

公告本
-----

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：97/119959

B01D 15/08 (2006.01)

※ 申請日期：97.5.29

※IPC 分類：C07K 16/00 (2006.01)

## 一、發明名稱：(中文/英文)

免疫球蛋白之純化

IMMUNOGLOBULIN PURIFICATION

## 二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

瑞士商赫孚孟拉羅股份公司  
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

代表人：(中文/英文)

1. 菲杜林 克勞士納  
KLAUSNER, FRIDOLIN

2. 丹尼斯 史崔柏  
STREBEL, DENISE

住居所或營業所地址：(中文/英文)

瑞士貝士勞市格蘭山查街124號  
124 GRENZACHERSTRASSE CH-4070 BASEL SWITZERLAND

國 籍：(中文/英文)

瑞士 SWITZERLAND

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 羅伯托 佛肯斯丹  
FALKENSTEIN, ROBERTO
2. 克勞蒂亞 吉賽兒  
GIESSEL, CLAUDIA

國 籍：(中文/英文)

1. 德國 GERMANY
2. 德國 GERMANY

#### 四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項  第一款或  第二款規定之事實，其

事實發生日期為： 年 月 日。

事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 歐洲專利機構；2007年06月01日；07010840.2

2.

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

## 五、中文發明摘要：

本發明報導一種純化免疫球蛋白之方法，其中該方法包括將包含單體及聚集體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在可使單體形式之免疫球蛋白不與陽離子交換材料結合之條件下施用至陽離子交換材料，及在與陽離子交換材料接觸後自溶液回收單體形式之免疫球蛋白。

## 六、英文發明摘要：

The current invention reports a method for purifying an immunoglobulin, wherein the method comprises applying an aqueous, buffered solution comprising an immunoglobulin in monomeric and in aggregated form to a cation exchange material under conditions whereby the immunoglobulin in monomeric form does not bind to the cation exchange material, and recovering the immunoglobulin in monomeric form from the solution after the contact with the cation exchange material.

**七、指定代表圖：**

(一)本案指定代表圖為：第 ( 3 ) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

**八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：**

(無)

## 九、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明屬於多肽純化領域。其報導一種藉由在溶液中將免疫球蛋白與雜質，尤其與聚集體形式之免疫球蛋白分離來提供單體形式之免疫球蛋白的方法。

### 【先前技術】

蛋白且尤其免疫球蛋白在當今之醫學領域中具有重要作用。對於人類應用而言，每種治療性蛋白必須符合不同標準。為確保生物藥劑對人類的安全性，尤其必須移除可能引起嚴重危害之核酸、病毒及宿主細胞蛋白。為符合此等質量管理規格標準，在製造製程之後必須進行一或多個純化步驟。純度、產量及產率尤其在確定適當純化方法中具有重要作用。

已完善建立了不同方法且其廣泛用於蛋白純化，諸如使用微生物蛋白之親和層析法(例如，蛋白A或蛋白G親和層析法)、離子交換層析法(例如，陽離子交換(磺丙基或羧甲基樹脂)、陰離子交換(胺基乙基樹脂)及混合模式離子交換)、嗜硫吸附(例如，使用 $\beta$ -巰基乙醇及其他SH配位體)、疏水性相互作用或芳族吸附層析法(例如，使用苯基-瓊脂糖、氮雜親砂性樹脂或間胺基苯基醯酸)、金屬螯合劑親和層析法(例如，使用Ni(II)-及Cu(II)-親和材料)、分子篩層析法及電泳法(諸如凝膠電泳法、毛細電泳法)(Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102)。

Necina, R.等人(Biotechnol. Bioeng. 60 (1998) 689-698)報導藉由展現高電荷密度之離子交換介質直接自細胞培養物上清液捕獲人類單株抗體。在WO 89/05157中，報導一種藉由直接使細胞培養基經受陽離子交換處理來純化產物免疫球蛋白之方法。Danielsson, A.等人，J. Immun. Meth. 115 (1988), 79-88描述對於來自小鼠腹水之單株IgG抗體的單步驟純化。

Mhatre, R.等人(J. Chrom. A 707 (1995) 225-231)研究藉由陽離子交換層析法及pH值梯度溶離來純化抗體Fab片段。

WO 94/00561報導人類單株抗恆河猴抗體及產生其之細胞株。WO 2004/024866中報導一種藉由離子交換層析法純化多肽之方法，其中使用梯度洗滌自一或多種污染物解析所關注之多肽。Schwarz, A.等人(Laborpraxis 21 (1997) 62-66)報導使用CM-HyperD管柱來純化單株抗體。

WO 2004/076485報導一種藉由蛋白A及離子交換層析法純化抗體之方法。在EP 0 530 447中報導一種藉由三個層析步驟之組合來純化IgG單株抗體之方法。US 4,983,722中報導自抗體製劑移除蛋白A。

重組單株抗體處理常使用陰離子交換層析法來結合痕量雜質及潛在污染物，諸如DNA、宿主細胞蛋白及病毒，同時允許抗體流過(Knudsen, H.L.等人，J. Chrom. A 907 (2001) 145-154)。

WO 95/16037報導藉由蛋白A陽離子交換層析法進行自

雜交融合瘤純化抗EGF-R/抗CD3雙特異性單株抗體。EP 1 084 136中報導藉由使用離子交換層析法將抗體單體與其多聚體分離。US 5,429,746係關於將疏水性相互作用層析法組合層析法用於純化抗體分子蛋白。

US 4,604,208中報導一種用於過濾受帶電微粒污染之流體，特殊非經腸或生物液體的陰離子性改質微孔膜。WO 03/040166報導一種經設計用於移除含蛋白流中之痕量雜質的膜及裝置。

US 6,716,598中報導一種回收多肽之方法。在US 2006/0194953中報導一種自藉助於蛋白A親和層析法純化之抗體選擇性地移除洩漏蛋白A之方法。

#### 【發明內容】

本發明包含免疫球蛋白純化領域中之多種態樣。一種態樣為一種純化免疫球蛋白之方法，其包含以下步驟：將包含單體及聚集體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在藉以使單體形式之免疫球蛋白不與陽離子交換材料結合之條件下施用至陽離子交換材料，及在與陽離子交換材料接觸後自溶液回收單體形式之免疫球蛋白。在一實施例中，該步驟為以流過模式運作之層析步驟。

在一實施例中，本發明之方法包含在陽離子交換步驟之前或之後的另一步驟：將包含單體及/或聚集體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在藉以使免疫球蛋白不與陰離子交換材料結合之條件下施用至陰離子交換材料，及自陰離子交換材料之流出液回收免疫球蛋白。在一實施例中，該

步驟為以流過模式運作之層析步驟。

在另一實施例中，本發明之方法包含在陽離子交換步驟之前或在陰離子交換步驟之前的另一步驟：將包含單體及聚集體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在藉以使免疫球蛋白與親和管柱結合之條件下施用至親和管柱，及自親和管柱回收單體及聚集體形式之免疫球蛋白。在一實施例中，該步驟為以結合-併行-溶離模式運作之層析步驟。

在本發明方法之另一實施例中，該方法包括作為陽離子交換步驟的以下步驟：將包含單體及聚集體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在藉以使單體形式之免疫球蛋白不結合至膜陽離子交換材料之條件下施用至膜陽離子交換材料，及自膜陽離子交換材料之流出液回收單體形式之免疫球蛋白。在一實施例中，該陽離子交換材料為膜陽離子交換材料。在另一實施例中，膜陽離子交換材料為Mustang™ S、Mustang™ C、Sartobind™ S或Sartobind™ C。在另一實施例中，膜陽離子交換材料為經磺酸基團或羧甲基改質之以聚醚砜為主之膜或以再生纖維素為主之膜。在一實施例中，溶液具有pH 4至pH 8，較佳pH 5至pH 8之pH值。在另一實施例中，溶液具有1 mS/cm至15 mS/cm，較佳4.0 mS/cm至10.0 mS/cm之導電率。

另一實施例包含自流出液回收單體形式之該免疫球蛋白係藉由選自以下之方法：沈澱、鹽析、超濾、透濾、凍乾、親和層析法或縮減溶劑體積以獲得濃縮溶液。較佳地，該回收係藉由超濾、凍乾或縮減溶劑體積。

在另一實施例中，該免疫球蛋白係自膜陽離子交換材料之流出液獲得且至少95%之免疫球蛋白為單體形式。在另一實施例中，至少90%單體形式之免疫球蛋白不與陽離子交換材料結合。一種實施例為經緩衝水溶液為包含磷酸或其鹽、檸檬酸或其鹽、或組胺酸或其鹽之溶液。在另一實施例中，經緩衝水溶液包含氯化鈉或氯化鉀。且在另一實施例中，層析步驟為管柱層析法或卡匣層析法。

### 【實施方式】

本發明包含一種純化免疫球蛋白之方法，其包含以下步驟：將包含單體及聚集體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在藉以使單體形式之免疫球蛋白不與陽離子交換材料結合之條件下施用至陽離子交換材料，及在與陽離子交換材料接觸後(亦即，在移除陽離子交換材料後)自溶液或上清液回收單體形式之免疫球蛋白。

如本申請案中所用之術語"離子交換材料"或其同等語法表示載有共價結合之帶電取代基的固定高分子量基質。為達成總體電荷中性，非共價結合之抗衡離子藉由離子相互作用結合至帶電取代基。"離子交換材料"具有將其非共價結合之抗衡離子與周圍溶液中之帶相似電荷的結合搭配物或離子交換的能力。視其可交換抗衡離子之電荷而定，"離子交換材料"稱為"陽離子交換材料"或"陰離子交換材料"。視帶電基團(取代基)之性質而定，"離子交換材料"稱為(例如，在陽離子交換材料之情況下)磺酸樹脂或磺丙基樹脂(S)或羧甲基樹脂(CM)。視帶電基團/取代基之化學性質而

定，"離子交換材料"可視共價結合帶電取代基之強度而另外分類為強或弱離子交換材料。舉例而言，強陽離子交換材料具有磺酸基團，較佳磺丙基作為帶電取代基，弱陽離子交換材料具有羧酸基團，較佳羧甲基作為帶電取代基。強陰離子交換材料具有四級銨基團，且弱陰離子交換材料具有二乙基胺基乙基作為帶電取代基。

如本申請案中所用之術語"膜"表示微孔或大孔膜。膜本身由聚合材料構成，諸如聚乙烯、聚丙烯、乙烯乙酸乙烯酯共聚物、聚四氟乙烯、聚碳酸酯、聚氯乙烯、聚醯胺(耐綸，例如 Zetapore™、N<sub>66</sub> Posidyne™)、聚酯、乙酸纖維素、再生纖維素、纖維素複合物、聚砒、聚醚砒、聚芳基砒、聚苯基砒、聚丙烯腈、聚偏二氟乙烯、非編織及編織織物(例如，Tyvek®)、纖維材料，或膜本身由無機材料構成，諸如沸石、SiO<sub>2</sub>、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、TiO<sub>2</sub>或羥基磷灰石。在一實施例中，膜為聚醚砒膜或再生纖維素膜。

離子交換樹脂可以不同名稱自許多公司購得，諸如陽離子交換樹脂，均購自 BioRad Laboratories 之 Bio-Rex®(例如，70型)、Chelex®(例如，100型)、Macro-Prep®(例如，CM、High S、25 S型)、AG®(例如，50W、MP型)，購自 Ciphergen 之 WCX 2，購自 Dow chemical company 之 Dowex® MAC-3，購自 Pall Corporation 之 Mustang C 及 Mustang S，購自 Whatman plc. 之 Cellulose CM(例如，23、52型)、hyper-D、Partisphere，均購自 Tosoh Bioscience GmbH 之 Amberlite® IRC(例如，76、747、748型)、

Amberlite<sup>®</sup> GT 73、Toyopearl<sup>®</sup>(例如，SP、CM、650M型)，購自BioChrom Labs之CM 1500及CM 3000，購自GE Healthcare之SP-Sepharose<sup>™</sup>、CM-Sepharose<sup>™</sup>，購自PerSeptive Biosystems之Poros樹脂，購自Shoko America Inc.之Asahipak ES(例如，502C型)、CXpak P、IEC CM(例如，825、2825、5025、LG型)、IEC SP(例如，420N、825型)、IEC QA(例如，LG、825型)，購自Eichrom Technologies Inc.之50W陽離子交換樹脂；及諸如陰離子交換樹脂，如購自Dow chemical company之Dowex<sup>®</sup> 1，均購自BioRad Laboratories之AG<sup>®</sup>(例如，1、2、4型)、Bio-Rex<sup>®</sup> 5、DEAE Bio-Gel 1、Macro-Prep<sup>®</sup> DEAE，購自Eichrom Technologies Inc.之1型陰離子交換樹脂，均購自GE Healthcare之Source Q、ANX Sepharose 4、DEAE Sepharose(例如，CL-6B、FF型)、Q Sepharose、Capto Q、Capto S，購自PerkinElmer之AX-300，均購自Shoko America Inc.之Asahipak ES-502C、AXpak WA(例如，624、G型)、IEC DEAE，均購自Tosoh Bioscience GmbH之Amberlite<sup>®</sup> IRA-96、Toyopearl<sup>®</sup> DEAE、TSKgel DEAE，購自Pall Corporation之Mustang Q。在膜離子交換材料中，結合位點可存在於流過孔壁上且不隱藏於擴散孔內，從而允許經由對流而非擴散之質傳。膜離子交換材料可以不同名稱自一些公司購得，諸如Sartorius(膜陽離子交換材料：Sartobind<sup>™</sup> CM、Sartobind<sup>™</sup> S，膜陰離子交換材料：Sartobind<sup>™</sup> Q)，或Pall Corporation(膜陽離子交換材

料：Mustang™ S、Mustang™ C，膜陰離子交換材料：Mustang™ Q)或Pall BioPharmaceuticals。在一實施例中，膜陽離子交換材料為Sartobind™ CM或Sartobind™ S或Mustang™ S或Mustang™ C。在另一實施例中，膜陽離子交換材料為經磺酸基團或羧甲基改質之以聚醚磺為主之膜或以再生纖維素為主之膜。在另一實施例中，陰離子交換材料為Q型(四級銨基團型)膜陰離子交換材料或Q-陰離子交換管柱。

"多肽"為天然產生或合成產生的由肽鍵連接之胺基酸殘基之聚合物。少於約20個胺基酸殘基之多肽稱為"肽"。

"蛋白"為包含一或多個多肽鏈之巨分子或具有100個以上胺基酸殘基之多肽鏈。蛋白亦可包含非肽組份，諸如碳水化合物基團。碳水化合物基團及其他非肽取代基可由產生蛋白之細胞添加至蛋白中，且將視細胞類型而改變。蛋白在本文中係按照其胺基酸主鏈結構來定義；通常不指定諸如碳水化合物基團之取代基，但其仍可存在。

在本申請案中可互換使用之術語"免疫球蛋白"及其同等語法包含至少兩個輕多肽鏈及兩個重多肽鏈。重多肽鏈及輕多肽鏈各自含有可變區(通常為多肽鏈之胺基末端部分)，其含有與抗原相互作用之結合域。重多肽鏈及輕多肽鏈各自亦包含恆定區(通常為多肽鏈之羧基末端部分)，其可調節抗體與宿主組織或因子之結合，該等宿主組織或因子包括免疫系統之各種細胞、一些吞噬細胞及經典補體系統之第一組份(C1q)。輕多肽鏈及重多肽鏈一般為各自

基本上由可變區(亦即,  $V_L$ 或 $V_H$ )及恆定區(亦即, 在輕多肽鏈之情況下為 $C_L$ , 或在重多肽鏈之情況下為 $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$ 、 $C_{H3}$ 及視情況之 $C_{H4}$ )組成的鏈。

如本文中所用之術語"免疫球蛋白"係指由一或多種大體上由免疫球蛋白基因編碼之多肽組成之蛋白。已識別之免疫球蛋白基因包括不同之恆定區基因以及無數免疫球蛋白可變區基因。免疫球蛋白可以多種形式存在, 例如包括Fv、Fab及 $F(ab)_2$ 以及單鏈(例如, Huston, J.S.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 5879-5883; Bird, R. E.等人, Science 242 (1988) 423-426; 及一般而言, Hood等人, Immunology, Benjamin N.Y., 第2版(1984); 及 Hunkapiller, T.及Hood, L., Nature 323 (1986) 15-16)。在一實施例中, 本發明之免疫球蛋白包含單株抗體及其片段, 例如經分離之重鏈或輕鏈, 或與另一肽或多肽融合之重鏈或輕鏈, 以及其片段。

術語"單體形式之免疫球蛋白"及其同等語法表示未與第二免疫球蛋白分子締合之免疫球蛋白分子, 亦即免疫球蛋白分子未共價或非共價結合至第二免疫球蛋白分子。術語"聚集體形式之免疫球蛋白"及其同等語法表示與至少一個其他免疫球蛋白分子共價或非共價締合之免疫球蛋白分子。聚集體形式之免疫球蛋白可以單峰形式自分子篩層析管柱溶離。如本申請案中所用之術語"單體形式"及其同等語法未必表示100%之免疫球蛋白分子均係以單體形式存在。其另外表示在免疫球蛋白中, 至少90%之免疫球蛋白

為單體形式，至少95%之免疫球蛋白為單體形式，至少98%之免疫球蛋白為單體形式，至少99%之免疫球蛋白為單體形式，或99%以上之免疫球蛋白為單體形式。術語"單體及聚集體形式"表示未與其他免疫球蛋白分子締合之免疫球蛋白分子及與其他免疫球蛋白分子締合之免疫球蛋白分子的混合物。在此混合物中，單體形式及聚集體形式均非單獨存在。

如本申請案中所用之術語"100%"表示指定組份以外之組份的量低於與指定條件下之分析方法相關之偵測極限。

如本申請案中所用之術語"90%"、"95%"、"98%"、"99%"並非表示確切值而是在與指定條件下之分析方法相關之準確度範圍內之值。

一般層析法及其用途為熟習此項技術者所已知。例如參見 Chromatography, 第5版, A部分: Fundamentals and Techniques, Heftmann, E.(編), Elsevier Science Publishing Company, New York, (1992); Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences, Deyl, Z.(編), Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, (1998); Chromatography Today, Poole, C. F.及 Poole, S. K., Elsevier Science Publishing Company, New York, (1991); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (1982); Sambrook, J. 等人(編), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; 或 Current Protocols in

Molecular Biology, Ausubel, F. M.等人(編), John Wiley & Sons, Inc., New York。

對於純化重組產生之免疫球蛋白而言，常使用不同管柱層析步驟之組合。通常在蛋白A親和層析法之後進行一或兩個其他分離步驟。最終純化步驟為所謂"精純步驟"，其係用於移除痕量雜質及污染物，如聚集體免疫球蛋白、殘餘HCP(宿主細胞蛋白)、DNA(宿主細胞核酸)、病毒或內毒素。對於此精純步驟而言，常使用流過模式之陰離子交換材料。

如本發明中所用之術語"流過模式"及其同等語法表示純化方法(例如，層析法)之運作模式，例如：其中使含有待純化之所關注物質(例如，單體形式之免疫球蛋白)之溶液與固定相(較佳為固體)接觸，藉此使所關注之物質不結合至該固定相。因此，所關注之物質係在流出液(若純化方法為層析法)或上清液(若純化方法為分批操作法)中獲得。亦存在於溶液中之非所關注物質(例如，聚集體形式之免疫球蛋白)則結合至固定相，且以此方式自溶液移除。此未必表示100%之非所關注物質均自溶液移除，而是基本上100%之非所關注物質被移除，亦即至少50%之非所關注物質自溶液移除，至少75%之非所關注物質自溶液移除，至少90%之非所關注物質自溶液移除，或95%以上之非所關注物質自溶液移除。

如本申請案中所用之術語"施用至"及其同等語法表示純化方法之部分步驟，其中使含有待純化之所關注物質之溶

液與固定相接觸。此表示 a) 將溶液添加至固定相安置於其中之層析裝置，或 b) 將固定相添加至溶液。在情況 a) 中，使含有待純化之所關注物質之溶液穿過固定相，從而允許固定相與溶液中物質之間的相互作用。視諸如 pH 值、導電率、鹽濃度、溫度及 / 或流動速率之條件而定，溶液中的一些物質結合至固定相，且由此自溶液移除。其他物質保留在溶液中。保留在溶液中物質可在流出液中找到。"流出液" 表示穿過層析裝置後所獲得之溶液。較佳地，層析裝置為管柱或卡匣。在一實施例中，層析步驟為管柱層析法，亦即於管柱中使用固相之層析步驟；或卡匣層析法，亦即於卡匣中使用固相之層析步驟。在較佳實施例中，卡匣層析法於卡匣中使用膜。在一實施例中，未結合至固定相之所關注物質可藉由熟習此項技術者熟悉之方法自流出液回收，諸如沈澱、鹽析、超濾、透濾、凍乾、親和層析法或縮減溶劑體積以獲得濃縮溶液。在一較佳實施例中，單體形式之免疫球蛋白係藉由凍乾、超濾或縮減溶劑體積自流出液回收。在情況 b) 中，將例如粉末形式之固定相添加至含有待純化之所關注物質之溶液中，從而允許固定相與溶液中物質之間的相互作用。在相互作用之後，(例如) 藉由過濾移除固定相，且在上清液中獲得未結合至固定相之所關注物質。

如本申請案中所用之術語"不結合至"及其同等語法表示在與固定相(例如，離子交換材料)接觸時，所關注之物質(例如，免疫球蛋白)保留在溶液中。此未必表示 100% 之所

關注物質均保留在溶液中，而是基本上100%之所關注物質保留在溶液中，亦即至少50%之所關注物質保留在溶液中且不結合至固定相，至少65%之所關注物質保留在溶液中且不結合至固定相，至少80%之所關注物質保留在溶液中且不結合至固定相，至少90%之所關注物質保留在溶液中且不結合至固定相，或95%以上之所關注物質保留在溶液中且不結合至固定相。

如本申請案中所用之術語"經緩衝"表示已用緩衝物質調整因添加或稀釋酸性或鹼性物質所引起之pH值變化的溶液。包含緩衝物質之溶液為"經緩衝溶液"。任何產生該作用之緩衝物質均可使用。在一實施例中，使用醫藥學上可接受之緩衝物質，諸如磷酸及其鹽、檸檬酸及其鹽、嗎啉、2-(N-嗎啉基)乙烷磺酸及其鹽、組胺酸及其鹽、甘胺酸及其鹽、或參-(羥基甲基)胺基甲烷(TRIS)及其鹽。在一較佳實施例中，緩衝物質為磷酸及/或其鹽、檸檬酸及/或其鹽、或組胺酸及/或其鹽。視情況，經緩衝溶液可包含其他鹽，諸如氯化鈉、硫酸鈉、氯化鉀、硫酸鉀、檸檬酸鈉或檸檬酸鉀。在一實施例中，經緩衝溶液包含氯化鈉或氯化鉀。

如本發明中所用之術語"結合-併行-溶離模式"表示純化方法之運作模式，其中使含有待純化之所關注物質之溶液與固定相(較佳固相)接觸，藉此使所關注物質結合至固定相。因此，所關注物質保留在固定相上，而非所關注物質隨流出液或上清液而移除。隨後視情況在洗滌步驟之後在

第二步驟中自固定相溶離所關注物質且藉此隨溶離溶液自固定相回收。

為將單體形式之免疫球蛋白與聚集體形式之免疫球蛋白分離，通常使用以結合-併行-溶離模式運作之使用陽離子交換材料之層析法，例如參見WO 2006/125599。現已意外發現，以流過模式運作之陽離子交換材料可用於自含有單體及聚集體形式之免疫球蛋白的溶液移除聚集體形式之免疫球蛋白。使用此純化免疫球蛋白之方法，可以快速且簡易之方式自含有單體形式與聚集體形式之免疫球蛋白之混合物的溶液移除聚集體形式之免疫球蛋白。

因此，本發明報導一種純化免疫球蛋白之方法，其中該方法包含以下步驟：

a)將包含單體及聚集體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在藉以使單體形式之免疫球蛋白不與陽離子交換材料結合之條件下施用至陽離子交換材料，及在與陽離子交換材料接觸後自溶液回收單體形式之免疫球蛋白。

更詳言之，本發明包含一種自包含單體及聚集體形式之免疫球蛋白的溶液獲得單體形式免疫球蛋白之方法，藉此該方法包含以下步驟：將包含單體及聚集體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在藉以使單體形式之免疫球蛋白不與陽離子交換材料結合之條件下施用至陽離子交換材料，及在與陽離子交換材料接觸後自溶液回收單體形式之免疫球蛋白。在一實施例中，該步驟為以流過模式運作之層析步驟。在另一實施例中，該陽離子交換材料為膜陽離子交換

材料。

如本申請案中所用之術語"使單體形式之免疫球蛋白不與陽離子交換材料結合之條件"及其同等語法表示在與陽離子交換材料接觸時，單體形式之免疫球蛋白保留在溶液中。此未必表示100%單體形式之免疫球蛋白均保留在溶液中，而是基本上100%之單體形式免疫球蛋白保留在溶液中且不與陽離子交換材料結合，亦即至少50%之單體形式免疫球蛋白保留在溶液中且不與陽離子交換材料結合，至少65%之單體形式免疫球蛋白保留在溶液中且不與陽離子交換材料結合，至少80%之單體形式免疫球蛋白保留在溶液中且不與陽離子交換材料結合，至少90%之單體形式免疫球蛋白保留在溶液中且不與陽離子交換材料結合，或95%以上之單體形式免疫球蛋白保留在溶液中且不與陽離子交換材料結合。該等條件(例如)在一實施例中為pH 5至pH 8之經緩衝水溶液之pH值及/或在另一實施例中為1.0 mS/cm至15 mS/cm，較佳4.0 mS/cm至10.0 mS/cm之經緩衝水溶液的導電率。

在本發明之一實施例中，純化免疫球蛋白之方法包含以下步驟：將包含單體及聚集體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在藉以使單體形式之免疫球蛋白不結合至膜陽離子交換材料之條件下施用至膜陽離子交換材料，及自膜陽離子交換材料之流出液回收單體形式之免疫球蛋白。

在此實施例中，純化方法為以流過模式運作之層析法，其允許快速純化免疫球蛋白，因為所需單體形式之免疫球

蛋白可易於自管柱流出液獲得，從而無需諸如洗滌管柱、溶離結合物質或使經溶離免疫球蛋白溶液脫鹽之其他步驟。

本發明之方法可以單步驟方法形式使用或與其他步驟組合使用，諸如在一實施例中與陰離子交換層析步驟，或在另一實施例中與親和層析步驟組合使用。

因此，本發明之一實施例為一種純化免疫球蛋白之方法，其中該方法包含以下連續步驟：

b)將包含單體及聚集體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在藉以使免疫球蛋白不與陰離子交換材料結合之條件下施用至陰離子交換層析管柱，及自陰離子交換管柱之流出液以經緩衝水溶液形式回收單體及聚集體形式之免疫球蛋白；及

a)將步驟b)中獲得之包含單體及聚集體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在藉以使單體形式之免疫球蛋白不與陽離子交換材料結合之條件下施用至陽離子交換材料，及在與陽離子交換材料接觸後自溶液回收單體形式之免疫球蛋白。

在一實施例中，步驟b)為以流過模式運作之層析法。在另一實施例中，步驟a)為以流過模式運作之層析法。在另一實施例中，步驟a)中之該陽離子交換材料為膜陽離子交換材料。步驟b)之條件為熟習此項技術者所已知。使用步驟b)，可能減少含免疫球蛋白之溶液中之宿主細胞蛋白(HCP)、蛋白A、內毒素及/或病毒的量。亦可能顛倒兩個

離子交換步驟之次序。在將溶液施用於純化方法之一個步驟(或後續步驟)之前，必須調整諸如溶液pH值或導電率之參數。在一實施例中，步驟a)中所施用水溶液之pH值為pH 4至pH 8，較佳為pH 5至pH 8。在另一實施例中，水溶液之導電率為4.0 mS/cm至10.0 mS/cm。

另外，在一實施例中，本發明包含一種純化免疫球蛋白之方法，其中該方法包含以下連續步驟：

a)將包含單體及聚集體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在藉以使單體形式之免疫球蛋白不與陽離子交換材料結合之條件下施用至陽離子交換材料，及在與陽離子交換材料接觸後自溶液回收單體形式之免疫球蛋白；及

c)將步驟a)之包含單體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在藉以使免疫球蛋白不與陰離子交換材料結合之條件下施用至陰離子交換層析管柱，及自陰離子交換層析管柱之流出液回收單體形式之免疫球蛋白。

在一實施例中，步驟c)為以流過模式運作之層析法。在另一實施例中，步驟a)為以流過模式運作之層析法。在另一實施例中，步驟a)中之該陽離子交換材料為膜陽離子交換材料。其可有助於(例如)移除宿主細胞蛋白團塊及使用親和層析法培養最初純化步驟中之副產物。

本發明之一實施例為一種包含以下次序之以下步驟的方法：

d)將包含單體及聚集體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在藉以使免疫球蛋白與親和管柱結合之條件下施用至親

和管柱，及自親和管柱以經緩衝水溶液形式回收單體及聚集體形式之免疫球蛋白；及

b)視情況將步驟d)中獲得之包含單體及聚集體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在藉以使免疫球蛋白不與陰離子交換材料結合之條件下施用至陰離子交換層析管柱，及自陰離子交換管柱之流出液以經緩衝水溶液形式回收單體及聚集體形式之免疫球蛋白；及

a)將步驟d)中獲得之或步驟b)中獲得之包含單體及聚集體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在藉以使單體形式之免疫球蛋白不與陽離子交換材料結合之條件下施用至陽離子交換材料，及在與陽離子交換材料接觸後自溶液回收單體形式之免疫球蛋白。

在一實施例中，步驟b)為以流過模式運作之層析法。在另一實施例中，步驟a)為以流過模式運作之層析法。在另一實施例中，步驟d)係以結合-併行-溶離模式運作。在另一實施例中，該陽離子交換材料為膜陽離子交換材料。親和管柱可為(例如)蛋白A親和管柱、蛋白G親和管柱、疏水性電荷感應層析管柱(HCIC)或疏水性相互作用層析管柱(HIC，例如使用苯基-瓊脂糖、氮雜親砂性樹脂或間胺基苯基酮酸)。較佳地，親和管柱為蛋白A管柱或HCIC管柱。

在另一實施例中，將步驟b)中之包含單體形式及聚集體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液及/或步驟c)中之包含單體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在藉以使免疫球蛋白

不與陰離子交換材料結合之條件下施用至陰離子交換層析管柱，且自陰離子交換材料以經緩衝水溶液形式回收。

本發明之一態樣為一種自包含單體及聚集體形式之免疫球蛋白的溶液獲得單體形式免疫球蛋白之方法，藉此該方法包含以下步驟：

a)以流過模式運作之層析步驟，其包含將包含單體形式及聚集體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在藉以使單體形式之免疫球蛋白不與陽離子交換材料結合之條件下施用至膜陽離子交換材料，自膜陽離子交換材料之流出液回收單體形式之免疫球蛋白。

在一實施例中，本發明之方法在步驟a)之前包含以下步驟：

b)以流過模式運作之層析步驟，其包含將包含單體及聚集體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在藉以使免疫球蛋白不與陰離子交換材料結合之條件下施用至陰離子交換層析管柱，及自陰離子交換管柱之流出液以經緩衝水溶液形式回收單體及聚集體形式之免疫球蛋白。

在一實施例中，本發明之方法在步驟a)之後包含以下步驟：

c)以流過模式運作之層析步驟，其包含將步驟a)中獲得之包含單體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在藉以使免疫球蛋白不與陰離子交換材料結合之條件下施用至陰離子交換層析管柱，及自陰離子交換層析管柱之流出液回收單體形式之免疫球蛋白。

在另一實施例中，本發明之方法在步驟a)或步驟b)之前包含以下步驟：

d)以結合-併行-溶離模式運作之層析步驟，其包含將包含單體及聚集體形式之免疫球蛋白的經緩衝水溶液在藉以使免疫球蛋白與親和管柱結合之條件下施用至親和管柱，及自親和管柱以經緩衝水溶液形式回收單體及聚集體形式之免疫球蛋白。

在另一實施例中，自流出液回收單體形式之該免疫球蛋白係藉由選自以下之方法：沈澱、鹽析、超濾、透濾、凍乾、親和層析法或縮減溶劑體積以獲得濃縮溶液。較佳地，該回收係藉由超濾、凍乾或縮減溶劑體積。

在一實施例中，免疫球蛋白係自膜陽離子交換材料之流出液獲得，至少95%之免疫球蛋白為單體形式。在另一實施例中，至少90%單體形式之免疫球蛋白不與陽離子交換材料結合。

在另一實施例中，經緩衝水溶液之pH值為pH 5至pH 8。在另一實施例中，經緩衝水溶液之導電率為4.0 mS/cm至10.0 mS/cm。在一實施例中，經緩衝溶液為包含磷酸或其鹽、檸檬酸或其鹽、或組胺酸或其鹽之溶液。在另一實施例中，水溶液包含氯化鈉或氯化鉀。

在一實施例中，膜陽離子交換材料為經磺酸基團或羧甲基改質之以聚醚砜為主之膜或以再生纖維素為主之膜。在另一實施例中，層析步驟為管柱層析法或卡匣層析法。

提供以下實例及圖式以助於理解本發明，其真實範疇陳

述於隨附申請專利範圍中。應瞭解，可在不背離本發明精神之情況下對所闡述程序進行修改。

## 實例

### 材料及方法：

#### 經調理之蛋白 A 溶離液：

在第一步驟中使用蛋白 A 親和層析法純化抗-(IL-13R $\alpha$ 1) 抗體(下文中稱為 mAb IL13，例如參見 WO 2006/072564)及抗-Her2 抗體(下文中稱為 mAb Her2，例如參見 US 5,677,171)。

在酸性條件下(3.5 mM 鹽酸，pH 值 2.7  $\pm$  0.2)自蛋白 A 管柱溶離 mAb IL13。在過濾步驟之前，將含有免疫球蛋白之溶離份的 pH 值以 pH 9.0 之濃縮(例如，1 M)緩衝溶液(例如，參(羥基甲基)胺基-甲烷(TRIS)或磷酸鹽緩衝液)調節至 pH 5.0。此材料在下文中稱為 mAb IL13 之經調理之蛋白 A 溶離液。

在第一步驟中使用蛋白 A 親和層析法純化 mAb Her2。在酸性條件下(10 mM 檸檬酸鈉緩衝液，pH 值為 3.0  $\pm$  0.5)進行自蛋白 A 管柱之溶離。在過濾步驟之前，將含有免疫球蛋白之溶離份的 pH 值以濃縮參(羥基甲基)胺基甲烷(TRIS)緩衝液調節至 pH 5.6。此材料在下文中稱為 mAb Her2 之經調理之蛋白 A 溶離液。

### 分析方法：

#### 分子篩層析法：

樹脂： TSK 3000 (Tosohaas)

管柱： 300×7.8 mm

流動速率： 0.5 ml/min

緩衝液： 含有 250 mM 氯化鉀之 200 mM 磷酸鉀，經調節至 pH 7.0

波長： 280 nm

DNA-臨限系統： 例如參見 Merrick, H. 及 Hawlitschek, G.,  
Biotech Forum Europe 9 (1992) 398-403

蛋白 A ELISA： 將微量滴定盤之孔用源自雞之多株抗蛋白 A-IgG 塗佈。結合之後，藉由用樣本緩衝液洗滌來移除未反應抗體。對於蛋白 A 結合而言，向孔中添加確定樣本體積。樣本中所存在之蛋白 A 由雞抗體結合且滯留於盤孔中。培育之後，移除樣本溶液且洗滌各孔。隨後添加源自雞之多株抗蛋白 A-IgG 生物素共軛物及抗生蛋白鏈菌素過氧化酶共軛物以用於偵測。在另一洗滌步驟之後，添加基質溶液，導致形成有色反應產物。顏色強度與樣本中之蛋白質 A 含量成比例。在確定時間之後，停止反應且量測吸光度。

宿主細胞蛋白 (HCP) ELISA：

將微量滴定盤之孔壁用血清白蛋白與抗生蛋白鏈菌素之混合物塗佈。使源自山羊之抗 HCP 多株抗體結合至微量滴定盤之

孔壁。在洗滌步驟之後，以不同濃度之HCP校正序列及樣本溶液培育微量滴定盤之不同孔。培育之後，藉由用緩衝溶液洗滌來移除未結合之樣本材料。為進行偵測，以抗體過氧化酶共軛物培育各孔以偵測結合之宿主細胞蛋白。藉由以ABTS培育且於405 nm下偵測來偵測固定過氧化酶活性。

## 實例 1

### mAb IL13純化為單體形式-條件比較

在將mAb IL13純化為單體形式中，評估不同條件。

純化方法係以流過模式之層析純化方法形式運作。評估流過純化mAb IL13之不同條件。使用Mustang™ S-吸附劑系統 (Mustang™ S Coin, 1.5 cm<sup>2</sup> 膜面積, Pall Corporation, USA)作為膜陽離子交換材料。

經調理之蛋白A溶離液具有7.1 g/l之mAb IL13濃度，其中90.9%為單體形式之免疫球蛋白且9.1%為聚集體形式之免疫球蛋白。在實驗之前，經調理之蛋白A溶離液已經病毒滅活且經0.2 μm之微孔過濾器過濾。在用相應緩衝液稀釋至大約1 mg/ml之蛋白濃度(大約1:7(v/v)之比率)、調整pH值及導電率之後，將溶液施用至膜陽離子交換材料。若必需，可用磷酸氫鉀或磷酸二氫鉀調整pH值，且藉由添加KCl或去離子水(pH值分別為大約5.5及7.5)來調整導電率。該經稀釋、調節及調理之蛋白A溶離液在下文中稱為樣本

材料。

多樣化參數為導電率及pH值。所觀察之參數為單體形式樣本材料所流出免疫球蛋白的產率及純度。樣本材料之多樣化參數概述於表1中。

表1：樣本材料參數

樣本編號	pH值	緩衝液	導電率[mS/cm]
1	5.5	40 mM磷酸鉀	4.8
2	6.5	40 mM磷酸鉀	4.8
3	7.5	40 mM磷酸鉀	4.8
4	5.5	50 mM磷酸鉀	5.8
5	6.5	50 mM磷酸鉀	5.8
6	7.5	50 mM磷酸鉀	5.8
7	5.5	60 mM磷酸鉀	6.8
8	6.5	60 mM磷酸鉀	6.8
9	7.5	60 mM磷酸鉀	6.8

藉由分子篩層析法來分析流出液，以測定單體形式及聚集體形式之免疫球蛋白的量。選擇第二溶離份進行分析，因為在製程開始時(第一溶離份)，由於層析系統之無益體積無法產生穩定流，以致此第一溶離份中含有未知稀釋液，故未建立穩定的純化製程。例示性流過模式圖描述於圖1中。結果概述於表2中。樣本材料及溶離份2(pH 6.5, 5.8 mS/cm)之分子篩層析圖展示於圖2a)及2b)中。

表 2：使用 Mustang™ S 膜之單體形式之 mAb IL13 免疫球蛋白(根據 SEC 層析法之面積百分比)及產率

pH值 → 導電率 [mS/cm]↓	5.5		6.5		7.5	
	單體形式 mAb IL13	產率	單體形式 mAb IL13	產率	單體形式 mAb IL13	產率
4.8	100%	33.6%	100%	82.5%	75%	94.4%
5.8	100%	65.7%	100%	90.9%	0%	100%
6.8	100%	67.9%	99%	91.1%	0%	-

表 2 中所呈現之資料展示可調節適於在優良產率下純化 mAb IL13(亦即，將單體形式與聚集體形式之免疫球蛋白分離)之條件，亦即使單體形式之免疫球蛋白不結合至膜陽離子交換材料之條件，諸如 5.8 mS/cm 之導電率及 6.5 之 pH 值。

## 實例 2

### mAb IL13 純化為單體形式-膜比較

實例 1 中所獲得之結果普遍適用且適用於膜陽離子交換材料 Sartobind™ S(75 cm<sup>2</sup> 膜面積，Sartorius AG, Göttingen, Germany)。對於 Mustang™ S 之較佳條件(亦即，5.8 mS/cm 之導電率及 6.5 之 pH 值)亦適用於 Sartobind™ 材料。含有 mAb IL13 之樣本材料具有 1.34 mg/ml 之蛋白濃度，其中 94.8% 為單體形式之免疫球蛋白且 5.2% 為聚集體形式之免疫球蛋白。將樣本材料施用於實例 1 中所報導之膜。純化製程之結果概述於表 3 中。

表 3：使用 Sartobind™ S膜之單體及聚集體形式之 mAb IL13 免疫球蛋白(根據 SEC 層析法之面積百分比)及產率

樣本編號	mAb IL13之樣本量	樣本體積	流出液中單體形式之 mAb IL13				流出液中聚集體形式之 mAb IL13	
			總濃度	面積百分比	量	產率	面積百分比	量
1	14.71 mg	11 ml	0.029 mg/ml	100%	1.02 mg	6.9%	bdl	-
2	14.71 mg	11 ml	0.51 mg/ml	99%	5.59 mg	38.0%	1.00%	0.06 mg
3	14.71 mg	11 ml	0.89 mg/ml	97.6%	9.54 mg	64.9%	2.45%	0.24 mg
4	14.71 mg	11 ml	0.94 mg/ml	97.5%	10.03 mg	68.2%	2.53%	0.26 mg
5	14.71 mg	11 ml	0.94 mg/ml	97.8%	10.11 mg	68.7%	2.17%	0.22 mg
6	14.71 mg	11 ml	0.94 mg/ml	97.9%	10.16 mg	69.1%	2.07%	0.22 mg
7	14.71 mg	11 ml	0.95 mg/ml	97.5%	10.14 mg	68.9%	2.54%	0.26 mg
樣本 4至7 之平均值	14.71 mg	11 ml	0.94 mg/ml	97.7%	10.11 mg	68.7%	2.33%	0.24 mg

bdl=在偵測極限以下

將相同樣本材料亦施用於 Sartobind™ C膜。結果呈現於表 4 中且第三溶離份之例示性分子篩層析圖展示於圖 3 中。

表 4：使用 Sartobind™ C 膜之單體及聚集體形式之 mAb IL13 免疫球蛋白(根據 SEC 層析法之面積百分比)及產率

樣本 編號	mAb IL13 之樣本量	樣本 體積	流出液中單體形式之 mAb IL13				流出液中聚集體形 式之 mAb IL13	
			總濃度	面積 百分比	量	產率	面積 百分比	量
1	14.71 mg	11 ml	0 mg/ml	bdl	-	-	bdl	-
2	14.71 mg	11 ml	0.033 mg/ml	100%	0.36 mg	2.4%	bdl	-
3	14.71 mg	11 ml	0.56 mg/ml	100%	6.15 mg	41.8%	bdl	-
4	14.71 mg	11 ml	0.87 mg/ml	99.4%	9.54 mg	64.9%	0.65%	0.06 mg
5	14.71 mg	11 ml	0.93 mg/ml	99.3%	10.20 mg	69.3%	0.66%	0.07 mg
6	14.71 mg	11 ml	0.96 mg/ml	98.9%	10.43 mg	70.9%	1.13%	0.12 mg
7	14.71 mg	11 ml	0.98 mg/ml	98.9%	10.66 mg	72.5%	1.08%	0.12 mg
樣本4至7 之平均值	14.71 mg	11 ml	0.94 mg/ml	99.1%	10.21 mg	69.4%	0.88%	0.09 mg

bdl=在偵測極限以下

-=未測定

藉由在所有實驗中使用以一種膜材料確定之純化條件，所有已證實之陽離子膜吸附劑將具有在相同條件之流過模式運作中移除聚集體及獲得單體 IgG 之能力。

### 實例 3

#### mAb Her2 純化為單體形式-膜比較

經調理之蛋白 A 溶離液具有 7.61 g/l 之 mAb Her2 濃度，純度為 98.8%。藉由將 mAb Her2 溶液加熱至 37°C 歷時 3 天來產生/獲得聚集體形式之免疫球蛋白。在不考慮經熱處理樣本中所存在之低分子量物質的情況下，熱處理後溶液含有 99.0% 單體形式之免疫球蛋白及 1.0% 聚集體形式之免疫球蛋白。在實驗之前，經調理之蛋白 A 溶離液已經病毒滅活

且經 0.2  $\mu\text{m}$  之微孔過濾器過濾。在稀釋至 1.03 mg/ml 之蛋白濃度、pH 值及導電率調節之後，將溶液分別施用至膜陽離子交換材料 Sartobind™ S 及 C。導電率之調節係藉由添加 NaCl (5 mol/l) 來完成。結果展示於表 5 及 6 中。

表 5：使用 Sartobind™ S 膜之單體及聚集體形式之 mAb Her2 免疫球蛋白 (根據 SEC 層析法之面積百分比) 及產率

樣本編號	mAb Her2 之樣本量	樣本體積	流出液中單體形式之 mAb Her2				流出液中聚集體形式之 mAb Her2	
			總濃度	面積百分比	量	產率	面積百分比	量
1	11.35 mg	11 ml	0.053 mg/ml	40.4%	0.23 mg	0.02%	bdl	-
2	11.35 mg	11 ml	0.600 mg/ml	99.2%	6.47 mg	57.0%	bdl	-
3	11.35 mg	11 ml	0.908 mg/ml	99.8%	9.86 mg	86.9%	0.02%	0.002 mg
4	11.35 mg	11 ml	0.977 mg/ml	99.9%	10.60 mg	93.4%	0.03%	0.003 mg
5	11.35 mg	11 ml	0.999 mg/ml	99.8%	10.83 mg	95.4%	bdl	-
6	11.35 mg	11 ml	1.013 mg/ml	99.9%	10.99 mg	96.8%	bdl	-
7	11.35 mg	11 ml	1.019 mg/ml	99.8%	10.04 mg	88.5%	0.05%	0.006 mg
8	11.35 mg	11 ml	1.023 mg/ml	99.9%	11.10 mg	97.8%	0.08%	0.009 mg
9	11.35 mg	11 ml	1.025 mg/ml	99.8%	11.12 mg	98.0%	0.14%	0.016 mg
10	11.35 mg	11 ml	1.024 mg/ml	99.8%	11.11 mg	97.9%	0.17%	0.019 mg
11	11.35 mg	11 ml	1.025 mg/ml	99.7%	11.11 mg	97.9%	0.18%	0.020 mg
12	11.35 mg	11 ml	1.027 mg/ml	99.7%	11.13 mg	98.1%	0.23%	0.026 mg
13	11.35 mg	11 ml	1.028 mg/ml	99.7%	11.13 mg	98.1%	0.24%	0.027 mg
14	11.35 mg	11 ml	1.028 mg/ml	99.6%	11.13 mg	98.1%	0.30%	0.034 mg
15	11.35 mg	11 ml	1.027 mg/ml	99.6%	11.30 mg	99.6%	0.32%	0.036 mg
樣本4至15之平均值	11.35 mg	11 ml	1.018 mg/ml	99.8%	10.97 mg	96.7%	0.14%	0.016 mg

bdl=在偵測極限以下

-=未測定

表6：使用Sartobind™ C膜之單體及聚集體形式之mAb Her2免疫球蛋白(根據SEC層析法之面積百分比)及產率

樣本編號	mAb Her2之樣本量	樣本體積	流出液中單體形式之mAb Her2				流出液中聚集體形式之mAb Her2	
			總濃度	面積百分比	量	產率	面積百分比	量
1	11.35 mg	11 ml	0.082 mg/ml	74.8%	0.67 mg	5.9%	bdl	-
2	11.35 mg	11 ml	0.656 mg/ml	99.1%	7.07 mg	62.3%	bdl	-
3	11.35 mg	11 ml	0.861 mg/ml	99.7%	9.32 mg	82.1%	bdl	-
4	11.35 mg	11 ml	0.929 mg/ml	99.7%	10.06 mg	88.6%	0.04%	0.004 mg
5	11.35 mg	11 ml	0.965 mg/ml	99.7%	10.45 mg	92.1%	0.09%	0.01 mg
6	11.35 mg	11 ml	0.992 mg/ml	99.7%	10.47 mg	92.2%	0.15%	0.015 mg
7	11.35 mg	11 ml	1.004 mg/ml	99.8%	10.88 mg	95.9%	0.14%	0.015 mg
8	11.35 mg	11 ml	1.014 mg/ml	99.7%	10.98 mg	96.7%	0.24%	0.027 mg
9	11.35 mg	11 ml	1.015 mg/ml	99.7%	10.99 mg	96.8%	0.29%	0.032 mg
10	11.35 mg	11 ml	1.017 mg/ml	99.6%	11.00 mg	96.9%	0.36%	0.04 mg
11	11.35 mg	11 ml	1.019 mg/ml	99.6%	11.03 mg	97.2%	0.43%	0.047 mg
12	11.35 mg	11 ml	1.021 mg/ml	99.5%	11.04 mg	97.3%	0.41%	0.046 mg
13	11.35 mg	11 ml	1.022 mg/ml	99.5%	11.05 mg	97.4%	0.42%	0.047 mg
14	11.35 mg	11 ml	1.024 mg/ml	99.5%	11.07 mg	97.5%	0.51%	0.055 mg
15	11.35 mg	11 ml	1.024 mg/ml	99.5%	11.07 mg	97.5%	0.47%	0.051 mg
樣本4至15之平均值	11.35 mg	11 ml	1.0 mg/ml	99.6%	10.84 mg	95.5%	0.30%	0.032 mg

bdl=在偵測極限以下

-=未測定

Sartobind™ C膜之流出液之溶離份4的例示性分子篩層析法(SEC)分析展示於圖4中。

自上文可概括出pH值與單位為mS/cm之導電率的總和較佳在9至18之範圍內，更佳在10至15之範圍內。

#### 實例4

#### 蛋白A、DNA及HCP含量之分析

分析實例2中所獲得之溶離份的蛋白A、DNA及HCP含量。結果在表7及8中給出。

在施用至Sartobind™ S膜之前溶液中之蛋白A含量為2.6 ng/ml，DNA含量小於0.3 pg/mg，且宿主細胞蛋白(HCP)含量為1791 ng/mg。

表7：使用Sartobind™ S膜獲得之含mAb IL13免疫球蛋白之溶離份的蛋白A、DNA及HCP含量

樣本編號	樣本體積 [ml]	蛋白濃度 [mg/ml]	蛋白A [ng/mg]	DNA [pg/mg]	HCP [ng/mg]
1	11	0.029	< 4.1	< 138	28
2	11	0.513	0.5	< 0.8	< 118
3	11	0.889	< 0.3	< 0.4	< 202
4	11	0.935	0.7	< 0.4	255
5	11	0.939	-	< 0.4	-
6	11	0.943	-	< 0.4	-

-=未測定

在施用至Sartobind™ C膜之前溶液中之蛋白A含量為3.0 ng/ml，DNA含量小於0.4 pg/mg，且宿主細胞蛋白(HCP)含量為5250 ng/mg。

表 8：使用 Sartobind™ C 膜獲得之含 mAb IL13 免疫球蛋白  
之溶離份的蛋白 A、DNA 及 HCP 含量

樣本編號	樣本體積 [ml]	蛋白濃度 [mg/ml]	蛋白 A [ng/mg]	DNA [pg/mg]	HCP [ng/mg]
1	11	0.033	< 4.2	< 13.3	155
2	11	0.559	< 0.2	< 0.7	1036
3	11	0.873	0.3	< 0.5	989
4	11	0.933	0.7	< 0.4	1366
5	11	0.959	n. b.	n. b.	n. b.
6	11	0.979	n. b.	n. b.	n. b.

【圖式簡單說明】

圖 1：使用 Mustang™ S 膜之 mAb IL13 流過模式純化之圖表。

圖 2a 及 2b：a) 樣本材料 mAb IL13 之 SEC (分子篩層析圖) 分析；b) 流出液之溶離份 2 的 SEC 分析。

圖 3：含 mAb IL13 之樣本材料之 Sartobind™ C 膜製程的流出液之溶離份 2 的 SEC 分析。

圖 4：含 mAb Her2 之樣本材料之 Sartobind™ C 膜製程的流出液之溶離份 4 的 SEC 分析。

## 十、申請專利範圍：

1. 一種自包含單體及聚集體形式之免疫球蛋白的溶液獲得單體形式之免疫球蛋白的方法，其特徵在於該方法包含以下步驟：

a)將包含單體及聚集體形式之該免疫球蛋白的經緩衝水溶液在可使至少90%單體形式之該免疫球蛋白不與膜陽離子交換材料結合之條件下，施用至該膜陽離子交換材料，及在與該膜陽離子交換材料接觸後自該經緩衝水溶液回收單體形式之該免疫球蛋白，

其中該步驟a)係以流過模式運作之層析步驟，且步驟a)之該經緩衝水溶液具有pH 4至pH 8之pH值，及步驟a)之該經緩衝水溶液具有1.0 mS/cm至15.0 mS/cm之導電率，及該經緩衝水溶液之pH值與單位為mS/cm之導電率的總和係在10至15之範圍內，

其中該自流出液回收單體形式之該免疫球蛋白之方法係選自：沈澱、鹽析、超濾、透濾、凍乾、親和層析法或縮減溶劑體積以獲得濃縮溶液。

2. 如請求項1之方法，其特徵在於該方法在步驟a)之前包括以下步驟：

b)將包含單體及聚集體形式之該免疫球蛋白的經緩衝水溶液在可使該免疫球蛋白不與陰離子交換材料結合之條件下施用至該陰離子交換材料，及在與該陰離子交換材料接觸後，自該溶液回收單體及聚集體形式之該免疫球蛋白。

3. 如請求項2之方法，其特徵在於該步驟b)係以流過模式運作之層析步驟，其包括將包含單體及聚集體形式之該免疫球蛋白的經緩衝水溶液在可使該免疫球蛋白不與陰離子交換材料結合之條件下施用至該陰離子交換材料，及在與該陰離子交換材料接觸後，自該溶液回收單體及聚集體形式之該免疫球蛋白。
4. 如請求項1至3中任一項之方法，其特徵在於該方法在步驟a)之後包含以下步驟：
  - c)將包含單體形式之該免疫球蛋白的經緩衝水溶液在可使該免疫球蛋白不與陰離子交換材料結合之條件下施用至該陰離子交換材料，及在與該陰離子交換材料接觸後，自該溶液回收單體形式之該免疫球蛋白。
5. 如請求項4之方法，其特徵在於該步驟c)係以流過模式運作之層析步驟，其包括將包含單體形式之該免疫球蛋白的經緩衝水溶液在可使該免疫球蛋白不與陰離子交換材料結合之條件下施用至該陰離子交換材料，及在與該陰離子交換材料接觸後，自該溶液回收單體形式之該免疫球蛋白。
6. 如請求項1至3中任一項之方法，其特徵在於該方法在步驟a)之前或在步驟b)之前包括以下另一步驟：
  - d)將包含單體及聚集體形式之該免疫球蛋白的經緩衝水溶液在可使該免疫球蛋白與親和管柱結合之條件下施用至該親和管柱，及自該親和管柱回收單體及聚集體形式之該免疫球蛋白。

7. 如請求項6之方法，其特徵在於該步驟d)係以結合-及-分離模式運作之層析步驟，其包括將包含單體及聚集體形式之該免疫球蛋白的經緩衝水溶液在可使該免疫球蛋白與親和管柱結合之條件下施用至該親和管柱，及自該親和管柱回收單體及聚集體形式之該免疫球蛋白。
8. 如請求項1之方法，其特徵在於該膜陽離子交換材料為Mustang™ S、Mustang™ C或Sartobind™ S或Sartobind™ C。
9. 如請求項1之方法，其特徵在於該膜陽離子交換材料為經磺酸基團或羧甲基改質之以聚醚砜為主之膜或以再生纖維素為主之膜。
10. 如請求項1至3中任一項之方法，其特徵在於步驟a)之該經緩衝水溶液具有pH 5至pH 8之pH值。
11. 如請求項1之方法，其特徵在於步驟a)之該經緩衝水溶液具有4.0 mS/cm至10.0 mS/cm之導電率。
12. 如請求項1之方法，其特徵在於該回收法係藉由超濾、凍乾或縮減溶劑體積。
13. 如請求項1至3中任一項之方法，其特徵在於在自該膜陽離子交換材料之流出液所獲得之該免疫球蛋白中，至少95%之該免疫球蛋白為單體形式。
14. 如請求項1至3中任一項之方法，其特徵在於該經緩衝水溶液為包含磷酸或其鹽、檸檬酸或其鹽、或組胺酸或其鹽之溶液。
15. 如請求項1至3中任一項之方法，其特徵在於該經緩衝水

溶液包含氯化鈉或氯化鉀。

16. 如請求項1至3中任一項之方法，其特徵在於該層析步驟為管柱層析法或卡匣層析法。

十一、圖式：



圖 1

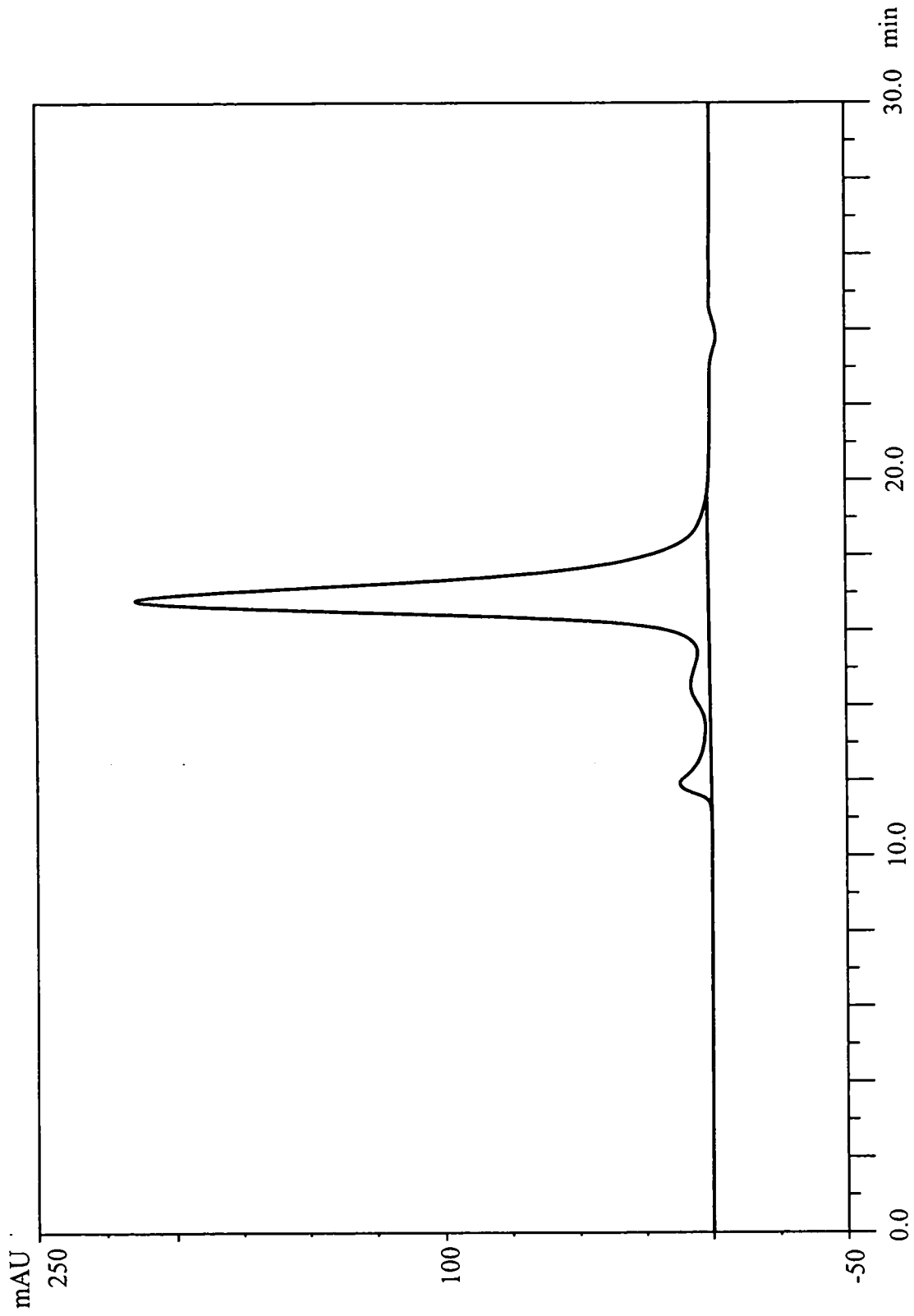


圖 2a

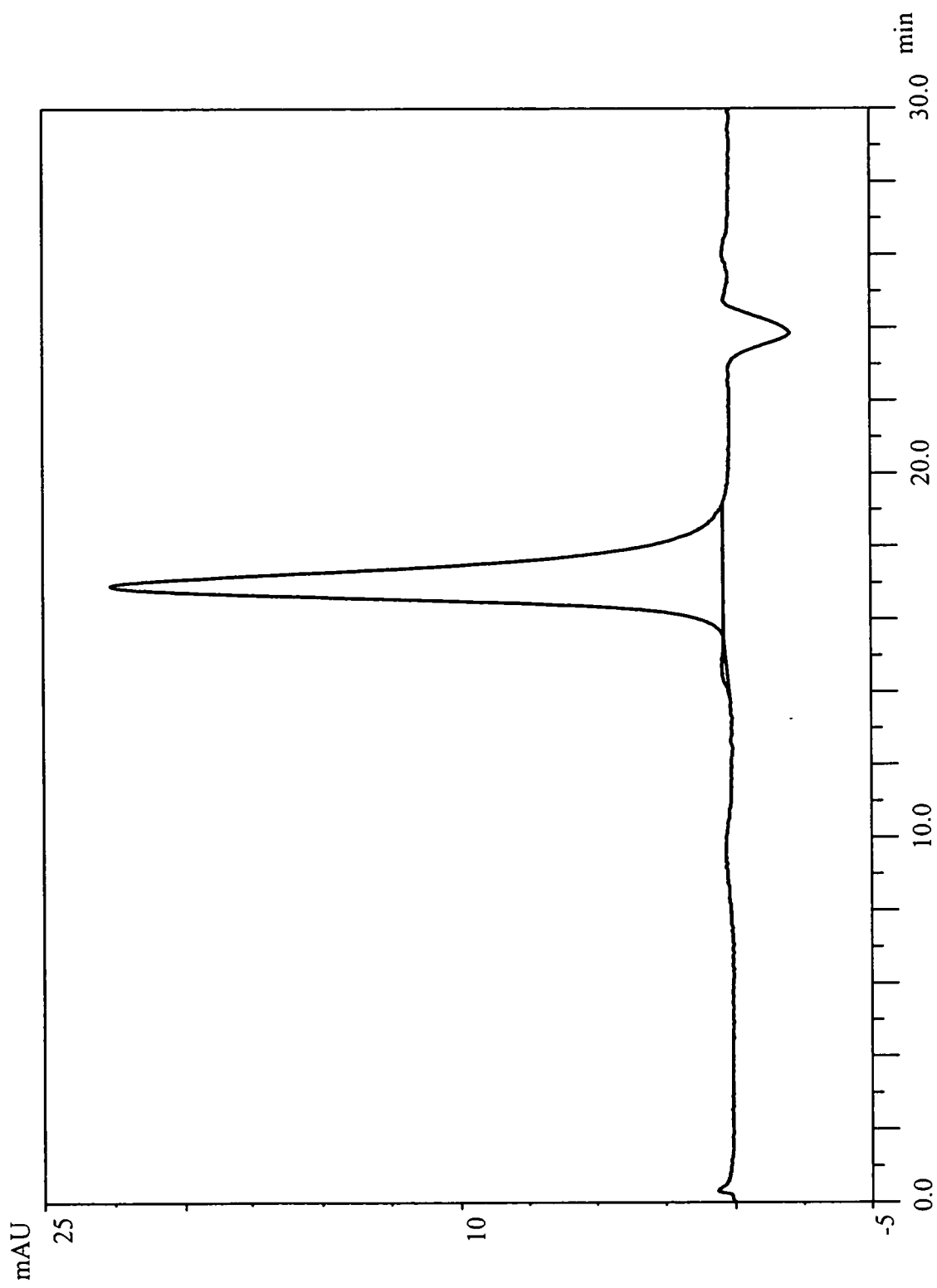


圖 2b)

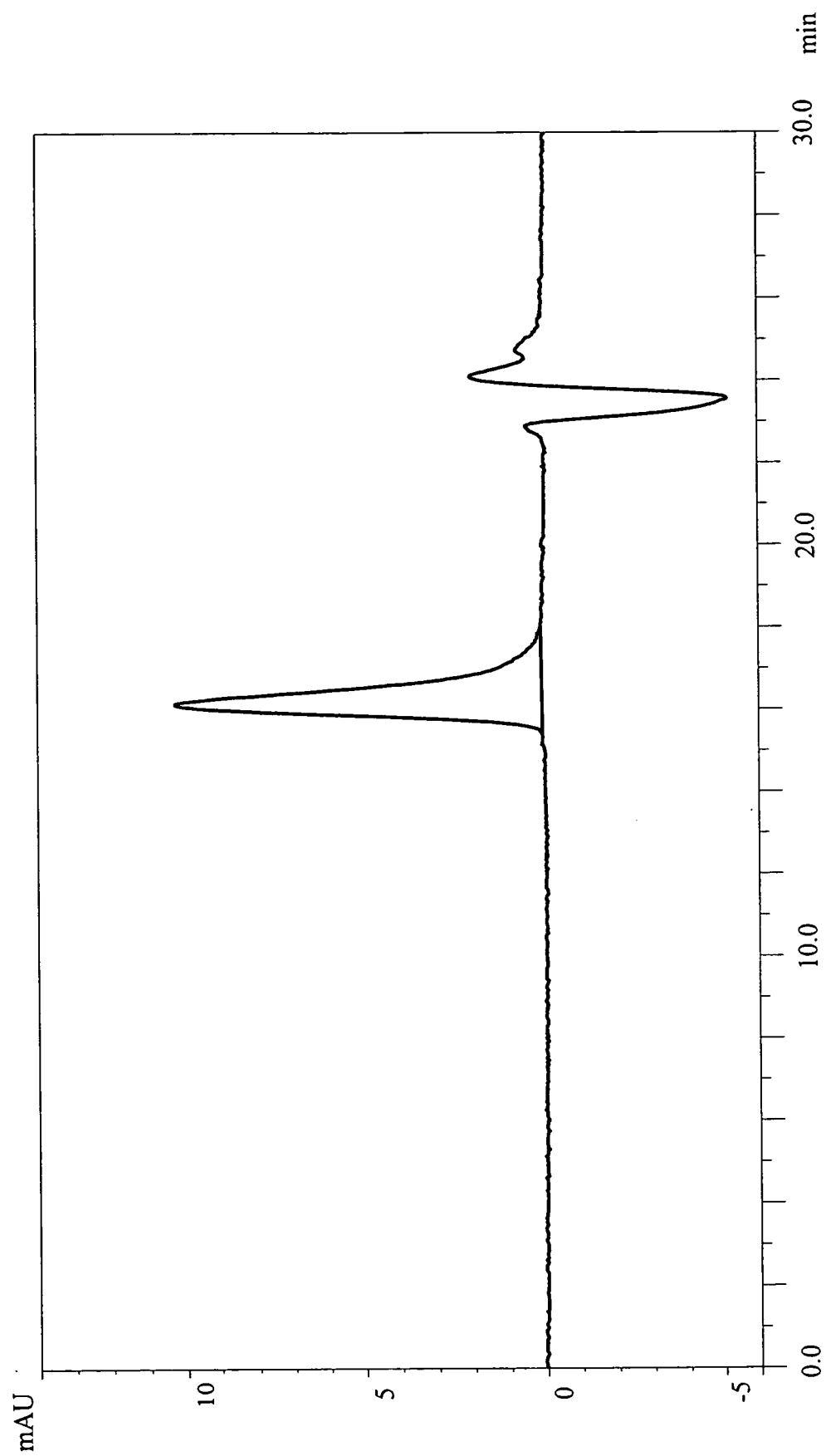


圖 3

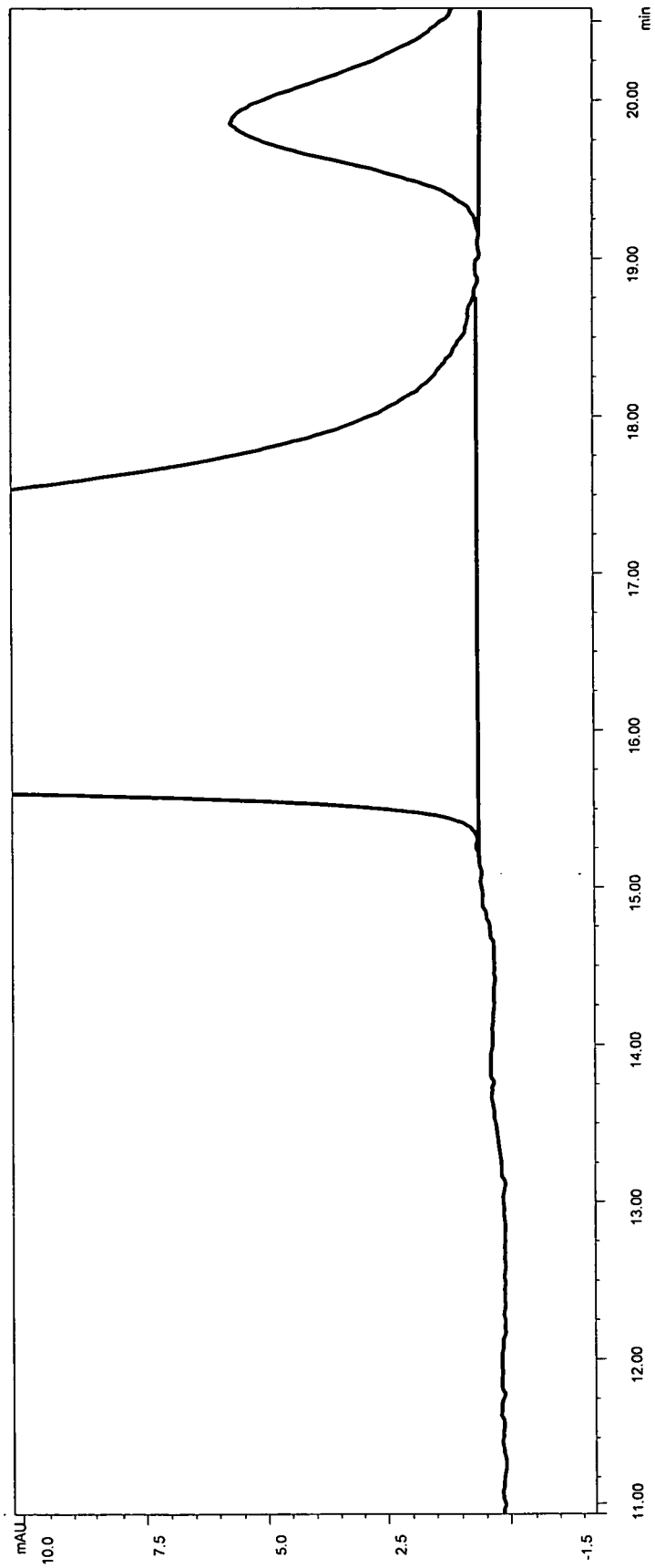


圖 4