



(21)申請案號：107146337

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 12 月 21 日

(51)Int. Cl. : C07K1/22 (2006.01)

(30)優先權：2017/12/21 美國 62/609,214

2018/07/05 美國 62/694,387

(71)申請人：美商健臻公司 (美國) GENZYME CORPORATION (US)  
美國

(72)發明人：貝吉 卡爾 BEIGIE, CARL A. (US)

(74)代理人：陳彥希；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：95 項 圖式數：8 共 71 頁

## (54)名稱

用於增強蛋白 A 層析期間雜質去除的方法

## (57)摘要

本文提供了涉及經由蛋白 A 層析純化含 Fc 區的多肽(例如抗體)的方法；涉及在蛋白質 A 層析期間使用包含苯甲酸鹽和/或苄醇的洗滌溶液的方法；以及在蛋白 A 層析之前使用苯甲酸鈉調節收穫物的方法。

Provided herein are methods relating to the purification of a polypeptide comprising an Fc region (e.g., an antibody) via protein A chromatography; methods relating to the use of a wash solution comprising a benzoate salt and/or benzyl alcohol during protein A chromatography; and methods of adjusting a harvest using sodium benzoate prior to protein A chromatography.

指定代表圖：

圖 1

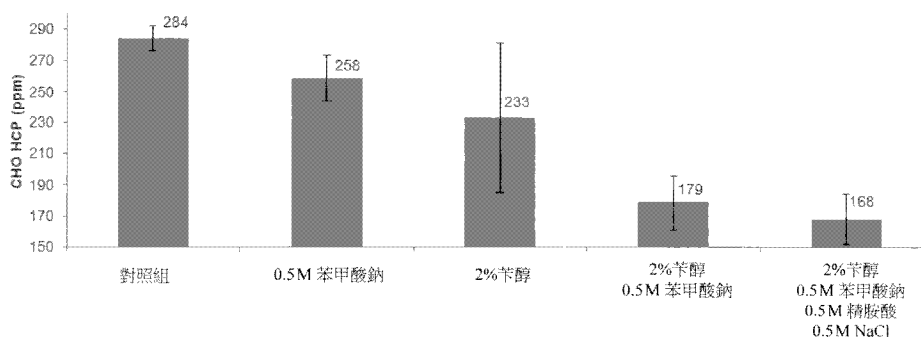


圖 2A

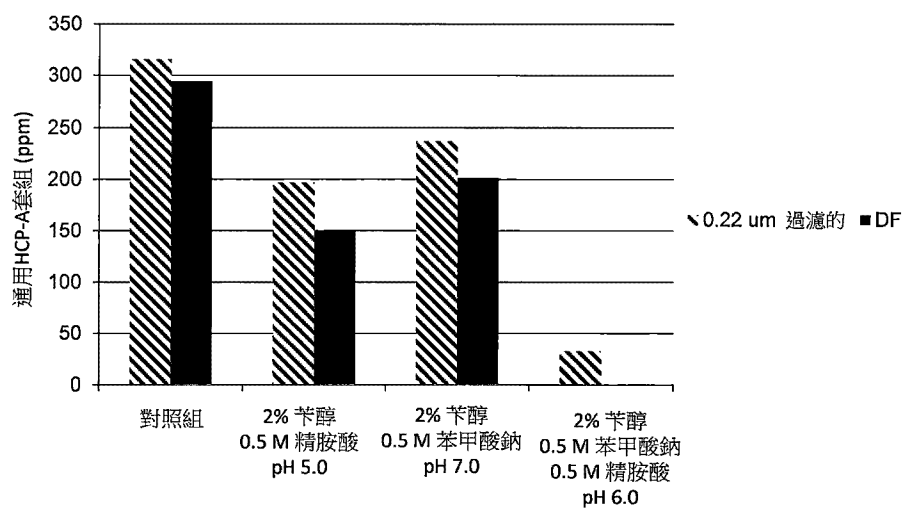


圖 2B

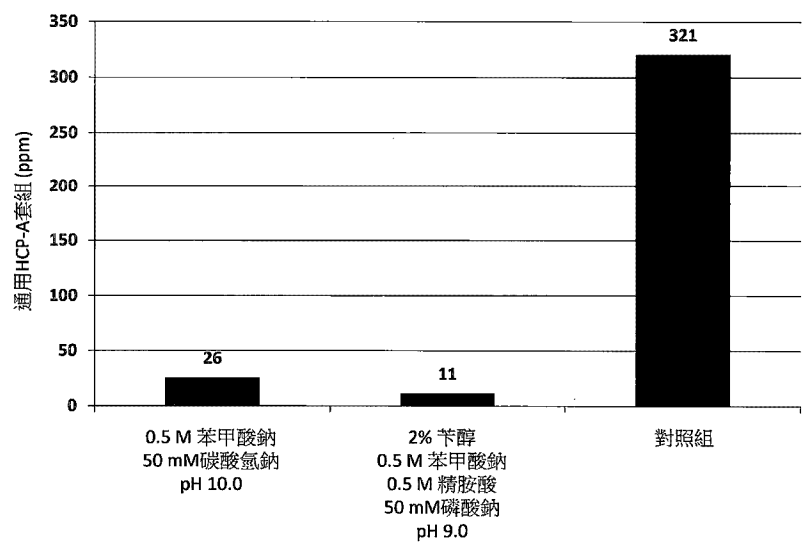
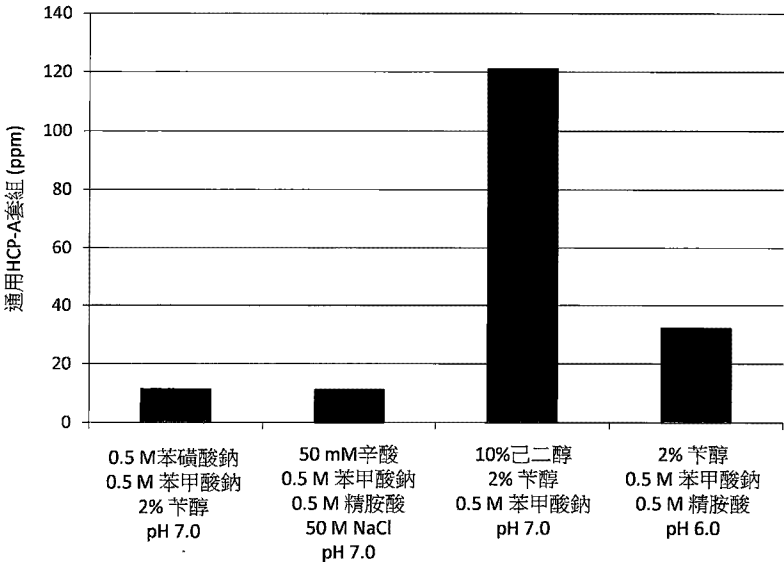


圖 3



## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 用於增強蛋白A層析期間雜質去除的方法  
【英文發明名稱】 METHODS FOR ENHANCED REMOVAL OF  
IMPURITIES DURING PROTEIN A  
CHROMATOGRAPHY

### 【相關申請的交叉引用】

本申請案請求2017年12月21日提交的美國臨時申請序列號62/609,214和2018年7月5日提交的美國臨時申請序列號62/694,387的優先權權益，將其內容通過引用以其整體併入本文。

### 【技術領域】

本公開文本涉及經由蛋白A層析純化含Fc區的多肽（例如，抗體）的方法。

### 【先前技術】

已經發現抗體和其他含Fc區的蛋白質（如免疫粘附素）被廣泛用於藥物/治療應用中。使用這些分子（例如，在人類患者中）需要從蛋白質生產期間可能產生的任何污染物/雜質中小心地純化出來。通常利用一個或多個層析純化步驟來實現對治療性蛋白質的純化；對含有免疫球蛋白Fc區的蛋白質（例如，抗體）特別有用的層析純化類型是蛋白A層析。然而，已顯示宿主細胞蛋白（HCP）在常規捕獲模式蛋白層析（包括蛋白A層析）期間與抗體共洗脫，這對於這些抗體的下游應用來說可能是有問題的。通常，在洗脫前產物（例如，含有免疫球蛋白Fc區的蛋白質）與層析樹脂結合後，採用一個或多個洗滌步驟。不幸的是，目前由鹽和緩衝物質構成的洗滌配製品可能不足以破壞HCP和其他雜質與各種單株抗體（mAb）產物的相互作用。因此，需要改進的純化方法（例如，實施新的洗滌配製品），該改進的純化方法降低（例如，在蛋白A親和層析期間）與抗體共純化的雜質（例如，HCP）的濃度/數量。

本文中引用的所有參考文獻，包括專利申請案、專利出版物、非專利文獻和UniProtKB/Swiss-Prot登錄號均藉由引用以其整體併入本文，如同每個單獨的參考文獻被具體地且單獨地指明藉由引用併入。

### 【發明內容】

為了滿足上述和其他需求，本文揭露將含Fc區的多肽從一種或多種雜質中純化出來的改進的方法。這些方法包括使蛋白A層析基質與樣品（例如，細胞裂解物）接觸，該樣品包含 (i) 含Fc區的多肽和 (ii) 一種或多種雜質，並且用洗滌溶液洗滌該基質，該洗滌溶液具有約4.0-10.0的pH且包含苯甲酸鹽和/或苺醇。本公開文本至少部分基於以下令人驚奇的發現：在蛋白A層析期間在pH為約4.0-10.0的洗滌溶液中使用苯甲酸鹽（例如，苯甲酸钠）和/或苺醇提供了超過目前使用的洗滌配製品的優異的雜質（例如，宿主細胞雜質）清除率（參見圖1，實例1）。本公開文本還至少部分基於以下發現：當包括一種或多種選自苯磺酸鹽（例如，苯磺酸钠）、辛酸（caprylic acid）、己二醇和/或精胺酸的額外組分在洗滌溶液中時可以進一步改進雜質的清除率（參見圖2和3，實例1）。

因此，在一個方面，本文提供了純化含Fc區的多肽的方法，該方法包括以下步驟：(A) 在含Fc區的多肽與蛋白A結合的條件下使蛋白A層析基質與樣品接觸，該樣品包含 (i) 含Fc區的多肽和 (ii) 一種或多種雜質；並且 (B) 用洗滌溶液洗滌該基質，其中該洗滌溶液包含以下中的一種或全部兩種：(i) 濃度為約0.1 M至約1.0 M的苯甲酸鹽和 (ii) 濃度為約0.5%至約4%體積/體積（v/v）的苺醇，並且其中該洗滌溶液具有約4.0至約10.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含：(1) 苯甲酸鹽；(2) 苺醇；或 (3) 苯甲酸鹽和苺醇。在一些實施例中，苯甲酸鹽的濃度為從約0.1 M至約0.5 M。在可以與任何前述實施例組合的一些實施例中，苯甲酸鹽是苯甲酸鹼金屬鹽。在可以與任何前述實施例組合的一些實施例中，苯甲酸鹽是苯甲酸钠。在一些實施例中，苯甲酸钠的濃度為約0.1 M至約0.3 M。在一些實施例中，苯甲酸钠的濃度為約0.3 M。在一些實施例中，苯甲酸钠的濃度為約0.5 M。在可以與任何前述實施例組合的一些實施例中，苺醇的濃度為從約1%至約4%（v/v）。在可

以與任何前述實施例組合的一些實施例中，苧醇的濃度為從約1%至約2% (v/v)。在可以與任何前述實施例組合的一些實施例中，苧醇的濃度為約2% (v/v)。在可以與任何前述實施例組合的一些實施例中，苧醇的濃度為約4% (v/v)。

在可以與任何前述實施例組合的一些實施例中，洗滌溶液進一步包含緩衝劑。在一些實施例中，緩衝劑選自磷酸鹽、tris、精胺酸、乙酸鹽和檸檬酸鹽。在一些實施例中，緩衝劑的濃度為約10 mM至約50 mM或約10 mM至約500 mM。在一些實施例中，緩衝劑是濃度為約50 mM。在一些實施例中，緩衝劑是濃度為約500 mM。在一些實施例中，洗滌溶液具有約5.0至約10.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液具有約5.0至約9.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液具有約5.0、約6.0、約7.0、約8.0、約9.0或約10.0的pH。

在可以與任何前述實施例組合的一些實施例中，洗滌溶液進一步包含苯磺酸鈉。在一些實施例中，苯磺酸鈉的濃度為約0.1 M至約0.5 M。在可以與任何前述實施例組合的一些實施例中，洗滌溶液進一步包含辛酸。在一些實施例中，辛酸的濃度為約10 mM至約50 mM。在可以與任何前述實施例組合的一些實施例中，洗滌溶液進一步包含己二醇。在一些實施例中，己二醇的濃度為約1%至約10% (v/v)。在可以與任何前述實施例組合的一些實施例中，洗滌溶液進一步包含肌酸。在一些實施例中，肌酸的濃度為約10 mM至約100 mM。在可以與任何前述實施例組合的一些實施例中，洗滌溶液進一步包含精胺酸。在一些實施例中，精胺酸的濃度為約0.1 M至約1.0 M。在一些實施例中，精胺酸的濃度為約0.5 M。在一些實施例中，精胺酸是精胺酸-HCl。在一些實施例中，包含精胺酸的洗滌溶液具有約4.0至約6.0的pH。在一些實施例中，包含精胺酸的洗滌溶液具有約8.0至約10.0的pH。在可以與任何前述實施例組合的一些實施例中，洗滌溶液進一步包含一種或多種非緩衝鹽。在一些實施例中，該一種或多種非緩衝鹽選自氯化鈉、溴化鈉、氯化鉀、溴化鉀、氯化鎂、溴化鎂、氯化鈣、溴化鈣及其任何組合。在一些實施例中，該一種或多種非緩衝鹽是氯化鈉和/或氯化鉀。在一些實施例中，該一種或多種非緩衝鹽的濃度為約0.1 M至約1.0 M。

在可以與任何前述實施例組合的一些實施例中，洗滌溶液是選自以下

的溶液：(i) 包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉和濃度為約50 mM的碳酸氫鈉，具有約10.0的pH的溶液；(ii) 包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約2%的苳醇、濃度為約0.5 M的精胺酸和濃度為約50 mM的磷酸鈉，具有約9.0的pH的溶液；(iii) 包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉和濃度為約2% (v/v) 的苳醇，具有約7.0的pH的溶液；(iv) 包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約2% (v/v) 的苳醇和濃度為約0.5 M的氯化鈉，具有約7.0的pH的溶液；(v) 包含濃度為約10% (v/v) 的己二醇、濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉和濃度為約2% (v/v) 的苳醇，具有約7.0的pH的溶液；(vi) 包含濃度為約0.5 M的苯磺酸鹽、濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉和濃度為約2% (v/v) 的苳醇，具有約7.0的pH的溶液；(vii) 包含濃度為約50 mM的辛酸、濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約0.5 M的精胺酸和濃度為約0.5 M的氯化鈉，具有約7.0的pH的溶液；(viii) 包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約2% (v/v) 的苳醇和濃度為約0.5 M的精胺酸，具有約6.0的pH的溶液；(ix) 包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約2% (v/v) 的苳醇和濃度為約0.5 M的精胺酸，具有約5.0的pH的溶液；(x) 包含濃度為約4% (v/v) 的苳醇，具有約5.0至約10的pH的溶液；(xi) 包含濃度為約4% (v/v) 的苳醇，具有約9.0的pH的溶液；和 (xii) 包含濃度為約2% (v/v) 的苳醇和濃度為約0.5 M的精胺酸，具有約5.0的pH的溶液。

在可以與任何前述實施例組合的一些實施例中，該方法進一步包括在用如上所述的洗滌溶液洗滌基質之前，用第一溶液洗滌基質的步驟。在一些實施例中，第一溶液包含選自以下的緩衝液：磷酸鹽緩衝液、tris緩衝液、乙酸鹽緩衝液、碳酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液及其任何組合。在一些實施例中，第一溶液包含濃度為約10 mM至約100 mM或約10 mM至約500 mM的緩衝液。在一些實施例中，第一溶液是磷酸鹽緩衝液。

在可以與任何前述實施例組合的一些實施例中，該方法進一步包括在用如上所述的洗滌溶液洗滌基質之後，用第二溶液洗滌基質的步驟。在一些實施例中，第二溶液包含選自以下的緩衝液：磷酸鹽緩衝液、tris緩衝液、乙酸鹽緩衝液、碳酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液及其任何組合。在一些實施例中，第二溶液包含濃度為約10 mM至約100 mM或約10 mM至約500 mM

的緩衝液。在一些實施例中，第二溶液具有約5.0至約7.0的pH。在一些實施例中，第二溶液包含基本上較低的鹽或不包含鹽。

在可以與任何前述實施例組合的一些實施例中，該方法進一步包括在一個或多個洗滌步驟之後，使蛋白A層析基質與洗脫溶液接觸的步驟。在一些實施例中，該方法進一步包括收集洗脫液的步驟，該洗脫液包含含Fc區的多肽。在一些實施例中，該方法進一步包括經由深度過濾來過濾洗脫液的步驟。在一些實施例中，洗脫液包含少於約500百萬分率（ppm）的一種或多種雜質。

在可以與任何前述實施例組合的一些實施例中，應用本文所述的方法得到以比缺乏用洗滌溶液洗滌基質的步驟的相應方法更高的程度從一種或多種雜質中純化出來的該含Fc區的多肽。在可以與任何前述實施例組合的一些實施例中，該一種或多種雜質是宿主細胞蛋白（HCP）。在一些實施例中，該一種或多種HCP選自磷脂酶（例如推定的磷脂酶B樣蛋白2）、叢生蛋白、絲胺酸蛋白酶、延伸因子及其任何組合。在一些實施例中，宿主細胞是哺乳動物宿主細胞。在一些實施例中，宿主細胞是中國倉鼠卵巢（CHO）細胞。

在一些實施例中，Fc區是人類Fc區。在一些實施例中，人類Fc區包括人類IgG1、IgG2或IgG4 Fc區。在一些實施例中，Fc區是小鼠Fc區。在一些實施例中，小鼠Fc區包括小鼠IgG1、IgG2或IgG3 Fc區。在可以與任何前述實施例組合的一些實施例中，含Fc區的多肽是抗體。在一些實施例中，抗體是人類抗體、人源化抗體或嵌合抗體。在一些實施例中，抗體是單株抗體。在一些實施例中，抗體是雙特異性抗體或三特異性抗體。

在一些實施例中，上述任何一種方法進一步包括，在使蛋白A層析基質與樣品（包含 (i) 含Fc區的多肽和 (ii) 一種或多種雜質）接觸之前，調節包含含Fc區的多肽的收穫物以實現在約0.1 M與約0.5 M之間的苯甲酸鹽終濃度以及在約7.0與約9.0之間的pH，例如，以產生包含 (i) 含Fc區的多肽和 (ii) 一種或多種雜質的樣品。在一些實施例中，苯甲酸鹽是苯甲酸鹼金屬鹽。在一些實施例中，苯甲酸鹽是苯甲酸鈉。在一些實施例中，收穫物中苯甲酸鹽的終濃度在約0.4 M與約0.5 M之間。在一些實施例中，調節後收穫物的

pH在約7.0與約8.0之間。在一些實施例中，調節後收穫物的pH在約8.0與約9.0之間。在一些實施例中，從包含宿主細胞的培養物中生成收穫物，該宿主細胞被工程改造以表現多肽。在一些實施例中，宿主細胞是真核宿主細胞。在一些實施例中，真核宿主細胞是中國倉鼠卵巢（CHO）細胞。在一些實施例中，在調節之前使收穫物澄清。在一些實施例中，在調節後使收穫物澄清。

在相關方面，提供了純化含Fc區的多肽的方法，該方法包括以下步驟：(A) 調節包含含Fc區的多肽的收穫物以實現約0.1 M和約0.5 M的苯甲酸鹽的終濃度以及在約7.0與約9.0之間的pH，例如，以產生包含 (i) 含Fc區的多肽和 (ii) 一種或多種雜質的樣品；並且 (B) 使該樣品與至少一種層析基質接觸。在一些實施例中，該至少一種層析基質包含親和層析基質。在一些實施例中，親和層析基質是蛋白A層析基質或蛋白G層析基質。在一些實施例中，該方法進一步包括使該至少一種層析基質與至少一種洗滌溶液接觸的步驟。在一些實施例中，該方法進一步包括使該至少一種層析基質與洗脫溶液接觸的步驟。在一些實施例中，該方法進一步包括收集洗脫液的步驟，該洗脫液包含含Fc區的多肽。在一些實施例中，該方法進一步包括經由深度過濾來過濾洗脫液的步驟。在一些實施例中，洗脫液包含少於約500百萬分率（ppm）的一種或多種雜質。

在一些實施例中，苯甲酸鹽是苯甲酸鹼金屬鹽。在一些實施例中，苯甲酸鹽是苯甲酸钠。在一些實施例中，收穫物中苯甲酸鹽的終濃度在約0.4 M與約0.5 M之間。在一些實施例中，調節後收穫物的pH在約7.0與約8.0之間。在一些實施例中，調節後收穫物的pH在約8.0與約9.0之間。在一些實施例中，從包含宿主細胞的培養物中生成收穫物，該宿主細胞被工程改造以表現多肽。在一些實施例中，宿主細胞是真核宿主細胞。在一些實施例中，真核宿主細胞是中國倉鼠卵巢（CHO）細胞。在一些實施例中，在調節之前使收穫物澄清。在一些實施例中，在調節後使收穫物澄清。在一些實施例中，該方法得到以比缺乏調節包含含Fc區的多肽的收穫物以產生樣品的步驟的相應方法更高的程度從一種或多種雜質中純化出來的該含Fc區的多肽。在一些實施例中，該一種或多種雜質是宿主細胞蛋白（HCP）。在一些實施

例中，該一種或多種HCP選自：磷脂酶、叢生蛋白、絲胺酸蛋白酶、延伸因子及其任何組合。在一些實施例中，HCP是推定的磷脂酶B樣蛋白2（PLBL2）。在一些實施例中，Fc區是人類Fc區。在一些實施例中，人類Fc區包括人類IgG1、IgG2或IgG4 Fc區。在一些實施例中，Fc區是小鼠Fc區。在一些實施例中，小鼠Fc區包括小鼠IgG1、IgG2或IgG3 Fc區。在一些實施例中，含Fc區的多肽是抗體。在一些實施例中，抗體是人類抗體、人源化抗體或嵌合抗體。在一些實施例中，抗體是單株抗體。在一些實施例中，抗體是雙特異性抗體或三特異性抗體。

應當理解，上文和本文中所描述各種實施例的一種、一些或全部特性都可以組合以形成本公開文本的其他實施例。本公開文本的這些和其他方面對於熟習此項技術者而言將變得清楚。本公開文本的這些和其他實施例由隨後的具體實施方式進一步進行描述。

#### 【圖式簡單說明】

圖1顯示了在用指定的對照或測試洗滌溶液洗滌之後從蛋白A柱洗脫的抗體樣品中的中國倉鼠卵巢（CHO）宿主細胞蛋白（HCP）雜質的濃度。

圖2A-B顯示了從蛋白A柱洗脫的抗體樣品中特定HCP（HCP-A）的濃度。圖2A顯示了與對照洗滌相比，在用2% 芞醇 ± 0.5 M 苯甲酸鈉和/或0.5 M 精胺酸洗滌之後從蛋白A柱洗脫的抗體樣品中HCP-A的濃度，如通過ELISA評估的。圖2B顯示了與對照洗滌相比，在用pH為9.0或10.0的各種洗滌溶液洗滌之後從蛋白A柱洗脫的抗體樣品中HCP-A的濃度，如通過ELISA評估的。

圖3顯示了在用含有額外測試化合物的指定洗滌溶液洗滌之後從蛋白A柱洗脫的抗體樣品中HCP-A的濃度，如通過ELISA評估的。

圖4A-B顯示了從蛋白A柱洗脫的抗體樣品中通用HCP和PLBL2的濃度。圖4A顯示了與過程對照洗滌相比，在用0.5 M 精胺酸、0.5 M 苯甲酸鈉或4% 芞醇洗滌之後從蛋白A柱洗脫的抗體樣品中通用HCP的濃度，如通過ELISA評估的。圖4B顯示了與過程對照洗滌相比，在用0.5 M 精胺酸、0.5 M 苯甲酸鈉或4% 芞醇洗滌之後從蛋白A柱洗脫的抗體樣品中通用PLBL2的濃度，如通過ELISA評估的。

圖5顯示了從用包含2% 苄醇和0.5 M 苯甲酸鈉的中間洗滌液洗滌的蛋白A柱洗脫的抗體樣品的視覺澄清度的改進。

圖6A-B顯示了當加載蛋白A柱超過40 g/L時脫柱（off-column）產率和PLBL2去除的降低。圖6A顯示了當蛋白A柱的加載密度從40 g/L增加至60 g/L時，脫柱產率的百分比從93.1%線性降低至78.1%。圖6B顯示了當蛋白A柱的加載密度從40 g/L增加至60 g/L時，從蛋白A柱中洗出的PLBL2的水平從32.1 ppm降低至17 ppm。

圖7顯示了在蛋白A純化前將收穫物調節至0.5 M 苯甲酸鈉和pH 7.2或將收穫物調節至0.5 M 苯甲酸鈉和pH 9導致改進的PLBL2和HCP雜質去除。將收穫物調節至0.5 M 苯甲酸鈉pH 9.0顯示出最低水平的PLBL2和HCP雜質，並且相對於單獨的pH調節證明對數更大的PLBL2清除率。

圖8顯示了PLBL2含量與苯甲酸鈉濃度之間的關係呈近似S形。對於高於0.4 M 苯甲酸鈉的濃度觀察到減少的PLBL2清除率增益。

### 【實施方式】

本文描述了在基於蛋白A分離含Fc區的蛋白質期間減少共純化的雜質（例如，宿主細胞蛋白雜質）的數量的方法。本公開文本的方法應用使用含有苯甲酸鹽和/或苄醇的新型洗滌溶液進行的中間洗滌步驟，已顯示該中間洗滌步驟顯著降低在蛋白A親和層析期間收集的洗脫液中的宿主細胞蛋白雜質的水平（參見實例1和2）。在該新型洗滌溶液中包括一種或多種添加劑（例如，苯磺酸鹽、辛酸、己二醇、肌酸和/或精胺酸）進一步改進了在從蛋白A基質捕獲和洗脫之後雜質從蛋白質洗脫液（含有含Fc區的蛋白質）中的清除率。

### I. 定義

在詳細描述本公開文本之前，應當理解的是本公開文本不限於特定的組合物或生物系統，其當然可以變化。還應當理解，本文所用的術語僅用於描述具體實施例的目的，而不意圖具有限制性。

如在本說明書及所附發明申請專利範圍中所使用的，單數形式“一種/一個(a/an)”和“該”包括複數指示物，除非上下文另有明確說明。因此，例如，提及“一種分子”任選地包括兩種或更多種這樣的分子的組合等。

如本文使用的術語“約”是指熟習此項技術者容易知道的相應值的一般誤差範圍。本文對“約”值或參數的引用包括（並描述）涉及該值或參數本身的實施例。

應理解的是，本文所述的本公開文本的方面和實施例包括“包括（comprising）”多個方面和實施例、“由其組成（consisting）”以及“基本上由其組成（consisting essentially of）”。

如本文所用，術語“和/或”，如“A和/或B”這樣的短語旨在包括A和B兩者；A或B；A（單獨）；和B（單獨）。同樣地，如本文所用，術語“和/或”，如“A、B和/或C”這樣的短語旨在涵蓋以下實施例中的每一個：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（單獨）；B（單獨）；和C（單獨）。

術語“多肽”或“蛋白質”在本文中可互換使用，是指任何長度的胺基酸聚合物。該聚合物可以是直鏈或支鏈的，它可以包含經修飾的胺基酸，並且它可以被非胺基酸打斷。該術語還涵蓋已天然地或通過干預被修飾的胺基酸聚合物；例如，二硫鍵形成、糖基化、脂化、乙醯化、磷酸化、或任何其他操縱或修飾，如與標記組分或毒素的綴合。該定義中還包括，例如，含有胺基酸的一種或多種類似物（包括例如非天然胺基酸等）、以及本領域已知的其他修飾的多肽。

術語“抗體”在本文中以最廣泛的含義使用，並且具體包括單株抗體（包括全長單株抗體）、多株抗體、多特異性抗體（例如，雙特異性抗體、三特異性抗體等）、抗體片段、或攜帶一個或多個CDR或CDR衍生的序列的合成多肽（只要該多肽展現出所需的活性即可）。抗體（Ab）和免疫球蛋白（Ig）是具有相同結構特徵的糖蛋白。通常，抗體被認為是具有確定的或公認的特異性的Ig。因此，雖然抗體展現出對特定靶標的結合特異性，但免疫球蛋白包括抗體以及缺乏靶標特異性的其他抗體樣分子。本公開文本的抗體可以屬任何類別（例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA等）或亞類（例如，IgG1、IgG2、IgG2a、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2等）。“類型”和“類別”和“亞型”和“亞類”在本文中可互換使用。天然或野生型（由非人工操縱的群體成員獲得）抗體和免疫球蛋白通常是約150,000道爾頓的異四

聚體糖蛋白，由兩條相同的輕（L）鏈和兩條相同的重（H）鏈構成。每條重鏈在一個末端具有可變結構域（VH），隨後是許多恒定結構域。每條輕鏈在一個末端具有可變結構域（VL），並且在另一個末端具有恒定結構域。本文所述的抗體可以是人類抗體、人源化抗體、非人類動物（例如小鼠、大鼠、倉鼠、兔、駱駝等）抗體、或嵌合抗體。

在抗體的可變結構域的上下文中，術語“可變”可以是指相關分子的某些部分，其在抗體間（between and among antibodies）序列廣泛不同並且用於特定抗體對其特定靶標的特異性識別和結合。然而，變異性在整個抗體的可變結構域上不是均勻分佈的。可變性集中在輕鏈和重鏈可變結構域兩者中的被稱為互補決定區（CDR）（也稱為高變區）的三個區段中。可變結構域的更高度保守的部分被稱為框架（FR）區或序列。天然的重鏈和輕鏈可變結構域各自包含主要採用 $\beta$ -折疊構型、通過三個CDR連接的四個FR區，其形成連接 $\beta$ -折疊結構的環並且在一些情況下形成 $\beta$ -折疊結構的一部分。每條鏈中的CDR通常在FR區附近與來自另一條鏈的CDR2結合在一起，有助於形成抗體的靶（表位或決定簇）結合位點（參見Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Nation Institute of Health, Bethesda, MD (1987)）。如本文所用，除非另有說明，否則根據Kabat等人的免疫球蛋白胺基酸殘基編號系統進行免疫球蛋白胺基酸殘基的編號。一個CDR可以攜帶與同源表位特異性地結合的能力。

如本文所用的術語“鉸鏈”或“鉸鏈區”可以是指包含在抗體的第一與第二恒定結構域之間的胺基酸的柔性多肽。

術語“雙特異性抗體”可以是指將兩種抗體的抗原結合位點組合在單個分子內的分子。因此，雙特異性抗體能夠同時結合兩種不同的抗原。

本文所用的術語“單株抗體”可以是指從基本上同源的抗體群體獲得的抗體，即，除了可能以少量存在的可能天然發生的突變之外構成該群體的各個抗體是相同的。本文中的單株抗體特別包括其中一部分重鏈和/或輕鏈與衍生自特定物種或屬特定抗體類別或亞類的抗體中的相應序列相同或同源、而該一條或兩條鏈的剩餘部分與衍生自另一物種或屬於另一抗體類

別或亞類的抗體中的相應序列相同或同源的“嵌合”抗體，以及此類抗體的片段（只要它們保留所需的活性即可）。

如本文所用的術語“多價抗體”（multivalent antibody或polyvalent antibody）可以是指包含兩個或更多個抗原結合位點的抗體，因此能夠同時結合可能具有相同或不同結構的兩種或更多種抗原。術語“二價”意指抗體包含兩個抗原結合位點。術語“四價”意指抗體包含四個抗原結合位點。

如本文所用的術語“抗原結合位點”可以是指包含與抗原的部分或全部特異性地結合並與其互補的區域的抗體部分。在抗原很大的情況下，抗體可能僅與抗原的特定部分結合，該部分被稱為表位。抗原結合結構域可以由一個或多個抗體可變結構域提供，並且可以由抗體輕鏈可變結構域（VL）和抗體重鏈可變結構域（VH）的締合構成。

如與人類抗體相比，“人源化”形式的非人類（例如，鼠類）抗體是含有從非人類免疫球蛋白衍生的序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或其片段。通常，人源化抗體將包含一個和通常兩個可變結構域的基本上全部，其中全部或基本上全部CDR區與非人類免疫球蛋白的那些對應，並且全部或基本上全部FR區是人類免疫球蛋白模板序列的那些。人源化抗體還可以包含免疫球蛋白恒定區的至少一部分，通常是所選擇的人類免疫球蛋白模板的那部分。通常，目標是具有在人類中免疫原性最低的抗體分子。因此，可能的是，也可以將一個或多個CDR中的一個或多個胺基酸改變為對人類主體免疫原性較低的胺基酸，而基本上不使該一個或多個CDR對靶標的特異性結合功能最小化。可替代地，FR可以是非人類的，但免疫原性最高的那些胺基酸被免疫原性較低的胺基酸替代。然而，CDR移植（如上所述）不是獲得人源化抗體的唯一方式。例如，僅修飾CDR區可能是不夠的，因為框架殘基在確定CDR環的三維結構和抗體對其配體的總體親和力中起作用並不罕見。因此，可以實施任何手段以致於將非人類母體抗體分子修飾為對人類具有較低免疫原性的抗體分子，並且與人類抗體具有全域序列一致性並非總是必需的。

術語“雜質”可以是指存在於溶液（例如包含含有Fc區的多肽的樣品）

中的任何外來或不需要的分子。雜質可以是生物（分子）（例如，大分子）如DNA、RNA或蛋白質，其也存在於含有感興趣的蛋白質的樣品中。雜質可以包括不希望的蛋白質變體（例如，聚集的蛋白質、錯誤折疊的蛋白質、二硫鍵結合下的蛋白質、片段等），來自宿主細胞的其他蛋白質、來自細胞培養基的組分、作為用於親和層析的吸收劑部分的分子（例如，蛋白A）、內毒素、核酸、病毒等。

## II. 分離和/或純化含Fc區的多肽的方法

### *概述*

本公開文本的某些方面涉及經由蛋白A層析純化含Fc區（例如，抗體）的多肽的方法。在一些實施例中，該方法包括以下步驟：在含Fc區的多肽（例如，抗體）與蛋白A結合的條件下，使蛋白A層析基質或樹脂與樣品接觸，該樣品包含(1)含Fc區的多肽（例如，抗體）和(2)一種或多種雜質（例如，宿主細胞雜質）；並且用洗滌溶液洗滌該基質，該洗滌溶液包含苯甲酸鹽和/或苄醇。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.1 M至約1.0 M的苯甲酸鹽。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5%至約4%體積/體積（v/v）的苄醇。在一些實施例中，洗滌溶液具有約4.0至約10.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含一種或多種添加劑（例如，苯磺酸鹽、辛酸、己二醇、非緩衝鹽（如氯化鈉）、肌酸和/或精胺酸中的一種或多種）。在一些實施例中，洗滌溶液進一步包含緩衝劑。在一些實施例中，調節包含含有Fc區的多肽的收穫物以實現在約0.1 M與0.5 M之間的苯甲酸鹽終濃度以及在約7與約9之間的pH，以產生包含(1)含Fc區的多肽（例如，抗體）和(2)一種或多種雜質（例如，宿主細胞雜質）的樣品。

### *使樣品與蛋白A基質或樹脂接觸*

本公開文本的某些方面涉及經由蛋白A層析純化含Fc區（例如，抗體）的多肽的方法。在一些實施例中，該方法包括以下步驟：在含Fc區的多肽（例如，抗體）與蛋白A結合的條件下，使蛋白A層析基質或樹脂與樣品接觸，該樣品包含(1)含Fc區的多肽（例如，抗體）和(2)一種或多種雜質（例如，宿主細胞雜質）。

在一些實施例中，本公開文本涉及從樣品（例如，細胞裂解物樣品、

細胞培養上清液樣品等)中純化含Fc區的多肽(例如,抗體、免疫粘附素、融合蛋白等)的方法。在一些實施例中,樣品是細胞培養上清液(例如,來自被工程改造以產生和分泌多肽的細胞(如CHO細胞)的上清液),或源自細胞培養上清液(例如,部分純化的細胞培養上清液樣品)。在一些實施例中,含Fc區的多肽是分泌的多肽。在一些實施例中,Fc區是免疫球蛋白重鏈的C末端區,並且可以包括天然序列Fc區和變體Fc區。儘管免疫球蛋白重鏈的Fc區的邊界可能不同,但人類IgG重鏈Fc區通常被定義為從位置Cys226或從Pro230處的胺基酸殘基延伸至其羧基末端(Fc區中的殘基的編號是如Kabat中的EU索引的編號)。免疫球蛋白的Fc區通常包含兩個恒定結構域(CH2和CH3),並且任選地包含CH4結構域。在一些實施例中,Fc區是從任何合適的免疫球蛋白(如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亞型、IgA、IgE、IgD或IgM)獲得的Fc區。在一些實施例中,多肽包含具有人類Fc區、非人類動物Fc區(例如,小鼠、大鼠、兔、倉鼠等)、或其任何組合的胺基酸序列的Fc區。在一些實施例中,Fc區是小鼠Fc區。在一些實施例中,小鼠Fc區包括小鼠IgG1、IgG2或IgG3 Fc區。在一些實施例中,Fc區是人類Fc區。在一些實施例中,人類Fc區包括人類IgG1、IgG2和/或IgG4 Fc區。

在一些實施例中,含Fc區的多肽是抗體。在一些實施例中,“抗體”在本文中以最廣泛的含義使用,並且具體涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體、多價抗體(例如,二價、三價、四價等)和多特異性抗體(例如,雙特異性、三特異性等)。抗體可以來自任何起源,包括例如人類、非人類靈長類動物、齧齒動物(例如,小鼠、大鼠、倉鼠等)、兔、駱駝、鯊魚,和/或可以是重組產生的。在一些實施例中,抗體是人類抗體、人源化抗體和/或嵌合抗體。在一些實施例中,抗體是單株抗體。在一些實施例中,抗體是多特異性和/或多價抗體。在一些實施例中,抗體是雙特異性抗體或三特異性抗體。

在一些實施例中,包含含有Fc區的多肽的樣品(例如,細胞裂解物樣品、細胞培養上清液樣品等)進一步包含一種或多種雜質。在一些實施例中,歸因於用來生產含Fc區的多肽的過程(例如,生產分泌抗體的過程),樣品中存在一種或多種雜質。在一些實施例中,該一種或多種雜質是源自

宿主細胞的一種或多種雜質（例如，一種或多種宿主細胞蛋白、一種或多種宿主細胞核酸、一種或多種宿主細胞脂質等）。宿主細胞可以是本領域已知的適合用於生產含Fc區的多肽的任何宿主細胞，包括例如原核細胞（如大腸桿菌（*E. coli*）細胞、黑麴黴（*A. niger*）細胞等）、真核細胞（如酵母細胞、植物細胞、昆蟲細胞（例如，S1細胞）和/或哺乳動物（小鼠、大鼠、倉鼠、兔、人類、非人類靈長類動物等）細胞（例如，雜交瘤、CHO細胞、293T細胞、PER.C6細胞、NS0細胞等）。在一些實施例中，該一種或多種雜質是一種或多種宿主細胞蛋白（HCP）。在一些實施例中，HCP是指在細胞培養或發酵期間由宿主細胞產生的非產物蛋白質。在一些實施例中，該一種或多種雜質是選自磷脂酶、叢生蛋白、絲胺酸蛋白酶、延伸因子和/或其任何組合的一種或多種（例如，一種或多種、兩種或更多種、三種或更多種、四種或更多種等）宿主細胞蛋白（HCP）。在一些實施例中，該宿主細胞是CHO細胞。在一些實施例中，該一種或多種雜質是一種或多種CHO細胞HCP。在一些實施例中，該一種或多種CHO細胞HCP是磷脂酶、叢生蛋白、絲胺酸蛋白酶、延伸因子和/或其任何組合中的一種或多種。

在一些實施例中，本公開文本涉及經由蛋白A層析將含Fc區的多肽從樣品中的一種或多種雜質中純化出來的方法。在一些實施例中，使樣品與蛋白A基質或樹脂接觸。在一些實施例中，在適合於樣品中的含Fc區的多肽與蛋白A結合的條件下使樣品與蛋白A基質或樹脂接觸。用於使含Fc區的多肽與蛋白A基質或樹脂接觸和結合的方法和合適的條件是熟習此項技術者容易理解的（例如，如可商購的蛋白A基質或樹脂的製造商方案中描述的方法）。本領域已知的任何合適的蛋白A基質或樹脂都可以用於本公開文本的方法中，包括例如：MabSelect、MabSelect Xtra、MabSelect Sure、MabSelect Sure LX Protein A、MabSelect pcc、MabSelect PrismA、rProtein A Sepharose CL-4B、和nProtein A Sepharose 4 FF（GE Healthcare）；EshmunoA、ProSep A、ProSep-vA High Capacity、ProSep-vA Ultra、和ProSep-vA UltraPlus（Millipore）；Poros A和Mabcapture A（Poros）；IPA-300、IPA-400、和IPA-500（RepliGen Corp.）；Affigel protein A和Affiprep protein A（Bio-Rad）；MABsorbent A1PP和MABsorbent A2P（Affinity Chromatography Ltd.）；Protein A Ceramic Hyper

D F (Pall Corp.) ; Ultralink Immobilized protein A和Agarose Protein A (PIERCE) ; Protein A Cellthru 300和Protein A Ultraflow (Bioseparation) ; Amsphere A3 (JSR) ; 和/或Toyopearl AF-rProtein A HC-650F (Tosoh Biosciences) 。在一些實施例中，蛋白A基質或樹脂以柱層析的形式使用。在一些實施例中，在使蛋白A基質或樹脂與樣品接觸之前，調節蛋白A基質或樹脂的一個或多個參數（如pH、離子強度、溫度、其他物質的添加）。在一些實施例中，在使蛋白A基質或樹脂與樣品接觸之前和/或之後，將蛋白A基質或樹脂沖洗、洗滌、平衡、剝離和/或消毒。在一些實施例中，在使蛋白A基質或樹脂與樣品接觸之前，將蛋白A基質或樹脂平衡和/或洗滌。可以使用本領域已知的任何合適的平衡和/或洗滌緩衝液。在一些實施例中，將蛋白A基質或樹脂在用例之間消毒、剝離和/或再生。

#### *用洗滌溶液洗滌蛋白A基質或樹脂*

本公開文本的某些方面涉及經由蛋白A層析（通過用包含苯甲酸鹽和/或苳醇的洗滌溶液洗滌與含Fc區的多肽（例如抗體）結合的蛋白A基質或樹脂）純化含Fc區的多肽的方法。在一些實施例中，該方法包括以下步驟：在含Fc區的多肽（例如，抗體）與蛋白A結合的條件下，使蛋白A層析基質或樹脂與樣品接觸，該樣品包含 (1) 含Fc區的多肽（例如，抗體）和 (2) 一種或多種雜質（例如，宿主細胞雜質）；並且用洗滌溶液洗滌該基質或樹脂，該洗滌溶液包含濃度為約0.1 M至約1.0 M的苯甲酸鹽和/或濃度為約0.5%至約4%體積/體積（v/v）的苳醇，其中該洗滌溶液具有約4.0至約10.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含苯甲酸鹽。在一些實施例中，洗滌溶液包含苳醇。在一些實施例中，洗滌溶液包含苯甲酸鹽和苳醇。

在一些實施例中，本公開文本涉及包含苯甲酸鹽和/或苯甲酸的洗滌溶液（例如，pH調節的）。本領域已知的任何合適的苯甲酸鹽（例如，鹼金屬鹽）來源或形式和/或苯甲酸都可以用於本公開文本的洗滌溶液中，包括例如苯甲酸钠、苯甲酸鉀、苯甲酸鋰、苯甲酸鈣、苯甲酸鎂、苯甲酸鋁、苯甲酸鋇、和/或其任何組合。在一些實施例中，苯甲酸鹽是苯甲酸鹼金屬鹽。在一些實施例中，苯甲酸鹽是苯甲酸钠或苯甲酸鉀。在一些實施例中，苯甲酸鹽是苯甲酸钠。

在一些實施例中，苯甲酸鹽（例如，苯甲酸钠）和/或苯甲酸以約0.1 M至約1.0 M的濃度存在於洗滌溶液中。例如，苯甲酸鹽（例如，苯甲酸钠）和/或苯甲酸以以下的濃度存在於洗滌溶液中：約0.1 M至約1.0 M、約0.1 M至約0.9 M、約0.1 M至約0.8 M、約0.1 M至約0.7 M、約0.1 M至約0.6 M、約0.1 M至約0.5 M、約0.1 M至約0.4 M、約0.1 M至約0.3 M、約0.1 M至約0.2 M、約0.2 M至約1.0 M、約0.2 M至約0.9 M、約0.2 M至約0.8 M、約0.2 M至約0.7 M、約0.2 M至約0.6 M、約0.2 M至約0.5 M、約0.2 M至約0.4 M、約0.2 M至約0.3 M、約0.3 M至約1.0 M、約0.3 M至約0.9 M、約0.3 M至約0.8 M、約0.3 M至約0.7 M、約0.3 M至約0.6 M、約0.3 M至約0.5 M、約0.3 M至約0.4 M、約0.4 M至約1.0 M、約0.4 M至約0.9 M、約0.4 M至約0.8 M、約0.4 M至約0.7 M、約0.4 M至約0.6 M、約0.4 M至約0.5 M、約0.5 M至約1.0 M、約0.5 M至約0.9 M、約0.5 M至約0.8 M、約0.5 M至約0.7 M、約0.5 M至約0.6 M、約0.6 M至約1.0 M、約0.6 M至約0.9 M、約0.6 M至約0.8 M、約0.6 M至約0.7 M、約0.7 M至約1.0 M、約0.7 M至約0.9 M、約0.7 M至約0.8 M、約0.8 M至約1.0 M、約0.8 M至約0.9 M、或約0.9 M至約1.0 M。在一些實施例中，苯甲酸鹽（例如，苯甲酸钠）和/或苯甲酸以約0.1 M至約0.5 M的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，苯甲酸鹽（例如，苯甲酸钠）和/或苯甲酸以約0.1 M至約0.3 M的濃度存在於洗滌溶液中。

在一些實施例中，苯甲酸鹽（例如，苯甲酸钠）和/或苯甲酸以以下的任一濃度存在於洗滌溶液中：約0.1 M、0.15 M、0.2 M、0.25 M、0.3 M、0.35 M、0.4 M、0.45 M、0.5 M、0.55 M、0.6 M、0.65 M、0.7 M、0.75 M、0.8 M、0.85 M、0.9 M、0.95 M、或1.0 M。在一些實施例中，苯甲酸鹽（例如，苯甲酸钠）和/或苯甲酸以約0.5 M的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，苯甲酸鹽（例如，苯甲酸钠）和/或苯甲酸以以下的濃度存在於洗滌溶液中：約0.1 M或少於約0.1 M、約0.3 M或少於約0.3 M、約0.5 M或少於約0.5 M、約0.75 M或少於約0.75 M、或約1.0 M或少於約1.0 M。在一些實施例中，苯甲酸鹽（例如，苯甲酸钠）和/或苯甲酸以約0.5 M或少於約0.5 M的濃度存在於洗滌溶液中。

在一些實施例中，本公開文本涉及包含苺醇的洗滌溶液。本領域已知的任何合適的苺醇來源或形式都可以用於本公開文本的洗滌溶液中。

在一些實施例中，苺醇以約0.5%至約4.0%體積/體積 (v/v) 的濃度存在於洗滌溶液中。例如，苺醇可以以約0.5%至約4%、約1%至約4%、約1.5%至約4%、約2%至約4%、約2.5%至約4%、約3%至約4%、約3.5%至約4%、約0.5%至約3.5%、約1%至約3.5%、約1.5%至約3.5%、約2%至約3.5%、約2.5%至約3.5%、約3%至約3.5%、約0.5%至約3%、約1%至約3%、約1.5%至約3%、約2%至約3%、約2.5%至約3%、約0.5%至約2.5%、約1%至約2.5%、約1.5%至約2.5%、約2%至約2.5%、約0.5%至約2%、約1%至約2%、約1.5%至約2%、約0.5%至約1.5%、約1%至約1.5%、或約0.5%至約1% (v/v) 的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，苺醇以約1%至約4%體積/體積 (v/v) 的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，苺醇以約1%至約2%體積/體積 (v/v) 的濃度存在於洗滌溶液中。

在一些實施例中，苺醇以約0.5%、0.75%、1%、1.25%、1.5%、1.75%、2%、2.25%、2.5%、2.75%、3%、3.25%、3.5%、3.75%、或約4% (v/v) 中的任一濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，苺醇以約2% (v/v) 的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，苺醇以約1%或少於約1%、約2%或少於約2%、約3%或少於約3%、或約4%或少於約4%的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，苺醇以約4%或少於約4% (v/v) 的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，苺醇以約4%或少於約2% (v/v) 的濃度存在於洗滌溶液中。

### 添加劑

在一些實施例中，本公開文本的洗滌溶液進一步包含以下添加劑中的一種或多種（例如，一種或多種、兩種或更多種、三種或更多種、四種或更多種、或全部五種）：在本文所述的任何濃度下的苯磺酸鹽、辛酸、己二醇、非緩衝鹽和/或肌酸。在一些實施例中，包含該一種或多種添加劑的洗滌溶液具有約4.0至約10.0的pH。在一些實施例中，在洗滌溶液中包括一種或多種添加劑進一步改進了通過本文所述的方法將含Fc區的多肽從一種或多種雜質（例如，宿主細胞雜質）中純化出來。

在一些實施例中，洗滌溶液包含在約4.0至約10.0的pH下的苯甲酸鹽和/或苧醇以及以下中的一種：苯磺酸鹽、辛酸、己二醇、非緩衝鹽和/或肌酸。例如，洗滌溶液可以包含：在約4.0至約10.0的pH下的苯甲酸鹽和/或苧醇和苯磺酸鹽；苯甲酸鹽和/或苧醇和辛酸；苯甲酸鹽和/或苧醇和己二醇；苯甲酸鹽和/或苧醇和非緩衝鹽；或苯甲酸鹽和/或苧醇和肌酸。

在一些實施例中，洗滌溶液包含在約4.0至約10.0的pH下的苯甲酸鹽和/或苧醇以及以下中的兩種：苯磺酸鹽、辛酸、己二醇、非緩衝鹽和/或肌酸。例如，洗滌溶液可以包含：在約4.0至約10.0的pH下的苯甲酸鹽和/或苧醇、苯磺酸鹽和辛酸；苯甲酸鹽和/或苧醇、苯磺酸鹽和己二醇；苯甲酸鹽和/或苧醇、苯磺酸鹽和非緩衝鹽；苯甲酸鹽和/或苧醇、苯磺酸鹽和肌酸；苯甲酸鹽和/或苧醇、辛酸和己二醇；苯甲酸鹽和/或苧醇、辛酸和非緩衝鹽；苯甲酸鹽和/或苧醇、辛酸和肌酸；苯甲酸鹽和/或苧醇、己二醇和非緩衝鹽；苯甲酸鹽和/或苧醇、己二醇和肌酸；或苯甲酸鹽和/或苧醇、非緩衝鹽和肌酸。

在一些實施例中，洗滌溶液包含在約4.0至約10.0的pH下的苯甲酸鹽和/或苧醇以及以下中的三種：苯磺酸鹽、辛酸、己二醇、非緩衝鹽和/或肌酸。例如，洗滌溶液可以包含：在約4.0至約10.0的pH下的苯甲酸鹽和/或苧醇、苯磺酸鹽、辛酸和己二醇；苯甲酸鹽和/或苧醇、苯磺酸鹽、辛酸和非緩衝鹽；苯甲酸鹽和/或苧醇、苯磺酸鹽、辛酸和肌酸；苯甲酸鹽和/或苧醇、苯磺酸鹽、己二醇和非緩衝鹽；苯甲酸鹽和/或苧醇、苯磺酸鹽、己二醇和肌酸；苯甲酸鹽和/或苧醇、苯磺酸鹽、非緩衝鹽和肌酸；苯甲酸鹽和/或苧醇、辛酸、己二醇和非緩衝鹽；苯甲酸鹽和/或苧醇、辛酸、己二醇和肌酸；或苯甲酸鹽和/或苧醇、辛酸、非緩衝鹽和肌酸；苯甲酸鹽和/或苧醇、己二醇、非緩衝鹽和肌酸。

在一些實施例中，洗滌溶液包含在約4.0至約10.0的pH下的苯甲酸鹽和/或苧醇以及以下中的四種：苯磺酸鹽、辛酸、己二醇、非緩衝鹽和/或肌酸。例如，洗滌溶液可以是包括：在約4.0至約10.0的pH下的苯甲酸鹽和/或苧醇、苯磺酸鹽、辛酸、己二醇和非緩衝鹽；苯甲酸鹽和/或苧醇、苯磺酸鹽、辛酸、己二醇和肌酸；苯甲酸鹽和/或苧醇、苯磺酸鹽、辛酸、非緩衝鹽和肌

酸；苯甲酸鹽和/或苧醇、苯磺酸鹽、己二醇、非緩衝鹽和肌酸；或苯甲酸鹽和/或苧醇、辛酸、己二醇、非緩衝鹽和肌酸。

在一些實施例中，洗滌溶液包含在約4.0至約10.0的pH下的苯甲酸鹽和/或苧醇以及以下中的全部五種：苯磺酸鹽、辛酸、己二醇、非緩衝鹽和肌酸。

在一些實施例中，本公開文本涉及包含苯磺酸鹽的洗滌溶液。本領域已知的任何合適的苯磺酸鹽形式或來源都可以用於本公開文本的洗滌溶液中，包括例如苯磺酸鹽（例如，鹼金屬鹽）如苯磺酸鈉或苯磺酸鉀、苯磺酸和/或其任何組合。在一些實施例中，苯磺酸鹽是苯磺酸鈉。

在一些實施例中，苯磺酸鹽（例如，苯磺酸鈉）以約0.1 M至約0.5 M的濃度存在於洗滌溶液中。例如，苯磺酸鈉可以以約0.1 M至約0.5 M、約0.1 M至約0.4 M、約0.1 M至約0.3 M、約0.1 M至約0.2 M、約0.2 M至約0.5 M、約0.2 M至約0.4 M、約0.2 M至約0.3 M、約0.3 M至約0.5 M、約0.3 M至約0.4 M、或約0.4 M至約0.5 M的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，苯磺酸鈉以約0.1 M至約0.3 M的濃度存在於洗滌溶液中。

在一些實施例中，苯磺酸鈉以約0.1 M、0.15 M、0.2 M、0.25 M、0.3 M、0.35 M、0.4 M、0.45 M、或0.5 M中的任一濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，苯磺酸鈉以約0.5 M的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，苯磺酸鈉以約0.1 M或少於約0.1 M、約0.3 M或少於約0.3 M、或約0.5 M或少於約0.5 M的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，苯磺酸鈉以約0.5 M或少於約0.5 M的濃度存在於洗滌溶液中。

在一些實施例中，本公開文本涉及包含辛酸的洗滌溶液。本領域已知的任何合適的辛酸形式或來源都可以用於本公開文本的洗滌溶液中。

在一些實施例中，辛酸以約1 mM至約50 mM的濃度存在於洗滌溶液中。例如，辛酸可以以約1 mM至約50 mM、約10 mM至約50 mM、約20 mM至約50 mM、約30 mM至約50 mM、約40 mM至約50 mM、約1 mM至約40 mM、約10 mM至約40 mM、約20 mM至約40 mM、約30 mM至約40 mM、約1 mM至約30 mM、約10 mM至約30 mM、約20 mM至約30 mM、約1 mM至約20 mM、約10 mM至約20 mM、或約1 mM至約10 mM的濃度存在於洗滌溶液中。在

一些實施例中，辛酸以約10 mM至約50 mM的濃度存在於洗滌溶液中。

在一些實施例中，辛酸以約1 mM、5 mM、10 mM、15 mM、20 mM、25 mM、30 mM、35 mM、40 mM、45 mM、或50 mM中的任一濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，辛酸以約50 mM的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，辛酸以約10 mM或少於約10 mM、約30 mM或少於約30 mM、或約50 mM或少於約50 mM的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，辛酸以約50 mM或少於約50 mM的濃度存在於洗滌溶液中。

在一些實施例中，本公開文本涉及包含己二醇的洗滌溶液。本領域已知的任何合適的己二醇形式或來源都可以用於本公開文本的洗滌溶液中。

在一些實施例中，己二醇以約0.5%至約10% (v/v) 的濃度存在於洗滌溶液中。例如，己二醇可以以約0.5%至約10%、約1%至約10%、約2%至約10%、約4%至約10%、約6%至約10%、約8%至約10%、約9%至約10%、0.5%至約9%、約1%至約9%、約2%至約9%、約4%至約9%、約6%至約9%、約8%至約9%、約0.5%至約8%、約1%至約8%、約2%至約8%、約4%至約8%、約6%至約8%、約0.5%至約6%、約1%至約6%、約2%至約6%、約4%至約6%、約0.5%至約4%、約1%至約4%、約2%至約4%、約0.5%至約2%、約1%至約2%、或約0.5%至約1% (v/v) 的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，己二醇以約1%至約10% (v/v) 的濃度存在於洗滌溶液中。

在一些實施例中，己二醇以約0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或10% (v/v) 中的任一濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，己二醇以約10% (v/v) 的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，己二醇以約1%或少於約1%、約2%或少於約2%、約4%或少於約4%、約6%或少於約6%、約8%或少於約8%、或約10%或少於約10% (v/v) 的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，己二醇以約10%或少於約10% (v/v) 的濃度存在於洗滌溶液中。

在一些實施例中，本公開文本涉及包含一種或多種（例如，一種或、兩種或更多種、三種或更多種等）非緩衝鹽的洗滌溶液。本領域已知的任何合適的非緩衝鹽形式或來源都可以用於本公開文本的洗滌溶液中。非緩

衝鹽可以包括鹵素鹽（如包含Cl或Br的那些），尤其是包含鹼金屬（如Na或K）或鹼土金屬（如Ca或Mg）的鹵素鹽。在一些實施例中，非緩衝鹽是氯化鈉或氯化鉀。在一些實施例中，非緩衝鹽是氯化鈉。

在一些實施例中，非緩衝鹽（例如，氯化鈉）以約0.1 M至約1.0 M的濃度存在於洗滌溶液中。例如，非緩衝鹽（例如，氯化鈉）可以以約0.1 M至約1.0 M、約0.1 M至約0.8 M、約0.1 M至約0.6 M、約0.1 M至約0.5 M、約0.1 M至約0.4 M、約0.1 M至約0.2 M、約0.2 M至約1.0 M、約0.2 M至約0.8 M、約0.2 M至約0.6 M、約0.2 M至約0.5 M、約0.2 M至約0.4 M、約0.4 M至約1.0 M、約0.4 M至約0.8 M、約0.4 M至約0.6 M、約0.4 M至約0.5 M、約0.5 M至約1.0 M、約0.5 M至約0.8 M、約0.5 M至約0.6 M、約0.6 M至約1.0 M、約0.6 M至約0.8 M、或約0.8 M至約1.0 M的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，非緩衝鹽（例如，氯化鈉）以約0.1 M至約0.5 M的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，非緩衝鹽（例如，氯化鈉）以約0.5 M至約1.0 M的濃度存在於洗滌溶液中。

在一些實施例中，非緩衝鹽（例如，氯化鈉）以約0.1 M、0.15 M、0.2 M、0.25 M、0.3 M、0.35 M、0.4 M、0.45 M、0.5 M、0.55 M、0.6 M、0.65 M、0.7 M、0.75 M、0.8 M、0.85 M、0.9 M、0.95 M、或1.0 M中的任一濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，非緩衝鹽（例如，氯化鈉）以約0.5 M的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，非緩衝鹽（例如，氯化鈉）以約1.0 M的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，非緩衝鹽（例如，氯化鈉）以約0.1 M或少於約0.1 M、約0.2 M或少於約0.2 M、約0.4 M或少於約0.4 M、約0.5 M或少於約0.5 M、約0.6 M或少於約0.6 M、約0.8 M或少於約0.8 M、或約1.0 M或少於約1.0 M的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，非緩衝鹽（例如，氯化鈉）以約0.5 M或少於約0.5 M的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，非緩衝鹽（例如，氯化鈉）以約1.0 M或少於約1.0 M的濃度存在於洗滌溶液中。

在一些實施例中，本公開文本涉及包含肌酸的洗滌溶液。本領域已知的任何合適的肌酸形式或來源都可以用於本公開文本的洗滌溶液中，包括

例如肌酸-HCl、肌酸酯、丙酮酸肌酸、磷酸肌酸、 $\alpha$ -酮戊二酸肌酸、檸檬酸肌酸和/或其任何組合。在一些實施例中，該肌酸是肌酸-HCl。

在一些實施例中，肌酸以約1 mM至約100 mM的濃度存在於洗滌溶液中。例如，肌酸可以以約1 mM至約100 mM、約10 mM至約100 mM、約25 mM至約100 mM、約50 mM至約100 mM、約75 mM至約100 mM、約1 mM至約75 mM、約10 mM至約75 mM、約25 mM至約75 mM、約50 mM至約75 mM、約1 mM至約50 mM、約10 mM至約50 mM、約25 mM至約50 mM、約1 mM至約25 mM、約10 mM至約25 mM、或約1 mM至約10 mM的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，肌酸以約10 mM至約100 mM的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，肌酸以約10 mM至約50 mM的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，肌酸以約1 mM、5 mM、10 mM、15 mM、20 mM、25 mM、30 mM、35 mM、40 mM、45 mM、50 mM、55 mM、60 mM、65 mM、70 mM、75 mM、80 mM、85 mM、90 mM、95 mM、或100 mM中的任一濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，肌酸以約50 mM的濃度存在於洗滌溶液中。

### 精胺酸

在一些實施例中，本公開文本涉及進一步包含精胺酸和/或精胺酸衍生物的洗滌溶液。在一些實施例中，在洗滌溶液中包括精胺酸和/或精胺酸衍生物進一步改進了通過本文所述的方法將含Fc區的多肽從一種或多種雜質（例如，宿主細胞雜質）中純化出來。本領域已知的任何合適的精胺酸和/或精胺酸衍生物形式或來源都可以用於本公開文本的洗滌溶液中，包括例如精胺酸（arginine）、精胺酸-HCl、乙醯精胺酸、胍丁胺、精胺酸（arginic acid）、N- $\alpha$ -丁醯基-L-精胺酸、N- $\alpha$ -特戊醯基精胺酸和/或其任何組合。精胺酸和/或精胺酸衍生物可以是L-精胺酸和/或D-精胺酸及其衍生物。在一些實施例中，精胺酸和/或精胺酸衍生物是精胺酸-HCl。

在一些實施例中，本公開文本涉及在包含苯甲酸鹽和/或苄醇的洗滌溶液中使用精胺酸和/或精胺酸衍生物（例如，精胺酸-HCl）。在一些實施例中，洗滌溶液包含苯甲酸鹽和精胺酸和/或精胺酸衍生物（例如，精胺酸-HCl）。在一些實施例中，洗滌溶液包含苄醇和精胺酸和/或精胺酸衍生物（例如，

精胺酸-HCl)。在一些實施例中，洗滌溶液包含苯甲酸鹽、苧醇和精胺酸和/或精胺酸衍生物（例如，精胺酸-HCl）。在一些實施例中，洗滌溶液進一步包含以下中的一種或多種（例如，一種或多種、兩種或更多種、三種或更多種、四種或更多種、或全部五種）：在本文所述的任何濃度下的苯磺酸鹽、辛酸、己二醇、非緩衝鹽和/或肌酸。在一些實施例中，包含精胺酸和/或精胺酸衍生物的洗滌溶液具有約4.0至約10.0的pH。在一些實施例中，包含精胺酸和/或精胺酸衍生物的洗滌溶液具有約4.0至約6.0的pH。在一些實施例中，包含精胺酸和/或精胺酸衍生物的洗滌溶液具有約4.0至約5.0的pH。在一些實施例中，包含精胺酸和/或精胺酸衍生物的洗滌溶液具有約8.0至約10.0的pH。在一些實施例中，包含精胺酸和/或精胺酸衍生物的洗滌溶液具有約8.0至約9.0的pH。

在一些實施例中，洗滌溶液包含苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸和/或精胺酸衍生物（例如，精胺酸-HCl）、以及以下中的一種：苯磺酸鹽、辛酸、己二醇、非緩衝鹽和/或肌酸。例如，洗滌溶液可以包含：苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸和苯磺酸鹽；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸和辛酸；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸和己二醇；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸和非緩衝鹽；或苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸和肌酸。

在一些實施例中，洗滌溶液包含苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸和/或精胺酸衍生物（例如，精胺酸-HCl）、以及以下中的兩種：苯磺酸鹽、辛酸、己二醇、非緩衝鹽和/或肌酸。例如，洗滌溶液可以包含：苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、苯磺酸鹽和辛酸；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、苯磺酸鹽和己二醇；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、苯磺酸鹽和非緩衝鹽；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、苯磺酸鹽和肌酸；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、辛酸和己二醇；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、辛酸和非緩衝鹽；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、辛酸和肌酸；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、己二醇和非緩衝鹽；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、己二醇和肌酸；或苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、非緩衝鹽和肌酸。

在一些實施例中，洗滌溶液包含苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸和/或精胺酸衍生物（例如，精胺酸-HCl）、以及以下中的三種：苯磺酸鹽、辛酸、

己二醇、非緩衝鹽和/或肌酸。例如，洗滌溶液可以包含：苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、苯磺酸鹽、辛酸和己二醇；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、苯磺酸鹽、辛酸和非緩衝鹽；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、苯磺酸鹽、辛酸和肌酸；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、苯磺酸鹽、己二醇和非緩衝鹽；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、苯磺酸鹽、己二醇和肌酸；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、苯磺酸鹽、非緩衝鹽和肌酸；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、辛酸、己二醇和非緩衝鹽；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、辛酸、己二醇和肌酸；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、辛酸、非緩衝鹽和肌酸；或苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、己二醇、非緩衝鹽和肌酸。

在一些實施例中，洗滌溶液包含苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸和/或精胺酸衍生物（例如，精胺酸-HCl）、以及以下中的四種：苯磺酸鹽、辛酸、己二醇、非緩衝鹽和/或肌酸。例如，洗滌溶液可以是包括：苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、苯磺酸鹽、辛酸、己二醇和非緩衝鹽；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、苯磺酸鹽、辛酸、己二醇和肌酸；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、苯磺酸鹽、辛酸、非緩衝鹽和肌酸；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、苯磺酸鹽、己二醇、非緩衝鹽和肌酸；苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸、辛酸、己二醇、非緩衝鹽和肌酸。

在一些實施例中，洗滌溶液包含苯甲酸鹽和/或苧醇、精胺酸和/或精胺酸衍生物（例如，精胺酸-HCl）、以及以下中的全部五種：苯磺酸鹽、辛酸、己二醇、非緩衝鹽和/或肌酸。

在一些實施例中，精胺酸和/或精胺酸衍生物（例如，精胺酸-HCl）以約0.1 M至約1.0 M的濃度存在於洗滌溶液中。例如，精胺酸和/或精胺酸衍生物（例如，精胺酸-HCl）可以以約0.1 M至約1.0 M、約0.1 M至約0.9 M、約0.1 M至約0.8 M、約0.1 M至約0.7 M、約0.1 M至約0.6 M、約0.1 M至約0.5 M、約0.1 M至約0.4 M、約0.1 M至約0.3 M、約0.1 M至約0.2 M、約0.2 M至約1.0 M、約0.2 M至約0.9 M、約0.2 M至約0.8 M、約0.2 M至約0.7 M、約0.2 M至約0.6 M、約0.2 M至約0.5 M、約0.2 M至約0.4 M、約0.2 M至約0.3 M、約0.3 M至約1.0 M、約0.3 M至約0.9 M、約0.3 M至約0.8 M、約0.3 M至約0.7 M、約0.3 M至約0.6 M、約0.3 M至約0.5 M、約0.3 M至約0.4 M、約0.4 M至

約1.0 M、約0.4 M至約0.9 M、約0.4 M至約0.8 M、約0.4 M至約0.7 M、約0.4 M至約0.6 M、約0.4 M至約0.5 M、約0.5 M至約1.0 M、約0.5 M至約0.9 M、約0.5 M至約0.8 M、約0.5 M至約0.7 M、約0.5 M至約0.6 M、約0.6 M至約1.0 M、約0.6 M至約0.9 M、約0.6 M至約0.8 M、約0.6 M至約0.7 M、約0.7 M至約1.0 M、約0.7 M至約0.9 M、約0.7 M至約0.8 M、約0.8 M至約1.0 M、約0.8 M至約0.9 M、或約0.9 M至約1.0 M的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，精胺酸和/或精胺酸衍生物（例如，精胺酸-HCl）以約0.1 M至約0.5 M的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，精胺酸和/或精胺酸衍生物（例如，精胺酸-HCl）以約0.1 M至約0.3 M的濃度存在於洗滌溶液中。

在一些實施例中，精胺酸和/或精胺酸衍生物（例如，精胺酸-HCl）以約0.1 M、0.15 M、0.2 M、0.25 M、0.3 M、0.35 M、0.4 M、0.45 M、0.5 M、0.55 M、0.6 M、0.65 M、0.7 M、0.75 M、0.8 M、0.85 M、0.9 M、0.95 M、或1.0 M中的任一濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，精胺酸和/或精胺酸衍生物（例如，精胺酸-HCl）以約0.5 M的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，精胺酸和/或精胺酸衍生物（例如，精胺酸-HCl）以約約0.1 M或少於約0.1 M、約0.2 M或少於約0.2 M、約0.3 M或少於約0.3 M、約0.4 M或少於約0.4 M、約0.5 M或少於約0.5 M、約0.75 M或少於約0.75 M、或約1.0 M或少於約1.0 M的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，精胺酸和/或精胺酸衍生物（例如，精胺酸-HCl）以約0.5 M或少於約0.5 M的濃度存在於洗滌溶液中。

## pH

在一些實施例中，本公開文本涉及具有約4.0至約10.0的pH的洗滌溶液。例如，洗滌溶液可以具有以下的pH：約4.0至約10.0、約5.0至約10.0、約6.0至約10.0、約6.5至約10.0、約7.0至約10.0、約7.5至約10.0、約8.0至約10.0、約9.0至約10.0、4.0至約9.0、約5.0至約9.0、約6.0至約9.0、約6.5至約9.0、約7.0至約9.0、約7.5至約9.0、約8.0至約9.0、4.0至約8.0、約5.0至約8.0、約6.0至約8.0、約6.5至約8.0、約7.0至約8.0、約7.5至約8.0、4.0至約7.5、約5.0至約7.5、約6.0至約7.5、約6.5至約7.5、約7.0至約7.5、約4.0至約7.0、約5.0至約7.0、約6.0至約7.0、約6.5至約7.0、4.0至約6.5、約5.0至約6.5、約6.0至

約6.5、4.0至約6.0、約5.0至約6.0、或約4.0至約5.0。在一些實施例中，洗滌溶液具有約5.0至約9.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液具有約4.0至約6.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液具有約4.0至約5.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液具有約8.0至約10.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液具有約8.0至約9.0的pH。

在一些實施例中，洗滌溶液具有以下中的任一者的pH：約4.0、4.25、4.5、4.75、5.0、5.25、5.5、5.75、6.0、6.25、6.5、6.75、7.0、7.25、7.5、7.75、8.0、8.25、8.5、8.75、9.0、9.25、9.5、9.75、或10.0。在一些實施例中，洗滌溶液具有約4.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液具有約5.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液具有約6.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液具有約6.5的pH。在一些實施例中，洗滌溶液具有約7.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液具有約7.5的pH。在一些實施例中，洗滌溶液具有約9.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液具有約10.0的pH。

### 緩衝劑

在一些實施例中，本公開文本的洗滌溶液進一步包含一種或多種（例如，一種或多種、兩種或更多種、三種或更多種、四種或更多種、五種或更多種等）緩衝劑。在本公開文本的洗滌溶液中可以使用本領域已知的任何合適的緩衝劑，包括例如磷酸鹽、tris（（三(羥基甲基)甲胺）、雙-tris、雙-tris丙烷、精胺酸、組胺酸、三乙醇胺、二乙醇胺、甲酸鹽、乙酸鹽、碳酸鹽、MES（2-(N-嗎啉代)乙烷磺酸）、檸檬酸鹽、HEPES（4-2-羥基乙基-1-吡嗪乙烷磺酸）、MOPS（3-(N-嗎啉代)丙烷磺酸）、TAPS（3-[[三(羥基甲基)氨基]丙烷磺酸）、Bicine（N,N-雙(2-羥基乙基)甘胺酸）、Tricine（N-三(羥基甲基)氨基甘胺酸）、TES（2-[[三(羥基甲基)氨基]乙烷磺酸）、PIPES（吡嗪-N,N'-雙(2-乙烷磺酸)）、甲次砷酸鹽（cacodylate）（二甲基次砷酸）、SSC（鹽水檸檬酸鈉）、和/或其任何組合。在一些實施例中，緩衝劑是磷酸鹽、tris、精胺酸、乙酸鹽和/或檸檬酸鹽中的一種或多種。

在一些實施例中，緩衝劑（例如，磷酸鹽、tris、精胺酸、乙酸鹽和/或檸檬酸鹽）以約1 mM至約100 mM或約1 mM至約500 mM的濃度存在於洗滌溶液中。例如，緩衝劑（例如，磷酸鹽、tris、精胺酸、乙酸鹽和/或檸檬

酸鹽)可以以約1mM至約500 mM、10 mM至約500 mM、50 mM至約500 mM、100 mM至約500 mM、150 mM至約500 mM、200 mM至約500 mM、250 mM至約500 mM、300 mM至約500 mM、350 mM至約500 mM、400 mM至約500 mM、450 mM至約500 mM、1mM至約450 mM、1mM至約400 mM、1mM至約350 mM、1mM至約300 mM、1mM至約250 mM、1mM至約200 mM、1mM至約150 mM、1 mM至約100 mM、約10 mM至約100 mM、約25 mM至約100 mM、約40 mM至約100 mM、約50 mM至約100 mM、約60 mM至約100 mM、約75 mM至約100 mM、約1 mM至約75 mM、約10 mM至約75 mM、約40 mM至約75 mM、約50 mM至約75 mM、約60 mM至約75 mM、約1 mM至約60 mM、約10 mM至約60 mM、約25 mM至約60 mM、約40 mM至約60 mM、約50mM至約60 mM、約1 mM至約50 mM、約10 mM至約50 mM、約25 mM至約50 mM、約40 mM至約50 mM、約1 mM至約40 mM、約10 mM至約40 mM、約25 mM至約40 mM、約1 mM至約25 mM、約10 mM至約25 mM、或約1 mM至約10 mM的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，緩衝劑（例如，磷酸鹽、tris、精胺酸、乙酸鹽和/或檸檬酸鹽）以約10 mM至約50 mM或約10 mM至約500mM的濃度存在於洗滌溶液中。

在一些實施例中，緩衝劑（例如，磷酸鹽、tris、精胺酸、乙酸鹽和/或檸檬酸鹽）以約1 mM、5 mM、10 mM、15 mM、20 mM、25 mM、30 mM、35 mM、40 mM、45 mM、50 mM、55 mM、60 mM、65 mM、70 mM、75 mM、80 mM、85 mM、90 mM、95 mM、或100 mM中的任一濃度存在於洗滌溶液中。可替代地，緩衝劑（例如，磷酸鹽、tris、精胺酸、乙酸鹽和/或檸檬酸鹽）以約150 mM、200 mM、250 mM、300 mM、350 mM、400 mM、450 mM、或500 mM中的任一濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，緩衝劑（例如，磷酸鹽、tris、精胺酸、乙酸鹽和/或檸檬酸鹽）以約500 mM的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，緩衝劑（例如，磷酸鹽、tris、精胺酸、乙酸鹽和/或檸檬酸鹽）以約50 mM的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，緩衝劑（例如，磷酸鹽、tris、精胺酸、乙酸鹽和/或檸檬酸鹽）以約10 mM或少於約10 mM、約25 mM或少於約25 mM、約50 mM或少於約50 mM、約75 mM或少於約75 mM、或約100 mM或少於約100 mM、或

約500 mM或少於約500 mM的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，緩衝劑（例如，磷酸鹽、tris、精胺酸、乙酸鹽和/或檸檬酸鹽）以約50 mM或少於約50 mM的濃度存在於洗滌溶液中。在一些實施例中，緩衝劑（例如，磷酸鹽、tris、精胺酸、乙酸鹽和/或檸檬酸鹽）以約500 mM或少於約500 mM的濃度存在於洗滌溶液中。

### 例示性洗滌溶液

在一些實施例中，本公開文本的洗滌溶液包含苯甲酸鈉和/或苄醇，並且具有約7.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉和/或濃度為約2% (v/v) 的苄醇，並且具有約7.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉和濃度為約2% (v/v) 的苄醇，並且具有約7.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液進一步包含磷酸鹽緩衝液（例如，在約50 mM的濃度）。

在一些實施例中，本公開文本的洗滌溶液包含苯甲酸鈉、苄醇和/或氯化鈉，並且具有約7.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約2% (v/v) 的苄醇和/或濃度為約0.5 M的氯化鈉，並且具有約7.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約2% (v/v) 的苄醇和濃度為約0.5 M的氯化鈉，並且具有約7.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液進一步包含磷酸鹽緩衝液（例如，在約50 mM的濃度）。

在一些實施例中，本公開文本的洗滌溶液包含苯甲酸鈉、苄醇、精胺酸和/或氯化鈉，並且具有約7.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約2% (v/v) 的苄醇、濃度為約0.5 M的精胺酸和/或濃度為約0.5 M的氯化鈉，並且具有約7.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約2% (v/v) 的苄醇、濃度為約0.5 M的精胺酸和濃度為約0.5 M的氯化鈉，並且具有約7.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液進一步包含磷酸鹽緩衝液（例如，在約50 mM的濃度）。

在一些實施例中，本公開文本的洗滌溶液包含苯甲酸鈉、苄醇、磷酸鹽緩衝液、和/或精胺酸，並且具有約9.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液

包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約2% (v/v)的苄醇、濃度為約50 mM的磷酸鹽緩衝液和/或濃度為約0.5 M的精胺酸，並且具有約9.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約2% (v/v)的苄醇、濃度為約50 mM的磷酸鹽緩衝液和濃度為約0.5M的精胺酸，並且具有約9.0的pH。

在一些實施例中，本公開文本的洗滌溶液包含苯甲酸鈉、苄醇和/或精胺酸，並且具有約6.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約2% (v/v)的苄醇和/或濃度為約0.5 M的精胺酸，並且具有約6.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約2% (v/v)的苄醇和濃度為約0.5 M的精胺酸，並且具有約6.0的pH。

在一些實施例中，本公開文本的洗滌溶液包含己二醇、苯甲酸鈉和/或苄醇，並且具有約7.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約10% (v/v)的己二醇、濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉和/或濃度為約2% (v/v)的苄醇，並且具有約7.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約10% (v/v)的己二醇、濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉和濃度為約2% (v/v)的苄醇，並且具有約7.0的pH。

在一些實施例中，本公開文本的洗滌溶液包含苯磺酸鹽、苯甲酸鈉和/或苄醇，並且具有約7.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯磺酸鹽、濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉和/或濃度為約2% (v/v)的苄醇，並且具有約7.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯磺酸鹽、濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉和濃度為約2% (v/v)的苄醇，並且具有約7.0的pH。

在一些實施例中，本公開文本的洗滌溶液包含苯甲酸鈉、苄醇和/或精胺酸（例如，精胺酸-HCl），並且具有約5.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約2% (v/v)的苄醇和/或濃度為約0.5 M的精胺酸（例如，精胺酸-HCl），並且具有約5.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約2% (v/v)的

苧醇、和濃度為約0.5 M的精胺酸（例如，精胺酸-HCl），並且具有約5.0的pH。

在一些實施例中，本公開文本的洗滌溶液包含苯甲酸鈉、苧醇和/或精胺酸（例如，精胺酸-HCl），並且具有約6.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約2%（v/v）的苧醇和/或濃度為約0.5 M的精胺酸（例如，精胺酸-HCl），並且具有約6.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約2%（v/v）的苧醇、和濃度為約0.5 M的精胺酸（例如，精胺酸-HCl），並且具有約6.0的pH。

在一些實施例中，本公開文本的洗滌溶液包含苧醇和/或精胺酸（例如，精胺酸-HCl），並且具有約5.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約2%（v/v）的苧醇和/或濃度為約0.5 M的精胺酸（例如，精胺酸-HCl），並且具有約5.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約2%（v/v）的苧醇和濃度為約0.5 M的精胺酸（例如，精胺酸-HCl），並且具有約5.0的pH。

在一些實施例中，本公開文本的洗滌溶液包含苯甲酸鈉、精胺酸（例如，精胺酸-HCl）、辛酸和/或氯化鈉，並且具有約9.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約0.5 M的精胺酸（例如，精胺酸-HCl）、濃度為約50 mM的辛酸、和/或濃度為約0.5 M的氯化鈉，具有約9.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約0.5 M的精胺酸（例如，精胺酸-HCl）、濃度為約50 mM的辛酸和濃度為約0.5 M的氯化鈉，具有約9.0的pH。

在一些實施例中，本公開文本的洗滌溶液包含苯甲酸鈉、精胺酸（例如，精胺酸-HCl）、辛酸和/或氯化鈉，並且具有約7.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約0.5 M的精胺酸（例如，精胺酸-HCl）、濃度為約50 mM的辛酸、和/或濃度為約0.5 M的氯化鈉，具有約7.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉、濃度為約0.5 M的精胺酸（例如，精胺酸-HCl）、濃度為約50 mM的辛酸和濃度為約0.5 M的氯化鈉，具有約7.0的pH。

在一些實施例中，本公開文本的洗滌溶液包含苯甲酸鈉和/或碳酸氫鈉，並且具有約10.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉和/或濃度為約50 mM的碳酸氫鈉，並且具有約10.0的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約0.5 M的苯甲酸鈉和濃度為約50 mM的碳酸氫鈉，並且具有約10.0的pH。

在一些實施例中，本公開文本的洗滌溶液包含濃度為約4% (v/v) 的苄醇、並且具有約5.0至約10的pH。在一些實施例中，洗滌溶液包含濃度為約4% (v/v) 的苄醇、並且具有約9.0的pH。

#### *在層析之前調節包含含有Fc區的多肽的收穫物*

在一個方面，提供了純化含Fc區的多肽的方法，該方法包括以下步驟：  
(A) 調節包含含Fc區的多肽的收穫物以實現約0.1 M和約0.5 M的苯甲酸鹽的終濃度以及在約7.0與約9.0之間的pH，以產生包含 (i) 含Fc區的多肽和 (ii) 一種或多種雜質的樣品；並且 (B) 使該樣品與至少一種層析基質接觸。在一些實施例中，該至少一種層析基質是親和層析基質，例如，蛋白A層析基質和/或蛋白G層析基質。在一些實施例中，該方法進一步包括使該至少一種層析基質與至少一種洗滌溶液接觸的步驟。在一些實施例中，該方法進一步包括使該至少一種層析基質與洗脫溶液接觸的步驟。在一些實施例中，該方法進一步包括收集洗脫液的步驟，該洗脫液包含含Fc區的多肽。

在一些實施例中，術語“收穫物”是指在細胞培養結束時或在細胞培養之後存在的流體，例如，細胞裂解物樣品，或細胞培養上清液樣品（例如，來自被工程改造以生產和分泌多肽的細胞（如CHO細胞）的上清液）。在一些實施例中，收穫物包含完整的宿主細胞和/或細胞碎片。在一些實施例中，收穫物不包含完整的宿主細胞和/或細胞碎片。例如，在一些實施例中，在調節以實現約0.1 M和約0.5 M的苯甲酸鹽終濃度以及在約7.0與約9.0之間的pH之前，將在細胞培養結束時或在細胞培養之後存在的流體進行一個或多個離心和/或過濾步驟。在一些實施例中，收穫物源自于在細胞培養結束時或在細胞培養之後存在的流體。例如，在一些實施例中，將在細胞培養結束時或在細胞培養之後存在的流體進行一個或多個預處理步驟，以優化細胞分離和/或對含Fc區的多肽的純化。

在相關方面，本文所述的純化含Fc區的多肽的任何一種方法進一步包括如下步驟：調節包含含Fc區的多肽的收穫物以實現0.1 M和約0.5 M的苯甲酸鹽終濃度以及在約7.0與約9.0之間的pH以產生如下樣品，該樣品包含 (i) 含Fc區的多肽、和 (ii) 一種或多種雜質。

在一些實施例中，苯甲酸鹽是苯甲酸鹼金屬鹽。在一些實施例中，苯甲酸鹽是苯甲酸钠。在一些實施例中，調節收穫物以實現以下中的任一者的苯甲酸鹽（例如，苯甲酸钠）終濃度：約0.025 M、0.05 M、0.075 M、0.1 M、0.125 M、0.15 M、0.175 M、0.2 M、0.225 M、0.25 M、0.275 M、0.3 M、0.325 M、0.35 M、0.375 M、0.4 M、0.425 M、0.45 M、0.475 M、0.5 M、0.525 M、0.55 M、0.575 M、0.6 M、0.625 M、0.65 M、0.675 M、0.7 M、0.725 M、0.75 M、0.775 M、或0.8 M（包括介於這些值之間的任何範圍）。在一些實施例中，將收穫物的pH調節至以下中的任一者：約7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、或10.0（包括介於這些值之間的任何範圍）。在一些實施例中，在調節之前使收穫物澄清（例如，添加苯甲酸钠並調節pH）。在一些實施例中，在調節後使收穫物澄清（例如，添加苯甲酸钠並調節pH）。

在一些實施例中，該方法包括調節收穫物以實現約0.5 M的最終苯甲酸钠濃度和約7的pH。在一些實施例中，該方法包括調節收穫物以實現約0.1 M的最終苯甲酸钠濃度和約9的pH。在一些實施例中，該方法包括調節收穫物以實現約0.2 M的最終苯甲酸钠濃度和pH 9。在一些實施例中，該方法包括調節收穫物以實現約0.3 M的最終苯甲酸钠濃度和pH 9。在一些實施例中，該方法包括調節收穫物以實現約0.4 M的最終苯甲酸钠濃度和pH 9。在一些實施例中，該方法包括調節收穫物以實現約0.5 M的最終苯甲酸钠濃度和pH 9。

在一些實施例中，調節收穫物（例如，添加苯甲酸钠並且調節pH）得到以比缺乏調節包含含Fc區的多肽的收穫物以產生樣品的步驟的相應方法更高的程度從該一種或多種雜質中純化出來的含Fc區的多肽。在一些實施例中，一種或多種雜質是宿主細胞蛋白（HCP），如磷脂酶、叢生蛋白、

絲胺酸蛋白酶、延伸因子及其任何組合。在一些實施例中，HCP是推定的磷脂酶B樣蛋白2（PLBL2）。

在一些實施例中，經調節的收穫物（例如，已向其中添加苯甲酸鈉以實現本文所述的終濃度並且其pH已如本文所述進行調節）包含 (i) 含Fc區的多肽和 (ii) 一種或多種雜質，或者是包含 (i) 含Fc區的多肽和 (ii) 一種或多種雜質的樣品。在一些實施例中，樣品與至少一種層析基質接觸（例如，樣品經歷至少一個層析步驟）。在一些實施例中，該至少一種層析基質包括以下中的任何一種或多種：以任何順序的親和層析基質、混合模式層析基質（例如，多模式層析基質）、疏水性相互作用（HIC）層析基質、陰離子交換層析基質、陽離子交換層析基質、尺寸排阻層析基質、陶瓷羥磷灰石（CHT）層析基質和/或親水性相互作用液相層析（HILIC）基質等。在一些實施例中，樣品與親和層析基質（例如，蛋白A基質或蛋白G基質）接觸。在一些實施例中，該方法進一步包括使該至少一種層析基質與至少一種洗滌溶液接觸的步驟。在一些實施例中，該方法進一步包括使該至少一種層析基質與洗脫溶液接觸的步驟。在一些實施例中，該方法進一步包括收集洗脫液的步驟，該洗脫液包含含Fc區的多肽。

#### 雜質去除

本公開文本的某些方面涉及經由蛋白A層析純化含Fc區的多肽的方法（通過用包含苯甲酸鹽和/或苄醇的洗滌溶液洗滌與含Fc區的多肽（例如抗體）結合的蛋白A基質，以便改進將該多肽從一種或多種雜質中純化出來）。在一些實施例中，該方法包括以下步驟：在含Fc區的多肽（例如，抗體）與蛋白A結合的條件下，使蛋白A層析基質與樣品接觸，該樣品包含 (1) 含Fc區的多肽（例如，抗體）和 (2) 一種或多種雜質（例如，宿主細胞雜質）；並且用洗滌溶液洗滌該基質，該洗滌溶液包含濃度為約0.1 M至約1.0 M的苯甲酸鹽和/或濃度為約0.5%至約4%體積/體積（v/v）的苄醇，其中該洗滌溶液具有約4.0至約10.0的pH。在一些實施例中，用洗滌溶液洗滌蛋白A基質得到以比缺乏用該洗滌溶液洗滌該基質的步驟的相應方法（如上所述）更高的程度從該一種或多種雜質中純化出來的該含Fc區的多肽。

標準蛋白A過程通常產生約95%的產物純度，而不使用如本文所述的洗

滌步驟。產物中最大比例的雜質歸因於產物的高分子量（HMW）聚集體和/或低分子量（LMW）片段。這些產物變體被認為是雜質，歸因於它們能夠基於各種參數（例如，電荷、疏水性、尺寸差異等）與產物分離。這些HMW和LMW雜質占蛋白A庫的約4%-5%。此外，缺乏使用如本文所述的洗滌步驟的標準蛋白A過程通常還導致在產物庫中包括近似1000 ppm或約0.1%的宿主細胞蛋白（HCP）雜質。然而，歸因於針對可注射mAb產品設定的規格（參見例如，FDA指南），減少和/或完全去除該0.1%的HCP雜質是相當重要的。包括應用本文所述的洗滌溶液的步驟可以將庫中存在的HCP的量減少至約100-10 ppm（相對於缺少本文所述的洗滌步驟的相同蛋白A過程，HCP減少10至100倍），占90%-99%的相對改進。測量樣品蛋白純度和/或雜質水平的方法（例如，通過ELISA測定）對熟習此項技術者而言通常是已知的。使用標準方法相比本文所述的任何方法，將單株抗體（mAb）從一種或多種宿主細胞蛋白中例示性純化顯示於下表A中。

表A：例示性純化過程

| 組合物（蛋白A後）     |      |      |       |
|---------------|------|------|-------|
|               | HCP  |      | mAb   |
| 條件：           | ppm： | %    | %     |
| 標準            | 1000 | 0.10 | 94.90 |
| 包括洗滌步驟（如本文所述） | 100  | 0.01 | 94.99 |
| 變化（%）         | 90   | 90   | 0.09  |

在一些實施例中，本文所述的方法在蛋白A洗脫之後生產含有含Fc區的多肽（例如，單株抗體）的蛋白質庫，該蛋白質庫含有少於約500 ppm（百萬分率）的HCP（例如，來自CHO細胞的一種或多種HCP）。例如，通過本文所述的方法生產的含有含Fc區的多肽的蛋白質庫可能含有少於約500 ppm、少於約450 ppm、少於約400 ppm、少於約350 ppm、少於約300 ppm、少於約250 ppm、少於約200 ppm、少於約150 ppm、少於約100 ppm、少於約75 ppm、少於約50 ppm、少於約25 ppm、少於約10 ppm、或少於約1 ppm的HCP（例如，來自CHO細胞的一種或多種HCP）。在一些實施例中，通

過本文所述的方法生產的含有含Fc區的多肽的蛋白質庫含有少於約100 ppm的HCP（例如，來自CHO細胞的一種或多種HCP）。在一些實施例中，通過本文所述的方法生產的含有含Fc區的多肽的蛋白質庫含有少於約10 ppm的HCP（例如，來自CHO細胞的一種或多種HCP）。

在一些實施例中，本文所述的方法在蛋白A洗脫之後生產含有含Fc區的多肽（例如，單株抗體）的蛋白質庫，該蛋白質庫含有少於約0.1%的HCP（例如，來自CHO細胞的一種或多種HCP）。例如，通過本文所述的方法生產的含有含Fc區的多肽的蛋白質庫可能含有少於約0.1%、少於約0.09%、少於約0.08%、少於約0.07%、少於約0.06%、少於約0.05%、少於約0.04%、少於約0.03%、少於約0.02%、或少於約0.01%的HCP（例如，來自CHO細胞的一種或多種HCP）。在一些實施例中，通過本文所述方法生產的含有含Fc區的多肽的蛋白質庫含有少於約0.05%的HCP（例如，來自CHO細胞的一種或多種HCP）。在一些實施例中，通過本文所述方法生產的含有含Fc區的多肽的蛋白質庫含有少於約0.01%的HCP（例如，來自CHO細胞的一種或多種HCP）。

在一些實施例中，相對於與含Fc區的多肽（通過缺少用洗滌溶液洗滌蛋白A基質的步驟的相應方法純化）共純化的一種或多種雜質的量，本文所述的方法將與含Fc區的多肽共純化的一種或多種雜質（例如，一種或多種HCP，如來自CHO細胞的一種或多種HCP）的量和/或濃度（例如，百萬分率）減少了至少約10%。例如，相對於與含Fc區的多肽（通過缺少用洗滌溶液洗滌蛋白A基質的步驟的相應方法純化）共純化的一種或多種雜質的量，本文所述的方法將與含Fc區的多肽共純化的一種或多種雜質（例如，一種或多種HCP，如來自CHO細胞的一種或多種HCP）的量和/或濃度（例如，百萬分率）減少了至少約10%、至少約15%、至少約20%、至少約25%、至少約30%、至少約35%、至少約40%、至少約45%、至少約50%、至少約55%、至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%或至少約99%。在一些實施例中，相對於與含Fc區的多肽（通過缺少用洗滌溶液洗滌蛋白A基質的步驟的相應方法純化）共純化的一種或多種雜質的量，本文所述的方法將與含Fc區的多肽共純化的一

種或多種雜質（例如，一種或多種HCP，如來自CHO細胞的一種或多種HCP）的量和/或濃度（例如，百萬分率）減少了至少約1.5倍。例如，相對於與含Fc區的多肽（通過缺少用洗滌溶液洗滌蛋白A基質的步驟的相應方法純化）共純化的一種或多種雜質的量，本文所述的方法將與含Fc區的多肽共純化的一種或多種雜質（例如，一種或多種HCP，如來自CHO細胞的一種或多種HCP）的量和/或濃度（例如，百萬分率）減少了至少約1.5倍、至少約2倍、至少約2.5倍、至少約3倍、至少約3.5倍、至少約4倍、至少約4.5倍、至少約5倍、至少約5.5倍、至少約6倍、至少約6.5倍、至少約7倍、至少約7.5倍、至少約8倍、至少約8.5倍、至少約9倍、至少約9.5倍、至少約10倍、至少約50倍、或至少約100倍。

#### 額外步驟

在一些實施例中，本文所述的方法進一步包括一個或多個額外洗滌步驟。在一些實施例中，本文所述的方法進一步包括一個或多個洗脫步驟。在一些實施例中，本文所述的方法進一步包括一個或多個洗滌步驟和一個或多個洗脫步驟。

在一些實施例中，本公開文本涉及在用洗滌溶液洗滌基質之前用第一溶液洗滌蛋白A基質。在一些實施例中，在用洗滌溶液洗滌基質之前，用第一溶液將基質洗滌一次或多次（例如，一次或多次、兩次或更多次、三次或更多次、四次或更多次、五次或更多次等）。在一些實施例中，在用洗滌溶液洗滌基質之前，用第一溶液將基質洗滌一次。在一些實施例中，第一溶液包含緩衝液。在第一溶液中可以使用本領域已知的任何合適的緩衝液，包括例如磷酸鹽、tris（三(羥基甲基)甲胺）、乙酸鹽、碳酸鹽、檸檬酸鹽、雙-tris、雙-tris丙烷、精胺酸、組胺酸、三乙醇胺、二乙醇胺、甲酸鹽、MES（2-(N-嗎啉代)乙烷磺酸）、HEPES（4-2-羥基乙基-1-哌嗪乙烷磺酸）、MOPS（3-(N-嗎啉代)丙烷磺酸）、TAPS（3-{[三(羥基甲基)甲基]胺基}丙烷磺酸）、Bicine（N,N-雙(2-羥基乙基)甘胺酸）、Tricine（N-三(羥基甲基)甲基甘胺酸）、TES（2-{[三(羥基甲基)甲基]胺基}乙烷磺酸）、PIPES（哌嗪-N,N'-雙(2-乙烷磺酸)）、甲次砷酸鹽（cacodylate）（二甲基次砷酸）、SSC（鹽水檸檬酸鈉）、和/或其任何組合。在一些實施例中，第一溶液包

含磷酸鹽緩衝液、tris緩衝液、乙酸鹽緩衝液、碳酸鹽緩衝液和/或檸檬酸鹽緩衝液。在一些實施例中，第一溶液包含磷酸鹽緩衝液。在一些實施例中，第一溶液包含一種或多種額外組分（例如，苯甲酸鹽、苄醇、本文所述的一種或多種添加劑等）。在一些實施例中，第一溶液具有pH約5.0至約10.0（例如，約6.0至約10.0、約6.0至約9.0、約7.0至約10.0、約7.0至約9.0、約8.0至約10.0、約8.0至約9.0、約9.0至約10.0、約5.0至約8.0、約6.0至約8.0、約7.0至約8.0、約5.0至約7.0、約6.0至約7.0、或約5.0至約6.0）。在一些實施例中，第一溶液具有約7.0的pH。

在一些實施例中，第一溶液包含濃度為約10 mM至約100 mM或約10 mM至約500 mM的緩衝液。例如，第一溶液可以包含濃度為約10 mM至約500 mM、約100 mM至約500 mM、約150 mM至約500 mM、約200 mM至約500 mM、約250 mM至約500 mM、約300 mM至約500 mM、約350 mM至約500 mM、約400 mM至約500 mM、約450 mM至約500 mM、約10 mM至約450 mM、約10 mM至約400 mM、約10 mM至約350 mM、約10 mM至約300 mM、約10 mM至約250 mM、約10 mM至約200 mM、約10 mM至約150 mM、約10 mM至約100 mM、約25 mM至約100 mM、約40 mM至約100 mM、約50 mM至約100 mM、約60 mM至約100 mM、約75 mM至約100 mM、約10 mM至約75 mM、約25 mM至約75 mM、約40 mM至約75 mM、約50 mM至約75 mM、約60 mM至約75 mM、約10 mM至約60 mM、約25 mM至約60 mM、約40 mM至約60 mM、約50 mM至約60 mM、約10 mM至約50 mM、約25 mM至約50 mM、約40 mM至約50 mM、約10 mM至約40 mM、約25 mM至約40 mM、或約10 mM至約25 mM的緩衝液。在一些實施例中，第一溶液包含濃度為約10 mM至約50 mM或約10 mM至約500 mM的緩衝液。

在一些實施例中，第一溶液包含濃度為約10 mM、15 mM、20 mM、25 mM、30 mM、35 mM、40 mM、45 mM、50 mM、55 mM、60 mM、65 mM、70 mM、75 mM、80 mM、85 mM、90 mM、95 mM、或100 mM中的任一者的緩衝液。可替代地，第一溶液包含濃度為約150 mM、200 mM、250 mM、300 mM、350 mM、400 mM、450 mM、或500 mM中的任一者的緩衝液。在一些實施例中，第一溶液包含濃度為約500 mM的緩衝液。在一些實施例中，第一溶

液包含濃度為約50 mM的緩衝液。在一些實施例中，第一溶液包含濃度為約500 mM的磷酸鹽緩衝液。在一些實施例中，第一溶液包含濃度為約50 mM的磷酸鹽緩衝液。

在一些實施例中，第一溶液包含磷酸鹽緩衝液（例如，磷酸鈉）和氯化鈉。在一些實施例中，第一溶液包含磷酸鹽緩衝液（例如，磷酸鈉）和氯化鈉，並且具有約7.0的pH。在一些實施例中，第一溶液包含濃度為約50 mM的磷酸鹽緩衝液（例如，磷酸鈉）和濃度為約0.5 M的氯化鈉。在一些實施例中，第一溶液包含濃度為約50 mM的磷酸鹽緩衝液（例如，磷酸鈉）和濃度為約0.5 M的氯化鈉，並且具有約7.0的pH。

在一些實施例中，本公開文本涉及在用洗滌溶液洗滌基質之後用第二溶液洗滌蛋白A基質。在一些實施例中，在用洗滌溶液洗滌基質之後，用第二溶液將基質洗滌一次或多次（例如，一次或多次、兩次或更多次、三次或更多次、四次或更多次、五次或更多次等）。在一些實施例中，在用洗滌溶液洗滌基質之後，用第二溶液將基質洗滌一次。在一些實施例中，第二溶液包含緩衝液。在第二溶液中可以使用本領域已知的任何合適的緩衝液，包括例如磷酸鹽、tris（三(羥基甲基)胺）、乙酸鹽、碳酸鹽、檸檬酸鹽、雙-tris、雙-tris丙烷、精胺酸、組胺酸、三乙醇胺、二乙醇胺、甲酸鹽、MES（2-(N-嗎啉代)乙烷磺酸）、HEPES（4-(2-羥基乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸）、MOPS（3-(N-嗎啉代)丙烷磺酸）、TAPS（3-[[三(羥基甲基)胺基]丙烷磺酸）、Bicine（N,N-雙(2-羥基乙基)甘胺酸）、Tricine（N-三(羥基甲基)胺基甘胺酸）、TES（2-[[三(羥基甲基)胺基]乙烷磺酸）、PIPES（哌嗪-N,N'-雙(2-乙烷磺酸)）、甲次砷酸鹽（*cacodylate*）（二甲基次砷酸）、SSC（鹽水檸檬酸鈉）、和/或其任何組合。在一些實施例中，第二溶液包含磷酸鹽緩衝液、tris緩衝液、乙酸鹽緩衝液、碳酸鹽緩衝液和/或檸檬酸鹽緩衝液。在一些實施例中，第二溶液包含磷酸鹽緩衝液。在一些實施例中，第二溶液包含基本上較低的鹽或不包含鹽。在一些實施例中，第二溶液具有約4.0至約8.0（例如，約5.0至約8.0、約6.0至約8.0、約7.0至約8.0、約4.0至約7.0、約5.0至約7.0、約6.0至約7.0、約4.0至約6.0、約5.0至約6.0、或約4.0至約5.0）的pH。在一些實施例中，第二溶液具有約5.0至約7.0的pH。在一

些實施例中，第二溶液具有約7.0的pH。在一些實施例中，第二溶液包含基本上較低的鹽。在一些實施例中，第二溶液不包含鹽。

在一些實施例中，第二溶液包含濃度為約10 mM至約100 mM或約10 mM至約500 mM的緩衝液。例如，第二溶液可以包含濃度為約10 mM至約500 mM、約100 mM至約500 mM、約150 mM至約500 mM、約200 mM至約500 mM、約250 mM至約500 mM、約300 mM至約500 mM、約350 mM至約500 mM、約400 mM至約500 mM、約450 mM至約500 mM、約10 mM至約450 mM、約10 mM至約400 mM、約10 mM至約350 mM、約10 mM至約300 mM、約10 mM至約250 mM、約10 mM至約200 mM、約10 mM至約150 mM、約10 mM至約100 mM、約25 mM至約100 mM、約40 mM至約100 mM、約50 mM至約100 mM、約60 mM至約100 mM、約75 mM至約100 mM、約10 mM至約75 mM、約25 mM至約75 mM、約40 mM至約75 mM、約50 mM至約75 mM、約60 mM至約75 mM、約10 mM至約60 mM、約25 mM至約60 mM、約40 mM至約60 mM、約50 mM至約60 mM、約10 mM至約50 mM、約25 mM至約50 mM、約40 mM至約50 mM、約10 mM至約40 mM、約25 mM至約40 mM、或約10 mM至約25 mM的緩衝液。在一些實施例中，第二溶液包含濃度為約10 mM至約50 mM或約10 mM至約500 mM的緩衝液。

在一些實施例中，第二溶液包含濃度為約10 mM、15 mM、20 mM、25 mM、30 mM、35 mM、40 mM、45 mM、50 mM、55 mM、60 mM、65 mM、70 mM、75 mM、80 mM、85 mM、90 mM、95 mM、或100 mM中的任一者的緩衝液。可替代地，第二溶液包含濃度為約150 mM、200 mM、250 mM、300 mM、350 mM、400 mM、450 mM、或500 mM中的任一者的緩衝液。在一些實施例中，第二溶液包含濃度為約500 mM的緩衝液。在一些實施例中，第二溶液包含濃度為約50 mM的緩衝液。

在一些實施例中，第二溶液包含磷酸鹽緩衝液（例如，磷酸鈉）。在一些實施例中，第二溶液包含磷酸鹽緩衝液（例如，磷酸鈉），並且具有約7.0的pH。在一些實施例中，第二溶液包含濃度為約50 mM的磷酸鹽緩衝液（例如，磷酸鈉）。在一些實施例中，第二溶液包含濃度為約50 mM的磷酸鹽緩衝液（例如，磷酸鈉），並且具有約7.0的pH。

在一些實施例中，本公開文本的方法涉及用洗滌溶液洗滌蛋白A基質，並且不包括用第一溶液（在洗滌溶液之前）或第二溶液（在洗滌溶液之後）洗滌基質的步驟。在一些實施例中，本公開文本的方法涉及用第一溶液洗滌蛋白A基質，然後用洗滌溶液洗滌基質，並且不包括用第二溶液洗滌基質的步驟（在洗滌溶液之後）。在一些實施例中，本公開文本的方法涉及用洗滌溶液洗滌蛋白A基質，並且然後用第二溶液洗滌基質，並且不包括用第一溶液洗滌基質的步驟（在洗滌溶液之前）。在一些實施例中，本公開文本的方法涉及用第一溶液洗滌蛋白A基質，然後用洗滌溶液洗滌基質，並且然後用第二溶液洗滌基質。

在一些實施例中，在一個或多個洗滌步驟之後，將蛋白A基質與洗脫溶液接觸一次或多次（例如，一次或多次、兩次或更多次、三次或更多次、四次或更多次、五次或更多次等）。在一些實施例中，將基質與洗脫溶液接觸一次。本領域已知的適合用於洗脫與蛋白A基質結合的多肽的任何溶液都可以用作本公開文本的方法中的洗脫溶液（例如，包含40 mM乙酸鈉、具有約3.1的pH的洗脫溶液）。在一些實施例中，洗脫溶液進一步包含一種或多種額外組分（例如，本文所述的任何濃度的精胺酸）。在一些實施例中，在使基質與洗脫溶液接觸之後，收集包含含Fc區的多肽的洗脫液。在一些實施例中，在將基質與洗脫溶液接觸兩次或更多次之後，收集包含含Fc區的多肽的兩種或更多種洗脫液。在一些實施例中，在洗脫之後將兩種或更多種洗脫液合併。在一些實施例中，過濾該一種或多種洗脫液。可以使用本領域已知的過濾洗脫液的任何合適的方法，包括例如經由深度過濾。在一些實施例中，經由深度過濾來過濾該一種或多種洗脫液。

在一些實施例中，可以將如本文所述的來自蛋白A基質的洗脫液進一步加工和/或純化（例如，使用額外層析和/或過濾步驟（如通過使用離子交換層析、混合模式層析、親和層析、疏水性相互作用層析、固定化金屬親和層析、尺寸排阻層析、滲濾、超濾和/或病毒去除過濾中的一種或多種）），和/或配製（例如，製備適合用於向有需要的受試者（如人類受試者）給予的藥物配製品）。

上述書面描述被認為足以使熟習此項技術者能夠實施本公開文本。以下實例僅出於說明性目的而提供，並且不旨在以任何方式限制本公開文本的範圍。實際上，除了本文所示和所述的那些之外，本公開文本的各種修改對於熟習此項技術者而言從上文的描述將變得清楚並且落入所附發明申請專利範圍的範圍內。

## 實例

### 實例1：用於在抗體純化期間改進或增強雜質去除的洗滌溶液

以下實例描述了在中間洗滌溶液中使用苯甲酸鈉和苄醇的各種組合以改進/增強在蛋白A層析期間的雜質去除。

#### 材料和方法

##### 樣品製備

如下製備進行蛋白A層析的兩種單獨的人類單株抗體收穫物材料：在重組中國倉鼠卵巢（CHO）細胞（被工程改造以組成型表現兩種抗體中任一種）的懸浮培養物中生成收穫物。將重組產物分泌到培養基中，然後將其離心並通過深度過濾澄清用於下游處理。在加載到蛋白A柱上之前，用0.22  $\mu\text{m}$  聚醚砜（PES）過濾器過濾澄清的收穫物材料。

##### 蛋白A層析

如下製備蛋白A樹脂/柱：將MabSelect Sure LX蛋白A層析樹脂（GE Healthcare Life Sciences；目錄號17-5474）經由重力沉降用0.5 M氯化鈉溶液進行交換。使用AKTA Pure或AKTA Avant（GE Healthcare Life Sciences）來填充柱，使用(A) 1.0 cm直徑柱(Essential Life Solutions 10/250 Snap Column；目錄號S10/250-PPSL-OE-FP10) 或(B) 0.66 cm直徑柱(Omnifit™ 6.6/100；目錄號006BCC0610FF)。對於柱(A)，將樹脂填充至20 cm  $\pm$  10%的床高度，或者對於柱(B)，將樹脂填充至5 cm  $\pm$  10%的珠粒高度。將1.0 M氯化鈉溶液以1%柱體積注射到在0.1 M氯化鈉溶液中平衡的柱上進行柱評定(column qualification)，並且使用Unicorn Evaluation軟件分析電導率追蹤。柱的效率需要為至少每米775理論塔板數，並且需要證明0.8-1.8的不對稱性。

在加載收穫物材料之前，用反滲透去離子水沖洗柱以去除20%乙醇的儲

存緩衝液。隨後，用0.5 M乙酸沖洗柱以確保在平衡之前去除任何結合的實體。用含有0.5 M氯化鈉的50 mM磷酸鹽緩衝液平衡柱，直至柱的pH > 6.5。

然後將所製備的樣品加載到蛋白A柱上。向著40 g/L樹脂的目標用mAb A（IgG1亞型）或mAb B（IgG4亞型）加載柱。如上所述用含有50 mM磷酸鹽和0.5 M氯化鈉的磷酸鹽緩衝溶液洗滌加載柱。接下來，用測試洗滌溶液洗滌柱，隨後用含有緩衝溶液的pH 7的無鹽洗滌溶液洗滌柱。最後，使用含有40 mM乙酸鈉的pH 3.1的溶液從柱上洗脫抗體。下表1提供了例示性層析過程。

表1：柱層析過程描述

| 步驟  | 緩衝液/溶液                       | 流動方向 | 停留時間<br>(min) | 體 積<br>(CV) |
|-----|------------------------------|------|---------------|-------------|
| 沖洗  | 注射用水（WFI）                    | 向下流  | 8             | 2.5         |
| 剝離  | 0.5 M乙酸                      | 向下流  | 5             | 2           |
| 平衡  | 50 mM磷酸鈉、0.5 M氯化鈉，<br>pH 7.0 | 向下流  | 5             | 3           |
| 加載  | mAb收穫物，0.22 μm過濾的            | 向下流  | 5             |             |
| 洗滌1 | 50 mM磷酸鈉、0.5 M氯化鈉，<br>pH 7.0 | 向下流  | 5             | 3           |
| 洗滌2 | 測試溶液                         | 向下流  | 5             | 2           |
| 洗滌3 | 50 mM磷酸鈉，pH 7.0              | 向下流  | 5             | 3           |
| 洗脫  | 40 mM乙酸鈉，pH 3.1              | 向下流  | 5             | 2           |
| 剝離  | 0.5 M乙酸                      | 向下流  | 5             | 3           |
| 平衡後 | 50 mM磷酸鈉、0.5 M氯化鈉，<br>pH 7.0 | 向上流  | 5             | 3           |
| 消毒  | 0.5 M氫氧化鈉                    | 向上流  | 5             | 3           |
| 平衡後 | 50 mM磷酸鈉、0.5 M氯化鈉，<br>pH 7.0 | 向上流  | 5             | 2           |
| 存儲  | 20%乙醇                        | 向上流  | 8             | 2           |

宿主細胞蛋白檢測

在洗脫之後，使用第3代CHO HCP ELISA套組（Cygnus Technologies）根據製造商的方案測試抗體樣品中宿主細胞蛋白（HCP）雜質的存在。在1：400與1：800之間的稀釋度下進行HCP ELISA，並且使用Spectramax Plus 384讀板儀在450/600 nm下讀取吸光度。

### 特定“HCP-A”檢測

使用可商購的倉鼠（CHO）ELISA套組（ICL Labs）根據製造商的方案在洗脫的抗體樣品中量化特定HCP（HCP-A）濃度。在1：100與1：800之間的稀釋度下進行HCP-A ELISA，並且使用Spectramax Plus 384讀板儀在450 nm下讀取吸光度。

### 結果

已經顯示宿主細胞蛋白（HCP）與單株抗體（mAb）共洗脫，這對於這些抗體的下游應用來說可能是有問題的。為了鑑定能夠將與感興趣的mAb共洗脫的污染物HCP的量減少的潛在洗滌添加劑，向1.7 mL蛋白A層析柱中加載含有從CHO細胞收穫的分泌的IgG1人類單株抗體（mAb A）的樣品，在下游處理之前已將該樣品離心並通過深度過濾澄清（參見表1）。首先將柱用磷酸鹽緩衝溶液洗滌。接下來，用含有50 mM磷酸鹽和添加劑（單獨地或作為與苯甲酸鈉、苄醇和精胺酸的組合）的在pH 7.0下的許多測試洗滌溶液之一洗滌柱（圖1）。對照運行未摻入任何添加劑洗滌。在測試洗滌之後，將柱用無鹽的50 mM磷酸鹽（pH 7.0）洗滌。最後，從柱上洗脫單株抗體，並使用2 M tris鹼將pH調節至pH 6.0。在調節之後，將洗脫液庫使用0.22 µm PES過濾器過濾，並測試HCP雜質的存在（圖1）。有趣的是，含有2% 苄醇和/或0.5 M苯甲酸鈉的洗滌有效地降低了洗脫的抗體樣品中污染HCP的水平。還觀察到在洗滌中包括精胺酸將改進HCP清除率。

接下來，在從蛋白A柱洗脫的抗體中檢查HCP-A的特定存在。在該實驗中使用的測試和對照洗滌溶液示於下表2中。

表2：測試洗滌溶液

| 測試<br>溶液： | 組分：                                     | pH：  |
|-----------|-----------------------------------------|------|
| 對照        | 沒有額外洗滌                                  | 7.0  |
| 1         | 2% 茛醇；0.5 M 苯甲酸鈉                        | 7.0  |
| 2         | 2% 茛醇；0.5 M 苯甲酸鈉；0.5 M 精胺酸              | 6.0  |
| 3         | 0.5 M 苯磺酸鹽；0.5 M 苯甲酸鈉；2% 茛醇             | 7.0  |
| 4         | 50 mM 辛酸；0.5 M 苯甲酸鈉；0.5 M 精胺酸、0.5 M 氯化鈉 | 9.0  |
| 5         | 10% 己二醇；2% 茛醇；0.5 M 苯甲酸鈉                | 7.0  |
| 6         | 2% 茛醇；0.5 M 苯甲酸鈉；0.5 M 精胺酸              | 6.0  |
| 7         | 2% 茛醇；0.5 M 精胺酸                         | 5.0  |
| 8         | 0.5 M 苯甲酸鈉，50 mM 碳酸氫鈉                   | 10.0 |
| 9         | 2% 茛醇、0.5 M 苯甲酸鈉，0.5 M 精胺酸、40 mM 磷酸鈉    | 9.0  |

已經證明了茛醇和苯甲酸鈉的組合去除HCP雜質的能力，測試了用以靶向去除HCP-A的另外的配製品。將具有已知高HCP-A表現的IgG4抗體（mAb B）用於特定地增加柱上的HCP-A負荷。表1提供了純化過程期間進行的步驟的總結。簡言之，在平衡至加載pH和電導率之後，向15.7 mL蛋白A層析柱中加載含有分泌的人類單株抗體的樣品，該樣品是在下游處理之前經由離心和通過深度過濾澄清兩者從CHO細胞收穫。一旦達到40 g/L（樹脂）加載，將柱使用磷酸鹽緩衝溶液重新平衡。然後將表2中所描繪的洗滌之一（測試溶液1、2和7）以2個柱體積（CV）應用，並且隨後立即應用3個CV的在pH 7.0下的無鹽磷酸鹽緩衝溶液。在用40 mM乙酸鈉洗脫之後，使用2 M Tris鹼將洗脫液庫調節至pH 5.5。然後用0.22 μm PES過濾器或Millipore C0HC深度過濾器過濾洗脫液庫，並且通過ELISA測試HCP-A含量（圖2A）。相對於對照（294 ppm），所有三種洗滌條件（測試溶液1、2和7）都能夠清除額外HCP-A。結果還表明，HCP-A的去除效果是累積的，因為茛醇、苯甲酸鈉和精胺酸的組合相對於對照除去了幾乎90%的HCP-A。此外，深度過濾為洗滌條件洗脫液提供了隨後15%-25%的額外的HCP-A去除。

按照如上所述的類似程序，接下來通過在pH 9.0或10.0下洗滌柱來測試高pH洗滌的有效性。在具有已知高HCP-A表現的細胞株中生產IgG4抗體（mAb B）以特定增加蛋白A柱上的HCP-A負荷。**表1**提供了純化過程期間進行的步驟的總結。簡言之，在平衡至加載pH和電導率之後，向15.7 mL蛋白A層析柱中加載含有分泌的人類單株抗體的樣品，該樣品是在下游處理之前經由離心和通過深度過濾澄清兩者從收穫的CHO細胞收穫。一旦達到60 g/L（樹脂）加載，將柱使用磷酸鹽緩衝溶液重新平衡。然後將測試溶液8或9之一（**表2**）應用兩個CV，並且隨後立即應用三個CV的在pH 7.0下的無鹽磷酸鹽緩衝溶液。在用40 mM乙酸鈉洗脫之後，使用2 M tris鹼將洗脫液庫調節至pH 5.5。然後用0.22  $\mu$ m PES過濾器過濾洗脫庫。如圖**2B**中所示，在pH 10.0下的含有緩衝鹽的0.5 M苯甲酸鈉相對於對照在去除HCP-A（92%減少）方面非常有效。此外，苄醇和精胺酸的添加再次互補並且在pH 9.0下增加HCP-A的清除率。總之，在圖**2A-B**中所描繪的結果顯示了允許顯著清除HCP-A的穩健的pH範圍。

最後，篩選額外添加劑以進一步增強2%苄醇和0.5 M苯甲酸鈉的洗滌。在1.7 mL規模柱上使用相同的IgG4 mAb（mAb B）。**表1**提供了純化過程期間進行的步驟的總結。簡言之，在平衡後將柱加載到40 g/L。然後將**表2**中所描繪的四種洗滌（測試溶液3-6）之一應用於柱。之後，用2 M Tris鹼將洗脫樣品調節至pH 5.5，並使用0.22  $\mu$ m PES過濾器過濾。然後使用HCP-A特异性ELISA測量HCP-A含量（圖**3**）。用測試溶液洗滌證明了，與2%苄醇和0.5 M苯甲酸鈉組合（201.3 ppm）相比，歸因於添加精胺酸、辛酸、苯磺酸鹽和己二醇在HCP-A去除方面的累積響應。含有2%苄醇、0.5 M苯甲酸鈉和選自己二醇、苯磺酸鈉、辛酸或精胺酸的組分的洗滌液在去除HCP-A方面非常有效。

總之，在本實例中提供的數據顯示，在人類單株抗體的蛋白A純化期間，含有苯甲酸鈉和/或苄醇的中間洗滌步驟能夠提供優異的宿主細胞蛋白雜質清除率。此外，在靶單株抗體的蛋白A純化期間，在洗滌溶液中包括選自苯磺酸鹽、辛酸、己二醇和/或精胺酸的一種或多種添加劑進一步改進了宿主細胞蛋白雜質的清除率。

**實例2：鑑定蛋白A層析後存在的特定宿主細胞蛋白，開發用於改進或增強抗體純化期間雜質去除的洗滌溶液，以及評估推定的磷脂酶B樣蛋白2與人類單株抗體的相互作用**

以下實例描述了對蛋白A層析後純化的抗體洗脫液中特定宿主細胞蛋白（HCP）的鑑定。該實例進一步描述了在中間洗滌溶液中使用苯甲酸鈉和辛醇以改進/增強在蛋白A層析期間HCP（包括推定的磷脂酶B樣蛋白2（PLBL2））的去除。最後，該實例描述了加載條件對蛋白A層析效率的影響。

## 材料和方法

### 樣品製備

如實例1中所述製備進行蛋白A層析的人類單株抗體收穫物材料。簡言之，在重組CHO細胞（工程改造以組成型表現兩種人類單株抗體中任一種）的懸浮培養物中生成收穫物。將重組產物分泌到培養基中，然後將其離心並通過深度過濾澄清用於下游處理。在加載到蛋白A柱上之前，用0.22  $\mu\text{m}$  聚醚砜（PES）過濾器過濾澄清的收穫物材料。

### 蛋白A層析

如實例1中所述製備蛋白A樹脂/柱。簡言之，將MabSelect Sure LX蛋白A層析樹脂（GE Healthcare Life Sciences；目錄號17-5474）經由重力沉降用0.5 M氯化鈉溶液進行交換。使用AKTA Pure或AKTA Avant（GE Healthcare Life Sciences）來填充柱，使用（A）1.0 cm直徑柱（Essential Life Solutions 10/250 Snap Column；目錄號S10/250-PPSL-OE-FP10）或（B）0.66 cm直徑柱（Omnifit™ 6.6/100；目錄號006BCC0610FF）。對於柱（A），將樹脂填充至20 cm  $\pm$  10%的床高度，或者對於柱（B），將樹脂填充至5 cm  $\pm$  10%的珠粒高度。將1.0 M氯化鈉溶液以1%柱體積注射到在0.1 M氯化鈉溶液中平衡的柱上進行柱評定（column qualification），並且使用Unicorn Evaluation軟件分析電導率追蹤。柱的效率需要為至少每米775理論塔板數，並且需要證明0.8-1.8的不對稱性。

在加載收穫物材料之前，用反滲透去離子水沖洗柱以去除20%乙醇的儲

存緩衝液。隨後，用0.5 M乙酸沖洗柱以確保在平衡之前去除任何結合的實體。用含有0.5 M氯化鈉的50 mM磷酸鹽緩衝液平衡柱，直至柱的pH > 6.5。

然後將所製備的樣品加載到蛋白A柱上。通常，向著40 g/L樹脂的目標用人類單株抗體A（IgG1亞型）或人類單株抗體B（IgG4亞型）加載柱。如上所述用含有50 mM磷酸鹽和0.5 M氯化鈉的磷酸鹽緩衝溶液洗滌加載柱。接下來，用測試洗滌溶液洗滌柱，隨後用含有緩衝溶液的pH 7的無鹽洗滌溶液洗滌柱。然而，對照處理未用測試洗滌溶液洗滌。最後，使用含有40 mM乙酸鈉的pH 3.1的溶液從柱上洗脫抗體。**表1**提供了例示性層析過程。

#### *通過質譜法進行HCP檢測*

在標準條件下進行蛋白A柱純化和洗脫後，通過質譜法分析人類單株抗體洗脫液以確定每種HCP的相對量。具體地，在蛋白A純化的人類單株抗體樣品中鑑定了叢生蛋白和推定的磷脂酶B樣蛋白2（PLBL2）的相對量。使用 Acquity H-Class Xevo G2-XS Q-ToF和2.1 x 150 mm ACQUITY UPLC柱1.7  $\mu$ m CSH C18進行質譜分析。首先使用50 mM碳酸氫銨中0.05% Rapigest使樣品變性，並且然後使用20 mM DTT（二硫蘇糖醇）和40 mM IAA（碘乙醯胺）還原和烷基化。通過2% LysC進行酶消化過夜，隨後用4%胰蛋白酶進行酶消化3小時。經由離心去除Rapigest，並且使用甲酸將樣品酸化。然後添加2.5 fmol/ $\mu$ l ClpB大腸桿菌的加標內標，以比較HCP和PLBL2的相對量。在約785.8426 m/z進行鎖定質量校準。將MS<sup>E</sup>用於分析離子數據並鑑定HCP。

#### *通過ELISA進行HCP檢測*

在洗脫後，如實例1中所述評估人類單株抗體樣品中通用HCP的存在。簡言之，用第3代CHO HCP ELISA套組（Cygnus Technologies）根據製造商的方案測試抗體樣品中HCP雜質的存在。在1:400與1:800之間的稀釋度下進行HCP ELISA，並且使用Spectramax Plus 384讀板儀在450/600 nm下讀取吸光度。

#### *通過ELISA進行PLBL2檢測*

使用可商購的倉鼠（CHO）ELISA套組（ICL Labs，E-65PLB）根據製造商的方案在洗脫的抗體樣品中量化PLBL2的濃度。在1:100與1:800之間

的稀釋度下進行PLBL2 ELISA，並且使用Spectramax Plus 384讀板儀在450 nm下讀取吸光度。

## 結果

### 通過質譜法進行HCP檢測

在蛋白A純化後，已經顯示HCP與人類單株抗體共洗脫，這對於這些抗體的下游應用來說可能是有問題的。為了鑑定蛋白A純化後在純化的人類單株抗體溶液中存在的特定HCP，向1.7 mL蛋白A層析柱中加載含有從CHO細胞收穫的分泌的IgG1人類單株抗體（mAb A）的樣品，在下游處理之前已將該樣品離心並通過深度過濾澄清（參見表1）。首先將柱用磷酸鹽緩衝溶液洗滌。接下來，將柱用無鹽的50 mM磷酸鹽（pH 7.0）洗滌。最後，從柱上洗脫單株抗體，並使用2 M tris鹼將pH調節至pH 6.0。在調節之後，將洗脫液庫使用0.22  $\mu$ m PES過濾器過濾，並且通過質譜法分析以鑑定HCP的相對量。值得注意的是，叢生蛋白和PLBL2是人類單株抗體洗脫液中存在的兩種最豐富的HCP。

### 鑑定中間洗滌條件以改進HCP/PLBL2去除。

上面詳述的質譜分析提供了進一步的證據，即HCP（包括PLBL2）在蛋白A純化後與人類單株抗體共洗脫。接下來，開發ELISA篩選以鑑定可以用於進一步改進和增強HCP和PLBL2去除的中間洗滌溶液（圖4A和4B）。有趣的是，包含4%苄醇或0.5 M苯甲酸鈉的中間洗滌有效地降低了抗體洗脫液樣品中污染的HCP和PLBL2的水平。含有單獨的0.5 M精胺酸的洗滌不會降低通用HCP的水平，但是確實降低了污染PLBL2的水平。

PLBL2 ELISA篩選進一步顯示深度過濾與中間洗滌相結合，該中間洗滌包括：1) 2%苄醇和0.5 M精胺酸pH 5.0，2) 2%苄醇和0.5 M苯甲酸鈉pH 7.0，或3) 2%苄醇、0.5 M苯甲酸鈉、0.5 M精胺酸pH 6.0，在蛋白A純化期間有效地去除了PLBL2。此外，pH水平升高的洗滌（0.5 M苯甲酸鈉和50 mM碳酸氫鈉pH 10.0，或者2%苄醇、0.5 M苯甲酸鈉、0.5 M精胺酸和50 mM磷酸鈉pH 9.0）在蛋白A純化期間去除PLBL2方面非常有效。實際上，與對照處理相比，用50 mM碳酸氫鈉pH 10.0進行的苯甲酸鈉洗滌能夠去除超過92%的PLBL2。最後，包含以下項的洗滌：1) 0.5 M苯甲酸鈉、2%苄醇和0.5 M苯

磺酸鹽pH 7.0，2) 0.5 M苯甲酸鈉、50 mM辛酸、0.5 M精胺酸和0.5 M氯化鈉pH 7.0，3) 0.5 M苯甲酸鈉、2%苧醇和10%己二醇pH 7.0，或4) 0.5 M苯甲酸鈉、2%苧醇和0.5 M精胺酸pH 6.0，與對照洗滌相比，證明穩健的去除PLBL2的能力。

此外，在實驗洗滌和對照洗滌兩者之後對抗體洗脫液的視覺比較揭示，相對於對照洗滌的樣品，用2%苧醇和0.5 M苯甲酸鈉洗滌的樣品具有改進的澄清度（圖5）。

上面詳述的PLBL2 ELISA證明，含有苧醇和苯甲酸鈉的中間洗滌可以有效地降低蛋白A純化的抗體洗脫液中的PLBL2的水平。接下來，通過質譜法進一步正交地證實了該結果。質譜法結果顯示，相對於對照處理，測試洗滌（0.5 M苯甲酸鈉、0.5 M精胺酸、50 mM辛酸、0.5 M NaCl pH 9.0）從洗脫液中去除了近93%的PLBL2。

#### *評估柱加載對產率和PLBL2去除的影響*

上述實驗證明宿主細胞蛋白PLBL2存在於蛋白A純化的抗體洗脫液中，並且可以使用含有苧醇和苯甲酸鈉的中間洗滌溶液有效地除去。接下來，評估了蛋白A柱加載水平對脫柱（off-column）產率和PLBL2去除的影響。為了鑑定理想的加載條件以使脫柱產率和PLBL2去除最大化，以40-60 g/L的範圍加載蛋白A柱（圖6A和16）。結果證明，增加柱加載超過40 g/L會降低脫柱產率和PLBL2去除兩者。

總之，在本實例中提供的數據顯示PLBL2在蛋白A純化後與人類單株抗體共洗脫的宿主細胞蛋白之中。此外，數據證明，在人類單株抗體的蛋白A純化期間，含有苯甲酸鈉和/或苧醇的中間洗滌步驟能夠提供優異的宿主細胞蛋白雜質和PLBL2清除率。此外，數據顯示使蛋白A樹脂柱過載可以降低脫柱產率和PLBL2去除。

#### **實例3：評估在包含抗體的收穫物中的pH和苯甲酸鹽濃度對抗體純化期間的雜質去除的影響。**

以下實例描述了進行用以確定調節包含單株抗體的收穫物的苯甲酸鈉濃度和pH是否改進或增強抗體純化期間雜質去除的實驗。

如實例1中所述製備人類單株抗體收穫物。將澄清和深度過濾的收穫物調節至不同的pH和添加劑濃度，以篩選對HCP和PLBL2清除率的影響。將苯甲酸鈉（先前顯示作為額外洗滌步驟的一部分對PLBL2去除有效）作為固體以足以達到給定收穫物體積的目標終濃度的量添加。在添加之後，通過添加2 M tris鹼來達到目標pH。將第一收穫物用苯甲酸鈉補充，以實現0.5 M苯甲酸鈉的終濃度並調節至pH 7.2。將第二收穫物用苯甲酸鈉補充，以實現0.5 M苯甲酸鈉的終濃度並調節至pH 9。將第三收穫物調節至pH 9（未添加苯甲酸鈉）。參見表3：

表3.

| 收穫物添加劑    | pH  |
|-----------|-----|
| Tris鹼僅調節用 | 9.0 |
| 0.5 M苯甲酸鈉 | 7.2 |
| 0.5 M苯甲酸鈉 | 9.0 |

在調節每種收穫物並0.22 μm過濾後，用調節過的收穫物將三個蛋白A柱各自加載到50 g/L樹脂的目標。用含有50 mM磷酸鹽和0.5 M氯化鈉的磷酸鹽緩衝溶液洗滌加載柱。接下來，用反滲透去離子（RODI）水洗滌柱。最後，使用含有40 mM乙酸鈉的pH 3.1的溶液從柱上洗脫抗體。下表4提供了例示性層析過程。

表4.

| 步驟  | 緩衝液/溶液                       | 流動方向 | 停留時間<br>(min) | 體 積<br>(CV) |
|-----|------------------------------|------|---------------|-------------|
| 沖洗  | 注射用水（WFI）                    | 向下流  | 8             | 2.5         |
| 剝離  | 0.5 M乙酸                      | 向下流  | 5             | 2           |
| 平衡  | 50 mM磷酸鈉、0.5 M氯化鈉，<br>pH 7.0 | 向下流  | 5             | 3           |
| 加載  | 調節過的mAb收穫物，0.22<br>μm過濾的     | 向下流  | 5             |             |
| 洗滌1 | 50 mM磷酸鈉、0.5 M氯化鈉，           | 向下流  | 5             | 3           |

|     |                              |     |   |   |
|-----|------------------------------|-----|---|---|
|     | pH 7.0                       |     |   |   |
| 洗滌2 | 反滲透去離子 (RODI) 水              | 向下流 | 5 | 2 |
| 洗脫  | 40 mM乙酸鈉，pH 3.1              | 向下流 | 5 | 2 |
| 剝離  | 0.5 M乙酸                      | 向下流 | 5 | 3 |
| 平衡後 | 50 mM磷酸鈉、0.5 M氯化鈉，<br>pH 7.0 | 向上流 | 5 | 3 |
| 消毒  | 0.5 M氫氧化鈉                    | 向上流 | 5 | 3 |
| 平衡後 | 50 mM磷酸鈉、0.5 M氯化鈉，<br>pH 7.0 | 向上流 | 5 | 2 |
| 存儲  | 20%乙醇                        | 向上流 | 8 | 2 |

然後如實例1中所述經由ELISA測試三種蛋白A洗脫液的每一種中的宿主細胞蛋白(HCP)雜質的存在，並且經由定制的ELISA測試PLBL2的存在。如圖7中所示，0.5 M苯甲酸鈉pH 9.0顯示出最低水平的PLBL2和HCP雜質，並且相對於單獨的pH調節證明對數更大的PLBL2清除率。當向pH 7.2的收穫物中添加0.5 M苯甲酸鈉時，僅改進了HCP清除率。需要對收穫物調節pH和苯甲酸鈉兩者以對PLBL2產生影響。HMW沒有受到調節的影響(未示出)。與在蛋白A步驟期間僅進行RODI洗滌的未經調節的收穫物相比，HCP減少了65%，而PLBL2減少了約79%。

接下來，如上所述，在蛋白A純化之前，向收穫物中補充苯甲酸鈉，以實現0.1 M、0.2 M、0.3 M、0.4 M、或0.5 M的終濃度並調節至pH 9。參見表5。

表5.

| 收穫物添加劑    | pH  |
|-----------|-----|
| 0.1 M苯甲酸鈉 | 9.0 |
| 0.2 M苯甲酸鈉 | 9.0 |
| 0.3 M苯甲酸鈉 | 9.0 |
| 0.4 M苯甲酸鈉 | 9.0 |
| 0.5 M苯甲酸鈉 | 9.0 |

然後經由定制的ELISA測試每種蛋白A洗脫液中PLBL2的存在，並且評估每種洗脫液中抗體的產率。圖8顯示了PLBL2含量與苯甲酸鈉濃度之間的關係呈近似S形。對於高於0.4 M苯甲酸鈉的濃度觀察到減少的PLBL2清除率增益。隨著苯甲酸鈉濃度的增加，抗體產率略有下降。從0.1 M至0.5 M苯甲酸鈉，抗體產率從94.8%降至89.4%。當在蛋白A純化之前將收穫物調節至0.4 M苯甲酸鈉和pH 9.0時，觀察到最高產率和最高PLBL2清除率。將苯甲酸鈉濃度增加到0.4 M以上導致減少的清除率增益，以抗體產率略有下降為代價。0.1 M苯甲酸鈉的所有樣品具有相當的HCP清除率至約250 ppm。在0.1 M苯甲酸鈉及以下，HCP為約500 ppm。苯甲酸鈉濃度在0.2 M與0.5 M之間不影響電荷變化曲線，並且所有洗脫液都在規定的限度內。

總之，這些數據表明溶液中苯甲酸鈉的存在使得宿主細胞雜質與mAb的結合在高pH下非常不利。這些條件可以在mAb與蛋白A樹脂已經結合之後通過單獨的洗滌步驟實現，或者在柱加載階段之前或期間在溶液中實現。這為蛋白A純化步驟的操作提供了更大的靈活性，並且進一步支持了苯甲酸鈉作為洗滌添加劑的獨特特性。

儘管出於清楚和理解的目的，已經通過說明和實例的方式詳細地描述了前述公開文本，但是實施方式和實例不應被解釋為限制本公開文本的範圍。

【符號說明】 無

**【發明摘要】**

**【中文發明名稱】** 用於增強蛋白A層析期間雜質去除的方法  
**【英文發明名稱】** METHODS FOR ENHANCED REMOVAL OF  
IMPURITIES DURING PROTEIN A  
CHROMATOGRAPHY

**【中文】** 本文提供了涉及經由蛋白A層析純化含Fc區的多肽（例如抗體）的方法；涉及在蛋白質A層析期間使用包含苯甲酸鹽和/或苄醇的洗滌溶液的方法；以及在蛋白A層析之前使用苯甲酸鈉調節收穫物的方法。

**【英文】** Provided herein are methods relating to the purification of a polypeptide comprising an Fc region (*e.g.*, an antibody) via protein A chromatography; methods relating to the use of a wash solution comprising a benzoate salt and/or benzyl alcohol during protein A chromatography; and methods of adjusting a harvest using sodium benzoate prior to protein A chromatography.

【指定代表圖】圖1至圖3

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

## 【發明申請專利範圍】

【第1項】一種純化含Fc區的多肽的方法，該方法包括以下步驟：

(a) 在該含 Fc 區的多肽與蛋白 A 結合的條件下，使蛋白 A 層析基質與樣品接觸，該樣品包含 (i) 該含 Fc 區的多肽，和 (ii) 一種或多種雜質；並且

(b) 用洗滌溶液洗滌該基質，其中該洗滌溶液包含以下中的一種或全部兩種：(i) 濃度為約 0.1 M 至約 1.0 M 的苯甲酸鹽和 (ii) 濃度為約 0.5% 至約 4% 體積/體積 (v/v) 的苄醇，並且其中該洗滌溶液具有約 4.0 至約 10.0 的 pH。

【第2項】如請求項1的方法，其中該洗滌溶液包含：1) 苯甲酸鹽；2) 苄醇；或3) 苯甲酸鹽和苄醇。

【第3項】如請求項1或請求項2的方法，其中該苯甲酸鹽的濃度為從約 0.1 M 至約 0.5 M。

【第4項】如請求項1-3中任一項的方法，其中該苯甲酸鹽是苯甲酸鹼金屬鹽。

【第5項】如請求項1-4中任一項的方法，其中該苯甲酸鹽是苯甲酸钠。

【第6項】如請求項5的方法，其中該苯甲酸钠的濃度為從約 0.1 M 至約 0.3 M。

【第7項】如請求項5的方法，其中該苯甲酸钠的濃度為約 0.3 M。

【第8項】如請求項5的方法，其中該苯甲酸钠的濃度為約 0.5 M。

【第9項】如請求項1-8中任一項的方法，其中該苄醇的濃度為從約 1% 至約 4% (v/v)。

【第10項】如請求項1-8中任一項的方法，其中該苄醇的濃度為從約 1% 至約 2% (v/v)。

【第11項】如請求項1-8中任一項的方法，其中該苄醇的濃度為約 2% (v/v) 至約 4% (v/v)。

【第12項】如請求項1-11中任一項的方法，其中該洗滌溶液進一步包含緩衝劑。

【第13項】如請求項11的方法，其中該緩衝劑選自磷酸鹽、tris、精胺酸、乙酸鹽和檸檬酸鹽。

【第14項】如請求項11或請求項13的方法，其中該緩衝劑的濃度為約10 mM至約500 mM。

【第15項】如請求項11或請求項13的方法，其中該緩衝劑的濃度為約50 mM或500 mM。

【第16項】如請求項1-15中任一項的方法，其中該洗滌溶液具有約5.0至約10.0的pH。

【第17項】如請求項1-16中任一項的方法，其中該洗滌溶液具有約5.0至約9.0的pH。

【第18項】如請求項1-16中任一項的方法，其中該洗滌溶液具有約5.0、約6.0、約7.0、約9.0或約10.0的pH。

【第19項】如請求項1-18中任一項的方法，其中該洗滌溶液進一步包含苯磺酸鈉。

【第20項】如請求項19的方法，其中該苯磺酸鈉的濃度為約0.1 M至約0.5 M。

【第21項】如請求項1-20中任一項的方法，其中該洗滌溶液進一步包含辛酸。

【第22項】如請求項21的方法，其中該辛酸的濃度為約10 mM至約50 mM。

【第23項】如請求項1-22中任一項的方法，其中該洗滌溶液進一步包含己二醇。

【第24項】如請求項23的方法，其中該己二醇的濃度為約1%至約10% (v/v)。

【第25項】如請求項1-24中任一項的方法，其中該洗滌溶液進一步包含肌酸。

【第26項】如請求項25的方法，其中該肌酸的濃度為約10 mM至約100 mM。

【第27項】如請求項1-26中任一項的方法，其中該洗滌溶液進一步包含精胺酸。

【第28項】如請求項27的方法，其中該精胺酸的濃度為約0.1 M至約1.0 M。

【第29項】如請求項27的方法，其中該精胺酸的濃度為約0.5 M。

【第30項】如請求項27-29中任一項的方法，其中該精胺酸是精胺酸-HCl。

【第31項】如請求項27-30中任一項的方法，其中包含精胺酸的該洗滌溶液具有約4.0至約6.0的pH。

【第32項】如請求項27-30中任一項的方法，其中包含精胺酸的該洗滌溶液具有約8.0至約10.0的pH。

【第33項】如請求項1-32中任一項的方法，其中該洗滌溶液進一步包含一種或多種非緩衝鹽。

【第34項】如請求項33的方法，其中該一種或多種非緩衝鹽選自氯化鈉、溴化鈉、氯化鉀、溴化鉀、氯化鎂、溴化鎂、氯化鈣、溴化鈣及其任何組合。

【第35項】如請求項33的方法，其中該一種或多種非緩衝鹽是氯化鈉和/或氯化鉀。

【第36項】如請求項33-35中任一項的方法，其中該一種或多種非緩衝鹽的濃度為約0.1 M至約1.0 M。

【第37項】如請求項1-36中任一項的方法，其中該洗滌溶液是選自以下的溶液：

(i) 包含濃度為約 0.5 M 的苯甲酸鈉和濃度為約 50 mM 的碳酸氫鈉，具有約 10.0 的 pH 的溶液；

(ii) 包含濃度為約 0.5 M 的苯甲酸鈉、濃度為約 2% 的苄醇、濃度為約 0.5 M 的精胺酸和濃度為約 50 mM 的磷酸鈉，具有約 9.0 的 pH 的溶液；

(iii) 包含濃度為約 0.5 M 的苯甲酸鈉和濃度為約 2% (v/v) 的苄醇，具有約 7.0 的 pH 的溶液；

- (iv) 包含濃度為約 0.5 M 的苯甲酸鈉、濃度為約 2% (v/v) 的苧醇和濃度為約 0.5 M 的氯化鈉，具有約 7.0 的 pH 的溶液；
- (v) 包含濃度為約 10% (v/v) 的己二醇、濃度為約 0.5 M 的苯甲酸鈉和濃度為約 2% (v/v) 的苧醇，具有約 7.0 的 pH 的溶液；
- (vi) 包含濃度為約 0.5 M 的苯磺酸鹽、濃度為約 0.5 M 的苯甲酸鈉和濃度為約 2% (v/v) 的苧醇，具有約 7.0 的 pH 的溶液；
- (vii) 包含濃度為約 50 mM 的辛酸、濃度為約 0.5 M 的苯甲酸鈉、濃度為約 0.5 M 的精胺酸和濃度為約 0.5 M 的氯化鈉，具有約 7.0 的 pH 的溶液；
- (viii) 包含濃度為約 0.5 M 的苯甲酸鈉、濃度為約 2% (v/v) 的苧醇和濃度為約 0.5 M 的精胺酸，具有約 6.0 的 pH 的溶液；
- (ix) 包含濃度為約 0.5 M 的苯甲酸鈉、濃度為約 2% (v/v) 的苧醇和濃度為約 0.5 M 的精胺酸，具有約 5.0 的 pH 的溶液；和
- (x) 包含濃度為約 2% (v/v) 的苧醇和濃度為約 0.5 M 的精胺酸，具有約 5.0 的 pH 的溶液。

【第38項】 如請求項1-37中任一項的方法，其進一步包括在用如請求項1中的步驟 (b) 的洗滌溶液洗滌該基質之前，用第一溶液洗滌該基質的步驟。

【第39項】 如請求項38的方法，其中該第一溶液包含選自磷酸鹽緩衝液、tris緩衝液、乙酸鹽緩衝液、碳酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液及其任何組合的緩衝液。

【第40項】 如請求項39的方法，其中該第一溶液包含濃度為約10 mM至約100 mM的該緩衝液。

【第41項】 如請求項38-40中任一項的方法，其中該第一溶液是磷酸鹽緩衝液。

【第42項】 如請求項1-41中任一項的方法，其進一步包括在用如請求項1中的步驟 (b) 的洗滌溶液洗滌該基質之後，用第二溶液洗滌該基質的步驟。

【第43項】 如請求項42的方法，其中該第二溶液包含選自磷酸鹽緩衝液、

tris緩衝液、乙酸鹽緩衝液、碳酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液及其任何組合的緩衝液。

【第44項】如請求項43的方法，其中該第二溶液包含濃度為約10 mM至約100 mM的該緩衝液。

【第45項】如請求項42-44中任一項的方法，其中該第二溶液具有約5.0至約7.0的pH。

【第46項】如請求項42-45中任一項的方法，其中該第二溶液包含基本上較低的鹽或不包含鹽。

【第47項】如請求項1-46中任一項的方法，其進一步包括在一個或多個洗滌步驟之後，使該蛋白A層析基質與洗脫溶液接觸的步驟。

【第48項】如請求項47的方法，其進一步包括收集洗脫液的步驟，該洗脫液包含該含Fc區的多肽。

【第49項】如請求項48的方法，其進一步包括經由深度過濾來過濾該洗脫液的步驟。

【第50項】如請求項48或請求項49的方法，其中該洗脫液包含少於約500百萬分率（ppm）的該一種或多種雜質。

【第51項】如請求項1-50中任一項的方法，其中該方法得到以比缺乏用該洗滌溶液洗滌該基質的步驟的相應方法更高的程度從該一種或多種雜質中純化出來的該含Fc區的多肽。

【第52項】如請求項1-51中任一項的方法，其中該一種或多種雜質是宿主細胞蛋白（HCP）。

【第53項】如請求項52的方法，其中該一種或多種HCP選自磷脂酶、叢生蛋白、絲胺酸蛋白酶、延伸因子及其任何組合。

【第54項】如請求項52或請求項53的方法，其中該HCP是推定的磷脂酶B樣蛋白2（PLBL2）。

【第55項】如請求項52或請求項53的方法，其中該宿主細胞是哺乳動物宿主細胞。

【第56項】如請求項52-55中任一項的方法，其中該宿主細胞是中國倉鼠卵巢（CHO）細胞。

【第57項】如請求項1-56中任一項的方法，其中該Fc區是人類Fc區。

【第58項】如請求項57的方法，其中該人類Fc區包括人類IgG1、IgG2或IgG4 Fc區。

【第59項】如請求項1-56中任一項的方法，其中該Fc區是小鼠Fc區。

【第60項】如請求項59的方法，其中該小鼠Fc區包括小鼠IgG1、IgG2或IgG3 Fc區。

【第61項】如請求項1-60中任一項的方法，其中該含Fc區的多肽是抗體。

【第62項】如請求項61的方法，其中該抗體是人類抗體、人源化抗體或嵌合抗體。

【第63項】如請求項61或請求項62的方法，其中該抗體是單株抗體。

【第64項】如請求項61或請求項62的方法，其中該抗體是雙特異性抗體或三特異性抗體。

【第65項】如請求項1-64中任一項的方法，其進一步包括，在步驟(a)之前，調節包含該含Fc區的多肽的收穫物以達到在約0.1 M與約0.5 M之間的苯甲酸鹽終濃度以及在約7.0與約9.0之間的pH，以產生包含 (i) 該含Fc區的多肽和 (ii) 一種或多種雜質的樣品。

【第66項】一種純化含Fc區的多肽的方法，該方法包括以下步驟：

(A) 調節包含該含Fc區的多肽的收穫物以達到約0.1 M和約0.5 M的苯甲酸鹽終濃度以及在約7.0與約9.0之間的pH，以產生包含 (i) 該含Fc區的多肽和 (ii) 一種或多種雜質的樣品；並且

(B) 使該樣品與至少一種層析基質接觸。

【第67項】如請求項65或66的方法，其中該苯甲酸鹽是苯甲酸鹼金屬鹽。

【第68項】如請求項67的方法，其中該苯甲酸鹽是苯甲酸钠。

【第69項】如請求項65-68中任一項的方法，其中該收穫物中苯甲酸鹽的終濃度在約0.4 M與約0.5 M之間。

【第70項】如請求項65-69中任一項的方法，其中該收穫物的pH在約7.0與約8.0之間。

【第71項】如請求項65-69中任一項的方法，其中該收穫物的pH在約8.0與約9.0之間。

【第72項】如請求項65-67中任一項的方法，其中該收穫物是從包含被工程改造以表現該多肽的宿主細胞的培養物中生成。

【第73項】如請求項72的方法，其中該宿主細胞是真核宿主細胞。

【第74項】如請求項73的方法，其中該真核宿主細胞是中國倉鼠卵巢（CHO）細胞。

【第75項】如請求項65-74中任一項的方法，其中在該調節之前使該收穫物澄清。

【第76項】如請求項65-74中任一項的方法，其中在該調節後使該收穫物澄清。

【第77項】如請求項66-76中任一項的方法，其中該至少一種層析基質包含親和層析基質。

【第78項】如請求項77的方法，其中該親和層析基質是蛋白A層析基質或蛋白G層析基質。

【第79項】如請求項65-78中任一項的方法，其進一步包括使該至少一種層析基質與至少一種洗滌溶液接觸的步驟。

【第80項】如請求項65-79中任一項的方法，其進一步包括使該至少一種層析基質與洗脫溶液接觸的步驟。

【第81項】如請求項80的方法，其進一步包括收集洗脫液的步驟，該洗脫液包含該含Fc區的多肽。

【第82項】如請求項81的方法，其進一步包括經由深度過濾來過濾該洗脫液的步驟。

【第83項】如請求項81或請求項82的方法，其中該洗脫液包含少於約500百萬分率（ppm）的該一種或多種雜質。

【第84項】如請求項66-83中任一項的方法，其中該方法得到以比缺乏調節包含該含Fc區的多肽的收穫物以產生該樣品的步驟的相應方法更高的程度從該一種或多種雜質中純化出來的該含Fc區的多肽。

【第85項】如請求項66-84中任一項的方法，其中該一種或多種雜質是宿主細胞蛋白（HCP）。

【第86項】如請求項85的方法，其中該一種或多種HCP選自磷脂酶、叢生蛋白、絲胺酸蛋白酶、延伸因子及其任何組合。

【第87項】如請求項85或請求項86的方法，其中該HCP是推定的磷脂酶B樣蛋白2（PLBL2）。

【第88項】如請求項66-87中任一項的方法，其中該Fc區是人類Fc區。

【第89項】如請求項82的方法，其中該人類Fc區包括人類IgG1、IgG2或IgG4 Fc區。

【第90項】如請求項66-89中任一項的方法，其中該Fc區是小鼠Fc區。

【第91項】如請求項90的方法，其中該小鼠Fc區包括小鼠IgG1、IgG2或IgG3 Fc區。

【第92項】如請求項66-91中任一項的方法，其中該含Fc區的多肽是抗體。

【第93項】如請求項92的方法，其中該抗體是人類抗體、人源化抗體或嵌合抗體。

【第94項】如請求項92或請求項93的方法，其中該抗體是單株抗體。

【第95項】如請求項92或請求項93的方法，其中該抗體是雙特異性抗體或三特異性抗體。

















