获重组治疗性蛋白并失活存在于包括重组治疗性蛋白的流体中的病毒;捕获重组治疗性蛋白、失活存在于包括重组治疗性蛋白的流体中的病毒并调整包括重组治疗性蛋白的液体的离子浓度和/或pH;纯化重组治疗性蛋白并精制重组治疗性蛋白;纯化重组治疗性蛋白、精制重组治疗性蛋白并过滤包括重组治疗性蛋白的流体或从包括重组治疗性蛋白的流体去除沉淀物和/或特定物质;和纯化重组治疗性蛋白、精制重组治疗性蛋白、过滤包括重组治疗性蛋白的流体或从包括重组治疗性蛋白的流体去除沉淀物和/或特定物质并调整包括重组治疗性蛋白的液体的离子浓度和/或pH。

[0131] 可用于本装置和方法的生物制造系统的其他示例性特征描述于2013年3月8日提交的美国专利申请系列号61/775,060和2013年7月19日提交的美国专利申请系列号61/856,390。

[0132] 由本系统提供的益处

[0133] 本文所述的系统提供了具有下列一项或多项(例如2、3、4、5、6或7项)益处的细胞培养物的连续过滤:与其他单向开放回路过滤系统(例如单向TFF系统)或双向闭合回路过滤系统(闭合回路ATF<sup>TM</sup>系统)相比减少的细胞培养物外部体积(贮液器外)、增加的交换百分数(第一导管、TFF单元和第二导管内)、细胞培养物减少的外部停留时间(贮液器外)、细胞培养物过滤过程中减少的剪切应力、细胞培养物中改善的细胞活力、细胞培养物中升高的活细胞密度和减少的过滤器结垢。

[0134] 本文所述系统的交换百分数和外部停留时间可使用下列等式1和2计算:

$$\text{交换百分数} = \frac{\text{交换体积}}{\text{外部体积}} \quad (\text{等式 1})$$

[0135]

$$\text{外部停留时间} = \frac{\text{外部体积}}{\text{交换速率} \times \text{交换百分数}} \quad (\text{等式 2})$$

[0136]

[0137] 举例来说,本系统可仅具有贮液器、第一导管、第二导管和TFF单元中细胞培养物

总体积的约1%至约7% (例如约1.0%至约6.5%、约1%至约6.0%、约1%至约5.5%或约1%至约5.0%) 的细胞培养物外部体积。本文提供的系统还可提供减少的约1秒至约60秒 (例如约1秒至约55秒、约1秒至约50秒、约1秒至45秒、约1秒至约30秒、约1秒至约25秒、约1秒至约20秒、约1秒至约15秒、约1秒至13秒、约1秒至10秒、约1秒至约8秒、约1秒至约5秒或约10秒至14秒) 的贮液器外细胞培养物停留时间 (减少的外部停留时间)。下文表1比较了实施例中所述的示例性系统和闭合系统交替切向过滤系统(ATF4)的外部停留时间。

[0138] 表1本文提供的示例性系统和闭合系统ATF4的外部停留时间和外部百分数的比较

	外部体积	外部百分数	停留时间
[0139]	ATF4 0.756L	19%	71秒
	TFF 0.550L	78%	12秒

[0140] 本系统还提供了多于50% (例如多于约55%、多于约60%、多于约65%、多于约70%、多于约75%、多于约80%或多于约85%) 的改善的交换百分数。本文所述系统可提供细胞培养物中的高活细胞密度,例如多于约 $30 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $32 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $34 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $36 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $38 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $40 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $42 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $44 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $46 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $48 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $50 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $52 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $54 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $56 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $58 \times 10^6$ 细胞/mL或多于约 $60 \times 10^6$ 细胞/mL的活细胞密度。本文所述系统可提供多于约 $65 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $70 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $75 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $80 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $85 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $90 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $95 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $100 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $105 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $110 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $115 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $120 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $125 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $130 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $135 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $140 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $145 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $150 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $155 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $160 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $165 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $170 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $175 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $180 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $185 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $190 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $200 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $210 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $220 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $230 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $240 \times 10^6$ 细胞/mL或多于约 $250 \times 10^6$ 细胞/mL的活细胞密度。

[0141] 本文提供的系统还提供优化的交换速率(本文也称为流速)。本领域的技术人员可以理解的是交换速率过高可导致负面影响细胞生长和细胞培养物表现的剪切应力的水平,且太低的交换速率可导致过滤器结垢和较长的细胞培养物外部停留时间。本文提供的系统提供了任何本文所述的示例性速率的实现。

[0142] 本文提供的系统还提供了优化的交换速率(XR)比灌注率(PR)的比率。本领域的技术人员可以理解的是提供增加的XR:PR比率的系统和方法导致更有效的细胞培养物生产方法(例如在灌注过程中利用较少的细胞培养物)。在一些实例中,本文示例性的装置和方法提供了多于约2 (例如多于约3、多于约4、多于约5、多于约6、多于约7、多于约8、多于约9、多于约10、多于约11、多于约12、多于约13、多于约14、多于约15、多于约16、多于约17、多于约18、多于约19、多于约20、多于约21、多于约22、多于约23、多于约24、多于约25、多于约50、多

于约75、多于约100、多于约125、多于约150、多于约175、多于约200、多于约225、多于约250、多于约275、多于约300、多于约325、多于约350、多于约375、多于约400、多于约425、多于约450、多于约475、多于约500、多于约525、多于约550、多于约575或多于约600)或约5至约600(例如约10至约550、约10至约500、约10至约450、约10至约400、约10至约350、约10至约300、约10至约250、约10至约200、约10至约150、约10至约100或约10至约50)的XR:PR比率。

[0143] 处理细胞培养物的方法

[0144] 还提供了处理细胞培养物的方法,其包括(a)提供开放回路过滤系统(例如任何本文所述的开放回路过滤系统), (b)使细胞培养物以第一流动方向持续第一时间段从贮液器流通TFF单元, (c)逆转第一流动方向并使细胞培养物以第二流动方向持续第二时间段流通TFF单元, (d)逆转第二流动方向并使培养物以第一流动方向持续第三时间段流通TFF单元, (e)重复步骤(c) - (d)至少两(例如至少三、四、五、六、七、八、九、十、十五、二十、三十、四十、五十、六十、七十、八十、九十或一百或多于一百)次,和(f)收集滤液。这些方法的多种示例性方面描述于下文。

[0145] 细胞培养物

[0146] 将在本文提供的方法中处理的细胞培养物可在液体培养基中包括多种任何类型的哺乳动物细胞。在本文所述的全部方法的一些实施方案中,哺乳动物细胞是在悬浮培养物中生长的细胞。在其他实例中,哺乳动物细胞是粘附细胞(例如需要固体底物如微载体用于在灌注生物反应器中生长的细胞)。可存在于细胞培养物中的哺乳动物细胞的非限制性实例包括:中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(例如CHO DG44细胞、CHO-K1s细胞、Sp2.0、骨髓瘤细胞(例如NS/0)、B-细胞、杂交瘤细胞、T细胞、人胚肾(HEK)细胞(例如HEK 293E和HEK 293F)、非洲绿猴肾上皮细胞(Vero)细胞和Madin-Darby犬(Cocker Spaniel)肾上皮细胞(MDCK)细胞。可存在于细胞培养物中的其他哺乳动物细胞为本领域已知。

[0147] 使用任何本文所述方法处理的细胞培养物可包括多于约 $0.5 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $1.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $5.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $10.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $15.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $20.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $25.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $30.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $35.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $40.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $45.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $50.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $55.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $60.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $65.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $70.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $75.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $80.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $85.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $90.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $95.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $100.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $105.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $110.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $120.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $125.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $130.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $135.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $140.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $145.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $150.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $155.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $160.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $170.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $175.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $180.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $185.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $190.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $195.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $200.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $205.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $210.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $215.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $220.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $225.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $230.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $235.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $240.0 \times 10^6$ 细胞/mL、多于约 $245.0 \times 10^6$ 细胞/mL或多于约 $250.0 \times 10^6$ 细胞/mL的活细胞密度。在一些实例中,细胞培养物具有约 $30 \times 10^6$ 细胞/mL至约 $100 \times 10^6$ 细胞/mL的活细胞浓度



10<sup>6</sup>细胞/mL、约180x 10<sup>6</sup>细胞/mL至约200x 10<sup>6</sup>细胞/mL、约190x 10<sup>6</sup>细胞/mL至约250x 10<sup>6</sup>细胞/mL、约190x 10<sup>6</sup>细胞/mL至约240x 10<sup>6</sup>细胞/mL、约190x 10<sup>6</sup>细胞/mL至约230x 10<sup>6</sup>细胞/mL、约190x 10<sup>6</sup>细胞/mL至约220x 10<sup>6</sup>细胞/mL、约190x 10<sup>6</sup>细胞/mL至约210x 10<sup>6</sup>细胞/mL、约200x 10<sup>6</sup>细胞/mL至约250x 10<sup>6</sup>细胞/mL、约200x 10<sup>6</sup>细胞/mL至约240x 10<sup>6</sup>细胞/mL、约200x 10<sup>6</sup>细胞/mL至约230x 10<sup>6</sup>细胞/mL、约200x 10<sup>6</sup>细胞/mL至约220x 10<sup>6</sup>细胞/mL、约210x 10<sup>6</sup>细胞/mL至约250x 10<sup>6</sup>细胞/mL、约210x 10<sup>6</sup>细胞/mL至约240x 10<sup>6</sup>细胞/mL、约220x 10<sup>6</sup>细胞/mL至约240x 10<sup>6</sup>细胞/mL,或约230x 10<sup>6</sup>细胞/mL至约250x 10<sup>6</sup>细胞/mL)。

[0148] 系统(滤液导管和滤液储存罐外)中的细胞培养物总量可为0.2L至约10,000L(例如约0.2L至约9,500L、约0.2L至约9,000L、约0.2L至约8,500L、约0.2L至约8,000L、约0.2L至约7,500L、约0.2L至约7,000L、约0.2L至约6,500L、约0.2L至约6,500L、约0.2L至约6,000L、约0.2L至约5,500L、约0.2L至约5,000L、约0.2L至约4,500L、约0.2L至约4,000L、约0.2L至约3,500L、约0.2L至约3,000L、约0.2L至约2,500L、约0.2L至约2,000L、约0.2L至约1,500L、约0.2L至约1,000L、约0.2L至约500L、约0.2L至约400L、约0.2L至约300L、约0.2L至约200L、约0.2L至约150L、约0.2L至约100L、约0.2L至约50L,或约0.2L至约10L)。

[0149] 存在于细胞培养物中的哺乳动物细胞可包括重组核酸(例如稳定整合入哺乳动物细胞基因组的核酸),其编码重组蛋白(例如由哺乳动物细胞分泌的重组蛋白)。编码重组蛋白的核酸可使用多种分子生物学和分子遗传学已知的方法导入哺乳动物细胞。非限制性实例包括转染(例如脂质体转染)、转导(例如慢病毒、腺病毒或逆转录病毒感染)和电穿孔。在一些实例中,编码重组蛋白的核酸未稳定整合入哺乳动物细胞的染色体(瞬时转染),而在其他实例中核酸整合。可替换地或此外,编码重组蛋白的核酸可存在于质粒和/或哺乳动物人工染色体(例如人人工染色体)中。可替换地或此外,核酸可使用病毒载体(例如慢病毒、逆转录病毒或腺病毒载体)导入细胞。核酸可以可操作地与启动子(例如强启动子如β-肌动蛋白启动子和CMV启动子或诱导型启动子)序列连接。编码可溶性重组蛋白的核酸序列可包括在重组蛋白的N-或C-末端编码分泌信号肽的序列,所述信号肽序列由存在于哺乳动物细胞中的酶裂解,并随后释放入培养基。酌情包括核酸的载体可包括选择性标记物(例如赋予哺乳动物细胞潮霉素、嘌呤霉素或新霉素抗性的基因)。

[0150] 在细胞培养物中可由哺乳动物细胞分泌重组蛋白的非限制性实例包括免疫球蛋白(包括轻链和重链免疫球蛋白、抗体或抗体片段(例如任何本文所述的抗体片段))、酶(例如半乳糖苷酶(例如α-半乳糖苷酶)、Myozyme或Cerezyme)、蛋白(例如人红细胞生成素、肿瘤坏死因子(TNF)或干扰素α或β)或免疫原性或抗原蛋白或蛋白片段(例如用于疫苗中使用的蛋白)。在一些实施方案中,重组蛋白是工程化的抗原结合多肽,其包括至少一个多功能性重组蛋白支架(参见例如Gebauer等人Current Opin.Chem.Biol.13:245-255,2009和美国专利公开号2012/0164066(在本文通过提述以其整体并入)中所述的重组抗原结合蛋白)。是抗体的重组蛋白非限制性实例包括:帕尼单抗(panitumumab)、奥马珠单抗(omalizumab)、abagovomab、abciximab、actoxumab、阿达木单抗(adalimumab)、adecatumumab、阿非莫单抗(afelimomab)、afutuzumab、alacizumab、alacizumab、阿仑单抗(alemtuzumab)、alirocumab、altumomab、amatuximab、anatumomab、apolizumab、atinumab、托珠单抗(tocilizumab)、basilizimab、bectumomab、贝利单抗(belimumab)、贝伐单抗(bevacizumab)、biciromab、canakinumab、西妥昔单抗(cetuximab)、daclizumab、

densumab、依库珠单抗(eculizumab)、依决洛单抗(edrecolomab)、依法珠单抗(efalizumab)、efungumab、ertumaxomab、etaracizumab、戈利木单抗(golimumab)、英夫利昔单抗(infliximab)、那他珠单抗(natalizumab)、帕利珠单抗(palivizumab)、帕尼单抗(panitumumab)、帕妥珠单抗(pertuzumab)、兰尼单抗(ranibizumab)、利妥昔单抗(rituximab)、托珠单抗(tocilizumab)和曲妥珠单抗(trastuzumab)。可由本文所述方法产生的治疗性抗体的其他实例为本领域已知。在细胞培养物中可由哺乳动物细胞分泌的其他重组蛋白的非限制性实例包括：重组阿葡糖苷酶 $\alpha$ (alglucosidase alfa)、laronidase、阿贝西普(abatacept)、加硫酶(galsulfase)、lutropin alfa、抗血友病因子(antihemophilic factor)、 $\beta$ -半乳糖苷酶(agalsidase beta)、干扰素 $\beta$ -1a、阿法达贝泊汀(darbepoetin alfa)、替奈普酶(tenecteplase)、依那西普(etanercept)、凝血因子IX、卵泡刺激素、干扰素 $\beta$ -1a、伊米昔酶(imiglucerase)、阿法链道酶(dornase alfa)、阿法依泊汀(epoetin alfa)和阿替普酶(alteplase)。

[0151] 液体培养基为本领域已知。液体培养基可补充有哺乳动物血清(例如胎牛血清和牛血清)和/或生长激素或生长因子(例如胰岛素、转铁蛋白和表皮生长因子)。可替换地或此外，液体培养基可以是化学上限定的液体培养基、没有动物来源组分的液体培养基、没有血清的液体培养基或包括血清的液体培养基。化学上限定的液体培养基、没有动物来源组分的液体培养基、没有血清的液体培养基和包括血清的液体培养基的实例可商业获得。

[0152] 液体培养基通常包括能量源(例如糖如葡萄糖)、必需氨基酸(例如二十种氨基酸加半胱氨酸的基本组合)、维生素和/或其他以低浓度需要的有机化合物、游离脂肪酸和/或痕量元素。酌情液体培养基可补充有例如哺乳动物激素或生长因子(例如胰岛素、转铁蛋白和表皮生长因子)、盐和缓冲剂(例如钙、镁和磷酸盐)、核苷和碱基(例如腺苷、胸腺嘧啶和次黄嘌呤)、蛋白和组织水解物和/或任何这些或其他添加剂的组合。

[0153] 液体培养基的非限制性实例包括例如CD CHO、Opti CHO和Forti CHO(都可从Life Technologies; Grand Island, NY获得)、Hycell CHO培养基(Thermo Fisher Scientific, Inc.; Waltham, MA)、Ex-cell CD CHO融合培养基(Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, MO)和PowerCHO培养基(Lonza Group, Ltd.; Basel, Switzerland)。还可存在于液体培养基的培养基组分包括但不限于化学上限定(CD)的水解物,例如CD蛋白胨、CD多肽(两个或多个氨基酸)和CD生长因子。液体组织培养基和培养基组分的其他实例为本领域已知。

[0154] 包括粘附型哺乳动物细胞的细胞培养物可在灌注生物反应器中使用例如微载体生长。可使用的非限制性示例性微载体包括CytoPore<sup>TM</sup> 1和CytoPore<sup>TM</sup> 2(可从GE Healthcare, Life Sciences, Piscataway, New Jersey获得)。可使用的微载体的其他实例是公众可获的且为本领域已知。

[0155] 示例性开放回路过滤系统的使用

[0156] 任何本文所述的开放回路过滤系统可用于给出的处理细胞培养物的方法。举例来说,用于本文所述的方法的开放回路过滤系统中的生物反应器可以是生物反应器(例如任何本领域已知的灌注生物反应器)或冷藏储存罐。在所述方法中使用的开放回路过滤系统可包括一个或多个为生物相容性管的导管(例如第一导管、第二导管、邻近TFF单元间的一个或多个导管和/或滤液导管)。在一些实例中,所述开放回路过滤系统包括贮液器和两个或多个亚系统(如本文所述)。

[0157] 在所述方法中使用的开放回路过滤系统可包括具有如本文所述的单交叉流过滤器(例如管状交叉流过滤器)或两个或多个(例如两个、三个、四个或五个)交叉流过滤器(例如管状交叉流过滤器)的TFF单元。在其他实例中,使用的开放回路过滤系统可包括两个或多个(例如两个、三个或四个)TFF单元,其中每对相邻的TFF单元通过流体导管流体性连接。TFF单元可提供约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $150\text{m}^2$ (例如约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $145\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $140\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $135\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $130\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $125\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $120\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $115\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $110\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $105\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $100\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $95\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $90\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $85\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $80\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $75\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $70\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $65\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $60\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $55\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $50\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $45\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $40\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $35\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $30\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $25\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $20\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $15\text{m}^2$ 、约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $10\text{m}^2$ ,或约 $0.1\text{m}^2$ 至约 $5\text{m}^2$ )的总过滤面积。TFF单元中存在的过滤器可具有任何本文所述的孔径(例如约 $0.2\mu\text{m}$ )、形状、纤维内径和/或纤维长度。

[0158] 本文使用的开放回路过滤系统可包括至少一个置于第一导管或第二导管或两者中的泵。所述至少一个泵还可置于系统中的一个或多个导管中(例如第一导管、第二导管和/或相邻TFF单元间的一个或多个导管中的一个或多个)。使用的系统可包括置于贮液器中并接近第一或第二导管的至少一个泵(例如从泵至第一导管或第二导管与生物反应器连接的位置处 $0.01\text{cm}$ 至 $5\text{cm}$ (例如 $0.01\text{cm}$ 至 $4\text{cm}$ 、 $0.01\text{cm}$ 至 $3\text{cm}$ 、 $0.01\text{cm}$ 至 $2\text{cm}$ 或 $0.01\text{cm}$ 至 $1\text{cm}$ )的距离)。一些系统仅包括单泵,其使细胞培养物以第一方向在第一和第三时间段流动,并使细胞培养物以第二方向在第二时间段流动。其他系统包括第一和第二泵,其中第一泵使细胞培养物以第一方向流动且第二泵使细胞培养物以第二方向流动。

[0159] 在用于所述方法的任何系统中,所述至少一个泵(例如一个、两个、三个或四个泵)可以是LTP(例如本文所述的任何LTP,如蠕动泵)。在用于所述方法的系统中存在的至少一个泵(例如至少一个LTP)可具有本文所述泵(例如LTP)的特征或特性的任何组合(例如泵头体积、类型和/或管)。在一些方法中,所述至少一个泵以约 $10\text{RPM}$ 至约 $100\text{RPM}$ 的泵速(RPM)使用(例如约 $10\text{RPM}$ 至约 $95\text{RPM}$ 、约 $10\text{RPM}$ 至约 $90\text{RPM}$ 、约 $10\text{RPM}$ 至约 $85\text{RPM}$ 、约 $10\text{RPM}$ 至约 $80\text{RPM}$ 、约 $10\text{RPM}$ 至约 $75\text{RPM}$ 、约 $10\text{RPM}$ 至约 $70\text{RPM}$ 、约 $10\text{RPM}$ 至约 $65\text{RPM}$ 、约 $10\text{RPM}$ 至约 $60\text{RPM}$ 、约 $10\text{RPM}$ 至约 $55\text{RPM}$ 、约 $10\text{RPM}$ 至约 $50\text{RPM}$ 、约 $10\text{RPM}$ 至约 $45\text{RPM}$ 、约 $10\text{RPM}$ 至约 $40\text{RPM}$ 、约 $10\text{RPM}$ 至约 $35\text{RPM}$ 、约 $10\text{RPM}$ 至约 $30\text{RPM}$ 、约 $10\text{RPM}$ 至约 $25\text{RPM}$ 或约 $10\text{RPM}$ 至约 $20\text{RPM}$ )。在一些实例中,所述方法导致约 $0.5\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 至约 $40\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 、约 $0.5\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 至约 $35\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 、约 $0.5\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 至约 $30\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 、约 $0.5\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 至约 $25\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 、约 $0.5\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 至约 $20\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 、约 $0.5\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 至约 $15\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 、约 $0.5\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 至约 $10\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 、约 $0.5\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 至约 $9\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 、约 $0.5\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 至约 $8\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 、约 $0.5\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 至约 $7\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 、约 $0.5\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 至约 $6\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 、约 $0.5\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 至约 $5\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 、约 $0.5\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 至约 $4\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 、约 $0.5\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 至约 $3\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 、约 $0.5\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 至约 $2\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 或约 $0.8\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 至约 $1.2\text{L}/\text{m}^2/\text{小时}$ 的灌注流量速率。在一些实例中,至少一个泵的使用导致系统中约 $50\text{s}^{-1}$ 至约 $1000\text{s}^{-1}$ 的剪切速率(例如约 $50\text{s}^{-1}$ 至约 $950\text{s}^{-1}$ 、约 $50\text{s}^{-1}$ 至约 $900\text{s}^{-1}$ 、约 $50\text{s}^{-1}$ 至约 $850\text{s}^{-1}$ 、约 $50\text{s}^{-1}$ 至约 $800\text{s}^{-1}$ 、约 $50\text{s}^{-1}$ 至约 $750\text{s}^{-1}$ 、约 $50\text{s}^{-1}$ 至约 $700\text{s}^{-1}$ 、约 $50\text{s}^{-1}$ 至约 $650\text{s}^{-1}$ 、约 $50\text{s}^{-1}$ 至约 $600\text{s}^{-1}$ 、约 $50\text{s}^{-1}$ 至约 $550\text{s}^{-1}$ 、约 $50\text{s}^{-1}$ 至约 $500\text{s}^{-1}$ 、约 $\text{s}^{-1}$ 至约 $450\text{s}^{-1}$ 、约 $50\text{s}^{-1}$ 至约 $400\text{s}^{-1}$ 、约 $50\text{s}^{-1}$ 至约 $350\text{s}^{-1}$ 、约 $50\text{s}^{-1}$ 至约 $300\text{s}^{-1}$ 、约 $50\text{s}^{-1}$ 至约 $250\text{s}^{-1}$ 、约 $50\text{s}^{-1}$ 至约 $200\text{s}^{-1}$ 、约 $50\text{s}^{-1}$ 至约 $150\text{s}^{-1}$ 或约 $50\text{s}^{-1}$ 至约 $100\text{s}^{-1}$

<sup>-1)</sup>。可用于这些方法中的泵的具体实例为具有16mm管的Watson-Marlow 620蠕动泵或具有40mm管的Watson-Marlow 800蠕动泵。

[0160] 本领域的技术人员将理解的是系统中细胞培养物的总体积(排除滤液导管和滤液储存罐中滤液的体积)、由至少一个TFF单元提供的总过滤面积和流速(例如在第二和第三时间段)需要以允许本文提供的系统和方法的一项或多项益处的合理比率(例如本文所述的示例性值和参数)实施。

[0161] 流动循环

[0162] 在本文所述的方法中,第一、第二和/或第三时间段的时间可以是约20秒至约15分钟(例如约30秒至约15分钟、约20秒至约14分钟、约20秒至约13分钟、约20秒至约12分钟、约20秒至约11分钟、约20秒至约10分钟、约20秒至约9分钟、约20秒至约8分钟、约20秒至约7分钟、约20秒至约6分钟、约20秒至约5分钟、约20秒至约4分钟、约20秒至约3分钟、约20秒至约2分钟、约20秒至约115秒、约20秒至约110秒、约20秒至约105秒、约20秒至约100秒、约20秒至约95秒、约20秒至约90秒、约20秒至约85秒、约20秒至约80秒、约20秒至约75秒、约20秒至约70秒、约20秒至约65秒、约20秒至约60秒、约20秒至约55秒、约20秒至约50秒、约20秒至约45秒、约20秒至约40秒、约20秒至约35秒、约20秒至约30秒、约20秒至约25秒、约30秒至约90秒、约35秒至约85秒、约40秒至约80秒、约45秒至约75秒、约50秒至约70秒、约55秒至约65秒、约30秒至约14分钟、约30秒至约13分钟、约30秒至约12分钟、约30秒至约11分钟、约30秒至约10分钟、约30秒至约9分钟、约30秒至约8分钟、约30秒至约7分钟、约30秒至约6分钟、约30秒至约5分钟、约30秒至约4分钟、约30秒至约3分钟、约30秒至约2分钟、约30秒至约90秒、约30秒至约1分钟、约1分钟至约15分钟、约1分钟至约14分钟、约15分钟至约13分钟、约1分钟至约12分钟、约1分钟至约11分钟、约1分钟至约10分钟、约1分钟至约9分钟、约1分钟至约8分钟、约1分钟至约7分钟、约1分钟至约6分钟、约1分钟至约5分钟、约1分钟至约4分钟、约1分钟至约3分钟、约1分钟至约2分钟或约1分钟至约90秒)。在一些实例中,所述第一、第二和第三时间段大约相同。在其他实例中,所述第一、第二和第三时间段不同。

[0163] 在一些实例中,第一时间段中的第一流动方向使细胞培养物从贮液器流通至少一个泵(例如单泵)置于其中的第一或第二导管,随后流通至少一个TFF单元,随后通过其他导管流回至贮液器(例如持续约30秒至约60分钟、约30秒至约50分钟、约30秒至约40分钟、约30秒至约30分钟、约30秒至约20分钟、约30秒至约15分钟、约30秒至约10分钟或约30秒至约5分钟的时间段)。在这些实例中,使用在第一时间段的流动以平衡系统中的至少一个TFF单元(和其中的至少一个交叉流过滤器)。图8是显示出于平衡系统中至少一个TFF单元的目的的细胞培养物以第一流动方向的流动的示意图。

[0164] 图9显示了实例,其中细胞培养物以第一流动方向持续第一时间段( $t_1$ )从贮液器流通TFF单元、经过时间段( $t_{r1}$ )逆转第一流动方向并以第二流动方向持续第二时间段( $t_2$ )使细胞培养物流通TFF单元、经过时间段( $t_{r2}$ )逆转第二流动方向并以第一流动方向持续第三时间段( $t_3$ )使培养物流通TFF单元。举例来说, $t_{r1}$ 和/或 $t_{r2}$ 可以为约1秒至约1分钟(例如约1秒至约55秒、约1秒至约50秒、约1秒至约45秒、约1秒至约40秒、约1秒至约35秒、约1秒至约30秒、约1秒至约25秒、约1秒至约20秒、约1秒至约15秒、约1秒至约10秒、约1秒至约5秒、约5秒至约60秒、约5秒至约55秒、约5秒至约50秒、约5秒至约45秒、约5秒至约40秒、约5秒至约35秒、约5秒至约30秒、约5秒至约25秒、约5秒至约20秒、约5秒至约15秒、约5秒至约10秒或

约2秒至约10秒、约2秒至约8秒、约2秒至约6秒或约2秒至约4秒)。

[0165] 第一和/或第二方向(例如第一、第二和/或第三时间段中任何时间段)的流动可导致约0.5L/分钟至约120L/分钟的流速(例如约0.5L/分钟至约115L/分钟、约0.5L/分钟至约110L/分钟、约0.5L/分钟至约105L/分钟、约0.5L/分钟至约100L/分钟、约0.5L/分钟至约95L/分钟、约0.5L/分钟至约90L/分钟、约0.5L/分钟至约85L/分钟、约0.5L/分钟至约80L/分钟、约0.5L/分钟至约75L/分钟、约0.5L/分钟至约70L/分钟、约0.1L/分钟至约65L/分钟、约0.1L/分钟至约60L/分钟、约0.1L/分钟至约55L/分钟、约0.1L/分钟至约50L/分钟、约0.1L/分钟至约45L/分钟、约0.1L/分钟至约40L/分钟、约0.1L/分钟至约35L/分钟、约0.1L/分钟至约30L/分钟、约0.1L/分钟至约25L/分钟、约0.1L/分钟至约20L/分钟、约0.1L/分钟至约15L/分钟、约0.1L/分钟至约10L/分钟或约0.1L/分钟至约5L/分钟)。

[0166] (i)使细胞培养物以第一流动方向经第一时间段流动和(ii)使细胞培养物以第二流动方向经第二时间段流动的单次重复可导致约40%至约95%的交换百分数(例如约40%至约90%、约40%至约85%、约40%至约80%、约40%至约75%、约45%至约80%、约50%至约80%、约55%至约75%、约60%至约85%、约70%至约95%或约70%至约85%)。

[0167] 在本文提供的方法中,系统中细胞培养物的体积(排除滤液导管、滤液储存罐和/或生物制造系统)可以为约0.1L至约50L(例如约0.1L至约45L、约0.1L至约40L、约0.1L至约35L、约0.1L至约30L、约0.1L至约25L、约0.1L至约20L、约0.1L至约18L、约0.1L至约16L、约0.1L至约14L、约0.1L至约12L、约0.1L至约10L、约0.1L至约8L、约0.1L至约6L、约0.1L至约4L、约0.1L至约3L、约0.1L至约2L或约0.1L至约1L)。本文所述方法中细胞培养物在贮液器(例如灌注生物反应器)外花费的时间可以为5秒至45秒(例如约5秒至约40秒、约5秒至约35秒、约5秒至约30秒、约5秒至约25秒、约5秒至约20秒、约5秒至约15秒、约5秒至约10秒)。

[0168] 本文提供的方法的一些实施方案产生不包含哺乳动物细胞的滤液。本文提供的方法还可产生包括来自含有分泌重组蛋白的细胞培养物的分泌重组蛋白(例如抗体或其抗原结合片段、生长因子、细胞因子或酶)的滤液。在一些实施方案中,细胞培养物和/或滤液是无菌的。

[0169] 本方法的规模可扩大或缩小以在每时间单元过滤较大体积的细胞培养物。本领域的技术人员将理解的是较大体积的细胞培养物可通过并入至少一个具有较大泵头体积的泵和较大管和/或TFF单元中较多数目的交叉流过滤器或较多数目的TFF单元(例如较大的总过滤面积)进行每时间单元处理。这些改变可在用于实施本文所述方法的开放回路过滤系统中实施且可进行测试以确保较大规模的系统具有下列一项或多项(例如,二、三、四、五、六或七项)益处:与其他单向开放回路过滤系统(例如单向TFF系统)或双向闭合回路过滤系统(闭合回路ATF<sup>TM</sup>系统)相比减少的细胞培养物外部体积(贮液器外)、增加的交换百分数(例如第一导管、TFF单元和第二导管内)、细胞培养物减少的外部停留时间(贮液器外)、细胞培养物过滤过程中减少的剪切应力、细胞培养物中改善的细胞活力、细胞培养物中升高的活细胞密度和减少的过滤器结垢。这些不同示例性方法和用于实施每种方法的开放回路过滤系统的物理和功能性参数的实例示于表2(下文)。

[0170] 本文所述的任何方法可连续实施约14天至约100天的时间段(例如约14天至约90天、约14天至约80天、约14天至约70天、约14天至约60天、约14天至约50天、约14天至约40天、约14天至约30天、约14天至约20天、约20天至约100天、约20天至约90天、约20天至约80

天、约20天至约70天、约20天至约60天、约20天至约50天、约20天至约40天、约20天至约30天、约30天至约100天、约30天至约90天、约30天至约80天、约30天至约70天、约30天至约60天、约30天至约50天、约30天至约40天、约40天至约100天、约50天至约90天、约50天至约80天、约50天至约70天、约50天至约60天、约60天至约100天、约60天至约90天、约60天至约80天或约60天至约70天)。

[0171] 表2.三种不同示例性方法和用于实施每种方法的系统的参数

	过滤器	工作体积(L)	纤维长度(cm)	过滤面积(m <sup>2</sup> )	Xv目标(E6细胞/mL)	灌注速率(L/d)	交換率(L/min)	内部体积(L)	交換百分数(%)	外部停留时间(s)	剪切速率(1/s)	XR:PR	灌注流量(L/m <sup>2</sup> /hr)	泵	泵速(RPM)
[0172]	ATF4	10	30	0.77	40-80	20	3.5	0.55	78	12	716	252	1.08	Watson Marlow 620 带16mm管	68
	2xATF6 或ATF8	50	60	5	40-80	200	8	3.5	50	25	543	58	1.67	Watson Marlow 800 带25mm管	25
	4x ATF10	500	60	40	40-80	2000	60	15	70	15	509	43	2.08	Watson Marlow 800 带40mm管	45

[0173] 在一些实施方案中,在方法实施过程中沿至少一个TFF单元中的一个或多个交叉流过滤器中的过滤纤维的压力变化和/或在至少一个TFF单元中的一个或多个交叉流过滤器中过滤膜上的压力变化保持基本上相同(例如在方法开始时沿过滤纤维或过滤膜上压力的初始变化的约±20%内、约±19%内、约±18%内、约±17%内、约±16%内、约±15%内、约±14%内、约±13%内、约±12%内、约±11%内、约±10%内、约±9%内、约±8%内、约±7%内、约±6%内、约±5%内、约±4%内、约±3%内、约±2.5%内、约±2.0%内、约±1.5%内、约±1.0%内或约±0.5%内),上述方法实施持续约例如约1小时至约100天的时间段(例如约1小时至约95天、约1小时至约90天、约1小时至约90天、约1小时至约85天、约1小时至约80天、约1小时至约75天、约1小时至约70天、约1小时至约65天、约1小时至约60天、约1小时至约55天、约1小时至约50天、约1小时至约45天、约1小时至约40天、约1小时至约35天、约1小时至约30天、约1小时至约25天、约1小时至约20天、约1小时至约15天、约1小时至约10天、约1小时至约5天、约1天至约100天、约1天至约90天、约1天至约85天、约1天至约80天、约1天至约75天、约1天至约70天、约1天至约65天、约1天至约60天、约1天至约55天、约1天至约50天、约1天至约45天、约1天至约40天、约1天至约35天、约1天至约30天、约1天至约25天、约1天至约20天、约1天至约15天、约1天至约10天、约10天至约100天、约10天至约95天、约10天至约90天、约10天至约85天、约10天至约80天、约10天至约75天、约10天至约70天、约10天至约65天、约10天至约60天、约10天至约55天、约10天至约50天、约10天至约45天、约10天至约40天、约10天至约35天、约10天至约30天、约10天至约25天、约10天至约20天、约10天至约15天、约10天至约10天、约5天至约100天、约5天至约95天、约5天至约90天、约5天至约85天、约5天至约80天、约5天至约75天、约5天至约70天、约5天至约65天、约5天至约60天、约5天至约55天、约5天至约50天、约5天至约45天、约5天至约40天、约5天至约35天、约5天至约30天、约5天至约25天、约5天至约20天、约5天至约15天、约5天至约10天、约15天至约100天、约15天至约95天、约15天至约90天、约15天至约85天、约15天至约80天、约15天至约75天、约15天至约70天、约15天至约65天、约15天至约60天、约15天至约55天、约15天至约50天、约15天至约45天、约15天至约40天、约15天至约35天、约15天至约30天、约15天至约25天、约15天至约20天、约15天至约15天、约15天至约10天、约15天至约5天)。过滤纤维或过滤膜上压力变化的显著增加表明系统中的至少一个交叉流过滤器的结

垢。

[0174] 在贮液器中温育细胞培养物

[0175] 一些实施方案进一步包括在贮液器(例如灌注生物反应器)中在允许哺乳动物细胞将重组蛋白分泌入组织培养基的条件下温育细胞培养物。举例来说,贮液器中的细胞培养物可在约32°C至约39°C的温度温育。本领域的技术人员将理解的是在温育的过程中特定时间点的温度可改变(例如以每小时或每日为基础)。举例来说,温度可在将细胞培养物置入贮液器后约一天、二天、三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天、十天、十一天、十二天、十四天、十五天、十六天、十七天、十八天、十九天或约二十天或更久改变或移动(例如增加或减少)。举例来说,温度可向上移动(例如改变多至或约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10.0°C)。举例来说,温度可向下移动(例如改变多至或约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10°C)。细胞培养物在贮液器中的温育也可在包括最多或约1%至15% CO<sub>2</sub>的环境中实施(例如最多或约14% CO<sub>2</sub>、12% CO<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>、8% CO<sub>2</sub>、6% CO<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、4% CO<sub>2</sub>、3% CO<sub>2</sub>、2% CO<sub>2</sub>或最多或约1% CO<sub>2</sub>)。此外,本文所述的任何方法可包括在潮湿的环境中温育胞培养物(例如至少或约20%、30%、40%、50%、60%、70%、85%、80%、85%、90%或至少或约95%的湿度或约100%湿度)。

[0176] 在再次重复第一、第二和第三时间段的过程中贮液器(例如灌注生物反应器)中的细胞培养物的温育可包括添加一定体积的液体培养基至生物反应器的步骤。举例来说,将一定体积的液体培养基添加至生物反应器可抗衡作为滤液离开系统的液体培养基的损失。液体培养基向贮液器的添加可连续或周期(例如每三天一次、每两天一次、每天一次、每天两次、每天三次、每天四次、每天五次或每天多于五次)或以其组合实施。在一些实例中可实施添加一定体积的液体培养基至贮液器由此系统中细胞培养物的初始体积(排除存在于滤液导管和滤液储存罐的滤液体积)在每24-小时的时间段或在所述方法实施的整个时间段内大致相同。如本领域已知,液体培养基从系统作为滤液去除的速率(体积/时间单位)和一定体积的液体培养基添加至贮液器的速率(体积/时间单位)可有所变化。液体培养基从系统作为滤液去除的速率(体积/时间单位)和添加一定体积的液体培养基的速率(体积/时间单位)可大致相同或不同。

[0177] 可替换地,在实施所述方法的过程中,从系统作为滤液去除的体积和添加至贮液器的体积在每24-小时的时间段(或可替换地,0.1小时至约24小时的增量时间段或多于24小时的增量时间段)可变化(例如逐渐增加)。举例来说,从系统作为滤液去除的液体培养基的体积和添加的液体培养基的体积在实施所述方法过程中在每24-小时时间段内(或可替换地,1小时至24小时以上的渐进时间段或多于24小时的渐进时间段)可例如从方法实施开始时的贮液器体积或总细胞培养物体积的0.5%至约20%的体积增加(例如逐渐或通过交错递增)至约方法实施开始时的贮液器体积或总细胞培养物体积的25%至约150%。本领域的技术人员可以理解的是,在24-小时的时间段内,从系统作为滤液去除的体积和添加至贮液器的体积优选为约方法实施开始时的贮液器体积或总细胞培养物体积的约100%至约400%(例如约100%至约350%、约100%至约300%、约100%至约250%、约100%至约200%、约100%至约150%、约150%至约400%、约150%至约350%、约150%至约300%、约

150%至约250%、约150%至约200%、约200%至约400%、约200%至约350%、约200%至约300%或约200%至约250%)。

[0178] 本领域的技术人员将理解的是从洗脱作为滤液去除的液体培养基和添加至贮液器的液体培养基可以是相同类型的培养基。在其他实例中,从系统作为滤液去除的液体培养基和添加至贮液器的液体培养基可实质上不同。一定体积的液体培养基可手动或使用自动化系统例如通过灌注泵添加。

[0179] 从滤液分离重组蛋白

[0180] 本文所述的任何方法可进一步包括从滤液分离分泌重组蛋白(例如任何本文所述的重组蛋白)的步骤。用于从流体分离多肽(例如分泌多肽)的多种方法为本领域已知。举例来说,用于分离重组蛋白的方法可包括下列一个或多个步骤:捕获、纯化、精制和/或过滤包括重组蛋白的流体。如本领域熟知,用于分离重组蛋白的特定方法将取决于重组蛋白的生物物理特性。举例来说,重组抗体可部分使用应用蛋白A树脂捕获抗体的步骤纯化。

[0181] 在一些实例中,滤液中存在的重组蛋白使用包括通过至少一个多重柱层析系统(MCCS)(例如任何一个或多个本文所述的MCCS)的分离的整合和连续的方法进行分离。整合和连续的方法可使用任何本文所述的示例性生物制造系统实施。用于分离重组蛋白的示例性整合和连续方法和将用于这些方法中的生物制造系统描述于2013年3月8日提交的美国专利申请系列号61/775,060和2013年7月19日提交的美国专利申请系列号61/856,390。

[0182] 获得的分离重组蛋白按重量可以为至少或约50%纯,例如按重量至少或约55%纯、按重量至少60%纯、按重量至少65%纯、按重量至少70%纯、按重量至少75%纯、按重量至少80%纯、按重量至少85%纯、按重量至少90%纯、按重量至少95%纯、按重量至少96%纯、按重量至少97%纯、按重量至少98%纯或按重量至少或约99%纯或按重量大于99%纯。

[0183] 一些方法进一步包括通过将分离的重组蛋白与药物上可接受的赋形剂或缓冲剂混合配制治疗性药物物质的步骤。混合可通过将包括分离的重组蛋白的流体与缓冲溶液混合实施。在其他实例中,混合可用过将固体缓冲剂添加至具有缓冲溶液的包括分离的重组蛋白的流体中实施。涵盖在本文中的混合的另一种形式是溶解具有缓冲溶液(例如可注射的无菌盐水)的包括分离的重组蛋白的固体组合物(例如冻干粉末或饼)。可配制治疗性药物物质用于任何本领域已知的施用途径(例如口服施用、静脉内施用、动脉内施用、肌肉内施用、腹膜内施用、皮下施用、鞘内施用或吸入)。

## 实施例

[0184] 本发明在下列实施例中进一步详述,其并不限制权利要求描述的本发明的保护范围。

[0185] 实施例1.通过本文提供的开放回路过滤系统实现的处理对比通过ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology)实现的处理的比较

[0186] 实施一组实验以比较通过本文提供的开放回路过滤系统实现的细胞培养物处理对比通过ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology)(一种交替切向流过滤系统的闭合回路)实现的细胞培养物处理。用于实施这些实验的装置一般性地描述于图5。具体地,在开放回路过滤系统中使用的贮液器是Broadly-James 15L生物反应器,第一导管和第二导管是具有0.5英寸的内径的生物相容的焊接输送管,TFF单元包括单管状交叉流过滤器(由聚醚砜纤维组成,具有

30cm的长度和1mm的内径,且具有 $0.2\mu\text{m}$ 的平均孔径、830纤维/过滤器的纤维密度和 $0.77\text{m}^2$ 的过滤面积)、至少一个泵是能够使流体以第一和第二流动方向流动的单Watson-Marlow蠕动泵,具有50mL至100mL的泵头体积,伴随具有16mm的内径和4mm的壁径的双通道GORE Sta-Pure管。

[0187] 材料和方法

[0188] 用于比较通过本发明给出的开放回路过滤系统和Refine Technology的ATF<sup>TM</sup>实现的处理的实验参数概述总结于表3和4中(下文)。用于实施这些实验的方法的进一步详细总结提供如下。

[0189] 表3. 实验参数

参数	详述	
	TFF	ATF4
细胞系	GC2008 克隆 A61, 高密度库“GC2008 A61 HD WAVE,” $45 \times 10^7$ 细胞/小瓶	
培养基	具有谷氨酰胺的 CD CHO	
生物反应器	Broadly James 15 L 生物反应器	
工作体积	10 L	
生物反应器接种物	摇瓶种子培养	
接种密度	$0.5 - 1 \times 10^6$ 细胞/mL	
细胞密度目标	使用 2 反应器体积(RV)/天允许达到 $40 \times 10^6$ 细胞/mL, 并泄放维护	
细胞比灌注速率	0.05 mL/细胞·天	
生物质去除(按需要)	如果容量(Aber) vs 细胞密度相关性良好, 使用容量以控制泄放速率。可替换地, 使用 O <sub>2</sub> 喷射	
温度	37 °C	
[0190] 搅拌	120 RPM	
DO	$\geq 40\%$	
碱	1M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (碳酸钠)	
消泡剂	Invitrogen Foam Away 3% Simethicone (30,000 PPM) 工作储液: 3000PPM (WFI 中稀释)	
pCO <sub>2</sub>	<120 mmHg, 如果>120 mmHg 用 N <sub>2</sub> 喷射	
pH	$6.95 \pm 0.1$	
气体添加	喷射: 氧气、CO <sub>2</sub> (按需要)、N <sub>2</sub> (按需要) 覆盖: 100 CCPM 的空气	
O <sub>2</sub> 喷射器	20 μm 烧结的	
N <sub>2</sub> 喷射器	1 mm 钻孔的	
细胞分离装置	具有 Watson-Marlow 620Du 蠕动泵的 TFF, 620L 泵头、 16mm ID Gore sta-纯化管 ATF4 过滤器 (0.2 μm)	Refine ATF4

[0191]	ATF/TFF 交换速率	3.5 L/分钟 (65-70 rpm), 每 1 分钟逆转	3.5 L/分钟, 每 7 秒逆转
--------	--------------	--------------------------------	-------------------

[0192] 表4. 参数的比较

[0193]	交换率 (L/min)	传输管 ID (英寸)	外部体积 (L)	交换百分 比(%)	外部停留 时间(s)	泵 RPM	剪切速 率(1/s)	交換速 率:灌 注速率	泵逆轉時 間(s)
ATF4	3.5	0.375	0.756	19	71	N/A	716	252	7
TFF	3.5	0.500	0.550	78	12.1	68.5	716	252	60

[0194] 用于运行灌注生物反应器的条件列于表3中。将生物反应器保持在 $40 \times 10^6$ 细胞/mL, 具有10L工作体积并用CD-CHO培养基以2反应器体积/天替换。测试的本文提供的开放回路过滤系统包括与ATF4相同的过滤器和外罩, 但使用了具有50mL至100mL的泵头体积的Watson-Marlow蠕动泵620Du作为培养再循环泵以可逆地使细胞培养物流通所述系统(示于图5) 和开放回路系统(而非ATF4中使用的闭合系统)。在培养的第20天, ATF4生物反应器灌注速率从2反应器体积/天变为1反应器体积/天, 而本文提供的测试的开放回路过滤系统在第32天从2反应器体积/天的灌注速率变为1反应器体积/天, 还补充10% Efficient Feed B(Gibco, Invitrogen)。

#### [0195] 结果

[0196] 测试的本文提供的开放回路过滤系统在第9和10天达到 $40 \times 10^6$ 细胞/mL的活细胞密度, 并比相应的ATF系统较早达到 $40 \times 10^6$ 细胞/mL的细胞密度(图10)。一旦培养物达到 $40 \times 10^6$ 细胞/mL, 测试的本文提供的开放回路过滤系统的活细胞百分比为约90%, 并持续减少直至经过三周稳定在70% (图11)。测试的本文提供的开放回路过滤系统的细胞培养物的容量与ATF系统中的细胞培养物相比有所升高(图12), 且来自测试的本文提供的开放回路过滤系统的细胞培养物和ATF系统的细胞培养物的活细胞平均直径是相似的(图13)。

[0197] 本文提供的开放回路过滤系统中细胞培养物和ATF系统的细胞培养物的生产率概貌示于图14、图15、图16和图17中。与ATF系统相比, 通过本文提供的开放回路过滤系统中的细胞培养物产生的IgG的浓度在稍晚的时间点增加(图14)。本文提供的开放回路过滤系统中细胞培养物的体积生产率和比生产率与ATF系统中的细胞培养物相比增加(分别在图15和图16中)。测试的本文提供的开放回路过滤系统中细胞培养物的筛分系数在培养三周后保持在约90%, 且大于ATF系统中细胞培养物的筛分系数(图17)。

[0198] 每个测试的系统的葡萄糖和乳酸盐生产概貌示于图18、图19、图20和图21。测试的本文提供的开放回路过滤系统中细胞培养物的比葡萄糖消耗速率和比乳酸盐生产速率大于ATF系统中细胞培养物的比葡萄糖消耗速率和比乳酸盐生产速率(分别在图18和图19中)。此外, 来自葡萄糖的比有氧葡萄糖消耗速率和乳酸盐产量在测试的本文提供的开放回路过滤系统的细胞培养物中高于来自ATF系统细胞培养物中的葡萄糖的比有氧葡萄糖消耗速率和乳酸盐产量(分别在图20和图21中)。

[0199] 这些数据表明本发明提供的开放回路过滤系统提供了与另一闭合回路切向过滤系统(ATF<sup>TM</sup>系统, Refine Technology)相比具有改善的或可比较的细胞培养物特性的细胞培养物, 如增加的或可比较的容量、增加的或可比较的体积或比生产率、增加或可比较的筛分系数和增加的或可比较的比葡萄糖消耗。

#### [0200] 实施例2. 开放回路过滤系统中观察到的活细胞密度

[0201] 实施试验以确定使用本文提供的开放回路过滤系统实现的最高活细胞密度, 且任选地, 在相似条件下, 将确定的活细胞密度与使用ATF<sup>TM</sup>(Refine Technology) (交替切向流

过滤系统的闭合回路)实现的活细胞密度进行了比较。在这些实验中使用的装置一般的描述于图5中。具体地,在开放回路过滤系统中使用的贮液器是Broadly-James 15L生物反应器,第一导管和第二导管是具有0.5英寸的内径的生物相容性焊接输送管,TFF单元包括单管状交叉流过滤器(由聚醚砜纤维组成,具有30cm的长度和1mm的内径,且具有0.2 $\mu\text{m}$ 的平均孔径、830纤维/过滤器的纤维密度和0.77 $\text{m}^2$ 的过滤面积),至少一个泵是能够使流体以第一和第二流动方向流动的单Watson-Marlow蠕动泵,具有50mL至100mL的泵头体积,伴随具有16mm的内径和4mm的壁径的双通道GORE Sta-Pure管。

[0202] 材料和方法

[0203] 用于确定可使用本发明提供的开放回路过滤系统(和任选地ATF<sup>TM</sup>,Refine Technology)实现的最高细胞密度的实验参数概述示于表5中。在这些实验中使用的方法的进一步详细总结提供于下文中。

[0204] 表5.实验参数

参数	详述	
	TFF	ATF4
细胞系	GC2008 克隆 A61, HD 库“GC2008 A61 HD WAVE,” $45 \times 10^7$ 细胞/小瓶	
培养基	具有谷氨酰胺的 CD CHO	
生物反应器	Broadly James 15 L 生物反应器	
工作体积	10 L	
生物反应器接种物	摇瓶种子培养	
接种密度	$0.5 - 1 \times 10^6$ 细胞/mL	
细胞密度	以增加的灌注速率允许细胞连续生长进而匹配 0.05 nL/细胞·天的 CSPR, 不具有或具有低泄放以维持细胞密度	
细胞比灌注速率	0.05 nL/细胞·天	
温度	37 °C	
搅拌	120 RPM	
DO	$\geq 40\%$	
碱	1M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (碳酸钠)	
消泡剂	Invitrogen Foam Away 3% Simethicone (30,000 PPM) 工作储液:3000PPM (WFI 中稀释)	
pCO <sub>2</sub>	<120 mmHg, 如果>120 mmHg 用 N <sub>2</sub> 喷射	
pH	$6.95 \pm 0.1$	
气体添加	喷射: 氧气、CO <sub>2</sub> (按需要)、N <sub>2</sub> (按需要) 覆盖: 100 CCPM 的空气	
O <sub>2</sub> 喷射器	20 $\mu\text{m}$ 烧结的	
N <sub>2</sub> 喷射器	1 mm 钻孔的	
细胞分离装置	具有 Watson-Marlow 620Du 蠕动泵的 TFF, 具有 620L 泵头、16mm ID Gore sta-纯化管 ATF4 过滤器(0.2 $\mu\text{m}$ )	Refine ATF4
ATF/TFF 交换率	3.5 L/分钟 (65-70 rpm), 每 1 分钟逆转	3.5 L/分钟, 每 7 秒逆转

[0206] 运行灌注生物反应器所使用的条件列于表5中。允许细胞在生物反应器中以10-L工作体积生长,并使用CD-CHO培养基充分替换以维持0.05nL/细胞·天的细胞比灌注速率。开放回路过滤系统包括与ATF4相同的过滤器和外罩,但使用了具有50mL至100mL的泵头体

积的Watson-Marlow蠕动泵620Du作为培养再循环泵以可逆地使细胞培养物流通所述系统(示于图5)和开放回路系统(而非ATF4中使用的闭合系统)。在运行细胞培养物处理过程中每天一次确定细胞培养物的活细胞密度。

[0207] 其他实施方案

[0208] 可以理解的是尽管本发明已连同其发明详述进行了描述,上述说明意在阐述而并非限制本发明的保护范围,其通过附加的权利要求的保护范围限定。其他方面、优势和修饰在下列权利要求的保护范围内。

[0209] 更具体地,本申请提供下列各项:

[0210] 1.一种处理细胞培养物的方法,所述方法包括:

[0211] (a)提供开放回路过滤系统,其包括含有细胞培养物的贮液器、具有第一和第二入口的切向流过滤(TFF)单元、流体连通所述贮液器和所述TFF单元第一入口间的第一导管,和流体连通所述贮液器和所述TFF单元第二入口间的第一导管,和至少一个置于系统中用于使流体流通所述系统的泵,其中配置所述系统进而流体可经由所述至少一个泵从或至所述贮液器可逆地流通所述系统并流通所述第一和第二导管和所述TFF单元,并可从TFF单元收集滤液;

[0212] (b)使细胞培养物以第一流动方向持续第一时间段从所述贮液器流通所述TFF单元,

[0213] (c)逆转所述第一流动方向并使所述细胞培养物以第二流动方向持续第二时间段流通所述TFF单元;

[0214] (d)逆转所述第二流动方向并使所述培养物以第一流动方向持续第三时间段流通所述TFF单元;

[0215] (e)重复步骤(c)-(d)至少两次;并

[0216] (f)收集滤液。

[0217] 2.根据项1所述的方法,其中所述贮液器是生物反应器。

[0218] 3.根据项1所述的方法,其中所述贮液器是冷藏储存罐。

[0219] 4.根据项1所述的方法,其中所述第一和第二导管之一或两者包括生物相容性管。

[0220] 5.根据项1所述的方法,其中所述TFF单元包括单交叉流过滤器。

[0221] 6.根据项5所述的方法,其中所述单交叉流过滤器是管状交叉流过滤器。

[0222] 7.根据项1所述的方法,其中所述TFF单元包括两个或多个交叉流过滤器。

[0223] 8.根据项1所述的方法,其中所述系统包括置于所述第一导管、所述第二导管或两者中的一个或多个额外的TFF单元。

[0224] 9.根据项5-8任一项所述的方法,其中所述交叉流过滤器具有约0.2微米的平均孔径。

[0225] 10.根据项1所述的方法,其中所述至少一个泵置于所述第一导管或所述第二导管或两者中。

[0226] 11.根据项8所述的方法,其中所述至少一个泵置于任何两个TFF单元间的系统中。

[0227] 12.根据项1所述的方法,其中所述至少一个泵置于所述贮液器中并接近所述第一或所述第二流体导管。

[0228] 13.根据项1和10-12任一项所述的方法,其中所述至少一个泵是低湍流泵(LTP)。

- [0229] 14. 根据项13所述的方法,其中所述LTP是蠕动泵。
- [0230] 15. 根据项13所述的方法,其中所述系统包括第一和第二LTP,其中所述第一LTP以第一方向使细胞培养物流动且所述第二LTP以第二方向使细胞培养物流动。
- [0231] 16. 根据项13所述的方法,其中所述系统包括单LTP,其中所述单LTP在第一和第三时间段使所述细胞培养物以第一方向流动且在第二时间段使所述细胞培养物以第二方向流动。
- [0232] 17. 根据项1所述的方法,其中所述第一、第二和第三时间段为约30秒至约15分钟。
- [0233] 18. 根据项1所述的方法,其中所述细胞培养物以约0.5L/分钟至约80L/分钟的速度在(a)、(b)和(c)的一步或多步中流动。
- [0234] 19. 根据项18所述的方法,其中所述细胞培养物以约3.0L/分钟至约60L/分钟的速度在(a)、(b)和(c)的一步或多步中流动。
- [0235] 20. 根据项1所述的方法,其中(b)和(c)的单次重复导致多于50%的交换百分数(exchange fraction)。
- [0236] 21. 根据项1所述的方法,其中所述滤液不包含哺乳动物细胞。
- [0237] 22. 根据项1所述的方法,其中所述细胞培养物包含分泌重组蛋白且所述滤液包含分泌重组蛋白。
- [0238] 23. 根据项22所述的方法,其中所述分泌重组蛋白是抗体或其抗原结合片段、生长因子、细胞因子或酶,或其组合。
- [0239] 24. 根据项22所述的方法,其进一步包括从所述滤液分离所述分泌重组蛋白。
- [0240] 25. 根据项24所述的方法,其中分离使用包括通过至少一个多重柱层析系统(MCCS)的分离的整合和连续步骤实施。
- [0241] 26. 根据项24所述的方法,其进一步包括通过将分离的重组蛋白与药物上可接受的赋形剂或缓冲剂混合配制治疗性药物物质。
- [0242] 27. 根据项1所述的方法,其中所述细胞培养物或滤液或两者是无菌的。
- [0243] 28. 根据项1所述的方法,其中所述方法连续实施约14天至约80天的时间段。
- [0244] 29. 一种开放回路过滤系统,其包括贮液器、具有第一和第二入口的切向流过滤(TFF)单元,流体连通所述贮液器和所述TFF单元第一入口的第一导管和流体连通所述贮液器和所述TFF单元第二入口的第二导管,和至少一个置于所述系统中的泵,其中驱动所述至少一个泵使流体可逆地从所述贮液器流通所述系统、流通所述第一导管、所述TFF单元、所述第二导管并流回至所述贮液器。
- [0245] 30. 根据项29所述的开放回路过滤系统,其中所述贮液器是生物反应器。
- [0246] 31. 根据项29所述的开放回路过滤系统,其中所述贮液器是冷藏储存罐。
- [0247] 32. 根据项29所述的开放回路过滤系统,其中所述第一和第二导管之一或两者包括生物相容性管。
- [0248] 33. 根据项29所述的开放回路过滤系统,其中所述TFF单元包括单交叉流过滤器。
- [0249] 34. 根据项33所述的开放回路过滤系统,其中所述单交叉流过滤器是管状交叉流过滤器。
- [0250] 35. 根据项29所述的开放回路过滤系统,其中所述TFF单元包括两个或多个交叉流过滤器。

- [0251] 36. 根据项29所述的开放回路过滤系统, 其中所述系统包括置于所述第一导管、所述第二导管或两者中的一个或多个额外的TFF单元。
- [0252] 37. 根据项33-36任一项所述的开放回路过滤系统, 其中所述交叉流过滤器具有约0.2微米的平均孔径。
- [0253] 38. 根据项29所述的开放回路过滤系统, 其中所述至少一个泵置于所述第一导管或所述第二导管或两者中。
- [0254] 39. 根据项36所述的开放回路过滤系统, 其中所述至少一个泵置于任何两个TFF单元间的系统中。
- [0255] 40. 根据项29所述的开放回路过滤系统, 其中所述至少一个泵置于所述贮液器中并接近所述第一或所述第二流体导管。
- [0256] 41. 根据项29和38-40任一项所述的开放回路过滤系统, 其中所述至少一个泵是低湍流泵 (LTP)。
- [0257] 42. 根据项41所述的开放回路过滤系统, 其中所述LTP是蠕动泵。
- [0258] 43. 根据项41所述的开放回路过滤系统, 其中所述系统包括第一和第二LTP, 其中所述第一LTP适于使所述细胞培养物以第一流动方向流动且所述第二LTP适于逆转所述第一流动方向并使所述细胞培养物以第二流动方向流动。
- [0259] 44. 根据项41所述的开放回路过滤系统, 其中所述系统包括适于可逆地使所述细胞培养物以第一和第二流动方向流动的单LTP。
- [0260] 45. 根据项42所述的开放回路过滤系统, 其中所述蠕动泵具有约20mL至约250mL的泵头体积。
- [0261] 46. 根据项29所述的开放回路过滤系统, 其进一步包括滤液储存罐和流体连通所述TFF单元和所述滤液储存罐间的滤液导管。
- [0262] 47. 根据项29所述的开放回路过滤系统, 其进一步包括生物制造系统, 所述生物制造系统包括至少一个多重柱层析系统 (MCCS) 和入口和出口和流体连通TFF单元和所述生物制造系统入口间的滤液导管, 其中配置所述装置进而滤液流入所述生物制造系统的入口, 通过所述至少一个MCCS并通过所述生物制造系统的出口排出所述装置。
- [0263] 48. 根据项29所述的开放回路过滤系统, 其中所述TFF单元置于外罩中。

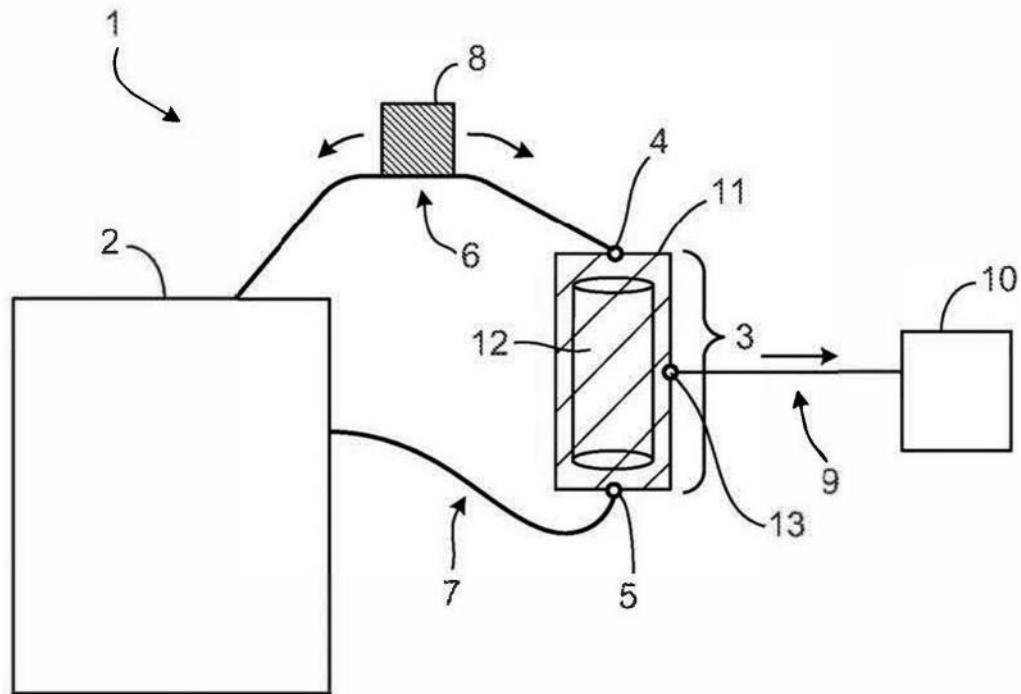


图1

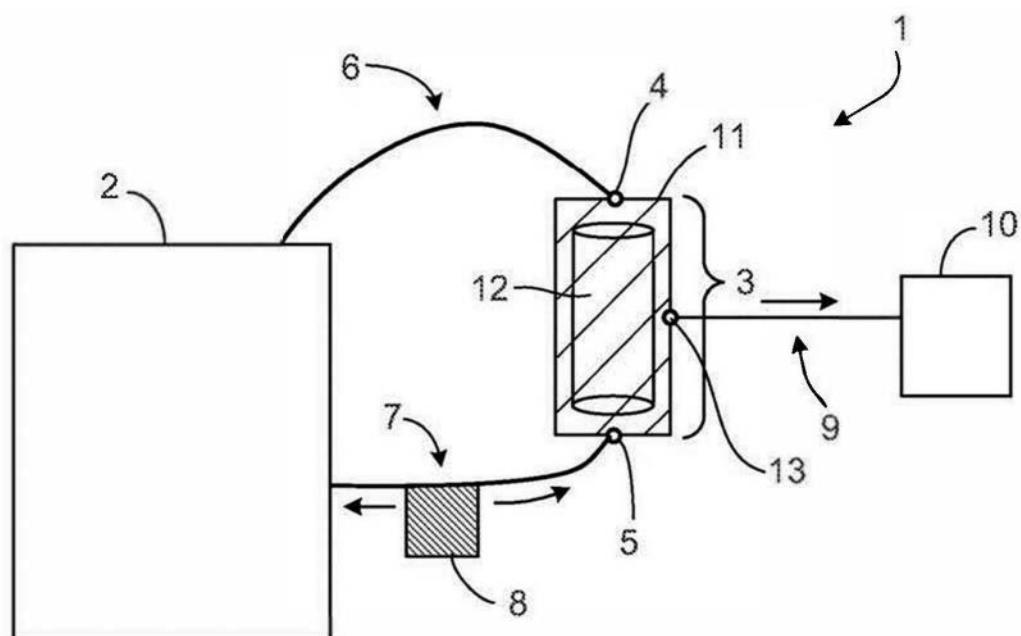


图2

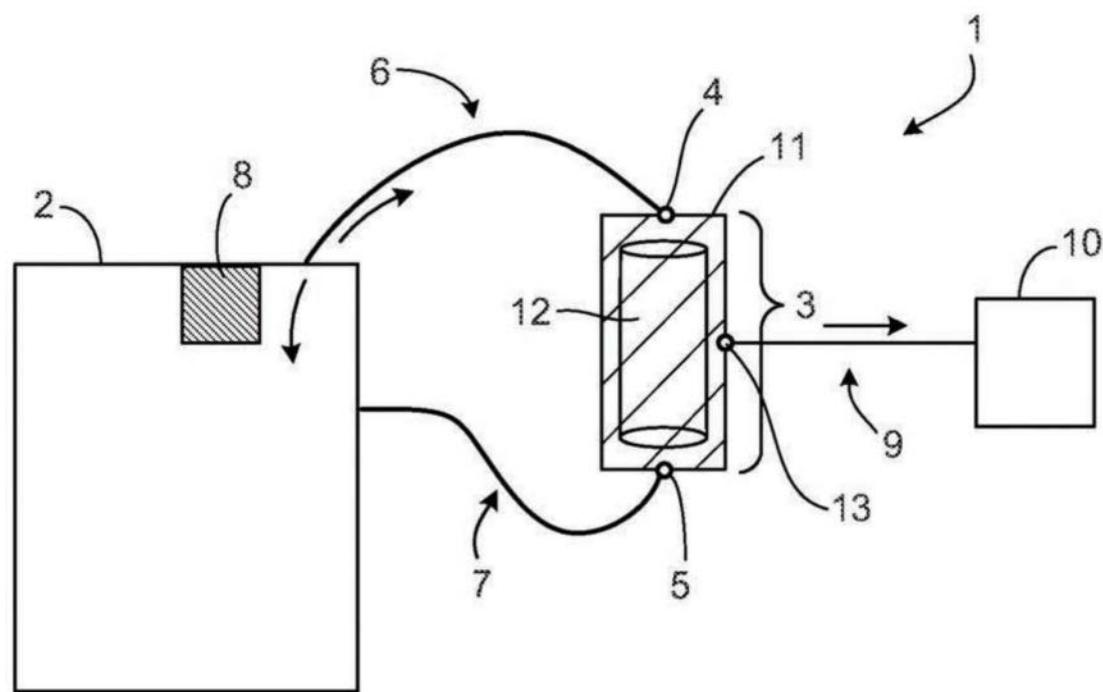


图3

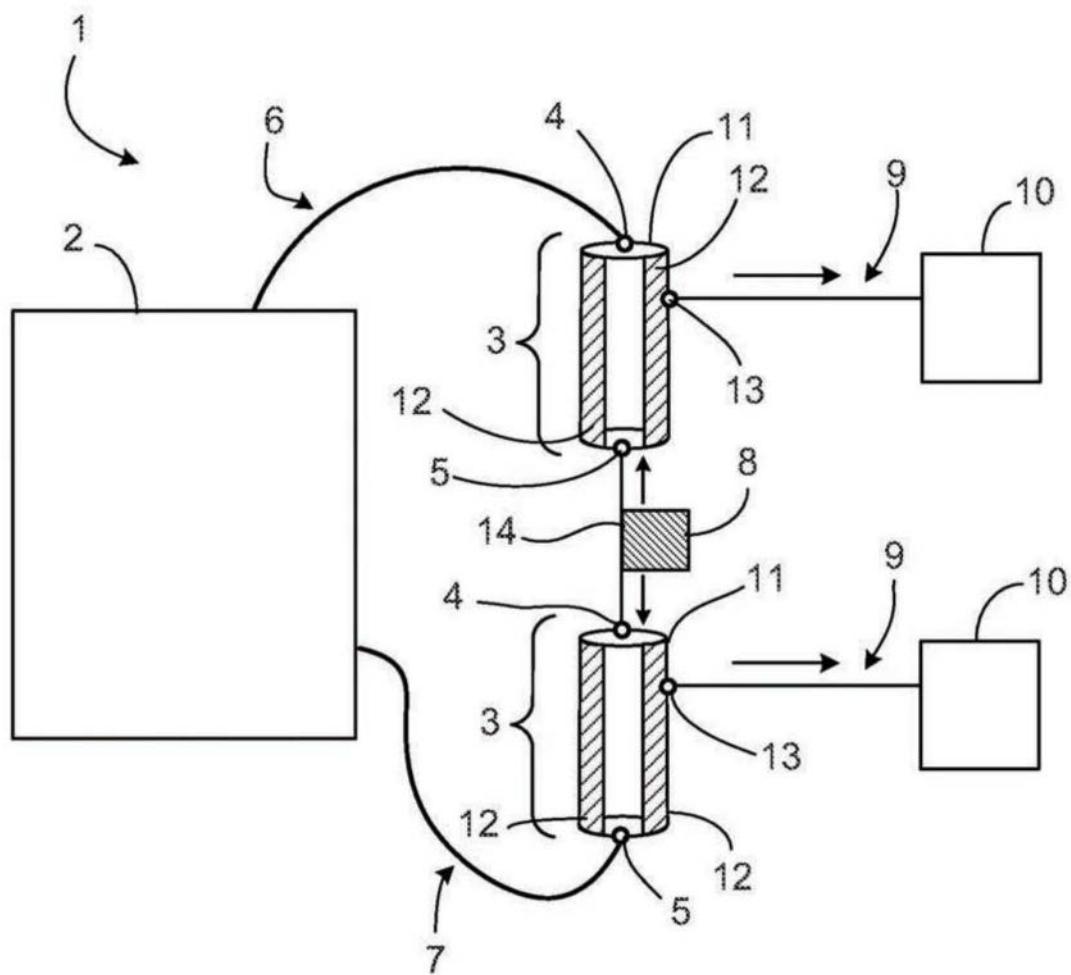


图4

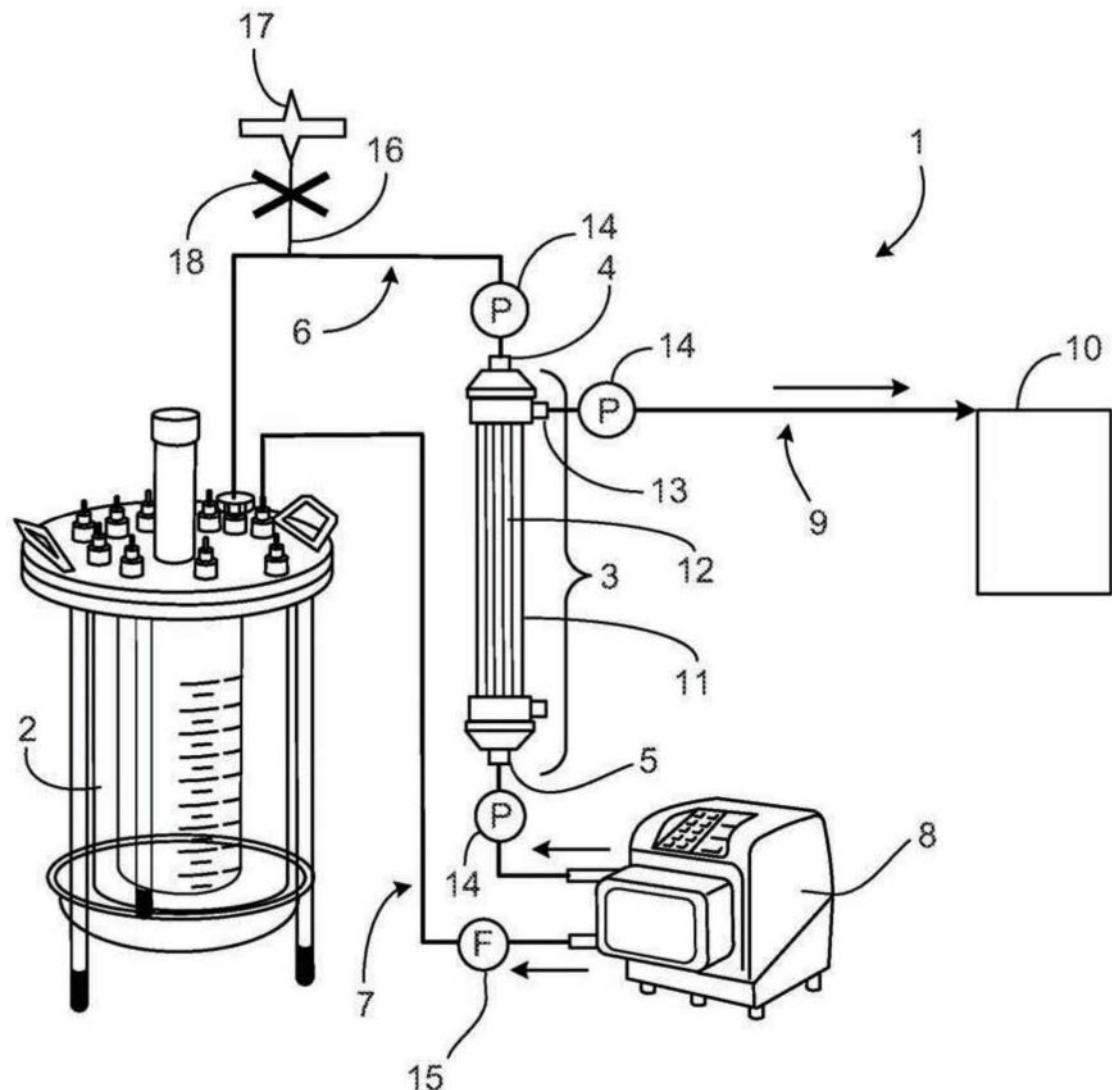


图5

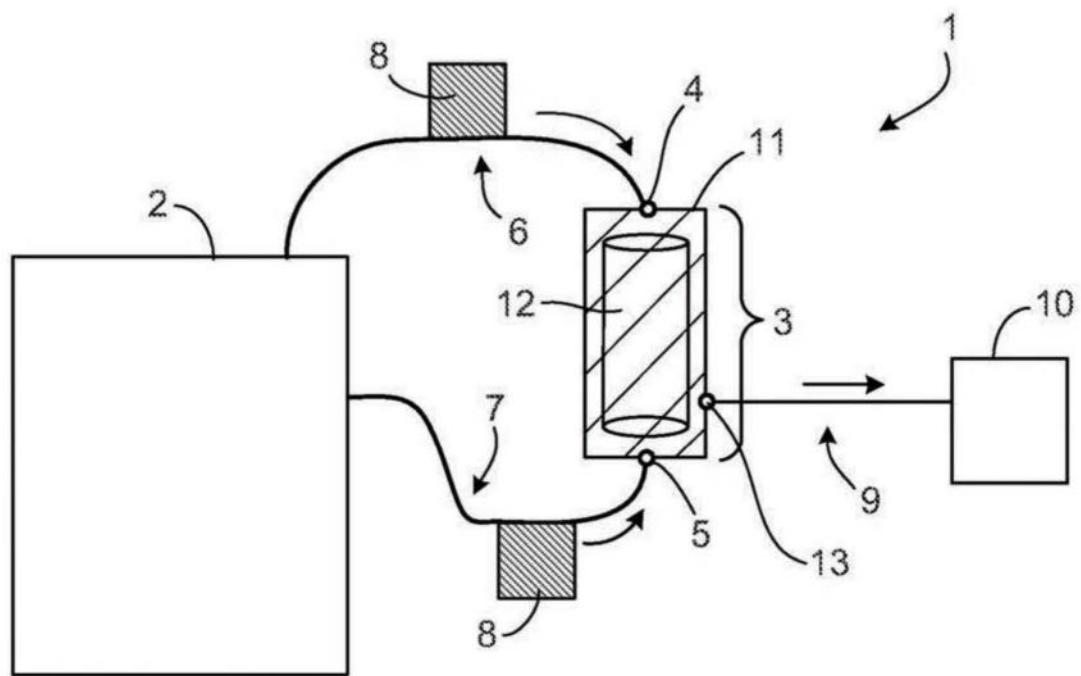


图6

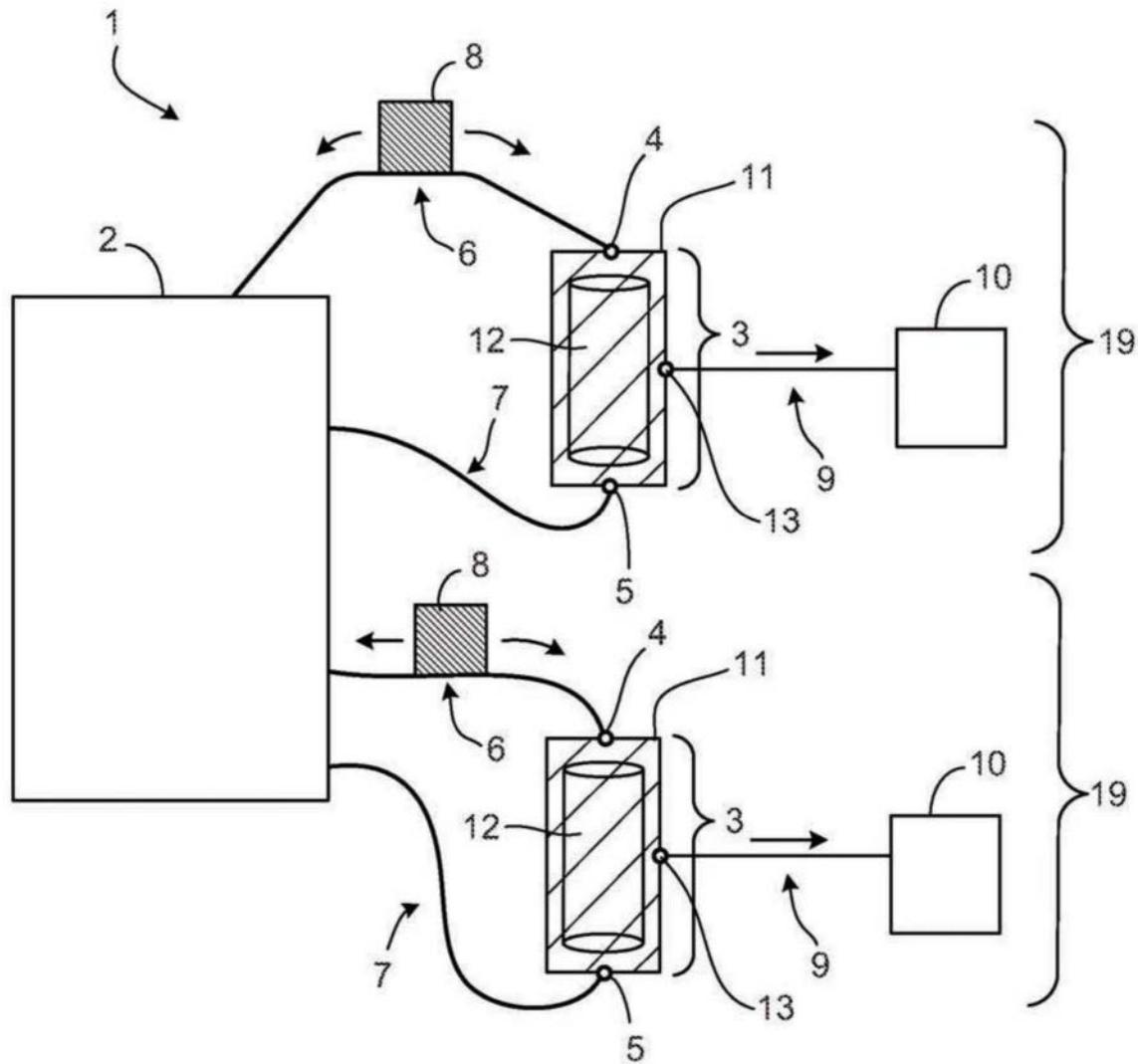


图7

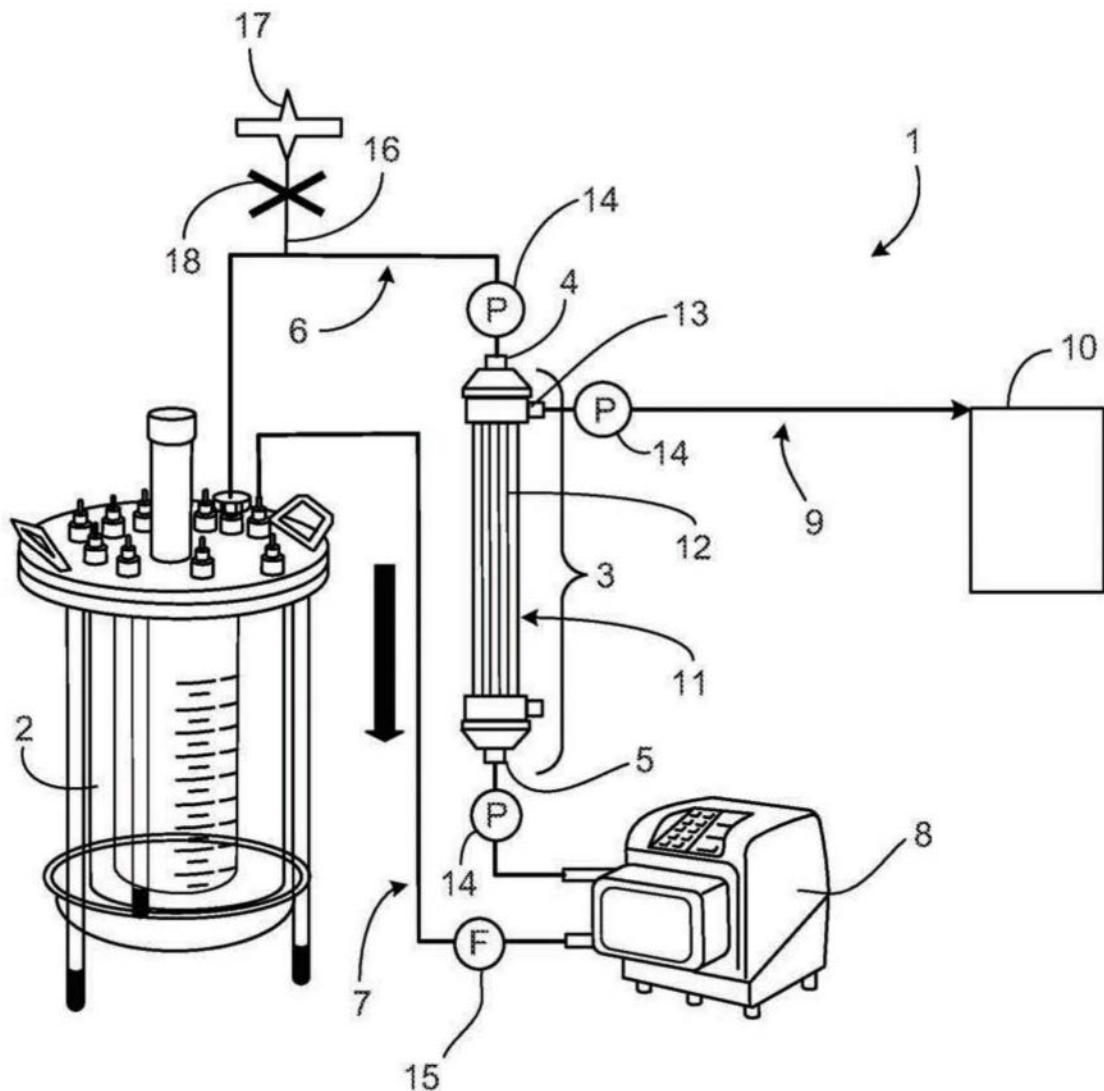


图8

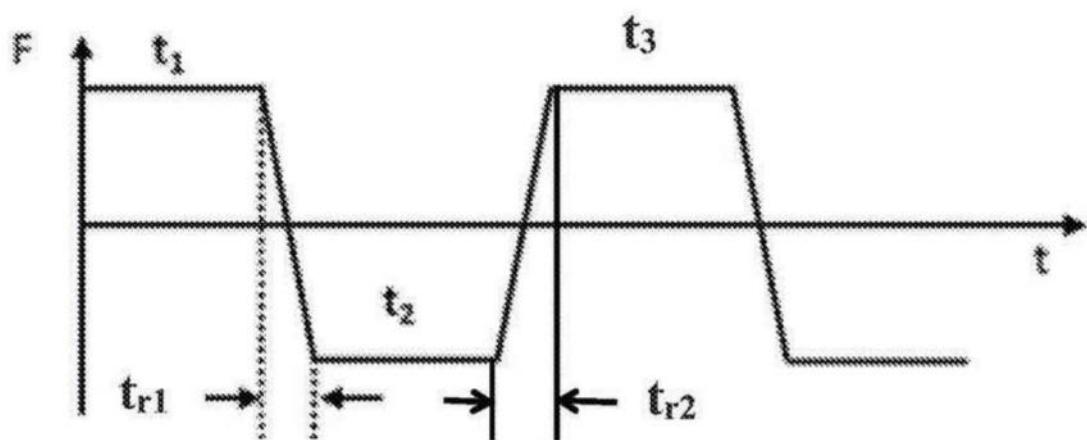


图9

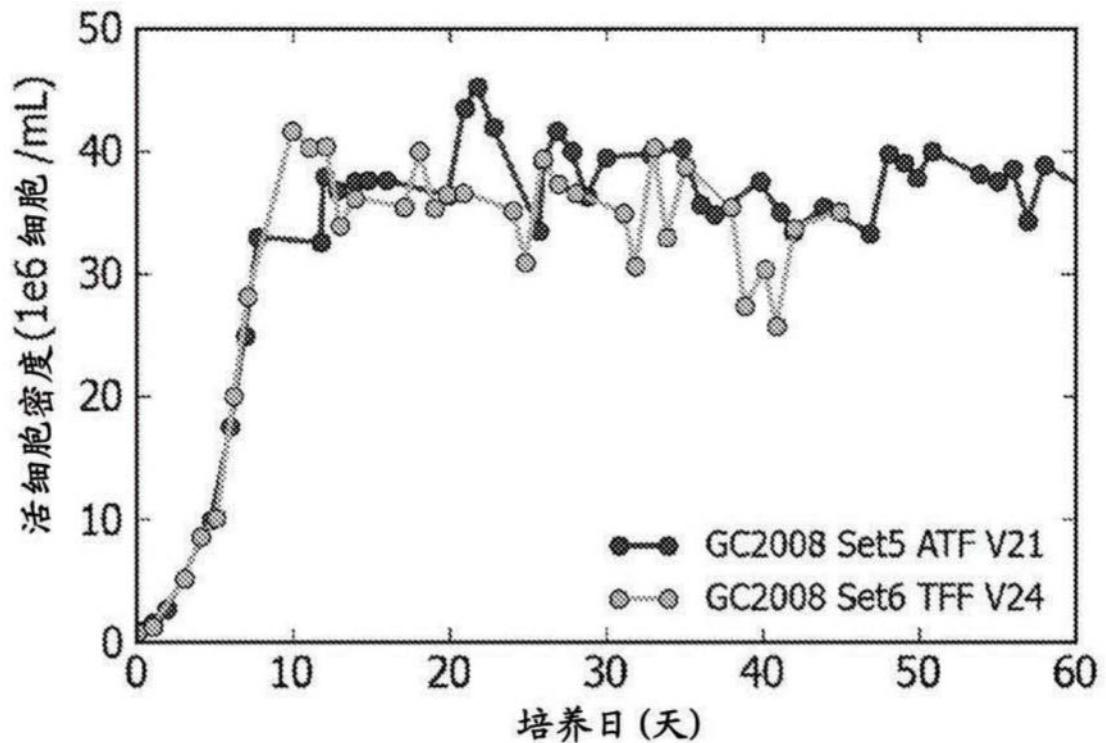


图10

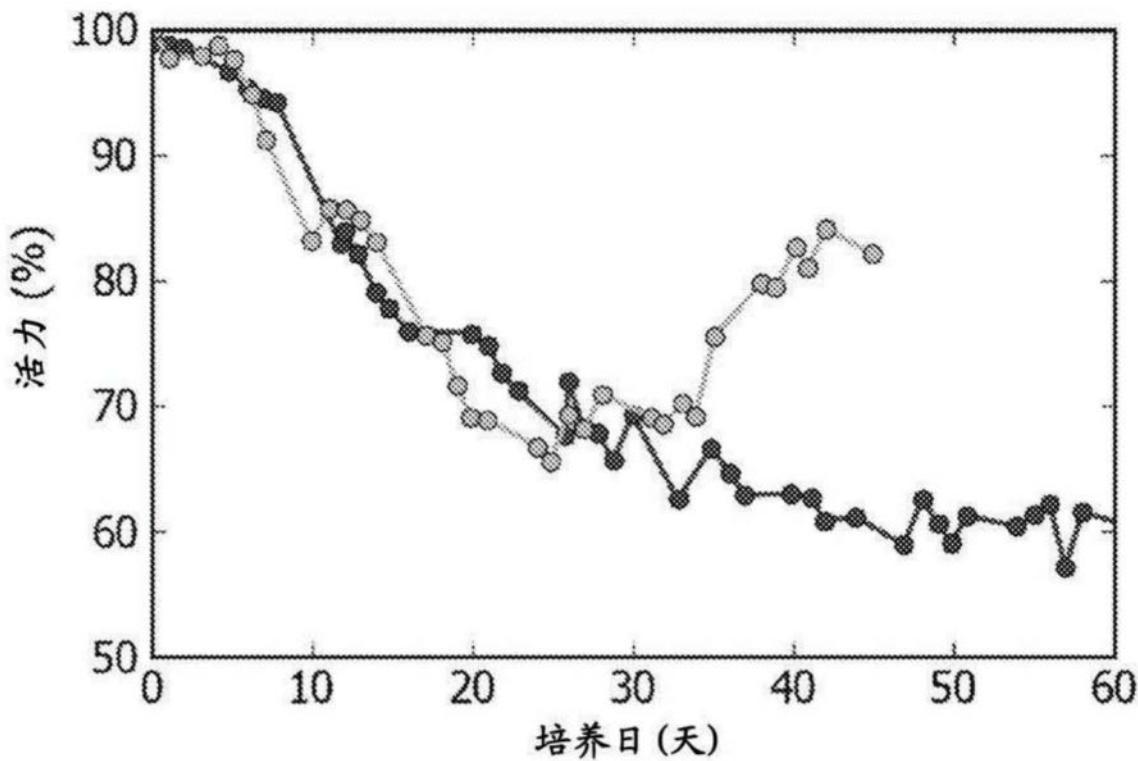


图11

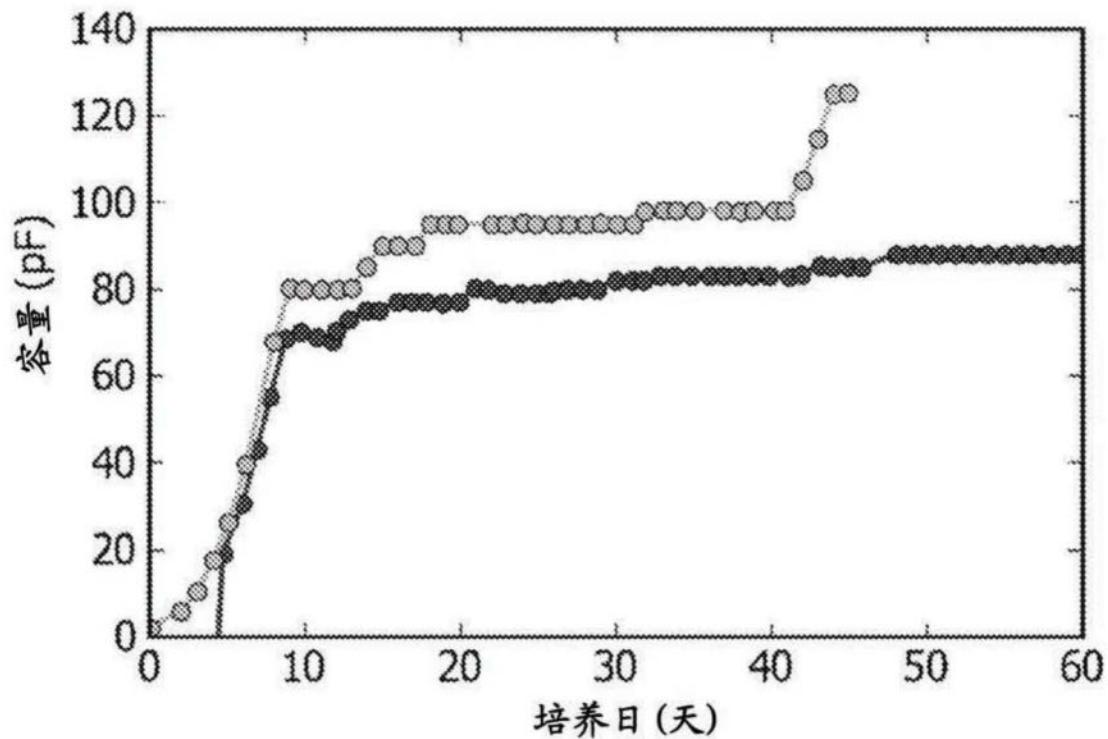


图12

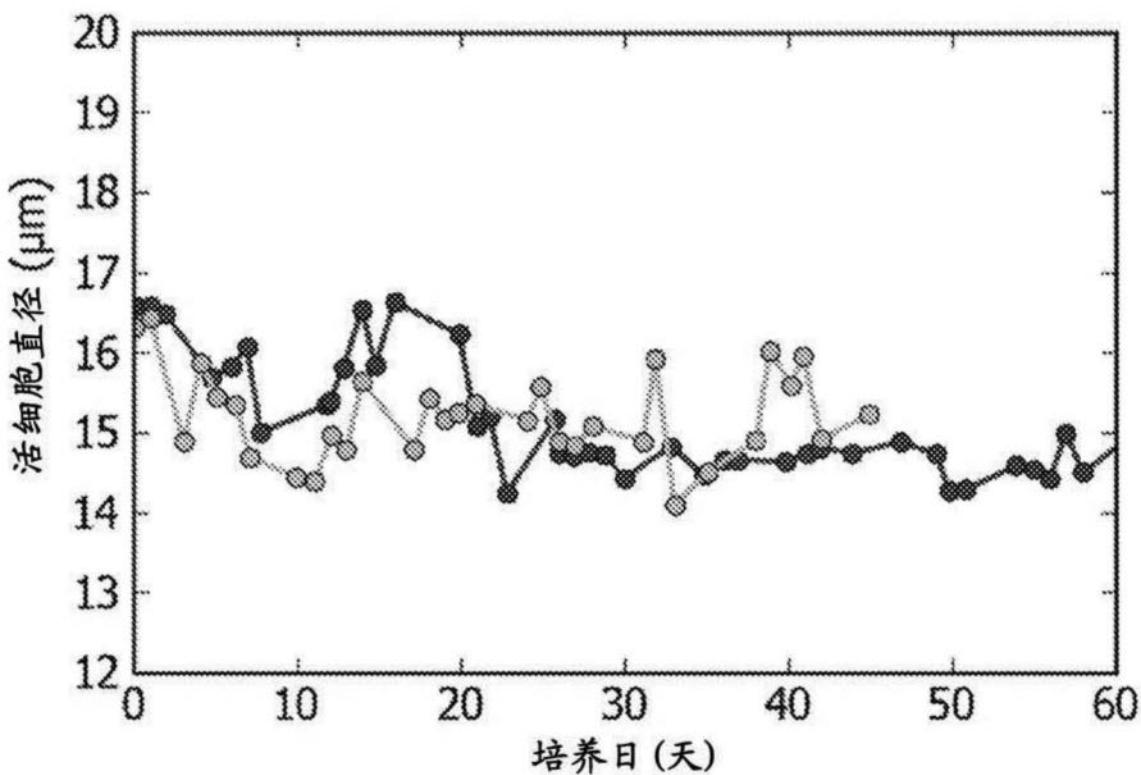


图13

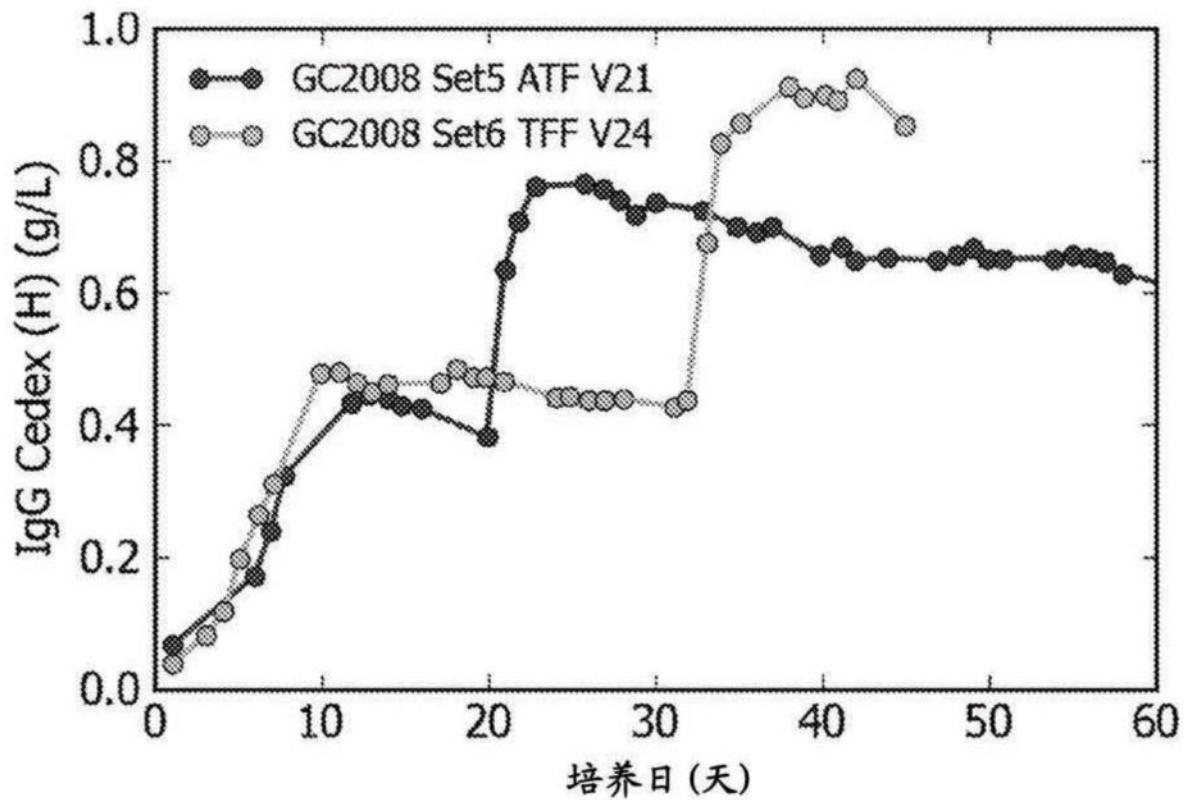


图14

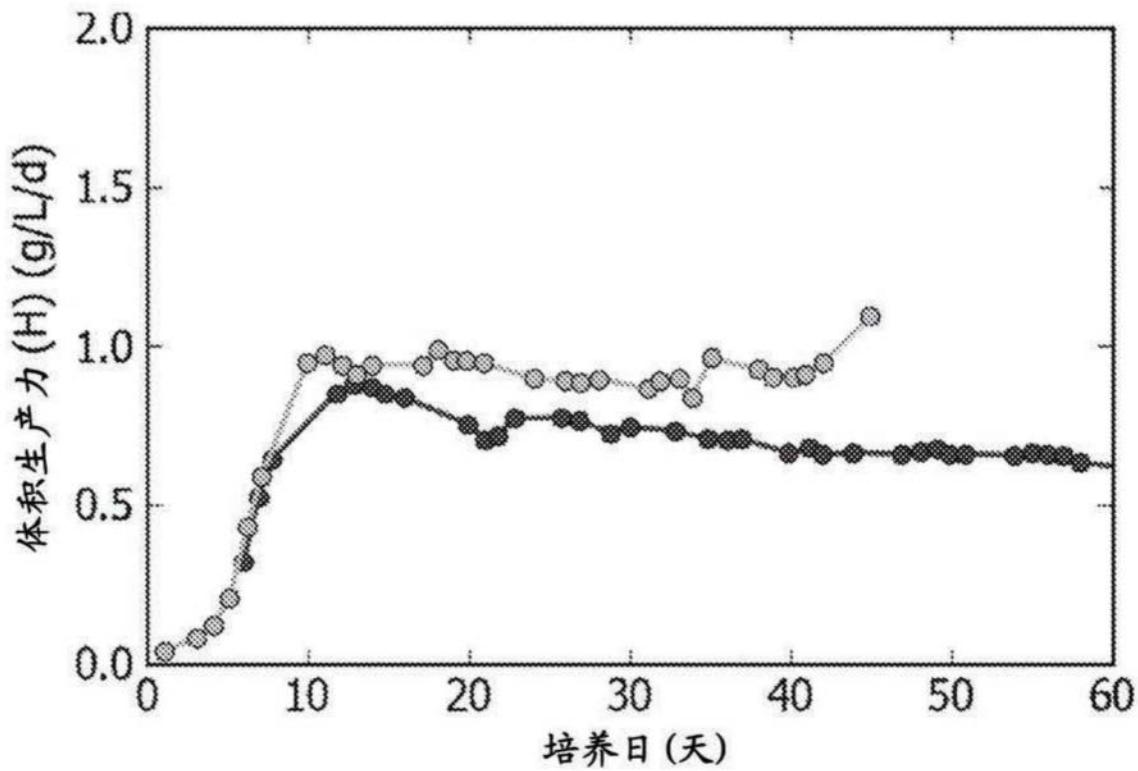


图15

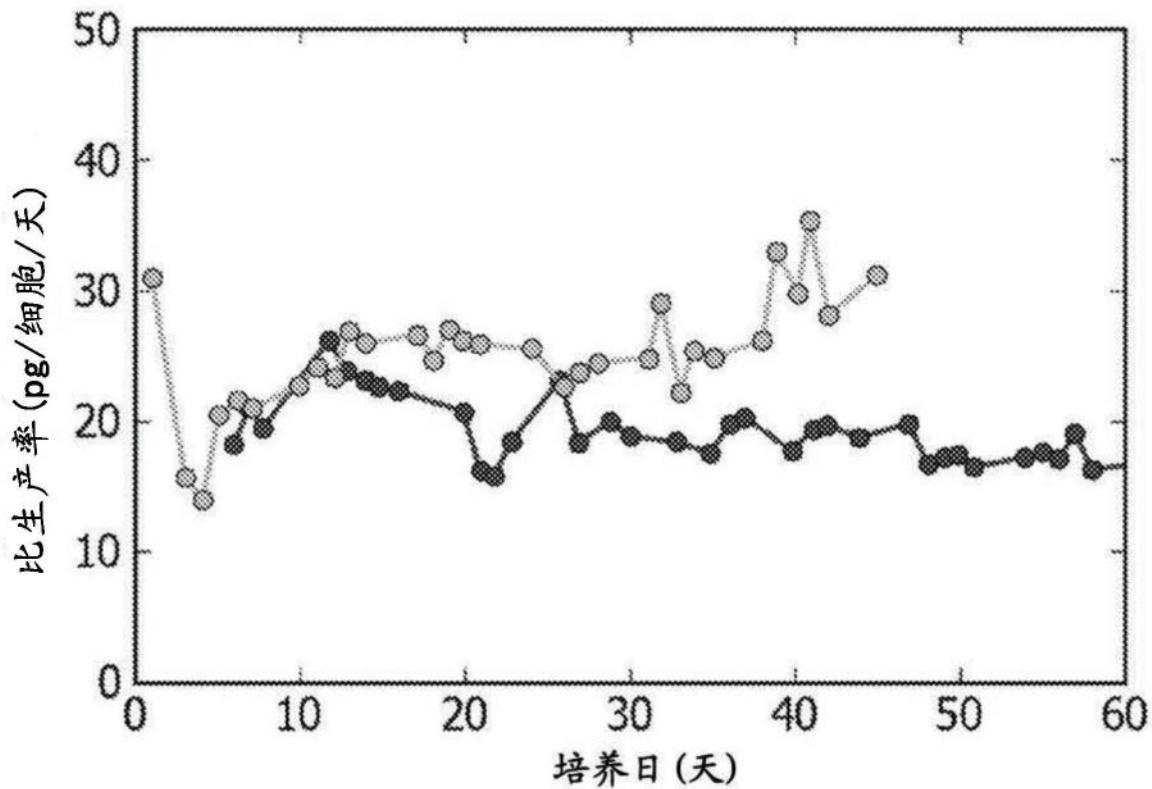


图16

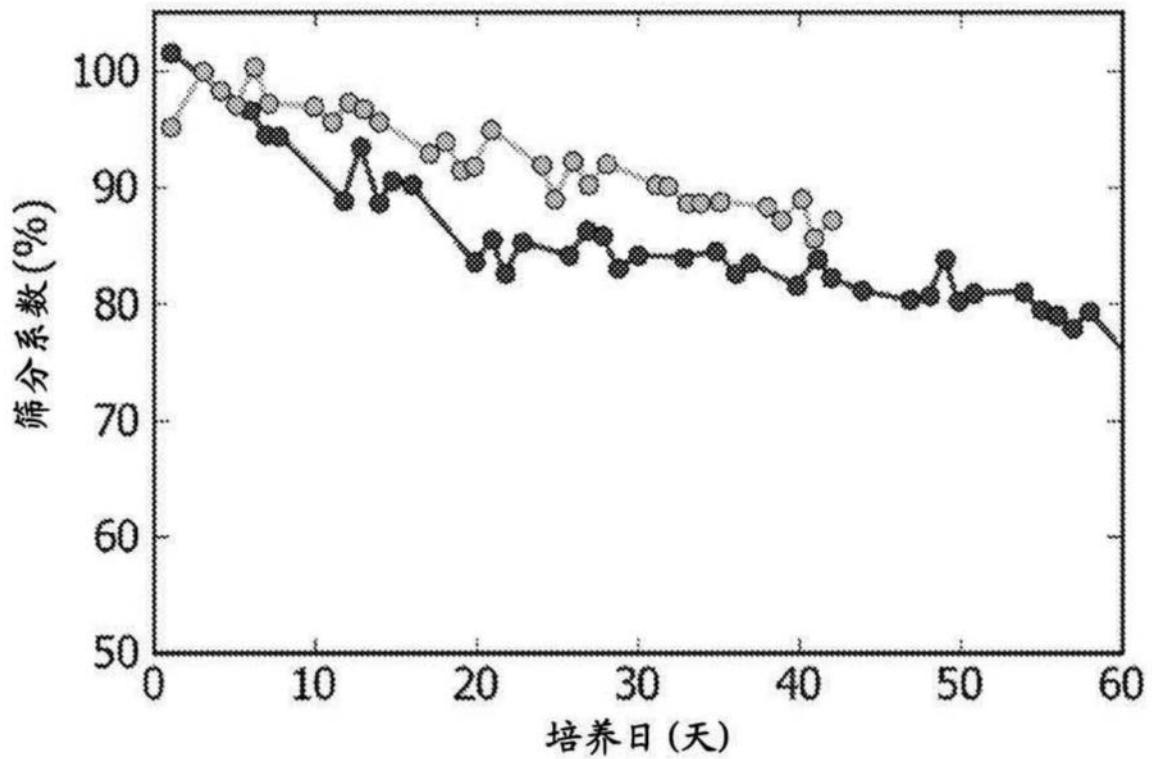


图17

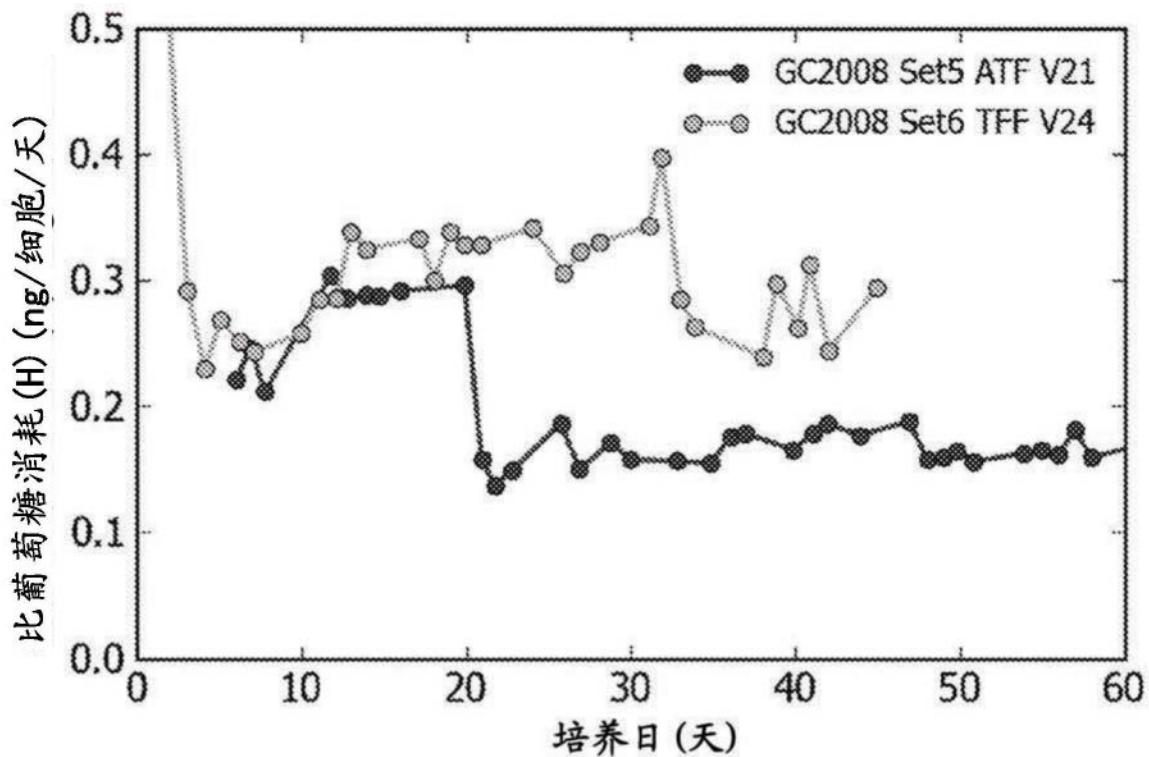


图18

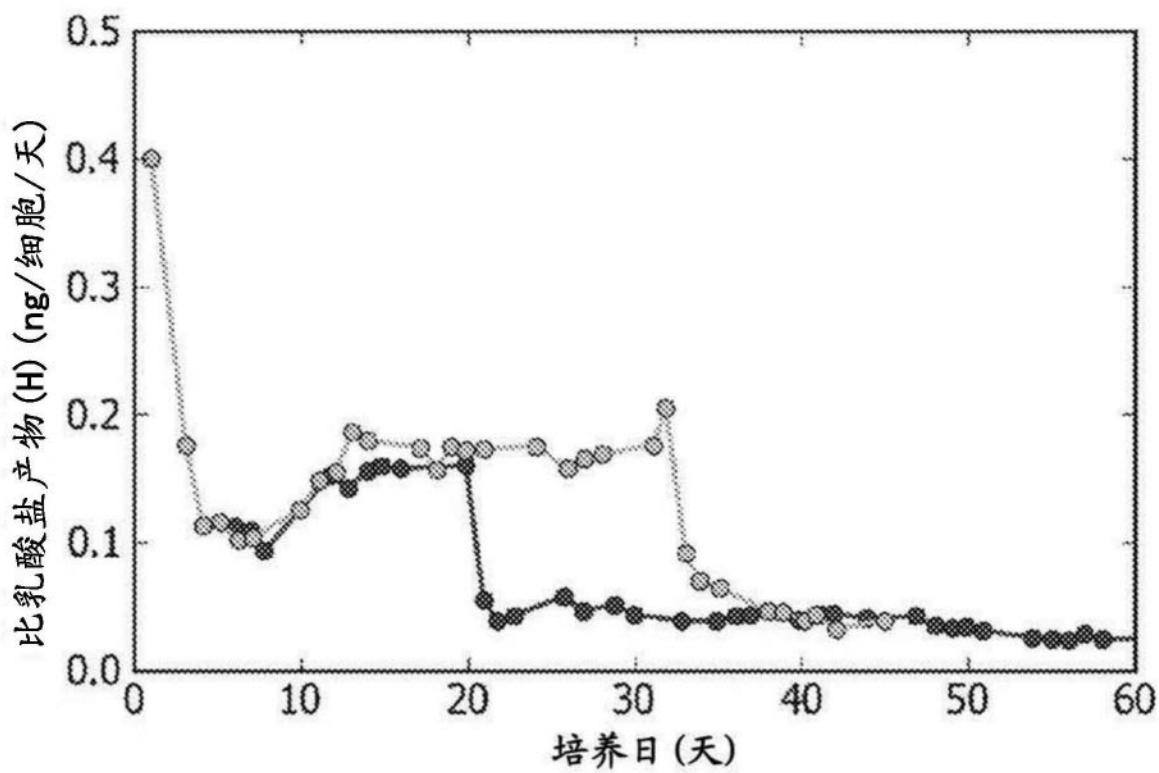


图19

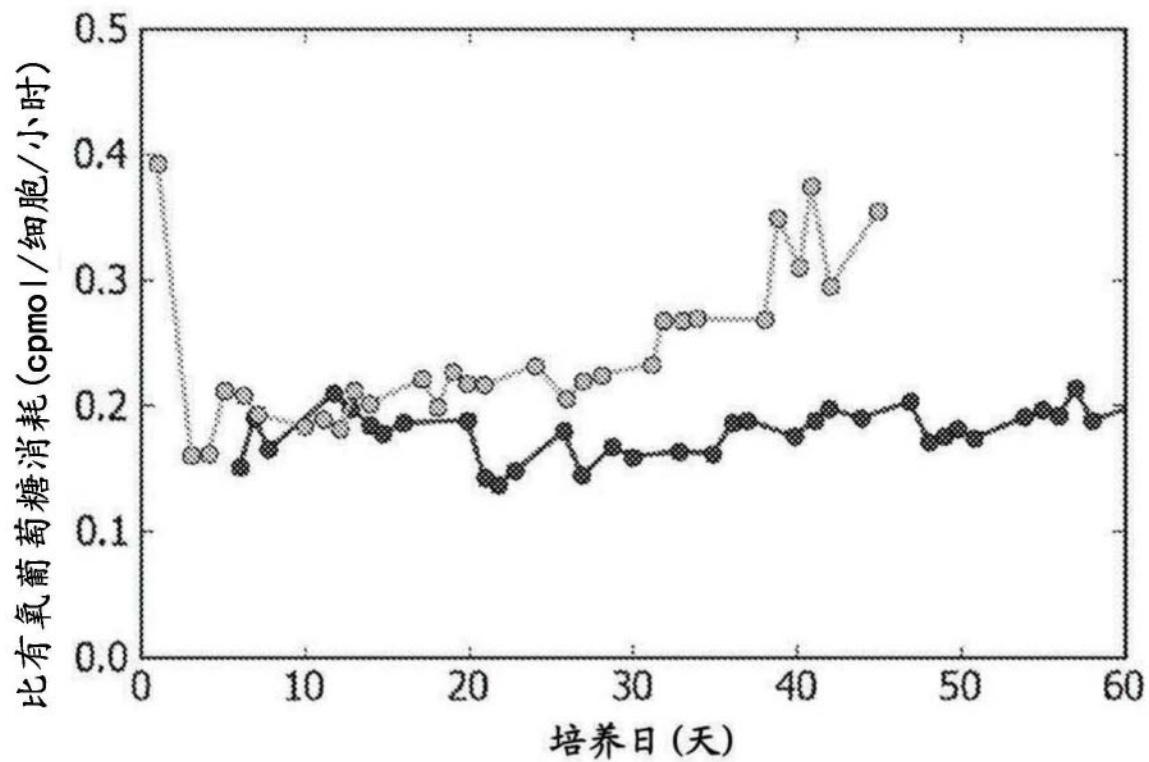


图20

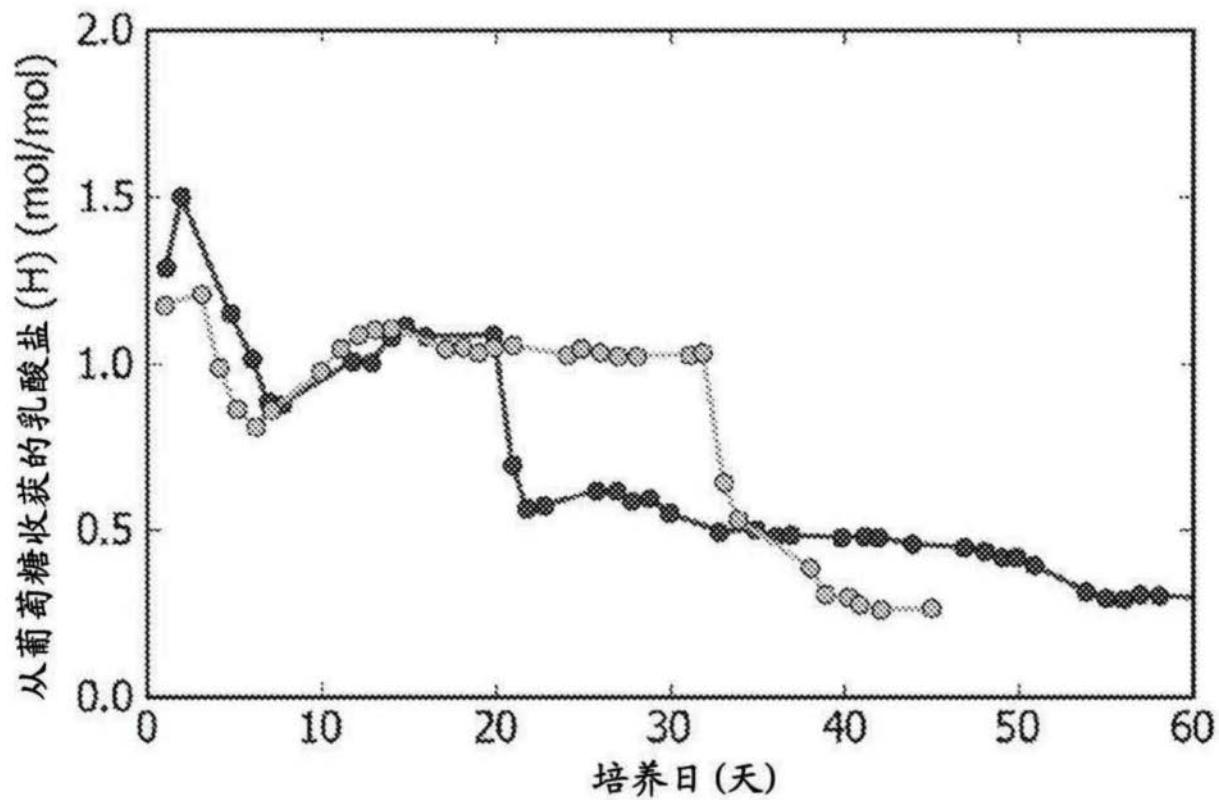


图21