

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090399

(13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.20

(51) Int. Cl. G01N 33/68 (2006.01)
G01N 1/34 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.08.01

(54) СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ
ОБРАЗЦА ПОЛИПЕПТИДА ДЛЯ АНАЛИЗА С ПОМОЩЬЮ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

(31) 62/539,803

(72) Изобретатель:
У Чао-Сиан (US)

(32) 2017.08.01

(33) US

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

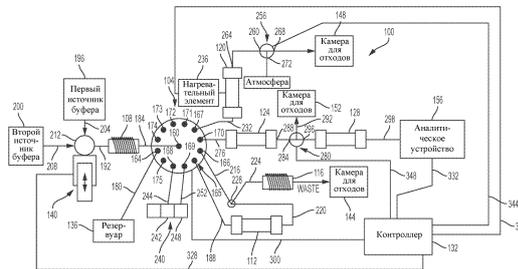
(86) PCT/US2018/044887

(87) WO 2019/028187 2019.02.07

(71) Заявитель:

ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(57) Представлены системы и способы, которые содействуют осуществлению анализа образца практически в режиме реального времени. Таким образом, анализ можно выполнять и получать требуемый результат намного быстрее, чем позволяют традиционные системы и способы.



202090399

A1

A1

202090399

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-560694EA/011

СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ОБРАЗЦА ПОЛИПЕПТИДА ДЛЯ АНАЛИЗА С ПОМОЩЬЮ МАСС- СПЕКТРОМЕТРИИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета по предварительной заявке на патент США № 62/539803, имеющей название "Systems and Methods for Performing a Real-Time Assay of a Sample" и поданной 1 августа 2017 года, полное раскрытие которой настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящее изобретение в целом относится к анализам и, более конкретно, к выполнению анализа образца в режиме реального времени.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0003] Настоящая заявка подается с перечнем последовательностей в электронной форме. Перечень последовательностей предоставлен в виде файла под названием "51800_Seqlisting.txt", созданного 31 июля 2018 года и имеющего размер 263964 байт. Информация о перечне последовательностей в электронной форме включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Анализы обычно выполняют для количественной оценки одного или нескольких параметров аналита, такого как лекарственное средство, биохимическое вещество или клетка. Примером такого анализа является анализ на основе многопараметрового способа (MAM), с помощью которого можно обнаруживать и количественно оценивать критические параметры качества (CQA) образца, идентифицированные в целевом профиле качества препарата (QTPP) (Development of a quantitative mass spectrometry multi-attribute method for characterization, quality control testing and disposition of biologics. Rogers RS, Nightlinger NS, Livingston B, Campbell P, Bailey R, Balland A. MABs. 2015; 7(5): 881-90). MAM-анализ представляет собой проводимый вручную процесс, выполняемый, например, в лаборатории по контролю готовой продукции высокомолекулярных соединений (LMRT). MAM представляет собой способ картирования пептидов на основе жидкостной хроматографии (LC) - масс-спектрометрии (MS), предусматривающий три стадии: (1) подготовки образца (такой как денатурация, восстановление, алкилирование и расщепление полипептидов); (2) разделения расщепленных полипептидов с помощью LC и обнаружения с помощью MS; и (3) анализа данных относительно целевых CQA и обнаружения нового сигнала (т. е. пиков) при сравнении с эталонным стандартом.

[0005] CQA представляют собой химические, физические или биологические свойства, которые находятся в пределах специфического значения или диапазона значений. Например, в случае терапевтических молекул, представляющих собой крупные

полипептиды, важными СQA являются физические параметры и модификации аминокислот (структурных элементов полипептидов), которые отслеживают в ходе и после получения, а также во время разработки лекарственного средства. В отличие от традиционных аналитических методов, в которых отслеживаются изменения размера пика и формы пика целых полипептидов или их частей, МAM обнаруживает специфические СQA на аминокислотном уровне.

[0006] Однако, хотя МAM является важным усовершенствованием в оценке СQA полипептидных терапевтических молекул во время разработки, получения и хранения (например, оценки стабильности), анализ, охватывающий от подготовки образца до окончательного анализа, может занимать от семи до десяти дней, это время ведет к затратам и задержкам в разработке и выпуске лекарственных средств. Например, полипептидные терапевтические средства обычно получают с помощью культивируемых клеток, экспрессирующих целевой полипептид. Такие производственные системы нелегко "поставить на паузу" на то время, когда проводится МAM-анализ СQA, что приводит к тому, что клетки продуцируют целевой полипептид с СQA, которые не соответствуют спецификациям, - пустой трате времени, материалов и рабочей силы. Более того, во время разработки лекарственного средства задержки в семь - десять дней накапливаются, например, при оптимизации условий культивирования, что задерживает снабжение пациентов важными и новыми полипептидными фармацевтическими средствами. Таким образом, существует потребность в эффективных и более быстрых способах, содействующих проведению анализа СQA с применением МAM.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[0007] В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ выполнения анализа в режиме реального времени. Способ предусматривает стадии: (a) перемещения образца продукта, содержащего полипептиды, в колонку для связывания полипептидов через первый удерживающий змеевик; (b) связывания полипептидов в образце с колонкой для связывания полипептидов, за счет чего полипептиды в образце отделяются от остальной части образца; (c) перемещения раствора элюирующего буфера из источника буфера в колонку для связывания полипептидов через первый удерживающий змеевик и сквозь второй удерживающий змеевик, расположенный после колонки для связывания полипептидов, за счет чего элюируются полипептиды, связанные с колонкой для связывания полипептидов, и элюентная/полипептидная смесь, содержащая раствор элюирующего буфера и элюированные полипептиды, перемещается во второй удерживающий змеевик; (d) перемещения элюентной/полипептидной смеси из второго удерживающего змеевика в реакционную камеру; (e) инкубирования полипептидов из элюентной/полипептидной смеси в реакционной камере, что приводит к получению денатурированных полипептидов; (f) перемещения восстанавливающего реагента, который расщепляет сшивающие дисульфидные связи, в реакционную камеру через первый удерживающий змеевик после (e); (g) инкубирования денатурированных полипептидов с восстанавливающим реагентом в реакционной камере, что приводит к

получению денатурированных и восстановленных полипептидов; (h) перемещения алкилирующего реагента, который алкилирует сульфгидрильные группы, в реакционную камеру после (g); (i) инкубирования денатурированных и восстановленных полипептидов с алкилирующим реагентом в реакционной камере, за счет чего денатурированные и восстановленные полипептиды алкилируются; (j) перемещения денатурированных, восстановленных и алкилированных полипептидов, раствора элюирующего буфера, восстанавливающего реагента и алкилирующего реагента из реакционной камеры в обессоливающую колонку через первый удерживающий змеевик, при этом обессоливающая колонка уравновешена с помощью буфера для протеолиза; (k) подачи денатурированных, восстановленных и алкилированных полипептидов в обессоливающую колонку, за счет чего денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды отделяются от восстанавливающего и алкилирующего реагентов и обеспечивается получение обессоленных полипептидов; (l) перемещения обессоленных полипептидов в колонку с протеолитическими ферментами, расположенную после обессоливающей колонки; (m) расщепления обессоленных полипептидов в третьей колонке для полипептидов, что приводит к получению расщепленных полипептидов; и (n) перемещения расщепленных полипептидов в аналитическое устройство для анализа расщепленных полипептидов.

[0008] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ выполнения анализа в режиме реального времени с применением закрытой системы, включающей многопортовый клапан, первый удерживающий змеевик, расположенный до многопортового клапана, колонку для связывания полипептидов, соединенную по текучей среде с первым портом многопортового клапана и расположенную после него, второй удерживающий змеевик, соединенный по текучей среде с колонкой для связывания полипептидов и расположенный после нее, реакционную камеру, соединенную по текучей среде со вторым и третьим портами многопортового клапана и расположенную после них, обессоливающую колонку, соединенную по текучей среде с четвертым портом многопортового клапана и расположенную после него, и колонку с протеолитическими ферментами, расположенную после обессоливающей колонки. Способ предусматривает: (a) перемещение, под управлением контроллера, связанного коммуникационным взаимодействием с закрытой системой, образца продукта, содержащего полипептиды, в первый удерживающий змеевик; (b) установку, под управлением контроллера, многопортового клапана в первое положение, при котором первый удерживающий змеевик соединен с колонкой для связывания полипептидов через первый порт многопортового клапана, так что образец перетекает в первую колонку, в результате чего полипептиды в образце связываются с колонкой для связывания полипептидов; (c) когда многопортовый клапан находится в первом положении, перемещение, под управлением контроллера, раствора элюирующего буфера из источника раствора элюирующего буфера во второй удерживающий змеевик через колонку для связывания полипептидов, так что раствор элюирующего буфера элюирует практически все полипептиды, связанные с

колонкой для связывания полипептидов; (d) перемещение, под управлением контроллера, многопортового клапана во второе положение, при котором второй удерживающий змеевик соединен с реакционной камерой через второй порт многопортового клапана; (e) когда многопортовый клапан находится во втором положении, перемещение, под управлением контроллера, элюентной/полипептидной смеси, содержащей раствор элюирующего буфера и элюированные полипептиды, в реакционную камеру, в результате чего полипептиды в элюентной/полипептидной смеси денатурируются; (f) перемещение, под управлением контроллера, многопортового клапана в третье положение, при котором первый удерживающий змеевик соединен с реакционной камерой через третий порт многопортового клапана; (g) после (f) перемещение, под управлением контроллера, восстанавливающего реагента, который расщепляет сшивающие дисульфидные связи, в первый удерживающий змеевик и перемещение, под управлением контроллера, восстанавливающего реагента из первого удерживающего змеевика в реакционную камеру через третий порт многопортового клапана, за счет чего денатурированные полипептиды восстанавливаются; (h) после (g) перемещение, под управлением контроллера, алкилирующего реагента, который алкилирует сульфгидрильные группы, в первый удерживающий змеевик и перемещение, под управлением контроллера, алкилирующего реагента из первого удерживающего змеевика в реакционную камеру через третий порт, за счет чего денатурированные и восстановленные полипептиды алкилируются; (i) перемещение, под управлением контроллера, алкилированных полипептидов, раствора элюирующего буфера, восстанавливающего реагента и алкилирующего реагента из реакционной камеры в первый удерживающий змеевик через третий порт; (j) перемещение, под управлением контроллера, многопортового клапана в четвертое положение, при котором первый удерживающий змеевик соединен с обессоливающей колонкой через четвертый порт многопортового клапана, и, когда многопортовый клапан находится в четвертом положении, перемещение алкилированных полипептидов, раствора элюирующего буфера, восстанавливающего реагента и алкилирующего реагента из первого удерживающего змеевика в обессоливающую колонку, в результате чего денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды подаются в обессоливающую колонку, таким образом денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды отделяются от восстанавливающего и алкилирующего реагентов, что приводит к получению обессоленных полипептидов; (k) перемещение, под управлением контроллера, обессоленных полипептидов в колонку с протеолитическими ферментами, в результате чего обессоленные полипептиды расщепляются; и (l) переход, под управлением контроллера, расщепленных полипептидов в аналитическое устройство, в результате чего осуществляется анализ расщепленных полипептидов.

[0009] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрена закрытая система для выполнения встроенного анализа в режиме реального времени. Система включает первый удерживающий змеевик, смонтированный для приема по текучей среде образца

продукта, содержащего полипептиды; многопортовый клапан, соединенный по текучей среде с первым удерживающим змеевиком и помещенный после него; колонку для связывания полипептидов, соединенную по текучей среде с многопортовым клапаном и смонтированную для приема образца из первого удерживающего змеевика через первый порт многопортового клапана, причем колонка для связывания полипептидов выполнена с возможностью связывания полипептидов из образца; источник буфера, соединенный по текучей среде с многопортовым клапаном и смонтированный для подачи раствора элюирующего буфера во второй удерживающий змеевик, помещенный после колонки для связывания полипептидов, так что раствор элюирующего буфера обладает возможностью элюировать практически все полипептиды из колонки для связывания полипептидов; реакционную камеру, соединенную по текучей среде с многопортовым клапаном и смонтированную после колонки для связывания полипептидов, причем реакционная камера обладает возможностью приема смеси из колонки для связывания полипептидов через второй порт многопортового клапана, при этом смесь содержит раствор элюирующего буфера и элюированные полипептиды, где полипептиды из смеси денатурируются в реакционной камере, где реакционная камера смонтирована для приема восстанавливающего реагента, который расщепляет сшивающие дисульфидные связи, через первый удерживающий змеевик и третий порт многопортового клапана, причем восстанавливающий реагент восстанавливает денатурированные полипептиды, и где реакционная камера дополнительно смонтирована для приема алкилирующего реагента, который алкилирует сульфгидрильные группы, через первый удерживающий змеевик и третий порт многопортового клапана, где алкилирующий реагент алкилирует денатурированные и восстановленные полипептиды в реакционной камере; обессоливающую колонку, соединенную по текучей среде с многопортовым клапаном и смонтированную для приема денатурированных, восстановленных и алкилированных полипептидов, раствора элюирующего буфера и алкилирующего реагента из реакционной камеры, причем обессоливающая колонка выполнена с возможностью отделять денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды от раствора элюирующего буфера, восстанавливающего реагента и алкилирующего реагента; и колонку с протеолитическими ферментами, соединенную по текучей среде со второй колонкой для полипептидов и смонтированную после нее, для получения отделенных полипептидов из обессоливающей колонки, причем колонка с протеолитическими ферментами выполнена с возможностью расщепления обессоленных полипептидов.

[0010] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрена закрытая система для выполнения анализа в режиме реального времени. Система включает многопортовый клапан; первый удерживающий змеевик, расположенный до многопортового клапана; колонку для связывания полипептидов, соединенную по текучей среде с первым портом многопортового клапана и расположенную после него; второй удерживающий змеевик, соединенный по текучей среде с колонкой для связывания полипептидов и расположенный после нее; реакционную камеру, соединенную по текучей среде со

вторым и третьим портами многопортового клапана и расположенную после них; обессоливающую колонку, соединенную по текучей среде с четвертым портом многопортового клапана и расположенную после него; колонку с протеолитическими ферментами, расположенную после обессоливающей колонки; и контроллер, связанный коммуникационным взаимодействием с многопортовым клапаном. Контроллер включает запоминающее устройство, процессор и алгоритм, хранимый в накопителе и исполняемый процессором для: (a) перемещения образца продукта, содержащего полипептиды, в первый удерживающий змеевик; (b) установки многопортового клапана в первое положение, при котором первый удерживающий змеевик соединен с колонкой для связывания полипептидов через первый порт многопортового клапана, так что образец перетекает в первую колонку, в результате чего полипептиды в образце связываются с колонкой для связывания полипептидов; (c) когда многопортовый клапан находится в первом положении, перемещения раствора элюирующего буфера из источника раствора элюирующего буфера во второй удерживающий змеевик через колонку для связывания полипептидов, так что раствор элюирующего буфера элюирует практически все полипептиды, связанные с колонкой для связывания полипептидов; (d) перемещения многопортового клапана во второе положение, при котором второй удерживающий змеевик соединен с реакционной камерой через второй порт многопортового клапана; (e) когда многопортовый клапан находится во втором положении, перемещения элюентной/полипептидной смеси, содержащей раствор элюирующего буфера и элюированные полипептиды, в реакционную камеру, в результате чего полипептиды в элюентной/полипептидной смеси денатурируются; (f) перемещения многопортового клапана в третье положение, при котором первый удерживающий змеевик соединен с реакционной камерой через третий порт многопортового клапана; (g) после (f) перемещения восстанавливающего реагента, который расщепляет дисульфидные связи, в первый удерживающий змеевик и перемещения восстанавливающего реагента из первого удерживающего змеевика в реакционную камеру через третий порт многопортового клапана, за счет чего денатурированные полипептиды восстанавливаются; (h) после (g) перемещения алкилирующего реагента, который алкилирует сульфгидрильные группы, в первый удерживающий змеевик и перемещения алкилирующего реагента из первого удерживающего змеевика в реакционную камеру через третий порт, за счет чего денатурированные и восстановленные полипептиды алкилируются; (i) перемещения денатурированных, восстановленных и алкилированных полипептидов, раствора элюирующего буфера, восстанавливающего реагента и алкилирующего реагента из реакционной камеры в первый удерживающий змеевик через третий порт; (j) перемещения многопортового клапана в четвертое положение, при котором первый удерживающий змеевик соединен с обессоливающей колонкой через четвертый порт многопортового клапана, и, когда многопортовый клапан находится в четвертом положении, перемещения денатурированных, восстановленных и алкилированных полипептидов, раствора элюирующего буфера, восстанавливающего реагента и

алкилирующего реагента из первого удерживающего змеевика в обессоливающую колонку, в результате чего денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды подвергаются обессоливанию; (к) перемещения обессоленных полипептидов в колонку с протеолитическими ферментами, в результате чего обессоленные полипептиды расщепляются; и (л) перехода расщепленных полипептидов в устройство для анализа гликанов, в результате чего расщепленные полипептиды подвергаются разделению и количественной оценке.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0011] ФИГ. 1 представляет собой блок-схему системы для выполнения встроенного анализа в режиме реального времени, которая собрана в соответствии с идеями настоящего изобретения.

[0012] ФИГ. 2 представляет собой блок-схему контроллера из системы, проиллюстрированной на ФИГ. 1.

[0013] ФИГ. 3А и 3В представляют собой графики, изображающие результаты исследования по отслеживанию эффективности системы, изображенной на ФИГ. 1, в течение производственного цикла продолжительностью 40 дней.

[0014] ФИГ. 3С представляет собой график, изображающий краткое описание результатов, изображенных на ФИГ. 3В, за период времени 8 дней.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0015] В настоящем изобретении предусмотрены анализы в режиме реального времени и способы, которые позволяют отслеживать и контролировать СQA в режиме реального времени таким образом, что можно продуцировать требуемый конечный продукт, представляющий собой полипептидное терапевтическое средство. Раскрытые анализы и способы могут ускорять время обработки результатов МАМ, так что результаты становятся доступными в пределах нескольких часов (например, двух - трех часов), вместо типичного результата измерения, проводимого вручную, в автономном режиме, получаемого через семь - десять дней. Таким образом, раскрытые анализы и способы уменьшают время обработки в примерно 54-120 раз. Такие результаты "на лету" (в режиме реального времени) позволяют, например, корректировать переменные производственного процесса для эффективного (встроенного) производства продуктов с соответствующими СQA.

[0016] На ФИГ. 1 проиллюстрирована блок-схема системы 100, собранной в соответствии с идеями настоящего изобретения. Система 100, которая может помещаться в лаборатории (например, лаборатории по контролю готовой продукции высокомолекулярных соединений), представляет собой закрытую систему для автоматического или практически автоматического проведения анализа образца продукта, содержащего полипептиды, как более подробно описано ниже. Путем автоматизации (или практически полной автоматизации) данного способа с применением системы 100 анализ можно выполнять в режиме реального времени (или практически реального времени), так

что весь способ можно выполнить и получить требуемый результат за считанные часы (например, за 2-3 часа), что является значительным улучшением в сравнении с 7-10 днями, которые, как правило, требуются при общеизвестных, проводимых вручную МАМ-анализах. Более того, закрытая природа данного способа, в котором используется система 100, поддерживает стерильные условия.

[0017] В данном варианте полипептиды могут представлять собой терапевтические полипептиды, которые дополнительно обсуждаются ниже.

[0018] Система 100, проиллюстрированная на ФИГ. 1, обычно включает многопортовый клапан 104, первый удерживающий змеевик 108, первую колонку 112, второй удерживающий змеевик 116, реакционную камеру 120, вторую колонку 124, третью колонку 128 и контроллер 132. В варианте, проиллюстрированном на ФИГ. 1, система 100 также включает резервуар 136, насос 140, первую камеру 144 для отходов, вторую камеру 148 для отходов, третью камеру 152 для отходов и аналитическое устройство 156 для анализа полипептидов. Однако в других вариантах система 100 может не включать один или несколько из данных компонентов. В качестве примера, система 100 может не включать резервуар 136 и/или аналитическое устройство 156. В любом случае, при необходимости, обычно между каждым из компонентов системы 100 проходит традиционная система трубопроводов, чтобы содействовать соединению по текучей среде между компонентами системы 100, как более подробно описано ниже. Многопортовый клапан 104 обычно выполнен с возможностью управления соединением по текучей среде между различными компонентами системы 100. В данном варианте многопортовый клапан 104 представляет собой клапан с двенадцатью периферическими портами и центральным общим портом. Другими словами, многопортовый клапан 104 имеет центральный порт 160 и двенадцать периферических портов 164-175, которые избирательно соединяются по текучей среде с центральным портом 160. Многопортовый клапан 104 может перемещаться между двенадцатью различными положениями, которые по текучей среде соединяют центральный порт 160 с двенадцатью различными периферическими портами 164-175 соответственно (некоторые из которых не используются при работе системы 100, изображенной на ФИГ. 1). В других вариантах многопортовый клапан 104 может включать больше или меньше периферических портов, может представлять собой клапан другого типа или может быть заменен одним или несколькими другими клапанами (каждый из которых имеет один или несколько портов). В качестве примера, многопортовый клапан 104 может быть заменен совокупностью однопортовых клапанов, отдельно соединенных с контроллером 132 и управляемых с его помощью, при этом каждый из однопортовых клапанов эффективно заменяет один из периферических портов 164-175.

[0019] Резервуар 136 обычно выполнен с возможностью содержания или хранения продукта, содержащего полипептиды, который необходимо проанализировать. Резервуар 136 в данном варианте представлен в виде биореактора, в котором содержится или хранится продукт. Однако в других вариантах резервуар 136, в качестве альтернативы,

может быть представлен в виде резервуара для клеточной культуры, такого как колба, планшет и т. д. Резервуар 136 соединен по текучей среде с периферическим портом 164 клапана 104 через канал 180 системы трубопроводов, так что в случае необходимости клапан 104 может получать образец продукта, содержащегося в резервуаре 136, из резервуара 136.

[0020] Первый удерживающий змеевик 108 помещен до клапана 104 и соединен по текучей среде с центральным портом 160 клапана 104 через канал 184 системы трубопроводов. Первый удерживающий змеевик 108 смонтирован таким образом, чтобы получать образец продукта из резервуара 136 через клапан 104, когда клапан 104 находится в первом положении, при котором центральный порт 160 соединен по текучей среде с периферическим портом 164.

[0021] Первая колонка 112 помещена после клапана 104 и соединена по текучей среде с периферическим портом 165 клапана 104 через канал 188 системы трубопроводов. Первая колонка 112 смонтирована таким образом, чтобы получать образец из первого удерживающего змеевика 108 через клапан 104, когда клапан 104 находится во втором положении, при котором центральный порт 160 соединен по текучей среде с периферическим портом 165. В случае, когда первая колонка 112 получает образец, первая колонка 112 выполнена с возможностью связывать полипептиды из образца по мере перетекания образца сквозь нее. Таким образом, первая колонка 112 отделяет полипептиды в образце от оставшейся части образца, которая может переходить в первую камеру 144 для отходов через второй удерживающий змеевик 116.

[0022] Первая колонка 112, которая в данном документе также может обозначаться как колонка для связывания полипептидов, выбрана из группы, состоящей из колонки с белком А, колонки с белком G, колонки с белком A/G, колонки с белком L, колонки для разделения аминокислот, колонки с авидином, колонки со стрептавидином, колонки для связывания углеводов, колонки для разделения углеводов, колонки с глутатионом, колонки с гепарином, колонки для гидрофобных взаимодействий, иммуноаффинной колонки, колонки для разделения нуклеотидов/коферментов, специализированной колонки и колонки для аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных металлов (ИМАС). Например, в случае полипептидов, которые представляют собой человеческие IgG подклассов 1, 2 или 4, IgM, IgA или IgE (и содержащие человеческую Fc-часть и/или Fab-область семейства VH3 человека), пригодны колонки с белком А. Для очистки человеческих IgG подклассов 1-4 можно применять колонки с белком G. Для очистки всех данных классов человеческих антител также можно применять колонки с рекомбинантным слитым белком A/G, поскольку в слитом белке обеспечены сайты связывания белка А и белка G. Таким образом, для очистки человеческих IgG, IgA, IgE и IgM можно применять слитые белки на основе белка A/G. Более того, для очистки человеческих IgG, IgM, IgA, IgE и IgD можно применять колонки с белком L, при условии, что целевые антитела имеют соответствующую легкую цепь подтипа каппа (κ) (т. е. подтипов V κ I, V κ III и V κ IV); колонки с белком L также можно применять для

очистки Fab- и scFv-фрагментов, также имеющих соответствующую цепь подтипа κ, поскольку белок L связывает цепь варибельной области (V) антител.

[0023] Насос 140 помещен до первого удерживающего змеевика 108 и соединен с ним по текучей среде через канал 192 системы трубопроводов. Насос 140 в данном варианте представлен в виде поршневого насоса, который соединен по текучей среде как с первым источником 196 буфера, так и со вторым источником 200 буфера. В данном варианте первый источник 196 буфера представляет собой источник элюирующего буфера, который может подавать раствор 204 элюирующего буфера, например, в случае антител, связанных с белком А, кислый буфер или, в случае антител, связанных с белком G, очень кислый (рН 3 или менее) буфер; специалист в данной области сможет оптимизировать и подобрать соответствующие элюирующие буферы для связанных антител, в насос 140 (и, в конечном итоге, в первый удерживающий змеевик 108), а второй источник 200 буфера представляет собой источник денатурирующего буфера (содержащий денатурирующее средство, которое разрушает четвертичную, третичную или вторичную структуру полипептидов), который может подавать денатурирующий реагент 208 в насос 140 (и, в конечном итоге, в первый удерживающий змеевик 108). В других вариантах насос 140 может представлять собой насос другого типа, и/или для каждого из источников 196, 200 буфера можно использовать различные насосы 140.

[0024] В некоторых вариантах денатурирующий реагент может представлять собой или включать денатурирующий детергент или хаотроп. В тех вариантах, в которых денатурирующий реагент представляет собой или включает денатурирующий детергент, денатурирующий детергент предпочтительно выбран из группы, состоящей из додецилсульфата натрия (SDS), холата натрия, дезоксихолата натрия, гликохолата натрия, таурохолата натрия, тауродезоксихолата натрия, N-лауроилсаркозина, додецилсульфата лития, бромида гексадецилтриметиламмония (СТАВ) и бромида триметил(тетрадецил)аммония (TTAB). Более предпочтительно денатурирующий детергент представляет собой SDS. В тех вариантах, в которых денатурирующий реагент представляет собой или включает хаотроп, хаотроп предпочтительно выбран из группы, состоящей из мочевины, n-бутанола, этанола, хлорида гуанидиния, перхлората лития, ацетата лития, хлорида магния, фенола, 2-пропанола и тиомочевины. В качестве альтернативы или дополнения денатурирующий реагент может представлять собой или включать нагретую жидкость, которая имеет температуру, подходящую для достижения, если не поддержания, заранее заданной температуры (например, от приблизительно 22°C до приблизительно 120°C) в реакционной камере 120, когда денатурирующий реагент переходит в реакционную камеру 120.

[0025] Клапан 212 помещен между насосом 140 и первым и вторым источниками 196, 200 буферов для избирательного соединения по текучей среде насоса 140 только с одним из источников 196, 200 буфера за один раз. Более конкретно, клапан 212 может перемещаться между первым положением, при котором насос 140 соединен по текучей среде с первым источником 196 буфера и насос 140 изолирован по текучей среде от

второго источника 200 буфера, и вторым положением, при котором насос 140 соединен по текучей среде со вторым источником 200 буфера и насос 140 изолирован по текучей среде от первого источника 196 буфера. Другими словами, насос 140 избирательно соединяется по текучей среде с первым источником 196 буфера или со вторым источником 200 буфера в зависимости от положения клапана 212.

[0026] Как отмечено выше, в данном варианте насос 140 представляет собой поршневой насос. Обычно поршневой насос 140 выполнен с возможностью получения буфера из одного из источников 196, 200 буферов и выведения такого буфера в первый удерживающий змеевик 108. Когда клапан 212 находится в первом положении, насос 140 может получать (например, втягивать) раствор 204 элюирующего буфера из первого источника 196 буфера и, при необходимости, может выводить (например, выталкивать) такой раствор 204 элюирующего буфера в первый удерживающий змеевик 108. И наоборот, когда клапан 212 находится во втором положении, насос 140 может получать (например, втягивать) денатурирующий реагент 208 из второго источника 200 буфера и, при необходимости, может выводить (например, выталкивать) такой денатурирующий реагент 208 в первый удерживающий змеевик 108.

[0027] Второй удерживающий змеевик 116 помещен после клапана 104, первого удерживающего змеевика 108 и первой колонки 112. Второй удерживающий змеевик 116 избирательно соединяется по текучей среде с периферическим портом 166 клапана 104 через каналы 216, 220 системы трубопроводов. Второй удерживающий змеевик 116 также избирательно соединяется по текучей среде с первой колонкой 112 через канал 220 и канал 224. Трехходовой клапан 228 смонтирован между каналами 216, 220, 224 для содействия избирательному соединению в целях создания требуемого потока жидкости, как более подробно описано ниже.

[0028] Второй удерживающий змеевик 116 смонтирован таким образом, чтобы принимать раствор 204 элюирующего буфера из первого удерживающего змеевика 108 через клапан 104 и сквозь первую колонку 112, когда насос 140 выводит раствор 204 элюирующего буфера образом, описанным выше, клапан 104 находится во втором положении, при котором центральный порт 160 соединен по текучей среде с периферическим портом 165. По мере перехода раствора 204 элюирующего буфера сквозь первую колонку 112 раствор 204 элюирующего буфера элюирует практически все полипептиды, связанные с первой колонкой 112. Трехходовой клапан 228 используется для соединения каналов 220, 224, за счет чего первая колонка 112 соединяется по текучей среде со вторым удерживающим змеевиком 116, так что элюэнтная/полипептидная смесь, содержащая раствор 204 элюирующего буфера и элюированные полипептиды, перетекает из первой колонки 112 во второй удерживающий змеевик 116 через каналы 220, 224.

[0029] Реакционная камера 120 помещена после клапана 104 и первой колонки 112 и соединена по текучей среде с периферическим портом 167 клапана 104 через канал 232 системы трубопроводов. В данном варианте реакционная камера 120 частично, если не полностью, предварительно заполняется денатурирующим реагентом 208 (т. е.

заполняется до начала работы системы 100) из второго источника буфера 200 с применением насоса 140 с выведением денатурирующего реагента 208 в первый удерживающий змеевик 108 и перемещением многопортового клапана 104 в четвертое положение, при котором центральный порт 160 соединен по текучей среде с периферическим портом 167 клапана 167, что содействует перемещению денатурирующего реагента 208 из первого удерживающего змеевика 108 в реакционную камеру 120. Однако в других вариантах реакционная камера 120 может частично или полностью заполняться денатурирующим реагентом 208 во время работы системы 100 (например, после того, как второй удерживающий змеевик 116 получает раствор 204 элюирующего буфера), частично или полностью заполняться денатурирующим реагентом из другого источника буфера и/или иным образом, или реакционная камера 120 может не заполняться совсем, в таком случае к реакционной камере 120 может подводиться тепло от нагревательного элемента 236, присоединенного к реакционной камере 120.

[0030] После того как элюентная/полипептидная смесь достигает второго удерживающего змеевика 116, элюентная/полипептидная смесь перемещается в реакционную камеру 120. В данном варианте реакционная камера 120 принимает элюентную/полипептидную смесь из второго удерживающего змеевика 116 опосредованно. Более конкретно, трехходовый клапан 228 используется для соединения каналов 216, 224, при этом элюентная/полипептидная смесь перемещается из второго удерживающего змеевика 116 в периферический порт 166 многопортового клапана 104 через каналы 216, 224, клапан 104 перемещается в третье положение, при котором центральный порт 160 соединен по текучей среде с периферическим портом 166, так что смесь перемещается в первый удерживающий змеевик 108, и клапан 104 перемещается в четвертое положение, при котором центральный порт 160 соединен по текучей среде с периферическим портом 167 клапана 104, так что смесь перемещается из первого удерживающего змеевика 108 в реакционную камеру 120. В других вариантах реакционная камера 120 может принимать элюентную/полипептидную смесь из второго удерживающего змеевика 116 напрямую или может принимать смесь из второго удерживающего змеевика 116 опосредованно с использованием одного или нескольких других компонентов и/или компонентов, расположенных в другом порядке.

[0031] В любом случае, после того как элюентная/полипептидная смесь достигает реакционной камеры 120, полипептиды в смеси инкубируются в реакционной камере 120, за счет чего полипептиды денатурируются в реакционной камере 120. Например, когда реакционная камера 120 по меньшей мере частично заполнена денатурирующим реагентом, после того как полипептиды в смеси достигают реакционной камеры 120 и вступают в реакцию с денатурирующим реагентом, они будут подвергаться денатурации. В некоторых случаях реакционная камера 120 может одновременно или постоянно нагреваться нагревательным элементом 236, соединенным (например, установленным непосредственно вблизи, окружающим) с реакционной камерой 120 для облегчения содействия процессу денатурации. Другими словами, нагревательный элемент 236 может

подводить тепло, предпочтительно тепло, имеющее температуру от приблизительно 22°C до приблизительно 120°C, и более предпочтительно тепло, имеющее температуру приблизительно 40°C, к реакционной камере 120 для стимуляции денатурации. Нагревательный элемент 236 может быть представлен, например, в виде нагревательного блока, нагревательного змеевика, индукционного нагревателя, теплового насоса, патронного нагревателя, провода электрического сопротивления, нагретой жидкости или другого элемента, подходящего для нагревания одной или нескольких частей реакционной камеры 120. В любом случае, подвод тепла от нагревательного элемента 236 к реакционной камере 120 может содействовать процессу денатурации. Однако в других случаях реакционная камера 120 может не заполняться денатурирующим реагентом, а содействие процессу денатурации может осуществляться путем подвода тепла от нагревательного элемента 236.

[0032] После денатурации полипептидов в смеси реакционная камера 120 может принимать восстанавливающий реагент, который расщепляет сшивающие дисульфидные связи, за счет чего денатурированные полипептиды восстанавливаются. Восстанавливающий реагент может быть выбран из группы, состоящей из дитиотрептола (DTT), глутатиона, β -меркаптоэтанола (β -ME) и трис(2-карбок시에тил)фосфина (ТСЕР), и он обычно подается за счет охлаждающего резервуара 240, который, например, может быть представлен в виде холодильника с температурой 4°C. В данном варианте охлаждающий резервуар 240 помещен после клапана 104 и имеет первую камеру 242, которая содержит восстанавливающий реагент и соединена по текучей среде с периферическим портом 168 клапана 104 через канал 244 системы трубопроводов. Первая камера 242 подает восстанавливающий реагент в первый удерживающий змеевик 108, когда клапан 104 находится в пятом положении, при котором центральный порт 160 соединен по текучей среде с периферическим портом 168 клапана 104, а затем восстанавливающий реагент перемещается из первого удерживающего змеевика 108 в реакционную камеру 120, когда клапан 104 находится (или возвращается) в четвертом положении (при котором центральный порт 160 соединен по текучей среде с периферическим портом 167). Таким образом, в данном варианте восстанавливающий реагент подается в реакционную камеру 120 опосредованно через первый удерживающий змеевик 108. Однако в других вариантах первая камера 242 может подавать восстанавливающий реагент в реакционную камеру 120 напрямую (т. е. без перемещения восстанавливающего реагента в первый удерживающий змеевик 108).

[0033] После восстановления денатурированных полипептидов реакционная камера 120 может принимать алкилирующее средство, которое алкилирует сульфгидрильные группы в реакционной камере 120, за счет чего денатурированные и восстановленные полипептиды алкилируются в реакционной камере 120. Предпочтительно, алкилирующее средство представляет собой алкилирующий реагент, так как индол-3-уксусная кислота (IAA), хотя могут применяться и другие алкилирующие средства. В данном варианте охлаждающий резервуар 240 имеет вторую камеру 248, которая содержит алкилирующее

средство и соединена по текучей среде с периферическим портом 169 клапана 104 через канал 252 системы трубопроводов. Вторая камера 248 подают алкилирующее средство в первый удерживающий змеевик 108, когда клапан 104 находится в шестом положении, при котором центральный порт 160 соединен по текучей среде с периферическим портом 169 клапана 104, а затем алкилирующее средство перемещается из первого удерживающего змеевика 108 в реакционную камеру 120, когда клапан 104 находится (или возвращается) в четвертом положении. Таким образом, в данном варианте алкилирующее средство подается в реакционную камеру 120 опосредованно через первый удерживающий змеевик 108. Однако в других вариантах вторая камера 248 может подавать алкилирующее средство напрямую в реакционную камеру 120 (т. е. без перемещения алкилирующего средства в первый удерживающий змеевик 108) и/или алкилирующее средство может подаваться из другого охлаждающего резервуара (например, охлаждающего резервуара, независимого от охлаждающего резервуара 240).

[0034] В данном варианте система 100 дополнительно включает первый нормально открытый клапан 256, который соединен по текучей среде с реакционной камерой 120 и помещен после нее. Нормально открытый клапан 256 имеет входной порт 260, который соединен по текучей среде с выходом 264 реакционной камеры 120, первый выходной порт 268, который соединен по текучей среде со второй камерой 148 для отходов, и второй выходной порт 272, который соединен по текучей среде с атмосферой. Нормально открытый клапан 256 в норме работает в открытом, или первом, положении, когда система 100 находится в рабочем состоянии, и, более конкретно, реакционная камера 120 принимает и заполняется элюентной/полипептидной смесью, восстанавливающим реагентом, алкилирующим средством и, в некоторых случаях, денатурирующим реагентом, клапан 256. В данном открытом положении входной порт 260 соединен по текучей среде с первым выходным портом 268, и входной порт 260 изолирован по текучей среде от второго выходного порта 272, так что когда реакционная камера 120 заполняется сверх своего фиксированного объема, любое избыточное содержимое направляется во вторую камеру 148 для отходов. Однако нормально открытый клапан 256 может перемещаться (например, за счет подачи тока на клапан 256) из открытого положения в закрытое, или второе, положение, например, когда реакционная камера 120 больше не принимает вышеописанное содержимое и наступило время для очистки реакционной камеры 120. В данном закрытом положении входной порт 260 соединен по текучей среде со вторым выходным портом 272, и входной порт 260 изолирован по текучей среде от первого выходного порта 268, так что выход 264 реакционной камеры 120 контактирует с атмосферой. В свою очередь, в реакционную камеру 120 может поступать воздух, что содействует удалению содержимого из реакционной камеры 120.

[0035] Вторая колонка 124, также обозначаемая в данном документе как обессоливающая колонка 124, предпочтительно представлена в виде колонки для эксклюзионной хроматографии, которая расположена после клапана 104 и соединена по текучей среде с периферическим портом 170 клапана 104 через канал 276 системы

трубопроводов. Таким образом, вторая колонка 124 смонтирована для приема денатурированных, восстановленных и алкилированных полипептидов, раствора 204 элюирующего буфера, алкилирующего средства, восстанавливающего реагента и денатурирующего реагента (в случае его применения) из реакционной камеры 120. В данном варианте вторая колонка 124 принимает данные материалы из реакционной камеры 120 опосредованно. Более конкретно, данные материалы перемещаются из реакционной камеры 120 в первый удерживающий змеевик 108 через клапан 104, когда клапан 104 находится (или перемещается) в четвертом положении (при котором центральный порт 160 соединен по текучей среде с периферическим портом 167), и клапан 104 перемещается в седьмое положение, при котором центральный порт 160 соединен по текучей среде с периферическим портом 170, так что материалы перемещаются из первого удерживающего змеевика 108 во вторую колонку 124. В других вариантах вторая колонка 124 может принимать данные материалы из реакционной камеры 120 напрямую или может принимать данные материалы опосредованно с использованием одного или нескольких других компонентов и/или компонентов, расположенных в другом порядке.

[0036] В любом случае, когда вторая колонка 124 принимает денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды, раствор 204 элюирующего буфера, алкилирующее средство, восстанавливающий реагент и денатурирующий реагент (в случае его применения), вторая колонка 124 может отделять денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды от раствора 204 элюирующего буфера, алкилирующего средства, восстанавливающего реагента и денатурирующего реагента (в случае его применения), которые в конечном итоге перемещаются в третью камеру 152 для отходов. Таким образом, вторая колонка 124 в данном документе может обозначаться как обессоливающая колонка 124. В то же время, вторая колонка 124 может осуществлять замену буфера у полипептидов на буфер с требуемыми параметрами, что позволяет третьей колонке 128 выполнять функции, описанные ниже.

[0037] В данном варианте система 100 дополнительно включает второй нормально открытый клапан 280, который соединен по текучей среде с второй колонкой 124 и третьей колонкой 128 и помещен между ними. Нормально открытый клапан 280 имеет входной порт 284, который соединен по текучей среде с выходом 288 второй колонки 124, первый выходной порт 292, который соединен по текучей среде с третьей камерой 152 для отходов, и второй выходной порт 296, который соединен по текучей среде с третьей колонкой 128. Нормально открытый клапан 280 в норме работает в открытом, или первом, положении, когда система 100 находится в рабочем состоянии. В данном открытом положении входной порт 284 соединен по текучей среде с первым выходным портом 292, и входной порт 284 изолирован по текучей среде от второго выходного порта 296, так что раствор 204 элюирующего буфера, алкилирующее средство, восстанавливающий реагент и денатурирующий реагент направляются в третью камеру 152 для отходов. Однако нормально открытый клапан 280 может перемещаться (например, за счет подачи тока на

клапан 280) из открытого положения в закрытое, или второе, положение, когда необходимо переместить обессоленные полипептиды из второй колонки 124 в третью колонку 128, которая помещена после второй колонки 124. В данном закрытом положении входной порт 284 соединен по текучей среде со вторым выходным портом 296, и входной порт 284 изолирован по текучей среде от первого выходного порта 292, так что вторая колонка 124 соединена по текучей среде с третьей колонкой 128, так что обессоленные полипептиды могут переходить из второй колонки 124 в третью колонку 128. В данном варианте третья колонка 128 включает протеолитический фермент (например, эндопептидазу, выбранную из группы, состоящей из трипсина, химо tripsина, эластазы, термолизина, пепсина, глутамилэндопептидазы, неприлизина, протеазы Lys-C и протеазы V8 *Staphylococcus aureus*), так что третья колонка 128 в данном документе может обозначаться как колонка с протеолитическими ферментами. В любом случае, третья колонка 128 расщепляет обессоленные полипептиды, полученные из второй колонки 124.

[0038] После того как полипептиды расщепились в третьей колонке 128, расщепленные полипептиды могут перемещаться в аналитическое устройство 156, которое, например, может быть представлено в виде устройства для жидкостной хроматографии, устройства для высокоэффективной жидкостной хроматографии, устройства для сверхэффективной жидкостной хроматографии, устройства для масс-спектрометрии, устройства для анализа гликанов, устройства для другого анализа или их комбинации. В данном варианте аналитическое устройство 156 помещено после третьей колонки 128 и соединено по текучей среде с третьей колонкой 128 через канал 298 системы трубопроводов. Таким образом, в данном варианте расщепленные полипептиды могут автоматически перемещаться в аналитическое устройство 156 для анализа (например, для количественной оценки и разделения). Однако в других вариантах аналитическое устройство 156 не является частью системы 100 (например, не соединяется по текучей среде с третьей колонкой 128), в таком случае расщепленные полипептиды могут перемещаться в аналитическое устройство 156 иным способом (например, вручную).

[0039] Как вкратце отмечалось выше, система 100 также включает контроллер 132, который в данном варианте связан коммуникационным взаимодействием или соединен с различными компонентами системы 100, чтобы отслеживать и содействовать или направлять вышеописанную работу системы 100 путем передачи сигналов (например, сигналов управления, данных) к различным компонентам системы 100 и получения сигналов (например, данных) от них. Контроллер 132 может быть помещен непосредственно рядом с другими компонентами системы 100 (например, в том же окружении, что и система 100) или может быть помещен удаленно от других компонентов системы 100. Как проиллюстрировано, контроллер 132 связан коммуникационным взаимодействием или соединен с многопортовым клапаном 104 через коммуникационную сеть 300, с насосом 140 через коммуникационную сеть 328, с аналитическим устройством 156 через коммуникационную сеть 332, с нагревательным элементом 236 через

коммуникационную сеть 340, с первым нормально открытым клапаном 256 через коммуникационную сеть 344 и вторым нормально открытым клапаном 280 через коммуникационную сеть 348. В других вариантах контроллер 132 может быть связан коммуникационным взаимодействием или соединен с большим или меньшим количеством компонентов системы 100, например, первым удерживающим змеевиком 108, первой колонкой 112, вторым удерживающим змеевиком 116, реакционной камерой 120, второй колонкой 124, третьей колонкой 128, резервуаром 136, трехходовым клапаном 228 и/или охлаждающим резервуаром 240.

[0040] Применяемые в данном документе фразы "связанный коммуникационным взаимодействием" и "соединенный" по определению обозначают непосредственно связанный или соединенный или опосредованно связанный или соединенный через один или несколько промежуточных компонентов. Такие промежуточные компоненты могут включать аппаратные и/или программные компоненты. Понятно, что сети 300-348 могут представлять собой беспроводные сети, проводные сети или комбинации проводной и беспроводной сети (например, сотовой телефонной сети и/или сети стандарта 802.11x) и могут включать общедоступную сеть, такую как Интернет, частную сеть или их комбинацию. Тип и конфигурация сетей 300-348 зависят от способа реализации, и можно применять сети с коммуникацией любого типа, которые содействуют описанной коммуникации между контроллером 132 и компонентами системы 100, доступные на данный момент или те, которые будут разработаны позже.

[0041] Как показано на ФИГ. 2, контроллер 132 включает процессор 352, запоминающее устройство 356, коммуникационный интерфейс 360 и вычислительный алгоритм 364. Процессор 352 может представлять собой универсальный процессор, процессор для цифровой обработки сигналов, специализированную интегральную микросхему (ASIC), логическую матрицу, программируемую пользователем, графический процессор, аналоговый контур, цифровой контур или любой другой известный процессор или процессор, который будет разработан позже. Процессор 352 работает в соответствии с инструкциями, находящимися в запоминающем устройстве 356. Запоминающее устройство 356 может представлять собой энергозависимое или энергонезависимое запоминающее устройство. Запоминающее устройство 356 может включать одно или несколько из постоянного запоминающего устройства (ROM), запоминающего устройства с произвольной выборкой (RAM), флэш-памяти, электронно-перепрограммируемого постоянного запоминающего устройства (EEPROM) или другого типа запоминающего устройства. Запоминающее устройство 356 может включать оптическую, магнитную (жесткий диск) или любую другую форму устройства хранения данных.

[0042] Коммуникационный интерфейс 360 предусмотрен для обеспечения возможности или содействия электронной коммуникации между контроллером 132 и компонентами системы 100 охлаждения через сети 300-348. Коммуникационный интерфейс 360 может представлять собой или включать, например, один или несколько портов универсальной последовательной шины (USB), один или несколько портов

локальной сети и/или один или несколько других портов или интерфейсов. Электронная коммуникация может происходить с помощью любого известного протокола коммуникации, включая, например, USB, RS-232, RS-485, WiFi, Bluetooth и/или любой другой подходящий протокол коммуникации.

[0043] Алгоритм 364 обычно включает одну или несколько стандартных программ управления и/или одну или несколько стандартных подпрограмм, осуществляемых как машиночитаемые инструкции, хранимые в запоминающем устройстве 356. Стандартные программы и/или подпрограммы управления могут выполнять PID (пропорционально-интегрально-дифференциальное) управление, управление с использованием нечеткой логики, нелинейное управление или любой другой подходящий тип управления. Процессор 352 обычно исполняет алгоритм 364 для выполнения действий, связанных с работой системы 100.

[0044] В общих чертах, алгоритм 364, при его исполнении, заставляет процессор 352 управлять компонентами системы 100, в частности многопортовым клапаном 104, насосом 140, нагревательным элементом 236, первым и вторым нормально открытыми клапанами 256, 280 и аналитическим устройством 156, так что система 100 работает требуемым образом, обсуждаемым в данном документе. Более конкретно, алгоритм 364 может, при его исполнении, заставлять процессор 352 (i) перемещать многопортовый клапан 104 в любое описанное в данном документе положение или между ними, за счет чего осуществляется соединение по текучей среде различных компонентов системы 100, как описано выше, (ii) управлять насосом 140 (например, заставлять насос 140 получать и выводить раствор 204 элюирующего буфера или денатурирующий реагент 208), (iii) управлять нагревательным элементом 236 (при его использовании в системе 100) для избирательного подвода тепла к реакционной камере 120 (и ее содержимому), (iv) управлять первым нормально открытым клапаном 256, (v) управлять вторым нормально открытым клапаном 280, (vi) управлять аналитическим устройством 156 и выполнять другие требуемые функции.

[0045] Например, когда необходимо выполнить анализ образца продукта, содержащего полипептиды, в режиме реального времени алгоритм 364, исполняемый процессором 352, устанавливает клапан 104 в первое положение, описанное выше, перемещает образец продукта из резервуара 136 в первый удерживающий змеевик 108 через канал 180, порт 164, порт 160, устанавливает клапан 104 во второе положение, описанное выше, и перемещает образец из первого удерживающего змеевика 108 в колонку 112 для связывания полипептидов и сквозь нее через канал 184, порты 160, 164 и канал 188. В свою очередь, практически все полипептиды в образце связываются с колонкой 112, так что полипептиды в образце отделяются от остальной части образца, которая переходит в первую камеру 144 для отходов через каналы 220, 224 и второй удерживающий змеевик 116.

[0046] Алгоритм 364, далее исполняемый процессором 352, заставляет насос 140 получать раствор 204 элюирующего буфера из первого источника 196 буфера и выводить

раствор 204 элюирующего буфера в первый удерживающий змеевик 108 через канал 192. В некоторых случаях насос 140 может быть необходимо переместить из второго положения в первое положение (для того, чтобы соединить по текучей среде насос 140 с первым источником 196 буфера), но в других случаях насос 140 уже может находиться в первом положении. В любом случае, алгоритм 364, исполняемый процессором 352, перемещает раствор 204 элюирующего буфера из первого удерживающего змеевика 108 в первую колонку 112 и сквозь нее и во второй удерживающий змеевик 116 через канал 184, порты 160, 165 и каналы 188, 220 и 224. Таким образом, раствор 204 элюирующего буфера элюирует практически все полипептиды, связанные с первой колонкой 112, и элюентная/полипептидная смесь, включающая раствор 204 элюирующего буфера и элюированные полипептиды, перетекает из первой колонки 112 во второй удерживающий змеевик 116.

[0047] Алгоритм 364, далее исполняемый процессором 352, перемещает клапан 104 в третье положение, описанное выше, перемещает смесь элюирующего буфера/полипептидов из второго удерживающего змеевика 116 в первый удерживающий змеевик 108 через каналы 224, 216, порты 166, 160 и канал 184, перемещает клапан 104 в четвертое положение, описанное выше, и перемещает элюентную/полипептидную смесь из первого удерживающего змеевика 108 в реакционную камеру 120 через канал 184, порты 160, 167 и канал 232. В свою очередь, полипептиды в элюентной/полипептидной смеси инкубируют в реакционной камере 120 с денатурирующим реагентом 208 и/или в присутствии тепла, подводимого от нагревательного элемента 236, в результате чего полипептиды денатурируются.

[0048] Алгоритм 364, далее исполняемый процессором 352, перемещает клапан 104 в пятое положение, описанное выше, перемещает восстанавливающий реагент из первой камеры 242 охлаждающего резервуара 240 в первый удерживающий змеевик 108 через канал 244, порты 168, 160 и канал 184, перемещает клапан 104 обратно в четвертое положение и перемещает восстанавливающий реагент из первого удерживающего змеевика 108 в реакционную камеру 120 через канал 184, порты 160, 167 и канал 232. После того как восстанавливающий реагент достигает реакционной камеры 120, он расщепляет сшивающие дисульфидные связи, за счет чего денатурированные полипептиды в реакционной камере 120 восстанавливаются.

[0049] Алгоритм 364, далее исполняемый процессором 352, перемещает клапан 104 в шестое положение, описанное выше, перемещает алкилирующее средство из второй камеры 248 охлаждающего резервуара 240 в первый удерживающий змеевик 108 через канал 252, порты 169, 160 и канал 184, перемещает клапан 104 обратно в четвертое положение и перемещает алкилирующее средство из первого удерживающего змеевика 108 в реакционную камеру 120 через канал 184, порты 160, 167 и канал 232. После того как алкилирующее средство достигает реакционной камеры 120, оно алкилирует сульфгидрильные группы в реакционной камере 120, за счет чего денатурированные и восстановленные полипептиды в реакционной камере 120 алкилируются.

[0050] Алгоритм 364, далее исполняемый процессором 352, перемещает клапан 104 в четвертое положение (если он еще не находится в нем), перемещает денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды, раствор 204 элюирующего буфера, алкилирующее средство, восстанавливающий реагент и денатурирующий реагент (в случае его применения) из реакционной камеры 120 в первый удерживающий змеевик 108 через канал 232, порты 167, 160 и канал 184, перемещает клапан 104 в седьмое положение, описанное выше, и перемещает денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды, раствор 204 элюирующего буфера, алкилирующее средство, восстанавливающий реагент и денатурирующий реагент (в случае его применения) из первого удерживающего змеевика 108 в обессоливающую колонку 124 через канал 184, порты 160, 170 и канал 276. В свою очередь, обессоливающая колонка 124 отделяет денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды от раствора 204 элюирующего буфера, алкилирующего средства, восстанавливающего реагента и денатурирующего реагента, которые переходят или перемещаются в третью камеру 152 для отходов.

[0051] В определенный момент времени, после того, как денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды, раствор 204 элюирующего буфера, алкилирующее средство, восстанавливающий реагент и денатурирующий реагент (в случае его применения) перемещаются из реакционной камеры 120 в первый удерживающий змеевик 108, алгоритм 364, далее исполняемый процессором 352, перемещает нормально открытый клапан 256 из его открытого, первого положения, при котором выход 264 камеры 120 соединен по текучей среде со второй камерой 148 для отходов, чтобы направлять содержимое, которое не будет помещаться в реакционной камере 120 (в результате чего она становится заполненной сверх своего фиксированного объема), во вторую камеру 148 для отходов, в его закрытое, второе положение, при котором выход 264 соединен по текучей среде с атмосферой, так что воздух может поступать в реакционную камеру 120, что содействует удалению содержимого из реакционной камеры 120. Нормально открытый клапан 256 может возвращаться в открытое первое положение сразу после опустошения реакционной камеры 120 или может возвращаться в открытое первое положение в более поздний момент времени.

[0052] После того, как обессоливающая колонка 124 отделяет денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды от других материалов, алгоритм 364, далее исполняемый процессором 352, перемещает нормально открытый клапан 280 из его открытого, первого положения, при котором входной порт клапана 280 соединен по текучей среде с третьей камерой 152 для отходов, в его закрытое, второе положение, при котором входной порт клапана 280 соединен по текучей среде с колонкой 128 с протеолитическими ферментами. В свою очередь, алгоритм 364, исполняемый процессором 352, перемещает обессоленные (или отделенные) полипептиды из обессоливающей колонки 124 в колонку 128 с протеолитическими ферментами, в которой обессоленные полипептиды расщепляются.

[0053] После того как полипептиды подверглись расщеплению, по меньшей мере в данном варианте, алгоритм 364, далее исполняемый процессором 352, перемещает расщепленные полипептиды из колонки 128 с протеолитическими ферментами в аналитическое устройство 156 для анализа полипептидов и заставляет аналитическое устройство 156 выполнять требуемый анализ. В качестве примера, алгоритм 364, при его исполнении процессором 352, может заставлять аналитическое устройство 156 отделять и количественно оценивать полипептиды.

[0054] В других вариантах алгоритм 364, при его исполнении процессором 352, может заставлять выполнять дополнительные функции, меньшее число функций и/или иные функции. В качестве примера, алгоритм 364, при его исполнении процессором 352, может не перемещать расщепленные полипептиды из колонки 128 в аналитическое устройство 156 или заставлять аналитическое устройство 156 выполнять требуемый анализ. Более того, в других вариантах алгоритм 364 может исполняться процессором 352 в ином порядке, чем описанный в данном документе. Наконец, понятно, что алгоритм 364 может исполняться процессором 352 любое число отдельных раз, поскольку систему 100 можно применять для выполнения анализов нескольких образцов (от одного и того же продукта и/или от другого продукта) в режиме реального времени.

[0055] На ФИГ. 3А-3С проиллюстрированы результаты встроенного МАМ-анализа в режиме реального времени, разработанного для отслеживания эффективности системы 100 при подготовке образца продукта, содержащего молекулу биспецифического активатора Т-клеток (BiTE®). В частности, в ходе исследования отслеживали эффективность системы 100 на протяжении производственного цикла продолжительностью 40 дней. В ходе исследования начинали отслеживание и сбор данных CQA, таких как процент площади в случае 2 сайтов дезамидирования, DS1 и DS2, и частота фрагментации, FF, проиллюстрированные на ФИГ. 3А, а также высота пика MS (выраженная как число импульсов ионов) для четырех эталонных пептидов RP1, RP2, RP3 и RP4, проиллюстрированных на ФИГ. 3В и 3С, в 6-й день 40-дневного производственного цикла. Как проиллюстрировано на ФИГ. 3А, система 100 была способна и эффективно выполняла заданные функции, обсуждаемые в данном документе, на всем протяжении 40-дневного производственного цикла, и, как проиллюстрировано на ФИГ. 3В и 3С, данные CQA, собранные в период от дня 6 до дня 40, были практически стабильными, т. е. отсутствовало значимое изменение качества продукта с течением времени, и качество продукта фактически выросло после дня 32, за счет чего демонстрируется надежность системы 100 в автоматической подготовке образца. Действительно, как проиллюстрировано на ФИГ. 3С, данные CQA, собранные для RP1, RP2, RP3 и RP4 на протяжении такого периода времени, были лучше, чем данные CQA, полученные в ходе типичного МАМ-анализа, выполняемого вручную.

Терапевтические полипептиды

[0056] В раскрытых устройствах и способах могут быть применимы белки, включая те, которые связываются с одним или несколькими из нижеуказанного. Они

включают белки CD, включая CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD30 и CD34; включая белки, которые препятствуют связыванию с рецептором. Белки семейства рецепторов HER, в том числе HER2, HER3 и HER4, и рецептор EGF. Молекулы клеточной адгезии, например, LFA-1, MoI, p150, 95, VLA-4, ICAM-1, VCAM и альфа-v/бета-3 интегрин. Факторы роста, такие как фактор роста эндотелия сосудов ("VEGF"), гормон роста, тиреотропный гормон, фолликулостимулирующий гормон, лютеинизирующий гормон, фактор высвобождения гормона роста, паратиреоидный гормон, мюллерова ингибирующая субстанция, воспалительный белок макрофагов человека (MIP-I-альфа), эритропоэтин (EPO), фактор роста нервной ткани, такой как NGF-бета, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), факторы роста фибробластов, включая, например, aFGF и bFGF, эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующие факторы роста (TGF), включая, среди прочего, TGF- α и TGF- β , включая TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 или TGF- β 5, инсулиноподобные факторы роста-I и -II (IGF-I и IGF-II), дез(1-3)-IGF-I (IGF-I головного мозга) и остеоиндуктивные факторы. Инсулины и родственные инсулину белки, включая инсулин, А-цепь инсулина, В-цепь инсулина, проинсулин и белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста. Белки, задействованные в процессах коагуляции и связанные с коагуляцией, такие как, среди прочего, фактор VIII, тканевой фактор, фактор фон Виллебранда, белок С, альфа-1-антитрипсин, активаторы плазминогена, такие как урокиназа и тканевой активатор плазминогена ("t-PA"), бомбезин, тромбин и тромбопоэтин; (vii) другие белки крови и сыворотки, включая без ограничения альбумин, IgE и антигены группы крови. Колонистимулирующие факторы и их рецепторы, включая, среди прочего, M-CSF, GM-CSF и G-CSF и их рецепторы, такие как рецептор CSF-1 (c-fms). Рецепторы и ассоциированные с рецепторами белки, включая, например, рецептор flk2/flt3, рецептор ожирения (OB), рецептор LDL, рецепторы гормонов роста, рецепторы тромбопоэтина ("TPO-R", "c-mpl"), рецепторы глюкокагона, рецепторы интерлейкинов, рецепторы интерферонов, Т-клеточные рецепторы, рецепторы факторов стволовых клеток, такие как c-Kit, и другие рецепторы. Лиганды рецепторов, включая, например, OX40L, лиганд рецептора OX40. Нейротрофические факторы, включая нейротрофический фактор кости (BDNF) и нейротрофин-3, -4, -5 или -6 (NT-3, NT-4, NT-5 или NT-6). А-цепь релаксина; В-цепь релаксина; прорелаксин; интерфероны и рецепторы интерферона, включая, например, интерферон- α , - β и - γ и их рецепторы. Интерлейкины и рецепторы интерлейкинов, включая IL-1 - IL-33 и рецепторы IL-1 - IL-33, такие как, среди прочего, рецептор IL-8. Вирусные антигены, включая антиген оболочки вируса, вызывающего СПИД. Липопроотеины, кальцитонин, глюкокагон, предсердный натрийуретический фактор; сурфактант легкого, фактор некроза опухоли-альфа и -бета, энкефалиназа, RANTES (регулируемый при активации, экспрессируемый и секретлируемый нормальными Т-клетками), мышинный гонадотропин-связанный пептид, ДНКаза, ингибин и активин. Интегрин, белок А или D, ревматоидные факторы; иммунотоксины, костный морфогенетический белок (BMP), супероксиддисмутаза, поверхностные мембранные белки, фактор ускорения распада (DAF), оболочка вируса,

вызывающего СПИД, транспортные белки, хоминг-рецепторы, адрессины, регуляторные белки, иммуноадгезины, антитела. Миостатины, белки TALL, включая TALL-1, амилоидные белки, включая без ограничения белки бета-амилоида, тимусные стромальные лимфопоэтины ("TSLP"), лиганд RANK ("OPGL"), c-kit, рецепторы TNF, включая рецептор TNF типа 1, TRAIL-R2, ангиопоэтины и биологически активные фрагменты или аналоги или варианты любого из вышеуказанного.

[0057] Иллюстративные полипептиды и антитела включают Activase® (альтеплаза); алирокумаб, Aranesp® (дарбапоэтин-альфа), Eprex® (эпоэтин-альфа или эритропоэтин); Avonex® (интерферон β -1a); Веххар® (тозитумомаб); Betaseron® (интерферон- β); бокоцизумаб (моноклональное антитело к PCSK9, обозначенное как L1L3, см. US8080243); Campath® (алемтузумаб); Дунеро® (эпоэтин-дельта); Velcade® (бортезомиб); MLN0002 (mAb к $\alpha 4\beta 7$); MLN1202 (mAb к рецептору хемокина CCR2); Enbrel® (этанерцепт); Eprex® (эпоэтин-альфа); Erbitux® (цетуксимаб); эволюкумаб; Genotropin® (соматропин); Herceptin® (трастузумаб); Humatropе® (соматропин [источник получения рДНК] для инъекции); Humira® (адалимумаб); Infergen® (интерферон альфакон-1); Natrecor® (несиритид); Kineret® (анакинра), Leukine® (саргамостим); LymphoCide® (эпратузумаб); Benlysta™ (белимумаб); Metalyse® (тенектеплаза); Mircera® (метоксиполиэтиленгликоль-эпоэтин-бета); Mylotarg® (гемтузумаб озогамидин); Raptiva® (эфализумаб); Cimzia® (цертолизумаб пегол); Soliris™ (экулизумаб); пекселизумаб (антитело к C5-компоненту системы комплемента); MEDI-524 (Numax®); Lucentis® (ранибизумаб); эдрекломаб (Panorex®); Trabio® (лерделимумаб); терацим hR3 (нимотузумаб); омнитарг (пертузумаб, 2C4); Osidem® (IDM-I); OvaRex® (B43.13); Nuvion® (висилизумаб); кантузумаб мертанзин (huC242-DM1); NeoRecormon® (эпоэтин-бета); Neumega® (опрелвекин); Neulasta® (пегилированный филграстрим, пегилированный G-CSF, пегилированный hu-Met-G-CSF); Neupogen® (филграстрим); ортоклон ОКТ3® (муромонаб-CD3), Procrit® (эпоэтин-альфа); Remicade® (инфликсимаб), Reopro® (абциксимаб), Actemra® (mAb к рецептору IL6), Avastin® (бевацизумаб), HuMax-CD4 (занолимумаб), Rituxan® (ритуксимаб); Tarceva® (эрлотиниб); Roferon-A® (интерферон альфа-2a); Simulect® (базиликсимаб); Stelara™ (устекинумаб); Prexige® (лумиракоксиб); Synagis® (паливизумаб); 146B7-CHO (антитело к IL15, см. US7153507), Tysabri® (натализумаб); Valortim® (MDX-1303, mAb к защитному антигену B. anthracis); ABthrax™; Vectibix® (панитумумаб); Xolair® (омализумаб), ETI211 (mAb к MRSA), ловушку для IL-1 (Fc-часть человеческого IgG1 и внеклеточные домены обоих компонентов рецептора IL-1 (рецептора I типа и акцессорного белка)), ловушку для VEGF (Ig-домены VEGFR1, слитые с Fc IgG1), Zenarax® (даклизумаб); Zenarax® (даклизумаб), Zevalin® (ибритумомаб тиуксетан), зетию (эзетимиб), атацицепт (TACI-Ig), mAb к $\alpha 4\beta 7$ (ведолизумаб); галиксимаб (моноклональное антитело к CD80), mAb к CD23 (люмиксимаб); BR2-Fc (слитый белок huBR3/huFc, растворимый антагонист BAFF); Simponi™ (голимумаб); мапатумумаб (человеческое mAb к рецептору TRAIL-1); окрелизумаб (человеческое mAb к CD20); HuMax-EGFR (залутумумаб); M200

(волоциксимаб, mAb к интегрину $\alpha 5\beta 1$); MDX-010 (ипилимумаб, mAb к CTLA-4 и VEGFR-I (IMC-18F1); mAb к токсину А и токсину В *S. difficile* (MDX-066 (CDA-I) и MDX-1388); конъюгаты PE38 с dsFv к CD22 (CAT-3888 и CAT-8015); mAb к CD25 (HuMax-TAC); антитела к TSLP; антитело к рецептору TSLP (US8101182); антитело к TSLP, обозначенное как A5 (US7982016); (mAb к CD3 (NI-0401); адекатумумаб (MT201, mAb к EpCAM-CD326); MDX-060, SGN-30, SGN-35 (mAb к CD30); MDX-1333 (антитело к IFNAR); HuMax CD38 (mAb к CD38); mAb к CD40L; mAb к Cripto; антитело к CTGF, вызывающему идиопатический легочный фиброз, которое проходит испытание I фазы (FG-3019) от Fibrogen; mAb к CTLA4; mAb к эотаксину (CAT-213); mAb к FGF8; mAb к ганглиозиду GD2; антитела к склеростину (см. US8715663 или US7592429) антитело к склеростину, обозначенное как Ab-5 (US8715663 или US7592429); mAb к ганглиозиду GM2; человеческое mAb к GDF-8 (MYO-029); mAb к рецептору GM-CSF (CAM-3001); mAb к HepC (HuMax HepC); MEDI-545, MDX-1103 (mAb к $IFN\alpha$); mAb к IGfIR; mAb к IGF-IR (HuMax-Inflam); mAb к IL12/IL23p40 (бриакинумаб); mAb к IL-23p19 (LY2525623); mAb к IL13 (CAT-354); mAb к IL-17 (AIN457); mAb к IL2Ra (HuMax-TAC); mAb к рецептору IL5; mAb к рецепторам интегринов (MDX-018, CNTO 95); mAb к IPIO язвенного колита (MDX-1100); антитело к LLY; BMS-66513; mAb к рецептору маннозы/hCG β (MDX-1307); конъюгат PE38-dsFv к мезотелину (CAT-5001); mAb к PDI (MDX-1 106 (ONO-4538)); антитело к PDGFR α (IMC-3G3); mAb к TGF β (GC-1008); человеческое mAb к рецептору-2 TRAIL (HGS-ETR2); mAb к TWEAK; mAb к VEGFR/Flt-1; mAb к ZP3 (HuMax-ZP3) и моноклональное антитело к амилоиду-бета, содержащее последовательности SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:6 (US7906625).

[0058] Примеры антител, подходящих для способов и фармацевтических составов, включают антитела, показанные в таблице 1. Другие примеры подходящих антител включают инфликсимаб, бевацизумаб, цетуксимаб, ранибизумаб, паливизумаб, абаговомаб, абциксимаб, актоксумаб, адалимумаб, афелимомаб, афутузумаб, алацизумаб, алацизумаб пегол, ald518, алемтузумаб, алирокумаб, альтумомаб, аматуксимаб, анатумомаб мафенатокс, анрукинзумаб, аполизумаб, арцитумомаб, азелизумаб, алтинумаб, атлизумаб, аторолимиумаб, тоцилизумаб, бапинеузумаб, базиликсимаб, бавитуксимаб, бектумомаб, белимумаб, бенрализумаб, бертилимумаб, безилесомаб, бевацизумаб, безлтоксумаб, бициромаб, биватузумаб, биватузумаб мертанзин, блинатумомаб, блосозумаб, брентуксимаб ведотин, бриакинумаб, бродалумаб, канакинумаб, кантузумаб мертанзин, каплацизумаб, капромаб пендетид, карлумаб, катумаксумаб, сс49, цеделизумаб, цертолизумаб пегол, цетуксимаб, цитатузумаб богатокс, циксутумумаб, клазакизумаб, кленоликсимаб, кливатузумаб тетраксетан, конатумумаб, кренезумаб, сг6261, дацетузумаб, даклизумаб, далотузумаб, даратумумаб, демцизумаб, деносумаб, детумомаб, дорлимомаб аритокс, дрозитумаб, дулиготумаб, дупилумаб, экромексимаб, экулизумаб, эдобакомаб, эдреколомаб, эфализумаб, эфунгумаб, элотузумаб, элсилимомаб, энаватузумаб, энлимомаб пегол, энокизумаб, энотикумаб, энситуксимаб, эпитумомаб цитуксетан, эпратузумаб, эренумаб, эрлизумаб, эртумаксумаб,

этарацизумаб, этролизумаб, эволокумаб, эксбивирумаб, фанолесомаб, фаралимомаб, фарлетузумаб, фасинумаб, fbta05, фелвизумаб, фезакинумаб, фиклатузумаб, фигитумумаб, фланвотумаб, фонтолизумаб, форалумаб, форавирумаб, фрезолимумаб, фулранумаб, футуксимаб, галиксимаб, ганитумаб, гантенерумаб, гавилимомаб, гемтузумаб озогамидин, гевокизумаб, гирентуксимаб, глембатумумаб ведотин, голимумаб, гомиликсимаб, gs6624, ибализумаб, ибритумомаб тиуксетан, икрукумаб, иговомаб, имциромаб, имгатузумаб, инклакумаб, индатуксимаб равтанзин, инфликсимаб, интетумумаб, инолимомаб, инотузумаб озогамидин, ипилимумаб, иратумумаб, итолизумаб, иксекизумаб, келиксимаб, лабетузумаб, лебрикизумаб, лемалезомаб, лерделимумаб, лексатумумаб, либивирумаб, лигелизумаб, линтузумаб, лирилумаб, лорвотузумаб мертанзин, лукатумумаб, лумиликсимаб, мапатумумаб, маслимомаб, маврилимумаб, матузумаб, меполизумаб, метелимумаб, милатузумаб, минретумомаб, митумомаб, могамулизумаб, моролимумаб, мотавизумаб, моксетумомаб пасудотокс, муромонаб-cd3, наколомаб тафенатокс, намилумаб, наптумомаб эстафенатокс, нарнутумаб, натализумаб, небакумаб, нецитумумаб, нерелимомаб, несвакумаб, нимотузумаб, ниволумаб, нофетумомаб мерпентан, окаратузумаб, окрелизумаб, одулимомаб, офатумумаб, оларатумаб, олокизумаб, омализумаб, онартузумаб, опортузумаб монатокс, ореговомаб, ортикумаб, отеликсизумаб, окселумаб, озанезумаб, озорализумаб, пагибаксимаб, паливизумаб, панитумумаб, панобакумаб, парсатузумаб, пасколизумаб, патеклизумаб, патритумаб, пемтумомаб, перакизумаб, пертузумаб, пекселизумаб, пидилизумаб, пинтумомаб, плакулумаб, понезумаб, приликсимаб, притумумаб, PRO 140, квилизумаб, ракотумомаб, радретумаб, рафивирумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, регавирумаб, реслизумаб, рилотумумаб, ритуксимаб, робатумумаб, роледумаб, ромосозумаб, ронтализумаб, ровелизумаб, руплизумаб, самализумаб, сарилумаб, сатумомаб пендетид, секукинумаб, севирумаб, сибротузумаб, сифалимумаб, силтуксимаб, симтузумаб, сиплизумаб, сирукумаб, соланезумаб, солитомаб, сонепцизумаб, сонтузумаб, стамулумаб, сулесомаб, сувизумаб, табалумаб, такатузумаб тетракетан, тадоцизумаб, тализумаб, танезумаб, таплитумомаб паптокс, тефибазумаб, телимомаб аритокс, тенатумомаб, тефибазумаб, тенеликсимаб, теплизумаб, тепротумумаб, тезепелумаб, TGN1412, тремелимумаб, тицилимумаб, тилдракизумаб, тигатузумаб, TNX-650, тоцилизумаб, торализумаб, тозитумомаб, тралокинумаб, трастузумаб, TRBS07, трегализумаб, тукотузумаб целмолейкин, тувирумаб, ублитуксимаб, урелумаб, уртоксазумаб, устекинумаб, вапаликсимаб, вателизумаб, ведолизумаб, велтузумаб, вепалимомаб, весенкумаб, висилизумаб, волоциксимаб, ворсетузумаб мафодотин, вотумумаб, залутумумаб, занолимумаб, затуксимаб, зиралимумаб, золимомаб аритокс.

[0059] К антителам также относятся адалимумаб, бевацизумаб, блинатумомаб, цетуксимаб, конатумумаб, деносумаб, экулизумаб, эренумаб, эволокумаб, инфликсимаб, натализумаб, панитумумаб, рилотумумаб, ритуксимаб, ромосозумаб, тезепелумаб и трастузумаб, а также антитела, выбранные из таблицы 1.

Таблица 1

Примеры терапевтических антител

Мишень (неофициальное название)	Концентрация (мг/мл)	Вязкость (сП)	Тип НС (включая аллотипы)	LC Тип	pI	LC, SEQ ID NO	НС, SEQ ID NO
Амилоид	142,2	5,0	IgG1 (f) (R;EM)	Каппа	9,0	1	2
GMCSF (247)	139,7	5,6	IgG2	Каппа	8,7	3	4
CGRPR	136,6	6,3	IgG2	Лямбда	8,6	5	6
RANKL	152,7	6,6	IgG2	Каппа	8,6	7	8
Склеростин (27H6)	145,0	6,7	IgG2	Каппа	6,6	9	10
IL-1R1	153,9	6,7	IgG2	Каппа	7,4	11	12
Миостатин	141,0	6,8	IgG1 (z) (K;EM)	Каппа	8,7	13	14
B7RP1	137,5	7,7	IgG2	Каппа	7,7	15	16
Амилоид	140,6	8,2	IgG1 (za) (K;DL)	Каппа	8,7	17	18
GMCSF (3.112)	156,0	8,2	IgG2	Каппа	8,8	19	20
CGRP (32H7)	159,5	8,3	IgG2	Каппа	8,7	21	22
CGRP (3B6.2)	161,1	8,4	IgG2	Лямбда	8,6	23	24
PCSK9 (8A3.1)	150,0	9,1	IgG2	Каппа	6,7	25	26
PCSK9 (492)	150,0	9,2	IgG2	Каппа	6,9	27	28
CGRP	155,2	9,6	IgG2	Лямбда	8,8	29	30
Гепцидин	147,1	9,9	IgG2	Лямбда	7,3	31	32
TNFR p55)	157,0	10,0	IgG2	Каппа	8,2	33	34
OX40L	144,5	10,0	IgG2	Каппа	8,7	35	36
HGF	155,8	10,6	IgG2	Каппа	8,1	37	38
GMCSF	162,5	11,0	IgG2	Каппа	8,1	39	40
Глюкагон R	146,0	12,1	IgG2	Каппа	8,4	41	42
GMCSF	144,5	12,1	IgG2	Каппа	8,4	43	44

(4.381)								
Склеростин (13F3)	155,0	12,1	IgG2	Каппа	7,8	45	46	
CD-22	143,7	12,2	IgG1 (f) (R;EM)	Каппа	8,8	47	48	
INFR	154,2	12,2	IgG1 (za)	Каппа	8,8	49	50	
Ang2	151,5	12,4	IgG2	Каппа	7,4	51	52	
TRAILR2	158,3	12,5	IgG1 (f) (R;EM)	Каппа	8,7	53	54	
EGFR	141,7	14,0	IgG2	Каппа	6,8	55	56	
IL-4R	145,8	15,2	IgG2	Каппа	8,6	57	58	
IL-15	149,0	16,3	IgG1 (f) (R;EM)	Каппа	8,8	59	60	
IGF1R	159,2	17,3	IgG1 (za)	Каппа	8,6	61	62	
IL-17R	150,9	19,1	IgG2	Каппа	8,6	63	64	
Dkk1 (6.37.5)	159,4	19,6	IgG2	Каппа	8,2	65	66	
Склеростин	134,8	20,9	IgG2	Каппа	7,4	67	68	
TSLP	134,2	21,4	IgG2	Лямбда	7,2	69	70	
Dkk1 (11H10)	145,3	22,5	IgG2	Каппа	8,2	71	72	
PCSK9	145,2	22,8	IgG2	Лямбда	8,1	73	74	
GIPR (2G10.006)	150,0	23,0	IgG1 (z) (K;EM)	Каппа	8,1	75	76	
Активин	133,9	29,4	IgG2	Лямбда	7,0	77	78	
Склеростин (2B8)	150,0	30,0	IgG2	Лямбда	6,7	79	80	
Склеростин	141,4	30,4	IgG2	Каппа	6,8	81	82	
c-fms	146,9	32,1	IgG2	Каппа	6,6	83	84	
$\alpha 4\beta 7$	154,9	32,7	IgG2	Каппа	6,5	85	86	

* Иллюстративная концентрация, подходящая для введения пациенту; ^НС - тяжелая цепь антитела; LC - легкая цепь антитела.

[0060] Исходя из вышеприведенного описания, следует понимать, что устройства,

системы и способы, описанные в данном документе, содействуют выполнению анализа образца практически в режиме реального времени. Таким образом, анализ можно выполнять и получать требуемый результат намного быстрее, чем обеспечивают традиционные способы.

[0061] Следует также понимать, что устройства, системы и способы, описанные в данном документе, позволяют легко отслеживать процесс подготовки встроенного анализа в режиме реального времени с применением системы 100, что, в свою очередь, может уменьшать риск и продлевать производственный цикл продукта. В частности, этот процесс можно отслеживать путем определения, например, с применением контроллера, такого как контроллер 132, и/или вручную оператором системы 100, являются ли условия в системе 100 оптимальными, т. е. удовлетворяют ли они заранее заданному пороговому значению производительности. Как проиллюстрировано на ФИГ. 3В и 3С, например, высоту пика MS, выраженную в импульсах ионов, для четырех эталонных пептидов RP1, RP2, RP3 и RP4, можно получать и сравнивать с ретроспективными значениями для таких эталонных пептидов во время квалификационного испытания способа для определения того, являются ли условия в системе 100 оптимальными (а они являются), так что производственный цикл может быть инициирован, продолжен или удлинен. Однако, если определено, что условия в системе 100 не являются оптимальными, тогда по меньшей мере один компонент культуры клеток можно корректировать до тех пор, пока не будут достигнуты оптимальные условия в закрытой системе. Примеры компонентов культуры клеток, которые можно корректировать, включают без ограничения: pH, давление, температуру, поток среды (например, скорость потока среды, скорость подачи среды), состав среды (включая аминокислоты, питательные вещества, сахара, буфер), стратегию снабжения газами (например, смесь кислорода и углекислого газа, скорость подачи газа), перемешивание (например, скорость перемешивания), добавки (например, металлические добавки, сахарные добавки), скорость подачи добавок (например, пеногасителя) и скорость перфузии. В некоторых случаях может быть необходимо корректировать лишь один компонент культуры клеток, чтобы условия в закрытой системе стали оптимальными, тогда как в других случаях может быть необходимо корректировать несколько компонентов культуры клеток. В качестве альтернативы, если определено, что условия не являются оптимальными, или если условия в системе 100 не являются оптимальными даже после корректировки по меньшей мере одного компонента культуры клеток, контроллер и/или оператор системы 100 могут выключать систему 100.

[0062] Таким образом, устройства, системы и способы, описанные в данном документе, также снижают риск, связанный с продолжительной работой системы 100, когда условия не являются оптимальными или когда по иной причине нежелательно продолжение работы системы 100. В частности, риск можно снижать путем определения (например, вычисления или получения) данных параметров процесса и качества продукта, например, pH, температуры, растворимости кислорода, жизнеспособности клеток, плотности клеток, титра, агрегации, варианта заряда, гликозилирования и т. д.,

ассоциированных с текущей работой системы 100, определения того, удовлетворяют ли данные параметров процесса и качества продукта заранее заданному пороговому значению риска (определенному перед началом работы системы 100 с помощью контроллера, такого как контроллер 132, и/или в ответ на входной сигнал от оператора системы 100), а затем определения того, продолжать ли, прекращать или корректировать работу системы 100 на основании того, удовлетворяют ли данные параметров процесса и качества продукта заранее заданному пороговому значению риска. Например, заранее заданное пороговое значение риска можно определять путем проверки (1) применения доступных данных параметров процесса и данных качества продукта для расчета средних ретроспективных многомерных (MV) данных, ассоциированных с предыдущей работой системы 100 или какой-то другой аналогичной системы, а затем (2) установления рассчитанных средних ретроспективных MV данных в качестве порогового значения (пороговое значение может представлять собой рассчитанные средние ретроспективные MV данные сами по себе или некоторое значение или набор значений на основе рассчитанных средних ретроспективных MV данных). В одном примере заранее заданное пороговое значение риска может представлять собой приемлемое отклонение (например, три стандартных отклонения) от рассчитанных средних ретроспективных MV данных. В качестве альтернативы или дополнения, заранее заданное пороговое значение риска можно определить на основе входного сигнала от оператора системы 100. В некоторых случаях система 100 может быть выключена, когда данные параметров процесса и качества продукта, ассоциированные с текущей работой системы 100, не удовлетворяют (например, превышают) заранее заданное пороговое значение риска. Однако в других случаях система 100 может корректироваться, когда данные параметров процесса и качества продукта, ассоциированные с текущей работой системы 100, не удовлетворяют (например, превышают) заранее заданному пороговому значению риска, или даже когда данные параметров процесса и качества продукта удовлетворяют, но близки к заранее заданному пороговому значению риска.

[0063] Кроме того, заявитель обнаружил, что устройства, системы и способы, описанные в данном документе, также позволяют продлевать производственные циклы с применением системы 100. Традиционные процессы, как правило, предусматривают производственные циклы максимальной длительностью 32-40 дней. Однако заявитель обнаружил, что устройства, системы и способы, описанные в данном документе, делают возможными 50-80, если не 100-кратные удвоения популяции, т. е. примерно 50-80, если не 100-дневные производственные циклы. Таким образом, можно получать большее количество продукта, пока работа системы 100 отслеживается, чтобы гарантировать то, что продукт удовлетворяет показателям качества, а риск снижен.

[0064] В данном документе описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, включая наилучший способ или способы, известные авторам настоящего изобретения, для осуществления настоящего изобретения. Хотя в данном документе показаны и описаны многочисленные примеры, специалисты в данной области

техники легко поймут, что детали различных вариантов осуществления не должны быть взаимоисключающими. Вместо этого, специалисты в данной области техники после прочтения представленных в данном документе идей смогут скомбинировать один или несколько признаков одного варианта осуществления с одним или несколькими признаками остальных вариантов осуществления. Кроме того, также следует понимать, что проиллюстрированные варианты осуществления являются лишь иллюстративными и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения. Все способы, описанные в данном документе, можно выполнять в любом удобном порядке, если иное не указано в данном документе или иное явно не противоречит контексту. Использование всех без исключения примеров или вводных слов (например, "такой как"), представленных в данном документе, предназначено исключительно для лучшего освещения аспектов иллюстративного варианта осуществления или вариантов осуществления настоящего изобретения и не налагает ограничения на объем настоящего изобретения. Ни одна формулировка в настоящем описании не должна истолковываться как указывающая на какой-либо незаявленный элемент как существенный для практической реализации настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ выполнения анализа в режиме реального времени, причем способ предусматривает стадии:

(a) перемещения образца продукта, содержащего полипептиды, в колонку для связывания полипептидов через первый удерживающий змеевик;

(b) связывания полипептидов в образце с колонкой для связывания полипептидов, за счет чего полипептиды в образце отделяются от остальной части образца;

(c) перемещения раствора элюирующего буфера из источника буфера в колонку для связывания полипептидов через первый удерживающий змеевик и сквозь второй удерживающий змеевик, расположенные после колонки для связывания полипептидов, за счет чего полипептиды, связанные с колонкой для связывания полипептидов, элюируются и элюентная/полипептидная смесь, содержащая раствор элюирующего буфера и элюированные полипептиды, перемещается во второй удерживающий змеевик;

(d) перемещения элюентной/полипептидной смеси из второго удерживающего змеевика в реакционную камеру;

(e) инкубирования полипептидов в элюентной/полипептидной смеси в реакционной камере, что приводит к получению денатурированных полипептидов;

(f) перемещения восстанавливающего реагента, который расщепляет сшивающие дисульфидные связи, в реакционную камеру через первый удерживающий змеевик после (e);

(g) инкубирования денатурированных полипептидов с восстанавливающим реагентом в реакционной камере, что приводит к получению денатурированных и восстановленных полипептидов;

(h) перемещения алкилирующего реагента, который алкилирует сульфгидрильные группы, в реакционную камеру после (g);

(i) инкубирования денатурированных и восстановленных полипептидов с алкилирующим реагентом в реакционной камере, за счет чего денатурированные и восстановленные полипептиды алкилируются;

(j) перемещения денатурированных, восстановленных и алкилированных полипептидов, раствора элюирующего буфера, восстанавливающего реагента и алкилирующего реагента из реакционной камеры в обессоливающую колонку через первый удерживающий змеевик, при этом обессоливающая колонка уравновешена с помощью буфера для протеолиза;

(k) подачи денатурированных, восстановленных и алкилированных полипептидов в обессоливающую колонку, за счет чего денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды отделяются от восстанавливающего и алкилирующего реагентов и обеспечивается получение обессоленных полипептидов;

(l) перемещения обессоленных полипептидов в колонку с протеолитическими ферментами, расположенную после обессоливающей колонки;

(m) расщепления обессоленных полипептидов в третьей колонке для

полипептидов, что приводит к получению расщепленных полипептидов; и

(n) перемещения расщепленных полипептидов в аналитическое устройство для анализа расщепленных полипептидов.

2. Способ по п. 1, где одна или несколько из (a), (c), (d), (f), (h), (i), (l) и (n) выполняются автоматически.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где (a) - (n) выполняются в закрытой системе.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где (a) предусматривает установку многопортового клапана в первое положение, при котором первый удерживающий змеевик и колонка для связывания полипептидов соединены по текучей среде через первый порт многопортового клапана.

5. Способ по п. 4, где (d) предусматривает установку многопортового клапана во второе положение, при котором второй удерживающий змеевик и реакционная камера соединены по текучей среде через второй порт многопортового клапана.

6. Способ по п. 5, где каждая из (f) и (h) предусматривает установку многопортового клапана в третье положение, при котором первый удерживающий змеевик и реакционная камера соединены по текучей среде через третий порт многопортового клапана.

7. Способ по п. 6, где (j) предусматривает перемещение денатурированных, восстановленных и алкилированных полипептидов, раствора элюирующего буфера, восстанавливающего реагента и алкилирующего реагента из реакционной камеры в обессоливающую колонку через третий порт многопортового клапана и

установку многопортового клапана в четвертое положение, при котором первый удерживающий змеевик и обессоливающая колонка соединены по текучей среде через четвертый порт многопортового клапана.

8. Способ по любому из пп. 1-7, дополнительно предусматривающий, перед или во время (d), перемещение первого клапана, соединенного по текучей среде с реакционной камерой и помещенного после нее, в первое положение, при котором первый клапан направляет содержимое, полученное из первого удерживающего змеевика при превышении объема реакционной камеры, в камеру для отходов.

9. Способ по п. 8, дополнительно предусматривающий, после (i), перемещение первого клапана из первого положения во второе положение, при котором первый клапан направляет воздух в реакционную камеру.

10. Способ по любому из пп. 1-9, дополнительно предусматривающий, после (k) и перед (l), (o) перемещение второго клапана, соединенного по текучей среде с обессоливающей колонкой и колонкой с протеолитическими ферментами и помещенного между ними, из первого положения, при котором второй клапан направляет содержимое, полученное из обессоливающей колонки, в камеру для отходов, во второе положение, при котором второй клапан направляет содержимое, полученное из обессоливающей колонки, в колонку с протеолитическими ферментами.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где (а) предусматривает перемещение образца продукта из резервуара, содержащего полипептиды, в колонку для связывания полипептидов через первый удерживающий змеевик.

12. Способ по любому из пп. 1-11, дополнительно предусматривающий, перед (d), по меньшей мере частичное заполнение реакционной камеры денатурирующим реагентом, и где (е) предусматривает инкубирование полипептидов в элюентной/полипептидной смеси с денатурирующим реагентом в реакционной камере.

13. Способ по п. 12, где по меньшей мере частичное заполнение реакционной камеры денатурирующим реагентом предусматривает перемещение денатурирующего реагента из источника денатурирующего буфера в реакционную камеру через первый удерживающий змеевик.

14. Способ по любому из пп. 1-13, дополнительно предусматривающий подвод тепла к реакционной камере.

15. Способ по п. 12, где (j) дополнительно предусматривает перемещение денатурирующего реагента из реакционной камеры в обессоливающую колонку через первый удерживающий змеевик, и где на (k) денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды дополнительно отделяются от денатурирующего реагента.

16. Способ выполнения анализа в режиме реального времени с применением закрытой системы, содержащей многопортовый клапан, первый удерживающий змеевик, расположенный до многопортового клапана, колонку для связывания полипептидов, соединенную по текучей среде с первым портом многопортового клапана и расположенную после него, второй удерживающий змеевик, соединенный по текучей среде с колонкой для связывания полипептидов и расположенный после нее, реакционную камеру, соединенную по текучей среде со вторым и третьим портами многопортового клапана и расположенную после них, обессоливающую колонку, соединенную по текучей среде с четвертым портом многопортового клапана и расположенную после него, и колонку с протеолитическими ферментами, расположенную после обессоливающей колонки, при этом способ предусматривает:

(а) перемещение, под управлением контроллера, связанного коммуникационным взаимодействием с закрытой системой, образца продукта, содержащего полипептиды, в первый удерживающий змеевик;

(b) установку, под управлением контроллера, многопортового клапана в первое положение, при котором первый удерживающий змеевик соединен по текучей среде с колонкой для связывания полипептидов через первый порт многопортового клапана, так что образец перетекает в колонку, в результате чего полипептиды в образце связываются с колонкой для связывания полипептидов;

(с) когда многопортовый клапан находится в первом положении, перемещение, под управлением контроллера, раствора элюирующего буфера из источника раствора элюирующего буфера во второй удерживающий змеевик через колонку для связывания полипептидов, так что раствор элюирующего буфера элюирует практически все

полипептиды, связанные с колонкой для связывания полипептидов;

(d) перемещение, под управлением контроллера, многопортового клапана во второе положение, при котором второй удерживающий змеевик соединен с реакционной камерой через второй порт многопортового клапана;

(e) когда многопортовый клапан находится во втором положении, перемещение, под управлением контроллера, элюентной/полипептидной смеси, содержащей раствор элюирующего буфера и элюированные полипептиды, в реакционную камеру, в результате чего полипептиды в элюентной/полипептидной смеси денатурируются;

(f) перемещение, под управлением контроллера, многопортового клапана в третье положение, при котором первый удерживающий змеевик соединен с реакционной камерой через третий порт многопортового клапана;

(g) после (f) перемещение, под управлением контроллера, восстанавливающего реагента, который расщепляет сшивающие дисульфидные связи, в первый удерживающий змеевик и перемещение, под управлением контроллера, восстанавливающего реагента из первого удерживающего змеевика в реакционную камеру через третий порт многопортового клапана, за счет чего денатурированные полипептиды восстанавливаются;

(h) после (g) перемещение, под управлением контроллера, алкилирующего реагента, который алкилирует сульфгидрильные группы, в первый удерживающий змеевик и перемещение, под управлением контроллера, алкилирующего реагента из первого удерживающего змеевика в реакционную камеру через третий порт, за счет чего денатурированные и восстановленные полипептиды алкилируются;

(i) перемещение, под управлением контроллера, алкилированных полипептидов, раствора элюирующего буфера, восстанавливающего реагента и алкилирующего реагента из реакционной камеры в первый удерживающий змеевик через третий порт;

(j) перемещение, под управлением контроллера, многопортового клапана в четвертое положение, при котором первый удерживающий змеевик соединен с обессоливающей колонкой через четвертый порт многопортового клапана, и, когда многопортовый клапан находится в четвертом положении, перемещение алкилированных полипептидов, раствора элюирующего буфера, восстанавливающего реагента и алкилирующего реагента из первого удерживающего змеевика в обессоливающую колонку, в результате чего денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды вносятся в обессоливающую колонку, за счет чего денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды отделяются от восстанавливающего и алкилирующего реагентов, что приводит к получению обессоленных полипептидов;

(k) перемещение, под управлением контроллера, обессоленных полипептидов в колонку с протеолитическими ферментами, в результате чего обессоленные полипептиды расщепляются; и

(l) переход, под управлением контроллера, расщепленных полипептидов в аналитическое устройство, в результате чего осуществляется анализ расщепленных

полипептидов.

17. Способ по п. 16, где (а) предусматривает перемещение, под управлением контроллера, образца из резервуара, содержащего полипептиды, в первый удерживающий змеевик.

18. Способ по п. 16 или п. 17, где (к) предусматривает переход расщепленных полипептидов в аналитическое устройство, выбранное из группы, состоящей из устройства для жидкостной хроматографии, устройства для высокоэффективной жидкостной хроматографии, устройства для сверхэффективной жидкостной хроматографии, устройства для масс-спектрометрии, устройства для анализа гликанов или их комбинации.

19. Способ по любому из пп. 16-18, дополнительно предусматривающий, перед (е), перемещение, под управлением контроллера, многопортового клапана в третье положение и перемещение, под управлением контроллера, денатурирующего реагента в реакционную камеру.

20. Способ по п. 19, где перемещение денатурирующего реагента в реакционную камеру предусматривает перемещение, под управлением контроллера, денатурирующего реагента из источника денатурирующего буфера в первый удерживающий змеевик с помощью насоса и перемещение, под управлением контроллера, денатурирующего реагента из первого удерживающего змеевика в реакционную камеру через третий порт многопортового клапана.

21. Способ по п. 19 или п. 20, где (i) дополнительно предусматривает перемещение денатурирующего реагента из реакционной камеры в первый удерживающий змеевик через третий порт, и где (j) дополнительно предусматривает перемещение денатурирующего реагента из первого удерживающего змеевика в обессоливающую колонку и в результате чего, когда денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды вносятся в обессоливающую колонку, денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды дополнительно отделяются от денатурирующего реагента.

22. Закрытая система для выполнения встроенного анализа в режиме реального времени, содержащая:

первый удерживающий змеевик, смонтированный для приема по текучей среде образца продукта, содержащего полипептиды;

многопортовый клапан, соединенный по текучей среде с первым удерживающим змеевиком и помещенный после него;

колонку для связывания полипептидов, соединенную по текучей среде с многопортовым клапаном и смонтированную для приема образца из первого удерживающего змеевика через первый порт многопортового клапана, при этом колонка для связывания полипептидов выполнена с возможностью связывания полипептидов из образца,

источник буфера, соединенный по текучей среде с многопортовым клапаном и

смонтированный для подачи раствора элюирующего буфера во второй удерживающий змеевик, помещенный после колонки для связывания полипептидов, так что раствор элюирующего буфера обладает возможностью элюировать практически все полипептиды из колонки для связывания полипептидов;

реакционную камеру, соединенную по текучей среде с многопортовым клапаном и смонтированную после колонки для связывания полипептидов, при этом реакционная камера обладает возможностью приема смеси из колонки для связывания полипептидов через второй порт многопортового клапана, причем смесь содержит раствор элюирующего буфера и элюированные полипептиды, где полипептиды в смеси денатурируются в реакционной камере, где реакционная камера смонтирована для приема восстанавливающего реагента, который расщепляет сшивающие дисульфидные связи, через первый удерживающий змеевик и третий порт многопортового клапана, при этом восстанавливающий реагент восстанавливает денатурированные полипептиды, и где реакционная камера дополнительно смонтирована для приема алкилирующего реагента, который алкилирует сульфгидрильные группы, через первый удерживающий змеевик и третий порт многопортового клапана, где алкилирующий реагент алкилирует денатурированные и восстановленные полипептиды в реакционной камере;

обессоливающую колонку, соединенную по текучей среде с многопортовым клапаном и смонтированную для приема денатурированных, восстановленных и алкилированных полипептидов, раствора элюирующего буфера и алкилирующего реагента из реакционной камеры, причем обессоливающая колонка выполнена с возможностью отделять денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды от раствора элюирующего буфера, восстанавливающего реагента и алкилирующего реагента; и

колонку с протеолитическими ферментами, соединенную по текучей среде со второй колонкой для полипептидов и смонтированную после нее, для получения отделенных полипептидов из обессоливающей колонки, причем колонка с протеолитическими ферментами выполнена с возможностью расщепления обессоленных полипептидов.

23. Система по п. 22, дополнительно содержащая биореактор, выполненный с возможностью продуцирования продукта, содержащего полипептиды, где первый удерживающий змеевик соединен по текучей среде с биореактором.

24. Система по п. 22 или п. 23, где многопортовый клапан представляет собой клапан с 12 периферическими портами и центральным общим портом.

25. Система по любому из пп. 22-24, где колонка для связывания полипептидов выбрана из группы, состоящей из колонки с белком А, колонки с белком G, колонки с белком A/G, колонки с белком L, колонки для разделения аминокислот, колонки с авидином, колонки со стрептавидином, колонки для связывания углеводов, колонки для разделения углеводов, колонки с глутатионом, колонки с гепарином, колонки для гидрофобных взаимодействий, иммуноаффинной колонки, колонки для разделения

нуклеотидов/коферментов, специализированной колонки и колонки для аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных металлов (ИМАС).

26. Система по любому из пп. 22-25, дополнительно содержащая насос, выполненный с возможностью прокачивания образца продукта из биореактора в первый удерживающий змеевик.

27. Система по любому из пп. 22-26, где восстанавливающий реагент выбран из группы, состоящей из дитиотреитола (ДТТ), глутатиона, β -меркаптоэтанола (β -МЕ) и трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР).

28. Система по любому из пп. 22-27, где алкилирующий реагент представляет собой индол-3-уксусную кислоту (IAA).

29. Система по любому из пп. 22-28, где обессоливающая колонка представляет собой колонку для эксклюзионной хроматографии.

30. Система по любому из пп. 22-29, где колонка с протеолитическими ферментами содержит протеолитический фермент, и где протеолитический фермент представляет собой эндопептидазу.

31. Система по п. 30, где эндопептидаза выбрана из группы, состоящей из трипсина, химотрипсина, эластазы, термолизина, пепсина, глутамилэндопептидазы, неприлизина, протеазы Lys-C и протеазы V8 *Staphylococcus aureus*.

32. Система по любому из пп. 22-31, где реакционная камера по меньшей мере частично предварительно заполнена денатурирующим реагентом.

33. Система по п. 32, дополнительно содержащая насос, выполненный с возможностью прокачивания денатурирующего реагента из источника денатурирующего буфера в реакционную камеру через первый удерживающий змеевик.

34. Система по п. 32 или п. 33, где денатурирующий реагент предусматривает денатурирующий детергент или хаотроп.

35. Система по п. 34, где хаотроп выбран из группы, состоящей из мочевины, *n*-бутанола, этанола, хлорида гуанидиния, перхлората лития, ацетата лития, хлорида магния, фенола, 2-пропанола и тиомочевины.

36. Система по п. 34, где денатурирующий детергент выбран из группы, состоящей из додецилсульфата натрия (SDS), холата натрия, дезоксихолата натрия, гликохолата натрия, таурохолата натрия, тауродезоксихолата натрия, *N*-лауроилсаркозина, додецилсульфата лития, бромида гексадецилтриметиламмония (СТАВ) и бромида триметил(тетрадецил)аммония (ТТАВ).

37. Система по п. 36, где денатурирующий детергент представляет собой SDS.

38. Система по п. 32, где денатурирующий реагент предусматривает нагретую жидкость.

39. Система по любому из пп. 22-38, дополнительно содержащая нагревательный элемент, установленный непосредственно вблизи реакционной камеры, причем нагревательный элемент выполнен с возможностью подвода тепла к реакционной камере.

40. Система по п. 39, где тепло имеет температуру от приблизительно 22°C до

приблизительно 120°C.

41. Система по п. 40, где тепло имеет температуру приблизительно 40°C.

42. Система по любому из пп. 22-41, дополнительно содержащая первый клапан, соединенный по текучей среде с реакционной камерой и помещенный после нее, причем первый клапан может использоваться в первом положении, при котором первый клапан направляет содержимое, полученное из первого удерживающего змеевика при превышении объема реакционной камеры, в отходы, и во втором положении, при котором первый клапан направляет воздух в реакционную камеру.

43. Система по п. 42, дополнительно содержащая контроллер, связанный коммуникационным взаимодействием с первым клапаном для управления положением первого клапана, где контроллер перемещает первый клапан из первого положения во второе положение перед перемещением денатурированных, восстановленных и алкилированных полипептидов, раствора элюирующего буфера, денатурирующего реагента, восстанавливающего реагента и алкилирующего реагента из реакционной камеры в обессоливающую колонку.

44. Система по любому из пп. 22-43, дополнительно содержащая второй клапан, соединенный по текучей среде с обессоливающей колонкой и колонкой с протеолитическими ферментами и помещенный между ними, где второй клапан может использоваться в первом положении, при котором второй клапан направляет содержимое, полученное из обессоливающей колонки, в отходы, и во втором положении, при котором второй клапан направляет содержимое, полученное из обессоливающей колонки, в колонку с протеолитическими ферментами.

45. Система по п. 44, дополнительно содержащая контроллер, связанный коммуникационным взаимодействием со вторым клапаном для управления положением второго клапана, где контроллер перемещает второй клапан из первого положения во второе положение после того, как обессоливающая колонка отделила денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды от раствора элюирующего буфера, денатурирующего реагента, восстанавливающего реагента и алкилирующего реагента.

46. Система по любому из пп. 22-41, дополнительно содержащая контроллер, связанный коммуникационным взаимодействием с реакционной камерой, при этом контроллер выполнен с возможностью поддержания реакционной камеры при температуре примерно 40 градусов Цельсия.

47. Система по любому из пп. 22-41, дополнительно содержащая контроллер, связанный коммуникационным взаимодействием с многопортовым клапаном, причем контроллер выполнен с возможностью избирательно открывать и закрывать первый, второй, третий и четвертый порты многопортового клапана.

48. Закрытая система для выполнения анализа в режиме реального времени, содержащая:

многопортовый клапан;

первый удерживающий змеевик, расположенный до многопортового клапана;

колонку для связывания полипептидов, соединенную по текучей среде с первым портом многопортового клапана и расположенную после него;

второй удерживающий змеевик, соединенный по текучей среде с колонкой для связывания полипептидов и расположенный после нее;

реакционную камеру, соединенную по текучей среде со вторым и третьим портами многопортового клапана и расположенную после них;

обессоливающую колонку, соединенную по текучей среде с четвертым портом многопортового клапана и расположенную после него;

колонку с протеолитическими ферментами, расположенную после обессоливающей колонки; и

контроллер, связанный коммуникационным взаимодействием с многопортовым клапаном и содержащий запоминающее устройство, процессор и алгоритм, хранящийся в запоминающем устройстве и исполняемый процессором для:

(a) перемещения образца продукта, содержащего полипептиды, в первый удерживающий змеевик;

(b) установки многопортового клапана в первое положение, при котором первый удерживающий змеевик соединен по текучей среде с колонкой для связывания полипептидов через первый порт многопортового клапана, так что образец перетекает в первую колонку, в результате чего полипептиды в образце связываются с колонкой для связывания полипептидов;

(c) когда многопортовый клапан находится в первом положении, перемещения раствора элюирующего буфера из источника раствора элюирующего буфера во второй удерживающий змеевик через колонку для связывания полипептидов, так что раствор элюирующего буфера элюирует практически все полипептиды, связанные с колонкой для связывания полипептидов;

(d) перемещения многопортового клапана во второе положение, при котором второй удерживающий змеевик соединен с реакционной камерой через второй порт многопортового клапана;

(e) когда многопортовый клапан находится во втором положении, перемещения элюентной/полипептидной смеси, содержащей раствор элюирующего буфера и элюированные полипептиды, в реакционную камеру, в результате чего полипептиды в элюентной/полипептидной смеси денатурируются;

(f) перемещения многопортового клапана в третье положение, при котором первый удерживающий змеевик соединен с реакционной камерой через третий порт многопортового клапана;

(g) после (f), перемещения восстанавливающего реагента, который расщепляет дисульфидные связи, в первый удерживающий змеевик и перемещения восстанавливающего реагента из первого удерживающего змеевика в реакционную камеру через третий порт многопортового клапана, за счет чего денатурированные полипептиды восстанавливаются;

(h) после (g), перемещения алкилирующего реагента, который алкилирует сульфгидрильные группы, в первый удерживающий змеевик и перемещения алкилирующего реагента из первого удерживающего змеевика в реакционную камеру через третий порт, за счет чего денатурированные и восстановленные полипептиды алкилируются;

(i) перемещения денатурированных, восстановленных и алкилированных полипептидов, раствора элюирующего буфера, восстанавливающего реагента и алкилирующего реагента из реакционной камеры в первый удерживающий змеевик через третий порт;

(j) перемещения многопортового клапана в четвертое положение, при котором первый удерживающий змеевик соединен с обессоливающей колонкой через четвертый порт многопортового клапана, и, когда многопортовый клапан находится в четвертом положении, перемещения денатурированных, восстановленных и алкилированных полипептидов, раствора элюирующего буфера, восстанавливающего реагента и алкилирующего реагента из первого удерживающего змеевика в обессоливающую колонку, в результате чего денатурированные, восстановленные и алкилированные полипептиды подвергаются обессоливанию;

(k) перемещения обессоленных полипептидов в колонку с протеолитическими ферментами, в результате чего обессоленные полипептиды расщепляются; и

(l) перехода расщепленных полипептидов в устройство для анализа гликанов, в результате чего расщепленные полипептиды подвергаются разделению и количественной оценке.

49. Система по п. 48, где колонка для связывания полипептидов выбрана из группы, состоящей из колонки с белком А, колонки с белком G, колонки с белком A/G, колонки с белком L, колонки для разделения аминокислот, колонки с авидином, колонки со стрептавидином, колонки для связывания углеводов, колонки для разделения углеводов, колонки с глутатионом, колонки с гепарином, колонки для гидрофобных взаимодействий, иммуноаффинной колонки, колонки для разделения нуклеотидов/коферментов, специализированной колонки и колонки для аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных металлов (IMAC).

50. Система по п. 48 или п. 49, дополнительно содержащая насос, выполненный с возможностью прокачивания образца продукта из биореактора, содержащего продукт, в первый удерживающий змеевик.

51. Система по любому из пп. 48-50, где восстанавливающий реагент выбран из группы, состоящей из дитиотреитола (ДТТ), глутатиона, β -меркаптоэтанола (β -МЕ) и трис(2-карбоксиитил)фосфина (ТСЕР).

52. Система по п. 48, где алкилирующий реагент представляет собой индол-3-уксусную кислоту (IAA).

53. Система по п. 48, где обессоливающая колонка представляет собой колонку для эксклюзионной хроматографии.

54. Система по п. 48, где колонка с протеолитическими ферментами содержит протеолитический фермент, и где протеолитический фермент представляет собой эндопротеазу.

55. Система по п. 54, где эндопротеаза выбрана из группы, состоящей из трипсина, химотрипсина, эластазы, термолизина, пепсина, глутамилэндопептидазы, неприлизина, протеазы Lys-C и протеазы V8 *Staphylococcus aureus*.

56. Система по п. 48, где перед (е) алгоритм, исполняемый процессором, перемещает многопортовый клапан в третье положение и перемещает денатурирующий реагент в реакционную камеру.

57. Система по п. 56, где алгоритм, исполняемый процессором, перемещает денатурирующий реагент из источника денатурирующего буфера в первый удерживающий змеевик с помощью насоса, смонтированного до первого удерживающего змеевика, и перемещает денатурирующий реагент из первого удерживающего змеевика в реакционную камеру через третий порт многопортового клапана.

58. Система по п. 56 или п. 57, где денатурирующий реагент предусматривает денатурирующий детергент или хаотроп.

59. Система по п. 58, где хаотроп выбран из группы, состоящей из мочевины, н-бутанола, этанола, хлорида гуанидиния, перхлората лития, ацетата лития, хлорида магния, фенола, 2-пропанола и тиомочевины.

60. Система по п. 58, где денатурирующий детергент выбран из группы, состоящей из додецилсульфата натрия (SDS), холата натрия, дезоксихолата натрия, гликохолата натрия, таурохолата натрия, тауродезоксихолата натрия, N-лауроилсаркозина, додецилсульфата лития, бромида гексадецилтриметиламмония (СТАВ) и бромида триметил(тетрадецил)аммония (ТТАВ).

61. Система по п. 60, где денатурирующий детергент представляет собой SDS.

62. Система по п. 57 или п. 58, где денатурирующий реагент предусматривает нагревание.

63. Система по любому из пп. 56-62, где, перед или во время (е), алгоритм, исполняемый процессором, подводит тепло к реакционной камере.

64. Система по п. 62 или п. 63, где тепло имеет температуру от приблизительно 22°C до приблизительно 120°C.

65. Система по п. 64, где тепло имеет температуру приблизительно 40°C.

66. Система по п. 48, дополнительно содержащая первый клапан, соединенный по текучей среде с реакционной камерой и помещенный после нее, где первый клапан может использоваться в первом положении, при котором первый клапан направляет содержимое, полученное из первого удерживающего змеевика при превышении объема реакционной камеры, в камеру для отходов, и во втором положении, при котором первый клапан направляет воздух в реакционную камеру, где контроллер связан коммуникационным взаимодействием с первым клапаном для управления положением первого клапана, где контроллер перемещает первый клапан из первого положения во второе положение после

(h).

67. Система по п. 48, дополнительно содержащая второй клапан, соединенный по текучей среде с обессоливающей колонкой и колонкой с протеолитическими ферментами и помещенный между ними, где второй клапан может использоваться в первом положении, при котором второй клапан направляет содержимое, полученное из обессоливающей колонки, в камеру для отходов, и во втором положении, при котором второй клапан направляет содержимое, полученное из обессоливающей колонки, в колонку с протеолитическими ферментами, где контроллер связан коммуникационным взаимодействием со вторым клапаном для управления положением второго клапана, где контроллер перемещает второй клапан из первого положения во второе положение после (j).

68. Система по п. 48, где контроллер связан коммуникационным взаимодействием с реакционной камерой, при этом контроллер выполнен с возможностью поддержания реакционной камеры при температуре примерно 40°C.

69. Способ по пп. 1-21 или система по пп. 22-68, где полипептид из продукта представляет собой терапевтический полипептид.

70. Способ или система по п. 69, где терапевтический полипептид выбран из группы, состоящей из антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, производного антитела или фрагмента антитела и слитого полипептида.

71. Способ или система по п. 70, где антитело выбрано из группы, состоящей из инфликсимаба, бевацизумаба, ранибизумаба, цетуксимаба, ранибизумаба, паливизумаба, абаговомаба, абциксимаба, актоксумаба, адалимумаба, афелимомаба, афутузумаба, алацизумаба, алацизумаба пегола, ald518, алемтузумаба, алирокумаба, алемтузумаба, альтумомаба, аматуксимаба, анатумомаба мафенатокса, анрукинзумаба, аполизумаба, арцитумомаба, азелизумаба, алтинумаба, атлизумаба, аторолимиумаба, тоцилизумаба, бапинеузумаба, базиликсимаба, бавитуксимаба, бектумомаба, белимумаба, бенрализумаба, бертилимумаба, безилесомаба, бевацизумаба, безлотоксумаба, бициромаба, биватузумаба, биватузумаба мертанзина, блинатумомаба, блосозумаба, брентуксимаба ведотина, бриакинумаба, бродалумаба, канакинумаба, кантузумаба мертанзина, кантузумаба мертанзина, каплацизумаба, капромаба пендетида, карлумаба, катумаксомаба, сс49, цеделизумаба, цертолизумаба пегола, цетуксимаба, цитатузумаба богатокса, циксутумумаба, клазакизумаба, кленоликсимаба, кливатузумаба тетраксетана, конатумумаба, кренезумаба, сгб261, дацетузумаба, даклизумаба, далотузумаба, даратумумаба, демцизумаба, деносумаба, детумомаба, дорлимомаба аритокса, дрозитумаба, дулиготумаба, дупилумаба, экромексимаба, экулизумаба, эдобакомаба, эдреколомаба, эфализумаба, эфунгумаба, элотузумаба, элсилимомаба, энаватузумаба, энлимомаба пегола, энокизумаба, энокизумаба, энотикумаба, энотикумаба, энситуксимаба, эпитумомаба цитуксетана, эпратузумаба, эрлизумаба, эртумаксомаба, этарацизумаба, этролизумаба, эксбивирумаба, эксбивирумаба, фанолесомаба, фаралимомаба, фарлетузумаба, фасинумаба, fbta05, фелвизумаба, фезакинумаба,

фиклатузумаба, фигитумумаба, фланвотумаба, фонтолизумаба, форалумаба, форавирумаба, фрезолимумаба, фулранумаба, футуксимаба, галиксимаба, ганитумаба, гантенерумаба, гавилимомаба, гемтузумаба озогамидина, гевокизумаба, гирентуксимаба, глембатумумаба ведотина, голимумаба, гомиликсимаба, gs6624, ибализумаба, ибритумумаба тиуксетана, икрукумаба, иговомаба, имциромаба, имгатузумаба, инклакумаба, индатуксимаба равтанзина, инфликсимаба, интетумумаба, инолимомаба, инотузумаба озогамидина, ипилимумаба, иратумумаба, итолизумаба, иксекизумаба, келиксимаба, лабетузумаба, лебрикизумаба, лемалезомаба, лерделимумаба, лексатумумаба, либивирумаба, лигелизумаба, линтузумаба, лирилумаба, лорвотузумаба мертанзина, лукатумумаба, лумиликсимаба, мапатумумаба, маслимомаба, маврилимумаба, матузумаба, меполизумаба, метелимумаба, милатузумаба, минретумумаба, митумумаба, могамулизумаба, моролимумаба, мотавизумаба, моксетумумаба пасудотокса, муромонаба-cd3, наколомаба тафенатокса, намилумаба, наптумумаба эстафенатокса, нарнутумаба, натализумаба, небакумаба, нецитумумаба, нерелимомаба, несвакумаба, нимотузумаба, ниволумаба, нофетумумаба мерпентана, окаратузумаба, окрелизумаба, одулимомаба, офатумумаба, оларатумаба, олокизумаба, омализумаба, онартузумаба, опортузумаба монатокса, ореговомаба, ортикумаба, отеликсизумаба, окселумаба, озанезумаба, озорализумаба, пагибаксимаба, паливизумаба, панитумумаба, панобакумаба, парсатузумаба, пасколизумаба, патеклизумаба, патритумаба, пемтумумаба, перакизумаба, пертузумаба, пекселизумаба, пидилизумаба, пинтумумаба, плакулумаба, понезумаба, приликсимаба, притумумаба, PRO 140, квилизумаба, ракотумумаба, радретумаба, рафивирумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, раксибакумаба, регавирумаба, реслизумаба, рилотумумаба, ритуксимаба, робатумумаба, роледумаба, ромосозумаба, ронтализумаба, ровелизумаба, руплизумаба, самализумаба, сарилумаба, сатумумаба пендетид, секукинумаба, севирумаба, сибротузумаба, сифалимумаба, силтуксимаба, симтузумаба, сиплизумаба, сирукумаба, соланезумаба, солитомаба, сонепцизумаба, сонтузумаба, стамулумаба, сулесомаба, сувизумаба, табалумаба, такатузумаба тетракетана, тадоцизумаба, тализумаба, танезумаба, таплитумумаба паптокса, тефибазумаба, телимомаба аритокса, тенатумумаба, тефибазумаба, телимомаба аритокса, тенатумумаба, тенеликсимаба, теплизумаба, тепротумумаба, тезепелумаба, TGN1412, тремелимумаба, тицилимумаба, тилдракизумаба, тигатузумаба, TNX-650, тоцилизумаба, торализумаба, тозитумумаба, тралокинумаба, трастузумаба, TRBS07, трегализумаба, тремелимумаба, тукотузумаба целмолейкина, тувирумаба, ублитуксимаба, урелумаба, уртоксазумаба, устекинумаба, вапаликсимаба, вателизумаба, ведолизумаба, велтузумаба, вепалимомаба, весенкумаба, висилизумаба, волоциксимаба, ворсетузумаба мафодотина, вотумумаба, залутумумаба, занолимумаба, затуксимаба, зиралимумаба, золимомаба аритокса и тех антител, которые показаны в таблице 1.

72. Способ или система по п. 70, где терапевтический полипептид представляет собой полипептид, выбранный из группы, состоящей из гликопротеина, полипептида CD,

полипептида рецептора HER, полипептида клеточной адгезии, полипептида фактора роста, полипептида инсулина, родственного инсулину полипептида, коагуляционного полипептида, родственного коагуляционному полипептида, альбумина, IgE, антигена группы крови, колониестимулирующего фактора, рецептора, нейротрофического фактора, интерферона, интерлейкина, вирусного антигена, липопротеина, кальцитонина, глюкагона, атриального натрийуретического фактора, легочного сурфактанта, фактора некроза опухоли-альфа и -бета, энкефалиназы, ассоциированного с мышинным гонадотропином пептида, ДНКазы, ингибина, активина, интегрина, белка А, белка D, ревматоидного фактора, иммунотоксина, костного морфогенетического белка, супероксиддисмутазы, поверхностного мембранного полипептида, фактора ускорения распада, белка оболочки вируса, вызывающего СПИД, транспортного полипептида, «хоминг»-рецептора, адрессина, регуляторного полипептида, иммуноадгезина, миостатина, полипептида TALL, амилоидного полипептида, стромального лимфопоэтина тимуса, лиганда RANK, полипептида c-kit, рецептора TNF и ангиопоэтина, а также их биологически активных фрагментов, аналогов или вариантов.

73. Способ отслеживания встроенного анализа в режиме реального времени, выполняемого закрытой системой по п. 22 или п. 48, причем способ предусматривает:

определение того, удовлетворяют ли условия в закрытой системе заранее заданному пороговому значению производительности; и

если определено, что условия в закрытой системе не удовлетворяют заранее заданному пороговому значению производительности, корректировку по меньшей мере одного компонента культуры клеток до тех пор, пока условия в закрытой системе не будут удовлетворять заранее заданному пороговому значению производительности.

74. Способ по п. 73, где корректировка по меньшей мере одного компонента культуры клеток включает регуляцию одного или нескольких из рН, давления, температуры, потока среды, состава среды, стратегии снабжения газами, перемешивания, состава добавок, скорости подачи добавок или скорости перфузии.

75. Способ продления производственного цикла с применением закрытой системы по п. 22 или п. 48, причем способ предусматривает:

определение того, удовлетворяют ли условия в закрытой системе заранее заданному пороговому значению производительности; и

если определено, что условия в закрытой системе не удовлетворяют заранее заданному пороговому значению производительности, корректировку по меньшей мере одного компонента культуры клеток до тех пор, пока условия в закрытой системе не будут удовлетворять заранее заданному пороговому значению производительности.

76. Способ по п. 75, где корректировка по меньшей мере одного компонента культуры клеток включает регуляцию одного или нескольких из рН, давления, температуры, потока среды, состава среды, стратегии снабжения газами, перемешивания, состава добавок, скорости подачи добавок или скорости перфузии.

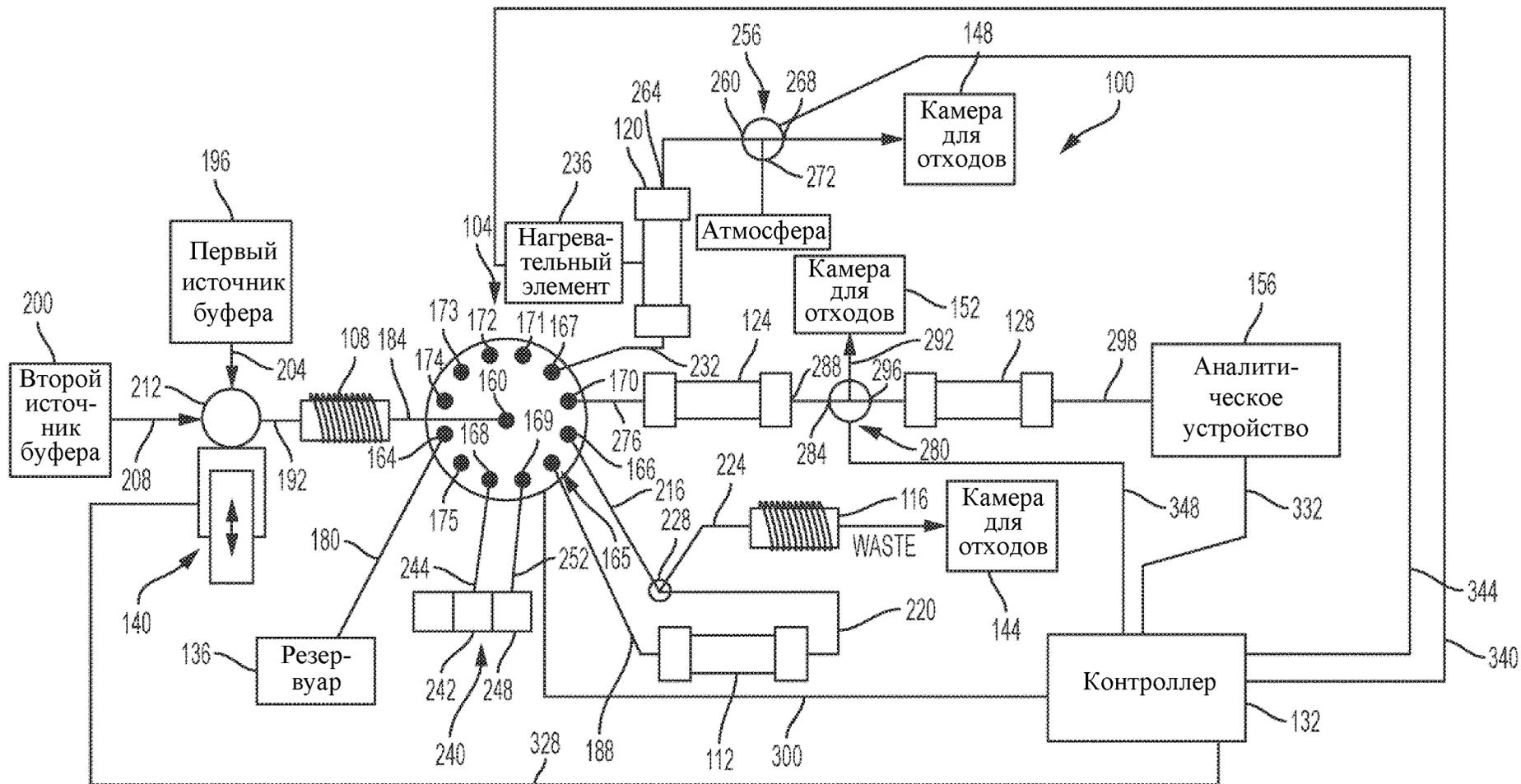
77. Способ снижения риска, при этом способ предусматривает:

определение данных процесса и качества продукта, ассоциированных с работой закрытой системы по п. 22 или п. 48;

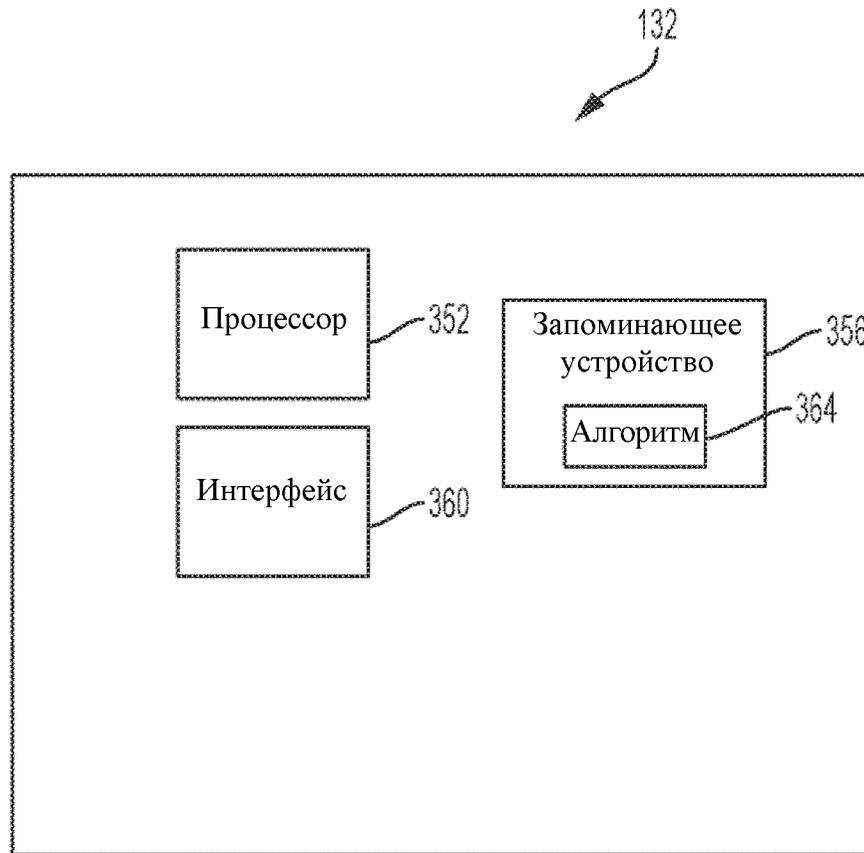
определение того, соответствуют ли данные процесса и качества продукта заранее заданному пороговому значению риска; и

определение того, продолжать, корректировать или прекратить ли работу закрытой системы на основе того, удовлетворяют ли данные процесса и качества продукта заранее заданному пороговому значению риска.

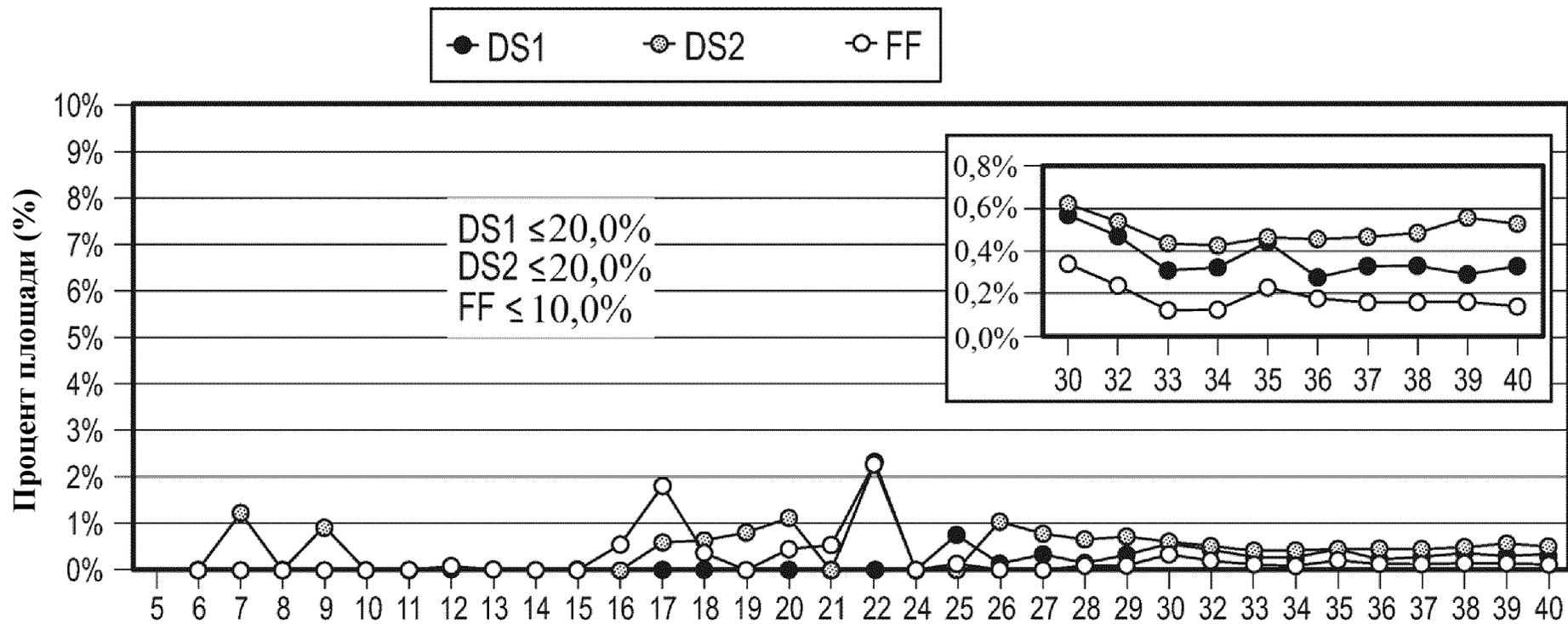
По доверенности



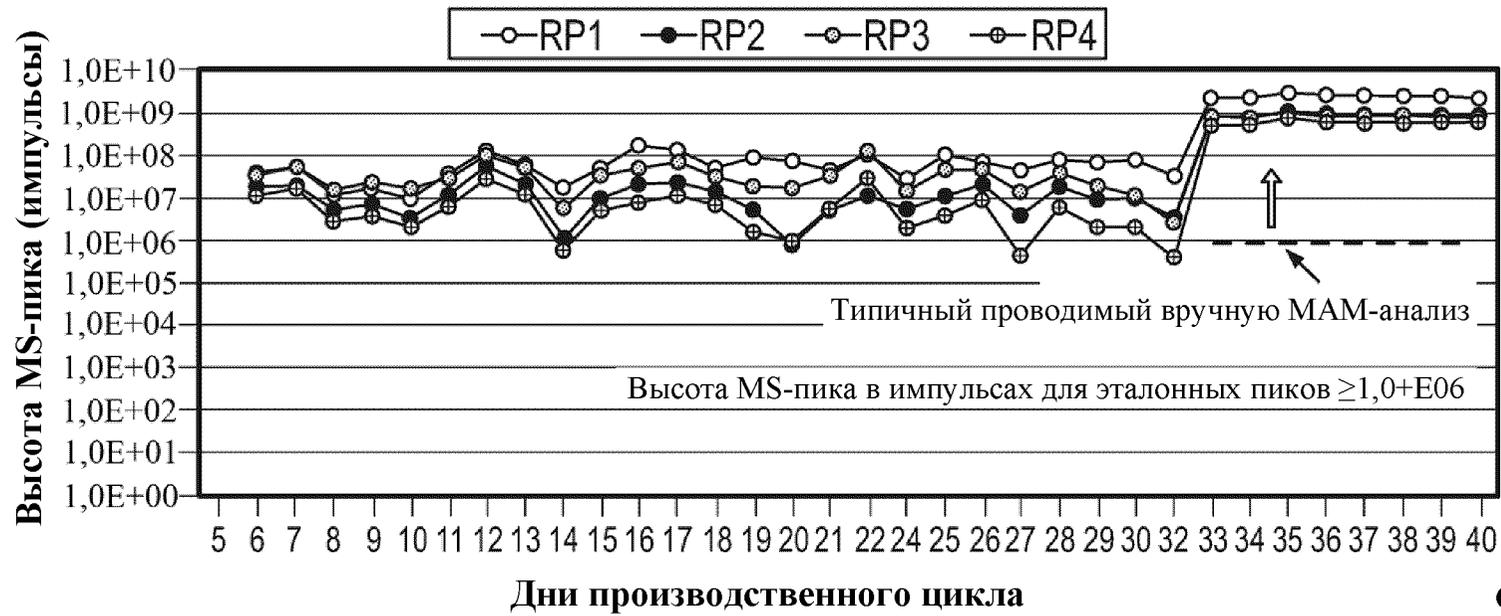
ФИГ. 1



ФИГ. 2

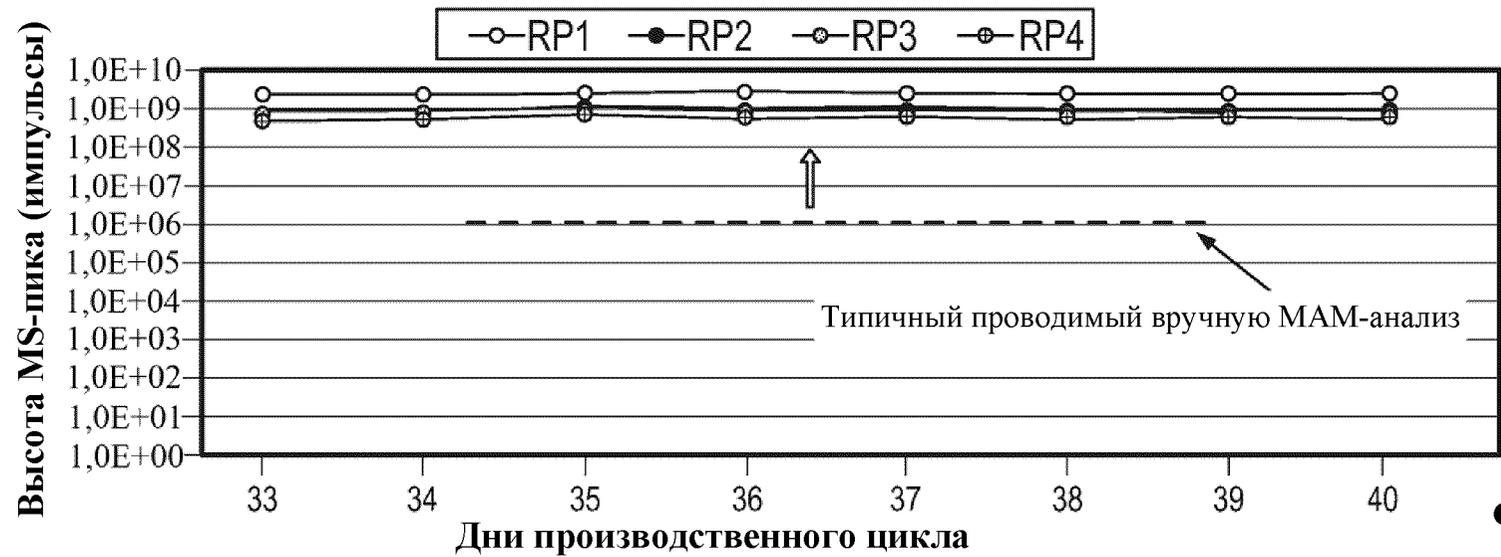


ФИГ. 3А



ФИГ. 3В

4/4



ФИГ. 3С