



(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 I671312 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 09 月 11 日

(21)申請案號：104101335

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 01 月 15 日

(51)Int. Cl. : C07K1/16 (2006.01)

B01D15/10 (2006.01)

A61L2/08 (2006.01)

(30)優先權：2014/01/17 美國

61/928,906

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

美國

(72)發明人：古德瓦特 拉胡爾 GODAWAT, RAHUL (US)；瓦克古 維那 WARIKOO, VEENA

(US)；帕提爾 羅翰 PATIL, ROHAN (US)；康斯坦丁諾夫 康斯坦丁

KONSTANTINOV, KONSTANTIN (US)；羅伊科拉 凡卡特 RYAKALA, VENKAT

KISHOR (US)；魯哈尼 瑪莎 ROHANI, MAHSA (US)

(74)代理人：林秋琴；陳彥希

(56)參考文獻：

CN 102655919A

CN 102656452A

Warikoo, Veena, et al. "Integrated continuous production of recombinant therapeutic proteins." *Biotechnology and bioengineering* 109.12 (2012): 3018-3029.

Ng, Paul K., and Valerie McLaughlin. "Regeneration studies of anion-exchange chromatography resins." *BioProcess International* 5.5 (2007): 52.

審查人員：劉建宏

申請專利範圍項數：34 項 圖式數：8 共 102 頁

(54)名稱

無菌層析法及製法

(57)摘要

本發明提供用 γ -射線照射的層析樹脂進行層析的方法，其包括提供包含 γ -射線照射的層析樹脂之層析管柱；通過管柱進行第一循環的層析，其中該循環包括將層析樹脂暴露至變性緩衝液；並且通過該管柱進行至少另一層析循環。本發明亦提供整合的、封閉的或基本上封閉的，且連續的重組蛋白製造方法，其包括使用至少一個含有 γ -射線照射的層析樹脂的層析管柱，在該過程之每一循環期間將 γ -射線照射的層析樹脂暴露於變性緩衝液，並於該方法中使用生物負荷量減少的緩衝液。

Provided herein are methods of performing chromatography with gamma-irradiated chromatography resin that include providing a chromatography column including a gamma-irradiated chromatography resin; performing a first cycle of chromatography through the column, where the cycle includes exposing the chromatography resin to a denaturing buffer; and performing at least one additional cycle of chromatography through the column. Also provided are integrated, closed or substantially closed, and continuous processes for manufacturing of a recombinant protein that include the use of at least one chromatography column including gamma-irradiated chromatography resin, where the gamma-irradiated chromatography resin is

exposed to denaturing buffer during each cycle in the process, and reduced bioburden buffer is used in the process.

指定代表圖：

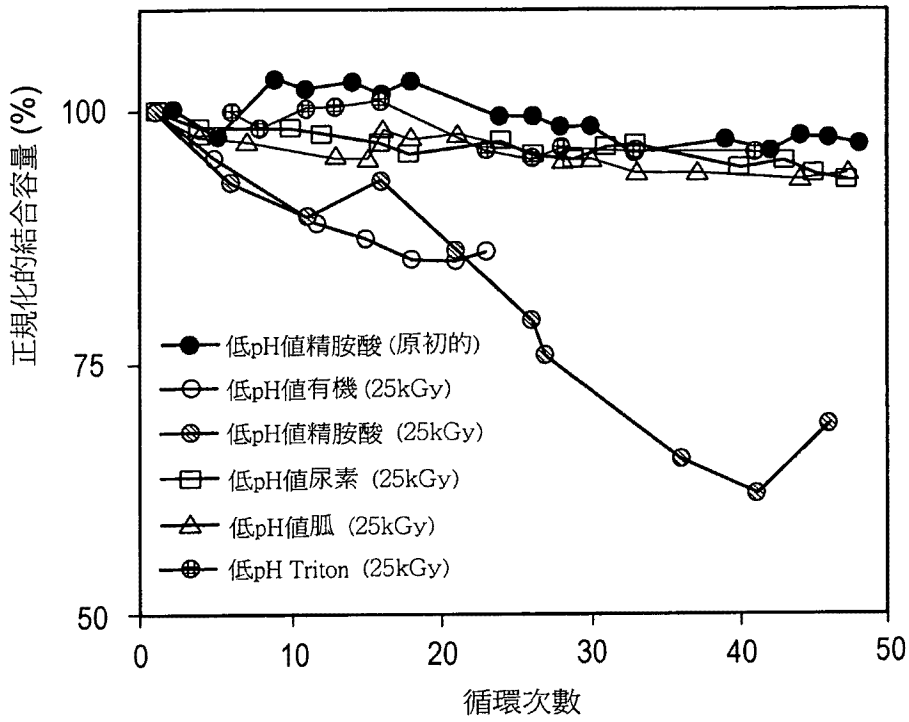


圖 4

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】 無菌層析法及製法

STERILE CHROMATOGRAPHY AND
MANUFACTURING PROCESSES

【技術領域】

【0001】 本發明係關於生物技術和生物製造重組蛋白質的方法。

【先前技術】

【0002】 包含編碼重組蛋白質之核酸的哺乳動物細胞經常被用於生產醫療上或商業上重要的蛋白質。目前多樣的產品生產環境中，生物技術公司愈來愈多被驅使去研發創新具高度彈性與成本上有效之醫療蛋白質藥物製造的解決手段。分離重組蛋白質的有效率的策略之一是透過包括連續層析法(例如，使用封閉系統)的過程。連續層析法的一項已知限制就是系統中存在污染劑(例如，增加的生物負荷量)，其造成系統中受污染的產物、生產率降低、以及流速減低(或壓力增大)。例如，該系統中增加的生物負荷量會造成系統完全停止運作。

【發明內容】

發明的簡要說明

【0003】 本發明至少部分係根據以下發現，即 γ 射線照射層析樹脂會造成該樹脂的結合容量降低(例如，經過數個層析循環穩定地降低樹脂的結合容量)，並且該 γ 射線照射的層析樹脂之結合能力可以藉由將樹脂暴露於變性緩衝液而回復。鑑於此項發現，本說明書中提供的是用 γ 射線照射的層析樹脂進行層析的方法，其包括提供包含 γ 射線照射過的層析樹脂之層

析管柱；通過管柱進行第一次層析循環，其中該循環包括將層析樹脂暴露於變性緩衝液中；並且通過管柱進行至少一次另外的層析循環。同時提供整合的、封閉的或基本上封閉的，和連續的重組蛋白質之製造過程，其包括使用至少一根包含 γ 射線照射過的層析樹脂層析管柱，其中該 γ 射線照射的層析樹脂在該過程的每一循環期間均暴露至變性緩衝液，並且使用生物負荷量減少的緩衝液於該過程中。任何本說明書中的方法和過程可以是生物負荷量減少、無菌的、防腐的、或絕對無菌的方法或過程(如本說明書中所定義者)。本說明書中所定義的任何本說明書中的方法和過程可為防腐的和生物負荷量減少、無菌的，或絕對無菌的組合。

【0004】 本說明書中所提供的是用 γ -射線照射處理過的樹脂進行層析法，其包括：(a)提供提供包含 γ 射線照射過的層析樹脂之層析管柱；(b)通過管柱進行第一次層析循環，其中該循環包括將層析樹脂暴露在變性緩衝液中；並且(c)通過管柱進行至少一次另外的層析循環。在這些方法的某些具體實例中，進行(b)和/或(c)中的循環包括以下步驟：(a)藉著將層析樹脂與含有重組蛋白的液體接觸來捕獲重組蛋白質；(b)藉著將層析樹脂與沖洗用緩衝液接觸以沖洗層析樹脂；(c)藉著將層析樹脂與溶離用緩衝液接觸以溶離重組蛋白質；並且(d)藉著將層析樹脂與變性用緩衝液接觸以使層析樹脂再生。

【0005】 在任何本說明書說明的方法之某些實例中，含有重組蛋白的液體是液態培養基。在任何本說明書說明方法的某些具體實例中，(b)和(c)中的循環是利用封閉的和整合的系統進行。在任何本說明書說明的方法之某些實例中，該緩衝液是生物負荷量減少的緩衝液(例如，藉由過濾法製備之生物負荷量減少的緩衝液)。

【0006】 在任何本說明書說明的方法之某些實例中，該變性緩衝液包括尿素、胍氫氯化物、和 Triton™ X-100 之一種或多種。在任何本說明書說明的方法之某些具體實例中，(b)循環尚包括將層析樹脂暴露到包含大約 0.5 M 到大約 1.5 M 氫氧化鈉的沖洗緩衝液，接著暴露到變性緩衝液中。在某些具體實例中，使用包含蛋白質配體的親和性層析樹脂，(b)循環尚包括將層析樹脂暴露到包含大約 1 mM 到大約 100 mM 氫氧化鈉的沖洗緩衝液中。在任何本說明書說明的方法之某些實例中，該管柱是多重管柱層析系統 (MCCS) [例如，週期性反流層析系統(PCCS)]的一部分。

【0007】 在任何本說明書說明的方法之某些具體實例中，該層析樹脂是陰離子交換層析樹脂、陽離子交換層析樹脂、分子篩層析樹脂、疏水性交互作用層析樹脂、親和性層析樹脂，或其任何組合。在某些實例中，該層析樹脂是陰離子交換層析樹脂。

【0008】 在任何本說明書說明的方法之某些具體實例中，該層析樹脂已使用介在大約 10 kGy 到大約 40 kGy(例如介於大約 15 kGy 到大約 35 kGy，或介於大約 20 kGy 到大約 30 kGy)的 γ -射線照射劑量處理過。在任何本說明書說明的方法之某些具體實例中，進行 4 個或多於 4 個(例如，9 個或多於 9 個、14 個或多於 14 個、19 個或多於 19 個、20 個或多於 20 個、39 個或多於 39 個)另外的層析循環。在任何本說明書說明的方法之某些實例中，步驟(c)經至少 4 天的期間進行(例如，至少 5 天、至少 7 天、至少 14 天、或至少 28 天)。在任何本說明書所說明方法之某些實例中，該重組蛋白是重組的治療用蛋白。

【0009】 本說明書亦提供整合的、封閉的或基本上封閉的，以及連續的製造純化之重組蛋白的過程，其包括：(a)提供包含基本上不含細胞的重

組蛋白液態培養基；(b)將液態培養基連續注入包含至少一個含 γ -射線照射層析樹脂的管柱之多管柱層析系統(MCCS)，其中使層析樹脂在每一循環期間暴露至變性緩衝液，該過程利用生物負荷量減少的緩衝液，經過整合並連續從液態培養基流洗到 MCCS 的洗出液中，該洗出液即純化的重組蛋白質。在這些過程的某些具體實例中，MCCS 進行了至少兩個相異的單元操作。在任何本說明書說明的方法之某些實例中，MCCS 涉及管柱切換。在任何本說明書說明的方法之某些具體實例中，所有 MCCS 中的管柱都包含 γ -射線照射的層析樹脂。

【0010】 在任何本說明書說明的方法之某些實例中，MCCS 進行捕獲重組蛋白和病毒失活的單元操作，或捕獲和純化重組蛋白的單元操作。在任何本說明書說明的方法之某些具體實例中，MCCS 是一個週期性回流層析系統。在任何本說明書說明的方法之某些具體中，MCCS 包括複數個用於親和性層析、陽離子交換層析、陰離子交換層析、分子篩層析，或疏水性作用層析或其組合的管柱。在任何本說明書說明的方法之某些具體實例中，MCCS 包含用於親和性層析法的管柱，且該親和性層析法是以選自以下群組的捕獲機制進行的，包括：蛋白質 A 結合捕獲機制、基質結合捕獲機制、抗體或抗體片段結合捕獲機制、適體(aptamer)-結合捕獲機制，和輔因子結合的捕獲機制。在任何本說明書說明的方法之某些實例中，親和性層析法是以蛋白質 A 結合捕獲機制實行的，且該重組蛋白是一種抗體或抗體片段。在任何本說明書說明的方法之某些實例中，該重組蛋白是治療的重組蛋白。本說明書中說明之任何方法的某些具體實例尚包括將純化的重組蛋白調配成醫藥調配物。在任何本說明書說明的方法之某些具體實例中，該變性緩衝液包括尿素、鹽酸胍，以及 Triton™ X-100 之一種或多於一種。

在任何本說明書說明的方法之某些實例中，在每一循環層析樹脂被暴露至包含大約 0.5 M 到大約 1.5 M 氫氧化鈉的沖洗緩衝液接著暴露至變性緩衝液。

【0011】 本發明亦提供用於製造重組蛋白之整合、封閉或基本上封閉且連續的方法，包括：(a)提供包含基本上不含細胞的重組蛋白液態培養基；(b)將液態培養基連續注入第一個多管柱層析系統(MCCS1)；(c)利用 MCCS1 從液態培養基捕獲重組蛋白；(d)從包含重組蛋白的 MCCS1 產生洗出液並且將洗出液連續注入第二個多管柱層析法系統(MCCS2)；(e)將得自洗出液的重組蛋白連續注入 MCCS2 並緊接著溶離該重組蛋白，從而產生純化的重組蛋白，其中：該方法利用整合之生物負荷量減少的緩衝液，並且從液態培養基連續流洗到純化的重組蛋白，並且至少一個 MCCS1 和/或 MCCS2 中的管柱是含 γ -射線照射的層析樹脂之層析管柱，並且該層析樹脂在該方法的每一循環期間暴露至變性緩衝液。在任何本說明書說明的方法之某些實例中，MCCS1 和/或 MCCS2 實行了至少兩個相異的單元操作。在任何本說明書說明的方法之某些實例中，MCCS1 或 MCCS2 或兩者的使用涉及管柱之替換。

【0012】 在任何本說明書說明的方法之某些具體實例中，MCCS1 尚實行捕獲重組蛋白和病毒失活的單元操作。在任何本說明書說明的方法之某些具體實例中，MCCS2 實行重組蛋白之純化和精製的單元操作。在任何本說明書說明的方法之某些實例中，MCCS1 和/或 MCCS2 利用至少兩個層析管柱。在任何本說明書說明的方法之某些實例中，在 MCCS1 和 MCCS2 中的所有層析管柱是含有 γ -射線照射的層析樹脂之層析管柱。在任何本說明書說明的方法之某些實例中，MCCS1 是第一個週期性反流層析系統

(PCCS1)。在任何本說明書說明的方法之某些具體實例中，該捕獲係利用親和性層析法、陽離子交換層析法、陰離子交換層析法、或分子篩層析法、疏水性交互作用層析法、或任何其組合實行。在任何本說明書說明的方法之某些實例中，該捕獲係利用具有選自以下群組之捕獲機制的親和性層析法：蛋白質 A 結合捕獲機制、基質結合捕獲機制、抗體或抗體片段結合捕獲機制、適體結合捕獲機制、以及輔因子結合捕獲機制。在任何本說明書說明的方法之某些具體實例中，親和性層析法是以蛋白質 A 結合捕獲機制實行，並且該重組蛋白是抗體或抗體片段。

【0013】 在任何本說明書說明的方法之某些具體實例中，MCCS2 是第二項週期性反流層析系統(PCCS2)。在任何本說明書說明的方法之某些實例中，該重組蛋白是治療用重組蛋白。任何本說明書中說明方法的某些具體實例尚包括將純化的重組蛋白調配成醫藥調配物。在任何本說明書說明的方法之某些實例中，該過程連續進行經至少 4 天的期間(例如至少 5 天、至少 7 天、至少 14 天或至少 28 天)。

【0014】 在任何本說明書說明的方法之某些具體實例中，層析樹脂是陰離子交換層析樹脂、陽離子交換層析樹脂、分子篩層析樹脂、疏水性交互作用層析樹脂、親和性層析樹脂、或任何其組合。在任何本說明書說明的方法之某些實例中，該層析樹脂是陰離子交換層析樹脂。在任何本說明書說明的方法之某些實例中，該層析樹脂已被劑量介於大約 10 kGy 到大約 40 kGy (例如介於大約 15 kGy 到大約 35 kGy，或介於大約 20 kGy 到大約 30 kGy)的 γ -射線照射。在任何本說明書說明的方法之某些具體實例中，該變性緩衝液包括尿素、胍氫氯化物和 Triton™ X-100 之一種或多於一種。在任何本說明書說明的方法之某些具體實例中，層析樹脂被暴露於包含大

約 0.5 M 到大約 1.5 M 氫氧化鈉的沖洗緩衝液，接著暴露到變性緩衝液。在任何本說明書說明的方法之某些具體實例中，層析樹脂是一種具有蛋白質配體的親和性樹脂(例如蛋白質 A 配體)，該層析樹脂被暴露到包含介於大約 1 mM 到大約 100 mM 氫氧化鈉的沖洗緩衝液，接著暴露至變性緩衝液。

【0015】 如本說明書中所使用的，在名詞之前的「a」一字代表一個或多於一個特別名詞。例如，「層析管柱」之片語代表「一個或多於一個層析管柱」。

【0016】 「 γ -射線照射的層析樹脂」一詞意指已經暴露到 γ -射線照射的層析樹脂。例如， γ -射線照射的層析樹脂可為暴露於足以減少層析樹脂的生物負荷量之 γ -射線照射的層析樹脂。在某些實例中， γ -射線照射的層析樹脂已經被暴露到介於大約 1 kGy 到大約 15 kGy 劑量的 γ -射線照射、介於大約 1 kGy 到大約 20 kGy 劑量的 γ -射線照射、介於大約 1 kGy 到大約 25kGy 劑量的 γ -射線照射、介於大約 1 kGy 到大約 30 kGy 劑量的 γ -射線照射、或介於大約 1 kGy 到大約 35 kGy 劑量的 γ -射線照射。 γ -射線照射的層析樹脂可具有大約或少於 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-9} 、或 1×10^{-10} 的無菌保證量。用於 γ -射線照射的層析樹脂之作為實例的方法說明在本說明書中。用於 γ -射線照射的層析樹脂之另外的方法在本技藝中為已知。

【0017】 「含有(containing)、包括(including)或包含(comprising) γ -射線照射的層析樹脂的層析法管柱」一詞亦指包含 γ -射線照射的層析樹脂(如本說明書中所定義)之層析管柱。例如，此一層析法管柱可包含已暴露到介於大約 1 kGy 到大約 15 kGy γ -射線照射劑量、介於大約 1 kGy 到大約 20 kGy γ -射線照射劑量、介於大約 1 kGy 到大約 25 kGy γ -射線照射劑量、介於大約 1 kGy 到大約 30 kGy γ -射線照射劑量、或介於大約 1 kGy 到大約 35

kGy γ -射線照射劑量的層析樹脂。例如，層析管柱可包含具有大約或少於 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-9} 、或 1×10^{-10} 無菌保證量之 γ -射線照射的層析樹脂。在某些具體實例中，含有(containing)、包括(including)或包含(comprising) γ -射線照射層析樹脂的層析管柱具有生物負荷量減少、無菌的、絕對無菌的或防腐之 γ -射線照射層析樹脂(如本說明書所定義)[亦即含有(containing)、包括(including)或包含(comprising) γ -射線照射層析樹脂的層析管柱內面及內容物具有減少的生物負荷量、無菌的、絕對無菌的或防腐的)。在某些具體實例中，含有(containing)、包括(including)或包含(comprising) γ -射線照射層析樹脂的層析管柱是防腐的且具有減少的生物負荷量、是無菌或絕對無菌的。

【0018】 「變性緩衝液」一詞意指包含足量之一種或多於一種造成蛋白質變性的化學用劑(例如清潔劑、還原劑、酸、鹼、兩性用劑、有機溶劑、或交叉連接用劑、或任何其組合)之液體。非作為限制之變性緩衝液之實例說明於本說明書中。另外的變性沖洗緩衝液的實例在本技藝中已知。偵測蛋白質變性之方法在本技藝中亦為詳知者(例如直接偵測蛋白質變性(例如光譜分析法)或間接的(例如透過蛋白質活性(例如酵素活性或蛋白質結合活性)檢驗)。偵測蛋白質之非作為限制的實例在本說明書中有說明。本說明書中說明的任何方法或過程之中，變性緩衝液可被用於包含 γ -射線照射的層析樹脂(例如，本說明書中說明的任何層析樹脂或層析樹脂的組合)之層析法管柱之再生。

【0019】 「生物負荷量減少的緩衝液」一詞意指經處理的(例如經過濾、高壓釜殺菌、或 γ -射線照射)的液體(例如，一種經處理的緩衝溶液)，其具有之自行複製生物汙染劑小於在完全相同的未處理液體中所發現之自

行複製生物汙染劑。自行複製生物汙染劑之非限制實例可為細菌(例如，革蘭氏陽性或革蘭氏陰性菌，或細菌或真菌孢子)、分個桿菌、病毒(例如，水泡病毒、卡奇谷病毒[Cache Valley virus]、微小病毒[parvovirus]、泡疹病毒、和本揚病毒[bunyavirus])、寄生蟲、真菌、酵母菌、和原生動物。例如，生物負荷量減少的緩衝液可具有大約或小於 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} , 或 1×10^{-10} 的無菌保證量。

【0020】 「絕對無菌性」或「絕對無菌的」是用於說明完全不含自身複製生物汙染物的組成物或方法。例如，該詞可應用在 γ -射線照射的層析樹脂、層析法管柱的內部表面和含量(例如，層析樹脂)。絕對無菌的組成物或方法可為乾淨的(如該詞在本技藝中所知)。

【0021】 「無菌的」或「無菌性」係用於說明具有大約或小於 1.0×10^{-6} (例如大約或小於 1.0×10^{-7} 、大約或小於 1.0×10^{-8} 、大約或小於 1.0×10^{-9} 、或 1×10^{-10})無菌保證量之組成物或方法。可利用數個本技藝中已知的確切的生產方法試驗以測定是否一種組成物或方法是無菌的。例如，一種無菌組成物或方法可完全不含可存活的自行複製之生物汙染物(例如，任何本說明書中所說明之自行複製之生物汙染物)。一種無菌組成物或方法亦可說是乾淨的(如該詞在本技藝中已知者)。

【0022】 「殺菌」一詞意指用於使一組成物(γ -射線照射的層析樹脂)變得無菌的有效過程。吾人可測量在處理過程中自我複製的生物汙染物(例如細菌)之抗藥性指示劑失活速率以測定組成物(γ -射線照射的層析樹脂)之無菌性是否已達成。

【0023】 「無菌保證度」或「SAL」是技藝上已知的並且意指在一批經處理單元中達成絕對無菌性的信心程度。或然率通常是根據在確認期間進行的失活研究計算的並以 1×10^{-n} 的形式表示。

【0024】 「防腐的」一詞係用於說明不含引起疾病的或引起症狀的自身複製生物污染物和/或蛋白質的組成物或方法(例如本說明書中說明之任何自我複製的生物污染物、毒素[例如內毒素]，或發炎蛋白質)。任何防腐的組成或方法亦可為乾淨的(如該詞在本技藝中為人所知的意義)。

【0025】 「一個層析循環」或「層析循環」是一項本技藝的用語，且意指使用單一層析管柱之單輪層析中實行的所有步驟。例如，一個層析循環可包括用緩衝液平衡層析管柱的步驟、使包含重組蛋白的樣品通過層析管柱、從層析管柱上將重組蛋白溶離，並且使變性緩衝液通過層析管柱以沖洗該管柱。另外在層析循環中進行的步驟實例說明在本說明中。更多在層析循環中進行的步驟實例亦為本技藝中詳知者。

【0026】 「單元操作」是一項本技藝的用語，且意指可在將重組蛋白從液態培養基中純化出來的的過程中實行的功能性步驟。例如，一項單元操作可為過濾(例如，移除掉污染物細菌、酵母菌、病毒、或分個桿菌，和/或得自包含重組蛋白之液體的微粒物質)、捕獲、移除抗原決定基標籤、純化、保持或貯存、精製、使病毒失活、調整包含重組蛋白之液體的離子濃度和/或 pH 值，以及移除不想要的鹽類。

【0027】 「捕獲」一詞意指被實行以從一種或多於一種其他存在於液態培養基或稀釋的液態培養基中的成分[例如培養基蛋白質或一種或多於一種存在於哺乳動物細胞或從其分泌之其他成分(例如：DNA、RNA 或其他蛋白質)]將重組蛋白(例如重組的治療用蛋白質)部分純化或分離(例如至少或

大約 5%，例如至少或大約 10%，15%，20%，25%，30%，40%，45%，50%，55%，60%，65%，70%，75%，80%，85%，90%，或至少或大約 95%重量比之純度)並濃縮的步驟。典型上，捕獲是利用與重組蛋白結合的層析樹脂進行的(例如，經由使用親和性層析法)。在本說明書中或他處說明之被用於從液態培養基或稀釋的液態培養基中捕獲重組蛋白質的非作為限制的實例是本技藝中已知的。重組蛋白可從液態培養基中使用至少一種層析管柱和或層析法的薄膜(例如，任何本說明書中說明的層析管柱和或層析法的薄膜)予以捕獲。

【0028】 「純化」一詞意指經實行以從一種或多於一種存在於包含有重組蛋白之液體的雜質(如大量雜質)或成分[例如培養基蛋白質或一種或多於一種存在於哺乳動物細胞或從其分泌之其他成分(例如：DNA、RNA、其他蛋白質、內毒素、病毒等)]中分離出重組蛋白(例如重組的治療用蛋白質)的步驟。例如，捕獲可在最初的捕獲步驟期間或其後實行。純化可利用能與重組蛋白或污染物結合的層析樹脂、薄膜、或任何其他固態擔體進行(例如透過使用親和性層析法、疏水性交互作用層析法、陰離子或陽離子交換層析法，或分子篩層析法)。重組蛋白可使用至少一個層析管柱和/或層析法薄膜(例如本說明書說明之任何其他層析管柱和/或層析法薄膜)從包含重組蛋白的液體中純化出來。

【0029】 「精製(polishing)」是一項本技藝的用語，且意指經實行以從包含重組蛋白(例如重組之治療用的蛋白質)之接近最後所需純度的液體中移除剩餘之微量或少量污染物或雜質的步驟。例如，精製可藉著將包含重組蛋白通過一個能選擇性地與標靶重組蛋白或存在於包含重組蛋白的液體中之少量污染物或雜質結合的層析管柱或薄膜吸收物。在此一實例中，該層析管柱或薄膜吸收物的洗出液/濾液中即包含該重組蛋白。

【0030】 「過濾」一詞意指從一種液體(例如存在於本說明書說明之任何方法中的液態培養基或液體)中移除至少部分(例如至少 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%,或 99%)不想要的生物污染物(例如, 哺乳動物細胞、細菌、酵母菌細胞、病毒或分個桿菌)和/或顆粒狀物質(例如沉澱的蛋白質)。

【0031】 「洗出液/濾液」一詞是本技藝的用語並且亦指從層析管柱或層析薄膜放出的液體, 其包括可偵測量的重組蛋白(例如, 重組的治療用蛋白質)。

【0032】 「整合的過程」一詞意指利用以合作方式運作的結構元素達成特定結果之過程(例如從液態培養基中純化重組蛋白)。

【0033】 「連續的過程」一詞意指將液體連續注入該系統的至少一部份之過程。例如, 一個連續的方法式一種將含有組合蛋白的液態培養基從生物反應器經由 MCCS 連續注入的過程。另一項連續過程的實例是連續將含有組合蛋白的液態培養基從生物反應器經由第一個和第二個 MCCS(MCCS1 和 MCCS2)連續注入的過程。另外的實例包括將含有組合蛋白的液態培養基經由 MCCS 連續注入的過程, 該過程係將含有組合蛋白的液態培養基經由 MCCS1 和 MCCS2 連續注入, 或該過程係將含有組合蛋白的液態培養基經由 MCCS2 連續注入。

【0034】 「封閉的過程」是本技藝的用語, 且意指被實行以使會與重組蛋白或包含重組蛋白的液體接觸之過程中的成分(例如層析樹脂和/或緩衝液)不要故意在顯著的時間暴露到污染劑(例如不要故意在顯著的時間裡暴露至空氣)。

【0035】 「醫療用蛋白質藥物物質」一詞意指已被充分純化或從污染的蛋白質、脂質和核酸(例如, 存在於液態培養基中或得自宿主細胞[例如得

自哺乳類細胞、酵母菌或細菌宿主細胞]的污染蛋白質、脂質和核酸)和生物污染物(例如病毒的和細菌的污染物)中分離出來的重組蛋白(例如一種免疫球蛋白、蛋白質片段、遺傳改造的蛋白質，或酵素)，且可被調配成醫藥用劑而不需要更多基本的純化和/或去汙步驟。

【0036】 「多重管柱層係系統」或「MCCS」意指具有總數一個或多於一個其間連接或替換的層析管柱和/或層析薄膜的系統。多重管柱層析系統之非用作限制的實例是週期性反流層析系統(PCC)，其包含總共兩個或多於兩個中間連接或替換的層析管柱和/或層析薄膜。另外之多重管柱層析系統的實例說明在本說明書中，並且是本技藝中已知的。

【0037】 「基本上不含」一詞意指一種組成物(例如一種液態培養基)，其不含至少大約有 90%不含(例如至少大約 95%, 96%, 97%, 98%, 或至少或大約 99%不含，或至少大約 100%不含)指定物質(例如，哺乳動物細胞或得自哺乳動物之污染蛋白質、核酸、醣類或脂類)。

【0038】 「哺乳動物細胞」一詞意指任何得自或衍生自哺乳動物(例如人類、倉鼠、小鼠、綠猴、大鼠、豬、牛或兔)的細胞。例如，哺乳動物細胞可為永生化細胞。在某些具體實例中，該哺乳動物細胞是分化的細胞。在某些具體實例中，該哺乳動物細胞是未經分化的細胞。非作為限制之哺乳動物細胞的實例在本說明書中有說明。另外的哺乳動物細胞實例是本技藝中已知的。

【0039】 「培養」或「細胞培養」一詞意指在受控制的系列物理條件下維持哺乳動物細胞或使其增殖。

【0040】 「哺乳動物細胞的培養」一詞意指包含複數個哺乳動物細胞的液態培養基，其在受控制的系列物理條件下被維持或增殖。

【0041】 「液態培養基」一詞意指包含充分營養以使細胞(例如哺乳動物細胞)在試管中生長或增殖。例如，液態培養基可包含一種或多於一種：胺基酸(例如 20 個胺基酸)、嘌呤(例如次黃嘌呤)、嘧啶(例如胸嘧啶)、膽鹼、肌醇、硫胺素、葉酸、生物素、鈣、菸鹼胺、維他命 B6、核黃素、胸腺嘧啶核苷、氫鈷胺、丙酮酸鹽、硫辛酸、鎂、葡萄糖、鈉、鉀、鐵、銅、鋅、和碳酸氫鈉。在某些具體實例中，液態培養基可包含得自哺乳動物的血清。在某些具體實例中，液態培養基不包括血清或另一種得自哺乳動物的萃取物(一種經定義的液態培養基)。在某些具體實例中，液態培養基可包含微量金屬、哺乳動物的生長激素、和/或哺乳動物的生長因子。液態培養基的另一實例是營養極小化的培養基(例如僅包含無機鹽、碳來源和水的培養基)。液態培養基之非限制實例說明在本說明書中。液態培養基之另外的實例為本技藝中已知且可購得。液態培養基可包括任何密度的哺乳動物細胞。例如，本說明書中使用的從生物反應器中移出之某量液態培養基基本上可不含哺乳動物細胞。

【0042】 「不含動物衍生成分的液態培養基」意指不包含任何從哺乳動物衍生之成分(例如蛋白質或血清)的液態培養基。

【0043】 「不含血清的液態培養基」一詞意指不含哺乳動物血清的液態培養基。

【0044】 「含有血清的液態培養基」一詞意指含有哺乳動物血清的液態培養基。

【0045】 「化學定義的液態培養基」一詞是本技藝的用語，且意指其中所有化學成分均已知的液態培養基。例如，一種經化學定義的液態培養

基不含胎牛血清、胎牛白蛋白或人類血清白蛋白，因為這些製備物典型上含有白蛋白和脂類的複雜混合物。

【0046】 「不含蛋白質的液態培養基」一詞意指不含任何蛋白質(例如任何可偵測脂蛋白質)的液態培養基。

【0047】 「免疫球蛋白」一詞意指免疫球蛋白(例如可變區位序列、架構序列和/或固定區位序列)包含具有至少 15 個胺基酸(例如至少 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 或 100 個胺基酸)之胺基酸序列的多肽。該免疫球蛋白可包含例如輕鏈免疫球蛋白的至少 15 個胺基酸，例如重鏈免疫球蛋白的至少 15 個胺基酸。該免疫球蛋白可為經分離出的抗體(例如 IgG、IgE、IgD、IgA 或 IgM)，例如一個 IgG 的亞類(例如 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4)。該免疫球蛋白可為抗體片段，例如 Fab 片段、F(ab')₂ 片段，或 scFv 片段。該免疫球蛋白亦可為雙重特定抗體或三重特定抗體，或二聚體、三聚體或多聚體抗體，或雙特異抗體、Affibody®、或 Nanobody®。該免疫球蛋白亦可為至少包含一個免疫球蛋白區位之遺傳改造蛋白質(例如一種融合蛋白質)。免疫球蛋白之非限制的實例在本說明書中有說贏，且另外的免疫球蛋白實例是本技藝中是已知的。

【0048】 「蛋白質片段」或「多肽片段」意指一部分的多肽序列，其為至少或大約 4 個胺基酸，至少或大約 5 個胺基酸，至少或大約 6 個胺基酸，至少或大約 7 個胺基酸，至少或大約 8 個胺基酸，至少或大約 9 個胺基酸，至少或大約 10 個胺基酸，至少或大約 11 個胺基酸，至少或大約 12 個胺基酸，至少或大約 13 個胺基酸，至少或大約 14 個胺基酸，至少或大約 15 個胺基酸，至少或大約 16 個胺基酸，至少或大約 17 個胺基酸，至少或大約 18 個胺基酸，至少或大約 19 個胺基酸，或至少或大約 20 胺基酸

長度，或多於 20 個胺基酸長度。重組蛋白片段可利用任何本說明書中說明的方法產生。

【0049】 「遺傳改造的蛋白質」一詞意指非天然地以生物體內(例如哺乳動物)存在的內源核酸編碼的多肽。改造之蛋白質的實例包括酵素(例如具有一個或多於一個胺基酸取代、刪除、插入或添加，造成經改造的酵素之穩定性和/或催化活性增加者)、融合蛋白質、抗體(例如二價抗體、三價抗體或雙特異抗體)，以及包括至少一段重組鷹架序列之與抗原結合的蛋白質。

【0050】 「分泌的蛋白質」或「分泌的重組蛋白」一詞意指原本就包含至少一段分泌示信序列之蛋白質(例如重組蛋白)，當其在哺乳動物細胞中被轉譯時且在哺乳動物細胞中經過至少一部分酵素切割分泌示信序列時，其至少有一部分被分泌到細胞外的空間(例如液態的培養基)。熟習本技藝的實行者會知道「分泌的」蛋白質不需要與細胞完全分離才被認為是分泌的蛋白質。

【0051】 「灌滿的生物反應器」一詞意指包含複數個細胞(例如哺乳動物細胞)在第一種液態培養基中的生物反應器，其中在該反應器中的細胞培養包括週期和連續移除第一種液態培養基並且同時或之後短時間即添加基本上同體積的第二種液態培養基至該生物反應器。在某些實例中，在培養期間經過遞增的期間(例如一段大約 24 小時的期間，一段介於大約 1 分鐘和大約 24 小時的期間，或一段大於 24 小時的期間)移除與添加之第一種液態培養基的體積會遞增地變化(例如增加或減少) (例如以每日作基準之再注入比例)。每日移除和更換之培養基的部份量可視所培養的特殊細胞、最初

接種密度，以及特別時間的細胞密度而改變。「RV」或「反應器體積」意指在培養過程一開始存在的培養基體積(例如播種後存在之培養基總量)。

【0052】 「分批注入生物反應器」是本技藝的用語，且意指包含複數細胞(例如哺乳動物細胞)在第一種液態培養基中的生物反應器，其中在該生物反應器中存在的細胞之培養包括週期的或連續的將第二種液態培養基添加到第一種液態培養基而未相當或顯著將第一種液態培養基或第二種液態培養基從細胞培養物中移除。第二種液態培養基可與第一種液態培養基相同。在某些分批注入培養的實例中，第二種液態培養基是第一種液態培養基的濃縮形式。在某些分批注入培養的實例中，第二種液態培養基係以乾粉添加。

【0053】 「澄清化的液態培養基」一詞意指得自細菌或酵母菌獲得的基本上沒有(例如，至少 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%或 99%)細菌或酵母菌細胞的液態培養基。

【0054】 除非另有定義，否則所有用於本說明書中的技術和科學用語具有與熟習本發明所屬技藝者一般瞭解之同樣意義。方法和材料說明在本說明中供本發明之用途，其他本技藝已知的適當方法和材料亦可被使用。該材料、方法和實例僅為說明而非意圖作為限制。所有出版物、專利申請案、專利、序列、資料庫詞條、和其他本說明書中提到的參考資料均以其完整內容併入參考文獻中。若有衝突情形，則本說明書包括定義掌控了該意義。

【0055】 其他本發明的特徵和優點從以下詳細說明和附圖，以及從申請專利範圍顯然易知。

發明的詳細說明

【0056】 本說明書中提供使用 γ -射線照射的層析樹脂進行層析的方法，其包括提供包含 γ -射線照射的層析樹脂之層析管柱，並且通過該管柱進行第一個層析循環，其中該循環包括將層析樹脂暴露至變性緩衝液。本說明書亦提供整合的、封閉的或基本上封閉的過程，以及製造重組蛋白之連續過程，其包括使用至少一個包含 γ -射線照射的層析樹脂之層析管柱，其中在該過程的每一循環期間將 γ -射線照射的層析樹脂暴露至變性緩衝液，並且在該過程中使用生物負荷量減低的緩衝液。這些方法和過程之非作為限制的方面說明如下。因為可在本技藝中被領會察知，所以以下說明的許多方面可不加限制地用於任何組合。

γ -射線照射的層析樹脂

【0057】 本技藝中所知廣泛種類之相異型式的層析樹脂(或其組合)可利用本技藝已知的方法暴露至 γ -射線。例如，一種同位素如鈷-60 或銫-137 被用作為 γ -射線來源。暴露至 γ -射線的層析樹脂可存在於充填好的層析管柱。在其他實例中，暴露至 γ -射線的層析樹脂存在於一個密封的容器中(例如在密封容器中的糊狀物)。

【0058】 該層析樹脂可在介於大約-25 °C 和大約 0 °C (包括-25 °C 和 0 °C)，或介於大約 0 °C 和大約 25 °C (包括 0 °C 和 25 °C) 暴露至 γ -射線。層析樹脂可暴露至介於大約 0.1 kGy 到大約 100 kGy、介於大約 1 kGy 到大約 100 kGy、介於大約 1 kGy 到大約 90 kGy、介於大約 1 kGy 到大約 80 kGy、介於大約 1 kGy 到大約 70 kGy、介於大約 1 kGy 到大約 65 kGy、介於大約 5 kGy 到大約 65 kGy、介於大約 10 kGy 到大約 60 kGy、介於大約 10 kGy 到

大約 55 kGy、介於大約 10 kGy 到大約 50 kGy、介於大約 10 kGy 到大約 45 kGy、介於大約 10 kGy 到大約 40 kGy、介於大約 10 kGy 到大約 35 kGy、介於大約 10 kGy 到大約 30 kGy、介於大約 15 kGy 到大約 50 kGy、介於大約 15 kGy 到大約 45 kGy、介於大約 15 kGy 到大約 40 kGy、介於大約 15 kGy 到大約 35 kGy、or 介於大約 20 kGy 到大約 30 kGy 的 γ -射線照射劑量。

【0059】 γ -射線照射的層析樹脂可為陰離子交換層析樹脂、陽離子交換層析樹脂、分子篩層析樹脂、疏水性交互作用層析樹脂、親和性層析樹脂、或其任何組合。非作為限制的親和性層析樹脂實例包括具有胜肽配體，蛋白質配體(例如蛋白質 A 或蛋白質 G)，適體配體，基質配體，產物配體，金屬配體，和輔因子配體的樹脂。 γ -射線照射的層析樹脂可為雙特異抗體層析樹脂(例如具有陰離子交換和疏水性交互作用特徵的層析樹脂)。

包含 γ -射線照射層析樹脂的層析管柱

【0060】 本說明書中說明的方法包括使用包含 γ -射線照射層析樹脂的層析管柱且本說明書中說明的過程包括使用一或二個包含至少一個含 γ -射線照射層析樹脂的層析管柱之 MCCS。該 γ -射線照射的層析樹脂可為本說明書中說明之任何型式樹脂(或本技藝中已知任何形式的層析樹脂)。 γ -射線照射的層析樹脂可利用任何本說明書中說明的或本技藝已知方法製備。

【0061】 此種層析法管柱可用未經處理的層析樹脂裝填層析管柱，並將裝填好的管柱暴露至 γ -射線照射(例如利用本說明書中說明的任何暴露方式和條件)來製備。在其他實例中，包含 γ -射線照射的樹脂的層析管柱可藉著將層析樹脂暴露至 γ -射線(例如在容器中提供的層析樹脂)並用 γ -射線照射的層析樹脂裝填層析管柱來產生。在此種方法中，暴露至 γ -射線的層析

樹脂可以糊狀物存在於容器中，且層析管柱是在生物負荷量減低的通風櫥中裝填的。在某些方法中，該層析樹脂可以固態混合物在容器中暴露至 γ -射線，且該 γ -射線照射的層析樹脂的糊狀物可使用生物負荷量減低的緩衝液製備(例如在生物負荷量減低的通風櫥中製備)，在生物負荷量減低的通風櫥中將所得到的糊狀物用於裝填層析管柱。在這些實例中的某些實例之中，裝填之前的層析管柱可經處理以降低生物負荷量(例如：高壓釜滅菌、 γ -射線照射、或暴露至環氧乙烷)。

【0062】 包含 γ -射線照射之層析樹脂的層析管柱可具有介於大約 1×10^{-3} 和大約 1×10^{-12} ，介於大約 1×10^{-4} 和大約 1×10^{-12} ，介於 1×10^{-5} 和大約 1×10^{-11} ，介於大約 1×10^{-5} 和大約 1×10^{-10} ，介於大約 1×10^{-5} 和大約 1×10^{-9} ，介於大約 1×10^{-6} 和大約 1×10^{-9} ，或介於大約 1×10^{-6} 和大約 1×10^{-8} (包含首末值在內)的無菌保證度(SAL)。

生物負荷量減低的緩衝液

【0063】 本說明書中說明的方法和過程可利用一種或多於一種生物負荷量減低的緩衝液來實行。因為可在本技藝中被領會察知，所以生物負荷量減低的緩衝液可為用於層析循環之任何型式的緩衝液(例如在層析循環中任何步驟中或在本說明書中說明的任何單元操作中使用的緩衝液)。用於減低緩衝液之生物負荷量之作為實例的方法包括過濾(0.2 μ m-孔徑大小的過濾)、高壓釜殺菌和 γ -射線照射。另外之減低緩衝液之生物負荷量的方法在本技藝中已知。生物負荷量減低的緩衝液可具有介於大約 1×10^{-3} 和大約 1×10^{-12} ，介於大約 1×10^{-4} 和大約 1×10^{-12} ，介於 1×10^{-5} 和大約 1×10^{-11} ，介於大約 1×10^{-5} 和大約 1×10^{-10} ，介於大約 1×10^{-5} 和大約 1×10^{-9} ，介於大約

1×10^{-6} 和大約 1×10^{-9} ，或介於大約 1×10^{-6} 和大約 1×10^{-8} (包含首末值在內) 的無菌保證度。

變性緩衝液

【0064】 本說明書中說明的方法和過程包括使用變性緩衝液。變性緩衝液包括足量之一種或多於一種會造成蛋白質變性的化學用劑(例如清潔劑、還原劑、酸、兩性用劑、有機溶劑、或交叉連接劑或任何其組合)。可被包含在變性緩衝液中之非作為限制的範例清潔劑包括 Triton X-100、十二烷基硫酸鈉和乙基三甲基溴化銨。可包含於變性緩衝液中之非作為限制的有機溶劑實例包括乙醇、丁醇、苯酚、丙醇和甲醇。可包含於變性緩衝液中之非作為限制的還原劑包括 2-巰基乙醇、二硫蘇糖醇和三(2-羧乙基)磷。可包含於變性緩衝液中之非作為限制的酸包括乙酸、三氯乙酸和硫代水楊酸。可包含於變性緩衝液中之非作為限制的兩性用劑包括尿素(例如 6 到 9 M 尿素)、硫代尿素、氯化胍(例如 5 到 7 M 氯化胍)、過氯酸鋰(例如 4 到 7 M 過氯酸鋰)或乙酸鋰。可包含於變性緩衝液中之非作為限制的交叉連接劑包括甲醛和戊二醛。

【0065】 變性緩衝液之非作為限制的實例包括：8 M 尿素、1 M NaCl、0.1 M 檸檬酸，pH 2.5 (例如接著用 1 N NaOH 處理)；6 M 鹽酸胍，pH 2.5 (例如接著用 1 N NaOH 或 1 N NaOH 加 1 M NaCl 處理)；以及 0.5% Triton-X 100 在 0.1 M 乙酸，pH 2.5 (例如接著用 0.7 M 乙酸，20%乙醇，50%乙二醇，pH 2.5，接著用 1 N NaOH 處理)。

重組的治療用蛋白質

【0066】 本說明書中說明的重組蛋白可為重組的治療用蛋白質。可用本說明書中的方法提供之非作為限制的重組治療用蛋白質包括免疫球蛋白(包含輕鏈與重鏈免疫球蛋白、抗體、或抗體片段(例如本說明書中說明的任何抗體片段)、酵素(例如半乳糖苷酶(例如 α -半乳糖苷酶)、Myozyme®或 Cerezyme®)、蛋白質(例如人類紅血球生成素、腫瘤壞死因子(TNF)、或干擾素 α 或 β)、或致免疫的或致抗原性的蛋白質或蛋白質片段(例如用於疫苗的蛋白質)。可用於治療各種溶小體儲積症之非作為限制的實例的重組治療用蛋白質顯示在附圖 8 中。重組的治療用蛋白質可為與基因改造的抗原結合的多肽，其包含至少一個多功的重組蛋白架構(請參考例如與重組抗原的蛋白質，說明於 Gebauer 等人，《現代觀念化學生物學》，第 13 冊：第 245-255 頁，2009 頁；以及美國專利申請案第 2012/0164066 號(以其完整內容併在本說明書的參考資料中))。抗體之非作為限制的重組治療用蛋白質實例包括：帕尼單抗(panitumumab)、奧瑪佐單抗(omalizumab)、阿巴高芙單抗(abagovomab)、阿布西單抗(abciximab)、阿克托單抗(actoxumab)、阿達利姆單抗(adalimumab)、阿地卡姆單抗(adecatumumab)、阿斐立摩單抗(afelimomab)、阿美土佐單抗(afutuzumab)、阿拉西佐單抗(alacizumab)、阿拉西佐單抗(alacizumab)、阿蘭土佐單抗(alemtuzumab)、阿洛克單抗(alirocumab)、奧圖姆單抗(altumomab)、阿瑪土西單抗(amatuximab)、阿納圖摩單抗(anatumomab)、阿波立佐單抗(apolizumab)、阿媿努單抗(atinumab)、托西立佐單抗(tocilizumab)、巴西利西單抗(basilizimab)、貝克圖摩單抗(bectumomab)、必立姆單抗(belimumab)、必伐西佐單抗(bevacizumab)、必西羅單抗(bicirumab)、坎納克努單抗(canakinumab)、西特吉單抗(cetuximab)、單抗(daclizumab)、丹素單抗(densumab)、艾克力佐單抗(eculizumab)、愛德

克洛單抗(edrecolomab)、埃法立佐單抗(efalizumab)、愛芬固單抗(efungumab)、爾圖馬單抗(ertumaxomab)、艾特拉西佐單抗(etaracizumab)、狗立姆單抗(golimumab)、因弗利西單抗(infliximab)、那塔立佐單抗(natalizumab)、帕立維佐單抗(palivizumab)、帕尼特姆單抗(panitumumab)、培特姆單抗(pertuzumab)、拉尼必佐單抗(ranibizumab)、立特西單抗(rituximab)、托西利佐單抗(tocilizumab)和特拉斯特佐單抗(trastuzumab)。可藉由本說明書說明的方法產生另外之重組治療用抗體的實例是本技藝中已知的。另外的非作為現製的重組的治療用蛋白質之實例可藉由本發明的方法產生/純化者包括：重組阿葡糖苷酶(alglucosidase alfa)、拉羅尼酶(laronidase)、阿巴西普(abatacept)、加硫酶(galsulfase)、重組人類黃體刺激素(lutropin alfa)、抗血友病因子、 β -半乳糖苷酶(agalsidase beta)、干擾素 β -1a、紅血球生成素(darbepoetin alfa)、添奈可特酶(tenecteplase)、埃坦西普(etanercept)、第九號凝血因子、濾泡刺激激素、干擾素 β -1a、伊米昔酶(imiglucerase)、 α -鏈道酶(dornase alfa)、重組人類紅血球生成素 α 、和栓體舒(alteplase)。

【0067】 一種分泌的、可溶的重組治療用蛋白質可藉由移除或物理方式將液態培養基與細胞(例如哺乳類動物細胞)分離從液態培養基(例如第一種和/或第二種液態培養基)中回收。有許多不同之將液態培養基從細胞(例如哺乳動物細胞)移除的方法是本技藝已知者，包括例如：離心、過濾、滴管處理和/或真空抽吸。然後該分泌之重組的治療用蛋白質可從液態培養基中進一步回收和純化，利用各種生物技術包括各種型式的層析法(例如親和性層析法、分子篩層析法、陽離子交/換層析法、陰離子交換層析法、或疏水性交互作用層析法、或任何其組合)和/或過濾法(例如，分子量切分過濾法)。

層析循環

【0068】 如本技藝中詳知的，層析循環的步驟可視層析樹脂、用以進行循環中每一步驟使用的緩衝液，以及標靶重組蛋白的生物物理特性(例如重組治療用蛋白質)而定。例如，親和性層析法管柱可包括以下步驟：將含有標靶液體重組蛋白的液體裝載到親和性層析管柱上，沖洗管柱以移除掉不想要的生物物質(例如污染的蛋白質和/或小分子)，溶離結合到管柱的標靶重組蛋白，並且重新平衡該管柱。利用陽離子和/或陰離子交換層析管柱的層析循環—其中標靶重組蛋白在裝載步驟中結合到層析樹脂，其可包括用含有標靶蛋白質的液體裝載管柱，沖洗該管柱以移除掉不想要的生物物質、溶離結合到管柱的重組蛋白、並且重新平衡該管柱。在其他實例中，利用陽離子和/或陰離子交換層析法管柱的層析循環，其中於裝載步驟期間不想要的生物物質會結合到層析樹脂，而標靶重組蛋白則不會，其可包括將管柱用包含目標蛋白質的液體裝載、在流出液中收集標靶重組蛋白，並且重新平衡該管柱的步驟。如本技藝中所詳知的，任何在層析法循環中的單一步驟可包含單一緩衝液或多重緩衝液(例如兩種或多於兩種緩衝液)，並且層析循環中的任何單一步驟之一項或多於一項可包含緩衝液梯度。任何單一層析循環之各詳知方面的組合均可以任何組合、流速、緩衝液、管柱的空隙體積、管柱的柱床體積、緩衝液體積、用於每一步驟的緩衝液體積、包含標靶蛋白質的液體體積、以及使用於每一步驟之緩衝液的數目和型式被使用於這些方法中。

用 γ -射線殺菌的樹脂進行層析的方法

【0069】 本說明書中提供的是用 γ -射線照射的層析樹脂實行層析的方法。這些方法包括提供包含 γ -射線照射的層析樹脂之層析法管柱，通過管柱進行第一個層析循環，其中該循環包括將層析樹脂暴露至變性緩衝液，並且經過該管柱進行至少一個另外的層析循環。 γ -射線照射的層析樹脂可為任何型式的層析樹脂且/或可為任何本說明書中說明或本技藝已知的包含 γ -射線照射的層析樹脂。層析管柱可為任何本說明書中說明或本技藝已知的包含 γ -射線照射的層析樹脂的層析管柱。該重組蛋白可為重組的治療用蛋白質(例如任何本說明書中說明或本技藝已知的重組治療用蛋白質)。

【0070】 在某些實例中，該管柱是多重管柱層析系統(MCCS)的部分，例如可為週期性反流層析系統(PCCS)的部分。

【0071】 變性緩衝液可為任何本說明書中說明或本技藝以之作為範例的變性緩衝液。例如，該變性緩衝液包括尿素、鹽酸胍和 Triton™ X-100 之一種或多於一種。在某些實例中，該層析樹脂被暴露到變性緩衝液經過介於至少 1 分鐘到大約 2 小時的期間(例如介於 1 分鐘和大約 1.5 小時之間，介於大約 1 分鐘和大約 1.0 小時之間，介於大約 1 分鐘和大約 55 分鐘之間，介於大約 1 分鐘和大約 50 分鐘之間，介於大約 1 分鐘和大約 45 分鐘之間，介於大約 1 分鐘和大約 40 分鐘之間，介於大約 1 分鐘 和大約 40 分鐘之間，介於大約 1 分鐘和大約 35 分鐘之間，介於大約 1 分鐘和大約 30 分鐘之間，介於大約 1 分鐘和大約 25 分鐘之間，介於大約 1 分鐘和大約 20 分鐘之間，介於大約 1 分鐘和大約 15 分鐘之間，或介於大約 1 分鐘和大約 10 分鐘)。在某些實例中，將層析樹脂暴露到變性緩衝液包括使介於大約 0.5x 柱床體積到大約 10x 柱床體積(例如，介於大約 0.5x 柱床體積到大約 9.0x 柱床體積，介於大約 0.5x 柱床體積到大約 8.0x 柱床體積，介於大約 0.5x 柱床體積到大

約 7.0x 柱床體積，介於大約 0.5x 柱床體積到大約 6.0x 柱床體積，介於大約 0.5x 柱床體積到大約 5.0x 柱床體積，介於大約 0.5x 柱床體積到大約 4.0x 柱床體積，介於大約 0.5x 柱床體積到大約 3.5x 柱床體積，介於大約 0.5x 柱床體積到大約 3.0x 柱床體積，介於大約 0.5x 柱床體積到大約 2.5x 柱床體積，介於大約 0.5x 柱床體積到大約 2.0x 柱床體積，或介於大約 0.5x 柱床體積到大約 1.5x 柱床體積)的變性緩衝液通過層析管柱。在某些實例中，第一個層析循環可包括將層析樹脂暴露至包含大約 0.5 M 到大約 1.5 M 氫氧化鈉的沖洗緩衝液，接著暴露到變性緩衝液。

【0072】 通過管柱進行的第一個層析循環可為任何本說明書中說明或本技藝已知的層析循環，其包括將層析樹脂暴露至變性緩衝液。該至少另一個通過管柱進行的層析循環可為任何本說明書中說明或本技藝已知的層析循環。例如，該第一層析循環和至少另一個層析循環包括以下步驟：藉著將層析樹脂與包含重組蛋白的液體接觸捕獲重組蛋白；藉著將層析樹脂與沖洗緩衝液接觸沖洗重組蛋白，藉著將層析樹脂與溶離緩衝液接觸將重組蛋白溶離出來，並且使層析樹脂暴露至變性緩衝液以使層析樹脂再生。在某些實例中，該包含重組蛋白的液體是一種液態培養基(例如一種從灌滿或分批培養物收集到的液態培養基)。

【0073】 第一個層析循環和至少另一個層析法循環可利用封閉的和整合的系統(例如任何作為範例之本說明書中說明或本技藝已知的封閉和整合系統)。例如，第一個層析循環和至少另一個層析循環可利用封閉的和整合的系統實行，其中該緩衝液是生物負荷量減低的緩衝液(例如用於第一個和至少另一個循環中的所有緩衝液)。如本技藝中詳知的，生物負荷量減低

的緩衝液可利用各種不同的方法生產(例如藉由過濾法、加壓釜處理或熱處理製備之)。

【0074】 該至少另一個層析循環可為兩個或更多個(例如 3 個或更多個、4 個或更多個、5 個或更多個、6 個或更多個、7 個或更多個、8 個或更多個、9 個或更多個、10 個或更多個、11 個或更多個、12 個或更多個、13 個或更多個、14 個或更多個、15 個或更多個、20 個或更多個、25 個或更多個、30 個或更多個、35 個或更多個、40 個或更多個、45 個或更多個、50 個或更多個、55 個或更多個、60 個或更多個、65 個或更多個、70 個或更多個、75 個或更多個、80 個或更多個、85 個或更多個、90 個或更多個、95 個或更多個、或 100 個或更多個)另外的層析循環。在某些實例中，至少另一個層析循環被連續操作至少 3 天(例如，至少 4 天、至少 5 天、至少 6 天、至少 7 天、至少 8 天、至少 9 天、至少 10 天、至少 11 天、至少 12 天、至少 13 天、至少 14 天、至少 15 天、至少 16 天、至少 17 天、至少 18 天、至少 19 天、至少 20 天、至少 21 天、至少 22 天、至少 23 天、至少 24 天、至少 25 天、至少 30 天、至少 35 天、至少 40 天、至少 45 天、至少 50 天、至少 55 天、至少 60 天、至少 65 天、至少 70 天、至少 75 天、至少 80 天、至少 85 天、至少 90 天、至少 95 天、或至少 100 天)的期間。

【0075】 整合的、封閉的或基本上封閉且連續之製造重組蛋白的過程

【0076】 本說明書中提供的是整合的、封閉的或基本上封閉的，以及連續之製造純化重組蛋白(例如重組之治療用蛋白質)的過程。這些過程包括提供基本上不含細胞之包含一種重組蛋白(例如重組之治療用蛋白質)的液態培養基。

【0077】 某些過程包括將液態培養基連續注入多重管柱層析系統 (MCCS)，該系統包括至少一個包含 γ -射線殺菌樹脂的層析管柱，其中該層析樹脂在每一循環被暴露至變性緩衝液(例如暴露至任一本說明書中說明的或本技藝已知的變性緩衝液經歷本說明書中說明的任何期間)。這些過程使用生物負荷量減低的緩衝液是整合的，並且連續從液態培養基流到出自 MCCS 的洗出液，其為純化的重組蛋白(例如治療用的蛋白質藥物)。

【0078】 某些過程包括將液態培養基連續注入第一個 MCCS (MCCS1)、利用 MCCS1 從液體培養機捕獲重組蛋白、從包含重組蛋白的 MCCS1 產生洗出液並且將洗出液連續注入第二個多管柱層析法系統 (MCCS2)中、將得自洗出液的重組蛋白連續注入 MCCS2 並緊接著溶離該重組蛋白，從而產生純化的重組蛋白，其中至少一個 MCCS1 和/或 MCCS2 中的管柱是含有 γ -射線照射的層析樹脂層析管柱並且使該層析樹脂在每一循環期間暴露到變性緩衝液(例如暴露至任何本說明書中說明或本技藝已知的變性緩衝液經歷任何本說明書中說明的期間)。這些過程使用生物負荷量減低的緩衝液，其為整合的，並且連續從液態培養基進行到純化的重組蛋白。

【0079】 在某些實例中，每一 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2 中使用的層析管柱均包含 γ -射線照射的層析樹脂。某些具體實例尚包括將純化的重組蛋白調配成醫藥調配物。

【0080】 本說明書中所說明的過程提供連續的和時間上有效之從包含重組蛋白之液態培養基生產純化之重組蛋白的方法。例如將包含醫療用蛋白質的液態培養基注入 MCCS 或 MCCS1 和將重組蛋白從 MCCS 或 MCCS2 溶離出來之間經過的時間，分別可為例如：介於大約 4 小時和大約

48 小時之間(包含首末值在內),例如:介於大約 4 小時和大約 40 小時之間,介於大約 4 小時和大約 35 小時之間,介於大約 4 小時和大約 30 小時之間,介於大約 4 小時和大約 28 小時之間,介於大約 4 小時和大約 26 小時之間,介於大約 4 小時和大約 24 小時之間,介於大約 4 小時和大約 22 小時之間,介於大約 4 小時和大約 20 小時之間,介於大約 4 小時和大約 18 小時之間,介於大約 4 小時和大約 16 小時之間,介於大約 4 小時和大約 14 小時之間,介於大約 4 小時和大約 12 小時之間,介於大約 6 小時和大約 12 小時之間,介於大約 8 小時和大約 12 小時之間,介於大約 6 小時和大約 20 小時之間,介於大約 6 小時和大約 18 小時之間,介於大約 6 小時和大約 14 小時之間,介於大約 8 小時和大約 16 小時之間,介於大約 8 小時和大約 14 小時之間,介於大約 8 小時和大約 12 小時之間,介於大約 10 小時和 20 小時之間,介於大約 10 小時和 18 小時之間,介於大約 10 小時和 16 小時之間,介於大約 10 小時和 14 小時之間,介於大約 12 小時和大約 14 小時之間,介於大約 10 小時和大約 40 小時之間,介於大約 10 小時和大約 35 小時之間,介於大約 10 小時和大約 30 小時之間,介於大約 10 小時和大約 25 小時之間,介於大約 15 小時和大約 40 小時之間,介於大約 15 小時和大約 35 小時之間,介於大約 15 小時和大約 30 小時之間,介於大約 20 小時和大約 40 小時之間,介於大約 20 小時和大約 35 小時之間,或介於大約 20 小時和大約 30 小時之間(包含首末值在內)。在另一項實例中,將包含醫療用蛋白質的液態培養基注入 MCCS 或 MCCS1 和將重組蛋白從 MCCS 或 MCCS2 溶離出來之間所經時間,分別是例如大於大約 4 小時和小於大約 40 小時(包含首末值在內),例如:大於大約 4 小時和小於大約 39 小時、大約 38 小時、大約 37 小時、大約 36 小時、大約 35 小時、大約 34 小時、大約 33 小時、大

約 32 小時、大約 31 小時、大約 30 小時、大約 29 小時、大約 28 小時、大約 27 小時、大約 26 小時、大約 25 小時、大約 24 小時、大約 23 小時、大約 22 小時、大約 21 小時、大約 20 小時、大約 19 小時、大約 18 小時、大約 17 小時、大約 16 小時、大約 15 小時、大約 14 小時、大約 13 小時、大約 12 小時、大約 11 小時、大約 10 小時、大約 9 小時、大約 8 小時、大約 7 小時、大約 6 小時、大約 5 小時或大約 4.5 小時(包含首末值在內)。

【0081】 可用於任何這些過程之 MCCS 之非作為限制的方面(MCCS、MCCS1、和/或 MCCS2)說明在美國臨時專利申請案序號 61/775,060 和 61/856,390 (每一者均以參考資料併在本說明書中)。

【0082】 某些作為範例的過程並未使用保存步驟(例如在整個過程中不使用容器[例如緩衝箱])其他則在整個過程中使用最多 1、2、3、4 或 5 個容器(例如緩衝箱)。任何本說明書中說明的過程可使用最多 1、2、3、4 或 5 個容器(例如緩衝箱)在整個過程中，其中每一緩衝箱只保存重組蛋白經過例如介於大約 5 分鐘和少於大約 6 小時(保括首末值在內)，介於大約 5 分鐘和大約 5 小時，大約 4 小時、大約 3 小時、大約 2 小時、大約 1 小時或大約 30 分鐘(保括首末值在內)的總期間。

【0083】 某些過程使用一、二、三、四、五或六個容器(例如緩衝箱)且可具有例如介於 1 mL 和大約 300 mL(包含首末值在內)，例如介於 1 mL 和大約 280 mL、大約 260 mL、大約 240 mL、大約 220 mL、大約 200 mL、大約 180 mL、大約 160 mL、大約 140 mL、大約 120 mL、大約 100 mL、大約 80 mL、大約 60 mL、大約 40 mL、大約 20 mL、或大約 10 mL (包含首末值在內)的容量，任何在液體被注入 MCCS 或 MCCS 之前(在任何本說明書中說明的過程中)被用於保存液體的容器(例如緩衝箱)可具有容量為：

例如介於 1 mL 和大約 100% (包含首末值在內), 例如介於 1 mL 和大約 90%、大約 80%、大約 70%、大約 60%、大約 50%、大約 40%、大約 30%、大約 20%、大約 10%、或大約 5% (包含首末值在內) 的 MCCS 或 MCCS1 的第一個管柱裝載體積。一個容器 (例如緩衝箱) 可被於保留來自 MCCS1 的洗出液—在其進入 MCCS2 之前, 且可具有例如介於 1 mL 和大約 100% (包含首末值在內) 的容量, 例如介於 1 mL 和大約 90%、大約 80%、大約 70%、大約 60%、大約 50%、大約 40%、大約 30%、大約 20%、大約 10% 或大約 5% (包含首末值在內) 之 MCCS2 的第一個管柱裝載量。

【0084】 這些方法之各種附加方面於以下詳細說明, 並且可以任何組合在本說明書所提供的方法中被使用而不受到限制。所提供方法之作為範例的方面說明於以下; 然而熟習本技藝者會知道附加的步驟可被添加到本說明書所說明的方法中, 並且其他材料可被使用以進行任何本說明書中所說明方法的步驟。

液態培養基

【0085】 包含重組蛋白 (例如重組的治療用蛋白質) 之基本上不含細胞的液態培養基可得自任何來源。例如, 該液態培養基可得自重組細胞培養物 (例如重組細菌、酵母菌或哺乳動物細胞培養物)。該液體培養基可得自分批注入的細胞 (例如哺乳動物細胞) 的培養物 (例如一個包含能分泌重組蛋白之哺乳動物細胞培養物之分批注入生物反應器包括能分泌重組蛋白之哺乳動物細胞培養物) 或灌滿的細胞 (例如哺乳動物細胞) 培養物 (例如包含能分泌重組蛋白的哺乳動物細胞之灌滿生物反應器)。該液態培養基亦可為得自能分泌重組蛋白的細菌或酵母菌培養之澄清化的液態培養基。

【0086】 從重組細胞培養物得到的液態培養基可經過濾或澄清化以得到基本上不含細胞和/或病毒的液態培養基。過濾或澄清液態培養基以移除細胞的方法在本技藝中已知(例如 0.2-微米過濾和利用交替切線流動(Alternating Tangential Flow, ATF™)系統過濾。亦可利用離心法並移除基本上不含細胞的上澄液,或容許細胞沉降到包含液體培養基的容器(例如生物反應器)重力底部並移除遠離沉降細胞的液態培養基(基本上不含細胞的液態培養基)以將重組細胞從液態培養基中移出。

【0087】 該液態培養基可得自重組細胞(例如重組細菌、酵母菌或哺乳動物細胞)的培養物,該重組細胞能產生本說明書中說明的或本技藝中已知的任何重組蛋白(例如,重組的治療用蛋白質)。任何本說明書中說明的過程實例均可進而包括培養能生產重組蛋白(例如重組的治療用蛋白質)之重組細胞(例如重組細菌、酵母菌或哺乳動物細胞)的步驟。

【0088】 液態培養基可為任何本說明書中說明的或本技藝已知的液態培養基。例如,該培養基可選自以下群組:不含得自動物成分的液態培養基、不含血清的液態培養基,含血清的液態培養基,化學定義的液態培養基,以及不含蛋白值的液態培養基。在任何本說明書中說明的過程中,得自培養物的液態培養基可在裝填到 MCCS 或 MCCS1 之前藉由添加第二種液體(例如一種緩衝液)將其稀釋。

【0089】 基本上不含細胞之包含重組蛋白的液態培養基可貯存(例如在低於大約 15 °C 的溫度(例如低於大約 10 °C、低於大約 4 °C、低於大約 0 °C、低於大約 -20 °C、低於大約 -50 °C、低於大約 -70 °C 或低於大約 -80 °C)經至少一天(例如至少大約 2 天、至少大約 5 天、至少大約 10 天、至少大約 15 天、至少大約 20 天、或至少大約 30 天)在將該液態培養基注入 MCCS 或 MCCS1

之前。或者，在某些實例中該液態培養基被直接從生物反應器注入 MCCS 或 MCCS1(例如在過濾或澄清化步驟之後直接從生物反應器注入 MCCS 或 MCCS1)。

多重管柱層析系統

【0090】 本說明書中說明的過程包括使用 MCCS 或兩個或多於兩個(例如二、三、四、五或六個)多重管柱層析系統(MCCSs) (例如 MCCS1 和 MCCS2)。一個 MCCS 可包括兩個或多於兩個層析管柱、兩片或多於兩片層析薄膜，或至少一個層析管柱與至少一片層析薄膜的組合。在非作為限制的實例中，MCCS(例如在任何本說明書的過程中之 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2)可包含四個層析管柱、三個層析管柱和一片層析薄膜、三個層析管柱、兩個層析管柱、兩片層析薄膜，以及兩個層析管柱和一片層析薄膜。層析管柱和/或層析薄膜之另外的實例可以被熟習本技藝者預想到其在 MCCS (例如 MCCS, MCCS1 和/或 MCCS2 在任何本說明書中說明的過程中)之用途。存在於 MCCS 之個別的層析管柱和/或層析薄膜可為完全相同的(例如具有相同的形狀、體積、樹脂、捕獲機制、單元操作)，或可為相異的(例如具有一種或多於一種不同的形狀、體積、樹脂、捕獲機制和單元操作)。存在於 MCCS(例如 MCCS, MCCS1, 和/或 MCCS2 在任何本說明書中說明的過程中)的個別層析管柱(s)和/或層析薄膜可進行相同的單元操作(例如捕獲、純化或精製的單元操作)或相異的單元操作(例如選自例如捕獲、純化、精製、使病毒失活、調整包含重組蛋白之液體的離子濃度和/或 pH 值、和過濾之單元操作)。例如，在本說明書中說明的實例中，在 MCCS 或 MCCS1 中之至少一個層析管柱和/或層析薄膜係進行捕獲重組蛋白之單元操作。

【0091】 存在於 MCCS (例如存在於 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2) 中的一個或多於一個層析管柱可具有的樹脂體積，例如介於大約 1 mL 和大約 2 mL、大約 5 mL、大約 10 mL、大約 15 mL、大約 20 mL、大約 25 mL、大約 30 mL、大約 35 mL、大約 40 mL、大約 45 mL、大約 50 mL、大約 55 mL、大約 60 mL、大約 65 mL、大約 70 mL、大約 75 mL、大約 80 mL、大約 85 mL、大約 90 mL、大約 95 mL、或大約 100 mL (包含首末值在內)。

可存在於 MCCS (例如存在於 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2)中的一個或多於一個層析管柱可具有的樹脂體積介於大約 2 mL to 大約 100 mL、介於大約 2 mL 和大約 90 mL、介於大約 2 mL 和大約 80 mL、介於大約 2 mL 和大約 70 mL、介於大約 2 mL 和大約 60 mL、介於大約 2 mL 和大約 50 mL、介於大約 5 mL 和大約 50 mL、介於大約 2 mL 和大約 45 mL、介於大約 5 mL 和大約 45 mL、介於大約 2 mL 和大約 40 mL、介於大約 5 mL 和大約 40 mL、介於大約 2 mL 和大約 35 mL、介於大約 5 mL 和大約 35 mL、介於大約 2 mL 和大約 30 mL、介於大約 5 mL 和大約 30 mL、介於大約 2 mL 和大約 25 mL、介於大約 5 mL 和大約 25 mL、介於大約 15 mL 和大約 60 mL、介於大約 10 mL 和大約 60 mL、介於大約 10 mL 和大約 50 mL、和介於大約 15 mL 和大約 50 mL。用於本說明書中說明的任一過程之 MCCS (例如存在於 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2)中的一個或多於一個層析管柱可具有的樹脂體積 可具有基本上相同的樹脂體積或可具有相異的樹脂體積。MCCS (例如 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2)中的一個或多於一個層析管柱的流速可為例如：介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 25 mL/分鐘(例如介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約

0.5 mL/分鐘到大約 10 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL 分鐘和大約 14 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 25.0 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 15.0 mL/分鐘)。

【0092】 MCCS (例如 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2)中的一個或多於一個層析管柱可具有基本上相同的形狀或可具有基本上相異的形狀。例如，MCCS (例如 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2)中的一個或多於一個層析管柱可具有基本上為圓柱體的形狀或基本上為橢圓柱體的同樣形狀。

【0093】 可存在於 MCCS (例如 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2)中的一片或多於一片層析薄膜可具有之柱床體積，例如：介於大約 1 mL 到大約 500 mL (例如介於大約 1 mL 到大約 475 mL、介於大約 1 mL 到大約 450 mL、介於大約 1 mL 到大約 425 mL、介於大約 1 mL 到大約 400 mL、介於大約 1 mL 到大約 375 mL、介於大約 1 mL 到大約 350 mL、介於大約 1 mL 到大約 325 mL、介於大約 1 mL 到大約 300 mL、介於大約 1 mL 到大約 275 mL、介於大約 1 mL 到大約 250 mL、介於大約 1 mL 到大約 225 mL、介於大約 1 mL 到大約 200 mL、介於大約 1 mL 到大約 175 mL、介於大約 1 mL 到大約 150 mL、介於大約 1 mL 到大約 125 mL、介於大約 1 mL 到大約 100 mL、介於大約 2 mL 到大約 100 mL、介於大約 5 mL 到大約 100 mL、介於大約 1 mL 到大約 80 mL、介於大約 2 mL 到大約 80 mL、介於大約 5 mL 到大約 80 mL、介於大約 1 mL 到大約 60 mL、介於大約 2 mL 到大約 60 mL、介於大約 5 mL 到大約 60 mL、介於大約 1 mL 到大約 40 mL、介於大約 2 mL 到大約 40 mL、介於大約 5 mL 到大約 40 mL、介於大約 1 mL 到大約 30 mL、介於大約 2 mL 到大約 30 mL、介於大約 5 mL 到大約 30 mL、介於大約 1 mL 和大約 25 mL、介於大約 2 mL 和大約 25 mL、介於大約 1 mL 和大約 20 mL、

介於大約 2 mL 和大約 20 mL、介於大約 1 mL 和大約 15 mL、介於大約 2 mL 和大約 15 mL、介於大約 1 mL 和大約 10 mL、或介於大約 2 mL 和大約 10 mL)。

【0094】 一種或多於一種(例如，三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四、十五、十六、十七、十八、十九、二十、二十一、二十二、二十三或二十四種)不同型式之生物負荷量減低的緩衝液可在本說明書中說明的任何過程中使用 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2 期間被採用。如本技藝中所知，本說明書中說明的任何過程中之 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2 使用的一種或多於一種型式之生物負荷量減低的緩衝液會視存在於 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2 之層析管柱和/或層析薄膜中的樹脂、重組蛋白的生物物理性質，以及 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2 之特定層析管柱和/或層析薄膜進行的單元操作(例如任何本說明書中說明之任何作為範例的單元操作)而定。在使用本說明書中說明的任何過程中之 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2 期間採用之緩衝液的體積及型式亦可被熟習本技藝者所決定(例如在以下更詳細的討論)。例如，在使用本說明書中說明的任何過程中之 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2 期間採用之緩衝液的體積及型式可被選擇以使以下純化之重組蛋白中的一項或多於一項最佳化：重組蛋白的總產率、重組蛋白的活性、重組蛋白的純化程度、以及從包含重組蛋白的液體(例如液態培養基)將生物污染物移除(例如，不含活性的病毒、分個桿菌、酵母菌、細菌或哺乳動物細胞)。

【0095】 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2 可為週期性反流層析系統(PCCS)。PCCS 可以包括兩個或多於兩個層析管柱(例如三個管柱或四個管柱)，其可被調換以容許連續將重組蛋白從兩個或多於兩個層析管柱中溶離

出來。PCCS 可包含兩個或多於兩個層析管柱、兩片或多於兩片層析薄膜、或至少一個層析管柱和至少一片層析薄膜。管柱操作(循環)一般包括：裝載、沖洗、溶離和再生的步驟。在 PCCS 中，多個管柱被使用以循環的方式分開地和連續地進行相同步驟。因為管柱是依序操作的，流經一個管柱的沖洗物會被另一個管柱捕獲。這種 PCCS 之獨特的特徵容許裝載接近其靜態結合容量而非動態結合容量的樹脂，這在分批模式的層析法中是典型的。因為連續的循環與溶離，所以進入 PCCS 的液體是經連續處理，而且包含重組蛋白的洗出液是連續產出的。

【0096】 管柱替換策略被採用以求在 PCCS 循環中從一個步驟前進到另一步驟。可被用於 PCCS 的管柱替換實例說明在美國臨時專利申請案序號第 61/775,060 號和第 61/856,390 號。例如，管柱替換法可採用兩項自動化的替換操作於每個管柱：第一項操作係關於最初產物的穿透，而第二項操作與管柱飽和重疊。測定何時應進行管柱替換操作可藉著監測從 PCCS 中每一層析管柱流出的洗出液中重組蛋白的濃度來決定(例如藉著 UV 監測來進行監測)。例如，管柱替換可藉任何能在線測量產物濃度而回饋控制的 PAT 工具來決定。PAT 工具能即時在線測量產物濃度而回饋控制。如本技藝中已知的，管柱替換可根據通過 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2 中一個或多於一個層析管柱和/或層析薄膜的時間或液體(例如緩衝液)的量來設計。

【0097】 在 PCCS 中，重組蛋白在每一存在於 PCCS 的層析管柱和/或層析薄膜上駐留的時間(RT)可減低而不需增加管柱/薄膜大小，因為從第一個管柱/薄膜之穿透物可被 PCCS 中的另一管柱/薄膜捕獲。一項連續過程的系統可經設計藉由改變管柱/薄膜體積(V)和 RT，利用 $V = D * RT$ 的公式以任何灌注速率(D)處理液態培養基。

【0098】 可使用目前所說明的過程以 MCCS 或 MCC1 和/或 MCCS2 實行的一項或多於一項單元操作包括：例如，捕獲重組蛋白、使存在於包含重組蛋白之液體中的病毒失活、純化重組蛋白、精鍊重組蛋白，保留該含有重組蛋白的液體(例如使用任何本說明書中說明之作為範例的緩衝槽)、過濾得自包含重組蛋白之液體中的顆粒狀物質和/或細胞，並調整包含重組蛋白之液體的離子濃度和/或 pH。

【0099】 在某些具體實例中，MCCS 或 MCCS1 包括進行捕獲重組蛋白之單元操作的至少一個層析管柱和/或層析薄膜。該捕獲之單元操作可利用至少一個例如利用捕獲機制的層析管柱和/或層析薄膜來實行。捕獲機制之非作為限制的實例包括蛋白質 A 結合捕獲機制、抗體-或抗體片段-結合捕獲機制、基質結合捕獲機制、適體-結合捕獲機制、標籤結合捕獲機制(例如多個 His 標籤為基礎的捕獲機制)以及輔因子結合捕獲機制。捕獲可利用樹脂進行，該樹脂可用於實行陽離子交換或陰離子交換層析法、分子篩層析法，或疏水性交互作用層析法。可用於捕獲重組蛋白之非作為限制的樹脂說明在本說明書中。另外可用於捕獲重組蛋白的樹脂實例在本技藝中是已知的。

【0100】 使存在於包含重組蛋白之液體中的病毒失活的單元操作可利用 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2 (例如包括：例如，能培育含重組蛋白的液體在介於大約 3.0 到 5.0 之 pH (例如介於大約 3.5 到大約 4.5，介於大約 3.5 到大約 4.25，介於大約 3.5 到大約 4.0，介於大約 3.5 到大約 3.8，或大約 3.75 的層析管柱、層析薄膜、或貯存槽)經至少 30 分鐘的期間(例如介於大約 30 分鐘到 1.5 小時，介於大約 30 分鐘到 1.25 小時，介於大約 0.75 小時到 1.25 小時，或大約 1 小時的期間來實行。

【0101】 純化重組蛋白的單元操作可利用一個或多於一個 MCCS (例如 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2)來實行，其包含例如一個包含樹脂(例如使用捕獲系統)的層析管柱或層析薄膜。捕獲機制的非作為限制的實例包括蛋白質 A 結合捕獲機制、抗體-或抗體片段-結合捕獲機制、基質結合捕獲機制、適體結合捕獲機制、標籤結合捕獲機制(例如多個 His 標籤為基礎的捕獲機制)以及輔因子結合捕獲機制。純化亦可利用樹脂進行，該樹脂可用於實行陽離子交換或陰離子交換層析法、分子篩層析法，或疏水性交互作用層析法。可用於捕獲重組蛋白之非作為限制的樹脂說明在本說明書中。另外可用於捕獲重組蛋白的樹脂實例在本技藝中是已知的。

【0102】 精製重組蛋白的單元操作可利用一個或多於一個 MCCS (例如 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2)來實行，其包含例如一個包含樹脂的層析管柱或層析薄膜，其可被用於實行。陽離子交換或陰離子交換層析法、分子篩層析法，或疏水性交互作用層析法。可用於捕獲重組蛋白之非作為限制的樹脂說明在本說明書中。另外可用於精製重組蛋白的樹脂實例在本技藝中是已知的。

【0103】 保存包含重組蛋白液體之單元操作可利用一個 MCCS (例如 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2)來實行，其包括至少一個容器(例如緩衝槽)或最多 1、2、3、4、或 5 個容器(例如緩衝槽)在 MCCS 或合併的 MCCS1 和 MCCS2。例如可被用於達成此項單元操作的容器(例如緩衝槽)之每一者可具有介於大約 1 mL 到大約 1 L 的體積(例如介於大約 1 mL 到大約 800 mL、介於大約 1 mL 到大約 600 mL、介於大約 1 mL 到大約 500 mL、介於大約 1 mL 到大約 400 mL、介於大約 1 mL 到大約 350 mL、介於大約 1 mL 到大約 300 mL、介於大約 10 mL 和大約 250 mL、介於大約 10 mL 和大約 200 mL、

介於大約 10 mL 和大約 150 mL、或介於大約 10 mL 到大約 100 mL)。用於本說明書中說明之過程的容器(例如緩衝槽)可具有容積例如介於 1 mL 和大約 300 mL 之間(包含首末值在內),例如介於 1 mL 和大約 280 mL、大約 260 mL、大約 240 mL、大約 220 mL、大約 200 mL、大約 180 mL、大約 160 mL、大約 140 mL、大約 120 mL、大約 100 mL、大約 80 mL、大約 60 mL、大約 40 mL、大約 20 mL 或大約 10 mL 之間(包含首末值在內)。用於(任何本說明說明之過程)在液體進入 MCCS 或 MCCS1 之前保存該液體的任何容器(例如所使用的緩衝槽)可具有容積例如介於 1 mL 和大約 100%(包含首末值在內)、介於大約 1 mL 和大約 90%、大約 80%、大約 70%、大約 60%、大約 50%、大約 40%、大約 30%、大約 20%、大約 10%或大約 5%(包含首末值在內)之 MCCS 或 MCCS1 的第一個管柱之裝載體積。用於在出自 MCCS 的洗出液進入 MCCS2 之前保存該洗出液的任何容器可具有容積為介於 1 mL 和大約 100% (包含首末值在內)、例如介於大約 1 mL 和大約 90%、大約 80%、大約 70%、大約 60%、大約 50%、大約 40%、大約 30%、大約 20%、大約 10%或大約 5%(包含首末值在內)之 MCCS2 的第一個管柱之裝載體積。

【0104】 該容器(例如緩衝槽)之每一者可保存該含重組蛋白的液體經至少 10 分鐘(例如至少 20 分鐘、至少 30 分鐘、至少 1 小時、至少 2 小時、至少 4 小時或少 6 小時)。在其他實例中,該容器(例如緩衝槽)僅能保存重組蛋白經總共例如介於大約 5 分鐘和少於大約 6 小時(包含首末值在內),例如介於大約 5 分鐘和大約 5 小時、大約 4 小時、大約 3 小時、大約 2 小時、大約 1 小時、或大約 30 分鐘(包含首末值在內)的期間。該容器(例如緩衝槽)可被用於保存和冷藏(例如在小於 25 °C, 小於 15 °C 或小於 10 °C 的溫度)

包含重組蛋白的液體。該容器可具有任何形狀，包括圓柱體、橢圓柱體、或大約長方形密封的和無法滲透的袋子。過濾包含重組蛋白之液體的單元操作可利用 MCCS (例如 MCCS、MCCS1、和/或 MCCS2)來實行，其包括：例如，一個濾器、或包含分子篩樹脂的層析管柱或層析薄膜。如本技藝中既知者，許多種次微米的濾器(例如濾器之聚有的濾孔大小為小於 1 μm 、小於 0.5 μm 、小於 0.3 μm 、大約 0.2 μm 、小於 0.2 μm 、小於 100 nm、小於 80 nm、小於 60 nm、小於 40 nm、小於 20 nm、或小於 10 nm)在本技藝中可獲得，其能移除掉任何沉澱物質和/或細胞(例如沉澱的未折疊蛋白質；沉澱的不想要的宿主細胞蛋白質；沉澱的脂質；細菌；酵母菌細胞、真菌細胞、分個桿菌；和/或哺乳動物細胞)。具有孔洞大小大約 0.2 μm 或小於 0.2 μm 的濾器已知能有效的將細菌從包含重組蛋白的液體移除。如本技藝已知者，包含分子篩樹脂的層析管柱或層析薄膜亦可被用於 MCCS (例如 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2)以實行過濾包含重組蛋白之液體的單元操作。

【0105】 調整包含重組蛋白之液體的離子濃度之單元操作的利用 MCCS (例如 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2)來實行，其包括並利用一個緩衝液調節容器(例如一個內嵌緩衝液調節容器)，該容器能將新的緩衝溶液添加到包含重組蛋白的液體中(例如介在 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2 之中的管柱間，或在倒數第二個 MCCS (e.g., the MCCS1)的最後一個管柱之後(例如 MCCS1) 且在包含重組蛋白的液體被注入下一個 MCCS(例如 MCCS2)之前)。如在本技藝中可知，內嵌的緩衝液調節容器可為任何大小(例如大於 100 mL)並且可包含任何經緩衝的溶液(例如具有一種或多於一種以下性質的經緩衝的溶液：與包含重組蛋白的液體相比，具增加或減少的 pH；與包含重組蛋白的液體相比，具增加或減少的離子(例如鹽)濃度；和/或增加或

減少之與重組蛋白競爭結合到樹脂的用劑濃度，該樹脂存在於 MCCS (例如 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2) 中的至少一個層析管柱或至少一片層析薄膜。

【0106】 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2 可進行兩個或兩個以上的單元操作。例如 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2 每一者可進行至少以下的單元操作：捕獲重組蛋白並使存在於包含重組蛋白之液體中的病毒失活；捕獲重組蛋白並使存在於包含重組蛋白之液體中的病毒失活，並調整包含重組蛋白之液體的離子濃度和/或 pH；純化重組蛋白並精鍊重組蛋白；純化重組蛋白、精鍊重組蛋白，並過濾包含重組蛋白之液體或移除包含重組蛋白之液體中的沉澱物和/或顆粒狀物質；以及純化重組蛋白、精鍊重組蛋白、過濾包含重組蛋白之液體或移除包含重組蛋白之液體中的沉澱物和/或顆粒狀物質，並調整包含重組蛋白之液體的離子濃度和/或 pH。

捕獲重組蛋白

【0107】 本發明的過程包括利用 MCCS 或 MCCS1 捕獲重組蛋白的步驟。從本技藝可知，包含重組蛋白的液態培養基可利用各種不同的方法連續輸送到 MCCS 或 MCCS1 中。例如，該液態培養基可用幫浦主動打入 MCCS 或 MCCS1 中，或該液態培養基可用重力注入 MCCS 或 MCCS1 中。該液態培養基在其被注入 MCCS 或 MCCS1 之前可貯存在一個容器中(例如一個貯存槽)，或者該液態培養基可用幫浦主動從包含細胞培養物(例如分泌重組蛋白到培養基中的哺乳動物細胞)的生物反應器注入 MCCS 或 MCCS1。

【0108】 該液態培養基可介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 25 mL/分鐘 (例如，介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 10 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL 分鐘和大約 14 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 25.0 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 15.0 mL/分鐘)的流速注入(裝載到) MCCS 或 MCCS1 中。包含重組蛋白的液態培養基可從任何本說明書中說明或本技藝中已知之作為範例的來源獲得。

【0109】 某些實例尚包括視需要在液態培養基被注入 MCCS 或 MCCS1 之前將其過濾的步驟。任合作為過濾本說明書中說明之液態培養基或包含重組蛋白的液體之作為範例的方法，或任何本技藝中已知的過濾方法均可被使用在液態培養基被注入 MCCS 或 MCCS1 前將之過濾。

【0110】 在本說明書中說明的方法中，從液態培養基捕獲重組蛋白是利用 MCCS 或 MCCS1 實行的。從本技藝中可知，為了達到捕獲重組蛋白，在 MCCS 或 MCCS1 之中至少有一個層析管柱或至少一片層析薄膜必須包含一種利用捕獲機制的樹脂(例如任何本說明書中說明之作為範例的捕獲機制)，或包含能進行陽離子交換、陰離子交換、分子篩、或疏水性交互作用層析法的樹脂。例如，若該重組蛋白是一個抗體或抗體片段，則該捕獲系統可為蛋白質 A 結合捕獲機制或抗原結合捕獲機制(其中該捕獲抗原是會被重組之抗體或抗體片段特定辨識的)。若該重組蛋白是一種酵素，則該捕獲機制可使用特定結合至酵素的抗體或抗體片段以捕獲該重組酵素、酵素的基質以捕獲該重組酵素、酵素的輔因子以捕獲該重組酵素，或者若該重組酵素包括一個標籤則可使用一種特定結合至存在於重組蛋白中之標籤的蛋

白質、金屬螯合物或抗體(或抗體片段)。可被用於捕獲重組蛋白之非作為限制的樹脂被說明在本說明書中，且另外之可用於捕獲重組蛋白的樹脂為本技藝已知者。一種非作為限制的使用蛋白質 A 結合捕獲機制之樹脂是 MabSelect SuRe 樹脂(GE Healthcare 公司出品，該公司位於紐澤西州的 Piscataway 市)。

【0111】 可用於捕獲重組蛋白而非作為限制之存在於 MCCS 或 MCCS1 中的層析管柱或層析薄膜之範例大小和形狀說明在本說明書中。該注入(裝載入) MCCS 或 MCCS1 中的液態培養基可包括，例如：介於大約 0.05 mg/mL 到大約 100 mg/mL 的重組蛋白(例如，介於大約 0.1 mg/mL 到大約 90 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 80 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 70 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 60 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 50 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 40 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 30 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 20 mg/mL、介於 0.5 mg/mL 到大約 20 mg/mL、介於大約 0.1mg/mL 到大約 15 mg/mL、介於大約 0.5 mg/mL 到大約 15 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 10 mg/mL、或介於大約 0.5 mg/mL 到大約 10 mg/mL 重組蛋白)。重組蛋白結合到用於進行捕獲之單元操作樹脂所需的平均時間可以例如：介於大約 5 秒到大約 10 分鐘(例如介於大約 10 秒到大約 8 分鐘、介於大約 10 秒到大約 7 分鐘、介於大約 10 秒到大約 6 分鐘、介於大約 10 秒到大約 5 分鐘、介於大約 30 秒到大約 5 分鐘、介於大約 1 分鐘到大約 5 分鐘、介於大約 10 秒到大約 4 分鐘、介於大約 30 秒到大約 4 分鐘、或介於大約 1 分鐘 到大約 4 分鐘)。

【0112】 從本技藝中可知，為了利用存在於 MCCS 或 MCCS1 中的層析管柱或層析薄膜捕獲重組蛋白，吾人必須實行裝載、沖洗、溶離和使

存在於 MCCS 或 MCCS1 中的層析管柱或層析薄膜再生的連續層析步驟。對於本說明書中說明的每一連續步驟所指定的任何作為範例的流速、緩衝液體積，和/或時間長度均可被使用於一個或多於一個這些相異的連續層析步驟(例如用於捕獲重組蛋白的一個或多於一個裝載、沖洗、溶離和使存在於 MCCS 或 MCCS1 中的層析管柱或層析薄膜再生的連續層析步驟)。以下提供對每一存在於 MCCS 或 MCCS1 中可用於捕獲的層析管柱或層析薄膜(例如 PCCS 或 PCCS1)指定而非作為限制之流速、緩衝液體積，和/或時間長度。此外，可用於 MCCS 和/或 MCCS1 之作為範例的緩衝液說明於下。

【0113】 包括至少一個層析管柱和/或層析薄膜(其包含可實行捕獲之單元操作樹脂，例如任何可用於本說明書中說明之捕獲的範例樹脂)的 MCCS 或 MCCS1 可裝載任何包含重組蛋白的液態培養基，使用任何以上說明的裝載流速(注入速度)。在某些實例中，包含樹脂而該樹脂能實行捕獲之單元操作的單一層析管柱或單一層析薄膜在介於大約 10 分鐘到大約 90 分鐘(例如介於大約 15 分鐘和大約 90 分鐘、介於大約 20 分鐘和 80 分鐘、介於大約 30 分鐘和 80 分鐘、介於大約 40 分鐘和大約 80 分鐘、介於大約 50 分鐘和大約 80 分鐘，和介於大約 60 分鐘和 80 分鐘)的時間裡進行裝載。在某些實例中，其中 MCCS 或 MCCS1 包含至少兩個層析含樹脂的管柱，該樹脂能連續實行捕獲的單元操作，連續裝載兩個層析管柱所需的時間是例如介於大約 50 分鐘到大約 180 分鐘(例如介於大約 60 分鐘和大約 180 分鐘、介於大約 70 分鐘和大約 180 分鐘、介於大約 80 分鐘和大約 180 分鐘、介於大約 90 分鐘和大約 180 分鐘、介於大約 100 分鐘和大約 180 分鐘、介於大約 110 分鐘和 150 分鐘，以及介於大約 125 分鐘和大 145 分鐘)。

【0114】 在將重組蛋白裝載到 MCCS 或 MCCS1 中至少一個層析管柱和/或層析薄膜(其包含可實行捕獲之單元操作樹脂)之後，該至少一個層析管柱和/或層析薄膜經以至少一種緩衝液予以沖洗。從本技藝可知，該至少一種(例如二種、三種或四種)沖洗用緩衝液係特意將所有不是重組蛋白的蛋白質從該至少一個層析管柱和/或層析薄膜上沖洗下來，而不會干擾到重組蛋白與樹脂的交互作用。

【0115】 該沖洗緩衝液可通過至少一個層析管柱或層析薄膜，以介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 25 mL/分鐘(例如介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 10 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 14 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 25.0 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 15.0 mL/分鐘)的流速進行。所用之沖洗用緩衝液的體積(例如，當使用不只一種沖洗用緩衝液時其為所使用沖洗用緩衝液的合併總體積)可為例如：介於大約 1X 管柱體積(CV)到大約 15X CV (例如介於大約 1X CV 到大約 14X CV、大約 1X CV 到大約 13X CV、大約 1X CV 到大約 12X CV、大約 1X CV 到大約 11X CV、大約 2X CV 到大約 11X CV、大約 3X CV 到大約 11X CV、大約 4X CV 到大約 11X CV、大約 5X CV 到大約 11X CV 或大約 5X CV 到大約 10X CV)。沖洗的總時間可為例如介於大約 2 分鐘到大約 3 小時(例如介於大約 2 分鐘到大約 2.5 小時、介於大約 2 分鐘到大約 2.0 小時、介於大約 5 分鐘到大約 1.5 小時、介於大約 10 分鐘到大約 1.5 小時、介於大約 10 分鐘到大約 1.25 小時、介於大約 20 分鐘到大約 1.25 小時或介於大約 30 分鐘到大約 1 小時)。

【0116】 MCCS 或 MCCS1 中至少一個層析管柱或層析薄膜(其包含可實行捕獲之單元操作的樹脂)之後，藉著使溶離緩衝液通過該 MCCS 或 MCCS1 中至少一個層析管柱或層析薄膜(其包含可實行捕獲之單元操作樹脂)以將重組蛋白溶離出來。該溶離緩衝液可以介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 25 mL/分鐘(例如介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 10 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘和大約 6.0 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 5.0 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘和大約 14 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 25.0 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 15.0 mL/分鐘)的流速通過至少一個層析管柱或層析薄膜(其包含可實行捕獲之單元操作的樹脂)。用於將重組蛋白從至少一個層析管柱或層析薄膜(其包含可實行捕獲之單元操作樹脂)之每一者溶離出來的溶離緩衝液體積可為：例如介於大約 1X 管柱體積(CV)到大約 15X CV (例如介於大約 1X CV 到大約 14X CV、大約 1X CV 到大約 13X CV、大約 1X CV 到大約 12X CV、大約 1X CV 到大約 11X CV、大約 2X CV 到大約 11X CV、大約 3X CV 到大約 11X CV、大約 4X CV 到大約 11X CV、大約 5X CV 到大約 11X CV 或大約 5X CV 到大約 10X CV)。總共的溶離時間可為介於大約 2 分鐘到大約 3 小時(例如介於大約 2 分鐘到大約 2.5 小時、介於大約 2 分鐘到大約 2.0 小時、介於大約 2 分鐘到大約 1.5 小時、介於大約 2 分鐘到大約 1.5 小時、介於大約 2 分鐘到大約 1.25 小時、介於大約 2 分鐘到大約 1.25 小時、介於大約 2 分鐘到大約 1 小時、介於大約 2 分鐘和大約 40 分鐘、介於大約 10 分鐘和大約 40 分鐘、介於大約 20 分鐘和大約 40 分鐘)。可用於這些方法之溶離緩衝液的非作為

限制的實例會視捕獲機制和/或重組蛋白而定。例如，溶離緩衝液可包含不同濃度的鹽(例如增加的鹽濃度)、不同的 pH(例如增加的或減少的鹽濃度)或一種能與重組蛋白競爭結合至該樹脂(能實行捕獲單元操作者)之分子。本說明書中說明之此種溶離緩衝液的實例是本技藝中詳知的。

【0117】 在將重組蛋白從 MCCS 或 MCCS1 中至少一個層析管柱或層析薄膜(其包含可實行捕獲之單元操作的樹脂)溶離出來之後，且在下一體積量的液態培養基能被裝載到至少一個層析管柱和/或層析薄膜之前，該至少一個層析管柱或層析薄膜必須用再生用緩衝液予以平衡。可使該再生用緩衝液通過至少一個層析柱或層析薄膜(其包含可實行捕獲之單元操作的樹脂)，以介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 25 mL/分鐘(例如介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 10 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘和大約 6.0 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 5.0 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘和大約 14 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 25.0 mL/分鐘、介於大約 5.0 mL/分鐘到大約 15.0 mL/分鐘或介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 15.0 mL/分鐘)的流速進行。在某些實例中，該再生緩衝液是一種變性緩衝液(例如本說明書中說明的任何變性緩衝液或合併的變性緩衝液)。用於平衡至少一個層析管柱或層析薄膜(其包含可實行捕獲之單元操作的樹脂)的再生緩衝液的體積可為例如介於大約 1X 管柱體積(CV)到大約 15X CV (例如介於大約 1X CV 到大約 14X CV、大約 1X CV 到大約 13X CV、大約 1X CV 到大約 12X CV、大約 1X CV 到大約 11X CV、大約 2X CV 到大約 11X CV、大約 3X CV

到大約 11X CV、大約 2X CV 到大約 5X CV、大約 4X CV 到大約 11X CV、大約 5X CV 到大約 11X CV 或大約 5X CV 到大約 10X CV)。

【0118】 在某些本說明書說明的過程中，MCCS 或 MCCS1 包含一個能貯存包含重組蛋白的液體在低 pH 值(例如低於 4.6、低於 4.4、低於 4.2、低於 4.0、低於 3.8、低於 3.6、低於 3.4、低於 3.2 或低於 3.0 的 pH 值)經過例如大約 1 分鐘到 1.5 小時(例如大約 1 小時)，且使存在於該包含重組蛋白的液體中之病毒失活的容器。可用於實行該使病毒失活之單元操作的容器是一個攪拌用燒瓶(例如 500-mL 的攪拌用燒瓶，例如 500-mL 攪拌用燒瓶與一個設定攪拌器)，其能貯存包含重組蛋白的液體經例如大約 1 分鐘到 1.5 小時，例如在該包含重組蛋白的液體被注入 MCCS2 之前。用於實行使病毒失活之單元操作的容器可為具有設定攪拌器的 500-mL 攪拌瓶(例如設定將容器中的液體混合[例如週期性混合]的攪拌器，例如每四小時進行)。可用於實行使病毒失活之單元操作的容器的另一實例則是能貯存包含重組蛋白的液體經例如大約 1 分鐘到 1.5 小時的塑膠袋(例如 500-mL 塑膠袋)，在例如包含重組蛋白的液體被注入 MCCS2 之前進行。在某些實例中，當包含重組蛋白的液體被注入用於實行病毒失活之單元操作的容器時，該液體可為已具低 pH 值者(例如低於 4.6、低於 4.4、低於 4.2、低於 4.0、低於 3.8、低於 3.6、低於 3.4、低於 3.2 或低於 3.0)。熟習本技藝者可知道許多其他的方法可被用於實行使病毒失活的單元操作。例如，對包含重組蛋白的液體施以 UV 照射亦可被用於實行使病毒失活的單元操作。實行使包含重組蛋白的液體中病毒失活之單元操作可使用的容器之作為非限制的實例說明在本說明書中。

【0119】 MCCS 或 MCCS1 可包括包含四個層析管柱的 PCCS，其中四個層析管柱中至少三個進行將重組蛋白從液態培養基中捕獲的單元操作(例如使用包含任一包含能實行捕獲之單元操作的樹脂之層析管柱的 MCCS[例如任何本說明書中所說明者])。在這些具體實例中，PCC 的第四個管柱可實行使包含重組蛋白的液體中病毒失活之單元操作(例如本說明書中說明之任何可用於達成使包含重組蛋白之液體中病毒失活的範例管柱)。

【0120】 在某些實例中，包含重組蛋白之液體連續從 MCCS1(例如 PCCS1)中被溶離出來，並且連續注入 MCCS2(例如 PCCS2)中。在 MCCS 或 MCCS1 (例如 PCCS 或 PCCS1)的洗出液中被回收的重組蛋白之百分率可為：例如，至少 70%、至少 72%、至少 74%、至少 76%、至少 78%、至少 80%、至少 82%、至少 84%、至少 86%、至少 88%、至少 90%、至少 92%、至少 94%、至少 96%或至少 98%)。得自 MCCS1 (例如 PCCS1)的洗出液可利用各種本技藝中已知的方法(例如配管)注入 MCCS2 (例如 PCCS2)。MCCS1 (例如 PCCS1)的洗出亦可被注入 MCCS2 (例如 PCCS2)，以例如介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 25 mL/分鐘(例如介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 10 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘和大約 6.0 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 5.0 mg/分鐘、介於大約 0.5 mL 分鐘和大約 14 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 25.0 mL/分鐘、介於大約 5.0 mL/分鐘到大約 15.0 mL/分鐘、介於大約 15 mL/分鐘到大約 25 mL/分鐘、或介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 15.0 mL/分鐘)的流速進行。

【0121】 本說明書中說明的某些方法尚可包括在得自 MCCS1 (例如 PCCS1)的洗出液被注入 MCCS2 (例如 PCCS2)之前調節其離子濃度和/或 pH 值的步驟。如本說明書中所說明的，得自 MCCS1 (例如 PCCS1)的洗出液之離子濃度和/或 pH 值可藉著將緩衝液(例如經由使用內嵌緩衝調節容器)添加到洗出液中予以調節(在其被注入 MCCS2 之前)。該緩衝液可從 MCCS1 被添加到該洗出液，以介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘(例如介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 12.5 mL/分鐘、介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 10.0 mL/分鐘、介於大約 0.1 mL/分鐘 到大約 8.0 mL/分鐘、介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 6 mL/分鐘、介於大約 0.1 mL/分鐘到 4 mL/分鐘、或介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 5 mL/分鐘)的流速進行。

【0122】 本說明書中所說明的方法可進而包括保存或貯存的步驟(且視需要還有冷藏)該出自 MCCS1 的洗出液，在將該洗出液從 MCCS1 注入 MCCS2 之前。如本說明書中所說明的，此種保存或貯存的步驟可利用任何本說明書中說明的容器(例如個援槽)來實行。

【0123】 本說明書所說明的方法亦可包括在出自 MCCS1 的洗出液被注入 MCCS2 之前將該洗出液過濾的步驟。任何本說明書中說明之作為範例的濾器或過濾方法都可被用在 MCCS1 的洗出液被注入 MCCS2 前將該洗出液過濾。

精製和純化重組蛋白

【0124】 MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2 可被用於實行純化和精製重組蛋白的單元操作。例如，MCCS2 可被用於實行純化和精至該重組蛋白的操作且出自 MCCS2 的洗出液是蛋白質的藥物物質。MCCS、MCCS1 和/或

MCCS2 可包括至少一個(例如二個、三個或四個)可用於實行重組蛋白之純化與精製之單元操作的層析管柱或層析薄膜，且至少一個(例如二個、三個或四個)可用於實行重組蛋白精製之單元操作的層析管柱或層析薄膜。

【0125】 至少一個可用於實行重組蛋白純化之單元操作的層析管柱或層析薄膜可包含利用捕獲機制(例如任何本說明書中說明或本技藝已知的捕獲機制)的樹脂，或是可被用於實行陰離子交換、陽離子交換、分子篩、或疏水性交互作用層析的樹脂。該至少一個可用於實行重組蛋白精製的層析管柱或層析薄膜可包含可被用於實行陰離子交換、陽離子交換、分子篩、或疏水性交互作用層析的樹脂(例如任何用於實行本說明書中說明或本技藝已知的陰離子交換、陽離子交換、分子篩、或疏水性交互作用層析之作為範例的樹脂)。

【0126】 至少一個可用於實行重組蛋白純化之單元操作的層析管柱或層析薄膜的大小、形狀和體積，和/或至少一片可用於實行重組蛋白精製之單元操作的層析薄膜的大小和形狀可為任何本說明書中說明作為範例的大小、形狀和體積的組合。熟習本技藝者可知，重組蛋白的純化和精製步驟可以例如包括裝載、沖洗、溶離和平衡至少一個用於實行重組蛋白之純化或精製的層析管柱或層析薄膜的步驟。典型上，該出自用於實行純化之單元操作的層析管柱或層析薄膜的溶離緩衝液可包含該重組蛋白。典型上，該出自用於實行純化之單元操作的層析管柱或層析薄膜的裝載和/或沖洗緩衝液包含該重組蛋白。

【0127】 例如，該至少一個可用於實行重組蛋白純化之單元操作的層析管柱或層析薄膜的大小可具有的體積，例如：介於大約 2.0 mL 到大約 200 mL (例如介於大約 2.0 mL 到大約 180 mL、介於大約 2.0 mL 到大約 160

mL、介於大約 2.0 mL 到大約 140 mL、介於大約 2.0 mL 到大約 120 mL、介於大約 2.0 mL 到大約 100 mL、介於大約 2.0 mL 到大約 80 mL、介於大約 2.0 mL 到大約 60 mL、介於大約 2.0 mL 到大約 40 mL、介於大約 5.0 mL 到大約 40 mL、介於大約 2.0 mL 到大約 30 mL、介於大約 5.0 mL 到大約 30 mL、或介於大約 2.0 mL 到大約 25 mL)。包含重組蛋白的液體當被裝載到至少一個層析管柱或至少一片層析薄膜(可被用於實行重組蛋白之純化的單元操作者)之流速可為，例如：介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 25 mL/分鐘(例如介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 12.5 mL/分鐘、介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 10.0 mL/分鐘、介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 8.0 mL/分鐘、介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 6 mL/分鐘、介於大約 0.1 mL/分鐘到 4 mL/分鐘、介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 3 mL/分鐘、介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 2 mL/分鐘、或大約 0.2 mL/分鐘到大約 4 mL/分鐘)。裝載到可用於實行重組蛋白純化之單元操作的至少一個層析管柱或層析薄膜之液體中的重組蛋白濃度可為例如：介於大約 0.05 mg/mL 到大約 100 mg/mL 重組蛋白(例如介於大約 0.1 mg/mL 到大約 90 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 80 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 70 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 60 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 50 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 40 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 30 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 20 mg/mL、介於 0.5 mg/mL 到大約 20 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 15 mg/mL、介於大約 0.5 mg/mL 到大約 15 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 10 mg/mL、或介於大約 0.5 mg/mL 到大約 10 mg/mL 重組蛋白)。該用於實行純化之單元操作的至少一個層析管柱或層析薄膜中的樹脂可為用於實行陰離子交換或陽離子交換層析法的樹脂。該用於實行純化之單元操作的至少

一個層析管柱或層析薄膜中的樹脂可為一種陽離子交換樹脂(例如 Capto-S 樹脂[奇異保健生命科學公司(GE Healthcare Life Sciences)出品，位在紐澤西州 Piscataway 市)。

【0128】 將重組蛋白裝載到可用於實行重組蛋白純化之單元操作的至少一個層析管柱或層析薄膜之後，將至少一個層析管柱或層析薄膜用至少一種沖洗緩衝液沖洗。從本技藝可知，至少一種(例如二種、三種或四種)沖洗緩衝液特意要將所有不是重組蛋白的蛋白質從至少一個層析管柱或層析薄膜中溶離出來而不干擾到重組蛋白與樹脂的交互作用，否則就會把重組蛋白溶離出來。

【0129】 該沖洗緩衝液可通過至少一個層析管柱或層析薄膜，以介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 25 mL/分鐘(例如介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 10 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘和大約 14 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 25.0 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 15.0 mL/分鐘)的流速進行。所使用之沖洗用緩衝液的體積(例如當一種或多於一種沖洗用緩衝液被使用時，將全部的沖洗用緩衝液體積合併起來)可為例如介於大約 1X 管柱體積(CV)到大約 15X CV (例如介於大約 1X CV 到大約 14X CV、大約 1X CV 到大約 13X CV、大約 1X CV 到大約 12X CV、大約 1X CV 到大約 11X CV、大約 2X CV 到大約 11X CV、大約 3X CV 到大約 11X CV、大約 4X CV 到大約 11X CV、大約 2.5X CV 到大約 5.0X CV、大約 5X CV 到大約 11X CV、或大約 5X CV 到大約 10X CV)。沖洗的總共時間介於大約 2 分鐘到大約 3 小時(例如介於大約 2 分鐘到大約 2.5 小時、

介於大約 2 分鐘到大約 2.0 小時、介於大約 5 分鐘到大約 1.5 小時、介於大約 10 分鐘到大約 1.5 小時、介於大約 10 分鐘到大約 1.25 小時、介於大約 20 分鐘到大約 1.25 小時、介於大約 30 分鐘到大約 1 小時、介於大約 2 分鐘和 10 分鐘、介於大約 2 分鐘和 15 分鐘、或介於大約 2 分鐘和 30 分鐘)。

【0130】 在沖洗用於實行重組蛋白純化之單元操作的至少一個層析管柱或層析薄膜之後，使溶離緩衝液通過用於實行重組蛋白純化之單元操作的至少一個層析管柱或層析薄膜以將重組蛋白從至少一個層析管柱或層析薄膜中溶離出來。可使該溶離緩衝液通過可用於實行重組蛋白純化之單元操作的至少一個層析管柱或層析薄膜，以介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 25 mL/分鐘(例如介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 10 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘和大約 6.0 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 5.0 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘和大約 14 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 25.0 mL/分鐘、或介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 15.0 mL/分鐘)的流速進行。用於將該重組蛋白從可用於實行重組蛋白純化之單元操作的至少一個層析管柱或層析薄膜之每一者中溶離出來的溶離緩衝液體積可為例如介於大約 1X 管柱體積(CV)到大約 25X CV (例如介於大約 1X CV 到大約 20X CV、介於大約 15X CV 和大約 25X CV、介於大約 1X CV 到大約 14X CV、大約 1X CV 到大約 13X CV、大約 1X CV 到大約 12X CV、大約 1X CV 到大約 11X CV、大約 2X CV 到大約 11X CV、大約 3X CV 到大約 11X CV、大約 4X CV 到大約 11X CV、大約 5X CV 到大約 11X CV、或大約 5X CV 到大約 10X CV)。總共的溶離時間可為介於大約 2 分鐘到大約 3 小時(例如

介於大約 2 分鐘到大約 2.5 小時、介於大約 2 分鐘到大約 2.0 小時、介於大約 2 分鐘到大約 1.5 小時、介於大約 2 分鐘到大約 1.5 小時、介於大約 2 分鐘到大約 1.25 小時、介於大約 2 分鐘到大約 1.25 小時、介於大約 2 分鐘到大約 1 小時、介於大約 2 分鐘和大約 40 分鐘、介於大約 10 分鐘和大約 40 分鐘、介於大約 20 分鐘和大約 40 分鐘、或介於大約 30 分鐘和 1.0 小時)。這些方法中非作為限制的可使用溶離緩衝液實例視樹脂和/或重組蛋白的生物物理性質而定。例如，一種緩衝液可包括不同濃度的鹽(例如增加的鹽濃度)、不同的 pH (例如增加的或減少的鹽濃度)、或與重組蛋白競爭結合至樹脂分子。用於本說明書說明之每一範例的捕獲機制之此種溶離緩衝液的實例是本技藝已詳知者。

【0131】 在將重組蛋白從可用於實行重組蛋白純化之單元操作的至少一個層析管柱或層析薄膜溶離出來之後，且在下一體積量之包含重組蛋白的液體能被裝載到至少一個層析管柱和/或層析薄膜之前，該至少一個層析管柱或層析薄膜必須用再生緩衝液予以平衡。可使該再生用緩衝液通過至少一個用於實行重組蛋白純化之單元操作的層析管柱或層析薄膜，以例如介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 25 mL/分鐘(例如介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 10 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘和大約 6.0 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 5.0 mg/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘和大約 14 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 25.0 mL/分鐘、介於大約 5.0 mL/分鐘到大約 15.0 mL/分鐘，或介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 15.0 mL/分鐘)的流速進行。用於平衡至少一個層析管柱或層析薄膜(其包含可實行純化

重組蛋白之單元操作的樹脂)的再生緩衝液的體積可為例如介於大約 1X 管柱體積(CV)到大約 15X CV (例如介於大約 1X CV 到大約 14X CV、介於大約 1X CV 到大約 13X CV、介於大約 1X CV 到大約 12X CV、介於大約 1X CV 到大約 11X CV、介於大約 2X CV 到大約 11X CV、介於大約 3X CV 到大約 11X CV、介於大約 2X CV 到大約 5X CV、介於大約 2.5X CV 到大約 7.5X CV、介於大約 4X CV 到大約 11X CV、介於大約 5X CV 到大約 11X CV、或介於大約 5X CV 到大約 10X CV)。用於實行重組蛋白純化之單元操作的至少一個層析管柱或層析薄膜之洗出液中的重組蛋白濃度可為，例如：介於大約 0.05 mg/mL 到大約 100 mg/mL 重組蛋白(例如介於大約 0.1 mg/mL 到大約 90 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 80 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 70 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 60 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 50 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 40 mg/mL、介於大約 2.5 mg/mL 和 大約 7.5 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 30 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 20 mg/mL、介於 0.5 mg/mL 到大約 20 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 15 mg/mL、介於大約 0.5 mg/mL 到大約 15 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 10 mg/mL，或介於大約 0.5 mg/mL 到大約 10 mg/mL 重組蛋白)。

【0132】 至少一個可用於實行重組蛋白精製之單元操作的層析管柱或層析薄膜可包含可被用於實行陰離子交換、陽離子交換、或分子篩層析法的樹脂。從本技藝中可知，使用至少一個可用於實行重組蛋白精製之單元操作的層析管柱或層析薄膜之重組蛋白精製可包括，例如：對至少一個可用於實行重組蛋白精製之單元操作的層析管柱或層析薄膜進行裝載、追捕和再生的步驟。例如，當裝載、追捕和再生的步驟被用於實行重組蛋白

的精製時，該重組蛋白不會結合至該至少一個可用於實行重組蛋白精製之單元操作的層析管柱或層析薄膜中的樹脂，並且該重組蛋白於裝載和追捕的步驟中從該至少一個層析管柱或層析薄膜被溶離出來，而再生步驟則被用於將另外的包含重組蛋白之液體裝載到該至少一個層析管柱或層析薄膜之前，先將任何雜質從該至少一個層析管柱或層析薄膜移除掉。被用在每一裝載、追捕和再生的步驟中之作為範例的流速和緩衝液體積說明於下。

【0133】 至少一個可用於實行重組蛋白精製之單元操作的層析管柱或層析薄膜的大小、形狀和體積，和/或至少一片可用於實行重組蛋白精製之單元操作的層析薄膜的大小和形狀可為任何本說明書中說明作為範例的大小、形狀和體積的組合。例如，至少一個可用於實行重組蛋白精製之單元操作的層析管柱或層析薄膜的大小可具有介於大約 0.5 mL 到大約 200 mL (例如介於大約 0.5 mL 到大約 180 mL、介於大約 0.5 mL 到大約 160 mL、介於大約 0.5 mL 到大約 140 mL、介於大約 0.5 mL 到大約 120 mL、介於大約 0.5 mL 到大約 100 mL、介於大約 0.5 mL 到大約 80 mL、介於大約 0.5 mL 到大約 60 mL、介於大約 0.5 mL 到大約 40 mL、介於大約 5.0 mL 到大約 40 mL、介於大約 0.5 mL 到大約 30 mL、介於大約 5.0 mL 到大約 30 mL、介於大約 0.5 mL 到大約 25 mL、介於大約 0.2 mL 到大約 10 mL，或介於大約 0.2 mL 到大約 5 mL)的體積。包含重組蛋白的液體當被裝載到至少一個層析管柱或至少一片層析薄膜(可被用於實行重組蛋白之精製的單元操作者)之流速可為，例如：介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 25 mL/分鐘 (例如介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 12.5 mL/分鐘、介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 10.0 mL/分鐘、介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 8.0 mL/分鐘、介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 6 mL/分鐘、介於大約 0.1 mL/分鐘到 4 mL/分鐘、介於大約 0.1 mL/分鐘

到大約 3 mL/分鐘、介於大約 2 mL/分鐘和大約 6 mL/分鐘、介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 2 mL/分鐘，或大約 0.2 mL/分鐘到大約 4 mL/分鐘)。裝載當可用於實行重組蛋白精製之單元操作的至少一個層析管柱或層析薄膜上之包含重組蛋白之液體的總體積可為，例如：介於大約 1.0 mL 到大約 250 mL (例如介於大約 1.0 mL 到大約 225 mL、介於大約 1.0 mL 到大約 200 mL、介於大約 1.0 mL 到大約 175 mL、介於大約 1.0 mL 到大約 150 mL、介於大約 100 mL 到大約 125 mL、介於大約 100 mL 到大約 150 mL、介於大約 1.0 mL 到大約 150 mL、介於大約 1.0 mL 到大約 125 mL、介於大約 1.0 mL 到大約 100 mL、介於大約 1.0 mL 到大約 75 mL、介於大約 1.0 mL 到大約 50 mL，或介於大約 1.0 mL 到大約 25 mL)。用於實行精製之至少一個層析管柱或層析薄膜中的樹脂可為陰離子交換或陽離子交換樹脂。用於實行重組蛋白精製的單元操作的至少一個層析管柱或層析薄膜中之樹脂可為陽離子交換樹脂 (例如 Sartobind® Q 樹脂，Sartoriuse 公司出品，位於德國的哥廷根市)。

【0134】 在裝載步驟之後，進行追捕的步驟(例如將追捕緩衝液通過至少一個層析管柱或層析薄膜以收集基本上不會與該至少一個層析管柱或層析薄膜結合的重組蛋白)。在這些實例中，可將追捕緩衝液通過至少一個層析管柱或層析薄膜，以介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 50 mL/分鐘(例如介於大約 1 mL/分鐘到大約 40 mL/分鐘、介於大約 1 mL/分鐘到大約 30 mL/分鐘、介於大約 5 mL/分鐘到大約 45 mL/分鐘、介於大約 10 mL/分鐘到大約 40 mL/分鐘、介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 10 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL 分鐘和大約 14 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大

約 25.0 mL/分鐘，或介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 15.0 mL/分鐘的流速進行)。

所使用的追捕緩衝液的體積可為例如：介於大約 1X 管柱體積(CV)到大約 100X CV (例如介於大約 1X CV 到大約 90X CV、介於大約 1X CV 到大約 80X CV、介於大約 1X CV 到大約 70X CV、介於大約 1X CV 到大約 60X CV、介於大約 1X 到大約 50X CV、介於大約 1X CV 到大約 40X CV、介於大約 1X CV 到大約 30X CV、介於大約 1X CV 到大約 20X CV、介於大約 1X CV 到大約 15X CV、介於大約 5X CV 到大約 20X CV、介於大約 5 X CV 到大約 30X CV、介於大約 1X CV 到大約 14X CV、大約 1X CV 到大約 13X CV、大約 1X CV 到大約 12X CV、大約 1X CV 到大約 11X CV、大約 2X CV 到大約 11X CV、大約 3X CV 到大約 11X CV、大約 4X CV 到大約 11X CV、大約 2.5X CV 到大約 5.0X CV、大約 5X CV 到大約 11X CV，或大約 5X CV 到大約 10X CV)。

追捕的總時間可為，例如：介於大約 1 分鐘到大約 3 小時(例如介於大約 1 分鐘到大約 2.5 小時、介於大約 1 分鐘到大約 2.0 小時、介於大約 1 分鐘到大約 1.5 小時、介於大約 2 分鐘到大約 1.5 小時、介於大約 1 分鐘到大約 1.25 小時、介於大約 2 分鐘到大約 1.25 小時、介於大約 1 分鐘到大約 5 分鐘、介於大約 1 分鐘到大約 10 分鐘、介於大約 2 分鐘到大約 4 分鐘、介於大約 30 分鐘到大約 1 小時、介於大約 2 分鐘和 10 分鐘、介於大約 2 分鐘和 15 分鐘，或介於大約 2 分鐘和 30 分鐘)。

在裝載步驟和在追捕步驟中存在於洗出液中之重組蛋白的合併濃度可為例如：介於大約 0.1 mg/mL 到大約 100 mg/mL 重組蛋白(e.g.、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 90 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 80 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 70 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 60 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 50 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 40 mg/mL、介於大約 2.5

mg/mL 到大約 7.5 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 30mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 20 mg/mL、介於 0.5 mg/mL 到大約 20 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 15 mg/mL、介於大約 0.5 mg/mL 到大約 15 mg/mL、介於大約 0.1 mg/mL 到大約 10 mg/mL、介於大約 0.5 mg/mL 到大約 10 mg/mL，或介於大約 1 mg/mL 和大約 5 mg/mL 重組蛋白)。

【0135】 在追捕步驟之後和在下一個包含重組蛋白的液體體積可裝載到該可用於實行精製之單元操作的至少一個層析管柱或層析薄膜之前，該至少一個層析管柱或層析薄膜必須利用再生緩衝液使其再生。可將再生緩衝液通過該可用於實行精製之單元操作的至少一個層析管柱或層析薄膜，以例如介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 50 mL/分鐘(例如介於大約 1 mL/分鐘到大約 40 mL/分鐘、介於大約 1 mL/分鐘到大約 30 mL/分鐘、介於大約 5 mL/分鐘到大約 45 mL/分鐘、介於大約 10 mL/分鐘到大約 40 mL/分鐘、介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 20 mL/分鐘、介於大約 0.2 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 10 mL/分鐘、介於大約 0.5 mL/分鐘和大約 14 mL/分鐘、介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 25.0 mL/分鐘，介於大約 1.0 mL/分鐘和大約 15.0 mL/分鐘)。使用於使可用於實行精製之單元操作的至少一個層析管柱或層析薄膜的再生緩衝液體積可為例如：介於大約 1X 管柱體積(CV)到大約 500X CV(例如介於大約 1X CV 到大約 450X CV、介於大約 1X CV 到大約 400X CV、介於大約 1X CV 到大約 350X CV、介於大約 1X CV 到大約 300X CV、介於大約 1X CV 到大約 250X CV、介於大約 1X CV 到大約 200X CV、介於大約 1X CV 到大約 150X CV、介於大約 1X CV 到大約 100 X CV、介於大約 1X CV 到大約 90X CV、介於大約

1X CV 到大約 80X CV、介於大約 1X CV 到大約 70X CV、介於大約 1X CV 到大約 60X CV、介於大約 1X 到大約 50X CV、介於大約 1X CV 到大約 40X CV、介於大約 1X CV 到大約 30X CV、介於大約 1X CV 到大約 20X CV、介於大約 1X CV 到大約 15X CV、介於大約 5X CV 到大約 20X CV、介於大約 5 X CV 到大約 30X CV、介於大約 1X CV 到大約 14X CV、大約 1X CV 到大約 13X CV、大約 1X CV 到大約 12X CV、大約 1X CV 到大約 11X CV、大約 2X CV 到大約 11X CV、大約 3X CV 到大約 11X CV、大約 4X CV 到大約 11X CV、大約 2.5X CV 到大約 5.0X CV、大約 5X CV 到大約 11X CV，或大約 5X CV 到大約 10X CV)。

【0136】 在其他實例中，用於實行精製之單元操作的至少一個層析管柱和/或層析薄膜包含樹脂可選擇性結合或保留存在於含重組蛋白之液體中之雜質，並且將使一個或多於一個管柱和/或薄膜再生的步驟代之以置換一個或多於一個管柱和/或薄膜(例如，一旦在一個或多於一個管柱和/或薄膜的結合容量已達到或基本上接近達成時用基本上相似的管柱和/或薄膜予以置換。

【0137】 本說明書說明的這些過程的某些實例中，MCCS2 包括含三個層析管柱和一片層析薄膜的 PCCS，其 PCCS 中的三個層析管柱可實行重組蛋白純化的單元操作(例如使用至少一個能用於實行蛋白質純化之單元操作的層析管柱)且該 PCCS 中的層析薄膜可實行精製重組蛋白的單元操作。在這些實例中，PCCS 中用於實行精製治療用蛋白質之單元操作的層析薄膜可為本說明書說明之任何作為範例之可用於精製重組蛋白的層析薄膜。本說明書中說明之任何管柱替換方法均可用於測定何時本實例之 PCCS 中前三個層析管柱和層析薄膜可替換。

【0138】 這些實例中的某些具體實例可進而包括在得自 PCCS 中三個層析管柱洗出液在注入層析薄膜之前調整其離子濃度和/或 pH 值的步驟。如本說明書中說明的，得自 PCCS 中三個層析管柱之離子濃度和/或 pH 值(在其注入本實例之 PCCS 中的層析薄膜之前)可藉添加緩衝液到 PCCS 中三個層析管柱之洗出液予以調節(例如透過使用內嵌的緩衝液調節容器)。該緩衝液可被添加到洗出液中，以例如介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 15 mL/分鐘(例如介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 12.5 mL/分鐘、介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 10.0 mL/分鐘、介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 8.0 mL/分鐘、介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 6 mL/分鐘、介於大約 0.1 mL/分鐘到大約 4 mL/分鐘，或介於大約 0.5 mL/分鐘到大約 5 mL/分鐘)。

【0139】 這些實例還可包括在將得自本實例之 PCCS 中三個層析管柱的洗出液注入層析薄膜(可用於實行重組蛋白精製之單元操作)前之保存或貯存的步驟。如本說明書中說明的，該保存或貯存的步驟可利用任何本說明書中說明的容器(例如個援槽)來實行。

【0140】 這些實例亦可包括過濾得自範例之 PCCS 系統中層析薄膜洗出液(可用於實行重組蛋白精製之單元操作的層析薄膜之洗出液)的步驟。本說明書中說明的任何作為範例之濾器或過濾方法均可被用於過濾得自本範例 PCCS 中層析薄膜的洗出液可用於實行重組蛋白精製之單元操作的層析薄膜之洗出液)。

【0141】 如本技藝中可知者，經純化的重組蛋白可利用本說明書中說明的任何過程週期性地從 MCCS 或 MCCS2 溶離出來。例如，任何本說明書中說明的過程可將純化的重組蛋白溶離，經過一段例如介於大約 30 秒和大約 5 小時(例如介於大約 1 分鐘和大約 4 小時、介於大約 1 分鐘和大約 3

小時、介於大約 1 分鐘和大約 2 小時、介於大約 1 分鐘或大約 1.5 小時、介於大約 1 分鐘和大約 1 小時，或介於大約 1 分鐘和大約 30 分鐘)的期間，以例如介於大約 1 分鐘和大約 6 小時(例如介於大約 1 分鐘和大約 5 小時、介於大約 1 分鐘和大約 4 小時、介於大約 1 分鐘和大約 3 小時、介於大約 1 分鐘和 2 小時、介於大約 1 分鐘和 1 小時，或介於大約 1 分鐘和 30 分鐘)的頻率進行，其視例如 MCCS 或 MCCS1 和 MCCS2 中所使用的例如層析管柱和/或層析薄膜而定。

培養的方法

【0142】 本說明書中說明的某些過程還包括能將重組蛋白分泌在生物反應器(例如灌滿的或分批注入的生物反應器)中之細胞(例如重組的哺乳動物細胞)培養步驟，該反應器包含一種液態培養基，其中將基本上不含細胞(例如哺乳動物細胞)的液態培養基連續或週期性地從生物反應器(例如灌滿的生物反應器)中移除並且注入 MCCS 或 MCCS1。該生物反應器可具有體積，例如：介於大約 1 L 到大約 10,000 L (例如介於大約 1 L 到大約 50 L、介於大約 50 L 到大約 500 L、介於大約 500 L 到大約 1000 L、介於 500 L 到大約 5000L、介於大約 500 L 到大約 10,000 L、介於大約 5000 L 到大約 10,000 L、介於大約 1 L 和大約 10,000 L、介於大約 1L 和大約 8,000 L、介於大約 1 L 和大約 6,000 L、介於大約 1 L 和大約 5,000 L、介於大約 100 L 和大約 5,000 L、介於大約 10 L 和大約 100 L、介於大約 10 L 和大約 4,000 L、介於大約 10 L 和大約 3,000 L、介於大約 10 L 和大約 2,000 L，或介於大約 10 L 和大約 1,000 L)。存在於生物反應器之液態培養基的量可為例如：介於大約 0.5 L 到大約 5,000 L (例如介於大約 0.5 L 到大約 25 L、介於大約 25 L 到大

約 250 L、介於大約 250 L 到大約 500 L、介於 250 L 到大約 2500 L、介於大約 250 L 到大約 5,000 L、介於大約 2500 L 到大約 5,000 L、介於大約 0.5 L 和大約 5,000 L、介於大約 0.5 L 和大約 4,000 L、介於大約 0.5 L 和大約 3,000 L、介於大約 0.5 L 和大約 2,500 L、介於大約 50 L 和大約 2,500 L、介於大約 5 L 和大約 50 L、介於大約 5 L 和大約 2,000 L、介於大約 5 L 和大約 1,500 L、介於大約 5 L 和大約 1,000 L，或介於大約 5 L 和大約 500 L)。細胞培養可利用例如分批注入的生物反應器或灌滿的生物反應器來實行，細胞培養之非限制實例與不同方面(例如培養哺乳動物細胞)在以下說明並可以任何組合方式被使用。

細胞

【0143】 本說明書中說明的某些過程中所培養的細胞可為細菌(例如格蘭氏陰性菌)、酵母菌(例如啤酒酵母[*Saccharomyces cerevisiae*]、嗜甲醇酵母菌[*Pichia pastoris*]、漢生酵母[*Hansenula polymorpha*]、乳酸克魯維酵母[*Kluyveromyces lactis*]、裂殖酵母[*Schizosaccharomyces pombe*]、解脂耶羅威亞酵母[*Yarrowia lipolytica*]，或不完全菌門[*Arxula adenivorans*])，或哺乳動物細胞。該哺乳動物細胞可為生長在懸浮物中的細胞或一種黏附細胞。可用任何本說明書中說明之過程培養的哺乳動物細胞之非作為限制的實例包括：中國倉鼠的卵巢(CHO)細胞(e.g., CHO DG44 細胞或 CHO-K1 細胞)、Sp2.0、骨髓瘤細胞(例如 NS/0)、B-細胞、融合瘤細胞、T-細胞、人類胚胎腎細胞(HEK) 細胞(例如 HEK 293E 和 HEK 293F)、非洲綠猴腎上皮細胞(Vero)細胞，以及馬-達二氏犬[*Madin-Darby Canine*] (即西班牙長耳獵犬)腎上皮細胞(MDCK)細胞。在某些實例中，當黏附的細胞被培養，該培養物

亦可包含複數個微載體(例如包含一個或多於一個孔洞的微載體)。另外可用本發明書中說明的任何過程培養之哺乳動物細胞在本技藝中是已知的。

【0144】 該哺乳動物細胞可包含編碼重組蛋白(例如一種重組蛋白)的重組核酸(例如穩定整合在哺乳動物細胞基因組中的核酸)。編碼作為範例之重組蛋白的重組核酸之非作為限制的實例說明於以下，其為可利用本說明書中說明的方法生產的重組蛋白。在某些實例之中，該培養在生物反應器(例如任何本說明書中說明的生物反應器)中的哺乳動物細胞係得自較大量的培養物。

【0145】 可使用廣泛種細胞生物學和細胞遺傳學中已知的方法將編碼重組蛋白的核酸導入哺乳動物細胞。非作為限制的實例包括轉移感染法(例如脂質體轉染)、轉移導入法(例如慢病毒、腺病毒或逆轉濾過性病毒感染)和電穿孔法。在某些實例中，編碼重組蛋白的核酸並未穩定整合到哺乳動物細胞的染色體中(短暫性轉移感染)，但是在其他實例中該核酸是被整合的。二者擇一或是此外，編碼重組蛋白的核酸可存在於質體和/或哺乳動物的人工合成染色體(例如人類的人工合成染色體)。二者擇一或除此之外，可利用病毒載體(例如慢病毒、逆轉濾過性病毒或腺病毒)將該核酸被導入細胞。該核酸可經可操作性地連接到一段啟動子序列(例如一段強啟動子，如 β -肌動蛋白啟動子和 CMV 啟動子，或視一個可誘發的啟動子)。若需要，包含核酸的載體亦可包含一個可挑選的標記物(例如一個能賦予哺乳動物細胞對潮黴素、嘌呤黴素或新黴素具抗性的基因)。

【0146】 在某些實例中，該重組蛋白是一種分泌的蛋白質且其由哺乳動物細胞釋放到細胞外的基質中(例如第一種和或第二種液態培養基)。例如，一個編碼可溶性重組蛋白的核酸序列可包含在重組蛋白的 N 端或 C 端編碼

分泌信號肽的序列，其由存在於哺乳動物細胞中的酵素切割，並且緊接著被釋放到細胞外的基質中(例如第一種和或第二種液態培養基)。

培養基

【0147】 液態培養基在本技藝中是已知的。該液態培養基(亦即第一和/或第二種組織培養基)可用哺乳動物血清補充營養(例如胎牛血清和牛血清)，和/或一種生長激素或生長因子(例如，胰島素、運鐵蛋白和上皮生長因子)。二擇一或除此之外，該液態培養基(例如第一種和/或第二種液態培養基)可為一種化學定義的液態培養基、不含得自動物之成分的液態培養基、不含血清的液態培養基，或包含血清的液態培養基。化學定義的液態培養基、不含得自動物之成分的液態培養基、不含血清的液態培養基，或包含血清的液態培養基之非作為限制的實例是可購得的。

【0148】 一種液態培養基典型上包含能量來源(例如醣類，如葡萄糖)、必需胺基酸(例如基本全套二十個胺基酸加上半胱胺酸)、維生素和/或其他以低濃度被需要的有機化合物、自由的胺基酸，和/或微量元素。該液態培養基(例如第一和/或第二種液態培養基)若需要可補充以例如哺乳動物的激素或生長因子(例如，胰島素、運鐵蛋白或上皮生長因子)、鹽和緩衝液(例如鈣、鎂和磷酸鹽類)、核苷與鹼基(例如腺苷、胸苷和次黃嘌呤)、蛋白質和組織的水解物和/或任何這些添加物的組合。

【0149】 在本說明書中說明的任何方法中可用於培養細胞(例如哺乳動物細胞)之廣泛種不同的液態培養基使本技藝中已知的。亦可用於本發明之過程的培養基成分包括但不限於：化學定義的(CD)水解物，例如 CD 蛋白胨、CD 多肽(兩種或多於兩種胺基酸)，以及 CD 生長因子。另外之液體組織培養基成分是本技藝已知的。

【0150】 熟練的操作者會知道本說明書中所說明的第一種液態培養基和第二種液態培養基可為相同型式的培養基或相異型式的培養基。

【0151】 作為範例之生物反應器的另外特徵

【0152】 本說明書說明的任何生物反應器的內部表面可具有至少一層覆膜(例如至少一層動物膠、膠原蛋白、聚-L-鳥胺酸、聚苯乙烯和層黏連蛋白)，並且如本技藝所知的具有一個或多於一個 O₂、CO₂、和 N₂ 進入液態培養基的噴氣口和用於攪動液態培養基的攪拌機制。該生物反應器可使細胞培養保溫再經調控的加濕氛圍中(例如大於 20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或 95%的濕度，或 100%的濕度)。該生物反應器亦可裝配能將大量液態培養基從生物反應器移出的機械裝置，並且視需要在該機械裝置中裝配一項濾器，其能在將液態培養基轉出生物反應器(例如一個 ATF 系統或美國臨時專利案序號第 61/878,502 號說明之細胞過濾系統)的過程期間將細胞從液態培養基中移除掉。

溫度

【0153】 培養哺乳動物細胞的步驟可在大約 31 °C 到大約 40 °C 的溫度實行。熟練的實行者會知道溫度可在培養步驟期間裡特定的時間點作改變，例如以小時或以天數為基礎。例如，該溫度可以在最初將細胞(例如哺乳動物細胞)植入生物反應器之後的大約一天、二天、三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天、或大約二十或多於二十天改變或偏移(例如增加或減少)。例如，該溫度可以向上偏移(例如高達或大約 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 或高達或大約 20 °C 的變

化)。例如，該溫度可往下偏移(the temperature can be shifted downwards (例如高達或大約大約 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19,或高達或大約 20 °C 的變化)。

CO₂

【0154】 本說明書說明的培養步驟還可包含將生物反應器中的液態培養基暴露到含最多或大約 15% CO₂ 的氛圍(例如最多或大約 14% CO₂、12% CO₂、10% CO₂、8% CO₂、6% CO₂、5% CO₂、4% CO₂、3% CO₂、2% CO₂、或最多或大約 1% CO₂)。

灌滿的生物反應器

【0155】 本說明書中說明的培養步驟可利用灌滿的生物反應器實行的。在灌滿的生物反應器中的細胞培養(例如哺乳動物細胞)包括從生物反應器移除第一個體積量的第一種液態培養基(例如，包含任何濃度的哺乳動物細胞，例如基本上不含細胞的第一個體積量的第一種液態培養基)，並將第二體積量的第二種液態培養基添加到第一種培養基中。移除和添加可以同時進行或一個接一個進行，或者是將二者合併。而且，移除和添加可以連續(例如以移除和置換的體積介於 0.1%到 800% [例如介於 1%和 700%、介於 1%和 600%、介於 1%和 500%、介於 1%和 400%、介於 1%和 350%、介於 1%和 300%、介於 1%和 250%、介於 1%和 100%、介於 100%和 200%、介於 5%和 150%、介於 10%和 50%、介於 15%和 40%、介於 8%和 80%或介於 4%和 30%]生物反應器體積或第一種液態培養基的體積經過任何給定

期間[例如經過 24-小時期間、經過大約 1 小時到大約 24 小時增加的期間，或經過大於 24 小時之增加的期間]或者週期性的(例如每三天一次、每隔天一次、一天兩次、一天三次、一天四次、或一天五次)或任何其組合的速率進行。當週期性實行時，移除或置換的體積(例如在大約 24-小時期間、經過大約 1 小時到大約 24 小時增加的期間，或經過大於 24 小時之增加的期間)可為例如介於 0.1% to 800% (例如介於 1%和 700%、介於 1%和 600%、介於 1%和 500%、介於 1%和 400%、介於 1%和 300%、介於 1%和 200%、介於 1%和 100%、介於 100%和 200%、介於 5%和 150%、介於 10%和 50%、介於 15%和 40%、介於 8%和 80%，或介於 4%和 30%)生物反應器體積或第一種液態培養基的體積。移除掉的第一種液態培養基的第一個體積量和添加的第二種液態培養基的第二體積量在某些實例中可保持大約相同，在全部或部分的培養期間裡每一者經 24-小時的期間(或是二擇一，大約 1 小時到大約 24 小時之時間增量或大於 24 小時的時間增量)。如本技藝中已知的，第一個體積量的第一種液態培養基被移除的速率(體積/單位時間)和第二個體積量的第二種液態培養基被添加的速率(體積/單位時間)可以改變。第一個體積量的第一種液態培養基被移除的速率(體積/單位時間)和第二個體積量的第二種液態培養基被添加的速率(體積/單位時間)可為大約相同或可為互異的。

【0156】 或者，在培養期間裡，移除與添加的體積每一者經過 24-小時期間(或者，以介於 1 小時和大約 24 小時的時間增量或大於 24 小時的時間增量)可以改變(例如逐漸增加)。例如在每一者為 24-小時的期間內第一種液態培養基被移除的體積和第二種液態培養基被添加的體積(或者，以介於 1 小時和大約 24 小時的時間增量或大於 24 小時的時間增量)在培養期間可

從介於 0.5%到大約 20%生物反應器體積或第一種液態培養基的體積至大約 25%到大約 150%生物反應器體積或第一種液態培養基的體積增加(例如漸漸增加或以瞬間增加)。

【0157】 熟練的實行者會知道第一種液態培養基和第二種液態培養基可為相同型式的培養基。在其他實例中，第一種液態培養基和第二種液態培養基可為互異。

【0158】 第一個體積量的第一種液態培養基可被移除，例如藉由可將第一個體積量的第一種液態培養基 (例如基本上不含來自生物反應器之細胞的第一個體積的第一種液態培養基)從生物反應器移除的機械系統。二擇一或除此以外，第一個體積量的第一種液態培養基可藉著將第一個體積量的第一種液態培養基滲漏或以重力流經分子量切分點能將細胞(例如哺乳動物細胞)排除之無菌薄膜。

【0159】 第二個體積量的第二種液態培養基可以自動化的方式添加到第一種液態培養基中，例如藉由灌注幫浦。

【0160】 在某些實例中，移除第一個體積量的第一種液態培養基(例如：基本上不含哺乳動物細胞的第一種液態培養基)並且將第二個體積量的第二種液態培養基添加到第一種液態培養基的步驟未在將哺乳動物細胞接種到生物反應器至少 1 小時(例如在 2 小時內、在 3 小時內、在 4 小時內、在 5 小時內、在 6 小時內、在 7 小時內、在 8 小時內、在 9 小時內、在 10 小時內、在 12 小時內、在 14 小時內、在 16 小時內、在 18 小時內、在 24 小時內、在 36 小時內、在 48 小時內、在 72 小時內、在 96 小時內，或在 96 小時之後)發生。

分批注入生物反應器

【0161】 本說明書中說明的培養步驟可以利用分批注入生物反應器來實行。以分批注入生物反應器培養細胞包括經過主要的培養期間裡將第二個體積量的第二種液態培養基添加(例如週期性的或連續的添加)到第一種液態培養基裡。添加第二種液態培養基可連續實行(例如其以佔生物反應器或第一種液態培養基之介於 0.1% to 300% [例如介於 1%和 250%、介於 1%和 100%、介於 100%和 200%、介於 5%和 150%、介於 10%和 50%、介於 15%和 40%、介於 8%和 80%, or 介於 4%和 30%]的體積, 經過任何所給定的期間[例如在 24-小時的期間內、經過大約 1 小時到大約 24 小時之時間增量、經過大於 24 小時之時間增量]的速率進行)或是週期性的實行(例如每三天一次、每隔天一次、每天一次、兩天一次、三天一次、四天一次或五天一次)或任何其組合的速率進行。當以週期性進行時, 添加的體積(例如在 24-小時的期間內、經過大約 1 小時到大約 24 小時之時間增量、經過大於 24 小時之時間增量)可為例如介於 0.1%到 300% (例如介於 1%和 200%、介於 1%和 100%、介於 100%和 200%、介於 5%和 150%、介於 10%和 50%、介於 15%和 40%、介於 8%和 80%, 或介於 4%和 30%)之生物反應器的體積或第一種液態培養基的體積。在全部或部分的培養期間裡所添加的第二個體積量的第二種液態培養基在某些實例中每 24-小時的期間(或是二擇一地, 介於大約 1 小時到大約 24 小時之時間增量或大於 24 小時的時間增量)可保持大約相同。如本技藝中已知的, 第二個體積量的第二種液態培養基的添加速率(體積/單位時間)在全部或部分的培養期間裡可有變化。例如, 所添加之第二種液態培養基的體積在培養的期間裡每 24-小時的期間(或是二擇一地, 介於大約 1 小時到大約 24 小時之時間增量或大於 24 小時的時間增

量)裡可作改變(例如逐漸增加)。例如所添加之第二種液態培養基的體積在培養的期間裡每 24-小時的期間裡可增加(例如逐漸增加或以瞬間增加)，其體積介於 0.5%到大約 20%生物反應器體積或第一種液態培養基的體積至大約 25%到大約 150%生物反應器體積或第一種液態培養基體積。第二個體積的第二種液態培養基的添加速率(體積/單位時間)在整個或部分的培養期間裡可為大約相同。

【0162】 熟練的操作者會知道本說明書中所說明的第一種液態培養基和第二種液態培養基可為相同型式的培養基。在其他實例中，第一種液態培養基和第二種液態培養基可為相異的。第二種液態培養基的體積可以自動方式添加到第一種液態培養基中，例如藉由灌注幫浦。

【0163】 在某些實例中，將第二個體積的第二種液態培養基添加到第一種液態培養基不會在用哺乳動物細胞接種生物反應器的至少 1 小時內發生(例如在 2 小時內、在 3 小時內、在 4 小時內、在 5 小時內、在 6 小時內、在 7 小時內、在 8 小時內、在 9 小時內、在 10 小時內、在 12 小時內、在 14 小時內、在 16 小時內、在 18 小時內、在 24 小時內、在 36 小時內、在 48 小時內、在 72 小時內、在 96 小時或在 96 小時之後)。在分批注入的細胞培養基中的細胞培養基典型上是在培養期末予以收獲並且用於任何本說明書中說明的過程，然而在分批注入的細胞培養基中的細胞培養基亦可在培養期間的一個或多於一個時點予以收獲並且用於任何本說明書中說明的過程。

【0164】 熟練的實行者會知道任何各種培養的參數(例如容器、體積、培養體積的置換速率或頻率、攪拌頻率、溫度、基質和 CO₂ 濃度)可以任何

組合使用於進行這些方法。而且，本說明書中所說明或本技藝中已知的任何哺乳動物均可被用於生產重組蛋白。

作為範例的生物製造系統

【0165】 有用於進行本說明書說明之過程以及包含 MCCS 或 MCCS1 和 MCCS2 的生物製造系統實例說明在美國臨時專利申請案序號第 61/775,060 號和第 61/856,390 號(以參考文獻併在本說明書中)。在這些作為範例的系統中，至少有一個(例如至少兩個、三個、四個、五個或六個)包含 γ -射線照射的層析樹脂的層析法管柱在 MCCS 或在 MCCS1 和/或 MCCS2 中。例如，整個系統可包含總共二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四、十五、十六、十七、十八、十九、二十個包含 γ -射線照射的層析樹脂層析法管柱。例如，MCCS、MCCS1 和/或 MCCS2 可包含(或每一者可包含)一、二、三、四、五、六、七、八、九或十個包含 γ -射線照射層析樹脂的層析管柱。

【0166】 例如，有用的系統可包括含一個輸入口的 MCCS1 和含一個輸出口的 MCCS2，或含一個輸入口和一個輸出口的 MCCS。在某些具體實例中，MCCS1 和 MCCS2 互相以液體溝通。這些系統亦可被安裝使的液體可以通到輸入口，經過 MCCS1 和 MCCS2，並且通過輸出口離開製造系統。這些系統提供從液態培養基連續和時間上有效率之治療用藥物的製造。例如，在注入包含治療用蛋白質的液體(例如一種液態培養基)到 MCCS1 和從 MCCS2 洗出純化的重組蛋白(例如治療用的蛋白質藥物)經過的時間可介於大約 4 小時和大約 48 小時(包含首末值在內)。

【0167】 某些作為範例的系統不包含緩衝槽。在其他時立中，該系統包括最多一、二、三、四或五個緩衝槽在整個系統中(例如其中每一緩衝槽僅保留治療用蛋白質經例如介於大約 5 分鐘和大約 6 小時[包含首末值在內]的總期間)。該緩衝槽可具有介於 1 mL 和大約 300 mL [包含首末值在內]的容量。任何配置在系統中使液體在進入 MCCS1 或 MCCS 前先進入的緩衝槽可具有介於 1 mL 和大約 100% [包含首末值在內] MCCS1 或 MCCS 個別之第一個管柱的裝載體積。任何配置在系統中使液體在進入 MCCS2 前(和在離開 MCCS1 之後)進入的緩衝槽可具有例如介於 1 mL 和大約 100% [包含首末值在內] MCCS2 之第一個管柱的裝載體積。

另外之作為實例的系統結構和特性

【0168】 MCCS 或 MCCS1 可包括液體(例如基本上不含細胞的液態培養基)可包括一個液體(例如基本上不含細胞的液態培養基)分別可通入 MCCS 或 MCCS1 的輸入口。該輸入口可為任何本技藝中已知用於此目地的結構。其可包括例如用於使液體管道插入的螺紋、個撐體或是火漆，使得液體管道插入輸入口之後，液體會通過輸入口進入 MCCS 或 MCCS1 而不會有顯著的液體滴漏到輸入口外面。在本系統中可使用但非作為限制的輸入口是已知，且為從事本技藝者所瞭解的。

【0169】 MCCS 或 MCCS1 可包括至少兩個層析管柱、至少兩片層析薄膜，或至少一個層析和至少一片層析薄膜，以及一個輸入口。MCCS 或 MCCS1 可為任何本說明書中說明之作為範例的 MCCS，或是具有一種或多於一種本說明書中說明 MCCS 之作為範例的特性(以任何組合)。存在於

MCCS 或 MCCS1 中的層析管柱和/或層析薄膜可具有一種或多於一種本說明書中說明之任何作為範例的形狀、大小、體積(柱床體積)和/或單元操作。

【0170】 存在於 MCCS 或 MCCS1 中的層析管柱和/或層析薄膜可包括一種或多於一種任何本說明書說明或本技藝已之作為範例的樹脂。例如，MCCS 或 MCCS1 中包含一個或多於一個層析管柱和/或層析薄膜中的樹脂可為一種利用捕獲機制(例如蛋白質 A 結合捕獲機制、蛋白質 G-結合捕獲機制、抗體-或抗體片段-結合捕獲機制、基質結合捕獲機制、輔因子結合捕獲機制、一種適體結合捕獲機制、和/或一種標籤結合捕獲機制)的樹脂。MCCS 或 MCCS1 中包含一個或多於一個層析管柱和/或層析薄膜中的樹脂可為陽離子交換樹脂、陰離子交換樹脂、分子篩樹脂、或疏水性交互作用樹脂，或任何其組合。可用於純化重組蛋白之另外的樹脂實例為本技藝中已知者，且其可被包含在 MCCS 或 MCCS1 中的一個或多於一個層析管柱和/或層析薄膜中。該存在於 MCCS 或 MCCS1 中之一個或多於一個層析管柱和/或層析薄膜可包含相同的和/或相異的樹脂(例如任何本說明書說明或本技藝中已知用於重組蛋白純化的樹脂)。

【0171】 存在於 MCCS 或 MCCS1 中之兩個或多於兩個層析管柱和/或層析樹脂可實行一種或於一種單元操作(例如捕獲重組蛋白、純化重組蛋白、精製重組蛋白、使病毒失活、調整包含重組蛋白之液體的離子濃度和/或 pH，或過濾包含重組蛋白的液體)。在非作為限制的實例中，該 MCCS 或 MCCS1 可實行從液體(例如液態培養基)捕獲重組蛋白並且使存在於包含重組蛋白的液體中之病毒失活的的單元操作。該 MCCS 或 MCCS1 可進行任何兩個或多於兩個本說明書說明或本技藝中已知的單元操作組合。

【0172】 存在於 MCCS 或 MCCS1 中之層析管柱和/或層析薄膜可藉由替換機制彼此連接或移走(例如一種管柱替換機制)。MCCS 或 MCCS1 亦可包含一個或多於一個(例如兩個、三個、四個或五個)幫浦(例如自動化的、例如自動化的蠕動幫浦)。管柱替換事項可偵測之重組蛋白的量所觸發，其量係藉由偵測相等於通過 MCCS 或 MCCS1 之液體中某量之重組蛋白(例如 MCCS 或 MCCS1 中之一個或多於一個層析管柱和/或層析薄膜的輸入液和/或洗出液)、特定體積的液體(例如緩衝液)，或特定的經過時間測得。管柱替換一般而言意指在 MCCS 或 MCCS1 中至少有兩個相異的層析管柱和/或層析薄膜(例如在 MCCS1 或 MCCS2 中兩個或多於兩個相異的層析管柱和/或層析薄膜)被容許於至少部分過程進行期間，基本上同時經歷不同的步驟(例如平衡、裝載、溶離，或沖洗)。

【0173】 MCCS 或 MCCS1 可為週期的反流層析系統(PCCS)。例如，PCCS 為 MCCS 或 MCCS1 者(亦即分別為 PCCS 或 PCCS1)可包括四個層析管柱，其中第三個管柱進行從液體(例如一種液態培養基)捕獲重組蛋白的單元操作，並且 PCCS 的第四個管柱進行使包含重組蛋白之液體中的病毒失活的單元操作。PCCS 為 MCCS 或 MCCS1 者可使用管柱替換機制。PCC 系統可利用一種能運作高達例如四個、五個、六個、七個或八個管柱或更多管柱之經修改的 ÄKTA 系統(GE Healthcare 公司出品，該公司位於紐澤西州的 Piscataway 市)。

【0174】 MCCS 或 MCCS1 可配備一台或多於一台(例如兩台、三台、四台、五台、六台、七台、八台、九台或十台) UV 監測器，一個或多於一個(例如兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個)閥門，一台或多於一台(例如兩台、三台、四台、五台、六台、七台、八台、九台

或十台) pH 計, 和/或一台或多於一台(例如兩台、三台、四台、五台、六台、七台、八台、九台或十台)導電度計。MCCS 或 MCCS1 亦可配備一項操作系統, 其使用軟體(例如以 Unicorn 為基礎的軟體, GE Healthcare 公司出品, 該公司位於紐澤西州的 Piscataway 市)以感測何時應替換管柱(例如根據 UV 吸光值、液體體積、或經過的時間)並且影響(觸發)管柱替換事項。

【0175】 MCCS 或 MCCS1 還可包含一個或多於一個(例如, 二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四、十五、十六、十七、十八、十九、二十、二十一、二十二、二十三或二十四個)嵌入的緩衝液調節容器和/或一個緩衝液容器。在其他實例中, MCCS 或 MCCS1 可包含一個或多於一個(例如, 二、三、四、五、六個)可保留未能立即通過 MCCS 或 MCCS1 中的一個或多於一個層析管柱和/或層析薄膜的液體之緩衝槽。本說明書說明的系統可包含一個或多於一個緩衝槽(例如本說明書中說明的緩衝槽)在 MCCS、MCCS1、和/或 MCCS2 中。本說明書中說明的系統之其他實例不包括緩衝槽在 MCCS、MCCS1、和/或 MCCS2 中, 或不包括緩衝槽在整個系統中。本說明書中說明的系統之其他實例包括最多一個、兩個、三個、四個或五個緩衝槽(例如任何本說明書中說明的緩衝槽)在該整個系統中。

第二個 MCCS

【0176】 在作為範例的系統中第二個 MCCS (MCCS2)包含至少兩個層析管柱、至少兩片層析薄膜, 或至少一個層析管柱和至少一片層析薄膜, 以及一個輸出口。MCCS2 可為本說明書說明的作為範例之 MCCS, 或可具有一項或多於一項本說明書說明 MCCS 之任何作為範例的特徵(以其任何組

合)。存在於 MCCS2 中之層析管柱和/或層析薄膜可具有一個或多於一個：任何本說明書說明的形狀、大小、體積(柱床體積)，和/或操作單元。該層析管柱和/或層析薄膜可包含任何本說明書說明或本技藝中已知之作為範例的樹脂。例如，包含在 MCCS2 之一種多於一種層析管柱和/或層析薄膜中的樹脂可為利用捕獲機制(例如蛋白質 A 結合捕獲機制、蛋白質 G-結合捕獲機制、抗體或抗體片段結合捕獲機制、基質結合捕獲機制、輔因子結合捕獲機制、標籤結合捕獲機制、和/或適體結合捕獲機制)的樹脂。有用的樹脂包括，例如：陽離子交換樹脂、陰離子交換樹脂、分子篩樹脂，和疏水性交互作用樹脂，另外的樹脂實例使本技藝中已知的。MCC2 中之層析管柱和/或層析薄膜可包括相同的和/或相異的樹脂(例如任何本說書中說明的或本技藝中已知用於重組蛋白純化的樹脂)。

【0177】 MCC2 中之層析管柱和/或層析薄膜可實行一項或多於一項單元操作(例如任何本說明書說明的單元操作或任何本說明書說明的單元操作之組合)。在非作為限制的實例中，MCCS2 可進行從液體純化重組蛋白並將存在於該包含重組蛋白之液體中將重組蛋白加以精製的單元操作。在另一項非作為限制的實例中，MCCS2 可進行純化液體中的重組蛋白、精製液體中的重組蛋白、過濾包含重組蛋白之液體的單元操作。在其他實例中，MCCS2 可實行純化液體中之重組蛋白、精製液體中之重組蛋白、過濾含有重組蛋白之液體，以及調整離子濃度和/或 pH 值的單元操作。MCCS2 可實行任和兩種或多於兩種本說明書說明或本技藝中已知的單元操作組合。

【0178】 MCCS2 中的層析管柱和/或層析薄膜可以藉由替換機制(例如管柱替換機制)彼此連接或移開。MCCS2 亦可包含一個或多於一個(例如兩個、三個、四個、或五個)幫浦(例如自動化的，例如自動化的蠕動幫浦)。

該管柱替換情形可藉著以 UV 吸光質監測重組蛋白量，而該量相當於某量通過MCCS2之液體的重組蛋白(例如MCCS2中一個或多於一個層析管柱和/或層析薄膜的輸入液和/或洗出液)、特定量的液體(例如緩衝液)、或特定的經過時間而被觸發。

【0179】 MCCS2 為一種週期性反流層析系統(亦即 PCCS2)。例如，PCCS2 可包括三個實行從液體純化重組蛋白之單元操作的層析管柱，以及實行將液體中的重組蛋白加以精製的單元操作之層析薄膜。例如，實行從液體純化重組蛋白之單元操作的管柱可包含陽離子交換樹脂，且實行將液體中的重組蛋白加以精製的單元操作之層析薄膜可包含陽離子交換樹脂。PCCS2 可利用管柱替換機制。PCCS2 可利用能進行高達例如四個、五個、六個、七個，或八個管柱或多於八個管柱個經改良的 ÄKTA 系統(GE Healthcare 公司出品，該公司位於紐澤西州的 Piscataway 市)。

【0180】 MCCS2 可配備：一台或多於一台(例如：二、三、四、五、六、七、八、九或十台) UV 監測器、一個或多於一個(例如：二、三、四、五、六、七、八、九或十個)閥門、一台或多於一台(例如：二、三、四、五、六、七、八、九或十台) pH 計、和/或一台或多於一台(例如：二、三、四、五、六、七、八、九或十台)導電度計。MCCS2 亦可配備一個利用軟體(例如以 Unicorn 為基礎的軟體，GE Healthcare 公司出品，該公司位於紐澤西州的 Piscataway 市)的操作系統，以感測何時應發生管柱替換(例如根據 UV 吸光值、液體體積、或經過的時間)並且影響該管柱替換事項。

【0181】 MCCS2 還可包含一個或多於一個(例如：二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四、十五、十六、十七、十八、十九、二十、二十一、二十二、二十三或二十四個)內嵌的緩衝液調節

容器和/或一個緩衝亦調節容器。在其他實例中，MCCS2 可包括一個或多於一個(例如兩個、三個、四個、五個或六個)緩衝槽(例如任何本說明書說明的緩衝槽)，其可保留未能立即通入 MCCS2 中一個或多於一個層析管柱和/或層析薄膜之液體。

【0182】 MCCS2 包含一個輸出口，治療用蛋白質藥物可經該出口離開系統。該輸出口可包含：用於使液體管道插入的螺紋、個撐體或是火漆，或一個經設計能保留或貯存純化重組蛋白(例如治療用的蛋白質藥物)的小瓶子。輸出口可包含一種能被用於將生物負荷量降低之小瓶或其他此種貯存容器密封到輸出口上，以使純化過的重組蛋白(例如治療用的蛋白質藥物)直接流入生物負荷量降低之小瓶或貯存容器表面。可用於本系統之非作為限制的輸出口是已知的，而且本技藝中的人會瞭解。

【0183】 本說明書說明的系統亦可包含一個配製在 MCCS1 和 MCCS2 之間的液體通道。本說明書中說明的任何液體通道可為例如：聚乙烯、聚碳酸酯或塑膠製造的管子。該配置在 MCCS1 和 MCCS2 之間的液體通道尚可包含一個或多於一個以下的任何組合：一個或多於一個內嵌的緩衝液調節容器，該容器與液體通道作液體交流，並且經定位以使貯存在內嵌的緩衝液調節容器中的緩衝液被添入液體通道中的液體；一個緩衝槽(例如任何本說明書說明的緩衝槽)，該緩衝槽與液體通道作液體交流，並且經定位以使其能保留液體通道中無法立即注入 MCCS2 的任何過量液體；以及一個或多於一個濾器，其經配置在液體通道中使其能過濾(例如移除細菌)液體通道中的液體。任何嵌入的緩衝液調節容器可包含例如介於大約 0.5 L 到 50 L 的緩衝液體積(例如溫度位在或小於 25 °C、15 °C，或 10 °C)。

【0184】 本說明書說明的系統可視需要包含一個配置在 MCCS2 中最後一個層析管柱或層析薄膜和該輸出口之間的液體通道。本說明書說明的系統還可包含一個或多於一個濾器，其與配置在 MCCS2 中最後一個層析管柱或層析薄膜和該輸出口之間的液體通道作液體連接，使得該濾器能移除例如來自液體通道中之沉澱物、結成顆粒的物質或細菌，該通道係配置在 MCCS2 中最後一個層析管柱或層析薄膜和該輸出口之間。

【0185】 本說明書中提供的某些系統實例亦包含生物反應器，其與 MCCS 或 MCCS1 的輸入口作液體連接。任何本說明書說明或本技藝中已知作為範例的生物反應器均可用於本系統中。

【0186】 本說明書所提供的某些系統實例亦包含幫浦系統。一個幫浦系統可包括一項或多於一項以下裝置：一個或多於一個(例如：二、三、四、五、六、七、八、九或十個)幫浦、一個或多於一個(例如：二、三、四、五、六、七、八、九或十個)閥門、一個或多於一個(例如：二、三、四、或五個)濾器(例如任何本說明書中說明的或本技藝中已知的濾器)，一台或多於一台(例如：二、三、四、五、六、七、八、九或十台) UV 監測器，以及一個或多於一個(例如：二、三、四、或五個)緩衝槽(例如任何本說明書說明的緩衝槽)。本說明書提供的某些實例尚可包含配置在幫浦和 MCCS 或 MCCS1 的輸入口之間的液體通道(例如任何本說明書說明或本技藝中已知作為範例的液體通道)。在某些實例中，此種特殊的液體通道可包含一個或多於一個(例如：二、三或四個)幫浦(例如任何本說明書說明或本技藝中已知的幫浦)和/或一個或多於一個(例如：二、三或四個)緩衝槽(例如任何本說明書說明作為範例的緩衝槽)，其中這些幫浦和/或緩衝槽與該液體通道中的液體作液體的連接。

【0187】 某些本說明書說明的系統實例尚包含一個連接至介在幫浦和輸入口之間的液體通道之液體通道，其中另一液體通道的一方末端以液體方式連接到一台生物反應器且另一末端以液體方式連接到介於幫浦和輸入口之間的液體通道。此一另加的液體通道可包含一個能將生物反應器(例如 ATF 細胞滯留系統)移出的液態培養基中的細胞移除之濾器。

【0188】 本說明書提供的系統能連續生產純化的重組蛋白(例如治療用的蛋白質藥物)。如本技藝中所知。該系統可提供以求週期性地溶離純化的重組蛋白(例如治療用的蛋白質藥物)。本說明書說明的系統亦可造成純化之重組蛋白(例如治療用的蛋白質藥物)淨產率為 至少大約 5 g/每天、至少大約 10 g/每天、至少大約 15 g/每天、至少大約 20 g/每天、至少大約 30 g/每天、或至少大約 40 g/每天，經過至少大約 5 天、至少大約 10 天、至少大約 15 天、至少大約 20 天、至少大約 25 天、至少大約 30 天、至少大約 40 天、至少大約 50 天、至少大約 60 天、至少大約 70 天、至少大約 80 天、至少大約 90 天、或至少大約 100 天的連續期間。

【0189】 本發明還用以下實施例進行說明，其並非對申請專利範圍中說明之本發明的範疇作限制。

【圖式簡單說明】

【0190】 圖 1 是未經處理的(未經使用的)具有陰離子交換與疏水性基團的多模態樹脂(AE 樹脂)和 25 kGy γ -射線照射的 AE 樹脂(無層析循環)在 t_0 之結合等溫線作圖。

【0191】 圖 2 是未經使用的(未經處理的) AE 樹脂、15 kGy γ -射線照射的 AE 樹脂和 25 kGy γ -射線照射的 AE 樹脂經多次管柱層析循環之正規化結合容量之百分率作圖，在每一循環中 700mM 精胺酸、100mM 乙酸鹽(pH

3.0)、接著是 1 N NaOH 溶液被用於沖洗每種樹脂(在溶離重組蛋白之後)。每種樹脂的結合容量百分率係以未經使用(未經處理)的 AE 樹脂在時間 0(t_0)的結合容量予以正規化，其結果亦被發現非常相似於在 t_0 時 γ -射線照射的樹脂(27 ± 2 mg/mL)。

【0192】 圖 3 顯示未經使用的(未經處理的) AE 樹脂、15 kGy γ -射線照射的 AE 樹脂和 25 kGy γ -射線照射的 AE 樹脂經多次管柱層析循環之結合能力平均下降速率的作圖，在每一循環中 700mM 精胺酸、100mM 乙酸鹽(pH 3.0)、接著是 1 N NaOH 溶液被用於沖洗每種樹脂(在溶離重組蛋白之後)。

【0193】 圖 4 是未經使用的(未經處理的) AE 樹脂經多次管柱層析循環之正規化結合容量的百分率作圖，其使用包含未經使用的(未經處理的)單一層析管柱，在每一循環中以 700mM 精胺酸、100mM 乙酸鹽(pH 3.0)、接著在溶離重組蛋白之後以 1 N NaOH 溶液沖洗(低 pH 值之精胺酸未經使用樹脂)，或使用包含 25 kGy γ -射線照射的 AE 樹脂的單一層析管柱，在每一循環中於溶離重組蛋白後以 8M 尿素，1 M NaCl，0.1 M 檸檬酸，pH 2.5 (低 pH 值尿素)；6 M 鹽酸胍(pH 2.5) (低 pH 值胍)；0.5% Triton-X 100 在 0.1 M 乙酸(pH 2.5)接著是 0.7 M 乙酸，20%乙醇，50%乙二醇(pH 2.5) (低 pH 值 Triton)；700 mM 精胺酸，100 mM 乙酸鹽(pH 3.0) (低 pH 精胺酸)；或 0.7 M 乙酸，20%乙醇，50%乙二醇(pH 2.5) (低 pH 值有機)，每一者接著用 1 N NaOH 溶液沖洗。每種樹脂經每一循環的結合容量百分率係以未經使用的(未經處理的) AE 樹脂在時間 0(t_0)的結合能力予以正規化，其結果亦被發現非常相似於在 t_0 時 γ -射線照射的樹脂(27 ± 2 mg/mL)。

【0194】 圖 5 是得自多重管柱層析法(MCC)流洗過程的代表性的層析圖譜，其顯示使用包含 25 kGy 經照射之 AE 樹脂經過多次管柱層析循環之洗出液在波長 280 nm 的吸光值，其中在每一循環使用 8 M 尿素、1 M NaCl、0.1 M 檸檬酸 pH 2.5，接著使用 1 N NaOH 溶液沖洗每一樹脂(在溶離出重組蛋白之後)。在三個相異循環中暴露於 8M 尿素、1 M NaCl、0.1 M 檸檬酸、pH 2.5 變性緩衝液期間代表從 AE 樹脂釋出結合蛋白質的尖峰以箭頭指示。層析圖譜顯示對於用於進行 MCC 流洗過程的所有三種層析法管柱之微量 UV。

【0195】 圖 6 是經過多次管柱層析循環與層析樹脂結合的之重組蛋白回收百分率，其中使用包含未經使用的(未經處理的)單一層析管柱，在每一循環中以 700mM 精胺酸、100mM 乙酸鹽(pH 3.0)、接著在溶離重組蛋白之後以 1 N NaOH 溶液沖洗(低 pH 值之精胺酸未經使用樹脂)，或使用包含 25 kGy γ -射線照射的 AE 樹脂的單一層析管柱，在每一循環中於溶離重組蛋白後以 8M 尿素，1 M NaCl，0.1 M 檸檬酸，pH 2.5 (低 pH 值尿素)；6 M 鹽酸胍(pH 2.5) (低 pH 值胍)；0.5% Triton-X 100 在 0.1 M 乙酸(pH 2.5)接著是 0.7 M 乙酸，20%乙醇，50%乙二醇(pH 2.5) (低 pH 值 Triton)；或 0.7 M 乙酸，20%乙醇，50%乙二醇(pH 2.5) (低 pH 值有機)，接著每一者用 1 N NaOH 溶液沖洗。

【0196】 圖 7 是經多次管柱層析循環存在於洗出液中之宿主細胞蛋白質(ng/mg)的作圖，其中使用包含未經使用的(未經處理的)單一層析管柱，在每一循環中以 700mM 精胺酸、100mM 乙酸鹽(pH 3.0)、接著在溶離重組蛋白之後以 1 N NaOH 溶液沖洗(低 pH 值之精胺酸未經使用樹脂)，或使用包含 25 kGy γ -射線照射的 AE 樹脂的單一層析管柱，在每一循環中於溶離

重組蛋白後以 8M 尿素，1 M NaCl，0.1 M 檸檬酸，pH 2.5 (低 pH 值尿素)；6 M 鹽酸胍(pH 2.5) (低 pH 值胍)；0.5% Triton-X 100 在 0.1 M 乙酸(pH 2.5) 接著是 0.7 M 乙酸，20%乙醇，50%乙二醇(pH 2.5) (低 pH 值 Triton)；700 mM 精胺酸，100 mM 乙酸鹽(pH 3.0) (低 pH 精胺酸)；或 0.7 M 乙酸，20%乙醇，50%乙二醇(pH 2.5) (低 pH 值有機)，接著每一者用 1 N NaOH 溶液沖洗。

【0197】 圖 8 是溶小體儲積症和可用於治療每一疾病之重組治療酵素的列表。

【實施方式】

實施例 1. 在 t_0 時 γ -射線照射對層析樹脂之結合容量的影響

【0198】 吾人實行一套實驗以研究 γ -射線照射對於兼具陰離子交換和疏水性質之

【0199】 雙模態層析樹脂(AE 樹脂)的結合容量之影響。在這些實驗中所使用的 AE 樹脂是 Capto Adhere (奇異保健生命科學公司出品)，其具有 N-苯甲基-N-甲基乙醇胺配體，平均顆粒大小為 75 μ m，以及離子容量為 0.09 - 0.12 mmol Cl^{-1}/mL 的基質。該 AE 樹脂或保持未經處理(原初的)或經處理以降低樹脂的生物負荷量(暴露至 25 kGy 的 γ -射線照射)，使用 0.2 毫升糊狀懸浮在 50 mM 磷酸鈉，pH 7.0 中的樹脂進行輻射線照射。

【0200】 在不同標靶蛋白質(Fabrazyme®)濃度下測定結合至未經處理之 AE 樹脂(在液態培養基中)和結合至 t_0 (沒有層析進行)的 25 kGy γ -射線照射的 AE 樹脂之蛋白質(Fabrazyme®)的量。圖 1 顯示在 t_0 未經處理和 25 kGy γ -射線照射處理的 AE 樹脂的結合等溫線。這些數據顯示在 t_0 γ -射線照射樹脂後之標靶蛋白結合不會改變。

實施例 2. 經多重循環 γ -射線照射對於層析樹脂結合容量的影響和變性緩衝

液用於緩和結合容量喪失的用途

【0201】 吾人進行實驗以試驗經多重循環 γ -射線照射對於層析樹脂結合容量的影響。在多重管柱層析中，每一使用的管柱都被裝載了達其結合容量的蛋白質(Fabrazyme® 在液態培養基中)。用 20 mM MES(2-(N-嗎啉基)乙磺酸)，pH 7.0 進行管柱平衡和沖洗。使用溶離緩衝液，200 mM 精胺酸，270 mM MES，20%乙二醇 pH 7.5 將結合到管柱的蛋白質溶離出來。為了試驗 γ -射線照射的層析樹脂經其在此實施例中的整個生命期之效能，吾人利用多重管柱層析系統(MCCS)或單一管柱將含有未經處理之 AE 或 25 kGy γ -射線照射的層析樹脂(如實施例 1 說明的方式製備)的管柱循環，在仿照 MCCS 條件的狀況下進行(在進行沖洗和溶離之前，每一管柱都裝載至其靜態結合容量)。在本實施例中說明的實驗裡每一沖洗和溶離步驟都以逐一步驟的方式進行。

【0202】 使用含有 AE 樹脂(原初的、經 15 kGy γ -射線照射的、或 25 kGy γ -射線照射的樹脂)之單一層析管柱進行多重管柱層析循環，並且在每一循環中使用 700 mM 精胺酸，100 mM 乙酸鹽(pH 3.0)的沖洗緩衝液，接著使用 1 N NaOH 的溶液(在溶離出重組蛋白之後)。測定經過多重循環之正規化結合容量百分率(在 t_0 與未經處理[原初的]樹脂相比較)。得自這些實驗的數據顯示在 t_0 當未經處理和經過 γ -射線照射的樹脂之結合容量相似時，未經處理和經過 γ -射線照射的樹脂之結合容量顯示經多重層析循環其結合容量減少的速率不同(圖 2)。當原初的樹脂顯示經多重層析循環其結合容量減少， γ -射線照射的樹脂顯示經多重層析循環其結合容量有更為戲劇化的減少(圖 2)。在這套實驗中每種樹脂的結合容量減低速率的計算結果也顯示在圖 3 中。這些數據證明使用 γ -射線照射以降低層析法的生物負荷量會造成樹脂

的結合容量減少，該容量之減少在經過多重層析循環會逐漸惡化。吾人進行數套實驗以測定是否可使用各種變性緩衝液來收復 γ -射線照射的層析樹脂喪失的結合容量。在這些實驗中，吾人用原初(未經處理過的)AE 樹脂所進行的層析循環是利用 700 mM 精胺酸，100 mM 乙酸鹽(pH 3.0)的沖洗緩衝液，接著用 1 N NaOH(低 pH 精胺酸)的溶液進行的。吾人使用也 25 kGy-射線照射的樹脂進行層析循環，在每一循環將重組蛋白溶離之後利用以下組合之一的緩衝液沖洗樹脂：8 M 尿素，1 M NaCl，0.1 M 檸檬酸，pH 2.5，接著用 1 N NaOH 溶液(低 pH 尿素)；6 M 鹽酸胍(pH 2.5)，接著用 1 N NaOH 溶液(或 1 M NaOH + 1 M NaCl) (低 pH 胍)；0.5% Triton-X 100 在 0.1 M 乙酸中(pH 2.5)，接著用 0.7 M 乙酸，20%乙醇，50%乙二醇(pH 2.5)溶液，接著用 1 N NaOH 溶液(低 pH Triton)；0.7 M 乙酸，20%乙醇，50%乙二醇(pH 2.5)，接著用 1 N NaOH 溶液(低 pH 有機)；或 700 mM 精胺酸，100 mM 乙酸鹽(pH 3.0)，接著用 1 N NaOH 溶液(低 pH 精胺酸)。測定正規化的結合容量百分率(相對於原初[未經處理過的]樹脂在 t_0 的結合容量作正規化)、每一循環之重組蛋白回收百分率(相對於裝載到樹脂上的液體中之重組蛋白的量)，以及每一循環之洗出液中宿主細胞蛋白質(ng/mg)的存在量。圖 4 的數據顯示所有受試的變性緩衝液都能緩和 γ -射線照射的層析樹脂之結合容量喪失，除了用 0.7 M 乙酸，20%乙醇，50%乙二醇(pH 2.5)和 700 mM 精胺酸，100 mM 乙酸鹽(pH 3.0)者不能。圖 4 的數據顯示所有變性緩衝液，除了 0.7 M 乙酸，20%乙醇，50%乙二醇(pH 2.5)和 700 mM 精胺酸，100 mM 乙酸鹽(pH 3.0)，均能有效清潔 γ -射線照射的層析樹脂和經過多重層析循環仍維持 γ -射線照射的層析樹脂之結合容量。

【0203】 圖 6 的數據顯示所有受試的變性緩衝液均會使得經多重循環之每一循環結合至 γ -射線照射的層析樹脂上的重組蛋白有穩定的回收百分率。圖 6 的數據顯示每一受試的變性緩衝液在每一循環中不論結合到 γ -射線照射的層析樹脂的蛋白質量多少，都能將其回收至相似程度範圍。圖 7 的數據顯示使用各種受試的變性緩衝液會造成每一循環之重組蛋白洗出液中具有可接受量的宿主細胞蛋白質。

【0204】 每一循環中所使用的變性緩衝液被認為是藉著將緊密結合的蛋白質從樹脂上釋放來回復 γ -射線照射的層析樹脂之結合容量。利用三個層析管柱進行多重層析循環之代表性的層析圖譜被記錄下來(圖 5)，該管柱包含 25 kGy γ -射線照射的 AE 樹脂，在溶離出重組蛋白後用 8 M 尿素，1 M NaCl，0.1 M 檸檬酸，pH 2.5，以及 1 N NaOH 溶液沖洗(在每一循環之後)。該層析圖譜顯示用變性緩衝液處理 γ -射線照射的樹脂在經多重循環的三個層析管柱之每一者中會造成基本上相同量的蛋白質釋出(請參考圖 5 的箭頭)。

【0205】 總之，這些數據顯示不同的變性緩衝液可被用於回復 γ -射線照射的層析樹脂的結合容量已達到所預期的表現。

其他具體實例

【0206】 吾人應瞭解雖然本發明已經連同其詳細說明來進行說明，但是先前的說明係意圖要說明而非對本發明的範疇加以限制[本發明的範疇係以所附之申請專利範圍的範疇定義者]。其他方面，益處與改良均在以下申請專利範圍的範疇內。

I671312

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※ I P C 分類：

【發明名稱】 無菌層析法及製法

STERILE CHROMATOGRAPHY AND
MANUFACTURING PROCESSES

【中文】

本發明提供用 γ -射線照射的層析樹脂進行層析的方法，其包括提供包含 γ -射線照射的層析樹脂之層析管柱；通過管柱進行第一循環的層析，其中該循環包括將層析樹脂暴露至變性緩衝液；並且通過該管柱進行至少另一層析循環。本發明亦提供整合的、封閉的或基本上封閉的，且連續的重組蛋白製造方法，其包括使用至少一個含有 γ -射線照射的層析樹脂的層析管柱，在該過程之每一循環期間將 γ -射線照射的層析樹脂暴露於變性緩衝液，並於該方法中使用生物負荷量減少的緩衝液。

【英文】

Provided herein are methods of performing chromatography with gamma-irradiated chromatography resin that include providing a chromatography column including a gamma-irradiated chromatography resin; performing a first cycle of chromatography through the column, where the cycle includes exposing the chromatography resin to a denaturing buffer; and

performing at least one additional cycle of chromatography through the column. Also provided are integrated, closed or substantially closed, and continuous processes for manufacturing of a recombinant protein that include the use of at least one chromatography column including gamma-irradiated chromatography resin, where the gamma-irradiated chromatography resin is exposed to denaturing buffer during each cycle in the process, and reduced bioburden buffer is used in the process.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（4）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

圖式

1/7

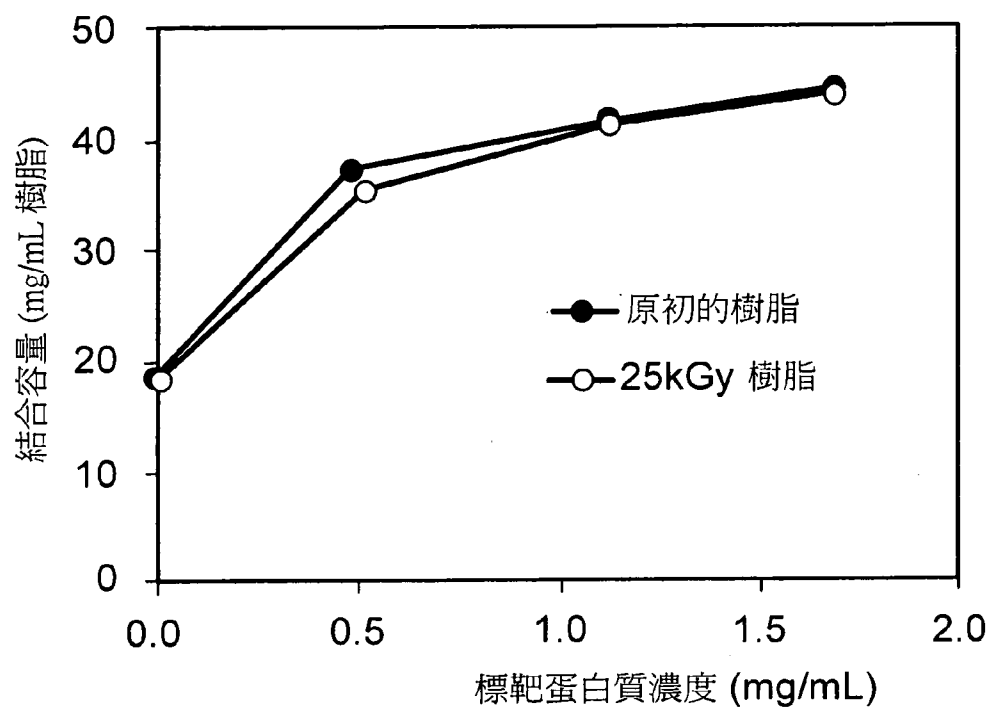


圖 1

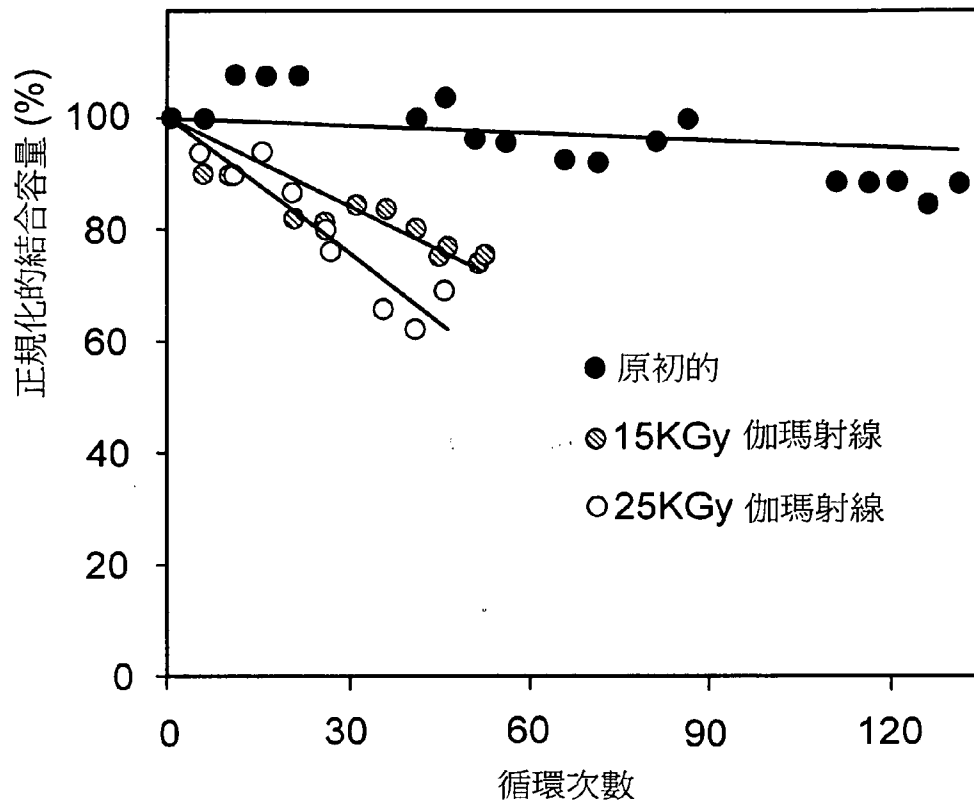


圖 2

樹脂條件	原初的	15 kGy	25 kGy
結合容量下降速率 (%循環)	0.10	0.40	0.83

圖 3

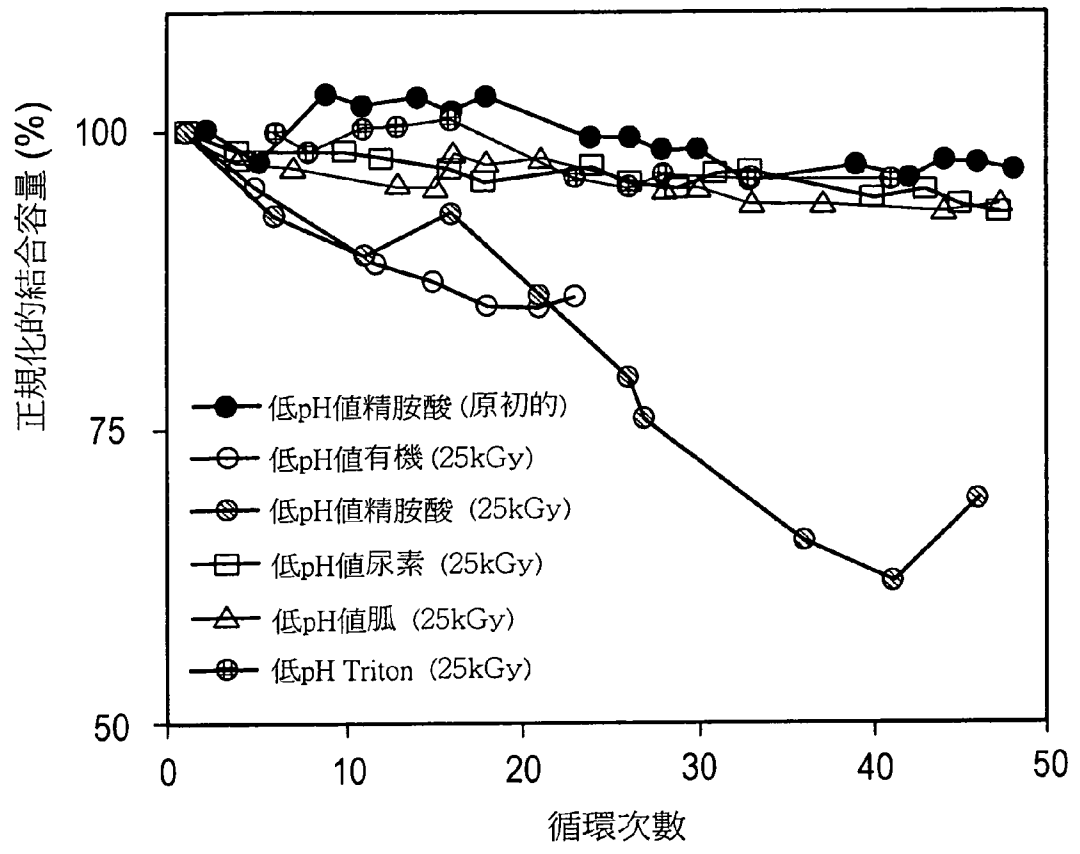


圖 4

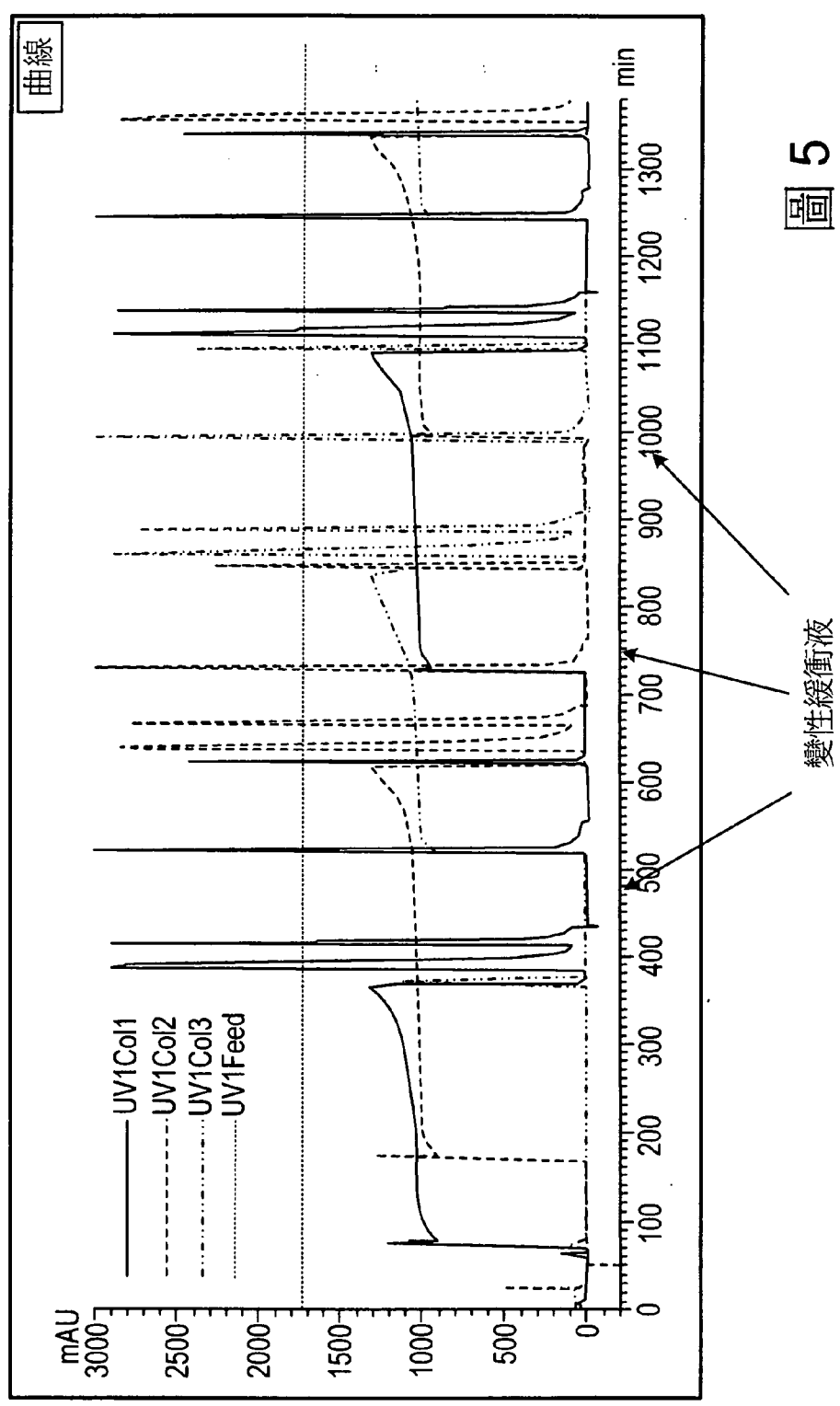


圖 5

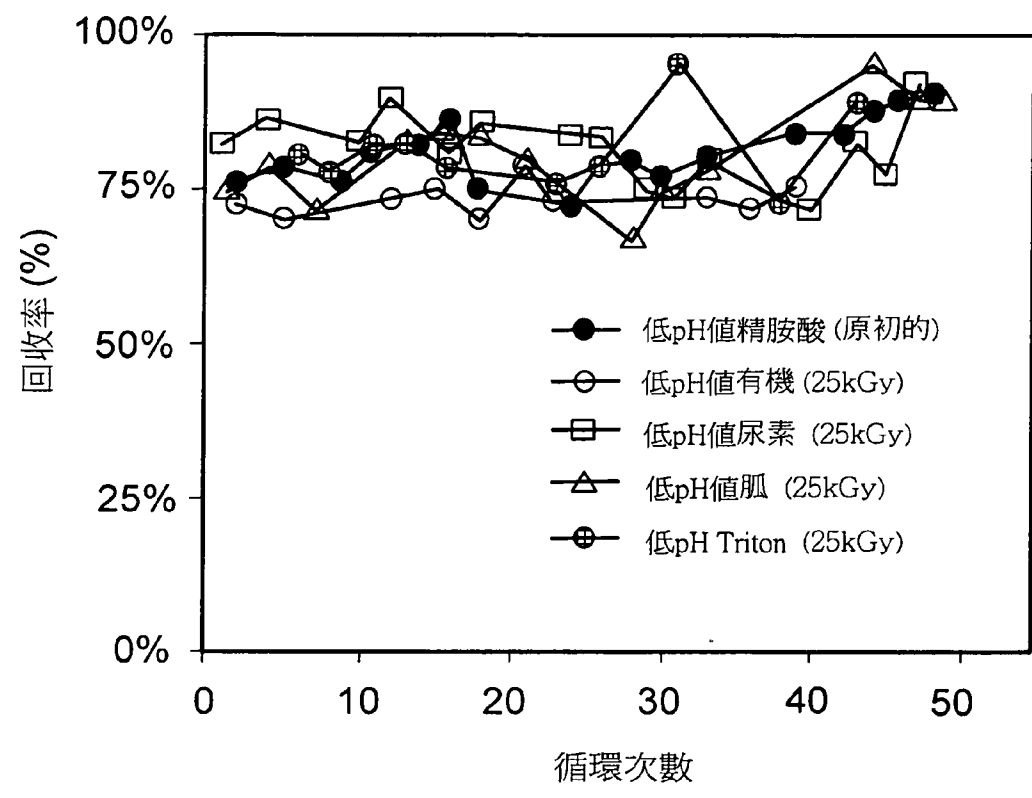


圖 6

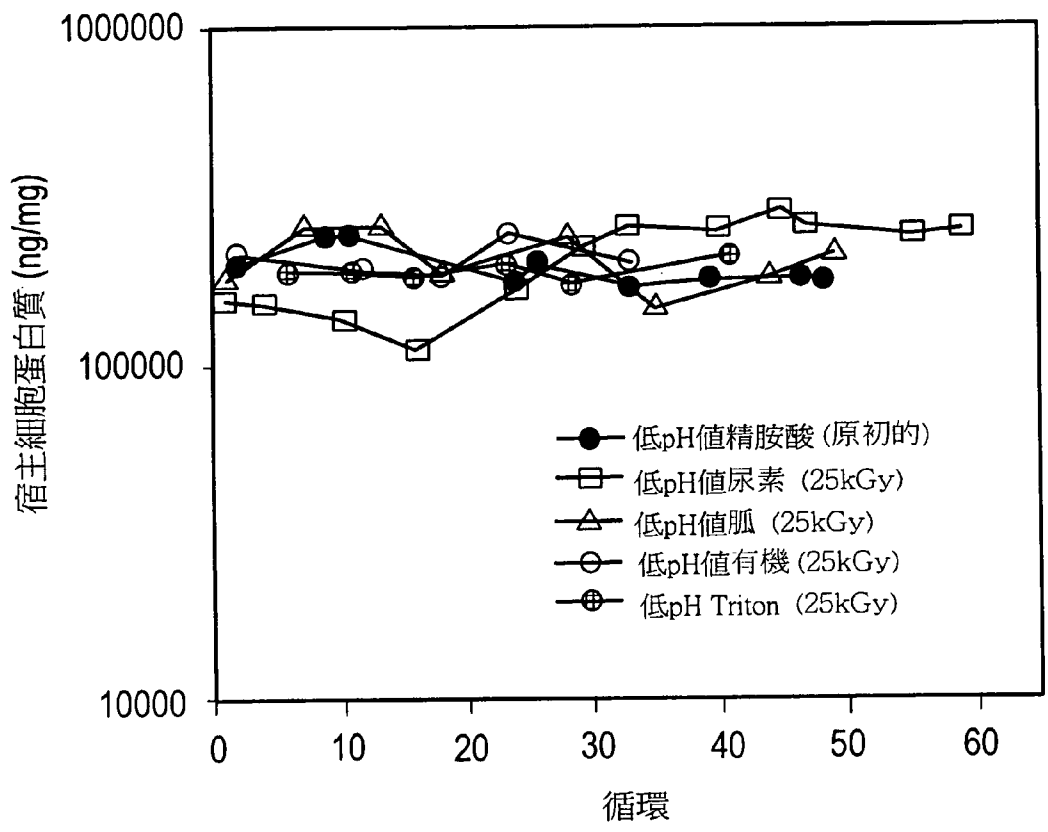


圖 7

 溶酶體貯積病和關聯的酵素缺損

疾病	酵素缺損
龐貝氏症	酸性 α -葡萄糖苷酶(例如Myozyme®, Lumizyme®)
MPS I*(賀勒氏症)	α -L-己醛糖酸鹽水解酶(例如Aldurazyme®)
MPS II(杭特氏症)	己醛糖酸鹽硫酸酯酶
MPS III(聖菲利柏氏症)	肝黏糖硫酸酯酶
MPS IV(莫奎歐氏症 A)	半乳糖-6-硫酸酯酶
MPS IV(莫奎歐氏症 B)	酸性 β -半乳糖苷酶
MPS VII(黏多醣貯積症)	β]-葡萄糖醛酸酶
I-細胞疾病	N-乙醯基葡萄糖胺-1-磷酸轉移酶
辛德勒氏症	α -N-乙醯基葡萄糖胺水解酶(α -半乳糖苷酶B)
沃曼氏症	酸性脂解酶
膽固醇酯貯積症	酸性脂解酶
法柏氏症	溶酶體酸性神經醯胺酶
尼曼-匹克氏症	酸性神經鞘磷脂酵素
高雪氏症	β]-葡萄糖苷酶(例如Cerezume®, Ceredase®)
克羅貝氏症	半乳糖基神經醯胺酶
法布理氏症	α -半乳糖苷酶 A
CM1 神經節苷脂儲積症	酸性 β -半乳糖苷酶
半乳糖苷溶酶體貯積症	β -半乳糖苷酶和神經胺酸酶
泰-薩克斯症	己醣胺酵素A
山德霍夫氏症	己醣胺酵素A和B

*MPS = 黏多醣症

圖 8

申請專利範圍

1. 一種用 γ -射線照射的層析樹脂進行層析的方法，其包括：
 - (a) 提供含有 γ -射線照射的層析樹脂的層析管柱；
 - (b) 通過該管柱進行第一個層析循環，其中該第一個層析循環包括藉由將該 γ 射線照射的層析樹脂暴露至變性緩衝液而使該 γ 射線照射的層析樹脂之結合容量回復；並且
 - (c) 通過該管柱進行至少一個額外的層析循環，其中該管柱在該至少一個額外的層析循環之每一循環期間暴露至變性緩衝液，且其中該變性緩衝液之流速、體積及濃度係以實質上回復由於 γ 射線照射的層析樹脂所造成結合容量喪失而選擇。
2. 根據申請專利範圍第 1 項的方法，其中步驟(b)中進行之第一個層析循環和/或步驟(c)中進行之至少一個額外的層析循環包括以下步驟：
 - (a) 藉著將該 γ 射線照射的層析樹脂與含有重組蛋白的液體接觸捕獲該重組蛋白；
 - (b) 藉著將該 γ 射線照射的層析樹脂與沖洗緩衝液接觸以沖洗該 γ 射線照射的層析樹脂；
 - (c) 將該 γ 射線照射的層析樹脂與一種溶離緩衝液接觸將重組蛋白溶離出來，並且
 - (d) 藉著將該 γ 射線照射的層析樹脂與變性緩衝液接觸以使該 γ 射線照射的層析樹脂的結合容量回復。
3. 根據申請專利範圍第 2 項的方法，其中該含有重組蛋白的液體是一種液態培養基。

4. 根據申請專利範圍第 1 項的方法，其中步驟(b)中第一個層析循環和/或步驟(c)中至少一個額外的層析循環是利用封閉的和整合的系統進行的。
5. 根據申請專利範圍第 4 項的方法，其中該變性緩衝液具有大約或少於 1×10^{-6} 的無菌保證量。
6. 根據申請專利範圍第 1 項的方法，其中該變性緩衝液包括尿素、鹽酸胍和 Triton™ X-100 之一種或多於一種。
7. 根據申請專利範圍第 6 項的方法，其中該變性緩衝液包括約 6 M 到約 9 M 尿素。
8. 根據申請專利範圍第 6 項的方法，其中該變性緩衝液包括約 5 M 到約 7 M 氯化胍。
9. 根據申請專利範圍第 6 項的方法，其中該變性緩衝液包括 Triton™ X-100。
10. 根據申請專利範圍第 1 項的方法，其中該變性緩衝液係選自以下組成之群組：
8 M 尿素、1 M NaCl、0.1 M 檸檬酸，pH 2.5；
6 M 鹽酸胍，pH 2.5；以及
0.5% Triton-X 100 在 0.1 M 乙酸，pH 2.5。
11. 根據申請專利範圍第 1 項的方法，其中步驟(b)中第一個層析循環尚包括在將該 γ 射線照射的層析樹脂暴露至變性緩衝液之後，將該該 γ 射線照射的層析樹脂至包含大約 0.5 M 到大約 1.5 M 氫氧化鈉的沖洗緩衝液。
12. 根據申請專利範圍第 1 項的方法，其中該管柱是多重管柱層析系統 (MCCS) 的部分。

13. 根據申請專利範圍第 12 項的方法，其中 MCCS 是一種週期的反流層析系統(PCCS)。
14. 根據申請專利範圍第 1 項的方法，其中該層析樹脂是陰離子交換層析樹脂、陽離子交換層析樹脂、分子篩層析樹脂、疏水性交互作用層析樹脂、親和性層析樹脂，或任何其組合。
15. 根據申請專利範圍第 14 項的方法，其中該層析樹脂是陰離子交換層析樹脂。
16. 根據申請專利範圍第 1 項的方法，其中該 γ 射線照射的層析樹脂已被大約 10 kGy 到大約 40 kGy 之劑量的 γ -射線照射。
17. 根據申請專利範圍第 16 項的方法，其中該 γ 射線照射的層析樹脂已被大約 15 kGy 到大約 35kGy 之劑量的 γ -射線照射。
18. 根據申請專利範圍第 17 項的方法，其中該 γ 射線照射的層析樹脂已被大約 20 kGy 到大約 30kGy 之劑量的 γ -射線照射。
19. 根據申請專利範圍第 1 項的方法，其中步驟(c)包括進行四個或多於四個另外的層析循環。
20. 根據申請專利範圍第 19 項的方法，其中步驟(c)包括進行九個或多於九個另外的層析循環。
21. 根據申請專利範圍第 20 項的方法，其中步驟(c)包括進行十四個或多於十四個另外的層析循環。
22. 根據申請專利範圍第 21 項的方法，其中步驟(c)包括進行十九個或多於十九個另外的層析循環。
23. 根據申請專利範圍第 22 項的方法，其中步驟(c)包括進行二十四個或多於二十四個另外的層析循環。
24. 根據申請專利範圍第 23 項的方法，其中步驟(c)包括進行二十九個或多

- 於二十九個另外的層析循環。
25. 根據申請專利範圍第 24 項的方法，其中步驟(c)包括進行三十九個或多於三十九個另外的層析循環。
 26. 根據申請專利範圍第 1 項的方法，其中步驟(c)至少在四天期間連續進行。
 27. 根據申請專利範圍第 26 項的方法，其中步驟(c)至少在五天期間連續進行。
 28. 根據申請專利範圍第 27 項的方法，其中步驟(c)至少在七天期間連續進行。
 29. 根據申請專利範圍第 28 項的方法，其中步驟(c)至少在十四天期間連續進行。
 30. 根據申請專利範圍第 29 項的方法，其中步驟(c)至少在二十八天期間連續進行。
 31. 根據申請專利範圍第 2 項的方法，其中該重組蛋白是一種重組的治療用蛋白質。
 32. 根據申請專利範圍第 31 項的方法，其中該重組的治療用蛋白質是免疫球蛋白、蛋白質片段、遺傳改造的蛋白質或酵素。
 33. 根據申請專利範圍第 32 項的方法，其中該酵素為半乳糖苷酶。
 34. 根據申請專利範圍第 33 項的方法，其中該半乳糖苷酶為 α -半乳糖苷酶。