202523676

(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 202523676 A

(43)公開日： 中華民國 114 (2025) 年 06 月 16 日

(21)申請案號：114107974 (22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 11 月 06 日

(51)Int. Cl.： *C07K1/18 (2006.01)* *C07K16/06 (2006.01)*
C07K16/46 (2006.01) *B01D15/36 (2006.01)*

(30)優先權：2019/11/07 美國 62/931,874

(71)申請人：美商安進公司 (美國) AMGEN INC. (US)
美國

(72)發明人：安布哈卡 馬爾哈爾 R AMBHAIKAR, MALHAR R. (IN)；狄雅茲 路易斯 DIAZ, LUIS (US)；歌梅茲 娜塔莉 GOMEZ, NATALIA (US)；提洛斯頓 班傑明 J TILLOTSON, BENJAMIN J. (US)

(74)代理人：陳長文；張哲倫；姚金梅

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：31 項 圖式數：8 共 63 頁

(54)名稱

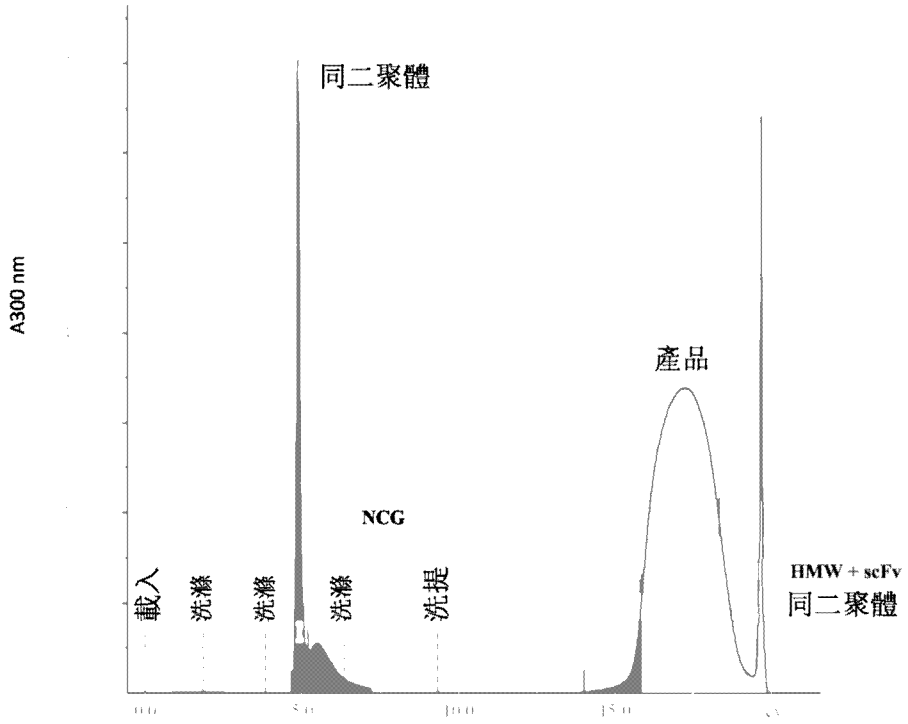
陽離子交換層析期間之高鹽洗滌以去除產品相關的雜質

(57)摘要

本發明關於在陽離子交換純化操作期間去除低等電點產品相關的雜質之方法。

The invention relates to methods for removal of low isoelectric point product-related impurities during cation exchange purification operations.

指定代表圖：



【圖2】

20252076
202411H074
專利案號：114107974
原申請案號：109138883

【發明摘要】

【中文發明名稱】　陽離子交換層析期間之高鹽洗滌以去除產品相關的雜質

【英文發明名稱】　HIGH SALT WASHES DURING CATION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY TO REMOVE PRODUCT-REALATED IMPURITIES

【中文】

本發明關於在陽離子交換純化操作期間去除低等電點產品相關的雜質之方法。

【英文】

The invention relates to methods for removal of low isoelectric point product-related impurities during cation exchange purification operations.

【指定代表圖】　圖2

【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】　陽離子交換層析期間之高鹽洗滌以去除產品相關的雜質

【英文發明名稱】　HIGH SALT WASHES DURING CATION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY TO REMOVE PRODUCT-REALATED IMPURITIES

【技術領域】

【0001】本發明關於生物藥劑製造領域。特別地，本發明關於用於去除多特異性蛋白陽離子交換純化操作中產品相關的雜質之方法。

【先前技術】

【0002】抗體產品係生物藥劑市場上最大之領域，在未來十年內能夠容易達到數千億美元的銷售額。治療性抗體的商業開發開始於1980年代，其中批准了第一批治療性單株抗體，此後其一直在持續發展和擴大。儘管單株抗體能夠以高親和力和特異性與靶標結合，並且已非常成功的用於治療某些適應症，但它們在治療方面也有局限性。單株抗體只能與單一靶標結合；然而，許多疾病係多因性的。在癌症免疫療法中，針對單一靶標的治療可能不足以完全破壞或固定癌細胞。另外，一些接受單株抗體治療的患者可能在一段時間後對治療無響應，或甚至出現耐藥性。

【0003】已開發出新抗體樣結構，例如抗體Fab片段、Fc融合蛋白、抗體-藥物偶聯物、乙二醇工程改造的抗體，尤其是雙特異性和其他多特異性抗體樣結構，以應對該等挑戰。該等抗體樣結構，特別是雙特異性抗體，相對於傳統的單

株抗體治療提供了改進（例如多靶標親和力），並被證明係有效的具有多種形式的新一代生物治療劑，可以開發用於應對甚至更多具有挑戰性的治療適應症。

【0004】 雙特異性抗體係該等抗體樣結構中最多樣化之組，其結構的種類也在不斷增加，以應對更大範圍的治療適應症的挑戰。該等結構將抗體之結合特性與工程改造到該結構中之另外分子特性相結合，以適應靶向疾病適應症的需求。正在開發雙特異性抗體，用於各種適應症和用途，例如將免疫效應細胞重新定向至腫瘤細胞以針對癌症進行免疫應答、阻斷傳訊途徑、靶向腫瘤血管生成、阻斷細胞介素、穿越血腦障壁、診斷測定、治療病原體、並作為遞送劑。（Sedykh等人, Drug Design, Development and Therapy [藥物設計、開發和療法] 18 (12), 195-208, 2018; Walsh, Nature Biotechnology [自然生物技術], 32 (10), 992-1000, 2014; Ecker等人, mAbs 7 (1), 9-14, 2015; Spiess等人, Mol Immunol [分子免疫學] 67, 95-106, 2015；Fan等人, J Hematol & Oncology [血液與腫瘤學雜誌] 8: 130-143, 2015；Williams等人, Process Design for Bispecific Antibodies [雙特異性抗體的過程設計], Biopharmaceutical Processing, Development, Design and Implementation of Processes [生物藥劑加工、開發、設計與過程實現], Jagschies等人編輯, 愛思唯爾有限公司（Elsevier Ltd）, 第837-855頁, 2018）。

【0005】 該等多特異性蛋白的開發帶來了新生物製造挑戰，特別是關於產品不穩定性和低表現產量。特別地，多特異性蛋白的純化由於形成產品相關的變體（例如同二聚體、半抗體、團聚體、高分子量物質和低分子量物質等）而變得複雜。該等產品相關的變體與目標多特異性蛋白分享相似的結構和物理特性，例如電荷，這使其難以在純化期間分離。該等產品有關的雜質降低了多特異性藥物產品之產量及活性。

【0006】在陽離子交換層析單元操作期間，與目標多特異性蛋白具有相似電荷（等電點，pI）的產品相關之雜質可以與多特異性蛋白共洗提，從而使純化複雜並降低產量。在洗提之前分離低pI產品相關的雜質將是有益的。本文所述之發明藉由在陽離子交換層析期間提供高鹽洗滌條件以去除該等低pI產品相關的雜質而滿足了此需求。

【發明內容】

【0007】本發明提供了用於純化多特異性蛋白之方法，該方法包括將包含多特異性蛋白的樣本載入到陽離子交換層析介質上；用至少一種包含100-147 mM氯化鈉的洗滌緩衝液洗滌該陽離子交換介質；並且從陽離子交換層析樹脂洗提該多特異性蛋白。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含100-125 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含100-105 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含105-147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含105-125 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含125-147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽，pH 5.0% ± 0.05%至pH 5.0% ± 0.1%。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽，pH 4.91-5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽，pH 4.9、5.0、或5.1。在另一個相關實施方式中，該洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-125 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-105 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、105-147 mM氯化鈉。

在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、105-125 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、125-147 mM氯化鈉。

【0008】在一個實施方式中，用至少兩種洗滌緩衝液洗滌陽離子交換介質。在一個實施方式中，用至少三種洗滌緩衝液洗滌陽離子交換介質。

【0009】在一個實施方式中，用至少兩種洗滌緩衝液洗滌陽離子交換介質，該等洗滌緩衝液中至少一種包含0-147 mM氯化鈉。在一個相關實施方式中，用至少兩種洗滌緩衝液洗滌陽離子交換介質，該等洗滌緩衝液中至少一種包含0-70 mM氯化鈉。在一個實施方式中，用至少兩種洗滌緩衝液洗滌陽離子交換介質，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉，隨後洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉。在一個相關實施方式中，用包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉的洗滌緩衝液，隨後用選自由以下組成之群組的洗滌緩衝液洗滌該陽離子交換介質：包含乙酸鹽、100 mM氯化鈉的洗滌緩衝液，包含乙酸鹽、105 mM氯化鈉的洗滌緩衝液，或包含乙酸鹽、125 mM氯化鈉的洗滌緩衝液。在一個實施方式中，用包含乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉的洗滌緩衝液，隨後包含乙酸鹽、0-70 mM氯化鈉的洗滌緩衝液洗滌該陽離子交換介質。在一個相關實施方式中，用包含乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉的洗滌緩衝液，隨後包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉的洗滌緩衝液洗滌該陽離子交換介質。在另一個相關實施方式中，用包含乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉的洗滌緩衝液，隨後包含70 mM氯化鈉的洗滌緩衝液洗滌該陽離子交換介質。

【0010】在一個實施方式中，用至少三種洗滌緩衝液洗滌陽離子交換介質：包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉的第一洗滌緩衝液，隨後包含乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉的第二洗滌緩衝液，隨後包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉的第三洗滌緩衝液或包含乙酸鹽、70 mM氯化鈉的洗滌緩衝液。在一個相關實施方式中，用以下洗滌陽離子交換介質：包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉的第一洗滌緩衝液；隨後選自由以

下組成之群組的第二洗滌緩衝液：包含乙酸鹽、100 mM氯化鈉的洗滌緩衝液，包含乙酸鹽、105 mM氯化鈉的洗滌緩衝液，隨後包含乙酸鹽的洗滌緩衝液或包含乙酸鹽、125 mM氯化鈉的洗滌緩衝液；隨後用包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉的第三洗滌緩衝液洗滌。在一個相關實施方式中，用以下洗滌陽離子交換介質：包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉的第一洗滌緩衝液；隨後包含乙酸鹽、147 mM氯化鈉的第二洗滌緩衝液，隨後包含乙酸鹽的洗滌緩衝液洗滌；隨後包含乙酸鹽、70 mM氯化鈉的第三洗滌緩衝液。

【0011】 在一個實施方式中，用2.5 mM/CV的包含147 mM氯化鈉的洗滌緩衝液洗滌陽離子交換介質。

【0012】 在一個實施方式中，藉由梯度將該多特異性蛋白從陽離子交換介質洗提。在一個相關實施方式中，該梯度係線性梯度或步長梯度（step gradient）。在一個相關實施方式中，該梯度係鹽梯度。在一個相關實施方式中，用於形成洗提梯度的緩衝液包含0-1 M氯化鈉。在另一個相關實施方式中，至少一種用於形成洗提梯度的緩衝液包含70-500 mM氯化鈉。在另一個相關實施方式中，至少一種用於形成洗提梯度的緩衝液包含125 mM氯化鈉。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液和一種洗提緩衝液包含125 mM氯化鈉。

【0013】 在一個實施方式中，將該陽離子交換介質載入至少10 g/L的多特異性蛋白。在一個實施方式中，將該陽離子交換介質載入10 g/L至40 g/L的多特異性蛋白。在一個相關實施方式中，將該陽離子交換介質載入15 g/L至30 g/L。在一個相關實施方式中，將該陽離子交換介質載入25 g/L-40 g/L。在一個實施方式中，將該陽離子交換介質載入10 g/L的多特異性蛋白，用包含105 mM氯化鈉的洗滌緩衝液洗滌並以8 mM/CV在鹽梯度中洗提。在一個實施方式中，將該陽離子交換介質載入15 g/L至30 g/L的多特異性蛋白，用包含147 mM氯化鈉的洗滌

緩衝液洗滌。在一個實施方式中，將該陽離子交換介質載入25 g/L至40 g/L的多特異性蛋白，其中至少一種洗滌緩衝液和一種洗提緩衝液包含125 mM氯化鈉。

【0014】 在一個實施方式中，至少一種產品相關的雜質係同二聚體、高分子量物質、半抗體、團聚體、低分子量物質、抗體片段、或輕鏈錯配（mis-assembly）。在一個實施方式中，純化過程包括這樣的單元操作，該操作單元包括根據以上所述之方法進行的陽離子交換層析。

【0015】 在一個實施方式中，以上方法進一步包括，用於純化多特異性蛋白的一個或多個單元操作（在陽離子交換層析步驟之前和/或之後），該單元操作包括親和層析、離子交換層析、疏水相互作用層析柱、和/或混合模式層析柱。

【0016】 在一個實施方式中，該多特異性蛋白係雙特異性蛋白。在一個實施方式中，該多特異性蛋白係雙特異性抗體。在一個實施方式中，根據以上所述之方法產生純化的多特異性蛋白。在一個實施方式中，該陽離子交換層析介質係樹脂。

【0017】 本發明提供了從陽離子交換層析的洗提液中減少低pI產品相關的雜質之方法，該方法包括將包含多特異性蛋白和至少一種具有低於多特異性蛋白的pI的產品相關的雜質的組成物載入到陽離子交換層析介質上；用第一洗滌緩衝液洗滌陽離子交換介質，用包含100-147 mM氯化鈉的第二洗滌緩衝液洗滌陽離子交換介質；從陽離子交換層析樹脂洗提該多特異性蛋白；其中與從相應的在洗滌緩衝液配製物中不含氯化鈉之方法中回收的陽離子交換層析洗提液相比，該陽離子交換層析洗提液具有減少的低pI產品相關的雜質。在一個實施方式中，用第三洗滌緩衝液洗滌陽離子交換介質。

【0018】 本發明提供了在高鹽洗滌條件下進行陽離子交換層析以減少產品相關的雜質之方法，該方法包括將包含多特異性蛋白和至少一種產品相關的雜質的組成物載入到平衡陽離子交換柱上；用至少兩種洗滌緩衝液洗滌該陽離

子交換介質，其中一種洗滌緩衝液包含100-147 mM氯化鈉；並且從陽離子交換層析樹脂洗提結合的多特異性蛋白。在一個實施方式中，在載入組成物前，用不含氯化鈉的緩衝液來平衡陽離子交換介質。

【0019】本發明提供了用於產生分離的、純化的重組多特異性蛋白之方法，該方法包括用表現多特異性蛋白的宿主細胞在生物反應器中建立細胞培養；培養宿主細胞以表現多特異性蛋白；從細胞培養收穫重組多特異性蛋白；親和純化重組多特異性蛋白；將親和純化的重組多特異性蛋白載入到陽離子交換層析樹脂上；用至少一次包括100-147 mM氯化鈉的洗滌來洗滌陽離子交換樹脂；從陽離子交換層析樹脂洗提該多特異性蛋白；並以流過模式將包含重組多特異性蛋白的陽離子交換層析洗提液載入到另外的層析介質上。在一個實施方式中，另外的層析介質選自陽離子交換層析介質、多模式層析介質、疏水相互作用層析介質和羥基磷灰石層析介質。在一個實施方式中，該親和純化的多特異性蛋白在洗提液池中並且使其經受低pH病毒滅活，隨後在載入到陽離子交換介質上之前進行中和。在一個實施方式中，使來自第三層析介質的流過物經受超濾和滲濾單元操作。在一個實施方式中，根據以上所述之方法製成分離的、純化的重組多特異性蛋白。在一個實施方式中，用以上所述之方法產生包含分離的、純化的重組多特異性蛋白的藥物組成物。

【圖式簡單說明】

【0020】[圖1]示出了隨主產品（雙特異性#1）一起洗提的產品相關的雜質（同二聚體，NCG）。

【0021】 [圖2]示出了在高鹽洗滌條件下，將所有在pI方面低於主產品的產品相關的雜質在第二和第三次洗滌步驟之間從柱洗出。洗提前基線恢復為零。洗提峰減少到一個峰。

【0022】 [圖3]示出了柱上殘留了多種雜質，並隨主產品一起洗提。該等雜質包括半抗體（級分1-4，其中約50%半抗體）、2X輕鏈錯配（級分5和6）和高分子量（級分12-21）。

【0023】 [圖4]示出了高鹽洗滌導致洗提曲線中峰的數量從四個峰減少到一個帶有小肩峰的單峰，該峰仍含有2X LC2錯配的物質（與預期比率為1相比LC1/LC2 < 0.11）。

【0024】 [圖5]示出了在陡峭的洗提梯度下高負載密度導致的單一洗提峰。在高負載密度下，低pI產品相關的雜質不能從主產品分離，並且主要存在於級分1-3中，如降低的CE-SDS所示。

【0025】 [圖6]示出了以較緩的梯度降低載入密度導致主要的低pI產品雜質分離成含有錯配的LC1物質的明顯峰。

【0026】 [圖7]示出了高鹽洗滌之結果。洗提曲線中雜質峰的數量減少，大部分雜質在第二和第三次洗滌步驟期間被去除。第三洗滌步驟在洗提開始之前將UV基線重新設置為零，從而收緊了洗提曲線，導致主產品有效的多的收集和更好品質。

【0027】 [圖8]示出了在高鹽洗滌條件下，所有低pI產品相關的雜質（pI為6.8的同二聚體物質和任何具有低pI的聚集物質）在「洗滌池」中都流經柱進入廢物或單獨收集，以測試其內含物。洗提前基線恢復為零。洗提峰減少到一個峰。

【實施方式】

【0028】因為文獻中關於多特異性蛋白的下游處理的資訊不是很多，因此經常應用為單株抗體開發的平臺（Shulka和Norman, 第26章Downstream Processing of Fc Fusion Proteins, Bispecific Antibodies, and Antibody-Drug Conjugates [Fc融合蛋白、雙特異性抗體和抗體藥物軛合物（conjugate）的下游處理], 在第二版Process Scale Purification of Antibodies [抗體的生產規模純化] 中, Uwe Gottswchalk編輯, 第559-594頁, John Wiley & Sons [約翰威立父子公司], 2017）。將多特異性蛋白進行高度工程改造，在對於抗體典型的條件下，以結合和洗提模式對此類蛋白進行陽離子交換層析（CEX）可能不足以穩定多特異性蛋白和/或管理隨主產品一起洗提的產品相關的雜質。該等產品相關的雜質的等電點均低於和高於主要產品。發現那些pI低於主產品的產品相關雜質隨主產品一起洗提，如前峰。這樣的洗提曲線不支持強健、可持續、商業規模的製造製程之發展。

【0029】發現使用高鹽洗滌策略產生主產品的更好產量和純度，並改善製造製程。在洗提步驟之前添加高鹽洗滌藉由將較低pI產品相關的雜質除去，從而降低洗提液池中此較低pI產品相關的雜質。添加含105-147 mM範圍內的氯化鈉的洗滌步驟會導致產品相關的雜質的pI低於洗提步驟前從陽離子交換介質中洗滌出或洗提的主要產品，這減少了洗提曲線中峰的數量。當存在前峰時，基於OD的洗提液自動合併變得很困難。發現將高鹽洗滌步驟合併到陽離子交換層析方案減少了洗提前與低pI產品相關的雜質相關的前峰，從而減少了在洗提期間收集主產品過程中使用的更為保守的策略的需求，這可能會導致產量更低和製造製程不穩健。

【0030】本發明提供了用於純化多特異性蛋白之方法，該方法包括將包含多特異性蛋白的樣本載入到陽離子交換層析介質上；用至少一種包含100-147

mM氯化鈉的洗滌緩衝液洗滌該陽離子交換介質；並且從陽離子交換層析樹脂洗提該多特異性蛋白。

【0031】 本發明提供了從陽離子交換層析的洗提液中減少低pI產品相關的雜質之方法，該方法包括將包含多特異性蛋白和至少一種具有低於多特異性蛋白的pI的產品相關的雜質的組成物載入到陽離子交換層析介質上；用第一洗滌緩衝液洗滌陽離子交換介質，用包含100-147 mM氯化鈉的第二洗滌緩衝液洗滌陽離子交換介質；從陽離子交換層析樹脂洗提該多特異性蛋白；其中與從相應的在洗滌緩衝液配製物中不含氯化鈉之方法中回收的陽離子交換層析洗提液相比，該陽離子交換層析洗提液具有減少的低pI產品相關的雜質。

【0032】 本發明提供了在高鹽洗滌條件下進行陽離子交換層析以減少產品相關的雜質之方法，該方法包括將包含多特異性蛋白和至少一種產品相關的雜質的組成物載入到平衡陽離子交換柱上；用至少兩種洗滌緩衝液洗滌陽離子交換介質，其中一種洗滌緩衝液包含100-147 mM氯化鈉；並且從陽離子交換層析樹脂洗提結合的多特異性蛋白。

【0033】 本發明提供了用於產生分離的、純化的重組多特異性蛋白之方法，該方法包括用表現多特異性蛋白的宿主細胞在生物反應器中建立細胞培養；培養宿主細胞以表現多特異性蛋白；從細胞培養收穫重組多特異性蛋白；親和純化重組多特異性蛋白；將親和純化的重組多特異性蛋白載入到陽離子交換層析樹脂上；用至少一次包括100-147 mM氯化鈉的洗滌來洗滌陽離子交換樹脂；從陽離子交換層析樹脂洗提該多特異性蛋白；並以流過模式將包含重組多特異性蛋白的陽離子交換層析洗提液載入到第三層析介質上。

【0034】 本發明提供了包括這樣的單元操作的純化過程，該單元操作包括根據本文所述之方法進行的陽離子交換層析。

【0035】 本發明提供了根據以上所述之方法產生的純化的多特異性蛋白。

【0036】本發明提供了根據以上所述之任何方法產生的包含分離的、純化的重組多特異性蛋白的藥物組成物。

【0037】在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含0-147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含70-147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含100-147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含100-125 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含100-105 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含105-147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含105-125 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含125-147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含0、70、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、142、144、145、146、或147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含0 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含70 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含100 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含105 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含125 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含147 mM氯化鈉。

【0038】在本發明之一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽，pH為5.0 ± 0.05至5.0 ± 0.1。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽，pH 4.9-5.1。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽，pH 4.9、5.0、或5.1。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽，pH 5.0% ± 0.05%至pH 5.0% ± 0.1%。在一個實施方式中，

至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽，pH 4.9-5.1。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽，pH 4.9、5.0、或5.1。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽，pH 5.0。洗滌緩衝液可以高或低0.05至0.1個pH單位（電導率發生變化）以穩健去除產品相關的雜質。

【0039】 在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0-147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、70-147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-125 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-105 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、105-147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、105-125 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、125-147 mM氯化鈉。在一個相關實施方式中，乙酸鹽濃度為100 mM。

【0040】 在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、70 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、105 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、125 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、147 mM氯化鈉。在一個相關實施方式中，乙酸鹽濃度為100 mM。

【0041】 在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0-147 mM氯化鈉，pH 5.0% ± 0.05%至pH 5.0% ± 0.1%。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、70-147 mM氯化鈉，pH 5.0% ± 0.05%至pH 5.0% ± 0.1%。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉，pH 5.0%

± 0.05%至pH 5.0% ± 0.1%。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-125 mM氯化鈉，pH 5.0% ± 0.05%至pH 5.0% ± 0.1%。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-105 mM氯化鈉，pH 5.0% ± 0.05%至pH 5.0% ± 0.1%。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、105-147 mM氯化鈉，pH 5.0% ± 0.05%至pH 5.0% ± 0.1%。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、105-125 mM氯化鈉，pH 5.00% ± 0.05%至pH 5.0% ± 0.1%。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、125-147 mM氯化鈉，pH 5.00% ± 0.05%至pH 5.0% ± 0.1%。在一個相關實施方式中，乙酸鹽濃度為100 mM。

【0042】在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉，pH 5.00% ± 0.05%至pH 5.0% ± 0.1%。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、70 mM氯化鈉，pH 5.00% ± 0.05%至pH 5.0% ± 0.1%。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100 mM氯化鈉，pH 5.00% ± 0.05%至pH 5.0% ± 0.1%。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、105 mM氯化鈉，pH 5.00% ± 0.05%至pH 5.0% ± 0.1%。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、125 mM氯化鈉，pH 5.00% ± 0.05%至pH 5.0% ± 0.1%。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、147 mM氯化鈉，pH 5.00% ± 0.05%至pH 5.0% ± 0.1%。在一個相關實施方式中，乙酸鹽濃度為100 mM。

【0043】在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0-147 mM氯化鈉，pH 4.9-5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、70-147 mM氯化鈉，pH 4.9-5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉，pH 4.9-5.1。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-125 mM氯化鈉，pH 4.9-5.1。在一個相關實施方式

中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-105 mM氯化鈉，pH 4.9-5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、105-147 mM氯化鈉，pH 4.9-5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、105-125 mM氯化鈉，pH 4.9-5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、125-147 mM氯化鈉，pH 4.9-5.1。在一個相關實施方式中，乙酸鹽濃度為100 mM。

【0044】 在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉，pH 4.9-5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、70 mM氯化鈉，pH 4.9-5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100 mM氯化鈉，pH 4.9-5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、105 mM氯化鈉，pH 4.9-5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、125 mM氯化鈉，pH 4.9-5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、147 mM氯化鈉，pH 4.9-5.1。在一個相關實施方式中，乙酸鹽濃度為100 mM。

【0045】 在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0-147 mM氯化鈉，pH 4.9、5.0或5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、70-147 mM氯化鈉，pH 4.9、5.0或5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉，pH 4.9、5.0或5.1。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-125 mM氯化鈉，pH 4.9、5.0或5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-105 mM氯化鈉，pH 4.9、5.0或5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、105-147 mM氯化鈉，pH 4.9、5.0或5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、105-125 mM氯化鈉，pH 4.9、5.0或5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、125-147 mM氯化鈉，pH 4.9、5.0或5.1。在一個相關實施方式中，乙酸鹽濃度為100 mM。

【0046】在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉，pH 4.9、5.0或5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、70 mM氯化鈉，pH 4.9、5.0或5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100 mM氯化鈉，pH 4.9、5.0或5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、105 mM氯化鈉，pH 4.9、5.0或5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、125 mM氯化鈉，pH 4.9、5.0或5.1。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、147 mM氯化鈉，pH 4.9、5.0或5.1。在一個相關實施方式中，乙酸鹽濃度為100 mM。

【0047】在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、100 mM氯化鈉，pH 5.0% ± 0.5%至pH 5.0 ± 0.1。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、105 mM氯化鈉，pH 5.0% ± 0.5%至pH 5.0 ± 0.1。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、125 mM氯化鈉，pH 5.0% ± 0.5%至 ± 0.1。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、147 mM氯化鈉，pH 5.0% ± 0.5%至pH 5.0 ± 0.1。在本發明之一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、70 mM氯化鈉，pH 5.0% ± 0.5%至pH 5.0 ± 0.1。在本發明之一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、0 mM氯化鈉，pH 5.0% ± 0.5%至pH 5.0 ± 0.1。

【0048】在本發明之一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、0-147 mM氯化鈉，pH 5.0。在本發明之一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、70-147 mM氯化鈉，pH 5.0。在本發明之一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、100-125 mM氯化鈉，pH 5.0。在本發明之一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、100-105 mM氯化鈉，pH 5.0。在本發明之一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、105-147 mM氯化鈉，pH 5.0。在本發明之一個實施方式中，至少一

種洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、105-125 mM氯化鈉，pH 5.0。在本發明之一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、125-147 mM氯化鈉，pH 5.0。洗滌緩衝液可以高或低0.05至0.1個pH單位（電導率發生變化）以穩健去除產品相關的雜質。

【0049】在一個實施方式中，用至少兩種洗滌緩衝液洗滌陽離子交換介質。在一個實施方式中，該洗滌緩衝液包含0-147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含0、70、100、105、125、或147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，該洗滌緩衝液包含乙酸鹽。在一個實施方式中，該洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液的pH係5.0% ± 0.05%至pH 5.0% ± 0.1%。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液的pH係4.9-5.1。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液的pH係4.9、5.0、或5.1。在一個實施方式中，用至少兩種洗滌緩衝液洗滌陽離子交換介質：至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0-70 mM氯化鈉，並且至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-147 mM鈉。在一個實施方式中，用至少兩種洗滌緩衝液洗滌陽離子交換層析介質：一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉，隨後包含乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉的洗滌緩衝液。在一個實施方式中，用至少兩種洗滌緩衝液洗滌陽離子交換層析介質：一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉，隨後包含乙酸鹽、0-70 mM氯化鈉的洗滌緩衝液。在一個實施方式中，用至少兩種洗滌緩衝液洗滌陽離子交換層析介質：第一洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0 mM NaCl，並且第二洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，第二洗滌緩衝液的氯化鈉濃度選自100、105、125和147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，用至少兩種洗滌緩衝液洗滌陽離子交換層析介質：第一洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-147 mM NaCl，並且第二洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0-70 mM氯化鈉。在一個實施方式中，第一洗滌緩衝液的氯化鈉濃度選自100、105和147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，該

第一緩衝液濃度的濃度係100 mM乙酸鹽、0 mM氯化鈉，並且第二洗滌緩衝液的濃度係100 mM乙酸鹽、125 mM氯化鈉。

【0050】在一個實施方式中，用至少三種洗滌緩衝液洗滌陽離子交換介質。在一個實施方式中，該洗滌緩衝液包含0-147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含0、70、100、105、125、或147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，該洗滌緩衝液包含乙酸鹽。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液的pH係5.0%±0.05%至pH 5.0%±0.1%。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液的pH係4.9-5.1。在一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液的pH係4.9、5.0、或5.1。

【0051】在一個實施方式中，用至少三種洗滌緩衝液洗滌陽離子交換介質：至少兩種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0-70 mM氯化鈉，並且至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-147 mM鈉。在一個實施方式中，用至少三種洗滌緩衝液洗滌陽離子交換層析介質，一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉；隨後包含乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉的洗滌緩衝液；隨後包含乙酸鹽、0-70 mM氯化鈉的洗滌緩衝液。在一個實施方式中，該第一洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0 mM NaCl；第二洗滌緩衝液包含乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉；並且第三洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0-70 mM氯化鈉。在一個實施方式中，第一洗滌緩衝液的氯化鈉濃度為0 mM氯化鈉。在一個實施方式中，第二洗滌緩衝液的氯化鈉濃度選自100、105和147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，第三洗滌緩衝液的氯化鈉濃度選自0和70 mM氯化鈉。在一個實施方式中，該第一洗滌緩衝液濃度係100 mM乙酸鹽、0 mM氯化鈉；第二洗滌緩衝液選自100 mM乙酸鹽、100 mM氯化鈉和100 mM乙酸鹽、105 mM氯化鈉；並且第三洗滌緩衝液係100 mM乙酸鹽、0 mM氯化鈉。在一個實施方式中，該第一洗滌緩衝液係100 mM乙酸鹽、0 mM氯化鈉；第二洗滌緩衝

液係100 mM乙酸鹽、147 mM氯化鈉並且第三洗滌緩衝液係100 mM乙酸鹽、70 mM氯化鈉。

【0052】在一個實施方式中，用2.5 mM/CV的包含147 mM氯化鈉的洗滌緩衝液洗滌陽離子交換樹脂。

【0053】在一個實施方式中，藉由梯度將該多特異性蛋白從陽離子交換介質洗提。在一個相關實施方式中，該梯度係線性梯度或步長梯度。在一個相關實施方式中，該梯度係鹽梯度。在一個相關實施方式中，至少一種用於形成洗提梯度的緩衝液包含0-1 M氯化鈉。在一個相關實施方式中，至少一種用於形成洗提梯度的緩衝液包含70-500 mM氯化鈉。

【0054】在一個實施方式中，至少一種用於形成洗提梯度的緩衝液包含125 mM氯化鈉。在一個相關實施方式中，至少一種洗滌緩衝液和一種洗提緩衝液包含125 mM氯化鈉。

【0055】在一個實施方式中，在載入組成物前，用不含氯化鈉的緩衝液來平衡陽離子交換介質。

【0056】在一個實施方式中，將該陽離子交換介質載入10 g/L的多特異性蛋白，用包含105 mM氯化鈉的洗滌緩衝液洗滌並以8 mM/CV在鹽梯度中洗提。

【0057】在一個實施方式中，至少一種產品相關的雜質係同二聚體、高分子量物質、半抗體、團聚體、低分子量物質、抗體片段、或輕鏈錯配。

【0058】在一個實施方式中，該親和純化的多特異性蛋白在洗提液池中並且使其經受低pH病毒滅活，隨後在載入到陽離子交換介質上之前進行中和。

【0059】在一個實施方式中，該陽離子交換層析介質係樹脂。

【0060】在一個實施方式中，該第三層析介質選自陽離子交換層析介質、多模式層析介質、疏水相互作用層析介質和羥基磷灰石層析介質。在一個實施方式中，使來自第三層析介質的流過物經受超濾和滲濾單元操作。

【0061】在一個實施方式中提供了，用於純化多特異性蛋白的一個或多個單元操作（在陽離子交換層析步驟之前和/或之後），該單元操作包括親和層析、離子交換層析、疏水相互作用層析柱、和/或混合模式層析柱。

【0062】在一個實施方式中，該多特異性蛋白係雙特異性蛋白。在一個實施方式中，該多特異性蛋白係雙特異性抗體。

【0063】「多特異性」、「多特異性蛋白」和「多特異性抗體」在本文用於指重組工程化以同時結合和中和同一抗原上的至少兩個不同抗原或至少兩個不同表位的蛋白。例如，多特異性蛋白可以被工程化以靶向與針對腫瘤的靶向細胞毒性劑或感染劑組合的免疫效應子。已發現該等多特異性蛋白可藉由將免疫效應子細胞重定向至腫瘤細胞、藉由阻斷傳訊途徑修飾細胞傳訊、靶向腫瘤血管生成、阻斷細胞介素、以及作為藥物的預靶向遞送媒介物（如遞送化學治療劑、放射性標記（以改善檢測靈敏度）和奈米顆粒（定向到特定的細胞/組織，如癌細胞））而用於多種應用，如在癌症免疫療法中。

【0064】最常見和最多樣化的多特異性蛋白係結合兩種抗原的蛋白，在本文中稱為「雙特異性」、「雙特異性蛋白」和「雙特異性抗體」。雙特異性蛋白可分為兩大類：免疫球蛋白G（IgG）樣分子和非IgG樣分子。IgG樣分子保留Fc介導的效應子功能，如抗體依賴性細胞介導的細胞毒性（ADCC）、補體依賴性細胞毒性（CDC）和抗體依賴性細胞吞噬作用（ADCP），Fc區有助於改善溶解性和穩定性並且促進一些純化操作。非IgG樣分子較小，可增強組織穿透力（參見Sedykh等人, Drug Design, Development and Therapy [藥物設計、開發與療法] 18 (12), 195-208, 2018；Fan等人, J Hematol & Oncology [血液與腫瘤學雜誌] 8: 130-143, 2015；Spiess等人, Mol Immunol [分子免疫學] 67, 95-106, 2015；Williams等人, 第41章 Process Design for Bispecific Antibodies in Biopharmaceutical Processing Development [生物藥劑加工開發中雙特異性抗體的過程設計], Design and

Implementation of Manufacturing Processes [製造過程的設計與實現], Jagschies等人編輯, 2018, 第837-855頁。雙特異性蛋白有時被用作具有對不同抗原或表位數目的結合特異性的另外組分的框架，增加了分子的結合特異性。

【0065】 包括雙特異性抗體的雙特異性蛋白的形式正在不斷發展，並且包括但不限於四源雜交瘤（quadromas）、杵臼結構（knobs-in-holes）、交叉單株抗體（cross-Mab）、雙可變結構域IgG（DVD-IgG）、IgG-單股Fv（scFv）、scFv-CH3 KIH、雙功能Fab（DAF）、半-分子交換、κλ-體、串聯scFv、scFv-Fc、雙抗體、單股雙抗體（sc雙抗體）、sc雙抗體-CH3、三抗體、微型抗體、微型體、TriBi微型體、串聯雙抗體、sc雙抗體-HAS、串聯scFv-毒素、雙親和重定向分子（dual-affinity retargeting molecule（DART））、奈米抗體、奈米抗體-HSA、對接和鎖定（DNL）、股交換工程化結構域SEED體（SEEDbody）、三功能抗體（Triomab）、白胺酸拉鍊（LUZ-Y）、XmAb®；Fab-臂交換、DutaMab、DT-IgG、電荷對（charged pair）、Fcab、正交Fab、IgG（H）-scFv、scFV-（H）IgG、IgG（L）-scFV、IgG（L1H1）-Fv、IgG（H）-V、V（H）-IgG、IgG（L）-V V（L）-IgG、KIH IgG-scFab、2scFV-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig、Zy體、DVI-Ig4（四位一體）、Fab-scFv、scFv-CH-CL-scFV、F（ab’）2-scFv2、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四價HCAb、sc雙抗體-Fc、雙抗體-Fc、胞內抗體、ImmTAC、HSA體（HSABody）、IgG-IgG、Cov-X-體、scFv1-PEG-scFv2、雙特異性T細胞銜接子（BITE®）和半衰期延長的雙特異性T細胞銜接子（HLE BITE®）（Fan, 同上；Spiess, 同上；Sedykh, 同上；Seimetz等人, Cancer Treat Rev [癌症治療評論] 36 (6) 458-67, 2010；Shulka和Norman, 第26章 Downstream Processing of Fc Fusion Proteins, Bispecific Antibodies, and Antibody-Drug Conjugates [Fc融合蛋白、雙特異性抗體和抗體藥物軛合物的下游處理], 在第二版Process Scale Purification of Antibodies [抗體的生產規模純化] 中,

Uwe Gottswchalk編輯, p559-594, John Wiley & Sons [約翰威立父子公司], 2017；Moore等人, MAbs 3: 6，546-557，2011）。

【0066】在一些實施方式中，雙特異性蛋白可以包括博納吐單抗、卡妥索單抗、厄妥索單抗、索利托單抗、targomiRs、魯吉珠單抗（ABT981）、伐努賽珠單抗（RG7221）、王托魯單抗（ABT122）、ozoralixumab（ATN103）、floteuzmab（MGD006）、帕妥昔珠單抗（AMG112、MT112）、lymphomun（FBTA05）、（ATN-103）、AMG211（MT111、Medi-1565）、AMG330、AMG420（B1836909）、AMG-110（MT110）、MDX-447、TF2、rM28、HER2Bi-aATC、GD2Bi-aATC、MGD006、MGD007、MGD009、MGD010、MGD011（JNJ64052781）、IMCgp100、錮標記的IMP-205、xm734、LY3164530、OMP-305BB3、REGN1979、COV322、ABT112、ABT165、RG-6013（ACE910）、RG7597（MEDH7945A）、RG7802、RG7813（RO6895882）、RG7386、BITS7201A（RG7990）、RG7716、BFKF8488A（RG7992）、MCLA-128、MM-111、MM141、MOR209/ES414、MSB0010841、ALX-0061、ALX0761、ALX0141；BII034020、AFM13、AFM11、SAR156597、FBTA05、PF06671008、GSK2434735、MEDI3902、MEDI0700、MEDI7352、以及其分子或變體或類似物，和上述任何一種的生物仿製藥。

【0067】雙特異性蛋白還包括三特異性抗體、四價雙特異性抗體、不含抗體組分多特異性蛋白（如雙抗體、三抗體或四抗體、微型體）、和能夠結合多個靶標的單鏈蛋白。Coloma, M.J. 等人, Nature Biotech [自然生物技術]. 15 (1997) 159-163

【0068】在一些實施方式中，目的多特異性蛋白與以下特異性結合、中和、和/或相互作用：一種或多種CD蛋白、HER受體家族蛋白、細胞黏附分子、生長因子、神經生長因子、成纖維細胞生長因子、轉化生長因子（TGF）、胰島素樣生長因子、骨誘導因子、胰島素和胰島素相關蛋白、凝血和凝血相關蛋白、群落

刺激因子（CSF）、其他血液和血清蛋白血型抗原；受體、受體相關蛋白、生長激素、生長激素受體、T細胞受體；神經營養因子、神經營養蛋白、鬆弛素（relaxin）、干擾素、白介素、病毒抗原、脂蛋白、整合素、類風濕因子、免疫毒素、表面膜蛋白、運輸蛋白、歸巢受體、位址素、調節蛋白和免疫黏附素。

【0069】在一些實施方式中，目的多特異性蛋白單獨或以任何組合與以下一種或多種蛋白質結合、中和、和/或相互作用：CD蛋白（包括但不限於CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD19、CD20、CD22、CD25、CD30、CD33、CD34、CD38、CD40、CD70、CD123、CD133、CD138、CD171和CD174）、HER受體家族蛋白（包括例如HER2、HER3、HER4和EGF受體）、EGFRvIII、細胞黏附分子（例如LFA-1、Mol、p150,95、VLA-4、ICAM-1、VCAM和αv/β3整合素）、生長因子（包括但不限於例如血管內皮生長因子（「VEGF」））；VEGFR2、生長激素、促甲狀腺激素、卵泡刺激素、黃體生成素、生長激素釋放因子、甲狀旁腺激素、米勒管抑制物質（mullerian-inhibiting substance）、人巨噬細胞炎性蛋白（MIP-1-α）、促紅血球生成素（EPO）、神經生長因子（如NGF-β）、血小板源性生長因子（PDGF）、成纖維細胞生長因子（包括例如aFGF和bFGF）、表皮生長因子（EGF）、Cripto、轉化生長因子（TGF）（尤其包括TGF-α和TGF-β（包括TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、TGF-β4或TGF-β5））、胰島素樣生長因子-I和胰島素樣生長因子-II（IGF-I和IGF-II）、des(1-3)-IGF-I（腦IGF-I）和骨誘導因子、胰島素和胰島素相關蛋白（包括但不限於胰島素、胰島素A鏈、胰島素B鏈、胰島素原和胰島素樣生長因子結合蛋白）；（凝血蛋白和凝血相關蛋白，尤其如，VIII因子、組織因子、範威爾邦德（von Willebrand）因子、蛋白C、α-1-抗胰蛋白酶、纖溶酶原活化劑（如尿激酶和組織纖溶酶原活化劑（「t-PA」））、邦巴辛（bombazine）、凝血酶、血小板生成素和血小板生成素受體、群落刺激因子（CSF）（尤其包括以下物質：M-CSF、GM-CSF和G-CSF）、其他血液和血清

蛋白（包括但不限於白蛋白、IgE和血型抗原）、受體和受體相關蛋白（包括例如flk2/flt3受體、肥胖（OB）受體、生長激素受體和T細胞受體）；神經營養因子，包括但不限於骨源性神經營養因子（BDNF）和神經營養蛋白-3、神經營養蛋白-4、神經營養蛋白-5或神經營養蛋白-6（NT-3、NT-4、NT-5或NT-6）；鬆弛素A鏈、鬆弛素B鏈和鬆弛素原、干擾素（包括例如干擾素α、干擾素β和干擾素γ）、白介素（IL）（例如IL-1至IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-23、IL-12/IL-23、IL-2Ra、IL1-R1、IL-6受體、IL-4受體和/或IL-13受體、IL-13RA2或IL-17受體、IL-1RAP；病毒抗原，包括但不限於AIDS有包膜病毒抗原、脂蛋白、降鈣素、升糖素、心鈉素、肺表面活性劑、腫瘤壞死因子-α和腫瘤壞死因子-β、腦啡肽酶、BCMA、STEAP1、IgKappa、ROR-1、ERBB2、間皮素、RANTES（受激活調節的正常T細胞表現與分泌因子）、小鼠促性腺激素相關肽、DNA酶、FR-α、抑制素和活化素、整合素、蛋白A或D、類風濕因子、免疫毒素、骨成形性蛋白質（BMP）、超氧化物歧化酶、表面膜蛋白、衰變加速因子（DAF）、AIDS包膜、運輸蛋白、歸巢受體、MIC（MIC-a、MIC-B）、ULBP 1-6、EPCAM、位址素、調節蛋白、免疫黏附素、抗原結合蛋白、生長激素、CTGF、CTLA4、嗜酸性粒細胞趨化因子（eotaxin）-1、MUC1、CEA、c-MET、密蛋白（Claudin）-18、GPC-3、EPHA2、FPA、LMP1、MG7、NY-ESO-1、PSCA、神經節苷脂GD2、神經節苷脂GM2、BAFF、OPGL（RANKL）、肌生成抑制素、Dickkopf-1（DKK-1）、Ang2、NGF、IGF-1受體、肝細胞生長因子（HGF）、TRAIL-R2、c-Kit、B7RP-1、PSMA、NKG2D-1、計劃性細胞死亡蛋白1和配位基、PD1和PDL1、甘露糖受體/hCGβ、TNF、TL1A、丙型肝炎病毒、間皮素dsFv[PE38軛合物、嗜肺軍團菌（lly）、IFNγ、γ干擾素誘導蛋白10（IP10）、IFNAR、TALL-1、胸腺基質淋巴細胞生成素（TSLP）、前蛋白轉化酶枯草桿菌蛋白酶/Kexin 9型（PCSK9）、幹細胞因子、Flt-3、降鈣素基因相關肽（CGRP）、OX40L、α4β7、血小板特異性

（血小板糖蛋白IIb/IIIb（PAC-1）、轉化生長因子β（TFGβ）、透明帶精子結合蛋白3（ZP-3）、TWEAK、血小板衍生的生長因子受體α（PDGFRα）、硬化蛋白（sclerostin）、以及任何前述內容的生物活性片段或變體。

【0070】在一些實施方式中，目的多特異性蛋白可以包括這樣的雙特異性抗體，該雙特異性抗體與包括CD3和CD19、EpCAM、CEA、PSA、CD33、BCMA、Her2、CD20、P-鈣黏素、CD123、gpA33、或B7H3之組合特異性結合。在一些實施方式中，目的雙特異性抗體可以包括這樣的雙特異性抗體，該雙特異性抗體與包括IL1α + IL1β之組合特異性結合。

【0071】多特異性蛋白可能具有科學意義或商業意義，特別是基於雙特異性之治療法。可以以多種方式產生多特異性蛋白，最常見的藉由使用細胞培養方法重組動物細胞系的方式。多特異性蛋白可以在細胞內產生或分泌到可以從中回收和/或收集的培養基中，並且可以稱為「重組多特異性蛋白」、「重組多特異性抗體」、「重組雙特異性蛋白」和「重組雙特異性抗體」。術語「分離的多特異性蛋白」、「分離的重組多特異性抗體」、「分離的雙特異性蛋白」和「分離的雙特異性抗體」係指已經從蛋白質、多肽、DNA和/或其他污染物或雜質（例如會干擾其治療、診斷、預防、研究或其他用途的產品相關的雜質，特別是低pI產品相關的雜質）中純化出的多特異性蛋白，包括雙特異性蛋白。目的多特異性蛋白包括藉由結合兩個或更多個靶、特別是下面列出的那些中的靶而發揮治療作用的多特異性抗體，包括從其衍生的靶、與其相關的靶及其修飾。

【0072】「純化」意味著藉由從組成物中去除（部分或完全）至少一種產品相關的雜質來提高組成物中多特異性蛋白之純度。藉由下游單元操作（特別是那些涉及離子交換層析的操作）來完成多特異性蛋白的回收和純化，從而產生更「均質的」多特異性蛋白組成物，其滿足產量和產品品質目標（例如減少產品相關的雜質和提高產品品質）。

【0073】「產品相關的雜質」係指產品相關的目的多特異性蛋白的變體。在某些情況下，洗提峰中該等雜質的pI低於主產品。產品相關的雜質包括，例如，同二聚體、高分子量（HMW）物質、半抗體、團聚體、低分子量（LMW）物質、抗體片段和抗體片段的多種組合、以及輕鏈錯配，例如2XLC、3XLC或4XLC。「半抗體」係指可能（例如）由於兩個重鏈多肽之間的不完全組裝或相互作用的破壞而形成的產品相關的雜質。半抗體包含單個輕鏈多肽和單個重鏈多肽。「同二聚體」係指可能（例如）當對同一靶標具有特異性的重鏈和輕鏈彼此重組而不是配對以形成所需的雙特異性異二聚體時而形成的產品相關的雜質。這典型地在宿主細胞中表現期間發生。對於需要多條鏈（例如輕鏈，LC）藉由程改造的殘基（例如帶電荷的成對突變，杵臼結構等）以正確配對的多特異性構建體，在LC和HC之間錯配時，仍然可能存在雜質，其中LC1不是與HC1配對，而是錯誤地與HC2（2xLC1）配對，反之亦然（2x LC2）。如果多特異性蛋白係二價的，具有兩個與每個目標抗原結合的位點，則可能具有3X LC1、4X LC1和錯配物種的其他組合。

【0074】如本文所揭露的，產品相關的雜質的pI可以低於所需的多特異性蛋白的pI，並隨主產品洗提。具有較低pI的產品相關的雜質在主產品之前洗提出來。蛋白質的「等電點」或「pI」係指正電荷平衡蛋白質負電荷的pH。可以使用已知方法（例如根據蛋白質胺基酸殘基的淨電荷或藉由等電聚焦）來計算/確定pI。在一個實施方式中，產品相關的雜質的pI和主產品之間的差異係至少0.5個pI單位。在另一個實施方式中，該差異係0.5至3個pI單位。在另一個實施方式中，該差異係0.5至2個pI單位。在另一個實施方式中，該差異係0.5至1個pI單位。在另一個實施方式中，該差異係1至3個pI單位。在另一個實施方式中，該差異係2至3個pI單位。在另一個實施方式中，該差異係至少0.5、1、2、3或更多個pI單位。

【0075】包含一種或多種編碼如本文中所提供的目的多特異性蛋白的多核苷酸的呈質體、表現載體、轉錄盒或表現盒形式的表現系統和構建體，以及包含該等表現系統或構建體的宿主細胞。如本文所用，「載體」意指適合用於將多特異性資訊編碼蛋白轉移和/或轉運至宿主細胞和/或特定位置和/或宿主細胞內的區室的任何分子或實體（例如，核酸、質體、噬菌體、轉座子、黏接質體、染色體、病毒、病毒衣殼、病毒體、裸DNA、複合DNA等）。載體可以包括病毒和非病毒載體、非附加型哺乳動物載體。載體通常被稱為表現載體，例如，重組表現載體和選殖載體。可以將載體引入宿主細胞以允許載體自身的複製，並從而擴增其中包含的多核苷酸的拷貝。選殖載體可含有序列組分，該等序列組分通常包括但不限於複製起點、啟動子序列、轉錄起始序列、增強子序列和選擇標誌物。該等元件可以由熟悉該項技術者適當選擇。

【0076】一種或多種「細胞」包括任何原核或真核細胞。細胞可以是離體細胞、體外細胞或體內細胞，可以是單獨的或作為高級結構（如組織或器官）的一部分。細胞包括「宿主細胞」，也稱為「細胞系」，它們經基因工程化以表現具有商業或科學意義的多特異性蛋白。宿主細胞典型地源自來自原代培養物的譜系，其可在培養中維持無限時間。基因工程化宿主細胞涉及用重組多核苷酸分子轉染、轉化或轉導細胞，和/或以其他方式改變（例如，藉由同源重組和基因激活或重組細胞與非重組細胞的融合）以引起宿主細胞表現所需的重組多特異性蛋白。用於遺傳工程化細胞和/或細胞系以表現目的多特異性蛋白之方法和載體係熟悉該項技術者熟知的。

【0077】宿主細胞可以是任何原核細胞（例如大腸桿菌）或真核細胞（例如酵母、昆蟲或動物細胞（例如CHO細胞））。可經由常規轉化或轉染技術將載體DNA引入原核或真核細胞中。

【0078】宿主細胞當在適當條件下培養時表現目的多特異性蛋白，該目的多特異性蛋白隨後可以自培養基收集（若宿主細胞將其分泌至培養基中）或直接由產生它的宿主細胞收集（若其並非分泌的）。合適的宿主細胞的選擇將取決於各種因素，例如所需的表現水平、活性所需或必需的蛋白質修飾（例如糖基化或磷酸化）以及易於折疊成生物活性分子。

【0079】「培養」或「進行培養」係指細胞在多細胞生物體或組織外部的生長和繁殖。對於哺乳動物細胞的合適培養條件係本領域已知的。細胞培養基和組織培養基可互換地用於指在體外細胞培養期間適合宿主細胞生長的培養基。典型地，細胞培養基含有緩衝液、鹽、能量來源、胺基酸、維生素和痕量必需元素。可以使用能夠支持適當宿主細胞在培養中生長的任何培養基。可以將細胞培養基進一步補充其他組分以最大化特定培養的宿主細胞中的細胞生長、細胞活力和/或重組蛋白生產，該細胞培養基係可商購的，並且包括RPMI-1640培養基、RPMI-1641培養基、杜爾貝科改良伊格爾培養基（DMEM）、伊格爾最低必需培養基、F-12K培養基、哈姆F12培養基、伊思考夫改良的杜爾貝科培養基、麥考伊（McCoy's）5A培養基、Leibovitz L-15培養基和無血清培養基如EX-CELL™300系列等，該培養基可以從美國典型培養物保藏中心（American Type Culture Collection）或SAFC生物科學公司（SAFC Biosciences）和其他供應商處獲得。細胞培養基可以是無血清、無蛋白質、無生長因子和/或無蛋白質胰的培養基。還可以藉由添加營養來富集細胞培養物，並以高於其通常的、推薦的濃度使用。

【0080】在培養過程中可以使用多種培養基配製物，例如，以促進從一個階段（例如，生長階段或生長期）過渡到另一階段（例如，生產階段或生產期）和/或優化細胞培養期間的條件（例如在灌注培養過程中提供的濃縮培養基）。生長培養基配製物可用於促進細胞生長並使蛋白質表現最小化。生產培養基配製物可用於促進目的蛋白質的生產和細胞的維持，同時使新細胞的生長減至最

少。飼料培養基，典型地是包含在細胞培養物生產期過程中消耗的較高濃度組分（如營養素和胺基酸）的培養基，可用於補充和維持活性培養物，特別是分批加料、半灌注或灌注模式的培養物。這種濃縮的飼料培養基可以包含大多數細胞培養基組分，例如，其正常量的約5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、12倍、14倍、16倍、20倍、30倍、50倍、100倍、200倍、400倍、600倍、800倍或甚至約1000倍。

【0081】 生長期可以在比生產期更高的溫度下進行。例如，生長期可以在從約35°C至約38°C的第一溫度下進行，並且生產期可以在從約29°C至約37°C，視需要從約30°C至約36°C或從約30°C至約34°C的第二溫度下進行。此外，可以在溫度變化之前和/或之後的同時添加蛋白質產生的化學誘導劑，如像咖啡因、丁酸酯和六亞甲基雙乙醯胺（HMBA）。如果在溫度變化後添加誘導劑，則可以在溫度變化後1小時至5天，視需要在溫度變化後1至2天添加誘導劑。

【0082】 宿主細胞可以懸浮或以附著在固體基質上的黏附形式培養。可以在帶有或不帶有微載體的流化床生物反應器、中空纖維生物反應器、滾瓶、搖瓶或攪拌罐生物反應器中建立細胞培養。

【0083】 細胞培養能以分批、分批加料、連續、半連續或灌注模式進行。哺乳動物細胞（如CHO細胞）可以在生物反應器中以小於100 ml至小於1000 ml的較小規模培養。可替代地，可以使用含有1000 ml至20,000升以上培養基的較大規模生物反應器。大規模細胞培養，如用於蛋白治療劑的臨床和/或商業規模生物製造的細胞培養，可維持數週甚至數月，在此期間細胞產生所需的一種或多種蛋白。

【0084】 因為產品相關的雜質（例如同二聚體、半抗體等）可能類似於所需的多特異性蛋白，因此已開發了策略和技術（例如杵臼結構，CrossMab，DVD

IgG等）來提高細胞培養對所需多特異性蛋白的選擇。然而，仍然會產生一部分產品相關的雜質，該等雜質必須在下游處理期間被去除。

【0085】 然後可以從細胞培養基中收穫所產生的表現的重組多特異性蛋白。從懸浮細胞中收穫蛋白之方法係本領域已知的，並且包括但不限於酸沈澱、加速沈降（如絮凝）、使用重力分離、離心、聲波分離、過濾（包括使用超濾器、微濾器、切向流過濾器、替代切向流過濾器、深度過濾器和沖積過濾器的膜過濾）。藉由本領域已知的氧化還原折疊過程之方法，從細胞質中的包涵體中回收由原核生物表現的重組蛋白。

【0086】 然後，可以藉由一個或多個下游單元操作從任何雜質，如剩餘的細胞培養基、細胞提取物、不需要的組分、宿主細胞蛋白、表現不正確的蛋白、產品相關的雜質等中純化或部分純化收穫的多特異性蛋白。

【0087】 從收穫的細胞培養液中純化多特異性蛋白可以從捕獲層析開始。捕獲層析利用與目的重組多特異性蛋白結合的介質（例如樹脂、膜、凝膠等），例如親和層析、尺寸排阻層析、離子交換層析、疏水相互作用層析（HIC）、固相金屬親和層析（IMAC）等。此類材料係本領域已知的並且可以是可商購的。親和層析選擇可以包括例如底物結合捕獲機制、適體結合捕獲機制或輔因子結合捕獲機制。對於含有Fc組分的多特異性蛋白，可以使用抗體或抗體片段結合捕獲機制，例如蛋白質A、蛋白質G、蛋白質A/G和蛋白質L。目的重組蛋白可以用聚組胺酸標籤標記或者表位（如FLAG®）標記並且隨後使用針對這種表位的特異性抗體進行純化。

【0088】 在下游處理的任何點都可以進行病毒滅活和/或病毒過濾，以從包含目的多特異性蛋白的組成物中去除病毒物質。一種用於實現病毒滅活之方法係在低pH或其他適合的溶液條件下孵育以實現病毒滅活。在低pH病毒滅活之後，可以進行中和操作，該操作將重新調節經過病毒滅活的溶液至更符合後續單

元操作要求的pH值。典型地，在pH 5-7進行中和。病毒滅活或中和的病毒滅活池後也可以進行過濾，例如深層過濾，以除去任何產生的渾濁或沈澱。可以使用微濾器或納濾器進行病毒過濾，諸如可以從旭化成株式會社（Plavona®）和EDM Millipore（VPro®）獲得的那些。

【0089】「精製」在本文用於指進行一個或多個層析步驟以從包含接近最終所需純度的重組多特異性蛋白的流體組成物中去除殘留的污染物和雜質，如DNA、宿主細胞蛋白；產物特異性雜質、變體產物和聚集體和病毒吸附。例如，可以藉由使包括重組多特異性蛋白的流體流過一種或多種層析柱或一種或多種膜吸收劑，使其選擇性結合目標重組多特異性蛋白或存在於流體組成物中的污染物或雜質，以結合和洗提模式進行精製。在此實例中，一種或多種層析柱或膜吸收劑的洗提液/濾液包括重組多特異性蛋白。

【0090】模式精製層析利用介質（例如樹脂和/或膜），該介質含有以以下模式使用的試劑：流過模式（其中多特異性蛋白流過樹脂/膜並包含在流過洗提液中，而污染物和雜質與層析介質結合）、正面層析或超載層析模式（將含有目標蛋白質的溶液載入到柱上，直到其上的吸附位被佔據，並且對固定相（目的蛋白質）具有最低親和力的物質開始洗提）、或結合並洗提模式（其中目的蛋白質與層析介質結合，並在污染物和雜質流過層析介質或從層析介質中洗滌出後被洗提）。此類層析操作的實例包括離子交換層析（IEX）（包括陰離子交換層析（AEX）和/或陽離子交換層析（CEX））；疏水相互作用層析（HIC）；混合模式或多模式層析（MM）、羥基磷灰石層析（HA）；反相層析、尺寸排阻層析（SEC）和凝膠過濾。在一個實施方式中，該層析方法係陽離子交換層析。在一個實施方式中，該陽離子交換介質係樹脂。

【0091】「陽離子交換層析」係指在帶負電荷且具有游離陽離子的固相介質上進行的層析用於與通過或穿過固相的水溶液中的陽離子交換。電荷可能是

藉由將一個或多個帶電配位基附接至該固相（例如藉由共價連接）上來提供。可替代地或此外，電荷可以是該固相的固有特性（例如，對於矽膠而言，它帶有總體的負電荷）。可商購的陽離子交換介質係可用的，並且其中包括但不限於固定在瓊脂糖上的磺基丙基（SP）（例如SP-SEPHAROSE FAST FLOW™、SP-SEPHAROSE FAST FLOW XL™或SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™，來自通用電氣醫療集團（GE Healthcare））、CAPTO S™、CAPTO SP ImpRes™、CAPTO S ImpAct™（通用電氣醫療集團）、FRACTOGEL-SO3™、FRACTOGEL-SE HICAP™、FRACTOPREP™（EMD Merck）、Fractogel® EMD SO3-(M)、Fractogel® EMD SE Hicap (M)、Eshmuno® CPX、Eshmuno® S樹脂、Fractogel® EMD COO-(M)、含Mustang S的Mustang S Acrodisc、含Mustang S的AcroPrep、含CM Ceramic HyperD® F的CM Ceramic HyperD® F AcroSep。

【0092】對於本發明之方法，以結合和洗提模式進行陽離子交換層析。將來自先前下游步驟的洗提液或儲存池中的多特異性蛋白載入到陽離子交換介質上，使得目標多特異性蛋白與陽離子交換介質結合。藉由將多特異性蛋白與陽離子交換介質「結合」係指在適當條件下（pH/電導率）將多特異性蛋白暴露於陽離子交換介質，使得多特異性蛋白憑藉目的多特異性蛋白與陽離子交換介質的一個或多個帶電基團之間的離子相互作用來可逆地固定在陽離子交換介質中或之上。洗提液或池可能源自先前的單元操作，例如親和層析、中和的低pH病毒滅活、深層過濾或收穫和/或精製層析操作。可以將另外的緩衝液添加至洗提液或池中，使得多特異性蛋白的最終負載處於所需濃度。

【0093】然後使載入的陽離子交換層析介質經受至少一次洗滌步驟。洗滌陽離子交換介質意指使適當的洗滌緩衝液通過或穿過陽離子交換介質。洗滌緩衝液的功能係從陽離子交換介質中去除一種或多種污染物，而基本上不洗提目的多特異性蛋白。「緩衝液」意味著藉由其酸-鹼偶聯組分的作用抵抗pH變化的

溶液。在一個實施方式中，該緩衝液係乙酸鹽。在一個實施方式中提供了100 mM乙酸鹽。在一個實施方式中，該洗滌緩衝液的pH在5.0% ± 0.05%至5.0% ±0.1%的範圍內。在一個實施方式中，該洗滌緩衝液的pH在4.9至5.1的範圍內。在一個實施方式中，該洗滌緩衝液的pH係4.9、5.0、或5.1。在本發明之一個實施方式中，至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽，pH 5.0。洗滌緩衝液可以高或低0.05至0.1個pH單位（電導率發生變化）以穩健去除產品相關的雜質。

【0094】 至少一種洗滌緩衝液還包含鹽。在一個實施方式中，該鹽係氯化鈉。在一個實施方式中，洗滌緩衝液中氯化鈉的濃度係從0 mM至147 mM。在一個實施方式中，洗滌緩衝液中氯化鈉的濃度係從70 mM至147 mM。在一個實施方式中，洗滌緩衝液中氯化鈉的濃度係100 mM至147 mM。在一個實施方式中，洗滌緩衝液中氯化鈉的濃度係100 mM至125 mM。在一個實施方式中，洗滌緩衝液中氯化鈉的濃度係100 mM至105 mM。在一個實施方式中，洗滌緩衝液中氯化鈉的濃度係105 mM至147 mM。在一個實施方式中，洗滌緩衝液中氯化鈉的濃度係105 mM至125 mM。在一個實施方式中，洗滌緩衝液中氯化鈉的濃度係125 mM至147 mM。在一個實施方式中，洗滌緩衝液中氯化鈉的濃度係0 mM。在一個實施方式中，洗滌緩衝液中氯化鈉的濃度係70 mM。在一個實施方式中，洗滌緩衝液中氯化鈉的濃度係100 mM。在一個實施方式中，洗滌緩衝液中氯化鈉的濃度係105 mM。在一個實施方式中，洗滌緩衝液中氯化鈉的濃度係125 mM。在一個實施方式中，洗滌緩衝液中氯化鈉的濃度係147 mM。

【0095】 洗滌步驟在載入後並且洗提目的多特異性蛋白之前洗滌了陽離子交換介質。本發明提供了至少一個包含高鹽濃度洗滌緩衝液的洗滌步驟。找到高鹽洗滌緩衝液以在洗提主產品之前從陽離子交換介質洗滌或洗提低pI產品相關的雜質。除高鹽洗滌步驟外，可能還有一個或多個另外的洗滌步驟，該等步驟使用不含鹽的緩衝液和/或與高鹽洗滌緩衝液相比含有濃度較低的鹽的緩衝液。

較佳的是，在洗提開始之前的最後洗滌步驟結束時，UV基線已經回到或非常接近於零。根據本發明之一個實施方式，至少有兩個洗滌步驟。在一個實施方式中，有「第一洗滌緩衝液」和「第二洗滌緩衝液」。根據本發明之一個實施方式，至少有三個洗滌步驟。在一個實施方式中，有「第一洗滌緩衝液」、「第二洗滌緩衝液」和「第三洗滌緩衝液」。術語「第一次洗滌」、「第二次洗滌」和/或「第三次洗滌」不應解釋為在一個或多個洗滌步驟之間排除使用一種或多種另外的洗滌或其他緩衝液。在洗提目的多特異性蛋白之前，洗滌緩衝液用於洗滌或重新平衡陽離子交換材料。一種或多種洗滌緩衝液配製物可以與平衡和/或最終經調節的負載緩衝液配製物相同。

【0096】在本發明之一個實施方式中，該第一次洗滌包括：包含乙酸鹽的洗滌緩衝液，pH 5.0 ± 0.5至pH 5.0% ± 0.1%。在本發明之一個實施方式中，該第一洗滌緩衝液包含乙酸鹽，pH為4.9至5.1。在本發明之一個實施方式中，該第一洗滌緩衝液包含乙酸鹽，pH為4.9、5.0、或5.1。在本發明之一個實施方式中，該第一洗滌緩衝液包含乙酸鹽，pH為5.0。在本發明之一個實施方式中，該第一洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽。在本發明之一個實施方式中，該第一洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽，pH 5.0。在本發明之一個實施方式中，該第一洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0-147 mM氯化鈉。在本發明之一個實施方式中，該第一次洗滌包括：包含100 mM乙酸鹽、0 mM氯化鈉的洗滌緩衝液，pH 5.0 ± 0.5至pH 5.0% ± 0.1%。

【0097】在本發明之一個實施方式中，該第二次洗滌包括：包含乙酸鹽的洗滌緩衝液，pH 5.0 ± 0.5至pH 5.0% ± 0.1%。在本發明之一個實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含乙酸鹽，pH為4.9 to 5.1。在本發明之一個實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含乙酸鹽，pH為4.9、5.0、或5.1。在本發明之一個實施方式中，該

第二洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽。在本發明之一個實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽，pH 5.0。

【0098】在本發明之一個相關實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含0-147 mM氯化鈉。在本發明之一個相關實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含70-147 mM氯化鈉。在本發明之一個相關實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含100-147 mM氯化鈉。在本發明之一個相關實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含100-125 mM氯化鈉。在本發明之一個相關實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含100-105 mM氯化鈉。在本發明之一個相關實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含105-147 mM氯化鈉。在本發明之一個相關實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含105-125 mM氯化鈉。在本發明之一個相關實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含125-147 mM氯化鈉。在本發明之一個相關實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含125 mM氯化鈉。

【0099】在本發明之一個實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、0-147 mM氯化鈉，pH 5.0 ± 0.05至pH 5.0 ± 0.1。在本發明之一個實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、70-147 mM氯化鈉，pH 5.0 ± 0.05至pH 5.0 ± 0.1。在本發明之一個實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉，pH 5.0 ± 0.05至pH 5.0 ± 0.1。在本發明之一個實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、100-125 mM氯化鈉，pH 5.0 ± 0.05至pH 5.0 ± 0.1。在本發明之一個實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、100-105 mM氯化鈉，pH 5.0 ± 0.05至pH 5.0 ± 0.1。在本發明之一個實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、105-147 mM氯化鈉，pH 5.0 ± 0.05至pH 5.0 ± 0.1。在一個相關實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、105-125 mM氯化鈉，pH 5.0 ± 0.05至pH 5.0 ± 0.1。在一個相關實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、125-147 mM氯化鈉，pH 5.0 ± 0.05至pH 5.0 ±

0.1。在一個相關實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、125 mM氯化鈉，pH 5.0 ± 0.05至pH 5.0 ± 0.1。

【0100】在一個相關實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、0 mM氯化鈉，pH 5.0。在一個相關實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、70 mM氯化鈉，pH 5.0。在一個相關實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、100 mM氯化鈉，pH 5.0。在一個相關實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、105 mM氯化鈉，pH 5.0。在一個相關實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、125 mM氯化鈉，pH 5.0。在一個相關實施方式中，該第二洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、147 mM氯化鈉，pH 5.0。

【0101】在本發明之一個實施方式中，該第三次洗滌包括：包含乙酸鹽的洗滌緩衝液，pH 5.0 ± 0.05至pH 5.0% ± 0.1%。在本發明之一個實施方式中，該第三洗滌緩衝液包含乙酸鹽，pH為4.9至5.1。在本發明之一個實施方式中，該第三洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽。在本發明之一個實施方式中，該第三洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽，pH 5.0% ± 0.5%至pH 5.0 ± 0.1。在本發明之一個實施方式中，該第三洗滌緩衝液包含0-147 mM氯化鈉。在本發明之一個實施方式中，該第三洗滌緩衝液包含0 mM氯化鈉。在本發明之一個實施方式中，該第三洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、0 mM氯化鈉，pH 5.0% ± 0.5%至pH 5.0% ±0.1%。在本發明之一個實施方式中，該第三洗滌緩衝液包含70 mM氯化鈉。在本發明之一個實施方式中，該第三洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽、70 mM氯化鈉，pH 5.0% ± 0.5%至pH 5.0 ± 0.1。

【0102】在一個實施方式中，用至少三種洗滌緩衝液洗滌陽離子交換層析介質，一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉；隨後包含乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉的洗滌緩衝液；隨後包含乙酸鹽、0-70 mM氯化鈉的洗滌緩衝液。在一個實施方式中，該第一洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0 mM NaCl；第二洗滌緩衝液包含

乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉；並且第三洗滌緩衝液包含乙酸鹽、0-70 mM氯化鈉。在一個實施方式中，第一洗滌緩衝液的氯化鈉濃度為0 mM氯化鈉。在一個實施方式中，第二洗滌緩衝液的氯化鈉濃度選自100、105和147 mM氯化鈉。在一個實施方式中，第三洗滌緩衝液的氯化鈉濃度選自0和70 mM氯化鈉。在一個實施方式中，該第一洗滌緩衝液濃度係100 mM乙酸鹽、0 mM氯化鈉；第二洗滌緩衝液選自100 mM乙酸鹽、100 mM氯化鈉和100 mM乙酸鹽、105 mM氯化鈉；並且第三洗滌緩衝液係100 mM乙酸鹽、0 mM氯化鈉。在一個實施方式中，該第一洗滌緩衝液係100 mM乙酸鹽、0 mM氯化鈉；第二洗滌緩衝液係100 mM乙酸鹽、147 mM氯化鈉；並且第三洗滌緩衝液係100 mM乙酸鹽、70 mM氯化鈉。

【0103】在本發明之一個實施方式中，將該陽離子交換介質載入至少10 g/L的多特異性蛋白。在本發明之一個實施方式中，將該陽離子交換介質載入10 g/L至40 g/L的多特異性蛋白。在本發明之一個相關實施方式中，將該陽離子交換介質載入15 g/L至40 g/L的多特異性蛋白。在本發明之一個相關實施方式中，將該陽離子交換介質載入20 g/L至40 g/L的多特異性蛋白。在本發明之一個相關實施方式中，將該陽離子交換介質載入25 g/L至40 g/L的多特異性蛋白。在本發明之一個相關實施方式中，將該陽離子交換介質載入35 g/L至40 g/L的多特異性蛋白。在一個相關實施方式中，將該陽離子交換介質載入15 g/L至35 g/L的多特異性蛋白。在一個相關實施方式中，將該陽離子交換介質載入15 g/L至25 g/L的多特異性蛋白。在一個實施方式中，將該陽離子交換介質載入15 g/L至20 g/L的多特異性蛋白。在一個相關實施方式中，將該陽離子交換介質載入15 g/L至35 g/L的多特異性蛋白。在一個相關實施方式中，將該陽離子交換介質載入20 g/L至35 g/L的多特異性蛋白。在一個相關實施方式中，將該陽離子交換介質載入20 g/L至30 g/L的多特異性蛋白。在一個相關實施方式中，將該陽離子交換介質載入20 g/L至25 g/L的多特異性蛋白。在一個相關實施方式中，將該陽離子交換介質載入25

g/L至35 g/L的多特異性蛋白。在一個相關實施方式中，將該陽離子交換介質載入25 g/L至30 g/L的多特異性蛋白。

【0104】 在一個實施方式中，本發明提供了將該陽離子交換介質載入10 g/L的多特異性蛋白，用至少一種包含105 mM氯化鈉的洗滌緩衝液洗滌並以8 mM/CV在鹽梯度中洗提。

【0105】 在一個實施方式中，本發明提供了將該陽離子交換介質載入15 g/L至30 g/L的多特異性蛋白，並用至少一種包含147 mM氯化鈉的洗滌緩衝液洗滌。

【0106】 在本發明一個實施方式中，將該陽離子交換介質載入25 g/L至40 g/L的多特異性蛋白，其中至少一種洗滌緩衝液和一種洗提緩衝液包含125 mM氯化鈉。

【0107】 然後從陽離子交換層析介質的固相洗提結合的多特異性蛋白。可以藉由梯度洗提多特異性蛋白。該梯度可以是線性梯度或步長梯度。該梯度可以是鹽梯度。梯度可以是線性鹽梯度或步長鹽梯度（step salt gradient）。對於鹽梯度，鹽濃度（離子強度）在梯度期間隨時間而變化。需要足夠的鹽濃度以破壞多特異性蛋白的結合並將其釋放到洗提液中。可以使用的鹽的實例包括氯化鈉、氯化鉀和乙酸鹽。

【0108】 可以使陽離子交換層析洗提液經受進一步的下游精製層析純化單元操作。在一個實施方式中，以下陽離子交換層析，以流過模式將目的多特異性蛋白施加到精製層析介質中。

【0109】 在精製層析操作之後，可以藉由超濾和滲濾操作完成純化的多特異性蛋白的濃縮和緩衝液交換成所需的配製物緩衝液用於原料藥的大量儲存。

【0110】 可以測量純化的多特異性蛋白的關鍵屬性和性能參數，以更好地指導有關製造期間每個步驟性能的決策。該等關鍵屬性和參數可以即時監測、近

即時監測和/或事後監測。在細胞培養期間可以測量主要的關鍵參數，如消耗的培養基組分（如葡萄糖）、累積的代謝副產物（如乳酸和氨）的水平、和與細胞維持和存活相關的參數，如溶解氧含量。可在製造過程的適當儲存期間進行監測關鍵屬性，如比生產率、活細胞密度、pH、莫耳滲透壓濃度、外觀、顏色、聚集、產率百分比和滴定度，。可以使用已知技術和可商購的設備進行監測和測量。

【0111】該等藥物組成物（溶液、懸浮液等）可包含以下一種或多種：緩衝劑，例如中性緩衝鹽溶液、磷酸鹽緩衝鹽溶液等；碳水化合物，如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇；蛋白質；多肽或胺基酸，諸如甘胺酸；抗氧化劑；螯合劑，諸如EDTA或麩胱甘肽；佐劑（例如，氫氧化鋁）；和防腐劑；無菌稀釋劑，諸如注射用水、鹽溶液，較佳的是生理鹽水、林格氏溶液、等滲氯化鈉，固定油，諸如可用作溶劑或懸浮介質的合成的單甘油酯或二甘油酯、聚乙二醇、甘油、丙二醇，或其他溶劑；抗菌劑，如苯甲醇或對羥基苯甲酸甲酯；抗氧化劑，如抗壞血酸或亞硫酸氫鈉；螯合劑，如乙二胺四乙酸；緩衝劑，如乙酸鹽、檸檬酸鹽或磷酸鹽；以及用於調節張力的試劑，如氯化鈉或葡萄糖。胃腸外製劑可以被封裝在由玻璃或塑膠製成的安瓿、一次性注射器或多劑量小瓶中。

【0112】儘管在本申請中使用的術語係本領域中的標準術語，但是本文提供了某些術語的定義以確保請求項的含義的清楚性和確定性。單位、前綴和符號可能會用它們的SI接受形式表示。本文列舉的數字範圍包括定義範圍的數字，並且包括並支持所定義範圍內的每個整數。除非另外指示，否則本文所述之方法及技術可根據本領域中熟知的常規方法且如貫穿本說明書所引用及論述的各種通用及更特定參考文獻中所描述來進行。參見例如Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual [分子選殖：實驗室手冊], 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press [冷泉港實驗室出版社], 冷泉港, 紐約 (2001) 和Ausubel等人, Current Protocols in Molecular Biology [分子生物學現代方法], Greene Publishing

Associates [格林出版聯合公司] (1992)；以及Harlow和Lane Antibodies: A Laboratory Manual [抗體：實驗室手冊] Cold Spring Harbor Laboratory Press [冷泉港實驗室出版社], 冷泉港, 紐約 (1990)。在本申請中所引用的所有文檔或文檔之部分，包括但不局限於專利、專利申請、論文、書籍、和專著，都藉由引用清楚地併入本文。

【0113】 本發明在範圍上不受本文所述之特定實施方式的限制，該等特定實施方式旨在作為本發明各個方面的單個說明，並且功能上等效之方法和組分也在本發明之範圍內。在本發明之一個實施方式中描述的內容可以與本發明之其他實施方式組合。實際上，除了本文中顯示和描述的那些之外，根據前述描述和附圖，本發明之各種修改對於熟悉該項技術者將變得顯而易見。這類改變旨在落入所附申請專利範圍的範圍內。

【0114】 以下實例，包括進行的實驗和實現的結果，僅提供解釋說明目的，並且不應被解釋為限制所附申請專利範圍之範圍。

實例

實例 1 單一無鹽洗滌雙特異性#1

【0115】 在表 1 中概括的條件下，將在乙酸鹽緩衝液中含有完全人雙特異性工程改造的免疫球蛋白（雙特異性#1）的中和蛋白 A 池載入到 Capto-SP ImpRes®陽離子交換層析樹脂(通用電氣醫療集團生物科學部(GE Healthcare Bio-Science），瑪律堡（Marlborough），麻塞諸塞州（MA））。

【0116】 [表1] 使用低鹽洗滌進行陽離子交換層析的條件

	雙特異性#1
柱尺寸和柱速	20 ± 2cm 180 cm/hr ± 10%
濃度g/L	20
預平衡	500 mM乙酸鹽1.75 M 氯化鈉pH 4.9

平衡	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗滌1	100 mM乙酸鹽pH 5.0 CV 2.0
洗提緩衝液A	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗提緩衝液B	100 mM乙酸鹽500 mM氯化鈉pH 5.0
洗提梯度起點，%B	0
洗提梯度終點，%B	100
洗提梯度長度，CV	31.25
洗提鹽梯度，mM/CV	16.0
柱體積CVs	17.5
產量	70%
回收洗提液中的雜質	整個洗提步驟藉由級分收集。最好的級分產生0.9%的HMW、0%的NCG

【0117】 圖1在洗提曲線中顯示了三個峰，表明柱上殘留了多種雜質，並隨主產品一起洗提。該等雜質包括同二聚體、NCG（非共有糖基化）、和高分子量物質（HMW）。

實例2 高鹽洗滌雙特異性#1

【0118】 在表2所述之條件下，將在乙酸鹽緩衝液中含有雙特異性#1的中和病毒滅活池載入到Capto-SP ImpRes®陽離子交換層析樹脂。

【0119】 [表2] 使用高鹽洗滌進行陽離子交換層析的條件

	雙特異性#1
柱尺寸和柱速	20 ± 2cm 180 cm/hr線性速度
濃度	30 g/L
預平衡	500 mM乙酸鹽1.75 M氯化鈉pH 4.9
平衡	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗滌1	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗滌2	100 mM乙酸鹽147 mM氯化鈉pH 5.0 CV 2.5
洗滌3	100 mM乙酸鹽70 mM氯化鈉pH 5.0
洗提緩衝液A	100 mM乙酸鹽pH 5.00
洗提緩衝液B	100 mM乙酸鹽350 mM氯化鈉pH 5.0

洗提梯度起點，%B	20
洗提梯度終點，%B	100
洗提梯度長度，CV	17.5
洗提鹽梯度，mM/CV	16.0
柱體積CVs	17.5
產量	70%
回收洗提液中的雜質	1.6% HMW 0.5% NCG

【0120】 發現當添加高鹽洗滌時，先前在洗提洗提液中去除的較低pI雜質現在在洗提之前從洗滌的樹脂中去除。圖2示出了添加高鹽洗滌導致洗提曲線中雜質峰的數量從三個峰減少到一個峰。在第二和第三洗滌步驟之間去除了大部分雜質，≥68%的NCG以及≥80%的同二聚體。在第二次洗滌期間，主要從樹脂中去除同二聚體和NCG，或者其最低程度的與樹脂結合。第三洗滌步驟在洗提開始之前將UV基線重新設置為零，從而收緊了洗提曲線，導致主產品有效的多的收集和更好品質。添加高鹽洗步驟優化了純化，使其更加強健並具有製造製程友好性，從而降低了產品品質的超規格結果，並保持了可接受的產量。

【0121】 該等條件在雙特異性#1的負載濃度為15-30 g/L時係有效的。

【0122】 另外，測試了高於和低於洗滌緩衝液pH 5.0的0.05個pH單位（pH 4.95-5.05），並發現對去除低pI產品相關的雜質係有效的，與以上結果一致。

【0123】 發現使用2.5柱體積的第二洗滌緩衝液足以從陽離子交換介質中洗滌/洗提出產品相關的雜質。較小的柱體積不能有效地去除產品相關的雜質，而使用大於2.5柱體積開始洗提主產品。

實例3 單一無鹽洗滌雙特異性#2

【0124】 在表3中概括的條件下，將含有工程改造的完全人抗異源IgG雙特異性抗體（雙特異性#2）的中和蛋白A洗提液池（100 mM醋酸鹽，pH 5.0）載入

到Capto-SP ImpREs®陽離子交換層析樹脂（通用電氣醫療集團生物科學部，瑪律堡，麻塞諸塞州）。

【0125】 [表3] 在低鹽洗滌條件下進行陽離子交換層析的條件

	雙特異性#2
柱尺寸和柱速	4.66 mL，140%線性速度（cm/hr）
濃度 載入量（g/L）	25
預平衡	500 mM乙酸鹽1.75 M氯化鈉pH 4.9
平衡	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗滌	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗提緩衝液A	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗提緩衝液B	100 mM乙酸鹽500 mM氯化鈉pH 5.0
洗提梯度起點，%B	0
洗提梯度終點，%B	100
洗提梯度長度，CV	31
洗提鹽梯度，mM/CV	16
池柱體積	2.5
產量（從合併的級分7至11）	65%
回收洗提液中的雜質 （從合併的級分7至11）	SE-HPLC HMW（%）= 1.5% SE-HPLC LMW（%）= 0.9% 半抗體 = 0% 降低的CE/SDS LC1/LC2比率 = 1.40

【0126】 圖3示出了柱上殘留了多種雜質，並隨主產品一起洗提。該等雜質包括半抗體（級分1、2、3、4，其中約50%半抗體）、2X輕鏈錯配（級分5和6，其中LC1與LC2比率 < 0.4，這表明LC2與HC1組裝錯誤）、和高分子量（HMW級分12至21）。儘管層析分離的解析度對於包含雜質的明顯前峰係可以接受的，但製造製程使用了基於OD的自動合併；為此，有必要藉由從超過前峰的最高OD開始收集洗提液，從而降低了產量，並使得該製程不足以用於製造操作。

實例4 高鹽洗滌雙特異性#2

【0127】 在表4中概括的條件下，將含有雙特異性#2的中和蛋白A洗提液池（100 mM醋酸鹽，pH 5.0）載入到Capto-SP ImpREs®陽離子交換層析樹脂（通用電氣醫療集團生物科學部，瑪律堡，麻塞諸塞州）。

【0128】 [表4] 在高鹽洗滌條件下進行陽離子交換層析的條件

	雙特異性#2
柱尺寸和柱速	4.66 mL，140%線性速度（cm/hr）
濃度 載入量（g/L）	20
預平衡	500 mM乙酸鹽1.75 M氯化鈉pH 4.9
平衡	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗滌1	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗滌2	100 mM乙酸鹽 100 mM氯化鈉pH 5.0
洗滌3	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗提緩衝液A	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗提緩衝液B	100 mM乙酸鹽500 mM氯化鈉pH 5.0
洗提梯度起點，%B	0
洗提梯度終點，%B	100
洗提梯度長度，CV	31
洗提鹽梯度，mM/CV	16.0
池柱體積	3
產量（從合併的級分5-10）	73%
回收洗提液中的雜質 （對應於級分5-10）	SE-HPLC HMW（%）= 1.4 SE-HPLC LMW（%）= 0.6 半抗體 = 0.4% 降低的CD/SDS LC1/LC2比率 = 0.8

【0129】 發現添加高鹽洗滌步驟時（含有100 mM氯化鈉的洗滌2），在洗提之前從CEX樹脂中去除了半抗體雜質（在收集的洗滌2和3中檢測到100%半抗體）。圖4示出了高鹽洗滌導致洗提曲線中峰的數量從四個峰減少到一個帶有小肩峰的單峰，該峰仍然含有2X LC2錯配的物質（當LC1和LC2分別正確組裝到HC1和HC2時，與預期比率為1相比LC1/LC2 < 0.11）。第三洗滌步驟在洗提開始

之前也將UV基線重新設置為零，從而收緊了洗提曲線，導致主產品有效的多的收集和更好品質。這種優化的用較高鹽洗滌的程序，適用於生產車間。CEX純化產量從65%增加至73%，具有足夠的洗提曲線用於收集具有低水平的半抗體、錯配的LC2物質（藉由LC1與LC2的比率接近1來證明）、HMW和LMW以及基於吸光度的合併標準的純化池。

實例 5 單一無鹽洗滌雙特異性#3

【0130】 在表5中概括的條件下，將含有完全人工程改造的IgG/Fab融合蛋白（雙特異性#3）的中和蛋白A洗提液池載入到Capto-SP ImpREs®陽離子交換層析樹脂（通用電氣醫療集團生物科學部，瑪律堡，麻塞諸塞州）。

【0131】 [表5] 無鹽負載條件下高負載密度陽離子交換層析的條件

	雙特異性#3
柱尺寸和柱速	4.66 mL 140 cm/h線性速度
濃度 載入量（mg/ml）	25
預平衡	500 mM乙酸鹽1.75 M氯化鈉pH 4.9
平衡	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗滌	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗提緩衝液A	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗提緩衝液B	100 mM乙酸鹽500 mM氯化鈉pH 5.0
洗提梯度起點，%B	0
洗提梯度終點，%B	100
洗提梯度長度，CV	31
洗提鹽梯度，mM/CV	16
池柱體積	1.5
產量	44%
回收洗提液中的雜質（對應於級分3、5和6）	降低的CR/SDS LC1/LC2比率 = 0.9 SE-HPLC HMW（%）= 1.7 SE-HPLC LMW（%）= 0.9 SE-HPLC單體 = 97.4%

【0132】 圖5示出了在陡峭的洗提梯度下高負載密度導致的單一洗提峰。在高負載密度下，低pI產品相關的雜質不能從主產品分離，並且主要存在於級分1、2和3中，如CE-SDS LC1與LC2的比率從4降低至7（錯配的LC物質）和LMW物質從2降低至4%所示。

實例 6 較低負載密度，單一無鹽洗滌，雙特異性#3

【0133】 在表6中概括的條件下，將含有完全人工程改造的IgG/Fab融合蛋白（雙特異性#3）的中和蛋白A洗提液池載入到Capto-SP ImpREs®陽離子交換層析樹脂（通用電氣醫療集團生物科學部，瑪律堡，麻塞諸塞州）。

【0134】 [表6] 無鹽負載條件下較低負載密度陽離子交換層析的條件

	雙特異性#3
柱尺寸和柱速	4.66 mL 140 cm/h線性速度
濃度 載入量（mg/mL）	10
預平衡	500 mM乙酸鹽1.75 M氯化鈉pH 4.9
平衡	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗滌	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗提緩衝液A	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗提緩衝液B	100 mM乙酸鹽500 mM氯化鈉pH 5.0
洗提梯度起點，%B	0
洗提梯度終點，%B	100
洗提梯度長度，CV	62
洗提鹽梯度，mM/CV	8
池柱體積	3.0
產量	73%
回收洗提液中的雜質（對應於級分5,6,7,8,9和10）	降低的CE-SDS LC1/LC2比率 = 1.2 SE-HLPC HMW（%）= 1.4 SE-HPLC LMW（%）= 0.1 SE-HPLC單體 = 98.4%

【0135】 由於實例5的高負載密度、陡峭的洗提梯度條件不能提供足夠的來自低pI產品相關的雜質的主產品的解析度，因此降低了負載密度和梯度條件。圖6示出了較低的負載密度（10相比於25 g/L）和較緩的梯度（8相比於16 mM/CV）使主要的低pI產品雜質分離成由級分1-4形成的明顯峰。此級分顯示LC1與LC2的比率為3至10，這表明LC1物質錯配。相反，主峰顯出累積的LC1與LC2比率為1.2。儘管解析度更好，並且將產量從44%增加到73%，因為它仍然需要基於OD的自動合併，因此仍然有必要藉由超過前峰的最高OD開始收集洗提液，從而降低了產量，使得該製程不足以用於製造操作。

實例7 高鹽洗滌，雙特異性 #3

【0136】 在表7中概括的條件下，將含有雙特異性#3的中和病毒滅活池載入到Capto-SP ImpREs®陽離子交換層析樹脂（通用電氣醫療集團生物科學部，瑪律堡，麻塞諸塞州）。

【0137】 [表7] 在高鹽載入下進行陽離子交換層析的條件。

	雙特異性#3
柱尺寸和柱速	4.66 mL 140 cm/h線性速度
濃度g/L	10
預平衡	500 mM乙酸鹽1.75 M氯化鈉pH 4.9
平衡	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗滌1	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗滌2	100 mM乙酸鹽105 mM氯化鈉pH 5.0
洗滌3	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗提緩衝液A	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗提緩衝液B	100 mM乙酸鹽500 mM氯化鈉pH 5.0
洗提梯度起點，%B	0
洗提梯度終點，%B	100

洗提梯度長度，CV	62
洗提鹽梯度，mM/CV	8.1
池柱體積	3.0
產量	66
回收洗提液中的雜質（對應於級分7,8,9,10,11和12）	降低的CE-SDS LC1與LC2比率 = 1.1 SE-HPLC HMW = 1.4% SE HPLC LMW = 0.0 SE-HPLC單體 = 98.6%

【0138】發現當添加高鹽洗滌步驟時（洗滌2），在洗提之前從CEX樹脂中去除了雜質。鑒於收集的洗滌2和洗滌3上的LC1與LC2的比率為8.0（與LC1和LC2正確組裝和配對時的預期比例為1相比），該等雜質可能對應於錯配的LC1物質。圖7示出了高鹽洗滌導致洗提曲線中雜質峰的數量從兩個峰減少到一個帶有小肩峰的單峰，該峰仍含有錯配的物質（LC1/LC2 = 2至4）。在第二和第三洗滌步驟期間去除了大部分雜質。第三洗滌步驟在洗提開始之前也將UV基線重新設置為零，從而收緊了洗提曲線，導致主產品有效的多的收集和更好品質。這種優化用較高鹽洗滌的程序，結合較低的負載水平和較緩的梯度，適用於生產車間。CEX純化產量從44%增加至66%，具有足夠的洗提曲線用於收集具有低水平的錯配的LC1物質（藉由LC1與LC2的比率接近1來證明）、HMW和LMW以及基於吸光度的合併標準的純化池。

實例8 高鹽洗滌雙特異性#4

【0139】在表 7 所述之條件下，將含有完全人工程改造的免疫球蛋白雙特異性抗體（雙特異性#4）的中和的低 pH 值病毒滅活蛋白 A 洗提液池載入到 Capto-SP ImpREs®陽離子交換層析樹脂上。

【0140】[表7] 在高鹽洗滌條件下進行陽離子交換層析的條件

	雙特異性#4
柱速	20 cm，180 cm/h線性速度
濃度g/L	35
預平衡	200 mM乙酸鹽1.0 M氯化鈉pH 5.0
平衡	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗滌1	100 mM乙酸鹽pH 5.0
洗滌2	100 mM乙酸鹽125 mM氯化鈉pH 5.0
洗提緩衝液A	100 mM乙酸鹽125 mM氯化鈉pH 5.0
洗提緩衝液B	100 mM乙酸鹽500 mM氯化鈉pH 5.0
洗提梯度起點，%B	0
洗提梯度終點，%B	100
洗提梯度長度，CV	10
洗提鹽梯度，mM/CV	37.5
平均池柱體積（CV）	2.5 2-3（第二輪運行）
產量	66% 77.7%（第二輪運行）
回收洗提液中的雜質	SE-HPLC HMW = 1.3%（第二輪運行1.2） SE HPLC LMW = 0.6（第二輪運行0.5） %主峰 = 98.1%（第二輪運行98.3） %後峰 = 0.0（兩輪運行） %前峰 = 0.0（兩輪運行）

【0141】發現當添加高鹽濃度下的洗滌步驟（洗滌2）時，在洗提之前，從陽離子交換介質中去除低pI產品相關的雜質（同二聚體和聚集物質）。圖8示出了高鹽洗滌導致洗提曲線中雜質峰的數量從三個峰減少到一個峰。不含氯化鈉的第一次洗滌使電導率達到基線。在隨後的高鹽洗滌步驟期間，去除低pI產品相關的雜質，並在洗提前將電導率基線恢復為零。用具有與高鹽洗滌緩衝液相同的高鹽配製物的洗提緩衝液A保持電導率。由於分離係基於pI的，因此允許在洗提

開始之前保持穩定的電導率並收緊洗提曲線，從而導致對主產品更強健並更有效的收集以及更好的主產品品質。

【0142】另外，測試了高於和低於洗滌緩衝液pH 5.0的0.1個pH單位（pH 4.9-5.1），並發現對去除低pI產品相關的雜質同樣有效。

【0143】另外，測試了雙特異性#4的25至40 g/L-r的負載濃度，並發現其雜質清除率與上述35 g/L-r條件相似。

【符號說明】

【0144】無

【生物材料寄存】

【0145】無

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種在高鹽洗滌條件下進行陽離子交換層析以減少產品相關的雜質之方法，該方法包含

將包含雙特異性抗體及至少一種產品相關的雜質的組成物載入到平衡陽離子交換柱上；

用至少兩種洗滌緩衝液洗滌該陽離子交換介質，其中一種洗滌緩衝液包含100-147 mM氯化鈉；以及

從陽離子交換層析樹脂洗提結合的雙特異性抗體。

【請求項2】 如請求項1所述之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含100-125 mM、100-105 mM、105-147 mM、105-125 mM或125-147 mM氯化鈉。

【請求項3】 如請求項1所述之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含105-125 mM氯化鈉。

【請求項4】 如請求項1所述之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽。

【請求項5】 如請求項1所述之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含：

(i) 乙酸鹽，pH 5.0% ± 0.05%至pH 5.0% ± 0.1%；

(ii) 乙酸鹽，pH 4.91-5.1；

(iii) 乙酸鹽，pH 4.9、5.0、或5.1；

(iv) 100 mM乙酸鹽；

(v) 乙酸鹽、100-125 mM氯化鈉；

(vi) 乙酸鹽、100-105 mM氯化鈉；

(vii) 乙酸鹽、105-147 mM氯化鈉；

(viii) 乙酸鹽、105-125 mM氯化鈉；或

(ix)　乙酸鹽、125-147 mM氯化鈉。

【請求項6】 如請求項1所述之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽，pH 4.91-5.1。

【請求項7】 如請求項1所述之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含100 mM乙酸鹽。

【請求項8】 如請求項1所述之方法，其中至少一種洗滌緩衝液包含乙酸鹽、105-125 mM氯化鈉。

【請求項9】 如請求項1所述之方法，該方法包含至少一種pH 4.91-5.1之洗滌緩衝液。

【請求項10】如請求項1所述之方法，其中用至少三種洗滌緩衝液洗滌該陽離子交換介質。

【請求項11】如請求項1所述之方法，其中該等洗滌緩衝液中至少一種包含0-70 mM氯化鈉。

【請求項12】如請求項1所述之方法，其中用至少一種包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉的洗滌緩衝液，隨後用包含乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉的洗滌緩衝液洗滌該陽離子交換介質。

【請求項13】 如請求項1所述之方法，其中用包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉的洗滌緩衝液，隨後用選自由以下組成之群組的洗滌緩衝液洗滌該陽離子交換介質：包含乙酸鹽、100 mM氯化鈉的洗滌緩衝液，包含乙酸鹽、105 mM氯化鈉的洗滌緩衝液，及包含乙酸鹽、125 mM氯化鈉的洗滌緩衝液。

【請求項14】如請求項1所述之方法，其中用包含乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉的洗滌緩衝液，隨後用包含乙酸鹽、0-70 mM氯化鈉的洗滌緩衝液洗滌該陽離子交換介質。

【請求項15】如請求項1所述之方法，其中用包含乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉的洗滌緩衝液，隨後用包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉的洗滌緩衝液洗滌該陽離子交換介質。

【請求項16】如請求項1所述之方法，其中用包含乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉的洗滌緩衝液，隨後用包含70 mM氯化鈉的洗滌緩衝液洗滌該陽離子交換介質。

【請求項17】 如請求項10所述之方法，其中用至少三種洗滌緩衝液洗滌該陽離子交換介質，包括：

包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉的第一洗滌緩衝液，隨後

包含乙酸鹽、100-147 mM氯化鈉的第二洗滌緩衝液，隨後

包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉的第三洗滌緩衝液或包含乙酸鹽、70 mM氯化鈉的洗滌緩衝液。

【請求項18】 如請求項17所述之方法，其中用以下洗滌該陽離子交換介質：

包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉的第一洗滌緩衝液，隨後

選自由以下組成之群組的第二洗滌緩衝液：包含乙酸鹽、100 mM氯化鈉的洗滌緩衝液，包含乙酸鹽、105 mM氯化鈉的洗滌緩衝液，及包含乙酸鹽、125 mM氯化鈉的洗滌緩衝液；隨後

包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉的第三洗滌緩衝液。

【請求項19】 如請求項17所述之方法，其中用以下洗滌該陽離子交換介質：

包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉的第一洗滌緩衝液，隨後

包含乙酸鹽、147 mM氯化鈉的第二洗滌緩衝液，隨後

包含乙酸鹽、70 mM氯化鈉的第三洗滌緩衝液。

【請求項20】 如請求項17所述之方法，其中用以下洗滌該陽離子交換介質：

包含乙酸鹽、0 mM氯化鈉的第一洗滌緩衝液，隨後

包含乙酸鹽、105-125 mM氯化鈉的第二洗滌緩衝液，隨後

包含乙酸鹽、70 mM氯化鈉的第三洗滌緩衝液。

【請求項21】 如請求項1所述之方法，其中用2.5 mM/CV的包含147 mM氯化鈉的洗滌緩衝液洗滌該陽離子交換介質。

【請求項22】如請求項1所述之方法，其中藉由梯度將該雙特異性抗體從該陽離子交換介質洗提。

【請求項23】 如請求項22所述之方法，其中

(i) 該梯度係線性梯度或步長梯度(step gradient)；

(ii) 該梯度係鹽梯度；或

(iii) 至少一種用於形成洗提梯度的緩衝液包含0-1 M氯化鈉、70-500 mM氯化鈉、或125 mM氯化鈉。

【請求項24】如請求項1所述之方法，其中至少一種洗滌緩衝液和一種洗提緩衝液包含125 mM氯化鈉。

【請求項25】如請求項1所述之方法，其中將該陽離子交換介質載入至少10 g/L的雙特異性抗體。

【請求項26】如請求項1所述之方法，其中將該陽離子交換介質載入10 g/L至40 g/L的雙特異性抗體。

【請求項27】 如請求項1所述之方法，其中將該陽離子交換介質載入：

(i) 10 g/L的雙特異性抗體，用包含105 mM氯化鈉的洗滌緩衝液洗滌並以8 mM/CV在鹽梯度中洗提；

(ii) 15 g/L至30 g/L的雙特異性抗體，用包含147 mM氯化鈉的洗滌緩衝液洗滌；或

(iii) 25 g/L至40 g/L的雙特異性抗體，其中至少一種洗滌緩衝液和一種洗提緩衝液包含125 mM氯化鈉。

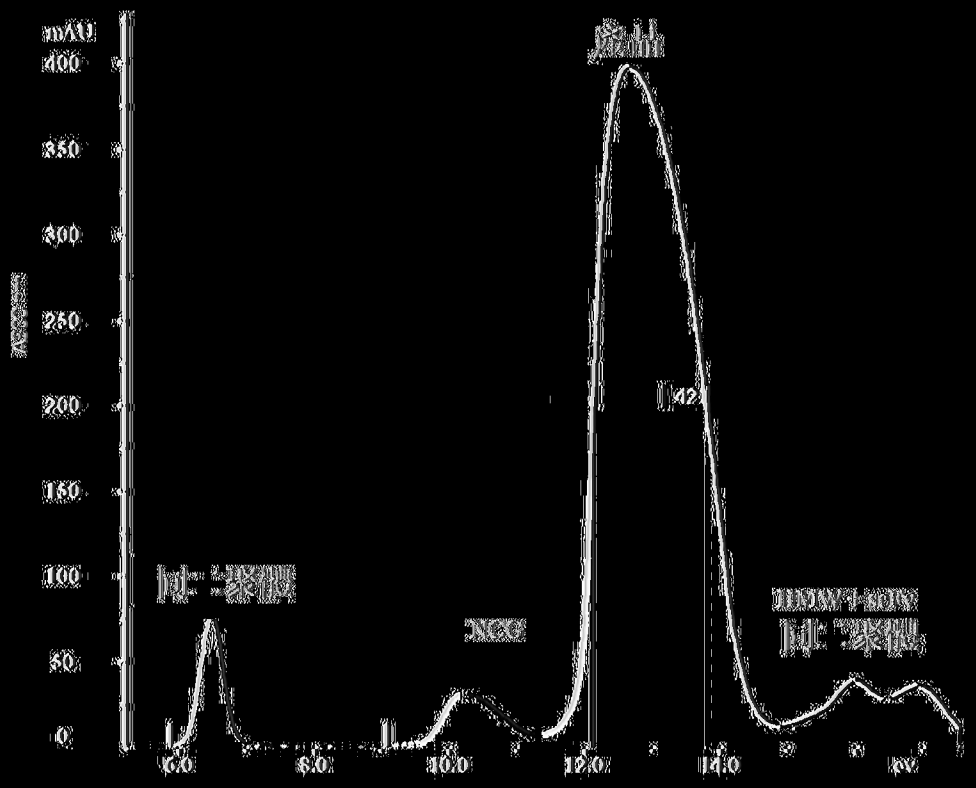
【請求項28】如請求項1所述之方法，其中至少一種產品相關的雜質係同二聚體、高分子量物質、半抗體、團聚體、低分子量物質、抗體片段、或輕鏈錯配。

【請求項29】如請求項1所述之方法，該方法進一步包含在陽離子交換層析步驟之前及/或之後，用於純化該雙特異性抗體的一個或多個單元操作，該單元操作包含親和層析、離子交換層析、疏水相互作用層析柱、及/或混合模式層析柱。

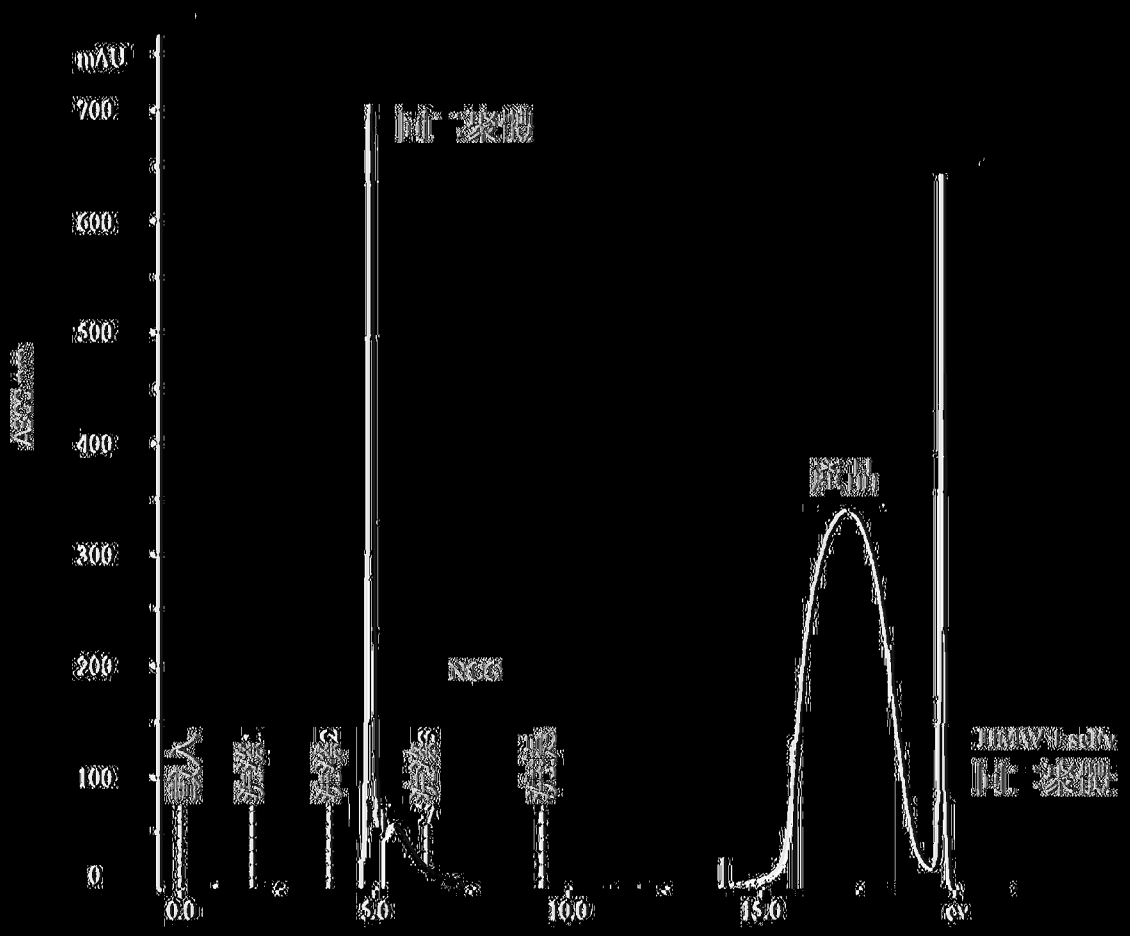
【請求項30】 如請求項1所述之方法，其中該組成物不含氯化鈉。

【請求項31】如請求項1所述之方法，其中在載入該組成物前，用不含氯化鈉的緩衝液來平衡該陽離子交換介質。

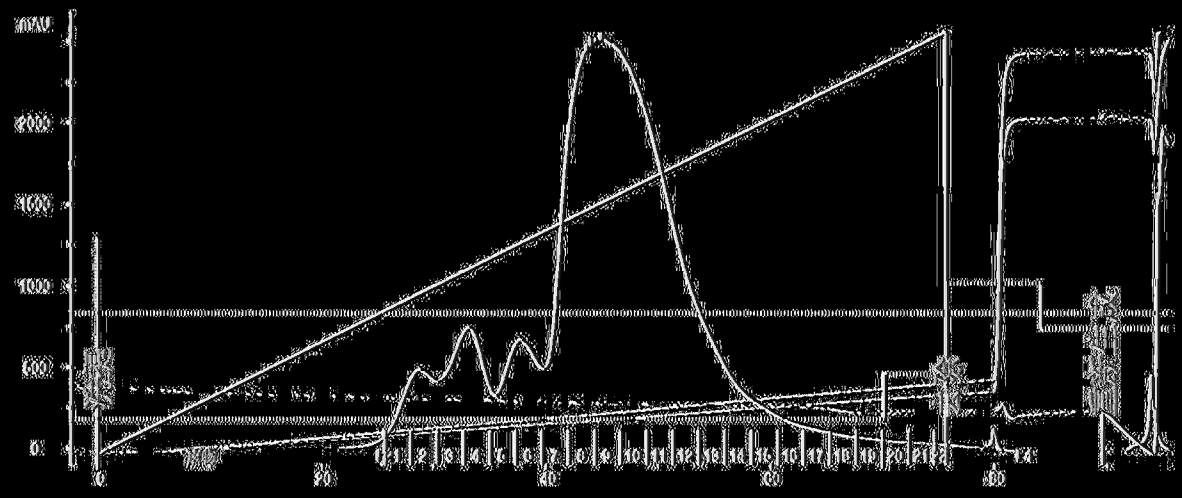
【發明圖式】


mAU
400
350
300
250
200
150
100
50
0
6.0
8.0
10.0
12.0
14.0
16.0
單體
NCG
二聚體
二聚體

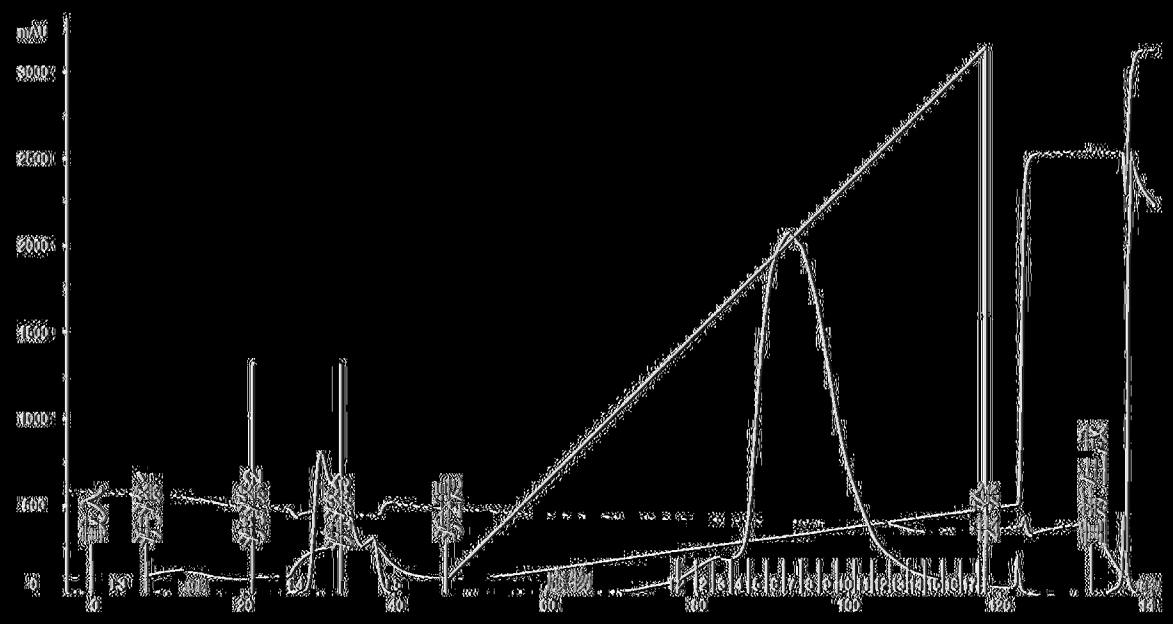
【圖1】



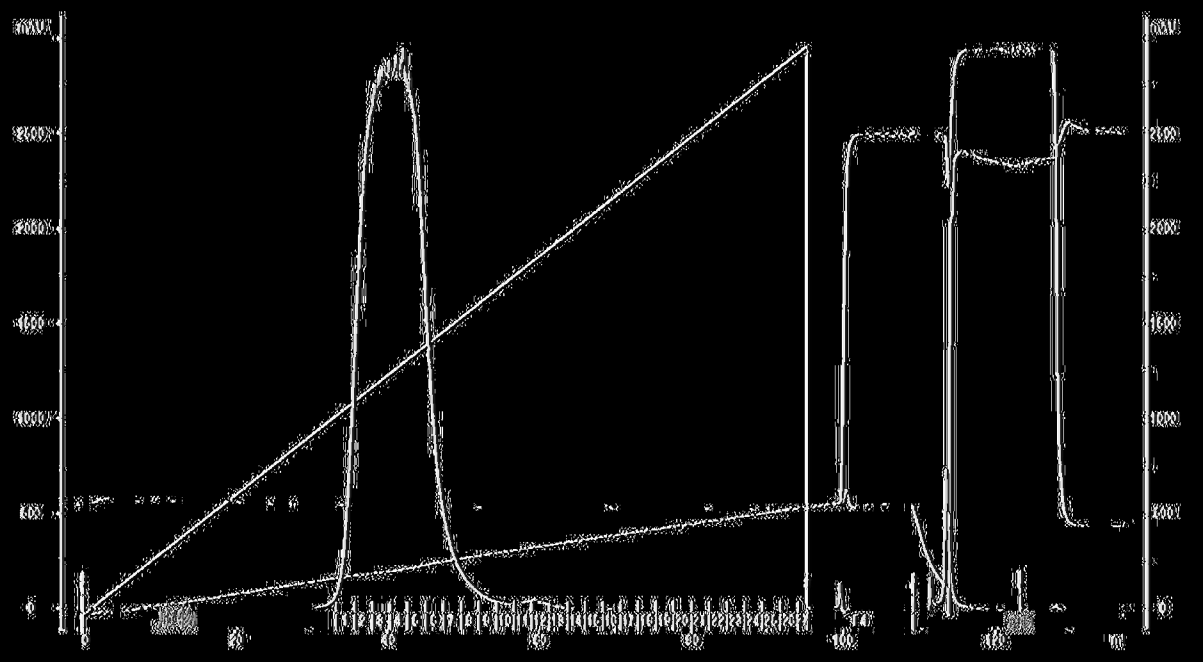
[圖2]



[圖3]



[圖4]



[圖5]

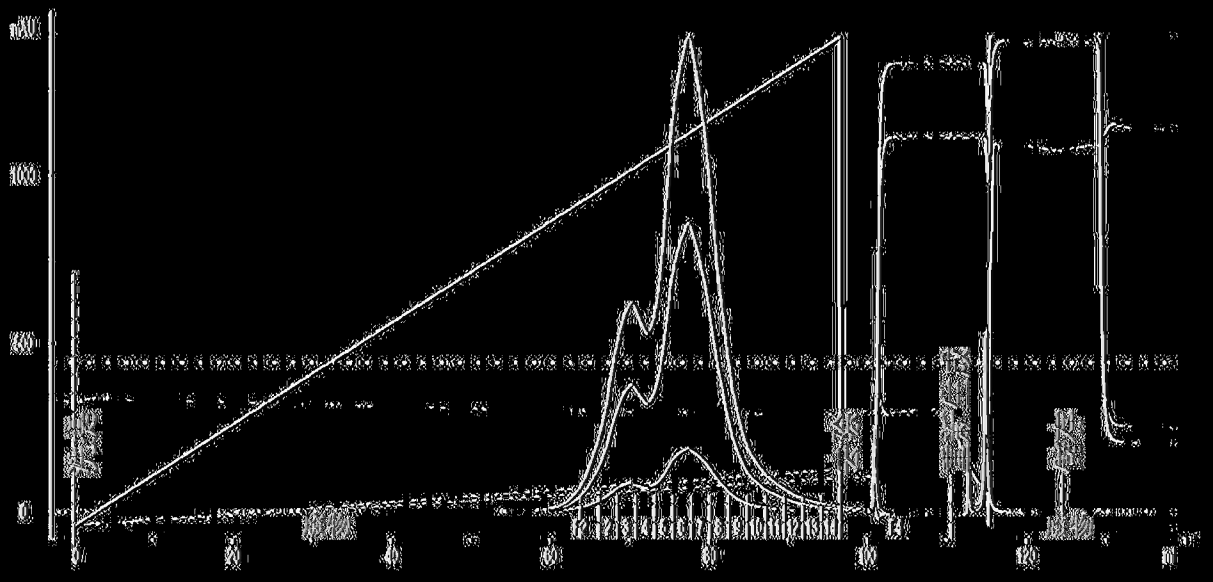


圖6

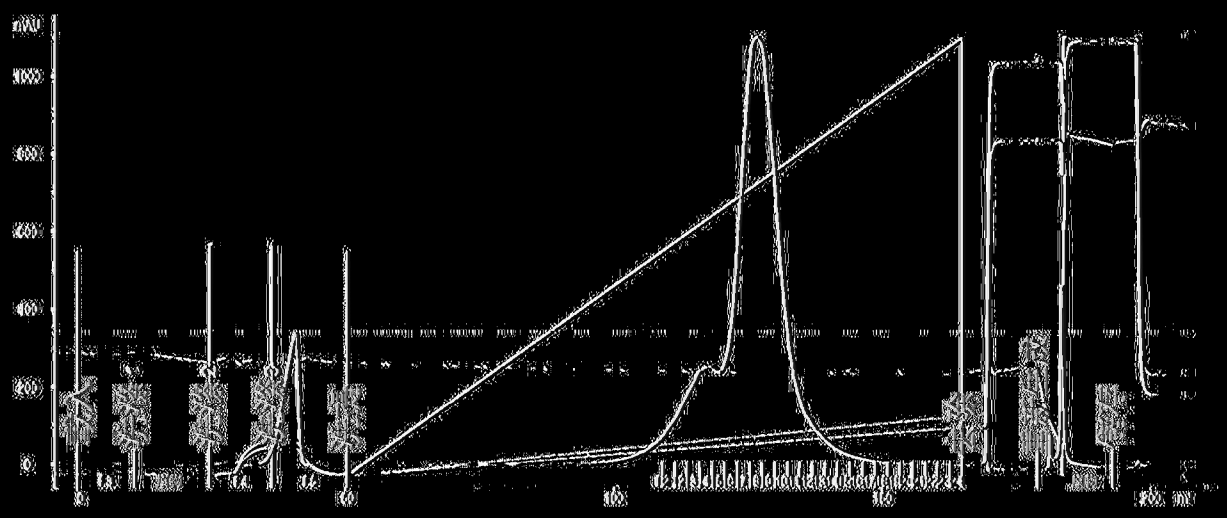


圖7

202523676

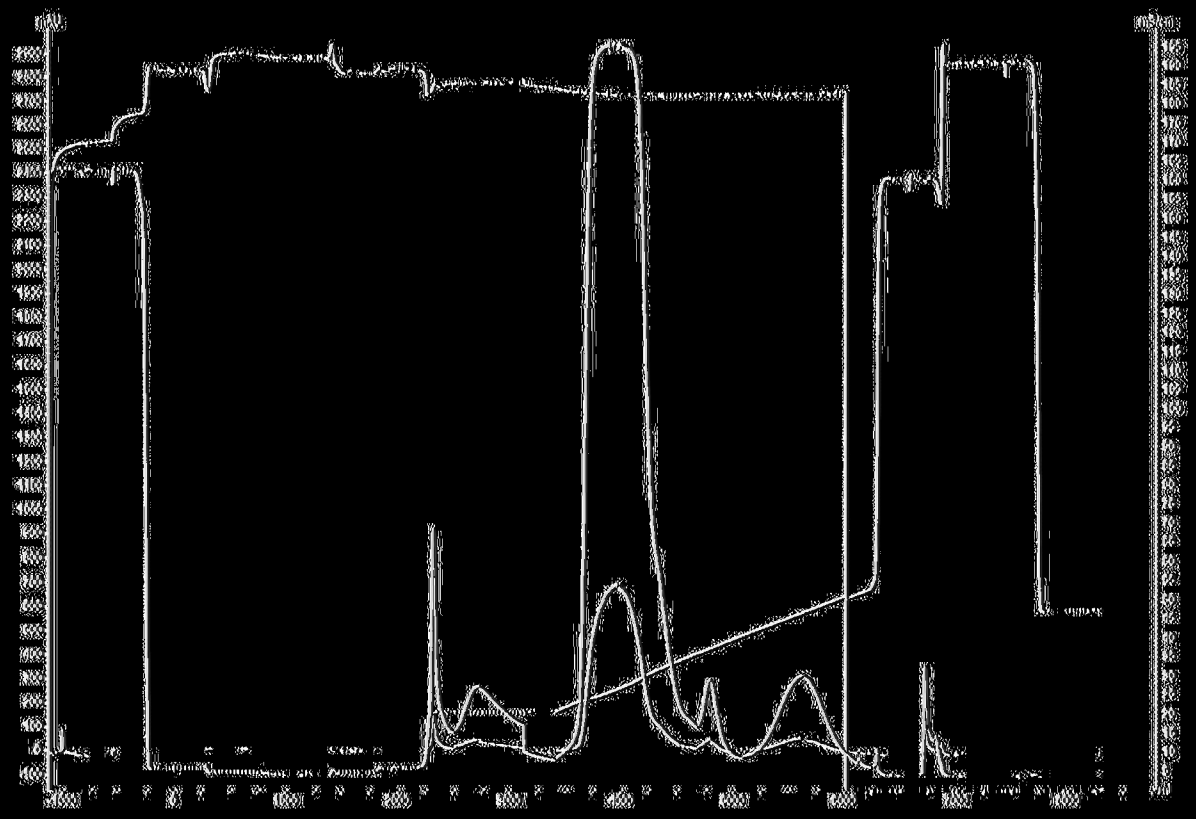


圖8