



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102472731 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 13

(21) 申请号 201080029549. 3

(22) 申请日 2010. 06. 21

(30) 优先权数据

0950494-5 2009. 06. 26 SE

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 12. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/SE2010/050700 2010. 06. 21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/151214 EN 2010. 12. 29

(73) 专利权人 通用电气健康护理生物科学股份
公司

地址 瑞典乌普萨拉

(72) 发明人 P·班格特森 E·埃斯特拉达

K·拉克基 H·斯科格拉尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

代理人 张金金 朱海煜

(51) Int. Cl.

G01N 30/86(2006. 01)

B01D 15/14(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 201116921 Y, 2008. 09. 17,

US 2002134718 A1, 2002. 09. 26,

US 2007131615 A1, 2007. 06. 14,

US 7178386 B1, 2007. 02. 20,

WO 2006084065 A2, 2006. 08. 10,

WO 2008153472 A1, 2008. 12. 18,

Howard A. Chase. Prediction of
the performance of preparative
affinity chromatography. 《Journal of
Chromatography》. 1984, 第 297 卷 179-202.

Howard A. Chase. Prediction of
the performance of preparative
affinity chromatography. 《Journal of
Chromatography》. 1984, 第 297 卷 179-202.

Robert L. Fahrner et al. Real-time
control of antibody loading during protein
A affinity chromatography using an on-line
assay. 《Journal of Chromatography A》. 1999,
第 849 卷 191-196.

审查员 肖锡峰

权利要求书2页 说明书8页 附图6页

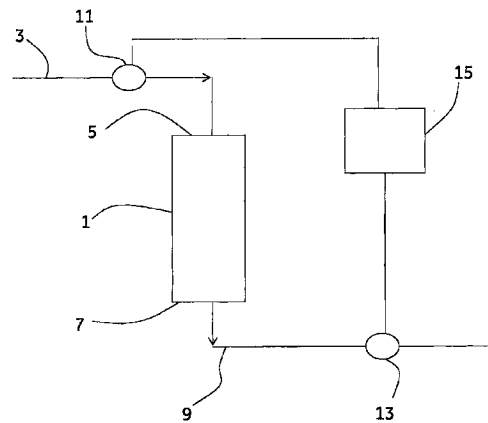
(54) 发明名称

色谱系统中的方法

(57) 摘要

用于确定色谱柱(1;39,47,59;107,109,111,113)的结合能力的方法,其包括:-检测进料信号(21;201),其代表向柱的入口提供的进料材料的成分;-检测流出物信号(23;203,205,207,209),其代表来自柱的流出物的成分;-使用该进料信号和该流出物信号来确定柱的结合能力。用于控制包括至少一个柱的色谱系统的方法,其包括下列中的步骤:-根据上文确定至少一个色谱柱的结合能力;和-根据确定的结合能力控制不同的色谱工艺步骤的起动和停止。

CN 102472731 B



1. 一种用于确定周期逆流 PCC 系统中至少两个色谱柱(1 ;39,47,59 ;107,109,111,113)的结合能力的方法,其包括:

- 检测进料信号(21 ;201),其代表向所述柱的入口提供的进料材料的成分;

- 检测来自周期逆流 PCC 系统中的至少两个色谱柱(39,47,59 ;107,109,111,113)的流出物信号(23,203,205,207,209),所述流出物信号代表来自所述柱的流出物的成分;

- 使用所述进料信号和所述流出物信号来确定所述柱的结合能力,其包括使用所述进料信号(21 ;201)和所述流出物信号(23 ;203,205,207,209)来确定 Δ 信号和最大 Δ 信号(27), Δ 信号是所述进料信号减去所述流出物信号,最大 Δ 信号(27)是当所述流出物信号由于大致全部未结合组分已经经过所述柱这一事实而显示平稳期(25)时所述进料信号减去所述流出物信号;进一步包括

使用这些流出物信号连同所述进料信号(201)以在所述色谱工艺期间连续确定所述 PCC 系统的不同色谱柱(39,47,59 ;107,109,111,113)的结合能力,

其中使用所述 Δ 信号来确定所述柱的穿透点(c)和 / 或饱和点(d),所述穿透点和饱和点计算为所述最大 Δ 信号(27)的相应的某一预定百分比。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其包括使用相同类型的检测器(11,13 ;33,45,53,65 ;115,117,119,121,123)检测所述进料信号(21 ;201)和所述流出物信号(23 ;203,205,207,209)。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其包括当确定所述 Δ 信号和所述最大 Δ 信号时补偿时间延迟,所述时间延迟代表未结合组分经过所述柱所花的时间。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其包括检测所述进料材料和所述流出物中的 UV 吸光度。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其包括检测所述进料材料和所述流出物中的 pH、电导率、光散射、荧光、IR 或可见光。

6. 一种色谱系统,其包括在周期逆流 PCC 系统中的至少两个柱(39,47,59 ;107,109,111,113),其特征在于,所述色谱系统进一步包括:

- 第一检测器(11 ;33 ;115),其适应于检测代表向至少一个柱的入口提供的进料材料成分的进料信号(21 ;201);

- 第二检测器(13 ;45 ;117),其适应于检测代表来自所述系统的第一柱(1 ;39 ;107)的流出物成分的流出物信号(23 ;203);

进一步包括另外的检测器(53,65,119,121,123),其中在每个另外的柱(47,59,109,111,113)之后具有一个该另外的检测器,每个另外的检测器适应于检测代表来自每个另外的柱(47,59 ;109,111,113)的流出物的成分的流出物信号(205,207,209),每个检测器连接到确定单元(71),所述确定单元适应于在所述色谱工艺期间基于所述进料信号和所述流出物信号连续确定每个色谱柱(39,47,59 ;107,109,111,113)的结合能力,其中

所述确定单元(15 ;71)适应于使用所述进料信号(21 ;201)和所述流出物信号(23 ;203,205,207,209)来确定对于每个柱(1 ;39,47,59 ;107,109,111,113)的 Δ 信号和最大 Δ 信号(27), Δ 信号是所述进料信号减去所述流出物信号,最大 Δ 信号(27)是当所述流出物信号由于大致全部未结合组分已经经过所述柱这一事实而显示平稳期(25)时所述进料信号减去所述流出物信号;

其中所述色谱系统进一步包括控制单元(73),所述控制单元(73) 连接到所述确定单元(15 ;71) 并且适应于在所述色谱工艺期间连续监测所述确定的结合能力并且依赖于所述确定的结合能力实时控制不同的色谱工艺步骤的起动和停止,

其中所述确定单元(15 ;71)进一步适应于使用所述 Δ 信号来确定所述柱的穿透点(c) 和 / 或饱和点(d),所述穿透点和饱和点计算为所述最大 Δ 信号(27)的相应的某一预定百分比。

7. 如权利要求 6 所述的色谱系统,其中所有检测器(11,13 ;33,45,53,65 ;115,117,119,121,123) 是相同类型。

8. 如权利要求 6 或 7 所述的色谱系统,其中所述确定单元(15 ;71) 进一步适应于当确定所述 Δ 信号和所述最大 Δ 信号时补偿时间延迟,所述时间延迟代表未结合组分经过所述柱所花的时间。

9. 如权利要求 6 或 7 所述的色谱系统,其中所述检测器(11,13 ;33,45,53,65 ;115,117,119,121,123) 是 UV 检测器。

10. 如权利要求 6 或 7 所述的色谱系统,其中所述检测器(11,13 ;33,45,53,65 ;115,117,119,121,123) 是 pH、电导率、光散射、荧光、IR 或可见光检测器。

11. 一种用于控制包括至少两个柱(39,47,59 ;107,109,111,113) 的色谱系统的方法,其包括下列中的步骤:

- 检测进料信号(201),其代表向所述柱的入口提供的进料材料的成分;
- 检测流出物信号(203,205,207,209),其代表来自所述系统中的每个柱的流出物的成分;
- 根据权利要求 1-6 中任一项确定所述至少两个色谱柱的结合能力;
- 依赖于所确定的结合能力控制对所述柱的进料以及所述柱之间的进料。

12. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,在所述色谱工艺期间连续确定所述结合能力并且依赖于所确定的结合能力实时控制对所述柱的进料以及所述柱之间的进料。

13. 如权利要求 11 或 12 所述的方法,其包括依赖于所确定的结合能力控制所述进料和缓冲泵(31,37 ;101,103,105) 的流率。

14. 如权利要求 11 或 12 所述的方法,其包括通过根据所确定的结合能力调整不同的柱应该多久在加载段中以及在加载段中哪个位置而补偿不同的柱性质和 / 或流率中的任何差异。

色谱系统中的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于确定色谱柱结合能力 (binding capacity) 的方法、色谱系统以及用于控制色谱系统的方法。

背景技术

[0002] 溶质的色谱柱的结合能力是工艺色谱中非常重要的因素。该结合能力直接影响色谱步骤的生产力和成本。该结合能力从动态 / 穿透能力方面定义或作为最大结合能力来定义。该动态能力取决于溶液流过色谱介质填充柱的条件, 例如定义为柱体积和进料流率之间的比率的停留时间。如果停留时间无限长, 则最大结合能力代表柱的穿透能力。初始穿透能力定义为在流出物中首次检测到溶质时的点处由柱占据的结合溶质的量。穿透能力还可定义为给定的穿透百分比处的能力, 其中百分比代表在流出物中存在的来自柱的结合溶质的量, 其采用进料中存在的溶质的百分比表达。根据该定义, 最大结合能力将等于 100% 穿透 (即不再有溶质能结合到柱的点处) 的穿透能力。因此, 为了确定最大能力, 在不同的穿透水平测量穿透能力, 其中这些水平由在样品加载期间在流出物中测量的来自柱的溶质的浓度水平来定义。通常, 通过连续监测通过置于流出物线的检测器的流中的信号来确定这些浓度。这些浓度 (信号) 对时间 (或体积或加载质量) 的标绘图称作穿透曲线。色谱上穿透的位置和它的形状与有多少溶质能够在柱上结合以及溶质有多快将所有吸附位饱和有关。还示出有在任何给定时间还有多少溶质可以结合到柱。在杂质存在的情况下溶质的穿透结合能力是当发展纯化规程时优化的最关键参数之一。因为杂质大部分情况下具有与溶质相似的吸光性质, 结合穿透能力的确定是繁琐和费力的工作。在典型的试验中, 来自的柱的流出物采用连续小部分收集, 其随后使用例如 HPLC 等高分辨率技术对溶质进行分析。从而对色谱柱的结合能力的确定是相当复杂的, 并且进料溶液浓度在进料施加到色谱柱上的期间随机变化的情况下, 无法测量实际的穿透能力。如果想在最佳工艺条件下操作柱, 测量实际穿透能力是非常重要的。例如, 可以示出, 在某些条件下当感兴趣的溶质达到它在柱流出物中的浓度的某一值时, 例如它初始浓度的 10%, 获得捕获色谱步骤的最大生产力。如果穿透能力根据上文描述的方法确定, 如果进料浓度或工艺条件 (其包括流率 and / 或色谱介质性质) 采用不可预测的方式随时间变化, 则无法在确切的 10% 的穿透时终止柱的加载。

[0003] 此外, 在变化的工艺条件下, 确定在不同穿透水平处的穿透能力在连续色谱的情况下是非常重要的。在连续色谱中, 若干相同的柱采用允许柱串联和 / 或并联操作的设置而连接, 其取决于方法要求。从而, 原则上所有柱可以同时运行, 只是方法步骤稍微改变。程序可以重复, 使得每个柱在工艺中加载、洗脱和再生若干次。与“常规的”色谱相比, 其中单个色谱循环基于若干连贯步骤, 例如加载、清洗、洗脱和再生, 在基于多个相同柱的连续色谱中, 所有这些步骤同时发生只是每个发生在不同的柱上。连续色谱操作导致更好地利用色谱树脂、减少的处理时间并且降低的缓冲需求, 所有这些有益于工艺经济。连续色谱有时表示为模拟移动床 (SMB) 色谱。模拟移动床色谱是周期逆流工艺的一个示例, 因为构成系

统的所有色谱柱在与样品流相反的方向上周期地同时移动。柱的明显的移动通过使到柱的进入流和从柱的输出流适当地重定向而实现。

[0004] Bishop 等人 (" Simulated Moving Bed technology in Biopharmaceutical Processing(生物制药加工中的模拟移动床技术)", Bishops, M. 和 Pennings, M., Recovery Biological Products XI, (2003) Banff, Alberta, Canada) 公开了基于模拟移动床 (SMB) 技术的连续色谱法, 其已经成功地用于具有蛋白 A 亲和树脂的 IgG 的实验室规模的纯化。尽管实际上由 SMB 提供的多柱和多段连续方法极大地提高工艺效率, 但至今 SMB 系统尚未用于 cGMP 生物制药生产, 这主要因为从硬件和操作两个角度的系统的复杂性。操作的角度是特别感兴趣的, 因为连续法是更复杂的并且需要许多操作 (步骤) 在非常精确的预定时间点同时发生。与批量色谱相比之下, 考虑工艺变化性的安全因素的实现不建议用于连续工艺, 这是因为通过限定, 它们在假设仅在到系统的输入没有变化的情况下才能成立的稳定态下操作。

[0005] Heeter 等人 (Heeter, G. A. and Liapis, A. I., J. Chrom A, 711(1995)) 已经提出基于三柱周期逆流色谱 (3C-PCC) 原理的方法作为典型的四段 SMB 系统的备选。最近, Lacki 等人 (" Protein A Counter-Current Chromatography for Continuous Antibody Purification(用于连续抗体纯化的蛋白 A 逆流色谱)", Lacki, K. M. 和 Bryntesson, L. M., ACS(2004) Anaheim, CA USA) 描述这样的 3C-PCC 系统用于对 MabSelect™亲和树脂的 IgG 吸附。该 3C-PCC 系统需要比典型的四段 SMB 系统更简单的硬件和更容易的操作, 其直接降低与资本设备和系统维护关联的成本。

[0006] 事实上, 模拟移动床技术已经在各种其他领域中使用了几十年。例如, 美国 3, 291, 726 (Universal Oil Products) 早在 1966 年描述用于石油化工业的连续模拟逆流吸附工艺。

[0007] 在历史上, 可靠的连续工艺的必不可少的因素是: 1) 使用的柱的质量, 并且更具体地, 柱之间的相似性或甚至同一性, 2) 恒定进料成分, 和 3) 硬件可靠性, 更具体地, 由泵输送的恒定流率。如果柱是不相同的, 典型地用于设计连续色谱工艺的理论计算将不正确, 并且将变得难以设计高效和健全连续色谱工艺。如果进料浓度和流率采用意想不到的方式随时间变化, 相同的论点适用。因此, 为了放大考虑, 在系统中具有相同的柱和可靠的泵是必不可少的。然而, 用色谱介质封装柱以便获得可重复结果是非常复杂的。甚至板的数量或其他封装性质中的小的差异可以对最终结果产生巨大影响。此外, 由于色谱树脂的能力在树脂寿命 / 使用期间典型地变化, 为新的树脂选择的工艺条件将不能适用于已经使用若干次的树脂。如果进料浓度还将改变, 设计将一直在最佳状态操作的高效连续色谱工艺将甚至是更复杂的。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供用于确定和监测色谱柱的结合能力的可靠的和动态方法。

[0009] 这通过根据权利要求 1 的方法并且通过根据权利要求 10 的色谱系统实现。因此进料信号和流出物信号可以用于连续确定色谱柱的结合能力。

[0010] 本发明的另外的目的是提供用于控制色谱系统的可靠的和动态方法。

[0011] 这采用根据权利要求 20 的方法实现。因此色谱系统可以基于实时测量色谱柱的

结合能力而动态控制。

[0012] 在本发明的一个实施例中,色谱系统是周期逆流系统。

[0013] 本发明的另外的合适的实施例在从属的权利要求中限定。

附图说明

[0014] 图 1 示意地示出根据本发明的色谱系统,其包括一个色谱柱和两个检测器。

[0015] 图 2 是示出来自图 1 中的两个检测器的信号的图。

[0016] 图 3 示意地示出根据本发明的三柱周期逆流 (3C-PCC) 系统,其包括四个检测器。

[0017] 图 4a、b 和 c 示意地示出图 3 的三个阀。

[0018] 图 5 示意地示出根据本发明的四柱周期逆流 (4C-PCC) 系统。

[0019] 图 6 是示出从图 5 中示出的 4C-PCC 系统中的五个检测器中检测的信号图。

具体实施方式

[0020] 为了克服关于现有技术论述的困难,由本发明提供基于类似反馈的控制原理的实时控制算法。因此,用于评估不同的柱在任何给定工艺时刻的状态的方法是特别感兴趣的。例如,了解色谱柱在特定的穿透水平时的结合能力将允许人们评估柱是否仍能够结合溶质以及在柱达到全饱和之前仍能够结合多少溶质。相似地,从工艺成品率角度来看,了解是否已经到达初始穿透能力是最感兴趣的,因为此时将在来自柱的流出物的流中发现溶质,并且如果没有采取适当行动,溶质将直接浪费或与其他未结合组分一起被收集。

[0021] 图 1 示意地示出根据本发明的简单色谱系统的一部分。该色谱系统包括一个色谱柱 1。它进一步包括连接到色谱柱 1 的入口端 5 的进料线 3。要传递通过柱 1 的样品可以通过该进料线 3 添加。系统进一步包括连接到相反端 (即色谱柱 1 的出口端 7) 的流出物线 9。已经经过色谱柱 1 的样品可以通过流出物线 9。色谱系统根据本发明进一步包括沿着进料线 3 的某处安置的第一检测器 11。该第一检测器 11 适应于检测进料信号,其代表进入进料线的进料材料 (样品) 的成分。此外,色谱系统包括第二检测器 13,其沿着流出物线 9 的某处安置并且适应于检测代表通过流出物线 9 从柱 1 流出的样品的成分的流出物信号。该第一和该第二检测器 11、13 合适地是相同类型的检测器并且在一个实施例中,其是 UV 检测器,即测量样品的 UV 吸光度。其他可能类型的检测器测量 pH、电导率、光散射、荧光、IR 或可见光。如果系统中的不同的检测器不是相同类型的检测器,当根据本发明用于进一步计算时,需要使检测到的信号相关。

[0022] 此外,根据本发明,第一和第二检测器 11、13 都连接到确定单元 15。所述单元分析在第一和第二检测器 11、13 中检测的信号,以便确定色谱柱的结合能力。来自第一和第二检测器 11、13 的可能的信号在图 2 中示出,在图中示出随时间的信号强度。进料信号表示为 21 并且是来自第一检测器 11 的信号。它大致上是直线,因为进料样品在该情况下并且在该时间窗口期间是成分恒定的。流出物信号表示为 23 并且是来自第二检测器 13 的信号。样品的一部分一经过柱 1 并且进入流出物线 9 (其中安置第二检测器 13) 的通道,该流出物信号 23 就在点 a 从零开始上升。信号然后将上升直到点 b,此处它稳定进入平稳期 25。当进料中的所有未结合组分已经经过柱时,该平稳期 25 出现。在平稳期 25 之后当信号 23 开始再次上升时进一步限定穿透点 c。这是由于柱 1 中的色谱介质开始达到饱和并且原本应

该已经结合在柱中的样品部分中的一些开始穿透柱这一事实。当信号 23 接近信号 21 时进一步限定穿透点 d。该点限定作为饱和点并且代表样品的结合组分几乎完全将色谱介质饱和的时刻。

[0023] 根据本发明,在任何给定时间点计算 Δ 信号 (Deltasignal),其定义成从在减少了规定时间延迟的给定时间与给定时间之间测量的信号减去在给定时间测量的流出物信号 23 所选取的进料信号 21。进料信号 21 对进料的未结合和结合组分两者的特征(在一个实施例中,UV 吸光度)进行测量。该时间延迟定义为样品中的未结合化合物从进料检测器 11(图 1)移动到流出物检测器 13(图 1)的时间。该时间延迟可以应用停留时间分布理论测量,或它可以通过从信号 23 达到平稳期 25 时的时间中扣除信号 21 首次到达最高平稳期 e 时的时间而测量。这在图 2 中图示为箭头 29。一个具体时间点处的 Δ 信号在图 2 中图示为箭头 28。如指示的,如果时间延迟被补偿,该箭头 28 可以倾斜。

[0024] 根据本发明,计算最大 Δ 信号 (Deltasignalmax) 27,其定义成进料信号 21 减去流出物信号 23 在平稳期 25 时的信号水平。该最大 Δ 信号 27 然后可以用于限定对于例如穿透点和饱和点的合适的水平。穿透点 c 可以合适地定义成最大 Δ 信号的某一预定百分比,例如在跨度 1-10% 中的某处或更合适地在 1-3% 的跨度中的某处,并且饱和点 d 可以合适地定义成最大 Δ 信号的某一预定百分比,例如在跨度 60-90% 中的某处或更合适地在跨度 70-80% 中的某处。

[0025] 确定穿透点和饱和点的该方法的一个优势是这可以实时自动完成并且这由于进料信号被自动补偿而不依赖进料浓度。

[0026] 在本发明的另外的方面,结合能力(例如穿透点和饱和点)的这些确定用于自动控制不同的色谱工艺步骤的起动和停止,即当已经达到某一穿透点或饱和点水平时,控制系统可以控制色谱系统进入下一个工艺步骤,例如使柱流出物重定向到不同的收集点,或停止加载步骤并且启动柱清洗步骤。

[0027] 在本发明的另一个方面,在所谓的周期逆流 (PCC) 系统中,色谱系统包括超过一个色谱柱。在该周期逆流系统中,进料大部分时间被传递通过串联连接的至少两个柱。该串联通常称作加载段,并且在该加载段中添加柱和从该加载段去除柱分别基于串联的最后一个和第一个柱的预定穿透点和饱和点。在图 3 中示意地示出根据本发明的包括三个柱的这样的系统。本发明的益处在该示例中甚至更明确,这是因为 PCC 系统中的一个常见问题是为了能够获得高效系统操作而需要在系统中使用的柱尽可能相同并且进料成分和流率应该恒定,或至少它们随工艺时间的变化用先验应该得知。利用本发明,可以通过根据确定的穿透点和饱和点调整不同的柱应该在加载段中多久以及应该在加载段中哪个位置而补偿柱结合能力和 / 或流率中的任何差异。

[0028] 在图 3 中示出进料泵 31 经由第一检测器 33 连接到第一阀块 35。缓冲泵 37 还连接到该第一阀块 35。该第一阀块 35 经由第一 T 型阀 41 进一步连接到第一柱 39 的入口。该第一柱 39 的出口端通过第二检测器 45 连接到第二 T 型阀 43。该第一阀块 35 经由第二阀块 49 进一步连接到第二柱 47 的入口。该第二柱 47 的出口端经由第三检测器 53 连接到第三阀块 51。此外,第三 T 型阀 55 连接在该第二 T 型阀 43 和该第三阀块 51 之间。该第三 T 型阀 55 还连接到第四 T 型阀 57,其还连接到第一 T 型阀 41 和第二阀块 49。因此来自第一柱 39 的流出物可以通过 T 型阀 43、55、57 和阀块 49 被引导到第二柱 47 的入口。此外,

第一阀块 35 经由第五 T 型阀 61 连接到第三柱 59 的入口。第三柱 59 的出口端经由第四检测器 65 连接到第六 T 型阀 63。此外,第七 T 型阀 67 连接在第三阀块 51 和该第六 T 型阀 63 之间。该第七 T 型阀 67 还连接到第八 T 型阀 69,其还连接到第二阀块 49 和第五 T 型阀 61。因此,来自第二柱 47 的流出物可以被引导到第三柱 59 的入口。来自第三柱 59 的流出物可以通过阀 63、67、51、55、57 和 41 引导到第一柱 39 的入口。第一阀块 35 的结构在图 4a 中示意地示出,第二阀块 49 的结构在图 4b 中示意地示出并且第三阀块 51 的结构在图 4c 中示意地示出。在这些图中,每组四个盒子代表 T 型阀(3 通阀)。此外,根据本发明,第一、第二、第三和第四检测器 33、45、53 和 65 全部连接到确定单元 71。该确定单元适应于使用来自检测器的检测信号来确定对于三个不同的柱的穿透点和饱和点。该确定单元 71 和所有的阀块以及 T 型阀和泵进一步连接到控制单元 73(所有连接未在图中示出),其适应于从何时从加载段去除柱或添加柱进入加载段、何时改变流率、何时起动新的清洗步骤等方面控制色谱系统。检测器 33、45、53、65 在一个实施例中是 UV 检测器。可以用于本发明的检测器的其他示例已经在前面论述。

[0029] 在本发明的一个实施例中,采用图 3 的系统实行的色谱工艺包括:

[0030] (a) 用第一检测器 33 连续监测进料线中的信号并且连续监测来自柱 39、47、59 的每个的流出物中的信号(用第二、第三和第四检测器 45、53、65),以及计算在时间上往后偏移预定延迟时间的进料信号和来自每个柱 39、47、59 的输出流线中的流出物信号之间的差;

[0031] (b) 将包括至少一个目标化合物的进料传过第一吸附剂(第一柱 39 中的色谱介质),并且当在进料线和来自第一吸附剂的流出物之间测量的 Δ 信号(如上文关于图 2 描述的定义)达到预定值 x_1 时将输出流从第一吸附剂引导到第二吸附剂(第二柱 47 中的色谱介质);

[0032] (c) 将进料重定向到第二吸附剂,并且当在进料线和来自第一吸附剂的流出物之间测量的 Δ 信号达到预定值 x_2 时使清洗液传过目标化合物已经与之结合的第一吸附剂;

[0033] (d) 当在进料线和来自第二吸附剂的流出物之间测量的 Δ 信号达到预定值 x_1 时,引导清洗液输出流到第三吸附剂(第三柱 59 中的色谱介质)并且随后将输出流从第二吸附剂引导到第三吸附剂;

[0034] (e) 使第一吸附剂再生;

[0035] (f) 将进料重定向到所述第三吸附剂,并且当在进料线和来自第二吸附剂的流出物之间测量的 Δ 信号达到预定值 x_2 时使清洗液传过目标化合物已经与之结合的第二吸附剂;

[0036] (g) 当在进料线和来自第三吸附剂的流出物之间测量的 Δ 信号达到预定值 x_1 时,引导清洗液输出流到第一吸附剂,并且随后将输出流从第三吸附剂引导到第一吸附剂;

[0037] (h) 使第二吸附剂再生;

[0038] (i) 将进料重定向到所述第一吸附剂,并且当在进料线和来自第三吸附剂的流出物之间测量的 Δ 信号达到预定值 x_2 时使清洗液传过目标化合物已经与之结合的第三吸附剂;

[0039] (j) 当在进料线和来自第一吸附剂的流出物之间测量的 Δ 信号达到预定值 x_1 时,引导清洗液输出流到第二吸附剂,并且随后将输出流从第一吸附剂引导到第二吸附剂;

[0040] (k) 使第三吸附剂再生；

[0041] (l) 重复步骤 (b)-(k)；

[0042] 其中至少一个目标化合物在步骤 (d)、(g) 和 / 或 (j) 中收集。x1 和 x2 的预定值分别代表穿透点和饱和点。

[0043] 当操作逆流系统时本发明能够使用不相同的柱,这是因为柱性质中的任何差异可以通过基于对柱的每个测量的 Δ 信号和最大 Δ 信号自动调整穿透和饱和切换点而补偿。这还能够当由于进料浓度中的任何变化而发生进料浓度的意想不到的变化时操作逆流系统,并且从而加载进入每个柱的质量的变化可以通过基于自动补偿进料浓度变动的 Δ 信号和最大 Δ 信号自动调整穿透和饱和切换点而补偿。

[0044] 在本发明的另一个实施例中,包括超过 2 个色谱柱的色谱系统可以用于直接捕获来自源于灌注细胞培养的进料流的产物。对于本领域内技术人员,众所周知在这样的流中的组分浓度将随时间改变,并且在没有自动控制算法情况下,由于错误地用先验指定的重定向点,色谱系统的操作不可能没有明显损耗产物的风险。

[0045] 示例

[0046] 提供本示例仅为了说明目的,并且不应该解释为限制由附上的权利要求限定的本发明。

[0047] 该示例图示使用根据本发明的具有 ΔUV_{max} 控制(即在该示例中检测器是 UV 检测器并且最大 Δ 信号称作 ΔUV_{max})的四柱周期逆流(4C-PCC)系统在蛋白 A 色谱树脂上从包含单克隆抗体(MAb)和牛血清白蛋白的混合物中提纯 MAb 的连续主要捕获步骤。更具体地,四个相似的柱用蛋白 A 色谱树脂 MabSelect™(GE Healthcare Bio-Sciences, 瑞典,乌普萨拉)填充。这些柱连接到定制修改的 ÄKTAexplorer™(GE Healthcare Bio-Sciences, 瑞典,乌普萨拉)色谱系统(图 5),其配置为具有基于连续比较在四个柱的每个的前面和后面测量的 UV 信号的自动控制功能的四柱周期逆流系统 4C-PCC。该系统包括三个独立的泵:进料泵 101、第一缓冲泵 103 和第二缓冲泵 105。该系统进一步包括第一柱 107、第二柱 109、第三柱 111 和第四柱 113。该系统进一步包括 5 个 UV 检测器:安置在进料线上的第一 UV 检测器 115,安置在第一柱 107 后面的第二 UV 检测器 117,安置在第二柱 109 后面的第三 UV 检测器 119,安置在第三柱 111 后面的第四 UV 检测器 121 和安置在第四柱 113 后面的第五 UV 检测器 123。该系统进一步包括若干旋转阀 125a-j 和分流器 127。安置这些 UV 检测器 115、117、119、121、123 使得进料流和来自每个柱的流出物传递通过 UV 检测器(图 5)。来自每个 UV 检测器的吸光度使用 UNICORN™软件(GE Healthcare Bio-Sciences, 瑞典,乌普萨拉)记录。UNICORN™还用于控制所有的泵和阀。从蛋白 A 柱洗脱的 MAb 收集在单个池子中。

[0048] 下列单柱色谱循环用作用于采用连续方式操作 4C-PCC 洗脱的基础:1) 用 3 个柱体积(CV)的缓冲液 A 来平衡柱;2) 柱加载进料;3) 用 4CV 的缓冲液 A 清洗柱;4) 用 4CV 的缓冲液 B 洗脱柱;5) 用 4CV 的缓冲液 C 的柱 CIP;以及,6) 用 3CV 的缓冲液 A 使柱再生。所有步骤以 0.4mL/min 的流率进行。

[0049] 使用的溶液的成分在下面给出:

[0050] 缓冲液 A :PBS, pH 7

[0051] 缓冲液 B :0.1M 柠檬酸钠, pH = 3.5

[0052] 缓冲液 C :50mM NaOH

[0053] 进料 :溶解在缓冲液 A 中的~ 2.00g/L MAb 和 3mg/ml BSA(Sigma)

[0054] 包含进料的几百毫升的溶液连续馈送进入上文描述的试验 4C-PCC 装置中。进料溶液的吸光度由安置在进料线(图 5)上的第一 UV 检测器 115 连续测量。纯化的 MAb 采用谨慎的方式通过将缓冲液 B 施加进入饱和柱而从系统中洗脱。在洗脱步骤之前清洗饱和柱。在图 6 中,在第一启动期间记录进料线和来自色谱柱 107、109、111、113 的每个的流出物中的信号,4C-PCC 循环由以下组成:1) 将进料加载进入第一柱 107;2) 串联连接第一和第二柱 107、109;3) 当清洗第一柱 107 至第三柱 111 时将进料引导到第二柱 109;4) 当施加进料时串联连接第二和第三柱 109、111;5) 洗脱第一柱 107;6) 使第一柱 107 再生;7) 当清洗第二柱 109 至第四柱 113 时将进料引导进入第三柱 111;8) 当连续施加进料时串联连接第三和第四柱 111、113;9) 洗脱第二柱 109;10) 使第二柱 109 再生;11) 当清洗第三柱 111 至第一柱 107 时将进料引导进入第四柱 113;12) 当连续施加进料时串联连接第四和第一柱 113、107;13) 洗脱第三柱 111;14) 使第三柱 111 再生;15) 当清洗第四柱 113 至第二柱 109 时将进料引导进入第一柱 107;16) 当连续施加进料时串联连接第一和第二柱 107、109;17) 洗脱第四柱 113;18) 使第四柱 113 再生;19) 再一次重复步骤 3-18。

[0055] 在图 2 中示出的重复 UV 图样在图 6 中描绘,其中呈现在 9 个单柱加载期间(其代表两个 4C-PCC 循环)记录的 UV 信号。表示的曲线 201 是源于图 5 中的第一 UV 检测器 115 的信号,即这是进料信号。表示的曲线 203 是源于图 5 中的第二 UV 检测器 117 的信号,即这是来自第一柱 107 的流出物信号。表示的曲线 205 是源于图 5 中的第三 UV 检测器 119 的信号,即这是来自第二柱 109 的流出物信号。表示的曲线 207 是源于图 5 中的第四 UV 检测器 121 的信号,即这是来自第三柱 111 的流出物信号。表示的曲线 209 是源于图 5 中的第五 UV 检测器 123 的信号,即这是来自第四柱 113 的流出物信号。如在图 6 中示出的,代表来自每个柱的流出物中 MAb 浓度的色谱根据本发明中描述的原理通过分别对在 ΔUV_{max} 信号的 $x = 3\%$ 和 $x = 70\%$ 处检测穿透点和饱和点所设置的 ΔUV (即在该示例中检测器是 UV 检测器并且 Δ 信号称作 ΔUV) 判据而获得,其中 x 由以下给出:

$$[0056] \quad x = \frac{\Delta UV_{max} - \Delta UV}{\Delta UV_{max}} 100\%$$

[0057] 在该试验中获得的结果的简要描述在下面的表 1 和 2 中示出。其中示出进料溶液的体积与加载到每个柱上的计算量。这些数据与不使用根据本发明的自动控制则会获得的计算结果比较,即如果在具有相同柱的相同系统上进行参考运行,则使用如在点 1-18 中描述的重定向流动的预先指定的切换时间。如在图 6 中示出的,在来自第一柱 107 的流出物中测量的 UV 信号示出到第一柱上的加载在观察到 MAb 穿透之前的时间与加载施加到其他三个柱直到相同水平的穿透的时间相比要短。该提前穿透表明该柱中的树脂的量或树脂自身与其他两个柱中的不同。事实上,在 4C-PCC 试验之前,处理第一柱 107 以降低它的结合能力并且通过这么做使它与其他三个柱不同。

[0058] 因为第一柱 107 不同于第二柱 109,当基于预定柱切换时间操作 4C-PCC 系统时,对于该柱的提前穿透已经在试验中观察到。在这样的条件下,在循环的步骤 1 期间已经观察到 MAb 中的损耗。另外,在步骤 2 中加载到第二柱 109 上的 MAb 的量将比计算的要大并

且随后在步骤 4 中在该柱将连接到第三柱 111 之前 MAb 中的一些将在来自第二柱 109 的流出物中失去。这种加载到柱上的量的不匹配然后将扩展通过步骤 5-18, 并且未被柱捕获的 MAb 的量将随着每次柱切换而稳定增加。未结合的 MAb 的该损耗将通过实现根据本发明的控制算法而避免。在表 1 中, 示出在试验期间加载到每个柱的 MAb 的估计质量。基于在每个柱后面的流出物线中测量的相应的 UV 曲线以上的面积估计加载的质量。忽略从一个柱洗出并且加载到第二个顺次至下一个柱的质量。如在表 1 中示出的, 与加载到其他三个柱上的质量相比, 明显不同质量的 MAb 加载到第一柱 107。在两个不同的循环期间加载到第一柱 107 上的质量比加载到其他柱的每个上的质量小 20-30% 之间, 加载到其他柱的每个上的质量在柱和循环之间几乎是相同的, 其中差不超出 5%。另一方面, 如果 4C-PCC 系统在没有自动控制下操作, 其中切换时间设置成启用每毫升树脂 77mg 的加载, 在整个试验期间每个循环和每个柱损失的 MAb 的量将是明显的 (表 2) 并且将占据加载到系统上的质量的大约 10%。

[0059] 表 1

[0060] 4C-PCC 运行的简要描述。在两个加载循环期间在每个柱上加载的 MAb 的质量, 以毫克计。*

[0061]

	加载 1	加载 2	加载 3
--	------	------	------

[0062]

第一柱	54.3	56.6	55.8
第二柱	77.1	74.2	-
第三柱	74.4	76.5	-
第四柱	73.8	74.9	

[0063] * 第一柱被加载三次。

[0064] 表 2

[0065] 如果 4C-PCC 系统在相当于每升树脂 77g 的加载的恒定切换时间操作, 每个循环和每个柱将损失 (废物流中发现的) 的所估计的质量。

[0066]

	加载 1	加载 2	加载 3
第一柱	22.7	20.4	21.2
第二柱	-0.1	2.8	
第三柱	2.6	0.5	
第四柱	3.2	2.1	

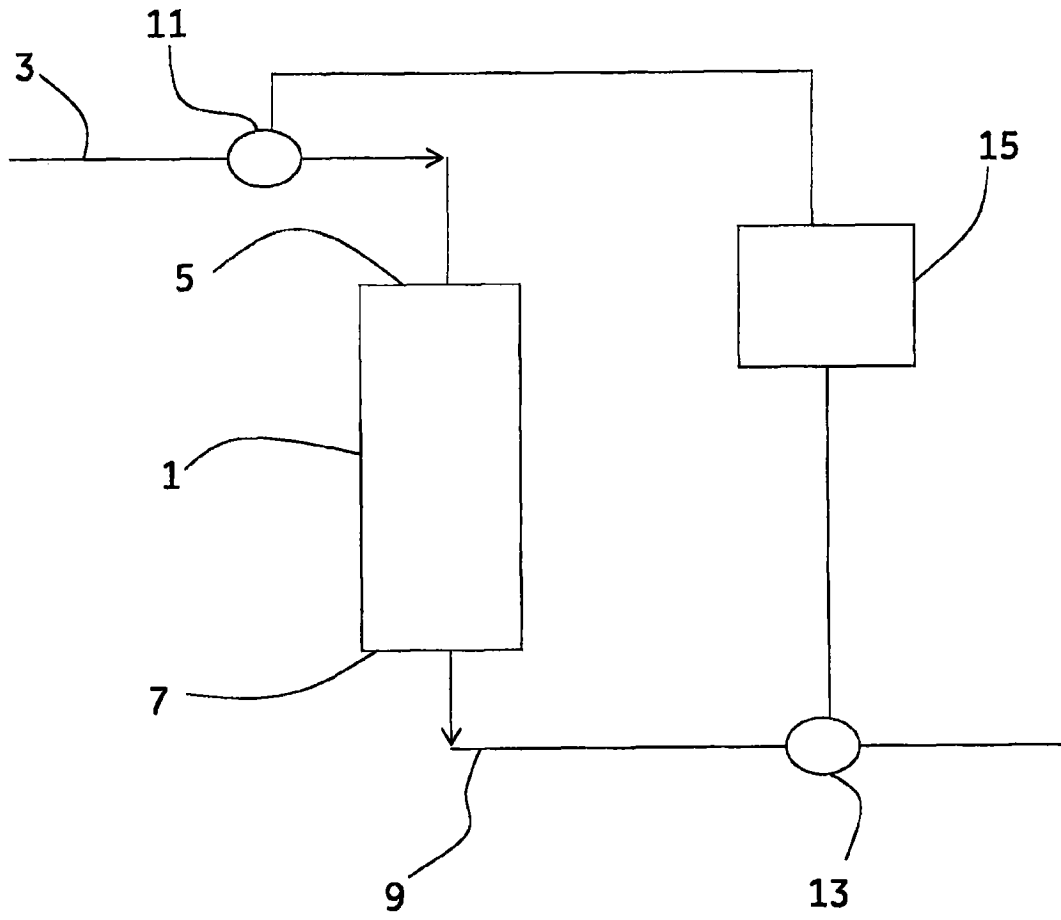


图 1

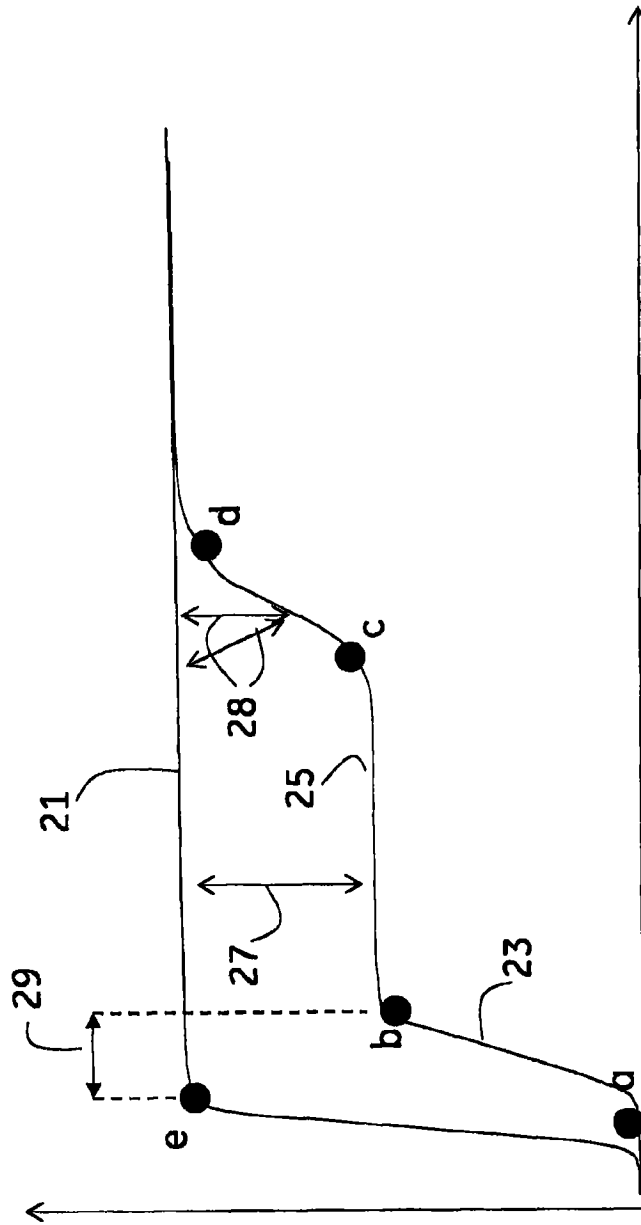


图 2

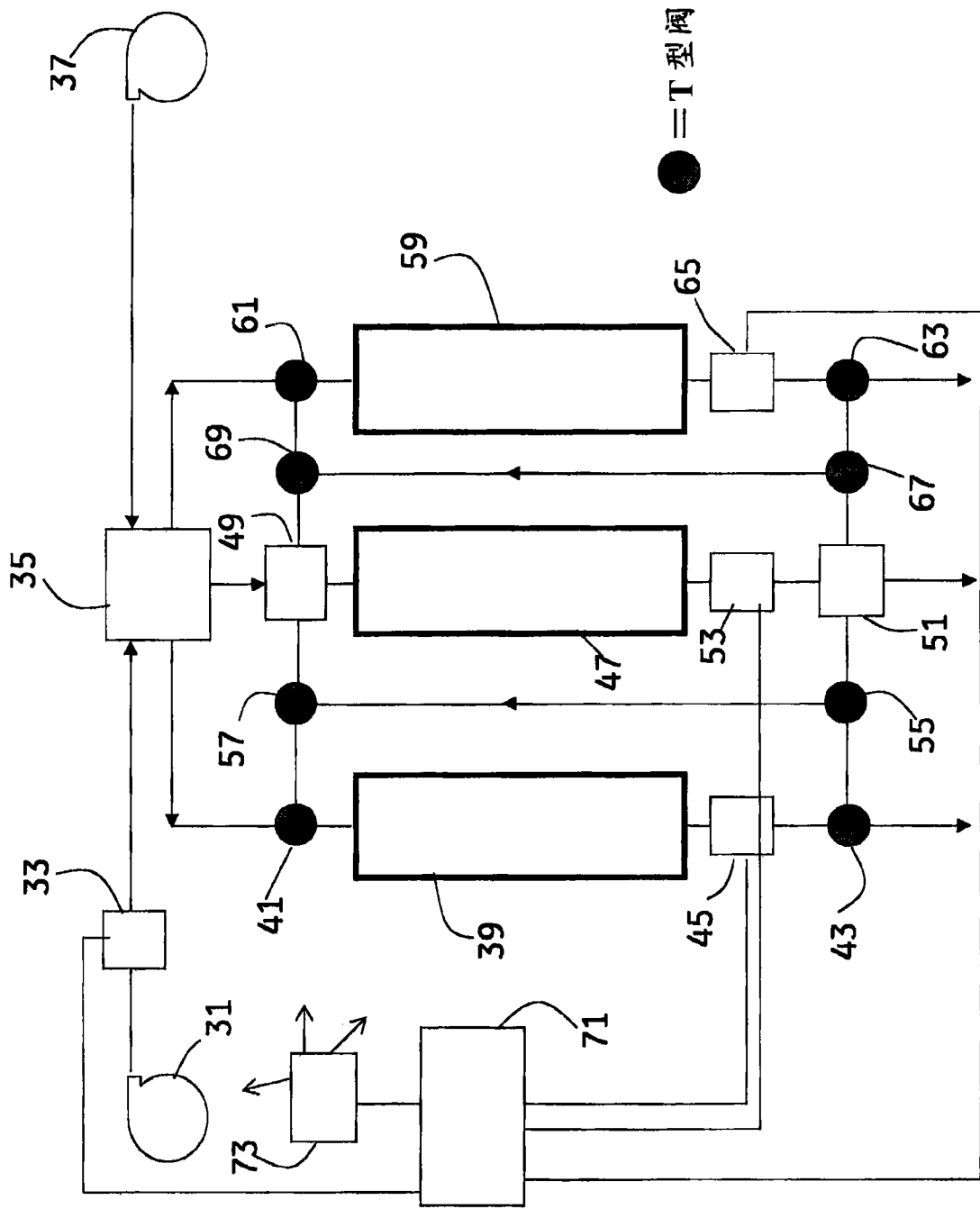


图 3

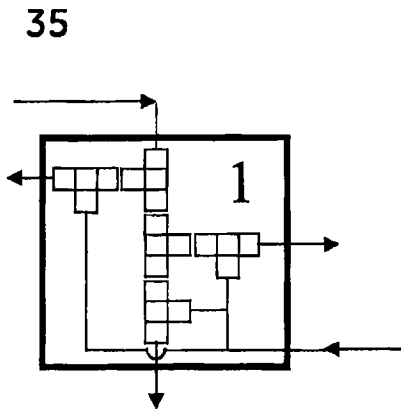


图 4a

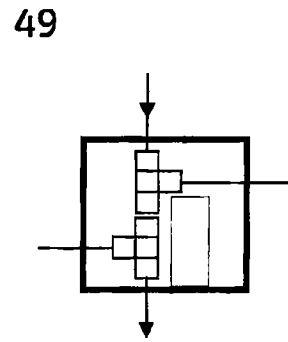


图 4b

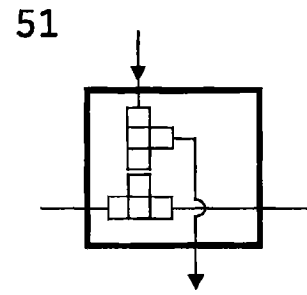


图 4c

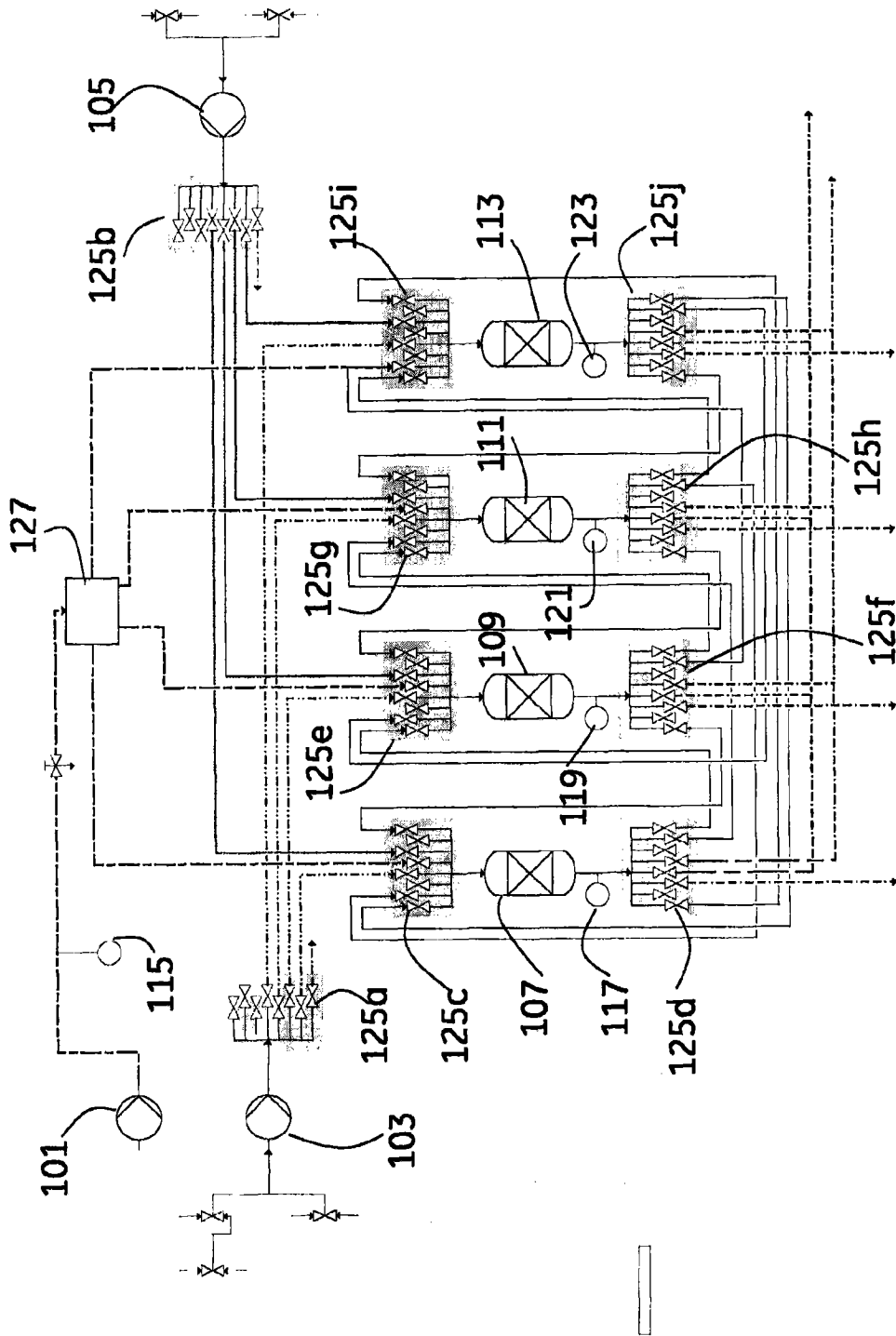


图 5

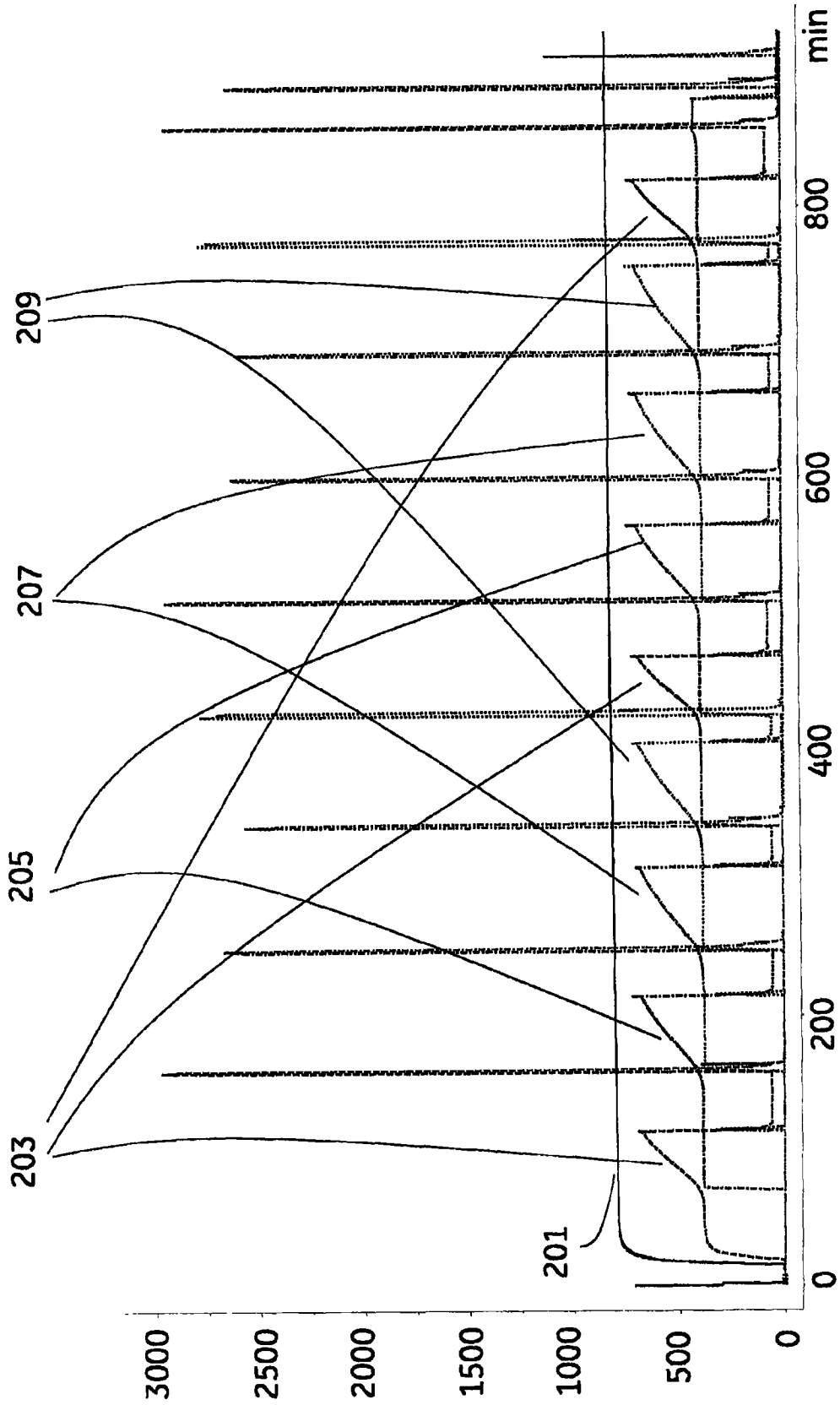


图 6