

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044363**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2023.08.21

(21) Номер заявки

202191826

(22) Дата подачи заявки

2019.04.01(51) Int. Cl. **C12M 1/26 (2006.01)****C12M 1/36 (2006.01)****C12M 1/00 (2006.01)**

**(54) АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ КОМПЛЕКСНЫЕ НЕПРЕРЫВНЫЕ СИСТЕМА И
БИОПРОЦЕСС ДЛЯ ПРОДУКЦИИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО БЕЛКА**

(31) **201921003147**(32) **2019.01.25**(33) **IN**(43) **2021.12.31**(86) **PCT/IB2019/052654**(87) **WO 2020/152509 2020.07.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ЭНЗЕН БИОСАЙЕНСЕС ЛИМИТЕД
(IN)**

(72) Изобретатель:

**Бартаке Хришикеш, Гаджил
Химаншу, Банерджи Абир, Лондхе
Харшита, Бхори Абиджар, Бутти
Абхиджит, Варма Самир, Годсе Рохан,
Редди Вирендра (IN)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)(56) **WO-A2-2014137903**

RAHUL GODAWAT ET AL.: "End-to-end integrated fully continuous production of recombinant monoclonal antibodies", *JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 1 June 2015 (2015-06-01), XP055205966, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.06.393, page 2, right-hand column, line 13 - page 3, left-hand column, paragraph 1; figure 3 page 3, right-

hand column, last paragraph - page 7, left-hand column, paragraph 3; figure 5

Massimo Morbidelli: "End-to-end integrated Continuous Manufacture of Therapeutic Proteins", *Cell Culture & Downstream World Congress Munich*, 1 February 2017 (2017-02-01), pages 1-52, XP055622279, Retrieved from the Internet: URL: https://www.chromacon.com/resources/publications/media/kcfinder/files/ETHZ_end-end-mfg.pdf [retrieved on 2019-09-13] page 1, pages 17-18, pages 25,31, pages 43-46, page 50

FABIAN STEINEBACH ET AL.: "Continuous counter-current chromatography for capture and polishing steps in biopharmaceutical production", *BIOTECHNOLOGY JOURNAL*, vol. 11, no. 9, 1 September 2016 (2016-09-01), pages 1126-1141, XP055622293, DE, ISSN: 1860-6768, DOI: 10.1002/biot.201500354, figure 3

DANIEL J. KARST ET AL.: "Process performance and product quality in an integrated continuous antibody production process : Integrated Continuous Antibody Production Process", *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*, vol. 114, no. 2, 1 February 2017 (2017-02-01), pages 298-307, XP055622291, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.26069, page 300, left-hand column, last paragraph - right-hand column, line 2; figure 2 US-A1-2015353896

JAMES POLLOCK ET AL.: "Integrated continuous bioprocessing: Economic, operational, and environmental feasibility for clinical and commercial antibody manufacture", *BIOTECHNOLOGY PROGRESS*, vol. 33, no. 4, 2 June 2017 (2017-06-02), pages 854-866, XP055622207, ISSN: 8756-7938, DOI: 10.1002/btpr.2492, the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к системе автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса и биопроцессу, которые позволяют непрерывно производить терапевтический белок и масштабируются от лабораторного до промышленного масштаба. В настоящем изобретении предложены система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса и биопроцесс для продукции терапевтического белка, причем указанные система и процесс управляются одной или более системами управления, выбранными из системы (110) внешнего управления и сбора данных, пропорционально-интегрально-дифференциального регулирования (PID), программируемой логической схемы (PLC), промышленного ПК (IPC), распределенной системы управления (DCS) и системы ретрансляции сообщений, а также автоматизированный протокол при СЭЖХ/ВЭЖХ для анализа в ходе работы с целью запуска системы и процесса без перерывов и непрерывной продукции терапевтического белка.

B1**044363****044363 B1**

Область изобретения

Настоящее изобретение в целом относится к системе для непрерывного биопроцесса для получения терапевтического белка. В частности, настоящее изобретение относится к системе автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса и биопроцессу, которые позволяют непрерывно продуцировать терапевтический белок и масштабируются от лабораторного до промышленного масштаба.

Уровень техники

Описание уровня техники включает информацию, которая может быть полезна для понимания настоящего изобретения. Это не является признанием того, что какая-либо информация, представленная в настоящем документе, относится к предшествующему уровню техники или относится к заявленному в настоящее время изобретению, или что любая публикация, на которую приведена конкретная или неявная ссылка, представляет собой предшествующий уровень техники.

Определение значимости терапевтического белка привело к новой революции в биофармацевтической промышленности. Однако при производстве терапевтического белка обычно возникают его заряженные изоформы, которые в значительной степени мешают процессам выделения и очистки, необходимым для достижения высокого выхода и качества продукта.

Обычно терапевтические белки производят биофармацевтические компании с использованием периодических процессов, в которых единичные операции выполняют и завершают до того, как технологический поток перейдет к следующему этапу. В последнее время биофармацевтические компании используют непрерывные биопроцессы производства терапевтического белка. В непрерывном биопроцессе участвующие в процессе продукты перемещаются на следующий этап после завершения каждого единичного процесса. Непрерывный биопроцесс вызывает большой интерес из-за своих различных преимуществ, например, работы в равновесном режиме, малого размера оборудования, высокой объемной производительности, оптимизированного технологического потока, малого времени цикла и снижения капитальных затрат.

В существующем уровне техники предпринимались попытки получения терапевтического белка с использованием способов непрерывного биопроцесса. Однако такие существующие непрерывные биопроцессы представляют собой псевдонепрерывные процессы, содержащие автономные блоки, каждый из которых выполняет свою функцию. В таких системах каждая единичная операция имеет ограниченную связь между отдельными параметрами системы и работает в основном в изоляции. Кроме того, текущие непрерывные процессы в основном включают автономный хроматографический анализ с ограниченной или отсутствующей обратной связью с текущим процессом. По мере роста биофармацевтических компаний возникла неудовлетворенная потребность в создании автоматизированных комплексных биопроцессов и систем для производства терапевтического белка, которые можно масштабировать от лаборатории до уровня производства.

Задачи настоящего изобретения

Задачей настоящего изобретения является создание системы автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса для продукции терапевтического белка.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса для продукции терапевтического белка с использованием системы управления, оснащенной функцией связи и программируемого управления для регулирования всех параметров процесса с помощью главного контроллера.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса для продукции терапевтического белка, который может осуществляться постоянно и непрерывно.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение в некоторых аспектах относится к системе автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса для непрерывной продукции терапевтического белка с использованием системы управления, оснащенной функцией связи и программируемого управления для регулирования всех параметров процесса с помощью главного контроллера.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса для продукции терапевтического белка, содержащая:

биореактор (103) для культивирования клеток млекопитающих, способных продуцировать терапевтический белок, в культуральной среде, причем указанный биореактор (103) снабжен фильтром (109) с переменным тангенциальным потоком (ATF) для сбора материала, содержащего белок, секретируемый в культуральную среду;

первую хроматографическую систему (119), соединенную с системой (109) фильтрации ATF биореактора (103) без промежуточного сосуда для хранения, для очистки собранного рекомбинантного терапевтического белка и получения элюата белка А;

систему (126) инактивации вирусов, включающую (128) сосуд для инактивации вирусов, соединенный с первой хроматографической системой (119) для сбора элюата белка А и инактивации вирусов, которые могут присутствовать в элюате, и при этом сосуд (128) для инактивации вирусов выполнен с возможностью автоматического регулирования pH элюата белка А;

сосуд (136) для сбора, соединенный с сосудом (128) для инактивации вирусов через один или более фильтров для приема вирус-инактивированного, нейтрализованного и отфильтрованного элюата белка А, причем указанные один или более фильтров (224) и (226) выполнены с возможностью удаления примесей в виде осадков из элюата нейтрализованного белка А, полученного из сосуда для инактивации вируса;

вторую хроматографическую систему (137), соединенную с сосудом (136) для сбора, для приема отфильтрованного элюата белка А из сосуда (136) для сбора и получения дополнительно очищенного белка.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, необязательно дополнительно содержащая дополнительный сосуд (140) для сбора, соединенный со второй хроматографической системой (137), для приема и хранения очищенного белка, который может быть дополнительно очищен с использованием одного или более фильтров (142), и получения дополнительно очищенного терапевтического белка.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, дополнительно содержащая одну или более систем управления, выбранных из системы (110) внешнего управления и сбора данных (SCADA); пропорционально-интегрально-дифференциального регулирования (PID) (не показано); программируемой логической схемы (ПЛС, PLC) (112); промышленного ПК, распределенной системы управления (DCS) (не показана); модулей (130) ввода-вывода или блоков (132) ввода-вывода и, функционально связанных с отдельными системами, например, хроматографической системой 1 (119); системами (128) инактивации вирусов; сосудом (136) для сбора; хроматографической системой 2 (137); и системой ретрансляции сообщений (не показана).

В одном аспекте настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, дополнительно содержащая один или более из электромагнитных или пневматических пережимных клапанов (114) и, необязательно, состоящих из расходомеров, датчиков пузырьков воздуха, датчиков давления и нагрузочных отсеков для создания контура обратной связи для поддержания потока жидкости между различными компонентами системы, предотвращения образования пузырьков воздуха и регулирования потока жидкости.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, дополнительно содержащая перегрузочный мешок (116), соединенный с биореактором через один из пережимных клапанов (114).

В одном аспекте настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, содержащая сосуд (128) для инактивации вирусов, один или более из датчиков рН, соединенных с передатчиком рН, используемых для измерения рН элюата белка А, и автоматический титратор, включающий PLC и насосы (122), в свою очередь, соединенные с контейнерами (124), содержащими кислоту и основание, используемые для титрования, датчиками уровня для проверки уровня жидкости в сосуде и встроенными датчиками измерения мутности для измерения мутности в нефелометрических единицах (NTU) в реальном времени.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, в которой каждый из фильтров между сосудом для инактивации вирусов и сосудом для сбора представляет собой фильтр с размером пор 0,2-0,45 мкм.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, в которой сосуд для инактивации вирусов, сосуд для сбора и дополнительный сосуд для сбора изготовлены из стекла или нержавеющей стали.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, в которой первая хроматографическая система включает одну или более колонок для аффинной хроматографии, а вторая хроматографическая система включает одну или более мультимодальных анионообменных колонок и один или более катионообменных колонок.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, причем указанная система дополнительно включает систему (120) чистки на месте (CIP) для периодической чистки впускного отверстия хроматографической системы, сосуда для инактивации вирусов, сосуда для сбора и трубок для потока жидкости.

В одном аспекте настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, причем указанная система дополнительно включает автоматизированный отбор образцов полученного материала из биореактора для подсчета клеток и анализа питательных веществ, а также автоматизированный отбор образцов в различных местоположениях для хроматографического анализа в ходе работы во время непрерывного биопроцесса.

Настоящее изобретение в некоторых других аспектах относится к непрерывному биопроцессу для непрерывной продукции терапевтического белка, который можно масштабировать от лабораторного до промышленного масштаба.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс для продукции терапевтического белка, причем указанный процесс управляется одной или более системами управления, выбранными из системы (110) внешнего управления и сбора данных (SCADA), пропорционально-интегрально-дифференциального регулирования (PID), программируемой логической схемы (PLC), промышленного ПК (IPC), распределенной системы управления (DCS) и сис-

темы ретрансляции сообщений, и указанный процесс включает этапы:

(a) культивирование клеток млекопитающих, способных продуцировать терапевтический белок, в жидкой культуральной среде в биореакторе (103), снабженном фильтром (109) с переменным тангенциальным потоком (ATF), и сбор выделяющегося собираемого материала, содержащего белок, секретируемый в культуральную среду;

(b) подача собираемого материала клеточной культуры, содержащего терапевтический белок, из биореактора (103) в первую хроматографическую систему (119) для получения элюата белка А;

(c) подача элюата белка А из первой хроматографической системы (119) в сосуд (128) для инактивации вирусов и обеспечение возможности инактивации вирусов и нейтрализации элюата белка и нейтрализации элюата белка А;

(d) пропускание вирус-инактивированного и нейтрализованного элюата белка А через один или более фильтров для удаления примесей в виде осадка, образовавшегося во время этапов инактивации и нейтрализации вируса, и сбор отфильтрованного элюата белка А в сосуд (136) для сбора и;

(e) подача отфильтрованного элюата белка А во вторую хроматографическую систему (137) для получения очищенного белка.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс, необязательно дополнительно включающий хранение очищенного белка, полученного из второй хроматографической системы (137), в дополнительном сосуде (140). В одном аспекте настоящего изобретения предложен автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс, необязательно дополнительно содержащий один или более из этапов пропускания очищенного белка через один или более фильтров (142) для дальнейшей очистки терапевтического белка.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс, в котором клетки млекопитающих культивируют в биореакторе (103), представляющем собой перфузионный биореактор, в котором используется технология переменного тангенциального потока (ATF).

В одном аспекте настоящего изобретения предложен автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс, в котором собранный осветленный материал клеточной культуры непосредственно подают из биореактора (103) в первую хроматографическую систему (119) с использованием насоса первой хроматографической системы.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс, в котором первую хроматографию выполняют с использованием одной или более колонок для аффинной хроматографии для очистки собираемого материала клеточной культуры, содержащего терапевтический белок, из биореактора, и обеспечения получения элюата белка А.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс, в котором рН элюата белка А на этапе инактивации вирусов регулируется автоматически с помощью одного или более из пропорционально-интегрально-дифференциального (PID) контроллера, программируемого логического контроллера (PLC) или контроллера промышленного компьютера (IPC).

В одном аспекте настоящего изобретения предложен автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс, в котором этап второй хроматографии выполняют с использованием одной или более мультимодальных анионообменных колонок и одной или более катионообменных колонок, соответственно, для получения очищенного белка.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс, причем указанный процесс включает автоматический отбор образцов для анализа в ходе работы и чистку на месте с использованием системы (CIP) (120) для периодической чистки хроматографических систем, трубок и сосудов с целью поддержания непрерывности работы.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс, в котором продуцируемый терапевтический белок выбран из антитела, фрагмента антитела, моноклонального антитела, фермента, рекомбинантного белка, сконструированного белка, иммуногенного белка, фрагмента белка, пептида, иммуноглобулина или любой их комбинации.

Различные объекты, особенности, аспекты и преимущества предмета изобретения станут более очевидными из следующего подробного описания предпочтительных вариантов реализации.

Краткое описание чертежей

Сопроводительные чертежи приведены для дополнительного понимания настоящего изобретения, включены в настоящее раскрытие и составляют часть его описания. Чертежи иллюстрируют типичные варианты реализации настоящего изобретения и вместе с описанием служат для объяснения принципов настоящего изобретения.

Фиг. 1 иллюстрирует типичную последовательность операций для предшествующего процесса.

Фиг. 2 иллюстрирует типичную последовательность операций для последующего процесса.

Фиг. 3 представляет собой схему, на которой показан общий вид системы автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса для продукции терапевтического белка.

Фиг. 4 представляет собой схему, на которой показан обзор системы инактивации вирусов в составе системы автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса для продукции терапевтическо-

го белка.

Фиг. 5 представляет собой схему, на которой показан общий вид СР-системы хроматографии 1 в составе системы автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса для продукции терапевтического белка.

Фиг. 6 представляет собой график, на котором показано влияние лактозы по сравнению с глюкозой на рост клеток в различные дни.

Фиг. 7 представляет собой хроматограмму хроматографической системы 1, на котором показаны пик рН, пик элюирования и пик проводимости.

Фиг. 8 представляет собой хроматограмму хроматографической системы 2, на котором показаны пик элюирования, пик элюата и пик проводимости.

Подробное описание изобретения

Ниже приведено подробное описание вариантов реализации настоящего изобретения. Варианты реализации подробно настолько, чтобы ясно описывать настоящее изобретение. В то же время количество предлагаемых подробностей не предназначено для ограничения ожидаемых изменений вариантов реализации; напротив, целью является охват всех модификаций, эквивалентов и альтернатив, подпадающих под сущность настоящего изобретения, определенную прилагаемой формулой изобретения.

Все публикации включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка были специально и по отдельности указаны как включенные посредством ссылки. Если определение или использование термина во включенном источнике не согласуется или противоречит определению этого термина, приведенному в настоящем документе, используют определение этого термина, приведенное в настоящем документе, а определение этого термина в источнике не применяется.

В настоящем изобретении упоминание "одного варианта реализации" или "варианта реализации" означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в связи с этим вариантом реализации, включены по меньшей мере в один вариант реализации. Таким образом, появление выражений "в одном варианте реализации" или "в варианте реализации" в различных местах настоящего описания не обязательно относится к одному и тому же варианту реализации. Кроме того, конкретные особенности, структуры или характеристики можно объединять любым подходящим образом в одном или более из вариантов реализации.

В некоторых вариантах реализации следует понимать, что числа, выражающие количества ингредиентов, свойства, такие как концентрация, условия реакции и т.д., используемые для описания и включения определенных вариантов реализации изобретения в его формулу, в некоторых случаях модифицированы термином "приблизительно". Соответственно, в некоторых вариантах реализации численные параметры, изложенные в письменном описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приближенными и могут варьироваться в зависимости от желательных свойств, которые должны быть получены с помощью конкретного варианта реализации. В некоторых вариантах реализации численные параметры следует интерпретировать в свете количества зарегистрированных значащих цифр и с применением обычных методов округления. Несмотря на то, что численные диапазоны и параметры, определяющие широкие рамки некоторых вариантов реализации изобретения, являются приближенными, численные значения, изложенные в конкретных примерах, приведены настолько точно, насколько это практически возможно. Численные значения, представленные в некоторых вариантах реализации изобретения, могут содержать определенные ошибки, обусловленные наличием стандартного отклонения, обнаруженного в соответствующих испытательных измерениях.

В настоящем документе и во всей формуле изобретения формы единственного числа включают формы множественного числа, если иное явным образом не следует из контекста. Кроме того, в настоящем документе предлог "в" включает "в" и "на", если иное явным образом не следует из контекста.

Если иное явным образом не следует из контекста, во всем нижеследующем описании слово "содержать" и его формы, например, "содержит" и "содержащий", следует толковать в открытом, включительном смысле, как "включающий, но не ограничивающийся".

Перечисление диапазонов значений в настоящем документе предназначено для использования в качестве сокращенного способа индивидуального упоминания каждого определенного значения, попадающего в этот диапазон. Если в настоящем документе не указано иное, каждое отдельное значение включено в описание настоящего изобретения, как если бы оно было отдельно указано в настоящем документе.

Все способы, описанные в настоящем документе, можно выполнять в любом подходящем порядке, если иное не указано в настоящем документе или не противоречит контексту явным образом. Использование всевозможных примеров или фраз, подразумевающих использования примера (например, "такой, как"), представленных в отношении определенных вариантов реализации в настоящем документе, предназначено для лучшего освещения настоящего изобретения и не налагает ограничения на сущность изобретения, определяемую формулой изобретения. Никакие формулировки в описании настоящего изобретения не следует интерпретировать как указывающие на какой-либо элемент, не включенный в формулу изобретения и существенный для практической реализации изобретения.

Группировки альтернативных элементов или вариантов реализации изобретения, описанных в на-

стоящем документе, не следует рассматривать как ограничения. Каждого члена группы можно упоминать или включать в формулу изобретения по отдельности или в любой комбинации с другими членами группы или другими элементами, найденными в настоящем документе. Одного или более членов группы можно включать в группу или удалять из нее по причинам удобства и/или патентоспособности. При любом таком включении или удалении считается, что описание в настоящем документе содержит группу в том виде, в котором она была модифицирована, за счет чего соблюдаются требования письменного описания.

Нижеследующее описание и описанные в настоящем документе варианты реализации предоставлены в качестве иллюстрации примера или примеров конкретных вариантов реализации принципов и аспектов настоящего изобретения. Эти примеры предоставлены с целью разъяснения, а не ограничения этих принципов и настоящего изобретения.

Кроме того, следует принимать во внимание, что настоящее изобретение можно реализовать множеством способов, в том числе в виде системы, способа или устройства. В настоящем описании эти варианты реализации или любая другая форма, которую может принять изобретение, могут называться процессами. В общем случае порядок этапов описанных процессов можно изменять в пределах сущности изобретения.

Заголовки и реферат настоящего изобретения, представленные в настоящем документе, предназначены исключительно для удобства, а не интерпретации сущности или значения вариантов реализации.

В нижеследующем обсуждении представлены многие типичные варианты реализации предмета изобретения. Хотя каждый вариант реализации представляет собой единственную комбинацию элементов настоящего изобретения, считается, что предмет настоящего изобретения включает все возможные комбинации описанных элементов. Таким образом, если один вариант реализации содержит элементы А, В и С, а второй вариант реализации содержит элементы В и D, то считается, что предмет изобретения содержит и другие оставшиеся комбинации А, В, С или D, даже если они не описаны явным образом.

Ниже показаны различные термины, используемые в настоящем документе. Если определение термина, используемого в формуле изобретения, не приведено ниже, ему следует давать самое широкое определение, принятое для этого термина специалистами в соответствующей области техники, как это отражено в печатных публикациях и патентах, выданных на момент подачи заявки.

В настоящем документе термин "непрерывный биопроцесс" относится к любому процессу, включающему два или более последовательных этапа обработки, при этом выход предыдущего этапа (единичной операции) постоянно передается на следующий этап (единичную операцию) до заключительного этапа хроматографии, причем необязательно, чтобы предыдущий этап обработки завершался до начала следующего этапа обработки. В непрерывном процессе некоторая часть целевого продукта всегда проходит через систему обработки. В идеале непрерывный процесс регулируется таким образом, чтобы каждый этап или единичная операция в рамках непрерывного процесса выполнялись в максимально возможной степени одновременно и по существу с одинаковой производительностью. Таким образом, достигается максимальное сжатие времени цикла и минимально возможное время завершения.

Термин "непрерывная передача" относится к потоку продукта, перемещающемуся от предыдущей единичной операции к следующей единичной операции, и означает, что соединения или связи между двумя единичными операциями таковы, что предыдущая единичная операция передает поток продукта (напрямую или через другие компоненты) второй (следующей) единичной операции, и что следующая единичная операция начинается до завершения предыдущей единичной операции (т.е. две последовательных единичных операции обрабатывают потоки продуктов, текущие в них одновременно, по меньшей мере для части хода общего процесса, в состав которого входят две указанные единичные операции).

В настоящем документе термин "перфузионный процесс культивирования клеток" относится к перфузионному культивированию, осуществляемому путем непрерывной подачи свежей среды в биореактор и постоянного удаления бесклеточной отработанной среды при удержании клеток в реакторе; таким образом, в перфузионных культурах можно получать более высокую плотность клеток по сравнению с непрерывными культурами, поскольку клетки удерживаются в реакторе с помощью устройства удержания клеток. Скорость перфузии зависит от потребности линии клеток, концентрации питательных веществ в подаваемой среде и уровня накопления токсичных веществ.

Термин "среда для культивирования клеток" относится ко всем видам сред, используемым в контексте культивирования клеток. Обычно среда для культивирования клеток содержит аминокислоты, по меньшей мере один углевод в качестве источника энергии, микроэлементы, витамины, соли и, возможно, дополнительные компоненты (например, для влияния на рост и/или продуктивность клеток и/или качество продукта).

Термин "терапевтический белок" означает рекомбинантный белок, в достаточной степени очищенный от загрязняющих белков, липидов и нуклеиновых кислот, присутствующих в жидкой культуральной среде, и биологических загрязнителей (например, вирусных и бактериальных загрязнителей), или выделенный из клетки-хозяина (например, млекопитающих, дрожжей или бактерий), который можно включать в фармацевтический продукт для лечения или профилактики различных заболеваний или устройств. Типичные примеры терапевтических белков включают антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, фермент, сконструированный белок, иммуногенный белок, фрагмент белка и имму-

ноглобулин, но не ограничиваются ими.

Термин "антитело" относится к функциональному компоненту сыворотки и часто обозначается как совокупность молекул (антитела или иммуноглобулины, фрагменты и т.д.), либо как молекула. Молекула антитела способна связываться со специфической антигенной детерминантой или реагировать с ней, что, в свою очередь, может приводить к специфическому иммунологическому эффекту или механизмам.

Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, продуцируемому единственным клоном клеток или линией клеток и состоящему из идентичных молекул антител.

В настоящем документе термин "время удерживания" относится к времени, в течение которого половина количества растворенного вещества элюируется из хроматографической системы. Оно определяется длиной колонки и скоростью миграции растворенного вещества и может находиться в диапазоне от 1 до 30 мин.

В настоящем документе термин "элюат" относится к жидкости, элюируемой из хроматографической колонки или хроматографической мембраны и содержащей обнаружимое количество рекомбинантного терапевтического белка.

В настоящем изобретении используются различные сокращения, расшифровка которых приведена ниже:

ATF: чередующийся тангенциальный поток;
 CV: объем колонки;
 CEX: катионообменная (CEX) хроматография;
 CIP: очистка на месте;
 DO: растворенный кислород;
 DCS: распределенная система управления;
 ВЭЖХ: высокоэффективная жидкостная хроматография;
 ППК: промышленный ПК;
 мин: минуты;
 mM: миллимолярный;
 mAU: миллиединицы оптической плотности;
 мл: миллилитр;
 мСм/см: миллисименс/сантиметр;
 mA: миллиамперы;
 NTU: нефелометрическая единица мутности;
 NaOH: гидроксид натрия;
 PLC: программируемая логическая схема;
 PCC: периодический противоток;
 PID: пропорционально-интегрально-дифференциальное регулирование;
 RV: объем реактора;
 TTL: транзисторно-транзисторная логическая схема;
 УФ: ультрафиолет;
 СЭЖХ: сверхэффективная жидкостная хроматография;
 VI: инактивация вирусов;
 V: вольты;
 VCC: количество жизнеспособных клеток.

Настоящее изобретение в некоторых вариантах реализации относится к системе автоматизированного комплексного биопроцесса для непрерывной продукции терапевтического белка, управляемой системой управления, оснащенной функциями связи и программируемого управления для регулирования всех параметров процесса с использованием главного контроллера.

Настоящее изобретение будет более конкретно описано для следующих вариантов реализации с упоминанием комплексной автоматизированной системы для непрерывной продукции терапевтического белка.

На фиг. 3 показана представительная автоматизированная комплексная система для непрерывной продукции терапевтического белка в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения, описанным ниже в настоящем документе:

Автоматизированная комплексная система (100) для непрерывной продукции терапевтического белка включает:

биореактор (103) для культивирования клеток млекопитающих, способных продуцировать терапевтический белок в культуральной среде, причем биореактор (103) оснащен мешалкой (102) с присоединенными лопастями (105), входным отверстием (104) для подачи и оснащен перфузионным фильтром (109) с переменным тангенциальным потоком (ATF) для сбора собираемого материала, содержащего белок, секретируемый в культуральную среду в биореакторе;

первую хроматографическую систему (119), соединенную с системой ATF-фильтрации биореактора (103) без промежуточного сосуда для хранения для очистки рекомбинантного терапевтического белка, продуцируемого культивируемыми клетками млекопитающих, от культуральной среды, и получения

элюата белка А;

систему (126) инактивации вирусов, включающую сосуд (128) для инактивации вирусов, соединенный с первой хроматографической системой (119) для сбора элюата белка А и инактивации вирусов, которые могут присутствовать в элюате белка А, причем сосуд (128) для инактивации вирусов выполнен с возможностью автоматической регулировки рН элюата белка А;

сосуд (136) для сбора, соединенный с сосудом (128) для инактивации вирусов через один или более фильтров, для приема нейтрализованного элюата белка А из сосуда (128) для инактивации вирусов после прохождения нейтрализованного элюата белка А через один или более фильтров для удаления примесей в виде осадков из элюата белка А;

вторая хроматографическая система (137), соединенная с сосудом (136) для сбора, для приема нейтрализованного и отфильтрованного элюата белка А из сосуда (136) для сбора и получения очищенного белка.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, необязательно дополнительно содержащая дополнительный сосуд (140) для сбора, соединенный со второй хроматографической системой (137), для приема и хранения очищенного белка, который может быть дополнительно очищен с использованием одного или более фильтров (142), и получения дополнительно очищенного терапевтического белка.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, дополнительно содержащая одну или более систем управления, выбранных из системы (110) внешнего управления и сбора данных (SCADA); пропорционально-интегрально-дифференциального регулирования (PID) (не показано); программируемой логической схемы (PLC), промышленного ПК (IPC), распределенной системы управления (DCS) (не показана); модулей ввода-вывода или блоков ввода-вывода (130) и (132), функционально связанных с отдельными системами, включая хроматографическую систему 1 (119); системы (126) инактивации вирусов; сосуд (136) для сбора; хроматографическую систему 2 (137); и системы ретрансляции сообщений (не показана).

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, дополнительно содержащая один или более из электромагнитных или пневматических пережимных клапанов (114) и, необязательно, содержащая расходомеры, датчики пузырьков воздуха, датчики давления и грузовые отсеки для создания контура обратной связи для поддержания потока жидкости между различными компонентами системы, предотвращения образования пузырьков воздуха и регулирования потока жидкости.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, дополнительно содержащая перегрузочный мешок (116), соединенный с биореактором через один из пережимных клапанов (114).

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, содержащая систему (126) инактивации вирусов, включающую сосуд (128) для инактивации вирусов, один или более из датчиков рН, соединенных с передатчиком рН, используемые для измерения рН элюата белка А, и автоматический титратор, включающий PLC и насосы (122), в свою очередь, соединенные с контейнерами, содержащими кислоту и основание, используемые для титрования (124), необязательно содержащая датчики уровня для проверки уровня жидкости в сосуде и встроенными датчиками измерения мутности для измерения мутности в нефелометрических единицах (NTU) в реальном времени.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, в которой каждый из фильтров между сосудом для инактивации вирусов и сосудом для сбора представляет собой фильтр с размером пор 0,2-0,45 мкм.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, в которой первая хроматографическая система включает одну или более колонок для аффинной хроматографии, а вторая хроматографическая система включает одну или более мультимодальных анионообменных колонок и один или более катионообменных колонок.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, в которой сосуд для инактивации вирусов, сосуд для сбора и дополнительный сосуд для сбора изготовлены из стекла или нержавеющей стали.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, в которой поток жидкости поддерживают с помощью трубок, изготовленных из подходящего материала, например, силикона и биопрена. В одном варианте реализации используемые разъемы представляют собой асептические разъемы для уменьшения бионагрузки на систему.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, причем указанная система дополнительно включает систему (120) чистки на месте (CIP) для периодической чистки хроматографической системы, сосуда для инактивации вирусов, сосуда для сбора и трубок.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена система автоматизированного

комплексного непрерывного биопроцесса, причем указанная система дополнительно включает автоматизированный отбор образцов полученного материала из биореактора для подсчета клеток и анализа питательных веществ, а также автоматизированный отбор образцов в различных местоположениях для хроматографического анализа в ходе работы во время непрерывного биопроцесса.

В одном варианте реализации система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса необязательно содержит системы (108) и (138) сверхэффективной жидкостной хроматографии (СЭЖХ). В некоторых вариантах реализации первая и вторая хроматографические системы, используемые в настоящем изобретении, могут представлять собой системы жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ). В еще одном варианте реализации система обеспечивает возможность встраивания/системы анализа с использованием автоматизированной системы пробоотбора. Контроллер запускает системы ВЭЖХ для запуска анализа с использованием подходящего одного или более цифровых интерфейсов, выбранных из Open Platform Communications (OPC), Modbus TCP/IP, EtherCAT, Profibus, Profinet, profibus и промышленного интерфейса Ethernet, но не ограничивающихся ими.

В одном варианте реализации контроллер регулирует многопортовый электрический поворотный клапан или клапаны выбора потока для регулирования потока жидкости. Контроллер регулирует запуск прецизионного насоса и открывает клапан отверстия биореактора для пробоотбора. Происходит сбор запрограммированного количества жидкости, и система ВЭЖХ выполняет анализ. Система ВЭЖХ выполняет анализ в соответствии с установленной программой. Система ВЭЖХ отправляет данные анализа в систему SCADA.

В еще одном варианте реализации главный контроллер, состоящий из IPC с программным обеспечением SCADA, управляет визуализацией данных, мониторингом и выступает в качестве архиватора параметров процесса. Главный контроллер связан с отдельными системами, например, биореактором, первой хроматографической системой, второй хроматографической системой и системой инактивации вирусов с использованием одного или более из цифровых интерфейсов, выбранных из OPC, modbus TCP/IP, EtherCAT, profinet, profibus или промышленного Ethernet, но не ограничивающихся ими.

На фиг. 4 показан общий вид системы инактивации вирусов в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения. Система (200) инактивации вирусов содержит сосуд (201) для инактивации вирусов (VI), сделанный из стекла или нержавеющей стали, для сбора элюата белка А, поступающего из первой хроматографической системы. Сосуд VI (201) содержит верхнюю мешалку/магнитную мешалку (216) с множеством портов для добавления и удаления элюата. Система инактивации вирусов содержит датчик (220) pH, соединенный с передатчиком для измерения pH элюата белка А, полученного из первой хроматографической системы. Система дополнительно необязательно содержит грузовые отсеки (202), (206), (208), (210), (212) и (214) для хранения различных жидкостей, например, кислоты, основания, NaOH, воды и буферов. Система дополнительно содержит фильтры (224) и (226) с размером пор 0,2-0,45 мкм для удаления осадков, которые могли образоваться во время этапа нейтрализации. Система может дополнительно включать датчики (250-1)-(250-3) потока для мониторинга потока различных жидкостей в сосуд (201) VI и сосуд для сбора (230). Система может также включать датчик(и) уровня для проверки уровня жидкости в сосуде VI и датчики нагрузочных отсеков (248-1)-(248-6) для мониторинга уровня жидкости в соответствующих нагрузочных отсеках. В системе управления предусмотрена возможность автоматического переключения пути прохождения жидкости между двумя фильтрами, если один из фильтров засоряется во время непрерывной работы, которая может быть основана на использовании датчиков (256-1) и (256-2) давления или переключателя. Система может подавать сигнал тревоги при засорении и переключении фильтров для вмешательства оператора. Система может дополнительно содержать датчик (254) мутности после сосуда для инактивации для измерения мутности в нефелометрических единицах (NTU). При превышении порогового значения система подаст сигнал тревоги для вмешательства оператора. Дополнительный датчик (252) пузырьков воздуха, присоединенный к пути прохождения жидкости после сосуда для инактивации вируса, может переключать пути прохождения жидкости для предотвращения попадания пузырьков воздуха в хроматографическую систему. Ловушка для воздушных пузырьков (не показана) предотвращает попадание пузырьков воздуха в хроматографические системы. Сосуд для инактивации вирусов (VI) специально разработан для аккуратного добавления воды, элюата, кислоты, основания и буфера(ов) во избежание пенообразования и разбрызгивания жидкостей. Система состоит из сосуда (230) для сбора, который является сосудом для сбора элюата после инактивации вирусов. Сосуд (230) для сбора содержит верхнюю мешалку/магнитную мешалку (236) с множеством портов для добавления и удаления различных жидкостей и элюата.

В одном варианте реализации система инактивации вирусов содержит различные датчики для мониторинга и регулирования системы инактивации вирусов в непрерывном и автоматическом режиме без перерывов.

В одном варианте реализации система инактивации вирусов необязательно содержит датчики уровня или датчики нагрузочных отсеков, выбранные из датчиков (248-1) для мониторинга уровня кислоты, (248-2) для мониторинга уровня основания, (248-3) для мониторинга уровня NaOH, (248-4) для мониторинга уровня воды, (248-5) и (248-6) для мониторинга уровня буферов, но не ограничивающиеся ими.

В одном варианте реализации система инактивации вирусов необязательно включает датчики пото-

ка для контроля потока различных жидкостей в сосуд (201) VI и сосуд для сбора (230), причем датчики потока выбраны из датчиков (250-1) для мониторинга потока кислоты, (250-2) для мониторинга потока основания и (250-3) для мониторинга потока NaOH, воды и буферов, но не ограничиваются ими.

В одном варианте реализации система инактивации вирусов функционально подключена к главному контроллеру, например, PID, PLC или IPC, для измерения и контроля pH в реальном времени. Блок управления запрограммирован на несколько параметров, например, заданное значение pH, время выдержки, количество оборотов мешалки в минуту, контроль скорости насоса кислоты и щелочи, контроль цикла CIP. Система инактивации вирусов управляется различными способами, которые выбраны из различных настроек (238), основного источника (240) питания, автоматического или ручного выбора режима (242), подачи сигнала тревоги (244), калибровки (258), а также завершения работы системы (246), но не ограничиваются ими. Контроллер подает сигналы различным исполнительным механизмам в системе, например, клапанам (222-1)-(222-10) и насосам (204-1)-(204-5), для регулирования потока жидкости, а также контроля добавления кислоты и основания к элюату белка А для регулирования pH.

В одном варианте реализации контроллер принимает и отправляет сигналы от хроматографических систем, например, аналоговые сигналы, например, 0-10 В или 4-20 мА, или цифровые сигналы от логических схем TTL или одного или более из более продвинутых интерфейсов, выбранных из OPC, Modbus TCP/IP, EtherCAT, Profibus, Profinet, profibus и промышленного Ethernet, но не ограничивающихся ими. Сигнал от первой хроматографической системы запускает программу инактивации вирусов. Передатчик измеряет сигнал, генерируемый датчиком (220) pH, и передает значения на главный контроллер. Система автоматически регулирует pH элюата на основе заданных значений в контроллере, который активирует добавление кислоты (202) или основания (206), после чего следует время выдержки для этапа инактивации вирусов. По завершении времени выдержки для инактивации вирусов и доведения pH до заданного значения 2 система перекачивает элюат после инактивации вирусов из сосуда для инактивации вирусов (201) в сосуд для сбора (230). Пути прохождения жидкости контролируются в цифровом виде с помощью нормально закрытых электромагнитных/пневматических пережимных клапанов (222-1)-(222-3), которые блокируют и отводят поток жидкости по мере необходимости.

В одном варианте реализации после переноса элюата белка А из сосуда для инактивации вирусов в сосуд для сбора контроллер отправляет сигналы во вторую хроматографическую систему, например, аналоговые сигналы, например 0-10 В или 4-20 мА, или цифровые сигналы от логических схем TTL или одного или более из более продвинутых цифровых интерфейсов, выбранных из OPC, modbus TCP/IP, EtherCAT, Profibus, Profinet, profibus и промышленного Ethernet, но не ограничивающихся ими. Механизм запуска инициирует загрузку элюата из сосуда для сбора во вторую хроматографическую систему для дальнейшей очистки элюата белка А и получения очищенного белка.

В одном варианте реализации контроллер инициирует цикл CIP в сосуде для инактивации вирусов. В сосуде VI во время цикла CIP контроллер подает сигнал о запуске насоса (204-4) и открывает клапан (222-5) для потока NaOH из нагрузочного отсека (208). Мониторинг потока NaOH в сосуд VI осуществляется датчиком потока (250-3) и регулируется насосом (204-4). По истечении заданного времени, отрегулированного с помощью средства установки времени (218) выдержки для выдержки NaOH в сосуде VI, контроллер подает сигнал насосу (204-3) для отхода на удаление NaOH из сосуда VI и открывает клапан (222-4) отхода для отвода отходов (228). Опорожнение сосуда VI от NaOH запускает датчик (252) пузырьков воздуха, который отправляет сигнал на контроллер и останавливает насос (252) отходов (204-3) и его клапан (222-4), в качестве альтернативы, если датчик пузырьков воздуха отсутствует, контроллер также можно запрограммировать на запуск насоса на заданное время, пока сосуд не будет опорожнен. Затем контроллер подает сигнал насосу (204-4) о запуске и открывает клапан (222-6), позволяя воде течь из нагрузочного отсека (210) и регулируя поток воды через клапан (222-6), контролируемый датчиком (250-3) и управляемый насосом (204-4), в сосуд VI (201). По истечении заданного времени для выдержки воды в сосуде VI контроллер подает сигнал насосу отходов (204-3), чтобы удалить воду из сосуда VI и открыть клапан отходов (222-4) воды. Опорожнение сосуда VI от воды запускает датчик (252) пузырьков воздуха, который отправляет сигнал на контроллер и останавливает насос (204-3) отходов и его клапан (222-4), в качестве альтернативы, если датчик пузырьков воздуха отсутствует, контроллер также можно запрограммировать на запуск насоса на заданное время, пока резервуар не будет опорожнен. Затем контроллер подает сигнал насосу о запуске и открывает клапан (222-7), инициируя поток буфера из нагрузочного отсека (212). Сигнал опорожнения сосуда VI от буфера запускается первой хроматографической системой по готовности белка А к загрузке в сосуд VI. Контроллер принимает этот сигнал, включает насос отходов для удаления буфера из сосуда VI и открывает клапан отходов (222-4). Опорожнение сосуда VI от буфера запускает датчик (252) пузырьков воздуха, который отправляет сигнал на контроллер и останавливает насос отходов (204-3) и его клапан (222-4), в качестве альтернативы, если датчик пузырьков воздуха отсутствует, контроллер также можно запрограммировать на запуск насоса на заданное время, пока резервуар не будет опорожнен.

По завершении времени выдержки для инактивации вирусов и доведения pH до заданного значения 2 система перекачивает элюат после инактивации вирусов из сосуда для инактивации вирусов (201) в сосуд (230) для сбора. Пути прохождения жидкости контролируются в цифровом виде с помощью нор-

мально закрытых электромагнитных/пневматических пережимных клапанов (222-1)-(222-3), которые блокируют и отводят поток жидкости по мере необходимости.

В одном варианте реализации после инактивации вирусов белок А элюируется из сосуда (201) VI через электромагнитный/пневматический пережимной клапан (222-1) с цифровым управлением, за которым следует еще один электромагнитный/пневматический пережимной клапан (222-2) и/или (222-3) с цифровым управлением проходит через фильтры (224) и/или (226) с размером пор 0,2-0,45 мкм для удаления осадков, которые могли образоваться во время этапа инактивации вирусов. Необязательно могут быть предусмотрены настройки датчиков (256-1) и (256-2) давления в пути прохождения текучей среды, позволяющие автоматически переключаться между двумя фильтрами, если один из фильтров засоряется во время непрерывной работы. Система подает сигнал тревоги при засорении и переключении фильтров для вмешательства оператора. Необязательно могут быть предусмотрены настройки датчика (254) мутности после сосуда для инактивации, измеряющего NTU; при достижении порогового значения система подает сигнал тревоги для вмешательства оператора. Необязательно могут быть предусмотрены настройки датчика (252) пузырьков воздуха после сосуда для инактивации вирусов, запускающие отключение путей прохождения жидкости для предотвращения попадания пузырьков воздуха в хроматографические системы, причем ловушка для пузырьков воздуха предотвращает попадание пузырьков воздуха в хроматографические системы. При переносе вирус-инактивированного и нейтрализованного белка из сосуда (201) VI после осветления через фильтры (224) и (226) в сосуд (230) для сбора контроллер отправляет сигналы второй хроматографической системе, например, аналоговые сигналы 0-10 В или 4-20 мА или цифровые сигналы от логических схем TTL или одного или более из более продвинутых цифровых интерфейсов, выбранных из OPC, Modbus TCP/IP, EtherCAT, Profibus, Profinet, profibus или промышленного Ethernet, но не ограничивающихся ими. Механизм запуска инициирует загрузку элюата белка из сосуда для сбора во вторую хроматографическую систему через порт (232).

На фиг. 5 показан общий вид системы чистки на месте (CIP) для первой хроматографической системы в соответствии с вариантом реализации настоящего изобретения. Система (300) CIP для хроматографической системы функционально соединена с контроллером, который подает сигнал различным исполнительным механизмам, например, клапанам и насосам в составе системы для регулирования потока жидкости. Контроллер принимает и отправляет сигналы от хроматографических систем, например, аналоговые сигналы, например, 0-10 В или 4-20 мА, или цифровые сигналы от логических схем TTL или одного или более из цифровых интерфейсов, выбранных из OPC, Modbus TCP/IP, EtherCAT, Profibus, Profinet, profibus и промышленного Ethernet, но не ограничивающихся ими. Сигнал от первой хроматографической системы (314) запускает программу CIP входного отверстия для образцов. Контроллер открывает спускной клапан (306-2), направляя жидкость/материал в перегрузочный мешок (308) и запуская спускной насос (310). Контроллер открывает клапан CIP NaOH (306-3), запускает насос (312) и одновременно закрывает клапан (306-1). По истечении заданного времени для потока NaOH через первую хроматографическую систему контроллер подает сигнал клапану NaOH (306-3) на закрытие и одновременно открывает клапан (306-4) воды. По истечении заданного времени для потока воды через первую хроматографическую систему контроллер подает сигнал клапану (306-4) воды на закрытие и одновременно открывает клапан (306-5) буфера. По истечении заданного времени для потока буфера через первую хроматографическую систему контроллер подает сигнал клапану (306-5) буфера на закрытие, а спускной клапан (306-2), насос (310) и клапан (306-1) одновременно открываются, за счет чего достигается очистка первой хроматографической системы на месте во время процесса.

Дополнительные варианты реализации настоящего изобретения относятся к автоматизированному комплексному биопроизводственному процессу, который обеспечивает непрерывную продукцию терапевтического белка, причем указанный процесс контролируется одной или более системами управления, выбранными из системы (110) внешнего управления и сбора данных (SCADA), пропорционально-интегрально-дифференциального регулирования (PID), программируемой логической схемы (PLC), промышленного ПК (IPC), распределенной системы управления (DCS) и системы ретрансляции сообщений, для запуска и непрерывного выполнения процесса.

В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к автоматизированному комплексному непрерывному биопроцессу для постоянной продукции терапевтического белка, масштабируемому от лабораторного до промышленного масштаба согласно настоящему изобретению и включающему этапы:

(а) культивирование клеток млекопитающих, способных продуцировать терапевтический белок, в жидкой культуральной среде в биореакторе (103), снабженном фильтром (109) с переменным тангенциальным потоком (ATF), и сбор выделяющегося собираемого материала, содержащего белок, секретиремый в культуральную среду;

(b) подача собираемого материала клеточной культуры, содержащего терапевтический белок, из биореактора (103) в первую хроматографическую систему (119) для получения элюата белка А;

(с) подача элюата белка А из первой хроматографической системы (119) в сосуд (128) для инактивации вирусов и обеспечение возможности инактивации вирусов и нейтрализации элюата белка, которые могут присутствовать в элюате белка А;

(d) пропускание вирус-инактивированного и нейтрализованного элюата белка А через один или бо-

лее фильтров для удаления примесей в виде осадка, образовавшегося во время этапов инактивации и нейтрализации вируса, и сбор отфильтрованного элюата белка А в сосуде (136) для сбора и;

(е) подача нейтрализованного и отфильтрованного элюата белка А во вторую хроматографическую систему (137) для получения дополнительно очищенного белка.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложен автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс, в котором клетки млекопитающих культивируют в биореакторе (103), представляющем собой перфузионный биореактор, снабженного средствами осуществления переменного тангенциального потока (ATF).

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложен автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс, в котором собранный осветленный материал клеточной культуры непосредственно подают из биореактора (103) в первую хроматографическую систему (119) с использованием насоса первой хроматографической системы.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложен автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс, в котором этап первой хроматографии выполняют с использованием одной или более колонок для аффинной хроматографии для очистки собираемого материала клеточной культуры, содержащего терапевтический белок из биореактора, обеспечивающей получение элюата белка А.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложен автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс, в котором рН элюата белка А на этапе инактивации вирусов регулируется автоматически с помощью пропорционально-интегрально-дифференциального (PID) контроллера, программируемого логического контроллера (PLC) или контроллера промышленного персонального компьютера (IPC).

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложен автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс, в котором этап второй хроматографии выполняют с использованием одной или более мультимодальных анионообменных колонок и одной или более катионообменных колонок, для получения очищенного белка.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложен автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс, необязательно дополнительно включающий хранение очищенного белка, полученного из второй хроматографической системы (137), в дополнительном сосуде (140) для сбора. В одном варианте реализации настоящего изобретения предложен автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс, необязательно дополнительно содержащий один или более из этапов прохождения очищенного белка через один или более фильтров (142) для дальнейшей очистки терапевтического белка. Фильтр(ы) можно выбрать из нанофильтра, ультрафильтра и диафильтра.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложен автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс, причем указанный процесс включает автоматический отбор образцов для анализа в ходе работы и чистку на месте с использованием системы (120) (CIP) для периодической чистки хроматографический(ой) систем(ы) и их компонентов, включая хроматографические колонки, трубки и сосуды с целью поддержания непрерывности работы.

В одном варианте реализации указанного биопроцесс необязательно включает автоматизированный отбор образцов при ВЭЖХ для проверки параметров процесса в ходе работы с использованием системы внешнего управления и сбора данных (SCADA), системы чистки на месте (CIP) и переключения пути потока жидкости для поддержания непрерывности работы системы. В одном варианте реализации указанного биопроцесс необязательно дополнительно включает автоматизированный отбор образцов при СЭЖХ для проверки параметров процесса в ходе работы с использованием системы внешнего управления и сбора данных (SCADA), системы чистки на месте (CIP) и переключения пути потока жидкости для поддержания непрерывности работы системы.

В еще одном варианте реализации комплексным непрерывным биопроцессом согласно настоящему изобретению может управлять главный контроллер, состоящий из IPC с программным обеспечением SCADA для управления визуализацией данных, мониторингом и выступающий в качестве архиватора параметров процесса. Главный контроллер способен управлять отдельными системами, например, биореактором, первой хроматографической системой, второй хроматографической системой и системой инактивации вирусов с использованием одного или более из цифровых интерфейсов, выбранных из OPC, modbus TCP/IP, EtherCAT, Profibus, Profinet, profibus или промышленного Ethernet и т.д., но не ограничивающихся ими.

В еще одном варианте реализации автоматизированный биопроцесс согласно настоящему изобретению обеспечивает непрерывную передачу потока продукта от предыдущего процесса к следующему процессу.

В одном варианте реализации предыдущий процесс выполняют в биореакторе системы автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса с системами управления, подходящими для культивирования клеток млекопитающих. В одном варианте реализации предыдущий процесс выполняют в биореакторе, использующем технологию ATF, причем материал, содержащий продуцируемый терапевтический белок, собирают с использованием насоса системы ВЭЖХ из ATF. Типичная последовательность операций для предыдущего процесса показана на фиг. 1.

В одном варианте реализации предыдущий процесс культивирования клеток млекопитающих в биореакторе использует перфузионный процесс культивирования клеток, и продолжительность культивирования серии клеток млекопитающих выбирают из интервала от 3 до 16 дней. Кроме того, предыдущий процесс можно выполнять путем культивирования клеток в другой среде для культивирования клеток, известной специалисту в данной области техники, для усиленного роста клеток млекопитающих в биореакторе.

В одном варианте реализации следующий процесс включает этапы очистки терапевтического белка, продуцируемого во время предыдущего процесса в системе непрерывного автоматизированного комплексного биопроцесса, причем осветленную жидкость для культивирования клеток подают в первую хроматографическую систему, содержащую одну или более аффинных колонок, для получения элюата белка А, инактивации и нейтрализации элюата белка А в системе инактивации вирусов, и подают во вторую хроматографическую систему, содержащую одну или более мультимодальных колонок для анионообменной хроматографии и одну или более колонок для катионообменной хроматографии, для получения очищенного белка. Типичная последовательность операций для следующего процесса показана на фиг. 2.

В различных вариантах реализации во время предыдущих и следующих процессов и работы системы согласно настоящему изобретению для продукции представляющего интерес белка можно использовать клетки, выбранные из нативных, диких, мутированных или рекомбинантных клеток, способных продуцировать желательный белок, представляющий интерес; питательные или культуральные среды, подходящие для используемых клеток; различные химические вещества; реагенты; смолы, используемые на этапах хроматографии; и любые подходящие материалы. В некоторых вариантах реализации различные используемые буферы или буферные системы содержат химические вещества, подходящие для использования в качестве буфера для промывки, вытеснения буфера, буфера для уравнивания, буфера для элюирования и т.п.

Автоматизированная комплексная непрерывная система и биопроцесс способны продуцировать терапевтический белок, выбранный из антитела, фрагмента антитела, моноклонального антитела, фермента, сконструированного белка, иммуногенного белка, фрагмента белка, иммуноглобулина или любой их комбинации.

Терапевтический белок, полученный с помощью автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса в соответствии с настоящим изобретением, выбран из группы, состоящей из: панитумумаба, омализумаба, абаговоумаба, абциксимаба, актоксумаба, адалимумаба, адекватумаба, афелимоумаба, афутумаба, алацизумаба, алацизумаба, алемтузумаба, алирокумаба, алтумоумаба, аматуксимаба, аматуксимаба, анатумоумаба, анрукинзумаба, аполизумаба, арцитумоумаба, атинумаба, тоцилизумаба, базиликсимаба, бестумоумаба, белимумаба, бевацизумаба, бесилесоумаба, безлотоксумаба, бицироумаба, блинатумоумаба, канакинумаба, цертолизумаба, цетуксимаба, циксутумумаба, даклизумаба, деносумаба, экулизумаба, эдреколоумаба, эфализумаба, эфунгуумаба, эпратузумаба, эртумаксумаба, этарацизумаба, фигитумумаба, голимумаба, ибритумоумаба тиуксетана, иговоумаба, имгатузумаба, инфликсимаба, инолимоумаба, инотузумаба, лабетузумаба, лебрикизумаба, моксетумумаба, натализумаба, ниволумаба, обинтузумаба, ореговумаба, паливизумаба, панитумумаба, пертузумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, ритуксимаба, секукинумаба, тоцилизумаба, тоситумоумаба, траклокинумаба, тукотузумаба, трастузумаба, устекинумаба, ведолизумаба, велтузумаба, залутумумаба, затуксимаба, ферментов, белков, иммуногенных или антигенных белков или фрагментов белков, альфа-глюкозидазы, ларонидазы, абатацепта, галсульфазы, альфалютропина, антигемофильного фактора, бета-агалзидазы, интерферона-бета 1а, дарбэпоэтина-альфа, тенекеплазы, этанерцепта, фактора свертывания IX, фолликулостимулирующего гормона, интерферона-бета 1а, имиглюцеразы, дорназы-альфа, эпоэтина-альфа, инсулина или аналогов инсулина, мекасермина, фактора VIII, фактора VIIa, антитромбина III, белка C, человеческого альбумина, эритропоэтина, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, интерлейкина-11, ларонидазы, идурсульфазы, галсульфазы, ингибитора альфа-1-протеиназы, лактазы, аденозиндезаминазы, тканевого активатора плазминогена, альфа-тиреотропина, кислой β-галактозидазы, β-галактозидазы, нейраминидазы, гексозаминидазы А и гексозаминидазы В.

Хотя выше описаны различные варианты реализации настоящего изобретения, можно разработать другие и дополнительные варианты реализации настоящего изобретения без отступления от его сущности. Сущность изобретения определяется следующей формулой изобретения. Настоящее изобретение не ограничивается описанными вариантами реализации, версиями или примерами, которые включены для того, чтобы дать возможность специалисту с обычной квалификацией в данной области техники создавать и использовать изобретение в сочетании с информацией и знаниями, доступными специалисту с обычными навыками в данной области техники.

Примеры

Настоящее изобретение дополнительно разъясняется в форме следующих примеров. В то же время следует понимать, что следующие примеры являются чисто иллюстративными и не должны рассматриваться в качестве ограничения сущности изобретения.

Пример 1.

Продукция и очистка цетиксумаба с помощью автоматизированной комплексной непрерывной сис-

темы и биопроцесса.

Предыдущий процесс - продукция белка

Для продукции белка, представляющего интерес, линия клеток, используемая в автоматизированном непрерывном процессе, представляла собой линию клеток CHO-S с номером в каталоге 11619012, приобретенную в INVITROGEN, США.

Перед посевом клеток млекопитающих CHO выполняли калибровку растворенного кислорода (DO) путем барботирования воздуха с расходом 0,5 л/мин. После стабилизации значения DO датчик DO калибровали на 100%.

Для непрерывного процесса использовали ATF, систему фильтрации и перфузии, в которой чередующийся тангенциальный поток через фильтрующий картридж использовали для высокоэффективной фильтрации. Это позволяло клеткам расти до плотности 80-100 миллионов клеток на миллилитр с жизнеспособностью более 90%, что приводило к чрезвычайно высокому выходу белка.

Биореактор заполняли до рабочего объема культуральной средой, например, ActiPro, а затем засеивали клетками млекопитающих, т.е. клетками CHO, в количестве $0,3-0,5 \times 10^6$ жизнеспособных клеток млекопитающих/мл. Культивирование запускали на 3 дня. Затем запускали систему переменного тангенциального потока (ATF) и в течение 5-10 мин реактор и ATF пришли в равновесие. Чередующийся тангенциальный поток через фильтрующий картридж использовали для высокоэффективной фильтрации. Это позволяло клеткам расти до плотности 80-100 миллионов клеток на миллилитр с жизнеспособностью более 90%, что приводило к чрезвычайно высокому выходу белка. Клетки закачивали в полое волокно и из него в реактор со скоростью рециркуляции 1,5-6 л/мин в зависимости от концентрации клеток. Затем запускали насос для фильтрата, подключенный к системе периодической противоточной хроматографии (PCC) АКТА™. Среды, используемые с 3 по 16 день для перфузии, представляли собой среду PM-Basal media + среду для стимуляции клеток 7a (1 г/л) и среду для стимуляции клеток (1 г/л) + 8 г/л глюкозы и 8 мМ глутамина.

Начальная скорость фильтрации составляла 0,25 объема реактора (RV) на 3 день, 0,5 RV на 4 день, 1 RV на 5-7 день, 1,25 RV на 8-9 день и 1,5 RV на 10-16 день. Выполняли проверку, достаточна ли надежность уплотнения насоса, чтобы гарантировать поддержание разрежения на стороне фильтрата (трансмембранное давление). Это связано с тем, что ATF осуществляет обратную циркуляцию в каждом цикле, при которой небольшое количество жидкости втягивается из фильтрата обратно через фильтр в реактор. Поскольку система ATF не контролировала скорость потока в насосе, пользователь вручную управлял им, контролируя скорость потока в насосе системы ВЭЖХ.

Рост клеток и жизнеспособность клеток ежедневно контролировали во всех культурах. Профиль роста клеток представлен в табл. 1.

Таблица 1

Возраст культуры (дней)	VCC (млн/мл)	Жизнеспособность (%)
0,0	0,58	99,0
1,0	0,89	99,2
2,0	1,8	99,7
3,0	2,7	98,5
4,0	4,8	98,1
5,0	11,4	99,2
6,0	29,6	99,0
7,0	47,8	98,8
8,0	59,5	98,2
9,0	68,0	98,2
10,0	78,0	97,5
11,0	85,0	98,1
12,0	88,0	96,8
13,0	92,0	95,2
14,0	100,0	95,0
15,0	94,3	93,2
16,0	92,3	90,0

Данные в вышеприведенной таблице ясно показывают, что жизнеспособность клеток поддерживалась на приемлемом уровне (>90%) во всех культурах в установленных условиях культивирования.

Кроме того, исследовали влияние среды для культивирования клеток на рост клеток. Результаты роста клеток с использованием глюкозы и лактата в качестве сред для культивирования клеток показаны на фиг. 6.

Следующий процесс: очистка продуцированного белка.

А. 1 этап хроматографии выполняли с использованием системы аффинной хроматографии с 4 ко-

лонками при параметрах следующего процесса, указанных в табл. 2(а).

Таблица 2(а)

Этап процесса	Параметры процесса
Аффинная хроматография	<p>Аффинная хроматография:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Используемые колонки: 4 колонки - Диаметр колонки: 5 см - Смола: Mab Select Sure LX - Высота слоя: $8,6 \pm 0,2$ см. - Объем слоя: ~ 168 мл - Время пребывания: ~4 мин - Рабочий расход: 42 мл/мин - Буфер для уравнивания: 50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,0 - Буфер для промывки 2: 50 мМ натрий-фосфатный буфер + 1 М NaCl, pH 7,0 - Буфер для промывки 3: 50 мМ натрий-ацетатный буфер, pH 5,5 - Буфер для элюирования: 200 мМ уксусная кислота - Раствор для регенерации и дезинфекции: 100 мМ раствор гидроксида натрия - Раствор для хранения колонки: 20% этанол или 2% бензиловый спирт. - Коэффициент загрузки: ~35 мг/мл - Элюирование: ступенчатое элюирование буфером для элюирования. - Сбор после элюирования: для проточной УФ-кюветы с длиной пути 2 мм собирали фракцию элюата от 50 миллиединиц оптической плотности на восходящей стороне до трех объемов колонки с белком А (168 мл x 3) мл.

Первую хроматографическую систему соединяли с четырьмя колонками с четырьмя различными положениями колонок в системе АКТА РСС, и через колонки пропускали ~3 CV воды Milli Q для удаления раствора для хранения. Уравнивание колонок: первый контейнер с буфером для уравнивания хроматографической системы подключали к системе и ставили отметку

"Уравнивание". Все колонки уравнивали пропуском 3 CV буфера.

Загрузка: линию S1 первой хроматографической системы АКТА РСС подключали к выходу ATF и начинали загрузку через нее. Для нее ставили отметку "Загрузка" и отдавали команду "Автоматическое обнуление УФ". Загрузку 1 цикла на первую колонку выполняли за 219 мин.

Промывка буфером для уравнивания после загрузки: после загрузки в течение 219 мин (1 цикл) процесс переключали с этапа загрузки на этап промывки путем направления потока на буфер для хроматографии-1 через другой насос системы АКТА РСС. Ставили отметку "Промывка буфером для уравнивания после загрузки", и через колонку пропускали 3 CV буфера.

Когда процесс переключали с этапа загрузки на этап промывки в данном цикле, этап загрузки одновременно начинали в другой колонке как другой цикл.

Промывка 2: после промывки после загрузки через колонку пропускали 2 CV буфера для промывки 2.

Промывка 3: после промывки буфером для промывки 2 через колонку пропускали 2 CV буфера для промывки 2.

Элюирование: желательный белок элюировали элюирующим буфером для хроматографии-1. Пик элюирования собирали от $\uparrow 50$ миллиединиц оптической плотности до общего объема элюирования 3 CV.

Регенерация: после элюирования колонку регенерировали, пропуская буфер для регенерации в количестве 3 CV.

Промывка водой Milli Q: пропускали 3 CV воды Milli Q для удаления дезинфицирующего раствора.

Буфер для уравнивания: пропускали 3 CV EQB для повторного уравнивания колонки после регенерации.

Хранение колонки: для хранения колонки (после завершения всех циклов) пропускали 2 CV раствора для хранения при хроматографии-1.

В. В альтернативном способе следующий процесс выполняли с использованием системы аффинной хроматографии с двумя колонками для уменьшения использования смолы на серию. Параметры процесса соответствовали приведенным в табл. 2(б).

Таблица 2(b)

Этап процесса	Параметры процесса
Аффинная хроматография	<p>Аффинная хроматография:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Используемые колонки: две - Диаметр колонки: 5 см - Смола: Mab Select Sure LX - Высота слоя: $4,2 \pm 0,2$ см - Объем слоя: ~84 мл - Время пребывания: ~2 мин - Рабочий расход: 42 мл/мин - Буфер для уравнивания: 50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,0 - Буфер для промывки 2: 50 мМ натрий-фосфатный буфер + 1 М NaCl, pH 7,0 - Буфер для промывки 3: 50 мМ натрий-ацетатный буфер, pH 5,5 - Буфер для элюирования: 200 мМ уксусная кислота - Раствор для регенерации и дезинфекции: 100 мМ раствор гидроксида натрия - Раствор для хранения колонки: 20% этанол или 2% бензиловый спирт. - Коэффициент загрузки: ~35 мг/мл - Элюирование: ступенчатое элюирование буфером для элюирования. - Сбор после элюирования: для длины пути проточной УФ-кюветы 2 мм собирали фракцию элюата от 50 миллиединиц оптической плотности на восходящей стороне до трех объемов колонки с белком А (294 мл x 3) мл.

Таким образом, в результате 1 этапа хроматографии, выполненного с помощью аффинной хроматографии с использованием смолы Mab Select Sure LX, улавливающей белок, представляющий интерес, указанный белок, представляющий интерес, связывался со смолой, а примеси удалялись по мере прохождения через нее. Хроматограмма, полученная на этом этапе, показана на фиг. 7, на которой показан пик элюирования, соответствующий белку, представляющему интерес, элюированному с использованием буфера с низким pH (pH 2,8), причем пик элюирования систематически наблюдался для всех циклов, как и ожидалось. Обработка для инактивации вирусов при низком pH и нейтрализация Инактивацию вирусов и нейтрализацию выполняли с использованием следующих параметров, указанных в табл. 3.

Таблица 3

Инактивация вирусов при низком pH	<p>Инактивация при низком pH:</p> <ul style="list-style-type: none"> - pH инактивации: $3,5 \pm 0,2$ - Время инкубирования: 45 мин \pm 5 - Температура: КТ (23 ± 2) °C - Буфер для нейтрализации: 2 М трис-основание - pH нейтрализации: $5,5 \pm 0,2$
-----------------------------------	---

pH элюата белка А в каждом цикле поддерживали в ожидаемом диапазоне $3,5 \pm 0,2$ после смешивания (система контроля обеспечивала этот диапазон с помощью механизма обратной связи). После учета pH выполняли полное перемешивание раствора белка в течение 45 ± 5 мин при комнатной температуре (23 ± 2 °C) и записывали время начала, время окончания инкубирования, продолжительность инкубирования и температуру.

После 45 ± 5 мин инкубирования pH раствора белка доводили до $5,5 \pm 0,2$ с использованием 2 М раствора трис-основания с помощью системы контроля, основанной на механизме обратной связи. Ожидаемая проводимость после нейтрализации составляла ~6 мСм/см. После нейтрализации раствор белка пропускали через фильтр с размером пор 0,2 мкм в капсуле Sartopore® с помощью перистальтического насоса, приводимого в действие системой управления, и фильтрат собирали во второй сосуд для сбора для дальнейшей обработки на этапе мультимодальной и катионообменной хроматографии.

Мультимодальная анионообменная хроматография и катионообменная хроматография.

Белок очищали с использованием второй хроматографической системы с использованием мультимодальной анионообменной хроматографии и катионообменной хроматографии со следующими параметрами, указанными в табл. 4.

Анионо- и катионообменная хроматография	<p>Анионообменная хроматография:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Диаметр колонки: 2,6 см - Смола: Carto adhere ImpRes - Высота слоя: $\sim 15 \pm 0,2$ см - Объем слоя: ~ 80 мл - Время пребывания: ~ 4 мин - Рабочий расход: 20 мл/мин - Буфер для промывки с высоким содержанием солей: 50 мМ натрий-фосфатный буфер + 300 мМ хлорид натрия, pH 5,5 - Буфер для уравнивания: 50 мМ фосфат натрия, pH 5,5 - Раствор для регенерации и дезинфекции: 1 М гидроксид натрия + 2 М хлорид натрия. - Раствор для хранения колонки: 10 мМ раствор гидроксида натрия - Коэффициент загрузки: ~ 35 мг/мл - Элюирование: проточный (отрицательный) режим - Сбор пика: протекающий белок напрямую связывается с последовательно соединенной СЕХ-колонкой. <p>Катионообменная хроматография:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Диаметр колонки: 3,2 см - Смола: SP Sepharose FF - Высота слоя: $20 \text{ см} \pm 0,5$ см - Объем слоя: ~ 160 мл - Время пребывания: ~ 8 мин - Рабочий расход: 20 мл/мин для загрузки и промывки после загрузки и 32 мл/мин во время последующей работы - Буфер для уравнивания: 50 мМ натрий-ацетатный буфер, pH 5,5 - Буфер для элюирования: 50 мМ натрий-ацетатный буфер + 150 мМ хлорида натрия, pH 5,5 - Раствор для регенерации и дезинфекции: 1000 мМ гидроксид натрия + 2000 мМ хлорид натрия. - Буфер для промывки с высоким содержанием солей: 20 мМ натрий-ацетатный буфер + 300 мМ хлорид натрия, pH
	<p>5,5</p> <ul style="list-style-type: none"> - Раствор для хранения колонки: 10 мМ гидроксид натрия - Коэффициент загрузки: ~ 25 мг/мл - Элюирование: ступенчатое элюирование - Сбор после элюирования: для проточной УФ-кюветы с длиной пути 2 мм собирали фракцию элюата от 50 миллиединиц оптической плотности на восходящей стороне до 50 миллиединиц оптической плотности на нисходящей стороне.

Первую колонку, которая представляла собой анионообменную колонку второй хроматографической системы, подключали к положениям многостороннего клапана 2 и 4 системы АКТА pure, а вторую колонку, которая представляла собой катионообменную колонку второй хроматографической системы, подключали к положению 1 колонки. Через колонки пропускали 3 CV воды Milli Q для удаления раствора для хранения.

Буфер для промывки с высоким содержанием соли: 2 CV промывочного буфера с высоким содержанием соли пропускали через анионообменные и катионообменные колонки второй хроматографической системы и убеждались, что pH и проводимость колонок находились в диапазоне буфера для промывки с высоким содержанием соли.

Уравновешивание колонки: обе колонки уравновешивали пропусканьем 5 CV буфера для уравновешивания.

Загрузка и вытеснение буфера: образец нейтрализованного и отфильтрованного элюата белка А, собранный в сосуд для сбора, загружали через последовательно соединенные колонки, в которых белок, представляющий интерес, не связывался с анионообменной колонкой второй хроматографической системы и проходил через нее, связываясь с катионообменной колонкой второй хроматографической системы. После завершения загрузки в загрузочный контейнер вносили 100 мл буфера для уравновешивания и пропускали его через колонки, обеспечивая полную загрузку образца нейтрализованного элюата белка.

Промывка буфером для уравновешивания после загрузки: после вытеснения буфера для уравновешивания пропускали еще 2 CV буфера для уравновешивания для равновесной стабилизации пика потока анионообменной колонки второй хроматографической системы и для удаления слабосвязанного и несвязанного белка из катионообменной колонки второй хроматографической системы. Затем представляющий интерес белок, связанный с катионообменной колонкой второй хроматографической системы, элюировали с использованием элюирующего буфера для катионообменной хроматографии. Пик элюирования собирали от \uparrow 50 миллиединиц оптической плотности пика до \downarrow 50 миллиединиц оптической плотности пика при УФ 280 нм для проточной кюветы с длиной пути 2 мм. Фракцию элюата каждого цикла хранили при температуре от 2 до 8°C до дальнейшей обработки.

Регенерация: через обе колонки пропускали 2 CV буфера для анионообменной и катионообменной хроматографии для регенерации.

Промывка водой Milli Q: пропускали 2 CV воды Milli Q для удаления раствора для регенерации.

Хранение колонки: для хранения колонок (в конце всех циклов) пропускали 2 CV анионообменного и катионообменного раствора для хранения.

Таким образом, 2 этап хроматографии состоял из двух этапов, первая из которых представляла собой мультимодальную анионообменную хроматографию, где использовали смолу Capto Adhere Impres, а вторая - катионообменную хроматографию, где использовали смолу SP-sepharose FF. После мультимодальной анионообменной хроматографии примеси связывались с колонкой, а белок, представляющий интерес, проходил через нее. Колонка для катионообменной хроматографии была соединена с колонкой для анионообменной хроматографии в виде тандема, и с ней связывался белок, представляющий интерес. Затем белок элюировали из колонки для катионообменной хроматографии, используя буфер с высоким содержанием солей. Хроматограмма, полученная на этом этапе, показана на фиг. 8, где пик элюирования можно согласованно наблюдать для всех циклов, как и ожидалось.

Фильтрация с тангенциальным потоком (ультрафильтрация и диафильтрация). Элюат, полученный при катионообменной хроматографии, объединяли и дополнительно обрабатывали для фильтрации с тангенциальным потоком с целью концентрирования и замены буфера белка цетуксимаба на буфер для фармацевтического состава без конечного вспомогательного вещества в соответствии с параметрами, показанными ниже в табл. 5.

Таблица 5

Система TFF	Шкала Cogent μ
Кассета	Pellicon Biomax 30
Площадь кассеты	0,1 м ²
МОС кассеты	PES
Концентрация элюата 3 после хроматографии	До 50 мг/мл
Замена буфера	8 объемов диафильтрации
Давление	\leq 1 бар
Пороговый размер/MWCO	30 кДа

Белковый раствор, извлеченный из системы TFF, разбавляли до концентрации 5 мг/мл с использованием буфера для фармацевтического состава с раствором конечного вспомогательного вещества.

Полученный раствор фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм (МОС- полиэфирсульфон) в асептических условиях в бутылку из PETG. Полученный таким образом фильтрат представлял собой конечный продукт белка цетуксимаба, пригодный для применения в качестве лекарственного вещества.

Данные по сходимости типичной серии соответствовали следующим параметрам, приведенным в табл. 6.

Таблица 6

Этап	Общий белок (мг)	Сходимость (%)
Загрузка, хроматография 1	30240	82
Объединенный элюат, хроматография 3	24816	
Загрузка TFF	24816	97,9
Концентрат TFF	24300	
Лекарственное вещество	24300	100
Общий выход	80,35%	

Вышеупомянутые примеры являются чисто иллюстративными и не должны рассматриваться в качестве ограничения сущности изобретения. Различные изменения и модификации описанных вариантов реализации очевидны для специалистов в данной области техники. Такие изменения и модификации можно сделать без выхода за рамки сущности изобретения.

Преимущества настоящего изобретения

В настоящем изобретении предложен автоматизированный биопроцесс для непрерывной работы в течение нескольких суток без повторной смены сосудов/пакетов во время процесса.

В настоящем изобретении предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса, в которой используется контроллер для регулирования и мониторинга всего предыдущего и следующего процесса с использованием SCADA или DCS.

В настоящем изобретении предложена система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса для продукции терапевтического белка, включающая масштабируемую и точную автоматизированную систему регулирования pH в реальном времени для инактивации вирусов.

В настоящем изобретении предложены автоматизированный биопроцесс и система, в которых автоматизированный отбор образцов в ходе работы для ВЭЖХ-анализа позволяет осуществлять углубленный анализ процесса, а также обратную связь по параметрам процесса.

В настоящем изобретении предложен автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс для продукции терапевтического белка с использованием системы, содержащей пережимные клапаны для беспроблемной замены трубок после каждого завершения непрерывной серии, что упрощает операции.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Система (100) автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса для продукции терапевтического белка, содержащая:

биореактор (103) для культивирования клеток млекопитающих, способных продуцировать терапевтический белок, в культуральной среде, причем указанный биореактор (103) снабжен фильтром с переменным тангенциальным потоком (109) для сбора собираемого материала, содержащего белок, секретиремый в культуральную среду;

первую хроматографическую систему (119), включающую одну или более колонок для аффинной хроматографии, соединенную с системой (109) фильтрации биореактора, снабженной фильтром (109) с переменным тангенциальным потоком (ATF) биореактора (103) без промежуточного сосуда для хранения для очистки собранного рекомбинантного терапевтического белка и получения элюата белка А;

систему (126) инактивации вирусов, включающую сосуд (128) для инактивации вирусов, соединенный с первой хроматографической системой (119) для сбора элюата белка А и инактивации вирусов, которые могут присутствовать в элюате, и сосуд (128) для инактивации вирусов, выполненный с возможностью автоматического регулирования pH элюата белка А;

сосуд (136) для сбора, соединенный с сосудом (128) для инактивации вирусов через один или более фильтров для приема вирус-инактивированного, нейтрализованного и отфильтрованного элюата белка А, причем указанные один или более фильтров (224) и (226) выполнены с возможностью удаления примесей в форме осадков из нейтрализованного элюата белка А, полученного из сосуда для инактивации вируса;

вторую хроматографическую систему (137), включающую одну или более мультимодальных анионообменных колонок и одну или более катионообменных колонок, соединенную с сосудом (136) для сбора, для приема отфильтрованного элюата белка А из сосуда (136) для сбора и получения дополнительно очищенного белка;

систему (120) чистки на месте (CIP) для периодической чистки хроматографическ(ой) систем(ы), сосуда для инактивации вирусов, сосуда для сбора и трубок для потока жидкости;

один или более электромагнитных или пневматических пережимных клапанов (114), и, необязательно, содержит расходомеры, датчики пузырьков воздуха, датчики давления и нагрузочный отсек для создания контура обратной связи для поддержания потока жидкости между различными компонентами системы, предотвращения образования пузырьков воздуха и регулирования потока жидкости; и

одну или более систем управления, выбранных из системы (110) внешнего управления и сбора данных (SCADA); пропорционально-интегрально-дифференциального регулирования (PID); программируемой логической схемы (PLC), промышленного ПК (IPC), распределенной системы управления (DCS); модулей ввода-вывода или блоков ввода-вывода (130) и (132), функционально связанных с отдельными системами, включая хроматографическую систему 1 (119); систему (126) инактивации вирусов; сосуд (136) для сбора; хроматографическую систему 2 (137); и системы ретрансляции сообщений.

2. Система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса по п.1, отличающаяся тем, что указанная система дополнительно содержит перегрузочный мешок (116), соединенный с биореактором через клапан (114).

3. Система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса по п.1, отличающаяся тем, что система (200) инактивации вирусов содержит сосуд (201) для инактивации вирусов (VI), датчик (220) pH, соединенный с передатчиком, для измерения pH элюата белка А и автотитратором (122), датчики нагрузочных отсеков (248-1)-(248-6) для мониторинга уровня жидкости в соответствующих нагрузочных отсеках, датчик уровня для проверки уровня жидкости в сосуде VI, датчики (256-1) и (256-2) давления в пути прохождения текучей среды для автоматического переключения между двумя фильтрами, если один из фильтров засоряется во время непрерывной работы, встроенный датчик (254) мутности для измерения мутности в нефелометрических единицах мутности (NTU) в реальном времени и датчик (252) пузырьков воздуха для предотвращения попадания пузырьков воздуха в хроматографическую систему.

4. Система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса по п.1, отличающаяся тем, что каждый из фильтров между сосудом для инактивации вирусов и сосудом для сбора представляет собой фильтр с размером пор 0,2-0,45 мкм.

5. Система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса по п.1, отличающаяся тем, что сосуд для инактивации вирусов и сосуд для сбора изготовлены из стекла или нержавеющей стали.

6. Система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса по п.1, отличающаяся тем, что система (120) чистки на месте (CIP) для периодической чистки хроматографический(ой) систем(ы) включает чистку их компонентов, включая хроматографическую(ие) колонку(и), входное отверстие, трубки и сосуды.

7. Система автоматизированного комплексного непрерывного биопроцесса по п.1, отличающаяся тем, что указанная система дополнительно включает автоматизированный отбор образцов собираемого материала из биореактора для подсчета клеток и анализа питательных веществ, а также автоматизированный отбор образцов в различных местоположениях для хроматографического анализа в ходе работы во время непрерывного биопроцесса.

8. Автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс для продукции терапевтического белка в системе по пп.1-7, причем указанный процесс управляется одной или более системой управления, выбранной из системы внешнего управления и сбора данных (110), пропорционально-интегрально-дифференциального регулирования (PID), программируемой логической схемы (PLC), промышленного ПК (IPC), распределенной системы управления (DCS) и системы ретрансляции сообщений, и указанный процесс включает этапы:

(а) культивирование клеток млекопитающих, способных продуцировать терапевтический белок, в жидкой культуральной среде в биореакторе (103), снабженном фильтром (109) с переменным тангенциальным потоком (ATF), и сбор выделяющегося собираемого материала, содержащего белок, секретируемый в культуральную среду;

(b) подача собираемого материала клеточной культуры, содержащего терапевтический белок, из биореактора (103) в первую хроматографическую систему (119), включающую одну или более колонок для аффинной хроматографии, для получения элюата белка А;

(с) подача элюата белка А из первой хроматографической системы (119) в сосуд (128) для инактивации вирусов и обеспечение возможности инактивации вирусов и в элюате белка А;

(d) пропускание вирус-инактивированного и нейтрализованного элюата белка А через один или более фильтров для удаления примесей в виде осадка, образовавшегося во время этапов инактивации и нейтрализации вируса, и сбор отфильтрованного элюата белка А в сосуде (136) для сбора;

(е) подача нейтрализованного и отфильтрованного элюата белка А во вторую хроматографическую систему (137), включающую одну или более мультимодальных анионообменных хроматографических колонок и одну или более катионообменных хроматографических колонок, для получения очищенного белка; и

при этом указанный процесс включает автоматический отбор образцов для анализа в ходе работы и чистку на месте с использованием системы (120) (CIP) для периодической чистки входного отверстия хроматографической системы с целью поддержания непрерывной работы.

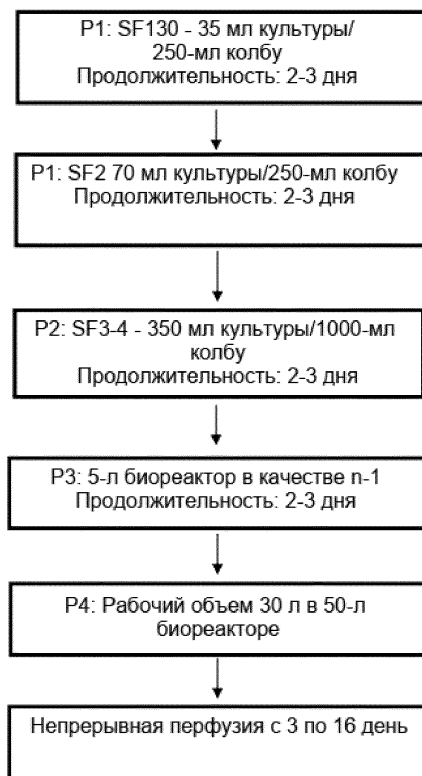
9. Автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс по п.8, отличающийся тем, что клетки млекопитающих культивируют в биореакторе (103), представляющем собой перфузионный биореактор, снабженный средствами осуществления переменного тангенциального потока (ATF).

10. Автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс по п.8, отличающийся тем, что жидкую культуральную среду непосредственно подают из биореактора (103) в первую хроматографическую

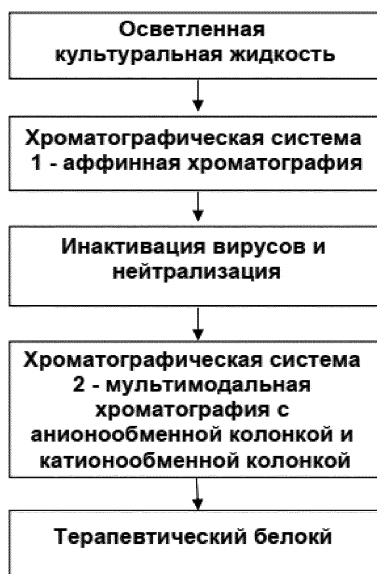
скую систему (119) с использованием насоса первой хроматографической системы.

11. Автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс по п.8, отличающийся тем, что рН элюата белка А на этапе инактивации вирусов регулируется автоматически с помощью пропорционально-интегрально-дифференциального (PID) контроллера, программируемого логического контроллера (PLC) или контроллера промышленного персонального компьютера (IPC).

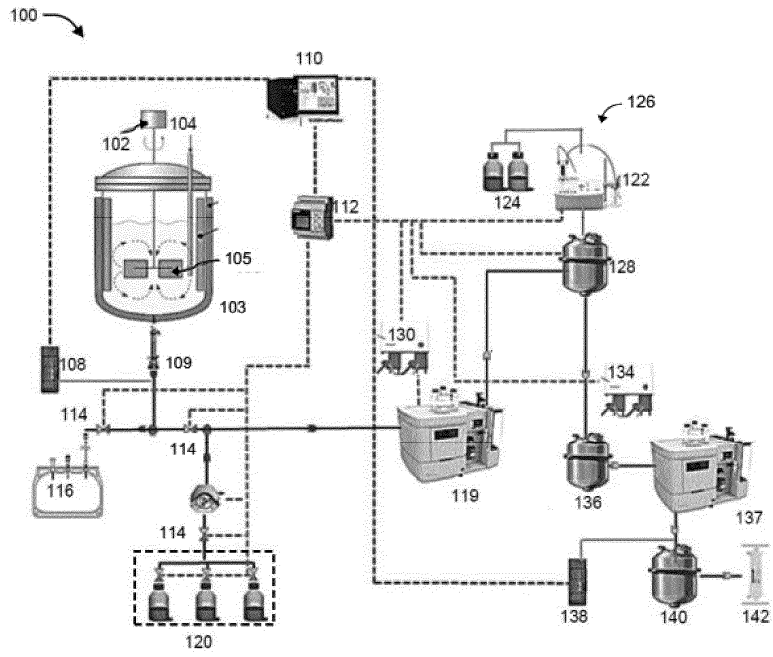
12. Автоматизированный комплексный непрерывный биопроцесс по п.8, отличающийся тем, что терапевтический белок выбран из антитела, фрагмента антитела, моноклонального антитела, фермента, рекомбинантного белка, сконструированного белка, иммуногенного белка, фрагмента белка, пептида, иммуноглобулина или любой их комбинации.



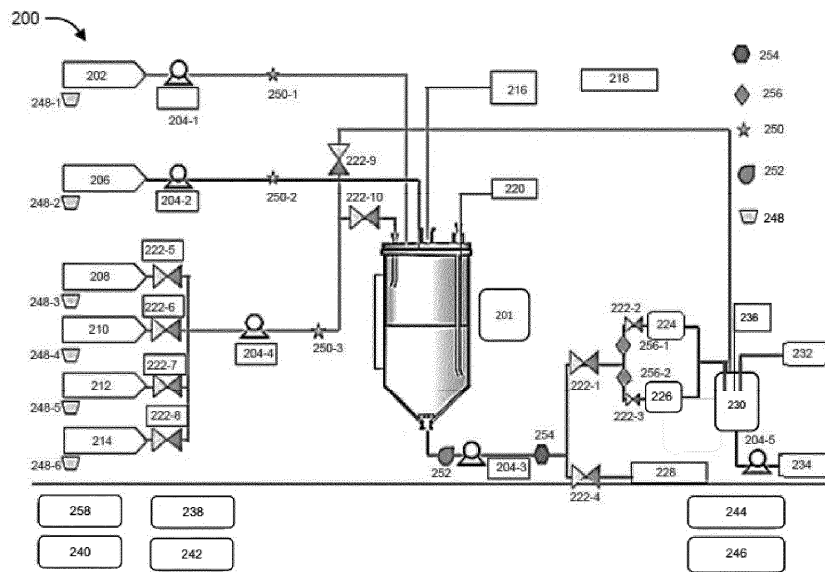
Фиг. 1



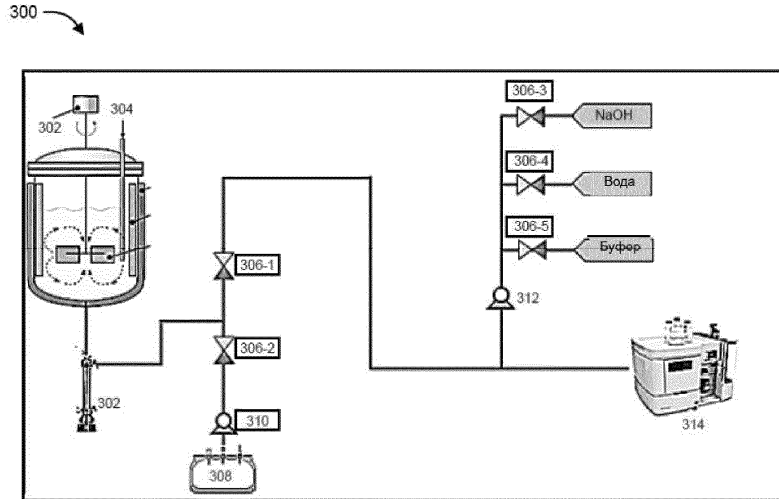
Фиг. 2



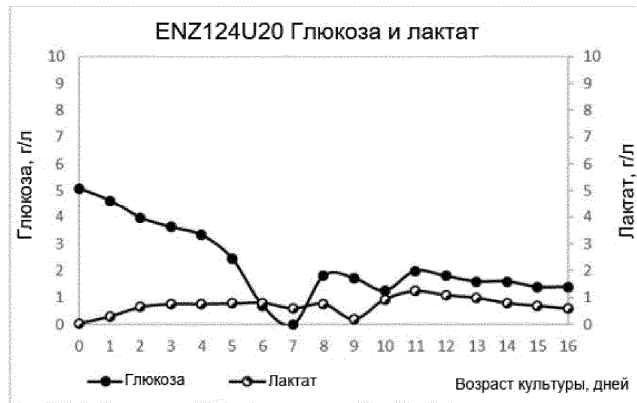
Фиг. 3



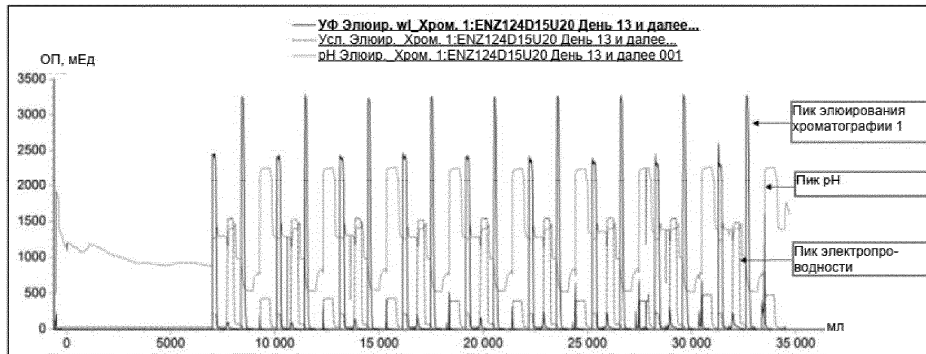
Фиг. 4



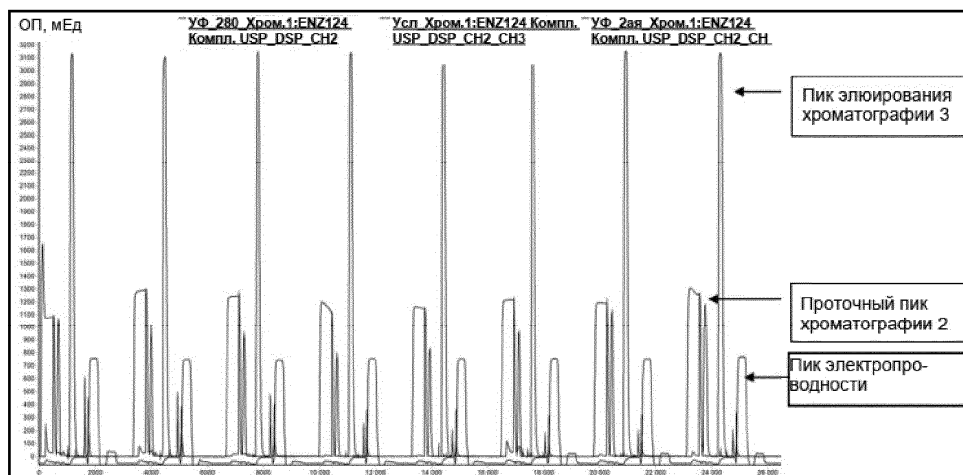
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

