



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116406369 A

(43) 申请公布日 2023.07.07

(21) 申请号 202180075985.2

(22) 申请日 2021.10.04

(30) 优先权数据

63/087,719 2020.10.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.05.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/053394 2021.10.04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/076318 EN 2022.04.14

(71) 申请人 百时美施贵宝公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 J·J·洪 M·A·荷斯坦

S·F·拉姆 S·高斯

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

C07K 1/34 (2006.01)

权利要求书5页 说明书26页 附图17页

(54) 发明名称

用于浓缩蛋白质的方法

(57) 摘要

本文提供了通过使用补料分批设置的分批样模式下的超滤浓缩大体积的抗体原料以产生浓缩的药物的优化方法。

1. 一种减少目的蛋白的过滤处理时间的方法,所述方法包括向进料罐连续地装入已经过滤过至少一次的包含所述目的蛋白的蛋白质混合物(“渗余物”),其中所述进料罐与主储存(“渗余物”)罐分开。

2. 一种浓缩目的蛋白的方法,所述方法包括向进料罐连续地装入已经过滤过至少一次的包含所述目的蛋白的蛋白质混合物(“渗余物”),其中所述进料罐与主储存(“渗余物”)罐分开。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述进料罐进一步包含尚未过滤过至少一次的包含目的蛋白的初始蛋白质混合物。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中将所述初始蛋白质混合物和所述渗余物混合在一起。

5. 根据权利要求3或4所述的方法,其中将所述蛋白质混合物和/或所述渗余物通过过滤器过滤。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中将过滤后的蛋白质混合物和所述渗余物(“渗余物”)装入所述进料罐中。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中继续所述装载,直到将所述目的蛋白浓缩到至少约1mg/mL、至少约10mg/mL、至少约20mg/mL、至少约30mg/mL、至少约40mg/mL、至少约50mg/mL、至少约60mg/mL、至少约70mg/mL或至少约80mg/mL。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中继续所述装载,直到将所述目的蛋白浓缩到约1mg/mL与80mg/mL之间、约5mg/mL与70mg/mL之间、约10mg/mL与60mg/mL之间、约10mg/mL与50mg/mL之间、约10mg/mL与40mg/mL之间、约10mg/mL与30mg/mL之间、约10mg/mL与20mg/mL之间、约20mg/mL与70mg/mL之间、约20mg/mL与60mg/mL之间、约20mg/mL与50mg/mL之间、约20mg/mL与40mg/mL之间或约20mg/mL与30mg/mL之间。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中将所述渗余物的装载重复至少两次、至少三次、至少四次、至少五次、至少六次、至少七次、至少八次、至少九次、至少十次、至少20次、至少30次、至少40次、至少50次、至少60次、至少70次、至少80次、至少90次、至少100次、至少110次、至少120次、至少130次、至少140次、至少150次、至少160次、至少170次、至少180次、至少190次、至少200次、至少210次、至少220次、至少230次、至少240次、至少250次、至少260次、至少270次、至少280次、至少290次或至少300次。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,所述方法进一步包括停止将所述渗余物装入所述进料罐。

11. 根据权利要求10所述的方法,所述方法进一步包括将所述渗余物引导至储存罐。

12. 一种减少目的蛋白的过滤处理时间的方法,所述方法包括将包含所述目的蛋白的蛋白质混合物装入过滤系统,所述过滤系统包括进料罐、储存罐、过滤器、三通阀和储存输入端,所述三通阀包括将所述过滤器连接到所述进料罐的进料罐阀和将所述过滤器连接到所述储存罐的储存罐阀,所述储存输入端连接所述进料罐和所述储存罐。

13. 一种浓缩目的蛋白的方法,所述方法包括将包含所述目的蛋白的蛋白质混合物装入过滤系统,所述过滤系统包括进料罐、储存罐、过滤器、三通阀和储存输入端,所述三通阀包括将所述过滤器连接到所述进料罐的进料罐阀和将所述过滤器连接到所述储存罐的储存罐阀,所述储存输入端连接所述进料罐和所述储存罐。

14. 根据权利要求12或13所述的方法,其中将所述储存罐关闭,直到将所述目的蛋白充分浓缩。

15. 根据权利要求12至14中任一项所述的方法,所述方法进一步包括将蛋白质混合物连续添加到所述进料罐中。

16. 根据权利要求12至15中任一项所述的方法,其中将所述蛋白质混合物从所述进料罐引导至所述储存罐。

17. 根据权利要求11至16中任一项所述的方法,其中所述储存罐连接到所述过滤器。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述过滤器包括嵌入式滤膜。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述嵌入式滤膜是超滤膜。

20. 根据权利要求18或权利要求19所述的方法,其中所述嵌入式滤膜是聚乙烯醚、聚乙烯醇、尼龙、硅、多晶硅、超纳米金刚石、类金刚石碳、二氧化硅、钛、硅石、氮化硅、聚四氟乙烯、硅酮、聚甲基丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚丙烯酸酯、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚碳酸酯、石墨烯、氧化石墨烯、多糖、陶瓷颗粒、聚(苯乙烯二乙烯基)苯、聚砜、聚醚砜、改性聚醚砜、聚芳砜、聚苯砜、聚氯乙烯、聚丙烯、乙酸纤维素、硝酸纤维素、聚乳酸、聚丙烯腈、聚偏氟乙烯、聚吡嗪、聚酰胺-聚醚嵌段聚合物、聚酰亚胺、聚醚酰亚胺、聚酰胺、再生纤维素、复合再生纤维素或其组合。

21. 根据权利要求18至20中任一项所述的方法,其中所述滤膜的截留分子量(MWCO)低于约50kD至约5kD、约50kD、约40kD、约30kD、约20kD、约10kD或约5kD。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述MWCO低于约5kD。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的方法,其中允许所述混合物流动,直到达到所需的过滤蛋白质浓度。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述所需的过滤蛋白质浓度为约10mg/mL至约300mg/mL,例如约10mg/mL、约50mg/mL、约100mg/mL、约110mg/mL、约120mg/mL、约130mg/mL、约140mg/mL、约150mg/mL、约160mg/mL、约170mg/mL、约180mg/mL、约190mg/mL、约200mg/mL、约250mg/mL或约300mg/mL。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述所需的过滤蛋白质浓度为约150mg/mL。

26. 根据权利要求23至25中任一项所述的方法,其中蛋白质粘度为约0cP至约200cP。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述蛋白质粘度为约20cP至约60cP。

28. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法,其中所述进料罐的体积与所述储存罐的体积之间的体积比为约1:2至约10:1、约1:2至约1:1、约1:1至约1:2、约1:1至约1:3、约1:1至约1:4、约1:1至约1:5、约1:1至约1:6、约1:1至约1:7、约1:1至约1:8、约1:1至约1:9或约1:1至约1:10。

29. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法,其中所述进料罐的体积与所述储存罐的体积之间的体积比为约1:1、约2:1或约5:1。

30. 根据权利要求16至29中任一项所述的方法,其中使用隔膜泵、旋转凸轮泵或蠕动泵将所述蛋白质混合物引导至所述储存罐和/或所述过滤器。

31. 根据权利要求1至30中任一项所述的方法,所述方法进一步包括将尚未过滤过至少一次的包含目的蛋白的初始蛋白质混合物装入所述进料罐,然后向所述进料罐连续地装入已经过滤过至少一次的包含所述目的蛋白的蛋白质混合物(“渗余物”)。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中将所述初始蛋白质混合物以约1mg/mL至约30mg/mL的浓度添加到所述进料罐中。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中将所述初始蛋白质混合物以约5mg/mL的浓度添加到所述进料罐中。

34. 根据权利要求1至33中任一项所述的方法,其中与补料分批浓缩工艺的处理时间相比,处理时间减少约1%、约5%、约10%、约20%、约30%、约40%或约50%。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中与补料分批浓缩工艺的处理时间相比,所述处理时间减少约40%。

36. 根据权利要求1至33中任一项所述的方法,其中与补料分批浓缩工艺的处理时间相比,所述处理时间减少约0.2小时、约0.4小时、约0.5小时、约0.6小时、约0.8小时或约1.0小时。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中与补料分批浓缩工艺的处理时间相比,所述处理时间减少约0.5小时。

38. 根据权利要求1至37中任一项所述的方法,其中与补料分批浓缩工艺的微粒计数相比,1-2 μ m微粒计数降低约10%、约20%、约30%、约40%或约50%。

39. 根据权利要求1至38中任一项所述的方法,其中与补料分批浓缩工艺的微粒计数相比,5-10 μ m微粒计数降低约10%、约20%、约30%、约40%或约50%。

40. 根据权利要求1至39中任一项所述的方法,其中与补料分批浓缩工艺的微粒计数相比,10-25 μ m微粒计数降低约10%、约20%、约30%、约40%或约50%。

41. 根据权利要求1至40中任一项所述的方法,其中所述蛋白质混合物包含抗体、抗体片段、抗原结合片段、融合蛋白、天然存在的蛋白质、嵌合蛋白或其任何组合。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中所述蛋白质混合物包含选自IgM、IgA、IgE、IgD和IgG的抗体。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中所述蛋白质混合物包含抗体,并且所述抗体是选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的IgG抗体。

44. 根据权利要求41至43中任一项所述的方法,其中所述抗体包括双可变结构域免疫球蛋白。

45. 根据权利要求41至43中任一项所述的方法,其中所述抗体包括三价抗体。

46. 根据权利要求41所述的方法,其中所述抗体或抗体片段包括抗PD-1、抗PD-L1、抗CTLA4、抗TIM3、抗LAG3、抗NKG2a、抗ICOS、抗CD137、抗KIR、抗TGF β 、抗IL-10、抗B7-H4、抗GITR、抗CXCR4、抗CD73、抗TIGIT、抗OX40、抗IL-8抗体或其抗体片段。

47. 根据权利要求41至46中任一项所述的方法,其中所述蛋白质混合物源自细菌、酵母、昆虫或哺乳动物细胞培养物。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中所述哺乳动物细胞培养物是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞培养物。

49. 根据权利要求1至48中任一项所述的方法,其中从分批细胞培养获得所述蛋白质混合物。

50. 根据权利要求1至49中任一项所述的方法,其中从补料分批细胞培养获得所述蛋白质混合物。

51. 根据权利要求1至50中任一项所述的方法, 其中在生物反应器中产生所述蛋白质混合物。

52. 根据权利要求51所述的方法, 其中在一次性生物反应器中产生所述蛋白质混合物。

53. 根据权利要求1至48中任一项所述的方法, 其中从灌注细胞培养获得所述蛋白质混合物。

54. 根据权利要求53所述的方法, 其中在灌注或TFF灌注生物反应器中产生所述蛋白质混合物。

55. 根据权利要求47至54中任一项所述的方法, 其中在持续约1天至约60天的细胞培养中产生所述蛋白质混合物。

56. 根据权利要求55所述的方法, 其中在持续约25天的细胞培养中产生所述蛋白质混合物。

57. 根据权利要求1至54中任一项所述的方法, 其中用加载缓冲液将所述蛋白质混合物添加到所述进料罐中。

58. 根据权利要求57所述的方法, 其中所述加载缓冲液包含氨基酸、弱酸、弱碱和/或糖。

59. 根据权利要求1至58中任一项所述的方法, 所述方法进一步包括将所述蛋白质配制成药物组合物。

60. 一种通过根据权利要求1至59中任一项所述的方法制备的蛋白质。

61. 一种药物组合物, 所述药物组合物包含根据权利要求1至60所述的蛋白质。

62. 一种向有需要的受试者施用根据权利要求61所述的药物组合物的方法。

63. 一种治疗有需要的受试者的疾病或病症的方法, 所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求61所述的药物组合物。

64. 一种用于浓缩目的蛋白的系统, 所述系统包括:

进料罐;

通过第一流体通道连接到所述进料罐的储存罐;

通过第二流体通道连接到所述储存罐的滤膜; 和

三通阀, 其中所述三通阀通过第三流体通道连接到所述滤膜, 其中所述三通阀通过第四流体通道连接到所述储存罐, 并且其中所述三通阀通过第五流体通道连接到所述进料罐,

其中所述储存罐经由所述第一流体通道从所述进料罐接收包含所述目的蛋白的蛋白质混合物,

其中所述滤膜经由所述第二流体通道从所述储存罐接收包含所述目的蛋白的蛋白质混合物, 并且过滤所述蛋白质混合物, 并且

其中所述三通阀经由所述第三流体通道从所述过滤器接收渗余物, 并且将所述渗余物经由所述第四流体通道引导至所述储存罐或经由所述第五流体通道引导至所述进料罐。

65. 根据权利要求64所述的系统, 其中如果所述系统内所述蛋白质混合物的总体积小于所述储存罐的容量, 则所述三通阀将所述渗余物引导至所述储存罐, 并且其中如果所述系统内所述蛋白质混合物的总体积大于所述储存罐的容量, 则所述三通阀将所述渗余物引导至所述进料罐。

66. 根据权利要求64或65所述的系统,所述系统进一步包括被配置为确定所述系统内所述蛋白质混合物的总体积和/或浓度的传感器,其中所述三通阀基于来自所述传感器的反馈自动将所述渗余物引导至所述储存罐或引导至所述进料罐。

67. 根据权利要求64至66中任一项所述的系统,所述系统进一步包括一个或多个隔膜泵、旋转凸轮泵或蠕动泵。

68. 根据权利要求64至67中任一项所述的系统,其中其中所述过滤器包括嵌入式滤膜。

69. 根据权利要求68所述的系统,其中所述嵌入式滤膜是超滤膜。

70. 根据权利要求69所述的系统,其中所述嵌入式滤膜是聚乙烯醚、聚乙烯醇、尼龙、硅、多晶硅、超纳米金刚石、类金刚石碳、二氧化硅、钛、硅石、氮化硅、聚四氟乙烯、硅酮、聚甲基丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚丙烯酸酯、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚碳酸酯、石墨烯、氧化石墨烯、多糖、陶瓷颗粒、聚(苯乙烯二乙烯基)苯、聚砜、聚醚砜、改性聚醚砜、聚芳砜、聚苯砜、聚氯乙烯、聚丙烯、乙酸纤维素、硝酸纤维素、聚乳酸、聚丙烯腈、聚偏氟乙烯、聚吡嗪、聚酰胺-聚醚嵌段聚合物、聚酰亚胺、聚醚酰亚胺、聚酰胺、再生纤维素、复合再生纤维素或其组合。

用于浓缩蛋白质的方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2020年10月5日提交的美国临时申请号63/087,719的优先权权益,并且将其通过引用以其整体特此并入。

背景技术

[0002] 由于更大的患者便利性和患者依从性,抗体疗法正越来越多地向通过皮下形式递送转变。为了实现皮下递送,必须经由高剂量低体积注射来递送治疗性蛋白(如抗体),这要以高浓度配制最终药物产品。在蛋白质制造工艺中,产生高浓度药品的负担主要落在超滤/渗滤(UF/DF)步骤上,其中通常将纯化的蛋白质进料流在第一超滤步骤中浓缩至中间浓度,缓冲液交换到目标配制品中,并且在第二超滤步骤中浓缩至最终的高浓度。由于溶液粘度随浓度的显著增加以及蛋白质在长时间暴露于剪切和界面应力下的聚集倾向,这带来了独特的挑战。高粘度导致高系统压力,由于对系统压力的安全相关限制,这限制了可达到的最大蛋白质浓度。粘度的增加可能与渗透通量的显著降低相关,渗透通量的显著降低导致处理时间长,从而可能加剧蛋白质聚集的风险。高浓度材料的产生导致装载材料的体积显著降低,这可能对设施配套和容量构成挑战,并且加剧由长时间暴露于剪切和界面应力而引起的聚集挑战。

[0003] 需要改进的方法来产生高浓度药品。

发明内容

[0004] 本公开文本涉及一种减少目的蛋白的过滤处理时间的方法,所述方法包括向进料罐连续地装入已经过滤过至少一次的包含所述目的蛋白的蛋白质混合物(“渗余物”),其中所述进料罐与主储存(“渗余物”)罐分开。本公开文本还涉及一种浓缩目的蛋白的方法,所述方法包括向进料罐连续地装入已经过滤过至少一次的包含所述目的蛋白的蛋白质混合物(“渗余物”),其中所述进料罐与主储存(“渗余物”)罐分开。在一些方面,所述进料罐进一步包含尚未过滤过至少一次的包含目的蛋白的初始蛋白质混合物。在一些方面,将所述初始蛋白质混合物和所述渗余物混合在一起。在一些方面,将所述蛋白质混合物和/或所述渗余物通过过滤器过滤。在一些方面,将过滤后的蛋白质混合物和所述渗余物(“渗余物”)装入所述进料罐中。在一些方面,继续所述装载,直到将所述目的蛋白浓缩到至少约1mg/mL、至少约10mg/mL、至少约20mg/mL、至少约30mg/mL、至少约40mg/mL、至少约50mg/mL、至少约60mg/mL、至少约70mg/mL或至少约80mg/mL。在一些方面,继续所述装载,直到将所述目的蛋白浓缩到约1mg/mL与80mg/mL之间、约5mg/mL与70mg/mL之间、约10mg/mL与60mg/mL之间、约10mg/mL与50mg/mL之间、约10mg/mL与40mg/mL之间、约10mg/mL与30mg/mL之间、约10mg/mL与20mg/mL之间、约20mg/mL与70mg/mL之间、约20mg/mL与60mg/mL之间、约20mg/mL与50mg/mL之间、约20mg/mL与40mg/mL之间或约20mg/mL与30mg/mL之间。在一些方面,将所述渗余物的装载重复至少两次、至少三次、至少四次、至少五次、至少六次、至少七次、至少八次、至少九次、至少十次、至少20次、至少30次、至少40次、至少50次、至少60次、至少70次、至少80次、

至少90次、至少100次、至少110次、至少120次、至少130次、至少140次、至少150次、至少160次、至少170次、至少180次、至少190次、至少200次、至少210次、至少220次、至少230次、至少240次、至少250次、至少260次、至少270次、至少280次、至少290次或至少300次。在一些方面,所述方法进一步包括停止将所述渗余物装入所述进料罐。在一些方面,所述方法进一步包括将所述渗余物引导至储存罐。

[0005] 本公开文本还涉及一种减少目的蛋白的过滤处理时间的方法,所述方法包括将包含所述目的蛋白的蛋白质混合物装入过滤系统,所述过滤系统包括进料罐、储存罐、过滤器、三通阀和储存输入端,所述三通阀包括将所述过滤器连接到所述进料罐的进料罐阀和将所述过滤器连接到所述储存罐的储存罐阀,所述储存输入端连接所述进料罐和所述储存罐。本公开文本还涉及一种浓缩目的蛋白的方法,所述方法包括将包含所述目的蛋白的蛋白质混合物装入过滤系统,所述过滤系统包括进料罐、储存罐、过滤器、三通阀和储存输入端,所述三通阀包括将所述过滤器连接到所述进料罐的进料罐阀和将所述过滤器连接到所述储存罐的储存罐阀,所述储存输入端连接所述进料罐和所述储存罐。在一些方面,将所述储存罐阀关闭,直到将所述目的蛋白充分浓缩。在一些方面,所述方法进一步包括将蛋白质混合物连续添加到所述进料罐中。在一些方面,其中将所述蛋白质混合物从所述进料罐引导至所述储存罐。在一些方面,其中所述储存罐连接到所述过滤器。在一些方面,所述过滤器包括嵌入式(in-line)滤膜。在一些方面,所述嵌入式滤膜是超滤膜。在一些方面,所述嵌入式滤膜是聚乙烯醚、聚乙烯醇、尼龙、硅、多晶硅、超纳米金刚石、类金刚石碳、二氧化硅(silicon dioxide)、钛、硅石(silica)、氮化硅、聚四氟乙烯、硅酮、聚甲基丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚丙烯酸酯、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚碳酸酯、石墨烯、氧化石墨烯、多糖、陶瓷颗粒、聚(苯乙烯二乙烯基)苯、聚砜、聚醚砜、改性聚醚砜、聚芳砜、聚苯砜(polyphenyl sulfone)、聚氯乙烯、聚丙烯、乙酸纤维素、硝酸纤维素、聚乳酸、聚丙烯腈、聚偏氟乙烯、聚吡嗪、聚酰胺-聚醚嵌段聚合物、聚酰亚胺、聚醚酰亚胺、聚酰胺、再生纤维素、复合再生纤维素或其组合。在一些方面,所述滤膜的截留分子量(MWCO)低于约50kD至约5kD、约50kD、约40kD、约30kD、约20kD、约10kD或约5kD。在一些方面,所述MWCO低于约5kD。

[0006] 在一些方面,允许所述混合物流动,直到达到所需的过滤蛋白质浓度。在一些方面,所述所需的过滤蛋白质浓度为约10mg/mL至约300mg/mL,例如约10mg/mL、约50mg/mL、约100mg/mL、约110mg/mL、约120mg/mL、约130mg/mL、约140mg/mL、约150mg/mL、约160mg/mL、约170mg/mL、约180mg/mL、约190mg/mL、约200mg/mL、约250mg/mL或约300mg/mL。在一些方面,所述所需的过滤蛋白质浓度为约150mg/mL。在一些方面,蛋白质粘度为约0cP至约200cP。在一些方面,所述蛋白质粘度为约20cP至约60cP。在一些方面,所述进料罐的体积与所述储存罐的体积之间的体积比为约1:2至约10:1、约1:2至约1:1、约1:1至约1:2、约1:1至约1:3、约1:1至约1:4、约1:1至约1:5、约1:1至约1:6、约1:1至约1:7、约1:1至约1:8、约1:1至约1:9或约1:1至约1:10。在一些方面,所述进料罐的体积与所述储存罐的体积之间的体积比为约1:1、约2:1或约5:1。在一些方面,使用隔膜泵、旋转凸轮泵或蠕动泵将所述蛋白质混合物引导至所述储存罐和/或所述过滤器。

[0007] 在一些方面,所述方法进一步包括将尚未过滤过至少一次的包含目的蛋白的初始蛋白质混合物装入所述进料罐,然后向所述进料罐连续地装入已经过滤过至少一次的包含

所述目的蛋白的蛋白质混合物(“渗余物”)。在一些方面,将所述初始蛋白质混合物以约1mg/mL至约30mg/mL的浓度添加到所述进料罐中。在一些方面,将所述初始蛋白质混合物以约5mg/mL的浓度添加到所述进料罐中。

[0008] 在一些方面,与补料分批浓缩工艺的处理时间相比,处理时间减少约1%、约5%、约10%、约20%、约30%、约40%或约50%。在一些方面,与补料分批浓缩工艺的处理时间相比,所述处理时间减少约40%。

[0009] 在一些方面,与补料分批浓缩工艺的处理时间相比,所述处理时间减少约0.2小时、约0.4小时、约0.5小时、约0.6小时、约0.8小时或约1.0小时。在一些方面,与补料分批浓缩工艺的处理时间相比,所述处理时间减少约0.5小时。

[0010] 在一些方面,与补料分批浓缩工艺的微粒计数相比,1-2 μm 微粒计数降低约10%、约20%、约30%、约40%或约50%。在一些方面,与补料分批浓缩工艺的微粒计数相比,5-10 μm 微粒计数降低约10%、约20%、约30%、约40%或约50%。在一些方面,与补料分批浓缩工艺的微粒计数相比,10-25 μm 微粒计数降低约10%、约20%、约30%、约40%或约50%。

[0011] 在一些方面,所述蛋白质混合物包含抗体、抗体片段、抗原结合片段、融合蛋白、天然存在的蛋白质、嵌合蛋白或其任何组合。在一些方面,所述蛋白质混合物包含选自IgM、IgA、IgE、IgD和IgG的抗体。在一些方面,所述蛋白质混合物包含抗体,并且所述抗体是选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的IgG抗体。在一些方面,所述抗体包括双可变结构域免疫球蛋白。在一些方面,所述抗体包括三价抗体。在一些方面,所述抗体或抗体片段包括抗PD-1、抗PD-L1、抗CTLA4、抗TIM3、抗LAG3、抗NKG2a、抗ICOS、抗CD137、抗KIR、抗TGF β 、抗IL-10、抗B7-H4、抗GITR、抗CXCR4、抗CD73、抗TIGIT、抗OX40、抗IL-8抗体或其抗体片段。

[0012] 在一些方面,所述蛋白质混合物源自细菌、酵母、昆虫或哺乳动物细胞培养物。在一些方面,所述哺乳动物细胞培养物是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞培养物。

[0013] 在一些方面,从分批细胞培养获得所述蛋白质混合物。在一些方面,从补料分批细胞培养获得所述蛋白质混合物。在一些方面,在生物反应器中产生所述蛋白质混合物。在一些方面,在一次性生物反应器中产生所述蛋白质混合物。在一些方面,从灌注细胞培养获得所述蛋白质混合物。在一些方面,在灌注或TFP灌注生物反应器中产生所述蛋白质混合物。在一些方面,在持续约1天至约60天的细胞培养中产生所述蛋白质混合物。在一些方面,在持续约25天的细胞培养中产生所述蛋白质混合物。

[0014] 在一些方面,用加载缓冲液将所述蛋白质混合物添加到所述进料罐中。在一些方面,所述加载缓冲液包含氨基酸、弱酸、弱碱和/或糖。

[0015] 在一些方面,所述方法进一步包括将所述蛋白质配制成药物组合物。在一些方面,通过本文所公开的方法制备蛋白质。在一些方面,药物组合物包含如本文所制备的蛋白质。

[0016] 本公开文本还涉及一种施用本文所述的药物组合物的方法。本公开文本还涉及一种治疗有需要的受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用所述药物组合物。

[0017] 本公开文本还涉及一种用于浓缩目的蛋白的系统,所述系统包括:

- (a) 进料罐;
- (b) 通过第一流体通道连接到所述进料罐的储存罐;
- (c) 通过第二流体通道连接到所述储存罐的滤膜;和

(d)三通阀,其中所述三通阀通过第三流体通道连接到所述滤膜,其中所述三通阀通过第四流体通道连接到所述储存罐,并且其中所述三通阀通过第五流体通道连接到所述进料罐,

其中所述储存罐经由所述第一流体通道从所述进料罐接收包含所述目的蛋白的蛋白质混合物,

其中所述滤膜经由所述第二流体通道从所述储存罐接收包含所述目的蛋白的蛋白质混合物,并且过滤所述蛋白质混合物,并且

其中所述三通阀经由所述第三流体通道从所述过滤器接收渗余物,并且将所述渗余物经由所述第四流体通道引导至所述储存罐或经由所述第五流体通道引导至所述进料罐。

[0018] 在一些方面,如果所述系统内所述蛋白质混合物的总体积小于所述储存罐的容量,则所述三通阀将所述渗余物引导至所述储存罐,并且其中如果所述系统内所述蛋白质混合物的总体积大于所述储存罐的容量,则所述三通阀将所述渗余物引导至所述进料罐。

[0019] 在一些方面,所述系统进一步包括被配置为确定所述系统内所述蛋白质混合物的总体积和/或浓度的传感器,其中所述三通阀基于来自所述传感器的反馈自动将所述渗余物引导至所述储存罐或引导至所述进料罐。在一些方面,所述系统进一步包括一个或多个隔膜泵、旋转凸轮泵或蠕动泵。在一些方面,所述过滤器包括嵌入式滤膜。在一些方面,所述嵌入式滤膜是超滤膜。在一些方面,所述嵌入式滤膜是聚乙烯醚、聚乙烯醇、尼龙、硅、多晶硅、超纳米金刚石、类金刚石碳、二氧化硅、钛、硅石、氮化硅、聚四氟乙烯、硅酮、聚甲基丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚丙烯酸酯、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚碳酸酯、石墨烯、氧化石墨烯、多糖、陶瓷颗粒、聚(苯乙烯二乙烯基)苯、聚砜、聚醚砜、改性聚醚砜、聚芳砜、聚苯砜、聚氯乙烯、聚丙烯、乙酸钠纤维素、硝酸纤维素、聚乳酸、聚丙烯腈、聚偏氟乙烯、聚哌嗪、聚酰胺-聚醚嵌段聚合物、聚酰亚胺、聚醚酰亚胺、聚酰胺、再生纤维素、复合再生纤维素或其组合。

附图说明

[0020] 图1A-图1C示出了切向流过滤(TFF)系统的示意图。图1A示出了以补料分批配置设置的TFF超滤/渗滤系统的示意图。图1B示出了以伪分批配置设置的TFF超滤/渗滤系统的示意图。图1C示出了以分批配置设置的TFF超滤/渗滤系统的示意图。

[0021] 图2A-图2B示出了分批装载、补料分批装载和伪分批装载配置的随经过的处理时间变化的渗余物mAb A浓度。图2A示出了分批、补料分批和伪分批装载策略的随经过的处理时间(小时)变化的渗余物mAb A浓度计算值(g/L)。图2B示出了每个工艺阶段的对应处理时间,从左到右分别为:超滤1(UF1)、渗滤(DF)和超滤2(UF2)。

[0022] 图3示出了在超滤/渗滤运行期间随渗余物mAb A浓度计算值变化的渗透通量(LHM)。使用分批、补料分批或伪分批装载执行运行(UF1),但是所有三种运行对于DF和UF2步骤都以分批配置操作。

[0023] 图4示出了分批、补料分批(混合)和伪分批装载策略的在UF/DF工艺中的中间点mAb A的高分子量(HMW)种类的水平。

[0024] 图5A-图5D示出了使用分批、补料分批(混合)和伪分批装载策略产生的过程中UF/

DF池的微粒的mAb A颗粒计数。图5A示出了1-2 μm 颗粒的颗粒计数。图5B示出了5-10 μm 颗粒的颗粒计数。图5C示出了10-25 μm 颗粒的颗粒计数。图5D示出了50-100 μm 颗粒的颗粒计数。使用微流控成像量化颗粒含量。为简洁起见,省略了2-5 μm 和25-50 μm 尺寸范围的颗粒计数,但是它们分别与针对5-10 μm 和50-100 μm 尺寸范围观察到的趋势一致。

[0025] 图6A示出了使用隔膜泵和蠕动泵的伪分批运行的随处理时间变化的渗余物mAb浓度。图6B示出了图6A的每个工艺阶段(例如,UF1、DF和UF2)的对应处理时间。

[0026] 图7示出了使用隔膜泵和蠕动泵的伪分批运行的随渗余物浓度变化的渗透通量。

[0027] 图8示出了使用隔膜泵和蠕动泵的伪分批工艺的高分子量(HMW)种类的水平。

[0028] 图9A-图9D示出了使用采用隔膜泵或蠕动泵的伪分批装载策略产生的过程中UF/DF池的微粒的mAb A颗粒计数。图9A示出了1-2 μm 颗粒的颗粒计数。图9B示出了5-10 μm 颗粒的颗粒计数。图9C示出了10-25 μm 颗粒的颗粒计数。图9D示出了50-100 μm 颗粒的颗粒计数。使用微流控成像量化颗粒含量。

[0029] 图10A示出了伪分批运行的随处理时间变化的渗余物mAb浓度,其中在装载步骤期间渗余物罐中的液体体积恒定保持在相对于总装载体积较低的体积(例如,10%和20%)。图10B示出了图10A的每个工艺阶段(例如,UF1、DF和UF2)的对应处理时间。

[0030] 图11示出了伪分批运行的随渗余物浓度变化的渗透通量,其中在装载步骤期间渗余物罐中的液体体积恒定保持在相对于总装载体积较低的体积。

[0031] 图12示出了伪分批运行的高分子量(HMW)种类的水平,其中在装载步骤期间渗余物罐中的液体体积恒定保持在相对于总装载体积较低的体积。

[0032] 图13A-图13D示出了使用伪分批装载产生的过程中UF/DF池的微粒的mAb A颗粒计数,其中在装载步骤期间渗余物罐中的液体体积恒定保持在相对于总装载体积较低的体积。图13A示出了1-2 μm 颗粒的颗粒计数。图13B示出了5-10 μm 颗粒的颗粒计数。图13C示出了10-25 μm 颗粒的颗粒计数。图13D示出了50-100 μm 颗粒的颗粒计数。使用微流控成像量化颗粒含量。

[0033] 图14示出了针对非mAb治疗性蛋白(MW为大约20Da)的伪分批和补料分批工艺运行的随处理时间变化的渗余物蛋白质浓度。

[0034] 图15示出了图14所示的伪分批和补料分批工艺运行的随渗余物浓度变化的渗透通量。

[0035] 图16示出了图14所示的伪分批和补料分批工艺运行的高分子量(HMW)种类的水平。

[0036] 图17A-图17D示出了图14的针对非mAb治疗性蛋白的伪分批和补料分批工艺运行的颗粒计数。图17A示出了1-2 μm 颗粒的颗粒计数。图17B示出了5-10 μm 颗粒的颗粒计数。图17C示出了10-25 μm 颗粒的颗粒计数。图17D示出了50-100 μm 颗粒的颗粒计数。使用微流控成像量化颗粒含量。

具体实施方式

[0037] 本公开文本涉及减少目的蛋白的过滤处理时间的方法。本公开文本还涉及浓缩目的蛋白的方法。

I. 定义

[0038] 为了可以更容易地理解本公开文本,首先定义某些术语。如本说明书所用,除非本文另外明确提供,否则以下术语中的每一个都应当具有下文所阐述的含义。另外的定义贯穿本说明书进行阐述。

[0039] 应注意,术语“一个/一种(a)”或“一个/一种(an)”是指一个/一种或多个/多种该实体;例如,“一个核苷酸序列”应理解为表示一个或多个核苷酸序列。因此,术语“一个/一种(a)”(或“一个/一种(an)”)、“一个/一种或多个/多种(one or more)”以及“至少一个/一种(at least one)”在本文中可互换地使用。

[0040] 术语“和/或”在本文中使用的情况下被视为对两个指定特征或组分中的每一个与或不与另一个的具体公开。因此,如在本文中以短语如“A和/或B”使用的术语“和/或”旨在包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)和“B”(单独)。同样地,如以短语如“A、B和/或C”使用的术语“和/或”旨在涵盖以下方面中的每一个:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);以及C(单独)。

[0041] 应理解,无论在哪里在本文中用语言“包括/包含(comprising)”描述方面,还提供了以“由……组成”和/或“基本上由……组成”措辞描述的在其他方面类似的方面。

[0042] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与本公开文本所涉及领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。例如,Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 第2版, 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 第3版, 1999, Academic Press; 以及 Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, 修订版, 2000, Oxford University Press 为技术人员提供了本公开文本所用的许多术语的通用词典。

[0043] 单位、前缀和符号以其国际单位制(SI)认可的形式表示。数值范围包括限定所述范围的数字。本文提供的标题不是对本公开文本的各个方面的限制,所述各个方面可以通过参考说明书作为整体而获得。因此,通过从整体上参考说明书,更全面地定义下文紧接着定义的术语。

[0044] 替代方案(例如,“或”)的使用应当理解为意指替代方案中的任一者、两者或其任何组合。如本文所用,不定冠词“一个/一种(a)”或“一个/一种(an)”应当理解为是指任何所列举或枚举的组分中的“一个/一种或多个/多种”。

[0045] 术语“约”或“基本上由……构成”是指在如通过本领域普通技术人员确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成,所述可接受误差范围将部分取决于如何测量或确定所述值或组成,即测量系统的限制。例如,根据本领域的实践,“约”或“基本上由……构成”可以意指在1个或多于1个标准差内。可替代地,“约”或“基本上由……构成”可以意指高达20%的范围。此外,特别是关于生物系统或过程,所述术语可以意指值的高达一个数量级或高达5倍。当在本申请和权利要求中提供特定值或组成时,除非另外说明,否则应当假定“约”或“基本上由……构成”的含义在该特定值或组成的可接受误差范围内。

[0046] 如本文所述,除非另外指示,否则任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围都应理解为包括所列举范围内的任何整数的值以及在适当时所述值的分数(如整数的十分之一和百分之一)。

[0047] 术语“超滤”是指例如基于膜的分离工艺,其基于尺寸分离溶液中的分子,这可以实现不同分子的分离或实现类似分子的浓缩。

[0048] 术语“切向流过滤”是指特定的过滤方法,其中含溶质的溶液切向地穿过超滤膜,并且通过施加压力使较低分子量的溶质通过膜。保留切向地穿过超滤膜的含较高分子量溶质的溶液,因此此溶液在本文中被称为“渗余物”。通过超滤膜的较低分子量溶质在本文中被称为“渗透物”。因此,通过在压力下例如切向地沿着超滤膜的表面流动来浓缩渗余物。超滤膜的孔径具有一定的截断值。在一些方面,截断值为约50kDa或更小,例如50kDa、40kDa、30kDa、20kDa或10kDa。在一些方面,截断值为30kD或更小。

[0049] 术语“渗滤”或“DF”是指例如使用超滤膜从含有蛋白质、肽、核酸或其他生物分子的溶液或混合物中除去、替代溶剂、缓冲液和/或盐或降低其浓度。

[0050] 如本文所用的术语“补料分批”、“补料分批过滤”或“补料分批过滤工艺”是指切向流过滤的过滤(例如,超滤)方法,其中将包含目的蛋白的原料装入进料罐中,随后引导到储存罐中,其中将原料通过TFF浓缩,并且将渗余物引导回渗余物罐中。术语“分批”、“分批过滤”或“分批过滤工艺”是指这样的过滤(例如,超滤)配置,其中将蛋白质混合物装入储存罐中,从中产生渗余物,并且将渗余物引导回储存罐中,同时将渗透物引导至排废物管。

[0051] 术语“多肽”或“蛋白质”在本文中可互换地用于指代任何长度的氨基酸聚合物。聚合物可以是直链或支链的,它可以包含经修饰的氨基酸,并且它可以被非氨基酸中断。所述术语还涵盖已经天然修饰的或通过干预修饰的氨基酸聚合物;所述修饰是例如二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他修饰操作,如与标记组分缀合。所述定义中还包括例如含有氨基酸(包括例如非天然氨基酸等)的一种或多种类似物以及本领域已知的其他修饰的多肽。如本文所用的术语“多肽”和“蛋白质”具体涵盖抗体和含Fc结构域的多肽(例如,免疫粘附素)。

[0052] 如本文所用,术语“目的蛋白”用于包括存在于混合物中需要纯化的任何蛋白质(天然的或重组的)。此类目的蛋白包括但不限于酶、激素、生长因子、细胞因子、免疫球蛋白(例如,抗体)和/或任何融合蛋白。在一些方面,目的蛋白是指可以使用本文所述的切向流过滤(TFF)方法纯化和/或浓缩的任何蛋白质。在一些方面,目的蛋白是抗体。在一些方面,目的蛋白是重组蛋白。

[0053] 如本文所用的术语“补料分批培养”或“补料分批培养工艺”是指培养细胞的方法,其中在培养过程开始后的某个时间向培养物提供另外的组分。可以使用基础培养基开始补料分批培养。在培养过程开始后的某个时间向培养物提供另外的组分的培养基是补料培养基。通常在某一点停止补料分批培养,并且收获并任选地纯化培养基中的细胞和/或组分。

[0054] 如本文所用,“灌注”或“灌注培养”或“灌注培养工艺”是指生理营养液的连续流以稳定的速率穿过或经过细胞群。由于灌注系统通常涉及将细胞保留在培养单元内,因此灌注培养典型地具有相对较高的细胞密度,但是培养条件难以维持和控制。另外,由于使细胞生长到高密度,然后在高密度下保留在培养单元内,因此生长速率通常会随着时间的推移持续降低,导致细胞生长的后期指数期或甚至静止期。此连续培养策略通常包括在连续细胞培养系统中在生产阶段期间培养哺乳动物细胞(例如,非贴壁依赖性细胞),表达目的多肽和/或病毒。

[0055] 如本文所用,除非另外指示,否则“设定点”是指在TFF系统或用于浓缩和/或产生蛋白质产物的其他上游处理容器中条件的初始设定。在本文所述的UF/DF工艺开始时建立设定点。由于在TFF期间UF/DF条件的变化,在设定点之后在UF/DF期间可能出现条件的后续

变化。例如,设定点可以是重量设定点。在一些方面,设定点是温度设定点。在一些方面,可以在整个细胞培养方法中维持设定点。在其他方面,可以维持设定点,直到不同的设定点被设定。在其他方面,可以将设定点改变为另一个设定点。

[0056] “抗体”(Ab)应当包括但不限于糖蛋白免疫球蛋白,其与抗原特异性结合并且包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链。每条H链包含重链可变区(在本文中缩写为 V_H)和重链恒定区。重链恒定区包含三个恒定结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 。每条轻链包含轻链可变区(在本文中缩写为 V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个恒定结构域 C_L 。 V_H 和 V_L 区可以进一步细分为具有高变性的区域,称为互补决定区(CDR),散布有更保守的区域,称为框架区(FR)。每个 V_H 和 V_L 包含三个CDR和四个FR,其按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。重链可以具有或不具有C末端赖氨酸。在一些方面,抗体是全长抗体。

[0057] 免疫球蛋白可以源自任何通常已知的同种型,包括但不限于IgA、分泌型IgA、IgG、IgD、IgE和IgM。IgG亚类也是本领域技术人员熟知的,并且包括但不限于人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别或亚类(例如,IgM或IgG1)。举例来说,术语“抗体”包括单克隆抗体和多克隆抗体;嵌合抗体和人源化抗体;人抗体或非人抗体;全合成抗体;和单链抗体。可以通过重组方法将非人抗体人源化以降低其在人体中的免疫原性。术语“抗体”可以包括能够结合多于两种抗原的多价抗体(例如,三价抗体)。三价抗体是IgG形状的双特异性抗体,其由经由柔性接头肽与一个不对称的第三Fab大小的结合模块融合的两条规则Fab臂构成。此第三模块替代IgG Fc区,并且由与具有“杵(knob)”突变的CH3融合的重链的可变区和与具有匹配“臼(hole)”的CH3融合的轻链的可变区构成。铰链区不含二硫键,以促进抗原接近第三结合位点。在没有明确说明的情况下,并且除非上下文另外指示,否则术语“抗体”包括单特异性抗体、双特异性抗体或多特异性抗体,以及单链抗体。

[0058] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”是指抗体的保留与抗原特异性结合的能力的一个或多个片段。已经证明抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段执行。涵盖在术语抗体的“抗原结合片段”内的结合片段的例子包括(i)Fab片段(来自木瓜蛋白酶切割的片段)或由VL、VH、LC和CH1结构域组成的类似的单价片段;(ii)F(ab')₂片段(来自胃蛋白酶切割的片段)或包含由铰链区的二硫桥连接的两个Fab片段的类似的二价片段;(iii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv)由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(v)dAb片段(Ward等人,(1989)Nature 341:544-546),其由VH结构域组成;(vi)经分离的互补决定区(CDR);以及(vii)可以任选地通过合成接头连接的两个或更多个经分离的CDR的组合。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由单独的基因编码,但它们可以使用重组方法通过合成接头来连接,从而使得它们能够成为单条蛋白质链,在其中VL和VH区配对以形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如,Bird等人(1988)Science 242:423-426;和Huston等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)。此类单链抗体也旨在涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内。使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,并且以与完整抗体相同的方式筛选片段的效用。抗原结合部分可以通过重组DNA技术或通

过完整免疫球蛋白的酶促或化学切割来产生。

[0059] “双特异性”或“双功能抗体”是具有两个不同的重链/轻链对从而产生对不同抗原具有特异性的两个抗原结合位点的人工杂合抗体。双特异性抗体可以通过多种方法产生,所述方法包括杂交瘤的融合或Fab'片段的连接。参见例如,Songsivilai和Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321(1990); Kostelny等人, J. Immunol. 148, 1547-1553(1992)。

[0060] “融合”或“嵌合”蛋白包含与第二氨基酸序列连接的第一氨基酸序列,所述第一氨基酸序列在自然界中并非天然地与所述第二氨基酸序列连接。可以使通常存在于单独的蛋白质中的氨基酸序列在融合多肽中聚在一起,或者可以将通常存在于相同蛋白质中的氨基酸序列以新排列置于融合多肽(例如,本公开文本的因子VIII结构域与Ig Fc结构域的融合物)中。例如通过化学合成或通过产生和翻译多核苷酸来产生融合蛋白,在所述多核苷酸中肽区以所需的关系被编码。嵌合蛋白可以进一步包含通过共价非肽键或非共价键与第一氨基酸序列缔合的第二氨基酸序列。

[0061] “施用”是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统中的任一种将包含治疗剂的组合物物理引入受试者。本文所公开的配制品的施用途径包括静脉内、肌内、皮下、腹膜内、脊柱或其他肠胃外施用途径,例如通过注射或输注。如本文所用的短语“肠胃外施用”意指除肠内和局部施用以外的施用方式(通常通过注射施用),并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、淋巴内、病灶内、囊内、眼眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注以及体内电穿孔。在一些实施方案中,经由非肠胃外途径施用配制品,在一些实施方案中,口服施用。其他非肠胃外途径包括局部、表皮或粘膜施用途径,例如鼻内、阴道、直肠、舌下或局部。施用还可以例如进行一次、多次和/或经一个或多个延长的时间段。

[0062] 受试者的“治疗”或“疗法”是指对受试者进行的任何类型的干预或处理,或者向受试者施用活性剂,目的是逆转、减轻、改善、抑制、减缓症状、并发症或病症的进展、发展、严重程度或复发或者与疾病相关的生化指标。实体瘤疗效评价标准(Response Evaluation Criteria In Solid Tumors, RECIST)是治疗功效的量度,并且是定义肿瘤在治疗期间何时反应、稳定或进展的既定规则。RECIST 1.1是用于成人和儿科癌症临床试验的客观评估肿瘤大小变化的实体瘤测量和定义的当前指南。东部肿瘤协作组(ECOG)体能状态是一种编号量表,其用于定义待在试验中研究的患者群体,使得其可以在招募患者的医生之间一致地再现。在儿科患者中,Lansky表现量表是用于描述儿童的功能状态的方法。它是在癌症儿童中推导并且内部验证的,以评估对疗法的反应和总体状态。

[0063] 如本文所述,除非另外指示,否则任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围都应理解为包括所列举范围内的任何整数的值以及在适当时所述值的分数(如整数的十分之一和百分之一)。

[0064] 如本文所用的术语“所需的最终蛋白质浓度”是指已经使用本文所述的切向过滤方法浓缩的目的蛋白的蛋白质浓度。例如,通过使包含目的蛋白的混合物经受如本文所述的UF1、DF和UF2步骤来达到目的蛋白的所需的最终蛋白质浓度。在一些方面,所需的最终蛋白质浓度高达300mg/mL。

[0065] 如本文所用,“药学上可接受的载体”是指用于药理活性剂的媒介物。载体有助于将活性剂递送到靶位点,而不会终止活性剂的功能。载体的合适形式的非限制性例子包括

适合于局部施用的溶液、乳膏、凝胶、凝胶乳液、胶冻、糊剂、洗剂、药膏、喷雾剂、软膏、散剂、固体混合物、气雾剂、乳液(例如,油包水或水包油)、凝胶水溶液、水溶液、悬浮液、搽剂、酞剂和贴剂。

[0066] 如本文所用,短语“药学上可接受的组合物”(或“药物组合物”)是指可接受用于药物施用(如向人施用)的组合物。这种组合物可以包括具有水平不超过药物施用可接受水平(这种水平包括不存在此类杂质)的杂质的物质,并且除任何一种或多种活性剂外,还可以包括药学上可接受的赋形剂、媒介物、载体和其他非活性成分,例如以为便于施用而配制这种组合物。例如,药学上可接受的抗PD1抗体组合物可以包括DNA,只要其处于可接受用于向人施用的水平即可。

II. 超滤方法

[0067] 本公开文本提供了使得最终的蛋白质产率能够得到高度浓缩的蛋白质纯化方法。在一些方面,本公开文本的方法减少了蛋白质纯化工艺的第一超滤步骤(例如,在包括第一超滤步骤、渗滤和第二超滤步骤或由其组成的工艺中)所需的处理时间,其中原料经历大的体积降低,并且初始体积大到足够需要初始以补料分批模式操作。

[0068] 在一些方面,本公开文本的方法减轻了与通过超滤产生高浓度药品(例如,目的蛋白)相关的间接挑战。例如,高浓度材料(例如,大约150-300g/L)的产生导致装载材料的体积显著降低,除了加剧由长时间暴露于剪切和界面应力而引起的聚集挑战之外,这对设施配套和容量也构成了挑战。在超滤期间,样品体积显著降低(例如,通常是10倍或更多),而渗余物容器和系统保留体积是固定的,导致工艺中存在系统的规模(例如,渗余物容器和系统保留体积)与样品体积之间有很大的错配的点。因为系统流动路径(包括容器的底部)必须在整个过滤工艺中保持充满液体,所以最终浓度的药品(例如,目的蛋白)体积连同渗余物容器的几何形状决定了系统的最小工作体积。因为最小工作体积随容器尺寸而增加,所以最终的药品设定了渗余物容器尺寸的上限。此上限低于装载体积。因此,需要使用补料分批装载将部分装载材料补料到渗余物容器中。必须通过补料分批装载来补料的初始装载体积的百分比随设施配套(如可用的容器尺寸和系统保留体积)变化。

[0069] 虽然补料分批装载允许处理大的装载体积,但与分批操作相比,此装载策略会带来处理时间损失。对于给定量的剩余样品体积,补料分批工艺的渗余物蛋白质浓度高于分批工艺,因为在补料分批工艺中样品的液体(缓冲液)体积是在装载容器(例如,进料罐)中的稀释材料与渗余物容器中的浓缩蛋白质之间分开的,而不是在分批工艺中在总蛋白质团(例如,渗余物容器中的所有物质)中均匀分布的。结果,由于较高的渗余物浓度,补料分批渗透通量较低。因此,与分批模式相比,系统在补料分批模式下在第一超滤步骤中的大部分以较高的浓度和较低的通量操作,导致处理时间较长,这反过来增加了剪切和界面应力诱导的聚集的风险。

[0070] 在制造规模的设置中,用于产生高浓度药品的第一超滤步骤的操作模式通常既不是完全分批也不是补料分批。相反,超滤步骤在将装载材料进料到渗余物容器中期间以补料分批模式操作,并且一旦装载材料完全包含在渗余物容器中,则切换到分批模式。此混合模式超滤步骤将在下文被称为“混合”模式。混合模式导致第一超滤步骤的处理时间落在完全以分批模式或补料分批模式操作预期的处理时间之间并且取决于系统从以补料分批模式操作切换到分批模式的交叉点。描述交叉点和混合工艺的时间的方程在实施例1中描

述。对应于交叉点的浓度反过来是相对装载和系统体积的函数,使得处理时间成为设施配套的强函数。

[0071] 这种依赖性为工艺开发和技术转让带来了挑战,因为如果在技术转移过程中不考虑相对装载和系统体积的差异,则在实验室规模下开发的工艺参数规格可能导致在制造规模下的处理时间意外地更长。相比之下,分批工艺的处理时间仅取决于膜装载,使得工艺完全可扩展。

[0072] 尚未开发出系统的方法来解决在第一超滤步骤期间由混合操作模式引起的处理时间损失或设施配套依赖性。为了减轻这些挑战,开发了本文所公开的方法,以允许使用补料分批样设置分批样操作超滤步骤,在本文中称为伪分批操作模式。

[0073] 本公开文本提供了通过使用补料分批设置的分批样模式下的超滤浓缩大体积的蛋白质原料以产生浓缩的药物的优化方法。本公开文本还涉及用于通过切向流过滤(TFF)产生包含高度浓缩的蛋白质的溶液的方法。本文所公开的方法减少了工艺的第一超滤步骤(例如,在包括第一超滤步骤、渗滤和第二超滤步骤或由其组成的工艺中)所需的处理时间,其中原料经历大的体积降低,并且初始体积大到足够需要初始以补料分批模式操作。在一些方面,所述方法凭借较短的处理时间改进了产物质量,如通过在超滤工艺期间产生的微粒和杂质负荷所量化的。在一些方面,所述方法消除了当以补料分批模式操作时在实验室(例如,开发)规模与制造规模之间的设备设置之间观察到的处理时间的可变性。在一些方面,因此改进的规模之间处理时间的一致性可以提高按比例缩小的超滤/渗滤(UF/DF)模型的准确性,导致按比例放大和技术转移活动更有效。

[0074] 本公开文本涉及用于UF/DF的伪分批配置,在一些方面,所述伪分批配置可以通过将补料分批设置(例如,使用进料罐和渗余物容器)转换为分批样操作(例如,如本文所述的连接进料罐和渗余物容器,使得它们在切向流过滤(TFF)再循环回路中作为单个容器起作用)以浓缩目的蛋白来减轻与补料分批装载相关的时间损失。

[0075] 切向流过滤是这样的超滤程序,其依赖于使用流体压力来驱动较小分子迁移通过超滤膜同时保留较大分子(例如,“渗余物”)。通常,选择截留分子量(MWCO)比待保留的蛋白质的分子量小三至六倍的膜。本领域技术人员已知的其他因素也可以影响适当的MWCO的选择,例如流速、处理时间、跨膜压力、分子形状或结构、溶质浓度、其他溶质的存在和离子条件。

[0076] 传统的补料分批TFF配置在图1A中示出,其中容纳装载材料的进料罐通过进料泵连接到渗余物容器(例如,储存器),并且渗余物容器单独地并入具有TFF膜装置和再循环泵的再循环回路中。

[0077] 在一些方面,通过TFF浓缩目的蛋白和/或减少目的蛋白的过滤时间的方法包括第一超滤步骤(UF1)、渗滤(DF)和第二超滤步骤(UF2)。

[0078] 在本文所述的伪分批配置中,在一些方面,流动路径被修改为将进料罐并入再循环回路中(图1B)。在TFF过滤器模块的渗余物端口之后放置三通阀,以根据第一超滤步骤的状态将渗余物流引导至进料罐或渗余物容器。在一些方面,将混合器用于进料罐和储存(例如,渗余物)罐两者。

[0079] 在一些方面,在UF1的初始装载阶段期间,三通阀被设定为将渗余物流引导至进料罐并且阻止流向渗余物容器。采用进料泵将装载材料从进料罐进料到渗余物容器中,但是

使来自TFF过滤器模块的渗余物返回到进料罐并且与剩余的装载材料混合。现在将此新的装载材料混合物稍微更浓缩,并且进料到渗余物容器中,并且重复循环。在一些方面,将在进料罐和渗余物容器两者中的蛋白质溶液以相同的速率浓缩,这与补料分批装载不同,在补料分批装载中,渗余物变得越来越浓缩,而装载材料保持固定在初始稀释浓度。采用此配置,进料罐有效地充当渗余物容器的延伸部,并且这两者在再循环回路中充当单个储存器,类似于分批设置(图1C)。本文所述的伪分批配置将原本的混合模式工艺转换为分批样工艺,减轻了第一超滤步骤的补料分批装载部分的时间损失以及处理时间的设施配套依赖性。在一些方面,在装载步骤期间,渗余物罐中的液体体积恒定保持在相对于总装载体积较低的体积。在一些方面,在装载步骤期间,液体体积恒定保持在总初始装载体积的约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%或约40%。在一些方面,在装载步骤期间,液体体积恒定保持在总初始装载体积的约5%至约10%之间、约5%至约15%之间、约5%至约20%之间、约5%至约25%之间、约5%至约30%之间、约10%至约15%之间、约10%至约20%之间、约10%至约25%之间、约10%至约30%之间、约15%至约20%之间、约15%至约25%之间、约15%至约30%之间、约20%至约30%之间或约25%至约30%之间。在一些方面,在装载步骤期间,液体体积恒定保持在总初始装载体积的约10%。在一些方面,在装载步骤期间,液体体积恒定保持在总初始装载体积的约20%。

[0080] 在一些方面,当装载步骤完成时(例如,当总蛋白质溶液体积已经降低至低于渗余物容器体积时),三通阀被致动以将渗余物流重新引导至渗余物容器并且阻止流向进料罐,有效地消除了再循环回路中的进料罐并且将TFF设置转换为真正的分批配置。在一些方面,可以操作进料泵持续另外的时间,以在两个容器之间的连接管中向前推动残余材料(例如,推进渗余物容器中),以便使装载材料的回收最大化。

[0081] 可以基于TFF膜对待浓缩样品的截留特征选择用于浓缩的TFF膜。一般来说,膜的截留分子量(MWCO)应当为待保留的分子(例如,目的蛋白)的分子量的1/3至1/6,以确保完全保留。MWCO越接近样品的分子量,浓缩期间某些产物损失的风险越大。如果还将使用渗滤,则风险会增加,因为相对损失取决于将产生的滤液的总体积。膜通量率(每单位面积膜的滤液流量)与孔径相关。在相同的施加压力下,孔越小,通量越低。因此,在选择用于浓缩/渗滤的膜时,必须考虑时间因素与产物回收的关系。可以通过增加膜面积的使用量来减少处理时间。

[0082] 渗滤是使用滤膜(例如,超滤膜)从含有蛋白质、肽、核酸和其他生物分子的溶液中完全除去、替代盐或溶剂或降低其浓度的技术。DF选择性地利用可渗透的(例如,多孔的)膜过滤器来基于溶液和悬浮液的组分的分子大小分离它们。超滤膜保留比膜的孔大的分子,而100%可渗透的较小分子(如盐、溶剂和水)自由地通过膜。DF是这样的分级工艺,其将较小的分子洗涤通过膜并且使较大的分子(例如,目的蛋白)留在渗余物中,而最终不会改变浓度。

[0083] 渗滤可以是连续的或不连续的。在连续渗滤中,将渗滤溶液(例如,缓冲液)以与产生滤液相同的速率添加到样品进料储存罐中。以此方式,样品储存罐中的体积保持恒定,但是可以自由地渗透通过膜的小分子(例如,盐)被洗掉。使用脱盐为例,每个另外的渗滤体积(DV)都进一步降低盐浓度。(DV是在DF步骤期间已经进行的洗涤的程度的量度。它基于与渗余物体积相比引入的渗滤缓冲液的体积。在恒定体积DF中,渗余物体积保持恒定,并且DF缓

冲液以与渗透物离开相同的速率进入。例如，一个渗滤体积等于将体积等于系统中产物的体积的缓冲液添加到进料储存罐中，然后浓缩回起始体积。例如，以200mL样品开始，一个渗滤体积(DV 1)等于200mL)。第二渗滤体积(DV 2)将采用连续渗滤使离子强度降低约99%。在不连续渗滤中，首先将溶液稀释，然后浓缩回起始体积。然后重复所述过程，直到达到在储存罐中剩余的小分子(例如，盐)的所需浓度。每个另外的DV都进一步降低盐浓度。连续渗滤需要较少的滤液体积实现与不连续渗滤相同程度的盐降低。通过首先浓缩样品，可以显著降低为了达到指定离子强度所需的渗滤溶液的量。

[0084] 在一些方面，如果渗余物容器重量低于渗余物容器重量设定点，则DF进料泵将仅在DF或回收模式期间运行。在一些方面，由控制系统每2秒检查一次此重量。在一些方面，DF重量被设定，并且DF泵将维持直到DF终点。在一些方面，如果容器重量下降到低于输入的设定点，则DF泵将打开。在达到DF终点之后，系统将前进到浓缩步骤。在一些方面，通过控制系统的图形用户界面来选择DF终点选项。在一些方面，默认终点选项是管中的空气。在一些方面，DF重量设定点将是渗余物容器满时重量。

[0085] 本公开文本提供了减少目的蛋白的过滤处理时间的方法，所述方法包括向进料罐连续地装入已经过滤过至少一次的包含目的蛋白的蛋白质混合物(例如，渗余物)，其中进料罐与主储存(例如，渗余物)罐分开。在一些方面，减少目的蛋白的过滤处理时间的方法包括将包含目的蛋白的蛋白质混合物装入过滤系统，所述过滤系统包括进料罐、储存罐、过滤器、三通阀和储存输入端，所述三通阀包括将过滤器连接到进料罐的进料罐阀和将过滤器连接到储存罐的储存罐阀，所述储存输入端连接进料罐和储存罐。

[0086] 本公开文本还提供了浓缩目的蛋白的方法，所述方法包括向进料罐连续地装入已经过滤过至少一次的包含目的蛋白的蛋白质混合物(例如，渗余物)，其中进料罐与主储存(例如，渗余物)罐分开。在一些方面，浓缩目的蛋白的方法包括将包含目的蛋白的蛋白质混合物装入过滤系统，所述过滤系统包括进料罐、储存罐、过滤器、三通阀和储存输入端，所述三通阀包括将过滤器连接到进料罐的进料罐阀和将过滤器连接到储存罐的储存罐阀，所述储存输入端连接进料罐和储存罐。

[0087] 在一些方面，进料罐进一步包含尚未过滤过至少一次的包含目的蛋白的初始蛋白质混合物，其中将初始蛋白质混合物和渗余物混合在一起。在一些方面，将蛋白质混合物和渗余物通过过滤器(例如，超滤过滤器)过滤。在一些方面，将过滤后的蛋白质混合物和渗余物装入进料罐中。在一些方面，将蛋白质混合物和渗余物连续地装入进料罐中，直到将目的蛋白浓缩到至少约1mg/mL、至少约10mg/mL、至少约20mg/mL、至少约30mg/mL、至少约40mg/mL、至少约50mg/mL、至少约60mg/mL、至少约70mg/mL或至少约80mg/mL。在一些方面，将蛋白质混合物和渗余物连续地装入进料罐中，直到将目的蛋白浓缩到至少约1mg/mL、至少约5mg/mL、至少约10mg/mL、至少约11mg/mL、至少约12mg/mL、至少约13mg/mL、至少约14mg/mL、至少约15mg/mL、至少约16mg/mL、至少约17mg/mL、至少约18mg/mL、至少约19mg/mL、至少约20mg/mL。在一些方面，将蛋白质混合物和渗余物连续地装入进料罐中，直到将目的蛋白浓缩到至少约21mg/mL、至少约22mg/mL、至少约23mg/mL、至少约24mg/mL、至少约25mg/mL、至少约26mg/mL、至少约27mg/mL、至少约28mg/mL、至少约29mg/mL或至少约30mg/mL。在一些方面，将蛋白质混合物和渗余物连续地装入进料罐中，直到将目的蛋白浓缩到至少约31mg/mL、至少约32mg/mL、至少约33mg/mL、至少约34mg/mL、至少约35mg/mL、至少约36mg/mL、至少

约37mg/mL、至少约38mg/mL、至少约39mg/mL、至少约40mg/mL、至少约45mg/mL、至少约50mg/mL、至少约55mg/mL、至少约60mg/mL、至少约65mg/mL、至少约70mg/mL、至少约75mg/mL、或至少约80mg/mL、至少约85mg/mL或至少约90mg/mL。在一些方面,将蛋白质混合物和渗余物连续地装入进料罐中,直到将目的蛋白浓缩到约1mg/mL与80mg/mL之间、约5mg/mL与70mg/mL之间、约10mg/mL与60mg/mL之间、约10mg/mL与50mg/mL之间、约10mg/mL与40mg/mL之间、约10mg/mL与30mg/mL之间、约10mg/mL与20mg/mL之间、约20mg/mL与70mg/mL之间、约20mg/mL与60mg/mL之间、约20mg/mL与50mg/mL之间、约20mg/mL与40mg/mL之间或约20mg/mL与30mg/mL之间。在一些方面,将蛋白质混合物和渗余物连续地装入进料罐中,直到将目的蛋白浓缩到约1mg/mL与10mg/mL之间、约10mg/mL与20mg/mL之间、约20mg/mL与30mg/mL之间、约30mg/mL与40mg/mL之间、约40mg/mL与50mg/mL之间、约50mg/mL与60mg/mL之间、约60mg/mL与70mg/mL之间或约70mg/mL与80mg/mL之间。

[0088] 在一些方面,通过本文所述的伪分批流动路径使渗余物的装载再循环。在一些方面,将渗余物的装载重复至少两次、至少三次、至少四次、至少五次、至少六次、至少七次、至少八次、至少九次、至少十次、至少二十次、至少三十次、至少四十次、至少五十次、至少六十次、至少七十次、至少八十次、至少九十次、至少一百次、至少一百一十次、至少一百二十次、至少一百三十次、至少一百四十次、至少一百五十次、至少一百六十次、至少一百七十次、至少一百八十次、至少一百九十次、至少二百次、至少二百一十次、至少二百二十次、至少二百三十次、至少二百四十次、至少二百五十次、至少二百六十次、至少二百七十次、至少二百八十次、至少二百九十次或至少三百次。

[0089] 在一些方面,所述方法进一步包括停止将渗余物装入进料罐。在一些方面,所述方法进一步包括将渗余物引导至储存罐。在一些方面,将储存罐阀关闭,直到将目的蛋白充分浓缩。在一些方面,所述方法进一步包括将蛋白质混合物连续添加到进料罐中。在一些方面,将蛋白质混合物从进料罐引导至储存罐。

[0090] 在一些方面,储存罐连接到过滤器。在一些方面,过滤器包括嵌入式滤膜。在一些方面,嵌入式滤膜是超滤膜。在一些方面,嵌入式滤膜是聚乙烯醚、聚乙烯醇、尼龙、硅、多晶硅、超纳米金刚石、类金刚石碳、二氧化硅、钛、硅石、氮化硅、聚四氟乙烯、硅酮、聚甲基丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚丙烯酸酯、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚碳酸酯、石墨烯、氧化石墨烯、多糖、陶瓷颗粒、聚(苯乙烯二乙烯基)苯、聚砜、聚醚砜、改性聚醚砜、聚芳砜、聚苯砜、聚氯乙烯、聚丙烯、乙酸钠纤维素、硝酸纤维素、聚乳酸、聚丙烯腈、聚偏氟乙烯、聚哌嗪、聚酰胺-聚醚嵌段聚合物、聚酰亚胺、聚醚酰亚胺、聚酰胺、再生纤维素、复合再生纤维素或其组合。在一些方面,嵌入式滤膜是聚醚砜。在一些方面,嵌入式滤膜是纤维素。在一些方面,嵌入式滤膜是聚醚砜和纤维素的组合。在一些方面,滤膜的截留分子量(MWCO)低于约50kD至约5kD。在一些方面,滤膜的MWCO低于约5kD。

[0091] 在一些方面,允许混物流动(例如,再循环),直到达到所需的过滤蛋白质浓度。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约10mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约20mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约30mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约40mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约50mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约60mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约70mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约80mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所

需的过滤蛋白质浓度为约90mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约100mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约110mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约120mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约130mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约140mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约150mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约160mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约170mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约180mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约190mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约200mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约210mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约220mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约230mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约240mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约250mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约260mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约270mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约280mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约290mg/mL至约300mg/mL。在一些方面,所需的过滤蛋白质浓度为约150mg/mL。

[0092] 在一些方面,蛋白质粘度为约0cP至约200cP。在一些方面,蛋白质粘度为约20cP至约60cP。在一些方面,蛋白质粘度为约10cP至约200cP。在一些方面,蛋白质粘度为约20cP至约200cP。在一些方面,蛋白质粘度为约30cP至约200cP。在一些方面,蛋白质粘度为约40cP至约200cP。在一些方面,蛋白质粘度为约50cP至约200cP。在一些方面,蛋白质粘度为约60cP至约200cP。在一些方面,蛋白质粘度为约70cP至约200cP。在一些方面,蛋白质粘度为约80cP至约200cP。在一些方面,蛋白质粘度为约90cP至约200cP。在一些方面,蛋白质粘度为约100cP至约200cP。在一些方面,蛋白质粘度为约100cP至约200cP。在一些方面,蛋白质粘度为约120cP至约200cP。在一些方面,蛋白质粘度为约130cP至约200cP。在一些方面,蛋白质粘度为约140cP至约200cP。在一些方面,蛋白质粘度为约150cP至约200cP。在一些方面,蛋白质粘度为约160cP至约200cP。在一些方面,蛋白质粘度为约170cP至约200cP。在一些方面,蛋白质粘度为约180cP至约200cP。在一些方面,蛋白质粘度为约190cP至约200cP。

[0093] 在一些方面,进料罐的体积与储存罐的体积之间的体积比为约1:2至约10:1、约1:2至约1:1、约1:1至约1:2、约1:1至约1:3、约1:1至约1:4、约1:1至约1:5、约1:1至约1:6、约1:1至约1:7、约1:1至约1:8、约1:1至约1:9或约1:1至约1:10。在一些方面,进料罐的体积与储存罐的体积之间的体积比为约1:1、约2:1或约5:1。

[0094] 在一些方面,使用隔膜泵、旋转凸轮泵或蠕动泵将蛋白质混合物引导至储存罐和/或过滤器。在一些方面,使用隔膜泵将蛋白质混合物引导至储存罐和/或过滤器。在一些方面,使用蠕动泵将蛋白质混合物引导至储存罐和/或过滤器。

[0095] 在一些方面,浓缩目的蛋白和/或减少目的蛋白的过滤处理时间的方法进一步包括将尚未过滤过至少一次的包含目的蛋白的初始蛋白质混合物装入进料罐,然后向进料罐连续地装入已经过滤过至少一次的包含目的蛋白的蛋白质混合物(“渗余物”)。在一些方面,将初始蛋白质混合物以约1mg/mL至约30mg/mL的浓度添加到进料罐中。在一些方面,将初始蛋白质混合物以约5mg/mL的浓度添加到进料罐中。

[0096] 在一些方面,与补料分批浓缩工艺的处理时间相比,处理时间减少约1%、约5%、约10%、约20%、约30%、约40%或约50%。在一些方面,与补料分批浓缩工艺的处理时间相比,处理时间减少约40%。在一些方面,与补料分批浓缩工艺的处理时间相比,处理时间减少约0.2小时、约0.4小时、约0.5小时、约0.6小时、约0.8小时或约1.0小时。在一些方面,与补料分批浓缩工艺的处理时间相比,处理时间减少约0.5小时。

[0097] 在一些方面,其中与补料分批浓缩工艺的微粒计数相比,1-2 μm 微粒计数降低约10%、约20%、约30%、约40%或约50%。在一些方面,与补料分批浓缩工艺的微粒计数相比,5-10 μm 微粒计数降低约10%、约20%、约30%、约40%或约50%。在一些方面,与补料分批浓缩工艺的微粒计数相比,10-25 μm 微粒计数降低约10%、约20%、约30%、约40%或约50%。

[0098] 在一些方面,用加载缓冲液将蛋白质混合物添加到进料罐中。在一些方面,加载缓冲液包含氨基酸、弱酸、弱碱和/或糖。

III. 目的蛋白

[0099] 在一些方面,本文所公开的方法可以应用于任何蛋白质产物(例如,目的蛋白)。在一些方面,蛋白质产物是治疗性蛋白。在一些方面,治疗性蛋白选自抗体或其抗原结合片段、Fc融合蛋白、抗凝剂、凝血因子、骨形态发生蛋白、工程化蛋白支架、酶、生长因子、激素、干扰素、白细胞介素和溶栓剂。在一些方面,蛋白质产物是抗体或其抗原结合片段。在一些方面,蛋白质是重组蛋白。

[0100] 在一些方面,蛋白质产物是抗体或其抗原结合片段。在一些方面,蛋白质产物是包含抗体的抗原结合片段的嵌合多肽。在一些方面,蛋白质产物是单克隆抗体或其抗原结合片段(“mAb”)。抗体可以是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一些方面,蛋白质产物是双特异性抗体。

[0101] 在一些方面,包含蛋白质产物和污染物的混合物包含先前纯化步骤的产物。在一些方面,混合物是先前纯化步骤的原始产物。在一些方面,混合物是包含先前纯化步骤的原始产物和缓冲液(例如,起始缓冲液)的溶液。在一些方面,混合物包含在起始缓冲液中重构的先前纯化步骤的原始产物。

[0102] 在一些方面,蛋白质产物的来源是散装蛋白。在一些方面,蛋白质产物的来源是包含蛋白质产物和非蛋白质组分的组合物。非蛋白质组分可以包括DNA和其他污染物。

[0103] 在一些方面,蛋白质产物的来源来自动物。在一些方面,动物是哺乳动物,如非灵长类动物(例如,牛、猪、马、猫、狗、大鼠等)或灵长类动物(例如,猴和人)。在一些方面,来源是来自人的组织或细胞。在某些方面,此类术语是指非人动物(例如,诸如猪、马、牛、猫或狗的非人动物)。在一些方面,此类术语是指宠物或家畜。在一些方面,此类术语是指人。

[0104] 在一些方面,通过本文所述的方法纯化的蛋白质产物是融合蛋白。“融合物”或“融合蛋白”包含与第二氨基酸序列框内连接的第一氨基酸序列,所述第一氨基酸序列在自然界中并非天然地与所述第二氨基酸序列连接。可以使通常存在于单独的蛋白质中的氨基酸序列在融合多肽中聚在一起,或者可以将通常存在于相同蛋白质中的氨基酸序列以新排列置于融合多肽中。例如通过化学合成或通过产生和翻译多核苷酸来产生融合蛋白,在所述多核苷酸中肽区以所需的关系被编码。融合蛋白可以进一步包含通过共价非肽键或非共价键与第一氨基酸序列缔合的第二氨基酸序列。在转录/翻译后,获得了单一蛋白质。以此方

式,可以将多种蛋白质或其片段掺入单一多肽中。“可操作地连接”旨在意指两个或更多个元件之间的功能性连接。例如,两个多肽之间的可操作连接将两个多肽框内融合在一起以产生单一多肽融合蛋白。在一个特定方面,融合蛋白进一步包含第三多肽,如下文进一步详细讨论的,所述第三多肽可以包含接头序列。

[0105] 在一些方面,通过本文所述的方法纯化的蛋白质是抗体。抗体可以包括例如单克隆抗体、重组产生的抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、免疫球蛋白、合成抗体、包含两个重链和两个轻链分子的四聚体抗体、抗体轻链单体、抗体重链单体、抗体轻链二聚体、抗体重链二聚体、抗体轻链-抗体重链对、胞内抗体、杂缀合抗体、单结构域抗体、单价抗体、单链抗体或单链Fv(scFv)、驼源化抗体、亲和体、Fab片段、F(ab')₂片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、抗独特型(抗Id)抗体(包括例如抗抗Id抗体)和上述任一种的抗原结合片段。在一些方面,本文所述的抗体是指多克隆抗体群。抗体可以属于免疫球蛋白分子的任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY)、任何类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1或IgA2)或任何亚类(例如,IgG2a或IgG2b)。在一些方面,本文所述的抗体是IgG抗体,或其类别(例如,人IgG1或IgG4)或亚类。在一个方面,抗体是人源化单克隆抗体。在一些方面,抗体是人单克隆抗体,优选地作为免疫球蛋白。在一些方面,本文所述的抗体是IgG1或IgG4抗体。

[0106] 在一些方面,蛋白质是抗LAG3抗体、抗CTLA-4抗体、抗TIM3抗体、抗NKG2a抗体、抗ICOS抗体、抗CD137抗体、抗KIR抗体、抗TGFβ抗体、抗IL-10抗体、抗B7-H4抗体、抗Fas配体抗体、抗间皮素抗体、抗CD27抗体、抗GITR抗体、抗CXCR4抗体、抗CD73抗体、抗TIGIT抗体、抗OX40抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗IL8抗体或其任何组合。在一些方面,蛋白质是阿巴西普NGP。在其他方面,蛋白质是贝拉西普(Belatacept)NGP。

[0107] 在一些方面,蛋白质是抗PD-1抗体。

[0108] 本领域已知的抗PD-1抗体可以用于本发明所述的组合物和方法中。以高亲和力与PD-1特异性结合的各种人单克隆抗体已经披露在美国专利号8,008,449中。已经证明美国专利号8,008,449中披露的抗PD-1人抗体展现出以下特征中的一种或多种:(a)以 1×10^{-7} M或更小的 K_D 与人PD-1结合,如使用Biacore生物传感器系统通过表面等离子体共振所确定的;(b)基本上不与人CD28、CTLA-4或ICOS结合;(c)在混合淋巴细胞反应(MLR)测定中增加T细胞增殖;(d)在MLR测定中增加干扰素-γ产生;(e)在MLR测定中增加IL-2分泌;(f)与人PD-1和食蟹猴PD-1结合;(g)抑制PD-L1和/或PD-L2与PD-1的结合;(h)刺激抗原特异性记忆应答;(i)刺激抗体应答;以及(j)抑制体内肿瘤细胞生长。可用于本公开文本中的抗PD-1抗体包括与人PD-1特异性结合并且展现出前述特征中的至少一种、在一些方面至少五种的单克隆抗体。

[0109] 其他抗PD-1单克隆抗体已经描述于例如美国专利号6,808,710、7,488,802、8,168,757和8,354,509,美国公开号2016/0272708,以及PCT公开号WO 2012/145493、WO 2008/156712、WO 2015/112900、WO 2012/145493、WO 2015/112800、WO 2014/206107、WO 2015/35606、WO 2015/085847、WO 2014/179664、WO 2017/020291、WO 2017/020858、WO 2016/197367、WO 2017/024515、WO 2017/025051、WO 2017/123557、WO 2016/106159、WO 2014/194302、WO 2017/040790、WO 2017/133540、WO 2017/132827、WO 2017/024465、WO 2017/025016、WO 2017/106061、WO 2017/19846、WO 2017/024465、WO 2017/025016、WO

2017/132825和WO 2017/133540中,将其中的每一个通过引用以其整体并入。

[0110] 在一些方面,抗PD-1抗体选自纳武单抗(也称为OPDIVO®、5C4、BMS-936558、MDX-1106和ONO-4538)、派姆单抗(Merck;也称为KEYTRUDA®、兰洛利珠单抗(lambrolizumab)和MK-3475;参见WO 2008/156712)、PDR001(Novartis;参见WO 2015/112900)、MEDI-0680(AstraZeneca;也称为AMP-514;参见WO 2012/145493)、西米普利单抗(cemiplimab)(Regeneron;也称为REGN-2810;参见WO 2015/112800)、JS001(TAIZHOU JUNSHI PHARMA;也称为特瑞普利单抗(toripalimab);参见Si-Yang Liu等人, J.Hematol.Oncol.10:136(2017))、BGB-A317(Beigene;也称为替雷利珠单抗(Tislelizumab);参见WO 2015/35606和US 2015/0079109)、INCSHR1210(Jiangsu Hengrui Medicine;也称为SHR-1210;参见WO 2015/085847;Si-Yang Liu等人, J.Hematol.Oncol.10:136(2017))、TSR-042(Tesaro Biopharmaceutical;也称为ANB011;参见WO 2014/179664)、GLS-010(Wuxi/Harbin Gloria Pharmaceuticals;也称为WBP3055;参见Si-Yang Liu等人, J.Hematol.Oncol.10:136(2017))、AM-0001(Armo)、STI-1110(Sorrento Therapeutics;参见WO 2014/194302)、AGEN2034(Agenus;参见WO 2017/040790)、MGA012(MacroGenics,参见WO 2017/19846)、BCD-100(Biocad;Kaplon等人, mAbs10(2):183-203(2018))和IBI308(Innovent;参见WO 2017/024465、WO 2017/025016、WO 2017/132825和WO 2017/133540)。

[0111] 在一些方面,蛋白质是抗PD-L1抗体。本领域已知的抗PD-L1抗体可以用于本公开文本的组合物和方法中。可用于本公开文本的组合物和方法中的抗PD-L1抗体的例子包括美国专利号9,580,507中披露的抗体。已经证明美国专利号9,580,507中披露的抗PD-L1人单克隆抗体展现出以下特征中的一种或多种:(a)以 1×10^{-7} M或更小的 K_D 与人PD-L1结合,如使用Biacore生物传感器系统通过表面等离子体共振所确定的;(b)在混合淋巴细胞反应(MLR)测定中增加T细胞增殖;(c)在MLR测定中增加干扰素- γ 产生;(d)在MLR测定中增加IL-2分泌;(e)刺激抗体应答;以及(f)逆转T调节细胞对T细胞效应细胞和/或树突细胞的作用。可用于本公开文本中的抗PD-L1抗体包括与人PD-L1特异性结合并且展现出前述特征中的至少一种、在一些方面至少五种的单克隆抗体。

[0112] 在某些方面,抗PD-L1抗体选自BMS-936559(也称为12A4、MDX-1105;参见例如,美国专利号7,943,743和WO 2013/173223)、阿特殊单抗(Roche;也称为TECENTRIQ®、MPDL3280A、RG7446;参见US 8,217,149;还参见Herbst等人(2013) J Clin Oncol 31(增刊):3000)、度伐鲁单抗(durvalumab)(AstraZeneca;也称为IMFINZI™、MEDI-4736;参见WO 2011/066389)、阿维鲁单抗(avelumab)(Pfizer;也称为BAVENCIO®、MSB-0010718C;参见WO 2013/079174)、STI-1014(Sorrento;参见WO 2013/181634)、CX-072(Cytomx;参见WO 2016/149201)、KN035(3D Med/Alphamab;参见Zhang等人, Cell Discov.7:3(2017年3月))、LY3300054(Eli Lilly Co.;参见例如,WO 2017/034916)、BGB-A333(BeiGene;参见Desai等人, JCO 36(15增刊):TPS3113(2018))和CK-301(Checkpoint Therapeutics;参见Gorelik等人, AACR:Abstract 4606(2016年4月))。

[0113] 在一些方面,蛋白质是抗GITR(糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体家族相关基因)抗体。在一些方面,抗GITR抗体具有6C8的CDR序列,例如具有如例如WO 2006/105021中所述的6C8的CDR的人源化抗体;包含WO 2011/028683中所述的抗GITR抗体的CDR的抗体;包

含JP 2008278814中所述的抗GITR抗体的CDR的抗体;包含WO 2015/031667、WO 2015/187835、WO 2015/184099、WO 2016/054638、WO 2016/057841、WO 2016/057846、WO 2018/013818中所述的抗GITR抗体的CDR的抗体;或本文所述或提及的其他抗GITR抗体,将其全部以其整体并入本文。

[0114] 在其他方面,蛋白质是抗LAG3抗体。淋巴细胞激活基因3(也称为LAG-3)是在人是由LAG3基因编码的蛋白质。LAG3在1990年被发现并且是对T细胞功能具有多种生物学效应的细胞表面分子。它是免疫检查点受体,因此是制药公司寻求开发用于癌症和自身免疫性障碍的新型治疗的各种药物开发项目的靶标。以可溶形式,它本身也正在被开发为癌症药物。抗LAG3抗体的例子包括但不限于WO 2017/087901 A2、WO 2016/028672A1、WO 2017/106129 A1、WO 2017/198741 A1、US 2017/0097333 A1、US 2017/0290914A1和US 2017/0267759 A1中的抗体,将其全部以其整体并入本文。

[0115] 在一些方面,蛋白质是抗CXCR4抗体。CXCR4是与G1偶联的7次跨膜蛋白。CXCR4在造血来源的细胞上广泛表达,并且是针对人免疫缺陷病毒1(HIV-1)的与CD4+的主要共受体。参见Feng, Y., Broeder, C. C., Kennedy, P. E. 和Berger, E. A. (1996) Science 272, 872-877。抗CXCR4抗体的例子包括但不限于WO 2009/140124 A1、US 2014/0286936A1、WO 2010/125162 A1、WO 2012/047339 A2、WO 2013/013025 A2、WO 2015/069874A1、WO 2008/142303 A2、WO 2011/121040 A1、WO 2011/154580 A1、WO 2013/071068A2和WO 2012/175576 A1中的抗体,将其全部以其整体并入本文。

[0116] 在一些方面,蛋白质是抗CD73(外5'-核苷酸酶)抗体。在一些方面,抗CD73抗体抑制腺苷的形成。AMP降解为腺苷导致在肿瘤微环境内产生促进癌症的发生和进展的受免疫抑制和促血管生成的微环境。抗CD73抗体的例子包括但不限于WO 2017/100670A1、WO 2018/013611 A1、WO 2017/152085 A1和WO 2016/075176 A1中的抗体,将其全部以其整体并入本文。

[0117] 在一些方面,蛋白质是抗TIGIT(具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体)抗体。TIGIT是PVR(脊髓灰质炎病毒受体)免疫球蛋白家族的一员。TIGIT在几类T细胞(包括滤泡B辅助T细胞(TFH))上表达。已经表明所述蛋白质以高亲和力结合PVR;这种结合被认为有助于TFH与树突细胞之间的相互作用,以调节T细胞依赖性B细胞应答。抗TIGIT抗体的例子包括但不限于WO 2016/028656 A1、WO 2017/030823 A2、WO 2017/053748A2、WO 2018/033798 A1、WO 2017/059095 A1和WO 2016/011264 A1中的抗体,将其全部以其整体并入本文。

[0118] 在一些方面,蛋白质是抗OX40(即,CD134)抗体。OX40是肿瘤坏死因子(TNF)配体家族的细胞因子。OX40在T细胞抗原呈递细胞(APC)相互作用中起作用,并且介导经激活的T细胞与内皮细胞的粘附。抗OX40抗体的例子包括但不限于WO 2018/031490A2、WO 2015/153513 A1、WO 2017/021912 A1、WO 2017/050729 A1、WO 2017/096182A1、WO 2017/134292 A1、WO 2013/038191 A2、WO 2017/096281 A1、WO 2013/028231A1、WO 2016/057667 A1、WO 2014/148895 A1、WO 2016/200836 A1、WO 2016/100929A1、WO 2015/153514 A1、WO 2016/002820 A1和WO 2016/200835 A1,将其全部以其整体并入本文。

[0119] 在一些方面,蛋白质是抗IL8抗体。IL-8是吸引嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和T细胞,但是不吸引单核细胞的趋化因子。它还参与嗜中性粒细胞激活。它响应于炎症刺激而从几种细胞类型中释放。

[0120] 在一些方面,蛋白质是阿巴西普(作为ORENCIA®市售)。阿巴西普(在本文中也缩写为Aba)是用于通过干扰T细胞的免疫活性来治疗自身免疫性疾病(像类风湿性关节炎)的药物。阿巴西普是由与CTLA-4的细胞外结构域融合的免疫球蛋白IgG1的Fc区构成的融合蛋白。为了激活T细胞并且产生免疫应答,抗原呈递细胞必须向T细胞呈递两种信号。这些信号之一是与抗原组合的主要组织相容性复合物(MHC),并且另一种信号是CD80或CD86分子(也称为B7-1和B7-2)。

[0121] 在一些方面,蛋白质是贝拉西普(商品名NULOJIX®)。贝拉西普是由与CTLA-4的细胞外结构域连接的人IgG1免疫球蛋白的Fc片段构成的融合蛋白,CTLA-4是调节T细胞共刺激从而选择性地阻断T细胞激活过程的关键分子。它旨在提供延长的嫁接物和移植物存活时间,同时限制由标准免疫抑制方案(如钙调磷酸酶抑制剂)产生的毒性。它与阿巴西普(ORENCIA®)只有2个氨基酸的差异。

[0122] 在一些方面,蛋白质混合物包含抗体、抗体片段、抗原结合片段、融合蛋白、天然存在的蛋白质、嵌合蛋白或其任何组合。在一些方面,蛋白质混合物包含选自IgM、IgA、IgE、IgD和IgG的抗体。在一些方面,蛋白质混合物包含抗体,并且抗体是选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的IgG抗体。在一些方面,抗体包括双可变结构域免疫球蛋白。在一些方面,抗体包括三价抗体。在一些方面,抗体或抗体片段包括抗PD-1、抗PD-L1、抗CTLA4、抗TIM3、抗LAG3、抗NKG2a、抗ICOS、抗CD137、抗KIR、抗TGFβ、抗IL-10、抗B7-H4、抗GITR、抗CXCR4、抗CD73、抗TIGIT、抗OX40、抗IL-8抗体或其抗体片段。

[0123] 在一些方面,包含目的蛋白的蛋白质混合物源自细菌、酵母、昆虫或哺乳动物细胞培养物。在一些方面,哺乳动物细胞培养物是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞培养物。

[0124] 在一些方面,从分批细胞培养获得包含目的蛋白的蛋白质混合物。在一些方面,从补料分批细胞培养获得包含目的蛋白的蛋白质混合物。在一些方面,在生物反应器中产生蛋白质混合物。在一些方面,在一次性生物反应器中产生蛋白质混合物。在一些方面,从灌注细胞培养获得蛋白质混合物。在一些方面,在灌注或TFF灌注生物反应器中产生蛋白质混合物。在一些方面,在持续约1天至约60天的细胞培养中产生蛋白质混合物。在一些方面,在持续约25天的细胞培养中产生蛋白质混合物。

IV. 药物组合物

[0125] 通过本公开文本的方法产生的蛋白质可以被进一步配制成适合于人施用,例如药物组合物。一种可接受用于药物施用的组合物,这种组合物可以包括作为水平不超过药物施用可接受水平(这种水平包括不存在此类杂质)的杂质的物质,并且除任何一种或多种活性剂外,还可以包括药学上可接受的赋形剂、媒介物、载体和其他非活性成分,例如以为便于施用而配制这种组合物。通过本公开文本的方法制备的组合物可用于治疗多种疾病。

V. 超滤系统

[0126] 本公开文本提供了用于减少目的蛋白的过滤处理时间的系统。本公开文本还提供了用于浓缩目的蛋白的系统。

[0127] 在一些方面,用于浓缩目的蛋白的系统包括:进料罐;通过第一流体通道连接到进料罐的储存罐;通过第二流体通道连接到储存罐的滤膜;以及三通阀,其中三通阀通过第三流体通道连接到滤膜,其中三通阀通过第四流体通道连接到储存罐,并且其中三通阀通过第五流体通道连接到进料罐,其中储存罐经由第一流体通道从进料罐接收包含目的蛋白的

蛋白质混合物,其中滤膜经由第二流体通道从储存罐接收包含目的蛋白的蛋白质混合物并过滤蛋白质混合物,并且其中三通阀经由第三流体通道从过滤器接收渗余物并将渗余物经由第四流体通道引导至储存罐或者经由第五流体通道引导至进料罐。

[0128] 在一些方面,如果系统内蛋白质混合物的总体积小于储存罐的容量,则三通阀将渗余物引导至储存罐,并且其中如果系统内蛋白质混合物的总体积大于储存罐的容量,则三通阀将渗余物引导至进料罐。

[0129] 在一些方面,所述系统进一步包括被配置为确定系统内蛋白质混合物的总体积、重量和/或浓度的传感器,其中三通阀基于来自传感器的反馈自动将渗余物引导至储存罐或引导至进料罐。在一些方面,使用在线紫外-可见光分光光度计实时监测蛋白质混合物中的蛋白质浓度。在一些方面,使用物位传感器实时监测进料罐和储存罐中的任一个或两个中的蛋白质溶液的体积。在一些方面,这些物位传感器包括但不限于导波雷达或基于膜的压力物位传感器。在一些方面,重量分析地对进料罐和储存罐中的任一个或两个中的蛋白质溶液的体积进行监测,其中使用天平测量进料罐和/或储存罐中的蛋白质溶液的质量,并且使用溶液密度将质量转换为体积。在一些方面,所述系统进一步包括一个或多个隔膜泵、旋转凸轮泵或蠕动泵。

[0130] 在一些方面,过滤器包括嵌入式滤膜。在一些方面,嵌入式滤膜是超滤膜。在一些方面,嵌入式滤膜是。在一些方面,嵌入式滤膜是聚乙烯醚、聚乙烯醇、尼龙、硅、多晶硅、超纳米金刚石、类金刚石碳、二氧化硅、钛、硅石、氮化硅、聚四氟乙烯、硅酮、聚甲基丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚丙烯酸酯、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚碳酸酯、石墨烯、氧化石墨烯、多糖、陶瓷颗粒、聚(苯乙烯二乙烯基)苯、聚砜、聚醚砜、改性聚醚砜、聚芳砜、聚苯砜、聚氯乙烯、聚丙烯、乙酸纤维素、硝酸纤维素、聚乳酸、聚丙烯腈、聚偏氟乙烯、聚哌嗪、聚酰胺-聚醚嵌段聚合物、聚酰亚胺、聚醚酰亚胺、聚酰胺、再生纤维素、复合再生纤维素或其组合。在一些方面,嵌入式滤膜是聚醚砜。在一些方面,嵌入式滤膜是纤维素。在一些方面,嵌入式滤膜是聚醚砜和纤维素的组合。在一些方面,滤膜的截留分子量(MWCO)低于约50kD至约5kD。在一些方面,滤膜的MWCO低于约5kD。

实施例

实施例1

[0131] 补料分批工艺的时间是多个设施配套参数(即渗余物容器体积、系统保留体积、装载蛋白质浓度和装载体积)的函数。

[0132] 当装载材料体积太大使得装载无法在渗余物容器内配套时,部分装载材料留在进料罐中,并且在补料分批超滤期间缓慢地进料到渗余物容器中。渗余物体积已经降低到足够在渗余物容器中容纳全部蛋白质装载(以克蛋白质计)的点被称为交叉浓度(方程1):

$$C_{\text{交叉}} = \frac{C_0 * V_0}{V_{\text{渗余物罐}} + V_{\text{保留}}} \quad (1)$$

[0133] 其中 C_0 和 V_0 分别是蛋白质装载浓度和体积, $V_{\text{渗余物罐}}$ 是渗余物容器体积,并且 $V_{\text{保留}}$ 是系统保留体积。

[0134] 可以使用方程2c用数字表示地计算以补料分批模式浓缩蛋白质所需的处理时间,通过取通量方程(方程2a,关于累积渗透物体积 V' 定义)的积分并且假设通量的浓度极化模型(方程2b)得出方程2c。方程2c中的积分 $V_{\text{渗透物,最终}}$ 的限值是交叉浓度下的预期渗透物体积。

可以通过方程3将补料分批操作下的蛋白质浓度定义为累积渗透物体积 V' 的函数,其中 $V_{\text{渗余物罐}}$ 是渗余物容器的满载体积,并且在补料分批装载期间保持恒定。 $V_{\text{渗余物,最终}}$ 因此可以通过使用交叉蛋白质浓度(方程1)对 V' 求解方程3来计算。

$$[0135] \quad \frac{dV'}{dt} = J(c) * A_m \quad (2a)$$

$$[0136] \quad J(c) = k_c * \ln\left(\frac{c_w}{c}\right) \quad (2b)$$

$$[0137] \quad \int_0^t dt = \int_0^{V_{\text{渗余物,最终}}} \frac{1}{J(c)*A_m} dV' \quad (2c)$$

$$[0138] \quad c(V') = \frac{c_0 * (V_{\text{渗余物罐}} + V')}{V_{\text{渗余物罐}} + V_{\text{保留}}} \quad (3)$$

[0139] 根据这些方程清楚的是,补料分批工艺的时间是多个设施配套参数(即渗余物容器体积、系统保留体积、装载蛋白质浓度和装载体积)的函数。

实施例2

[0140] 传统的补料分批TFF配置示于图1A中。此处,容纳装载材料的进料罐通过进料泵连接到渗余物容器(例如,储存器),并且渗余物容器单独地并入具有TFF膜装置和再循环泵的再循环回路中。

[0141] 在本文所述的伪分批配置中,流动路径被修改为将进料罐并入再循环回路中,如图1B所示。在TFF过滤器模块的渗余物端口之后放置三通阀,以根据第一超滤步骤的状态将渗余物流引导至进料罐或渗余物容器,如将在下文解释的。将混合器(未示出)用于两个罐/容器。

[0142] 在第一超滤步骤的初始装载阶段期间,三通阀被设定为将渗余物流引导至装载罐并且阻止流向渗余物容器。通常采用进料泵将装载材料从进料罐进料到渗余物容器中,但是使来自TFF过滤器模块的渗余物返回到进料罐并且与剩余的装载材料混合。现在将新的装载材料稍微更浓缩,并且进料到渗余物容器中,并且重复循环。因此,将在装载罐和渗余物容器两者中的蛋白质溶液以相同的速率浓缩,这与补料分批装载不同,在补料分批装载中,渗余物变得越来越浓缩,而装载材料保持固定在初始稀释浓度。采用此配置,进料罐有效地充当渗余物容器的延伸部,并且这两者在再循环回路中充当单个储存器,类似于分批设置(图1C)。因此,伪分批配置将原本的混合模式工艺转换为分批样工艺,减轻了第一超滤步骤的补料分批装载部分的时间损失以及处理时间的设施配套依赖性。

[0143] 当装载步骤完成时(例如,当总蛋白质溶液体积已经降低至低于渗余物容器体积时),三通阀被致动以将渗余物流重新引导至渗余物容器并且阻止流向进料罐,有效地消除了再循环回路中的进料罐并且将TFF设置转换为真正的分批配置。可以操作进料泵稍久一些,以在两个容器之间的连接管中向前推动残余材料(推进渗余物容器中),以便使装载材料的回收最大化。

[0144] 作为证明上述伪分批配置的优势的概念验证,通过在实验室规模下以分批、混合和伪分批配置进行的TFF产生了mAb A的高浓度溶液(约180g/L)。在三种配置之间比较了每个过滤步骤(第一超滤(UF1)、渗滤(DF)和第二超滤(UF2))的处理时间以及回收后纯化的药品(PDS)的质量属性(例如,高分子量(HMW)种类、颗粒计数)。通过高效液相尺寸排阻色谱法使用配备有2487型双波长检测器(Waters Corporation,美国马萨诸塞州米尔福德)与

TSKgel SuperSW3000主柱和保护柱(Tosoh Bioscience,美国宾夕法尼亚州普鲁士王市)的Alliance 2695HPLC系统测量HMW水平,并且使用MFI 5200(Protein Simple,美国加利福尼亚州圣何塞)通过微流成像量化1与100 μm 之间的微粒的颗粒计数。使用Hach 2100Q浊度计(每天在使用前校准)一式三份地测量PDS浊度。

[0145] 使用配备有Quattroflow 150泵(High Purity New England,美国罗德岛州史密斯菲尔德)和88cm² 30kDa Ultracel Pellicon 3D滤膜(MilliporeSigma,美国马萨诸塞州伯灵顿)的PendoTECH控制和数据采集系统(PendoTECH,美国新泽西州普林斯顿)进行TFF实验。将单个批次的纯化的10g/L mAb溶液分成单独的等分试样,以产生用于三种运行的相同装载材料,其中等分试样体积被限定为实现大约600g/m²的膜装载。对于伪分批和混合两种配置,初始装载体积与渗余物容器加上系统保留体积的体积比都被设定为5。对于每种运行,在第一超滤步骤期间将mAb浓缩至50g/L,然后与5个渗滤体积(diavolume)的渗滤缓冲液进行缓冲液交换。然后在第二超滤步骤中,将渗滤后的蛋白质溶液进一步浓缩至180g/L(重量分析地根据渗余物和渗透物质量确定,并且考虑了高浓度下溶液密度的变化)。然后通过用缓冲液将残余的蛋白质溶液从保留体积中推出来回收药品,其中所使用的推进缓冲液的体积是系统保留体积的1.2倍。

实施例3

A. 处理时间

[0146] 在图2A中示出了三种配置的随处理时间变化的近似渗余物mAb浓度(根据系统中的渗余物体积和总蛋白质质量计算)。每个工艺阶段(UF1、DF和UF2)的对应处理时间在图2B中示出。针对三种运行观察到的对应渗透通量在图3中示出。

[0147] 混合(补料分批装载)运行的UF1步骤的处理时间比分批运行的处理时间长60%,如图2B所示。使用补料分批策略观察到在装载步骤(UF1的初始部分)期间的渗透通量较低(图3),这也可能导致混合运行的UF1处理时间较长。相比之下,伪分批运行的UF1处理时间(图2B)和渗透通量(图3)都与分批运行几乎相同。不出所料,在所有三种运行之间渗滤和UF2处理时间几乎相同(图2B),因为DF和UF2步骤必须以分批配置进行,而不论装载(UF1)步骤期间的系统配置如何。三种运行之间渗滤处理时间的差异很小是由于在渗滤步骤期间蛋白质浓度的轻微可变性(49-51g/L)。这些结果说明了初始样品装载(UF1)步骤期间的系统配置对总处理时间的影响,并且证明了伪分批处理配置能够减轻与UF1步骤期间的补料分批装载相关的时间损失并且消除与混合(补料分批装载)工艺相关的处理时间可扩展性挑战。

B. 质量属性

[0148] 评价了伪分批配置对药品质量属性的影响,以确定将第二泵(例如,进料泵)并入再循环回路中是否会产生不利影响,因为在每个再循环循环中,蛋白质溶液现在经过两个泵,而不是一个。

[0149] 发现mAb A对与UF/DF期间可溶性高分子量(HMW)种类的形成有关的泵剪切暴露不敏感。在所有三种配置策略的整个过程中,HMW水平基本上保持不变(图4)。因此,与伪分批配置相关的增加的泵剪切暴露似乎对HMW的形成没有不利影响。

[0150] 通过微流控成像(MFI)量化伪分批配置对较大的不溶性聚集体的影响。使用三种配置产生的过程中池的显微镜下可见(1-100 μm)颗粒计数在图5A-图5D中示出。与针对HMW

形成观察到的不同,随着时间的推移mAb A确实显示出显微镜下可见颗粒形成的显著增加,其中颗粒的总数和相对粒度分布在配置之间都明显不同。

[0151] 对于所有粒度范围,混合运行始终比分批运行具有更高的颗粒计数,这与较长的处理时间以及蛋白质的对应增加的对剪切和界面应力的暴露一致。相比之下,除了50-100 μ m尺寸范围(图5D)之外,伪分批运行在1-25 μ m尺寸范围内产生了与分批运行相当或更低量的颗粒(图5A-图5C)。与其他两种装载策略相比,在UF1步骤期间由于加倍经过泵而产生的(未检测到的)聚集体前体的水平增加可能导致50-100 μ m尺寸范围的颗粒计数更高。然而,重要的是注意到,50-100 μ m尺寸范围的总颗粒计数比较小粒度范围的颗粒计数小几个数量级。从整体颗粒产生的角度来看,伪分批配置是对补料分批配置的明显改进,并且似乎产生了与分批配置质量相当的药品。

[0152] 有趣的是注意到,尽管事实是UF2步骤是整体工艺的最短部分(图2B),但三种配置之间颗粒计数的最大差异出现在DV5与UF2后之间。考虑到对于DF和UF2两个步骤,所有三种配置都具有相同的处理时间和设置,这些结果证明了UF1步骤在产生可能无法被SEC/MFI检测到但影响最终的药品的质量的聚集前体方面的重要性。

实施例4

[0153] 为了确定进料泵的类型是否会影响伪分批工艺,用蠕动进料泵替代隔膜进料泵。使用采用与实施例3中的伪分批运行相同的工艺参数(例如,膜装载、装载浓度、渗滤浓度、交换的渗滤体积、泵进料通量和TMP)的伪分批装载配置产生了约180g/L的mAb A溶液。初始装载体积与渗余物罐体积的体积比保持在5(即,在装载步骤期间渗余物罐中的液体体积维持在等于初始总装载体积的20%的恒定值),如在实施例3中。将此运行的工艺性能与使用隔膜进料泵的伪分批运行的工艺性能进行了比较。

[0154] 在图6A中示出了两种伪分批运行的随处理时间变化的近似渗余物mAb浓度(根据系统中的渗余物体积和总蛋白质质量计算)。每个工艺阶段(UF1、DF和UF2)的对应处理时间在图6B中示出。随渗余物浓度计算值变化的渗透通量在图7中示出。对于UF/DF工艺的每个阶段,两种运行的通量概况以及处理时间几乎相同,这表明针对进料泵的蠕动泵或隔膜泵的选择对伪分批装载方法关于工艺通量的性能没有影响。

[0155] 还评价了药品质量属性,以确定伪分批配置中的进料泵类型是否会在UF/DF工艺期间显著影响蛋白质稳定性,蛋白质稳定性可以是伪分批方法的一般实用性的决定因素。如从图8中可以看出,在UF/DF期间,使用蠕动进料泵相对于隔膜进料泵未导致HMW形成的任何增加(在测定可变性内)。因此,与使用蠕动进料泵相关的剪切暴露和与使用隔膜进料泵相关的剪切暴露的差异似乎对HMW形成没有不利影响。

[0156] 通过微流控成像(MFI)量化进料泵类型对较大的不溶性聚集体的影响。使用进料泵类型产生的过程中池的显微镜下可见(1-100 μ m)颗粒计数在图9A-图9D中示出。与针对HMW形成观察到的不同,颗粒的总数和相对粒度分布在泵类型之间都明显不同。与隔膜泵相比,蠕动进料泵导致产生了显著更多的较小颗粒(<25 μ m),但是大颗粒(>50 μ m)较少。此概况表明,当蛋白质溶液循环通过进料泵时,蠕动泵产生更高的剪切或更多的湍流态,这会使较大的微粒不稳定并且导致较小的微粒相对较多。然而,如上所述,粒度分布的差异似乎不会影响膜通量或工艺通量。由于这些微粒在UF/DF步骤之后在最终配制和过滤步骤期间被除去,因此两种泵类型之间微粒产生的差异不可能成为最终产品质量的问题。

实施例5

[0157] 为了确定在装载步骤期间渗余物与总装载体积的比率是否会影响伪分批性能,在装载步骤期间渗余物罐中的液体体积恒定保持在相对于总装载体积较低的体积。使用伪分批装载方法使用实施例4中所述的UF/DF工艺参数和配置(蠕动进料泵)产生了约180g/L的mAb A溶液。然而,在UF1步骤的装载部分期间,渗余物罐中的液体体积保持在总初始装载体积的10%,而不是如实施例4中的20%。将此运行的工艺性能与伪分批运行的工艺性能进行了比较,在伪分批运行中,在装载步骤期间,渗余物罐体积维持在总初始装载体积的20%。

[0158] 在图10A中示出了两种伪分批运行的随处理时间变化的近似渗余物mAb浓度(根据系统中的渗余物体积和总蛋白质质量计算)。每个工艺阶段(UF1、DF和UF2)的对应处理时间在图10B中示出。随渗余物浓度计算值变化的渗透通量在图11中示出。两种运行的通量概况以及UF1和UF2处理时间几乎相同,这表明在装载步骤期间渗余物罐与总装载体积的比率对浓缩蛋白质所需的处理时间没有影响。渗滤时间的较小差异可能是由于实际渗滤浓度在50g/L的目标值附近稍有变化。此结果与补料分批操作不同,在补料分批操作中,UF1处理时间取决于渗余物罐与总装载体积的相对体积比,如前面在实施例1中所解释的。实施例4和实施例5中UF1处理时间对装载步骤期间相对渗余物与装载体积的比率的独立性与伪分批方法的指导原理一致,其中在UF/DF再循环回路中,进料罐与渗余物罐的连接允许它们作为单个储存罐有效地起作用并且将装载步骤转换成分批工艺。

[0159] 还评价了药品质量属性,以确定在装载步骤期间渗余物与总装载体积的比率是否会影响UF/DF工艺期间的蛋白质稳定性。如从图12中可以看出,渗余物体积维持在初始装载体积的10%的运行具有与以体积比为20%进行的运行相同的HMW水平。类似地,如通过MFI所量化的UF2后溶液的粒度分布(1-100 μ m)在两种运行之间几乎相同,如在图13A至图13D中所见。两种运行之间HMW和大颗粒概况的相似性可以部分归因于相同的UF1处理时间(图10B)和随处理时间变化的浓度概况(图10A),因为蛋白质在两种运行之间经历的泵经过次数相同并经受相同的其他压力因素。

实施例6

[0160] 对用作装载材料的非mAb治疗性蛋白(MW=约20Da)采用伪分批方法。使用传统的补料分批方法以及伪分批方法将蛋白质从0.7g/L浓缩至15.5g/L。在这两种运行期间没有进行缓冲液交换。所有其他工艺参数(膜装载、泵进料通量、TMP)在两种运行之间保持恒定。在两种运行的整个装载步骤中,渗余物罐中的液体体积都恒定保持在等于总初始装载体积的30%的值,并且使用蠕动泵作为进料泵。

[0161] 在图14中示出了两种运行的随处理时间变化的近似渗余物蛋白质浓度(根据系统中的渗余物体积和总蛋白质质量计算)。补料分批运行的对应处理时间为3.0小时,并且伪分批运行为2.9小时。随渗余物浓度计算值变化的渗透通量在图15中示出。通量与浓度概况相同,这表明装载方法的差异不会影响固有的膜性能,这与先前实施例的观察结果一致。在本实施例中,工艺的装载步骤在非常小且稀释的浓度范围(0.7-2g/L)内进行,使得在此浓度范围内的通量衰减基本上可忽略不计,导致在装载步骤期间的平均渗透通量几乎相同,因此两种运行之间的处理时间相似。然而,与补料分批装载方法相比,伪分批装载策略仍然提供了减少处理时间的优势,尽管由于进行装载步骤的超低浓度范围,在这种情况下差异非常小(约0.1小时)。

[0162] 还评价了药品质量属性,以确定伪分批装载策略是否会由于蛋白质经历的泵经过次数增加而对UF/DF期间非mAb蛋白质的稳定性产生不利影响。如从图16中可以看出,伪分批方法和补料分批方法产生了相当量的HMW种类。然而,两种方法在UF/DF期间形成的较大颗粒的量和相对尺寸分布方面有所不同,如通过MFI所表征的。如在图17A至图17D中可以看出,与补料分批方法相比,伪分批装载方法产生了更多的小颗粒($<25\mu\text{m}$),但是较大颗粒($>50\mu\text{m}$)的量相当。此结果与在实施例3至实施例5中针对mAb A观察到的结果一致。伪分批装载方法固有的额外泵经过次数导致较小微粒的形成增加,但是不会导致较大微粒的形成增加。由于制造生物工艺通常在UF/DF步骤之后包括最终配制和过滤步骤,因此预期这些微粒将从最终的药品中除去。因此,预期由伪分批方法导致的小颗粒形成的增加不会对最终的药物产品的质量产生不利影响。

[0163] 本文所述的UF/DF的伪分批配置能够通过将补料分批设置(使用进料罐和渗余物容器)转换为分批样操作(将两个容器以在TFF再循环回路中充当单个容器的方式连接)来减轻与补料分批装载相关的时间损失。这种转换还消除了与混合工艺(例如,补料分批装载+分批浓缩)相关的处理时间的规模依赖性,使得工艺完全可扩展。另外,将进料泵包括到再循环回路中导致与分批配置相比两倍的泵经过次数不会对产品质量造成任何明显的不利影响,如通过HMW形成和显微镜下可见颗粒计数所量化的。

[0164] 随着生物制药行业越来越多地向皮下药物递送形式转变,混合UF/DF工艺在产生高浓度药品方面必将变得更加普遍。取而代之,本文所述的伪分批配置可以用于减少与补料分批装载相关的时间损失,消除由混合工艺产生的处理时间的规模依赖性,并且与混合工艺相比潜在地改进产品质量。综合来说,这些益处可以提高工艺通量和产率,并且改进UF/DF工艺的可扩展性,以实现从实验室/开发规模到制造规模的更简化的技术转移。

[0165] 具体方面的前述描述将如此充分地揭示本发明的一般性质,使得其他人可以通过应用本领域技术范围内的知识,在无需过度实验并且不偏离本发明总体概念的情况下容易地修改和/或调整此类具体方面用于各种应用。因此,基于本文呈现的传授内容和指导,此类调整和修改旨在所公开的方面的等效方案的含义和范围内。应理解,本文的措辞或术语是出于描述而非限制的目的,因此本说明书的术语或措辞将由熟练技术人员根据传授内容和指导来解释。

[0166] 将本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请都通过引用并入本文,并入程度就像每个单独的出版物、专利或专利申请被明确且单独地指出通过引用并入一样。

[0167] 在考虑本文所公开的本发明的说明书和实践后,本领域技术人员将清楚本发明的其他方面。所述说明书和实施例旨在仅被视为示例性的,所附权利要求指示了本发明的真实范围和精神。

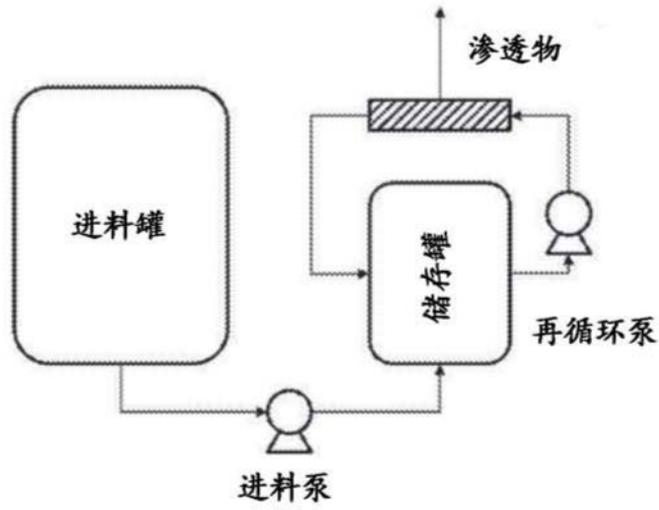


图1A

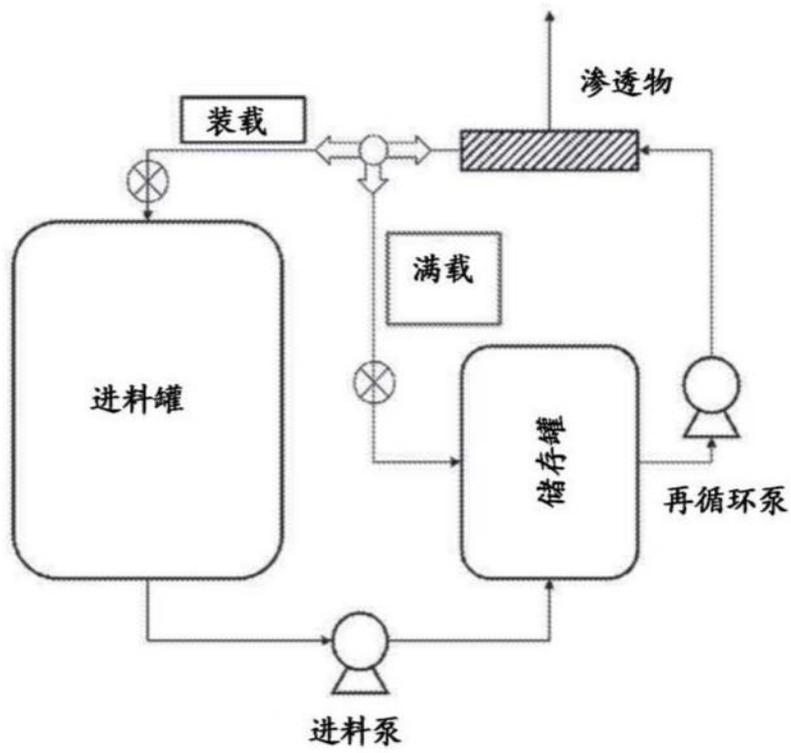


图1B

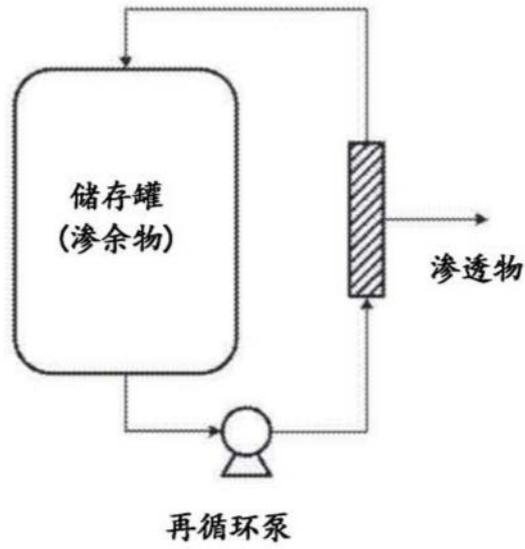


图1C

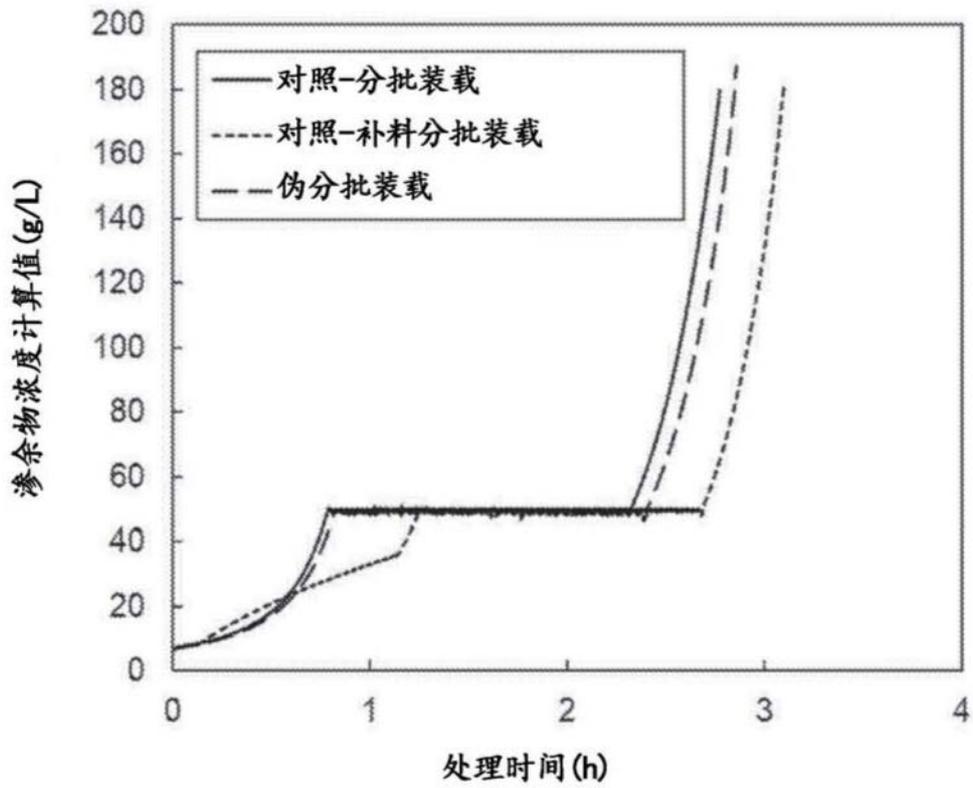


图2A

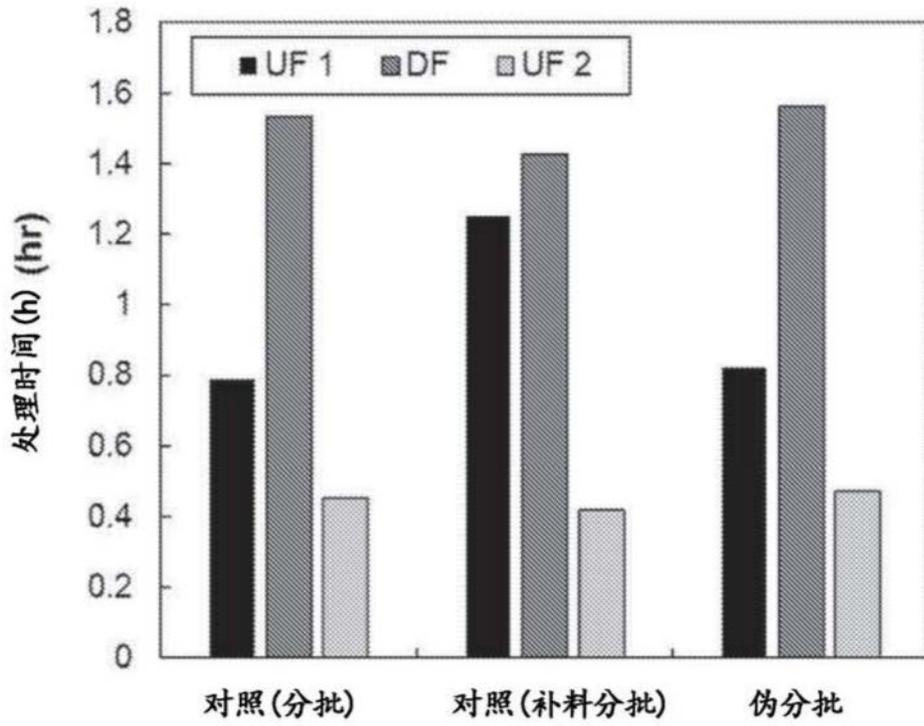


图2B

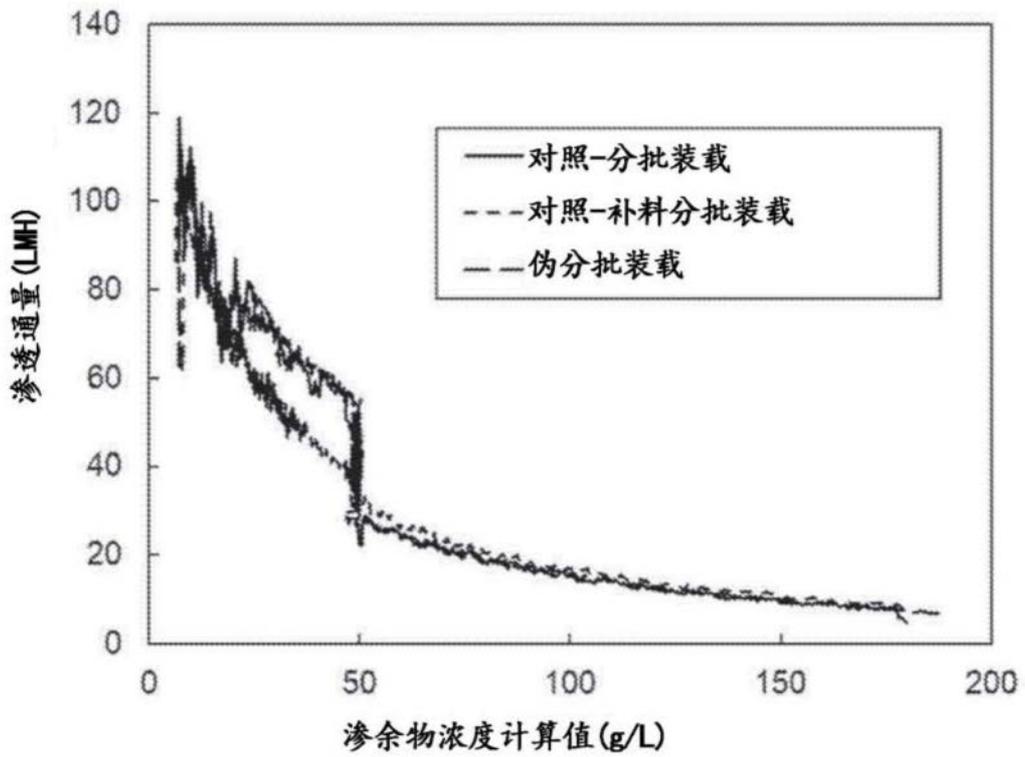


图3

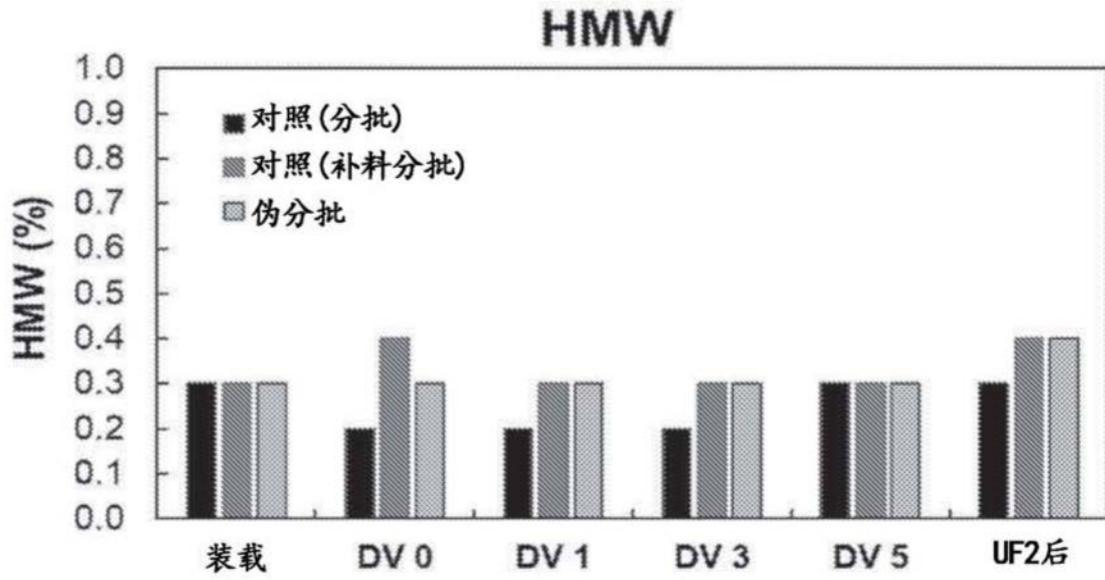


图4

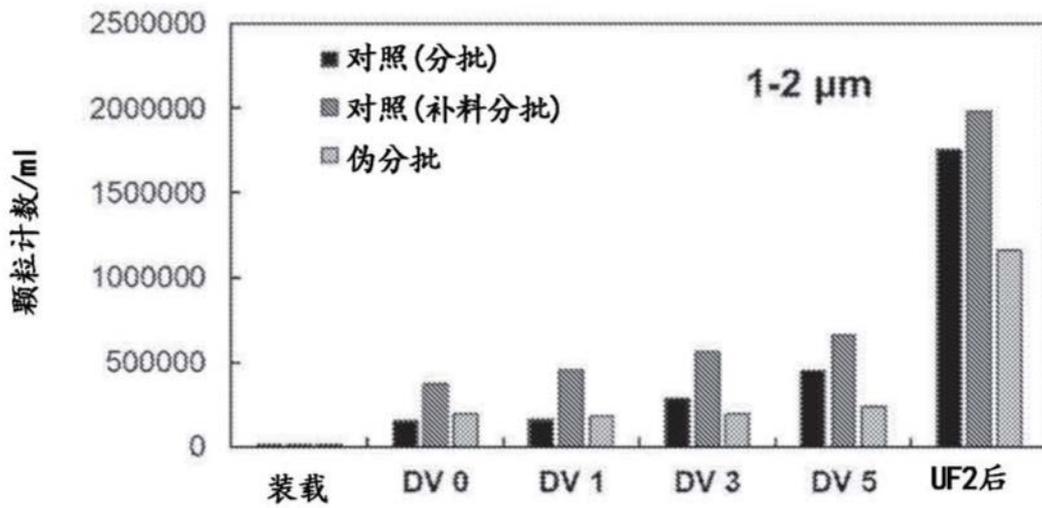


图5A

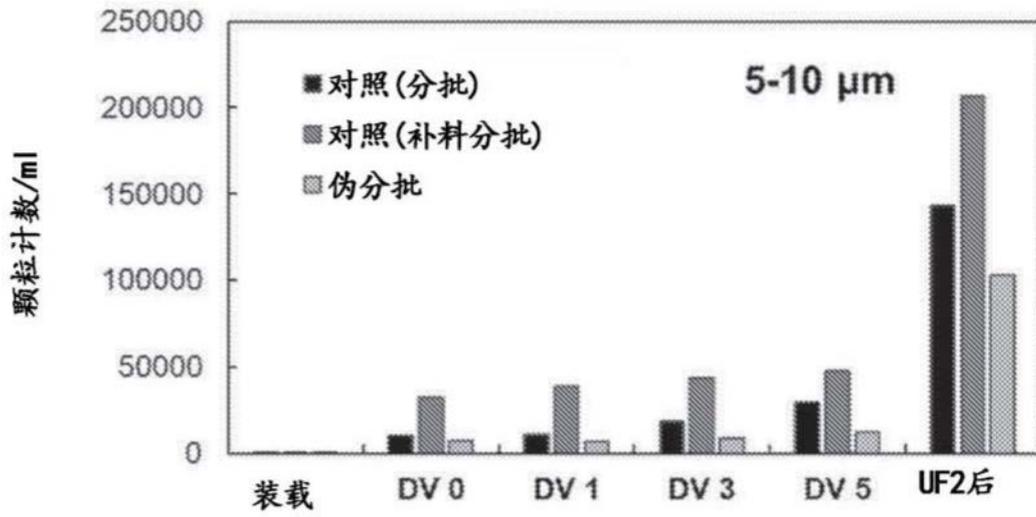


图5B

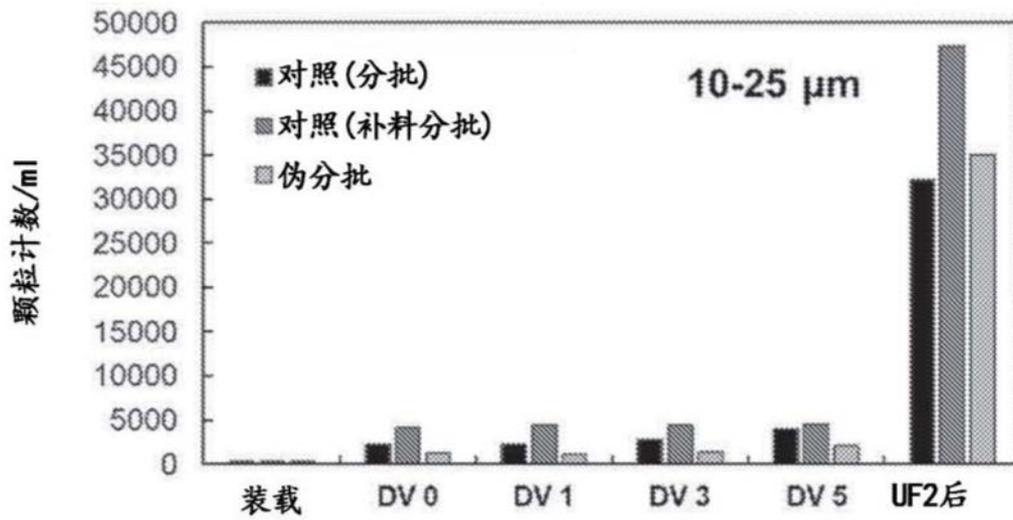


图5C

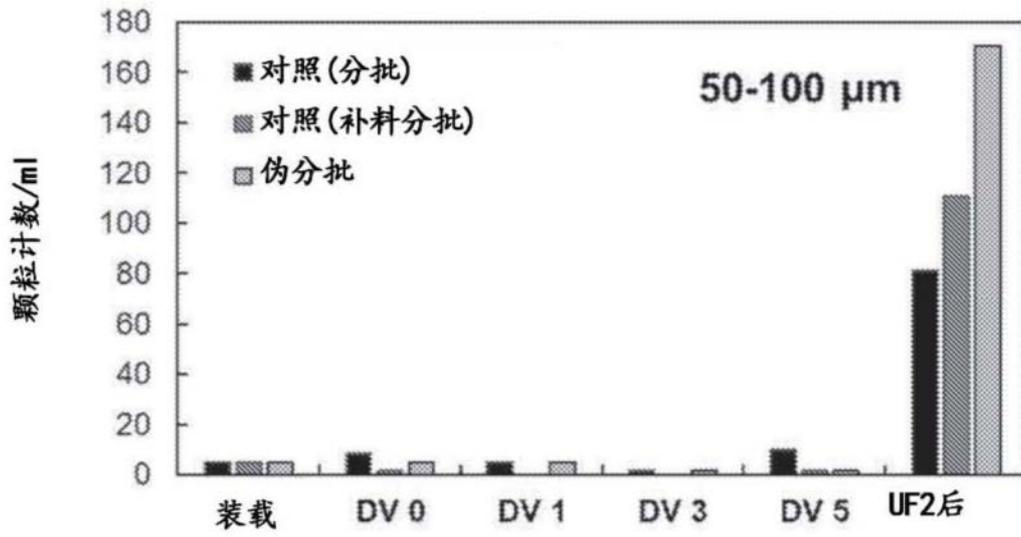


图5D

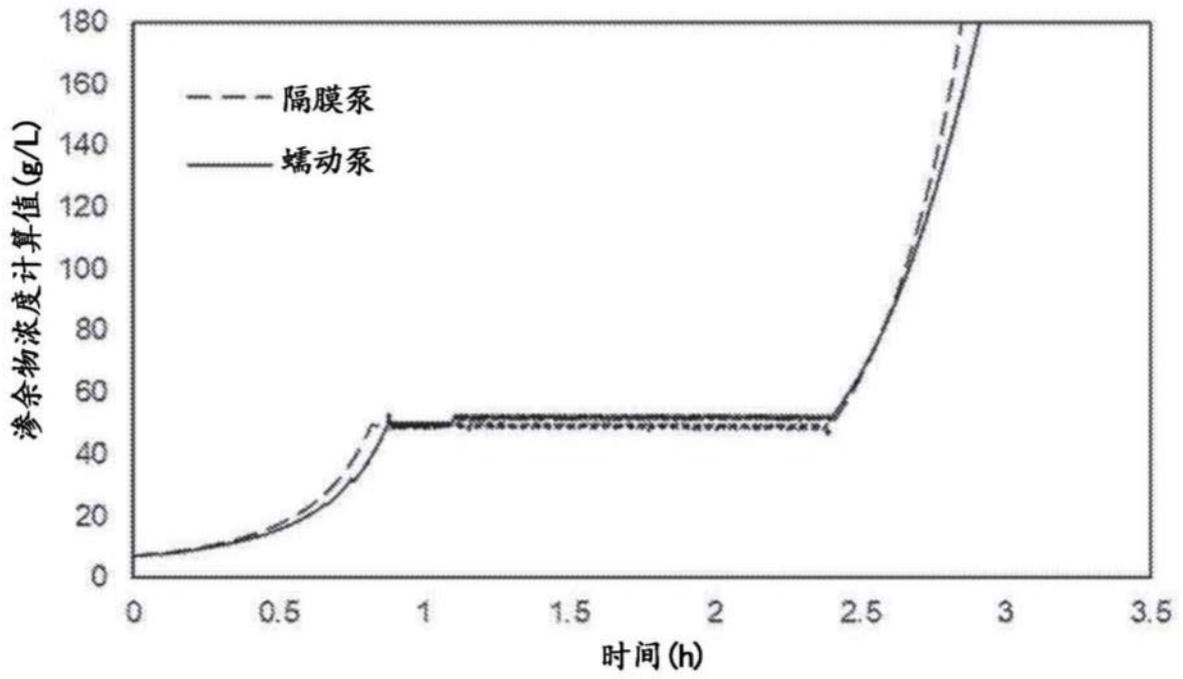


图6A

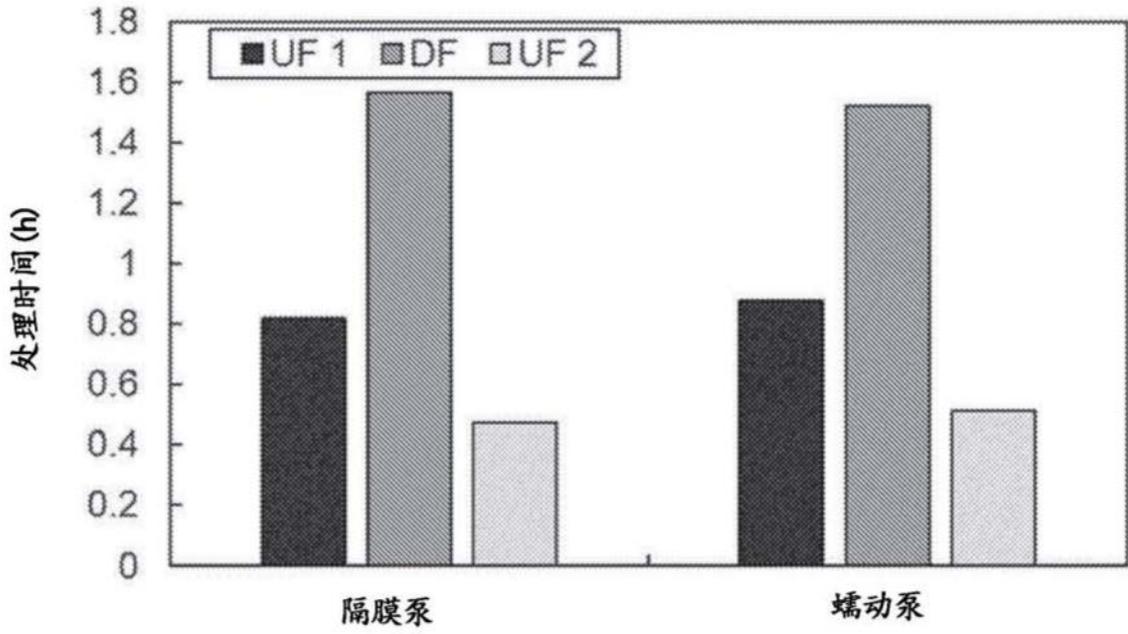


图6B

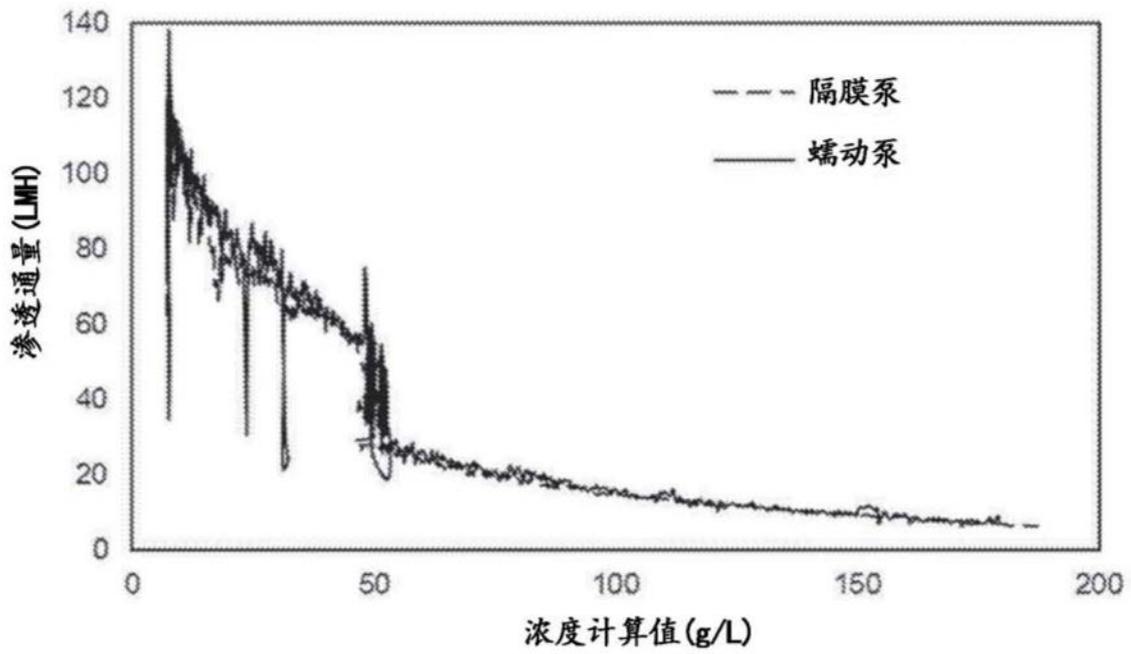


图7

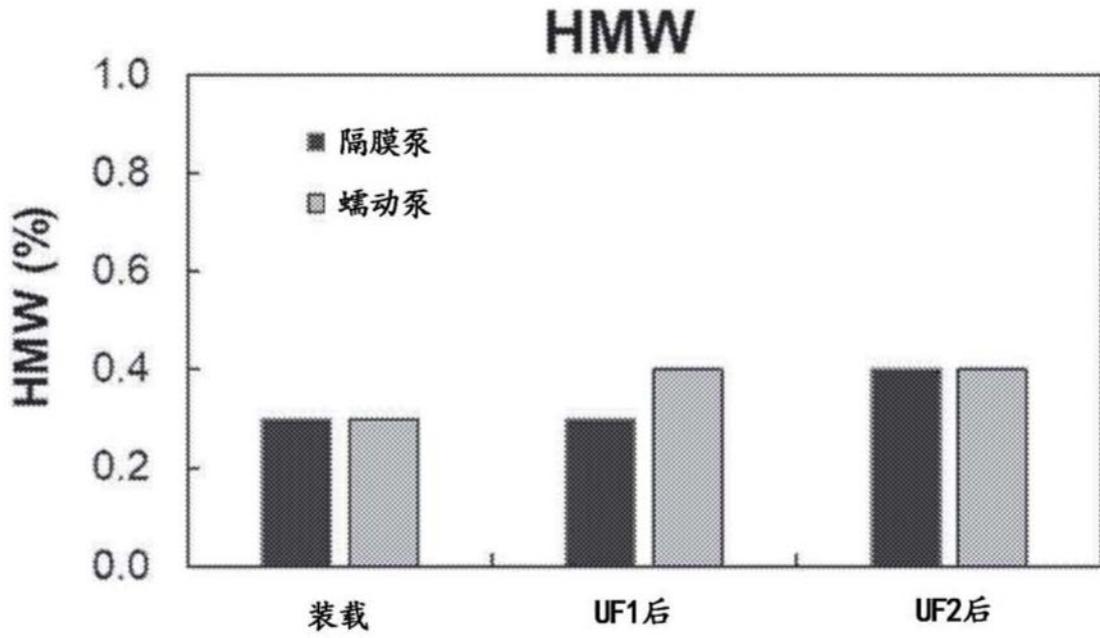


图8

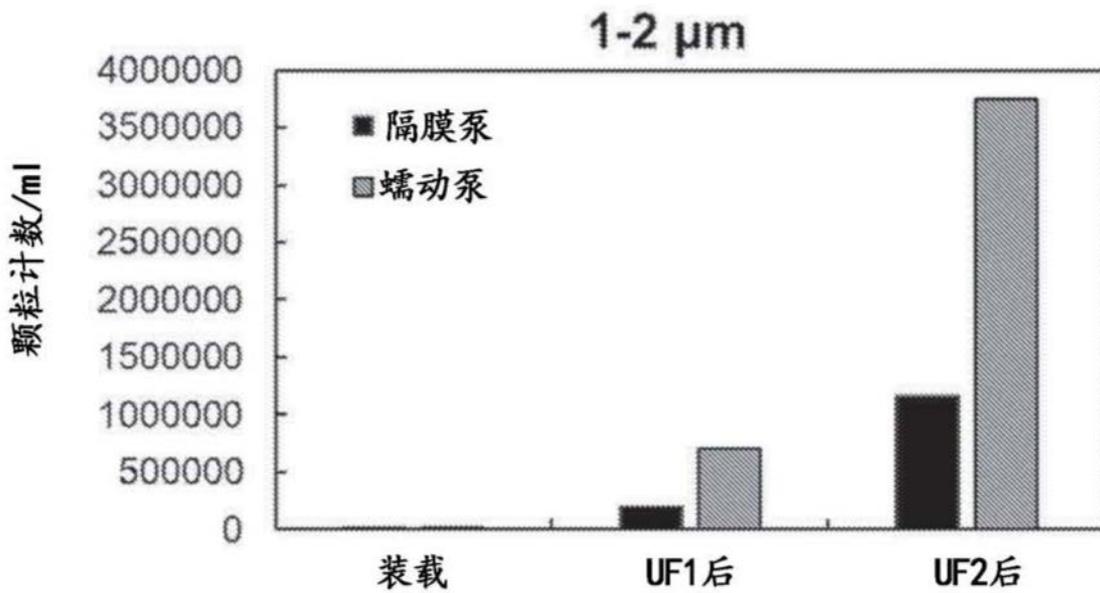


图9A

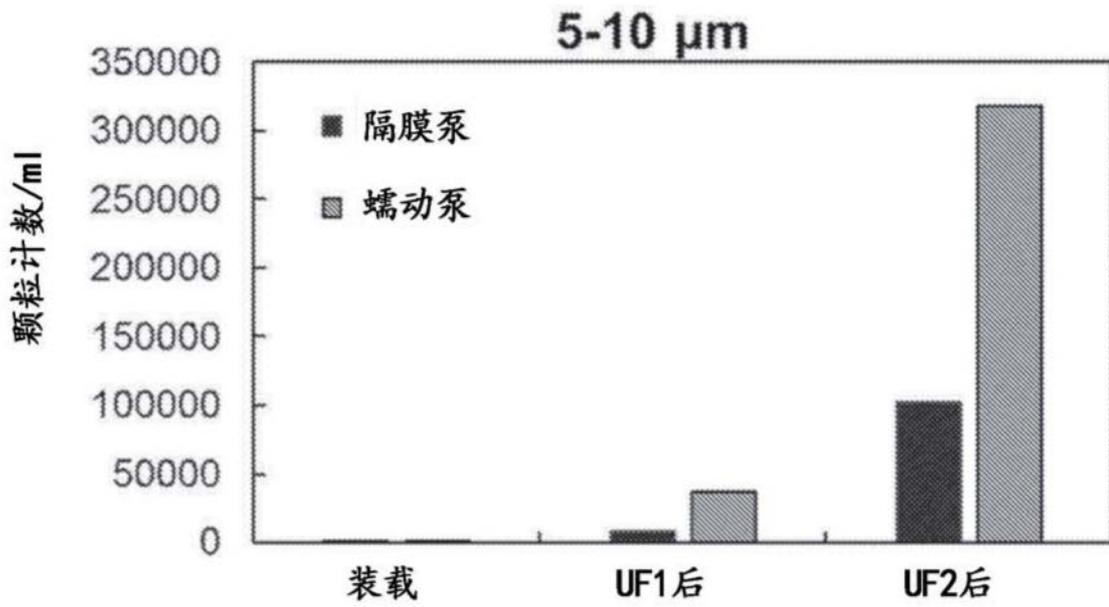


图9B

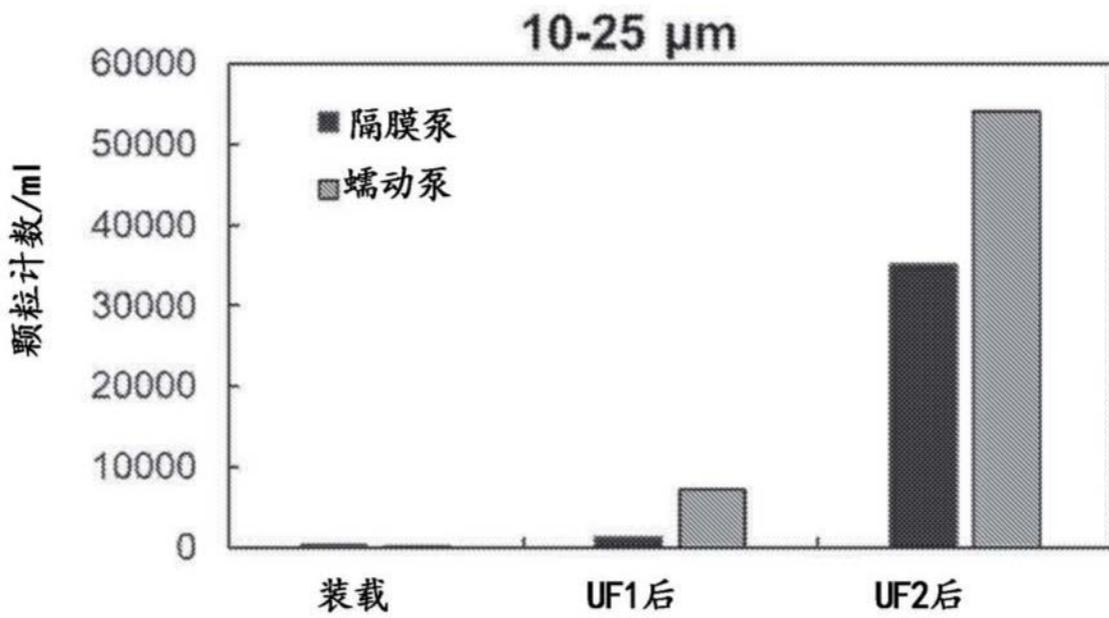


图9C

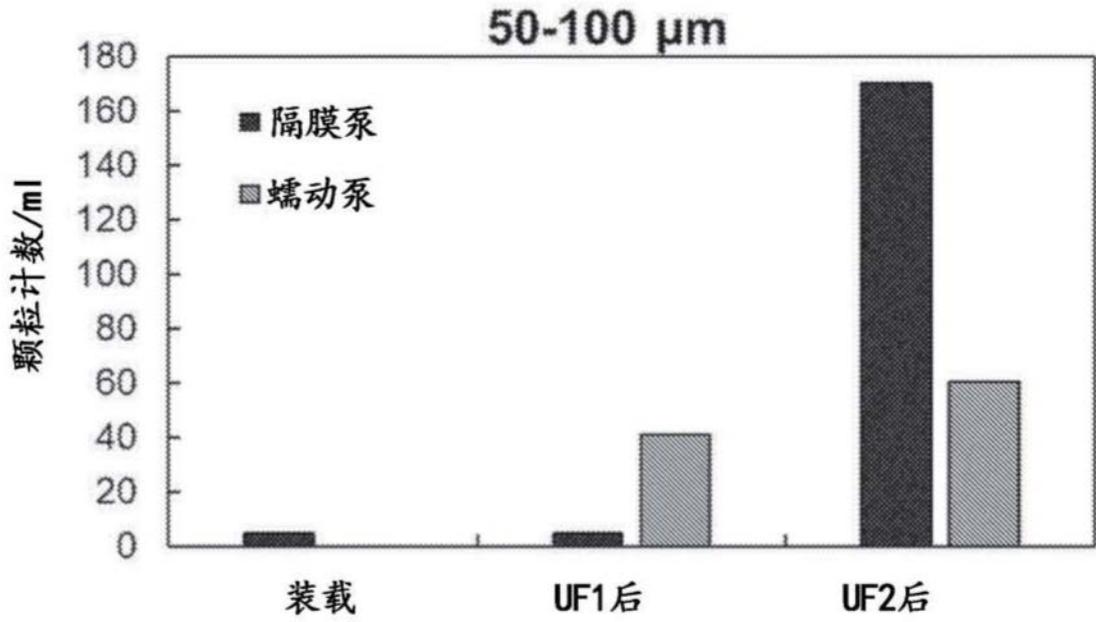


图9D

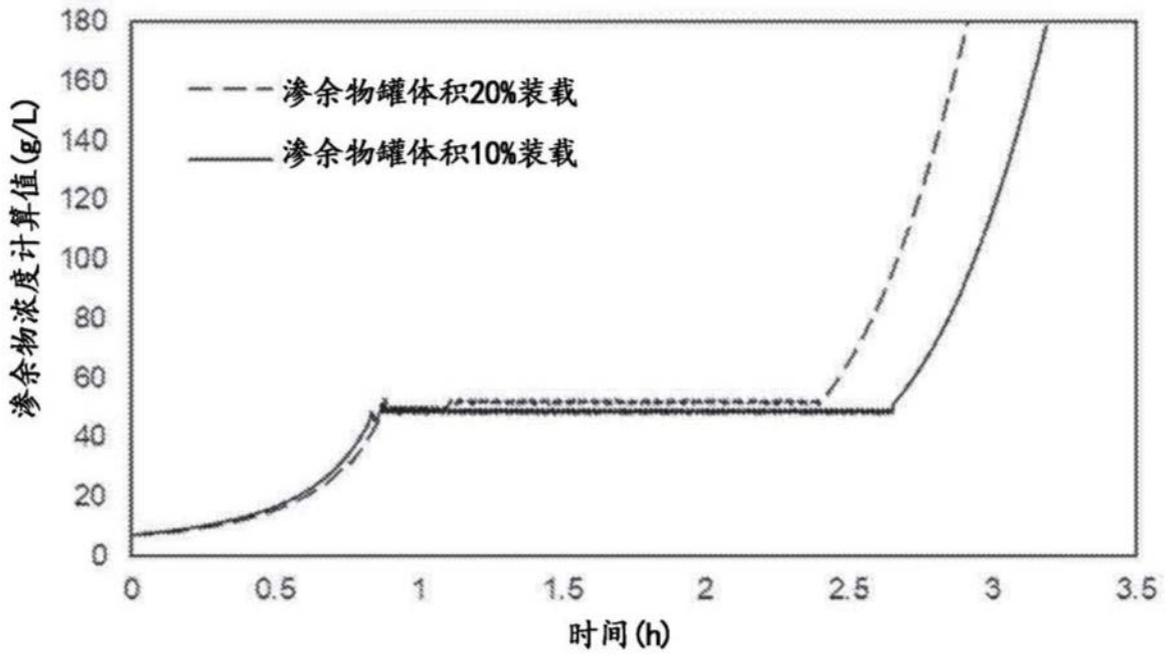


图10A

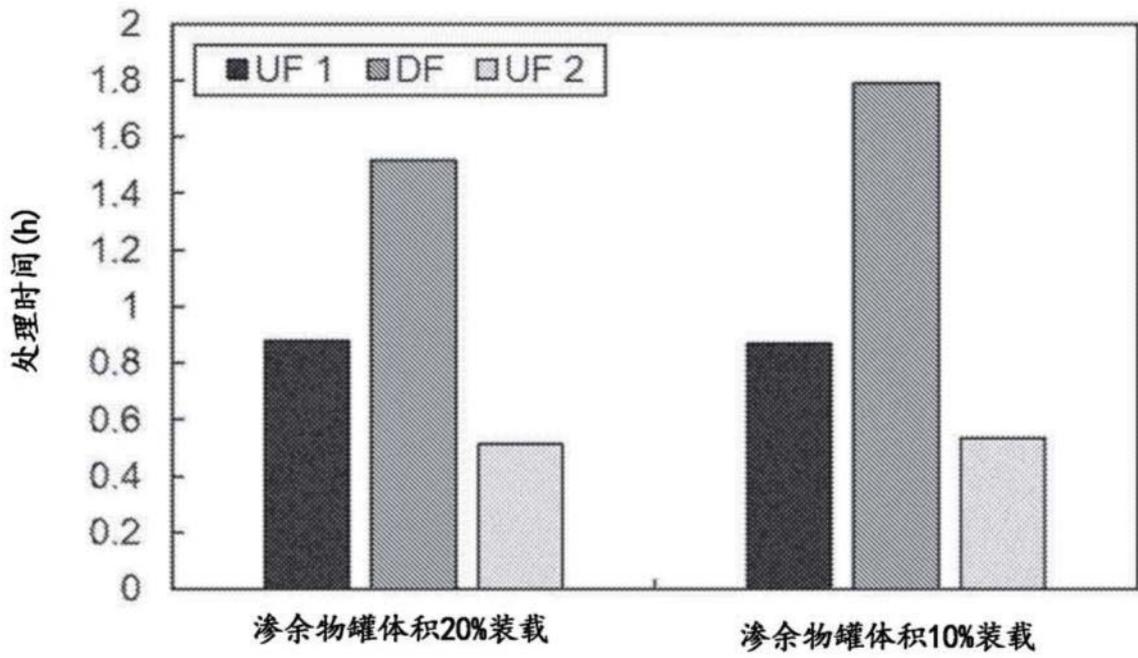


图10B

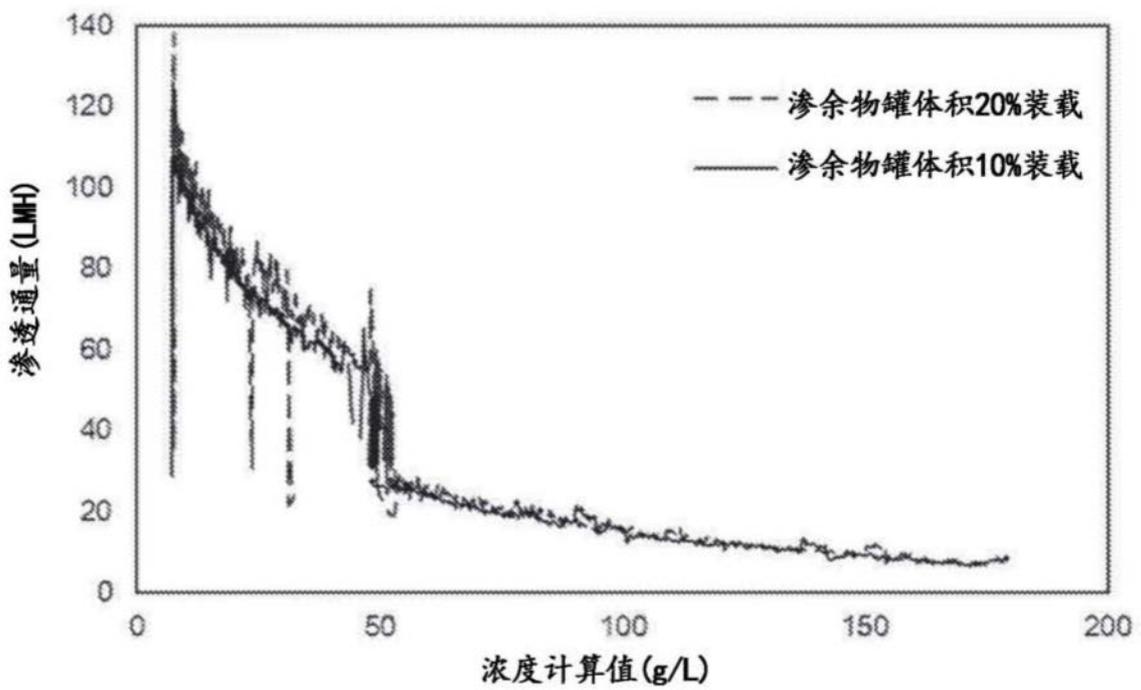


图11

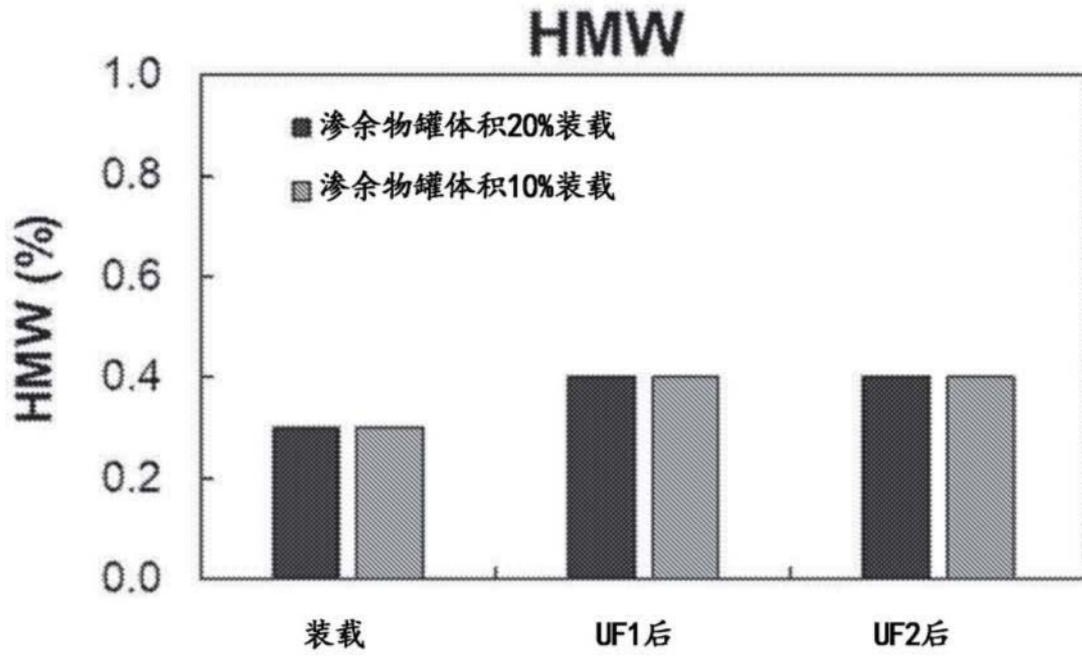


图12

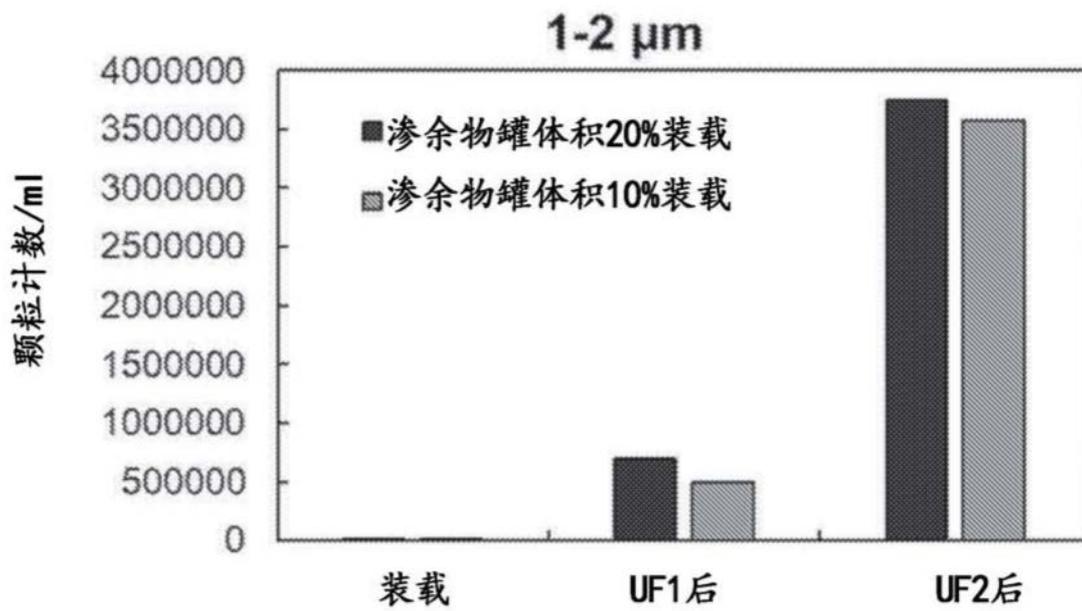


图13A

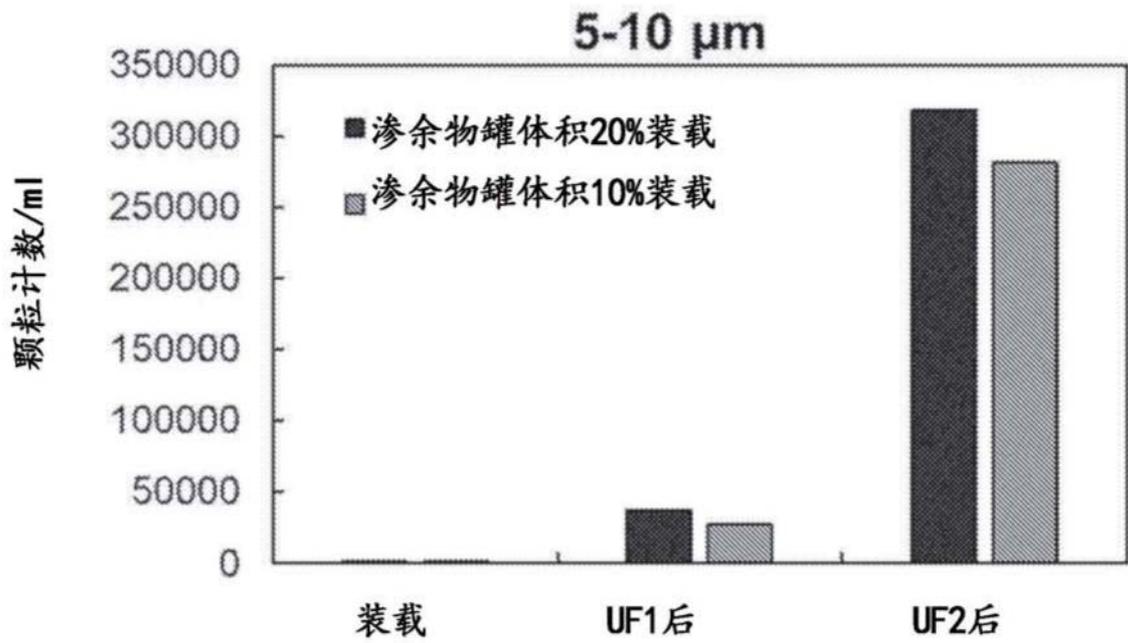


图13B

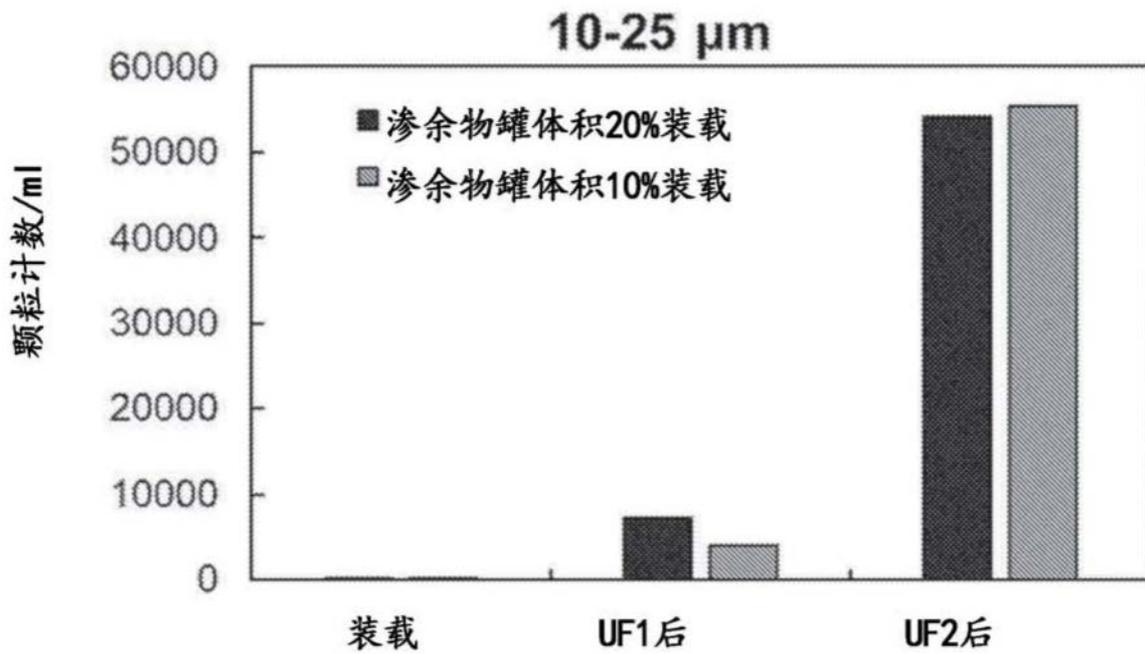


图13C

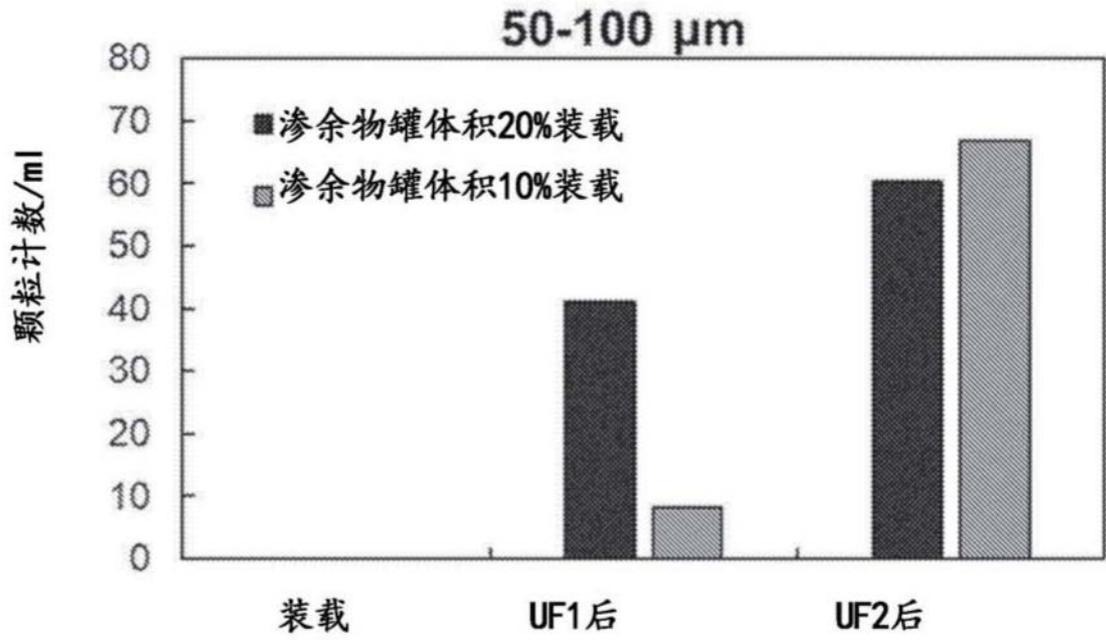


图13D

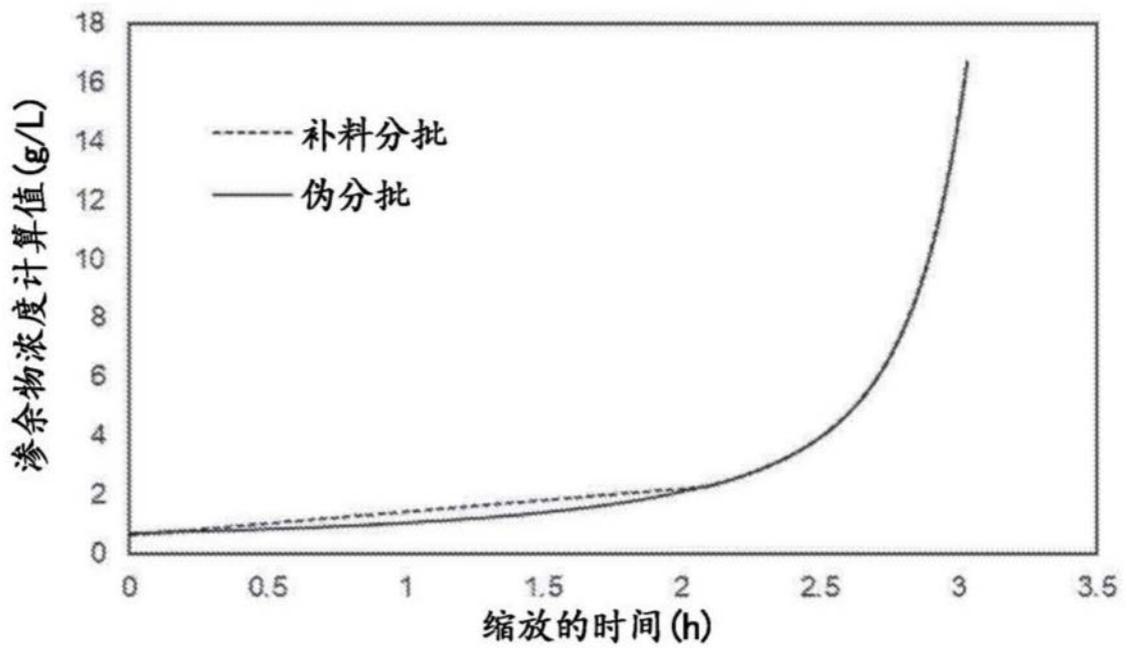


图14

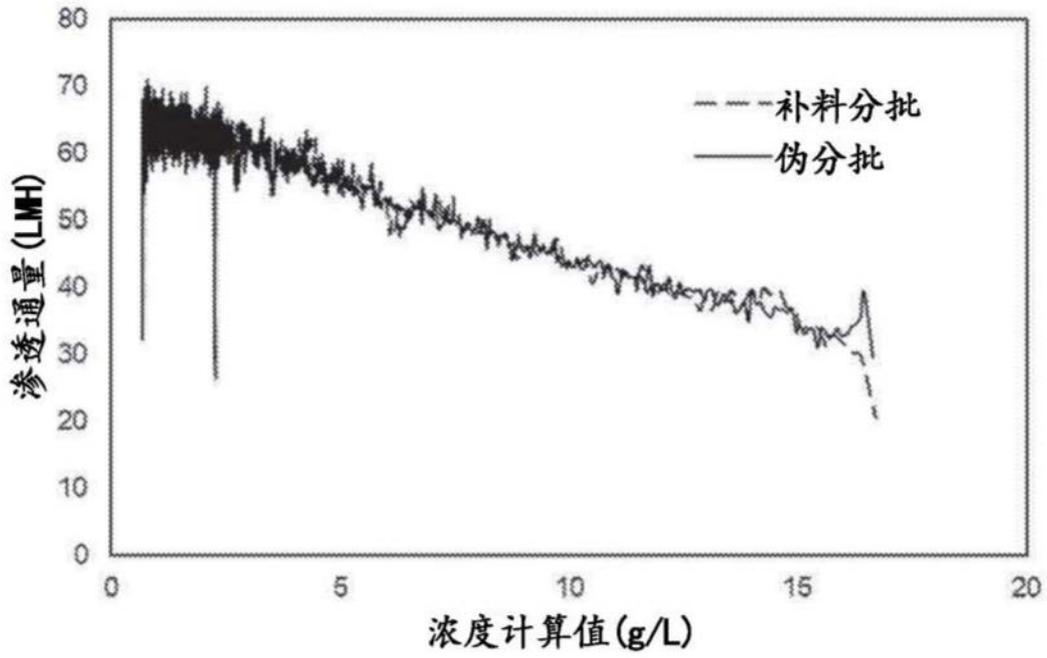


图15

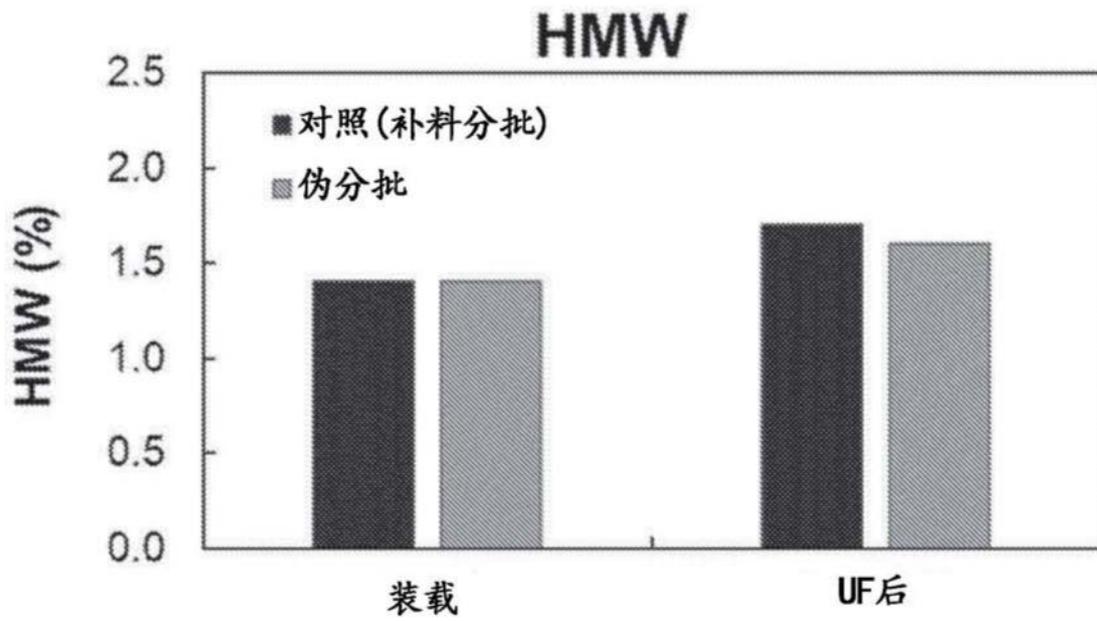


图16

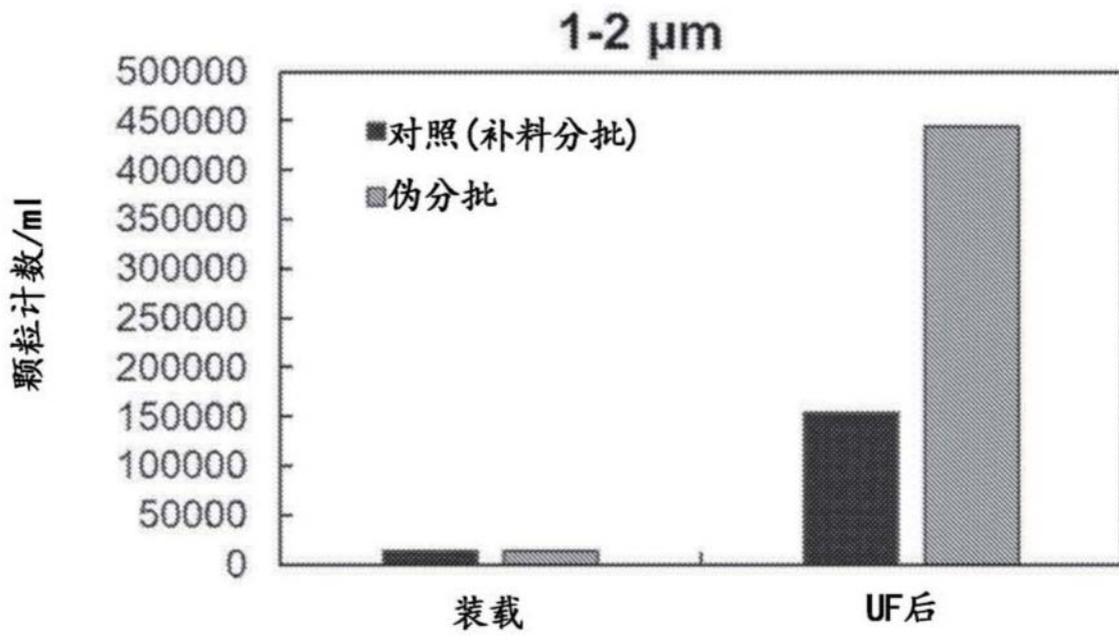


图17A

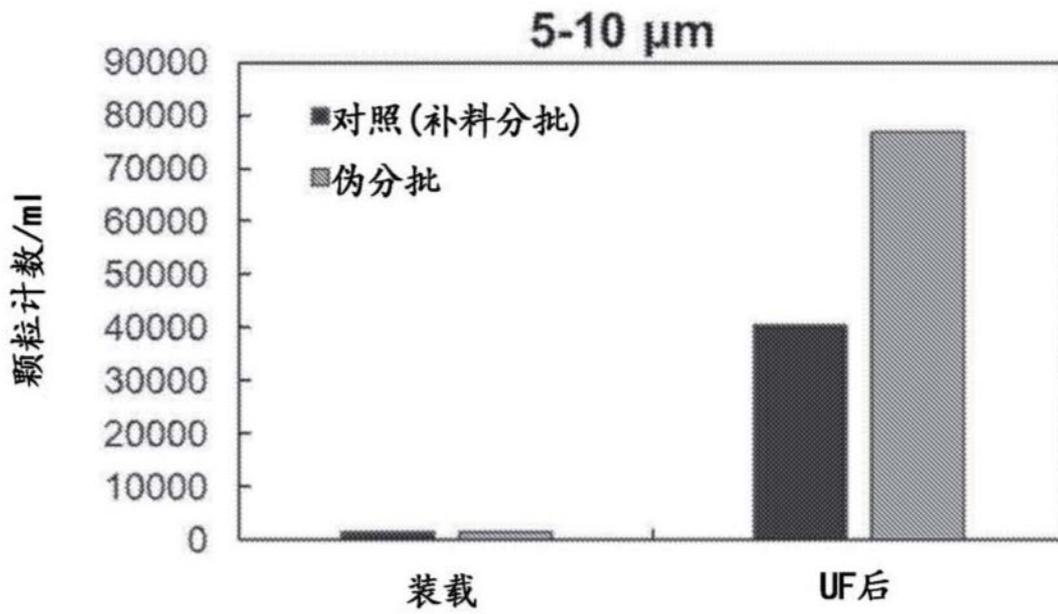


图17B

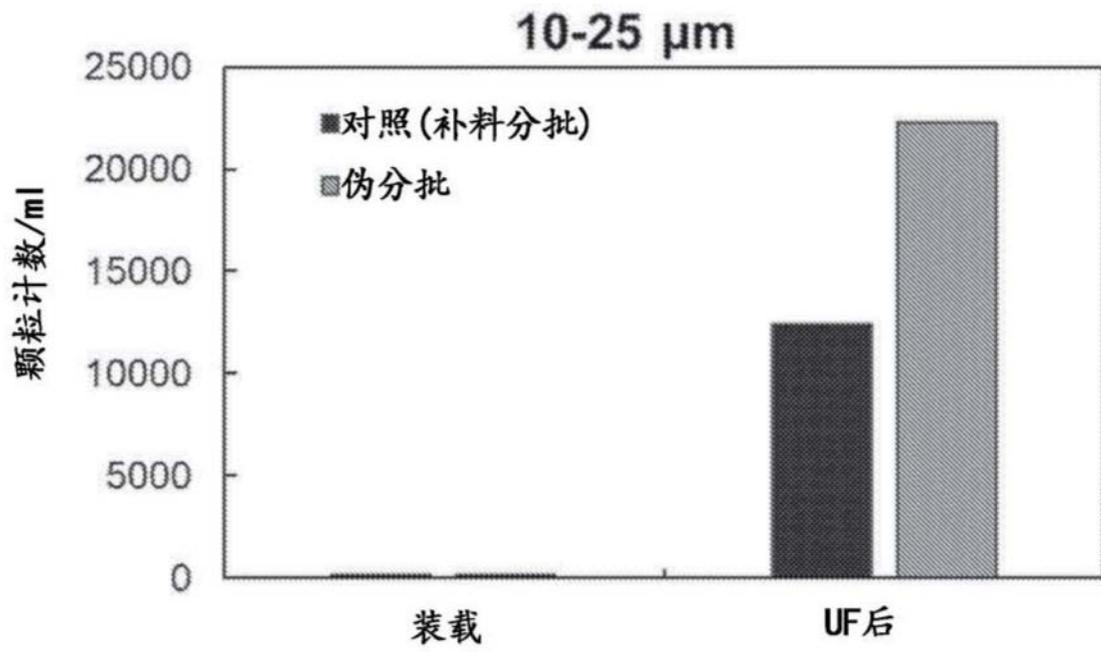


图17C

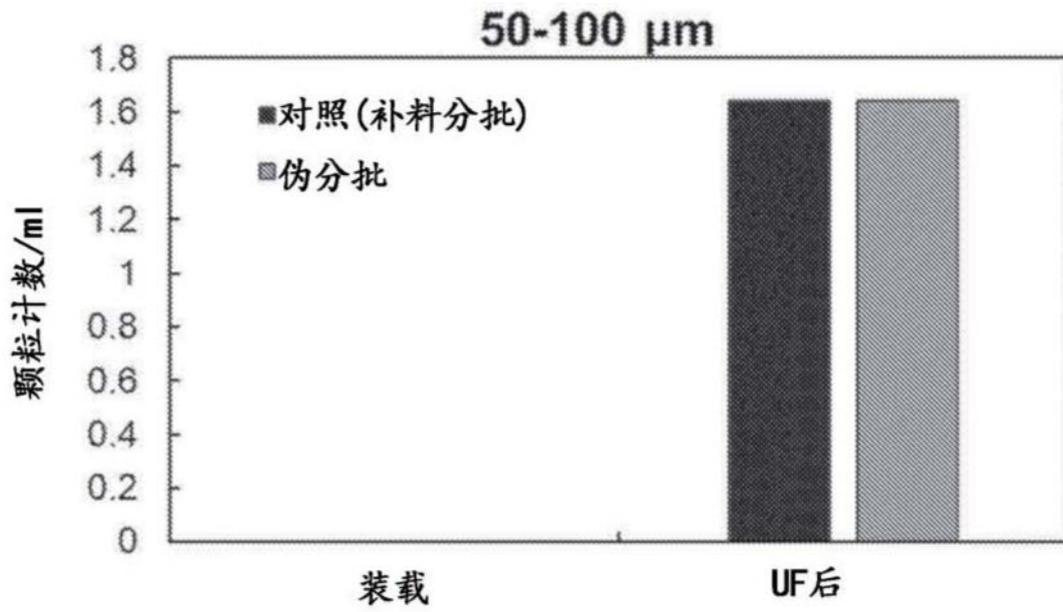


图17D