



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112041663 B

(45) 授权公告日 2025.01.21

(21) 申请号 201980028453.6

M · 辛卡皮 S · L · 巴雷特

(22) 申请日 2019.03.01

J · S · 波洛克

(65) 同一申请的已公布的文献号

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理人 封新琴

申请公布号 CN 112041663 A

(43) 申请公布日 2020.12.04

(51) Int.CI.

(30) 优先权数据

G01N 21/3577 (2014.01)

62/637,891 2018.03.02 US

G01N 21/552 (2014.01)

62/673,845 2018.05.18 US

B01D 15/18 (2006.01)

62/729,402 2018.09.10 US

G01N 30/46 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

G01N 30/78 (2006.01)

2020.10.26

G01N 30/86 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

G01N 21/35 (2014.01)

PCT/US2019/020355 2019.03.01

G01N 21/84 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

G01N 30/88 (2006.01)

W02019/169303 EN 2019.09.06

(56) 对比文件

(73) 专利权人 建新公司

CN 104406836 A, 2015.03.11

地址 美国马萨诸塞州

EP 3173782 A1, 2017.05.31

(72) 发明人 D · P · 瓦萨拉汉特里

JP 4638153 B2, 2011.02.23

J · C · 特瓦里 康学真

JP H05322747 A, 1993.12.07

审查员 张永柯

权利要求书7页 说明书31页 附图33页

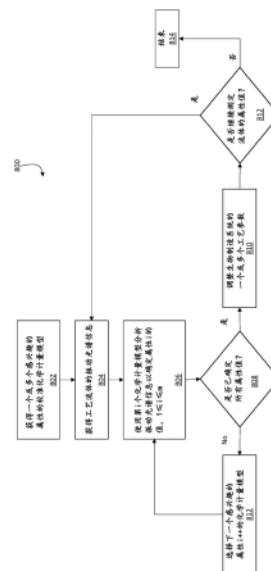
(54) 发明名称

用于生物制造的多元谱分析与监测

(57) 摘要

本公开文本的特征在于以下方法，所述方法包括：获得生物制造系统中的溶液的振动光谱(804)，使用第一化学计量模型分析所述振动光谱(806)以确定与所述溶液相关的第一质量属性值，使用第二化学计量模型分析所述振动光谱(806)以确定与所述溶液相关的第二质量属性值(812)，并且基于所述第一质量属性值和所述第二质量属性值中的至少一个来调节所述生物制造系统的纯化单元的至少一个参数(810)。

CN 112041663 B



1.一种方法,其包括:

获得生物制造系统中的溶液的振动光谱,其中获得所述振动光谱包括引导辐射通过光纤的第一纤芯并入射到不同于所述光纤且集成到所述光纤的端部的光学元件的第一表面上使得所述光学元件的至少一部分位于所述光纤的包层内,并在所述光纤的第二纤芯中捕获从所述光学元件的第二表面经历全内反射的入射辐射;

使用第一化学计量模型分析所述振动光谱以确定与所述溶液相关的第一质量属性值;

使用第二化学计量模型分析所述振动光谱以确定与所述溶液相关的第二质量属性值;并且

基于所述第一质量属性值和所述第二质量属性值中的至少一个来调节所述生物制造系统的纯化单元的至少一个参数。

2.根据权利要求1所述的方法,其进一步包括:使用所述生物制造系统来生产基于蛋白质的治疗物质、基于核酸的药品和基因疗法药品中的至少一种。

3.根据权利要求2所述的方法,其中所述基于蛋白质的治疗物质包含蛋白质、肽、抗体和酶中的至少一种。

4.根据权利要求2所述的方法,其中所述基于核酸的药品包含DNA、质粒、寡核苷酸、适配体、DNA酶、RNA诱饵、微小RNA片段和小干扰RNA片段中的至少一种。

5.根据权利要求4所述的方法,其中所述适配体为RNA适配体。

6.根据权利要求1所述的方法,其中对于由所述生物制造系统生产的生物产品,所述第一质量属性和所述第二质量属性各自独立地选自产品质量属性、产品相关杂质和工艺相关杂质。

7.根据权利要求1所述的方法,其中所述光学元件的所述第二表面接触包含溶液的流动池。

8.根据权利要求7所述的方法,其进一步包括:当所述溶液相对于所述光学元件流动时测量来自所述溶液的衰减全反射辐射。

9.根据权利要求1所述的方法,其中所述光学元件是棱镜。

10.根据权利要求1所述的方法,其中入射辐射包含红外辐射。

11.根据权利要求1所述的方法,其中所述第一化学计量模型包括与所述第一质量属性相关的第一组主要振动组分。

12.根据权利要求11所述的方法,其中所述第一化学计量模型包括至少三种主要振动组分。

13.根据权利要求11所述的方法,其中所述第一化学计量模型包括至少五种主要振动组分。

14.根据权利要求11所述的方法,其中使用所述第一化学计量模型分析所述振动光谱包括基于所述第一组主要振动组分计算所述第一质量属性值。

15.根据权利要求14所述的方法,其中计算所述第一质量属性值包括将所述值确定为所述第一组主要振动组分的线性函数。

16.根据权利要求11所述的方法,其中所述第二化学计量模型包括与所述第一质量属性相关的第二组主要振动组分。

17.根据权利要求16所述的方法,其中所述第二化学计量模型包括至少三种主要振动

组分。

18. 根据权利要求16所述的方法,其中所述第二化学计量模型包括至少五种主要振动组分。

19. 根据权利要求16所述的方法,其中所述第一组主要振动组分和所述第二组主要振动组分没有共同的成员。

20. 根据权利要求16所述的方法,其中使用所述第二化学计量模型分析所述振动光谱可包括基于所述第二组主要振动组分计算所述第二质量属性值。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中计算所述第二质量属性值包括将所述值确定为所述第二组主要振动组分的线性函数。

22. 根据权利要求1所述的方法,其中所述溶液包括从所述生物制造系统的纯化单元排出的溶液。

23. 根据权利要求22所述的方法,其进一步包括:纯化所述纯化单元中的所述溶液,然后获得所述溶液的振动光谱。

24. 根据权利要求22所述的方法,其中所述纯化单元包括色谱柱。

25. 根据权利要求1所述的方法,其进一步包括:当所述溶液在所述生物制造系统的第一纯化单元与第二纯化单元之间流动时,通过测量来自所述溶液的辐射来获得所述振动光谱。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述第一纯化单元和所述第二纯化单元各自包括色谱柱。

27. 根据权利要求1所述的方法,其进一步包括:在所述溶液流出所述生物制造系统的最终纯化单元之后通过测量来自所述溶液的辐射来获得所述振动光谱。

28. 根据权利要求1所述的方法,其中所述溶液是第一溶液,所述方法进一步包括:

获得所述生物制造系统中的第二溶液的振动光谱;

使用所述第一化学计量模型分析所述第二溶液的振动光谱,以确定所述第二溶液的第一质量属性值;并且

使用所述第二化学计量模型分析所述第二溶液的振动光谱,以确定所述第二溶液的第二质量属性值。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述第一溶液在所述生物制造系统的第一纯化单元与第二纯化单元之间流动,并且所述第二溶液在所述生物制造系统的所述第二纯化单元与第三纯化单元之间流动。

30. 根据权利要求28所述的方法,其进一步包括:基于所述第一溶液的第一质量属性值和第二质量属性值与所述第二溶液的第一质量属性值和第二质量属性值中的至少一个来调节所述至少一个参数。

31. 根据权利要求1所述的方法,其进一步包括:从所述辐射入射到所述溶液上的时间开始,在30秒或更短的时间段内获得所述振动光谱并确定所述第一质量属性值和所述第二质量属性值。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述时间段是10秒或更短。

33. 根据权利要求31所述的方法,其中所述时间段是2秒或更短。

34. 根据权利要求1所述的方法,其进一步包括:重复以下多个步骤:获得所述振动光

谱,使用所述第一化学计量模型分析所述振动光谱,并且使用所述第二化学计量模型分析所述振动光谱,以确定与所述溶液的连续部分相关的第一质量属性值和第二质量属性值的时间序列。

35. 根据权利要求34所述的方法,其进一步包括:基于第一质量属性值的时间序列和第二质量属性值的时间序列中的至少一个来调节所述至少一个参数。

36. 根据权利要求16所述的方法,其进一步包括:

获得具有代表所述溶液的一个或多个校准光谱的集合;并且

分析校准光谱的所述集合以确定所述第一组主要振动组分和所述第二组主要振动组分。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中所述第一化学计量模型包括与所述第一组主要振动组分相关的第一组系数,并且所述第二化学计量模型包括与所述第二组主要振动组分相关的第二组系数,所述方法进一步包括基于回归分析确定所述第一组系数和所述第二组系数。

38. 根据权利要求16所述的方法,其进一步包括:使用第三化学计量模型分析所述振动光谱以确定与所述溶液相关的第三质量属性值。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述第三化学计量模型包括与所述第三质量属性相关的第三组主要振动组分。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中所述第三化学计量模型包括至少三种主要振动组分。

41. 根据权利要求39所述的方法,其中所述第三化学计量模型包括至少五种主要振动组分。

42. 根据权利要求39所述的方法,其中使用所述第三化学计量模型分析所述振动光谱包括基于所述第三组主要振动组分计算所述第三质量属性值。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中计算所述第三质量属性值包括将所述值确定为所述第三组主要振动组分的线性函数。

44. 根据权利要求42所述的方法,其进一步包括:基于所述第一质量属性值、所述第二质量属性值和所述第三质量属性值中的至少一个来调节所述至少一个参数。

45. 根据权利要求38所述的方法,其进一步包括:使用第四化学计量模型分析所述振动光谱以确定与所述溶液相关的第四质量属性值。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述第四化学计量模型包括与所述第四质量属性相关的第四组主要振动组分。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述第四化学计量模型包括至少三种主要振动组分。

48. 根据权利要求46所述的方法,其中所述第四化学计量模型包括至少五种主要振动组分。

49. 根据权利要求46所述的方法,其中使用所述第四化学计量模型分析所述振动光谱包括基于所述第四组主要振动组分计算所述第四质量属性值。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中计算所述第四质量属性值包括将所述值确定为所述第四组主要振动组分的线性函数。

51. 根据权利要求45所述的方法,其进一步包括:基于所述第一质量属性值、所述第二质量属性值、所述第三质量属性值和所述第四质量属性值中的至少一个来调节所述至少一个参数。

52. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一质量属性和所述第二质量属性中的至少一个选自浓度、聚集体、电荷变体分布、纯度、聚糖谱、同一性和完整性。

53. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一质量属性和所述第二质量属性中的至少一个选自蛋白质片段、核酸片段、核酸变体、空衣壳和载体杂质。

54. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一质量属性和所述第二质量属性中的至少一个选自宿主细胞蛋白、残留宿主DNA、残留柱配体、杂质浓度、杂质量、残留辅助病毒、残留辅助病毒蛋白和残留辅助病毒DNA。

55. 一种生物制造系统,其包括:

生物反应器,其被配置为生产包含生物产品的溶液;

纯化单元,其被配置为接收所述溶液;

辐射源,其被配置为产生辐射;

检测装置,其包含:

光纤,所述光纤包括在共同包层中的第一光纤芯和第二光纤芯;

光学元件,所述光学元件不同于所述光纤且集成到所述光纤的端部以使所述光学元件的至少一部分位于所述共同包层内,使得所产生的辐射传播通过所述第一光纤芯并入射在所述光学元件的第一表面上,并且所述辐射从所述光学元件的第二表面经历全内反射并耦合到所述第二光纤芯;和

检测器,所述检测器被定位成接收来自所述第二光纤芯的辐射;和

系统控制器,其连接至所述生物反应器和所述检测装置,并被配置为:

接收来自所述检测装置的测量信号,所述测量信号对应于有关所述溶液的振动光谱的信息;

使用第一化学计量模型分析所述信息以确定与所述溶液相关的第一质量属性值;

使用第二化学计量模型分析所述信息以确定与所述溶液相关的第二质量属性值;并且

基于所述第一质量属性值和所述第二质量属性值中的至少一个来调节所述纯化单元的至少一个参数。

56. 根据权利要求55所述的系统,其进一步包含流动池,所述流动池被定位为使所述溶液通过所述流动池,并且当所述溶液处于所述流动池中时所述光学元件被定位为使所述辐射入射到所述溶液上。

57. 根据权利要求55所述的系统,其中所述生物产品包括基于蛋白质的治疗物质、基于核酸的药品和基因疗法药品中的至少一种。

58. 根据权利要求57所述的系统,其中所述基于蛋白质的治疗物质包含蛋白质、肽、抗体和酶中的至少一种。

59. 根据权利要求57所述的系统,其中所述基于核酸的药品包含DNA、质粒、寡核苷酸、适配体、DNA酶、RNA诱饵、微小RNA片段和小干扰RNA片段中的至少一种。

60. 根据权利要求59所述的系统,其中所述适配体为RNA适配体。

61. 根据权利要求55所述的系统,其中对于由所述生物制造系统生产的生物产品,所述

第一质量属性和所述第二质量属性各自独立地选自产品质量属性、产品相关杂质和工艺相关杂质。

62. 根据权利要求56所述的系统,其中所述检测器包括全内反射传感器,所述全内反射传感器被配置为测量来自所述溶液的衰减全反射辐射。

63. 根据权利要求62所述的系统,其中所述全内反射传感器与所述流动池的一部分集成。

64. 根据权利要求62所述的系统,其中所述控制器和所述检测装置被配置为当所述溶液在所述流动池内流动时测量来自所述溶液的衰减全反射辐射。

65. 根据权利要求62所述的系统,其中入射辐射包含红外辐射。

66. 根据权利要求55所述的系统,其中所述第一化学计量模型包括与所述第一质量属性相关的第一组主要振动组分。

67. 根据权利要求66所述的系统,其中所述第一化学计量模型包括至少三种主要振动组分。

68. 根据权利要求66所述的系统,其中所述第一化学计量模型包括至少五种主要振动组分。

69. 根据权利要求66所述的系统,其中所述控制器被配置为使用所述第一化学计量模型、通过基于所述第一组主要振动组分计算所述第一质量属性值来分析所述振动光谱。

70. 根据权利要求69所述的系统,其中所述控制器被配置为将所述第一质量属性值计算为所述第一组主要振动组分的线性函数。

71. 根据权利要求66所述的系统,其中所述第二化学计量模型包括与所述第一质量属性相关的第二组主要振动组分。

72. 根据权利要求71所述的系统,其中所述第二化学计量模型包括至少三种主要振动组分。

73. 根据权利要求71所述的系统,其中所述第二化学计量模型包括至少五种主要振动组分。

74. 根据权利要求71所述的系统,其中所述第一组主要振动组分和所述第二组主要振动组分没有共同的成员。

75. 根据权利要求71所述的系统,其中所述控制器被配置为使用所述第二化学计量模型、通过基于所述第二组主要振动组分计算所述第二质量属性值来分析所述振动光谱。

76. 根据权利要求75所述的系统,其中所述控制器被配置为将所述第二质量属性值计算为所述第二组主要振动组分的线性函数。

77. 根据权利要求55所述的系统,其中所述溶液包括从所述纯化单元排出的溶液。

78. 根据权利要求77所述的系统,其中所述控制器连接至所述纯化单元并被配置为纯化所述纯化单元中的溶液然后获得有关所述溶液的振动光谱的信息。

79. 根据权利要求55所述的系统,其中所述纯化单元包括色谱柱。

80. 根据权利要求55所述的系统,其中所述纯化单元是所述系统的第一纯化单元,并且所述系统进一步包括:

第二纯化单元,其被配置为接收所述溶液,

其中,当溶液在所述第一纯化单元与所述第二纯化单元之间流动时,所述检测装置被

定位为测量来自所述溶液的辐射。

81. 根据权利要求80所述的系统,其中所述第一纯化单元和所述第二纯化单元各自包括色谱柱。

82. 根据权利要求55所述的系统,其中所述纯化单元是所述系统的最终纯化单元。

83. 根据权利要求55所述的系统,其中所述溶液是第一溶液,并且所述检测装置被进一步配置为测量来自第二溶液的辐射,并且所述控制器被配置为:

接收来自所述检测装置的测量信号,所述测量信号对应于有关所述第二溶液的振动光谱的信息;

使用所述第一化学计量模型分析有关所述第二溶液的信息,以确定所述第二溶液的第一质量属性值;并且

使用所述第二化学计量模型分析有关所述第二溶液的信息,以确定所述第二溶液的第二质量属性值。

84. 根据权利要求83所述的系统,其中所述纯化单元是第一纯化单元,并且所述系统包含第二纯化单元和第三纯化单元,并且其中:

所述第一溶液在所述第一纯化单元与所述第二纯化单元之间流动;并且

所述第二溶液在所述第二纯化单元与所述第三纯化单元之间流动。

85. 根据权利要求83所述的系统,其中所述控制器被配置为基于所述第一溶液的第一质量属性值和第二质量属性值与所述第二溶液的第一质量属性值和第二质量属性值中的至少一个来调节所述至少一个参数。

86. 根据权利要求62所述的系统,其中所述检测装置和所述控制器被配置为从所述辐射入射到所述溶液上的时间开始,在30秒或更短的时间段内,测量来自所述溶液的辐射并确定所述第一质量属性值和所述第二质量属性值。

87. 根据权利要求86所述的系统,其中所述时间段是10秒或更短。

88. 根据权利要求86所述的系统,其中所述时间段是2秒或更短。

89. 根据权利要求55所述的系统,其中所述检测装置和所述控制器被配置为重复以下多个步骤:测量来自所述溶液的辐射,使用所述第一化学计量模型分析有关所述溶液的振动光谱的信息,并且使用所述第二化学计量模型分析所述振动光谱,以确定与所述溶液的连续部分相关的第一质量属性值和第二质量属性值的时间序列。

90. 根据权利要求55所述的系统,其中所述控制器被进一步配置为基于第一质量属性值的时间序列和第二质量属性值的时间序列中的至少一个来调节所述至少一个参数。

91. 根据权利要求71所述的系统,其中所述控制器被配置为获得具有代表所述溶液的一个或多个校准光谱的集合,并且分析校准光谱的所述集合以确定所述第一组主要振动组分和所述第二组主要振动组分。

92. 根据权利要求91所述的系统,其中所述第一化学计量模型包括与所述第一组主要振动组分相关的第一组系数,并且所述第二化学计量模型包括与所述第二组主要振动组分相关的第二组系数,并且所述控制器被进一步配置为通过进行回归分析确定所述第一组系数和所述第二组系数。

93. 根据权利要求71所述的系统,其中所述控制器被配置为使用第三化学计量模型分析有关所述溶液的振动光谱的信息以确定与所述溶液相关的第三质量属性值。

94. 根据权利要求93所述的系统,其中所述第三化学计量模型包括与所述第三质量属性相关的第三组主要振动组分。

95. 根据权利要求94所述的系统,其中所述第三化学计量模型包括至少三种主要振动组分。

96. 根据权利要求94所述的系统,其中所述第三化学计量模型包括至少五种主要振动组分。

97. 根据权利要求94所述的系统,其中所述控制器被配置为使用所述第三化学计量模型、通过基于所述第三组主要振动组分计算所述第三质量属性值来分析有关所述振动光谱的信息。

98. 根据权利要求97所述的系统,其中所述控制器被配置为通过将所述第三质量属性值确定为所述第三组主要振动组分的线性函数来计算所述第三质量属性值。

99. 根据权利要求97所述的系统,其中所述控制器被进一步配置为基于所述第一质量属性值、所述第二质量属性值和所述第三质量属性值中的至少一个来调节所述至少一个参数。

100. 根据权利要求94所述的系统,其中所述控制器被配置为使用第四化学计量模型分析有关所述振动光谱的信息以确定与所述溶液相关的第四质量属性值。

101. 根据权利要求100所述的系统,其中所述第四化学计量模型包括与所述第四质量属性相关的第四组主要振动组分。

102. 根据权利要求101所述的系统,其中所述第四化学计量模型包括至少三种主要振动组分。

103. 根据权利要求101所述的系统,其中所述第四化学计量模型包括至少五种主要振动组分。

104. 根据权利要求101所述的系统,其中所述控制器被配置为使用所述第四化学计量模型、通过基于所述第四组主要振动组分计算所述第四质量属性值来分析有关所述振动光谱的信息。

105. 根据权利要求104所述的系统,其中所述控制器被配置为通过将所述第四质量属性值确定为所述第四组主要振动组分的线性函数来计算所述第四质量属性值。

106. 根据权利要求100所述的系统,其中所述控制器被配置为基于所述第一质量属性值、所述第二质量属性值、所述第三质量属性值和所述第四质量属性值中的至少一个来调节所述至少一个参数。

107. 根据权利要求55所述的系统,其中所述第一质量属性和所述第二质量属性中的至少一个选自浓度、聚集体、电荷变体分布、纯度、聚糖谱、同一性和完整性。

108. 根据权利要求55所述的系统,其中所述第一质量属性和所述第二质量属性中的至少一个选自蛋白质片段、核酸片段、核酸变体、空衣壳和载体杂质。

109. 根据权利要求55所述的系统,其中所述第一质量属性和所述第二质量属性中的至少一个选自宿主细胞蛋白、残留宿主DNA、残留柱配体、杂质浓度、杂质量、残留辅助病毒、残留辅助病毒蛋白和残留辅助病毒DNA。

用于生物制造的多元谱分析与监测

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求以下美国临时申请的优先权,将其每个的全部内容通过引用并入本文:提交于2018年3月2日的62/637,891;提交于2018年5月18日的62/673,845;和提交于2018年9月10日的62/729,402。

技术领域

[0003] 本公开文本涉及用于在集成连续生物制造系统中使用的系统和方法。

背景技术

[0004] 含有编码重组蛋白的核酸的哺乳动物细胞通常用于生产在治疗上或商业上重要的蛋白质。集成连续生物制造是降低与基于此类蛋白质的疗法相关成本的重要方面。监测系统用于生物制造,以评估各种生物产品和工艺条件。

发明内容

[0005] 治疗性蛋白质物质和其他生物分子的集成连续生物制造为将来生产拯救生命的药物和促进依赖于此类生物分子的可用性的疗法的广泛采用提供了巨大的希望。具有各种配置的双柱和多柱色谱系统可用于工业规模的生物制造。在此类系统中,各种洗脱剂流的过程监测可用于调节工艺相关参数和控制产品属性,例如,从某些柱中选择性收集洗脱剂流和调节溶液缓冲特性(例如pH)。

[0006] 本公开文本的特征在于使用与色谱系统和/或生物反应器集成在线的并与电子控制器(分析由传感器测得的信息)耦合的实时或近实时传感器确定溶液特性的方法和系统,所述溶液特性是例如溶质浓度、感兴趣的分析物的电荷分布、工艺与产品杂质、分子完整性、聚集状态以及pH。可以连续监测溶液的红外光谱,并且使用化学计量模型同时地准确表征溶液中的各种分析物的定量性化学、物理和/或生物学特性。可以从流动的溶液中在线获得光谱,从而在很少或不中断制造工艺的情况下进行测量。此外,化学计量模型可以实时或近实时地提取定量性分析物信息,允许快速反馈和控制生物制造工艺相关的参数和操作。

[0007] 在第一方面,本公开文本的特征在于以下方法,所述方法包括:获得生物制造系统中的溶液的振动光谱,使用第一化学计量模型分析所述振动光谱以确定与所述溶液相关的第一质量属性值,使用第二化学计量模型分析所述振动光谱以确定与所述溶液相关的第一质量属性值,并且基于所述第一质量属性值和所述第二质量属性值中的至少一个来调节所述生物制造系统的纯化单元的至少一个参数。

[0008] 所述方法的实施方案可包括以下特征中的任何一个或多个。

[0009] 所述方法可包括使用生物制造系统来生产基于蛋白质的治疗物质、基于核酸的药品和基因疗法药品中的至少一种。基于蛋白质的治疗物质可包含蛋白质、肽、抗体和酶中的至少一种。基于核酸的药品可包含DNA、质粒、寡核苷酸、适配体、DNA酶、RNA适配体、RNA诱饵、微小RNA片段和小干扰RNA片段中的至少一种。

[0010] 对于由所述生物制造系统生产的生物产品,所述第一质量属性和所述第二质量属性可各自独立地选自产品质量属性、产品相关杂质和工艺相关杂质。

[0011] 获得所述振动光谱可包括引导辐射入射到所述溶液上并测量来自所述溶液的衰减全反射辐射。辐射可以通过透过辐射窗口而入射到溶液上,并且衰减全反射辐射可以在被测量之前通过辐射窗口。所述方法可包括当所述溶液相对于所述辐射窗口流动时测量来自所述溶液的衰减全反射辐射。

[0012] 辐射窗口可形成流动池的一部分。入射的辐射可包括红外辐射。

[0013] 第一化学计量模型可包括与第一质量属性相关的第一组主要振动组分。第一化学计量模型可包括至少三个主要振动组分(例如,至少五个主要振动组分)。使用所述第一化学计量模型分析所述振动光谱可包括基于所述第一组主要振动组分计算所述第一质量属性值。计算第一质量属性值可包括将所述值确定为第一组主要振动组分的线性函数。

[0014] 第二化学计量模型可包括与第一质量属性相关的第二组主要振动组分。第二化学计量模型可包括至少三个主要振动组分(例如,至少五个主要振动组分)。所述第一组主要振动组分和所述第二组主要振动组分可以没有共同的成员。使用所述第二化学计量模型分析所述振动光谱可包括基于所述第二组主要振动组分计算所述第二质量属性值。计算第二质量属性值可包括将所述值确定为第二组主要振动组分的线性函数。

[0015] 所述溶液可包括从所述生物制造系统的纯化单元排出的溶液。所述方法可包括纯化所述纯化单元中的溶液,然后获得所述溶液的振动光谱。所述纯化单元可包括色谱柱。

[0016] 所述方法可包括当所述溶液在所述生物制造系统的第一纯化单元与第二纯化单元之间流动时,通过测量来自所述溶液的辐射来获得所述振动光谱。所述第一纯化单元和所述第二纯化单元可各自包括色谱柱。

[0017] 所述方法可包括在所述溶液流出所述生物制造系统的最终纯化单元之后通过测量来自所述溶液的辐射来获得所述振动光谱。

[0018] 所述溶液可以是第一溶液,并且所述方法可包括:获得生物制造系统中的第二溶液的振动光谱,使用第一化学计量模型分析第二溶液的振动光谱以确定第二溶液的第一质量属性值,并且使用第二化学计量模型分析第二溶液的振动光谱以确定第二溶液的第二质量属性值。所述第一溶液可以在所述生物制造系统的第一纯化单元与第二纯化单元之间流动,并且所述第二溶液可以在所述生物制造系统的所述第二纯化单元与第三纯化单元之间流动。所述方法可包括基于所述第一溶液的第一质量属性值和第二质量属性值与所述第二溶液的第一质量属性值和第二质量属性值中的至少一个来调节所述至少一个参数。

[0019] 所述方法可包括从辐射入射到溶液上的时间开始,在30秒或更短的时间段内获得振动光谱并确定第一质量属性值和第二质量属性值。所述时间段可以是10秒或更短(例如,2秒或更短)。

[0020] 所述方法可包括重复以下多个步骤:获得振动光谱,使用第一化学计量模型分析振动光谱,并且使用第二化学计量模型分析振动光谱,以确定与所述溶液的连续部分相关的第一质量属性值和第二质量属性值的时间序列。所述方法可包括基于第一质量属性值的时间序列和第二质量属性值的时间序列中的至少一个来调节至少一个参数。

[0021] 所述方法可包括获得具有代表所述溶液的一个或多个校准光谱的集合,并且分析校准光谱的所述集合以确定所述第一组主要振动组分和所述第二组主要振动组分。第一化

学计量模型可包括与第一组主要振动组分相关的第一组系数，并且第二化学计量模型可包括与第二组主要振动组分相关的第二组系数，并且所述方法可包括基于回归分析确定第一组系数和第二组系数。

[0022] 所述方法可包括使用第三化学计量模型分析所述振动光谱以确定与所述溶液相关的第三质量属性值。第三化学计量模型可包括与第三质量属性相关的第三组主要振动组分。第三化学计量模型可包括至少三个主要振动组分(例如，至少五个主要振动组分)。使用所述第三化学计量模型分析所述振动光谱可包括基于所述第三组主要振动组分计算所述第三质量属性值。计算第三质量属性值可包括将所述值确定为第三组主要振动组分的线性函数。所述方法可包括基于第一质量属性值、第二质量属性值和第三质量属性值中的至少一个来调节至少一个参数。

[0023] 所述方法可包括使用第四化学计量模型分析所述振动光谱以确定与所述溶液相关的第四质量属性值。第四化学计量模型可包括与第四质量属性相关的第四组主要振动组分。第四化学计量模型可包括至少三个主要振动组分(例如，至少五个主要振动组分)。使用第四化学计量模型分析振动光谱可包括基于第四组主要振动组分计算第四质量属性值。计算第四质量属性值可包括将所述值确定为第四组主要振动组分的线性函数。所述方法可包括基于第一质量属性值、第二质量属性值、第三质量属性值和第四质量属性值中的至少一个来调节至少一个参数。

[0024] 第一质量属性和第二质量属性中的至少一个可选自浓度、聚集体、电荷变体分布、纯度、聚糖谱、同一性和完整性。第一质量属性和第二质量属性中的至少一个可选自蛋白质片段、核酸片段、核酸变体、空衣壳和载体杂质。第一质量属性和第二质量属性中的至少一个可选自宿主细胞蛋白、残留宿主DNA、残留柱配体、杂质浓度、杂质量、残留辅助病毒、残留辅助病毒蛋白和残留辅助病毒DNA。

[0025] 除非另外明确说明，否则所述方法的实施方案还可包括本文公开的任何其他特征，包括结合不同实施方案单独公开的特征的组合。

[0026] 另一方面，本公开文本的特征在于生物制造系统，所述生物制造系统包括：生物反应器，其被配置为生产包含生物产品的溶液；纯化单元，其被配置为接收所述溶液；辐射源，其被配置为引导辐射入射到溶液上；检测装置，其被配置为测量来自所述溶液的辐射；以及系统控制器，其连接至所述生物反应器和所述检测装置，并被配置为：接收来自所述检测装置的测量信号，所述测量信号对应于有关所述溶液的振动光谱的信息；使用第一化学计量模型分析所述信息以确定与所述溶液相关的第一质量属性值；使用第二化学计量模型分析所述信息以确定与所述溶液相关的第二质量属性值；并且基于所述第一质量属性值和所述第二质量属性值中的至少一个来调节所述纯化单元的至少一个参数。

[0027] 所述系统的实施方案可包括以下特征中的任何一个或多个。

[0028] 所述系统可包括流动池，所述流动池被定位为使所述溶液通过所述流动池，并且当所述溶液处于所述流动池中时所述辐射源引导所述辐射入射到所述溶液上。

[0029] 所述生物产品可包括基于蛋白质的治疗物质、基于核酸的药品和基因疗法药品中的至少一种。基于蛋白质的治疗物质可包含蛋白质、肽、抗体和酶中的至少一种。基于核酸的药品可包含DNA、质粒、寡核苷酸、适配体、DNA酶、RNA适配体、RNA诱饵、微小RNA片段和小干扰RNA片段中的至少一种。

[0030] 对于由所述生物制造系统生产的生物产品,所述第一质量属性和所述第二质量属性可各自独立地选自产品质量属性、产品相关杂质和工艺相关杂质。

[0031] 所述检测器可包括全内反射传感器,所述全内反射传感器被配置为测量来自所述溶液的衰减全反射辐射。所述全内反射传感器可与所述流动池的一部分集成。所述控制器和检测装置可被配置为当溶液在流动池内流动时测量来自溶液的衰减全反射辐射。入射的辐射可包括红外辐射。

[0032] 第一化学计量模型可包括与第一质量属性相关的第一组主要振动组分。第一化学计量模型可包括至少三个主要振动组分(例如,至少五个主要振动组分)。

[0033] 所述控制器可被配置为使用所述第一化学计量模型、通过基于所述第一组主要振动组分计算所述第一质量属性值来分析所述振动光谱。所述控制器可被配置为将所述第一质量属性值计算为所述第一组主要振动组分的线性函数。

[0034] 第二化学计量模型可包括与第一质量属性相关的第二组主要振动组分。第二化学计量模型可包括至少三个主要振动组分(例如,至少五个主要振动组分)。所述第一组主要振动组分和所述第二组主要振动组分可以没有共同的成员。所述控制器可被配置为使用所述第二化学计量模型、通过基于所述第二组主要振动组分计算所述第二质量属性值来分析所述振动光谱。所述控制器可被配置为将所述第二质量属性值计算为所述第二组主要振动组分的线性函数。

[0035] 所述溶液可包括从所述纯化单元排出的溶液。所述控制器可连接至所述纯化单元并被配置为纯化所述纯化单元中的溶液然后获得有关所述溶液的振动光谱的信息。

[0036] 所述纯化单元可包括色谱柱。所述纯化单元可以是系统的第一纯化单元,并且所述系统可包括被配置为接收所述溶液的第二纯化单元,其中所述检测装置被定位为当所述溶液在所述第一纯化单元与所述第二纯化单元之间流动时测量来自所述溶液的辐射。所述第一纯化单元和所述第二纯化单元可各自包括色谱柱。

[0037] 所述纯化单元可以是所述系统的最终纯化单元。

[0038] 所述溶液可以是第一溶液,并且所述检测装置可被配置为测量来自第二溶液的辐射,并且所述控制器可被配置为:接收来自所述检测装置的测量信号,所述测量信号对应于有关所述第二溶液的振动光谱的信息;使用所述第一化学计量模型分析有关所述第二溶液的信息以确定所述第二溶液的第一质量属性值;并且使用所述第二化学计量模型分析有关所述第二溶液的信息以确定所述第二溶液的第二质量属性值。

[0039] 所述纯化单元可为第一纯化单元并且所述系统可包括第二纯化单元和第三纯化单元,其中第一溶液可在第一纯化单元与第二纯化单元之间流动,并且第二溶液可在第二纯化单元与第三纯化单元之间流动。所述控制器可被配置为基于所述第一溶液的第一质量属性值和第二质量属性值与所述第二溶液的第一质量属性值和第二质量属性值中的至少一个来调节所述至少一个参数。

[0040] 所述检测装置和所述控制器可被配置为从辐射入射到溶液上的时间开始,在30秒或更短的时间段内,测量来自溶液的辐射并确定第一质量属性值和第二质量属性值。所述时间段可以是10秒或更短(例如,2秒或更短)。

[0041] 所述检测装置和所述控制器可被配置为重复以下多个步骤:测量来自溶液的辐射,使用第一化学计量模型分析有关溶液的振动光谱的信息,并且使用第二化学计量模型

分析振动光谱,以确定与所述溶液的连续部分相关的第一质量属性值和第二质量属性值的时间序列。所述控制器可被配置为基于第一质量属性值的时间序列和第二质量属性值的时间序列中的至少一个来调节至少一个参数。

[0042] 所述控制器可被配置为获得具有代表所述溶液的一个或多个校准光谱的集合,并且分析校准光谱的所述集合以确定所述第一组主要振动组分和所述第二组主要振动组分。第一化学计量模型可包括与第一组主要振动组分相关的第一组系数,并且第二化学计量模型可包括与第二组主要振动组分相关的第二组系数,并且所述控制器可被配置为通过进行回归分析确定第一组系数和第二组系数。

[0043] 所述控制器可被配置为使用第三化学计量模型分析有关溶液的振动光谱的信息以确定与所述溶液相关的第三质量属性值。第三化学计量模型可包括与第三质量属性相关的第三组主要振动组分。第三化学计量模型可包括至少三个主要振动组分(例如,至少五个主要振动组分)。所述控制器可被配置为使用第三化学计量模型、通过基于第三组主要振动组分计算第三质量属性值来分析有关振动光谱的信息。所述控制器可被配置为通过将第三质量属性值确定为第三组主要振动组分的线性函数来计算所述第三质量属性值。所述控制器可被配置为基于第一质量属性值、第二质量属性值和第三质量属性值中的至少一个来调节至少一个参数。

[0044] 所述控制器可被配置为使用第四化学计量模型分析有关振动光谱的信息以确定与所述溶液相关的第四质量属性值。第四化学计量模型可包括与第四质量属性相关的第四组主要振动组分。第四化学计量模型可包括至少三个主要振动组分(例如,至少五个主要振动组分)。所述控制器可被配置为使用第四化学计量模型、通过基于第四组主要振动组分计算第四质量属性值来分析有关振动光谱的信息。所述控制器可被配置为通过将第四质量属性值确定为第四组主要振动组分的线性函数来计算所述第四质量属性值。所述控制器可被配置为基于第一质量属性值、第二质量属性值、第三质量属性值和第四质量属性值中的至少一个来调节至少一个参数。

[0045] 第一质量属性和第二质量属性中的至少一个可选自浓度、聚集体、电荷变体分布、纯度、聚糖谱、同一性和完整性。第一质量属性和第二质量属性中的至少一个可选自蛋白质片段、核酸片段、核酸变体、空衣壳和载体杂质。第一质量属性和第二质量属性中的至少一个可选自宿主细胞蛋白、残留宿主DNA、残留柱配体、杂质浓度、杂质量、残留辅助病毒、残留辅助病毒蛋白和残留辅助病毒DNA。

[0046] 除非另外明确说明,否则所述系统的实施方案还可包括本文公开的任何其他特征,包括结合不同实施方案单独公开的特征的组合。

[0047] 如本文所用,“实时”是指以相对小的延迟或重现周期发生的测量或过程。例如,“实时”测量是这样的测量,其中开始测量光谱信息与从所述信息计算参数值或其他量的时间之间的总经过时间间隔是1分钟或更短。周期性实时测量是循环/周期性测量,其连续测量之间的时间间隔为1分钟或更短。

[0048] 如本文所用,“近实时”测量是这样的测量,其中开始测量光谱信息与从所述信息计算参数值或其他量的时间之间的总经过时间间隔是在1分钟与5分钟之间。周期性近实时测量是循环/周期性测量,其连续测量之间的时间间隔在1分钟与5分钟之间。

[0049] 如本文所用,术语“质量属性”是指一种参数值,其被用于评估生物制造系统的操

作条件、在这种系统中实施的工艺的完整性、和/或源自这种工艺的产品。质量属性可以是产品质量属性,其与生物制造系统所生产产品的纯度、完整性、产量及其他特征有关;它们可以是产品相关的杂质参数,其提供有关在所述系统中所生产的产品的信息;并且它们可以是工艺相关的纯度参数,其提供有关在所述系统中实施的生物制造工艺的保真度的信息。

[0050] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本公开文本所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。尽管与本文所述的方法和材料类似或等同的那些方法和材料可以用于本文主题的实践或测试,但下面描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献都通过引用以其整体而并入。在冲突存在的情况下,则以包括定义在内的本说明书为准。此外,材料、方法以及实施例仅仅是说明性的并不意在是限制性的。

[0051] 在下面的附图和说明书中阐述了一个或多个实施方案的细节。从说明书、附图和权利要求中,其他特征和优势将变得清楚。

附图说明

[0052] 图1是显示一种系统的例子的示意图,所述系统用于测量生物制造系统中工艺溶液的红外光谱信息。

[0053] 图2是显示光纤的例子的截面示意图。

[0054] 图3是显示棱镜的例子的示意图,所述棱镜形成衰减全反射界面。

[0055] 图4是显示定位于两个流体导管之间的流动池的例子的示意图。

[0056] 图5是显示定位于两个流体导管之间的流动池的另一个例子的示意图。

[0057] 图6是显示在棱镜表面折射的入射辐射光线的示意图。

[0058] 图7是显示测量生物制造系统中的流体的红外光谱信息的测量系统的例子的示意图。

[0059] 图8是显示示例步骤的流程图,可进行这些步骤以分析工艺流体的振动光谱信息。

[0060] 图9是显示示例步骤的流程图,可进行这些步骤以基于针对工艺流体测量的振动光谱信息来构建和验证针对工艺流体属性的化学计量模型。

[0061] 图10是显示生物制造系统的例子的示意图。

[0062] 图11是显示在周期性逆流色谱系统中的三柱转换技术的例子的示意图。

[0063] 图12是显示蛋白A(Protein A)纯化抗体样品的傅立叶变换红外(FTIR)光谱的图。

[0064] 图13是显示从针对抗体浓度的偏最小二乘(PLS)模型计算的预测抗体浓度值以及相应的所测量的抗体浓度值的图。

[0065] 图14A是显示蛋白A(Protein A)纯化样品的傅立叶自解卷积FTIR红外光谱的例子的图。

[0066] 图14B是显示针对样品的聚集值开发的PLS校准模型以及测量的样品聚集值的图。

[0067] 图15A是显示一组光谱的图,所述组光谱用于构建针对样品的宿主细胞蛋白(HCP)含量的PLS模型。

[0068] 图15B是显示针对从图15A中的光谱确定的样品HCP含量的PLS模型以及测量的样品HCP值的图。

- [0069] 图16A-16C是显示针对样品的电荷变体分布值的三种不同PLS模型的图。
- [0070] 图17是显示使用针对抗体浓度的偏最小二乘法模型预测的六个样品的抗体浓度值的表。
- [0071] 图18A-18D是显示灌注生物反应器的活细胞密度、细胞活力、收获效价和比生产率的测量值的图。
- [0072] 图19A-19D是显示对于生产单克隆抗体产品的生物反应器在不同细胞密度、pH和灌注条件下的葡萄糖浓度、谷氨酰胺浓度、乳酸浓度和铵离子浓度的测量值的图。
- [0073] 图20A-20D是显示生物反应器培养基的葡萄糖浓度、收获效价、乳酸浓度和铵离子浓度的每日测量值的图。
- [0074] 图21A-21F是显示从红外光谱信息确定的生物反应器培养基的葡萄糖浓度、谷氨酰胺浓度、IgG浓度、乳酸浓度、铵离子浓度和摩尔渗透压浓度的测量值的图。
- [0075] 图22A-22D是显示从红外光谱信息确定的生物反应器培养基的葡萄糖浓度、收获效价、乳酸浓度和铵离子浓度的多个值的图。
- [0076] 图23A-23C是显示从红外光谱信息确定的生物反应器培养基在后期的葡萄糖浓度、乳酸浓度和铵离子浓度的多个值的图。
- [0077] 图中相同的符号表示相同的元件。

具体实施方式

- [0078] 引言
- [0079] 工业规模的生物制造可以在双柱和多柱色谱系统中以各种配置进行。在这些复杂系统中，产品产量、质量和废品率是大量与工艺相关的参数和步骤的函数。在制造治疗性蛋白质和其他具有商业价值的生物分子期间，产品结果可受这些参数和步骤的强烈影响。因此，适当控制此类参数和步骤是大规模制造的重要方面。例如，在PCT专利申请公开号W0 2014/137903中公开了生物制造系统的特征和方面，将所述申请的全部内容通过引用并入本文。
- [0080] 通过对中间溶液流的过程内在线监测，特别是监测此类流中的中间体和产品的浓度以及此类流的其他特性（例如pH），来促进对生物制造参数运用适当控制（包括自动控制）。用于溶液监测的常规方法包括如UV吸光度测量的技术。然而不幸的是，由于如温度、湿度、环境光强度和局部样品不均一性等因素，此类方法在几天的测量周期中发生漂变。
- [0081] 此外，此类方法通常不允许由单次测量（例如，吸光度光谱的测量）实时或近实时地计算或以其他方式确定多个量。取而代之，在进行的测量与从此类测量确定的量之间通常存在1:1的对应关系。因此，例如，为了测量溶液流中两种不同物质的浓度，将记录两种不同的UV吸光度测量值，并且每种测量值将产生这些物质之一的浓度值。由于确定此类值所需的测量与分析时间，可能无法实时或近实时地确定多个量的值。
- [0082] 本文公开了使用红外光谱测量结合多元化学计量模型来确定有关分析物的定量信息与工艺溶液中特性的方法和系统。例如，分析物可包括产品与中间组分、废产品、残留试剂和缓冲液组分。特性的例子可包括但不限于pH水平、盐度水平、蛋白质/肽聚集水平、生物产品（如蛋白质、肽和核酸）的量/浓度、工艺杂质与产品杂质的浓度/量、以及蛋白质的电荷变体分布。

[0083] 红外光谱测量可以快速且高重现性地进行，并且校准的化学计量模型用于在各种生物制造工艺条件下且针对各种试剂、产品、副产品和杂质实时或近实时地预测质量属性。由本文公开的基于化学计量的分析方法所提供的广泛控制允许更有效地进行生物制造工艺，具有更少的浪费、更高的产品产量和更高的产品纯度。

[0084] 由于红外辐射的波长，红外光谱测量通常提供有关分析物（例如生物制造系统内的工艺流体中的反应产品和副产品）的振动特性的信息。虽然其他测量方式如拉曼光谱也可以产生有关此类分析物的重要信息，但红外测量在某些情况下可提供某些优势。通常，例如，红外光谱信息的测量（例如，在大约30秒或更短时间内）可以比相应的拉曼测量（其可花费10分钟与15分钟之间）更快地进行。因此，红外测量可以更好地适用于实时和近实时的过程监测和控制应用。

[0085] 迄今为止，由于在水溶液中实施制造工艺，并且水在约 1640cm^{-1} 处具有强吸收，红外测量在针对生物药物的生物制造操作中的上游和下游过程监测中的应用非常有限。工艺用水本质上干扰基于红外测量的常规分析计算，有时甚至达到无法从此类测量中确定定量信息的程度。但是，即使存在强吸水性，本文公开的化学计量学方法也可以可靠地预测各种参数的定量值。因此，本文公开的方法可使用红外光谱测量来进行常规的、高通量的过程监测与控制。

[0086] 此外，与拉曼测量相比，红外光谱测量对分析物和工艺流体特性的变化更为敏感。结合可以进行此类测量的速率，红外光谱测量可能更适合于在生物制造工艺的主动监测期间更高通量的应用。

[0087] 此外，红外光谱测量通常对于在进行测量时发生的环境条件变化不太敏感。例如，相对于拉曼测量，红外光谱测量通常对于温度、湿度和环境光的变化不太敏感。因此，基于此类测量的化学计量模型，一旦经校准，则可以在更多种条件下使用，并且可以更容易地从实验室转化为商业化的高通量制造操作。

[0088] 红外光谱测量与测量系统

[0089] 图1是显示一种测量系统100的实施方案的示意图，所述测量系统用于测量生物制造系统中工艺溶液的红外光谱信息。系统100包括位于流体导管102与104之间的流动池106。流体122从导管102进入流动池106，沿图1中箭头所示的方向流动通过池106，并离开池106进入导管104。

[0090] 在一些实施方案中，如图1所示，流动池106包括衰减全反射(ATR)界面，以用于测量ATR配置/模式中的红外光谱信息。在图1中，ATR界面实施为棱镜108，所述棱镜形成池106内的内腔的一部分。第一光纤110光学耦合到棱镜108的第一表面124和光源112。第二光纤114光学耦合到棱镜108的第二表面126和检测器116。辐射源112和检测器116电连接到控制器120。

[0091] 在操作期间，控制器120激活辐射源112以产生入射辐射130。入射辐射130耦合到第一光纤110中并由第一光纤110通过第一表面124传递到棱镜108中。在进入棱镜108之后，入射辐射130向流动池106的表面128传播。

[0092] 将相对于表面128法线的入射辐射130的入射角度 θ 以及形成流动池106的材料选择为使得当入射辐射130到达表面128时，入射辐射在表面128处经历全内反射，从而产生反射辐射132。反射辐射132穿过表面126耦合到第二光纤114中，传播通过第二光纤114，并由

检测器116检测。检测器116将反射辐射132转换为光谱信息，并将光谱信息发送到控制器120。如下面将更详细解释的，控制器120分析光谱信息以确定有关流体122的一种或多种组分的信息和/或与生产流体122的生物制造工艺相关的一种或多种工艺条件。

[0093] 辐射源112可包括各种不同的辐射源。在一些实施方案中，例如，辐射源112包括一个或多个发光二极管(LED)。通常，辐射源112在电磁波谱的红外区域中产生入射辐射130。例如，入射辐射130通常包括在750nm与500微米之间的一个或多个波长处的辐射。

[0094] 在某些实施方案中，辐射源112以多个不同的波长产生入射辐射130。例如，辐射源112可以在3个或更多个(例如，5个或更多个、7个或更多个、10个或更多个、15个或更多个、20个或更多个、或者甚至更多个)不同的、光谱分离的“带”或“线”(其每个具有在光谱的红外区域内的中心波长)上产生入射辐射130。

[0095] 在一些实施方案中，辐射源112在红外光谱区域中的一系列波长上产生宽带入射辐射130。例如，入射辐射130可以具有在100nm或更大(例如，200nm或更大、500nm或更大、1微米或更大、5微米或更大、10微米或更大、50微米或更大、100微米或更大、200微米或更大、300微米或更大)的半最大带宽处的全宽。

[0096] 检测器116通常可以按各种方式实施。例如，在某些实施方案中，检测器116可以是傅立叶变换红外(FTIR)光谱仪，其接收反射辐射132并产生反射辐射的光谱信息。用作检测器116的一种合适的FTIR光谱仪是Bruker **MATRIX-MF®FTIR**(可购自Bruker Optics公司，比勒利卡，马萨诸塞州)，其具有碲镉汞(MCT)红外传感器，但也可使用许多其他FTIR光谱仪。

[0097] 检测器116也可使用标准光学元件来实施，所述标准光学元件在空间上分散反射辐射132的频率分量，从而将辐射频率映射到空间坐标方向上并且然后分析作为位置函数的分散的频率分量以测量辐射强度。用于在空间上分散反射辐射132的频率分量的合适的光学元件包括光栅、棱镜、衍射光学元件和自适应调制器，如基于液晶的光学调制器。在反射辐射132的频率组分已经在空间上分散之后，可使用适用于检测红外辐射的各种检测器测量作为频率函数的辐射强度，包括基于碲镉汞、锑化铟、锑化砷、和硒化铅中的一种或多种的检测器，和/或具有基于量子阱和/或量子点的传感器特征的检测器。

[0098] 如图1所示，在一些实施方案中，入射辐射130和反射辐射132可以通过光纤110和114传送至和传送自ATR界面(例如，棱镜108)。但是，在某些实施方案中，入射辐射130和反射辐射均可以使用单根光纤传送至和传送自ATR界面。图2显示的是光纤200的截面示意图，所述光纤包括由不透明包层材料252包绕的第一辐射传输芯210和第二辐射传输芯214。集成到光纤200一端的是ATR界面(实施为棱镜208)。将棱镜208定位为使得表面250可以光学耦合到图1的流动池106，代替棱镜108。

[0099] 在操作期间，由辐射源112产生的入射辐射130耦合到光纤芯210中并且通过芯210传播，到达集成棱镜208。所述入射辐射进入棱镜208并从棱镜208的表面250经历全内反射，从而产生反射辐射132。反射辐射132耦合到芯214中并通过光纤200传播回来。在与棱镜208相对的光纤200的末端，反射辐射132耦合至检测器116并如上所讨论的被分析。

[0100] 通常，前述例子仅代表可用于在系统100中传输入射辐射130和反射辐射132的光纤和探针的子集。可使用各种各样的光纤和探针，包括某些市售部件。合适的市售探针的一个例子是IN350T®金刚石ATR探针(可购自Bruker Optics)。

[0101] 另外,在一些实施方案中,入射辐射130和/或反射辐射132可以通过自由空间传播而不是在光纤中传输。自由空间传播可允许将另外的光学元件(如滤光器、光阑、分束器、反射镜和透镜)插入入射辐射130和反射辐射132之一或二者的光路中,从而允许进一步控制两个光束的特性。

[0102] 如图1和2所示,在一些实施方案中,ATR界面可实施为具有几何特征(例如,顶角)的棱镜,所述几何特征被选择为确保当入射辐射遇到棱镜材料与流体122之间的界面时发生入射辐射130的全内反射。更一般地,ATR界面也可以按其他方式实施。图3是显示ATR界面的另一例子的示意图,所述ATR界面被实施为梯形308(或者可替代地,作为截棱镜)。梯形308的表面328形成流动池106的内腔的一部分。另外,反射涂层362设置在梯形308的表面360上,所述表面与表面328相对。

[0103] 在操作期间,入射辐射330(例如,来自光纤)穿过表面324耦合到梯形308中。入射辐射330沿着流体122与梯形308的表面328之间的界面入射在第一位置372处。入射辐射在表面328处经历全内反射,形成反射辐射332。反射辐射332被表面360上的涂层362反射,并且沿着流体122与梯形308的表面328之间的界面再次入射在位置374处。反射辐射334从位置374处出现,由涂层362反射,并沿着流体122与表面328之间的界面入射在位置376处。反射辐射336从位置376处出现并且穿过表面326从梯形308耦合出来(例如,进入光纤)。

[0104] 梯形308的几何特征确保入射辐射330穿过梯形308的表面328与流体122进行多次相互作用,这相对于发生在图1的例子中的单次相互作用测量,增加了由反射辐射336承载的光谱信息的信噪比。通常,梯形308可以被配置为使得入射辐射330穿过表面328与流体122之间的相互作用的数量是2次或更多次(例如,3次或更多次、5次或更多次、7次或更多次、10次或更多次,或者甚至更多次)。

[0105] 通常,用于系统100的ATR界面(如棱镜108和梯形308)是由相对高折射率的材料形成,以确保在棱镜108和/或梯形308与流体122之间的界面处(例如,表面128和/或328)发生全内反射。可以形成如棱镜108和/或梯形328的ATR界面的合适材料包括但不限于金刚石、锗、各种卤化铊、硒化锌和硅。

[0106] 在图1中,流动池106被实施为连接在导管102与104之间的流通池。流体122,其可以包括生物制造系统内的各个位置处的各种不同工艺流体中的任何一种或多种,在测量和分析红外光谱信息时流动通过池106。流动池106可以被定位在生物制造系统内的各个位置,以允许测量光谱信息,用于产品质量评估和工艺控制。例如,在一些实施方案中,流动池106可以被定位在生物反应器(例如,灌注生物反应器,如切向流灌注生物反应器)的出口端口。可替代地或另外地,流动池106可以沿着生物制造系统的部件之间的流体流动路径定位,包括定位于生物反应器与纯化单元之间、在两个纯化单元之间、和/或在纯化单元之后。生物制造系统通常可包括单个流动池106或多个流动池106,各个流动池被定位于生物制造系统内以测量不同位置处的光谱信息。

[0107] 在一些实施方案中,当流体122不在池106中流动时进行红外光谱测量。图4是显示定位在两个流体导管102与104之间的流动池106的示意图。第一阀402电连接至控制器120,被定位于导管102与流动池106之间。第二阀404电连接至控制器120,被定位于流动池106与导管104之间。在操作期间,控制器120打开阀402以允许流体122的一部分进入流动池106。当流体122的这部分已进入流动池106时,控制器120关闭阀402。在阀404保持关闭的情况下

下,流体122的这部分暂时被截留在流动池106内。如上所讨论,通过控制器120测量流体122的红外光谱信息,其中流体122在流动池106内保持静止;并且然后控制器120打开阀404以允许流体122的一部分流出池106。在同一时间或之后,控制器120还可打开阀402以允许流体122的新的部分进入流动池106。以这种方式,可以从流体122的非流动部分测量红外光谱信息,当流体122通过池106的流速会以另外的方式扰乱或干扰从所述流体获得准确的、可再现的红外光谱信息时,这可能是有用的。此类情况例如在如下情形时会发生:流动通过池106的流体高度浑浊,导致入射辐射130的散射和/或与流体122中的气泡及其他和流动相关的不均匀物质的相互作用。

[0108] 虽然图1显示了可以用于系统100的流动池106的一个例子,但更一般地,可以使用具有各种不同几何形状的流动池。图5是显示定位在导管102与104之间的流动池506的示意图。ATR界面形成流动池506内的腔或通道壁的一部分。如图5所示,流体122从导管102流动通过池506并进入导管104。当流体122流动时,或者可替代地当流体122在流动池506内静止时(例如,如上所讨论,当连接至控制器120的阀调节流体122进出流动池506的流动时),通过界面128处的入射辐射130的ATR进行红外光谱测量。

[0109] 虽然图1中的流动池106定义了从导管102通过流动池106并进入导管104的非线性二维流体流动路径,但由于流体端口502与504的位置在流动池506的任一末端处,流动池506定义了线性一维流体流动路径。对于在生物制造系统内以相对较高的速率流动的工艺流体,流动池506可以提供相对于流动池106的某些优势。具体而言,流动池506可以允许维持更高的聚集体流体流动速率,从而确保红外光谱测量不会将流速瓶颈引入连续生物制造工艺。

[0110] 如上所讨论,本文公开的某些测量系统被配置为使用基于ATR的几何结构来进行红外光谱测量。ATR几何结构利用了在形成ATR界面(例如,棱镜108和308)的材料与流体122之间的折射率的失配优势。图6是显示入射在棱镜108的表面128上的入射辐射130的光线602的示意图。表面128形成了在形成棱镜108的材料(通常是在光线602的波长处具有相对高的折射率的材料)与流体122(其通常具有相对较小的折射率)之间的边界。斯涅尔定律(Snell's law)描述了在界面处入射角和反射角即 θ_i 和 θ_r 与棱镜和流体的折射率 n_p 和 n_f 之间的关系,对应地为:

$$n_p \sin\theta_i = n_f \sin\theta_r \quad [1]$$

[0112] 随着 n_p 的值相对于 n_f 的值增加, $\sin\theta_r$ 的值增加以维持方程式(1)中的关系。换言之,棱镜108与流体122之间的折射率失配越大, $\sin\theta_r$ 的值越大,其意味着折射角 θ_r 增加。对于 n_p 与 n_f 的固定值,可以将入射角 θ_i 选择为使得 $\sin\theta_r=1$ 。即,折射光线604在与表面128相切的方向上传播。此入射角称为临界角 θ_c 。

[0113] 对于大于临界角的入射角,在表面128处不产生折射光线604。取而代之,入射光线602在表面128处经历全内反射,产生反射光线606。但是,在表面128处,倏逝场延伸一段短距离(通常称为穿透深度)超过界面并进入流体122。没有能量流过界面。尽管如此,倏逝场与流体122(以及流体的组分)相互作用并且通过这种相互作用改变了所述场的光谱特性。结果是,通过分析反射光线606的光谱特性的变化,可以提取有关各种组分(如分析物和制造副产品)及流体属性的信息。

[0114] 在一些实施方案中,使用ATR几何结构测量红外光谱信息可以提供某些优势。例

如,相对于传输模式红外光谱测量,ATR几何结构涉及通过倏逝场进入问询流体的穿透深度,其与传输模式试验中使用的常规吸收路径长度相比相对较短。通常,路径长度越长,测量灵敏度的降低程度越大。因此,在某些实施方案中,基于ATR的红外光谱测量能够以比传输模式红外吸收测量更高的灵敏度进行。

[0115] 尽管如此,在一些实施方案中,可以对通过传输模式测量获得的红外光谱信息进行基于化学计量学的分析。图7显示的是与生物制造系统一起使用的测量系统700的示意图。系统700通过传输模式测量几何结构来测量流体122的红外光谱信息。

[0116] 流体122从导管102流动通过流动池106并进入导管104。控制器120激活辐射源112,产生入射辐射130。入射辐射130通过光纤110传播并通过窗口耦合(所述窗口形成流动池106的壁的一部分),并且进入流动池106内的内腔或通道。一旦进入流动池,则入射辐射130的至少一部分被一种或多种分析物或者流体122的其他组分吸收。入射辐射130的未吸收部分通过流动池106中的第二窗口作为传输辐射702出现,并且通过第二光纤114传播到检测器116。由检测器116产生的、编码由传输辐射602承载的红外光谱信息的电信号被传输至控制器120以进行分析。

[0117] 对红外光谱信息进行的基于化学计量学的分析

[0118] 用于制造小分子药物物质的工艺分析的预测性的、基于化学计量模型的光谱测量分析已取得了一些成功。但是,此类方法尚未应用于对更大的生物治疗药物(如基于抗体的药物)的开发,因为此类产品尺寸大、复杂且不均一。此外,此类物质的生物制造工艺比小分子药物的更加复杂,并且产生含有广泛分析物及其他物质的工艺溶液。迄今为止,这些复杂性已经建议不要应用化学计量学方法来对大生物分子(如基于抗体的药物和基于核酸的产品)的生物制造进行工艺控制。

[0119] 但是,人们已经发现,尽管存在上述复杂性,但基于化学计量模型的光谱测量分析可以产生与大生物分子的生物制造相关的各种工艺相关参数和产品属性的值。这些参数和属性可用于实时或近实时地工艺反馈与控制。具体而言,来自红外反射(或吸收)测量的振动光谱信息特别适用于基于化学计量模型的分析,因为光谱信息提供了丰富的数据集,其具有如与特定分析物和副产品直接相关的伸缩与弯曲共振的突出特征。更一般地,光谱信息编码工艺流体组分对入射红外辐射的响应的复杂集,并且多元数据分析工具可以解码这些响应,且对于某些参数,可以高准确性地、预测性地使用。

[0120] 在本节中,讨论了用于构建化学计量模型并将其应用于红外光谱信息的方法和系统。所述方法和系统特别适合于产生与在连续生物制造操作期间产生的工艺流体相关的各种产品属性和参数的值,并且可用于监测此类操作并通过调节各种生物制造工艺的输入和特性来进行工艺控制。具体而言,所述方法可用于实时或近实时地生物制造工艺反馈与控制。

[0121] 如下面将更加详细描述的,本文讨论的多元数据分析方法用于分离由于不同分析物及质量属性所致的光谱信息响应。由从参考方法(如色谱或质谱)获得的数据为各分析物和/或质量属性构建化学计量模型之后,可以获得单组光谱信息(例如,红外吸光度或反射光谱),并且可以使用化学计量模型处理光谱信息,以预测与来自同一组光谱信息的模型相对应的各个质量属性的定量值。因为模型对相同的信息集起作用,所以质量属性值的预测性确定可以实时或近实时地发生。

[0122] 本节中讨论的基于化学计量模型的分析方法对红外光谱信息起作用,以确定与工艺相关的参数值。可以如前面章节中所述或通过使用其他方法测量所述红外光谱信息。通常,红外光谱信息对应于振动光谱信息,并且更具体地,对应于工艺流体(和所述流体中含有的组分)的振动光谱。振动光谱是二维数据集,其包括作为辐射波长或频率的函数的强度值,其中波长或频率的范围落在电磁波谱的红外部分以内,并且因此对应于工艺流体的组分的不同振动模式的典型波长或频率。

[0123] 更一般地,如本文所用,振动光谱信息包括代表工艺流体的组分的振动响应(例如不同振动模式)的任何数据集。振动光谱信息可以被编码为常规的振动光谱,或处于代表与振动光谱类似的信息内容的不同形式。

[0124] 图8是显示一系列示例步骤的流程图800,可以进行这些步骤以分析工艺流体及其相关组分的振动光谱信息(如振动光谱)以确定所述流体及其相关组分的各种属性值。流程图800中所示的各个步骤可以由系统控制器(如控制器120)以自动方式执行以进行分析。

[0125] 在第一步骤802中,获得针对待确定的各个属性值的经校准且验证的化学计量模型。在一些实施方案中,化学计量模型(其通常由描述工艺流体的属性值与一个或多个波长或频率处的光谱强度值之间的函数关系的校准系数组成)可以通过从存储介质中检索先前存储的系数值来获得。可替代地,在某些实施方案中,化学计量模型在由控制器120预测性地使用之前得以构建和验证。

[0126] 图9是显示一系列示例步骤的流程图,可进行这些步骤以基于针对工艺流体测量的振动光谱信息来构建和验证针对工艺流体属性的化学计量模型。在第一步骤902中,控制器120确定特征模型自变量的集合。在实践中,模型变量的集合对应于振动光谱信息内的独立振动频率的集合,其预测属性(针对所述属性构建所述模型)。应当理解,虽然以下讨论涉及振动光谱信息内的“频率”,但是考虑到在振动光谱信息中波长与频率之间的相互关系,所述讨论也可等效地指代“波长”。即,依据一组频率定义化学计量模型的方法等同于依据一组波长定义化学计量模型的方法。

[0127] 可按各种方式确定独立振动频率的集合。例如,在一些实施方案中,可通过对多个校准数据集进行主成分分析来确定振动频率的集合,各个校准数据集对应于与具有不同的、已知的感兴趣属性值的工艺流体相关的振动光谱信息。主成分分析确定有多少独立频率可靠地预测在各个校准数据集上的属性值以及独立频率的值。主成分的集合对应于在步骤902中形成独立模型变量的频率的集合。用于进行主成分分析的方法例如在Bro等的“Principal component analysis,”Anal. Methods 6:2812-2831 (2014) 和Chatfield等的“Principal component analysis,”Introduction to Multivariate Analysis, Springer, 第51-87页(1980) 中进行了讨论,其各自的全部内容通过引用并入本文。

[0128] 接下来,在步骤904中,基于来自步骤902的自变量的集合构建针对感兴趣属性的化学计量模型。通常,化学计量模型可以采用多种函数形式。一种这样的形式是线性模型,其中感兴趣的属性A值表示为自变量集合的线性函数:

$$A = a_1 I_{v1} + a_2 I_{v2} + \dots + a_i I_{vi} + \dots + a_n I_{vn} \quad [2]$$

[0129] 其中 $v_1 \dots v_n$ 是对应于在步骤902中确定的自变量集合的n个频率的集合(即,n个主成分的集合),并且 $I_{v1} \dots I_{vn}$ 是来自对应于所述n个频率中的每一个的振动光谱信息的n个强度值的集合。参数 $a_1 \dots a_n$ 是系数的集合,其有效地加权来自振动光谱信息的各个强度值对预

测属性A值的贡献。

[0131] 通常,如方程式(2)所示,针对属性A的值的化学计量模型是多元模型,其中属性A的值取决于多个自变量值。化学计量模型中的自变量的数量通常可以根据需要选择,例如,基于主成分分析的结果来选择。因此,例如,化学计量模型中的属性A的值可表示为一个或多个(例如,两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、十个或更多个、12个或更多个、15个或更多个、20个或更多个、或者甚至更多个)自变量的函数。

[0132] 在一些实施方案中,化学计量模型具有比方程式(2)的线性形式更复杂的形式。例如,某些化学计量模型可为非线性的,其中感兴趣属性A的值表示为自变量的集合的非线性函数。化学计量模型的此类函数形式可表示如下:

$$[0133] A = f_1(I_{v1}) + f_2(I_{v2}) + \cdots + f_i(I_{vi}) + \cdots + f_n(I_{vn}) \quad [3]$$

[0134] 其中各个函数形式 $f_j(I_{vj})$ 在 I_{vj} 中是线性的或非线性的。对于代表A的非线性化学计量模型的方程式(3), $f_j(I_{vj})$ 中的至少一个是 I_{vj} 的非线性函数。

[0135] 通常,各个 $f_j(I_{vj})$ 函数形式在 I_{vj} 中可以是线性的或非线性的。在 $f_j(I_{vj})$ 是 I_{vj} 的非线性函数的情况下, $f_j(I_{vj})$ 可以具有各种不同形式中的任何形式,例如但不限于:指数形式、对数形式、多项式形式、幂定律形式、三角形式、双曲线形式、以及任何前述函数形式的任何组合。通常可以在化学计量模型的构建期间根据需要选择此类函数形式,以确保模型对属性A的值的预测能力足够准确。随后的讨论集中在方程式(2)的线性例子,但是应当理解,类似的原理也适用于非线性化学计量模型。即,非线性化学计量模型类似线性化学计量模型,具有从校准数据集确定的系数,并且然后用于从测量的振动(即红外)光谱信息预测质量属性值。

[0136] 返回到方程式(2)的线性模型,在下一步骤906中,在模型被构建好之后,基于一个或多个校准数据集确定系数值。以下讨论假定属性A的化学计量模型是根据上面的方程式(2)所定义的线性模型。如果模型不同,可在使用下面讨论的方法时稍微加以修改以确定系数值。

[0137] 各个校准数据集对应于具有不同的、已知的属性A值的工艺流体的一组振动光谱信息(例如,振动光谱)。关于方程式(2),对于各个校准数据集, A 和 $I_{v1} \cdots I_{vn}$ 的值是已知的。因此,在步骤906中,在各个校准数据集上以自洽方式确定系数值 $a_1 \cdots a_n$ 的单个集合,使得方程式(2)尽可能正确地确定各个校准数据集的属性A的各已知值。

[0138] 可以使用各种方法来确定所有校准数据集中的系数值 $a_1 \cdots a_n$ 的集合。在一些实施方案中,例如,在所有校准数据集中同时使用偏最小二乘回归分析,从而使得属性A的各值的平方误差项的总和最小化。进行偏最小二乘回归的方法例如在 Haenlein 等的“*A Beginner's Guide to Partial Least Squares Analysis*,”*Understanding Statistics* 3 (4) : 283 - 297 (2004) 和 Sellin 的“*Partial Least Squares Analysis*,”*Int. J. Educational Research* 10 (2) : 189 - 200 (1986) 中进行了描述,其各自的全部内容通过引用并入本文。

[0139] 接下来,在步骤908中,可以针对一个或多个附加校准数据集可选地验证在步骤906中确定的系数值 $a_1 \cdots a_n$ 的集合,以验证针对属性A的化学计量模型将属性值预测在可接受的误差内。此验证步骤涉及使用化学计量模型以基于工艺流体的一组或多组校准数据

(各组校准数据是一组振动光谱信息)预测工艺流体的属性A的一个或多个值。由于已知各个工艺流体(对其测量了校准数据集)的属性A的值,因此可以容易地评估由化学计量模型生成的属性A的预测值的准确性。

[0140] 在可选步骤910中,系数值 $a_1 \cdots a_n$ 的集合可以存储在存储介质中,以便以后由控制器120检索。流程图900中所示的过程结束于步骤912。

[0141] 在一些实施方案中,一个或多个校准数据集以及测量的振动光谱信息均可在用于构建化学计量模型和/或从测量的信息生成预测的质量属性值之前被处理。通常,可以实施各种处理步骤。在一些实施方案中,例如,可以对一个或多个校准数据集和/或测量的光谱信息进行基线校正。在某些实施方案中,可以对一个或多个数据集和/或测量的信息进行如均值归一化和/或衍生化的处理步骤。例如,此类步骤可以使用商业分析软件如MATLAB®(可购自MathWorks,纳蒂克市,马萨诸塞州)来进行。

[0142] 在某些实施方案中,预测属性A的值的化学计量模型也可以对测量光谱信息的某些条件是特异性的。例如,所述模型可绑定于被测量了信息的特定工艺流体(例如,洗脱自特定色谱柱的流体)。因此,在一些实施方案中,本文公开的方法包括生成多于一个的化学计量模型以预测属性A的值。

[0143] 作为例子,可以生成第一化学计量模型以预测从生物制造系统中的第一色谱柱洗脱的工艺流体中的A的浓度,并且可以生成第二化学计量模型以预测从第一个柱下游的第二个色谱柱洗脱的不同工艺流体中的A的浓度。由于从两个柱洗脱的流体的组成不同,化学计量模型可以是不同的,但是各个都是特异地生成以准确预测系统中某个测量位置处的属性A的值。在生成属性A的多个模型的情况下,可以可选地存储各个模型。

[0144] 回到图8,在针对各个感兴趣的属性获得校准的化学计量模型之后,在步骤804中获得工艺流体的振动光谱信息。作为例子,使用ATR几何结构的红外反射测量(如上所讨论)可用于获得振动光谱信息,其可对应于工艺流体及其相关组分的振动光谱。

[0145] 接下来,在步骤806中,使用在步骤802中获得的第一化学计量模型分析振动光谱信息,以确定流体的感兴趣的第一属性值。如上面结合流程图900所讨论的,确定各个属性A的值涉及使用在来自振动光谱信息的各个独立频率变量上测量的强度值 $I_{v1} \cdots I_{vn}$ 的集合以及针对化学计量模型确定的系数 $a_1 \cdots a_n$ 的集合来计算A的值。因为计算是确定性的(例如,无论化学计量模型是如在方程式(2)中是线性的还是更加复杂的),所以其由控制器120非常快速地进行。

[0146] 在确定第一属性值之后,控制传至决定步骤808。如果要确定工艺流体的另外的属性值,则在步骤812中选择针对下一个感兴趣的属性的化学计量模型,并且控制返回到步骤806,在这里确定下一个感兴趣的属性值。在确定工艺流体的总共m个属性值的情况下,在步骤806中将m个不同的化学计量模型应用于振动光谱信息。

[0147] 本文公开的方法与系统的显著优点在于,由于振动光谱信息的丰富性,m个属性值中的各个可获得自同一组振动光谱信息。即,不进行新的测量以确定各属性值。取而代之,振动光谱信息仅被测量一次,并且从同一组振动光谱信息确定多个属性值,各个属性值可以基于一组多个自变量来确定。因为信息测量通常是确定属性值的过程中最耗时的步骤,所以确定多个属性值的经过时间段可以比与涉及多个测量步骤的方法相关联的可比时间段明显短得多。

[0148] 在一些实施方案中,例如,获得振动光谱信息并使用化学计量模型从振动光谱信息确定一个或多个属性值的经过时间段是从入射辐射130入射到与流体122接触的ATR界面的表面上开始30秒或更短(例如,25秒或更短、20秒或更短、15秒或更短、10秒或更短、5秒或更短、2秒或更短)。

[0149] 如果在步骤808中确定了所有感兴趣的属性值,则控制传至步骤810。在步骤810中,控制器120响应于测量的工艺流体属性值调节生物制造系统的一个或多个工艺参数。通常,可以基于所确定的属性值的性质以及那些属性值对于生物制造工艺的影响来进行各种各样的调节。在随后的章节中讨论了测量属性以及对生物制造系统进行相应调节的某些例子。

[0150] 接下来,在决定步骤812中,如果要继续确定工艺流体的属性值(例如,用于连续过程监测和控制),则控制返回到步骤804,并且在适当的时间间隔之后获得工艺流体的新的振动光谱信息。可替代地,如果不继续确定属性值,则控制传至步骤814,在这里流程图800的过程结束。

[0151] 通常,流程图800中所示的过程可用于从同一组振动光谱信息中确定任意数量的属性值。例如,在一些实施方案中,可以使用不同的化学计量模型从相同的振动光谱信息中确定1个或多个属性值(例如,2个或更多个属性值、3个或更多个属性值、4个或更多个属性值、5个或更多个属性值、6个或更多个属性值、8个或更多个属性值、10个或更多个属性值、12个或更多个属性值、或者甚至更多个属性值)。

[0152] 通常,与给定的化学计量模型相关的自变量的集合不同于与用于从同一组振动光谱信息计算不同属性值的其他化学计量模型相关的自变量的集合。对于各个化学计量模型,与模型相关的自变量的集合可包括两个或更多个(例如,三个或更多个、四个或更多个、五个或更多个、六个或更多个、八个或更多个、10个或更多个、12个或更多个、15个或更多个、或者甚至更多个)主要振动组分。

[0153] 但是,因为通常针对各个化学计量模型独立地确定自变量的集合,所以与不同化学计量模型相关的主要振动组分的集合可能没有共同的成员。可替代地,在一些实施方案中,与不同化学计量模型相关的主要振动组分的集合可以具有1个或多个(例如,2个或更多个、3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个)共同的成员。

[0154] 工艺流体及组分属性的化学计量模型

[0155] 通常,可以构建化学计量模型以确定与生物制造工艺相关的各种各样不同的质量属性。这些质量属性通常分为若干类别,包括但不限于:产品质量属性,其与生物制造工艺的产品的纯度、完整性、产量、形态及其他属性相关;产品相关杂质,其与生物制造工艺中产生的工艺流体中存在的不同合成副产品的性质有关;以及工艺相关杂质,其与系统内的工艺条件所造成的副产品和其他不希望的物质有关。

[0156] 通常可以构建化学计量模型以便应用于大量不同物质的生物制造。与不同类别的物质相关的质量属性中的一些是不同的,而一些是相似的。例如,在一些实施方案中,本文公开的方法可以应用于蛋白质治疗物质(如抗体、肽、酶以及具有氨基酸链的其他物质)的生物制造。对于此类物质,可构建化学计量模型以预测质量属性值,所述质量属性包括:(a)产品质量属性,其包括浓度、聚集体、电荷变体分布、纯度、聚糖谱、同一性和完整性;(b)产品相关杂质,如蛋白质片段;和(c)工艺相关杂质,如宿主细胞蛋白、残留的宿主细胞DNA、残

留的柱配体(例如蛋白A)以及其他杂质,如缓冲液组分、表面活性剂、工艺添加剂(如胰岛素、泊洛沙姆、洗涤剂、聚山梨醇酯80)以及来自生物反应器和色谱/分离柱的其他化合物。

[0157] 在某些实施方案中,本文公开的方法可以应用于核酸药品的生物制造,所述核酸药品包括:基于DNA的物质,如DNA、质粒、寡核苷酸、适配体和DNA酶(例如DNase);和基于RNA的物质,如RNA适配体、RNA诱饵、微小RNA和小干扰RNA。对于此类物质,可构建化学计量模型以预测质量属性值,所述质量属性包括:(a)产品质量属性,其包括浓度、同一性、完整性和聚集体;(b)产品相关杂质,如核酸片段和核酸变体;和(c)工艺相关杂质,如残留的柱配体以及其他杂质,如缓冲液组分、表面活性剂、工艺添加剂(如胰岛素、泊洛沙姆、洗涤剂、聚山梨醇酯80)、以及来自生物反应器和色谱/分离柱的其他化合物。

[0158] 在一些实施方案中,本文公开的方法可以应用于基因疗法药品的生物制造。对于此类物质,可构建化学计量模型以预测质量属性值,所述质量属性包括:(a)产品质量属性,如浓度、聚集体、同一性和完整性;(b)产品相关杂质,如空衣壳、片段和载体杂质;和(c)工艺相关杂质,如宿主细胞蛋白、宿主细胞DNA、残留的辅助病毒、残留的辅助病毒蛋白、残留的辅助病毒DNA以及其他杂质,如缓冲液组分、表面活性剂、工艺添加剂(如胰岛素、泊洛沙姆、洗涤剂、聚山梨醇酯80)以及来自生物反应器和色谱/分离柱的其他化合物。

[0159] 可以通过合适的化学计量模型预测性地生成前述的任何质量属性的值。因此,方程式(2)和(3)中的属性A可以代表上述的任何质量属性。

[0160] 此外,应当注意,可以构建化学计量模型以从单组测量的光谱信息(例如,红外振动光谱)预测性地生成任何上述的质量属性的组合的值。通常,上述质量属性的任意两种或更多种(例如,三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、七种或更多种、八种或更多种、十种或更多种,或者甚至更多种)的组合的值可通过适当构建的化学计量模型从相同的光谱信息生成。

[0161] 在以下讨论中,提供了与基于蛋白质的治疗物质的生物制造相关的质量属性的具体例子。对工艺流体122(及其组分)进行光谱测量。从测量的光谱信息确定的质量属性值可用于各种目的,包括产品质量评估、生物制造工艺调节以及工艺终止。使用质量属性值以便由控制器120对生物制造工艺进行调节的方面将在后面讨论。

[0162] (i) 抗体浓度值

[0163] 在某些实施方案中,如当生物制造工艺的期望产品是基于抗体的药物产品时,生物制造系统内的特定位置处的工艺流体的抗体浓度值可以与期望产品的总产量相关。因此,在一些实施方案中,本文公开的方法包括获得并应用化学计量学模型以确定工艺流体的抗体浓度值。

[0164] 在化学计量模型中针对抗体浓度值使用的独立振动频率集合可包括特定频率范围内的频率。通过将频率包括在这些特定范围内,可以减少与从振动光谱信息确定抗体浓度值相关的预测误差。

[0165] 例如,在一些实施方案中,化学计量模型中针对抗体浓度值使用的主要振动频率或组分的集合可以包括在波数范围 1100cm^{-1} 到 1595cm^{-1} 与波数范围 1600cm^{-1} 到 1700cm^{-1} 的至少一个中的振动光谱信息。在某些实施方案中,主要振动频率或组分的集合包括至少一个对应于在波数范围 1100cm^{-1} 到 1595cm^{-1} 中的振动光谱信息的组分,和至少一个对应于在波数范围 1600cm^{-1} 到 1700cm^{-1} 中的振动光谱信息的组分。

[0166] (ii) 蛋白质聚集的程度

[0167] 在某些实施方案中,如当生物制造工艺的期望产品是基于蛋白质时,工艺流体中蛋白质聚集的程度可以提供有关蛋白质相互作用和产品产量的重要信息。因此,在一些实施方案中,本文公开的方法包括获得并应用化学计量模型以确定工艺流体中蛋白质聚集的程度。

[0168] 在化学计量模型中针对蛋白质聚集程度使用的独立振动频率集合可包括特定频率范围内的频率。例如,在一些实施方案中,化学计量模型中针对蛋白质聚集程度使用的各个主要振动频率或组分对应于在波数范围 1393cm^{-1} 到 1554cm^{-1} 、范围 1600cm^{-1} 到 1635cm^{-1} 和范围 844cm^{-1} 到 1180cm^{-1} 的至少一个中的振动光谱信息。

[0169] 在某些实施方案中,化学计量模型中针对蛋白质聚集程度使用的主要振动频率或组分集合中的至少一个对应于在频率范围 1393cm^{-1} 到 1554cm^{-1} 中的振动光谱信息,至少一个主要振动频率或组分对应于在频率范围 1600cm^{-1} 到 1635cm^{-1} 中的振动光谱信息,并且至少一个主要振动频率或组分对应于在频率范围 844cm^{-1} 到 1180cm^{-1} 中的振动光谱信息。

[0170] (iii) 宿主细胞蛋白质的量

[0171] 在某些实施方案中,控制器120可以使用生物制造系统中的工艺流体的宿主细胞蛋白质的量来调节制造工艺参数以提高产品产量并减少副产品的形成。因此,本文公开的方法可包括获得并应用化学计量模型以确定工艺流体中的宿主细胞蛋白质的量。

[0172] 在化学计量模型中针对宿主细胞蛋白质的量使用的独立振动频率集合可包括特定频率范围内的频率。例如,在某些实施方案中,化学计量模型中针对宿主细胞蛋白质的量使用的各个主要振动频率或组分可对应于在波数范围 1500cm^{-1} 到 1600cm^{-1} 、波数范围 1600cm^{-1} 到 1680cm^{-1} 、波数范围 1414cm^{-1} 到 1489cm^{-1} 和波数范围 1174cm^{-1} 到 1286cm^{-1} 的至少一个中的振动光谱信息。

[0173] 在一些实施方案中,化学计量模型中针对宿主细胞蛋白质的量使用的主要振动频率或组分中的至少一个对应于在波数范围 1500cm^{-1} 到 1600cm^{-1} 中的振动光谱信息,至少一个主要振动频率或组分对应于在波数范围 1600cm^{-1} 到 1680cm^{-1} 中的振动光谱信息,至少一个主要振动频率或组分对应于在波数范围 1414cm^{-1} 到 1489cm^{-1} 中的振动光谱信息,并且至少一个主要振动频率或组分对应于在波数范围 1174cm^{-1} 到 1286cm^{-1} 中的振动光谱信息。

[0174] (iv) 电荷变体分布

[0175] 在某些实施方案中,控制器120可以使用生物制造系统中的工艺流体的电荷变体分布来调节制造工艺参数。因此,本文公开的方法可包括获得并应用化学计量学模型以确定工艺流体中的电荷变体分布。

[0176] 已经确定,此类化学计量模型的主要振动频率或组分的某些频率范围可以产生更准确地预测电荷变体分布值的化学计量模型。在一些实施方案中,例如,化学计量模型中针对电荷变体分布使用的各个主要振动频率或组分对应于在波数范围 1118cm^{-1} 到 1500cm^{-1} 、波数范围 1120cm^{-1} 到 1470cm^{-1} 和波数范围 1187cm^{-1} 到 1839cm^{-1} 的至少一个中的振动光谱信息。

[0177] 在某些实施方案中,化学计量模型中针对电荷变体分布使用的主要振动频率或组分中的至少一个对应于在波数范围 1118cm^{-1} 到 1500cm^{-1} 中的振动光谱信息,至少一个主要振动频率或组分对应于在波数范围 1120cm^{-1} 到 1470cm^{-1} 中的振动光谱信息,并且至少一个

主要振动频率或组分对应于在波数范围 1187cm^{-1} 到 1839cm^{-1} 中的振动光谱信息。

[0178] 可替代地,在一些实施方案中,化学计量模型中针对电荷变体分布使用的主要振动频率或组分包括:第一组至少三个频率或组分,这些频率或组分对应于在波数范围 1118cm^{-1} 到 1500cm^{-1} 中的振动光谱信息;第二组至少三个频率或组分,这些频率或组分对应于在波数范围 1120cm^{-1} 到 1470cm^{-1} 中的振动光谱信息;和第三组至少三个频率或组分,这些频率或组分对应于在波数范围 1187cm^{-1} 到 1839cm^{-1} 中的振动光谱信息。如前面所讨论的,在这些主要振动频率或组分中,至少一个或多个可能是至少两个组所共有的,或可替代地,对于任何两个或更多个组,可能没有共有的。

[0179] 基于生物反应器的分析物的化学计量模型

[0180] 集成连续生物制造系统通常执行药品和其他反应器衍生产品的连续捕获和捕获后处理(即,纯化、精处理和过滤)。在连续操作系统和更常规的基于批次的生物反应器系统二者中,评估生物反应器条件和调节各种工艺参数的方法对于确保高产量是重要的。此外,对于大规模制造操作,并且在相对敏感的内部生物反应器条件下,期望用于监测工艺参数的方法高度自动化、稳健,并且提供可用于自动调节生物反应器条件的信息。

[0181] 已经显示在生产条件下使用的特定细胞系和化学培养基显著影响生物反应器的容积生产率和比生产率。具体而言,在适当选择细胞系和生物反应器培养基的情况下,活细胞密度(VCD)和容积生产率已经持续相对长的时间段。图18A-18D是显示灌注生物反应器在45天时间内的活细胞密度(图18A)、细胞活力(图18B)、收获效价(图18C)和比生产率(图18D)的图。这些数据表明,在测试条件下,所述反应器可以按 1.5RV/天 的灌注速率以 100×10^6 个活细胞/ mL 操作,在初始的反应器条件达到平衡后,活细胞密度、细胞活力、收获效价和比生产率保持相对稳定。

[0182] 不同的VCD、pH条件和灌注速率可以调节生物反应器内的条件。具体而言,这些操作参数中的任何一个或多个的变化可以改变各种中间体和培养基组分(如乳酸、铵离子、葡萄糖和谷氨酰胺)的水平。由于这些中间体在调节生产速率与影响细胞活力方面的重要性,可以相对频繁地测量和调节许多此类量的值,以确保生物反应器在确保稳定性和相对高生产率的条件范围内操作。图19A-19D是显示对于生产单克隆抗体产品的特定生物反应器在不同细胞密度、pH和灌注条件下的葡萄糖浓度(图19A)、谷氨酰胺浓度(图19B)、乳酸浓度(图19C)和铵离子浓度(图19D)如何变化的图。

[0183] 由于这些和其他细胞培养基组分和工艺中间体对细胞活力及生产率的影响,这些和其他组分的值的测量提供了有关内部生物反应器工艺的重要信息,并且可进一步提供用于对偏离特定目标条件太远的生物反应器条件进行自动调节的数据。图20A-20D是显示葡萄糖浓度(图20A)、收获效价(图20B)、乳酸浓度(图20C)和铵离子浓度(图20D)的每日近线(at-line)测量的图。图20A-20D中的数据获得自每日手动测量,其中对生物反应器培养基进行采样并对图20A-20D中的各个量进行单独分析。

[0184] 遗憾的是,手动测量前述量的各个值可能非常耗时,这限制了可进行测量的速率。进行测量的速率越慢,在可发生生物反应器条件的校正调节之前的延迟越长。这样,如果细胞活力与理想条件相差太显著,产品产量可能受到不利影响。此外,手动收集和处理样品以测量这些生物反应器培养基组分的值的频率导致与所采用的采样方法相关的耗材的相对多的使用。随着时间的推移,耗材的附随成本可能很高。

[0185] 之前讨论的在线红外测量技术和化学计量方法可以直接应用于对基于生物反应器培养基的组分如葡萄糖、谷氨酰胺、乳酸和铵离子的测量。与手动采样及分析方法相比，可获得红外光谱信息的速度以及可获得红外光谱信息的非侵入方式使得此类测量非常有优势。此外，具有验证模型的化学计量学方法允许从单组红外光谱信息中提取多个量的值。这样，葡萄糖、谷氨酰胺、乳酸和铵离子(以及其他培养基组分)的浓度可各自获得自使用合适的化学计量模型分析的单次测量的红外光谱，这显著减少了进行光谱测量的次数，并且进而提高了可响应于测量值来调节生物反应器条件的速率。

[0186] 生物制造系统的集成与调节

[0187] 本文公开的测量系统可与生物制造系统集成，以便为各种生物产品的合成和纯化工艺中的各种组分与步骤提供反馈控制。测量系统通常在制造系统的部件之间在线实施，这样使得能够在无需采样或转移的情况下实时分析流动或静止的溶液。在进行红外光谱测量之前，测量系统还可以更常规地用于从反应器皿、容纳槽或色谱柱中提取的样品。

[0188] 用于制造治疗性蛋白质药物和其他物质的集成与全连续工艺可包括，例如，提供含有基本上无细胞的重组治疗性蛋白质的液体培养基，然后将所述液体培养基进料到第一多柱色谱系统(MCCS1)中。下一步骤涉及使用MCCS1在所述液体培养基中捕获重组治疗性蛋白质，然后将含有重组治疗性蛋白质的MCCS1洗脱物连续进料到第二多柱色谱系统(MCCS2)中，并使用MCCS2对所述蛋白质进行纯化和精处理。来自MCCS2的所得洗脱物被认为是治疗性蛋白质药品。所述工艺是集成的，并且可以从液体培养基连续运行到来自MCCS2的洗脱物(即治疗性蛋白质药品)。

[0189] 生物制造系统通常用于进行上述工艺。例如，此类系统可包括MCCS1(其包括入口)和MCCS2(其包括出口)。在这些系统中，第一与第二MCCS彼此流体连通。这些系统还被配置为使得流体可被传送进入入口、通过第一MCCS和第二MCCS，并通过出口离开所述制造系统。

[0190] 此类系统可以从液体培养基中提供连续的、具有时效性的治疗性药品的生产。例如，在将含有治疗性蛋白质的流体(例如，液体培养基)进料到第一MCCS与从第二MCCS的出口洗脱治疗性蛋白质药品(含有治疗性蛋白质)之间的经过时间可以是例如约4小时与约48小时之间。

[0191] 图10是显示生物制造系统的例子的示意图。系统1包括第一MCCS，即四柱周期逆流色谱系统(PCCS)2，其中四柱PCCS 2的四个柱中的三个(柱3、4和5)进行从含有重组治疗性蛋白质的流体(例如，基本无哺乳动物细胞的液体培养基)中捕获重组治疗性蛋白质的单元操作，并且PCCS 2的柱中的一个(柱6)进行灭活洗脱物中存在的病毒的单元操作，所述洗脱物来自含有重组治疗性蛋白质的PCCS 2的柱3、4和5。柱3、4和5可含有利用蛋白A结合捕获机制的树脂。柱6能够将pH为约3.75的流体保持约1小时。PCCS 1还具有入口7。入口7可以是，例如，接受流体进入PCCS 1的孔口。

[0192] 系统1还包括第二MCCS(其为PCCS 8)，所述第二MCCS包括三个色谱柱9、10和11以及一个色谱膜12。PCCS 8中的柱9、10和11可含有阳离子交换树脂。PCCS 8中的色谱膜12可含有阳离子交换树脂。PCCS 8还具有设置在PCCS 8中的柱9、10和11与PCCS 8中的色谱膜12之间的流体导管13。PCCS 8还具有与流体导管13处于流体连通的在线缓冲液调节储器14，并且配置为使得容纳于在线缓冲调节储器14内的缓冲液被引入存在于流体导管13中的流体中。PCCS 8还包括出口15。出口15可以是例如允许流体从PCCS 8排出的孔口。

[0193] 系统1可进一步包括设置在PCCS 2与PCCS 8之间的流体导管16。系统1还可包括与流体导管16处于流体连通的在线缓冲调节储器17，其被配置为使得容纳于在线缓冲调节储器17内的缓冲液可被引入存在于流体导管16中的流体中。系统1还可包括设置在流体导管16中的过滤器18，以过滤存在于流体导管16中的流体。系统1还可包括断流槽19，所述断流槽被设置在流体导管16中并且被配置为容纳流体导管16中的任何不能容易地进料到PCCS 8中的流体。

[0194] 系统1可进一步包括与入口7处于流体连通的泵系统20。泵系统20可包括用于将流体推入入口7的泵21。系统1还可包括设置在泵21与入口7之间的流体导管22。系统1还可包括设置在流体导管22中的过滤器23，以过滤存在于流体导管22中的流体(例如，液体培养基)。系统1还可包括设置在流体导管22中的断流槽24，其被配置为使得断流槽24与流体导管22处于流体连通并且能够存储存在于流体导管22中的不能进入入口7的任何流体。

[0195] 系统1还可包括生物反应器25和设置在生物反应器25与泵21之间的流体导管26。过滤系统27可以设置在流体导管26中，以对存在于流体导管26中的液体培养基进行过滤(例如，从中除去细胞)。

[0196] 第一MCCS(PCCS 2)包括入口，通过所述入口，流体(例如，基本上无细胞的液体培养基)可被传送进入第一MCCS。所述入口可以是本领域已知的用于此类目的的任何结构。它可包括，例如，允许插入流体导管的螺纹、肋材或密封件，这样使得在将流体导管插到入口中之后，流体将通过入口进入第一MCCS而没有大量流体从入口渗出。

[0197] 第一MCCS包括至少两个色谱柱、至少两个色谱膜，或者至少一个色谱柱和至少一个色谱膜，以及入口。例如，第一MCCS可包括总共四个色谱柱，或者三个色谱柱与一个色谱膜，或本文所述的任何其他的示例性MCCS，或者具有本文所述的MCCS的任何示例性特征(以任意组合)中的一个或多个。

[0198] 存在于第一MCCS中的一个或多个色谱柱和/或一个或多个色谱膜可含有各种树脂中的一种或多种。例如，包含于在第一MCCS中存在的一个或多个色谱柱和/或一个或多个色谱膜中的一个或多个中的树脂可以是利用捕获机制(例如，蛋白A结合捕获机制、蛋白G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、辅因子结合捕获机制、适配体结合捕获机制、和/或标签结合捕获机制)的树脂。包含于第一MCCS的一个或多个色谱柱和/或一个或多个色谱膜中的一个或多个中的树脂可以是阳离子交换树脂、阴离子交换树脂、分子筛树脂或疏水性相互作用树脂、或其任意组合。可用于纯化重组治疗性蛋白质的树脂的其他例子是本领域已知的，并且可包含于在第一MCCS中存在的一个或多个色谱柱和/或一个或多个色谱膜中的一个或多个中。存在于第一MCCS中的一个或多个色谱柱和/或色谱膜可含有相同的和/或不同的树脂(例如，本文所述的或本领域已知的用于重组蛋白质纯化的任何树脂)。

[0199] 存在于第一MCCS中的两个或更多个色谱柱和/或色谱树脂可以进行一种或多种单元操作(例如，捕获重组治疗性蛋白质、纯化重组治疗性蛋白质、精处理重组治疗性蛋白质、灭活病毒、调节含有重组治疗性蛋白质的流体的离子浓度和/或pH、或过滤含有重组治疗性蛋白质的流体)。在非限制性例子中，第一MCCS可进行从流体(例如液体培养基)中捕获重组治疗性蛋白质并且灭活存在于含有重组治疗性蛋白质的流体中的病毒的单元操作。第一MCCS可进行本文描述的或本领域已知的两个或更多个单元操作的任意组合。

[0200] 存在于第一MCCS中的一个或多个色谱柱和/或一个或多个色谱膜可以通过切换机制(例如,柱切换机制)相对于彼此连接或移动。第一MCCS还可包括一个或多个(例如,两个、三个、四个或五个)泵(例如,自动化的,例如自动蠕动泵)。柱切换事件可通过检测经过第一MCCS的流体(例如,进入和/或来自第一MCCS中的一个或多个色谱柱和/或色谱膜中的一个或多个的输入和/或洗脱物)中的重组治疗性蛋白质的水平、特定的液体(例如缓冲液)体积或特定的经过时间来触发。柱切换通常是指允许MCCS中至少两个不同的色谱柱和/或色谱膜(例如,MCCS(例如,第一或第二MCCS)中存在的两个或更多个不同的色谱柱和/或色谱膜)在工艺的至少部分期间基本上同时地通过不同步骤(例如,平衡、加载、洗脱或洗涤)的机制。

[0201] 作为第一MCCS的PCCS 2可包括四个色谱柱,其中前三个柱进行从流体(例如液体培养基)中捕获重组治疗性蛋白质的单元操作,并且PCCS的第四个柱进行在含有重组治疗性蛋白质的流体中灭活病毒的单元操作。作为第一MCCS的PCCS可以使用柱切换机制。PCC系统可以利用能够运行多至例如四个、五个、六个、七个或八个柱、或者更多柱的改良的ÄKTA系统(GE Healthcare, Piscataway, NJ)。

[0202] 柱切换事件可通过检测流体中的特定蛋白质或其他物质的浓度来触发,所述流体从PCCS 2或PCCS 8的一个柱中洗脱出、流动通过在MCCS中的过滤器、包含在MCCS的断流槽中、或流动通过MCCS中的导管(例如,在MCCS1与MCCS 2之间)。本文公开的测量系统可用于测量此类蛋白质的浓度,并将所述浓度信息传递至系统1中的控制器,所述控制器在系统1中启动如柱切换、过滤和流体传输等事件。

[0203] 第一MCCS可配备:一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)被配置为获得工艺流体的红外光谱信息的测量系统(例如,系统100),一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)阀,一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、或十个)pH计,和/或一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)电导率计。第一MCCS还可配备执行操作系统的控制器,所述操作系统利用软件(例如,基于Unicorn的软件(GE Healthcare, 皮斯卡塔韦, 新泽西州)或实施类似功能的其他软件)来确定何时应发生柱切换(例如,基于来自红外光谱测量的浓度信息、液体体积或经过时间)并影响(触发)柱切换事件。测量系统可任选地放置在第一MCCS中的一个或多个色谱柱和/或一个或多个色谱膜中的一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)的入口处,和/或在第一MCCS中的一个或多个色谱柱和/或一个或多个色谱膜中的一个或多个的出口处。

[0204] 第一MCCS可进一步包括一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个、二十个、二十一个、二十二个、二十三个或二十四个)在线缓冲液调节储器和/或缓冲液储器。在其他例子中,第一MCCS可包括一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个或六个)断流槽,所述一个或多个断流槽可容纳不能容易地进入第一MCCS中的一个或多个色谱柱和/或色谱膜的流体。本文所述的系统可在第一和/或第二MCCS中含有一个或多个断流槽(例如,本文所述的断流槽)。本文所述的系统的其他例子不包括在第一MCCS或第二MCCS中的断流槽,或者在整个系统中不包括断流槽。所述系统的其他例子包括在整个系统中最多一个、两个、三个、四个或五个断流槽。

[0205] 在一些实施方案中,第一MCCS可以包括病毒灭活设备。例如,参考图10,在某些实施方案中,第一MCCS包括病毒灭活设备6(即,代替上述柱6)。病毒灭活设备6被配置为灭活用于生物制造工艺的病毒和病毒载体。在一些实施方案中,例如,病毒灭活设备6包括混合器皿。可替代地,在某些实施方案中,例如,设备6包括活塞流灭活系统。这些病毒灭活设备的各个例子有助于从第一MCCS中的工艺流体中消除活性病毒和病毒载体。

[0206] 第二MCCS包括至少两个色谱柱,至少两个色谱膜,或者至少一个色谱柱与至少一个色谱膜,以及出口。例如,第二MCCS可包括总共四个色谱柱,三个色谱柱与一个色谱膜,或本文所述的任何其他的示例性MCCS,或者可以具有本文所述的MCCS的任何示例性特征(以任意组合)中的一个或多个。存在于第二MCCS中的一个或多个色谱柱和/或一个或多个色谱膜可具有以下的一种或多种:本文所述的任何形状、尺寸、体积(床体积)和/或单元操作。包含于在第二MCCS中存在的一个或多个色谱柱和/或一个或多个色谱膜中的一个或多个中的树脂可以是利用捕获机制(例如,蛋白A结合捕获机制、蛋白质G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、辅因子结合捕获机制、标签结合捕获机制、和/或适配体结合捕获机制)的树脂。有用的树脂包括,例如,阳离子交换树脂、阴离子交换树脂、分子筛树脂和疏水相互作用树脂。存在于第二MCCS中的一个或多个色谱柱和/或色谱膜可含有相同的和/或不同的树脂(例如,本文所述的或本领域已知的用于重组蛋白质纯化的任何树脂)。

[0207] 存在于第二MCCS中的一个或多个色谱柱和/或一个或多个色谱膜可进行一个或多个单元操作(例如,本文所述的任何单元操作或本文所述的单元操作的任何组合)。在非限制性例子中,第二MCCS可进行从流体中纯化重组治疗性蛋白质并且精处理存在于含有重组治疗性蛋白质的流体中的重组治疗性蛋白质的单元操作。在其他非限制性例子中,第二MCCS可以进行纯化存在于流体中的重组治疗性蛋白质、精处理存在于流体中的重组治疗性蛋白质、以及过滤含有重组治疗性蛋白质的流体的单元操作。在另一个例子中,第二MCCS可以进行纯化存在于流体中的重组治疗性蛋白质、精处理存在于流体中的重组治疗性蛋白质、过滤含有重组治疗性蛋白质的流体、以及调节含有重组治疗性蛋白质的流体的离子浓度和/或pH的单元操作。第二MCCS可进行本文描述的或本领域已知的两个或更多个单元操作的任何组合。

[0208] 第二MCCS还可包括一个或多个(例如,两个、三个、四个或五个)泵(例如,自动化的,例如自动蠕动泵)。

[0209] 存在于第二MCCS中的一个或多个色谱柱和/或一个或多个色谱膜可以通过切换机制(例如,柱切换机制)相对于彼此连接或移动。柱切换事件可以通过检测重组治疗性蛋白质或其他物质的水平(经红外光谱测量并使用如上所讨论的化学计量模型对其进行分析以确定经过第二MCCS的流体(例如,进入和/或来自第二MCCS中的一个或多个色谱柱和/或色谱膜中的一个或多个的输入和/或洗脱物)中的重组治疗性蛋白质的水平)、特定的液体(例如缓冲液)体积或特定的经过时间来触发。

[0210] 形成第二MCCS的PCCS 8可含有三个柱(进行从流体中纯化重组治疗性蛋白质的单元操作)和一个色谱膜(进行精处理在流体中存在的重组治疗性蛋白质的单元操作)。例如,进行从流体中纯化重组治疗性蛋白质的单元操作的三个柱可含有例如阳离子交换树脂,并且进行精处理的单元操作的色谱膜可含有阳离子交换树脂。作为第二MCCS的PCCS可以使用

柱切换机制。例如,PCCS可利用能够运行多至例如四个、五个、六个、七个或八个柱、或者更多柱的改良的AKTA系统(GE Healthcare,皮斯卡塔韦,新泽西州)

[0211] 与第一MCCS类似,第二MCCS也可配备:一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)红外光谱测量系统,一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、九个或十个)阀,一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)pH计,和/或一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)电导率计。一个或多个测量系统将测量的流体中的蛋白质或其他物质的浓度信息传输到控制器,所述控制器使用浓度信息来确定是否触发柱切换事件。第二MCCS可配备由接收浓度信息的控制器执行的操作系统,所述操作系统利用软件(例如,基于Unicorn的软件,GE Healthcare,皮斯卡塔韦,新泽西州)来确定何时应发生柱切换事件(例如,基于红外光谱测量、液体体积或经过时间)并启动柱切换事件。在第二MCCS包括一个或多个红外光谱测量系统的例子中,测量系统可任选地放置在第二MCCS中的一个或多个色谱柱和/或一个或多个色谱膜中的一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)的入口处,和/或在第二MCCS中的一个或多个色谱柱和/或一个或多个色谱膜中的一个或多个的出口处。

[0212] 第二MCCS可进一步包括一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个、二十个、二十一个、二十二个、二十三个或二十四)在线缓冲液调节储器和/或缓冲液储器。在其他例子中,第二MCCS可包括一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个或六个)断流槽(例如,本文所述的任何断流槽),所述一个或多个断流槽可容纳不能容易地进入第二MCCS中的一个或多个色谱柱和/或色谱膜的流体。

[0213] 第二MCCS包括出口,治疗性蛋白质药品可以通过所述出口离开系统。出口可包括,例如,允许插入流体导管的螺纹、肋材或密封件,或设计用于容纳或储存治疗性蛋白质药品的小瓶。出口可含有可用于将无菌小瓶或其他此类储存容器密封在出口上的表面,以允许重组蛋白质药品直接流入无菌小瓶或储存容器中。

[0214] 如本文所公开的一个或多个红外光谱测量系统也可以被定位为测量流出出口的蛋白质药品(或另一种物质)的浓度。此信息可被传输至MCCS控制器,所述控制器可以基于所述信息确定所述物质的纯度。

[0215] 本文描述的系统还可包括设置在第一MCCS与第二MCCS之间的流体导管。可沿流体导管设置一个或多个红外光谱测量系统,以确定有关容纳于(例如流动通过)导管内的流体的信息(例如浓度信息)。此信息可被传输至MCCS控制器,所述控制器如上所讨论可以基于所述信息确定是否启动柱切换事件。

[0216] 本文所述的任何流体导管可以是例如由例如聚乙烯、聚碳酸酯或塑料制成的管。设置在第一MCCS与第二MCCS之间的流体导管可以进一步包括以下任何组合中的一个或多个:一个或多个在线缓冲液调节储器,其与流体导管处于流体连通并且被定位为使得储存于一个或多个在线缓冲液调节储器中的缓冲液被添加到存在于流体导管中的流体中;断流槽(例如,本文所述的任何一个或多个断流槽),其与流体导管处于流体连通并且被定位为使得其可以容纳存在于流体导管中的不能容易地进料到第二MCCS的任何多余流体;以及一个或多个过滤器,其被设置于流体导管中使得它们能够对存在于流体导管中的流体进行过

滤(例如,除去细菌)。任何在线缓冲液调节储器可含有例如体积在约0.5L与50L之间的缓冲液(例如,在为或低于50°C、37°C、25°C、15°C或10°C的温度下)。

[0217] 本文所述的系统可任选地包括设置在第二MCCS中的最终色谱柱或色谱膜与出口之间的流体导管。本文所述的系统可以进一步包括一个或多个过滤器,所述一个或多个过滤器与设置在第二MCCS中的最终色谱柱或色谱膜与出口之间的流体导管处于流体连接,使得过滤器可以从存在于流体导管中的流体除去例如沉淀材料、微粒物质或者细菌,所述流体导管设置在第二MCCS中的最终色谱柱或色谱膜与出口之间。

[0218] 本文提供的系统的一些例子还包括与第一MCCS的入口处于流体连接的生物反应器。本文所述或本领域中已知的任何示例性生物反应器都可以用于本发明的系统中。

[0219] 本文提供的系统的一些例子还包括泵系统。泵系统可以包括以下中的一个或多个:一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)泵(例如,本文所述或本领域中已知的任何泵),一个或多个(例如,两个、三个、四个或五个)过滤器(例如,本文所述或本领域中已知的任何过滤器),一个或多个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个)UV检测器,以及一个或多个(例如,两个、三个、四个或五个)断流罐(例如,本文所述的任何断流罐)。本文提供的系统的一些例子进一步包括设置在泵与第一MCCS的入口之间的流体导管(例如,本文所述的或本领域已知的任何示例性流体导管)。在一些例子中,此特定流体导管可以包括一个或多个(例如,两个、三个或四个)泵(例如,本文所述或本领域中已知的任何泵)和/或一个或多个(例如,两个、三个或四个)断流罐(例如,本文所述的任何示例性断流罐),其中这些泵和/或断流罐与存在于流体导管中的流体处于流体连接。

[0220] 本文所述的系统的一些例子进一步包括连接到在泵与入口之间的流体导管的另一个流体导管,其中另一个流体导管的一端流体地连接到生物反应器,并且另一端流体地连接到在泵与入口之间的流体导管。此另一个流体导管可以包括过滤器,所述过滤器能够从取自生物反应器(例如,ATF细胞保留系统)的液体培养基中除去细胞。

[0221] 前述生物制造系统允许连续生产治疗性蛋白质药品。例如,本文提供的系统允许重组治疗性蛋白质(自起始材料,例如起始液体培养基)的产率百分比大于约70%、大于约80%、大于约82%、大于约84%、大于约86%、大于约88%、大于约90%、大于约92%、大于约94%、大于约96%、或大于约98%。本文所述的系统还可导致重组治疗性蛋白质(自起始材料,例如起始液体培养基)的产率百分比为约80%至约90%之间、约82%至约90%之间、约84%至约90%之间、约84%至约88%之间、约84%至约94%之间、约82%至约92%之间、或约85%至约95%之间。

[0222] 本文描述的系统还可导致如下治疗性蛋白质药品的产生,其含有的重组治疗性蛋白质的浓度大于约1.0mg/mL,例如,大于约15mg/mL、大于约20mg/mL、大于约25mg/mL、大于约30mg/mL、大于约35mg/mL、大于约40mg/mL、大于约45mg/mL、大于约50mg/mL、大于约55mg/mL、大于约60mg/mL、大于约65mg/mL、大于约70mg/mL、大于约75mg/mL、大于约80mg/mL、大于约85mg/mL、大于约90mg/mL、大于约100mg/mL、大于约125mg/mL、或大于约150mg/mL。

[0223] 如上所讨论,在一些实施方案中,第一和/或第二MCCS可以是周期性逆流色谱系统(PCCS)。PCCS可以例如包括两个或更多个色谱柱(例如,三个柱或四个柱),将其切换以允许从两个或更多个色谱柱连续洗脱重组治疗性蛋白质。PCCS可包括两个或更多个色谱柱,两

个或更多个色谱膜，或者至少一个色谱柱与至少一个色谱膜。柱操作通常由加载、洗涤、洗脱以及再生步骤组成。在PCCS中，将多个柱用于以循环方式离散地且连续地运行相同的步骤。由于柱是串联操作的，因此经过一个柱的流和来自所述柱的洗液由另一个柱捕获。PCCS的此独特特征允许树脂的装载接近其静态结合能力而不是动态结合能力，这在分批模式色谱过程中是典型的。

[0224] 用于含有三个柱的PCCS中的三柱切换技术的例子显示于图11。一个循环被定义为三个完整的柱操作，其产生来自柱切换技术中使用的三个柱中的各个的洗脱池。一旦完成循环中的所有步骤，循环重新开始。由于连续循环与洗脱，进入PCCS的流体被连续地处理，而重组治疗性蛋白质从各个柱的洗脱是离散的和周期性的。

[0225] 为了从PCCS循环中的一个步骤前进到另一个步骤，正如图11中所显示的示例性循环，采用柱切换策略。柱切换方法在图11所显示的示例性PCCS系统的三柱中采用每柱两个自动切换操作，其中第一个与初始产品穿透有关，而第二个与柱饱和相符。确定何时应发生柱切换操作是基于有关在来自PCCS的各个色谱柱的洗脱物中重组治疗性蛋白质的浓度的信息。

[0226] 如以上所讨论的，本文公开的红外光谱测量系统可用于确定来自PCCS柱的洗脱物中重组治疗性蛋白质的浓度。浓度信息，其作为生物制造系统的反馈控制而发挥作用，被传输至MCCS控制器，所述控制器在确定切换被授权之后启动柱切换。

[0227] 例如，在柱加载期间，所述PCCS控制系统可以使用上面讨论的红外光谱测量系统确定从柱洗脱的治疗性蛋白质物质的基线浓度（其通常为零浓度）。在活性洗脱期间，当蛋白质物质穿透时，测量的蛋白质浓度增加（例如，高于基线浓度）。系统继续监测渐增的蛋白质浓度，并且当浓度达到预定的阈值时，来自柱1的流被引导到柱2上而不是到废弃物。名义上，这发生在时间 t_1 。

[0228] 随着继续向柱1内进料，柱1最终几乎被蛋白质产品饱和。此时，测量的洗脱物中蛋白质浓度已达到另一个预定值，其发生在时间 t_2 。此时，MCCS控制器将入口进料切换到柱2。

[0229] 无论进料产品浓度和容量如何，上述柱切换策略都允许对柱进行均匀加载。可以基于检测到的在来自各个柱的洗脱物中的重组蛋白水平实施柱的类似切换。柱切换还可以基于通过第一或第二MCCS中的一个或多个色谱柱和/或色谱膜的流体（例如，缓冲液）的经过时间或量。

[0230] 本文公开的测量系统除了提供反馈信息以控制柱切换事件之外，还可以提供用于调节各种其他生物制造步骤和操作参数的反馈信息。此类调节的一个例子是在生物制造工艺的各个阶段控制性调节缓冲液浓度。

[0231] 通常，在本文所述的任何工艺中使用两个或更多个MCCS期间，可采用一个或多个（例如，三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个、二十个、二十一个、二十二个、二十三个或二十四）不同类型的缓冲液。如本领域已知的，在本文所述的工艺中使用的用于两个或更多个MCCS中的一种或多种类型的缓冲液将取决于：存在于所述两个或更多个MCCS（例如，第一MCCS和第二MCCS）的一个或多个色谱柱和/或一个或多个色谱膜中的树脂，重组治疗性蛋白质，和单元操作（例如，本文所述的任何示例性单元操作）-其通过所述两个或更多个MCCS的特定的一个或多个色谱柱和/或一个或多个色谱膜进行。在本文所述的任何工艺中使用两个或

更多个MCCS期间,所采用的缓冲液的体积和类型也可由本领域技术人员确定(例如,下面将更详细地讨论)。例如,可选择在本文所述的任何工艺中使用两个或更多个MCCS期间所采用的缓冲液的体积和一个或多个类型,以优化重组蛋白质药物产品中的以下中的一个或多个:重组治疗性蛋白质的总产量、重组治疗性蛋白质的活性、重组治疗性蛋白质的纯度水平、以及从含有重组治疗性蛋白质的流体中除去生物污染物(例如,不存在活性病毒、分枝杆菌、酵母菌、细菌或哺乳动物细胞)。

[0232] 调节含有重组治疗性蛋白质的流体的离子浓度和/或pH的单元操作可以使用MCCS(例如,第一和/或第二MCCS)来进行,所述MCCS包括并利用缓冲液调节储器(例如,在线缓冲液调节储器)以将新的或另外的缓冲溶液添加到含有重组治疗性蛋白质的流体中(例如在单个MCCS中的柱之间,或在倒数第二个MCCS(例如第一MCCS)中的最后一个柱之后并且在将含有重组治疗性蛋白质的流体进料到下一个MCCS(例如第二MCCS)的第一个柱之前。在线缓冲液调节储器可以是任何尺寸(例如,大于100mL)并且可以含有任何缓冲溶液(例如具有以下中的一个或多个的缓冲溶液:与含有重组治疗性蛋白质的流体相比升高或降低的pH;与含有重组治疗性蛋白质的流体相比增加或减少的离子(例如盐)浓度;和/或增加或减少的试剂浓度,所述试剂与重组治疗性蛋白质竞争地结合于存在于MCCS(例如第一或第二MCCS)的至少一个色谱柱或至少一个色谱膜中的树脂)。

[0233] 在一些实施方案中,MCCS控制器确定添加到工艺流体中的缓冲溶液的量是基于有关从如前面所讨论的进行红外光谱测量得到的工艺流体组分的浓度信息。例如,用于此类测量的溶质可以是缓冲溶液组分或工艺流体组分,其浓度与流体缓冲液组成、工艺流体的pH、和/或工艺流体的离子强度有关。将组分的浓度信息的测量作为反馈信息提供给MCCS控制器,其使用反馈信息来确定将一种或多种缓冲溶液在何时和以多少量排放到工艺流体中。红外光谱测量系统通常可以定位在生物制造系统中的任何位置,用于测量工艺流体以向MCCS控制器提供与缓冲液相关的反馈信息。

[0234] 在某些实施方案中,工艺流体的抗体浓度信息可用于控制将细胞培养物引入生物反应器的速率。具体而言,通过确定从生物反应器收获的工艺流体中的抗体浓度值,MCCS控制器可调节细胞培养物流出到生物反应器中的速率。以这种方式的调节允许控制源自生物反应器的细胞密度和比生产率的容积生产率。对于固定的灌注速率,此类调节允许控制工艺流体中的抗体浓度,使得MCCS 1每单位时间将接收近似恒定量的产品。换言之,调节这种性质可用于确保生物反应器内的产品生成速率在特定时间段内保持近似恒定。

[0235] 在一些实施方案中,与工艺流体相关的某些质量属性的确定可由MCCS控制器使用以确定生物制造系统是否在可接受的参数范围内操作,或者在操作期间,系统是否在一个或多个可接受的参数范围之外。

[0236] 对于一个或多个质量属性中的各个,可通过校准程序建立可接受的值的范围。这些范围有效地为系统建立了操作条件,在所述操作条件下生物产品以可接受的速率和纯度水平产生,而副产品及其他不希望的物质的产量处于可接受的低水平。当系统在一个或多个范围之外操作时,产品产量和/或纯度可能会降低,不希望的物质产生的速率/量可能会增加,试剂消耗速率可能会增加,和/或其他不希望的效果或情况可能发生。

[0237] 在系统内的一个或多个位置处为工艺流体确定的质量属性可用于确保系统在这些操作参数的可接受范围内操作。如果一个或多个质量属性的确定值落在确立的可接受范

围之外，则MCCS控制器识别出存在潜在的故障状况。

[0238] 为了解决故障状况，MCCS控制器（或连接至MCCS控制器的另一个系统控制器）可调节生物制造系统的任何操作参数以修改其操作，从而也调节质量属性值，使得它们落在可接受的范围内。这种性质的纠正措施确保了基于由确定的质量属性值提供的反馈，系统可主动地保持在确立的一组或一系列操作条件内。

[0239] 在某些实施方案中，如果MCCS控制器（或连接至MCCS控制器的另一个系统控制器）确定系统离其可接受的操作条件范围太远以致于将系统返回到可接受的条件范围会是困难的或者甚至不可能的，或者会导致其他不希望的后果，则控制器可将控制信号传输至生物反应器以中止生产并将其内容物排放到废弃物中。在此类案例中，生产工艺偏离系统的可接受的操作条件范围太远，有效的纠正措施是不切实际或不可能的。通过简单地排除生物反应器的内容物，系统可以通过重新开始生产工艺节省相当多的时间，而不是试图调节可能已经无可挽回地偏离可接受条件范围的正在进行的生产工艺。

[0240] 此外，可以基于一种或多种生物反应器培养基组分（例如葡萄糖浓度、谷氨酰胺浓度、乳酸浓度和铵离子浓度）的测量值向MCCS控制器（或另一种系统控制器）提供反馈，然后所述控制器可用于调节反应器条件以确保细胞活力、产品产量以及其他性能指标被维持在目标范围内。控制器可以基于生物反应器培养基组分的值，以类似于基于产品质量属性和其他测量的量值实行的调节的方式调节任何一个或多个工艺参数。

[0241] 实施例

[0242] 提供以下实施例以进一步说明前述公开文本的各个方面，但除非另有明确说明，否则不旨在以另外的方式限制权利要求的任何特征，或限制实施方案的任何方面。

[0243] 为评价本文公开的方法和系统，使用ATR几何结构和偏最小二乘多元数据分析的FTIR光谱被用于开发化学计量模型，以使用单组（多属性产品质量（MAP-Q）振动光谱信息快速且准确地确定多种工艺物理和化学属性。使用离线参考测定（色谱和ELISA）分析来自抗体药物候选物X在多个收获日的蛋白A纯化样品的浓度、聚集体、电荷变体分布以及宿主细胞蛋白（HCP）含量，并且相同的样品经受FTIR ATR测量。使用来自离线参考测定和FTIR ATR红外光谱信息响应的数据，以通过使用PLS多元数据分析来构建化学计量模型，并且对模型进行交叉验证以评估其准确性。

[0244] 蛋白A纯化的、内部产生的抗体药物候选物X的收获样品被用于此研究。使用的单克隆抗体属于IgG4亚类，并表达于中国仓鼠卵巢细胞（CHO）哺乳动物表达系统中。从交替切向流灌注生物反应器在不同培养日获得收获的样品（26个样品）。使用AKTA Explorer系统（可购自GE Healthcare Life Sciences公司，匹兹堡市，宾夕法尼亚州），用填充了MabSelect SuRe LX树脂的0.66cm×20cm I.D.（6.8mL）蛋白A柱来纯化收获物。

[0245] 使用配备有IN350T®金刚石ATR（衰减全反射）光纤探头和MCT（碲镉汞）传感器的Bruker MATRIX-MF®FTIR（Bruker Optics公司，比勒利卡市，马萨诸塞州）光谱仪进行样品的近线测量。将约50mL的各样品置于ATR金刚石晶体上，并使用Bruker OPUS采集软件（可购自Bruker Optics公司，比勒利卡市，马萨诸塞州）测量波数范围在400cm⁻¹到4000cm⁻¹中的光谱（扫描速度10kHz，分辨率2cm⁻¹，并且每次运行32次扫描）。首先使用构建在探针上的空白ATR池记录参考光谱。获得所有样品的单束光谱，并将其与空气的背景光谱分开，从而以吸光度单位显示光谱。

[0246] 对红外振动信息进行预处理，并使用MATLAB计算软件(可购自MathWorks公司，纳蒂克，马萨诸塞州)和unscrambler camo软件(CAMO Software股份有限公司,33300埃及巷，马格诺利亚市，德克萨斯州)构建各个感兴趣的属性的化学计量偏最小二乘(PLS)模型。在预处理期间，首先使用 $800\text{-}1800\text{cm}^{-1}$ 之间的平均吸光度值抵消FTIR光谱，然后进行基线校正和面积归一化。评价了若干预处理方法，如线性偏移减法、直线减法、矢量归一化、最小-最大归一化、多元散射校正、一阶导数和二阶导数，以改善交叉验证的均方根误差(RMSECV)和PLS模型的测定系数(R^2)。在构建PLS模型时，将各个属性的离线色谱/基于ELISA的参考测量与预处理的FTIR ATR光谱数据相关联。

[0247] 为了确保校准模型的验证，将交叉验证方法应用于20个蛋白A纯化样品，其中使用k折交叉验证来验证样品的各个FTIR ATR光谱，在交叉验证中数据集被分成k个子集，并且对k折模型进行了训练和测试。每次，将k个子集中的一个用作测试集，并且合并其他k-1个子集以形成训练集。计算所有k次试验的平均误差。优化了对应于各个属性值的波数(或频率)范围，以实现最佳的多元统计。

[0248] 还使用了离线色谱和ELISA测定来测试样品的抗体浓度、聚集体、电荷变体分布以及宿主细胞蛋白(HCP)含量以产生参考值。在Agilent 1100HPLC系统(可购自Agilent Technologies公司，圣克拉拉市，加利福尼亚州)上通过蛋白A色谱使用 $0.21\times 3\text{cm I.D.}$ (0.1mL)POROS蛋白A ID管柱(可购自Applied Biosystems公司，福斯特市，加利福尼亚州)测量了抗体浓度，然后在 280nm 下对洗脱物进行UV测量。在Agilent 1100HPLC系统上通过尺寸排阻色谱(SEC)使用配备有 $0.60\times 4\text{cm I.D. TSK胶G3000SWXL防护柱}$ 的 $0.78\times 30\text{cm I.D. TSK胶G3000SWXL分析型SEC柱}$ (可购自Tosoh Bioscience公司，普鲁士王市，宾夕法尼亚州)分析了样品中抗体的聚集形式的百分比。将 150mM 氯化钠中的 40mM 磷酸钠洗脱缓冲液以等度模式使用，然后使用光电二极管阵列检测器检测在 280nm 下的UV吸光度。使用来自Cygnus technologies公司(可购于伦瑟姆市，马萨诸塞州)的中国仓鼠卵巢细胞HCP ELISA试剂盒根据制造商的手册测量样品的HCP含量。以三种稀释度制备样品，然后对各样品进行多次测量。

[0249] 使用iCE3TM系统(可购自ProteinSimple公司，圣何塞市，加利福尼亚州)通过毛细管等电聚焦(cIEF)分析样品中抗体的电荷变体分布。在甲基纤维素载体两性电解质中制备了各样品，并允许在电解条件下基于它们的pI分离电荷变体(酸性与碱性物质)。使用iCE3TM系统的内置全柱UV检测器获取电荷变体的相对分布。

[0250] 在蛋白质分子的红外光谱中，分子的化学结构起主要的作用，其通过振动键的强度和振动原子的质量确定观察到的振动频率。但是，由于通常存在于光谱中的许多重叠带，纯粹基于红外光谱可能难以明确地确定蛋白质的化学结构。

[0251] 尽管如此，往往可以基于观察到的光谱带的变化来检测分子的化学结构的变化。一个这样的例子是检测蛋白质侧链的质子化态的变化，其对于蛋白质功能往往是必要的。许多蛋白质侧链的质子化态反映在蛋白质的红外光谱中，并且经常可以从红外光谱信息中可靠地推断出。

[0252] 蛋白A纯化抗体样品的FTIR ATR光谱显示于图12，其中酰胺I($1600\text{-}1690\text{cm}^{-1}$)和酰胺II($1480\text{-}1575\text{cm}^{-1}$)的特征带清晰可辨。酰胺I带由于肽骨架的C=O伸缩振动对蛋白质的 α -螺旋、 β -折叠、转角和无序构象及其氢键结合环境敏感。酰胺II起源于N-H弯曲振动和C-N

伸缩振动，并且它是构象敏感的。

[0253] 在一些情况下，酰胺II带对应于NH面内弯曲模式和CN伸缩模式的异相组合，来自C0面内弯曲模式和CC与NC伸缩模式的贡献较小。在蛋白质中，酰胺II带通常几乎不受侧链振动的影响，但蛋白质二级结构与频率之间的相关性不如酰胺I带的简单，这有助于使蛋白质的副产品相关并为所述蛋白质提供有价值的结构信息和二级结构预测。

[0254] 1300-1400cm⁻¹之间的酰胺III带是由于面内N-H弯曲以及C-N伸缩。酰胺IV带是由因O=C-N变形所致的若干个坐标位移的混合物产生的非常复杂的带，这些坐标位移主要发生在625-725cm⁻¹。二级结构中氢键结合的强度和在肽的不同转换偶极子之间的偶联影响此区域中的吸收频率，并且可用于从实验光谱数据中量化蛋白质。

[0255] 在生物样品中，各个构象实体都贡献于分子的FTIR ATR光谱。酰胺I带轮廓线是由若干个重叠的组分带组成的复杂复合物，这些组分带代表不同的结构元件，例如α螺旋、β折叠、转角、和无序或不规则结构。

[0256] 为了提取在那些FTIR带中编码的组成结构信息，使用频率范围从1100到1595cm⁻¹和1600到1700cm⁻¹中的FTIR光谱信息，从而用二阶导数均值中心化的FTIR ATR光谱计算PLS标度，其中排除由缓冲液组分和水产生的吸光度。使用具有抗体药物候选物X的20个蛋白A纯化样品的k折交叉验证方法构建PLS模型。还分析了模型的过度训练，并评价了模型的稳健性。

[0257] 图13是显示从针对抗体浓度的PLS模型计算的预测抗体浓度值以及相应的所测量抗体浓度值的图。PLS模型展现出FTIR ATR预测值与基于离线色谱的参考值之间的优异的相关性。相关系数R²为0.99，且交叉验证的均方根误差(RMSECV)为0.55。通过使用开发的校准模型预测6个未知样品的抗体浓度来评价模型的准确性。未知样品U-1至U-6的结果显示于图17的表中。

[0258] 蛋白质错误折叠的聚集现象可导致FTIR ATR光谱中关键酰胺峰的漂移。结果是，使用带窄化傅立叶自解卷积技术来估计离散子组分吸收带的FTIR范围和位置。傅立叶自解卷积减小带宽，允许使用高斯函数分离重叠的组分带。

[0259] 由于不同的疏水性环境，聚集蛋白的振动频率降至1620-1625cm⁻¹附近，并且往往显示酰胺II的频率漂移(约1540cm⁻¹)。因此，选择1393-1554cm⁻¹和1600-1635cm⁻¹的FTIR区域来开发校准模型。此外，由于蛋白质的C-O-H振动，选择1180-844cm⁻¹的FTIR区域以提高预测准确性。图14A显示蛋白A纯化样品的傅立叶自解卷积FTIR光谱的例子。

[0260] 图14B是显示针对聚集(实线)和测量的聚集值(点)而开发的PLS校准模型的图。参考SEC值，PLS校准模型在FTIR预测的聚集值(%)之间展现出优异的相关性。RMSECV、R²和相对百分比差异(RDP)的值分别为0.04、0.97和5.8。

[0261] 为如HCP的低浓度物质构建稳健的化学计量模型的挑战之一是培养基中高分子电解质的影响。已知在约1,390cm⁻¹和1005-110cm⁻¹处出现的峰可归于高分子电解质。图15A显示了一组用于构建HCP的PLS模型的均值中心化的、基线校正的且面积平均化的二阶导数FTIR ATR光谱。

[0262] 为了开发用于HCP定量测定的PLS模型，使用范围在1500-1600cm⁻¹、1600-1680cm⁻¹、1489-1414cm⁻¹和1174-1286cm⁻¹的中红外(mid-IR)区域频率。所有光谱均为均值中心化的、基线校正的且面积平均化的，如图15A所示。

[0263] 图15B是显示用于HCP定量测定的模型(实线)与测量的HCP值(点)的图。观察到相当好的相关性,其中 $R^2=0.89$,RMSECV=71.1,且RPD=3.05。

[0264] 为评价用于确定电荷变体分布的PLS模型,使用20个样品对样品的预处理FTIR ATR光谱针对主峰前(酸性)物质、主峰物质和主峰后(碱性)物质进行k折交叉验证,以分别构建三个独立的模型。评价了模型的过度训练和稳健性。电荷变体的分析在很大程度上取决于C-末端赖氨酸修饰,其导致光谱图案主要在1000到1850cm⁻¹的指纹区域中漂移。因此,使用经过多次散射校正与从1118cm⁻¹到1500cm⁻¹的二阶导数分析的均值中心化光谱来构建主峰的PLS模型,显示于图16B中(实线)。主峰模型的PLS统计数据包括0.99的 R^2 ,0.00,1的RMSECV,以及12.4的RPD。

[0265] 对于主峰前物质分析,使用高达10的PLS等级,从1120cm⁻¹到1470cm⁻¹的FTIR区域产生最佳PLS校准模型。所述模型显示于图16A。RMSECV、 R^2 和RPD的值分别为0.00125、0.9937和12.6。

[0266] 对于主峰后物质分析,使用从1187cm⁻¹到1839cm⁻¹的FTIR区域构建PLS模型,显示于图16C的图上。从参考cIEF方法中实现了与测量值的优良的相关性。RMSECV、 R^2 和RPD的值为0.00118、99.59和15.7。还通过预测6个未知样品U-1至U-6的电荷变体分布来评价模型的准确性,其结果显示于图17中。

[0267] 为了评价使用在线红外光谱测量和化学计量模型准确确定生物反应器培养基组分与条件的值的有效性,本文公开的方法用于测量葡萄糖浓度、谷氨酰胺浓度、IgG浓度、乳酸浓度、氨浓度以及摩尔渗透压浓度。具体地,在反应器培养基上进行在线ATR红外光谱测量,并且使用针对这些量中的每一个的经验证的化学计量模型来预测来自红外光谱测量的各量的值。为了确定红外衍生值的准确性,还对反应器培养基进行手动采样,并通过单独分析确定各量的值。

[0268] 图21A-21F是显示生物反应器培养基的葡萄糖浓度(图21A)、谷氨酰胺浓度(图21B)、IgG浓度(图21C)、乳酸浓度(图21D)、铵离子浓度(图21E)、以及摩尔渗透压浓度(图21F)的“真实”值(菱形标记)与预测(或红外衍生的)值(实线)的图。对于各个测量的量,真实值与预测值之间的良好一致性得以实现。

[0269] 图22A-22D是显示葡萄糖浓度(图22A)、收获效价(图22B)、乳酸浓度(图22C)和铵离子浓度(图22D)的真实(菱形标记)值与预测(点标记)值的图。对于各真实值,从多个红外光谱测量中确定了多个预测值,并且图22A-22D中的点标记的分布表明基于红外光谱信息预测的值的可变性。尽管在各个图中出现相对少量的异常值,但是大多数单独预测的值与各种量的真实值非常一致,并且各组红外确定的值的分布与对应的真实值一致。

[0270] 图23A-23C是显示在生物反应器培养基的后期阶段(在第42和43天)葡萄糖浓度(图23A)、乳酸浓度(图23B)和铵离子浓度(图23C)的真实(大点)值与预测(即,红外测定的,小点)值的图。从图中可以明显看出,这些量的红外测定值与真实值持续保持一致,证明依赖于红外光谱信息来确定多种不同培养基组分相关量值的基于化学计量学的方法仍然是高度准确的,即使细胞培养和培养基在相对长的时间后继续产生产品也是如此。

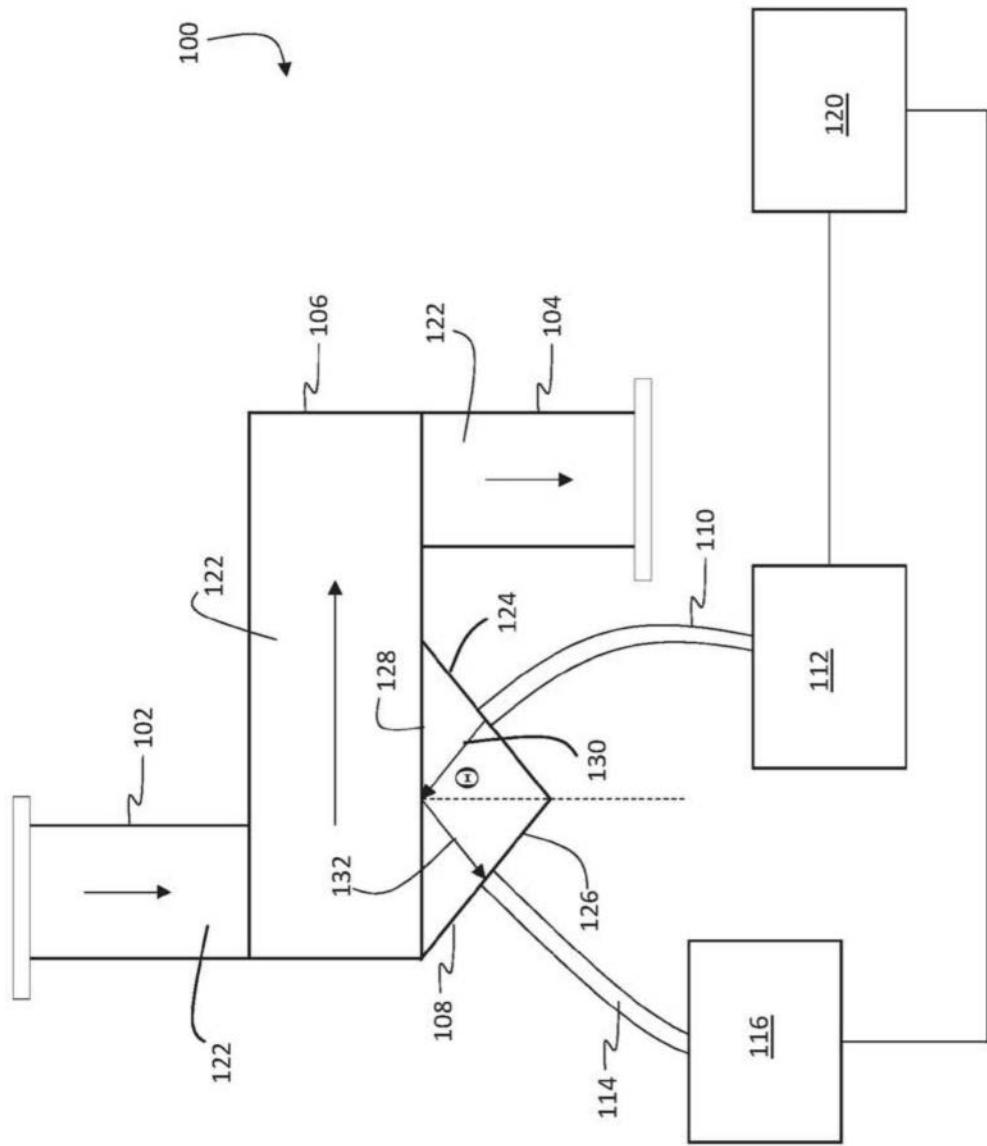


图1

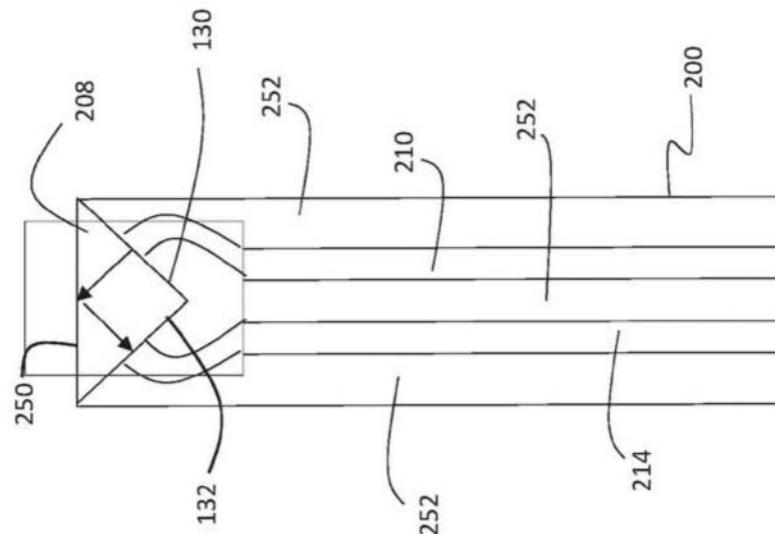


图2

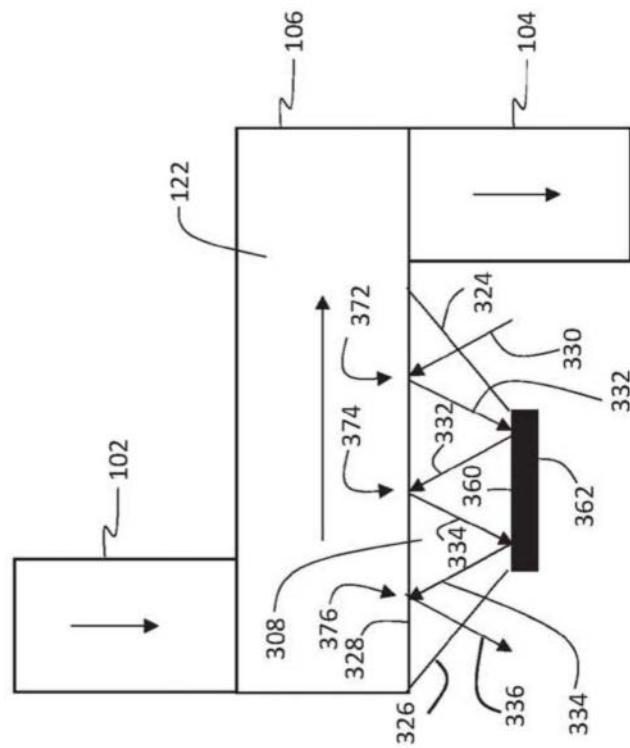


图3

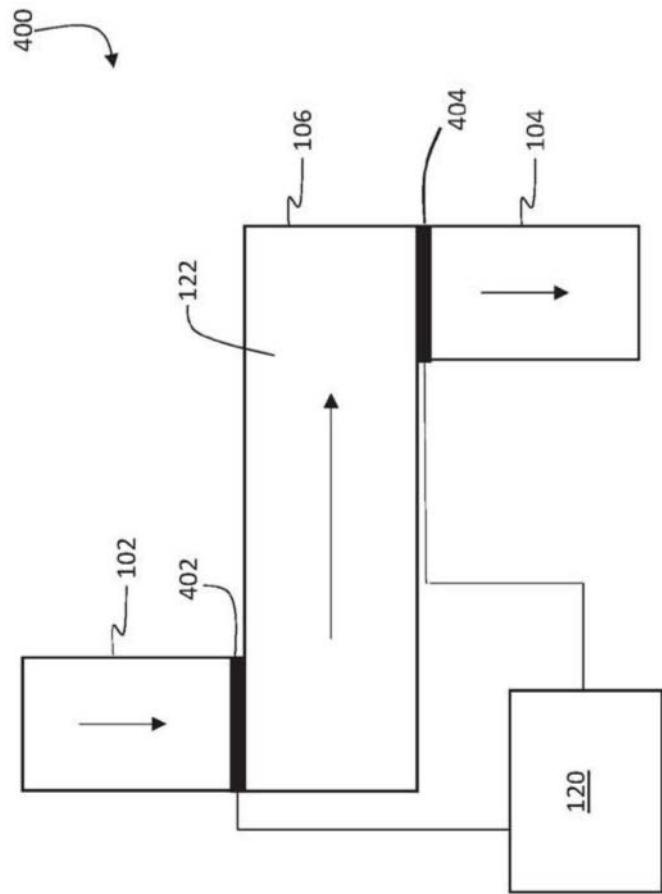


图4

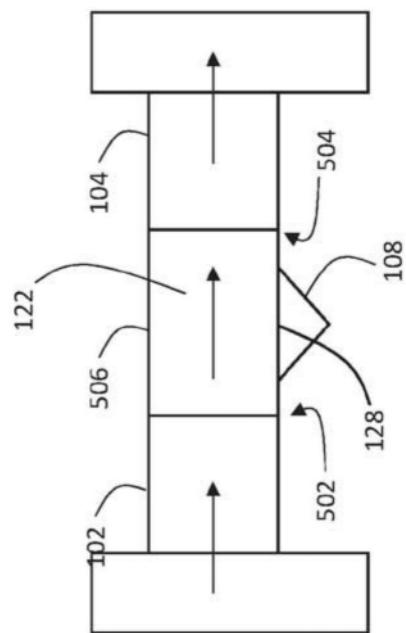


图5

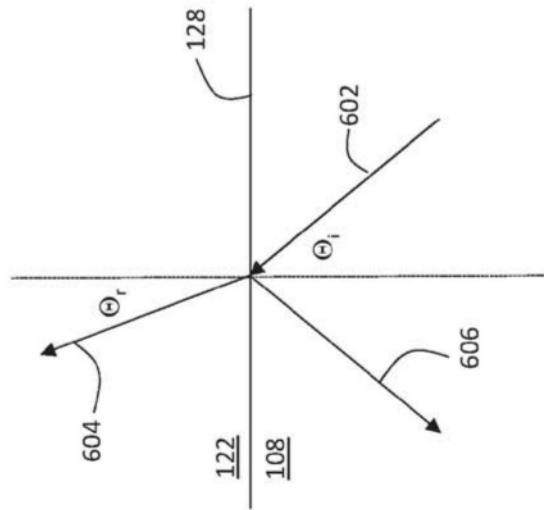


图6

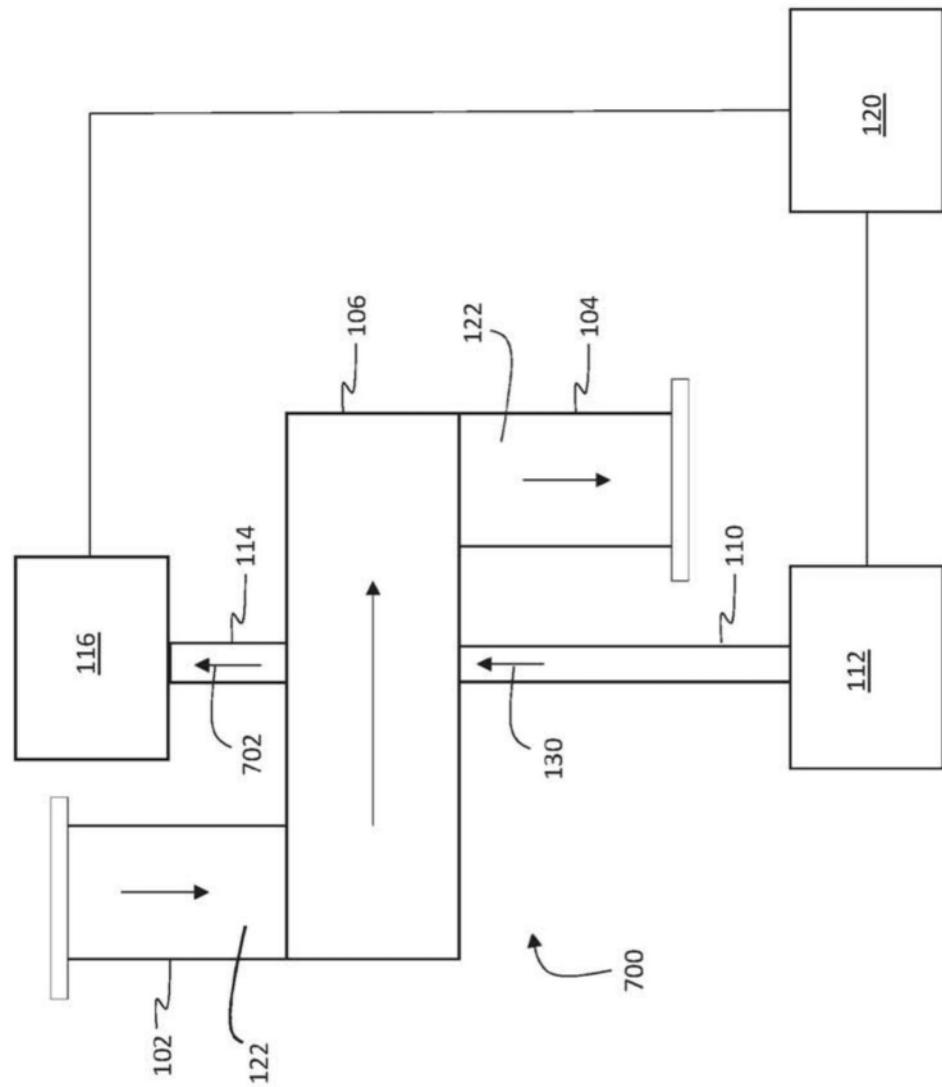


图7

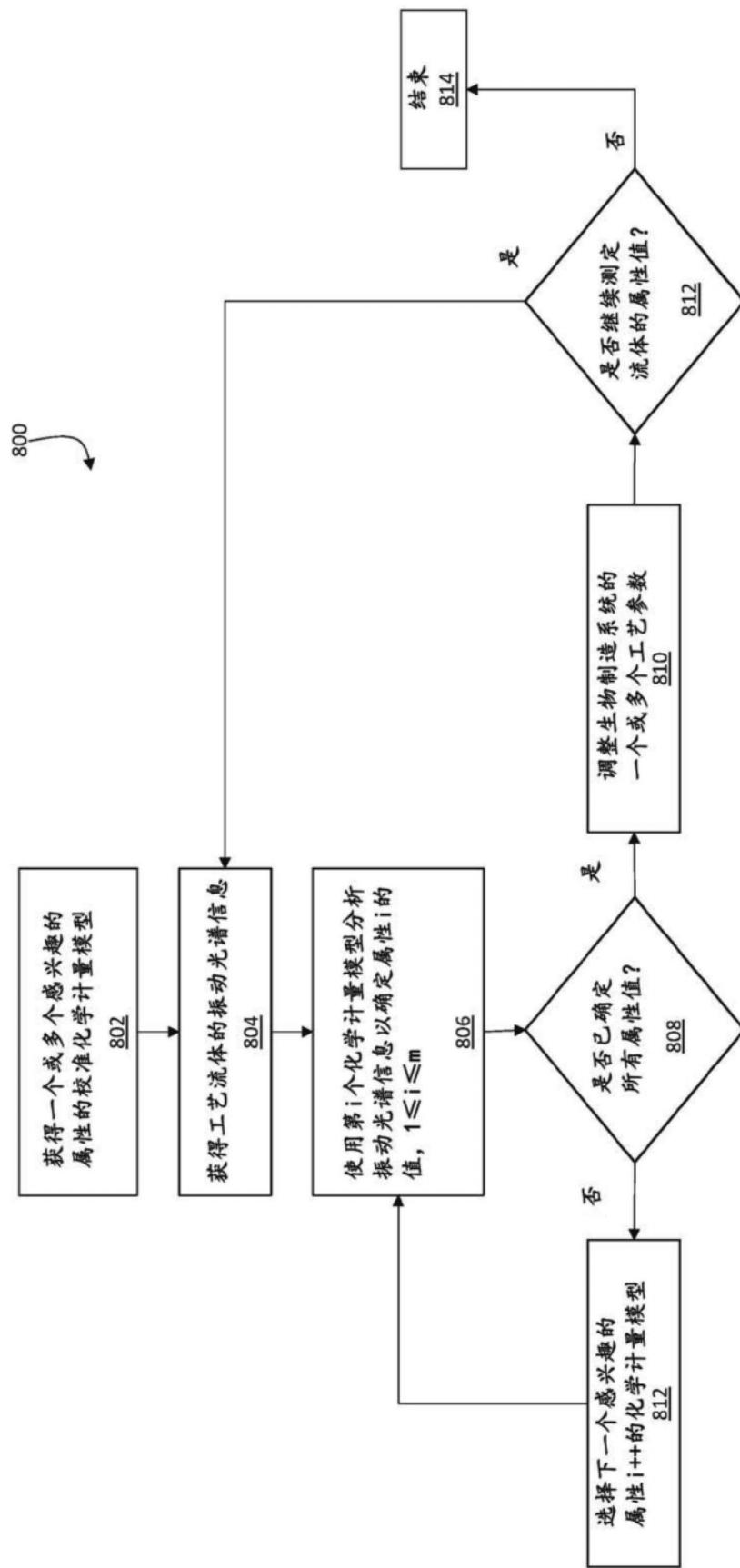


图8

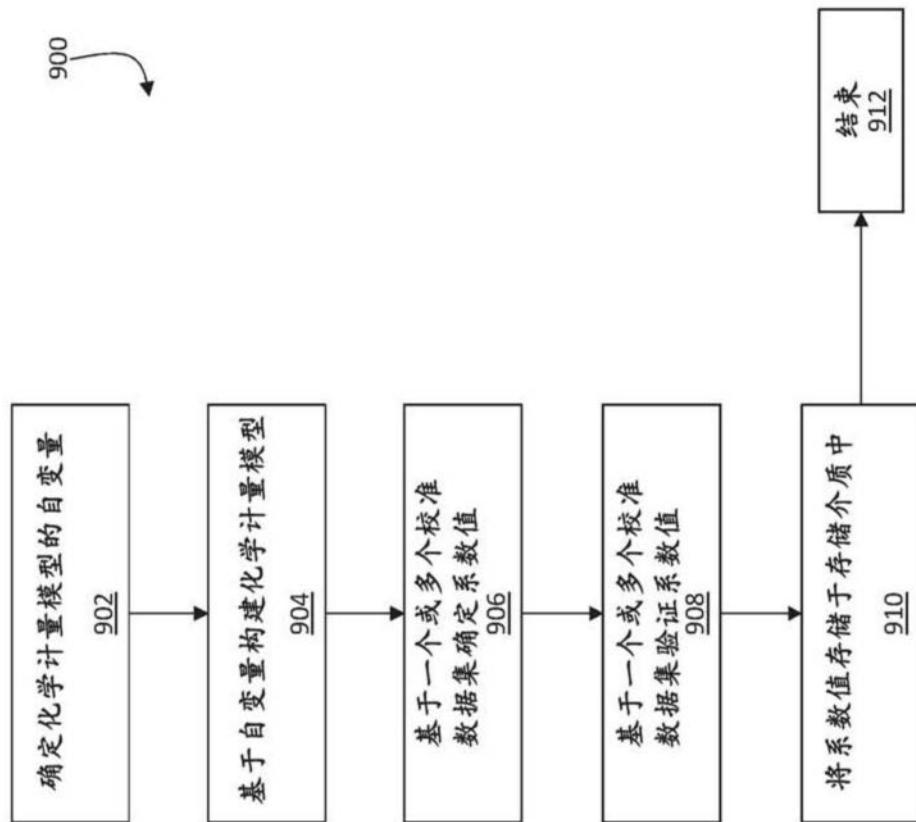


图9

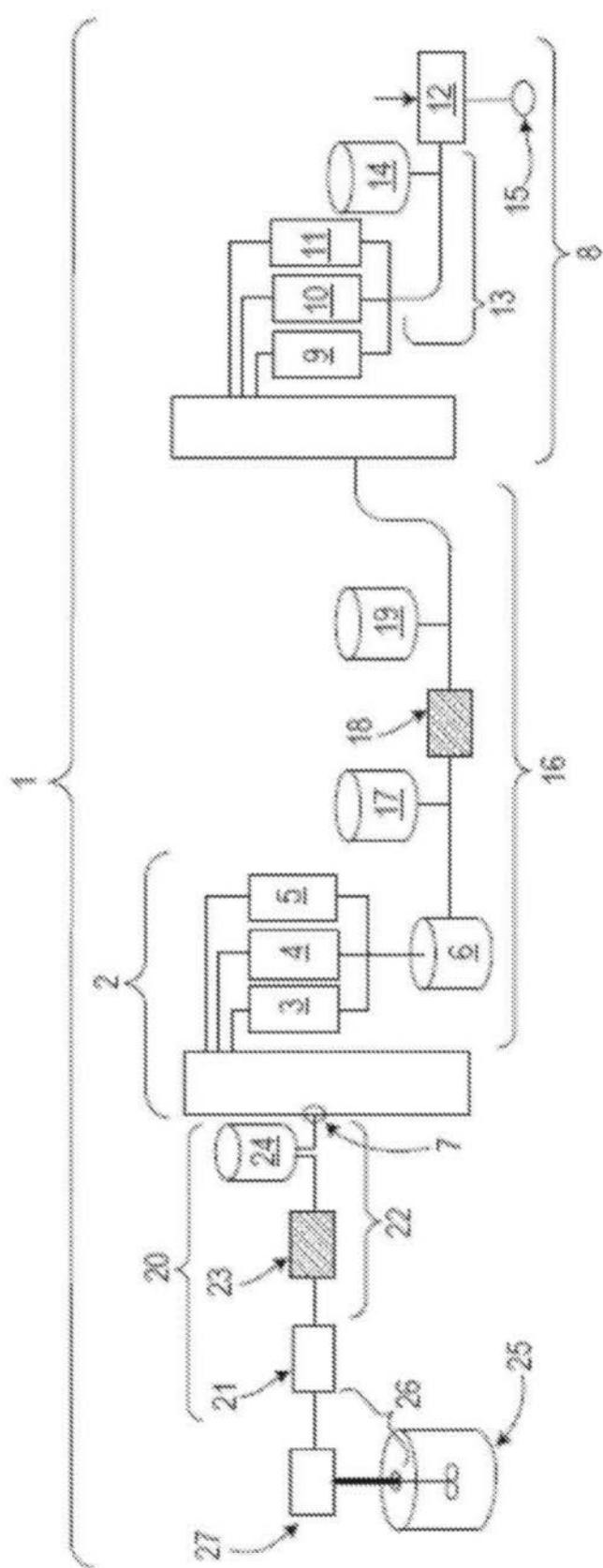


图10

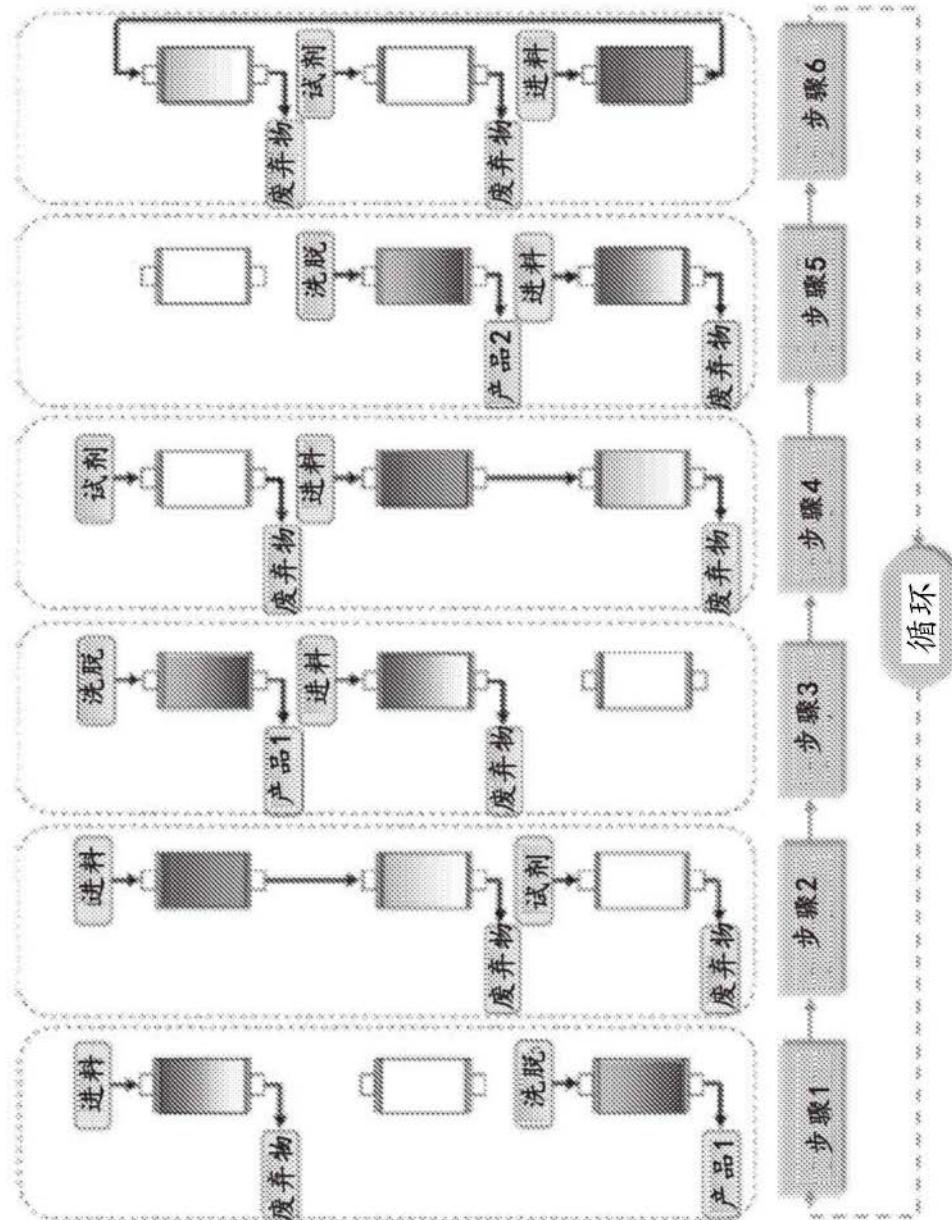


图11

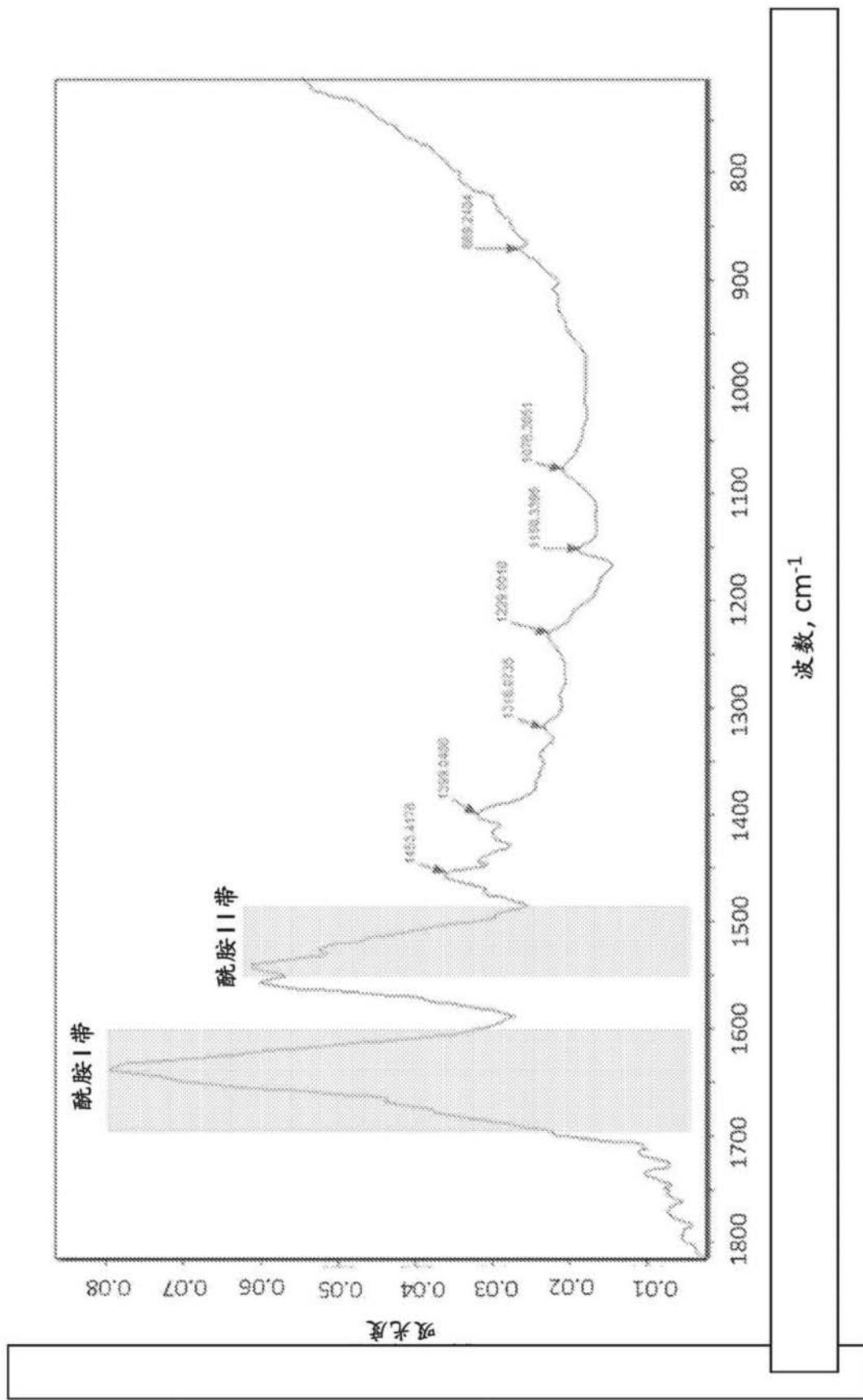


图12

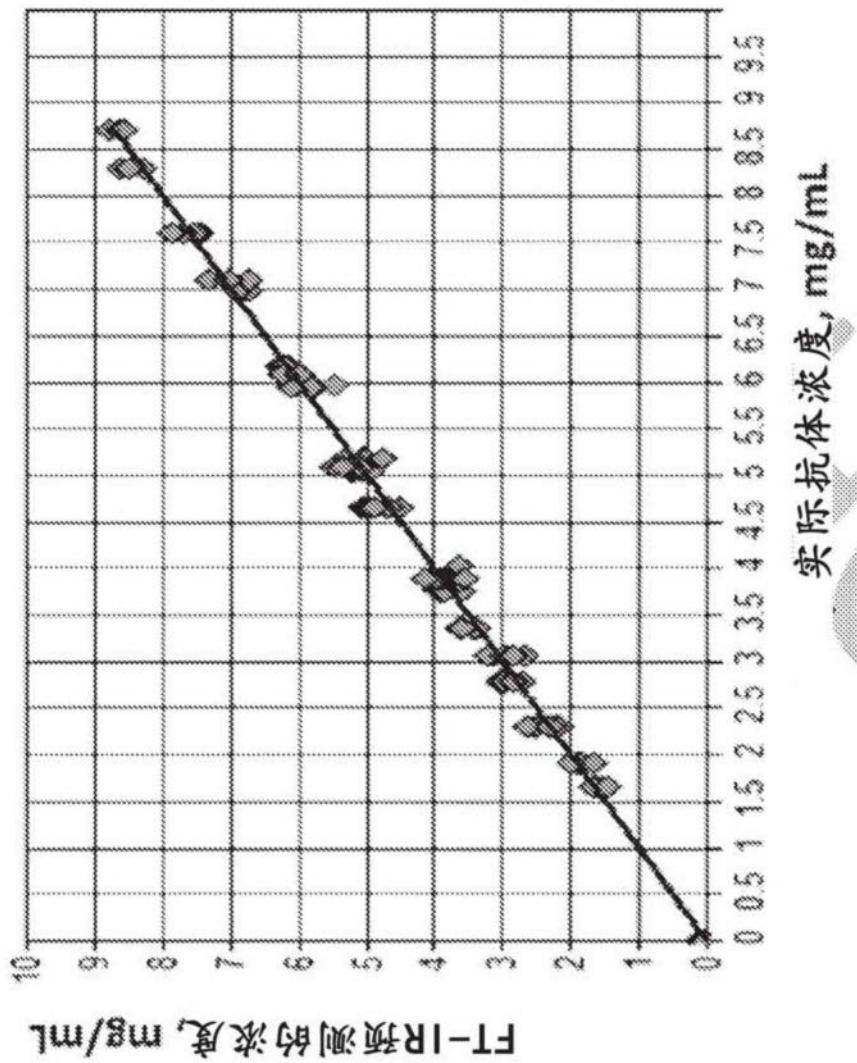


图13

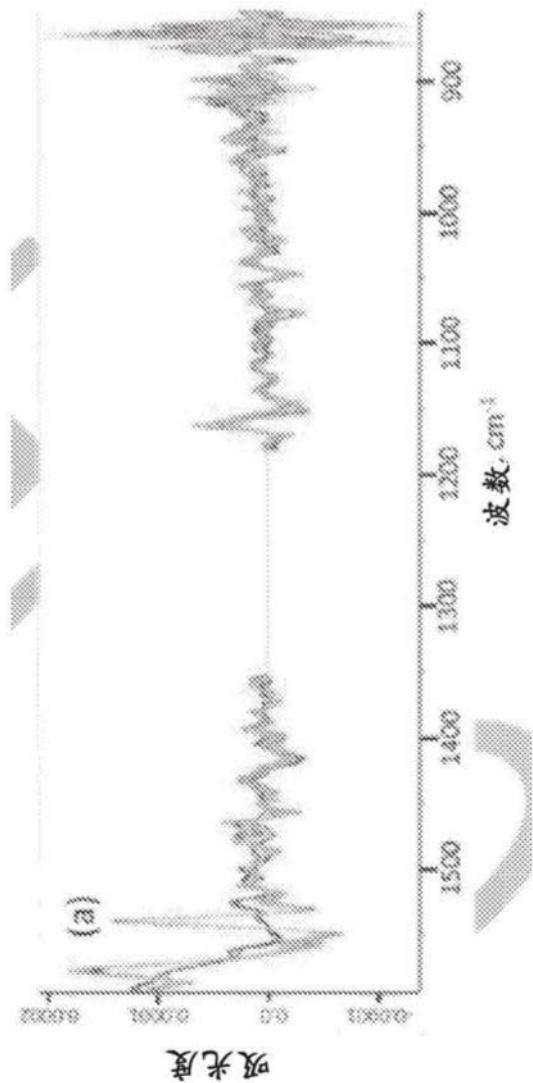


图14A

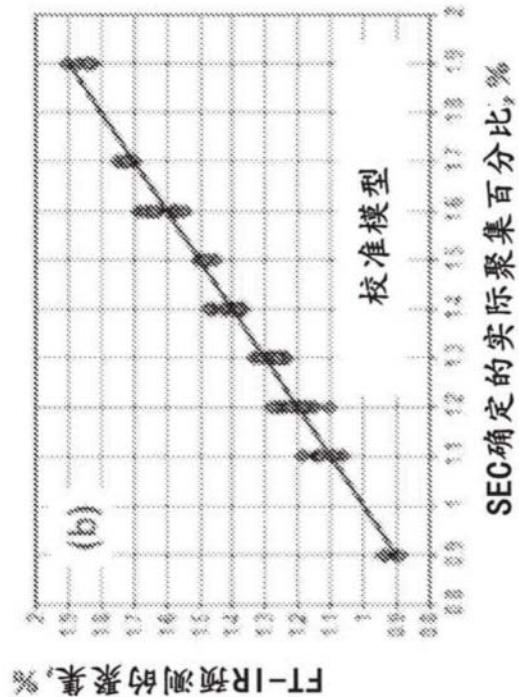


图14B

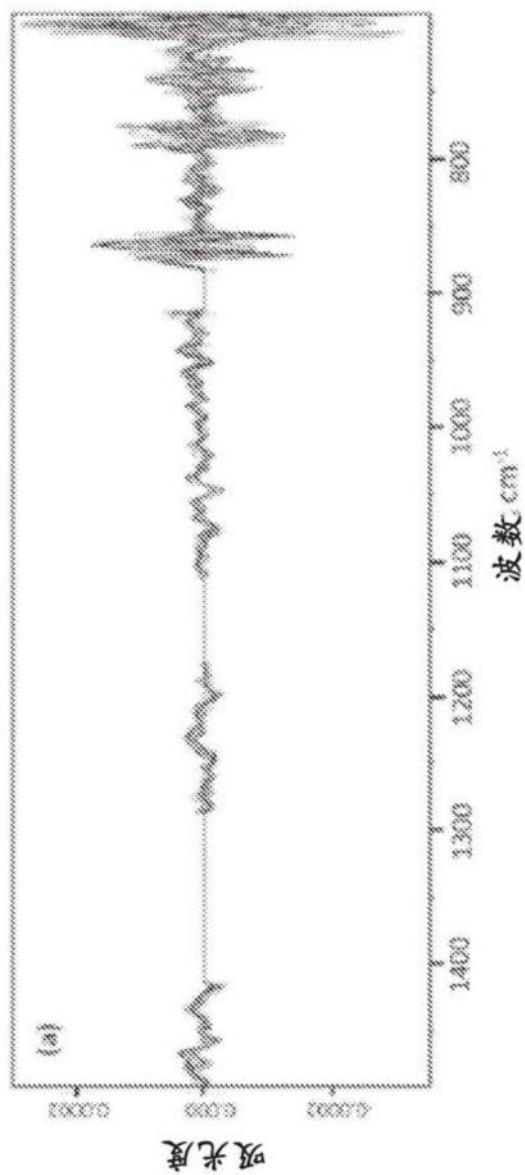


图15A

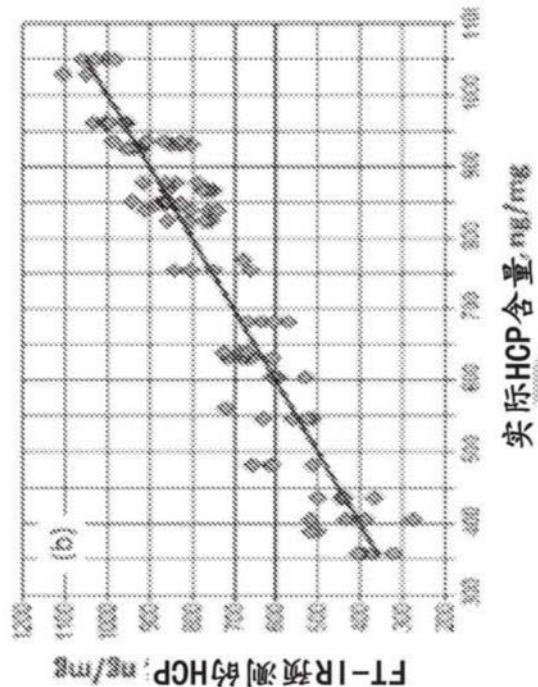


图15B

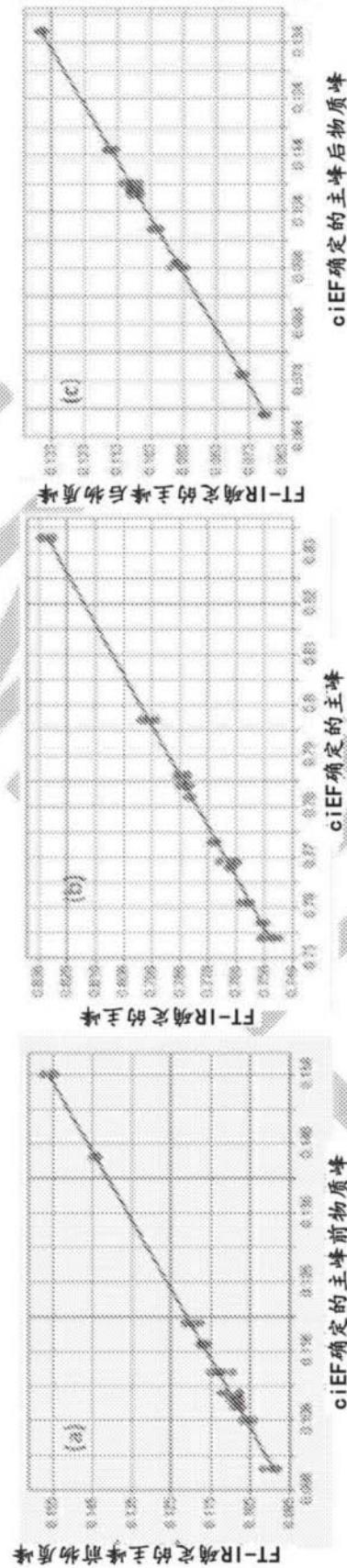


图16A
图16B
图16C

样品	浓度 mg/mL			聚集 %			电荷变体			HCP, ng/mg		
				主峰前物质			主峰			主峰后物质		
	HPLC	FT-IR	SEC	FT-IR	CELF	FT-IR	CELF	FT-IR	CELF	FT-IR	Abs	FT-IR
U-1	7.10	7.04	1.20	1.26	0.14	0.14	0.76	0.76	0.09	0.10	727	878
U-2	5.96	5.73	1.40	1.38	0.11	0.11	0.78	0.78	0.10	0.11	647	683
U-3	5.04	5.10	1.30	1.27	0.12	0.11	0.78	0.79	0.11	0.10	948	934
U-4	5.10	5.25	1.10	1.11	0.11	0.11	0.79	0.78	0.11	0.11	811	839
U-5	5.94	5.87	1.30	1.27	0.10	0.10	0.83	0.83	0.07	0.07	367	322
U-6	6.08	6.03	1.20	1.21	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	890	878

图17

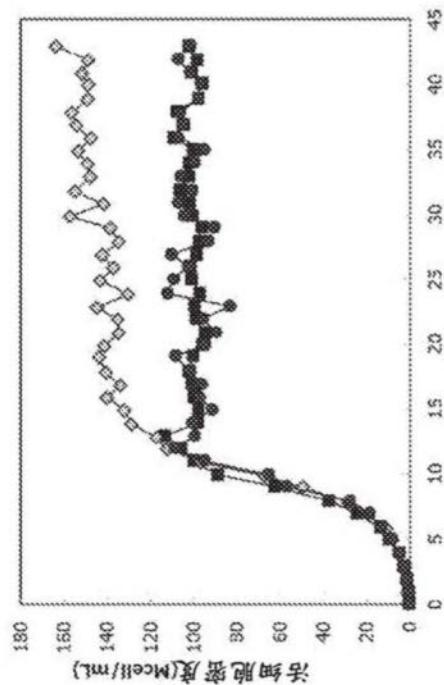


图18A

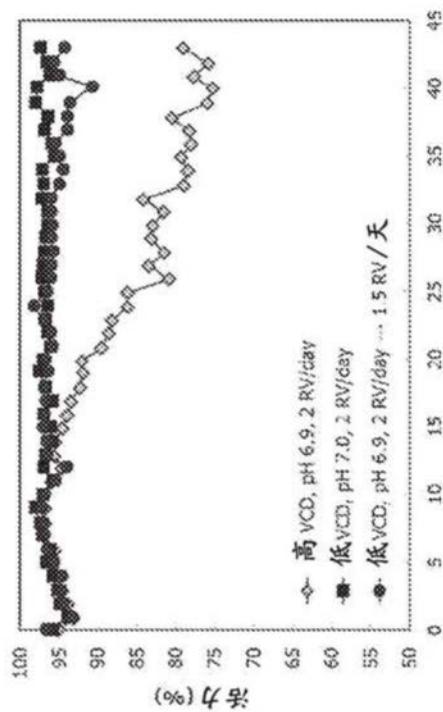


图18B

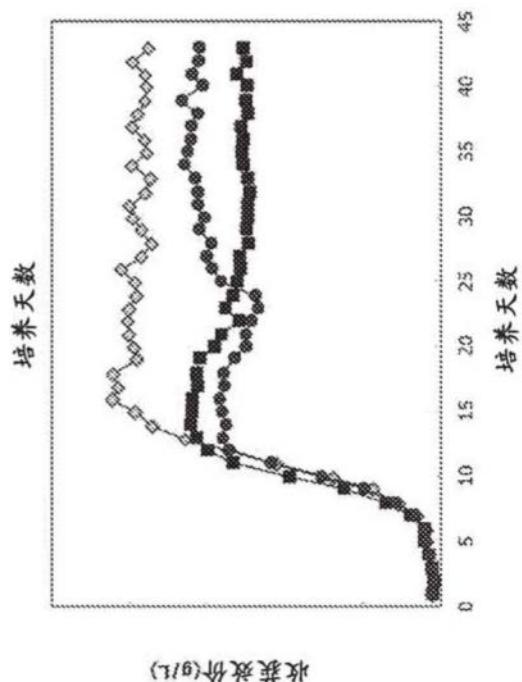


图18C

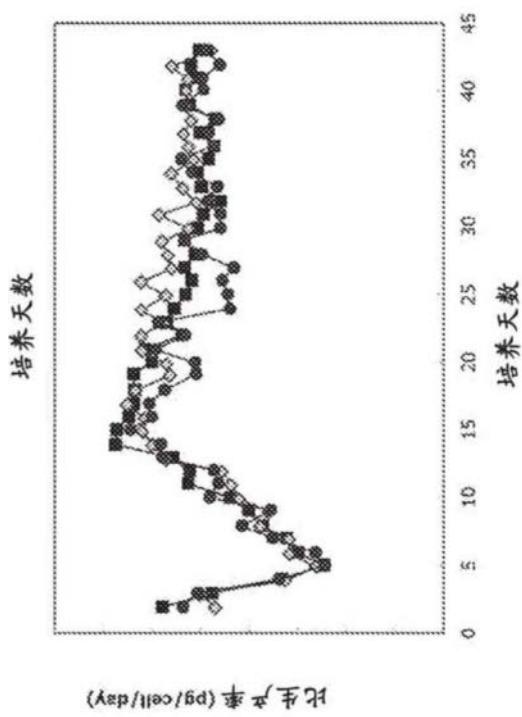


图18D

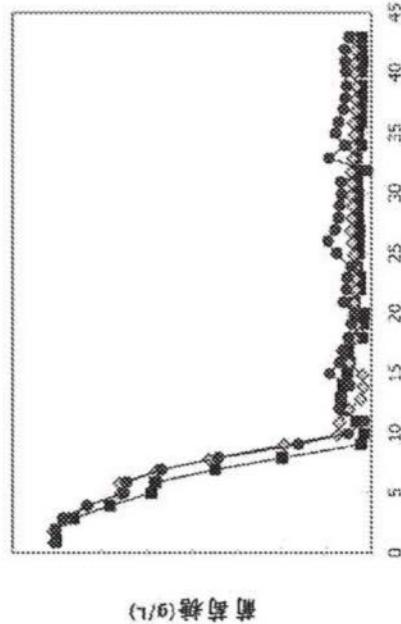


图19A

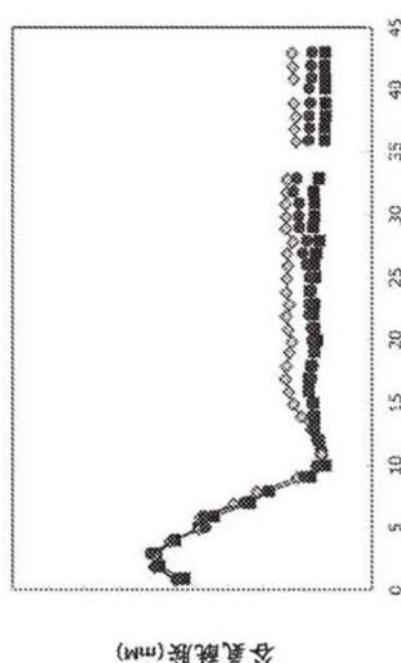
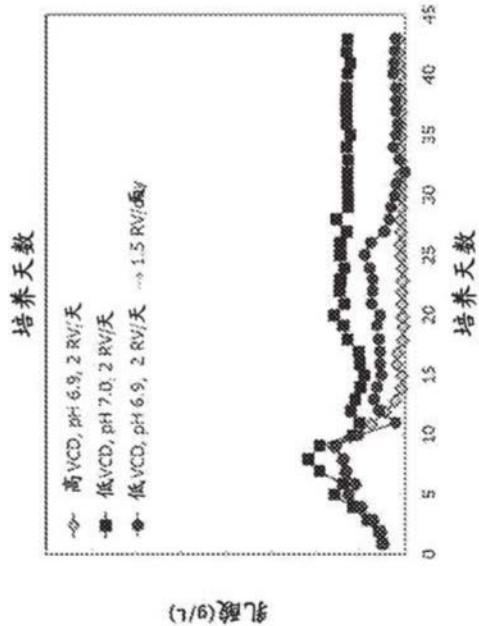
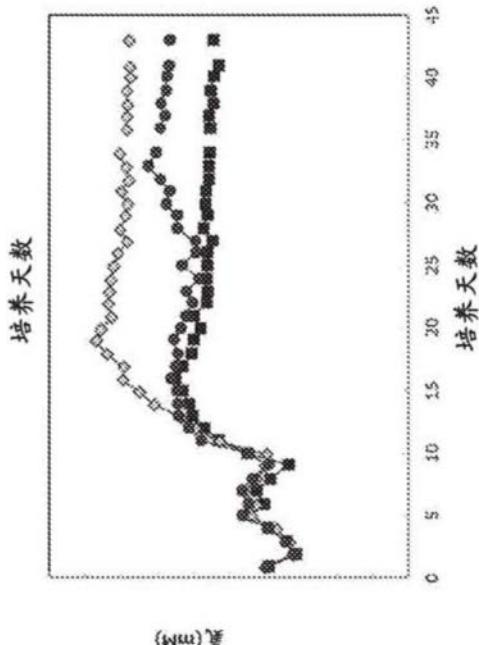


图19B



(7/6)

图19C



(7/6)

图19D

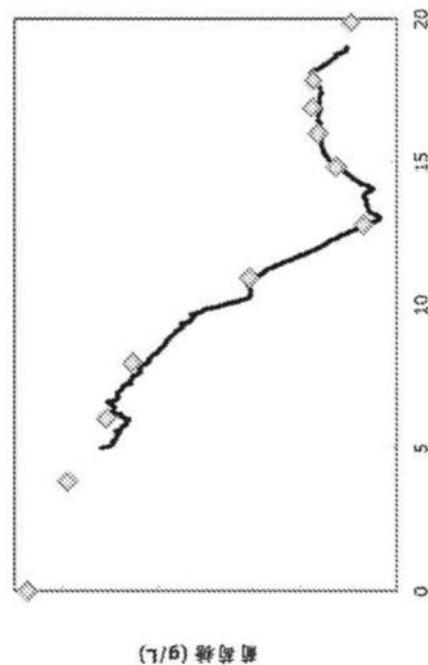


图20A

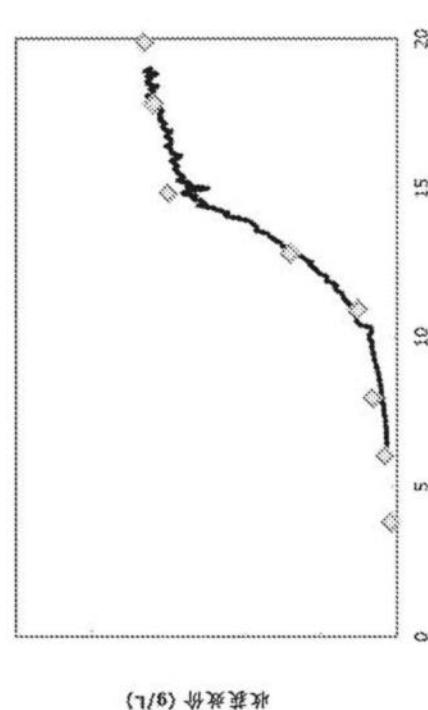


图20B

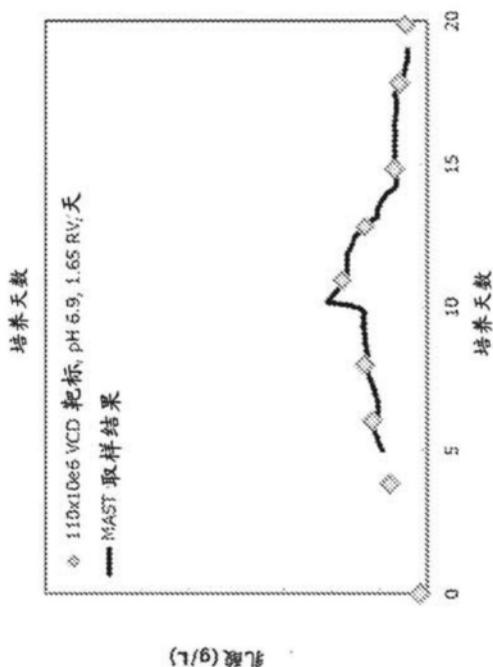


图20C

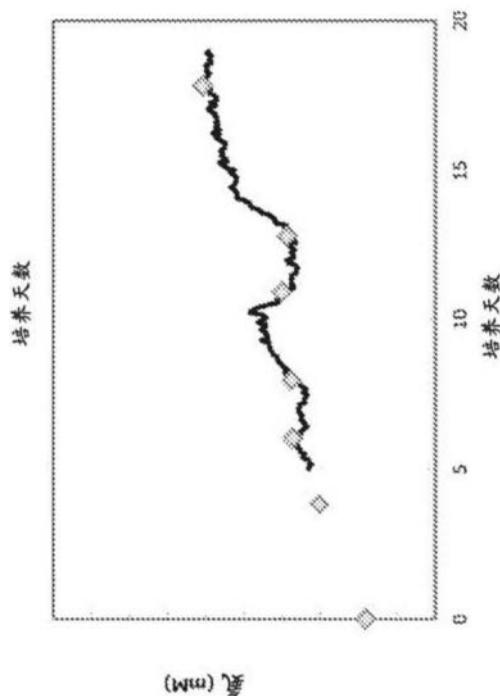


图20D

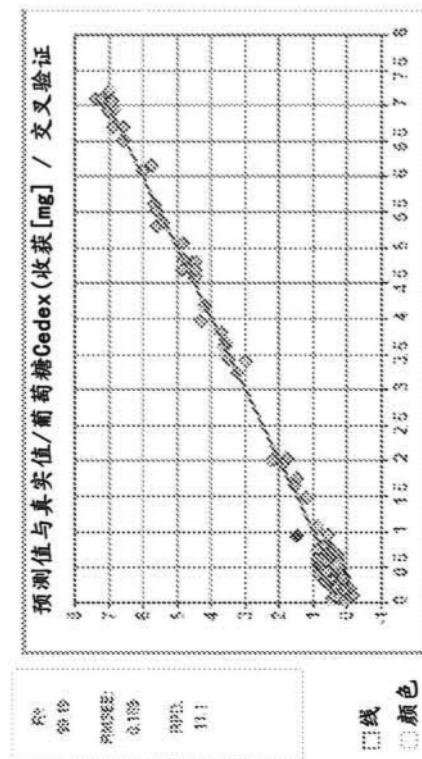


图21A

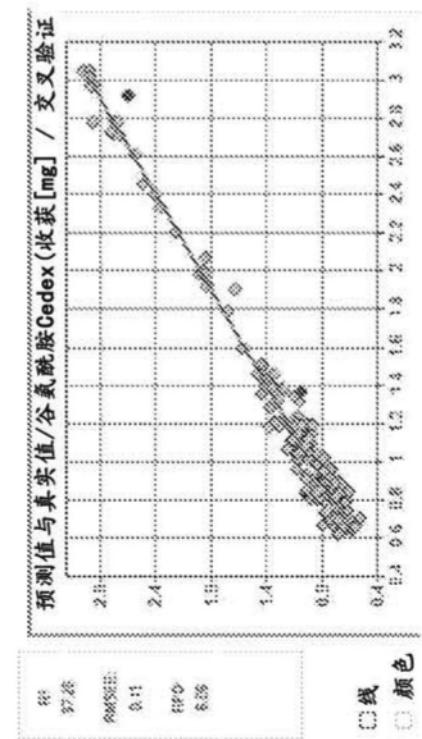


图21B

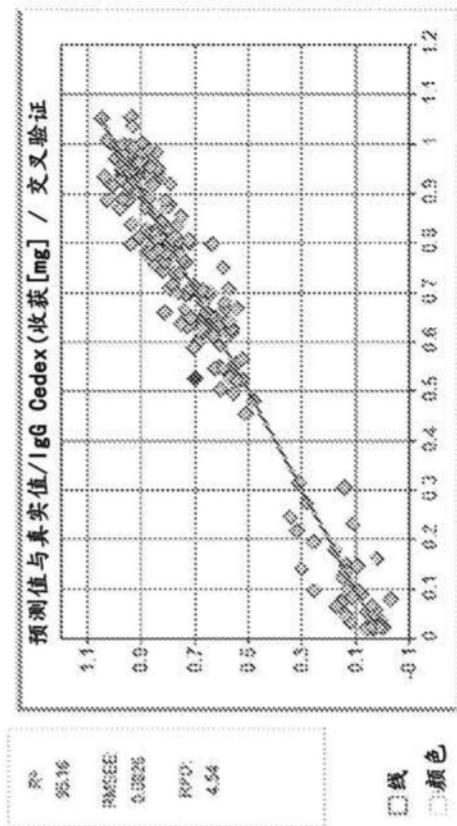


图21C

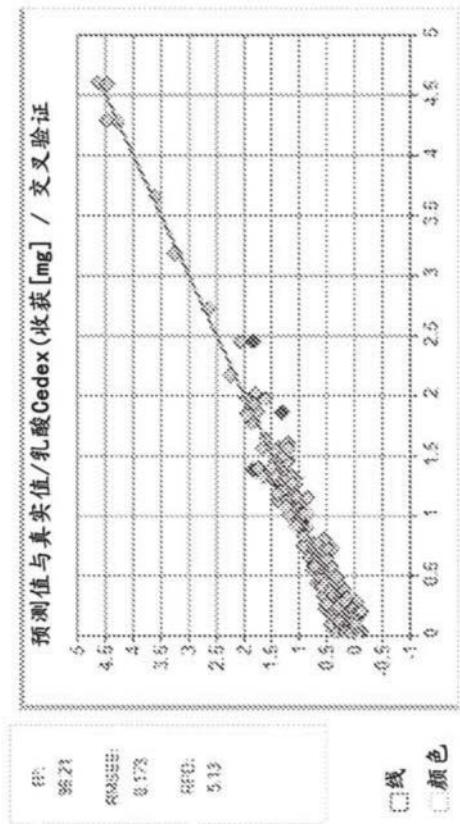


图21D

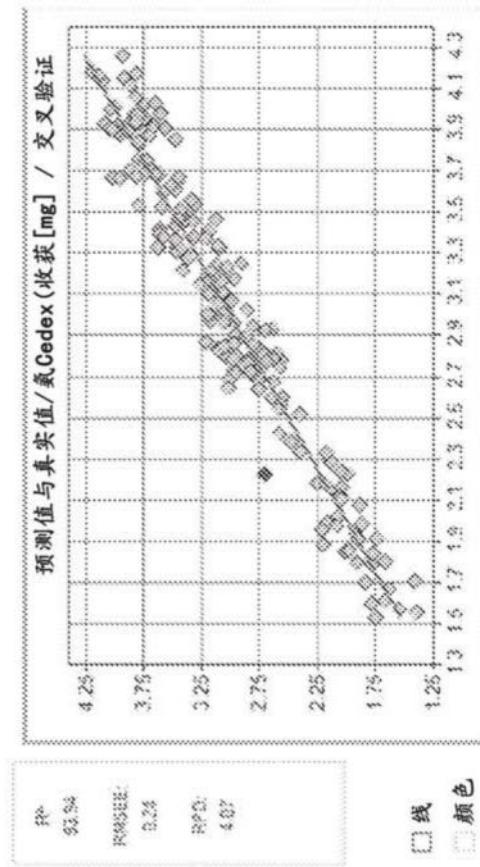


图21E

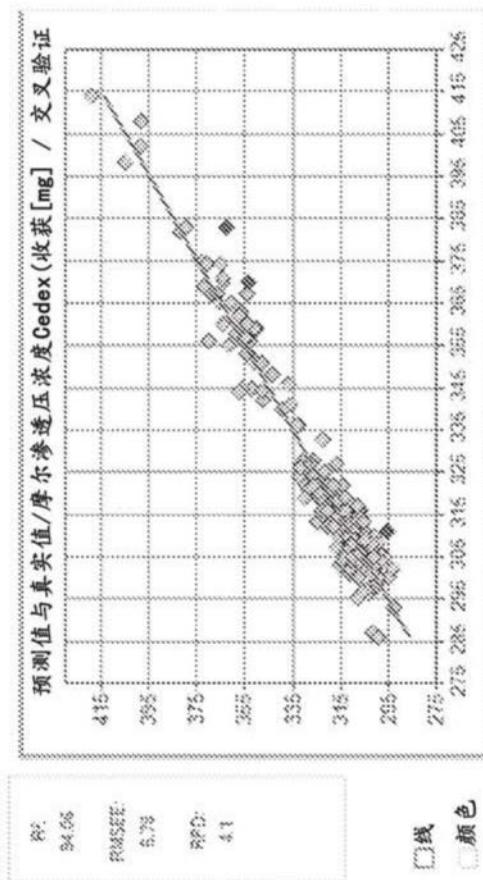


图21F

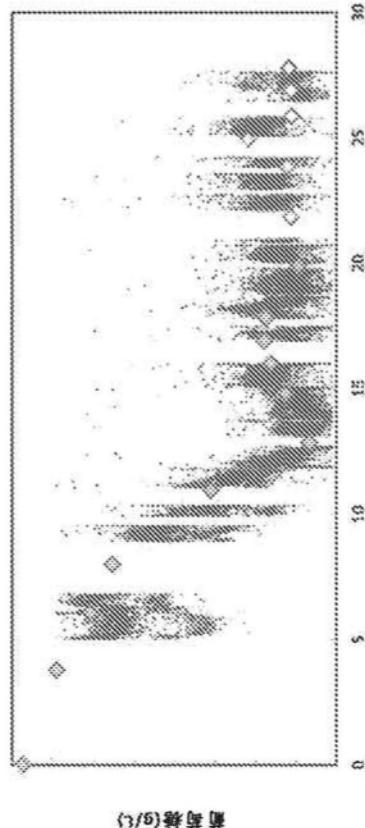


图22A

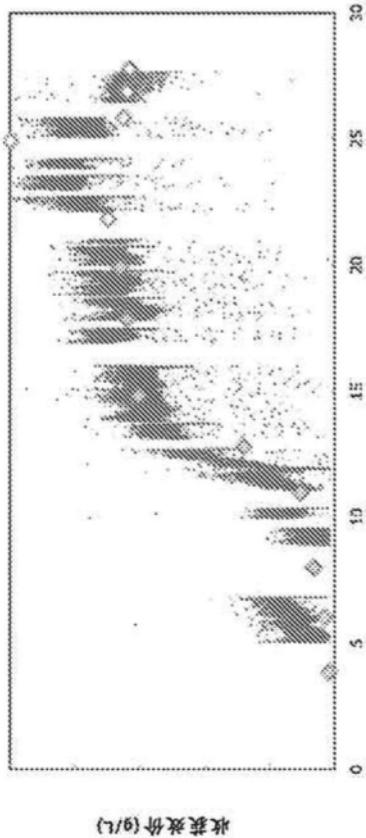


图22B

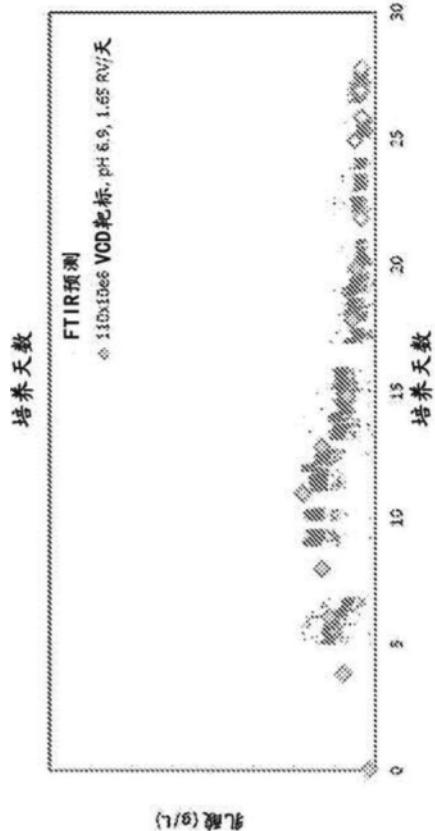


图22C

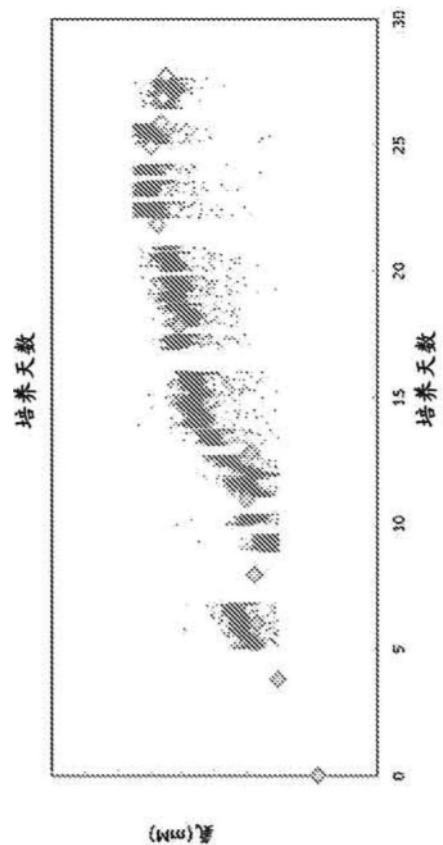


图22D

