



(21)申請案號：111131425

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 08 月 22 日

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

C07K1/107 (2006.01)

A61K47/68 (2017.01)

(30)優先權：2021/08/23 美國

63/236,170

(71)申請人：美商建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

(72)發明人：漢德瑞克斯 瑞秋 HENDRICKS, RACHEL (US)；胡金森 馬修 亨利

HUTCHINSON, MATTHEW HENRY (US)；費迪斯科 馬克 弗瑞德瑞克

FEDESCO, MARK FREDERICK (US)；特蘭 班傑明 富 TRAN, BENJAMIN PHU

(US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：30 項 圖式數：5 共 37 頁

(54)名稱

用於抗體藥物結合物之流通陽離子交換層析純化製程

(57)摘要

本發明涉及一種在不改變 ADC 之關鍵品質屬性 (CQA) 情況下利用抗體中間體的純化條件以流通模式使用陽離子交換層析開發用於抗體藥物結合物之純化製程的方法。

The present invention relates to a method of developing purification processes for antibody drug conjugates using cation-exchange chromatography in flow-through mode leveraging the purification conditions of the antibody intermediate without a change to the critical quality attributes (CQA) of the ADC.

指定代表圖：

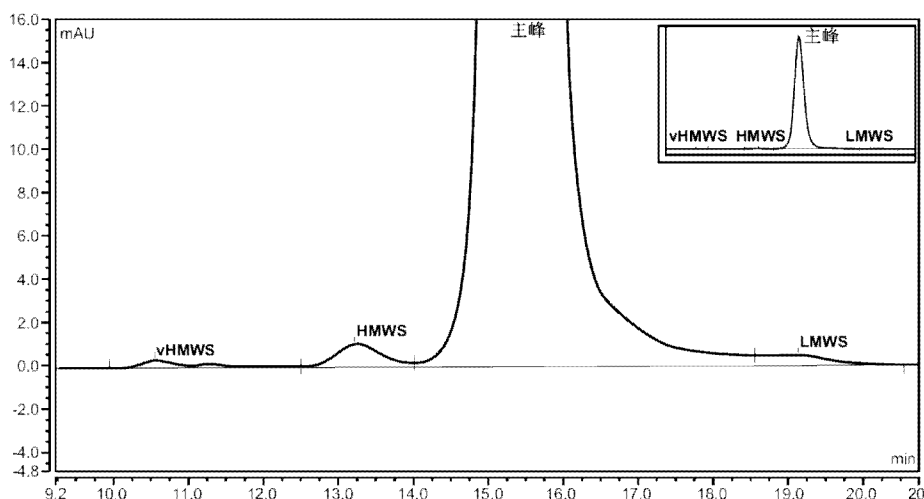


圖 1

【發明摘要】

【中文發明名稱】 用於抗體藥物結合物之流通陽離子交換層析純化製程

【英文發明名稱】 FLOW THROUGH CATION EXCHANGE

CHROMATOGRAPHY PURIFICATION PROCESSES FOR ANTIBODY DRUG
CONJUGATES

【中文】本發明涉及一種在不改變 ADC 之關鍵品質屬性 (CQA) 情況下利用抗體中間體的純化條件以流通模式使用陽離子交換層析開發用於抗體藥物結合物之純化製程的方法。

【英文】The present invention relates to a method of developing purification processes for antibody drug conjugates using cation-exchange chromatography in flow-through mode leveraging the purification conditions of the antibody intermediate without a change to the critical quality attributes (CQA) of the ADC.

【指定代表圖】

圖 1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 用於抗體藥物結合物之流通陽離子交換層析純化製程

【英文發明名稱】 FLOW THROUGH CATION EXCHANGE

CHROMATOGRAPHY PURIFICATION PROCESSES FOR ANTIBODY DRUG
CONJUGATES

【技術領域】

【0001】 一般而言，本發明涉及一種以流通模式使用陽離子交換層析開發用於抗體藥物結合物之純化製程的方法。特別地，它涉及以流通模式使用陽離子交換層析的半胱胺酸靶向抗體藥物結合物之純化製程。更特別地，它涉及利用抗體中間體的純化條件以流通模式使用陽離子交換層析的半胱胺酸靶向抗體藥物結合物之純化製程。

【先前技術】

【0002】 作為蛋白質藥物組的一部分，抗體分子非常容易受到物理和化學降解。化學降解包括涉及經由鍵形成或裂解來修飾蛋白質以產生新化學實體之任何製程。已知多種化學反應會影響蛋白質。這些反應可能涉及水解，包括肽鍵的斷裂以及脫醯胺、異構化、氧化和分解。物理降解係指高級結構的變化，且包括變性、吸附到表面、聚集和沉澱。蛋白質穩定性受蛋白質本身特性的影響，例如胺基酸序列、醯基化模式以及受外部影響，諸如溫度、溶劑、pH、賦形劑、界面或剪切速率。

【0003】 抗體-藥物結合物 (ADC) 是靶向抗癌療法，旨在相對於傳統小分子和抗體癌症化療降低非特異性毒性並提高療效。抗體-藥物結合物利用單株抗體的強大靶向能力，以專門向癌細胞遞送高效的結合小分子療法。ADC 由與抗體結合的強效小分子藥物組成，以允許靶向遞送至腫瘤細胞。結合製程涉及抗體與細胞毒性藥物之間的化學反應，以實現所需的藥物與抗體比率 (DAR)。

(R.V.J.Chari, M.L.Miller, W.C.Widdison, Antibody-Drug Conjugates: An

Emerging Concept in Cancer Therapy, Ange.Chem. Int. Ed. 53 (2014) 3796-3827; P. Polakis, Pharmacological Reviews (2016),3-19).DAR 需要嚴格控制，因為它直接影響安全性和有效性。DAR 還需要控制在適當狹隘的規格內，以確保產物一致性。

【0004】 形成抗體-藥物結合物所需的化學反應步驟可能需要諸如長的保持時間、升高的 pH 值、溶劑背景等可能導致蛋白質聚集的反應條件。作為最終原料藥，結合物中的聚集體水平必須控制在要求的規格範圍內。除了聚集體的總水平之外，可能具體地需要特別關注產物多聚體，其大於二聚體，通常稱為極高分子量物質 (vHMWS)。由於來自蛋白質聚集體的免疫原性的風險增加，特別是對於極高分子量物質 (vHMWS)，已經做出了共同努力來減少這種特定聚集體物質的形成 (W. Wang, S.K.Singh, N. Li, M.R.Toler, K.R.King, S.

Nema, Immunogenicity of protein aggregates--concerns and realities, Int J Pharm. 431 (2012) 1-11)。

【0005】 起始單株抗體 (mAb) 中間體經製造和純化以達到與標準生物治療劑類似的產物品質 (A.A.Shukla, B. Hubbard, T. Tressel, S. Guhan S, D. Low,

Downstream processing of monoclonal antibodies--application of platform

approaches, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 848 (2007) 28-39); P. Gronemeyer, R. Ditz, J. Strube. Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. Bioengineering (Basel) 1 (2014) 188-212)。

【0006】 抗體的純化通常使用結合-沖提層析或流通層析進行。弱分配層析 (Kelley, BD et al., 2008 Biotechnol Bioeng 101(3):553-566; US Patent Application Publication No. 2007/ 0060741) 和過載層析 (PCT/US2011/037977) 已用分別於陰離子交換 (AEX) 樹脂和陽離子交換 (CEX) 樹脂上以增強抗體純化。

【0007】 利用平臺製程和 HTS 方法的純化製程通常用於抗體純化開發，而陽離子交換 (CEX) 層析通常用於抗體純化製程中的聚集體和雜質去除。CEX 通常在具有相對較低的靶向負載密度結合-沖提模式下操作 (H.F.Liu, J. Ma, C. Winter, R. Bayer, Recovery and purification process development for monoclonal antibody production, mAbs, 2 (2010) 480–499)。

【0008】 結合-沖提層析：在結合-沖提層析中，通常加載產物以使與層析材料的動態結合能力 (DBC) 最大化，然後確定沖洗和沖提條件，以便在沖提液中獲得最大的產物純度。結合-沖提層析的一個限制是負載密度對實際樹脂 DBC 的限制。因此，由於負載密度較低，結合-沖提層析純化需要較大的管柱尺寸。結合-沖提模式純化步驟在製造階段的開發和實施更加複雜。結合-沖提純化步驟的匯集標準可能是一個關鍵參數，並可能導致較低產率和設施適應性挑戰。

【0009】 流通層析：使用流通層析，可以確定在產物流過時雜質與層析材料強烈結合的負載條件。流通層析允許針對標準抗體的高負載密度。

【0010】 過載層析：在這種層析的模式中，對目標產物加載超出了層析材料對產物的動態結合能力，因此稱為過載。該操作模式已被證明可以使用陽離子交換 (CEX) 介質，特別是膜提供抗體純化。然而，這種方法的一個限制是因為沒有沖提相，樹脂的產率可能低。過載層析的額外挑戰是適當的關鍵工藝參數，包括高效價的設施以及適當的負載條件。

【0011】 高通量篩選 (HTS) 機械手臂設備通常用於標準單株抗體的純化開發。然而，這種高通量篩選 (HTS) 機械手臂設備針對處理細胞毒性化合物可能不適合或不安全 (J.L.Coffman, J.F.Kramarczyk, B.D.Kelley, High-throughput screening of chromatographic separations: I. Method development and column modeling. *Biotechnol. Bioeng.*, 100 (2008) 605-618; M.I.Hensgen, B. Stump, Safe Handling of Cytotoxic Compounds in a Biopharmaceutical Environment. 在：Ducry L. (Eds.), *Antibody-Drug Conjugates. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 1045 (2013); Humana Press, Totowa, NJ. 2013, pp. 130-142)。這給使用 HTS 用於純化 ADC 帶來了挑戰。

【0012】 如果在形成 ADC 的結合反應期間不能嚴格控制聚集體的形成，則必須在結合後實施純化步驟以達到原料藥聚集體規格。純化必須在不影響處理強效化合物的安全要求且不影響所需的 ADC 產物品質（諸如 DAR 和藥物負載分佈）的情況下進行。ADC 純化技術也採用疏水性交互作用層析 (HIC)。HIC 是基於其疏水性用於分離分子的有用工具。通常，HIC 管柱上加載了高鹽緩衝液中的樣品分子。緩衝液中的鹽與水分子相互作用以減少溶液中分子的溶劑化，從而暴露樣品分子中的疏水區域，從而將其吸收於 HIC 管柱上。分子越疏水，促進結合所需的鹽就越少。通常，使用遞減的鹽梯度從管柱中沖提樣

品。隨著離子強度的遞減，分子親水區域的暴露增加，且分子以疏水性遞增的順序從管柱中沖提下來。樣品沖提還可以藉由在沖提緩衝液中加入溫和的有機改性劑或去污劑來實現。HIC 在 *Protein Purification*, 2d Ed., Springer-Verlag, New York, pgs 176-179 (1988) 中進行了綜述。

【0013】然而，HIC 技術通常在大約中性 pH 值和高鹽濃度的存在下進行，可能會導致 ADC 沉澱，以及由於過濾器結垢而導致處理強效化合物的安全問題。(Becker C.L., Duffy R.J., Gandarilla J., Richter S.M. (2020) Purification of ADCs by Hydrophobic Interaction Chromatography.在：Tumey L. (eds) *Antibody-Drug Conjugates*.Methods in Molecular Biology, vol 2078.Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9929-3_19)

【0014】一般而言，由於處理細胞毒性化合物的安全要求，ADC 純化開發更具挑戰性。將 ADC 大規模、經濟高效地純化至足夠純度以用為人類治療藥物仍然是一項艱鉅的挑戰。

【0015】文獻中已經解釋了各種 ADC 純化技術。例如，CN104208719 描述了關於 ADC 純化的沖提和過載。然而，CN104208719 沒有提供任何關於以流通模式進行純化的教導。此外，CN104208719 沒有討論抗體純化，也沒有提供任何關於利用抗體中間體純化期間開發的純化條件來純化 ADC 的教導。在另一實例中，US2013245139 使用 CEX 膜進行抗體的流通聚合純化。然而，US2013245139 沒有提供關於 ADC 純化的任何教導，尤其是關於利用抗體中間體純化期間開發的純化條件來純化 ADC。

【0016】因此，本發明之目的係提供一種利用抗體中間體的純化條件以流通模式使用陽離子交換層析開發用於抗體藥物結合物之純化製程的方法。

【0017】 本發明之另一個目的係識別純化期間的條件以去除聚集體，該聚集體也不影響 ADC 產物的關鍵品質屬性 (CQA)，諸如 DAR 和藥物負載分佈。

【0018】 本發明之另一個目的係提供以流通模式使用陽離子交換層析用於抗體藥物結合物的快速且穩健的純化步驟之開發。

【0019】 本發明之另一個目的係提供以流通模式使用陽離子交換層析用於抗體藥物結合物的低成本、穩健的純化步驟。

【0020】 本發明之另一個目的係去除 vHMWS。

【0021】 簡化的 ADC 純化方法和 ADC 純化製程顯著降低了 vHMWS，穩定地實現了高產率，並且沒有改變 ADC 產物的關鍵品質屬性 (CQA)。這種純化方法還可以用於以最少的開發，開發用於 ADC 的 vHMWS 去除的純化製程。

【發明內容】

【0022】 本發明提供了一種利用抗體中間體純化期間開發的純化條件來純化 ADC 的方法。

【0023】 在一個方面，本發明提供了一種用於降低半胱胺酸導向的抗體藥物結合物 (ADC) 中極高分子量物質 (vHMWS) 的濃度之改進方法，該方法包括以下步驟；

- a. 使用第一組純化條件以陽離子交換層析材料對抗體進行第一純化，以獲得純化的抗體中間體；

- b. 將該純化的抗體中間體與細胞毒性劑結合，以形成包含 cys ADC 及蛋白質聚集體之粗製品；以及
- c. 使用該第一組純化條件以流通模式以陽離子交換層析材料對該粗製品進行第二純化，以產生純化的 cys ADC，
其中該組純化條件包含緩衝系統之負載密度、緩衝液種類、pH 及電導率。

【0024】在另一個方面，本發明提供了相對於 cys ADC 及蛋白質聚集體的粗混合物中蛋白質聚集體的濃度，將洗提液中的 vHMWS 的濃度降低至少 85% 而不改變該 cys ADC 之關鍵品質屬性 (CQA)。

【0025】在又一方面，本發明提供一種方法，其中 ADC 中之 vHMWS 降低至小於 0.1%。

【0026】在又一方面，本發明提供一種方法，其中用於陽離子交換管柱的樹脂係選自由以下所組成之群組：POROS 50HS、POROS XS 和 SPFF 樹脂。

【0027】在另一方面，本發明提供了一種純化半胱胺酸導向的抗體藥物結合物 (cys ADC) 之方法，該方法包含以下步驟：

- a. 使用第一組純化條件以陽離子交換層析材料對抗體進行第一純化，以獲得純化的抗體中間體；
- b. 將該純化的抗體中間體與細胞毒性劑結合，以形成 cys ADC 之粗製品；以及
- c. 使用該第一組純化條件以流通模式以陽離子交換層析材料對該粗製品進行第二純化，以產生純化的 cys ADC，

其中該組純化條件包含緩衝系統之負載密度、緩衝液種類、pH 及電導率。

【0028】在純化 cys ADC 的方法的一個實施例中，細胞毒性分子係選自由以下所組成之群組：奧瑞他汀 (auristatins)、美登素類 (maytansinoids) 和 DNA 損傷劑。

【0029】在純化 cys ADC 的方法的另一個實施例中，DNA 損傷劑係選自由以下所組成之群組的衍生物：卡奇黴素 (Calicheamicin)、蒽環黴素 (Anthracyclines) 及吡咯并苯并二氮呋 (Pyrrolobenzodiazepines)。

【0030】在本發明的又一個實施例中，用於 cys ADC 的形成的抗體以結合-沖提模式純化。

【0031】在本發明的另一個實施例中，獲得純化的抗體中間體的第一純化包括步驟沖提。

【0032】在本發明的又一個實施例中，獲得純化的抗體中間體的第一純化包括梯度沖提。

【0033】在純化抗體的方法的另一個實施例中，確定抗體的結合行為的篩選方法是高通量篩選 (HTS)。

【0034】在本發明的另一個實施例中，在抗體的純化中採用的 HTS 用於繪製抗體的結合行為隨 pH 和相對離子濃度變化的圖譜。

【0035】在另一個實施例中，用於繪製抗體的結合行為的抗體 HTS 結果被利用來識別 ADC 純化的流通條件。

【0036】 在本發明的另一個實施例中，在抗體或 cys ADC 的純化過程中去除的蛋白質聚集體物質包括抗體或 cys ADC 的極高分子量物質 (vHMWS) 和高分子量物質 (HMWS)。

【0037】 在本發明的又一個實施例中，在純化過程中去除的蛋白質聚集體物質是極高分子量物質 (vHMWS)。

【0038】 在本發明的另一個實施例中，cys ADC 係選自由以下所組成之群組：經由工程改造之半胱胺酸的位點特異性結合物及靶向天然半胱胺酸之鏈間半胱胺酸 (interchain-cysteine) 結合物。

【0039】 在另一個實施例中，cys ADC 為經由工程改造之半胱胺酸的位點特異性結合物。

【0040】 在再一個實施例中，cys ADC 為靶向天然半胱胺酸之鏈間半胱胺酸結合物。

【0041】 在本發明的又一個實施例中，開發純化製程的方法包括 thomab 抗生素抗體結合物 (AAC)。

【0042】 在本發明的另一個實施例中，cys ADC 的匯集標準是從 0.5 到 0.5 OD。

【圖式簡單說明】

【0043】

圖 1 描繪了使用 TSKgel G3000SWxL 管柱 (7.8 x 300 mm，Tosoh Bioscience，Tokyo，Japan) 藉由 SEC-HPLC 分析的蛋白質雜質的色譜圖的實例。使用 15% IPA 和 85% 0.2 M 磷酸鉀、0.25 M 氯化鉀、pH 6.95 的移動相，以等度分離解

析峰。流速在環境溫度下保持在 0.5 mL/min，且 UV 偵測保持在 280 nm。偵測到的兩種主要聚集體物質包括 vHMWS 和 HMWS。HMWS 是抗體-藥物結合物的蛋白質二聚體，而 vHMWS 是抗體-藥物結合物的寡聚物。

圖 2 描繪了使用分析疏水性交互作用層析 (HIC) 方法確定的針對鏈間半胱胺酸結合物的平均 DAR 和藥物負載分佈的實例。

圖 3 描繪了使用分析疏水性交互作用層析 (HIC) 方法確定的針對位點特異性結合物的平均 DAR 和藥物負載分佈的實例。

圖 4 描繪了批量結合等值線圖的實例，其比較 CEX 樹脂上抗體及其相應的半胱胺酸導向的抗體藥物結合物 (cys ADC) 的結合行為。

圖 5 描繪了針對結合物負載密度為 500 g/L_r 的 CEX 管柱，半胱胺酸導向的抗體藥物結合物的聚集體物質（vHMWS 和 HMWS）貫通的實例。

【實施方式】

相關申請之交叉引用

【0044】 本申請主張 2021 年 8 月 23 日申請的美國臨時申請第 63/236,170 號的優先權權益，其內容藉由引用方式全文併入本文。

【0045】 本發明涉及開發純化之方法和用於純化半胱胺酸導向的抗體藥物結合物之製程，其包含純化抗體和利用抗體中間體聚集體物質的結合行為用於 ADC 純化。

【0046】 就本說明書及申請專利範圍之目的而言，除另有說明，否則在任何情況下，無論是否明確指出，在說明書和申請專利範圍中所使用之所有表示成分數量、材料之百分比或比例、反應條件和其他數值的數字均應理解為被術語「約」修飾。術語「約」通常是指人們認為等同於所列數值的數字範圍。

在許多情況下，術語「約」可以包括四捨五入到最接近之有效數字的數字。此外，本文所揭露之所有範圍均應理解為涵蓋其中所包含的所有子範圍。

【0047】 本文引用之所有出版物、專利及專利申請藉由引用之方式整體併入本文。

【0048】 在進一步詳細描述本發明之前，首先定義一些術語。這些術語的使用並不限制本發明的範籌，而僅用於促進本發明的描述。

定義：

【0049】 術語「抗體」以最廣義使用，且具體地涵蓋由至少兩種完整抗體形成的完整單株抗體 (mAb's)、多株抗體、多特異性抗體 (例如雙特異性抗體) 及抗體片段，只要其等展現出所欲之生物活性即可。

【0050】 「抗體片段」包含完整抗體的一部分，通常為完整抗體的抗原結合或可變區。抗體片段之實例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 及 Fv 片段；雙抗體；線性抗體；單鏈抗體分子；及由抗體片段形成之多特異性抗體。

【0051】 如本文所使用，「抗體中間體」是指使用第一組純化條件藉由進行第一純化而純化的純化抗體，其用於與細胞毒性劑結合以產生抗體藥物結合物。

【0052】 如本文和所附申請專利範圍中所使用，單數形式「一個」、「或」和「該」包括複數指示物，除非上下文另外明確指出。

【0053】 如本文所使用，「結合行為」是指在包括 pH 和相對離子濃度的特定條件下抗體、抗體中間體或 ADC 與樹脂的結合或解除結合。

【0054】 如本文中所使用，「緩衝液」係指藉由酸-鹼結合物組分之作用來抵抗 pH 變化的緩衝溶液。本發明的 CEX 層析方面的緩衝液具有約 4.5 至

6.5，優選約 5.3 至 5.7 範圍內之 pH。將 pH 控制於此範圍內之緩衝液的實例包括磷酸鹽、乙酸鹽、檸檬酸鹽或銨鹽緩衝液，或多於一種。較佳的此類緩衝液是乙酸鹽、檸檬酸鹽和銨鹽緩衝液，最佳是乙酸钠緩衝液。「負載緩衝液」是用於將 ADC 和雜質/污染物的混合物加載到 CEX 管柱上的緩衝液，「平衡/沖洗緩衝液」是用於從管柱上沖洗 ADC 以回收抗體同時雜質/污染物保留在管柱上的緩衝液。通常負載緩衝液和平衡/沖洗緩衝液具有相同的 pH 和/或電導率條件。

【0055】 如本文所使用的關於層析的術語「順序」是指進行第一層析，接著進行第二層析。在第一層析與第二層析之間可以包括額外步驟。

【0056】 如本文所使用的關於層析的術語「連續」是指第一層析材料和第二層析材料直接連接或具有允許在兩種層析材料之間連續流動的某種其他機制。

【0057】 如本文所使用，術語工程改造之半胱胺酸是指具有用於位點特異性結合的工程改造之反應性半胱胺酸殘基並展示均質結合物的抗體。

【0058】 如本文所使用，術語半胱胺酸導向的抗體藥物結合物 (cys ADC) 是指具有可用於與細胞毒性劑結合的半胱胺酸殘基的抗體的結合物。

【0059】 如本文所使用，術語天然半胱胺酸是指鏈間雙硫鍵並且藉由部分還原產生，產生包含 0-DAR、2-DAR、4-DAR、6-DAR 和 8-DAR 形式的異源結合物。

【0060】 如本文所使用之術語「細胞毒性劑」是指抑制或阻止細胞功能及/或引起細胞死亡或破壞的物質。細胞毒性劑包括但不限於奧瑞他汀、美登素類和 DNA 損傷劑（包括卡奇黴素 (Calicheamicin)、蒽環黴素 (Anthracyclines)

及吡咯并苯并二氮呋 (Pyrrolobenzodiazepines))、放射性同位素；化學治療劑或藥物（例如，胺甲喋呤 (methotrexate)、阿黴素 (adriamycin)、長春花生物鹼 (vinca alkaloid)（長春新鹼 (vincristine)、長春鹼 (vinblastine)、依托泊苷 (etoposide)）、多柔比星 (doxorubicin)、黴法磷 (melphalan)、絲裂黴素 C (mitomycin C)、苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、柔紅黴素 (daunorubicin) 或其他嵌入劑）；生長抑制劑；酶及其片段，例如溶核酶；抗生素；毒素，諸如細菌、真菌、植物或動物來源的小分子毒素或酶活性毒素，包括其片段和/或變體；以及各種抗腫瘤或抗癌劑。

【0061】如本文所使用，術語「DAR」是平均藥物與抗體比率。DAR 直接影響 ADC 的安全性和有效性，並在 ADC 製造製程中受到直接控制。

【0062】如本文所使用，術語「藥物負載分佈」是指與抗體結合的藥物的數量。

【0063】術語關鍵品質屬性 (CQA) 包括平均藥物與抗體比率 (DAR) 和藥物負載分佈，並決定了藉由 ADC 可以遞送的細胞毒性劑的量。

【0064】層析材料的「動態結合能力」是在未結合產物發生顯著貫通之前，材料將在實際流動條件下結合的產物（例如多肽）的量。

【0065】如本文所使用，「分配係數」 K_p 是指產物（例如多肽）在固定相中的莫耳濃度除以產物在流動相中的莫耳濃度。

【0066】「負載密度」是指與一定體積（例如升）的層析材料接觸的組合物數量（例如克）。在一些實例中，負載密度以 g/L_r 表示。

【0067】如本文所使用，術語「離子交換」和「離子交換層析」是指其中目標抗體或抗體藥物結合物與連接至固相離子交換材料的帶電化合物相互作用

用或不相互作用的層析製程，使得混合物中的雜質或聚集體從離子交換材料管柱中的沖提快於或慢於目標抗體或抗體藥物結合物相對於雜質或聚集體與樹脂的結合或從樹脂中的排除。「離子交換層析」具體而言包括陽離子交換層析、陰離子交換層析及混合模式離子交換層析。

【0068】如本文所使用，術語「陰離子交換樹脂」或「AEX」是指帶正電荷的固相，例如，具有與其連接的一個或多個帶正電荷的配體，諸如四級胺基。商購獲得之陰離子交換樹脂包括 DEAE 纖維素、QAE SEPHADEX™ 和 FAST Q SEPHAROSE™ (法瑪西亞公司 (Pharmacia))。陰離子交換層析可以結合靶向分子然後沖提，或者可以在靶向抗體或抗體藥物結合物「流過」管柱時主要結合雜質。

【0069】陽離子交換層析材料是帶負電荷的固相，並且具有用於與通過或通過固相的水溶液（諸如包含抗體和雜質的組合物）中的陽離子交換的游離陰離子。在本文所述的任何方法的一些實施例中，陽離子交換材料可以是膜、整料或樹脂。在一些實施例中，陽離子交換材料可以是樹脂。陽離子交換材料可以包含羧酸官能團或磺酸官能團，諸如但不限於磺酸鹽、羧酸、羧甲基磺酸、磺基異丁基、磺乙基、羧基、磺丙基、磺醯基、磺氧基乙基或正磷酸鹽。在上述的一些實施例中，陽離子交換層析材料是陽離子交換層析管柱。在上述的一些實施例中，陽離子交換層析材料是陽離子交換層析膜。包括樹脂在內的陽離子交換材料的實例是本領域已知的，包括但不限於 Mustang® S、Sartobind® S、SO₃ Monolith（諸如，例如，CIM®、CIMmultus® 和 CIMac® SO₃）、S Ceramic HyperD®、Poros® XS、Poros® HS 50、Poros® HS 20、磺丙基 (sulphopropyl)-Sephacrose® Fast Flow (SPSFF)、SP-Sephacrose® XL (SPXL)、CM

Sepharose® Fast Flow, Capto™ S、Fractogel® EMD Se Hicap、Fractogel® EMD SO₃、或 Fractogel® EMD COO。在一些實施例中，陽離子交換層析以「結合-沖提」模式進行。在一些實施例中，陽離子交換層析以「流通」模式進行。在上述的一些實施例中，陽離子交換層析材料在管柱中。在上述的一些實施例中，陽離子交換層析材料在膜中。

【0070】「雜質」是指不同於所需的多肽產物的材料。雜質可以指產物特異性多肽，諸如單臂抗體和錯誤組裝的抗體、抗體變體（包括鹼性變體和酸性變體）以及聚集體。其他雜質包括製程特異性雜質，其包括但不限於：宿主細胞材料，諸如宿主細胞蛋白 (HCP)；濾出的蛋白質 A；核酸；另一種多肽；內毒素；病毒污染物；細胞培養基成分等。在一些實例中，雜質可以是來自例如但不限於細菌細胞（諸如大腸桿菌細胞 (ECP)）、昆蟲細胞、原核細胞、真核細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、鳥類細胞、真菌細胞的 HCP。在一些實例中，雜質可以是來自哺乳動物細胞的 HCP，諸如 CHO 細胞，即 CHO 細胞蛋白質 (CHOP)。雜質可以指用於促進多特異性抗體的表達、折疊或組裝的輔助蛋白；例如，原核伴護蛋白（諸如 FkpA、DsbA 和 DsbC）。

【0071】如本文所使用的高分子量物質 (HMWS) 是指 ADC 的蛋白質二聚體或抗體的蛋白質二聚體。

【0072】如本文所使用，極高分子量物質是指 ADC 的寡聚物或抗體的寡聚物。

【0073】如本文所使用，術語蛋白質包括抗體和 ADC。

【0074】純度是一個相對術語，並不一定意味著絕對純度。如本文可互換使用的術語「純化」、「分離」或「單離」是指從包含所需的分子和一種或

多種雜質的組合物或樣品中增加所需的分子的純度。通常，通過從組合物中（完全或部分）去除至少一種雜質來提高所需的分子的純度。

【0075】純化條件也是一個相對術語，且這些條件可能因每種純化方法而異。純化條件可以包括緩衝系統的負載密度、緩衝液種類、pH 及電導率。

【0076】材料與方法

a. 藥物結合物

【0077】結合是一個多步驟的製程，用於修飾可能因結合物設計而異的蛋白質。使用兩種類型的結合物探索純化：經由工程改造之半胱胺酸的位點特異性結合物及靶向天然半胱胺酸之鏈間半胱胺酸結合物。

【0078】對於位點特異性結合物，純化的中間體與還原劑一起孵育過夜，以完全還原抗體的天然半胱胺酸和工程改造之半胱胺酸，並從工程改造之半胱胺酸中移除所有半胱胺酸或麩胱甘肽帽蓋。將還原的抗體進行緩衝液交換以清除殘留的還原劑以及帽蓋物質。鏈間雙硫鍵經由再氧化步驟重新形成，使工程改造之半胱胺酸可用於與連接子-藥物結合。添加過量的連接子-藥物以確保與所有游離硫醇完全結合 (J. Junutula, H. Raab, S. Clark, et al. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index, Nat Biotechnol 26 (2008) 925–932). 依據連接子-藥物，通過降低反應的 pH 來終止或停止結合。最後，去除殘留的游離藥物。

【0079】對於鏈間半胱胺酸結合物，抗體中間體的天然半胱胺酸在與連接子-藥物結合之前用預定量的還原劑部分還原 (M.M.C.Sun, K.S.Beam, C.G.Cervený, K.J.Hamblett, R.S.Blackmore, M.Y.Torgov, F.G.M.Handley, N.C.Ihle, P.D.Senter, S.C.Alley, Reduction-Alkylation Strategies for the Modification of

Specific Monoclonal Antibody Disulfides, *Bioconjugate Chemistry* 16 (2005) 1282-1290).過量的連接子-藥物被淬滅並去除殘留的游離藥物。

b. 結合物管柱純化

【0080】 使用具有各種尺寸的填充有陽離子交換樹脂的管柱 AKTA

Explorer 100 進行管柱層析實驗。將調整後的負載以各種負載密度施加到平衡管柱上，並收集流出物。在負載階段之後，用平衡緩衝液沖洗管柱以增加 cys ADC 回收率。在沖洗階段結束或在 $OD < 0.5$ 時終止匯集。管柱用 0.5 N NaCl 再生，用 0.5 N NaOH 消毒並儲存在 0.1 N NaOH 中。

c. 抗體中間體純化開發

【0081】 使用已知製程對抗體中間體進行高通量篩選 (HTS) (P.

McDonald, B. Tran, C.R.Williams, M. Wong, T. Zhao, B.D.Kelley, P. Lester, The rapid identification of elution conditions for therapeutic antibodies from cation-exchange chromatography resins using high-throughput screening, *J Chromatogr A*. 1433 (2016) 66-74)。HTS 繪製抗體的結合行為隨 pH 和緩衝液濃度變化的圖譜。(J.L. Coffman, J.F.Kramarczyk, B.D.Kelley, High-throughput screening of chromatographic separations: I. Method development and column modeling.*Biotechnol. Bioeng.*, 100 (2008) 605-618)。使用 Tecan Robotic 液體處理系統或多通道移液器的帶有 96 孔濾盤的 HTS 用於批量結合實驗，以開發陽離子交換層析樹脂的結合和沖提條件。實驗室規模的填充床管柱用於確認和優化條件。

【0082】 實施 CEX 抗體中間體純化製程以去除聚集體和宿主細胞雜質，並在負載密度 $\leq 100 \text{ g/L}_r$ 下以沖提模式操作 (H.F.Liu, B. McCooey, T. Duarte,

D.E.Myers, T. Hudson, A. Amanullah, R. van Reis, B.D.Kelley, Exploration of overloaded cation exchange chromatography for monoclonal antibody purification, J Chromatogr A. 1218 (2011) 6943-52).在用沖提緩衝液沖提單體之前加載產物並沖洗管柱。抗體中間體聚集體的結合行為被用於 ADC 純化開發。

d. 分析方法

【0083】 通過 UV-vis 分光光度法 (Agilent 8453) 對蛋白質濃度進行量化。通過在 280 nm 處的吸光度 (減去在 320 nm 或 400 nm 處的吸光度以校正光散射) 確定蛋白質濃度。樣品的消光係數 ϵ 與以下等式一起使用，其中 l 是樣品路徑長度， A_{280} 和 A_{320} 分別是在 280 nm 和 320 nm 處測得的吸光度值。

$$\text{蛋白質濃度} = \frac{A_{280} - A_{320}}{\epsilon \times l} \times \text{稀釋係數}$$

【0084】 使用 TSKgel G3000SWxL 管柱 (7.8 x 300 mm, Tosoh Bioscience, Tokyo, Japan) 藉由 SEC-HPLC 分析蛋白質雜質。使用 15% IPA 和 85% 0.2 M 磷酸鉀、0.25 M 氯化鉀、pH 6.95 的移動相，以等度分離解析峰。流速在環境溫度下保持在 0.5 mL/min，且 UV 偵測保持在 280 nm。圖 1 中示出一個實例色譜圖，其代表了兩種結合物類型。偵測到的兩種主要聚集體物質包括 vHMWS 和 HMWS。HMWS 是蛋白質二聚體，而 vHMWS 是抗體/ADC 的寡聚物。

【0085】 使用分析疏水性交互作用層析 (HIC) 方法確定平均 DAR 和藥物負載分佈，如圖 2 和圖 3 中所示。將樣品注入 Tosoh Bioscience Butyl-NPR 管柱 (4.6 mm x 3.5 cm, 2.5 μ m) 上並在監測吸光度 280 nm 下用溶劑 B 以 0.8 mL/min 的流速在線性梯度上沖提。個體結合物的梯度和溶劑 B 如表 1 所示。

表 1.HIC-HPLC 方法梯度和溶劑 B

分子	梯度，%B	溶劑 B
ADC-1	10-85%，12 分鐘	20% IPA 具有 25 mM 磷酸鈉 pH 5.30
ADC-2	10-45%，60 分鐘	25% IPA 具有 25 mM 磷酸鈉 pH 6.95
ADC-3	0-100%，15 分鐘	25% IPA 具有 25 mM 磷酸鈉 pH 6.95

【0086】 ADC 的純化製程是基於其各自抗體中間體的開發而開發的。每種抗體中間體都根據其特性（例如 *pI*、結合特性等）進行了獨立的純化製程開發，這導致純化製程和操作模式略有不同（表 2）。基於不同的抗體純化步驟，使用不同的方法來開發用於結合分子的流通純化條件，如本文所述。

【0087】 ADC-1：由於抗體-1 使用梯度沖提，因此使用 ADC-1 進行了手動樹脂篩選，並與抗體-1 的 HTS 結果進行了比較。選擇有希望的條件，其包括 $\text{Log}K_p$ （抗體）在 0.75-1.25 之間的條件和緊密結合聚集體但不結合單體以使單體流過管柱的 pH/電導率條件。通過填充床管柱實驗測試有希望的條件，以確定最佳流通條件。

【0088】 ADC-2：沒有對 ADC 進行 HTS，而是利用了抗體-2 開發 HTS 結果。開發了抗體中間體分步沖提條件，使得從管柱中沖提單體同時保留聚集體。將這些條件施加至結合物，使得管柱負載材料將導致產物流通同時去除聚集體。使用填充床管柱實驗評估負載條件對純化能力的穩健性，並評估製造規模的性能。

【0089】 ADC-3：抗體純化條件的理論可以施加至 ADC（用第三種產物進行了測試）。與抗體-2 類似，沒有對 ADC-3 進行 HTS，並且將來自抗體-3

的分步沖提條件施加至 ADC 以流通去除聚集體。進行了單填充床管柱實驗以確認結合物的純化能力。

表 2: 分子細節和 CEX 純化條件。

分子	抗體-1 / ADC-1	抗體-2 / ADC-2	抗體-3 / ADC-3
抗體 CEX 沖提 模式	梯度沖提	分步沖提	分步沖提
抗體 <i>pI</i>	8.4	7.1	7.4
結合化學	鏈間半胱胺 酸	位點特異性	鏈間半胱胺 酸
ADC 中的近似 vHMWS，CEX 負載	0.8%	0.5-0.8%	0.4%

【0090】 除非另有說明，否則將 0.66 cm 內徑 (ID) x 1.0 cm 床高 (BH) 小型色譜管柱用於 ADC 純化運行。此外，調整平衡/沖洗緩衝液條件以便與負載條件相符。ADC 純化的重點是 vHMWS 去除，但也監測 HMWS 去除。此外，不需在純化步驟中改變 DAR 或藥物負載分佈。

【0091】 實例 1：ADC-1 純化方法

【0092】 為了確定 ADC-1 的流通條件，使用多通道移液器及 96 孔盤以 CEX 樹脂進行手動批次結合篩選。在結合行為相似的抗體與結合物之間的結合物篩選結果相當（圖 4）。選擇 214 mM 醋酸鈉 (pH 5.5) 的負載條件（對應於大約 1 的 Log K_p 值）作為靶向條件，以允許單體流通而聚集體保持與樹脂結合。

【0093】 將選定的靶向純化條件施加至 ADC-1，以便可以以流通模式運行純化步驟。將 ADC 負載滴定至靶向電導率和 pH 值，然後加載到管柱上至 500 g/L_r 的負載密度。用 10 CV 的平衡緩衝液沖洗管柱以回收 ADC-1。針對聚

集體藉由 SEC-HPLC 分析負載和匯集，且藉由 HIC-HPLC 針對對 DAR 的影響分析負載和匯集（表 3）。

表 3.ADC-1 純化結果

	vHMWS (%)	HMWS (%)	主峰 (%)	LMWS (%)	平均 DAR
負載	0.74	2.42	96.2	0.69	3.8
匯集	0.10	1.92	97.3	0.64	3.8

【0094】 流通純化條件將 ADC-1 的 vHMWS 成功地降低到 0.10%。實現了 89% 的產率，並且對平均 DAR 或藥物分佈沒有影響。儘管抗體-1 未使用分步沖提進行純化，但本研究表明抗體 HTS 可以用於 ADC 純化開發，且無需使用結合物進行手動批次結合篩選。評估了兩種額外產物，以進一步測試抗體 HTS 結果可以用於鑑定 ADC 純化的流通條件的理論。

【0095】 實例 2：ADC-2 純化方法

- i. 針對抗體-2的高通量篩選
 - a. 使用 HTS 進行抗體-2 CEX 分步沖提的開發。這些實驗生成了 LogK_p 等高線圖，其支援有希望的分步沖提條件的鑑定，這些條件預計會沖提單體，而聚集體雜質仍然與樹脂結合。根據這些資料，針對抗體-2 選擇了靶向沖提緩衝液，且隨後的穩健性研究證實了分步沖提純化的穩健性。
- ii. ADC-2 純化開發
 - b. 在 ADC-2 CEX 步驟的開發期間，利用針對抗體-2 的分步沖提條件來確定條件，以便聚集體與樹脂結合且在所需的產物（單體）流過時被去除。為此，調整管柱平衡、負載和沖洗階段以便與用於抗體-2 製程的沖提條件（pH 和電導率）相符。

c. 在證明在靶向條件下成功去除聚集體後，在一系列 pH 值和電導率條件下圍繞靶向的製程穩健性進行了測試（表 4）。由於降低的 pH 值和降低的電導率，選擇代表針對 CEX 管柱的較強結合條件的「低」條件。相反，經確定「高」負載條件會降低產物的結合，但也可能會減少聚集體的去除。在不同的 pH 值和電導率範圍內測試了多個「高」負載條件，以研究在最壞情況下在聚集體去除方面的操作的穩健性。使用適當的緩衝液物質將結合物負載調整至所需的電導率和 pH 值。調整平衡和沖洗緩衝液以便與負載的各種條件相符。負載密度範圍為 220-300 g/L_r。

表 4.測試的五種負載條件下的 ADC-2 純化結果

負載條件	距離靶向範圍		vHMW S (%)	HMW S (%)	產率 (%)
低	-0.1 pH , -1.0 mS/cm	負載	0.61	0.73	81%
		匯集	0.09	0.13	
標靶	N/A	負載	0.66	0.78	95%
		匯集	0.01	0.57	
高	+0.1 pH , +0.7 mS/cm	負載	0.80	0.80	97%
		匯集	0.02	0.74	
高+	+0.2 pH , +0.7 mS/cm	負載	0.53	1.06	97%
		匯集	0.03	1.07	
高++	+0.2 pH , +1.1 mS/cm	負載	0.57	0.79	98%
		匯集	0.54	0.74	

- d. 「低」負載條件呈現出與樹脂的初始結合和隨後的貫通，類似於純化的過載機制，HMWS 在這種負載條件下也顯著降低（H.F.Liu, B. McCooley, T. Duarte, D.E.Myers, T. Hudson, A. Amanullah, R. van Reis, B.D.Kelley, Exploration of overloaded cation exchange chromatography for monoclonal antibody purification, J Chromatogr A. 1218 (2011) 6943-52).在更高的質量負載密度下提高了產率。「高++」負載條件確定了失效的點並且沒有去除 vHMWS。然而，在「低」與「高+」條件（±0.1 pH，±0.7 mS/cm）之間的靶向負載條件附近的一系列負載條件被證明是穩健的。設置負載和緩衝規格以確保在製造中的穩健實施。
- e. 在表明可接受的操作範圍後，使用 0.66 cm ID x 20 cm BH 管柱將負載密度提高到 500 g/L_r。將結合匯集調整至靶向負載 pH 值和電導率，並加載到管柱至 500 g/L_r。
- f. 高負載密度實驗的產率為 96%，匯集中的 vHMWS 降低至 0.02%（表 5）。此外，純化對平均 DAR 沒有影響。在 500 g/L_r 的負載密度下，將抗體-2 CEX 分步沖提條件以流通模式有效地施加至結合物。

表 5.ADC-2 高負載密度實驗結果

	vHMWS (%)	HMWS (%)	主峰 (%)	LMWS (%)	平均 DAR
負載	0.69	0.77	98.5	0.04	1.8
匯集	0.02	0.68	99.2	0.10	1.8

【0096】 使用 14 cm ID x 15 cm BH 管柱成功地將 ADC-2 純化製程擴大到製造規模。在靶向條件下進行了 3 次運行，每次運行的管柱加載至約 260

g/L_r。原料藥結果顯示沒有可偵測到的 vHMWS，並且符合所有其他產物品質屬性（表 6）。此外，三次運行的色譜圖是一致的，並且在負載階段壓力沒有增加。

表 6.靶向條件下的 ADC-2 製造規模純化結果

運行	vHMWS (%) ^a	HMWS (%) ^a	分步產率 (%)
1	ND	0.3	94
2	ND	0.3	94
3	ND	0.3	95

a. 縮寫：ND = 未偵測到。

^a結果是針對最終原料藥的。未對大規模運行進行製程中匯集分析。

【0097】 實例 3：ADC-3 純化開發

【0098】 與抗體-2 類似，抗體-3 的純化製程採用分步沖提 CEX 步驟來去除聚集體和雜質。在不進行任何 ADC 純化開發的情況下，利用抗體-3 分步沖提條件進行 ADC-3 純化。將抗體分步沖提條件施加至 ADC，以使聚集體與樹脂結合且在所需的產物（單體）流過時被去除。

【0099】 為了實現產物流通，將結合的 ADC-3 的 pH 和電導率調整至靶向抗體-3 的沖提緩衝液條件。將調整後的結合物加載到 CEX 管柱上至負載密度為 500 g/L_r。用 10 CV 的平衡緩衝液沖洗管柱，每 50 g/L_r 收集分液。匯集分液並將結果與負載進行比較（表 7）。

表 7.ADC-3 純化結果

	vHMWS (%)	HMWS (%)	主峰 (%)	LMWS (%)	平均 DAR
負載	0.39	0.43	98.88	0.29	3.4
匯集	0.03	0.41	99.23	0.33	3.4

【0100】觀察到 vHMWS 的小幅貫通在 300 g/L_r 負載密度開始（圖 5）。

為了減低 vHMWS 貫通，使用了較低的負載密度或較強的結合條件。然而，即使在受到 500 g/L_r 負載密度的挑戰時，純化匯集中 vHMWS 的最終水平也會降低到可接受的水平。

【0101】這些結果表明抗體中間純化步驟可以用於 ADC 純化。沒有進行 ADC 純化開發，因為已成功實施抗體-3 分步沖提條件，以使結合物以流通模式運行。流通純化條件成功地將 ADC-3 的 vHMWS 從 0.39% 降低到 0.03%，產率為 98%。此外，對平均 DAR 和藥物分佈沒有影響。

結論

【0102】抗體純化開發資料可以用於其各自結合物之簡單流通純化步驟的簡化開發。抗體分步沖提條件（pH 值和電導率）可以轉化為 ADC 以允許流通純化。在沒有抗體分步沖提條件的情況下，可以利用抗體 HTS 來確定理想的 ADC 流通條件。ADC 純化步驟：

- 顯著降低 vHMWS
- 持續實現高產率
- 沒有改變平均 DAR 或藥物負載分佈

【0103】上述揭示內容可以涵蓋具有獨立效用的多個不同發明。許多變化是可能的，並且如本文所揭示和圖示的其特定實施例不應被認為具有限制意義。以下申請專利範圍特別指出了某些被認為是新穎的和非顯而易見的組合和子組合。可以在主張本申請或相關申請案的優先權的申請中主張以特徵、功能、元素和/或特性的其他組合和子組合體現的發明。此類申請專利範圍，無論是針對不同的發明還是針對相同的發明，以及無論在範圍上是否比原始權利要

求更寬、更窄、相同或不同，都被認為包括在本文所教導的發明之主題範圍內。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種用於降低半胱胺酸導向的抗體藥物結合物 (cys ADC) 中之蛋白質聚集體的濃度之方法，該方法包含以下步驟：

- a. 使用第一組純化條件以陽離子交換層析材料對抗體進行第一純化，以獲得純化的抗體中間體；
- b. 將該純化的抗體中間體與細胞毒性劑結合，以形成包含 cys ADC 及蛋白質聚集體之粗製品；以及
- c. 使用該第一組純化條件以流通模式以陽離子交換層析材料對該粗製品進行第二純化，以產生純化的 cys ADC，

其中該組純化條件包含緩衝系統之負載密度、緩衝液種類、pH 及電導率。

【請求項2】

如請求項 1 之方法，其進一步包含沖洗該陽離子交換層析材料以回收純化的 cys ADC 之額外步驟。

【請求項3】

如請求項 2 之方法，其中該純化的 cys ADC 之產率為 98% w/w 以上。

【請求項4】

如請求項 2 之方法，其中該純化的 cys ADC 中之蛋白質聚集體的濃度相對於 cys ADC 及蛋白質聚集體的粗混合物中之蛋白質聚集體的濃度降低至少 85% 而沒有改變該 cys ADC 之關鍵品質屬性 (CQA)。

【請求項5】

如請求項 1 之方法，其中該等蛋白質聚集體係選自由以下所組成之群組：極高分子量物質 (vHMWS) 及高分子量物質 (HMWS)。

【請求項6】

如請求項 5 之方法，其中該等蛋白質聚集體為 vHMWS。

【請求項7】

如請求項 6 之方法，其中該 vHMWS 為寡聚物。

【請求項8】

如請求項 2 之方法，其中該純化的 cys ADC 中之 vHMWS 降低至小於 0.1%。

【請求項9】

如請求項 2 之方法，其中該 cys ADC 中之 vHMWS 降低至小於 0.02%。

【請求項10】

一種純化半胱胺酸導向的抗體藥物結合物 (cys ADC) 之方法，該方法包含以下步驟：

- a. 使用第一組純化條件以陽離子交換層析材料對抗體進行第一純化，以獲得純化的抗體中間體；
- b. 將該純化的抗體中間體與細胞毒性劑結合，以形成 cys ADC 之粗製品；以及
- c. 使用該第一組純化條件以流通模式以陽離子交換層析材料對該粗製品進行第二純化，以產生純化的 cys ADC，

其中該組純化條件包含緩衝系統之負載密度、緩衝液種類、pH 及電導率。

【請求項11】

如請求項 10 之方法，其進一步包含沖洗該陽離子交換層析材料以回收純化的 cys ADC 之額外步驟。

【請求項12】

如請求項 11 之方法，其中該純化的 cys ADC 之產率為 98% w/w 以上。

【請求項13】

如請求項 1 或請求項 10 之方法，其中該 cys ADC 係選自由以下所組成之群組：經由工程改造之半胱胺酸的位點特異性結合物及靶向天然半胱胺酸之鏈間半胱胺酸 (interchain-cysteine) 結合物。

【請求項14】

如請求項 13 之方法，其中該 cys ADC 為經由工程改造之半胱胺酸的位點特異性結合物。

【請求項15】

如請求項 13 之方法，其中該 cys ADC 為靶向天然半胱胺酸之鏈間半胱胺酸結合物。

【請求項16】

如請求項 1 或請求項 10 之方法，其中該陽離子交換材料為樹脂。

【請求項17】

如請求項 16 之方法，其中該樹脂係選自由以下所組成之群組：POROS 50HS、POROS XS 及 SPFF 樹脂。

【請求項18】

如請求項 17 之方法，其中該樹脂為 POROS XS。

【請求項19】

如請求項 17 之方法，其中該樹脂為 SPFF。

【請求項20】

如請求項 1 或請求項 10 之方法，其中 cys ADC 及蛋白質聚集體的粗混合物之該第二純化中的負載密度為 100 g/L_r 至 1000 g/L_r。

【請求項21】

如請求項 20 之方法，其中 cys ADC 及蛋白質聚集體的該粗混合物之該第二純化中的該負載密度為 500 g/L_r。

【請求項22】

如請求項 1 或請求項 10 之方法，其中使用第一組純化條件對該抗體進行該第一純化以獲得純化的抗體中間體係以結合-洗提 (bind-elute) 模式進行。

【請求項23】

如請求項 1 或請求項 10 之方法，其中該細胞毒性劑係選自由以下所組成之群組：奧瑞他汀 (Auristatins)、美登素類 (Maytansinoids) 及 DNA 損傷劑。

【請求項24】

如請求項 23 之方法，其中該 DNA 損傷劑為選自由以下所組成之群組的衍生物：卡奇黴素 (Calicheamicin)、蒽環類 (Anthracyclines) 及吡咯并苯并二氮呋 (Pyrrolobenzodiazepines)。

【請求項25】

如請求項 24 之方法，其中該細胞毒性劑為吡咯并苯并二氮呋衍生物。

【請求項26】

如請求項 25 之方法，其中該細胞毒性劑為吡咯并苯并二氮呋單醯胺。

【請求項27】

如請求項 23 之方法，其中該細胞毒性劑為奧瑞他汀之衍生物。

【請求項28】

如請求項 27 之方法，其中該細胞毒性劑為 MMAE（單甲基奧瑞他汀 E）。

【請求項29】

如請求項 1 或請求項 10 之方法，其中該細胞毒性劑形成連接子藥物複合物 (linker drug complex)。

【請求項30】

如請求項 29 之方法，其中該連接子藥物複合物為 vcMMAE（單甲基奧瑞他汀 E，具有纈胺酸-瓜胺酸 (vc-) 連接子之細胞毒素）。

