

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490904 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.05.29

(51) Int. Cl. G01N 33/52 (2006.01)
G01N 27/416 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.10.06

(54) СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ И УПРАВЛЕНИЯ pH

(31) 63/253,281

(32) 2021.10.07

(33) US

(86) PCT/US2022/045902

(87) WO 2023/059800 2023.04.13

(88) 2023.06.01

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

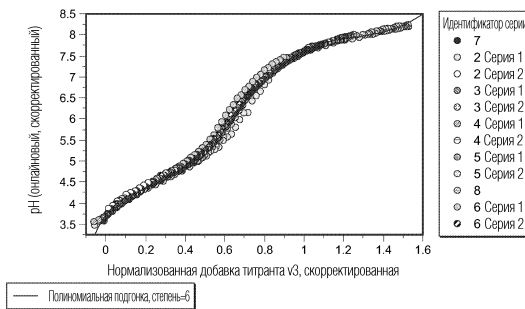
(72) Изобретатель:

Браун Росс (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к системам и способам управления pH образца, содержащим измерение начального pH, добавление количества титранта и измерение второго pH, а также использование безразмерного моделирования для нормализации титранта и определения количества титранта, требуемого для достижения конечного pH. Системы и способы могут использоваться для управления pH в ходе инактивирования вирусов или титрования образцов белка.



202490904

A1

A1

202490904

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580794EA/019

СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ И УПРАВЛЕНИЯ pH

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] Данная заявка испрашивает на приоритет и преимущество предварительной заявки на патент США № 63/253281, поданной 7 октября 2021 года, содержание которой полностью включено по ссылке в данный документ.

Предпосылки изобретения

[0002] Традиционные способы измерения и управления pH в ходе процессов, которые включают в себя изменение pH образца, могут быть проблематичными. Способы стерилизации pH-зонда и вставки зонда в образец часто являются несовместимыми с калибровкой pH-зонда. В силу этого в данной области техники существует потребность в системах и способах для управления pH образца.

Сущность изобретения

[0003] Это изобретение предусматривает системы и способы измерения и управления pH в процессе, содержащем изменение pH образца, такого как образец белка.

[0004] В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению эти способы содержат (a) измерение начального pH ($pH_{initial}$) образца; (b) добавление по меньшей мере первого количества титранта ($Titrant_n$) в образец и измерение по меньшей мере первого дополнительного значения pH (pH_n), причем $Titrant_n$ представляет собой количество титранта, добавленного в образец для достижения pH_n , при этом pH_n отличается от $pH_{initial}$; (c) применение модели для определения нормализованного начального количества титранта ($Titrant_{initial}$) и нормализованного $Titrant_n$, при этом модель соотносит нормализованное количество титранта, добавленного в образец, с pH образца; и (d) определение еще одного дополнительного количества титранта, которое следует добавить в образец для достижения целевого pH (pH_{n+1}), причем pH_{n+1} представляет собой pH, достигнутый посредством добавления общего количества титранта в образец.

[0005] В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению эти способы содержат добавление второго количества титранта ($Titrant_{n+2}$) в образец и измерение второго дополнительного pH (pH_{n+2}), и повторение этапов (c) и (d). В некоторых вариантах осуществления способы содержат добавление третьего количества титранта в образец и измерение третьего дополнительного pH, и повторение этапов (c) и (d). В некоторых вариантах осуществления добавление третьего количества титранта в образец приводит к pH, который составляет в пределах 0,05-0,10 единицы pH от конечного целевого pH (pH_{final}). В некоторых вариантах осуществления способы содержат добавление четвертого количества титранта в образец и измерение четвертого дополнительного pH. В некоторых вариантах осуществления способы содержат не более чем 3 или 4 добавления титранта для изменения pH образца до pH_{final} .

[0006] В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению способы содержат создание модели. В некоторых вариантах осуществления способы содержат (i)

создание по меньшей мере одной кривой контрольного титрования от по меньшей мере одного контрольного образца, соотносящей количество титранта, добавленного в контрольный образец, с рН контрольного образца; (ii) нормализацию упомянутой по меньшей мере одной кривой контрольного титрования; и (iii) создание модели для подгонки упомянутой по меньшей мере одной кривой контрольного титрования. В некоторых вариантах осуществления модель содержит полином, соотносящий нормализованное количество титранта с рН.

[0007] В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению разность между измеренным рН образца и моделью выявляет ошибку в калибровке рН-метра, используемого для измерения рН образца. В некоторых вариантах осуществления способы содержат перекалибровку рН-метра; (a) добавление дополнительного количества титранта в образец и измерение дополнительного рН; (b) применение модели и сравнение нормализованного количества титранта и рН с моделью; и (c) добавление оставшегося количества титранта в образец для достижения pH_{final} , когда рН соответствует модели; тем самым предотвращая повреждение образца посредством добавления слишком большого количества титранта в образец. В некоторых вариантах осуществления образец содержит белок, и способы предотвращают повреждение белка.

[0008] Изобретение предусматривает способы инактивации вируса в образце, содержащие: (a) обеспечение образца при начальном рН ($pH_{initial}$) в 4,0 или более; (b) добавление первого количества кислотного титранта ($Titrant_{n_acid}$) в образец и измерение первого дополнительного значения кислотного рН (pH_{n_acid}), причем $Titrant_{n_acid}$ представляет собой количество титранта, добавленного в образец для достижения pH_{n_acid} , при этом pH_{n_acid} отличается от $pH_{initial}$; (c) применение модели для определения нормализованного количества титранта, при этом модель соотносит нормализованное количество титранта, добавленного в образец, с рН образца; (d) определение количества титранта, которое следует добавить в образец для достижения целевого кислотного рН (pH_{acid_target}), на основе нормализованного количества титранта, рН и модели; (e) добавление этого количества титранта в образец для достижения pH_{acid_target} ; (f) повторение этапов (d) и (e) до тех пор, пока не будет достигнут конечный кислотный рН (pH_{acid_final}); (g) поддержание образца при pH_{final_acid} в течение периода времени, достаточного для инактивирования вируса; (h) добавление первого количества основного титранта ($Titrant_{n_base}$) в образец и измерение первого дополнительного значения основного рН (pH_{n_base}), причем $Titrant_{n_base}$ представляет собой количество титранта, добавленного в образец для достижения pH_{n_base} , при этом pH_{n_base} отличается от pH_{acid_final} ; (i) нормализацию $Titrant_{n_base}$ посредством применения второй модели; (j) определение количества основного титранта, которое следует добавить в образец для изменения рН образца до целевого основного рН (pH_{target_base}), на основе нормализованного количества титранта, рН и модели; (k) добавление этого количества основного титранта в образец для достижения pH_{target_base} ; и (l) повторение этапов (j) и (k) до тех пор, пока не будет достигнут конечный основной рН (pH_{final_base}). В некоторых вариантах осуществления

способы содержат повторение этапов (b) и (c) по меньшей мере один раз, чтобы подтвердить, что поведение образца соответствует модели. В некоторых вариантах осуществления способы содержат повторение этапов (d) и (e) 1, 2 или 3 раза. В некоторых вариантах осуществления способы содержат повторение этапов (d) и (e) 2 или 3 раза, и повторение этапов (d) и (e) 2 или 3 раза приводит к целевому кислотному рН, который составляет в пределах 0,05-0,10 единицы рН от pH_{acid_final} . В некоторых вариантах осуществления способы содержат повторение этапов (d) и (e) дополнительный раз для достижения pH_{acid_final} . В некоторых вариантах осуществления способы содержат всего не более чем 3 или 4 добавления кислотного титранта. В некоторых вариантах осуществления способы содержат повторение этапов (h) и (i) по меньшей мере один раз, чтобы подтвердить, что поведение образца соответствует модели. В некоторых вариантах осуществления способы содержат повторение этапов (j) и (k) 1, 2 или 3 раза. В некоторых вариантах осуществления способы содержат повторение этапов (j) и (k) 2 или 3 раза, и повторение этапов (j) и (k) 2 или 3 раза приводит к рН, который составляет в пределах 0,05-0,10 единицы рН от pH_{final_base} . В некоторых вариантах осуществления способы содержат повторение этапов (j) и (k) дополнительный раз для достижения pH_{final_base} . В некоторых вариантах осуществления способы содержат всего не более чем 3 или 4 добавления основного титранта. В некоторых вариантах осуществления pH_{acid_final} составляет между примерно 3,0 и 4,0, между примерно 3,1 и 3,9, между примерно 3,2 и 3,8, между примерно 3,3 и 3,7, между примерно 3,4 и 3,7 или между примерно 3,5 и 3,7. В некоторых вариантах осуществления pH_{final_base} составляет между примерно 5,3 и 8,5, между примерно 5,1 и 8,1, между примерно 5,5-8,0 или между примерно 7,0 и 8,5.

[0009] Изобретение предусматривает аппараты, предназначенные для способов по изобретению.

[0010] Изобретение предусматривает аппараты для управления рН при очистке белка. В некоторых вариантах осуществления аппарат может включать в себя реактор и проточную рН-ячейку, содержащую расположенный в ней рН-зонд, причем проточная рН-ячейка гидравлически соединена с реактором. Проточная рН-ячейка может принимать отводимый поток забора образцов из реактора и содержит расположенный в ней рН-зонд, который измеряет рН отводимого потока. Аппарат включает в себя блок подачи кислотного титранта, гидравлически соединенный с реактором. Блок подачи кислотного титранта подает кислотный титрант в реактор для того, чтобы уменьшить рН в реакторе. Аппарат дополнительно включает в себя блок подачи основного титранта, гидравлически соединенный с реактором. Блок подачи основного титранта подает основной титрант в реактор для того, чтобы увеличить рН в реакторе. В некоторых вариантах осуществления аппарат может дополнительно включать в себя насос для забора образцов, который доставляет отводимый поток из реактора в проточную рН-ячейку. В некоторых вариантах осуществления аппарат может включать в себя приемник отходов, который принимает выходящий поток из проточной рН-ячейки.

Краткое описание чертежей

[0011] Фиг. 1 является графиком, показывающим 11 кривых титрования, созданных с использованием 5 различных белков. рН понижали посредством добавления кислотного раствора для достижения целевого рН в 3,6. рН отложен на оси Y, в то время как ось X указывает количество добавленного кислотного титранта в оборотах насоса на килограмм элюата (об/кг). К данным о скорости работы насоса применяли сдвиг по времени для учета задержки между добавлением кислоты и откликом рН.

[0012] Фиг. 2 является графиком, показывающим кривые титрования с фиг. 1 после линейного преобразования осей X и Y с использованием уравнения 1 (ось Y) и уравнения 2 (ось X).

[0013] Фиг. 3 является схемой, показывающей применение рН-моделирования в варианте осуществления изобретения.

[0014] Фиг. 4 является графиком, показывающим 12 кривых титрования, созданных с использованием 7 различных белков. рН повышали посредством добавления основного раствора для достижения целевого рН между 7,5 и 8,0, в зависимости от белка. рН отложен на оси Y, в то время как ось X указывает количество добавленного кислотного титранта в оборотах насоса на килограмм элюата (об/кг). К данным о скорости работы насоса применяли сдвиг по времени для учета задержки между добавлением кислоты и откликом рН.

[0015] Фиг. 5 является графиком, показывающим кривые титрования с фиг. 4 после линейного преобразования осей X и Y с использованием уравнения 5 (ось Y) и уравнения 6 (ось X).

[0016] Фиг. 6 является графиком, показывающим кривые титрования с фиг. 4 после линейного преобразования осей X и Y с использованием уравнения 7 (ось Y) и уравнения 8 (ось X).

[0017] Фиг. 7 является графиком, показывающим нормализованные кривые титрования с фиг. 6, с цветовым кодированием по разности между начальным онлайн- и оффлайн-измерением для рН-зонда, используемого для того, чтобы собирать данные для каждой кривой титрования. Кривые с наибольшим отклонением от модели (черная линия) также имели наибольшие разности начальных онлайн- и оффлайн-измерений.

[0018] Фиг. 8 является графиком, показывающим нормализованные кривые титрования с фиг. 6 после коррекции онлайн-рН с использованием уравнения 9.

[0019] Фиг. 9 является графиком, показывающим кривые титрования с фиг. 4 после принудительной сходимости 2 фиксированных значений рН (рН 3,70 и рН 7,60) и линейного преобразования оси X с использованием уравнения 10. Онлайн-значения рН (ось Y) корректировали с использованием уравнения 9.

[0020] Фиг. 10 является графиком, показывающим кривые титрования с фиг. 4 после принудительной сходимости 2 фиксированных значений рН (рН 3,70 и рН 7,60) и линейного преобразования оси X с использованием уравнения 10. Онлайн-значения рН (ось Y) корректировали с использованием уравнения 9. Подогнанный к данным

полином 6 степени показан в виде сплошной линии.

[0021] Фиг. 11 является списком частот примерной системы для управления рН при изменении рН образца.

[0022] Фиг. 12 является блок-схемой последовательности операций, показывающей примерную стратегию управления для понижения рН образца белка для инактивации вирусов. VI: инактивация вирусов.

[0023] Фиг. 13 является блок-схемой последовательности операций, показывающей примерную стратегию управления для повышения рН образца белка после инактивации вирусов. VIP: пул с инактивированными вирусами (образец после добавления основания).

[0024] Фиг. 14 показывает примерную калибровочную кривую для рН-метра, используемого в примерных способах по изобретению.

[0025] Фиг. 15 является таблицей, показывающей результаты из пяти опытных серий понижения и повышения рН с использованием аппарата и способов по варианту осуществления изобретения.

[0026] Фиг. 16 является парой графиков, показывающих разность рН отведенного потока и оффлайн рН (Δ рН) сверху и ошибки дозировки в % (снизу). Формулы, используемые для вычисления Δ рН и ошибки дозировки в %, показаны на фиг. 15.

[0027] Фиг. 17 является графиком, сравнивающим условия работы рН-зонда в серии опытов по инактивации вирусов с использованием аппарата и способов по варианту осуществления изобретения.

[0028] Фиг. 18 показывает технологический мониторинг в реальном времени процесса инактивации вирусов в образцах.

[0029] Фиг. 19 является блок-схемой аппарата для управления рН, согласно варианту осуществления.

[0030] Фиг. 20 является принципиальной схемой аппарата для управления рН, согласно варианту осуществления.

[0031] Фиг. 21 является графиком, показывающим разность между фактическим рН (измеренным посредством оффлайн контрольного зонда) и целевым рН для 18 партий белка после регулирования рН с использованием 3 (кружки) или 4 (крестики) добавлений кислоты или основания. На оси X слева показана разность между измеренным и целевым рН после того, как рН был понижен для инактивации вирусов до рН между 3,50 и 3,60, в зависимости от белка. На оси X справа показана разность между фактическим и целевым рН после повышения рН до уровня между 5,50 и 8,00, в зависимости от белка. Пунктирные линии указывают заданный уровень конечного рН после добавления, который составляет в пределах 0,10 единицы рН от целевого рН.

[0032] Фиг. 22 является графиком, показывающим разность между рН, измеренным посредством онлайн управляющего зонда, и целевым рН для 18 партий белка после регулирования рН с использованием 3 (кружки) или 4 (крестики) добавлений кислоты или основания. На оси X слева показана разность между измеренным и целевым рН после того, как рН был понижен для инактивации вирусов до рН в 3,6. На оси X справа показана

разность между фактическим и целевым рН после повышения рН до рН в 7,7-8,0, в зависимости от белка. Пунктирные линии указывают заданный уровень конечного рН после добавления, который составляет в пределах 0,05 единицы рН от целевого рН.

[0033] Фиг. 23 является графиком, показывающим разность рН, измеренного посредством оффлайнного контрольного зонда и онлайнного управляющего зонда, установленного в проточной ячейке (Δ рН), на каждом этапе добавления для 18 партий белка.

[0034] Фиг. 24 является графиком, показывающим процентную ошибку добавленного объема (иногда называемую "ошибкой дозирования") на каждом этапе добавления для 18 партий белка (для 133 добавлений в сумме). Формула для процентной ошибки добавленного объема показана на фиг. 15.

Подробное описание изобретения

[0035] Изобретение относится к способам управления рН в ходе процессов, которые включают в себя изменение рН образца. Одним примером процесса, который включает в себя изменения рН, является крупномасштабное изготовление биопрепаратов, таких как антитела или другие терапевтические белки. Изготовление множества терапевтических белков включает культивирование клеток, экспрессирующих терапевтический белок, с последующей очисткой белка от культивируемых клеток и/или среды для культивирования клеток. Управление рН среды для культивирования клеток в ходе культивирования клеток и управление рН образца в ходе очистки белка важны для производства терапевтического белка. Большинство клеток млекопитающих имеют конкретный диапазон рН, который поддерживает оптимальный рост клеток, метаболизм и производство белка. Кроме того, клетки, используемые в изготовлении терапевтических белков, могут переносить вирусы, которые являются потенциально вредными, если они загрязняют лекарственные субстанции или лекарственные продукты. Один способ инактивировать потенциально вредные вирусы заключается в скоротечном понижении рН в ходе очистки терапевтического белка. Множество вирусов необратимо денатурируются и эффективно уничтожаются при рН примерно 5,0-5,5. Несколько оболочечных вирусов эффективно инактивируются в диапазоне рН примерно 3,5-4,0. Тем не менее, слишком сильное понижение рН образца белка влечет за собой риск денатурирования терапевтического белка, которое может приводить к разрушению партии белка и увеличенным производственным затратам. Поэтому существует потребность в измерении и управлении рН в ходе изготовления терапевтических белков, как в ходе культивирования клеток, так и в ходе очистки белка.

[0036] Традиционные способы измерения рН в ходе очистки белка могут быть ненадежными и приводить к отходам белкового продукта. В одном способе рН измеряют в ходе очистки белка посредством вставки стерильного рН-зонда непосредственно в реакционный сосуд, содержащий раствор белка. Однако может быть затруднительным поддерживать стерильность и точность зонда с использованием этого подхода. рН-зонды типично калибруются, запечатываются в мешок с силифонным соединителем,

используемым для того, чтобы вставлять зонд в реакционный сосуд, и стерилизуются с помощью автоклава или гамма-облучения. Тем не менее, это приводит к некоторому периоду времени между калибровкой и использованием, когда рН-зонд является сухим, что может влиять на точность зонда. Помимо этого, рН-зонды изготовлены из стекла и могут ломаться при вставке в сосуд. Вставка зонда, при поддержании стерильности, может быть затруднительной. В другом способе, который измеряет рН раствора белка косвенно, отбирают "отводимый поток" из основного раствора белка и измеряют рН отводимого потока с использованием рН-зонда. Однако без прямого измерения основной ванны раствора белка невозможно управление титрованием с прямой обратной связью для регулировки рН. Дополнительно, любой белок, извлекаемый из основной ванны в отводимый поток для измерения рН, не возвращается в основную ванну и в итоге тратится впустую. И хотя могут использоваться статистические модели титрования для того, чтобы спрогнозировать количество кислоты или основания, добавляемое при проведении регулировок рН в белковый раствор в ходе процессов изготовления, эти модели требуют ручного пользовательского ввода концентраций белка, и каждый тип титрования (кислотное или основное) требует большого статистического набора данных для создания модели. В дополнение, эти модели не являются универсально точными для всех процессов и типов белков.

[0037] В силу этого существует потребность в дополнительных способах измерения и управления рН при изготовлении белка, которые не требуют прямой вставки рН-зонда в ванну раствора белка либо непрерывного вытягивания отводимого потока материала из белковой ванны. Изобретение предусматривает способы и системы для моделирования и управления рН во время изготовления белка. Способы по изобретению являются точными по широкому диапазону белков, не требуют ввода оператора или оффлайн-измерения концентрации и не требуют больших количеств статистических данных. Способы по изобретению могут использоваться для того, чтобы экстраполировать количества кислоты или основания, требуемых для регулировки рН в ходе процессов изготовления. Кроме того, раскрытые здесь способы и системы позволяют воспроизводимо и точно достигать значений рН, которые составляют в пределах 0,05-0,10 единицы рН от требуемого целевого рН, в ходе процессов с изменением рН образца. Конечный целевой рН, например, целевой кислотный рН для инактивации вирусов образца белка или целевой основной рН после инактивации, может точно и надежно достигаться всего лишь с 3-4 добавлениями титранта. Кроме того, раскрытые здесь способы и системы также позволяют точно определять и добавлять то количество кислотного или основного титранта, которое нужно добавить в образец, и могут добавлять требуемый объем титранта с точностью 10%-й ошибки по объему или меньше в расчете на одно добавление титранта.

[0038] Изобретение предусматривает способы, содержащие измерение начального рН белкового пула, добавление консервативного количества титранта, такого как кислый или основной раствор, измерение промежуточного рН, необязательно добавление второго

количества титранта и повторение измерения рН, и определение дополнительного количества титранта, необходимого для достижения целевого рН, на основе начальных измерений и модели, основанной на контрольных образцах, которая соотносит рН с нормализованным количеством титранта. Изобретение дополнительно предусматривает аппарат для осуществления способов по изобретению.

[0039] Соответственно, изобретение предусматривает способы, содержащие: (a) измерение начального рН ($pH_{initial}$) образца; (b) добавление по меньшей мере первого количества титранта ($Titrant_n$) в образец и измерение по меньшей мере первого дополнительного значения рН (pH_n), причем $Titrant_n$ представляет собой количество титранта, добавленного в образец для достижения pH_n , при этом pH_n отличается от $pH_{initial}$; (c) применение модели для определения нормализованного $Titrant_n$, при этом модель соотносит нормализованное количество титранта, добавленного в образец, с рН образца; и (d) определение оставшегося количества титранта, которое следует добавить в образец для достижения конечного рН (pH_{final}), причем pH_{final} достигается посредством добавления общего количества титранта ($Titrant_{total}$) в образец.

Определения

[0040] При использовании в данном документе термин "начальный рН" означает рН образца перед добавлением титранта, используемого для изменения рН, т.е. раствора, который является кислым или основным относительно начального рН образца.

[0041] При использовании в данном документе термин "конечный рН" означает требуемый рН образца. Например, образец может иметь рН в 3,6, но для того, чтобы быть подходящим для конкретного назначения, должен иметь рН в 7,5, и применяемые здесь процессы используются для изменения рН с 3,6 до 7,5 за счет управляемого добавления основного титранта. В этом случае 3,6 представляет собой начальный рН, а 7,5 – конечный, или целевой рН. Специалисты поймут, что, в зависимости от образца, условий образца и применения, начальные и конечные значения рН любого конкретного образца могут быть иными. Специалисты в данной области техники поймут, что когда осуществляются процессы по изменению рН, процесс может охватывать множественные этапы, каждый из которых имеет относящийся к нему целевой рН, до достижения конечного рН образца (или конечного целевого рН).

[0042] При использовании в данном документе термин "общее количество титранта ($Titrant_{total}$)" означает количество титранта, добавленного в образец для изменения рН с начального рН до конечного рН.

[0043] При использовании в данном документе термин " pH_n " означает рН образца после добавления некоторого количества титранта (необходимого для изменения образца с предыдущего рН (pH_{n-1}) до pH_n). Соответственно, количество титранта, необходимого для изменения рН, например, с начального рН до pH_n , называется здесь " $Titrant_n$ ". Специалисты поймут, что измеренные значения рН и соответствующие количества титранта, добавленного в образец для изменения рН образца до этих измеренных значений рН, могут быть итеративными. То есть, добавочное количество титранта может

добавляться в образец при pH_n для изменения pH образца до pH_{n+1} , и количество титранта, добавленного в образец для изменения pH с начального pH до pH_{n+1} , называется "Titrant_{n+1}". Аналогично, некоторое количество титранта может добавляться в образец при pH_{n+1} для изменения pH образца до pH_{n+2} , и т.п. до тех пор, пока не будет достигнут целевой pH .

[0044] Термин "образец" означает образец, подвергаемый описанным здесь способам для изменения его pH . В некоторых случаях образец содержит белок, например, очищенный или частично очищенный белок в жидком растворе. Однако в пределах объема настоящего изобретения предусмотрены и другие типы образцов, которые включают в себя ДНК, РНК и лекарственные средства. Специалисты в данной области техники поймут, что, при использовании в данном документе, образец означает жидкий раствор, например, жидкий раствор, содержащий множество биологических молекул (ДНК, РНК или белков) или аналитов (химических соединений, лекарственных средств и т.п.). Образцы могут иметь любую подходящую концентрацию или начальный pH и включать в себя любой подходящий буфер или носитель.

[0045] Термин "контрольный образец" означает контрольный образец со свойствами, аналогичными или идентичными образцу, который был подвергнут изменениям pH , аналогичным изменениям pH образца, с которого были собраны данные о pH и добавке титранта и соотношении между этими двумя показателями. Контрольный образец может быть идентичным образцу, например, контрольный образец, извлеченный из большего образца (т.е. подобразец в качестве контрольного образца). Тем не менее, контрольный образец не должен быть обязательно идентичным образцу, если он ведет себя аналогично образцу при добавлении титранта. Например, образец и контрольный образец могут представлять собой различные партии одинакового белка, произведенного и очищенного посредством одинакового или аналогичного процесса. В качестве дополнительного примера, образец и контрольный образец могут представлять собой аналогичные, но не идентичные белки, к примеру, два антитела, или два белка с аналогичными профилями гликозилирования, которые ведут себя аналогично при прохождении аналогичного процесса титрования.

[0046] При использовании в данном документе термин "кривая титрования" означает график (или последовательность измерений), соотносящий объем добавленного в образец титранта в качестве независимой переменной с pH раствора в качестве зависимой переменной. Кривые титрования могут создаваться с помощью непрерывных измерений, например, посредством вставки pH -зонда непосредственно в образец и снятия непрерывных измерений. Альтернативно, кривые титрования могут создаваться из прерывистых измерений, с последующей подгонкой надлежащей кривой к измеренным точкам данных.

[0047] При использовании в данном документе термин "нормализовать" означает приведение значений, измеренных на различных шкалах, к общей шкале.

[0048] При использовании в данном документе термин "титрант" означает раствор

с известным рН и, предпочтительно, с известной концентрацией, который добавляют в (которым титруют) другой раствор, чтобы изменять рН этого раствора.

[0049] Термин "кислотный титрант" означает титрант с рН, который является более кислым, чем образец. В общем, кислотные титранты должны иметь рН меньше 7,0. Общепринятые кислотные титранты включают фосфорную кислоту (H_3PO_4), гидрохлорид глицина ($C_2H_6ClNO_2$, или HCl глицина), уксусную кислоту (CH_3COOH), хлористоводородную кислоту (HCl), перхлорную кислоту ($HClO_4$) и серную кислоту (H_2SO_4). Растворы кислотного титранта могут быть приготовлены путем разбавления предлагаемого на рынке концентрированного исходного раствора и определения концентрации посредством стандартизации с учетом стандартного слабого основания. Примерные кислотные титранты включают фосфорную кислоту с концентрацией от 0,20 М до 2,0 М, от 0,25 М до 1,5 М либо от 0,5 М до 1,0 М. Например, в качестве кислотного титранта может использоваться фосфорная кислота с концентрацией в 0,10 М, 0,20 М, 0,25 М, 0,30 М, 0,35 М, 0,40 М, 0,45 М, 0,50 М, 0,60 М, 0,70 М, 0,80 М, 0,90 М, 1,0 М, 1,1 М, 1,2 М, 1,3 М, 1,4 М, 1,5 М, 1,6 М, 1,7 М, 1,8 М, 1,9 М или 2,0 М. Дополнительные примерные кислотные титранты включают HCl глицина с концентрацией от 0,1 М до 1,0 М, от 0,2 М до 0,75 М, от 0,25 М до 0,75 М либо от 0,25 М до 0,5 М. Например, HCl глицина с концентрацией в 0,10 М, 0,20 М, 0,25 М, 0,30 М, 0,35 М, 0,40 М, 0,45 М, 0,50 М, 0,60 М, 0,70 М, 0,80 М, 0,90 М или 1,0 М представляет собой кислотный титрант. Дополнительные примерные кислотные титранты включают уксусную кислоту с концентрацией от 0,5 М до 3,0 М, от 1,0 М до 2,5 М, от 1,0 М до 2,0 М либо от 1,5 М до 2,0 М. Например, уксусная кислота с концентрацией в 0,50 М, 0,60 М, 0,70 М, 0,80 М, 0,90 М, 1,0 М, 1,1 М, 1,2 М, 1,3 М, 1,4 М, 1,5 М, 1,6 М, 1,7 М, 1,8 М, 1,9 М, 2,0 М, 2,1 М, 2,2 М, 2,3 М, 2,4 М, 2,5 М, 2,6 М, 2,7 М, 2,8 М, 2,9 М или 3,0 М представляет собой кислотный титрант. "Основной титрант" или "основной титрант" означает титрант с рН, который является более основным, чем образец. Общепринятые основные титранты включают гидроксид натрия (NaOH), который предлагается на рынке как в виде нечистого твердого вещества, так и в виде раствора с приблизительно 50%-ым значением вес/об. Растворы NaOH могут быть стандартизованы с учетом стандарта слабых кислот, чтобы определять концентрацию. Дополнительные общепринятые основные титранты включают трометамин (также называемый "трис-(гидроксиметил)аминометаном", или "трис-основанием", с формулой $C_4H_{11}NO_3$). Примерный основной титрант включает трометамин с концентрацией от 0,5 М до 3,0 М, от 1,0 М до 2,5 М, от 1,0 М до 2,0 М либо от 1,5 М до 2,0 М. Например, трометамин с концентрацией в 0,50 М, 0,60 М, 0,70 М, 0,80 М, 0,90 М, 1,0 М, 1,1 М, 1,2 М, 1,3 М, 1,4 М, 1,5 М, 1,6 М, 1,7 М, 1,8 М, 1,9 М, 2,0 М, 2,1 М, 2,2 М, 2,3 М, 2,4 М, 2,5 М, 2,6 М, 2,7 М, 2,8 М, 2,9 М или 3,0 М представляет собой основной титрант.

[0050] рН-метр измеряет активность ионов водорода в растворах на водной основе, указывающую на их кислотность или щелочность, выражаемую в виде рН. рН-метр измеряет разность электрического потенциала между рН-электродом и электродом

сравнения. "pH-зонд" означает часть pH-метра, содержащую pH-электрод и электрод сравнения. Типично, pH-электроды представляют собой стеклянные электроды, которые относятся к типу ионоселективного электрода, выполненного из мембраны из легированного стекла, которая является чувствительной к конкретному иону. Примерный pH-электрод представляет собой стеклянный электрод, который чувствителен к ионам водорода. Напряжение стеклянного электрода, относительно некоторого опорного значения (т.е. от электрода сравнения), является чувствительным к изменениям активности ионов водорода. Другими словами, активность ионов водорода в измеренном растворе оказывает влияние на электрохимический потенциал между электродом сравнения и чувствительным к ионам водорода электродом. pH-метр калибруется для того, чтобы скоррелировать электрохимический потенциал со значением pH.

[0051] "Калибровка pH-метра" означает процесс калибрования pH-метра относительно одного или более стандартизированных буферов с известным pH, поскольку известно, что pH-электроды дрейфуют от своих калиброванных настроек. Типичные процессы калибровки используют калибровочную кривую, созданную с помощью по меньшей мере трех стандартных буферов, хотя также может использоваться двухточечная калибровка. Примерный протокол калибровки содержит очистку электрода, погружение промытого электрода в первый стандарт при pH 4,0, затем во второй стандарт при pH 7,0 и в конечный стандарт при pH 10,0, с очисткой электродов между измерениями.

[0052] "Отведенный поток" или "отводимый поток" при использовании в данном документе означает способ забора образцов, при котором из основного образца вытягивают или выделяют подобраец, например, с использованием трубки, вставленной в основной образец, и измерения выполняют на этом подобраце. Отведенный поток может быть непрерывным, т.е. постоянно вытягиваемым из образца, либо прерывистым, вытягиваемым из образца только в дискретные моменты времени в ходе процесса.

[0053] При использовании в данном документе "онлайнный зонд" или "онлайнный pH-зонд" означает зонд, который измеряет pH образца в ходе изменений pH (онлайнный pH), и информация от которого используется в сочетании с моделями, описанными в данном документе, для того, чтобы определять количество титранта, который нужно добавить в образец в ходе этапов добавления титранта. Онлайнный зонд может быть зондом отведенного потока, например, установленным в проточной ячейке, связанной с отведенным потоком. Альтернативно, онлайнный зонд может вставляться непосредственно в реактор.

[0054] При использовании в данном документе "пептид", "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяемо во всем документе и означают молекулу, содержащую два или более аминокислотных остатка, соединенных между собой пептидной связью. Пептиды, полипептиды и белки могут также иметь модификации, такие как гликозилирование, присоединение липида, сульфатирование, гамма-карбоксихлирование, глутаминовых кислотных остатков, алкилирование, гидроксихлирование и АДФ-рибозилирование. Пептиды, полипептиды и белки могут представлять научный или

коммерческий интерес, в том числе как белковые лекарственные средства (биотерапевтические средства). Пептиды, полипептиды и белки включают, в числе прочего, антитела и химерные или слитые белки. Пептиды, полипептиды и белки могут производиться посредством рекомбинантных животных клеточных линий, к примеру, клеточных линий млекопитающих, с использованием способов культивирования клеток.

[0055] Фраза "снижение вирусной нагрузки/инактивация вирусов", используемая в данном документе, подразумевает означаемой уменьшение числа вирусных частиц в конкретном образце ("снижение"), а также уменьшение активности, например, но не ограничиваясь этим, инфекционности или способности реплицироваться у вирусных частиц в конкретном образце ("инактивацию"). Такие уменьшения числа и/или активности вирусных частиц могут составлять порядка от примерно 50% до примерно 99%, еще более предпочтительно от примерно 60% до примерно 99%, еще более предпочтительно от примерно 70% до примерно 99%, еще более предпочтительно от примерно 80% до 99%, еще более предпочтительно от примерно 90% до примерно 99%, еще более предпочтительно от примерно 95% до 99%, еще более предпочтительно от примерно 95% до 99,9%, еще более предпочтительно от примерно 95% до 99,99%, а еще более предпочтительно от примерно 98% до 99,99%. В определенных неограничивающих вариантах осуществления количество вируса, если он имеется, в очищенном продукте с антителами составляет меньше ID₅₀ для этого вируса (количество вируса, которое инфицирует 50 процентов целевой совокупности), предпочтительно, по меньшей мере в 10 раз меньше, чем ID₅₀ для этого вируса, более предпочтительно, по меньшей мере в 100 раз меньше, чем ID₅₀ для этого вируса, а еще более предпочтительно, по меньшей мере в 1000 раз меньше, чем ID₅₀ для этого вируса.

[0056] Все публикации и патенты, упомянутые в данном документе, полностью включены сюда по ссылке, как если бы каждая отдельная публикация или патент были конкретно и отдельно указаны включенными по ссылке. В случае конфликта будет преобладать настоящая заявка, включая любые приведенные здесь определения. Тем не менее, упоминание любого справочного материала, статьи, публикации, патента, патентной публикации и заявки на патент, процитированных в данном документе, не рассматривается и не должно рассматриваться в качестве подтверждения или любой формы предложения того, что они составляют допустимый уровень техники или образуют часть общеизвестных сведений в любой стране в мире.

Изменение pH образца

[0057] Изобретение предусматривает способы изменения pH образца, содержащие проведение измерения начального pH, добавление по меньшей мере первого количества титранта в образец, измерение по меньшей мере первого дополнительного значения pH и применение модели, которая соотносит pH образца с нормализованным количеством титранта, добавленного в образец. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно содержат добавление второго количества титранта в образец и измерение второго pH, и применение модели. В некоторых вариантах осуществления способы

дополнительно содержат добавление третьего, четвертого, дополнительных количеств титранта, измерение рН после каждого добавления и применение модели. Дополнительные этапы добавления консервативных количеств титранта и проверки рН могут использоваться для верифицирования того, что образец ведет себя так, как прогнозируется по модели, и того, что отсутствуют ошибки в процессе, например, ошибки вследствие калибровки рН-метра. После одного или более добавлений титранта и измерений, результаты этих измерений и модель могут использоваться для определения количества титранта, которое нужно добавить в образец для изменения рН образца до конечного, или целевого рН.

[0058] Способы по изобретению могут быть реализованы с использованием относительно небольшого числа дискретных измерений и модели для определения того количества титранта, которое следует добавить в образец для изменения рН. Посредством использования модели способы позволяют улучшить точность, с которой достигается конечный рН образца, по сравнению со способами, которые измеряют рН посредством вставки рН-зонда в образец. Разности между измеренными значениями рН и моделью могут также использоваться для выявления ошибок в процессах, например, ошибок в калибровке или функционировании рН-метра.

[0059] В некоторых вариантах осуществления рН образца изменяют за счет добавления нескольких количеств титранта. В некоторых вариантах осуществления рН образца изменяют за счет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 добавлений титранта для достижения конечного рН. В некоторых вариантах осуществления рН образца изменяют за счет 2 добавлений титранта для достижения конечного рН. В некоторых вариантах осуществления рН образца изменяют за счет 3 добавлений титранта для достижения конечного рН. В некоторых вариантах осуществления рН образца изменяют за счет 4 добавлений титранта для достижения конечного рН. В некоторых вариантах осуществления рН образца изменяют за счет 5 добавлений титранта для достижения конечного рН. В некоторых вариантах осуществления рН образца изменяют до значения рН в пределах 0,01-0,20, 0,01-0,15, 0,01-0,10, 0,05-0,20, 0,05-0,15, 0,05-0,10, 0,01-0,07 или 0,05-0,07 единицы рН от конечного рН, с последующим конечным добавлением титранта для достижения конечного рН. В некоторых вариантах осуществления рН образца изменяют до значения рН в 0,05-0,10 единицы рН от конечного рН, с последующим конечным добавлением титранта для достижения конечного рН. В качестве примера, рН образца может изменяться на целевой рН, который составляет в пределах 0,05-0,10 единицы рН от конечного рН, посредством выполнения 1, 2, 3, 4 или 5 добавлений титранта, с последующим конечным добавлением титранта для достижения конечного рН. В некоторых вариантах осуществления, например, тех вариантах осуществления, где рН образца понижается, титрант представляет собой кислоту. В альтернативных вариантах осуществления, например, тех вариантах осуществления, в которых рН образца повышается, титрант представляет собой основание. Рассогласование целевого рН, спрогнозированного по описанным здесь моделям, и измеренного рН на любом из

описанных здесь этапов добавления может указывать на то, что рН-метр, используемый для проведения измерений, имеет ошибку калибровки. Например, если спрогнозированные и измеренные значения рН для данного этапа добавления отличаются на более чем 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20 или больше единицы рН, это указывает на то, что рН-метр, используемый для измерения образца, выдает ошибочное показание. В качестве дополнительного примера, если спрогнозированные и измеренные значения рН для данного этапа добавления отличаются на более чем 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09 или 0,10 единицы рН, это указывает на то, что рН-метр, используемый для измерения образца, выдает ошибочное показание. В некоторых вариантах осуществления способы содержат прекращение процесса по изменению рН образца, когда возникает разность между спрогнозированными и измеренными значениями рН, до тех пор, пока рН-метр не будет перекалиброван или не будет заменен рН-зонд.

[0060] Способы по изобретению могут использоваться в любое время, когда требуется изменение рН образца. Например, если процесс, такой как очистка белка, производит жидкий образец, содержащий интересующий белок (иногда называемый "белковым пулом") с рН, неподходящим для этапов или вариантов применения очистки далее по ходу процесса, описанные в данном документе способы могут использоваться для изменения рН образца на требуемый рН. В качестве дополнительного примера, способы по изобретению могут использоваться для понижения рН образца белка до рН, достаточно низкого для инактивирования вирусов, потенциально загрязняющих образец белка, а затем повышения рН до нейтрального рН для дальнейших процессов очистки белка и анализа.

[0061] В некоторых вариантах осуществления образец содержит интересующий белок, например, терапевтический белок, и способы используются для инактивирования вируса в образце, содержащем терапевтический белок.

[0062] Способы рН-инактивации вирусов включают в себя, но не ограничены ими, инкубацию смеси в течение некоторого периода времени при низком рН, а затем нейтрализацию рН и удаление макрочастиц посредством фильтрации. В некоторых вариантах осуществления рН образца понижают до рН между примерно 2 и 5, предпочтительно до рН между примерно 3 и 4, а более предпочтительно до рН примерно 3,6, и инкубируют образец при этом рН, чтобы инактивировать любые присутствующие вирусы. рН смеси образца может понижаться любой подходящей кислотой, включая, но не ограничиваясь ими, фосфорную кислоту, гидрохлорид глицина, перхлорную кислоту, хлористоводородную кислоту, лимонную кислоту, уксусную кислоту, каприловую кислоту или другие подходящие кислоты. Выбор уровня рН главным образом зависит от профиля стабильности белка в образце и буферных компонентах.

[0063] В примерном способе инактивирования вируса в образце добавляют консервативное начальное количество кислотного титранта, оценивают рН, а затем добавляют дополнительное консервативное количество кислотного титранта, с

последующей еще одной оценкой рН. Это можно повторять с использованием небольших количеств кислоты до тех пор, пока не будет достигнут целевой рН, в процессе, который может занимать от 30 минут до 2 часов. Образец поддерживают при этом целевом рН в течение периода времени, достаточного для инактивирования вируса, и рН образца повышают посредством идентичного процесса, описанного выше.

[0064] В некоторых вариантах осуществления длительность периода инкубации при низком рН, который инактивирует вирус, будет составлять от 0,5 часа до 2 часов, либо от 0,5 часа до 1,5 часа, либо от 0,5 часа до 1 часа. В некоторых вариантах осуществления инкубация при низком рН составляет примерно 20 минут, примерно 30 минут, примерно 40 минут, примерно 50 минут, примерно 60 минут, примерно 70 минут, примерно 80 минут либо примерно 90 минут. Таким образом, специалист в данной области техники, в зависимости от интересующего белка, будет способен выбрать надлежащие концентрацию белка, рН и длительность времени для достижения инактивации вируса.

[0065] В некоторых вариантах осуществления изменение рН образца, содержащего интересующий белок, включает в себя понижение рН образца. Например, конечный рН образца (pH_{final}) меньше начального рН образца (pH_{initial}), и титрант представляет собой кислоту. Может использоваться любой подходящий кислый раствор, при условии, что рН титранта меньше начального рН образца.

[0066] В некоторых вариантах осуществления, например, в тех вариантах осуществления, в которых рН понижают, начальный рН образца (pH_{initial}) составляет между примерно 4,0 и 4,7, между примерно 4,0 и 4,5, между примерно 4,0 и 4,3, между примерно 4,1 и 4,6, между примерно 4,1 и 4,5, между примерно 4,1 и 4,4, между примерно 4,1 и 4,3, между примерно 4,1 и 4,2, между примерно 4,2 и 4,5, между примерно 4,3 и 4,5, между примерно 4,1 и 4,4 либо между примерно 4,2 и 4,4. В некоторых вариантах осуществления pH_{initial} составляет между примерно 4,0 и 4,5, между примерно 4,1 и 4,5, между примерно 4,2 и 4,5, между примерно 4,3 и 4,5, между примерно 4,1 и 4,4 либо между примерно 4,2 и 4,4. В некоторых вариантах осуществления начальный рН составляет примерно 4,1. В некоторых вариантах осуществления конечный рН образца (pH_{final}) составляет между примерно 3,0 и 3,8, между примерно 2,0 и 3,7, между примерно 3,0 и 3,6, между примерно 3,0 и 3,5, между примерно 3,0 и 3,4, между примерно 3,0 и 3,3, между примерно 3,1 и 3,8, между примерно 3,3 и 3,8, между примерно 3,5 и 3,8, между примерно 3,2 и 3,8, между примерно 3,3 и 3,7, между примерно 3,4 и 4,0, между примерно 3,5 и 4,0, 3,4 и 3,9, между примерно 3,4 и 3,8, между примерно 3,4 и 3,7, между примерно 3,4 и 3,6, между примерно 3,5 и 3,9, между примерно 3,5 и 3,8, между примерно 3,5 и 3,7 либо между примерно 3,5 и 3,6. В некоторых вариантах осуществления pH_{final} составляет между примерно 3,0 и 3,8, между примерно 3,1 и 3,8, между примерно 3,2 и 3,8, между примерно 3,3 и 3,7, между примерно 3,4 и 3,7 либо между примерно 3,5 и 3,7. В некоторых вариантах осуществления конечный рН составляет между примерно 3,5 и 3,7. В некоторых вариантах осуществления конечный рН составляет примерно 3,6.

[0067] В некоторых вариантах осуществления изменение рН образца, содержащего интересующий белок, включает в себя повышение рН образца. Например, конечный рН образца (pH_{final}) больше начального рН образца (pH_{initial}), и титрант представляет собой основание. Может использоваться любой подходящий основной раствор, при условии, что рН титранта является большим, чем начальный рН образца.

[0068] В некоторых вариантах осуществления, например, в тех вариантах осуществления, в которых рН повышают, начальный рН образца (pH_{initial}) составляет между примерно 3,0 и 3,8, между примерно 2,0 и 3,7, между примерно 3,0 и 3,6, между примерно 3,0 и 3,5, между примерно 3,0 и 3,4, между примерно 3,0 и 3,3, между примерно 3,1 и 3,8, между примерно 3,3 и 3,8, между примерно 3,5 и 3,8, между примерно 3,2 и 3,8, между примерно 3,3 и 3,7, между примерно 3,4 и 4,0, между примерно 3,5 и 4,0, 3,4 и 3,9, между примерно 3,4 и 3,8, между примерно 3,4 и 3,7, между примерно 3,4 и 3,6, между примерно 3,5 и 3,9, между примерно 3,5 и 3,8, между примерно 3,5 и 3,7 либо между примерно 3,5 и 3,6. В некоторых вариантах осуществления pH_{final} составляет между примерно 3,0 и 3,8, между примерно 3,1 и 3,8, между примерно 3,2 и 3,8, между примерно 3,3 и 3,7, между примерно 3,4 и 3,7 либо между примерно 3,5 и 3,7. В некоторых вариантах осуществления pH_{initial} составляет между примерно 3,0 и 3,8, между примерно 3,1 и 3,8, между примерно 3,2 и 3,8, между примерно 3,3 и 3,7, между примерно 3,4 и 3,7 либо между примерно 3,5 и 3,7. В некоторых вариантах осуществления начальный рН составляет между примерно 3,1 и 3,8. В некоторых вариантах осуществления начальный рН составляет между примерно 3,3 и 3,8. В некоторых вариантах осуществления начальный рН составляет между примерно 3,5 и 3,7. В некоторых вариантах осуществления начальный рН составляет примерно 3,6. В некоторых вариантах осуществления конечный рН (pH_{final}) составляет между примерно 5,1 и 8,5, между примерно 5,1 и 8,3, между примерно 5,1 и 8,1, между примерно 5,1 и 8,0, между примерно 5,1 и 7,7, между примерно 5,1 и 7,5, между примерно 5,1 и 7,3, между примерно 5,1 и 7,0, между примерно 5,3 и 8,5, между примерно 5,3 и 8,3, между примерно 5,3 и 8,1, между примерно 5,3 и 8,0, между примерно 5,3 и 7,7, между примерно 5,3 и 7,5, между примерно 5,3 и 7,3, между примерно 5,3 и 7,0, между примерно 5,5 и 8,5, между примерно 5,5 и 8,3, между примерно 5,5 и 8,1, между примерно 5,5 и 8,0, между примерно 5,5 и 7,7, между примерно 5,5 и 7,0, между примерно 6,0 и 8,5, между примерно 6,0 и 8,3, между примерно 6,0 и 8,0, между примерно 6,0 и 7,7, между примерно 6,0 и 7,0, между примерно 6,5 и 8,5, между примерно 6,5 и 8,3, между примерно 6,5 и 8,0, между примерно 6,5 и 7,7, между примерно 6,5 и 7,0, между примерно 7,0 и 8,5, между примерно 7,0 и 8,3, между примерно 7,5 и 8,0, между примерно 7,7 и 8,0, между примерно 7,7 и 8,5, между примерно 7,7 и 8,3, между примерно 7,9 и 8,2, между примерно 7,0 и 8,0, между примерно 7,0 и 7,9, между примерно 7,0 и 7,5, между примерно 6,8 и 7,8, между примерно 6,8 и 7,6 либо между примерно 6,8 и 7,4. В некоторых вариантах осуществления pH_{final} составляет между примерно 5,3 и 8,5, между примерно 5,1 и 8,1, между примерно 5,5 и 8,0 либо между примерно 7,5 и 8,0. В некоторых вариантах осуществления конечный рН составляет

между примерно 5,5 и 8,0. В некоторых вариантах осуществления конечный pH составляет между примерно 7,0 и 8,0.

[0069] Изобретение предусматривает способы инактивирования вируса в образце. В некоторых вариантах осуществления способы содержат обеспечение образца, содержащего интересующий белок, например, образца, который был очищен от культивируемых клеток посредством колоночной хроматографии, и понижение pH. Примерный образец может иметь начальный pH примерно 4,1-4,5, а конечный pH составляет примерно 3,5-3,7, необязательно примерно 3,6. Начальный pH будет зависеть от интересующего белка, используемых способов очистки и состава образца после этапов очистки белка (например, элюирующих буферов и т.п.). После уменьшения pH и поддержания в течение некоторого периода времени для того, чтобы инактивировать вирус, pH затем повышают до конечного основного pH между примерно 7,5 и 8,5 либо примерно 7,5 и 8,0, или примерно 7,6. Конечный основной pH будет зависеть от интересующего белка и выбора буферов и т.п., который будет зависеть от желаемых последующих применений.

[0070] Соответственно, изобретение предусматривает способы инактивации вируса в образце. В некоторых вариантах осуществления образец содержит интересующий белок. В некоторых вариантах осуществления способы содержат обеспечение образца при начальном pH ($pH_{initial}$) в 4,0 или больше, например, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4 или 4,5. В некоторых вариантах осуществления способы содержат измерение начального pH перед добавлением кислотного титранта. В некоторых вариантах осуществления способы содержат добавление первого количества кислотного титранта ($Titrant_{n_acid}$) в образец и измерение первого дополнительного значения кислотного pH (pH_{n_acid}), причем $Titrant_{n_acid}$ представляет собой количество титранта, добавленного в образец для достижения pH_{n_acid} , при этом pH_{n_acid} отличается от $pH_{initial}$. Первое количество титранта обычно представляет собой консервативное количество титранта. Например, первое количество титранта представляет собой количество титранта, спрогнозированное на основе предыдущих контрольных образцов как достаточное для изменения pH образца не более чем на полпути до целевого pH, либо не более чем на две трети пути до целевого pH, либо не более чем на три четверти пути до целевого pH. Специалисты поймут, что количества кислотного титранта, добавляемого в образец при каждом добавлении, могут регулироваться в зависимости от образца, начального pH образца, конечного целевого pH и числа добавлений кислотного титранта, добавляемого в образец для изменения pH образца. В некоторых вариантах осуществления способы включают нормализацию pH и применение модели для определения нормализованного количества титранта, т.е. нормализованного количества титранта, соответствующего начальному pH и pH после добавления первого количества кислотного титранта, при этом модель соотносит нормализованное количество титранта, добавленного в образец, с pH образца. Необязательно, добавление количества титранта может повторяться по меньшей мере один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз или более, чтобы подтвердить то, что

поведение образца соответствует модели. Если образец не соответствует модели, или подозревается ошибка калибровки рН-метра, специалисты могут снижать количество добавленного титранта и увеличивать число раз добавления титранта с тем, чтобы более точно измерить рН, и в ходе процесса исключить проскакивание целевого рН. В некоторых вариантах осуществления способы содержат определение оставшегося количества титранта, которое следует добавить в образец для достижения конечного кислотного рН (pH_{acid_final}) между 3,4 и 3,7, на основе нормализованного количества титранта, рН и модели. В некоторых вариантах осуществления способы содержат добавление оставшегося количества титранта в образец для достижения pH_{acid_final} .

[0071] В некоторых вариантах осуществления способы содержат поддержание образца при pH_{final_acid} в течение периода времени, достаточного для инактивирования вируса, например, в течение времени инкубации, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления способы содержат добавление первого количества основного титранта ($Titrant_{n_base}$) в образец и измерение первого дополнительного значения основного рН (pH_{n_base}), причем $Titrant_{n_base}$ представляет собой количество титранта, добавленного в образец для достижения pH_{n_base} , при этом pH_{n_base} отличается от pH_{acid_final} . Количество основного титранта, добавленного в образец, обычно представляет собой консервативное количество титранта, т.е. количество титранта, спрогнозированное на основе предыдущих контрольных образцов как достаточное для изменения рН образца не более чем на полпути до целевого основного рН, либо не более чем на две трети, либо не более чем на три четверти пути до целевого основного рН. Специалисты поймут, что количества основного титранта, добавленного в образец при каждом добавлении, могут регулироваться в зависимости от образца, начального рН образца, конечного целевого рН и числа добавлений основного титранта, который должен добавляться в образец для изменения его рН. В некоторых вариантах осуществления способы включают нормализацию $Titrant_{n_base}$ путем применения второй модели. В некоторых вариантах осуществления способы содержат повторение этапов добавления и измерения по меньшей мере один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз или больше, чтобы подтвердить, что поведение образца соответствует модели. Если образец не соответствует модели, или подозревается ошибка калибровки рН-метра, специалисты могут снижать количество добавленного титранта и увеличивать число раз добавления титранта с тем, чтобы более точно измерять рН и в ходе процесса исключить проскакивание целевого рН. В некоторых вариантах осуществления способы содержат определение оставшегося количества основного титранта, которое следует добавить в образец для изменения рН образца до конечного рН между 7,0 и 8,5 (pH_{final_base}), на основе нормализованного количества титранта, рН и модели. В некоторых вариантах осуществления способы содержат добавление оставшегося количества основного титранта в образец для достижения pH_{final_base} .

[0072] В некоторых вариантах осуществления способы содержат добавление одного или более консервативных количеств титранта, т.е. количеств титранта, которые

предполагаются изменяющимися рН образца не более чем на полпути до целевого рН, измерение рН и применение модели для определения оставшегося количества титранта, которое следует добавить в образец для достижения целевого, или конечного рН. В некоторых вариантах осуществления определение конечного количества титранта, которое следует добавить в образец, определяется по формуле:

$$\text{Titrant}_n \times \left[\left(\frac{(\text{normalized Titrant}_{\text{total}} - \text{normalized Titrant}_{\text{initial}})}{(\text{normalized Titrant}_n - \text{normalized Titrant}_{\text{initial}})} \right) - 1 \right] \quad (\text{Уравнение 15}).$$

В этой формуле $\text{normalized Titrant}_{\text{total}}$ – общее количество титранта, добавленного в образец для достижения конечного рН, после нормализации, $\text{normalized Titrant}_{\text{initial}}$ – количество титранта, добавленного в образец для начального рН, после нормализации (это значение может быть равно 0 до нормализации), и $\text{normalized Titrant}_n$ – количество титранта, добавленного в образец для достижения промежуточного рН_n, нормализованное с использованием модели, причем рН_n попадает между рН_{initial} и рН_{final}. Специалисты поймут, что если в образец добавляются несколько промежуточных количеств титранта и соответствующие значения рН измеряются, оставшееся количество титранта, который следует добавить в образец для достижения конечного рН, будет повторно вычисляться согласно описанной выше формуле.

[0073] В некоторых вариантах осуществления способы содержат добавление первого количества титранта (Titrant_n) в образец и измерение по меньшей мере первого дополнительного значения рН (pH_n), причем Titrant_n представляет собой количество титранта, добавленного в образец для достижения рН_n, при этом рН_n отличается от начального рН ($\text{pH}_{\text{initial}}$); применение модели для определения нормализованного начального количества титранта ($\text{Titrant}_{\text{initial}}$) и нормализованного Titrant_n , при этом модель соотносит нормализованное количество титранта, добавленного в образец, с рН образца; и определение еще одного дополнительного количества титранта (Titrant_{n+1}), который следует добавить в образец для достижения целевого рН (pH_{n+1}), причем рН_{n+1} представляет собой рН, достигнутый посредством добавления еще одного дополнительного количества титранта (Titrant_{n+1}) в образец. В некоторых вариантах осуществления способы содержат применение модели и вычисление дополнительного количества титранта (Titrant_{n+2}), которое следует добавить в образец для достижения второго целевого рН (pH_{n+2}). В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно содержат добавление дополнительного количества титранта (Titrant_{n+2}) в образец, с изменением тем самым рН образца на второй целевой рН (pH_{n+2}). В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно содержат применение модели и вычисление дополнительного количества титранта (Titrant_{n+3}), которое следует добавить в образец для достижения третьего целевого рН (pH_{n+3}). В некоторых вариантах осуществления способы содержат добавление Titrant_{n+3} , с изменением тем самым рН образца на рН_{n+3}. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно содержат применение модели и вычисление дополнительного количества титранта (Titrant_{n+4}), добавляемого в образец для достижения четвертого целевого рН (pH_{n+4}). В

некоторых вариантах осуществления добавление Titrant_{n+1} , Titrant_{n+2} , Titrant_{n+3} или Titrant_{n+4} дает целевой рН, который составляет в пределах 0,05-0,10 единицы рН от конечного целевого рН (pH_{final}). В некоторых вариантах осуществления дополнительное количество титранта, определенное посредством применения модели, добавляют в образец для достижения конечного целевого рН. Например, pH_{n+2} составляет в пределах 0,05-0,10 единицы рН от конечного целевого рН, который достигается посредством добавления Titrant_{n+3} , при этом количество добавляемого титранта для Titrant_{n+3} определяют посредством применения модели. В качестве дополнительного примера, pH_{n+3} , составляет в пределах 0,05-0,10 единицы рН от конечного целевого рН, который достигается посредством добавления Titrant_{n+4} , при этом количество добавляемого титранта для Titrant_{n+4} определяют посредством применения модели. Специалисты в данной области техники поймут, что в зависимости от абсолютной величины требуемого изменения рН и природы образца и титранта может использоваться большее или меньшее число добавлений титранта, чем описанные выше добавления, для достижения конечного целевого рН. В некоторых вариантах осуществления конечный рН достигается посредством выполнения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 добавлений титранта, при этом рН измеряют после каждого добавления, и модели, применяемой для определения количества титранта, который следует добавить для достижения дополнительного целевого рН и, необязательно, требуемого конечного рН. В некоторых вариантах осуществления способы содержат сравнение целевого рН на любом из этапов добавления, описанных в данном документе (например, pH_{n+1} , pH_{n+2} , pH_{n+3} , pH_{n+4} и т.д.), с целевым рН, спрогнозированным для соответствующего этапа по модели.

[0074] При осуществлении способов изменения рН, описанных в данном документе, измерения рН образца могут проводиться с использованием рН-зонда, вставленного в подобраец, взятый из образца. Подобраец может быть взят из образца посредством отведенного потока, например, отведенного потока, соединяющего реакционный сосуд, содержащий образец, с проточной ячейкой, в которую вставлен рН-зонд. В некоторых вариантах осуществления отведенный поток является непрерывным. В некоторых вариантах осуществления отведенный поток является непрерывным, или прерывистым. В некоторых вариантах осуществления рН образца не измеряют с использованием рН-зонда, вставленного непосредственно в образец.

Калибровка рН-метра

[0075] Способы, описанные в данном документе, могут использоваться для определения того, возникли ли ошибки в калибровке или функционировании рН-метра. Когда образец представляет собой белок, изменения рН за рамки тех, которые выдерживаются белком, могут приводить к денатурации белка, потенциально уничтожая образец. Таким образом, возможность быстро и надежно выявить ошибки калибровки рН-метра представляет собой преимущество раскрытых здесь способов по сравнению с другими способами, известными в данной области техники. Например, если обнаружена ошибка в калибровке рН-метра, то рН-метр может быть перекалиброван, заменен на

новый, либо измерения, снятые с помощью неточного рН-метра, могут быть скорректированы математически с использованием измерений, снятых с помощью второго рН-метра. В некоторых вариантах осуществления способы содержат перекалибровку рН-метра. В некоторых вариантах осуществления способы содержат замену рН-метра или рН-зонда. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно содержат добавление дополнительного количества титранта в образец и измерение дополнительного рН; применение модели и сравнение нормализованного количества титранта и рН или нормализованного рН с моделью; и добавление оставшегося количества титранта в образец для достижения pH_{final} , когда рН или нормализованный рН соответствует модели, тем самым предотвращая повреждение интересующего белка, вызываемое добавлением слишком большого количества титранта в образец.

[0076] В некоторых вариантах осуществления разность между измеренным рН образца и моделью выявляет ошибку в калибровке рН-метра, использованного для измерения рН образца. В некоторых вариантах осуществления разность измеренного рН и спрогнозированного по модели рН, которая составляет $> 0,01$ единицы рН, $> 0,02$ единицы рН, $> 0,03$ единицы рН, $> 0,04$ единицы рН, $> 0,05$ единицы рН, $> 0,06$ единицы рН, $> 0,07$ единицы рН, $> 0,08$ единицы рН, $> 0,09$ единицы рН или $> 0,10$ единицы рН, указывает на ошибку, связанную с рН-метром, к примеру, ошибку калибровки. В некоторых вариантах осуществления разность $> 0,01$ единицы рН указывает на ошибку рН-метра. В некоторых вариантах осуществления разность $> 0,05$ единицы рН указывает на ошибку рН-метра. В некоторых вариантах осуществления разность $> 0,10$ единицы рН указывает на ошибку рН-метра.

[0077] В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно содержат коррекцию для калибровки рН-метра при определении значений рН образца или значений рН по меньшей мере одного контрольного образца, используемого для создания модели. В некоторых вариантах осуществления коррекция для калибровки рН-метра содержит: (а) удаление первой части образца или контрольного образца перед добавлением титранта и измерение рН упомянутой первой части независимо калиброванным рН-метром, с получением тем самым оффлайнного начального значения рН ($pH_{\text{initial_off}}$); (б) удаление второй части образца или контрольного образца после добавления общего количества титранта и измерение рН упомянутой второй части независимо калиброванным рН-метром, с получением тем самым оффлайнного конечного значения рН ($pH_{\text{final_off}}$); и (с) применение соотношения между оффлайнным значением рН и измеренным значением рН для того, чтобы определить скорректированный рН для контрольного образца. Независимо калиброванный рН-метр может представлять собой такой же рН-метр, что и рН-метр, использованный для проведения начальных измерений, после дополнительного раунда калибровки. Альтернативно, независимо калиброванный рН-метр может представлять собой иной рН-метр.

[0078] Оффлайнное измерение может использоваться для того, чтобы вычислять

скорректированный pH согласно следующей формуле, при этом скорректированный pH для образца (или контрольного образца) определяется следующим образом:

$$pH_{\text{initial_off}} + (pH_{\text{final_off}} - pH_{\text{initial_off}}) \times \left(\frac{pH_n - pH_{\text{initial}}}{pH_{\text{final}} - pH_{\text{initial}}} \right) \quad (\text{Уравнение 16}).$$

Здесь $pH_{\text{initial_off}}$ – начальный pH образца, измеренный оффлайновым pH-метром, $pH_{\text{final_off}}$ – конечный pH образца, измеренный оффлайновым pH-метром, pH_{initial} и pH_{final} – начальное и конечное значения pH, измеренные онлайн-метром (pH-метром с ошибкой калибровки), а pH_n – нескорректированный результат измерения pH от нескорректированного pH-метра. Если корректируемый pH-метр использовался для того, чтобы проводить измерения контрольного образца, справедливо то же самое соотношение между скорректированным и нескорректированным pH, как и описанное для образца.

Модели

[0079] Изобретение предусматривает модели для использования в способах по изобретению и способы создания этих моделей.

[0080] В некоторых вариантах осуществления создание модели содержит обезразмеривание, например, обезразмеривание значений титранта кривых контрольного титрования. Обезразмеривание представляет собой частичное или полное удаление единиц измерения физических величин из уравнения, включающего в себя физические величины, посредством подстановки подходящих переменных. Например, объем титранта, добавленного в образец, может определяться в оборотах/кг насоса или мл титранта, добавленного на кг всего образца, и эти единицы измерения могут быть удалены методами обезразмеривания. Обезразмеривание может упрощать и параметризовать задачи, в которые вовлечены измеренные единицы. В некоторых случаях масштабирование является взаимозаменяемым с обезразмериванием, когда обезразмеривание используется для преобразования нескольких наборов данных в одну шкалу.

[0081] В некоторых вариантах осуществления создание модели содержит регрессионный анализ. Регрессионный анализ представляет собой набор статистических процессов для оценки соотношений между зависимой переменной (зачастую называемой переменной "отклика") и более независимыми переменными, в этом случае – pH и нормализованным количеством титранта соответственно. Одна общая форма регрессионного анализа представляет собой линейную регрессию, при которой специалист находит линию, которая наиболее близко подгоняется к данным по конкретному математическому критерию. Например, обычный метод наименьших квадратов вычисляет уникальную линию, которая минимизирует сумму квадратов разности между истинными данными и этой линией.

[0082] В некоторых вариантах осуществления подгонка модели содержит линейную регрессию. Линейная регрессия представляет собой линейный подход для моделирования соотношения между скалярной переменной отклика и одной или более объясняющих переменных. Случай одной объясняющей переменной называется "простой

линейной регрессией". В линейной регрессии соотношения моделируются с использованием функций линейного предиктора, неизвестные параметры модели которых оцениваются из данных. Такие модели называются линейными моделями.

[0083] Линейная регрессия была первым типом регрессионного анализа, тщательно изученным и экстенсивно используемым в практических вариантах применения. Это обусловлено тем, что модели, которые линейно зависят от своих неизвестных параметров, проще подгонять, чем модели, которые нелинейно соотносятся со своими параметрами, и тем, что проще определять статистические свойства результирующих оценщиков.

[0084] В некоторых вариантах осуществления регрессионный анализ содержит полиномиальную регрессию. Полиномиальная регрессия представляет собой такую форму регрессионного анализа, при которой соотношение между независимой переменной (например, нормализованным количеством титранта) и зависимой переменной (например, pH) моделируется в виде полинома n -ой степени. Полиномиальная регрессия подгоняет нелинейное соотношение между значением независимой переменной и соответствующим условным средним значением зависимой переменной. Хотя полиномиальная регрессия подгоняет к данным нелинейную модель, в качестве задачи статистической оценки она линейна в том смысле, что регрессионная функция является линейной в неизвестных параметрах, которые оцениваются из данных. По этой причине полиномиальная регрессия считается типом множественной линейной регрессии.

[0085] Полиномиальные регрессионные модели могут подгоняться с использованием метода наименьших квадратов. Метод наименьших квадратов минимизирует дисперсию несмещенных оценщиков коэффициентов, при условиях теоремы Гаусса-Маркова.

[0086] В некоторых вариантах осуществления подгонка модели содержит подгонку кривых. Подгонка кривых представляет собой процесс конструирования кривой или математической функции, которая имеет наилучшее соответствие последовательности точек данных. Подгонка кривых может включать в себя либо интерполяцию, при которой требуется точная подгонка к данным, либо сглаживание, при котором конструируется "плавная" функция, которая приблизительно соответствует данным. Кривые могут экстраполироваться, т.е. продлеваться за пределы диапазона наблюдаемых данных, хотя экстраполированные кривые подвержены некоторой степени неопределенности.

[0087] Подгонка модели может быть осуществлена с использованием любой подходящей программы, известной в данной области техники, например, Microsoft Excel, MATLAB или R.

[0088] В некоторых вариантах осуществления модель определяется по одной или более кривым титрования, созданным исходя из одного или более контрольных образцов. Контрольные образцы могут быть идентичными образцу, например, быть подобрацом большего образца, подвергнутого идентичным pH-процессам. Альтернативно, контрольные образцы могут быть аналогичными образцу. Примеры таких контрольных образцов включают ранее очищенные партии белка, идентичного интересующему белку,

которые были очищены с использованием аналогичных или идентичных способов и подвергнуты практически таким же рН-процессам. В качестве еще одной дополнительной альтернативы, контрольный белок может представлять собой белок, аналогичный, но не идентичный интересующему белку, например, два антитела или два слитых белка Fc-рецептора, при условии, что эти два белка ведут себя аналогично при прохождении через аналогичные режимы изменения рН. Вследствие обезразмеривания и способов моделирования, описанных в данном документе, начальные и конечные значения рН всех контрольных образцов и образца не должны обязательно быть идеально идентичными. Например, начальные и/или конечные значения рН одного или более контрольных образцов и образца могут отличаться на примерно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 или 1,5 единицы рН. Альтернативно, начальные и/или конечные значения рН одного или более контрольных образцов и образца могут быть идентичными.

[0089] Соответственно, изобретение предусматривает один или более контрольных образцов, применяемых для создания моделей, используемых в данном документе. Изобретение предусматривает кривые титрования, созданные посредством изменения рН контрольного образца и соотнесения рН контрольного образца с количеством титранта, добавленного в контрольный образец. Способы создания и построения кривых титрования будут известны специалистам в данной области техники.

[0090] В некоторых вариантах осуществления способы содержат (i) создание по меньшей мере одной кривой контрольного титрования исходя из по меньшей мере одного контрольного образца, соотносящей количество титранта, добавленного в контрольный образец, с рН контрольного образца; (ii) нормализацию упомянутой по меньшей мере одной кривой контрольного титрования; и (iii) создание модели для подгонки к упомянутой по меньшей мере одной кривой контрольного титрования. В некоторых вариантах осуществления создание упомянутой по меньшей мере одной кривой контрольного титрования содержит измерение начального рН контрольного образца ($pH_{initial_ref}$). За этим следует добавление в контрольный образец количества титранта ($Titrant_{n_ref}$), достаточного для изменения рН контрольного образца, и измерение дополнительного контрольного значения рН после добавления этого титранта (pH_{n_ref}). Эти этапы могут повторяться до тех пор, пока не будет достигнут конечный рН, и количество титранта в зависимости от рН контрольного образца наносится на график с использованием любой подходящей программы, известной в данной области техники. При создании кривых контрольного титрования могут использоваться любые подходящие способы добавления титранта. Титрант может добавляться дискретными шагами, например, посредством добавления дискретного количества титранта, перемешивания в течение некоторого количества времени для смешивания его с контрольным образцом (например, до тех пор, пока рН контрольного образца не станет стабильным), и проведения измерения рН. Альтернативно, титрант может добавляться непрерывно, и рН может измеряться непрерывно. При создании кривых титрования контрольного образца или образцов, могут использоваться любые подходящие способы измерения рН.

Например, pH контрольного образца может измеряться посредством pH-зонда, вставленного непосредственно в контрольный образец, или может измеряться посредством pH-зонда, вставленного в отводимый поток для непрерывного или дискретного забора образцов, вытягиваемый из контрольного образца.

[0091] В некоторых вариантах осуществления количество титранта, добавленного в контрольный образец, нормализуют по следующей формуле:

$$\text{normalized Titrant}_{n_ref} = \frac{\text{Titrant}_{n_ref} - \text{Titrant}_{1_ref}}{\text{Titrant}_{2_ref} - \text{Titrant}_{1_ref}} \quad (\text{Уравнение 17}).$$

В этой формуле Titrant_{1_ref} – количество титранта, добавленного в контрольный образец для достижения первого pH_{1_ref} , а Titrant_{2_ref} – количество титранта, добавленного в контрольный образец для достижения pH_{2_ref} .

[0092] В некоторых вариантах осуществления, например, когда для создания модели используются один контрольный образец и соответствующая кривая титрования, pH_{1_ref} может быть таким же, как и начальный pH контрольного образца, а pH_{2_ref} может быть идентичным конечному pH контрольного образца.

[0093] В альтернативных вариантах осуществления для создания модели используют множество контрольных образцов и соответствующих кривых титрования. Когда множество кривых титрования не имеют одинаковых начальных и/или конечных значений pH, pH_{1_ref} не является таким же, как и некоторые или все начальные значения pH контрольных образцов, и pH_{2_ref} не является таким же, как и некоторые или все конечные значения pH контрольных образцов. Каждая кривая контрольного титрования содержит $\text{pH}_{\text{initial_ref}}$ и $\text{pH}_{\text{final_ref}}$, и pH_{1_ref} является $\text{pH}_{\text{initial_ref}}$ из одной из множества кривых контрольного титрования, pH_{2_ref} является $\text{pH}_{\text{final_ref}}$ из одной из множества кривых контрольного титрования, и pH_{1_ref} и pH_{2_ref} выбираются охватывающими максимальную разность значений при одновременном охватывании значений pH, покрываемых всеми из множества кривых контрольного титрования. Таким образом, pH_{1_ref} и pH_2 находятся как можно дальше друг от друга, но смещены в определенной степени от $\text{pH}_{\text{initial}}$ и pH_{final} . В качестве примера, если кривые контрольного титрования содержат повышение pH, pH_{1_ref} может быть $\text{pH}_{\text{initial_ref}}$ кривой контрольного титрования с наибольшим начальным pH, а pH_{2_ref} может быть $\text{pH}_{\text{final_ref}}$ кривой контрольного титрования с наименьшим конечным pH. Специалисты поймут, что когда кривые контрольного титрования содержат понижение pH, было бы справедливым противоположное соотношение.

[0094] В некоторых вариантах осуществления начальный pH образца ($\text{pH}_{\text{initial}}$) и pH_{1_ref} являются примерно одинаковыми.

[0095] В качестве примера, значения pH могут считаться примерно одинаковыми, если они составляют в пределах примерно 0,05 единицы друг от друга. Альтернативно, значения pH в пределах 10%, 5% или 3% друг от друга могут считаться примерно одинаковыми.

[0096] В некоторых вариантах осуществления начальный pH образца ($\text{pH}_{\text{initial}}$) и pH_{1_ref} не являются одинаковыми, т.е. разность между $\text{pH}_{\text{initial}}$ и pH_{1_ref} составляет

примерно 0,05-1,5, составляет примерно 0,05-1, примерно 0,1-1, примерно 0,1-0,5 либо примерно 0,1-0,3 единицы рН. В некоторых вариантах осуществления разность между $pH_{initial}$ и pH_{1_ref} составляет примерно 0,1-0,5 единицы рН.

[0097] В некоторых вариантах осуществления конечный рН образца (pH_{final}) и pH_{2_ref} являются примерно одинаковыми.

[0098] В некоторых вариантах осуществления pH_{final} и pH_{2_ref} не являются одинаковыми, т.е. разность между pH_{final} и pH_{2_ref} составляет примерно 0,5-1,5, составляет примерно 0,05-1, примерно 0,1-1, примерно 0,1-0,5 либо примерно 0,1-0,3 единицы рН. В некоторых вариантах осуществления разность между pH_{final} и pH_{2_ref} составляет примерно 0,5-1,5 единицы рН. В некоторых вариантах осуществления разность между pH_{final} и pH_{2_ref} составляет примерно 0,5-1,0 единицы рН. В некоторых вариантах осуществления разность между pH_{final} и pH_{2_ref} составляет примерно 0,1-0,5 единицы рН.

[0099] В некоторых вариантах осуществления $pH_{initial}$, $pH_{initial_ref}$ и pH_{1_ref} являются одинаковыми, и при этом pH_{final} , pH_{final_ref} и pH_{2_ref} являются одинаковыми.

[0100] Специалисты в данной области техники примут во внимание, что выбор pH_{1_ref} и pH_{2_ref} зависит от конкретных контрольных образцов, соответствующих кривых контрольного титрования и величины вариации, содержащейся в них с учетом начальных и конечных значений рН.

[0101] В некоторых вариантах осуществления конечный рН образца (pH_{final}) меньше начального рН образца ($pH_{initial}$), и титрант представляет собой кислоту. В некоторых вариантах осуществления образец и множество контрольных образцов содержат интересующие белки. В некоторых вариантах осуществления pH_{1_ref} составляет примерно 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8 или 4,9, а pH_{2_ref} составляет примерно 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,8 или 3,9. В некоторых вариантах осуществления pH_{1_ref} составляет примерно 4,1, а pH_{2_ref} составляет примерно 3,6. В некоторых вариантах осуществления начальный рН образца и множества контрольных образцов составляет между примерно 4,1 и 4,5. В некоторых вариантах осуществления конечный рН образца и множества контрольных образцов составляет между примерно 3,5 и 3,7, необязательно – примерно 3,6. В некоторых вариантах осуществления количество титранта, добавленного во множество контрольных образцов, нормализуют к шкале от примерно -0,76 до примерно 1,49. В некоторых вариантах осуществления создание модели из множества контрольных образцов содержит подгонку полинома. В некоторых вариантах осуществления полином содержит полином 4-го порядка с формулой:

$$\text{normalized Titrant}_n = a + b \cdot pH_n + c \cdot pH_n^2 + d \cdot pH_n^3 + e \cdot pH_n^4 \quad (\text{Уравнение 18}).$$

В некоторых вариантах осуществления полином содержит:

$$\text{normalized Titrant}_n = 283,35764 - 279,43987 \cdot pH_n + 104,25395 \cdot pH_n^2 - 17,257125 \cdot pH_n^3 + 1,0589067 \cdot pH_n^4 \quad (\text{Уравнение 19}).$$

Описанный выше полином, созданный из модели, может использоваться для вычисления нормализованного количества титранта, добавленного в образец, исходя из измеренного значения рН.

[0102] В некоторых вариантах осуществления при этом конечный рН образца (pH_{final}) больше его начального рН ($pH_{initial}$), и титрант представляет собой основание. В некоторых вариантах осуществления образец и множество контрольных образцов содержат интересующие белки. В некоторых вариантах осуществления pH_{1_ref} составляет между примерно 3,1 и 3,8. В некоторых вариантах осуществления pH_{1_ref} составляет между примерно 3,4 и 4,1. В некоторых вариантах осуществления pH_{1_ref} составляет примерно 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,8 или 3,9. В некоторых вариантах осуществления pH_{1_ref} составляет примерно 3,6. В некоторых вариантах осуществления pH_{1_ref} составляет примерно 3,7. В некоторых вариантах осуществления pH_{2_ref} составляет между примерно 7,5 и 8,5. В некоторых вариантах осуществления pH_{2_ref} составляет примерно 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3 или 8,4. В некоторых вариантах осуществления pH_{2_ref} составляет примерно 7,6. В некоторых вариантах осуществления $pH_{initial}$ составляет между примерно 3,5 и 3,7. В некоторых вариантах осуществления pH_{final} составляет между примерно 5,1 и 8,5. В некоторых вариантах осуществления pH_{final} составляет между примерно 7,5 и 8,0. В некоторых вариантах осуществления pH_{final} составляет между примерно 7,5 и 8,0. В некоторых вариантах осуществления pH_{final} составляет между примерно 7,0 и 8,0, между примерно 7,1 и 7,9, между примерно 7,2 и 7,8, между примерно 7,3 и 7,7 либо между примерно 7,4 и 7,6. В некоторых вариантах осуществления количество титранта, добавленного в контрольный образец, нормализуют к шкале от примерно -0,06 до примерно 1,53. В некоторых вариантах осуществления создание модели из множества контрольных образцов содержит подгонку полинома. В некоторых вариантах осуществления полином содержит полином 5-го порядка с формулой:

$$\text{normalized Titrant}_n = a + b * pH_n + c * pH_n^2 + d * pH_n^3 + e * pH_n^4 + f * pH_n^5 \text{ (Уравнение 20).}$$

В некоторых вариантах осуществления полином содержит:

$$\text{normalized Titrant}_n = 12,256725 - 10,723277 * pH_n + 3,3662386 * pH_n^2 - 0,4588175 * pH_n^3 + 0,0255417 * pH_n^4 - 0,0003153 * pH_n^5 \text{ (Уравнение 21).}$$

Описанный выше полином, созданный из модели, может использоваться для вычисления нормализованного количества титранта, добавленного в образец, исходя из измеренного значения рН.

Описанные выше модели предназначены быть примерными и неограничивающими. Специалисты примут во внимание, что, в зависимости от начальных и конечных значений рН контрольного образца или образцов и образца, другие модели, включающие другие полиномы, созданные исходя из контрольных образцов способами, описанными в данном документе, будут подходящими для использования в способах, описанных в данном документе.

Интересующие белки

[0103] Изобретение предусматривает образцы, содержащие интересующие белки, для использования в способах, описанных в данном документе. Интересующий белок может представлять собой терапевтический белок, т.е. белок, прописанный субъекту для

лечения заболевания или расстройства. Примерные интересующие белки включают, но не ограничены ими, антитела, слитые белки Fc-рецептора, такие как белки-ловушки, цитокины, хемокины, факторы роста и т.п.

[0104] В некоторых вариантах осуществления интересующий белок представляет собой антигенсвязывающий белок, такой как антитело.

[0105] Фраза "антигенсвязывающий белок" включает в себя белок, который имеет по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR) и способен селективно распознавать антиген, т.е. способен связывать антиген с КД, которая находится по меньшей мере в микромолярном диапазоне. Терапевтические антигенсвязывающие белки (например, терапевтические антитела) часто требуют КД, которая находится в наномолярном или пикомолярном диапазоне. Типично, антигенсвязывающий белок включает в себя две или более CDR, например, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR. Примеры антигенсвязывающих белков включают антитела, антигенсвязывающие фрагменты антител, такие как полипептиды, содержащие переменные области тяжелых цепей и легких цепей антитела (например, Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент), и белки, содержащие переменные области тяжелых цепей и легких цепей антитела и содержащие дополнительные аминокислоты из константных областей тяжелых и/или легких цепей (к примеру, одного или более константных доменов, т.е. одного или более из CL-, CH1-, шарнирного, CH2- и CH3-доменов).

[0106] "Антитело" означает молекулу иммуноглобулина, состоящую из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, взаимно соединенных дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет переменную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь имеет переменную область легкой цепи (VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). VH- и VL-области могут дополнительно подразделяться на области гиперпеременности, называемые "определяющими комплементарность областями (CDR)", перемежаемые областями, которые являются более консервативными, называемыми "каркасными областями (FR)". Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Термин "антитело" включает в себя гликозилированные и негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин "антитело" включает в себя молекулы антитела, приготовленные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными средствами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной нуклеотидной последовательностью для того, чтобы экспрессировать это антитело. Термин "антитело" также включает в себя биспецифическое антитело, которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с более чем одним эпитопом. Термин "антитело", при использовании в данном документе, также включает в себя антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антитела и

слитые белки, содержащие антитела или антигенсвязывающие фрагменты.

[0107] Термин "антигенсвязывающий участок" антитела (или фрагмент антитела) означает один или более фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с антигеном. Неограничивающие примеры связывающих фрагментов белка, охватываемые термином "антигенсвязывающий участок" антитела, включают (i) Fab-фрагмент, т.е. моновалентный фрагмент, состоящий из VL-, VH-, CL- и CH1-доменов; (ii) F(ab')₂-фрагмент, т.е. бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из VH- и CH1-доменов; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из VL- и VH-доменов одного плеча антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward и др., "Nature" (1989) 241:544-546), который состоит из VH-домена, (vi) выделенную CDR и (vii) scFv, который состоит из двух доменов Fv-фрагмента, VL и VH, соединенных синтетическим линкером с образованием одной белковой цепи, в которой VL- и VH-области спариваются, образуя моновалентные молекулы. Другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела, также охватываются термином "антитело". См., например, Holliger и др., "PNAS", США (1993) 90:6444-6448; Poljak и др., "Structure" (1994) 2:1121-1123.

[0108] Еще дополнительно, антитело или его антигенсвязывающий участок может быть частью большей иммуноадгезионной молекулы, образованной посредством ковалентного или нековалентного ассоциирования антитела или участка антитела с одним или более другими белками или пептидами. Неограничивающие примеры таких иммуноадгезионных молекул включают использование области ядра стрептавидина для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov и др., "Human Antibodies and Hybridomas" (1995) 6:93-101) и использование остатка цистеина, маркерного пептида и C-концевой полигистидиновой метки для получения бивалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov и др., "Mol. Immunol." (1994) 31:1047-1058). Участки антител, такие как Fab- и F(ab')₂-фрагменты, могут быть приготовлены из целых антител с использованием традиционных методов, таких как расщепление папаином или пепсином целых антител. Кроме того, антитела, участки антител и иммуноадгезионные молекулы могут быть получены с использованием стандартных рекомбинантных ДНК-методов, общеизвестных в данной области техники (см. Sambrook и др., 1989).

[0109] Термин "антитело человека" предназначен включать в себя антитела, имеющие переменные и константные области, производные от последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека по настоящему изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодированные последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфичным мутагенезом *in vitro*, или соматическая мутация *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3.

[0110] Термин "рекомбинантное антитело человека", при использовании в данном документе, предназначено включать в себя все антитела человека, которые приготовлены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными средствами, такие как

антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфицированного в клетку-хозяина, антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных, комбинаторных антител человека, антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным для генов иммуноглобулина человека (см., например, работу авторов Taylor и др., "Nucl. Acids Res.", (1992) 20:6287-6295), либо антитела, приготовленные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим средством, которое включает в себя сращивание последовательностей генов иммуноглобулинов человека с другими ДНК-последовательностями. Такие рекомбинантные антитела человека имеют переменные и константные области, производные от последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергаются мутагенезу *in vitro* (либо, когда используется животное, трансгенное в отношении Ig-последовательностей человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), а значит, аминокислотные последовательности VH- и VL-областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя являются производными от и родственными VH- и VL-последовательностям зародышевой линии человека, могут не существовать в природе в репертуаре зародышевой линии антител человека *in vivo*.

[0111] В пределах объема раскрытых сейчас способов культивирования клеток и производства терапевтических белков предусмотрены дополнительные терапевтические белки. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок представляет собой антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антигенсвязывающего антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетраатело, Fab-фрагмент или F(ab')₂-фрагмент, антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG₁, антитело IgG₂, антитело IgG₃ или антитело IgG₄. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG₁, антитело IgG₂, антитело IgG₄, химерное антитело IgG₂/IgG₄, химерное антитело IgG₂/IgG₁ или химерное антитело IgG₂/IgG₁/IgG₄.

[0112] В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из антитела к программируемой гибели 1 клеток (например, анти-PD1 антитела, описанного в публикации заявки на патент США № US2015/0203579A1), антитела к лиганду-1 программируемой гибели клеток (например, анти-PD-L1 антитела, описанного в публикации заявки на патент США № US2015/0203580A1), анти-Dll4 антитела, антитела к ангиопоэтину-2 (например, анти-ANG2 антитела, описанного в патенте США № 9402898), антитела к ангиопоэтин-подобному белку 3 (например, анти-AngPt13 антитела, описанного в патенте США № 9018356), антитела к рецептору тромбоцитарного фактора роста (например, анти-PDGFR антитела, описанного в патенте США № 9265827), анти-Erb3 антитела, антитела к рецептору пролактина (например, анти-PRLR антитела, описанного в патенте США № 9302015), антитела к компоненту 5 комплемента (например, анти-C5 антитела, описанного в публикации заявки на патент

США № US2015/0313194A1), анти-ФНО антитела, антитела к рецептору эпидермального фактора роста (например, анти-EGFR антитела, описанного в патенте США № 9132192, или анти-EGFRvIII антитела, описанного в публикации заявки на патент США № US2015/0259423A1), антитела к пропротеиновой конвертазе субтилизин-кексинового типа 9 (например, анти-PCSK9 антитела, описанного в патенте США № 8062640 или публикации заявки на патент США № US2014/0044730A1), антитела к фактору-8 роста и дифференцировки (например, анти-GDF8 антитела, также известного как антитело к миостатину, описанного в патентах США №№ 8871209 или 9260515), антитела к рецептору глюкагона (например, анти-GCGR антитела, описанного в публикациях заявки на патент США №№ US2015/0337045A1 или US2016/0075778A1), анти-VEGF антитела, анти-IL1R антитела, антитела к рецептору интерлейкина 4 (например, анти-IL4R антитела, описанного в публикации заявки на патент США № US2014/0271681A1 или патентах США №№ 8735095 или 8945559), антитела к рецептору интерлейкина 6 (например, анти-IL6R антитела, описанного в патентах США №№ 7582298, 8043617 или 9173880), анти-IL1 антитела, анти-IL2 антитела, анти-IL3 антитела, анти-IL4 антитела, анти-IL5 антитела, анти-IL6 антитела, анти-IL7 антитела, антитела к интерлейкину-33 (например, анти-IL33 антитела, описанного в публикациях заявки на патент США №№ US2014/0271658A1 или US2014/0271642A1), антитела к респираторному синтициальному вирусу (например, анти-RSV антитела, описанного в публикации заявки на патент США № US2014/0271653A1), антитела к кластеру дифференцировки 3 (например, анти-CD3 антитела, описанного в публикациях заявки на патент США №№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1 и в заявке на патент США № 62/222605), антитела к кластеру дифференцировки 20 (например, анти-CD20 антитела, описанного в публикациях заявки на патент США №№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1 и в патенте США № 7879984), анти-CD19 антитела, анти-CD28 антитела, антитела к кластеру дифференцировки 48 (например, анти-CD48 антитела, описанного в патенте США № 9228014), анти-Fel-d1 антитела (например, описанного в патенте США № 9079948), антитела к вирусу ближневосточного респираторного синдрома (например, анти-MERS антитела, описанного в публикации заявки на патент США № US2015/0337029A1), антитела к вирусу Эбола (например, описанного в публикации заявки на патент США № US2016/0215040), антитела к вирусу Зика, антитела к гену-3 активации лимфоцитов (например, анти-LAG3 антитела или анти-CD223 антитела), антитела к фактору роста нервов (например, анти-NGF антитела, описанного в публикации заявки на патент США № US2016/0017029 и патентах США №№ 8309088 и 9353176) и антитела к активину А. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело выбрано из группы, состоящей из биспецифического анти-CD3 x анти-CD20 антитела (описанного в публикациях заявки на патент США №№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1), биспецифического антитела к CD3 и к муцину 16 (например, биспецифического анти-CD3 x анти-Muc16 антитела) и биспецифического антитела к CD3 и к простатоспецифичному мембранному антигену (например, биспецифического анти-CD3 x анти-PSMA антитела). В некоторых вариантах

осуществления интересующий белок выбран из группы, состоящей из алирокумаба, сарилумаба, фасинумаба, несвакумаба, дупилумаба, тревогрумаба, эвинакумаба и ринукумаба. Все публикации, упомянутые по всему этому раскрытию, полностью включены в данный документ по ссылке.

[0113] В других вариантах осуществления терапевтический белок представляет собой рекомбинантный белок, который содержит Fc-фрагмент и другой домен (например, слитый Fc-белок). В некоторых вариантах осуществления слитый Fc-белок представляет собой слитый белок Fc-рецептора, который содержит один или более внеклеточных доменов рецептора, соединенного с Fc-фрагментом. В некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент содержит шарнирную область, за которой следует СН2- и СН3-домен IgG. В некоторых вариантах осуществления слитый белок Fc-рецептора содержит две или более разных рецепторных цепи, которые связываются либо с одним лигандом, либо с несколькими лигандами. Например, слитый Fc-белок представляет собой белок-ловушку, такую как, например, IL-1-ловушка (например, рилонацепт, который содержит лигандсвязывающую область IL-1RAcP, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитой с Fc hIgG1; см. патент США № 6927004, который полностью включен в данный документ по ссылке), VEGF-ловушку (например, афлиберцепт или зив-афлиберцепт, который содержит Ig-домен 2 VEGF-рецептора Flt1, слитый с Ig-доменом 3 VEGF-рецептора Flk1, слитого с Fc IgG1; см. патенты США №№ 7087411 и 7279159; или конберцепт, который содержит Ig-домен 2 VEGF-рецептора Flt1, слитый с Ig-доменом 3 VEGF-рецептора Flk1, слитого с Ig-доменом 4 VEGF-рецептора Flk1, слитого с Fc hIgG1; см. патент США № 8216575) или ФНО-ловушку (например, этанерцепт, который содержит ФНО-рецептор, слитый с Fc hIgG1; см. патент США № 5610279). В других вариантах осуществления слитый Fc-белок представляет собой слитый ScFv-Fc-белок, который содержит один или более из одного или более антигенсвязывающих доменов, таких как переменный фрагмент тяжелой цепи и переменный фрагмент легкой цепи, антитела, соединенного с Fc-фрагментом.

[0114] В некоторых вариантах осуществления интересующий белок представляет собой гликопротеин. Гликопротеины с аспарагин-связанными (N-сцепленными) гликанами являются повсеместными в эукариотических клетках. Биосинтез этих гликанов и их перенос в полипептиды происходит в эндоплазматическом ретикулуме (ER). N-гликановые структуры дополнительно модифицируются некоторым числом гликозидаз и гликозилтрансфераз в ER и комплексе Гольджи. Гликозилирование терапевтических белков может быть критическим для качества и эффективности терапевтического белка. Например, гликозилирование антител представляет собой общую посттрансляционную модификацию и может играть роль в функции эффектора антител, а также в стабильности антител. Способы анализа профилей гликозилирования и процентной доли гликозилированного белка в образце белка будут известны специалисту.

Очистка белка

[0115] Описанные в данном документе способы очистки производимых клетками

интересующих белков и способы культивирования клеток для производства интересующего белка будут известны специалистам в данной области техники. Способы очистки интересующих белков от среды для культивирования клеток или от клеток включают хроматографические и нехроматографические способы. Хроматографические способы содержат пропускание содержащего антитело раствора через твердую фазу (например, кремнидидоксидную смолу или гранулы, монолитные колонки или целлюлозные мембраны) и обеспечение связывания или прохождения интересующих белков в зависимости от того, используются ли хроматографические способы на основе принципа "связывание-и-элюирование" или на основе проточного отбора. Хроматографические технологии включают, но не ограничены ими, связывание по аффинным меткам, связывание на основе белка А, ионообменную хроматографию (к примеру, анионообменную хроматографию), эксклюзионную хроматографию или иммуноаффинную хроматографию. Очистка также может достигаться посредством использования генетически слитых меток очистки, таких как полигистидиновые метки или FLAG-метки.

[0116] Примерный протокол очистки белка содержит получение осветленного раствора, содержащего интересующий белок, и выполнение комбинации различных методов очистки, включая этапы ионообменного разделения и этапы разделения с гидрофобным взаимодействием. Этапы разделения позволяют разделять смеси белков на основе их заряда, степени гидрофобности или размера. В одном аспекте изобретения разделение выполняют с использованием хроматографии, включающей катионное, анионное и гидрофобное взаимодействие. Для каждого из этих этапов доступны различные хроматографические смолы, что обеспечивает возможность точного приспособления схемы очистки к конкретному задействованному белку. Суть каждого из способов разделения заключается в том, что белки можно либо заставить проходить вниз по колонке с различными скоростями, достигая физического разделения, которое увеличивается по мере того, как они проходят дальше вниз по колонке, либо селективно прилипать к разделительной среде, причем после этого они по-разному элюируются различными растворителями. В некоторых случаях интересующий белок отделяется от примесей, когда примеси специфично прилипают к колонке, а белок не прилипает, т.е. интересующий белок присутствует в сквозном потоке.

[0117] В некоторых вариантах осуществления очистки интересующего белка включает в себя этап первичного извлечения. В некоторых вариантах осуществления этап первичного извлечения задействует хроматографическую колонку, к примеру, аффинную колонку. После этапа первичного извлечения также может быть та точка, в которой вирусы инактивируют с использованием способов, описанных в данном документе, например, посредством подвергания пула интересующего белка в элюате описанным в данном документе изменениям pH.

[0118] В некоторых вариантах осуществления извлеченный образец белка с этапа первичного извлечения подвергают дополнительным этапам очистки для того, чтобы

дополнительно очистить интересующий белок. Например, может использоваться аффинная хроматография. Неограничивающие примеры хроматографического материала, который может использоваться, включают: белок А, белок G, хроматографический материал, содержащий антиген, связанный интересующим антителом, или антитело, которое связывается с интересующим белком, и хроматографический материал, содержащий Fc-связывающий белок. В качестве дополнительного примера, может использоваться колонка с гидрофобным взаимодействием для того, чтобы удалять примеси, такие как агрегаты.

[0119] Любой этап очистки может производить образец, который может подвергаться описанным в данном документе. Потенциальные вирусы могут быть инактивированы после любого подходящего этапа очистки с использованием процессов управления рН, описанных в данном документе, после любого подходящего этапа очистки. Помимо этого, либо может изменяться рН раствора, содержащего интересующий белок, например, до рН, требуемого для следующего этапа очистки или другого последующего применения, с использованием описанных в данном документе способов.

Клетки и культивирование клеток

[0120] Изобретение предусматривает популяции клеток для использования в производстве интересующего белка, описанном в данном документе. Подходящие клетки включают в себя бактериальные клетки, дрожжевые клетки и клетки млекопитающих.

[0121] В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток выделяют или выводят из клеточной линии, способной на производство интересующего белка. Неограничивающие примеры клеточных линий, которые используются для производства терапевтических белков, включают, в числе прочего, первичные клетки, BSC-клетки, HeLa-клетки, HepG2-клетки, LLC-MK-клетки, CV-1-клетки, COS-клетки, клетки Веро, MDBK-клетки, MDCK-клетки, CRFK-клетки, RAF-клетки, RK-клетки, TCMK-1-клетки, LLCRK-клетки, PK15-клетки, LLC-RK-клетки, MDOK-клетки, клетки почки детеныша хомяка (ВНК), ВНК-21-клетки, CHO-клетки, CHO-K1-клетки, NS-1-клетки, MRC-5-клетки, WI-38-клетки, ВНК-клетки, 3Т3-клетки, 293-клетки, RK-клетки, Per.C6-клетки и клетки куриного эмбриона. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток содержит CHO-клетки. В некоторых вариантах осуществления CHO-клетки содержат CHO-клетки из одной или более из нескольких конкретных разновидностей CHO-клеток, оптимизированных для крупномасштабного производства белка, например, CHO-K1-, CHO-K1-производные клетки EESYR® (с областями с улучшенной экспрессией и стабильностью) (патент США № 7771997), либо технологии FASTR, описанной в патенте США № 6919183, которая обеспечивает выделение клеток, производящих секретированные белки.

[0122] В некоторых вариантах осуществления популяция клеток, которая культивируется и экспрессирует интересующий белок, представляет собой популяцию клеток, полученных посредством клонального размножения клетки (т.е. клетки-предшественника), которая питает и экспрессирует полинуклеотид, кодирующий

интересующий терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% либо примерно 100% клеток, составляющих популяцию клеток, полученных или разведенных посредством клонального размножения из клетки-предшественника, содержат белок-кодирующий полинуклеотид и экспрессируют интересующий белок.

[0123] В некоторых вариантах осуществления популяция клеток, которая культивируется и экспрессирует терапевтический белок, производится посредством культивирования клеток, которые были заморожены и хранились. Клетки млекопитающих могут замораживаться и криоконсервироваться, например, в среде криоконсервации, содержащей диметилсульфоксид (ДМСО) и среду для культивирования клеток. В примерном протоколе криоконсервации клетки млекопитающих переносятся в среду криоконсервации и медленно замораживаются перед хранением в жидком азоте. Например, клетки могут быть размножены и криоконсервированы, чтобы создать банк клеток, который представляет собой банк клеток, созданных из одного пула клеток с требуемыми характеристиками.

[0124] Настоящее изобретение предусматривает способы культивирования клеток, экспрессирующих интересующий белок, до очистки.

[0125] "Культивирование клеток" или "культивирование" означает рост и распространение клеток за пределами многоклеточного организма или ткани. Подходящие условия культивирования для клеток млекопитающих известны в данной области техники. См., например, работу "Animal cell culture:: A Practical Approach", D. Rickwood, ed., Oxford University Press, Нью-Йорк (1992). Клетки млекопитающих могут культивироваться в суспензии или при присоединении к твердой подложке. Для культивирования клеток млекопитающих доступны биореакторы с псевдооживленным слоем, половолоконные биореакторы, роллер-флаконы, встряхиваемые колбы или биореакторы с перемешивающим баком, с микроносителями или без них, и работающие в периодическом, периодическом с подпиткой, непрерывном, полунепрерывном или перфузионном режиме.

[0126] В некоторых вариантах осуществления культивирование популяции клеток, экспрессирующих интересующий белок, содержит фазу размножения или роста, в которой популяция клеток размножается до размера, достаточного для того, чтобы произвести требуемое количество интересующего белка на стадии производства.

[0127] В некоторых вариантах осуществления культивирование популяции клеток, экспрессирующих интересующий белок, содержит фазу производства, при этом популяцию клеток культивируют в производственной среде культивирования клеток при условиях, достаточных для того, чтобы производить интересующий белок. Фаза производства может проводиться при любом масштабе культивирования, от отдельных колб и встряхиваемых колб или мешков фирмы Wave, до однолитровых биореакторов и до крупномасштабных промышленных биореакторов. Крупномасштабный процесс может

проводиться в объеме примерно от 100 литров до 20000 литров или больше. Могут использоваться одно или более из нескольких средств для управления производством белка, к примеру, температурным сдвигом или химической индукцией. Фаза роста может происходить при более высокой температуре, чем фаза производства. Например, фаза роста может происходить при первой температуре примерно 35-38°C, а фаза производства может происходить при второй температуре примерно 29-37°C, необязательно от примерно 30°C до 36°C или от примерно 30°C до 34°C. Помимо этого, химические индукторы производства белка, такие как кофеин, бутират, тамоксифен, эстроген, тетрациклин, доксициклин и гексаметиленбисацетамид (НМВА), могут добавляться одновременно с, до или после температурного сдвига. Если индукторы добавляются после температурного сдвига, они могут добавляться от одного часа до пяти дней после температурного сдвига, к примеру, от одного до двух дней после температурного сдвига. Производственные культуры клеток могут выполняться сериями в качестве системы культивирования с непрерывной подачей, аналогично хемостату (см. работу авторов С. Altamirano и др., "Biotechnol Prog.", ноябрь-декабрь 2001 г.; 17 (6):1032-41), либо согласно периодическому процессу с подпиткой (работа автора Huang, 2010).

[0128] При использовании в данном документе, термины "среда для культивирования клеток", "среда", "клеточная среда", "среда культивирования клеток" или "культуральная среда" означают любой питательный раствор, используемый для выращивания клеток, например, клеток животных или млекопитающих, который, в общем, предоставляет по меньшей мере один или более компонентов из следующего: источник энергии (обычно в форме углевода, к примеру, глюкозы); одна или более из всех незаменимых аминокислот и, в общем, двадцати основных аминокислот; витамины и/или другие органические соединения, типично требуемые в низких концентрациях; липиды или свободные жирные кислоты; и следовые элементы, например, неорганические соединения или встречающиеся в природе элементы, которые типично требуются в очень низких концентрациях, обычно в микромолярном диапазоне. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток формируется посредством комбинирования гидролизата сои или другого растительного белка с одним или более дополнительными ингредиентами.

[0129] При использовании в данном документе, "дополнительный ингредиент" включает в себя любые один или более компонентов среды для культивирования клеток, включая, но не ограничиваясь ими, воду, источник энергии, одну или более из всех незаменимых аминокислот и, в общем, двадцати основных аминокислот; витамины и/или другие органические соединения, типично требуемые в низких концентрациях, липиды или свободные жирные кислоты, следовые элементы и полиамины, такие как орнитин и путресцин. Например, среда для культивирования клеток может быть образована посредством комбинирования гидролизатов сои с основной средой для культивирования клеток и пополнения среды дополнительными полиаминами.

[0130] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток

содержит основную среду, которая химически задана, к примеру, индивидуально определяемый состав или предлагаемую на рынке основную среду.

[0131] Предлагаемые на рынке культуральные среды будут известны специалистам в данной области техники и включают в себя, в числе прочего, MEM (минимальную незаменимую среду) (Eagle, "Science", 1955, 112 (3168):501-504), F12 Хама (Ham, "Proc. Nat'l. Acad. Sci.", США, 1965, 53:288-293), среду F-12 К, среду Дульбекко, среду Игла, модифицированную Дульбекко ("Proc. Nat'l. Acad. Sci." США, август 1952; 38 (8): 747-752), среды DMEM/Хама F12 1:1, Тройэлла T8, A2 (Holmes и Wolf, "Biophys. Biochem. Cytol.", 1961, 10:389-401), среду Уэймута (Davidson и Waymouth, "Biochem. J.", 1945, 39 (2):188-199), E-среду Уильямса (William и др., "Exp. Cell Res.", 1971, 69:105 и далее), RPMI 1640 (Moore и др., "J. Amer. Med. Assoc.", 1967, 199:519-524), среду MCDB 104/110 (Bettger и др., "Proc. Nat'l. Acad. Sci.", США, 1981, 78 (9):5588-5592), среду Ventrex HL-1, альбуминово-глобулиновую среду (Ogg и др., "Appl. Microbiol.", 1973, 25 (1):49-54), среду RPM I-1640, среду RPM I-1641, среду Искова, модифицированную Дульбекко, 5A-среду МакКоя, L-15-среду Лейбовица, и бессывороточные среды, к примеру, серию EX-CELL® 300 ("JRH Biosciences", Ленекса, Канзас), протаминово-цинково-инсулиновую среду (Weiss и др., 1974, патент США № 4072565), биотиново-фолатную среду (Cartaya, 1978, США Re30985), трансферрин-жирнокислотную среду (Baker, 1982, патент США № 4560655), трансферрин-EGF-среду (Hasegawa, 1982, патент США № 4615977; Chesseebeuf, 1984, патент США № 4786599) и другие пермутации сред (см. Inlow, патент США № 6048728; Drapeau, патент США № 7294484; Mather, патент США № 5122469; Furukawa, патент США № 5976833; Chen, патент США № 6180401; Chen, патент США № 5856179; Etcheverry, патент США № 5705364; Etcheverry, патент США № 7666416; Ryll, патент США № 6528286; Singh, патент США № 6924124; Luan, патент США № 7429491; и т.п.).

[0132] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток является бессывороточной. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток является бессывороточной и безгидролизатной.

[0133] В некоторых вариантах осуществления среда, которая находится при своей полезной концентрации (т.е. 1x), содержит по меньшей мере 40 ± 6 мМ или по меньшей мере $55 \pm 10,5$ мМ смеси аминокислот или солей аминокислот. В одном варианте осуществления среда содержит по меньшей мере 40 мМ смеси аминокислот. В этом или другом варианте осуществления среда содержит по меньшей мере 55 мМ смеси аминокислот. В одном варианте осуществления смесь аминокислот (за исключением глутамина, который может добавляться обратно в среду в качестве добавки на месте использования) содержит аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновую кислоту, цистеин, глутаминовую кислоту, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин.

[0134] В некоторых вариантах осуществления среда содержит одну или более жирных кислот. В одном конкретном варианте осуществления среда содержит смесь жирных кислот (или производных жирных кислот) и альфа-токоферола. Жирные кислоты

или производные жирных кислот выбраны из группы, состоящей из линолевой кислоты, линоленовой кислоты, тиоктовой кислоты, олеиновой кислоты, пальмитиновой кислоты, стеариновой кислоты, арахидиновой кислоты, кислоты, лауриновой кислоты, бегеновой кислоты, декановой кислоты, додекановой кислоты, гексановой кислоты, лигноцериновой кислоты, миристиновой кислоты и октановой кислоты.

[0135] В некоторых вариантах осуществления среда содержит смесь нуклеозидов. В одном варианте осуществления среда содержит аденозин, гуанозин, цитидин, уридин, тимидин и гипоксантин.

[0136] В некоторых вариантах осуществления среда содержит смесь солей. Соли включают двухвалентные катионы, такие как кальций и магний. В одном варианте осуществления среда содержит хлорид кальция и сульфат магния. Другие соли могут включать в себя фосфатные соли.

[0137] В зависимости от процесса культивирования клеток, разная среда культивирования клеток может использоваться в разные моменты времени в ходе культивирования клеток. Например, среда культивирования клеток для размножения может использоваться при размножении исходной популяции клеток из замороженной аликвоты, чтобы произвести популяцию клеток для производства интересующего белка. Вторая, производственная среда культивирования клеток может использоваться для культивации размноженной популяции клеток для производства интересующего белка, а третья, "питающая" среда для культивирования клеток может использоваться для питания культуры клеток в ходе производства. Альтернативно, идентичная среда культивирования клеток может использоваться во всем процессе культивирования клеток. В качестве дополнительной альтернативы, среда для размножения может отличаться от производственной и питающей сред, которые имеют идентичный или аналогичный состав.

[0138] В некоторых вариантах осуществления одна или более добавок на месте использования могут добавляться в любую из сред культивирования клеток в ходе культивирования клеток, как описано в данном документе.

[0139] В некоторых вариантах осуществления культивирование популяции клеток содержит добавление питающей среды в производственную культуру клеток. При использовании в данном документе, "питающая среда" означает среду, добавляемую к культивируемым клеткам, чтобы пополнить истощенные питательные вещества. Питающая среда может быть концентрированной. Например, один или все компоненты питающей среды могут быть концентрированными по сравнению с производственной средой культивирования клеток. Альтернативно, питающая среда может иметь аналогичную концентрацию с производственной средой культивирования клеток. Питающая среда может добавляться в культуру непрерывно или с интервалами в ходе культивирования, например, каждый день, через день, либо культура клеток может подпитываться тогда, когда концентрация конкретного компонента среды, который отслеживается, выходит за пределы требуемого диапазона.

[0140] В некоторых вариантах осуществления среда пополняется с интервалами в

ходе культивирования клеток согласно периодическому процессу с подпиткой. Периодическое культивирование с подпиткой является общеизвестным в данной области техники и используется для того, чтобы оптимизировать производство белка. См., например, работу авторов Y.M. Huang и др., "Biotechnol Prog.", (2010) 26 (5) pp.1400-1410.

[0141] Процент жизнеспособных клеток может измеряться в любой точке во время описанных в данном документе способов культивирования клеток. Способы определения количества жизнеспособных клеток и плотности клеток включают, но не ограничены ими, обработку изображений клеток и количественное определение числа, плотности, диаметра и биомаркерной экспрессии клеток.

[0142] Клетки млекопитающих, к примеру, СНО-клетки, могут культивироваться в мелкомасштабных контейнерах для культивирования клеток, к примеру, в 125-миллилитровых контейнерах с примерно 25 мл среды, в 250-миллилитровых контейнерах с примерно 50-100 мл среды, либо в 500-миллилитровых контейнерах с примерно 100-200 мл среды. Например, эти мелкомасштабные контейнеры могут представлять собой встряхиваемые колбы. Колбы для культивирования клеток известны в данной области техники и предлагаются, например, компаниями Corning, Fisher Scientific и другими поставщиками.

[0143] Альтернативно, культуры клеток могут выращиваться в лабораторном масштабе. Они включают, например, 1000-миллилитровые контейнеры с примерно 300-1000 мл среды, 3000-миллилитровые контейнеры с примерно 500-3000 мл среды, 8000-миллилитровые контейнеры с примерно 2000-8000 мл среды и 15000-миллилитровые контейнеры с примерно 4000-15000 мл среды. Подходящие системы культивирования клеток предлагаются на рынке.

[0144] Культуры для промышленного изготовления (т.е. производственные культуры клеток) могут содержать 10000 л среды или более. Крупномасштабные культуры клеток или "производственные культуры клеток", к примеру, для изготовления терапевтического белка, типично поддерживаются в течение многих дней или даже недель, в то время как клетки производят требуемый(е) белок(ки). В течение этого времени культура может пополняться концентрированной питающей средой, содержащей такие компоненты, как питательные вещества и аминокислоты, которые потребляются в ходе культивирования.

[0145] В некоторых вариантах осуществления среда культивирования клеток пополняется одной или более "добавками на месте использования", также известными как добавки, ингредиенты на месте использования или химикаты на месте использования, в ходе роста клеток или производства белка. Добавки на месте использования включают в себя любое одно или более из фактора роста или других белков, буфера, источника энергии, соли, аминокислоты, металла, осмолита и хелатора. Другие белки включают трансферрин и альбумин. Факторы роста, которые включают цитокины и хемокины, являются общеизвестными в данной области техники, и известно, что они стимулируют рост клеток или, в некоторых случаях, клеточную дифференцировку. Фактор роста

обычно представляет собой белок (например, инсулин), небольшой пептид или стероидный гормон, к примеру, эстроген, ДНЭА, тестостерон и т.п.

[0146] В некоторых вариантах осуществления среда культивирования клеток пополняется любыми одной или более или всеми из следующих добавок на месте использования: бикарбонат натрия, декстроза, L-глутамин, L-тирозин, смесь аминокислот и фосфат натрия.

[0147] Буферы являются общеизвестными в данной области техники. Изобретение не ограничено каким-либо конкретным буфером или буферами, и любой из средних специалистов в данной области техники сможет выбрать надлежащий буфер или буферную систему для применения с конкретной клеточной линией, производящей конкретный белок.

[0148] Источники энергии для применения в качестве добавки на месте использования при культивировании клеток также известны в данной области техники. Без ограничения, в некоторых вариантах осуществления источником энергии - добавкой на месте использования является глюкоза. В других вариантах осуществления источником энергии - добавкой на месте использования является декстроза.

[0149] Хелаторы аналогично известны в области техники культивирования клеток и производства белков. Дегидрат и цитрат ЭДТА тетранатрия представляют собой два общепринятых хелатора, используемых в данной области техники, хотя другие хелаторы могут использоваться при практическом применении этого изобретения.

[0150] Другие добавки на месте использования включают в себя одну или более различных солей металлов, таких как соли железа, никеля, цинка и меди. В одном варианте осуществления среда культивирования клеток пополняется любыми одним или более из сульфата меди, сульфата цинка, хлорида железа и сульфата никеля.

Аппараты

[0151] Изобретение предусматривает аппараты для применения в способах, описанных в данном документе.

[0152] В некоторых вариантах осуществления аппарат может использоваться для управления рН и реализации рН-последовательностей (последовательностей, изменяющих рН образца) для эффективного инактивирования вирусов в образцах белка в реакторах. Вытягивание образца из реактора и измерение рН образца может решать несколько проблем, которые возникают в результате использования зонда, вставленного в реакторе. Например, зонды зачастую нельзя калибровать после стерилизации. Стерилизация может оказывать влияние на кривую калибровки зонда. Стерилизация с помощью автоклава зачастую включает в себя координацию с третьей стороной и в силу этого является времязатратной. Зонд может храниться в сухой окружающей среде после стерилизации, что может снижать характеристики и срок хранения зонда. Использование зонда зачастую включает в себя использование дополнительного стерильного соединительного порта. Дополнительно, использование зонда включает в себя риск поломки зонда и утечки контрольного раствора в белковый продукт, измеряемый зондом.

[0153] Фиг. 19 является блок-схемой аппарата 100 для управления рН, согласно варианту осуществления. Как показано, аппарат 100 включает в себя реактор 110, проточную рН-ячейку 120, блок 130 подачи кислотного титранта, блок 140 подачи основного титранта и, необязательно, приемник 150 отходов. Проточная рН-ячейка 120 содержит рН-зонд 121, расположенный в ней с возможностью измерять рН образца текучей среды в проточной ячейке. Линии между компонентами представляют гидравлические соединения. Аппарат 100 может включать в себя один или более контроллеров для управления любым из своих технологических блоков. Контроллеры могут управлять последовательностями этапов (например, развертыванием кислотного титранта/основного титранта). В некоторых вариантах осуществления один или более контроллеров управляют последовательностями, которые могут быть основаны на измерениях рН в проточной рН-ячейке. Контроллеры могут быть доступными через пользовательский интерфейс. В некоторых вариантах осуществления пользовательский интерфейс может включать в себя компьютер, переносной компьютер, мобильное устройство, планшетный компьютер, мобильный телефон или любое другое подходящее устройство.

[0154] В реакторе 110 управляют рН на основе задаваемой пользователем последовательности, например, задаваемой пользователем последовательности изменений рН, спроектированной для инактивирования вирусов в образце, содержащем очищенный или частично очищенный белок. В некоторых вариантах осуществления реактор 110 может представлять собой реактор периодического действия или иметь свойства реактора периодического действия. В некоторых вариантах осуществления реактор 110 может представлять собой реактор с баком непрерывного перемешивания (CSTR) или иметь свойства CSTR. В некоторых вариантах осуществления реактор 110 может представлять собой реактор с пробковым режимом течения (PFR) или иметь свойства PFR. В некоторых вариантах осуществления реактор 110 может включать в себя расположенный в нем смеситель. В некоторых вариантах осуществления смеситель может включать в себя лопастное колесо. Смеситель может гомогенизировать содержимое реактора 110 непосредственно до, после или в ходе добавления кислотного титранта и/или основного титранта. В некоторых вариантах осуществления смеситель управляется контроллером, т.е. контроллер отправляет сигналы смесителю на запуск лопастного колеса, остановку лопастного колеса или управление скоростью лопастного колеса. В некоторых вариантах осуществления аппарат 100 может включать в себя смеситель, расположенный снаружи реактора 110. Другими словами, смеситель может представлять собой отдельный от реактора 110 блок. В некоторых вариантах осуществления смеситель кислоты (не показан) может быть гидравлически соединен с блоком 130 подачи кислотного титранта и смешивать кислотный титрант перед добавлением в реактор 110. В некоторых вариантах осуществления смеситель основания (не показан) может быть гидравлически соединен с блоком 140 подачи основного титранта и смешивать основной титрант перед добавлением в реактор 110. В некоторых вариантах осуществления в реакторе 110 может отсутствовать

измерительный рН-зонд, расположенный в нем. Реактор 110 может поддерживаться при требуемом рН посредством доставки кислотного титранта и/или основного титранта из блока 130 подачи кислотного титранта и/или блока 140 подачи основного титранта.

[0155] В некоторых вариантах осуществления контроллер отправляет сигналы смесителю на запуск смесителя перед запуском насоса кислотного титранта (для добавлений кислотного титранта) или перед запуском насоса основного титранта (для добавлений основного титранта). В некоторых вариантах осуществления контроллер отправляет сигналы смесителю на остановку через фиксированный период времени после того, как остановится насос кислотного титранта или насос основного титранта. Например, контроллер может отправлять сигнал смесителю на остановку через 15 секунд, 30 секунд, 1 минуту, 2 минуты, 3 минуты, 4 минуты, 5 минут, 6 минут, 7 минут, 8 минут, 9 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут или 1 час после того, как остановит насос кислотного титранта или насос основного титранта.

[0156] В некоторых вариантах осуществления реактор 110 может иметь объем, составляющий по меньшей мере примерно 1 л, по меньшей мере примерно 2 л, по меньшей мере примерно 3 л, по меньшей мере примерно 4 л, по меньшей мере примерно 5 л, по меньшей мере примерно 6 л, по меньшей мере примерно 7 л, по меньшей мере примерно 8 л, по меньшей мере примерно 9 л, по меньшей мере примерно 10 л, по меньшей мере примерно 20 л, по меньшей мере примерно 30 л, по меньшей мере примерно 40 л, по меньшей мере примерно 50 л, по меньшей мере примерно 60 л, по меньшей мере примерно 70 л, по меньшей мере примерно 80 л, по меньшей мере примерно 90 л, по меньшей мере примерно 100 л, по меньшей мере примерно 200 л, по меньшей мере примерно 300 л, по меньшей мере примерно 400 л, по меньшей мере примерно 500 л, по меньшей мере примерно 600 л, по меньшей мере примерно 700 л, по меньшей мере примерно 800 л, по меньшей мере примерно 900 л, по меньшей мере примерно 1 м³, по меньшей мере примерно 2 м³, по меньшей мере примерно 3 м³, по меньшей мере примерно 4 м³, по меньшей мере примерно 5 м³, по меньшей мере примерно 6 м³, по меньшей мере примерно 7 м³, по меньшей мере примерно 8 м³, по меньшей мере примерно 9 м³, по меньшей мере примерно 10 м³, по меньшей мере примерно 20 м³, по меньшей мере примерно 30 м³, по меньшей мере примерно 40 м³, по меньшей мере примерно 50 м³, по меньшей мере примерно 60 м³, по меньшей мере примерно 70 м³, по меньшей мере примерно 80 м³ либо, по меньшей мере примерно 90 м³. В некоторых вариантах осуществления реактор 110 может иметь объем, составляющий не более примерно 100 м³, не более примерно 90 м³, не более примерно 80 м³, не более примерно 70 м³, не более примерно 60 м³, не более примерно 50 м³, не более примерно 40 м³, не более примерно 30 м³, не более примерно 20 м³, не более примерно 10 м³, не более примерно 9 м³, не более примерно 8 м³, не более примерно 7 м³, не более примерно 6 м³, не более примерно 5 м³, не более примерно 4 м³, не более примерно 3 м³, не более примерно 2 м³, не более примерно 1 м³, не более примерно 900 л, не более примерно 800 л, не более примерно 700 л, не более примерно 600 л, не более примерно 500 л, не более

примерно 400 л, не более примерно 300 л, не более примерно 200 л, не более примерно 100 л, не более примерно 90 л, не более примерно 80 л, не более примерно 70 л, не более примерно 60 л, не более примерно 50 л, не более примерно 40 л, не более примерно 30 л, не более примерно 20 л, не более примерно 10 л, не более примерно 9 л, не более примерно 8 л, не более примерно 7 л, не более примерно 6 л, не более примерно 5 л, не более примерно 4 л, не более примерно 3 л или не более примерно 2 л.

[0157] Также возможны комбинации вышеуказанных объемов реактора 110 (например, по меньшей мере примерно 1 л и не более примерно 100 м³ или по меньшей мере примерно 10 л и не более примерно 500 л), включая все значения и диапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления реактор 110 может иметь объем примерно 1 л, примерно 2 л, примерно 3 л, примерно 4 л, примерно 5 л, примерно 6 л, примерно 7 л, примерно 8 л, примерно 9 л, примерно 10 л, примерно 20 л, примерно 30 л, примерно 40 л, примерно 50 л, примерно 60 л, примерно 70 л, примерно 80 л, примерно 90 л, примерно 100 л, примерно 200 л, примерно 300 л, примерно 400 л, примерно 500 л, примерно 600 л, примерно 700 л, примерно 800 л, примерно 900 л, примерно 1 м³, примерно 2 м³, примерно 3 м³, примерно 4 м³, примерно 5 м³, примерно 6 м³, примерно 7 м³, примерно 8 м³, примерно 9 м³, примерно 10 м³, примерно 20 м³, примерно 30 м³, примерно 40 м³, примерно 50 м³, примерно 60 м³, примерно 70 м³, примерно 80 м³, примерно 90 м³ либо примерно 100 м³. В некоторых вариантах осуществления реактор 110 может включать в себя индикатор уровня.

[0158] В некоторых вариантах осуществления рН-зонд 121 может располагаться в проточной рН-ячейке 120. В некоторых вариантах осуществления рН в реакторе 110 можно определять или выявлять на основе показания от рН-зонда 121 в проточной рН-ячейке 120. рН-зонд 121 в проточной рН-ячейке 120 измеряет разность электрических потенциалов между электродом сравнения и селективным к ионам водорода электродом при вставке в выходящий из реактора 110 поток. Другими словами, активность ионов водорода в выходящем потоке влияет на электрохимический потенциал между электродом сравнения и селективным к ионам водорода электродом, и рН-передатчик (не показан) откалиброван коррелировать разность потенциалов с рН. В некоторых вариантах осуществления аппарат 100 может включать в себя рН-передатчик (не показан). В некоторых вариантах осуществления рН-передатчик соединен с рН-зондом 121 и выполнен с возможностью принимать сигнал, формируемый рН-зондом 121. В некоторых вариантах осуществления рН-передатчик преобразует принятый от рН-зонда 121 сигнал в результат измерения рН. В некоторых вариантах осуществления рН-передатчик содержит пользовательский интерфейс, выполненный с возможностью отображать результат измерения рН. В некоторых вариантах осуществления рН-передатчик может представлять собой отдельный от проточной рН-ячейки 120 компонент. В некоторых вариантах осуществления рН-передатчик может передавать показание рН из рН-зонда 121 в контроллер. В некоторых вариантах осуществления контроллер отправляет показание рН из рН-передатчика в пользовательский интерфейс (не показан), выполненный с

возможностью отображать показание рН. На основе рН, передаваемого рН-передатчиком, аппарат 100 может либо поддерживать свой текущий режим работы или инициировать изменение в работе (например, добавление кислотного титранта из блока 130 подачи кислотного титранта). В некоторых вариантах осуществления изменение в работе может быть реализовано автоматически. В некоторых вариантах осуществления изменение в работе может быть реализовано через пользовательский ввод.

[0159] В некоторых вариантах осуществления рН-зонд 121, расположенный в проточной рН-ячейке 120, может измерять рН между нижним граничным значением рН и верхним граничным значением рН. В некоторых вариантах осуществления нижнее граничное значение рН может составлять примерно 1,0, примерно 1,1, примерно 1,2, примерно 1,3, примерно 1,4, примерно 1,5, примерно 1,6, примерно 1,7, примерно 1,8, примерно 1,9 или примерно 2,0, включая все значения и диапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления верхнее граничное значение рН может составлять примерно 8,5, примерно 8,7, примерно 8,8, примерно 8,9, примерно 9,0, примерно 9,1, примерно 9,2, примерно 9,3, примерно 9,4, примерно 9,5, примерно 9,6, примерно 9,7, примерно 9,8, примерно 9,9, примерно 10,0, примерно 10,2, примерно 10,5, примерно 10,7, примерно 11,0, примерно 11,5, примерно 12,0 или примерно 12,5, включая все значения и диапазоны между ними.

[0160] РН-зонд измеряет рН объема образца в проточной рН-ячейке 120 из реактора 110. В некоторых вариантах осуществления объем образца может составлять по меньшей мере примерно 0,1 мл, по меньшей мере примерно 0,2 мл, по меньшей мере примерно 0,3 мл, по меньшей мере примерно 0,4 мл, по меньшей мере примерно 0,5 мл, по меньшей мере примерно 0,6 мл, по меньшей мере примерно 0,7 мл, по меньшей мере примерно 0,8 мл, по меньшей мере примерно 0,9 мл, по меньшей мере примерно 1 мл, по меньшей мере примерно 2 мл, по меньшей мере примерно 3 мл, по меньшей мере примерно 4 мл, по меньшей мере примерно 5 мл, по меньшей мере примерно 6 мл, по меньшей мере примерно 7 мл, по меньшей мере примерно 8 мл, по меньшей мере примерно 9 мл, по меньшей мере примерно 10 мл, по меньшей мере примерно 20 мл, по меньшей мере примерно 30 мл, по меньшей мере примерно 40 мл, по меньшей мере примерно 50 мл, по меньшей мере примерно 60 мл, по меньшей мере примерно 70 мл, по меньшей мере примерно 80 мл, по меньшей мере примерно 90 мл, по меньшей мере примерно 100 мл, по меньшей мере примерно 110 мл, по меньшей мере примерно 120 мл, по меньшей мере примерно 130 мл, по меньшей мере примерно 140 мл или по меньшей мере примерно 150 мл. В некоторых вариантах осуществления объем образца может составлять не более примерно 150 мл, не более примерно 140 мл, не более примерно 130 мл, не более примерно 120 мл, не более примерно 110 мл, не более примерно 100 мл, не более примерно 90 мл, не более примерно 80 мл, не более примерно 70 мл, не более примерно 60 мл, не более примерно 50 мл, не более примерно 40 мл, не более примерно 30 мл, не более примерно 20 мл, не более примерно 10 мл, не более примерно 9 мл, не более примерно 8 мл, не более примерно 7 мл, не более примерно 6 мл, не более примерно

5 мл, не более примерно 4 мл, не более примерно 3 мл, не более примерно 2 мл, не более примерно 1 мл, не более примерно 0,9 мл, не более примерно 0,8 мл, не более примерно 0,7 мл, не более примерно 0,6 мл, не более примерно 0,5 мл, не более примерно 0,4 мл, не более примерно 0,3 мл или не более примерно 0,2 мл. Также возможны комбинации вышеуказанных объемов образца (например, по меньшей мере примерно 0,1 мл и не более примерно 100 мл или по меньшей мере примерно 10 мл и не более примерно 20 мл), включая все значения и диапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления объем образца может составлять примерно 0,1 мл, примерно 0,2 мл, примерно 0,3 мл, примерно 0,4 мл, примерно 0,5 мл, примерно 0,6 мл, примерно 0,7 мл, примерно 0,8 мл, примерно 0,9 мл, примерно 1 мл, примерно 2 мл, примерно 3 мл, примерно 4 мл, примерно 5 мл, примерно 6 мл, примерно 7 мл, примерно 8 мл, примерно 9 мл, примерно 10 мл, примерно 20 мл, примерно 30 мл, примерно 40 мл, примерно 50 мл, примерно 60 мл, примерно 70 мл, примерно 80 мл, примерно 90 мл или примерно 100 мл.

[0161] В некоторых вариантах осуществления объем образца может быть фиксированным объемом. В некоторых вариантах осуществления объем образца может быть переменным объемом. В некоторых вариантах осуществления объем образца может изменяться на основе нескольких факторов, включая, но не ограничиваясь ими, количество текучей среды в реакторе 110, тип белка в реакторе 110 и/или размер реактора 110. В некоторых вариантах осуществления образцы могут вытягиваться из реактора 110 и измеряться с предписанными интервалами. В некоторых вариантах осуществления образцы могут вытягиваться из реактора 110 и измеряться со спонтанными указываемыми пользователем интервалами.

[0162] В некоторых вариантах осуществления один или более контроллеров могут инициировать действие(я) на основании измеренного проточной рН-ячейкой 120 значения рН. Например, контроллер может инициировать доставку кислотного титранта из блока 130 подачи кислотного титранта в реактор 110, если рН, измеренный проточной рН-ячейкой 120, больше требуемого значения рН. В некоторых вариантах осуществления контроллер может инициировать доставку основного титранта из блока 140 подачи основного титранта в реактор 110, если рН, измеренный проточной рН-ячейкой 120, меньше требуемого значения рН. В некоторых вариантах осуществления контроллер(ы) может поддерживать рН на требуемом значении в течение требуемого периода времени. В некоторых вариантах осуществления действие может быть инициировано вручную (т.е. посредством вмешательства пользователя). В некоторых вариантах осуществления действие может быть инициировано автоматически (т.е. на основе предписанной последовательности). В некоторых вариантах осуществления предписанная последовательность может включать в себя снижение рН в реакторе 110 до первого значения рН и затем увеличение рН в реакторе до второго значения рН. В некоторых вариантах осуществления первое значение рН может составлять между примерно 3,0 и примерно 4,5, между примерно 3,5 и примерно 4,3, между примерно 3,5 и примерно 4,0, между примерно 3,1 и примерно 3,9, между примерно 3,2 и примерно 3,8, между

примерно 3,3 и примерно 3,7, между примерно 3,4 и примерно 3,7, между примерно 3,3 и примерно 3,6, между примерно 3,4 и примерно 3,6, между примерно 3,4 и примерно 3,5 либо между примерно 3,5 и примерно 3,6. В некоторых вариантах осуществления второе значение рН может составлять между примерно 7 и примерно 8,5, между примерно 7,1 и примерно 8,4, между примерно 7,2 и примерно 8,3, между примерно 7,3 и примерно 8,2, между примерно 7,4 и примерно 8,2, между примерно 7,4 и примерно 8,1, между примерно 7,4 и примерно 8,0, между примерно 7,5 и примерно 8,2, между примерно 7,5 и примерно 8,1, между примерно 7,5 и примерно 8,0, между примерно 7,6 и примерно 8,1, между примерно 7,6 и примерно 8,0, между примерно 7,6 и примерно 7,9, между примерно 7,7 и примерно 8,0, между примерно 7,7 и примерно 7,9 либо между примерно 7,7 и примерно 7,8.

[0163] В некоторых вариантах осуществления доставка кислотного титранта для достижения первого значения рН может происходить на множественных фазах. Другими словами, кислотный титрант может добавляться с детализацией таким образом, что рН содержимого реактора 110 может точно отслеживаться. В некоторых вариантах осуществления доставка кислотного титранта для достижения первого значения рН может происходить за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, примерно 15, примерно 20, примерно 35, примерно 30, примерно 35, примерно 40, примерно 45, примерно 50, примерно 55, примерно 60, примерно 65, примерно 70, примерно 75, примерно 80, примерно 85, примерно 90, примерно 95 или примерно 100 фаз, включая все значения и диапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления доставка кислотного титранта для достижения первого значения рН может происходить за 1, 2, 3 или 4 фазы. Это может разрешать трудность проверки рН-метров, поскольку небольшие добавления титранта могут более прогнозируемо изменять рН содержимого реактора 110.

[0164] В некоторых вариантах осуществления доставка основного титранта для достижения второго значения рН может происходить на множественных фазах. Другими словами, основной титрант может добавляться с детализацией таким образом, что рН содержимое реактора 110 может точно отслеживаться. В некоторых вариантах осуществления доставка основного титранта для достижения второго значения рН может происходить за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, примерно 15, примерно 20, примерно 35, примерно 30, примерно 35, примерно 40, примерно 45, примерно 50, примерно 55, примерно 60, примерно 65, примерно 70, примерно 75, примерно 80, примерно 85, примерно 90, примерно 95 или примерно 100 фаз, включая все значения и диапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления доставка основного титранта для достижения второго значения рН может происходить за 1, 2, 3 или 4 фазы.

[0165] Кислотный титрант может доставляться из блока 130 подачи кислотного титранта, когда это желательно. В некоторых вариантах осуществления кислотный титрант может доставляться посредством насоса (не показан). В некоторых вариантах осуществления блок 130 подачи кислотного титранта может включать в себя контейнер. В некоторых вариантах осуществления блок 130 подачи кислотного титранта может

[0166] Также возможны комбинации вышеуказанных объемов блока 130 подачи кислотного титранта (например, по меньшей мере примерно 10 мл и не более примерно 10 м³ либо по меньшей мере примерно 1 л и не более примерно 5 л), включая все значения и диапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления блок 130 подачи кислотного титранта может иметь объем примерно 10 мл, примерно 20 мл, примерно 30 мл, примерно 40 мл, примерно 50 мл, примерно 60 мл, примерно 70 мл, примерно 80 мл, примерно 90 мл, примерно 100 мл, примерно 200 мл, примерно 300 мл, примерно 400 мл, примерно 500 мл, примерно 600 мл, примерно 700 мл, примерно 800 мл, примерно 900 мл, примерно 1 л, примерно 2 л, примерно 3 л, примерно 4 л, примерно 5 л, примерно 6 л, примерно 7 л, примерно 8 л, примерно 9 л, примерно 10 л, примерно 20 л, примерно 30 л, примерно 40 л, примерно 50 л, примерно 60 л, примерно 70 л, примерно 80 л, примерно 90 л, примерно 100 л, примерно 200 л, примерно 300 л, примерно 400 л, примерно 500 л, примерно 600 л, примерно 700 л, примерно 800 л, примерно 900 л, примерно 1 м³, примерно 2 м³, примерно 3 м³, примерно 4 м³, примерно 5 м³, примерно 6 м³, примерно 7 м³, примерно 8 м³ или примерно 9 м³, либо примерно 10 м³.

[0167] В некоторых вариантах осуществления блок 130 подачи кислотного титранта может поддерживаться при рН по меньшей мере примерно 0,5, по меньшей мере примерно 1, по меньшей мере примерно 1,5, по меньшей мере примерно 2, по меньшей мере примерно 2,5, по меньшей мере примерно 3, по меньшей мере примерно 3,5, по меньшей мере примерно 4, по меньшей мере примерно 4,5, по меньшей мере примерно 5, по меньшей мере примерно 5,5, по меньшей мере примерно 6 либо по меньшей мере примерно 6,5. В некоторых вариантах осуществления блок 130 подачи кислотного титранта может поддерживаться при рН не более примерно 7, не более примерно 6,5, не более примерно 6, не более примерно 5,5, не более примерно 5, не более примерно 4,5, не более примерно 4, не более примерно 3,5, не более примерно 3, не более примерно 2,5, не более примерно 2, не более примерно 1,5, не более примерно 1 либо не более примерно 0,5. Также возможны комбинации вышеуказанных значений рН в блоке 130 подачи кислотного титранта (например, по меньшей мере примерно 0,5 и не более примерно 7 либо по меньшей мере примерно 2 и не более примерно 6), включая все значения и диапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления блок 130 подачи кислотного титранта может поддерживаться при рН примерно 0, примерно 0,5, примерно 1, примерно 1,5, примерно 2, примерно 2,5, примерно 3, примерно 3,5, примерно 4, примерно 4,5, примерно 5, примерно 5,5, примерно 6, примерно 6,5 или примерно 7.

[0168] Основной титрант может доставляться из блока 140 подачи основного титранта, когда это желательно. В некоторых вариантах осуществления основной титрант может доставляться посредством насоса (не показан). В некоторых вариантах осуществления блок 140 подачи основного титранта может включать в себя контейнер. В некоторых вариантах осуществления блок 140 подачи основного титранта может включать в себя бак. В некоторых вариантах осуществления блок 140 подачи основного титранта может иметь объем по меньшей мере примерно 10 мл, по меньшей мере

м³ либо по меньшей мере примерно 1 л и не более примерно 5 л), включая все значения и диапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления блок 140 подачи основного титранта может иметь объем примерно 10 мл, примерно 20 мл, примерно 30 мл, примерно 40 мл, примерно 50 мл, примерно 60 мл, примерно 70 мл, примерно 80 мл, примерно 90 мл, примерно 100 мл, примерно 200 мл, примерно 300 мл, примерно 400 мл, примерно 500 мл, примерно 600 мл, примерно 700 мл, примерно 800 мл, примерно 900 мл, примерно 1 л, примерно 2 л, примерно 3 л, примерно 4 л, примерно 5 л, примерно 6 л, примерно 7 л, примерно 8 л, примерно 9 л, примерно 10 л, примерно 20 л, примерно 30 л, примерно 40 л, примерно 50 л, примерно 60 л, примерно 70 л, примерно 80 л, примерно 90 л, примерно 100 л, примерно 200 л, примерно 300 л, примерно 400 л, примерно 500 л, примерно 600 л, примерно 700 л, примерно 800 л, примерно 900 л, примерно 1 м³, примерно 2 м³, примерно 3 м³, примерно 4 м³, примерно 5 м³, примерно 6 м³, примерно 7 м³, примерно 8 м³ или примерно 9 м³, либо примерно 10 м³.

[0170] В некоторых вариантах осуществления блок 140 подачи основного титранта может поддерживаться при рН по меньшей мере примерно 7, по меньшей мере примерно 7,5, по меньшей мере примерно 8, по меньшей мере примерно 8,5, по меньшей мере примерно 9, по меньшей мере примерно 9,5, по меньшей мере примерно 10, по меньшей мере примерно 10,5, по меньшей мере примерно 11, по меньшей мере примерно 11,5, по меньшей мере примерно 12, по меньшей мере примерно 12,5, по меньшей мере примерно 13 или по меньшей мере примерно 13,5. В некоторых вариантах осуществления блок 140 подачи основного титранта может поддерживаться при рН не более примерно 14, не более примерно 13,5, не более примерно 13, не более примерно 12,5, не более примерно 12, не более примерно 11,5, не более примерно 11, не более примерно 10,5, не более примерно 10, не более примерно 9,5, не более примерно 9, не более примерно 8,5, не более примерно 8 или не более примерно 7,5. Также возможны комбинации вышеуказанных значений рН в блоке 140 подачи основного титранта (например, по меньшей мере примерно 7,5 и не более примерно 14 либо по меньшей мере примерно 8 и не более примерно 10), включая все значения и диапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления блок 140 подачи основного титранта может поддерживаться при рН примерно 7, примерно 7,5, примерно 8, примерно 8,5, примерно 9, примерно 9,5, примерно 10, примерно 10,5, примерно 11, примерно 11,5, примерно 12, примерно 12,5, примерно 13, примерно 13,5 или примерно 14.

[0171] Приемник 150 отходов является необязательным и может принимать выходящий поток от образца, измеренного в проточной рН-ячейке 120. В некоторых вариантах осуществления приемник 150 отходов может включать в себя контейнер, бак, обрабатывающую установку или любое другое подходящее устройство, которое может принимать выходящий поток из проточной рН-ячейки 120.

[0172] Фиг. 20 является принципиальной схемой аппарата 200 для управления рН, согласно варианту осуществления. Как показано, аппарат 200 включает в себя реактор 210, проточную рН-ячейку 220 с рН-зондом 221, насос 222 для забора образцов, обратный

клапан 224 (также известный как невозвратный клапан), блок 230 подачи кислотного титранта, насос 232 кислотного титранта, расходомер 234 кислотного титранта, блок 240 подачи основного титранта, насос 242 основного титранта, расходомер 244 основного титранта, приемник 250 отходов, контроллер 260 и пользовательский интерфейс 262. В некоторых вариантах осуществления обратный клапан 224 разрешает течение только в одном направлении, из реактора 210, тем самым предотвращая загрязнение реактора 210 объемом образца в проточной рН-ячейке 220. В некоторых вариантах осуществления реактор 210, проточная рН-ячейка 220, блок 230 подачи кислотного титранта, блок 240 подачи основного титранта и приемник 250 отходов могут быть идентичными или практически аналогичными реактору 110, проточной рН-ячейке 120, блоку 130 подачи кислотного титранта, блоку 140 подачи основного титранта и приемнику 150 отходов, как описано выше со ссылкой на фиг. 19. Таким образом, конкретные аспекты реактора 210, проточной рН-ячейки 220, блока 230 подачи кислотного титранта, блока 240 подачи основного титранта и приемника 250 отходов не описаны здесь подробнее. Как показано, стрелки представляют поток текучих сред.

[0173] Как показано, поток может вытекать из реактора 210 в приемник 250 отходов. Реактор 210 принимает потоки из блока 230 подачи кислотного титранта и блока 240 подачи основного титранта. В некоторых вариантах осуществления реактор 210 может включать в себя расположенный в нем смеситель. В некоторых вариантах осуществления аппарат 200 может включать в себя один или более смесителей, внешних относительно реактора 210.

[0174] В некоторых вариантах осуществления проточная рН-ячейка 220 может представлять собой проточную рН-ячейку компании Mettler Toledo. В некоторых вариантах осуществления в проточной рН-ячейке 220 может быть расположен рН-зонд 221. Примерные рН-зонды, подходящие для описанных в данном документе аппаратов, включают встроенные рН-зонды компаний Mettler Toledo, Thermo Fisher Scientific или Cole-Parmer. В некоторых вариантах осуществления рН-зонд 221 соединен с рН-передатчиком. РН-передатчик, например, может представлять собой рН-передатчик М400 компании Mettler Toledo. В некоторых вариантах осуществления рН-передатчик может визуально отображать на себе показание рН. В некоторых вариантах осуществления рН-передатчик передает показание рН в контроллер 260. В некоторых вариантах осуществления контроллер 260 передает показание рН пользовательскому интерфейсу 262, который отображает показание рН. В некоторых вариантах осуществления рН-передатчик может передавать показание рН пользовательскому интерфейсу 262. Течением через проточную ячейку 220 можно управлять посредством насоса 222 для забора образцов.

[0175] Насос 222 для забора образцов откачивает объем текучей среды образца (т.е. отводимый поток) из реактора 210, так что объем текучей среды образца может входить в проточную рН-ячейку 220. В некоторых вариантах осуществления насос 222 для забора образцов может включать в себя перистальтический насос, диафрагменный насос,

шестеренчатый насос, лепестковый насос, поршневой насос, центробежный насос или любой другой подходящий насос, либо их комбинации. В некоторых вариантах осуществления насос 222 для забора образцов может включать в себя насос модели 120 компании Watson-Marlow.

[0176] Обратный клапан 224 разрешает течение только в одном направлении, из реактора 210, тем самым предотвращая загрязнение реактора 210 объемом образца в проточной ячейке 220. Как показано, клапан 224 расположен по ходу потока перед насосом 222 для забора образцов. В некоторых вариантах осуществления клапан 224 может быть расположен по ходу потока за насосом 222 для забора образцов. В некоторых вариантах осуществления аппарат 200 может включать в себя отсечной клапан (не показан), расположенный по ходу потока за реактором 210 и гидравлически соединенный с реактором 210. В некоторых вариантах осуществления отсечной клапан может быть физически соединен с реактором.

[0177] Блок 230 подачи кислотного титранта содержит кислотный титрант. Кислотный титрант может вытягиваться из блока 230 подачи кислотного титранта через насос 232 кислотного титранта. Насос 232 кислотного титранта вытягивает текучую среду из блока 230 подачи кислотного титранта и обеспечивает поток кислотного титранта в реактор 210. В некоторых вариантах осуществления насос 232 кислотного титранта может обеспечивать расход кислотного титранта по меньшей мере примерно 1 мл/мин, по меньшей мере примерно 2 мл/мин, по меньшей мере примерно 3 мл/мин, по меньшей мере примерно 4 мл/мин, по меньшей мере примерно 5 мл/мин, по меньшей мере примерно 6 мл/мин, по меньшей мере примерно 7 мл/мин, по меньшей мере примерно 8 мл/мин, по меньшей мере примерно 9 мл/мин, по меньшей мере примерно 10 мл/мин, по меньшей мере примерно 20 мл/мин, по меньшей мере примерно 30 мл/мин, по меньшей мере примерно 40 мл/мин, по меньшей мере примерно 50 мл/мин, по меньшей мере примерно 60 мл/мин, по меньшей мере примерно 70 мл/мин, по меньшей мере примерно 80 мл/мин, по меньшей мере примерно 90 мл/мин, по меньшей мере примерно 100 мл/мин, по меньшей мере примерно 200 мл/мин, по меньшей мере примерно 300 мл/мин, по меньшей мере примерно 400 мл/мин, по меньшей мере примерно 500 мл/мин, по меньшей мере примерно 600 мл/мин, по меньшей мере примерно 700 мл/мин, по меньшей мере примерно 800 мл/мин, по меньшей мере примерно 900 мл/мин, по меньшей мере примерно 1 л/мин, по меньшей мере примерно 2 л/мин, по меньшей мере примерно 5 л/мин, по меньшей мере примерно 10 л/мин, по меньшей мере примерно 20 л/мин, по меньшей мере примерно 30 л/мин, по меньшей мере примерно 40 л/мин или по меньшей мере примерно 50 л/мин. В некоторых вариантах осуществления насос 232 кислотного титранта может обеспечивать расход кислотного титранта не более примерно 50 л/мин, не более примерно 40 л/мин, не более примерно 30 л/мин, не более примерно 20 л/мин, не более примерно 10 л/мин, не более примерно 5 л/мин, не более примерно 2 л/мин, не более примерно 1 л/мин, не более примерно 900 мл/мин, не более примерно 800 мл/мин, не более примерно 700 мл/мин, не более примерно 600 мл/мин, не более примерно 500

мл/мин, не более примерно 400 мл/мин, не более примерно 300 мл/мин, не более примерно 200 мл/мин, не более примерно 100 мл/мин, не более примерно 90 мл/мин, не более примерно 80 мл/мин, не более примерно 70 мл/мин, не более примерно 60 мл/мин, не более примерно 50 мл/мин, не более примерно 40 мл/мин, не более примерно 30 мл/мин, не более примерно 20 мл/мин, не более примерно 10 мл/мин, не более примерно 9 мл/мин, не более примерно 8 мл/мин, не более примерно 7 мл/мин, не более примерно 6 мл/мин, не более примерно 5 мл/мин, не более примерно 4 мл/мин, не более примерно 3 мл/мин или не более примерно 2 мл/мин.

[0178] Также возможны комбинации вышеуказанных расходов кислотного титранта (например, по меньшей мере примерно 1 мл/мин и не более примерно 1 л/мин либо по меньшей мере примерно 10 мл/мин и не более примерно 50 мл/мин), включая все значения и диапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления насос 232 кислотного титранта может обеспечивать расход кислотного титранта примерно 1 мл/мин, примерно 2 мл/мин, примерно 3 мл/мин, примерно 4 мл/мин, примерно 5 мл/мин, примерно 6 мл/мин, примерно 7 мл/мин, примерно 8 мл/мин, примерно 9 мл/мин, примерно 10 мл/мин, примерно 20 мл/мин, примерно 30 мл/мин, примерно 40 мл/мин, примерно 50 мл/мин, примерно 60 мл/мин, примерно 70 мл/мин, примерно 80 мл/мин, примерно 90 мл/мин, примерно 100 мл/мин, примерно 200 мл/мин, примерно 300 мл/мин, примерно 400 мл/мин, примерно 500 мл/мин, примерно 600 мл/мин, примерно 700 мл/мин, примерно 800 мл/мин, примерно 900 мл/мин или примерно 1 л/мин.

[0179] Расход кислотного титранта может измеряться расходомером 234 кислотного титранта. В некоторых вариантах осуществления расходомер 234 кислотного титранта может включать в себя ультразвуковой расходомер, вихревой смеситель, магнитометр, кориолисов расходомер или любой другой подходящий расходомер, либо их комбинации. Подходящие расходомеры кислотного титранта предлагаются на рынке, например, расходомер 234 кислотного титранта может включать в себя ультразвуковой расходомер компании Sonotec.

[0180] В некоторых вариантах осуществления насос 232 кислотного титранта может включать в себя перистальтический насос, диафрагменный насос, шестеренчатый насос, лепестковый насос, поршневой насос, центробежный насос или любой другой подходящий насос, либо их комбинации. Подходящие насосы (232) кислотного титранта предлагаются на рынке, например, насос модели 530 компании Watson-Marlow.

[0181] Блок 240 подачи основного титранта содержит основной титрант. Основной титрант может вытягиваться из блока 240 подачи основного титранта через насос 242 основного титранта. Насос 242 основного титранта вытягивает текучую среду из блока 240 подачи основного титранта и обеспечивает поток основного титранта в реактор 210. В некоторых вариантах осуществления насос 242 основного титранта может обеспечивать расход основного титранта по меньшей мере примерно 1 мл/мин, по меньшей мере примерно 2 мл/мин, по меньшей мере примерно 3 мл/мин, по меньшей мере примерно 4 мл/мин, по меньшей мере примерно 5 мл/мин, по меньшей мере примерно 6 мл/мин, по

меньшей мере примерно 7 мл/мин, по меньшей мере примерно 8 мл/мин, по меньшей мере примерно 9 мл/мин, по меньшей мере примерно 10 мл/мин, по меньшей мере примерно 20 мл/мин, по меньшей мере примерно 30 мл/мин, по меньшей мере примерно 40 мл/мин, по меньшей мере примерно 50 мл/мин, по меньшей мере примерно 60 мл/мин, по меньшей мере примерно 70 мл/мин, по меньшей мере примерно 80 мл/мин, по меньшей мере примерно 90 мл/мин, по меньшей мере примерно 100 мл/мин, по меньшей мере примерно 200 мл/мин, по меньшей мере примерно 300 мл/мин, по меньшей мере примерно 400 мл/мин, по меньшей мере примерно 500 мл/мин, по меньшей мере примерно 600 мл/мин, по меньшей мере примерно 700 мл/мин, по меньшей мере примерно 800 мл/мин, по меньшей мере примерно 900 мл/мин, по меньшей мере примерно 1 л/мин, по меньшей мере примерно 2 л/мин, по меньшей мере примерно 5 л/мин, по меньшей мере примерно 10 л/мин, по меньшей мере примерно 20 л/мин, по меньшей мере примерно 30 л/мин, по меньшей мере примерно 40 л/мин или по меньшей мере примерно 50 л/мин. В некоторых вариантах осуществления насос 242 основного титранта может обеспечивать расход кислотного титранта не более примерно 50 л/мин, не более примерно 40 л/мин, не более примерно 30 л/мин, не более примерно 20 л/мин, не более примерно 10 л/мин, не более примерно 5 л/мин, не более примерно 2 л/мин, не более примерно 1 л/мин, не более примерно 900 мл/мин, не более примерно 800 мл/мин, не более примерно 700 мл/мин, не более примерно 600 мл/мин, не более примерно 500 мл/мин, не более примерно 400 мл/мин, не более примерно 300 мл/мин, не более примерно 200 мл/мин, не более примерно 100 мл/мин, не более примерно 90 мл/мин, не более примерно 80 мл/мин, не более примерно 70 мл/мин, не более примерно 60 мл/мин, не более примерно 50 мл/мин, не более примерно 40 мл/мин, не более примерно 30 мл/мин, не более примерно 20 мл/мин, не более примерно 10 мл/мин, не более примерно 9 мл/мин, не более примерно 8 мл/мин, не более примерно 7 мл/мин, не более примерно 6 мл/мин, не более примерно 5 мл/мин, не более примерно 4 мл/мин, не более примерно 3 мл/мин или не более примерно 2 мл/мин.

[0182] Также возможны комбинации вышеуказанных расходов основного титранта (например, по меньшей мере примерно 1 мл/мин и не более примерно 1 л/мин либо по меньшей мере примерно 10 мл/мин и не более примерно 50 мл/мин), включая все значения и диапазоны между ними. В некоторых вариантах осуществления насос 242 основного титранта может обеспечивать расход основного титранта примерно 1 мл/мин, примерно 2 мл/мин, примерно 3 мл/мин, примерно 4 мл/мин, примерно 5 мл/мин, примерно 6 мл/мин, примерно 7 мл/мин, примерно 8 мл/мин, примерно 9 мл/мин, примерно 10 мл/мин, примерно 20 мл/мин, примерно 30 мл/мин, примерно 40 мл/мин, примерно 50 мл/мин, примерно 60 мл/мин, примерно 70 мл/мин, примерно 80 мл/мин, примерно 90 мл/мин, примерно 100 мл/мин, примерно 200 мл/мин, примерно 300 мл/мин, примерно 400 мл/мин, примерно 500 мл/мин, примерно 600 мл/мин, примерно 700 мл/мин, примерно 800 мл/мин, примерно 900 мл/мин или примерно 1 л/мин.

[0183] Расход основного титранта может измеряться расходомером 244 основного

титранта. В некоторых вариантах осуществления расходомер 244 основного титранта может включать в себя ультразвуковой расходомер, вихревой смеситель, магнитометр, кориолисов расходомер или любой другой подходящий расходомер, либо их комбинации. Подходящие расходомеры основного титранта предлагаются на рынке, например, расходомер 244 основного титранта может включать в себя ультразвуковой расходомер компании Sonotec.

[0184] В некоторых вариантах осуществления насос 242 основного титранта может включать в себя перистальтический насос, диафрагменный насос, шестеренчатый насос, лепестковый насос, поршневой насос, центробежный насос или любой другой подходящий насос, либо их комбинации. Подходящие насосы основного титранта предлагаются на рынке, например, насос 242 основного титранта может включать в себя насос модели 530 компании Watson-Marlow.

[0185] Как показано, пунктирный прямоугольник окружает компоненты, над которыми пользовательский интерфейс 262 может проявлять некоторый уровень контроля. Другими словами, пользовательский интерфейс 262 может действовать посредством контроллера 260 или нескольких контроллеров, управляя любым из компонентов аппарата 200. В некоторых вариантах осуществления пользовательский интерфейс 262 может поддерживать связь с и может осуществлять управление над реактором 210, проточной рН-ячейкой 220, насосом 222 для забора образцов, клапаном 224, блоком 230 подачи кислотного титранта, насосом 232 кислотного титранта, расходомером 234 кислотного титранта, блоком 240 подачи основного титранта, насосом 242 основного титранта, расходомером 244 основного титранта и/или приемником 250 отходов. В некоторых вариантах осуществления управление любым из вышеуказанных компонентов может быть инициировано пользователем. Другими словами, пользователь может вручную управлять любым из компонентов аппарата 200, инициируя действие в по меньшей мере одном из компонентов. В некоторых вариантах осуществления управление любым из компонентов аппарата 200 может быть автоматическим в ответ на состояние аппарата 200 (например, на рН, измеренный в проточной рН-ячейке 220). В некоторых вариантах осуществления управление любым из компонентов аппарата 200 может осуществляться без какого-либо участия пользователя. В некоторых вариантах осуществления пользователь может отправлять инструкции в контроллер 260 через пользовательский интерфейс 262 для того, чтобы управлять или продвигаться по предварительно запрограммированной рН-последовательности либо добавлять заданное количество кислотного титранта или основного титранта.

[0186] В некоторых вариантах осуществления контроллер 260 может быть связан с расходомером 234 кислотного титранта, расходомером 244 основного титранта, рН-зондом 221, насосом 232 кислотного титранта и/или насосом 242 основного титранта. В некоторых вариантах осуществления контроллер 260 может принимать сигнал из расходомера 244 кислотного титранта, за счет чего контроллер 260 определяет количество кислотного титранта, которое следует добавлять в образец. В некоторых вариантах

осуществления контроллер 260 может принимать сигнал из расходомера 244 основного титранта, за счет чего контроллер 260 определяет количество основного титранта, которое следует добавлять в образец. В некоторых вариантах осуществления контроллер 260 может принимать сигнал из рН-зонда 221, за счет чего сигнал передает измерение рН в контроллер 260, и контроллер 260 соотносит измерение рН с соответствующим количеством кислотного титранта или основного титранта, которое следует добавлять в образец. В некоторых вариантах осуществления контроллер 260 может отправлять сигнал в насос 232 кислотного титранта для того, чтобы запускать насос, останавливать насос или изменять скорость работы насоса. В некоторых вариантах осуществления контроллер 260 может отправлять сигнал в насос 242 основного титранта для того, чтобы запускать насос, останавливать насос или изменять скорость работы насоса. В некоторых вариантах осуществления контроллер 260 может применять модель к измерению рН и к соответствующему количеству кислотного или основного титранта, добавленного в образец.

[0187] В некоторых вариантах осуществления пользовательский интерфейс 262 может сообщаться с реактором 210 и/или с расположенным в нем смесителем через контроллер 260. В некоторых вариантах осуществления контроллер 260 может сообщаться со смесителем, управляя временем смешивания и скоростью смешивания. Например, контроллер 260 может отправлять сигнал смесителю включиться непосредственно перед и в ходе добавления кислотного титранта и/или основного титранта. Смешивание в ходе добавления титранта может предотвращать возникновение объемов с высокой концентрацией титранта в образце, которые могут потенциально повреждать образец. В некоторых вариантах осуществления время смешивания может модифицироваться на основе того, сколько кислотного титранта и/или основного титранта было добавлено. В некоторых вариантах осуществления контроллер 260 может сообщаться с клапаном 224, чтобы прекращать или разрешать поток текучей среды для забора образца через него. В некоторых вариантах осуществления контроллер 260 может сообщаться с насосом 222 для забора образцов, чтобы активировать накачку текучей среды для забора образца через него или изменять расход текучей среды для забора образца через него. В некоторых вариантах осуществления команды насосу 222 для забора образцов и клапану 224 могут быть основаны на данных, передаваемых в пользовательский интерфейс 262 через рН-передатчик и контроллер 260.

[0188] Контроллер 260 выполнен с возможностью принимать сигналы от компонентов описанного в данном документе аппарата и отправлять им инструкции. В некоторых вариантах осуществления контроллер 260 может сообщаться с насосом 232 кислотного титранта для того, чтобы прокачивать через него кислотный титрант. Например, контроллер 260 отправляет сигнал, который запускает насос 232 кислотного титранта, останавливает насос кислотного титранта или изменяет скорость работы насоса кислотного титранта. В некоторых вариантах осуществления связь с насосом 232 кислотного титранта может быть основана на данных, передаваемых в контроллер 260

через рН-передатчик и/или расходомер 234 кислотного титранта. В некоторых вариантах осуществления контроллер 260 может сообщаться с насосом 242 основного титранта для того, чтобы прокачивать через него основной титрант. Например, контроллер 260 отправляет сигнал, который запускает насос 242 основного титранта, останавливает насос основного титранта или изменяет скорость работы насоса основного титранта. В некоторых вариантах осуществления связь с насосом 242 основного титранта может быть основана на данных, передаваемых в контроллер 260 через рН-передатчик и/или расходомер 244 основного титранта. В некоторых вариантах осуществления контроллер 260 выполнен с возможностью принимать значение рН из рН-зонда 221 (например, через рН-передатчик), и контроллер 260 применяет математическую модель к значению рН для соответствующего количества кислотного или основного титранта, добавленного в образец в то время, когда был измерен рН. В некоторых вариантах осуществления контроллер 260 выполнен с возможностью применять описанную в данном документе модель к одному или более значениям рН и соответствующим количествам титранта, добавленного в образец. В некоторых вариантах осуществления контроллер 260 выполнен с возможностью определять оставшееся количество титранта, который должен добавляться в образец для достижения целевого рН, исходя из измеренного(ых) значения(й) рН, количества титранта, добавленного в образец, и модели. Необязательно, эти этапы могут повторяться один или более раз до тех пор, пока не будет достигнут конечный целевой рН. Например, контроллер 260 выполнен с возможностью принимать начальное показание рН, отправлять сигнал насосу 242 кислотного или основного титранта, за счет чего заданное количество кислотного или основного титранта добавляется в образец, после чего рН-зонд 221 снимает показание и отправляет измеренное значение рН в контроллер 260 через рН-передатчик. Контроллер 260 затем применяет модель к начальному значению рН, измеренному значению рН после добавления титранта и количеству титранта, добавленного в образец, и определяет дополнительное количество титранта, которое следует добавить в образец. В некоторых вариантах осуществления, например, если имеется заданная рН-последовательность, контроллер 260 может отправлять инструкции продвигаться по рН-последовательности автоматически. В других вариантах осуществления пользователь через пользовательский интерфейс дает инструкции контроллеру 260 продвигаться по рН-последовательности, и контроллер 260 ретранслирует упомянутые инструкции в аппарат, например, приводя в действие насос 232 кислотного титранта или насос 242 основного титранта, снимая показания рН и т.п.

[0189] В некоторых вариантах осуществления контроллер 260 может включать в себя сервер, компьютер, переносной компьютер, мобильное устройство, планшетный компьютер, мобильный телефон или любое другое подходящее устройство. Контроллер 260 может включать в себя один или более центральных процессоров ("процессоров"), запоминающее устройство и устройства ввода-вывода. В конкретных вариантах осуществления контроллер 260 включает в себя одно или более запоминающих устройств

и/или устройств хранения данных. Запоминающие устройства и устройства хранения данных могут представлять собой один или более машиночитаемых носителей данных, которые могут хранить машиноисполняемые инструкции, которые реализуют по меньшей мере части различных вариантов осуществления, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления контроллер 260 включает в себя машиночитаемый носитель данных, который хранит машиноисполняемые инструкции, которые включают в себя, но не ограничены ими, инструкции приводить в действие, останавливать или изменять скорость работы насоса 232 кислотного титранта, инструкции приводить в действие, останавливать или изменять скорость работы насоса 242 основного титранта, инструкции принимать и сохранять значения pH от pH-зонда 221 и/или pH-передатчика, и инструкции принимать и сохранять данные из расходомера 234 кислотного титранта и/или расходомера 244 основного титранта. В некоторых вариантах осуществления машиноисполняемые инструкции включают в себя инструкции принимать и сохранять вводимые пользователем значения pH, например, оффлайновые значения pH, измеренные и введенные пользователем, когда обнаруживается ошибка в pH-зонде 221, расположенном в проточной pH-ячейке 220. В некоторых вариантах осуществления машиноисполняемые инструкции включают в себя инструкции вычислять количество кислотного или основного титранта, добавленного в образец, исходя из данных от расходомера 234 кислотного титранта или расходомера 244 основного титранта и, необязательно, от насоса 232 кислотного титранта или насоса 242 основного титранта. В некоторых вариантах осуществления машиноисполняемые инструкции включают в себя инструкции применять описанные в данном документе модели к значениям pH и количествам титранта, добавленного в образец. В некоторых вариантах осуществления машиноисполняемые инструкции включают в себя инструкции выполнять один или более этапов pH-последовательности, необязательно в ответ на команды от пользователя через пользовательский интерфейс. В некоторых вариантах осуществления контроллер 260 включает в себя процессор, выполненный с возможностью выполнять инструкции, описанные выше.

[0190] Изобретение предусматривает пользовательский интерфейс 262, выполненный с возможностью принимать сигналы из контроллера 260 и отправлять ему инструкции. В некоторых вариантах осуществления пользовательский интерфейс 262 представляет собой промышленный человеко-машинный интерфейс. Подходящие пользовательские интерфейсы включают в себя видеоинтерфейсы (компьютерные мониторы, плоские экраны, сенсорные экраны и т.п.), а также клавиатуру, указательное устройство, такое как мышь, и эквиваленты. В некоторых вариантах осуществления пользовательский интерфейс 262 выполнен с возможностью отображать результаты измерения pH из контроллера 260. В некоторых вариантах осуществления пользовательский интерфейс 262 выполнен с возможностью принимать одно или более оффлайновых измерений pH от пользователя. В некоторых вариантах осуществления пользовательский интерфейс 262 выполнен с возможностью принимать инструкции от

пользователя, за счет чего инструкции отправляются в контроллер 260, чтобы продвигаться по рН-последовательности.

[0191] Настоящее описание излагает множество примерных конфигураций, способов, параметров и т.п. Тем не менее, следует признать, что такое описание не предназначено накладывать ограничения на объем настоящего изобретения, а вместо этого приведено в качестве описания примерных вариантов осуществления. Варианты осуществления настоящего изобретения, описанные выше, могут быть выгодными отдельно или в комбинации с одним или более другими аспектами или вариантами осуществления. Без ограничения вышеприведенного описания, ниже приведены определенные неограничивающие варианты осуществления изобретения. Как будет очевидно специалистам в данной области техники после прочтения этого раскрытия, каждый из отдельно пронумерованных вариантов осуществления может быть использован или скомбинирован с любым из предшествующих или последующих отдельно пронумерованных вариантов осуществления. Это предназначено предоставлять поддержку для всех таких комбинаций вариантов осуществления и не ограничено явно приведенными ниже комбинациями вариантов осуществления.

Пронумерованные варианты осуществления

[0192] Изобретение может быть понято с учетом следующих пронумерованных вариантов осуществления:

[0193] 1. Способ, содержащий:

(a) измерение начального рН (pH_{initial}) образца;

(b) добавление по меньшей мере первого количества титранта (Titrant_n) в образец и измерение по меньшей мере первого дополнительного значения рН (pH_n), причем Titrant_n представляет собой количество титранта, добавленного в образец для достижения pH_n , при этом pH_n отличается от pH_{initial} ;

(c) применение модели для определения нормализованного начального количества титранта ($\text{Titrant}_{\text{initial}}$) и нормализованного Titrant_n , при этом модель соотносит нормализованное количество титранта, добавленного в образец, с рН образца; и

(d) определение еще одного дополнительного количества титранта (Titrant_{n+1}), которое следует добавить в образец для достижения целевого рН (pH_{n+1}), причем pH_{n+1} представляет собой рН, достигнутый посредством добавления еще одного дополнительного количества титранта в образец.

[0194] 2. Способ по варианту 1, содержащий добавление второго количества титранта (Titrant_{n+2}) в образец и измерение второго дополнительного рН (pH_{n+2}), и повторение этапов (c) и (d).

[0195] 3. Способ по варианту 2, содержащий добавление третьего количества титранта (Titrant_{n+3}) в образец и измерение третьего дополнительного рН (pH_{n+3}), и повторение этапов (c) и (d).

[0196] 4. Способ по варианту 3, в котором добавление третьего количества титранта в образец приводит к рН, который составляет в пределах 0,05-0,10 единицы рН

от конечного целевого рН (pH_{final}).

[0197] 5. Способ по любому из вариантов 1-4, содержащий добавление четвертого количества титранта в образец и измерение четвертого дополнительного рН.

[0198] 6. Способ по любому из вариантов 1-5, при этом способ содержит не более чем 3 или 4 добавления титранта для изменения рН образца до pH_{final} .

[0199] 7. Способ по любому из вариантов 1-6, содержащий:

(i) создание по меньшей мере одной кривой контрольного титрования от по меньшей мере одного контрольного образца, соотносящей количество титранта, добавленного в контрольный образец, с рН контрольного образца;

(ii) необязательно, нормализацию упомянутой по меньшей мере одной кривой контрольного титрования; и

(iii) создание модели для подгонки упомянутой по меньшей мере одной кривой контрольного титрования.

[0200] 8. Способ по варианту 7, в котором создание упомянутой по меньшей мере одной кривой контрольного титрования содержит:

(i) измерение начального рН контрольного образца ($pH_{initial_ref}$);

(ii) добавление количества титранта в контрольный образец ($Titrant_{n_ref}$) и измерение дополнительного контрольного значения рН (pH_{n_ref}), причем $Titrant_{n_ref}$ представляет собой количество титранта, добавленного в образец для достижения pH_{n_ref} , при этом pH_{n_ref} отличается от $pH_{initial_ref}$;

(iii) повторение этапов (i)-(ii) до тех пор, пока упомянутый по меньшей мере один контрольный образец не достигнет конечного рН (pH_{final_ref}), путем добавления общего количества титранта в контрольный образец ($Titrant_{tot_ref}$); и

(iv) нанесение на график количества добавленного титранта в зависимости от рН контрольного образца.

[0201] 9. Способ по варианту 7 или 8, в котором титрант добавляют в контрольный образец дискретными шагами в течение множества периодов времени.

[0202] 10. Способ по варианту 7 или 8, в котором титрант непрерывно добавляют в контрольный образец.

[0203] 11. Способ по любому из вариантов 7-10, в котором рН контрольного образца измеряют рН-зондом, вставленным непосредственно в контрольный образец.

[0204] 12. Способ по любому из вариантов 7-10, в котором рН контрольного образца измеряют рН-зондом, вставленным в отводимый поток с непрерывным или дискретным забором образцов из контрольного образца.

[0205] 13. Способ по любому из вариантов 7-12, в котором количество титранта, добавленного в контрольный образец, нормализуют следующим образом:

$$\text{normalized } Titrant_{n_ref} = \frac{Titrant_{n_ref} - Titrant_{1_ref}}{Titrant_{2_ref} - Titrant_{1_ref}} \text{ (Уравнение 17),}$$

где $Titrant_{1_ref}$ – количество титранта, добавленного в контрольный образец для достижения pH_{1_ref} , и $Titrant_{2_ref}$ – количество титранта, добавленного в контрольный

образец для достижения pH_{2_ref} .

[0206] 14. Способ по любому из вариантов 7-13, в котором упомянутая по меньшей мере одна кривая контрольного титрования включает одну единственную кривую титрования, и при этом $pH_{1_ref} = pH_{initial_ref}$, а $pH_{2_ref} = pH_{final_ref}$.

[0207] 15. Способ по любому из вариантов 7-13, в котором упомянутая по меньшей мере одна кривая контрольного титрования включает множество кривых контрольного титрования.

[0208] 16. Способ по варианту 15, в котором каждая кривая контрольного титрования содержит $pH_{initial_ref}$ и pH_{final_ref} , и при этом:

(a) pH_{1_ref} является $pH_{initial_ref}$ из одной из множества кривых контрольного титрования,

(b) pH_{2_ref} является pH_{final_ref} из одной из множества кривых контрольного титрования, и

при этом pH_{1_ref} и pH_{2_ref} выбирают охватывающими максимальную разность значений при одновременном охватывании значений pH, покрываемых всеми из множества кривых контрольного титрования.

[0209] 17. Способ по любому из вариантов 13-16, в котором начальный pH образца ($pH_{initial}$) и pH_{1_ref} являются примерно одинаковыми.

[0210] 18. Способ по любому из вариантов 13-16, в котором начальный pH образца ($pH_{initial}$) и pH_{1_ref} не являются одинаковыми.

[0211] 19. Способ по варианту 18, в котором разность между $pH_{initial}$ и pH_{1_ref} составляет примерно 0,05-1, примерно 0,1-1, примерно 0,1-0,5 или примерно 0,1-0,3 единицы pH.

[0212] 20. Способ по любому из вариантов 13-19, в котором конечный pH образца (pH_{final}) и pH_{2_ref} являются примерно одинаковыми.

[0213] 21. Способ по любому из вариантов 13-19, в котором pH_{final} и pH_{2_ref} не являются одинаковыми.

[0214] 22. Способ по варианту 21, в котором разность между pH_{final} и pH_{2_ref} составляет примерно 0,05-1, примерно 0,1-1, примерно 0,1-0,5 или примерно 0,1-0,3 единицы pH.

[0215] 23. Способ по любому из вариантов 13-22, в котором $pH_{initial}$, $pH_{initial_ref}$ и pH_{1_ref} являются примерно одинаковыми, и при этом pH_{final} , pH_{final_ref} и pH_{2_ref} являются примерно одинаковыми.

[0216] 24. Способ по любому из вариантов 1-23, в котором конечный pH образца (pH_{final}) меньше начального pH образца ($pH_{initial}$), и титрант представляет собой кислоту.

[0217] 25. Способ по варианту 24, в котором количество титранта, добавленного в контрольный образец, нормализуют к шкале от примерно -0,76 до примерно 1,49.

[0218] 26. Способ по вариантам 24 или 25, в котором pH_{1_ref} составляет между примерно 4,0 и 4,3, и, необязательно, при этом pH_{1_ref} составляет примерно 4,1, а pH_{2_ref} составляет между примерно 3,4 и 3,9, и, необязательно, при этом pH_{2_ref} составляет

примерно 3,7.

[0219] 27. Способ по любому из вариантов 24-26, в котором $pH_{initial}$ составляет между примерно 4,0 и 4,5, между примерно 4,1 и 4,5, между примерно 4,2 и 4,5, между примерно 4,3 и 4,5, между примерно 4,1 и 4,4 или между примерно 4,2 и 4,4.

[0220] 28. Способ по любому из вариантов 24-27, в котором pH_{final} составляет между примерно 3,0 и 3,8, между примерно 3,1 и 3,8, между примерно 3,2 и 3,8, между примерно 3,3 и 3,7, между примерно 3,4 и 3,7 или между примерно 3,5 и 3,7.

[0221] 29. Способ по любому из вариантов 24-27, в котором pH_{final} составляет примерно 3,6.

[0222] 30. Способ по любому из вариантов 24-29, в котором модель содержит полином.

[0223] 31. Способ по варианту 30, в котором модель содержит полином 4-го порядка с формулой: $normalized\ Titrant_n = a + b \cdot pH_n + c \cdot pH_n^2 + d \cdot pH_n^3 + e \cdot pH_n^4$ (Уравнение 18).

[0224] 32. Способ по варианту 30 или 31, в котором полином содержит: $normalized\ Titrant_n = 283,35764 - 279,43987 \cdot pH_n + 104,25395 \cdot pH_n^2 - 17,257125 \cdot pH_n^3 + 1,0589067 \cdot pH_n^4$ (Уравнение 19).

[0225] 33. Способ по любому из вариантов 1-23, в котором конечный pH образца (pH_{final}) больше начального pH ($pH_{initial}$), и титрант представляет собой основание.

[0226] 34. Способ по варианту 33, в котором количество титранта, добавленного в контрольный образец, нормализуют к шкале от примерно -0,06 до примерно 1,53.

[0227] 35. Способ по варианту 33 или 34, в котором pH_{1_ref} составляет между примерно 3,0 и 3,8, либо между примерно, между примерно 3,1 и 3,8, между примерно 3,2 и 3,8, между примерно 3,3 и 3,7, между примерно 3,4 и 3,7 или между примерно 3,5 и 3,7, а pH_{2_ref} составляет между примерно 5,3 и 8,5, между примерно 5,1 и 8,1, между примерно 5,5-8,0 или между примерно 7,5 и 8,0.

[0228] 36. Способ по варианту 33 или 34, в котором pH_{1_ref} составляет примерно 3,7, а pH_{2_ref} составляет примерно 7,6.

[0229] 37. Способ по любому из вариантов 33-36, в котором $pH_{initial}$ составляет между примерно 3,0 и 3,8, между примерно 3,1 и 3,8, между примерно 3,2 и 3,8, между примерно 3,3 и 3,7, между примерно 3,4 и 3,7 или между примерно 3,5 и 3,7.

[0230] 38. Способ по любому из вариантов 33-37, в котором pH_{final} составляет между примерно 5,3 и 8,5, между примерно 5,1 и 8,1, между примерно 5,5-8,0 или между примерно 7,5 и 8,0.

[0231] 39. Способ по любому из вариантов 33-38, в котором модель содержит полином.

[0232] 40. Способ по варианту 39, в котором модель содержит полином 5-го порядка с формулой:

$$normalized\ Titrant_n = a + b \cdot pH_n + c \cdot pH_n^2 + d \cdot pH_n^3 + e \cdot pH_n^4 + f \cdot pH_n^5 \text{ (Уравнение 20).}$$

[0233] 41. Способ по варианту 37 или 38, в котором полином содержит:

$\text{normalized Titrant}_n = 12,256725 - 10,723277 \cdot \text{pH}_n + 3,3662386 \cdot \text{pH}_n^2 - 0,4588175 \cdot \text{pH}_n^3 + 0,0255417 \cdot \text{pH}_n^4 - 0,0003153 \cdot \text{pH}_n^5$ (Уравнение 21).

[0234] 42. Способ по любому из вариантов 1-41, дополнительно содержащий коррекцию для калибровки рН-метра при определении значений рН образца или упомянутого по меньшей мере одного контрольного образца.

[0235] 43. Способ по варианту 42, в котором коррекция для калибровки рН-метра содержит:

(а) удаление первой части образца или контрольного образца перед добавлением титранта и измерение рН упомянутой первой части независимо калиброванным рН-метром, с получением тем самым оффлайнового начального значения рН ($\text{pH}_{\text{initial_off}}$);

(b) удаление второй части образца или контрольного образца после добавления общего количества титранта и измерение рН упомянутой второй части независимо калиброванным рН-метром, с получением тем самым оффлайнового конечного значения рН ($\text{pH}_{\text{final_off}}$); и

(с) применение соотношения между оффлайновым значением рН и измеренным значением рН для определения скорректированного рН для контрольного образца.

[0236] 44. Способ по варианту 43, в котором скорректированный рН_n для контрольного образца определяют следующим образом:

$$\text{pH}_{\text{initial_off_ref}} + (\text{pH}_{\text{final_off_ref}} - \text{pH}_{\text{initial_off_ref}}) \times \left(\frac{\text{pH}_n - \text{pH}_{\text{initial_ref}}}{\text{pH}_{\text{final_ref}} - \text{pH}_{\text{initial_ref}}} \right) \quad (\text{Уравнение 22}).$$

[0237] 45. Способ по варианту 43, в котором скорректированный рН для образца определяют следующим образом:

$$\text{pH}_{\text{initial_off}} + (\text{pH}_{\text{final_off}} - \text{pH}_{\text{initial_off}}) \times \left(\frac{\text{pH}_n - \text{pH}_{\text{initial}}}{\text{pH}_{\text{final}} - \text{pH}_{\text{initial}}} \right) \quad (\text{Уравнение 16}).$$

[0238] 46. Способ по любому из вариантов 1-45, в котором определение оставшегося количества титранта, которое следует добавить в образец, определяют на этапе (d) следующим образом:

$$\text{Titrant}_n \times \left[\left(\frac{\text{normalized Titrant}_{\text{final}} - \text{normalized Titrant}_{\text{initial}}}{\text{normalized Titrant}_n - \text{normalized Titrant}_{\text{initial}}} \right) - 1 \right] \quad (\text{Уравнение 23}).$$

[0239] 47. Способ по любому из вариантов 1-46, в котором рН образца измеряют с использованием рН-зонда, вставленного в подобразец, удаленный из образца или отведенного потока с дискретным забором образцов.

[0240] 48. Способ по любому из вариантов 1-46, в котором рН образца измеряют с использованием рН-зонда, вставленного непосредственно в образец или непрерывный отведенный поток.

[0241] 49. Способ по любому из вариантов 1-48, в котором образец содержит первый интересующий белок, а упомянутый по меньшей мере один контрольный образец содержит второй интересующий белок.

[0242] 50. Способ по варианту 49, в котором первый интересующий белок и второй интересующий белок являются одинаковыми.

[0243] 51. Способ по варианту 49, в котором первый интересующий белок и второй

интересующий белок не являются одинаковыми, но аналогично откликаются на добавление титранта в образец и контрольный образец.

[0244] 52. Способ по любому из вариантов 49-51, в котором первый интересующий белок и второй интересующий белок представляют собой гликозилированные белки.

[0245] 53. Способ по любому из вариантов 49-52, в котором первый и второй интересующие белки представляют собой антитело.

[0246] 54. Способ по варианту 53, в котором антитело выбрано из группы, состоящей из выбранных из группы, состоящей из анти-PD1 антитела, анти-PDL-1 антитела, анти-Dll4 антитела, анти-ANG2 антитела, анти-AngPt13 антитела, анти-PDGFR антитела, анти-Erb3 антитела, анти-PRLR антитела, анти-ФНО антитела, анти-EGFR антитела, анти-PCSK9 антитела, анти-GDF8 антитела, анти-GCGR антитела, анти-VEGF антитела, анти-IL1R антитела, анти-IL4R антитела, анти-IL6R антитела, анти-IL1 антитела, анти-IL2 антитела, анти-IL3 антитела, анти-IL4 антитела, анти-IL5 антитела, анти-IL6 антитела, анти-IL7 антитела, анти-RSV антитела, анти-NGF антитела, анти-CD3 антитела, анти-CD20 антитела, анти-CD19 антитела, анти-CD28 антитела, анти-CD48 антитела, биспецифического анти-CD3/анти-CD20 антитела, биспецифического анти-CD3/анти-MUC16 антитела и биспецифического анти-CD3/анти-PSMA антитела.

[0247] 55. Способ по любому из вариантов 49-54, в котором первый и второй интересующие белки представляют собой слитый белок Fc-рецептора (ловушку).

[0248] 56. Способ по варианту 55, в котором белок-ловушка содержит VEGF-ловушку или IL-1-ловушку.

[0249] 57. Способ по любому из вариантов 1-56, при этом способ повышает точность достижения конечного рН образца по сравнению со способом, при котором рН измеряют посредством вставки рН-зонда непосредственно в образец или непрерывный отводимый поток, вытягиваемый из образца.

[0250] 58. Способ по любому из вариантов 1-57, при этом способ уменьшает отходы образца по сравнению со способом, при котором рН измеряют посредством рН-метра, вставленного в непрерывный отводимый поток, вытягиваемый из образца.

[0251] 59. Способ по любому из вариантов 1-58, в котором разность между измеренным рН образца и моделью выявляет ошибку в калибровке рН-метра, используемого для измерения рН образца.

[0252] 60. Способ по варианту 59, содержащий:

(а) перекалибровку рН-метра;

(b) добавление дополнительного количества титранта в образец и измерение дополнительного рН;

(с) применение модели и сравнение нормализованного количества титранта и рН или нормализованного рН с моделью; и

(d) добавление оставшегося количества титранта в образец для достижения рН_{final}, когда рН или нормализованный рН соответствует модели; тем самым предотвращая повреждение интересующего белка, вызываемое добавлением

слишком большого количества титранта в образце.

[0253] 61. Способ инактивации вируса в образце, содержащий:

- (a) обеспечение образца при начальном рН ($\text{pH}_{\text{initial}}$) в 4,0 или более;
- (b) добавление первого количества кислотного титранта ($\text{Titrant}_{\text{n_acid}}$) в образец и измерение первого дополнительного значения кислотного рН ($\text{pH}_{\text{n_acid}}$), причем $\text{Titrant}_{\text{n_acid}}$ представляет собой количество титранта, добавленного в образец для достижения $\text{pH}_{\text{n_acid}}$, при этом $\text{pH}_{\text{n_acid}}$ отличается от $\text{pH}_{\text{initial}}$;
- (c) применение модели для определения нормализованного начального количества титранта ($\text{Titrant}_{\text{initial}}$) и нормализованного количества титранта, при этом модель соотносит нормализованное количество титранта, добавленного в образец, с рН образца;
- (d) определение количества титранта, которое следует добавить в образец для достижения целевого кислотного рН ($\text{pH}_{\text{acid_target}}$), на основе нормализованного количества титранта, рН и модели;
- (e) добавление этого количества титранта в образец для достижения $\text{pH}_{\text{acid_target}}$;
- (f) повторение этапов (d) и (e) до тех пор, пока не будет достигнут конечный кислотный рН ($\text{pH}_{\text{acid_final}}$);
- (g) поддержание образца при $\text{pH}_{\text{final_acid}}$ в течение периода времени, достаточного для инактивирования вируса;
- (h) добавление первого количества основного титранта ($\text{Titrant}_{\text{n_base}}$) в образец и измерение первого дополнительного значения основного рН ($\text{pH}_{\text{n_base}}$), причем $\text{Titrant}_{\text{n_base}}$ представляет собой количество титранта, добавленного в образец для достижения $\text{pH}_{\text{n_base}}$, при этом $\text{pH}_{\text{n_base}}$ отличается от $\text{pH}_{\text{acid_final}}$;
- (i) нормализацию $\text{Titrant}_{\text{n_base}}$ посредством применения второй модели;
- (j) определение количества основного титранта, которое следует добавить в образец для изменения рН образца до целевого основного рН ($\text{pH}_{\text{target_base}}$), на основе нормализованного количества титранта, рН и модели;
- (k) добавление этого количества основного титранта в образец для достижения $\text{pH}_{\text{target_base}}$; и
- (l) повторение этапов (j) и (k) до тех пор, пока не будет достигнут конечный основной рН ($\text{pH}_{\text{final_base}}$).

[0254] 62. Способ по варианту 61, содержащий повторение этапов (b) и (c) по меньшей мере один раз, чтобы подтвердить, что поведение образца соответствует модели.

[0255] 63. Способ по варианту 61 или 62, содержащий повторение этапов (d) и (e) 1, 2 или 3 раза.

[0256] 64. Способ по любому из вариантов 61-63, содержащий повторение этапов (d) и (e) 2 или 3 раза, и при этом повторение этапов (d) и (e) 2 или 3 раза приводит к целевому кислотному рН, который составляет в пределах 0,05-0,10 единицы рН от $\text{pH}_{\text{acid_final}}$.

[0257] 65. Способ по варианту 64, содержащий повторение этапов (d) и (e) дополнительный раз для достижения $\text{pH}_{\text{acid_final}}$.

[0258] 66. Способ по любому из вариантов 61-65, содержащий повторение этапов (h) и (i) по меньшей мере один раз, чтобы подтвердить, что поведение образца соответствует модели.

[0259] 67. Способ по любому из вариантов 61-66, содержащий повторение этапов (j) и (k) 1, 2 или 3 раза.

[0260] 68. Способ по любому из вариантов 61-66, содержащий повторение этапов (j) и (k) 2 или 3 раза, и при этом повторение этапов (j) и (k) 2 или 3 раза приводит к рН, который составляет в пределах 0,05-0,10 единицы рН от pH_{final_base} .

[0261] 69. Способ по варианту 68, содержащий повторение этапов (j) и (k) дополнительный раз для достижения pH_{final_base} .

[0262] 70. Способ по любому из вариантов 61-69, в котором pH_{acid_final} составляет между примерно 3,0 и 3,8, между примерно 3,1 и 3,8, между примерно 3,2 и 3,8, между примерно 3,3 и 3,7, между примерно 3,4 и 3,7 или между примерно 3,5 и 3,7.

[0263] 71. Способ по любому из вариантов 61-70, в котором pH_{final_base} составляет между примерно 5,3 и 8,5, между примерно 5,1 и 8,1, между примерно 5,5-8,0 или между примерно 7,0 и 8,5.

[0264] 72. Способ по любому из вариантов 61-71, в котором первая модель содержит полином.

[0265] 73. Способ по варианту 72, в котором полином содержит:

$$\text{normalized Titrant}_n = 283,35764 - 279,43987 * pH_n + 104,25395 * pH_n^2 - 17,257125 * pH_n^3 + 1,0589067 * pH_n^4$$
 (Уравнение 13).

[0266] 74. Способ по любому из вариантов 61-73, в котором вторая модель содержит полином.

[0267] 75. Способ по варианту 74, в котором полином содержит:

$$\text{normalized Titrant}_n = 12,256725 - 10,723277 * pH_n + 3,3662386 * pH_n^2 - 0,4588175 * pH_n^3 + 0,0255417 * pH_n^4 - 0,0003153 * pH_n^5$$
 (Уравнение 21).

[0268] 76. Способ по любому из вариантов 61-75, дополнительно содержащий коррекцию для калибровки рН-метра.

[0269] 77. Способ по любому из вариантов 61-76, в котором рН образца измеряют с использованием рН-зонда, вставленного в подобредец, удаленный из образца или отведенного потока с дискретным забором образцов.

[0270] 78. Способ по любому из вариантов 61-77, в котором измерение рН образца не включает в себя рН-зонд, вставленный непосредственно в образец.

[0271] 79. Способ по любому из вариантов 61-78, в котором образец содержит интересующий белок.

[0272] 80. Способ по варианту 79, в котором интересующий белок представляет собой терапевтический белок.

[0273] 81. Способ по варианту 79 или 80, в котором интересующий белок представляет собой антитело.

[0274] 82. Способ по варианту 79 или 80, причем интересующий белок

представляет собой слитый белок Fc-рецептора (ловушку).

[0275] 83. Способ по любому из вариантов 61-82, при этом способ повышает точность достижения конечного рН образца по сравнению со способом, при котором рН измеряют посредством вставки рН-метра в образец или непрерывный отводимый поток, вытягиваемый из образца.

[0276] 84. Способ по любому из вариантов 61-83, при этом способ уменьшает отходы образца по сравнению со способом, при котором рН измеряют посредством рН-метра, вставленного в непрерывный отводимый поток, вытягиваемый из образца.

[0277] 85. Способ по любому из вариантов 61-84, в котором разность между измеренным рН образца и моделью выявляет ошибку в калибровке рН-метра, используемого для измерения рН образца.

[0278] 86. Способ по варианту 85, содержащий:

- (а) перекалибровку рН-метра;
- (b) добавление дополнительного количества титранта в образец и измерение дополнительного рН;
- (с) применение модели и сравнение нормализованного количества титранта и рН с моделью; и
- (d) добавление оставшегося количества титранта в образец для достижения рН_{final}, когда рН соответствует модели;

тем самым предотвращая повреждение интересующего белка посредством добавления слишком большого количества титранта в образец.

[0279] 87. Аппарат, выполненный с возможностью осуществлять способы по любому из вариантов 1-86.

[0280] 88. Аппарат по варианту 87, содержащий:

реактор;
 проточную рН-ячейку, содержащую расположенный в ней рН-зонд, причем проточная рН-ячейка гидравлически соединена с реактором, причем проточная рН-ячейка выполнена с возможностью принимать отводимый поток для забора образцов из реактора и измерять рН отводимого потока;

блок подачи кислотного титранта, гидравлически соединенный с реактором, причем блок подачи кислотного титранта выполнен с возможностью подавать кислотный титрант в реактор для уменьшения рН в реакторе; и/или

блок подачи основного титранта, гидравлически соединенный с реактором, причем блок подачи основного титранта выполнен с возможностью подавать основной титрант в реактор для увеличения рН в реакторе.

[0281] 89. Аппарат, содержащий:

реактор;
 проточную рН-ячейку, содержащую расположенный в ней рН-зонд, причем проточная рН-ячейка гидравлически соединена с реактором, причем проточная рН-ячейка выполнена с возможностью принимать отводимый поток для забора образцов из реактора

и измерять рН отводимого потока;

блок подачи кислотного титранта, гидравлически соединенный с реактором, причем блок подачи кислотного титранта выполнен с возможностью подавать кислотный титрант в реактор для уменьшения рН в реакторе; и/или

блок подачи основного титранта, гидравлически соединенный с реактором, причем блок подачи основного титранта выполнен с возможностью подавать основной титрант в реактор для увеличения рН в реакторе.

[0282] 90. Аппарат по варианту 88 или 89, дополнительно содержащий:

насос для забора образцов, выполненный с возможностью доставлять отводимый поток из реактора в проточную рН-ячейку.

[0283] 91. Аппарат по варианту 88 или 89, дополнительно содержащий:

приемник отходов, выполненный с возможностью принимать выходящий поток из проточной рН-ячейки.

[0284] 92. Аппарат по варианту 88 или 89, дополнительно содержащий:

насос кислотного титранта, выполненный с возможностью доставлять кислотный титрант из блока подачи кислотного титранта в реактор; и

расходомер кислотного титранта, выполненный с возможностью измерять расход кислотного титранта из блока подачи кислотного титранта в реактор.

[0285] 93. Аппарат по варианту 92, дополнительно содержащий:

насос основного титранта, выполненный с возможностью доставлять основной титрант из блока подачи основного титранта в реактор; и

расходомер основного титранта, выполненный с возможностью измерять расход основного титранта из блока подачи основного титранта в реактор.

[0286] 94. Аппарат по варианту 93, дополнительно содержащий контроллер, причем контроллер связан с расходомером кислотного титранта, расходомером основного титранта, рН-зондом, насосом кислотного титранта и насосом основного титранта.

[0287] 95. Аппарат по варианту 94, в котором контроллер выполнен с возможностью:

(а) принимать сигнал из расходомера кислотного титранта, за счет чего контроллер определяет количество кислотного титранта, добавленного в образец;

(b) принимать сигнал из расходомера основного титранта, за счет чего контроллер определяет количество основного титранта, добавленного в образец;

(с) принимать сигнал из рН-зонда, причем этот сигнал передает результат измерения рН в контроллер, а контроллер соотносит результат измерения рН с соответствующим количеством кислотного титранта или основного титранта, добавленного в образец;

(d) отправлять сигнал насосу кислотного титранта на запуск насоса, остановку насоса или изменение скорости работы насоса; и

(е) отправлять сигнал насосу основного титранта на запуск насоса, остановку насоса или изменение скорости работы насоса.

[0288] 96. Аппарат по варианту 94 или 95, в котором контроллер связан с насосом для забора образцов, при этом контроллер выполнен с возможностью отправлять сигнал насосу для забора образцов на запуск насоса, остановку насоса или изменение скорости работы насоса.

[0289] 97. Аппарат по любому из вариантов 94-96, в котором контроллер выполнен с возможностью применять модель к результату измерения рН и к соответствующему количеству кислотного или основного титранта, добавленного в образец.

[0290] 98. Аппарат по любому из вариантов 94-97, в котором контроллер выполнен с возможностью приводить в действие насос кислотного титранта и добавлять заданное количество кислотного титранта, когда рН, измеренный в проточной рН-ячейке, больше требуемого значения, и контроллер дополнительно выполнен с возможностью приводить в действие насос основного титранта и добавлять заданное количество основного титранта, когда рН, измеренный в проточной рН-ячейке, меньше требуемого значения.

[0291] 99. Аппарат по любому из вариантов 94-98, в котором контроллер выполнен с возможностью отправлять сигнал насосу кислотного титранта на остановку насоса, когда заданное количество кислотного титранта добавлено в образец, и отправлять сигнал насосу основного титранта на остановку насоса, когда заданное количество основного титранта добавлено в образец.

[0292] 100. Аппарат по любому из вариантов 94-99, в котором контроллер выполнен с возможностью поддерживать рН на требуемом значении в течение некоторого периода времени.

[0293] 101. Аппарат по варианту 100, в котором требуемое значение изменяется во времени, в соответствии с рН-последовательностью.

[0294] 102. Аппарат по варианту 101, в котором рН-последовательность является подходящей для инактивации вирусов, которые могут присутствовать в реакторе.

[0295] 103. Аппарат по варианту 102, в котором рН-последовательность содержит:

(а) понижение рН до первого целевого рН между примерно 3,0 и 3,8, между примерно 3,1 и 3,8, между примерно 3,2 и 3,8, между примерно 3,3 и 3,7, между примерно 3,4 и 3,7 или между примерно 3,5 и 3,7,

(b) поддержание рН на первом целевом рН в течение периода времени,

(с) повышение рН до второго целевого рН между примерно 5,3 и 8,5, между примерно 5,1 и 8,1, между примерно 5,5-8,0 или между примерно 7,5 и 8,0, и

(d) поддержание рН на втором целевом рН.

[0296] 104. Аппарат по варианту 103, в котором понижение рН на этапе (а) или повышение рН на этапе (с) содержит добавление одного или более количеств титранта, достаточных для изменения рН образца, и измерение рН образца.

[0297] 105. Аппарат по любому из вариантов 88-104, дополнительно содержащий:

обратный клапан на гидравлическом соединении между реактором и проточной рН-ячейкой, причем обратный клапан выполнен с возможностью предотвращать загрязнение реактора противотоком из проточной рН-ячейки.

[0298] 106. Аппарат по любому из вариантов 88-105, в котором реактор не включает в себя измерительный рН-зонд, расположенный в нем.

[0299] 107. Аппарат по любому из вариантов 88-106, дополнительно содержащий смеситель, расположенный в реакторе, выполненный с возможностью смешивать содержимое в реакторе непосредственно до, в ходе и/или после добавления кислотного титранта и/или основного титранта.

[0300] 108. Аппарат по варианту 107, в котором контроллер связан со смесителем, и при этом контроллер выполнен с возможностью отправлять смесителю сигнал на приведение в действие смесителя перед запуском кислотного насоса или основного насоса.

[0301] 109. Аппарат по варианту 108, в котором контроллер выполнен с возможностью отправлять смесителю сигнал, по которому смеситель останавливается через фиксированный период времени после остановки кислотного насоса или основного насоса.

[0302] 110. Аппарат по любому из вариантов 88-109, дополнительно содержащий пользовательский интерфейс, выполненный с возможностью принимать и отображать результат измерения рН из контроллера.

[0303] 111. Аппарат по варианту 110, в котором пользовательский интерфейс выполнен с возможностью отправлять контроллеру сигнал, по которому контроллер сигнализирует насосу кислотного титранта или насосу основного титранта добавить заданный объем кислотного или основного титранта в образец.

[0304] 112. Аппарат по варианту 110 или 111, в котором пользовательский интерфейс выполнен с возможностью отправлять контроллеру сигнал, по которому пользователь может инструктировать контроллер переходить к следующему этапу в рН-последовательности.

[0305] 113. Аппарат по любому из вариантов 110-112, в котором пользовательский интерфейс выполнен с возможностью принимать одно или более оффлайн-измерений рН от пользователя, при этом упомянутые одно или более оффлайн-измерений рН содержат результаты измерения рН образца, которые являются независимыми от рН-зонда, расположенного в проточной рН-ячейке.

[0306] 114. Аппарат по любому из вариантов 88-113, в котором объем кислотного титранта или основного титранта, доставляемого в реактор, имеет процентную ошибку в 10% или менее.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Моделирование титрования для понижения рН белкового раствора

[0307] В биореакторах выращивали клетки, экспрессирующие пять различных белков, и белки секретировались в среды культивирования клеток. После этапа начального сбора клеток для удаления клеток и продуктов клеточного распада, белки захватывали с использованием хроматографической системы на основе белка А, промывали и элюировали. Элюат, содержащий частично очищенный белок, затем

переносили в автоматизированную систему для инактивации вирусов посредством понижения рН до 3,6.

[0308] Чтобы измерять рН, рН-зонд InPro 3253 компании Mettler Toledo калибровали, затем стерилизовали с помощью автоклава или гамма-облучения в запечатанном сильфоне с соединением типа Kleenpak, чтобы обеспечивать стерильное соединение с сосудом для пула, содержащим раствор частично очищенного белка. рН-зонд вставляли в сосуд для пула и добавляли кислотный раствор до тех пор, пока не был достигнут целевой рН в 3,6. Вставка рН-зонда непосредственно в сосуд для пула давала возможность управления титрованием с обратной связью, чтобы управлять конечным рН. В этом примере титранты дозировали непрерывно и рН измеряли непрерывно.

[0309] рН в зависимости от количества добавленной кислоты измеряли для 11 серий инактивации вирусов по 5 различным белкам и нанесли на график на фиг. 1. На фиг. 1 количество добавленного основания указано в оборотах насоса на кг продукта в сосуде перед добавлением какого-либо титранта, и данные о скорости работы насоса сдвинуты по времени для того, чтобы учесть задержку между добавлением основания и откликом рН. Как можно видеть на фиг. 1, все кривые титрования были визуальными аналогами по форме. Кривые титрования были в основном линейными, с наблюдаемой небольшой нисходящей кривой. Кривые титрования также отличались по отсекаемым на осях X и Y отрезкам.

[0310] К кривым титрования, показанным на фиг. 1, применяли линейное преобразование осей.

[0311] Ось Y (рН) преобразовали в шкалу в $1 \rightarrow 0$ (начальный рН \rightarrow конечный рН) с использованием следующего уравнения:

$$y = \frac{\text{pH} - \text{pH}_{\text{final}}}{\text{pH}_{\text{initial}} - \text{pH}_{\text{final}}} \quad (\text{Уравнение 1}).$$

Ось X (добавленная кислота, англ. «acid added») преобразовали в шкалу в $0 \rightarrow 1$ (начальное \rightarrow конечное) с использованием следующего уравнения:

$$x = \frac{\text{acid added}}{\text{acid added}_{\text{final}}} \quad (\text{Уравнение 2}).$$

Линейное преобразование двух осей, которое заставляет сходить 2 точки на каждой кривой, должно приводить к слиянию всех кривых, как показано на фиг. 2. Моделирование результирующих преобразованных данных, показанных на фиг. 2, дало полином второго порядка:

Нормализованный рН $v1 = 1,0584433 - 1,0049047 * \text{нормализованная добавка титранта } v1 - 0,214062 * (\text{нормализованная добавка титранта } v1 - 0,56403)^2$ (Уравнение 3).

Сводка по подгонке полинома показана в нижеприведенной таблице 1:

Таблица 1. Сводка по подгонке

RSquare	0,996943
RSquare Adj	0,996936

Среднеквадратичная ошибка	0,017471
Среднее значение отклика	0,470191
Наблюдения (или сумма весов)	830

RMSE (среднеквадратичная ошибка) квадратичной подгонки = 0,0175 нормализованной единицы рН, что в единицах рН составляет приблизительно: $0,0175 * \left(\frac{4,2-3,6}{1}\right) = 0,011$ рН (Уравнение 4). Начальные и конечные значения рН немного варьировались между сериями.

Пример 2. Моделирование титрования для повышения рН белкового раствора

[0312] После инактивации вирусов, рН раствора повышали до нейтрального или почти нейтрального рН посредством добавления основного раствора, используя такой же подход, как и описанный в примере 1.

[0313] рН в зависимости от количества добавленного основания измеряли для 12 серий инактивации вирусов по 7 различным белкам и нанесли на график на фиг. 4. На фиг. 4 количество добавленного основания указано в оборотах насоса на кг продукта в сосуде перед добавлением какого-либо титранта, и данные о скорости работы насоса сдвинуты по времени для того, чтобы учесть задержку между добавлением основания и откликом рН. Как можно видеть на фиг. 4, кривые были аналогичными по форме, с согласованной точкой перегиба около рН 6. Местоположение этой точки перегиба на оси X было переменным.

[0314] К кривым титрования, показанным на фиг. 4, применяли линейное преобразование осей. В теории, линейное преобразование, которое заставляет сходиться 2 хорошо подобранные точки на каждой кривой, должно приводить к слиянию всех кривых в одну кривую. Изначальный подход был основан на моделировании кислотного титрования, описанном в примере 1, выше.

[0315] В этом первом подходе ось Y (рН) преобразовали в шкалу в $0 \rightarrow 1$ (начальный рН \rightarrow конечный рН) с использованием следующего уравнения:

$$y = \frac{\text{pH} - \text{pH}_{\text{initial}}}{\text{pH}_{\text{final}} - \text{pH}_{\text{initial}}} \quad (\text{Уравнение 5}).$$

[0316] Ось X (добавленное основание, англ. «base added») преобразовали в шкалу в $0 \rightarrow 1$ (начальное \rightarrow конечное) с использованием следующего уравнения:

$$x = \frac{\text{base added}}{\text{base added}_{\text{final}}} \quad (\text{Уравнение 6}).$$

[0317] Результаты этого преобразования показаны на фиг. 5. Как можно видеть на фиг. 5, этот inicialный подход к нормализации не приводит к слиянию кривых основного титрования в той степени, как у кривых кислотного титрования в примере 1 (сравните фиг. 5 с фиг. 2).

[0318] Одно из объяснений этой вариации заключается в том, что хотя целевой рН для кислотного титрования был одинаковым по белкам (рН 3,6), целевой рН для

основного титрования различался между белками, в диапазоне от 7,7 до 8,0, в зависимости от белка. Таким образом, конечные точки данных кривых титрования не должны сходиться при нормализации.

[0319] Соответственно, второй подход к нормализации принимал во внимание то, что конечные точки титрования не должны сходиться. В этом втором подходе ось Y устанавливали на 0 в момент времени = 0, и pH 7,60, который близок к целевому pH, но меньше его, устанавливали равным 1. Аналогично, ось X фиксировали равной 0 для момента времени = 0, и 1 – для количества титранта, необходимого для достижения pH 7,60.

[0320] В этом втором подходе ось Y (pH) преобразовали в шкалу 0 → 1+ (начальный → pH 7,60) с использованием уравнения:

$$y = \frac{\text{pH} - \text{pH}_{\text{initial}}}{7.60 - \text{pH}_{\text{initial}}} \quad (\text{Уравнение 7}).$$

[0321] Ось X (добавленное основание, англ. «base added») преобразовали в шкалу 0 → 1+ (начальный → pH 7,60) с использованием уравнения:

$$x = \frac{\text{base added}}{\text{base added}_{\text{pH } 7.60}} \quad (\text{Уравнение 8}).$$

[0322] Результаты этого второго преобразования показаны на фиг. 6. Как показано на фиг. 6, принудительная сходимость в момент времени = 0 и при pH=7,60 значительно улучшает подгонку. Тем не менее, две кривые титрования по-прежнему отклоняются от оставшихся кривых.

[0323] Это отклонение может быть вызвано проблемами с калибровкой pH-зонда. Например, pH-зонды, используемые для создания кривых титрования, стерилизовали в запечатанном мешке с использованием автоклава или гамма-облучения. Стерилизация происходила после калибровки, но до применения, так что зонд был сухим в течение определенного периода времени между калибровкой и тем моментом, когда он снимал первое измерение. Проблемы с pH-зондами могут приводить к тому, что эти две кривые титрования отклоняются от модели. Оффлайнный pH измеряли в начале и конце всех серий pH-титрования. Иными словами, в начале и конце каждой серии либо с понижением, либо с повышением pH, небольшое количество белкового раствора удаляли из пула и измеряли pH отдельно с помощью зонда, который не был подвергнут стерилизации. Как видно на фиг. 7, две серии с наибольшим отклонением от модели также показали наибольшее различие в начальных онлайнных и оффлайнных измерениях, что указывает на то, что проблема с наибольшей вероятностью заключается в зондах, использованных для создания этих двух кривых титрования.

[0324] Проблемы с онлайнными измерениями pH могут быть исправлены с помощью линейного преобразования с использованием двух оффлайнных измерений (начального и конечного). Это эквивалентно по факту 2-точечной pH-стандартизации. Третий подход к нормализации принимал во внимание как (1) то, что конечные точки

титрования не должны сходиться, так и (2) разности между онлайнвыми и оффлайнвыми измерениями. Скорректированный онлайнвый рН вычисляли с использованием следующего уравнения:

$$pH_{corrected}^{online} = pH_{initial}^{offline} + (pH_{final}^{offline} - pH_{initial}^{offline}) * \left(\frac{pH_{online} - pH_{initial}^{online}}{pH_{final}^{online} - pH_{initial}^{online}} \right) \quad (\text{Уравнение 9}).$$

Результаты показаны на фиг. 8. Как показано на фиг. 8, коррекция онлайнвого рН улучшает подгонку.

[0325] Четвертый подход использовали для того, чтобы дополнительно уплотнить подгонку. Поскольку различные серии имели немного отличающийся начальный рН, различные кривые титрования принудительно сводили в 2 промежуточных точках, а не в одной промежуточной точке (рН 7,60), как в предыдущих попытках. Сходимость принудительно вызывали в 2 промежуточных точках: рН 3,70 и 7,60. Преобразования рН (ось Y) не требовалось, поскольку сходимость принудительно вызывали при 2 фиксированных значениях рН. Количество добавленного основания (ось X) преобразовали в шкалу $\sim 0 \rightarrow 1+$ (рН 3,70 \rightarrow рН 7,60) с использованием нижеприведенного вычисления:

$$X = \frac{\text{base added} - \text{base added}_{@ \text{pH } 3.70}}{\text{base added}_{@ \text{pH } 7.60} - \text{base added}_{@ \text{pH } 3.70}} \quad (\text{Уравнение 10}).$$

[0326] Результаты показаны на фиг. 10. Этот скорректированный, преобразованный набор данных использовали для того, чтобы создать модель для добавления основания (линия, фиг. 10). Для Подгонки потребовался полином 6+ порядка вследствие более сложной формы кривой для кривых титрования при добавлении основания по сравнению с кривыми титрования при добавлении кислоты:

$$\text{pH (онлайнвый, скорректированный)} = 2,5460075 + 5,5157799 * \text{Titrant} - 0,1694419 * (\text{Titrant} - 0,63949)^2 - 11,009696 * (\text{Titrant} - 0,63949)^3 + 2,1806629 * (\text{Titrant} - 0,63949)^4 + 13,771715 * (\text{Titrant} - 0,63949)^5 - 7,7443576 * (\text{Titrant} - 0,63949)^6 \quad (\text{Уравнение 11}).$$

(Значения титранта являются нормализованными значениями из Уравнения 10).

[0327] RMSE модели регулирования основания = 0,080 единицы рН. Сводка по подгонке показывается в нижеприведенной таблице 2.

[0328] Таблица 2. Сводка по подгонке

RSquare	0,997091
RSquare Adj	0,997069
Среднеквадратичная ошибка	0,079609
Среднее значение отклика	6,035137
Наблюдения (или сумма весов)	773

[0329] В общем, способы, описанные в примере 1 и 2, обеспечивают точные автоматизированные регулировки рН с подходом к измерению непрерывного отводимого потока. При регулировании рН может быть взято небольшое число образцов, и использовалась рН-модель для определения того, сколько дополнительной кислоты или

основания следует добавить, чтобы достичь целевого рН, с высокой степенью точности и без необходимости в непрерывном заборе образцов или измерении. Используемые при моделировании кривые титрования могут быть разработаны всего лишь с одним набором экспериментальных данных. Этот подход также обеспечивает возможность титрования до любого значения рН в рамках набора обучающих данных. Наконец, точность управления рН может быть повышена путем добавления дополнительных промежуточных точек забора образцов.

Пример 3. Разработка системы для регулирования и управления рН

[0330] Была разработана система для измерения рН в ходе инактивации вирусов, с использованием рН-зонда, вставленного в прерывистый отведенный поток, и безразмерной модели для соотнесения рН и добавленного в образец титранта. Примерный список частей, использованных в этой системе, показан на фиг. 11. Схемы системы показаны на фиг. 19-20.

[0331] В этом примере системы добавлением каждого из кислотного и основного титрантов в реакционный сосуд, содержащий образец, управляют посредством отдельного насоса модели 530 компании Watson-Marlow, соединенного с ультразвуковым расходомером CO.55 компании Sonotec. Насос принимает титрант из трубки, соединенной с мешком титранта, затем отправляет титрант в реакционный сосуд через расходомер. Линия забора образцов из реакционного сосуда соединена с насосом для забора образцов через обратный клапан, который может использоваться для предотвращения загрязнения реакционного сосуда в том случае, когда узел забора образцов установлен неправильно. Насос для забора образцов отправляет образец из реакционного сосуда в проточную рН-ячейку, в которую вставлен рН-зонд. рН-зонд соединен с рН-передатчиком. Из проточной ячейки образец отправляется в приемник отходов. Все насосы соединены с контроллером, так что программируемая управляющая логика контроллера может управлять объемом и расходом кислотного и основного титрантов, а также тем, вытягивается ли образец и сколько его вытягивается из реакционного сосуда для анализа.

[0332] Преимущества этой системы включают следующее. Когда зонд вставлен в реакционный сосуд, зонд нельзя откалибровать после стерилизации (и до вставки). Стерилизация может влиять на кривую калибровки зонда. В этой системе зонд вставляется в отдельную проточную ячейку, и стерилизация не требуется. Автоклавы или стерильные соединительные порты типа Kleenpak не требуются, и риск поломки зонда в реакционном сосуде или утечки раствора из зонда в белковый продукт исключается. Насос для забора образцов и обратный клапан дают дискретные образцы для измерения рН, уменьшая отходы продукта. Система также может быть соединена с любым реакционным сосудом через линию забора образцов и в силу этого является очень гибкой.

[0333] Пример рабочей последовательности операций процесса регулирования кислоты показан на фиг. 12. После настройки оборудования, которая включает в себя калибровку зонда и автоматическое обнуление расходомеров, автоматически проводят начальное измерение рН до какого-либо добавления кислотного титранта, и в образец

добавляют первое количество кислотного титранта. Объемом добавки управляют с использованием обратной связи из расходомера. Начальное количество кислоты обычно является консервативным, чтобы гарантировать, что не проскочен целевой рН. Кислоту добавляют с постоянной скоростью (мл кислоты на кг белкового пула в реакционном сосуде), что позволяет вычислить общий начальный объем добавки. Затем автоматически измеряют рН после того, как был добавлен общий объем титранта при этом начальном добавлении, и начальное и измеренное значения рН и количество кислоты, добавленной для получения второго значения рН, подаются в модель для определения соответствующих безразмерных значений добавки титранта. Выбирают промежуточный целевой рН между конечным целевым рН и рН после первого добавления титранта, и используют модель для вычисления соответствующего безразмерного значения добавки титранта. Безразмерное количество титранта, который нужно добавить в образец для достижения этого промежуточного рН, вычисляют по следующей формуле:

$$\text{Titran}_{\text{n}} \times \left[\left(\frac{(\text{normalized Titran}_{\text{total}} - \text{normalized Titran}_{\text{initial}})}{(\text{normalized Titran}_{\text{n}} - \text{normalized titran}_{\text{initial}})} \right) - 1 \right] \quad (\text{Уравнение 15}).$$

[0334] В этой формуле $\text{normalized Titran}_{\text{total}}$ – общее количество титранта, добавленного в образец для достижения промежуточного целевого рН, после нормализации, $\text{normalized Titran}_{\text{initial}}$ – количество титранта, добавленного в образец для начального рН, после нормализации (это значение может быть равно 0 до нормализации), и $\text{normalized Titran}_{\text{n}}$ – количество титранта, добавленного в образец для достижения первого промежуточного рН, нормализованное с использованием модели. Следует отметить, что модель также используется для вычисления $\text{normalized Titran}_{\text{initial}}$. С помощью двух нормализованных количеств титранта, а также фактического (размерного) количества добавленного титранта, можно выполнять преобразование между нормализованным и ненормализованным количеством титранта. Добавляют второй объем кислоты, эти этапы повторяют для верифицирования точности модели и рН-метра, а затем добавляют конечный объем кислоты для достижения целевого рН. После выдержки низкого рН для инактивирования вируса, рН доводят обратно до нейтрального с использованием аналогичной последовательности этапов.

[0335] Аналогичная рабочая последовательность операций процесса для повышения рН показана на фиг. 13. После автоматического обнуления расходомеров добавляют в образец первое количество основного титранта, измеряют рН и вычисляют первый объем с использованием линейной функции, связывающей мл/кг добавленного основания с целевым нейтральным рН. Начальный рН, измеренный рН и объем основного титранта подгоняют к модели. Добавляют второй объем основания, эти этапы повторяют для верифицирования точности модели и рН-метра, и затем добавляют конечный объем основания для достижения целевого рН.

[0336] В этих процессах значение рН отведенного потока сравнивают с ожидаемым значением после каждого измерения. Если измеренный рН находится за пределами ожидаемого диапазона, пользователю выдается указание на забор образца, измерение

оффлайнного рН на независимо калиброванном рН-метре и ввод оффлайнного значения в модель. Если эти два измерения отличаются на $> 0,10$ единицы рН, то пользователь должен завершать процесс с оффлайнными измерениями рН, и использовать консервативные объемы и дополнительные этапы измерения, чтобы завершить процесс. Консервативные добавления в ходе этапа регулирования кислоты компенсируют потенциальную неточность более ранних измерений рН автоматически отобранных образцов из онлайнного рН-зонда.

[0337] Хотя процесс по-прежнему автоматизирован, вместо автоматического забора образцов рН после каждого добавления титранта, пользовательский интерфейс выдает указание пользователю на забор образца, измерение рН оффлайн, например, с помощью независимого рН-зонда и ввод оффлайнного значения в пользовательский интерфейс. Другими словами, если онлайнный зонд в проточной рН-ячейке определен как неправильно откалиброванный в середине этапа регулирования (например, в ходе регулирования кислоты после того, как было выполнено первое добавление кислоты), оставшаяся часть этого этапа регулирования (например, регулирования кислоты) выполняется с использованием консервативных добавлений и оффлайнных измерений рН. В этом сценарии регулирование основания также выполняется с использованием модели безразмерного титрования, но пользователь должен продолжать использовать независимый рН-зонд и оффлайнные значения рН, которые вводятся в пользовательский интерфейс, вместо измерения рН в проточной ячейке. Модель применяется к оффлайнным значениям рН для того, чтобы закончить рН-последовательность.

[0338] Если разность составляет $\leq 0,10$ единицы рН, то процесс может продолжаться с использованием подхода к измерению рН отведенного потока. Сводка этапов процесса, подхода к вычислению объема и приемлемый онлайнный рН показаны в нижеприведенной таблице 3:

Таблица 3. Критерии приемлемости для онлайнного рН

Этап процесса	Подход к вычислению добавленного объема	Приемлемый онлайнный рН
Измерение рН белкового пула	Нет данных	4,00-4,50
Добавление №1	Консервативное добавление Кислота – постоянное количество кислоты в мл на кг захватываемого пула Основание – линейная функция в мл/кг от целевого нейтрального рН	Δ рН в пределах возможного диапазона, спрогнозированного по статистической модели VI

Добавление №2	Безразмерная модель титрования Цель: на полпути до конечного рН	$\leq 0,10$ единицы рН от цели
Добавление №3	Безразмерная модель титрования Цель: конечный рН	$\leq 0,10$ единицы рН от цели

Таблица 3 применяется к рН-последовательности с 3 этапами добавления. Например, если используются четыре (или более) добавления, то целевой рН для каждого добавления, относительно конечного рН, должен регулироваться соответствующим образом.

Пример 4. Калибровка рН-метров, используемых в онлайн-процессе

[0339] Одна проблема, которую нужно было решить с существующей системой, заключалась в калибровке рН-зонда и в том, как выполнять калибровку внешне по отношению к рН-передатчику. Промышленные рН-передатчики (например, М400 компании Mettler Toledo) типично ограничены процессом 2-точечной калибровки. Тем не менее, желательна 4-точечная калибровка, охватывающая рН 2-10 для того, чтобы обеспечить точность, и стандартная процедура с использованием оффлайн-зондов.

[0340] Поэтому был разработан процесс 4-точечной калибровки для онлайн-зонда с тем, чтобы принять процедуру калибровки, эквивалентную процедурам, принятым оффлайн-зондами.

[0341] Была разработана процедура калибровки, которую осуществляли в управляющей логике системы (например, через MATLAB), вместо использования функции калибровки передатчика. В этой процедуре калибровки передатчик отправляет в контроллер необработанные сигналы напряжения зонда в мВ и температуры зонда вместо вычисленного сигнала рН. Управляющая логика проводит пользователя по этапам калибровки и записывает напряжение в мВ и температуру для каждого стандарта буфера. Использовали следующие критерии приемлемости калибровки:

Наклон: 95-105%

Смещение: $\pm(0-15$ мВ)

Температура: 20-25°C для всех стандартов

Испытание на линейность: Все стандарты в пределах 0,05 единицы рН после калибровки

[0342] В ходе калибровки температурная компенсация также вычисляется в управляющей логике, чтобы учесть температурную зависимость рН от стандартов буфера. Температурная компенсация также вычисляется во время внутрипроцессных измерений в ходе процесса титрования.

[0343] Примерная кривая калибровки онлайн-зонда показана на фиг. 14.

Пример 5. Дополнительная модель для регулирования рН без нормализации рН

[0344] Разработана дополнительная модель для соотнесения титранта с рН, которая не использует рН-нормализацию для добавления кислоты или основания.

[0345] В этом подходе, для добавления кислоты, выбирали два значения pH из статистических кривых титрования, описанных в примере 1, которые смещали от конечных точек кривых титрования. Эти контрольные значения pH (pH_1 и pH_2) выбирали таким образом, чтобы они находились как можно дальше друг от друга, при том, что они по-прежнему являются значениями pH, входящими в каждую кривую контрольного титрования. Нормализованное количество титранта затем вычисляли по следующему уравнению:

Нормализованное количество титранта = (добавленный титрант – титрант, добавленный при контрольном pH_1)/(титрант, добавленный при контрольном pH_2 – титрант, добавленный при контрольном pH_1) (Уравнение 12).

Для модели кислотного титранта, контрольный pH_1 составлял 4,1, а контрольный pH_2 составлял 3,7. Для модели основного титранта, контрольный pH_1 составлял 3,7, а контрольный pH_2 составлял 7,6.

[0346] Это нормализованное количество титранта находится в диапазоне от ниже 0 до выше 1. Набор данных, используемый для создания модели регулирования кислоты, попадал в диапазон от -0,76 до 1,49, что давало шкалу, к которой нормализовали кислотный титрант. Набор данных, используемый для создания модели регулирования основания, попадал в диапазон от -0,06 до 1,53, что давало шкалу, к которой нормализовали основной титрант. Используемые диапазоны зависят от вариабильности начальных и конечных значений pH в наборе данных. Два контрольных значения pH, выбранные для нормализации, находились как можно дальше друг от друга, при том, что они оставались в пределах границ набора кривых контрольного титрования. Одно преимущество этого подхода заключается в том, что конечный pH образца может находиться в любом месте вдоль кривой титрования, созданной посредством контрольных образцов, при том условии, что он содержится в кривых контрольного титрования. Например, конечный pH для регулирования кислоты может быть больше или равен конечному pH контрольного образца. Аналогично, конечный pH для регулирования основания может быть меньше или равен конечному pH контрольного образца.

[0347] Использование этой стратегии нормализации приводило к следующему полиному 4-го порядка для нормализации кислотного титранта в ходе добавления кислоты:

нормализованная добавка кислотного титранта = $283,35764 - 279,43987 * pH + 104,25395 * pH^2 - 17,257125 * pH^3 + 1,0589067 * pH^4$ (Уравнение 13).

[0348] Аналогичную модель, полином 5-го порядка, использовали для нормализации основного титранта в ходе добавления основания:

нормализованная добавка основного титранта = $12,256725 - 10,723277 * pH + 3,3662386 * pH^2 - 0,4588175 * pH^3 + 0,0255417 * pH^4 - 0,0003153 * pH^5$ (Уравнение 14).

[0349] Аппарат, описанный в примере 3, и модели, описанные здесь, использовали на мелкомасштабном белковом пуле для испытания характеристик. Испытывали измерение pH отведенного потока и точность ультразвукового расходомера. Результаты

из пяти опытных серий показаны на фиг. 15. Δ pH и ошибка дозирования (%) в зависимости от этапа процесса, для каждой из пяти опытных серий, нанесены на график на фиг. 16.

[0350] Как показано на фиг. 15, наблюдаемая разность pH между онлайн-выми и оффлайн-выми зондами составляла 0,05 или менее для всех этапов добавления. Ошибка дозирования была обычно меньше 5%, за исключением конечного добавления основания первой опытной серии. Фиг. 16 показывает данные с фиг. 15, причем разность между онлайн-вым и оффлайн-вым pH в верхней части и ошибка дозирования в нижней части нанесены на график по всей pH-последовательности инактивации вирусов. Ошибка дозирования представляет собой погрешность в объеме титранта, добавленного на каждом этапе, сообщаемую в виде разности в % между целевым объемом и фактическим объемом.

[0351] Влияние проточной ячейки на характеристики pH-зонда также оценивали в опытной серии, которая сравнивала онлайн-вый зонд, используемый в этом способе, оффлайн-вый зонд и онлайн-вый зонд, проводящий измерения за пределами проточной ячейки. В этом случае было предусмотрено четыре этапа добавления кислоты, поскольку оффлайн-вый pH не находился в диапазоне после третьего этапа добавления кислоты.

[0352] pH в зависимости от этапа добавления титранта нанесен на график на фиг. 17 для каждого из трех условий работы зонда. После каждого измерения pH отведенного потока в течение опытной серии зонд удаляли из проточной ячейки и вставляли непосредственно в образец для того, чтобы оценить влияние проточной ячейки на измерение. Как показано на фиг. 17, результаты измерения pH, снятые онлайн-вым зондом в проточной ячейке, онлайн-вым зондом вне проточной ячейки и оффлайн-вым зондом, показали хорошее соответствие.

[0353] Визуализация в реальном времени одной из опытных серий с использованием 55,1-килограммового белкового пула показана на фиг. 18.

Пример 6. Регулирование pH с 3 или 4 добавлениями с использованием автоматизированной системы титрования и модели

[0354] Автоматизированную систему титрования, описанную в примере 3, использовали для выполнения инактивации вирусов при низком pH для 18 партий белка, которые представляют 7 различных белковых продуктов. Модель, описанную в примере 5, который не использует pH-нормализацию, использовали для соотнесения количества титранта с pH в ходе процесса регулирования pH. При инактивации вирусов 18 партий белка задача состояла в том, чтобы достичь заданного уровня pH, который составлял менее чем 0,10 единицы pH от конечного целевого pH, как при понижении pH для инактивирования потенциальных вирусов, так и при повышении pH обратно до нейтрального после инактивации вирусов.

[0355] При использовании 3 или 4 добавлений кислоты или основания в расчете на этап регулирования, все 18 партий белка удовлетворяли заданному уровню $< 0,10$ единицы pH от целевого pH, согласно оффлайн-вому контрольному зонду для этапов регулирования и кислоты, и основания. Результаты показаны на фиг. 21, которая иллюстрирует разность между pH, измеренным оффлайн-вым контрольным зондом, и

целевым рН после регулирования кислоты (слева) или основания (справа). Кислоту или основание добавляли соответственно за 3 добавления (кружки) или 4 добавления (крестики). Целевой кислотный рН для инактивации вирусов составлял между 3,50 и 3,60. Целевой нейтрализационный рН после инактивации вирусов составлял между 5,50 и 8,00, в зависимости от белка.

[0356] При использовании 3 добавлений в расчете на этап регулирования, все партии белка находились в пределах $< 0,10$ единицы рН от целевого рН после добавления кислоты или основания (фиг. 21). Тем не менее, при использовании 3 добавлений в расчете на этап регулирования, более строгий заданный уровень, состоявший в конечном рН в пределах менее чем 0,05 единицы рН от целевого рН, согласно онлайн-контролирующему зонду, не удовлетворялся согласованно при регулировании рН до нейтрального после этапа инактивации вирусов низким рН (фиг. 22, правая сторона).

[0357] Стратегия с 4 добавлениями была реализована для повышения точности способа. За счет этого пересмотренного подхода третье добавление кислоты или основания доводило рН до величины в пределах 0,05-0,10 единицы рН от целевого рН. Небольшое четвертое добавление выполняли для того, чтобы точно достичь целевого рН. Как можно видеть на фиг. 21 и 22, стратегия с 4 добавлениями увеличивала точность способов, так что конечный рН, который составлял в пределах 0,05 единицы рН от целевого рН, был согласованно достигнут для этапов регулирования и кислоты, и основания. Как можно видеть на фиг. 22, все 13 партий, у которых их рН был отрегулирован с использованием стратегии с 4 этапами добавления, удовлетворяли заданному уровню в менее чем 0,05 единицы рН от целевого рН согласно онлайн-зонду.

[0358] Автоматизированная система также была способна точно измерять рН образцов белка в течение всего процесса инактивации вирусов. Когда разность между рН, измеренным оффлайн-контрольным зондом, и рН, измеренным онлайн-контролирующим зондом, определяли на каждом этапе добавления, было обнаружено, что 147 из 151 дискретного измерения рН попадали в пределы разности в 0,05 единицы рН между оффлайн-контрольным зондом и онлайн-контролирующим зондом, вставленным в проточную ячейку (фиг. 23). Таким образом, модель способна точно определять количество кислоты или основания, которое следует добавлять на каждом этапе, и система может добавлять требуемое количество кислоты или основания, чтобы согласованно производить такие изменения рН в ходе процесса кислотного или основного титрования, которые составляют в пределах 0,05 единицы рН от целевого рН для любого данного этапа добавления.

[0359] Помимо этого, автоматизированная система способна точно добавлять определенные по модели объемы кислотного или основного титранта. Как показано на фиг. 24, 133 из 133 добавлений имели менее чем 10%-ую ошибку в объеме добавленного титранта.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ, включающий:
 - a. измерение начального рН ($pH_{initial}$) образца;
 - b. добавление по меньшей мере первого количества титранта ($Titrant_n$) в образец и измерение по меньшей мере первого дополнительного значения рН (pH_n), причем $Titrant_n$ представляет собой количество титранта, добавленного в образец для достижения рН_n, при этом рН_n отличается от $pH_{initial}$;
 - c. применение модели для определения нормализованного начального количества титранта ($Titrant_{initial}$) и нормализованного $Titrant_n$, при этом модель соотносит нормализованное количество титранта, добавленного в образец, с рН образца; и
 - d. определение еще одного дополнительного количества титранта ($Titrant_{n+1}$), которое следует добавить в образец для достижения целевого рН (pH_{n+1}), причем рН_{n+1} представляет собой рН, достигнутый посредством добавления общего количества титранта в образец.
2. Способ по п. 1, включающий добавление второго количества титранта ($Titrant_{n+2}$) в образец и измерение второго дополнительного рН (pH_{n+2}), и повторение этапов (c) и (d).
3. Способ по п. 2, включающий добавление третьего количества титранта в образец и измерение третьего дополнительного рН, и повторение этапов (c) и (d).
4. Способ по п. 3, в котором добавление третьего количества титранта в образец приводит к рН, который составляет в пределах 0,05-0,10 единицы рН от конечного целевого рН (pH_{final}).
5. Способ по любому из пп. 1-4, включающий добавление четвертого количества титранта в образец.
6. Способ по любому из пп. 1-5, при этом способ содержит не более чем 3 или 4 добавления титранта для изменения рН образца до pH_{final} .
7. Способ по любому из пп. 1-6, включающий:
 - (i) создание по меньшей мере одной кривой контрольного титрования от по меньшей мере одного контрольного образца, соотносящей количество титранта, добавленного в контрольный образец, с рН контрольного образца;
 - (ii) необязательно, нормализацию упомянутой по меньшей мере одной кривой контрольного титрования; и
 - (iii) создание модели для подгонки упомянутой по меньшей мере одной кривой контрольного титрования.
8. Способ по п. 7, в котором создание упомянутой по меньшей мере одной кривой контрольного титрования содержит:
 - (i) измерение начального рН контрольного образца ($pH_{initial_ref}$);
 - (ii) добавление количества титранта в контрольный образец ($Titrant_{n_ref}$) и измерение дополнительного контрольного значения рН (pH_{n_ref}), причем $Titrant_{n_ref}$ представляет собой количество титранта, добавленного в образец для достижения рН_{n_ref}, при этом рН_{n_ref} отличается от $pH_{initial_ref}$;

(iii) повторение этапов (i)-(ii) до тех пор, пока упомянутый по меньшей мере один контрольный образец не достигнет конечного рН (pH_{final_ref}) посредством добавления общего количества титранта в контрольный образец ($Titrant_{tot_ref}$); и

(iv) нанесение на график количества добавленного титранта в зависимости от рН контрольного образца.

9. Способ по п. 7 или 8, в котором количество титранта, добавленного в контрольный образец, нормализуют следующим образом:

$$\text{normalized Titrant}_{n_ref} = \frac{Titrant_{n_ref} - Titrant_{1_ref}}{Titrant_{2_ref} - Titrant_{1_ref}},$$
 где $Titrant_{1_ref}$ – количество титранта, добавленного в контрольный образец для достижения pH_{1_ref} , а $Titrant_{2_ref}$ – количество титранта, добавленного в контрольный образец для достижения pH_{2_ref} .

10. Способ по любому из пп. 7-9, в котором упомянутая по меньшей мере одна кривая контрольного титрования включает одну единственную кривую титрования, и при этом $pH_{1_ref} = pH_{initial_ref}$, а $pH_{2_ref} = pH_{final_ref}$.

11. Способ по любому из пп. 7-9, в котором упомянутая по меньшей мере одна кривая контрольного титрования включает множество кривых контрольного титрования, при этом каждая кривая контрольного титрования содержит $pH_{initial_ref}$ и pH_{final_ref} , и при этом:

a. pH_{1_ref} является $pH_{initial_ref}$ из одной из множества кривых контрольного титрования,

b. pH_{2_ref} является pH_{final_ref} из одной из множества кривых контрольного титрования,

и при этом pH_{1_ref} и pH_{2_ref} выбирают охватывающими максимальную разность значений при одновременном охватывании значений рН, покрываемых всеми из множества кривых контрольного титрования.

12. Способ по любому из пп. 9-11, в котором начальный рН образца ($pH_{initial}$) и pH_{1_ref} являются примерно одинаковыми, или при этом начальный рН образца ($pH_{initial}$) и pH_{1_ref} не являются одинаковыми.

13. Способ по любому из пп. 9-12, в котором конечный рН образца (pH_{final}) и pH_{2_ref} являются примерно одинаковыми, или при этом pH_{final} и pH_{2_ref} не являются одинаковыми.

14. Способ по любому из пп. 9-13, в котором $pH_{initial}$, $pH_{initial_ref}$ и pH_{1_ref} являются примерно одинаковыми, и при этом pH_{final} , pH_{final_ref} и pH_{2_ref} являются примерно одинаковыми.

15. Способ по любому из пп. 1-14, в котором конечный рН образца (pH_{final}) меньше начального рН образца ($pH_{initial}$), и титрант представляет собой кислоту.

16. Способ по п. 15, в котором pH_{1_ref} составляет между примерно 4,0 и 4,3, и, необязательно, при этом pH_{1_ref} составляет примерно 4,1, а pH_{2_ref} составляет между примерно 3,4 и 3,9, и, необязательно, при этом pH_{2_ref} составляет примерно 3,7.

17. Способ по п. 15 или 16, в котором $pH_{initial}$ составляет между примерно 4,0 и 4,5, между примерно 4,1 и 4,5, между примерно 4,2 и 4,5, между примерно 4,3 и 4,5, между

примерно 4,1 и 4,4 или между примерно 4,2 и 4,4.

18. Способ по любому из пп. 15-17, в котором pH_{final} составляет между примерно 3,0 и 3,8, между примерно 3,1 и 3,8, между примерно 3,2 и 3,8, между примерно 3,3 и 3,7, между примерно 3,4 и 3,7 или между примерно 3,5 и 3,7.

19. Способ по любому из пп. 15-18, в котором модель содержит полином 4-го порядка.

20. Способ по любому из пп. 1-19, в котором конечный pH образца (pH_{final}) больше начального pH (pH_{initial}), и титрант представляет собой основание.

21. Способ по п. 20, в котором pH_{1_ref} составляет между примерно 3,0 и 3,8, либо между примерно, между примерно 3,1 и 3,8, между примерно 3,2 и 3,8, между примерно 3,3 и 3,7, между примерно 3,4 и 3,7 или между примерно 3,5 и 3,7, а pH_{2_ref} составляет между примерно 5,3 и 8,5, между примерно 5,1 и 8,1, между примерно 5,5 и 8,0 или между примерно 7,5 и 8,0.

22. Способ по п. 20 или 21, в котором pH_{initial} составляет между примерно 3,0 и 3,8, между примерно 3,1 и 3,8, между примерно 3,2 и 3,8, между примерно 3,3 и 3,7, между примерно 3,4 и 3,7 или между примерно 3,5 и 3,7.

23. Способ по любому из пп. 20-22, в котором pH_{final} составляет между примерно 5,3 и 8,5, между примерно 5,1 и 8,1, между примерно 5,5-8,0 или между примерно 7,5 и 8,0.

24. Способ по любому из пп. 20-23, в котором модель содержит полином 5-го порядка.

25. Способ по любому из пп. 1-24, дополнительно включающий коррекцию для калибровки pH-метра при определении значений pH образца или упомянутого по меньшей мере одного контрольного образца.

26. Способ по любому из пп. 1-25, в котором образец содержит первый интересующий белок, а упомянутый по меньшей мере один контрольный образец содержит второй интересующий белок.

27. Способ по п. 26, в котором первый интересующий белок и второй интересующий белок представляют собой гликозилированные белки.

28. Способ по п. 27, в котором первый и второй интересующие белки представляют собой антитело или слитый белок Fc-рецептора (ловушку).

29. Способ по любому из пп. 1-28, при этом способ повышает точность достижения конечного pH образца по сравнению со способом, при котором pH измеряют посредством вставки pH-зонда непосредственно в образец или непрерывный отводимый поток, вытягиваемый из образца.

30. Способ по любому из пп. 1-29, при этом способ уменьшает отходы образца по сравнению со способом, при котором pH измеряют посредством pH-метра, вставленного в непрерывный отводимый поток, вытягиваемый из образца.

31. Способ по любому из пп. 1-30, в котором разность между измеренным pH образца и моделью выявляет ошибку в калибровке pH-метра, используемого для

измерения pH образца.

32. Способ инактивации вируса в образце, включающий:

a. обеспечение образца при начальном pH ($pH_{initial}$) в 4,0 или более;

b. добавление первого количества кислотного титранта ($Titrant_{n_acid}$) в образец и измерение первого дополнительного значения кислотного pH (pH_{n_acid}), причем $Titrant_{n_acid}$ представляет собой количество титранта, добавленного в образец для достижения pH_{n_acid} , при этом pH_{n_acid} отличается от $pH_{initial}$;

c. применение модели для определения нормализованного начального количества титранта ($Titrant_{initial}$) и нормализованного количества титранта, при этом модель соотносит нормализованное количество титранта, добавленного в образец, с pH образца;

d. определение количества титранта, которое следует добавить в образец для достижения целевого кислотного pH (pH_{acid_target}), на основе нормализованного количества титранта, pH и модели;

e. добавление этого количества титранта в образец для достижения pH_{acid_target} ;

f. повторение этапов (d) и (e) до тех пор, пока не будет достигнут конечный кислотный pH (pH_{acid_final});

g. поддержание образца при pH_{final_acid} в течение периода времени, достаточного для инаktivирования вируса;

h. добавление первого количества основного титранта ($Titrant_{n_base}$) в образец и измерение первого дополнительного значения основного pH (pH_{n_base}), причем $Titrant_{n_base}$ представляет собой количество титранта, добавленного в образец для достижения pH_{n_base} , при этом pH_{n_base} отличается от pH_{acid_final} ;

i. нормализацию $Titrant_{n_base}$ посредством применения второй модели;

j. определение количества основного титранта, которое следует добавить в образец для изменения pH образца до целевого основного pH (pH_{target_base}), на основе нормализованного количества титранта, pH и модели;

k. добавление этого количества основного титранта в образец для достижения pH_{target_base} ; и

l. повторение этапов (j) и (k) до тех пор, пока не будет достигнут конечный основной pH (pH_{final_base}).

33. Способ по п. 32, включающий повторение этапов (b) и (c) по меньшей мере один раз, чтобы подтвердить, что поведение образца соответствует модели.

34. Способ по п. 32, включающий повторение этапов (d) и (e) 1, 2 или 3 раза.

35. Способ по п. 32, включающий повторение этапов (d) и (e) 2 или 3 раза, и при этом повторение этапов (b) и (c) 2 или 3 раза приводит к pH, который составляет в пределах 0,05-0,10 единицы pH от pH_{acid_final} .

36. Способ по п. 35, включающий повторение этапов (d) и (e) дополнительный раз для достижения pH_{acid_final} .

37. Способ по любому из пп. 32-36, включающий повторение этапов (h) и (i) по меньшей мере один раз, чтобы подтвердить, что поведение образца соответствует модели.

38. Способ по любому из пп. 32-36, включающий повторение этапов (j) и (k) 1, 2 или 3 раза.

39. Способ по любому из пп. 32-36, включающий повторение этапов (j) и (k) 2 или 3 раза, и при этом повторение этапов (j) и (k) 2 или 3 раза приводит к рН, который составляет в пределах 0,05-0,10 единицы рН от pH_{final_base} .

40. Способ по п. 39, включающий повторение этапов (j) и (k) дополнительный раз для достижения pH_{final_base} .

41. Способ по любому из пп. 32-40, в котором pH_{acid_final} составляет между примерно 3,0 и 3,8, между примерно 3,1 и 3,8, между примерно 3,2 и 3,8, между примерно 3,3 и 3,7, между примерно 3,4 и 3,7 или между примерно 3,5 и 3,7.

42. Способ по любому из пп. 32-41, в котором pH_{final_base} составляет между примерно 5,3 и 8,5, между примерно 5,1 и 8,1, между примерно 5,5 и 8,0 или примерно между 7,0 и 8,5.

43. Способ по любому из пп. 32-42, в котором первая модель содержит полином.

44. Способ по любому из пп. 32-43, дополнительно включающий коррекцию для калибровки рН-метра.

45. Способ по любому из пп. 32-44, в котором образец содержит интересующий белок.

46. Способ по п. 45, в котором интересующий белок представляет собой терапевтический белок.

Способ по п. 44 или 45, в котором интересующий белок представляет собой антитело или слитый белок Fc-рецептора (ловушку).

47. Способ по любому из пп. 32-46, при этом способ повышает точность достижения конечного рН образца по сравнению со способом, при котором рН измеряют посредством вставки рН-метра в образец или непрерывный отводимый поток, вытягиваемый из образца.

48. Способ по любому из пп. 32-47, при этом способ уменьшает отходы образца по сравнению со способом, при котором рН измеряют посредством рН-метра, вставленного в непрерывный отводимый поток, вытягиваемый из образца.

49. Способ по любому из пп. 32-48, в котором разность между измеренным рН образца и моделью выявляет ошибку в калибровке рН-метра, используемого для измерения рН образца.

50. Аппарат, выполненный с возможностью осуществлять способы по любому из пп. 1-49.

51. Аппарат, содержащий:

реактор;

проточную рН-ячейку, содержащую расположенный в ней рН-зонд, причем проточная рН-ячейка гидравлически соединена с реактором, причем проточная рН-ячейка выполнена с возможностью принимать отводимый поток забора образцов из реактора и измерять рН отводимого потока;

блок подачи кислотного титранта, гидравлически соединенный с реактором, причем блок подачи кислотного титранта выполнен с возможностью подавать кислотный титрант в реактор для уменьшения рН в реакторе; и

блок подачи основного титранта, гидравлически соединенный с реактором, причем блок подачи основного титранта выполнен с возможностью подавать основной титрант в реактор для увеличения рН в реакторе.

52. Аппарат по п. 51, дополнительно содержащий:

насос для забора образцов, выполненный с возможностью доставлять отводимый поток из реактора в проточную рН-ячейку;

приемник отходов, выполненный с возможностью принимать выходной поток из проточной рН-ячейки;

насос кислотного титранта, выполненный с возможностью доставлять кислотный титрант из блока подачи кислотного титранта в реактор;

расходомер кислотного титранта, выполненный с возможностью измерять расход кислотного титранта из блока подачи кислотного титранта в реактор;

насос основного титранта, выполненный с возможностью доставлять основной титрант из блока подачи основного титранта в реактор; и

расходомер основного титранта, выполненный с возможностью измерять расход основного титранта из блока подачи основного титранта в реактор.

53. Аппарат по п. 51 или 52, дополнительно содержащий контроллер, причем контроллер связан с расходомером кислотного титранта, расходомером основного титранта, рН-зондом, насосом кислотного титранта и насосом основного титранта.

54. Аппарат по п. 53, в котором контроллер выполнен с возможностью:

(а) принимать сигнал из расходомера кислотного титранта, за счет чего контроллер определяет количество кислотного титранта, добавленного в образец;

(б) принимать сигнал из расходомера основного титранта, за счет чего контроллер определяет количество основного титранта, добавленного в образец;

(с) принимать сигнал из рН-зонда, причем этот сигнал передает результат измерения рН в контроллер, а контроллер соотносит результат измерения рН с соответствующим количеством кислотного титранта или основного титранта, добавленного в образец;

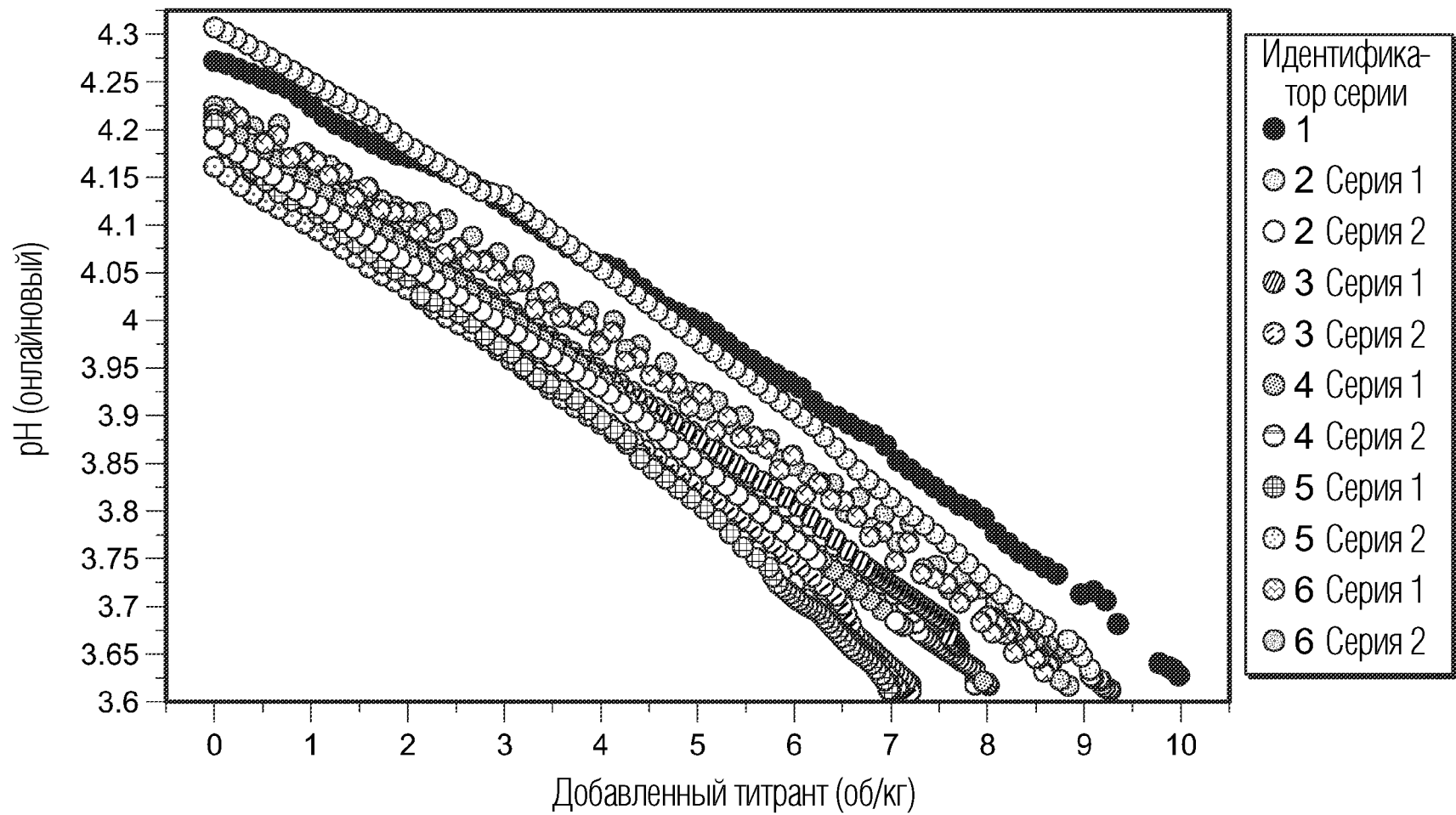
(д) отправлять сигнал насосу кислотного титранта на запуск насоса, остановку насоса или изменение скорости работы насоса; и

(е) отправлять сигнал насосу основного титранта на запуск насоса, остановку насоса или изменение скорости работы насоса,

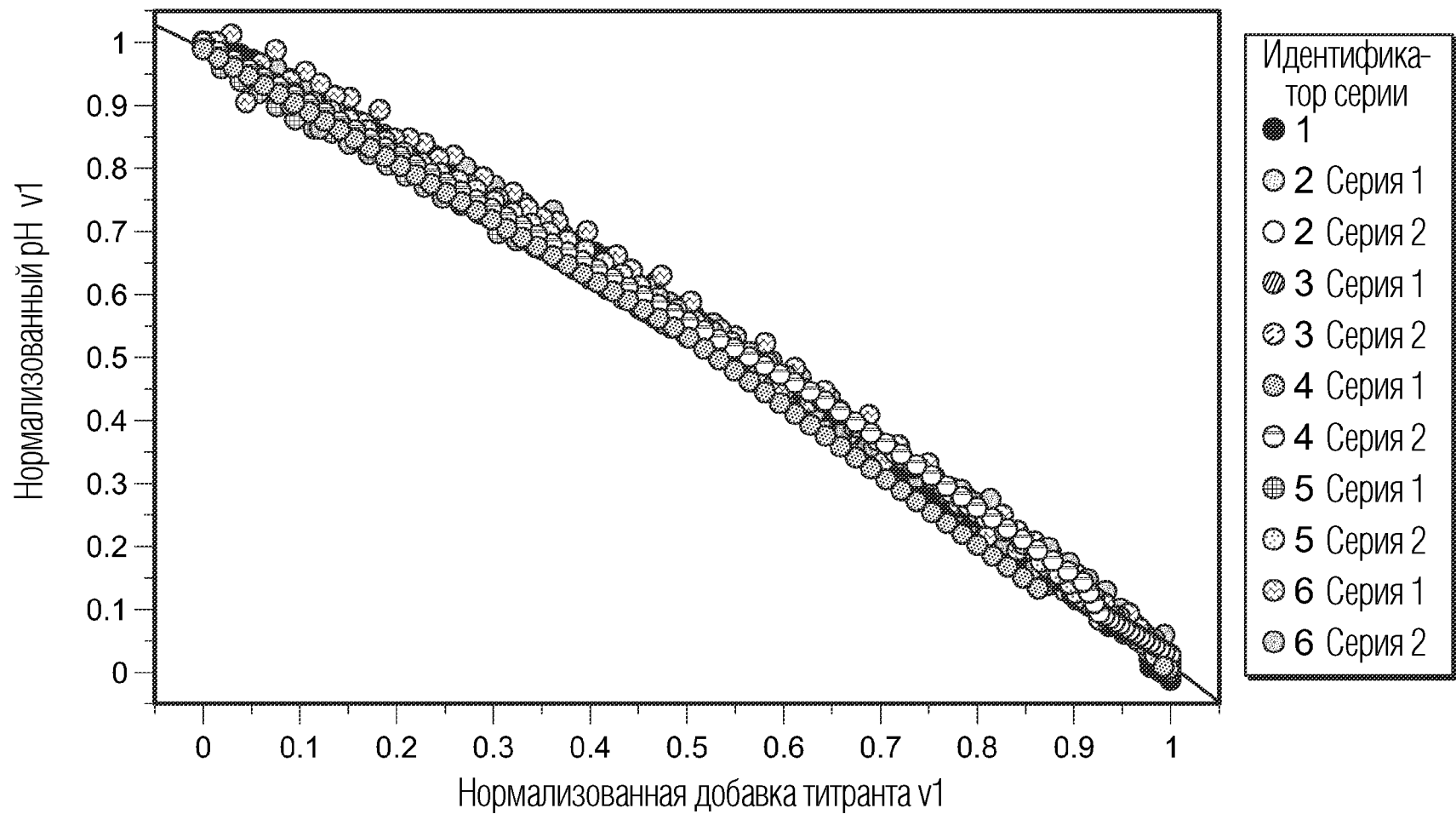
при этом контроллер выполнен с возможностью применять модель к результату измерения рН и к соответствующему количеству кислотного или основного титранта, добавленного в образец.

55. Аппарат по любому из пп. 51-54, в котором объем кислотного титранта или основного титранта, доставляемого в реактор, имеет процентную ошибку в 10% или

менее.



ФИГ. 1



ФИГ. 2

Преобразование pH в шкалу 1 → 0 (начальный → конечный)

$$y = \frac{\text{pH} - \text{pH}_{\text{final}}}{\text{pH}_{\text{initial}} - \text{pH}_{\text{final}}}$$

Преобразование добавленной кислоты в шкалу 0 → 1 (начальное → конечное)

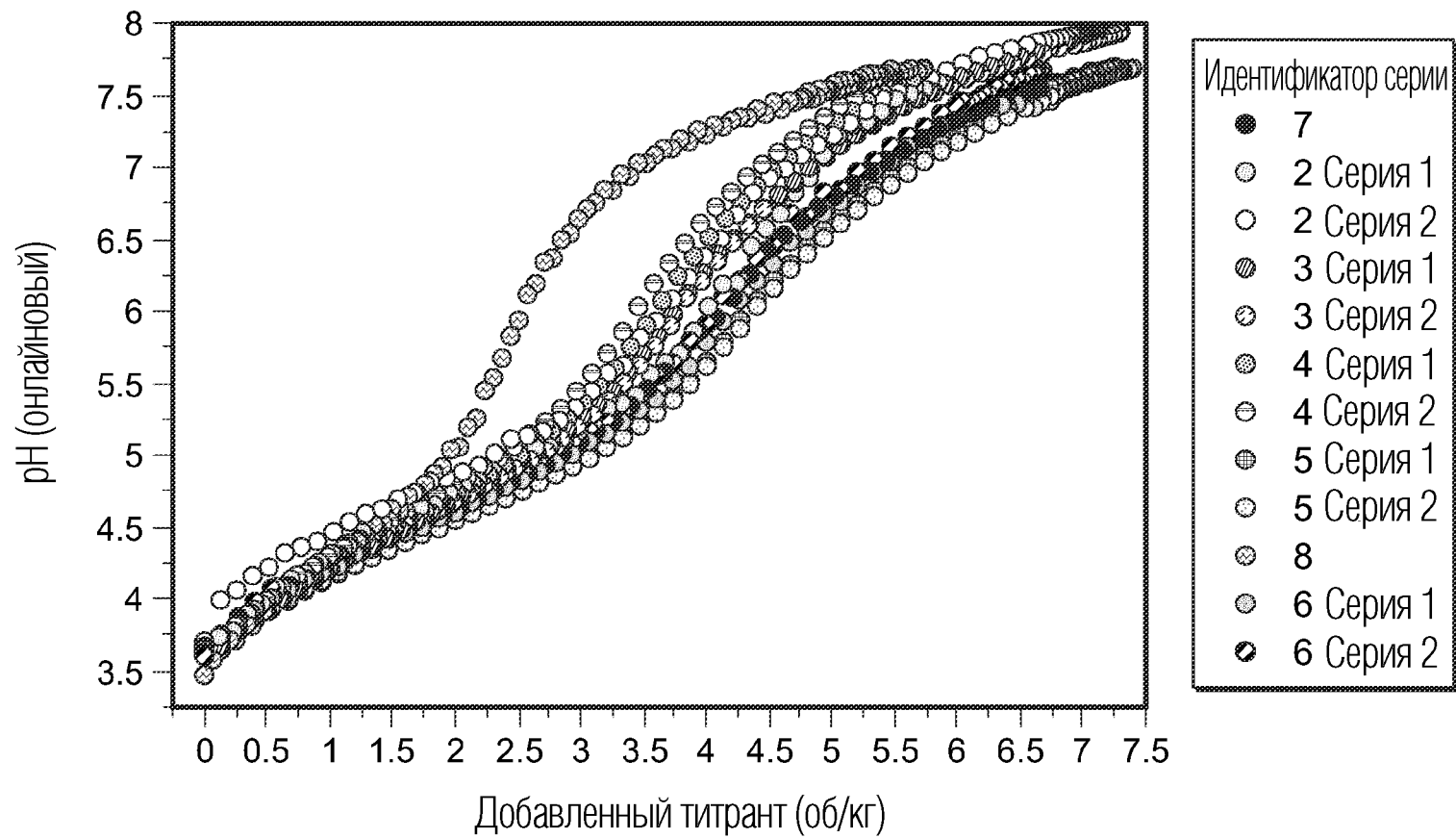
$$x = \frac{\text{acid added}}{\text{acid added}_{\text{final}}}$$

- RMSE квадратичной подгонки = 0,0175 нормализованной единицы pH
 → В единицах pH $\text{RMSE} = 0.0175 * \left(\frac{4.2 - 3.6 \text{ pH}}{1} \right) = 0.011 \text{ pH}$

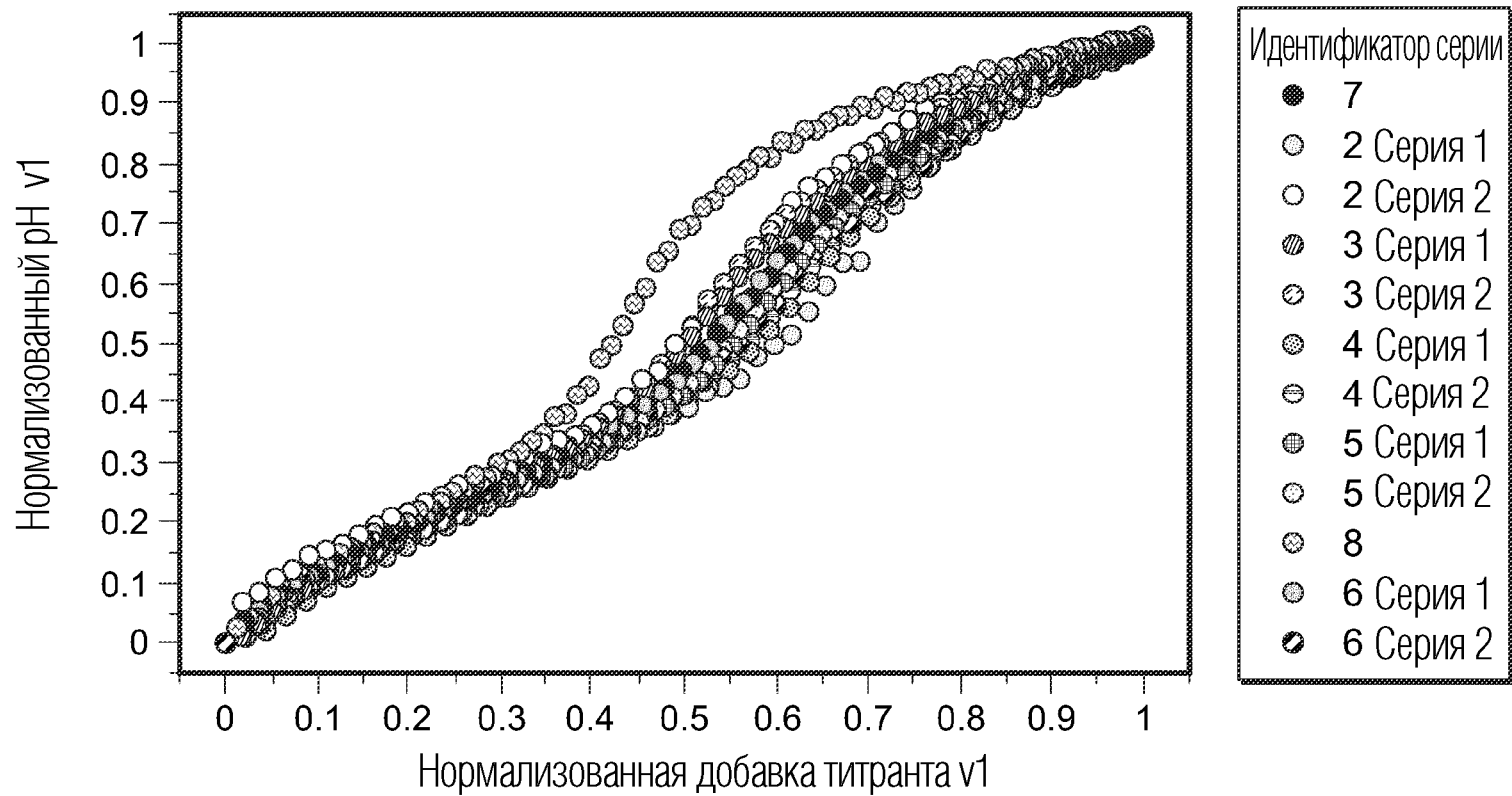
Как используется модель?

1. Измерение начального pH (автоматический забор образца)
2. Добавление консервативного количества кислоты
3. Измерение промежуточного pH (автоматический забор образца)
4. Вычисление нормализованного промежуточного pH
5. Вычисление нормализованного количества добавленной кислоты посредством решения полиномиальной подгонки
6. Вычисление оставшейся кислоты, которую нужно добавить

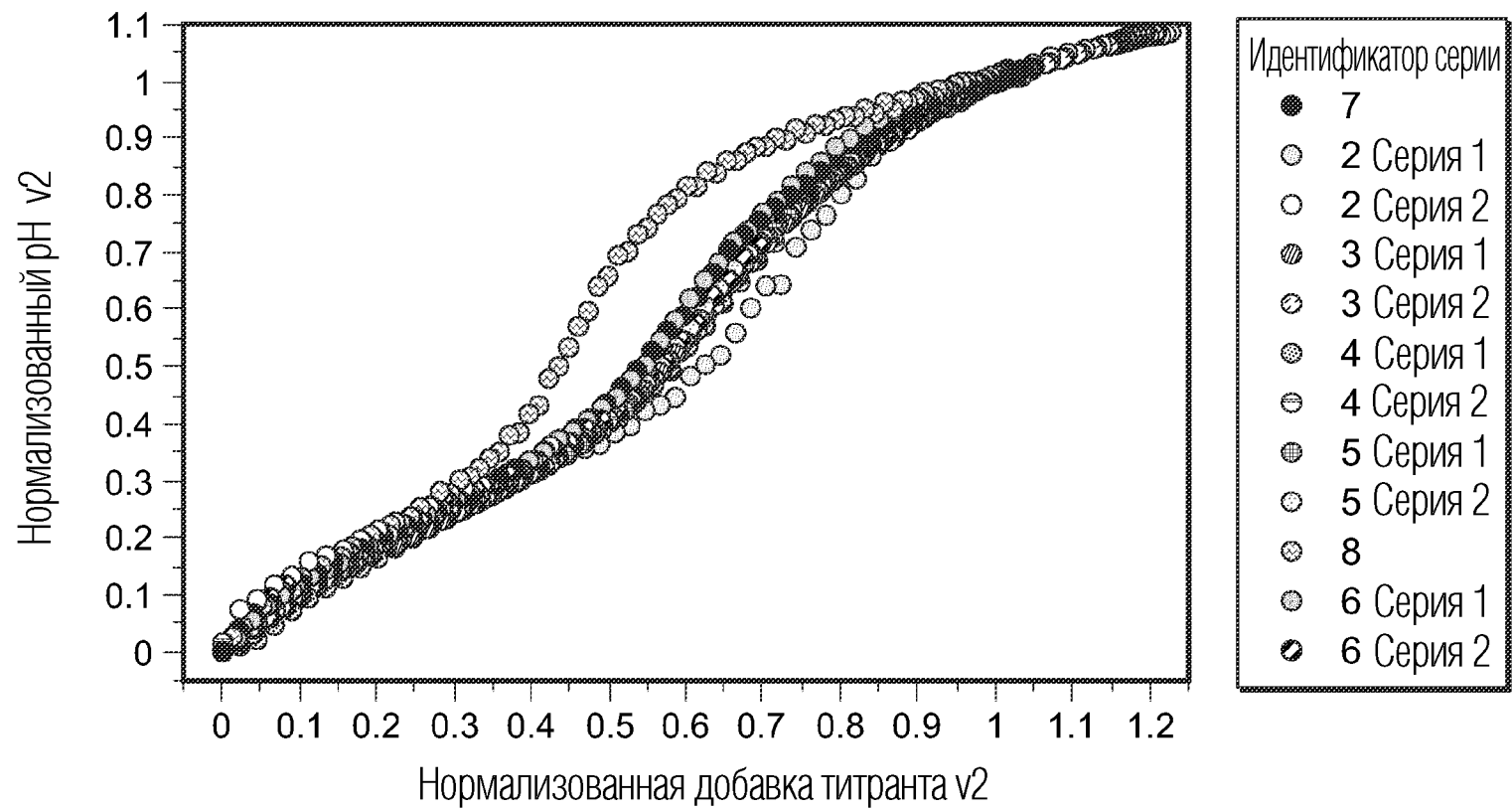
ФИГ. 3



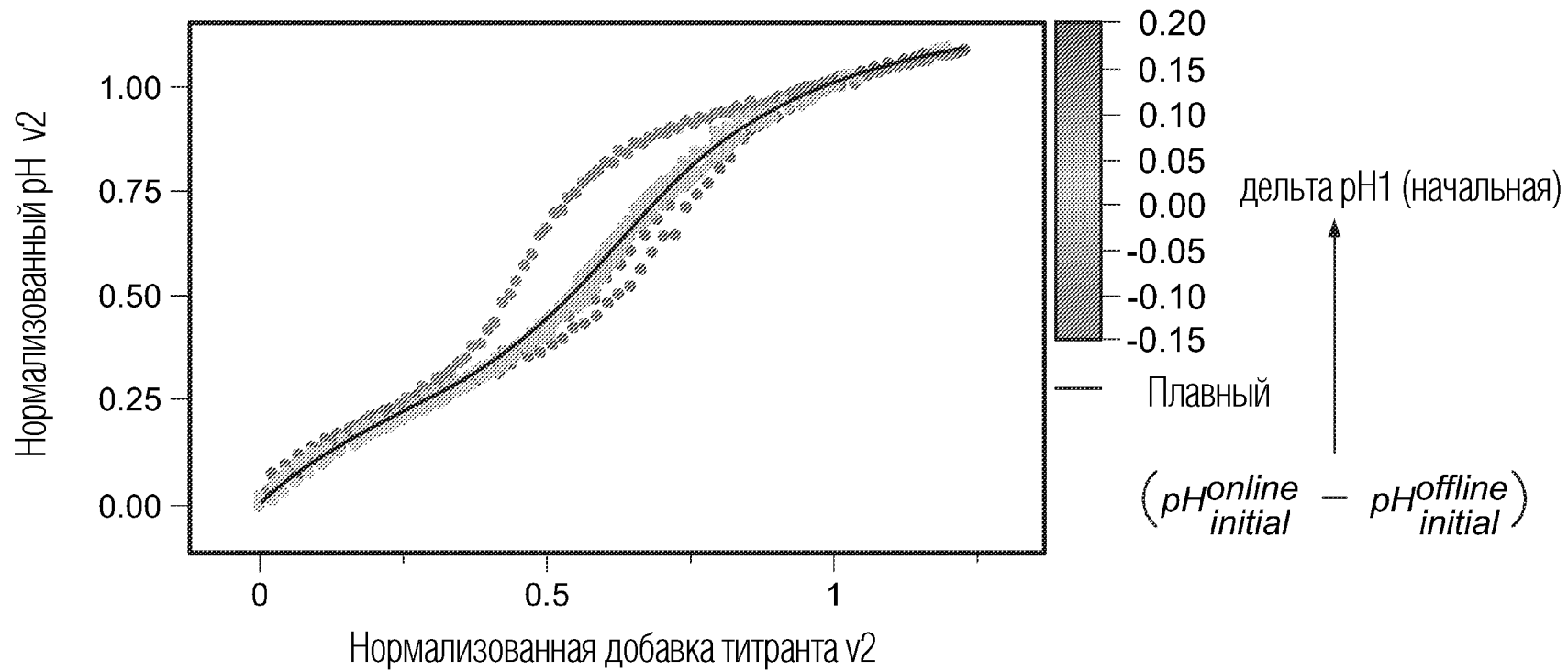
ФИГ. 4



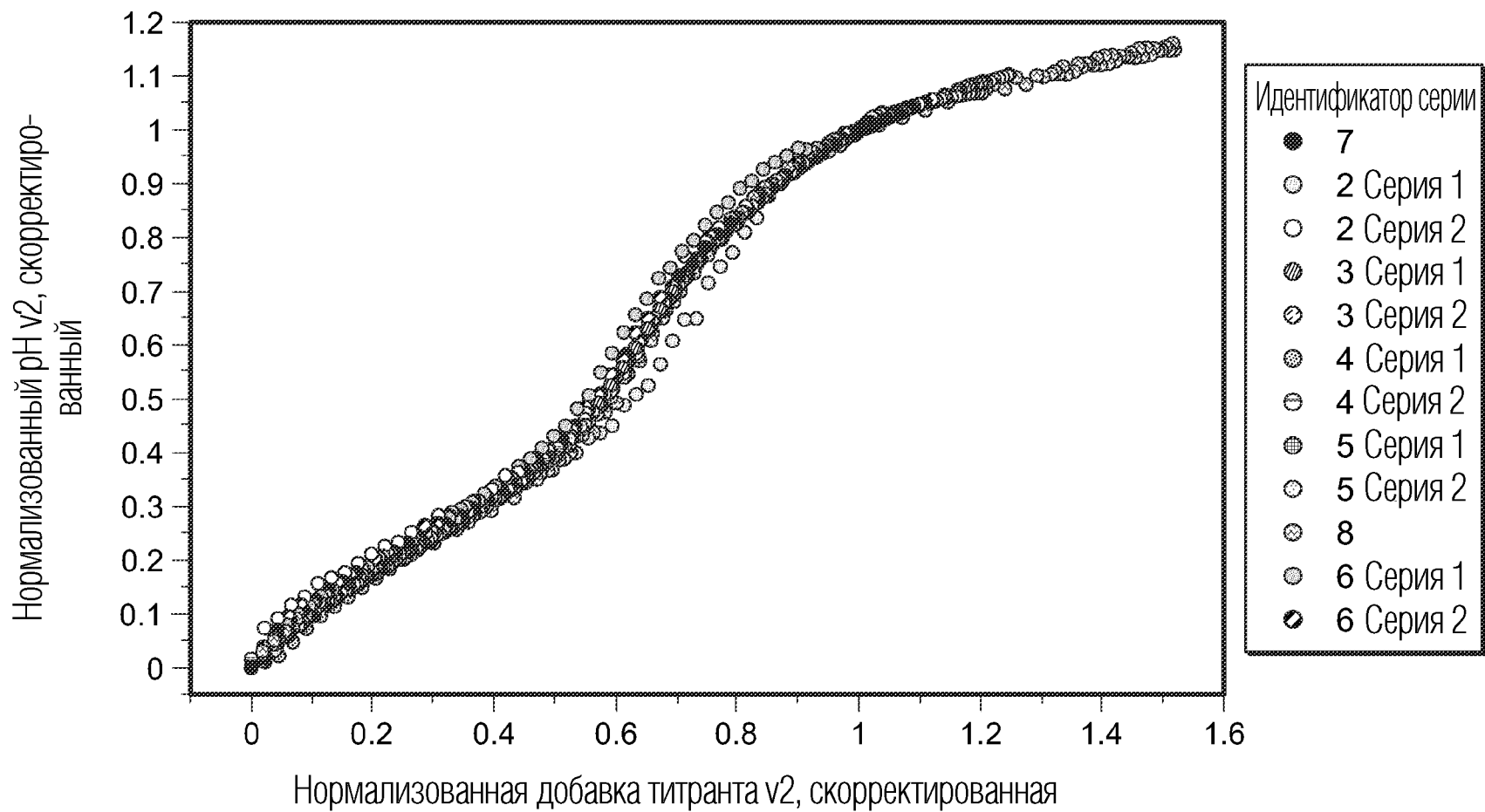
ФИГ. 5



ФИГ. 6



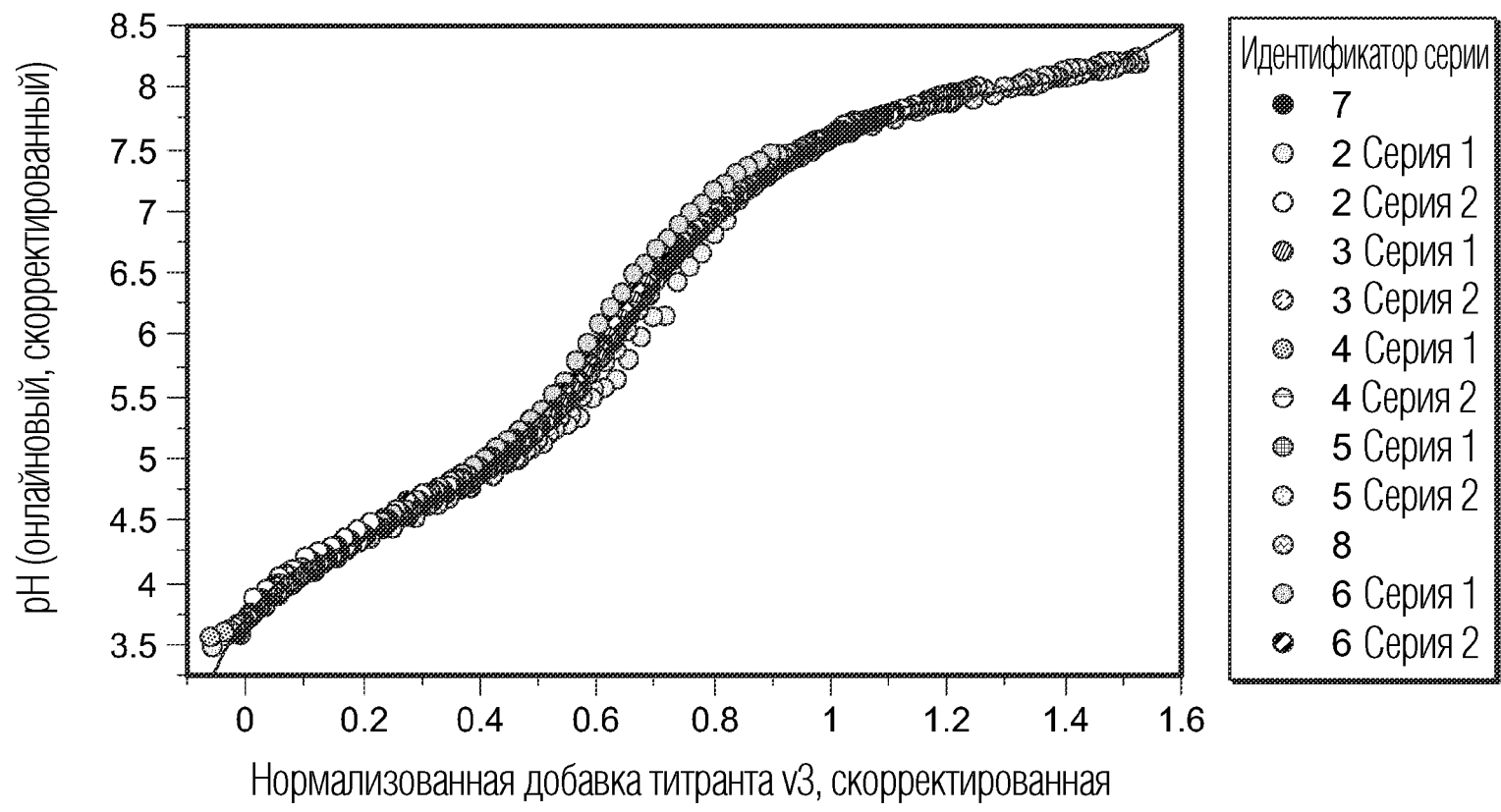
ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9

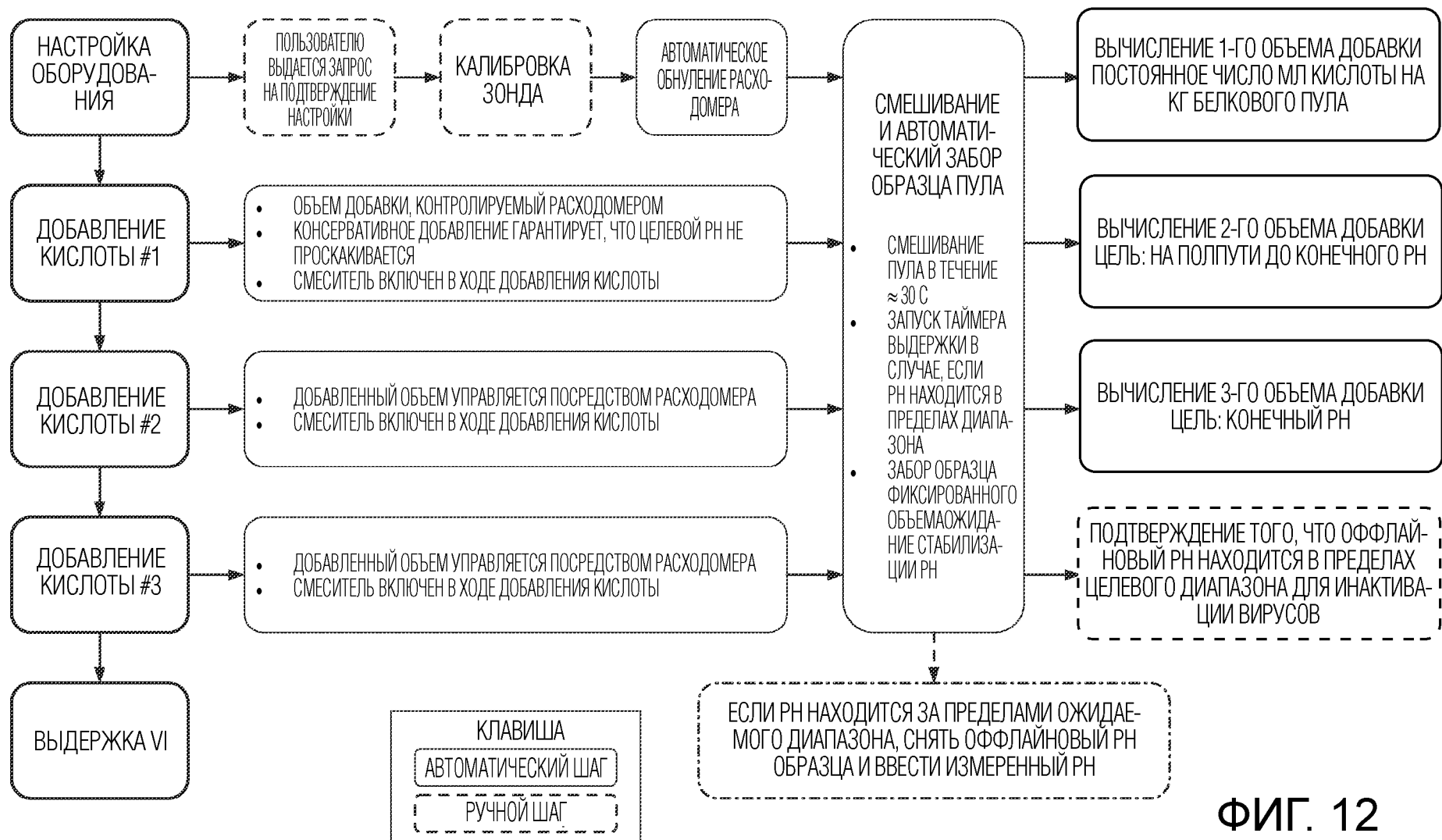


ФИГ. 10

Компоненты	Сигналы
2 × насоса модели 530 компании Watson-Marlow	Уставка скорости (AO) Обратная связь по скорости (AI) Вкл/выкл (DO)
1 × насос модели 120 компании Watson-Marlow	Уставка скорости (AO) Обратная связь по скорости (AI) Вкл/выкл (DO)
2 × ультразвуковых расходомера CO.55 компании Sonotec	Автоматическое обнуление (DO) Импульс объема (DI)
1 × pH-передатчик M400 компании Mettler	pH (AI) Температура (AI) mV (AI)
1 × Проточная pH-ячейка компании Mettler	Нет данных
1 × Управляющий кабель смесителя imPULSE	Уставка скорости (AO) Вкл/выкл (DO)
3 × Ethernet-модуля ввода-вывода	Нет данных

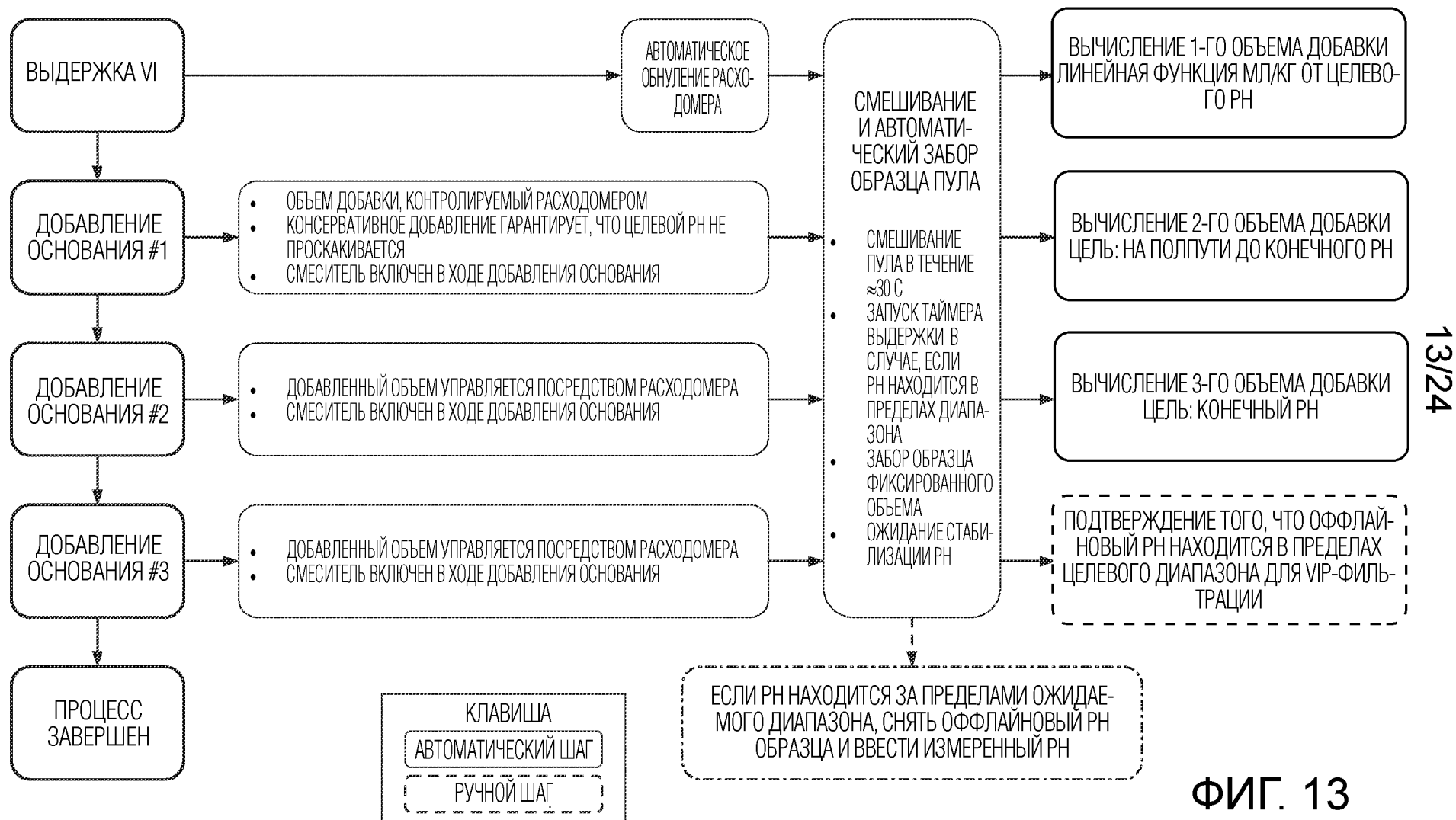
ФИГ. 11

Последовательность операций процесса - Регулирование кислоты
 Стратегия управления для подхода отведенным потоком



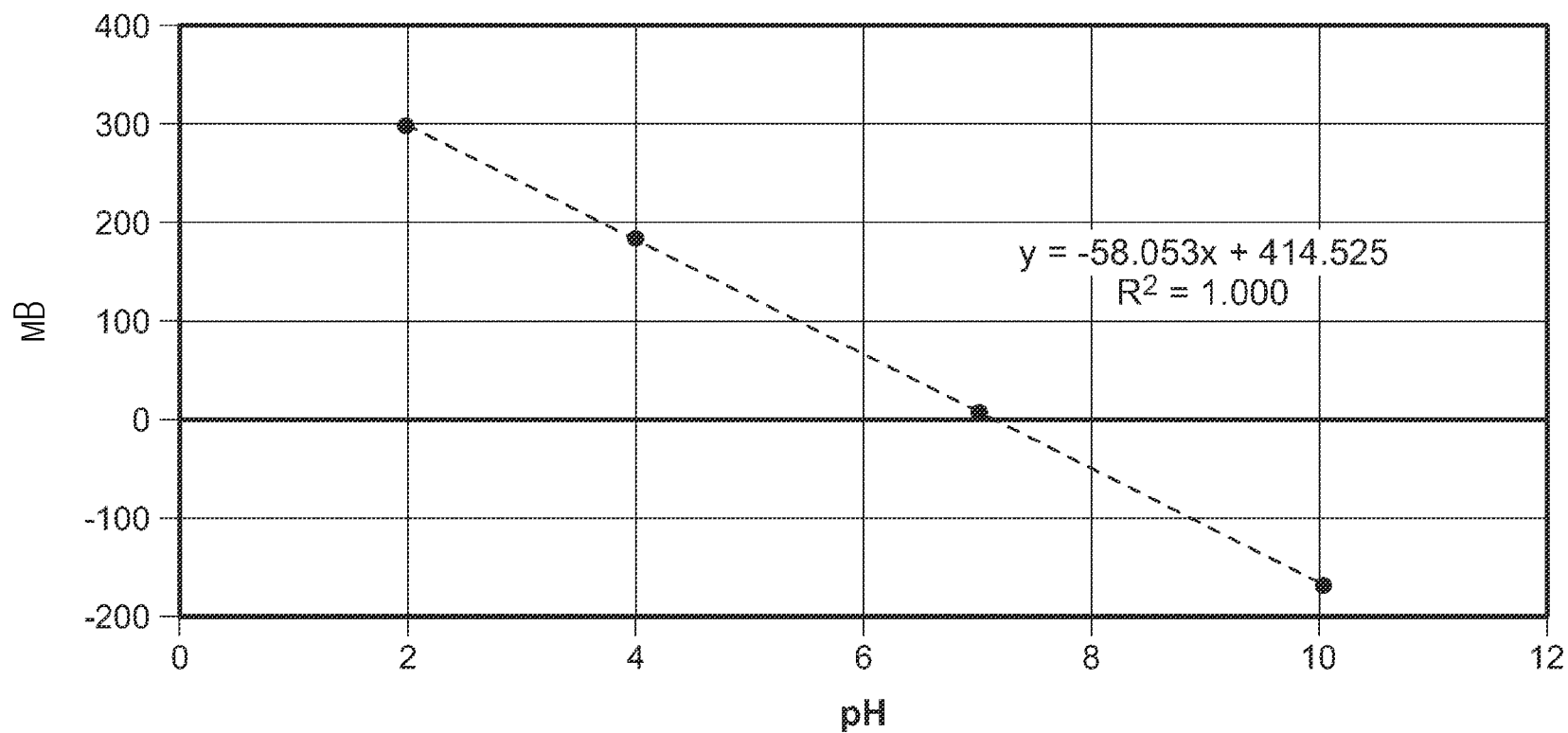
ФИГ. 12

Последовательность операций процесса - Регулирование основания
Стратегия управления для подхода с отведенным потоком



ФИГ. 13

Данные калибровки онлайн-зонда



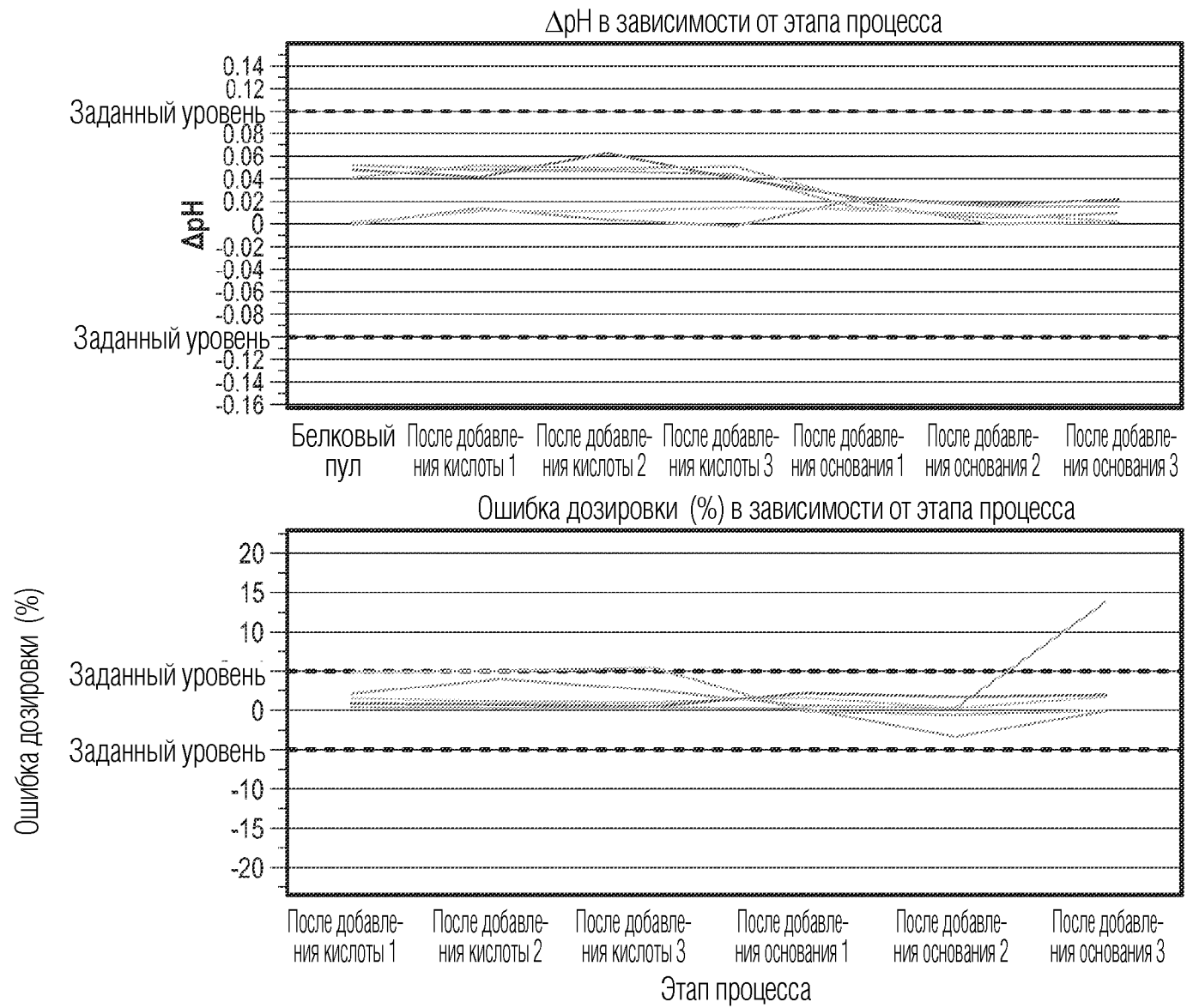
ФИГ. 14

ЭТАП ПРОЦЕССА	ОПЫТНАЯ СЕРИЯ #1		ОПЫТНАЯ СЕРИЯ #2		ОПЫТНАЯ СЕРИЯ #3		ОПЫТНАЯ СЕРИЯ #4		ОПЫТНАЯ СЕРИЯ #5	
	ΔpH	ОШИБКА ДОЗИРОВКИ (%)	ΔpH	ОШИБКА ДОЗИРОВКИ (%)	ΔpH	ОШИБКА ДОЗИРОВКИ (%)	ΔpH	ОШИБКА ДОЗИРОВКИ (%)	ΔpH	ОШИБКА ДОЗИРОВКИ (%)
БЕЛКОВЫЙ ПУЛ	0.05	НЕТ ДАННЫХ	0.05	НЕТ ДАННЫХ	0.00	НЕТ ДАННЫХ	0.00	НЕТ ДАННЫХ	0.04	НЕТ ДАННЫХ
ДОБАВКА КИСЛОТЫ #1	0.05	2.2	0.04	0.9	0.01	1.6	0.01	0.4	0.05	4.9
ДОБАВКА КИСЛОТЫ #2	0.05	4.0	0.06	0.9	0.01	1.1	0.00	0.3	0.05	5.0
ДОБАВКА КИСЛОТЫ #3	0.04	2.6	0.04	0.5	0.01	1.0	0.00	0.4	0.05	5.5
ДОБАВКА ОСНОВАНИЯ #1	0.01	0.6	0.02	2.2	0.01	1.7	0.02	0.2	0.02	-0.1
ДОБАВКА ОСНОВАНИЯ #2	0.00	0.3	0.02	1.8	0.01	0.4	0.02	-3.4	0.00	-0.6
ДОБАВКА ОСНОВАНИЯ #3	0.01	13.9	0.02	1.9	0.00	1.7	0.01	-0.1	0.00	0.0

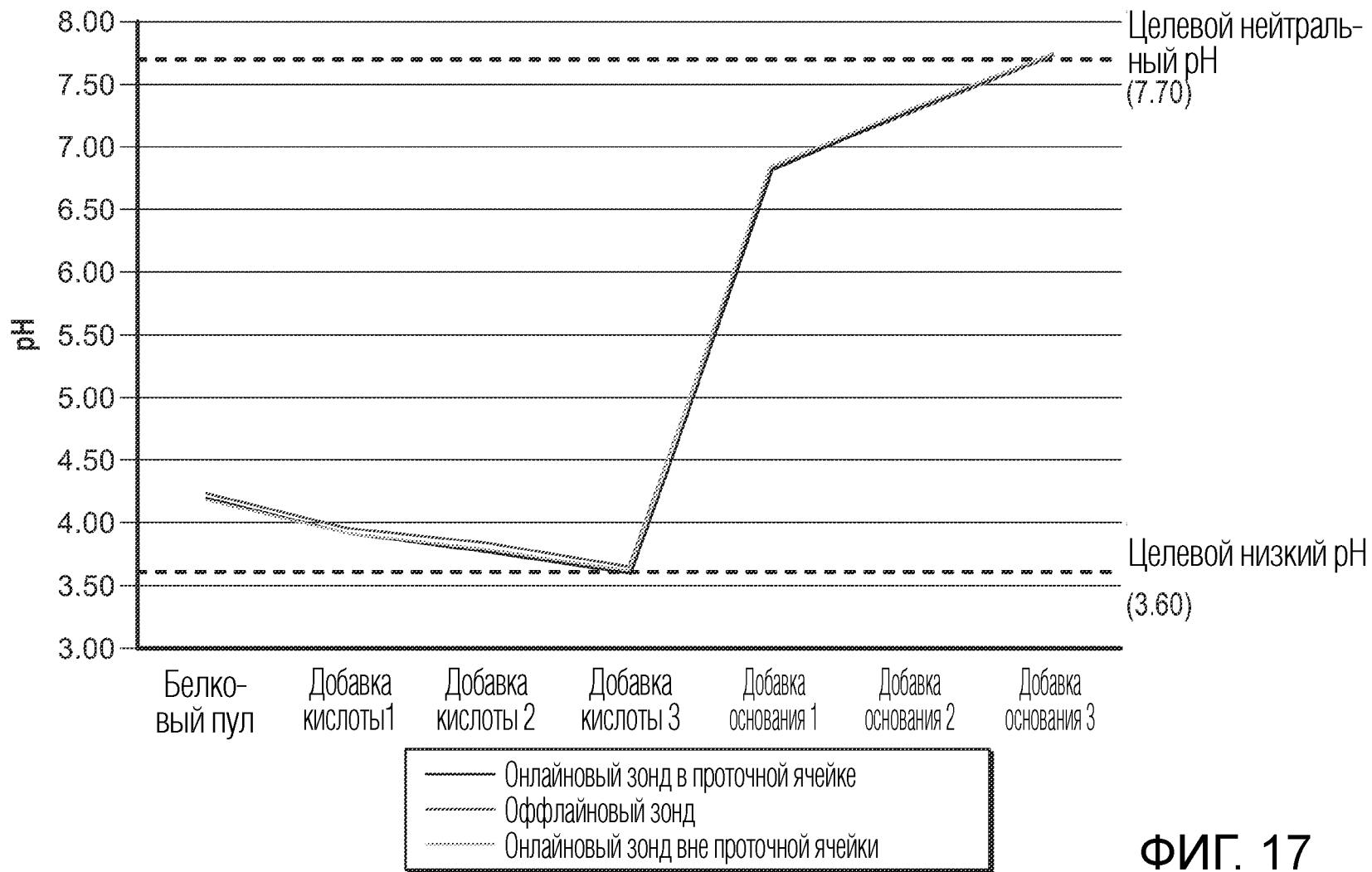
ΔpH = pH ОТВЕДЕННОГО ПОТОКА - ОФФЛАЙНОВЫЙ pH

$$\text{ДОЗИРОВАННЫЙ ОБЪЕМ} = \frac{(\text{ДОЗИРОВАННЫЙ ОБЪЕМ} - \text{ЦЕЛЕВОЙ ОБЪЕМ})}{\text{ЦЕЛЕВОЙ ОБЪЕМ}} * 100\%$$

ФИГ. 15

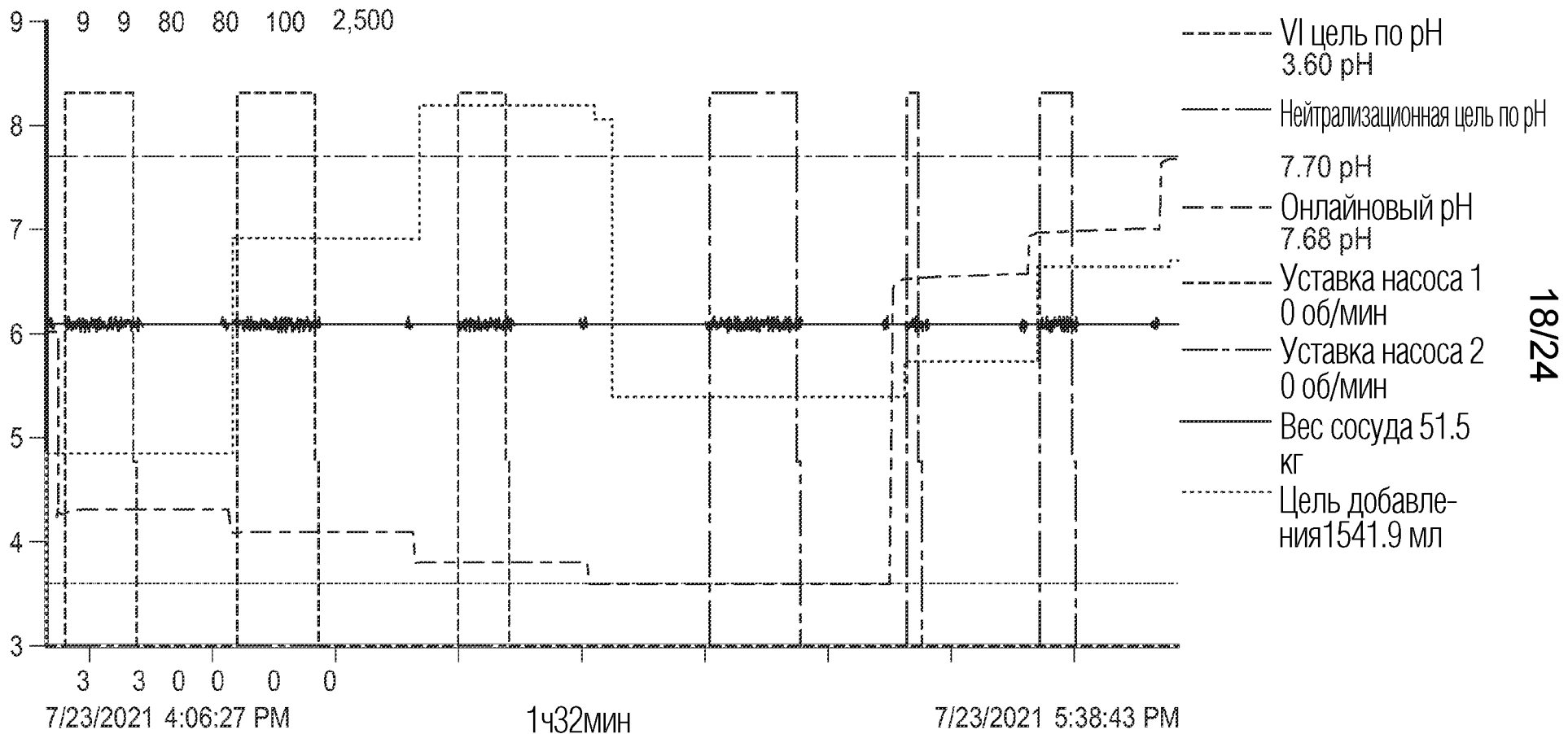


ФИГ. 16

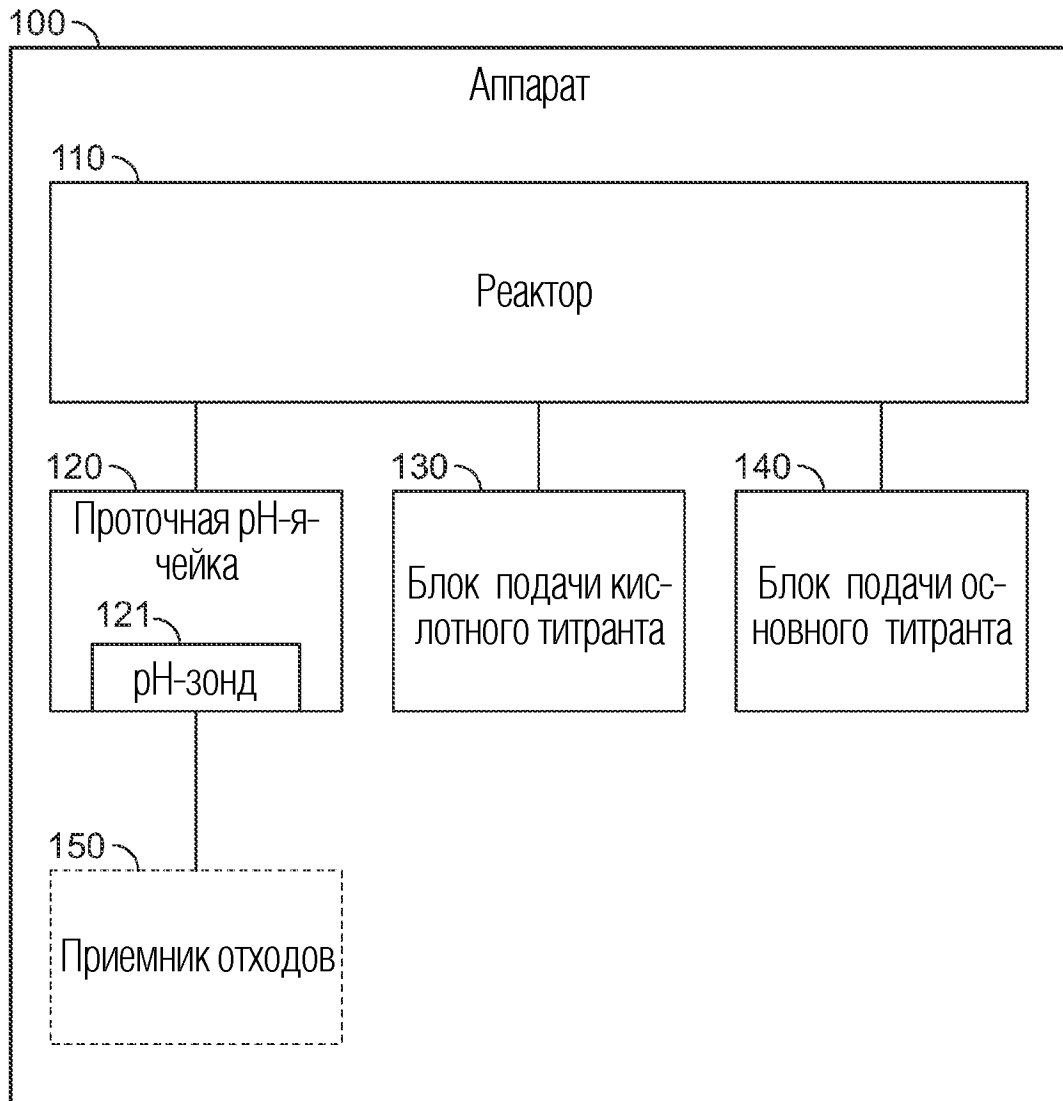


17/24

ФИГ. 17

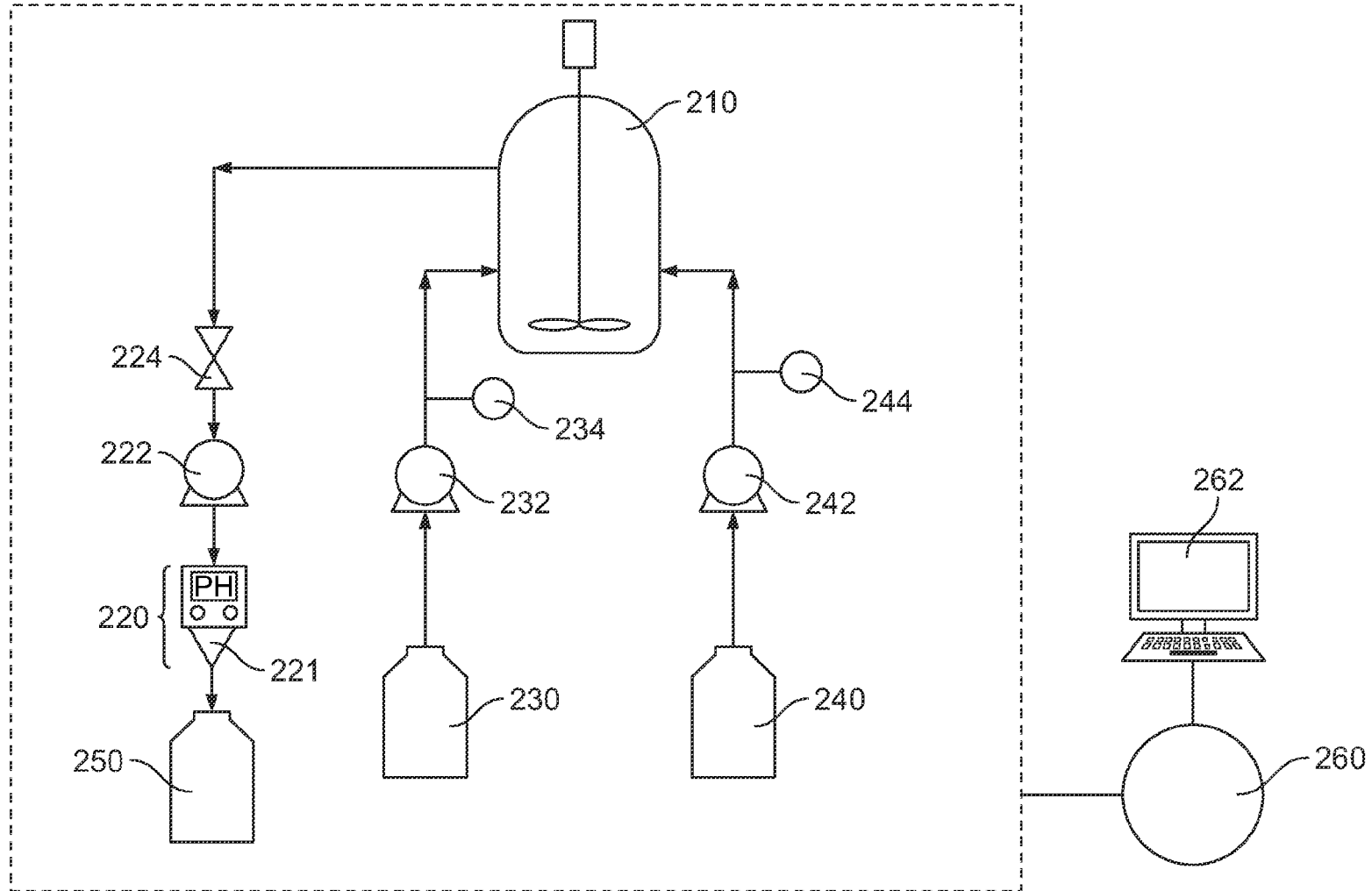


ФИГ. 18

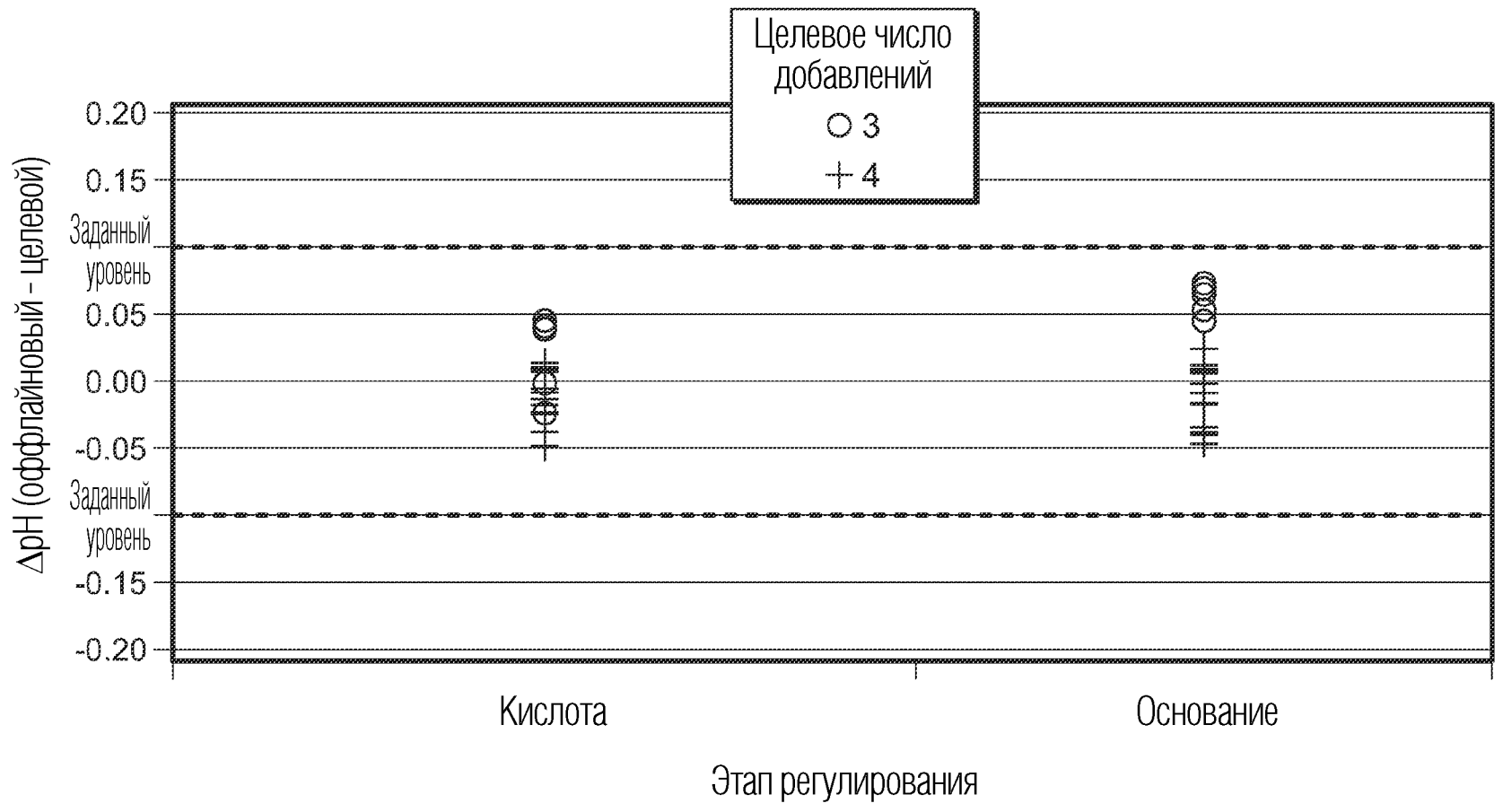


ФИГ. 19

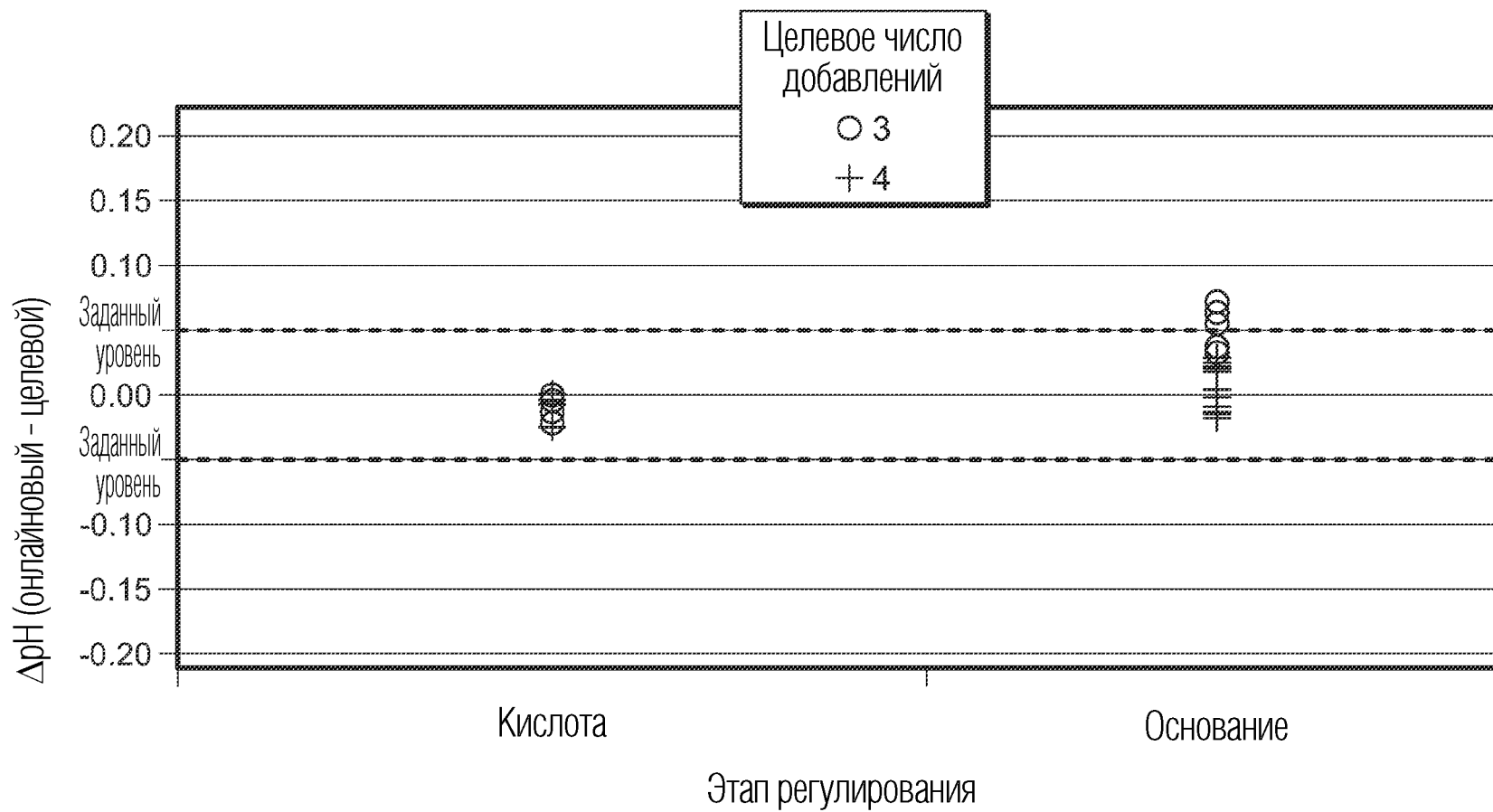
200



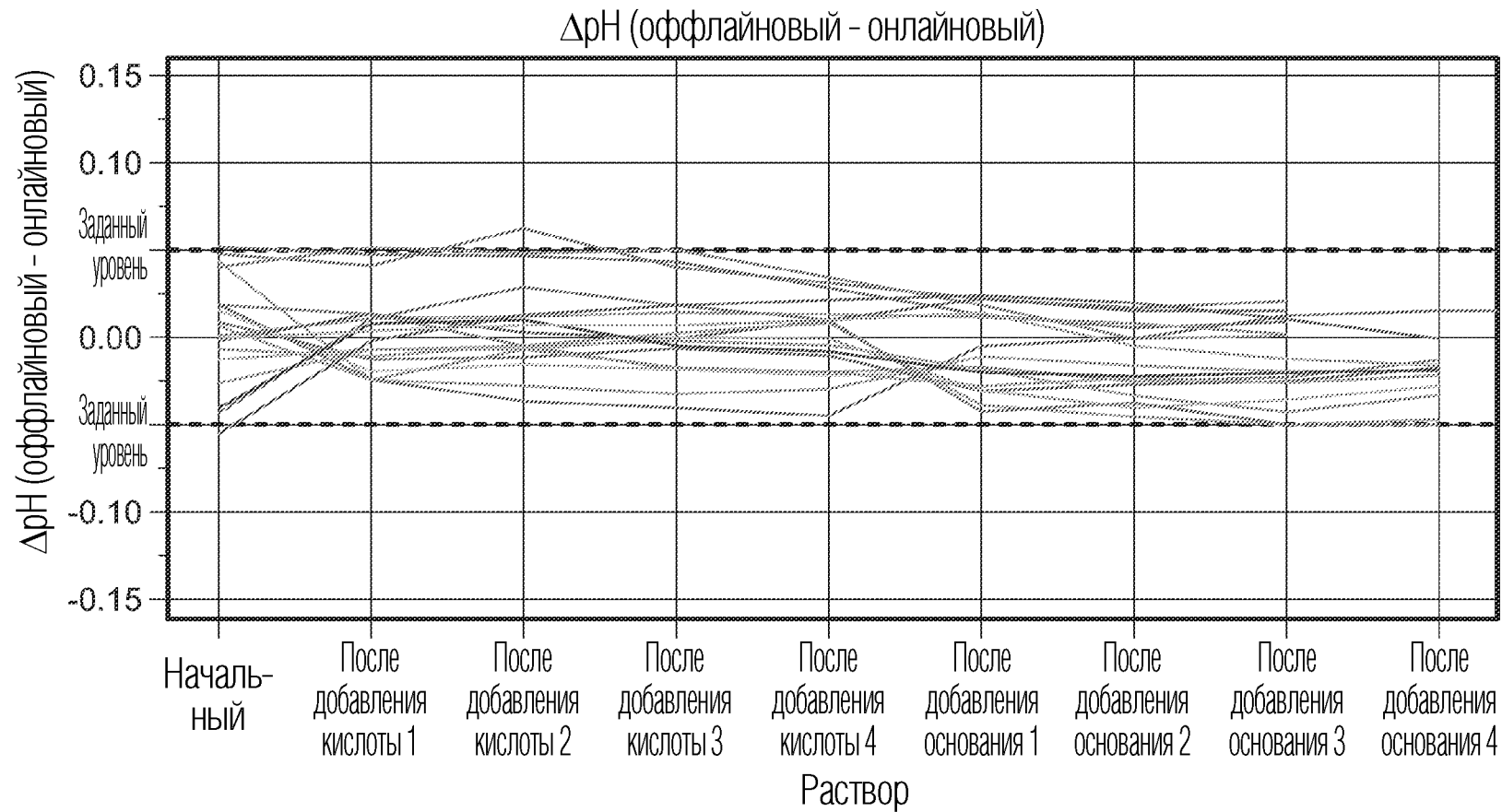
ФИГ. 20



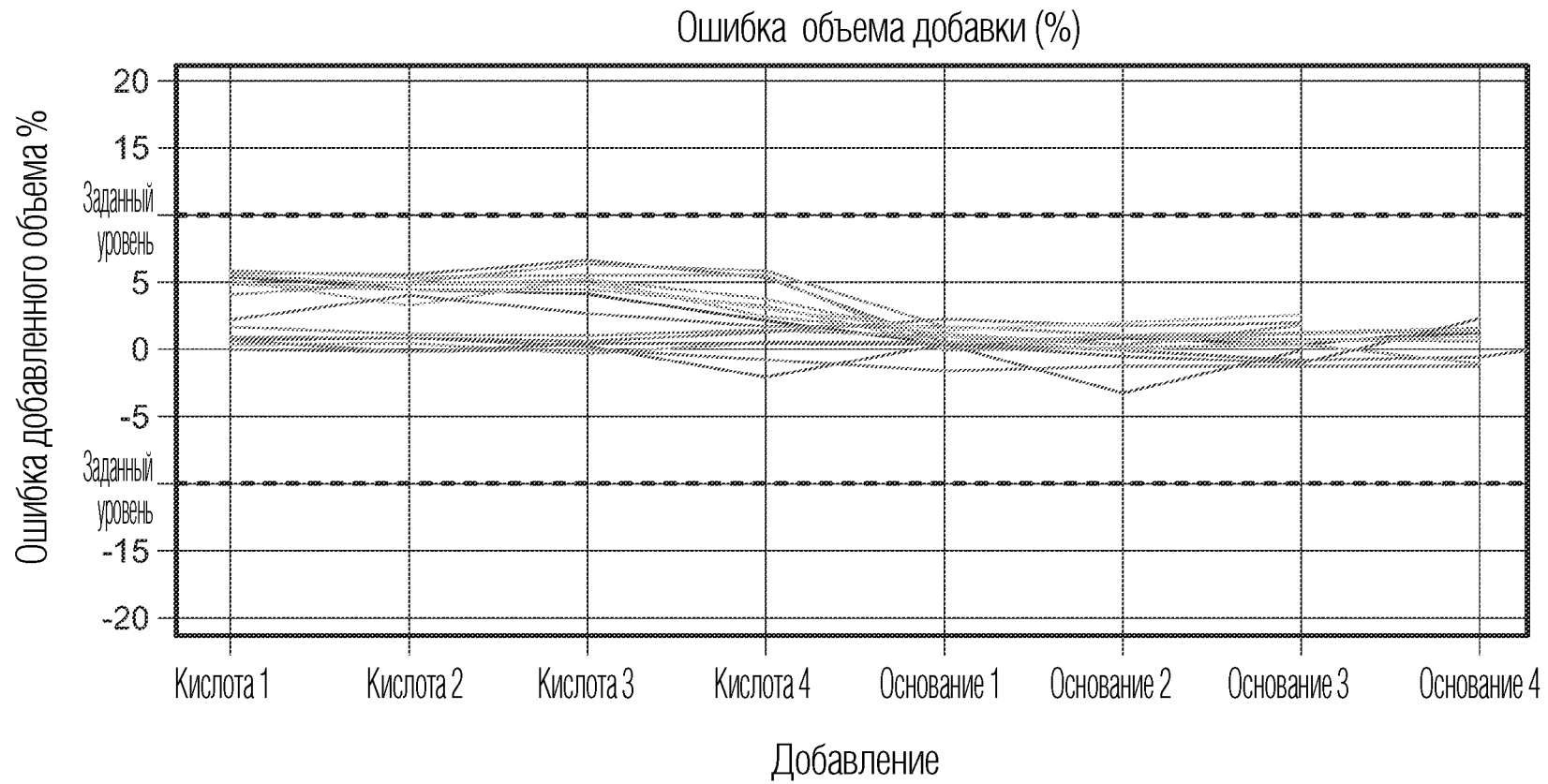
ФИГ. 21



ФИГ. 22



ФИГ. 23



ФИГ. 24