(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202391026 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.29

(22) Дата подачи заявки
2021.10.01

(51) Int. Cl. ***B01D 15/18*** (2006.01)
B01D 15/24 (2006.01)
B01D 15/32 (2006.01)
C07K 1/20 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
A61L 2/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) НЕПРЕРЫВНАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ С УДЕРЖАНИЕМ ВИРУСОВ

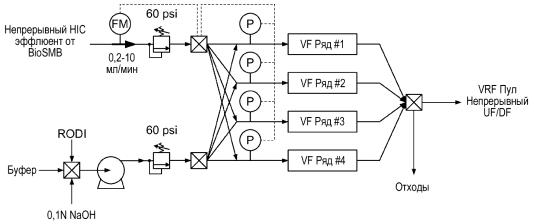
(31) **63/087,037; 63/109,942**
(32) **2020.10.02; 2020.11.05**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/053260**
(87) **WO 2022/072899 2022.04.07**

(71) Заявитель:
РИДЖЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Браун Росс, Шнайдер Эрик (US)

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

(57) В изобретении предлагаются способы и системы для очистки от вирусов для очистки антитела из образца, содержащего одну или большее количество примесей, включая вирусные частицы. Указанный способ проводят в системе, которая включает колонку для гидрофобной хроматографии (HIC) и систему фильтрации с удержанием вируса (VRF). Колонка HIC и система VRF соединены в линию в системе непрерывной обработки, а система VRF содержит по меньшей мере два параллельных ряда фильтров.



202391026 A1

202391026 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577800EA/072

НЕПРЕРЫВНАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ С УДЕРЖАНИЕМ ВИРУСОВ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет и преимущество по предварительной патентной заявке США № 63/087,037, поданной 2 октября 2020 года, и предварительной патентной заявке США № 63/109,942, поданной 5 ноября 2020 года, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылок.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение в целом относится к способам и системам для очистки антитела из образца, содержащего одну или большее количество примесей, включая вирусные частицы. Указанный способ можно проводить в системе непрерывной обработки, которая включает колонку для гидрофобной хроматографии и систему фильтрации, удерживающую вирусы.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Очистка от вирусов имеет решающее значение для изготовления биофармацевтических продуктов, поскольку биологические продукты доступны для бактерий, грибов и вирусов с риском передачи вирусных заболеваний. Органы здравоохранения во всем мире требуют оценки качества очистки от вирусов при изготовлении биологических или биотехнологических продуктов, поскольку контаминация вирусами может усиливаться во время роста культур клеток млекопитающих. Эффективные исследования по очистке от вирусов являются важной частью валидации процесса, которая имеет решающее значение для обеспечения безопасности лекарственных средств. Контаминация вирусами может также повлиять на сырье, процессы культивирования клеток, биореактор и последующие процессы очистки.

Валидационные исследования по очистке от вирусов предназначены для документирования выбранных рабочих условий в отношении качества продукта для обеспечения противовирусной безопасности. Экспериментальный дизайн исследований по очистке от вирусов включает критически важные характеризации производственного процесса для определения существенных параметров процесса, чтобы улучшить понимание условий обработки и обосновать выбор условий «наихудшего случая».

Существует потребность в изготовлении биологических продуктов в больших коммерческих масштабах путем преобразования обработки в периодическом режиме в непрерывную обработку. Чтобы предлагаемая непрерывная обработка соответствовала нормативным требованиям, необходимо обеспечить противовирусную безопасность. Процессы инактивации или удаления вирусов включают обработку посредством pH, тепловую обработку, обработку растворителем/детергентом, фильтрацию или хроматографию. Этапы фильтрации считаются надежными этапами очистки от вирусов, поскольку механизм удаления основан на размерах пор фильтров.

Следует понимать, что существует потребность в разработке способов и систем для

эффективного включения очистки от вирусов и тестирования непрерывной обработки биологических продуктов.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В этом изобретении предлагаются способы и системы для включения очистки от вирусов и тестирования во время очистки антител из образца, содержащего одну или большее количество примесей, включая вирусные частицы, в системе непрерывной обработки. Предлагаемая система непрерывной обработки включает колонку гидрофобной хроматографии (HIC), которая соединена с системой фильтрации для удержания вируса (VRF).

В настоящем изобретении предлагается способ очистки антитела из образца, содержащего одну или большее количество примесей, включая вирусные частицы, при этом указанный способ включает: получение образца, содержащего антитело, и загрузку образца в колонку HIC, которая подключена к системе VRF, при этом колонка HIC и система VRF соединены в линию в системе непрерывной обработки, при этом система VRF включает по меньшей мере два параллельных ряда фильтров. В некоторых типовых вариантах осуществления способ по настоящей заявке дополнительно включает этап однопроходной тангенциальной проточной фильтрации и/или предварительной фильтрации. В некоторых типовых вариантах осуществления способность способа по настоящей заявке к снижению вирусной нагрузки составляет по меньшей мере 4 LRV (логарифмическое значение снижения).

В некоторых аспектах каждый из по меньшей мере двух рядов фильтров запланирован на определенный момент времени для заполнения, уравновешивания, фильтрации, промывки, проверки на целостность, дезинфекции, нейтрализации или хранения. В некоторых аспектах каждый из по меньшей мере двух рядов фильтров включается или выключается в зависимости от объемной пропускной способности или конечного значения давления, и запланирован для работы в разные временные интервалы. В других аспектах каждый из по меньшей мере двух рядов фильтров содержит по меньшей мере один фильтр, при этом указанный фильтр выполняет фильтрацию через среду, фильтрацию через мембрану, функциональную фильтрацию, хроматографическую фильтрацию или фильтрацию с исключением по размеру. В других аспектах система VRF работает при постоянном потоке или постоянном давлении при внешнем питающем потоке. В других аспектах система VRF работает при постоянном потоке от около 10 до около 100 литров/м^2/час (LMH). В некоторых аспектах система VRF работает при постоянном потоке около 90 LMH.

В настоящем изобретении, по меньшей мере частично, предлагается система непрерывной обработки для очистки антитела из образца, содержащего одну или большее количество примесей, включая вирусные частицы, причем указанная система непрерывной обработки содержит: колонку для гидрофобной хроматографии (HIC) и систему фильтрации для удержания вируса (VRF); при этом колонка HIC и система VRF соединены в линию, при этом образец загружается в колонку HIC, и при этом система

VRF содержит по меньшей мере два параллельных ряда фильтров. В некоторых аспектах система непрерывной обработки по настоящей заявке дополнительно включает однопроходную тангенциальную проточную фильтрацию и/или предварительную фильтрацию. В других аспектах способность системы непрерывной обработки по настоящей заявке снижать вирусную нагрузку составляет по меньшей мере 4 LRV (логарифмическое значение снижения).

В некоторых аспектах каждый из по меньшей мере двух рядов фильтров запланирован на определенный момент времени для заполнения, уравновешивания, фильтрации, промывки, проверки на целостность, дезинфекции, нейтрализации или хранения. В некоторых аспектах каждый из по меньшей мере двух рядов фильтров включается или выключается в зависимости от объемной пропускной способности или конечного значения трансмембранного давления, и запланирован для работы в разные временные интервалы. В других аспектах каждый из по меньшей мере двух рядов фильтров содержит по меньшей мере один фильтр, при этом указанный фильтр выполняет фильтрацию через среду, фильтрацию через мембрану, функциональную фильтрацию, хроматографическую фильтрацию или фильтрацию с исключением по размеру. В других аспектах система VRF работает при постоянном потоке или постоянном давлении под внешним потоком подачи. В других аспектах система VRF работает при постоянном потоке от около 10 до около 100 LMH. В некоторых аспектах система VRF работает при постоянном потоке около 90 LMH.

Эти и другие аспекты изобретения будут лучше оценены и поняты при рассмотрении вместе со следующим описанием и прилагаемыми графическими материалами. Следующее описание, хотя и указывает на различные варианты осуществления и их многочисленные конкретные детали, предлагается в качестве иллюстрации, а не ограничения. Многие замены, модификации, добавления или перестановки могут быть выполнены в пределах объема настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 продемонстрирована конструкция системы фильтрации для удержания вирусов (VRF), которая может быть соединена с HIC и однопроходной тангенциальной проточной фильтрацией (SPTFF) согласно типовому варианту осуществления. Система VRF может быть реализована с применением одного или большего количества фильтров для мелких вирусов для снижения уровней парвовирусов и более крупных вирусов в технологическом процессе путем исключения по размеру согласно типовому варианту осуществления.

На Фиг. 2 продемонстрирована конструкция системы непрерывной VRF небольших масштабов, содержащей множество фильтров, которые могут быть соединены с непрерывной HIC и однопроходной тангенциальной проточной фильтрацией (SPTFF) согласно типовому варианту осуществления. Система непрерывной VRF может быть реализована с применением одного или большего количества фильтров для мелких вирусов для снижения уровней парвовирусов и более крупных вирусов в технологическом

процессе путем исключения по размеру согласно типовому варианту осуществления.

На Фиг. 3 продемонстрирован дисплей мониторинга системы непрерывной VRF, содержащей два или большее количество параллельных рядов фильтров согласно типовому варианту осуществления. Ряды фильтров системы непрерывной VRF могут находиться в различных состояниях, таких как фильтрация, промывка буфером или заполнение фильтра согласно типовому варианту осуществления.

На Фиг. 4 продемонстрирована система непрерывной VRF для очистки от вирусов, включающая два или большее количество параллельных рядов фильтров согласно типовому варианту осуществления. Каждый ряд фильтров запланирован для различных этапов в определенные моменты времени в соответствии с логикой управления непрерывной VRF, например, этап заполнения буфером, уравновешивания, фильтрации, промывки буфером или проверки на целостность согласно типовому варианту осуществления.

На Фиг. 5 продемонстрирована производительность системы обработки для очистки моноклонального антитела с помощью HIC, которая была соединена в линию с системой VRF согласно типовому варианту осуществления. Производительность системы обработки оценивали на основе VRF ΔP (psi) в зависимости от пропускной способности фильтра для улавливания вируса (л/м^2) для трех хроматографических циклов согласно типовому варианту осуществления.

На Фиг. 6 продемонстрирована производительность системы VRF при работе с постоянным давлением, указывающая на 56,6%-ное затухание потока при пропускной способности 1000 л/м^2 с более чем 4,6 LRV согласно типовому варианту осуществления.

На Фиг. 7 продемонстрирована производительность системы VRF при работе с постоянным потоком, указывающая на отсутствие обнаруживаемого повышения давления (менее 1,5 psi) при пропускной способности 1000 л/м^2 с LRV более 5,2 согласно типовому варианту осуществления.

На Фиг. 8 продемонстрирована производительность системы VRF при постоянном давлении согласно типовому варианту осуществления. Терминальное затухание потока измерялось в зависимости от различных условий работы.

На Фиг. 9 продемонстрирована производительность системы VRF при постоянном потоке и постоянном давлении согласно типовому варианту осуществления. Результаты были проанализированы при постоянном потоке и постоянном давлении с точки зрения проницаемости фильтра в зависимости от пропускной способности фильтра.

На Фиг. 10 продемонстрированы примеры разработки исследований по очистке от вирусов для характеризации пространства проектирования для систем непрерывной VRF согласно типовому варианту осуществления. Вирусы добавляли в непрерывный процесс, который включал HIC, префильтр и Viresolve® Pro согласно типовому варианту осуществления.

На Фиг. 11 продемонстрирована стратегия управления данными и контроля системы непрерывной VRF согласно типовому варианту осуществления.

На Фиг. 12 продемонстрирован дизайн исследования стабильности минутного вируса мышей (MVM) в условиях низкого pH согласно типовому варианту осуществления.

На Фиг. 13 продемонстрирован дизайн исследования стабильности MVM в условиях высокого pH согласно типовому варианту осуществления.

На Фиг. 14 продемонстрированы результаты исследований стабильности MVM в условиях низкого и высокого pH с низкой или высокой концентрацией цитрата на основе LRF MVM (Log10) в зависимости от момента времени (часы)согласно типовому варианту осуществления.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Поскольку контаминация вирусами может усиливаться во время выращивания культуры клеток млекопитающих или вирусы могут проникать из контаминированного оборудования во время обработки, оценка качества очистки от вирусов при изготовлении биологических или биотехнологических продуктов важна для обеспечения безопасности лекарственных средств. Органы здравоохранения предоставили руководство по управлению рисками пациентов для оценки того, очищает ли этап от вируса - зная, как происходит очищение, когда этапы осуществляются независимо друг от друга, являются ли их возможности аддитивными или нет, и зная, что влияет на производительность. Оценка очистки от вирусов должна включать демонстрацию удаления конкретного модельного вируса для ретровирусоподобных частиц, присущих геному клеток яичника китайского хомяка (CHO) (Anderson et al., Endogenous origin of defective retroviruslike particles from a recombinant Chinese hamster ovary cell line, Virology 181(1): 305-311, 1991).

Фильтры для улавливания вирусов широко применяются в области биотехнологии для снижения риска контаминации вирусами биофармацевтических препаратов. Система непрерывной фильтрации для удержания вируса (VRF) может быть соединена с колонкой для гидрофобной хроматографии (HIC), как продемонстрировано на Фиг. 1. В настоящей заявке предлагается система непрерывной VRF в небольших и производственных масштабах для работы в условиях непрерывной обработки, которая может быть подключена к колонке HIC и/или системе однопроходной тангенциальной проточной фильтрации (SPTFF), как продемонстрировано на Фиг. 2. Система непрерывной VRF по настоящей заявке может соответствовать критериям по очистке от вирусов для минимизации вероятности контаминации вирусами в процессе изготовления биофармацевтических препаратов в рамках требований промышленного производства и/или нормативных документов. Система непрерывной VRF по настоящей заявке обеспечивает критически важные атрибуты качества для очистки от вирусов, такие как, по меньшей мере, четырехкратное логарифмическое значение снижения (LRV). Настоящая заявка также демонстрирует способ определения критически важных параметров процесса и свойств материала для реализации контрольных пределов производства. Система непрерывной VRF по настоящей заявке может быть реализована с применением одного или большего количества фильтров, таких как фильтры для мелких вирусов для снижения

уровней парвовирусов и более крупных вирусов в технологическом процессе путем исключения по размеру, как продемонстрировано на Фиг. 1. Парвовирусы (parvo означает «мелкий») представляют собой группу очень мелких ДНК-вирусов, которые широко распространены и заражают многие виды животных. Парвовирусы представляют собой безоболочечные икосаэдрические частицы диаметром от 18 до 26 нм. Отраслевые ожидания результата очистки от вирусов с помощью этапа фильтрации мелких вирусов составляют не менее четырех log. (John R. Pattison and Gary Patou, Chapter 64 Parvoviruses, Medical Microbiology, 4th edition, Baron S, editor, University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.)

Снижение вирусной нагрузки относится к разнице между общим количеством вирусов во входном образце и выходном образце после выполнения определенного этапа процесса. Способность к снижению вирусной нагрузки может быть определена по LRV или по логарифмическому коэффициенту снижения (LRF) этапа процесса. Коэффициент снижения рассчитывается на основе общей вирусной нагрузки до применения этапа очистки и общего количества вируса после применения этапа очистки. Валидационные исследования по очистке от вирусов могут быть проведены для документального подтверждения очистки от известных вирусов, ассоциированных с продуктом, и для оценки эффективности процесса по очистке от потенциальных вирусных контаминантов путем определения способности процесса удалять неспецифические модельные вирусы.

Типичный рабочий цикл для изучения очистки от вирусов в производственном процессе включает добавление вируса в образец, запуск процесса в эксперименте с уменьшением масштаба для имитации крупномасштабного этапа и документирование способности очистить образец от добавленного вируса. В нормативных документах рекомендуется учитывать данные валидационных исследований по очистке от вирусов для разработки ограничений в рамках процесса при определении критических важных параметров процесса, например, для проведения валидаций в крайних точках процесса. Тесты можно проводить в условиях «наихудшего случая», чтобы продемонстрировать минимальную очистку, которую может обеспечить этап процесса (1998, Q5A Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin. T. I. C. f. H. o. T. R. f. P. f. H. Use). Условия «наихудшего случая» могут определяться факторами, которые влияют на механизм очистки от вирусов в зависимости от применяемого процесса. Условия «наихудшего случая» можно протестировать с целью демонстрации минимального снижения вирусной нагрузки на конкретном этапе процесса (Aranha et al., Viral clearance strategies for biopharmaceutical safety, part II: a multifaceted approach to process validation, BioPharm 14 (5), 43-54, 90, 2001).

Валидационные исследования по очистке от вирусов предназначены для документирования выбранных рабочих условий в отношении качества продукта и специфики процесса для обеспечения противовирусной безопасности. Процессы инактивации или удаления вирусов включают обработку посредством pH, тепловую обработку, фильтрацию или хроматографию. Инкубация при низком pH может

применяться для инактивации оболочечных вирусов, например, путем необратимой денатурации капсида (Brorson et al., Bracketed generic inactivation of rodent retroviruses by low pH treatment for monoclonal antibodies and recombinant proteins, Biotechnol Bioeng 82(3): 321-329, 2003). Фильтрация представляет собой удаление на основе размера, которое может быть использовано для удаления как оболочечных, так и необолочечных вирусов (Lute et al., Phage passage after extended processing in small-virus-retentive filters, Biotechnol Appl Biochem 47(Pt 3): 141-151, 2007). Для очистки биологических продуктов можно применять этапы хроматографии, которые способны обеспечить снижение уровня вирусной нагрузки для очищения от вирусов, например, хроматография с белком А (Bach et al., Clearance of the rodent retrovirus, XMuLV, by protein A chromatography, Biotechnol Bioeng 112(4): 743750, 2015) или анионообменная хроматография.

Существуют различные проблемы при разработке системы непрерывной VRF, включающей тестирование на наличие вирусов, методы очистки или инактивации при изготовлении биофармацевтических продуктов. Для проведения непрерывной VRF, должна поддерживаться работа с постоянным потоком, при этом поддержание постоянного давления является промышленным стандартом. Когда система непрерывной VRF подключена к HIC, рабочее давление ограничено. Например, когда на входе не установлен уравнительный бак, например, накопительный резервуар, система непрерывной VRF будет работать на условиях, установленных HIC. На очистку от вирусов могут влиять различные факторы, в том числе производительность, поток технологических жидкостей и обращение с ними. Изменения в составе исходного материала с течением времени также представляют трудности для проведения непрерывной VRF. Кроме того, необходимо оценивать колебания концентрации белка во время исследований по очистке от вирусов. (Strauss, et al., Characterizing the Impact of Pressure on Virus Filtration Processes and Establishing Design Spaces to Ensure Effective Parvovirus Removal. Biotechnology Progress, vol. 33, no. 5, 2017, pp. 1294-1302, doi:10.1002/btpr.2506). Некоторые подходы были адаптированы для преодоления этих проблем. Например, непрерывные процессы выполняют до VRF, а затем проводят периодическую VRF и периодическую ультрафильтрацию/диафильтрацию (UF/DF). Некоторые процессы также адаптируют два последовательно соединенных фильтра для улавливания вирусов с целью снижения риска неудовлетворительных результатов проверки на целостность. Другим вариантом является смещение пространства проектирования в сторону более низких рабочих давлений или потоков с более длительным временем обработки.

Небольшие поры фильтров для задержания вирусов чувствительны к закупорке следовыми контаминантами и часто требуют адсорбционной предварительной фильтрации на линии. Чтобы валидировать непрерывную очистку от вирусов, необходимо решить проблему засорения и перегрузки фильтра. Выполнение проверки на целостность каждого применяемого фильтра может быть критически важной стратегией для изоляции обработанного материала от посторонних вирусных контаминантов. Проверка

целостности фильтра после фильтрации обработанного материала позволяет определить, была ли нарушена целостность фильтра во время процесса. Поскольку непрерывное культивирование можно проводить в течение более длительных периодов времени, следует выбирать определенные моменты времени для тестирования на наличие посторонних агентов. Существуют проблемы с помещением в карантин контаминированных материалов после получения неудовлетворительных результатов проверки на целостность. В некоторых случаях нет конкретного затухания потока, указывающего на прорыв фильтра, и валидированная объемная пропускная способность становится единственным надежным параметром для определения того, когда следует прекратить использование фильтра. Стабильность потока и колебания состава загружаемого материала, такие как концентрация, pH или проводимость, могут влиять на эффективность системы непрерывной VRF для очистки от вирусов.

К другим проблемам относятся прерывания процесса, такие как разгерметизация, которая может произойти, когда клапаны переключаются между фильтрацией и промывкой буфера при выполнении непрерывной HIC. Были проведены исследования для изучения влияния прерывания процесса на удержание вирусов фильтрами для мелких вирусов во время непрерывной обработки. Эти исследования показывают, что удержание вирусов может уменьшаться о за счет прерывания процесса в зависимости от конструкции или рабочих механизмов фильтров. Некоторые типы фильтров более чувствительны к прерыванию процесса, чем другие. Прерывание процесса может привести к снижению способности фильтра удерживать вирус, что может быть связано с распределением пор по размерам и положением вируса в матрице фильтра во время прерывания процесса. Когда конвективный поток возобновляется после прерывания процесса, удержанный вирус может иметь шансы найти путь через фильтр. (Genest, P., Slocum, A., LaCasse, D., Pizzelli, K., Greenhalgh, P., Mullin, L. Impact of Process Interruption on Virus Retention of Small-Virus Filters. Bioprocess Int. Bioprocess Tech., 11 (10), 34-44).

Исследование в уменьшенном масштабе может быть разработано для изучения способности системы непрерывной VRF снижать количество вирусов, которая включает в себя один или большее количество фильтров для мелких вирусов, технологические материалы и буферы. Модель в уменьшенном масштабе должна максимально точно отражать производственный процесс и работать в репрезентативных условиях процесса производственного масштаба. Валидированное значение LRV не может гарантировать, что оно представляет крупномасштабный процесс, если валидационное исследование не точно представляет производственный процесс. Парвовирус, такой как минутный вирус мышей (MVM), может быть добавлен в процесс в качестве модели для исследования в уменьшенном масштабе исследования системы непрерывной VRF. MVM часто является предпочтительной моделью, поскольку MVM обладает высокой устойчивостью к химической обработке и имеет небольшой размер частиц, такой как 18-24 нм, который особенно сложно удалить с помощью фильтрации путем исключения по размеру. (Genest et al.).

Были проведены исследования для изучения методов добавления вирусов в производственную линию с целью валидации применения фильтра для улавливания вирусов в модели уменьшенного масштаба. Если предварительная фильтрация удаляет вирусы и препятствует измерению показателя LRV фильтра для улавливания вирусов, стандартным подходом является периодическая предварительная фильтрация белкового раствора, добавление вируса, а затем фильтрация вируса. Тем не менее, стандартные периодические исследования очистки от вирусов могут не отражать фактические условия нагрузки. Для ряда белков периодическая предварительная фильтрация приводит к увеличению закупорки и значительному снижению пропускной способности, чем встроенная в линию предварительная фильтрация. В одном исследовании представлена встроенная в линию система предварительной фильтрации с прямым измерением способности удаления вируса фильтром, которая тестируется с тремя разными белковыми добавками и двумя разными фильтрами для улавливания парвовирусов при двух скоростях введения вируса. Эта встроенная в линию система может надежно измерять LRV при пропускной способности, характерной для производственного процесса. (Lutz, Herbert, et al. “Qualification of a Novel Inline Spiking Method for Virus Filter Validation.” Biotechnology Progress, vol. 27, no. 1, 2010, pp. 121-128., doi:10.1002/btpr.500). Градиенты концентрации белка должны быть более точно смоделированы с помощью встроенной в линию системы добавления вируса.

Были проведены дополнительные исследования, чтобы изучить пространство проектирования фильтров для валидации фильтрации вирусов в приложениях с непрерывной обработкой. Одно исследование показывает успешную очистку от вирусов PBS (фосфатно-солевого буфера) с добавлением бактериофага PP7 при давлении 2,5 psi на фильтре Pegasus™ Prime. Исследование включало восемь дней обработки с 24-часовой технологической паузой на день 7 с нагрузкой до объемной производительности около 7000 л/м^2. Это показывает, что принципы качества проектирования (QbD) важны для минимизации риска изменения пространство проектирования. Важно использовать QbD, чтобы охарактеризовать пространство проектирования и подтвердить очистку от вирусов во всех ожидаемых рабочих условиях, например, при скорости потока, концентрации белка, загрузке и паузах в процессе. (McAlister, Morven, Virus Filtration in Continuous Processing: Considerations for Filter Design Space and Validation, BioProcess International Conference and Exhibition. BioProcess International Conference and Exhibition, 27 Sept. 2017, Boston, MA). QbD в фармацевтике представляет собой систематический подход к разработке процессов, который начинается с заранее определенных целей, делая упор на понимание продукта, понимание процесса и контроль процесса на основе достоверных научных данных и управления рисками в отношении качества. Верификация пространства проектирования - это демонстрация того, что предложенная комбинация входных параметров процесса и свойств материала способна обеспечить качественный продукт в промышленных масштабах.

Были предложены различные стратегии проектирования для обеспечения

противовирусной безопасности при проведении непрерывной обработки биологических продуктов, включая встроенную в линию систему добавления вируса. Предлагается автоматизированная система параллельного переключения, включающая схему фильтрации включения и выключения путем переключения между старыми и новыми фильтрами до достижения их валидированной общей объемной пропускной способности. Исследование подтверждения концепции показывает, что эта автоматизированная система фильтрации с параллельным потоком способна очищать модели с бактериофагами со значением LRV, превышающем или равным 4, с содержанием белка и без него, с помощью традиционных методологий периодического добавления вируса. Поэтому до тех пор, пока существуют достаточные и надежные научные данные, позволяющие обеспечить валидированную очистку от вирусов и другие гарантии безопасности в новых схемах производства, нет причин не внедрять непрерывную обработку (Johnson, Sarah A., et al., Adapting Viral Safety Assurance Strategies to Continuous Processing of Biological Products, Biotechnology and Bioengineering, vol. 114, no. 6, 2017, pp. 1362-1362).

В некоторых типовых вариантах осуществления в настоящей заявке предлагается непрерывная система VRF для очистки от вирусов, содержащая два или большее количество параллельных рядов фильтров, при этом система непрерывной VRF работает в режиме непрерывной обработки, при этом ряды фильтров включаются или выключаются в зависимости от объемной пропускной способности или конечного значения давления, и при этом каждый ряд фильтров содержит один или большее количество фильтров. В некоторых аспектах система непрерывной VRF соединена с HIC, при этом образец, содержащий антитела, вирусные частицы и одну или большее количество примесей, может быть загружен в HIC. В одном аспекте система непрерывной VRF в соответствии с настоящей заявкой включает множество параллельных рядов фильтров, и работает под внешним потоком подачи, например, система Cadence® BioSMB (приобретается у Pall Corporation). Система непрерывной VRF по настоящей заявке имеет возможности заполнения, дезинфекции, нейтрализации, уравновешивания и промывки фильтров. К примеру, как продемонстрировано на Фиг. 3 относительно дисплея мониторинга системы непрерывной VRF, ряд фильтров может находиться в различных состояниях, таких как фильтрация, промывка буфером или заполнение фильтра. Например, сообщение системы демонстрирует состояние рядов фильтров, например, выполняется очистка буфером для ряда 2.

В некоторых типовых вариантах осуществления в настоящей заявке предлагается непрерывная система VRF для очистки от вирусов, содержащая два или большее количество параллельных рядов фильтров, при этом система непрерывной VRF работает в режиме непрерывной обработки путем включения или выключения двух или большего количества рядов фильтров. Каждый ряд фильтров запланирован для различных этапов в определенные моменты времени в соответствии с непрерывной логикой управления VRF, например, этап заполнения буфером, уравновешивания, дезинфекции, фильтрации, промывки буфером или проверки на целостность, как продемонстрировано на Фиг. 4.

Кроме того, система непрерывной VRF по настоящей заявке имеет гибкую конструкцию, которая позволяет реализовать любой этап непрерывной фильтрации с нормальным потоком, например, фильтрация через среду, фильтрация через мембрану или фильтрация Emphaze™ (очиститель Emphaze™ от 3M, Inc). Кроме того, системы автоматизированной фильтрации могут быть адаптированы для других этапов непрерывной фильтрации с нормальным потоком, таких как глубинная фильтрация, фильтрация среды от вирусов или стерильная фильтрация между отдельными операциями.

Системы фильтрации среды работают за счет физического захвата загрязняющих веществ и/или адсорбции загрязняющих веществ в результате химических реакций. Системы мембранной фильтрации работают за счет применения проницаемого тонкого слоя материала (*например,* материала фильтрующей мембраны), который задерживает примеси и целевые загрязняющие вещества из потока жидкости, проходящего через проницаемый слой. Механизм удаления при мембранной фильтрации заключается в физической блокировке частиц материалом фильтрующей мембраны. Размер пор в системах мембранной фильтрации относится к размеру отверстий или зазоров в материале фильтрующей мембраны. Когда размер пор фильтрующей мембраны меньше, более мелкие частицы могут быть заблокированы от прохождения через материал фильтрующей мембраны. Фильтрация Emphaze™ может проводиться с помощью очистителя Emphaze™, который содержит синтетическую функционализированную среду, анионообменную среду и асимметричную мембрану для снижения бионагрузки. Очиститель Emphaze™ обеспечивает проточное хроматографическое разделение контаминантов или комбинацию хроматографических и размер-эксклюзионных механизмов.

Потребности производства биологического продукта в больших коммерческих масштабах привели к растущему спросу на преобразование обработки в периодическом режиме в непрерывную обработку. Чтобы предлагаемая система непрерывной обработки соответствовала нормативным требованиям, необходимо обеспечить противовирусную безопасность. В настоящем изобретении предлагаются способы и системы для удовлетворения вышеупомянутых потребностей путем обеспечения способов и систем для эффективного включения очистки от вирусов и тестирования в предлагаемую систему непрерывной обработки для изготовления биологических продуктов.

Типовые варианты осуществления, описанные в данном документе, соответствуют вышеупомянутым критериям, обеспечивая способы и системы для очистки антитела из образца, содержащего одну или большее количество примесей, включая вирусные частицы.

Формы единственного числа следует понимать как означающие «по меньшей мере один»; и термины «около» и «приблизительно» следует понимать как допускающие стандартные вариации, как будет понятно специалистам в данной области техники; а если указаны диапазоны, то включены конечные значения.

Подразумевается, что применяемые в данном документе термины «включают», «включает» и «включающий» являются неограничивающими и понимаются как имеющие

значение «содержат», «содержит» и «содержащий» соответственно.

В некоторых типовых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ очистки антитела из образца, содержащего одну или большее количество примесей, включая вирусные частицы, при этом указанный способ включает: получение образца, содержащего антитело, и загрузку образца в колонку для гидрофобной хроматографии (HIC), которая соединена с системой фильтрации для удержания вируса (VRF); при этом колонка HIC и система VRF соединены в линию в системе непрерывной обработки, при этом система VRF включает по меньшей мере два параллельных ряда фильтров. В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагается система непрерывной обработки для очистки антитела из образца, содержащего одну или большее количество примесей, включая вирусные частицы, при этом указанная система непрерывной обработки содержит: колонку для гидрофобной хроматографии (HIC) и систему фильтрации для удержания вируса (VRF); при этом колонка HIC и система VRF соединены в линию, при этом образец загружается в колонку HIC, и при этом система VRF содержит по меньшей мере два параллельных ряда фильтров.

В контексте данного документа термин «вирусные частицы» включает инфекционные агенты, которые размножаются внутри живых клеток. Вирусная частица содержит РНК или ДНК, окруженную белковой оболочкой, называемой капсидом. Капсид защищает внутреннее ядро, которое включает геном вируса и вирусные белки. Когда вирусная частица связывается с поверхностью конкретной клетки-хозяина, вирусная ДНК или РНК вводится в клетку-хозяина для репликации вируса. В конце концов, вирусная инфекция распространяется на другие клетки-хозяева. Вирусные частицы могут представлять собой, например, парвовирусы, такие как минутный вирус мышей (MBM).

В контексте данного документа термин «антитело» относится к молекулам иммуноглобулина, состоящим из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет вариабельную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь имеет вариабельную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL может состоять из трех CDR и четырех FR, расположенных от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает в себя обозначение как гликозилированных, так и негликозилированных иммуноглобулинов любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает в себя, помимо прочего, молекулы антител, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью рекомбинантных способов, например, антитела или биспецифические антитела, выделенные из клетки-

хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. IgG включает подмножество антител.

В контексте данного документа термин «примеси» или «примесь» может включать любой нежелательный белок или вирусную частицу, присутствующую в белковом биофармацевтическом продукте. Примесь может включать технологические и родственные примеси. Примесь также может иметь известную структуру, частично характеризованную или неидентифицированную. Технологические примеси могут быть образованы в ходе процесса изготовления и могут включать три основные категории: образованные из клеточного субстрата, образованные из клеточной культуры и образованные в ходе последующих этапов. Примеси, образованные из клеточного субстрата, включают в себя, помимо прочего, белки, полученные из организма хозяина, и нуклеиновую кислоту (геномную, векторную или общую ДНК клетки хозяина). Примеси, полученные из клеточной культуры, включают без ограничения индукторы, антибиотики, сыворотку и другие компоненты среды. Примеси, происходящие из последующих этапов процесса, включают, помимо прочего, ферменты, химические и биохимические реагенты для обработки (*например*, бромистый цианоген, гуанидин, окисляющие и восстанавливающие агенты), неорганические соли (*например*, тяжелых металлов, мышьяка, иона неметалла), растворители, носители, лиганды (*например*, моноклональные антитела) и другие выщелачиваемые продукты. Родственные примеси (*например,* прекурсоры, некоторые продукты разложения) могут представлять собой молекулярные варианты, возникающие в ходе изготовления и/или хранения, которые не обладают свойствами, сопоставимыми со свойствами желаемого продукта относительно активности, эффективности и безопасности. Такие варианты могут требовать значительных усилий для выделения и характеризации с целью идентификации типа модификации (-ий). Родственные примеси могут включать усеченные формы, модифицированные формы и агрегаты. Усеченные формы образуются под действием гидролитических ферментов или химических веществ, катализирующих расщепление пептидных или дисульфидных связей. Модифицированные формы включают в себя, помимо прочего, дезамидированные; изомеризованные, ошибочно соединенные посредством S-S, окисленные или измененные конъюгированные формы (*например,* гликозилированные, фосфорилированные). Модифицированные формы также могут включать в себя любые посттрансляционные модифицированные формы. Агрегаты включают в себя димеры и большие величины желаемого продукта. (Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, ICH August 1999, U.S. Dept of Health and Humans Services).

Типовые варианты осуществления изобретения

Типовые варианты осуществления, описанные в данном документе, обеспечивают способы и системы для очистки антитела из образца, содержащего одну или большее количество примесей, включая вирусные частицы. Указанный способ осуществляется в системе непрерывной обработки, которая включает колонку HIC и систему VRF.

В некоторых типовых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ очистки антитела из образца, содержащего одну или большее количество примесей, включая вирусные частицы, при этом указанный способ включает: получение образца, содержащего антитело, и загрузку образца в колонку HIC, которая подключена к системе VRF, при этом колонка HIC и система VRF соединены в линию в системе непрерывной обработки, при этом система VRF включает по меньшей мере два параллельных ряда фильтров.

В одном аспекте способность способа по настоящей заявке снижать вирусную нагрузку составляет 0,1-0,9 LRV, 0,9-2,1 LRV, 4,6 LRV, 5,2 LRV, 0,1-4 LRV, 0,1-5 LRV, 0,1-6 LRV, 3-6 LRV, 4-5 LRV или по меньшей мере 4 LRV.

В одном аспекте каждый из по меньшей мере двух рядов фильтров содержит по меньшей мере один фильтр, при этом указанный фильтр выполняет фильтрацию через среду, фильтрацию через мембрану, функциональную фильтрацию, хроматографическую фильтрацию или фильтрацию с исключением по размеру. В одном аспекте каждый из по меньшей мере двух рядов фильтров запланирован на определенный момент времени для заполнения, уравновешивания, фильтрации, промывки, проверки на целостность, дезинфекции, нейтрализации или хранения.

Понятно, что система не ограничена каким-либо из вышеупомянутых фильтров, антител, вирусных частиц, HIC, системой VRF, предварительной фильтрации или SPTFF. Последовательная маркировка этапов способа, предложенного в данном документе, номерами и/или буквами не подразумевает ограничения способа или каких-либо вариантов его осуществления конкретным указанным порядком. В тексте описания цитируются различные публикации, включая патенты, патентные заявки, опубликованные патентные заявки, номера доступа, технические статьи и научные статьи. Каждая из этих процитированных ссылок в полном объеме и во всех целях включена в данный документ посредством ссылки. Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит настоящее изобретение.

Настоящее изобретение станет более понятно со ссылкой на следующие примеры, которые приведены для более подробного описания изобретения. Примеры предназначены для иллюстрации и не должны восприниматься как ограничивающие объем изобретения.

ПРИМЕРЫ

Материалы

1. Фильтрация: Viresolve® Pro, Viresolve® Pro Shield H и Viresolve® Pro Shield представляют собой фильтрующие мембраны для удаления вирусов в зависимости от размера, которые были приобретены у корпорации EMD Millipore. Viresolve® Pro Shield H и Viresolve® Pro Shield представляют собой префильтры, применяемые вместе с фильтром Viresolve® Pro filter. Фильтр Viresolve® Pro Shield H основан на смешанной адсорбционной химической структуре, которая устойчива к щелочам и обладает низкой

экстрагируемостью. Фильтр Viresolve® Pro Shield основан на катионообменной адсорбционной химической структуре, которая устойчива к щелочам и обладает низкой экстрагируемостью.

2. Система непрерывной VRF: Система непрерывной обработки для очистки моноклонального антитела была спроектирована и построена, а также соединена в линию с хроматографической системой, выполняющей процесс HIC. Образец, содержащий антитела, загружали в колонку HIC. Поток HIC загружали в систему непрерывной VRF. HIC проводили с использованием колонки с внутренним диаметром 1 см. Система непрерывной VRF содержала два фильтра Viresolve® Pro Shield H (фильтр 3,1 $см^2$) и два фильтра Viresolve® Pro (фильтр 3,1 $см^2$).

Пример 1. Встроенное в линию соединение системы HIC и VRF

Обработку для очистки моноклонального антитела (*например,* MAB1) проводили с использованием HIC, которая был соединена в линию с системой VRF, содержащей два фильтра Viresolve® Pro Shield H и два фильтра Viresolve® Pro в качестве доказательства концепции. Образец, содержащий MAB1, загружали в колонку HIC. Поток HIC загружали в систему VRF. Эта обработка проводилась при постоянном потоке, основанном на скорости потока HIC. Поток VRF составил 253 LMH ($л/м^2$/час) при начальном ΔP 15 psi. Было проведено три цикла HIC при загрузке VRF 1160 $л/м^2$. Учитывая прогнозируемое затухание потока при постоянном давлении около 12%, соответствующее прогнозируемое увеличение давления при постоянном расходе составляло около 2 psi.

Производительность этой системы обработки оценивали на основе дифференциального давления VRF в зависимости от пропускной способности. Дифференциальное давление на фильтре для улавливания вирусов было построено как функция пропускной способности фильтре для улавливания вирусов в $л/м^2$, как продемонстрировано на Фиг. 5. Давление на входе в префильтр во время промывки буфером составляло 14,6 psi, максимальное давление в цикле 1 составляло 16,7 psi, максимальное давление в цикле 2 составляло 16,6 psi и максимальное давление в цикле 3 составляло 17,2 psi. Не наблюдалось значительного увеличения значения ΔP фильтра при постоянном потоке VRF, загруженном до 1160 $л/м^2$, что свидетельствует об эффективности системы с соединением фильтров HIC и VRF на линии. Эти результаты согласуются с производительностью предыдущих процессов VRF, проводившихся при постоянном давлении.

Пример 2. Очистка от вируса при постоянном потоке

Непрерывную обработку для очистки моноклонального антитела (*например,* MAB2) проводили с помощью системы непрерывной VRF. Производительность системы VRF тестировали в режимах постоянного потока и постоянного давления. Загрузочный материал включал пул моноклональных антител (MAB2) HIC, pH которого был доведен до 4,9. Как только загрузку доводили до pH 4,9, в нее добавляли 0,1% об./об. маточного раствора MVM. Материал с добавленным MVM пропускали через фильтр с размером пор 0,1 мкм для стимулирования заражения монодисперсным вирусом перед фильтром

вируса. Низкий уровень pH использовали из-за повышенного клиренса HCP с помощью Viresolve® Pro Shield, наблюдаемого во время разработки процесса. Обработку проводили при постоянном давлении с применением сжатого азота и установки баллона под давлением, потока буфера 460 LMH при 25 psi и загрузке 1000 л/м^2. В альтернативном варианте обработку проводили при постоянном потоке с применением AKTA Explorer (система FPLC, приобретенная у GE Healthcare Life Science, Inc.), 90 LMH при начальном давлении 5 psi и загрузке 1000 л/м^2 с промывкой буфером после использования. Низкое начальное давление позволило увеличить производительность до достижения предела давления на входе. Низкое давление потенциально может привести к проникновению вируса из-за броуновского движения вирусных частиц (Strauss Daniel et al.).

Результаты при работе с постоянным давлением показали 56,6%-ное затухание потока при пропускной способности 1000 л/м^2 с более чем 4,6 LRV, как продемонстрировано на Фиг. 6. Результаты при постоянном потоке показали отсутствие обнаруживаемого повышения давления (менее 1,5 psi) при пропускной способности 1000 л/м^2 с более чем 5,2 LRV в пуле продукта и при промывке буфера, как продемонстрировано на Фиг. 7. Следовательно, потока 90 LMH было достаточно для обеспечения очистки от вируса. Результаты также показали, что циклы с постоянным потоком могут привести к значительному снижению загрязнения фильтра по сравнению с циклами с постоянным давлением. Система VRF, работающая в режиме постоянного потока при низком потоке около 90 LMH, смогла обеспечить достаточную противовирусную безопасность, что позволило создать полностью интегрированный непрерывный последующий процесс.

Пример 3. Сравнение постоянного потока и постоянного давления

Производительность системы VRF тестировали в режимах постоянного потока и постоянного давления с условиями, позволяющими провести прямое сравнение. Поток фильтровали через Viresolve® Pro и Viresolve® Pro Shield в режимах постоянного потока и постоянного давления на устройстве AKTA Explorer (например, FPLC) при 270 LMH и 15 psi соответственно. Был протестирован ряд условий для оценки факторов, влияющих на затухание потока в режиме постоянного давления, как продемонстрировано на Фиг. 8. Для сравнения режимов постоянного потока и постоянного давления пул MAB2 HIC доводили до pH 4,0 для повышения уровня загрязнения, что увеличило сигнал. Результаты анализировали на основе проницаемости мембраны, выраженной в виде потока, деленного на трансмембранное давление (TMP), например, LMH/psi. Начальную проницаемость рассчитывали путем деления 270 LMH на 15 psi, что равнялось 18 LMH/psi.

Результаты при работе с постоянным давлением показали 92%-ное затухание потока при 590 л/м^2 и снижение проницаемости на 50% при 206 л/м^2, как продемонстрировано на Фиг. 9. Результаты при работе с постоянным потоком показали 55 psi ΔP при 479 л/м^2 и снижение проницаемости на 50% при 208 л/м^2 Таким образом, полученные результаты продемонстрировали, что постоянный поток и постоянное давление VRF при 270 лм/ч/15 psi показали одинаковые характеристики с точки зрения

проницаемости фильтра в зависимости от пропускной способности фильтра. Снижение проницаемости, по-видимому, зависело от общего количества удаленных загрязняющих частиц, что не было обусловлено режимом фильтрации.

Пример 4. Конструктивные особенности системы непрерывной VRF по настоящей заявке

Система непрерывной VRF для очистки от вирусов, содержащая два или большее количество параллельных рядов фильтров, была спроектирована и построена, как продемонстрировано на Фиг. 3. В систему непрерывной VRF загружали образец пула HIC, содержащий антитела, необязательно вирусные частицы и одну или большее количество примесей. Система непрерывной VRF по настоящей заявке работала в течение 3,5 дней без перерыва в небольших масштабах. Система непрерывной VRF работала в условиях непрерывной обработки путем включения или выключения рядов фильтров в зависимости от объемной пропускной способности или конечного значения давления. Система непрерывной VRF позволяла заполнять, дезинфицировать, нейтрализовать, уравновешивать и промывать фильтры. Каждый ряд фильтров системы непрерывной VRF включал один или большее количество фильтров. Каждый ряд фильтров подвергался различным состояниям, таким как фильтрация, промывка буфером или заполнение фильтра, как продемонстрировано на Фиг. 3. Система непрерывной VRF имела гибкую конструкцию для реализации различных этапов непрерывной проточной фильтрации, включая фильтрацию через среду, фильтрацию через мембрану или фильтрацию Emphaze™. Система непрерывной VRF работала под внешним потоком подачи, например, система Cadence® BioSMB. Конструкция системы непрерывной VRF небольшого масштаба приведена на Фиг. 2.

Результаты испытаний показали, что выбор давления по сравнению с регулированием потока не повлиял на производительность системы непрерывной VRF. Вирусы не были обнаружены в пуле VRF с постоянным потоком, работающем при около 20% потока VRF периодического действия. Система непрерывной VRF, подключенная к выходу HIC, продемонстрировала производительность, сравнимую с VRF периодического действия.

Во время разработки системы непрерывной VRF и других установок непрерывного действия были проведены исследования для оценки производительности системы VRF непрерывного действия при низких скоростях потока, включая изменения молекул загрузки, условий загрузки, концентрации белка, скорости потока и паузы в процессе. Прежде чем перевести первый непрерывный процесс с этапа разработки на производство, для разработки исследований по очистке от вирусов применяли QbD, чтобы охарактеризовать пространство проектирования для системы непрерывной VRF с целью минимизации риска изменения пространства проектирования. Были проведены исследования для изучения пространства проектирования фильтра для валидации фильтрации вирусов в приложениях с непрерывной обработкой. Очистка от вирусов была подтверждена во всех ожидаемых рабочих условиях. Примеры разработки исследований

по очистке от вирусов для характеризации пространства проектирования для системы непрерывной VRF приведены на Фиг. 10, с примерами, демонстрирующими попеременное использование потока HIC с максимальной концентрацией белка или без концентрации белка. Вирусы добавляли в непрерывный процесс, который включал этапы обработки HIC, предварительной фильтрации и Viresolve® Pro. Впоследствии оценивали способность фильтров для улавливания вирусов к очистке от вирусов. Точки переключения фильтров были запрограммированы в системе непрерывной VRF на основе минимальной пропускной способности, достигнутой в исследованиях очистки от вирусов.

Каждый ряд фильтров в системе непрерывной VRF запланирован для различных этапов в определенные моменты времени в соответствии с непрерывной логикой управления VRF, такой как этап заполнения буфером, уравновешивания, фильтрации, промывки буфером или проверки на целостность, как продемонстрировано на Фиг. 4. Например, каждый ряд фильтров можно запланировать для работы в разные временные интервалы. Результаты испытаний показали, что промывка буфером VRF после использования повышает постоянство концентрации пула для непрерывной ультрафильтрации/диафильтрации (UF-DF). Когда фильтры для улавливания вирусов не использовались, они хранились в NaOH в качестве резервных фильтров. Диаграмма на Фиг. 4 служит для иллюстрации, и период времени для каждого этапа не соответствует масштабу. В частности, время фильтрации на фильтр может быть значительно выше по сравнению с традиционной периодической VRF из-за низкого потока, потенциально превышающего один день на фильтр. Процесс, продемонстрированный на Фиг. 4, можно повторять бесконечно, предполагая, что пользователи вмешиваются в процесс, чтобы заменить израсходованные фильтры.

Кроме того, конструктивные особенности системы непрерывной VRF по настоящей заявке включали стратегию управления данными и контроля, как продемонстрировано на Фиг. 11. Система непрерывной VRF, такая как клапаны, насосы, датчики давления и датчики потока, напрямую связаны с платами Ethernet I/O (ввода/вывода). Впоследствии программное обеспечение Kepware преобразовало протокол связи платы ввода-вывода в отраслевой стандарт OPC (Коммуникации на открытой платформе, англ. - Open Platform Communications). SynTQ имеет доступ на чтение/запись к Kepware для управления системой. PI (Информация о процессе, англ. - Process Information) имеет доступ только для чтения к Kepware для хранения, анализа и визуализации данных.

Kepware представляет собой платформу подключения, которая обеспечивает единый источник данных промышленной автоматизации для приложений, позволяя пользователям подключать, управлять, следить и контролировать различные устройства автоматизации и программные приложения через единый пользовательский интерфейс. OPC представляет собой промышленный стандарт связи, который позволяет обмениваться данными между устройствами разных производителей и управляющими приложениями без каких-либо проприетарных ограничений. PI представляет собой приложение для архивации данных в режиме реального времени с базой данных временных рядов для

записи, анализа и мониторинга информации в реальном времени, такой как клапаны, насосы, потоки, давление или уровни. Программный комплекс управления знаниями synTQ PAT (англ. - synTQ PAT Knowledge Management Software Suite) может обеспечить универсальную интеграцию аппаратных и программных систем посредством эффективной регистрации данных в режиме реального времени и управления этими данными. MATLAB (матричная лаборатория) представляет собой высокопроизводительный язык для технических вычислений, позволяющий интегрировать вычисления, визуализацию и программирование. Логика управления представляет собой ключевую часть программы, которая контролирует работу программы.

Пример 5. Исследования стабильности MVM в условиях низкого и высокого pH

Поскольку вирусные частицы в загрузке VRF могут со временем деградировать, очистка от вируса может быть артефактом стабильности вируса без демонстрации фактической очистки от вируса через фильтр. Продолжительность времени, в течение которого количество добавленного вируса остается стабильным, будет определять, как долго можно применять единый источник загрузки для будущих исследований по очистке от вируса. Были проведены исследования стабильности MVM в условиях низкого и высокого pH с низкой или высокой концентрацией цитрата. Примеры экспериментальной схемы приведены на Фиг. 12 и Фиг. 13.

Результаты испытаний анализировали на основе MVM LRF как функции времени, что продемонстрировано на Фиг. 14. В качестве контроля использовали буферный запас вируса. Деградацию вируса с течением времени наблюдали во всех оцениваемых условиях загрузки по сравнению с контролем. В течение 24 часов наблюдалось около 0-0,9 LRF. В течение 7 дней (168 часов) наблюдалось около 0,9-2,1 LRF. На основании этих результатов испытаний использование загрузки может быть ограничено 24 часами после добавления вируса для обеспечения адекватной вирусной нагрузки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ для очистки антитела из образца, содержащего одну или большее количество примесей, включая вирусные частицы, при этом указанный способ включает:

обеспечение образца, включающего антитело, и

загрузку образца в колонку гидрофобной хроматографии (HIC), которая соединена с системой фильтрации для удержания вируса (VRF), при этом колонка HIC и система VRF соединены в линию в системе непрерывной обработки, и при этом система VRF включает по меньшей мере два параллельных ряда фильтров.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что каждый из по меньшей мере двух параллельных рядов фильтров включается или выключается в зависимости от объемной пропускной способности или конечного значения давления.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что система VRF работает при постоянном потоке или постоянном давлении.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что каждый из по меньшей мере двух параллельных рядов фильтров запланирован на работу в разные временные интервалы.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что система VRF работает под внешним потоком подачи.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что каждый из по меньшей мере двух рядов фильтров содержит по меньшей мере один фильтр, при этом указанный фильтр выполняет фильтрацию через среду, фильтрацию через мембрану, функциональную фильтрацию, хроматографическую фильтрацию или фильтрацию с исключением по размеру.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что каждый из по меньшей мере двух рядов фильтров запланирован на определенный момент времени для заполнения, уравновешивания, фильтрации, промывки, проверки на целостность, дезинфекции, нейтрализации или хранения.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что система VRF работает при постоянном потоке от около 10 LMH до около 100 LMH.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что система VRF работает при постоянном потоке около 90 LMH.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что способность способа к снижению вирусной нагрузки составляет по меньшей мере 4 LRV (логарифмическое значение снижения).

11. Способ по п. 1, дополнительно включающий этап однопроходной тангенциальной проточной фильтрации и/или предварительной фильтрации.

12. Система непрерывной обработки для очистки антитела из образца, содержащего одну или большее количество примесей, включая вирусные частицы, при этом указанная система непрерывной обработки содержит:

колонку для хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC), и

систему фильтрации с удержанием вирусов (VRF);

при этом колонка HIC и система VRF соединены в линию, причем образец загружают в колонку HIC, и причем система VRF содержит по меньшей мере два параллельных ряда фильтров.

13. Система непрерывной обработки по п. 12, отличающаяся тем, что каждый из по меньшей мере двух параллельных рядов фильтров включается или выключается в зависимости от объемной пропускной способности или конечного значения давления.

14. Система непрерывной обработки по п. 12, отличающаяся тем, что система VRF работает при постоянном потоке или постоянном давлении.

15. Система непрерывной обработки по п. 12, отличающаяся тем, что каждый из по меньшей мере двух параллельных рядов фильтров запланирован на работу в разные временные интервалы.

16. Система непрерывной обработки по п. 12, отличающаяся тем, что система VRF работает под внешним потоком подачи.

17. Система непрерывной обработки по п. 12, отличающаяся тем, что каждый из по меньшей мере двух рядов фильтров содержит по меньшей мере один фильтр, при этом указанный фильтр выполняет фильтрацию через среду, фильтрацию через мембрану, функциональную фильтрацию, хроматографическую фильтрацию или фильтрацию с исключением по размеру.

18. Система непрерывной обработки по п. 12, отличающаяся тем, что каждый из по меньшей мере двух рядов фильтров запланирован на определенный момент времени для заполнения, уравновешивания, фильтрации, промывки, проверки на целостность, дезинфекции, нейтрализации или хранения.

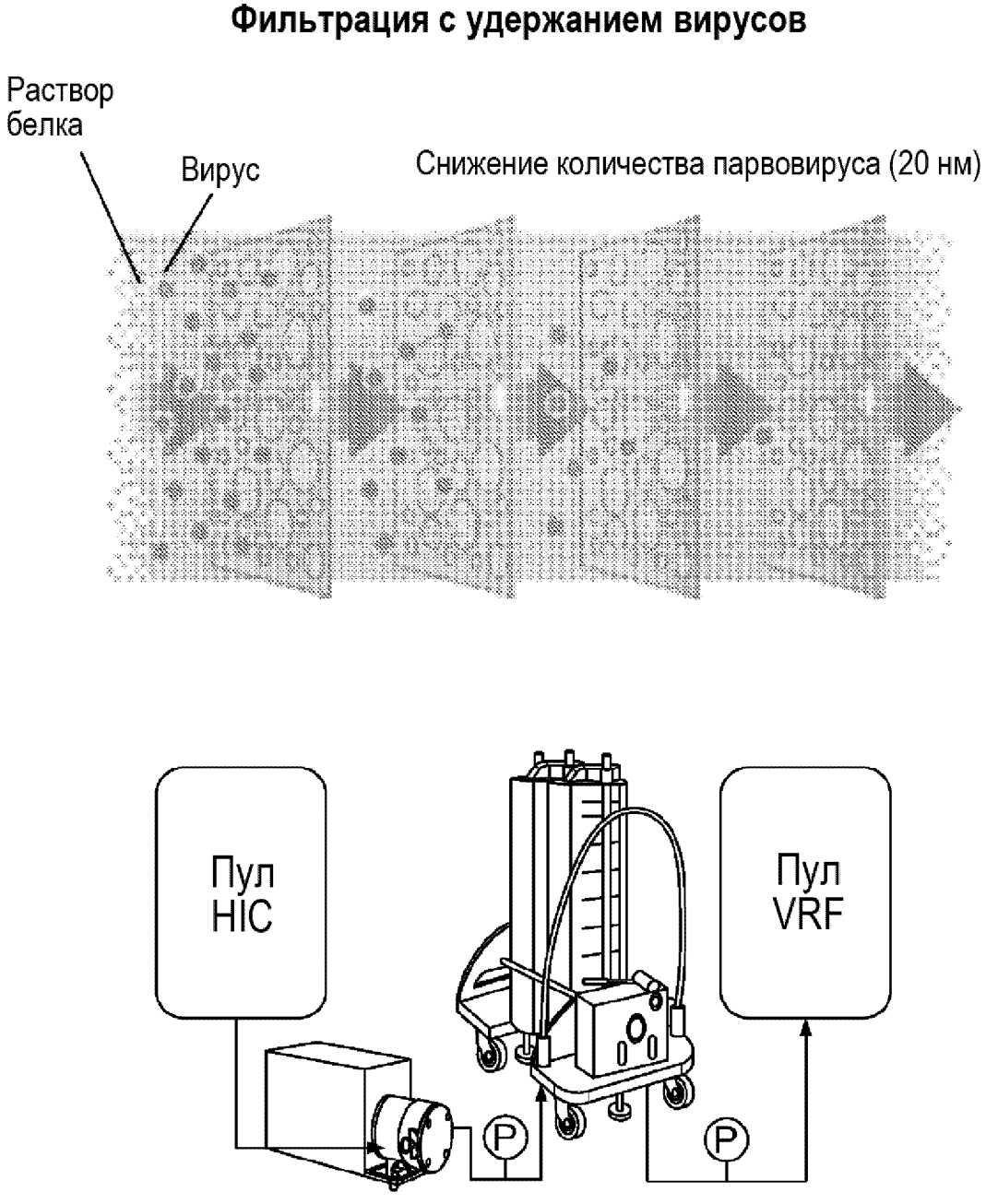
19. Система непрерывной обработки по п. 12, отличающаяся тем, что система VRF работает при постоянном потоке от около 10 LMH до 100 LMH.

20. Система непрерывной обработки по п. 12, отличающаяся тем, что система VRF работает при постоянном потоке около 90 LMH.

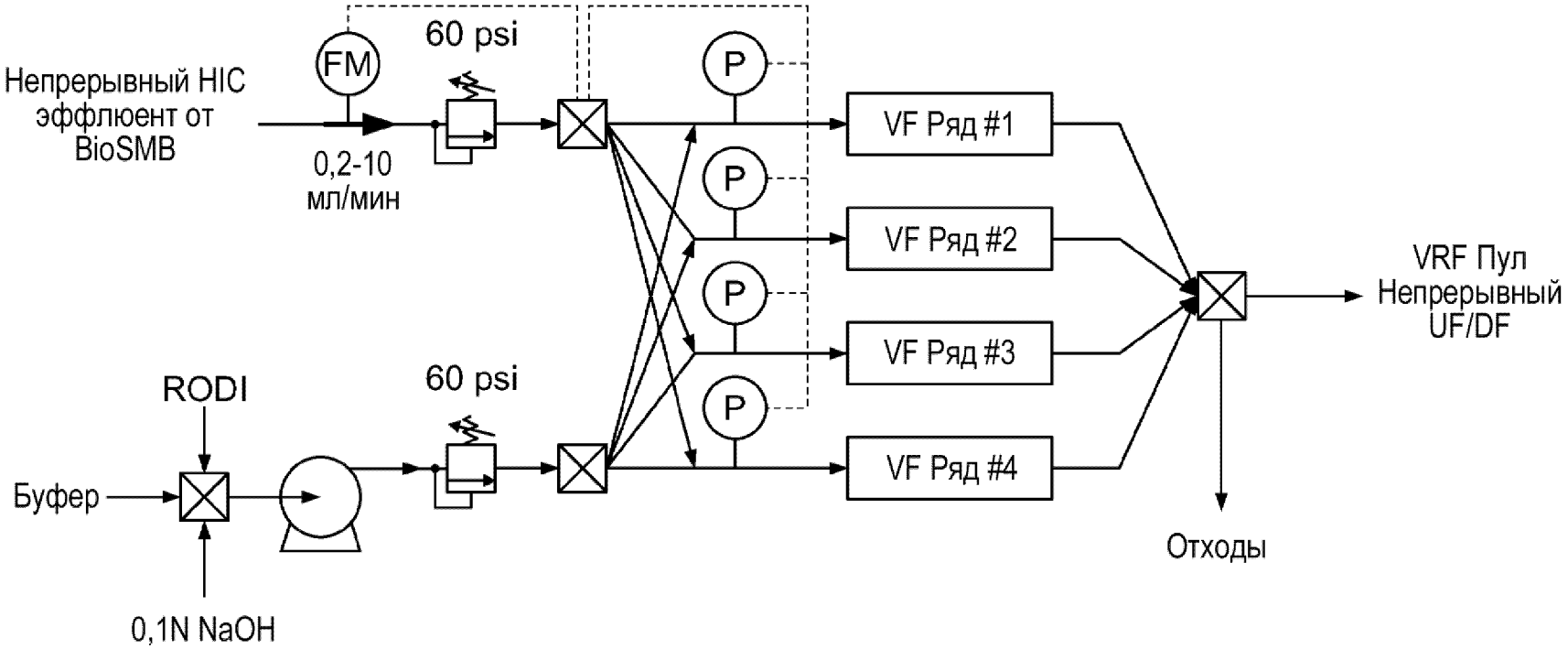
21. Система непрерывной обработки по п. 12, отличающаяся тем, что способность указанной системы к снижению вирусной нагрузки составляет по меньшей мере 4 LRV (логарифмическое значение снижения).

22. Система непрерывной обработки по п. 12, дополнительно включающая однопроходную тангенциальную проточную фильтрацию и/или предварительную фильтрацию.

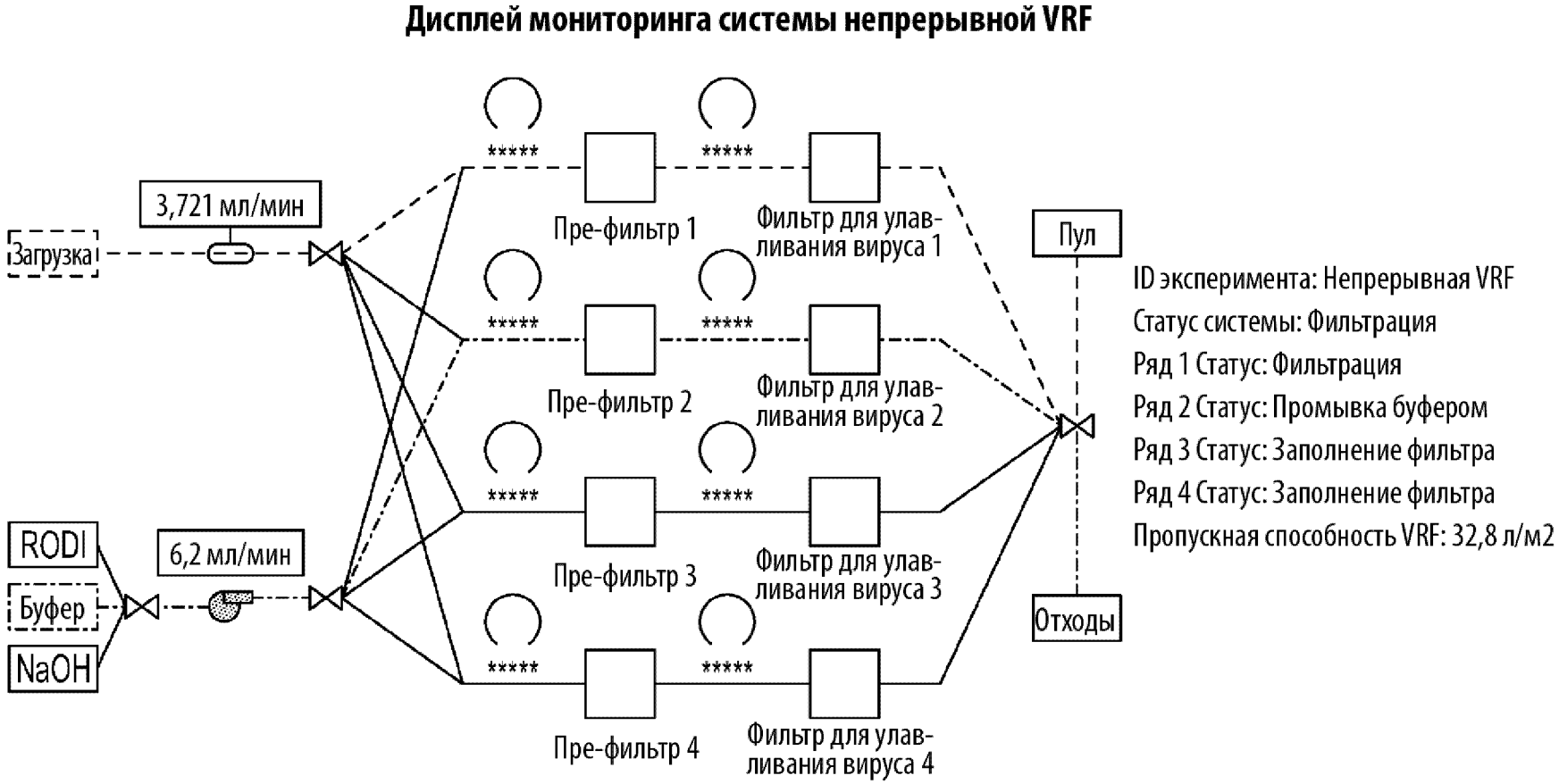
По доверенности


Фильтрация с удержанием вирусов
Раствор белка
Вирус
Снижение количества парвовируса (20 нм)
Пул HIC
Пул VRF
P
P

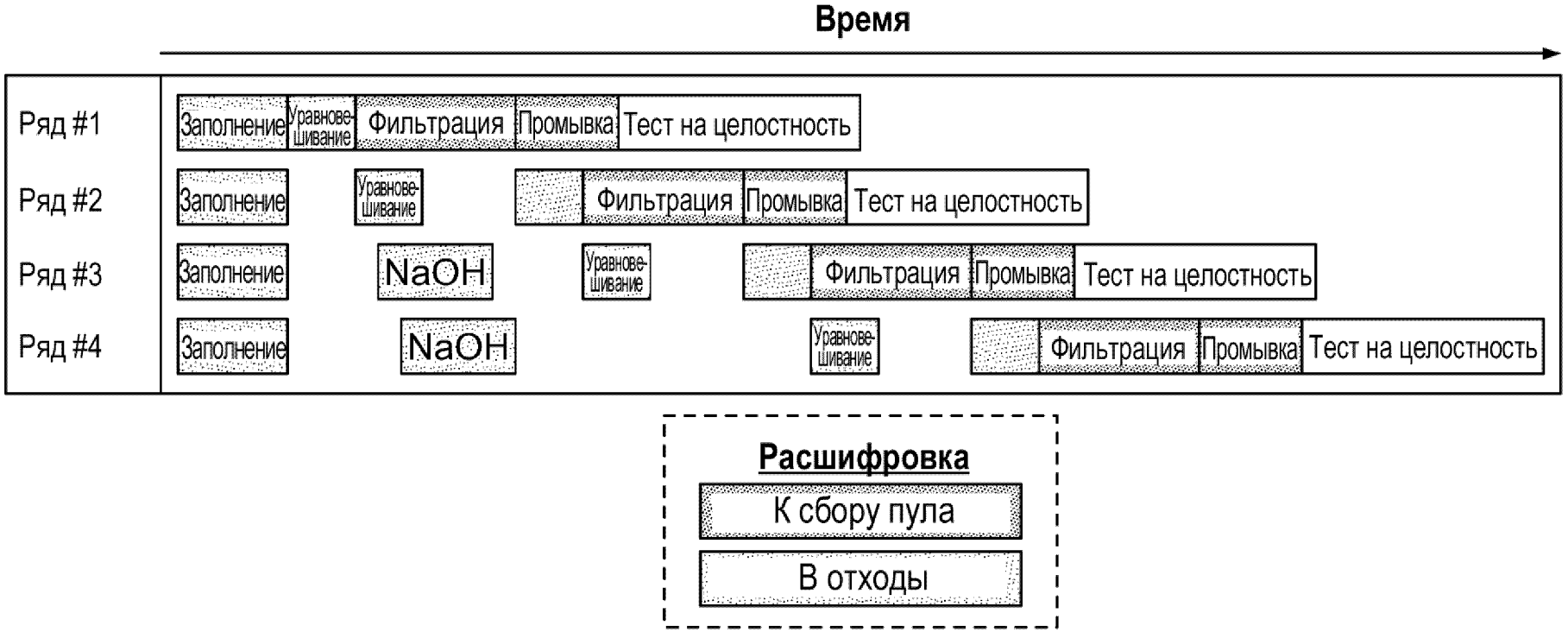
Фиг. 1


Непрерывный HIC
эффлюент от
BioSMB
FM
60 psi
0,2-10
мл/мин
P
P
P
P
VF Ряд #1
VF Ряд #2
VF Ряд #3
VF Ряд #4
VRF Пул
Непрерывный
UF/DF
Отходы
RODI
Буфер
60 psi
0,1N NaOH

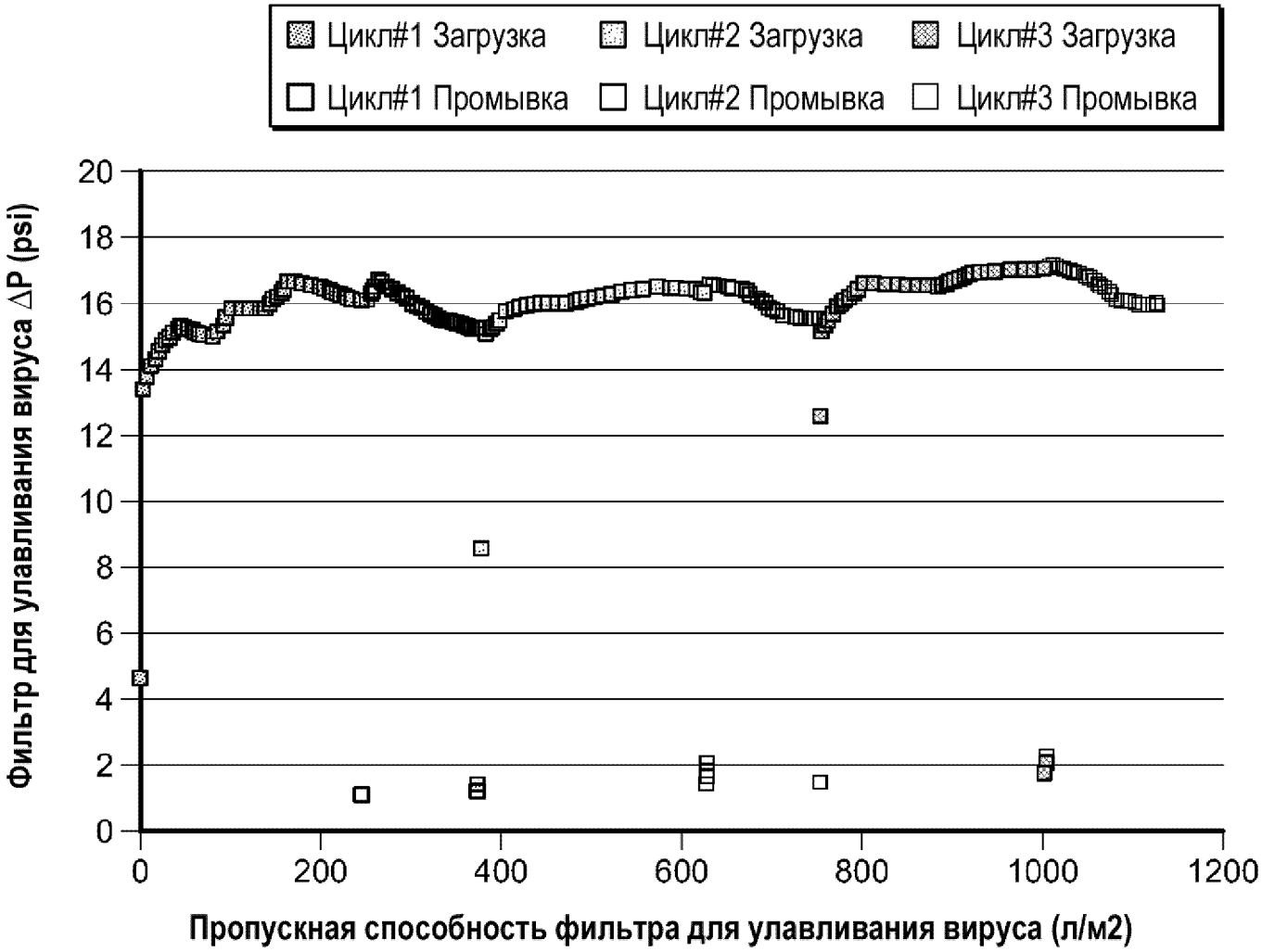
Фиг. 2


Дисплей мониторинга системы непрерывной VRF
3,721 мл/мин
Загрузка
RODI
Буфер
NaOH
6,2 мл/мин
Пре-фильтр 1
Фильтр для улавливания вируса 1
Пре-фильтр 2
Фильтр для улавливания вируса 2
Пре-фильтр 3
Фильтр для улавливания вируса 3
Пре-фильтр 4
Фильтр для улавливания вируса 4
Пул
Отходы
ID эксперимента: Непрерывная VRF
Статус системы: Фильтрация
Ряд 1 Статус: Фильтрация
Ряд 2 Статус: Промывка буфером
Ряд 3 Статус: Заполнение фильтра
Ряд 4 Статус: Заполнение фильтра
Пропускная способность VRF: 32,8 л/м2
Сообщение системы: Идет промывка буфером для ряда 2 – пожалуйста, подождите

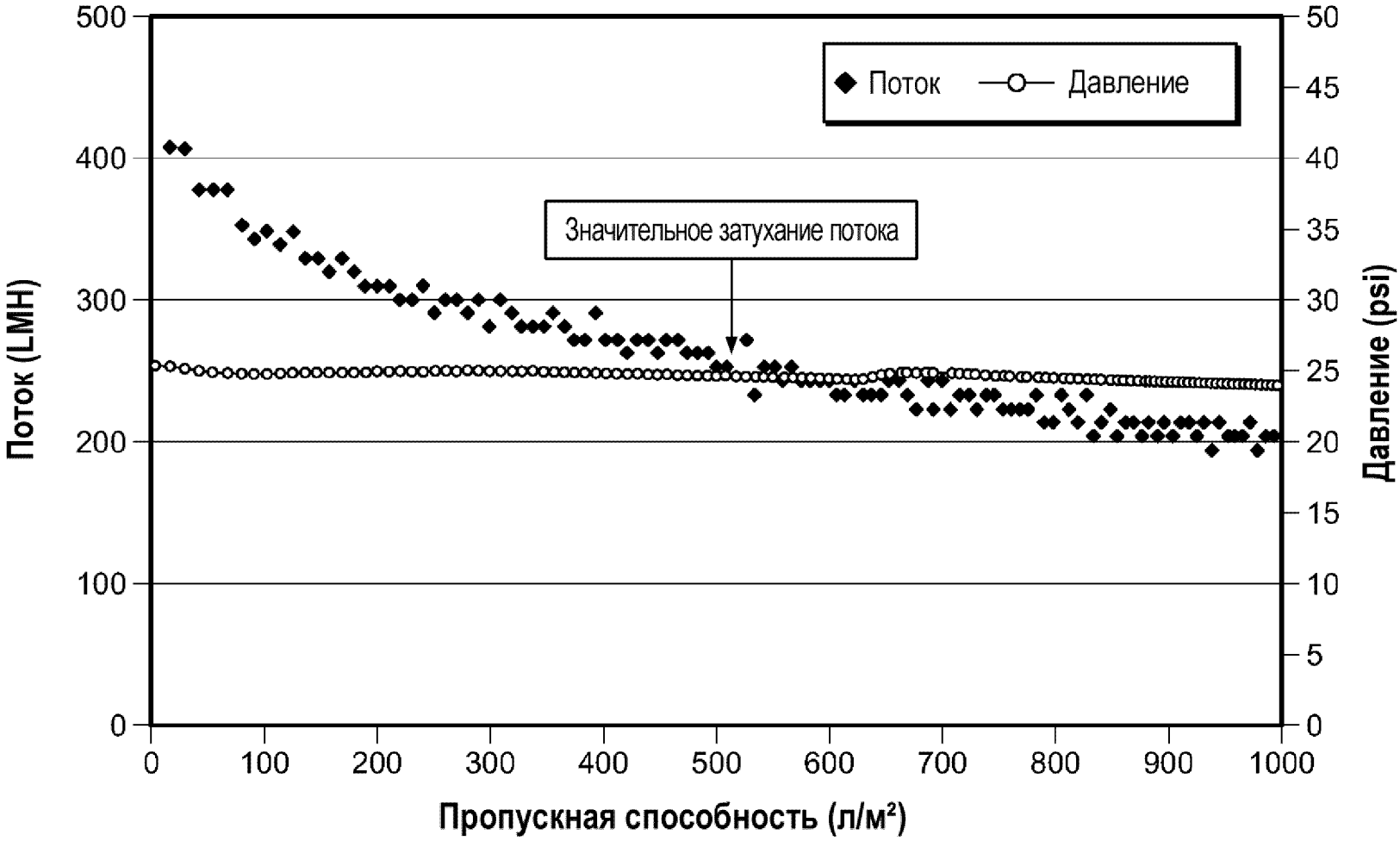
Фиг. 3


Время
Ряд #1
Ряд #2
Ряд #3
Ряд #4
Заполнение
Уравнове-шивание
Фильтрация
Промывка
Тест на целостность
NaOH
Расшифровка
К сбору пула
В отходы

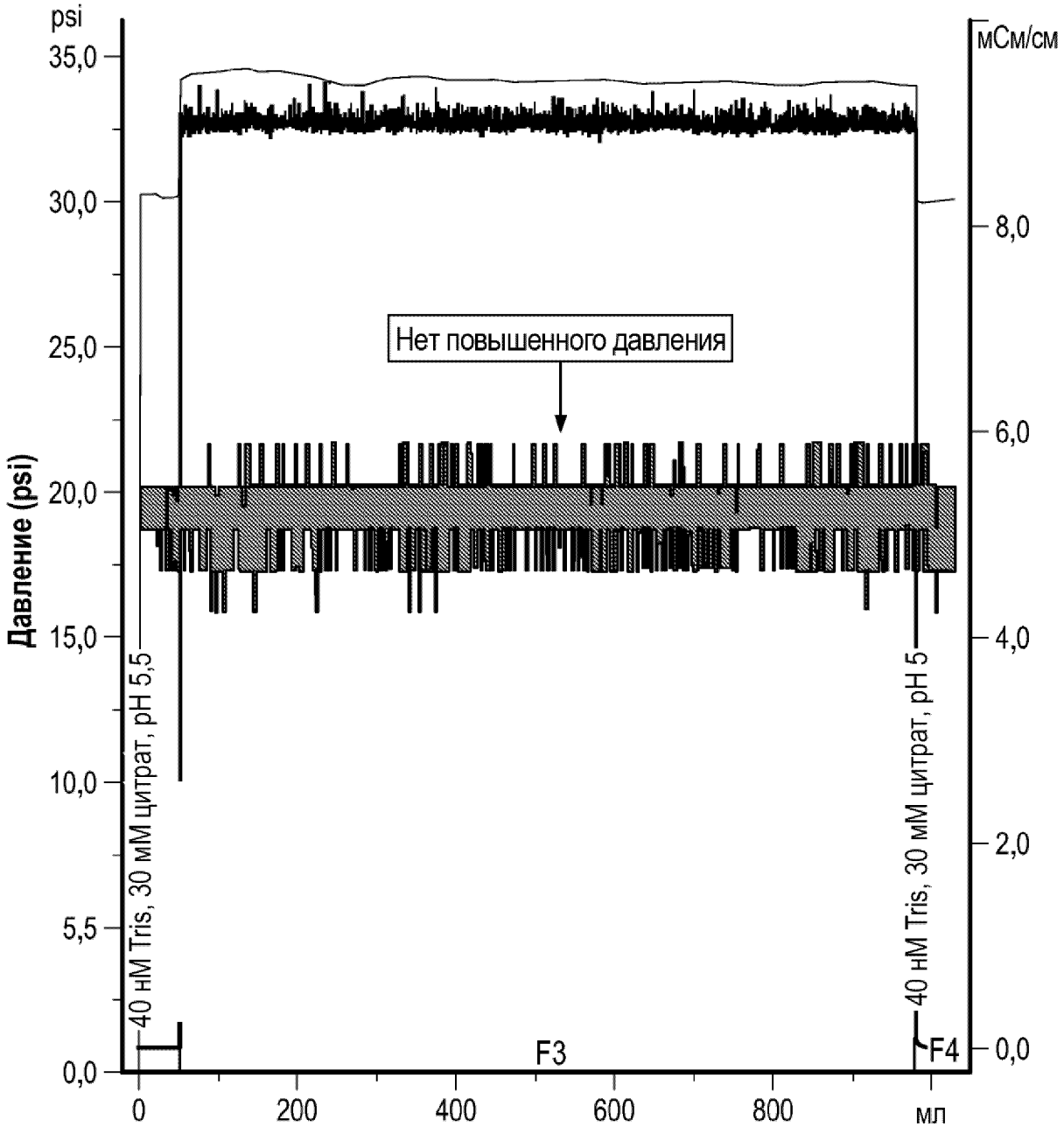
Фиг. 4


Цикл#1 Загрузка
Цикл#2 Загрузка
Цикл#3 Загрузка
Цикл#1 Промывка
Цикл#2 Промывка
Цикл#3 Промывка
Фильтр для улавливания вируса ΔP (psi)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
0
200
400
600
800
1000
1200
Пропускная способность фильтра для улавливания вируса (л/м2)

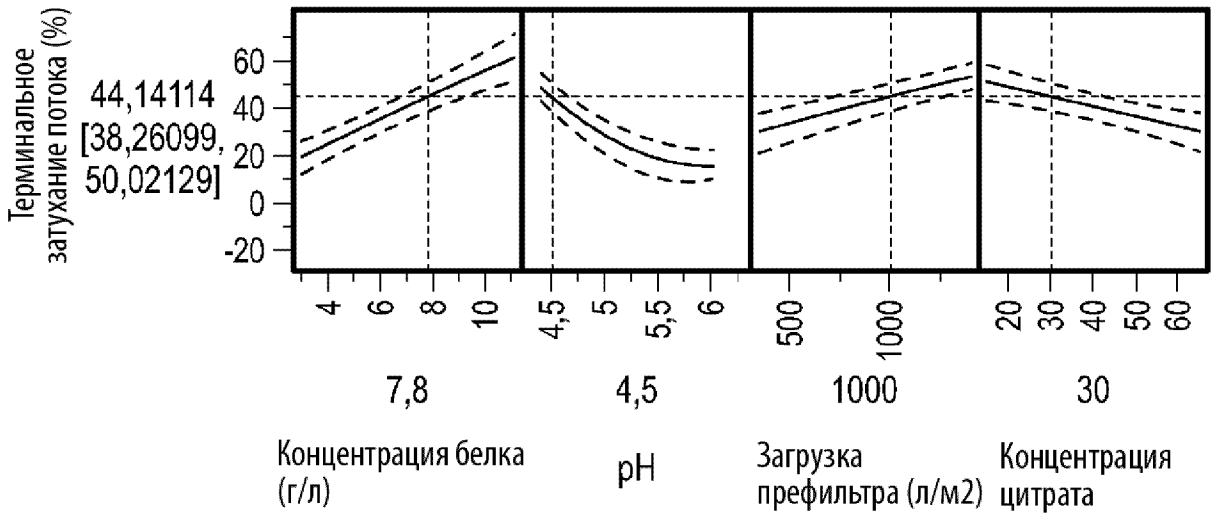
Фиг. 5


Поток
Давление
Значительное затухание потока
Поток (LMH)
Давление (psi)
Пропускная способность (л/м²)
500
400
300
200
100
0
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000

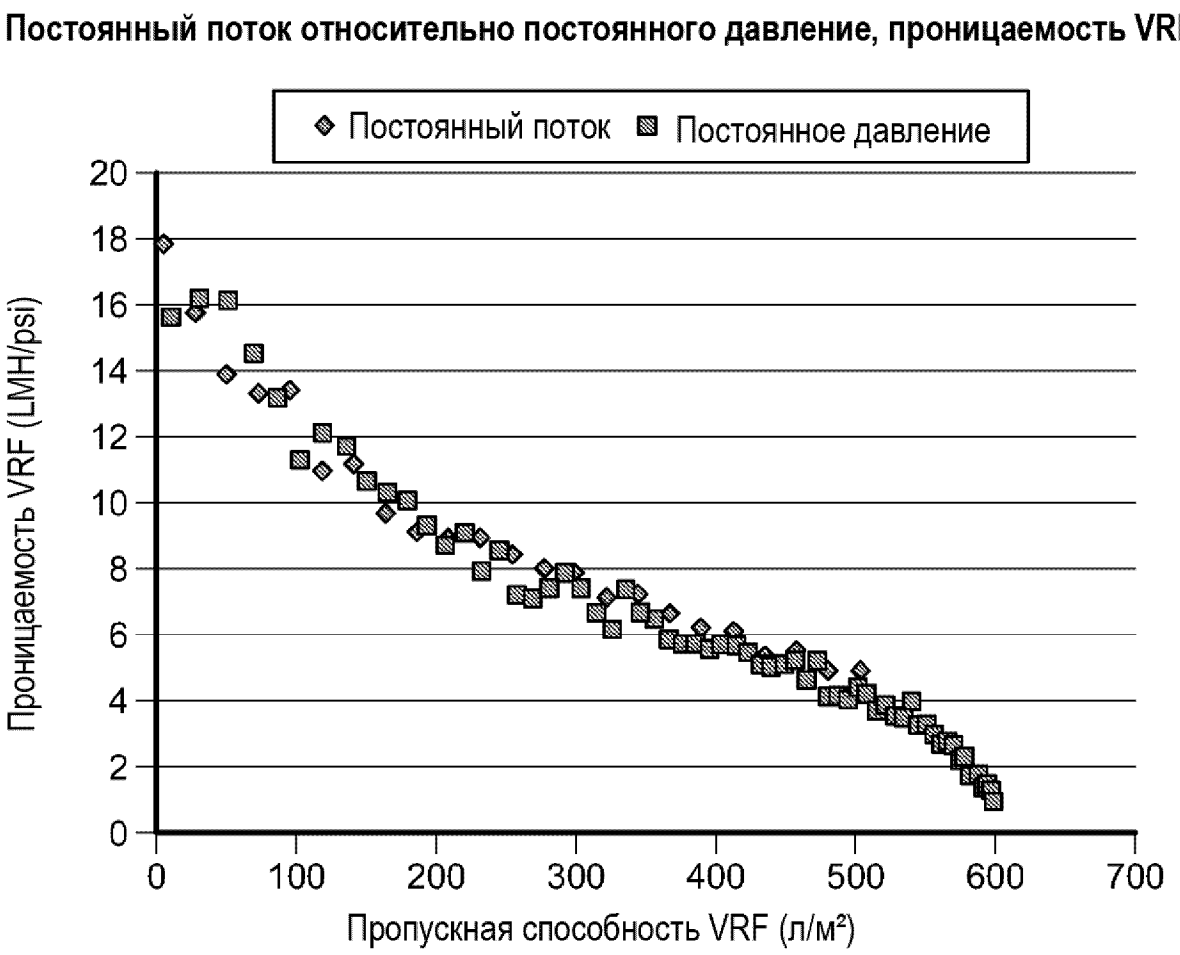
Фиг. 6


psi
35,0
30,0
25,0
20,0
15,0
10,0
5,5
0,0
Давление (psi)
мСм/см
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
Нет повышенного давления
40 нМ Tris, 30 мМ цитрат, pH 5,5
40 нМ Tris, 30 мМ цитрат, pH 5
F3
F4
0
200
400
600
800
мл

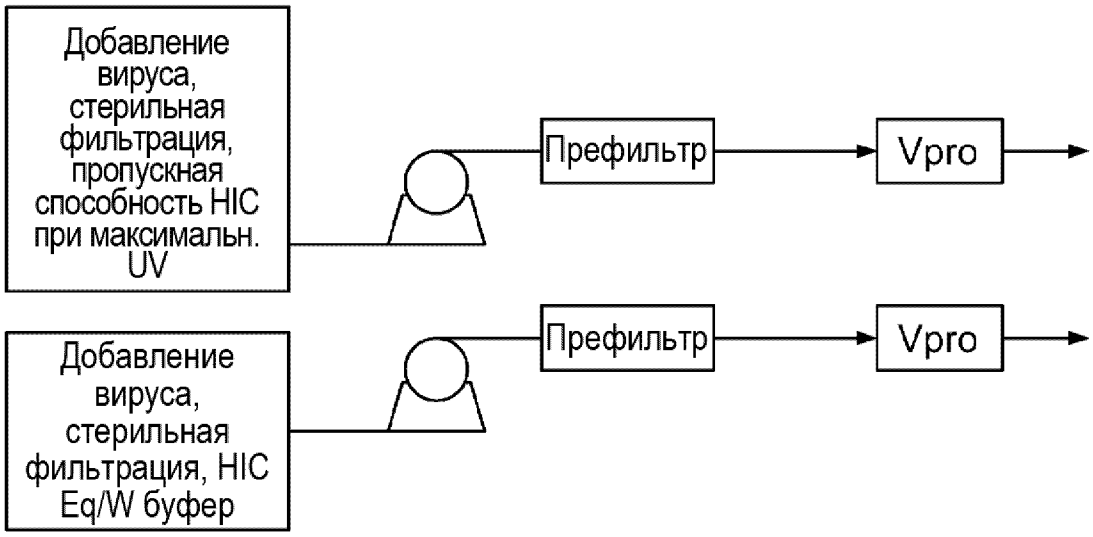
Фиг. 7


Терминальное затухание потока (%)
44,14114
[38,26099, 50,02129]
60
40
20
0
-20
4
6
8
10
4,5
5
5,5
6
500
1000
20
30
40
50
60
7,8
4,5
1000
30
Концентрация белка (г/л)
pH
Загрузка префильтра (л/м2)
Концентрация цитрата

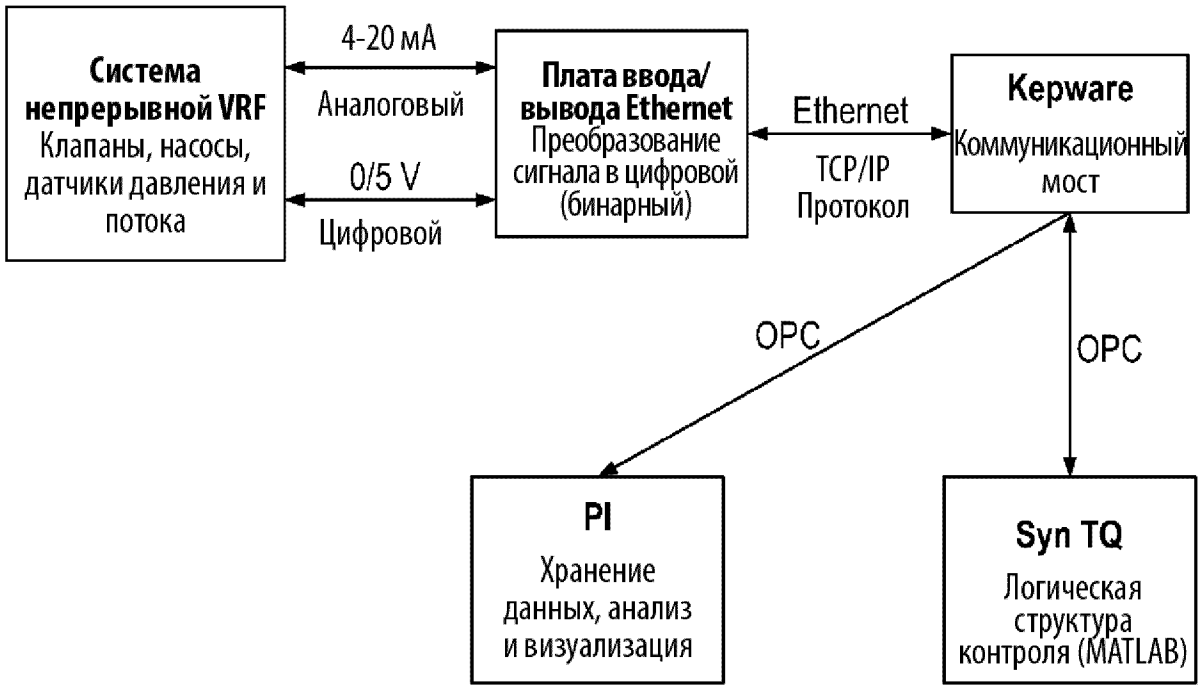
Фиг. 8


Постоянный поток относительно постоянного давление, проницаемость VRF
Постоянный поток
Постоянное давление
Проницаемость VRF (LMH/psi)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
100
200
300
400
500
600
700
Пропускная способность VRF (л/м²)

Фиг. 9

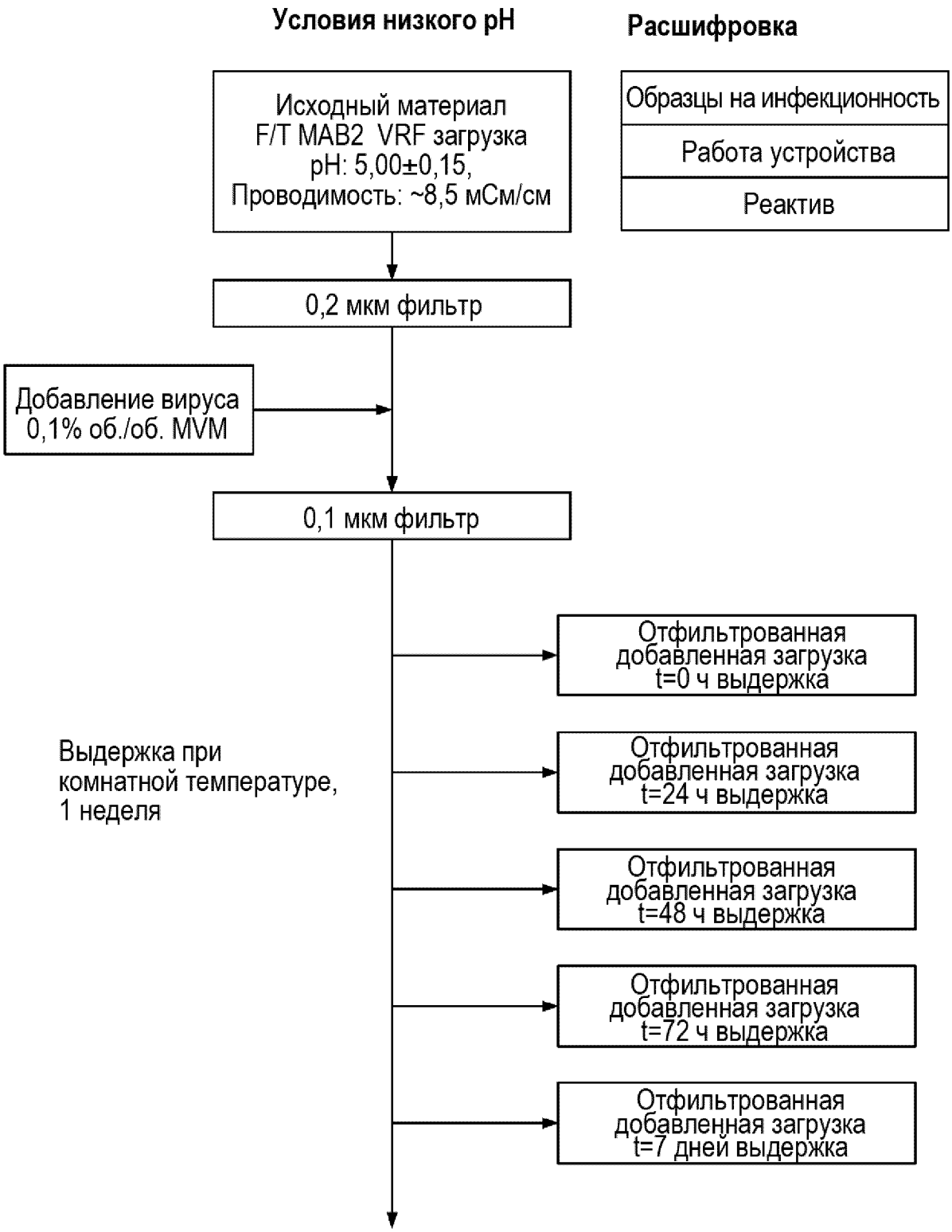

Добавление вируса, стерильная фильтрация, пропускная способность HIC при максимальн. UV
Префильтр
Vpro
Добавление вируса, стерильная фильтрация, HIC Eq/W буфер
Префильтр
Vpro

Фиг. 10

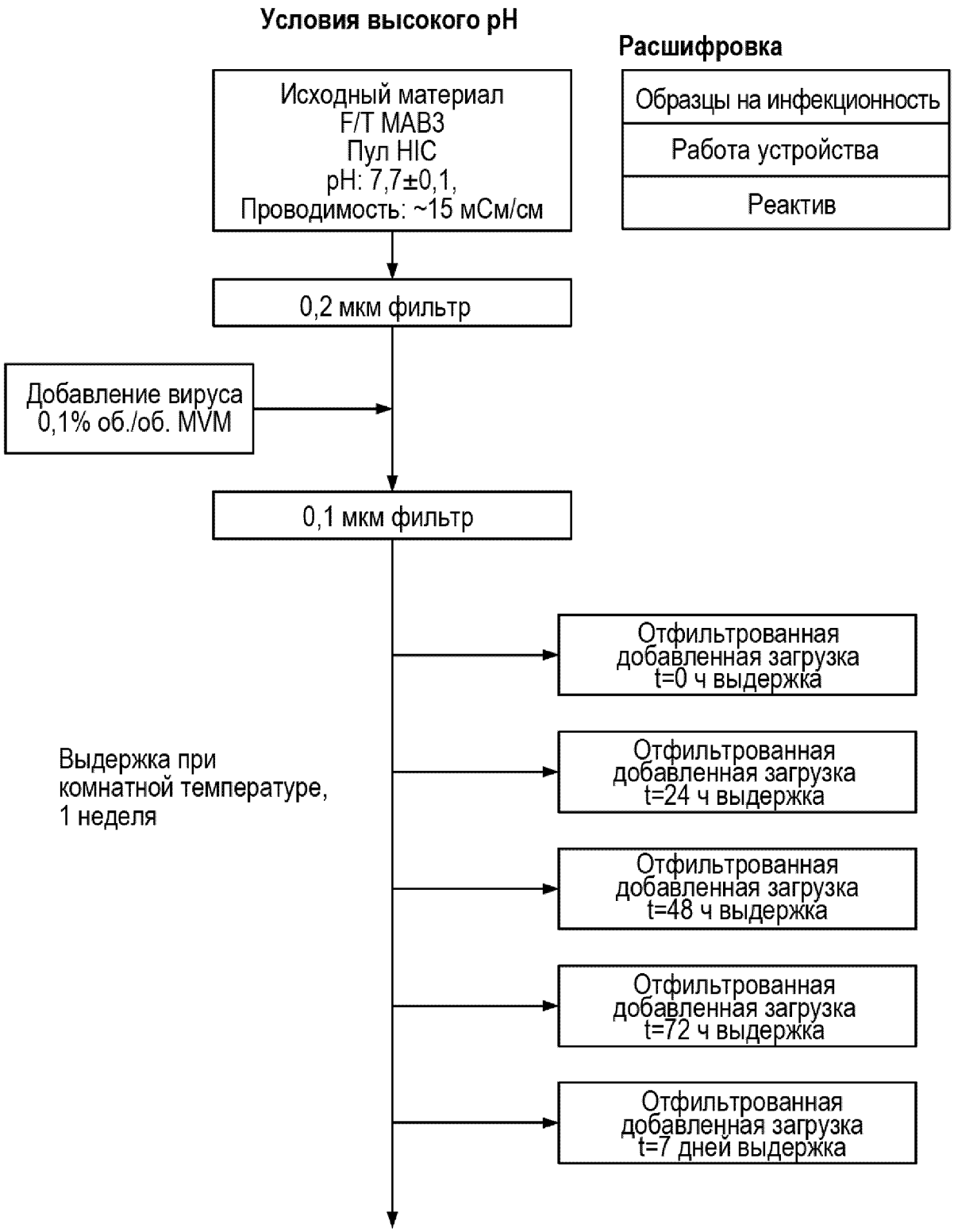


OPC: Коммуникации на открытой платформе

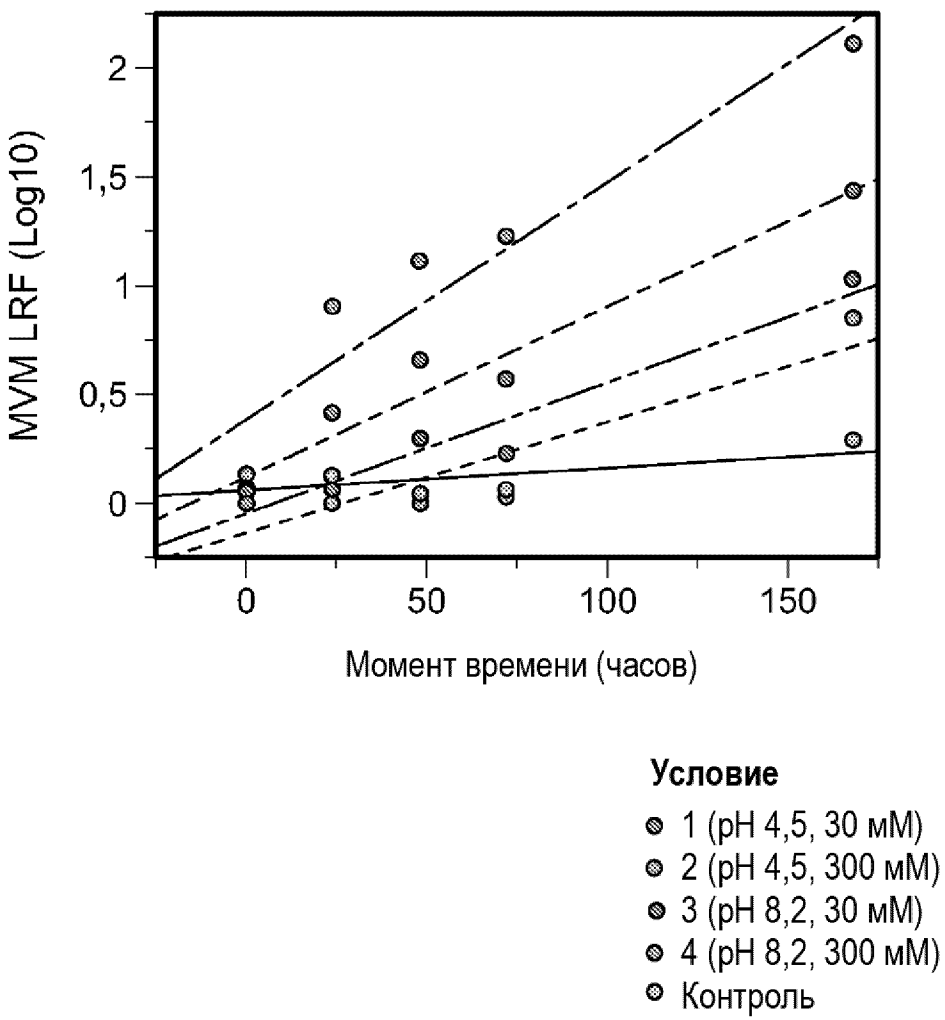
Фиг. 11


Условия низкого pH
Расшифровка
Исходный материал
F/T MAB2 VRF загрузка
pH: 5,00±0,15,
Проводимость: ~8,5 мСм/см
Образцы на инфекционность
Работа устройства
Реактив
0,2 мкм фильтр
Добавление вируса
0,1% об./об. MVM
0,1 мкм фильтр
Выдержка при
комнатной температуре,
1 неделя
Отфильтрованная
добавленная загрузка
t=0 ч выдержка
Отфильтрованная
добавленная загрузка
t=24 ч выдержка
Отфильтрованная
добавленная загрузка
t=48 ч выдержка
Отфильтрованная
добавленная загрузка
t=72 ч выдержка
Отфильтрованная
добавленная загрузка
t=7 дней выдержка

Фиг. 12


Условия высокого pH
Расшифровка
Исходный материал
F/T MAB3
Пул HIC
pH: 7,7±0,1,
Проводимость: ~15 мСм/см
Образцы на инфекционность
Работа устройства
Реактив
0,2 мкм фильтр
Добавление вируса
0,1% об./об. MVM
0,1 мкм фильтр
Отфильтрованная
добавленная загрузка
t=0 ч выдержка
Выдержка при
комнатной температуре,
1 неделя
Отфильтрованная
добавленная загрузка
t=24 ч выдержка
Отфильтрованная
добавленная загрузка
t=48 ч выдержка
Отфильтрованная
добавленная загрузка
t=72 ч выдержка
Отфильтрованная
добавленная загрузка
t=7 дней выдержка

Фиг. 13


MVM LRF (Log10)
2
1,5
1
0,5
0
0
50
100
150
Момент времени (часов)
Условие
1 (pH 4,5, 30 мМ)
2 (pH 4,5, 300 мМ)
3 (pH 8,2, 30 мМ)
4 (pH 8,2, 300 мМ)
Контроль

Фиг. 14