



(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 I754898 B

(45) 公告日：中華民國 111 (2022) 年 02 月 11 日

(21) 申請案號：109106352

(22) 申請日：中華民國 109 (2020) 年 02 月 26 日

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

A61K38/18 (2006.01)

(30) 優先權：2019/07/08 南韓

10-2019-0082061

(71) 申請人：南韓商參天堂製藥股份有限公司 (南韓) SAM CHUN DANG PHARM. CO., LTD.

(KR)

南韓

(72) 發明人：河秉緝 HA, BYUNG-JHIP (KR)；樸鎔涉 PARK, YONG-SEOP (KR)；徐美蘭 SEO, MEE-RAN (KR)；李在鎬 LEE, JAE-HO (KR)；金東奎 KIM, DONG-KYU (KR)；鄭在寅 JEONG, JAE-IN (KR)

(74) 代理人：趙鴻儒

(56) 參考文獻：

TW 201829777A

審查人員：張維纓

申請專利範圍項數：10 項 圖式數：4 共 31 頁

(54) 名稱

眼用蛋白質藥物的精制方法

(57) 摘要

本發明涉及通過應用陽離子交換色譜或陰離子交換色譜來精制具有特定範圍內的等電點的眼用蛋白質藥物的方法。根據本發明，可以通過應用三次或四次色譜工藝更經濟地生產高純度的眼用蛋白質藥物。

The present invention relates to a method for refining an ophthalmic protein pharmaceutical with an isoelectric point in a particular range by applying cation exchange chromatography or anion exchange chromatography. According to the present invention, high-purity ophthalmic protein pharmaceutical can be produced more economically by applying three or four chromatography processes.

指定代表圖：

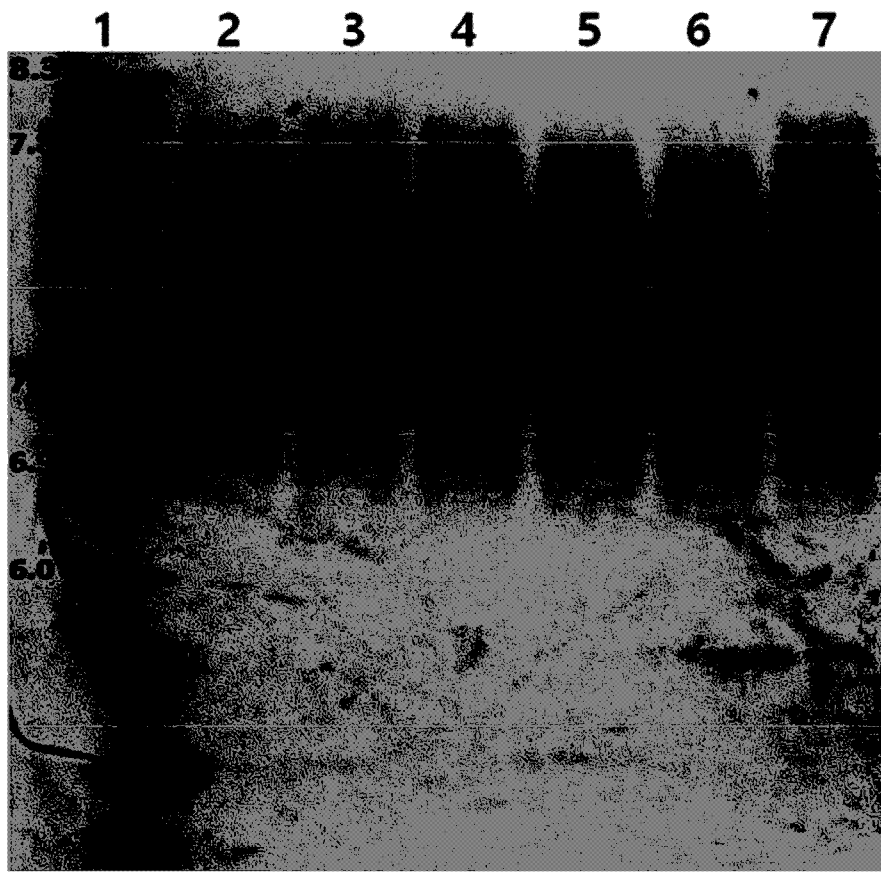


圖2



I754898

公告本

【發明摘要】

【中文發明名稱】眼用蛋白質藥物的精制方法

【英文發明名稱】REFINING METHOD OF OPHTHALMIC PROTEIN

PHARMACEUTICAL

【中文】

本發明涉及通過應用陽離子交換色譜或陰離子交換色譜來精制具有特定範圍內的等電點的眼用蛋白質藥物的方法。根據本發明，可以通過應用三次或四次色譜工藝更經濟地生產高純度的眼用蛋白質藥物。

【英文】

The present invention relates to a method for refining an ophthalmic protein pharmaceutical with an isoelectric point in a particular range by applying cation exchange chromatography or anion exchange chromatography. According to the present invention, high-purity ophthalmic protein pharmaceutical can be produced more economically by applying three or four chromatography processes.

【指定代表圖】 圖(2)

【代表圖之符號簡單說明】

無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】眼用蛋白質藥物的精制方法

【英文發明名稱】REFINING METHOD OF OPHTHALMIC PROTEIN

PHARMACEUTICAL

【技術領域】

【0001】本發明涉及一種用於精制用作眼用蛋白質藥物的有效成分的阿柏西普的方法。根據本發明，可以通過執行陽離子交換色譜或陰離子交換色譜來純化具有特定範圍內的等電點值的阿柏西普，從而改善眼用蛋白質藥物的質量和產率。

【先前技術】

【0002】血管生成被認為與諸如實體瘤、增生性視網膜病變、年齡相關性黃斑變性(AMD)和類風濕性關節炎的多種疾病的發病機制有關。血管內皮生長因子(VEGF)是血管生成所需的因子之一，在人類癌症中表達，並且也在腫瘤新血管生成中起著關鍵作用。還已知在糖尿病和其它局部缺血性視網膜病患者中的眼液中高濃度的 VEGF 與血管生成活性高度相關(Aiello LP, et al., N Engl J Med 1994; 331:1480-1487)，並且導致生長因子定位在年齡相關性黃斑變性(AMD)患者的脈絡膜新生血管膜中(Amin R1, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994 Jul; 35(8):3178-88)。因此，抗 VEGF 抗體或 VEGF 抑制劑可以用於治療實體瘤和眼內血管生成相關疾病的有希望的候選物。

【0003】 VEGF 抑制劑之一的阿柏西普是一種重組融合蛋白，該重組融合蛋白由來自人 VEGF 受體 1 和 2 的細胞外結構域的血管內皮生長因子(VEGF)結合部分組成，血管內皮生長因子(VEGF)結合部分與人 IgG1 免疫球蛋白的 Fc 部分融合。阿柏西普已在美國和歐洲以商品名 Eylea™ 被批准用於治療濕性黃斑變性。

【0004】 通過使用基因重組技術，阿柏西普可以在諸如 CHO 細胞和 NS0 細胞的動物細胞中表達。阿柏西普以二聚體形式存在，並表現出生物活性。已知表達的二聚體表現出其中聚糖結構與總共十個天冬酰胺殘基結合并且帶負電荷的唾液酸會包含在每個聚糖結構的末端部分中的形式，因此，通過細胞培養表達的阿柏西普物質由於存在各種含量的唾液酸糖而表現出具有 pH 6.0-10 的很寬範圍內的等電點值的複合物的形式。

【0005】 為了在人體上使用利用基因重組技術生產的蛋白質藥物，需要非常嚴格的安全性驗證程序和有效性驗證程序，因此，這些程序需要能夠以極高純度級別實現純化的有效純化工藝。也就是說，通過細胞培養生產的培養物包含各種含量的唾液酸糖以及來自各種工藝的雜質，因此，需要從其精制僅具有分布在針對嚴格的安全性驗證和有效性驗證的標準設定內的等電點值的蛋白質的工藝。此外，僅當通過確保足夠的精制收率來確保經濟效率時，才能在工業上使用此類蛋白質。

【0006】 抗體藥物或 Fc 融合蛋白的常規純化工藝方案(或順序)通常包括色譜步驟，該色譜步驟用於測試抗體分子在與各種雜質的結合強度或維持強度相比時優選地(優先地)結合或固定在色譜柱的固相上的能力。這些色譜工藝的特徵在於在預定條件下執行一系列色譜方法，色譜方法包括諸如蛋白質 A 或蛋白質

G 固相親和色譜、固相金屬親和色譜、陽離子交換色譜、陰離子交換色譜、疏水相互作用色譜、尺寸排阻凝膠過濾色譜、混合模式或多模式色譜和羥基磷灰石色譜的各種技術。然而，尚未揭示執行純化高純度的阿柏西普(或阿柏西普生物類似物)物質的色譜的具體條件。

【發明內容】

【0007】 技術問題

【0008】 本發明人嘗試通過從使用動物細胞株的細胞培養生產的阿柏西普有效地去除多聚體、內毒素、異源蛋白質和核酸、高等電點形式的雜質類似物等來完成開發可用於人類的高純度藥物的一系列工藝。

【0009】 本發明人排除了由於樣品的有限注射量而會對產率產生負面影響的尺寸排阻色譜，並且嘗試完成具有由於不使用有機溶劑等而不可能使蛋白質變性的優點的工藝。

【0010】 具體地，基於這樣的事實：阿柏西普包含總共十個 N-連接的聚糖結構，這比普通抗體藥物多得多，並且每個聚糖結構的末端部分中包含帶負電荷的唾液酸，因此，由於存在各種含量的唾液酸糖，所以阿柏西普表現出具有 pH 6.0-10 的很寬範圍內的等電點值的復合物形式，本發明人嘗試提供一種通過在特定條件下執行陰離子交換色譜和陽離子交換色譜來精制高純度的僅具有非常特定範圍(pH 6.0-8.3)內的等電點值的物質的技術。

【0011】 技術方案

【0012】 根據本發明的一方面，提供了一種陽離子交換色譜方法，該方法執行的步驟包括：(a)將阿柏西普混合物上樣至使用 pH 4.5-6.6 的緩衝溶液平衡的陽離子交換樹脂上；

【0013】 (b)在 pH 4.5-6.6 的條件下，使用包含 0-40 mM 氯化鈉或氯化鉀的緩衝溶液進行洗滌；以及

【0014】 (c)在 pH 4.5-6.6 的條件下，通過使用包含比步驟(b)中的濃度高的 40-120 mM 的氯化鈉或氯化鉀的緩衝溶液洗脫來收集具有 6.0-8.3 的範圍內的等電點的阿柏西普，從而可以精制具有 6.0-8.3 的範圍內的等電點的阿柏西普。

【0015】 用於柱平衡、洗滌和洗脫的緩衝溶液可以是乙酸鈉或磷酸鈉緩衝液。

【0016】 此外，用於陽離子交換樹脂的配體可以是羧甲(CM)基。

【0017】 根據本發明的另一方面，提供了一種陰離子交換色譜方法，該方法執行的步驟包括：

【0018】 (a)將阿柏西普混合物上樣至使用 pH 7.5-9.0 的緩衝溶液平衡的陰離子交換樹脂上；

【0019】 (b)在 pH 7.5-9.0 的條件下，使用包含 0-20 mM 氯化鈉或氯化鉀的緩衝溶液進行洗滌；以及

【0020】 (c)在 pH 7.5-9.0 的條件下，通過使用包含比步驟(b)中的濃度高的 20-150 mM 的氯化鈉或氯化鉀的緩衝溶液洗脫來收集具有 6.0-8.3 的範圍內的等電點的阿柏西普，從而可以精制具有 6.0-8.3 的範圍內的等電點的阿柏西普。

【0021】 用於柱平衡、洗滌和洗脫的緩衝溶液可以是磷酸鈉或 Tris 緩衝液。

【0022】 此外，用於陰離子交換樹脂的配體可以是季銨(Q)基。

【0023】 在對阿柏西普混合物執行離子交換色譜之前，可以應用從由蛋白質 A 親和色譜、混合模式或多模式色譜和脫鹽超濾組成的組中選擇的至少一種。

【0024】 此外，可以通過組合執行陽離子交換色譜方法和陰離子交換色譜方法來精制具有 6.0-8.3 的範圍內的等電點的阿柏西普。

【0025】 根據本發明的又一方面，提供一種用於配制最終精制的阿柏西普以具有以下三種組合物中的任何一種以適於玻璃體內注射的方法：

【0026】 (a)10 mM 乙酸鈉、7%蔗糖、0.03%聚山梨酯 20 的組合物，該組合物 pH 5.5；

【0027】 (b)10 mM 乙酸鈉、6.5%蔗糖、15 mM 氯化鈉、0.03%聚山梨酯 20 的組合物，該組合物 pH 5.5；以及

【0028】 (c)50 mM 乙酸鈉、6%蔗糖、0.03%聚山梨酯 20 的組合物，該組合物 pH 5.5。

【0029】 將詳細描述如上所述的本發明。

【0030】 實現本發明的一方面是以高收率和高純度精制阿柏西普的方法，阿柏西普是通過來自中國倉鼠卵巢(CHO)細胞(其是轉基因動物細胞)的細胞培養物表達的靶蛋白。

【0031】 由於尺寸排阻色譜中的樣品的可注射量受到工業生產規模的限制，導致對產率的負面影響，因此在本發明中排除了尺寸排阻色譜。另外，還排除了由於使用有機溶劑等而會使蛋白質變性的反相色譜以及由於使用高濃度鹽而可能使蛋白質變性的疏水色譜。

【0032】 根據本發明的優選實施例，一次或更多次地應用在從由存在於聚糖結構的末端中的唾液酸的含量的異質性導致的具有各種等電點的阿柏西普物

質去除相對高的等電點類似物的形式的雜質的同時用於執行精制高純度的僅具有特定範圍內的等電點值的物質的陽離子交換色譜的特定條件。

【0033】 根據本發明的另一個優選實施例，一次或更多次地應用在從由存在於聚糖結構的末端中的唾液酸的含量的異質性導致的具有各種等電點的阿柏西普物質去除相對高的等電點類似物的形式的雜質的同時用於執行精制高純度的僅具有特定範圍內的等電點值的物質的陰離子交換色譜的特定條件。

【0034】 根據本發明的另一優選實施例，可以一起應用用於執行陽離子交換色譜的特定條件和用於執行陰離子交換色譜的特定條件。

【0035】 在實施例中，在實施本發明的純化方法之前，可以另外地執行蛋白質 A 固相親和色譜、混合模式或多模式色譜和超濾(透析)。

【0036】 有益效果

【0037】 本發明的特徵和優點總結如下。

【0038】 (a)本發明提供了一種新型的精制方法，所述精制方法能夠有效地精制僅具有 pH 6.0-8.3 的範圍內的等電點值的阿柏西普(或阿柏西普生物類似物)物質。

【0039】 (b)本發明提供了一種精制方法，所述精制方法能夠克服阿柏西普具有很寬範圍的等電點分布的理化性質所引起的困難，並在工業規模上大量生產阿柏西普。

【0040】 (c)本發明提供了一種即使不執行超濾也能以高收率大量生產阿柏西普的精制方法，該超濾對應於會導致各色譜工藝之間的收率降低的緩衝液交換步驟。

【0041】 (d)根據本發明，通過對通過細胞培養表達的阿柏西普物質進行三次或四次色譜工藝來有效去除雜質蛋白質，因此可以獲得可適用於玻璃體內給藥和眼內給藥於患有諸如與濕性年齡相關性黃斑變性和糖尿病性黃斑水腫的各種疾病的患者的阿柏西普。

【圖式簡單說明】

【0042】

圖1是示出執行使用Capto adhere樹脂的多模式色譜的結果的曲線圖。在上樣和洗滌期間獲得的級分(fraction)指示在圖的底部中。

圖2示出了在根據本發明的精制方法中包含通過使用陽離子交換色譜的具有pH 6.0-8.3的範圍內的等電點值的阿柏西普級分的等電點電泳的考馬斯染色結果。

泳道1：pI標記物(SERVA)

泳道2：阿柏西普內標物

泳道3：陽離子交換樹脂色譜級分(示例1-1)

泳道4：陽離子交換樹脂色譜級分(示例1-2)

泳道5：陽離子交換樹脂色譜級分(示例1-3)

泳道6：陽離子交換樹脂色譜級分(示例1-4)

泳道7：陽離子交換樹脂色譜級分(示例1-5)

圖3示出了在根據本發明的精制方法中包含通過使用陰離子交換色譜的具有pH 6.0-8.3的範圍內的等電點值的阿柏西普級分的等電點電泳的考馬斯染色結果。

泳道1：pI標記物(SERVA)

泳道2：阿柏西普內標物

泳道3：陰離子交換樹脂色譜級分(示例2-1)

泳道4：陰離子交換樹脂色譜級分(示例2-2)

泳道5：陰離子交換樹脂色譜級分(示例2-3)

泳道6：陰離子交換樹脂色譜級分(示例2-4)

泳道7：陰離子交換樹脂色譜級分(示例2-5)

泳道8：陰離子交換樹脂色譜級分(示例2-6)

圖4示出了在根據本發明的精制方法中包含被上樣有陽離子交換色譜的洗脫樣品的陰離子交換色譜的洗滌級分和洗脫級分的等電點電泳的考馬斯染色結果。

泳道1：標記物(SERVA)

泳道2：阿柏西普內標物

泳道3：陰離子交換樹脂色譜的洗滌級分

泳道4：陰離子交換樹脂色譜的洗脫級分

泳道5：上樣至陰離子交換樹脂色譜上的樣品(陽離子交換樹脂色譜的洗脫物)。

【實施方式】

【0043】 將通過步驟以及示例詳細描述本發明的用於阿柏西普的純化方法。提供這些步驟或示例用於說明本發明，並且本發明的範圍不限於此。

【0044】 步驟 1：從表達阿柏西普的動物細胞的培養物獲得預處理溶液

【0045】 首先，通過從表達阿柏西普的動物細胞的培養物去除動物細胞來獲得預處理溶液。表達阿柏西普的動物細胞優選是哺乳動物細胞、嚙齒動物細

胞、禽細胞或昆蟲細胞，更優選中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、VERO 細胞、小倉鼠腎(BHK)細胞和 NS0 細胞，並且最優選 CHO 細胞。

【0046】 可以通過本領域已知的各種方法來培養表達阿柏西普的動物細胞。例如，可以進行本領域已知的 CHO 細胞培養方法中包括的從由分批培養、分批補料培養、重復補料分批培養、連續培養和灌注培養組成的組中選擇的至少一種。

【0047】 由於各種蛋白質、糖和脂肪通常被摻入動物細胞的培養物中，因此在執行柱色譜之前需要去除雜質的預處理步驟，以提高根據本發明的純化方法中的純化效率。

【0048】 優選地，可以通過諸如深度過濾和膜過濾的本領域已知的各種方法來執行預處理步驟。

【0049】 步驟 2：從預處理培養物精制阿柏西普

【0050】 在執行用於精制僅具有特定範圍內的等電點值的阿柏西普的陽離子交換色譜或陰離子交換色譜之前，可以通過選自於由親和色譜、混合模式或多模式色譜以及脫鹽超濾組成的組中的至少一種方法來純化預處理培養物，但其不限於此。

【0051】 對於單克隆抗體和 Fc 融合蛋白，用於純化工藝的工業標準通常包括包含若干步驟的純化工藝。在本發明的示例中，使用蛋白質 A 親和色譜對預處理培養物進行初步純化。這是其中應用與 Fc 融合蛋白或抗體的 Fc 區結合的稱為蛋白質 A 的親和配體的純化步驟。將預處理培養物上樣至蛋白質 A 柱上，洗滌，然後用大約 pH 3 的乙酸鹽或檸檬酸鹽緩衝溶液洗脫，從而獲得初步純化的阿柏西普級分。

【0052】 蛋白質聚集體或高分子蛋白質種類是需要從包含 Fc 融合蛋白或抗體分子的生物藥物去除的主要雜質中的一種類型。例如，在將產品用於診斷、治療或其它應用之前，需要從生物藥物去除蛋白質聚集體和其它污染物。在本發明的示例中，使用了混合模式或多模式色譜，因此，通過將初步純化的級分上樣在混合模式或多模式樹脂上來執行這種色譜，而無需任何超濾工藝。

【0053】 可以有利地應用其中兩個或更多個彼此不同但一起起作用的位點與靶蛋白相互作用的多模式色譜法。對洗脫池進行培養物中的蛋白質聚集體和其它雜質的去除，從而獲得更高純度的阿柏西普物質。

【0054】 本發明中的用於純化阿柏西普的混合模式或多模式樹脂可商購獲得，其示例為 Capto MMC™(GE Healthcare(通用電氣醫療集團))、Capto stick™(GE Healthcare)、MBI HyperCel™(Pall)等。與常規離子交換劑相比，Capto adhere™ 包含具有多模式功能的配體以賦予不同的選擇性，並表現出與靶分子相互作用的多種有用功能，諸如離子相互作用、氫鍵相互作用和疏水相互作用。對於本領域技術人員而言將明顯的是，本發明的實施例中使用的多模式樹脂是 Capto adhere™，但不限於此。

【0055】 通過柱平衡步驟、上樣步驟和洗脫步驟來執行混合模式或多模式色譜，並且混合模式或多模式色譜還可以在上樣步驟之後且在洗脫步驟之前包括一個或更多個洗滌步驟。可以控制用於執行色譜的條件，使得可以在上樣步驟和洗滌步驟期間以不與樹脂結合的方式獲得高純度的阿柏西普物質，或者可以在與樹脂第一次結合之後在洗脫步驟中獲得高純度的阿柏西普物質。在本發明的示例中，用 10 mL 的 Capto adhere(GE Healthcare)樹脂填充柱子(GE Healthcare，XK16/20)，然後用 50 mM 的包含 20 mM 氯化鈉的乙酸钠緩衝溶液(pH 5.5)平衡

柱子，並且收集在上樣步驟和洗滌步驟期間流出而未與樹脂結合的溶液(等同於平衡緩衝溶液)(如圖 1 中的柱色譜圖中所示)，使得可以有效地去除蛋白質聚集體和其它雜質，並且有可能不執行超濾工藝和離子交換色譜，超濾工藝被執行用於交換上樣的樣品的緩衝溶液，以在下一步驟中上樣所述上樣的樣品。

【0056】 步驟 3：精制具有特定範圍內的等電點值的阿柏西普

【0057】 在執行用於精制僅具有特定範圍內的等電點值的阿柏西普的陽離子交換色譜或陰離子交換色譜之前，可以通過選自於由親和色譜、混合模式或多模式色譜以及脫鹽超濾組成的組中的至少一種方法來純化預處理培養物，但其不限於此。

【0058】 為了分析等電點圖案，採用了等電聚焦。在制備標準溶液和測試溶液各 20 μg 之後，將每種溶液上樣至 Novex pH 3-10 IEF Gel 1.0 mm，10 孔(Life Technologies)上，並在 100V、200V 和 500V 下分別進行電泳 1 小時、1 小時和 30 分鐘。使用 12%三氯乙酸固化凝膠 30 分鐘，使用超純水洗滌 3 次，每次 10 分鐘，用考馬斯染色溶液(Coomassie staining solution)染色，然後觀察。

【0059】 在下文中，將單獨地描述執行陽離子交換色譜(示例 1)、執行陰離子交換色譜(示例 2)以及組合執行陽離子交換色譜和陰離子交換色譜。

【0060】 <示例 1：執行陽離子交換色譜>

【0061】 (1)陽離子交換色譜法

【0062】 對通過蛋白質 A 親和色譜收集的阿柏西普樣品溶液或者從一起執行蛋白質 A 親和色譜和多模式色譜收集的阿柏西普樣品溶液進行陽離子交換色譜，以純化僅具有特定範圍內的等電點值的阿柏西普物質。

【0063】 本發明中使用的帶有陽離子交換樹脂的帶電荷的官能團的示例可以是羧甲基(CM)、磺乙基(SE)、磺丙基(SP)、磷酸鹽(P)等，陽離子交換樹脂的載體的示例可以是聚苯乙烯、聚苯乙烯/二乙烯基苯、纖維素、葡聚糖、瓊脂糖和 Toyopearl。本發明中使用的陽離子交換劑的示例特別具有羧甲基(CM)。

【0064】 可以使用可具有緩衝能力的任何緩衝溶液作為本發明的陽離子交換色譜工藝中使用的緩衝溶液，其示例包括檸檬酸鈉、乙酸鈉、磷酸鈉、磷酸鉀和甘氨酸-HCl。

【0065】 可以使用各種緩衝溶液作為平衡溶液，特別是乙酸鈉和磷酸鈉緩衝溶液，並且使用的 pH 為 4.5-6.6。可以使用各種緩衝溶液作為洗滌溶液，特別是乙酸鈉和磷酸鈉緩衝溶液，並且使用的 pH 為 4.5-6.6，並且緩衝溶液可以包含低濃度的氯化鈉或氯化鉀(0-40 mM 的濃度範圍，這意味著不包含氯化鈉或氯化鉀，或者如果存在，則以大於 0-40 mM 的濃度範圍包含氯化鈉或氯化鉀)。可以使用各種緩衝溶液作為洗脫溶液，特別是乙酸鈉和磷酸鈉緩衝溶液，並且使用的 pH 為 4.5-6.6。證明的是，隨著氯化鈉或氯化鉀的鹽濃度的增加，具有較低 pI 值的蛋白質首先被順序地洗脫。為了純化具有 8.3 或更小的等電點的物質，優選以大約 120 mM 或更小的鹽濃度進行洗脫。

【0066】 當執行陽離子交換色譜時，本發明人在平衡步驟、洗滌步驟和洗脫步驟期間使用 pH 4.5-6.6 的範圍內的溶液。原因在於在低於 pH 4.5 的條件下會收集具有低唾液酸含量的阿柏西普物質，而在高於 pH 6.6 的條件下會損失具有特定範圍(pH 6.0-8.3)內的等電點值的阿柏西普物質，導致純化效率降低。

【0067】 以下將參照本發明的具體示例來描述步驟。通過使用填充有 2 mL 的 CM-Sepharose FF(GE healthcare)的 Tricon 柱(GE healthcare，直徑 0.5cm，高度

10cm)來進行作為用於找到用於 pI 切割的合適的 pH 和鹽濃度的初步試驗的 1)NaCl 鹽梯度洗脫和 2)pH 梯度洗脫，CM-Sepharose FF(GE healthcare)是一種弱酸性陽離子交換樹脂。

【0068】 首先，對於 NaCl 鹽梯度洗脫測試，用 10 倍柱體積(CV)的 50 mM 乙酸钠(pH 5.5)平衡緩衝溶液來平衡柱子。用每種平衡緩衝溶液稀釋如上所述的步驟 2 中通過執行蛋白質 A 親和色譜或 Capto adhere 多模式色譜得到的阿柏西普樣品溶液，然後將樣品溶液的 pH 調節至與平衡緩衝溶液的 pH 相同。此後，將樣品溶液以 0.3 mL/min 的流速上樣至柱子上。用相同的 5 CV 平衡緩衝溶液洗滌柱子之後，使洗脫緩衝液(50 mM 乙酸钠、0.5 M 氯化鈉、pH 5.5)以 0%至 100% 流動 30 CV，從而通過增加鹽濃度來洗脫蛋白質，並通過自動級分收集器收集 16 個級分。通過等電點電泳來分析收集的級分，其結果證明，隨著氯化鈉的鹽濃度的增加，具有較低 pI 值的蛋白質首先被順序地洗脫。為了純化具有 8.3 或更小的等電點的物質，優選以大約 120 mM 或更小的鹽濃度進行洗脫。

【0069】 對於 pH 梯度洗脫測試，用 10 CV 的平衡緩衝溶液(20 mM 乙酸钠、20 mM 磷酸鈉、pH 5.5)平衡柱子，並通過與鹽濃度梯度洗脫測試中的方法相同的方法來處理阿柏西普樣品溶液。在用 5 CV 的平衡緩衝溶液洗滌柱子之後，使洗脫緩衝液(20 mM 乙酸钠、20 mM 磷酸鈉、pH 8.5)以 0%至 100%流動 30 CV，從而通過增大 pH 來洗脫蛋白質，並通過自動級分收集器收集 20 個級分。通過等電點電泳來分析收集的級分，其結果證明，隨著 pH 增大，具有較低 pI 值的蛋白質首先被順序地洗脫。作為執行逐步 pH 洗脫條件測試以探索更詳細的 pH 條件的結果，發現優選在 pH 6.6 或更小的條件下進行陽離子交換色譜的平衡步驟和洗滌步驟，並且為了未來放大的可再現性，選擇鹽濃度增加洗脫方法以完

成如表 1 中所示的更精確的洗脫條件，與 pH 洗脫方法相比，鹽濃度增加洗脫方法可以實現更穩定的工藝。

【0070】 根據表 1 中的每個示例的條件，用平衡緩衝液以 150 cm/h 的流速平衡樹脂。然後，用各平衡緩衝溶液稀釋通過執行如上所述的步驟 2 中的蛋白質 A 親和色譜或 Capto adhere 多模式色譜得到的阿柏西普樣品溶液，然後將其 pH 調節至與平衡緩衝溶液的 pH 相同。之後，將樣品溶液以 150 cm/h 的流速上樣至填充有 CM-Sepharose FF 樹脂的柱子上。之後，根據表 1 上的每個示例的條件，使用洗滌緩衝溶液以 150 cm/h 的流速進行洗滌步驟，從而去除具有相對更高的等電點值的阿柏西普物質，然後使洗脫緩衝溶液以 150 cm/h 的流速流動，從而僅收集具有特定範圍(pH 6.0-8.3)內的等電點值的阿柏西普物質。用 0.5 N 的氫氧化鈉溶液使測試中使用的樹脂再生，用各平衡緩衝溶液重新平衡，然後再使用。

【0071】 【表 1】

【0072】 用於 CM-Sepharose 陽離子交換色譜的詳細示例條件

示例	平衡緩衝溶液	洗滌緩衝溶液	洗脫緩衝溶液
1-1	50 mM 乙酸钠(pH 4.5)	50 mM 乙酸钠、40mM 氯化鈉(pH 4.5)	50 mM 乙酸钠、100 mM 氯化鈉(pH 5.5)
1-2	20 mM 磷酸鈉(pH 6.6)	20 mM 磷酸鈉(pH 6.6)	20 mM 磷酸鈉、50 mM 氯化鈉(pH 6.6)
1-3	20 mM 磷酸鈉 (pH 6.6)	20 mM 磷酸鈉(pH 6.6)	20 mM 磷酸鈉、45 mM 氯化鈉(pH 6.6)
1-4	20 mM 磷酸鈉(pH 6.6)	20 mM 磷酸鈉(pH 6.6)	20 mM 磷酸鈉、40mM 氯化鈉(pH 6.6)
1-5	50 mM 乙酸钠(pH 5.5)	20 mM 磷酸鈉(pH 6.6)	20 mM 磷酸鈉、50 mM 氯化鈉(pH 6.6)

【0073】 (2)陽離子交換色譜結果

【0074】 使用作為一種弱陽離子交換樹脂的 CM-Sepharose FF(GE Healthcare)樹脂測試各種平衡條件、洗滌條件以及洗脫條件。主要使用乙酸钠和磷酸鈉緩衝溶液作為平衡溶液，並且使用的 pH 為 4.5-6.6。主要使用乙酸钠和磷酸鈉緩衝溶液作為洗滌溶液，並且使用的 pH 為 4.5-6.6，並且緩衝溶液優選包含低濃度的氯化鈉或氯化鉀(0-40 mM 的濃度範圍，這意味著不包含氯化鈉或氯化鉀，或者如果存在，則以大於 0 mM 至 40 mM 的濃度範圍包含氯化鈉或氯化鉀)。使用乙酸钠和磷酸鈉緩衝溶液的洗脫溶液中所用的 pH 為 4.5-6.6，洗脫溶液中包含較高濃度(40-120 mM 的濃度範圍)的氯化鈉或氯化鉀。洗脫溶液中的氯化鈉鹽濃度優選為 40-100 mM，並且進行表 1 上所示的各個平衡步驟、上樣步驟、洗滌步驟和洗脫步驟以有效地純化與標準品阿柏西普具有最相似的等電點值範圍 (pH 6.0-8.3) 的阿柏西普物質。

【0075】 表 2 和圖 2 中的等電點分析結果證明考慮到與標準品阿柏西普相比，通過遵循表 1 上用於執行色譜的詳細條件，可以有效地利用使用 CM-Sepharose FF 樹脂的色譜純化。

【0076】 本發明人已經發現在洗滌步驟和洗脫步驟期間，通過使用自動級分收集器從洗滌液和洗脫液獲得對應於 1 倍柱體積(CV)的體積單位的級分，並且當通過等電點分析來分析這些級分中的每個，隨後收集指定為具有與標準品阿柏西普最相似的等電點範圍的洗滌級分和洗脫級分時，更容易確保等電點分布的相似性。可以在陽離子交換色譜工藝中選擇性地使用這種級分方法。

【0077】 【表 2】

【0078】 陽離子交換色譜的純化結果

示例	等電點分析結果	IEF 凝膠上樣量(μg)
----	---------	----------------------------

1-1	圖 2 中的泳道 3	20
1-2	圖 2 中的泳道 4	20
1-3	圖 2 中的泳道 5	20
1-4	圖 2 中的泳道 6	20
1-5	圖 2 中的泳道 7	20

【0079】 <示例 2：執行陰離子交換色譜>

【0080】 (1)陰離子交換色譜法

【0081】 通過蛋白質 A 親和色譜收集的阿柏西普樣品溶液或者從一起執行的蛋白質 A 親和色譜和多模式色譜收集的阿柏西普樣品溶液進行陰離子交換色譜，以純化僅具有特定範圍內的等電點值的阿柏西普物質。

【0082】 本發明中使用的帶有陰離子交換樹脂的帶電荷的官能團的示例可以是胺或氨基，更優選伯胺、仲胺、叔胺或季胺，並且最優選叔胺或季胺，陰離子交換樹脂的載體的示例可以是聚苯乙烯、聚苯乙烯/二乙烯基苯、纖維素、葡聚糖、瓊脂糖和 Toyopearl。在本發明中使用的陰離子交換劑的示例特別地具有二乙基氨基乙基(DEAE)配體和季銨(Q)配體。

【0083】 可以使用可具有緩衝能力的任何緩衝溶液作為用於本發明的陰離子交換色譜工藝中的緩衝溶液，其示例包括磷酸鈉、磷酸鉀、HEPES、甘氨酸-HCl 和 Tris。

【0084】 可以使用各種緩衝溶液作為平衡溶液，特別是磷酸鈉和 Tris 緩衝溶液，並且 pH 可以在 7.5-9.0 的範圍內。可以使用各種緩衝溶液作為洗滌溶液，特別是磷酸鈉和 Tris 緩衝溶液，並且使用的 pH 為 7.5-9.0，並且緩衝溶液可以包含低濃度的氯化鈉或氯化鉀(0-20 mM 的濃度範圍，這意味著不包含氯化鈉或氯化鉀，或者如果存在，則以大於 0 至 20 mM 的濃度範圍包含氯化鈉或氯化鉀)。可以使用各種緩衝溶液作為洗脫溶液，特別是磷酸鈉和 Tris 緩衝溶液。證明的

是，隨著氯化鈉或氯化鉀的鹽濃度增加，具有較低 pI 值的蛋白質首先被順序地洗脫。為了純化具有 8.3 或更小的等電點的物質，優選以大約 150 mM 或更小的鹽濃度執行洗脫。

【0085】 在執行陰離子交換色譜時，本發明人在平衡步驟、洗滌步驟和洗脫步驟期間使用 pH 7.5-9.0 的範圍內的溶液。原因在於在小於 pH 7.5 的條件下會損失具有特定範圍(pH 6.0-8.3)內的等電點值的阿柏西普物質，導致純化效率降低，而在大於 pH 9.0 的條件下會收集具有低唾液酸含量的阿柏西普物質。

【0086】 以下將參照本發明的具體示例來描述步驟。通過使用填充有 2 mL 的 Q-Sepharose FF(GE healthcare)的 Tricon 柱(GE healthcare，直徑 0.5cm，高度 10cm)來進行作為用於找到用於 pI 切割的合適的 pH 和鹽濃度的初步試驗的 1)NaCl 鹽梯度洗脫和 2)pH 梯度洗脫，Q-Sepharose FF(GE healthcare)是一種強鹼性陰離子交換樹脂。

【0087】 首先，對於 NaCl 鹽梯度洗脫測試，用 10 倍柱體積(CV)的 20 mM Tris(pH 8.5)平衡緩衝溶液平衡柱子。用各平衡緩衝溶液稀釋通過執行如上所述的步驟 2 中的蛋白質 A 親和色譜或 Cpto adhere 多模式色譜得到的阿柏西普樣品溶液，然後將樣品溶液的 pH 調節至與平衡緩衝溶液的 pH 相同。之後，將樣品溶液以 0.3 mL/min 的流速上樣至柱子上。用 5 CV 相同的平衡緩衝溶液洗滌柱子之後，使洗脫緩衝液(20 mM Tris、0.5 M 氯化鈉、pH 8.5)以 0%至 100%流動 30 CV，從而通過增加鹽濃度來洗脫蛋白質，並通過自動級分收集器收集 13 個級分。通過等電點電泳來分析收集的級分，其結果證明，隨著氯化鈉的鹽濃度的增加，具有較高 pI 值的蛋白質首先被順序地洗脫。為了純化具有 8.3 或更小的等電點的物質，優選以大約 150 mM 或更小的鹽濃度進行洗脫。

【0088】對於pH梯度洗脫測試，用10 CV的平衡緩衝溶液(20 mM 乙酸钠、20 mM Tris、pH 8.5)平衡柱子，並通過與鹽濃度梯度洗脫測試中的方法相同的方法來處理阿柏西普樣品溶液。在用5 CV的平衡緩衝溶液洗滌柱子之後，使洗脫緩衝液(20 mM 乙酸钠、20 mM Tris、pH 5.5)以0%至100%流動30 CV，從而通過減小pH來洗脫蛋白質，並通過自動級分收集器收集25個級分。通過等電點電泳來分析收集的級分，其結果證明，隨著pH值的減小，具有較高pI值的蛋白質首先被順序地洗脫。發現的是，由於具有相對低的等電點的阿柏西普蛋白質在pH 7.5或更小的平衡條件和洗滌條件下未吸附在柱子上，因此優選在pH 7.5或更大的條件下執行色譜。為了未來放大的可再現性，選擇鹽濃度增加洗脫方法以完成如表3中所示的更精確的洗脫條件，與pH洗脫方法相比，鹽濃度增加洗脫方法可以實現更穩定的工藝。

【0089】根據表3中的每個示例的條件，用平衡緩衝液以150 cm/h的流速平衡樹脂。然後，用各平衡緩衝溶液稀釋通過執行如上所述的步驟2中的蛋白質A親和色譜或Capto adhere多模式色譜得到的阿柏西普樣品溶液，然後將其pH調節至與平衡緩衝溶液的pH相同。之後，將樣品溶液以150 cm/h的流速上樣至填充有Q-Sepharose FF樹脂的柱子上。之後，根據表3上的每個示例的條件，使用洗滌緩衝液以150 cm/h的流速進行洗滌步驟，從而去除具有相對更高的等電點值的阿柏西普物質，然後使洗脫緩衝液以150 cm/h的流速流動，從而僅收集具有特定範圍(pH 6.0-8.3)內的等電點值的阿柏西普物質。用1 N的氫氧化鈉溶液使測試中使用的樹脂再生，用每種平衡緩衝液重新平衡，然後再使用。

【0090】 【表3】

【0091】用於 Q-sepharose 陰離子交換色譜的詳細示例條件

示例	平衡緩衝溶液	洗滌緩衝溶液	洗脫緩衝溶液
2-1	20 mM 磷酸鈉 (pH 7.5)	20 mM 磷酸鈉 (pH 7.5)	20 mM 磷酸鈉、70 mM 氯化鈉 (pH 7.5)
2-2	20 mM Tris (pH 8.5)	20 mM Tris、20 mM 氯化鈉 (pH 8.5)	20 mM Tris、80 mM 氯化鈉 (pH 8.5)
2-3	20 mM Tris (pH 8.5)	20 mM Tris、20 mM 氯化鈉 (pH 8.5)	20 mM Tris、85 mM 氯化鈉 (pH 8.5)
2-4	20 mM Tris (pH 8.5)	20 mM Tris、20 mM 氯化鈉 (pH 8.5)	20 mM Tris、90 mM 氯化鈉 (pH 8.5)
2-5	20 mM Tris (pH 8.5)	20 mM Tris (pH 7.6)	20 mM Tris、60 mM 氯化鈉 (pH 7.6)
2-6	20 mM Tris (pH 8.5)	20 mM Tris (pH 7.6)	20 mM Tris、50 mM 氯化鈉 (pH 7.6)

【0092】(2) 陽離子交換色譜結果

【0093】使用作為一種強鹼性陰離子交換樹脂的 Q-Sepharose FF (GE Healthcare) 樹脂測試各種平衡條件、洗滌條件和洗脫條件。可以特別使用磷酸鈉和 Tris 緩衝溶液作為平衡溶液，並且使用的 pH 可以在 7.5-9.0 的範圍內。可以使用磷酸鈉和 Tris 緩衝溶液作為洗滌溶液，並且使用的 pH 可以在 7.5-9.0 的範圍內，並且緩衝溶液優選包含低濃度 (0-20 mM 的濃度範圍) 的氯化鈉或氯化鉀。可以特別使用磷酸鈉和 Tris 緩衝溶液作為洗脫溶液。為了純化具有 8.3 或更小的等電點的物質，優選以 20 mM 或更大的鹽濃度執行洗脫，20 mM 或更大的鹽濃度高於洗滌步驟中的鹽濃度並且小於 150 mM，並且更優選地，在 pH 7.5-8.5 的條件下，洗脫溶液中的氯化鈉鹽濃度為 20-90 mM。即使在 90 mM 或更大的鹽濃度下，也能夠純化在目標等電點範圍內的阿柏西普，但是隨著洗脫峰的形狀變得相對尖銳，所收集級分之間的等電點值差異趨於減小。

【0094】 進行表 3 上所示的各個平衡步驟、上樣步驟、洗滌步驟和洗脫步驟，以有效純化與標準品阿柏西普具有最相近的等電點值範圍(pH 6.0-8.3)的阿柏西普物質。表 4 和圖 3 中的等電點分析結果證明的是，考慮到與標準品阿柏西普相比，通過遵循表 3 上用於執行色譜的詳細條件，可以有效地利用使用 Q-Sepharose FF 樹脂的色譜純化。

【0095】 本發明人已經發現在洗滌步驟和洗脫步驟期間通過使用自動級分收集器從洗滌液和洗脫液獲得對應於 1 倍柱體積(CV)的體積單位的級分，並且當通過等電點分析來分析這些級分中的每個，隨後收集指定為具有與標準品阿柏西普最相似的等電點範圍的洗滌級分和洗脫級分時，更容易確保等電點分布的相似性。可以在陰離子交換色譜工藝中選擇性地使用這種級分方法。

【0096】 【表 4】

【0097】 陰離子交換色譜的純化結果

示例	等電點分析結果	IEF 凝膠上樣量(μg)
2-1	圖 3 中的泳道 3	20
2-2	圖 3 中的泳道 4	20
2-3	圖 3 中的泳道 5	20
2-4	圖 3 中的泳道 6	20
2-5	圖 3 中的泳道 7	20
2-6	圖 3 中的泳道 8	20

【0098】 <示例 3：組合執行陽離子交換色譜和陰離子交換色譜>

【0099】 將通過蛋白質 A 親和色譜收集的阿柏西普樣品溶液或從一起執行的蛋白質 A 親和色譜和多模式色譜的阿柏西普樣品溶液進行陽離子交換色譜和陰離子交換色譜的組合應用，以純化僅具有特定範圍內的等電點值的阿柏西普物質。

【0100】 即，根據示例 1 和示例 2 的方法，首先執行以 CM-Sepharose FF 樹脂作為陽離子交換樹脂的色譜，然後執行以 Q-Sepharose FF 樹脂作為陰離子交換樹脂的色譜，或者首先執行以 Q-Sepharose FF 樹脂作為陰離子交換樹脂的色譜，然後執行以 CM-Sepharose FF 樹脂作為陽離子交換樹脂的色譜，使得與單獨執行離子交換色譜時相比，可以更容易地純化僅具有特定範圍(pH 6.0-8.3)內的等電點值的阿柏西普物質，並且也可以提高純化效率。

【0101】 下面將詳細描述組合應用，其中，執行以 CM-Sepharose FF 樹脂作為陽離子交換樹脂的色譜，然後執行以 Q-Sepharose FF 樹脂作為陰離子交換樹脂的色譜。對於順序色譜應用，有利於使洗滌緩衝溶液和洗脫緩衝溶液中的每種鹽濃度降低至 0-30 mM。用平衡緩衝溶液(50 mM 乙酸钠、pH 5.5)以 1 mL/min 的流速平衡填充有 10 mL 的 CM-Sepharose FF 樹脂的柱子(GE Healthcare, XK16/20)。然後，用平衡緩衝溶液將如上所述的步驟 2 中的通過執行蛋白質 A 親和色譜或 Capto adhere 多模式色譜獲得的阿柏西普樣品溶液稀釋，然後將其 pH 調節為與平衡緩衝溶液的 pH 相同。之後，將樣品溶液以 1 mL/min 的流速上樣至填充有 CM-Sepharose FF 樹脂的柱子上。使平衡緩衝溶液以 3 倍柱體積(CV)流動之後，使用洗滌緩衝溶液以 1 mL/min 的流速進行洗滌步驟，以去除具有相對高的等電點值的阿柏西普物質，然後使用自動級分收集器進行級分，同時使洗脫緩衝溶液(20 mM 磷酸鈉，50 mM 氯化鈉，pH 6.5)以 1 mL/min 的流速流動。在僅收集具有特定範圍(pH 6.0-9.0)內的等電點值的阿柏西普物質之後，在 Q-Sepharose 色譜工藝中用平衡緩衝溶液將樣品稀釋 10 倍，並調節至 pH 8.5。用平衡緩衝溶液(10 mM Tris, pH 8.5)以 1 mL/min 的流速平衡填充有 10 mL 的作為一種強鹼性陰離子交換樹脂的 Q-Sepharose FF 樹脂的柱子(GE Healthcare,)

XK16/20)。然後，將以陽離子交換色譜制備的阿柏西普樣品溶液以 1 mL/min 的流速上樣至柱子上。之後，使用包含 20 mM 氯化鈉的 10 mM Tris(pH 8.5)洗滌緩衝溶液以 1 mL/min 的流速進行洗滌步驟，以去除具有相對高的等電點值的阿柏西普物質，然後使洗脫緩衝溶液(10 mM Tris, 120 mM 氯化鈉, pH 8.5)以 1 mL/min 的流速流動，以僅收集具有特定範圍(pH 6.0-8.3)內的等電點值的阿柏西普物質。

【0102】 與單獨執行的陽離子交換色譜或陰離子交換色譜相比，示例 3 中的通過陽離子交換色譜和陰離子交換色譜的組合應用的具有特定範圍內的等電點值的阿柏西普的純化產率表現出高出大約 15%-30%的值，並且如從圖 4 中的等電點分析結果可以看出，可以生產與標準品相比具有非常相似的等電點分布的阿柏西普物質。

【0103】 步驟 4：通過配方制備最終的儲備溶液

【0104】 為了通過最終配制具有 pH 6.0 至 8.3 的等電點的阿柏西普溶液來制備儲備溶液，使用 Vivaspin(Sartorius, MWCO 50kDa)濃縮阿柏西普溶液，然後通過重復添加配制緩衝溶液來使其替換為配制緩衝溶液，該阿柏西普溶液是通過陽離子交換色譜、陰離子交換色譜或組合的陽離子/陰離子交換色譜的純化收集的。最後，添加聚山梨酯 20 至 0.03%的含量，從而制備包含大約 40 mg/mL 的濃度的阿柏西普的最終儲備溶液。對於配制緩衝溶液的組合物，可以選擇 10 mM 乙酸鈉、7%蔗糖、0.03%聚山梨酯 20 的組合物(pH 5.5)，或者作為具有增加的鹽濃度以改善長期穩定性的組合物，可以選擇 10 mM 乙酸鈉、6.5%蔗糖、15mM 氯化鈉、0.03%聚山梨酯 20 的組合物(pH 5.5)或者 50 mM 乙酸鈉、6%蔗糖、0.03%聚山梨酯 20 的組合物(pH 5.5)。使用 0.22 μ m PES 膜進行滅菌過濾。

【0105】 如上面所闡述的，本發明提供了通過在其特定條件下執行陽離子交換色譜或陰離子交換色譜來精制具有特定範圍內的等電點值的阿柏西普的方法，並最終提供了可以通過包括步驟 1 至步驟 4 的工藝更經濟地生產高純度眼用蛋白質藥物的優點。

【0106】 儘管已經參照具體的說明性實施例描述了本發明，但是本發明所屬領域的技術人員可以理解的是，在不脫離本發明的技術精神或本質特性的情況下，可以以其它具體形式來實施本發明。因此，上述實施例應被解釋為是示例性的，而不限制本發明。本發明的範圍不由如上闡述的詳細描述限定，而是由本發明的所附權利要求限定，並且還應該理解的是，從權利要求及其等同物的定義和範圍得出的所有改變或修改落入發明的範圍內。

【符號說明】

【0107】

無。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種用於通過在陽離子交換色譜之後執行陰離子交換色譜來精制具有 6.0-8.3 的範圍內的等電點的阿柏西普的方法，其中，該陽離子交換色譜的步驟包括以下步驟：

(a-1) 將阿柏西普混合物上樣至使用 pH 4.5-6.6 的緩衝溶液平衡的陽離子交換樹脂上；

(a-2) 在 pH 4.5-6.6 的條件下，使用包含 0-40 mM 氯化鈉或氯化鉀的緩衝溶液進行洗滌；以及

(a-3) 在 pH 4.5-6.6 的條件下，通過使用包含比步驟(a-2)中的濃度高的 40-120 mM 的氯化鈉或氯化鉀的緩衝溶液洗脫來收集具有 6.0-9.0 的範圍內的等電點的阿柏西普；以及

其中，該陰離子交換色譜的步驟包括以下步驟：

(b-1) 將步驟 (a-3) 中的具有 6.0-9.0 的範圍內的等電點的阿柏西普上樣至使用 pH 7.5-9.0 的緩衝溶液平衡的陰離子交換樹脂上；

(b-2) 在 pH 7.5-9.0 的條件下，使用包含 0-20 mM 氯化鈉或氯化鉀的緩衝溶液進行洗滌；以及

(b-3) 在 pH 7.5-9.0 的條件下，通過使用包含比步驟 (b-2) 中的濃度高的 20-150 mM 的氯化鈉或氯化鉀的緩衝溶液洗脫來收集具有 6.0-8.3 的範圍內的等電點的阿柏西普。

【請求項2】一種用於通過在陰離子交換色譜之後執行陽離子交換色譜來精制具有 6.0-8.3 的範圍內的等電點的阿柏西普的方法，其中，該陰離子交換色譜的步驟包括以下步驟：

(b-1) 將阿柏西普混合物上樣至使用 pH 7.5-9.0 的緩衝溶液平衡的陰離子交換樹脂上；

(b-2) 在 pH 7.5-9.0 的條件下，使用包含 0-20 mM 氯化鈉或氯化鉀的緩衝溶液進行洗滌；以及

(b-3) 在 pH 7.5-9.0 的條件下，通過使用包含比步驟 (b-2) 中的濃度高的 20-150 mM 的氯化鈉或氯化鉀的緩衝溶液洗脫來收集具有 6.0-8.3 的範圍內的等電點的阿柏西普；以及

其中，該陽離子交換色譜的步驟包括以下步驟：

(a-1) 將步驟 (b-3) 中的具有 6.0-8.3 的範圍內的等電點的阿柏西普上樣至使用 pH 4.5-6.6 的緩衝溶液平衡的陽離子交換樹脂上；

(a-2) 在 pH 4.5-6.6 的條件下，使用包含 0-40 mM 氯化鈉或氯化鉀的緩衝溶液進行洗滌；以及

(a-3) 在 pH 4.5-6.6 的條件下，通過使用包含比步驟 (a-2) 中的濃度高的 40-120 mM 的氯化鈉或氯化鉀的緩衝溶液洗脫來收集具有 6.0-8.3 的範圍內的等電點的阿柏西普。

【請求項3】 如請求項 1 或 2 所述之方法，其中在步驟 (a-1)、步驟 (a-2) 和步驟 (a-3) 中的緩衝溶液是選自於由乙酸鈉緩衝液和磷酸鈉緩衝液所組成的組中的至少一種，並且其中，步驟 (b-1)、步驟 (b-2) 和步驟 (b-3) 中的緩衝溶液是選自於由該磷酸鈉緩衝液和 Tris 緩衝液組成的組中的至少一種。

【請求項4】 如請求項 1 或 2 所述之方法，其中用於陽離子交換樹脂的配體是羧甲基。

【請求項5】如請求項 1 或 2 所述之方法，其中用於陰離子交換樹脂的配體是季銨基。

【請求項6】如請求項 1 或 2 所述之方法，其中在對該阿柏西普混合物執行該陽離子交換色譜之前，應用從由蛋白質 A 親和色譜、混合模式或多模式色譜和脫鹽超濾組成的組中選擇的至少一種。

【請求項7】如請求項 1 或 2 所述之方法，其中在對該阿柏西普混合物執行該陰離子交換色譜之前，應用從由蛋白質 A 親和色譜、混合模式或多模式色譜和脫鹽超濾組成的組中選擇的至少一種。

【請求項8】如請求項 1 或 2 所述之方法，其中在步驟 (b-3) 中的該緩衝溶液包含 20-90mM 的氯化鈉或氯化鉀。

【請求項9】如請求項 1 或 2 所述之方法，其中在步驟 (b-3) 中的緩衝溶液包含 20-90mM 的氯化鈉或氯化鉀，並且 pH 為 7.5-8.5。

【請求項10】 一種如請求項 1 至 9 之任一項所述之方法所配制最終精制的阿柏西普以具有以下三種組合物中的任何一種以適於玻璃體內注射的方法，係包括：

(a) 10 mM 乙酸鈉、7%蔗糖、0.03%聚山梨酯 20 的組合物，組合物 pH 5.5；

(b) 10 mM 乙酸鈉、6.5%蔗糖、15 mM 氯化鈉、0.03%聚山梨酯 20 的組合物，組合物 pH 5.5；以及

(c) 50 mM 乙酸鈉、6%蔗糖、0.03%聚山梨酯 20 的組合物，組合物 pH 5.5。

【發明圖式】

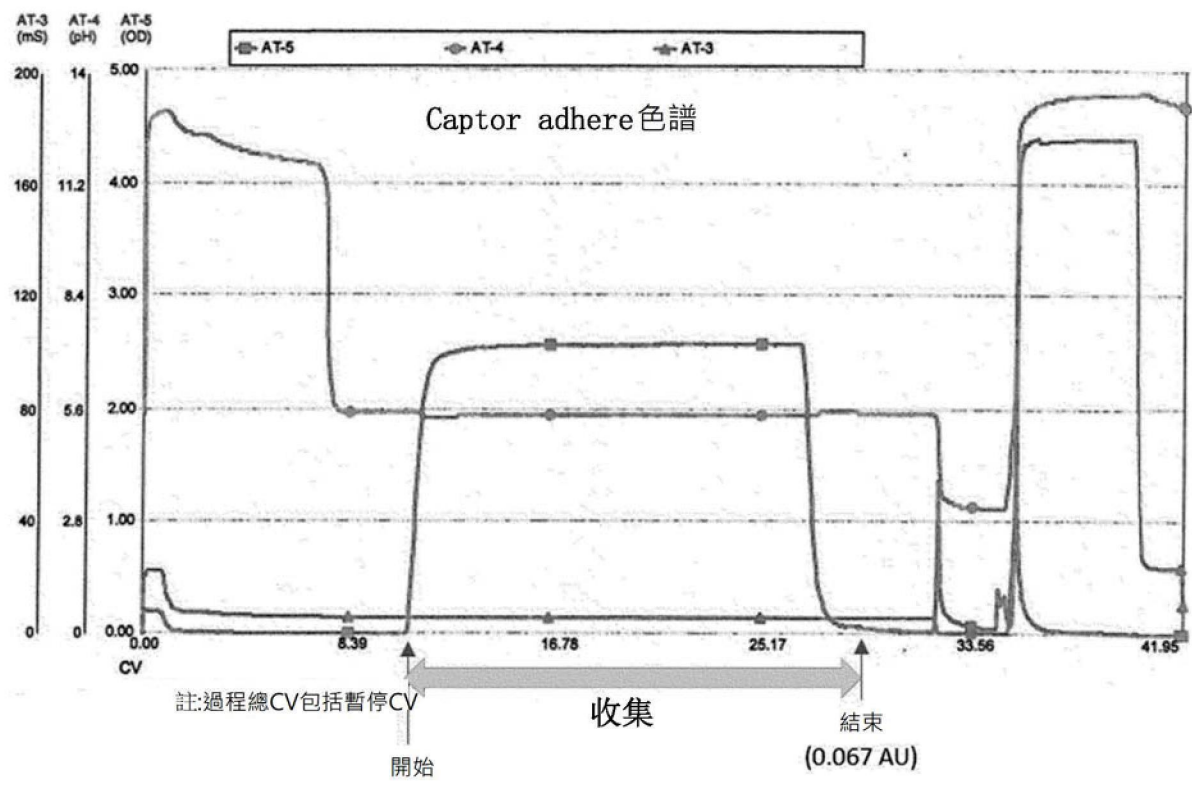


圖1

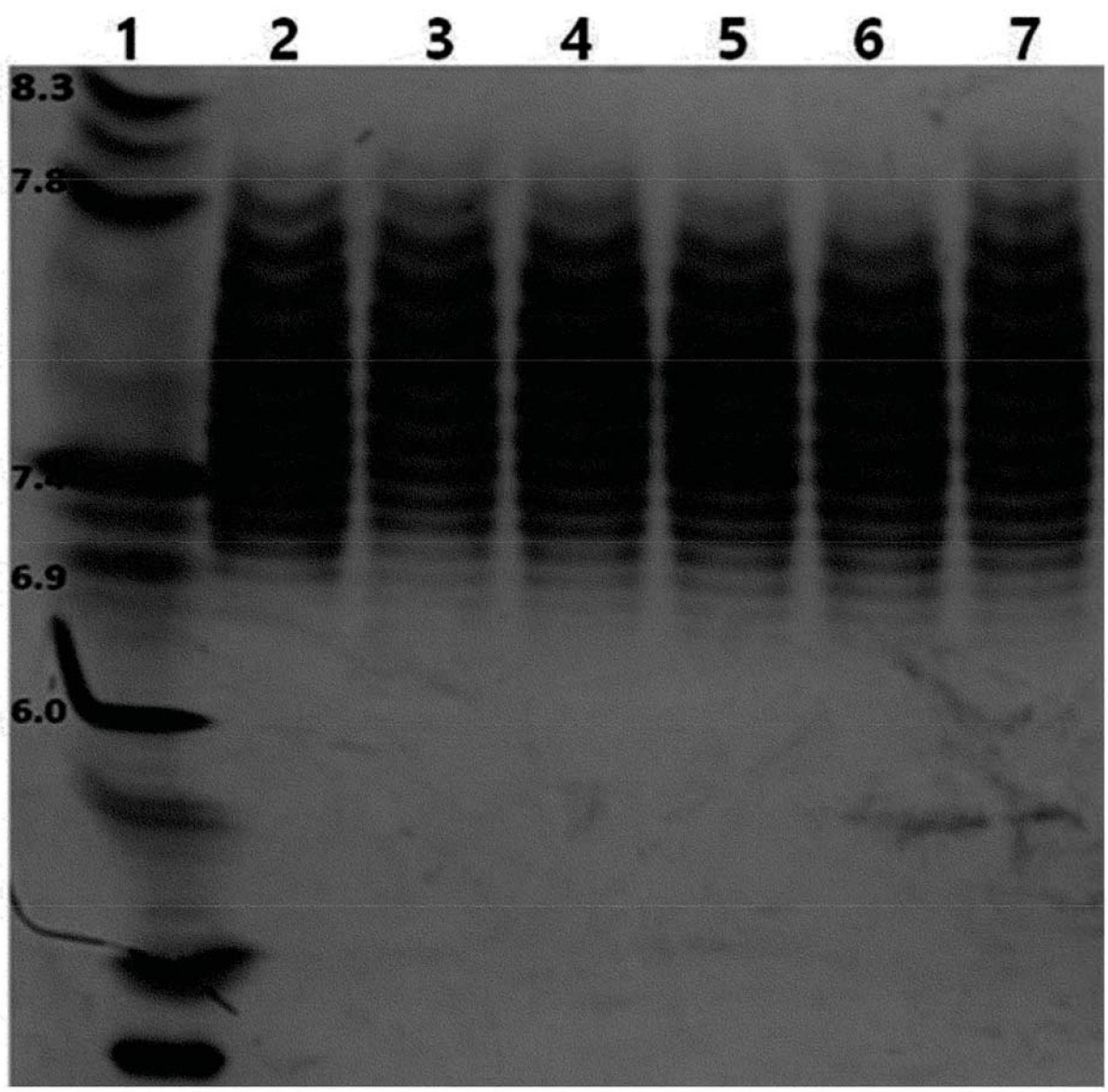


圖2

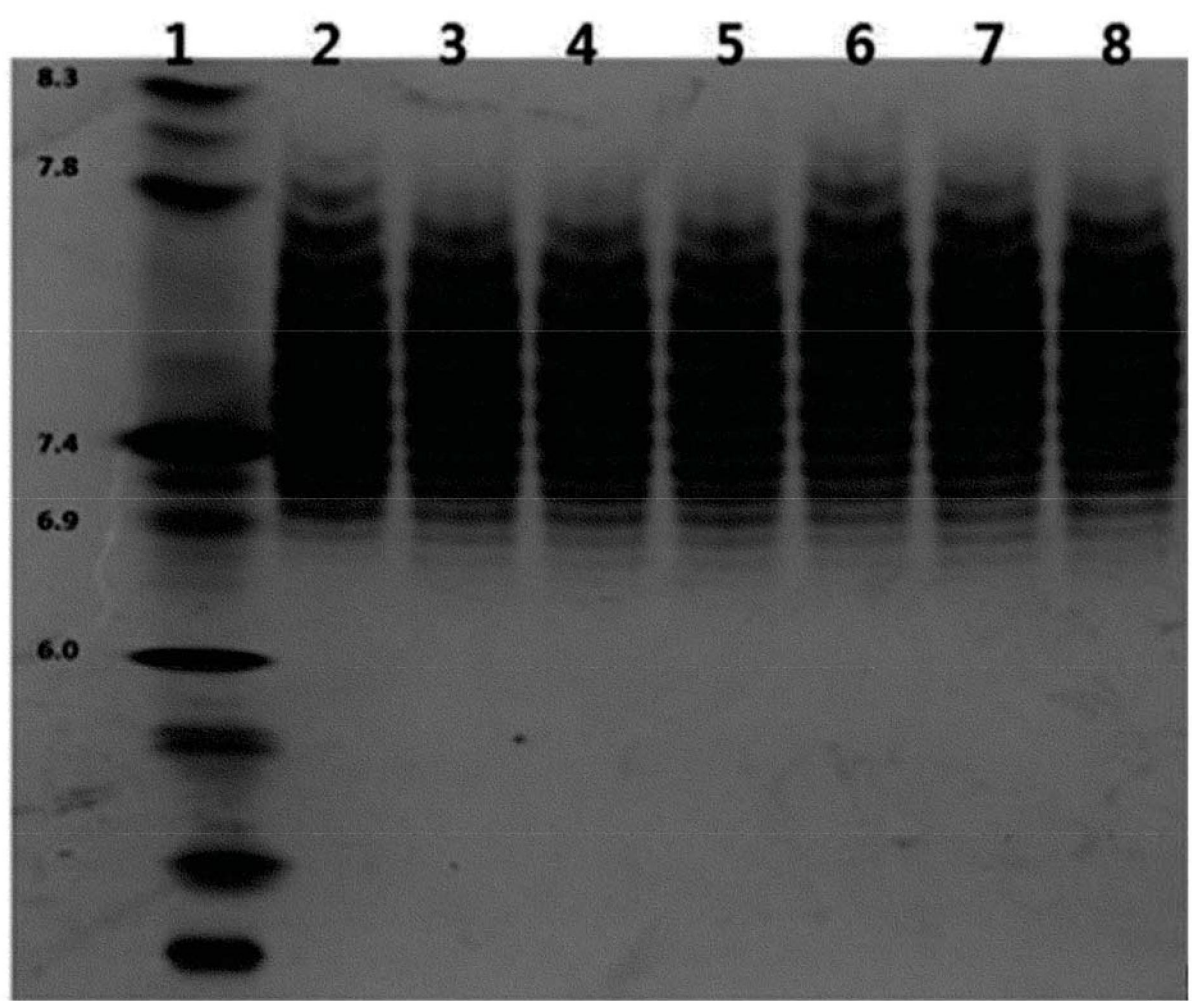


圖3

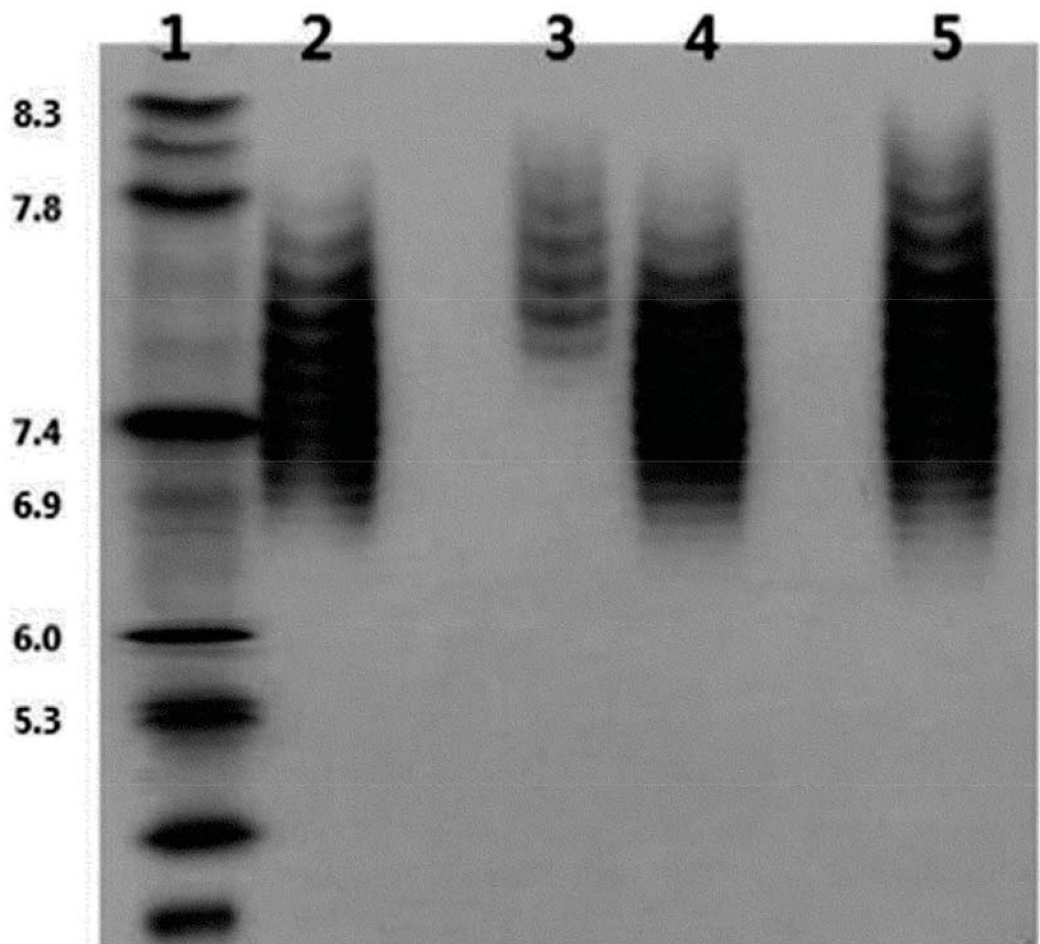


圖4