



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I574975 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 03 月 21 日

(21)申請案號：101128407

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 08 月 07 日

(51)Int. Cl. : C07K1/18 (2006.01)

B01D15/36 (2006.01)

(30)優先權：2011/08/19 美國

61/575,349

2012/06/29 美國

61/666,240

(71)申請人：EMD 密理博公司 (美國) EMD MILLIPORE CORPORATION (US)

美國

(72)發明人：邊 南穎 BIAN, NANYING (US)；吉勒司比 克里斯多夫 GILLESPIE, CHRISTOPHER (US)；史東 馬修 T STONE, MATTHEW T. (US)；科茲洛夫 米克海爾 KOZLOV, MIKHAIL (US)；陳捷 CHEN, JIE (US)；史瓦克 馬丁 SIWAK, MARTIN (US)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

(56)參考文獻：

US 4639513

US 2011/0040075A1

審查人員：莊智惠

申請專利範圍項數：41 項 圖式數：22 共 130 頁

(54)名稱

用於減少蛋白質純化期間樣本中一或多種雜質含量之方法

METHODS OF REDUCING LEVEL OF ONE OF MORE IMPURITIES IN A SAMPLE DURING PROTEIN PURIFICATION

(57)摘要

本發明提供新穎及經改良之蛋白質純化方法，該等方法併入某些類型之含碳材料且使得可在不會不利地影響所要蛋白質產物之產率的情況下有效且選擇性地移除某些不合需要之雜質。

The present invention provides novel and improved protein purification processes which incorporate certain types of carbonaceous materials and result in effective and selective removal of certain undesirable impurities without adversely effecting the yield of the desired protein product.

指定代表圖：

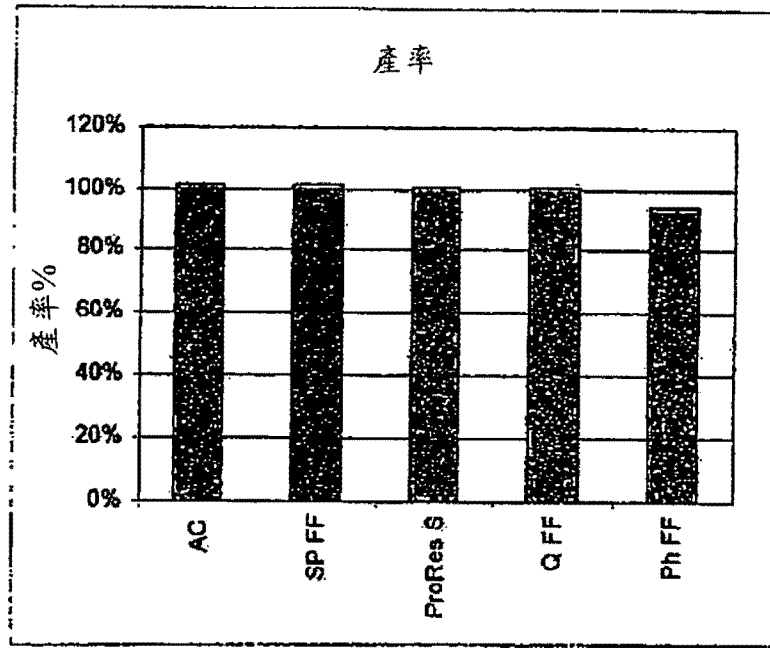


圖 1

發明專利說明書

公告本

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101128407

C07K 1/18 (2006.01)

※申請日：101.8.7

※IPC 分類：B01D 15/36 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

用於減少蛋白質純化期間樣本中一或多種雜質含量之
方法

METHODS OF REDUCING LEVEL OF ONE OF MORE
IMPURITIES IN A SAMPLE DURING PROTEIN
PURIFICATION

二、中文發明摘要：

本發明提供新穎及經改良之蛋白質純化方法，該等方法併入某些類型之含碳材料且使得可在不會不利地影響所要蛋白質產物之產率的情況下有效且選擇性地移除某些不合需要之雜質。

三、英文發明摘要：

The present invention provides novel and improved protein purification processes which incorporate certain types of carbonaceous materials and result in effective and selective removal of certain undesirable impurities without adversely effecting the yield of the desired protein product.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：圖 1。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

六、發明說明：

【相關申請案】

本申請案主張申請日期為 2011 年 8 月 19 日之美國臨時專利申請案第 61/575,349 號及申請日期為 2012 年 6 月 29 日之美國臨時專利申請案第 61/666,240 號的優先權權益，各申請案係以全文引用的方式併入本文中。

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於改良的層析方法及用於減少蛋白質純化期間一或多種雜質之含量的方法。

【先前技術】

在生物材料（例如單株抗體）之純化中，層析為一種主要純化技術。

常用層析方法包括親和性層析介質、離子交換層析介質、疏水性相互作用、親水性相互作用、尺寸排除及混合模式（亦即各種層析相互作用之組合）層析中之一或多者。舉例而言，對於單株抗體之純化，典型純化方法包括初始蛋白質 A 親和力捕捉步驟之後進行一或多個離子交換淨化步驟，其目的在於減少一或多種雜質（諸如宿主細胞蛋白質（HCP））之含量。此外，可使用其他層析技術，諸如：結合及洗提疏水性相互作用層析（HIC）；流過式疏水性相互作用層析（FTHIC）；流過式陰離子交換層析（AEX）；利用陽離子交換、陰離子交換或疏水性相互作用樹脂之弱分配層析；混合模式層析技術，例如結合及洗提弱陽離子及陰離子交換、結合及洗提疏水性及離子交換相互作用、以

及流過式疏水性及離子交換混合模式相互作用 (FTMM)，兩者均可利用諸如 Capto™ Adhere、Capto™ MMC、HEA Hypercel™、PPA Hypercel™之樹脂。此外，疏水性電荷誘導 (HCI) 層析以及其他及各種技術之組合均可用於淨化。

雖然層析為較小規模之蛋白質純化提供許多優勢，但在大規模下，填充層析管柱不僅為勞動力及時間密集的而且昂貴。此外，層析管柱之沾污亦為一個常見問題，導致使用者必須撤換管柱，此舉尤其因層析樹脂之高成本而不合需要。

近來，行業中存在一種試圖減少蛋白質純化製程中之步驟數目的明顯趨勢。此外，行業中對於使用生物反應器來獲得更高表現效價之技術的使用呈上升趨勢。此兩種趨勢之組合使得更多產物被裝載於管柱上，從而引起十分昂貴之層析介質之負荷的增加以及產物純度的降低，此兩者均不合需要。

【發明內容】

本發明至少部分基於一項驚人且意外的發現，即某些材料（例如含碳材料，諸如活性碳）可以流過模式併入基於層析管柱之蛋白質純化方法中，從而減少層析管柱之負荷且因此增加層析管柱之壽命。

此外，本發明係基於一項驚人且意外的發現，即可在捕捉層析步驟上游或下游使用含碳材料（例如活性碳）來減少一或多種雜質之含量。在根據所主張之方法的一些具體實例中，在陽離子交換 (CEX) 層析步驟之前使樣本與含

碳材料接觸。在其他具體實例中，在樣本與含碳材料接觸之前使用陽離子交換(CEX)層析步驟。在其他具體實例中，在蛋白質 A 親和性捕捉步驟之後使樣本與含碳材料接觸。或者，可在樣本與含碳材料接觸之後使用蛋白質 A 親和性層析步驟。在某些具體實例中，蛋白質 A 親和性捕捉步驟之後可進行陰離子交換(AEX)流過層析步驟且進行或不進行 CEX 層析結合/洗提步驟。在其他具體實例中，可在非親和性捕捉步驟(例如使用 CEX 結合及洗提層析作為捕捉步驟)之後使用含碳材料且接著進行 AEX 層析步驟。

此外，本發明提供基於層析之蛋白質純化製程，該等製程與習知製程相比包括較少步驟。

在根據本發明之一個態樣中，提供一種減少一或多個層析管柱之負荷的方法。在一些具體實例中，此種方法包含在使包含關注蛋白質及一或多種雜質之樣本與一或多個含有親和性介質、AEX 介質、CEX 介質、HIC 介質或混合模式介質之層析管柱接觸之前，使該樣本以流過模式與下列之一接觸：(i) 含碳材料；(ii) 含碳材料與 CEX 介質之組合；(iii) 含碳材料與 AEX 介質之組合；(iv) 含碳材料與混合模式介質之組合；(v) 含碳材料與 HIC 介質之組合；及 (vi) 含碳材料與 CEX、AEX 及混合模式介質之組合，從而減少一或多個層析管柱之負荷。

在根據所主張方法之另一態樣中，提供一種減少含有關注蛋白質及一或多種雜質之樣本中一或多種雜質之含量的方法，其中該方法包含以下步驟：(i) 使包含關注蛋白質

及一或多種雜質之樣本與一或多個含有親和性介質、AEX 介質、CEX 介質、HIC 介質或混合模式介質之層析管柱在使得關注蛋白質結合至管柱的條件下接觸；(ii) 獲得該樣本之第一洗出液；(iii) 使該第一洗出液以流過模式與下列之一接觸：(a) 含碳材料；及 (b) 含碳材料與 CEX 介質、AEX 介質、混合模式介質及 HIC 介質中之一或多者之組合；及 (iv) 獲得該樣本之第二洗出液；其中相對於該第一洗出液中一或多種雜質之含量而言，該第二洗出液包含較低或減少含量之一或多種雜質。

在又一態樣中，提供一種減少包含關注蛋白質及一或多種雜質之樣本中一或多種雜質之含量的方法，該方法包含以下步驟：(i) 使包含關注蛋白質及一或多種雜質之樣本與含有親和性介質之層析管柱接觸；(ii) 獲得該樣本之第一洗出液；(iii) 使該第一洗出液以流過模式與含碳材料接觸；(iv) 獲得該樣本之第二洗出液；(v) 使該第二洗出液與陰離子交換層析介質接觸；及 (vi) 獲得該樣本之第三洗出液，其中相對於該第一洗出液不與含碳材料接觸時一或多種雜質之含量而言，該第三洗出液包含較低或減少含量之一或多種雜質。

在一些具體實例中，此種方法包括在親和性捕捉步驟之後且在樣本與陰離子交換層析介質接觸之前的 CEX 結合及洗提層析步驟，在一些具體實例中，該陰離子交換層析介質為膜吸附劑。在一些具體實例中，根據所主張之發明方法避免對其他層析步驟（例如在親和性捕捉步驟之後

所用之結合及洗提 CEX 層析步驟) 的需要。例示性市售陰離子交換層析介質為膜吸附劑，諸如 ChromaSorb™ (MILLIPORE 公司，Billerica, MA, USA)、Mustang Q(PALL 公司，Port Washington, NY, USA)、Sartobind Q (SARTORIUS STEDIM, Germany)；以及珠粒介質，諸如 Q Sepharose FF(GE HEALTHCARE, Philadelphia, PA, USA)。

在一些具體實例中，根據所主張之發明的方法採用非基於管柱之層析步驟。

在又一態樣中，提供一種減少包含關注蛋白質之樣本中一或多種雜質之含量的方法，該方法包含以下步驟：(i) 獲得包含該關注蛋白質之蛋白質相；(ii) 使用適合緩衝液來復原該包含關注蛋白質之蛋白質相，從而獲得經復原之蛋白質溶液；(iii) 使該經復原之蛋白質溶液以流過模式與含碳材料接觸；(iv) 獲得包含該關注蛋白質之第一洗出液；(v) 使該第一洗出液與陰離子交換層析介質接觸；及 (vi) 獲得包含該關注蛋白質之第二洗出液，其中相對於得自 (iii) 之該經復原之蛋白質溶液不與含碳材料接觸時一或多種雜質之含量而言，該第二洗出液包含較低或減少含量之一或多種雜質。

在一些具體實例中，此種方法避免對任何結合及洗提層析步驟（例如結合及洗提親和性或 CEX 層析步驟）的需要。

在根據本發明之一些方法中，使用一或多種選自由以下組成之群的方法獲得蛋白質相：沈澱、絮凝、結晶、管

柱層析、使用可溶性小分子、使用聚合配位體、或使用懸浮層析介質。

在一些具體實例中，含碳材料與 AEX 介質、CEX 介質、HIC 介質及混合介質中之一或多者之組合要求混合含碳材料與該等介質中之一或多者。在其他具體實例中，含碳材料與 AEX 介質、CEX 介質、HIC 介質及混合介質中一或多者之組合要求聯合使用組合中之不同材料。

在根據本發明方法之各種具體實例中，親和性介質係選自蛋白質 A 或蛋白質 G。

在一些具體實例中，關注蛋白質為抗體或含 Fc 區之蛋白質。在一些具體實例中，抗體為單株抗體。在其他具體實例中，抗體為多株抗體。

在一些具體實例中，該樣本包含細胞培養物饋料。

在一些具體實例中，該樣本為澄清細胞培養物饋料。

在一些具體實例中，該澄清細胞培養物饋料係經由深度過濾及/或離心獲得。

在一些具體實例中，該澄清細胞培養物係經由用鹽、酸、聚合物或刺激反應性聚合物來沈澱而獲得。

在各種具體實例中，根據所主張之發明的方法中所用之含碳材料為活性碳。在一些具體實例中，活性碳包含活性木炭。

在一些具體實例中，含碳材料與 CEX 介質、AEX 介質、混合模式介質及 HIC 介質中一或多者之組合包含活性碳與 CEX 樹脂、AEX 樹脂、混合模式樹脂及 HIC 樹脂中一或多

者之混合物。在一些具體實例中，將此種混合物填充至層析管柱中。在其他具體實例中，將該混合物填充至圓盤中。在其他具體實例中，將該混合物填充至袋（pod）、濾筒或膠囊中。

在一些具體實例中，將活性碳填充至層析管柱中。在其他具體實例中，將活性碳填充至密封拋棄式裝置中，諸如 Millistak+® Pod 中。在其他具體實例中，將活性碳填充至濾筒或膠囊中。

在一些具體實例中，使活性碳浸滲入多孔材料中，例如將活性碳併入多孔纖維介質中。多孔材料可容納在管柱、圓盤、Millistak+® Pod、濾筒或膠囊內。在一些具體實例中，將活性碳填充入纖維素介質中。

在一個特定具體實例中，AEX 介質為具有包含一或多種聚合一級胺或其共聚物之表面塗層的膜。

在一些具體實例中，在對包含關注蛋白質及一或多種雜質之樣本進行親和性捕捉步驟之前，使該樣本與活性碳接觸。在其他具體實例中，在親和性捕捉步驟之後使樣本與活性碳接觸。

在根據所主張之發明的各種方法中，使用採用活性碳之製程時，關注蛋白質之產率損失小於總蛋白質之量之 20%。換言之，根據所主張之發明的製程產生 80% 或 80% 以上關注蛋白質之產率，其中 100% 為總蛋白質之量。在另一具體實例中，使用採用活性碳之製程時關注蛋白質之產率損失小於 10%。換言之，根據所主張之發明之製程產生 90%

或 90%以上關注蛋白質之產率，其中 100%為總蛋白質之量。

在一個特定具體實例中，在用於自樣本（例如洗出液，諸如自流過式純化步驟之前所進行的結合及洗提層析捕捉製程步驟中回收之蛋白質 A 洗出液）中純化目標分子（例如含 Fc 區之蛋白質或抗體）之方法中，使用活性碳作為流過式純化製程步驟或單元操作之一部分。在此種流過式純化製程步驟或單元操作中，得自結合及洗提層析步驟（例如蛋白質 A 親和性管柱）之洗出液依序流過活性碳及 AEX 介質及 CEX 介質及病毒過濾器，如圖 19 中所描述。在一些具體實例中，在 AEX 步驟與 CEX 步驟之間進行溶液變化（例如 pH 值變化），其中該溶液採用線內靜態混合器及/或緩衝槽。在一些具體實例中，如本文所述採用活性碳之流過式純化製程步驟或單元操作為用於純化目標分子之連續製程的一部分，其中該流過式純化步驟與該流過式純化步驟之上游製程步驟（例如結合及洗提層析捕捉步驟）及下游製程步驟（例如調配步驟）流體連通，從而使液體樣本能夠連續流過該製程。

在一個特定具體實例中，整個流過製程步驟或單元操作採用單一制動器(skid)（亦即控制/監控設備）。

【實施方式】

本發明提供用於自含有關注蛋白質及一或多種雜質之樣本中純化關注蛋白質的新穎及經改良之方法。

活性碳先前已用於水純化製程。另外，活性碳已用於自血清白蛋白中移除小分子雜質，諸如脂肪酸及膽紅素（參

看例如 Chen 等人, J. Biol. Chem., 242: 173-181 (1967); Nakano 等人, Anal Biochem., 129: 64-71 (1983); Nikolaev 等人, Int. J. Art. Org., 14:179-185 (1991))。活性碳亦已用於在植物病毒純化期間移除顏料以及宿主蛋白質、蛋白酶及核糖核酸酶 (參看例如 Price, Am. J. Botany, 33: 45-54 (1946); Corbett, Virology, 15:8-15 (1961); McLeana 等人, Virology, 31: 585-591 (1967))。

因此, 一般而言, 已報導活性碳非特異性地結合溶液中之分子 (例如水樣本中之雜質)。

本發明至少部分係基於一項意外及驚人之發現, 即活性碳可選擇性地移除蛋白質雜質及 DNA 群體, 從而使其適用於經由在細胞中重組表現來純化所產生之蛋白質。

如本文之實施例中所論證, 活性碳可用於在蛋白質純化製程期間選擇性地移除宿主細胞蛋白質 (HCP) 及 DNA 雜質而不顯著影響目標蛋白質之產率。此外, 如本文所述之實施例中所論證, 當在蛋白質純化製程中以流過模式使用活性碳 (單獨或呈與一或多種不同類型層析介質之混合物形式) 時, 引起含蛋白質之樣本中一或多種雜質之含量顯著減少以及減少下游層析管柱之負荷。此外, 在某些情況下, 活性碳減少純化製程中可能使用之步驟的數目, 從而減少總體操作成本並節約時間。此外, 如本文所述之實施例中所論證, 活性碳可在捕捉步驟之前或之後使用, 從而減少含有關注蛋白質之樣本中一或多種雜質之含量。

在本文所述之一些具體實例中, 活性碳用於純化目標

分子之整個製程之流過式純化步驟中，其中整個製程以及流過式純化步驟以連續方式進行。

為了能更容易地理解本發明，首先定義某些術語。其他定義在整個實施方式中加以闡述。

I. 定義

如本文所用之術語「含碳材料(carbonaceous material)」係指由碳構成或含有碳的任何物質。在一些具體實例中，根據所主張之發明的方法中所用之含碳材料為活性碳(active carbon)或活性碳(activated carbon)。在一些具體實例中，活性碳包含活性木炭。在一些具體實例中，將活性碳併入纖維素介質中。

如本文中可互換使用之術語「活性碳(active carbon)」或「活性碳(activated carbon)」係指已進行用於增強其孔結構之製程的含碳材料。活性碳為具有極高表面積之多孔固體。其可來源於多種來源，包括煤、木材、椰子皮、堅果殼及泥炭。活性碳可使用涉及在控制氛圍下加熱之物理活化或使用強酸、鹼或氧化劑之化學活化而由此等材料製造。活化製程產生具有高表面積之多孔結構，該種結構賦予活性碳以較高雜質移除容量。活化製程可經改進以控制表面之酸度。

典型活化製程涉及對碳來源，諸如樹脂廢物、煤、煤焦炭、石油焦、褐煤、聚合材料及木質素纖維材料(包括紙漿及紙張)、紙漿製造殘餘物、木材(如木材碎片、鋸屑及木屑)、堅果殼(如杏殼及椰子殼)、核仁及果核(如橄

欖核及櫻桃核) 進行熱製程(例如用氧化氣體)或化學製程(例如用磷酸或金屬鹽, 諸如氯化鋅)。利用磷酸(H_3PO_4)進行之基於木材之碳之例示性化學活化揭示於美國專利第 Re.31,093 號中, 此活化使得碳脫色及氣體吸附能力得以改良。此外, 美國專利第 5,162,286 號教示基於木材之材料的磷酸活化, 該材料特別緻密且含有相對較高(30%)之木質素含量, 諸如堅果殼、果核及核仁。木質素纖維素材料之磷酸活化亦論述於美國專利第 5,204,310 號中, 作為製備具有高活性及高密度之碳的步驟。此段落中所列出之各專利的教示內容係以全文引用的方式併入本文中。

與大多數其他吸附材料相反, 據信活性碳使用相對較弱之凡得瓦爾力(van der Waals)或倫敦色散力(London dispersion force)與分子相互作用。典型市售活性碳產物展現至少 $300 \text{ m}^2/\text{g}$ 之表面積, 如藉由基於氮吸附之布魯諾-埃梅特-特勒(Brunauer-Emmett-Teller;「BET」)方法所量測, 該方法在此項技術中為熟知方法。

雖然活性碳或活性碳先前已用於純化液體及氣體之製程中, 但先前尚未用於自一或多種蛋白質雜質中純化重組表現之蛋白質的製程中。

術語「免疫球蛋白(immunoglobulin)」、「Ig」或「IgG」或「抗體」(本文中可互換使用)係指具有由兩個重鏈及兩個輕鏈組成之基礎四多肽鏈結構的蛋白質, 該等鏈由例如鏈間雙硫鍵加以穩定, 該蛋白具有特異性結合抗原的能力。術語「單鏈免疫球蛋白(single-chain immunoglobulin)」

或「單鏈抗體 (single-chain antibody)」(本文中可互換使用) 係指具有由一個重鏈及一個輕鏈組成之雙多肽鏈結構的蛋白質，該等鏈由例如鏈間肽連接子加以穩定，該蛋白具有特異性結合抗原的能力。術語「結構域 (domain)」係指包含肽環 (例如包含 3 至 4 個肽環) 之重鏈或輕鏈多肽之球狀區域，該等鏈由例如 β -摺疊片及/或鏈內雙硫鍵加以穩定。結構域在本文中基於「恆定」結構域情況下不同類別成員之結構域內序列變化之相對缺乏或在「可變」結構域情況下不同類別成員之結構域內之顯著變化而進一步被稱為「恆定」或「可變」。抗體或多肽「結構域」在此項技術中通常可互換地稱為抗體或多肽「區域 (region)」。抗體輕鏈之「恆定」域可互換地稱為「輕鏈恆定區」、「輕鏈恆定域」、「CL」區或「CL」域。抗體重鏈之「恆定」域可互換地稱為「重鏈恆定區」、「重鏈恆定域」、「CH」區或「CH」域。抗體輕鏈之「可變」域可互換地稱為「輕鏈可變區」、「輕鏈可變域」、「VL」區或「VL」域。抗體重鏈之「可變」域可互換地稱為「重鏈可變區」、「重鏈可變域」、「VH」區或「VH」域。

免疫球蛋白或抗體可為單株或多株，且可以單體或聚合形式存在，例如以五聚體形式存在之 IgM 抗體及/或以單體、二聚體或多聚體形式存在之 IgA 抗體。免疫球蛋白或抗體亦可包括多特異性抗體 (例如雙特異性抗體) 及抗體片段，只要其保留或經修飾而包含配位體特異性結合域即可。術語抗體之「片段 (fragment)」或「功能片段 (functional

fragment)」係指與完整或完全抗體或抗體鏈相比包含較少胺基酸殘基的抗體或抗體鏈部分。片段可經由完整或完全抗體或抗體鏈之化學或酶促處理而獲得。片段亦可藉由重組手段獲得。當重組產生時，片段可單獨或作為較大蛋白質（稱為融合蛋白）之部分而得以表現。例示性片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc 及/或 Fv 片段。例示性融合蛋白包括 Fc 融合蛋白。

在一個特定具體實例中，根據所主張之發明的方法用於純化抗體片段，該抗體片段為含有 Fc 區之片段。

術語「Fc 區 (Fc region)」及「含有 Fc 區之蛋白質 (Fc region containing protein)」意謂蛋白質含有免疫球蛋白之重鏈及/或輕鏈恆定區或域（如先前定義之 CH 及 CL 區）。含有「Fc 區」之蛋白質可具有免疫球蛋白恆定域之效應功能。「Fc 區」（諸如 CH₂/CH₃ 區）可選擇性地結合至親和性配位體，諸如蛋白質 A 或其功能變異體。在一些具體實例中，含有 Fc 區之蛋白質特異性地結合蛋白質 A 或其功能衍生物、變異體或片段。在其他具體實例中，含有 Fc 區之蛋白質特異性地結合蛋白質 G 或蛋白質 L、或其功能衍生物、變異體或片段。

如上文所論述，在一些具體實例中，目標蛋白質為含有 Fc 區之蛋白質，例如免疫球蛋白。在一些具體實例中，含有 Fc 區之蛋白質為重組蛋白質，其包括與另一多肽或其片段融合之免疫球蛋白之 Fc 區。

一般而言，免疫球蛋白或抗體針對相關「抗原」。抗原

較佳為生物學上重要之多肽，且向罹患疾病或病症之哺乳動物投予抗體可在該哺乳動物中產生治療益處。

如本文可互換使用之術語「單株抗體 (monoclonal antibody)」或「Mab」係指獲自實質上均質之抗體群體的抗體，亦即，該群體中之個別抗體除可少量存在之可能天然存在之突變以外為相同的。單株抗體對單一抗原性位點具有高特異性。此外，與典型地包括針對不同決定子（抗原決定基）之不同抗體的習知（多株）抗體製劑相反，各單株抗體針對抗原上之單一決定子。修飾語「單株」指示抗體在獲自實質上均質之抗體群體時的特徵，且不應被視為需要藉由任何特定方法產生抗體。例如，根據本發明使用之單株抗體可藉由 Kohler 等人，Nature 256:495 (1975) 中首次描述之融合瘤法來製造，或可藉由重組 DNA 法（參看例如美國專利第 4,816,567 號）來製造。亦可使用 Clackson 等人，Nature 352:624-628 (1991) 及 Marks 等人，J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) 中所述之技術自噬菌體抗體庫分離「單株抗體」。

單株抗體可進一步包括「嵌合」抗體（免疫球蛋白），其中一部分重鏈及/或輕鏈與源自特定物種或屬於特定抗體種類或亞類之抗體中的相應序列一致或同源，而該（等）鏈之其餘部分與源自另一物種或屬於另一抗體種類或亞類之抗體中的相應序列一致或同源；以及該等抗體之片段，只要其展現出所要生物活性即可（美國專利第 4,816,567 號；及 Morrison 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA

81:6851-6855 (1984))。

術語「高變區 (hypervariable region)」在用於本文時係指負責抗原結合之抗體的胺基酸殘基。高變區包含來自「互補決定區」或「CDR」之胺基酸殘基 (亦即輕鏈可變域中之殘基 24 至 34 (L1)、50 至 56 (L2) 及 89 至 97 (L3)，以及重鏈可變域中之殘基 31 至 35 (H1)、50 至 65 (H2) 及 95 至 102 (H3)；Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) 及/或來自「高變環」之殘基 (亦即輕鏈可變域中之殘基 26 至 32 (L1)、50 至 52 (L2) 及 91 至 96 (L3)，以及重鏈可變域中之殘基 26 至 32 (H1)、53 至 55 (H2) 及 96 至 101 (H3)；Chothia 及 Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。「構架」或「FR」殘基為除如本文所定義之高變區殘基以外的可變域殘基。

非人類 (例如鼠類) 抗體之「人類化」形式為嵌合抗體，其含有源自非人類免疫球蛋白之最小序列。對大多數而言，人類化抗體為人類免疫球蛋白 (受體抗體)，其中受體之高變區殘基被替換為來自諸如小鼠、大鼠、兔子或非人類靈長類動物之非人類物種 (供體抗體) 的具有所要特異性、親和性及容量之高變區殘基。在一些情況下，人類免疫球蛋白之 Fv 構架區 (FR) 殘基被替換為相應非人類殘基。此外，人類化抗體可包含受體抗體或供體抗體中未見之殘基。進行此等修飾以進一步改進抗體效能。一般而言，

人類化抗體將包含實質上所有至少一個且典型地兩個可變域，其中所有或實質上所有高變環對應於非人類免疫球蛋白之高變環，且所有或實質上所有 FR 區為人類免疫球蛋白序列之 FR 區。人類化抗體可包含至少一部分免疫球蛋白恆定區 (Fc)，典型地為人類免疫球蛋白之恆定區。關於其他細節，參看 Jones 等人，*Nature* 321:522-525 (1986)；Riechmann 等人，*Nature* 332:323-329 (1988)；及 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。

本文中可互換使用之術語「聚核苷酸 (polynucleotide)」及「核酸分子 (nucleic acid molecule)」係指任何長度之多聚形式之核苷酸 (核糖核苷酸或脫氧核糖核苷酸)。此等術語包括單股、雙股或三股 DNA、基因體 DNA、cDNA、RNA、DNA-RNA 雜合體、或包含嘌呤及嘧啶鹼基或其他天然、經化學或生物化學修飾、非天然或衍生化核苷酸鹼基之聚合物。聚核苷酸之主鏈可包含糖及磷酸酯基 (如典型地可在 RNA 或 DNA 中所見) 或經修飾或取代之糖或磷酸酯基。另外，雙股聚核苷酸可藉由合成互補股且在適當條件下將該等股黏接或藉由使用 DNA 聚合酶與適當引子重新合成互補股而獲自化學合成之單股聚核苷酸產物。核酸分子可呈現許多不同形式，例如基因或基因片段、一或多個外顯子、一或多個內含子、mRNA、cDNA、重組聚核苷酸、分枝聚核苷酸、質體、載體、任何序列之分離 DNA、任何序列之分離 RNA、核酸探針及引子。聚核苷酸可包含經修飾之核苷酸，諸如甲基化核苷酸及核苷酸類似物、尿嘧啶、其他

糖及鍵聯基團（諸如氟代核糖及硫代酸酯）及核苷酸分枝。如本文所用之「DNA」或「核苷酸序列」不僅包括鹼基 A、T、C 及 G，而且包括此等鹼基之類似物或經修飾形式中之任一者，諸如甲基化核苷酸、核苷酸間修飾（諸如不帶電鍵聯及硫代酸酯）、使用糖類似物、及經修飾及/或替代性主鏈結構，諸如聚醯胺。

如本文所用之術語「溶液（solution）」、「組成物（composition）」或「樣本（sample）」係指關注蛋白質或目標蛋白質（例如含有 Fc 區之蛋白質，諸如抗體）與一或多種雜質之混合物。在一些具體實例中，在進行根據所主張之發明的方法之前，對樣本進行澄清步驟。在一些具體實例中，樣本包含細胞培養物饋料，例如來自哺乳動物細胞培養物（例如 CHO 細胞）之饋料。然而，樣本亦涵蓋用於產生關注蛋白質之非哺乳動物表現系統。

如本文所用之術語「非哺乳動物表現系統（non-mammalian expression system）」係指用於產生治療性蛋白質之所有宿主細胞或生物體，其中該等宿主細胞或生物體具有非哺乳動物來源。非哺乳動物表現系統之非限制性實例為大腸桿菌（*E. coli*）及畢赤酵母（*Pichiapastoris*）。

如本文所用之術語「UV 活性物質」係指使澄清細胞培養物通過蛋白質 A 分析管柱後該培養物之流過洗提份之組成物，如藉由 UV 分光光度計所監測。在一些具體實例中，UV 分光光度計監測 280 nm 下之洗提份。此洗提份一般由雜質組成，諸如染料（諸如 pH 值指示劑）、宿主細胞蛋白

質、DNA 及需要自該洗提份中移除的其他細胞培養介質組分，該洗提份亦含有關注蛋白質（例如抗體）。人工或藉由預設算法對流過雜質峰進行積分，且用於對總雜質含量進行定量。

如本文所用之術語「多肽（polypeptide）」一般係指具有超過約 10 個胺基酸之肽及蛋白質。如本文中可互換使用之術語「關注蛋白質（protein of interest）」及「目標蛋白質（target protein）」係指蛋白質或多肽，包括但不限於含有 Fc 區之蛋白質，諸如欲藉由本發明方法自一或多種雜質中純化之抗體。

例示性多肽包括例如腎素；生長激素，包括人類生長激素及牛生長激素；生長激素釋放因子；甲狀旁腺激素；促甲狀腺激素；脂蛋白； α -1-抗胰蛋白酶；胰島素 α -鏈；胰島素 β -鏈；胰島素原；促濾泡激素；降鈣素；促黃體生成激素；高血糖素；凝血因子，諸如因子 VIIIC、因子 IX、組織因子及溫韋伯氏因子（von Willebrands factor）；抗凝血因子，諸如蛋白質 C；心房利尿鈉因子；肺表面活性劑；血纖維蛋白溶酶原活化劑，諸如尿激酶或人尿或組織型血纖維蛋白溶酶原活化劑（t-PA）；鈐蟾肽（bombesin）；凝血酶；造血生長因子；腫瘤壞死因子- α 及腫瘤壞死因子- β ；腦啡肽酶；RANTES（對正常 T 細胞表現及分泌之活化進行調節）；人類巨噬細胞發炎性蛋白（MIP-1- α ）；血清白蛋白，諸如人血清白蛋白；苗勒氏抑制物質（Muellerian-inhibiting substance）；鬆弛素 α -鏈；鬆弛素 β -鏈；鬆弛素原；小鼠促

性腺激素結合肽；微生物蛋白質，諸如 β -內醯胺酶；DNase；IgE；細胞毒性 T-淋巴球結合抗原 (CTLA)(例如 CTLA-4)；抑制素；活化素；血管內皮生長因子 (VEGF)；激素或生長因子受體；蛋白質 A 或 D；類風濕因子；神經營養因子，諸如骨源性神經營養因子 (BDNF)、神經營養因子-3、神經營養因子-4、神經營養因子-5 或神經營養因子-6 (NT-3、NT-4、NT-5 或 NT-6) 或神經生長因子，諸如 NGF- β ；血小板衍生生長因子 (PDGF)；纖維母細胞生長因子，諸如 α FGF 及 β FGF；表皮生長因子 (EGF)；轉型生長因子 (TGF)，諸如 TGF- α 及 TGF- β ，包括 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4 或 TGF- β 5；胰島素樣生長因子-I 及胰島素樣生長因子-II (IGF-I 及 IGF-II)；des(I-3)-IGF-I (腦 IGF-I)、胰島素樣生長因子結合蛋白 (IGFBP)；CD 蛋白，諸如 CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD34 及 CD40；紅血球生成素；骨生成誘導因子；免疫毒素；骨形態生成蛋白 (BMP)；干擾素，諸如干擾素- α 、干擾素- β 或干擾素- γ ；群落刺激因子 (CSF)，例如 M-CSF、GM-CSF 及 G-CSF；介白素 (IL)，例如 IL-1 至 IL-10；過氧化物歧化酶；T 細胞受體；表面膜蛋白；促衰變因子；病毒抗原，諸如 AIDS 被膜之一部分；轉運蛋白；歸巢受體；地址素；調節蛋白；整合素，諸如 CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4 及 VCAM；腫瘤相關抗原，諸如 HER2、HER3 或 HER4 受體；及上文所列出之多肽中任一者之片段及/或變異體。另外，本發明之蛋白質或多肽為特異性結合至上文所列出之多肽中任一

者的抗體、其片段或變異體。

如本文可互換使用之術語「污染物(contaminant)」、「雜質(impurity)」及「碎屑(debris)」係指任何外來或不適宜分子，包括生物高分子，諸如 DNA、RNA、一或多種宿主細胞蛋白質(HCP)、內毒素、脂質及在含有目標蛋白質之樣本中可能存在之一或多種添加劑，該目標蛋白質係使用本發明方法自一或多種外來或不適宜分子中分離。此外，此種污染物可包括可在純化製程之前進行之步驟中使用或產生的任何試劑，諸如在採用蛋白質 A 親和性層析步驟情況下之經浸析蛋白質 A。

術語「中國倉鼠卵巢細胞蛋白質(Chinese hamster ovary cell protein)」及「CHOP」可互換用於指代源自中國倉鼠卵巢(「CHO」)細胞培養物之宿主細胞蛋白質(「HCP」)之混合物。HCP 或 CHOP 一般作為雜質存在於包含關注蛋白質(諸如 CHO 細胞中所表現之抗體或免疫黏附素)之細胞培養基或溶胞物(例如所收集之細胞培養液(「HCCF」))中。包含關注蛋白質之混合物中所存在之 CHOP 之量提供關注蛋白質之純度的量度。HCP 或 CHOP 包括但不限於由宿主細胞(諸如 CHO 宿主細胞)表現之關注蛋白質。典型地，蛋白質混合物中 CHOP 之量表現為相對於混合物中關注蛋白質之量的百萬分率。應理解，在宿主細胞為另一細胞類型(例如除 CHO 以外之哺乳動物細胞、大腸桿菌、酵母、昆蟲細胞或植物細胞)的情況下，HCP 係指宿主細胞溶胞物中所發現之除目標蛋白質以外的蛋白質。

術語「百萬分率 (parts per million)」或「ppm」在本文中可互換用於指代藉由本發明方法加以純化之目標蛋白質之純度的量度。單位 ppm 係指 HCP 或 CHOP 以奈克/毫克關注蛋白質或毫克/毫升為單位之量，亦即 $\text{CHOP ppm} = (\text{CHOP ng/ml})/(\text{關注蛋白質 mg/ml})$ ，其中該等蛋白質處於溶解狀態。

如本文可互換使用之術語「純化 (purifying)」、「分離 (separating)」或「分離 (isolating)」係指提高包含關注蛋白質及一或多種雜質之組成物或樣本中相關多肽或蛋白質或目標蛋白質之純度。典型地，藉由自組成物中移除（完全或部分）至少一種雜質來提高關注蛋白質之純度。「純化步驟」可為產生「均質」組成物或樣本之整個純化製程之一部分，「均質」組成物或樣本在本文中用於指代在包含關注蛋白質之組成物中包含以下之組成物或樣本：少於 100 ppm HCP，或者少於 90 ppm、少於 80 ppm、少於 70 ppm、少於 60 ppm、少於 50 ppm、少於 40 ppm、少於 30 ppm、少於 20 ppm、少於 10 ppm、少於 5 ppm 或少於 3 ppm HCP。

如本文所用之術語「蛋白質相 (protein phase)」係指樣本之一部分，其中目標蛋白質之濃度相對於樣本中目標蛋白質之初始濃度已實質上提高。濃縮製程可涉及在固體多孔或非多孔載體上的蛋白質吸附；液體-空氣或液體-氣體界面處的蛋白質吸附；兩種不可混溶或部分混溶之液體之間的界面處的蛋白質吸附；蛋白質作為純組分或由於與一或多種其他分子或聚合物形成複合物而沈澱；或使用蛋白

質結晶。

如本文所用之術語「液相 (liquid phase)」係指樣本之一部分，其中目標蛋白質之濃度與樣本中蛋白質之初始濃度相比已實質上降低。液相可與上文定義之蛋白質相同時產生。

如本文可互換使用之術語「流過製程 (flow-through process)」、「流過模式 (flow-through mode)」及「流過層析 (flow-through chromatography)」係指一種產物分離技術，其中樣本中至少一種產物意欲流過層析樹脂或介質，而至少一種潛在組分結合至層析樹脂或介質。

意欲流過之樣本一般稱為「移動相」。「流過模式」一般為同溶劑操作（亦即期間移動相組成不變之層析製程）。流過所用之介質通常用含有目標蛋白質分子之相同緩衝溶液進行預平衡。純化後，可用額外量之相同緩衝液沖洗介質以增加產物回收率。在一些具體實例中，「流過模式」之移動相為含有相關產物之細胞培養物饋料。在一些情況下，調節饋料之 pH 值或電導率以便將使用流過製程之雜質移除率最大化。

在根據所主張之方法且如本文所述之實施例中所述之一些具體實例中，該等方法採用以流過模式進行之陰離子交換步驟。

如本文可互換使用之術語「結合及洗提模式 (bind and elute mode)」及「結合及洗提製程 (bind and elute process)」係指一種產物分離技術，其中樣本中所含之至少一種產物

結合至層析樹脂或介質且隨後洗提。

術語「層析 (chromatography)」係指將相關分析物 (例如含有 Fc 區之蛋白質，諸如免疫球蛋白) 自混合物中所存在之其他分子中分離的任何種類之技術，其中相關分析物由於混合物之個別分子在移動相影響下或在結合及洗提製程中遷移通過固定介質之速率差異而與其他分子分離。

術語「層析樹脂 (chromatography resin)」或「層析介質 (chromatography media)」在本文中可互換使用且係指任何種類之多孔或非多孔固相，其將相關分析物 (例如含有 Fc 區之蛋白質，諸如免疫球蛋白) 自混合物中所存在之其他分子中分離。通常，相關分析物由於混合物之個別分子在移動相影響下或在結合及洗提製程中遷移通過固定固相之速率差異而與其他分子分離。非限制性實例包括具有陽離子、陰離子、HIC 或混合模式表面改質之樹脂；具有陽離子、陰離子、HIC 或混合模式表面改質之膜；具有陽離子、陰離子、HIC 或混合模式表面改質之編織或非編織纖維；及具有陽離子、陰離子、HIC 或混合模式表面改質之整體料。

如本文所用之術語「親和性分離 (affinity separation)」或「親和性純化 (affinity purification)」係指涉及使含有目標分析物 (例如含有 Fc 區之蛋白質，諸如免疫球蛋白) 之樣本與已知可結合目標分析物之親和性介質 (例如上面攜帶已知可結合分析物之親和性配位體 (諸如蛋白質 A 或其變異體) 的固體載體) 接觸的任何純化或分析技術。

如本文可互換使用之術語「親和性層析法 (affinity

chromatography)」及「蛋白質親和性層析法 (protein affinity chromatography)」係指一種蛋白質分離技術，其中目標蛋白質（例如含有 Fc 區之關注蛋白質或抗體）特異性結合至目標蛋白質特異性配位體。在一些具體實例中，此種配位體為蛋白質 A 或蛋白質 G 或其功能變異體，其共價附著於層析固相材料上且可在溶液接觸層析固相材料時接近溶液中之目標蛋白質。目標蛋白質在層析步驟期間一般保留其對配位體之特異性結合親和力，而混合物中之其他溶質及 / 或蛋白質不會顯著或特異性地結合配位體。目標蛋白質與固定配位體之結合使得污染蛋白質或蛋白質雜質穿過層析介質，而目標蛋白質保持特異性結合於固相材料上之固定配位體。接著在適宜條件下（例如低 pH 值、高 pH 值、高鹽、競爭配位體等）將特異性結合之目標蛋白質以活性形式自固定配位體上移除，且穿過具有洗提緩衝液之層析管柱，該洗提緩衝液不含允許較早穿過管柱之污染蛋白質或蛋白質雜質。任何組分均可用作配位體以便純化其各別特異性結合蛋白質，例如抗體。然而，在根據本發明之各種方法中，使用蛋白質 A 作為含有 Fc 區之目標蛋白質或抗體的配位體。目標蛋白質（例如含有 Fc 區之蛋白質）自配位體（例如蛋白質 A）洗提之條件可由一般技術者容易地確定。在一些具體實例中，蛋白質 G 或功能變異體可用作配位體。在一些具體實例中，配位體（諸如蛋白質 A）以 5 至 9 之 pH 值範圍使用以便結合於含有 Fc 區之蛋白質、洗滌或再平衡配位體 / 目標蛋白質結合物，接著用 pH 值為約 4

或低於 4 之緩衝液進行洗提。

雖然親和性層析法特定用於結合關注蛋白質，但採用諸如蛋白質 A 及蛋白質 G 之配位體之使用的親和性層析法傾向於相當昂貴，且非特異性材料（例如一或多種雜質）快速沾污層析管柱在工業上會造成巨大問題。本發明方法藉由使用可藉由自樣本中移除一或多種該等非特異性材料來減輕層析管柱之負荷的材料（例如活性碳）而提供此問題之解決方案，從而降低總成本，並且延長管柱壽命。此外，根據所主張之發明的一些方法使得在親和性層析步驟之後使用較少層析步驟，從而提高總製程效率。

在重組產生之蛋白質的多步驟純化中，在製程早期將目標蛋白質自細胞培養液中所存在之可溶性雜質之各種不同陣列中分離通常有利。此分離可藉由目標蛋白質之層析捕捉或藉由目標蛋白質之非層析分離來達成。

如本文所用之層析「捕捉」步驟由使目標蛋白質結合於恰好定位於由細菌醱酵或由細胞培養物表現產生之所收集原料下游的層析介質組成。典型地，所收集之原料為澄清的，然而捕捉亦可由未澄清原料實現。此步驟之主要功能在於使用可能最少量之樹脂結合來自溶液之目標蛋白質，同時允許雜質流過。接著將目標蛋白質洗提至顯著較小體積之緩衝液中以便進一步下游處理。選擇具有動態結合容量、物質回收及目標生物活性保留之最佳組合的層析介質。對於含有 Fc 結合區之抗體，通常使用親和性層析介質，諸如基於蛋白質 A 或蛋白質 G 之介質。

用於捕捉之層析介質係選自包含多孔樹脂、膜、整體料、編織或非編織多孔材料之群。

目標蛋白質之非層析分離可藉由一或多個以下步驟來實現：固體多孔或非多孔載體上的蛋白質吸附；液體-空氣或液體-氣體界面處的蛋白質吸附；兩種不可混溶或部分混溶液體之間的界面處之蛋白質吸附；蛋白質作為純組分或由於與一或多種其他分子或聚合物形成複合物而沈澱；或使用蛋白質結晶。

術語「離子交換 (ion-exchange)」及「離子交換層析 (ion-exchange chromatography)」係指層析製程，其中混合物中之相關溶質或分析物（例如含有 Fc 區之目標蛋白質）與藉由例如共價連接而鍵聯於固相離子交換材料之帶電化合物相互作用，使得相關溶質或分析物與混合物中之溶質雜質或污染物相比在更大或更小程度上與帶電化合物非特異性地相互作用。混合物中之污染性溶質與相關溶質相比更快或更慢地自離子交換材料管柱洗提，或者相對於相關溶質結合於樹脂或自樹脂中排除。特定言之，「離子交換層析」包括陽離子交換層析、陰離子交換層析及混合模式離子交換層析。舉例而言，陽離子交換層析可結合目標分子（例如含有 Fc 區之目標蛋白質），接著洗提（陽離子交換結合及洗提層析或「CIEX」），或可主要結合雜質，而目標分子「流過」管柱（陽離子交換流過型層析 FT-CIEX）。陰離子交換層析可結合目標分子（例如含有 Fc 區之目標蛋白質），接著洗提，或可主要結合雜質，而目標分子「流過」

管柱。在一些具體實例中且如本文所述之實施例中所顯示，以流過模式進行陰離子交換層析步驟。在一個特定具體實例中，陰離子交換層析步驟採用多孔吸附性介質之使用，該介質包含多孔基材及處於該基材上之多孔塗層，其中該塗層包含一或多種聚合一級胺或其共聚物。

如本文所用之術語「混合模式層析 (mixed-mode chromatography)」或「多模式層析 (multi-modal chromatography)」係指採用攜帶至少兩種各自能夠與關注分子相互作用之不同類型官能基之層析固定相的製程。混合模式層析介質之一個實例為 Capto™ Adhere (GE Healthcare)，其為一種 AEX 混合模式樹脂。混合模式層析一般採用與目標蛋白質及/或雜質具有超過一種相互作用模式之配位體。配位體典型地包括至少兩個不同但合作性位點，該等位點與欲結合物質相互作用。舉例而言，此等位點之一可與相關物質具有電荷-電荷型相互作用，而另一位點可與相關物質具有電子受體-供體型相互作用及/或疏水性及/或親水性相互作用。電子供體-受體相互作用類型包括氫鍵結、 π - π 、陽離子- π 、電荷轉移、偶極子-偶極子及誘導偶極子相互作用。一般而言，基於相互作用總和之差異，目標蛋白質與一或多種雜質可在一定範圍的條件下分離。

如本文所用之術語「疏水性相互作用層析 (hydrophobic interaction chromatography)」或「HIC」係指基於分子之疏水性（亦即其自水溶液中吸附至疏水性表面的能力）而分離分子的製程。HIC 與逆相 (RP) 層析的不同之處通常在

於，與 RP 樹脂相比經特別設計之 HIC 樹脂典型地具有較低疏水性或疏水性配位體密度。

HIC 層析典型地依賴於溶質分子表面上之疏水性基團之差異。此等疏水性基團傾向於結合至不溶性基質表面上之疏水性基團。由於 HIC 採用與逆相液相層析相比更具極性、較少變性之環境，因此其用於蛋白質純化（通常與離子交換或凝膠過濾層析組合）之流行度正在增加。

術語「離子交換樹脂 (ion exchange resin)」、「離子交換介質 (ion exchange media)」及「離子交換材料 (ion exchange material)」係指帶負電（亦即陽離子交換樹脂）或帶正電（亦即陰離子交換樹脂）之固相。電荷可藉由使一或多種帶電配位體附著於固相（例如藉由共價鍵聯或非共價塗佈或吸附）來提供。作為替代方案，或另外，電荷可為固相之固有性質。

如本文所用之術語「CEX」、「陽離子交換介質 (cation exchange media)」、「陽離子交換樹脂 (cation exchange resin)」及「陽離子交換材料 (cation exchange material)」係指帶負電且因此具有自由陽離子以供與穿越或穿過固相之水溶液中之陽離子進行交換的固相。附著於固相形成陽離子交換樹脂之帶負電配位體可為（例如）羧酸根或磺酸根。市售陽離子交換樹脂包括羧基-甲基-纖維素、固定於瓊脂糖上之磺丙基 (SP)（例如得自 Pharmacia 之 SP-SEPHAROSE FAST FLOW™ 或 SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™）及固定於瓊脂糖上之磺醯基（例如得自

Pharmacia 之 S-SEPHAROSE FAST FLOW™)。

如本文所用之術語「混合模式介質 (mixed mode media)」、「混合模式樹脂 (mixed mode resin)」及「混合模式離子交換樹脂 (mixed mode ion exchange resin)」係指用陽離子、陰離子及疏水性部分進行共價改質之固相。市售混合模式離子交換樹脂為含有弱陽離子交換基團、低濃度陰離子交換基團及附著於矽膠固相載體基質之疏水性配位體的 BAKERBOND ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.)。

如本文所用之術語「HIC 介質 (HIC media)」或「HIC 樹脂 (HIC resin)」或「HIC 材料」係指用於 HIC 分離之層析材料。HIC 介質通常源自於經疏水性配位體 (諸如短脂族或芳族基團) 改質之多孔層析樹脂。HIC 介質之實例包括丁基瓊脂糖 FF 及苯基瓊脂糖 FF，兩者均購自 GE Healthcare。市售 HIC 樹脂之其他實例包括 Fractogel® Phenyl 及 Fractogel® Propyl (MERCK KGa, Darmstadt, Germany)、Butyl Sepharose® 及 Phenyl Sepharose® (GE HEALTHCARE)。

如本文所用之術語「AEX」、「陰離子交換介質 (anion exchange media)」、「陰離子交換樹脂 (anion exchange resin)」及「陰離子交換材料 (anion exchange material)」係指帶正電 (例如具有一或多個附著於其之帶正電配位體，諸如一級胺基、二級胺基、三級胺基或四級胺基) 之固相。市售陰離子交換樹脂包括 DEAE 纖維素、QAE SEPHADEX™ 及 FAST Q SEPHAROSE™ (PHARMACIA)。

術語「蛋白質 A (Protein A)」及「ProA」在本文中可互換使用且涵蓋自其天然來源回收之蛋白質 A、合成產生之蛋白質 A (例如藉由肽合成或藉由重組技術) 及其保留結合蛋白質之能力的變異體，該等變異體具有 CH_2/CH_3 區，諸如 Fc 區。蛋白質 A 可購自 Repligen、GE Healthcare 及 Lonza。蛋白質 A 一般固定在固相載體材料上。術語「ProA」亦係指含有共價附著於蛋白質 A 之層析固體載體基質的親和性層析樹脂或管柱。

根據本發明方法中所用之蛋白質 A 之功能衍生物、片段或變異體的特徵在於對於小鼠 IgG2a 或人類 IgG1 之 Fc 區，結合常數為至少 $K = 10^{-8} \text{ M}$ ，且較佳為 $K = 10^{-9} \text{ M}$ 。順應該結合常數值之相互作用在本發明內容中稱為「高親和性結合」。蛋白質 A 之該功能衍生物或變異體較佳包含選自天然結構域 E、D、A、B、C 之野生型蛋白質 A 的功能 IgG 結合域之至少一部分或其保留 IgG 結合功能性之工程改造突變體。

根據本發明之「污染蛋白質 A」為如上文所定義自蛋白質 A 親和性層析管柱中洗提結合抗體時所獲得之蛋白質 A 或其功能衍生物之任何類型功能性 IgG 結合後代。該污染蛋白質 A 物質可由例如肽鍵水解而產生，肽鍵水解極可能利用酶作用（尤其在工業製造中）來進行。蛋白質 A 層析在粗略純化時用作下游處理中之早期步驟，新鮮產物溶液仍保有相當大的蛋白酶活性。細胞培養液中之死細胞或者初始離心或過濾步驟中被破壞之細胞可能釋放蛋白酶；出

於調節目的，在下游處理之前或在下游處理過程中向細胞培養液中補充蛋白酶抑制劑往往未能實現，與生物化學研究實務相反。實例為苯基-甲基-磺醯氯（PMSF）或 *N*-己酸。該等化學試劑作為生物醫藥製造中之添加劑不合需要。更有可能蛋白質 A 之重組功能衍生物或片段與野生型蛋白質 A 相比具有較低蛋白酶抗性，視蛋白質摺疊之三級結構而定。鍵聯個別 IgG 結合域之胺基酸片段可能在結合域之總數目減少時暴露。域間接觸可能有助於域摺疊之穩定性。亦可能是蛋白質 A 或其該等功能衍生物與抗體之結合影響或促進對蛋白酶作用之敏感性，此係歸因於抗體結合時所誘導之構形變化。

分子「結合」至層析樹脂意謂在適當條件（pH 值/電導率）下將分子暴露於層析樹脂以使得該分子藉助於配位體-蛋白質相互作用而可逆地固定於層析樹脂中或上。非限制性實例包括分子與離子交換材料之帶電基團之間的離子相互作用及蛋白質 A 與免疫球蛋白之間的生物特異性相互作用。

術語「洗滌緩衝液（wash buffer）」或「平衡緩衝液（equilibration buffer）」在本文中可互換使用，係指用於在洗提相關多肽分子之前洗滌或再平衡層析樹脂的緩衝液。在一些情況下，洗滌緩衝液及負載緩衝液可相同。「洗滌」層析介質欲涵蓋使適當緩衝液穿過或穿越介質。

「洗提緩衝液」用於自固相中洗提目標蛋白質。洗提緩衝液之電導率及/或 pH 值通常使得目標蛋白質自層析樹

脂中洗提。

自層析樹脂中「洗提」分子（例如相關多肽或雜質）意謂藉由改變溶液條件以使得緩衝液與關注分子競爭結合至層析樹脂而自其中移除分子。非限制性實例為藉由改變離子交換材料周圍之緩衝液之離子強度以使得緩衝液與分子競爭離子交換材料上之帶電位點而自離子交換樹脂中洗提分子。

如本文所用之術語「洗出液（eluate）」係指含有經由洗提獲得之關注分子以及含有由於流過式純化而獲得之相關目標蛋白質之流過洗提份的溶液。在一些具體實例中，術語「洗出液」係指得自結合及洗提層析步驟（例如蛋白質 A 親和性層析步驟）之洗提彙集物。在一些具體實例中，得自蛋白質 A 親和性層析步驟之洗出液流入採用活性碳之流過式純化製程中，其中存在或不存在插入病毒去活化步驟。

術語「固相（solid phase）」或「多孔基材（porous substrate）」或「基礎基質（base matrix）」係指一或多個帶電配位體可黏附之非水材料。固相可為純化管柱、多孔或非多孔離散粒子之不連續相、膜、編織或非編織纖維、整體料或過濾器。用於形成固相之材料的實例包括多醣（諸如瓊脂糖及纖維素）；及其他機械穩定性基質，諸如二氧化矽（例如控制孔隙玻璃）、聚（苯乙烯二乙烯基）苯、聚丙烯醯胺、聚乙烯醚、耐綸、高分子量聚乙烯（HDPE）、聚醚砜、陶瓷及以上任一者之衍生物。

「緩衝液」為一種藉由其酸鹼共軛物組分之作用來抵抗 pH 值變化的溶液。可視例如緩衝液之所要 pH 值而採用之各種緩衝液描述於 Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D. 編, Calbiochem Corporation (1975) 中。在所主張之發明之方法的一些步驟中，緩衝液具有在 2.0 至 4.0 或 2.8 至 3.8 範圍內之 pH 值。在所主張之發明的其他步驟中，緩衝液具有在 5.0 至 9.0 範圍內的 pH 值。在所主張之發明的其他步驟中，緩衝液具有在 4.0 至 6.5 範圍內的 pH 值。在所主張之發明之方法的其他步驟中，緩衝液具有低於 4.0 之 pH 值。將 pH 值控制在此範圍內之緩衝液的非限制性實例包括 MES、MOPS、MOPSO、Tris、HEPES、磷酸鹽、乙酸鹽、檸檬酸鹽、丁二酸鹽及鉍緩衝液以及此等之組合。

術語「電導率 (conductivity)」係指水溶液在兩個電極之間傳導電流的能力。在溶液中，電流藉由離子輸送而流動。因此，隨著水溶液中所存在之離子量的增加，溶液將具有更高電導率。電導率之量度單位為毫西門子/公分 (mS/cm 或 mS)，且可使用市售電導率計（例如由 Orion 出售）來量測。溶液之電導率可藉由改變其中之離子濃度而改變。舉例而言，可改變溶液中緩衝劑之濃度及/或鹽（例如 NaCl 或 KCl）之濃度以達到所要電導率。較佳如以下實施例中對各種緩衝液之鹽濃度進行調節以達到所要電導率。

多肽之「pI」或「等電點」係指多肽之正電荷平衡其負

電荷時的 pH 值。pI 可由多肽之附著碳水化合物之胺基酸殘基或唾液酸殘基之淨電荷來計算或可藉由等電聚焦來測定。

如本文所用之「濾液」係指穿過介質之樣本部分。

如本文所用之「保留物」係指實質上由介質保留之樣本部分。

如本文所用之術語「澄清」係指藉由移除懸浮粒子來降低含蛋白質溶液之混濁度（如用 NTU 所量測）的製程。澄清可藉由多種手段達成，包括分批及連續離心、深度過濾、法向及切向流過濾、以及沈澱（包括與小分子及聚合物質一起絮凝）或其任何方法組合。

「減少層析管柱之負荷」一詞係指對含蛋白質樣本進行之處理或加工，該處理或加工可減少對隨後將裝載蛋白質樣本之層析管柱的沾污。在一個典型層析實驗中，可能有非洗提物質或雜質留在固定相上，從而造成對層析管柱之沾污。在按比例放大期間此問題更為嚴重，其中由於所存在之雜質的含量更大而使得管柱沾污程度更大。管柱沾污亦導致管柱壽命顯著縮短，該等管柱通常相當昂貴。本發明方法提供用於顯著減少層析管柱之負荷的改良方法，從而延長管柱壽命，同時產生更大蛋白質產率。本發明方法使得在將樣本裝載於層析管柱上之前移除大量雜質，從而減少管柱負荷。典型雜質包括宿主細胞蛋白質、DNA、脂肪酸（來自細胞碎片）、染料分子、消泡劑等。

如本文可互換使用之術語「製程步驟」或「單元操作」

係指在純化製程中使用一或多種方法或裝置來達到某一結果。可用於本文所述之製程及系統中的製程步驟或單元操作之實例包括但不限於澄清、結合及洗提層析捕捉、病毒去活化、流過式純化及調配。應理解，各製程步驟或單元操作可採用超過一個步驟或方法或裝置來達成該製程步驟或單元操作之預期結果。舉例而言，在一些具體實例中，如本文所述之流過式純化步驟可採用超過一個步驟或方法或裝置來達到該製程步驟或單元操作，其中至少一個此種步驟涉及活性碳。在一些具體實例中，用於執行製程步驟或單元操作之一或多個裝置為單次使用或拋棄式的，且可進行移除及/或更換而不必更換該製程中之任何其他裝置或甚至不必停止製程運作。

如本文所用之術語「彙集槽 (pool tank)」係指任何容器 (container)、器皿 (vessel)、儲集器、貯槽或囊袋，其一般在製程步驟之間使用且具有一定尺寸/體積以便能夠收集來自製程步驟的整個輸出體積。彙集槽可用於保留或貯存或處理來自製程步驟之整個輸出體積的溶液狀態。在一些具體實例中，該等製程及如本文所述可免除對使用一或多個彙集槽之需要。

如本文所用之術語「緩衝槽」係指任何容器或器皿或囊袋，其在製程步驟之間或在製程步驟內（例如當單一製程步驟包含超過一個步驟時）使用；其中來自一個步驟之輸出流過緩衝槽到達下一步驟。因此，緩衝槽不同於彙集槽，不同之處在於其不欲保留或收集來自一個步驟之輸出

的總體積；而是替代地，能夠使來自一個步驟之輸出的連續流到達下一步驟。在一些具體實例中，在本文所述之製程或系統中，兩個製程步驟之間或一個製程步驟內所用之緩衝槽之體積不超過來自該製程步驟之輸出總體積之 25%。在另一具體實例中，緩衝槽之體積不超過來自製程步驟之輸出總體積之 10%。在一些其他具體實例中，緩衝槽之體積小於生物反應器中細胞培養物總體積之 35%、或小於 30%、或小於 25%、或小於 20%、或小於 15%、或小於 10%，該細胞培養物構成欲純化出目標分子之起始材料。在一些具體實例中，在使用活性碳、接著進行 AEX 層析、接著進行 CEX 層析、接著進行病毒過濾之流過式純化製程步驟期間採用緩衝槽，其中該緩衝槽用於在 AEX 層析步驟之後進行溶液變化。

如本文所用之術語「連續製程」係指一種用於純化目標分子之製程，其包括兩個或兩個以上製程步驟（或單元操作），以使得來自一個製程步驟之輸出直接流入該製程中之下一製程步驟而不中斷，且其中兩個或兩個以上製程步驟可在其持續時間之至少一部分期間同時進行。換言之，連續製程免除對純化製程中在進行下一製程步驟之前完成製程步驟的需要。術語「連續製程」亦適用於一個製程步驟內之步驟，在此情況下，在進行包括多個步驟之製程步驟期間，樣本連續流過進行該製程步驟所必需之不同步驟。因此，在一些具體實例中，採用活性碳之流過式純化步驟係以連續方式進行，其中來自在流過式純化步驟之前

進行的結合及洗提層析步驟（例如蛋白質 A 層析捕捉步驟）之洗出液流入活性碳（填充於纖維素介質中）步驟，接著進行 AEX 層析步驟，接著進行 CEX 層析步驟，接著進行病毒過濾步驟。

術語「靜態混合器（static mixer）」係指用於混合兩種流體材料（典型地為液體）的裝置。該裝置一般由圓柱形（管）外殼中所含之混合器元件（亦稱為非移動元件）組成。在物流通過靜態混合器時，非移動元件連續摻合該等材料。完全混合視許多變數而定，包括流體性質、管內徑、混合器元件數目及其設計等。在本文所述之一些具體實例中，在本文所述之製程中使用一或多個靜態混合器，例如在 AEX 層析步驟與 CEX 層析步驟之間。

藉由以下實施例進一步說明本發明，該等實施例不應被視為具限制性。本申請案全文所引用之所有參考文獻、專利及公開專利申請案以及圖式之內容係以引用的方式併入本文中。

II. 供用於所主張之方法中的例示性含碳材料

在本發明方法中，某些含碳材料（諸如活性碳）用於蛋白質純化。活性碳可描述為具有極高表面積之多孔固體。在一些具體實例中，活性碳包含活性木炭。活性碳可來源於多種來源，包括（但不限於）煤、木材、椰子皮、堅果殼及泥炭。活性碳可藉由涉及在控制氛圍下加熱之物理活化或藉由使用強酸、鹼或氧化劑之化學活化而由此等材料製造。活化製程產生具有較高表面積之多孔結構，該

多孔結構賦予活性碳以較大雜質移除容量。活化製程可經改進以控制表面之酸度。

活性碳可得自廣泛多種商業來源且分為許多等級及形式。活性碳之一些商業供應商包括諸如 MeadWestVaco 公司 (Richmond, VA, USA)、Norit Americas 公司 (Marshall, TX, USA)、Calgon Carbon 公司 (Pittsburgh, PA, USA) 之公司。

活性碳之兩種主要形式為粉末及顆粒。粉末狀活性碳含有較小且通常小於 1 mm 直徑的粒子，且最常用於純化液體。顆粒活性碳具有較大粒度且因此具有較小表面積，因此其較佳用於擴散速率較快的氣體純化。

關於活性碳用於消費型應用（諸如水、食物、飲料及醫藥純化）之安全性的一個重要考慮為減少及控制可萃取化合物。意欲用於飲用水及食物接觸應用之活性碳通常依照涵蓋針對水之所有間接添加劑的安全標準 ANSI/NSF 標準 61。此外，ASTM 標準測試方法 D6385 描述藉由灰化測定活性碳中之酸可萃取物含量且可用於研究來自活性碳之可萃取物之含量並使其減至最小。

一定範圍的活性碳類型可利用以供各種應用。舉例而言，MeadWestVaco 公司供應在其容量、表面酸度、對目標分子之孔隙可接近性及預定應用方面不同的至少 12 種類型粉末狀活性碳。一般需要使活性碳之雜質移除容量最大化。

在本文所述之一些具體實例中，將活性碳併入纖維素介質中。

III. 習知流過式純化製程

大部分習知流過式純化製程顯然依賴於相關目標蛋白質與欲移除雜質之間的不同表面相互作用。舉例而言，單株抗體之習知 AEX 流過式純化依賴於大部分抗體之等電點高於其他蛋白質及核酸且通常高於 7 的事實。因此，AEX 流過式純化製程在比所純化抗體之 pI 低的 pH 值下進行，以便確保固定相及抗體具有相同電荷且因此抗體流過介質而不顯著結合至表面。另一方面，許多蛋白質雜質核酸及內毒素具有比抗體低的 pI，其通常低於 7 且因此，其結合至 AEX 介質之表面。

如同大多數離子交換層析製程一樣，AEX 流過式純化一般對溶液電導性敏感且一般在較高鹽度下之有效性較低。在單株抗體之典型純化製程中，在一或多個結合及洗提管柱層析步驟之後進行 AEX 流過式純化，有時稱為「淨化步驟」。

下文展示兩種最常用之製程模板：

1) 蛋白質 A 捕捉 → CEX 結合及洗提純化並濃縮 → 稀釋 → AEX 流過；

2) 蛋白質 A 捕捉 → AEX 流過 → CEX 結合及洗提純化並濃縮。

除此等常用製程模板之外，有時採用其他純化流程，包括 CEX 捕捉及使用混合模式及無機結合及洗提樹脂（諸如陶瓷羥基磷灰石、CHT）。一般而言，流過式純化之目的在於移除痕量雜質，而整體純化係使用結合及洗提步驟完

成。然而，主要使用結合及洗提步驟轉移至流過式純化製程可為節約時間、試劑以及操作成本的極其成本有效之解決方案。因此，本文所述之製程為習知製程提供一種可行的解決方案，其更為成本有效且減少製造及操作總成本。

在本文所述之一些具體實例中，提供改良之流過式純化製程，該等製程能夠以連續方式進行流過式純化。

IV.在純化製程中使用含碳材料

如上文所論述，本發明提供新穎及改良之純化製程，該等製程採用活性碳。活性碳可直接添加至純化步驟中，隨後可藉由沈降或過濾或藉由使溶液或氣體通過含有活性碳之裝置而移除。活性碳可獨立填充於適合裝置中，或可與增強其機械、流動或分離性質之其他材料摻合。舉例而言，活性碳可併入含有纖維素之濕法纖維介質中，接著密封在拋棄式裝置（諸如獲自 Millipore 公司之 Millistak+® Pod CR 或獲自 Pall 公司（Port Washington, NY, USA）之 Seitz® AKS Filter Media）內。另一活性碳形式為活性碳塊，其中活性碳藉由與熱塑性粉末一起壓製而併入多孔整體料中。顆粒形式之活性碳亦可填充至管柱中，與層析介質相似，或其可填充至適合裝置中。一般接受的是將活性碳介質用於脫色、移除小分子雜質等。舉例而言，存在若干種等級之活性碳介質（獲自 Pall 公司），該等活性碳介質可基於目標雜質之分子量進行選擇。可獲得 3 個分子量範圍：200 道爾頓至 400 道爾頓、400 道爾頓至 1,000 道爾頓及 400 道爾頓至 1,500 道爾頓，最後一個範圍最大。然而，尚未描

述市售活性碳介質用於自生物樣本中選擇性移除大得多的雜質（分子量在 2000 道爾頓至 200,000 道爾頓範圍內）。

本發明至少部分基於一項驚人的發現，即活性碳能夠選擇性地結合不合需要之雜質（例如 HCP 及 DNA），而同時展示可忽略之與目標蛋白質之結合。

本發明亦認識到，與所有吸附性材料相似，活性碳之吸附容量並非無限的。舉例而言，在 CHO-S 饋料之情況下，已顯示當 HCP 及 DNA 以代表性饋料中所觀察到之濃度存在時，活性碳可有效移除此等物質，如實施例 1 中所示。然而，發現添加異常高含量之 DNA 可抑制活性碳之 HCP 移除效率，如實施例 2 中所示。

活性碳亦可高度有益於移除目標蛋白質捕捉步驟之前及之後可能存在於目標蛋白質之溶液中的潛在細胞培養基組分。典型細胞培養基組分包括界面活性劑（例如 Pluronic® F68）、胰島素、抗生素、甲胺喋呤及消泡劑。由於存在一些此等組分將被帶入經純化目標蛋白質中之風險，因此在蛋白質純化系列中併入能夠移除此等組分之步驟非常有利。活性碳可用於純化製程中以移除該等組分，如本文之實施例進一步證明。

以下為併入活性碳作為一或多個中間步驟之蛋白質純化製程的實施例，活性碳在以下表 I 中以下劃線顯示。應理解，可使用此等製程之許多變化形式。

表 I

	步驟 1	步驟 2	步驟 3	步驟 4	步驟 5
製程 A	提供澄清細胞培養液	流過 <u>活性碳</u>	用親和性介質結合並洗提	用 CEX 介質結合並洗提	流過 AEX 介質
製程 B	提供澄清細胞培養液	用親和性介質結合並洗提	流過 <u>活性碳</u>	用 CEX 介質結合並洗提	流過 AEX 介質
製程 C	提供澄清細胞培養液	用親和性介質結合並洗提	用 CEX 介質結合並洗提	流過 <u>活性碳</u>	流過 AEX 介質
製程 D	提供澄清細胞培養液	用親和性介質結合並洗提	用 CEX 介質結合並洗提	流過 AEX 介質	流過 <u>活性碳</u>
製程 E	提供澄清細胞培養液	用親和性介質結合並洗提	流過 <u>活性碳</u>	流過 AEX 介質	
製程 F	提供澄清細胞培養液	用 CEX 介質結合並洗提	流過 <u>活性碳</u>	流過 AEX 介質	
製程 G	提供澄清細胞培養液	用親和性介質結合並洗提	流過 <u>活性碳</u>	流過 AEX 介質	流過 CEX 介質

一般而言，在上表中，用親和性介質結合並洗提及/或用 CEX 介質結合並洗提之步驟可用以下三種模式中之任一種進行操作：(1) 分批模式，其中用目標蛋白質裝載介質，停止裝載，洗滌介質並洗提，並且收集彙集物；(2) 半連續模式，其中連續進行裝載，同時間歇性洗提（例如在連續多管柱層析的情況下）；及 (3) 完全連續模式，其中裝載及洗提均連續進行。

在上表中所述之一或多種製程的一些具體實例中，可在結合及洗提步驟之後並且在對洗出液進行流過式純化步驟之前進行病毒去活化步驟，如本文所述。

應理解，本文所述及上表中之製程可進一步採用其他步驟以及線內或經由緩衝槽改變溶液條件之步驟。在本文

所述之一些具體實例中，製程包括以下步驟：澄清；用蛋白質 A 親和性介質結合並洗提；線內病毒去活化；如下之流過式純化：活性碳，接著為流過 AEX 介質，接著使用線內靜態混合器及/或緩衝槽進行溶液變化，接著為流過 CEX 介質，接著進行病毒過濾；及調配。

V. 關於一或多種雜質之含量減少的分析

本發明提供用於減少含有關注蛋白質之樣本中所存在之一或多種雜質之含量的製程。源自生物來源之蛋白質樣本中所含之典型雜質包括宿主細胞蛋白質（HCP）及核酸（DNA）。當宿主細胞為中國倉鼠卵巢（CHO）時，HCP 通常稱為 CHO HCP 或 CHOP。使用針對 HCP 之抗體的免疫方法（諸如西方墨點法及 ELISA）慣常用於偵測該等雜質。常規亦採用微量滴定板免疫酶分析（ELISA）以提供較高分析敏感度。該等分析為用於量測純化製程期間一或多種雜質之含量的簡單易用、客觀而有效的工具。

一些用於量測 HCP 之 ELISA 套組可購自供應商，諸如 Cygnus Technologies（Southport, NC, USA）。一些該等套組在其欲與基本上所有可能污染產物（與所用純化製程無關）之 HCP 反應的意義上來看為「一般」套組。在一些具體實例中，市售套組可用於偵測樣本中一或多種雜質之含量。

藉由以下實施例進一步說明本發明，該等實施例不應被視為具限制性。本申請案全文所引用之所有參考文獻、專利及公開專利申請案以及圖式之內容係以引用的方式併

入本文中。

實施例

實施例 1.評估用於以流過模式移除雜質之各種材料

在此實驗中，評估不同材料自澄清 CHO 饋料中移除雜質的能力。測試表 II 中所示之材料以流過模式對雜質之移除。使用磷酸鹽緩衝生理鹽水 (PBS, 10 mM 磷酸鹽, pH 7.4) 作為平衡及洗滌緩衝液。

表 II

材料	縮寫	描述	供應商/目錄
活性炭	AC	RGC80	MeadWestVado
SP 瓊脂糖 FastFlow	SPFF	瓊脂糖陽離子交換層析 (CIEX) 樹脂	GE Healthcare
ProRes™-S	ProRes™-S	聚合陽離子交換層析 (CIEX) 樹脂	Millipore 公司
Q 瓊脂糖 FastFlow	QFF	瓊脂糖陰離子交換層析 (AIEX) 樹脂	GE Healthcare
苯基瓊脂糖 FastFlow	PhFF	瓊脂糖疏水性相互作用層析 (CHIC) 樹脂	GE Healthcare

使用重力流過 (FT) 測試法來測試樹脂雜質移除。允許 1 ml 表 II 中所列出之各材料 (1 ml) 沈降並填充至 5 ml 拋棄式層析管柱 (Evergreen Scientific, LA, CA) 中。用 5 倍管柱體積 (CV) 之平衡緩衝液 (PBS) 使管柱平衡，裝載 20 倍 CV 饋料且用 5 倍 CV 之洗滌緩衝液 (PBS) 再次洗滌。收集流過洗提份。使用添加多株 IgG (約 2.6 mg/ml, SeraCare) 之未經處理之澄清空白 CHO-S 饋料。

測試流過洗提液及相應饋料之 IgG 產率、UV 活性物質 (280 nm) 移除、HCP 移除及 DNA 移除。在 Waters Alliance HPLC (Milford, MA) 上使用 Poros Protein A 2.1 mm×30 mm 分析管柱 (LIFE TECHNOLOGIES, Palo Alto, CA) 根據供應商之說明對 IgG 產率進行定量。使用蛋白質 A 層析圖上顯示為流過峰之非保留物質之峰面積對 280 nm 下之 UV 活性物質進行定量。使用 CHO-CM HCP ELISA 套組 (CYGNUS TECHNOLOGIES, Southport, NC) 偵測宿主細胞蛋白質。使用 Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA 試劑 (LIFE TECHNOLOGIES, Foster City, CA) 偵測 DNA。所有分析均根據製造商方案進行。結果描述於圖 1 至圖 4 中。

如圖 1 中所述，除顯示約 5% IgG 產率損失之 HIC 樹脂外，所篩選之所有其他介質，亦即活性碳、SPFF、ProRes™-S 及 QFF 均未顯示可偵測之產率損失。

此外，如圖 2、圖 3 及圖 4 中所述，活性碳使得 280 nm 下之 UV 活性物質含量顯著減少。此包括 pH 值指示劑、一些 HCP 群體、DNA 及一些殘餘細胞培養物組分。在使用多株 IgG 的情況下，此洗提份亦包括蛋白質 A 不結合之 IgG 3 群體。雖然所有材料似乎均在某種程度上移除 HCP，包括活性碳，但兩種具有陽離子交換官能性之材料 Sepharose FastFlow 及 ProRes™-S 移除最多 HCP。關於 DNA 移除，雖然看到陰離子交換樹脂 Q FastFlow 達成顯著 DNA 移除並不令人驚訝，但看到活性碳以相似容量移除 DNA 出乎意料。所有其他材料均在較小程度上移除 DNA。

此實施例之資料顯示，活性碳以及具有陽離子交換、陰離子交換及疏水性相互作用官能基之材料可以流過模式在不同程度上自 CHO 饋料中移除雜質（HCP、DNA 及 UV 活性物質）而不會造成顯著產率損失。

實施例 2.流過雜質移除容量

在一個代表性實驗中，評估每單位體積不同材料所移除的雜質之量。藉由添加市售鯡魚精 DNA 來增加 CHO-S 饋料中 DNA 之含量以瞭解 DNA 與 HCP 之間的吸附競爭作用。評估雜質移除之材料列於以下表 III 中。

表 III

材料	縮寫	描述	供應商/目錄
活性碳	AC	活性碳	MeadWestVaco RGC80
SP 瓊脂糖 FastFlow	SPFF	陽離子交換層析 (CIEX) 樹脂，瓊脂糖基礎基質	GE Healthcare， 目錄號 17-0729-01
ProRes™-S	ProRes™-S	陽離子交換層析 (CIEX) 樹脂，聚合基礎基質	Millipore 公司
Q 瓊脂糖 FastFlow	QFF	陰離子交換層析 (AIEX) 樹脂，瓊脂糖基礎基質	GE Healthcare， 目錄號 17-0510-01

將表 III 中所列出之各材料（1 ml）填充至 Omnifit 管柱（0.66 cm 內徑）中。用 5 倍 CV 之 PBS 平衡管柱，裝載 100 倍 CV 之添加多株 IgG 及鯡魚精 DNA 之空白未處理澄清 CHO-S 饋料，且用 20 倍管柱體積之 PBS 在 BioCad（APPLIED BIOSYSTEMS，Palo Alto，CA）上進行洗滌。以每 10 倍管柱體積收集裝載步驟期間的流過洗提份。使用

與實施例 1 中所述相同之方法分析流過洗提份及相應饋料的 IgG 產率、UV 活性物質、HCP 及 DNA 移除。

如圖 5 中所述，所篩選之所有材料在 100 倍管柱體積之饋料負載下均未顯示顯著 IgG 產率損失。如圖 6 中所述，在 100 倍 CV 範圍內，活性碳移除最多 UV 活性物質。在 100 倍 CV 範圍內，陰離子交換材料亦在某種程度上移除 UV 活性物質。此外，如圖 7 中所述，陰離子交換樹脂 Q FastFlow 之 HCP 移除容量由於其穿透早期洗提份而受限制。然而，陽離子交換材料 Q FastFlow 及 ProRes™-S 在 100 倍管柱體積範圍內移除大量 HCP。在此特定實驗中之高 DNA 濃度（亦即額外 195 µg/mL）下，與未添加 DNA 之饋料相比，活性碳移除較少 HCP。舉例而言，在使用未添加 DNA 之原始空白 CHO-S 饋料的相似實驗中，活性碳在 100 倍 CV 範圍內移除接近 20% HCP（資料未顯示）。此現象證明 DNA 與 HCP 在一定程度上競爭吸附至活性碳。此外，如圖 8 中所述，所有材料均在一定程度上移除 DNA。

此實施例之資料顯示，在 100 倍管柱體積範圍內，活性碳以及具有陽離子交換、陰離子交換及疏水性相互作用官能基之材料可以流過模式在不同程度上自 CHO 細胞饋料中移除雜質（HCP、DNA 及 UV 活性物質）而不會造成顯著產率損失。

實施例 3. 不同材料之組合對雜質移除之作用

在另一實驗中，評估圖 9 中所述之工作流中所示之不同材料組合的雜質移除。使該等材料（1 ml）沉降並填充在

5 ml 拋棄式層析管柱中。用 5 倍 CV 之 PBS 使管柱平衡，裝載 20 倍 CV 之饋料且用 5 倍 CV 之 PBS 洗滌。

將流過洗提份進一步裝載至具有所選介質之下一個拋棄式管柱上（如圖 9 中左側所述之兩種工作流中所示）。分析工作流中之最後一次流過洗提液。在右側所述之工作流的情況下，其中饋料通過介質混合物，直接分析洗提液。使用添加多株 IgG（約 2.5 mg/ml，得自 SeraCare）之非表現 CHO-S 饋料製備饋料。使用與上文於實施例 1 中所述相同之方法分析流過洗提份及相應饋料的 IgG 產率、UV 活性物質、HCP 及 DNA 移除。結果示於圖 10 至圖 12 中。

如圖 10 中所述，活性碳及含有活性碳之混合物顯著減少 UV 活性物質之含量。此外，雖然所有材料均在一定程度上展現 HCP 移除，但與陽離子樹脂組合之活性碳混合物顯示最有效之 HCP 移除，如圖 11 中所述。此外，如圖 12 中所述，雖然所有材料均在一定程度上移除 DNA，但活性碳與陰離子交換樹脂之組合顯示最有效之 DNA 移除。

此實施例之資料顯示，與任何單一組分相比，活性碳與具有陽離子交換、陰離子交換及疏水性相互作用官能基之材料的組合可更有效地以流過模式自 CHO 饋料中移除雜質（HCP、DNA 及 UV 活性物質）。

實施例 4. 蛋白質 A 洗提彙集物之雜質移除

在另一實驗中，使用標準重力流過測試方法來研究後蛋白質 A 彙集物中之雜質移除。評估實施例 1 中所篩選之材料，亦即活性碳、陽離子交換樹脂（SP FF 及 ProRes™-S）、

陰離子交換樹脂 Q FF 及 HIC 樹脂、Phenyl FastFlow 及此等材料之不同組合。使活性碳或樹脂材料 (1 ml) 沈降並填充至拋棄式層析管柱 (得自 Evergreen) 中。用 5 倍 CV 之 PBS 使各管柱平衡，裝載 20 倍 CV 之饋料且用 5 倍 CV 之 PBS 洗滌。收集裝載步驟期間的流過洗提份。所用饋料為將 pH 值調節至 7.0 之後的蛋白質 A (ProSep Ultra Plus) 洗提彙集物 (約 3.2 mg/ml IgG)。用於蛋白質 A 管柱之饋料為外加多株 IgG 之非表現 CHO-S。

評估流過洗提份及蛋白質 A 洗提彙集物之 IgG 產率、UV 活性物質移除、HCP 移除及 DNA 移除。如實施例 1 中所述進行所有分析，但在 HCP 之情況下，使用 CHO-3G HCP ELISA 套組 (CYGNUS TECHNOLOGIES, Southport, NC)。

如圖 13 中所述，所篩選之所有材料均產生約 85% 或更高產率。作為單一材料，活性碳、陽離子交換樹脂 SP FastFlow 移除最多 HCP。不同材料之混合物提供最高 HCP 移除，如圖 14 中所述。圖 15 描述所有材料均移除大量 DNA，部分是由於饋料中之含量較低。總體而言，與單一材料相比，材料混合物在雜質移除方面一般更有效。

此實施例之資料顯示，活性碳及具有陽離子交換、陰離子交換及疏水性相互作用官能基之材料以及此等材料之混合物可在不同程度上以流過模式自 CHO 饋料所產生之蛋白質 A 洗提彙集物中移除雜質 (HCP、DNA 及 UV 活性物質)。

實施例 5. 製備代表性基於親和性之 (蛋白質 A) 捕捉

MAb 饋料以評估活性碳之 MAb 純化效能

使用 CHO 細胞株培養物產生經部分純化之單株抗體，稱為 MAb I，以供用作代表性親和性（蛋白質 A）捕捉單株抗體饋料來評估活性碳純化蛋白質之效能。首先，使用可作為 Millistak⁺® POD 過濾器（MILLIPORE CORPORATION, Billerica, MA, USA）獲得之深度過濾介質直接使細胞培養物自生物反應器中澄清。細胞培養液通過一系列兩個過濾器 D0HC 及 X0HC 進行過濾，直至最終混濁度 < 10 NTU，隨後用 Millipore Express® SHC 膠囊過濾器進行無菌過濾。

將得自 Millipore 公司（Billerica, MA, USA）之丙烯酸系 Quick-Scale® 14 cm 內徑管柱中填充 Millipore ProSep-vA High Capacity Protein A 介質，直至柱床體積為約 3.2 L。使用流體組合填充管柱，用 PBS 填充並振動。所有層析步驟均在 Millipore K-Prime 40-I 系統上進行，其中使用 280 nm 波長之 UV 吸收進行偵測。管柱用於 MAb I 純化持續至少 5 次循環，並且儲存於 4°C PBS 中。在使用管柱之前，用至少 2 倍管柱體積(CV)之 0.15 M 磷酸 pH 1.5-1.7 沖洗管柱，接著用 PBS 平衡直至 pH 值穩定(至少 3 倍 CV)。典型地，澄清後次日，以至少 5 分鐘之滯留時間（亦即流速為 500 至 600 mL min⁻¹）將經無菌過濾之澄清細胞培養物裝載至蛋白質 A 管柱上。裝載管柱以確保不超過管柱之最大容量，該容量定義為 30 公克 MAb I/公升介質。

裝載管柱之後，用 PBS 以相同滯留時間沖洗管柱直至

UV 跡線達到基線，典型地在 3 倍 CV 以內。接著用至少 3 倍 CV，但不超過 5 倍 CV 之含 0.5 M NaCl 之 20 mM 乙酸钠（pH 6）洗滌管柱。接著使用 20 mM 乙酸 pH 3.0 之階梯式變化洗提產物，其中人工進行洗提峰之捕捉以減少洗提峰之稀釋。將洗出液留在室溫（20℃至 25℃）下培育至少 30 分鐘至最大 1.5 小時。培育之後，使用 2 M Tris 鹼（pH 10 或更高）將洗提彙集物之 pH 值滴定至 pH 5±0.2。洗提彙集物之起始 pH 值典型地接近 pH 4.0 且需要添加少於 5% 體積之 Tris 鹼溶液。在洗提彙集物滴定期間，觀察到可見沈澱物。在對洗提彙集物進行無菌過濾之前，使用 Millipore Millistak⁺® X0HC 實驗室規模 POD 進行沈澱物移除，其中需要至少兩個 0.027 m² POD 來清除整個洗提彙集物之沈澱物。深度過濾之後，使用 Millipore Express Plus Stericup 過濾單元對洗出液進行無菌過濾且儲存在 4℃ 下直至使用。

實施例 6. 製備代表性基於非親和性之（陽離子交換）捕捉 MAb 饋料以評估活性碳之 MAb 純化效能

使用 CHO 細胞株培養物產生經部分純化之單株抗體，稱為 MAb I，以供用作代表性非親和性（陽離子交換）捕捉單株抗體饋料來評估活性碳純化蛋白質之效能。如實施例 5 中所論述來製造 MAb I 澄清細胞培養液。細胞培養液經由一系列兩個過濾器 D0HC 及 X0HC 進行過濾，直至最終混濁度 < 10 NTU，隨後用 Millipore Express® SHC 膠囊過濾器進行無菌過濾。

將得自 Millipore 公司（Billerica, MA, USA）之 22 cm

內徑玻璃 Vantage®實驗室管柱填充陽離子交換 (CEX) 介質 Fractogel® $\text{SO}_3^-(\text{M})$ 。在 Äkta® Explorer 100 (GE HEALTHCARE, Uppsala, Sweden) 上用 PBS 填充管柱，其中表觀線速度為約 1000 cm h^{-1} 。在填充及所有隨後管柱運作期間，保持跨越管柱之壓降低於 3 巴。在 75 mL 填充床體積下，管柱之床壓縮為約 15%。使用脈衝注入 $500 \mu\text{L}$ 25 mM Tris、1 M NaCl、3% (v/v) 丙酮 (pH 6.9，以 100 cm h^{-1} 之表觀線速度)，使用 PBS 作為運作緩衝液來量測管柱之填充效率。在說明系統之死體積之後，使用標準方法使用丙酮峰計算理論板等效高度 (height equivalent to a theoretical plate; HETP)，且在 1.3 之峰不對稱性下計算為 0.053 cm，表明管柱經充分填充。NaCl 峰顯示較大程度之峰拖尾，但此可能與鹽離子與介質之相互作用相關，而不表示管柱效率。

在第一次使用管柱之前，進行無蛋白質負載之完全空轉以便減少及/或消除任何相關溶液與基礎介質之相互作用。在裝載之前，用至少 5 倍 CV 之 20 mM 乙酸钠 pH 5 使管柱平衡。將管柱裝載含有 MA b I 之澄清細胞培養物，該澄清細胞培養物已使用冰醋酸將 pH 值降低至 pH 5。當降低細胞培養物之 pH 值時，通常觀察到沈澱物且使用 Millipore Millistak⁺® X0HC 實驗室規模 POD，使用離心與深度過濾之組合將其移除。

在使用 Millipore Express Plus Stericup 過濾單元進行裝載之前，對裝載溶液進行無菌過濾。使用 10 分鐘之滯留時

間將無菌過濾負載裝載至管柱上以試圖使管柱容量最大化（約 45 公克 MAb I/公升介質），同時將跨越管柱之壓降減至最小。裝載之後，用 5 倍 CV 之平衡緩衝液沖洗管柱。接著用 5 倍 CV 之 20 mM 乙酸鈉、0.1 M NaCl pH 5.0 緩衝液洗滌管柱。用至少 5 倍 CV 之 20 mM 乙酸鈉、0.25 M NaCl pH 6.0 之階梯式變化進行管柱洗提。將洗出液部分分離且彙集峰洗提份並且儲存在 4℃ 下供進一步使用。接著用 20 mM 乙酸鈉、1 M NaCl pH 6.0 洗滌管柱以移除強結合蛋白質，該等蛋白質經測定主要為宿主細胞蛋白質（HCP）。接著用 5 倍 CV 之 0.5 N NaOH，以等效於 30 分鐘滯留時間之較低流速洗滌管柱。接著用 5 倍 CV 之平衡緩衝液洗滌管柱，且儲存在室溫（20℃ 至 25℃）下供進一步使用。

實施例 7.藉由對親和性捕捉 MAb 洗出液進行流過處理來評估各種吸附劑

在流過應用中比較活性碳與若干種常用於蛋白質純化之不同市售吸附介質，包括用於親和性（蛋白質 A）捕捉單株抗體洗出液純化之陰離子交換（ChromaSorb™）、陽離子交換（HiTrap SP FF、HiTrap CM FF）及疏水性相互作用（HiTrap Phenyl FF、HiTrap Butyl FF）化學物質，以證明活性碳對於自蛋白質溶液中移除雜質而言獨特且意外地有效。

根據實施例 5 製備經部分純化之 MAb I 親和性（蛋白質 A）捕捉洗出液。用 Tris 鹼（2 M）將 MAb I 洗出液自約 pH 5 調節至 pH 7，且經由 0.22 微米 Millipore Express Plus

Stericup 過濾單元進行過濾。該溶液在本文中稱為 MAb I 蛋白質 A 洗出液。

Nuchar HD 及 HD Nuchar 活性碳在本文中可互換使用且係指獲自 MeadWestVaco 公司 (Richmond, VA, USA) 之粉末狀活性碳之等級。將玻璃 Omnifit 層析管柱 (10 mm 直徑, 100 mm 長度) 中裝載已於水中漿液化之 250 mg HD Nuchar 活性碳, 獲得 1 mL 之填充管柱體積。使用獲自 Millipore 公司 (Billerica, MA, USA) 之經聚烯丙胺改質之 0.65 微米等級之聚乙烯膜在不同尺寸之裝置中製造 0.2 mL ChromaSorb 膜裝置。將膜切成 25 mm 之盤狀物; 堆疊 5 個盤狀物; 且密封在與可購自 Millipore 公司之 OptiScale 25 拋棄式膠囊過濾器裝置相同類型之包覆模製聚丙烯裝置中。該等裝置包括排氣口以防止氣塞, 且具有 3.5 cm^2 之有效過濾面積及 0.2 mL 之體積。

1 mL 預填充層析管柱 HiTrap SP FF、HiTrap CM FF、HiTrap Phenyl FF (high sub) 及 HiTrap Butyl FF 係購自 GE Healthcare (Pittsburgh, PA, USA), 且在使用前用緩衝溶液 (Tris-HCl 緩衝液, 25 mM, pH 7) 使其平衡。組裝 6 種流過式純化系列: a) 活性碳; b) ChromaSorb; c) HiTrap SP FF; d) HiTrap CM FF; e) HiTrap Phenyl FF; 及 f) HiTrap Butyl FF。隨後, 使 96 mL MAb I 蛋白質 A 洗出液以 0.25 mL/min 之流速穿過各配置。穿過純化系列之後, 分析溶液的宿主細胞蛋白質 (HCP)、IgG 濃度及殘餘蛋白質 A。使用得自 Cygnus Technologies (Southport, NC, USA) 之市

售 ELISA 套組（目錄號 F550），按照套組製造商之方案進行 HCP 分析。使用裝備 Poros® A 蛋白質 A 分析管柱之 Agilent HPLC 系統量測 IgG 濃度。使用得自 Meridian Life Sciences（Saco，ME，USA）之市售 ELISA 套組，套組 C0Z51-188 進行蛋白質 A 分析。結果彙總於表 IV 中。

結果顯示活性碳移除最大量之雜質，其中宿主細胞蛋白質（HCP）之對數下降值（LRV）為 0.87。活性碳之 HCP 之 LRV 值與所研究之市售介質（陰離子交換、陽離子交換、疏水性相互作用）相比顯著更高，其具有在 0.19 至 0.35 範圍內之 HCP 之 LRV。來自親和性捕捉步驟之殘餘蛋白質 A 亦被有效移除而低於活性碳之可偵測限值。觀察到移除任何顯著量之殘餘蛋白質 A 的唯一市售介質為陰離子交換介質（ChromaSorb™），其亦將殘餘蛋白質 A 之濃度降低至低於可偵測限值。儘管活性碳所移除之雜質量更高，但其仍具有極佳單株抗體產物（MAb I）回收率（96%），此結果類似於針對所研究之市售介質觀察到的產物回收率（82%至 100%）。

表 IV

流過吸附劑	MAb I (mg/mL)	MAb I 之回收率	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	HCP 之 LRV	蛋白質 A (ng/mL)	蛋白質 A (ppm)
未經處理 (對照組)	7.18	NA	869	121	NA	4.61	0.62
活性碳	6.88	96%	112	16	0.87	ND	ND
ChromaSorb	5.92	82%	320	54	0.35	ND	ND
HiTrap SP FF	6.09	85%	364	60	0.31	2.95	0.48
HiTrap CM FF	6.28	87%	463	74	0.22	2.72	0.43
HiTrap Phenyl FF	6.89	96%	385	56	0.33	3.21	0.47
HiTrap Butyl FF	7.21	100%	563	8	0.19	4.25	0.59

ND-未偵測到

NA-不適用

實施例 8.利用活性碳及/或陰離子交換介質進行 MAb 親和性捕捉洗出液之靜態浸泡處理

研究單獨及與陰離子交換介質組合之活性碳自親和性 (蛋白質 A)捕捉單株抗體洗出液中移除雜質以證明一種獨特且出乎意料有效之雜質移除方法。

根據實施例 5 製備經部分純化之 MAb I 親和性 (蛋白質 A) 捕捉洗出液。用 Tris 鹼 (2 M) 將 MAb I 洗出液自約 pH 5 調節至 pH 7，且經由 0.22 微米 Millipore Express Plus Stericup 過濾單元進行過濾。該溶液在本文中稱為 MAb I 蛋白質 A 洗出液。

Nuchar RGC 及 RGC Nuchar 活性碳在本文中可互換使用且係指獲自 MeadWestVaco 公司 (Richmond, VA, USA) 之粉末狀活性碳之等級。在一個代表性實驗中，將 ChromaSorb™ 膜之 7 mm 直徑圓形部分 (5 μ L) 及/或 10 mg

RGC Nuchar 活性碳與 Tris-HCl 緩衝液 (25 mM, pH 7) 一起添加至 1.5 mL 離心管中以平衡吸附介質。將該等管離心且移除上層平衡緩衝液。隨後，向含有經平衡吸附劑之 1.5 mL 離心管中添加 1 mL 體積之 MAb I 蛋白質 A 洗出液。在室溫下在輕緩旋轉下允許吸附介質與洗出液相互作用 18 小時。接著對該等管進行離心且分析上層溶液之宿主細胞蛋白質 (HCP) 及 IgG 濃度。

使用得自 Cygnus Technologies (Southport, NC, USA) 之市售 ELISA 套組 (目錄號 F550)，按照套組製造商之方案進行 HCP 分析。使用裝備 Poros® A 蛋白質 A 分析管柱之 Agilent HPLC 系統量測 IgG 濃度。一項此類實驗之結果彙總於表 V 中。

結果顯示，單獨及與陰離子交換介質組合之活性碳對於自單株抗體溶液中移除雜質出乎意料地有效。活性碳與陰離子交換介質 (ChromaSorb) 之組合移除最大量之雜質，其中宿主細胞蛋白質 (HCP) 之對數下降值 (LRV) 為 1.43。個別活性碳及陰離子交換介質分別具有 1.21 及 0.36 之 HCP 之 LRV。單獨及與陰離子交換介質組合之活性碳均具有極佳單株抗體產物回收率，分別為 95% 及 95%。

表 V

吸附介質	MAb I (mg/mL)	MAb I 之回收率	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	HCP 之 LRV
對照組 (未添加任何物質)	6.92	NA	1748	252	NA
活性碳	6.58	95%	102	16	1.21
ChromaSorb	6.74	97%	743	110	0.36
活性碳及 ChromaSorb	6.58	95%	62	9	1.43

NA - 不適用

實施例 9. 利用活性碳及/或陰離子交換介質進行 MAb 親和性捕捉洗出液之靜態浸泡處理

研究單獨及與陰離子交換介質組合之活性碳自含有不同於 MAb I 之單株抗體（稱為 MAb II）之親和性（蛋白質 A）捕捉單株抗體洗出液中移除雜質以證明單獨及與陰離子交換介質組合之活性碳提供一種可應用於純化多種不同單株抗體之獨特且出乎意料有效之方法。

根據實施例 5 製備第二經部分純化之 MAb II 親和性（蛋白質 A）捕捉洗出液。用 Tris 鹼（2 M）將 MAb II 洗出液自約 pH 5 調節至 pH 7，且經由 0.22 微米 Millipore Express Plus Stericup 過濾單元進行過濾。該溶液在本文中稱為 MAb II 蛋白質 A 洗出液。

將 ChromaSorb 膜之 7 mm 直徑圓形部分（5 μ L）及/或 10 mg RGC Nuchar 活性碳與 Tris-HCl 緩衝液（25 mM, pH 7）一起添加至 1.5 mL 離心管中以平衡吸附介質。將該等管離心且移除上層平衡緩衝液。隨後，向含有平衡吸附劑之 1.5 mL 離心管中添加 1 mL 體積之 pH 值經調節之 MAb II 蛋白質 A 洗出液。在室溫下在輕緩旋轉下允許吸附介質與洗出液相互作用 18 小時。接著對該等管進行離心且分析上層溶液之宿主細胞蛋白質（HCP）及 IgG 濃度。使用得自 Cygnus Technologies（Southport, NC, USA）之市售 ELISA 套組（目錄號 F550），按照套組製造商之方案進行 HCP 分析。

使用裝備 Poros® A 蛋白質 A 分析管柱之 Agilent HPLC 系統量測 IgG 濃度。結果彙總於表 VI 中。

結果顯示，單獨及與陰離子交換介質組合之活性碳對於自含有第二類型單株抗體之溶液中移除雜質出乎意料地有效。活性碳與陰離子交換介質 (ChromaSorb™) 之組合移除最大量之雜質，其中宿主細胞蛋白質 (HCP) 之對數下降值 (LRV) 為 1.78。個別活性碳及陰離子交換介質分別具有 1.08 及 0.64 之 HCP 之 LRV。單獨及與陰離子交換介質組合之活性碳均具有良好單株抗體產物回收率，分別為 87% 及 85%。

表 VI

吸附介質	MAb II (mg/mL)	MAb II 之回收率	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	HCP 之 LRV
對照組 (不添加任何物質)	18.19	NA	23418	1287	NA
活性碳	15.89	87%	4681	295	0.64
ChromaSorb	16.08	88%	1711	106	1.08
活性碳及 ChromaSorb	15.44	85%	329	21	1.78

NA-不適用

實施例 10. 利用活性碳及/或陰離子交換介質進行 MAb I 非親和性捕捉洗出液之靜態浸泡處理

研究單獨及與陰離子交換介質組合之活性碳自非親和性 (陽離子交換) 捕捉單株抗體洗出液中移除雜質以證明單獨及與陰離子交換介質組合之活性碳提供一種獨特且出乎意料有效之雜質移除方法。相對於親和性 (蛋白質 A) 捕

捉洗出液，非親和性（陽離子交換）捕捉洗出液含有顯著較高含量之不同類型雜質。應用活性碳來純化非親和性捕捉洗出液顯示此方法通用且可應用於純化多種不同蛋白質洗出液。

在一個單獨實驗中，如實施例 6 中所述製備經部分純化之 MAb I CEX 洗出液。用緩衝溶液（Tris-HCl 緩衝液，25 mM，pH 7）將洗出液稀釋 4 倍，接著經由 0.22 微米 Millipore Express Plus Stericup 過濾單元進行過濾。該溶液在本文中稱為 MAb I CEX 洗出液。

將 ChromaSorb 膜之兩個 10 mm 直徑圓形部分（19.6 μ L）及/或 20 mg RGC Nuchar 活性碳與 Tris-HCl 緩衝液（25 mM，pH 7）一起添加至 1.5 mL 離心管中以平衡吸附介質。將該等管離心且移除上層平衡緩衝液。隨後，向含有平衡吸附劑之 1.5 mL 離心管中添加 1 mL 體積之 MAb I CEX 洗出液。在室溫下在輕緩旋轉下允許吸附介質與洗出液相互作用 18 小時。接著對該等管進行離心且分析上層溶液之宿主細胞蛋白質（HCP）及 IgG 濃度。使用得自 Cygnus Technologies（Southport, NC, USA）之市售 ELISA 套組（目錄號 F550），按照套組製造商之方案進行 HCP 分析。使用裝備 Poros® A 蛋白質 A 分析管柱之 Agilent HPLC 系統量測 IgG 濃度。結果彙總於表 VII 中。

結果顯示，單獨及與陰離子交換介質組合之活性碳對於自使用非親和性（陽離子交換）層析自細胞培養物中捕捉之單株抗體溶液中移除雜質出乎意料地有效。與更具特

異性之基於親和性（蛋白質 A）之捕捉介質相比，基於非親和性（陽離子交換）之捕捉介質結合更多雜質與單株抗體。因此，非親和性捕捉洗出液含有顯著較高含量之不同類型雜質。活性碳與陰離子交換膜（ChromaSorb™）之組合移除最大量之雜質，其中宿主細胞蛋白質（HCP）之對數下降值（LRV）為 1.45。個別活性碳及陰離子交換介質分別具有 1.20 及 0.55 之 HCP 之 LRV。單獨及與陰離子交換介質組合之活性碳均具有良好單株抗體產物回收率，分別為 95% 及 74%。

表 VII

	MAb I (mg/mL)	MAb I 之回收率	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	HCP 之 LRV
對照組	3.14	NA	64,254	20,463	NA
活性碳	2.99	95%	17,091	5,716	0.55
ChromaSorb	2.93	93%	3,817	1,303	1.20
活性碳及 ChromaSorb	2.32	74%	1,676	722	1.45

NA - 不適用

實施例 11. 在不同 pH 值下利用活性碳進行 MAb I 親和性捕捉洗出液之靜態浸泡處理

研究活性碳在不同溶液 pH 值下自親和性（蛋白質 A）捕捉單株抗體洗出液中移除雜質以證明活性碳在多種不同溶液條件下有效。

在一個單獨實驗中，根據實施例 5 製備經部分純化之 MAb I 親和性（蛋白質 A）捕捉洗出液。用 Tris 鹼（2 M）

將 MAb I 洗出液自約 pH 5 調節至 pH 7，且經由 0.22 微米 Millipore Express Plus Stericup 過濾單元進行過濾。該溶液在本文中稱為 MAb I 蛋白質 A 洗出液。

藉由添加 Tris 鹼（2 M）或乙酸（3 M）將 MAb I 蛋白質 A 洗出液（20 mL）之 pH 值調節至 5、6、7 或 8。隨後使用 Millipore Express® 0.22 微米膜對所得 pH 值經調節之 MAb I 蛋白質 A 洗出液進行無菌過濾以移除任何混濁。接著將 RGC Nuchar 活性碳（10 mg）與 Tris-HCl 緩衝液（25 mM，pH 7）一起添加至 1.5 mL 離心管中以平衡活性碳。將該等管離心且移除上層平衡緩衝液。隨後向管中添加 1 mL pH 值經調節之 MAb I 蛋白質 A 洗出液。在室溫下在輕緩旋轉下允許吸附介質與洗出液相互作用 18 小時。接著對該等管進行離心並移除 0.5 mL 上層清液且分析宿主細胞蛋白質（HCP）及 IgG 濃度。使用得自 Cygnus Technologies（Southport, NC, USA）之市售 ELISA 套組，目錄號 F550，按照套組製造商之方案進行 HCP 分析。使用裝備 Poros® A 蛋白質 A 分析管柱之 Agilent HPLC 系統量測 IgG 濃度。結果彙總於表 VIII 中。

結果顯示，活性碳對於在較寬 pH 值範圍內自單株抗體溶液中移除雜質出乎意料地有效。對於 pH 6、pH 7 及 pH 8，宿主細胞蛋白質（HCP）之對數下降值（LRV）極其相似，HCP 之 LRV 在 1.27 至 1.30 範圍內。活性碳在 pH 5 下仍提供選擇性雜質移除，但 HCP 之 LRV 降至 0.70。對於所研究之所有 pH 值條件，活性碳均具有在 90% 至 95% 範圍內之極

佳單株抗體產物回收率。

表 VIII

pH 值	MAB I (mg/mL)		MAB I 之回收率	HCP (ng/mL)		HCP (ppm)		HCP 之 LRV
	對照組	A.C.之後		對照組	A.C.之後	對照組	A.C.之後	
5	7.31	6.97	95%	5,505	1,048	753	150	0.70
6	7.26	6.88	95%	1,986	101	274	15	1.27
7	7.04	6.79	96%	1,889	91	268	13	1.30
8	8.63	7.76	90%	1,556	75	180	10	1.27

實施例 12. 利用活性碳及/或陰離子交換介質進行 MAb I 親和性捕捉洗出液之流過處理

研究單獨及與陰離子交換介質組合之活性碳在流過應用中自親和性（蛋白質 A）捕捉單株抗體洗出液中移除雜質以證明單獨及與陰離子交換介質組合之活性碳提供一種用於在常用於大規模蛋白質純化之流過條件下移除雜質的獨特且出乎意料有效之方法。

根據實施例 5 製備經部分純化之 MAb I 親和性（蛋白質 A）捕捉洗出液。用 Tris 鹼（2 M）將 MAb I 洗出液自約 pH 5 調節至 pH 7，且經由 0.22 微米 Millipore Express Plus Stericup 過濾單元進行過濾。該溶液在本文中稱為 MAb I 蛋白質 A 洗出液。

將玻璃 Omnifit 層析管柱（10 mm 直徑，100 mm 長度）中裝載已於水中漿液化之 250 mg HD Nuchar 活性碳，獲得 1 mL 之填充管柱體積。用緩衝溶液（Tris-HCl 緩衝液，25 mM，pH 7）使管柱平衡。亦用緩衝溶液（Tris-HCl 緩衝液，

25 mM, pH 7) 使如上文於實施例 7 中所述製造之 0.2 mL ChromaSorb 裝置平衡。隨後組裝 3 種純化系列。第一種由 ChromaSorb 裝置組成, 第二種由活性碳管柱組成, 且第三種由活性碳管柱及 ChromaSorb 裝置依序組成。使 100 mL MAb I 蛋白質 A 洗出液以 0.25 mL/min 之流速通過各配置。收集該洗出液之 10 份 10 mL 洗提份。分析所有 10 份洗提份以及所選個別洗提份之彙集樣本的宿主細胞蛋白質 (HCP) 及 IgG 濃度。使用得自 Cygnus Technologies (Southport, NC, USA) 之市售 ELISA 套組 (目錄號 F550), 按照套組製造商之方案進行 HCP 分析。使用裝備 Poros® A 蛋白質 A 分析管柱之 Agilent HPLC 系統量測 IgG 濃度。結果彙總於表 IX 中。

如圖 16 中所述及表 IX 中所彙總, 結果顯示, 用單獨及與陰離子交換介質組合之活性碳進行親和性捕捉洗出液之流過處理對於自單株抗體溶液中移除雜質出乎意料地有效。活性碳與陰離子交換膜 (ChromoSorb) 之組合移除最大量之雜質, 其中宿主細胞蛋白質 (HCP) 之對數下降值 (LRV) 為 1.95。個別活性碳及陰離子交換介質分別具有 0.96 及 0.23 之 HCP 之 LRV。單獨及與陰離子交換介質組合之活性碳均具有極佳單株抗體產物回收率, 分別在 96% 及 98% 範圍內。

表 IX

流過系列	MAbI (mg/mL)	MAb I 之回收率	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	HCP 之 LRV
未經處理 (對照組)	9.21	NA	6,259	679	NA
僅 ChromaSorb	8.92	97%	3,538	397	0.23
僅活性碳	9.03	98%	1,330	148	0.96
活性碳，之後為 ChromaSorb	8.81	96%	67	8	1.95

NA - 不適用

實施例 13. 單獨或在用活性碳處理後用各種陰離子交換介質進行 MAb I 親和性捕捉洗出液之流過處理

研究單獨及與多種不同市售陰離子交換介質組合之活性碳自親和性 (蛋白質 A) 捕捉單株抗體洗出液中移除雜質以證明活性碳可與各種不同陰離子交換介質組合。所研究之市售陰離子交換介質包括一級胺 (ChomaSorb) 及四級胺 (Sartobind Q、Mustang Q、HiTrap Q FF)。研究承載於膜 (ChomaSorb、Sartobind Q、Mustang Q) 及樹脂 (HiTrap Q FF) 上之市售陰離子交換化學物質。

根據實施例 5 製備經部分純化之 MAb I 親和性 (蛋白質 A) 捕捉洗出液。用 Tris 鹼 (2 M) 將 MAb I 洗出液自約 pH 5 調節至 pH 7，且經由 0.22 微米 Millipore Express Plus Stericup 過濾單元進行過濾。該溶液在本文中稱為 MAb I 蛋白質 A 洗出液。

將玻璃 Omnifit 層析管柱 (10 mm 直徑，100 mm 長度) 中裝載已於水中漿液化之 250 mg HD Nuchar 活性碳，獲得 1 mL 之填充管柱體積。用緩衝溶液 (Tris-HCl 緩衝液，25

mM, pH 7) 使管柱平衡。使用市售 Sartobind Q 膜盤 (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) (0.26 mL, 3 片) 及裝置外殼以及用於製造如上文於實施例 7 中所述製造的 0.2 mL ChromaSorb 裝置之製程來製造三層 0.26 mL Sartobind Q 膜裝置。具有 Mustang Q 膜之 0.18 mL Acrodisc® 單元係購自 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)。將此等裝置與 1 mL HiTrap Q FF 預填充管柱 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) 及 0.2 mL ChromaSorb 裝置一起用緩衝溶液 (Tris-HCl 緩衝液, 25 mM, pH 7) 平衡。

組裝 9 種流過式純化系列：a) 活性碳；b) ChromaSorb；c) 依序為活性碳及 ChromaSorb；d) Sartobind Q；e) 依序為活性碳及 Sartobind Q；f) Mustang Q；g) 依序為活性碳及 Mustang Q；h) HiTrap Q FF；i) 依序為活性碳及 HiTrap Q FF。隨後，使 96 mL MAb I 蛋白質 A 洗出液以 0.25 mL/min 之流速通過各配置。通過純化系列之後，分析溶液的宿主細胞蛋白質 (HCP) 及 IgG 濃度。使用得自 Cygnus Technologies (Southport, NC, USA) 之市售 ELISA 套組 (目錄號 F550)，按照套組製造商之方案進行 HCP 分析。使用裝備 Poros® A 蛋白質 A 分析管柱之 Agilent HPLC 系統量測 IgG 濃度。結果彙總於表 X 中。

結果顯示，用活性碳與多種不同陰離子交換介質之組合對親和性 (蛋白質 A) 捕捉單株抗體洗出液進行流過處理對於雜質移除出乎意料地有效。對於單獨活性碳，宿主細

胞蛋白質（HCP）之對數下降值（LRV）為 0.91。不同的市售陰離子交換介質單獨使用時具有極其相似之 HCP 之 LRV，在 0.17 至 0.23 範圍內。依序為活性碳及不同市售陰離子交換介質之組合具有高得多的 HCP 之 LRV，在 1.70 至 1.93 範圍內。依序為活性碳及不同陰離子交換介質之組合具有極佳單株抗體產物回收率，在 96%至 97%範圍內。資料顯示，與多種不同市售陰離子交換介質（包括一級胺（ChomaSorb™）及四級胺（Sartobind Q、Mustang Q、HiTrap Q FF））組合之活性碳對於抗體純化出乎意料地有效。與承載於膜（ChomaSorb、Sartobind Q、Mustang Q）及樹脂（HiTrap Q FF）上之市售陰離子交換化學物質組合之活性碳的組合高度有效。

表 X

AEX 介質	MAb I (mg/mL)		MAb I 之回收率		HCP (ng/mL)		HCP (ppm)		HCP 之 LRV	
	AEX 單獨	依序為 AEX 及 A.C.	AEX 單獨	依序為 AEX 及 A.C.	AEX 單獨	依序為 AEX 及 A.C.	AEX 單獨	依序為 AEX 及 A.C.	AEX 單獨	依序為 AEX 及 A.C.
無 AEX 介質	NA	8.82	NA	96%	5,701	738	618	84	NA	0.91
ChromaSorb	9.20	8.89	100%	96%	3,660	70	398	8	0.23	1.93
Sartobind Q	9.26	8.99	100%	97%	4,103	98	443	11	0.19	1.80
Mustang Q	9.17	8.86	99%	96%	4,001	120	436	14	0.19	1.70
Q Fast Flow	9.20	8.76	100%	95%	4,245	81	462	9	0.17	1.86

NA - 不適用

實施例 14.依序用活性碳及陰離子交換介質或依序用陰離子交換介質及活性碳進行 MAb I 親和性捕捉洗出液之流過處理

研究用於自親和性（蛋白質 A）捕捉單株抗體洗出液中流過移除雜質之活性碳及陰離子交換介質的順序以證明兩種吸附劑之順序出乎意料地影響其有效性。該實驗說明，將活性碳置放在陰離子交換介質之前對於使吸附劑組合自蛋白質溶液中移除雜質之能力最大化很重要。

根據實施例 5 製備經部分純化之 MAb I 親和性（蛋白質 A）捕捉洗出液。用 Tris 鹼（2 M）將 MAb I 洗出液自約 pH 5 調節至 pH 7，且經由 0.22 微米 Millipore Express Plus Stericup 過濾單元進行過濾。該溶液在本文中稱為 MAb I 蛋白質 A 洗出液。

將玻璃 Omnifit 層析管柱（10 mm 直徑，100 mm 長度）中裝載已於水中漿液化之 250 mg HD Nuchar 活性碳，獲得 1 mL 之填充管柱體積。用緩衝溶液（Tris-HCl 緩衝液，25 mM，pH 7）使管柱平衡。亦用緩衝溶液（Tris-HCl 緩衝液，25 mM，pH 7）使如上文於實施例 7 中所述製造之 0.2 mL ChromaSorb 膜裝置平衡。組裝兩種流過系列。第一種依序具有活性碳管柱及 ChromaSorb 膜裝置，而第二種以相反順序，依序具有 ChromaSorb 膜裝置及活性碳管柱。使 96 mL MAb I 蛋白質 A 洗出液以 0.25 mL/min 之流速通過各配置。通過純化系列之後，分析溶液的宿主細胞蛋白質（HCP）及 IgG 濃度。使用得自 Cygnus Technologies（Southport, NC, USA）之市售 ELISA 套組（目錄號 F550），按照套組製造商之方案進行 HCP 分析。使用裝備 Poros® A 蛋白質 A 分析管柱之 Agilent HPLC 系統量測 IgG 濃度。結果彙總於表 XI

中。

結果顯示以下出乎意料之結果：活性碳及陰離子交換介質（ChromaSorb）之順序對於親和性（蛋白質 A）捕捉洗出液之流過式純化的有效性很有重要。當活性碳置放在陰離子交換介質之前時，宿主細胞蛋白質（HCP）之對數下降值（LRV）為 1.87。當陰離子交換介質置放在活性碳之前時，HCP 之 LRV 降至 1.38。活性碳與陰離子交換介質之順序對抗體回收率無影響，該回收率在兩種吸附劑順序下均為 97%。結果揭示一個重要的認識：活性碳置放在陰離子交換介質之前對於使兩種吸附劑之組合自蛋白質溶液中移除雜質之有效性最大化很重要。

表 XI

流過系列	MAb I (mg/mL)	MAb I 之回收率	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	HCP 之 LRV
未經處理（對照組）	9.24	NA	4,986	540	NA
依序為 ChromaSorb 及活性碳	8.95	97%	202	23	1.38
依序為活性碳及 ChromaSorb	8.95	97%	65	7	1.87

NA - 不適用

實施例 15. 利用活性碳進行 MAb I 非親和性捕捉洗出液之流過處理

研究活性碳在流過應用中自非親和性（陽離子交換）捕捉單株抗體洗出液中移除雜質以證明活性碳提供一種用於移除雜質之獨特且出乎意料有效之方法。相對於親和性（蛋白質 A）捕捉洗出液，非親和性（陽離子交換）捕捉洗

出液含有顯著較高含量之不同類型雜質。應用活性碳來純化非親和性捕捉洗出液證明此方法通用且可應用於純化多種不同蛋白質溶液。

如實施例 6 中所述製備經部分純化之 MAb I CEX 洗出液。用緩衝溶液 (Tris-HCl 緩衝液, 25 mM, pH 7) 將洗出液稀釋 4 倍。用 Tris 鹼 (2 M) 將經稀釋之 MAb I 洗出液自約 pH 6 調節至 pH 7, 且經由 0.22 微米 Millipore Express Plus Stericup 過濾單元進行過濾。該溶液在本文中稱為 MAb I CEX 洗出液。

將玻璃 Omnifit 層析管柱 (10 mm 直徑, 100 mm 長度) 中裝載已於水中漿液化之 250 mg HD Nuchar 活性碳, 獲得 1 mL 之填充管柱體積。用緩衝溶液 (Tris-HCl 緩衝液, 25 mM, pH 7) 使管柱平衡。

接著使 70 mL MAb I CEX 洗出液以 0.25 mL/min 之流速通過活性碳管柱。收集該洗出液之 7 份 10 mL 洗提份。分析所有 7 份洗提份以及所選個別洗提份之彙集樣本的宿主細胞蛋白質 (HCP) 及 IgG 濃度。使用得自 Cygnus Technologies (Southport, NC, USA) 之市售 ELISA 套組 (目錄號 F550), 按照套組製造商之方案進行 HCP 分析。使用裝備 Poros® A 蛋白質 A 分析管柱之 Agilent HPLC 系統量測 IgG 濃度。結果彙總於表 XI 中。

如圖 16 中所述及以下表 XII 中所彙總, 結果顯示, 用活性碳進行之流過式純化對於自非親和性 (陽離子交換) 捕捉單株抗體洗出液中移除雜質出乎意料地有效。與更具

特異性之基於親和性（蛋白質 A）之捕捉介質相比，基於非親和性（陽離子交換）之捕捉介質結合更多雜質與單株抗體。因此，非親和性捕捉洗出液含有顯著較高含量之不同類型雜質。活性碳提供 0.76 之宿主細胞蛋白質（HCP）對數下降值（LRV）且具有 89% 之單株抗體產物回收率。此等結果表明活性碳可用於自多種不同蛋白質溶液中移除雜質。

表 XII

流過系列	MAb I (mg/mL)	MAb I 之回收率	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	HCP 之 LRV
未經處理（對照組）	3.13	NA	66,269	21,172	NA
活性碳管柱	2.79	89%	10,343	3,707	0.76

NA - 不適用

實施例 16. 用活性碳填充管柱及活性碳-纖維素裝置進行 MAb I 親和性捕捉洗出液之流過式純化

研究填充在管柱中或摻合在纖維素片中之活性碳在流過應用中自親和性（蛋白質 A）捕捉單株抗體洗出液中移除雜質以證明活性碳提供一種用於移除呈不同形式之雜質的獨特且出乎意料有效之方法。

根據實施例 5 製備經部分純化之 MAb I 親和性（蛋白質 A）捕捉洗出液。用 Tris 鹼（2 M）將 MAb I 洗出液自約 pH 5 調節至 pH 7，且經由 0.22 微米 Millipore Express Plus Stericup 過濾單元進行過濾。該溶液在本文中稱為 MAb I 蛋白質 A 洗出液。

將玻璃 Omnifit 層析管柱 (15 mm 直徑, 100 mm 長度) 中裝載已於水中漿液化之 600 mg HD Nuchar 活性碳, 獲得 2.4 mL 之填充管柱體積。將以 Millistak+ Pod CR 裝置形式購自 Millipore 公司 (Billerica, MA) 之經活性碳浸漬之纖維素片介質置於包覆模製聚丙烯注射器裝置 (內部過濾面積 25 mm², 4.6 mL 柱床體積, 裝備有針對入口及出口之 Luer 連接件) 中。

用緩衝溶液 (Tris-HCl 緩衝液, 25 mM, pH 7) 使管柱及活性碳-纖維素裝置平衡。組裝兩種流過系列。第一種具有活性碳管柱, 而第二種具有活性碳-纖維素裝置。隨後, 使 315 mL MA b I 蛋白質 A 洗出液以 0.75 mL/min 之流速通過各配置。通過純化系列之後, 分析溶液的宿主細胞蛋白質 (HCP) 及 IgG 濃度。使用得自 Cygnus Technologies (Southport, NC, USA) 之市售 ELISA 套組 (目錄號 F550), 按照套組製造商之方案進行 HCP 分析。使用裝備 Poros® A 蛋白質 A 分析管柱之 Agilent HPLC 系統量測 IgG 濃度。結果彙總於表 XIII 中。

結果顯示, 當將活性碳填充至管柱中或摻合至纖維素片中時, 用活性碳進行之流過式純化對於自親和性 (蛋白質 A) 捕捉單株抗體洗出液中移除雜質出乎意料地有效。填充至管柱中或摻合至纖維素片中之活性碳均提供極其相似之宿主細胞蛋白質 (HCP) 對數下降值 (LRV), 分別為 0.95 及 0.97。其亦具有極其相似之單株抗體產物回收率, 管柱為 91% 且纖維素片為 87%。此等結果表明活性碳在摻合至

纖維素片中時可有效地用於自蛋白質溶液中移除雜質。

表 XIII

流過系列	MAb I (mg/mL)	MAb I 之回收率	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	HCP 之 LRV
未經處理 (對照組)	9.79	NA	6,229	642	NA
HD Nuchar 活性碳管柱	8.92	91%	682	76	0.95
活性碳-纖維素裝置	8.53	87%	620	73	0.97

NA - 不適用

實施例 17. 利用兩種其他類型活性碳進行 MAb I 親和性捕捉洗出液之流過式純化

研究兩種其他類型市售活性碳在流過應用中自親和性 (蛋白質 A) 捕捉單株抗體洗出液中移除雜質以證明以下出乎意料之結果：多種不同活性碳可用於自蛋白質溶液中移除雜質。

根據實施例 5 製備經部分純化之 MAb I 親和性 (蛋白質 A) 捕捉洗出液。用 Tris 鹼 (2 M) 將 MAb I 洗出液自約 pH 5 調節至 pH 7，且經由 0.22 微米 Millipore Express Plus Stericup 過濾單元進行過濾。該溶液在本文中稱為 MAb I 蛋白質 A 洗出液。

將玻璃 Omnifit 層析管柱 (5 mm 直徑，100 mm 長度) 中裝載已於水中漿液化之 125 mg Chemvicon Pulsorb PGC 活性碳 (Chemvicon Carbon, Feluy, Belgium) 或 Norit A Supra USP 活性碳 (Norit Americas 公司, Marshall, Texas, USA)，

獲得 0.24 mL 之填充管柱體積。用緩衝溶液 (Tris-HCl 緩衝液, 25 mM, pH 7) 使管柱平衡。組裝兩種流過系列。第一種具有 Chemvicon Pulsorb PGC 活性碳管柱, 而第二種具有 Norit A Supra USP 活性碳管柱。使 96 mL MAb I 蛋白質 A 洗出液以 0.25 mL/min 之流速通過各配置。通過純化系列之後, 分析溶液的宿主細胞蛋白質 (HCP) 及 IgG 濃度。使用得自 Cygnus Technologies (Southport, NC, USA) 之市售 ELISA 套組 (目錄號 F550), 按照套組製造商之方案進行 HCP 分析。使用裝備 Poros® A 蛋白質 A 分析管柱之 Agilent HPLC 系統量測 IgG 濃度。結果彙總於表 XIV 中。

結果顯示, 用兩種其他類型活性碳進行之流過式純化對於自親和性 (蛋白質 A) 捕捉單株抗體洗出液中移除雜質出乎意料地有效。Chemvicon Pulsorb PSG 及 Norit A Supra USP 均移除雜質, 宿主細胞蛋白質 (HCP) 之對數下降值 (LRV) 分別為 0.40 及 0.48。其亦具有極佳單株抗體產物回收率, Chemvicon Pulsorb PSG 為 100% 且 Norit A Supra USP 為 100%。此等結果表明若干不同類型之活性碳可用於自蛋白質溶液中移除雜質。

表 XIV

流過系列	MAb I (mg/mL)	MAb 之回收率	HCP (ng/mL)	HCP (ppm)	HCP 之 LRV
未經處理 (對照組)	7.15	NA	1026	144	NA
Chemvicon Pulsorb PGC	7.18	100%	409	57	0.40
Norit A Supra USP	7.17	100%	341	48	0.48

NA - 不適用

實施例 18.在存在不同緩衝鹽的情況下進行 MAb I 親和性捕捉洗出液之流過式純化

研究活性碳在流過應用中自添加各種不同鹽之親和性 (蛋白質 A) 捕捉單株抗體洗出液中移除雜質以證明活性碳提供一種用於在存在許多不同鹽的情況下移除雜質的獨特且出乎意料有效之方法。該研究說明此方法通用且可應用於純化多種不同緩衝鹽中之蛋白質。

根據實施例 5 製備經部分純化之 MAb I 親和性 (蛋白質 A) 捕捉洗出液。用 Tris 鹼 (2 M) 將 MAb I 洗出液自約 pH 5 調節至 pH 7, 且經由 0.22 微米 Millipore Express Plus Stericup 過濾單元進行過濾。該溶液在本文中稱為 MAb I 蛋白質 A 洗出液。

向 MAb I 蛋白質 A 洗出液之 50 mL 部分中添加 10 mL 含有 300 mM 各種鹽之水溶液, 其中該等鹽為硫酸銨、脫水乙二胺四乙酸二鈉鹽 (EDTA)、2-(N-嗎啉基)乙磺酸 (MES)、氯化鈉、脫水檸檬酸三鈉、七水合磷酸氫二鈉及 Trizma® 預設晶體 pH 7.0 (Tris-HCl)。

使用經 10 mL 水稀釋之溶液作為對照組。用 2 M Tris 鹼或 3 M 乙酸將外加鹽之蛋白質 A 洗出液的 pH 值調節回至 7。該溶液在本文中稱為外加鹽之 MAb I 蛋白質 A 洗出液。

將玻璃 Omnifit 層析管柱 (5 mm 直徑, 100 mm 長度) 中裝載已於水中漿液化之 125 mg HD Nuchar 活性碳, 獲得 0.5 mL 之填充管柱體積。用緩衝溶液 (Tris-HCl 緩衝液, 25 mM, pH 7) 使管柱平衡。接著使 40 mL 外加鹽之 MAb I

蛋白質 A 洗出液以 0.125 mL/min 之流速通過活性碳管柱。通過管柱之後，分析溶液的宿主細胞蛋白質（HCP）及 IgG 濃度。使用得自 Cygnus Technologies (Southport, NC, USA) 之市售 ELISA 套組（目錄號 F550），按照套組製造商之方案進行 HCP 分析。使用裝備 Poros® A 蛋白質 A 分析管柱之 Agilent HPLC 系統量測 IgG 濃度。結果彙總於表 XV 中。

結果顯示，用活性碳對親和性（蛋白質 A）捕捉單株抗體洗出液進行流過式純化對於在存在多種不同鹽添加劑的情況下移除雜質出乎意料地有效。活性碳在存在所有所添加之鹽的情況下移除雜質，宿主細胞蛋白質（HCP）之對數下降值（LRV）在 0.63 至 1.00 之範圍內。其亦具有在 92% 至 96% 範圍內之極佳單株抗體產物回收率。此等結果表明活性碳可用於自多種不同的鹽緩衝液中之蛋白質溶液中移除雜質。

表 XV

外加鹽	MAb I(mg/mL)		MAb I 之回收率	HCP(ng/mL)		HCP(ppm)		HCP 之 LRV
	A.C 之前	A.C 之後		A.C 之前	A.C 之後	A.C 之前	A.C 之後	
僅水(對照組)	7.33	6.86	94%	987	76	135	11	1.08
Tris	6.99	6.68	96%	1,194	119	171	18	0.98
氯化鈉	6.58	6.33	96%	1,151	111	175	17	1.00
硫酸銨	6.93	6.66	96%	1,359	177	196	27	0.87
磷酸氫二鈉	6.92	6.59	95%	1,293	153	187	23	0.90
檸檬酸鈉	6.53	6.03	92%	1,351	241	207	40	0.71
EDTA	6.71	6.39	95%	1,304	293	194	46	0.63
MES	6.90	6.54	94%	1,110	132	161	20	0.90

實施例 19. 在 pH 5 及 pH 7 下進行蛋白質 A 洗出液之流過式純化

研究活性碳在流過應用中在兩種不同 pH 值條件下自親和性（蛋白質 A）捕捉單株抗體洗出液中移除雜質以證明活性碳提供一種用於在不同溶液 pH 值條件下流過式移除雜質的獨特且出乎意料有效之方法。該研究說明此方法通用且可應用於在不同 pH 值條件下純化蛋白質。

根據實施例 5 製備經部分純化之 MAb I 親和性（蛋白質 A）捕捉洗出液。該溶液在本文中稱為 pH 5 MAb I 蛋白質 A 洗出液。

用 Tris 鹼（2 M）將根據實施例 5 製備之 MAb I 洗出液之一部分自約 pH 5 調節至 pH 7，且經由 0.22 微米 Millipore Express Plus Stericup 過濾單元進行過濾。該溶液在本文中稱為 pH 7 MAb I 蛋白質 A 洗出液。

將玻璃 Omnifit 層析管柱（15 mm 直徑，100 mm 長度）中裝載已於水中漿液化之 1.25 g HD Nuchar 活性碳，獲得 5 mL 之填充管柱體積。用緩衝溶液（Tris-HCl 緩衝液，25 mM，pH 7）使管柱平衡。接著使 500 mL pH 5 MAb I 蛋白質 A 洗出液或 pH 7 MAb I 蛋白質 A 洗出液以 1.25 mL/min 之流速通過活化管柱。通過純化系列之後，分析溶液的宿主細胞蛋白質（HCP）及 IgG 濃度。使用得自 Cygnus Technologies（Southport，NC，USA）之市售 ELISA 套組（目錄號 F550），按照套組製造商之說明進行 HCP 分析。使用裝備 Poros® A 蛋白質 A 分析管柱之 Agilent HPLC 系統量測 IgG 濃度。結果彙總於表 XVI 中。

結果顯示，用活性碳對親和性（蛋白質 A）捕捉單株抗

體洗出液進行流過式純化對於在 pH 5 及 pH 7 下移除雜質出乎意料地有效。活性碳移除雜質，宿主細胞蛋白質（HCP）之對數下降值（LRV）在 pH 5 下為 0.85，而在 pH 7 下為 1.15。活性碳亦具有極佳單株抗體回收率，在 pH 5 下為 97%，而在 pH 7 下為 101%。此等結果表明活性碳可用於在不同 pH 值條件下移除蛋白質溶液之雜質。

表 XVI

pH 值	MAb I (mg/mL)		MAb I 之回收率	HCP(ng/mL)		HCP(ppm)		HCP 之 LRV
	A.C.之前	A.C.之後		A.C.之前	A.C.之後	A.C.之前	A.C.之後	
5	9.22	8.98	97%	3,429	486	371	54	0.85
7	8.61	8.68	101%	1,774	124	206	14	1.15

實施例 20. 使用連續層析對所製備之蛋白質 A 洗出液進行流過式純化

此代表性實驗證明，活性碳及陰離子交換層析裝置可用於使用連續多管柱層析（CMC）對所獲得之蛋白質 A 洗出液進行純化。

在此實施例中，如同在申請中之歐洲專利申請案第 EP12002828.7 號中所述，使用三管柱連續多管柱層析（CMC）法使用 Prosep® Ultra Plus 蛋白質 A 樹脂來純化單株抗體（MAb II），該申請案以引用的方式併入本文中。如實施例 12 中所述，彙集蛋白質 A 洗出液且依序通過活性碳裝置及陰離子交換層析裝置（亦即 ChromaSorb™）進行處理。

如圖 18 中所顯示，當使用活性碳與陰離子交換層析裝置之組合時，獲得單株抗體之成功純化，如由 HCP 濃度降至 10 ppm 以下所量度。

實施例 21. 連接若干個流過式雜質移除步驟

在此代表性實驗中，證明在流過模式中連接若干個雜質移除步驟以便作為單一單元操作或製程步驟加以操作同時滿足產物純度及產率目標的可行性。

在此實施例中，將個別裝置，亦即活性碳裝置、陰離子交換層析裝置（亦即 ChromaSorb™）、陽離子交換層析裝置及病毒過濾裝置（亦即 Viresolve® Pro）連接以便以流過模式進行操作。此外，將線內靜態混合器及/或緩衝槽定位在陰離子交換層析裝置與陽離子交換層析裝置之間以達成 pH 值改變。最後，將視情況選用之深度過濾器定位於活性碳裝置上游以防止正在進行純化之樣本混濁。

圖 19 描述實驗配置用於進行流過式純化製程步驟之示意性圖示，該步驟包括以下所述之裝置。

此外，此種配置中亦可包括必需的泵、閥門、感測器等。

所有裝置在不同位置處個別地經濕潤，接著組裝。根據製造商之方案對該等裝置進行濕潤及預處理。簡言之，依序用 100 L/m^2 之水及 5 倍體積之平衡緩衝液 1（EB1；用 1 M Tris 鹼（pH 11）調節至 pH 7.5 之蛋白質 A 洗提緩衝液）沖洗深度過濾器（A1HC 等級）。如實施例 12 中所述將 2.5 mL 活性碳填充至 2.5 cm Omnifit 管柱中以產生 0.55 kg/L 之抗

體負載。用 10 倍 CV 之水沖洗管柱，接著用 EB1 平衡直至 pH 值穩定至 pH 7.5。將兩個 ChromaSorb 裝置（0.2 mL 及 0.12 mL）串聯連接以獲得 4.3 kg/L 之負載。以 12.5 倍 CV/min 用水濕潤該等裝置，持續至少 10 分鐘，接著用 5 倍 DV（裝置體積）之 EB1 來濕潤裝置。使用具有 12 個元件之拋棄式螺旋狀靜態混合器（Koflo 公司，Cary，IL）來進行線內 pH 值調節。將兩個用於移除聚集物之 1.2 mL 陽離子交換流過裝置並聯連接以移除聚集物。CEX 裝置上之 MAbs 負載為約 570 mg/mL。依序用 10 倍 DV 之水及 5 倍 DV 之平衡緩衝液 2（EB2；使用 1 M 乙酸調節至 pH 5.0 的 EB1）來濕潤此等裝置。用 5 倍 DV（裝置體積）之 EB2 + 1 M NaCl 進一步處理該等裝置，接著用 5 倍 DV 之 EB2 平衡。用壓力為 30 psi 之水將 3.1 cm² VireSolve® Pro 裝置濕潤至少 10 分鐘。接著每分鐘監測流速直至流速保持恆定連續 3 分鐘。在所有裝置均濕潤及平衡之後，如圖 19 中所示將其連接。使 EB1 通過整個系統直至所有壓力讀數及 pH 值讀數均穩定。平衡之後，使饋料通過流過系列。運作期間，在緩衝槽之前及 Viresolve® Pro 之後收集樣本以監測 IgG 濃度及雜質含量（HCP、DNA、浸析 PrA 及聚集物）。處理饋料之後，用 3 倍死體積之 EB1 沖洗系統以回收裝置及管系中之蛋白質。

用於所連接之流過製程的饋料為分批蛋白質 A 製程中所產生之 MAbs II 蛋白質 A 洗出液。此 MAbs 中聚集物之天然含量不超過 1%，因此開發特殊程序以增加聚集物之含量。伴隨輕緩攪拌用 NaOH 水溶液使溶液 pH 值上升至 11

且保持 1 小時。接著在輕緩攪拌下用 HCl 水溶液使 pH 值緩慢降至 pH 5。將該 pH 值循環重複 4 次。聚集物之最終含量為約 5%，主要由 MAb 二聚物及三聚物組成，如由 SEC 所量測。接著使饋料透析至 Tris-HCl 緩衝液（pH 7.5，電導率為約 3 mS/cm）中。

此運作所處理之 MAb 饋料之量為 102 mL 之 13.5 mg/mL MAb，流速為 0.6 mL/min。

在 ChromaSorb™之後，隨時間變化之 HCP 穿透低於上限 10 ppm（圖 20）。CEX 裝置將聚集物自 5%減至 1.1%（圖 21）。所連接之製程的 MAb II 產率為 92%。Viresolve® Pro 裝置上之輸送量 $>3.7 \text{ kg/m}^2$ 。

因此，上述實施例顯示若干個裝置可經連接而成功地以流過模式操作，從而達到所要產物純度及產率目標。

實施例 22.連接流過式純化製程步驟與連續結合及洗提層析捕捉步驟

在此代表性實驗中，將如本文所述之流過式純化製程直接連接至連續結合及洗提層析捕捉製程，該連續結合及洗提層析捕捉製程位於流過式純化之前。

在此實施例中，在分批饋料生物反應器中產生基於 CHO 之單株抗體（MAb II）。使總共 7 L 細胞培養物與刺激反應性聚合物溶液接觸以產生 0.2% v/v 之最終刺激反應性聚合物濃度。允許細胞培養物混合約 10 分鐘。添加 175 mL 2 M K_2HPO_4 溶液且允許再混合 10 分鐘。接著用 2 M tris 鹼使 pH 值上升至 7.0 且允許混合 15 分鐘。接著在 $4,500\times g$ 下

將溶液以 2 L 等分試樣形式離心 10 分鐘，且傾析並保留上層清液。除去固體。彙集細胞培養物上層清液，接著在連續攪拌下以分批模式以 1:10 之比率與 5 M NaCl 混合。此時量測該溶液之最終電導率且其為 55 ± 5 mS/cm。使 NaCl 濃度較高之所得溶液經由 0.22 μ m Express 過濾器進行無菌過濾。經無菌過濾之溶液為用於蛋白質 A 層析之裝載材料。

蛋白質 A 捕捉步驟由兩個蛋白質 A 管柱利用基於改進型 Akta Explorer 100 之方法來運作組成。蛋白質 A 管柱具有 10 mL ProSep® Ultra Plus 蛋白質 A 介質，該介質填充至 1.6 cm 內徑 Vantage-L (EMD Millipore) 層析管柱中直至柱床高度為 10.25 cm 及 10.85 cm。用 5 倍管柱體積 (CV) 之 1×TBS、0.5 M NaCl 使管柱平衡 (所有管柱體積均基於最小管柱)。在整個運作中，設定負載流速以便具有約 1 分鐘之負載滯留時間。在初始負載期間，兩個管柱串聯置放，其中一級管柱之流出物直接負載至二級管柱上直至達到特定負載體積。使特定負載體積通過管柱之後，停止饋料且使 2 倍 CV 之平衡緩衝液通過一級管柱到達二級管柱。接著將一級管柱定位以進行洗滌、洗提、清潔及再平衡，同時將二級管柱負載為一級管柱。使第一管柱再平衡之後，接著將該管柱移動至二級位置以便與現在之一級管柱串聯存在。重複此系列事件，其中在初始一級位置管柱負載至設定體積之後，使各管柱處於一級位置。將各管柱裝載總計 7 次。藉由使用 UV 觸發器來控制洗提之起始時間，用洗提份收集器收集來自各管柱之洗出液並且收集至約 3.5 倍 CV 之恆定

體積。

流過式純化系列由 6 個主要裝置組成：視情況選用之深度過濾器（用於在 pH 值調節至 pH 7.5 之後進行沈澱物移除）；活性碳；ChromaSorb™；用於線內 pH 值調節之靜態混合器及/或緩衝槽；用於聚集物移除之陽離子交換流過裝置（CEX 裝置）；及病毒過濾裝置（亦即 Viresolve® Pro）。

圖 19 說明此等裝置連接之順序。

所有裝置在不同位置個別地經濕潤，接著如圖 19 中所示進行組裝。根據製造商之方案或如先前所述對該等裝置進行濕潤及預處理。簡言之，依序用 100 L/m² 之水及 5 倍體積之平衡緩衝液 1（EB1；用 1 M Tris 鹼（pH 11）調節至 pH 7.5 之 PrA 洗提緩衝液）沖洗深度過濾器（A1HC）。如實施例 12 中所述將 10 mL 活性碳填充至 2.5 cm Omnifit 管柱中。用 10 倍 CV 之水沖洗管柱，接著用 EB1 平衡直至 pH 值穩定至 pH 7.5。將 1.2 mL ChromaSorb 膜（7 層）堆疊至 47 mm 直徑 Swinex 裝置中。以 12.5 倍 CV/min 用水濕潤裝置，持續至少 10 分鐘，接著用 5 倍裝置體積（DV）之 EB1 濕潤裝置。使用具有 12 個元件之拋棄式螺旋狀靜態混合器（Koflo 公司，Cary, IL）來進行線內 pH 值調節。依序用 10 倍 DV 之水及 5 倍 DV 之平衡緩衝液 2（EB2：使用 1 M 乙酸調節至 pH 5.0 之 EB1）濕潤三層陽離子交換層析裝置（0.12 mL 膜體積）。再用 5 倍 DV 之 EB2 + 1 M NaCl 處理裝置，接著用 5 倍 DV 之 EB2 平衡。用壓力為 30 psi 之水將 3.1 cm² VireSolve® Pro 病毒過濾裝置濕潤至少 10

分鐘。接著每分鐘監測流速直至流速保持恆定連續 3 分鐘。在所有裝置均濕潤並平衡之後，如圖 19 中所示將其連接。使 EB1 通過整個系統直至所有壓力讀數及 pH 值讀數均穩定。平衡之後，使饋料（調節至 pH 7.5 之 PrA 洗出液）通過流過式純化系列。運作期間，在緩衝槽之前及 Viresolve® Pro 之後收集樣本以監測 IgG 濃度及雜質含量（HCP、DNA、浸析 PrA 及聚集物）。處理饋料之後，用 3 倍死體積之 EB1 沖洗系統以回收裝置及管系中之蛋白質。

圖 22 顯示深度過濾器、活性碳及 ViresolvePro 之前的壓力讀數。對於該運作之大部分，深度過濾器上之壓力保持不變，但在接近結束時上升，表明在蛋白質 A 運作接近結束時蛋白質 A 洗出液饋料洗提份存在一定程度的沈澱。活性碳管柱由於活性碳上游之深度過濾器而保持不受任何沈澱物損害。ViresolvePro 壓力隨時間緩慢上升，但遠遠低於操作最大限度（50 psi）。

ViresolvePro 彙集物中之最終 HCP < 1 ppm（表 XVI）。洗提份中之平均浸析蛋白質 A 為 32 ppm。Viresolve® Pro 彙集物中之浸析蛋白質 A 為 4 ppm。聚集物自 1% 減至 0.4%。以下表 XVII 描述研究當與連續結合及洗提層析製程步驟連接時之流過式純化效能之實驗的結果。

表 XVII

流過式純化產率 (%)	97.8%
ViresolvePro 彙集物中所有 PrA 洗出液之平均 HCP (ppm)	172 → 1.75
ViresolvePro 彙集物中之聚集物 (%)	1 → 0.4%
ViresolvePro 彙集物中之傾析 PrA (ppm)	32→4
ViresolvePro 輸送量 (kg/m ²)	> 6.1
蛋白質 A 後稀釋因子	1.15×

實施例 23. 使用活性碳移除細胞培養物組分雜質

在此代表性實驗中，證明活性碳自可持續通過蛋白質 A 親和性捕捉步驟之細胞培養物中移除潛在雜質。

細胞培養基之常見組分胰島素為哺乳動物細胞之生長刺激劑，其典型地以 1 mg/L 至 20 mg/L 之濃度存在於細胞培養基中。將重組人類胰島素 (Incelligent AF，得自 EMD Millipore 公司) 以 1 mg/mL 溶解於 50 mM Tris pH 7.0 緩衝液中，添加單株抗體 MAb II 直至濃度為 7 g/L。將玻璃 Omnifit 管柱中填充 HD Nuchar 活性碳。使溶液以 0.25 CV/min 之恆定速率流過管柱，達到 1 kg/L 之總 MAb II 負載。分析流過彙集物之胰島素及抗體濃度。分析時，使用裝備有 HC18 管柱 (Cadenza) 之 Agilent HPLC 系統；使用以下條件由 UV A214 吸光度偵測胰島素：溶劑 A：0.1% TFA/水；溶劑 B：0.1% TFA/乙腈；優化梯度 5% 至 30% B，經 15 分鐘。首先，在存在抗體的情況下使用胰島素標準溶液產生校正曲線。在來自活性碳管柱之流出物中未偵測到胰島素，表明活性碳在存在 MAb 的情況下具有胰島素容量，超過 240 mg/g。

實施例 24. 用活性碳纖維素介質自 MA b II 親和性捕捉洗出液之混濁溶液中流過式移除雜質

在此代表性實驗中，證明活性碳對於移除源自於微生物饋料之 HCP 獨特且出乎意料地有效。以 1.5 mg/mL 向大腸桿菌溶胞物溶液中外加 mAb 單株抗體。在流過條件下用填充於管柱中之活性碳處理外加饋料。

藉由離心自大腸桿菌培養物中回收細胞。傾析出上層清液且藉由用力振盪及攪拌將剩餘細胞集結粒懸浮於溶解緩衝液（25 mM Tris、0.1 mM EDTA，pH 7）中。接著添加一份 0.4 mL 於乙醇中之 100 mM PMSF 儲備溶液。將懸浮液分成數份（各約 100 mL）且進行開啟 3 秒且關閉 4 秒之音波處理，持續 5 分鐘。音波處理之後，彙集材料且在 -80 °C 下儲存 48 小時。接著將溶液解凍並在 4,500×g 下離心 2 小時以移除溶解之細胞。用 Stericup-HV 0.45 µm Durapore 膜（1000 mL，目錄號：SCHVU11RE，Millipore 公司，Billerica，MA，01821，USA）過濾上層清液。接著使其經由 Stericup-GP 0.22 µm Millipore Express PLUS 膜（1000 mL，目錄號：SCGPU11RE，Millipore 公司，Billerica，MA，01821，USA）進行過濾。接著將經過濾之溶胞物與 7.5 mL 10 mg/mL mAb 溶液合併，獲得外加 1.5 mL mAb 之溶液。溶液之 pH 值經量測為 7.7。

將玻璃 Omnifit 層析管柱（10 mm 直徑，100 mm 長度）中裝載已於水中漿液化之 250 mg Nuchar HD 活性碳（MeadWestVaco 公司，Richmond，VA，USA），獲得 1 mL

之填充管柱體積。用 25 mM Tris 緩衝液 (pH 7) 平衡管柱。接著使 42 mL 外加 mAb 之大腸桿菌溶胞物以 0.25 mL/min 之流速通過活性碳管柱，在活性碳中獲得 4 分鐘滯留時間。提交對照組及彙集物樣本供分析宿主細胞蛋白質 (HCP) 及 IgG 濃度之用。

使用得自 Cygnus Technologies (Southport, NC, USA) 之市售大腸桿菌 HCP ELISA 套組 (目錄號 F410)，按照套組製造商之說明進行 HCP 分析。使用裝備 Poros® A 蛋白質 A 分析管柱之 Agilent HPLC 系統量測 IgG 濃度。結果顯示，活性碳對於選擇性移除源自於微生物饋料之 HCP 出乎意料地有效。溶胞物中 HCP 之濃度自 206,000 ng/mL (133,000 ppm) 降至 119,000 ng/mL (77,800 ppm)，而 mAb 之回收率為 99%，起始濃度為 1.55 g/L 且回收濃度為 1.53 g/L。此實施例證明活性碳可用於自非哺乳動物細胞中移除 HCP。

實施例 25. 用活性碳-纖維素介質及陰離子交換介質自 MAb II 親和性捕捉洗出液之混濁溶液中移除雜質

在此實驗中，證明單獨及與離子交換介質組合之活性碳對於移除捕捉步驟後源自於微生物饋料之 HCP 獨特且出乎意料地有效。

以 1.5 mg/mL 向大腸桿菌溶胞物溶液中外加 mAb 單株抗體，接著用蛋白質 A 層析進行捕捉。依序用填充於管柱中之活性碳（在流過條件下）及 ChromaSorb™ AEX 膜處理經捕捉之饋料。

藉由離心自大腸桿菌培養物中回收細胞。傾析出上層

清液且藉由用力振盪及攪拌將剩餘細胞集結粒懸浮於溶解緩衝液（25 mM Tris、0.1 mM EDTA，pH 7）中。接著添加一份 0.4 mL 於乙醇中之 100 mM PMSF 儲備溶液。將懸浮液分成數份（各約 100 mL）且進行開啟 3 秒且關閉 4 秒之音波處理，持續 5 分鐘。音波處理之後，彙集材料且在 -80 °C 下儲存 48 小時。接著將溶液解凍並在 $4,500\times g$ 下離心 2 小時以移除溶解之細胞。用 Stericup-HV 0.45 μm Durapore 膜（1000 mL，目錄號：SCHVU11RE，Millipore 公司，Billerica，MA，01821，USA）過濾上層清液。接著使其經由 Stericup-GP 0.22 μm Millipore Express PLUS 膜（1000 mL，目錄號：SCGPU11RE，Millipore 公司，Billerica，MA，01821，USA）進行過濾。接著將經過濾之溶胞物與 7.5 mL 10 mg/mL mAb 溶液合併，獲得外加 1.5 mL mAb 之溶液。溶液之 pH 值經量測為 7.7。接著用蛋白質 A 層析捕捉外加溶胞物中之 mAb。接著在較低 pH 值下洗提 30 mL 經捕捉之 mAb。藉由逐滴添加 1 M Tris 使洗出液 pH 值自 3 至 4 上升至 7，接著經由 Stericup-GP 0.22 μm Millipore Express PLUS 膜（250 mL，目錄號：SCGPU02RE，Millipore 公司，Billerica，MA，01821，USA）進行過濾。留出 1 mL pH 值經調節之洗出液供分析之用。

將玻璃 Omnifit 層析管柱（10 mm 直徑，100 mm 長度）中裝載已於水中漿液化之 250 mg Nuchar HD 活性碳（MeadWestVaco 公司，Richmond，VA，USA），獲得 1 mL 之填充管柱體積。用 25 mM Tris 緩衝液（pH 7）平衡管柱。

接著使 29 mL mAb 蛋白質 A 層析洗出液以 0.2 mL/min 通過活性碳，獲得 4 分鐘之滯留時間。留出 1 mL 經活性碳處理之洗出液供分析之用。

接著，根據說明用水濕潤 0.08 mL ChromaSorb™ 裝置 (EMD Millipore 公司，Billerica，MA 01821，USA)，接著用 25 mM Tris pH 7 沖洗。接著使 27 mL 經活性碳處理之洗出液以 0.5 mL/min 之流速通過 ChromaSorb 裝置，獲得 0.16 分鐘之滯留時間。留出 1 mL 經活性碳及 ChromaSorb 處理之洗出液供分析之用。

分析各樣本之宿主細胞蛋白質 (HCP) 及 IgG 濃度。使用得自 Cygnus Technologies (Southport，NC，USA) 之市售大腸桿菌 HCP ELISA 套組 (目錄號 F410)，按照套組製造商之說明進行 HCP 分析。使用裝備 Poros® A 蛋白質 A 分析管柱之 Agilent HPLC 系統量測 IgG 濃度。

結果顯示，單獨及與 AEX 膜組合之活性碳對於自微生物饋料之捕捉洗出液中選擇性移除 HCP 出乎意料地有效。活性碳使洗出液中 HCP 之濃度自 86 ng/mL (7 ppm) 降至 8 ng/mL (0.7 ppm)，而 mAb 回收率為 97%，起始濃度為 11.5 g/L 且回收濃度為 11.2 g/L。ChromaSorb AEX 膜將經活性碳處理之洗出液中 HCP 之濃度進一步降至 3 ng/mL (0.3 ppm)，mAb 總回收率為 96%，獲得 11.1 g/L 之最終濃度。此實施例證明單獨及與 AEX 介質組合之活性碳可用於移除捕捉步驟後源自於非哺乳動物細胞之 HCP。

根據本說明書內所引用之參考文獻的教示最透徹地理

解本說明書，該等參考文獻以引用方式併入本文中。本說明書內之具體實例提供本發明具體實例之說明且不應被視為限制其範疇。熟練技術者容易認識到，本發明涵蓋許多其他具體實例。所有公開案及發明均以全文引用的方式併入本文中。在以引用方式併入之材料與本說明書矛盾或不一致的情況下，本說明書將替代任何此種材料。本文對任何參考文獻之引用並非允許該等參考文獻為本發明之先前技術。

除非另外指示，否則本說明書（包括申請專利範圍）中所用之表述成分數量、細胞培養物、處理條件等之所有數字均應理解為在所有情況下均由術語「約（about）」修飾。因此，除非另外相反指示，否則數值參數為近似值且可視本發明設法獲得之所要性質而改變。除非另外指示，否則處於一系列元件之前的術語「至少（at least）」應理解為指代該系列中之每個元件。熟習此項技術者僅使用常規實驗即能認識到或能夠確定本文所述之本發明之特定具體實例的許多等效物。意欲由以下申請專利範圍涵蓋該等等效物。

如熟習此項技術者顯而易知，可在不背離本發明之精神及範疇之情況下對本發明進行許多修改及改變。僅以實施例方式提供本文所述之特定具體實例且決不欲具有限制性。預期本說明書及實施例僅被視為例示性的，而本發明之真正範疇及精神由以下申請專利範圍指示。

【圖式簡單說明】

圖 1 描繪顯示如下實驗之結果的條形圖，該實驗量測

針對所評估之每一不同市售吸附介質之添加多株 IgG 之空白 CHO-S 饋料之流過洗出液中的 IgG 產率，該等介質亦即活性碳 (AC)；瓊脂糖陽離子交換樹脂 SP Sepharose™ Fastflow (SPFF)；聚合陽離子交換樹脂 ProRes™-S；瓊脂糖陰離子交換樹脂 Q Sepharose™ (QFF)；及瓊脂糖 HIC 樹脂 Phenyl Sepharose™ 6 Fastflow (ph FF)。如圖 1 中所顯示，除顯示達至約 5% IgG 產率損失之 HIC 樹脂之外，所篩選之所有其他介質均顯示無可偵測之產率損失。

圖 2 描繪顯示如下實驗之結果的條形圖，該實驗量測針對所評估之每一不同市售吸附介質之添加多株 IgG 之空白 CHO-S 饋料以及未經處理之澄清饋料之流過洗出液中的 UV 280 nm 活性物質之量，該等吸附介質亦即活性碳 Nuchar® RGC (AC)、SPFF、ProRes™-S、QFF 及 ph FF。如圖 2 中所顯示，與其他吸附介質相比，活性碳顯著減少著色物質之量。

圖 3 描繪顯示如下實驗之結果的條形圖，該實驗量測針對上文列出之各市售吸附介質之添加多株 IgG 之空白 CHO-S 饋料以及未經處理之澄清饋料之流過洗出液中的宿主細胞蛋白質 (HCP) 濃度。使用 Cygnus CHO-CM HCP ELISA 套組量測 HCP 濃度 (ng/mL)。如圖 3 中所顯示，所篩選之所有介質 (包括活性碳) 均在一定程度上移除 HCP。然而，陽離子樹脂 SPFF 及 ProRes™-S 最有效地移除 HCP。

圖 4 描繪顯示如下實驗之結果的條形圖，該實驗量測，針對上文列出之各介質之添加多株 IgG 之空白 CHO-S 饋料

以及未經處理之澄清饋料之流過洗出液中的 DNA 濃度。使用 PicoGreen 分析量測 DNA 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)。如圖 4 中所顯示，各介質在一定程度上移除 DNA。然而，陰離子交換介質最有效地移除 DNA，其次為活性碳。

圖 5 描繪顯示如下實驗之結果的 x-y 散點圖，該實驗以每 10 倍 CV 之負載饋料達至 100 倍 CV 量測針對上文所列出之各評估介質之添加多株 IgG 及鯡魚精 DNA 之空白 CHO-S 饋料（包括未經處理之澄清饋料）之流過洗出液中的 IgG 濃度。管柱體積 (CV) 顯示於 x 軸上，且 IgG 濃度 (mg/mL) 顯示於 y 軸上。所評估之所有介質，包括 AC、SPFF、ProRes™-S 及 QFF，在達至 100 倍 CV 未經處理之澄清饋料之負載下均未顯示顯著 IgG 損失。

圖 6 描繪顯示如下實驗之結果的 x-y 散點圖，該實驗以每 10 倍 CV 之負載饋料達至 100 倍 CV 量測針對所評估之各介質之添加多株 IgG 及鯡魚精 DNA 之空白 CHO-S 饋料（包括未經處理之澄清饋料）之流過洗出液中的 UV 活性物質峰面積（對應於 UV 活性物質之量）。管柱體積 (CV) 顯示於 x 軸上，且蛋白質 A 分析管柱流過物中之 UV 活性物質峰面積顯示於 y 軸上。在所評估之所有材料中，AC 在 100 倍 CV 範圍內移除超過 70% UV 活性物質；QFF 在 100 倍 CV 範圍內移除約 10% UV 活性物質；且兩種陽離子交換樹脂 SPFF 及 ProRes™-S 移除最少量之 UV 活性物質。

圖 7 描繪顯示如下實驗之結果的 x-y 散點圖，該實驗以每 10 倍 CV 之負載饋料達至 100 倍 CV 量測針對所評估及

上文列出之各介質之添加多株 IgG 及鯡魚精 DNA 之空白 CHO-S 饋料（包括未經處理之澄清饋料）之流過洗出液中的宿主細胞蛋白質（HCP）濃度。管柱體積（CV）顯示於 x 軸上且 HCP 濃度（ng/mL）顯示於 y 軸上。SPFF 及 ProRes S 在 100 倍 CV 範圍內移除最多 HCP。QFF 移除一些 HCP 但快速穿過。對於此種具有較高 DNA 濃度之特殊饋料，活性碳移除最少量之 HCP。

圖 8 描繪顯示如下實驗之結果的 x-y 散點圖，該實驗以每 10 倍 CV 之負載饋料達至 100 倍 CV 量測針對所評估及上文列出之各介質之添加多株 IgG 及鯡魚精 DNA 之空白 CHO-S 饋料（包括未經處理之澄清饋料）之流過洗出液中的 DNA 濃度。管柱體積（CV）顯示於 x 軸上且 DNA 濃度（ $\mu\text{g/mL}$ ）顯示於 y 軸上。然而，所評估之各介質，包括 AC、SPFF、ProResTM-S 及 QFF，在 100 倍 CV 範圍內在不同程度的上移除 DNA。

圖 9 為可用於雜質移除之不同例示性操作模式的示意圖。左側之流程圖描述一個代表性實驗，其中將未經處理之澄清饋料裝載至含有 AC 之管柱上，接著為含有 SPFF、ProResTM-S 或 QFF 介質之管柱。中間之流程圖描述一個代表性實驗，其中將未經處理之澄清饋料裝載至含有 AC 之管柱上，接著為含有 SPFF 或 ProResTM-S 之管柱，接著為 QFF。右側之流程圖描述一個代表性實驗，其中將未經處理之澄清饋料裝載至含有 AC 與 SPFF 之 1:1（v/v）混合物或 AC 與 ProResTM-S 之 1:1（v/v）混合物或 AC 與 ProResTM-S 及

QFF 之 1:1:1 (v/v/v) 混合物的管柱上。

圖 10 描繪顯示針對圖 9 中所示之各材料組合的添加多株 IgG 之空白 CHO-S 饋料（包括未經處理之澄清饋料）之流過洗出液中 UV 活性物質峰面積（其對應於 UV 活性物質之量）的條形圖。活性碳及含有活性碳之混合物顯著減少 UV 活性物質。在一個製程中使用活性碳及陰離子交換樹脂兩者的情況下，當依序使用或以混合物形式使用時，均移除更多 UV 活性物質，表明不同材料之協同作用。

圖 11 描繪顯示針對圖 9 中所示之各材料組合的添加多株 IgG 之空白 CHO-S 饋料（包括未經處理之澄清饋料）之流過洗出液中宿主細胞蛋白質（HCP）濃度的條形圖。所有材料均在某種程度上移除 HCP；然而，當在一個製程中活性碳與陽離子樹脂（諸如 SPFF 或 ProRes-S）或陰離子樹脂（諸如 QFF）一起使用時，當與樹脂依序使用或以與樹脂之混合物形式使用時，最有效地移除 HCP，表明不同材料之協同作用。

圖 12 描繪顯示針對圖 9 中所示之各材料組合的添加多株 IgG 之空白 CHO-S 饋料（包括未經處理之澄清饋料）之流過洗出液中 DNA 濃度的條形圖。所有材料均在某種程度上移除 DNA；然而，當活性碳與 QFF 依序使用或以與 QFF 之混合物形式使用時，其在 DNA 移除方面與所評估之其他材料及組合相比最有效。

圖 13 描繪顯示如下實驗之結果的條形圖，該實驗量測針對各評估材料（亦即 AC、SPFF、QFF、ph FF 以及兩種

材料組合 AC/SPFF/QFF 之 1:1:1 (v/v/v) 混合物及 PhFF/SPFF/QFF 之 1:1:1 (v/v/v) 混合物) 之蛋白質 A 管柱洗提彙集物之流過洗出液中的 IgG 產率。所評估之不同材料之流過洗出液的饋料為使用 Prosep Ultra Plus 蛋白質 A 樹脂由添加多株 IgG 之空白 CHO-S 饋料產生的蛋白質 A 管柱洗提彙集物。所篩選之所有材料均顯示高於 80% 之產率。

圖 14 描繪顯示如下實驗之結果的條形圖，該實驗量測針對各評估材料（亦即 AC、SPFF、QFF、ph FF 以及兩種材料組合 AC/SPFF/QFF 之 1:1:1 (v/v/v) 混合物及 PhFF/SPFF/QFF 之 1:1:1 (v/v/v) 混合物) 之蛋白質 A 管柱洗提彙集物之流過洗出液中的宿主細胞蛋白質 (HCP) 濃度。所評估之不同材料之流過洗出液的饋料為使用 Prosep Ultra Plus 蛋白質 A 樹脂由添加多株 IgG 之空白 CHO-S 饋料產生的蛋白質 A 管柱洗提彙集物。所有材料或材料混合物均自蛋白質 A 洗提彙集物中移除一定量的 HCP；然而，當單獨使用時，活性碳及陽離子交換樹脂更有效。當以混合物形式使用時，AC/SPFF/QFF 及 PhFF/SPFF/QFF 與單獨的任何單一組分相比移除更多 HCP。QFF 及 PhFF 在單獨使用時移除最少量之 HCP。

圖 15 為顯示如下實驗之結果的條形圖，該實驗量測針對各評估材料（亦即 AC、SPFF、QFF 及 ph FF 以及兩種材料組合 AC/SPFF/QFF 之 1:1:1 混合物及 PhFF/SPFF/QFF 之 1:1:1 混合物) 之蛋白質 A 管柱洗提彙集物之流過洗出液中的 DNA 濃度。所評估之不同材料之流過洗出液的饋料為使

用 Prosep Ultra Plus Protein A 樹脂由添加多株 IgG 之空白 CHO-S 饋料產生的蛋白質 A 管柱洗提彙集物。所有材料或材料混合物均自蛋白質 A 洗提彙集物中移除一定量的 DNA，其中樹脂混合物 AC/SPFF/QFF 及 PhFF/SPFF/QFF 與任何單一組分相比顯示輕微優勢。

圖 16 為顯示如下實驗之結果的圖，該實驗量測相對於單株抗體溶液之個別洗提份之產物（亦即單株抗體）濃度的 HCP 濃度（ppm），其中該溶液係使用蛋白質 A 層析自澄清細胞培養物中捕捉（稱為蛋白質 A 洗出液）且隨後經過 3 個獨立的流過純化系列。第一個系列採用包含 5 個層之 0.2 mL ChromaSorb™ 陰離子交換膜裝置；第二個系列採用 HD Nuchar 活性碳之 1 mL 填充管柱；且第三個系列依序採用 1 mL 活性碳管柱及 0.2 mL ChromaSorb™ 陰離子交換膜。自各純化系列收集該洗出液之 10 份 10 mL 洗提份，且分析所選洗提份之宿主細胞蛋白質（HCP）及 IgG 濃度。該圖之 X 軸描繪自來自活性碳管柱之洗出液之管柱體積（CV）中收集 10 mL 洗提份之終點。該圖之 Y 軸描繪活性碳洗出液之個別洗提份中相對於產物（亦即單株抗體）濃度之 HCP 濃度（ppm）。該圖顯示用單獨及與陰離子交換介質組合之活性碳對親和性捕捉洗出液進行流過處理對於自單株抗體溶液中移除雜質出乎意料地有效。

圖 17 為顯示如下實驗之結果的圖，該實驗量測相對於單株抗體溶液之個別洗提份之產物（亦即單株抗體）濃度的 HCP 濃度（ppm），其中該溶液係使用陽離子交換（CEX）

層析自澄清細胞培養物中捕捉（稱為 CEX 洗出液）且隨後用 HD Nuchar 活性碳之 1 mL 填充管柱進行純化。收集該洗出液之 7 份 10 mL 洗提份，分析其宿主細胞蛋白質（HCP）及 IgG 濃度。該圖之 X 軸描繪自來自活性碳管柱之洗出液的洗提體積（mL）中收集 10 mL 洗提份之終點。該圖之 Y 軸描繪個別洗提份中相對於產物（亦即單株抗體）濃度之 HCP 濃度（ppm）。該圖顯示活性碳可用於自多種不同蛋白質溶液中移除雜質。

圖 18 為顯示如下實驗之結果的圖，該實驗量測相對於單株抗體溶液之個別洗提份之產物（亦即單株抗體 MAb II）濃度的 HCP 濃度（ppm），其中該溶液係使用裝備蛋白質 A 管柱之三管柱連續多層析（CMC）系統自澄清細胞培養物中捕捉，且隨後依序用填充至管柱中之 HD Nuchar 活性碳及陰離子交換層析裝置（ChromaSorb™）進行純化。該圖之 X 軸描繪洗提份收集之終點，以每單位體積陰離子交換裝置所負載之抗體重量（kg/L）來量度。該圖之 Y 軸描繪個別洗提份中相對於產物（亦即單株抗體）濃度之 HCP 濃度（ppm）。該圖顯示雖然活性碳及 ChromaSorb™ 在單獨使用時均移除顯著部分之 HCP，但當組合使用時，其使起始溶液之純度自 1,370 ppm HCP 增至低於 10 ppm。

圖 19 顯示如本文所述之連接流過式純化製程步驟之示意圖。含有活性碳之裝置直接連接至陰離子交換裝置。來自陰離子交換裝置之流出物通過靜態混合器，其中添加酸水溶液以降低 pH 值，接著通過陽離子交換流過裝置及病毒

過濾器。

圖 20 為描繪量測陰離子交換層析裝置（亦即 ChromaSorb™）後之 HCP 穿透的實驗結果的圖。Y 軸表示 HCP 濃度（ppm）且 X 軸表示 AEX 負載（kg/L）。

圖 21 為描繪量測 MAb 聚集物移除隨流過式純化製程步驟中病毒過濾裝置之負載變化的實驗結果的圖。X 軸表示病毒過濾負載（kg/m²）且 Y 軸表示病毒過濾後樣本中 MAb 聚集物之百分比。

圖 22 為描繪量測深度過濾器、活性碳及病毒過濾後之壓力概況之實驗結果的圖。Y 軸表示壓力（psi）且 X 軸表示時間（小時）。

【主要元件符號說明】

無

七、申請專利範圍：

1.一種用於自蛋白質 A 洗出液中純化目標分子的流過方法，該方法包含以下步驟：

(i) 使自蛋白質 A 層析管柱中回收之洗出液與活性碳接觸，藉此移除宿主細胞蛋白質 (HCP)；

(ii) 使得自步驟 (i) 之流過樣本與陰離子交換層析介質接觸；

(iii) 使得自步驟 (ii) 之流過樣本與陽離子交換層析介質接觸；及

(iv) 獲得包含該目標分子之得自步驟 (iii) 之流過樣本，

其中該洗出液連續流經步驟 (i) 至步驟 (iii)，且其中在步驟 (iii) 之後，該流過樣本中 HCP 之含量與步驟 (i) 之前的含量相比少於 30%。

2.如申請專利範圍第 1 項之流過方法，其進一步包含對得自步驟 (iii) 之流過樣本進行病毒過濾。

3.如申請專利範圍第 1 項之流過方法，其進一步包含在步驟(ii)與步驟(iii)之間使用線內靜態混合器(in-line static mixer)及/或緩衝槽(surge tank)來改變 pH 值。

4.如申請專利範圍第 1 項之流過方法，其中該方法採用單一制動器(skid)。

5.如申請專利範圍第 1 項之流過方法，其中在與活性碳接觸之前對得自該蛋白質 A 層析管柱之洗出液進行病毒去活化。

6.如申請專利範圍第 1 項之方法，其中步驟 (i) 至步驟 (iii) 可以任何順序進行。

7.一種用於自蛋白質 A 洗出液中純化目標分子的流過式純化方法，該方法包含使該洗出液與活性碳接觸以移除 HCP 並與一種或一種以上選自以下之基質接觸：陰離子交換介質、陽離子交換介質及病毒過濾介質，其中該洗出液之流動為連續型，且其中相較於與活性碳及該基質接觸前之 HCP 含量，該方法降低 HCP 之含量至少於 30%。

8.一種用於減少蛋白質純化期間一或多種層析管柱上之負荷的方法，其中該方法包含在使包含關注蛋白質及 HCP 之樣本與一或多個包含親和性介質、陰離子交換層析介質、陽離子交換層析介質、疏水性相互作用層析介質或混合模式介質之層析管柱接觸之前，使該樣本以流過模式與下列之一接觸以移除 HCP：

(i) 活性碳；

(ii) 活性碳與陽離子交換層析介質之組合；

(iii) 活性碳與陰離子交換層析介質之組合；

(iv) 活性碳與混合模式介質之組合；及

(v) 活性碳與疏水性相互作用層析介質之組合，

從而減少該一或多個層析管柱上之負荷，其中相較於該樣本中之 HCP 含量，該方法降低 HCP 之含量至少於 30%。

9.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該親和性介質係選自蛋白質 A 或蛋白質 G。

10.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該樣本包含細

胞培養物饋料。

11.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中在使該樣本與 (i) 至 (v) 中之一者接觸之前，使該樣本經歷澄清步驟。

12.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中陽離子交換層析介質包含陽離子交換層析樹脂。

13.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中陰離子交換層析介質包含陰離子交換層析樹脂。

14.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中疏水性相互作用層析介質包含疏水性相互作用層析樹脂。

15.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中混合模式介質包含第一基團及第二基團，其中該第一基團及該第二基團兩者藉由不同機制與關注分子相互作用。

16.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該陰離子交換層析介質為具有包含一或多種聚合一級胺或其共聚物之表面塗層的多孔吸附介質。

17.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該陰離子交換層析介質為具有包含一或多種一級胺、二級胺、三級胺及四級胺之表面塗層的多孔吸附介質。

18.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該關注蛋白質為抗體或其功能片段。

19.如申請專利範圍第 18 項之方法，其中該抗體為單株抗體。

20.如申請專利範圍第 18 項之方法，其中該抗體為多株抗體。

21.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中活性碳包含活性木炭。

22.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該活性碳係填充在管柱、密封的拋棄式裝置、濾筒(cartridge)或膠囊中。

23.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該活性碳滲入多孔材料中。

24.如申請專利範圍第 23 項之方法，其中該多孔材料容納於管柱、密封的拋棄式裝置、濾筒或膠囊內。

25.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中活性碳與陰離子交換層析介質之組合為活性碳與陰離子交換層析樹脂之混合物，活性碳與陽離子交換層析介質之組合為活性碳與陽離子交換層析樹脂之混合物，活性碳與混合模式介質之組合為活性碳與混合模式樹脂之混合物，且活性碳與疏水性相互作用層析介質之組合為活性碳與疏水性相互作用層析樹脂之混合物。

26.如申請專利範圍第 25 項之方法，其中該混合物係填充在管柱中。

27.如申請專利範圍第 25 項之方法，其中該混合物係填充在密封的拋棄式裝置中。

28.一種用於減少蛋白質純化期間一或多個採用多孔介質之層析步驟之負荷的方法，其中該方法包含在使包含關注蛋白質及 HCP 之樣本與一或多個採用多孔介質之層析步驟接觸之前，使該樣本以流過模式與下列之一接觸以移除 HCP：

- (i) 活性碳；
- (ii) 活性碳與陽離子交換層析介質之組合；
- (iii) 活性碳與陰離子交換層析介質之組合；
- (iv) 活性碳與混合模式介質之組合；及
- (v) 活性碳與疏水性相互作用層析介質之組合，

從而減少該一或多個層析步驟上之負荷，其中相較於該樣本中之 HCP 含量，該方法降低 HCP 之含量至少於 30%。

29. 如申請專利範圍第 28 項之方法，其中該多孔介質包含親和性介質、陰離子交換層析介質、陽離子交換層析介質、疏水性相互作用層析介質或混合模式介質中之一或多者。

30. 如申請專利範圍第 28 項之方法，其中澄清步驟包含深度過濾、篩網過濾、絮凝及/或離心中之一或多者。

31. 如申請專利範圍第 28 項之方法，其中該陰離子交換層析介質為具有包含一或多種聚合一級胺或其共聚物之表面塗層的多孔吸附介質。

32. 如申請專利範圍第 28 項之方法，其中該陰離子交換層析介質為具有包含一或多種一級胺、二級胺、三級胺及四級胺之表面塗層的多孔吸附介質。

33. 一種減少樣本中與關注蛋白質一起之 HCP 之含量的方法，該方法包含以下步驟：

- (i) 使包含關注蛋白質及 HCP 之樣本與一或多個含有親和性介質、陰離子交換層析介質、陽離子交換層析介質、疏水性相互作用層析介質或混合模式介質之層析管柱在使

得該關注蛋白質結合至該一或多個層析管柱中之介質的條件下接觸；

(ii) 獲得該樣本之第一洗出液；

(iii) 使得自 (ii) 之該第一洗出液以流過模式與以下之一接觸：(a) 活性碳；及 (b) 活性碳與親和性介質、陽離子交換層析介質、陰離子交換層析介質、混合模式介質及疏水性相互作用層析介質中一或多者之組合，藉此移除 HCP；及

(iv) 獲得該樣本之第二洗出液；

其中相對於該樣本中 HCP 之含量，該第二洗出液包含少於 30% 之 HCP 含量。

34. 如申請專利範圍第 33 項之方法，其中該親和性介質係選自蛋白質 A 或蛋白質 G。

35. 如申請專利範圍第 33 項之方法，其中該第二洗出液包含小於 10% 之該關注蛋白質之產率損失。

36. 一種減少含有關注蛋白質及 HCP 之樣本中 HCP 之含量的方法，該方法包含以下步驟：

(i) 使包含關注蛋白質及 HCP 之樣本與含有親和性介質之層析管柱接觸；

(ii) 獲得該樣本之第一洗出液；

(iii) 使得自 (ii) 之該第一洗出液以流過模式與活性碳接觸，藉此移除 HCP；

(iv) 獲得該樣本之第二洗出液；

(v) 使該第二洗出液與陰離子交換多孔介質膜吸附劑

接觸；及

(vi) 獲得該樣本之第三洗出液，

其中相對於該樣本中 HCP 之含量，該第三洗出液包含少於 30% 之 HCP 含量。

37. 一種減少含有關注蛋白質之樣本中 HCP 之含量的方法，該方法包含以下步驟：

(i) 提供包含關注蛋白質及 HCP 之樣本；

(ii) 使該樣本與適合介質接觸以捕捉該關注蛋白質；

(iii) 獲得該樣本之第一洗出液；

(iv) 使該第一洗出液與活性碳接觸，藉此移除 HCP；

(v) 獲得該樣本之第二洗出液；及

(vi) 使該第二洗出液與陰離子交換介質接觸；及

(vii) 獲得該樣本之第三洗出液，

其中相對於該樣本中 HCP 之含量，該第三洗出液包含少於 30% 之 HCP 含量。

38. 如申請專利範圍第 37 項之方法，其中該關注蛋白質為抗體。

39. 如申請專利範圍第 38 項之方法，其中該抗體為單株抗體。

40. 如申請專利範圍第 37 項之方法，其中該陰離子交換介質為樹脂或膜。

41. 一種減少包含關注蛋白質之樣本中 HCP 之含量的方法，該方法包含以下步驟：

(i) 藉由沈澱、絮凝、結晶、結合至可溶性小分子或

聚合配位體、或者結合至懸浮層析介質而自該樣本中分離該關注蛋白質，從而獲得包含該關注蛋白質之蛋白質相；

(ii) 藉由將該蛋白質相溶解至適合緩衝液中來復原該蛋白質；

(iii) 使該經復原之蛋白質以流過模式與活性碳接觸，藉此移除 HCP；

(iv) 獲得該樣本之第一洗出液；

(v) 使該第一洗出液與陰離子交換層析介質接觸；及

(vi) 獲得該樣本之第二洗出液，

其中相對於該樣本中 HCP 之含量，該第二洗出液包含少於 30% 之 HCP 含量。

八、圖式：

(如次頁)

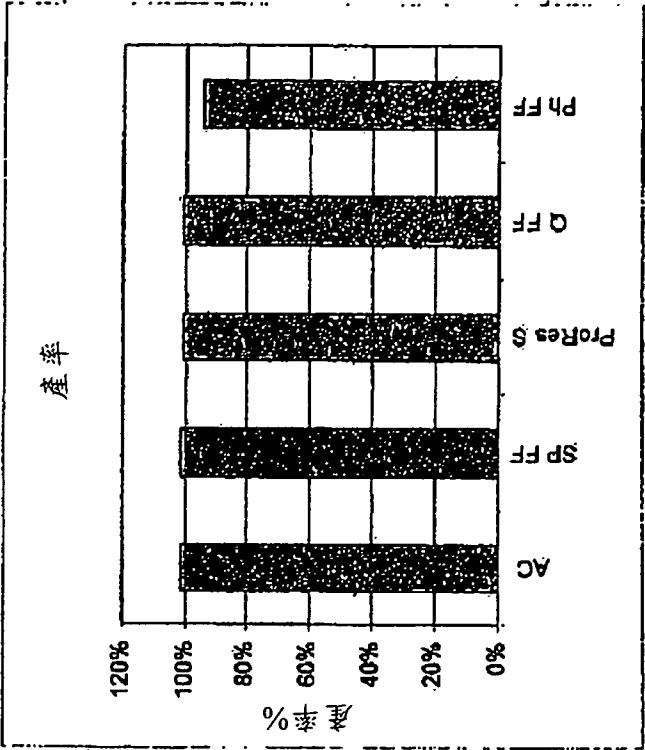


図 1

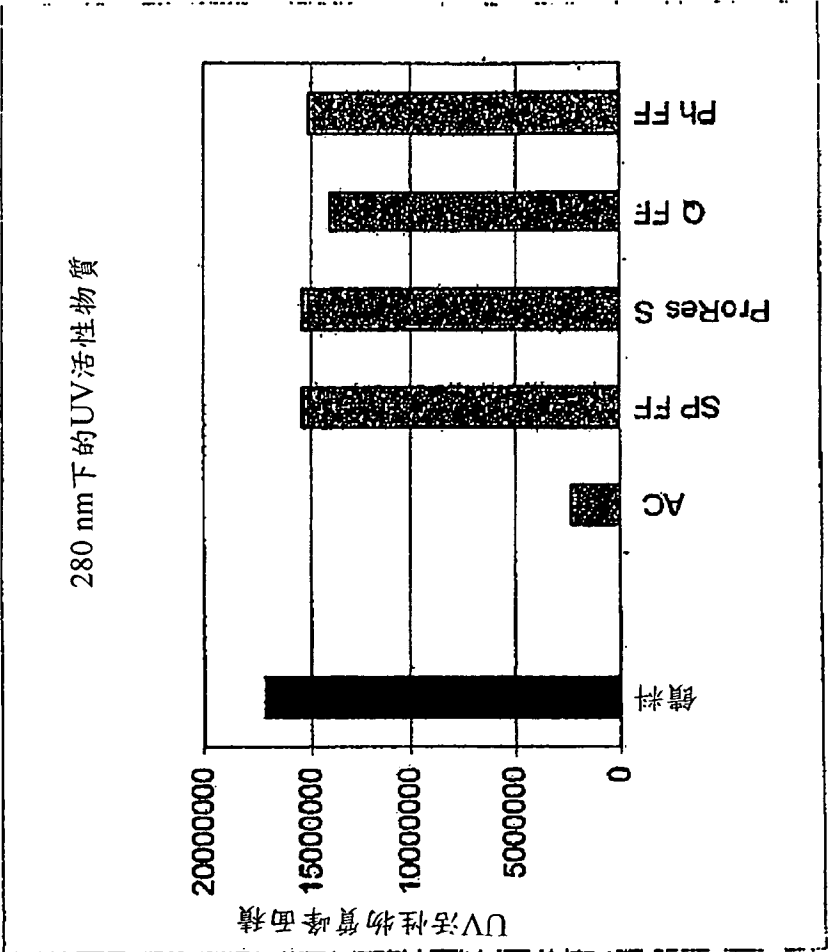


圖2

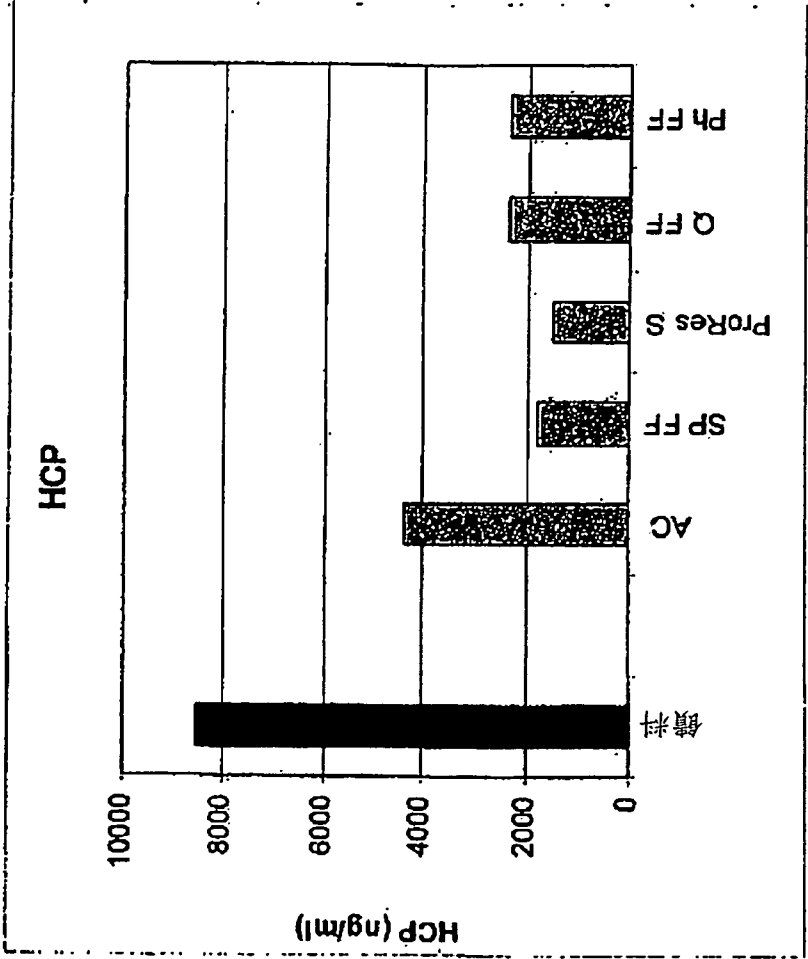


図3

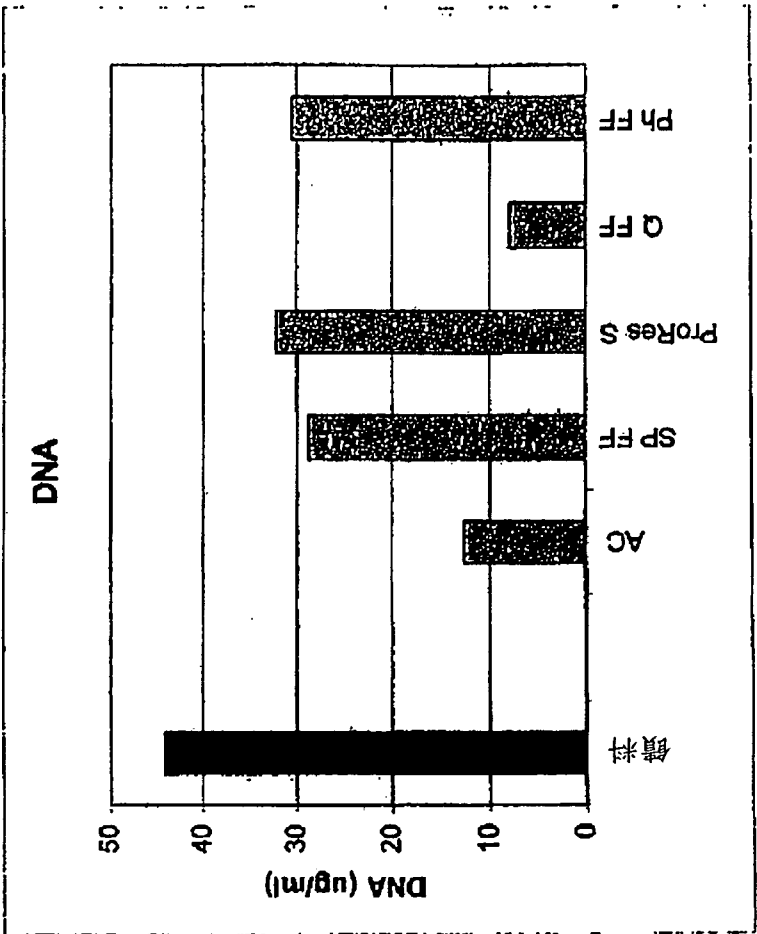


圖4

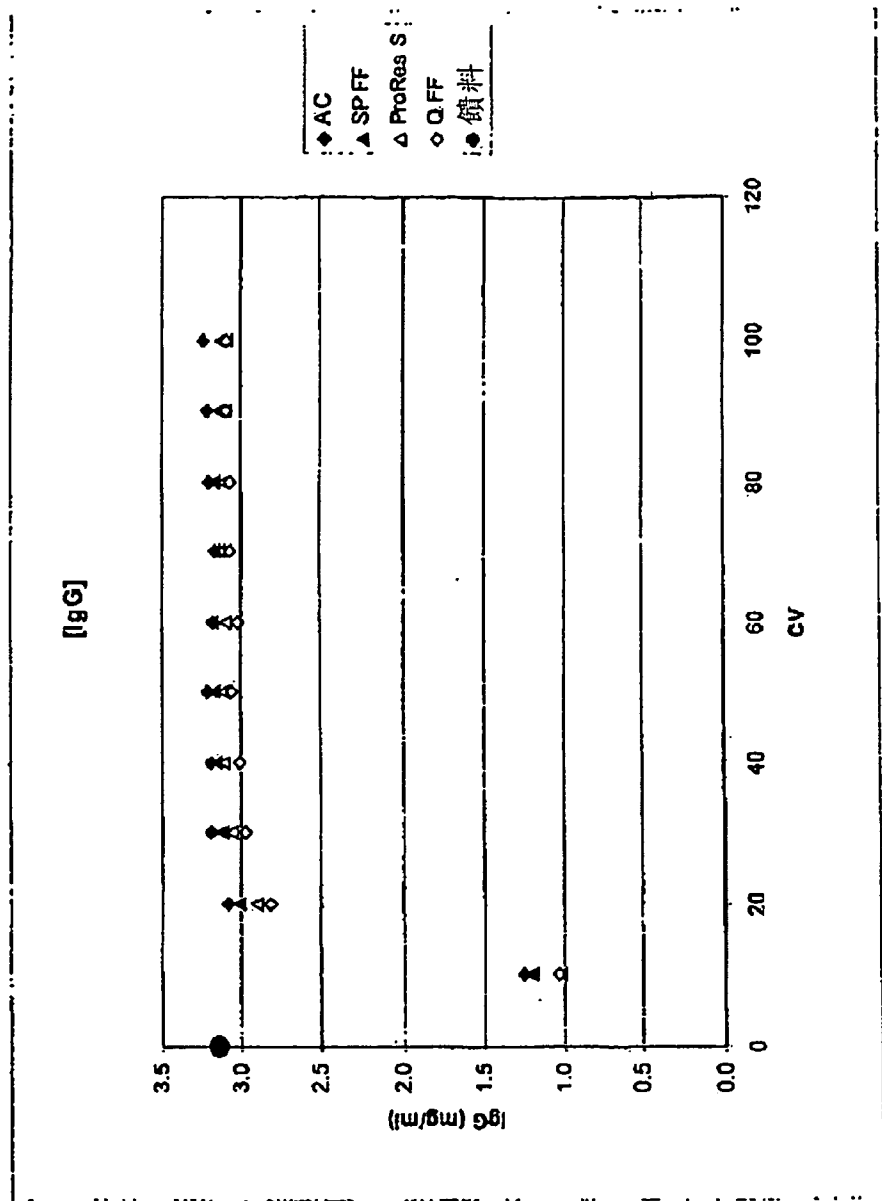


圖 5

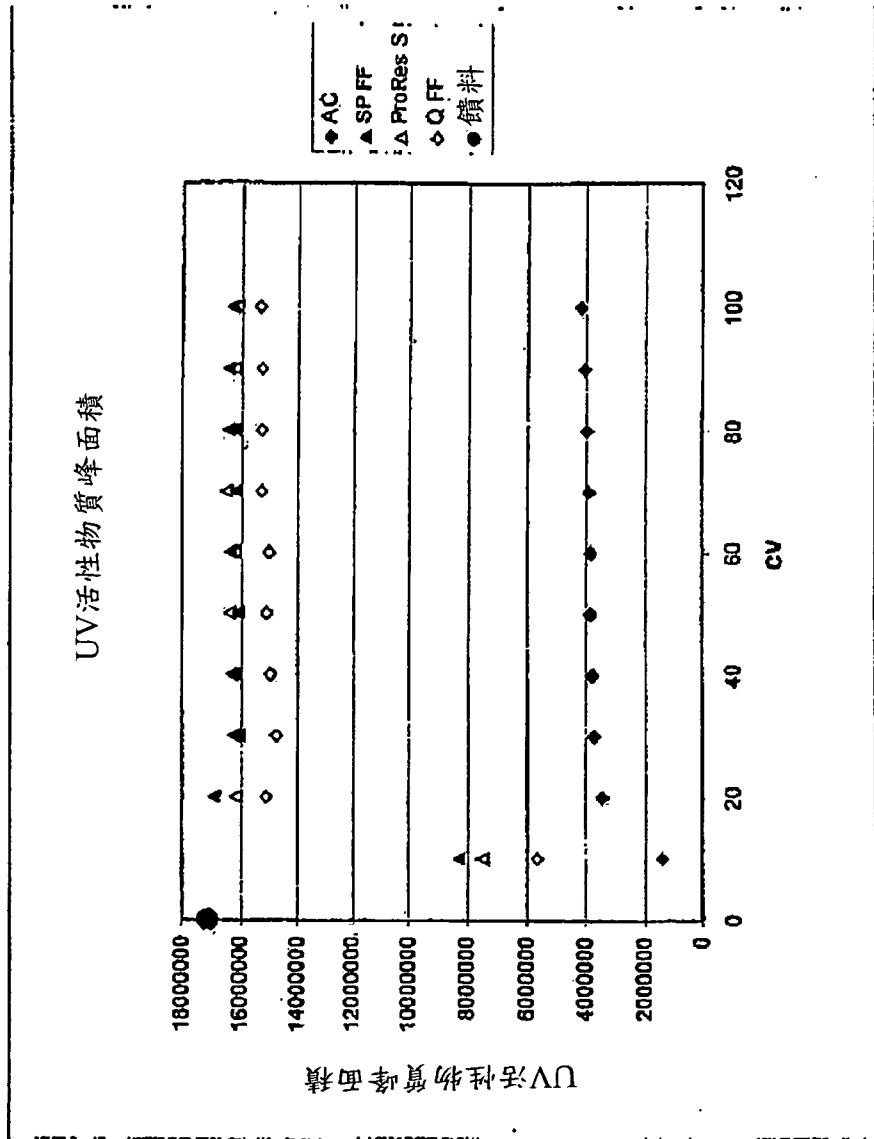


圖6

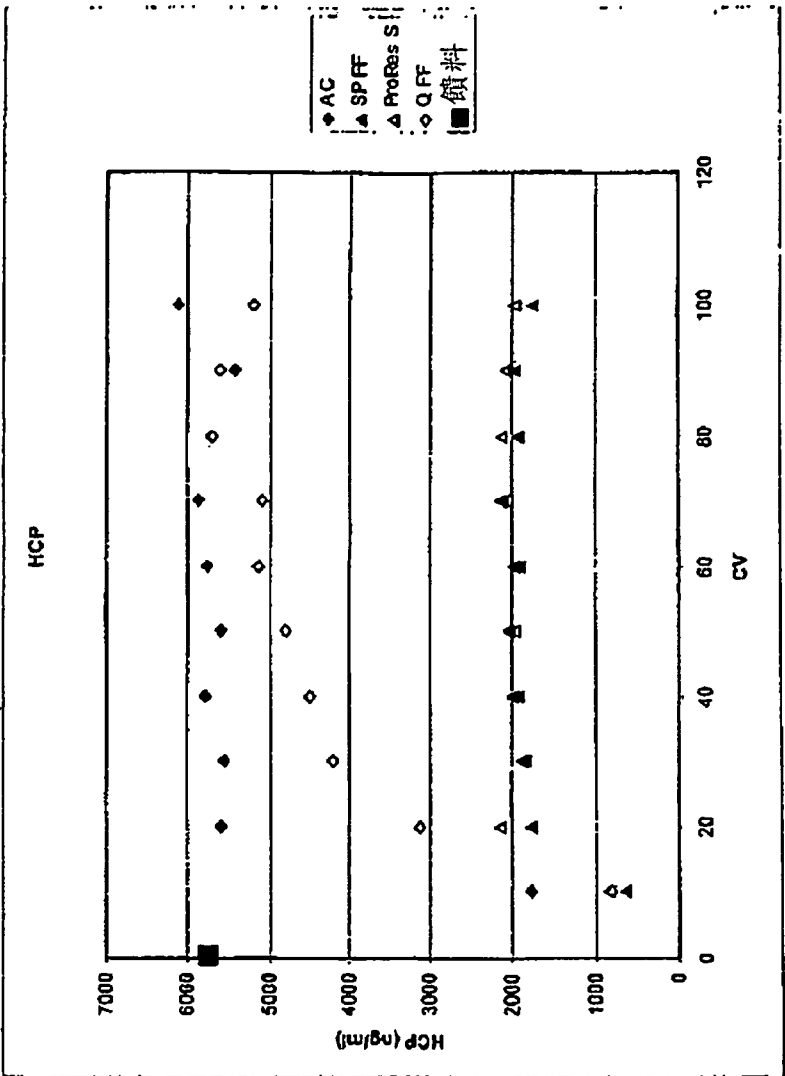


圖7

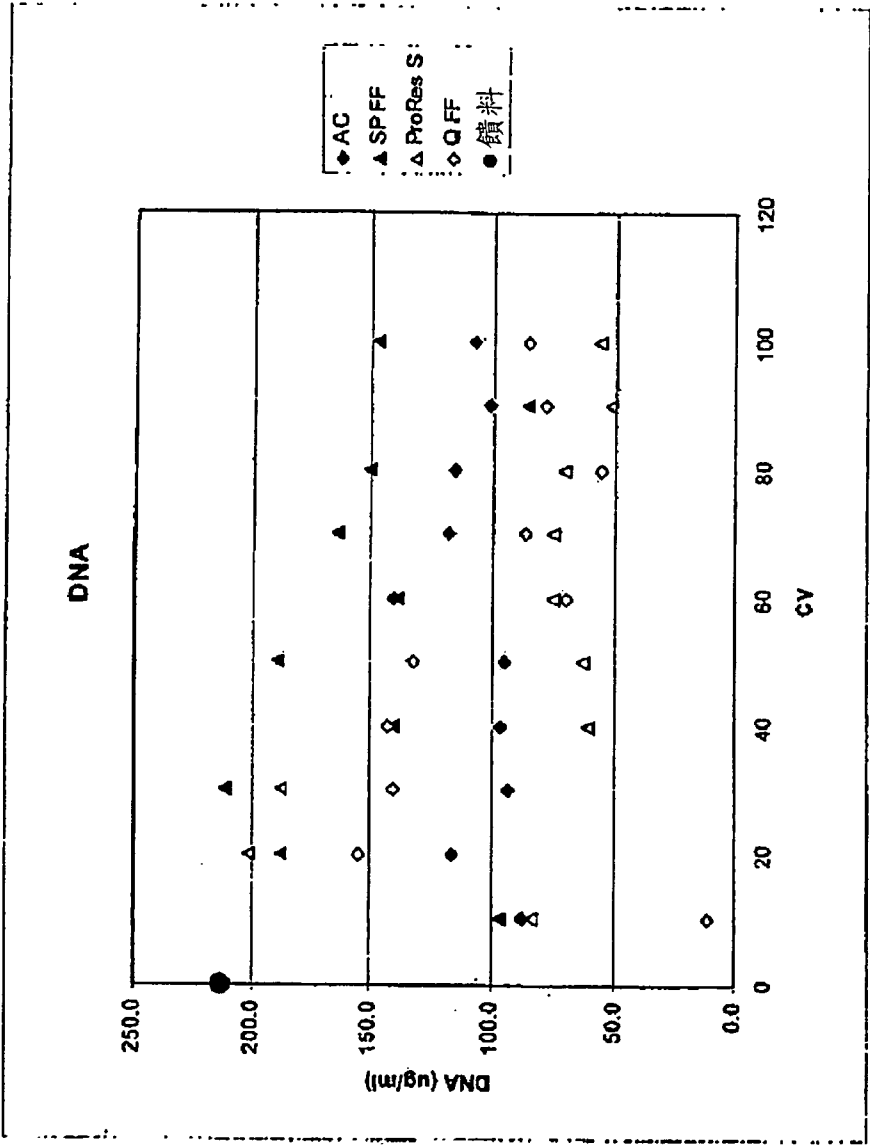


圖8

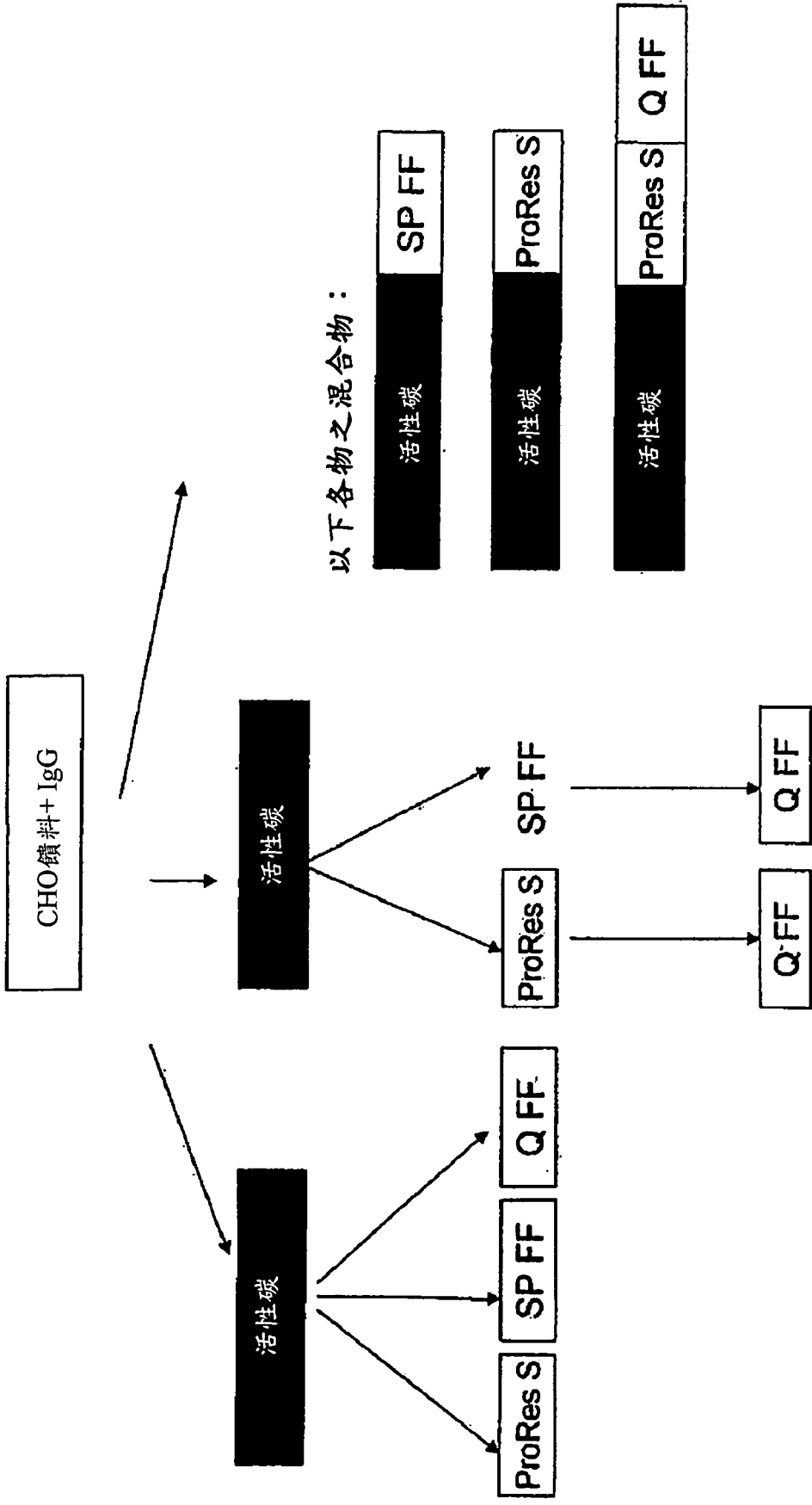


圖9

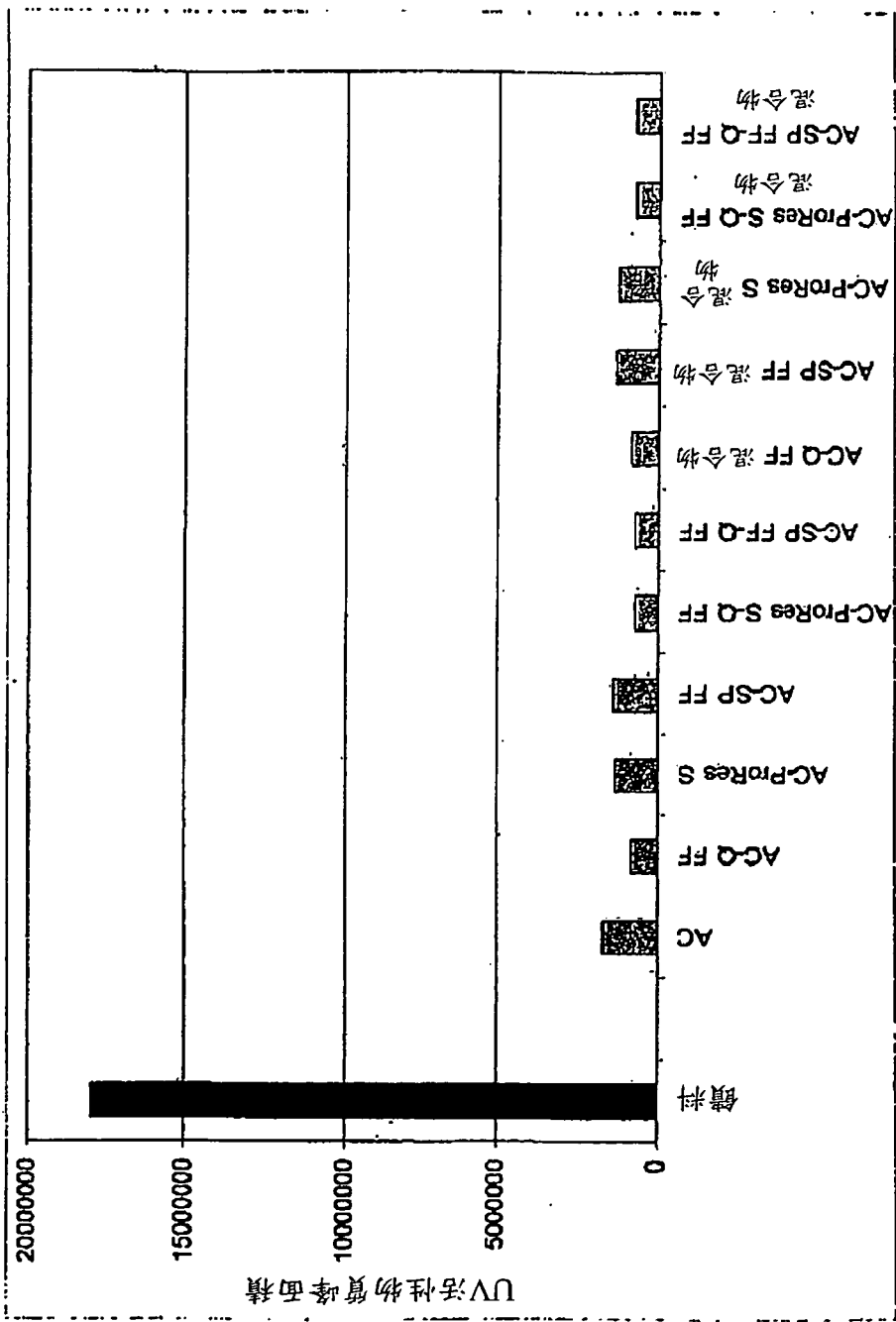
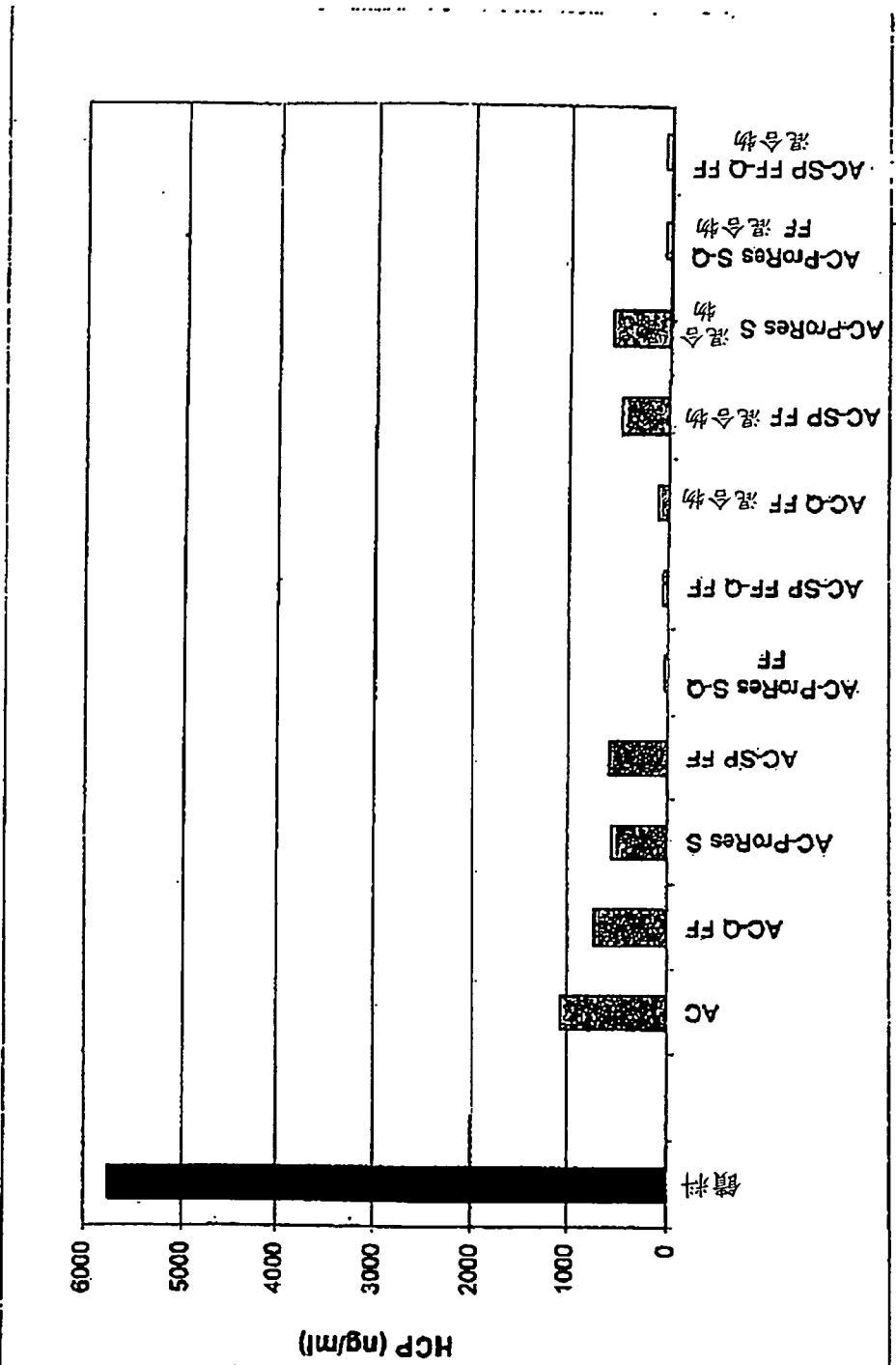


圖10



II 圖

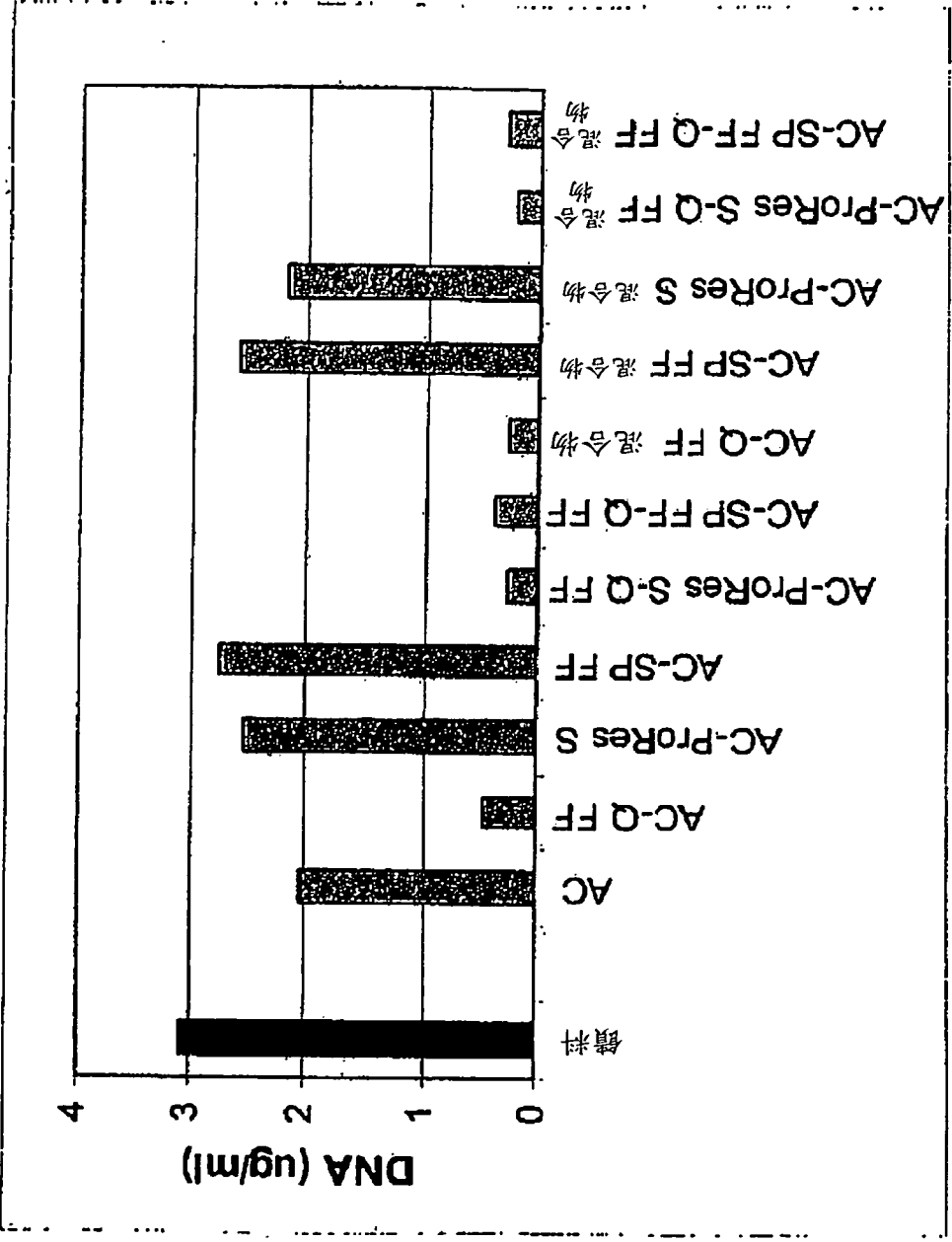


圖12

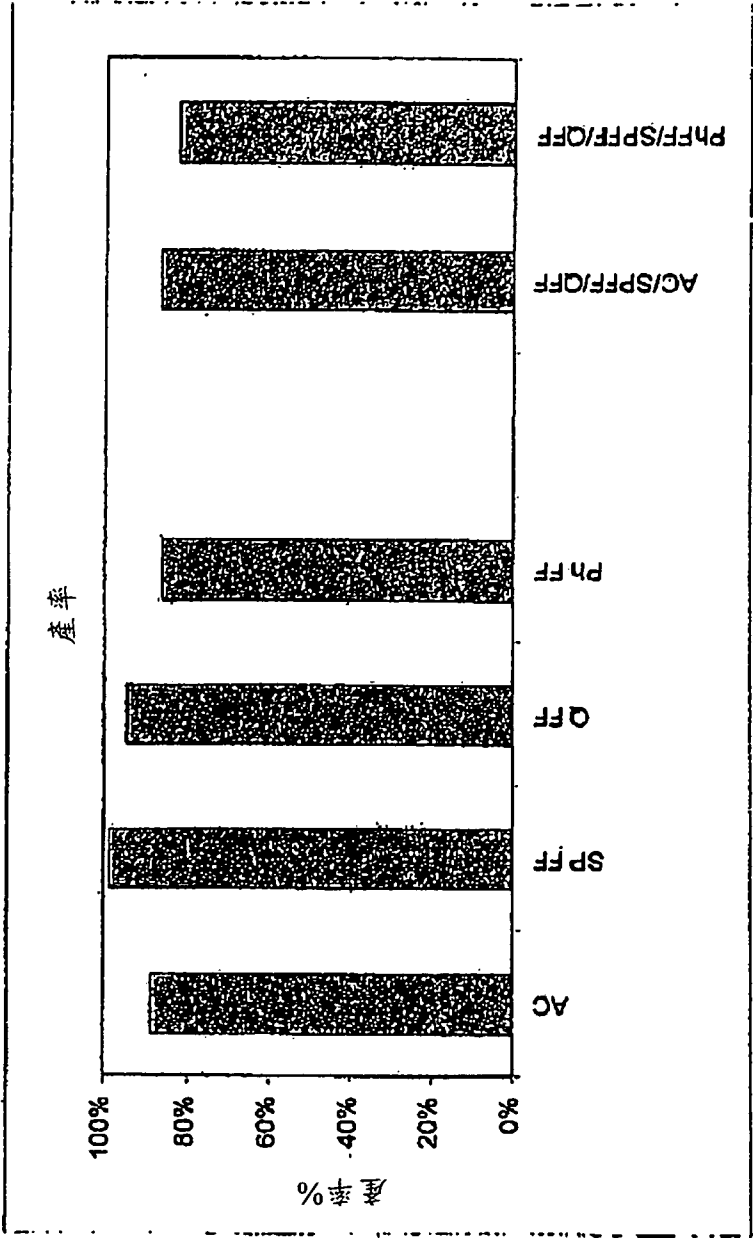


圖13

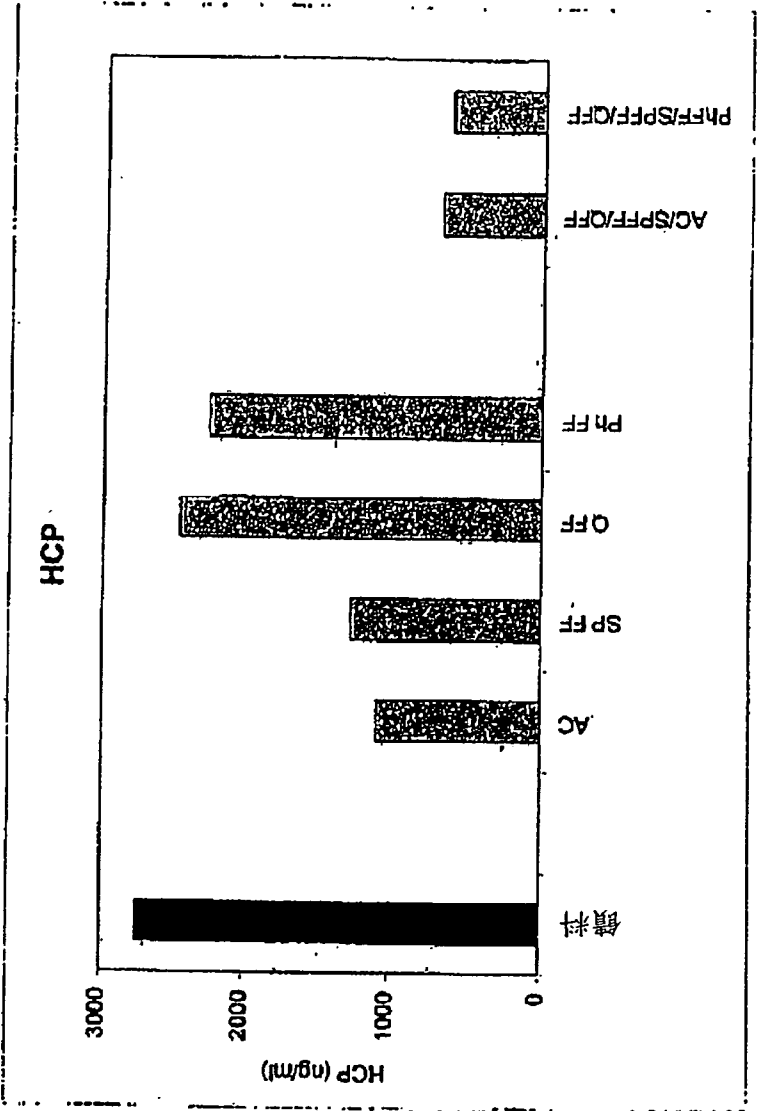


圖14

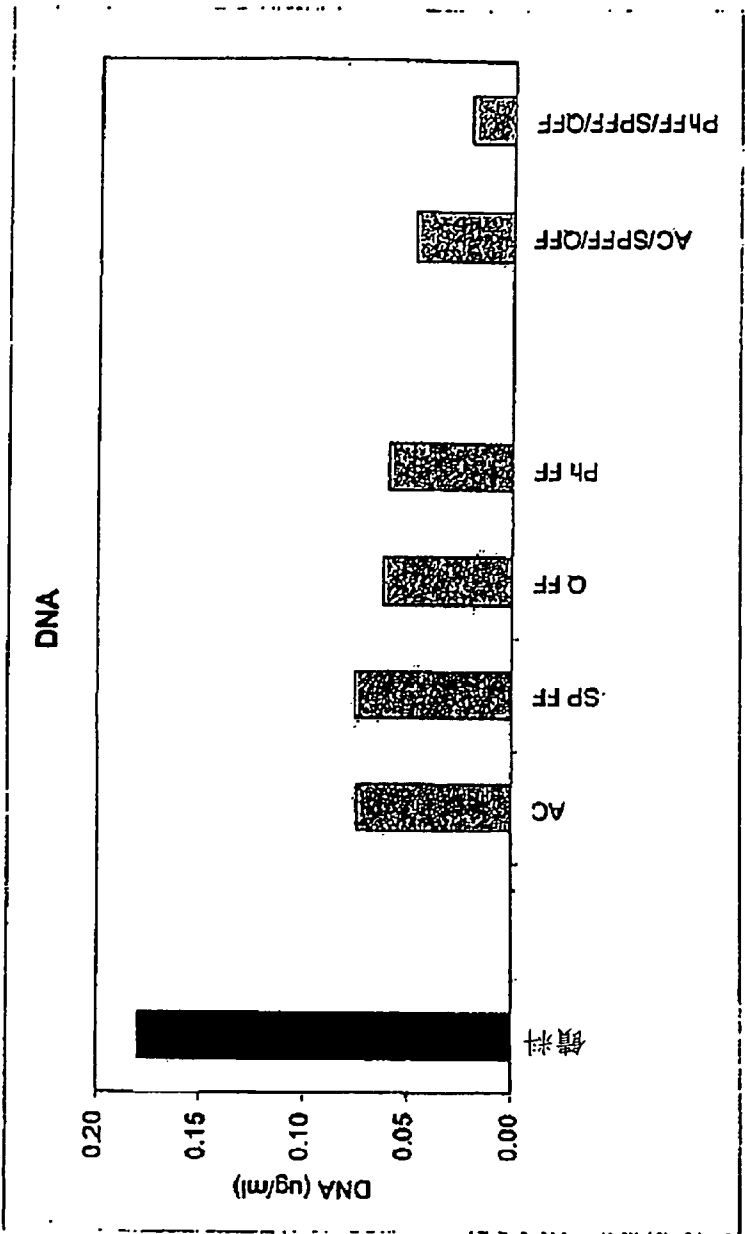


圖15

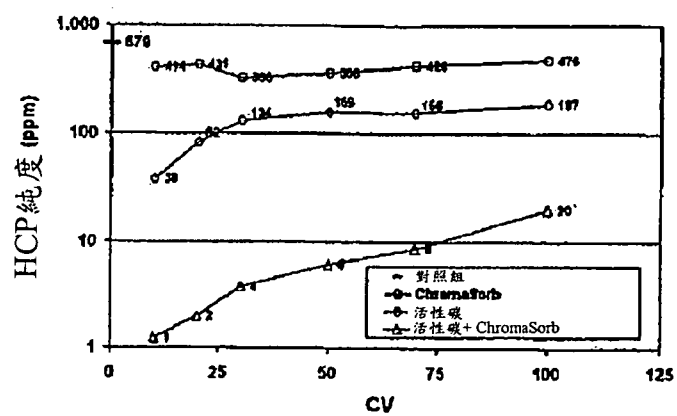


圖 16

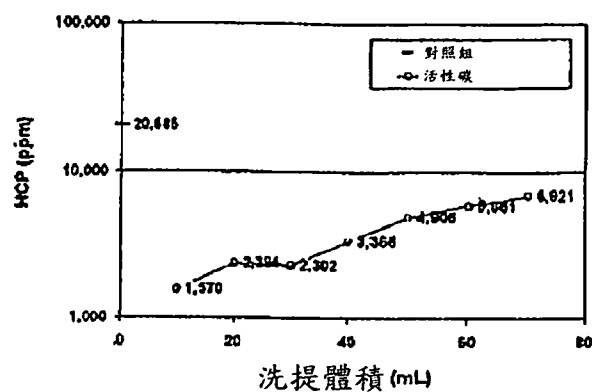


圖17

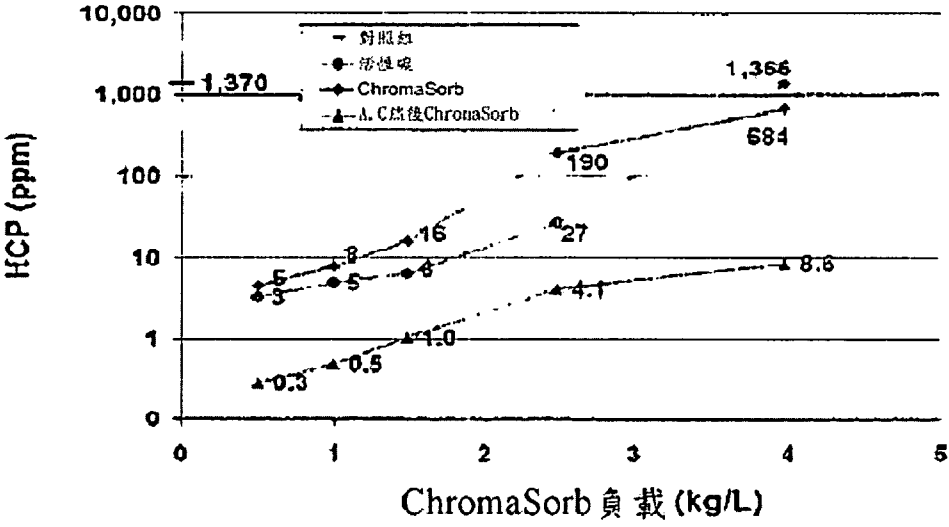


圖 18

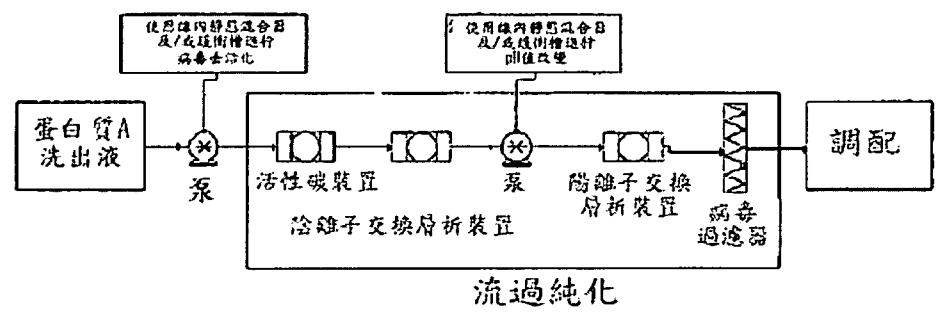


圖 19

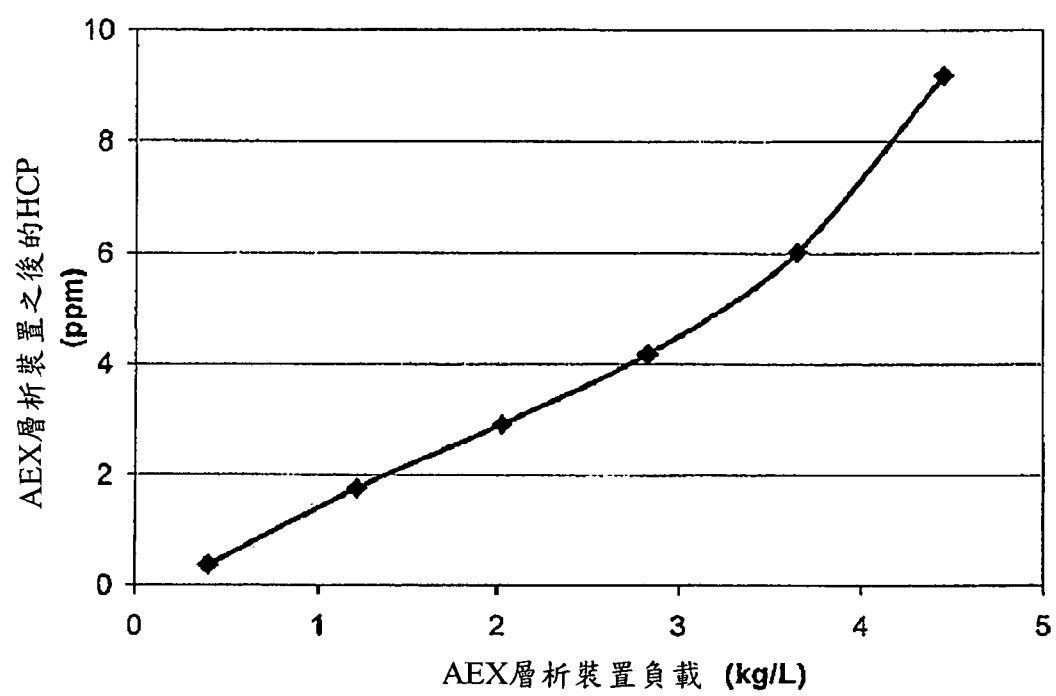


圖 20

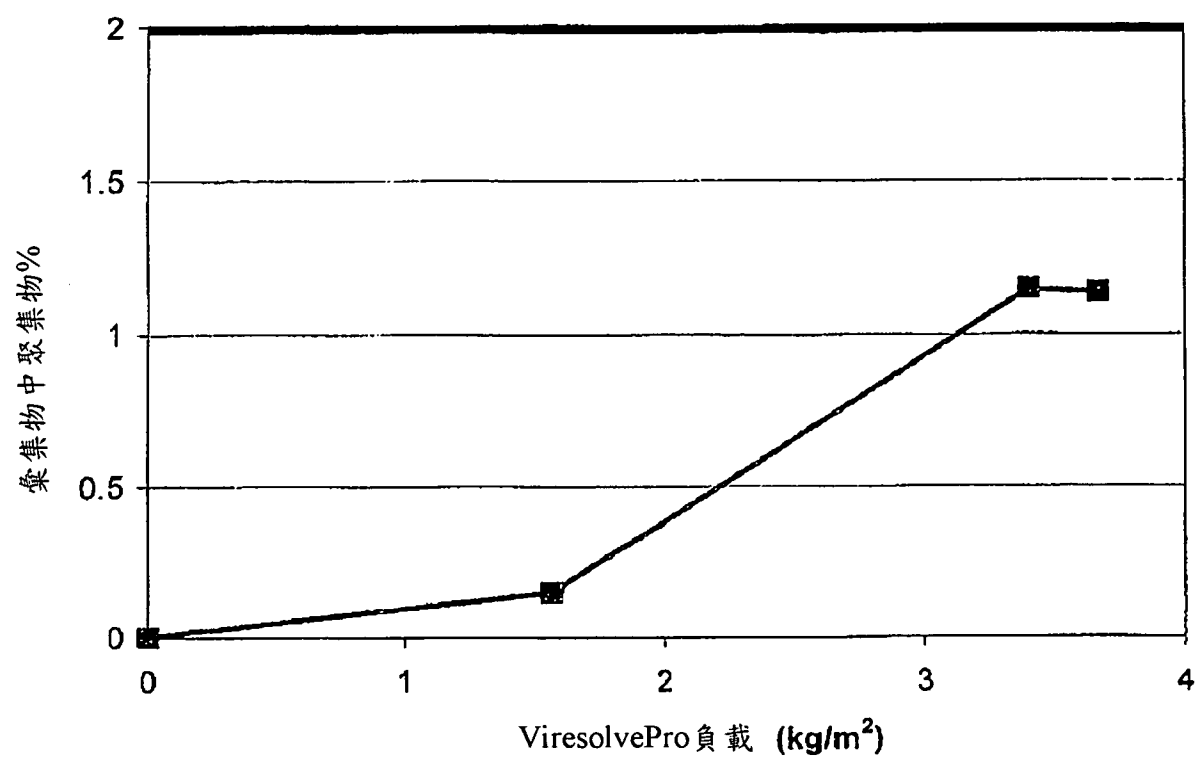


圖21

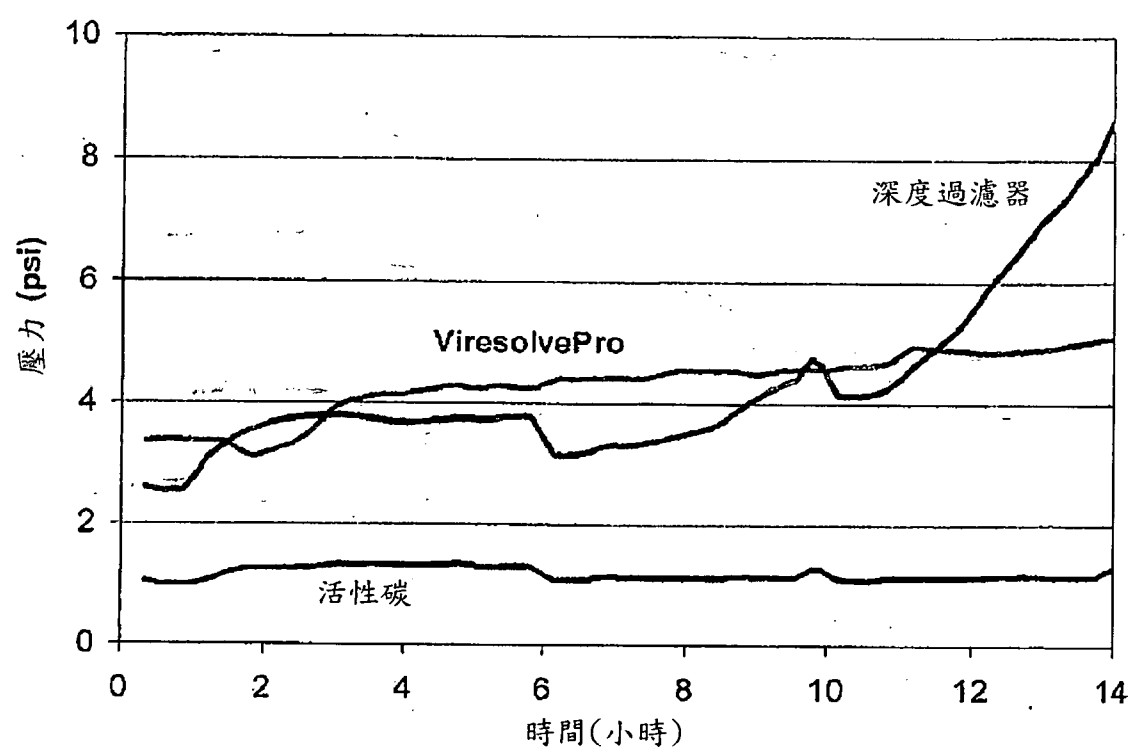


圖22