



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102712688 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 03

(21) 申请号 201080051883. 9

C07K 1/16(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 09. 23

(30) 优先权数据

09012120. 3 2009. 09. 23 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 05. 16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2010/005839 2010. 09. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02011/035914 EN 2011. 03. 31

(71) 申请人 百奥杰诺瑞克斯股份有限公司

地址 德国, 乌尔姆

(72) 发明人 沃尔特·因德雷尔 斯特凡·阿诺德

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 郇春艳 樊卫民

(51) Int. Cl.

C07K 14/505(2006. 01)

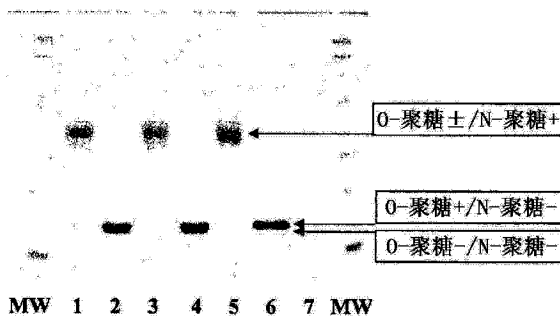
权利要求书 2 页 说明书 25 页 附图 2 页

(54) 发明名称

重组人红细胞生成素(EPO)的纯化方法、由此纯化的 EPO 以及包含纯化的 EPO 的药物组合物

(57) 摘要

本发明提供了红细胞生成素(EPO),特别是高纯形式的具有确定的糖型组成、即具有大量 O-糖基化 EPO 同种型的重组人 EPO (rhEPO) 的生产方法。



1. 一种从复杂的蛋白质混合物中纯化糖基化红细胞生成素(EPO)同种型的方法,其中该方法包括阴离子交换层析步骤和阳离子交换层析步骤,其通过反相(RP)层析步骤来分离。

2. 权利要求1的方法,其包括下述步骤:

(a) 作为捕获步骤的亲合层析步骤;

(b) 阴离子交换层析步骤;

(c) 反相(RP)层析步骤;以及

(d) 阳离子交换层析步骤。

3. 权利要求1或2的方法,其还包括下述步骤:

(e) 尺寸排阻层析步骤。

4. 权利要求1至3中任一项的方法,其中在一个或多个层析步骤中EPO的洗脱通过分步或梯度洗脱来进行。

5. 权利要求1至4中任一项的方法,其中所述阴离子交换层析步骤使用含有二乙氨基乙基(DEAE)、季铵乙基(QAE)、季铵基(Q)、二甲氨基乙基(DMAE)和/或三甲氨基乙基(TMAE)作为功能基的阴离子交换树脂或膜来进行。

6. 权利要求5的方法,其中所述阴离子交换层析步骤使用可商购的Q-Sepharose来进行。

7. 权利要求1至6中任一项的方法,其中所述反相(RP)层析步骤是反相高效液相层析(RP-HPLC)。

8. 权利要求7的方法,其中所述RP-HPLC使用含有甲基、丁基、苯基、丙基和/或辛基作为功能基的树脂来进行。

9. 权利要求8的方法,其中RP-HPLC使用可商购的C4反相层析材料来进行。

10. 权利要求1至9中任一项的方法,其中所述阳离子交换层析步骤使用含有磺丙基阳离子交换材料的树脂来进行。

11. 权利要求10的方法,其中所述阳离子交换层析步骤使用可商购的Macro-Prep High S来进行。

12. 权利要求2至11中任一项的方法,其中所述亲和层析步骤使用染料层析树脂来进行。

13. 权利要求12的方法,其中所述亲和层析步骤使用可商购的Blue-Sepharose来进行。

14. 权利要求3至13中任一项的方法,其中所述尺寸排阻层析步骤使用选自Superdex、Sephacryl、Sephadex、Sepharose、Fractogel、Toyopearl和Bio-Gel的凝胶过滤介质来进行。

15. 权利要求14的方法,其中所述尺寸排阻层析步骤使用可商购的Superdex-S200来进行。

16. 权利要求1至15中任一项的方法,其中使用所述阴离子交换层析来选择EPO同种型。

17. 权利要求16的方法,其中使用在pH约为7.0的包含20mMTris-HCl的缓冲液中0至200mM NaCl的线性盐梯度。

18. 权利要求 1 至 17 中任一项的方法,其中使用所述反相层析步骤来选择 O-糖基化 EPO。
19. 权利要求 18 的方法,其中使用有机溶剂的线性梯度来洗脱 EPO。
20. 权利要求 19 的方法,其中使用在水中 0 至 70% 乙腈的线性梯度,并且所述溶剂含有约 0.1%TFA。
21. 权利要求 20 的方法,其中使用在水中含有乙腈和约 0.1%TFA 的溶剂进行 EPO 的等度洗脱。
22. 权利要求 1 至 21 中任一项的方法,其在所述一个或多个层析步骤之前包括超滤步骤,以及任选作为最终步骤的纳滤步骤。
23. 权利要求 1 至 20 中任一项的方法,其包括下列步骤:
 - (a) 作为捕获步骤的亲层析步骤;
 - (b) 阴离子交换层析步骤;
 - (c) 反相(RP)层析步骤;
 - (d) 阳离子交换层析步骤;
 - (e) 尺寸排阻层析步骤;
 - (f) 纳滤步骤;以及
 - (g) 步骤(a)、(b)和/或(e)之前的超滤步骤。
24. 权利要求 1 至 23 中任一项的方法,其中所述 EPO 是人重组 EPO。
25. 权利要求 1 至 24 中任一项的方法,其中所述 EPO 是在 CHO 细胞中生产的人重组 EPO。
26. 通过权利要求 1 至 25 中任一项的方法纯化的糖基化 EPO 同种型制剂。
27. 权利要求 26 的制剂,其中所述 EPO 是人重组 EPO。
28. 权利要求 26 或 27 的制剂,其基本上不含未 O-糖基化的 EPO 同种型。
29. 一种药物组合物,其包含权利要求 27 至 29 中任一项的 EPO 制剂。

重组人红细胞生成素(EPO)的纯化方法、由此纯化的 EPO 以及包含纯化的 EPO 的药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及红细胞生成素(EPO),特别是高纯形式的具有确定的糖型组成、即具有大量 O-糖基化 EPO 同种型的重组人 EPO (rhEPO)的生产方法。这通过使用特定组合的层析步骤来实现。

背景技术

[0002] 红细胞生成素是调控红系祖细胞的增殖和分化以及维持循环红细胞的生理水平的主要激素。在胎儿中,EPO 主要在肝脏中产生,在出生后,其约 90%的生产切换到肾脏。当由于慢性或急性肾衰引起 EPO 水平下降时,必须外部给药 EPO 以防出现贫血。由于 EPO 基因的发现及其在啮齿动物细胞中的表达,已经可以获得治疗活性的人红细胞生成素。天然人红细胞生成素由 7 号染色体上位于 7q11-q22 处的基因编码(Law 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA (美国科学院院刊) 83 (1986), 6920-6924)。重组人 EPO 在 1989 年进入市场,当时 FDA 给出了它在与慢性肾衰相关的贫血症的治疗中使用的安全调查。与用作药物的其它重组糖蛋白的情况相同,EPO 的糖基化模式对糖蛋白的生物利用率、生物活性和免疫原性性质有显著影响。对于 rhEPO 的生产来说,中国仓鼠卵巢(CHO)和幼仓鼠肾(BHK-21)宿主细胞作为表达系统发挥重要作用,因此已被充分研究(Sasaki 等人, J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 262 (1987), 12059-12076 ;Takeuchi 等人, J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 263 (1988), 3657-36633 ;Nimtz 等人, Eur. J. Biochem. (欧洲生物化学杂志) 213 (1993), 39-56 ;Tsuda 等人, Biochemistry (生物化学) 27 (1988), 5646-5654)。已确定,这些细胞系产生与人类糖型最接近类似的糖型。也已公知,糖类在糖蛋白的定向和清除中发挥重要作用(Drickamer 等人, Annu. Rev. Cell. Biol. 9 (1003), 237-264 ;Helenius 等人, Science (自然科学杂志) 291 (2001), 2364-2369)。早些时候,被称为阿法达贝泊汀(darbepoetin alfa) (ARANESP®)的具有两个额外的 N-糖基化位点的新型红细胞生成素,得到 EMEA 和 FDA 的批准。

[0003] 人 EPO 基因编码 27 个氨基酸的信号肽以及 166 个氨基酸的计算分子量为 18396 道尔顿的蛋白。成熟蛋白通常具有 N-端单个氨基酸缺失,长度为 165 个氨基酸。信号序列将肽引导到参与正确糖基化的细胞区室中,产生具有三个 N-聚糖和一个 O-聚糖的成熟蛋白。占总分子量约 40%的糖组成部分,对于 EPO 在体内的完整生物活性来说是必需的。几项研究显示,末端唾液酸残基的数量对体内半衰期有正面影响,尽管体外活性、即与受体的结合在未糖基化或部分糖基化形式中最高(Takeuchi 和 Kobata, Glycobiology (糖生物学) 1 (1991), 337-346)。唾液酸化的程度与半衰期成正比,其中具有较少唾液酸的同种型以快得多的速率从生物体中清除,因此显示出低活性。在上下文中,Rush 等人(Anal. Chem. (分析化学) 67 (1995), 1442-1452)描述了红细胞生成素的唾液酸残基的 O-乙酰化及其对增加循环时间的影响,并表明唾液酸残基的高 O-乙酰化程度通过降低肝脏清除率而增加循环时间。

[0004] 通常通过在哺乳动物细胞、特别是 CHO 细胞中重组表达而获得的 EPO 制剂含有多达 50% 的缺少 O- 聚糖并因此失去了每个分子另外两个唾液酸残基的潜力的 EPO 同种型。因此, 提供基本上不含这种缺陷的、未 O- 糖基化同种型的 EPO 制剂以及提供它们的方法, 将是所希望的。

[0005] 从学术和专利文献中已知的 EPO 的分离 / 纯化方法包括不同的层析步骤。最常用的是阴离子交换层析(AEX)和反相 HPLC (RP-HPLC)。也使用其它层析方法, 例如羟磷灰石、疏水相互作用(HIC)、阳离子交换(CEX)、亲和(即免疫亲和或染料配体)和尺寸排阻(凝胶过滤)(SEC)层析。一些中间步骤例如浓缩, 渗滤, 超滤, 透析, 用乙醇、盐等沉淀, 也是常用的。

[0006] EP 205 564 描述了使用阳离子交换层析步骤随后进行 RP-HPLC 来纯化 EPO。

[0007] EP 228 452 和 US 4, 667, 016 描述了通过阴离子交换剂随后通过 RP 层析和凝胶层析来纯化 EPO。

[0008] EP 428 267 描述了 EP 228 452 方法的改进, 利用 RP 层析后的另一次阴离子交换剂来进行(特别是酸性)同种型的分离。

[0009] EP 1 394 179 描述了包含染料亲和层析、HIC、羟磷灰石、RP-HPLC 和阴离子交换剂的纯化方法。

[0010] EP 1 428 878 描述了一种纯化高度唾液酸化 EPO 同种型的方法, 所述方法使用了第一阴离子交换层析步骤作为捕获步骤和任选的酸洗步骤、疏水相互作用层析、亲和层析和带有酸洗步骤的第二阴离子交换层析步骤。

[0011] WO 99/28346 描述了将 EPO 纯化至以糖类结构中的 N- 乙酰 - 乳糖胺单元和 / 或四天分支型计高的纯度。该纯化方法从细胞培养上清液开始, 通过亲和层析进行捕获, 通过疏水相互作用层析、羟磷灰石和反相层析进行纯化。

[0012] WO 03/045996 描述了从细胞培养基回收和纯化 rhEPO 的方法, 所述方法包括尤其是阴离子交换层析、反相层析、阴离子交换层析和尺寸排阻层析步骤。

[0013] WO 03/080852 描述了生产 EPO 的方法, 所述方法至少包括染料亲和层析、疏水层析和阴离子交换层析, 任选还包括凝胶过滤层析。

[0014] Miyake 等人, J. Biol. Chem (生物化学杂志) 252 (1977), 5558-5564 描述了通过 7 步程序纯化尿液 EPO, 所述程序包括离子交换层析、乙醇沉淀、凝胶过滤和吸附层析。

[0015] Broudy 等人, Arch. Biochem. Biophys. (生物化学与生物物理学集刊) 265 (1988), 329-336 使用转染的 BHK 细胞系, 通过 Affi-Gel Blue 层析、阴离子交换层析和反相层析来纯化 EPO。

[0016] Gokana 等人, J. Chromatography (色谱分析杂志) 791 (1997), 109-118 描述了按照以前通过免疫亲和来纯化 EPO 之后, 利用 DEAE 层析来分离重组人 EPO 同种型。EPO 同种型的分离是基于其不同的 pI。

[0017] Goto 等人, Bio/Technology (生物技术) 6 (1988), 67-71 描述了利用免疫亲和、凝胶层析和羟磷灰石来纯化 EPO。

[0018] Hokke 等人, Eur. J. Biochem. (欧洲生物化学期刊) 228 (1995), 981-1008 描述了 EPO 的聚糖分析, 其包括 PNGase 处理以分别分析 N- 聚糖和 O- 聚糖。

[0019] Kishino 和 Miyazaki, J. Chromatography (色谱分析杂志) 699 (1997), 371-381 综述了用于糖蛋白分析的方法, 包括使用终端 RP 层析从尿液纯化 EPO。

[0020] Nimitz 等人, Eur. J. Biochem. (欧洲生物化学期刊) 213 (1993), 39-56 描述了包括 PNGase F 消化的 EPO 糖基化的分析, 显示出在幼仓鼠肾 (BHK) 细胞中表达并从其获得的重组人 EPO 仅有 60% 被 O- 糖基化。

[0021] Quelle 等人, Blood (血液) 74 (1989), 652-657 描述了从昆虫细胞纯化 EPO, 其中该纯化方法包含阴离子交换层析和 RP-HPLC 和随后的凝集素亲和层析。

[0022] Sasaki 等人, J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 262 (1987), 12059-12076 和 Sasaki 等人, Biochemistry (生物化学) 27 (1988) 8618-8626 描述了在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中表达并从其获得的重组人 EPO 的糖类结构的分析。EPO 利用 RP-HPLC 等方法来纯化。

[0023] Skibell 等人, Blood (血液) 98 (2001), 3626-3634 描述了来自于人类血清的 EPO 的聚糖结构与重组 EPO 相比的检查, 证实了在血液中循环的 EPO 也发生 O- 糖基化。

[0024] Sytkowski 和 Donahue J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 262 (1987), 1161-1166 确定了借助于单克隆抗体 (mAb) (利用中和来间接) 确定的 EPO 受体结合位点。表 II 显示了针对 EPO 的 111-129 位氨基酸序列的 mAb 表现出最强的中和效应, 表明位于 Ser126 处的 O- 聚糖可能参与受体结合。

[0025] 因此, 尽管 EPO 的糖基化的重要性是已知的, 但所提到的文献都没有公开提供具有如下特点的 EPO 制剂的方法: (i) 基本不含未 O- 糖基化的同种型, (ii) 纯化至医药级, (iii) 不含病毒污染物, 并且 (iv) 适合于大规模生产。通过在权利要求书中进行特征表述并在下文中进一步描述的实施方式, 该技术问题得以解决。

[0026] 发明简述

[0027] 本发明提供了从源自重组细胞的细胞培养基中回收和纯化人红细胞生成素 (rhEPO) 的方法, 所述方法包括反相 (RP) 层析步骤、优选 RP-HPLC, 以及随后的阳离子交换 (CEX) 层析步骤, 其中优选在 RP-HPLC 步骤之前进行阴离子交换 (AEX) 层析步骤。

[0028] 使用几种分析程序对按照本发明的方法纯化的重组人红细胞生成素 (rhEPO) 进行分析, 以对所述 EPO 的 N- 和 O- 糖基化状态进行表征。正如在背景部分中提到的, EPO 具有 S126 处的一个 O- 糖基化位点和 N24、N38 与 N83 处的三个 N- 糖基化位点。已发现, 本发明的 EPO 制剂的总体糖基化模式与在国际 BRP 标准品和商业参比产品中发现的模式相当相似。然而对于 O- 连接的寡糖来说, 观察到 EPO 的未糖基化形式, 如果存在的话, 其相对量与 BRP 标准品相比明显更低。这可能使本发明的 EPO 制剂与其它商业产品相比得到改进。

[0029] 不打算受到理论的限制, 相信在 HPLC 中 O- 脱糖基化的 (Des-O) EPO 形式的基本上选择性的分离, 由于缺少整个 O- 糖链这一事实而起作用。在 N- 聚糖的情况下, 差异不是如此显著。在这里, 只有偶尔的天线缺失, 但是整个聚糖的缺失即使有的话, 也是很少。缺少 N- 聚糖 (每个聚糖减去 4 个唾液酸) 的同种型已经在阴离子交换层析 (AEX) 步骤中被大量排除。在缺失 O- 链的情况下, 通常被糖链遮蔽的疏水性片 (约 121-130 个氨基酸) 暴露。事实上, 在更精细地检查 O- 糖基化位点后, 可以认识到 126 位丝氨酸周围疏水氨基酸的密集聚集。直接围绕 126 位丝氨酸的 4 个丙氨酸和 3 个脯氨酸 (121、122、129) 限定了显著疏水的区域。此外, 130 位亮氨酸也是疏水的并有助于这种效应。EPO 中所述的其它疏水位点增强了与 HPLC 柱的 C4 基质的总体结合力。因此, Des-O 形式在较晚的时间点洗脱。

[0030] 在本发明的特别优选的实施方式中, 提供了 5 个柱层析方法, 用于将 EPO 纯化成适合作为药物物质的纯的形式, 所述方法包括:

- [0031] (a) 染料亲和层析,用于捕获和浓缩含有 EPO 的溶液,并大量减少潜在的污染物;
- [0032] (b) 阴离子交换层析,用于富集 EPO 的酸性同种型,进一步除去污染物(例如 DNA、HCP)并消除可能从第一个柱上沥滤下来的任何染料配体;
- [0033] (c) RP-HPLC,其在用于除去在 Ser126 残基处没有糖基化的 EPO 分子和除去污染物的条件下进行;
- [0034] (d) 阳离子交换层析,用于除去 RP-HPLC 溶剂和聚集物质、交换缓冲液和浓缩 EPO 级份;以及
- [0035] (e) 尺寸排阻层析,其作为最后的层析步骤用于除去任何可能的剩余聚集物和其它污染物。

[0036] 此外,在 EPO 制造方法中包括了两个特异性病毒除去/失活步骤。首先,在 RP-HPLC 步骤之后,将洗脱液在 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 下、在酸性的乙腈:水加 0.1%(v/v)TFA 混合物中保留 60 至 180 分钟。其次,在最后的层析步骤后包括纳滤步骤,以增加药物物质的病毒安全性。此外,已证实阴离子交换层析也是用于除去病毒的有效步骤。得到的 EPO 药物物质可以使用例如蠕动泵分发到容积为 250ml 或 30ml 的原料药物质储存容器中,并可以储存在 $\leq -70^\circ\text{C}$ 下。

[0037] 因此,本发明的方法提供了 EPO 的分布情况指导性生产以及高度均匀的高质量产品。此外,本发明能够大规模制备大量具有高纯度和希望的 O-糖基化 EPO 同种型分布情况的生物活性 EPO。

[0038] 当通过 HPLC 和凝胶电泳测定时,EPO 的纯度高达超过总蛋白的至少 99%,有利地超过总蛋白的 99.9% 的纯度。此外,通过降低感染风险,改进了产品被病毒等污染的风险,并因此提高了临床安全性。在本发明上下文中,在纯化方法中,使用 RP-HPLC 以及使用有机溶剂来洗脱和在前进到下一步骤之间储存 EPO 样品的有利副作用,在于使病毒失活,否则病毒可能在用于例如疏水相互作用或离子交换层析的其它溶剂中保持存活。

[0039] 在本发明的上下文中,本领域普通技术人员将会认识到,本发明的一个基本特点在于进行 RP-HPLC 和随后的 CEX 层析步骤,而任何其它层析步骤可以被改变或完全省略。这也适用于 AEX 步骤,其尽管优选包括在本发明的方法中,但取决于所用的 EPO 样品,和/或在例如希望提供非均质或低唾液酸化但仍 O-糖基化的 EPO 制剂的情况下,其可以被不同的纯化步骤代替或者也可以被省略。

[0040] 按照本发明的方法分离的 EPO 的 O-糖基化比 BRP 标准品更加完全这一事实,表明 EPO 制剂的半衰期可能有很大增加。因此,可以审慎地预期,本发明的 EPO 制剂与迄今为止可商购的重组 EPO 产品相比,其体内半衰期如果没有增加,至少也是相近的。这也暗示药物动力学和药效学性质也将与市场产品的相似。因此,按照本发明的方法获得的 EPO 特别适用于人类医药中。

附图说明

[0041] 专利或申请文件可以包括一张或多张用彩色制成的图和/或一张或多张照片。本专利或专利申请公开的带有彩色图和/或照片的拷贝,可以在提出请求并付出必需费用后,由欧洲专利局(European Patent Office)或美国专利和商标局(United States Patent and Trademark Office)提供。

[0042] 图 1:用于分离高度唾液酸化和 O-糖基化 EPO 同种型的特定混合物的纯化程序的

流程图。在说明书中进一步解释了各个纯化步骤的重要性和所打算的目的。

[0043] 图 2 :HPLC 级份在用 PNGase 消化后的考马斯亮蓝染色的 12.5%SDS-PAGE 凝胶的照片。每个槽装载 5 μ g 蛋白。MW, 分子量标志物 ;BRP, BRP 标准品批次 1 (= 生物学参比制剂 = α - 和 β - 依伯汀的混合物);1 = 阴离子交换层析后 (AEX 合并物) 并进行 RP-HPLC 步骤之前的 EPO 样品 ;2-10= 在将 AEX 合并物进行 RP-HPLC 并应用如实施例所述的溶剂的线性梯度后获得的 EPO 洗脱液级份的样品 ;也参见表 6。显示了用多肽 N- 糖苷酶 (PNGase) 消化后的各个 EPO 批次, 所述 N- 糖苷酶除去所有 N- 聚糖, 但是留下附着的 O- 聚糖, 如果这些聚糖存在的话。靠下的较薄条带是未 O- 糖基化 (Des-0) 形式。酶本身也可以作为凝胶中部的痕量条带在凝胶中被检测到。左侧的道显示了 BRP 标准品, 接下来的道显示了上柱样品 (含有 Des-0 形式, 与 BRP 标准品类似), 随后是梯度洗脱的 9 个级份。可以看出, 前 5 个级份明显不含 Des-0 形式, Des-0 形式主要存在于后 3 到 4 个级份中, 证实了 Des-0 同种型保持结合在层析材料上并在较晚的时间点从柱上洗脱。合并物标准用于调节 Des-0 同种型的剩余比例。

[0044] 图 3 :考马斯亮蓝染色的 12.5%SDS-PAGE 凝胶的照片。MW, 分子量标志物 ;1-4= 通过实施例中所述方法获得的 EPO 制剂 ;5+6=BRP 标准品批次 1 (= 生物学参比制剂 = α - 和 β - 依伯汀的混合物) ;7= 空白。显示了用 PNGase 消化之前 (1,3,5) 和之后 (2,4,6) 的各个 EPO 批次。酶本身也可以作为痕量条带在凝胶中被检测到。BRP 标准品在消化后表现出双条带。靠下的较薄条带是未 O- 糖基化 (Des-0) 形式。可以看出, 按照本发明的方法获得的 EPO 制剂明显缺少靠下的条带, 证实了 Des-0 形式已在 HPLC 步骤中被除去。

[0045] 发明详述

[0046] 本发明提供了改进的 EPO 制剂的分离和纯化方法, 所述制剂如果有的话, 仅具有少量未 O- 糖基化的同种型, 并且基本上不含聚集物。这个目标通过在适当条件下经反相 (RP) 高压液相层析 (HPLC) 并随后使用阳离子交换层析 (CEX) 步骤减小未 O- 糖基化的 EPO 同种型含量来实现。更具体地, 本发明涉及从复杂的蛋白质混合物纯化糖基化红细胞生成素 (EPO) 同种型的方法, 其中所述方法包括阴离子交换 (AEX) 层析步骤和阳离子交换 (CEX) 层析步骤, 其通过反相 (RP) 层析步骤来分离。

[0047] 当在本文中使用时, 术语“同种型”是指如下的糖蛋白制剂 / 级份, 其包含的糖蛋白具有一致的氨基酸序列, 但是具有例如通过等电聚焦 (IEF) 凝胶所揭示的不同等电点或例如通过毛细管区带电泳 (CZE) 所揭示的不同电荷数。这些差异反映出糖基化模式的不均匀性。各个 EPO 分子可能在附着的糖基、唾液酸基和乙酰基的程度、复杂性、特性、天线型和次序方面有所不同。即使是带电荷的非有机基团例如磷酸酯和硫酸酯, 也对特定同种型的特性有贡献。因此, 本发明的糖蛋白同种型由它们不同的等电点及其一致的氨基酸序列定义, 并且因此在严格的化学意义上, 各种同种型事实上可以包含多种不同的 EPO 分子。

[0048] 按照本发明的方法, 优选使用阴离子交换层析来选择 EPO 同种型, 特别是高度唾液酸化的酸性 EPO 同种型 ;也参见图 1。根据本发明, EPO 的“酸性同种型”包含具有高的糖基、优选为唾液酸基程度或含量, 因此表现为具有低的 (酸性)pI 的那些同种型。当通过 IEF 从细胞培养上清液分析时, 重组人 EPO 显示出宽的等电点 (pI) 同种型分布, 在 pI 3-9 的范围内具有多达最多 14 种不同的同种型 (Gokana 等人, J. Chromatogr. (色谱分析杂志) 791 (1997), 109-118)。EPO 同种型主要由它们不同的糖基含量以及带负电荷的端基唾液酸残基

的不同数量引起。已知具有更多唾液酸残基并因此具有更酸性 pI 的 EPO 形式具有更高的生物活性和治疗价值,这是由于糖结构上的末端唾液酸残基阻止 EPO 在体内通过去唾液酸基-受体途径快速清除。

[0049] 阴离子交换层析步骤可以使用含有二乙氨基乙基(DEAE)、季铵乙基(QAE)、季铵基(Q)、二甲氨基乙基(DMAE)和/或三甲氨基乙基(TMAE)作为功能基的阴离子交换树脂或膜来进行。示例性的阴离子交换材料是可以从 Dow chemical company (陶氏化学)获得的 Dowex™1,可以从 BioRad Laboratories(伯乐实验室)获得的 AG™(例如 1、2、4 型)、Bio-Rex™ 5、DEAE Bio-Gel 1、Macro-Prep™ DEAE,可以从 Eichrom Technologies Inc. (Eichrom 技术有限公司)获得的 1 型阴离子交换树脂,可以从 GE Healthcare(通用医疗)获得的 Source Q、ANX Sepharose 4、DEAE Sepharose (例如 CL-6B、FF 型)、Q Sepharose、Capto Q、Capto S,可以从 PerkinElmer (珀金埃尔默公司)获得的 AX-300,可以从 Shoko America Inc. (Shoko 美国有限公司)获得的 Asahipak ES-502C、AXpak WA (例如 624、G 型)、IEC DEAE,可以从 Tosoh Bioscience GmbH (Tosoh 生物技术有限公司)获得的 Amberlite™ IRA-96、Toyopearl™ DEAE、TSKgel DEAE,可以从 Pall Corporation (颇尔公司)获得的 Mustang Q。在本发明方法的优选实施方式中,阴离子交换层析步骤使用 Q-Sepharose 来进行;也参见实施例。正如所述,排除低唾液酸化的碱性 EPO 同种型和选择高度唾液酸化的酸性 EPO 同种型,分别优选使用在 pH 约 7.0 的包含 20mM Tris-HCl 的缓冲液中 0 至 200mM NaCl 的线性盐梯度来进行。

[0050] 此外,根据本发明的方法,使用反相层析步骤来选择 O-糖基化的 EPO 同种型。正如在实施例中所示,这样的 EPO 同种型可以使用有机溶剂的线性梯度、优选为 0 至 70% 的乙腈在水中并含有约 0.1%TFA 来洗脱。此外或可选地,使用在水中含有乙腈和约 0.1%TFA 的溶剂进行 EPO 的等度洗脱。用于进行反相(RP)层析的手段和方法对于本领域普通技术人员来说是公知的;也参见在上面背景部分中叙述的现有技术。优选地,RP 层析步骤包括反相高效液相层析(RP-HPLC)。通常所述 RP-HPLC 使用含有甲基、丁基、苯基、丙基和/或辛基作为功能基的树脂来进行。在本发明方法的优选实施方式中,所述 RP-HPLC 使用可商购的 C4 反相层析材料来进行。示例性的反相材料是:可以从 Grace Davison 获得的 Vydac 214TPB 1015、C4;可以从 DAISO Fine Chem. GmbH (DAISO 精细化学有限公司)获得的 Daisopak SP-300-15-C4-BIO;可以从 YMC Europe GmbH (YMC 欧洲有限公司)获得的 YMC Gel Butyl Sphärisch C4, 15 μ, 300A;可以从 Phenomenex (菲罗门公司)获得的 Jupiter 15 μ, C4, 300A。

[0051] 最优选地,使用由表面带有 C4-烷基链的硅胶粒子构成的 VydacC4 (Vydac)。EPO 与蛋白质杂质的分离是基于疏水相互作用强度的差异。洗脱使用在稀三氟乙酸存在下乙腈在水中的梯度来进行。通常,必须通过分级分离截去“EPO 峰”的一部分。例如,在数量约 9 或 10 个含有 EPO 的洗脱级份中,必须舍弃通常可能占总 EPO 峰的 40% 的最后的 1 至 4 个样品,同时将剩余的洗脱液合并物在随后的步骤中进一步纯化;也参见图 2。

[0052] 根据本发明,制备型 RP-HPLC 通常在 > 10 巴的高压(根据制备规模高达 30-40 巴)和通常为硅胶的珠粒(5-10 μm)下进行,其产生更好的分辨率。优选地,使用 TFA 酸化的溶剂的 pH 约为 2。在低的乙腈浓度(例如 10% 或纯水)下应用 AEX 洗脱液并增加乙腈浓度梯度,将洗脱 EPO 同种型。

[0053] 在本发明上下文中,观察到当按照本发明的方法使用 RP-HPLC 时,与在低压下进行的普通 RP 层析(RPC)(也被称为中压方法,<10 巴,通常为 3-5 巴)显著不同。例如,RPC 通常使用 15 μ 珠粒或 30 μ 珠粒来进行,正如在国际申请 W003/045996 中所述(RP-Source 30)。此外,尽管与 HPLC 中类似可以使用有机溶剂,但 W003/045996 中的 RPC 步骤,在样品中使用 0.24M 硫酸铵进行硫酸铵沉淀之后开始,所述硫酸铵沉淀对于 HPLC 是不利的,但是非常适合于通常使用降低的盐梯度进行洗脱的 HIC(疏水相互作用层析)。因此,如国际申请 W003/045996 中所述的 RPC 在完全水性溶剂系统、即 pH 7 的 Tris/HCl 缓冲液中进行,因为迄今为止还未描述用于快速分离有机溶剂并避免在 EPO 制剂中形成/引出聚集物的适当方法。然而,省却使用有机溶剂的 HPLC 步骤,其代价是 EPO 同种型分离的效率降低,这是由于例如在 RPC 中使用的珠粒颗粒较大并且分离条件严苛性较低。无论如何 RP-HPLC 的分离性能优于 RPC。

[0054] 纯化流程的有效性的另一个重要因素在于在紧接 HPLC 后的第三个步骤中进行阳离子交换层析(CEX)。该步骤在应用方式方面是新颖的。在 RP 层析之后,必须将 EPO 快速进行缓冲液交换,因为它在酸性乙腈中不稳定,即随时间和温度的升高而逐渐形成聚集物。此外,对于随后用作最后的精制步骤的凝胶层析来说,样品体积必须非常小,即 RP 合并物中 EPO 的浓度必须被极大地提高。另一方面,由于分离 Des-0 形式所需的相对平的梯度,RP-HPLC 合并物具有相当大的体积。根据本发明,开发了使用所选材料(Macroprep S)的 CEX 层析步骤而不是使用标准的超滤/渗滤步骤,后者是常用但相当耗时的方法。该 CEX 层析允许特别高的流速并耐受高浓度的酸性乙腈。由于 EPO 在酸性环境中带正电这一事实,EPO 是强结合物,并且以非常陡的梯度、以小体积和高浓度洗脱在所希望的缓冲液中。令人吃惊地,CEX 层析也引起在乙腈中不可避免地形成的 EPO 聚集物的分离,因为它造成 EPO 聚集物不洗脱而是保留在柱上,并随后在再生中用 CIP 溶液洗脱。因此,根据本发明,在 RP 层析、特别是 RP-HPLC 后使用阳离子交换层析步骤进行缓冲液交换、EPO 浓缩和 EPO 聚集物的消除;也参见图 1。

[0055] 不同类型的阳离子交换材料可以在不同名称下并从许多公司获得,例如可以从 BioRad Laboratories(伯乐实验室)获得的 Bio-Rex™(例如 70 型)、Chelex™(例如 100 型)、Macro-Prep™(例如 CM、High S、25S 型)、AG™(例如 50W、MP 型);可以从 Ciphergen(赛弗吉)获得的 WCX 2,可以从 Dow chemical company(陶氏化学)获得的 Dowex™ MAC-3,可以从 Pall Corporation(颇尔公司)获得的 Mustang C 和 Mustang S,可以从 Whatman plc 获得的 Cellulose CM(例如 23、52 型)、hyper-D、PartiSphere,可以从 Tosoh Bioscience GmbH(Tosoh 生物技术有限公司)获得的 Amberlite™ IRC(例如 76、747、748 型)、Amberlite™ GT 73、Toyopearl™(例如 SP、CM、650M 型),可以从 BioChrom Labs(生物色谱实验室)获得的 CM 1500 和 CM 3000,可以从 GE Healthcare(通用医疗)获得的 SP-Sepharose™、CM-Sepharose™,可以从 PerSeptive Biosystems(PerSeptive 生物系统公司)获得的多孔树脂,可以从 Shoko America Inc.(Shoko 美国有限公司)获得的 Asahipak ES(例如 502C 型)、CXpak P、IEC CM(例如 825、2825、5025、LG 型)、IEC SP(例如 420N、825 型)、IEC QA(例如 LG、825 型),可以从 Eichrom Technologies Inc.(Eichrom 技术有限公司)获得的 50W 阳离子交换树脂。优选地,所述阳离子交换材料是强阳离子交换材料例如 Macro-Prep™ High S 或 25S、MacroCapSP、Toyopearl™ SP 650M、Source S、SP Sepharose 或 POLYCAT A。

在一个实施方式中,所述阳离子交换材料是磺丙基阳离子交换材料。在本发明方法的优选实施方式中,所述阳离子交换层析步骤使用 Macro-Prep High S 来进行;也参见实施例。

[0056] 在本发明方法的优选实施方式中,在上面描述的层析步骤之前使用亲和层析步骤作为捕获步骤。通常,所述亲和层析步骤使用染料层析树脂,例如使用可商购的 Blue-Sepharose 来进行;也参见实施例。优选地,本发明方法中的层析步骤以下列次序进行:

[0057] (a) 作为捕获步骤的亲和层析步骤;

[0058] (b) 阴离子交换层析步骤;

[0059] (c) 反相(RP)层析步骤;以及

[0060] (d) 阳离子交换层析步骤;也参见图 1 和实施例。

[0061] 在第一步骤中,染料层析主要通过蛋白酶除去污染物。优选使用蓝色三嗪染料例如 Cibachron® 蓝作为染料。其它的三嗪染料也是适当的。用于染料层析的载体材料并不关键,然而,优选使用基于多糖的载体材料例如 Sepharose, 优选为 Sepharose 6Fast Flow。根据本发明,在随后的层析步骤中进行高度唾液酸化和 O-糖基化的 EPO 同种型的富集;也参见图 1。

[0062] 在本发明方法的优选实施方式中,在一个或多个层析步骤中通过分步或梯度洗脱来进行 EPO 的洗脱。可以在本申请中互换使用的术语“分步洗脱”和“分步洗脱方法”,是指在方法中,引起洗脱、即被结合化合物从材料上的解离的物质浓度被立即升高或降低,即直接从一个值/水平变到下一个值/水平。在该“分步洗脱”中,一种或多种条件例如 pH、离子强度、盐浓度、有机化合物浓度和/或层析的流速,全部立即从第一、例如初始值变化到第二、例如最终值。这意味着条件以增量、即逐步变化,这与稳定的线性或非线性变化相反。在“分步洗脱方法”中,在离子强度或有机溶剂含量每次增加后收集新的级份。该级份含有分别使用离子强度和疏水性的相应增加从离子交换材料上回收的化合物。在每次增加后维持条件,直到进行洗脱方法中的下一步骤。通常,在大规模生产中,只要可能,使用分步或等度洗脱代替梯度洗脱。

[0063] 在本发明的上下文中,按照本发明的方法进行的任何层析步骤,可以以梯度或等度方式来进行;对于综述参见例如 Schellinger 和 Carr, *J. Chromatography* (色谱分析杂志), 1109 (2006), 253-266。具体来说,对于 RP-HPLC 和阴离子层析(AEX)步骤来说,设想用了用等度洗脱代替直线梯度。因此,在本发明方法的一个实施方式中,RP 和/或 AEX 步骤通过等度洗脱来进行。

[0064] 在本发明方法的其它层析步骤中,将从阳离子交换层析(CEX)获得的 EPO 制剂通过尺寸排阻层析(SEC)进行精制,所述尺寸排阻层析除去可能的二聚体、较大的聚集物和不希望的小分子例如过程相关的杂质,并且如果适合,也为最终制剂进行缓冲液交换。通常,所述尺寸排阻层析步骤使用选自 Superdex、Sephacryl、Sephadex、Sepharose、Fractogel、Toyopearl 和 Bio-Gel 的凝胶过滤介质来进行。优选地,所述尺寸排阻层析步骤使用可商购的 Superdex-S200 来进行;也参见实施例。

[0065] 为了在 CEX 层析后获得的 EPO 制剂中实现更高的产物浓度,优选在凝胶过滤(SEC)之前将洗脱液进一步浓缩。这通常使用 5-10kDa 的 UF 膜通过超滤步骤来进行,产生浓缩约 10 倍的每 ml 具有约 5 至 20mg EPO 的 UF 渗流物,以得到 SEC 合并物;也参见实施例。

[0066] 为了除去可能的病毒负载,在本发明的方法中进行了另外的最终病毒过滤步骤。该过滤使用被设计用于除去小至 15nm 粒子的特制膜例如 Planova 15N(Asahi)来进行。可选的最终纳滤装置是 PALL Ultipor VF Grade DV20 或 Millipore Viresolve NFP 滤芯或滤囊。特别是对于小的无包膜病毒(例如细小病毒)来说,几乎没有其它的病毒除去或失活工具。使无菌过滤后的 SEC 合并物通过带有适当膜的最终过滤器,滤液代表最终的原料药物质。可选地,可以将纳滤插入到 UF 浓缩与尺寸排阻层析之间。因此,本发明的方法可以在一个或多个层析步骤之前包含超滤步骤和任选的纳滤步骤,后者优选作为最终步骤;也参见图 1。

[0067] 在特别优选的实施方式中,本发明的方法包括下列步骤:

[0068] (a) 作为捕获步骤的亲 and 层析步骤;

[0069] (b) 阴离子交换层析步骤;

[0070] (c) 反相(RP)层析步骤;

[0071] (d) 阳离子交换层析步骤;

[0072] (e) 尺寸排阻层析步骤;

[0073] (f) 纳滤步骤;以及

[0074] (g) 步骤(a)、(b)和/或(e)之前的超滤步骤。

[0075] 可以通过 SDS-PAGE 来确定不同级份的内含物以作为过程中的对照,并且如果适合,将所选的级份合并或丢弃;对于从 RP-HPLC 步骤洗脱的 EPO 对照,参见例如图 2。

[0076] 在优选实施方式中,按照本发明方法纯化的 EPO 是人重组 EPO。因此,优选通过在宿主细胞中诱导 EPO 编码基因的表达来提供 EPO 分子。“宿主细胞”被理解为动物或人类细胞,其基因组含有活性 EPO 基因并且该 EPO 基因在细胞在无血清培养基中培养期间被转录和翻译。EPO 基因可以作为外源基因、优选与调控元件一起被导入该宿主细胞中(参见例如欧洲专利申请 EP-B 0 148 605 和 EP-B 0 209),可以作为活性内源基因已经存在于宿主细胞中,或者可以作为内源的无活性基因并被激活。内源基因的这种激活可以通过例如将调控元件经同源重组特异性导入到基因组中来实现。国际申请 WO 91/09955 和 WO93/09222 描述了这类方法的实例。

[0077] 通常使用哺乳动物细胞作为宿主细胞。如果要导入外源人 EPO 基因,可以使用例如 CHO 或 BHK 细胞作为宿主细胞。如果使用内源 EPO 基因进行表达,使用人类细胞例如肾脏、肝脏或淋巴细胞是有利的。优选地,所述 EPO 是在 CHO 细胞中生产的人重组 EPO。EPO 在 CHO 的重组生产通常通过在培养基中添加胎牛血清和任选的牛胰岛素来进行。结果,以这种方式生产的 EPO 制剂具有被病毒或 TSE 诱导剂感染的潜在风险,因为即使在纯化后它也可能含有至少痕量的这种动物来源的制剂。已知可以使用现有技术方法来进行含 EPO 基因的重组 CHO 细胞的无血清发酵;参见例如欧洲专利申请 EP 1 394 179、EP 0 513 738 和 EP 0 267 678,通用形式参见 Kawamoto 等人,Analytical Biochem. (分析生物化学)130 (1983) 445-453, Kowar 和 Franek, Methods in Enzymology (酶学方法)421 (1986), 277-292, Bavister, Expcology (生态学)271 (1981), 45-51, 欧洲专利申请 EP 0 248 656、EP 0 481 791、EP 0 307 247、EP 0 343 635 和国际申请 WO 88/00967,其公开内容在此引为参考。具有类似活性并在产 EPO 宿主细胞培养后产生的 EPO 衍生物和片段,也可以通过本发明的方法以纯的形式生产。人 EPO 的 DNA 和蛋白质序列,描述在例如欧洲专利申请 EP 0 205 564

和 EP 0 209 539 中。

[0078] 为了生产 EPO, 可以通过将含有 EPO 基因的宿主细胞在小体积培养中传代, 使其适应于不含天然来源蛋白的培养基。适应后的细胞任选进行低温保存, 在需要时从已建立的细胞库中取出并按照例如欧洲专利申请 EP 1 394 179 中所述在无血清培养基中扩增。为了纯化, 优选分离宿主细胞的无细胞培养上清液, 并在过滤后将其按照本发明进行纯化过程。在进行纯化过程之前, 如果需要, 可以进行另一过滤以分离混浊物或碎片和 / 或通过超滤进行浓缩。

[0079] 另一方面, 本发明涉及通过如上所述并优选如实施例中的说明来进行的本发明方法纯化的糖基化 EPO 同种型制剂。通常, 所述 EPO 是人重组 EPO。有利地, 本发明的 EPO 制剂基本上不含未 O- 糖基化的 EPO 同种型。术语“基本上不含未 O- 糖基化的 EPO 同种型”是指本发明的 EPO 制剂通常含有少于 10% 的未 O- 糖基化的 EPO 同种型, 优选少于 5%、有利地少于 1% 的未 O- 糖基化的 EPO 同种型。换句话说, 本发明的 EPO 制剂通常含有至少 90% 的 O- 糖基化 EPO 同种型, 优选至少 95%、最优选至少 99% 的 O- 糖基化 EPO 同种型, 通过这种特征可以将本发明的 EPO 制剂与按照本领域已知的方法纯化的 EPO 制剂区分开; 参见例如通过图 2 和图 3 中所示的 SDS-PAGE。表征糖基化状态的主要分析技术是 MALDI/TOF-MS 和 HPAEC-PAD。表征样品的其它技术包括 SDS-PAGE、IEF、UV、CD、荧光光谱法和 NMR。例如, 可以通过按照 Eur. Pharm. (欧洲医药) 的专论将 EPO 分子的胰蛋白酶肽的混合物通过 RP-HPLC C4- 相分离后进行 MALDI/TOF-MS 分析, 来进行 EPO 制剂的 O- 糖基化的测定。含有 Ser-126 部分的未糖基化的胰蛋白酶肽具有 1466.6 的质量, 而相应的带有 GalNAc 部分的肽 (Hex-NAc) 应该具有 203 的质量增量 ($m/z=1669$), 并且 Gal-GalNAc (Hex-NAc-Hex) 衍生物应该具有 365 的质量增量, 对应于 $m/z=1830$ 的质量。在本发明的范围内使用 MALDI/TOF-MS 分析进行的相应实验证实, 在通过多肽 -N 糖苷酶 (PNGase) 释放出 N- 聚糖后, 在 EPO 制剂的 SDS-PAGE 图样中基本上只能专一地观察到 EPO 蛋白的 O- 糖基化形式, 与此相比在标准的 EPO 制剂中存在约 15% 的未 O- 糖基化的同种型。

[0080] 在本发明的上下文中, EPO 比活性的最小值通常为每 mg (糖蛋白) 100, 000IU。在一个实施方式中, 由于高度唾液酸化的 EPO 同种型的富集, 可以获得具有 $>110, 000IU/mg$ 的活性的本发明的 EPO 制剂。

[0081] 因此, 本发明的 EPO 制剂特别适用于治疗应用。因此, 本发明还涉及包含如上定义的本发明的 EPO 制剂的药物组合物。在本发明的上下文中, 本发明还涉及药物组合物的制造方法, 所述方法包括制备和分离如上所定义的糖同种型混合物形式的 EPO, 以及提供由此制备和分离的 EPO 与可接受的药用载体的混合物。在一个实施方式中, 本发明涉及含有三羟甲基氨基甲烷作为稳定剂的 EPO 制剂的稳定药物制剂, 由此所述制剂不含氨基酸或人血清白蛋白, 最优选地所述制剂包含磷酸钠缓冲液作为 pH 缓冲剂, 量为 10 至 200mM 的三羟甲基氨基甲烷和 / 或量为 20-150mM 的 NaCl 作为稳定剂, 以及药用量的纯化的 EPO。对于本发明的 EPO 制剂的其它实施方式, 参见欧洲专利申请 EP 1537876, 其公开内容在此引为参考。本发明的药物组合物的特征在于至少是无菌和无热原的。当在本文中使用时, “药物组合物” 包括人类使用和兽医用制剂。制备本发明的药物组合物的方法在本领域的技术范围内, 例如如在《Remington 制药学》(Remington's Pharmaceutical Science, 第 17 版, Mack Publishing Company (麦克出版公司), Easton, Pa. (1985)) 和更新版的《Remington 药物科

学与实践》(Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000), the University of Sciences in Philadelphia (费城科学大学), ISBN 0-683-306472)中描述的,两份文献的全部公开内容在此引为参考。

[0082] 本发明的说明书和实施例公开并涵盖了这些以及其它实施方式。可以从公共图书馆和数据库检索关于在本发明中使用的任一种材料、方法、应用和化合物的其它文献。例如,可以利用公共数据库“Medline”,其由美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)和/或国家医学图书馆(National Library of Medicine)主办。其它数据库和网址,例如作为欧洲分子生物学实验室(European Molecular Biology Laboratory)(EMBL)的一部分的欧洲生物信息研究所(European Bioinformatics Institute)(EBI)的数据库和网址,对于本领域普通技术人员来说是已知的,并且也可以使用因特网搜索引擎来获得。生物技术领域专利信息的概述和可用于回溯检索和新近资料通告的专利信息相关资源的调查,在 Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364 中给出。

[0083] 上面的公开内容总体描述了本发明。除非另有陈述,否则对本文中使用的术语给出的定义如《牛津生物化学和分子生物学词典》(Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press(牛津大学出版社), 1997, 2000年修订, 2003年重印, ISBN 0198506732)中所提供的。在本说明书的文本中引用了几篇文献。所有引用的参考文献(包括在本申请中引用的文献参考、出版的专利、公开的专利申请和制造商的技术规格、说明书等)的内容,在此明确引为参考;然而,并不承认任何引用的文献事实上是本发明的现有技术。

[0084] 参考下面的具体实施例可以获得更完整的理解,在本文中提供所述实施例仅仅是出于说明的目的,并不是旨在限制本发明的范围。具体说来,所述实施例涉及本发明的优选实施方式。

具体实施方式

[0085] 实施例

[0086] 除非另有定义,否则在本文中使用的所有技术和科学术语具有与所述技术领域(例如细胞培养、分子遗传学、核酸化学、杂交技术、蛋白质化学和生物化学)中的普通技术人员所通常理解的相同的含义。使用分子、遗传和生物化学方法(总的来说,参见 Sambrook 等人,《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 第二版, (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press (冷泉港实验室出版社), Cold Spring Harbor (冷泉港), N.Y. (纽约)和 Ausubel 等人,《分子生物学简要方法》(Short Protocols in Molecular Biology) (1999) 第四版, John Wiley & Sons, Inc., 以及标题为《分子生物学现代方法》(Current Protocols in Molecular Biology)的完整版本,上述文献在此引为参考)以及化学方法的标准技术。

[0087] 起始材料

[0088] 含有 EPO 蛋白的培养基如本技术领域所述,通过含有扩增的人类 EPO 基因的转化的中国仓鼠卵巢细胞系(CHO dhfr⁻)的大规模灌注培养来生产;参见例如上面引用的文献。培养基中 EPO 蛋白的浓度与细胞生长相关。在实际中,产物表达的水平(单位体积的 mg

数)受到获得的最大细胞数量的限制。因此,使用允许在长的培养时期内进行高密度细胞培养连续灌注培养系统,使培养最大化。在确定的细胞密度时开始灌注,并通过针对细胞数量手动调节速率,将灌注速率维持在确定范围内。通过标准程序例如声波沉降器、过滤或离心来实现细胞滞留。将灌注液收获物在冷冻温度下分份收集。整个一批生产通常由几周的灌注培养构成,产生 5-10 份收获物。通过深度过滤从灌注液收获物除去灌注液中残留的细胞和碎片,并优选以 30kDa 的截留分子量通过切向流超滤浓缩蛋白。将浓缩物分成等分试样,并储存在 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 下,直到所有收获物都已收集。从冰箱中取出浓缩的收获物并置于冻融装置中。通过经 $0.45\ \mu\text{m}$ 深度滤器进行过滤,使合并和融化的收获物澄清。解冻后的所有下游纯化步骤在室温(17 至 25°C)下进行。

[0089] 缓冲液和溶液组成

[0090] 用于各个纯化步骤的缓冲溶液描述在下面的表 1 中。

[0091] 表 1 :缓冲液组成

[0092]

使用步骤	缓冲液/溶液	用途
亲和层析	20 mM Tris.HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.5	预平衡缓冲液
	20 mM Tris.HCl, pH 7.5	平衡缓冲液
	20 mM Tris.HCl, pH 7.5	清洗缓冲液
	20 mM Tris.HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.5	洗脱缓冲液
	5 M 尿素	再生
	0.5 M NaOH	消毒
	0.01 M NaOH	储存
渗滤	1 M NaOH	消毒
	20 mM Tris.HCl, pH 7.0	平衡和渗滤缓冲液
阴离子交换 层析	20 mM Tris.HCl, 1.0 M NaCl, pH 7.0	预平衡缓冲液
	20 mM Tris.HCl, pH 7.0	平衡和清洗缓冲液
	20 mM Tris.HCl, pH 7.0	洗脱溶液 A
	20 mM Tris.HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.0	洗脱溶液 B
	20 mM Tris.HCl, 1.0 M NaCl, pH 7.0	再生缓冲液
	1 M NaOH	消毒
	0.01 M NaOH	储存
RP-HPLC 层析	0.1% (v/v) TFA	平衡
	0.1% (v/v) TFA 在 WFI 中	洗脱溶液 A
	100% (v/v) 乙腈+0.1% (v/v) TFA	洗脱溶液 B
	100% (v/v) 乙腈	再生
	60% (v/v) 乙腈	清洁和储存

[0093] 表 1 (续):缓冲液组成

[0094]

使用步骤	缓冲液/溶液	用途
阳离子交换 层析	100mM 甘氨酸.HCl, pH 2.0	预平衡缓冲液
	20mM 甘氨酸.HCl, pH 2.0	平衡缓冲液
	20mM 甘氨酸.HCl, pH 2.0	清洗缓冲液
	10 mM NaPO ₄ , 0.15 M NaCl, pH 7.2	洗脱缓冲液
	10 mM NaPO ₄ , 1.0 M NaCl, pH 7.2	再生缓冲液
	0.01 M NaOH	储存
	1 M NaOH	消毒
超滤	1 M NaOH	消毒
	10 mM NaPO ₄ , 0.15 M NaCl, pH 7.2	平衡缓冲液
尺寸排阻层 析	0.5 M NaOH	消毒
	100 mM NaPO ₄ , pH 7.2	预平衡缓冲液
	10 mM NaPO ₄ , 0.15 M NaCl, pH 7.2	平衡缓冲液
	1.0 M NaOH	消毒
	0.01 M NaOH	储存
纳滤	10 mM NaPO ₄ , 0.15 M NaCl, pH 7.2	平衡缓冲液

[0095] 使用 5 个连续的柱层析过程来纯化各个合并的浓缩物,以产生一批治疗级的高度唾液酸化和 O-糖基化的 EPO;也参见图 1。

[0096] 实施例 1:通过使用 Blue Sepharose 6FF (蓝色琼脂糖凝胶 6FF)的亲层析捕获 EPO 并减少可能的污染物

[0097] Blue Sepharose 6FF 是与染料汽巴蓝(Cibacron Blue)共价连接的琼脂糖树脂,并被用于在发酵收获物中包含的污染物的存在下倾向性结合 EPO。首先如表 2 中所述将产物流通过亲和层析进行纯化。

[0098] 表 2:用于进行 Blue Sepharose 层析的参数

编号	生产程序	控制	希望值/公差
1.	Blue-Sepharose 10 x 12 cm = 1 L (BPG 100 / 500) 仪器: BioProcess 上样: 2.4 L 浓缩物=最大 3,000 mg EPO (1-1.5 mg EPO/ml) 洗脱液: ~ 500 ml 合并物在 100 ml Schott 瓶中 (~ 4 mg EPO/ml)		
1.1	柱载样和质量评定	HETP/不对称性	$N > 2,500/m$ $0.7 < A_s < 1.8$
1.2	浓缩物的解冻	温度 时间	$20 \pm 3^\circ\text{C}$ 2 h
1.3	浓缩物的过滤	主体滤器/除菌滤器 Sartobran 300 滤囊	来自于优化运行
1.4	柱消毒	NaOH 浓度 时间	0.1 N 1 h, 90 cm / h
[0099] 1.5	进行运行	流速 温度 载样量 分步梯度	$7 \pm 0.5 \text{ L / h}$ $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 最大 3 mg EPO/ml 凝胶 最大 3,000 mg EPO 使用 1.5 M NaCl
1.6	合并判据	合并开始 合并终止	$OD > 0.15$ $OD < 0.15$, 但 $Vol. \leq 0.5 \text{ CV}$
1.7	样品储存	温度 时间	$RT = 22 \pm 2^\circ\text{C}$ 过夜, 最多 18 h
1.8	柱后处理	1. 尿素: 浓度 时间 2. NaOH: 浓度 时间	5 M 30 min, 90cm / min 0.1 N 1 h, 90 cm / min
运行持续时间		约 5h	

[0100] 用 Blue Sepharose 6FF 树脂装填柱子。在装填后,对柱进行理论塔板和不对称因子的质量评定。将柱用 0.5M NaOH 消毒 1 小时,然后用注射用水(WFI)清洗。在载样前,将

柱用 20mM Tris.HCl, 1.5M NaCl, pH 7.5 平衡, 然后用 20mM Tris.HCl, pH 7.5 平衡。将样品上样到柱上, 并用 20mM Tris.HCl, pH 7.5 洗柱。使用 20mM Tris.HCl, 1.5M NaCl, pH 7.5 洗脱样品。在峰前与主峰之间的最小 OD 不小于 0.15 后开始进行样品收集。当 OD 等于或小于 0.15 时终止收集。将洗脱液收集在无菌一次性袋中。

[0101] 洗脱后, 将柱用 WFI 冲洗, 然后通过用 5M 尿素清洗来解吸。在用 WFI 进一步洗涤后, 将柱用 0.5M NaOH 消毒。将柱用 WFI 冲洗, 并储存在 0.01M NaOH 中。

[0102] 关于层析树脂的其它信息, 提供在制造商的管理支持文件中(代表性通用健康蓝色琼脂糖凝胶管理支持文件(Representative GE Healthcare Blue Sepharose Regulatory Support File))。

[0103] 实施例 2 : 通过渗滤浓缩 EPO

[0104] 通过超滤将洗脱液浓缩, 并在切向流过滤装置上使用 10kDa 截留膜进行渗滤; 参见表 3。

[0105] 表 3 : 用于进行渗滤的参数

[0106]

编号	生产程序	控制	希望值/公差
2.	渗滤 仪器: Proflux 0.1 m ² Hydrosart 10 kDa 膜 500ml BS 洗脱液, 浓缩至 300 ml, 使用 6 倍体积渗滤, 用 2 x 200ml 冲洗= 700 ml 渗余物		
2.1	膜质量评定	水等量性	
2.2	膜消毒	试剂 时间	1 N NaOH 至少 30 分钟
2.3	进行渗滤	渗余物流动 温度 入口压力 出口压力 渗滤体积	22±2°C 1 巴 0.5 巴 6 倍
2.4	浓缩物储存	温度 时间	4±2°C 直接重新使用, 最大 24 h
2.5	膜后处理	试剂 时间	1 N NaOH 至少 30 分钟
2.6	IPC 释放	电导率	< 2.5 mS/cm
渗滤持续时间		约 2h + 2h 的前处理和后处理	

[0107] 在使用过滤装置之前进行正常水通量测定(NWP)。将过滤装置用 1M NaOH 消毒至少 1 小时, 然后用 WFI 洗涤。在洗涤后, 使用 20mM Tris-HCl, pH 7.0 将过滤装置平衡。然后装载样品并在不超过 1 巴的跨膜压力下过滤。当渗透液的电导率低于 2.5mS/cm 时终止渗滤。

[0108] 实施例 3 : 通过使用 Q-Sepharose HP 的阴离子交换层析富集 EPO 的酸性同种型并进一步除去污染物

[0109] 使用 Q-Sepharose HP 树脂的阴离子交换层析被用于富集 EPO 的酸性同种型, 进一步除去污染物(例如 DNA、HCP) 并消除可能从第一个柱上淋滤的任何染料配体。此外, 阴离子交换层析是除去外来病毒的有效步骤。因此, 将渗滤液如表 4 中所述通过阴离子交换层析进行处理, 然后将 Q 洗脱液级份和级份合并物进行 0.2 μm 过滤。

[0110] 表 4 : 用于进行阴离子交换层析的参数

[0111]

编号	生产程序	控制	希望值/公差
3.	高效 Q-Sepharose 6.2 x 16.5 cm = 500 ml (Vantage 60 x 500) 仪器: ÄKTA 纯化器 上样: 700 ml 渗滤液=最大 1,500 mg EPO 洗脱液: 约 2,000 ml 在 250 ml Schott 瓶中: 100-200 ml 级份		
3.1	柱载样和质量评定	HETP/不对称性	$N > 4,000/m$ $0.6 < A_s < 2.0$
3.2	浓缩物的解冻	NaOH 浓度 时间	$1 \pm 0.05 N$ 1 h, 90 cm/h
3.3	浓缩物的过滤	平衡后的 pH 流速 温度 载样量 梯度	7.0 ± 0.1 $45 \pm 3 \text{ ml/min.} = 90 \text{ cm/h}$ $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 最大 3 mg EPO/ml 凝胶 最大 1,500 mg EPO 0-25 M NaCl 在 30CV 中
3.4	柱消毒	合并开始 合并终止	OD ~峰最大值的 85%, OD ~峰最大值的 25%, 对于蛋白质/EPO 两者来说
3.5	进行运行	温度 时间	$RT = 22 \pm 2^\circ\text{C}$ 过夜, 最多 18 h
3.6	合并判据	NaOH 浓度 时间	$1 \pm 0.05 N$ 1 h, 90 cm/h
3.7	样品储存	待测定的蛋白/EPO	在优化运行后 <1.5
运行持续时间:		约 6 h	

[0112] 用 Q-Sepharose HP 树脂装填柱子。在装填后,对柱进行理论塔板和不对称因子的质量评定。将柱用 WFI 冲洗,然后用 1M NaOH 消毒 1 小时。消毒后,将柱用 WFI 冲洗。在载样前,将柱用 20mM Tris.HCl, 1.0M NaCl, pH 7.0 平衡,然后用 20mM Tris.HCl, pH 7.0 平衡。将样品上样到柱上,并用 20mM Tris.HCl, pH 7.0 洗柱。使用 20mM Tris.HCl, 0.5M NaCl, pH 7.0, 用线性梯度洗脱样品。EPO 作为通过线性梯度的级份被收集。核心级份在下降斜率的峰最大值(UV)的约 85% 至 95% 时开始收集,并在 UV 值降低至峰最大值的约 25% 时终止收集。

[0113] 使用 0.2 μm 过滤装置对各个阴离子交换层析洗脱液级份进行过滤。在合并之前,在过程中测试正在进行时,将级份在无菌一次性袋中保持在 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 下最长 20 小时(保持步骤 1)。为了获得所希望的同种型分布技术指标,必须将所选的级份合并。为了确定哪些

级份将被合并,制备级份的小规模样品,并通过毛细管区带电泳(CZE)进行分析。优选选择与所希望同种型分布情况最接近的级份组合,并将这些级份合并用于进一步纯化。

[0114] 在使用之间,通过用 20mM Tris.HCl, 1M NaCl, pH 7.0 冲洗,然后用 WFI 清洗,将树脂再生。然后将柱用 1M NaOH 消毒 1 小时,并用 WFI 清洗。将柱储存在 0.01M NaOH 中。

[0115] 关于层析树脂的其它信息,提供在制造商的管理支持文件中(代表性通用健康 Q-琼脂糖凝胶管理支持文件(Representative GE Healthcare Q-Sepharose Regulatory Support File))。

[0116] 实施例 4 :通过使用 C4 树脂的 RP-HPLC 排除在 Ser126 残基处未糖基化的 EPO 分子并进一步除去污染物

[0117] 使用 C4 树脂的 RP-HPLC 在疏水性的基础上将 EPO 与可能的污染物分离开,并且如果需要,也可以减少在 Ser126 残基处未糖基化的 EPO 分子的量。此外,该步骤消除可能从第一个柱淋滤的任何残留的染料配体。如表 5 中所述,将过滤的阴离子交换层析级份合并物通过反相层析进行纯化。

[0118] 表 5 :用于进行 RP-HPLC 的参数

[0119]

编号	生产程序	控制	希望值/公差
4.	反相柱 5 x 25 cm = 491 ml Vydac C ₄ 反相柱 (10-15 μm) 仪器: Waters Deltaprep 4000 上样: 1,600-2,400 ml Q Sepharose 的洗脱液=最大 1,570 mg EPO 洗脱液: 约 500 ml 在 50 ml Falcon 管中 (~2 mg EPO/ml)		
4.1	柱质量评定	HETP/不对称性	分离标准混合物
4.2	柱消毒	-	-
4.3	进行运行	平衡后的 pH 流速 温度 载样量 梯度	2.0±0.25 100±5 ml/min.=300 cm/h 22±2°C 最大 3.2 mg EPO/ml 凝胶 最大 1,570 mg EPO 50-80%缓冲液 B (70%乙腈)
4.4	合并判据	合并开始 合并终止	OD ₂₈₀ >0.01 ~峰最大值的 45%
4.5	样品储存	温度 时间	RT = 22±2°C 过夜, 最多 18 h
4.6	柱后处理	乙腈 时间	100% (V/V) 1 h
运行持续时间:		约 6 h	

[0120] 用 C4 树脂装填柱子。将柱用 WFI 中的 0.1% (v/v) TFA 平衡。在使用前, 通过测定塔板数和不对称因子来确定柱性能。将样品上样到柱上, 然后使用表 1 和 6 中描述的线性梯度进行洗脱。在 280nm 处的吸收值达到 0.01AU 后收集洗脱液, 并在吸收值降低到下降斜率上峰最大值的 40% 至 45% 时终止收集。将洗脱液收集在玻璃瓶中。

[0121] 正如提到的, 梯度由水 /0.1% TFA (溶剂 A) 和 30% 水 /70% 乙腈 (v/v) /0.1% TFA (溶剂 B) 形成。具体来说, 将 Q Sepharose HP 洗脱液的解冻级份的合并物用作样品, 并通过 0.2 μm 滤器进行过滤。在用 2 倍柱体积 (CV) 的 Milli-Q 水冲洗柱子并用 4CV 溶剂 A 平衡后, 将样品上样到柱上, 并按照表 6 施加梯度。

[0122] 表 6 : 用于进行 RP-HPLC 的梯度

[0123]

时间(分钟)	A 的 %	B 的 %
0	100	0
9.2	50	50
18.3	50	50
52.7	20	80
59.5	0	100
75.6	0	100
91.6	100	0
108.8	100	0
总体积(L)	~5	~6

[0124] 将洗脱液以 50ml 的级份收集,并将其储存在 -20℃。

[0125] 在使用之间,将树脂再生并通过测量理论塔板数和不对称因子对柱进行质量评定。首先,使用 70% (v/v)乙腈至 100% (v/v)乙腈的梯度对柱进行清洗。然后将柱用 100% (v/v) 乙腈清洗。通过用 100% (v/v) 乙腈至 60% (v/v) 乙腈的梯度清洗来降低乙腈浓度,然后将柱储存在 60% (v/v) 乙腈中。

[0126] 关于层析树脂的其它信息,提供在制造商的管理支持文件中(代表性 Vydac C4 树脂管理支持文件)。

[0127] 实施例 5 :通过将 EPO 在乙腈 /TFA 中温育来使病毒失活

[0128] 在 RP-HPLC 步骤后,将洗脱液在 22±3℃ 下保持 60 至 180 分钟。洗脱液中的乙腈浓度接近于 41% (v/v),TFA 浓度接近于 0.1% (v/v)。在过程的该阶段中,控制保持温度和保持时间。

[0129] 实施例 6 :通过使用 MacroPrep High S 的阳离子交换层析除去 RP-HPLC 溶剂和聚集的 EPO 物质

[0130] 使用 MacroPrep High S 树脂的阳离子交换层析被用于除去 RP-HPLC 溶剂和聚集物质,并在相当短的时间内交换缓冲液。如表 7 中所述将 RP-HPLC 洗脱液通过阳离子交换层析进行处理,然后对 MacroPrep 洗脱液进行 0.2 μm 过滤。

[0131] 表 7 :用于进行阳离子交换层析的参数

[0132]

编号	生产程序	控制	希望值/公差
5.	MacroPrep High S 5 x 12.5 cm = 250 ml 仪器: AKTA 纯化器 上样: 400-500 ml RP 柱的洗脱液=最大 1,250 mg EPO 洗脱液: ~250 ml 在 50 ml Falcon 管中 (~3 mg EPO/ml)		
5.1	柱载样和质量评定	HETP/不对称性	$N > 2,500/m$ $0.6 < A_s < 1.8$
5.2	柱消毒	NaOH 浓度 时间	$1 \pm 0.05 N$ 1 h
5.3	进行运行	平衡后的 pH 流速 温度 载样量 梯度	2.0 ± 0.2 $50 \pm 3 \text{ ml/min.} = 150 \text{ cm/h}$ $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 最大 5 mg EPO/ml 凝胶 最大 1,250 mg EPO 在优化运行后使用 pH 和 NaCl 的分步梯度
5.4	合并判据	合并开始 合并终止	$OD_{280} > 0.03$ $OD_{280} < 0.03$
5.5	样品储存	温度 时间	$RT = 22 \pm 2^\circ\text{C}$ 在运行后立即浓缩, 最多 24 h
5.6	柱后处理	NaOH 浓度 时间	$1 \pm 0.05 N$ 1 h
运行持续时间:		约 3 h + 3h 的前处理和后处理	

[0133] 用 MacroPrep High S 树脂装填柱子。在装填后,对柱进行理论塔板和不对称因子的质量评定。将柱用 WFI 冲洗,然后用 1M NaOH 消毒至少 1 小时。消毒后,将柱用 WFI 冲洗。在载样前,将柱用 100mM 甘氨酸·HCl, pH 2.0 预平衡,然后用 20mM 甘氨酸·HCl, pH 2.0 平衡。将样品上样到柱上,并用 20mM 甘氨酸·HCl, pH 2.0 洗柱。使用表 1 中描述的陡梯度洗脱样品。在 280nm 处的吸收值达到 0.03AU 后收集洗脱液,并在吸收值达到 0.03AU 时终止收集。将洗脱液储存在无菌一次性袋中。使用 0.2 μm 过滤装置对阳离子交换层析洗脱液进行过滤,然后进行进一步纯化和 / 或开始在无菌一次性袋中在 22±3°C 下进行最长达 20 小时的保持时间。

[0134] 在使用之间,将树脂再生。将柱用 10mM NaPO₄, 1.0M NaCl, pH7.2 清洗,然后用 WFI 冲洗。EPO 聚集体洗脱在再生液中。将柱用 1M NaOH 消毒至少 1 小时,并用 WFI 冲洗。将柱储存在 0.01M NaOH 中。

[0135] 关于树脂的其它信息,提供在制造商的管理支持文件中(代表性的 BioRad MacroPrep High S 管理支持文件)。

[0136] 实施例 7:超滤

[0137] 任选地,使用具有 10kDa 截留值的切向流过滤装置,通过超滤对过滤过的阳离子交换层析洗脱液进行进一步浓缩,以实现所希望的体积减少。关于该过滤步骤的信息提供在表 8 中。

[0138] 表 8 :用于进行超滤的参数

[0139]

编号	生产程序	控制	希望值/公差
6.	超滤 仪器: Amicon Stirred Cell 76 mm 平面膜 YM-10kDa 将 250 ml 浓缩至 80 ml, 用 2 x 10ml 冲洗= 100 ml		
6.1	膜质量评定	水等量性	
6.2	膜消毒	试剂 时间	0.1 N NaOH 至少 1 h
6.3	进行超滤	温度 入口压力 渗余物中的 UV ₂₈₀ 滤液中的 UV ₂₈₀	22±2°C 1 巴 <0.05
6.4	浓缩物储存	温度 时间	RT=22±2°C 过夜, 最长 18 h
6.5	膜后处理	试剂 时间	0.1 N NaOH 至少 1 h
6.6	IPC 释放	EPO 浓度 渗余物体积	5 < X < 7 mg/ml ≤100 ml
超滤持续时间		约 1 h + 2 h 的前处理和后处理	

[0140] 将滤器装置用 1M NaOH 消毒, 然后用 WFI 清洗。在清洗后, 使用 10mM NaPO₄, 0.15M NaCl, pH 7.2 缓冲液平衡滤器装置。然后载入样品, 并在 22±3°C 下以 0.7 至 1.1 的进料压力进行过滤。将渗余物收集在无菌一次性袋中。

[0141] 实施例 8 :使用 Superdex S200 制备级经尺寸排阻层析除去任何残留的 EPO 聚集物和其它污染物

[0142] 使用 Superdex S200 制备级的尺寸排阻层析是最终的(精制)层析步骤, 并被用于除去任何可能的残留聚集物并配制药物质本体溶液。将超滤(实施例 7)后的浓缩液或 CEX 层析(实施例 6)后的洗脱液如表 9 中所述通过尺寸排阻层析进行处理, 然后如实施例 9 中所述将 SE-HPLC 洗脱液进行 0.2 μm 过滤。

[0143] 表 9 :用于进行尺寸排阻层析的参数

[0144]

编号	生产程序	控制	希望值/公差
7.	Superdex 200 pg 10 x 70 cm = 5.5 L (BPG 100 / 950) 仪器: ÄKTA 纯化器 上样: 100 ml UF 的浓缩物 洗脱液: ~300 ml 在 50 ml Falcon 管中 (~1.5 mg EPO/ml)		
7.1	柱载样和质量评定	HETP/不对称性	$N > 5,000/m$ $0.7 < A_s < 1.8$
7.2	柱消毒	NaOH 浓度 时间	$0.5 \pm 0.05 N$ 至少 1 h
7.3	进行运行	平衡后的 pH 流速 温度 上样液中的 EPO 浓度 上样液体积与 CV 相比的 X%	7.2 ± 0.2 $32 \pm 2 \text{ ml/min.} = 24 \text{ cm/h}$ $22 \pm 2^\circ\text{C}$ $5 < X < 7 \text{ mg EPO/ml}$ 最大 4%
7.4	合并判据	合并开始 合并终止	$OD_{280} > 0.01$ $OD_{280} < 0.01$, 最大 300 ml
7.5	合并物储存	温度 时间	在当天进行“纳滤”
7.6	柱后处理	NaOH 浓度 时间	$0.5 \pm 0.05 N$ 至少 1 h
7.7	IPC 释放	EPO 浓度	$1 < X < 3 \text{ mg/ml}$
运行持续时间:		约 3 h + 12 h 的前处理和后处理	

[0145] 用 Superdex S200 制备级树脂装填柱子。在装填后,对柱进行理论塔板和不对称因子的质量评定。将柱用 0.5M NaOH 消毒 1 小时,然后用 WFI 冲洗。在载样前,将柱用 100mM NaPO_4 , pH 7.2 预平衡,然后用 10mM NaPO_4 , 0.15M NaCl, pH 7.2 平衡。将样品上样到柱上,在 280nm 处的吸收值增加到超过 0.01AU 后收集洗脱液,并在吸收值达到 0.01AU 时终止收集。将洗脱液收集在无菌一次性袋中。在进一步处理之前,使用 0.2 μm 滤器将尺寸排阻层析洗脱液过滤到无菌一次性袋中。

[0146] 在使用后,将柱用 WFI 清洗。然后使用 0.5-1M NaOH (0.6CV)将柱消毒 1 小时,并

将其储存在 0.01M NaOH 中。

[0147] 关于树脂的其它信息,提供在制造商的管理支持文件中(代表性 GE Healthcare Superdex 管理支持文件)。

[0148] 实施例 9 :通过纳滤从 EPO 制剂中除去病毒

[0149] 在纯化方法中包括最后的 15nm 纳滤步骤以增加药物物质的病毒安全性。使用 Planova 15N 滤器对尺寸排阻层析洗脱液滤液进行纳滤,其用于从洗脱液中除去外来病毒剂。通过用 150ml 10mM NaPO₄, 0.15MNaCl, pH 7.2 进行冲洗来准备纳滤装置。将 0.2 μ m 过滤过的尺寸排阻层析洗脱液泵送通过纳滤器,并将滤液合并并在无菌一次性袋中。

[0150] 实施例 10 :装填、储存和运输

[0151] 装填过程是 EPO 药物物质制造过程的最后一步。在装填之前,将最终容器消毒并除热原。使用蠕动泵将纳滤过的级份分发到大小为 30ml 容积的原料药物物质储存容器中。该操作在环境温度下在装填室中在层流罩超静台(局部保护)中进行。最终产品的储存可以在 -70℃ 下进行,例如在特氟龙涂覆的 PP 管中。可以将药物物质转移到药品制造场所,并在运输期间使用干冰将原料药物物质维持在低于 -70℃。

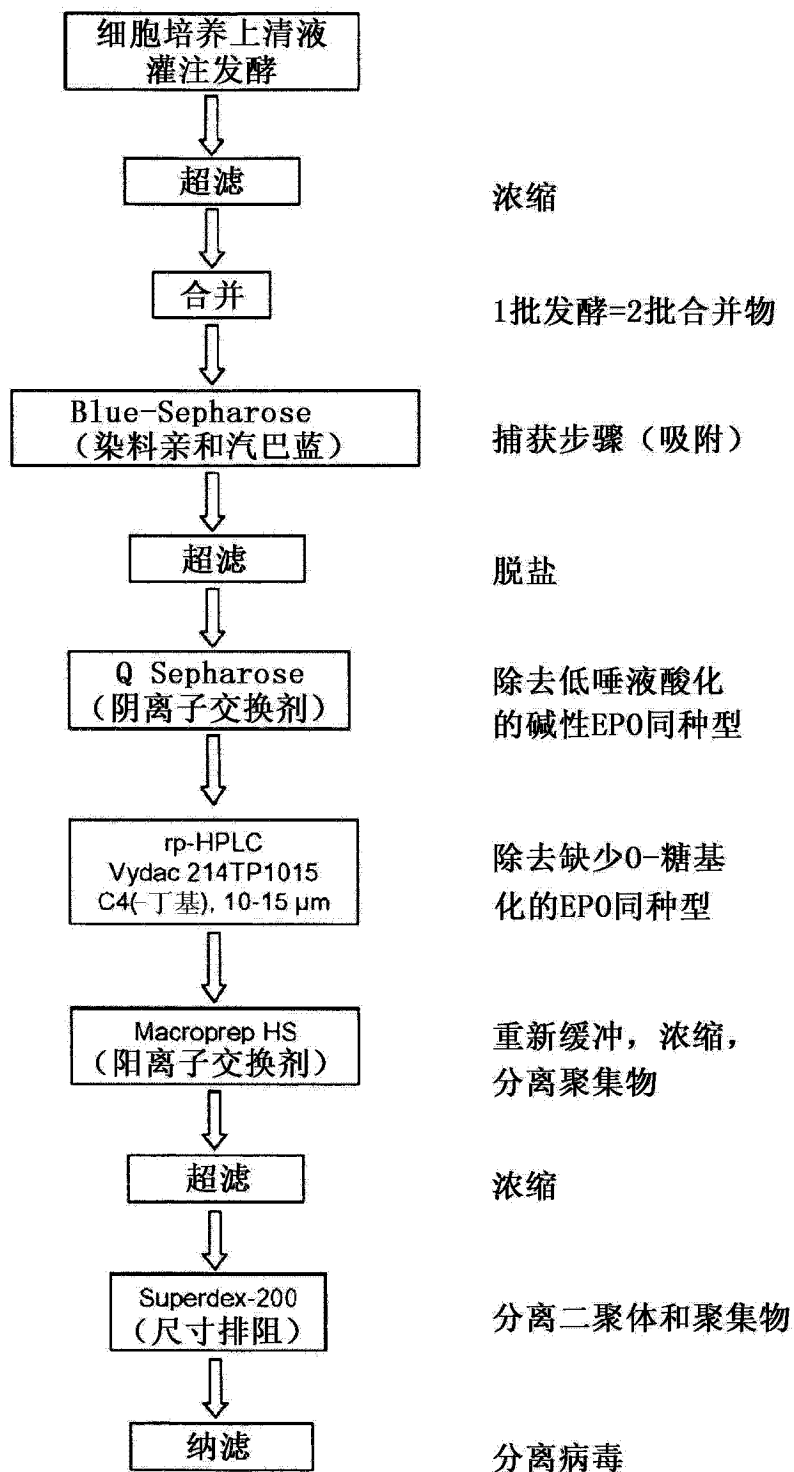


图 1

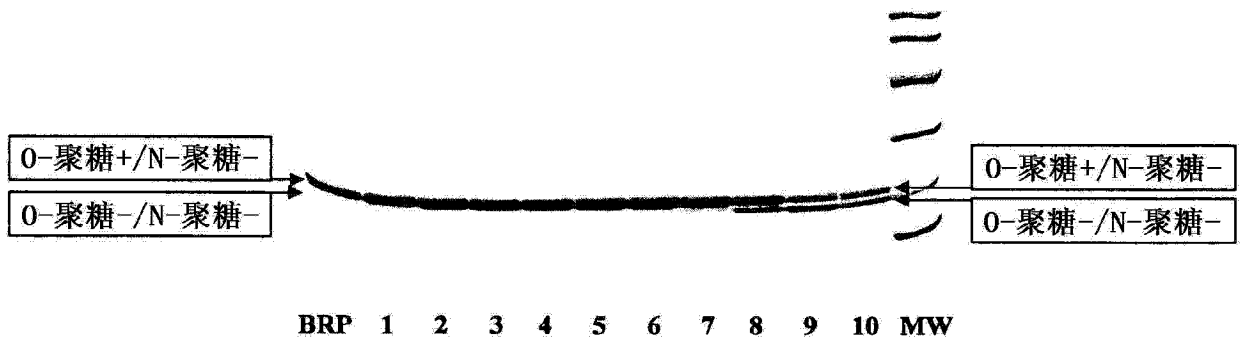


图 2

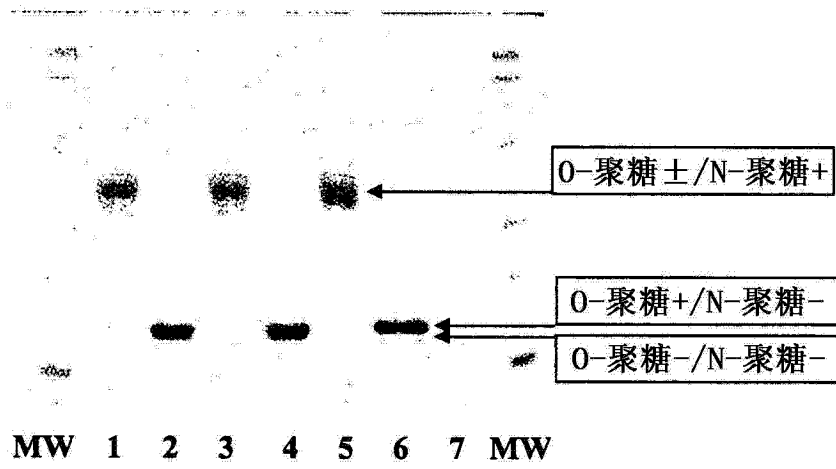


图 3