



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113661006 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 16

(21) 申请号 202080026414.5

(22) 申请日 2020.02.05

(30) 优先权数据

62/801225 2019.02.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.09.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/016743 2020.02.05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/163446 EN 2020.08.13

(71) 申请人 林迪生物科学公司

地址 美国北卡罗来纳州

(72) 发明人 D·L·比特菲尔德 M·Q·多尔蒂

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 罗文锋 黄希贵

(51) Int.Cl.

B01L 3/00 (2006.01)

C12M 1/32 (2006.01)

C12M 3/06 (2006.01)

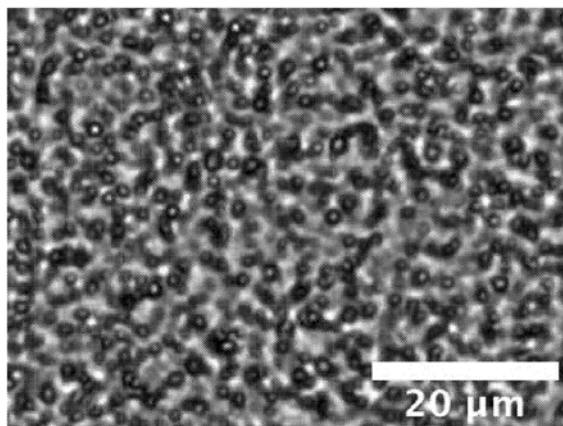
权利要求书3页 说明书21页 附图13页

(54) 发明名称

分离的细胞培养物组分以及用于从液体细胞培养基中分离其的方法

(57) 摘要

本文描述的是分离的细胞培养物组分,例如生物制品和/或脂质,以及用于从液体细胞培养基中分离细胞培养物组分的方法。本发明的方法可以包括使脱水组合物和包含靶组分的液体细胞培养基接触,以形成混合物;在混合物中形成至少部分脱水的组分;并且从混合物中分离至少部分脱水的组分,从而提供分离的组分。在一些实施方案中,分离的组分包含至少部分脱水的组分。在一些实施方案中,分离的组分存在于与至少部分脱水的组分分开的组合物(例如,液相)中。



1. 一种从液体细胞培养基中分离生物制品的方法,所述方法包括:
使第一有机溶剂和包含生物制品的液体细胞培养基接触,以形成混合物;
在所述混合物中形成至少部分脱水的生物制品;和
从所述混合物中分离所述至少部分脱水的生物制品,从而提供分离的生物制品。
2. 权利要求1的方法,其中所述生物制品以小于约200mg/mL、100mg/mL、50mg/mL、30mg/mL、20mg/mL、10mg/mL、5mg/mL、1mg/mL、0.1mg/mL、0.05mg/mL或0.01mg/mL的浓度存在于液体细胞培养基中,任选地其中所述生物制品至少部分地封装在液体细胞培养基中存在的细胞中。
3. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述方法同时从液体细胞培养基中提取水并保存所述生物制品。
4. 前述权利要求中任一项的方法,其中使所述第一有机溶剂和液体细胞培养基接触包括提供包含以固体(例如,粉末)形式的生物制品的悬浮液,任选地其中以固体形式的所述生物制品具有小于约50%或25%的含水量和/或小于约1的水活度。
5. 前述权利要求中任一项的方法,其中使所述第一有机溶剂和液体细胞培养基接触包括至少部分地裂解所述液体细胞培养基中存在的细胞。
6. 前述权利要求中任一项的方法,其中使所述第一有机溶剂和液体细胞培养基接触包括至少部分地溶解所述液体细胞培养基中存在的细胞的脂质和/或细胞膜。
7. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述混合物是油包水型乳状液,任选地其中所述油包水型乳状液包含直径和/或最小尺寸小于约1000 μ m或小于约500 μ m的液滴。
8. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述第一有机溶剂和/或第二有机溶剂与水不混溶,并且具有至少部分水溶性。
9. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述第一有机溶剂和/或第二有机溶剂具有小于约10的与水的界面张力。
10. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述混合物具有小于约1(例如,小于约0.9、0.85、0.8、0.75或0.7)的水活度。
11. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述混合物具有小于约0.95、0.9、0.85、0.8、0.75、0.7、0.65、0.6、0.55、0.5、0.45、0.4、0.35或0.3的水饱和分数。
12. 前述权利要求中任一项的方法,其中使所述第一有机溶剂和液体细胞培养基接触包括将各自进料到混合器(例如匀浆器)内。
13. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述第一有机溶剂和/或第二有机溶剂包含醇(例如,C1-C20醇、C4至C11醇或C4-C9醇),任选地其中所述醇对于水具有约2%至约15%的溶解度和/或任选地其中所述醇不是C10醇。
14. 前述权利要求中任一项的方法,其中形成所述至少部分脱水的生物制品包括使所述混合物匀浆化。
15. 权利要求14的方法,其中使所述混合物匀浆化用在线匀浆器进行。
16. 权利要求14或15的方法,其中用在约1、5、10、25、50、75或100L/小时至约150、250、500、1,000、1,500、2,000、2,500、3,000、3,500或4,000L/小时的范围内的进料速率,和/或用约0.1:100、0.5:100、1:100、2:100或5:100至约8:100、10:100、15:100、20:100或25:100(液体细胞培养基:第一有机溶剂)的液体细胞培养基与第一有机溶剂的进料体积比,进行

所述混合物的匀浆化。

17. 前述权利要求中任一项的方法, 其中使所述第一有机溶剂和液体细胞培养基接触的步骤、以及在所述混合物中形成至少部分脱水的生物制品的步骤基本上同时执行。

18. 前述权利要求中任一项的方法, 其中从所述混合物中分离所述至少部分脱水的生物制品包括使混合物过滤和/或使混合物离心。

19. 前述权利要求中任一项的方法, 其进一步包括用第二有机溶剂洗涤所述至少部分脱水的生物制品, 任选地其中所述第二有机溶剂与所述第一有机溶剂相同或不同。

20. 前述权利要求中任一项的方法, 其进一步包括用第三有机溶剂洗涤所述至少部分脱水的生物制品, 任选地其中所述第三有机溶剂与所述第一有机溶剂和/或第二有机溶剂相同或不同, 和/或是挥发性有机化合物(例如, 具有约0、50或100℃至约150、200或260℃的沸点)。

21. 前述权利要求任一项的方法, 其中在用所述第二有机溶剂洗涤所述至少部分脱水的生物制品之前, 所述方法包括使包含至少部分脱水的生物制品的混合物浓缩、离心和/或过滤。

22. 前述权利要求中任一项的方法, 其中在使所述第一有机溶剂和液体细胞培养基接触之前, 所述方法包括使所述液体细胞培养基与乳化溶剂接触, 任选地其中所述乳化溶剂是烷烃(例如, C1-C6烷烃)或醇(例如, C5-C14醇)。

23. 前述权利要求中任一项的方法, 其进一步包括贮存所述分离的生物制品。

24. 前述权利要求中任一项的方法, 其进一步包括使所述分离的生物制品水合, 并且任选地进一步纯化所述分离的生物制品。

25. 前述权利要求中任一项的方法, 其进一步包括在使所述第一有机溶剂和液体细胞培养基接触之前, 加工所述液体细胞培养基, 任选地其中加工所述液体细胞培养基包括使液体细胞培养基浓缩、离心、洗涤、透析、和/或过滤(例如, 以浓缩细胞和/或去除液体细胞培养基中存在的物质(例如, 盐和/或细胞))。

26. 前述权利要求中任一项的方法, 其进一步包括分离所述液体细胞培养基中存在的亲水性组分。

27. 前述权利要求中任一项的方法, 其中使所述第一有机溶剂和液体细胞培养基接触的步骤包括至少部分地裂解液体细胞培养基中存在的细胞, 并且其中所述方法缺乏另外的裂解步骤以分离生物制品(例如, 缺乏裂解步骤, 其包括物理破坏(例如, 多个冻/融循环、超声处理、高压匀浆、研磨等)和/或透化(例如, 用去污剂和/或酶))。

28. 前述权利要求中任一项的方法, 其中在所述方法的第一步之前, 所述液体细胞培养基不被裂解(例如, 通过物理破碎和/或透化)。

29. 前述权利要求中任一项的方法, 其中所述生物制品是蛋白质(例如, 细胞内表达的蛋白质和/或细胞外表达的蛋白质)和/或肽(例如, 细胞内表达的肽和/或细胞外表达的肽)。

30. 前述权利要求中任一项的方法, 其中所述生物制品是多核苷酸(例如, 寡核苷酸、DNA、RNA等)。

31. 前述权利要求中任一项的方法, 其中所述液体细胞培养基包含发酵液, 所述发酵液任选地包含细胞、细胞组分和/或合成材料。

32. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述液体细胞培养基包含微生物培养物,所述微生物培养物任选地包含细胞、细胞组分和/或合成材料。

33. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述液体细胞培养基包含细胞(例如,细菌细胞和/或酵母细胞)和/或细胞组分(例如,脂质、细胞膜、蛋白质、DNA等)。

34. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述液体细胞培养基包含细胞和任选的缓冲液。

35. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述分离的生物制品呈固体无定形颗粒(例如,微粒)的形式,任选地,其中所述分离的生物制品具有小于约15%(例如,小于约12%、10%、8%、6%、4%或2%)的含水量和/或小于约0.5的水活度。

34. 前述权利要求中任一项的方法,其进一步包括收集和/或回收所述第一有机溶剂和/或第二有机溶剂,任选地进一步包括从所述收集和/或回收的第一有机溶剂和/或第二有机溶剂中去除水和/或杂质。

35. 一种包含多个固体无定形颗粒(例如,微粒)的组合物,

其中所述多个固体无定形颗粒的至少一部分是包含生物制品(例如蛋白质、肽等)的固体无定形颗粒。

36. 权利要求35的组合物,其中所述组合物包含以按所述组合物的重量计小于约25%的量的水不溶性组分(例如,脂质)。

分离的细胞培养物组分以及用于从液体细胞培养基中分离其的方法

[0001] 相关申请信息

本申请要求于2019年2月5日提交的美国临时专利申请序列号62/801,225的权益,所述美国临时专利申请的公开内容通过引用以其整体并入本文。

技术领域

[0002] 本发明涉及分离的细胞培养物组分,例如生物制品和/或脂质,以及用于从液体细胞培养基中分离细胞培养物组分的方法。

背景技术

[0003] 由于显著增长和过渡到更复杂的基于生物制品的治疗学,制药公司和制造商看到了其药物开发和制造工艺中的显著变化。生物制品中的这种全行业增长是生产数百万单位的生物原料药物质(DS)中的主要推动力。温控药品的运输也是全球医疗保健物流行业中发展最快的垂直行业之一。此外,生物制造是生物制品生产的关键组分,并且占据生物制品市场的显著份额。

[0004] 许多公司正在将原料药物质生产与最终药物产品制造业务脱钩。这意味着有价值的DS必须根据临床试验供应和最终药物生产的需求在全球范围内贮存且运输。

[0005] 众所周知的是冷冻可以延长生物制品的贮存期限。这种实践已成为用于保存原料药物质的常见选择。然而,冷冻工艺本身以及后续解冻可以对生物分子的结构和稳定性具有不利作用。当冷冻发生时,蛋白质暴露于可以增加聚集的各种因素。冰晶产生其中蛋白质易于解折叠的大表面积。水变成冰相的去除了导致“低温浓缩”,即溶质(缓冲盐、赋形剂和蛋白质本身)变得更浓缩,并且引起pH转变和局部浓度波动。冷冻和解冻速率在很大程度上取决于体积和容器大小,因此它们固有地难以以受控方式缩放。典型的带夹套的金属冻融容器容纳至多300 L的DS,并且需要18小时才能冷冻。进一步地,在-20℃下贮存经常不足够远低于玻璃化转变温度,以赋予稳定性。随着贮存和运输温度降低,成本急剧增加。

[0006] 随着对制造工艺的更严格规定实施,生物制品制造中的挑战继续出现。制造商越来越重视稳定性和温度要求。当公司被要求丢弃或销毁生物药物物质的单位时,结果是相当更大的投资损失以及产品开发时间表中的延长延迟。整个行业都存在大量损失:仅由于温度偏差,制药行业每年发生超过\$150亿的产品损失;由于运送不当,25%的疫苗到达其目的地时是降解的;30%的报废药品可以归于物流问题;并且20%的温度敏感产品在运输过程中因冷链断裂而损坏。

[0007] 冻干可以用于对最终药物产品形式赋予稳定性。然而,它通常需要太多的前期开发(例如,鉴定适当的循环条件)以在这个阶段有用,并且它受到上文提到的冷冻应力的影响。另外,它仅是分批工艺,是漫长的过程(单个批次可能需要几天),并且资本设备和能源成本是昂贵的。

[0008] 喷雾干燥已作为用于生物制品的潜在替代加工技术进行调查。然而,它经常受到

产物产率减少和聚集问题的困扰。许多蛋白质是表面活性的,并且将在高能空气-水界面处聚集。对于温度敏感的蛋白质,所需的出口温度也可能是问题。经常需要大的赋形剂负载(例如,约50%-90% w/w)来稳定蛋白质,并且这些赋形剂已显示与颗粒内的蛋白质隔离,可能减少其有效性。

发明内容

[0009] 本发明的第一个方面涉及从液体细胞培养基中分离组分(例如,生物制品或脂质)的方法,该方法包括:使脱水组合物(例如,第一有机溶剂)和包含所述组分的液体细胞培养基接触,以形成混合物;在混合物中形成至少部分脱水的组分;并且从混合物中分离至少部分脱水的组分,从而提供分离的组分。在一些实施方案中,分离的组分包含至少部分脱水的组分。在一些实施方案中,分离的组分存在于与至少部分脱水的组分分开的组合物(例如,液相)中。

[0010] 本发明的另一个方面涉及包含多个固体无定形颗粒(例如,微粒)的组合物。在一些实施方案中,多个固体无定形颗粒的至少一部分是包含生物制品(例如,蛋白质、肽、多核苷酸等)的固体无定形颗粒。

[0011] 本发明的一个进一步方面涉及分离的生物制品,其中所述分离的生物制品是至少部分脱水的。

[0012] 本发明的另一个方面涉及分离的疏水组分(例如,脂质和/或类固醇)。分离的疏水组分可以与液体细胞培养基中存在的至少部分脱水的组分和/或水溶性组分至少部分地分开。

[0013] 应注意,关于一个实施方案描述的本发明的方面可以掺入不同的实施方案中,尽管没有对其进行具体描述。即,所有实施方案和/或任何实施方案的特征可以以任何方式和/或组合进行组合。申请人保留相应地更改任何最初提交的权利要求和/或提交任何新权利要求的权利,包括能够修改任何最初提交的权利要求以从属于任何一个或多个其它权利要求和/或掺入其任何特征的权利,尽管所述权利要求最初未以这种方式请求保护。本发明的这些和其它目的和/或方面在下文阐述的说明书中详细解释。通过阅读附图和下述优选实施方案的详细描述,本领域的普通技术人员将了解本发明的进一步特征、优点和细节,这些描述仅是本发明的说明。

附图说明

[0014] 图1是包括微玻璃化的溶菌酶颗粒的悬浮液的图像。

[0015] 图2是显示了基于Epstein-Plesset方程的预测固化时间的图,假设50 mg/mL,其中 $f = 0.3$,以考虑水的大量添加。由于混合,实际固化时间可增加。

[0016] 图3是显示了使用4种不同加工方案生产的Microglassified™牛丙种球蛋白(BGG)批次中的残留含水量的图。

[0017] 图4是显示了关于依照本发明的一些实施方案的在线工艺的代表性粒度分布的图。

[0018] 图5是显示了在小规模工艺的情况下的粒度分布的再现性的图。

[0019] 图6是显示了关于依照本发明的一些实施方案的在线工艺的粒度分布的再现性的

图。

[0020] 图7是显示了每克microglassified™ BGG剩余的残留溶剂的毫克的图。

[0021] 图8是根据本发明的一些实施方案,在细胞组合物和戊醇接触之后,微玻璃化颗粒在戊醇中的悬浮液的图像。

[0022] 图9是根据本发明的一些实施方案,在细胞组合物和乳酸丁酯接触之后,微玻璃化颗粒在乳酸丁酯中的悬浮液的图像。

[0023] 图10是根据本发明的一些实施方案,通过细胞组合物和戊醇的涡旋接触之后,微玻璃化颗粒在戊醇中的悬浮液的图像。

[0024] 图11是根据本发明的一些实施方案,通过细胞组合物和戊醇的匀浆化接触之后,微玻璃化颗粒在戊醇中的悬浮液的图像。

[0025] 图12是根据本发明的一些实施方案,通过高度浓缩的细胞组合物和戊醇的涡旋接触之后,微玻璃化颗粒在戊醇中的悬浮液的图像。

[0026] 图13是根据本发明的实施方案,在微玻璃化中使用的微流体装置的图像。

[0027] 图14是使用图10中所示的微流体装置产生的颗粒的图像。平均粒径为4.8 μm。

[0028] 图15是在蛋白质粉末的氮干燥过程中,随着时间过去的质量损失的图。

具体实施方式

[0029] 现在参考附图在下文中更全面地描述本发明,在所述附图中显示了本发明的实施方案。然而,本发明可以以许多不同的形式体现,并且不应被解释为限于本文阐述的实施方案;相反,提供这些实施方案,使得本公开内容将是彻底和完整的,并且将本发明的范围充分传达给本领域技术人员。

[0030] 在本文中本发明的说明书中使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并不预期是本发明的限制。如在本发明的说明书和所附权利要求中使用的,单数形式“一个”、“一种”和“该/所述”也预期包括复数形式,除非上下文另有明确说明。

[0031] 应理解,尽管术语“第一”、“第二”等在本文中可以用于描述各种要素,但这些要素不应受这些术语的限制。这些术语仅用于将一种要素与另一种要素区分开。因此,下文讨论的“第一”要素也可以被称为“第二”要素,而不脱离本发明的教导。除非另有具体说明,否则操作(或步骤)的顺序并不限于权利要求或附图中呈现的次序。

[0032] 除非另有定义,否则本文使用的所有术语(包括技术和科学术语)具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解相同的含义。应进一步理解,术语例如在常用词典中定义的那些术语,应当被解释为具有与其在本申请和相关领域的上下文中的含义一致的含义,并且不应当以理想化或过度正式的含义加以解释,除非在本文中如此明确地定义。本文提到的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献都通过引用以其整体并入。在术语冲突的情况下,以本说明书为准。

[0033] 同样如本文使用的,“和/或”指的是并且包括一个或多个相关所列项目的任何和所有可能的组合,以及当以替代方式(“或”)解释时组合的缺乏。

[0034] 除非上下文另有说明,否则特别预期本文描述的本发明的各种特征可以以任何组合使用。此外,本发明还考虑了在本发明的一些实施方案中,可以排除或省略本文阐述的任何特征或特征的组合。为了说明,如果说明书陈述复合物包含组分A、B和C,则特别预期可以

省略且放弃A、B或C中的任一个或其组合。

[0035] 如本文使用的,过渡短语“基本上由……组成”(和语法变体)被解释为包括所叙述的材料或步骤、“以及实质上并不影响本发明的基本和新型特点的那些材料或步骤”。参见 *In re Herz*, 537 F.2d 549, 551-52, 190 U.S.P.Q. 461, 463 (CCPA 1976) (在原文中强调); 还参见MPEP § 2111.03。因此,如本文使用的,术语“基本上由……组成”不应被解释为等价于“包含”。

[0036] 还应理解,如本文使用的,术语“实例”、“示例性”及其语法变体预期指本文讨论的非限制性实例和/或变体实施方案,并不预期指示与一个或多个其它实施方案相比,关于本文讨论的一个或多个实施方案的优选。

[0037] 如本文使用的,当提及可测量值如量或浓度等等时,术语“约”意欲包括指定值的 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 或甚至 $\pm 0.1\%$ 的变动以及指定值。例如,其中X是可测量值的“约X”,意欲包括X以及X的 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 或甚至 $\pm 0.1\%$ 的变动。本文提供的关于可测量值的范围可以包括其中的任何其它范围和/或各个值。

[0038] 如本文使用的,术语“增加(increase)”、“增加(increases)”、“增加(increased)”、“增加(increasing)”、“改善”、“增强”和类似术语指示指定参数的至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、150%、200%、300%、400%、500%或更多的升高。

[0039] 如本文使用的,术语“减少(reduce)”、“减少(reduces)”、“减少(reduced)”、“减少(reduction)”、“抑制”和类似术语指指定参数的至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或100%的降低。

[0040] 根据本发明的实施方案提供的是从液体细胞培养基中分离组分(例如,生物制品或脂质)的方法。组分可以为存在于液体细胞培养基中的任何化合物、分子和/或生物制品。示例性的液体细胞培养基包括但不限于发酵液和/或微生物培养物。如本领域理解的,液体细胞培养基可以包含细胞、细胞组分(例如脂质、细胞膜、蛋白质、DNA等)、合成材料(例如用于稳定培养基的添加剂(例如泊洛沙姆,例如泊洛沙姆188 PRO))、缓冲剂、糖和/或类似物。例如,发酵液可以包含胰蛋白酶大豆肉汤、bacto酵母提取物、氯化铵、磷酸二钠、磷酸钾和/或葡萄糖。任何类型的细胞都可以存在于本发明的液体细胞培养基中,例如但不限于细菌细胞、酵母细胞和/或哺乳动物细胞(例如,人细胞)。在一些实施方案中,液体细胞培养基包含细胞内和/或细胞外表达生物制品的细胞,所述生物制品可以依照本发明的方法进行分离。

[0041] 本发明的方法可以使用与该方法之前相比,没有对培养基的任何修饰(例如,不添加或去除任何东西)的液体细胞培养基。例如,可以直接使用来自细胞培养物的培养基。在一些实施方案中,本发明的方法可以包括加工液体细胞培养基,例如但不限于浓缩、离心、洗涤、透析和/或过滤液体细胞培养基。一个或多个加工步骤可以用于浓缩细胞和/或去除液体细胞培养基中存在的物质(例如盐和/或细胞)。待分离的组分可以决定细胞是要被浓缩还是被去除。例如,当组分在细胞内部表达时,细胞可以为浓缩的,而当组分细胞外表达时,细胞可以为去除的。在一些实施方案中,本发明的方法可以使用例如用水或水溶液(例如缓冲液)稀释的液体细胞培养基。在一些实施方案中,本发明的方法可以使用例如经由离心和/或过滤进行浓缩的液体细胞培养基。

[0042] 在一些实施方案中,液体细胞培养基可以包含一种或多种(例如,1、2、3、4、5种或更多种)添加剂。示例性的添加剂包括但不限于稳定剂、表面活性剂、张力剂、糖、盐、抗微生物剂、抗氧化剂、还原剂等。在一些实施方案中,添加剂以按液体细胞培养基的重量计约0.01%、0.1%或0.5%至约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%的浓度存在于液体细胞培养基中。

[0043] 示例性的表面活性剂包括但不限于聚山梨醇酯(例如,聚山梨醇酯20或80)、span、聚乙二醇化的脂肪酯和醚(例如,Laureth-4)、蔗糖酯、嵌段共聚物(例如,泊洛沙姆)和/或乙氧基化的甘油三酯(例如乙氧基化的蓖麻油)。

[0044] 示例性的抗微生物剂包括但不限于苯甲酸和/或苜醇。示例性的抗氧化剂包括但不限于丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯、没食子酸丙酯、叔丁基氢醌和/或维生素E。示例性的还原剂包括但不限于谷胱甘肽和/或二硫苏糖醇(DTT)。

[0045] 在一些实施方案中,可以将乳化溶剂加入液体细胞培养基中。乳化溶剂可以与液体细胞培养基和/或水性组合物形成界面。示例性的乳化溶剂包括但不限于烷烃,例如具有1-20个碳原子的烷烃(即C1-C20烷烃)或C4-C20烷烃(例如丙烷、戊烷、己烷等);醇(例如,C5-C14醇);乙酸酯;酯;醚;羧酸;(多)杂原子环状、无环、线性或分支分子;和/或乳酸酯,例如乳酸丁酯和/或乳酸乙酯。在一些实施方案中,溶剂可以包括碳、氮和/或硫原子。在一些实施方案中,乳化溶剂与本发明的脱水组合物中存在的溶剂可混溶。在一些实施方案中,乳化溶剂可以为醇如戊醇和/或乳酸酯如乳酸丁酯和/或乳酸乙酯。

[0046] 乳化溶剂可以以足以形成乳状液(例如,油包水型乳状液)的量存在于液体细胞培养基中。在一些实施方案中,乳化溶剂以约20%或更多,例如约25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多的量存在于液体细胞培养基中。在一些实施方案中,向液体细胞培养基中添加乳化溶剂可以至少部分地裂解液体细胞培养基中存在的细胞、细胞膜和/或脂质结构。在一些实施方案中,乳化溶剂并不使液体细胞培养基中存在的组分(例如,生物制品)脱水或存在于培养基中的浓度不足以使组分脱水。在一些实施方案中,乳化溶剂去除来自组分(例如生物制品)的水,所述组分以小于约10%、5%、2%、1%、0.5%或0.1%的量存在于液体细胞培养基中。在一些实施方案中,乳化溶剂有助于对于包含液体细胞培养基的乳状液和/或至少部分脱水组分提供所需的粒度。

[0047] 在一些实施方案中,乳化溶剂和水可以分开地(例如,一次一种或同时)加入液体细胞培养基中,和/或乳化溶剂和水可以存在于加入液体细胞培养基中的相同组合物中。水可以存在于具有乳化溶剂的组合物中,和/或以低于或处于其在乳化溶剂中的溶解度极限的量,与乳化溶剂一起加入液体细胞培养基中。

[0048] 从液体细胞培养基分开(例如,分离)的组分可以为亲水的(例如,生物制品)或疏水的(例如,脂质或类固醇)。在一些实施方案中,本发明的方法分离液体细胞培养基中存在的生物制品。生物制品可以存在于液体细胞培养基中的细胞中和/或存在于液体细胞培养基中的细胞外部。在一些实施方案中,生物制品是细胞内表达的和/或细胞外表达的。如本文使用的,“生物制品”指氨基酸、肽、蛋白质、酶或其片段、抗体或其片段(例如重链、轻链、融合蛋白、Fv和/或Fc)等)和/或多核苷酸例如寡核苷酸、DNA和/或RNA。生物制品可以包含化合物和/或分子,例如,可以与生物制品结合的那些化合物和/或分子,例如糖和/或盐。在一些实施方案中,生物制品可以为生物药物物质(DS)和/或用作治疗剂。

[0049] 如本文使用的,“分离的组分”例如“分离的生物制品”或“分离的脂质”,指已与所述组分存在于其中的液体细胞培养基中存在的其它组分至少部分地分开或自其中取出的组分。因此,“分离的组分”可能不是纯化的形式(例如,具有按它存在于其中的组合物的重量计大于90%的纯度)。在一些实施方案中,“分离的组分”(例如,分离的生物制品)并非以纯形式和/或不具有按它存在于其中的组合物的重量计大于约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%的纯度和/或浓度。如本文使用的,“分离”及其语法变体指将一种组分与其它组分至少部分地分开或自其中取出,例如将液体细胞培养基中存在的多种组分分成至少两组或相。在一些实施方案中,本发明的方法包括从液体细胞培养基中分离水溶性组分(例如,生物制品)和/或水不溶性组分(例如,脂质)。

[0050] 在一些实施方案中,本发明的方法包括使脱水组合物(例如有机溶剂)和包含组分(例如生物制品或脂质)的液体细胞培养基接触,以形成混合物;在混合物中形成至少部分脱水的组分;并且从混合物中分离至少部分脱水的组分,从而提供分离的组分。如本文使用的,“至少部分脱水的组分”指具有小于1的水活度的组分。在一些实施方案中,分离的组分包含至少部分脱水的组分(例如,至少部分脱水的生物制品)。在一些实施方案中,分离的组分(例如,水不溶性组分,例如脂质)存在于与至少部分脱水的组分分开的组合物中。虽然分离的组分可以与细胞培养基中存在的其它组分至少部分地分开,但另外的组分可以与分离的组分一起存在,例如宿主细胞蛋白质、糖、盐、缓冲剂和/或添加剂。与分离的组分一起存在的另外的组分在本文中也可以被称为杂质,并且杂质可以为至少部分脱水的。

[0051] 本发明的方法可以包括将固相与液相分开。在一些实施方案中,分离的组分存在于固相中。在一些实施方案中,分离的组分存在于液相中。固相和/或液相中存在的杂质可以包括水溶性组分和/或水不溶性组分。在一些实施方案中,固相中存在的杂质可以包含可以为至少部分脱水的亲水性组分和/或水溶性组分。在一些实施方案中,液相中存在的杂质可以包含疏水性组分和/或水不溶性组分。在一些实施方案中,液相中存在的杂质可以包含亲水性组分和/或水溶性组分。亲水性组分和/或水溶性组分可以以按液相的重量计小于约5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%的量存在于液相中。

[0052] 本发明的方法可以从可以存在于液体细胞培养基中的水溶性组分中去除(例如,溶解或提取)水,并且可以提供固化组分。在一些实施方案中,本发明的方法包括从液体细胞培养基中存在的生物制品中去除水,并且提供固化的生物制品(即,以固体形式的生物制品)。还可以从杂质(例如水溶性杂质)中去除水,并且提供固化的杂质。固化组分(例如,固化的生物制品和/或杂质)可以以任何形式存在,所述形式例如微粒、纳米颗粒、微球或纳米球。在一些实施方案中,固化组分是无定形的(例如无定形颗粒)。在一些实施方案中,固化组分的至少一部分是无定形的,因此固化组分可以为部分无定形的。例如,固化组分的基质可以为无定形的,但基质内的分子(例如,盐)可以为结晶的。在一些实施方案中,固化组分与任何液体分开和/或以粉末的形式提供。从组分中去除水(即,使组分脱水)以提供固体的过程在本文中被称为“微玻璃化”,并且固化组分在本文中可以被称为“微玻璃化”组分。微玻璃化组分不是沉淀物。在一些实施方案中,本发明的组合物和/或方法并不包括(即,缺乏)相分离剂。在本发明的微玻璃化方法中可能发生相分离,但微玻璃化组分并非通过相分离而形成。微玻璃化组分可以溶解回它存在于其中的初始组合物(例如,液体细胞培养基或水溶液)内和/或水性缓冲液内。

[0053] 根据一些实施方案,依照本发明的方法从液体细胞培养基中分离或分开生物制品。在一些实施方案中,该方法包括使生物制品至少部分地脱水。该方法可以同时从液体细胞培养基中去除水并保存生物制品。从生物制品中提取水可以保存生物制品,并且提供固化的生物制品(即微玻璃化的生物制品)。与在微玻璃化之前的生物制品的性质和/或功能相比、和/或与并非微玻璃化的对照生物制品的性质和/或功能相比,生物制品的一种或多种性质和/或功能可用微玻璃化生物制品得到保存和/或维持。

[0054] 生物制品可以以小于约200、175、150、125、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、5、1、0.1、0.05或0.01 mg/mL的浓度存在于液体细胞培养基中。在一些实施方案中,生物制品以在约0.01、0.05、0.1、0.5、1或5 mg/mL至约10、15、20、25、30、35、40、45或50 mg/mL范围内的浓度存在于液体细胞培养基中。在一些实施方案中,生物制品至少部分地封装在液体细胞培养基中存在的细胞中。

[0055] 如本文使用的,“接触(contact)”、“接触(contacting)”、“接触(contacted)”及其语法变体,指将两种或更多种材料(例如,组合物、化合物、溶剂等)放在一起,以形成混合物。使两种或更多种材料接触可以通过将两种材料或其一部分一起倾倒、喷射、混合、流动、注射和/或类似方式来进行。例如,接触可以包括将溶剂加入液体细胞培养基中或将液体细胞培养基加入溶剂中。在一些实施方案中,两种或更多种材料可以在膜乳化方法和/或技术期间接触。接触可以在装置例如混合器、匀浆器和/或微流体装置中进行。

[0056] 在一些实施方案中,接触包括将两种或更多种材料(例如,组合物、化合物、溶剂等)足够接近地放在一起,使得在合适的条件下,可以进行所需的反应(例如,可以从材料之一中存在的组分中去除水)。在一些实施方案中,本发明的方法中的接触步骤形成混合物,并且混合物可以为一个相或者两个或更多个(例如,2、3个或更多个)相。在一些实施方案中,混合物是多相组合物,因为该组合物具有两个或更多个(例如,2、3、4个或更多个)相。在一些实施方案中,本发明的方法中的接触步骤形成两相组合物和/或乳状液。在一些实施方案中,本发明的方法中的接触步骤形成悬浮液(例如,包括固体颗粒的一个或多个液相)。在一些实施方案中,形成乳状液,并且该乳状液可以为油包水型乳状液,其任选地包含直径和/或最小尺寸小于约1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、50、25、10、5或1 μm 的液滴。在一些实施方案中,混合物是油包水型乳状液,其包含直径和/或最小尺寸在约5、10、25、50、100、200、300、400或500 μm 至约600、700、800、900或1000 μm 范围内的液滴。在一些实施方案中,混合物是油包水型乳状液,其包含直径和/或最小尺寸在约0.1、0.5、1、2、3、4或5 μm 至约6、7、8、9、10、11、12、13、14或15 μm 范围内的液滴。在一些实施方案中,本发明的方法中的接触步骤形成混合物(例如乳状液),并且由于接触步骤和/或形成混合物所致,存在于材料之一中的组分是至少部分脱水的。

[0057] 液体细胞培养基可以与脱水组合物接触,所述脱水组合物使液体细胞培养基中存在的组分(例如,生物制品)至少部分地脱水。在使脱水组合物和液体细胞培养基接触后,脱水组合物可以以足以使液体细胞培养基中存在的组分至少部分地脱水的浓度存在。在一些实施方案中,脱水组合物包含从组分(例如生物制品)中去除水的溶剂(例如有机溶剂)。示例性的有机溶剂包括但不限于醇,例如具有1-20个碳的醇(即C1-C20醇)或C4-C20醇、含酯化合物(例如含有C1-C20酯的化合物,例如乙酸乙酯、乙酸丁酯、三乙酸甘油酯、乙酸异丁酯、乙酸异丙酯、乙酸甲酯、乙酸丙酯和/或乳酸丁酯)、乙酸、丙酮、茴香醚、甲基叔丁基醚、

枯烯、二甲基亚砷、二乙醚、甲酸乙酯、甲酸、烷烃(例如庚烷、戊烷等)和/或甲乙酮。

[0058] 在一些实施方案中,脱水组合物包含C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12、C13、C14、C15、C16、C17、C18、C19和/或C20醇,和/或含有C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12、C13、C14、C15、C16、C17、C18、C19和/或C20酯的化合物。在一些实施方案中,醇选自甲醇;乙醇;丙醇(例如,1-丙醇;2-丙醇);丁醇(例如,1-丁醇;2-丁醇);2-甲基-1-丙醇;2-甲基-2-丙醇;叔丁醇;戊醇(例如,1-戊醇、3-甲基-1-丁醇、2,2-二甲基-1-丙醇、环戊醇);己醇(例如,1-己醇);环己醇;庚醇(例如,1-庚醇);辛醇(例如,1-辛醇);壬醇(例如,1-壬醇);癸醇(例如,1-癸醇);2-丙烯-1-醇;苄醇;苯甲醇;二苯甲醇;十一醇;十二醇;丙基癸醇(propyldecanol);丁癸醇(butadecanol);十五醇;十六醇(例如,1-十六醇);和/或三苯甲醇。在一些实施方案中,脱水组合物不包含C10醇(例如,1-癸醇)。在一些实施方案中,含酯化合物可以由酸和C1-C20、C1-C10、C1-C8、C1-C6或C1-C4醇形成。在一些实施方案中,脱水组合物包含线性醇(例如,2-辛醇、3-戊醇、4-癸醇)的异构体,线性醇或其异构体(例如,辛基十二烷醇、新戊醇)的衍生物,二、三或四羟基化材料(例如,1,4-丁二醇、丙三醇),不饱和醇(例如环状醇、烯醇或炔醇,例如环己醇、香叶醇、油醇),和/或掺入内部和/或外部杂原子的醇(例如,聚乙二醇、聚丙二醇、乳酸酯等)。

[0059] 本发明的脱水组合物中可以存在一种或多种(例如,1、2、3、4种或更多种)溶剂。例如,在一些实施方案中,脱水组合物中存在至少两种醇(例如,1-戊醇和1-十六醇)、至少两种含酯化合物(例如,乙酸乙酯和三乙酸甘油酯)、或至少一种醇(例如,1-戊醇)和一种含酯化合物(例如,乙酸乙酯)。当脱水组合物中存在两种或更多种溶剂时,它们可以以任何合适的比率存在。在一些实施方案中,脱水组合物包含以约1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19或1:20的比率(按体积或重量计)存在于组合物中的两种溶剂。

[0060] 本发明的脱水组合物中存在的溶剂(例如有机溶剂)可以对于水具有约0.05%、1%、2%或5%至约10%、12%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50% w/w的溶解度。在一些实施方案中,有机溶剂对于水具有约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%或50% w/w的溶解度。溶剂(例如有机溶剂)可以具有小于约55 mN/m的与水的界面张力。在一些实施方案中,本发明的脱水组合物中存在的溶剂具有小于约55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1 mN/m的与水的界面张力。在一些实施方案中,本发明的脱水组合物中存在的溶剂具有在约1、2、3、4或5至约6、7、8、9或10范围内的与水的界面张力。在一些实施方案中,本发明的脱水组合物中存在的溶剂与乳化溶剂可混溶。

[0061] 在一些实施方案中,本发明的脱水组合物由有机溶剂(例如,醇)组成。在一些实施方案中,脱水组合物由两种或更多种C1-C20醇组成。在一些实施方案中,本发明的脱水组合物包含有机溶剂,其量为按脱水组合物的重量计约0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、

86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0062] 脱水组合物可以包含一种或多种(例如,1、2、3、4、5种或更多种)添加剂(例如,稳定剂、表面活性剂、张力剂、盐、糖、抗微生物剂、抗氧化剂等)。示例性的添加剂(例如,表面活性剂、抗微生物剂、抗氧化剂等)包括但不限于上文描述的那些添加剂。在一些实施方案中,添加剂以按脱水组合物的重量计约0.01%、0.1%或0.5%至约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%或35%的浓度存在于脱水组合物中。在一些实施方案中,脱水组合物包含表面活性剂和/或糖。在一些实施方案中,表面活性剂可以以按脱水组合物的重量计约30%或更少,例如按脱水组合物的重量计约25%、20%、15%、10%、5%或更少的量存在于脱水组合物中。在一些实施方案中,抗微生物剂可以以按脱水组合物的重量计约1%或更少,例如按脱水组合物的重量计约0.5%、0.1%或更少的量存在于脱水组合物中。在一些实施方案中,抗氧化剂可以以按脱水组合物的重量计约2.5%或更少,例如按脱水组合物的重量计约2%、1.5%、1%、0.5%、0.1%或更少的量存在于脱水组合物中。

[0063] 在一些实施方案中,脱水组合物包含选自以下的至少一种醇:苄醇、1-丙醇、1-丁醇、叔丁基、仲丁基、1-戊醇、1-己醇、1-庚醇、1-辛醇、1-壬醇、1-癸醇、1-十一醇、1-十二醇、丙基癸醇、丁癸醇、十五醇和十六醇,和/或选自以下的至少一种溶剂:水、三乙酸甘油酯、苄醇、乙酸、丙酮、茴香醚、2-丁醇、乙酸丁酯、甲基叔丁基醚、枯烯、二甲基亚砷、乙醇、乙酸乙酯、二乙醚、甲酸乙酯、甲酸、庚烷、乙酸异丁酯、乙酸异丙酯、乙酸甲酯、3-甲基-1-丁醇、甲乙酮、2-甲基-1-丙醇、戊烷、2-丙醇、乙酸丙酯和叔丁醇。可以存在于脱水组合物中的进一步的示例性溶剂包括但不限于烷烃,例如具有1-20个碳原子的烷烃(即,C₁-C₂₀烷烃)或C₄-C₂₀烷烃(例如,丙烷、戊烷、己烷等);醇(例如,C₅-C₁₄醇);乙酸酯;酯;醚;羧酸;(多)杂原子环状、无环、线性或分支分子;和/或乳酸酯。在一些实施方案中,脱水组合物包括包含碳、氮和/或硫原子的溶剂。

[0064] 本发明的方法可以包括使液体细胞培养基和一种或多种(例如,1、2、3、4种或更多种)脱水组合物接触。相应地,本发明的方法可以包括使液体细胞培养基与一种或多种(例如,1、2、3、4种或更多种)溶剂,例如第一有机溶剂、第二有机溶剂等接触。当在本发明的方法中使用两种或更多种脱水组合物时,组合物中存在的溶剂可以是相同或不同的。在一些实施方案中,脱水组合物中存在的溶剂可以比紧在脱水组合物之前的溶剂更易挥发,和/或可以为挥发性有机化合物(例如,具有约0、50或100℃至约150、200或260℃的沸点)。在一些实施方案中,脱水组合物和至少部分脱水的组分可以接触一次或多次(例如,1、2、3、4、5次或更多次)。

[0065] 分批或在线工艺可以用于使液体细胞培养基与一种或多种脱水组合物接触。在一些实施方案中,本发明的方法包括使液体细胞培养基和第一脱水组合物接触,以形成混合物,然后使混合物和第二脱水组合物接触。在一些实施方案中,本发明的方法包括使液体细胞培养基和第一脱水组合物接触,以形成混合物,从混合物中分离至少部分脱水的组分,并且使至少部分脱水的组分与第二脱水组合物接触。

[0066] 脱水组合物中存在的溶剂可以与液体细胞培养基和/或水性组合物形成界面。在一些实施方案中,脱水组合物中存在的溶剂与水不混溶。在一些实施方案中,首先用于使组分脱水的脱水组合物中存在的溶剂(即,第一脱水组合物或第一有机溶剂)与水不混溶和/

或与水形成界面,并且溶剂是至少部分水溶性的。在一些实施方案中,在第一脱水组合物后使用的脱水组合物中存在的溶剂(例如,第二脱水组合物或第三脱水组合物或者第二有机溶剂或第三有机溶剂)与水不混溶。

[0067] 使脱水组合物和液体细胞培养基接触和/或形成混合物,可以包括将混合物中存在的组分(例如生物制品)的含水量减少至少约0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些实施方案中,在本发明的接触步骤后,组分的含水量减少约5%、10%、15%、20%、25%、30%或35%至约40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

[0068] 包含脱水组合物和液体细胞培养基的混合物可以具有小于约0.99、0.98、0.95、0.9、0.85、0.8、0.75、0.7、0.65、0.6、0.55、0.5、0.45、0.4、0.35、0.3、0.25、0.2、0.15或0.1的水活度。在一些实施方案中,混合物具有在约0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45或0.5至约0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9或0.95范围内的水活度。在一些实施方案中,混合物具有小于约0.95、0.9、0.85、0.8、0.75、0.7、0.65、0.6、0.55、0.5、0.45、0.4、0.35、0.3、0.25、0.2、0.15或0.1的水饱和分数。在一些实施方案中,混合物具有在约0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45或0.5至约0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9或0.95范围内的水饱和分数。例如,在一些实施方案中,包含蛋白质的混合物可以具有约0.95或更小的水饱和分数。在一些实施方案中,包含盐的混合物可以具有约0.5或更小的水饱和分数。

[0069] 在与一种或多种脱水组合物接触后,至少部分脱水的组分(例如,生物制品)可以具有约99%、98%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、1%或0%的含水量。在一些实施方案中,在与一种或多种脱水组合物接触后,至少部分脱水的组分(例如,生物制品)具有在约0%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%或25%至约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或75%范围内的含水量。在一些实施方案中,在与一种或多种脱水组合物接触后,至少部分脱水的组分(例如,生物制品)具有在约0%、0.5%、1%、2%、3%或4%至约5%、6%、7%、8%、9%或10%范围内的含水量。在一些实施方案中,在与一种或多种脱水组合物接触后,至少部分脱水的组分(例如,生物制品)具有约0.986、0.98、0.95、0.9、0.85、0.8、0.75、0.7、0.65、0.6、0.55、0.5、0.45、0.4、0.35、0.3、0.25、0.2、0.15、0.1、0.05或0的水活度。在一些实施方案中,在与一种或多种脱水组合物接触后,至少部分脱水的组分(例如,生物制品)具有在约0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25或0.3至约0.35、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8或0.9范围内的水活度。

[0070] 在一些实施方案中,在使初始脱水组合物和液体细胞培养基接触后,至少部分脱水的组分具有小于约60%和/或在约1%、5%、10%、15%、20%或25%至约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%或70%范围内的含水量。在一些实施方案中,在使至少部分脱水的组分和后续(例如,第二)脱水组合物(其可以与初始脱水组合物相同或不同)接触后,至少部分脱水的组分具有小于约45%和/或在约0.5%、1%、5%、10%、15%或20%至约25%、30%、35%、40%、45%、50%、

55%、60%、65%或70%范围内的含水量。

[0071] 本发明的方法中的接触步骤可以在约-50、-20、-10、0、4、10、15或20℃至约25、20、35、40、45或50℃范围内的温度下进行。在一些实施方案中，本发明的方法中的接触步骤在室温和/或大气压下进行。在一些实施方案中，本发明的方法可以包含如美国专利号8,013,022中所述的装置、步骤和/或组合物，所述美国专利通过引用以其整体并入本文。

[0072] 在一些实施方案中，在使脱水组合物（例如，有机溶剂）和液体细胞培养基接触和/或形成包含脱水组合物和液体细胞培养基的混合物后，可以形成悬浮液，该悬浮液包含以悬浮于液体（例如混合物）中的固体形式的组分（例如，生物制品）。使脱水组合物和液体细胞培养基接触以提供混合物，以及在混合物中形成至少部分脱水的组分可以基本上同时执行。如本文使用的，提及使组分至少部分地脱水的“基本上同时”指在与脱水组合物接触后立即、或在距离与脱水组合物初始接触小于约1分钟内，使组分至少部分地脱水。在一些实施方案中，在脱水组合物和液体细胞培养基的初始接触后约100分钟或更短时间（例如，约90、60、30、15、10、5或1或更短时间）内，实现了在混合物中形成至少部分脱水的组分。

[0073] 在一些实施方案中，具有小于约60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%的含水量的至少部分脱水的组分（例如生物制品），可以在小于约10、9、8、7、6、5、4、3、2或1分钟或者小于约50、40、30、20、10、5、1、0.5或0.1秒内实现。在一些实施方案中，具有小于约60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%的含水量的至少部分脱水的组分（例如生物制品），可以在约0.01、0.05、0.1或0.5秒至约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10秒内实现。

[0074] 使脱水组合物和液体细胞培养基接触可以包括至少部分地裂解液体细胞培养基中存在的细胞，和/或至少部分地溶解液体细胞培养基中存在的脂质和/或细胞膜。

[0075] 根据一些实施方案，接触两种不同的组合物（例如，脱水组合物和液体细胞培养基、或溶剂和包含至少部分脱水的组分的组合物）包括将它们混合在一起。混合可以通过本领域已知的任何方法来完成，所述方法例如涡旋、搅拌、静态混合、匀浆化、挤出、泵送、注射、将一种组合物加入另一种组合物、将一种组合物喷射到另一种组合物内、和/或将组合物一起喷射以形成混合物。混合可以形成乳状液和/或可以将空气掺入混合物内，以形成乳状液。可以使用缓慢添加、快速添加或全部添加，将一种组合物加入另一种组合物，并且可以用低剪切和/或高剪切（例如，约1-10000000/s）来完成混合。当两种不同的组合物包含水性组合物和疏水性组合物（例如，包含有机溶剂的组合物）时，可以将水性组合物加入疏水性组合物中，或反之亦然。在一些实施方案中，两种不同的组合物在混合之前接触和/或在混合器中接触。示例性的混合器包括但不限于高压匀浆器、转子-定子匀浆器、叶轮、管道混合器（湍流和层流）、静态混合器、在线混合器和/或微流体装置（例如，包括交叉连接的微流体装置）。在一些实施方案中，混合器是在线的，例如在线匀浆器。在一些实施方案中，混合器是装置（例如，微流体装置），并且可以将两种不同的组合物加入或注射到装置内，从而将两种不同的组合物混合在一起。形成至少部分脱水的组分可以包括将混合物混合（例如，匀浆化）。

[0076] 在一些实施方案中，形成包含至少部分脱水的组分的混合物和/或组合物的两种不同的组合物，可以例如在分批过程中以其为两种不同的组合物的体积比的比率混合。例如，对于待在分批过程中接触以形成混合物的第一组合物和第二组合物，体积比可以为第

一组合物的待混合体积比第二组合物的待混合体积。在一些实施方案中,形成包含至少部分脱水的组分的混合物和/或组合物的两种不同的组合物,可以例如在在线工艺中以基于两种不同的组合物的进料速率的比率混合。例如,对于在在线工艺中待接触以形成混合物的第一组合物和第二组合物,该比率可以为在接触步骤过程中第一组合物的进料速率(例如,流速)比在接触步骤过程中第二组合物的进料速率(例如,流速)。

[0077] 在一些实施方案中,形成包含至少部分脱水的组分的混合物和/或组合物的两种不同的组合物,可以以在约1、510、25、50、75或100 mL/分钟至约150、250、500、1,000、1,500或2,000 mL/分钟范围内的进料速率(例如,流速)混合(例如,匀浆化)。在一些实施方案中,形成包含至少部分脱水的组分的混合物和/或组合物的两种不同的组合物,可以以在约1、5、10、25、50、75或100 L/小时至约150、250、500、1,000、1,500、2,000、2,500、3,000、3,500或4,000 L/小时的范围内的进料速率混合(例如,匀浆化)。每种组合物的进料速率可以是相同或不同的。

[0078] 在一些实施方案中,形成包含至少部分脱水的组分的混合物和/或组合物的两种不同的组合物,可以以给定的进料体积比接触和/或组合。两种不同的组合物可以包括提供水相的水性组合物(例如,液体细胞培养基和/或包含水的组合物),以及提供溶剂相的含溶剂组合物(例如,疏水性组合物)。在一些实施方案中,两种不同的组合物可以以约0.1:100、0.2:100、0.3:100、0.4:100、0.5:100、0.6:100、0.7:100、0.8:100、0.9:100、1:100、1.5:100、2:100、2.5:100、3:100、3.5:100、4:100、4.5:100、5:100、5.5:100、6:100、6.5:100、7:100、7.5:100、8:100、8.5:100、9:100、9.5:100、10:100、11:100、12:100、13:100、14:100、15:100、16:100、17:100、18:100、19:100、20:100、21:100、22:100、23:100、24:100或25:100(水性组合物:含溶剂组合物)的进料体积比接触和/或组合。在一些实施方案中,形成包含至少部分脱水的组分的混合物和/或组合物的两种不同的组合物,可以以在约0.1:100、0.3:100、0.5:100、0.7:100或1:100至约2:100、4:100、6:100、8:100、10:100、12:100、14:100、16:100、18:100、20:100、22:100或25:100范围内的进料体积比接触和/或组合。

[0079] 在一些实施方案中,乳化溶剂(或包含其的组合物)可以以约0.1:1、0.2:1、0.3:1、0.4:1、0.5:1、0.6:1、0.7:1、0.8:1、0.9:1、1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1或5:1(液体细胞培养基:乳化溶剂)的进料体积比与液体细胞培养基接触和/或组合。

[0080] 可以使用本领域技术人员已知的方法,从混合物和/或液相中分离至少部分脱水的组分。例如,至少部分脱水的组分可以通过以下从液相中分离:过滤(例如,压力过滤、切向流过滤、旋转过滤、离心过滤、盘叠式过滤等)、旋风分离、沉降(例如,通过声共振场的沉降)、蒸发、离心、流化床干燥、蒸发干燥、热干燥、冷冻干燥、常压冷冻干燥、喷雾干燥、喷雾冷冻干燥、微波/IR干燥和/或筛分。在一些实施方案中,至少部分脱水的组分可以通过洗涤步骤和/或溶剂交换方法、沉降和/或过滤步骤从液相中分离,和/或使用空气、真空和/或冷冻干燥步骤和/或其任何组合进一步干燥(例如,以去除水和/或溶剂)。

[0081] 在一些实施方案中,本发明的方法包括用洗涤组合物洗涤至少部分脱水的组分。洗涤组合物可以包含有机溶剂,例如醇(例如C1-C20醇)、烷烃(例如C4-C20烷烃)、酯和/或醚。此类有机溶剂包括但不限于上文描述的那些有机溶剂,和/或有机溶剂可以对于水具有如上所述的溶解度。在一些实施方案中,洗涤组合物中的有机溶剂与水可混溶。洗涤组合物中的有机溶剂可以与脱水组合物中的有机溶剂相同或不同。在一些实施方案中,如通过美

国食品和药物管理局 (Food & Drug Administration) 分类的, 洗涤组合中存在的有机溶剂可以为II类或III类残留溶剂。

[0082] 在一些实施方案中, 洗涤组合中存在的有机溶剂可以比脱水组合中的有机溶剂更易挥发。在一些实施方案中, 洗涤组合中的有机溶剂是挥发性有机化合物 (例如, 具有约0、50或100℃至约150、200或260℃的沸点)。在一些实施方案中, 洗涤组合可以用于洗掉和/或去除脱水组合、乳化溶剂、有机溶剂和/或杂质。在一些实施方案中, 洗涤组合中存在的有机溶剂对于乳化溶剂和/或脱水组合中存在的溶剂具有溶解性。

[0083] 根据一些实施方案, 本发明的方法是一步法, 其中使液体细胞培养基与脱水组合物接触, 以提供乳状液和分离的组分 (例如, 至少部分脱水的生物制品)。一步法中的接触步骤可以用相同或不同的脱水组合物重复一次或多次 (例如, 1、2、3、4、5次或更多次)。在一些实施方案中, 本发明的方法是包括预乳化步骤的两步法, 其中使液体细胞培养基与乳化溶剂接触, 以形成乳状液 (例如, 粗乳状液), 并且该乳状液随后与脱水组合物接触, 以提供分离的组分。两步法中的每个接触步骤可以用相同或不同的乳化溶剂和/或脱水组合物重复一次或多次 (例如, 1、2、3、4、5次或更多次)。一步法或两步法可以进一步包括使至少部分脱水的组分或包含其的组合物与洗涤组合物接触, 所述洗涤组合物任选地包括比该方法中使用的先前有机溶剂更易挥发的有机溶剂。

[0084] 本发明的方法可以使乳化溶剂、脱水组合物或洗涤组合物与液体细胞培养基、至少部分脱水的组分或包含至少部分脱水的组分的组合物接触一段时间。这些步骤中的每一个的接触时间可以为约1、5、15、30、45或60分钟, 或者约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时或更长时间。在一些实施方案中, 接触时间为约1、5或15分钟至约30、45或60分钟, 或者约1、2、3、4或5小时至约6、7、8、9或10小时或更长时间。在一些实施方案中, 其中乳化溶剂与液体细胞培养基接触的时间段小于脱水组合物和/或洗涤组合物与至少部分脱水的组分或包含其的组合物接触的时间段。

[0085] 本发明的方法可以包括贮存分离的组分, 例如分离的生物制品或脂质。在一些实施方案中, 本发明的方法包括纯化分离的组分。在一些实施方案中, 本发明的方法包括使至少部分脱水的组分 (例如, 生物制品) 水合和/或纯化至少部分脱水的组分。

[0086] 在一些实施方案中, 本发明的方法缺乏常规裂解技术。示例性的常规裂解技术包括但不限于多个冻/融循环、超声处理、高压匀浆、研磨和/或细胞膜用去污剂和/或酶的透化。在一些实施方案中, 液体细胞培养基在本发明的方法的第一步之前不被裂解 (例如, 通过物理破碎和/或透化)。在一些实施方案中, 本发明的方法缺乏用单相组合物 (即, 多个细胞存在于单相组合物中) 进行的裂解步骤。在一些实施方案中, 本发明的方法包括用两相组合物 (即, 多个细胞存在于两相组合物例如乳状液和/或悬浮液中) 进行的裂解步骤。

[0087] 在一些实施方案中, 包含至少部分脱水的组分的组合物和/或液体细胞培养基具有大于7, 例如约7.5、8、8.5、9、10或更大的pH。在一些实施方案中, 包含至少部分脱水的组分的组合物和/或液体细胞培养基具有小于7, 例如约6.5、6、5.5、5、4.5、4或更小的pH。在一些实施方案中, 包含至少部分脱水的组分的组合物和/或液体细胞培养基具有与所需分离的组分 (例如, 靶生物制品) 的等电点 (pI) 相差至少 ± 0.5 、1、1.5或2个pH单位的pH。在一些实施方案中, 在本发明的方法中包含至少部分脱水的组分的组合物的pH与组合物的初始pH改变小于约 ± 2 、1.5、1或0.5个pH单位。

[0088] 本发明的方法可以包括收集和/或回收组合物和/或其组分(例如,溶剂和/或添加剂)。在一些实施方案中,组合物和/或其组分可以与至少部分脱水的组分分开,并且任选地通过包括但不限于蒸馏、吸收、沉淀、吸附、过滤、透析和/或类似方式的方法进一步加工,以收集和/或回收组合物和/或其组分。在一些实施方案中,从收集和/或回收的组合物和/或其组分中去除水和/或杂质。在一些实施方案中,从液相中分离至少部分脱水的组分提供了液相中的分离的组分(例如脂质或类固醇),其与至少部分脱水的组分分开。在一些实施方案中,例如通过蒸馏从收集和/或回收的组合物和/或其组分中去除水。在一些实施方案中,例如通过化学分离方法(例如过滤)去除收集和/或回收的组合物和/或其组分中存在的添加剂。

[0089] 根据本发明的一些实施方案,提供了包含多个固体颗粒(例如,微粒)的组合物。固体颗粒可以为无定形和/或结晶的。在一些实施方案中,多个固体颗粒包含无定形颗粒。在一些实施方案中,多个固体颗粒可以包含结晶颗粒,例如当存在可以结晶的小分子(例如盐)时。在一些实施方案中,在从液相中分离固体颗粒之后,可以提供和/或获得组合物。多个固体颗粒在大小方面可以是一致的或者可以为多分散的。在一些实施方案中,多个固体颗粒的至少一部分具有在平均粒度的约± 5%、10%、15%、20%、25%、50%、75%、100%、150%、200%或更多内的大小。在一些实施方案中,组合物包含离散颗粒。在一些实施方案中,组合物包含以按生物制品的重量计小于约50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%或1%的量的生物制品聚集。

[0090] 在一些实施方案中,本发明的组合物中的多个固体颗粒的至少一部分是固体生物制品颗粒。在一些实施方案中,包含多个固体颗粒的组合物包含按组合物的重量计至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或100%的固体生物制品颗粒。在一些实施方案中,组合物包含一种或多种(例如,1、2、3、4种或更多种)杂质,例如可以是至少部分脱水的水溶性组分。杂质可以存在于包含多个固体颗粒的组合物中,所述固体颗粒的量为按组合物的重量计约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或更多。在一些实施方案中,水不溶性组分(例如,脂质)可以存在于包含多个固体颗粒的组合物中,所述固体颗粒的量为按组合物的重量计小于约60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%。

[0091] 本发明的方法可以保存液体细胞培养基中存在的组分。可以在培养基的下游纯化中的多个点处从液体细胞培养基保存和/或分离组分,这可以消除或减少工艺流程中断(例如,由于仪器停机),和/或可以允许例如与使相同组分冷冻、冻干和/或喷雾干燥的方法相比分离组分的产量和/或产率增加。在一些实施方案中,本发明的方法实现了约0.1、0.5、5、10、25或50 g/L的产率。在一些实施方案中,本发明的方法实现了在约0.1、1、5或10 g/L至约15、20、25、30、40或50 g/L范围内的产率。在一些实施方案中,本发明的方法可以减少(例如,至少约5%或95%或更多)分离的组分(例如,微玻璃化的生物制品)的贮存和/或运输体积和/或重量。在一些实施方案中,本发明的方法提供了分离的组分,即使在暴露于± 5、10、15、20或25℃或更多的温度波动后,所述分离的组分也可以维持一种或多种性质和/或功能和/或所需活性水平。

[0092] 在一些实施方案中,与在方法之前组分的一种或多种性质和/或功能相比、和/或与对照组分的一种或多种性质和/或功能相比,在依照本发明的方法(即,微玻璃化方法)形

成固体生物制品之后,组分(例如,生物制品)的一种或多种性质和/或功能可以得到保存和/或维持。例如,在一些实施方案中,任选地在溶解于溶液(例如,水溶液)中之后,至少部分脱水的生物制品可以具有在本发明的方法之前和/或在不存在本发明的方法的情况下的生物制品活性(例如,对照组分的活性) $\pm$ 60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%内的活性。在一些实施方案中,与冷冻、冻干和/或喷雾干燥且任选地随后溶解于溶液中的相同生物制品的活性相比,任选地在溶解于溶液之后,至少部分脱水的生物制品可以具有增加(例如至少约5%或更多)的活性。在一些实施方案中,与对照组分(即,缺乏本发明的方法的组分)和/或在本发明的方法之前的组分的活性相比,本发明的至少部分脱水的组分至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或更多的活性得到保留。在一些实施方案中,本发明的方法可以提供至少部分脱水的生物制品,与冷冻、冻干和/或喷雾干燥的相同生物制品的流动性相比,所述至少部分脱水的生物制品具有可比较或改善的流动性。

[0093] 在一些实施方案中,在依照本发明的方法形成固体生物制品后,组分(例如,生物制品)的结构(例如,一级、二级和/或三级)可以得到保存和/或维持。在一些实施方案中,具有折叠结构的至少部分脱水的生物制品在本发明的方法期间可能并不解折叠。在一些实施方案中,具有折叠结构的至少部分脱水的生物制品可能具有小于约50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%或5%的结构差异。

[0094] 与在不存在本发明的方法的情况下相同组分的贮存期限相比,和/或与在冷冻、冻干和/或喷雾干燥之后相同组分的贮存期限相比,本发明的至少部分脱水的组分可以具有增加的贮存期限。如本文使用的,“贮存期限”指组分维持在某一水平下或高于某一水平的活性的时间长度。在一些实施方案中,当在约2、4、10、15或20℃至约25、20、35或40℃的温度下,任选地在约4℃或25℃ $\pm$ 5℃贮存时,本发明的至少部分脱水的组分具有至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多周、月和/或年的贮存期限。在一些实施方案中,当在约2℃至约8℃的温度或约5℃ $\pm$ 3℃下贮存时,本发明的至少部分脱水的组分具有至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多周、月和/或年的贮存期限。在一些实施方案中,与已冷冻、冻干和/或喷雾干燥的相同组分的时间量相比,本发明的方法增加可以从细胞和/或细胞培养基中分离而无需纯化的分离的组分的时间量。例如,在一些实施方案中,包含多个分离的微玻璃化组分的本发明的组合物可以在贮存条件下(例如,在约4、10、15或20℃至约25、20、35或40℃的温度下)保持至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多周、月和/或年,而无需进一步纯化,并且任选地没有大于20%的活性损失。

[0095] 在一些实施方案中,与用于分离相同数量的组分的方法相比,本发明的方法减少了实现给定数量的分离组分的时间。例如,在一些实施方案中,与用于保存和/或纯化以相同数量的相同生物制品的不同方法(例如冷冻、冻干和/或喷雾干燥)相比,本发明的方法可以减少从细胞培养到生物制品的保存和/或纯化的时间量。在一些实施方案中,与用于分离组分的方法相比,任选地在更短的时间内,本发明的方法可以实现相同或增加量的分离组分。在一些实施方案中,本发明的方法提供了任选地在比不同的方法(例如,冷冻、冻干和/或喷雾干燥)更短的时间内快速保存的生物制品,然后保存的生物制品可以立即纯化或贮存并根据需要纯化。

[0096] 本发明的方法可以包括和/或是连续和/或在线工艺。在一些实施方案中,本发明

的方法可以包括和/或是分批工艺。在一些实施方案中,本发明的方法与细胞培养步骤和/或方法是连续和/或在线的,和/或与用于组分(例如,生物制品)的纯化步骤和/或方法是连续和/或在线的。在一些实施方案中,本发明的方法是连续的,因为对于依照本发明的实施方案的液体细胞培养基的总体积,仅总体积的一部分(例如,小于约50%)在给定的时间经历该方法的一个或多个步骤。

[0097] 本发明在下述非限制性实施例中更详细地加以解释。

实施例

[0098] 实施例1

使用本文称为微玻璃化的脱水方法,产生了干燥、致密的溶菌酶颗粒。通过将0.16 mL的100 mg/mL溶菌酶溶液加入0.8 mL戊醇(此处用作乳化溶剂)中,产生溶菌酶颗粒,并且将其短暂涡旋以形成粗乳状液。然后使该乳状液通过Avanti Lipids手动挤压机10-20次,以形成更细的乳状液。然后将该乳状液加入搅拌体积的戊醇(7 mL)(此处用作脱水组合物)中,其立即使水性液滴脱水,导致部分脱水颗粒的悬浮液。挤出过程总共重复3次,以使该体积的戊醇中的总共0.48 mL水溶液脱水。悬浮液显示于图1中。然后通过经由0.2微米过滤器过滤来收集颗粒。如从图1中可以看出的,使用乳状液溶剂导致小的、相对均匀颗粒的悬浮液。

[0099] 用微玻璃化溶菌酶的先前实验(参见例如,Aniket,Gaul DA,Bitterfield DL,Su JT,Li VM,Singh I等人,Enzyme Dehydration Using Microglassification™ Preserves the Protein's Structure and Function. J Pharm Sci. 2015 Feb;104(2):640-51)已证实了,当与冻干的溶菌酶相比时,两种样品在40℃贮存的第一个月后均丧失活性,但在三个月时MICROGLASSIFIED™溶菌酶和冻干的溶菌酶之间不存在差异。

[0100] 实施例2

微量移液管脱水技术已用于研究液滴溶解或脱水的动力学。这种技术允许液滴溶解的实时观察,并且因此允许任何相变的实时观察。这种技术还允许计算最终的颗粒密度或蛋白质浓度。作为用于测量两相微系统的工具,微量移液管技术已显示了,气-液和液-液系统遵循Epstein-Plesset模型的动力学,所述Epstein-Plesset模型取决于溶解组分在周围相中的溶解度和扩散:

$$\frac{dR}{dt} = -\frac{c_s}{\rho}(1-f)\left(\frac{1}{R} + \frac{1}{\sqrt{\rho Dt}}\right)$$

其中 R = 液滴半径, c_s = 溶解组分的溶解度, ρ = 溶解组分的密度, D = 溶解组分的扩散系数,且 f = 周围介质的饱和分数。一旦已知(或使用微量移液管测量)这些参数,就可以预测系统中任何其它液滴的溶解曲线。然后可以外推对于单个液滴测量的动力学参数,以预测任何其它溶剂系统中的任何液滴大小的动力学。

[0101] 蛋白质溶液的脱水速率密切地遵循水液滴(或盐溶液液滴)的脱水速率,并且是液滴大小、脱水溶剂和水饱和分数的函数。已讨论了这些因素各自的影响(Rickard DL, Biophys J. 2010;98(6):1075-84;Duncan PB,Langmuir. 2004 Mar 30;20(7):2567-78;Bitterfield DL,Langmuir. 2016 Dec 6;32(48):12749-59;以及Su JT,J Chem Phys.

2010;132 (4) :44506), 并且其可以用于预测匀浆器或其它混合器中所需的停留时间 (以及因此流速)。例如,图2显示了作为最终粒度的函数的在各种脱水溶剂中预测的固化时间。例如,对于大小范围2-20 μm 的颗粒,脱水在0.1秒至10秒内完成。

[0102] 所得到的颗粒可以与干燥溶剂分开,并且可以完成溶剂处置或再利用。可以再循环该方法中使用的干燥溶剂。例如,在微玻璃化方法中,200 L批次的微玻璃化蛋白质可能需要约14,000 L的干燥溶剂(例如,辛醇)。与冷冻干燥或喷雾干燥相比, Microglassification™ 提供了更高的通量和潜在更容易的缩放。200 L的小发酵批次在实验室规模的喷雾干燥器 (~15 mL/分钟的进料速率) 上需要加工220-300小时。中试规模的干燥机仅提供4x改善 (50 mL/分钟)。使用脱水微玻璃化方法,用实验室规模的在线匀浆器的初步测试达到了约2 mL/分钟的蛋白质进料速率。然而, IKA (和其它供应商) 提供了维持相似剪切速率的标准比例匀浆器,允许在规模中的2500x改善,或300 L/小时。20,000-L的发酵批次可以在约60小时内由单个匀浆器单元进行加工。

[0103] 许多 Microglassification™ 研究已使用小分批匀浆化工艺进行,一次生产mg数量的微玻璃化产物。为了评估放大的可行性,使用在线匀浆器测试该工艺。牛丙种球蛋白 (BGG) 用作模型蛋白,因为大部分BGG由免疫球蛋白组成,免疫球蛋白通常经制造用于多种治疗目的。获得了达到180 mL/分钟的总流速,并且使用1:26至1:132的流速比,而对大小分布没有不利作用。这些高流速导致在几分钟内数克蛋白质的 Microglassification™ 一在可行的可缩放性方面的重大进步。

[0104] 微玻璃化BGG的水分含量经由卡尔·费歇尔 (Karl Fischer) (KF) 分析进行确定,并且发现与喷雾干燥的蛋白质的水分含量 (4-9%) 可比较 (图3)。如图3中所示,脱水蛋白质中的最终含水量可通过调整其中分离最终蛋白质的方式修饰。

[0105] 通过调整关于脱水微玻璃化方法的工艺参数,能够实现各种粒度分布 (图4)。另外,使用较小的分批方案 (图5) 和上述的在线制造工艺 (图6) 两者实现了颗粒的良好再现性。

[0106] 微玻璃化产物中存在的残留溶剂的量可以是可预测的,并且远低于美国食品和药物管理局对于III类残留溶剂所允许的限度 (50 mg/天)。图7显示了每克微玻璃化BGG剩余的残留溶剂量。

[0107] 这些实验证实了使用微玻璃化方法增加材料通量的可行性。

[0108] 实施例3

将评估微玻璃化的模型蛋白 (包括单克隆抗体和酶) 的稳定性,并且将检查工艺参数的效应。模型蛋白在下游纯化的开始 (粗制药物物质) 或结束 (配制的药物物质) 时是脱水的,并且在加速条件下超过6个月评估稳定性。在下游纯化的开始和结束时评估保存,提供了待暂停的工作流的两个潜在步骤。

[0109] 细胞外生物制品的保存

Microglassification™ 将用于保存从中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系收获的培养基中的抗体,所述CHO细胞系通常用于治疗性蛋白质的商业生产。微玻璃化的上游抗体和微玻璃化的配制抗体的稳定性将在中间和加速条件下进行确定。

[0110] 上游加工实验-粗制药物物质保存:

作为模型系统,使非生产性CHO细胞系生长,并且用牛丙种球蛋白 (BGG) 掺料至5

g/L。BGG将是用于减少生产成本的这一任务的蛋白质,因为大量材料是残留水分和溶剂分析所需要的。

[0111] CHO细胞将在与抗体的商业生产中使用的培养基同源的培养基中培养14天。细胞通过离心进行分离,并且将BGG或单克隆抗体加入培养基中,以模拟由细胞产生的抗体。通过将培养基与如上所述的乳状液溶剂和/或脱水溶剂和/或洗涤溶剂组合,对来自细胞培养基的等分试样进行Microglassified™。微量移液管实验将用于检查脱水速率、最终蛋白质浓度和最终液滴密度(每体积的总固体质量)。脱水速率将用于计算关于给定粒度在Microglassification™工艺中所需的停留时间。最终浓度和密度将设定可以使用的最大f值(水饱和分数)。使用显微镜检查分析脱水且收集的粉末的大小/形态,使用卡尔·费歇尔滴定法分析水分含量,并且根据USP方法使用气相层析(GC)分析残留溶剂。在加工之前进行Microglassification™工艺的任何调整以考虑细胞培养基的组成。

[0112] 如上所述,将培养相同的CHO细胞系并且用mAb掺料至约5 g/L。来自细胞培养基的等分试样进行Microglassified™或冷冻。将脱水的粉末再水合至5 g/L的浓度,纯化,然后使用SEC和毛细管电泳(CE)测定结构的变化。功能性也将经由结合ELISA进行评价。作为对照,还纯化且分析来自非Microglassified™细胞培养基的mAb。进一步的样品进行Microglassified™,在氮下等分到钳口玻璃小瓶内,并且基于在25℃和40℃下长达6个月的加速稳定性进行放置。在预定的时间点,样品将如上所述再水合、纯化且测定。在研究结束时,冷冻样品将作为冻融比较进行解冻、纯化且分析。

[0113] 下游加工实验-配制的药物物质保存:

经由实验设计(DOE)方法,用于上游加工实验的相同mAb用于检查不同赋形剂-蛋白质比率(例如,以0:1至1:1重量比的蔗糖:蛋白质)的Microglassification™方案。微量移液管实验将用于检查脱水速率、最终蛋白质浓度和最终液滴密度(每体积的总固体质量)。纯化且配制的mAb溶液通过将其与乳状液溶剂和/或脱水溶剂和/或洗涤溶剂组合进行微玻璃化。测定收集的Microglassified™粉末样品的形态和残留水分。如上所述分析再水合的样品。将维持分子结构的那些组合物基于如上所述的加速稳定性进行放置。对照将包括贮存于-20℃下的冷冻溶液。

[0114] 细胞内生物制品的保存

从发酵液进行Microglassified™时的上游单链抗体片段(scFv)的稳定性与从纯化溶液进行Microglassified™时的配制scFv的稳定性进行比较。

[0115] 上游加工实验-粗制药物物质保存:

与来自细胞外分泌蛋白质的哺乳动物细胞的抗体生产不同,一些蛋白质,包括融合蛋白和酶,可以从细菌来源细胞内产生,在收获期间需要细胞裂解步骤(例如,匀浆化)。Microglassification™将从全发酵液进行。虽然不希望受任何特定理论的束缚,但由于脂质在所使用的有机溶剂中是可溶的,预计在Microglassification™过程中将去除一些细胞碎片。如果细胞并未通过Microglassification™工艺完全裂解,则样品将在细胞裂解和细胞碎片去除后进行Microglassified™。

[0116] 结合β-半乳糖苷酶的单链可变片段(scFv)由大肠杆菌(*E. coli*)产生。如上所述,等分试样进行Microglassified™,这次来自含有全细胞的发酵液。发酵液和细胞将与如上所述的乳状液溶剂和/或脱水溶剂和/或洗涤溶剂组合。微量移液管实验将用于检查脱水速

率、最终蛋白质浓度和最终液滴密度(每体积的总固体质量)。使用显微镜检查分析脱水粉末的大小/形态,使用卡尔·费歇尔滴定法分析水分含量,并且根据USP方法使用气相层析(GC)分析残留溶剂。进行Microglassification™工艺的任何调整以考虑细胞培养基的组成。

[0117] 来自发酵液的等分试样进行Microglassified™或冷冻。将脱水的粉末再水合至5 g/L的浓度,纯化,然后使用SEC和毛细管电泳(CE)测定结构的变化。功能性也将经由ELISA进行评价。作为对照,还纯化且分析没有Microglassified™的scFv。进一步的样品进行Microglassified™,在氮下等分到钳口玻璃小瓶内,并且基于在25℃和40℃下长达6个月的加速稳定性进行放置。在预定的时间点,样品将如上所述再水合、纯化且测定。在研究结束时,冷冻样品将作为冻融比较进行解冻、纯化且分析。

[0118] 下游加工实验-配制的药物物质保存:

经由实验设计(DOE)方法,与上游加工实验中使用的相同scFv用于检查不同赋形剂-蛋白质比率(例如,以0:1至1:1重量比的蔗糖:蛋白质)的Microglassification™方案。将使用纯化的scFv。微量移液管实验将用于检查脱水速率、最终蛋白质浓度和最终液滴密度(每体积的总固体质量)。纯化且配制的scFv溶液通过将其与乳状液溶剂和/或脱水溶剂和/或洗涤溶剂组合进行微玻璃化。测定收集的Microglassified™粉末样品的形态和残留水分。如上所述分析再水合的样品。维持分子结构的那些组合物基于如上所述的加速稳定性进行放置。对照将包括贮存于-20℃下的冷冻溶液。

[0119] 实施例4

预乳化步骤将用于脱水方法中,以使液体细胞培养基中存在的水溶性组分脱水。在预乳化步骤中,将使用并不显著溶解水的乳化溶剂,因此它并不使包含水溶性组分和/或生物制品的液体细胞培养基脱水。液体细胞培养基和乳化溶剂将是混合的(例如,通过涡旋、搅拌、匀浆化、挤出和/或通过将水相加入或喷射到溶剂相内),从而形成粗乳状液。然后将该粗乳状液与足以溶解水的一定体积的脱水溶剂(其可以与乳化溶剂相同或不同)组合。

[0120] 可以使用包括两个玻璃Hamilton注射器的手动挤压机,所述两个玻璃Hamilton注射器经连接,使得一个的内容物通过挤出室并进入另一个注射器内。可替代地,对于在线生产,可以使用静态混合器或匀浆器代替手动挤压机用于分批生产。

[0121] 实施例5

溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*) (ML) 细胞(冻干的)以50 mg/mL(干重)悬浮于150 mM磷酸盐缓冲液中,以提供细胞组合物。将49 μL细胞组合物快速地逐滴加入1 mL戊醇中,并且将混合物涡旋30秒。图8显示了来自悬浮于戊醇脱水溶剂中的细胞组合物的脱水颗粒。

[0122] 实施例6

ML细胞以14.2 mg/mL(干重)悬浮于水中。将31 μL细胞组合物快速地加入700 μL乳酸丁酯中,并且将混合物涡旋30秒。图9显示了来自悬浮于乳酸丁酯脱水溶剂中的细胞组合物的脱水颗粒。将脱水颗粒的悬浮液离心,通过移液管去除脱水溶剂,并且在过夜真空下去除残留溶剂。所得到的粉末通过加入800 μL水进行重构。如本领域技术人员将认识到的,全细胞悬浮液具有的浊度大于细胞的裂解悬浮液。在450nm处测量重构细胞的浊度,并且与未加工的细胞悬浮液的稀释物进行比较。在乳酸丁酯中脱水的细胞具有的浊度是起始细胞

悬浮液(稀释至相同浓度)的 $76 \pm 7\%$ ($n=3$),证实了在乳酸丁酯中脱水的细胞在脱水工艺期间被裂解。

[0123] 实施例7

ML细胞以 14.2 mg/mL (干重)悬浮于水中。将 $70 \text{ }\mu\text{L}$ 细胞组合物快速地加入 2.5 mL 戊醇中,并且将混合物涡旋或匀浆化30秒。图10显示了来自涡旋的细胞组合物的脱水颗粒,而图11显示了来自匀浆化的细胞组合物的脱水颗粒,两者均悬浮于戊醇脱水溶剂中。如从图11中可以看出的,使用匀浆器提供了较小的颗粒,但具有与涡旋的颗粒相似的形态。

[0124] 将脱水颗粒的悬浮液离心,通过移液管去除脱水溶剂,并且在过夜真空下去除残留溶剂。所得到的粉末通过加入 1.9 mL 水进行重构。在戊醇中涡旋且脱水的细胞具有的浊度是起始细胞悬浮液(稀释至相同浓度)的 $50 \pm 6\%$ ($n=3$)。

[0125] ML细胞以 195 mg/mL (干重)悬浮于水中,以接近浓缩浆料。将 $170 \text{ }\mu\text{L}$ 细胞组合物快速地加入 2.5 mL 戊醇中,并且将混合物涡旋30秒。图12显示了来自悬浮于戊醇脱水溶剂中的细胞组合物的脱水颗粒。这些颗粒具有与图11中的颗粒相似的形态,但由于较高的起始浓度而更大。

[0126] 实施例8

从微玻璃化方法获得的不纯的脱水溶剂将与吸湿材料接触。吸湿材料可以为在所讨论的溶剂中不溶解的任何材料(例如,固体、液体或气体材料)。示例性的材料包括但不限于硫酸镁、硫酸钠、3A分子筛、超吸收聚合物、二氧化硅、氧化铝、具有干燥空气的鼓泡塔等。一旦材料已与不纯的脱水溶剂度过了足够的时间,并且因而通过上述方法去除,它就是纯化或半纯化的溶剂。

[0127] 实施例9

从微玻璃化方法获得的不纯的脱水溶剂将通过蒸馏工艺,以得到纯化或半纯化的溶剂。

[0128] 实施例10

从微玻璃化方法获得的不纯的脱水溶剂将被冷却或加热,以便减少杂质在材料中的溶解度或冷冻其它材料。一旦一些材料已结晶或沉淀,它们就可以通过上述方法去除,以得到纯化或半纯化的溶剂。

[0129] 实施例11

如图13中所示,使用含有错流连接($14 \times 17 \text{ }\mu\text{m}$)的微流体装置,对蛋白质溶液进行微玻璃化。该装置由具有疏水涂层的石英构成,以允许形成油包水型乳状液。水相(45 mg/mL 溶菌酶)和脱水介质(1-戊醇)经由压力泵以范围为1:44至1:258(水:脱水溶剂)的流速比递送。水相通过中心通道进料,形成由从侧通道进入的脱水介质夹断的液滴。图14显示了使用1:46的流速比生产的平均直径为 $4.8 \text{ }\mu\text{m}$ 的收集颗粒。取决于所使用的脱水溶剂和最初形成的液滴大小,液滴可以在离开芯片之前进行脱水且固化,或者可以在外部容器中收集。这种方法允许生产非常均匀的颗粒。

[0130] 实施例12

收集的颗粒可以通过几种方法之一进行进一步干燥,以去除残留溶剂,得到干粉。图15显示了在通过暴露于干燥氮的干燥过程中,随着时间过去的质量损失。图15中显示的质量已针对干粉的最终质量进行标准化,所述干粉由75%牛血清白蛋白和25%其它固体组分

组成。大部分的质量损失是残留的脱水和洗涤溶剂,其对于图15中的颗粒是辛醇和戊醇。批次-1是以1至1.5 L/分钟的流速干燥的617 mg粉末。去除的溶剂和水分的量为427 mg。批次-2是以2 L/分钟的流速干燥的831mg粉末。去除的溶剂和水分的量为419 mg。批次-3是以1至1.8 L/分钟的流速干燥的890 mg粉末。去除的溶剂和水分的量为367 mg。

[0131] 前述内容是对本发明的说明,而不应被解释为其限制。本发明由所附权利要求限定,其中权利要求的等同内容包括在其中。本文引用的所有出版物、专利申请、专利、专利公开和其它参考文献通过引用以其整体并入,用于与其中呈现引用的句子和/或段落有关的教导。

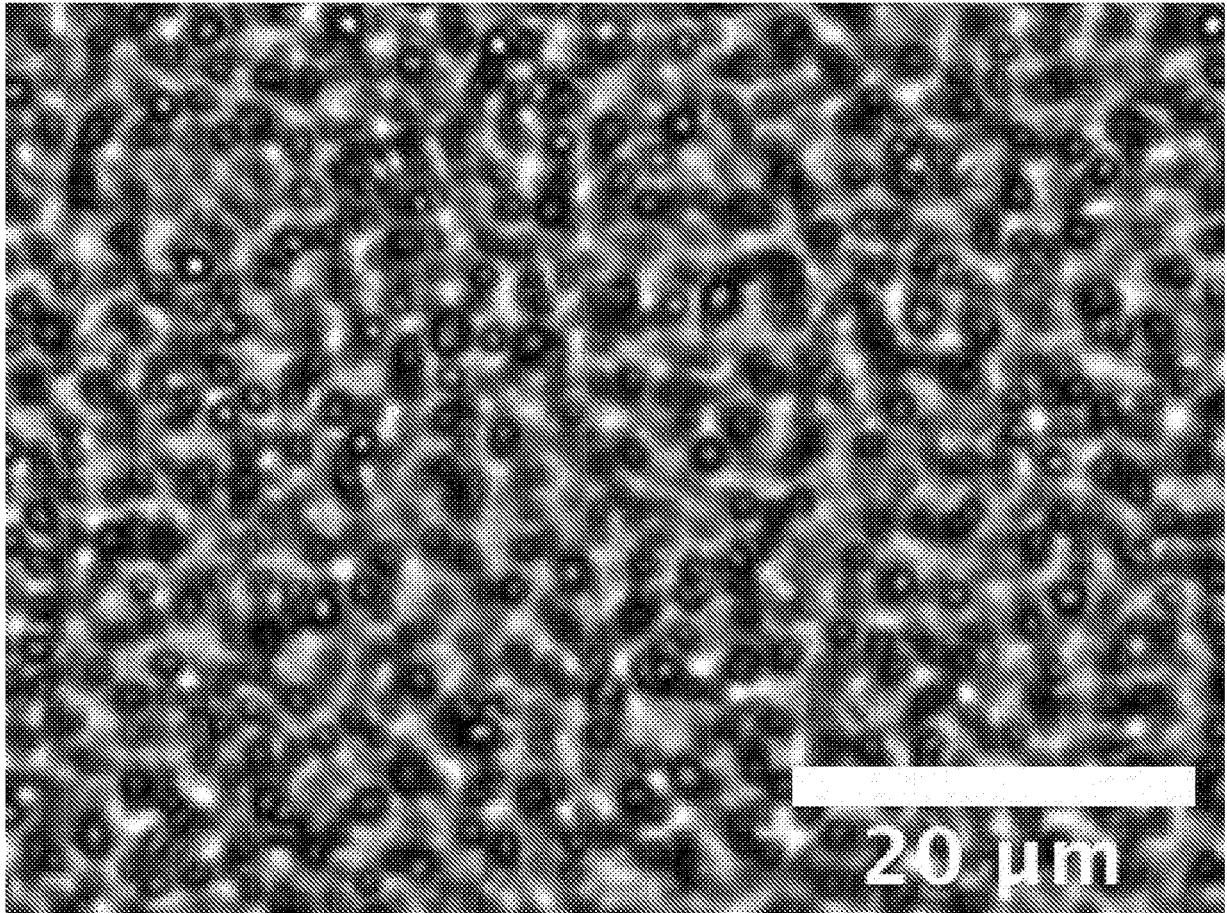


图 1

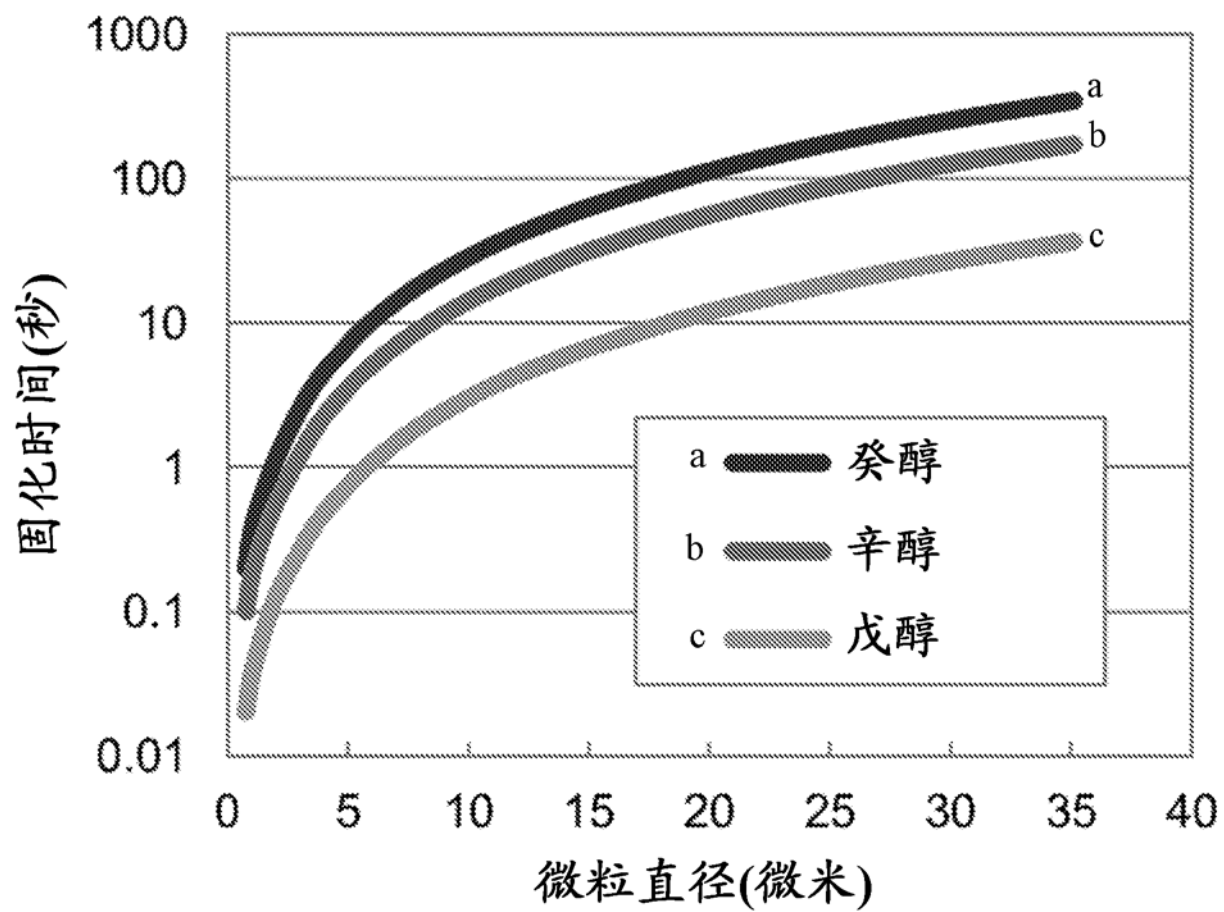


图 2

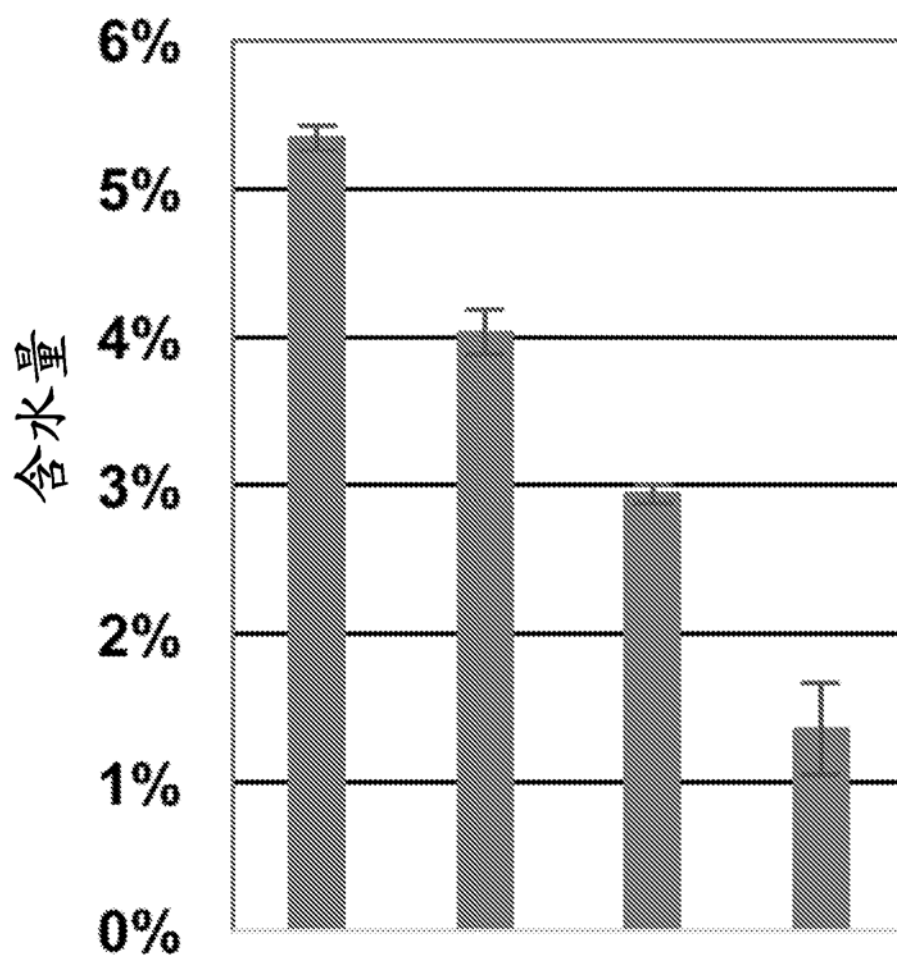


图 3

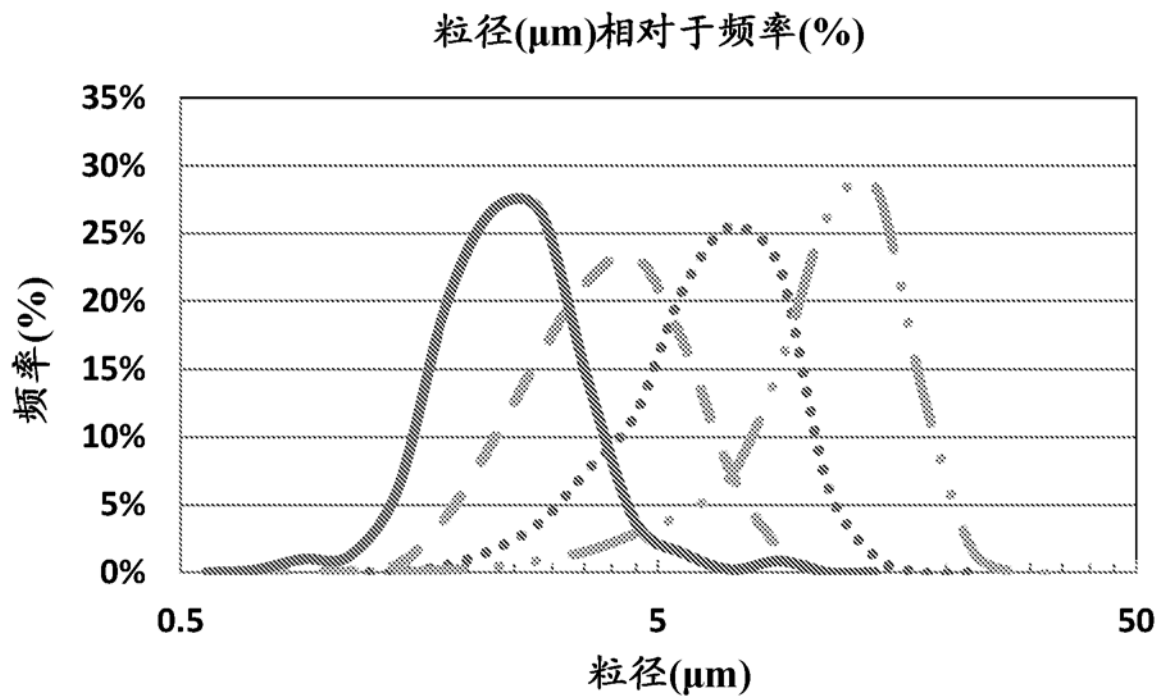


图 4

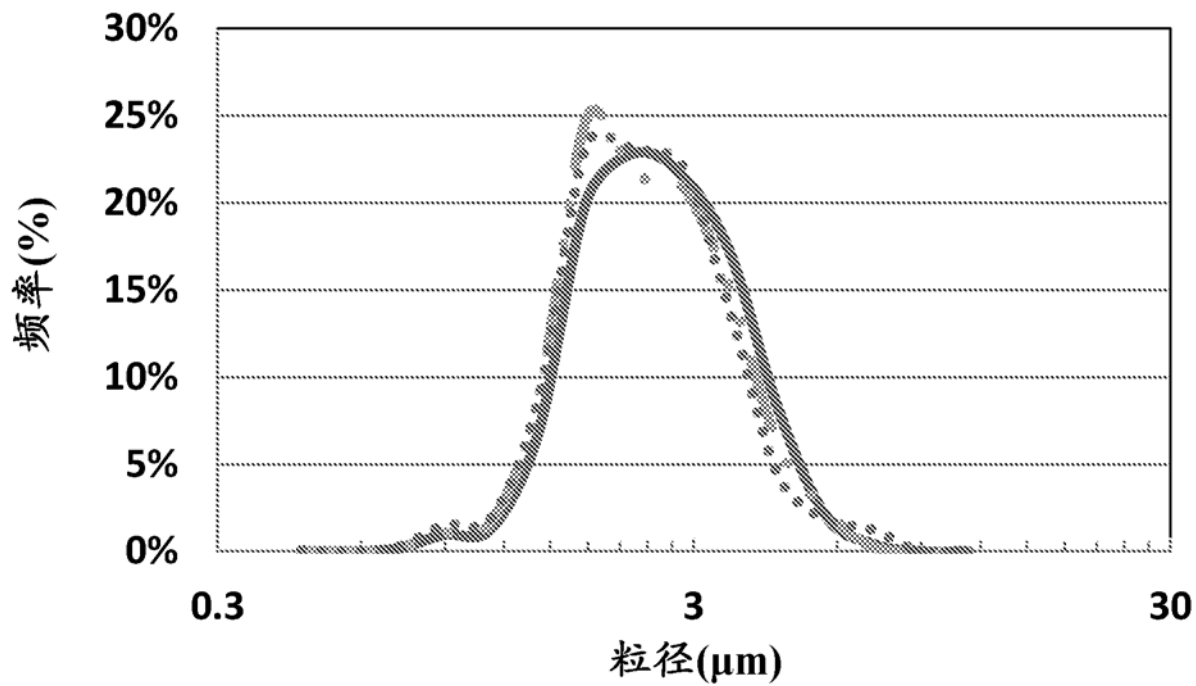


图 5

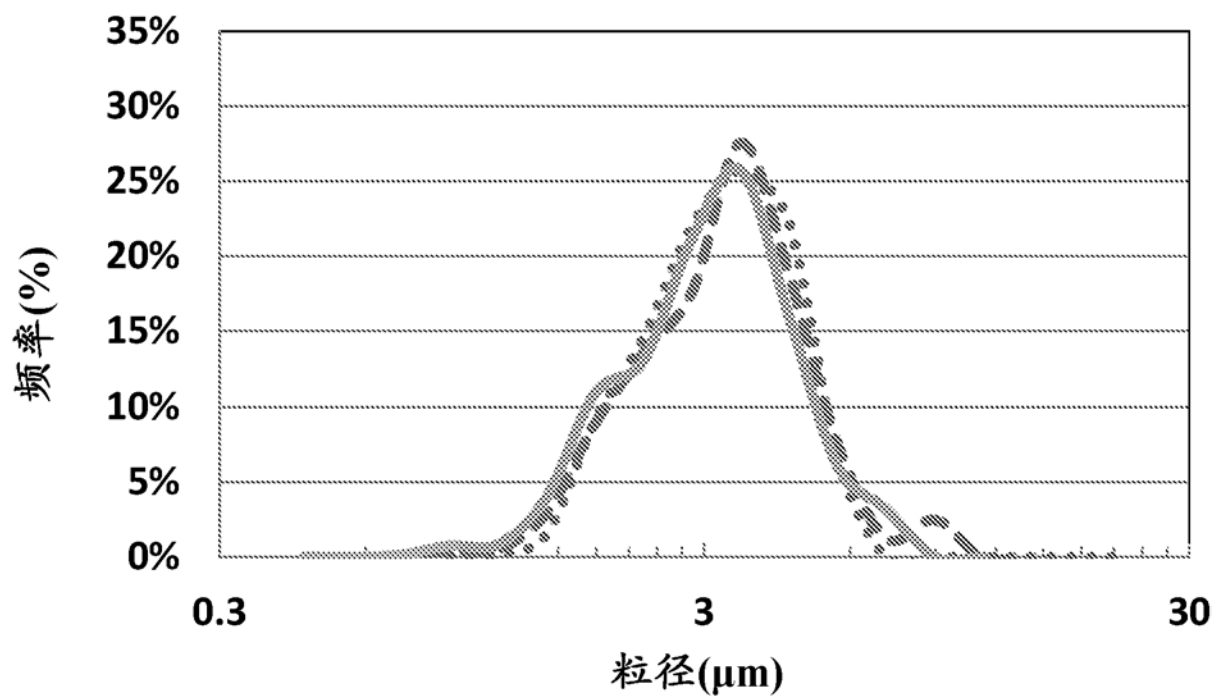


图 6

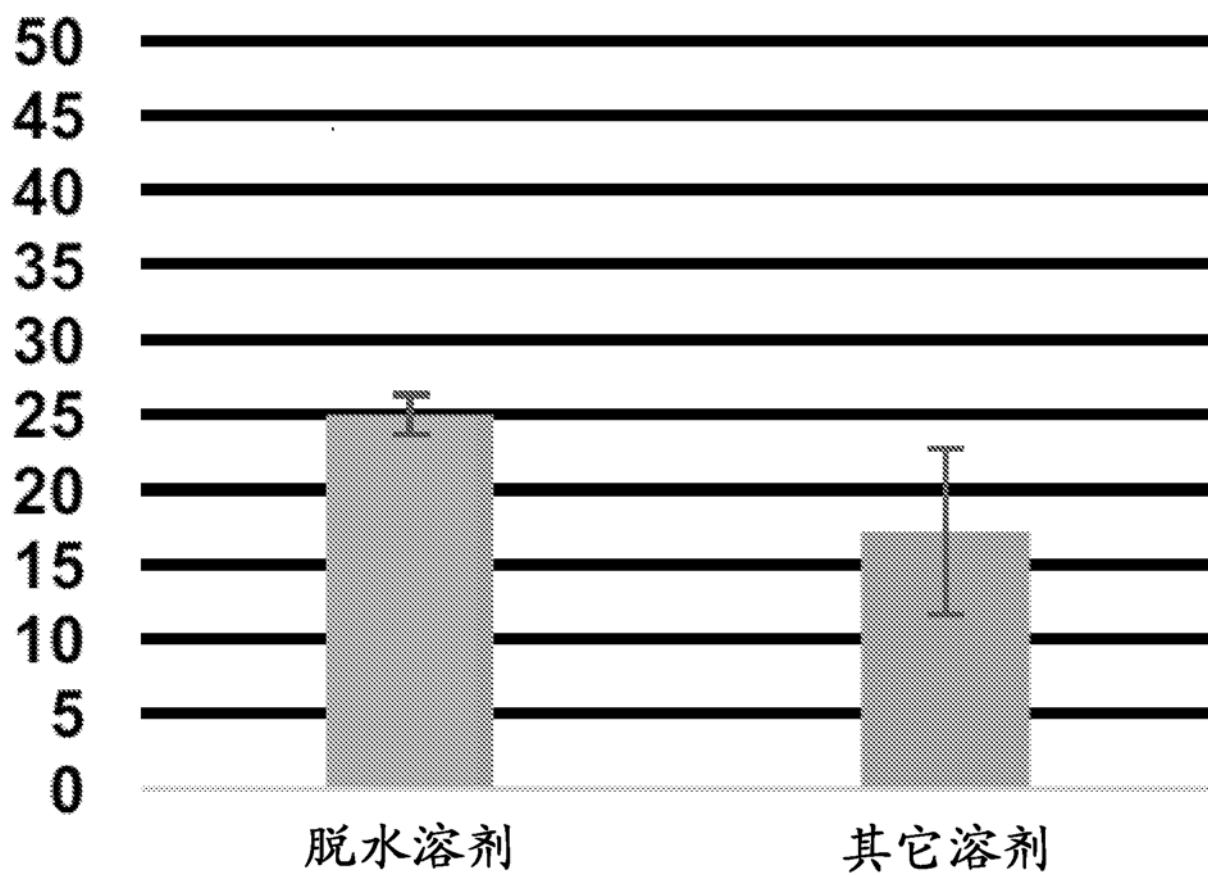


图 7

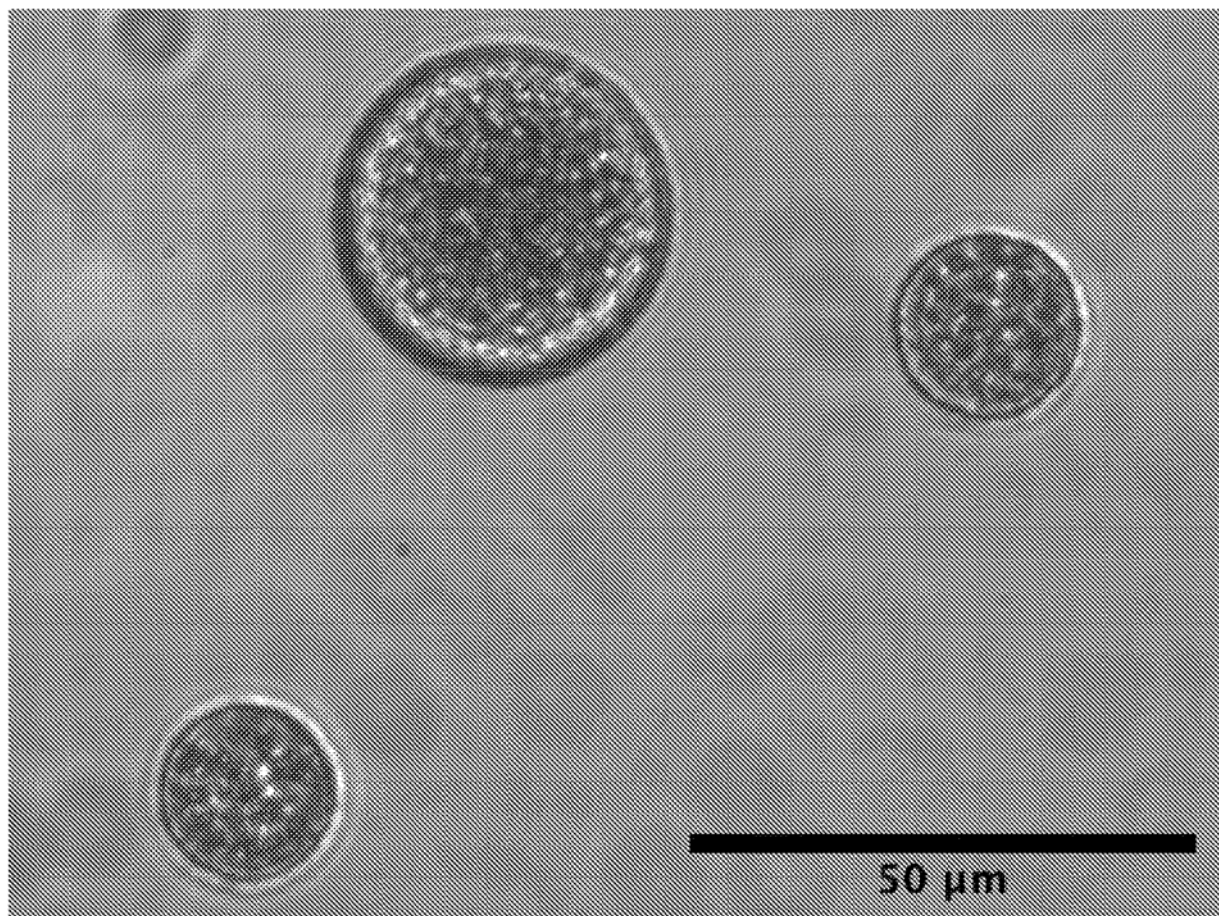


图 8

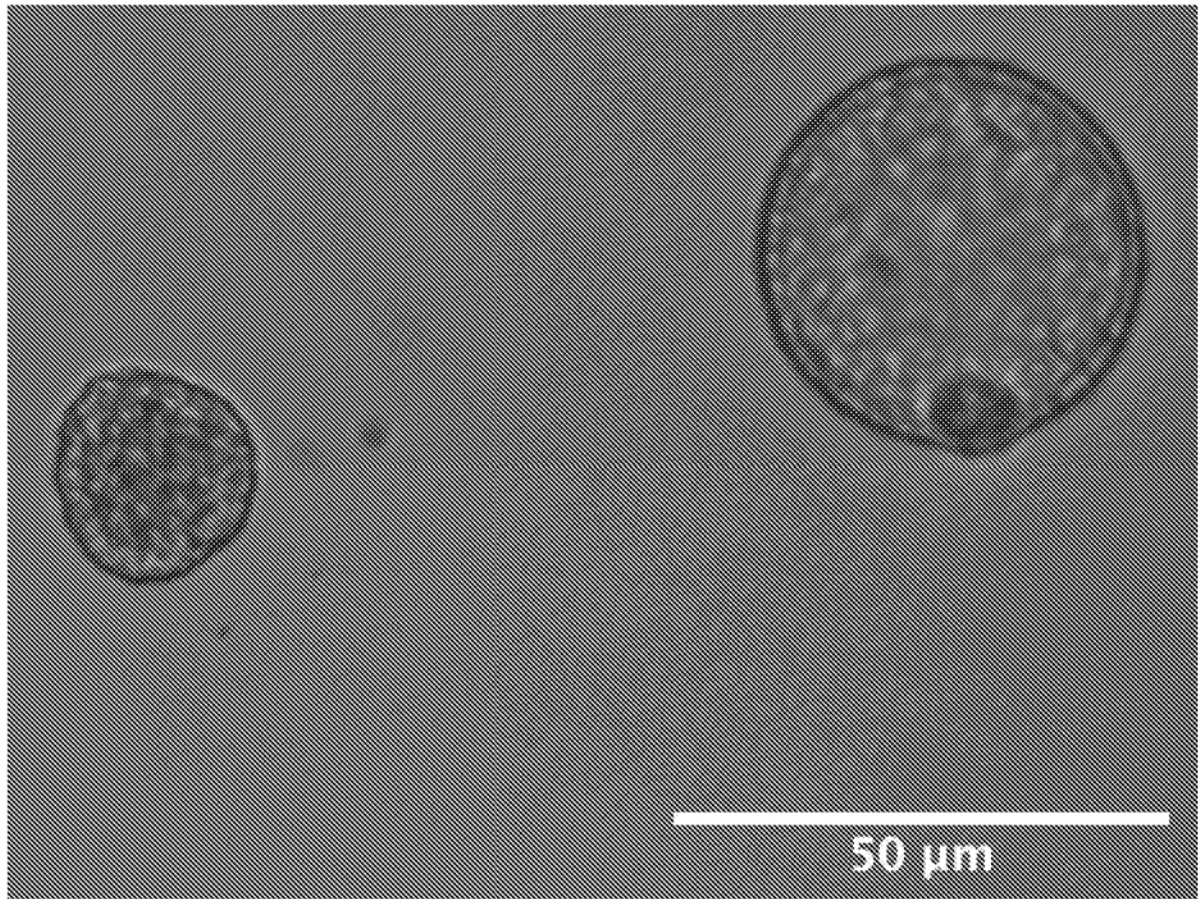


图 9

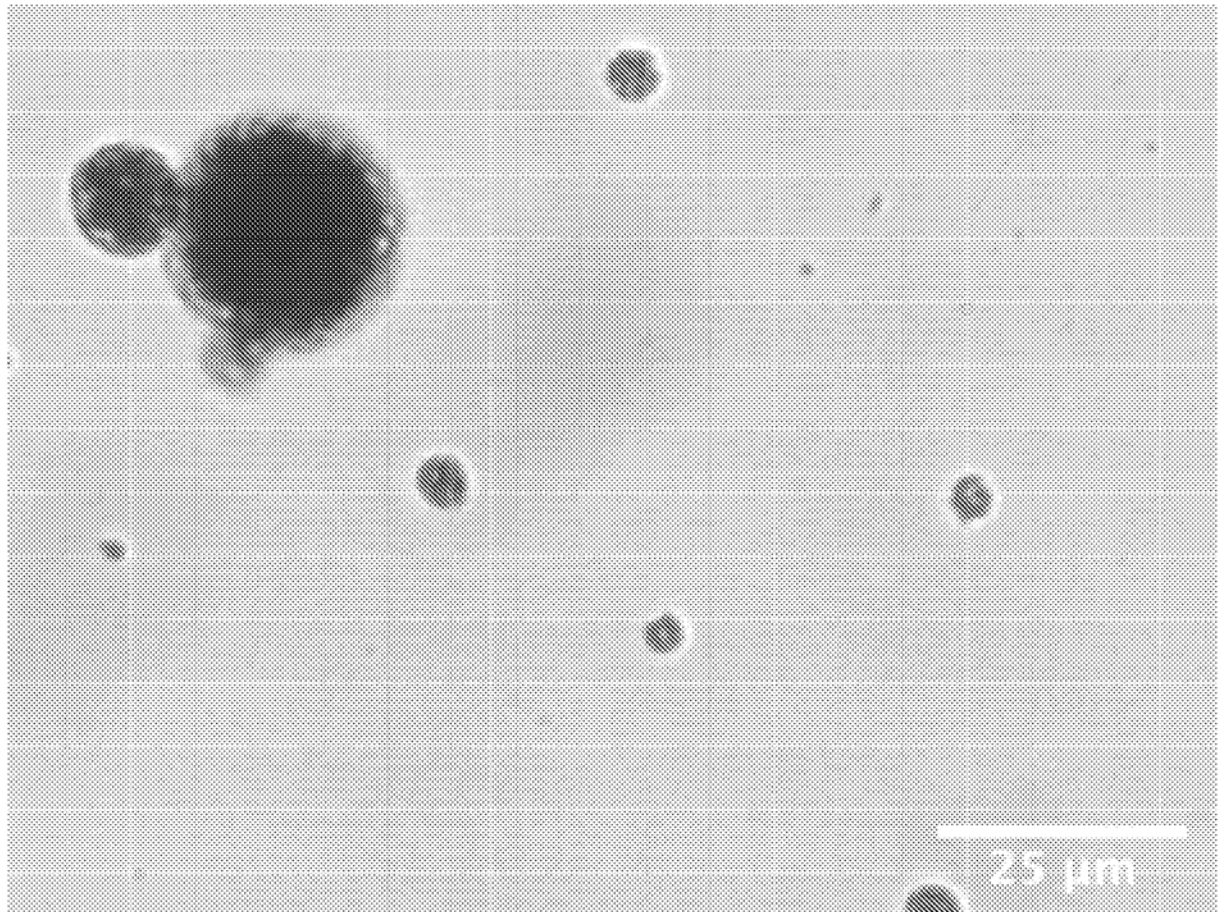


图 10

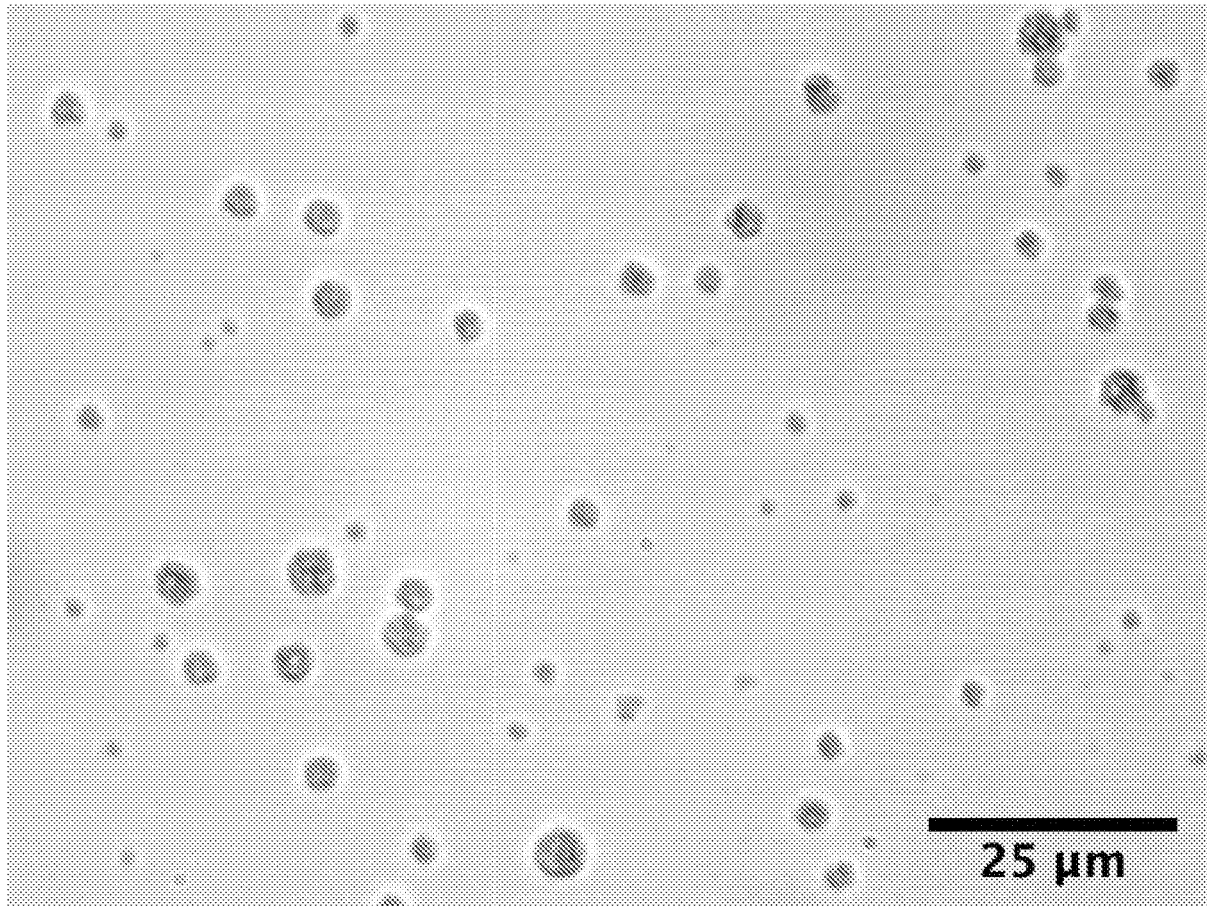


图 11

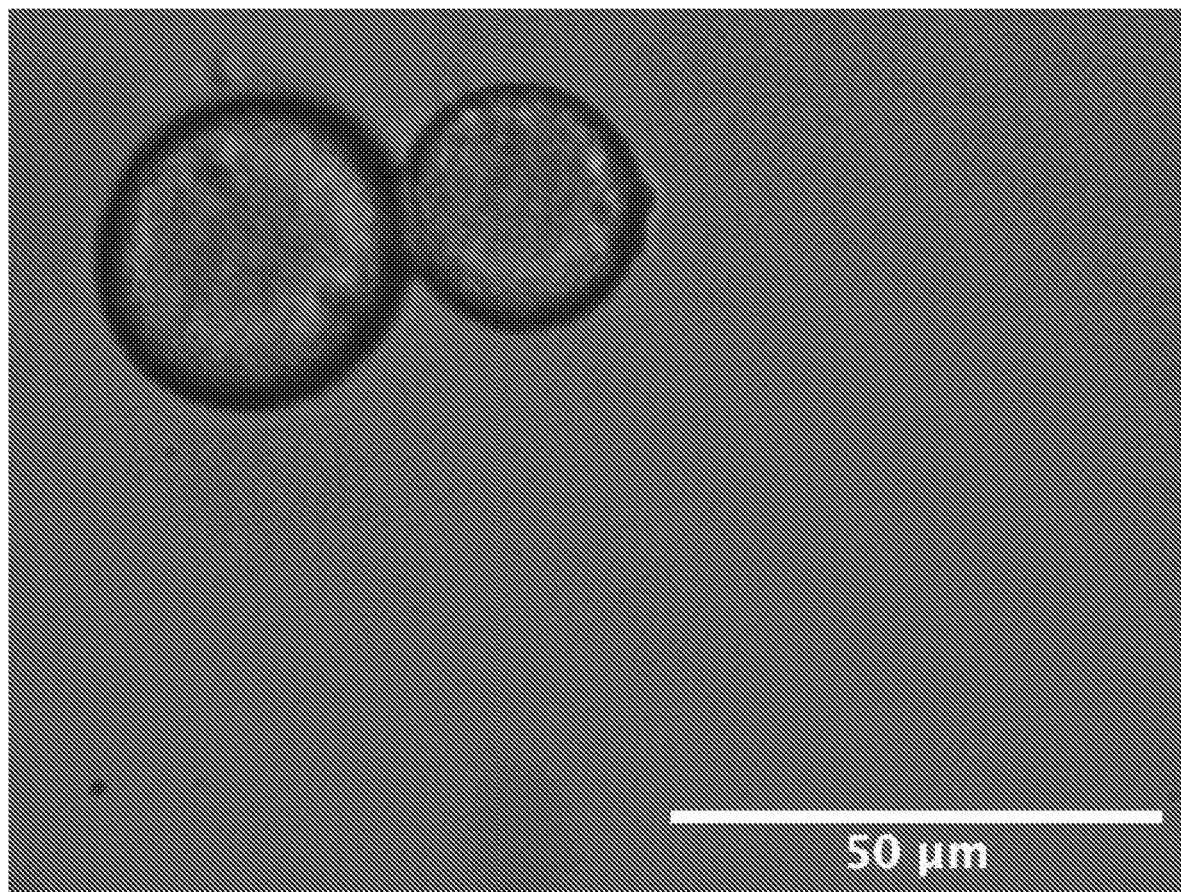


图 12

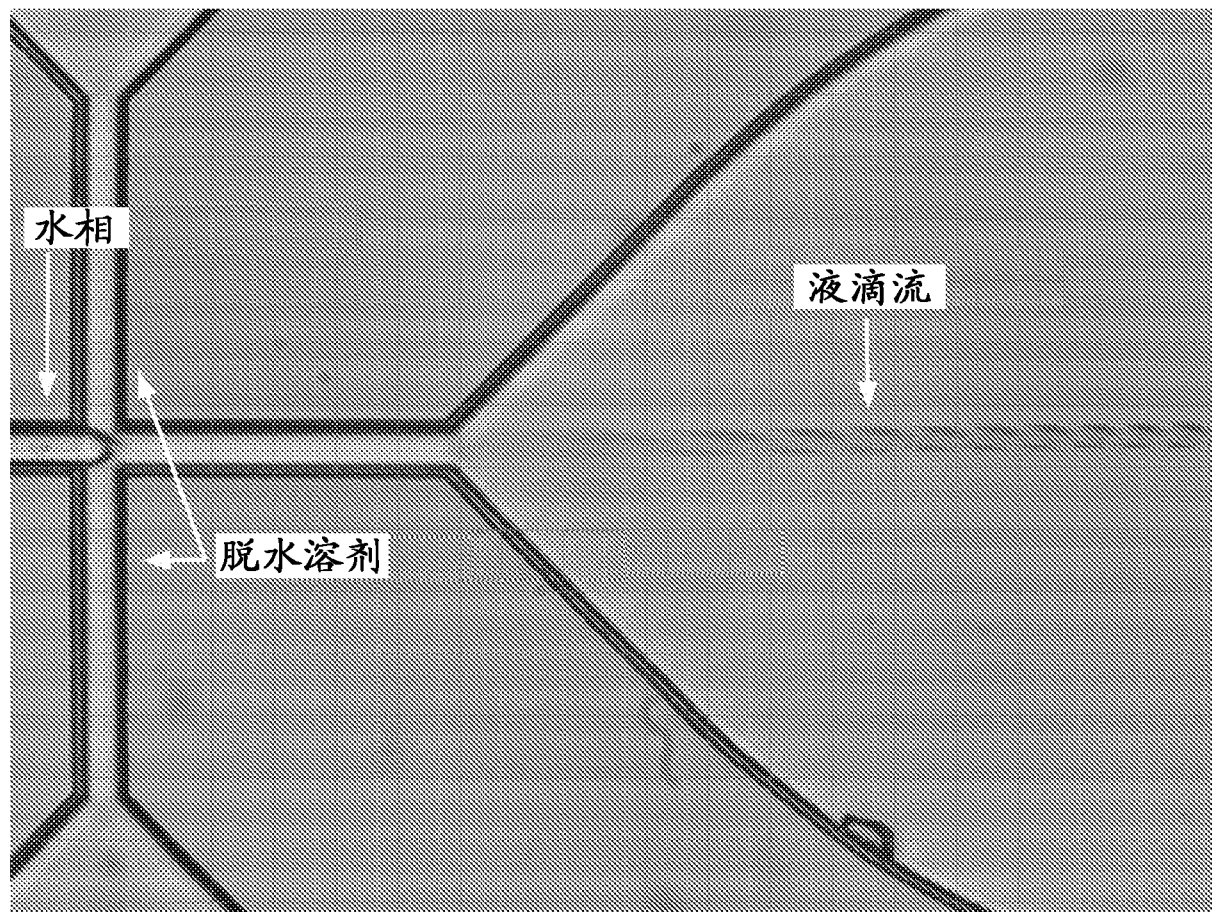


图 13

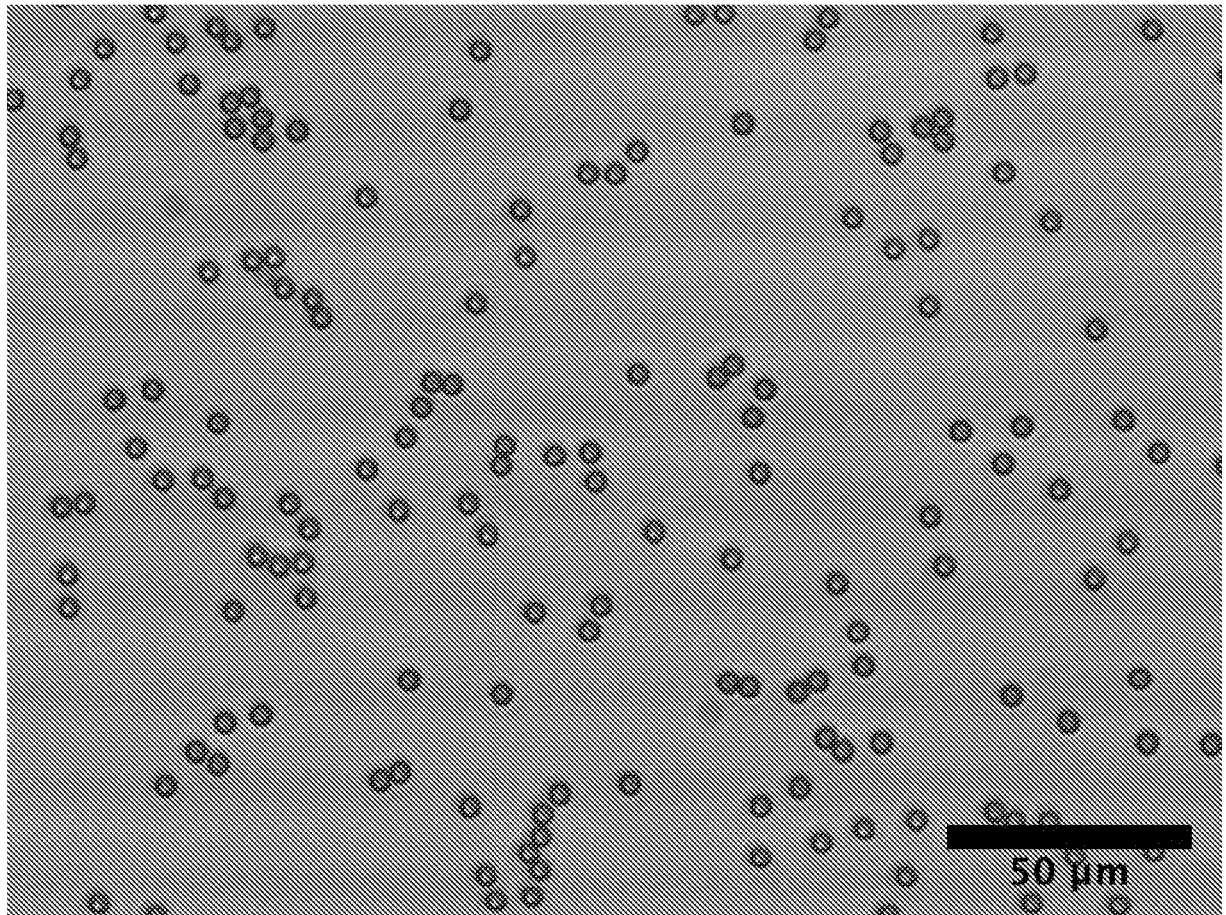


图 14

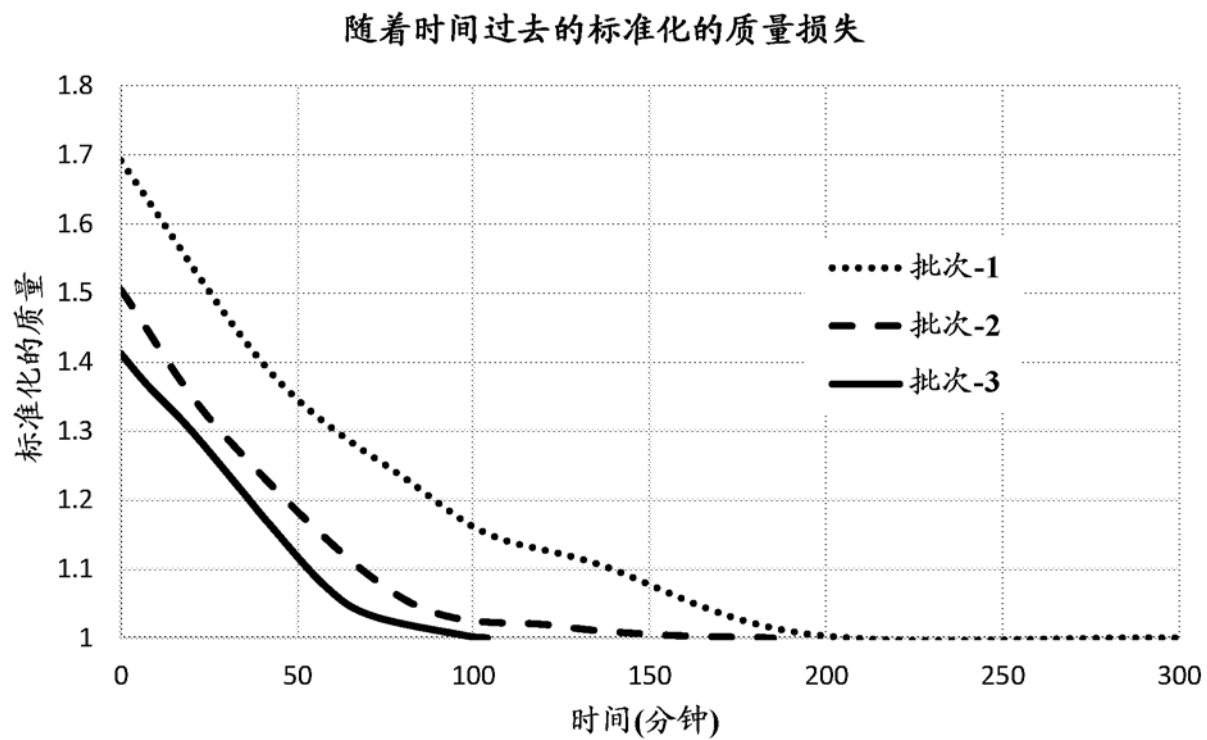


图 15