



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I695070 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：105112897

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 04 月 26 日

(51)Int. Cl. : C12N7/06 (2006.01)

(30)優先權：2015/04/28 歐洲專利局 15165505.7

(71)申請人：德商拜耳廠股份有限公司 (德國) BAYER AKTIENGESELLSCHAFT (DE)
德國(72)發明人：舒溫 彼得 SCHWAN, PETER (DE)；維斯特 安卓亞 VESTER, ANDREA (DE)；
羅柏丹恩 馬汀 LOBEDANN, MARTIN (DE)

(74)代理人：林秋琴；陳彥希；何愛文

(56)參考文獻：

WO 2006/039568A1

審查人員：張茜毓

申請專利範圍項數：4 項 圖式數：6 共 20 頁

(54)名稱

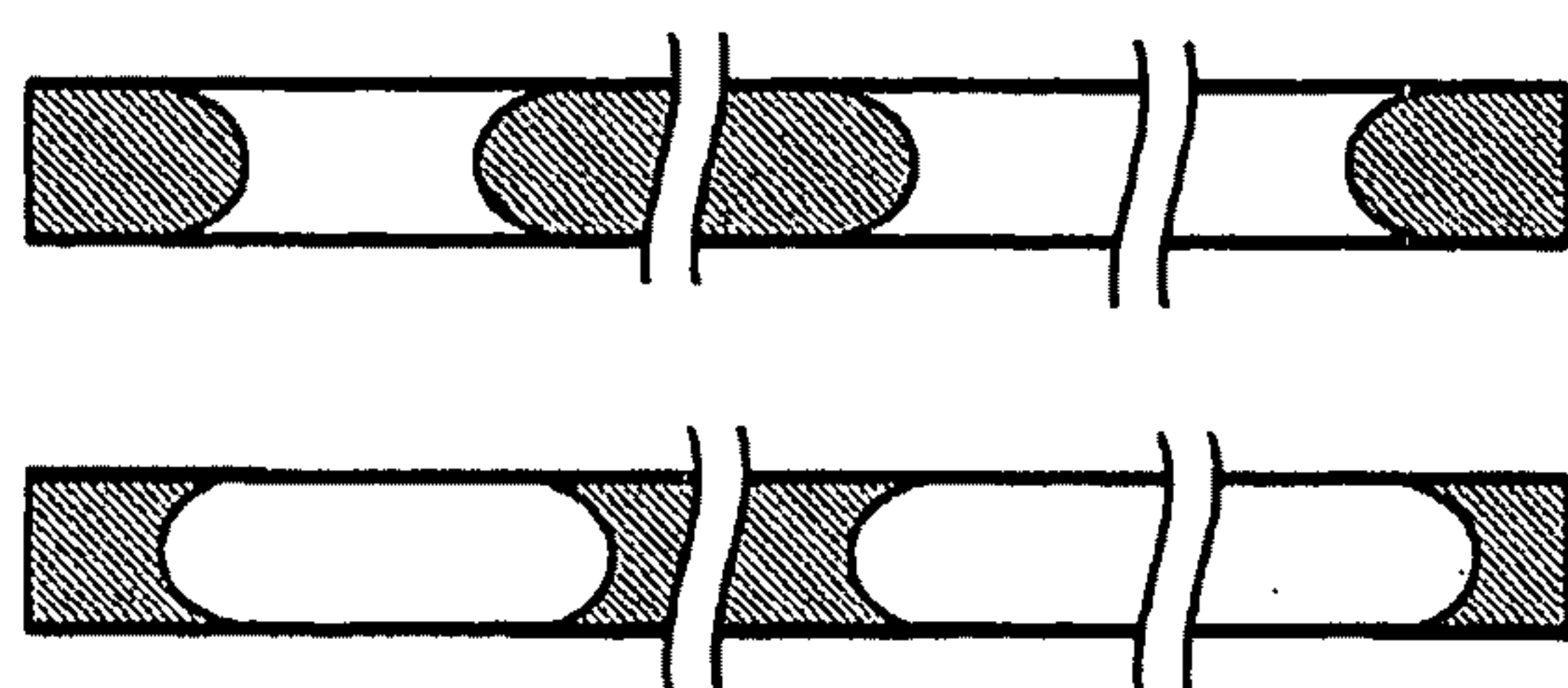
連續病毒去活性之方法

(57)摘要

本發明提供一種連續病毒去活性之方法。藉引入一與產物流不互溶的分開介質分段該產物流，及在所需滯留時間、在病毒去活性條件下，使該分段的產物流被輸送至反應器 1 內作為滯留區段 (detention segment)。

The invention provides a method for continuous virus inactivation. The product stream is segmented by introducing a separating medium which is immiscible with the product stream and the segmented product stream is transported into a reactor 1 as detention segment under virus inactivating conditions for the required detention time.

指定代表圖：



具疏水性表面的分段流

具親水性表面的分段流

圖 2

I695070

發明摘要

※ 申請案號：105112897

※ 申請日：105年4月26日

※ I P C 分類：**C12N 7/06** (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

連續病毒去活性之方法

METHOD FOR CONTINUOUS VIRUS INACTIVATION

【中文】

本發明提供一種連續病毒去活性之方法。藉引入一與產物流不互溶的分開介質分段該產物流，及在所需滯留時間、在病毒去活性條件下，使該分段的產物流被輸送至反應器1內作為滯留區段(detention segment)。

【英文】

The invention provides a method for continuous virus inactivation. The product stream is segmented by introducing a separating medium which is immiscible with the product stream and the segmented product stream is transported into a reactor 1 as detention segment under virus inactivating conditions for the required detention time.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 2 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

連續病毒去活性之方法

METHOD FOR CONTINUOUS VIRUS INACTIVATION

【技術領域】

【0001】 本發明關於一種在一滯留時間區段中連續病毒去活性之方法。

【先前技術】

【0002】 生物醫藥製造方法需要各種的病毒減少之正規步驟。常用於去活性(塗覆的)病毒之方法係與一酸介質接觸。

【0003】 以批次模式於低pH的病毒去活性為已知的且常被施用於活性成分的生物醫藥製造，例如抗體(Sofer 2003，在1990年代間 – 及進入第21世紀之病毒去活性。Part 4. BioPharm International)。在這情況下，欲被去活化的材料，及一潛在含有活性病毒的液體，被引入一合適的容器內，使用一酸性溶液調節至 $\text{pH} \leq 4$ ，若需要均化的話，及使其靜置所需的時間。在整個定義的產品依賴性及方法依賴性時間上病毒接觸酸性溶液的結果發生病毒去活性。袋的全部內容物因此經歷了具幾乎相同滯留時間的去活性及依此所進行的病毒減少在容器的各個流體元件中同樣是幾乎相同的。

【0004】 目前若生物醫藥及生物產品(特別是醫藥抗體)之製造方法，係欲以連續操作模式運行，則所需的保持時間(=滯留時間)

將必須受到病毒去活性的影響。

【0005】 在本申請案內文中，連續病毒去活性意指進料流進料至病毒去活性模組內及從該病毒去活性模組不停地進行產物流的移除。

【0006】 對於進行連續病毒去活性的可行性係利用UV-C光照射。WO2002038191、EP1339643B1、EP1464342B1、EP1914202A1及EP1916224A1敘述使用一螺旋滯留迴路(helical detention loop)其中欲被去活化的材料係利用UV-C光照射及存在的病毒依此被去活化。若一流體流經一螺旋盤繞的管時，該離心力係作用在該流體上。這些離心力誘導二次流動(被稱作Dean渦流)，其導致改進的徑向通流(radial throughflow)及因此更均勻照射該欲被去活化的材料。用在所述來源的螺旋結構係為一直式螺旋盤繞而沒有改變螺旋軸的方向。對於低pH下的連續病毒去活性之應用，因為，雖然滯留時間分布相比於具層狀通流(laminar throughflow)的直管較窄，它仍是過寬的，故使用直式螺旋結構，如在UV-C照射所用者，係無法實行的。由於該仍相對上寬的滯留時間分布，這幾何形狀對於pH病毒去活性將另外需要一大型設施。

【0007】 在層狀管流中，一拋物線速度輪廓形式，為其結果出現寬滯留時間分布(圖1)。因為在管流中央的最大速度係兩倍於中值速度，但在該管壁處速度係等於零(黏合條件)，在這些情況下出現一很寬的滯留時間分布。最終滯留時間係介於平均滯留時間的一半(由在管中央的快速流動流體元件所造成)與無限長滯留時間(由在壁附近的黏附流體元件所造成)之間。因為，首先，對於病毒的有效去活性，需要一最小滯留時間，及其次，雖然如此，在低pH下長滯留

時間會破壞產品(諸如(例如)蛋白質)，以連續操作達到一窄的滯留時間分布是很重要的。從層流位置變成具均一滯留時間的湍塞流(turbulent plug flow)，在這情況下，並不是可接受的替代方式。湍流呈現高流動速度。之後，若達到常見於低pH下病毒去活性的長滯留時間(例如60至120 min)時，不利於形成大型設施，其還具有一高壓力降。

【0008】 WO1998/02237敘述一種藉施用分段的程序(分段流方法)解決在連續操作的管狀反應器中來自液體反應混合物的沉澱產物之拋物線速度輪廓的問題之方法，其中不連續體積的反應混合物從與反應混合物不互溶的不連續體積的分離液體中被分離，其中在管狀反應器中該反應混合物的滯留時間係足以用於沉澱。在塞流條件之下產生不連續體積及對於各個體積該反應條件實質上相同，諸如此方式對於各個體積獲得一均勻產物。

【0009】 Tuercke 等人敘述分段的傳導 - 液體/液體或液體/氣體 - 係在以微粒產物的有機合成及製造(諸如(例如)多重乳液及奈米粒子及聚合)的連續操作微結構化的反應器中(Organic Process Research & Development 2009, 13, 1007-1013)。Fraunhofer Institute for Chemical Technology ICT還使用分段相之方法用在分離細胞(cells)。此外，在取樣及分析的Baychromat® System中使用分段相的技術用在樣品輸送(US 2009/0178495)。

【0010】 對於方法之塞流條件或分段流之適用性同時需要一長滯留時間及一窄滯留時間分布諸如(例如)於低pH下病毒去活性，至今未被研究或提及。

【0011】 由先前技術進行，目的欲提供一種新穎、簡易且低廉

的溶液其允許所需的滯留時間在一具連續病毒去活性之連續流通的滯留時間區段中，特別是於低pH下，具一窄的滯留時間分布。

【發明內容】

【0012】 本發明係在一具有0.01 mm至6 mm(較佳0.5 mm至3 mm)的低水力直徑的反應器1中藉一欲被去活化的產物流之連續病毒去活性之方法達成這目的，包含下述步驟：

- a) 提供欲被去活化的產物流，
- b) 設定病毒去活性條件，
- c) 將與產物流不互溶的分離介質引入產物流內以分段它，
- d) 在一由反應器1形成的滯留區段中在病毒-去活性條件下使該來自c)的分段的產物流進料及通過，
- e) 從該滯留區段流出，
- f) 較佳連續地分離出該分離介質。

【圖式簡單說明】

【0013】 圖1顯示具層狀通流的管的拋物線流動輪廓(上面：管的縱向截面)。在具層狀通流的管中流動方向的等速度線(下面：管的橫截面)。

【0014】 圖2顯示分段原則。

【0015】 圖3顯示連接至管狀反應器的分離劑的脈衝引入之替代工具。

【0016】 圖4顯示具後續pH調整的病毒去活性之流程圖，其中用於病毒去活性的裝置只示意性顯示。

【0017】 圖5顯示捲取反應器管的正方形框架。

【0018】 圖6顯示安裝在底座上複數個框架。

【實施方式】

【0019】 較佳地該反應器，還有用於分段產物流之接觸到產物流的模組元件，為可滅菌性，較佳可高壓滅菌的、可伽馬照射的或可以氧化乙烯(ETO)氣體處理，其允許低微生物或甚至無菌的操作。

【0020】 較佳地，該反應器為管狀反應器。特佳地，使用由一次性(disposable)材料製成的管狀反應器，例如撓性管，其在使用後被丟棄以能夠清洗分配。對於這性質，較佳使用撓性管符合相關品質要求，例如醫療品質(USP類VI)。例如，該管狀反應器為由矽酮製成的撓性管。依例示，可舉出有撓性管Pharmed®-BPT(矽酮撓性管)、C-Flex-374®(熱塑性撓性管)，或得自Saint-Gobain Performance Plastics的Sanipure®，但不限制本發明。在試驗設施中，使用具有內徑1.6 mm的SaniPure®之商用撓性管。

【0021】 以該管狀反應器的長度之幾何組態如所期望的：直式、盤繞的或彎曲的，條件是它不會斷離。適宜為予以一節省空間的管狀反應器安置。基本上，該管狀反應器藉一支撐結構所支持。例如，該管狀反應器係圍繞著在一底座上彼此之上固定的框架盤繞的。其中該框架可為圓形或正方形。圍繞著一或多個管柱的螺旋式盤繞亦是可行的。對於UV去活性，該管柱則可具有一UV燈及該管狀反應器對UV可呈透明的。再者，可建立經由加熱在該管狀反應器中的支撐結構之熱病毒-去活性條件。對於熱去活性，該盤繞的結構還可被引入一液體浴內以為了誘導急遽的溫度變化。

【0022】 或者，可使用一管狀反應器其由彼此之上堆疊的一或多個板所形成的，特別是塑膠板，其中合併一具有入口及出口的通道。若這板反應器包含複數個板時，中央板的入口及出口係以諸如由堆疊體形成的期望長度之連續通道之方式被定位的。再者，在該通道的長度之幾何組態係如所期望的：直式、盤繞的或彎曲的。

【0023】 該反應器1的橫截面基本上是圓形或橢圓形，但還可為正方形。

【0024】 在步驟a)中，一液體的產物流條件是可含有產物還有潛在性欲去活化的病毒二者。

【0025】 依用於步驟b)之可行的病毒-去活性條件，引用低pH(較佳 ≤ 4)、清潔劑、UV或熱處理。

【0026】 較佳地，在步驟b)中，該產物流的pH被設至 $\text{pH} \leq 4$ ，條件是欲被去活化的材料的pH不是已具有所需的pH。該產物流的pH通常是在進入病毒去活性的裝置內之前藉一感測器(圖4)被測定的。通常，這pH感測器沒有控制工作。記錄pH訊號僅僅是供作為方法監控。可進行設定欲去活化的溶液的pH至 ≤ 4 ，例如，藉添加HCl溶液。該溶液基本上在該裝置運行至病毒去活性中被添加。在步驟e)或f)之後，通常使用一鹼，例如氫氧化鈉溶液(NaOH)，將該pH設至 >4 以為了終止該病毒去活性。該中和作用可依批次操作或依連續製造方法進行，及因而可被整合成一批次方法或一連續方法。

【0027】 在根據本發明方法中，使用與產物流不互溶的相作為分離劑。較佳地，該分離劑為一油或一氣體諸如，例如空氣、 CO_2 或氮，較佳為一氣體，特佳為氮，乃由於其相對於產物流係反應惰性及在水性產物流中係低溶解度。

【0028】 對於在步驟c)中引入該分離劑及分段該產物流，該反應器基本上，除了一引入口(intake)4之外，具有一通常以T-片形式的用於分離劑的引入6，連接至其為一用於引入一脈衝至該分離劑的工具-任一具有連接的壓力線或泵之致動開啟閥(圖3)。區段(例如)以一具有每分鐘0.1至200次脈衝的脈衝速率之泵進行。

【0029】 通常，該反應器物流以自1至1000 l/min(較佳10至100 ml/min)的體積流動速率流過。

【0030】 作為脈衝引入之替代，該分離劑可經由一膜片被連續進料。在這具體實施中，使用一用於分段該產物流的模組其包含一或多個具有一疏水壁的中空纖維，透過其該分離劑被引入該產物流內。還可以使用具有一親水壁之中空纖維模組，其中在該中空纖維的管腔中，該分離劑係被連續地輸送及引經過該產物流的壁。此第二具體實施呈現該中空纖維的孔可滲透至該產物內。膜片分段的用途一般呈現該病毒-去活性條件不損及所需的膜片性質。當使用清潔劑時，T-片的施用因此為較佳的。

【0031】 還可以化學引入一分離劑，例如CO₂，特別是若病毒-去活性條件可容許pH改變時。

【0032】 藉諸如此產物流的分段，利用介於產物流體積之間的0.1 ml至10 ml的體積分離率通常形成自0.1 ml至100ml的產物流體積。

【0033】 通常，區段的最小長度，特別是一分離劑區段係三倍於該反應器的內徑。一段區的合理最大長度為該滯留區段的五分之一。

【0034】 由於在該反應器中的毛細作用及表面張力，維持相的

分段作用，以諸如一個相的兩個區段藉另一相的區段而分離之方式。結果是，在一相的兩區段之間的返混合被最小化及總體系統的滯留時間分布大大地變窄。

【0035】 個別輸送的產物流區段(=產物流體積)可被視為小型去活性容器其總是完全空的還有只最小程度彼此混合。

【0036】 通常，在步驟d)中的產物流被饋入及輸送至該反應器以流動速度為0.1至1000，較佳1至100，特佳10至100 ml/min，通常使用一泵。在這步驟中介於病毒-去活性條件之間的期望接觸時間(=滯留時間)，特別是該酸性溶液及存在的任意病毒，持續進行。該滯留時間長到足以去活化該病毒而沒有過度破壞產物。在轉換成連續方法之前，通常以批次方法實驗上測定，及基本上係自對pH-感測的產物之30 min至對低感測的產物之10小時。所需的滯留時間還有最大滯留時間為產物依賴性。該最大滯留時間通常以諸如最低限度破壞產物之方式最適化以維持對下游純化步驟的要求儘可能小。

【0037】 根據本發明作為方法之設計參數可對應舉出：

- 反應器的管內徑 d_i
- 管長度 L ，其中該管長度 L 及該管的內部直徑係以諸如符合在各個應用情況下所需的滯留時間之方式調適至該設施的總體設施的尺寸/通流速率之尺寸。
- 所期望的體積流動速率、產物流體積、分離劑體積及脈衝速率。

【0038】 該分離劑通常藉經由重力、離心力或藉膜片性質作用的分離器連續地被分離出。

【0039】 若使用一氣體作為分離劑，該體積流通常連續地被脫

氣。對於這目的，可使用一氣泡捕集器(bubble trap)、一排氣閥(venting valve)、或較佳一膜片脫氣模組。

【0040】 若該製造方法需要一或多次pH調節時，用於病毒去活性的裝置通常被連接至一用於調節pH的單元。通常，使用二個用於調節pH的單元，該去活性的第一上游用於調節該產物流至一 $\text{pH} \leq 4$ ，該去活性的另一下游用於中和該產物流。

【0041】 若用於病毒去活性的裝置被整合成一連續製造方法，較佳為一或多個用於調節pH的單元，其中該產物流流經過一再循環迴路。圖4藉舉例方式描述病毒去活性及隨後的中和作用，但不限制其。M0503輸送該產物流至該袋B0502內，此處在它離開病毒去活性之後pH調節至 $\text{pH} \geq 4$ 。該再循環泵M0504輸送該袋B0502的內容物經過該再循環迴路，其中該pH感測器pH0502測量該產物流的pH。感測器pH 0502的下游，用於調適化pH的調節劑被加入以控制該pH。這經由M0505的原始設定的轉動速度持續進行。

【0042】 在根據本發明方法中，欲被去活化的產物流通常為一來自生物反應器或層析管柱的溶液，特別是一蛋白質或胜肽溶液諸如(例如)一抗體溶液。

【0043】 相比於以先前技術中常見的批次模式之病毒去活性，根據本發明之連續病毒去活性的技術優點為它的整合成一連續處理方法的能力，亦稱為“下游加工”，而不需要改變方法程序。在這情況下，在由批次至連續及再返回的方法程序中沒有任何改變，但整個下游加工，或選擇性整個製造方法(上游及下游)可連續地運行經過。再者，連續病毒去活性可更易於與一其它批次處理方法之連續次-步驟組合。

【0044】 包括較佳具體實施的本發明係與圖式及下文實施例組合說明的，但不限制其。該具體實施可如所期望的彼此組合，條件是另一者不由上下文清楚地產生。

【0045】 圖1顯示具層狀通流的管的拋物線流動輪廓(上面：管的縱向截面)。在具層狀通流的管中流動方向的等速度線(下面：管的橫截面)。

a = 管壁

b = 在流動方向中管的軸方向

c = 徑方向

d = 在流動方向中等流動速度的線。

【0046】 圖2顯示分段原則。

【0047】 圖3顯示連接至管狀反應器的分離劑的脈衝引入之替代工具。

【0048】 圖4顯示具後續pH調整的病毒去活性之流程圖，其中用於病毒去活性的裝置只示意性顯示。

【0049】 圖5顯示捲取反應器管的正方形框架。

【0050】 圖6顯示安裝在底座上複數個框架。

【0051】 實施例1：

【0052】 對於實驗研究，選擇一內徑1.6 mm的撓性管。該管狀反應器捲繞在具有下述尺寸的框架上—

【0053】 框架直徑為63 mm；框架的外緣長度為195 mm。該框架係按照圖5製作的，及安裝在一根據圖6之底座上。

【0054】 在各例中每臂進行11次具有最小間隔的盤繞。每框架所用的撓性管長度係與框架直徑成正比，假設每臂固定數量盤繞。

【0055】 在這情況下，上框架的出口以諸如撓性管從頂部到底部進行框架的盤繞之方式被連接至框架下方的入口。或者，對於流動還可以從底部至頂部或以水平流動。

【0056】 體積流動速率大約3 ml/min流經過試驗設施。

【0057】 在用於連續病毒去活化的裝置中對於滯留時間量測的實驗係使用在系統出口的UV量測進行。

【0058】 所用的追蹤劑物質為具有0.25 g/l濃度的維生素B12溶液，因為維生素B12吸收於280 nm波長的UV光及因此適合作為指示劑。

【0059】 首先，該裝置以蒸餾水沖洗。在時間點k，在病毒去活化的入口處該系統被切換至該追蹤劑溶液及開始記錄UV感測器的量測訊號(依此追蹤劑溶液的階梯函數(step function)被應用至該系統)。當在該系統的出口處的UV訊號對應至追蹤劑溶液的UV訊號時，實驗會被終止，因為該系統(從這時間點)係完全地被追蹤劑溶液充填及因此該系統對階梯函數的應答被全部記錄。

【0060】 產生本申請案的工作係在 **European Fund for Regional Development (EFRD)** 的範疇中資金援助協定“**Bio.NRW: MoBiDiK – 模制生物製造 – 一次性及連續的**”下受資助。

【符號說明】

【0061】 所用的參考標號為：

1 = 反應器(彎曲的及/或螺旋盤繞的管或撓性管)

2 = 具有45°至180°的角度 α 之盤繞軸之方向逆轉及/或彎曲2

3 = 框架

4 = 入口

5 = 出口

6 = 支持底座

7 = 腳

8 = 產物流線

a = 管壁

b = 在流動方向中管的軸方向

c = 徑方向

d = 在流動方向中等流動速度的線。

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

【序列表】(請換頁單獨記載)

無

申請專利範圍

- 1、一種產物流之連續病毒去活性之方法，該產物流係欲被去活化的產物流且係在具有 0.01 mm 至 6 mm 的低水力直徑之反應器(1)中，包含下述步驟：
 - a. 提供欲被去活化的產物流，
 - b. 設定病毒去活性條件，經由使用低pH、清潔劑、UV或熱處理，其中該低pH代表 $\text{pH} \leq 4$ ，
 - c. 將與產物流不互溶的分離介質引入產物流內以分段產物流，
 - d. 在一由反應器(1)形成的滯留區段中、在病毒-去活性條件下，使該來自c)的分段的產物流進料及通過，
 - e. 從該滯留區段流出。
- 2、根據申請專利範圍第1項之方法，其中，在步驟b)中，該產物流的pH被設至 ≤ 4 ，條件是欲被去活化的產物流的pH已不具有所需的pH。
- 3、根據申請專利範圍第1或2項之方法，其特徵在於欲被去活化的產物流為巨分子的溶液。
- 4、根據申請專利範圍第1或2項之方法，其進一步包含連續地分離出該分離介質之步驟f)。

圖式

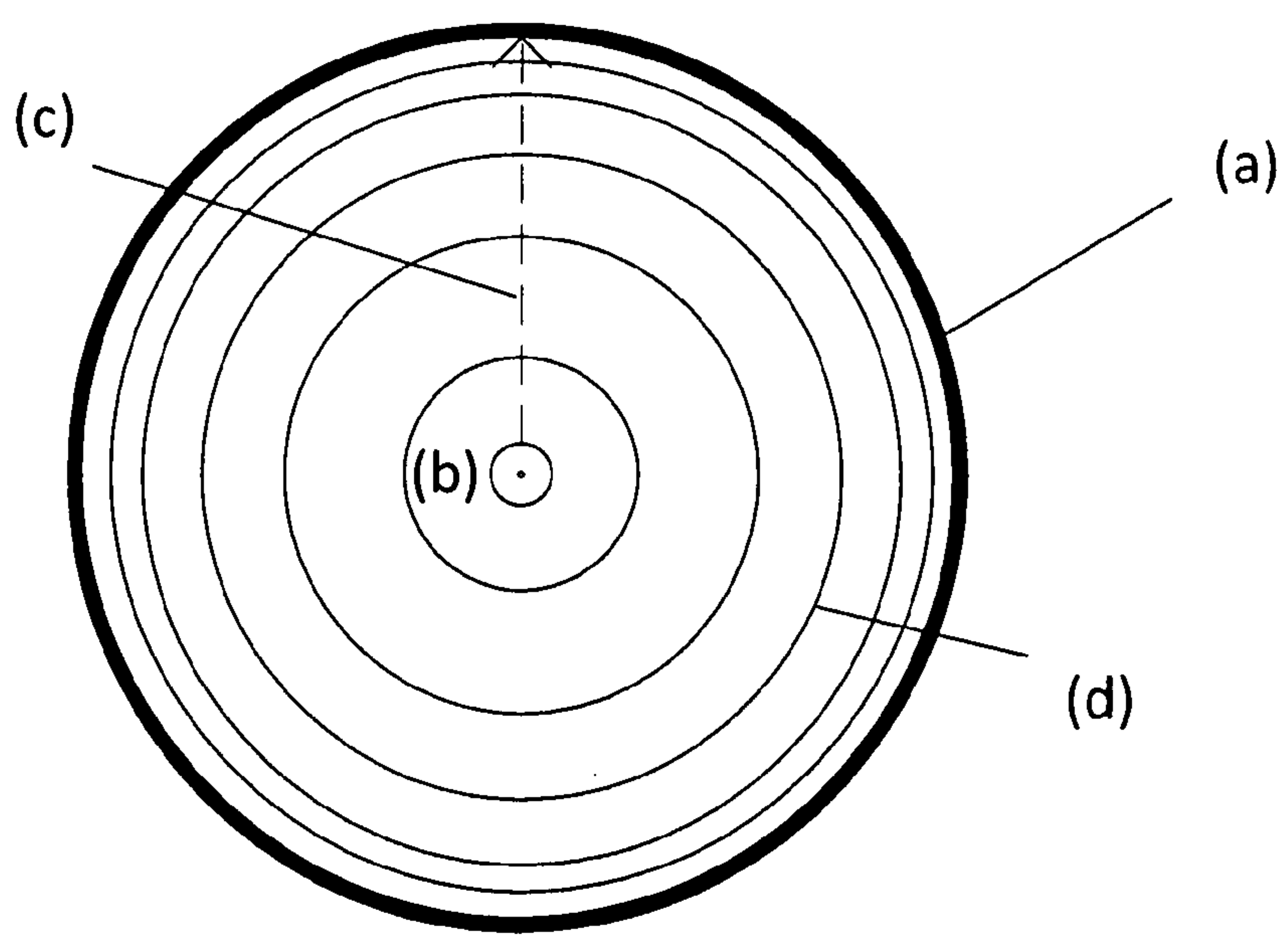
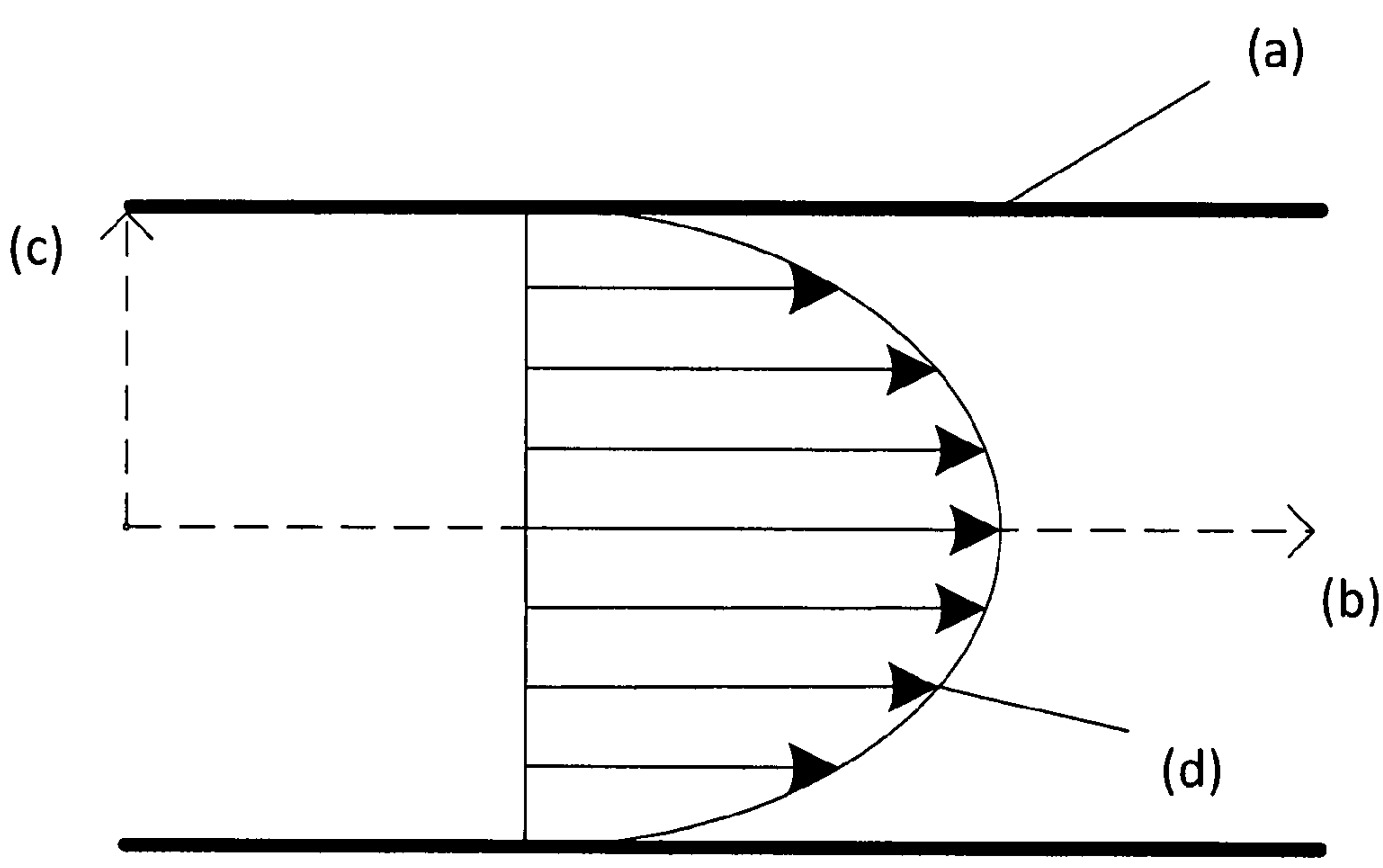


圖 1

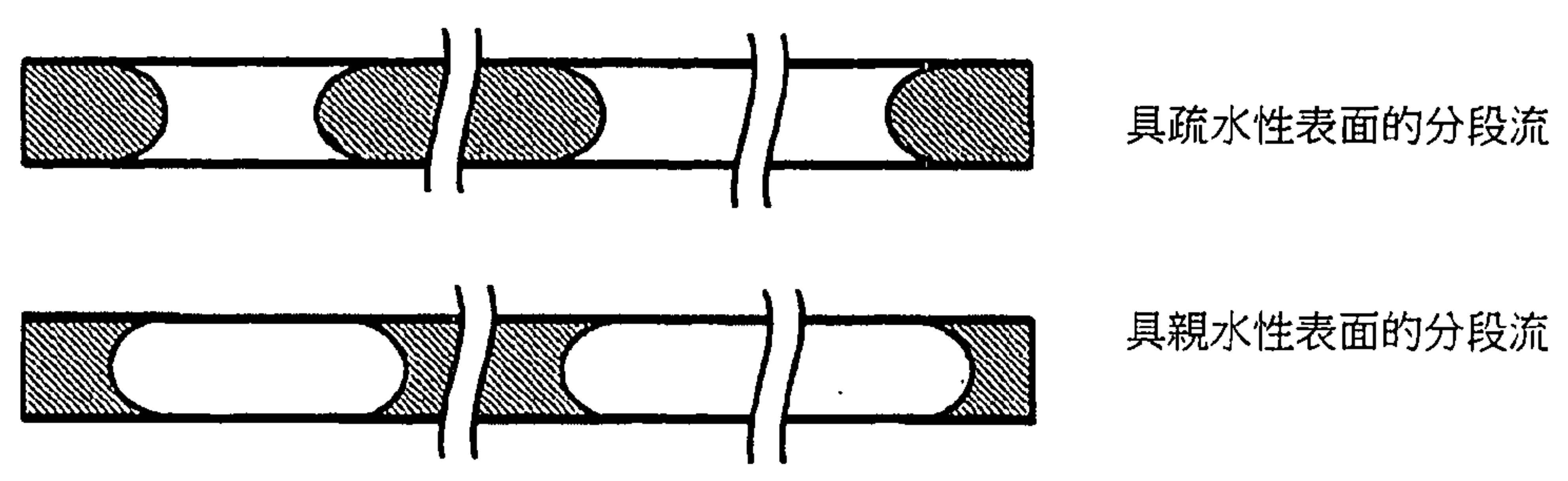


圖 2

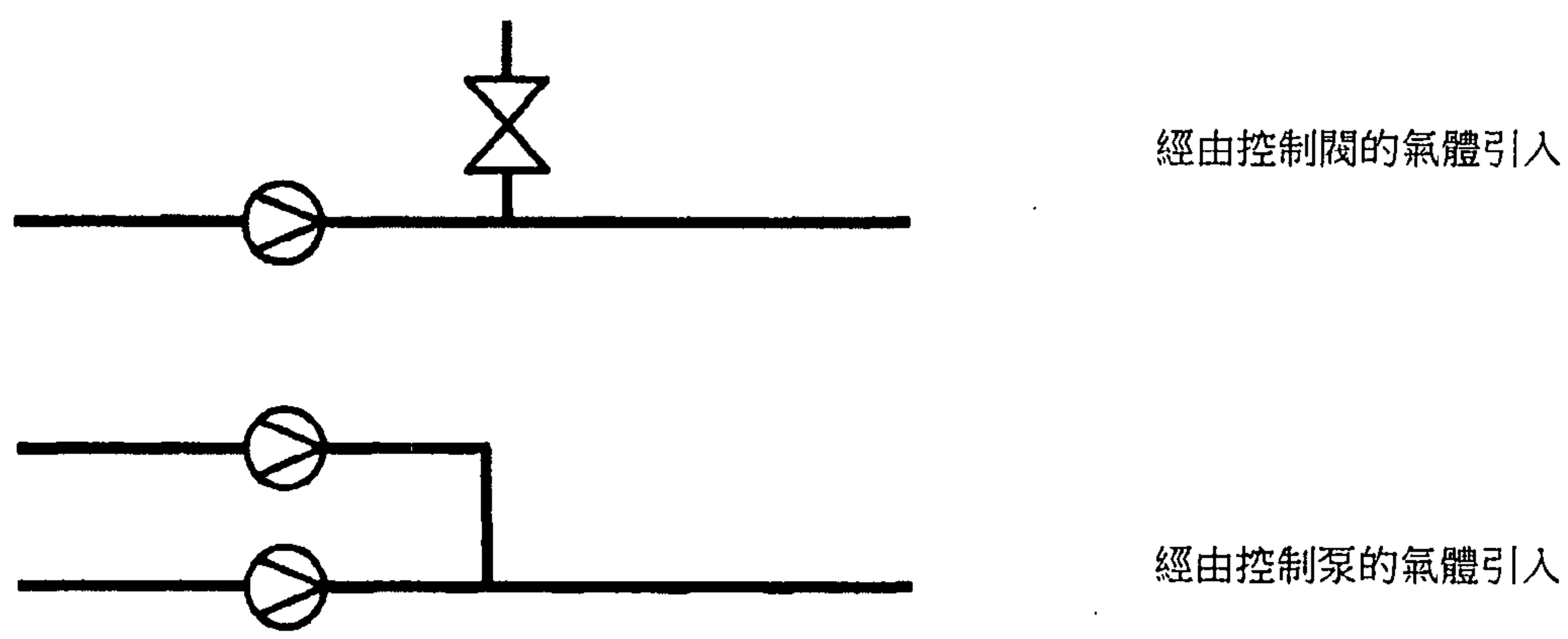


圖 3

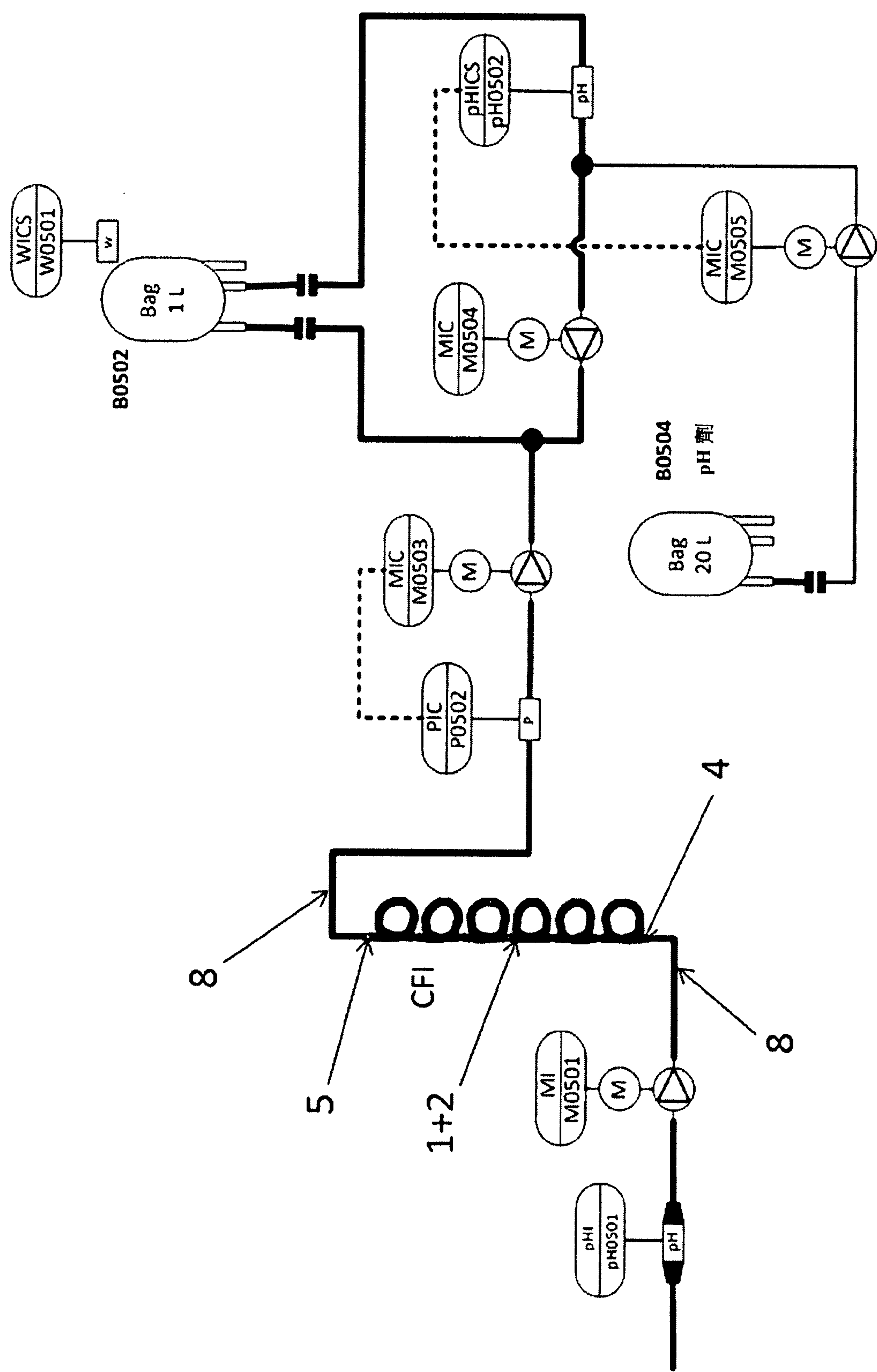


圖 4

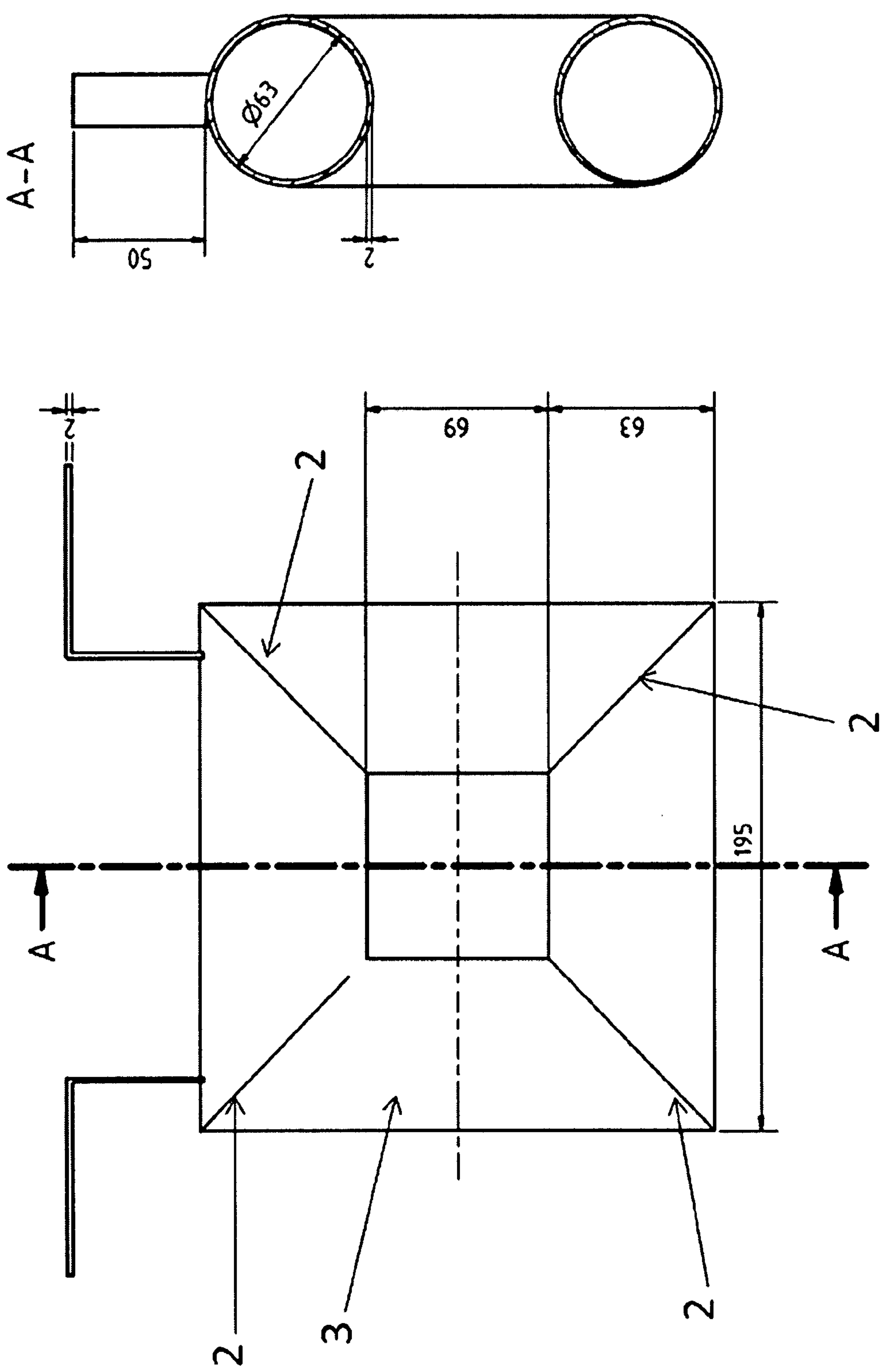


圖 5

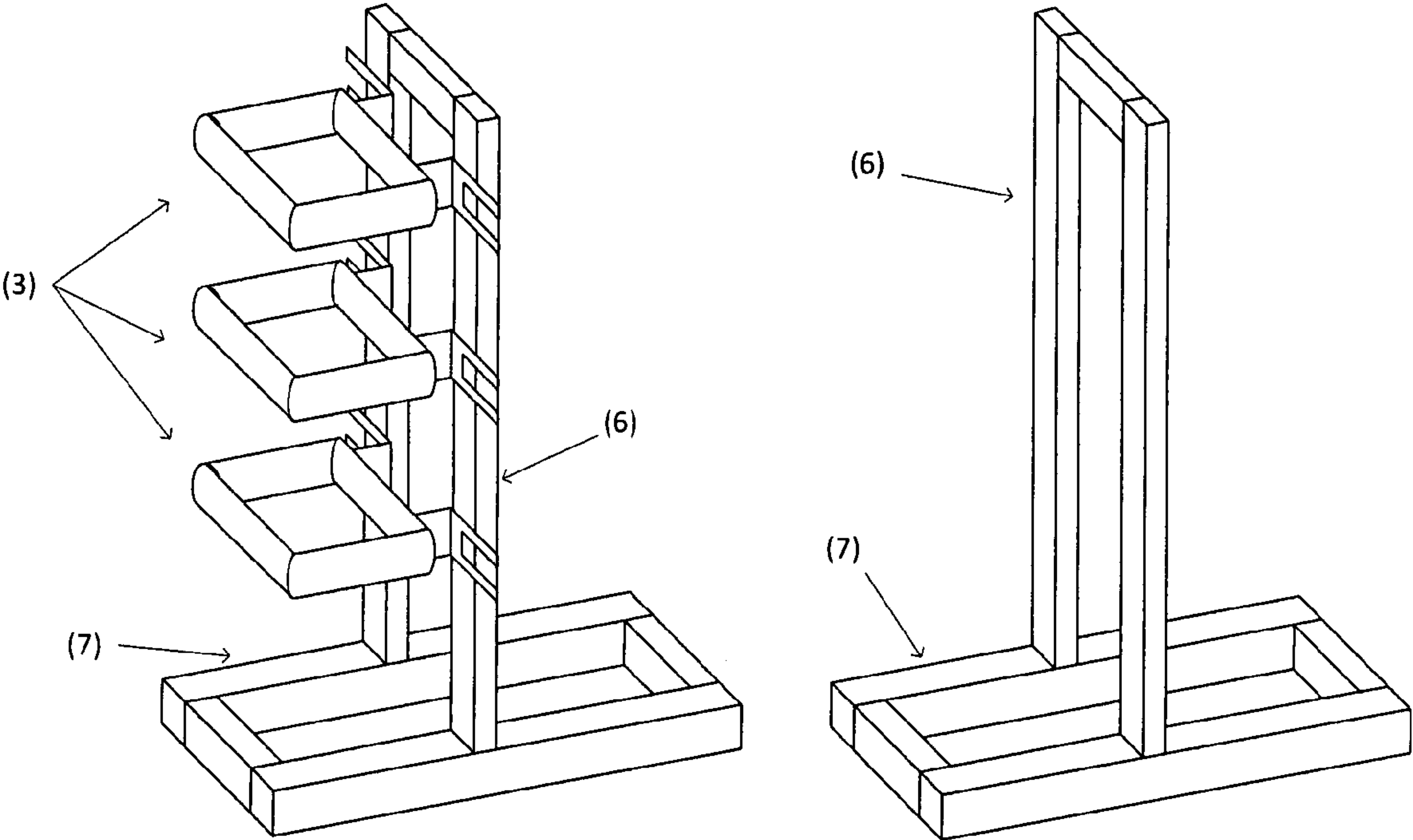


圖 6