



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202337900 A

(43)公開日：中華民國 112 (2023) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：112101014

(22)申請日：中華民國 112 (2023) 年 01 月 10 日

(51)Int. Cl. : C07K16/18 (2006.01)

B01D15/26 (2006.01)

B01D15/42 (2006.01)

(30)優先權：2022/01/12 美國

63/298,745

2022/12/06 美國

63/430,477

(71)申請人：美商再生元醫藥公司(美國) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
美國(72)發明人：陳 辛蒂 CHEN, CINDY (US)；巴瑪賽 安德魯 BARMASSE, ANDREW (US)；
芝波羅斯基 馬克 CHIBOROSKI, MARK (US)；賽文斯基 克里斯托弗
SEVINSKY, CHRISTOPHER (US)；丁 尚恩 DINN, SEAN (US)

(74)代理人：何愛文；王仁君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：83 項 圖式數：7 共 0 頁

(54)名稱

改良使用親和層析的異二聚蛋白質自雜質之解析的方法

(57)摘要

揭示經由一系列之層析循環自雜質純化異二聚蛋白質（例如，雙特異性抗體）之方法。在各種實施例中，溶離緩衝液之 pH 值隨著該系列內之循環增加而增加，以維持結合雜質之最小污染且無該異二聚蛋白質之回收的顯著損失。

Methods of purifying a heterodimeric protein (e.g., a bispecific antibody) from impurities through a series of chromatographic cycles are disclosed. In various embodiments, the pH of the elution buffer is increased with increasing cycles within the series to maintain minimal contamination with a binding impurity, and without significant loss of recovery of the heterodimeric protein.



【發明摘要】

【中文發明名稱】改良使用親和層析的異二聚蛋白質自雜質之解析的方法

【英文發明名稱】 METHODS FOR IMPROVING RESOLUTION OF
HETERODIMERIC PROTEINS FROM IMPURITIES USING AFFINITY
CHROMATOGRAPHY

【中文】

揭示經由一系列之層析循環自雜質純化異二聚蛋白質（例如，雙特異性抗體）之方法。在各種實施例中，溶離緩衝液之pH值隨著該系列內之循環增加而增加，以維持結合雜質之最小污染且無該異二聚蛋白質之回收的顯著損失。

【英文】

Methods of purifying a heterodimeric protein (*e.g.*, a bispecific antibody) from impurities through a series of chromatographic cycles are disclosed. In various embodiments, the pH of the elution buffer is increased with increasing cycles within the series to maintain minimal contamination with a binding impurity, and without significant loss of recovery of the heterodimeric protein.

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】改良使用親和層析的異二聚蛋白質自雜質之解析的方法

【英文發明名稱】 METHODS FOR IMPROVING RESOLUTION OF HETERODIMERIC PROTEINS FROM IMPURITIES USING AFFINITY CHROMATOGRAPHY

【技術領域】

【0001】 本發明係關於改良用於純化蛋白質產物，例如自蛋白質之複雜混合物純化異二聚蛋白質之親和層析管柱之解析壽命。特定言之，該等方法包括在增加之循環下利用增加之溶離pH值來進行一系列之層析循環，以最小化雜質污染，同時最小化異二聚蛋白質（例如，雙特異性抗體）之回收損失。

【先前技術】

【0002】 蛋白質產物之純化通常需要利用各種層析步驟移除雜質，諸如宿主細胞蛋白質、DNA、及不合需要之蛋白質產物物種。

【0003】 可將包括多特異性或雙特異性抗體之異二聚蛋白質形式化以使用親和層析進行純化。一種此類形式係基於具有改良之藥物動力學概況及極小免疫原性之標準完全人類IgG抗體（參見美國專利第8,586,713號，其全文併入本文中）。單一共同輕鏈及二個不同重鏈組合形成雙特異性抗體。重鏈中之一者含有減少或消除經取代之Fc序列（下文中稱為「Fc*」）與蛋白質A之結合的Fc*。舉例而言，一個此類Fc*序列在CH3域中含有H435R/Y436F（按EU編號系統；按IMGT外顯子編號系統，H95R/Y96F）取代。二個重鏈及共同輕鏈之共

同表現產生三種產物：其中之二者係重鏈的同二聚體且其中之一者係所要異二聚雙特異性產物。歸因於相較於高親和力FcFc重鏈同二聚體或弱結合Fc*Fc*同二聚體，其對蛋白質A之中間結合親和力，Fc*序列允許在市售親和管柱上選擇性純化FcFc*雙特異性產物。

【0004】 為實現異二聚蛋白質（例如雙特異性抗體）之商業規模純化，需要FcFc同二聚體、Fc*Fc異二聚體、及Fc*Fc*同二聚體之間的良好解析度。然而，在多個循環中重複使用親和管柱通常導致結合雜質之污染增加，其可能導致批次故障。雖然此等問題可藉由更換管柱之樹脂（附著至基材之蛋白質結合配位體）解決，但管柱更換為昂貴的（約\$15K/L樹脂），且帶來與管柱取出及重填之時間相關的延遲。對於經由親和層析純化，產生純化之異二聚蛋白質的成本係維持可接受之純度及回收率的同時可使用親和樹脂進行的循環數目的函數。因此，需要用於在更多數目個循環中改良管柱功能的方法。

【發明內容】

【0005】 在本揭露之一個態樣中，本發明提供一種純化異二聚蛋白質之方法，其包含：(a)進行一系列之層析循環，其中各循環包含：(i)將異二聚蛋白質與雜質之混合物引入含有蛋白質結合配位體之親和基質，其中該異二聚蛋白質包含對該蛋白質結合配位體具有不同親和力之第一多肽及第二多肽，且其中至少一種雜質結合該蛋白質結合配位體且至少一種雜質不結合該蛋白質結合配位體；(ii)在5至9之第一pH值下用第一洗滌緩衝液洗滌該親和基質以移除非結合雜質；(iii)在第一溶離緩衝液中在第二pH值下自該親和基質溶離該異二聚蛋白質；及(iv)在小於4之第三pH值下用第二洗滌緩衝液洗滌該親和基質以移除結

合雜質；其中該第二pH值在該系列之層析循環內之初始系列之循環期間處於初始pH值，且該第二pH值在該系列之層析循環內之後續系列之循環期間升高至高於該初始pH值之後續pH值，其中該初始pH值及該後續pH值在4.0至5.2範圍內；及(b)溶離液中自該親和基質收集該異二聚蛋白質。

【0006】 在一些實施例中，該初始系列之循環由20個循環組成。在一些實施例中，該初始系列之循環由30個循環組成。在一些實施例中，該初始系列之循環由40個循環組成。在一些實施例中，該初始系列之循環由50個循環組成。在一些實施例中，該初始系列之循環由至少50個循環、至少60個循環、至少70個循環、或至少80個循環、或更多個循環組成。

【0007】 在一些實施例中，該後續系列之循環由至少20個循環組成。在一些實施例中，該後續系列之循環由至少50個、至少60個、至少70個、或至少80個循環組成。

【0008】 在一些實施例中，該初始pH值係4.0至4.2。在一些情況下，該初始pH值係 4.1 ± 0.05 。在一些實施例中，該後續pH值係4.3至4.7。在一些情況下，該後續pH值係 4.5 ± 0.05 。

【0009】 在本揭露之一個態樣中，本發明提供一種純化異二聚蛋白質之方法，其包含：(a)進行一系列之層析循環，其中各循環包含：(i)將異二聚蛋白質與雜質之混合物引入含有蛋白質結合配位體之親和基質，其中該異二聚蛋白質包含對該蛋白質結合配位體具有不同親和力之第一多肽及第二多肽，且其中至少一種雜質結合該蛋白質結合配位體且至少一種雜質不結合該蛋白質結合配位體；(ii)在5至9之第一pH值下用第一洗滌緩衝液洗滌該親和基質以移除非結

合雜質；(iii)在第一溶離緩衝液中在第二pH值下自該親和基質溶離該異二聚蛋白質；及(iv)在小於4之第三pH值下用第二洗滌緩衝液洗滌該親和基質以移除結合雜質；(b)在該系列之層析循環內在任一或多個循環之後測量含有該異二聚蛋白質之溶離液中之結合雜質的水平，且將所測量結合雜質之該水平與結合雜質之參考水平進行比較，其中若所測量結合雜質之該水平超過結合雜質之該參考水平，則在該系列之層析循環內在後續循環中增加該第二pH值，其中該第二pH值在該系列之層析循環內之各循環或後續循環期間在4.0至5.2範圍內；及(c)該溶離液中自該親和基質收集該異二聚蛋白質。

【0010】 在一些實施例中，結合雜質之該參考水平係2%至10%。在一些情況下，結合雜質之該參考水平係3%至7%。在一些情況下，結合雜質之該參考水平係 $5\% \pm 0.5\%$ 。

【0011】 在一些實施例中，該溶離液中之結合雜質的該水平在該系列之層析循環內各循環之後測量。在一些實施例中，該溶離液中之結合雜質的該水平在該系列之層析循環內每隔五循環之後測量。在一些實施例中，該溶離液中之結合雜質的該水平在該系列之層析循環內每隔十循環之後測量。在一些實施例中，該溶離液中之結合雜質的該水平在該系列之層析循環內第二十循環之後測量。在一些實施例中，該溶離液中之結合雜質的該水平在該系列之層析循環內第四十循環或第五十循環之後測量。在一些情況下，溶離液在一系列之循環（例如，五個循環或十個循環）中收集，且結合雜質之水平在合併溶離液池中測量。

【0012】 在一些實施例中，若所測量結合雜質之該水平超過結合雜質之該參考水平，則該第二pH值自4.0至4.2範圍增加至4.3至4.7範圍。在一些情況下，若所測量結合雜質之該水平超過結合雜質之該參考水平，則該第二pH值自 4.1 ± 0.05 增加至 4.5 ± 0.05 。

【0013】 在本揭露之一個態樣中，本發明提供一種純化異二聚蛋白質之方法，其包含：(a)進行一系列之層析循環，其中各循環包含：(i)將異二聚蛋白質與雜質之混合物引入含有蛋白質結合配位體之親和基質，其中該異二聚蛋白質包含對該蛋白質結合配位體具有不同親和力之第一多肽及第二多肽，且其中至少一種雜質結合該蛋白質結合配位體且至少一種雜質不結合該蛋白質結合配位體；(ii)在5至9之第一pH值下用第一洗滌緩衝液洗滌該親和基質以移除非結合雜質；(iii)在第一溶離緩衝液中在第二pH值下自該親和基質溶離該異二聚蛋白質；及(iv)在小於4之第三pH值下用第二洗滌緩衝液洗滌該親和基質以移除結合雜質；其中該第二pH值在該系列之層析循環內之初級系列之循環期間處於初級pH值，該第二pH值在該系列之層析循環內之該初級系列之循環之後的二級系列之循環期間提高至高於該初級pH值之二級pH值，且該第二pH值在該系列之層析循環內之該二級系列之循環之後的三級系列之循環期間提高至高於該二級pH值之三級pH值，其中該初級pH值、該二級pH值、及該三級pH值在4.0至5.2範圍內；及(b)溶離液中自該親和基質收集該異二聚蛋白質。

【0014】 在一些實施例中，該初級系列之循環包含5至50個循環。在一些情況下，該初級系列之循環包含至多20個循環。在一些情況下，該初級系列之循環包含至多40個循環。

【0015】 在一些實施例中，該二級系列之循環包含5至50個循環。在一些情況下，該二級系列之循環包含10至25個循環。

【0016】 在一些實施例中，該三級系列之循環包含5至50個循環。在一些情況下，該三級系列之循環包含10至25個循環。

【0017】 在一些實施例中，該初級pH值在4.0至4.2範圍內。在一些情況下，該初級pH值係 4.1 ± 0.05 。在一些實施例中，該二級pH值在4.2至4.4範圍內。在一些情況下，該二級pH值係 4.3 ± 0.05 。在一些實施例中，該三級pH值在4.4至4.6範圍內。在一些情況下，該三級pH值係 4.5 ± 0.05 。

【0018】 在一些實施例中，該第二pH值在該系列之層析循環內之該三級系列之循環之後的第4系列之循環期間提高至高於該三級pH值之第4 pH值，其中該第4 pH值在4.0至5.2範圍內。

【0019】 在一些實施例中，該第二pH值在該系列之層析循環內之該第4系列之循環之後的第5系列之循環期間提高至高於該第4 pH值之第5 pH值，其中該第5 pH值在4.0至5.2範圍內。

【0020】 在一些實施例中，該第二pH值在該系列之層析循環內之該第5系列之循環之後的第6系列之循環期間提高至高於該第5 pH值之第6 pH值，其中該第6 pH值在4.0至5.2範圍內。

【0021】 在一些情況下，該二級pH值係比該初級pH值高0.1至0.9之pH值，該三級pH值係比該二級pH值高0.1至0.9之pH值，該第4 pH值係比該三級pH值高0.1至0.9之pH值，該第5 pH值係比該第4 pH值高0.1至0.9之pH值，及/或

該第6 pH值係比該第5 pH值高0.1至0.9之pH值，其中該初級pH值在4.0至4.2範圍內。在一些實施例中，該初級pH值係 4.1 ± 0.05 。

【0022】 在一些實施例中，該初級系列之循環、該二級系列之循環、該三級系列之循環、該第4系列之循環、該第5系列之循環、及/或該第6系列之循環中之各者在該系列之層析循環內包含5至50個循環。

【0023】 在上文或本文所論述之方法中之任一者之各種實施例中，該等雜質包含該第一多肽及該第二多肽之同二聚物種。

【0024】 在上文或本文所論述之方法中之任一者之各種實施例中，該蛋白質結合配位體係蛋白質A，且該親和基質包含附著於基材之蛋白質A配位體。

【0025】 在一些情況下，該蛋白質A配位體係包含Z域四聚體之經工程改造之蛋白質A、包含Y域四聚體之經工程改造之蛋白質A、或缺乏D及E域之經工程改造之蛋白質A。

【0026】 在一些情況下，該基材係粒子且該親和基質包含具有25 μm 至100 μm 之平均直徑的複數個粒子。在一些實施例中，該等粒子包含40 μm 至60 μm 之平均直徑。在一些實施例中，該等粒子包含45 μm 至55 μm 之平均直徑。在一些實施例中，該等粒子包含約50 μm 之平均直徑。

【0027】 在一些情況下，該基材包含瓊脂糖、聚(苯乙烯二乙烯基苯)、聚甲基丙烯酸酯、纖維素、受控微孔玻璃、及球形二氧化矽中之任一或多者。

【0028】 在一些情況下，該等粒子包含具有約1100Å之平均直徑的孔。

【0029】 在上文或本文所論述之方法中之任一者之各種實施例中，該溶離緩衝液包含濃度係至少250 mM之鹽。在一些情況下，該鹽濃度大於300 mM或大於400 mM。在一些情況下，該鹽濃度係約500 mM。

【0030】 在一些實施例中，該鹽選自含有下列之鹽：(i) Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 NO_3^- 、 $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ 、 NH_4^+ 、 Cs^+ 、 Rb^+ 、 K^+ 、 Na^+ 、 H^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Al^{3+} ；(ii) Na^+ 、 H^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、或 Al^{3+} 與 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 NO_3^- 、或 ClO_4^- 之組合，或(iii) CaCl_2 、 MgCl_2 、或 NaCl 。

【0031】 在上文或本文所論述之方法中之任一者之各種實施例中，該第一多肽包含能夠結合於該蛋白質結合配位體之CH3域，且該第二多肽包含不能夠結合於該蛋白質結合配位體之CH3域。

【0032】 在上文或本文所論述之方法中之任一者之各種實施例中，其中蛋白質結合配位體係蛋白質A，該第一多肽包含能夠結合於蛋白質A之CH3域，且該第二多肽包含不能夠結合於蛋白質A之CH3域。在一些情況下，該第二多肽包含該CH3域中之H435R修飾及Y436F修飾（EU編號）。

【0033】 在上文或本文所論述之方法中之任一者之各種實施例中，該第一pH值係6至8。

【0034】 在上文或本文所論述之方法中之任一者之各種實施例中，該第三pH值係2.8至3.5。

【0035】 在上文或本文所論述之方法中之任一者之各種實施例中，該異二聚蛋白質係抗體。在方法之各種實施例中，該異二聚蛋白質係雙特異性抗原結合蛋白。在一些實施例中，該雙特異性抗原結合蛋白係雙特異性抗體。

【0036】 在上文或本文所論述之方法中之任一者之各種實施例中，在該系列之層析循環內在各循環中，在該溶離液中回收至少85%之該異二聚蛋白質。在一些情況下，在該系列之層析循環內在各循環中，在該溶離液中回收至少87%之該異二聚蛋白質。在一些情況下，在該系列之層析循環內在各循環中，在該溶離液中回收至少89%之該異二聚蛋白質。

【0037】 在上文或本文所論述之方法中之任一者之各種實施例中，該系列之層析循環包含100或更多個循環。

【0038】 在上文或本文所論述之方法中之任一者之各種實施例中，在每個循環之後，可使該親和基質與pH值係至少11之鹼性溶液接觸。在一些情況下，在每三個循環之後，使該親和基質與pH值係至少11之鹼性溶液接觸。在一些情況下，在每五個循環之後，使該親和基質與pH值係至少11之鹼性溶液接觸。在一些情況下，在每七個循環之後，使該親和基質與pH值係至少11之鹼性溶液接觸。在一些實施例中，該鹼性溶液之pH值係至少12。在一些實施例中，該鹼性溶液包含濃度係0.1 N至0.5 N之鹼。在一些情況下，鹼濃度係0.1 N至0.3 N。在一些實施例中，該鹼性溶液包含NaOH。

【0039】 在上文或本文所論述之方法中之任一者之各種實施例中，各循環可進一步包含(v)藉由使該親和基質與pH值係至少11之鹼性溶液接觸來清潔該親和基質。在一些情況下，該鹼性溶液之pH值係至少12。在一些實施例中，該鹼性溶液包含濃度係0.1 N至0.5 N之鹼。在一些情況下，該濃度係0.1 N至0.3 N。在一些實施例中，該鹼性溶液包含NaOH。在一些實施例中，在該系列之層析循環內在各循環中，在該溶離液中回收至少75%的該異二聚蛋白質，且該

等結合雜質不超過6.5%。在一些情況下，在該系列之層析循環內在各循環中在該溶離液中回收至少78%之該異二聚蛋白質。在一些情況下，在該系列之層析循環內在各循環中在該溶離液中回收至少80%之該異二聚蛋白質。

【0040】 在各種實施例中，上文或本文中所論述之實施例之任何特徵或組分可組合，且此類組合涵蓋在本揭露之範疇內。上文或本文所論述之任何具體值可與上文或本文所論述之另一相關值組合以敘述範圍，其中該等值代表該範圍之上端及下端，且此類範圍涵蓋在本揭露的範疇內。

【圖式簡單說明】

【0041】 [圖1] 係根據本揭露之一實施例之例示性異二聚蛋白質（例如雙特異性Fc*Fc）及相關雜質（同二聚物種）的繪示。異二聚蛋白質包括結合蛋白質結合配位體之一種多肽及不結合蛋白質結合配位體(Ø)之一種多肽。二種所繪示雜質係同二聚體，非結合雜質由二種不結合(Ø)蛋白質結合配位體的多肽構成，且結合雜質由二種結合蛋白質結合配位體之多肽構成。

【0042】 [圖2] 係根據本揭露之一實施例的例示性層析循環之繪示。如圖所示，循環包括將異二聚蛋白質與雜質之混合物裝載至親和基質上，洗滌親和基質以移除非結合雜質，溶離異二聚蛋白質，且洗滌親和基質以移除結合雜質。結合雜質及異二聚蛋白質與親和基質中之蛋白質結合配位體之結合繪示於前二個圖區中。

【0043】 [圖3] 繪示原始層析管柱中溶離pH值與溶離液中結合雜質之存在，及異二聚蛋白質（例如雙特異性抗體）之相應回收率之間的關係。

【0044】〔圖4A〕及〔圖4B〕繪示原始管柱（7個循環）及循環管柱（84個循環）中增加溶離pH值對溶離液中結合雜質之存在（圖4A）及異二聚蛋白質（例如雙特異性抗體）的相應回收率（圖4B）的影響。關於結合雜質水平的圖4A中所示之「目標<5%」係例示性的，且可視所純化之異二聚蛋白質而變化。

【0045】〔圖5A〕及〔圖5B〕繪示設計診斷參數，包括功效分析（圖5A）及設計空間分率曲線（圖5B）。功效分析確定所提出設計將能夠區分某一大小之參數效應的機率。如圖5A中所示，主要效應項之功效>0.7。如圖5B中所展示，相對預測方差在50%之設計空間中低於0.32。

【0046】〔圖6〕繪示實例3中所評價之相關性的灰度圖。如圖所展示，所有相關性均低於0.6，從而指示充分正交之設計。對應於圖之資料的表亦包括於圖6中。

【0047】〔圖7A〕及〔圖7B〕繪示雙特異性物產率%（圖7A）及結合雜質%（圖7B）之模型預測曲線。隨著解析溶離緩衝液pH值降低及氫氧化物接觸時間增加，雙特異性物產率及結合雜質水平均增加。另外，隨著管柱負載增加，雙特異性物產率增加。

【實施方式】

【0048】在描述本發明之前，應理解，本發明不限於所描述之特定方法及實驗條件，因為此類方法及條件可變化。亦應理解，本文所用之用語僅用於描述具體實施例，且並不意欲係限制性的，因為本發明之範疇將僅由隨附申請專利範圍限制。

【0049】 除非另外規定，否則本文所用之所有技術及科學用語均具有與本發明所屬領域中具有通常知識者通常所理解相同的含義。如本文所使用，當參考特定敘述數值使用時，術語「約(about)」意謂值可與敘述值相差不超過1%。舉例而言，如本文所使用，表述「約100」包括99及101及其間之所有值（例如99.1、99.2、99.3、99.4等）。

【0050】 儘管可在本發明之實踐或測試中使用類似或等同於本文所描述之方法及材料的任何方法及材料，但現在描述較佳之方法及材料。本說明書中所提及之所有專利、申請案及非專利出版物均以全文引用之方式併入本文中。

總則

【0051】 雙特異性抗體經由親和層析之純化先前已描述。簡言之，將包括結合蛋白質結合配位體之一種多肽及不結合蛋白質結合配位體之一種多肽的所關注的異二聚蛋白質連同同二聚雜質引入至親和基質（含有蛋白質結合配位體）上。如所瞭解的，二種同二聚物種包括結合親和基質之蛋白質結合配位體的一對多肽，或不結合親和基質之蛋白質結合配位體的一對多肽（參見例如圖1）。

【0052】 在多個循環中重複使用親和層析管柱導致功能蛋白質配位體密度損失，導致雜質水平增加。不意欲受任何具體理論束縛，咸信功能性蛋白質配位體密度之損失由雜質之堆積、結構配位體變化、及/或配位體之物理損失導致。在一些情況下，咸信功能性蛋白質配位體密度之損失至少部分與暴露於用於定期清潔層析管柱之氫氧根離子（例如，來自NaOH）相關。不管原因，功能性蛋白質配位體密度之損失使得結合雜質及所關注之異二聚蛋白質二者對親

和基質親和力降低。親和力降低加上再結合事件之機率降低，可導致所關注的異二聚蛋白質與非結合雜質一起過早移除，或在溶離期間結合雜質與所關注的異二聚蛋白質一起過早移除。

【0053】 至少部分地基於下列出人意料的發現來預測本發明：在循環親和層析管柱中增加溶離pH值可改良異二聚蛋白質（例如雙特異性抗體）自結合雜質之解析，同時維持異二聚蛋白質之高回收率。治療蛋白（例如雙特異性抗體）之大規模商業製造及純化之材料成本係重要的問題，其中更換100 L管柱之成本可輕易超過\$1.5M，且延遲純化程序。因此，延長親和層析管柱在較大數目之循環內之可用壽命可實現顯著成本優勢。

【0054】 如下文更詳細地論述，延長親和管柱解析及維持異二聚蛋白質回收率之方法包括：(i)在初始溶離pH值下進行初始系列之循環且在後續（及較高）pH值下進行後續系列之循環；(ii)進行一系列之循環，其中在各循環之後或定期測量溶離液中之雜質水平，且在一或多個後續循環中提高溶離pH值以在整個系列之循環中維持最小雜質水平；及(iii)進行一系列之循環，其中溶離pH值以逐步方式在多組循環中提高（例如溶離pH值在每5、10、15、20、或25個循環之後提高0.1至1個點）。另外，在一些實施例中，降低層析管柱清潔（例如藉由使管柱與pH值係至少11之鹼性溶液接觸）之頻率或降低用於清潔層析管柱之溶液中之鹼濃度亦可延長親和管柱解析。

定義

【0055】 如本文所用，用語「抗體(antibody)」包括包含藉由雙硫鍵互連之四個多肽鏈，亦即二個重(H)鏈及二個輕(L)鏈之免疫球蛋白分子。各重鏈包

含重鏈可變區（本文中縮寫為HCVR或VH）及重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個域，CH1、CH2及CH3。各輕鏈包含輕鏈可變區（在本文中縮寫為LCVR或VL）及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個域CL。VH及VL區可進一步細分成高變區，稱為互補決定區(complementarity determining region, CDR)，穿插有稱為構架區(framework region, FR)之較保守區。各VH及VL由自胺基端至羧基端按下列順序配置之三個CDR及四個FR構成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4（重鏈CDR可簡稱為HCDR1、HCDR2、及HCDR3；輕鏈CDR可簡稱為LCDR1、LCDR2、及LCDR3。用語「高親和力(high affinity)」抗體係指如藉由表面電漿子共振，例如BIACORE™或溶液親和ELISA所測量，對其目標具有至少 10^{-9} M、至少 10^{-1} M；至少 10^{-11} M；或至少 10^{-12} M之結合親和力的彼等抗體。

【0056】 片語「雙特異性抗體(bispecific antibody)」包括能夠選擇性結合二個或更多個抗原表位之抗體。雙特異性抗體通常包含二條不同重鏈，其中各重鏈特異性結合在二個不同分子（例如抗原）上或在同一分子（例如在同一抗原）上的不同的抗原表位。若雙特異性抗體能夠選擇性結合二個不同抗原表位（第一抗原表位及第二抗原表位），則第一重鏈對第一抗原表位之親和力通常將比第一重鏈對第二抗原表位之親和力低至少一個至二個或三個或四個數量級，且反之亦然。由雙特異性抗體識別之抗原表位可在相同或不同目標上（例如在相同或不同蛋白質上）。雙特異性抗體可例如藉由組合識別相同抗原之不同抗原表位的重鏈來製得。舉例而言，編碼識別相同抗原之不同抗原表位之重鏈可變序列的核酸序列可與編碼不同重鏈恆定區之核酸序列融合，且此類序列

可在表現免疫球蛋白輕鏈之細胞中表現。一般雙特異性抗體具有：二條重鏈，其各自具有三個重鏈CDR，隨後為（N端至C端）CH1域、鉸鏈、CH2域、及CH3域；及免疫球蛋白輕鏈，其不賦予抗原結合特異性但可與各重鏈締合，或可與各重鏈締合且可結合重鏈抗原結合區所結合的抗原表位中的一或多者，或可與各重鏈締合且使得一或二條重鏈能夠與一或二個抗原表位結合。

【0057】 在本文所論述之方法之各種實施例中，異二聚蛋白質、雙特異性抗體、含Fc蛋白質、或其類似物可具有同型IgG。在一些情況下，異二聚蛋白質、雙特異性抗體、含Fc蛋白質、或其類似物具有同型IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4。在一些情況下，異二聚蛋白質、雙特異性抗體、含Fc蛋白質、或其類似物具有同型IgG1。在一些情況下，異二聚蛋白質、雙特異性抗體、含Fc蛋白質、或其類似物具有同型IgG4。在各種實施例中，異二聚蛋白質、雙特異性抗體、含Fc蛋白質、或其類似物係完全人類的。

【0058】 片語「重鏈 (heavy chain)」或「免疫球蛋白重鏈 (immunoglobulin heavy chain)」包括來自任何生物體之免疫球蛋白重鏈恆定區序列，且除非另外規定，否則包括重鏈可變域。除非另外說明，否則重鏈可變域包括三個重鏈CDR及四個FR區。重鏈之片段包括CDR、CDR、及FR，以及其組合。一般重鏈在可變域之後（自N端至C端）具有CH1域、鉸鏈、CH2域、及CH3域。重鏈之功能片段包括能夠特異性識別抗原（例如以在微莫耳、奈莫耳、或皮莫耳範圍中之KD識別抗原），能夠自細胞表現及分泌，且包含至少一個CDR之片段。

【0059】 片語「輕鏈(light chain)」包括來自任何生物體之免疫球蛋白輕鏈恆定區序列，且除非另外說明，否則包括人類 κ 及 λ 輕鏈。除非另外說明，否則輕鏈可變(VL)域一般包括三個輕鏈CDR及四個構架(FR)區。通常而言，全長輕鏈自胺基端至羧基端包括VL域，其包括FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，及輕鏈恆定域。可與本發明一起使用之輕鏈包括例如不選擇性結合由抗原結合蛋白質選擇性結合之第一或第二抗原的輕鏈。適合之輕鏈包括可藉由篩選現有抗體庫（濕庫或電腦模擬）中最常用之輕鏈來鑑別的輕鏈，其中該等輕鏈實質上不干擾抗原結合蛋白之抗原結合域的親和力及/或選擇性。適合之輕鏈包括可結合抗原結合蛋白質之抗原結合區所結合之一或二個抗原表位的輕鏈。

【0060】 片語「可變域(variable domain)」包括免疫球蛋白輕鏈或重鏈之胺基酸序列（視需要經修飾），其在N端至C端按順序包含下列胺基酸區（除非另外規定）：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。「可變域」包括能夠摺疊成具有雙 β 摺疊結構之標準域（VH或VL）的胺基酸序列，其中 β 摺疊經第一 β 摺疊之殘基與第二 β 摺疊之殘基之間的雙硫鍵聯接。

【0061】 片語「互補決定區(complementarity determining region)」或用語「CDR」包括由生物體之免疫球蛋白基因之核酸序列編碼之胺基酸序列，該免疫球蛋白基因通常（亦即，在野生型動物中）出現在免疫球蛋白分子（例如，抗體或T細胞受體）之輕鏈或重鏈之可變區中的二個構架區之間。CDR可由例如生殖系序列或經重排或未經重排序列編碼，且例如藉由原始或成熟B細胞或T細胞編碼。在一些情況下（例如對於CDR3），CDR可由二個或更多個不鄰接（例如在未經重排核酸序列中）但例如由於剪接或聯接序列（例如V-D-J重組

以用於形成重鏈CDR3)在B細胞核酸序列中鄰接的序列(例如生殖系序列)編碼。

【0062】 片語「含Fc蛋白質(Fc-containing protein)」包括抗體、雙特異性抗體、異二聚蛋白質、及免疫黏附素，及包含免疫球蛋白CH2及CH3區之至少一功能部分的其他結合蛋白。「功能部分(functional portion)」係指可結合Fc受體(例如FcγR；或FcRn，亦即新生兒Fc受體)及/或可參與補體活化之CH2及CH3區。若CH2及CH3區含有使其無法結合任何Fc受體且亦無法活化補體之缺失、取代、及/或插入、或其他修飾，則CH2及CH3區不具功能性。

【0063】 含Fc蛋白質可包含免疫球蛋白域中之修飾，包括其中修飾影響結合蛋白之一或多種效應功能(例如影響FcγR結合、FcRn結合且因此影響半衰期及/或CDC活性之修飾)。此類修飾包括但不限於下列修飾及其組合，參考免疫球蛋白恆定區之EU編號：238、239、248、249、250、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、297、298、301、303、305、307、308、309、311、312、315、318、320、322、324、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、337、338、339、340、342、344、356、358、359、360、361、362、373、375、376、378、380、382、383、384、386、388、389、398、414、416、419、428、430、433、434、435、437、438、及439。

【0064】 舉例而言，而非作為限制，結合蛋白係含Fc蛋白質且展現增強的血清半衰期(相比於無所述修飾之相同含Fc蛋白質)，且具有位置250(例

如E或Q)；250及428(例如L或F)；252(例如L/Y/F/W或T)、254(例如S或T)、及256(例如S/R/Q/E/D或T)處之修飾；或428及/或433(例如L/R/SI/P/Q或K)及/或434(例如H/F或Y)處之修飾；或250及/或428處之修飾；或307或308(例如308F、V308F)、及434處之修飾。在另一實例中，修飾可包含428L(例如M428L)及434S(例如N434S)修飾；428L、259I(例如V259I)、及308F(例如V308F)修飾；433K(例如H433K)及434(例如434Y)修飾；252、254、及256(例如252Y、254T、及256E)修飾；250Q及428L修飾(例如T250Q及M428L)；307及/或308修飾(例如308F或308P)。

【0065】 用語「星取代(star substitution)」、「Fc*」、及「HC*」包括任何含有消除與蛋白質A之結合之CH3域內序列的分子、免疫球蛋白重鏈、Fc片段、含Fc分子、異二聚蛋白質及其類似物。可削弱或消除CH3域中之蛋白質A結合的特定修飾，諸如H95R及Y96F，論述於US 8,586,713中。此二肽突變命名為「星取代」。

【0066】 用語「細胞(cell)」包括適合於表現重組核酸序列之任何細胞。細胞包括原核生物及真核生物之細胞(單細胞或多細胞)、細菌細胞(例如大腸桿菌(*E. coli*)、芽孢桿菌屬(*Bacillus spp.*)、鏈黴菌屬(*Streptomyces spp.*)之菌株等)、分枝桿菌細胞、真菌細胞、酵母細胞(例如釀酒酵母(*S. cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*S. pombe*)、巴斯德畢赤酵母(*P. pastoris*)、畢赤嗜甲醇酵母(*P. methanolica*)等)、植物細胞、昆蟲細胞(例如SF-9、SF-21、感染桿狀病毒之昆蟲細胞、粉紋夜蛾(*Trichoplusia ni*)等)、非人類動物細胞、人類細胞、或細胞融合物，諸如融合瘤或四源雜交瘤。在一些實施例中，細胞係人類、猴、

猿、倉鼠、大鼠、或小鼠細胞。在一些實施例中，細胞係真核細胞且選自下列細胞：CHO（例如CHO K1、DXB-11 CHO、Veggie-CHO）、COS（例如COS-7）、視網膜細胞、Vero、CV1、腎（例如HEK293、293 EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK）、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 8065、HL-60（例如BHK21）、Jurkat、Daudi、A431（表皮）、CV-1、U937、3T3、L細胞、C127細胞、SP2/0、NS-0、MMT 060562、塞特利氏細胞 (Sertoli cell)、BRL 3A細胞、HT1080細胞、骨髓瘤細胞、腫瘤細胞、及衍生自前述細胞之細胞株。

【0067】 片語「移動相改質劑(mobile phase modifier)」包括減少蛋白之間的非特異性（亦即非親和性）離子及其他非共價相互作用之作用或破壞該等相互作用的部分。「移動相改質劑」包括例如第I族及第II族金屬與乙酸酯、碳酸氫酯、碳酸酯、鹵素（例如氯或氟）、硝酸酯、磷酸酯、或硫酸酯的鹽、離子組合。「移動相改質劑」之非限制性說明性清單包括鉍、鋰、鈉、及鉀的乙酸鹽；碳酸氫鈉及鉀；鋰、鈉、鉀、及銻的碳酸鹽；鋰、鈉、鉀、銻、及鎂的氯化物；鈉及鉀的氟化物；鈉、鉀、及鈣的硝酸鹽；鈉及鉀的磷酸鹽；及鈣及鎂的硫酸鹽。

【0068】 「移動相改質劑」亦包括離液劑，其弱化或以其他方式干擾非共價力且在生物分子系統內增加熵。離液劑之非限制性實例包括丁醇、氯化鈣、乙醇、氯化鈉、過氯酸鋰、乙酸鋰、氯化鎂、苯酚、丙醇、十二烷基硫酸鈉、硫脲、及脲。離液劑包括影響蛋白質溶解度之鹽。較離液陰離子包括例如

氯離子、硝酸根、溴離子、氯酸根、碘離子、過氯酸根、及硫氰酸根。較離液陽離子包括例如鋰、鎂、鈣、及鈷。

【0069】 「移動相改質劑」包括影響離子或其他非共價相互作用之彼等部分，其在添加至pH值梯度或步階時，或在「移動相改質劑」中蛋白質A支撐物之平衡及pH值步階或梯度之應用時，使得同二聚IgG與異二聚IgG（例如野生型人類IgG及相同但攜帶如本文所述之其CH3域之一或多個修飾的IgG）溶離之間的pH值單元距離變寬。「移動相改質劑」之適合濃度可藉由其濃度採用同一管柱、pH值步階或梯度來確定，其中增加「移動相改質劑」濃度直至在給定pH值步階或pH值梯度下達至最大pH值距離。「移動相改質劑」亦可包括非極性改質劑，包括例如丙二醇、乙二醇、及其類似物。

【0070】 如本文所用，「親和層析(affinity chromatography)」係一種利用生物分子之間的特異性可逆相互作用，而非生物分子之諸如等電點、疏水性、或尺寸的通常特性，實現層析分離的層析方法。「蛋白質A親和層析(Protein A affinity chromatography)」或「蛋白質A層析(Protein A chromatography)」係指利用蛋白質A之IgG結合域對免疫球蛋白分子之Fc部分的親和力的特異性親和層析方法。此Fc部分包含人類或動物免疫球蛋白恆定域CH2及CH3，或實質上類似於此等之免疫球蛋白域。蛋白質A涵蓋來自金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)細胞壁之原生蛋白質，藉由重組或合成方法產生之蛋白質A，及保持與Fc區結合之能力的變異體。在實踐中，蛋白質A層析涉及使用固定至固體支撐物之蛋白質A。參見Gagnon, Protein A Affinity Chromatography, Purification Tools for Monoclonal Antibodies, pp. 155-198, Validated Biosystems, 1996。蛋白質G及蛋白質L亦可用於親和層析。固體支撐

第 20 頁，共 48 頁(發明說明書)

物係蛋白質A黏附於其上之非水性基質。此類支撐物包括瓊脂糖、瓊脂糖凝膠、玻璃、二氧化矽、聚苯乙烯、硝化纖維素、木炭、砂、纖維素、及任何其他適合材料。此類材料係此項技術中所熟知。任何適合方法均可用於將第二蛋白質附著至固體支撐物。使蛋白質附著至適合固體支撐物之方法係此技術領域中所熟知。參見例如 Ostrove, *Guide to Protein Purification* 中, *Methods in Enzymology*, 182: 357-371, 1990。此類固體支撐物在有或無固定化蛋白質A之情況下可容易地購自許多商業來源，包括諸如：Vector Laboratory (Burlingame, Calif.)、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif.)、BioRad (Hercules, Calif.)、Cytiva (Marlborough, Massachusetts)、Pall (Port Washington, NY)、及 EMD-Millipore (Billerica, Mass.)。固定至微孔玻璃基質之蛋白質A可作為 PROSEP[®]-A (Millipore)市購。固相亦可係基於瓊脂糖之基質。固定於瓊脂糖基質之蛋白質A可作為MabSelect[™] (Cytiva)市購。

【0071】 親和層析亦包括可用於選擇性結合且因此純化含有免疫球蛋白域及/或序列之抗體、抗體片段、或嵌合融合蛋白的介質。抗體包括IgG、IgA、IgM、IgY、IgD、及IgE類型。抗體亦包括單鏈抗體，諸如駱駝抗體、經工程改造之駱駝抗體、單鏈抗體、單域抗體、奈米抗體、及其類似抗體。抗體片段包括VH、VL、CL、CH序列。抗體片段及含有抗體序列之融合蛋白包括例如F(ab')₃、F(ab')₂、Fab、Fc、Fv、dsFv、(scFv)₂、scFv、scAb、微型抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、Fc-融合蛋白、截留分子、及其類似物（參見Ayyar等人，*Methods* 56 (2012): 116-129）。此類親和層析介質可含有選擇性結合抗體、其片段、及含有彼等片段之融合蛋白之配位體。此類配位體

包括針對目標分子（亦即需要純化之分子）之抗體結合蛋白、細菌源性受體、抗原、凝集素、或抗抗體。舉例而言，針對IgG-CH1、IgG-Fc、IgG-CH3、IgG1、LC- κ 、LC- λ 、IgG3/4、IgA、IgM、及其類似物中之任一或多者的駱駝源性親和配位體可用作親和配位體（作為CAPTURESELECT層析樹脂，Life Technologies, Inc., Carlsbad, Calif.市售）。

純化異二聚蛋白質之方法

【0072】 根據本揭露純化異二聚蛋白質（經由延長親和管柱解析及維持異二聚蛋白質回收率）之方法的實施例包括：(i)在初始溶離pH值下進行初始系列之循環且在後續（及較高）pH值下進行後續系列之循環；(ii)進行一系列之循環，其中在各循環之後或定期測量溶離液中之雜質水平，且在一或多個後續循環中提高溶離pH值，以在整個系列之循環中維持最小雜質水平；及(iii)進行一系列之循環，其中溶離pH值以逐步方式在多組循環中提高（例如溶離pH值在每10、15、20、或25個循環之後提高0.5、0.75、或1個點）。

【0073】 純化異二聚蛋白質之方法中之各者包含：(a)進行一系列之層析循環，其中各循環包含：(i)將異二聚蛋白質與雜質之混合物引入含有蛋白質結合配位體之親和基質，其中該異二聚蛋白質包含對該蛋白質結合配位體具有不同親和力之第一多肽及第二多肽，且其中至少一種雜質結合該蛋白質結合配位體且至少一種雜質不結合該蛋白質結合配位體；(ii)在5至9之第一pH值下用第一洗滌緩衝液洗滌該親和基質以移除非結合雜質；(iii)在第一溶離緩衝液中在第二pH值下自該親和基質溶離該異二聚蛋白質；及(iv)在小於4之第三pH值下

用第二洗滌緩衝液洗滌該親和基質以移除結合雜質，其中該第二pH值係4.0至5.2。

【0074】 在各種實施例中，將異二聚蛋白質與雜質之混合物裝載至親和基質上，包括自一或多個含有表現編碼異二聚蛋白質之核苷酸序列之細胞的生物反應器裝載純化細胞培養物。舉例而言，細胞可表現編碼形成雙特異性抗體之重鏈及輕鏈中之各者的核苷酸。在一些情況下，雙特異性抗體之抗原結合臂中之各者包含共同輕鏈。純化細胞培養物將包括異二聚蛋白質（例如雙特異性抗體），以及雜質，諸如同二聚物種、宿主細胞蛋白質、及DNA。在一些情況下，異二聚蛋白質可在真核細胞，諸如中國倉鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)細胞中產生。

【0075】 在一些實施例中，裝載至親和基質上的混合物包括含有下列的蛋白質之混合物：(i)包含第一多肽之二個複本的第一同二聚體、(ii)包含第一多肽及第二多肽之異二聚體、及(iii)包含第二多肽之二個複本的第二同二聚體。第一多肽及第二多肽對親和基質具有不同親和力，使得第一同二聚體、異二聚體、及第二同二聚體可基於與親和基質之結合差異來分離。可藉由尤其改變經過親和基質之溶液之pH值及/或離子強度來操縱與親和基質之結合差異。

【0076】 裝載純化細胞培養物之後，用pH值係5至9之洗滌緩衝液（第一洗滌緩衝液）洗滌親和基質。在一些情況下，洗滌緩衝液之pH值係6至8。在一些情況下，洗滌緩衝液之pH值係約7至約7.5。在各種實施例中，洗滌緩衝液之pH值係或係約5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、

7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、或9.0。在一些實施例中，洗滌緩衝液之pH值係或係約7.2。在各種實施例中，緩衝液可係能夠將pH值維持在所要點或所要範圍內之任何緩衝液。在各種實施例中，緩衝液濃度可係約5 mM至約100 mM。在一些情況下，緩衝液濃度係約5 mM至約15 mM。在一些情況下，緩衝液濃度係約5 mM至約50 mM。在一些情況下，緩衝液濃度係約10 mM至約25 mM。在一些情況下，緩衝液濃度係約20 mM至約40 mM。在一些情況下，緩衝液濃度係約30 mM至約50 mM。在各種實施例中，緩衝液濃度係或係約5 mM、6 mM、7 mM、8 mM、9 mM、10 mM、11 mM、12 mM、13 mM、14 mM、15 mM、16 mM、17 mM、18 mM、19 mM、20 mM、21 mM、22 mM、23 mM、24 mM、25 mM、26 mM、27 mM、28 mM、29 mM、30 mM、31 mM、32 mM、33 mM、34 mM、35 mM、36 mM、37 mM、38 mM、39 mM、40 mM、41 mM、42 mM、43 mM、44 mM、45 mM、46 mM、47 mM、48 mM、49 mM、或50 mM。在一些實施例中，洗滌緩衝液濃度係或係約10 mM。在一些實施例中，洗滌緩衝液濃度係或係約40 mM。在一些實施例中，洗滌緩衝液係磷酸鈉。洗滌緩衝液（第一洗滌緩衝液）亦可含有鹽，如下文所論述。

【0077】 在一些情況下，該洗滌緩衝液包含濃度係約200 mM至約800 mM之鹽。在一些情況下，該洗滌緩衝液包含濃度係約250 mM至約750 mM之鹽。在一些情況下，該洗滌緩衝液包含濃度係約300 mM至約700 mM之鹽。在一些情況下，該洗滌緩衝液包含濃度係約350 mM至約650 mM之鹽。在一些情況下，該洗滌緩衝液包含濃度係約400 mM至約600 mM之鹽。在一些情況下，

該洗滌緩衝液包含濃度係約450 mM至約550 mM之鹽。在一些情況下，該洗滌緩衝液包含濃度係或係約200 mM、210 mM、220 mM、225 mM、230 mM、240 mM、250 mM、260 mM、270 mM、275 mM、280 mM、290 mM、300 mM、310 mM、320 mM、325 mM、330 mM、340 mM、350 mM、360 mM、370 mM、375 mM、380 mM、390 mM、400 mM、410 mM、420 mM、425 mM、430 mM、440 mM、450 mM、460 mM、470 mM、475 mM、480 mM、490 mM、500 mM、510 mM、520 mM、525 mM、530 mM、540 mM、550 mM、560 mM、570 mM、575 mM、580 mM、590 mM、600 mM、610 mM、620 mM、625 mM、630 mM、640 mM、650 mM、660 mM、670 mM、675 mM、680 mM、690 mM、700 mM、710 mM、720 mM、725 mM、730 mM、740 mM、750 mM、760 mM、770 mM、780 mM、790 mM、或800 mM之鹽。在一些實施例中，該洗滌緩衝液之鹽濃度係或係約500 mM。在一些實施例中，該洗滌緩衝液包含約500 mM NaCl。在一些情況下，此親和基質洗滌移除未結合雜質，諸如對於親和基質材料（例如蛋白質A）具有極少或無親和力的宿主細胞蛋白質、DNA、及同二聚物種。

【0078】 在一些實施例中，該等方法包括在異二聚蛋白質溶離之前，用在5至9之pH值下包含極少(<25 mM) 或無鹽之洗滌緩衝液可選地進行之第二洗滌。在一些實施例中，此洗滌緩衝液包含約10 mM至約50 mM Tris[參(羥甲基)胺基甲烷]]、磷酸鈉、或乙酸鈉、或其組合。在各種實施例中，此洗滌緩衝液之pH值等於上文所論述之第一洗滌緩衝液之pH值。

【0079】 在上文論述之一或多個洗滌之後，溶離緩衝液中異二聚蛋白質自親和基質溶離且收集於溶離液中。溶離緩衝液具有約4至約5.2（或4.0至4.9）之pH值，且包括濃度大於200 mM之鹽。如下文結合各種方法更詳細地論述，在一些實施例中，溶離緩衝液之pH值係約4.0至約4.2。在一些實施例中，該溶離緩衝液之pH值係約4.4至約4.6。在各種實施例中，溶離緩衝液之pH值係或係約4.0、4.05、4.1、4.15、4.2、4.25、4.3、4.35、4.4、4.45、4.5、4.55、4.6、4.65、4.7、4.75、4.8、4.85、4.9、4.95、或5.0。在一些實施例中，溶離緩衝液之pH值係 4.1 ± 0.05 。在一些實施例中，溶離緩衝液之pH值係 4.5 ± 0.05 。在各種實施例中，緩衝液可係能夠將pH值維持在所要點或所要範圍內之任何緩衝液。在各種實施例中，緩衝液濃度可係約5 mM至約100 mM。在一些情況下，該緩衝液濃度係約25 mM至約55 mM。在一些情況下，緩衝液濃度係約30 mM至約50 mM。在各種實施例中，緩衝液濃度係或係約30 mM、31 mM、32 mM、33 mM、34 mM、35 mM、36 mM、37 mM、38 mM、39 mM、40 mM、41 mM、42 mM、43 mM、44 mM、45 mM、46 mM、47 mM、48 mM、49 mM、或50 mM。在一些實施例中，該溶離緩衝液濃度係或係約40 mM。在一些實施例中，該溶離緩衝液係乙酸。在一些實施例中，該溶離緩衝液係乙酸鹽。

【0080】 在一些情況下，該溶離緩衝液包含濃度係約200 mM至約800 mM之鹽。在一些情況下，該溶離緩衝液包含濃度係約250 mM至約750 mM之鹽。在一些情況下，該溶離緩衝液包含濃度係約300 mM至約700 mM之鹽。在一些情況下，該溶離緩衝液包含濃度係約350 mM至約650 mM之鹽。在一些情

況下，該溶離緩衝液包含濃度係約400 mM至約600 mM之鹽。在一些情況下，該溶離緩衝液包含濃度係約450 mM至約550 mM之鹽。在一些情況下，該溶離緩衝液包含濃度係或係約200 mM、210 mM、220 mM、225 mM、230 mM、240 mM、250 mM、260 mM、270 mM、275 mM、280 mM、290 mM、300 mM、310 mM、320 mM、325 mM、330 mM、340 mM、350 mM、360 mM、370 mM、375 mM、380 mM、390 mM、400 mM、410 mM、420 mM、425 mM、430 mM、440 mM、450 mM、460 mM、470 mM、475 mM、480 mM、490 mM、500 mM、510 mM、520 mM、525 mM、530 mM、540 mM、550 mM、560 mM、570 mM、575 mM、580 mM、590 mM、600 mM、610 mM、620 mM、625 mM、630 mM、640 mM、650 mM、660 mM、670 mM、675 mM、680 mM、690 mM、700 mM、710 mM、720 mM、725 mM、730 mM、740 mM、750 mM、760 mM、770 mM、780 mM、790 mM、或800 mM之鹽。在一些實施例中，該溶離緩衝液之鹽濃度係或係約500 mM。在一些實施例中，該溶離緩衝液包含約500 mM NaCl。在一些實施例中，該溶離緩衝液包含約500 mM CaCl₂。在一些實施例中，該溶離緩衝液包含約500 mM MgCl₂。

【0081】 在自親和基質溶離及收集異二聚蛋白質之後，親和基質用pH值小於約4之洗滌緩衝液（第二洗滌緩衝液）洗滌。在一些實施例中，該洗滌緩衝液之pH值係約2.5至約3.5。在一些實施例中，該洗滌緩衝液之pH值係3.0 ± 0.2。在各種實施例中，洗滌緩衝液之pH值係或約係2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、或3.9。洗滌緩衝液可包含任何適合的材料以提供上文提及之pH值或pH值範圍。

在一些實施例中，該洗滌緩衝液包含濃度係約20 mM至約60 mM之乙酸。在一些實施例中，該洗滌緩衝液包含濃度係約30 mM至約50 mM之乙酸。在一些情況下，該洗滌緩衝液包含約40 mM乙酸。在一些情況下，此親和基質洗滌移除先前結合之雜質，諸如對親和基質材料（例如蛋白質A）之親和力大於異二聚蛋白質的同二聚物種。在一些情況下，本發明之方法亦可包括用包含比上文剛剛論述之洗滌緩衝液更低的pH值（例如 2.45 ± 0.2 ）及較高濃度之緩衝材料（例如500 mM乙酸）的緩衝液進一步洗滌親和基質。

【0082】 在用如上文所述之一或多個洗滌移除額外雜質之後，親和基質可在開始下一循環之前重新平衡到5至9之pH值。在各種實施例中，親和基質平衡至係或係約5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、或9.0之pH值。在一些實施例中，親和基質平衡至約7.2之pH值。平衡可藉由具有所要pH值之平衡緩衝液進行。在各種實施例中，緩衝液可係能夠將pH值維持在所要點或所要範圍內之任何緩衝液。在各種實施例中，緩衝液濃度可係約5 mM至約100 mM。在一些情況下，該緩衝液濃度係約10 mM至約30 mM。在一些情況下，該緩衝液濃度係約30 mM至約50 mM。在一些情況下，該緩衝液濃度係約40 mM至約60 mM。在各種實施例中，緩衝液濃度係或係約10 mM、11 mM、12 mM、13 mM、14 mM、15 mM、16 mM、17 mM、18 mM、19 mM、20 mM、21 mM、22 mM、23 mM、24 mM、25 mM、26 mM、27 mM、28 mM、29 mM、30 mM、31 mM、32 mM、33 mM、34 mM、35 mM、36 mM、37

mM、38 mM、39 mM、40 mM、41 mM、42 mM、43 mM、44 mM、45 mM、46 mM、47 mM、48 mM、49 mM、50 mM、51 mM、52 mM、53 mM、54 mM、55 mM、56 mM、57 mM、58 mM、59 mM、或60 mM。在一些實施例中，該緩衝液濃度係或係約20 mM。在一些實施例中，該緩衝液濃度係或係約40 mM。在一些實施例中，該緩衝液濃度係或係約50 mM。在一些實施例中，該緩衝液係磷酸鈉。在一些實施例中，此緩衝液包含約10 mM至約50 mM Tris、磷酸鈉或乙酸鹽或其組合。

【0083】 在平衡親和基質之後，將含有異二聚蛋白質之經中和之溶離液（現自同二聚污染物及其他雜質純化）再施加於在5至9之pH值下之用於上文所論述之純化程序步驟中的相同親和基質。在各種實施例中，經中和之溶離液再施加於pH值係或係約5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、或9.0之親和基質。在一些實施例中，該pH值係或係約7.2。

【0084】 在一些實施例中，純化異二聚蛋白質之方法包含：(a)進行一系列之層析循環，其中各循環包含：(i)將異二聚蛋白質與雜質之混合物引入含有蛋白質結合配位體之親和基質，其中該異二聚蛋白質包含對該蛋白質結合配位體具有不同親和力之第一多肽及第二多肽，且其中至少一種雜質結合該蛋白質結合配位體且至少一種雜質不結合該蛋白質結合配位體；(ii)在5至9之第一pH值下用第一洗滌緩衝液洗滌該親和基質以移除非結合雜質；(iii)在第一溶離緩衝液中在第二pH值下自該親和基質溶離該異二聚蛋白質；及(iv)在小於4之第三

pH值下用第二洗滌緩衝液洗滌該親和基質以移除結合雜質，其中該第二pH值在該系列之層析循環內之初始系列之循環期間處於初始pH值，且該第二pH值在該系列之層析循環內之後續系列之循環期間升高至高於該初始pH值之後續pH值，其中該初始pH值及該後續pH值在4.0至5.2範圍內；及(b)在溶離液中自該親和基質收集該異二聚蛋白質。

【0085】 在各種實施例中，該初始系列之循環由20個循環組成。在一些實施例中，該初始系列之循環由30個循環組成。在一些實施例中，該初始系列之循環由40個循環組成。在一些實施例中，該初始系列之循環由50個循環組成。在一些實施例中，該初始系列之循環由60個循環組成。在一些實施例中，該初始系列之循環由70個循環組成。在一些實施例中，該初始系列之循環由80個循環組成。在一些情況下，初始系列之循環包含下列或由下列組成：5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、或100個循環、或更多個循環。

【0086】 在一些實施例中，該後續系列之循環由至少20個循環組成。在一些實施例中，該後續系列之循環由至少50個、至少60個、至少70個、或至少80個循環組成。在一些情況下，後續系列之循環包含下列或由下列組成：5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、

58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、85、90、95、或100個循環、或更多個循環。

【0087】 在一些實施例中，該初始pH值係4.0至4.2。在一些情況下，該初始pH值係 4.1 ± 0.05 。在一些情況下，初始pH值係4.0、4.025、4.05、4.075、4.1、4.125、4.15、4.175、或4.2。在一些實施例中，該後續pH值係4.3至4.7。在一些情況下，該後續pH值係 4.5 ± 0.05 。在一些情況下，後續pH值係4.4、4.425、4.45、4.475、4.5、4.525、4.55、4.575、或4.6。

【0088】 在一些實施例中，純化異二聚蛋白質之方法包含：(a)進行一系列之層析循環，其中各循環包含：(i)將異二聚蛋白質與雜質之混合物引入含有蛋白質結合配位體之親和基質，其中該異二聚蛋白質包含對該蛋白質結合配位體具有不同親和力之第一多肽及第二多肽，且其中至少一種雜質結合該蛋白質結合配位體且至少一種雜質不結合該蛋白質結合配位體；(ii)在5至9之第一pH值下用第一洗滌緩衝液洗滌該親和基質以移除非結合雜質；(iii)在第一溶離緩衝液中在第二pH值下自該親和基質溶離該異二聚蛋白質；及(iv)在小於4之第三pH值下用第二洗滌緩衝液洗滌該親和基質以移除結合雜質；(b)在該系列之層析循環內在任一或多個循環之後，測量含有該異二聚蛋白質之溶離液中之結合雜質的水平，且將所測量結合雜質之該水平與結合雜質之參考水平進行比較，其中若所測量結合雜質之該水平超過結合雜質之該參考水平，則在該系列之層析循環內在後續循環中增加該第二pH值，其中該第二pH值在該系列之層析循環內之各循環或後續循環期間在4.0至5.2範圍內；及(c)在該溶離液中自該親和基質收集該異二聚蛋白質。

【0089】 在一些實施例中，結合雜質之該參考水平係2%至10%。在一些情況下，結合雜質之該參考水平係3%至7%。在一些情況下，結合雜質之該參考水平係 $5\% \pm 0.5\%$ 。在各種實施例中，結合雜質之參考水平係或約係1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或10%。

【0090】 在一些實施例中，該溶離液中之結合雜質的該水平在該系列之層析循環內各循環之後測量。在一些實施例中，該溶離液中之結合雜質的該水平在該系列之層析循環內每隔五循環之後測量。在一些實施例中，該溶離液中之結合雜質的該水平在該系列之層析循環內每隔十循環之後測量。在一些實施例中，該溶離液中之結合雜質的該水平在該系列之層析循環內第二十循環之後測量。在一些實施例中，該溶離液中之結合雜質的該水平在該系列之層析循環內第四十循環或第五十循環之後測量。在各種實施例中，該溶離液中之結合雜質的該水平在循環1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、及/或循環100之後測量。在各種實施例中，該溶離液中之結合雜質的該水平在每2個循環、每3個循環、每4個循環、每5個循環、每6個循環、每7個循環、每8個循環、每9個循環、每10個循環、每15個循環、每20個循環、每25個循環、每

30個循環、每35個循環、每40個循環、每45個循環、或每50個循環之後測量。在一些情況下，溶離液在一系列之循環（例如，五個循環或十個循環）中收集，且結合雜質之水平在合併溶離液池中測量。在各種實施例中，合併溶離液池在一系列2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、或100個循環、或更多個循環中收集。

【0091】 在一些實施例中，若所測量結合雜質之該水平超過結合雜質之該參考水平，則該第二pH值自4.0至4.2範圍增加至4.2至5.2（或4.3至4.7）範圍。在一些情況下，若所測量結合雜質之該水平超過結合雜質之該參考水平，則該第二pH值自 4.1 ± 0.05 增加至 4.5 ± 0.05 。在一些情況下，第二pH值係4.0、4.025、4.05、4.075、4.1、4.125、4.15、4.175、或4.2，且若所測量結合雜質之該水平超過結合雜質之該參考水平，則增加至4.4、4.425、4.45、4.475、4.5、4.525、4.55、4.575、或4.6。

【0092】 在一些實施例中，第二pH值係4.0至4.2，且若所測量結合雜質之該水平超過結合雜質之該參考水平，則在後續循環中增加0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3、3.25、3.5、3.75、

4、4.25、4.5、4.75、或5個點。因此，在一些情況下，若所測量結合雜質之該水平超過結合雜質之該參考水平，則第二pH值可在後續循環中逐步增加，且若進行測量之下一循環中所測量結合雜質之該水平超過結合雜質之該參考水平，則隨後再次逐步增加（視需要，且再次、且再次，等等）。以此方式，溶離pH值可保持在使一系列之層析循環過程中溶離液中之結合雜質最少，同時維持異二聚蛋白質之回收率最大的水平。

【0093】 在一些實施例中，純化異二聚蛋白質之方法包含：(a)進行一系列之層析循環，其中各循環包含：(i)將異二聚蛋白質與雜質之混合物引入含有蛋白質結合配位體之親和基質，其中該異二聚蛋白質包含對該蛋白質結合配位體具有不同親和力之第一多肽及第二多肽，且其中至少一種雜質結合該蛋白質結合配位體且至少一種雜質不結合該蛋白質結合配位體；(ii)在5至9之第一pH值下用第一洗滌緩衝液洗滌該親和基質以移除非結合雜質；(iii)在第一溶離緩衝液中在第二pH值下自該親和基質溶離該異二聚蛋白質；及(iv)在小於4之第三pH值下用第二洗滌緩衝液洗滌該親和基質以移除結合雜質；其中該第二pH值在該系列之層析循環內之初級系列之循環期間處於初級pH值，該第二pH值在該系列之層析循環內之該初級系列之循環之後的二級系列之循環期間提高至高於該初級pH值之二級pH值，且該第二pH值在該系列之層析循環內之該二級系列之循環之後的三級系列之循環期間提高至高於該二級pH值之三級pH值，其中該初級pH值、該二級pH值、及該三級pH值在4.0至5.2範圍內；及(b)在溶離液中自該親和基質收集該異二聚蛋白質。

【0094】 在一些實施例中，該初級系列之循環包含5至50個循環。在一些情況下，該初級系列之循環包含至多20個循環。在一些情況下，該初級系列之循環包含至多40個循環。在一些情況下，該初級系列之循環包括或包括至多5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、或75個循環、或更多個循環。

【0095】 在一些實施例中，該二級系列之循環包含5至50個循環。在一些情況下，該二級系列之循環包含10至25個循環。在一些情況下，該二級系列之循環包括或包括至多5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、或75個循環、或更多個循環。

【0096】 在一些實施例中，該三級系列之循環包含5至50個循環。在一些情況下，該三級系列之循環包含10至25個循環。在一些情況下，該三級系列之循環包括或包括至多5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、或75個循環、或更多個循環。

【0097】 在一些實施例中，該初級pH值在4.0至4.2範圍內。在一些情況下，該初級pH值係 4.1 ± 0.05 。在一些情況下，該初級pH值係4.0、4.025、

4.05、4.075、4.1、4.125、4.15、4.175、或4.2。在一些實施例中，該二級pH值在4.2至4.4範圍內。在一些情況下，該二級pH值係 4.3 ± 0.05 。在一些情況下，二級pH值係4.2、4.225、4.25、4.275、4.3、4.325、4.35、4.375、或4.4。在一些實施例中，該三級pH值在4.4至4.6範圍內。在一些情況下，該三級pH值係 4.5 ± 0.05 。在一些情況下，三級pH值係4.4、4.425、4.45、4.475、4.5、4.525、4.55、4.575、或4.6。

【0098】 在一些實施例中，該第二pH值在該系列之層析循環內之該三級系列之循環之後的第4系列之循環期間提高至高於該三級pH值之第4 pH值，其中該第4 pH值在4.0至5.2範圍內。

【0099】 在一些實施例中，該第二pH值在該系列之層析循環內之該第4系列之循環之後的第5系列之循環期間提高至高於該第4 pH值之第5 pH值，其中該第5 pH值在4.0至5.2範圍內。

【0100】 在一些實施例中，該第二pH值在該系列之層析循環內之該第5系列之循環之後的第6系列之循環期間提高至高於該第5 pH值之第6 pH值，其中該第6 pH值在4.0至5.2範圍內。

【0101】 在一些情況下，該二級pH值係比該初級pH值高0.1至0.9之pH值，該三級pH值係比該二級pH值高0.1至0.9之pH值，該第4 pH值係比該三級pH值高0.1至0.9之pH值，該第5 pH值係比該第4 pH值高0.1至0.9之pH值，及/或該第6 pH值係比該第5 pH值高0.1至0.9之pH值，其中該初級pH值在4.0至4.2範圍內。在一些實施例中，該初級pH值係 4.1 ± 0.05 。

【0102】 在一些實施例中，二級、三級、第4、第5、或第6 pH值（或第7、第8、第9等pH值）在下一系列之循環中自緊接在前的pH值（例如二級pH值相對於初級pH值增加，且三級pH值相對於二級pH值增加等）增加0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、或1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3、3.25、3.5、3.75、4、4.25、4.5、4.75、或5個點。因此，在一些情況下，溶離pH值可在各後續系列之循環中逐步增加。以此方式，溶離pH值可保持在使一系列之層析循環過程中溶離液中之結合雜質最少，同時維持異二聚蛋白質之回收率最大的水平。

【0103】 在一些實施例中，該初級系列之循環、該二級系列之循環、該三級系列之循環、該第4系列之循環、該第5系列之循環、及/或該第6系列之循環（或必要時其他系列）中之各者在該系列之層析循環內包含5至50個循環。在各種實施例中，各系列之循環包括或包括至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、或75個循環、或更多個循環。

【0104】 在各種實施例中，自純化細胞培養物或自含有異二聚蛋白質之經中和溶離液裝載親和基質可包括添加至多約75 g/L親和基質樹脂的材料。在各種實施例中，親和基質裝載有小於或等於65 g/L、60 g/L、55 g/L、或50 g/L之材料。

【0105】 在一些實施例中，親和基質包含附著至基材之配位體（例如蛋白質A）。在一些情況下，基材係珠粒或粒子，使得親和基質係附著有配位體之複數個粒子。在各種實施例中，配位體係蛋白質A或蛋白質G。當配位體係蛋白質A時，蛋白質A可係天然存在或經修飾之葡萄球菌蛋白質A，或其可係經工程改造之蛋白質A。經工程改造之蛋白質A可係例如Z域四聚體、Y域四聚體、或缺乏D及E域之經工程改造之蛋白質A。此等經工程改造之蛋白質A範例無法結合（或即使結合，以非常低的親和力結合）至免疫球蛋白之VH3域，但仍可結合至IgG1、IgG2、及IgG4之CH3域。

【0106】 在一些情況下，親和基質基材含有下列或由下列構成：瓊脂糖、聚(苯乙烯二乙烯基苯)、聚甲基丙烯酸酯、受控微孔玻璃、球形二氧化矽、纖維素、及其類似物。在基材形狀係珠粒或粒子之實施例中，粒子之平均直徑係25 μm 至100 μm 。在一些實施例中，粒子之平均直徑係約40 μm 至約60 μm 。在一些實施例中，粒子之平均直徑係約45 μm 至約55 μm 。在一些實施例中，粒子之平均直徑係約40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、或55 μm 。在一些情況下，粒子之平均直徑係約45 μm 。在一些情況下，粒子之平均直徑係約50 μm 。在一些實施例中，粒子之平均直徑係35 μm 、45 μm 、60 μm 、75 μm 、或85 μm 。在一些實施例中，粒子含有平均直徑係約1000 Å、1050 Å、1100 Å、1150 Å、或1200 Å之孔。在一些實施例中，粒子含有平均直徑係約1100 Å之孔。

【0107】 在各種實施例中，溶離緩衝液或洗滌緩衝液可包含鹽。在一些情況下，該鹽包含 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 NO_3^- 、 $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ 、 NH_4^+ 、 Cs^+ 、 Rb^+ 、 K^+ 、

Na^+ 、 H^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、或 Al^{3+} 。在一些實施例中，該鹽包含 Na^+ 、 H^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、或 Al^{3+} 。在一些實施例中，該鹽包含 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 NO_3^- 、或 ClO_4^- 。在一些實施例中，該鹽包含 Na^+ 、 H^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、或 Al^{3+} 與 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 NO_3^- 、或 ClO_4^- 之組合。在一些實施例中，該鹽選自 CaCl_2 、 MgCl_2 、或 NaCl 。在一些實施例中，該鹽係 NaCl 。在一些實施例中，該鹽係 CaCl_2 。在一些實施例中，該鹽係 MgCl_2 。

【0108】 在本方法之一些實施例中，異二聚蛋白質係雙特異性抗體，其包含第一多肽及第二多肽，第一多肽包含能夠結合至蛋白質A之CH3域(「Fc」)，第二多肽包含不能夠結合至蛋白質A之CH3域(「Fc*」)。在一些情況下，第二多肽CH3域中包含H435R/Y436F(按EU編號系統；按IMGT外顯子編號系統，H95R/Y96F)取代(亦稱為「Fc*」或「星取代」)。因此，在一些實施例中，第一同二聚體係具有二個未經取代之CH3域(亦即，FcFc)之單特異性抗體；第二同二聚體係具有二個經H435R/Y436F取代之CH3域(亦即，Fc*Fc*)之單特異性抗體；且異二聚蛋白質係具有一個未經取代之CH3域及一個經H435R/Y436F取代之CH3域(亦即，Fc*Fc)的雙特異性抗體。

【0109】 在本方法之一些實施例中，可降低層析管柱經歷清潔(例如藉由使管柱與pH值係至少11之鹼性溶液接觸)之頻率以便最小化對蛋白質-配位體功能之影響。類似地，在本方法之一些實施例中，用於清潔層析管柱之溶液中之鹼濃度可降低至0.1 N至0.5 N範圍內，以便最大化較大數目個循環中之管柱解析度。

【0110】 在各種實施例中，在每個循環之後，可使該親和基質與pH值係至少11之鹼性溶液接觸。在一些情況下，在每三個循環之後，使該親和基質與pH值係至少11之鹼性溶液接觸。在一些情況下，在每五個循環之後，使該親和基質與pH值係至少11之鹼性溶液接觸。在一些情況下，在每七個循環之後，使該親和基質與pH值係至少11之鹼性溶液接觸。在各種實施例中，僅每2個循環、每3個循環、每4個循環、每5個循環、每6個循環、每7個循環、每8個循環、每9個循環或每10個循環之後，使該親和基質與pH值係至少11之鹼性溶液接觸。

【0111】 在一些實施例中，該鹼性溶液之pH值係至少12。在一些實施例中，鹼性溶液之pH值係至少11、至少11.1、至少11.2、至少11.3、至少11.4、至少11.5、至少11.6、至少11.7、至少11.8、至少11.9、至少12、至少12.1、至少12.2、至少12.3、至少12.4、至少12.5、至少12.6、至少12.7、至少12.8、至少12.9、或至少13。

【0112】 在一些實施例中，該鹼性溶液包含濃度係0.1 N至0.5 N之鹼。在一些情況下，鹼濃度係0.1 N至0.3 N。在一些情況下，鹼濃度係0.1 N、0.15 N、0.2 N、0.25 N、0.3 N、0.35 N、0.4 N、0.45 N、或0.5 N。在一些實施例中，該鹼性溶液包含鹼金屬氫氧化物。在一些情況下，該鹼係NaOH。在一些情況下，該鹼係KOH。

實例

實例1：親和層析中溶離pH值與結合雜質之存在及異二聚蛋白質之回收率的評價

【0113】 16.2 mL MabSelect SuRe™ pcc管柱（1.0 cm內徑，20.6 cm床高度）填充有原始樹脂且整合於AKTA Avant 25桌上型液相層析控制器上以進行此實驗。親和解析程序如下表1中所概述進行，但其中溶離pH值自3.90變化至4.30。

【0114】 表1：用於利用MabSelect SuRe™ pcc的bsAb1親和解析層析的溶離緩衝液確定程序

步驟	描述	溶液	體積	滯留時間 (分鐘)
1	移除儲存乙醇	RODI	2 CV	10
2	預 汽 提 (Pre-Strip)	500 mM 乙酸，pH 值 2.45 ± 0.20	2 CV	6
3	平衡	40 mM 磷酸鈉，500 mM NaCl，pH 值 7.20 ± 0.10	2 CV	6
4	負載	純化細胞培養物	55.0 g 結合物種/L 樹脂 ^a	6
5	洗滌 1	40 mM 磷酸鈉，500 mM NaCl，pH 值 7.20 ± 0.10	3 CV	6
6	洗滌 2	40 mM Tris，10 mM 乙酸鹽，pH 值 7.20 ± 0.10	2 CV	6
7	溶離	40 mM 乙酸鹽，500 mM NaCl pH 值 4.10 ± 0.05	6 CV ^b	6
8	汽提 1	40 mM 乙酸，pH 值 3.00 ± 0.10	2 CV	6
9	汽提 2	500 mM 乙酸，pH 值 2.45 ± 0.20	2 CV	6
10	重新平衡	20 mM 磷酸鈉，pH 值 7.20 ± 0.10	2 CV	6
11	儲存	20% (v/v)乙醇	2 CV	10

a 結合物種係指雙特異性物及結合雜質物種。結合效價用於確定管柱負載。

b 以 0.5 CV 開始，溶離液收集至溶離區塊中。

CV，管柱體積；RODI，逆滲透去離子水

【0115】 親和解析溶離液經分餾以使得能夠製備代表5、6、及7 CV溶離長度下之溶離液組成的模擬池。以0.5 CV開始，溶離液收集至溶離區塊中。CV 0.5至5成批收集，接著CV 5至6及CV 6至7個別收集。在分餾之後，自各份合併適當體積以產生6 CV及7 CV模擬池；5、6、及7 CV池隨後以統計方式作為離散運行評價。

【0116】 藉由UV (280 nm)用Solo VPE儀器測定各模擬池之濃度。分析各模擬池的雙特異性物純度，其使用混合模式層析分析所測量。各模擬池之溶離液體積、溶離液蛋白質濃度、結合雜質、及非結合雜質資料用於計算各運行之親和解析雙特異性物產率。模型使用選自反向逐步回歸工具之因數產生，其中進入機率0.25，離開機率0.05，且p值臨限終止規則設定為95%，且模型用於計算結合雜質水平及異二聚蛋白質回收率。

【0117】 如圖3中所示，原始管柱（0個先前循環）中溶離液中之結合雜質之百分比及異二聚蛋白質回收百分比隨著pH值增大而減小。如所示，pH值4.1提供在溶離液中最小水平之結合雜質（例如2.0%），同時維持相當大水平之異二聚蛋白質回收率（例如92.5%）。值得注意地，將溶離緩衝液之pH值升高至甚至4.2會顯著降低異二聚蛋白質之回收率（例如降低至約80%）。

實例2：原始及循環親和層析管柱中溶離pH值與結合雜質之存在及異二聚蛋白質之回收率的評價

【0118】 使用整合於Akta Avant 25 (Cytiva)液相層析系統中之MabSelect SuRe™ pcc管柱（1.0 cm內徑，20 cm床高度）進行此實驗。親和解析程序如下表2中所概述進行，但具有不同溶離pH值及循環數，如下表3中所示。

【0119】 表2：用於原始及循環管柱中利用MabSelect SuRe™ pcc的bsAb1

親和解析層析的溶離緩衝液確定程序

步驟	描述	溶液	體積	滯留時間 (分鐘)
1	移除儲存乙醇	反滲透去離子水	2 CV	10
2	預汽提	500 mM 乙酸，pH 值 2.45 ± 0.20	2 CV	6
3	平衡	20 mM 磷酸鈉，pH 值 7.20 ± 0.10	2 CV	6
4	負載	純化細胞培養物	52-63 g 結合物種 (結合雜質+雙特異性物) /L 樹脂	6
5	洗滌 1	10 mM 磷酸鈉，525 mM NaCl，pH 值 7.10 ± 0.10	3 CV	6
6	洗滌 2	20 mM 磷酸鈉，pH 值 7.20 ± 0.10	2 CV	6
7	溶離	40 mM 乙酸鹽， 500 mM NaCl， pH 值 4.10 ± 0.05 或 40 mM 乙酸鹽， 500 mM NaCl， pH 值 4.50 ± 0.05	≤ 7.25 CV	8
8	汽提 1	40 mM 乙酸，9 mM NaCl，pH 值 3.10 ± 0.10	2 CV	6
9	汽提 2	500 mM 乙酸，pH 值 2.45 ± 0.20	2 CV	6
10	重新平衡	20 mM 磷酸鈉，pH 值 7.20 ± 0.10	2 CV	6
11	汽提 3	0.5 M NaOH	2 CV	7.5
12	重新平衡	20 mM 磷酸鈉，pH 值 7.20 ± 0.10	2 CV	6
13	儲存	20% (v/v)乙醇	2 CV	10

【0120】 表3：樹脂之pH值及循環數目

運行	樹脂上之循環數目
----	----------

4.1 原始	1
4.1 循環	78
4.5 原始	6
4.5 循環	83

【0121】 如圖4A中所示，原始管柱（≤6個循環）中之溶離pH值增加（4.1至4.5）略微降低溶離液中之結合雜質的百分比（2.7%至1.2%），而循環管柱（78至83個循環）中之溶離pH值增加（4.1至4.5）顯著且出乎意料地降低溶離液中之結合雜質的百分比（17.4%至2.0%）。圖4B展示溶離pH值之增加（4.1至4.5）亦不利地影響異二聚蛋白質（例如雙特異性抗體）之回收百分比，但循環管柱中回收百分比之減少出乎意料地不太顯著（相對於原始管柱，少約10倍）。如圖4B中所示，當溶離pH值自4.1升高至4.5時，原始管柱中異二聚蛋白質回收率減少約40%，而對於相同pH值增加，循環管柱中之減少僅係約4%。

實例3：pH值溶離研究中輸入參數與測量輸出之評價

【0122】 使用個別地整合於AKTA pure 150 (Cytiva)液相層析系統中之三個MabSelect SuRe™ pcc管柱（1.0 cm內徑，21 cm床高度；16.5 mL管柱體積）進行此實驗。親和解析程序如下表4中所概述進行，但具有不同管柱負載（每L樹脂33至55 g結合物種（雙特異性物+結合雜質））、溶離pH值（4.0至4.5）、及氫氧化物循環或氫氧化物暴露時間（1至109個循環或0.28至30.56小時），如下表5中所示。結合管柱負載、溶離pH值、及氫氧化物循環（或暴露時間）測

量產率（雙特異性物+結合雜質%）、結合雜質(%)、以及聚集（SE-UPLC高分子量%）。

【0123】 表4：bsAb1之pH值溶離研究之程序

步驟	描述	溶液	體積	滯留時間 (分鐘)
1	水沖洗	純化水	3 CV	31.5
2	預汽提	500 mM 乙酸，pH 值 2.45 ± 0.2	2 CV	12.6
3	平衡	20 mM 磷酸鈉，pH 值 7.20 ± 0.1	2 CV	12.6
4	負載	純化細胞培養物	參見表 x	51.4-85.7
5	洗滌 1	10 mM 磷酸鈉，500 mM 氯化鈉，pH 值 7.20 ± 0.1	3 CV	18.9
6	洗滌 2	20 mM 磷酸鈉，pH 值 7.20 ± 0.1	2 CV	12.6
7	溶離	40 mM 乙酸鹽，500 mM 氯化鈉溶液 pH 值：參見表 5	6 CV	37.8
8	汽提 1	40 mM 乙酸，pH 值 3.00 ± 0.2	2 CV	12.6
9	汽提 2	500 mM 乙酸，pH 值 2.45 ± 0.2	2 CV	12.6
10	重新平衡	20 mM 磷酸鈉，pH 值 7.20 ± 0.1	2 CV	12.6

【0124】 表5：實驗運行中之參數之變化

運行	解析 pH 值	負 載 （ g/L 樹脂）	氫氧化物循環	氫氧化物接觸時間 (hr)
1	4.00	55	105	29.44
2	4.50	33	1	0.28
3	4.00	33	2	0.56
4	4.25	44	106	29.72
5	4.25	44	50	14.02
6	4.50	55	3	0.84
7	4.00	55	4	1.12
8	4.25	33	51	14.30
9	4.25	55	52	14.58
10	4.25	44	53	14.86

11	4.50	44	54	15.14
12	4.25	44	55	15.42
13	4.50	55	107	30.00
14	4.00	33	108	30.28
15	4.00	44	56	15.70
16	4.25	44	5	1.40
17	4.50	33	109	30.56

【0125】 實驗運行以上表5中所列之順序進行。設計診斷呈現於圖5A、圖5B、及圖6中。如上文所指出，在具有低(1-5)、中等(50-56)或高(105-109)數目個氫氧化物循環之三個管柱中進行實驗。氫氧化物循環轉化為氫氧化物循環時間以有助於分析。氫氧化物接觸時間係每循環16.82 min (0.28 hr)。解析溶離緩衝液在±0.05之pH值公差內製備。以0.5管柱體積(column volume，CV)開始，溶離液收集至溶離區塊中。

【0126】 藉由UV (280 nm)用Solo VPE儀器測定各池之濃度。溶離液體積及溶離液蛋白質濃度用於計算各運行之親和解析雙特異性物產率，其中假定池僅含有雙特異性蛋白質（亦即由於雜質（結合雜質），所得產率可測量成>100%）。使用疏水相互作用層析(hydrophobic interaction chromatography，HIC)分析來測量雙特異性物純度。聚集使用尺寸排阻超高效液相層析分析(ultra-high performance liquid chromatography，SE-UPLC)測量。

【0127】 模型使用選自反向逐步回歸工具之因數產生，以全模型開始，組合規則及0.05之離開p值臨限值。程序知識及/或進一步統計分析亦用於在適當時添加或移除模型項。對雙特異性物步驟產率(%)、結合雜質(%)、及聚集(% HMW)進行回歸分析。

【0128】 模型預測曲線展示於圖7A及圖7B中。針對雙特異性物產率及結合雜質產生具有顯著項之模型。未發現聚集之顯著項。較低pH值及較高管柱負載，及氫氧化物接觸時間產生較高雙特異性物產率。此較高產率之主要組分係歸因於存在增加之結合雜質，如圖7B中所示，其對於pH值及氫氧化物接觸時間遵循相同趨勢。

【0129】 進行三次確認運行以評估此等模型預測新資料之能力。純化細胞培養物在三個管柱中之各者上使用44 g/L樹脂之平均管柱負載純化。該等模型用於預測在管柱樹脂壽命之不同階段，應使用何種pH值來針對管柱上之固定結合雜質水平（約6%）。結果呈現於下文表6中。

【0130】 表6：模型確認運行

運行	解 析 溶 離 緩 衝 液 pH 值	負 載 (g/L 樹脂)	氫 氧 化 物 循 環	氫 氧 化 物 接 觸 時間(h)	解 析 雙 特 異 性 物 步 驟 產 率 (% , 預 測)	解 析 雙 特 異 性 物 步 驟 產 率 (% , 實 際)	結 合 雜 質 (% , 預 測)	結 合 雜 質 (% , 實 際)
1	4.10	44	6	1.68	76.3	80.4	6.41	6.20
2	4.25	44	57	15.98	71.7	78.7	6.43	5.97
3	4.35	44	110	30.84	80.4	83.2	6.24	6.22

【0131】 雙特異性物產率模型在整個評價範圍中始終預測偏低，但與實際相差7%內。管柱負載在結合雜質之預測中並非顯著因素。結合雜質模型預測高於實際，但相差0.5%內。

【0132】 本發明之範疇不受本文所描述之特定實施例限制。實際上，根據前述描述，除本文所描述之修改之外，本發明之各種修改對所屬技術領域中

具有通常知識者而言亦會變得顯而易見。此等修改意欲屬於隨附申請專利範圍之範疇內。

【符號說明】 無

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種純化異二聚蛋白質之方法，其包含：

(a) 進行一系列之層析循環，其中各循環包含：

- (i) 將異二聚蛋白質與雜質之混合物引入含有蛋白質結合配位體之親和基質，其中該異二聚蛋白質包含對該蛋白質結合配位體具有不同親和力之第一多肽及第二多肽，且其中至少一種雜質結合該蛋白質結合配位體且至少一種雜質不結合該蛋白質結合配位體；
- (ii) 在 5 至 9 之第一 pH 值下用第一洗滌緩衝液洗滌該親和基質以移除非結合雜質；
- (iii) 在第一溶離緩衝液中在第二 pH 值下自該親和基質溶離該異二聚蛋白質；及
- (iv) 在小於 4 之第三 pH 值下用第二洗滌緩衝液洗滌該親和基質以移除結合雜質；

其中該第二pH值在該系列之層析循環內之初始系列之循環期間處於初始pH值，且該第二pH值在該系列之層析循環內之後續系列之循環期間升高至高於該初始pH值之後續pH值，其中該初始pH值及該後續pH值在4.0至5.2範圍內；及

(b) 在溶離液中自該親和基質收集該異二聚蛋白質。

【請求項2】如請求項1之方法，其中該初始系列之循環由20個循環組成。

【請求項3】如請求項1之方法，其中該初始系列之循環由30個循環或40個循環組成。

【請求項4】如請求項1之方法，其中該初始系列之循環由50個循環或60個循環組成。

【請求項5】如請求項1之方法，其中該初始系列之循環由70個循環或80個循環組成。

【請求項6】如請求項2至5中任一項之方法，其中該後續系列之循環由至少20個循環組成。

【請求項7】如請求項6之方法，其中該後續系列之循環由至少50個、至少60個、至少70個、或至少80個循環組成。

【請求項8】如請求項1至7中任一項之方法，其中該初始pH值係4.0至4.2。

【請求項9】如請求項8之方法，其中該初始pH值係 4.1 ± 0.05 。

【請求項10】如請求項1至9中任一項之方法，其中該後續pH值係4.3至4.7。

【請求項11】如請求項10之方法，其中該後續pH值係 4.5 ± 0.05 。

【請求項12】一種純化異二聚蛋白質之方法，其包含：

(a) 進行一系列之層析循環，其中各循環包含：

- (i) 將異二聚蛋白質與雜質之混合物引入含有蛋白質結合配位體之親和基質，其中該異二聚蛋白質包含對該蛋白質結合配位體具有不同親和力之第一多肽及第二多肽，且其中至少一種雜質結合該蛋白質結合配位體且至少一種雜質不結合該蛋白質結合配位體；
- (ii) 在5至9之第一pH值下用第一洗滌緩衝液洗滌該親和基質以移除非結合雜質；

- (iii) 在第一溶離緩衝液中在第二 pH 值下自該親和基質溶離該異二聚蛋白質；及
 - (iv) 在小於 4 之第三 pH 值下用第二洗滌緩衝液洗滌該親和基質以移除結合雜質；
- (b) 在該系列之層析循環內在任一或多個循環之後，測量含有該異二聚蛋白質之溶離液中之結合雜質的水平，且將所測量結合雜質之該水平與結合雜質之參考水平進行比較，其中若所測量結合雜質之該水平超過結合雜質之該參考水平，則在該系列之層析循環內在後續循環中增加該第二 pH 值，其中該第二 pH 值在該系列之層析循環內之各循環或後續循環期間在 4.0 至 5.2 範圍內；及
- (c) 在該溶離液中自該親和基質收集該異二聚蛋白質。

【請求項13】如請求項12之方法，其中結合雜質之該參考水平係2%至10%。

【請求項14】如請求項13之方法，其中結合雜質之該參考水平係3%至7%。

【請求項15】如請求項14之方法，其中結合雜質之該參考水平係5% $\pm$ 0.5%。

【請求項16】如請求項12至15中任一項之方法，其中該溶離液中之結合雜質的該水平在該系列之層析循環內之各循環之後測量。

【請求項17】如請求項12至15中任一項之方法，其中該溶離液中之結合雜質的該水平在該系列之層析循環內之每隔五循環之後測量。

【請求項18】如請求項12至15中任一項之方法，其中該溶離液中之結合雜質的該水平在該系列之層析循環內之每隔十循環或每隔二十循環之後測量。

【請求項19】如請求項12至15中任一項之方法，其中該溶離液中之結合雜質的該水平在該系列之層析循環內之第四十循環或第五十循環之後測量。

【請求項20】如請求項12至15中任一項之方法，其中該溶離液中之結合雜質的該水平在自一系列之循環收集之合併溶離液池中測量。

【請求項21】如請求項12至20中任一項之方法，其中若所測量結合雜質之該水平超過結合雜質之該參考水平，則該第二pH值自4.0至4.2範圍增加至4.3至4.7範圍。

【請求項22】如請求項21之方法，其中若所測量結合雜質之該水平超過結合雜質之該參考水平，則該第二pH值自 4.1 ± 0.05 增加至 4.5 ± 0.05 。

【請求項23】一種純化異二聚蛋白質之方法，其包含：

(a) 進行一系列之層析循環，其中各循環包含：

- (i) 將異二聚蛋白質與雜質之混合物引入含有蛋白質結合配位體之親和基質，其中該異二聚蛋白質包含對該蛋白質結合配位體具有不同親和力之第一多肽及第二多肽，且其中至少一種雜質結合該蛋白質結合配位體且至少一種雜質不結合該蛋白質結合配位體；
- (ii) 在5至9之第一pH值下用第一洗滌緩衝液洗滌該親和基質以移除非結合雜質；
- (iii) 在第一溶離緩衝液中在第二pH值下自該親和基質溶離該異二聚蛋白質；及

(iv) 在小於 4 之第三 pH 值下用第二洗滌緩衝液洗滌該親和基質以移除結合雜質；

其中該第二pH值在該系列之層析循環內之初級系列之循環期間處於初級pH值，該第二pH值在該系列之層析循環內之該初級系列之循環之後的二級系列之循環期間提高至高於該初級pH值之二級pH值，且該第二pH值在該系列之層析循環內之該二級系列之循環之後的三級系列之循環期間提高至高於該二級pH值之三級pH值，其中該初級pH值、該二級pH值、及該三級pH值在4.0至5.2範圍內；及

(b) 在溶離液中自該親和基質收集該異二聚蛋白質。

【請求項24】如請求項23之方法，其中該初級系列之循環包含5至50個循環。

【請求項25】如請求項24之方法，其中該初級系列之循環包含至多20個循環。

【請求項26】如請求項24之方法，其中該初級系列之循環包含至多40個循環。

【請求項27】如請求項23至26中任一項之方法，其中該二級系列之循環包含5至50個循環。

【請求項28】如請求項27之方法，其中該二級系列之循環包含10至25個循環。

【請求項29】如請求項23至28中任一項之方法，其中該三級系列之循環包含5至50個循環。

【請求項30】如請求項29之方法，其中該三級系列之循環包含10至25個循環。

【請求項31】如請求項23至30中任一項之方法，其中該初級pH值在4.0至4.2範圍內。

【請求項32】如請求項31之方法，其中該初級pH值係 4.1 ± 0.05 。

【請求項33】如請求項23至32中任一項之方法，其中該二級pH值在4.2至4.4範圍內。

【請求項34】如請求項33之方法，其中該二級pH值係 4.3 ± 0.05 。

【請求項35】如請求項23至34中任一項之方法，其中該三級pH值在4.4至4.6範圍內。

【請求項36】如請求項35之方法，其中該三級pH值係 4.5 ± 0.05 。

【請求項37】如請求項23至30中任一項之方法，其中該第二pH值在該系列之層析循環內之該三級系列之循環之後的第4系列之循環期間提高至高於該三級pH值之第4 pH值，其中該第4 pH值在4.0至5.2範圍內。

【請求項38】如請求項37之方法，其中該第二pH值在該系列之層析循環內之該第4系列之循環之後的第5系列之循環期間提高至高於該第4 pH值之第5 pH值，其中該第5 pH值在4.0至5.2範圍內。

【請求項39】如請求項38之方法，其中該第二pH值在該系列之層析循環內之該第5系列之循環之後的第6系列之循環期間提高至高於該第5 pH值之第6 pH值，其中該第6 pH值在4.0至5.2範圍內。

【請求項40】如請求項37至39中任一項之方法，其中該二級pH值係比該初級pH值高0.1至0.9之pH值，該三級pH值係比該二級pH值高0.1至0.9之pH值，該第4 pH值係比該三級pH值高0.1至0.9之pH值，該第5 pH值係比該第4 pH值高0.1至0.9之pH值，及/或該第6 pH值係比該第5 pH值高0.1至0.9之pH值，其中該初級pH值在4.0至4.2範圍內。

【請求項41】如請求項40之方法，其中該初級pH值係 4.1 ± 0.05 。

【請求項42】如請求項37至41中任一項之方法，其中該初級系列之循環、該二級系列之循環、該三級系列之循環、該第4系列之循環、該第5系列之循環、及/或該第6系列之循環中之各者在該系列之層析循環內包含5至50個循環。

【請求項43】如請求項1至42中任一項之方法，其中該等雜質包含該第一多肽及該第二多肽之同二聚物種。

【請求項44】如請求項1至43中任一項之方法，其中該蛋白質結合配位體係蛋白質A，且該親和基質包含附著於基材之蛋白質A配位體。

【請求項45】如請求項44之方法，其中該蛋白質A配位體係包含Z域四聚體之經工程改造之蛋白質A、包含Y域四聚體之經工程改造之蛋白質A、或缺乏D域及E域之經工程改造之蛋白質A。

【請求項46】如請求項44或45之方法，其中該基材係粒子且該親和基質包含具有25 μm 至100 μm 之平均直徑的複數個粒子。

【請求項47】如請求項46之方法，其中該等粒子包含40 μm 至60 μm 之平均直徑。

【請求項48】如請求項47之方法，其中該等粒子包含45 μm 至55 μm 之平均直徑。

【請求項49】如請求項48之方法，其中該等粒子包含約50 μm 之平均直徑。

【請求項50】如請求項44至49中任一項之方法，其中該基材包含瓊脂糖、聚(苯乙烯二乙烯基苯)、聚甲基丙烯酸酯、纖維素、受控微孔玻璃、及球形二氧化矽中之任一或多者。

【請求項51】如請求項46至50中任一項之方法，其中該等粒子包含具有約1100Å之平均直徑的孔。

【請求項52】如請求項1至51中任一項之方法，其中該溶離緩衝液包含濃度係至少250 mM之鹽。

【請求項53】如請求項52之方法，其中該鹽濃度大於300 mM或大於400 mM。

【請求項54】如請求項53之方法，其中該鹽濃度係約500 mM。

【請求項55】如請求項52至54中任一項之方法，其中該鹽選自含有下列之鹽：(i) Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 NO_3^- 、 $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ 、 NH_4^+ 、 Cs^+ 、 Rb^+ 、 K^+ 、 Na^+ 、 H^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Al^{3+} ；(ii) Na^+ 、 H^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、或 Al^{3+} 與 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 NO_3^- 、或 ClO_4^- 之組合，或(iii) CaCl_2 、 MgCl_2 、或 NaCl 。

【請求項56】如請求項1至55中任一項之方法，其中該第一多肽包含能夠結合於該蛋白質結合配位體之CH3域，且該第二多肽包含不能夠結合於該蛋白質結合配位體之CH3域。

【請求項57】如請求項44之方法，其中該第一多肽包含能夠結合於蛋白質A之CH3域，且該第二多肽包含不能夠結合於蛋白質A之CH3域。

【請求項58】如請求項57之方法，其中該第二多肽包含該CH3域中之H435R修飾及Y436F修飾（EU編號）。

【請求項59】如請求項10至58中任一項之方法，其中該第一pH值係6至8。

【請求項60】如請求項1至59中任一項之方法，其中該第三pH值係2.8至3.5。

【請求項61】如請求項1至60中任一項之方法，其中該異二聚蛋白質係抗體。

【請求項62】如請求項1至60中任一項之方法，其中該異二聚蛋白質係雙特異性抗原結合蛋白。

【請求項63】如請求項62之方法，其中該雙特異性抗原結合蛋白係雙特異性抗體。

【請求項64】如請求項1至63中任一項之方法，其中在該系列之層析循環內在各循環中，在該溶離液中回收至少85%之該異二聚蛋白質。

【請求項65】如請求項64之方法，其中在該系列之層析循環內在各循環中，在該溶離液中回收至少87%之該異二聚蛋白質。

【請求項66】如請求項65之方法，其中在該系列之層析循環內在各循環中，在該溶離液中回收至少89%之該異二聚蛋白質。

【請求項67】如請求項1至66中任一項之方法，其中該系列之層析循環包含100或更多個循環。

【請求項68】如請求項1至67中任一項之方法，其中在每個循環之後，使該親和基質與pH值係至少11之鹼性溶液接觸。

【請求項69】如請求項1至67中任一項之方法，其中在每三個循環之後，使該親和基質與pH值係至少11之鹼性溶液接觸。

【請求項70】如請求項1至67中任一項之方法，其中在每五個循環之後，使該親和基質與pH值係至少11之鹼性溶液接觸。

【請求項71】如請求項1至67中任一項之方法，其中在每七個循環之後，使該親和基質與pH值係至少11之鹼性溶液接觸。

【請求項72】如請求項68至72中任一項之方法，其中該鹼性溶液之pH值係至少12。

【請求項73】如請求項68至72中任一項之方法，其中該鹼性溶液包含濃度係0.1 N至0.5 N之鹼。

【請求項74】如請求項73之方法，其中該濃度係0.1 N至0.3 N。

【請求項75】如請求項68至74中任一項之方法，其中該鹼性溶液包含NaOH。

【請求項76】如請求項1至63中任一項之方法，其中各循環進一步包含(v)藉由使該親和基質與pH值係至少11之鹼性溶液接觸來清潔該親和基質。

【請求項77】如請求項76之方法，其中該鹼性溶液之pH值係至少12。

【請求項78】如請求項76或77之方法，其中該鹼性溶液包含濃度係0.1 N至0.5 N之鹼。

【請求項79】如請求項78之方法，其中該濃度係0.1 N至0.3 N。

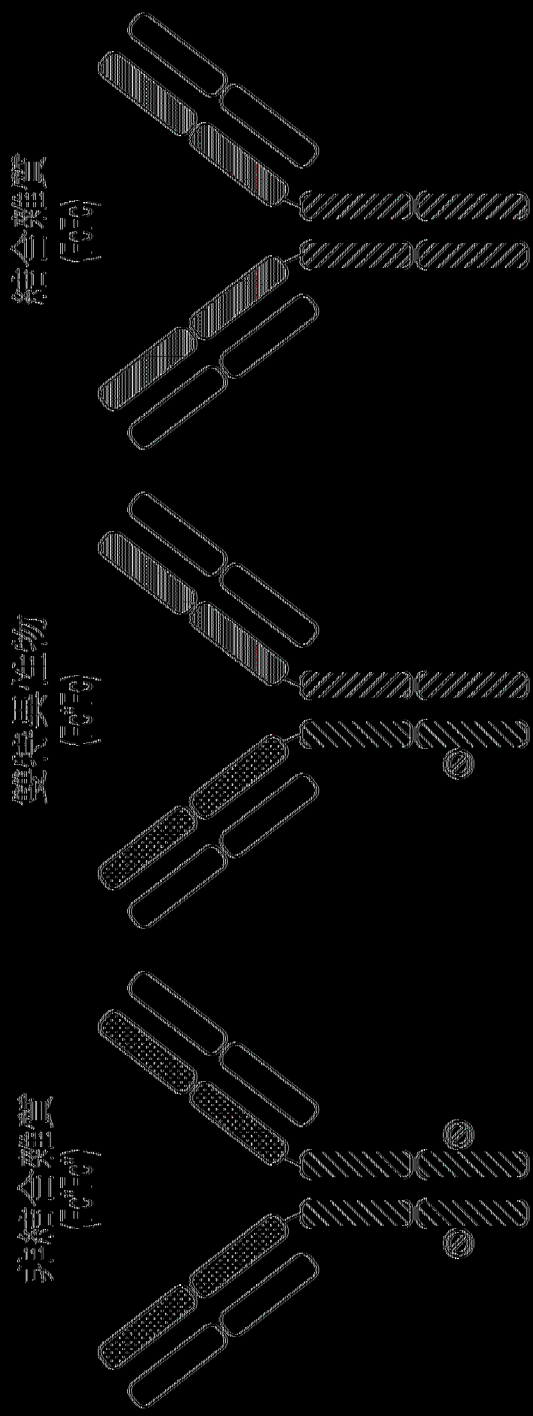
【請求項80】如請求項76至79中任一項之方法，其中該鹼性溶液包含NaOH。

【請求項81】如請求項76至80中任一項之方法，其中在該系列之層析循環內在各循環中，在該溶離液中回收至少75%之該異二聚蛋白質，且該等結合雜質不超過6.5%。

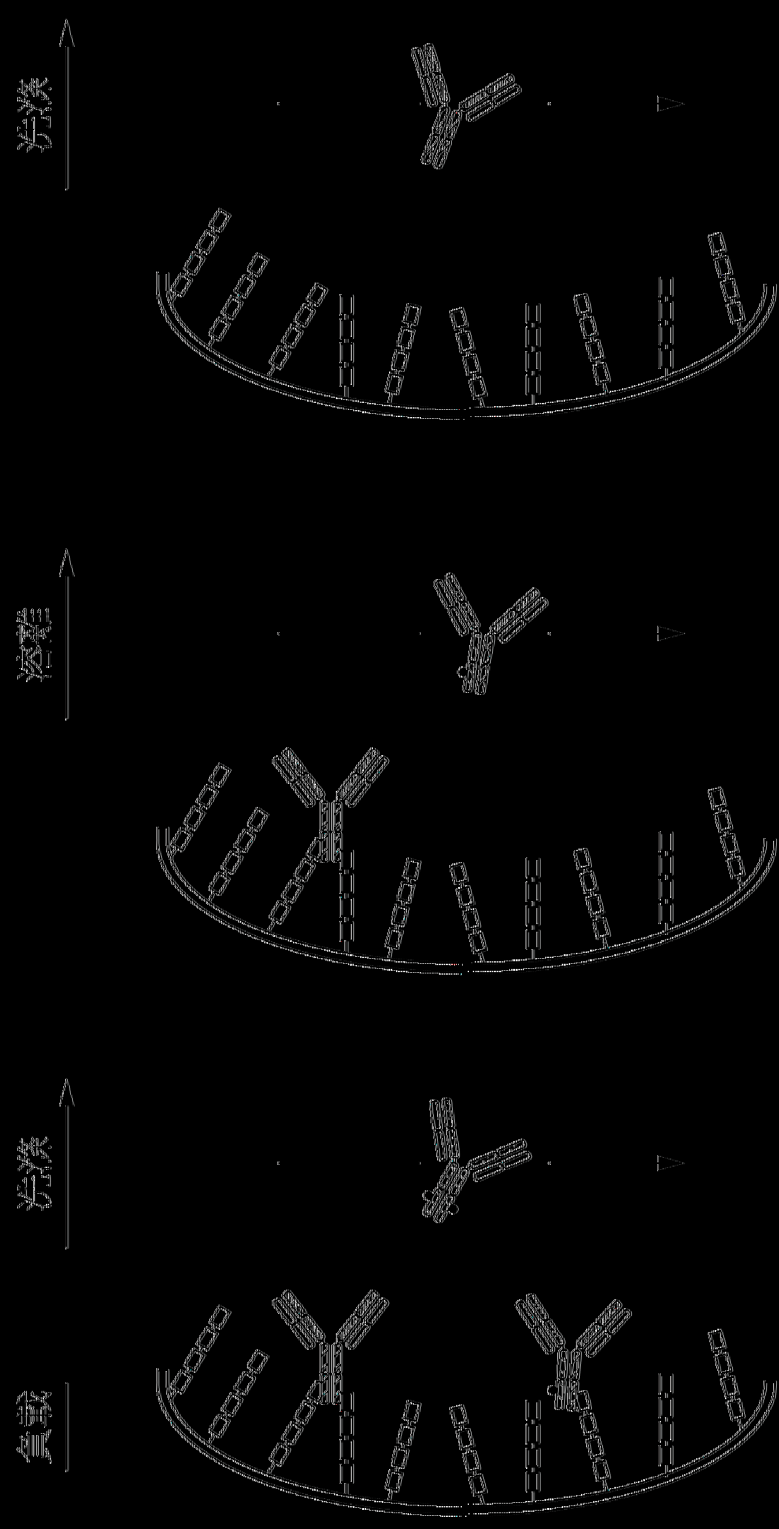
【請求項82】如請求項81之方法，其中在該系列之層析循環內在各循環中，在該溶離液中回收至少78%之該異二聚蛋白質。

【請求項83】如請求項82之方法，其中在該系列之層析循環內在各循環中，在該溶離液中回收至少80%之該異二聚蛋白質。

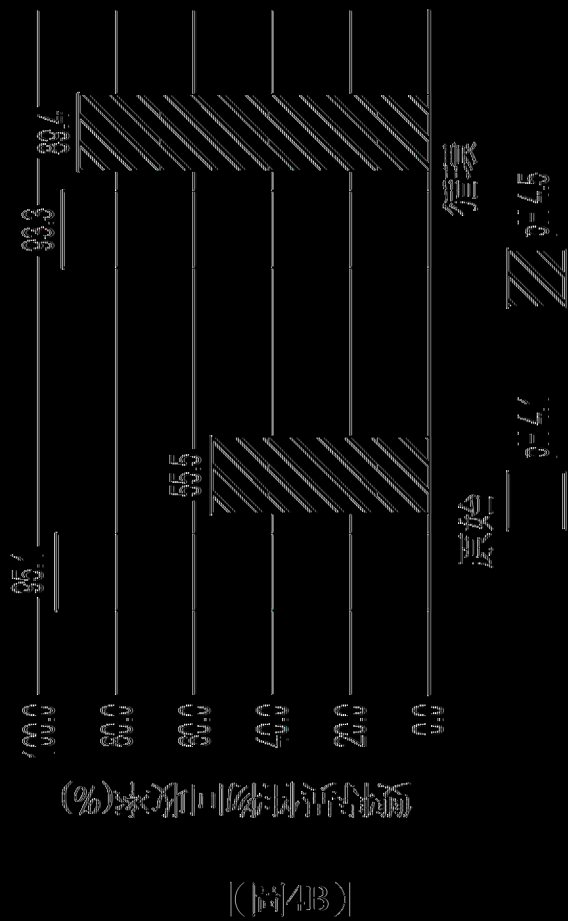
|(發明圖式)|



|(圖1)|

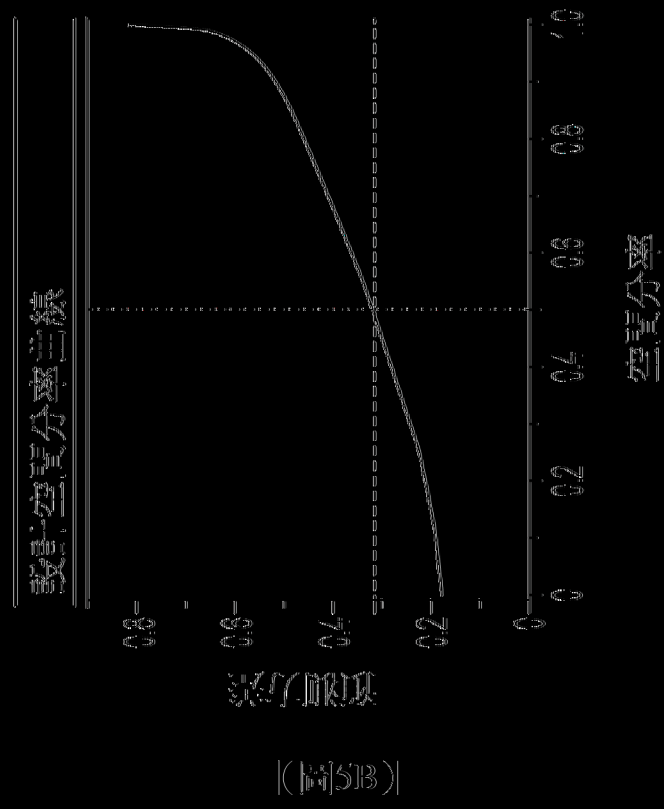


[(圖2)]



功效分析			
顯著性水平 0.05			
模型RMS E			
項	項數	項數係數	功效
源截			
解於溶難 ₂₂	/		0.525
管柱負載(g/L)	/		0.773
氫氧化物接觸時間(m)	/		0.772
解於溶難 ₂₂ *解於溶難 ₂₂	/		0.743
解於溶難 ₂₂ *管柱負載(g/L)	/		0.289
管柱負載(g/L)*管柱負載(g/L)	/		0.687
解於溶難 ₂₂ *氫氧化物接觸時間(m)	/		0.289
管柱負載(g/L)*氫氧化物接觸時間(m)	/		0.555
氫氧化物接觸時間(m)*氫氧化物接觸時間(m)	/		0.555
	/		0.247

[(E)5A]



水質測定項目		測定結果									
		項目	測定結果	項目	測定結果	項目	測定結果	項目	測定結果	項目	測定結果
水質測定項目	測定結果	pH		管柱上段		管柱上段		管柱上段		管柱上段	
		管柱上段		管柱上段		管柱上段		管柱上段		管柱上段	
		管柱上段		管柱上段		管柱上段		管柱上段		管柱上段	
		管柱上段		管柱上段		管柱上段		管柱上段		管柱上段	
		管柱上段		管柱上段		管柱上段		管柱上段		管柱上段	
		管柱上段		管柱上段		管柱上段		管柱上段		管柱上段	
		管柱上段		管柱上段		管柱上段		管柱上段		管柱上段	
		管柱上段		管柱上段		管柱上段		管柱上段		管柱上段	
		管柱上段		管柱上段		管柱上段		管柱上段		管柱上段	
		管柱上段		管柱上段		管柱上段		管柱上段		管柱上段	

(表9)

[illegible]

