



(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 I709569 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 11 月 11 日

(21)申請案號：104101334

(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)

(30)優先權：2014/01/17 美國

61/928,929

2014/05/21 美國

62/001,498

(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)

(74)代理人：林秋琴；陳彥希

(56)參考文獻：

US 2012255642A1

US 20070244307A1

US 20130068671A1

WO 2003045546A1

審查人員：劉建宏

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：17 共 111 頁

(54)名稱

無菌層析樹脂及其用於製造方法的用途

(57)摘要

本案中所提供者為減少(例如，無菌)層析樹脂的生物負荷量之方法，其包括將一種含組成物之容器曝露於足以減少容器和層析樹脂之生物負荷量的 γ -射線之劑量，該組成物包含層析樹脂和至少一種抗氧化劑及/或螯合劑，其中該至少一種抗氧化劑及/或螯合劑的存在量係足以改良層析樹脂曝露於 γ -射線的劑量之後/之時的結合能力之損失。本案亦提供包括該生物負荷量減少之層析樹脂的生物負荷量減少之層析管柱、包括層析樹脂和至少一種螯合劑及/或抗氧化劑之組成物、使用此等生物負荷量減少之層析管柱中的一者進行生物負荷量減少之管柱層析的方法、及用於生物負荷量減少地製造純化重組蛋白質之整合、封閉和連續方法。

Provided herein are methods of reducing bioburden of (e.g., sterilizing) a chromatography resin that include exposing a container including a composition including a chromatography resin and at least one antioxidant agent and/or chelator to a dose of gamma-irradiation sufficient to reduce the bioburden of the container and the chromatography resin, where the at least one antioxidant agent and/or chelator are present in an amount sufficient to ameliorate the loss of binding capacity of the chromatography resin after/upon exposure to the dose of gamma-irradiation. Also provided are reduced bioburden chromatography columns including the reduced bioburden chromatography resin, compositions including a chromatography resin and at least one chelator and/or antioxidant agent, methods of performing reduced bioburden column chromatography using one of these reduced bioburden chromatography columns, and integrated, closed, and continuous processes for reduced bioburden manufacturing of a purified recombinant protein.

I709569

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

無菌層析樹脂及其用於製造方法的用途

STERILE CHROMATOGRAPHY RESIN AND USE THEREOF IN
MANUFACTURING PROCESSES

【中文】

本案中所提供者為減少(例如，無菌)層析樹脂的生物負荷量之方法，其包括將一種含組成物之容器曝露於足以減少容器和層析樹脂之生物負荷量的 γ -射線之劑量，該組成物包含層析樹脂和至少一種抗氧化劑及/或螯合劑，其中該至少一種抗氧化劑及/或螯合劑的存在量係足以改良層析樹脂曝露於 γ -射線的劑量之後/之時的結合能力之損失。本案亦提供包括該生物負荷量減少之層析樹脂的生物負荷量減少之層析管柱、包括層析樹脂和至少一種螯合劑及/或抗氧化劑之組成物、使用此等生物負荷量減少之層析管柱中的一者進行生物負荷量減少之管柱層析的方法、及用於生物負荷量減少地製造純化重組蛋白質之整合、封閉和連續方法。

【英文】

Provided herein are methods of reducing bioburden of (e.g., sterilizing) a chromatography resin that include exposing a container including a composition including a chromatography resin and at least one antioxidant agent and/or chelator to a dose of gamma-irradiation sufficient to reduce the bioburden of the

container and the chromatography resin, where the at least one antioxidant agent and/or chelator are present in an amount sufficient to ameliorate the loss of binding capacity of the chromatography resin after/upon exposure to the dose of gamma-irradiation. Also provided are reduced bioburden chromatography columns including the reduced bioburden chromatography resin, compositions including a chromatography resin and at least one chelator and/or antioxidant agent, methods of performing reduced bioburden column chromatography using one of these reduced bioburden chromatography columns, and integrated, closed, and continuous processes for reduced bioburden manufacturing of a purified recombinant protein.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【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

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】(中文/英文)

無菌層析樹脂及其用於製造方法的用途

STERILE CHROMATOGRAPHY RESIN AND USE THEREOF IN
MANUFACTURING PROCESSES

【技術領域】

相關申請案之交互參照

本申請案主張 2014 年 1 月 17 日申請之美國臨時專利申請案第 61/928,929 號，和 2014 年 5 月 21 日申請之美國臨時專利申請案第 62/001,498 號的優先權。

本發明係關於生物技術的方法和重組蛋白質的生物製造。

【先前技術】

包括編碼重組蛋白質之核酸的哺乳動物細胞通常係用於製造治療或商業上重要的蛋白質。在當前多樣化的產品管線的環境下，生物技術公司越來越日趨使開發用於高靈活性且具成本效益地製造治療性蛋白質藥物之創新解決方案。用於有效地分離重組蛋白質之一策略為透過包括連續層析(例如，使用封閉系統)之方法。連續層析的一已知限制為污染劑存在於系統中(例如，增加之生物負荷量)，其導致受污染之產物、產率減少、和在系統中流速減少(或壓力增加)。例如，系統內增加之生物負荷量會導致系統之完全停機。

【發明內容】

概述

本發明至少部分係根據層析樹脂的 γ -射線減少層析樹脂之結合能力的發現。鑑於此發現，本文所提供者為減少層析樹脂的生物負荷量之方法，

其包括：將包括一種包括層析樹脂和至少一種抗氧化劑及/或螯合劑的組成物之容器曝露於足以減少容器和層析樹脂之生物負荷量的 γ -射線之劑量，其中該至少一種抗氧化劑及/或螯合劑的存在量係足以改良層析樹脂曝露於 γ -射線的劑量之後的結合能力之損失。所提供者亦為減少層析樹脂的生物負荷量之方法，其包括：將包括一種包括層析樹脂(及視需要之至少一種抗氧化劑及/或螯合劑，其量足以改良層析樹脂曝露於 γ -射線的劑量之後/之時的結合能力之損失)的組成物之容器以介於約 0.1 kGy/小時至約 6 kGy 小時之間的速率及/或在介於約 4 °C 至約 25 °C 之間的溫度下曝露於 γ -射線經歷足以減少容器和層析樹脂之生物負荷量的 γ -射線之劑量。所提供者亦為含有藉由任何本文所述方法製造的生物負荷量減少之層析樹脂的生物負荷量減少之層析管柱、包括層析樹脂和至少一種螯合劑及/或抗氧化劑之組成物、使用此等生物負荷量減少之層析管柱中之至少一者進行生物負荷量減少之管柱層析的方法、及包括使用此等生物負荷量減少之層析管柱中至少一者之用於生物負荷量減少地製造純化重組蛋白質之整合、封閉或實質上封閉和連續方法。藉由任何本文所述方法製造之任何層析樹脂、藉由任何本文所述方法製造之任何填充層析管柱、任何進行管柱層析之方法、和任何本文所述方法可為無菌、絕對無菌、滅菌、或減少的生物負荷量。藉由任何本文所述方法製造之任何層析樹脂、藉由任何本文所述方法製造之任何層析管柱、及任何本文所述方法可為滅菌和無菌、絕對無菌、滅菌、或減少的生物負荷量。

本文所提供者為一種減少層析樹脂的生物負荷量之方法，其包括：將包含一種包含層析樹脂和至少一種抗氧化劑及/或螯合劑的組成物之容器曝露於足以減少容器和層析樹脂之生物負荷量的 γ -射線之劑量，其中該至少一種抗氧化劑及/或螯合劑的存在量係足以改良層析樹脂曝露於 γ -射線的劑量之後的結合能力之損失。此等方法的一些具體實例另外包括在曝露之前，將組成物配置於容器中。在一些實例中，該照射係以介於約 0.1 kGy/小時至約 6 kGy/小時之間的速率及/或在介於約 4 °C 至約 25 °C 之間的溫度下進行。在任何此等方法的一些實例中，該容器為儲存容器、層析管柱、或填充層析管柱。在任何本文所述方法的一些實例中，該組成物為沈積層析樹脂在

包括至少一種抗氧化劑及/或螯合劑之液體中的漿體。在一些實例中，該液體包含：(i) 介於 75 mM 和約 125 mM 之間(例如，介於 80 mM 和約 120 mM 之間，介於約 85 mM 和約 115 mM 之間，介於約 90 mM 和約 110 mM 之間，或介於約 95 mM 和約 105 mM 之間)甘露醇；(ii) 介於 75 mM 和約 125 mM 之間(例如，介於約 80 mM 和約 120 mM 之間，介於約 85 mM 和約 115 mM 之間，介於約 90 mM 和約 110 mM 之間，或介於約 95 mM 和約 105 mM 之間)甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)；(iii) 介於 75 mM 和約 125 mM 之間(例如，介於約 80 mM 和約 120 mM 之間，介於約 85 mM 和約 115 mM 之間，介於約 90 mM 和約 110 mM 之間，或介於約 95 mM 和約 105 mM 之間)抗壞血酸鈉；(iv) 介於 75 mM 和約 125 mM 之間(例如，介於約 80 mM 和約 120 mM 之間，介於約 85 mM 和約 115 mM 之間，介於約 90 mM 和約 110 mM 之間，或介於約 95 mM 和約 105 mM 之間)組胺酸；(v) 介於 30 mM 和約 70 mM 之間(例如，介於約 35 mM 和約 65 mM 之間，介於約 40 mM 和約 60 mM 之間，或介於約 45 mM 和約 55 mM 之間)甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)和介於約 30 mM 和約 70 mM 之間(例如，介於約 35 mM 和約 65 mM 之間，介於約 40 mM 和約 60 mM 之間，或介於約 45 mM 和約 55 mM 之間)組胺酸；(vi) 介於約 10 mM 和約 50 mM 之間(例如，介於約 15 mM 和約 45 mM 之間，介於約 20 mM 和約 40 mM 之間，或介於約 25 mM 和約 35 mM 之間)甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)，介於約 10 mM 和約 50 mM 之間(例如，介於約 15 mM 和約 45 mM 之間，介於約 20 mM 和約 40 mM 之間，或介於約 25 mM 和約 35 mM 之間)組胺酸，和介於約 10 mM 和約 50 mM 之間(例如，介於約 15 mM 和約 45 mM 之間，介於約 20 mM 和約 40 mM 之間，或介於約 25 mM 和約 35 mM 之間)抗壞血酸鈉；或(vii) 介於約 5 mM 至約 45 mM 之間(例如，介於約 10 mM 和約 40 mM 之間，介於約 15 mM 和約 35 mM 之間，或介於 20 mM 和約 30 mM 之間)抗壞血酸鈉，介於約 5 mM 和約 45 mM 之間(例如，介於約 10 mM 和約 40 mM 之間，介於約 15 mM 和約 35 mM 之間，或介於 20 mM 和約 30 mM 之間)甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)，介於約 5 mM 和約 45 mM 之間(例如，介於約 10 mM 和約 40 mM 之間，介於約 15 mM 和約 35 mM

之間，或介於 20 mM 和約 30 mM 之間)甘露醇，和介於約 5 mM 和約 45 mM 之間(例如，介於約 10 mM 和約 40 mM 之間，介於約 15 mM 和約 35 mM 之間，或介於 20 mM 和約 30 mM 之間)組胺酸。在一些實例中，該液體為緩衝溶液(例如，磷酸鹽緩衝溶液，例如，磷酸鈉緩衝溶液，諸如 50 mM 磷酸鈉，pH 6.0)。

在任何本文所述方法的一些實例中，該組成物為固體混合物。在任何本文所述方法之一些具體實例中，該組成物包括至少一種選自下列群組之抗氧化劑：還原型麩胱甘肽、還原型硫氧還蛋白、還原型半胱胺酸、類胡蘿蔔素、褪黑激素、番茄紅素、生育酚、還原型泛醌、抗壞血酸鹽、膽紅素、尿酸、類脂酸、類黃酮、苯酚類丙酸(phenolpropanoid acid)、利多卡因(lidocaine)、柚配質、富勒烯、葡萄糖、甘露醇、4-羥基-2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧基、和二甲基甲氧基色原醇。在任何本文所述方法之一些具體實例中，該組成物包括至少一種(一、二、三或四種)選自甘露醇、抗壞血酸鈉、甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)、和組胺酸之抗氧化劑。在一些具體實例中，該組成物包括甘露醇、抗壞血酸鈉、甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)、和組胺酸。在任何本文所述方法之一些具體實例中，該組成物包括至少一種選自下列群組之螯合劑：乙二胺四乙酸(EDTA)、2,3-二巯基-1-丙磺酸鈉(DMPS)、二巯基丁二酸(DMSA)、金屬硫蛋白(metallothionin)、和去鐵胺(desferroxamine)。

在任何本文所述方法的一些實例中，該組成物包括至少一種選自下列群組之層析樹脂：陰離子交換層析樹脂、陽離子交換層析樹脂、親和性或假親和性層析樹脂、疏水性作用層析樹脂、和粒徑篩析層析樹脂(或其任何組合)。在任何本文所述方法的一些實例中，該層析樹脂可為多峰(例如，雙峰)層析樹脂(例如，一種具有陰離子交換和疏水性作用基團之層析樹脂、或一種具有陽離子交換和疏水性作用基團二者之層析樹脂)。在任何本文所述方法的一些實例中，該組成物包括親和性層析樹脂，該親和性層析樹脂包括蛋白質配位體(例如，蛋白質 A 或蛋白質 G)。在任何本文所述方法的一些實例中，該組成物包括一種陰離子交換層析樹脂(例如，一種包括 N-苯甲基-N-甲基-乙醇胺基團之陰離子交換層析樹脂)。

在任何本文所述方法的一些實例中，該劑量係介於約 2 kGy 至約 45 kGy 之間(例如，介於約 20 kGy 至約 30 kGy 之間，介於約 23 kGy 和約 27 kGy 之間，介於約 2 kGy 至約 40 kGy 之間，介於約 2 kGy 和約 35 kGy 之間，介於約 2 kGy 和約 30 kGy 之間，介於約 2 kGy 和約 25 kGy 之間，介於約 10 kGy 和約 45 kGy 之間，介於約 10 kGy 和約 40 kGy 之間，介於約 10 kGy 和約 35 kGy 之間，介於約 10 kGy 和約 30 kGy 之間，或介於約 10 kGy 和約 25 kGy 之間)。在任何本文所述方法之一些具體實例中，該曝露係在介於約 -25 °C 和約 0 °C 之間(含)，或介於約 0 °C 和約 25 °C 之間(含)(例如，介於約 4 °C 和約 25 °C 之間)的溫度下進行。

所提供者亦為一種藉由任何本文所述方法製造的生物負荷量減少之層析樹脂。在任何本文所提供的生物負荷量減少之層析樹脂的一些實例中具有介於約 1×10^{-8} 至約 1×10^{-5} 之間(例如，介於約 1×10^{-7} 至約 1×10^{-6} 之間)的滅菌保證水準(SAL)。例如，藉由任何本文所述方法製造之層析樹脂可具有減少生物負荷量、為無菌、為滅菌、或為絕對無菌。在一些具體實例中，藉由任何本文所述方法製造之層析樹脂可為滅菌且具有減少之生物負荷量、為無菌、或為絕對無菌。任何本文所提供的生物負荷量減少之層析樹脂的一些實例包括至少一種選自下列群組之樹脂：陰離子交換層析樹脂、陽離子交換層析樹脂、親和性或假-親和性層析樹脂、疏水性作用層析樹脂、和粒徑篩析層析樹脂。在一些具體實例中，本文所提供的生物負荷量減少之層析樹脂包括蛋白質配位體(例如，蛋白質 A 或蛋白質 G)之親和性層析樹脂。在一些具體實例中，本文所提供的生物負荷量減少之層析樹脂包括陰離子交換層析樹脂(例如，包括 N-苯甲基-N-甲基-乙醇胺基團之陰離子交換層析樹脂)。在一些具體實例中，本文所提供的生物負荷量減少之層析樹脂為多峰層析樹脂(例如，雙峰層析樹脂)。

所提供者亦為製造生物負荷量減少之填充層析管柱之方法，其包括：提供藉由任何本文所述方法製造的任何生物負荷量減少之層析樹脂；及在無菌環境中將層析樹脂填充於生物負荷量減少之管柱中。所提供者亦為藉由 γ -射線包括在層析管柱內之包括填充層析樹脂和至少一種抗氧化劑及/或螯合劑之組成物(例如，任何本文所提供的示例性組成物)所製造的生物負荷量

減少之填充層析管柱。任何本文所提供的生物負荷量減少之填充層析管柱可具有介於約 1×10^{-8} 至約 1×10^{-5} 之間(例如，介於約 1×10^{-7} 至約 1×10^{-6} 之間)的滅菌保證水準(SAL)。藉由任何本文所述方法製造之任何層析管柱可具有減少之生物負荷量、為無菌、為絕對無菌、或為滅菌。例如，藉由任何本文所述方法製造的任何層析管柱可為滅菌且可具有減少之生物負荷量、為無菌、或為絕對無菌。

在任何本文所提供的減少填充層析管柱之一些具體實例中，填充管柱中之樹脂包括至少一種選自下列群組之樹脂：陰離子交換層析樹脂、陽離子交換層析樹脂、親和性層析樹脂、疏水性作用層析樹脂、和粒徑篩析層析樹脂。在任何本文所提供的生物負荷量減少之填充層析管柱的一些具體實例中，該樹脂包括親和性層析樹脂，親和性層析樹脂包括蛋白質配位體(例如，蛋白質 A 或蛋白質 G)。在任何本文所提供的生物負荷量減少之填充層析管柱的一些具體實例中，該樹脂包括陰離子交換層析樹脂(例如，陰離子交換層析樹脂包括 N-苯甲基-N-甲基-乙醇胺基團)。

所提供者亦為包括層析樹脂和至少一種抗氧化劑及/或螯合劑之組成物，其中該至少一種抗氧化劑及/或螯合劑之存在量在用足以減少組成物之生物負荷量的 γ -射線之劑量處理時係足以改良層析樹脂的結合能力之損失。在任何本文所提供的組成物之一些實例中，該組成物為沈積層析樹脂在包含至少一種抗氧化劑及/或螯合劑之液體中的漿體。在一些實例中，該液體包含：(i) 介於 75 mM 和約 125 mM 之間(例如，介於 80 mM 和約 120 mM 之間，介於約 85 mM 和約 115 mM 之間，介於約 90 mM 和約 110 mM 之間，或介於約 95 mM 和約 105 mM 之間)甘露醇；(ii) 介於 75 mM 和約 125 mM 之間(例如，介於約 80 mM 和約 120 mM 之間，介於約 85 mM 和約 115 mM 之間，介於約 90 mM 和約 110 mM 之間，或介於約 95 mM 和約 105 mM 之間)甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)；(iii) 介於 75 mM 和約 125 mM 之間(例如，介於約 80 mM 和約 120 mM 之間，介於約 85 mM 和約 115 mM 之間，介於約 90 mM 和約 110 mM 之間，或介於約 95 mM 和約 105 mM 之間)抗壞血酸鈉；(iv) 介於 75 mM 和約 125 mM 之間(例如，介於約 80 mM 和約 120 mM 之間，介於約 85 mM 和約 115 mM 之間，介於約 90 mM 和約

110 mM 之間，或介於約 95 mM 和約 105 mM 之間)組胺酸；(v) 介於 30 mM 和約 70 mM 之間(例如，介於約 35 mM 和約 65 mM 之間，介於約 40 mM 和約 60 mM 之間，或介於約 45 mM 和約 55 mM 之間)甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)和介於約 30 mM 和約 70 mM 之間(例如，介於約 35 mM 和約 65 mM 之間，介於約 40 mM 和約 60 mM 之間，或介於約 45 mM 和約 55 mM 之間)組胺酸；(vi) 介於約 10 mM 和約 50 mM 之間(例如，介於約 15 mM 和約 45 mM 之間，介於約 20 mM 和約 40 mM 之間，或介於約 25 mM 和約 35 mM 之間)甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)，介於約 10 mM 和約 50 mM 之間(例如，介於約 15 mM 和約 45 mM 之間，介於約 20 mM 和約 40 mM 之間，或介於約 25 mM 和約 35 mM 之間)組胺酸，和介於約 10 mM 和約 50 mM 之間(例如，介於約 15 mM 和約 45 mM 之間，介於約 20 mM 和約 40 mM 之間，或介於約 25 mM 和約 35 mM 之間)抗壞血酸鈉；或(vii) 介於約 5 mM 至約 45 mM 之間(例如，介於約 10 mM 和約 40 mM 之間，介於約 15 mM 和約 35 mM 之間，或介於 20 mM 和約 30 mM 之間)抗壞血酸鈉之間，介於約 5 mM 和約 45 mM 之間(例如，介於約 10 mM 和約 40 mM 之間，介於約 15 mM 和約 35 mM 之間，或介於 20 mM 和約 30 mM 之間)甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)，介於約 5 mM 和約 45 mM 之間(例如，介於約 10 mM 和約 40 mM 之間，介於約 15 mM 和約 35 mM 之間，或介於 20 mM 和約 30 mM 之間)甘露醇，和介於約 5 mM 和約 45 mM 之間(例如，介於約 10 mM 和約 40 mM 之間，介於約 15 mM 和約 35 mM 之間，或介於 20 mM 和約 30 mM 之間)組胺酸。在一些實例中，該液體為緩衝溶液(例如，磷酸鹽緩衝溶液，例如磷酸鈉緩衝溶液，諸如 50 mM 磷酸鈉，pH 6.0)。

在任何本文所提供的組成物之一些實例中，該組成物為固體混合物。

任何本文所提供的組成物之一些具體實例可包括至少一種選自下列群組之抗氧化劑：還原型麩胱甘肽、還原型硫氧還蛋白、還原型半胱胺酸、類胡蘿蔔素、褪黑激素、番茄紅素、生育酚、還原型泛醌、抗壞血酸鹽、膽紅素、尿酸、類脂酸、類黃酮、苯酚類丙酸(phenolpropanoid acid)、利多卡因(lidocaine)、柚配質、富勒烯、葡萄糖、甘露醇、4-羥基-2,2,6,6-四甲基

哌啶-1-氧基、和二甲基甲氧基色原醇。任何本文所提供的組成物之一些具體實例可包括至少一種(一、二、三或四種)選自下列之抗氧化劑：甘露醇、抗壞血酸鈉、甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)、和組胺酸。任何本文所提供的組成物之一些實例包括甘露醇、抗壞血酸鈉、甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)、和組胺酸。任何本文所提供的組成物之一些實例可包括至少一種選自下列群組之螯合劑：乙二胺四乙酸(EDTA)、2,3-二巰基-1-丙磺酸鈉(DMPS)、二巰基丁二酸(DMSA)、金屬硫蛋白(metallothionin)、和去鐵胺(desferroxamine)。在任何本文所提供的組成物之一些實例中，該層析樹脂可包括至少一種選自下列群組之樹脂：陰離子交換層析樹脂、陽離子交換層析樹脂、親和性層析樹脂、疏水性作用層析樹脂、和粒徑篩析層析樹脂。在任何本文所提供的組成物之一些實例中，該樹脂包括親和性層析樹脂，該親和性層析樹脂包含蛋白質配位體(例如，蛋白質 A 或蛋白質 G)。

所提供者亦為進行生物負荷量減少之管柱層析的方法，其包括：(a) 提供藉由任何本文所述方法製造的任何生物負荷量減少之填充層析管柱；及(b) 在封閉系統中使用生物負荷量減少之填充層析管柱和生物負荷量減少之緩衝液進行管柱層析。在任何本文所述方法的一些實例中，使用生物負荷量減少之填充層析管柱的減少生物負荷量管柱層析係連續地進行至少 4 天(例如，至少 5 天，至少 7 天，至少 14 天，至少 28 天、或至少 60 天)的期間。在任何本文所述方法之一些具體實例中，在(a)中的生物負荷量減少之填充層析管柱中的樹脂相較於沒有用 γ -射線處理的相同樹脂，具有介於約 65% 和約 100%之間(例如，介於約 75%和約 100%之間)的百分比結合能力。在任何本文所述方法之一些具體實例中，在生物負荷量減少之填充層析管柱中的樹脂包括至少一種選自下列群組之樹脂：陰離子交換層析樹脂、陽離子交換層析樹脂、親和性或假-親和性層析樹脂、疏水性作用層析樹脂、和粒徑篩析層析樹脂。在任何本文所述方法的一些實例中，該樹脂包括親和性層析樹脂，該親和性層析樹脂包括蛋白質配位體(例如，蛋白質 A 或蛋白質 G)。在任何本文所述方法之一些具體實例中，該樹脂包括陰離子交換層析樹脂。

所提供者亦為用於生物負荷量減少地製造純化重組蛋白質之整合、封閉和連續方法，其包括：整合(a) 提供一種包括重組蛋白質之實質上無細胞的液體培養基；及(b)將液體培養基連續饋送至包括至少一個任何本文所述方法製造的任何生物負荷量減少之填充層析管柱之多管柱層析系統(MCCS)；其中該方法利用生物負荷量減少之緩衝液，被及從液體培養基連續地運行至來自 MCCS 之純化重組蛋白質的溶析液。在任何本文所述方法之一些具體實例中，該 MCCS 進行至少二種不同的單元操作。在任何本文所述方法之一些具體實例中，該方法包括管柱切換。在任何本文所述方法的一些實例中，該 MCCS 進行捕獲重組蛋白質及使病毒滅活的單元操作或進行捕獲和純化重組蛋白質的單元操作。

在任何本文所述方法之一些具體實例中，該 MCCS 包括至少二個生物負荷量減少之填充層析管柱。在任何本文所述方法的一些實例中，該 MCCS 為週期性逆流層析系統。在任何本文所述方法的一些實例中，該 MCCS 包括多個用於親和性層析、陽離子交換層析、陰離子交換層析、或粒徑篩析層析、或其任何組合之管柱。在任何本文所述方法之一些具體實例中，該 MCCS 包括用於親和性層析之管柱，及親和性層析係以使用選自下列群組之捕獲機制的方法進行：蛋白質 A-結合捕獲機制、受質-結合捕獲機制、抗體-或抗體片段-結合捕獲機制、適配體(aptamer)-結合捕獲機制、和輔因子-結合捕獲機制。在任何本文所述方法的一些實例中，該親和性層析係以使用蛋白質 A-結合捕獲機制之方法進行，及該重組蛋白質為抗體或抗體片段。

所提供者亦為一種用於生物負荷量減少地製造純化重組蛋白質之整合、封閉和連續方法，其包括：整合(a) 提供包含重組蛋白質之實質上無細胞的液體培養基；(b) 將液體培養基連續饋送至第一多管柱層析系統(MCCS1)；(c) 使用 MCCS1 捕獲在液體培養基中之重組蛋白質；(d) 從包括該重組蛋白質之 MCCS1 產生溶析液及將該溶析液連續地饋送至第二多管柱層析系統(MCCS2)；(e) 將來自該溶析液的重組蛋白質連續地饋送至 MCCS2 並接著溶析重組蛋白質從而產生純化重組蛋白質，其中：該方法利用生物負荷量減少之緩衝液，及從液體培養基連續地運行至該純化重組蛋白質，及在

MCCS1 及/或 MCCS2 中之至少一個管柱含有藉由任何本文所述方法製造的任何生物負荷量減少之填充層析管柱中至少一者。在任何本文所述方法之一些具體實例中，該 MCCS1 及/或 MCCS2 進行至少二種不同的單元操作。任何本文所述方法的一些實例包括管柱切換。在任何本文所述方法的一些實例中，該 MCCS1 進行捕獲重組治療性蛋白質和使病毒滅活的單元操作。在任何本文所提供之方法的一些具體實例中，該 MCCS2 進行純化和精緻純化重組蛋白質的單元操作。在任何本文所提供之方法的一些具體實例中，該 MCCS1 及/或 MCCS2 包括至少二個層析管柱。在任何本文所述方法的一些實例中，該 MCCS1 為第一週期性逆流層析系統(PCCS1)。在任何本文所述方法的一些實例中，其中該捕獲係使用親和性層析、陽離子交換層析、陰離子交換層析、或粒徑篩析層析、或其任何組合進行。在任何本文所述方法的一些實例中，該親和性層析係用選自下列群組之捕獲機制進行：蛋白質 A-結合捕獲機制、受質-結合捕獲機制、抗體-或抗體片段-結合捕獲機制、適配體-結合捕獲機制、和輔因子-結合捕獲機制。在任何本文所述方法之一些具體實例中，該親和性層析係用蛋白質-A 結合捕獲機制進行、及該重組蛋白質為抗體或抗體片段。

在任何本文所述方法之一些具體實例中，該 MCCS2 為第二週期性逆流(PCCS2)層析系統。在任何本文所述方法中，該重組蛋白質為一種治療性重組蛋白質。任何本文所述方法之一些具體實例另外包括將純化治療性重組蛋白質調配成一種醫藥組成物。任何本文所述方法之一些具體實例可連續地進行至少 4 天(例如，至少 5 天，至少 7 天，至少 14 天、或至少 28 天)之時段。

所提供者亦為一種減少層析的生物負荷量之方法，其包含：(a) 將一種包含實質上乾燥層析樹脂之容器曝露於足以減少容器和層析樹脂之生物負荷量的 γ -射線之劑量。此等方法的一些具體實例另外包含在步驟(a)之前，將層析樹脂乾燥以從層析樹脂移除液體。在一些具體實例中，該實質上 乾燥層析樹脂不含顯著量的抗氧化劑或顯著量的螯合劑。在一些具體實例中，該容器為儲存容器。在一些具體實例中，該層析樹脂係共價連接至物件(例如，晶片、膜、或片匣)的表面。在一些具體實例中，該層析樹脂包含蛋白

質配位體(例如，蛋白質 A 或蛋白質 G)。在一些具體實例中，該層析樹脂為一種陰離子交換層析樹脂(例如，包含 N-苯甲基-N-甲基-乙醇胺基團之層析樹脂)。在一些具體實例中，該劑量係介於約 15 kGy 至約 45 kGy 之間(例如，介於約 20 kGy 至約 30 kGy 之間)。所提供者亦為藉由任何本文所述方法製造的生物負荷量減少之層析樹脂。在一些具體實例中，該所製造的生物負荷量減少之層析樹脂具有介於約 1×10^{-8} 至約 1×10^{-5} 之間的滅菌保證水準(SAL)(例如，介於約 1×10^{-7} 至約 1×10^{-6} 之間的 SAL)。在一些具體實例中，該減少之層析樹脂包含至少一種選自下列群組之樹脂：陰離子交換層析樹脂、陽離子交換層析樹脂、親和性層析樹脂、疏水性作用層析樹脂、和粒徑篩析層析樹脂。在一些具體實例中，該減少之層析樹脂包含親和性層析樹脂，該親和性層析樹脂包含蛋白質配位體(例如，蛋白質 A)。在一些具體實例中，該減少之層析樹脂包含陰離子交換層析樹脂(例如，包括 N-苯甲基-N-甲基-乙醇胺基團之陰離子交換層析樹脂)。所提供者亦為製造生物負荷量減少之填充層析管柱之方法，其包含提供藉由任何本文所述方法製造的生物負荷量減少之層析樹脂；及在無菌環境中將該層析樹脂填充於生物負荷量減少之管柱中。所提供者亦為藉由任何本文所述方法製造的生物負荷量減少之填充層析管柱。

所提供者亦為用於生物負荷量減少地製造純化重組蛋白質之整合、封閉和連續方法，其包含：整合(a) 提供一種包含重組蛋白質之實質上無細胞的液體培養基；及(b) 將液體培養基連續饋送至包含至少一個藉由任何本文所提供的方法製造的生物負荷量減少之填充層析管柱的多管柱層析系統(MCCS)；其中該方法利用生物負荷量減少之緩衝液，及從液體培養基連續地運行至來自 MCCS 之純化重組蛋白質的溶析液。所提供者亦為用於生物負荷量減少地製造純化重組蛋白質之整合、封閉和連續方法，其包含：整合(a)提供包含重組蛋白質之實質上無細胞的液體培養基；(b)將液體培養基連續饋送至第一多管柱層析系統(MCCS1)；(c)使用 MCCS1 將重組蛋白質捕獲在液體培養基中；(d) 從包含該重組蛋白質之 MCCS1 製造溶析液及將該溶析液連續地饋送至第二多管柱層析系統(MCCS2)；(e) 將來自該溶析液之重組蛋白質連續地饋送至 MCCS2 並接著溶析重組蛋白質從而產生純化重

組蛋白質，其中：該方法利用生物負荷量減少之緩衝液，及及從液體培養基連續地運行至該純化重組蛋白質，及至少一個在 MCCS1 及/或 MCCS2 中之管柱含有藉由任何本文所提供的方法製造的生物負荷量減少之填充層析管柱。

如使用於本文中，名詞之前「一」字表示一或多個之特定名詞。例如，「一生物負荷量減少之層析管柱」短語表示「一或多個生物負荷量減少之層析管柱。」

術語「生物負荷量」為該技藝已知且指組成物(例如，固體或液體)中及/或在物件的表面(例如，外及/或內表面)上所存在之自我複製的生物污染物之水準。例如，生物負荷量可指含有層析樹脂或填充層析樹脂的組成物中所存在之自我複製生物污染物，(例如，填充層析管柱中的填充層析樹脂中所存在之自我複製生物污染物)。在其它實例中，生物負荷量可指自在層析管柱之內表面上及/或在層析管柱內之層析樹脂內的我複製生物污染物(例如，在層析管柱之內表面上的生物污染物和在層析管柱內之填充層析樹脂內的生物污染物)。生物負荷量也可指液體(例如，任何本文所述方法或方法(process)中所使用之緩衝液)內所存在之自我複製生物污染物。自我複製生物污染物的非限制例可為細菌(例如，革蘭氏陽性或革蘭氏陰性細菌、或細菌孢子)、分枝桿菌、病毒(例如，囊泡狀病(vesivirus)、卡奇谷病毒(Cache Valley virus)、小病毒、皰疹病毒、和崩芽病毒)、寄生蟲、真菌、酵母、和原生動物。測定生物負荷量之示例性方法係描述於本文中。測定生物負荷量之額外方法在該項技術中為已知的。

術語「生物負荷量減少」為已知且指組成物(例如，固體或液體)中及/或在物件之表面上(例如，外及/或內表面)所存在之自我複製生物污染物的水準之減少(例如，可檢出之減少)。用於減少層析樹脂(例如，填充層析樹脂)、緩衝液、及/或層析管柱(例如，填充層析管柱)的生物負荷量之方法的非限制例係描述於本文中。用於減少任何本文所述的組成物之生物負荷量的額外方法在該項技術中為已知的。

術語「生物負荷量減少之層析樹脂」表示一種已經經過處理以減少層析樹脂中所存在之自我複製生物污染物的水準之層析樹脂(例如，含有層析樹

脂的組成物(例如，漿體)中所存在之自我複製生物污染物的水準之可檢出減少層析樹脂)。例如，生物負荷量減少之層析樹脂可為曝露於足以減少層析樹脂中自我複製生物污染物的水準的 γ -射線之樹脂(例如，曝露於足以減少層析樹脂中自我複製生物污染物的水準的 γ -射線之含有層析樹脂的組成物)。

例如，一種生物負荷量減少之層析樹脂可為已曝露於介於約 1 kGy 至約 15 kGy 之間，介於約 1 kGy 和約 20 kGy 之間，介於約 1 kGy 和約 25 kGy γ -射線之間，介於約 1 kGy 和約 30 kGy γ -射線之間，或介於約 1 kGy 和約 35 kGy γ -射線之間的劑量之樹脂。減少層析樹脂的生物負荷量之示例性方法係描述於本文中。減少層析樹脂的生物負荷量之額外方法在該項技術中為已知的。

術語「生物負荷量減少之層析管柱」表示一種包括經處理之層析樹脂(例如， γ -射線之層析樹脂)的層析管柱(例如，填充層析管柱)，其具有自我複製生物污染物的水準係小於包括未經處理層析樹脂之相同層析管柱中所存在之自我複製生物污染物的水準。例如，生物負荷量減少之層析管柱可包括至少或約 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-9} 、或 1×10^{-10} 的滅菌保證水準的經處理之層析樹脂。

術語「生物負荷量減少之緩衝液」為已知的且表示一種經處理(例如，過濾、高壓滅菌、及/或 γ -射線)之液體(例如，經處理之緩衝溶液)，其具有之自我複製污染劑的水準係小於相同未經處理液體中所發現之自我複製污染劑的水準。例如，生物負荷量減少之緩衝液可具有至少或約 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-9} 、或 1×10^{-10} 的滅菌保證水準。

「絕對無菌性(sterility)」或「絕對無菌」為用於描述完全無自我複製生物污染物的組成物或方法之術語。例如，該等術語可適用於 γ -射線之層析樹脂，層析管柱之內表面和內含物(例如，層析樹脂)，及/或緩衝液。絕對無菌組成物或方法可為乾淨的(如該項技術中已知的術語)。

「無菌」或「無菌性」為用於描述一種具有約或小於 1.0×10^{-6} (例如，約或小於 1.0×10^{-7} ，約或小於 1.0×10^{-8} ，約或小於 1.0×10^{-9} 、或 1×10^{-10}) 之滅菌保證水準的組成物或方法之術語。組成物或方法是否為無菌之測定

可使用許多該項技術中已知的經驗證之製造方法。例如，一種無菌組成物或方法可完全無活的自我複製生物污染物(例如，任何本文所述的自我複製生物污染物)。無菌組成物或方法可為乾淨的(如該項技術中已知的術語)。

術語「無菌」表示一種用於使組成物無菌的經驗證之方法(如本文中所定義)。可測定抗指標自我複製生物污染物(例如，細菌)在處理方法期間的去活速率以確定是否已經達到組成物之無菌(如本文中所定義)。

術語「滅菌保證水準」或「SAL」為該項技術中已知的且表示處理單元之批料內達成絕對無菌的可信度之水準。概率通常根據在驗證期間進行去活研究的結果計算並以 1×10^{-n} 的形式表示。

術語「滅菌」為用於描述無引起疾病或引起症狀的自我複製生物污染物(例如，任何本文所述的自我複製生物污染物)之組成物或方法。滅菌組成物或方法可為乾淨的(如該項技術中已知的術語)。

術語「單元操作」為技術用語且表示可在一種純化來自液體培養基的重組蛋白質之方法進行之功能步驟。例如，一操作的單元可為過濾(例如，從包括重組蛋白質之流體移除污染物細菌、酵母、病毒、及/或分枝桿菌、及/或微粒物質)、捕獲、表位標籤移除、純化、保存或儲存、精緻純化、使病毒滅活、調整包括重組蛋白質的流體之離子濃度及/或 pH、和移除不要的鹽。

術語「捕獲」表示一種進行部分純化或分離(例如，至少或約 5%(例如)至少或約 10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或至少或約 95%純度，以重量計)和濃縮來自液體培養基或稀釋液體培養基中所存在之一或多種其他成分(例如，存在於或分泌自哺乳動物細胞之培養基蛋白質或一或多種其他成分(例如，DNA、RNA、或其他蛋白質))的重組蛋白質(例如，重組治療性蛋白質)之步驟。通常，捕獲係使用結合重組蛋白質之層析樹脂(例如，透過親和性層析之使用)進行。從液體培養基或稀釋液體培養基捕獲重組蛋白質之非限制方法係如本文所述且其在該項技術中為已知的。可使用至少一個層析管柱及/或層析膜(例如，任何本文所述的層析管柱及/或層析膜)從液體培養基捕獲重組蛋白質。

術語「純化」表示一種進行從一或多種其他雜質(例如，大量(bulk)雜質)分離重組蛋白質(例如，重組治療性蛋白質)或包括重組蛋白質的流體中所存在之成分(例如，存在於或分泌自哺乳動物細胞之液體培養基蛋白質或一或多種其他成分(例如，DNA、RNA、其他蛋白質、內毒素、病毒、等等))之步驟。例如，純化可在最初捕獲步驟期間或之後進行。純化可使用層析樹脂、膜、或任何結合重組蛋白質或污染物之其他固體撐體(例如，透過親和性層析、疏水性作用層析、陰離子或陽離子交換層析、或分子篩層析之使用)進行。重組蛋白質可使用至少一個層析管柱及/或層析膜(例如，任何本文所述的層析管柱或層析膜)而從包括重組蛋白質的流體純化。

術語「精緻純化」為技術用語且表示進行從接近最終所需純度的包括重組蛋白質的流體(例如，重組治療性蛋白質)移除殘餘微量或少量之污染物或雜質的步驟。例如，精緻純化可藉由將包括重組蛋白質的流體通過選擇性結合至目標重組蛋白質或包括重組蛋白質的流體中所存在之少量的污染物或雜質的層析管柱或膜吸收器進行。在該種實例中，該層析管柱或膜吸收器之溶析液/濾液包括重組蛋白質。

術語「過濾」表示從液體(例如，任何本文所述方法中所存在之液體培養基或流體)移除至少部分(例如，至少 80%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99%)的不要生物污染物(例如，哺乳動物細胞、細菌、酵母細胞、病毒、或分枝桿菌)及/或微粒物質(例如，沈澱蛋白質)。

術語「溶析液/濾液」為技術用語且表示從包括可檢測量的重組蛋白質(例如，重組治療性蛋白質)之層析管柱或層析膜發出的流體。

術語「整合方法」表示一種使用共同作用以達成特定結果(例如，從液體培養基純化重組蛋白質)的結構元件進行之方法。

術語「連續方法」表示一種將流體連續地饋送通過至少一部分的系統之方法。例如，一種連續方法為一種將包括重組蛋白質之液體培養基從生物反應器連續地饋送通過 MCCS 的方法。連續方法的另一實例為一種將包括重組蛋白質之液體培養基從生物反應器連續地饋送通過第一和第二 MCCS(MCCS1 和 MCCS2)之方法。另外的實例包括一種將包括重組蛋白質之液體培養基連續地饋送通過 MCCS 的方法、一種將包括重組蛋白質之液

體培養基連續地饋送通過 MCCS1 和 MCCS2 的方法、或一種將包括重組蛋白質的流體連續地饋送通過 MCCS2 的方法。

術語「封閉方法」為技術用語且表示一種其之進行致使與重組蛋白質或包括重組蛋白質之液體接觸的方法之成分(例如，層析樹脂及/或緩衝液)不意欲曝露於污染劑經歷顯著時段的方法(例如，不意欲曝露於空氣一顯著時段)。

術語「治療性蛋白質藥物」表示已充分從污染蛋白質、脂質、和核酸(例如，存在於液體培養基中或來自宿主細胞(例如，來自哺乳動物、酵母、或細菌宿主細胞)之污染蛋白質、脂質、和核酸)和生物污染物(例如，病毒和細菌污染物)純化或分離，且可調配成藥劑而沒有任何另外實質之純化及/或去污染步驟之重組蛋白質(例如，免疫球蛋白、蛋白質片段、改造蛋白質、或酶)。

術語「多管柱層析系統」或「MCCS」表示一種總計二或多個互連或切換層析管柱及/或層析膜之系統。多管柱層析系統的非限制例為一種包括總計二或多個互連或切換層析管柱及/或層析膜之週期性逆流層析系統(PCC)。多管柱層析系統的另外實例係如本文中所述且在該項技術中為已知的。

術語「實質上無」表示一種為無至少或約 90%(例如，無至少或約 95%、96%、97%、98%、或無至少或約 99%、或無約 100%)的特定物質(例如，哺乳動物細胞或、來自哺乳動物細胞的污染蛋白質、核酸、醣、或脂質)之組成物(例如，液體培養基)。

術語「哺乳動物細胞」表示任何得自或源自任何哺乳動物(例如，人、倉鼠、小鼠、綠猴、大鼠、豬、牛、或兔子)之細胞。例如，哺乳動物細胞可為無限增殖化細胞。在一些具體實例中，該哺乳動物細胞為分化細胞。在一些具體實例中，該哺乳動物細胞為未分化細胞。哺乳動物細胞的非限制例係描述於本文中。哺乳動物細胞的另外實例在該項技術中為已知的。

術語「培養」或「細胞培養」表示哺乳動物細胞在經控制之物理條件組下之維持或增殖。

術語「哺乳動物細胞之培養物」表示包括在經控制之物理條件組下維持或增殖的多種哺乳動物細胞之液體培養基

術語「液體培養基」表示一種包括使細胞(例如，哺乳動物細胞)體外生長或增殖的充足養分之流體。例如，液體培養基可包括下列中之一或多者：胺基酸(例如，20 個胺基酸)、嘌呤(例如，次黃嘌呤)、嘧啶(例如，胸苷)、膽鹼、肌醇、噻胺、葉酸、生物素、鈣、菸鹼醯胺、吡哆醇、核黃素、胸苷、氰鈷胺、丙酮酸鹽、類脂酸、鎂、葡萄糖、鈉、鉀、鐵、銅、鋅、和碳酸氫鈉。在一些具體實例中，液體培養基可包括來自哺乳動物的血清。在一些具體實例中，液體培養基不包括來自哺乳動物之血清或另一萃取物(經定義之液體培養基)。在一些具體實例中，液體培養基可包括微量金屬、哺乳動物生長激素、及/或哺乳動物生長因子。液體培養基之另一實例為最少培養基(例如，僅包括無機鹽、碳源、和水之培養基)。液體培養基的非限制例係描述於本文中。液體培養基的另外實例在該項技術中為已知的且為市售。液體培養基可包括任何密度的哺乳動物細胞。例如，如使用於本文中，從生物反應器移除之液體培養基的體積可為實質上無哺乳動物細胞。

術語「無動物來源之成分的液體培養基」表示一種不包括任何源自哺乳動物之成分(例如，蛋白質或血清)的液體培養基。

術語「無血清的液體培養基」表示一種不包括哺乳動物血清的液體培養基。

術語「含有血清的液體培養基」表示一種包括哺乳動物血清的液體培養基。

術語「化學成分確定的液體培養基」為技術用語且表示其中所有化學成分為已知的液體培養基。例如，化學成分確定的液體培養基不包括胎牛血清、牛血清白蛋白、或人類血清白蛋白，如此等製劑通常包括白蛋白和脂質的複雜混合。

術語「無蛋白質之液體培養基」表示一種不包括任何蛋白質(例如，任何可檢出之蛋白質)的液體培養基。

術語「免疫球蛋白」表示一種包括免疫球蛋白蛋白質的至少 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(例如，可變域序列、構架序列、及/或恆定區序列)的多肽。免疫球蛋白可(例如)包括輕鏈免疫球蛋白的至少 15 個胺基酸，例如於重鏈免疫

球蛋白之至少 15 個胺基酸。免疫球蛋白可為分離抗體(例如, IgG、IgE、IgD、IgA、或 IgM), 例如, IgG 之亞類(例如, IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4)。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。免疫球蛋白也可為雙特異性抗體或三特異性抗體、或二聚體、三聚體、或多聚體抗體、或二抗體、Affibody®、或 Nanobody®。免疫球蛋白也可為包括至少一種免疫球蛋白域之改造蛋白質(例如, 融合蛋白質)。免疫球蛋白的非限制例係如本文中所述且免疫球蛋白的另外實例在該項技術中為已知的。

術語「蛋白質片段」或「多肽片段」表示多肽序列之一部分, 其長度為至少或約 4 個胺基酸, 至少或約 5 個胺基酸, 至少或約 6 個胺基酸, 至少或約 7 個胺基酸, 至少或約 8 個胺基酸, 至少或約 9 個胺基酸, 至少或約 10 個胺基酸, 至少或約 11 個胺基酸, 至少或約 12 個胺基酸, 至少或約 13 個胺基酸, 至少或約 14 個胺基酸, 至少或約 15 個胺基酸, 至少或約 16 個胺基酸, 至少或約 17 個胺基酸, 至少或約 18 個胺基酸, 至少或約 19 個胺基酸、或至少或約 20 個胺基酸, 或長度大於 20 個胺基酸。重組蛋白質片段可使用任何本文所述方法製造。

術語「改造蛋白質」表示一種不是由生物體(例如, 哺乳動物)中所存在之內源核酸自然編碼的多肽。改造蛋白質的實例包括酶(例如, 具有一或多種導致改造酶的穩定性及/或催化活性的增加之胺基酸取代、缺失、插入或添加)、融合蛋白質、抗體(例如, 二價抗體、三價抗體、或二抗體)、和抗原-結合蛋白質, 彼等包括至少一種重組支架(scaffolding)序列。

術語「分泌蛋白質」或「分泌重組蛋白質」表示一種蛋白質(例如, 重組蛋白質), 當其在哺乳動物細胞內轉譯時, 其原本包括至少一種分泌信號序列, 且過透過(至少部分)在哺乳動物細胞中之分泌信號序列的酶裂解, 而至少部分分泌至細胞外空間(例如, 液體培養基)中。熟練的從業者將理解「分泌」蛋白質不需要從被認為是分泌蛋白之細胞完全分離。

術語「灌注生物反應器」表示一種第一液體培養基中包括多種細胞(例如, 哺乳動物細胞)之生物反應器, 其中該生物反應器中所存在之細胞的培養包括週期性地或連續移除第一液體培養基且同時或不久之後將實質上相同體積的第二液體培養基添加至生物反應器。

在一些實例中，所移除和添加之第一液體培養基的體積經過增量時段(例如，約 24-小時時段，介於約 1 分鐘和約 24-小時之間時段、或大於 24 小時時段)有增量改變(例如，增加或減少)在培養時段內(例如，每天培養基再進料速率)。每天所移除和替換之培養基的部分可視所要培養之特定細胞、初始接種密度、及在特定時間的細胞密度而改變。「RV」或「反應器體積」表示在培養方法開始時培養基的體積(例如，接種後培養液中所存在的總體積)。

術語「分批補料生物反應器」為技術用語且表示一種在第一液體培養基中包括多個細胞(例如，哺乳動物細胞)之生物反應器，其中該生物反應器中所存在之細胞的培養包括將第二液體培養基週期性地或連續添加至第一液體培養基而沒有從細胞培養物實質上或顯著移除第一液體培養基或第二液體培養基。第二液體培養基可與第一液體培養基相同。在分批補料培養物的一些實例中，第二液體培養基為第一液體培養基之濃縮形式。在分批補料培養物的一些實例中，第二液體培養基係以乾燥粉末添加。

術語「澄清液體培養基」表示一種從細菌或酵母細胞培養物獲得之液體培養基，其實質上無(例如，無至少 80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%、或 99%)之細菌或酵母細胞。

除非另有定義，否則本文所使用的所有技術和科學術語具有與本發明所屬技術領域之一般技術人員通常理解者相同的含義。方法和材料在本文中係描述使用於本發明中；也可使用該項技術中已知的其他適當方法和材料。該等材料、方法和實例僅是說明性的且不意欲被限制。所有出版物、專利申請案、專利、序列、資料庫記錄、以及本文所提及的其他參考文獻係以彼等之全文引用方式納入。在衝突的情況下，將以本說明書(包括定義)為準。

本發明的其它特徵和優點從以下詳細描述和附圖，及從申請專利範圍將是顯而易見的。

本文所提供者為減少層析樹脂的生物負荷量之方法：將包括一種包括層析樹脂和至少一種抗氧化劑及/或螯合劑的組成物之容器曝露於足以減少容器和層析樹脂之生物負荷量的 γ -射線之劑量，其中該至少一種抗氧化劑及/

或螯合劑的存在量係足以改良層析樹脂曝露於 γ -射線的劑量之後的結合能力之損失。所提供者亦為含有藉由任何本文所述方法製造的生物負荷量減少之層析樹脂的生物負荷量減少之層析管柱、包括層析樹脂和至少一種螯合劑及/或抗氧化劑之組成物、使用此等生物負荷量減少之層析管柱中至少一者進行減少生物負荷量管柱層析之種方法、和用於生物負荷量減少地製造純化重組蛋白質之整合、封閉和連續方法，其包括使用此等生物負荷量減少之層析管柱中之至少一者。此等方法和方法(processes)之非限制態樣係描述於下。如在該技術中可理解的，下述各種態樣可以任何組合使用而沒有限制。

含有層析樹脂和抗氧化劑及/或螯合劑之組成物

本文所提供者為包括層析樹脂(例如，任何本文中所述或該項技術中已知的層析樹脂)和至少一種抗氧化劑及/或螯合劑(例如，任何本文中所述或該項技術中已知的抗氧化劑及/或螯合劑)之組成物，其中該至少一種抗氧化劑及/或螯合劑的存在量足以改良層析樹脂在用足以減少組成物之生物負荷量的 γ -射線之劑量處理時的結合能力之損失。例如，該層析樹脂可為陰離子交換層析樹脂、陽離子交換層析樹脂、親和性或假-親和性層析樹脂、疏水性作用層析樹脂、和粒徑篩析層析樹脂、或其任何組合中之至少一者。在一些實例中，該層析樹脂為包括蛋白質或肽配位體之樹脂(例如，具有蛋白質或肽配位體之親和性層析樹脂，例如，蛋白質或蛋白質 G 層析樹脂)。

組成物(例如)可為沈積層析樹脂在包含至少一種抗氧化劑及/或螯合劑之液體中的漿體。例如，該液體可含有甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)、抗壞血酸鈉、組胺酸、和甘露醇中至少一者(例如，一、二、三或四種)。在一些實例中，該液體含有甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)、抗壞血酸鈉、組胺酸、和甘露醇。在一些實例中，該液體包含：(i) 介於 75 mM 和約 125 mM 之間(例如，介於 80 mM 和約 120 mM 之間，介於約 85 mM 和約 115 mM 之間，介於約 90 mM 和約 110 mM 之間，或介於約 95 mM 和約 105 mM 之間)甘露醇；(ii) 介於 75 mM 和約 125 mM 之間(例如，介於約 80 mM 和約 120 mM 之間，介於約 85 mM 和約 115 mM 之間，介於約 90 mM

和約 110 mM 之間，或介於約 95 mM 和約 105 mM 之間)甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)；(iii) 介於 75 mM 和約 125 mM 之間(例如，介於約 80 mM 和約 120 mM 之間，介於約 85 mM 和約 115 mM 之間，介於約 90 mM 和約 110 mM 之間，或介於約 95 mM 和約 105 mM 之間)抗壞血酸鈉；(iv) 介於 75 mM 和約 125 mM 之間(例如，介於約 80 mM 和約 120 mM 之間，介於約 85 mM 和約 115 mM 之間，介於約 90 mM 和約 110 mM 之間，或介於約 95 mM 和約 105 mM 之間)組胺酸；(v) 介於約 30 mM 和約 70 mM 之間(例如，介於約 35 mM 和約 65 mM 之間，介於約 40 mM 和約 60 mM 之間，或介於約 45 mM 和約 55 mM 之間)甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)和介於約 30 mM 和約 70 mM 之間(例如，介於約 35 mM 和約 65 mM 之間，介於約 40 mM 和約 60 mM 之間，或介於約 45 mM 和約 55 mM 之間)組胺酸；(vi) 介於約 10 mM 和約 50 mM 之間(例如，介於約 15 mM 和約 45 mM 之間，介於約 20 mM 和約 40 mM 之間，或介於約 25 mM 和約 35 mM 之間)甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)，介於約 10 mM 和約 50 mM 之間(例如，介於約 15 mM 和約 45 mM 之間，介於約 20 mM 和約 40 mM 之間，或介於約 25 mM 和約 35 mM 之間)組胺酸，和介於約 10 mM 和約 50 mM 之間(例如，介於約 15 mM 和約 45 mM 之間，介於約 20 mM 和約 40 mM 之間，或介於約 25 mM 和約 35 mM 之間)抗壞血酸鈉；或(vii) 介於約 5 mM 至約 45 mM 之間(例如，介於約 10 mM 和約 40 mM 之間，介於約 15 mM 和約 35 mM 之間，或介於 20 mM 和約 30 mM 之間)抗壞血酸鈉之間，介於約 5 mM 和約 45 mM 之間(例如，介於約 10 mM 和約 40 mM 之間，介於約 15 mM 和約 35 mM 之間，或介於 20 mM 和約 30 mM 之間)甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)，介於約 5 mM 和約 45 mM 之間(例如，介於約 10 mM 和約 40 mM 之間，介於約 15 mM 和約 35 mM 之間，或介於 20 mM 和約 30 mM 之間)甘露醇，和介於約 5 mM 和約 45 mM 之間(例如，介於約 10 mM 和約 40 mM 之間，介於約 15 mM 和約 35 mM 之間，或介於 20 mM 和約 30 mM 之間)組胺酸。在一些實例中，該液體為緩衝溶液(例如，磷酸鹽緩衝溶液(例如)磷酸鈉緩衝溶液，諸如 50 mM 磷酸鈉，pH 6.0)。在一些實例中，該液體為緩衝溶液(例如，磷酸鹽緩衝溶液，諸如磷酸鈉緩衝溶液(例

如，50 mM 磷酸鈉，pH 6.0)。

在一些實例中，該組成物可為固體混合物(例如，乾固體混合物或濕或潮濕的固體混合物)。固體混合物可包括甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)、抗壞血酸鈉、組胺酸、和甘露醇中之至少一者(例如，一、二、三或四者)。在一些實例中，該固體混合物含有甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)、抗壞血酸鈉、組胺酸、和甘露醇。在一些實例中，該組成物為一種填充在包括至少一種抗氧化劑及/或螯合劑之液體中的層析樹脂。該等液體的非限制例係描述於本文中。

本文所提供者亦為一種包括層析樹脂(例如，任何本文中所述或該項技術中已知的層析樹脂)和至少一種抗氧化劑及/或螯合劑(例如，任何本文中所述或該項技術中已知的抗氧化劑及/或螯合劑)之容器(例如，塑膠容器或層析管柱)，其中該至少一種抗氧化劑及/或螯合劑的存在量足以改良層析樹脂在用足以減少組成物之生物負荷量的 γ -射線之劑量處理時的結合能力之損失。例如，容器(例如，塑膠容器或層析管柱)可具有(例如)至少約 1 mL，5 mL，至少約 10 mL，至少約 20 mL，至少約 30 mL，至少約 40 mL，至少約 50 mL，至少約 60 mL，至少約 70 mL，至少約 80 mL，至少約 90 mL，至少約 100 mL，至少約 110 mL，至少約 120 mL，至少約 130 mL，至少約 140 mL，至少約 150 mL，至少約 160 mL，至少約 170 mL，至少約 180 mL，至少約 190 mL，至少約 200 mL，至少約 210 mL，至少約 220 mL，至少約 230 mL，至少約 240 mL，至少約 250 mL，至少 300 mL，至少 350 mL，至少 400 mL、或至少 500 mL 之內部體積。例如，容器可具有(例如)介於約 1 mL 和約 500 mL 之間，介於約 1 mL 和約 50 mL 之間，介於約 5 mL 和約 500 mL 之間，介於約 5 mL 和約 400 mL 之間，介於約 5 mL 和約 350 mL 之間，介於約 5 mL 和約 300 mL 之間，介於約 5 mL 和約 250 mL 之間，介於約 5 mL 和約 200 mL 之間，介於約 5 mL 和約 150 mL 之間，介於約 5 mL 和約 100 mL 之間，或介於約 5 mL 和約 50 mL 之間的內部體積。在一些實例中，該容器中之層析樹脂為沈積層析樹脂在包括至少一種抗氧化劑及/或螯合劑之液體中的漿體。在一些實例中，該容器包括填充層析樹脂(例如，填充在包括至少一種抗氧化劑及/或螯合劑之液體中)。

任何本文所提供的組成物可含有至少一種(例如，2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 種)抗氧化劑及/或至少一種(例如，2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 種)螯合劑。任何本文所提供的組成物中所包括之任何抗氧化劑可具有淬滅下列反應性氧及/或氮種類中之一或多者的能力：氫氧基(hydroxyl radical)、碳酸根基、超氧陰離子、過氧基、過氧亞硝酸根、二氧化氮、和一氧化氮。可包括在任何本文所提供的組成物中的抗氧化劑之非限制例包括：還原型麩胱甘肽、還原型硫氧還蛋白、還原型半胱胺酸、類胡蘿蔔素、褪黑激素、番茄紅素、生育酚、還原型泛醌、抗壞血酸鹽、膽紅素、尿酸、類脂酸、類黃酮、苯酚類丙酸(phenolpropanoid acid)、利多卡因(lidocaine)、柚配質、富勒烯、葡萄糖、甘露醇、4-羥基-2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧基、和二甲基甲氧基色原醇。抗氧化劑的另外非限制例包括抗氧化劑酶(例如，超氧化物歧化酶、麩胱甘肽過氧化酶、麩胱甘肽還原酶、過氧化氫酶、和硫氧還蛋白還原酶)。可包括在任何本文所提供的組成物中之抗氧化劑的另外實例包括甘露醇、抗壞血酸鈉、甲硫胺酸、和組胺酸。抗氧化劑的其它實例包括半胱胺酸、牛磺酸、巯丙醯基甘胺酸、N-乙醯基半胱胺酸、蒜油、二烯丙基硫醚、二氫類脂酸、和二烯丙基三硫醚。包括抗氧化劑酶作為抗氧化劑之一些具體實例可進一步包括一或多種用於酶之受質。抗氧化劑可使用許多該項技術中已知的方法測確定，包括(例如)旋轉誘捕、氧化還原敏感染料、和化學發光分析。

包括在任何本文所提供的組成物中之任何螯合劑可具有結合具有親和性(例如，約或小於 1 nM，約或小於 800 nM，約或小於 700 nM，約或小於 600 nM，約或小於 500 nM，約或小於 400 nM，約或小於 300 nM，約或小於 250 nM，約或小於 200 nM，約或小於 150 nM，約或小於 100 nM，約或小於 80 nM，約或小於 60 nM，約或小於 40 nM，約或小於 20 nM、或約或小於 1 nm) 的氧化還原活性金屬(例如， Cu^{2+} 和 Fe^{2+})之能力。可包括在任何本文所提供的組成物中之螯合劑的非限制例包括乙二胺四乙酸(EDTA)、2,3-二巯基-1-丙磺酸鈉(DMPS)、二巯基丁二酸(DMSA)、金屬硫蛋白(metallothionin)、和去鐵胺(desferroxamine)。

在任何本文所提供的組成物中之各個螯合劑及/或抗氧化劑的濃度可介

於約 0.1 mM 和約 150 mM 之間(例如，介於約 0.1 mM 和約 150 mM 之間，介於約 0.1 mM 和約 125 mM 之間，介於約 0.1 mM 和約 100 mM 之間，介於約 0.1 mM 和約 80 mM 之間，介於約 0.1 mM 和約 60 mM 之間，介於約 0.1 mM 和約 50 mM 之間，介於約 0.1 mM 和約 40 mM 之間，介於約 0.1 mM 和約 30 mM 之間，介於約 0.1 mM 和約 25 mM 之間，介於約 0.1 mM 和約 20 mM 之間，介於約 0.1 mM 和約 10 mM 之間，介於約 0.1 mM 和約 5.0 mM 之間，介於約 0.5 mM 和約 150 mM 之間，介於約 0.5 mM 和約 100 mM 之間，介於約 0.5 mM 和約 50 mM 之間，介於約 0.5 mM 和約 25 mM 之間，介於約 0.5 mM 和約 15 mM 之間，介於約 0.5 mM 和約 10 mM 之間，介於約 0.5 mM 和約 5 mM 之間，介於約 1 mM 和約 125 mM 之間，介於約 1 mM 和約 120 mM 之間，介於約 1 mM 和約 100 mM 之間，介於約 1 mM 和約 80 mM 之間，介於約 1 mM 和約 60 mM 之間，介於約 1 mM 和約 50 mM 之間，介於約 1 mM 和約 40 mM 之間，介於約 1 mM 和約 30 mM 之間，介於約 1 mM 和約 25 mM 之間，介於約 5 mM 和約 150 mM 之間，介於約 5 mM 和約 125 mM 之間，介於約 5 mM 和約 100 mM 之間，介於約 5 mM 和約 80 mM 之間，介於約 5 mM 和約 60 mM 之間，介於約 5 mM 和約 50 mM 之間，介於約 5 mM 和約 40 mM 之間，介於約 5 mM 和約 30 mM 之間，介於約 5 mM 和約 25 mM 之間，介於約 10 mM 和約 150 mM 之間，介於約 10 mM 和約 125 mM 之間，介於約 1 mM 和約 100 mM 之間，介於約 10 mM 和約 80 mM 之間，介於約 10 mM 和約 60 mM 之間，介於約 10 mM 和約 50 mM 之間，介於約 10 mM 和約 40 mM 之間，介於約 10 mM 和約 30 mM 之間，介於約 10 mM 和約 25 mM 之間，介於約 20 mM 和約 150 mM 之間，介於約 20 mM 和約 125 mM 之間，介於約 20 mM 和約 100 mM 之間，介於約 20 mM 和約 80 mM 之間，介於約 20 mM 和約 60 mM 之間，介於約 20 mM 和約 50 mM 之間，介於約 20 mM 和約 40 mM 之間，介於約 20 mM 和約 30 mM 之間，介於約 30 mM 和約 150 mM 之間，介於約 30 mM 和約 125 mM 之間，介於約 30 mM 和約 100 mM 之間，介於約 30 mM 和約 80 mM 之間，介於約 30 mM 和約 60 mM 之間，介於約 30 mM 和約 50 mM 之間，介於約 30 mM 和約 40 mM 之間，介於約 40 mM 和約 150 mM 之間，介於約 40 mM

和約 125 mM 之間，介於約 40 mM 和約 100 mM 之間，介於約 40 mM 和約 90 mM 之間，介於約 40 mM 和約 80 mM 之間，介於約 40 mM 和約 70 mM 之間，介於約 40 mM 和約 60 mM 之間，介於約 50 mM 和約 150 mM 之間，介於約 50 mM 和約 125 mM 之間，介於約 50 mM 和約 100 mM 之間，介於約 50 mM 和約 80 mM 之間，介於約 50 mM 和約 60 mM 之間，介於約 80 mM 和約 150 mM 之間，介於約 80 mM 和約 125 mM 之間，介於約 80 mM 和約 100 mM 之間，介於約 100 mM 和約 150 mM，或介於約 100 mM 和約 125 mM 之間)。

在一些實例中，該本文所提供的組成物含有下列中之一或多者：5 mM 至約 150 mM 甘露醇(例如，介於約 10 mM 和約 150 mM 之間，介於約 20 mM 和約 150 mM 之間，介於約 30 mM 和約 150 mM 之間，介於約 40 mM 和約 150 mM 之間，介於約 50 mM 和約 150 mM 之間，介於約 60 mM 和約 140 mM 之間，介於約 70 mM 和約 130 mM 之間，介於約 80 mM 和約 120 mM 之間，介於約 90 mM 和約 110 mM 之間，介於約 95 mM 和約 105 mM 之間，介於約 5 mM 和約 50 mM 之間，介於約 5 mM 和約 45 mM 之間，介於約 5 mM 和約 40 mM 之間，介於約 5 mM 和約 35 mM 之間，介於約 10 mM 和約 35 mM 之間，介於約 15 mM 和約 35 mM 之間，或介於 20 mM 和約 30 mM 之間甘露醇)；5 mM 至約 150 mM(例如，介於約 10 mM 和約 150 mM 之間，介於約 20 mM 和約 150 mM 之間，介於約 30 mM 和約 150 mM 之間，介於約 40 mM 和約 150 mM 之間，介於約 50 mM 和約 150 mM 之間，介於約 60 mM 和約 140 mM 之間，介於約 70 mM 和約 130 mM 之間，介於約 80 mM 和約 120 mM 之間，介於約 90 mM 和約 110 mM 之間，介於約 95 mM 和約 105 mM 之間，介於約 30 mM 和約 70 mM 之間，介於約 35 mM 和約 65 mM 之間，介於約 40 mM 和約 60 mM 之間，介於約 45 mM 和約 55 mM 之間，介於約 20 mM 和約 50 mM 之間，介於約 25 mM 和約 45 mM 之間，介於約 30 mM 和約 40 mM 之間，介於約 30 mM 和約 35 mM 之間，介於約 5 mM 和約 45 mM 之間，介於約 10 mM 和約 40 mM 之間，介於約 15 mM 和約 35 mM 之間，介於約 20 mM 和約 30 mM 之間，或介於約 20 mM 和約 25 mM 之間)甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)；5 mM 至 150 mM 抗壞血酸

鈉(例如，介於約 10 mM 和約 150 mM 之間，介於約 20 mM 和約 150 mM 之間，介於約 30 mM 和約 150 mM 之間，介於約 40 mM 和約 150 mM 之間，介於約 50 mM 和約 150 mM 之間，介於約 60 mM 和約 140 mM 之間，介於約 70 mM 和約 130 mM 之間，介於約 80 mM 和約 120 mM 之間，介於約 90 mM 和約 110 mM 之間，介於約 95 mM 和約 105 mM 之間，介於約 10 mM 和約 50 mM 之間，介於約 15 mM 和約 45 mM 之間，介於約 20 mM 和約 40 mM 之間，介於約 25 mM 和約 35 mM 之間，介於約 30 mM 和約 35 mM 之間，介於約 5 mM 和約 45 mM 之間，介於約 10 mM 和約 40 mM 之間，介於約 15 mM 和約 35 mM 之間，介於約 20 mM 和約 30 mM 之間，介於約 20 mM 和約 25 mM 抗壞血酸鈉)；及 5 mM 至約 150 mM(例如，介於約 10 mM 和約 150 mM 之間，介於約 20 mM 和約 150 mM 之間，介於約 30 mM 和約 150 mM 之間，介於約 40 mM 和約 150 mM 之間，介於約 50 mM 和約 150 mM 之間，介於約 60 mM 和約 140 mM 之間，介於約 70 mM 和約 130 mM 之間，介於約 80 mM 和約 120 mM 之間，介於約 90 mM 和約 110 mM 之間，介於約 95 mM 和約 105 mM 之間，介於約 30 mM 和約 70 mM 之間，介於約 35 mM 和約 65 mM 之間，介於約 40 mM 和約 60 mM 之間，介於約 45 mM 和約 55 mM 之間，介於約 20 mM 和約 50 mM 之間，介於約 25 mM 和約 45 mM 之間，介於約 30 mM 和約 40 mM 之間，介於約 30 mM 和約 35 mM 之間，介於約 5 mM 和約 45 mM 之間，介於約 10 mM 和約 40 mM 之間，介於約 15 mM 和約 35 mM 之間，介於約 20 mM 和約 30 mM 之間，或介於約 20 mM 和約 25 mM 之間)組胺酸。

任何組成物的非限制例含有(i) 介於約 75 mM 和約 125 mM 之間(例如，介於約 80 mM 和約 120 mM 之間，介於約 85 mM 和約 115 mM 之間，介於約 90 mM 和約 110 mM 之間，或介於約 95 mM 和約 105 mM 之間)甘露醇(例如，在緩衝溶液，例如磷酸鹽緩衝劑，諸如 50 mM 磷酸鈉中，pH 6.0)；(ii) 介於約 75 mM 和約 125 mM 之間(例如，介於約 80 mM 和約 120 mM 之間，介於約 85 mM 和約 115 mM 之間，介於約 90 mM 和約 110 mM 之間，或介於約 95 mM 和約 105 mM 之間)甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)(例如，在緩衝溶液，例如磷酸鹽緩衝劑，諸如 50 mM 磷酸鈉中，pH 6.0)；(iii)

介於約 75 mM 和約 125 mM 之間(例如,介於約 80 mM 和約 120 mM 之間,介於約 85 mM 和約 115 mM 之間,介於約 90 mM 和約 110 mM 之間,或介於約 95 mM 和約 105 mM 之間)抗壞血酸鈉(例如,在緩衝溶液,例如磷酸鹽緩衝劑,諸如 50 mM 磷酸鈉中, pH 6.0);(iv) 介於約 75 mM 和約 125 mM 之間(例如,介於約 80 mM 和約 120 mM 之間,介於約 85 mM 和約 115 mM 之間,介於約 90 mM 和約 110 mM 之間,或介於約 95 mM 和約 105 mM 之間)組胺酸(例如,在緩衝溶液,例如磷酸鹽緩衝劑,諸如 50 mM 磷酸鈉中, pH 6.0));(v) 介於約 30 mM 和約 70 mM 之間(例如,介於約 35 mM 和約 65 mM 之間,介於約 40 mM 和約 60 mM 之間,或介於約 45 mM 和約 55 mM 之間)甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽)和介於約 30 mM 和約 70 mM 之間(例如,介於約 35 mM 和約 65 mM 之間,介於約 40 mM 和約 60 mM 之間,或介於約 45 mM 和約 55 mM 之間)組胺酸(例如,在緩衝溶液,例如磷酸鹽緩衝劑,諸如 50 mM 磷酸鈉中, pH 6.0);(vi) 介於約 10 mM 和約 50 mM 之間(例如,介於約 15 mM 和約 45 mM 之間,介於約 20 mM 和約 40 mM 之間,介於約 25 mM 至約 35 mM 之間,或介於約 30 mM 和約 35 mM 之間)甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽),介於約 10 mM 和約 50 mM 之間(例如,介於約 15 mM 和約 45 mM 之間,介於約 20 mM 和約 40 mM 之間,介於約 25 mM 至約 35 mM 之間,或介於約 30 mM 和約 35 mM 之間)組胺酸,和介於約 10 mM 和約 50 mM 之間(例如,介於約 15 mM 和約 45 mM 之間,介於約 20 mM 和約 40 mM 之間,介於約 25 mM 至約 35 mM 之間,或介於約 30 mM 至約 35 mM 之間)抗壞血酸鈉(例如,在緩衝溶液,例如磷酸鹽緩衝劑,諸如 50 mM 磷酸鈉中, pH 6.0);或(vii) 介於約 5 mM 和約 45 mM 之間(例如,介於約 10 mM 和約 40 mM 之間,介於約 15 mM 和約 35 mM 之間,介於約 20 mM 和約 30 mM 之間,或介於約 23 mM 和約 27 mM 之間)抗壞血酸鈉,介於約 5 mM 和約 45 mM 之間(例如,介於約 10 mM 和約 40 mM 之間,介於約 15 mM 和約 35 mM 之間,介於約 20 mM 和約 30 mM 之間,或介於約 23 mM 和約 27 mM 之間)甲硫胺酸(或替代地半胱胺酸或麩胱甘肽),介於約 5 mM 和約 45 mM 之間(例如,介於約 10 mM 和約 40 mM 之間,介於約 15 mM 和約 35 mM 之間,介於約 20 mM 和約 30 mM 之間,

或介於約 23 mM 和約 27 mM 之間)甘露醇，和介於約 5 mM 和約 45 mM 之間(例如，介於約 10 mM 和約 40 mM 之間，介於約 15 mM 和約 35 mM 之間，介於約 20 mM 和約 30 mM 之間，或介於約 23 mM 和約 27 mM 之間)組胺酸(例如，在緩衝溶液，例如磷酸鹽緩衝劑，諸如 50 mM 磷酸鈉中，pH 6.0)。

足以減少任何本文所提供的組成物之生物負荷量的 γ -射線的非限制劑量描述如下。足以減少任何本文所提供的組成物之生物負荷量的另外劑量在該項技術中為已知的。例如，任何本文所述的組成物可以用於進行本文所述的 γ -射線之任何劑量、任何 γ -射線之速率、及/或在任何溫度下(於任何組合)進行 γ -射線。組成物之生物負荷量可(例如)藉由從將含有存在於組成物中之自我複製的生物污染物的組成物取得樣品(例如，藉由勻漿(Stomaching)、超音波、振動、渦旋混合、沖洗、摻合、或擦拭)，和定性或定量樣品中所存在之自我複製生物污染物的水準(例如，藉由將樣品放置在允許生物污染物自我複製的生長培養基中(例如，將樣品平板接種在培養皿上、或運轉樣品通過膜))測定。

可測定至少一種足以改良層析樹脂在用足以減少組成物的生物負荷量之 γ -射線的劑量處理時的結合能力之損失的抗氧化劑及/或螯合劑之量，例如，使用實例中所述之方法。例如，在某量之至少一種抗氧化劑及/或螯合劑存在下用 γ -射線處理之層析樹脂的結合能力之減少的水準可與在無至少一種抗氧化劑及/或螯合劑存在下用相同劑量的 γ -射線處理之層析樹脂的結合能力之減少的水準比較，其中相較於在無至少一種抗氧化劑及/或螯合劑存在下 γ -射線之層析樹脂，減少在至少一種抗氧化劑及/或螯合劑存在下 γ -射線之層析樹脂的結合能力的水準之減少指示至少一種抗氧化劑及/或螯合劑之存在量足以改良在用 γ -射線處理時層析樹脂的結合能力之損失。用於測定層析樹脂之結合能力的示例性方法係描述於實例中。用於測定層析樹脂之結合能力的另外實例方法在該項技術中為已知的。

減少層析樹脂的生物負荷量之方法

本文所提供者為減少層析樹脂的生物負荷量之方法。此等方法包括：將

包括一種包括層析樹脂和至少一種抗氧化劑及/或螯合劑的組成物之容器曝露於足以減少容器和層析樹脂之生物負荷量的 γ -射線之劑量的步驟，其中該至少一種抗氧化劑及/或螯合劑的存在量足以改良層析樹脂曝露於 γ -射線的劑量之後(或之時)的結合能力之損失。

所提供者亦為減少層析樹脂的生物負荷量之方法，其包括：將包括一種包括層析樹脂(及視需要地至少一種抗氧化劑及/或螯合劑，其量足以改良層析樹脂曝露於 γ -射線之後/之時的結合能力之損失)的組成物之容器在介於約 0.1 kGy/小時至約 6 kGy/小時之間(例如，介於約 0.1 kGy/小時至約 5.5 kGy/小時之間，介於約 0.1 kGy/小時至約 5.0 kGy/小時之間，介於約 0.1 kGy/小時至約 4.5 kGy/小時之間，介於約 0.1 kGy/小時至約 4.0 kGy/小時之間，介於約 0.1 kGy/小時至約 3.5 kGy/小時之間，介於約 0.1 kGy/小時至約 3.0 kGy/小時之間，介於約 0.1 kGy/小時至約 2.5 kGy/小時之間，介於約 0.1 kGy/小時至約 2.0 kGy/小時之間，介於約 0.1 kGy/小時至約 1.5 kGy/小時之間，介於約 0.1 kGy/小時至約 1.0 kGy/小時之間，介於約 0.5 kGy/小時至約 6 kGy/小時之間，介於約 0.5 kGy/小時至約 5.5 kGy/小時之間，介於約 0.5 kGy/小時至約 5.0 kGy/小時之間，介於約 0.5 kGy/小時至約 4.5 kGy/小時之間，介於約 0.5 kGy/小時至約 4.0 kGy/小時之間，介於約 0.5 kGy/小時至約 3.5 kGy/小時之間，介於約 0.5 kGy/小時至約 3.0 kGy/小時之間，介於約 0.5 kGy/小時至約 2.5 kGy/小時之間，介於約 0.5 kGy/小時至約 2.0 kGy/小時)的速率及/或在介於約 4 °C 至約 25 °C 之間(例如，介於約 4 °C 至約 20 °C 之間，介於約 4 °C 至約 15 °C 之間，介於約 4 °C 至約 10 °C 之間，介於約 10 °C 至約 25 °C 之間，介於約 10 °C 至約 20 °C 之間，介於約 10 °C 至約 15 °C 之間，或介於約 15 °C 至約 25 °C 之間)的溫度下曝露於 γ -射線經足以減少容器和層析樹脂之生物負荷量的 γ -射線之劑量。在本段所述之方法中，以此方法製造的 γ -射線之層析樹脂的結合能力程度大於在大於 6.1 kGy/小時的速率及/或於大於 25 °C 的溫度一者或二者下 γ -射線之 γ -射線的層析樹脂之結合能力程度。

層析樹脂可使用該項技術中已知的方法曝露於 γ -射線。例如，同位素諸如鈷-60 或銻-137 可用作 γ -射線之來源。層析樹脂可在約介於約 -25 °C 和約

0 °C 之間(含)，或介於約 0 °C 和約 25 °C 之間(含)的溫度下曝露於 γ -射線。層析樹脂可曝露於介於約 0.1 kGy 至約 100 kGy 之間，介於約 1 kGy 至約 100 kGy 之間，介於約 1 kGy 至約 90 kGy 之間，介於約 1 kGy 至約 80 kGy 之間，介於約 1 kGy 至約 70 kGy 之間，介於約 1 kGy 至約 65 kGy 之間，介於約 5 kGy 至約 65 kGy 之間，介於約 10 kGy 至約 60 kGy 之間，介於約 10 kGy 至約 55 kGy 之間，介於約 10 kGy 至約 50 kGy 之間，介於約 10 kGy 至約 45 kGy 之間，介於約 10 kGy 至約 40 kGy 之間，介於約 10 kGy 至約 35 kGy 之間，介於約 10 kGy 至約 30 kGy 之間，介於約 15 kGy 至約 50 kGy 之間，介於約 15 kGy 至約 45 kGy 之間，介於約 15 kGy 至約 40 kGy 之間，介於約 15 kGy 至約 35 kGy 之間，介於約 20 kGy 至約 30 kGy 之間，或介於約 23 kGy 至約 27 kGy 之間的 γ -射線之劑量。層析樹脂可曝露於劑量足以導致約或小於 1×10^{-6} ，約或小於 1×10^{-7} ，約或小於 10×10^{-8} ，約或小於 1×10^{-11} 、或約或小於 1×10^{-12} ，或介於約 1×10^{-6} 和約 1×10^{-12} 之間，介於約 1×10^{-6} 和約 1×10^{-11} 之間，介於約 1×10^{-6} 和約 1×10^{-10} 之間，介於約 1×10^{-6} 和約 1×10^{-9} 之間，介於約 1×10^{-6} 和約 1×10^{-8} 之間，介於 1×10^{-6} 和約 1×10^{-7} 之間，介於約 1×10^{-7} 和約 1×10^{-12} 之間，介於約 1×10^{-7} 和約 1×10^{-11} 之間，介於約 1×10^{-7} 和約 1×10^{-10} 之間，介於約 1×10^{-7} 和約 1×10^{-9} 之間，介於約 1×10^{-7} 和約 1×10^{-8} 之間，介於約 1×10^{-8} 和約 1×10^{-12} 之間，介於約 1×10^{-8} 和約 1×10^{-11} 之間，介於約 1×10^{-8} 和約 1×10^{-10} 之間，或介於約 1×10^{-8} 和約 1×10^{-9} 之間的層析樹脂之滅菌保證水準的 γ -射線。

足以減少層析樹脂的生物負荷量之 γ -射線的劑量可使用該項技術中已知的方法測定。例如，用 γ -射線之劑量處理的層析樹脂之生物負荷量水準可與未經處理(例如，對照非 γ -射線)之層析樹脂的生物負荷量水準比較、及相較於未經處理之層析樹脂， γ -射線之層析樹脂中生物負荷量的水準減少指示 γ -射線之劑量係足以減少層析樹脂的生物負荷量。用於測定組成物(例如，層析樹脂)中生物負荷量的水準之示例性方法係描述於本文中。用於測定組成物(例如，層析樹脂)中生物負荷量的水準之額外方法在該項技術中為已知的。

任何此等方法中之層析樹脂可為陰離子交換層析樹脂、陽離子交換層析

樹脂、粒徑篩析層析樹脂、疏水性作用層析樹脂、或親和性層析樹脂、或其任何組合。親和性層析樹脂的非限制例可包括蛋白質或肽配位體(例如，介於約 5 個胺基酸至約 100 個胺基酸之間，介於約 5 個胺基酸至約 90 個胺基酸之間，介於約 5 個胺基酸和約 80 個胺基酸之間，介於約 5 個胺基酸和約 70 個胺基酸之間，介於約 5 個胺基酸和約 60 個胺基酸之間，介於約 5 個胺基酸和約 50 個胺基酸之間，介於約 5 個胺基酸和約 40 個胺基酸之間，介於約 5 個胺基酸和約 30 個胺基酸之間，介於約 5 個胺基酸和約 25 個胺基酸，或介於約 5 個胺基酸和約 20 個胺基酸之間)、酶之小分子受質或輔因子、適配體、抑制劑(例如，競爭性蛋白質抑制劑)或金屬。在一些具體實例中，該親和性層析樹脂包括蛋白質配位體(例如，蛋白質 A)。親和性層析樹脂的另外實例包括輔因子配位體、受質配位體、金屬配位體、產物配位體、或適配體配位體。在一些實例中，該層析樹脂為雙峰層析樹脂(例如，陰離子交換層析樹脂和疏水性作用層析樹脂)。層析樹脂可為陰離子交換層析樹脂(例如，包括 N-苯甲基-N-甲基-乙醇胺基團之陰離子交換層析樹脂)。

包括層析樹脂之容器可為塑膠容器(例如，圓柱管、封口或夾緊盒、或封口袋)。此等方法中所使用之容器的非限制例包括儲存容器或層析管柱。例如，包括層析樹脂和至少一種抗氧化劑及/或螯合劑之組成物可存在於封口容器中(例如，封口容器中之漿體或封口容器(例如，層析管柱)中之填充層析樹脂)。本文所述方法中所使用之容器可為拋棄式層析管柱。在一些具體實例中，本文所述方法中所使用之容器為放置在泡罩包裝中之拋棄式層析管柱。容器(例如，儲存容器或層析管柱)可具有介於約 1 mL 至約 1 L 之間(例如，介於約 1 mL 和約 900 mL 之間，介於約 1 mL 和約 800 mL 之間，介於約 1 mL 和約 700 mL 之間，介於約 1 mL 和約 600 mL 之間，介於約 1 mL 和約 500 mL 之間，介於約 1 mL 和約 450 mL 之間，介於約 1 mL 和約 400 mL 之間，介於約 1 mL 和約 350 mL 之間，介於約 1 mL 和約 300 mL 之間，介於約 1 mL 和約 250 mL 之間，介於約 1 mL 和約 200 mL 之間，介於約 1 mL 和約 150 mL 之間，介於約 1 mL 和約 100 mL 之間，介於約 1 mL 和約 75 mL 之間，介於約 1 mL 和約 50 mL 之間，介於約 1 mL 和約 40 mL 之間，介於約 1 mL 和約 30 mL 之間，或介於約 1 mL 和約 20 mL 之間)的內總體積。

容器中所包括之含有層析樹脂和至少一種抗氧化劑及/或螯合劑的組成物可以固體混合物(例如，乾或濕固體混合物)存在。例如，容器可包括沈積層析樹脂在含有至少一種抗氧化劑及/或螯合劑的液體(例如，緩衝溶液)中之漿體。在一些具體實例中，該容器可包括填充層析樹脂。例如，包括該包括層析樹脂和至少一種抗氧化劑及/或層析樹脂之組成物的容器為填充層析管柱(例如，其中該樹脂係填充在含有至少一種抗氧化劑及/或層析樹脂的液體(例如，緩衝溶液)中)。一些具體實例包括：在曝露之前將含有層析樹脂和至少一種抗氧化劑及/或螯合劑的組成物配置於容器中。

任何本文所述的抗氧化劑及/或螯合劑可以任何組合使用，使用本文所述的示例性濃度之任何組合。例如，該組成物可包括至少一種選自下列之抗氧化劑：還原型麩胱甘肽、還原型硫氧還蛋白、還原型半胱胺酸、類胡蘿蔔素、褪黑激素、番茄紅素、生育酚、還原型泛醌、抗壞血酸鹽、膽紅素、尿酸、類脂酸、類黃酮、苯酚類丙酸(phenolpropanoid acid)、利多卡因(lidocaine)、柚配質、富勒烯、葡萄糖、甘露醇、4-羥基-2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧基、和二甲基甲氧基色原醇，及/或至少一種選自下列之螯合劑：EDTA、DMPS、DMSA、金屬硫蛋白(metallothionin)、和去鐵胺(desferroxamine)。

用於測定/確定至少一種抗氧化劑及/或螯合劑在用足以減少組成物的生物負荷量之 γ -射線的劑量處理之時足以改良層析樹脂的結合能力之損失的量之示例性方法係描述於本文中。用於測定/確定至少一種抗氧化劑及/或螯合劑在用足以減少組成物的生物負荷量之 γ -射線的劑量處理之時足以改良層析樹脂的結合能力之損失的量之額外方法在該項技術中為已知的。

本文所提供的亦為一種藉由任何本文所述方法製造的生物負荷量減少之層析樹脂(例如，提供於儲存容器(例如封口儲存容器)中的生物負荷量減少之層析樹脂。使用任何本文所述方法產生的生物負荷量減少之層析樹脂可具有約或小於 1×10^{-6} ，約或小於 1×10^{-7} ，約或小於 10×10^{-8} ，約或小於 1×10^{-11} 、或約或小於 1×10^{-12} ，或介於約 1×10^{-6} 和約 1×10^{-12} 之間，介於約 1×10^{-6} 和約 1×10^{-11} 之間，介於約 1×10^{-6} 和約 1×10^{-10} 之間，介於約 1×10^{-6} 和約 1×10^{-9} 之間，介於約 1×10^{-6} 和約 1×10^{-8} 之間，介於 1×10^{-6} 和約 1×10^{-7} 之間，介於約 1×10^{-7} 和約 1×10^{-12} 之間，介於約 1×10^{-7} 和約 1×10^{-11}

之間，介於約 1×10^{-7} 和約 1×10^{-10} 之間，介於約 1×10^{-7} 和約 1×10^{-9} 之間，介於約 1×10^{-7} 和約 1×10^{-8} 之間，介於約 1×10^{-8} 和約 1×10^{-12} 之間，介於約 1×10^{-8} 和約 1×10^{-11} 之間，介於約 1×10^{-8} 和約 1×10^{-10} 之間，或介於約 1×10^{-8} 和約 1×10^{-9} 之間的滅菌保證水準。藉由任何本文所述方法製造的生物負荷量減少之層析樹脂可具有結合能力，其為沒有經處理(例如，沒有經 γ -射線)以減少其生物負荷量之相同層析樹脂的結合能力之至少 74%(例如，至少 76%，至少 78%，至少 80%，至少 82%，至少 84%，至少 85%，至少 86%，至少 87%，至少 88%，至少 89%，至少 90%，至少 91%，至少 92%，至少 93%，至少 94%，至少 95%，至少 96%，至少 97%，至少 98%，至少 99%、或 100%)或介於約 74%和 95%之間，介於約 74%和約 95%之間，介於約 76%和約 95%之間，至少約 78%和約 95%之間，介於約 80%和約 95%之間，或介於約 74%和約 90%之間，介於約 76%和約 90%之間，介於約 78%和約 90%之間，或介於約 80%和約 90%之間，當相同蛋白質用於測試藉由本文所述方法製造的層析樹脂和對照未經處理之層析樹脂二者的結合能力時。

製造生物負荷量減少之填充層析管柱的方法

本文所提供者亦為製造減少填充層析管柱之方法，其包括提供藉由任何本文所述方法製造的生物負荷量減少之層析樹脂和在滅菌或生物負荷量減少之環境中將層析樹脂填充於生物負荷量減少之管柱。在一些具體實例中，生物負荷量減少之填充層析管柱可藉由將包括填充層析樹脂和至少一種抗氧化劑及/或螯合劑之管柱曝露於足以減少管柱和填充層析樹脂之生物負荷量的 γ -射線之劑量而製造，其中該至少一種抗氧化劑及/或螯合劑存在量係足以改良填充層析樹脂曝露於 γ -射線之劑量後的結合能力之損失。

所提供者亦為藉由本文所述方法製造的生物負荷量減少之填充層析管柱。藉由任何本文所述方法製造的生物負荷量減少之填充層析管柱可具有約或小於 1×10^{-6} ，約或小於 1×10^{-7} ，約或小於 10×10^{-8} ，約或小於 1×10^{-11} ，或約或小於 1×10^{-12} ，或介於約 1×10^{-6} 和約 1×10^{-12} 之間，介於約 1×10^{-6} 和約 1×10^{-11} 之間，介於約 1×10^{-6} 和約 1×10^{-10} 之間，介於約 1×10^{-6} 和約

1×10^{-9} 之間，介於約 1×10^{-6} 和約 1×10^{-8} 之間，介於 1×10^{-6} 和約 1×10^{-7} 之間，介於約 1×10^{-7} 和約 1×10^{-12} 之間，介於約 1×10^{-7} 和約 1×10^{-11} 之間，介於約 1×10^{-7} 和約 1×10^{-10} 之間，介於約 1×10^{-7} 和約 1×10^{-9} 之間，介於約 1×10^{-7} 和約 1×10^{-8} 之間，介於約 1×10^{-8} 和約 1×10^{-12} 之間，介於約 1×10^{-8} 和約 1×10^{-11} 之間，介於約 1×10^{-8} 和約 1×10^{-10} 之間，或介於約 1×10^{-8} 和約 1×10^{-9} 之間的滅菌保證水準。藉由本文所述方法製造的任何生物負荷量減少之填充層析管柱可含有至少一種選自下列群組之層析樹脂：陰離子交換層析樹脂、陽離子交換層析樹脂、親和性層析樹脂(例如，任何本文所述或該項技術中已知的親和性層析樹脂)、親水性作用層析樹脂、和粒徑篩析層析樹脂。例如，任何本文所述的生物負荷量減少之填充層析管柱可包括親和性層析樹脂，該親和性層析樹脂包括蛋白質配位體(例如，蛋白質 A)。本文所述的生物負荷量減少之填充層析管柱可包括陰離子交換層析樹脂(例如，包括 N-苯甲基-N-甲基-乙醇胺基團之陰離子交換層析樹脂)。

進行減少生物負荷量層析的方法

本文所述方法包括本文所提供的生物負荷量減少之填充層析管柱的使用和本文所述方法包括一或二種 MCCS 的使用，該 MCCS 包括至少一種本文所提供的生物負荷量減少之填充層析管柱。 γ -射線之層析樹脂可為任何本文所述的樹脂之類型(或任何該項技術中已知的層析樹脂之類型)。

生物負荷量減少之填充層析管柱可使用任何本文所述方法製造。例如，生物負荷量減少之填充層析管柱可藉由用包括層析樹脂和至少一種抗氧化劑及/或螯合劑之組成物(例如，任何本文所述的該等組成物)填充層析管柱、和將填充管柱曝露於 γ -射線(例如，使用任何本文所述的曝露和條件)而製造。在其它實例中，生物負荷量減少之填充層析管柱可藉由將包括層析樹脂和至少一種抗氧化劑及/或螯合劑之容器曝露於 γ -射線之劑量及用所得生物負荷量減少之層析樹脂填充層析管柱而製造。在該等方法中，(在曝露於 γ -射線期間容器中所存在之)層析樹脂可以漿體存在於容器中、和層析管柱係在生物負荷量減少之通風櫥中填充。在其他方法中，容器中所存在之層析樹脂與至少一種抗氧化劑及/或螯合劑可呈固體混合物在容器中曝露於 γ -射線，

和所得生物負荷量減少之層析樹脂的漿體可使用一種生物負荷量減少之緩衝液(例如，在生物負荷量減少之通風櫥中製備)，和所得用於填充層析管柱之漿體在生物負荷量減少之通風櫥中製造。在一些此等實例中，層析管柱在填充之前，可被處理以減少生物負荷量(例如，高壓滅菌、 γ -射線、或曝露於環氧乙烷)。

任何本文所述方法中所使用的生物負荷量減少之填充層析管柱可具有介於約 1×10^{-3} 和約 1×10^{-12} 之間，介於約 1×10^{-4} 和約 1×10^{-12} 之間，介於 1×10^{-5} 和約 1×10^{-11} 之間，介於約 1×10^{-5} 和約 1×10^{-10} 之間，介於約 1×10^{-5} 和約 1×10^{-9} 之間，介於約 1×10^{-6} 和約 1×10^{-9} 之間，或介於約 1×10^{-6} 和約 1×10^{-8} 之間(含)的滅菌保證水準(SAL)。

生物負荷量減少之緩衝液

本文所述之方法(methods)和方法(processes)可使用一或多種生物負荷量減少之緩衝液進行。如在該技術中可理解的，生物負荷量減少之緩衝液可為層析之循環中所使用的任何類型之緩衝液(例如，任何本文所述的層析之循環或單元操作的任何步驟中所使用之緩衝液)。用於減少緩衝液的生物負荷量之示例性方法包括過濾($0.2\mu\text{m}$ -孔徑過濾)、高壓蒸氣滅菌、和 γ -射線。用於減少緩衝液的生物負荷量之額外方法在該項技術中為已知的。生物負荷量減少之緩衝液可具有介於約 1×10^{-3} 和約 1×10^{-12} 之間，介於約 1×10^{-4} 和約 1×10^{-12} 之間，介於 1×10^{-5} 和約 1×10^{-11} 之間，介於約 1×10^{-5} 和約 1×10^{-10} 之間，介於約 1×10^{-5} 和約 1×10^{-9} 之間，介於約 1×10^{-6} 和約 1×10^{-9} 之間，或介於約 1×10^{-6} 和約 1×10^{-8} 之間(含)的滅菌保證水準。

重組治療性蛋白質

如本文所述的重組蛋白質可為一種重組治療性蛋白質。可藉由而本文所提供的方法製造之重組治療性蛋白質的非限制例包括免疫球蛋白(包括輕和重鏈免疫球蛋白；抗體、或抗體片段(例如，任何本文所述的抗體片段)、酶(例如，半乳糖苷酶(例如， α -半乳糖苷酶)、Myozyme®、或 Cerezyme®)、蛋白質(例如，人紅血球生成素、腫瘤壞死因子(TNF)、或干擾素 α 或 β)、

或免疫性或抗原性蛋白質或蛋白質片段(例如，用於疫苗之蛋白質)。可用於治療多種溶素體儲積病之重組治療性酶的非限制性實例係顯示於圖 10 中。重組治療性蛋白質可為一種包括至少一種多功能重組蛋白質支架之改造抗原結合多肽(參見(例如) 描述於 Gebauer 等人, *Current Opin. Chem. Biol.* 13:245-255, 2009; 及美國專利公開號 2012/0164066(在此以其全文引用方式納入)中的重組抗原結合之蛋白質)。其為抗體之重組治療性蛋白質的非限制例包括：帕尼單抗(panitumumab)、奧瑪珠單抗(omalizumab)、阿巴沃單抗(abagovomab)、阿昔單抗(abciximab)、阿克特單抗(actoxumab)、阿達木單抗(adalimumab)、阿德木單抗(adecatumumab)、阿非莫單抗(afelimomab)、阿夫土珠單抗(afutuzumab)、阿拉昔單抗(alacizumab)、阿拉昔單抗(alacizumab)、阿侖單抗(alemtuzumab)、阿利庫單抗(alirocumab)、阿妥莫單抗(altumomab)、阿馬昔單抗(amatuximab)、阿納圖單抗(anatumomab)、阿泊珠單抗(apolizumab)、阿替那單抗(atinumab)、托西利單抗(tocilizumab)、巴利昔單抗(basilizumab)、貝托莫單抗(bectumomab)、貝利單抗(belimumab)、貝伐珠單抗(bevacizumab)、比西單抗(biciromab)、卡那單抗(canakinumab)、西妥昔單抗(cetuximab)、達利珠單抗(daclizumab)、得穌單抗(densumab)、艾庫組單抗(eculizumab)、依決洛單抗(edrecolomab)、埃法珠單抗(efalizumab)、依芬古單抗(efungumab)、厄妥索單抗(ertumaxomab)、伊瑞西珠單抗(etaracizumab)、戈利木單抗(golimumab)、英利昔單抗(infliximab)、那他珠單抗(natalizumab)、帕利珠單抗(palivizumab)、帕尼單抗(panitumumab)、帕妥珠單抗(pertuzumab)、蘭尼單抗(ranibizumab)、利妥昔單抗(rituximab)、托西利單抗(tocilizumab)、和曲妥珠單抗(trastuzumab)。可藉由本文所述方法製造之重組治療性抗體的另外實例在該項技術中為已知的。可藉由本方法製造/純化之重組治療性蛋白質的額外非限制例包括：阿葡糖苷酶 α (alglucosidase alfa)、拉隆酶(laronidase)、阿貝西普(abatacept)、加硫酶(galsulfase)、促黃體素 α (lutropin alfa)、抗血友病因子、半乳糖苷酶(agalsidase) β 、干擾素 β -1a、達依泊汀 α (darbepoetin alfa)、替奈普酶(tenecteplase)、依那西普(etanercept)、凝血因子 IX、卵泡刺激素、干擾素貝他-1a、伊米苷酶(imiglucerase)、去氧核糖酶 α (dornase alfa)、依泊汀 α (epoetin alfa)、和阿替普酶(alteplase)。

分泌之可溶性重組治療性蛋白質可藉由從細胞(例如，哺乳動物細胞)移除或另外物理分離液體培養基而從液體培養基(例如，第一及/或第二液體培養基)回收。各種用於從細胞(例如，哺乳動物細胞)移除液體培養基之不同方法在該項技術中為已知的，包括(例如)離心、過濾、吸移、及/或抽吸接著可使用包括之各種類型之層析(例如，親和性層析、分子篩層析、陽離子交換層析、陰離子交換層析、或疏水性作用層析、或其任何組合)及/或過濾(例如，分子量截止過濾)之各種生化技術從液體培養基回收和進一步純化。分泌之重組治療性蛋白質。

層析之循環

如該項技術中所熟知的，層析之循環中的步驟可視層析樹脂、用於進行循環中之各步驟的緩衝液、和目標重組蛋白質(例如，重組治療性蛋白質)之生物物理特性而不同。例如，親和性層析管柱可包括下列步驟：用包括目標重組蛋白質之流體裝載親和性層析管柱、洗滌管柱以移除不要的生物材料(例如，污染蛋白質及/或小分子)、溶析結合至管柱之目標重組蛋白質、和再平衡管柱。一使用陽離子及/或陰離子交換層析管柱的層析之循環(其中在裝載步驟中該目標重組蛋白質結合至層析樹脂)可包括下列步驟：用包括目標蛋白質之流體裝載管柱、洗滌管柱以移除不要的生物材料、溶析結合至管柱之目標重組蛋白質、和再平衡管柱。在其它實例中，使用陽離子及/或陰離子交換層析管柱的層析之循環(其中在裝載步驟期間不要的生物材料結合至層析樹脂，而目標重組蛋白質則不結合)可包括下列步驟：用包括目標蛋白質之流體裝載管柱、收集流過之目標重組蛋白質、和再平衡管柱的步驟。如該項技術中所熟知的，層析循環中之任何單一步驟可包括單一緩衝液或多緩衝液(例如，二或多種緩衝液)、和層析循環中之任何單一步驟的一或多者可包括緩衝液梯度。層析之單一循環的各種熟知的態樣之任何組合可以任何組合(例如，不同層析樹脂、流速、緩衝液、管柱的空隙體積、管柱的床體積、各步驟中所使用之緩衝液的體積、包括目標蛋白質之流體的體積、和各步驟中所使用之緩衝液的數量和類型)使用於此等方法中。

進行生物負荷量減少之管柱層析的方法

本文所提供者為進行生物負荷量減少之管柱層析的方法。此等方法包括提供一種使用任何本文所述方法製造的生物負荷量減少之填充層析管柱、和進行使用該生物負荷量減少之填充層析管柱之管柱層析。生物負荷量減少之填充層析管柱可包括至少一種之任何本文所述的層析樹脂，於任何組合。例如，填充層析管柱中所存在的生物負荷量減少之層析樹脂可為包括蛋白質配位體(例如，蛋白質 A)之親和性樹脂或可包括陰離子交換層析樹脂。生物負荷量減少之填充層析管柱可具有任何本文所述的示例性內部體積。生物負荷量減少之填充層析管柱可具有本文所述或該項技術中已知的任何形狀(例如，圓柱、近圓柱形、或橢圓形)。進行此等方法之管柱層析可用於純化或分離重組蛋白質(例如，任何本文所述或該項技術中已知的重組治療性蛋白質)。在一些實例中，該生物負荷量減少之填充層析管柱為多管柱層析系統(MCCS)之部分，例如，可為週期性逆流層析系統(PCCS)之部分。

所進行之管柱層析可包括至少一種本文所述或該項技術中已知的層析之循環。例如，層析之至少一循環可包括下列步驟：藉由曝露層析樹脂而用包括重組蛋白質之液體來捕獲重組蛋白質；藉由將層析樹脂曝露於洗滌緩衝液來洗滌層析樹脂，藉由將層析樹脂曝露於溶析緩衝液來溶析重組蛋白質；及藉由將層析樹脂曝露於再生緩衝液來再生層析樹脂。在一些實例中，該包括重組蛋白質之液體為液體培養基(例如，從灌注或分批培養物收集的液體培養基)或稀釋液體培養基(例如，稀釋於緩衝液中之培養基)。

管柱層析可使用封閉和整合系統(例如，本文所述或該項技術中已知的任何示例性封閉和整合系統)進行。例如，管柱層析可使用封閉和整合系統進行管柱層析，其中該緩衝液為生物負荷量減少之緩衝液。如該項技術中所熟知的，生物負荷量減少之緩衝液可使用各種不同方法(例如，藉由過濾，藉由高壓蒸氣滅菌，或熱處理)製造。

管柱層析可包括二次或以上(例如，3 次或以上，4 次或以上，5 次或以上，6 次或以上，7 次或以上，8 次或以上，9 次或以上，10 次或以上，11 次或以上，12 次或以上，13 次或以上，14 次或以上，15 次或以上，20 次或以上，25 次或以上，30 次或以上，35 次或以上，40 次或以上，45 次或

以上，50 次或以上，55 次或以上，60 次或以上，65 次或以上，70 次或以上，75 次或以上，80 次或以上，85 次或以上，90 次或以上，95 次或以上，或 100 次或以上)循環的層析。在一些實例中，管柱層析係連續地進行至少 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)的時段。

在一些具體實例中，如相較於沒有用 γ -射線處理之相同樹脂(當相同蛋白質使用於試驗二樹脂之結合能力時)(例如，曝露於 γ -射線之後立即評估)，生物負荷量減少之填充層析管柱中的層析樹脂具有介於約 75%至約 100%之間(例如，介於約 76%和約 98%之間，介於約 76%和約 96%之間，介於約 76%和約 94%之間，介於約 76%和約 92%之間，介於約 76%和約 90%之間，介於約 78%和約 100%之間，介於約 78%和約 98%之間，介於約 78%和約 96%之間，介於約 78%和約 94%之間，介於約 78%和約 92%之間，介於約 78%和約 90%之間，介於約 80%和約 100%之間，介於約 80%和約 98%之間，介於約 80%和約 96%之間，介於約 80%和約 94%之間，介於約 80%和約 92%之間，介於約 80%和約 90%之間，介於約 82%和約 100%之間，介於約 82%和約 98%之間，介於約 82%和約 96%之間，介於約 82%和約 94%之間，介於約 82%和約 92%之間，介於約 82%和約 90%之間，介於約 84%和約 100%之間，介於約 84%和約 98%之間，介於約 84%和約 96%之間，介於約 84%和約 94%之間，介於約 84%和約 92%之間，介於約 84%和約 90%之間，介於約 86%和約 100%之間，介於約 86%和約 98%之間，介於約 86%和約 96%之間，介於約 86%和約 94%之間，介於約 86%和約 92%之間，介於約 88%和約 100%之間，介於約 88%和約 98%之間，介於約 88%和約 96%之間，介於約 88%和約 94%之間，介於約 90%和約 100%之間，介於約 90%和約 98%之間，介於約 90%和約 96%之間，介於約 92%和約 100%之間，或介於

約 92%和約 98%之間)的百分比結合能力。

用於製造重組蛋白質之整合、封閉或實質上封閉和連續方法

本文所提供者為用於製造重組蛋白質(例如，重組治療性蛋白質)之整合、封閉或實質上封閉和連續方法。此等方法包括提供包括重組蛋白質(例如，重組治療性蛋白質)之實質上無細胞的液體培養基。

一些方法包括整合：將液體培養基連續饋送至包括至少一個本文所提供的生物負荷量減少之填充層析管柱的多管柱層析系統(MCCS)，其中此等方法利用生物負荷量減少之緩衝液，及從液體培養基連續地運行至來自 MCCS 之純化重組蛋白質(例如，重組治療性蛋白質)的溶析液。

一些方法包括將液體培養基連續饋送至第一 MCCS(MCCS1)，使用 MCCS1 從液體培養基捕獲重組蛋白質，從包括重組蛋白質之 MCCS1 製造溶析液及連將溶析液續地饋送至第二 MCCS(MCCS2)中、及將來自該溶析液之重組蛋白質連續地饋送至 MCCS2 中和接著溶析重組蛋白質從而產生純化重組蛋白質，其中 MCCS1 及/或 MCCS2 中之至少一種管柱為本文所提供的生物負荷量減少之填充層析管柱，該等方法利用生物負荷量減少之緩衝液，整合，及連續地操作從液體培養基至該純化重組蛋白質。

在一些實例中，MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2 中所使用之層析管柱各為本文所提供的生物負荷量減少之填充層析管柱。一些具體實例另外包括將純化重組蛋白質調配成醫藥組成物之步驟。

本文所述方法提供純化重組蛋白質從包括重組蛋白質之液體培養基的連續且具時效性之製造。例如，在包括治療性蛋白質之液體培養基饋送至 MCCS 或 MCCS1 和分別從 MCCS 或 MCCS2 溶析重組蛋白質之間的經過時間可為(例如)介於約 4 小時和約 48 小時(含)，例如介於約 4 小時和約 40 小時之間，介於約 4 小時和約 35 小時之間，介於約 4 小時和約 30 小時之間，介於約 4 小時和約 28 小時之間，介於約 4 小時和約 26 小時之間，介於約 4 小時和約 24 小時之間，介於約 4 小時和約 22 小時之間，介於約 4 小時和約 20 小時之間，介於約 4 小時和約 18 小時之間，介於約 4 小時和約 16 小時之間，介於約 4 小時和約 14 小時之間，介於約 4 小時和約 12 小時之間，

介於約 6 小時和約 12 小時之間，介於約 8 小時和約 12 小時之間，介於約 6 小時和約 20 小時之間，介於約 6 小時和約 18 小時之間，介於約 6 小時和約 14 小時之間，介於約 8 小時和約 16 小時之間，介於約 8 小時和約 14 小時之間，介於約 8 小時和約 12 小時之間，介於約 10 小時和 20 小時之間，介於約 10 小時和 18 小時之間，介於約 10 小時和 16 小時之間，介於約 10 小時和 14 小時之間，介於約 12 小時和約 14 小時之間，介於約 10 小時和約 40 小時之間，介於約 10 小時和約 35 小時之間，介於約 10 小時和約 30 小時之間，介於約 10 小時和約 25 小時之間，介於約 15 小時和約 40 小時之間，介於約 15 小時和約 35 小時之間，介於約 15 小時和約 30 小時之間，介於約 20 小時和約 40 小時之間，介於約 20 小時和約 35 小時，或介於約 20 小時和約 30 小時之間(含)。在其它實例中，在將包括重組蛋白質之液體培養基饋送至 MCCS 或 MCCS1 和分別從 MCCS 或 MCCS2 溶析重組蛋白質之間經過時間為(例如)大於約 4 小時和小於約 40 小時(含)，例如大於約 4 小時和小於約 39 小時，約 38 小時，約 37 小時，約 36 小時，約 35 小時，約 34 小時，約 33 小時，約 32 小時，約 31 小時，約 30 小時，約 29 小時，約 28 小時，約 27 小時，約 26 小時，約 25 小時，約 24 小時，約 23 小時，約 22 小時，約 21 小時，約 20 小時，約 19 小時，約 18 小時，約 17 小時，約 16 小時，約 15 小時，約 14 小時，約 13 小時，約 12 小時，約 11 小時，約 10 小時，約 9 小時，約 8 小時，約 7 小時，約 6 小時，約 5 小時、或約 4.5 小時(含)。

可使用於任何此等方法中的 MCCS(MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2)的非限制性態樣係描述於美國臨時專利申請案序號 61/775,060 和 61/856,390(各以引用方式併入本文)中。

一些示例性方法不使用保存步驟(例如，在整個方法中不使用儲存器(例如，中斷槽))。其他在整個方法中可使用最多 1、2、3、4、或 5 個儲存器(例如，中斷槽)。任何本文所述方法在整個方法中可使用最多 1、2、3、4、或 5 個儲存器(例如，中斷槽)，其中各中斷槽只保存重組蛋白質經(例如)介於約 5 分鐘和小於約 6 小時之間(含)，例如介於約 5 分鐘和約 5 小時之間，約 4 小時，約 3 小時，約 2 小時，約 1 小時、或約 30 分鐘(含)之總時段。

一些方法利用一、二、三、四、五、或六個儲存器(例如，中斷槽)和可具有(例如)介於 1 mL 和約 300 mL 之間(含)(例如)介於 1 mL 和約 280 mL 之間，約 260 mL，約 240 mL，約 220 mL，約 200 mL，約 180 mL，約 160 mL，約 140 mL，約 120 mL，約 100 mL，約 80 mL，約 60 mL，約 40 mL，約 20 mL、或約 10 mL(含)的容量。(任何本文所述方法中)用以在流體饋送至 MCCS 或 MCCS1 之前保存該流體的任何儲存器(例如，中斷槽)可具有其為(例如)介於 1 mL 和約 100%之間(含)(例如介於 1 mL 和約 90%之間，約 80%，約 70%，約 60%，約 50%，約 40%，約 30%，約 20%，約 10%、或約 5%(含))之 MCCS 或 MCCS1 的第一管柱之裝載體積的容量。儲存器(例如，中斷槽)可用以在來自 MCCS1 之溶析液進入 MCCS2 之前保存該溶析液，且可具有其為(例如)介於 1 mL 和約 100%之間(含)(例如，介於 1 mL 和約 90%，約 80%，約 70%，約 60%，約 50%，約 40%，約 30%，約 20%，約 10%、或約 5%(含))之 MCCS2 的第一管柱之裝載體積的容量。

此等方法的各種另外態樣係詳細描述於下且可以任何組合用於本文所提供的方法中而沒有限制。所提供的方法之示例性態樣係描述於下；然而，熟習該項技術者將了解，額外的步驟可加至本文所述方法中且其他材料可用於進行本文所述方法中之任何步驟。

液體培養基

包括重組蛋白質(例如，重組治療性蛋白質)之實質上不含細胞的液體培養基可源自任何來源。例如，液體培養基可得自重組細胞培養物(例如，重組細菌、酵母、或哺乳動物細胞培養物)。液體培養基可得自分批補料細胞(例如，哺乳動物細胞)培養物(例如，包括分泌重組蛋白質之哺乳動物細胞的培養物之分批補料生物反應器)或灌注細胞(例如，哺乳動物細胞)培養物(例如包括分泌重組蛋白質之哺乳動物細胞的培養物之灌注生物反應器)。液體培養基也可為來自分泌重組蛋白質之細菌或酵母細胞的培養物之澄清液體培養基。

得自重組細胞培養物之液體培養基可過濾或澄清以獲得其實質上不含細胞及/或病毒之液體培養基。用於過濾或澄清液體培養基以移除細胞之方

法在該項技術中為已知的(例如，0.2- μm 過濾和使用交替切向流(ATF™)系統之過濾)。重組細胞也可使用離心和移除其實質上不含細胞之液體培養基的上清液、或使細胞沉降至包括液體培養基之容器(例如，生物反應器)的重力底部、和移除遠離沉降重組細胞的液體培養基(實質上不含細胞之液體培養基)而從液體培養基移除。

液體培養基可得自製造任何本文所述或該項技術中已知的重組蛋白質(例如，重組治療性蛋白質)之重組細胞(例如，重組細菌、酵母、或哺乳動物細胞)的培養物。任何本文所述的方法的一些實例可另外包括培養製造重組蛋白質(例如，重組治療性蛋白質)之重組細胞(例如，重組細菌、酵母、或哺乳動物細胞)的步驟。

液體培養基可為本文所述或該項技術中已知的液體培養基的任何類型。例如，液體培養基可選自下列之群組：無動物來源的成分之液體培養基、無血清之液體培養基、含血清之液體培養基、化學定義之液體培養基、和無蛋白質之液體培養基。在任何本文所述方法中，得自培養物之液體培養基可在饋送至 MCCS 或 MCCS1 之前藉由添加第二流體(例如，緩衝液)來稀釋。

在液體培養基饋送至 MCCS 或 MCCS1 之前，包括重組蛋白質之實質上無細胞的液體培養基可儲存(例如，在低於約 15 °C(例如，低於約 10 °C，低於約 4 °C，低於約 0 °C，低於約 -20 °C，低於約 -50 °C，低於約 -70 °C，或低於約 -80 °C)之溫度下經至少 1 天(例如，至少約 2 天，至少約 5 天，至少約 10 天，至少約 15 天，至少約 20 天、或至少約 30 天)。或者，在一些實例中該液體培養基係直接從生物反應器饋送至 MCCS 或 MCCS1(例如，在過濾或澄清步驟之後直接從生物反應器饋送至 MCCS 或 MCCS1)。

多管柱層析系統

本文所述方法包括使用 MCCS 或二或多個(例如，二、三、四、五、或六個)多管柱層析系統(MCCSs)(例如，MCCS1 和 MCCS2)。MCCS 可包括二或多個層析管柱、二或多個層析膜、或至少一個層析管柱和至少一個層析膜之組合。在非限制例中，MCCS(例如，任何本文之方法中的 MCCS、

MCCS1、及/或 MCCS2)可包括四個層析管柱、三個層析管柱和層析膜、三個層析管柱、二個層析管柱、二個層析膜、及二個層析管柱和一個層析膜。熟習該項技術者可預見使用於 MCCS(例如,任何本文所述方法中之 MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2)的層析管柱及/或層析膜之組合的另外實例而沒有限制。MCCS 中所存在之個別層析管柱及/或層析膜可為相同(例如,具有相同形狀、體積、樹脂、捕獲機制、和單元操作)、或可為不同(例如,具有一或多種不同形狀、體積、樹脂、捕獲機制、及/或單元操作)。MCCS 中所存在之個別層析管柱及/或層析膜(例如,任何本文所述方法中之 MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2)可進行相同單元操作(例如,捕獲、純化、或精緻純化之單元操作)或不同的單元操作(例如,選自(例如)下列群組之不同單元操作:捕獲、純化、精緻純化、使病毒滅活、調整包括重組蛋白質的流體的離子濃度及/或 pH、和過濾)。例如,在本文所述方法的實例中,MCCS 或 MCCS1 中至少一個層析管柱及/或層析膜進行捕獲重組蛋白質之單元操作。

一或多個可存在於 MCCS 中(例如,存在於 MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2 中)之層析管柱可具有(例如)介於約 1 mL 和約 2 mL 之間,約 5 mL,約 10 mL,約 15 mL,約 20 mL,約 25 mL,約 30 mL,約 35 mL,約 40 mL,約 45 mL,約 50 mL,約 55 mL,約 60 mL,約 65 mL,約 70 mL,約 75 mL,約 80 mL,約 85 mL,約 90 mL,約 95 mL、或約 100 mL(含)的樹脂體積。一或多個可存在於 MCCS 中(例如,存在於 MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2 中)之層析管柱可具有介於約 2 mL 至約 100 mL 之間,介於約 2 mL 和約 90 mL 之間,介於約 2 mL 和約 80 mL 之間,介於約 2 mL 和約 70 mL 之間,介於約 2 mL 和約 60 mL 之間,介於約 2 mL 和約 50 mL 之間,介於約 5 mL 和約 50 mL 之間,介於約 2 mL 和約 45 mL 之間,介於約 5 mL 和約 45 mL 之間,介於約 2 mL 和約 40 mL 之間,介於約 5 mL 和約 40 mL 之間,介於約 2 mL 和約 35 mL 之間,介於約 5 mL 和約 35 mL 之間,介於約 2 mL 和約 30 mL 之間,介於約 5 mL 和約 30 mL 之間,介於約 2 mL 和約 25 mL 之間,介於約 5 mL 和約 25 mL 之間,介於約 15 mL 和約 60 mL 之間,介於約 10 mL 和約 60 mL 之間,介於約 10 mL 和約 50 mL 之間,和介於約 15 mL 和約 50 mL 之間的樹脂體積。任何本文所述方法中所使用的 MCCS(例如,

MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2)中之一或多個層析管柱可具有實質上相同的樹脂體積或可具有不同樹脂體積。用於 MCCS(例如，MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2)中之一或多個層析管柱的流速可為(例如)介於約 0.2 mL/分鐘至約 25 mL/分鐘之間(例如，介於約 0.2 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間，介於約 0.2 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 10 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘和約 14 mL/分鐘之間，介於約 1.0 mL/分鐘和約 25.0 mL/分鐘之間，或介於約 1.0 mL/分鐘和約 15.0 mL/分鐘之間)。

MCCS 中之一或多個層析管柱(例如，MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2)可具有實質上相同的形狀或可具有實質上不同的形狀。例如，MCCS 中(例如，在 MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2 中)之一或多個層析管柱可具有實質上圓柱形狀或可實質上具有相同的橢圓筒形狀。

可存在於 MCCS 中(例如，存在於 MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2 中)之一或多個層析膜可具有(例如)介於約 1 mL 至約 500 mL 之間(例如，介於約 1 mL 至約 475 mL 之間，介於約 1 mL 至約 450 mL 之間，介於約 1 mL 至約 425 mL 之間，介於約 1 mL 至約 400 mL 之間，介於約 1 mL 至約 375 mL 之間，介於約 1 mL 至約 350 mL 之間，介於約 1 mL 至約 325 mL 之間，介於約 1 mL 至約 300 mL 之間，介於約 1 mL 至約 275 mL 之間，介於約 1 mL 至約 250 mL 之間，介於約 1 mL 至約 225 mL 之間，介於約 1 mL 至約 200 mL 之間，介於約 1 mL 至約 175 mL 之間，介於約 1 mL 至約 150 mL 之間，介於約 1 mL 至約 125 mL 之間，介於約 1 mL 至約 100 mL 之間，介於約 2 mL 至約 100 mL 之間，介於約 5 mL 至約 100 mL 之間，介於約 1 mL 至約 80 mL 之間，介於約 2 mL 至約 80 mL 之間，介於約 5 mL 至約 80 mL 之間，介於約 1 mL 至約 60 mL 之間，介於約 2 mL 至約 60 mL 之間，介於約 5 mL 至約 60 mL 之間，介於約 1 mL 至約 40 mL 之間，介於約 2 mL 至約 40 mL 之間，介於約 5 mL 至約 40 mL 之間，介於約 1 mL 至約 30 mL 之間，介於約 2 mL 至約 30 mL 之間，介於約 5 mL 至約 30 mL 之間，介於約 1 mL 和約 25 mL 之間，介於約 2 mL 和約 25 mL 之間，介於約 1 mL 和約 20 mL 之間，

介於約 2 mL 和約 20 mL 之間，介於約 1 mL 和約 15 mL 之間，介於約 2 mL 和約 15 mL 之間，介於約 1 mL 和約 10 mL 之間，或介於約 2 mL 和約 10 mL 之間)的床體積。

在任何本文所述方法中在使用 MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2 期間可使用一或多種(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)不同類型的生物負荷量減少之緩衝液。如該項技術中已知的，在本文所述方法中 MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2 中所使用的一或多種類型的生物負荷量減少之緩衝液將取決於 MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2 中之層析管柱及/或層析膜中所存在之樹脂、重組蛋白質之生物物理性質、和由 MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2 之特定層析管柱及/或層析膜進行的單元操作(例如，任何本文所述的示例性單元操作)。在任何本文所述方法中在使用 MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2 期間所採用之緩衝液的體積和類型也可由熟習該項技術者決定(例如，更詳細討論於下)。例如，可選擇在任何本文所述方法中在 MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2 期間所採用之緩衝液的體積和類型，以最佳化純化重組蛋白質(例如，重組蛋白質藥品)中之下列中一或多者：重組蛋白質的總產率、重組蛋白質的活性、重組蛋白質的純度水準、及從包括重組蛋白質的流體(例如，液體培養基)中除去生物污染物(例如，沒有活性病毒、分枝桿菌、酵母、細菌、或哺乳動物細胞)。

MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2 可為週期性逆流層析系統(PCCS)。PCCS 可(例如)包括二或多個層析管柱(例如，三個管柱或四個管柱)，彼等被切換以允許來自二或多個層析管柱之重組蛋白質的連續溶析。PCCS 可包括二或多個層析管柱、二或多個層析膜、或至少一個層析管柱和至少一個層析膜。一管柱操作(循環)通常由裝填、洗滌、溶析、和再生步驟組成。在 PCCS 中，多管柱係用於以循環方式不連續及連續地運行相同步驟。因為管柱係以串聯操作，所以從一管柱通過和洗滌之流體被另一管柱捕獲。此 PCCS 之獨特特徵允許樹脂裝載接近其靜態結合能力，而不是接近動態結合能力，如通常在分批模式層析期間。連續循環和溶析的結果，進入 PCCS 之流體被連續地處理，且連續地產生包括重組蛋白質之溶析液。

管柱切換策略係用於在 PCCS 循環中從一步驟前進至另一步驟。可用於 PCCS 之管柱切換的實例係描述於美國臨時專利申請案序號 61/775,060 和 61/856,390 中。例如，管柱切換方法可採用每個管柱之二個自動化切換操作：第一係有關最初產物穿透(breakthrough)，而第二與管柱飽和一致。管柱切換操作應何時發生的確定可藉由監測來自存在於 PCCS 中之各層析管柱的溶析液中之重組蛋白質濃度(例如，藉由 UV 監測進行之監測)來確定。例如，管柱切換可藉由任何能夠用反饋控制在線測量重組蛋白質濃度之 PAT 工具確定。PAT 工具係能夠用反饋控制即時在線測量重組蛋白質濃度。如該項技術中已知的，管柱切換也可根據通過 MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2 中之一或多個層析管柱及/或層析膜之流體(例如，緩衝液)的時間或量設計。

在 PCCS 中，重組蛋白質在 PCCS 中所存在之各層析管柱及/或層析膜上之滯留時間(RT)可減少而沒有增加管柱/膜尺寸，因為在 PCCS 中來自第一管柱/膜穿透(breakthrough)可在另一管柱/膜上被捕獲。一種連續方法系統可設計成藉由使用下列方程式改變管柱/膜體積(V)和 RT 而以任何的灌注速率(D)處理液體培養基： $V = D * RT$ 。

一或多種可藉由本所述方法中所使用之 MCCS 或 MCC1 及/或 MCCS2 進行的單元操作包括(例如)捕獲重組蛋白質、使包括重組蛋白質的流體中所存在之病毒滅活、純化重組蛋白質、精緻純化重組蛋白質、保存包括重組蛋白質的流體(例如，使用任何本文所述的示例性中斷槽)、從包括重組蛋白質的流體過濾或移除顆粒物質及/或細胞、和調整包括重組蛋白質的液體之離子濃度及/或 pH。

在一些具體實例中，該 MCCS 或 MCCS1 包括至少一個進行捕獲重組蛋白質之單元操作的層析管柱及/或層析膜。捕獲之單元操作可使用至少一個(例如)利用捕獲機制之層析管柱及/或層析樹脂進行。捕獲機制的非限制例包括蛋白質 A-結合捕獲機制、抗體-或抗體片段-結合捕獲機制、受質-結合捕獲機制、適配體-結合捕獲機制、標籤-結合捕獲機制(例如，以聚-His 標籤為主之捕獲機制)、和輔因子-結合捕獲機制。捕獲也可使用可用於進行陽離子交換或陰離子交換層析、分子篩層析、或疏水性作用層析之樹脂進

行。可用於捕獲重組蛋白質之非限制樹脂係描述於本文中。可用於捕獲重組蛋白質之樹脂的額外實例在該項技術中為已知的。

使包括重組蛋白質的流體中所存在之病毒滅活的單元操作可使用 MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2(例如，包括(例如)能夠將包括重組蛋白質的流體在介於約 3.0 至 5.0 之間(例如，介於約 3.5 至約 4.5 之間，介於約 3.5 至約 4.25 之間，介於約 3.5 至約 4.0 之間，介於約 3.5 至約 3.8 之間，或約 3.75 之間)的 pH 下培養於至少 30 分鐘時段(例如，介於約 30 分鐘至 1.5 小時之間時段，介於約 30 分鐘至 1.25 小時之間時段，介於約 0.75 小時至 1.25 小時之間、或約 1 小時時段)的層析管柱、層析膜、或保存槽)進行。

純化重組蛋白質之單元操作可使用一或多個包括(例如)層析管柱或層析膜的 MCCS(例如，MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2)進行，該層析管柱或層析膜(例如)包括利用捕獲系統之樹脂。捕獲機制的非限制例包括蛋白質 A-結合捕獲機制、抗體-或抗體片段-結合捕獲機制、受質-結合捕獲機制、適配體-結合捕獲機制、標籤-結合捕獲機制(例如，聚-His 標籤為主之捕獲機制)、和輔因子-結合捕獲機制。純化也可用一種可使用於進行陽離子交換或陰離子交換層析、分子篩層析、或疏水性作用層析之樹脂進行。可用於純化重組蛋白質之非限制樹脂係描述於本文中。可用於純化重組蛋白質之樹脂的額外實例在該項技術中為已知的。

精緻純化重組蛋白質之單元操作可使用一或多個包括(例如)包括樹脂的層析管柱或層析膜之 MCCS(例如，MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2)進行，該樹脂(例如)可用於進行陽離子交換、陰離子交換、分子篩層析、或疏水性作用層析。可用於精緻純化重組蛋白質之非限制樹脂係描述於本文中。可用於精緻純化重組蛋白質之樹脂的額外實例在該項技術中為已知的。

保存包括重組蛋白質的流體之單元操作可使用在組合之 MCCS 或 MCCS1 和 MCCS2 中包括至少一個儲存器(例如，中斷槽)或最多 1、2、3、4、或 5 個儲存器(例如，中斷槽)之 MCCS(例如，MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2)進行。例如，可用於達成此單元操作之儲存器(例如，中斷槽)可各自具有介於約 1 mL 至約 1 L 之間(例如，介於約 1 mL 至約 800 mL 之間，介於約 1 mL 至約 600 mL 之間，介於約 1 mL 至約 500 mL 之間，介於約 1 mL

至約 400 mL 之間，介於約 1 mL 至約 350 mL 之間，介於約 1 mL 至約 300 mL 之間，介於約 10 mL 和約 250 mL 之間，介於約 10 mL 和約 200 mL 之間，介於約 10 mL 和約 150 mL 之間，或介於約 10 mL 至約 100 mL)之間的體積。本文所述方法中所使用之儲存器(例如，中斷槽)可具有(例如)介於 1 mL 和約 300 mL 之間(含)(例如)介於 1 mL 和約 280 mL，約 260 mL，約 240 mL，約 220 mL，約 200 mL，約 180 mL，約 160 mL，約 140 mL，約 120 mL，約 100 mL，約 80 mL，約 60 mL，約 40 mL，約 20 mL、或約 10 mL 之間(含)的容量。(任何在本文所述方法中)任何用於在流體進入 MCCS 或 MCCS1 之前保存流體的儲存器(例如，中斷槽)可具有其為(例如)MCCS 或 MCCS1 之第一管柱的裝載體積之介於 1 mL 和約 100%(含)之間，介於約 1 mL 和約 90%，約 80%，約 70%，約 60%，約 50%，約 40%，約 30%，約 20%，約 10%，或約 5%之間(含)的容量。用於在來自 MCCS1 的溶析液(包括重組蛋白質)進入 MCCS2 之前將其保存的任何儲存器(例如，中斷槽)可具有其為(例如)MCCS2 之第一管柱的裝載體積之介於 1 mL 和約 100%(含)之間，例如介於約 1 mL 和約 90%，約 80%，約 70%，約 60%，約 50%，約 40%，約 30%，約 20%，約 10%、或約 5%之間(含)的容量。

儲存器(例如，中斷槽)可各自將包括重組蛋白質的流體保存至少 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、或至少 6 小時)。在其它實例中，儲存器(例如，中斷槽)僅將重組蛋白質保存(例如)介於約 5 分鐘和小於約 6 小時之間(含)，例如介於約 5 分鐘和約 5 小時，約 4 小時，約 3 小時，約 2 小時，約 1 小時、或約 30 分鐘(含)之間的總時段。儲存器(例如，中斷槽)可用於保存和冷凍(例如，在小於 25 °C，小於 15 °C、或小於 10 °C 之溫度下)包括重組蛋白質的流體。儲存器可具有任何形狀，包括圓柱、橢圓柱、或近似矩形之密封且非滲透性袋。

過濾包括重組蛋白質的流體之單元操作可使用包括(例如)包括分子篩樹脂之過濾器、或層析管柱或層析膜的 MCCS(例如，MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2)進行。如該項技術中已知的，各種的次微米過濾器(例如，具有孔徑小於 1 μm ，小於 0.5 μm ，小於 0.3 μm ，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

之過濾器)為該項技術中可用的，其能夠去除任何沈澱的物質和/或細胞(例如，沈澱的未折疊蛋白質；沈澱的不要之宿主細胞蛋白質；沈澱的脂類；細菌；酵母細胞；真菌細胞；分枝桿菌；及/或哺乳動物細胞)。具有約 0.2 μm 或小於 0.2 μm 之孔徑的過濾器已知有效地從包括重組蛋白質的流體移除細菌。如該項技術中已知的，包括分子篩樹脂之層析管柱或層析膜也可使用於 MCCS(例如，MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2)中以進行過濾包括重組蛋白質的流體之單元操作。

調整包括重組蛋白質的流體之離子濃度及/或 pH 的單元操作可使用包括和利用緩衝液調整儲存器(例如，在線緩衝液調整儲存器)之 MCCS(例如，MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2)進行，該儲存器將新緩衝液溶液加至包括重組蛋白質之流體(例如，在 MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2 內的管柱之間、或在倒數第二 MCCS(例如，MCCS1)中的最後管柱之後和包括重組蛋白質的流體饋送至下一 MCCS 的第一管柱(例如，MCCS2)之前)。如在該技術中可理解的，在線緩衝液調整儲存器可為任何尺寸(例如，大於 100 mL)且可包括任何緩衝溶液(例如，具有下列中之一或多者的緩衝溶液：相較於包括重組蛋白質的流體，pH 增加或減少，相較於包括重組蛋白質的流體，離子(例如，鹽)濃度增加或減少，及/或與重組蛋白質競爭 MCCS(例如，MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2)中之至少一個層析管柱或至少一個層析膜中所存在之樹脂的結合之試劑的濃度增加或減少)。

MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2 可進行二或多種單元操作。例如，MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2 可各自進行至少下列單元操作：捕獲重組蛋白質和使包括重組蛋白質的流體中所存在之病毒滅活；捕獲重組蛋白質、使包括重組蛋白質的流體中所存在之病毒滅活、和調整包括重組蛋白質的液體之離子濃度及/或 pH；純化重組蛋白質和精緻純化重組蛋白質；純化重組蛋白質、精緻純化重組蛋白質、及過濾包括重組蛋白質的流體或從包括重組蛋白質的流體移除沈澱物及/或顆粒物質；及純化重組蛋白質、精緻純化重組蛋白質、過濾包括重組蛋白質的流體或從包括重組蛋白質的流體移除沈澱物及/或微粒物質、和調整包括重組蛋白質的液體之離子濃度及/或 pH。

捕獲重組蛋白質

本發明方法包括使用 MCCS 或 MCCS1 捕獲重組蛋白質之步驟。如在該技術中可理解的，包括重組蛋白質之液體培養基可連續地饋送至使用各種不同裝置之 MCCS 或 MCCS1。例如，液體培養基可主動泵入 MCCS 或 MCCS1、或液體培養基可饋送至使用重力之 MCCS 或 MCCS1。液體培養基在其饋送至 MCCS 或 MCCS1 之前可儲存在儲存器(例如，保存槽)中或液體培養基可從包括細胞(例如，將重組蛋白質分泌於培養基中的哺乳動物細胞)的培養物之生物反應器主動泵入 MCCS 或 MCCS1。

液體培養基可以介於約 0.2 mL/分鐘至約 25 mL/分鐘之間(例如，介於約 0.2 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間，介於約 0.2 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 10 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘和約 14 mL/分鐘之間，介於約 1.0 mL/分鐘和約 25.0 mL/分鐘之間，介於約 1.0 mL/分鐘和約 15.0 mL/分鐘之間)的流速饋送(裝載)至 MCCS 或 MCCS1。包括重組蛋白質之液體培養基可得自本文所述或該項技術中已知的任何示例性來源。

一些實例另外包括在液體培養基饋送至 MCCS 或 MCCS1 之前將其過濾的視需要步驟。過濾本文所述的包括重組蛋白質之液體培養基或流體的任何示例性裝置、或該項技術中已知的任何過濾裝置，可用於將包括重組蛋白質之液體培養基在其饋送至 MCCS 或 MCCS1 之前進行過濾。

在本文所述方法中，從液體培養基捕獲重組蛋白質係使用 MCCS 或 MCCS1 進行。如在該技術中可理解的，為了達到重組蛋白質的捕獲，MCCS 或 MCCS1 中之至少一個層析管柱或至少一個層析膜必需包括利用捕獲機制(例如，本文所述的任何示例性捕獲機制)之樹脂、或包括能夠進行陽離子交換、陰離子交換、分子篩、或疏水性作用層析之樹脂。例如，若重組蛋白質為抗體或抗體片段，則捕獲系統可為蛋白質 A-結合之捕獲機制或抗原結合之捕獲機制(其中該捕獲抗原被重組抗體或抗體片段特異性識別)。若重組蛋白質為酶，則捕獲機制可使用特異性結合至酶以捕獲重組酶、酶的受質以捕獲重組酶、酶的輔因子以捕獲重組酶之抗體或抗體片段，或，若重

組酶包括標籤、蛋白質、金屬螯合物、或特異性結合至存在於重組酶中之標籤的抗體(或抗體片段)。用於捕獲重組蛋白質之非限制樹脂係如本文中所述且可用於捕獲重組蛋白質之額外樹脂在該項技術中為已知的。利用蛋白質 A-結合捕獲機制之樹脂的非限制例為 Mab Select SuRe™ 樹脂(GE Healthcare, Piscataway, NJ)、JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203(Sunnyvale, CA)、和 Kaneka KanCap A(Osaka, Japan)。

可用於捕獲重組蛋白質的 MCCS 或 MCCS1 中所存在之層析管柱或層析膜的示例性非限制大小及形狀係如本文中所述。饋送(裝載)至 MCCS 或 MCCS1 之液體培養基可包括(例如)介於約 0.05 mg/mL 至約 100 mg/mL 之間重組蛋白質(例如,介於約 0.1 mg/mL 至約 90 mg/mL 之間,介於約 0.1 mg/mL 至約 80 mg/mL 之間,介於約 0.1 mg/mL 至約 70 mg/mL 之間,介於約 0.1 mg/mL 至約 60 mg/mL 之間,介於約 0.1 mg/mL 至約 50 mg/mL 之間,介於約 0.1 mg/mL 至約 40 mg/mL 之間,介於約 0.1 mg/mL 至約 30 mg/mL 之間,介於約 0.1 mg/mL 至約 20 mg/mL 之間,介於 0.5 mg/mL 至約 20 mg/mL 之間,介於約 0.1 mg/mL 至約 15 mg/mL 之間,介於約 0.5 mg/mL 至約 15 mg/mL 之間,介於約 0.1 mg/mL 至約 10 mg/mL 之間,或介於約 0.5 mg/mL 至約 10 mg/mL 之間重組蛋白質)。重組蛋白質結合至用以進行捕獲之單元操作的樹脂所需之平均時間可為(例如)介於約 5 秒至約 10 分鐘之間(例如,介於約 10 秒至約 8 分鐘之間,介於約 10 秒至約 7 分鐘之間,介於約 10 秒至約 6 分鐘之間,介於約 10 秒至約 5 分鐘之間,介於約 30 秒至約 5 分鐘之間,介於約 1 分鐘至約 5 分鐘之間,介於約 10 秒至約 4 分鐘之間,介於約 30 秒至約 4 分鐘之間,或介於約 1 分鐘至約 4 分鐘之間)。

如在該技術中可理解的,為了使用 MCCS 或 MCCS1 中所存在之層析管柱或層析膜捕獲重組蛋白質,必須進行裝載、洗滌、溶析、和再生 MCCS 或 MCCS1 中所存在之層析管柱或層析膜的連續層析步驟。分配給本文所述的各連續層析步驟的任何示例性流速、緩衝液體積、及/或時間長度可使用於此等不同連續層析步驟中之一或多者(例如,裝載、洗滌、溶析、和再生用於捕獲重組蛋白質的 MCCS 或 MCCS1 中所存在之層析管柱或層析膜的連續層析步驟中之一或多者)。分配給可用於 MCCS 或 MCCS1(例如,PCCS

或 PCCS1)中之捕獲層析管柱及/或層析膜的各連續層析步驟之非限制流速、緩衝液體積、及/或時間長度係提供於下。此外，可使用於 MCCS 及/或 MCCS1 中之示例性緩衝液係描述於下。

包括至少一個包括可進行捕獲之單元操作的樹脂(例如，任何可用於本文所述的捕獲之示例性樹脂)之層析管柱及/或層析膜的 MCCS 或 MCCS1 可使用上述任何裝載流速裝載包括重組蛋白質之液體培養基(饋送速率)。在一些實例中，將包括能夠進行捕獲之單元操作的樹脂之單層析管柱或單一層析膜進行裝載(例如)在介於約 10 分鐘至約 90 分鐘之間(例如，介於約 15 分鐘和約 90 分鐘之間，介於約 20 分鐘和 80 分鐘之間，介於約 30 分鐘和 80 分鐘之間，介於約 40 分鐘和約 80 分鐘之間，介於約 50 分鐘和約 80 分鐘之間，和介於約 60 分鐘和 80 分鐘之間)。在一些實例中，其中該 MCCS 或 MCCS1 包括至少二個串聯的包括能夠進行捕獲之單元操作的樹脂之層析管柱，裝載二個串聯層析管柱所需之時間為(例如)介於約 50 分鐘至約 180 分鐘之間(例如，介於約 60 分鐘和約 180 分鐘之間，介於約 70 分鐘和約 180 分鐘之間，介於約 80 分鐘和約 180 分鐘之間，介於約 90 分鐘和約 180 分鐘之間，介於約 100 分鐘和約 180 分鐘之間，介於約 110 分鐘和 150 分鐘之間，和介於約 125 分鐘和約 145 分鐘之間)。

重組蛋白質裝載到 MCCS 或 MCCS1 中之至少一個包括能夠進行捕獲之單元操作的樹脂之層析管柱或層析膜之後，用至少一種洗滌緩衝液洗滌至少一個層析管柱或層析膜。如在該技術中可理解的，至少一種(例如、二、三、或四種)洗滌緩衝液意指溶析全部或大部分不是來自至少一個層析管柱或層析膜的重組蛋白質，同時不干擾重組蛋白質與樹脂的相互作用之蛋白質。

洗滌緩衝液可以介於約 0.2 mL/分鐘至約 25 mL/分鐘之間(例如，介於約 0.2 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間，介於約 0.2 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 10 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘和約 14 mL/分鐘之間，介於約 1.0 mL/分鐘和約 25.0 mL/分鐘之間，介於約 1.0 mL/分鐘和約 15.0 mL/分鐘)之流速通過至少一個層析管柱或層析

膜。所使用之洗滌緩衝液的體積(例如，當使用大於一種之洗滌緩衝液時所使用之洗滌緩衝液的合併總體積)可為(例如)介於約 1X 管柱體積(CV)至約 15X CV 之間(例如，介於約 1X CV 至約 14X CV，約 1X CV 至約 13X CV，約 1X CV 至約 12X CV，約 1X CV 至約 11X CV，約 2X CV 至約 11X CV，約 3X CV 至約 11X CV，約 4X CV 至約 11X CV，約 5X CV 至約 11X CV，或約 5X CV 至約 10X CV 之間)。洗滌之總時間可為(例如)介於約 2 分鐘至約 3 小時之間(例如，介於約 2 分鐘至約 2.5 小時之間，介於約 2 分鐘至約 2.0 小時之間，介於約 5 分鐘至約 1.5 小時之間，介於約 10 分鐘至約 1.5 小時之間，介於約 10 分鐘至約 1.25 小時之間，介於約 20 分鐘至約 1.25 小時之間，或介於約 30 分鐘至約 1 小時之間)。

洗滌 MCCS 或 MCCS1 中的至少一個包括能夠進行捕獲之單元操作的樹脂之層析管柱或層析膜之後，重組蛋白質係藉由將溶析緩衝液通過 MCCS 或 MCCS1 中的至少一個包括能夠進行捕獲之單元操作的樹脂之層析管柱或層析膜而從至少一個層析管柱或層析膜溶析。

溶析緩衝液可以介於約 0.2 mL/分鐘至約 25 mL/分鐘之間(例如，介於約 0.2 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間，介於約 0.2 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 10 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘和約 6.0 mL/分鐘之間，介於約 1.0 mL/分鐘和約 5.0 mg/分鐘之間，介於約 0.5 mL 分鐘和約 14 mL/分鐘之間，介於約 1.0 mL/分鐘和約 25.0 mL/分鐘之間，或介於約 1.0 mL/分鐘和約 15.0 mL/分鐘之間)的流速通過 MCCS 或 MCCS1 中的至少一個包括能夠進行捕獲之單元操作的樹脂之層析管柱或層析膜。用以從至少一個包括能夠進行純化之單元操作的樹脂之層析管柱或層析膜溶析重組蛋白質之溶析緩衝液的體積可為(例如)介於約 1X 管柱體積(CV)至約 15X CV 之間(例如，介於約 1X CV 至約 14X CV，約 1X CV 至約 13X CV，約 1X CV 至約 12X CV，約 1X CV 至約 11X CV，約 2X CV 至約 11X CV，約 3X CV 至約 11X CV，約 4X CV 至約 11X CV，約 5X CV 至約 11X CV，或約 5X CV 至約 10X CV 之間)。溶析之總時間可為(例如)介於約 2 分鐘至約 3 小時之間(例如，介於約 2 分鐘至約 2.5 小時之間，介

於約 2 分鐘至約 2.0 小時之間，介於約 2 分鐘至約 1.5 小時之間，介於約 2 分鐘至約 1.5 小時之間，介於約 2 分鐘至約 1.25 小時之間，介於約 2 分鐘至約 1.25 小時之間，介於約 2 分鐘至約 1 小時之間，介於約 2 分鐘和約 40 分鐘之間，介於約 10 分鐘和約 40 分鐘之間，或介於約 20 分鐘和約 40 分鐘之間)。可用於此等方法中之溶析緩衝液的非限制例將決取於捕獲機制及/或重組蛋白質。例如，溶析緩衝液可包括不同濃度的鹽(例如，增加之鹽濃度)、不同 pH(例如，增加或減少之鹽濃度)、或將與重組蛋白質競爭結合於能夠進行捕獲之單元操作的樹脂之分子。用於本文所述的各示例性捕獲機制之該溶析緩衝液的實例為該項技術中所熟知的。

從 MCCS 或 MCCS1 中之至少一個包括能夠進行捕獲之單元操作的樹脂之層析管柱或層析膜溶析重組蛋白質之後，和下一體積的液體培養基可裝載到至少一個層析管柱或層析膜之前，至少一個層析管柱或層析膜必須使用再生緩衝液進行平衡。再生緩衝液可以(例如)介於約 0.2 mL/分鐘至約 25 mL/分鐘之間(例如，介於約 0.2 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間，介於約 0.2 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 10 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘和約 6.0 mL/分鐘之間，介於約 1.0 mL/分鐘和約 5.0 mg/分鐘之間，介於約 0.5 mL 分鐘和約 14 mL/分鐘之間，介於約 1.0 mL/分鐘和約 25.0 mL/分鐘之間，介於約 5.0 mL/分鐘至約 15.0 mL/分鐘之間，或介於約 1.0 mL/分鐘和約 15.0 mL/分鐘之間)的流速通過至少一個包括能夠進行捕獲之單元操作的樹脂之層析管柱或層析膜。用於平衡至少一個包括能夠進行捕獲之單元操作的樹脂之層析管柱或層析膜的再生緩衝液之體積可為(例如)介於約 1X 管柱體積(CV)至約 15X CV 之間(例如，介於約 1X CV 至約 14X CV，約 1X CV 至約 13X CV，約 1X CV 至約 12X CV，約 1X CV 至約 11X CV，約 2X CV 至約 11X CV，約 3X CV 至約 11X CV，約 2X CV 至約 5X CV，約 4X CV 至約 11X CV，約 5X CV 至約 11X CV，或約 5X CV 至約 10X CV 之間)。

在一些本文所述方法中，MCCS 或 MCCS1 包括儲存器，其將包括重組蛋白質的流體在低 pH(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 之 pH)下保存(例如)約 1 分鐘至 1.5 小時(例如，約 1 小時)，並使存在於包括重組蛋白質的流體中之病毒滅活。可用於進行使病毒滅活之單元操作的儲存器之實例為攪拌燒瓶(例如，500-mL 攪拌燒瓶，例如，具有程式化控制板之 500-mL 攪拌燒瓶)，其能夠例如在包括重組蛋白質的流體饋送至 MCCS2 之前將包括重組蛋白質的流體保存(例如)約 1 分鐘至 1.5 小時。用於進行使病毒滅活之單元操作的儲存器儲存器可為具有程式化控制板之 500-mL 攪拌燒瓶(例如，程式化控制混合(例如，週期性地混合)儲存器內的流體，例如每 4 小時的攪拌板)。可用於進行使病毒滅活之單元操作的儲存器之另一實例為為塑膠袋(例如，500-mL 塑膠袋)，其例如能夠在包括重組蛋白質的流體饋送至 MCCS2 之前將包括重組蛋白質的流體保存(例如)約 1 分鐘至 1.5 小時。在一些實例中，該包括重組蛋白質的流體當其饋送至用於進行病毒滅活之單元操作的儲存器時可已經具有低 pH(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 之 pH)。如熟習該項技術者可理解的，各種其他裝置可用於進行使病毒滅活之單元操作。例如，包括重組蛋白質的流體的 UV 照射也可用以進行使病毒滅活之單元操作。可用以進行包括重組蛋白質的流體中所使存在的病毒滅活之單元操作的儲存器之非限制例係描述於本文中。

MCCS 或 MCCS1 可包括一種包括四個層析管柱之 PCCS，其中四個層析管柱中之至少三個進行從液體培養基捕獲重組蛋白質之單元操作(例如，使用任何包括至少一個包括能夠進行捕獲之單元操作的樹脂之層析管柱的 MCCS(例如，任何本文所述者))。在此等實例中，PCC 之第四管柱可進行使包括重組蛋白質的流體中之病毒滅活的單元操作(例如，任何本文所述的示例性管柱可用於達成包括重組蛋白質之流體的病毒滅活)。

在一些實例中，包括重組蛋白質的流體係從 MCCS1(例如，PCCS1)連續地溶析、並連續地饋送至 MCCS2(例如，PCCS2)。在 MCCS 或 MCCS1(例如，PCCS 或 PCCS1)之溶析液中回收重組蛋白質的百分比可為(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%)。使用各種該項技術中已知的裝置(例如，管道)，來自 MCCS1(例如，PCCS1)的溶析液可饋送至 MCCS2(例如，PCCS2)。MCCS1(例如，PCCS1)的溶析液可以(例如)介於約 0.2 mL/分鐘至約 25 mL/分鐘之間(例如，介於約 0.2 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間，介於約 0.2 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 10 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘和約 6.0 mL/分鐘之間，介於約 1.0 mL/分鐘和約 5.0 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘和約 14 mL/分鐘之間，介於約 1.0 mL/分鐘和約 25.0 mL/分鐘之間，介於約 5.0 mL/分鐘至約 15.0 mL/分鐘之間，介於約 15 mL/分鐘至約 25 mL/分鐘之間，或介於約 1.0 mL/分鐘和約 15.0 mL/分鐘之間)的流速饋送至 MCCS2(例如，PCCS2)。

一些本文所述方法可另外包括在來自 MCCS1(例如，PCCS1)之溶析液饋送至 MCCS2(例如，PCCS2)之前調整其離子濃度及/或 pH 之步驟。如本文所述，來自 MCCS1(例如，PCCS1)之溶析液的離子濃度及/或 pH 可藉由(在其饋送至 MCCS2 之前)將緩衝液加至溶析液(例如，透過使用在線緩衝液調整儲存器)來調整。緩衝液可以(例如)介於約 0.1 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間(例如，介於約 0.1 mL/分鐘至約 12.5 mL/分鐘之間，介於約 0.1 mL/分鐘至約 10.0 mL/分鐘之間，介於約 0.1 mL/分鐘至約 8.0 mL/分鐘之間，介於約 0.1 mL/分鐘至約 6 mL/分鐘之間，介於約 0.1 mL/分鐘至 4 mL/分鐘之間，或介於約 0.5 mL/分鐘至約 5 mL/分鐘之間) 的流速加至來自 MCCS1 之溶析液。

本文所述方法可另外包括在來自 MCCS1 之溶析液饋送至 MCCS2 之前保存或儲存(且也視需要地冷凍)來自 MCCS1 之溶析液的步驟。如本文所述，此保存或儲存步驟可使用任何本文所述的儲存器(例如，備用槽)進行。

本文所述方法也可包括在溶析液饋送至 MCCS2 之前過濾來自 MCCS1 之溶析液的步驟。任何本文所述用於過濾的示例性過濾器或方法可用於在溶析液饋送至 MCCS2 之前過濾來自 MCCS1 之溶析液。

精緻純化(polishing)和純化重組蛋白質

MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2 可用於進行純化和精緻純化重組蛋白質之單元操作。例如，MCCS2 可用於進行純化和精緻純化重組蛋白質之操作且來自 MCCS2 之溶析液為蛋白質藥物。MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2 可包括至少一個(例如，二、三、或四個)可用於進行純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜，和至少一個(例如，二、三、或四個)可用於進行精緻純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜。

至少一個可用於進行純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜可包括利用捕獲機制之樹脂(例如，任何本文所述或該項技術中已知的捕獲機制)、或可用於進行陰離子交換、陽離子交換、分子篩、或疏水性作用層析之樹脂。至少一個可用於進行精緻純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜包括可用於進行陰離子交換、陽離子交換、分子篩、或疏水性作用層析之樹脂(例如，任何本文所述或該項技術中已知的用於進行陰離子交換、陽離子交換、分子篩、或疏水性作用層析之示例性樹脂)。

至少一個可用於進行純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜之大小、形狀、和體積，及/或至少一個可用於進行精緻純化重組蛋白質之單元操作的層析膜之大小和形狀可為本文所述的層析管柱或層析膜之示例性大小、形狀、和體積的任何組合。如熟習該項技術者可理解的，純化或精緻純化重組蛋白質之步驟可(例如)包括裝載、洗滌、溶析、和平衡至少一個用於進行純化或精緻純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜之步驟。通常，退出用於進行純化之單元操作的層析管柱或層析膜之溶析緩衝液包括重組蛋白質。通常，退出用於進行精緻純化之單元操作的層析管柱或層析膜之裝載及/或洗滌緩衝液包括重組蛋白質。

例如，至少一個可用於進行純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜之大小可具有(例如)介於約 2.0 mL 至約 200 mL 之間(例如，介於約 2.0 mL 至約 180 mL 之間，介於約 2.0 mL 至約 160 mL 之間，介於約 2.0 mL 至約 140 mL 之間，介於約 2.0 mL 至約 120 mL 之間，介於約 2.0 mL 至約 100 mL 之間，介於約 2.0 mL 至約 80 mL 之間，介於約 2.0 mL 至約 60 mL 之間，介於約 2.0 mL 至約 40 mL 之間，介於約 5.0 mL 至約 40 mL 之間，介於約 2.0 mL 至約 30 mL 之間，介於約 5.0 mL 至約 30 mL 之間，或介於

約 2.0 mL 至約 25 mL 之間)的體積。包括重組蛋白質的流體當其裝載到可用於進行純化重組蛋白質之單元操作的至少一個層析管柱或至少一個層析時的流速可為(例如)介於約 0.1 mL/分鐘至約 25 mL/分鐘之間(例如,介於約 0.1 mL/分鐘至約 12.5 mL/分鐘之間,介於約 0.1 mL/分鐘至約 10.0 mL/分鐘之間,介於約 0.1 mL/分鐘至約 8.0 mL/分鐘之間,介於約 0.1 mL/分鐘至約 6 mL/分鐘之間,介於約 0.1 mL/分鐘至 4 mL/分鐘之間,介於約 0.1 mL/分鐘至約 3 mL/分鐘之間,介於約 0.1 mL/分鐘至約 2 mL/分鐘、或約 0.2 mL/分鐘至約 4 mL/分鐘)。在裝載到至少一個可用於進行純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜上重組蛋白質在流體中的濃度可為(例如)介於約 0.05 mg/mL 至約 100 mg/mL 之間重組蛋白質 (例如,介於約 0.1 mg/mL 至約 90 mg/mL 之間,介於約 0.1 mg/mL 至約 80 mg/mL 之間,介於約 0.1 mg/mL 至約 70 mg/mL 之間,介於約 0.1 mg/mL 至約 60 mg/mL 之間,介於約 0.1 mg/mL 至約 50 mg/mL 之間,介於約 0.1 mg/mL 至約 40 mg/mL 之間,介於約 0.1 mg/mL 至約 30 mg/mL 之間,介於約 0.1 mg/mL 至約 20 mg/mL 之間,介於 0.5 mg/mL 至約 20 mg/mL 之間,介於約 0.1 mg/mL 至約 15 mg/mL 之間,介於約 0.5 mg/mL 至約 15 mg/mL 之間,介於約 0.1 mg/mL 至約 10 mg/mL 之間,或介於約 0.5 mg/mL 至約 10 mg/mL 之間重組蛋白質)。在至少一個用於進行純化之單元操作的層析管柱或層析膜中之樹脂可為一種可用於進行陰離子交換或陽離子交換層析之樹脂。在至少一個用於進行純化之單元操作的層析管柱或層析膜中之樹脂可為陽離子交換樹脂(例如, Capto-S 樹脂, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ)。

重組蛋白質裝載到至少一個可用於進行純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜之後,用至少一種洗滌緩衝液洗滌至少一個層析管柱或層析膜。如在該技術中可理解的,至少一種(例如,二、三、或四種)洗滌緩衝液意指溶析所有不是來自至少一個層析管柱或層析膜之重組蛋白質同時不干擾重組蛋白質與樹脂的相互作用或另有溶析重組蛋白質的蛋白質。

洗滌緩衝液可以介於約 0.2 mL/分鐘至約 25 mL/分鐘之間(例如,介於約 0.2 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間,介於約 0.5 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間,介於約 0.2 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間,介於約 0.5 mL/分鐘至約

15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 10 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘和約 14 mL/分鐘之間，介於約 1.0 mL/分鐘和約 25.0 mL/分鐘之間，或介於約 1.0 mL/分鐘和約 15.0 mL/分鐘之間)的流速通過至少一個層析管柱或層析膜。所使用之洗滌緩衝液的體積(例如，所使用之洗滌緩衝液當大於一種時的合併總體積)可為(例如)介於約 1X 管柱體積(CV)至約 15X CV 之間(例如，介於約 1X CV 至約 14X CV，約 1X CV 至約 13X CV，約 1X CV 至約 12X CV，約 1X CV 至約 11X CV，約 2X CV 至約 11X CV，約 3X CV 至約 11X CV，約 4X CV 至約 11X CV，約 2.5X CV 至約 5.0X CV，約 5X CV 至約 11X CV、或約 5X CV 至約 10X CV 之間)。洗滌的總時間可為(例如)介於約 2 分鐘至約 3 小時之間(例如，介於約 2 分鐘至約 2.5 小時之間，介於約 2 分鐘至約 2.0 小時之間，介於約 5 分鐘至約 1.5 小時之間，介於約 10 分鐘至約 1.5 小時之間，介於約 10 分鐘至約 1.25 小時之間，介於約 20 分鐘至約 1.25 小時之間，介於約 30 分鐘至約 1 小時之間，介於約 2 分鐘和 10 分鐘之間，介於約 2 分鐘和 15 分鐘之間，或介於約 2 分鐘和 30 分鐘之間)。

洗滌至少一個用於進行純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜之後，重組蛋白質係藉由將溶析緩衝液通過至少一個用於進行純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜而從至少一個層析管柱或層析膜溶析。溶析緩衝液可以介於約 0.2 mL/分鐘至約 25 mL/分鐘之間(例如，介於約 0.2 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間，介於約 0.2 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 10 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘和約 6.0 mL/分鐘之間，介於約 1.0 mL/分鐘和約 5.0 mg/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘和約 14 mL/分鐘之間，介於約 1.0 mL/分鐘和約 25.0 mL/分鐘之間，或介於約 1.0 mL/分鐘和約 15.0 mL/分鐘之間)的流速通過至少一個可用於進行純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜。用於從至少一個可用於進行純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜溶析重組蛋白質之溶析緩衝液的體積可為(例如)介於約 1X 管柱體積(CV)至約 25X CV 之間(例如，介於約 1X CV 至約 20X CV 之間，介於約 15X CV 和約 25X

CV 之間，介於約 1X CV 至約 14X CV，約 1X CV 至約 13X CV，約 1X CV 至約 12X CV，約 1X CV 至約 11X CV，約 2X CV 至約 11X CV，約 3X CV 至約 11X CV，約 4X CV 至約 11X CV，約 5X CV 至約 11X CV、或約 5X CV 至約 10X CV 之間)。溶析的總時間可為(例如)介於約 2 分鐘至約 3 小時之間(例如，介於約 2 分鐘至約 2.5 小時之間，介於約 2 分鐘至約 2.0 小時之間，介於約 2 分鐘至約 1.5 小時之間，介於約 2 分鐘至約 1.5 小時之間，介於約 2 分鐘至約 1.25 小時之間，介於約 2 分鐘至約 1.25 小時之間，介於約 2 分鐘至約 1 小時之間，介於約 2 分鐘和約 40 分鐘之間，介於約 10 分鐘和約 40 分鐘之間，介於約 20 分鐘和約 40 分鐘之間，或介於約 30 分鐘和 1.0 小時之間)。可用於此等方法之溶析緩衝液的非限制例將取決於樹脂及/或重組蛋白質之生物物理性質。例如，溶析緩衝液可包括不同濃度的鹽(例如，增加之鹽濃度)、不同 pH(例如，增加或減少之鹽濃度)、或將與重組蛋白質競爭結合於樹脂的分子。用於本文所述的各示例性捕獲機制之該溶析緩衝液的實例為該項技術中所熟知的。

從至少一種用於進行純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜溶析重組蛋白質之後，和下一體積的包括重組蛋白質的流體可裝載到至少一個層析管柱或層析膜上之前，至少一個層析管柱或層析膜必須使用再生緩衝液進行平衡。再生緩衝液可以(例如)介於約 0.2 mL/分鐘至約 25 mL/分鐘之間(例如，介於約 0.2 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間，介於約 0.2 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 10 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘和約 6.0 mL/分鐘之間，介於約 1.0 mL/分鐘和約 5.0 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘和約 14 mL/分鐘之間，介於約 1.0 mL/分鐘和約 25.0 mL/分鐘之間，介於約 5.0 mL/分鐘至約 15.0 mL/分鐘之間，或介於約 1.0 mL/分鐘和約 15.0 mL/分鐘之間)的流速通過至少一個用於進行純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜。用於平衡至少一個包括可用於進行純化重組蛋白質之單元操作的樹脂之層析管柱或層析膜的之再生緩衝液的體積可為(例如)介於約 1X 管柱體積(CV)至約 15X CV 之間(例如，介於約 1X CV 至約 14X CV 之間，介於約 1X CV 至約 13X CV 之間，介於

約 1X CV 至約 12X CV 之間，介於約 1X CV 至約 11X CV 之間，介於約 2X CV 至約 11X CV 之間，介於約 3X CV 至約 11X CV 之間，介於約 2X CV 至約 5X CV 之間，介於約 2.5X CV 至約 7.5X CV 之間，介於約 4X CV 至約 11X CV 之間，介於約 5X CV 至約 11X CV 之間，或介於約 5X CV 至約 10X CV 之間)。重組蛋白質在至少一個用於進行純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜的溶析液中之濃度可為(例如)介於約 0.05 mg/mL 至約 100 mg/mL 之間重組蛋白質(例如，介於約 0.1 mg/mL 至約 90 mg/mL 之間，介於約 0.1 mg/mL 至約 80 mg/mL 之間，介於約 0.1 mg/mL 至約 70 mg/mL 之間，介於約 0.1 mg/mL 至約 60 mg/mL 之間，介於約 0.1 mg/mL 至約 50 mg/mL 之間，介於約 0.1 mg/mL 至約 40 mg/mL 之間，介於約 2.5 mg/mL 和約 7.5 mg/mL 之間，介於約 0.1 mg/mL 至約 30 mg/mL 之間，介於約 0.1 mg/mL 至約 20 mg/mL 之間，介於 0.5 mg/mL 至約 20 mg/mL 之間，介於約 0.1 mg/mL 至約 15 mg/mL 之間，介於約 0.5 mg/mL 至約 15 mg/mL 之間，介於約 0.1 mg/mL 至約 10 mg/mL 之間，或介於約 0.5 mg/mL 至約 10 mg/mL 之間重組蛋白質)。

至少一個可用於進行精緻純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜可包括可用於進行陽離子交換、陰離子交換、或分子篩層析之樹脂。如在該技術中可理解的，使用至少一個可用於進行精緻純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜來精緻純化重組蛋白質可包括(例如)裝載、驅趕(chasing)、和再生至少一個可用於進行精緻純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜的步驟。例如，當裝載、驅趕、和再生的步驟係用於進行精緻純化時，重組蛋白質不結合在至少一個用於進行精緻純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜中之樹脂，且重組蛋白質係在裝載和驅趕步驟中從至少一個層析管柱或層析膜溶析，及再生步驟係用於在包括重組蛋白質之額外流體可裝載到至少一個層析管柱或層析膜之前，從至少一個層析管柱或層析膜除去任何雜質。欲使用於各裝載、驅趕、和再生步驟之示例性流速和緩衝液體積係描述於下。

至少一個可用於進行精緻純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜之大小、形狀、和體積，及/或至少一個可用於進行精緻純化重組蛋白

質之單元操作的層析膜之大小和形狀可為本文所述的層析管柱或層析膜之示例性大小、形狀、和體積的任何組合。例如，至少一個可用於進行精緻純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜之大小可具有(例如)介於約 0.5 mL 至約 200 mL 之間(例如，介於約 0.5 mL 至約 180 mL 之間，介於約 0.5 mL 至約 160 mL 之間，介於約 0.5 mL 至約 140 mL 之間，介於約 0.5 mL 至約 120 mL 之間，介於約 0.5 mL 至約 100 mL 之間，介於約 0.5 mL 至約 80 mL 之間，介於約 0.5 mL 至約 60 mL 之間，介於約 0.5 mL 至約 40 mL 之間，介於約 5.0 mL 至約 40 mL 之間，介於約 0.5 mL 至約 30 mL 之間，介於約 5.0 mL 至約 30 mL 之間，介於約 0.5 mL 至約 25 mL 之間，介於約 0.2 mL 至約 10 mL 之間，或介於約 0.2 mL 至約 5 mL 之間)的體積。包括重組蛋白質的流體當其裝載到至少一個可用於進行精緻純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜時的流速可為(例如)介於約 0.1 mL/分鐘至約 25 mL/分鐘之間(例如，介於約 0.1 mL/分鐘至約 12.5 mL/分鐘之間，介於約 0.1 mL/分鐘至約 10.0 mL/分鐘之間，介於約 0.1 mL/分鐘至約 8.0 mL/分鐘之間，介於約 0.1 mL/分鐘至約 6 mL/分鐘之間，介於約 0.1 mL/分鐘至 4 mL/分鐘之間，介於約 0.1 mL/分鐘至約 3 mL/分鐘之間，介於約 2 mL/分鐘和約 6 mL/分鐘之間，介於約 0.1 mL/分鐘至約 2 mL/分鐘、或約 0.2 mL/分鐘至約 4 mL/分鐘)。包括重組蛋白質的流體裝載到至少一個可用於進行精緻純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜的總體積可為(例如)介於約 1.0 mL 至約 250 mL 之間(例如，介於約 1.0 mL 至約 225 mL 之間，介於約 1.0 mL 至約 200 mL 之間，介於約 1.0 mL 至約 175 mL 之間，介於約 1.0 mL 至約 150 mL 之間，介於約 100 mL 至約 125 mL 之間，介於約 100 mL 至約 150 mL 之間，介於約 1.0 mL 至約 150 mL 之間，介於約 1.0 mL 至約 125 mL 之間，介於約 1.0 mL 至約 100 mL 之間，介於約 1.0 mL 至約 75 mL 之間，介於約 1.0 mL 至約 50 mL 之間，或介於約 1.0 mL 至約 25 mL 之間)。在至少一個用以進行精緻純化之層析管柱或層析膜中的樹脂可為陰離子交換或陽離子交換樹脂。在至少一個用以進行精緻純化之層析管柱或層析膜中的樹脂可為陽離子交換樹脂(例如，Sartobind® Q 樹脂，Sartorius，Goettingen，德國)。

裝載步驟之後，進行驅趕步驟(例如，驅趕緩衝液係通過至少一個層析

膜或層析膜以收集實質上不結合於至少一個層析管柱或層析膜的重組蛋白質)。在此等實例中，驅趕緩衝液可以介於約 0.2 mL/分鐘至約 50 mL/分鐘之間(例如，介於約 1 mL/分鐘至約 40 mL/分鐘之間，介於約 1 mL/分鐘至約 30 mL/分鐘之間，介於約 5 mL/分鐘至約 45 mL/分鐘之間，介於約 10 mL/分鐘至約 40 mL/分鐘之間，介於約 0.2 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間，介於約 0.2 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 10 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL 分鐘和約 14 mL/分鐘之間，介於約 1.0 mL/分鐘和約 25.0 mL/分鐘之間，或介於約 1.0 mL/分鐘和約 15.0 mL/分鐘之間)的流速通過至少一個層析管柱或層析膜。所使用之驅趕緩衝液的體積可為(例如)介於約 1X 管柱體積(CV)至約 100X CV 之間(例如，介於約 1X CV 至約 90X CV 之間，介於約 1X CV 至約 80X CV 之間，介於約 1X CV 至約 70X CV 之間，介於約 1X CV 至約 60X CV 之間，介於約 1X 至約 50X CV 之間，介於約 1X CV 至約 40X CV 之間，介於約 1X CV 至約 30X CV 之間，介於約 1X CV 至約 20X CV 之間，介於約 1X CV 至約 15X CV 之間，介於約 5X CV 至約 20X CV 之間，介於約 5 X CV 至約 30X CV 之間，介於約 1X CV 至約 14X CV，約 1X CV 至約 13X CV，約 1X CV 至約 12X CV，約 1X CV 至約 11X CV，約 2X CV 至約 11X CV，約 3X CV 至約 11X CV，約 4X CV 至約 11X CV，約 2.5X CV 至約 5.0X CV，約 5X CV 至約 11X CV、或約 5X CV 至約 10X CV 之間)。驅趕的總時間可為(例如)介於約 1 分鐘至約 3 小時之間(例如，介於約 1 分鐘至約 2.5 小時之間，介於約 1 分鐘至約 2.0 小時之間，介於約 1 分鐘至約 1.5 小時之間，介於約 2 分鐘至約 1.5 小時之間，介於約 1 分鐘至約 1.25 小時之間，介於約 2 分鐘至約 1.25 小時之間，介於約 1 分鐘至約 5 分鐘之間，介於約 1 分鐘至約 10 分鐘之間，介於約 2 分鐘至約 4 分鐘之間，介於約 30 分鐘至約 1 小時之間，介於約 2 分鐘至約 10 分鐘之間，介於約 2 分鐘至約 15 分鐘之間，或介於約 2 分鐘至約 30 分鐘之間)。在裝載步驟和驅趕步驟中存在於通過管柱之溶析液中的重組蛋白質之合併濃度可為(例如)介於約 0.1 mg/mL 至約 100 mg/mL 之間重組蛋白質(例如，介於約 0.1 mg/mL 至約 90 mg/mL 之間，介於約 0.1 mg/mL 至約 80 mg/mL

之間，介於約 0.1 mg/mL 至約 70 mg/mL 之間，介於約 0.1 mg/mL 至約 60 mg/mL 之間，介於約 0.1 mg/mL 至約 50 mg/mL 之間，介於約 0.1 mg/mL 至約 40 mg/mL 之間，介於約 2.5 mg/mL 和約 7.5 mg/mL 之間，介於約 0.1 mg/mL 至約 30 mg/mL 之間，介於約 0.1 mg/mL 至約 20 mg/mL 之間，介於 0.5 mg/mL 至約 20 mg/mL 之間，介於約 0.1 mg/mL 至約 15 mg/mL 之間，介於約 0.5 mg/mL 至約 15 mg/mL 之間，介於約 0.1 mg/mL 至約 10 mg/mL 之間，介於約 0.5 mg/mL 至約 10 mg/mL 之間，或介於約 1 mg/mL 和約 5 mg/mL 之間重組蛋白質)。

驅趕步驟之後及下一體積的包括重組蛋白質的流體可裝載到至少一個可用於進行精緻純化之單元操作的層析管柱或層析膜之前，至少一個層析管柱或層析膜必須使用再生緩衝液再生。再生緩衝液可以(例如)介於約 0.2 mL/分鐘至約 50 mL/分鐘之間(例如，介於約 1 mL/分鐘至約 40 mL/分鐘之間，介於約 1 mL/分鐘至約 30 mL/分鐘之間，介於約 5 mL/分鐘至約 45 mL/分鐘之間，介於約 10 mL/分鐘至約 40 mL/分鐘之間，介於約 0.2 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 20 mL/分鐘之間，介於約 0.2 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL/分鐘至約 10 mL/分鐘之間，介於約 0.5 mL 分鐘和約 14 mL/分鐘之間，介於約 1.0 mL/分鐘和約 25.0 mL/分鐘之間，或介於約 1.0 mL/分鐘和約 15.0 mL/分鐘之間)的流速通過至少一個可用於進行精緻純化重組蛋白質之單元操作的層析管柱或層析膜。用於再生至少一個可用於進行精緻純化之單元操作的層析管柱或層析膜之再生緩衝液的體積可為(例如)介於約 1X 管柱體積(CV)至約 500X CV 之間(例如，介於約 1X CV 至約 450X CV 之間，介於約 1X CV 至約 400X CV 之間，介於約 1X CV 至約 350X CV 之間，介於約 1X CV 至約 300X CV 之間，介於約 1X CV 至約 250X CV 之間，介於約 1X CV 至約 200X CV 之間，介於約 1X CV 至約 150X CV 之間，介於約 1X CV 至約 100 X CV 之間，介於約 1X CV 至約 90X CV 之間，介於約 1X CV 至約 80X CV 之間，介於約 1X CV 至約 70X CV 之間，介於約 1X CV 至約 60X CV 之間，介於約 1X 至約 50X CV 之間，介於約 1X CV 至約 40X CV 之間，介於約 1X CV 至約 30X CV 之間，介於約 1X CV 至約

20X CV 之間，介於約 1X CV 至約 15X CV 之間，介於約 5X CV 至約 20X CV 之間，介於約 5 X CV 至約 30X CV 之間，介於約 1X CV 至約 14X CV，約 1X CV 至約 13X CV，約 1X CV 至約 12X CV，約 1X CV 至約 11X CV，約 2X CV 至約 11X CV，約 3X CV 至約 11X CV，約 4X CV 至約 11X CV，約 2.5X CV 至約 5.0X CV，約 5X CV 至約 11X CV、或約 5X CV 至約 10X CV 之間)。

在其它實例中，一或多種用於進行精緻純化之單元操作的層析管柱及/或層析膜包括選擇性結合或保留包括重組蛋白質的流體中所存在的雜質之樹脂而不是再生一或多種管柱及/或膜，一旦在一或多個管柱及/或膜中之樹脂的結合能力已達成或實質上接近達成，則以一或多個管柱及/或膜更換(例如，以實質上相似的管柱及/或膜更換)。

在此等本文所述方法的一些實例中，MCCS2 包括一種包括三個層析管柱和一個層析膜(例如)之 PCCS，其中在 PCCS 中之三個層析管柱進行純化重組蛋白質之單元操作(例如，使用至少一個可用於進行純化蛋白質之單元操作的層析管柱)和在 PCCS 中之層析膜進行精緻純化重組蛋白質之單元操作。在此等實例中，在用於進行精緻純化治療性蛋白質之單元操作的 PCCS 中之層析膜可為任何本文所述的可用於進行精緻純化重組蛋白質之單元操作的示例性層析膜。任何本文所述的管柱切換方法可用於確定在此實例中 PCCS 中的前三個層析管柱和層析膜何時可以切換。

此實例之一些具體實例可另外包括在溶析液饋送至 PCCS 中的層析膜之前調整來自 PCCS 中之三個層析管柱的溶析液之離子濃度及/或 pH 的步驟。如本文所述，來自 PCCS 中之三個層析管柱的溶析液之離子濃度及/或可藉由將緩衝液加至 PCCS 中之三個層析管柱的溶析液(例如，透過使用在線緩衝液調整儲存器)調整(在此實例中在其饋送至 PCCS 中之層析膜 PCCS 之前)。緩衝液可以(例如)介於約 0.1 mL/分鐘至約 15 mL/分鐘之間(例如，介於約 0.1 mL/分鐘至約 12.5 mL/分鐘之間，介於約 0.1 mL/分鐘至約 10.0 mL/分鐘之間，介於約 0.1 mL/分鐘至約 8.0 mL/分鐘之間，介於約 0.1 mL/分鐘至約 6 mL/分鐘之間，介於約 0.1 mL/分鐘至 4 mL/分鐘之間，或介於約 0.5 mL/分鐘至約 5 mL/分鐘之間)的流速加至溶析液。

此等實例可另外包括在將溶析液饋送至層析膜(可用於進行精緻純化重組蛋白質之單元操作的層析膜)之前，保存或儲存來自在此實例中的 PCCS 中之三個層析管柱的溶析液之步驟。如本文所述，此保存或儲存步驟可使用任何本文所述的儲存器 (例如，備用槽)進行。

此等實例也可包括過濾來自在示例性 PCCS 系統中之層析膜的溶析液(可用於進行精緻純化重組蛋白質之單元操作的層析膜之溶析液)的步驟。任何本文所述的用於過濾之示例性過濾器或方法可用於過濾來自在示例性 PCCS 中之層析膜的溶析液(可用於進行精緻純化重組蛋白質之單元操作的層析膜之溶析液)。

如熟習該項技術者可理解的，純化重組蛋白質可使用任何本文所述方法而週期性地從 MCCS 或 MCCS2 溶析。例如，任何本文所述方法可以(例如)介於約 1 分鐘和約 6 小時之間(例如，介於約 1 分鐘和約 5 小時之間，介於約 1 分鐘和約 4 小時之間，介於約 1 分鐘和約 3 小時之間，介於約 1 分鐘和 2 小時之間，介於約 1 分鐘和 1 小時之間，或介於約 1 分鐘和 30 分鐘之間)的頻率溶析純化重組蛋白質經(例如)介於約 30 秒和約 5 小時之間(例如，介於約 1 分鐘和約 4 小時之間，介於約 1 分鐘和約 3 小時之間，介於約 1 分鐘和約 2 小時之間，介於約 1 分鐘或約 1.5 小時之間，介於約 1 分鐘和約 1 小時之間，或介於約 1 分鐘和約 30 分鐘之間)的持續時間，取決於(例如) MCCS 或 MCCS1 和 MCCS2 中所使用之層析管柱及/或層析膜。

培養方法

一些本文所述方法另外包括在包括液體培養基的生物反應器(例如，灌注或分批補料生物反應器)中培養分泌重組蛋白質之細胞(例如，哺乳動物細胞)的步驟，其中實質上不含細胞(例如，哺乳動物細胞)之液體培養基的體積係從生物反應器(例如，灌注生物反應器)連續地或週期性地移除並饋送至 MCCS 或 MCCS1，生物反應器可具有(例如)介於約 1 L 至約 10,000 L 之間(例如，介於約 1 L 至約 50 L 之間，介於約 50 L 至約 500 L 之間，介於約 500 L 至約 1000 L 之間，介於 500 L 至約 5000L 之間，介於約 500 L 至約 10,000 L 之間，介於約 5000 L 至約 10,000 L 之間，介於約 1 L 和約 10,000 L 之間，

介於約 1L 和約 8,000 L 之間，介於約 1 L 和約 6,000 L 之間，介於約 1 L 和約 5,000 L 之間，介於約 100 L 和約 5,000 L 之間，介於約 10 L 和約 100 L 之間，介於約 10 L 和約 4,000 L 之間，介於約 10 L 和約 3,000 L 之間，介於約 10 L 和約 2,000 L 之間，或介於約 10 L 和約 1,000 L 之間)的體積。存在於生物反應器中之液體培養基的量可為(例如)介於約 0.5 L 至約 5,000 L 之間(例如，介於約 0.5 L 至約 25 L 之間，介於約 25 L 至約 250 L 之間，介於約 250 L 至約 500 L 之間，介於 250 L 至約 2500 L 之間，介於約 250 L 至約 5,000 L 之間，介於約 2500 L 至約 5,000 L 之間，介於約 0.5 L 和約 5,000 L 之間，介於約 0.5 L 和約 4,000 L 之間，介於約 0.5 L 和約 3,000 L 之間，介於約 0.5 L 和約 2,500 L 之間，介於約 50 L 和約 2,500 L 之間，介於約 5 L 和約 50 L 之間，介於約 5 L 和約 2,000 L 之間，介於約 5 L 和約 1,500 L 之間，介於約 5 L 和約 1,000 L 之間，或介於約 5 L 和約 500 L 之間)。培養細胞可(例如)使用分批補料生物反應器或灌注生物反應器進行。培養細胞(例如，培養哺乳動物細胞)之非限制例和不同態樣係描述於下且以任何組合使用。

細胞

本文所述的一些方法中所培養的細胞可為細菌(例如，革蘭氏陰性細菌)、酵母(例如，啤酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)、巴斯德畢赤酵母(*Pichia pastoris*)、多形漢遜酵母(*Hansenula polymorpha*)、乳酸克魯維酵母菌(*Kluyveromyces lactis*)、粟酒裂殖酵母菌(*Schizosaccharomyces pombe*)、耶氏解脂酵母(*Yarrowia lipolytica*)或 *Arxula adeninivorans*)、或哺乳動物細胞。哺乳動物細胞可為生長在懸浮液中的細胞或黏附細胞。可在任何本文所述方法中可培養之哺乳動物細胞的非限制例者包括：中國倉鼠卵巢(CHO)細胞(例如，CHO DG44 細胞或 CHO-K1s 細胞)、Sp2.0、骨髓瘤細胞(例如，NS/O)、B-細胞、融合瘤細胞、T-細胞、人胚腎(HEK)細胞(例如，HEK 293E 和 HEK 293F)、非洲綠猴腎上皮細胞(Vero)細胞、和 Madin-Darby 犬(Cocker Spaniel)腎上皮細胞(MDCK)細胞。在一些其中培養黏附細胞的實例中，培養物也可包括多種微載體(例如，包括一或多種孔之微載體)。可在任何本文所述方法

中培養之額外哺乳動物細胞在該項技術中為已知的。

哺乳動物細胞可包括編碼重組蛋白質(例如，重組蛋白質)之重組核酸(例如，穩定地整合於哺乳動物細胞的基因組之核酸)。編碼示例性重組蛋白質之重組核酸的非限制例係描述於下，如使用本文所述方法製造之重組蛋白質。在一些情況下，生物反應器(例如，任何本文所述的生物反應器)中所培養之哺乳動物細胞係源自較大培養物。

編碼重組蛋白質之核酸可使用分子生物學和分子遺傳學中已知的各種方法引入哺乳動物細胞中。非限制例包括轉染(例如，脂質體轉染)、轉導(例如，慢病毒、腺病毒、或反轉錄病毒感染)、和電穿孔。在一些情況下，編碼重組蛋白質之核酸不穩定地整合於哺乳動物細胞之染色體中(瞬時轉染)，而在其他核酸中被整合。可替代地或此外，編碼重組蛋白質之核酸可存在於質體及/或哺乳動物人造染色體(例如，人類人造染色體)中。可替代地或此外，使用病毒載體(例如，慢病毒、反轉錄病毒、或腺病毒載體)可將核酸引入細胞。核酸可被操作性連接至啟動子序列(例如，強啟動子，諸如 β -肌動蛋白啟動子和 CMV 啟動子、或誘導性啟動子)。如果需要的話，包括核酸之載體也可包括可篩選標記(例如，將潮黴素、嘌呤黴素或新黴素抗性賦予哺乳動物細胞之基因)。

在一些情況下，重組蛋白質為分泌蛋白質且由哺乳動物細胞釋放至細胞外培養基(例如，第一及/或第二液體培養基)。例如，編碼可溶性重組蛋白的核酸序列可包括編碼在重組蛋白質的 N-或 C-端之分泌信號肽序列，其由存在於哺乳動物細胞中之酶裂解，且隨後釋放至細胞外培養基(例如，第一及/或第二液體培養基)。

培養基

液體培養基在該項技術中為已知的。液體培養基(例如，第一及/或第二組織培養基)可補充哺乳動物血清(例如，胎牛血清和牛血清)，及/或生長激素或生長因子(例如，胰島素、運鐵蛋白、和表皮生長因子)。可替代地或此外，液體培養基(例如，第一及/或第二液體培養基)可為化學成分確定的液體培養基、無動物來源之成分的液體培養基、無血清的液體培養基、或含

有血清的液體培養基。化學成分確定的液體培養基、無動物來源之成分的液體培養基、無血清的液體培養基、和含有血清的液體培養基之非限制例為市售的。

液體培養基通常包括能量來源(例如，醣，諸如葡萄糖)、必需胺基酸(例如，二十種胺基酸加半胱胺酸之基本組)、維生素及/或其它所需之低濃度有機化合物、游離脂肪酸、及/或微量元素。如果需要的話，液體培養基(例如，第一及/或第二液體培養基)可補充(例如)哺乳動物激素或生長因子(例如，胰島素、運鐵蛋白、或表皮生長因子)、鹽和緩衝液(例如，鈣、鎂、和磷酸鹽)、核苷和鹼(例如，腺苷、胸苷、和次黃嘌呤)、蛋白質和組織水解物、及/或此等添加劑的任何組合。

在任何本文所述方法中可用於培養細胞(例如，哺乳動物細胞)的各種不同液體培養基在該項技術中為已知的。也可用於本發明方法之培養基成分包括(但不限於)化學成分確定的(CD)水解物(例如)CD 蛋白腴、CD 多肽(二或多種個胺基酸)、和 CD 生長因子。液體組織培養基和培養基成分的另外實例在該項技術中為已知的。

熟練的從業者將理解本文所述的第一液體培養基和第二液體培養基可為相同類型之培養基或不同培養基。

示例性生物反應器之額外特徵

任何本文所述的生物反應器之內表面可具有至少一種塗層(例如，至少一種明膠、膠原蛋白、聚-L-鳥胺酸、聚苯乙烯、和層連結蛋白之塗層)、和如該項技術中已知的，一或多種用於 O_2 、 CO_2 、和 N_2 噴射至液體培養基中之端口、和用於攪拌液體培養基之攪拌機制。生物反應器可在經控制之濕化氛圍(例如，於大於 20%、或 30%、或 40%、或 50%、或 60%、或 70%、或 75%、或 80%、或 85%、或 90%、或 95% 的濕度、或 100% 的濕度)下培養細胞培養物。生物反應器也可配備能夠從生物反應器移除某體積的液體培養基之機械裝置且視需要地，在從生物反應器轉移出液體培養基之方法期間從液體培養基移除之細胞機械裝置內的過濾器(例如，美國臨時專利申請案序號 61/878,502 中所描述之 ATF 系統或細胞過濾系統)。

溫度

培養哺乳動物細胞的步驟可在約 31 °C 至約 40 °C 之溫度下進行。熟練的從業者將理解溫度可在培養步驟期間於特定時間點(例如)以每小時或每天為基礎改變。例如，溫度可於該生物反應器以細胞(例如，哺乳動物細胞)初始接種之後約一天、二天、或三天、或四天、或五天、或六天、或七天、或八天、或九天、或十天、或十一天、或十二天、或十四天、或十五天、或十六天、或十七天、或十八天、或十九天、或約二十天或多天改變或偏移(例如，增加或減少)。例如，溫度可為向上偏移(例如，改變最多或約 0.1、或 0.2、或 0.3、或 0.4、或 0.5、或 0.6、或 0.7、或 0.8、或 0.9、或 1.0、或 1.5、或 2.0、或 2.5、或 3.0、或 3.5、或 4.0、或 4.5、或 5.0、或 5.5、或 6.0、或 6.5、或 7.0、或 7.5、或 8.0、或 8.5、或 9.0、或 9.5、或 10、或 11、或 12、或 13、或 14、或 15、或 16、或 17、或 18、或 19、或最多或約 20 °C)。例如，溫度可向下偏移(例如，改變最多或約 0.1、或 0.2、或 0.3、或 0.4、或 0.5、或 0.6、或 0.7、或 0.8、或 0.9、或 1.0、或 1.5、或 2.0、或 2.5、或 3.0、或 3.5、或 4.0、或 4.5、或 5.0、或 5.5、或 6.0、或 6.5、或 7.0、或 7.5、或 8.0、或 8.5、或 9.0、或 9.5、或 10、或 11、或 12、或 13、或 14、或 15、或 16、或 17、或 18、或 19、或最多或約 20 °C)。

CO₂

本文所述的培養步驟可另外包括將生物反應器中之液體培養基曝露於包括最多或約 15% CO₂(例如，最多或約 14% CO₂、12% CO₂、10% CO₂、8% CO₂、6% CO₂、5% CO₂、4% CO₂、3% CO₂、2% CO₂、或最多或約 1% CO₂)之氛圍。

灌注生物反應器

本文所述的培養步驟可使用灌注生物反應器進行。在灌注生物反應器中培養細胞(例如，哺乳動物細胞)包括從第一體積之第一液體培養基(例如，包括任何濃度的哺乳動物細胞，例如第一體積之實質上不含細胞的第一液

體培養基)的生物反應器移除，及將第二體積之第二液體培養基添加至第一液體培養基。移除和添加可同時或順序地、或該二者之組合進行。另外，移除和添加可連續地進行(例如，以移除和替換生物反應器的體積或第一液體培養基體積的介於 0.1%至 800%之間(例如，介於 1%和 700%之間，介於 1%和 600%之間，介於 1%和 500%之間，介於 1%和 400%之間，介於 1%和 350%之間，介於 1%和 300%之間，介於 1%和 250%之間，介於 1%和 100%之間，介於 100%和 200%之間，介於 5%和 150%之間，介於 10%和 50%之間，介於 15%和 40%之間，介於 8%和 80%之間，或介於 4%和 30%之間)的體積之速率經任何給定時間時段(例如，經 24 小時時段，經約 1 小時的增量時段至約 24 小時、或經大於 24 小時的增量時間)或週期性地(例如，每隔三天一次、每隔一天一次、每天一次、每天二次、每天三次、每天四次、或每天五次)、或其任何組合。在週期性地進行之情形，移除或替換的體積(例如，在約 24-小時時段內，約 1 小時至約 24 小時之增量時段內，或在大於 24 小時之增量時段內)可為(例如)生物反應器的體積或第一液體培養基體積的介於 0.1%至 800%之間(例如，介於 1%和 700%之間，介於 1%和 600%之間，介於 1%和 500%之間，介於 1%和 400%之間，介於 1%和 300%之間，介於 1%和 200%之間，介於 1%和 100%之間，介於 100%和 200%之間，介於 5%和 150%之間，介於 10%和 50%之間，介於 15%和 40%之間，介於 8%和 80%之間，或介於 4%和 30%之間)。所移除之第一液體培養基的第一體積和所添加之第二液體培養基的第二體積在某些情況下經過每 24 小時時段保持大約相同。如該項技術中已知的，移除第一液體培養基之第一體積的速率(體積/時間單位)和添加第二液體培養基之第二體積的速率(體積/時間單位)可改變。移除第一液體培養基之第一體積的速率(體積/時間單位)和添加第二液體培養基之第二體積的速率(體積/時間單位)可為約相同或可為不同。

或者，在培養時段內移除和添加之體積可改變(例如，逐漸增加)經過每 24-小時時段(或可替代地，介於 1 小時和約 24 小時之間的增量時段或大於 24 小時的增量時段)。例如在每 24-小時時段內(或可替代地，介於約 1 小時和約 24 小時之間的增量時段或大於 24 小時的增量時段)所移除之第一液體

培養基的體積和所添加之第二液體培養基的體積在培養時段內可從生物反應器體積或第一液體培養基體積的介於 0.5%至約 20%之間的體積增加(例如，逐漸或透過交錯增量)至生物反應器體積或第一液體培養基體積的約 25%至約 150%。

熟練的從業者將理解第一液體培養基和第二液體培養基可為相同類型之培養基。在其他情況下，第一液體培養基和第二液體培養基可為不同。

例如，藉由可從生物反應器移除第一液體培養基之第一體積的機械系統可移除第一液體培養基之第一體積(例如，來自生物反應器之實質上無細胞的第一液體培養基之第一體積)。可替代地或此外，藉由第一液體培養基之第一體積通過具有排除細胞(例如，哺乳動物細胞)之分子量截留的無菌膜之滲出或重力流動可移除第一液體培養基之第一體積。

第二液體培養基之第二體積可(例如)藉由灌注泵以自動方式加至第一液體培養基。

在一些情況下，移除第一液體培養基之第一體積(例如，實質上無哺乳動物細胞的第一液體培養基之第一體積)及第二液體培養基之第二體積添加至第一液體培養基不會在生物反應器接種哺乳動物細胞之至少 1 小時內(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 96 小時之後)發生。

分批補料生物反應器

本文所述之培養步驟可使用分批補料生物反應器進行。在分批補料生物反應器中培養細胞在大部分培養期包括第二液體培養基之第二體積添加至第一液體培養基(例如，時段或連續添加)。第二液體培養基之添加可連續地進行，例如，以添加生物反應器的體積或第一液體培養基體積之介於 0.1%至 300%之間(例如，介於 1%和 250%之間，介於 1%和 100%之間，介於 100%和 200%之間，介於 5%和 150%之間，介於 10%和 50%之間，介於 15%和 40%之間，介於 8%和 80%之間，或介於 4%和 30%之間)的體積經過任何所

給定之時段(例如，經過 24-小時時段，經過約 1 小時至約 24 小時的增量時段、或經過大於 24 小時的增量時段))或週期性地(例如，每隔三天一次、每隔一天一次、每天一次、每天二次、每天三次、每天四次、或每天五次)、或其任何組合之速率。在週期性地進行之情況中，添加之體積(例如，在約 24-小時時段內，在約 1 小時至約 24 小時的增量時段內，或在大於 24 小時的增量時段內)可為(例如)生物反應器的體積或第一液體培養基體積的介於 0.1%至 300%之間(例如，介於 1%和 200%之間，介於 1%和 100%之間，介於 100%和 200%之間，介於 5%和 150%之間，介於 10%和 50%之間，介於 15%和 40%之間，介於 8%和 80%之間，或介於 4%和 30%之間)。在整個或部分培養時段內所添加的第二液體培養基之第二體積在一些情況下經過每 24-小時時段(或可替代地，介於 1 小時和約 24 小時之間的增量時段或大於 24 小時的增量時段)可大致保持相同。如該項技術中已知的，在整個或部分的培養時段內，添加第二液體培養基之第二體積的速率(體積/時間單位)可改變。例如，在培養期間在每 24-小時時段內(或可替代地，介於 1 小時和約 24 小時之間的增量時段或大於 24 小時的增量時段)添加第二液體培養基之體積可改變(例如，逐漸增加)。例如在培養期間在每 24-小時時段內(或可替代地，介於約 1 小時和約 24 小時之間的增量時段或大於 24 小時的增量時段)所添加之第二液體培養基的體積可從生物反應器體積或第一液體培養基體積的介於 0.5%至約 20%之間的體積增加(例如，逐漸或透過交錯增量)至生物反應器體積或第一液體培養基體積的約 25%至約 150%。在整個或部分培養時段內添加第二液體培養基之第二體積的速率(體積/時間單位)大致保持相同。

熟練的從業者將理解第一液體培養基和第二液體培養基可為相同類型的培養基。在其他情況下，第一液體培養基和第二液體培養基可為不同。第二液體培養基之體積可(例如)藉由灌注泵以自動方式加至第一液體培養基。

在一些情況下，第二液體培養基之第二體積添加至第一液體培養基不會在生物反應器接種哺乳動物細胞之至少 1 小時內(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 96 小時之後)發生。分批補料培養物中之細胞培養基通常在培養時段結束時收穫並使用於任何本文所述方法中，然而，分批補料培養物之細胞培養基也可在培養時段期間內之一或多個時間點收穫並使用於任何本文所述方法中。

熟練的從業者將理解任何各種培養參數(例如，容器、體積、替代培養體積之速率或頻率、攪拌頻率、溫度、培養基、和 CO₂ 濃度)可以任何組合使用以進行此等方法。另外，任何本文所述或該項技術中已知的哺乳動物細胞可用於製造重組蛋白質。

示例性生物製造系統

可用於進行本文所述方法且包括 MCCS 或 MCCS1 和 MCCS2 之生物製造系統的實例係描述於美國臨時專利申請案序號 61/775,060 和 61/856,390(以引用方式納入)中。在此等示例性系統中，至少一個(例如，至少二、三、四、五、或六個)本文所提供的生物負荷量減少之填充層析管柱係存在於 MCCS 中或於 MCCS1 及/或 MCCS2 中。例如，整個系統可包括共計二、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、或二十個之本文所提供的生物負荷量減少之填充層析管柱。例如，MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2 可包括(或可各自包括)一、二、或三、或四、或五、或六、或七、或八、或九、或十個之本文所提供的生物負荷量減少之填充層析管柱。

例如，可用的系統可包括：包括入口之 MCCS1 和包括出口之 MCCS2，或包括入口和出口之 MCCS。在一些具體實例中，該 MCCS1 和 MCCS2 係彼此流體溝通。此等系統也可構造成使得流體可通進入口，通過 MCCS1 和 MCCS2、和透過出口退出製造系統。此等系統提供從液體培養基連續且具時效性地製造治療性藥物。例如，從將包括治療性蛋白質之流體(例如，液體培養基)饋送至 1MCCS1 及從 MCCS2 之出口溶析純化重組蛋白質(例如，治療性蛋白質藥物)之間的經過時間可為(例如)介於約 4 小時和約 48 小時之

間(含)。

一些示例性系統不包括中斷槽。在其他系統中，該系統在整個系統中可包括最多 1、或 2、或 3、或 4、或 5 個中斷槽(例如，其各中斷槽僅保存治療性蛋白質經(例如)介於約 5 分鐘和約 6 小時之間(含)的總時段)。中斷槽可具有介於 1 mL 和約 300 mL 之間(含)的容量。任何中斷槽配置在系統中使得進入中斷槽的流體在進入 MCCS1 或 MCCS 之前可分別具有 MCCS1 或 MCCS 之第一管柱的裝載體積之介於 1 mL 和約 100%之間(含)的容量。任何中斷槽配置在系統中使得進入中斷槽之流體在進入 MCCS2 之前(及退出 MCCS1 之後)可具有為(例如)MCCS2 之第一管柱的裝載體積之介於 1 mL 和約 100%(含)之間的容量。

額外示例性系統結構和特徵

MCCS 或 MCCS1 可包括流體通過(例如，實質上不含細胞之液體培養基)可分別通入 MCCS 或 MCCS1 之入口。入口可為該項技術中已知用於該等目的之任何結構。其可包括(例如)允許流體導管插入之螺紋、肋條、或封口，致使流體導管插進入口之後，流體將通過入口進入 MCCS 或 MCCS1 而無流體從入口顯著滲出。可使用於本系統中之非限制入口為已知的且將被熟習該項技術者所理解。

MCCS 或 MCCS1 可包括至少二種層析管柱，至少二種層析膜、或至少一種層析管柱和至少一個層析膜、和入口。MCCS 或 MCCS1 可為本文所述的任何示例性 MCCS，或具有(以任何組合)本文所述的 MCCS 之任何示例性特徵中的一或多者。MCCS 或 MCCS1 中所存在之層析管柱及/或層析膜可具有本文所述的任何示例性形狀、大小、體積(床體積)、及/或單元操作中的一或多者。

MCCS 或 MCCS1 中所存在之層析管柱及/或層析膜可包括任何本文所述或該項技術中已知的示例性樹脂中之一或多者。例如，MCCS 或 MCCS1 中所存在之層析管柱及/或層析膜中之一或多者中所包括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、受質-結合捕獲機制、輔因子-結合捕獲機制、適

配體-結合捕獲機制、及/或標籤-結合捕獲機制)之樹脂。MCCS 或 MCCS1 的層析管柱及/或層析膜中之一或多者中所包括的樹脂可為陽離子交換樹脂、陰離子交換樹脂、分子篩樹脂、或疏水性作用樹脂、或其任何組合。可用於純化重組蛋白質之樹脂的額外實例在該項技術中為已知的，且可包括在 MCCS 或 MCCS1 中所存在之層析管柱及/或層析膜中之一或多者中。MCCS 或 MCCS1 中所存在之層析管柱及/或層析膜可包括相同及/或不同的樹脂(例如，任何本文所述或該項技術中已知用於重組蛋白質純化的樹脂)。

MCCS 或 MCCS1 中所存在之二或多個層析管柱及/或層析樹脂可進行一或多種單元操作(例如，捕獲重組蛋白質、純化重組蛋白質、精緻純化重組蛋白質、使病毒滅活、調整包括重組蛋白質的流體的離子濃度及/或 pH、或過濾包括重組蛋白質的流體)。在非限制例中，MCCS 或 MCCS1 可進行從流體(例如，液體培養基)捕獲重組蛋白質和使包括重組蛋白質的流體中所存在之病毒滅活的單元操作。MCCS 或 MCCS1 可進行多種本文所述或該項技術中已知的單元操作之二者的組合。

MCCS 或 MCCS1 中所存在之層析管柱及/或層析膜可藉由切換機制(例如，管柱切換機制)而彼此相對連接或移動。MCCS 或 MCCS1 也可包括一或多個(例如，二、三、四、或五個)泵(例如，自動化，例如，自動化蠕動泵)。管柱切換事件可藉由對應於通過 MCCS 或 MCCS1 之流體(例如，輸入至及/或溶析自 MCCS 或 MCCS1 中的一或多個之層析管柱及/或層析膜)中的重組蛋白質之某水準、液體(例如，緩衝液)之特定體積、或特定經過時間的 UV 吸收率檢測重組蛋白質之水準的檢測觸發。管柱切換通常表示一種允許 MCCS 或 MCCS1 中的不同層析管柱及/或層析膜之至少二個(例如，MCCS1 或 MCCS2 中所存在之不同層析管柱及/或層析膜之二或多者)在至少部分的方法期間於實質上相同的時間經歷不同步驟(例如，平衡、裝載、溶析、或洗滌)之機制。

MCCS 或 MCCS1 可為週期性逆流層析系統(PCCS)。例如，其為 MCCS 或 MCCS1 之 PCCS(即，分別為 PCCS 或 PCCS1)可包括四個層析管柱，其中該前三個管柱進行從流體(例如，液體培養基)捕獲重組蛋白質之單元操作、和 PCCS 之第四個管柱進行使包括重組蛋白質的流體病毒滅活之單元操作。

其為 MCCS 或 MCCS1 之 PCCS 可利用管柱切換機制。PCC 系統可利用能夠運轉最多(例如)四、五、六、七、或八、或多個管柱之改良 ÄKTA 系統(GE Healthcare, Piscataway, NJ)。

MCCS 或 MCCS1 可配備：一或多個(例如，二、三、四、五、六、七、八、九、或十個) UV 監視器、一或多個(例如，二、三、四、五、六、七、八、九、或十個)閥、一或多個(例如，二、三、四、五、六、七、八、九、或十個)pH 計、及/或一或多個(例如，二、三、四、五、六、七、八、九、或十個)電導計。MCCS 或 MCCS1 也可配備利用檢測何發生管柱切換事件(例如，根據 UV 吸收、液體的體積、或經過時間)和產生管柱切換事件的軟體(例如，Unicorn-based software, GE Healthcare, Piscataway, NJ)之操作系統。

MCCS 或 MCCS1 可另外包括一或多個(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)在線緩衝液調整儲存器及/或緩衝液儲存器。在其它實例中，MCCS 或 MCCS1 可包括一或多個(例如，二、三、四、五、或六個)中斷槽，其可保存不能輕易通入 MCCS 或 MCCS1 中層析管柱及/或層析膜之一或多個的流體。本文所述的系統在 MCCS、MCCS1、及/或 MCCS2 中可包括一或多個中斷槽(例如，本文所述的中斷槽)。本文所述的系統之其他實例在 MCCS、MCCS1、或 MCCS2 中不包括中斷槽，或在整個系統中不包括中斷槽。本文所述的系統之其他實例在整個系統中包括最多一、二、三、四、或五個中斷槽(例如，本文所述的任何中斷槽)。

第二 MCCS

示例性系統中之第二 MCCS(MCCS2)包括至少二個層析管柱，至少二個層析膜、或至少一個層析管柱和至少一個層析膜、和出口。MCCS2 可為本文所述的任何示例性 MCCS、或可具有本文所述的 MCCS 之任何示例性特徵(於任何組合)中之一或多者。MCCS2 中所存在之層析管柱及/或層析膜可具有下列之一或多者：本文所述的任何形狀、大小、體積(床體積)、及/

或單元操作。層析管柱及/或層析膜可包括本文所述或該項技術中已知的任何示例性樹脂。例如，MCCS2 中所存在的層析管柱及/或層析膜之一或多者中所包括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、受質-結合捕獲機制、輔因子-結合捕獲機制、標籤-結合捕獲機制、及/或適配體-結合捕獲機制)的樹脂。可用的樹脂包括(例如)陽離子交換樹脂、陰離子交換樹脂、分子篩樹脂、和疏水性作用的樹脂。樹脂的額外實例在該項技術中為已知的。MCCS2 中所存在之層析管柱及/或層析膜可包括相同及/或不同的樹脂(例如，任何本文所述或該項技術中已知用於重組蛋白質純化的樹脂)。

MCCS2 中所存在之層析管柱及/或層析膜可進行一或多種單元操作(例如，本文所述的任何單元操作或本文所述的單元操作的任何組合)。在非限制例中，MCCS2 可進行從流體純化重組蛋白質和精緻純化包括重組蛋白質的流體中所存在之重組蛋白質的單元操作。在其他非限制例中，MCCS2 可進行純化存在於流體中之重組蛋白質、精緻純化存在於流體中之重組蛋白質、和過濾包括重組蛋白質的流體的單元操作。在另一實例中，MCCS2 可進行純化流體中所存在之重組蛋白質、精緻純化流體中所存在之重組蛋白質、過濾包括重組蛋白質的流體、及調整包括重組蛋白質的流體之離子濃度及/或 pH 的單元操作。MCCS2 可進行二或多種本文所述或該項技術中已知的單元操作之任何組合。

MCCS2 中所存在之層析管柱及/或層析膜可經由切換機制(例如，管柱切換機制)彼此相對地連接或移動。MCCS2 也可包括一或多個(例如，二、三、四、或五個)泵(例如，自動化，例如自動化蠕動泵)。管柱切換事件可藉由對應於通過 MCCS2 之流體中的重組蛋白質(例如，輸入至及/或溶析自 MCCS2 中的一或多個之層析管柱及/或層析膜)之某水準、液體(例如，緩衝液)之特定體積、或經過特定時間的 UV 吸光度檢測之重組蛋白質的水準之檢測觸發。

MCCS2 可為週期性逆流層析系統(即，PCCS2)。例如，PCCS2 可包括三個進行從流體純化重組蛋白質之單元操作的管柱、和進行精緻純化存在於流體中之重組蛋白質的單元操作之層析膜。例如，進行從流體純化重組

蛋白質之單元操作的三個管柱可包括(例如)陽離子交換樹脂，和進行精緻純化之單元操作的層析膜可包括陽離子交換樹脂。PCCS2 可利用管柱切換機制。PCCS2 可利用改良過的 ÄKTA 系統(GE Healthcare, Piscataway, NJ) 能夠運轉最多(例如)四、五、六、七、或八個管柱、或更多。

MCCS2 可配備：一或多個(例如，二、三、四、五、六、七、八、九、或十個) UV 監視器、一或多個(例如，二、三、四、五、六、七、八、九、或十個)閥、一或多個(例如，二、三、四、五、六、七、八、九、或十個) pH 計，及/或一或多個(例如，二、三、四、五、六、七、八、九、或十個)電導計。MCCS 也可配備利用檢測何發生管柱切換事件(例如，根據 UV 吸收、液體的體積、或經過時間)和產生管柱切換事件的軟體(例如，Unicorn-based software，GE Healthcare，Piscataway，NJ)之操作系統。

MCCS2 可另外包括一或多個(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)在線緩衝液調整儲存器及/或緩衝液儲存器。在其他實例中，MCCS2 可包括一或多個(例如，二、三、四、五、或六個)可保存不能容易通入 MCCS2 中之一或多個層析管柱及/或層析膜的流體之中斷槽(例如，任何本文所述的中斷槽)。

MCCS2 包括治療性蛋白質藥物可藉其退出系統之出口。出口可包括(例如)允許流體導管插入之螺紋、肋條、或封口或設計成保存或儲存純化重組蛋白質(例如，治療性蛋白質藥物)之小瓶。出口可包括可用於密封在出口上的生物負荷量減少之小瓶或其他儲存容器的表面，以使純化重組蛋白質(例如，治療性蛋白質藥物)直接流入生物負荷量減少之小瓶或儲存容器。可使用於本系統中之非限制出口為已知的且將被熟習該項技術者所理解。

本文所述的系統也可包括配置在 MCCS1 和 MCCS2 之間的流體導管。任何本文所述的流體導管可為(例如)由(例如)聚乙烯、聚碳酸酯、或塑料製造之管。配置在 MCCS1 和 MCCS2 之間的流體導管可另外包括下列於任何組合的多者之一者：一或多個在線緩衝液調整儲存器，其與流體導管流體溝通且位置在使儲存在於在線緩衝液調整儲存器內的緩衝液係加至流體導管中所存在之流體；中斷槽(例如，任何本文所述的中斷槽)，其與流體導管

流體溝通且位置在使其可保存無法容易地饋入 MCCS2 的任何流體導管中所存在之過量流體；及一或多種過濾器，其配置在流體導管中以使彼等能夠過濾(例如，移除細菌)流體導管中所存在之流體。任何在線緩衝液調整儲存器可包括(例如)緩衝液的介於約 0.5 L 至 50 L 之間的體積(例如，在或低於 25 °C，15 °C、或 10 °C 之溫度下)。

本文所述的系統可視需要地包括配置在介於 MCCS2 中的最終層析管柱或層析膜和出口之間的流體導管。本文所述的系統可另外包括一或多個與配置在介於 MCCS2 中的最終層析管柱或層析膜和出口之間的流體導管流體連接之過濾器，使得過濾器可從配置在介於 MCCS2 中的最終層析管柱或層析膜和出口之間的流體導管中所存在之流體移除(例如)沈澱材料、微粒物質、或細菌。

本文所提供之系統的一些實例也包括一種與 MCCS 或 MCCS1 的入口流體連通的生物反應器。本文所述或該項技術中已知的任何示例性生物反應器可使用於本系統中。

本文所提供之系統的一些實例也包括泵系統。泵系統可包括一或多種以下所列者：一或多個(例如，二、三、四、五、六、七、八、九、或十個)泵(例如，任何本文所述或該項技術中已知的泵)、一或多個(例如，二、三、四、或五個)過濾器(例如，任何本文所述或該項技術中已知的過濾器)、一或多個(例如，二、三、四、五、六、七、八、九、或十個)UV 檢測器、和一或多個(例如，二、三、四、或五個)中斷槽(例如，任何本文所述的斷槽)。本文所提供之系統的一些實例另外包括配置在 MCCS 或 MCCS1 的泵和入口之間的流體導管(例如，任何本文所述或該項技術中已知的示例性流體導管)。在一些實例中，此特殊流體導管可包括一或多個(例如，二、三、或四個)泵(例如，任何本文所述或該項技術中已知的泵)及/或一或多個(例如，二、三、或四個)中斷槽(例如，任何本文所述的示例性中斷槽)，其中此泵及/或中斷槽係與流體導管中所存在之流體流體上連接。

本文所述系統的一些實例另外包括連接至在泵和入口之間的流體導管的另一流體導管，其中另一流體導管之一端流體上連接至生物反應器和另一端流體上連接至在泵和入口之間的流體導管。此另一流體導管可包括能

夠從自生物反應器移出之液體培養基移除細胞的過濾器(例如，ATF 細胞保留系統)。

本文所提供之系統允許連續製造純化重組蛋白質(例如，治療性蛋白質藥物)。如該項技術中已知的，系統可提供純化重組蛋白質(例如，治療性蛋白質藥物)之週期性溶析。本文所述的系統經過至少約 5 天，至少約 10 天，至少約 15 天，至少約 20 天，至少約 25 天，至少約 30 天，至少約 40 天，至少約 50 天，至少約 60 天，至少約 70 天，至少約 80 天，至少約 90 天、或至少約 100 天的連續期間也可產生至少約 5 g/天，至少約 10 g/天，至少約 15 g/天，至少約 20 g/天，至少約 30 g/天、或至少約 40 g/天之淨產量之純化重組蛋白質(例如，治療性蛋白質藥物)。

減少包括使用實質上乾層析樹脂之層析樹脂的生物負荷量之方法

本文所提供者亦為減少層析樹脂的生物負荷量之方法，其包括(a)將包含實質上乾層析樹脂的容器曝露於足以減少容器和層析樹脂之生物負荷量的 γ -射線之劑量。此等方法的一些具體實例另外包括在步驟(a)之前乾燥層析樹脂以從層析樹脂移除液體。層析樹脂之乾燥可使用熱處理(例如，烘箱)或乾燥器進行。用於乾燥層析樹脂之額外方法在該項技術中為已知的。

本文所述的 γ -射線之任何條件和劑量可使用於此等方法中。例如， γ -射線之劑量可介於約 15 kGy 至約 45 kGy 之間(例如，介於約 20 kGy 至約 30 kGy 之間)。任何本文所述的容器和層析樹脂可使用於此等方法中。例如，容器可為儲存容器或層析管柱。在此等方法中層析樹脂可包括蛋白質配位體(例如，蛋白質 A 或蛋白質 G)。在一些實例中，該層析樹脂可包括陰離子交換層析樹脂(例如，包括 N-苯甲基-N-甲基-乙醇胺基團之層析樹脂)。在一些實例中，該層析樹脂係共價連接至物件(例如，晶片、膜、或片匣)之表面。在一些具體實例中，該實質上乾層析樹脂不含顯著量的抗氧化劑或顯著量的螯合劑。所提供者亦為藉由任何本文所述方法製造的生物負荷量減少之層析樹脂。

在一些實例中，所製造的生物負荷量減少之層析樹脂具有介於約 1×10^{-8} 至約 1×10^{-5} 之間的滅菌保證水準(SAL)(例如，介於約 1×10^{-7} 至約 $1 \times$

10^{-6} 之間的 SAL)。所製造的減少層析樹脂可包括至少一種選自由下列所組成群組之樹脂：陰離子交換層析樹脂、陽離子交換層析樹脂、親和性層析樹脂、疏水性作用層析樹脂、和粒徑篩析層析樹脂。在一些實例中，所製造的減少層析樹脂包括包含蛋白質配位體(例如，蛋白質 A)之親和性層析樹脂。在一些實例中，所製造的減少層析樹脂包括陰離子交換層析樹脂(例如，包括 N-苯甲基-N-甲基-乙醇胺基團之陰離子交換層析樹脂)。所提供者亦為一種製造生物負荷量減少之填充層析管柱之方法，其包括提供藉由任何本文所述方法製造的生物負荷量減少之層析樹脂；及在無菌環境中將層析樹脂填充於生物負荷量減少之管柱中。所提供者亦為藉由任何本文所述方法製造的生物負荷量減少之填充層析管柱。

所提供者亦為用於生物負荷量減少地製造純化重組蛋白質之整合、封閉和連續方法，其包括：整合(a)提供一種包含重組蛋白質之實質上無細胞的液體培養基；及(b)將液體培養基連續饋送至包含至少一個藉由任何本文所提供之方法製造的生物負荷量減少之填充層析管柱的多管柱層析系統(MCCS)；其中該方法利用生物負荷量減少之緩衝液，整合，及從液體培養基連續地運行至來自 MCCS 之純化重組蛋白質的溶析液。

所提供者亦為用於生物負荷量減少地製造純化重組蛋白質之整合、封閉和連續方法，其包括：整合(a)提供包含重組蛋白質之實質上無細胞的液體培養基；(b)將液體培養基連續饋送至第一多管柱層析系統(MCCS1)；(c)使用 MCCS1 捕獲在液體培養基中之重組蛋白質；(d)從包含該重組蛋白質之 MCCS1 製造溶析液及將該溶析液連續地饋送至第二多管柱層析系統(MCCS2)；(e)將來自該溶析液的重組蛋白質連續地饋送至 MCCS2 並接著溶析重組蛋白質從而產生純化重組蛋白質，其中：該方法利用生物負荷量減少之緩衝液，及從液體培養基連續地運行至該純化重組蛋白質，及至少一個在 MCCS1 及/或 MCCS2 中之管柱含有藉由任何本文所提供之方法製造的生物負荷量減少之填充層析管柱。任何本文所述的用於生物負荷量減少地製造純化重組蛋白質之整合、封閉和連續方法的示例性態樣可使用於此等方法中。

製造生物負荷量減少之膜、樹脂、塗層材料、晶片、和片匣的方法

本文所提供的亦為製造生物負荷量減少之膜、樹脂、塗層材料、晶片、和片匣的方法，其包括：將一種包括膜、樹脂、塗層材料、晶片、和片匣(例如，以纖維素-、洋菜糖-、或糖為主之膜、樹脂、塗層材料、晶片、和片匣)的組成物；及至少一種抗氧化劑及/或螯合劑之容器曝露於足以減少容器和膜、樹脂、塗層材料、晶片、和片匣之生物負荷量的 γ -射線之劑量，其中該至少一種抗氧化劑及/或螯合劑存在量係足以改良曝露於 γ -射線的劑量之後對膜、樹脂、塗層材料、晶片、和片匣的損害。在一些實例中，該片匣為含有樹脂的片匣(例如，任何本文所述或該項技術中已知的示例性樹脂)。在一些具體實例中，該膜、樹脂、塗層材料、晶片、和片匣包括共價連接到至少一或部分的其表面之蛋白質 A 或蛋白質 G 配位體。在一些具體實例中，組成物包括膜、樹脂、塗層材料、晶片、和片匣及包括至少一種抗氧化劑及/或至少一種螯合劑之液體。任何本文所述的抗氧化劑及/或螯合劑之示例性組合和濃度可使用於任何此等方法中。任何本文所述的示例性液體可使用於任何此等方法中。在一些具體實例中，該組成物為乾材料。本文所提供者亦為一種使用任何本文所述方法製造的生物負荷量減少之膜、樹脂、塗層材料、晶片、或片匣。在一些實例中該容器為密封的儲存容器或容器。

本文所提供的也是製造生物負荷量減少之膜、樹脂、塗層材料、晶片、和片匣的方法，其包括：將包括實質上乾膜、樹脂、塗層材料、晶片、和片匣之容器(例如，以為纖維素、瓊脂糖、或糖為主之膜、樹脂、塗層材料、晶片、和片匣)曝露於足以減少容器及膜、樹脂、塗層材料、晶片、和片匣之生物負荷量的 γ -射線之劑量。一些實例另外包括在曝露步驟之前乾燥膜、樹脂、塗層材料、晶片、或片匣的步驟。在一些具體實例中，該膜、樹脂、塗層材料、晶片、和片匣包括共價連接到其表面上之蛋白質 A 或蛋白質 G 配位體。在一些實例中，該片匣為含樹脂片匣(例如，任何本文所述或該項技術中已知的示例性樹脂)。本文所提供者亦為一種使用任何本文所述方法製造的生物負荷量減少之膜、樹脂、塗層材料、晶片、或片匣。

本發明係進一步描述於下列實例中，該等實例不限制申請專利範圍中

所述之本發明範圍。

【圖式簡單說明】

圖 1 為顯示未經處理之 GE Mab Select SuRe™ 樹脂、25 kGy γ -射線之 GE Mab Select SuRe™ 樹脂、15 kGy γ -射線之 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂、和 15 kGy γ -射線之 Kaneka KanCap A 樹脂的樹脂 (mg/mL 蛋白質) 之靜態結合曲線的圖。

圖 2 為顯示來自 GE Mab Select SuRe™ 樹脂 30 kGy γ -射線之後和來自 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂 30 kGy γ -射線之後的上清液之 280 nm 吸收率(蛋白質 A 吸收率)之表。

圖 3 為顯示經過使用未經處理之 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂(原始溶析液)或 15 kGy γ -射線之 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂(γ 溶析液)進行之多循環層析之溶析液中的蛋白質之量的圖。

圖 4 為顯示在使用未經處理之 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂進行的連續層析期間循環 7 和循環 11 之溶析輪廓的層析圖。

圖 5 為顯示在使用 15 kGy γ -射線之 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂進行的連續層析期間循環 7 和循環 11 之溶析輪廓的層析圖。

圖 6 為顯示在使用未經處理之 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂(原始)或 15 kGy γ -射線之 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂(γ)進行的連續層析期間經過使用未經處理者進行之循環 7 和循環 11 的溶析輪廓之溶析液中的蛋白質之量的圖。

圖 7 為經過使用未經處理之 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂(原始)或 15 kGy γ -射線之 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂(γ)進行的多循環層析所結合之蛋白質的圖。

圖 8 為顯示經過使用未經處理之 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂(原始)或 29 kGy γ -射線之 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂(γ)進行的多循環層析之溶析液中的蛋白質之量的圖。

圖 9 為顯示經過使用未經處理之 JSR LifeSciences Amsphere ProA

JWT203 樹脂(原始)、15 kGy γ -射線之 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂(15 kGy)、或 29 kGy γ -射線之 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂(29 kGy)進行的多次循環層析之溶析液中的蛋白質(抗- $\alpha\beta$ TCR(IgG1)或抗-TGF β (IgG4))之量的圖。

圖 10 為示例性重組蛋白質之名單，該等重組蛋白質為可用於治療人類的特定疾病之酶。

圖 11 為當含有單株 IgG1 的培養基用於裝載各樹脂時，經過多次層析循環的在未經處理(原始)和 29-kGy γ -射線之 GE Mab Select SuRe™ 樹脂之溶析液中的蛋白質之圖。

圖 12 為當含有單株 IgG1 的培養基用於裝載各樹脂時，經過多層析循環的結合至未經處理(原始)和 29-kGy γ -射線之 GE Mab Select SuRe™ 樹脂的蛋白質之量的圖。

圖 13 為蛋白質結合(mg 蛋白質/樹脂的 mL)至未經處理(原始)和 29-kGy γ -射線之 GE Mab Select SuRe™ LX 樹脂在裝載不同平衡濃度的單株 IgG4 抗體之後的溶析液中之蛋白質的量之圖。

圖 14 為在 2 mg/mL 的未經處理之 GE Mab Select SuRe™ LX 樹脂(原始 LX)、29-kGy γ -射線之 GE Mab Select SuRe™ LX 樹脂(29kGY LX)、乾未經處理之 GE Mab Select SuRe™ LX 樹脂、和乾 29-kGy γ -射線之 GE Mab Select SuRe™ LX 樹脂、和 GE Mab Select SuRe™ LX 樹脂 γ -射線之平衡 IgG4 抗體濃度下、於 29 kGy 的劑量下、在七種含有至少一種抗氧化劑的不同測試緩衝液中的一者存在下的靜態結合能力(mg 蛋白質/樹脂的 mL)之圖。

圖 15 為經過未經處理之 GE Mab Select SuRe™ LX 樹脂(原始)或在 25 mM 甘露醇、25 mM 組胺酸、25 mM 抗壞血酸鈉、25 mM 甲硫胺酸、50 mM 磷酸鈉，pH 6.0 存在下用 29 kGy 的劑量 γ -射線之 GE Mab Select SuRe™ LX 樹脂進行的多次層析循環之溶析液中的蛋白質之量的圖。

圖 16 為經過使用未經處理之 GE Mab Select SuRe™ LX 樹脂(原始)或在 25 mM 甘露醇、25 mM 組胺酸、25 mM 抗壞血酸鈉、25 mM 甲硫胺酸、50 mM 磷酸鈉，pH 6.0 存在下用 29 kGy 的劑量 γ -射線之 GE Mab Select

SuRe™ LX 樹脂進行的多次層析循環所結合之蛋白質的量之圖。

圖 17 為顯示經過使用未經處理之 GE Mab Select SuRe™ LX 樹脂(原始 LX)和在 25 mM 甘露醇、25 mM 組胺酸、25 mM 抗壞血酸鈉、25 mM 甲硫胺酸、50 mM 磷酸鈉，pH 6.0 存在下用 29 kGy 的劑量 γ -射線之 GE Mab Select SuRe™ LX 樹脂的多次層析循環之 IgG1 抗體溶析液之非減少十二基硫酸鈉聚丙烯醯胺。

【實施方式】

實例 1. γ -射線對不同層析樹脂之靜態結合能力的影響

進行一組實驗以測試 γ -射線對三種不同蛋白質親和性層析樹脂之靜態結合能力的影響：GE Mab Select SuRe™(具有 85 μm 之粒徑和將蛋白質 A 連接至洋菜糖之環氧官能基的高交聯洋菜糖樹脂)、JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203(具有 $\sim 50 \mu\text{m}$ 之粒徑和將蛋白質 A 連接至聚甲基丙烯酸酯之環氧官能基的多孔聚甲基丙烯酸酯樹脂)、和 Kaneka KanCap A(具有 65 – 85 μm 之粒徑與透過還原胺化連接至纖維素之蛋白質 A 的高交聯纖維素)。三種樹脂各用 15 kGy 的 γ -射線處理(除 Mab Select SuRe™ 用 25kGy 之輻射劑量處理，和 GE Mab Select SuRe™ 樹脂之對照樣品係保留未經處理之外)，裝載抗-TGF β 抗體(IgG4)、和測定在溶析液中之抗-TGF β 抗體的水準。在此實例各個樹脂之 γ -射線係在 50 mM 磷酸鹽(pH 7.0)中進行。各個 γ -射線之樹脂和未經處理之對照樹脂的靜態結合曲線係顯示於圖 1 中。此等數據顯示： γ -射線減少三種測試之蛋白質 A 層析樹脂各者的結合能力，且 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂顯示反應 15 kGy γ -射線之最小的結合能力之減少。

進行下一個實驗以測定 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂或 GE Mab Select SuRe™ 樹脂之 γ -射線是否導致從層析樹脂裂解(和釋放)蛋白質 A。在此等實驗中，將 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂或 GE Mab Select SuRe™ 樹脂用 30 kGy 的 γ -射線處理，及然後藉由測量於 280 nm 之吸收率測定在上清液中之蛋白質 A 的水準。得自此實驗之數據顯示：用 γ -射線處理之後，很少蛋白質 A 從此二種測試樹脂任一者釋放(圖

2)。

此等數據顯示： γ -射線導致親和層析樹脂的結合能力之立即減少，而該結合能力的損失不是由於蛋白質配位體從樹脂裂解。

實例 2. 多次 γ -射線對樹脂經過多循環層析之結合能力

進行下一組實驗，以測試 γ -射線對層析樹脂之結合能力經過多循環層析的影響。此等實驗係使用 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂進行，而此樹脂顯示實例 1 中回應 γ -射線之結合能力的損失之最少量。在本實例中各個樹脂的 γ -射線係在 50mM 磷酸鹽中，pH 值 7.0 進行。

進行第一實驗以測試 15 kGy γ -射線對 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂結合至抗-TGF β 抗體(IgG4)之能力經過多循環層析的影響。未經處理之 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂也用於進行多循環層析，作為正對照組。在各循環結束時，用 0.1 N NaOH 洗滌樹脂。測定來自各循環之溶析液中的抗-TGF β 抗體之量。數據顯示：15 kGy γ -射線導致 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂之結合能力的立即(約 20%至 25%)減少(即，在第一循環中)，但結合能力經過多次額外的層析循環只以非常慢的速度減少(即，以可媲美未經處理之樹脂的結合能力之減少的速率之速率)(圖 3、6、和 7)。

從此等實驗中的循環 7 和循環 11 之層析圖(圖 4 和 5)的比較，同樣顯而易見，15 kGy γ -射線之 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂最初層析之循環後的結合能力之最少減少。此等圖顯示：未經處理和 15 kGy γ -射線之 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂二者經過多循環層析只有輕微(如果有的話)可觀察到的此等樹脂之結合能力的改變。

進行額外實驗以測試仍未經處理或用 29 kGy γ -射線處理之 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂的結合能力經過多循環層析之改變。在此等實驗中，在各循環結束時用 0.1 N NaOH 洗滌樹脂，和在各循環開始時用抗- $\alpha\beta$ TCR 單株抗體(IgG1)裝載樹脂。所得數據再次顯示：相較於未經處理之樹脂，29 kGy γ -射線之樹脂的結合能力之約 20%至 25%的最初下降(圖 8)。未經處理和 29 kGy γ -射線之樹脂的結合能力經過多次額外

循環的層析僅略為減少 (以與未經處理和 29 kGy γ -射線之樹脂大約相同的速率)(圖 8)。

進行最後一組實驗以測試未經處理、15 kGy γ -射線、和 29 kGy γ -射線之 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂經過多循環層析的結合能力。在各循環結束時，用 0.1 N NaOH 洗滌樹脂，及用單株抗-TGF β (IgG4) 抗體或單株抗- $\alpha\beta$ TCR(IgG1)抗體(abTCR)裝載樹脂。數據顯示：15 kGy 和 29 kGy γ -射線之照射導致 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂之結合能力的減少之實質上相同水準，和 15 kGy 和 29 kGy γ -射線之 JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 樹脂的結合能力之水準經過多循環層析以與未處理之樹脂相同的速率略為減少(圖 9)。

此等數據顯示：具有蛋白質配位體之層析樹脂的 γ -射線導致結合能力之立即減少，及經過多回合的層析之結合能力的損失保持相對穩定。此等數據提示 γ -射線導致藉由在至少一種螯合劑及/或抗氧化劑存在下 γ -射線層析樹脂可防止、改良、或減少在 γ -射線期間對層析樹脂(例如，含有蛋白質或肽配位體的層析樹脂，諸如親和性層析樹脂)氧化性損害及在 γ -射線期間層析樹脂(例如，含有蛋白質或肽配位體的層析樹脂，諸如親和性層析樹脂)之結合能力的損失。

實例 3. γ -射線對在 GE Mab Select SuRe™ 樹脂上之結合能力的影響

進行一組實驗以測定 γ -射線對另一蛋白質配位體層析樹脂(GE Mab Select SuRe™ 樹脂)之結合能力經過多循環層析的影響。在 30-mL 的 Nalgene 瓶中將樹脂交換於 50mM 磷酸鈉(pH 為 7.0)中，然後用 29 kGy γ -射線處理。然後將樹脂填充於具有 3 cm 床高之 0.66-cm 直徑管柱(1 mL 管柱)中。然後將此管柱用於捕獲經過多循環層析的細胞培養基中之單株 IgG1 抗體。未經處理之 GE Mab Select SuRe™ 樹脂也用於進行多循環層析，作為正對照組。在各循環結束時，用 0.1 N NaOH 洗滌樹脂。測定來自各循環之在溶析液中的 IgG1 的量。數據顯示：29 kGy γ -射線導致 GE Mab Select SuRe™ 樹脂(即，在第一循環中)之結合能力的立即(約 25%至約 30%)減少(圖 11 和 12)。第一循環層析之後，29 kGy γ -射線之 GE Mab Select SuRe™ 樹脂僅顯示層析之

結合能力經過多次額外循環的非常緩慢的減少速率(即，以未經處理之樹脂的結合能力經過多次層析循環的減少速率)(圖 11 和 12)。此等數據類似於實例 2 中所述之 JSR 蛋白質 A 樹脂獲得之數據和樹脂結合能力由於 γ -射線之損失的機制似乎是相似的。

實例 4. γ -射線對 Mab Select SuRe™ LX 樹脂之靜態結合能力的影響

描於實例 1 中所述之數據顯示： γ -射線減少三種不同蛋白質 A 層析樹脂(GE Mab Select SuRe™、JSR LifeSciences Amsphere™ ProA JWT203、和 Kaneka KanCapA™)之靜態結合能力。用另一蛋白質 A 層析樹脂：GE Mab Select SuRe™ LX 測試 γ -射線。GE Mab Select SuRe™ LX 樹脂具有洋菜糖骨架和與 Mab Select SuRe™ 樹脂類以之蛋白質 A 配位體，但相較於 Mab Select SuRe™ 樹脂，具有較高配位體密度。樹脂緩衝液從 20% 乙醇交換至 50 mM 磷酸鈉，pH 6.0，且然後進行 29-kGy γ -射線。如實例 1 中所述測定樹脂之靜態結合(與 γ -射線之前和之後測定的樹脂之靜態結合能力)。數據指示樹脂 γ -射線之後的靜態結合能力的類似下降(圖 13)。此 γ -射線引起之 GE Mab Select SuRe™ LX 樹脂的靜態結合能力之減少係類似於實例 1 中所測試的三種蛋白質 A 層析樹脂在 γ -射線之後所觀察的靜態結合能力之下降(圖 1)。圖 13 中的數據顯示：Mab Select SuRe™ LX 之 γ -射線導致樹脂之靜態結合能力的立即減少。

實例 5. γ -射線引起之層析樹脂的結合能力的減少之減少

前述實例中之數據顯示層析樹脂之 γ -射線於減少樹脂之生物負荷量的劑量，也導致樹脂之結合能力的下降：相較於對照組未經處理之樹脂的結合能力，樹脂之結合能力減少約 20%至約 40%。由 γ -射線所造成之結合能力的減少程度似乎不依賴於連接於樹脂之蛋白質 A 配位體及/或樹脂之珠粒化學。進行此另一組之實驗以鑑定將防止在 γ -射線期間發生之層析樹脂的結合能力之損失的緩衝溶液。在此等實驗中使用 GE Mab Select SuRe™ LX 作為層析樹脂。GE Mab Select SuRe™ LX 具有共價固定在各珠粒之多孔基質上的蛋白質 A。先將樹脂從 20% 乙醇衝液交換至包括一或多種抗氧

化劑之不同緩衝液或不包括任何抗氧化劑之對照緩衝液。測試之緩衝溶液係顯示於下表 1 中。在對照組實驗中，在無抗氧化劑存在下將樹脂以乾燥組成物進行 γ -射線。此等樹脂樣品在烘箱中於 23 °C 乾燥 2 天以使在 γ -射線期間水含量達最小。將表 1 中所示之各樹脂樣品在 30-mL Nalgene 瓶中以 29 kGy 的劑量進行 γ -射線。使用實例 1 中所描述之方法測定 γ -射線之樹脂樣品和未經處理(非照射)之樹脂樣品的靜態結合能力。

表 1. 測試之 GE Mab Select SuRe™ LX 樹脂樣品和緩衝溶液

樹脂	基本緩衝液	淬滅劑
原始 MabSelect SuRe LX	50 mM 磷酸鈉，pH 6.0	無
29 kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 磷酸鈉，pH 6.0	無
29 kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 磷酸鈉，pH 6.0	100 mM 甘露醇
29 kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 磷酸鈉，pH 6.0	100 mM 甲硫胺酸
29 kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 磷酸鈉，pH 6.0	100 mM 抗壞血酸鈉
29 kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 磷酸鈉，pH 6.0	100 mM 組胺酸
29 kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 磷酸鈉，pH 6.0	50 mM 甲硫胺酸+50 mM 組胺酸
29 kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 磷酸鈉，pH 6.0	33 mM 甲硫胺酸+33 mM 組胺酸+33 mM 抗壞血酸鈉
29 kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 磷酸鈉，pH 6.0	25 mM 抗壞血酸鈉+25 mM 甘露醇+25 mM 組胺酸
乾原始 MabSelect SuRe LX	無	無
乾 29 kGy MabSelect SuRe LX	無	無

數據顯示：層析樹脂在一或多種抗氧化劑存在下之 γ -射線減少由 γ -射線所造成之結合能力的損失(圖 14 和表 2)。25 mM 抗壞血酸鈉、25 mM 甲硫胺酸、25 mM 甘露醇、25 mM 組胺酸、50 mM 磷酸鈉，pH 6.0(以下稱為「SMMH」緩衝液)之緩衝液完全減緩 γ -射線引起之樹脂的結合能力之損失(即，在未經處理之對照組樹脂和在 SMMH 緩衝液存在下用 29 kGy 之劑量 γ -射線的樹脂之間沒有觀察到結合能力的損失)(圖 14 和表 2)。29-kGy γ -射線之乾樹脂樣品具有與未經處理之樹脂樣品相同之結合能力。此等數據指示 γ -射線乾燥層析樹脂為減少 γ -射線引起之樹脂結合能力的損失之程度的另一種方式。

表 2. 測試之 GE Mab Select SuRe™ LX 樹脂樣品的特異性結合能力

樹脂	基本緩衝液	淬滅劑	SBC(mg/ml)
原始 MabSelect SuRe LX	50mM 磷酸鈉，pH 7.0	無	50
29 kGy MabSelect SuRe LX	50mM 磷酸鈉，pH 7.0	無	32.8
原始 MabSelect SuRe LX	50 mM 磷酸鈉，pH 6.0	無	70
29 kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 磷酸鈉，pH 6.0	無	53
29 kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 磷酸鈉，pH 6.0	100 mM 甘露醇	57
29 kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 磷酸鈉，pH 6.0	100 mM 甲硫胺酸	64.5
29 kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 磷酸鈉，pH 6.0	100 mM 抗壞血酸鈉	66
29 kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 磷酸鈉，pH 6.0	100 mM 組胺酸	69
29 kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 磷酸鈉，pH 6.0	50 mM 甲硫胺酸+50 mM 組胺酸	63.5
29 kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 磷酸鈉，pH 6.0	33 mM 甲硫胺酸+33 mM 組胺酸+33 mM 抗壞血酸鈉	69
29 kGy MabSelect SuRe LX	50 mM 磷酸鈉，pH 6.0	25 mM 抗壞血酸鈉+25 mM 甘露醇+25 mM 組胺酸	74
乾原始 MabSelect SuRe LX	無	無	75
乾 29 kGy MabSelect SuRe LX	無	無	74

進行另一實驗以測試在 SMMH 緩衝液存在下用 29 kGy 的劑量 γ -射線之樹脂和未經處理之樹脂經過多次層析循環的性能。將各測試之樹脂填充於 0.66-cm 直徑和 3-cm 高管柱中。用含有單株 IgG1 抗體的細胞培養基裝載管柱。如靜態結合能力實驗中所觀察者(圖 14)，所有循環的未經處理之樹脂及在 SMMH 緩衝液存在下用 29 kGy 的劑量 γ -射線之樹脂之間的動態結合能力相媲美(圖 15 和 16)。此外，其他關鍵量和方法性能指標也相媲美：藉由粒徑篩析層析-高效液相層析(SEC-HPLC)測量的高分子量種類之百分比和宿主細胞蛋白質(HCP)在溶析液中的濃度(表 3)。圖 17 為描繪來自未經處理之樹脂和在 SMMH 緩衝液存在下以 29 kGy 的劑量 γ -射線之樹脂的溶析液經過多次循環之可比較純度的非變性十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠。

表 3. 未經處理之 GE Mab Select SuRe™ LX 樹脂和在 SMMH 緩衝液存在下

γ-射線之 GE Mab Select SuRe™ LX 樹脂的溶析液中的高分子量種類和宿主細胞蛋白質之百分比

蛋白質 A 溶析液	%HMWS	HCP (ng/mg)	蛋白質 A 溶析液	%HMWS	HCP(ng/mg)
原始溶析液循環 1	1.55	173	SMMH 溶析液循環 1	1.82	107.6
原始溶析液循環 3	1.73	247.2	SMMH 溶析液循環 2	1.75	N/A
原始溶析液循環 5	1.89	289.5	SMMH 溶析液循環 3	1.59	146.2

藉由使用 Tosoh G3000 SWxl 管柱之粒徑篩析層析高效液相層析 (SEC-HPLC)測量百分比高分子量種類可和使用 ELISA 分析測量宿主細胞蛋白質濃度。

測試額外緩衝溶液之彼等減少 γ-射線引起之層析樹脂的結合能力之損失的能力。在此等實驗中，進行單一層析循環以動態模式來測定結合能力。對於各測試緩衝液，以含有單株 IgG1 的細胞培養基填充並裝載類似於上述之管柱(0.66-cm 直徑 x 3-cm 高)。如在靜態結合能力實驗中所觀察者(圖 14)，各含有至少一種抗氧化劑的緩衝液減少由 γ-射線所造成之樹脂結合能力的損失(表 4)。此等數據顯示：在至少一種抗氧化劑存在下可減少由 γ-射線所造成之樹脂結合能力的損失。此外，此等數據也提示螯合劑(其結合並防止氧化還原活性金屬產生活性含氧物和含氮物)也將能夠減少由 γ-射線所造成之樹脂結合能力的損失。

表 4. 得自在用含有 IgG1 的細胞培養物收穫之 GE MabSelect SuRe LX 樹脂 (未經處理和在淬滅劑存在或不存在下 29 kGy-照射)上的單一層析循環之數據

樹脂條件	溶析液中之蛋白質 (mg)	結合蛋白質 (mg)
原始 MabSelect SuRe LX	70	68
29kGy MabSelect SuRe LX 與 SMMH	69	67
29kGy MabSelect SuRe LX 與 100 mM 組胺酸	68	67
29kGy MabSelect SuRe LX 與 100mM 甲硫胺酸	64	63
29kGy MabSelect SuRe LX 與 100mM SA	62	61
29kGY MabSelect SuRe LX	51	51

總體而言，此等數據提示：層析樹脂的 γ-射線在至少一種抗氧化劑及/

或至少一種螯合劑存在下可減少由 γ -射線所造成之樹脂結合能力的損失。該等數據也提示：在至少一種抗氧化劑及/或至少一種螯合劑存在下防止固定蛋白質 A 配位體以及樹脂基本基質之由在 γ -射線期間所形成之自由基造成的損害。在至少一種抗氧化劑及/或至少一種螯合劑存在下也可使用於其他生物處理應用，其包括材料在可能導致損害基質及/或官能基的劑量下之 γ -射線。例如，含有至少一種抗氧化劑試劑及/或至少一種螯合劑試劑的組成物可用於防止 γ -射線引起之對纖維素和其他纖維素-、洋菜糖-、或糖基樹脂、膜、或材料的損害。

其他具體實例

應該理解的是：雖然本發明已結合其詳說明來描述，但前面的說明意在說明而不是限制本發明的範圍，其由所附申請專利範圍的範圍限定。其他態樣、優點和修改在下列申請專利範圍的範圍之內。

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

【序列表】(請換頁單獨記載)

無

申請專利範圍

1. 一種減少層析樹脂的生物負荷量之方法，其包含：
將包含組成物之容器曝露於足以減少容器和層析樹脂之生物負荷量的 γ -射線劑量，其中該組成物包含(i)層析樹脂和(ii)液體，該液體包含至少一種抗氧化劑及/或至少一種螯合劑，該至少一種抗氧化劑係選自由下列所組成群組：還原型麩胱甘肽、還原型硫氧還蛋白、還原型半胱胺酸、類胡蘿蔔素、褪黑激素、番茄紅素、生育酚、還原型泛醌、抗壞血酸鹽、膽紅素、尿酸、類脂酸、類黃酮、苯酚類丙酸(phenolpropanoid acid)、利多卡因(lidocaine)、柚配質、富勒烯、葡萄糖、甘露醇、4-羥基-2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧基、和二甲基甲氧基色原醇；該至少一種螯合劑係選自由下列所組成群組：乙二胺四乙酸(EDTA)、2,3-二巰基-1-丙磺酸鈉(DMPS)、二巰基丁二酸(DMSA)、金屬硫蛋白(metallothionin)、和去鐵胺(desferroxamine)；其中該至少一種抗氧化劑及/或該至少一種螯合劑在該液體中的存在量係足以改良層析樹脂曝露於 γ -射線劑量後的結合能力之損失。
2. 如請求項 1 之方法，其中該容器為儲存容器。
3. 如請求項 1 之方法，其中該容器為填充層析管柱。
4. 如請求項 1 之方法，其中該液體包含甘露醇、抗壞血酸鈉、組胺酸、和甲硫胺酸，其中甘露醇、抗壞血酸鈉、組胺酸、和甲硫胺酸一起以足以改良層析樹脂曝露於 γ -射線劑量後的結合損失之量存在於該液體中。
5. 如請求項 1 之方法，其中該液體包含至少一種選自由下列所組成群組之抗氧化劑：甘露醇、抗壞血酸鈉、組胺酸、和甲硫胺酸。
6. 如請求項 1 之方法，其中該液體包含甘露醇、抗壞血酸鈉、組胺酸、和甲硫胺酸。
7. 如請求項 6 之方法，其中該液體包含：
 - (i) 介於 75 mM 和 125 mM 之間甘露醇；
 - (ii) 介於 75 mM 和 125 mM 之間甲硫胺酸；

- (iii) 介於 75 mM 和 125 mM 之間抗壞血酸鈉；
 - (iv) 介於 75 mM 和 125 mM 之間組胺酸；
 - (v) 介於 30 mM 和 70 mM 之間甲硫胺酸和介於 30 mM 和 70 mM 之間組胺酸；
 - (vi) 介於 10 mM 和 50 mM 之間甲硫胺酸、介於 10 mM 和 50 mM 之間組胺酸、和介於 10 mM 和 50 mM 之間抗壞血酸鈉；或
 - (vii) 介於 5 mM 至 45 mM 之間抗壞血酸鈉、介於 5 mM 和 45 mM 之間甲硫胺酸、介於 5 mM 和 45 mM 之間甘露醇、和介於 5 mM 至 45 mM 之間組胺酸。
8. 如請求項 1 之方法，其中該液體包含至少一種選自由下列所組成群組之螯合劑：乙二胺四乙酸(EDTA)、2,3-二巯基-1-丙磺酸鈉(DMPS)、二巯基丁二酸(DMSA)、金屬硫蛋白(metallothionin)、和去鐵胺(desferroxamine)。
 9. 如請求項 1 之方法，其中該組成物包含至少一種選自由下列所組成群組之層析樹脂：陰離子交換層析樹脂、陽離子交換層析樹脂、親和性層析樹脂、疏水性作用層析樹脂、和粒徑篩析層析樹脂。
 10. 如請求項 9 之方法，其中該組成物包含陰離子交換層析樹脂。
 11. 如請求項 10 之方法，其中該陰離子交換層析樹脂包含 N-苯甲基-N-甲基-乙醇胺基團。
 12. 如請求項 1 之方法，其中該劑量係介於 15 kGy 至 45 kGy 之間。
 13. 一種藉由請求項 2 之方法製造的生物負荷量減少之層析樹脂。
 14. 一種製造生物負荷量減少之填充層析管柱之方法，其包含：
提供如請求項 13 之生物負荷量減少之層析樹脂；及
在無菌環境中將層析樹脂填充於生物負荷量減少之管柱中。
 15. 一種藉由如請求項 14 之方法製造的生物負荷量減少之填充層析管柱。
 16. 一種藉由如請求項 3 之方法製造的生物負荷量減少之填充層析管柱。
 17. 一種包含(i)層析樹脂和(ii)液體之組成物，其中該液體包含至少一種抗氧化劑及/或至少一種螯合劑，該至少一種抗氧化劑係選自由下列所組成群組：還原型麩胱甘肽、還原型硫氧還蛋白、還原型半胱胺酸、類

胡蘿蔔素、褪黑激素、番茄紅素、生育酚、還原型泛醌、抗壞血酸鹽、膽紅素、尿酸、類脂酸、類黃酮、苯酚類丙酸、利多卡因、柚配質、富勒烯、葡萄糖、甘露醇、4-羥基-2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧基、和二甲基甲氧基色原醇；該至少一種螯合劑係選自由下列所組成群組：乙二胺四乙酸(EDTA)、2,3-二巯基-1-丙磺酸鈉(DMPS)、二巯基丁二酸(DMSA)、金屬硫蛋白、和去鐵胺；其中該至少一種抗氧化劑及/或該至少一種螯合劑在該液體中的存在量係在足以減少組成物的生物負荷量的 γ -射線之劑量處理時，足以改良層析樹脂結合能力之損失的數量。

18. 一種進行生物負荷量減少之管柱層析之方法，其包含：
 - (a) 提供一種如請求項 15 或 16 之生物負荷量減少之填充層析管柱；及
 - (b) 在封閉系統中使用減少生物負荷量減少之填充層析管柱和生物負荷量減少之緩衝液進行管柱層析。
19. 一種用於生物負荷量減少地製造純化重組蛋白質之整合、封閉和連續的方法，其包含：
 - (a) 提供一種包含重組蛋白質之實質上無細胞的液體培養基；及
 - (b) 將液體培養基連續饋送至包含至少一個如請求項 15 或 16 之生物負荷量減少之填充層析管柱的多管柱層析系統(MCCS)；其中該方法利用生物負荷量減少之緩衝液，及從液體培養基連續地運行至來自 MCCS 之純化重組蛋白質的溶析液。
20. 一種用於生物負荷量減少地製造純化重組蛋白質之整合、封閉和連續的方法，其包含：
 - (a) 提供包含重組蛋白質之實質上無細胞的液體培養基；
 - (b) 將液體培養基連續饋送至第一多管柱層析系統(MCCS1)；
 - (c) 使用 MCCS1 捕獲在液體培養基中之重組蛋白質；
 - (d) 從包含該重組蛋白質之 MCCS1 製造溶析液及將該溶析液連續地饋送至第二多管柱層析系統(MCCS2)；
 - (e) 將來自該溶析液的重組蛋白質連續地饋送至 MCCS2，隨後溶析重組蛋白質從而產生純化重組蛋白質，其中：

該方法利用生物負荷量減少之緩衝液，及從液體培養基連續地運行至該純化重組蛋白質，及至少一個在 MCCS1 及/或 MCCS2 中之管柱含有如請求項 15 或 16 之生物負荷量減少之填充層析管柱。

圖式

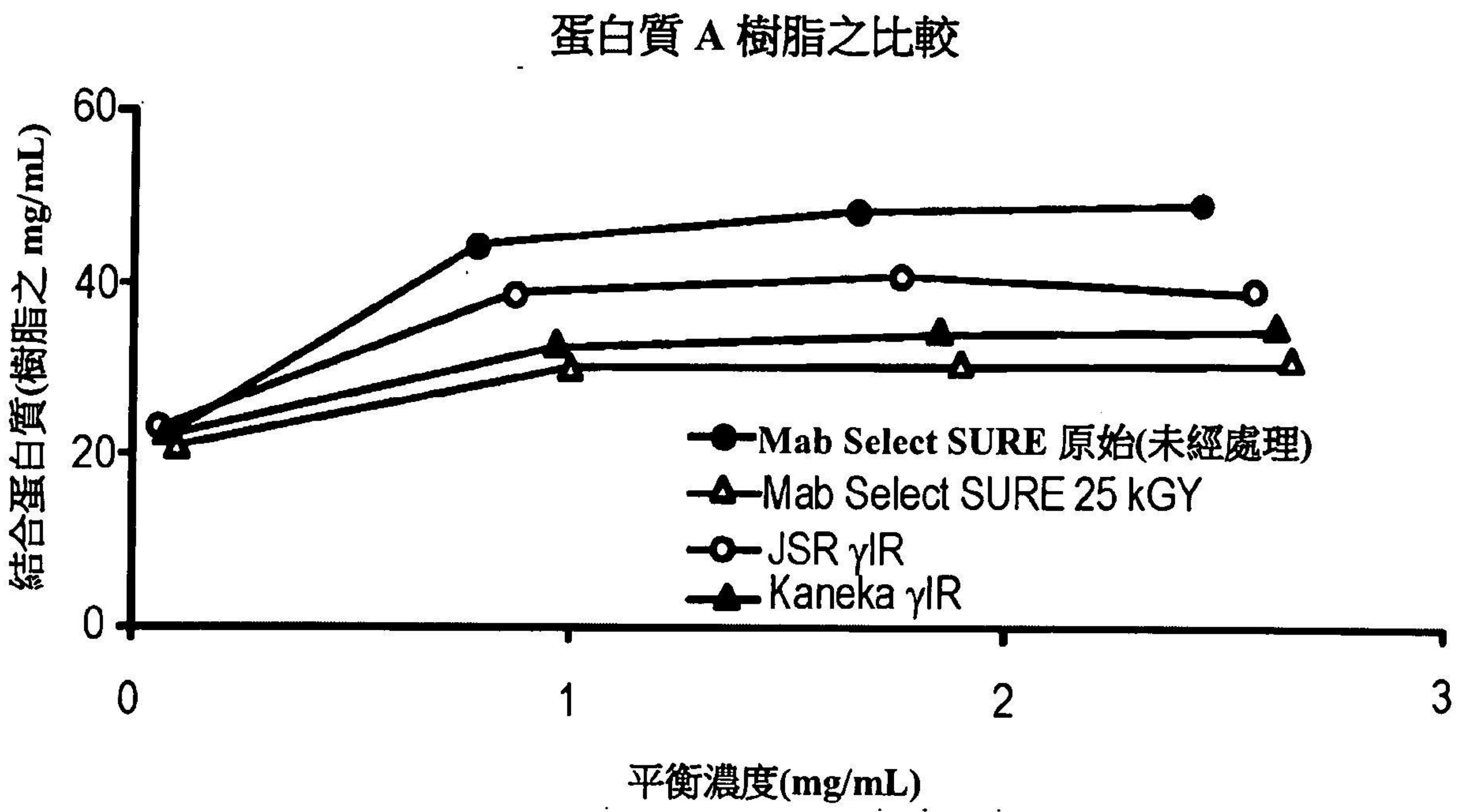


圖 1

樹脂	A ₂₈₀
Mab Select SuRe (30 kGY)	0.07
JSR Amsphere (30 kGY)	0.14

圖 2

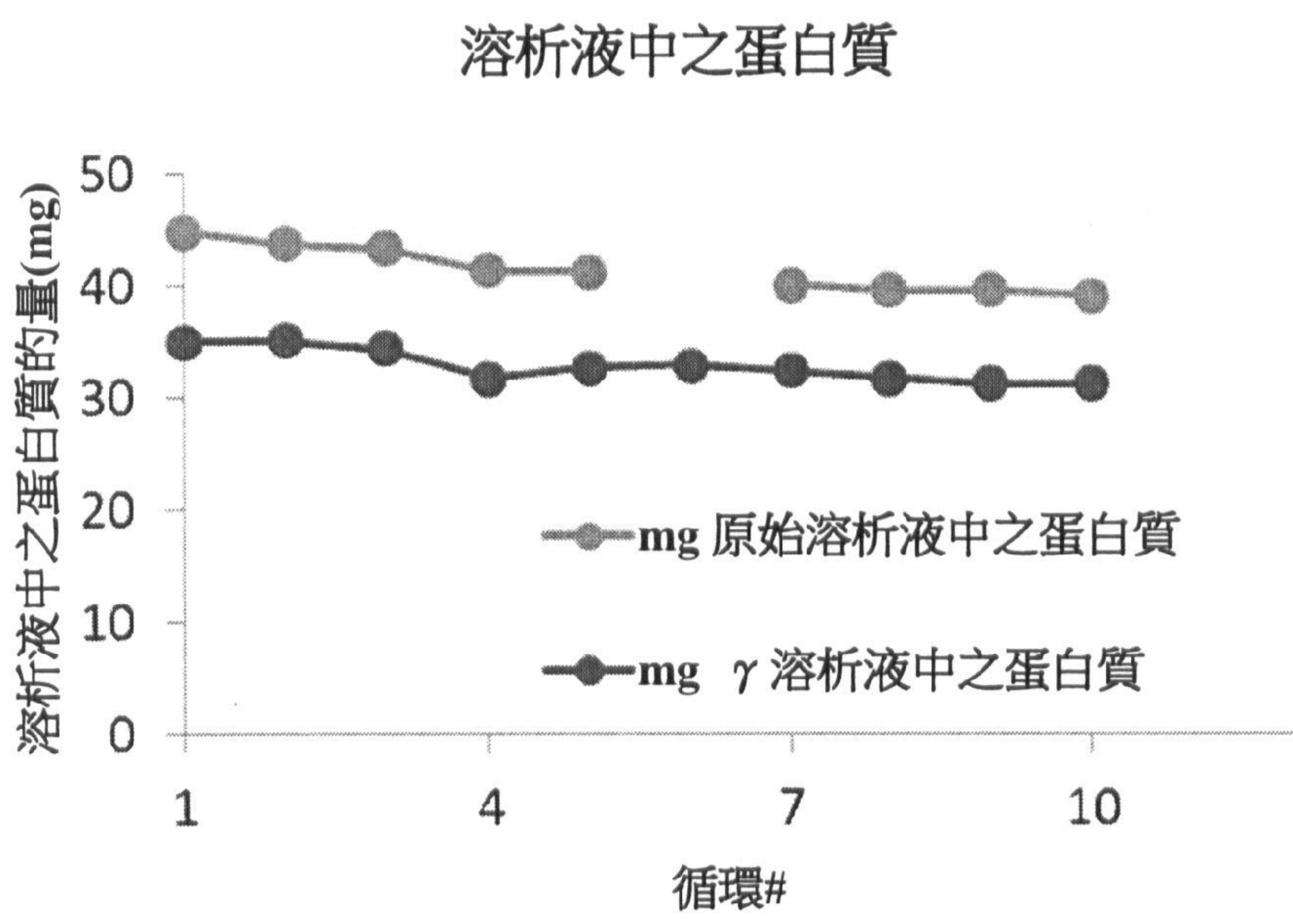


圖 3

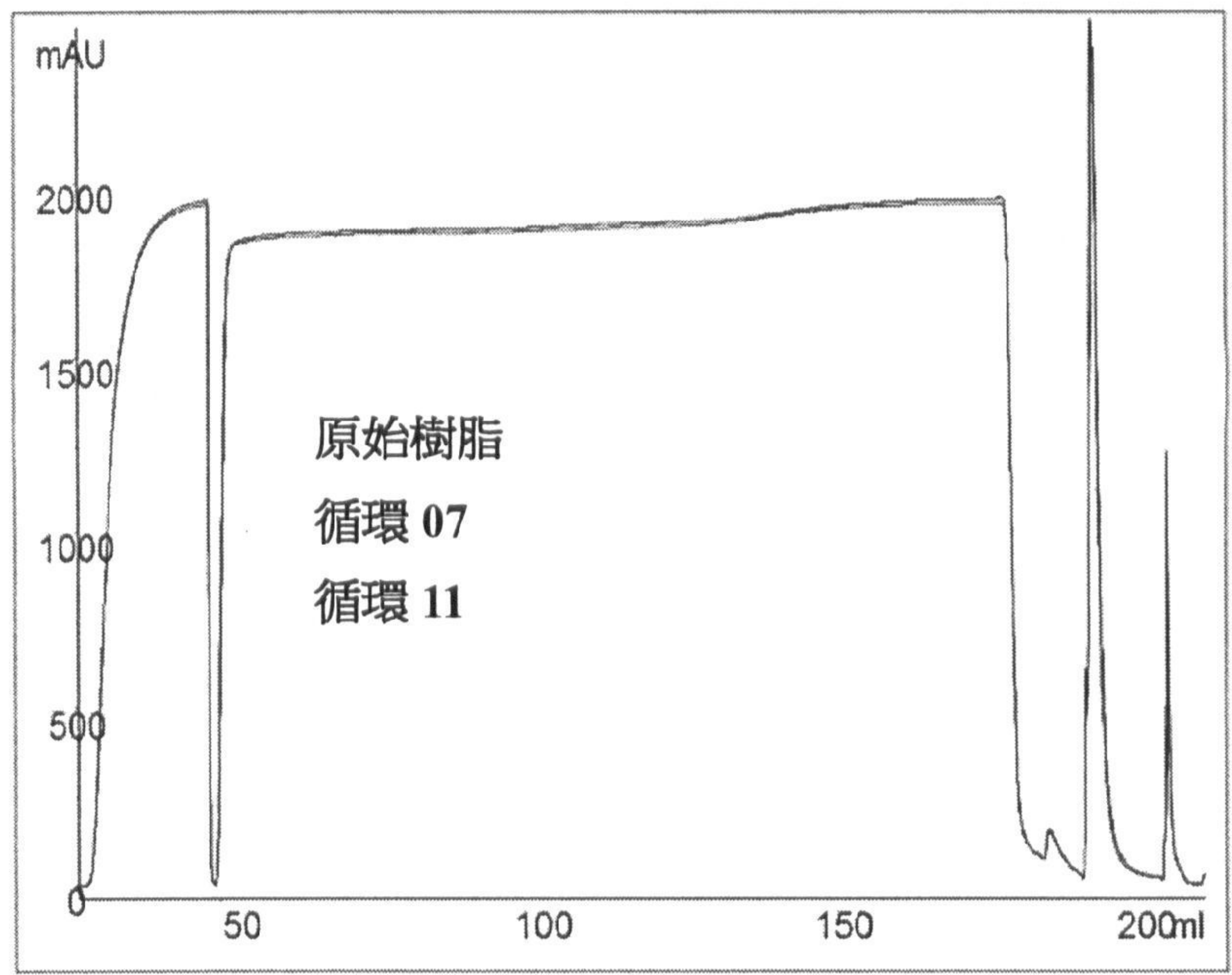


圖 4

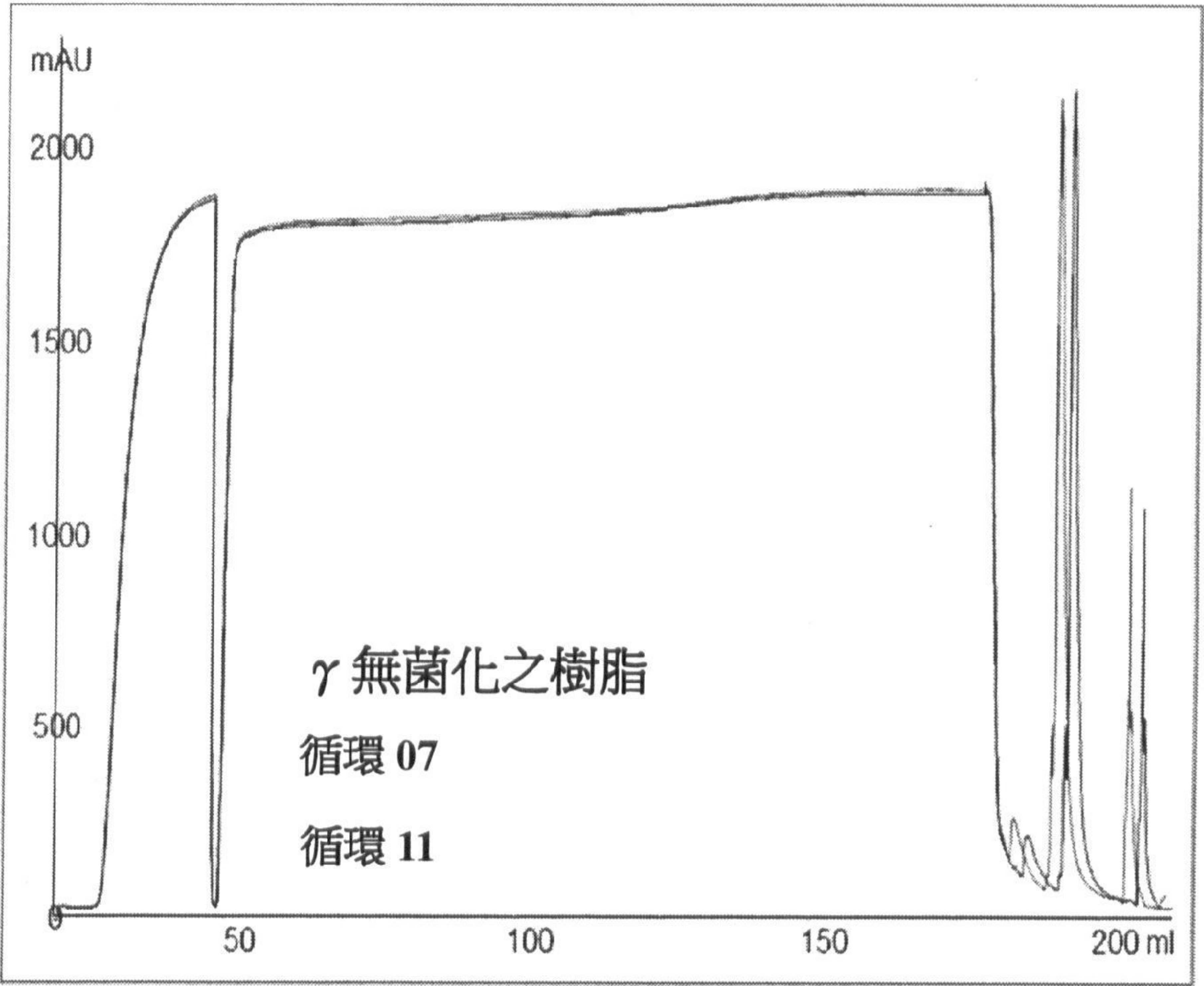


圖 5

溶析液中之蛋白質

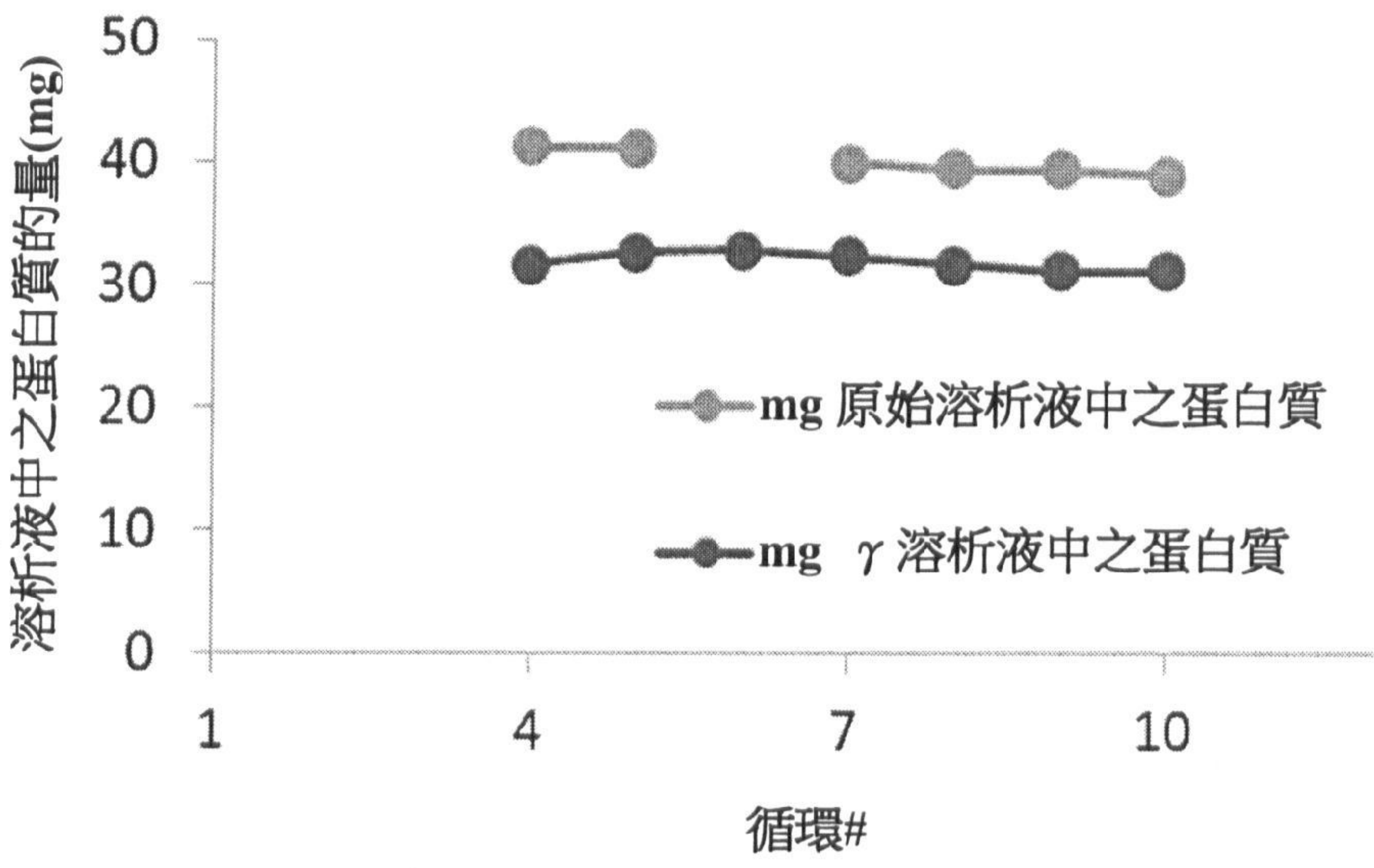


圖 6

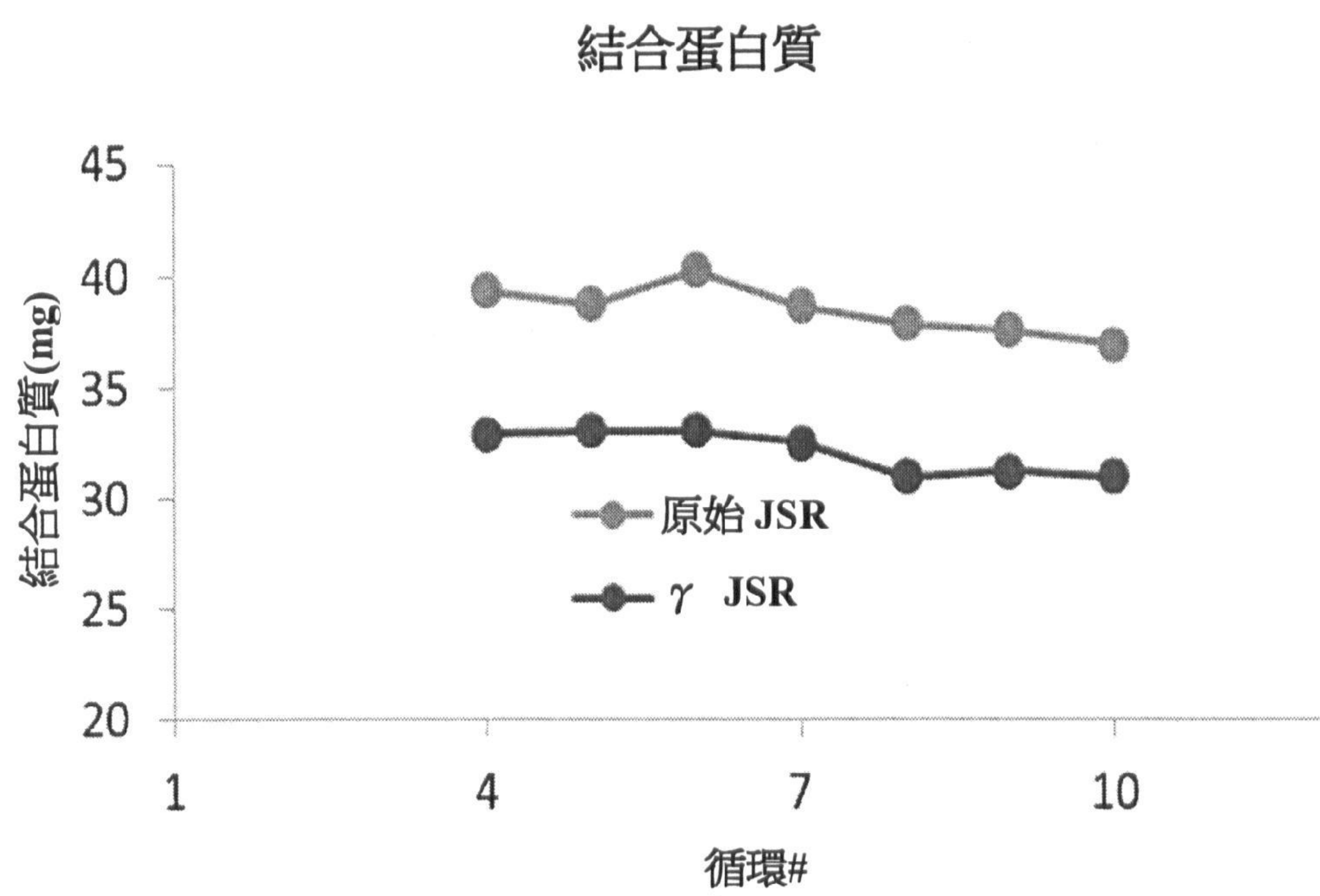


圖 7

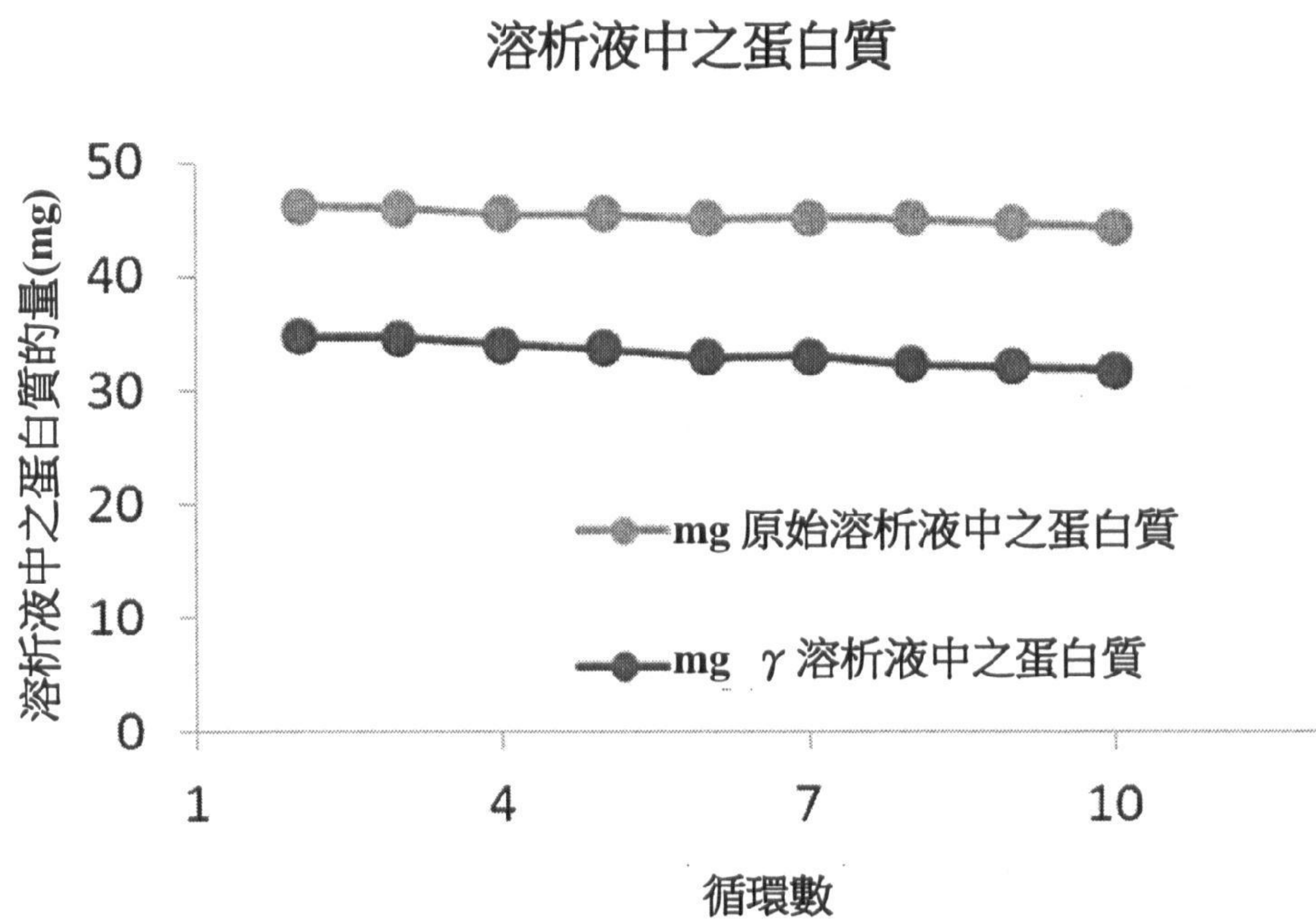


圖 8

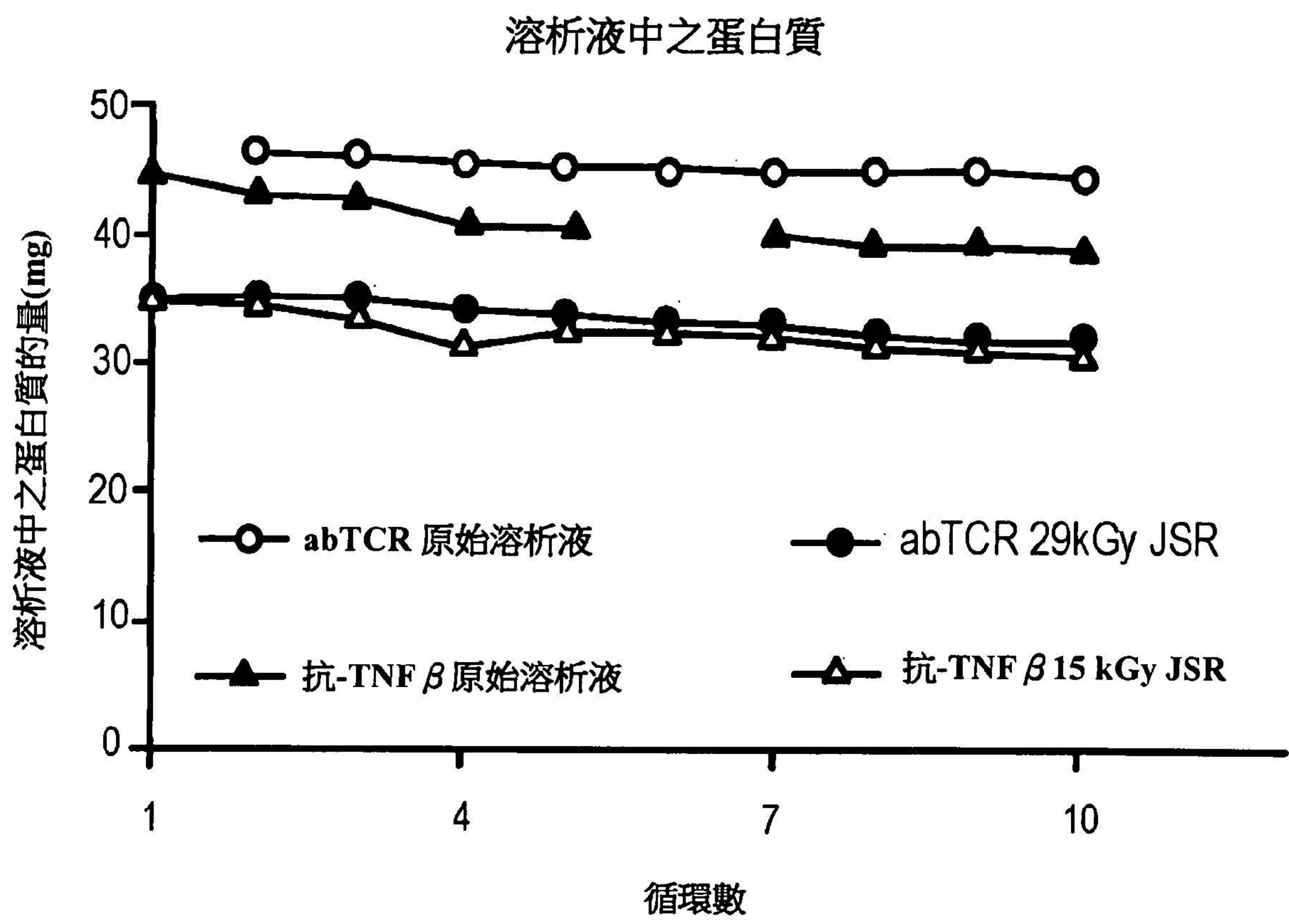


圖 9

溶素體儲積病和相關的酶缺陷	
疾病	酶缺陷
龐貝氏症	酸性 α -葡萄糖苷酶(例如，Myozyme®、Lumizyme®)
MPS I*(賀勒氏(Hurier)症)	α -L-艾杜糖醛酸酶(例如，Aidurazyme®)
MPSII(賀勒氏症)	艾杜糖硫酸酯酶
MPSIII(Sanfilippo)	肝素 N-硫酸酯酶
MPS IV(Morquio A)	半乳糖-6-硫酸酯酶
MP-S IV(Morquio B)	酸性 β -半乳糖苷酶
MPS VII (Sly 症)	β -葡萄糖醛酸酶
I-細胞病	N-乙酰基葡萄糖胺-1-磷酸轉移酶
辛德勒疾病(Schiodler disease)	α -N-乙酰基半乳糖胺酶(galactosaminidase)(α -半乳糖苷酶 B)
伍爾曼病	酸脂酶
膽固醇酯儲積病	酸脂酶
法伯氏病	溶素體酸性神經醯胺酶
尼曼匹克症	酸性神經髓磷脂酶
戈謝病	β -葡萄糖苷酶(例如 Cerezyme®、Ceredase®)
克拉培病	半乳糖基神經醯胺酶
法布瑞症	α -半乳糖苷酶 A
GM1 神經節苷脂症	酸性 β -半乳糖苷酶
半乳糖唾液酸沉積症	β -半乳糖苷酶和神經胺糖酸苷酶
戴-薩克斯病	己糖胺酶 A
山多夫病	己糖胺酶 A 和 B
*MPS =黏多醣症	

圖 10

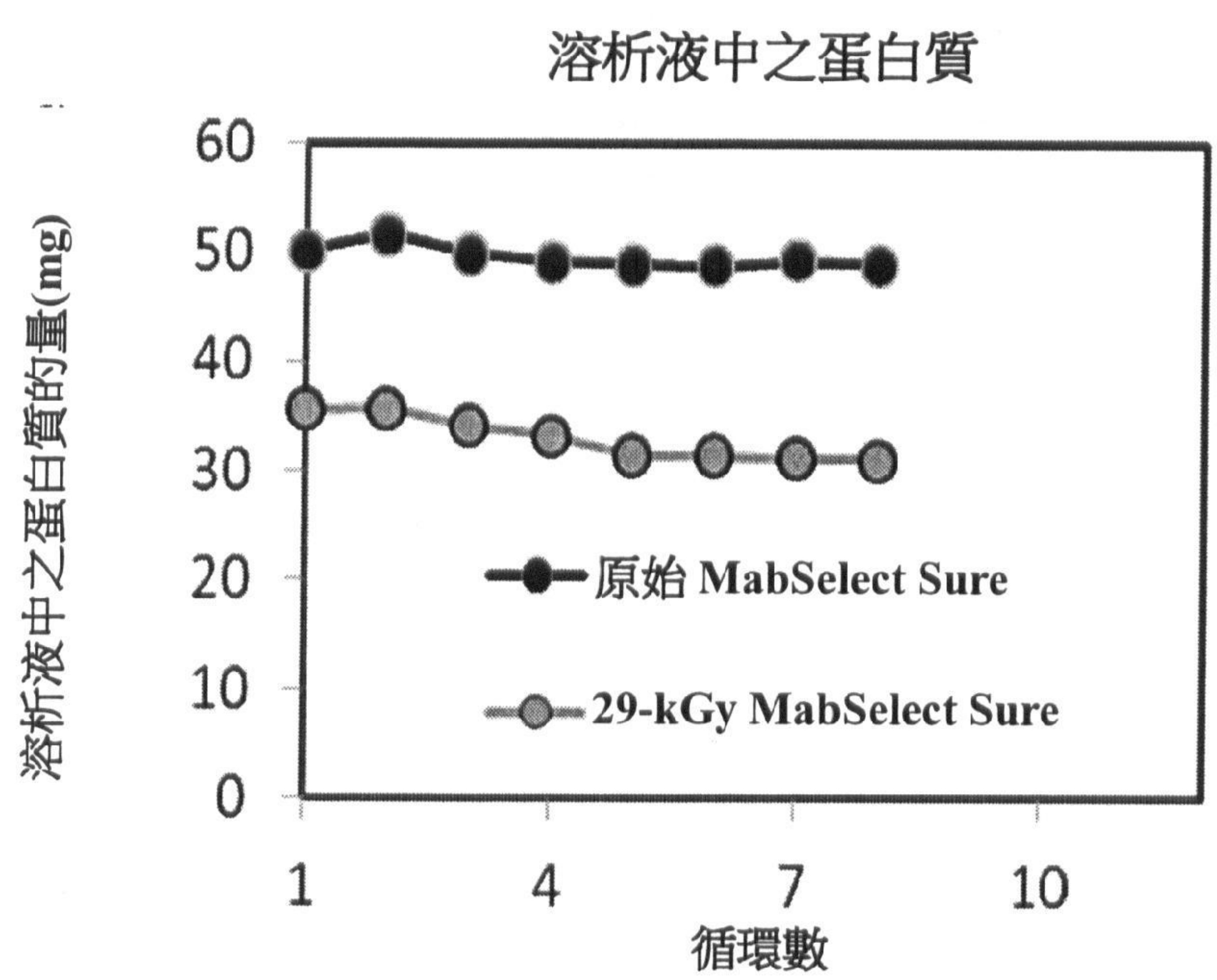


圖 11

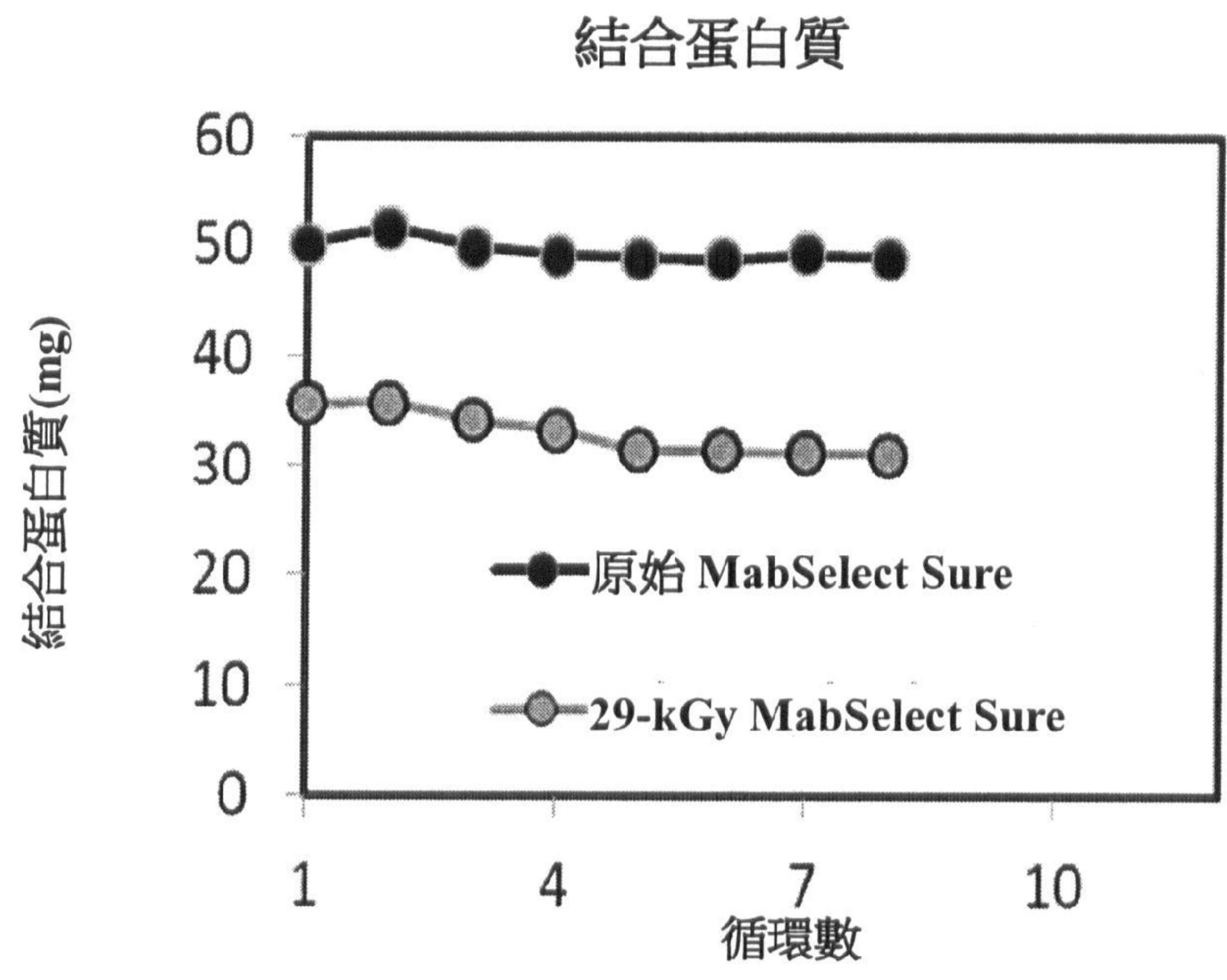


圖 12

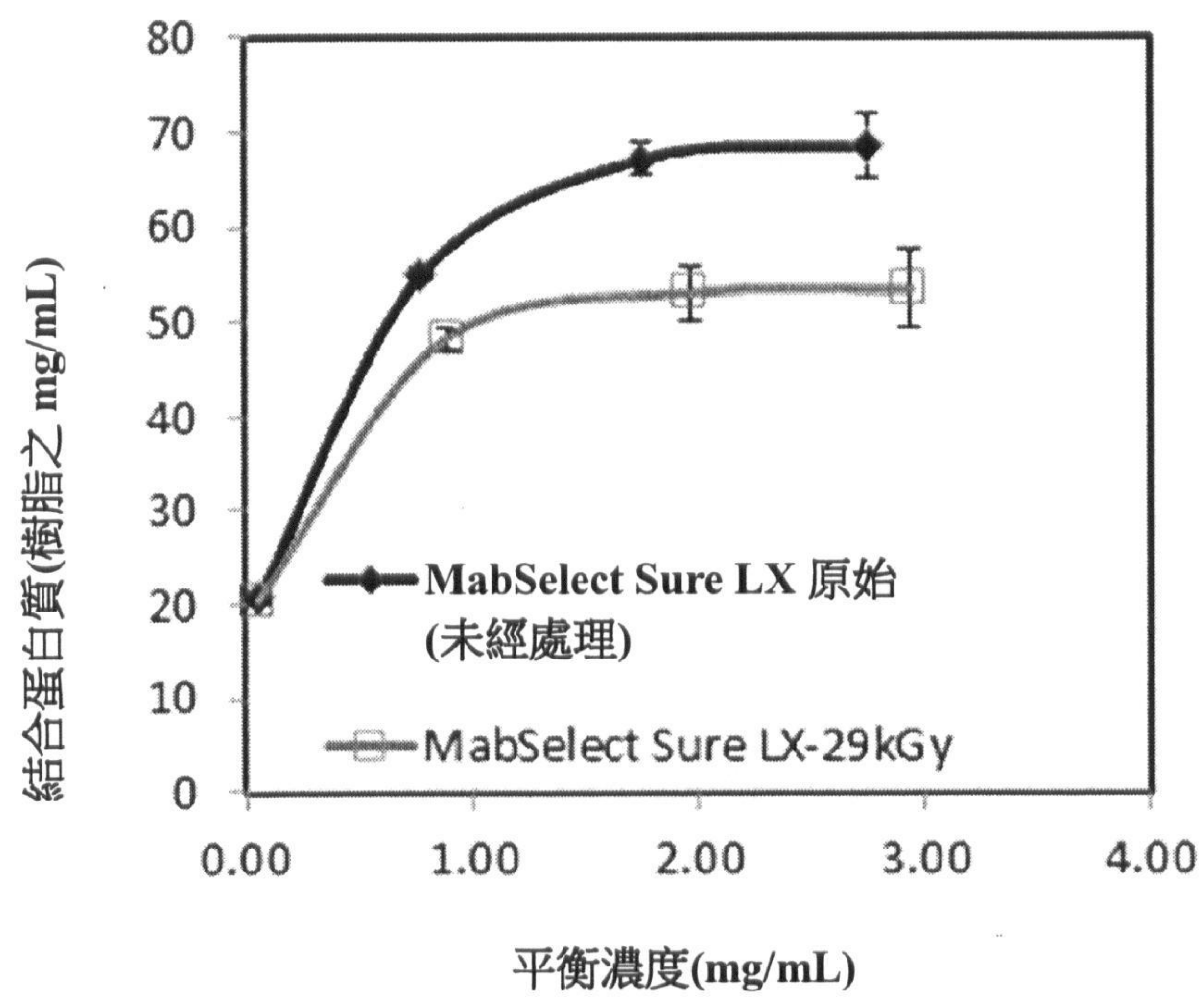


圖 13

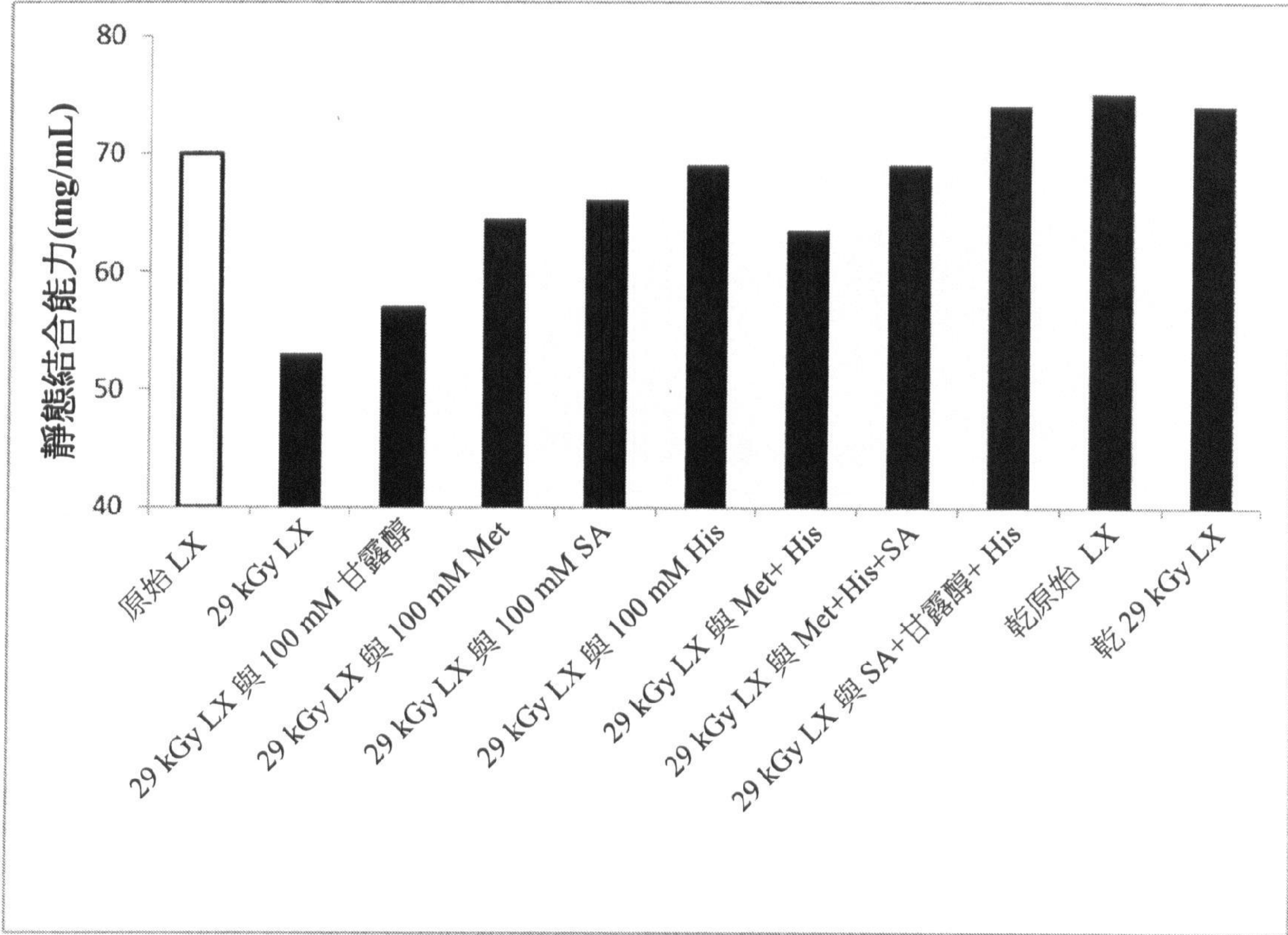


圖 14

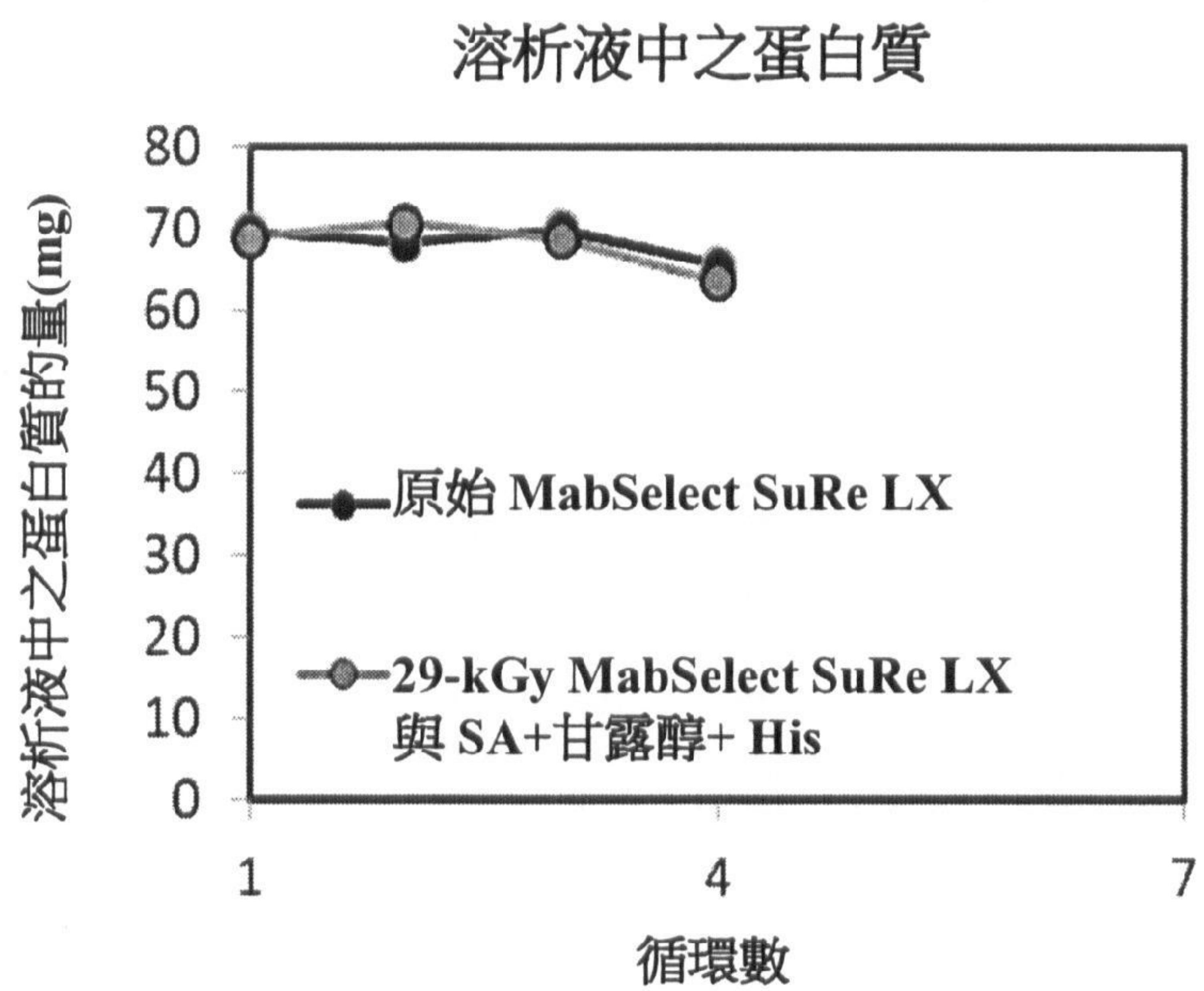


圖 15

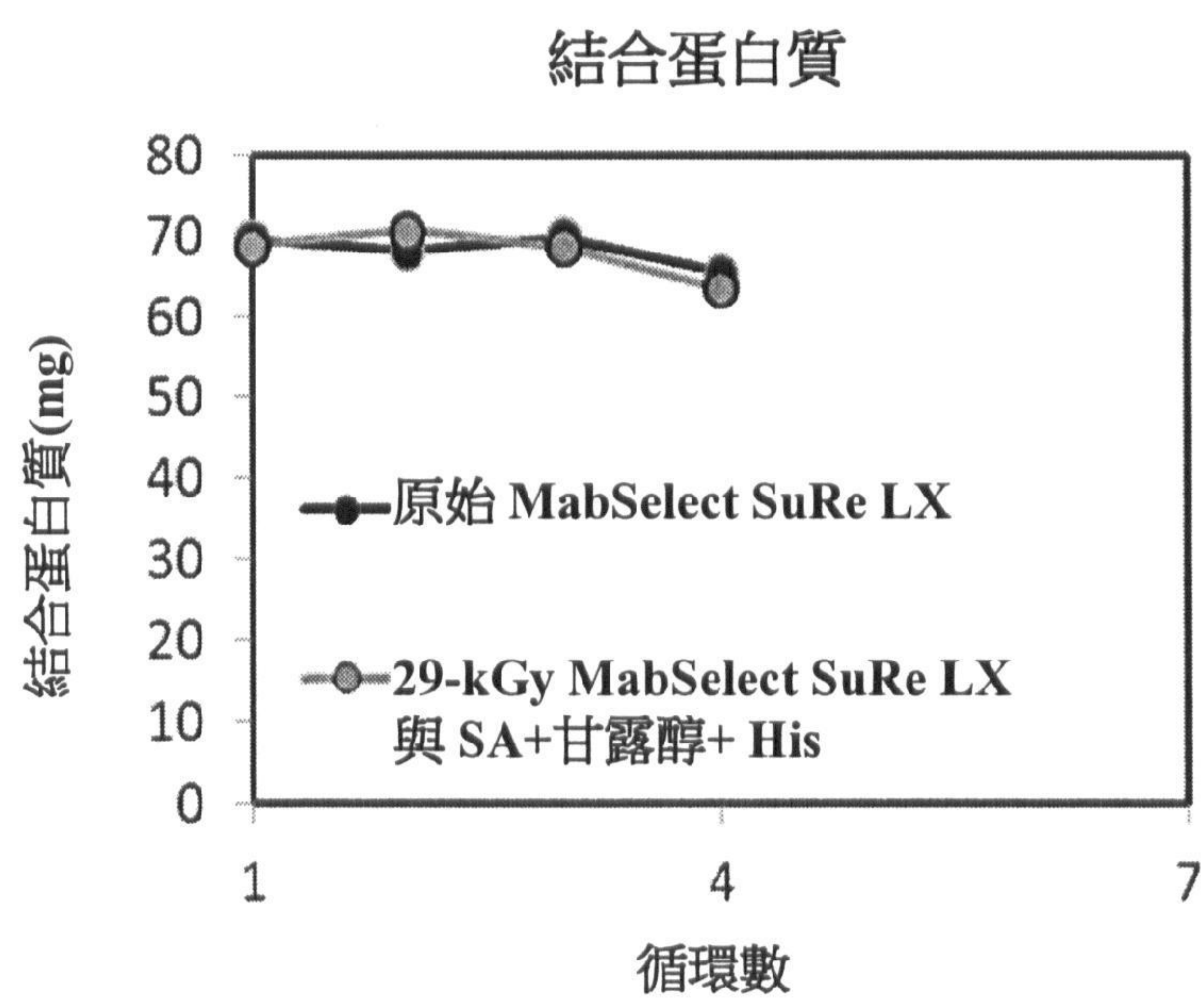
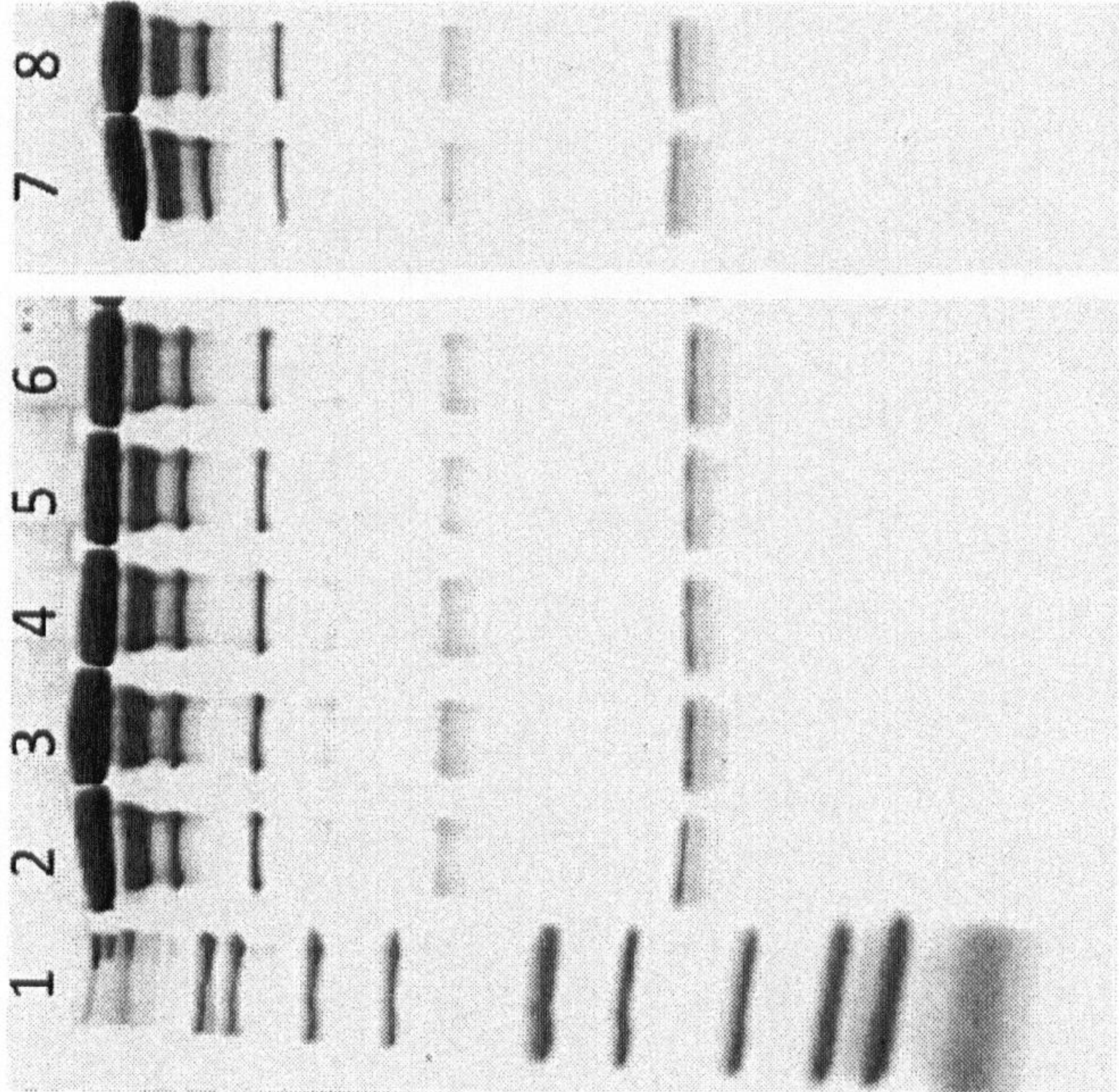


圖 16



泳道	樣品
1	指標
2	原始 LX 溶析液循環 2
3	原始 LX 溶析液循環 3
4	原始 LX 溶析液循環 6
5	29-kGy SMMH 循環 2
6	29-kGy SMMH 循環 3
7	原始 LX 溶析液循環 1
8	29-kGy SMMH 循環 1

圖 17