



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I798179 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 04 月 11 日

(21)申請案號：106120122

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 06 月 16 日

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

A61K39/395 (2006.01)

B01D15/26 (2006.01)

(30)優先權：2016/06/17 美國

62/351,908

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

美國

(72)發明人：吉斯 格稜 GIESE, GLEN (US)；羅森伯格 伊娃 ROSENBERG, EVA (DE)；莎莉爾 伯納德 SALLIER, BERNARD (FR)；克雷德 蘇珊娜 KONRAD, SUSANNE (DE)；寇恩蓮 沃夫甘 KOEHNLEIN, WOLFGANG (DE)；威廉 史提芬 WILLMANN, STEFFEN (DE)；百俄拉斯 艾格合 BIALAS, AGATHE (DE)；凱勒斯 金柏林 KALEAS, KIMBERLY (US)；伊格卓 應吉斯 YIGZAW, YINGES (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2015/070068A1

WO 2015/135884A1

WO 2016/018740A2

審查人員：方冠岳

申請專利範圍項數：40 項 圖式數：7 共 230 頁

(54)名稱

多特異性抗體之純化

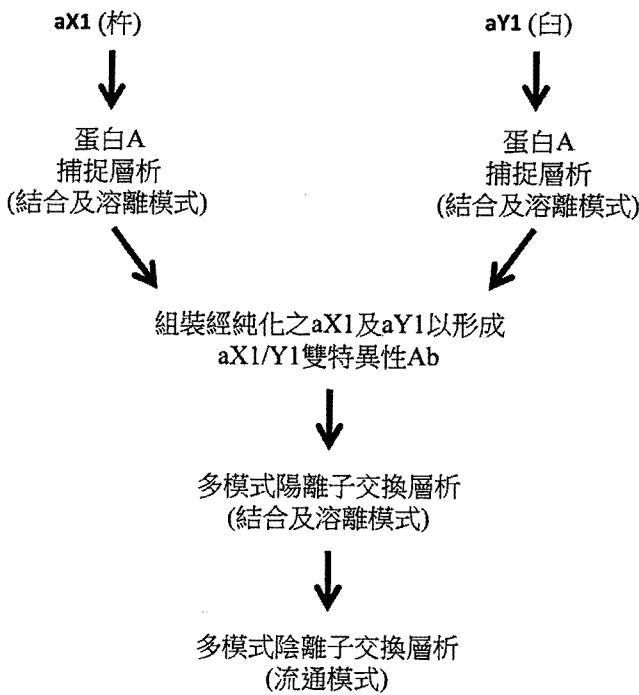
(57)摘要

本發明提供純化多特異性抗體之方法。該等方法包含執行捕捉層析、第一混合模式層析及第二混合模式層析之依序步驟。在一些態樣中，本發明提供多特異性抗體之組合物，該等組合物具有減少水準之一或多種產物特異性雜質及/或過程特異性雜質。

The present invention provides methods of purifying multispecific antibodies. The methods comprise the sequential steps of performing a capture chromatography, a first mixed mode chromatography and a second mixed mode chromatography. In some aspects, the invention provides compositions of multispecific antibodies, which compositions have reduced levels of one or more product-specific impurities and/or process-specific impurities.

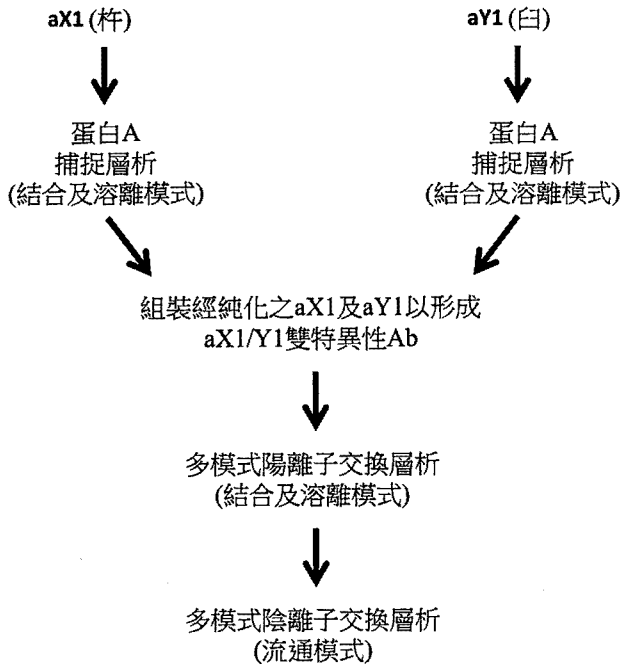
指定代表圖：

A.



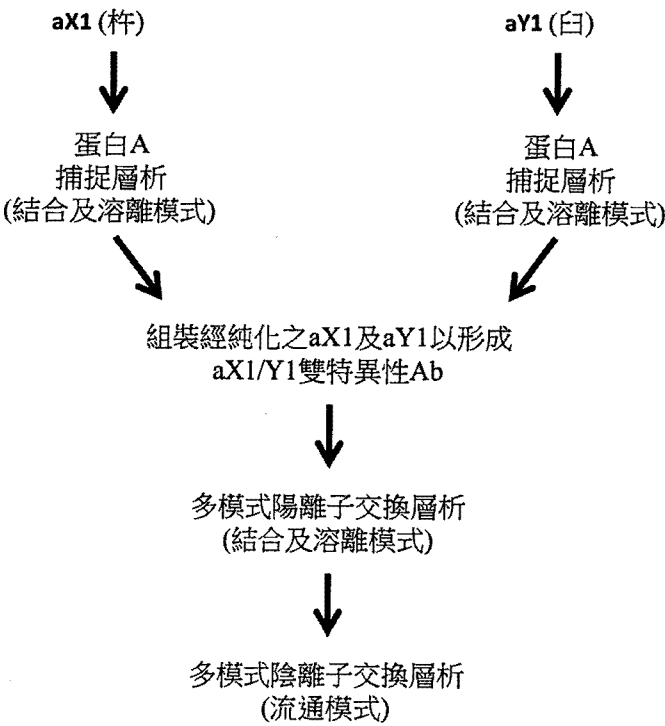
【圖 1】

B.



【圖 1】

C.



【圖 1】

【發明摘要】**【中文發明名稱】** 多特異性抗體之純化**【英文發明名稱】** PURIFICATION OF MULTISPECIFIC ANTIBODIES**【中文】**

本發明提供純化多特異性抗體之方法。該等方法包含執行捕捉層析、第一混合模式層析及第二混合模式層析之依序步驟。在一些態樣中，本發明提供多特異性抗體之組合物，該等組合物具有減少水準之一或多種產物特異性雜質及/或過程特異性雜質。

【英文】

The present invention provides methods of purifying multispecific antibodies. The methods comprise the sequential steps of performing a capture chromatography, a first mixed mode chromatography and a second mixed mode chromatography. In some aspects, the invention provides compositions of multispecific antibodies, which compositions have reduced levels of one or more product-specific impurities and/or process-specific impurities.

【指定代表圖】

圖 1

【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】多特異性抗體之純化

【英文發明名稱】PURIFICATION OF MULTISPECIFIC ANTIBODIES

【技術領域】

【0001】 本申請案主張 2016 年 6 月 17 日申請之美國臨時申請案第 62/351,908 號的優先權權益，該臨時申請案以引用之方式整體併入本文。

【0002】 呈 ASCII 文本文檔形式之以下提交的内容以引用之方式整體併入本文：序列表之電腦可讀形式 (CRF) (文檔名稱：146392036342SEQLIST.TXT，記錄日期：2017 年 6 月 9 日，大小：32 KB)。

【0003】 提供用於自包含多特異性抗體及至少一種雜質之組合物純化多特異性抗體之方法，該雜質包括至少一種產物特異性雜質。在一些實施例中，該產物特異性雜質為例如該多特異性抗體之前驅體、聚集體及/或變異體。亦提供根據該等方法純化之多特異性抗體，及包含該等多特異性抗體之組合物及調配物。

【先前技術】

【0004】 關於欲接受用於投與至人類患者之重組生物醫藥蛋白，重要的是自最終生物產物移除由製造及純化過程產生之殘餘雜質。此等過程組分包括培養基蛋白、免疫球蛋白親和力配位體、病毒、內毒素、DNA 及宿主細胞蛋白(HCP)。諸如多特異性抗體之新抗體形式的開發提供了新挑戰，因為習知製造及純化過程不適於充分地移除產物特異性雜質，包括非配對抗體臂及錯誤組裝之抗體。

【0005】 如與標準抗體之純化相比，自產物培養基純化多特異性抗體提

供了獨特的挑戰。雖然標準單特異性二價抗體由一致重鏈/輕鏈次單元之二聚產生，但多特異性抗體之產生需要至少兩種不同的重鏈/輕鏈次單元之二聚，各次單元包含不同的重鏈以及不同的輕鏈。具有最少量之錯誤配對、錯誤組裝或不完整分子之最終正確且完整多特異性抗體之產生及純化提供了不同的挑戰。通常觀察到鏈錯誤配對(例如，一致重鏈肽之均二聚或不適當重鏈/輕鏈締合)，亦觀察到歸因於不同抗體鏈之不均衡宿主細胞表現之不完全蛋白組裝。通常觀察到之產物特異性雜質包括半($\frac{1}{2}$)抗體(包含單一重鏈/輕鏈對)、四分之三($\frac{3}{4}$)抗體(包含缺乏單一輕鏈之完整抗體)及均二聚體。視所用之多特異性形式而定，可觀察到額外產物特異性雜質。例如，在多特異性抗體之一可變域經構建成單鏈 Fab (scFab)的情況下，可觀察到 5/4 抗體副產物(包含額外重鏈或輕鏈可變域)。該等相應產物特異性雜質將不會在標準抗體產生中出現。

【0006】 當為了移除更類似於多特異性抗體之雜質而執行時，經設計以移除諸如 HCP、DNA、內毒素及具有與該等抗體極其不同之特徵及特性的其他材料之過程相關雜質之習知純化技術可為不適當的。因而，需要開發有效地移除產物特異性雜質且產生足量之正確且完整多特異性抗體之製造及純化流程。

【0007】 本文所引用之所有參考文獻(包括專利申請案及公開案)均以引用之方式整體併入。

【發明內容】

【0008】 如本文所述及例示，申請者已發現在初始捕捉層析步驟之後使用至少兩個混合模式(本文中亦稱作多-模式或多模式)層析步驟會引起產物

特異性雜質之更大移除及用於純化多特異性抗體之改良方法。因此，在某些實施例中，提供一種用於自包含多特異性抗體及雜質之組合物純化多特異性抗體之方法，其中該多特異性抗體包含多個臂，各臂包含 VH/VL 單元，該方法包含依序步驟：a)使該組合物經受捕捉層析以產生捕捉層析溶離物；b)使該捕捉層析溶離物經受第一混合模式層析以產生第一混合模式溶離物；c)使該第一混合模式溶離物經受第二混合模式層析以產生第二混合模式溶離物；及 d)收集包含該多特異性抗體之溶離份，其中該方法減少來自該組合物之產物特異性雜質的量。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該捕捉層析溶離物在第一混合模式層析之前經受離子交換層析(例如，陰離子交換)或疏水性相互作用層析。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該第二混合模式溶離物經受離子交換層析(例如，陰離子交換)或疏水性相互作用層析。

【0009】 在某些實施例中，提供一種用於自包含多特異性抗體及雜質之組合物純化多特異性抗體之方法，其中該多特異性抗體包含多個臂，各臂包含 VH/VL 單元，其中該多特異性抗體之各臂分別地產生，該方法包含依序步驟：a)使該多特異性抗體之各臂經受捕捉層析以產生針對該多特異性抗體之各臂的捕捉溶離物，b)在足以產生包含該多特異性抗體之組合物的條件下形成包含該多特異性抗體之各臂的捕捉溶離物之混合物，c)使包含該多特異性抗體之組合物經受第一混合模式層析以產生第一混合模式溶離物，及 d)使該第一混合模式溶離物經受第二混合模式層析以產生第二混合模式溶離物；及 e)收集包含該多特異性抗體之溶離份，其中該方法減少來自該組合物之產物特異性雜質的量。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實

施例中，該捕捉層析溶離物在第一混合模式層析之前經受離子交換層析(例如，陰離子交換)或疏水性相互作用層析。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該第二混合模式溶離物經受離子交換層析(例如，陰離子交換)或疏水性相互作用層析。

【0010】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該捕捉層析為親和力層析。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該親和力層析為蛋白 L 層析、蛋白 A 層析、蛋白 G 層析、蛋白 A 及蛋白 G 層析。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該親和力層析為蛋白 A 層析。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該捕捉層析以結合及溶離模式進行。

【0011】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該第一混合模式層析及該第二混合模式層析為相鄰的。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該第一混合模式層析為混合模式陰離子交換層析。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該第二混合模式層析為混合模式陽離子交換層析。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該第一混合模式層析為混合模式陽離子交換層析。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該第二混合模式層析為混合模式陰離子交換層析。

【0012】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該第一混合模式層析以結合及溶離模式或以流通模式進行。在根據(或如應用於)其中該第一混合模式層析以結合及溶離模式進行的任何實施例之一些實施例中，該溶離為梯度溶離。

【0013】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該第二混合模式層析以結合及溶離模式或以流通模式進行。在根據(或如應用於)其中該第二混合模式層析以結合及溶離模式進行的任何實施例之一些實施例中，該溶離為梯度溶離。

【0014】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該方法進一步包含使該第二混合模式溶離物經受超濾之步驟。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該超濾依序包含第一超濾、透濾及第二超濾。

【0015】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該蛋白 A 層析包含連接至瓊脂糖之蛋白 A。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該蛋白 A 層析為 MAbSelect™、MAbSelect™ SuRe 及 MAbSelect™ SuRe LX、Prosep-VA、Prosep-VA Ultra Plus、蛋白 A 瓊脂糖速流或 Toyopearl 蛋白 A 層析。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該蛋白 A 層析使用蛋白 A 平衡緩衝液、蛋白 A 載樣緩衝液或蛋白 A 洗滌緩衝液之一或多者，其中該平衡緩衝液、載樣緩衝液及/或洗滌緩衝液在約 pH 7 與約 pH 8 之間。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該蛋白 A 平衡緩衝液為約 pH 7.7。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該蛋白 A 平衡緩衝液包含約 25 mM Tris 及約 25 mM NaCl。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該蛋白 A 層析在載樣之後用平衡緩衝液洗滌。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該多特异性抗體藉由向蛋白 A 層析應用具有低 pH 之蛋白 A 溶離緩衝液而自該蛋白 A 溶離。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些

實施例中，該蛋白 A 溶離緩衝液包含約 150 mM 乙酸(約 pH 2.9)。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該多特异性抗體藉由 pH 梯度而自蛋白 A 層析溶離。

【0016】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該陰離子交換混合模式層析包含四級胺及疏水性部分。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該陰離子交換混合模式層析包含連接至高度交聯瓊脂糖之四級胺及疏水性部分。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該混合模式層析為 Capto™ Adhere 層析或 Capto™ Adhere ImpRes 層析。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該陽離子交換混合模式層析包含 N-苯甲基-n-甲基乙醇胺。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該混合模式層析為 Capto™ MMC 層析或 Capto™ MMC ImpRes 層析。

【0017】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該第一混合模式層析使用混合模式預平衡緩衝液、混合模式平衡緩衝液、混合模式載樣緩衝液或混合模式洗滌緩衝液中之一或多者，其中該混合模式預平衡緩衝液、該混合模式平衡緩衝液、該混合模式載樣緩衝液及/或該混合模式洗滌緩衝液在約 pH 6 與約 pH 7 之間。在一些實施例中，陰離子混合模式平衡緩衝液在約 pH 6.5 與約 pH 8 之間。

【0018】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該第二混合模式層析使用混合模式預平衡緩衝液、混合模式平衡緩衝液、混合模式載樣緩衝液或混合模式洗滌緩衝液中之一或多者，其中該混合模式預平衡緩衝液、該混合模式平衡緩衝液及/或混合模式洗滌緩衝液在約 pH 5 與約

pH 8 之間，視情況在約 pH 5 與約 pH 7 之間，或在約 pH 5 與約 pH 6 之間，或在約 pH 6 與約 pH 7 之間。

【0019】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該混合模式預平衡緩衝液、該混合模式平衡緩衝液及/或混合模式洗滌緩衝液為約 pH 5.5。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該混合模式預平衡緩衝液包含約 500 mM 乙酸鹽。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該混合模式平衡緩衝液包含約 50 mM 乙酸鹽。

【0020】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該第一混合模式層析在載樣之後用洗滌緩衝液洗滌。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該第二混合模式層析在載樣之後用洗滌緩衝液洗滌。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該多特異性抗體藉由鹽梯度及/或 pH 梯度或 pH 分步溶離而自該第一混合模式層析溶離。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該多特異性抗體藉由向混合模式交換層析應用具有低 pH 之混合模式溶離緩衝液而自該第一混合模式層析溶離。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該多特異性抗體藉由鹽梯度及/或 pH 梯度或 pH 分步溶離而自該第二混合模式層析溶離。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該多特異性抗體藉由向混合模式交換層析應用具有低 pH 之混合模式溶離緩衝液而自該第二混合模式層析溶離。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該混合模式溶離緩衝液包含約 25 mM 乙酸鹽(約 pH 5.5)。

【0021】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該陰離子交換層析包含四級胺。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，

該陰離子交換層析包含連接至交聯瓊脂糖之四級胺。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該陰離子交換層析為 QSFF 層析。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該陰離子交換層析使用陰離子交換預平衡緩衝液、陰離子交換平衡緩衝液或陰離子交換載樣緩衝液中之一或多者，其中該陰離子交換預平衡緩衝液、該陰離子交換平衡緩衝液及/或陰離子交換載樣緩衝液在約 pH 8 與約 pH 9 之間。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該陰離子交換預平衡緩衝液、該陰離子交換平衡緩衝液及/或該陰離子交換載樣緩衝液為約 pH 8.5。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該陰離子交換預平衡緩衝液包含約 50 mM Tris、500 mM 乙酸鈉。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該陰離子交換平衡緩衝液包含約 50 mM Tris。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該陰離子交換層析在載樣之後用陰離子交換平衡緩衝液洗滌。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該多特异性抗體藉由鹽梯度而自陰離子交換層析溶離。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該多特异性抗體藉由向陰離子交換層析應用具有增加的鹽濃度之陰離子交換溶離緩衝液而自陰離子交換層析溶離。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該陰離子交換溶離緩衝液包含約 50 mM Tris、100 mM 乙酸鈉(在約 pH 8.5 下)。

【0022】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該多特异性抗體之臂在細胞中產生。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該細胞為原核細胞。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該原核細胞為大腸桿菌細胞。在根據(或如應用於)以上任何實施例之

一些實施例中，該細胞經工程改造以表現一或多種伴侶蛋白。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該伴侶蛋白為 FkpA、DsbA 或 DsbC 中之一或多者。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該伴侶蛋白為大腸桿菌伴侶蛋白。在根據(或如應用於)以上實施例之一些實施例中，該細胞為真核細胞。在根據(或如應用於)以上實施例之一些實施例中，該真核細胞為酵母細胞、昆蟲細胞或哺乳動物細胞。在根據(或如應用於)以上實施例之一些實施例中，該真核細胞為 CHO 細胞。

【0023】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該細胞在捕捉層析之前經溶解以產生包含該多特異性抗體或該多特異性抗體之臂的細胞溶解產物。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該細胞使用微流化器溶解。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，聚乙炔亞胺(PEI)在層析之前添加至細胞溶解產物中。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，PEI 添加至溶解產物中至約 0.4%之最終濃度。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，細胞溶解產物藉由離心澄清。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，來自哺乳動物細胞(例如，CHO 細胞)之細胞溶解產物經受一或多種以下處理：熱去活化、低 pH 去活化、藉由添加清潔劑實現之病毒去活化。

【0024】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該方法減少該組合物中之過程特異性雜質的量，諸如宿主細胞蛋白(HCP)、瀝出之蛋白 A、核酸、細胞培養基組分或病毒雜質中之任一者。

【0025】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該多特異性抗體為雙特異性抗體。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例

中，該雙特異性抗體為杵臼(KiH)抗體，例如 KiH 雙特異性抗體。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該雙特異性抗體為 CrossMab 雙特異性抗體。

【0026】 在根據(或如應用於)以上任何方法之一些實施例中，在最後層析步驟之後收集溶離份，其包含至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%、至少約 99%或約 100%多特異性抗體。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，在最後層析步驟之後收集溶離份，其包含減少之量的產物特異性雜質，其中該產物特異性雜質為以下一或多者：非配對抗體臂、抗體均二聚體、高分子量物質(HMWS)、低分子量物質(LMWS)或 $\frac{3}{4}$ 抗體。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該溶離份含有少於約 5%、少於約 4%、少於約 3%、少於約 2%或少於約 1%之非配對抗體臂。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該溶離份含有少於約 5%、少於約 4%、少於約 3%、少於約 2%或少於約 1%之抗體均二聚體。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該溶離份含有不超過約 1%或不超過約 2% HMWS。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該溶離份含有不超過約 2%或不超過約 1% LMWS。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該溶離份含有不超過約 5%、不超過約 4%、不超過約 3%、不超過約 2%或不超過約 1%之 $\frac{3}{4}$ 抗體。

【0027】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該溶離份含有

- a)至少約 95%-100%多特異性抗體；
- b)少於約 1%-5%非配對抗體臂；

- c)少於約 1%-5%抗體均二聚體；
- d)不超過約 1%或 2% HMWS；
- e)不超過約 1%或 2% LMWS；及/或
- f)不超過約 5% $\frac{3}{4}$ 抗體。

【0028】 在某些實施例中，提供一種包含多特異性抗體之組合物，其藉由上文所述之任何方法的方法純化。

【0029】 在根據(或如應用於)以上任何方法之一些實施例中，提供一種包含多特異性抗體之組合物，其中該組合物包含至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%、至少約 99%或約 100%多特異性抗體。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，提供一種包含多特異性抗體之組合物，其中該組合物包含減少之量的產物特異性雜質，其中該產物特異性雜質為以下一或多者：非配對抗體臂、抗體均二聚體、高分子量物質(HMWS)、低分子量物質(LMWS)或 $\frac{3}{4}$ 抗體。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該組合物少於約 5%、少於約 4%、少於約 3%、少於約 2%或少於約 1%之非配對抗體臂。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該組合物含有少於約 5%、少於約 4%、少於約 3%、少於約 2%或少於約 1%之抗體均二聚體。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該組合物含有不超過約 1%或不超過約 2% HMWS。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該組合物含有不超過約 2%或不超過約 1% LMWS。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該組合物含有不超過約 5%、不超過約 4%、不超過約 3%、不超過約 2%或不超過約 1%之 $\frac{3}{4}$ 抗體。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例

中，該組合物中之多特異性抗體為雙特異性抗體。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該雙特異性抗體為杵臼(KiH)抗體，例如 KiH 雙特異性抗體。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該雙特異性抗體為 CrossMab 雙特異性抗體。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該雙特異性抗體結合於 ANG-2 及 VEGF。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該雙特異性抗體結合於 ANG-2 及 VEGF，包含 a)包含第一抗原結合位點之第一全長抗體的重鏈及輕鏈；及 b)包含第二抗原結合位點之全長抗體的經修飾重鏈及經修飾輕鏈，其中恆定域 CL 及 CH1 由彼此置換。

【0030】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該組合物含有：a)至少約 95%-100%多特異性抗體；b)少於約 1%-5%非配對抗體臂；c)少於約 1%-5%抗體均二聚體；d)不超過約 1%或 2% HMWS；e)不超過約 1%或 2% LMWS；及/或 f)不超過約 5% $\frac{3}{4}$ 抗體。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該組合物中之多特異性抗體為雙特異性抗體。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該雙特異性抗體為杵臼(KiH)抗體，例如 KiH 雙特異性抗體。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該雙特異性抗體為 CrossMab 雙特異性抗體。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該雙特異性抗體結合於 ANG-2 及 VEGF。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該雙特異性抗體結合於 ANG-2 及 VEGF，包含 a)包含第一抗原結合位點之第一全長抗體的重鏈及輕鏈；及 b)包含第二抗原結合位點之全長抗體的經修飾重鏈及經修飾輕鏈，其中恆定域 CL 及 CH1 由彼此置換。

【0031】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，提供一種藉由上文所述之任一方法純化的包含多特異性或雙特異性抗體(諸如結合 ANG2 及 VEGF 之雙特異性抗體)之組合物，其用於治療癌症或眼病。

【0032】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，提供藉由上文所述之任一方法純化的包含多特異性或雙特異性抗體(諸如結合 ANG2 及 VEGF 之雙特異性抗體)之用途，其用於製造用於治療癌症或眼病之藥劑。

【0033】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，本文所提供之方法用於純化含 Fc 雜二聚體多肽。

【0034】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，提供本文所提供之任何方法用於減少組合物中的含 Fc 雜二聚體多肽相關雜質之用途。

【0035】 在某些實施例中，提供一種用多步驟層析方法純化含 Fc 區雜二聚體多肽之方法，其中該方法包含親和力層析步驟、隨後兩個不同的多模式離子交換層析步驟，及由此純化該含 Fc 區雜二聚體多肽。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該多步驟層析方法包含(i)親和力層析步驟、隨後多模式陰離子交換層析步驟、隨後多模式陽離子交換層析步驟；或(ii)親和力層析步驟、隨後多模式陽離子交換層析步驟、隨後多模式陰離子交換層析步驟。

【0036】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該多步驟層析方法包含親和力層析步驟、隨後多模式陰離子交換層析步驟、隨後多模式陽離子交換層析步驟。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施

例中，該多步驟層析方法確切地包含三個層析步驟。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該多模式陰離子交換層析步驟以流通模式執行。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，在該多模式陰離子交換層析步驟中，該含 Fc 區雜二聚體多肽在具有小於 7 mS/cm 之電導率值的溶液中應用。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，在該多模式陰離子交換層析步驟中，該含 Fc 區雜二聚體多肽在具有在約 6 mS/cm 至約 2 mS/cm 範圍內之電導率值的溶液中應用。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，在該多模式陰離子交換層析步驟中，該含 Fc 區雜二聚體多肽在具有約 4.5 mS/cm 之電導率值的溶液中應用。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該多模式陰離子交換層析步驟在約 7 之 pH 下執行。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，在該多模式陰離子交換層析步驟中，該含 Fc 區雜二聚體多肽在具有約 4.5 mS/cm 之電導率及約 7 之 pH 的溶液中應用。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，在該多模式陰離子交換層析步驟中，該含 Fc 區雜二聚體多肽以約 100 g 至約 300 g/公升層析材料之範圍應用。

【0037】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該多模式陰離子交換層析材料為多模式強陰離子交換層析材料。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該多模式陰離子交換層析材料具有高流量瓊脂糖基質、作為配位體的多模式強陰離子交換劑、36-44 μm 之平均粒徑及 0.08 至 0.11 mmol Cl⁻/mL 培養基之離子容量。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該多模式陽離子交換層析培養基為多模式弱陽離子交換層析培養基。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例

中，該多模式陽離子交換層析培養基具有高流量瓊脂糖基質、作為配位體的多模式弱陽離子交換劑、36-44 μm 之平均粒徑及 25 至 39 $\mu\text{mol/mL}$ 之離子容量。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該多模式陰離子交換層析步驟以結合及溶離模式執行。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該捕捉層析藉由親和力層析進行。在一些實施例中，該親和力層析為蛋白 A 親和力層析或蛋白 G 親和力層析或單鏈 Fv 配位體親和力層析或具有 CaptureSelect 層析材料之層析步驟或具有 CaptureSelect FcXL 層析材料之層析步驟。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該親和力層析步驟為蛋白 A 層析步驟。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該親和力層析步驟為具有 CaptureSelect™ 層析材料之層析步驟。

【0038】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該含 Fc 區雜二聚體多肽為抗體、雙特異性抗體或 Fc 融合蛋白。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該含 Fc 區雜二聚體多肽為雙特異性抗體。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該含 Fc 區雜二聚體多肽為 CrossMab。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該含 Fc 區雜二聚體多肽為雙特異性抗體，其包含 a) 特異性結合於第一抗原之第一全長抗體的重鏈及輕鏈；及 b) 特異性結合於第二抗原之全長抗體的經修飾重鏈及經修飾輕鏈，其中恆定域 CL 及 CH1 由彼此置換。

【0039】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該雙特異性抗體結合於 ANG2 及 VEGF。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，CrossMab 結合於 ANG2 及 VEGF。在根據(或如應用於)以上任

何實施例之一些實施例中，該雙特異性抗體為瓦紐賽單抗(vanucizumab)。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該雙特異性抗體包含第一抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 1 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 2；及第二抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 3 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 4。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該雙特異性抗體包含具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 9 之第一重鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 10 之第二重鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 11 之第一輕鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 12 之第二輕鏈。

【0040】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該雙特異性抗體包含第一抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 5 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 6；及第二抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 7 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 8。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，該雙特異性抗體包含具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 13 之第一重鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 14 之第二重鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 15 之第一輕鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 16 之第二輕鏈。

【0041】 在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，經純化之含 Fc 區雜二聚體多肽含有不超過約 5% $\frac{3}{4}$ 抗體。

【0042】 在某些實施例中，提供一種用多步驟層析方法純化結合於 ANG2 及 VEGF 之雙特異性抗體之方法，其中該方法包含親和力層析步驟、隨後多模式陰離子交換層析步驟、隨後多模式陽離子交換層析步驟，及由

此純化結合於 ANG2 及 VEGF 之雙特異性抗體，其中結合於 ANG2 及 VEGF 之雙特異性抗體包含第一抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 1 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 2；及第二抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 3 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 4，或包含第一抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 5 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 6；及第二抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 7 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 8。在根據(或如應用於)以上任何實施例之一些實施例中，結合於 ANG2 及 VEGF 之雙特異性抗體包含 a)包含第一抗原結合位點之第一全長抗體的重鏈及輕鏈；及 b)包含第二抗原結合位點之全長抗體的經修飾重鏈及經修飾輕鏈，其中恆定域 CL 及 CH1 由彼此置換。

【0043】 在一些實施例中，提供根據(或如應用於)以上任何實施例之任一方法用於減少含 Fc 雜二聚體多肽相關雜質之用途。

【0044】 在一些實施例中，提供用根據(或如應用於)以上任何實施例之方法獲得之含 Fc 雜二聚體多肽，其用於製造用於治療癌症或眼病之藥劑。

【0045】 在一些實施例中，提供由根據(或如應用於)以上任何實施例之方法獲得之含 Fc 雜二聚體多肽，其用於治療癌症或眼病。

【0046】 在某些實施例中，提供一種用於產生含 Fc 雜二聚體多肽之方法，其包含以下步驟：(i)培養包含編碼含 Fc 雜二聚體多肽之核酸的細胞；(ii)自細胞或培養基回收含 Fc 雜二聚體蛋白；(iii)使用根據(或如應用於)以上任何實施例之方法純化含 Fc 雜二聚體多肽，及由此產生含 Fc 雜二聚體多肽。

【0047】 在某些實施例中，提供一種產生結合於 ANG-2 及 VEGF 之雙特

異性抗體之方法，其包含以下步驟：(i)培養包含編碼該雙特異性抗體之核酸的細胞；(ii)自細胞或培養基回收該雙特異性抗體；(iii)使用根據(或如應用於)以上任何實施例之方法純化該雙特異性抗體，且由此產生結合於 ANG-2 及 VEGF 之雙特異性抗體。

【圖式簡單說明】

【0048】 圖 1A 描繪實例 1 中所用之第一純化流程。

【0049】 圖 1B 描繪實例 1 中所用之第二純化流程。

【0050】 圖 1C 描繪實例 1 中所用之第三純化流程。

【0051】 圖 2 描繪實例 2 中所用之純化流程。

【0052】 圖 3A 描繪實例 3 中所用之第一純化流程。

【0053】 圖 3B 描繪實例 3 中所用之第二純化流程。

【0054】 圖 4 描繪實例 4 中所用之純化流程。

【0055】 圖 5A 描繪實例 6 中所用之第一純化流程。

【0056】 圖 5B 描繪實例 6 中所用之第二純化流程。

【0057】 圖 6A 描繪實例 7 中所用之第一純化流程。

【0058】 圖 6B 描繪實例 7 中所用之第二純化流程。

【0059】 圖 7A 描繪實例 8 中所述之第一純化流程。

【0060】 圖 7B 描繪實例 8 中所述之第二純化流程。

【0061】 圖 7C 描繪實例 8 中所述之所用第三純化流程。

【實施方式】

【0062】 本文提供用於純化多特異性抗體(諸如雙特異性抗體或二價 $F(ab')_2$)之方法，其包含依序步驟：使包含該多特異性抗體之組合物經受 a)

捕捉層析，b)第一混合模式層析，及 c)第二混合模式層析。在一些態樣中，提供用於純化多特異性抗體之方法，其中該多特異性抗體之個別臂各自在獨立培養物中產生且各自藉由捕捉層析獨立地純化。經純化之抗體臂接著經組裝以產生該多特異性抗體。經組裝之多特異性抗體接著經受第一混合模式陰離子交換層析，隨後第二混合模式層析。如下文更詳細描述，該捕捉層析、第一混合模式層析及/或第二混合模式層析中之每一者視情況前接及/或後接一或多個額外層析步驟。術語混合模式層析及多模式層析在本文中可互換使用。

【0063】 在一些態樣中，提供包含多特異性抗體之組合物，其具有減少水準之一或多種過程特異性及/或產物特異性雜質，諸如非配對抗體臂、均二聚體、聚集體、低分子量物質、酸性及鹼性變異體。在一些態樣中，提供包含多特異性抗體之組合物，其具有減少水準之一或多種過程特異性雜質，諸如原核宿主細胞蛋白、真核宿主細胞蛋白(諸如 CHO 蛋白或「CHOP」)、核酸及伴侶蛋白(諸如原核伴侶蛋白，例如 FkpA、DsbA 及 DsbC)。在某些實施例中，本文所提供之組合物使用本文所提供之方法獲得。在某些實施例中，本文所提供之組合物具有與使用此項技術中已知之方法獲得的組合物相比減少水準之一或多種過程特異性及/或產物特異性雜質。

【0064】 在一些態樣中，提供如本文中所報告之方法用於純化含 Fc 雜二聚體多肽及用於減少含 Fc 雜二聚體多肽相關雜質之用途。實現產物特異性雜質之改良減少。在 CrossMab 特異性雜質之情況下，實現例如 $\frac{3}{4}$ 抗體之減少。

定義

【0065】 術語「多肽」及「蛋白」在本文中可互換使用以指任何長度之胺基酸的聚合物。該聚合物可為線性或分支鏈的，其可包含經修飾胺基酸，且其可由非胺基酸中斷。該等術語亦涵蓋已天然地或藉由干預經修飾之胺基酸聚合物；例如二硫鍵形成、糖基化、脂質化、乙醯化、磷酸化或任何其他操縱或修飾，諸如與標記組分結合。該定義內亦包括例如含有胺基酸(包括例如非天然胺基酸等)之一或多種類似物以及此項技術中已知之其他修飾的多肽。如本文所用之術語「多肽」及「蛋白」特定地涵蓋抗體。

【0066】 「經純化」多肽(例如，抗體或免疫黏附素)意謂該多肽之純度已增加，以致其以比其在其天然環境中存在及/或當最初在實驗室條件下合成及/或擴增時更純之形式存在。純度為相對術語且不必意謂絕對純度。如本文中可互換使用之術語「純化(purifying)」、「分離(separating)」或「分離(isolating)」係指增加來自包含所需分子及一或多種雜質之組合物或樣品的所需分子(諸如多特異性抗體，例如雙特異性抗體)之純度的程度。典型地，所需分子之純度的程度藉由自該組合物移除(完全地或部分地)至少一種雜質而增加。

【0067】 「結合所關注之抗原」之多特異性抗體為以充足親和力結合抗原(例如，蛋白)者，以致該多特異性抗體在靶向蛋白或表現該蛋白之細胞或組織時適用作診斷及/或治療劑，且不會顯著地與其他蛋白交叉反應。在該等實施例中，多特異性抗體與「非靶標」蛋白之結合程度將小於多特異性抗體與其特定靶標蛋白之結合的約 10%，如藉由例如螢光活化細胞分選(FACS)分析、放射性免疫沉澱(RIA)或 ELISA 等所測定。關於多特異性抗體與靶標分子之結合，術語「特異性結合」或「特異性結合於」特定多肽或

在特定多肽靶標上之抗原決定基或對其「具特異性」意謂顯著不同於非特異性相互作用(例如，非特異性相互作用可為結合於牛血清白蛋白或酪蛋白)之結合。特異性結合可例如藉由與對照分子之結合相比測定分子之結合來量測。例如，特異性結合可藉由與類似於靶標之對照分子(例如，過量非標記靶標)競爭來測定。在此情況下，若經標記靶標與探針之結合由過量未標記靶標競爭性地抑制，則指示特異性結合。如本文所用，術語「特異性結合」或「特異性結合於」特定多肽或在特定多肽靶標上之抗原決定基或對其「具特異性」可例如藉由對靶標具有至少約 200 nM、或者至少約 150 nM、或者至少約 100 nM、或者至少約 60 nM、或者至少約 50 nM、或者至少約 40 nM、或者至少約 30 nM、或者至少約 20 nM、或者至少約 10 nM、或者至少約 8 nM、或者至少約 6 nM、或者至少約 4 nM、或者至少約 2 nM、或者至少約 1 nM 或更大親和力之 K_d 的分子展現。在一實施例中，術語「特異性結合」係指如下結合，其中多特異性抗原結合蛋白結合於特定多肽或在特定多肽上之抗原決定基，而不會實質上結合於任何其他多肽或多肽抗原決定基。

【0068】 「結合親和力」一般係指在分子(例如多特異性抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間的非共價相互作用之合計強度。除非另外指示，否則如本文所用，「結合親和力」係指反映結合對之成員(例如，抗體及抗原)之間的 1:1 相互作用之固有結合親和力。分子 X 對其搭配物 Y 之親和力一般可由解離常數(K_d)表示。例如， K_d 可為約 200 nM 或更少、約 150 nM 或更少、約 100 nM 或更少、約 60 nM 或更少、約 50 nM 或更少、約 40 nM 或更少、約 30 nM 或更少、約 20 nM 或更少、約 10 nM 或更少、

約 8 nM 或更少、約 6 nM 或更少、約 4 nM 或更少、約 2 nM 或更少、或約 1 nM 或更少。親和力可藉由此項技術中已知之常見方法，包括本文所述之彼等來量測。低親和力抗體一般緩慢地結合抗原且傾向於快速地解離，而高親和力抗體一般更快結合抗原且傾向於保持更久結合。此項技術中已知多種量測結合親和力之方法，其中任一者均可用於本文所提供之方法及組合物。

【0069】 在一實施例中，根據本發明之「Kd」或「Kd 值」藉由在 25°C 下使用表面電漿共振分析使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 用固定靶標(例如抗原) CM5 晶片在 -10 反應單位(RU) 下量測。簡言之，羧基甲基化葡聚糖生物感測器晶片(CM5, BIAcore, Inc.) 根據供應商之說明書用 N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC) 及 N-羥基丁二醯亞胺(NHS) 活化。抗原用 10 mM 乙酸鈉(pH 4.8) 稀釋至 5 µg/ml (約 0.2 µM)，接著以 5 µl/分鐘之流動速率注射以實現大約 10 反應單位(RU) 之偶合蛋白。在抗原注射之後，注射 1 M 乙醇胺以阻斷未反應基團。關於動力學量測，在 25°C 下以大約 25 µl/min 之流動速率注射 Fab (例如 0.78 nM 至 500 nM) 於具有 0.05% Tween 20 之 PBS (PBST) 中的兩倍連續稀釋液。使用簡單一對一朗格繆爾結合模型(BIAcore 評估軟體 3.2 版) 藉由同時擬合締合及解離感測圖來計算締合速率($k_{\text{締合}}$) 及解離速率($k_{\text{解離}}$)。平衡解離常數 (Kd) 經計算為比率 $k_{\text{解離}}/k_{\text{締合}}$ 。參見例如 Chen 等人, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)。若藉由以上表面電漿共振分析發現締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ，則該締合速率可藉由使用螢光淬滅技術來測定，該螢光淬滅技術量測在 25°C 下 20 nM 抗-抗原抗體(Fab 形式) 在 PBS (pH 7.2) 中在遞增濃度之抗原存在下的

螢光發射強度(激發= 295 nm；發射= 340 nm，16 nm 帶通)之增加或降低，該螢光發射強度如光譜儀中所量測，該光譜儀如停流裝備分光光度計(Aviv Instruments)或具有攪拌杯之 8000- 系列 SLM-Aminco 分光光度計(ThermoSpectronic)。

【0070】 出於本文目的之「活性(Active)」或「活性(activity)」係指多肽形式(諸如多特異性抗體)，其保留原生或天然存在之多肽的生物及/或免疫活性，其中「生物」活性係指由原生或天然存在之多肽引起的生物功能(抑制或刺激)，誘導針對由原生或天然存在之多肽具有的抗原性抗原決定基產生抗體之能力除外，且「免疫」活性係指誘導針對由原生或天然存在之多肽具有的抗原性抗原決定基產生抗體之能力。

【0071】 除非另外規定，否則關於本文所提供之多特異性抗原結合蛋白，諸如抗體、其片段或衍生物，「生物活性(Biologically active)」及「生物活性(biological activity)」及「生物特徵(biological characteristics)」意謂具有結合於生物分子之能力。

【0072】 術語「抗體」在本文中以最廣泛意義使用且特定地涵蓋單株抗體、多株抗體、由至少兩種完整抗體形成之多特異性抗體(例如，雙特異性抗體)及抗體片段，只要其展現所需生物活性即可。術語「免疫球蛋白」(Ig)在本文中可與抗體互換使用。

【0073】 抗體為天然存在之免疫球蛋白分子，其具有變化結構，所有結構均基於免疫球蛋白折疊。例如，IgG 抗體具有兩條「重」鏈及兩條「輕」鏈，該等鏈由二硫鍵鍵結以形成功能性抗體。各重鏈及輕鏈自身包含「恆定」(C)及「可變」(V)區。V 區決定抗體之抗原結合特異性，而 C 區提供結

構支撐及與免疫效應子非抗原特異性相互作用之功能。抗體或抗體之抗原結合片段之抗原結合特異性為抗體特異性結合於特定抗原之能力。

【0074】 抗體之抗原結合特異性由 V 區之結構特徵決定。變異性未可在變域之 110 個胺基酸跨度內均勻地分佈。實際上，V 區由藉由具有極端變異性之較短區(稱作「高變區」)隔開之具有 15-30 個胺基酸之相對不變延伸(稱作構架區(FR))組成，該等較短區各自為 9-12 個胺基酸長。原生重鏈及輕鏈之可變域各自包含四個 FR，該等 FR 主要採用 β -折疊組態，由三個高變區連接，該等高變區形成連接 β -折疊結構之環且在一些情況下形成 β -折疊結構之一部分。各鏈中之高變區藉由 FR 緊密地保持在一起且與其他鏈之高變區一起有助於形成抗體之抗原結合位點(參見 Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。恆定域未直接牽涉於抗體與抗原之結合中，但展現多種效應子功能，諸如使抗體參與抗體依賴性細胞毒性 (ADCC)。

【0075】 各 V 區典型地包含三個互補決定區(「CDR」，其中每一者均含有「高變環」)及四個構架區。抗體結合位點(以實質親和力結合於特定所需抗原所需之最小結構單元)將因此典型地包括三個 CDR，及至少三個、較佳地四個散佈在其間以保持且提供呈適當構形之 CDR 的構架區。經典四鏈抗體具有由 V_H 及 V_L 域合作界定之抗原結合位點。諸如駱駝及鯊魚抗體之某些抗體缺乏輕鏈且僅依賴於由重鏈形成之結合位點。可製備單域經工程改造之免疫球蛋白，其中結合位點單獨地由重鏈或輕鏈形成，缺乏 V_H 與 V_L 之間的合作。

【0076】 術語「可變」係指如下實情，即可變域之某些部分在抗體之中在序列方面廣泛不同，且用於各特定抗體對其特定抗原之結合及特異性中。然而，變異性未在抗體之可變域中均勻地分佈。其集中於輕鏈及重鏈可變域中之三個稱作高變區之區段中。可變域之更高度保守部分稱作構架區(FR)。原生重鏈及輕鏈之可變域各自包含四個FR，該等FR主要採用 β -折疊組態，由三個高變區連接，該等高變區形成連接 β -折疊結構之環且在一些情況下形成 β -折疊結構之一部分。各鏈中之高變區藉由FR緊密地保持在一起且與其他鏈之高變區一起有助於形成抗體之抗原結合位點(參見 Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。恆定域未直接牽涉於抗體與抗原之結合中，但展現多種效應子功能，諸如使抗體參與抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。

【0077】 術語「高變區」當用於本文中時係指抗體中負責抗原結合之胺基酸殘基。高變區可包含來自「互補決定區」或「CDR」之胺基酸殘基(例如，在 V_L 中約殘基 24-34 (L1)、50-56 (L2)及 89-97 (L3)周圍，及在 V_H 中約 31-35B (H1)、50-65 (H2)及 95-102 (H3)周圍(Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))及/或來自「高變環」之彼等殘基(例如，在 V_L 中殘基 26-32 (L1)、50-52 (L2)及 91-96 (L3)，及在 V_H 中 26-32 (H1)、52A-55 (H2)及 96-101 (H3) (Chothia 及 Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。

【0078】 「構架」或「FR」殘基為除如本文所定義之高變區殘基外之彼等可變域殘基。

【0079】 在抗體或半抗體之背景下的「鉸鏈區」一般定義為自人類 IgG1 之 Glu216 延伸至 Pro230 (Burton, *Molec. Immunol.*22:161-206 (1985))。其他 IgG 同型之鉸鏈區可藉由將形成重鏈內 S-S 鍵之第一個及最後一個半胱胺酸殘基置於相同位置中而與 IgG1 序列進行比對。

【0080】 Fc 區之「下部鉸鏈區」通常定義為 Fc 區之緊挨 C 端的殘基至鉸鏈區之延伸，亦即殘基 233 至 239。在本申請案之前，FcγR 結合一般歸因於在 IgG Fc 區之下部鉸鏈區中的胺基酸殘基。

【0081】 人類 IgG Fc 區之「CH2 域」通常自 IgG 之約殘基 231 延伸至約 340。CH2 域為獨特的，因為其未與另一域緊密配對。更確切地，兩條 N 連接之分支碳水化合物鏈插入完整原生 IgG 分子之兩個 CH2 域之間。已推測，碳水化合物可提供用於域-域配對之替代物且幫助穩定化 CH2 域。Burton, *Molec. Immunol.*22:161-206 (1985)。

【0082】 「CH3 域」包含 Fc 區中 C 端殘基至 CH2 域之延伸(亦即，IgG 之約胺基酸殘基 341 至約胺基酸殘基 447)。

【0083】 「抗體片段」包含完整抗體之一部分，較佳地包含其抗原結合區。抗體片段之實例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 及 Fv 片段；雙功能抗體；串聯雙功能抗體(taDb)、線性抗體(例如，美國專利第 5,641,870 號，實例 2；Zapata 等人, *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995))；一臂抗體、單一可變域抗體、微型抗體、單鏈抗體分子；由抗體片段形成之多特異性抗體(例如，包括但不限於 Db-Fc、taDb-Fc、taDb-CH3、(scFV)₄-Fc、二-scFv、二-scFv 或串聯(二,三)-scFv)；及雙特異性 T 細胞銜接子(BiTE)。

【0084】 抗體之木瓜蛋白酶消化產生兩個一致抗原結合片段(稱作「Fab」

片段)，及殘餘「Fc」片段(反映容易結晶之能力的名稱)。Fab 片段由整個 L 鏈連同 H 鏈之可變區域(VH)及一條重鏈之第一恆定域(CH1)組成。抗體之胃蛋白酶處理產生單一大 F(ab')₂ 片段，該片段粗略地對應於具有二價抗原結合活性之兩個二硫鍵連接之 Fab 片段且仍能夠與抗原交聯。Fab' 片段與 Fab 片段之不同之處在於在 CH1 域之羧基端處具有額外數個殘基，包括來自抗體鉸鏈區之一或多個半胱胺酸。Fab'-SH 在本文中為其中恆定域之半胱胺酸殘基具有游離硫醇基之 Fab'-SH 之名稱。F(ab')₂ 抗體片段最初以 Fab' 片段對之形式產生，該等片段之間具有鉸鏈半胱胺酸。亦已知抗體片段之其他化學偶合。

【0085】 「Fv」為含有完全抗原識別及抗原結合位點之最小抗體片段。此區由一個重鏈及一個輕鏈可變域呈緊密、非共價締合形式之二聚體組成。在此組態中，各可變域之三個高變區相互作用以在 V_H-V_L 二聚體之表面上界定抗原結合位點。總之，六個高變區向抗體賦予抗原結合特異性。然而，即使單一可變域(或僅包含對抗原具特異性之三個高變區的 Fv 之一半)亦具有識別及結合抗原之能力，不過親和力低於完整結合位點。

【0086】 Fab 片段亦含有輕鏈之恆定域及重鏈之第一恆定域(CH1)。Fab' 片段與 Fab 片段之不同之處在於在重鏈 CH1 域之羧基端處添加數個殘基，包括來自抗體鉸鏈區之一或多個半胱胺酸。Fab'-SH 在本文中為其中恆定域之半胱胺酸殘基具有至少一個游離硫醇基之 Fab'-SH 之名稱。F(ab')₂ 抗體片段最初以 Fab' 片段對之形式產生，該等片段之間具有鉸鏈半胱胺酸。亦已知抗體片段之其他化學偶合。

【0087】 來自任何脊椎動物物種之抗體(免疫球蛋白)的「輕鏈」可基於其

恆定域之胺基酸序列經指派兩種明顯不同的類型(稱作 κ (kappa) 及 λ (lambda))之一。

【0088】 視其重鏈之恆定域的胺基酸序列而定,抗體可經指派不同類別。存在五個主要類別之完整抗體: IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM, 且此等類別中的一些可進一步分成亞類(同型), 例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA 及 IgA2。對應於不同類別之抗體的重鏈恆定域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。不同類別之免疫球蛋白的次單元結構及三維組態為熟知的。

【0089】 「單鏈 Fv」或「scFv」抗體片段包含抗體之 V_H 及 V_L 域, 其中此等域存在於單一多肽鏈中。在一些實施例中, Fv 多肽進一步包含在 V_H 與 V_L 域之間之多肽連接子, 其使得 scFv 能夠形成抗原結合所需之結構。關於 scFv 之回顧, 參見 Plückthun *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第 113 卷, Rosenberg 及 Moore 編, Springer-Verlag, New York, 第 269-315 頁 (1994)。

【0090】 術語「雙功能抗體」係指具有兩個抗原結合位點之小抗體片段, 該等片段在同一多肽鏈(V_H - V_L)中包含連接至輕鏈可變域(V_L)的重鏈可變域(V_H)。藉由使用過短而不允許同一鏈上的兩個域之間配對之連接子, 迫使該等域與另一鏈之互補域配對且產生兩個抗原結合位點。雙功能抗體更充分地描述於例如 EP 404,097; WO 93/11161; 及 Hollinger 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)中。

【0091】 如本文所用, 術語「半抗體」或「半聚體」係指單價抗原結合多肽。在某些實施例中, 半抗體或半聚體包含 V_H/V_L 單元且視情況包含免疫球蛋白恆定域之至少一部分。在某些實施例中, 半抗體或半聚體包含與

一條免疫球蛋白輕鏈締合之一條免疫球蛋白重鏈，或其抗原結合片段。在某些實施例中，半抗體或半聚體為單特異性的，亦即結合於單一抗原或抗原決定基。熟習此項技術者應容易理解，半抗體可具有由單一可變域組成之抗原結合域，例如源於駱駝科。

【0092】 術語「VH/VL 單元」係指抗體中包含至少一個 VH HVR 及至少一個 VL HVR 之抗原結合區。在某些實施例中，VH/VL 單元包含至少一個、至少兩個或全部三個 VH HVR 及至少一個、至少兩個或全部三個 VL HVR。在某些實施例中，VH/VL 單元進一步包含構架區(FR)之至少一部分。在一些實施例中，VH/VL 單元包含三個 VH HVR 及三個 VL HVR。在一些該等實施例中，VH/VL 單元包含至少一個、至少兩個、至少三個或全部四個 VH FR 及至少一個、至少兩個、至少三個或全部四個 VL FR。

【0093】 術語「多特異性抗體」以最廣泛意義使用且特定地涵蓋包含具有多抗原決定基特異性之抗原結合域的抗體(亦即，能夠特異性地結合於一種生物分子上之兩個或兩個以上不同抗原決定基或能夠特異性地結合於兩種或兩種以上不同生物分子上之抗原決定基)。在一些實施例中，多特異性抗體(諸如雙特異性抗體或二價 $F(ab')_2$)之抗原結合域包含兩個 VH/VL 單元，其中第一 VH/VL 單元特異性地結合於第一抗原決定基且第二 VH/VL 單元特異性地結合於第二抗原決定基，其中各 VH/VL 單元包含重鏈可變域(VH)及輕鏈可變域(VL)。該等多特異性抗體包括但不限於全長抗體、具有兩個或兩個以上 VL 及 VH 域之抗體、抗體片段(諸如 Fab、Fv、dsFv、scFv)、雙功能抗體、雙特異性抗體及三功能抗體、已經共價或非共價連接之抗體片段。進一步包含重鏈恆定區之至少一部分及/或輕鏈恆定區之至少一部分

的 VH/VL 單元亦可稱作「半聚體」或「半抗體」。在一些實施例中，半抗體包含單一重鏈可變區之至少一部分及單一輕鏈可變區之至少一部分。在一些該等實施例中，包含兩種半抗體且結合於兩種抗原之雙特異性抗體包含結合於第一抗原或第一抗原決定基但不結合於第二抗體或第二抗原決定基之第一半抗體及結合於第二抗原或第二抗原決定基且不結合於第一抗原或第一抗原決定基之第二半抗體。根據一些實施例，多特異性抗體為以 5 M 至 0.001 pM、3 M 至 0.001 pM、1 M 至 0.001 pM、0.5 M 至 0.001 pM、或 0.1 M 至 0.001 pM 之親和力結合於各抗原或抗原決定基之 IgG 抗體。在一些實施例中，半聚體包含充足部分之重鏈可變區以允許與第二半聚體形成分子內二硫鍵。在一些實施例中，半聚體包含杵突變或臼突變，例如以允許與包含互補臼突變或杵突變之第二半聚體或半抗體雜二聚化。杵突變及臼突變進一步論述於下文中。

【0094】 「雙特異性抗體」為包含能夠特異性地結合於一種生物分子上之兩種不同抗原決定基或能夠特異性地結合於兩種不同生物分子上之抗原決定基之抗原結合域的多特異性抗體。雙特異性抗體亦可在本文中稱作具有「雙重特異性」或為「雙重特異性的」。除非另外指示，否則由雙特異性抗體結合之抗原在雙特異性抗體名稱中列出之次序為任意的。在一些實施例中，雙特異性抗體包含兩種半抗體，其中各半抗體包含單一重鏈可變區及視情況重鏈恆定區之至少一部分，及單一輕鏈可變區及視情況輕鏈恆定區之至少一部分。在某些實施例中，雙特異性抗體包含兩種半抗體，其中各半抗體包含單一重鏈可變區及單一輕鏈可變區且不包含超過一個單一重鏈可變區且不包含超過一個單一輕鏈可變區。在一些實施例中，雙特異

性抗體包含兩種半抗體，其中各半抗體包含單一重鏈可變區及單一輕鏈可變區，且其中第一半抗體結合於第一抗原且不結合於第二抗原且第二半抗體結合於第二抗原且不結合於第一抗原。

【0095】 如本文所用，術語「杵臼」或「KiH」技術係指藉由將突起(杵)引入至一種多肽中且將空腔(臼)引入至另一多肽中該等多肽相互作用之界面處而引導兩種多肽活體外或活體內一起配對之技術。例如，KiH 已經引入至抗體之 Fc:Fc 結合界面、CL:CH1 界面或 VH/VL 界面中(參見例如 US 2011/0287009、US2007/0178552、WO 96/027011、WO 98/050431 及 Zhu 等人, 1997, *Protein Science* 6:781-788)。在一些實施例中，KiH 驅動在多特异性抗體之製造期間兩種不同重鏈一起配對。例如，在 Fc 區中具有 KiH 之多特异性抗體可進一步包含連接至各 Fc 區之單一可變域，或進一步包含與相似或不同輕鏈可變域配對之不同重鏈可變域。KiH 技術亦可用於使兩種不同的受體細胞外域一起配對或使包含不同靶標識別序列之任何其他多肽序列配對(例如，包括親和體、肽體及其他 Fc 融合物)。

【0096】 如本文所用，術語「杵突變」係指將突起(杵)引入至多肽中該多肽與另一多肽相互作用之界面處的突變。在一些實施例中，另一多肽具有臼突變(參見例如 US 5,731,168、US 5,807,706、US 5,821,333、US 7,695,936、US 8,216,805，各自以引用之方式整體併入本文中)。

【0097】 如本文所用，術語「臼突變」係指將空腔(臼)引入至多肽中該多肽與另一多肽相互作用之界面處的突變。在一些實施例中，另一多肽具有杵突變(參見例如 US 5,731,168、US 5,807,706、US 5,821,333、US 7,695,936、US 8,216,805，各自以引用之方式整體併入本文中)。

【0098】 表述「單域抗體」(sdAb)或「單一可變域(SVD)抗體」一般係指其中單一可變域(VH 或 VL)可賦予抗原結合之抗體。換言之，該單一可變域無需與另一可變域相互作用來識別靶標抗原。單域抗體之實例包括源於駱駝科動物(羊駝及駱駝)及軟骨魚綱(例如護士鯊)之彼等及由人類及小鼠抗體以重組方法產生之彼等(*Nature* (1989) 341:544-546; *Dev Comp Immunol* (2006) 30:43-56; *Trend Biochem Sci* (2001) 26:230-235; *Trends Biotechnol* (2003):21:484-490; WO 2005/035572; WO 03/035694; *FEBS Lett* (1994) 339:285-290; WO00/29004; WO 02/051870)。

【0099】 如本文所用，術語「單株抗體」係指獲自實質上均質抗體之群體的抗體，亦即，構成該群體之個別抗體為一致的及/或結合相同抗原決定基，除了可在該單株抗體之產生期間出現之可能變異體，該等變異體一般少量存在。與典型地包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑形成對比，各單株抗體針對抗原上之單一決定子。除了其特異性，該等單株抗體因為其不受其他免疫球蛋白污染亦為有利的。修飾語「單株」指示該抗體之特徵獲自抗體的實質上均質群體，且不應解釋為需要由任何特定方法產生該抗體。例如，欲根據本文所提供之方法使用的單株抗體可藉由首先由 Kohler 等人, *Nature* 256:495 (1975)描述之融合瘤方法製得，或可藉由重組 DNA 方法製得(參見例如美國專利第 4,816,567 號)。「單株抗體」亦可使用例如 Clackson 等人, *Nature* 352:624-628 (1991)及 Marks 等人, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)中所述之技術由噬菌體抗體文庫分離。

【0100】 本文中之單株抗體特定地包括「嵌合」抗體(免疫球蛋白)，其中重鏈及/或輕鏈之一部分與源於特定物種或屬特定抗體類別或亞類之抗體中

的相應序列一致或同源，而該(等)鏈之剩餘部分與源於另一物種或屬另一抗體類別或亞類之抗體中的相應序列一致或同源，以及該等抗體之片段，只要其展現所需生物活性即可(美國專利第 4,816,567 號；Morrison 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。本文中所關注之嵌合抗體包括包含源於非人類靈長類動物(例如舊大陸猴，諸如狒狒、恆河猴或食蟹獼猴)之可變域抗原結合序列及人類恆定區序列的「靈長類化」抗體(美國專利第 5,693,780 號)。

【0101】 非人類(例如鼠類)抗體之「人類化」形式為含有源於非人類免疫球蛋白之最小序列的嵌合抗體。主要地，人類化抗體為其中來自接受者之高變區的殘基由來自非人類物種(供體抗體)之高變區的殘基置換之人類免疫球蛋白(接受者抗體)，該非人類物種諸如小鼠、大鼠、兔或具有所需特異性、親和力及能力之非人類靈長類動物。在一些情況下，人類免疫球蛋白之構架區(FR)殘基由相應非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含在接受者抗體中或在供體抗體中未發現之殘基。進行此等修飾以進一步細化抗體效能。一般而言，人類化抗體將包含至少一個且典型地兩個可變域中之實質上全部，其中全部或實質上全部高變環對應於非人類免疫球蛋白之彼等且全部或實質上全部 FR 為人類免疫球蛋白序列之彼等，除了如上文所述之 FR 取代。人類化抗體視情況亦將包含免疫球蛋白恆定區(典型地，人類免疫球蛋白之恆定區)的至少一部分。關於進一步詳情，參見 Jones 等人, *Nature* 321:522-525 (1986)；Riechmann 等人, *Nature* 332:323-329 (1988)；及 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。

【0102】 為了達成本文中之目的，「完整抗體」為包含重鏈及輕鏈可變

域以及 Fc 區之抗體。恆定域可為原生序列恆定域(例如，人類原生序列恆定域)或其胺基酸序列變異體。較佳地，完整抗體具有一或多種效應子功能。

【0103】 「原生抗體」通常為具有約 150,000 道爾頓之雜四聚體糖蛋白，由兩條一致之輕(L)鏈及兩條一致之重(H)鏈構成。各輕鏈藉由一個共價二硫鍵連接至重鏈，而二硫鍵之數目在不同免疫球蛋白同型之重鏈之中變化。各重鏈及輕鏈亦具有規律間隔之鏈內二硫橋。各重鏈在一個末端處具有可變域(V_H)，隨後為多個恆定域。各輕鏈在一個末端處具有可變域(V_L)且在其另一末端處具有恆定域；該輕鏈之恆定域與該重鏈之第一恆定域對準，且該輕鏈可變域與該重鏈之可變域對準。咸信特定胺基酸殘基在輕鏈與重鏈可變域之間形成界面。

【0104】 「裸抗體」為未結合於異源分子(諸如細胞毒性部分或放射性標記)之抗體(如本文所定義)。

【0105】 如本文所用，術語「免疫黏附素」指明組合異源蛋白(「黏附素」)之結合特異性與免疫球蛋白恆定域之效應子功能的分子。結構上，免疫黏附素包含具有所需結合特異性之胺基酸序列與免疫球蛋白恆定域序列(例如，IgG 之 CH₂ 及/或 CH₃ 序列)的融合物，該胺基酸序列並非抗體之抗原識別及結合位點(亦即，與抗體之恆定區相比為「異源的」)。例示性黏附素序列包括包含受體或配位體中結合於所關注之蛋白的部分之相鄰胺基酸序列。黏附素序列亦可為結合所關注之蛋白，但並非受體或配位體序列之序列(例如，肽體中之黏附素序列)。該等多肽序列可藉由多種方法選擇或鑒別，包括噬菌體呈現技術及高通量分選方法。免疫黏附素中之免疫球蛋白恆定域序列可自任何免疫球蛋白，諸如 IgG-1、IgG-2、IgG-3 或 IgG-4 亞型、IgA (包

括 IgA-1 及 IgA-2)、IgE、IgD 或 IgM 獲得。

【0106】 在某些實施例中，含 Fc 區雜二聚體多肽為抗體、雙特異性抗體或 Fc-融合蛋白

【0107】 在某些實施例中，根據本文所提供之方法產生的 Fc-融合蛋白為經靶向免疫細胞因子。在某些實施例中，經靶向免疫細胞因子為 CEA-IL2v 免疫細胞因子。在某些實施例中，CEA-IL2v 免疫細胞因子為 RG7813。在某些實施例中，經靶向免疫細胞因子為 FAP-IL2v 免疫細胞因子。在某些實施例中，FAP-IL2v 免疫細胞因子為 RG7461。

【0108】 在某些實施例中，根據本文所提供之方法產生的多特異性抗體(諸如雙特異性抗體)結合 CEA 及至少一種額外靶標分子。在某些實施例中，根據本文所提供之方法產生的多特異性抗體(諸如雙特異性抗體)結合腫瘤靶向細胞因子及至少一種額外靶標分子。在某些實施例中，根據本文所提供之方法產生的多特異性抗體融合至 IL2v (亦即，介白素 2 變異體)及至少一種額外靶標分子。在某些實施例中，根據本文所提供之方法產生的多特異性抗體為 T 細胞雙特異性抗體(亦即，雙特異性 T 細胞銜接子或 BiTE)。

【0109】 在一些實施例中，抗體「效應子功能」係指可歸因於抗體之 Fc 區(原生序列 Fc 區或胺基酸序列變異體 Fc 區)的彼等生物活性，且隨抗體同型變化。抗體效應子功能之實例包括：C1q 結合及補體依賴性細胞毒性；Fc 受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；噬菌作用；細胞表面受體之下調。

【0110】 「補體依賴性細胞毒性」或「CDC」係指分子在補體存在下溶解靶標之能力。補體活化路徑藉由補體系統之第一組分(C1q)結合於與同源

抗原複合之分子(例如多肽(例如抗體))而起始。為了評估補體活化，可執行 CDC 分析，例如，如 Gazzano-Santoro 等人, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996) 中所述。

【0111】 「抗體依賴性細胞介導之細胞毒性」及「ADCC」係指細胞介導之反應，其中表現 Fc 受體(FcR)之非特異性細胞毒性細胞(例如，自然殺手(NK)細胞、嗜中性粒細胞及巨噬細胞)識別靶標細胞上之結合抗體且隨後引起靶標細胞之溶解。用於介導 ADCC 之原代細胞 NK 細胞僅表現 Fc γ RIII，而單核細胞表現 Fc γ RI、Fc γ RII 及 Fc γ RIII。造血細胞上之 FcR 表現概述於 Ravetch 及 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)第 464 頁上的表 3 中。為了評估所關注之細胞的 ADCC 活性，可執行活體外 ADCC 分析，諸如美國專利第 5,500,362 號或第 5,821,337 號中所述者。適用於該等分析之效應子細胞包括外周血單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。或者或另外，所關注之分子的 ADCC 活性可活體內，例如在動物模型(諸如 Clynes 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* 95:652-656 (1998)中所揭示者)中評估。

【0112】 「人類效應子細胞」為表現一或多種 FcR 且執行效應子功能之白血球。在一些實施例中，該等細胞至少表現 Fc γ RIII 且進行 ADCC 效應子功能。介導 ADCC 之人類白血球之實例包括外周血單核細胞(PBMC)、自然殺手(NK)細胞、單核細胞、細胞毒性 T 細胞及嗜中性粒細胞；其中 PBMC 及 NK 細胞為較佳。

【0113】 術語「Fc 受體」或「FcR」用於描述結合於抗體 Fc 區之受體。在一些實施例中，FcR 為原生序列人類 FcR。此外，較佳 FcR 為結合 IgG 抗體者(γ 受體)且包括 Fc γ RI、Fc γ RII 及 Fc γ RIII 亞類之受體，包括此等受體

之等位基因變異體及替代地剪接形式。FcγRII 受體包括 FcγRIIA (「活化受體」)及 FcγRIIB (「抑制受體」)，其具有相似胺基酸序列，該等序列之不同之處主要在於其細胞質域。活化受體 FcγRIIA 在其細胞質域中含有基於免疫受體酪胺酸之活化基序(ITAM)。抑制受體 FcγRIIB 在其細胞質域中含有基於免疫受體酪胺酸之抑制基序(ITIM)。(參見 Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997))。FcR 回顧於 Ravetch 及 Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)；Capel 等人, *Immunomethods*, 4:25-34 (1994)；及 de Haas 等人, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995)中。其他 FcR (包括未來欲鑒別之彼等)在本文中由術語「FcR」涵蓋。該術語亦包括新生兒受體 FcRn，其負責將母體 IgG 轉移至胎兒(Guyer 等人, *J. Immunol.* 117:587 (1976)及 Kim 等人, *J. Immunol.* 24:249 (1994))。

【0114】 術語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及「宿主細胞培養物」可互換使用且指其中已經引入外源核酸之細胞，包括該等細胞的後代。宿主細胞包括「轉型體」及「轉型細胞」，其包括原代轉型細胞及源於其之後代，而與繼代數目無關。後代可能在核酸含量方面未與親本細胞完全一致，但可含有突變。本文中包括如關於初始轉型細胞中所篩選或選擇具有相同功能或生物活性之突變型後代。

【0115】 「雜質」係指不同於所需多肽產物之材料。雜質可指產物特異性多肽，諸如一臂抗體及錯誤組裝抗體、抗體變異體(包括鹼性變異體及酸性變異體)及聚集體。其他雜質包括過程特異性雜質，包括而不限於：宿主細胞材料，諸如宿主細胞蛋白(HCP)；瀝出之蛋白 A；核酸；另一多肽；內毒素；病毒性污染物；細胞培養基組分等。在一些實例中，雜質可為來自

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、禽細胞、真菌細胞之 HCP。在一些實例中，雜質可為來自哺乳動物細胞(諸如 CHO 細胞)之 HCP，亦即 CHO 細胞蛋白(CHOP)。雜質可指用於促進多特異性抗體之表現、折疊或組裝的附屬蛋白；例如原核伴侶蛋白，諸如 FkpA、DsbA 及 DsbC。

【0116】 如本文所用，「複合物」或「複合」係指經由並非肽鍵之鍵及/或力(例如，範德瓦耳斯、疏水性、親水性力)彼此相互作用之兩種或兩種以上分子的締合。在一實施例中，複合物為雜多聚體。應理解如本文所用，術語「蛋白複合物」或「多肽複合物」包括具有以蛋白複合物形式結合至蛋白之非蛋白實體(例如，包括但不限於化學分子，諸如毒素或偵測劑)的複合物。

【0117】 「經分離」核酸係指已經與其天然環境之組分分離的核酸分子。經分離核酸包括含於細胞中之核酸分子，該等細胞通常含有該核酸分子，但該核酸分子存在於染色體外或不同於其天然染色體位置之染色體位置處。

【0118】 關於參考多肽序列之「百分比(%)胺基酸序列一致性」係定義為在比對候選序列及引入之間隙(必要時)以實現最大百分比序列一致性之後，且不考慮作為序列一致性的一部分之任何保守取代，候選序列中與該參考多肽序列中之胺基酸殘基一致的胺基酸殘基之百分率。用於達成確定百分比胺基酸序列一致性之目的的比對可以在本領域之技能內的多種方式實現，例如使用公開可得之計算機軟體，諸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR)軟體。熟習此項技術者可確定用於比對序列之適當參

數，包括在所比較之序列的全長內實現最大比對所需之任何算法。在某些實施例中，使用序列比較電腦程序 ALIGN-2 產生%胺基酸序列一致性值。該 ALIGN-2 序列比較電腦程序由 Genentech, Inc.創造，且源代碼已由美國版權局(U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559 之用戶文檔歸檔，其中其登記在美國版權登記號 TXU510087 下。該 ALIGN-2 程序由 Genentech, Inc., South San Francisco, California 公開可得，或可由源代碼編譯。該 ALIGN-2 程序應編譯用於 UNIX 操作系統，包括數位 UNIX V4.0D。所有序列比較參數均由 ALIGN-2 程序設定且不變化。

【0119】 在其中 ALIGN-2 用於胺基酸序列比較之情形中，既定胺基酸序列 A 相對、與、或針對既定胺基酸序列 B 之%胺基酸序列一致性(其或者可表述為具有或包含相對、與、或針對既定胺基酸序列 B 之某一%胺基酸序列一致性的既定胺基酸序列 A)計算如下：

$$100 \times \text{分數 } X/Y$$

【0120】 其中 X 為在 A 及 B 之序列比對程序 ALIGN-2 的比對中由彼程序評分為一致匹配之胺基酸殘基的數目，且其中 Y 為 B 中胺基酸殘基之總數。應瞭解在胺基酸序列 A 之長度不等於胺基酸序列 B 之長度的情況下，A 相對 B 之%胺基酸序列一致性將不等於 B 相對 A 之%胺基酸序列一致性。除非另外特定陳述，否則本文所用之所有%胺基酸序列一致性值均如前一段落中所述使用 ALIGN-2 電腦程序獲得。

【0121】 術語「可變區」或「可變域」係指抗體重鏈或輕鏈中牽涉於抗體與抗原之結合中的域。原生抗體之重鏈及輕鏈(分別為 VH 及 VL)的可變域一般具有相似結構，其中各域包含四個保守構架區(FR)及三個高變區

(HVR)。(參見例如 Kindt 等人, *Kuby Immunology*, 第 6 版, W.H. Freeman and Co., 第 91 頁(2007)。)單一 VH 或 VL 域可足以賦予抗原結合特異性。此外, 結合特定抗原之抗體可使用來自結合該抗原的抗體之 VH 或 VL 域進行分離以分別篩選互補 VL 或 VH 域之文庫。參見例如 Portolano 等人, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson 等人, *Nature* 352:624-628 (1991)。

【0122】 如本文所用, 術語「載體」係指能夠傳播與其連接之另一核酸的核酸分子。該術語包括呈自主複製核酸結構之載體以及併入其中已引入其的宿主細胞之基因組中之載體。某些載體能夠指導其可操作性連接之核酸的表現。該載體在本文中稱作「表現載體」。

【0123】 如本文中關於層析所用, 術語「依序」係指呈特定次序之層析步驟; 例如第一層析步驟、隨後第二層析步驟、隨後第三層析步驟等。額外步驟可包括於依序層析步驟之間。

【0124】 如本文中關於層析所用, 術語「連續」係指具有第一層析材料及第二層析材料, 該等材料直接連接或呈允許該兩種層析材料之間的連續流動之一些其他機制。

【0125】 「載樣密度」係指與一定體積之層析材料(例如, 公升)接觸之組合物的量(例如, 公克)。在一些實例中, 載樣密度以 g/L 表述。

【0126】 「樣品」係指較大量之材料的一小部分。一般而言, 對樣品執行根據本文所述之方法的測試。樣品典型地獲自例如由經培養之表現重組多肽之細胞株(本文中亦稱作「產物細胞株」)或經培養之宿主細胞獲得的重組多肽製劑。如本文所用, 「宿主細胞」不含用於表現所關注之重組多肽或產物之基因。樣品可獲自例如但不限於所收集之細胞培養液、在純化過

程中之某一步驟處的過程中池、或最終經純化產物。樣品亦可包括稀釋劑、緩衝液、清潔劑及污染物質、碎片及其類似物，其被發現與所需分子(諸如多特異性抗體，例如雙特異性抗體)混合。

【0127】 對「約」本文中之值或參數之提及包括(且描述)自身有關彼值或參數之變化。例如，提及「約 X」之描述包括「X」之描述。

【0128】 應理解，本文所述之本發明的態樣及實施例包括「包含」態樣及實施例、「由其組成」及「基本上由其組成」。

【0129】 除非本文另外清楚指示，否則如本文中及附圖中所用，單數形式「一(a)」、「或(or)」及「該(the)」包括複數個提及物。應理解，本文所述之本發明的態樣及變化形式包括「由態樣及變化形式組成」及/或「基本上由態樣及變化形式組成」。

【0130】 本文所引用之所有參考文獻(包括專利申請案及公開案)均以引用之方式整體併入本文。

多特異性抗體之純化方法

【0131】 本文中提供用於純化多特異性抗體之方法。在某些實施例中，該多特異性抗體為雙特異性抗體。在某些實施例中，該多特異性抗體為包含結合第一靶標之第一 F(ab)及結合第二靶標之第二 F(ab)的二價 F(ab')₂。在某些實施例中，該多特異性抗體為雙重特異性抗體，亦即具有兩個在胺基酸序列方面一致之抗原結合臂的抗體，且其中各 Fab 臂能夠識別兩種抗原(諸如雙重作用 Fab 抗體)。

【0132】 在一些態樣中，多特異性抗體之純化包含捕捉層析、第一混合模式層析及第二混合模式層析之依序步驟。在一些實施例中，多特異性抗

體在捕捉層析之前經組裝。在一些實施例中，多特異性抗體在捕捉層析之後經組裝。

【0133】 在一些實施例中，多特異性抗體(諸如雙特異性抗體或二價 $F(ab')_2$) 包含兩個或兩個以上抗體臂，其中不同抗體臂結合不同抗原決定基。在某些實施例中，不同抗原決定基在同一抗原上。在某些實施例中，各抗原決定基在不同抗原上。在某些實施例中，抗體臂包含 VH/VL 單元。在某些實施例中，抗體臂包含半聚體，亦稱作半抗體。為了促進組裝，在某些實施例中，一個抗體臂之重鏈經修飾以包含「杵」且另一抗體臂之重鏈包含「臼」，以致第一重鏈之杵配合至第二重鏈之臼中。

【0134】 在某些實施例中，多特異性抗體之各臂在獨立細胞培養物中產生。在抗體臂於宿主細胞中表現之後，收集全細胞肉湯且均質化，且萃取該抗體臂。在某些實施例中，聚乙炔亞胺(PEI)在層析之前添加至細胞溶解產物中。在一些實施例中，細胞溶解產物在層析之前經離心。該多特異性抗體之各臂接著藉由捕捉層析純化(以致各臂在獨立層析管柱或膜上經純化)。在某些實施例中，捕捉層析為親和力層析。在某些實施例中，該親和力層析為蛋白 A 層析。在某些實施例中，該親和力層析為蛋白 G 層析。在某些實施例中，該親和力層析為蛋白 A/G 層析。在某些實施例中，該親和力層析為蛋白 L 層析。在捕捉層析之後，經純化抗體臂可例如藉由 SDS-PAGE、SEC 層析、質譜分析等進行分析。接著組合該多特異性抗體之經純化臂且使其組裝，如本文中別處更詳細地論述。

【0135】 在其他實施例中，多特異性抗體之各臂在獨立細胞培養物中產生。在抗體臂於宿主細胞中表現之後，收集全細胞肉湯且均質化。接著混

合來自各培養物之細胞均質物且萃取經組合之抗體臂。在一些實施例中，聚乙烯亞胺(PEI)在層析之前添加至細胞溶解產物中。在一些實施例中，細胞溶解產物在層析之前經離心。該多特異性抗體之經組合臂接著藉由親和力層析純化。在一些實施例中，該親和力層析為蛋白 A 層析。此時，經純化抗體臂可例如藉由 SDS-PAGESEC 層析、質譜分析等進行分析。接著組合該多特異性抗體之經純化臂且藉由本文所述之方法使其組裝。

【0136】 在其他實施例中，多特異性抗體之各臂在相同細胞培養物中產生。在抗體臂於宿主細胞中表現之後，收集全細胞肉湯且均質化且萃取抗體臂。在一些實施例中，聚乙烯亞胺(PEI)在層析之前添加至細胞溶解產物中。在一些實施例中，細胞溶解產物在層析之前經離心。該多特異性抗體之臂接著藉由親和力層析純化。在一些實施例中，該親和力層析為蛋白 A 層析。此時，經純化抗體臂可例如藉由 SDS-PAGE、SEC 層析、質譜分析等進行分析。接著藉由本文所述之方法使該多特異性抗體之經純化臂組裝。

【0137】 在一些實施例中，細胞溶解產物中 PEI 之最終濃度為至少約 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%或 5.0 中之任一者。在一些實施例中，細胞溶解產物中 PEI 之最終濃度在約 0.1%與 5%、0.1%與 1%、0.1%與 0.5%、0.5%與 5%、0.5%與 1%或 1%與 5%中之任一者之間。在一些實施例中，包含 PEI 之細胞溶解產物保持超過約 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、7 h、8 h、9 h、10 h、12 h、14 h、16 h、18 h、20 h 或 24 h 中之任一者。在一些實施例中，包含 PEI 之細胞溶解產物保持在約 1 h 與 24 h、1 h 與 6 h、6 h 與 12 h、12 h 與 18 h、

18 h 與 24 h 中之任一者之間。在一些實施例中，包含 PEI 之細胞溶解產物保持在約 10 h 與 14 h 中之任一者之間。在一些實施例中，包含 PEI 之細胞溶解產物保持在約 4°C 與 37°C 之間。在一些實施例中，包含 PEI 之細胞溶解產物保持在約環境溫度下。

【0138】 在一些實施例中，細胞溶解產物在層析之前藉由離心澄清。在一些實施例中，細胞溶解產物在層析之前經過濾。在一些實施例中，細胞溶解產物在層析之前經由 0.22 μm 過濾器過濾。

【0139】 親和力層析之實例包括但不限於例如蛋白 A 層析、蛋白 G 層析、蛋白 A/G 層析或蛋白 L 層析。親和力層析材料之實例包括但不限於 ProSep[®]-vA、ProSep[®] Ultra Plus、蛋白 A Sepharose[®] Fast Flow、Toyopearl[®] AF-rProtein A、MabSelect[™]、MabSelect SuRe[™]、MabSelect SuRe[™] LX、KappaSelect、CaptureSelect[™]及 CaptureSelect[™] FcXL。在某些實施例中，該親和力層析材料在管柱中。在某些實施例中，該親和力層析以「結合及溶離模式」(替代地稱作「結合及溶離過程」)執行。「結合及溶離模式」係指產物分離技術，其中樣品中之產物(諸如該多特異性抗體)結合親和力層析材料且隨後自該親和力層析材料溶離。在一些實施例中，該溶離為分步溶離，其中移動相之組成在溶離過程期間在一個或數個時機逐步改變。在某些實施例中，該溶離為梯度溶離，其中移動相之組成在溶離過程期間連續地改變。在某些實施例中，該親和力層析材料為膜。在某些實施例中，該親和力層析為蛋白 A 層析。在某些實施例中，該蛋白 A 層析為 MabSelect SuRe 層析。在某些實施例中，該親和力層析為 CaptureSelect 層析。在某些實施例中，該親和力層析為 CaptureSelect FcXL 層析。

【0140】 在某些實施例中，來自親和力層析步驟之溶離物隨後應用於第一混合模式層析。在某些實施例中，第一混合模式材料包含能夠具有一或多種以下官能性之官能基：陰離子交換、陽離子交換、氫鍵結、 π - π 鍵相互作用、親水性相互作用、嗜硫性相互作用及疏水性相互作用。在某些實施例中，第一混合模式材料包含能夠進行陰離子交換及疏水性相互作用之官能基。在某些實施例中，第一混合模式材料包含能夠進行陽離子交換及疏水性相互作用之官能基。在某些實施例中，第一混合模式材料含有 N-苯甲基-N-甲基乙醇胺、4-巰基-乙基-吡啶、2-苯甲醯胺基-4-巰基丁酸、己胺、或苯基丙胺、或交聯聚烯丙基胺。該等混合模式材料之實例包括 Capto™ Adhere 樹脂、Capto™ MMC 樹脂、MEP HyperCel™ 樹脂、HEA HyperCel™ 樹脂、PPA HyperCel™ 樹脂、Eshmuno® HCX、Capto™ Adhere ImpRes、Capto™ MMC Impres、Nuvia™ cPrime™ 膜。在一些實施例中，第一混合模式材料為 Capto™ Adhere 樹脂。在某些實施例中，第一混合模式材料為 Capto™ Adhere 樹脂。在某些實施例中，第一混合模式材料為 Capto™ MMC。在某些實施例中，第一混合模式層析不包括陶瓷羥磷灰石層析。在某些實施例中，第一混合模式層析以「結合及溶離」模式執行。在一些實施例中，該溶離為分步溶離。在某些實施例中，該溶離為梯度溶離。在某些實施例中，第一混合模式層析以「流通」模式執行。在以上某些實施例中，第一混合模式材料在管柱中。在以上某些實施例中，第一混合模式材料在膜中。

【0141】 在某些實施例中，捕捉層析及第一混合模式層析為連續的，例如其中捕捉層析材料及第一混合模式材料直接地連接或藉由允許捕捉層析材料與第一混合模式材料之間的連續流動之一些其他機制連接。在某些實

施例中，捕捉層析及第一混合模式層析為相鄰的，其中第一混合模式層析直接地在捕捉層析之後執行。

【0142】 在某些實施例中，來自捕捉層析之溶離物在應用於第一混合模式樹脂之前經受一或多個額外層析步驟。例如，來自捕捉層析之溶離物可在經受第一混合模式層析之前經受呈任何次序及/或呈任何組合之任何一或多個以下層析步驟：疏水性相互作用(HIC)層析、陰離子交換層析、陽離子交換層析、尺寸排阻層析、親和力層析、陶瓷羥磷灰石(CHT)層析、親水性相互作用液相層析(HILIC)等。

【0143】 疏水性相互作用層析為根據疏水性分離生物分子之液相層析技術。HIC 層析材料之實例包括但不限於例如 Toyopearl®己基-650、Toyopearl®丁基-650、Toyopearl®苯基-650、Toyopearl®乙醚-650、HiTrap®瓊脂糖、辛基瓊脂糖(Octyl Sepharose)®、苯基瓊脂糖(Phenyl Sepharose)®或丁基瓊脂糖(Butyl Sepharose)®。在一些實施例中，HIC 層析材料包含苯基瓊脂糖。在某些實施例中，HIC 層析以「結合及溶離」模式執行。在一些實施例中，HIC 層析以「流通」模式執行。在以上一些實施例中，HIC 層析材料在管柱中。在以上一些實施例中，HIC 層析材料在膜中。

【0144】 陰離子交換層析材料為帶正電且具有用於與傳遞經過或通過固相之水溶液(諸如包含多特異性抗體及雜質之組合物)中的陰離子交換之游離陰離子的固相。在任何本文所述之方法的一些實施例中，陰離子交換材料可為膜、單片或樹脂。在一實施例中，陰離子交換材料可為樹脂。在一些實施例中，陰離子交換材料可包含一級胺、二級胺、三級胺或四級銨離子官能基、聚胺官能基、或二乙基胺基乙基官能基。陰離子交換材料之實

例為此項技術中已知的且包括但不限於 Poros® HQ 50、Poros® PI 50、Poros® D、Mustang® Q、Q Sepharose® Fast Flow (QSFF)、Accell™ Plus Quaternary Methyl Amine (QMA) 樹脂、Sartobind STIC® 及 DEAE-Sepharose®。在一些實施例中，陰離子交換層析以「結合及溶離」模式執行。在一些實施例中，陰離子交換層析以「流通」模式執行。在以上一些實施例中，陰離子交換層析材料在管柱中。在以上一些實施例中，陰離子交換層析材料在膜中。

【0145】 陽離子交換層析材料為帶負電且具有用於與傳遞經過或通過固相之水溶液(諸如包含多特異性抗體及雜質之組合物)中的陽離子交換之游離陰離子的固相。在任何本文所述之方法的一些實施例中，陽離子交換材料可為膜、單片或樹脂。在一些實施例中，陽離子交換材料可為樹脂。陽離子交換材料可包含羧酸官能基或磷酸官能基，諸如但不限於磷酸酯、羧酸、羧基甲基磺酸、磺基異丁基、磺基乙基、羧基、磺基丙基、磺醯基、磺基氧基乙基或原磷酸酯。在以上一些實施例中，陽離子交換層析材料為陽離子交換層析管柱。在以上一些實施例中，陽離子交換層析材料為陽離子交換層析膜。陽離子交換材料之實例為此項技術中已知的，包括但不限於 Mustang® S、Sartobind® S、SO₃ Monolith (諸如 CIM®、CIMmultus® 及 CIMac® SO₃)、S Ceramic HyperD®、Poros® XS、Poros® HS 50、Poros® HS 20、磺基丙基-Sepharose® Fast Flow (SPSFF)、SP-Sepharose® 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「結合及溶離」模式執行。在一些實施例中，陽離子交換層析以「流通」模式執行。在以上一些實施例中，陽離子交換層析材料在管柱中。在以上一些實

施例中，陽離子交換層析材料在膜中。

【0146】 羧磷灰石($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)層析材料之官能基包含晶體鈣離子之帶正電對(C-位點)及與晶體磷酸酯之三聯體締合的六個帶負電氧原子之叢集(P-位點)。C-位點、P-位點及羧基以固定模式分佈於晶體表面上。蛋白典型地在低濃度(例如 10–25 mM)之磷酸鹽緩衝液中經吸附至羧磷灰石，不過若負載於水、生理食鹽水或非磷酸鹽緩衝液中，則可吸附某些酸性蛋白。蛋白通常藉由增加之磷酸鹽梯度溶離，不過亦可使用 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 或 Cl^- 離子之梯度，諸如用於鹼性蛋白之選擇性溶離。在任何本文所述之方法的一些實施例中，羧磷灰石層析材料可為樹脂。在一些實施例中，羧磷灰石層析材料可為樹脂。在以上一些實施例中，羧磷灰石層析材料在管柱中。羧磷灰石層析材料之實例為此項技術中已知的，包括但不限於 CHT™ 陶瓷羧磷灰石、CHT 陶瓷羧磷灰石 I 型支撐物、CHT 陶瓷羧磷灰石 II 型支撐物。在一些實施例中，羧磷灰石層析以「結合及溶離」模式執行。在一些實施例中，羧磷灰石層析以「流通」模式執行。

【0147】 在一實施例中，如本文所報告之方法另外可包含一種自包含包含 Fc 域之雙特異性抗體的溶液分離該雙特異性抗體之方法，該方法包含(a)使該溶液與羧磷灰石層析介質接觸，(b)吸附該等雙特異性抗體至該羧磷灰石層析介質，及(c)在氯離子存在下自該羧磷灰石層析介質溶離該雙特異性抗體，其中該溶液進一步包含該雙特異性抗體之一或多個片段，該一或多個片段包含 Fc 域；及/或其中該溶液進一步包含一或多種具有大於該雙特異性抗體之分子量的分子量之多肽且包含該雙特異性抗體之兩條重鏈中的至少一者，該一或多種多肽進一步包含如 WO2015024896 中所提及之 Fc 域。

【0148】 在某些實施例中，來自捕捉層析之溶離物經受陰離子交換層析。在某些實施例中，陰離子交換層析為 Q Sepharose® Fast Flow (QSFF)。在某些實施例中，陰離子交換層析以「結合及溶離」模式執行。

【0149】 在某些實施例中，在第一混合模式層析之後收集的溶離物隨後應用於第二混合模式層析。在某些實施例中，第二混合模式材料包含能夠具有一或多種以下官能性之官能基：陰離子交換、陽離子交換、氫鍵結、 π - π 鍵相互作用、親水性相互作用、嗜疏性相互作用及疏水性相互作用。在某些實施例中，第二混合模式材料包含能夠進行陰離子交換及疏水性相互作用之官能基。在某些實施例中，第二混合模式材料包含能夠進行陽離子交換及疏水性相互作用之官能基。在某些實施例中，第二混合模式材料含有 N-苯甲基-N-甲基乙醇胺、4-巰基-乙基-吡啶、2-苯甲醯胺基-4-巰基丁酸、己胺、或苯基丙胺、或交聯聚烯丙基胺。該等混合模式材料之實例包括 Capto™ Adhere 樹脂、Capto™ MMC 樹脂、MEP HyperCel™ 樹脂、HEA HyperCel™ 樹脂、Eshmuno® HCX、Capto™ Adhere ImpRes、Capto™ MMC Impres、Nuvia™ Prime™ 膜。在一些實施例中，第二混合模式材料為 Capto™ Adhere 樹脂。在某些實施例中，第二混合模式材料為 Capto™ MMC。在某些實施例中，第二混合模式層析不包括陶瓷經磷灰石層析。在某些實施例中，第二混合模式層析以「結合及溶離」模式執行。在一些實施例中，該溶離為分步溶離。在某些實施例中，該溶離為梯度溶離。在某些實施例中，第一混合模式層析以「流通」模式執行。在以上某些實施例中，第二混合模式材料在管柱中。在以上某些實施例中，第二混合模式材料在膜中。

【0150】 在某些實施例中，第一混合模式層析及第二混合模式層析為連續的，例如其中捕捉層析材料及第一混合模式材料直接地連接或藉由允許捕捉層析材料與第一混合模式材料之間的連續流動之一些其他機制連接。在某些實施例中，第一混合模式層析及第二混合模式層析為連續的，其中第二混合模式層析直接地在第一混合模式層析之後執行。

【0151】 在某些實施例中，來自第一混合模式層析之溶離物在應用於第二混合模式樹脂之前經受一或多個額外層析操作。例如，來自第一混合模式層析之溶離物可在經受第二混合模式層析之前經受呈任何次序及/或呈任何組合之任何一或多個以下層析步驟：疏水性相互作用(HIC)層析、陰離子交換層析、陽離子交換層析、尺寸排阻層析、親和力層析、陶瓷羥磷灰石(CHT)層析、親水性相互作用液相層析(HILIC)等。

【0152】 在任何本文所述之方法的某些實施例中，來自第二混合模式層析之溶離物經受一或多個額外層析步驟。例如，來自第二混合模式層析之溶離物可經受呈任何次序及/或呈任何組合之任何一或多個以下層析步驟：疏水性相互作用(HIC)層析、陰離子交換層析、陽離子交換層析、尺寸排阻層析、親和力層析、陶瓷羥磷灰石(CHT)層析、親水性相互作用液相層析(HILIC)、混合模式層析等。

【0153】 在任何本文所述之方法的某些實施例中，該等方法包含使用緩衝液。在多特異性抗體之純化期間可採用多種緩衝液，取決於例如緩衝液之所需 pH、緩衝液之所需電導率、經純化之多特異性抗體的特徵、及純化方法。緩衝液可為載樣緩衝液、平衡緩衝液或洗滌緩衝液。在某些實施例中，載樣緩衝液、平衡緩衝液及/或洗滌緩衝液中之一或多者為相同的。在

某些實施例中，載樣緩衝液、平衡緩衝液及/或洗滌緩衝液為不同的。在任何本文所述之方法的某些實施例中，該緩衝液包含鹽。在某些實施例中，該緩衝液包含氯化鈉、乙酸鈉、Tris HCl、乙酸 Tris、磷酸鈉、磷酸鉀、MES、CHES、MOPS、BisTris、精胺酸、精胺酸 HCl 或其混合物。在某些實施例中，該緩衝液為氯化鈉緩衝液。在一些實施例中，該緩衝液為乙酸鈉緩衝液。在某些實施例中，該緩衝液為 Tris、精胺酸、磷酸鹽、MES、CHES 或 MOPS 緩衝液。

【0154】 「負載」係指經負載至層析材料上之組合物。載樣緩衝液為用於將該組合物(例如，包含多特異性抗體及雜質之組合物或包含抗體臂及雜質之組合物)負載至層析材料(諸如本文所述之層析材料中的任一者)上之緩衝液。該層析材料可在負載欲純化之組合物之前用平衡緩衝液平衡。洗滌緩衝液在將該組合物負載至層析材料上之後使用。溶離緩衝液用於自固相溶離所關注之多肽。

【0155】 將包含多特異性抗體之組合物(諸如包含多特異性抗體及雜質之組合物)負載至任何本文所述之層析材料上可針對多特異性抗體與雜質之分離經最佳化。在一些實施例中，當層析以結合及溶離模式執行時(例如，親和力層析、混合模式層析及離子交換層析，如本文所指示)，將包含多特異性抗體之組合物(諸如包含多特異性抗體及雜質之組合物)負載至任何本文所述之層析材料上針對多特異性抗體結合於層析材料經最佳化。

【0156】 電導率係指水溶液在兩個電極之間引導電流之能力。在溶液中，電流藉由離子轉運而流動。因此，隨著存在於水溶液中之離子的量增加，該溶液將具有較高電導率。電導率之量度的基礎單元為西門子(mS/cm)或歐

姆(姆歐)，且可使用電導率計，諸如多種型號之 Orion 電導率計來量測。由於電解質電導率為溶液中之離子攜帶電流的能力，溶液之電導率可藉由改變其中離子濃度而改變。例如，溶液中緩衝劑之濃度及/或鹽(例如，氯化鈉、乙酸鈉或氯化鉀)之濃度可改變以便實現所需電導率。較佳地，多種緩衝液之鹽濃度經修改以實現所需電導率。

【0157】 例如，在某些實施例中，包含多特異性抗體之組合物(諸如包含多特異性抗體及雜質之組合物)在處於多種不同 pH 值下之載樣緩衝液中負載至層析材料(例如，包含本文所述之層析材料中任一者的層析管柱)上，同時該載樣緩衝液之電導率恆定。或者，包含多特異性抗體之溶液可在處於多種不同電導率下之載樣緩衝液中負載至層析材料上，同時該載樣緩衝液之 pH 恆定。在將包含多特異性抗體之組合物(諸如包含多特異性抗體及雜質之組合物)負載至層析材料上且該多特異性抗體自該層析材料溶離至池部分中完成時，留在該池部分中之雜質的量提供關於該多特異性抗體與該雜質針對既定 pH 或電導率分離之資訊。同樣，關於其中該多特異性抗體流動通過該層析材料之層析，載樣緩衝液針對 pH 及電導率經最佳化以致該多特異性抗體流動通過層析，而雜質由層析材料保留或以不同於該多特異性抗體之速率流動通過該層析材料。

【0158】 在一些實施例中，包含多特異性抗體或抗體臂之溶液的載樣密度大於約 10 g/L、20 g/L、30 g/L、40 g/L、50 g/L、60 g/L、70 g/L、80 g/L、90 g/L、100 g/L、110 g/L、120 g/L、130 g/L、140 g/L 或 150 g/L 之親和力層析材料(例如，蛋白 A 層析材料)中任一者。在一些實施例中，包含多特異性抗體或抗體臂之溶液的載樣密度在約 10 g/L 與 20 g/L、20 g/L 與 30 g/L、

30 g/L 與 40 g/L、40 g/L 與 50 g/L、50 g/L 與 60 g/L、60 g/L 與 70 g/L、70 g/L 與 80 g/L、80 g/L 與 90 g/L、90 g/L 與 100 g/L 之捕捉層析材料(諸如親和力層析材料，例如蛋白 A 層析材料、蛋白 G 層析材料、蛋白 A/G 層析材料或蛋白 L 層析材料)中之任一者之間。

【0159】 在任何本文所述之方法之一些實施例中，在捕捉層析之後獲得的溶離物負載至陰離子交換層析材料(例如 Q Sepharose® Fast Flow (QSFF))上。在任何本文所述之方法之一些實施例中，在捕捉層析之後獲得的溶離物以大於約 30 g/L、40 g/L、50 g/L、60 g/L、70 g/L、80 g/L、90 g/L、100 g/L、110 g/L、120 g/L、130 g/L、140 g/L 或 150 g/L 之陰離子層析材料(例如 Q Sepharose® Fast Flow (QSFF))中任一者之多特異性抗體的載樣密度負載至陰離子交換層析材料上。在一些實施例中，在捕捉層析之後獲得的溶離物以在約 10 g/L 與 20 g/L、20 g/L 與 30 g/L、30 g/L 與 40 g/L、40 g/L 與 50 g/L、50 g/L 與 60 g/L、60 g/L 與 70 g/L、70 g/L 與 80 g/L、80 g/L 與 90 g/L、90 g/L 與 100 g/L 之陰離子交換層析材料(例如 Q Sepharose® Fast Flow (QSFF))中之任一者之間的多特異性抗體之載樣密度負載至陰離子交換層析材料上。

【0160】 在任何本文所述之方法之一些實施例中，在捕捉層析之後(視情況在捕捉層析及一或多個包含任何本文所述之層析操作的額外層析步驟之後)獲得的溶離物以大於約 30 g/L、40 g/L、50 g/L、60 g/L、70 g/L、80 g/L、90 g/L、100 g/L、110 g/L、120 g/L、130 g/L、140 g/L 或 150 g/L 之第一混合模式層析材料(例如 Capto™ Adhere 層析材料或 Capto™ MMC 層析材料)中任一者之多特異性抗體的載樣密度負載至第一混合模式層析材料上。在一些實施例中，在捕捉層析之後獲得的溶離物以在約 10 g/L 與 20 g/L、20 g/L

與 30 g/L、30 g/L 與 40 g/L、40 g/L 與 50 g/L、50 g/L 與 60 g/L、60 g/L 與 70 g/L、70 g/L 與 80 g/L、80 g/L 與 90 g/L、90 g/L 與 100 g/L 之第一混合模式層析材料(例如 Capto™ Adhere 層析材料或 Capto™ MMC 層析材料)中之任一者之間的多特異性抗體之載樣密度負載至第一混合模式層析材料上。

【0161】 在任何本文所述之方法之一些實施例中，在第一混合模式層析之後獲得的溶離物以大於約 30 g/L、40 g/L、50 g/L、60 g/L、70 g/L、80 g/L、90 g/L、100 g/L、110 g/L、120 g/L、130 g/L、140 g/L 或 150 g/L 之第二混合模式層析材料(例如 Capto™ Adhere 層析材料或 Capto™ MMC 層析材料)中任一者之多特異性抗體的載樣密度負載至第二混合模式層析材料上。在一些實施例中，在第一混合模式層析之後獲得的溶離物以在約 10 g/L 與 20 g/L、20 g/L 與 30 g/L、30 g/L 與 40 g/L、40 g/L 與 50 g/L、50 g/L 與 60 g/L、60 g/L 與 70 g/L、70 g/L 與 80 g/L、80 g/L 與 90 g/L、90 g/L 與 100 g/L 之混合模式層析材料(例如 Capto™ Adhere 層析材料或 Capto™ MMC 層析材料)中之任一者之間的多特異性抗體之載樣密度負載至第二混合模式層析材料上。

【0162】 在任何本文所述之方法之一些實施例中，在第二混合模式層析之後獲得的溶離物以大於約 30 g/L、40 g/L、50 g/L、60 g/L、70 g/L、80 g/L、90 g/L、100 g/L、110 g/L、120 g/L、130 g/L、140 g/L 或 150 g/L 之後續層析材料中任一者之多特異性抗體的載樣密度負載至後續層析材料(諸如疏水性相互作用(HIC)層析材料、陰離子交換層析材料、陽離子交換層析材料、尺寸排阻層析材料、親和力層析材料或額外混合模式層析材料)上。在一些實施例中，在第二混合模式層析之後獲得的溶離物以在約 10 g/L 與 20 g/L、

20 g/L 與 30 g/L、30 g/L 與 40 g/L、40 g/L 與 50 g/L、50 g/L 與 60 g/L、60 g/L 與 70 g/L、70 g/L 與 80 g/L、80 g/L 與 90 g/L、90 g/L 與 100 g/L 之後續層析材料中之任一者之間的多特異性抗體之載樣密度負載至後續層析材料(諸如疏水性相互作用(HIC)層析材料、陰離子交換層析材料、陽離子交換層析材料、尺寸排阻層析材料、親和力層析材料或額外混合模式層析材料)上。

【0163】 如本文所用，溶離為自層析材料移除產物，例如多特異性抗體或抗體臂。溶離緩衝液為用於自層析材料溶離該多特異性抗體或其他所關注之產物的緩衝液。在多種情況下，溶離緩衝液具有不同於載樣緩衝液之物理特徵。例如，溶離緩衝液可具有不同於載樣緩衝液之電導率或不同於載樣緩衝液之 pH。在一些實施例中，溶離緩衝液具有低於載樣緩衝液之電導率。在一些實施例中，溶離緩衝液具有高於載樣緩衝液之電導率。在一些實施例中，溶離緩衝液具有低於載樣緩衝液之 pH。在一些實施例中，溶離緩衝液具有高於載樣緩衝液之 pH。在一些實施例中，溶離緩衝液具有不同於載樣緩衝液之電導率及不同於載樣緩衝液之 pH。溶離緩衝液可具有更高或更低電導率及更高或更低 pH 之任何組合。

【0164】 在某些實施例中，多特異性抗體自層析材料之溶離針對產物之產率在最低雜質下且在最低溶離體積或池體積下經最佳化。例如，含有多特異性抗體(例如雙特異性抗體)或抗體臂之組合物可在載樣緩衝液中負載至層析材料(例如層析管柱)上。在負載完成時，多特異性抗體或抗體臂用處於多種不同 pH 值下之緩衝液溶離，同時該溶離緩衝液之電導率恆定。或者，多特異性抗體或抗體臂可在處於多種不同電導率下之溶離緩衝液中自層析材料溶離，同時該溶離緩衝液之 pH 恆定。在多特異性抗體(例如雙特異性

抗體)或抗體臂自層析材料之溶離完成時，池部分中之雜質的量提供關於該多特異性抗體或抗體臂與該雜質針對既定 pH 或電導率分離之資訊。多特異性抗體或抗體臂在高數字之管柱體積(例如八個管柱體積)中溶離指示了溶離型態之「拖尾」。在一些實施例中，溶離之拖尾減至最少。

【0165】 可採用之多種緩衝液取決於例如緩衝液之所需 pH、緩衝液之所需電導率、所關注之蛋白的特徵、層析材料及純化過程(例如「結合及溶離」或「流通」模式)。在任何本文所述之方法的一些實施例中，該等方法包含使用至少一種緩衝液。緩衝液可為載樣緩衝液、平衡緩衝液、溶離緩衝液或洗滌緩衝液。在一些實施例中，載樣緩衝液、平衡緩衝液、溶離緩衝液及/或洗滌緩衝液中之一或多者(諸如載樣緩衝液、平衡緩衝液及/或洗滌緩衝液用於捕捉層析、第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析等)為相同的。在一些實施例中，載樣緩衝液、平衡緩衝液及/或洗滌緩衝液(諸如載樣緩衝液、平衡緩衝液及/或洗滌緩衝液用於捕捉層析、第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析等)為不同的。在任何本文所述之方法的一些實施例中，該緩衝液包含鹽。載樣緩衝液(諸如載樣緩衝液、平衡緩衝液及/或洗滌緩衝液用於捕捉層析、第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析等)可包含氯化鈉、乙酸鈉、Tris、精胺酸、磷酸鹽、MOPS、MES、CHES、BisTris、硫酸銨、硫酸鈉、檸檬酸鹽、丁二酸鹽或其混合物。在某

些實施例中，該緩衝液為氯化鈉緩衝液。在一些實施例中，該緩衝液為乙酸鈉緩衝液。在某些實施例中，該緩衝液為 Tris、精胺酸、磷酸鹽、MES、CHES 或 MOPS 緩衝液。在一些實施例中，該緩衝液包含 Tris。在一些實施例中，該緩衝液包含精胺酸。

【0166】 在任何本文所述之方法的一些實施例中，載樣緩衝液(諸如載樣緩衝液用於捕捉層析、第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析等)具有大於約 1.0 mS/cm、1.5 mS/cm、2.0 mS/cm、2.5 mS/cm、3.0 mS/cm、3.5 mS/cm、4.0 mS/cm、4.5 mS/cm、5.0 mS/cm、5.5 mS/cm、6.0 mS/cm、6.5 mS/cm、7.0 mS/cm、7.5 mS/cm、8.0 mS/cm、8.5 mS/cm、9.0 mS/cm、9.5 mS/cm、10 mS/cm 或 20 mS/cm 中任一者之電導率。該電導率可在約 1 mS/cm 與 20 mS/cm、4 mS/cm 與 10 mS/cm、4 mS/cm 與 7 mS/cm、5 mS/cm 與 17 mS/cm、5 mS/cm 與 10 mS/cm 或 5 mS/cm 與 7 mS/cm 中之任一者之間。在一些實施例中，該電導率為約 1.0 mS/cm、1.5 mS/cm、2.0 mS/cm、2.5 mS/cm、3.0 mS/cm、3.5 mS/cm、4 mS/cm、4.5 mS/cm、5.0 mS/cm、5.5 mS/cm、6.0 mS/cm、6.5 mS/cm、7.0 mS/cm、7.5 mS/cm、8.0 mS/cm、8.5 mS/cm、9.0 mS/cm、9.5 mS/cm、10 mS/cm 或 20 mS/cm 中任一者。在一態樣中，該電導率為載樣緩衝液、平衡緩衝液及/或洗滌緩衝液之電導率。在一些實施例中，載樣緩衝液、平衡緩衝液及洗滌緩衝液之一或多者(諸如載樣緩衝液、平衡緩衝液及/或洗滌緩衝液用於捕捉層析、第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析

等)的電導率為相同的。在一些實施例中，載樣緩衝液之電導率不同於洗滌緩衝液及/或平衡緩衝液之電導率。

【0167】 在一些實施例中，溶離緩衝液(諸如溶離緩衝液用於捕捉層析、第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析等)具有低於載樣緩衝液之電導率的電導率。在任何本文所述之方法的一些實施例中，溶離緩衝液(諸如溶離緩衝液用於捕捉層析、第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析等)具有小於約 0 mS/cm、0.5 mS/cm、1.0 mS/cm、1.5 mS/cm、2.0 mS/cm、2.5 mS/cm、3.0 mS/cm、3.5 mS/cm、4.0 mS/cm、4.5 mS/cm、5.0 mS/cm、5.5 mS/cm、6.0 mS/cm、6.5 mS/cm 或 7.0 mS/cm 中任一者之電導率。該電導率可在約 0 mS/cm 與 7 mS/cm、1 mS/cm 與 7 mS/cm、2 mS/cm 與 7 mS/cm、3 mS/cm 與 7 mS/cm、or 4 mS/cm 與 7 mS/cm、0 mS/cm 與 5.0 mS/cm、1 mS/cm 與 5 mS/cm、2 mS/cm 與 5 mS/cm、3 mS/cm 與 5 mS/cm 或 4 mS/cm 與 5 mS/cm 中之任一者之間。在一些實施例中，溶離緩衝液(諸如溶離緩衝液用於捕捉層析、第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析等)之電導率為約 0 mS/cm、0.5 mS/cm、1.0 mS/cm、1.5 mS/cm、2.0 mS/cm、2.5 mS/cm、3.0 mS/cm、3.5 mS/cm、4 mS/cm、4.5 mS/cm、5.0 mS/cm、5.5 mS/cm、6.0 mS/cm、6.5 mS/cm 或 7.0 mS/cm 中任一者。

【0168】 在一些實施例中，溶離緩衝液具有大於載樣緩衝液之電導率的

電導率。在任何本文所述之方法的一些實施例中，溶離緩衝液(諸如溶離緩衝液用於捕捉層析、第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析等)具有大於約 5.5 mS/cm、6.0 mS/cm、6.5 mS/cm、7.0 mS/cm、7.5 mS/cm、8.0 mS/cm、8.5 mS/cm、9.0 mS/cm、9.5 mS/cm、10 mS/cm、11 mS/cm、12 mS/cm、13 mS/cm、14 mS/cm、15 mS/cm、16 mS/cm、17.0 mS/cm、18.0 mS/cm、19.0 mS/cm、20.0 mS/cm、21.0 mS/cm、22.0 mS/cm、23.0 mS/cm、24.0 mS/cm、25.0 mS/cm、26.0 mS/cm、27.0 mS/cm、28.0 mS/cm、29.0 mS/cm 或 30.0 mS/cm 中任一者之電導率。該電導率可在約 5.5 mS/cm 與 30 mS/cm、6.0 mS/cm 與 30 mS/cm、7 mS/cm 與 30 mS/cm、8 mS/cm 與 30 mS/cm、9 mS/cm 與 30 mS/cm 或 10 mS/cm 與 30 mS/cm 中之任一者之間。在一些實施例中，溶離緩衝液之電導率為約 5.5 mS/cm、6.0 mS/cm、6.5 mS/cm、7.0 mS/cm、7.5 mS/cm、8.0 mS/cm、8.5 mS/cm、9.0 mS/cm、9.5 mS/cm、10 mS/cm、11 mS/cm、12 mS/cm、13 mS/cm、14 mS/cm、15 mS/cm、16 mS/cm、17.0 mS/cm、18.0 mS/cm、19.0 mS/cm、20.0 mS/cm、21.0 mS/cm、22.0 mS/cm、23.0 mS/cm、24.0 mS/cm、25.0 mS/cm、26.0 mS/cm、27.0 mS/cm、28.0 mS/cm、29.0 mS/cm 或 30.0 mS/cm 中任一者。在任何以上實施例之一些態樣中，溶離緩衝液(諸如溶離緩衝液用於捕捉層析、第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析等)之電導率藉由分步梯度或藉由線性梯度相對載樣及/或洗滌緩衝液發生改變。

【0169】 在一些實施例中，包含多特異性抗體之溶液在具有約<6.5

mS/cm 之電導率的載樣緩衝液中負載至第一混合模式層析材料上且該多肽在具有約 1.5 mS/cm 之電導率的溶離緩衝液中自第一混合層析材料溶離。在一些實施例中，載樣緩衝液具有約 6.5 mS/cm 之電導率且溶離緩衝液具有約 3 mS/cm 之電導率。在一些實施例中，載樣緩衝液具有約 5.5 mS/cm 之電導率且溶離緩衝液具有約 2 mS/cm 之電導率。在一些實施例中，載樣緩衝液具有約 5.5 mS/cm 之電導率且溶離緩衝液具有約 1 mS/cm 之電導率。在以上實施例之其他實施例中，第一混合模式層析材料為 Capto™Adhere 樹脂。在以上實施例之其他實施例中，第一混合模式層析材料為 Capto™ MMC 樹脂。

【0170】 在任何以上實施例之一些態樣中，溶離緩衝液之電導率藉由分步梯度或藉由線性梯度相對載樣及/或洗滌緩衝液發生改變。在一些實施例中，包含多特異性抗體之組合物在 <6.5 mS/cm 下負載至第一混合模式層析(例如 Capto™Adhere 層析或 Capto™MMC 層析)上且該多特異性抗體藉由分步電導率梯度至約 1.5 mS/cm 而自第一混合模式層析溶離。

【0171】 在一些實施例中，包含多特異性抗體之溶液在具有約 <6.5 mS/cm 之電導率的載樣緩衝液中負載至第二混合模式層析材料上且該多肽在具有約 1.5 mS/cm 之電導率的溶離緩衝液中自第二混合層析材料溶離。在一些實施例中，載樣緩衝液具有約 6.5 mS/cm 之電導率且溶離緩衝液具有約 3 mS/cm 之電導率。在一些實施例中，載樣緩衝液具有約 5.5 mS/cm 之電導率且溶離緩衝液具有約 2 mS/cm 之電導率。在一些實施例中，載樣緩衝液具有約 5.5 mS/cm 之電導率且溶離緩衝液具有約 1 mS/cm 之電導率。在以上實施例之其他實施例中，第二混合模式層析材料為 Capto™Adhere 樹脂。在

以上實施例之其他實施例中，第二混合模式層析材料為 Capto™ MMC 樹脂。

【0172】 在任何以上實施例之一些態樣中，溶離緩衝液之電導率藉由分步梯度或藉由線性梯度相對載樣及/或洗滌緩衝液發生改變。在一些實施例中，包含多特異性抗體之組合物在 <6.5 mS/cm 下負載至第二混合模式層析(例如 Capto™ Adhere 層析或 Capto™ MMC 層析)上且該多特異性抗體藉由分步電導率梯度至約 1.5 mS/cm 而自第二混合模式層析溶離。

【0173】 在一些實施例中，包含多特異性抗體之組合物在 <2.5 mS/cm 下負載至陰離子交換層析(例如 QSFF 層析)上且該多特異性抗體藉由分步電導率梯度至約 8.6 mS/cm 而自陰離子交換層析溶離。

【0174】 在一些實施例中，包含多特異性抗體之組合物在約 5.0 mS/cm 下負載至陽離子交換層析(例如 POROS 50HS 層析)上且該多特異性抗體藉由分步電導率梯度至約 27.5 mS/cm 而自陽離子交換層析溶離。

【0175】 在任何本文所述之方法的一些實施例中，載樣緩衝液(諸如載樣緩衝液用於捕捉層析、第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析等)具有小於約 10、9、8、7、6 或 5 中任一者之 pH，包括在此等值之間的任何範圍。在任何本文所述之方法的一些實施例中，載樣緩衝液(諸如載樣緩衝液用於捕捉層析、第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析等)具有大於約 4、5、6、7、8 或 9 中任一者之 pH，包括在此等值之間的任何範圍。載樣緩衝液(諸如載樣緩

衝液用於捕捉層析、第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析等)可具有在約 4 與 9、4 與 8、4 與 7、5 與 9、5 與 8、5 與 7、5 與 6 中之任一者之間的 pH，包括在此等值之間的任何範圍。在一些實施例中，載樣緩衝液(諸如載樣緩衝液用於捕捉層析、第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析等)之 pH 具有約 4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5 或 8 中任一者之 pH，包括在此等值之間的任何範圍。該 pH 可為載樣緩衝液、平衡緩衝液或洗滌緩衝液(諸如載樣緩衝液、平衡緩衝液及/或洗滌緩衝液用於捕捉層析、第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析等)之 pH。在一些實施例中，載樣緩衝液、平衡緩衝液及/或洗滌緩衝液中之一或多者之 pH 為相同的。在一些實施例中，載樣緩衝液之 pH 不同於平衡緩衝液及/或洗滌緩衝液之 pH。

【0176】 在一些實施例中，溶離緩衝液(諸如溶離緩衝液用於捕捉層析、第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析等)具有小於載樣緩衝液之 pH 的 pH。在任何本文所述之方法的一些實施例中，溶離緩衝液具有小於約 8、7、6、5、4、3 或 2 中任一者之 pH，包括在此等值之間的任何範圍。溶離緩衝液之 pH 可在約 4 與 9、4 與 8、4 與 7、4 與 6、4 與 5、5 與 9、5 與 8、5 與 7、5 與 6、6 與 9、6 與 8、6 與 7 中之任一者之間，包括在此等值之間的任何範圍。在一些實施例中，溶離緩衝液(諸

如溶離緩衝液用於捕捉層析、第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析等)之 pH 為約 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 或 9.0 中任一者，包括在此等值之間的任何範圍。

【0177】 在一些實施例中，溶離緩衝液(諸如溶離緩衝液用於捕捉層析、第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析等)具有大於載樣緩衝液之 pH 的 pH。在任何本文所述之方法的一些實施例中，溶離緩衝液(諸如溶離緩衝液用於第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析等)具有大於約 5、6、7、8 或 9 中任一者之 pH，包括在此等值之間的任何範圍。在任何本文所述之方法的一些實施例中，溶離緩衝液(諸如溶離緩衝液用於捕捉層析)具有大於約 2、4 或 4 中任一者之 pH，包括在此等值之間的任何範圍。溶離緩衝液(諸如溶離緩衝液用於捕捉層析、第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析等)之 pH 可在約 2 與 9、3 與 9、4 與 9、2 與 8、3 與 8、4 與 8、2 與 7、3 與 7、4 與 7、2 與 6、3 與 6 及 4 與 6 中之任一者之間，包括在此等值之間的任何範圍。在一些實施例中，溶離緩衝液之 pH 為約 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 中任一者，包括在此等值之間的任何範圍。

【0178】 在一些實施例中，包含多特異性抗體或抗體臂之溶液在約 pH 7 下負載至親和力層析(例如蛋白 A 層析)上且該多特異性抗體或抗體臂藉由

分步梯度至約 2.9 之 pH 而自親和力層析溶離。

【0179】 在任何以上實施例之一些態樣中，溶離緩衝液(諸如溶離緩衝液用於捕捉層析、第一混合模式層析、第二混合模式層析及/或任何額外層析，諸如陰離子交換層析、陽離子交換層析、HIC 層析、尺寸排阻層析、額外混合模式層析等)之 pH 藉由分步梯度或藉由線性梯度相對載樣及/或洗滌緩衝液發生改變。

【0180】 在任何本文所述之方法的一些實施例中，流動速率小於約 50 CV/h、40 CV/h 或 30 CV/h 中任一者。該流動速率可在約 5 CV/h 與 50 CV/h、10 CV/h 與 40 CV/h、或 18 CV/h 與 36 CV/h 中之任一者之間。在一些實施例中，該流動速率為約 9 CV/h、18 CV/h、25 CV/h、30 CV/h、36 CV/h 或 40 CV/h 中任一者。在任何本文所述之方法的一些實施例中，流動速率小於約 100 cm/h、75 cm/h 或 50 cm/h 中任一者。該流動速率可在約 25 cm/h 與 150 cm/h、25 cm/h 與 100 cm/h、50 cm/h 與 100 cm/h、或 65 cm/h 與 85 cm/h 中之任一者之間。

【0181】 床高度為所用之層析材料的高度。在任何本文所述之方法的一些實施例中，床高度大於約 5 cm、10 cm、15 cm、20 cm、25 cm、30 cm、35 cm、40 cm、45 cm 或 50 cm 中任一者。在一些實施例中，床高度在約 5 cm 與 50 cm 之間。在一些實施例中，床高度基於負載中之多肽或污染物之量來確定。

【0182】 在一些實施例中，層析在具有大於約 1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL、6 mL、7 mL、8 mL、9 mL、10 mL、15 mL、20 mL、25 mL、30 mL、40 mL、50 mL、75 mL、100 mL、200 mL、300 mL、400 mL、500 mL、600

mL、700 mL、800 mL、900 mL、1 L、2 L、3 L、4 L、5 L、6 L、7 L、8 L、9 L、10 L、25 L、50 L、100 L、200 L、300 L、400 L、500 L、600 L、700 L、800 L、900 L 或 1000 L 之體積的管柱或容器中。

【0183】 在一些實施例中，自層析收集各部分。在一些實施例中，所收集之部分大於約 0.01 CV、0.02 CV、0.03 CV、0.04 CV、0.05 CV、0.06 CV、0.07 CV、0.08 CV、0.09 CV、0.1 CV、0.2 CV、0.3 CV、0.4 CV、0.5 CV、0.6 CV、0.7 CV、0.8 CV、0.9 CV、1.0 CV、2.0 CV、3.0 CV、4.0 CV、5.0 CV、6.0 CV、7.0 CV、8.0 CV、9.0 CV 或 10.0 CV。

【0184】 在某些實施例中，彙集含有經純化或部分純化之產物(例如多特異性抗體(諸如雙特異性抗體或二價 $F(ab')_2$)或抗體臂或 Fab)之部分。部分中多肽之量可由熟習此項技術者確定；例如，部分中多肽之量可藉由 UV 光譜法確定。在某些實施例中，當 OD_{280} 大於約 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 及 1.0 中任一者時，收集各部分。在某些實施例中，當 OD_{280} 在約 0.5 與 1.0、0.6 與 1.0、0.7 與 1.0、0.8 與 1.0 或 0.9 與 1.0 中之任一者之間時，收集各部分。在某些實施例中，彙集含有可偵測之多特異性抗體(例如雙特異性抗體)或抗體臂之部分。

【0185】 在任何本文所述之方法的某些實施例中，雜質為產物特異性雜質。產物特異性雜質之實例包括但不限於非配對半抗體、非配對抗體輕鏈、非配對重鏈、抗體片段、均二聚體(例如，包含相同重鏈及輕鏈之雙特異性抗體的配對半二聚體)、聚集體、高分子量物質(MHWS)(諸如極高分子量物質(vHMWS))、具有錯誤配對之二硫化物的多特異性抗體、輕鏈二聚體、重鏈二聚體、低分子量物質(LMWS)及電荷變異體(諸如抗體之酸性變異體及

鹼性變異體)。

【0186】 在某些實施例中，本文所提供之方法移除或減少包含多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及非配對半抗體之組合物中非配對半抗體之水準。量測組合物中非配對半抗體之存在或水準之方法為此項技術中已知的；例如，藉由質譜分析(諸如液相層析-質譜分析)、CE-SDS、逆相 HPLC、HIC HPLC。在任何本文所述之方法的某些實施例中，由一或多個純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中非配對半抗體之量減少超過約 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%中任一者，包括在此等值之間的任何範圍。在某些實施例中，由一或多個純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中非配對半抗體之量減少約 10 與 95%；10%與 99%；20%與 95%；20%與 99%；30%與 95%；30%與 99%；40%與 95%；40%與 99%；50%與 95%；50%與 99%；60%與 95%；60%與 99%；70%與 95%；70%與 99%；80%與 95%；80%與 99%；90%與 95%；或 90%與 99%中之任一者之間。在一些實施例中，組合物(諸如層析部分)中非配對半抗體之量減少約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者。在某些實施例中，非配對半抗體之存在或水準的減少藉由比較由純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中非配對半抗體之量與在該(等)純化步驟之前該組合物中非配對半抗體之量來確定。

【0187】 在某些實施例中，本文所提供之方法移除或減少包含多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及均二聚體之組合物中均二聚體之水準。量測組合物中均二聚體之存在或水準之方法為此項技術中已知的；例如，藉由質譜

分析(諸如液相層析-質譜分析、逆相 HPLC 及 HIC HPLC。在任何本文所述之方法的某些實施例中，由一或多個純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中均二聚體之量減少超過約 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99% 中任一者，包括在此等值之間的任何範圍。在某些實施例中，由一或多個純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中均二聚體之量減少約 10 與 95%；10%與 99%；20%與 95%；20%與 99%；30%與 95%；30%與 99%；40%與 95%；40%與 99%；50%與 95%；50%與 99%；60%與 95%；60%與 99%；70%與 95%；70%與 99%；80%與 95%；80%與 99%；90%與 95%；或 90%與 99%中之任一者之間。在一些實施例中，組合物(諸如層析部分)中均二聚體之量減少約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者。在某些實施例中，均二聚體之存在或水準的減少藉由比較由純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中均二聚體之量與在該(等)純化步驟之前該組合物中均二聚體之量來確定。

【0188】 在某些實施例中，本文所提供之方法移除或減少包含多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及高分子量物質(HMWS)蛋白之組合物中 HMWS 蛋白之水準。HMWS 蛋白可包含例如聚集之多肽(諸如聚集之多特異性抗體、聚集之半抗體、聚集之均二聚體等)。在某些實施例中，聚集之多肽包含重鏈多聚體、輕鏈多聚體及/或該多特異性抗體之多聚體。HMWS 蛋白可包含重鏈或輕鏈之 2、3、4、5、6、7 或 8 種或 8 種以上單體，或 2、3、4、5、6、7 或 8 種或 8 種以上聚集之多特異性抗體。量測聚集之蛋白(例如 HMWS 蛋白)之方法為此項技術中已知的且描述於例如 WO 2011/150110 中。該等

方法包括例如尺寸排阻層析、毛細管電泳-十二烷基硫酸鈉(CE-SDS)及液相層析-質譜分析(LC-MS)。在任何本文所述之方法的某些實施例中，由一或多個純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中 HMWS 蛋白之量減少超過約 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%中任一者，包括在此等值之間的任何範圍。在某些實施例中，由一或多個純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中 HMWS 蛋白之量減少約 10 與 95%；10%與 99%；20%與 95%；20%與 99%；30%與 95%；30%與 99%；40%與 95%；40%與 99%；50%與 95%；50%與 99%；60%與 95%；60%與 99%；70%與 95%；70%與 99%；80%與 95%；80%與 99%；90%與 95%；或 90%與 99%中之任一者之間。在一些實施例中，組合物(諸如層析部分)中 HMWS 蛋白之量減少約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者。在某些實施例中，HMWS 蛋白之存在或水準的減少藉由比較由純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中 HMWS 蛋白之量與在該(等)純化步驟之前該組合物中 HMWS 蛋白之量來確定。

【0189】 在某些實施例中，本文所提供之方法移除或減少包含多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及低分子量物質(LMWS)蛋白之組合物中 LMWS 蛋白之水準。LMWS 蛋白可包含片段化多肽。在某些實施例中，片段化多肽為多特異性抗體之片段、抗體臂之片段、重鏈片段或輕鏈片段。LMWS 蛋白之實例包括但不限於 Fab (亦即，片段抗原結合(fragment antigen binding))、Fc (片段(fragment)，可結晶(crystallizable))、兩者之區域或組合，或多特異性抗體、所關注之重鏈或輕鏈、或 $\frac{1}{2}$ 抗體(含有一個抗體輕鏈/重鏈對)或 $\frac{3}{4}$ 抗

體(含有抗體重鏈之雜二聚體或均二聚體及單一抗體輕鏈；本文中亦表示為 HHL)之任何無規片段化部分。量測片段化蛋白(例如 LMWS 蛋白)之方法為此項技術中已知的且描述於例如 WO 2011/150110 中。該等方法包括例如尺寸排阻層析、毛細管電泳-十二烷基硫酸鈉(CE-SDS)及液相層析-質譜分析(LC-MS)。在任何本文所述之方法的某些實施例中，由一或多個純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中 LMWS 蛋白之量減少超過約 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%中任一者，包括在此等值之間的任何範圍。在某些實施例中，由一或多個純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中 LMWS 蛋白之量減少約 10 與 95%；10%與 99%；20%與 95%；20%與 99%；30%與 95%；30%與 99%；40%與 95%；40%與 99%；50%與 95%；50%與 99%；60%與 95%；60%與 99%；70%與 95%；70%與 99%；80%與 95%；80%與 99%；90%與 95%；或 90%與 99%中之任一者之間。在一些實施例中，組合物(諸如層析部分)中 LMWS 蛋白之量減少約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者。在某些實施例中，LMWS 蛋白之存在或水準的減少藉由比較由純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中 LMWS 蛋白之量與在該(等)純化步驟之前該組合物中 LMWS 蛋白之量來確定。

【0190】 在某些實施例中，本文所提供之方法移除或減少包含多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及酸性及/或鹼性變異體之組合物中酸性及/或鹼性變異體之水準。抗體(諸如多特異性抗體，例如雙特異性抗體)之酸性變異體為其中該抗體之 pI 小於原生完整抗體之 pI 的變異體。抗體(諸如多特異性

抗體，例如雙特異性抗體)之鹼性變異體為其中該抗體之 pI 大於原生完整抗體之 pI 的變異體。該等電荷變異體(例如，酸性及鹼性變異體)可為抗體之天然過程的結果，諸如氧化、去醯胺化、離胺酸殘基之 C 端加工、N 端焦麩胺酸鹽形成、及糖化。量測電荷變異體之方法為此項技術中已知的；例如成像毛細管等電聚焦(iCIEF)。在任何本文所述之方法的某些實施例中，由一或多個純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中電荷變異體之量減少超過約 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%中任一者，包括在此等值之間的任何範圍。在某些實施例中，由一或多個純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中電荷變異體之量減少約 10 與 95%；10%與 99%；20%與 95%；20%與 99%；30%與 95%；30%與 99%；40%與 95%；40%與 99%；50%與 95%；50%與 99%；60%與 95%；60%與 99%；70%與 95%；70%與 99%；80%與 95%；80%與 99%；90%與 95%；或 90%與 99%中之任一者之間。在一些實施例中，組合物(諸如層析部分)中電荷變異體之量減少約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者。在某些實施例中，電荷變異體之存在或水準的減少藉由比較由純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中電荷變異體之量與在該(等)純化步驟之前該組合物中電荷變異體之量來確定。

【0191】 在任何本文所述之方法的某些實施例中，雜質為過程特異性雜質。例如，該過程特異性雜質可包含以下一或多者：瀝出之蛋白 A；宿主細胞材料；核酸；其他多肽；內毒素；病毒性污染物；細胞培養基組分、羧基肽酶 B、慶大黴素等。在某些實施例中，該過程特異性雜質可為來自

例如原核細胞、細菌細胞(諸如大腸桿菌細胞)、昆蟲細胞、真核細胞、真菌細胞、酵母細胞、禽細胞或哺乳動物細胞(例如 CHO 細胞)之宿主細胞蛋白(HCP)。

【0192】 在某些實施例中，本文所提供之方法移除或減少包含多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及瀝出之蛋白 A 的組合物中瀝出之蛋白 A 之水準。瀝出之蛋白 A 為自其所結合之固相剝離或洗滌之蛋白 A。例如，瀝出之蛋白 A 可自蛋白 A 層析管柱瀝出。蛋白 A 之量可例如藉由 ELISA 量測，如 WO 2011/150110 中所述。在某些實施例中，瀝出之蛋白 A 之存在或水準的減少藉由比較由純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中瀝出之蛋白 A 之量與在該(等)純化步驟之前該組合物中瀝出之蛋白 A 之量來確定。

【0193】 在某些實施例中，本文所提供之方法移除或減少包含多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及宿主細胞蛋白(HCP)之組合物中 HCP 之水準。HCP 為來自其中產生該多特異性抗體(諸如雙特異性抗體)之宿主細胞的蛋白。在某些實施例中，HCP 蛋白為來自原核細胞之蛋白。在某些實施例中，HCP 為來自大腸桿菌細胞之蛋白(亦即，大腸桿菌蛋白或 ECP)。原核 HCP (諸如 ECP)之實例包括但不限於原核伴侶蛋白，諸如 FkpA、DsbA 及 DsbC。在某些實施例中，HCP 為來自真核宿主細胞之蛋白，諸如本文中別處所述之彼等。在某些實施例中，HCP 為來自哺乳動物細胞之蛋白，諸如 CHO 細胞蛋白(亦即，中國倉鼠卵巢蛋白或 CHOP)。在某些實施例中，HCP (例如 ECP、FkpA、DsbA 或 DsbC，或例如 CHOP)之量藉由酶聯免疫吸附劑分析(「ELISA」)來量測。例如，抗體可針對 FkpA、DsbA 或 DsbC 之超純組合物產生。在某些實施例中，FkpA、DsbA 及/或 DsbC 之量藉由質譜分析確定。

在任何本文所述之方法之一些實施例中，HCP (例如 ECP、FkpA、DsbA 或 DsbC，或例如 CHOP)之量。在任何本文所述之方法的某些實施例中，由一或多個純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中 HCP (例如 ECP、FkpA、DsbA 或 DsbC，或例如 CHOP)之量減少至小於約 100 ppm、75 ppm、50 ppm、25 ppm、20 ppm、10 ppm、5 ppm、2 ppm 或 1 ppm，包括在此等值之間的任何範圍。在一些實施例中，組合物(諸如層析部分)中 HCP (例如 ECP、FkpA、DsbA 或 DsbC，或例如 CHOP)之量減少至小於約 100 ppm、75 ppm、50 ppm、25 ppm、20 ppm、10 ppm、5 ppm、2 ppm 或 1 ppm，包括在此等值之間的任何範圍。在某些實施例中，HCP (例如 ECP、FkpA、DsbA 或 DsbC，或例如 CHOP)之存在或水準的減少藉由比較由純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中 HCP 之量與在該(等)純化步驟之前該組合物中 HCP 之量來確定。

【0194】 在某些實施例中，本文所提供之方法移除或減少包含多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及核酸(諸如宿主細胞 DNA 及/或 RNA)之組合物中核酸之水準。量測核酸(諸如宿主細胞 DNA 及/或 RNA)之方法為此項技術中已知的且描述於例如 WO 2011/150110 中。該等方法包括例如用於宿主細胞 DNA 或 RNA 之 PCR。在任何本文所述之方法的某些實施例中，由一或多個純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中核酸之量減少超過約 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%中任一者，包括在此等值之間的任何範圍。在某些實施例中，由一或多個純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中核酸之量減少約 10與95%；10%與99%；20%與95%；20%與99%；

30%與 95%；30%與 99%；40%與 95%；40%與 99%；50%與 95%；50%與 99%；60%與 95%；60%與 99%；70%與 95%；70%與 99%；80%與 95%；80%與 99%；90%與 95%；或 90%與 99%中之任一者之間。在一些實施例中，組合物(諸如層析部分)中核酸之量減少約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者。在某些實施例中，核酸之存在或水準的減少藉由比較由純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中核酸之量與在該(等)純化步驟之前該組合物中核酸之量來確定。

【0195】 在某些實施例中，本文所提供之方法移除或減少包含多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及細胞培養基組分的組合物中細胞培養基組分之水準。「細胞培養基組分」係指存在於細胞培養基中之組分。在某些實施例中，「細胞培養基」係指在收集表現多特異性抗體(例如雙特異性抗體)或其臂之宿主細胞時的細胞培養基。在某些實施例中，細胞培養基組分為胰島素或四環素。在某些實施例中，胰島素或四環素之量藉由 ELISA 量測。在任何本文所述之方法的某些實施例中，由一或多個純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中細胞培養基組分之量減少超過約 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%中任一者，包括在此等值之間的任何範圍。

【0196】 在某些實施例中，由一或多個純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中細胞培養基組分之量減少約 10 與 95%；10%與 99%；20%與 95%；20%與 99%；30%與 95%；30%與 99%；40%與 95%；40%與 99%；50%與 95%；50%與 99%；60%與 95%；60%與 99%；70%與 95%；70%與 99%；80%與 95%；80%與 99%；90%與 95%；或 90%與 99%中之任一者之間。

在一些實施例中，組合物(諸如層析部分)中細胞培養基組分含量減少約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 95%中任一者。在某些實施例中，細胞培養基組分存在或水準的減少藉由比較由純化步驟回收之組合物(諸如層析部分)中細胞培養基組分含量與在該(等)純化步驟之前該組合物中細胞培養基組分含量來確定。

【0197】 在某些實施例中，本文中提供一種純化包含第一臂及第二臂之雙特異性抗體之方法，其中該等第一及第二臂分別地產生，該方法包含：使該等第一及第二臂經受以結合及溶離模式操作的捕捉層析(諸如本文中別處所述之捕捉層析步驟的任一者或組合)以產生第一及第二捕捉溶離物；在足以產生包含該多特異性抗體之組合物的條件下形成包含該等第一及第二捕捉溶離物之混合物，使包含該多特異性抗體之組合物經受呈結合及溶離模式的陰離子交換層析(例如，Q Sepharose® Fast Flow (QSFF)層析)以產生陰離子交換溶離物，其中該溶離為梯度溶離；使該陰離子交換溶離物經受呈結合及溶離模式的陰離子交換混合模式層析(例如，Capto™Adhere 層析)以產生第一混合模式溶離物，其中該溶離為梯度溶離；及使該第一混合模式溶離物經受呈結合及溶離模式的陽離子交換混合模式層析(例如，Capto™MMC 層析)以產生第二混合模式溶離物，其中該溶離為梯度溶離，及收集包含該雙特異性抗體之部分，其中該方法相對於包含該等第一及第二臂之混合物減少該部分中雜質含量。

【0198】 在某些實施例中，本文中提供一種純化包含第一臂及第二臂之雙特異性抗體之方法，其中該等第一及第二臂分別地產生，該方法包含：使該等第一及第二臂經受呈結合及溶離模式的捕捉層析(諸如本文中別處所

述之捕捉層析步驟的任一者或組合)以產生第一及第二捕捉溶離物；在足以產生包含該多特異性抗體之組合物的條件下形成包含該等第一及第二捕捉溶離物之混合物，使包含該多特異性抗體之組合物經受呈結合及溶離模式的陽離子交換混合模式層析(例如，Capto™MMC 層析)以產生第一混合模式溶離物；其中該溶離為 pH 及鹽分步溶離，及使該第一混合模式溶離物經受呈流通模式的陰離子交換混合模式層析(例如，Capto™Adhere 層析)以產生第二混合模式溶離物，及收集包含該雙特異性抗體之部分，其中該方法相對於包含該等第一及第二臂之混合物減少該部分中雜質之量。

【0199】 在某些實施例中，本文中提供一種純化包含第一臂及第二臂之雙特異性抗體之方法，其中該等第一及第二臂分別地產生，該方法包含：使該等第一及第二臂經受呈結合及溶離模式的捕捉層析(諸如本文中別處所述之捕捉層析步驟的任一者或組合)以產生第一及第二捕捉溶離物；在足以產生包含該多特異性抗體之組合物的條件下形成包含該等第一及第二捕捉溶離物之混合物，使包含該多特異性抗體之組合物經受呈結合及溶離模式的陰離子交換混合模式層析(例如，Capto™Adhere 層析)，其中該溶離為分步溶離，以產生第一混合模式溶離物；及使該第一混合模式溶離物經受呈結合及溶離模式的陽離子交換混合模式層析(例如，Capto™MMC 層析)以產生第二混合模式溶離物，其中該溶離為分步溶離，使該第二混合模式溶離物經受呈流通模式的疏水性相互作用層析(例如，Hexyl-650C 層析)以產生疏水性相互作用溶離物；及收集包含該雙特異性抗體之部分，其中該方法相對於包含該等第一及第二臂之混合物減少該部分中雜質之量。

【0200】 在某些實施例中，本文中提供一種純化包含第一臂及第二臂之

雙特異性抗體(諸如雙特異性 F(ab')₂)之方法，其中該等第一及第二臂分別地產生，該方法包含：使該第一臂經受呈結合及溶離模式的捕捉層析(諸如本文中別處所述之捕捉層析步驟的任一者或組合)以產生第一捕捉溶離物；使該第一捕捉溶離物經受呈結合及溶離模式的陽離子交換混合模式層析(例如，Capto™ MMC 層析)以產生第一混合模式溶離物；使該第二臂經受呈結合及溶離模式的捕捉層析(諸如本文中別處所述之捕捉層析步驟的任一者或組合)以產生第二捕捉溶離物；在足以產生包含該多特異性抗體之組合物的條件下形成包含第一混合模式溶離物及第二捕捉溶離物之混合物，使包含該多特異性抗體之組合物經受陰離子交換混合模式層析(例如 Capto™ Adhere 層析)以產生第二混合模式溶離物；及使該第二混合模式溶離物經受呈結合及溶離模式的陽離子交換層析(例如 POROS® 50 HS 層析)以產生陽離子交換溶離物；使該陽離子交換溶離物經受呈結合及溶離模式的後續陽離子交換混合模式層析以產生第三混合模式溶離物；及收集包含該雙特異性抗體之部分，其中該方法相對於包含該等第一及第二臂之混合物減少該部分中雜質之量。

【0201】 在某些實施例中，本文中提供一種純化包含第一臂及第二臂之雙特異性抗體(諸如雙特異性 F(ab')₂)之方法，其中該等第一及第二臂分別地產生，該方法包含：使該第一臂經受呈結合及溶離模式的捕捉層析(諸如本文中別處所述之捕捉層析步驟的任一者或組合)以產生第一捕捉溶離物；使該第一捕捉溶離物經受呈結合及溶離模式的陽離子交換混合模式層析(例如，Capto™ MMC 層析)以產生第一混合模式溶離物；使該第二臂經受呈結合及溶離模式的捕捉層析(諸如本文中別處所述之捕捉層析步驟的任一者或

組合)以產生第二捕捉溶離物；在足以產生包含該多特異性抗體之組合物的條件下形成包含第一混合模式溶離物及第二捕捉溶離物之混合物，使包含該多特異性抗體之組合物經受陰離子交換混合模式層析(例如 Capto™ Adhere 層析)以產生第二混合模式溶離物；及使該第二混合模式溶離物經受呈結合及溶離模式的後續陽離子交換混合模式層析(例如，Capto™ MMC 層析)以產生第三混合模式溶離物；及收集包含該雙特異性抗體之部分，其中該方法相對於包含該等第一及第二臂之混合物減少該部分中雜質之量。

【0202】 在一些實施例中，該多特異性抗體(諸如雙特異性抗體)進一步藉由病毒性過濾來純化。病毒性過濾為多肽純化進料流中之病毒性污染物的移除。病毒性過濾之實例包括例如超濾及微濾。在一些實施例中，該多肽使用細小病毒過濾器進行純化。

【0203】 在一些實施例中，該多特異性抗體在層析之後(例如，在第二混合模式層析之後或在第二混合模式層析之後執行的一或多個層析步驟之後)經濃縮。濃縮方法之實例為此項技術中已知的且包括但不限於例如超濾及透濾(UFDF)。在一些實施例中，該多特異性抗體藉由第一超濾、透濾及第二超濾經濃縮。在一些實施例中，該超濾及/或透濾使用具有小於約 5 kDal、10 kDal、15 kDal、20 kDal 或 25 kDal 或 30 kDal 中任一者之截止的過濾器。在一些實施例中，該第一超濾之滯留物經透濾至醫藥調配物中。

【0204】 在一些實施例中，多特異性抗體在濃縮之後之濃度為約 10 mg/mL、20 mg/mL、30 mg/mL、40 mg/mL、50 mg/mL、60 mg/mL、70 mg/mL、80 mg/mL、90 mg/mL、100 mg/mL、110 mg/mL、120 mg/mL、130 mg/mL、140 mg/mL、150 mg/mL、160 mg/mL、170 mg/mL、180 mg/mL、190 mg/mL、

200 mg/mL 或 300 mg/mL 中任一者。在一些實施例中，多特異性抗體之濃度在約 10 mg/mL 與 20 mg/mL、20 mg/mL 與 30 mg/mL、30 mg/mL 與 40 mg/mL、40 mg/mL 與 50 mg/mL、50 mg/mL 與 60 mg/mL、60 mg/mL 與 70 mg/mL、70 mg/mL 與 80 mg/mL、80 mg/mL 與 90 mg/mL、90 mg/mL 與 100 mg/mL、100 mg/mL 與 110 mg/mL、110 mg/mL 與 120 mg/mL、120 mg/mL 與 130 mg/mL、130 mg/mL 與 140 mg/mL、140 mg/mL 與 150 mg/mL、150 mg/mL 與 160 mg/mL、160 mg/mL 與 170 mg/mL、170 mg/mL 與 180 mg/mL、180 mg/mL 與 190 mg/mL、190 mg/mL 與 200 mg/mL、200 mg/mL 或 300 mg/mL 中之任一者之間。

【0205】 在任何本文所述之方法之一些實施例中，該等方法進一步包含組合該等純化方法之經純化多肽與醫藥學上可接受之載劑。在一些實施例中，該多特異性抗體藉由超濾/透濾經調配至醫藥調配物中。

【0206】 在某些實施例中，本文所提供之方法產生包含超過約 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 中任一者純之多特異性抗體的組合物。在某些實施例中，該組合物中之多特異性抗體超過約 96%、97%、98% 或 99% 中任一者純。

【0207】 在某些實施例中，本文所提供之方法產生包含含有不超過約 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、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% 中任一者之非配對抗體臂之多特異性抗體的組合物。在某些實施例中，本文所提供之方法產生包含含有不超過約 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、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%中任一者之均二聚體之多特異性抗體的組合物。在某些實施例中，本文所提供之方法產生包含含有不超過約0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%或5%中任一者之聚集之蛋白之多特異性抗體的組合物。在某些實施例中，本文所提供之方法產生包含含有不超過約0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%或35%中任一者之HMWS之多特異性抗體的組合物。在某些實施例中，本文所提供之方法產生包含含有不超過約0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、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%中任一者之LMWS之多特異性抗體的組合物。在某些實施例中，本文所提供之方法產生包含含有不超過約0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、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%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%中任一者之酸性變異體之多特異性抗體的組合物。在某些實施例中，本文所提供之方法產生包含含有不超過約0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%或35%中任一者之鹼性變異體之多特異性抗體的組合物。在某些實施例中，本文所提供之方法產生包含含有不超過約0.1 ppm、0.2 ppm、0.3 ppm、0.4 ppm、0.5 ppm、0.6 ppm、0.7 ppm、0.8 ppm、0.9 ppm、1 ppm、1.5 ppm、2 ppm、2.5 ppm、3 ppm、3.5 ppm、4 ppm、4.5 ppm、5 ppm、5.5 ppm、6 ppm、6.5 ppm、7 ppm、7.5 ppm、8 ppm、8.5 ppm、9 ppm、9.5 ppm或10 ppm中

任一者之瀝出之蛋白 A 之多特異性抗體的組合物。在某些實施例中，本文所提供之方法產生包含含有不超過約 0.1 ppm、0.2 ppm、0.3 ppm、0.4 ppm、0.5 ppm、0.6 ppm、0.7 ppm、0.8 ppm、0.9 ppm、1 ppm、1.5 ppm、2 ppm、2.5 ppm、3 ppm、3.5 ppm、4 ppm、4.5 ppm、5 ppm、5.5 ppm、6 ppm、6.5 ppm、7 ppm、7.5 ppm、8 ppm、8.5 ppm、9 ppm、9.5 ppm、10 ppm、15 ppm、20 ppm、25 ppm、30 ppm 或 35 ppm 中任一者之 HCP 之多特異性抗體的組合物。在某些實施例中，本文所提供之方法產生包含含有小於約 2 ppm、2.5 ppm、3 ppm、3.5 ppm、4 ppm、4.5 ppm、5 ppm、5.5 ppm、6 ppm、6.5 ppm、7 ppm、7.5 ppm、8 ppm、8.5 ppm、9 ppm、9.5 ppm 或 10 ppm 中任一者之核酸之多特異性抗體的組合物。在某些實施例中，包含該多特異性抗體之組合物包含不超過 0 ppm 核酸。在某些實施例中，包含該多特異性抗體之組合物中的核酸低於偵測水準。在某些實施例中，本文所提供之方法產生包含含有不超過約 0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30% 或 35% 中任一者之細胞培養基組分之多特異性抗體的組合物。

【0208】 在某些實施例中，提供根據本文所述之方法中的任一者純化之包含多特異性抗體之組合物。

【0209】 在某些實施例中，該組合物中之多特異性抗體超過約 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 中任一者純。在某些實施例中，該組合物中之多特異性抗體超過約 96%、97%、98% 或 99% 中任一者純。

【0210】 在某些實施例中，包含該多特異性抗體之組合物含有不超過約 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、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%中任一者之非配對抗體臂。在某些實施例中，包含該多特異性抗體之組合物含有不超過約0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、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%中任一者之均二聚體。在某些實施例中，包含該多特異性抗體之組合物含有不超過約 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%或 5%中任一者之聚集之蛋白。在某些實施例中，包含該多特異性抗體之組合物含有不超過約 0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%或 35%中任一者之 HMWS。在某些實施例中，包含該多特異性抗體之組合物含有不超過約0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、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%中任一者之 LMWS。在某些實施例中，包含該多特異性抗體之組合物含有不超過約 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、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%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或 50%中任一者之酸性變異體。在某些實施例中，包含該多特異性抗體之組合物含有不超過約 0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%或 35%中任一者之鹼性變異體。在某些實施例中，包含該多特異性抗體之組合物含有不超過約 0.1 ppm、0.2 ppm、0.3 ppm、0.4 ppm、0.5 ppm、0.6 ppm、0.7 ppm、0.8 ppm、0.9 ppm、1 ppm、1.5 ppm、2 ppm、2.5 ppm、

3 ppm、3.5 ppm、4 ppm、4.5 ppm、5 ppm、5.5 ppm、6 ppm、6.5 ppm、7 ppm、7.5 ppm、8 ppm、8.5 ppm、9 ppm、9.5 ppm 或 10 ppm 中任一者之瀝出之蛋白 A。在某些實施例中，包含該多特異性抗體之組合物含有不超過約 0.1 ppm、0.2 ppm、0.3 ppm、0.4 ppm、0.5 ppm、0.6 ppm、0.7 ppm、0.8 ppm、0.9 ppm、1 ppm、1.5 ppm、2 ppm、2.5 ppm、3 ppm、3.5 ppm、4 ppm、4.5 ppm、5 ppm、5.5 ppm、6 ppm、6.5 ppm、7 ppm、7.5 ppm、8 ppm、8.5 ppm、9 ppm、9.5 ppm、10 ppm、15 ppm、20 ppm、25 ppm、30 ppm 或 35 ppm 中任一者之 HCP。在某些實施例中，包含該多特異性抗體之組合物含有不超過約 0.1 ppm、0.2 ppm、0.3 ppm、0.4 ppm、0.5 ppm、0.6 ppm、0.7 ppm、0.8 ppm、0.9 ppm、1 ppm、1.5 ppm、2 ppm、2.5 ppm、3 ppm、3.5 ppm、4 ppm、4.5 ppm、5 ppm、5.5 ppm、6 ppm、6.5 ppm、7 ppm、7.5 ppm、8 ppm、8.5 ppm、9 ppm、9.5 ppm、10 ppm、15 ppm、20 ppm、25 ppm、30 ppm 或 35 ppm 中任一者之核酸。在某些實施例中，包含該多特異性抗體之組合物含有不超過約 0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30% 或 35% 中任一者之細胞培養基組分。

【0211】 在一些實施例中，提供一種包含多特異性抗體之組合物，其中該組合物含有：a)至少約 95%-100%多特異性抗體；b)少於約 1%-5%非配對抗體臂；c)少於約 1%-5%抗體均二聚體；d)不超過約 1%或 2% HMWS；e)不超過約 1%或 2% LMWS；及/或 f)不超過約 5% $\frac{3}{4}$ 抗體。

【0212】 在某些實施例中，提供根據本文所述之方法中的任一者純化之包含雙特異性抗體之組合物。在某些實施例中，該雙特異性抗體為杵臼(KiH)抗體，例如 KiH 雙特異性抗體。在一些實施例中，該雙特異性抗體為

CrossMab 雙特異性抗體。

【0213】 在某些實施例中，提供包含超過約 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 中任一者純之雙特異性抗體的組合物。在某些實施例中，該組合物中之雙特異性抗體超過約 96%、97%、98% 或 99% 中任一者純。在某些實施例中，該雙特異性抗體為杵臼(KiH)抗體，例如 KiH 雙特異性抗體。在一些實施例中，該雙特異性抗體為 CrossMab 雙特異性抗體。

【0214】 在某些實施例中，提供一種包含含有不超過約 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、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% 中任一者之非配對抗體臂之雙特異性抗體的組合物。在某些實施例中，提供一種包含含有不超過約 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、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% 中任一者之均二聚體之雙特異性抗體的組合物。在某些實施例中，提供一種包含含有不超過約 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5% 或 5% 中任一者之聚集之蛋白之雙特異性抗體的組合物。在某些實施例中，提供一種包含含有不超過約 0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30% 或 35% 中任一者之 HMWS 之雙特異性抗體的組合物。在某些實施例中，提供一種包含含有不超過約 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、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%中任一者之 LMWS 之雙特異性抗體的組合物。在某些實施例中，提供一種包含含有不超過約 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、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%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或 50%中任一者之酸性變異體之雙特異性抗體的組合物。在某些實施例中，提供一種包含含有不超過約 0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%或 35%中任一者之鹼性變異體之雙特異性抗體的組合物。在某些實施例中，提供一種包含含有不超過約 0.1 ppm、0.2 ppm、0.3 ppm、0.4 ppm、0.5 ppm、0.6 ppm、0.7 ppm、0.8 ppm、0.9 ppm、1 ppm、1.5 ppm、2 ppm、2.5 ppm、3 ppm、3.5 ppm、4 ppm、4.5 ppm、5 ppm、5.5 ppm、6 ppm、6.5 ppm、7 ppm、7.5 ppm、8 ppm、8.5 ppm、9 ppm、9.5 ppm 或 10 ppm 中任一者之瀝出之蛋白 A 之雙特異性抗體的組合物。在某些實施例中，提供一種包含含有不超過約 0.1 ppm、0.2 ppm、0.3 ppm、0.4 ppm、0.5 ppm、0.6 ppm、0.7 ppm、0.8 ppm、0.9 ppm、1 ppm、1.5 ppm、2 ppm、2.5 ppm、3 ppm、3.5 ppm、4 ppm、4.5 ppm、5 ppm、5.5 ppm、6 ppm、6.5 ppm、7 ppm、7.5 ppm、8 ppm、8.5 ppm、9 ppm、9.5 ppm、10 ppm、15 ppm、20 ppm、25 ppm、30 ppm 或 35 ppm 中任一者之 HCP 之雙特異性抗體的組合物。在某些實施例中，提供一種包含含有小於約 2 ppm、2.5 ppm、3 ppm、3.5 ppm、4 ppm、4.5 ppm、5 ppm、5.5 ppm、6 ppm、6.5 ppm、7 ppm、7.5 ppm、8 ppm、8.5 ppm、9 ppm、9.5 ppm 或 10 ppm 中任一者之核酸之雙特異性抗體的組合物。在某些實施例中，包含該雙特異性抗體之組合物包含不超過 0 ppm 核酸。在某些實施例中，包含該

雙特異性抗體之組合物中的核酸低於偵測水準。在某些實施例中，提供一種包含含有不超過約 0.1%、0.5%、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30% 或 35% 中任一者之細胞培養基組分之雙特異性抗體的組合物。在某些實施例中，該雙特異性抗體為杵臼(KiH)抗體，例如 KiH 雙特異性抗體。在一些實施例中，該雙特異性抗體為 CrossMab 雙特異性抗體。

【0215】 在一些實施例中，提供一種包含雙特異性抗體之組合物，其中該組合物含有：a)至少約 95%-100%雙特異性抗體；b)少於約 1%-5%非配對抗體臂；c)少於約 1%-5%抗體均二聚體；d)不超過約 1%或 2% HMWS；e)不超過約 1%或 2% LMWS；及/或 f)不超過約 5%^{3/4}抗體。在某些實施例中，該雙特異性抗體為杵臼(KiH)抗體，例如 KiH 雙特異性抗體。在一些實施例中，該雙特異性抗體為 CrossMab 雙特異性抗體。

【0216】 如本文所報告之一態樣為一種用多步驟層析方法純化含 Fc 區雜二聚體蛋白/多肽之方法，其中該方法包含親和力層析步驟、隨後兩個不同的多模式離子交換層析步驟，及由此純化該含 Fc 區雜二聚體蛋白/多肽。

【0217】 在某些實施例中，該方法包含 i.親和力層析步驟、隨後多模式陰離子交換層析步驟、隨後多模式陽離子交換層析步驟或 ii.親和力步驟、隨後多模式陽離子交換層析步驟、隨後多模式陰離子交換層析步驟。

【0218】 如本文所報告之一態樣為一種用於產生含 Fc 區雜二聚體蛋白/多肽之方法，其包含步驟 i.培養包含編碼該含 Fc 區雜二聚體蛋白/多肽之核酸的細胞，ii.自該細胞或培養基回收該含 Fc 區雜二聚體蛋白/多肽，iii.用如本文所報告之方法純化該含 Fc 區雜二聚體蛋白/多肽，及由此產生該含 Fc 區雜二聚體蛋白。已發現抗體純化過程之效能取決於所用之層析步驟的次

序。藉由選擇某一次序之層析步驟，可獲得改良過程。

【0219】 本文所提供之方法至少部分地基於以下發現，即藉由(直接地)在(初始)親和力層析步驟之後且在多模式陽離子交換層析步驟之前執行多模式陰離子交換層析步驟，可省略超濾/透濾步驟。若多模式陽離子交換層析步驟在多模式陰離子交換層析步驟之前執行，則此步驟為必需的。

【0220】 在某些實施例中，該多步驟層析方法包含親和力層析步驟、隨後多模式陰離子交換層析步驟、隨後多模式陽離子交換層析步驟。

【0221】 已發現使用本文所述之方法，可僅用三個層析步驟實現良好純度及產率。

【0222】 在某些實施例中，該多步驟層析方法精確地包含三個層析步驟。

【0223】 已發現若多模式陰離子交換層析方法/步驟以流通模式執行，則宿主細胞蛋白之移除可經改良。在某些實施例中，多模式陰離子交換層析方法/步驟以流通模式執行。

【0224】 已發現多模式陰離子交換層析步驟之負載的 pH 會影響 HCP、副產物及 DNA 移除。在所有態樣之一較佳實施例中，多模式陰離子交換層析步驟在約 7.0 之 pH 下執行。

表 1

層析 pH	電導率 [mS/cm]						
		產率	SEC	HCP	Caliper		DNA
			Σ HMW		前峰	HHL	
		[%]	[%]	[ng/mg]	[%]	[%]	[pg/mg]
6.5	5.75	85	3.34	139	8.132	2.428	<0.3
7.0	5.76	69	1.51	55	6.186	1.830	<0.4
7.5	6.73	67	1.23	35	5.671	1.555	22.1

【0225】 溶液之電導率可在純化過程期間對不同參數具有影響。此處，已發現多模式陰離子交換層析步驟之負載(亦即，包含該含 Fc 區雜二聚體多肽之溶液，其欲應用於層析材料)的低電導率值導致改良之 HCP 及 DNA 移除。

表 2

負載之電導率 [mS/cm]	HCP [ng/mg]	DNA [pg/mg]
16.92	303	78.6
5.86	35	22.1
3.64	14	0

【0226】 在某些實施例中，在多模式陰離子交換層析步驟中，該含 Fc 區雜二聚體多肽應用於具有小於 7 mS/cm 之電導率值之溶液中。在某些實施例中，在多模式陰離子交換層析步驟中，該含 Fc 區雜二聚體多肽應用於具有小於 6 mS/cm 之電導率值之溶液中。在某些實施例中，在多模式陰離子交換層析步驟中，該含 Fc 區雜二聚體多肽應用於具有在約 6 mS/cm 至約 2 mS/cm 範圍內之電導率值之溶液中。在某些實施例中，在多模式陰離子交換層析步驟中，該含 Fc 區雜二聚體多肽應用於具有在約 5 mS/cm 至約 4 mS/cm 範圍內之電導率值之溶液中。在某些實施例中，在多模式陰離子交換層析步驟中，該含 Fc 區雜二聚體多肽應用於具有約 4.5 mS/cm 之電導率值之溶液中。

【0227】 在某些實施例中，在多模式陰離子交換層析步驟中，該含 Fc 區雜二聚體多肽應用於具有約 4.5 mS/cm 之電導率及約 7 之 pH 的溶液中。

【0228】 本文所提供之方法至少部分地基於以下發現，即多模式陰離子交換層析步驟之蛋白負載量亦影響純化過程之效能。若負載在規定範圍內，則總體純化過程經改良，例如 DNA 污染之移除。

表 3：DNA 之開始量：80 pg/mg

每一 Capto adhere ImpRes 材料之多肽負載	220 g/L	180 g/L	150 g/L	120 g/L
層析步驟之後之 DNA 含量	0.8 pg/mg	0 pg/mg	0 pg/mg	0 pg/mg

【0229】 在某些實施例中，在多模式陰離子交換層析步驟中，該含 Fc 區雜二聚體多肽在約 100 g 至約 300 g/公升層析材料之範圍內應用，亦即，負載在約 100 g/L 至約 300 g/L 範圍內。在某些實施例中，在多模式陰離子交換層析步驟中，該含 Fc 區雜二聚體多肽在約 120 g 至約 240 g/公升層析材料之範圍內應用。在某些實施例中，在多模式陰離子交換層析步驟中，該含 Fc 區雜二聚體多肽在約 160 g 至約 200 g/公升層析材料之範圍內應用。

【0230】 已發現當應用於如本文所報告之方法中時，某些多模式樹脂材料尤其適用。

【0231】 在某些實施例中，多模式陰離子交換層析材料為多模式強陰離子交換層析材料。在某些實施例中，該多模式陰離子交換層析材料具有高流量瓊脂糖基質、作為配位體的多模式強陰離子交換劑、36-44 μm 之平均粒徑及 0.08 至 0.11 mmol Cl-/mL 培養基之離子容量。在某些實施例中，多模式陰離子交換層析材料為「Capto adhere ImpRes」。

【0232】 在某些實施例中，多模式陽離子交換層析材料為多模式弱陽離子交換層析介質。在某些實施例中，該多模式陽離子交換層析介質具有高流量瓊脂糖基質、作為配位體的多模式弱陽離子交換劑、36-44 μm 之平均粒徑及 25 至 39 μmol/mL 之離子容量。在某些實施例中，多模式陽離子交換層析介質為「Capto MMC ImpRes」。

【0233】 在某些實施例中，多模式陽離子交換層析方法/步驟以結合及溶

離模式執行。

【0234】 在某些實施例中，該親和力層析步驟為蛋白 A 層析步驟或蛋白 G 親和力層析或單鏈 Fv 配位體親和力層析或具有 KappaSelect 層析材料之層析步驟或具有 CaptureSelect 層析材料之層析步驟或具有 CaptureSelect FcXL 層析材料之層析步驟。在某些實施例中，該親和力層析步驟為蛋白 A 層析步驟。在某些實施例中，該親和力層析步驟為 CaptureSelect™層析步驟。在某些實施例中，該親和力層析步驟為蛋白 A 層析步驟。

【0235】 在某些實施例中，含 Fc 區雜二聚體蛋白/多肽為抗體、雙特異性抗體或 Fc-融合蛋白。在某些實施例中，含 Fc 區雜二聚體蛋白/多肽為雙特異性抗體。在某些實施例中，含 Fc 區雜二聚體蛋白/多肽為 CrossMab。在某些實施例中，含 Fc 區雜二聚體蛋白/多肽為 Fc-融合蛋白。在某些實施例中，該含 Fc 區雜二聚體蛋白/多肽為雙特異性抗體，其包含 a)特異性結合於第一抗原之第一全長抗體的重鏈及輕鏈；及 b)特異性結合於第二抗原之全長抗體的經修飾重鏈及經修飾輕鏈，其中恆定域 CL 及 CH1 由彼此置換。

【0236】 在某些實施例中，該雙特異性抗體為結合於 ANG2 及 VEGF 之雙特異性抗體。在某些實施例中，含 Fc 區雜二聚體蛋白/多肽為結合於 ANG2 及 VEGF 之 CrossMab。在某些實施例中，該雙特異性抗體為瓦紐賽單抗。

【0237】 在某些實施例中，該雙特異性抗體包含第一抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 1 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 2；及第二抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 3 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 4。在某些實施例中，該雙特異性抗體包含具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 9 之第一重鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID

NO: 10 之第二重鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 11 之第一輕鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 12 之第二輕鏈。在某些實施例中，該雙特異性抗體包含第一抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 5 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 6；及第二抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 7 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 8。在某些實施例中，該雙特異性抗體包含具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 13 之第一重鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 14 之第二重鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 15 之第一輕鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 16 之第二輕鏈。胺基酸序列 SEQ ID NO: 1-16 提供於下表 4 中：

表 4

SEQ ID NO: 1	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGEPTY AAEFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP HYYGSSHWF DVWGQGLVT VSS
--------------	---

SEQ ID NO: 2	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF TSSLHSGVPS RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIK
SEQ ID NO: 3	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GYMHWVRQA PGQGLEWMGW INPNSGGTNY AOKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSRRLSDD TAVYYCARSP NPYYDSSGY YYPGAFDIWG QGTMVTVS
SEQ ID NO: 4	QPGLTQPPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVYDD SDRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHYVFG TGTKVTVL
SEQ ID NO: 5	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYDFT HYGMNWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP YYYGTSHWYF DVWGQGTLLV VSS
SEQ ID NO: 6	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF TSSLHSGVPS RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIK
SEQ ID NO: 7	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GYMHWVRQA PGQGLEWMGW INPNSGGTNY AOKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSRRLSDD TAVYYCARSP NPYYDSSGY YYPGAFDIWG QGTMVTVSS
SEQ ID NO: 8	SYVLTQPPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVYDD SDRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHYVFG GGTKLTVLGQ
SEQ ID NO: 9	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GYMHWVRQA PGQGLEWMGW INPNSGGTNY AOKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSRRLSDD TAVYYCARSP NPYYDSSGY YYPGAFDIWG QGTMVTVSSA SVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGECDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPFS RDELTKNQVS LSCAVKGFYP SDIAVEWESN GOPENNYKTT PPVLDSDGSF FLVSKLTVDK SRWQOGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLG PGK
SEQ ID NO: 10	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP HYYGSSHWFY DVWGQGTLLV VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC RDELTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GOPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQOGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLG PGK
SEQ ID NO: 11	QPGLTQPPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVYDD SDRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHYVFG TGTKVTVLSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTOT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSC
SEQ ID NO: 12	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF TSSLHSGVPS RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVEIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYERHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK
SEQ ID NO: 13	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYDFT HYGMNWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP YYYGTSHWYF DVWGQGTLLV VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGSPVFLFP PKPKDTLMAS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLAQDWL NGKEYKCKVS NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC RDELTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GOPENNYKTT

	PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN AYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 14	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GYYMHWVRQA PGQGLEWMGW INPNSGGTNY AQKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSRRLRSD TAVYYCARSP NPYYDSSGY YYPGAFDIWG QGTMTVSSA SVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGECDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMAS RTEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLAQDWL NGKEYKCKVS NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPPS RDELTRNOVS LSCAVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN AYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 15	DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKPKAPKVLIIYF TSSLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIPEP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK
SEQ ID NO: 16	SYVLTPPPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVYDD SDRPSGIPER FSGNSCNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHWVFG GGTKLTVLSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSC

【0238】 在某些實施例中，經純化之含 Fc 區雜二聚體多肽含有不超過約 5% ³/₄ 抗體。在某些實施例中，經純化之含 Fc 區雜二聚體多肽含有不超過約 4% ³/₄ 抗體。在某些實施例中，經純化之含 Fc 區雜二聚體多肽含有不超過約 3% ³/₄ 抗體。在某些實施例中，經純化之含 Fc 區雜二聚體多肽含有不超過約 2% ³/₄ 抗體。在某些實施例中，經純化之含 Fc 區雜二聚體多肽含有不超過約 1% ³/₄ 抗體。

【0239】 如本文所報告之一態樣為一種用多步驟層析方法純化結合於 ANG2 及 VEGF 之雙特異性抗體之方法，其中該方法包含親和力層析步驟、隨後多模式陰離子交換層析步驟、隨後多模式陽離子交換層析步驟，及由此純化結合於 ANG2 及 VEGF 之雙特異性抗體，其中結合於 ANG2 及 VEGF 之雙特異性抗體包含第一抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 1 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 2；及第二抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 3 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 4，或包含第一抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之

SEQ ID NO: 5 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 6；及第二抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 7 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 8。

【0240】 在一實施例中，結合於 ANG2 及 VEGF 之雙特異性抗體包含 a) 包含第一抗原結合位點之第一全長抗體的重鏈及輕鏈；及 b) 包含第二抗原結合位點之全長抗體的經修飾重鏈及經修飾輕鏈，其中恆定域 CL 及 CH1 由彼此置換。

【0241】 如本文所報告之一態樣為如本文所報告之方法用於純化含 Fc 雜二聚體多肽之用途。

【0242】 如本文所報告之一態樣為如本文所報告之方法用於減少含 Fc 雜二聚體多肽相關雜質之用途。

【0243】 如本文所報告之一態樣為用如本文所報告之方法獲得的含 Fc 雜二聚體多肽，其用於製造用於治療癌症或眼病之藥劑。

【0244】 如本文所報告之一態樣為用如本文所報告之方法獲得的含 Fc 雜二聚體多肽，其用於治療癌症或眼病。

多肽

單株抗體

【0245】 在一些實施例中，抗體為單株抗體。單株抗體獲自實質上均質抗體之群體，亦即，構成該群體之個別抗體為一致的及/或結合相同抗原決定基，除了在該單株抗體之產生期間出現之可能變異體，該等變異體一般少量存在。因此，修飾語「單株」指示該抗體之特徵為並非個別或多株抗體之混合物。

【0246】 例如，單株抗體可使用首先由 Kohler 等人, *Nature* 256:495 (1975) 描述之融合瘤方法製得，或可藉由重組 DNA 方法製得(美國專利第 4,816,567 號)。

【0247】 在融合瘤方法中，小鼠或其他適當宿主動物如本文所述經免疫以引起產生或能夠產生將特異性地結合於用於免疫之多肽之抗體的淋巴細胞。或者，淋巴細胞可活體外經免疫。淋巴細胞接著使用諸如聚乙二醇之合適融合劑與骨髓瘤細胞融合，以形成融合瘤細胞(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第 59-103 頁 (Academic Press, 1986))。

【0248】 由此製備之融合瘤細胞在較佳地含有一或多種抑制未融合、親本骨髓瘤細胞之生長或存活的物質之合適培養基中接種且生長。例如，若該等親本骨髓瘤細胞缺乏酶次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶(HGPRT 或 HPRT)，則用於融合瘤之培養基典型地將包括次黃嘌呤、胺基喋呤及胸苷(HAT 培養基)，該等物質防止 HGPRT 缺乏細胞之生長。

【0249】 在一些實施例中，該等骨髓瘤細胞為有效地融合、支持由所選之抗體產生細胞穩定高水準產生抗體且對諸如 HAT 培養基之培養基敏感的彼等細胞。其中，在一些實施例中，骨髓瘤細胞株為鼠類骨髓瘤株，諸如源於可獲自 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA 之 MOPC-21 及 MPC-11 小鼠腫瘤及可獲自 American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA 之 SP-2 或 X63-Ag8-653 細胞的彼等細胞株。人類骨髓瘤及小鼠-人類異源骨髓瘤細胞株亦已關於人類單株抗體之產生加以描述(Kozbor, *J. Immunol.* 133:3001 (1984)；Brodeur 等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* 第 51-63 頁 (Marcel Dekker, Inc., New

York, 1987))。

【0250】 其中融合瘤細胞正在生長之培養基關於針對抗原之單株抗體的產生進行分析。在一些實施例中，由融合瘤細胞產生之單株抗體的結合特性藉由免疫沉澱或藉由活體外結合分析，諸如放射性免疫分析(RIA)或酶聯免疫吸附劑分析(ELISA)來確定。

【0251】 該單株抗體之結合親和力可例如藉由 Munson 等人; *Anal. Biochem.* 107:220 (1980)之斯卡查德分析(Scatchard analysis)來確定。

【0252】 在鑒別出產生具有所需特性、親和力及/或活性之抗體的融合瘤細胞之後，該等純系可藉由限制稀釋程序進行次選殖且藉由標準方法 (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* 第 59-103 頁 (Academic Press, 1986))生長。用於此目的之合適培養基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培養基。此外，該等融合瘤細胞可活體內作為動物中之腹水腫瘤生長。

【0253】 由該等次純系分泌之單株抗體合適地藉由習知免疫球蛋白純化程序，諸如多肽 A-瓊脂糖、羧磷灰石層析、凝膠電泳、透析、親和力層析或離子交換層析與培養基、腹水液或血清分離。

【0254】 編碼該等單株抗體之 DNA 容易地使用習知程序分離且測序(例如，藉由使用能夠特異性結合於編碼鼠類抗體的重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)。在一些實施例中，該等融合瘤細胞充當該 DNA 之來源。一旦經分離，該 DNA 可置於表現載體中，該等表現載體接著經轉染至不以其他方式產生免疫球蛋白多肽之宿主細胞，諸如大腸桿菌細胞、猿 COS 細胞、人類胚胎腎(HEK) 293 細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞中，以

獲得重組宿主細胞中單株抗體之合成。關於編碼該抗體之 DNA 在細菌中之重組表現的回顧文章包括 Skerra 等人, *Curr. Opinion in Immunol.* 5:256-262 (1993)及 Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992)。

【0255】 在另一實施例中，抗體或抗體片段可自使用 McCafferty 等人, *Nature* 348:552-554 (1990)中所述之技術產生的抗體噬菌體文庫分離。Clackson 等人, *Nature* 352:624-628 (1991)及 Marks 等人, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)描述了分別地使用噬菌體文庫分離鼠類及人類抗體。後續出版物描述了藉由鏈改組(Marks 等人, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992))產生高親和力(nM 範圍)人類抗體，以及作為用於構建極大噬菌體文庫之策略的組合感染及活體內重組(Waterhouse 等人, *Nuc. Acids. Res.* 21:2265-2266 (1993))。因此，此等技術為用於單株抗體之分離的傳統單株抗體融合瘤技術之可行替代。

【0256】 該 DNA 亦可例如藉由用人類重鏈及輕鏈恆定域之編碼序列取代來替代同源鼠類序列(美國專利第 4,816,567 號；Morrison 等人, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81:6851 (1984))，或藉由將非免疫球蛋白多肽之編碼序列的全部或部分共價接合至免疫球蛋白編碼序列而經修飾。

【0257】 典型地，該等非免疫球蛋白多肽取代抗體之恆定域，或其取代抗體之一抗原結合位點的可變域以產生包含對抗原具有特異性之一抗原結合位點及對不同抗原具有特異性之另一抗原結合位點的嵌合二價抗體。

【0258】 在任何本文所述之方法之一些實施例中，該抗體為 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM。在一些實施例中，該抗體為 IgG 單株抗體。

抗體片段

【0259】 在一些實施例中，該抗體為抗體片段。已開發多種技術來產生抗體片段。傳統地，此等片段經由完整抗體之蛋白水解消化而衍生(參見例如 Morimoto 等人, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)及 Brennan 等人, *Science* 229:81 (1985))。然而，此等片段現可直接地藉由重組宿主細胞產生。例如，抗體片段可自上文所論述之抗體噬菌體文庫分離。或者，Fab'-SH 片段可直接地由大腸桿菌回收且以化學方式偶合以形成 F(ab')₂ 片段(Carter 等人, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992))。根據另一方法，F(ab')₂ 片段可直接地自重組宿主細胞培養物分離。用於產生抗體片段之其他技術對於熟練從業者將為顯而易知的。在其他實施例中，所選抗體為單鏈 Fv 片段(scFv)。參見 WO 93/16185；美國專利第 5,571,894 號；及美國專利第 5,587,458 號。抗體片段亦可為「線性抗體」，舉例而言，如例如美國專利 5,641,870 所述。該等線性抗體片段可為單特異性或雙特異性的。

【0260】 在一些實施例中，提供本文所述之抗體的片段。在一些實施例中，該抗體片段為抗原結合片段。在一些實施例中，該抗原結合片段係選自由 Fab 片段、Fab'片段、F(ab')₂ 片段、scFv、Fv 及雙功能抗體組成之群。

多肽變異體及修飾

【0261】 在某些實施例中，涵蓋本文中蛋白之胺基酸序列變異體。例如，可需要改良該蛋白之結合親和力及/或其他生物特性。蛋白之胺基酸序列變異體可藉由將適當修飾引入至編碼該蛋白之核苷酸序列中，或藉由肽合成製備。該等修飾包括例如該蛋白之胺基酸序列內殘基的缺失、及/或插入及/或取代。可製得缺失、插入及取代之任何組合以獲得最終構築體，其限制

條件在於該最終構築體具有所需特徵。

【0262】 「多肽變異體」意謂如本文所定義之多肽(例如，活性多肽)，該多肽與該多肽之全長原生序列、缺乏信號肽之多肽序列、多肽之細胞外域(具有或不具有信號肽)具有至少約 80%胺基酸序列一致性。該等多肽變異體包括例如其中在全長原生胺基酸序列之 N 或 C 端處添加或缺失一或多個胺基酸殘基之多肽。通常，多肽變異體將與全長原生序列多肽序列、缺乏信號肽之多肽序列、多肽之細胞外域(具有或不具有信號肽)具有至少約 80%胺基酸序列一致性，或者至少約 85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%中任一者之胺基酸序列一致性。視情況，變異體多肽如與原生多肽序列相比將具有不超過一種保守胺基酸取代，或者如與原生多肽序列相比不超過約 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 種中任一者之保守胺基酸取代。

【0263】 例如，當與全長原生多肽相比時，該變異體多肽可在 N 端或 C 端處經截短，或可缺乏內部殘基。某些變異體多肽可缺乏並非所需生物活性所必需之胺基酸殘基。此等具有截短、缺失及插入之變異體多肽可藉由多種習知技術中之任一種製備。所需變異體多肽可以化學方式合成。另一合適技術涉及分離及藉由聚合酶鏈反應(PCR)擴增編碼所需變異體多肽之核酸片段。定義該核酸片段之所需末端的寡核苷酸在 PCR 中用於 5'及 3'引子處。較佳地，變異體多肽與本文所揭示之原生多肽共享至少一種生物及/或免疫學活性。

【0264】 胺基酸序列插入包括介於一個殘基至含有一百個或更多殘基之多肽的長度範圍內之胺基-及/或羧基端融合，以及單一或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括具有 N 端甲硫胺醯基殘基之抗體或融合

至細胞毒性多肽之抗體。該抗體分子之其他插入變異體包括該抗體之 N 端或 C 端融合至酶或增加該抗體之血清半衰期的多肽。

【0265】 例如，可需要改良該多肽之結合親和力及/或其他生物特性。該多肽之胺基酸序列變異體藉由將適當核苷酸改變引入至抗體核酸中，或藉由肽合成製備。該等修飾包括例如該多肽之胺基酸序列內殘基的缺失、及/或插入及/或取代。製得缺失、插入及取代之任何組合以獲得最終構築體，其限制條件在於該最終構築體具有所需特徵。該等胺基酸改變亦可改變該多肽(例如，抗體)之轉譯後過程，諸如改變糖基化位點之數目或位置。

【0266】 關於確定何種胺基酸殘基可插入、取代或缺失而不會不利地影響所需活性之指導可藉由比較該多肽之序列與同源已知多肽分子之序列且使在具有高同源性之區中進行的胺基酸序列改變之數目減至最少而發現。

【0267】 用於鑒別該多肽(例如，抗體)中作為突變誘發之較佳位置的某些殘基或區之適用方法被稱作「丙胺酸掃描突變誘發」，如由 Cunningham 及 Wells, Science 244:1081-1085 (1989)所述。此處，靶標殘基之殘基或基團經鑒別(例如帶電殘基，諸如 Arg、Asp、His、Lys 及 Glu)且由中性或帶負電胺基酸(最佳地，丙胺酸或聚丙胺酸)置換以影響該等胺基酸與抗原之相互作用。證明對取代之功能敏感性之彼等胺基酸位置接著藉由在取代位點處或針對該等位點引入進一步或其他變異體而細化。因此，雖然用於引入胺基酸序列變異之位點經預定，但突變本身之性質無需經預定。例如，為了分析在既定位點處突變之效能，在靶標密碼子或區處進行 ala 掃描或隨機突變誘發且針對所需活性篩選經表現之抗體變異體。

【0268】 另一類型之變異體為胺基酸取代變異體。此等變異體在抗體分

子中具有至少一個由不同殘基置換之胺基酸殘基。用於取代性突變誘發之最關注位點包括高變區，但亦涵蓋 FR 改變。若該等取代導致生物活性之改變，則可引入更多實質性改變(表 5 中經命名「例示性取代」，或如下文參考胺基酸類別進一步描述)且篩選產物。

表 5

初始殘基	例示性取代	保守取代
Ala (A)	Val ; Leu ; Ile	Val
Arg (R)	Lys ; Gln ; Asn	Lys
Asn (N)	Gln ; His ; Asp ; Lys ; Arg	Gln
Asp (D)	Glu ; Asn	Glu
Cys (C)	Ser ; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn ; Glu	Asn
Glu (E)	Asp ; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn ; Gln ; Lys ; Arg	Arg
Ile (I)	Leu ; Val ; Met ; Ala ; Phe ; 正白胺酸	Leu
Leu (L)	正白胺酸 ; Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe	Ile
Lys (K)	Arg ; Gln ; Asn	Arg
Met (M)	Leu ; Phe ; Ile	Leu
Phe (F)	Trp ; Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val ; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp ; Phe ; Thr ; Ser	Phe
Val (V)	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; 正白胺酸	Leu

【0269】 該多肽之生物特性的實質性修飾藉由選擇取代來實現，該等取代在其對維持(a)取代區域中多肽骨架之結構，例如，呈薄片或螺旋構形，(b)該分子在靶標位點處之電荷或疏水性，或(c)側鏈之大小的影響方面顯著不同。胺基酸可根據其側鏈之特性的相似性分組(在 A. L. Lehninger, Biochemistry 第二版, 第 73-75 頁, Worth Publishers, New York (1975)中)：

【0270】 (1)非極性：Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、

Trp (W)、Met (M)

【0271】 (2)不帶電極性：Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q)

【0272】 (3)酸性：Asp (D)、Glu (E)

【0273】 (4)鹼性：Lys (K)、Arg (R)、His(H)

【0274】 或者，天然存在之殘基可基於常見側鏈特性分成各組：

【0275】 (1)疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

【0276】 (2)中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

【0277】 (3)酸性：Asp、Glu；

【0278】 (4)鹼性：His、Lys、Arg；

【0279】 (5)影響鏈取向之殘基：Gly、Pro；

【0280】 (6)芳香性：Trp、Tyr、Phe。

【0281】 非保守取代將需要將此等類別之一的成員換成另一類別。

【0282】 未牽涉於維持抗體之適當構形中的任何半胱胺酸殘基亦可一般經絲胺酸取代，以改良該分子之氧化穩定性且防止異常交聯。相反地，半胱胺酸鍵可添加至該多肽中以改良其穩定性(尤其在該抗體為諸如 Fv 片段之抗體片段的情況下)。

【0283】 取代變異體之一實例涉及取代親本抗體(例如，人類化抗體)之一或多個高變區殘基。一般而言，針對進一步開發所選擇之所得變異體將具有相對於產生該等變異體之親本抗體有所改良之生物特性。用於產生該等取代變異體之便利方式涉及使用噬菌體呈現之親和力成熟。簡言之，數個高變區位點(例如，6-7個位點)突變以在各位點處產生所有可能的胺基取代。

因此產生之抗體變異體以單價形式自絲狀噬菌體粒子呈現為與封裝於各粒子內之 M13 的基因 III 產物之融合物。噬菌體呈現之變異體接著針對如本文所揭示之其生物活性(例如，結合親和力)進行篩選。為了鑒別用於修飾之候選高變區位點，可執行丙胺酸掃描突變誘發以鑒別顯著有助於抗原結合之高變區殘基。或者或另外，分析抗原-抗體複合物之晶體結構以鑒別該抗體與靶標之間的接觸點可為有益的。該等接觸殘基及相鄰殘基根據本文中詳細闡述之技術為用於取代之候選者。一旦產生該等變異體，變異體之組即經受如本文所述之篩選且在一或多種相關分析中具有卓越特性之抗體可篩選用於進一步開發。

【0284】 該多肽之另一類型的胺基酸變異體會改變該抗體之初始糖基化模式。該多肽可包含非胺基酸部分。例如，該多肽可經糖基化。該糖基化可在該多肽在宿主細胞或宿主生物體中表現期間天然地發生，或可為由人類干預引起之有意修飾。改變意謂缺失一或多種在該多肽中發現之碳水化合物部分，及/或添加一或多個未存在於該多肽中之糖基化位點。

【0285】 多肽之糖基化典型地為 N 連接或 O 連接的。N 連接係指該碳水化合物部分連接至天冬醯胺殘基之側鏈。三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸及天冬醯胺-X-酰胺酸(其中 X 為除了脯胺酸外之任何胺基酸)為關於該碳水化合物部分酶促連接至天冬醯胺側鏈之識別序列。因此，多肽中此等三肽序列中任一者之存在均會產生潛在糖基化位點。O 連接之糖基化係指糖 N-乙醯基半乳糖胺、半乳糖或木糖之一連接至羥基胺基酸，最通常為絲胺酸或酰胺酸，不過亦可使用 5-羥基脯胺酸或 5-羥基離胺酸。

【0286】 糖基化位點添加至該多肽中便利地藉由改變胺基酸序列以致其

含有一或多個上述三肽序列來實現(關於 N 連接糖基化位點)。該改變亦可藉由添加一或多個絲胺酸或酰胺酸殘基至初始抗體之序列中或由該一或多個絲胺酸或酰胺酸殘基取代來進行(關於 O 連接糖基化位點)。

【0287】 移除存在於該多肽上之碳水化合物部分可以化學方式或以酶方式或藉由編碼充當糖基化靶標之胺基酸殘基之密碼子的突變取代來實現。多肽上之碳水化合物部分之酶裂解可藉由使用多種內切及外切-糖苷酶來實現。

【0288】 其他修飾包括麩胺醯胺基及天冬醯胺基殘基分別地去醯胺化為麩胺醯基及天冬胺醯基殘基，脯胺酸及離胺酸之羥基化，絲胺醯基或酰胺醯基殘基之羥基的磷酸化，離胺酸、精胺酸及組胺酸側鏈之 γ -胺基的甲基化，N 端胺之乙醯化，及任何 C 端羧基之醯胺化。

嵌合多肽

【0289】 本文所述之多肽可以一定方式經修飾以形成包含融合至另一、異源多肽或胺基酸序列之多肽的嵌合分子。在一些實施例中，嵌合分子包含該多肽與標籤多肽之融合物，該標籤多肽提供可選擇性結合抗標籤抗體之抗原決定基。該抗原決定基標籤一般置於該多肽之胺基或羧基端處。該多肽之該等抗原決定基標記形式的存在可使用針對該標籤多肽之抗體來偵測。又，該抗原決定基標籤之提供使得該多肽能夠容易地使用抗標籤抗體或另一類型之結合於該抗原決定基標籤之親和力基質藉由親和力純化來純化。

多特异性抗體

【0290】 在某些實施例中，本文所提供之抗體為多特异性抗體，例如雙

特異性抗體。多特異性抗體為對至少兩個不同位點具有結合特異性之單株抗體。在某些實施例中，該等結合特異性之一針對 c-met 且另一者針對任何其他抗原。在某些實施例中，雙特異性抗體可結合於 c-met 之兩種不同抗原決定基。雙特異性抗體亦可用於使細胞毒性劑局限於表現 c-met 之細胞。雙特異性抗體可製備為全長抗體或抗體片段。

【0291】 用於製造多特異性抗體之技術包括但不限於具有不同特異性之兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對的重組共表現(參見 Milstein 及 Cuello, *Nature* 305: 537 (1983), WO 93/08829, 及 Traunecker 等人, *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), 及「杵臼」工程改造(參見例如美國專利第 5,731,168 號)。多特異性抗體亦可藉由工程改造針對製造抗體 Fc-雜二聚體分子之靜電轉向效應(WO 2009/089004A1)；使兩種或兩種以上抗體或片段交聯(參見例如美國專利第 4,676,980 號，及 Brennan 等人, *Science*, 229: 81 (1985))；使用白胺酸拉鍊來製造雙特異性抗體(參見例如 Kostelny 等人, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992))；使用用於製造雙特異性抗體片段的「雙功能抗體」技術(參見例如 Hollinger 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993))；及使用單鏈 Fv (sFv)二聚體(參見例如 Gruber 等人, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994))；及如例如 Tutt 等人 *J. Immunol.* 147: 60 (1991)中所述製備三特異性抗體而製得。

【0292】 本文中之抗體或片段亦包括 WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO 2009/080253、WO 2009/080254、WO 2010/112193、WO 2010/115589、WO 2010/136172、WO 2010/145792 及 WO 2010/145793 中所述之多特異性抗體。

【0293】 本文中亦包括具有三個或三個以上功能性抗原結合位點之經工

程改造之抗體，包括「章魚抗體」(參見例如 US 2006/0025576A1)。

【0294】 本文中之抗體或片段亦包括「雙重作用 Fab (Dual Acting Fab)」或「雙重作用 Fab (Dual Action Fab)」(DAF)，其包含結合於第一抗原決定基(例如，在第一抗原上)以及另一、不同抗原決定基(例如，在第一抗原上或在第二、不同抗原上)之抗原結合位點(參見例如 US 2008/0069820；Bostrom 等人 (2009) *Science*, 5921, 1610-1614)。

【0295】 用於製造雙特異性抗體之方法為此項技術中已知的。傳統上，雙特異性抗體之重組產生係基於兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之共表現，其中兩條重鏈具有不同特異性(Milstein 及 Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983))。由於免疫球蛋白重鏈及輕鏈之隨機分類，此等融合瘤(四源雜交瘤)產生 10 種不同抗體分子之潛在混合物，其中僅一種具有正確雙特異性結構。該正確分子之純化通常藉由親和力層析步驟進行，相當麻煩，且產物產率低。相似程序揭示於 1993 年 5 月 13 日公開之 WO 93/08829 中，及 Traunecker 等人, *EMBO J.*, 10: 3655 (1991)中。

【0296】 根據一種不同且更佳的方法，具有所需結合特異性之抗體可變域(抗體-抗原組合位點)融合至免疫球蛋白恆定域序列。該融合較佳地使用免疫球蛋白重鏈恆定域，包含鉸鏈區、CH2 及 CH3 區之至少一部分。較佳在至少一種融合物中存在第一重鏈恆定區(CH1)，其含有輕鏈結合所必需之位點。編碼該等免疫球蛋白重鏈融合物及必要時免疫球蛋白輕鏈之 DNA 插入至獨立表現載體中，且共轉染至合適之宿主生物體中。當用於構建之三條多肽鏈的不等比率提供最佳產率時，此舉提供了調節實施例中之三條多肽鏈的相互比例之極大靈活性。然而，當至少兩條呈相等比率之多肽鏈的

表現導致高產率時或當該等比率不具有特定重要性時，有可能在一表現載體中插入兩條或所有三條多肽鏈之編碼序列。

【0297】 在此方法之一較佳實施例中，該等雙特異性抗體由一臂中之具有第一結合特異性的雜合免疫球蛋白重鏈及另一臂中之雜合免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(提供第二結合特異性)構成。發現此不對稱結構促進所需雙特異性化合物與不想要之免疫球蛋白鏈組合的分離，因為該雙特異性分子之僅一半中存在免疫球蛋白輕鏈會提供容易之分離方式。此方法揭示於 WO 94/04690 中。關於產生雙特異性抗體之其他詳情，參見例如 Suresh 等人, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)。

杵臼技術

【0298】 根據另一方法，在一對抗體分子之間之界面可經工程改造以使自重組細胞培養物回收之雜二聚體的百分率增至最高。較佳界面包含抗體恆定域之 CH3 域的至少一部分。在此方法中，來自第一抗體分子之界面的一或多個小胺基酸側鏈用較大側鏈(例如，酪胺酸或色胺酸)(杵或突起)置換。與大側鏈具有一致或相似尺寸之補償性「空腔」(臼)在第二抗體分子之界面上藉由用較小胺基酸側鏈(例如，丙胺酸或酥胺酸)置換大胺基酸側鏈而產生。此提供了一種用於增加雜二聚體之產率超過諸如均二聚體之其他不想要的終產物之機制。杵及臼進一步描述於本文中。

【0299】 杵臼作為產生多特異性抗體及/或一臂抗體及/或免疫黏附素之方法的用途為此項技術中熟知的。參見受讓於 Genentech 之 1998 年 3 月 24 日授權之美國專利第 5,731,168 號，2009 年 7 月 16 日公開且受讓於 Amgen 之 PCT 公開案第 WO2009089004 號，及 2009 年 7 月 16 日公開且受讓於 Novo

Nordisk A/S 之美國專利公開案第 20090182127 號。亦參見 Marvin 及 Zhu, *Acta Pharmacologica Sincia* (2005) 26(6):649-658 及 Kontermann (2005) *Acta Pharacol. Sin.*, 26:1-9。此處提供簡短論述。

【0300】 「突起」係指自第一多肽之界面突出且因此可定位於相鄰界面(亦即，第二多肽之界面)中的補償性空腔中以便使雜多聚體穩定化，且由此例如支持雜多聚體形成超過均多聚體形成之至少一個胺基酸側鏈。該突起可存在於初始界面中或可以合成方式(例如，藉由改變編碼該界面之核酸)引入。通常，編碼第一多肽之界面的核酸發生改變以編碼該突起。為此，編碼第一多肽之界面中的至少一種「初始」胺基酸殘基之核酸由編碼至少一種具有大於該初始胺基酸殘基之側鏈體積的「輸入」胺基酸殘基之核酸置換。應瞭解，可存在超過一種初始及相應輸入殘基。經置換之初始殘基的數目之上限為第一多肽之界面中的殘基總數。多種胺基殘基之側鏈體積在下表中示出。

表 6：胺基酸之特性

胺基酸	單字母縮寫	質量 ^a (道爾頓)	體積 ^b (埃 ³)	可及表面積 ^c (埃 ²)
丙胺酸(Ala)	A	71.08	88.6	115
精胺酸(Arg)	R	156.20	173.4	225
天冬醯胺(Asn)	N	114.11	117.7	160
天冬胺酸(Asp)	D	115.09	111.1	150
半胱胺酸(Cys)	C	103.14	108.5	135
麩醯胺(Gln)	Q	128.14	143.9	180
麩胺酸(Glu)	E	129.12	138.4	190
甘胺酸(Gly)	G	57.06	60.1	75
組胺酸(His)	H	137.15	153.2	195
異白胺酸(Ile)	I	113.17	166.7	175
白胺酸(Leu)	L	113.17	166.7	170
離胺酸(Lys)	K	128.18	168.6	200
甲硫胺酸(Met)	M	131.21	162.9	185
苯丙胺酸(Phe)	F	147.18	189.9	210

胺基酸	單字母縮寫	質量 ^a (道爾頓)	體積 ^b (埃 ³)	可及表面積 ^c (埃 ²)
脯胺酸(Pro)	P	97.12	122.7	145
絲胺酸(Ser)	S	87.08	89.0	115
酥胺酸(Thr)	T	101.11	116.1	140
色胺酸(Trp)	W	186.21	227.8	255
酪胺酸(Tyr)	Y	163.18	193.6	230
纈胺酸(Val)	V	99.14	140.0	155

^a 分子量胺基酸減去水之分子量。來自 Handbook of Chemistry and Physics, 第 43 版 Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961 之值。

^b 來自 A.A. Zamyatnin, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 24:107-123, 1972 之值。

^c 來自 C. Chothia, *J. Mol. Biol.* 105:1-14, 1975 之值。可及表面積定義於此參考文獻之圖 6-20 中。

【0301】 用於形成突起之較佳輸入殘基一般為天然存在之胺基酸殘基且較佳地選自精胺酸(R)、苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)及色胺酸(W)。最佳為色胺酸及酪胺酸。在一實施例中，用於形成突起之初始殘基具有小的側鏈體積，諸如丙胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸、甘胺酸、絲胺酸、酥胺酸或纈胺酸。CH3 域中用於形成突起之例示性胺基酸取代包括而不限於 T366W 取代。

【0302】 「空腔」係指自第二多肽之界面凹進去且因此容納第一多肽之相鄰界面上的相應突起之至少一個胺基酸側鏈。該空腔可存在於初始界面中或可以合成方式(例如，藉由改變編碼該界面之核酸)引入。通常，編碼第二多肽之界面的核酸發生改變以編碼該空腔。為此，編碼第二多肽之界面中的至少一種「初始」胺基酸殘基之核酸由編碼至少一種具有小於該初始胺基酸殘基之側鏈體積的「輸入」胺基酸殘基之 DNA 置換。應瞭解，可存在超過一種初始及相應輸入殘基。經置換之初始殘基的數目之上限為第二多肽之界面中的殘基總數。多種胺基殘基之側鏈體積在上表 2 中示出。用

於形成空腔之較佳輸入殘基通常為天然存在之胺基酸殘基且較佳地選自丙胺酸(A)、絲胺酸(S)、酰胺酸(T)及纈胺酸(V)。最佳為絲胺酸、丙胺酸或酰胺酸。在一實施例中，用於形成空腔之初始殘基具有大的側鏈體積，諸如酪胺酸、精胺酸、苯丙胺酸或色胺酸。CH3 域中用於產生空腔之例示性胺基酸取代包括而不限於 T366S、L368A 及 Y407A 取代。

【0303】 「初始」胺基酸殘基為由可具有小於或大於該初始殘基之側鏈體積的「輸入」殘基置換者。輸入胺基酸殘基可為天然存在或非天然存在之胺基酸殘基，但較佳為前者。「天然存在之」胺基酸殘基為由遺傳密碼編碼且列於上表 2 中之彼等殘基。「非天然存在之」胺基酸殘基意謂未由遺傳密碼編碼，但能夠共價結合多肽鏈中之相鄰胺基酸殘基的殘基。非天然存在之胺基酸殘基的實例為正白胺酸、鳥胺酸、正纈胺酸、高絲胺酸及其他胺基酸殘基類似物，諸如 Ellman 等人, *Meth. Enzym.* 202:301-336 (1991) 中所述之彼等。為了產生該等非天然存在之胺基酸殘基，可使用 Noren 等人 *Science* 244: 182 (1989) 及 Ellman 等人, 上述之程序。簡言之，此涉及用非天然存在之胺基酸殘基以化學方式活化抑制因子 tRNA，隨後為該 RNA 之活體外轉錄及轉譯。本文所提供之方法涉及置換至少一種初始胺基酸殘基，但超過一種初始殘基可經置換。通常，僅在第一或第二多肽之界面中的總殘基將包含經置換之初始胺基酸殘基。典型地，用於置換之初始殘基「經掩埋」。「掩埋」意謂溶劑基本上不可及該殘基。一般而言，輸入殘基並非半胱胺酸以防止二硫鍵之可能氧化或錯誤配對。

【0304】 該突起「可定位於」空腔中，其分別意謂在第一多肽及第二多肽之界面上的突起及空腔之空間位置且該突起及空腔之尺寸使得該突起可

位於該空腔中而不會顯著地擾亂在界面處第一及第二多肽之正常締合。由於諸如 Tyr、Phe 及 Trp 之突起不會典型地自界面之軸垂直延伸且具有較佳構形，突起與相應空腔之對準依賴於基於三維結構(諸如藉由 X 射線結晶學或核磁共振(NMR)獲得者)對突起/空腔對建模。此可使用此項技術中之公認技術實現。

【0305】 「初始或模板核酸」意謂編碼所關注之多肽的核酸，其可「發生改變」(亦即，經遺傳工程改造或經突變)以編碼突起或空腔。該初始或起始核酸可為天然存在之核酸或可包含已經受先前改變之核酸(例如，人類化抗體片段)。「改變」核酸意謂初始核酸藉由插入、缺失或置換編碼所關注之胺基酸殘基的至少一種密碼子而經突變。通常，編碼初始殘基之密碼子由編碼輸入殘基之密碼子置換。用於以此方式遺傳修飾 DNA 之技術已回顧於 *Mutagenesis: a Practical Approach*, M.J. McPherson, Ed., (IRL Press, Oxford, UK. (1991)中，且包括例如定點突變誘發、卡匣突變誘發及聚合酶鏈反應(PCR)突變誘發。藉由使初始/模板核酸突變，由初始/模板核酸編碼之初始/模板多肽因此相應地改變。

【0306】 該突起或空腔可藉由合成方式，例如藉由重組技術、活體外肽合成、用於引入先前所述之非天然存在之胺基酸殘基的彼等技術、藉由肽之酶促或化學偶合或此等技術之一些組合「引入」至第一或第二多肽之界面中。相應地，「經引入」之突起或空腔為「非天然存在的」或「非原生的」，這意謂其並未存在於自然界中或初始多肽(例如，人類化單株抗體)中。

【0307】 一般而言，用於形成突起之輸入胺基酸殘基具有相對少量之「旋

轉異構體」(例如，約 3-6 個)。「旋轉異構體」為胺基酸側鏈之能量上有利之構形。多種胺基酸殘基之旋轉異構體的數目回顧於 Ponders 及 Richards, *J. Mol. Biol.* 193: 775-791 (1987)中。

【0308】 在一實施例中，第一 Fc 多肽及第二 Fc 多肽在界面處相遇/相互作用。在其中第一及第二 Fc 多肽在界面處相遇之一些實施例中，第二 Fc 多肽(序列)之界面包含可定位於在第一 Fc 多肽(序列)之界面中的空腔(亦稱為「臼」)中之突起(亦稱為「杵」)。在一實施例中，第一 Fc 多肽已自模板/初始多肽發生改變以編碼空腔或第二 Fc 多肽已自模板/初始多肽發生改變以編碼突起，或此兩種情況。在一實施例中，第一 Fc 多肽已自模板/初始多肽發生改變以編碼空腔且第二 Fc 多肽已自模板/初始多肽發生改變以編碼突起。在一實施例中，第二 Fc 多肽之界面包含可定位於在第一 Fc 多肽之界面中的空腔中之突起，其中該空腔或突起或兩者已分別引入至第一及第二 Fc 多肽之界面中。在其中第一及第二 Fc 多肽在界面處相遇之一些實施例中，第一 Fc 多肽(序列)之界面包含可定位於在第二 Fc 多肽(序列)之界面中的空腔中之突起。在一實施例中，第二 Fc 多肽已自模板/初始多肽發生改變以編碼空腔或第一 Fc 多肽已自模板/初始多肽發生改變以編碼突起，或此兩種情況。在一實施例中，第二 Fc 多肽已自模板/初始多肽發生改變以編碼空腔且第一 Fc 多肽已自模板/初始多肽發生改變以編碼突起。在一實施例中，第一 Fc 多肽之界面包含可定位於在第二 Fc 多肽之界面中的空腔中之突起，其中該突起或空腔或兩者已分別引入至第一及第二 Fc 多肽之界面中。

【0309】 在一實施例中，突起及空腔各自包含天然存在之胺基酸殘基。在一實施例中，包含突起之 Fc 多肽藉由用具有大於初始殘基之側鏈體積的

輸入殘基置換來自模板/初始多肽之界面的初始殘基而產生。在一實施例中，包含突起之 Fc 多肽藉由如下方法產生，該方法包含以下步驟，其中編碼來自該多肽之界面的初始殘基之聚核苷酸用編碼具有大於初始之側鏈體積的輸入殘基之聚核苷酸置換。在一實施例中，該初始殘基為酰胺酸。在一實施例中，該初始殘基為 T366。在一實施例中，該輸入殘基為精胺酸(R)。在一實施例中，該輸入殘基為苯丙胺酸(F)。在一實施例中，該輸入殘基為酪胺酸(Y)。在一實施例中，該輸入殘基為色胺酸(W)。在一實施例中，該輸入殘基為 R、F、Y 或 W。在一實施例中，突起藉由置換模板/初始多肽中之兩種或兩種以上殘基而產生。在一實施例中，包含突起之 Fc 多肽包含用色胺酸置換在位置 366 處之酰胺酸，胺基酸根據 Kabat 等人(第 688-696 頁 Sequences of proteins of immunological interest, 第 5 版, 第 1 卷 (1991; NIH, Bethesda, MD))之 EU 編號方案編號。

【0310】 在一些實施例中，包含空腔之 Fc 多肽藉由用具有小於初始殘基之側鏈體積的輸入殘基置換在模板/初始多肽之界面中的初始殘基而產生。例如，包含空腔之 Fc 多肽可藉由如下方法產生，該方法包含以下步驟，其中編碼來自該多肽之界面的初始殘基之聚核苷酸用編碼具有小於初始之側鏈體積的輸入殘基之聚核苷酸置換。在一實施例中，該初始殘基為酰胺酸。在一實施例中，該初始殘基為白胺酸。在一實施例中，該初始殘基為酪胺酸。在一實施例中，該輸入殘基並非半胱胺酸(C)。在一實施例中，該輸入殘基為丙胺酸(A)。在一實施例中，該輸入殘基為絲胺酸(S)。在一實施例中，該輸入殘基為酰胺酸(T)。在一實施例中，該輸入殘基為纈胺酸(V)。空腔可藉由置換模板/初始多肽之一或多種初始殘基而產生。例如，在一實施例中，

包含空腔之 Fc 多肽包含選自由酰胺酸、白胺酸及酪胺酸組成之群之兩種或兩種以上初始胺基酸的置換。在一實施例中，包含空腔之 Fc 多肽包含選自由丙胺酸、絲胺酸、酰胺酸及纈胺酸組成之群之兩種或兩種以上輸入殘基。在一些實施例中，包含空腔之 Fc 多肽包含選自由酰胺酸、白胺酸及酪胺酸組成之群之兩種或兩種以上初始胺基酸的置換，且其中該等初始胺基酸用選自由丙胺酸、絲胺酸、酰胺酸及纈胺酸組成之群之輸入殘基置換。在一些實施例中，經置換之初始胺基酸為 T366、L368 及/或 Y407。在一實施例中，包含空腔之 Fc 多肽包含用絲胺酸置換在位置 366 處之酰胺酸，胺基酸根據 Kabat 等人上述之 EU 編號方案編號。在一實施例中，包含空腔之 Fc 多肽包含用丙胺酸置換在位置 368 處之白胺酸，胺基酸根據 Kabat 等人上述之 EU 編號方案編號。在一實施例中，包含空腔之 Fc 多肽包含用纈胺酸置換在位置 407 處之酪胺酸，胺基酸根據 Kabat 等人上述之 EU 編號方案編號。在一實施例中，包含空腔之 Fc 多肽包含選自由 T366S、L368A 及 Y407V 組成之群之兩種或兩種以上胺基酸置換，胺基酸根據 Kabat 等人上述之 EU 編號方案編號。在此等抗體片段之一些實施例中，包含突起之 Fc 多肽包含用色胺酸置換在位置 366 處之酰胺酸，胺基酸根據 Kabat 等人上述之 EU 編號方案編號。

【0311】 在一實施例中，該抗體包含如 WO2005/063816 中所述構成「杵」及「臼」之 Fc 突變。例如，臼突變在 Fc 多肽中可為 T366A、L368A 及/或 Y407V 中之一或多者，且杵突變在 IgG1 或 IgG4 骨架中可為 T366W。其他免疫球蛋白同型中之相等突變可由熟習此項技術者製得。此外，熟練技術人員應容易理解，用於雙特異性之兩種半抗體較佳為相同同型。

CrossMab 技術

【0312】 Schaefer 等人(Roche Diagnostics GmbH)描述了一種將源於兩種現有抗體之兩條重鏈及兩條輕鏈表現為人類二價雙特異性 IgG 抗體而不使用人工連接子之方法(PNAS (2011) 108(27): 11187-11192 及 US 2009/0232811)。該方法涉及交換在該雙特異性抗體(CrossMab)之一半的抗原結合片段(Fab)內之一或多個重鏈及輕鏈域。該等輕鏈及其同源重鏈之正確締合藉由交換在該雙特異性抗體之一半的抗原結合片段(Fab)內之重鏈及輕鏈域而實現。此「交越(crossover)」保持抗原結合親和力，但使兩個臂極其不同，以致輕鏈錯誤配對不可再出現。參見 WO2009/080251、WO2009/080252、WO2009/080253、WO2009/080254、WO 2010/115589、WO 2010/136172、WO 2010/145792 及 WO 2010/145793，各自以引用之方式整體併入本文。儘管例如歸因於如「杵臼(KiH)或「CrossMab」技術之方法的開發出現此等最近優勢，多特異性抗體之表現仍可導致與其產生特定地相關之產物特異性雜質之不想要的形成。此等產物特異性雜質例如可包括 $\frac{1}{2}$ 抗體(包含單一重鏈/輕鏈對)、 $\frac{3}{4}$ 抗體(包含缺乏單一輕鏈之完整抗體)或 $\frac{5}{4}$ 抗體副產物(包含額外重鏈或輕鏈可變域)。

BiTE 技術

【0313】 用於雙特異性 T 細胞銜接子(BiTE)分子之另一形式(參見例如 Wolf 等人 (2005) Drug Discovery Today 10:1237-1244))係基於單鏈可變片段(scFv)分子。scFv 由經由可撓性連接子融合之抗體之輕鏈及重鏈可變區組成，該連接子一般可適當地折疊且以致該等區可結合同源抗原。BiTE 以串聯形式在單鏈上連接具有不同特異性之兩種 scFv。此組態排除了具有相同重鏈

可變區之兩種拷貝之分子的產生。另外，該連接子組態經設計以確保各別輕鏈及重鏈之正確配對。

其他雙特異性抗體形式

【0314】 Strop 等人(Rinat-Pfizer Inc.)描述了一種藉由分別地表現及純化兩種所關注之抗體及接著使其在規定之氧化還原條件下混合在一起而產生穩定雙特異性抗體之方法(J. Mol. Biol. (2012) 420:204-19)。

【0315】 相對於均二聚體對形成雜二聚體具有強烈偏好之其他雜二聚化域可併入至本發明多特異性抗原結合蛋白中。說明性實例包括但不限於例如 WO2007147901 (Kjærgaard 等人– Novo Nordisk：描述離子相互作用)；WO 2009089004 (Kannan 等人– Amgen：描述靜電轉向效應)；WO 2010/034605 (Christensen 等人- Genentech；描述纏繞線圈)。亦參見例如 Pack, P.及 Plueckthun, A., Biochemistry 31, 1579-1584 (1992) (描述白胺酸拉鍊)或 Pack等人, Bio/Technology 11, 1271-1277 (1993) (描述螺旋-轉角-螺旋基序)。措辭「雜多聚化域」及「雜二聚化域」在本文中可互換使用。在某些實施例中，該多特異性抗原結合蛋白包含一或多個雜二聚化域。

【0316】 Zhu 等人(Genentech)已工程改造了由完全缺乏恆定域之可變域抗體片段組成之雙功能抗體構築體之 VL/VH 界面中的突變，且產生了雜二聚體雙功能抗體(Protein Science (1997) 6:781-788)。同樣，Igawa 等人(Chugai)亦已工程改造了單鏈雙功能抗體之 VL/VH 界面中的突變以促進該雙功能抗體之選擇性表現且抑制構形性異構化(Protein Engineering, Design & Selection (2010) 23:667-677)。

【0317】 美國專利公開案第 2009/0182127 號(Novo Nordisk, Inc.)描述了

藉由修飾在 Fc 界面處及在輕鏈-重鏈對之 CH1:CL 界面處之胺基酸殘基而產生雙特異性抗體，該等修飾降低了一對輕鏈與另一對重鏈相互作用之能力。

【0318】 雙特異性抗體包括交聯或「雜結合物」抗體。例如，該雜結合物中之一抗體可偶合至抗生物素蛋白，另一抗體可偶合至生物素。該等抗體已例如經推薦使免疫系統細胞靶向不想要之細胞(美國專利第 4,676,980 號)，及用於治療 HIV 感染(WO 91/00360、WO 92/200373 及 EP 03089)。雜結合物抗體可使用任何便利交聯方法製得。合適之交聯劑為此項技術中熟知的，且連同多種交聯技術一起揭示於美國專利第 4,676,980 號中。

【0319】 該文獻中亦已描述用於自抗體片段產生雙特異性抗體之技術。例如，雙特異性抗體可使用化學連接製備。Brennan 等人, *Science* 229: 81 (1985)描述了一種程序，其中完整抗體經蛋白水解裂解以產生 $F(ab')_2$ 片段。此等片段在二硫醇複合劑亞砷酸鈉存在下經還原以穩定化鄰近二硫醇且防止分子間二硫化物形成。所產生之 Fab' 片段接著轉化為硫代硝基苯甲酸鹽(TNB)衍生物。該等 Fab' -TNB 衍生物之一接著藉由用巰基乙胺還原再轉化為 Fab' -硫醇且與等莫耳量之另一 Fab' -TNB 衍生物混合以形成該雙特異性抗體。所產生之雙特異性抗體可用作用於酶之選擇性固定之試劑。

【0320】 亦已描述了用於直接自重組細胞培養物製造及分離雙特異性抗體片段之多種技術。例如，雙特異性抗體已使用白胺酸拉鍊產生。Kostelny 等人, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992)。來自 Fos 及 Jun 蛋白之白胺酸拉鍊肽藉由基因融合連接至兩種不同抗體之 Fab' 部分。抗體均二聚體在鉸鏈區經還原以形成單體且接著再氧化以形成抗體雜二聚體。此方法亦可用於

產生抗體均二聚體。由 Hollinger 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) 描述之「雙功能抗體」技術已提供了一種用於製造雙特異性抗體片段之替代機制。該等片段包含藉由連接子連接至輕鏈可變域(VL)之重鏈可變域(VH), 該連接子過短而不允許同一鏈上之兩個域之間的配對。相應地, 迫使一片段之 VH 及 VL 域與另一片段之互補 VL 及 VH 域配對, 由此形成兩個抗原結合位點。亦已報告了另一藉由使用單鏈 Fv (scFv) 二聚體來製造雙特異性抗體片段之策略。參見 Gruber 等人, *J. Immunol.* 152:5368 (1994)。

【0321】 多種雙特異性及多特異性抗體形式之回顧提供於 Klein 等人, (2012) *mAbs* 4:6, 653-663 ; Spiess 等人 (2015) 「Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies.」 *Mol. Immunol.* 2015 年 1 月 27 日在線公開; doi:10.1016/j.molimm.2015.01.003 ; 及 Kontermann 等人 (2015) *Drug Discovery Today* 20, 838-847 中。

聚核苷酸、載體、宿主細胞及重組方法

【0322】 用於本文所述之純化方法的多特異性抗體可使用此項技術中熟知之方法, 包括重組方法獲得。以下章節提供關於此等方法之指導。

聚核苷酸

【0323】 如本文中可互換使用之「聚核苷酸」或「核酸」係指任何長度之核苷酸的聚合物, 且包括 DNA 及 RNA。

【0324】 編碼多肽之聚核苷酸可獲自任何來源, 包括但不限於由可信具有多肽 mRNA 且以可偵測水準表現其之組織製備的 cDNA 文庫。相應地, 編碼多肽之聚核苷酸可便利地獲自由人類組織製備之 cDNA 文庫。該多肽

編碼基因亦可獲自基因組文庫或藉由已知合成程序(例如，自動化核酸合成)獲得。

【0325】 例如，該聚核苷酸可編碼完整免疫球蛋白分子鏈，諸如輕鏈或重鏈。完整重鏈不僅包括重鏈可變區(V_H)；而且包括重鏈恆定區(C_H)，其典型地將包含三個恆定域： C_{H1} 、 C_{H2} 及 C_{H3} ；及「鉸鏈」區。在一些情況下，恆定區之存在為所需的。

【0326】 可由該聚核苷酸編碼之其他多肽包括抗原結合抗體片段，諸如單域抗體(「dAb」)、Fv、scFv、Fab'及 $F(ab')_2$ 及「微型抗體」。微型抗體(典型地)為已切除 C_{H1} 及 C_K 或 C_L 域之二價抗體片段。由於微型抗體小於習知抗體，其應在臨床/診斷用途中實現較佳組織穿透，但其為二價，其應保持高於諸如dAb之單價抗體片段的結合親和力。因此，除非本文另外指示，否則如本文所用之術語「抗體」不僅涵蓋完整抗體分子，而且涵蓋上文所論述之類型的抗原結合抗體片段。較佳地，存在於編碼多肽中之各構架區相對於相應人類受體構架將包含至少一種胺基酸取代。因此，舉例而言，該等構架區可相對於受體構架區包含總計三種、四種、五種、六種、七種、八種、九種、十種、十一種、十二種、十三種、十四種或十五種胺基酸取代。

【0327】 合適地，本文所述之聚核苷酸可經分離及/或經純化。在一些實施例中，該等聚核苷酸為經分離聚核苷酸。

【0328】 術語「經分離聚核苷酸」意欲指示該分子自其正常或天然環境移出或分離或已以使得其不存在於其正常或天然環境中之方式產生。在一些實施例中，該等聚核苷酸為經純化聚核苷酸。術語經純化意欲指示已移

除至少一些污染分子或物質。

【0329】 合適地，該等聚核苷酸實質上經純化，以致相關聚核苷酸構成存在於組合物中之主要(亦即，最豐富)聚核苷酸。

聚核苷酸之表現

【0330】 以下描述主要係關於藉由培養用含有編碼多肽之聚核苷酸的載體轉型或轉染之細胞來產生多肽。當然，預期可使用此項技術中熟知之替代方法來製備多肽。例如，適當胺基酸序列或其部分可使用固相技術(參見例如 Stewart 等人, *Solid-Phase Peptide Synthesis* W.H. Freeman Co., San Francisco, Calif. (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154 (1963)) 藉由直接肽合成製得。活體外蛋白合成可使用手動技術或藉由自動化執行。自動化合成可例如使用 Applied Biosystems 肽合成儀(Foster City, Calif.)使用製造商之說明書來實現。該多肽之多個部分可使用化學或酶學方法分別地及組合地以化學方式合成以製造所需多肽。

【0331】 如本文所述之聚核苷酸插入至表現載體中以產生該等多肽。術語「控制序列」係指在特定宿主生物體中可操作性連接之編碼序列之表現所必需的 DNA 序列。控制序列包括但不限於啟動子(例如，天然締合或異源啟動子)、信號序列、增強子元件及轉錄終止序列。

【0332】 當聚核苷酸置於與另一聚核苷酸序列之功能性關係中時，其「經可操作性連接」。例如，若用於前序列或分泌前導序列之核酸表現為參與多肽之分泌的前蛋白，則其可操作性連接至用於多肽之核酸；若啟動子或增強子影響編碼序列之轉錄，則其可操作性連接至該序列；或若核糖體結合位點經定位以便促進轉譯，則其可操作性連接至編碼序列。一般而言，

「可操作性連接」意謂所連接之核酸序列為鄰近的，且在分泌前導序列之情況下為鄰近的且在閱讀相中。然而，增強子不必為鄰近的。連接藉由在便利限制位點處之接合實現。若該等位點不存在，則根據習知規範使用合成寡核苷酸接頭或連接子。

【0333】 關於抗體，輕鏈及重鏈可選殖於相同或不同表現載體中。編碼免疫球蛋白鏈之核酸區段可操作性連接至表現載體中之控制序列，該等控制序列確保免疫球蛋白多肽之表現。

【0334】 關於包含四條不同多肽鏈之 CrossMab，使用四種表現卡匣。此等卡匣可選殖於兩種至四種不同表現載體中。編碼免疫球蛋白鏈之各核酸區段可操作性連接至表現載體中之控制序列，該等控制序列確保免疫球蛋白多肽之表現。若兩種或兩種以上表現卡匣包含於相同表現載體上，則此等表現卡匣可單向或雙向組織。

【0335】 含有該等聚核苷酸序列(例如，可變重鏈及/或可變輕鏈編碼序列及視情況選用之表現控制序列)之載體可藉由熟知方法轉移至宿主細胞中，該等方法視細胞宿主之類型而變化。例如，氯化鈣轉染通常用於原核細胞，而磷酸鈣處理、電穿孔、脂質轉染、基因槍或基於病毒之轉染可用於其他細胞宿主。(一般參見 Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, 第 2 版, 1989)。用於轉型哺乳動物細胞之其他方法包括使用聚凝胺、原生質體融合物、脂質體、電穿孔及微注射。關於轉殖基因動物之產生，轉殖基因可微注射至受精卵母細胞中，或可併入至胚胎幹細胞之基因組中，且該等細胞之細胞核經轉移至去核卵母細胞中。

載體

【0336】 術語「載體」包括表現載體及轉型載體及穿梭載體。

【0337】 術語「表現載體」意謂能夠活體內或活體外表現之構築體。

【0338】 術語「轉型載體」意謂能夠自一實體轉移至另一實體之構築體，該另一適體可為該物種或可為不同物種。若該構築體能夠自一物種轉移至另一物種(諸如自大腸桿菌質體至細菌，諸如桿菌屬細菌)，則該轉型載體有時稱作「穿梭載體」。其甚至可為能夠自大腸桿菌質體轉移至土壤桿菌屬直至植物之構築體。

【0339】 載體可經轉型至如下文所述之合適宿主細胞中以提供多肽之表現。多種載體為公開可得的。該載體可例如呈質體、黏接質體、病毒粒子或噬菌體之形式。適當核酸序列可藉由多種程序插入至載體中。一般而言，DNA 使用此項技術中已知之技術插入至適當限制核酸內切酶位點中。含有此等組分中之一或多者之合適載體的構建使用熟練技術人員已知之標準接合技術。

【0340】 該等載體可例如為具有複製起點之質體、病毒或噬菌體載體，視情況選用於該聚核苷酸之表現的啟動子及視情況選用之該啟動子之調節因子。載體可含有此項技術中熟知之一或多種可選擇標記基因。

【0341】 此等表現載體典型地在宿主生物體中可複製，呈游離體形式或作為宿主染色體 DNA 之主要部分。

【0342】 關於多特異性抗體產生，編碼該多特異性抗體(或該多特異性抗體之臂，亦即重鏈/輕鏈對)之核酸典型地經分離且插入至可複製載體中用於進一步選殖、擴增及/或用於表現。編碼該抗體之 DNA 容易地使用習知程

序分離且測序(例如，藉由使用能夠特異性結合於編碼抗體重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)。多種載體為可得的。載體之選擇部分地取決於欲使用之宿主細胞。應瞭解，任何同型之恆定區均可用於此目的，包括 IgG、IgM、IgA、IgD 及 IgE 恆定區，且該等恆定區可獲自任何人類或動物物種。

宿主細胞

【0343】 該宿主細胞可例如為細菌、酵母或其他真菌細胞、昆蟲細胞、植物細胞或哺乳動物細胞。

【0344】 已經遺傳操縱之轉殖基因多細胞宿主生物體可用於產生多肽。該生物體可為例如轉殖基因哺乳動物生物體(例如，轉殖基因山羊或小鼠株)。

【0345】 合適原核生物包括但不限於真細菌，諸如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物體，例如腸桿菌科，諸如大腸桿菌。多種大腸桿菌菌株為公開可得的，諸如大腸桿菌 K12 菌株 MM294 (ATCC 31,446)；大腸桿菌 X1776 (ATCC 31,537)；大腸桿菌菌株 W3110 (ATCC 27,325)及 K5 772 (ATCC 53,635)。其他合適原核宿主細胞包括腸桿菌科，諸如艾氏菌屬(例如大腸桿菌)、腸細菌、伊文氏桿菌屬、克萊桿菌屬、變形桿菌屬、沙門氏桿菌屬(例如沙門氏鼠傷寒桿菌)、鋸桿菌屬(例如黏質沙雷氏菌)及志賀桿菌屬，以及桿菌(諸如枯草桿菌及地衣桿菌(例如地衣桿菌 41P))、假單胞菌(諸如綠膿桿菌)及鏈黴菌。此等實例為說明性的而非限制性的。菌株 W3110 為一種尤其較佳之宿主或親本宿主，因為其為用於重組聚核苷酸產物發酵之常見宿主菌株。較佳地，該宿主細胞分泌最少量之蛋白水解酶。例如，菌株 W3110 可經修飾以在編碼宿主之內源多肽的基因中實現基因突變，其中該等宿主

之實例包括大腸桿菌 W3110 菌株 1A2，其具有完全基因型 *tonA*；大腸桿菌 W3110 菌株 9E4，其具有完全基因型 *tonA ptr3*；大腸桿菌 W3110 菌株 27C7 (ATCC 55,244)，其具有完全基因型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan'*；大腸桿菌 W3110 菌株 37D6，其具有完全基因型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan'*；大腸桿菌 W3110 菌株 40B4，其為具有非卡那黴素抗性 *degP* 缺失突變之菌株 37D6；及具有突變型周質蛋白酶之大腸桿菌菌株。或者，活體外選殖方法(例如 PCR 或其他核酸聚合酶反應)為合適的。在一些實施例中，原核宿主細胞(例如大腸桿菌宿主細胞)表現一或多種伴侶蛋白以促進抗體之折疊及組裝。在一些實施例中，伴侶蛋白為 FkpA、DsbA 或 DsbC 中之一或多者。在一些實施例中，伴侶蛋白自內源伴侶蛋白基因表現。在一些實施例中，伴侶蛋白自外源伴侶蛋白基因表現。在一些實施例中，伴侶蛋白基因為大腸桿菌伴侶蛋白基因(例如大腸桿菌 FkpA 基因、大腸桿菌 DsbA 基因及/或大腸桿菌 DsbC 基因)。

【0346】 在此等原核宿主中，吾人可製得表現載體，該等載體將典型地含有可與宿主細胞(例如複製起點)相容之表現控制序列。另外，將存在任何數目之多種熟知啟動子，諸如乳糖啟動子系統、色胺酸(trp)啟動子系統、 β -內醯胺酶啟動子系統或來自噬菌體 λ 之啟動子系統。該等啟動子將典型地控制表現，視情況使用操縱子序列，且具有用於起始及完成轉錄及轉譯之核糖體結合位點序列及其類似物。

【0347】 真核微生物可用於表現。諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物為用於多肽編碼載體之合適選殖或表現宿主。釀酒酵母為通常使用之低等真核宿主微生物。其他包括粟酒裂殖酵母；克魯維酵母宿主，諸如乳酸克魯

維酵母(MW98-8C、CBS683、CBS4574)、脆壁克魯維酵母(ATCC 12,424)、保加利亞克魯維酵母(ATCC 16,045)、威客克魯維酵母(ATCC 24,178)、瓦爾替克魯維酵母(ATCC 56,500)、果蠅克魯維酵母(ATCC 36,906)、耐熱克魯維酵母及馬克思克魯維酵母；耶氏酵母(EP 402,226)；巴斯德畢赤酵母；念珠菌屬；裡氏木黴；粗糙脈孢菌；許旺酵母，諸如西方許旺酵母；及絲狀真菌，諸如脈孢菌、青黴菌屬、彎頸黴屬，及麴菌屬宿主，諸如小巢狀麴菌及黑麴菌。甲基營養型酵母在本文中為合適的且包括但不限於能夠在甲醇上生長之酵母，其選自由漢遜氏菌屬、念珠菌屬、克勒克酵母屬、畢赤酵母菌屬、酵母菌屬、球擬酵母屬及紅酵母屬組成之屬。酵母菌屬為較佳酵母宿主，其中必要時合適載體具有表現控制序列(例如啟動子)、複製起點、終止序列及其類似物。典型啟動子包括 3-磷酸甘油酸激酶及其他醣解酶。誘導性酵母啟動子尤其包括來自醇去氫酶、異細胞色素 C、及負責麥芽糖及半乳糖利用之酶的啟動子。

【0348】 除了微生物之外，哺乳動物組織細胞培養物亦可用於表現且產生如本文所述之多肽且在一些情況下為較佳的(參見 Winnacker, *From Genes to Clones* VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987)。關於一些實施例，真核細胞可為較佳的，因為此項技術中已開發多種能夠分泌異源多肽(例如完整免疫球蛋白)之合適宿主細胞株，且包括 CHO 細胞株、多種 Cos 細胞株、海拉細胞，較佳地骨髓瘤細胞株或經轉型 B 細胞或融合瘤。在一些實施例中，哺乳動物細胞株為 CHO 細胞。

【0349】 在一些實施例中，宿主細胞為脊椎動物宿主細胞。適用之哺乳動物宿主細胞株之實例為藉由 SV40 轉型之猴腎 CV1 株(COS-7, ATCC CRL

1651);人類胚胎腎株(293或經次選殖用於懸浮培養物中之生長的293細胞);幼倉鼠腎細胞(BHK, ATCC CCL 10);中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR(CHO或CHO-DP-12株);小鼠足細胞;猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲綠猴腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);人類子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2);犬腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34);布法羅大鼠肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);人類肺細胞(W138, ATCC CCL 75);人類肝細胞(Hep G2, HB 8065);小鼠乳房腫瘤(MMT 060562, ATCC CCL51);TRI細胞;MRC 5細胞;FS4細胞;及人類肝細胞瘤株(Hep G2)。

使用原核宿主細胞產生多特異性抗體

載體構建

【0350】 編碼欲根據本文所提供之方法純化的該多特異性抗體之多肽組分的聚核苷酸序列可使用標準重組技術獲得。所需聚核苷酸序列可自抗體產生細胞(諸如融合瘤細胞)分離及測序。或者,聚核苷酸可使用核苷酸合成儀或PCR技術合成。一旦獲得,編碼該等多肽(諸如兩條或兩條以上重鏈及/或兩條或兩條以上輕鏈)之序列即插入至能夠在宿主細胞(諸如大腸桿菌細胞)中複製且表現異源聚核苷酸之重組載體中。此項技術中可得且已知之多種載體可用於本文所提供之方法及組合物。適當載體之選擇將主要取決於欲插入至該載體中之核酸及欲用該載體轉型之特定宿主細胞的尺寸。各載體含有多種組分,視其功能(異源聚核苷酸之擴增或表現,或兩者)及其與其停留之特定宿主細胞的相容性而定。該等載體組分一般包括但不限於:複製起點、選擇標記基因、啟動子、核糖體結合位點(RBS)、信號序列、異源核酸插入物及轉錄終止序列。

【0351】 一般而言，源於可與宿主細胞相容之物種的含有複製子及控制序列之質體載體與此等宿主聯合使用。該載體通常攜帶複製位點，以及能夠在經轉型細胞中提供表型選擇之標記序列。例如，大腸桿菌典型地使用源於大腸桿菌物種之質體 pBR322 轉型。pBR322 含有編碼安比西林(Amp)及四環素(Tet)抗性之基因且因此提供用於鑒別經轉型細胞之簡易方式。pBR322、其衍生物或其他微生物質體或噬菌體亦可含有或經修飾含有用於表現內源蛋白之可由微生物使用的啟動子。用於表現特定抗體之 pBR322 衍生物之實例詳細描述於 Carter 等人, 美國專利第 5,648,237 號中。

【0352】 另外，可與宿主微生物相容之含有複製子及控制序列的噬菌體載體可聯合此等宿主用作轉型載體。例如，諸如 GEM™-11 之噬菌體可用於製造可用於轉型諸如大腸桿菌 LE392 之敏感宿主細胞的重組載體。

【0353】 表現載體可包含兩個或兩個以上啟動子-順反子對，編碼該等多肽組分中之每一者。啟動子為位於順反子上游(5')之未轉譯調節序列，該順反子調節其表現。原核啟動子典型地屬另個類別，即誘導性及組成性的。誘導性啟動子為在其控制下回應於培養條件之改變(例如，營養物的存在或不存在或溫度改變)起始順反子之增加水準的轉錄之啟動子。

【0354】 熟知大量由多種潛在宿主細胞識別之啟動子。所選擇之啟動子可藉由經由限制酶消化自來源 DNA 移出啟動子且將經分離之啟動子序列插入至載體中而可操作性連接至編碼輕鏈或重鏈之順反子 DNA。原生啟動子序列及多種異源啟動子均可用於指導靶標基因之擴增及/或表現。在一些實施例中，利用異源啟動子，因為其一般允許如與原生靶標多肽啟動子相比更大之轉錄及所表現之靶標基因的更高產率。

【0355】 適合用於原核宿主之啟動子包括 PhoA 啟動子、-內鹼胺酶及乳糖啟動子系統、色胺酸(trp)啟動子系統及雜合啟動子(諸如 tac 或 trc 啟動子)。然而，在細菌中起作用之其他啟動子(諸如其他已知細菌或噬菌體啟動子)亦合適。其核苷酸序列已經公開，由此使得熟練工人能夠使用連接子或接頭使其可操作性接合至編碼靶標輕鏈及重鏈之順反子(Siebenlist 等人, (1980) *Cell* 20: 269)以供應任何所需限制位點。

【0356】 轉譯起始區(TIR)為蛋白之總體轉譯水準的主要決定因素。TIR 包括編碼信號序列之聚核苷酸，且自 Shine-Dalgarno 序列上游直接地延伸至在起始密碼子下游之大約二十個核苷酸處。一般而言，載體將包含 TIR，TIR 及變異體 TIR 為此項技術中已知的且用於產生 TIR 之方法為此項技術中已知的。一系列核酸序列變異體可以一定範圍之轉譯強度產生，由此提供用於針對多種不同多肽之最佳分泌調節此因素之便利方式。融合至此等變異體之報告基因(諸如 PhoA)之使用提供了一種定量不同轉譯起始區之相對轉譯強度的方法。變異體或突變型 TIR 可在質體載體之背景中提供，由此提供質體之集合，所關注之基因可插入其中且量測其表現，以便針對成熟多肽之最大表現確立轉譯強度之最佳範圍。變異體 TIR 揭示於 USP 8,241,901 中。

【0357】 在一態樣中，在重組載體內之各順反子包含指導所表現之多肽在膜上易位之分泌信號序列組分。一般而言，該信號序列可為載體之組分，或其可為插入至載體中之靶標多肽 DNA 的一部分。所選擇之信號序列應為由宿主細胞識別及加工(亦即，藉由信號肽酶裂解)者。關於不識別及加工異源多肽之原生信號序列之原核宿主細胞，該信號序列由原核信號序列取代。

該等序列為此項技術中熟知的。另外，載體可包含選自由鹼性磷酸酯酶、青黴素酶、Lpp 或熱穩定性腸毒素 II (STII)前導序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA 及 MBP 組成之群之信號序列。

【0358】 在一態樣中，一或多種聚核苷酸(例如，表現載體)共同地編碼抗體。在一實施例中，單一聚核苷酸編碼抗體之輕鏈且不同的聚核苷酸編碼抗體之重鏈。在一實施例中，單一聚核苷酸編碼抗體之輕鏈及重鏈。在一些實施例中，一或多種聚核苷酸(例如，表現載體)共同地編碼一臂抗體。在一實施例中，單一聚核苷酸編碼(a)一臂抗體之輕鏈及重鏈，及(b) Fc 多肽。在一實施例中，單一聚核苷酸編碼一臂抗體之輕鏈及重鏈，且不同的聚核苷酸編碼 Fc 多肽。在一實施例中，不同的聚核苷酸分別地編碼一臂抗體之輕鏈組分、一臂抗體之重鏈組分及 Fc 多肽。一臂抗體之產生描述於例如 WO2005063816 中。

【0359】 適用於表現抗體之原核宿主細胞包括古細菌及真細菌，諸如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物體。適用細菌之實例包括艾氏菌屬(例如大腸桿菌)、桿菌(例如枯草桿菌)、腸細菌、假單胞菌屬(例如綠膿桿菌)、沙門氏鼠傷寒桿菌、黏質沙雷氏菌、克萊桿菌屬、變形桿菌屬、志賀桿菌屬、根瘤菌、透明顫菌或副球菌屬。在一實施例中，使用革蘭氏陰性細胞。在一實施例中，大腸桿菌細胞用作宿主細胞。大腸桿菌菌株之實例包括菌株 W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, 第 2 卷 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 第 1190-1219 頁; ATCC 寄存號 27,325)及其衍生物，包括具有基因型 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR 之菌株 33D3 (美國專利第 5,639,635 號)

及菌株 63C1 及 64B4。在一些實施例中，大腸桿菌菌株為命名為 62A7 (Δ fhuA (Δ tonA) ptr3, lacIq, lacL8, ompT Δ (nmpc-fepE) Δ degP ilvG 修復)之 W3110 衍生物。其他菌株及其衍生物亦合適，諸如大腸桿菌 294 (ATCC 31,446)、大腸桿菌 B、大腸桿菌 λ 1776 (ATCC 31,537) 及大腸桿菌 RV308 (ATCC 31,608)。此等實例為說明性的而非限制性的。用於構建具有規定基因型之上文所提及細菌中任一者之衍生物之方法為此項技術中已知的且描述於例如 Bass 等人, *Proteins*, 8:309-314 (1990) 中。一般有必要考慮複製子在細菌之細胞中之可複製性來選擇適當細菌。例如，當使用諸如 pBR322、pBR325、pACYC177 或 pKN410 之熟知質體來供應複製子時，大腸桿菌、鋸桿菌屬或沙門氏桿菌屬可合適地用作宿主。典型地，宿主細胞應分泌微量的蛋白水解酶，且額外蛋白酶抑制劑可合乎需要地併入細胞培養物中。

【0360】 為了改良細菌培養物中該等多肽之產生率及品質，細菌細胞可經修飾。例如，為了改良所分泌之抗體多肽的適當組裝及折疊，細菌宿主細胞可包含表現伴侶蛋白(諸如 FkpA 及 Dsb 蛋白(DsbB、DsbC、DsbD 及/或 DsbG))之額外載體，其可用於共轉型宿主原核細胞。該等伴侶蛋白已證明促進在細菌宿主細胞中產生之異源蛋白的適當折疊及溶解性。

多特異性抗體產生

【0361】 宿主細胞經上述表現載體轉型且在習知營養培養基中培養，該等營養培養基適當時經改良用於誘導啟動子、選擇轉型體、或擴增編碼所需序列之基因。

【0362】 轉型意謂將 DNA 引入至原核宿主中使得該 DNA 為可複製的，作為染色體外元件或藉由染色體整合體。視所用之宿主細胞而定，轉型使

用適用於該等細胞之標準技術來進行。使用氯化鈣之鈣處理一般用於含有實質性細胞壁障壁之細菌細胞。用於轉型之另一方法使用聚乙二醇/DMSO。所用之另一技術為電穿孔。

【0363】 用於產生根據本文所提供之方法純化之多肽的原核細胞在此項技術中已知且適用於培養所選擇之宿主細胞的培養基中生長。合適培養基之實例包括 Luria 肉湯(LB)加上必需營養補充物。在一些實施例中，該等培養基亦含有基於表現載體之構建選擇的選擇劑，以選擇性地允許含有該表現載體之原核細胞的生長。例如，安比西林添加至培養基中用於表現安比西林抗性基因之細胞的生長。

【0364】 除碳、氮及無機磷酸鹽來源外之任何必需補充物亦可以適當濃度包括在內，單獨或作為與另一補充物或培養基之混合物(諸如複合氮源)引入。視情況，培養基可含有一或多種選自由麩胱甘肽、半胱胺酸、胱胺、硫乙醇酸鹽、二硫赤藻糖醇及二硫蘇糖醇組成之群之還原劑。

【0365】 原核宿主細胞在合適溫度下培養。關於大腸桿菌生長，舉例而言，較佳溫度介於約 20°C 至約 39°C、更佳地約 25°C 至約 37°C 範圍內，甚至更佳地在約 30°C 下。培養基之 pH 可為介於約 5 至約 9 範圍內之任何 pH，主要視宿主生物體而定。關於大腸桿菌，pH 較佳為約 6.8 至約 7.4，且更佳為約 7.0。

【0366】 若誘導性啟動子用於表現載體中，則蛋白表現在適用於活化該啟動子之條件下經誘導。在一態樣中，PhoA 啟動子用於控制該等多肽之轉錄。相應地，經轉型宿主細胞在用於誘導之磷酸鹽限制培養基中培養。較佳地，該磷酸鹽限制培養基為 C.R.A.P 培養基(參見例如 Simmons 等人, *J.*

Immunol. Methods (2002), 263:133-147)或WO2002/061090中所述之培養基。

如此項技術中已知，根據所用之載體構築體，可使用多種其他誘導劑。

【0367】 在一實施例中，欲使用本文所提供之方法純化的所表現多肽經分泌至宿主細胞之周質中且自其回收。蛋白回收典型地涉及破壞生物體，一般藉由諸如滲透衝擊、音波處理或溶解之方式。一旦細胞經破壞，可藉由離心或過濾移除細胞碎片或全細胞。該等蛋白可進一步例如藉由親和力樹脂層析來純化。或者，蛋白可轉運至培養基中且在其中經分離。細胞可自培養物移出且培養物上清液經過濾及濃縮用於所產生之蛋白的進一步純化。所表現之多肽可使用通常已知之方法進一步分離及鑒別，諸如聚丙烯醯胺凝膠電泳(PAGE)及免疫印跡分析(Western blot assay)。

【0368】 在一態樣中，藉由發酵過程大量進行抗體產生。多種大規模分批饋料發酵程序可用於產生重組多肽。大規模發酵具有至少 1000 公升之容量，較佳地約 1,000 至 100,000 公升之容量。此等發酵器使用攪拌器葉輪來分佈氧氣及營養物，尤其葡萄糖(較佳碳/能源)。小規模發酵一般係指在不超過大約 100 公升體積容量之發酵器中發酵，且可介於約 1 公升至約 100 公升範圍內。

【0369】 在發酵過程中，蛋白表現之誘導典型地在細胞已在合適條件下生長至所需密度(例如約 180-220 之 OD550)之後起始，在此階段該等細胞處於早期靜止期。如此項技術中已知及上文所述，根據所用之載體構築體，可使用多種誘導劑。細胞可在誘導之前生長持續較短時期。細胞通常經誘導持續約 12-50 小時，不過可使用更長或更短誘導時間。

【0370】 為了改良該等多肽之產生率及品質，可修改多種發酵條件。

例如，為了改良所分泌之抗體多肽的適當組裝及折疊，表現伴侶蛋白(諸如 FkpA、DsbA 及/或 DsbC)之額外載體可用於共轉型宿主原核細胞。該等伴侶蛋白已證明促進在細菌宿主細胞中產生之異源蛋白的適當折疊及溶解性。在一些實施例中，FkpA、DsbA 及/或 DsbC 在細菌宿主細胞中表現。

【0371】 為了使所表現之異源蛋白(尤其對蛋白水解敏感之彼等)的蛋白水解減至最少，可使用某些缺乏蛋白水解酶之宿主菌株。例如，宿主細胞菌株可經修飾以在編碼已知細菌蛋白酶之基因中實現基因突變，該等蛋白酶諸如蛋白酶 III、OmpT、DegP、Tsp、蛋白酶 I、蛋白酶 Mi、蛋白酶 V、蛋白酶 VI 及其組合。一些大腸桿菌蛋白酶缺乏菌株可獲得且描述於例如 Joly 等人, (1998), 上述；Georgiou 等人, 美國專利第 5,264,365 號；Georgiou 等人, 美國專利第 5,508,192 號；Hara 等人, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996)中。

【0372】 在一實施例中，缺乏蛋白水解酶且經表現一或多種伴侶蛋白之質體轉型的大腸桿菌菌株在表現系統中用作宿主細胞

使用真核宿主細胞產生多特異性抗體

信號序列組分

【0373】 用於真核宿主細胞之載體可視情況含有信號序列或在所關注之成熟蛋白或多肽之 N 端處具有特異性裂解位點之其他多肽。較佳地選擇之異源信號序列為由宿主細胞識別及加工(亦即，藉由信號肽酶裂解)者。在哺乳動物細胞表現中，可獲得哺乳動物信號序列以及病毒性分泌前導序列，例如單純疱疹 gD 信號。用於該前驅體區之 DNA 在閱讀框中接合至編碼所需雜多聚體蛋白(例如抗體)之 DNA。

複製起點

【0374】 一般而言，複製起點組分並非哺乳動物表現載體所需。例如，可典型地使用 SV40 起點，但僅因為其含有早期啟動子。

選擇基因組分

【0375】 表現及選殖載體可含有選擇基因，該選擇基因亦稱作可選擇標記物。典型選擇基因編碼(a)賦予對抗生素或其他毒素(例如安比西林、新黴素、胺甲喋呤或四環素)之抗性，(b)補充相關的營養缺陷型缺乏，或(c)供應無法自複合培養基獲得之關鍵營養物的蛋白。

【0376】 選擇機制之一實例利用藥物來阻止宿主細胞之生長。用異源基因成功地轉型之彼等細胞產生賦予抗藥性之蛋白且因此經受得住該選擇方案。該顯性選擇之實例使用藥物新黴素、黴酚酸及潮黴素。

【0377】 用於哺乳動物細胞之合適可選擇標記物之另一實例為使得能夠鑒別有能力吸收抗體核酸之細胞的彼等標記物，諸如 DHFR、胸苷激酶、金屬硫蛋白-I 及-II (較佳地靈長類動物金屬硫蛋白基因)、腺苷去胺酶、鳥胺酸去羧酶等。

【0378】 例如，用 DHFR 選擇基因轉型之細胞首先藉由在含有 DHFR 之競爭性拮抗劑胺甲喋呤(Mtx)之培養基中培養所有轉型體來鑒別。當使用野生型 DHFR 時，適當宿主細胞為缺乏 DHFR 活性之中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株(例如 ATCC CRL-9096)。

【0379】 或者，用編碼抗體之 DNA 序列、野生型 DHFR 蛋白及諸如胺基糖苷 3'-磷酸轉移酶(APH)之另一可選擇標記物轉型或共轉型之宿主細胞(尤其含有內源 DHFR 之野生型宿主)可藉由在含有用於可選擇標記物之選擇劑

的培養基中進行細胞生長來選擇，該選擇劑諸如胺基糖苷抗生素，例如卡那黴素、新黴素或 G418。參見例如美國專利第 4,965,199 號。

啟動子組分

【0380】 表現及選殖載體通常含有由宿主生物體識別且可操作性連接至所需含鉸鏈多肽(例如抗體)核酸之啟動子。已知用於真核細胞之啟動子序列。實際上所有真核基因均具有位於起始轉錄之位點上游大約 25 至 30 個鹼基處的富 AT 區。在多種基因之轉錄開始上游 70 至 80 個鹼基處發現的另一序列為 CNCAAT 區，其中 N 可為任何核苷酸。在大多數真核基因之 3'末端處為 AATAAA 序列，其可為用於添加聚腺苷酸尾至編碼序列之 3'末端中的信號。所有此等序列均合適地插入至真核表現載體中。

【0381】 哺乳動物宿主細胞中載體之所需重鏈及/或輕鏈轉錄例如藉由獲自病毒(諸如多瘤病毒、鳥痘病毒、腺病毒(諸如腺病毒 2)、牛乳頭狀瘤病毒、禽肉瘤病毒、細胞巨化病毒、逆轉錄病毒、B 型肝炎病毒及猿病毒 40 (SV40))之基因組、獲自異源哺乳動物啟動子(例如肌動蛋啟動子或免疫球蛋白啟動子)、或獲自熱休克啟動子之啟動子控制，限制條件在於該等啟動子可與宿主細胞系統相容。

【0382】 SV40 病毒之早期及晚期啟動子便利地以亦含有 SV40 病毒複製起點之 SV40 限制片段形式獲得。人類細胞巨化病毒之即刻早期啟動子便利地以 Hind III E 限制片段形式獲得。使用牛乳頭狀瘤病毒作為載體在哺乳動物宿主中表現 DNA 之系統揭示於美國專利第 4,419,446 號中。此系統之修改描述於美國專利第 4,601,978 號中。關於在來自單純疱疹病毒之胸苷激酶啟動子控制下人類 b-干擾素 eDNA 在小鼠細胞中之表現，亦參見 Reyes 等

人, *Nature* 297:598-601 (1982)。或者，勞斯肉瘤病毒長末端重複序列可用作啟動子。

增強子元件組分

【0383】 由高等真核細胞轉錄編碼所需含鉸鏈多肽(例如抗體)之 DNA 可藉由將增強子序列插入至載體中來增加。現已知多種增強子序列來自哺乳動物基因(例如，球蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、 α -胎蛋白及胰島素基因)。又，吾人可使用來自真核細胞病毒之增強子。實例包括在複製起點(bp 100-270)之後側上的 SV40 增強子、細胞巨化病毒早期啟動子增強子、在複製起點之後側上的多瘤病毒增強子及腺病毒增強子。關於用於增強真核啟動子之活化之元件的描述，亦參見 Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982)。該增強子可剪接至載體中在抗體多肽編碼序列之位置 5'或 3'處，限制條件在於實現增強，但一般地位於啟動子之位點 5'處。

轉錄終止組分

【0384】 用於真核宿主細胞中之表現載體典型地亦將含有轉錄終止及穩定化 mRNA 所必需之序列。該等序列通常可自真核或病毒 DNA 或 cDNA 之 5'及偶爾 3'末轉譯區獲得。此等區含有轉錄為編碼抗體之 mRNA 之未轉譯部分中之聚腺苷酸化片段的核苷酸區段。一種適用之轉錄終止組分為牛生長激素聚腺苷酸化區。參見 WO 94/11026 及其中所揭示之表現載體。

宿主細胞之選擇及轉型

【0385】 用於在本文中之載體中選殖或表現 DNA 之合適宿主細胞包括本文所述之高等真核細胞，包括脊椎動物宿主細胞。培養物(組織培養物)中脊椎動物細胞之增殖已成為常規程序。適用之哺乳動物宿主細胞株之實

例為藉由 SV40 轉型之猴腎 CV1 株(COS-7, ATCC CRL 1651); 人類胚胎腎株(293 或經次選殖用於懸浮培養物中之生長的 293 細胞, Graham 等人, *J. GenViral.* 36:59 (1977)); 幼倉鼠腎細胞(BHK, ATCC CCL 10); 中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR(CHO, Urlaub 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); 小鼠足細胞(TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); 猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70); 非洲綠猴腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); 人類子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2); 犬腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34); 布法羅大鼠肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人類肺細胞(W138, ATCC CCL 75); 人類肝細胞(Hep G2, HB 8065); 小鼠乳房腫瘤(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 細胞(Mather 等人, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); MRC 5 細胞; FS4 細胞; 及人類肝細胞瘤株(Hep G2)。

【0386】 宿主細胞經上文關於所需含鉸鏈多肽(例如抗體)產生所述之表現或選殖載體轉型且在習知營養培養基中培養, 該等營養培養基適當時經改良用於誘導啟動子、選擇轉型體、或擴增編碼所需序列之基因。

培養宿主細胞

【0387】 用於產生多特異性抗體(例如雙特異性抗體)之宿主細胞可在多種培養基中培養。諸如 Ham 氏 F10 (Sigma)、最低必需培養基((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma)及杜氏改良伊格爾氏培養基((DMEM), Sigma)之市售培養基適用於培養宿主細胞。另外, Ham 等人, *Meth. Enz.* 58:44 (1979); Barnes 等人, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980); 美國專利第 4,767,704 號; 第 4,657,866 號; 第 4,927,762 號; 第 4,560,655 號; 或第 5,122,469 號; WO 90/03430; WO 87/00195; 或美國專利再審 30,985 中所述之任何培養基均可用作該等

宿主細胞之培養基。任何此等培養基均可在必要時補充激素及/或其他生長因子(諸如胰島素、轉鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽(諸如氯化鈉、鈣、鎂及磷酸鹽)、緩衝液(諸如 HEPES)、核苷酸(諸如腺苷及胸苷)、抗生素(諸如 GENTAMYCIN™藥物)、痕量元素(定義為通常以微莫耳濃度範圍內之最終濃度存在的無機化合物)及葡萄糖或相等能源。亦可包括在熟習此項技術者將已知之適當濃度下之任何其他必要補充物。諸如溫度、pH 及其類似因素之培養條件為先前用於針對表現所選擇之宿主細胞的彼等條件，且將為一般技術者顯而易知的。

多特異性抗體形成/組裝

【0388】 在某些實施例中，本文提供用於產生多特異性抗體之方法。在某些實施例中，多特異性抗體藉由獨立地產生半抗體而產生，各半抗體包含結合特異性抗原決定基(例如，在單一靶標上之不同抗原決定基，或在兩種或兩種以上靶標上之不同抗原決定基)之 VH/VL 單元。在一些實施例中，各半抗體在宿主細胞中獨立地產生。在一些實施例中，各半抗體在相同宿主細胞中產生。該等半抗體混合且使其組裝成多特異性抗體。在一些實施例中，各半抗體在相同宿主細胞中一起產生。在一些實施例中，宿主細胞(諸如原核宿主細胞，例如大腸桿菌細胞)表現伴侶蛋白，諸如 FkpA、DsbA 及/或 DsbC，以促進半抗體之折疊。

【0389】 在一些實施例中，含有杵或臼突變之半抗體在獨立培養物中藉由在例如大腸桿菌之細菌宿主細胞中表現重鏈及輕鏈構築體而產生。各半抗體可獨立地藉由蛋白 A 親和力層析來純化。來自杵及臼半抗體之澄清細胞萃取物可藉由蛋白 A 管柱純化。蛋白 A 純化之具有不同特異性之半抗體

可經組裝以在還原劑存在下在活體外氧化還原反應中形成雙特異性抗體。

【0390】 在一些實施例中，含有杵或臼突變之半抗體在相同培養物中藉由在例如大腸桿菌宿主細胞或 CHO 宿主細胞之細菌宿主細胞中表現重鏈及輕鏈構築體而產生。該等半抗體可藉由蛋白 A 親和力層析純化。來自杵及臼半抗體之澄清細胞萃取物可藉由蛋白 A 管柱純化。蛋白 A 純化之具有不同特異性之半抗體可經組裝以在還原劑存在下在活體外氧化還原反應中形成雙特異性抗體。

【0391】 任何合適方法均可用於製備所需還原條件。例如，所需還原條件可藉由向反應(諸如本文所述之組裝混合物)中添加還原劑來製備。合適還原劑包括而不限於二硫蘇糖醇(DTT)、三(2-羧基乙基)膦(TCEP)、硫乙醇酸、抗壞血酸、硫醇乙酸、麩胱甘肽(GSH)、 β -巯基乙胺、半胱胺酸/胱胺酸、GSH/二硫化麩胱甘肽(GSSG)、半胱胺/胱胺、甘胺醯基半胱胺酸及 β -巯基乙醇，較佳地 GSH。在某些特定實施例中，還原劑為弱還原劑，包括而不限於 GSH、 β -巯基乙胺、半胱胺酸/胱胺酸、GSH/GSSG、半胱胺/胱胺、甘胺醯基半胱胺酸及 β -巯基乙醇，較佳地 GSH。在某些較佳實施例中，還原劑為 GSH。在某些實施例中，還原劑並非 DTT。在一般技術者之能力內選擇在合適濃度下且在合適實驗條件下之合適還原劑以在反應中實現所需還原條件。例如，在 20°C 下在具有 10 g/L 之雙特異性抗體蛋白濃度之溶液中的 10 mM L-還原麩胱甘肽將產生約 -400 mV 之起始氧化還原電位。例如，添加至組裝混合物中之麩胱甘肽會產生有利於杵臼雙特異性組裝之弱還原條件。呈相似類別之其他還原劑可具有相似效應，諸如 β -巯基乙胺(BMEA；Beta-MercaptoEthylAmine)。參見 WO2013/055958，以引用之方式整體併入

本文中。反應之還原條件可估計及使用此項技術中已知之任何合適方法量測。例如，還原條件可使用刃天青指示劑量測(在還原條件下自藍色褪色為無色)。關於更精確量測，可使用氧化還原電位計(諸如由 BROADLEY JAMES®製得之 ORP 電極)。

【0392】 在某些特定實施例中，還原條件為弱還原條件。如本文所用，術語「弱還原劑」或「弱還原條件」係指在 25°C 下具有負氧化電位之還原劑或由該還原劑製備之還原條件。當 pH 在 7 與 9 之間且溫度在 15°C 與 39°C 之間時，還原劑之氧化電位較佳地在 -50 至 -600 mV、-100 至 -600 mV、-200 至 -600 mV、-100 至 -500 mV、-150 至 -300 mV 之間，更佳地在約 -300 至 -500 mV 之間，最佳地為約 -400 mV。熟習此項技術者將能夠選擇用於製備所需還原條件之合適還原劑。熟練研究人員將認識到強還原劑(亦即，關於相同濃度、pH 及溫度具有比上文所提及之還原劑更具負性之氧化電位者)可以較低濃度使用。在一較佳實施例中，當在上述條件下培育時，該等蛋白將能夠在還原劑存在下形成二硫鍵。弱還原劑之實例包括而不限於麩胱甘肽、 β -巯基乙胺、半胱胺酸/胱胺酸、GSH/GSSG、半胱胺/胱胺、甘胺鹽基半胱胺酸及 β -巯基乙醇。在某些實施例中，類似於 200X 莫耳比率之 GSH:抗體之氧化電位的氧化電位可用作弱還原條件之參考點，此時可預期使用其他還原劑之有效組裝。

【0393】 麩胱甘肽濃度可以體積莫耳濃度或以相對於存在於組裝混合物中之半抗體的量之莫耳比率或莫耳過量表述。使用還原劑對照物關於組裝混合物中之蛋白濃度的靶標莫耳比率；此舉防止由於可變蛋白濃度而引起之過還原或還原不足。在某些其他實施例中，還原劑以相對於半抗體之總

量 2-600X、2-200X、2-300X、2-400X、2-500X、2-20X、2-8X、20-50X、50-600X、50-200X 或 100-300X 莫耳過量，較佳地 50-400X 或 50-150X，更佳地 100-300X，且最佳地 200X 或 100X 莫耳過量添加至組裝混合物中。在某些實施例中，該組裝混合物具有在 7 與 9 之間之 pH，較佳地 pH 8.5 或 8.3。

【0394】亦提供免疫結合物(可互換地稱作「抗體-藥物結合物」或「ADC」)，其包含任何結合至例如細胞毒性劑之本文所述之抗體，該細胞毒性劑諸如化學治療劑、藥物、生長抑制劑、毒素(例如細菌、真菌、植物或動物起源之酶活性毒素，或其片段)或放射性同位素(亦即，放射性結合物)。

抗原/靶標分子

【0395】可由根據本文所述之方法純化之多特異性抗體靶向的分子之實例包括但不限於可溶性血清蛋白及其受體及其他膜結合蛋白(例如，黏附素)。在某些實施例中，根據本文所述之方法純化之多特異性抗體能夠結合一種、兩種或超過兩種細胞因子、細胞因子相關蛋白及選自由以下組成之群之細胞因子受體：8MPI、8MP2、8MP38 (GDF10)、8MP4、8MP6、8MP8、CSF1 (M-CSF)、CSF2 (GM-CSF)、CSF3 (G-CSF)、EPO、FGF1 (α FGF)、FGF2 (β FGF)、FGF3 (int-2)、FGF4 (HST)、FGF5、FGF6 (HST-2)、FGF7 (KGF)、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF14、FGF16、FGF17、FGF19、FGF20、FGF21、FGF23、IGF1、IGF2、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFN81、IFNG、IFNWI、FEL1、FEL1 (ϵ)、FEL1 (ζ)、IL 1A、IL 1B、IL 2、IL 3、IL 4、IL 5、IL 6、IL 7、IL 8、IL 9、IL 10、IL 11、IL 12A、IL 12B、IL 13、IL 14、IL 15、IL 16、IL 17、IL 17B、IL 18、IL 19、IL 20、IL 22、IL 23、IL 24、IL 25、IL 26、IL 27、IL 28A、IL 28B、IL 29、IL 30、IL 33、PDGFA、

PDGFB、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFBb3、LTA (TNF- β)、LTB、TNF (TNF- α)、TNFSF4 (OX40 配位體)、TNFSF5 (CD40 配位體)、TNFSF6 (FasL)、TNFSF7 (CD27 配位體)、TNFSF8 (CD30 配位體)、TNFSF9 (4-1 BB 配位體)、TNFSF10 (TRAIL)、TNFSF11 (TRANCE)、TNFSF12 (APO3L)、TNFSF13 (April)、TNFSF13B、TNFSF14 (HVEM-L)、TNFSF15 (VEGI)、TNFSF18、HGF (VEGFD)、VEGF、VEGFB、VEGFC、IL1R1、IL1R2、IL1RL1、IL1RL2、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3RA、IL4R、IL5RA、IL6R、IL7R、IL8RA、IL8RB、IL9R、IL10RA、IL10RB、IL11RA、IL12RB1、IL12RB2、IL13RA1、IL13RA2、IL15RA、IL17R、IL18R1、IL20RA、IL21R、IL22R、IL1HY1、IL1RAP、IL1RAPL1、IL1RAPL2、IL1RN、IL6ST、IL18BP、IL18RAP、IL22RA2、AIF1、HGF、LEP (瘦素)、PTN 及 THPO。

【0396】 在某些實施例中，根據本文所述之方法純化之多特異性抗體能夠結合趨化因子、趨化因子受體、或選自由以下組成之群之趨化因子相關蛋白：CCL1 (1-309)、CCL2 (MCP-1/MCAF)、CCL3 (MIP-1 α)、CCL4 (MIP-1 β)、CCL5 (RANTES)、CCL7 (MCP-3)、CCL8 (mcp-2)、CCL11 (噬酸性細胞趨化因子)、CCL13 (MCP-4)、CCL15 (MIP-1 δ)、CCL16 (HCC-4)、CCL17 (TARC)、CCL18 (PARC)、CCL19 (MDP-3b)、CCL20 (MIP-3 α)、CCL21 (SLC/exodus-2)、CCL22 (MDC/STC-1)、CCL23 (MPIF-1)、CCL24 (MPIF-2/噬酸性細胞趨化因子-2)、CCL25 (TECK)、CCL26 (噬酸性細胞趨化因子-3)、CCL27 (CTACK/ILC)、CCL28、CXCL1 (GRO1)、CXCL2 (GR02)、CXCL3 (GR03)、CXCL5 (ENA-78)、CXCL6 (GCP-2)、CXCL9 (MIG)、CXCL10 (IP10)、CXCL11 (1-TAC)、CXCL12 (SDF1)、CXCL13、CXCL14、CXCL16、

PF4 (CXCL4)、PPBP (CXCL7)、CX3CL 1 (SCYDI)、SCYEI、XCLI (淋巴細胞趨化因子)、XCL2 (SCM-I β)、BLRI (MDR15)、CCBP2 (D6/JAB61)、CCRI (CKRI/HM145)、CCR2 (mcp-IRB IRA)、CCR3 (CKR3/CMKBR3)、CCR4、CCR5 (CMKBR5/ChemR13)、CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/ DRY6)、CCR7 (CKR7/EBII)、CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR- L1)、CCR9 (GPR-9-6)、CCRL1 (VSHK1)、CCRL2 (L-CCR)、XCR1 (GPR5/CCXCR1)、CMKLR1、CMKOR1 (RDC1)、CX3CR1 (V28)、CXCR4、GPR2 (CCR10)、GPR31、GPR81 (FKSG80)、CXCR3 (GPR9/CKR-L2)、CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo)、HM74、IL8RA (IL8R α)、IL8RB (IL8R β)、LTB4R (GPR16)、TCP10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSF8、BDNF、C5R1、CSF3、GRCC10 (C10)、EPO、FY (DARC)、GDF5、HDF1、HDF1 α 、DL8、PRL、RGS3、RGS13、SDF2、SLIT2、TLR2、TLR4、TREM1、TREM2 及 VHL。

【0397】 在某些實施例中，根據本文所述之方法純化的多特異性抗體能夠結合一或多種選自由以下組成之群之靶標：ABCF1；ACVR1；ACVR1B；ACVR2；ACVR2B；ACVRL1；ADORA2A；Aggrecan；AGR2；AICDA；AIF1；AIG1；AKAP1；AKAP2；AMH；AMHR2；ANGPTL；ANGPT2；ANGPTL3；ANGPTL4；ANPEP；APC；APOC1；AR；AZGP1 (鋅-a-醣蛋白)；B7.1；B7.2；BAD；BAFF (BLys)；BAG1；BAI1；BCL2；BCL6；BDNF；BLNK；BLRI (MDR15)；BMP1；BMP2；BMP3B (GDF10)；BMP4；BMP6；BMP8；BMPR1A；BMPR1B；BMPR2；BPAG1 (糙皮側耳凝集素基因)；BRCA1；C19orf10 (IL27w)；C3；C4A；C5；C5R1；CA125；CA15-3；CA19-9；

CANT1 ; CASP1 ; CASP4 ; CAV1 ; CCBP2 (D6/JAB61) ; CCL1 (1-309) ;
 CCL11 (噬酸性細胞趨化因子) ; CCL13 (MCP-4) ; CCL15 (MIP1δ) ; CCL16
 (HCC-4) ; CCL17 (TARC) ; CCL18 (PARC) ; CCL19 (MIP-3β) ; CCL2 (MCP-1) ;
 MCAF ; CCL20 (MIP-3α) ; CCL21 (MTP-2) ; SLC ; exodus-2 ; CCL22
 (MDC/STC-1) ; CCL23 (MPIF-1) ; CCL24 (MPIF-2/噬酸性細胞趨化因子-2) ;
 CCL25 (TECK) ; CCL26 (噬酸性細胞趨化因子-3) ; CCL27 (CTACK/ILC) ;
 CCL28 ; CCL3 (MTP-Iα) ; CCL4 (MDP-Iβ) ; CCL5 (RANTES) ; CCL7 (MCP-3) ;
 CCL8 (mcp-2) ; CCNA1 ; CCNA2 ; CCND1 ; CCNE1 ; CCNE2 ; CCR1
 (CKR/HM145) ; CCR2 (mcp-IRβ/RA) ; CCR3 (CKR/CMKBR3) ; CCR4 ; CCR5
 (CMKBR5/ChemR13) ; CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/ DRY6) ; CCR7
 (CKBR7/EBI1) ; CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1) ; CCR9 (GPR-9-6) ; CCRL1
 (VSHK1) ; CCRL2 (L-CCR) ; CD11a ; CD13 ; CD164 ; CD19 ; CD1C ; CD20 ;
 CD200 ; CD22 ; CD23 ; CD24 ; CD28 ; CD3 ; CD30 ; CD31 ; CD33 ; CD34 ;
 CD35 ; CD37 ; CD38 ; CD39 ; CD3E ; CD3G ; CD3Z ; CD4 ; CD40 ; CD40L ;
 CD41 ; CD44 ; LCA/CD45 ; CD45RA ; CD45RB ; CD45RO ; CD5 ; CD52 ;
 CD69 ; CD7 ; CD71 ; CD72 ; CD74 ; CD79A ; CD79B ; CD8 ; CD80 ; CD81 ;
 CD83 ; CD86 ; CD95/Fas ; CD99 ; CD100 ; CD106 ; CDH1 (E-鈣黏素) ; CD9/p24 ;
 CDH10 ; CD11a ; CD11c ; CD13 ; CD14 ; CD19, CD20 ; CDH12 ; CDH13 ;
 CDH18 ; CDH19 ; CDH20 ; CDH5 ; CDH7 ; CDH8 ; CDH9 ; CDK2 ; CDK3 ;
 CDK4 ; CDK5 ; CDK6 ; CDK7 ; CDK9 ; CDKN1A (p21/WAF1/Cip1) ; CDKN1B
 (p27/Kip1) ; CDKN1C ; CDKN2A (P16INK4a) ; CDKN2B ; CDKN2C ; CDKN3 ;
 CEA ; CEBPB ; CER1 ; CHGA ; CHGB ; 幾丁質酶 ; CHST10 ; CKLFSF2 ;

CKLFSF3 ; CKLFSF4 ; CKLFSF5 ; CKLFSF6 ; CKLFSF7 ; CKLFSF8 ;
 CLDN3;CLDN7 (水閘蛋白-7) ; CLN3 ; CLU (聚集素) ; C-MET ; CMKLR1 ;
 CMKOR1 (RDC1) ; CNR1 ; COL 18A1 ; COL1A1 ; COL4A3 ; COL6A1 ;
 CR2 ; CRP ; CSFI (M-CSF) ; CSF2 (GM-CSF) ; CSF3 (GCSF) ; CTLA4 ; CTNNB1
 (b-連環素) ; CTSB (組織蛋白酶 B) ; CTSD (組織蛋白酶 D) ; CX3CL1 (SCYDI) ;
 CX3CR1 (V28) ; CXCL1 (GRO1) ; CXCL10 (IP-10) ; CXCL11 (I-TAC/IP-9) ;
 CXCL12 (SDF1) ; CXCL13 ; CXCL14 ; CXCL16 ; CXCL2 (GRO2) ; CXCL3
 (GRO3) ; CXCL5 (ENA-78/LIX) ; CXCL6 (GCP-2) ; CXCL9 (MIG) ; CXCR3
 (GPR9/CKR-L2) ; CXCR4 ; CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo) ; CYB5 ; CYC1 ;
 CYSLTR1 ; 細胞角蛋白 ; DAB2IP ; DES ; DKFZp451J0118 ; DNCLI ; DPP4 ;
 E2F1 ; ECGF1 ; EDG1 ; EFNA1 ; EFNA3 ; EFNB2 ; EGF ; EGFR ; ELAC2 ;
 ENG ; ENO1 ; ENO2 ; ENO3 ; EPHB4 ; EPO ; ERBB2 (Her-2) ; EREG ; ERK8 ;
 ESR1 ; 雌激素受體 ; 孕酮受體 ; ESR2 ; F3 (TF) ; FADD ; FasL ; FASN ;
 FCER1A ; FCER2 ; FCGR3A ; FGF ; FGF1 (□FGF) ; FGF10 ; FGF11 ; FGF12 ;
 FGF12B ; FGF13 ; FGF14 ; FGF16 ; FGF17 ; FGF18 ; FGF19 ; FGF2 (bFGF) ;
 FGF20 ; FGF21 ; FGF22 ; FGF23 ; FGF3 (int-2) ; FGF4 (HST) ; FGF5 ; FGF6
 (HST-2) ; FGF7 (KGF) ; FGF8 ; FGF9 ; FGFR1 ; FGFR3 ; FIGF (VEGFD) ;
 FEL1 (ε) ; 纖維蛋白 ; FIL1 (ζ) ; FLJ12584 ; FLJ25530 ; FLRTI (纖維連接蛋
 白) ; FLT1 ; FOS ; FOSL1 (FRA-1) ; FY (DARC) ; GABRP (GABAa) ; GAGEB1 ;
 GAGEC1 ; GALNAC4S-6ST ; GATA3 ; GDF5 ; GFI1 ; GGT1 ; GM-CSF ;
 GNAS1 ; GNRHI ; GPR2 (CCR10) ; GPR31 ; GPR44 ; GPR81 (FKSG80) ;
 GRCCIO (C10) ; GRP ; GSN (凝溶膠蛋白) ; GSTP1 ; HAVCR2 ; HDAC4 ;

HDAC5 ; HDAC7A ; HDAC9 ; HGF ; HIF1A ; HOP1 ; 組胺及組胺受體 ;
 HLA-A ; HLA-DRA ; HM74 ; HMOXI ; HPV 蛋白 ; HUMCYT2A ; ICEBERG ;
 ICOSL ; 1D2 ; IFN-a ; IFNA1 ; IFNA2 ; IFNA4 ; IFNA5 ; IFNA6 ; IFNA7 ;
 IFNB1 ; IFN γ ; ITGB7 ; DFNW1 ; IGBP1 ; IGF1 ; IGF1R ; IGF2 ; IGFBP2 ;
 IGFBP3 ; IGFBP6 ; 介白素, 諸如 IL1-IL36 或其受體, 包括 IL-1 ; IL10 ; IL10RA ;
 IL10RB ; IL11 ; IL11RA ; IL-12 ; IL12A ; IL12B ; IL12RB1 ; IL12RB2 ; IL13 ;
 IL13RA1 ; IL13RA2 ; IL14 ; IL15 ; IL15RA ; IL16 ; IL17 ; IL17B ; IL17C ;
 IL17R ; IL18 ; IL18BP ; IL18R1 ; IL18RAP ; IL19 ; IL1A ; IL1B ; IL1F10 ;
 IL1F5 ; IL1F6 ; IL1F7 ; IL1F8 ; IL1F9 ; IL1HY1 ; IL1R1 ; IL1R2 ; IL1RAP ;
 IL1RAPL1 ; IL1RAPL2 ; IL1RL1 ; IL1RL2, ILIRN ; IL2 ; IL20 ; IL20RA ;
 IL21 R ; IL22 ; IL22R ; IL22RA2 ; IL23 ; IL24 ; IL25 ; IL26 ; IL27 ; IL28A ;
 IL28B ; IL29 ; IL2RA ; IL2RB ; IL2RG ; IL3 ; IL30 ; IL3RA ; IL33 ; IL4 ;
 IL4R ; IL5 ; IL5RA ; IL6 ; IL6R ; IL6ST (醣蛋白 130) ; P-醣蛋白 ; EL7 ;
 EL7R ; EL8 ; IL8RA ; DL8RB ; IL8RB ; DL9 ; DL9R ; DLK ; INHA ; INHBA ;
 INSL3 ; INSL4 ; IRAK1 ; ERAK2 ; ITGA1 ; ITGA2 ; ITGA3 ; ITGA6 (a6
 整合素) ; ITGAV ; ITGB3 ; ITGB4 (b4 整合素) ; JAG1 ; JAK1 ; JAK3 ; JUN ;
 K6HF ; KAI1 ; KDR ; 角蛋白 ; KITLG ; KLF5 (GC Box BP) ; KLF6 ; KLKIO ;
 KLK12 ; KLK13 ; KLK14 ; KLK15 ; KLK3 ; KLK4 ; KLK5 ; KLK6 ; KLK9 ;
 KRT1 ; KRT19 (角蛋白 19) ; KRT2A ; KHTHB6 (毛髮特異性 H 型角蛋白) ;
 κ 輕鏈 ; λ 輕鏈 ; LAMAS ; LEP (瘦素) ; Lingo-p75 ; Lingo-Troy ; LPS ; LTA
 (TNF-b) ; LTB ; LTB4R (GPR16) ; LTB4R2 ; LTBR ; LEWIS-xMACMARCKS ;
 MAG 或 Omgp ; MAP2K7 (c-Jun) ; MDK ; MIB1 ; 黑素體蛋白 ; 中期因子 ;

MEF ; MIP-2 ; MKI67 ; (Ki-67) ; MMP2 ; MMP9 ; MS4A1 ; MSMB ; MT3
 (金屬硫黏連蛋白-111) ; MTSS1 ; MUC1 (黏蛋白) ; MYC ; MY088 ; NCK2 ;
 神經黏蛋白 ; NFKB1 ; NFKB2 ; NGFB (NGF) ; NGFR ; NgR-Lingo ; NgR-
 Nogo66 (Nogo) ; NgR-p75 ; NgR-Troy ; NME1 (NM23A) ; NOX5 ; NPPB ;
 NR0B1 ; NR0B2 ; NR1D1 ; NR1D2 ; NR1H2 ; NR1H3 ; NR1H4 ; NR112 ;
 NR113 ; NR2C1 ; NR2C2 ; NR2E1 ; NR2E3 ; NR2F1 ; NR2F2 ; NR2F6 ;
 NR3C1 ; NR3C2 ; NR4A1 ; NR4A2 ; NR4A3 ; NR5A1 ; NR5A2 ; NR6A1 ;
 NRP1 ; NRP2 ; NT5E ; NTN4 ; ODZI ; OPRD1 ; P2RX7 ; PAP ; PART1 ;
 PATE ; PAWR ; PCA3 ; PCNA ; POGFA ; POGFB ; PECAM1 ; PF4 (CXCL4) ;
 PGF ; PGR ; 磷蛋白聚糖 ; PIAS2 ; PIK3CG ; PLAU (uPA) ; PLG ; PLXDC1 ;
 PPBP (CXCL7) ; PPID ; PRI ; PRKCQ ; PRKDI ; PRL ; PROC ; PROK2 ;
 PSA ; PSAP ; PSCA ; PTAFR ; PTEN ; PTGS2 (COX-2) ; PTN ; p53 ; RAC2
 (p21 Rac2) ; RAS ; Rb ; RARB ; RGS1 ; RGS13 ; RGS3 ; RNF110 (ZNF144) ;
 ROBO2 ; S100A2 ; SCGB1D2 (親脂蛋白 B) ; SCGB2A1 (乳腺珠蛋白 2) ;
 SCGB2A2 (乳腺珠蛋白 1) ; SCYE1 (內皮單核細胞活化細胞因子) ; S-100
 SDF2 ; SERPINA1 ; SERPINA3 ; SERP1NB5 (maspin) ; SERPINE1 (PAI-1) ;
 SERPDMF1 ; SHBG ; SLA2 ; SLC2A2 ; SLC33A1 ; SLC43A1 ; SLIT2 ; SPPI ;
 SPRR1B (Sprl) ; ST6GAL1 ; STABI ; STAT6 ; STEAP ; STEAP2 ; TB4R2 ;
 TBX21 ; TCPIO ; TOGFI ; TEK ; TGFA ; TGFBI ; 跨膜或細胞表面腫瘤特
 異性抗原(TAA) , 諸如描述於 USP 7,521, 541 中之 TAA ; TAU ; TGFB1II ;
 TGFB2 ; TGFB3 ; TGFBI ; TGFBR1 ; TGFBR2 ; TGFBR3 ; THIL ; THBSI (凝
 血栓蛋白-1) ; THBS2 ; THBS4 ; THPO ; TIE (Tie-1) ; TMP3 ; 組織因子 ;

TLR1 ; TLR2 ; TLR3 ; TLR4 ; TLR5 ; TLR6 ; TLR7 ; TLR8 ; TLR9 ; TLR10 ;
 Tn 抗原 TNF ; TNF-a ; TNFAEP2 (B94) ; TNFAIP3 ; TNFRSF1A ; TNFRSF1B ; TNFRSF21 ; TNFRSF5 ; TNFRSF6 (Fas) ; TNFRSF7 ; TNFRSF8 ;
 TNFRSF9 ; TNFSF10 (TRAIL) ; TNFSF11 (TRANCE) ; TNFSF12 (AP03L) ;
 TNFSF13 (April) ; TNFSF13B ; TNFSF14 (HVEM-L) ; TNFSF15 (VEGI) ;
 TNFSF18 ; TNFSF4 (OX40 配位體) ; TNFSF5 (CD40 配位體) ; TNFSF6 (FasL) ;
 TNFSF7 (CD27 配位體) ; TNFSF8 (CD30 配位體) ; TNFSF9 (4-1 BB 配位體) ;
 TOLLIP ; Toll 樣受體 ; TOP2A (拓撲異構酶 Ea) ; TP53 ; TPM1 ; TPM2 ;
 TRADD ; TRAF1 ; TRAF2 ; TRAF3 ; TRAF4 ; TRAF5 ; TRAF6 ; TREM1 ;
 TREM2 ; TRPC6 ; TSLP ; TWEAK ; 泛素 ; VEGF ; VEGFB ; VEGFC ; versican ;
 VHL C5 ; 波形蛋白 ; VLA-4 ; XCL1 (淋巴細胞趨化因子) ; XCL2 (SCM-1b) ;
 XCRI (GPR5/CCXCR1) ; YY1 ; 及 ZFPM2 。

【0398】 在某些實施例中，用於根據本文所提供之方法純化的多特異性抗體之靶標分子包括 CD 蛋白，諸如 CD3、CD4、CD8、CD16、CD19、CD20、CD34；ErbB 受體家族之 CD64、CD200 成員，諸如 EGF 受體、HER2、HER3 或 HER4 受體；細胞黏附分子，諸如 LFA-1、Mac1、p150.95、VLA-4、ICAM-1、VCAM、 $\alpha 4/\beta 7$ 整合素及 $\alpha v/\beta 3$ 整合素(包括其 α 或 β 次單元(例如，抗 CD11a、抗 CD18 或抗 CD11b 抗體))；生長因子，諸如 VEGF (VEGF-A)、FGFR、Ang1、KLB、VEGF-C；組織因子(TF)； α 干擾素(α IFN)；TNF α (介白素)，諸如 IL-1 β 、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-13、IL 17 AF、IL-18、IL13；IL-13R $\alpha 1$ 、IL13R $\alpha 2$ 、IL14 IL-4R、IL-5R、IL-9R、IgE；血型抗原；flk2/flt3 受體；肥胖(OB)受體；mpl 受體；CTLA-4；RANKL、RANK、RSV F 蛋白、

蛋白 C、BR3 等。

【0399】 在某些實施例中，用於根據本文所提供之方法純化的多特異性抗體之靶標分子包括低密度脂蛋白受體相關蛋白(LRP)-1 或 LRP-8 或轉鐵蛋白受體，及至少一種選自由以下組成之群之靶標：1) β -分泌酶(BACE1 或 BACE2)，2) α -分泌酶，3) γ -分泌酶，4) τ -分泌酶，5) 澱粉樣蛋白前驅蛋白(APP)，6) 死亡受體 6 (DR6)，7) 澱粉樣蛋白 β 肽，8) α -突觸核蛋白，9) Parkin，10) Huntingtin，11) p75 NTR，及 12) 凋亡蛋白酶-6。

【0400】 在某些實施例中，用於根據本文所提供之方法純化的多特異性抗體之靶標分子包括至少兩種選自由以下組成之群之靶標分子：IL-1 α 及 IL-1 β 、IL-12 及 IL-1S；IL-13 及 IL-9；IL-13 及 IL-4；IL-13 及 IL-5；IL-5 及 IL-4；IL-13 及 IL-1 β ；IL-13 及 IL-25；IL-13 及 TARC；IL-13 及 MDC；IL-13 及 MEF；IL-13 及 TGF $\sim$ ；IL-13 及 LHR 促效劑；IL-12 及 TWEAK、IL-13 及 CL25；IL-13 及 SPRR2a；IL-13 及 SPRR2b；IL-13 及 ADAMS、IL-13 及 PED2、IL13 及 IL17；IL13 及 IL4；IL13 及 IL33；IL17A 及 IL 17F、CD3 及 CD19、CD138 及 CD20；CD138 及 CD40；CD19 及 CD20；CD20 及 CD3；CD3S 及 CD13S；CD3S 及 CD20；CD3S 及 CD40；CD40 及 CD20；CD-S 及 IL-6；CD20 及 BR3、TNF α 及 TGF- β 、TNF α 及 IL-1 β ；TNF α 及 IL-2；TNF α 及 IL-3；TNF α 及 IL-4；TNF α 及 IL-5；TNF α 及 IL6；TNF α 及 IL8；TNF α 及 IL-9、TNF α 及 IL-10、TNF α 及 IL-11、TNF α 及 IL-12、TNF α 及 IL-13、TNF α 及 IL-14、TNF α 及 IL-15、TNF α 及 IL-16、TNF α 及 IL-17、TNF α 及 IL-18、TNF α 及 IL-19、TNF α 及 IL-20、TNF α 及 IL-23、TNF α 及 IFN α 、TNF α 及 CD4、TNF α 及 VEGF、TNF α 及 MIF、TNF α 及 ICAM-1、

TNF α 及 PGE4、TNF α 及 PEG2、TNF α 及 RANK 配位體、TNF α 及 Te38、TNF α 及 BAFF、TNF α 及 CD22、TNF α 及 CTLA-4、TNF α 及 GP130、TNF α 及 IL-12p40、FGFR1 及 KLB；VEGF 及 HER2、VEGF-A 及 HER2、VEGF-A 及 PDGF、HER1 及 HER2、VEGFA 及 ANG2、VEGF-A 及 VEGF-C、VEGF-C 及 VEGF-D、HER2 及 DR5、VEGF 及 IL-8、VEGF 及 MET、VEGFR 及 MET 受體、EGFR 及 MET、VEGFR 及 EGFR、HER2 及 CD64、HER2 及 CD3、HER2 及 CD16、HER2 及 HER3；EGFR (HER1) 及 HER2、EGFR 及 HER3、EGFR 及 HER4、IL-14 及 IL-13、IL-13 及 CD40L、IL4 及 CD40L、TNFR1 及 IL-1 R、TNFR1 及 IL-6R 及 TNFR1 及 IL-18R、EpCAM 及 CD3、MAPG 及 CD28、EGFR 及 CD64、CSPG 及 RGM A；CTLA-4 及 BTN02；IGF1 及 IGF2；IGF1/2 及 Erb2B；MAG 及 RGM A；NgR 及 RGM A；NogoA 及 RGM A；OMGp 及 RGM A；POL-1 及 CTLA-4；及 RGM A 及 RGM B。

【0401】 視情況結合至其他分子之可溶性蛋白或其片段可用作於產生抗體之免疫原。關於跨膜分子(諸如受體)，其片段(例如受體之細胞外域)可用作免疫原。或者，表現該跨膜分子之細胞可用作免疫原。該等細胞可源於天然來源(例如癌細胞株)或可為已藉由重組技術轉型以表現該跨膜分子之細胞。適用於製備抗體之其他抗原及其形式將為熟習此項技術者顯而易知的。

調配物及製備該等調配物之方法

【0402】 本文中亦提供包含藉由本文所述之方法純化的多特異性抗體之調配物及製備該調配物之方法。例如，經純化多肽可與醫藥學上可接受之載劑組合。

【0403】 在一些實施例中，該等多肽調配物可藉由混合具有所需程度之純度的多肽與視情況選用之醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑而製備(*Remington's Pharmaceutical Sciences* 第 16 版, Osol, A.編(1980))，呈凍乾調配物或水溶液形式用於儲存。

【0404】 如本文所用，「載劑」包括在所用劑量及濃度下對暴露於其之細胞或哺乳動物無毒的醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑。通常，生理學上可接受之載劑為 pH 緩衝水溶液。

【0405】 可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對接受者無毒，且包括緩衝液，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽、及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如十八烷基二甲基苯甲基氯化銨；氯化六氫季銨；苯紮氯銨；苄索氯銨；苯酚、丁基或苯甲基醇；對羥基苯甲酸烷基酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間-甲酚)；低分子量(小於約 10 個殘基)多肽；蛋白，諸如血清白蛋白、明膠、或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸、或離胺酸；單醣、二醣、及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖、或糊精；螯合劑，諸如 EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如，Zn-蛋白錯合物)；及/或非離子性界面活性劑，諸如 TWEEN™、PLURONIC™或聚乙二醇(PEG)。

【0406】 在一些實施例中，多肽調配物中之多肽維持功能活性。

【0407】 欲用於活體內投與之調配物必須為無菌的。此容易藉由經由無菌濾膜過濾來實現。

【0408】 本文中之調配物亦可含有所治療的特定適應症所必需之超過一種活性化合物，較佳地具有不會不利地彼此影響的互補活性之彼等。例如，除了多肽外，亦可需要在一種調配物中包括額外多肽(例如抗體)。或者或另外，該組合物可進一步包含化學治療劑、細胞毒性劑、細胞因子、生長抑制劑、抗激素劑及/或心臟保護劑。該等分子合適地以有效用於預期目的之量組合存在。

製造物件

【0409】 藉由本文所述之方法純化的多特異性抗體及/或包含藉由本文所述之方法純化的多肽之調配物可含於製造物件內。該製造物件可包含含有該多肽及/或該多肽調配物之容器。較佳地，該製造物件包含：(a)容器，該容器內包含包含本文所述之多肽及/或多肽調配物的組合物；及(b)具有關於向個體投與該調配物之說明書的包裝插頁。

【0410】 該製造物件包含容器及在該容器上或與該容器締合之標籤或包裝插頁。合適容器包括例如瓶、小瓶、注射器等。該等容器可由多種材料，諸如玻璃或塑膠形成。該容器容納或含有調配物且可具有無菌存取口(例如，該容器可為靜脈內溶液袋或具有可由皮下注射針刺穿之塞子的小瓶)。該組合物中之至少一種活性劑為該多肽。該標籤或包裝插頁指示該組合物在個體中之使用，其中關於給藥量及所提供之多肽及任何其他藥物的時間間隔給出特定指導。該製造物件可進一步包括自商業及使用者觀點來看可需要之其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、過濾器、針、及注射器。在一些實施例中，該容器為注射器。在一些實施例中，該注射器進一步含於注射器件內。在一些實施例中，該注射器件為自動注射器。

【0411】 「包裝插頁」用於指治療產品之商業包裝中慣常包括的說明書，其含有關於適應症、用法、劑量、投與、禁忌症、欲與經包裝產品組合之其他治療產品及/或有關該等治療產品的用途之警告之資訊。

【0412】 本說明書中所揭示之所有特徵可呈任何組合組合。本說明書中所揭示之各特徵可由用於相同、相等或相似目的之替代特徵置換。因此，除非另外明確規定，否則所揭示之各特徵僅為相等或相似特徵之一般系列的實例。

【0413】 前述書面描述被視為足以使得熟習此項技術者能夠實踐該等方法及/或獲得本文所述之組合物。以下實例及詳細描述作為說明而非作為限制提供。

【0414】 本說明書中之所有參考文獻的揭示內容均以引用之方式明確併入本文中。

序列表之描述

【0415】 SEQ ID NO: 1 瓦紐賽單抗之<VEGF>之可變重鏈域 VH

【0416】 SEQ ID NO: 2 瓦紐賽單抗之<VEGF>之可變輕鏈域 VL

【0417】 SEQ ID NO: 3 瓦紐賽單抗之<ANG-2>之可變重鏈域 VH

【0418】 SEQ ID NO: 4 瓦紐賽單抗之< ANG-2>之可變輕鏈域 VL

【0419】 SEQ ID NO: 5 RG7716 之<VEGF>之可變重鏈域 VH

【0420】 SEQ ID NO: 6 RG7716 之<VEGF>之可變輕鏈域 VL

【0421】 SEQ ID NO: 7 RG7716 之<ANG-2>之可變重鏈域 VH

【0422】 SEQ ID NO: 8 RG7716 之< ANG-2>之可變輕鏈域 VL

【0423】 SEQ ID NO: 9 瓦紐賽單抗之<ANG-2>之重鏈

- 【0424】 SEQ ID NO: 10 瓦紐賽單抗之<VEGF>之重鏈
- 【0425】 SEQ ID NO: 11 瓦紐賽單抗之<ANG-2>之輕鏈
- 【0426】 SEQ ID NO: 12 瓦紐賽單抗之<VEGF>之輕鏈
- 【0427】 SEQ ID NO: 13 RG7716 之<VEGF>之重鏈
- 【0428】 SEQ ID NO: 14 RG7716 之<ANG-2>之重鏈
- 【0429】 SEQ ID NO: 15 RG7716 之<VEGF>之輕鏈
- 【0430】 SEQ ID NO: 16 RG7716 之<ANG-2>之輕鏈

實例

【0431】 該等實例僅出於說明性目的提供，且不意欲以任何方式限制本發明之範圍。實際上，除本文所示及所述之彼等外的多種修飾對於熟習此項技術者而言將由前述描述顯而易知且屬隨附申請專利範圍之範圍。

實例 1：抗 X1/抗 Y1 雙特異性抗體之組裝及純化

【0432】 針對靶標蛋白 X1 及 Y1 之雙特異性抗體(抗 X1/抗 Y1 雙特異性抗體或 aX1/Y1 雙特異性)組裝如下。各半抗體(aX1 (杵)及 aY1 (臼))獨立地經受使用蛋白 A 樹脂(MabSelect SuRe, GE Healthcare)之親和力層析步驟。該蛋白 A 步驟使用相似過程條件、但不同負載密度靶標針對各半抗體獨立地完成。蛋白 A 管柱在環境溫度(15-30°C)下運行且負載經冷凍至 12-18°C。蛋白 A 管柱藉由應用三個管柱體積之溶離緩衝液、隨後三個管柱體積之再生緩衝液來製備。該等管柱接著達到平衡，載樣，洗滌三次(平衡緩衝液洗滌、磷酸鉀洗滌、平衡緩衝液洗滌)，溶離，且再生持續充足週期以加工負載材料。自蛋白 A 管柱彙集之材料必要時藉由添加溶離緩衝液以實現 pH ≤ 3.60 且保持最少 120 分鐘來進行 pH 調節。在此步驟之後，所彙集之材料的

pH 經調節至 $\text{pH } 5.0 \pm 0.3$ 用於進一步加工。

【0433】 獲自蛋白 A 層析步驟之半抗體池接著以 1:1 莫耳比率組合，pH 經調節至 $\text{pH } 8.2$ 。200 mM L-麩胱甘肽(91/9% GSH/GSSG)緩衝液添加至組合池中以實現針對每 1 莫耳所形成之雙特異性抗體 165 莫耳 L-麩胱甘肽之比率。該材料加熱至 $32.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ 持續 8-24 小時。所得經組裝之池冷卻至 $15\text{-}25^\circ\text{C}$ 且接著調節至 $\text{pH } 5.5$ 。

【0434】 pH 經調節之經組裝之池接著經受使用 Capto™ MMC 樹脂呈結合及溶離模式之多模式陽離子交換層析。該管柱用 100 mM 乙酸鈉($\text{pH } 5.5$)平衡。經調節之組裝池負載至管柱上至 45 g/L 樹脂且隨後用平衡緩衝液洗滌且用具有 25 mM 乙酸鈉之 50 mM HEPES 在 $\text{pH } 8.0$ 下進行第二洗滌期。該雙特異性抗體藉由在分步溶離中增加鹽及 pH，使用具有 245 mM 乙酸鈉之 50 mM HEPES 在 $\text{pH } 8.0$ 下自管柱中溶離出。陽離子交換彙集基於 280 nm 下之吸光度經起始及終止。

【0435】 來自多模式陽離子層析步驟之溶離物接著經受使用 Capto™ Adhere 樹脂呈流通模式之多模式陰離子交換層析。該 Capto™ Adhere 管柱用 50 mM Tris、85 mM 乙酸鈉($\text{pH } 8.0$)達到平衡。來自前一步驟之產物池用純化水調節至 9.0 mS/cm 之電導率且負載至管柱上。該雙特異性抗體流動通過該管柱，該管柱接著用平衡緩衝液洗滌。陰離子交換彙集基於 280 nm 下之吸光度經起始及終止。上述純化方案描述於圖 1A 中。

【0436】 第三層析步驟移除如 DNA、宿主細胞蛋白及內毒素之殘餘雜質，以及產物變異體，包括半抗體、均二聚體及聚集體。當 Capto™ Adhere 負載摻加 20% aY1 均二聚體時，該層析過程使該 aY1 均二聚體減少大約 2 倍(藉

由 MS 發現為 8%且藉由用於偵測產物相關雜質之基於細胞之分析發現為 10%)。

【0437】 圖 1A)中示出之純化方案與使用傳統陽離子交換(CEX)樹脂 (POROS XS)之純化方案(參見圖 1B)的比較示出，使用該多模式樹脂會改良雙特異性抗體與產物相關變異體、尤其均二聚體之分離。因此，當自親和力層析步驟彙集之材料摻加 20%白均二聚體時，多模式陽離子交換層析減少該白均二聚體至低於 2% (藉由質譜分析(MS))及低於 0.5%之定量極限(藉由用於產物相關雜質之基於細胞之分析)。

表 7：抗 XI/抗 YI 雙特異性抗體與宿主細胞及產物相關雜質之分離(POROS XS 樹脂，結合/溶離模式)

池	溶離緩衝液	產率(%)	CHOP (ng/mg)	SEC % (HMWS, 150 kD, 75 kD, LMWS)‡			
負載	--	--	2060	8.8	80.5	6.9	3.8
池	127 mM NaOAc , pH 6.5	90	654	0.3	90.3	8.0	1.4

表 8：雙特異性抗體與宿主細胞及產物相關雜質之分離(Capto MMC 樹脂，結合/溶離模式)

池	溶離緩衝液	產率 (%)	CHOP (ng/mg)	SEC % (HMWS, 150 kD, 75 kD, LMWS)‡			
負載	--	--	4080	8.4	89.3	1.4	0.3
池	244 mM NaOAc , pH 8.0	80	236	0.9	98.5	0.5	0.1

CHOP = CHO 細胞蛋白；HMWS =高分子量物質；150 kD =雙特異性及均二聚體；75 kD =半抗體；LMWS =低分子量物質

【0438】 在如表 9 及 10 所示之傳統陰離子交換(AEX)樹脂(QSFF) (參見圖 1C)與多模式 AEX 樹脂(Capto™Adhere) (參見圖 1A)之間的比較證明，如與傳統 AEX QSFF 樹脂相比，多模式 AEX 樹脂實現雙特異性抗體與產物相

關雜質之實質上更佳分離。QSFF 使主峰富集 1%，且 Adhere 使主峰富集 10%，這歸因於半抗體(75 kD)及聚集體(亦即，高分子量物質(HMWS))之移除。使用相同 Capto MMC 池直接比較 Capto Adhere 與 QSFF 示出，如與 QSFF 相比，Capto Adhere 樹脂實現尺寸變異體、產物相關變異體(包括半抗體)之更佳清除，及宿主細胞蛋白清除(表 11)。

表 9：雙特異性抗體與宿主細胞及產物相關雜質之分離(QSFF 樹脂，流通模式)

負載 pH	負載電導率 (mS/cm)	產率(%)	CHOP (ng/mg)	SEC % (HMWS, 150 kD, 75 kD, LMWS)†				抗 Y1 (白-白)均二聚體質譜分析(%)
負載	--	--	約 300	0.5	92.5	5.9	1.1	--
8.0	5.1	93	<15	0.6	93.5	4.4	1.5	3
8.0	9.0	97	<9.8	0.6	92.4	5.3	1.7	3

CHOP = CHO 細胞蛋白；HMWS = 高分子量物質；150 kD = 雙特異性及均二聚體；75 kD = 半抗體；LMWS = 低分子量物質

表 10：雙特異性抗體與宿主細胞及產物相關雜質之分離(Capto™ Adhere 樹脂，流通模式)

管柱運行		負載 pH	負載電導率(mS/cm)	總蛋白產率 (%)	CHOP (ppm)	SEC-HPLC % HMWS	SEC-HPLC % 75 kD	白-白均二聚體質譜分析 (%)
1	負載	8.0	9.0	-	276	0.5	1.6	
	池	--	--	85	1.5	0.2	0.0	<2% (LOQ)
2	負載	8.5	9.0	--	276	0.3	1.5	
	池	--	--	76	2.0	0.1	1.4	<2% (LOQ)

CHOP = CHO 細胞蛋白；HMWS = 高分子量物質；75 kD = 半抗體；LOQ = 定量極限

表 11 : *Capto Adhere* 與 *QSFF* 之比較

	負載 pH	負載電 導率 (mS/cm)	總蛋白產率 (%)	CHOP (ppm)	SEC-HPLC % HMWS	SEC-HPLC % 75 kD
負載	--	--	-	32	1.1	1.3
Capto Adhere 池	8.0	9.0	91	0.9	0.55	0.48
QSFF 池	8.0	9.0	100	< 8.5	1.4	1.4

CHOP = CHO 細胞蛋白；HMWS = 高分子量物質；75 kD = 半抗體；LOQ = 定量極限

【0439】 上述實驗證明，如與圖 1B 或圖 1C 中之純化方案相比，圖 1A 中描繪之純化方案實現 aX1/Y1 雙特異性抗體與產物相關雜質之顯著更佳分離。首先，當自親和力層析步驟彙集之材料摻加 20% 白均二聚體時，Capto MMC (亦即，多模式陽離子交換樹脂)減少該白均二聚體至低於 2% (藉由質譜分析(MS))且低於 0.5% 之定量極限(藉由用於產物相關雜質之基於細胞之分析)。(參見表 7 及 8)。該分離未使用 POROS XS (亦即傳統陽離子交換樹脂)實現。另外，CaptoAdhere (亦即，多模式陰離子交換樹脂)使主峰富集 10%，這歸因於高分子量物質(諸如半抗體(75 kD)及聚集體)之移除，而 QSFF (亦即，傳統陰離子交換樹脂)僅使主峰富集 1%。此外，如與多模式陽離子樹脂(CaptoMMC)、隨後傳統陰離子交換樹脂 QSFF 之組合相比，兩種多模式樹脂之組合(多模式陽離子樹脂、隨後多模式陰離子樹脂 CaptoAdhere)實現尺寸變異體、產物相關變異體(包括半抗體)之更佳清除，及宿主細胞蛋白清除(參見例如表 11)。

【0440】 當該等多模式樹脂之次序逆轉時，發現產物相關變異體及尺寸變異體之移除的相似改良：在一獨立實驗中，aX1/Y1 雙特異性抗體與產物

相關雜質之更佳分離亦藉由使自親和力層析步驟彙集之材料首先經受多模式陰離子樹脂、隨後多模式陽離子樹脂來實現。

實例 2： $F(ab')_2$ 雙特異性之組裝及純化

【0441】 初始嘗試實現 90%純， $F(ab')_2$ 雙特異性導致低產率(少於 10%起始材料)。增加了維持可接受之產率而無純度損失之問題具有數種挑戰，包括過程中間體之不穩定性及產物相關變異體(諸如均二聚體、游離輕鏈及重鏈、及未反應之 Fab' 離去基)的存在。開發新穎單元操作以便實現所需雙特異性 $F(ab')_2$ 之有效組裝及純化。包含兩種不同 Fab' 分子之雙特異性 $F(ab')_2$ 如圖 2 中提供之示意圖中所描繪經組裝及純化。

【0442】 首先，如下執行捕捉步驟。各 Fab' 首先自獨立大腸桿菌萃取物上清液捕捉。含有兩種 Fab' 半分子之一的上清液經受使用 CaptoL 蛋白 L 親和力層析樹脂之捕捉步驟。管柱使用 25 mM Tris 氯化鈉平衡緩衝液(pH 7.7)平衡。在應用負載材料至管柱之後，該管柱用平衡緩衝液(pH 7.7)洗滌，隨後用 0.4 M 磷酸鉀(pH 7)洗滌，用還原劑洗滌以移除半胱胺酸帽，且用平衡緩衝液(pH 7.7)進行額外洗滌。所關注之 Fab' 產物接著使用 0.1 M 乙酸 pH 2.9 之溶離緩衝液自 CaptoL 管柱溶離。使用 280 nm 下之吸光度收集產物。

【0443】 來自 Capto L 層析步驟之含有第一 Fab' 半分子(Fab' A)之池經調節至 pH 5.5。二吡啶基二硫(DPDS；Dipyridyl disulfide)添加至 pH 5.5 調節之 CaptoL 池中。DPDS 與 Fab' 分子中之游離鉸鏈半胱胺酸反應以形成吡啶基化 Fab'，其與可得 Fab' 游離硫醇反應，由此促進 $F(ab')_2$ 雜二聚體之形成。一旦經形成，該吡啶基化 Fab' A 即負載至第二層析管柱中用於純化。

【0444】 為了鑒別吡啶基化 Fab' 可與雜質(亦即，Fab' 均二聚體、高分子

量物質(HMWS)、Fab'單體)分離時所處之層析條件，在層析樹脂結合條件之 96 點分配係數篩選中表徵 Fab'均二聚體、高分子量物質(HMWS)、Fab'單體及吡啶基化 Fab'(pyr-Fab')在 Capto MMC 樹脂上之結合行為。吡啶基化 Fab'池負載至 Capto™ MMC 樹脂上。Fab'單體經預測在梯度中比 pyr-Fab'更早溶離，而 HMWS 及 Fab'均二聚體經預測在梯度中稍後溶離。第二 Fab'分子 Fab' B 自 CaptoL 層析樹脂溶離且接著經氧化。

【0445】 含有吡啶基化 Fab'A 及經氧化 Fab'B 之兩個 Fab'池接著經受適用於組裝 F(ab')₂ 雙特異性分子之條件。組合吡啶基化 Fab'A 及經氧化 Fab' B CaptoL 池。經組合之池保持最少組裝時間以允許形成 F(ab')₂ 雙特異性。該組裝池接著經調節用於負載至下一層析管柱上。

【0446】 執行低解析度 Kp (亦即，分配係數)篩選以表徵 F(ab')₂ 組裝混合物在不同層析樹脂上之結合行為。組裝混合物(0%聚集體、21.5% Fab'A 均二聚體、43.9% F(ab')₂、10.3% Fab' A 單體、8.8%吡啶基化 Fab' A、及 15.5% Fab' B 單體，如藉由 SEC-HPLC 所量測)藉由以 5 g/L 樹脂負載密度負載至以下樹脂上來測試：Capto™ MMC 樹脂、Capto™ Adhere 樹脂、QSFF 樹脂或 POROS® 50HS 樹脂。各流通板之蛋白組成及蛋白濃度經由 SEC-HPLC 進行分析。此等資料去捲積且用於產生對應於 F(ab')₂、Fab' A 均二聚體、Fab' B 均二聚體、Fab' A 單體及 Fab' B 單體在四種樹脂之每一者上在測試條件下之行為的輪廓圖。

【0447】 基於該等輪廓圖，Capto™ Adhere 經預測解析 Fab' A 單體、Fab' A 均二聚體及 Fab' B 均二聚體。特定言之，在 Capto™ Adhere 樹脂上之結合及 pH 梯度溶離中，Fab' A 單體及 Fab' B 均二聚體經預測比 F(ab')₂ 主峰

更早溶離，而 Fab' A 均二聚體經預測保持結合於樹脂。關於 QSFF 之輪廓圖示出，該等物質均未經預測針對所測試之 pH 範圍結合於 QSFF 樹脂，指示 F(ab')₂ 與產物相關雜質之分離將不會經由 QSFF 層析實現。混合模式樹脂提供在實驗條件下 F(ab')₂ 與產物相關雜質之最佳分離。Capto™ MMC 輪廓圖示出，Capto™ MMC 經預測在 pH 5.5 下使 F(ab')₂ 與其產物特異性雜質有效地分離。

【0448】 在 F(ab')₂ 雙特異性之組裝之後，該組裝池經受使用 CaptoAdhere 樹脂之多模式 AEX 層析。該組裝池經滴定至 pH 7.5 且經稀釋至 ≤ 5.5 mS/cm 之電導率。管柱用 25 mM 乙酸钠、50 mM Tris pH 7.5 平衡緩衝液平衡。該組裝池以 25 g/L 樹脂之負載密度負載至管柱上。該管柱接著用平衡緩衝液洗滌。該管柱使用 25 mM 乙酸钠、45 mM MES、5 mM Tris pH 5.5 溶離緩衝液溶離且溶離池藉由 A280 吸光度彙集。

【0449】 在多模式 AEX 之後，該材料負載至以結合及溶離模式操作之 Poros 50 HS 樹脂上。該 Poros 50 HS 管柱用 52 mM 乙酸钠(pH 4.9)平衡。負載經調節至 pH 5 且電導率 ≤ 3.3 mS/cm。該管柱用平衡緩衝液洗滌。該管柱接著用 169 mM 乙酸钠(pH 4.9)洗滌。該管柱使用分步溶離使用 247 mM 乙酸钠 pH 4.9 溶離緩衝液溶離。藉由 A280 收集該池。

【0450】 來自 POROS 50 HS 步驟之池接著經受使用 CaptoMMC 樹脂之多模式 CEX 層析。該多模式 CEX 步驟以結合及溶離溶離操作。管柱使用 50 mM 乙酸钠 pH 5.5 平衡緩衝液平衡。負載經調節至 pH 5.0 且電導率 ≤ 5 mS/cm 且負載至該管柱上至 15 g/L 之負載密度。該管柱用平衡緩衝液洗滌。該管柱接著用 140 mM 乙酸钠 pH 5.5 洗滌 2 緩衝液洗滌。該管柱用梯度溶離使

用平衡緩衝液及 350 mM 乙酸鈉 pH 5.5 溶離緩衝液溶離。藉由 A280 收集該池。

【0451】 如表 12 所示，與使用 POROS®HS 樹脂時相比，當使用 Capto™ MMC 樹脂時實現所關注之 F(ab')₂ 雙特異性產物(100 kD)與大腸桿菌蛋白及 71 kD 錯誤成形之二硫化物產物的改良分離。使用 CaptoMMC 作為第四管柱實現如藉由 SEC 所量測大於 95% Fab'2 雙特異性之純度。使用 CaptoMMC 作為第四管柱亦實現少於 5%之 71 kD 錯誤成形之二硫化物產物相關變異體。

表 12：F(ab')₂ 與宿主細胞及產物相關雜質之分離(POROS® HS 樹脂，結合及溶離模式對 Capto™ MMC，結合及溶離模式)

池	產率(%)	%F(ab') ₂ (SEC)	% 100 kD 物質	% 71 kD 物質	ECP (ppm)
負載材料(Capto Adhere池)	--	72.7	66.6	4.7	547
Poros®池(第 4 管柱)	72	93.9	90.1	5.2	42
Capto™ MMC 池(第 4 管柱)	60	96.0	93.1	4.5	21

% F(ab')₂=藉由 SEC 量測之%雙特異性；100 kD =藉由 CE-SDS 量測之所關注之 F(ab')₂ 雙特異性產物；71 kD =藉由 CE-SDS 量測之具有錯誤成形之二硫化物的產物相關變異體；ECP =大腸桿菌蛋白

【0452】 因此，圖 2 中所描繪之純化方案顯著改良純 F(ab')₂ 之產率且如與負載材料相比，降低存在於經純化 F(ab')₂ 池中之宿主細胞蛋白的量超過 99%。

實例 3：抗 X2/抗 Y2 雙特異性抗體之組裝及純化

【0453】 在另一實例中，如下純化雙特異性抗體。各半抗體獨立地產生

且經受親和力層析，隨後如本文所述之組裝。在組裝之後，組裝材料首先經受使用 Capto™ Adhere 樹脂呈結合及溶離模式之多模式陰離子交換層析。組裝材料經調節至 pH 7.5 且負載至用 150 mM 乙酸鹽/Tris 緩衝液(pH 7.5)預平衡之管柱上。在負載之後，該管柱用平衡緩衝液洗滌且結合之蛋白用 25 mM 乙酸鹽(pH 5.0)溶離。基於 A280 nm 信號觸發溶離池之收集。Capto™ Adhere 溶離池接著經受使用 Capto™ MMC 樹脂呈結合及溶離模式之多模式陽離子交換層析。該 Capto Adhere 溶離池經調節至 pH 6.5 且負載至在 25 mM 乙酸鹽、25 mM MES pH 6.5 緩衝液中預平衡之 Capto MMC 管柱上。在負載之後，該 Capto™ MMC 管柱用平衡緩衝液洗滌且結合之蛋白用 150 mM 乙酸鈉、25 mM MES pH 6.5. Capto™ MMC 溶離緩衝液溶離。池收集基於 A280 nm 信號。此純化方案描繪於圖 3A 中。

【0454】 如下文表 13 及 14 中所示，如與 Capto™ Adhere 層析、隨後 QSFF 層析(參見圖 3B)相比，當 Capto™ Adhere 層析後接 Capto™ MMC 層析(參見圖 3A)時，實現雙特異性抗體與諸如大腸桿菌蛋白及伴侶蛋白(例如 fkpA、dsbA 及 dsbC)之過程特異性雜質的更大分離。此外，如與 Capto™ Adhere 層析、隨後 QSFF 層析(參見圖 3B)相比，當 Capto™ Adhere 層析後接 Capto™ MMC 層析(參見圖 3A)時，實現雙特異性抗體與諸如極高分子量物質(vHMWS)、高分子量物質(HMWS)及低分子量物質(LMWS)之產物特異性雜質的更大分離。參見表 13 及 14。

表 13：在抗 X2/Y2 過程中用 Capto™ Adhere-QSFF 步驟實現之過程及產物特異性雜質的清除

步驟	水準，ppm	水準，%
----	--------	------

【0400】	ECP	FkpA	DsbA	DsbC	vHMWS	HMWS	主要	LMWS
抗 X2 MSS	6872	3983	38	80	0.1	4.1	NA	NA
抗 Y2 MSS	7640	2660	46	120	0.5	11.5	NA	NA
組裝	3441	1841	31	94	3.4	11.0	82	0.5
Capto™ Adhere	118	1689	5	35	1.6	5.8	95	0.0
QSFF	72	520	3	31	0.0	1.4	98	0.1

表 14：在抗 X2/Y2 過程中用 Capto™ Adhere-Capto™MMC 步驟實現之過程
及產物相關雜質的清除

步驟	水準，ppm				水準，%			
	ECP	FkpA	DsbA	DsbC	vHMWS	HMWS	主要	LMWS
抗 X2 MSS	27090.5	3124	17	59	0.35	5.6	NA	NA
抗 Y2 MSS	5113.5	2632	23	79	3	11.6	NA	NA
組裝	1566	1782	18	39	6.1	8.2	83.7	2.1
Capto™ Adhere	49.5	1387	5	107	1.45	2.1	95.8	0.6
Capto™ MMC	15	96	1	2	0.15	0.25	99.55	0

【0455】 上述實驗證明了如與圖 3B 中描繪之純化方案(亦即，其中多模式陰離子交換層析後接傳統陽離子交換層析)相比，圖 3A 中描繪之純化方案(亦即，其中多模式陰離子交換層析後接多模式陽離子交換層析)實現抗 X2Y2 雙特異性抗體與過程及產物相關雜質之改良分離。另外，如與圖 3B 中描繪之純化方案相比，圖 3A 中描繪之純化方案亦實現抗 X2Y2 雙特異性抗體之改良產率。

實例 4：抗 X3/抗 Y3 雙特異性抗體之組裝及純化

【0456】 抗 X3 杵半抗體經捕捉於蛋白 A 管柱上。管柱首先使用 25 mM Tris、25 mM 氯化鈉 pH 7.7 平衡緩衝液平衡。含有抗 X3 半抗體之大腸桿菌萃取物上清液接著負載至該管柱上。在負載該萃取物上清液之後，該管柱用平衡緩衝液、隨後 0.4 M 磷酸鉀 pH 7 洗滌緩衝液洗滌，且接著用平衡緩衝液洗滌。抗 X3 半抗體接著使用 0.15 M 乙酸 pH 2.9 溶離緩衝液溶離。藉由 A280 收集該溶離池。該溶離池經滴定至 pH 5.0 且接著儲存直至與抗 Y3

白半抗體組合。該抗 Y3 白半抗體使用關於抗 X3 半抗體所述之相同蛋白 A 過程經捕捉。

【0457】 該兩種半抗體以 1:1 質量比率組合。精胺酸添加至組裝池中至 50 mM 之最終濃度。經組合半抗體之池用 200 mM 組胺酸、8% PVP (pH 8) 1:1 稀釋。添加 L-還原麩胱甘肽至 200X 莫耳過量(每莫耳雙特异性抗體 200 莫耳麩胱甘肽)以組裝該兩種半抗體。該組裝池經滴定至 pH 8.0 且接著加熱至攝氏 35 度持續六個小時。該池接著冷卻至室溫且經調節用於負載於下一層析管柱上。

【0458】 該組裝池負載於 QSFF 陰離子交換管柱上。該管柱首先用 25 mM Tris、350 mM 氯化鈉(pH 9.1)，隨後用 25 mM Tris、70 mM 氯化鈉 pH 9.1 平衡緩衝液預平衡。經調節之負載接著在 pH 8.5、電導率 ≤ 4.9 mS/cm 下應用於該管柱。該管柱接著用平衡緩衝液洗滌。該池接著使用平衡緩衝液及 25 mM Tris、350 mM 氯化鈉溶離緩衝液溶離。藉由 A280 收集該溶離池。

【0459】 該 QSFF 池接著經調節以負載至下一管柱上。CaptoAdhere 多模式陰離子交換管柱用 500 mM 乙酸鈉 pH 6.0 預平衡緩衝液預平衡，隨後用八個管柱體積之 50 mM 乙酸鈉 pH 6.0 平衡緩衝液平衡。經調節之負載在 pH 6.0、電導率 ≤ 12 mS/cm 下應用於該管柱。該管柱接著用平衡緩衝液、隨後 0.1 M 精胺酸 pH 7.0 電導率 7.5 mS/cm 洗滌緩衝液洗滌，且接著用平衡緩衝液洗滌。該管柱接著用梯度溶離使用 50 mM 乙酸鈉 pH 5.0 溶離緩衝液溶離。藉由 A280 收集該溶離池。

【0460】 該 CaptoAdhere 池接著經調節以負載至下一管柱上。CaptoMMC 多模式陽離子交換管柱用 350 mM 乙酸鈉 pH 6.0 預平衡緩衝液預平衡，隨

後用 50 mM 乙酸鈉 pH 6.0 平衡緩衝液平衡。經調節之負載在 pH 6.0、電導率 ≤ 6.5 mS/cm 下應用於該管柱。該管柱接著用 80 mM 乙酸鈉 pH 6.0 洗滌緩衝液洗滌。該管柱接著用梯度溶離使用 350 mM 乙酸鈉 pH 6.0 溶離緩衝液溶離。藉由 A280 收集該溶離池。此純化方案描繪於圖 4 中。

【0461】 如下文表 15 所示，僅包含一個多模式管柱之三管柱過程(亦即，蛋白 A、隨後 QSFF、隨後 Capto™ Adhere)不實現充足 ECP 移除。使用 Capto™ MMC 層析使 Capto™ Adhere 層析之溶離物經受第四層析管柱會相對於 Capto™ Adhere 池使大腸桿菌蛋白之水準減少超過三倍，使 HMWS 降低至低於 1%，且使雙特異性含量增加至 100%。

表 15

步驟	%產率	% HMWS	%雙特異性	ECPs (ng/mg)
抗 X3 MSS	101	4	-	1513
抗 Y3 MSS	89	6	-	1864
組裝	100	11.4	88	2022
QSFF	65	1.6	96	597
CaptoAdhere	89	1.3	98	297
CaptoMMC	76	0.7	100	86

HMWS =藉由 SEC 量測之高分子量物質；%雙特異性=藉由逆相 HPLC 量測之%雙特異性抗體；ECP =大腸桿菌宿主細胞蛋白

實例 5：用於實例 6 及 7 之材料及方法

抗體

【0462】 實例 6-7 使用多種例示性抗體，包括：如 WO 2011/117329 中所述結合 Ang2 及 VEGF-A 之雙特異性抗體(抗 Ang2/VEGF-A 抗體；瓦紐賽單抗；RG7221)或 SEQ ID NO: 1 至 SEQ ID NO: 4 或如 WO 2014/009465 中所述針對 VEGF-A 及 Ang2 之雙特異性抗體(抗 VEGF-A/Ang2 抗體；RG7716)

或 SEQ ID NO: 5 至 SEQ ID NO: 8。本文中亦包括如下文實例中所述之多種抗體。

【0463】 本文所述或所提及之技術及程序一般為熟習此項技術者充分瞭解的且通常使用習知方法使用，該習知方法諸如 Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第 3 版 (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. ; Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel 等人編, (2003)) ; the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.) ; Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R.I. Freshney 編 (1987)) ; Methods in Molecular Biology, Humana Press ; Cell Biology: Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather 及 P.E. Roberts, 1998) Plenum Press ; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle、J.B. Griffiths 及 D.G. Newell 編, 1993-8) J. Wiley and Sons ; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir 及 C.C. Blackwell 編) ; Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan 等人編, 1991) ; Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999) ; Immunobiology (C.A. Janeway 及 P. Travers, 1997) ; Antibodies (P. Finch, 1997) ; Antibodies: A Practical Approach (D. Catty. 編, IRL Press, 1988-1989) ; Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd 及 C. Dean 編, Oxford University Press, 2000) ; Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow 及 D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999) ; 及 The Antibodies (M. Zanetti 及 J. D. Capra 編, Harwood Academic Publishers, 1995)中所述之廣泛使用方法。

藉由尺寸排除(SE ; Size Exclusion) HPLC 獲得之純度

【0464】 使用 SE HPLC 以在原生條件下藉由使用 SE HPLC 管柱分離抗體聚集體、單體及片段來監測尺寸異質性。溶離物藉由 UV 吸光度來監測。純度經確定為主峰、HMWS 形式之總和及 LMWS 形式之總和相對於所偵測之所有蛋白峰全體的百分率(面積)。

藉由離子交換(IE ; Ion Exchange) HPLC 獲得之純度

【0465】 使用梯度離子交換層析以藉由使用陽離子交換管柱分離用羧基肽酶 B 處理之樣品至主峰、酸性區及鹼性區中來定量監測樣品的電荷異質性。藉由 UV 吸光度執行偵測。純度經確定為主峰、酸性區及鹼性區相對於所偵測之所有蛋白峰全體的百分率(面積)。

藉由 CE-SDS (Caliper)獲得之純度

【0466】 用於蛋白之電泳分離之習知 SDS-PAGE 方法已轉換為 Caliper GXII/LabChip GX 分析系統(Caliper LifeScience, Inc./Perkin Elmer)中之晶片形式。蛋白藉由其各別尺寸經分離。製備樣品，接著藉由用螢光染料標記來分離，該等螢光染料可根據製造商之說明書經偵測及分離。

【0467】 在使用微流體 Labchip 技術(Caliper Life Science, USA)藉由 CE-SDS 進行各純化步驟之後，分析純度及抗體完整性。因此，分析物溶液經製備且在 LabChip GXII 系統上使用 HT 蛋白表現晶片加以分析。使用 LabChip GX 軟體分析資料。

藉由 UV 獲得之蛋白含量

【0468】 藉由 UV 測定樣品之蛋白濃度。蛋白吸收藉由自 280 nm 下之吸收減去 320 nm 下之吸收來校正。此吸光度值與蛋白濃度成正比。使用 1.5 mL mg⁻¹ cm⁻¹ 之消光係數來計算蛋白濃度。

用於宿主細胞蛋白(HCP)及 DNA 含量之偵測方法

a) CHO HCP 分析

【0469】 過程樣品中之殘餘 CHO HCP 含量藉由在 cobas e 411 免疫分析分析儀(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)上進行電化學發光免疫分析(ECLIA)來測定。

【0470】 該分析係基於使用來自山羊之多株抗 CHO HCP 抗體之夾心原則。

【0471】 首次培育：來自 15 μ L 樣品(純及/或經稀釋)之中國倉鼠卵巢宿主細胞蛋白(CHO HCP)及生物素結合之多株 CHO HCP 特異性抗體形成夾心複合物，該複合物經由生物素與抗生蛋白鏈菌素之相互作用結合於抗生蛋白鏈菌素塗佈之微粒。

【0472】 第二次培育：在添加用釐複合物(三(2,2'-聯吡啶基)釐(II)-複合物)標記之多株 CHO HCP 特異性抗體之後，在微粒上形成三重夾心複合物。

【0473】 該反應混合物經抽吸至量測元件中，其中該等微粒經磁性捕捉至電極之表面上。未結合物質接著在洗滌步驟中移除。向該電極施加電壓接著誘導化學發光發射，該發射藉由光電倍增器量測。

【0474】 測試樣品中 CHO HCP 之濃度最終自己知濃度之 CHO HCP 標準曲線計算。

b) DNA 含量

【0475】 基於 q PCR 之分析用於 CHO DNA 之偵測及定量。來自樣品之 DNA 用商業 RNA 萃取套組使用基於矽膠之膜萃取。經萃取之 DNA 用序列偵測系統使用 PCR 引子及探針經受定量即時 PCR。擴增子(經擴增產物)與

在 DNA 擴增期間持續量測之螢光發射的增加呈正比例定量。使用標準曲線定量樣品中 CHO 細胞 DNA 之量。

實例 6：結合 *Ang2* 及 *VEGF-A* 之雙特異性抗體(如 WO 2011/117329 中所述之抗 *Ang2*/抗 *VEGF-A* 抗體)的純化

【0476】 自 CHO 表現培養物收集之細胞培養液(HCCF)藉由呈結合-溶離模式之 MabSelect SuRe 親和力層析加工。在 HCCF 負載至管柱上至 38 g_{mAb}/l 樹脂之最大負載密度之後，該管柱用 25 mM Tris、25 mM NaCl (pH 7.2)洗滌持續 5 個管柱體積。接著，用 0.7 M Tris/HCl (pH 7.2)執行額外洗滌持續五個管柱體積。使用高度純化水或 10 mM Tris/HCl pH 7.5 進行第三洗滌步驟。管柱結合之抗體使用 50 mM 乙酸鹽(pH 3.4)溶離。基於 500 至 250 mAU (路徑長度 1 cm)之 OD₂₈₀，經最大三個管柱體積收集溶離池。

【0477】 該親和力溶離池用乙酸調節至 pH 3.5 且保持 30 min。該池接著用 1.5 M Tris 鹼調節至 pH 5.0 且藉由深層過濾清除。該深層過濾池使用 1.5 M Tris 鹼調節至 pH 7 且用作使用多模式陰離子交換樹脂 Capto adhere ImpRes 之第二層析步驟的饋料。

【0478】 該 Capto adhere ImpRes 管柱用 50 mM Tris 乙酸鹽(pH 7.0)平衡。該平衡管柱經負載直至 180 g_{mAb}/l 樹脂之負載密度且用 20 mM Tris 乙酸鹽(pH 7.0)洗滌。基於 1000 至 4000 mAU (路徑長度 1 cm)之 OD₂₈₀ 收集該溶離池。

【0479】 該第二層析步驟之池用乙酸調節至 pH 5.0 且用作使用多模式陽離子交換樹脂 Capto MMC ImpRes 之最終第三層析步驟的饋料。該第三層析步驟以結合及溶離模式運行。該 Capto MMC ImpRes 管柱用 30 mM Tris/乙酸鹽 pH 5.0 (平衡緩衝液)平衡。該平衡管柱經負載直至 45 g_{mAb}/l 樹脂之負

載密度且用平衡緩衝液洗滌持續五個管柱體積。使用 30 mM Tris/乙酸鹽(pH 6.8)執行第二洗滌持續十個管柱體積，隨後使用平衡緩衝液持續五個管柱體積。使用 30 mM Tris/乙酸鹽(pH 4.9)、500 mM 硫酸鈉執行最終洗滌步驟持續十個管柱體積。管柱結合之抗體使用 30 mM Tris/乙酸鹽(pH 6.0)、500 mM 硫酸鈉溶離。基於 3600 至 1000 mAU (路徑長度 1 cm)之 OD₂₈₀收集該溶離池。

【0480】 該第三層析步驟之池經濃縮且經緩衝液交換至調配緩衝液中。上述純化方案描繪於圖 5A 中。

表 16：在各別層析步驟之後產物及過程特異性雜質之分析資料

Ang2/VEGF	Caliper，未減少		
	¾抗體[%]	前峰[%]	主峰[%]
MabSelect SuRe 溶離池	1.8	8.4	91.6
Capto adhere ImpRes 溶離池	1.1	5.9	94.1
Capto MMC ImpRes (C3)溶離池	0.4	2	98
Ang2/VEGF	SE-HPLC		
	HMW [%]	主峰[%]	LMW [%]
MabSelect SuRe 溶離池	5.5	94.2	0.32
Capto adhere ImpRes 溶離池	0.9	98.9	0.25
Capto MMC ImpRes (C3)溶離池	0.7	99.2	0.02
Ang2/VEGF	IE-HPLC		
	酸性[%]	主峰[%]	鹼性[%]
MabSelect SuRe 溶離池	29.8	29.8	29.8
Capto adhere ImpRes 溶離池	24.4	24.4	24.4
Capto MMC ImpRes (C3)溶離池	26.4	26.4	26.4
Ang2/VEGF	HCP		DNA
	HCP [ng/mg]		DNA [pg/mg]
MabSelect SuRe 溶離池	159		17
Capto adhere ImpRes 溶離池	11		1
Capto MMC ImpRes (C3)溶離池	2		n.d.

表 17：與使用包含親和力層析、陽離子交換層析、疏水性相互作用層析及陰離子交換層析之 4 種層析管柱的過程(4 管柱(4C)過程)之比較

	Ang2/VEGF 3C過程 (參見5A)	Ang2/VEGF 4C過程 (參見5B)
總體產率[%]	約50	約48
SE-HPLC面積[%]		
主峰	99.3	98.7
HMW形式之總和	0.7	1.1
HCP [ng/mg]	2	3
DNA [pg/mg]	<0.1	<0.1
主峰[%] (Caliper)	98	96
IE-HPLC面積[%]		
主峰	57	57
酸性峰	26	30
鹼性峰	17	12

【0481】 可見如與使用包含捕捉層析、傳統陽離子交換層析、疏水性相互作用層析及傳統陰離子交換層析之四管柱過程相比，藉由使用包含 MabSelectSure、Capto adhere 及 Capto MMC ImpRes HHL 之三管柱過程，可減少諸如 3/4 抗體、前峰、HMWS、LMWS 之產物相關雜質及諸如 HCP 及 DNA 之過程相關雜質。

實例 7：針對 VEGF-A 及 Ang2 之雙特異性抗體(如 WO 2014/009465 中所述之抗 VEGF-A/抗 Ang2 抗體)的純化

【0482】 自 CHO 表現培養物收集之細胞培養液(HCCF)藉由呈結合-溶離模式之 Capture Select FcXL 親和力層析加工。在 HCCF 負載至管柱上至 25 g_{mAb}/l_{樹脂}之最大負載密度之後，該管柱用 25 mM Tris/HCl、25 mM NaCl (pH 7.2)洗滌持續 2 個管柱體積。接著，用純化水 PWII 執行額外洗滌持續五個

管柱體積。管柱結合之抗體使用 30 mM 乙酸(pH 3.2)溶離。基於 2500 至 1000 mAU (路徑長度 1 cm)之 OD₂₈₀收集該溶離池。

【0483】 該親和力溶離池用乙酸調節至 pH 3.4 且保持 60 min。該池接著用 1.5 M Tris 鹼調節至 pH 5.0 且藉由深層過濾清除。該深層過濾池使用 1.5 M Tris 鹼調節至 pH 7 且用作使用多模式陰離子交換樹脂 Capto adhere 之第二層析步驟的饋料。由於負載之電導率<5 mS/cm，不必要調節電導率。

【0484】 該 Capto adhere 管柱用 50 mM Tris/乙酸鹽(pH 7.0)平衡。該平衡管柱經負載直至 170 g_{mAb}/l_{樹脂}之負載密度且用 50 mM Tris/乙酸鹽(pH 7.0) (=平衡緩衝液)洗滌。基於 1000 至 2500 mAU (路徑長度 1 cm)之 OD₂₈₀，經最多 3 個 CV 洗滌收集溶離池。

【0485】 該第二層析步驟之池用乙酸調節至 pH 5.0 且用作使用多模式陽離子交換樹脂 Capto MMC ImpRes 之最終第三層析步驟的饋料。該第三層析步驟以結合及溶離模式運行。該 CaptoMMC ImpRes 管柱用 30 mM Tris/乙酸鹽、30 mM Tris/檸檬酸鹽(pH 5.0)平衡。該平衡管柱經負載直至 30 g_{mAb}/l_{樹脂}之負載密度且用平衡緩衝液洗滌持續五個管柱體積。使用 30 mM Tris/乙酸鹽、30 mM Tris/檸檬酸鹽、150 mM NaCl (pH 5.0)執行第二洗滌持續十個管柱體積，隨後使用平衡緩衝液持續五個管柱體積。使用 30 mM Tris/乙酸鹽、30 mM Tris/檸檬酸鹽、500 mM NaCl (pH 4.5)執行最終洗滌步驟持續十個管柱體積。管柱結合之抗體使用 0-50% B 之 pH/鹽梯度在 40 個管柱體積中溶離。緩衝液 A 為平衡緩衝液 30 mM Tris/乙酸鹽、30 mM Tris/檸檬酸鹽 (pH 5.0)且緩衝液 B 為 30 mM Tris/乙酸鹽、30 mM Tris/檸檬酸鹽、1.5 M NaCl (pH 8.5)。基於 250 至 4500 mAU (路徑長度 1 cm)之 OD₂₈₀收集該溶離池。

表 18：在各別層析步驟之後產物及過程特異性雜質之分析資料

	Caliper，未減少		
VEGF/Ang2	%抗體[%]	前峰[%]	主峰[%]
Capture Select FcXL 溶離池	2.57	8.43	91.16
Capto adhere 溶離池	1.64	5.84	94.16
Capto MMC ImpRes 溶離池	1.23	2.37	97.63
	SE-HPLC		
VEGF/Ang2	HMW [%]	主峰[%]	LMW [%]
Capture Select FcXL 溶離池	10.1	89.5	0.5
Capto adhere 溶離池	2.1	97.3	0.55
Capto MMC ImpRes 溶離池	0.7	99.3	0.04
	IE-HPLC		
VEGF/Ang2	酸性[%]	主峰[%]	鹼性[%]
Capture Select FcXL 溶離池	29.7	57.2	13.1
Capto adhere 溶離池	26.2	62.7	11.1
Capto MMC ImpRes 溶離池	25.8	67.3	7
	HCP	DNA	
VEGF/Ang2	HCP [ng/mg]	DNA [pg/mg]	
Capture Select FcXL 溶離池	8615	210	
Capto adhere 溶離池	484	1.4	
Capto MMC ImpRes 溶離池	7	1.7	

表 19：與使用包含親和力層析、陽離子交換層析、疏水性相互作用層析及陰離子交換層析之 4 種層析管柱的過程(4 管柱(4C)過程)之比較

	VEGF/Ang2 3C過程	VEGF/Ang2 4C過程
總體產率[%]	約40	約25-35
SE-HPLC面積[%]		
主峰	99.3	98.8
HMW形式之總和	0.7	
HCP [ng/mg]	7	1
DNA [pg/mg]	1.7	<0.1
主峰[%] (Caliper/CE SDS)	97.6	94.6
IE-HPLC面積[%]		
主峰	67.3	72.2

酸性峰	25.8	23.1
鹼性峰	7.0	4.7

【0486】 可見藉由使用 Capto Adhere 及 Capto MMC ImpRes HHL，可減少諸如 3/4 抗體、前峰、HMWS、LMWS 之產物相關雜質及諸如 HCP 及 DNA 之過程相關雜質。

實例 8：抗 X1/抗 Y1 雙特異性抗體之組裝及純化

【0487】 針對靶標蛋白 X1 及 Y1 之雙特異性抗體(抗 X1/抗 Y1 雙特異性抗體或 aX1/Y1 雙特異性)組裝如下。如實例 1 中所述，各半抗體(aX1 (杵)及 aY1 (臼))獨立地經受使用蛋白 A 樹脂(MabSelect SuRe, GE Healthcare)之親和力層析步驟。

【0488】 獲自蛋白 A 層析步驟之半抗體池接著如實例 1 中所述以 1:1 莫耳比率組合且組裝。pH 經調節之經組裝之池接著經受使用 Capto™ Adhere 樹脂呈流通模式之多模式陰離子交換層析。該 Capto™ Adhere 管柱如實例 1 中所述達到平衡。來自雙特異性組裝步驟之產物池用純化水調節至 9.0 mS/cm 之電導率且負載至管柱上。該雙特異性抗體流動通過該管柱，該管柱接著用平衡緩衝液洗滌。陰離子交換彙集基於 280 nm 下之吸光度經起始及終止。

【0489】 該多模式陰離子層析產物池接著經受使用 Capto™ MMC樹脂呈結合及溶離模式之多模式陽離子交換層析。該管柱如實例 1 中所述達到平衡。該多模式陰離子層析產物池如實例 1 中所述經負載及洗滌。該雙特異性抗體如實例 1 中所述藉由在分步溶離中增加鹽及 pH 自管柱中溶離出。陽離子交換彙集基於 280 nm 下之吸光度經起始及終止。上述純化方案描繪於

圖 7A 中。

【0490】 使用圖 7A 中所示之純化方案實現的該雙特異性抗體與產物相關及過程相關雜質之分離程度與使用圖 7B 及 7C 中所示之純化方案實現的分離程度相比較。

【0491】 重複上述實驗，且自該親和力層析步驟彙集之材料摻加 20% 白均二聚體。使用圖 7A 中所示之純化方案實現的該雙特異性抗體與產物相關及過程相關雜質之分離程度再一次與使用圖 7B 及 7C 中所示之純化方案實現的分離程度相比較。

實施例清單

1. 一種用於自包含多特異性抗體及雜質之組合物純化該多特異性抗體之方法，其中該多特異性抗體包含多個臂，各臂包含 VH/VL 單元，該方法包含依序步驟：

a) 使該組合物經受捕捉層析以產生捕捉層析溶離物；

b) 使該捕捉層析溶離物經受第一混合模式層析以產生第一混合模式溶離物；

及

c) 使該第一混合模式溶離物經受第二混合模式層析以產生第二混合模式溶離物；及

d) 收集包含該多特異性抗體之部分，

其中該方法減少該組合物中之產物特異性雜質的量。

2. 實施例 1 之方法，其中該捕捉層析溶離物在該第一混合模式層析之前經受離子交換或 HIC 層析。

3. 一種用於自包含多特異性抗體及雜質之組合物純化該多特異性抗體之方

法，其中該多特異性抗體包含多個臂，各臂包含 VH/VL 單元，其中該多特異性抗體之各臂獨立地產生，該方法包含依序步驟：

- a)使該多特異性抗體之各臂經受捕捉層析以針對該多特異性抗體之各臂產生捕捉溶離物，
- b)在足以產生包含該多特異性抗體之組合物的條件下形成包含該多特異性抗體之各臂的捕捉溶離物之混合物，
- c)使該包含該多特異性抗體之組合物經受第一混合模式層析以產生第一混合模式溶離物，及
- d)使該第一混合模式溶離物經受第二混合模式層析以產生第二混合模式溶離物；及
- e)收集包含該多特異性抗體之部分，

其中該方法減少該組合物中之產物特異性雜質的量。

4.實施例 3 之方法，其中該包含該多特異性抗體之組合物在該第一混合模式層析之前經受離子交換或 HIC 層析。

5.實施例 1-4 中任一者之方法，其中該捕捉層析為親和力層析。

6.實施例 5 之方法，其中該親和力層析為蛋白 L 層析、蛋白 A 層析、蛋白 G 層析、蛋白 A 及蛋白 G 層析。

7.實施例 5 或實施例 6 之方法，其中該親和力層析為蛋白 A 層析。

8.實施例 1-7 中任一者之方法，其中該捕捉層析以結合及溶離模式進行。

9.實施例 1-8 中任一者之方法，其中該第一混合模式層析及該第二混合模式層析為鄰近的。

10.實施例 1-9 中任一者之方法，其中該第一混合模式層析為混合模式陰離

子交換層析。

11.實施例 1-10 中任一者之方法，其中該第二混合模式層析為混合模式陽離子交換層析。

12.實施例 1-9 中任一者之方法，其中該第一混合模式層析為混合模式陽離子交換層析。

13.實施例 1-10 及 12 中任一者之方法，其中該第二混合模式層析為混合模式陰離子交換層析。

14.實施例 1-13 中任一者之方法，其中該第一混合模式層析以結合及溶離模式進行。

15.實施例 14 之方法，其中該溶離為梯度溶離。

16.實施例 1-13 中任一者之方法，其中該第一混合模式層析以流通模式進行。

17.實施例 1-16 中任一者之方法，其中該第二混合模式層析以結合及溶離模式進行。

18.實施例 17 之方法，其中該溶離為梯度溶離。

19.實施例 1-16 中任一者之方法，其中該第二混合模式層析以流通模式進行。

20.實施例 1-19 中任一者之方法，其進一步包含使該第二混合模式溶離物經受超濾之步驟。

21.實施例 20 之方法，其中該超濾依序包含第一超濾、透濾及第二超濾。

22.實施例 7-21 中任一者之方法，其中該蛋白 A 層析包含連接至瓊脂糖之蛋白 A。

- 23.實施例 7-21 中任一者之方法，其中該蛋白 A 層析為 MAbSelect™、MAbSelect™ SuRe 及 MAbSelect™ SuRe LX、Prosep-VA、Prosep-VA Ultra Plus、蛋白 A 瓊脂糖速流或 Toyopearl 蛋白 A 層析。
- 24.實施例 7-23 中任一者之方法，其中該蛋白 A 層析使用蛋白 A 平衡緩衝液、蛋白 A 載樣緩衝液或蛋白 A 洗滌緩衝液中之一或多者，其中該平衡緩衝液、載樣緩衝液及/或洗滌緩衝液在約 pH 7 與約 pH 8 之間。
- 25.實施例 24 之方法，其中該蛋白 A 平衡緩衝液為約 pH 7.7。
- 26.實施例 24 或實施例 25 之方法，其中該蛋白 A 平衡緩衝液包含約 25 mM Tris 及約 25 mM NaCl。
- 27.實施例 24-26 中任一者之方法，其中該蛋白 A 層析在載樣之後用平衡緩衝液洗滌。
- 28.實施例 7-27 中任一者之方法，其中該多特异性抗體藉由 pH 分步溶離自蛋白 A 層析溶離。
- 29.實施例 7-28 中任一者之方法，其中該多特异性抗體藉由向蛋白 A 層析應用具有低 pH 之蛋白 A 溶離緩衝液而自該蛋白 A 溶離。
- 30.實施例 29 之方法，其中該蛋白 A 溶離緩衝液包含約 150 mM 乙酸(約 pH 2.9)。
- 31.實施例 7-30 中任一者之方法，其中彙集蛋白 A 溶離物，其中該溶離物之 OD₂₈₀ 大於約 0.5。
- 32.實施例 10-31 中任一者之方法，其中該陰離子交換混合模式層析包含四級胺及疏水性部分。
- 33.實施例 32 之方法，其中該陰離子交換混合模式層析包含連接至高度交聯

瓊脂糖之四級胺及疏水性部分。

34.實施例 33 之方法，其中該混合模式層析為 Capto™ Adhere 層析或 Capto™ Adhere ImpRes 層析。

35.實施例 11-34 中任一者之方法，其中該陽離子交換混合模式層析包含 N-苯甲基-n-甲基乙醇胺。

36.實施例 35 之方法，其中該混合模式層析為 Capto™ MMC 層析或 Capto™ MMC ImpRes 層析。

37.實施例 1-36 中任一者之方法，其中該第一混合模式層析使用混合模式預平衡緩衝液、混合模式平衡緩衝液、混合模式載樣緩衝液或混合模式洗滌緩衝液中之一或多者，且其中該混合模式預平衡緩衝液、該混合模式平衡緩衝液、該混合模式載樣緩衝液及/或該混合模式洗滌緩衝液在約 pH 6 與約 pH 7 之間。

38.實施例 1-37 中任一者之方法，其中該第二混合模式層析使用混合模式預平衡緩衝液、混合模式平衡緩衝液、混合模式載樣緩衝液或混合模式洗滌緩衝液中之一或多者，其中該混合模式預平衡緩衝液、該混合模式平衡緩衝液及/或混合模式洗滌緩衝液在約 pH 5 與約 pH 8 之間。

39.實施例 37 或實施例 38 之方法，其中該混合模式預平衡緩衝液、該混合模式平衡緩衝液及/或混合模式洗滌緩衝液為約 pH 6.5。

40.實施例 37-39 中任一者之方法，其中該混合模式預平衡緩衝液包含約 500 mM 乙酸鹽。

41.實施例 37-40 中任一者之方法，其中該混合模式平衡緩衝液包含約 50 mM 乙酸鹽。

- 42.實施例 37-41 中任一者之方法，其中該第一混合模式層析在載樣之後用洗滌緩衝液洗滌。
- 43.實施例 37-42 中任一者之方法，其中該第二混合模式層析在載樣之後用洗滌緩衝液洗滌。
- 44.實施例 15 及 18-43 中任一者之方法，其中該多特異性抗體藉由 pH 梯度自該第一混合模式層析溶離。
- 45.實施例 15 及 18-44 中任一者之方法，其中該多特異性抗體藉由向混合模式離子交換層析應用具有低 pH 之混合模式溶離緩衝液而自該第一混合模式層析溶離。
- 46.實施例 15 及 18-45 中任一者之方法，其中該多特異性抗體藉由 pH 梯度自該第二混合模式層析溶離。
- 47.實施例 15 及 18-46 中任一者之方法，其中該多特異性抗體藉由向混合模式交換層析應用具有低 pH 之混合模式溶離緩衝液而自該第二混合模式層析溶離。
- 48.實施例 2 及 4-47 中任一者之方法，其中該離子交換層析包含四級胺。
- 49.實施例 48 之方法，其中該離子交換層析為陰離子交換層析，且其中該陰離子交換層析包含連接至交聯瓊脂糖之四級胺。
- 50.實施例 49 之方法，其中該混合模式陰離子交換層析為 CaptoAdhere 層析。
- 51.實施例 48-50 中任一者之方法，其中該陰離子交換層析使用陰離子交換預平衡緩衝液、陰離子交換平衡緩衝液或陰離子交換載樣緩衝液中之一或多者，其中該陰離子交換預平衡緩衝液、該陰離子交換平衡緩衝液及/或陰

離子交換載樣緩衝液在約 pH 6 與約 pH 8 之間。

52.實施例 51 之方法，其中該陰離子交換預平衡緩衝液、該陰離子交換平衡緩衝液及/或該陰離子交換載樣為約 pH 6.5。

53.實施例 51 或實施例 52 之方法，其中該陰離子交換預平衡緩衝液包含約 50 mM Tris、500 mM 乙酸鈉。

54.實施例 51-53 中任一者之方法，其中該陰離子交換平衡緩衝液包含約 50 mM Tris。

55.實施例 51-54 中任一者之方法，其中該陰離子交換層析在載樣之後用陰離子交換平衡緩衝液洗滌。

56.實施例 51-55 中任一者之方法，其中該多特异性抗體藉由鹽梯度自該陰離子交換層析溶離。

57.實施例 51-56 中任一者之方法，其中該多特异性抗體藉由向該陰離子交換層析應用具有增加的鹽濃度之陰離子交換溶離緩衝液而自該陰離子交換層析溶離。

58.實施例 57 之方法，其中該陰離子交換溶離緩衝液包含約 50 mM Tris、100 mM 乙酸鈉(在約 pH 8.5 下)。

59.實施例 51-58 中任一者之方法，其中彙集陰離子交換溶離物，其中該溶離物之 OD₂₈₀ 大於約 0.5 至約 2.0。

60.實施例 1-59 中任一者之方法，其中該多特异性抗體之臂在細胞中產生。

61.實施例 60 之方法，其中該細胞為原核細胞。

62.實施例 61 之方法，其中該原核細胞為大腸桿菌細胞。

63.實施例 61 或實施例 62 之方法，其中該細胞經工程改造以表現一或多種

伴侶蛋白。

64.實施例 63 之方法，其中該伴侶蛋白為 FkpA、DsbA 或 DsbC 中之一或多者。

65.實施例 63 或實施例 64 之方法，其中該伴侶蛋白為大腸桿菌伴侶蛋白。

66.實施例 1-60 中任一者之方法，其中該細胞為真核細胞。

67.實施例 66 之方法，其中該真核細胞為酵母細胞、昆蟲細胞或哺乳動物細胞。

68.實施例 66 或實施例 67 之方法，其中該真核細胞為 CHO 細胞。

69.實施例 60-68 中任一者之方法，其中該等細胞在捕捉層析之前經溶解以產生包含該多特異性抗體或該多特異性抗體之臂的細胞溶解產物。

70.實施例 69 之方法，其中該等細胞使用微流化器溶解。

71.實施例 69 或實施例 70 之方法，其中聚乙烯亞胺(PEI)在層析之前添加至該細胞溶解產物中。

72.實施例 1-71 中任一者之方法，其中該方法減少該組合物中宿主細胞蛋白(HCP)、滲出之蛋白 A、核酸、細胞培養基組分或病毒雜質中之任一者的量。

73.實施例 1-72 中任一者之方法，其中該多特異性抗體為雙特異性抗體。

74.實施例 73 之方法，其中該雙特異性抗體為杵臼(KiH)雙特異性抗體。

75.實施例 73 或實施例 74 之方法，其中該雙特異性抗體為 CrossMab 雙特異性抗體。

76.實施例 1-75 中任一者之方法，其中該部分含有至少約 95%多特異性抗體。

77.實施例 1-76 中任一者之方法，其中該產物特異性雜質為非配對抗體臂、

抗體均二聚體、聚集體、高分子量物質(HMWS)、低分子量物質(LMWS)、酸性變異體或鹼性變異體中之一或多者。

78.實施例 77 之方法，其中該部分含有不超過約 5%非配對抗體臂。

79.實施例 77 或實施例 78 之方法，其中該部分含有不超過約 5%抗體均二聚體。

80.實施例 77-79 中任一者之方法，其中該部分含有不超過約 2%聚集體或高分子量物質(HMWS)。

81.實施例 77-80 中任一者之方法，其中該部分含有不超過約 2% LMWS。

82.實施例 77-81 中任一者之方法，其中該部分含有不超過約 50%酸性變異體。

83.實施例 77-82 中任一者之方法，其中該部分含有不超過約 35%鹼性變異體。

84.實施例 77-83 中任一者之方法，其中該部分含有不超過約 5% $\frac{3}{4}$ 抗體。

85.實施例 77 之方法，其中該部分含有

a)至少約 95%-100%多特異性抗體；

b)不超過約 1%-5%非配對抗體臂；

c)不超過約 1%-5%抗體均二聚體；

d)不超過約 1%或 2% HMWS；

e)不超過約 1%或 2% LMWS；及

f)不超過約 5% $\frac{3}{4}$ 抗體。

86.一種包含藉由實施例 1-85 中任一者之方法純化的多特異性抗體之組合物。

87.一種包含藉由實施例 1-85 中任一者之方法純化的多特異性抗體之組合物，其用於治療癌症或眼病。

88.一種用多步驟層析方法純化含 Fc 區雜二聚體多肽之方法，其中該方法包含親和力層析步驟、隨後兩個不同的多模式離子交換層析步驟，及由此純化該含 Fc 區雜二聚體多肽。

89.根據實施例 88 之方法，其中該多步驟層析方法包含

i.親和力層析步驟、隨後多模式陰離子交換層析步驟、隨後多模式陽離子交換層析步驟

或

ii.親和力層析步驟、隨後多模式陽離子交換層析步驟、隨後多模式陰離子交換層析步驟。

90.根據實施例 88-89 中任一者之方法，其中該多步驟層析方法包含親和力層析步驟、隨後多模式陰離子交換層析步驟、隨後多模式陽離子交換層析步驟。

91.根據實施例 88-90 中任一者之方法，其中該多步驟層析方法精確地包含三個層析步驟。

92.根據實施例 89-91 中任一者之方法，其中該多模式陰離子交換層析步驟以流通模式執行。

93.根據實施例 89-92 中任一者之方法，其中在該多模式陰離子交換層析步驟中，該含 Fc 區雜二聚體多肽在具有小於 7 mS/cm 之電導率值的溶液中應用。

94.根據實施例 89-93 中任一者之方法，其中在該多模式陰離子交換層析步

驟中，該含 Fc 區雜二聚體多肽在具有在約 6 mS/cm 至約 2 mS/cm 範圍內之電導率值的溶液中應用。

95.根據實施例 89-94 中任一者之方法，其中在該多模式陰離子交換層析步驟中，該含 Fc 區雜二聚體多肽在具有約 4.5 mS/cm 之電導率值的溶液中應用。

96.根據實施例 89-95 中任一者之方法，其中該多模式陰離子交換層析步驟在約 7 之 pH 下執行。

97.根據實施例 89-96 中任一者之方法，其中在該多模式陰離子交換層析步驟中，該含 Fc 區雜二聚體多肽在具有約 4.5 mS/cm 之電導率及約 7 之 pH 的溶液中應用。

98.根據實施例 89-97 中任一者之方法，其中在該多模式陰離子交換層析步驟中，該含 Fc 區雜二聚體多肽在約 100 g 至約 300 g/公升層析材料之範圍內應用。

99.根據實施例 89-98 中任一者之方法，其中該多模式陰離子交換層析材料為多模式強陰離子交換層析材料。

100.根據實施例 89-99 中任一者之方法，其中該多模式陰離子交換層析材料具有高流量瓊脂糖基質、作為配位體的多模式強陰離子交換劑、36-44 μm 之平均粒徑及 0.08 至 0.11 mmol Cl⁻/mL 培養基之離子容量。

101.根據實施例 89-100 中任一者之方法，其中該多模式陽離子交換層析介質為多模式弱陽離子交換層析介質。

102.根據實施例 89-101 中任一者之方法，其中該多模式陽離子交換層析介質具有高流量瓊脂糖基質、作為配位體的多模式弱陽離子交換劑、36-44 μm

之平均粒徑及 25 至 39 $\mu\text{mol/mL}$ 之離子容量。

103.根據實施例 89-102 中任一者之方法，其中該多模式陰離子交換層析步驟以結合及溶離模式執行。

104.根據實施例 88-103 中任一者之方法，其中該親和力層析為蛋白 A 親和力層析或蛋白 G 親和力層析或單鏈 Fv 配位體親和力層析或具有 CaptureSelect 層析材料之層析步驟或具有 CaptureSelect FcXL 層析材料之層析步驟。

105.根據實施例 88-104 中任一者之方法，其中該親和力層析步驟為蛋白 A 層析步驟。

106.根據實施例 88-105 中任一者之方法，其中該親和力層析步驟為具有 CaptureSelect™層析材料之層析步驟。

107.根據實施例 88-106 中任一者之方法，其中該含 Fc 區雜二聚體多肽為抗體、雙特異性抗體或 Fc-融合蛋白。

108.根據實施例 88-107 中任一者之方法，其中該含 Fc 區雜二聚體多肽為雙特異性抗體。

109.根據實施例 90-108 中任一者之方法，其中該含 Fc 區雜二聚體多肽為 CrossMab。

110.根據實施例 90-109 中任一者之方法，其中該含 Fc 區雜二聚體多肽為雙特異性抗體，其包含

a)特異性結合於第一抗原之第一全長抗體的重鏈及輕鏈；及

b)特異性結合於第二抗原之全長抗體的經修飾重鏈及經修飾輕鏈，其中恆定域 CL 及 CH1 由彼此置換。

111.根據實施例 108-110 中任一者之方法，其中該雙特異性抗體結合於 ANG2 及 VEGF。

112.根據實施例 108-110 中任一者之方法，其中該 CrossMab 結合於 ANG2 及 VEGF。

113.根據實施例 108-112 中任一者之方法，其中該雙特異性抗體為瓦紐賽單抗。

114.根據實施例 108-112 中任一者之方法，其中該雙特異性抗體包含第一抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 1 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 2；及第二抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 3 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 4。

115.根據實施例 108-112 中任一者之方法，其中該雙特異性抗體包含具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 9 之第一重鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 10 之第二重鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 11 之第一輕鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 12 之第二輕鏈。

116.根據實施例 108-112 中任一者之方法，其中該雙特異性抗體包含第一抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 5 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 6；及第二抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 7 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 8。

117.根據實施例 108-112 中任一者之方法，其中該雙特異性抗體包含具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 13 之第一重鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 14 之第二重鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 15 之第一輕鏈及具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 16 之第二輕鏈。

118.實施例 108-117 中任一者之方法，其中該經純化含 Fc 區雜二聚體多肽含有不超過約 5%^{3/4}抗體。

119.一種用多步驟層析方法純化結合於 ANG-2 及 VEGF 之雙特異性抗體之方法，其中該方法包含親和力層析步驟、隨後多模式陰離子交換層析步驟、隨後多模式陽離子交換層析步驟，

及由此純化該結合於 ANG-2 及 VEGF 之雙特異性抗體，

其中雙特異性抗體包含第一抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 1 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 2；及第二抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 3 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 4

或包含第一抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 5 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 6；及第二抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 7 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 8。

120.根據實施例 119 之方法，其中該雙特異性抗體結合於 ANG-2 及 VEGF，其包含

- a)包含該第一抗原結合位點之第一全長抗體的重鏈及輕鏈；及
- b)包含該第二抗原結合位點之全長抗體的經修飾重鏈及經修飾輕鏈，其中恆定域 CL 及 CH1 由彼此置換。

121.一種包含雙特異性抗體之組合物，其中該組合物含有至少約 95%雙特異性抗體。

122.實施例 121 之組合物，其中該組合物含有不超過約 5%非配對抗體臂。

123.實施例 121 或 122 之組合物，其中該組合物含有不超過約 5%抗體均二

聚體。

124.一種包含 CrossMab 抗體之組合物，其中該組合物含有至少 95% CrossMab 抗體。

125.實施例 121-124 中任一者之組合物，其中該組合物含有不超過約 2%聚集體或高分子量物質(HMWS)。

126.實施例 121-125 中任一者之組合物，其中該組合物含有不超過約 2%低分子量物質(LMWS)。

127.實施例 121-126 中任一者之組合物，其中該組合物含有不超過約 50%酸性變異體。

128.實施例 121-127 中任一者之組合物，其中該組合物含有不超過約 35%鹼性變異體。

129.實施例 121-128 中任一者之組合物，其中該組合物含有不超過約 5% $\frac{3}{4}$ 抗體。

130.實施例 121 或實施例 122 之組合物，其中該組合物含有

a)至少約 95%-100%多特異性抗體；

b)不超過約 1%-5%非配對抗體臂；

c)不超過約 1%-5%抗體均二聚體；

d)不超過約 1%或 2% HMWS；

e)不超過約 1%或 2% LMWS；及

f)不超過約 5% $\frac{3}{4}$ 抗體。

131.實施例 121-130 中任一者之組合物，其中該雙特異性抗體結合於 ANG-2 及 VEGF。

132.實施例 131 之組合物，其中該雙特異性抗體結合於 ANG-2 及 VEGF，其包含

- a)包含該第一抗原結合位點之第一全長抗體的重鏈及輕鏈；及
- b)包含該第二抗原結合位點之全長抗體的經修飾重鏈及經修飾輕鏈，其中恆定域 CL 及 CH1 由彼此置換。

133.一種包含結合於 ANG-2 及 VEGF 之雙特異性抗體之組合物，其中該組合物含有不超過約 5%、約 4%、約 3%、約 2%或約 1%^{3/4}抗體。

134.實施例 133 之組合物，其中該結合於 ANG-2 及 VEGF 之雙特異性抗體包含

- a)包含該第一抗原結合位點之第一全長抗體的重鏈及輕鏈；及
- b)包含該第二抗原結合位點之全長抗體的經修飾重鏈及經修飾輕鏈，其中恆定域 CL 及 CH1 由彼此置換。

135.實施例 133 或 134 之組合物，其中該組合物使用實施例 119 之方法獲得。

136.根據實施例 88-118 中任一者之方法用於純化含 Fc 雜二聚體多肽之用途。

137.根據實施例 88-118 中任一者之方法用於減少含 Fc 雜二聚體多肽相關雜質之用途。

138.一種用根據實施例 88-118 中任一者之方法獲得的含 Fc 雜二聚體多肽或一種使用實施例 119-120 中任一者之方法獲得的結合於 ANG-2 及 VEGF 之雙特異性抗體，其用於製造用於治療癌症或眼病之藥劑。

139.一種由根據實施例 88-118 中任一者之方法獲得的含 Fc 雜二聚體多肽或

一種使用實施例 119-120 中任一者之方法獲得的結合於 ANG-2 及 VEGF 之雙特異性抗體，其用於治療癌症或眼病。

140.一種用於產生含 Fc 雜二聚體多肽之方法，其包含以下步驟：

- i.培養包含編碼含 Fc 雜二聚體多肽之核酸的細胞，
 - ii.自該細胞或該培養基回收該含 Fc 雜二聚體蛋白，
 - iii.用根據實施例 88-118 中任一者之方法純化該含 Fc 雜二聚體多肽，
- 及由此產生該含 Fc 雜二聚體多肽。

141.一種用於產生使用實施例 119-120 中任一者之方法獲得的結合於 ANG-2 及 VEGF 之雙特異性抗體之方法，其包含步驟

- i.培養包含編碼該雙特異性抗體之核酸的細胞，
 - ii.自該細胞或該培養基回收該雙特異性抗體，
 - iii.用根據實施例 119-120 中任一者之方法純化該雙特異性抗體，
- 及由此產生該結合於 ANG-2 及 VEGF 之雙特異性抗體。

序列表

<110> Glen GIESE
Eva ROSENBERG
Bernard SALLIER
Susanne KONRAD
Wolfgang KOEHNLEIN
Steffen WILLMANN
Agathe BIALAS

<120> 多特異性抗體之純化

<130> 146392036342

<140> 尚未經指派

<141> 與此並行

<150> US 62/351,908

<151> 2016-06-17

<160> 16

<170> 用於 Windows 4.0 版本之 FastSEQ

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 1

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp	Phe
	50					55				60					
Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 2
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45
Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 3
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 3
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

```

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
      20                      25                      30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35                      40                      45
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
      50                      55                      60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
      65                      70                      75                      80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95
Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
      100                     105                     110
Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
      115                     120                     125

```

<210> 4
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

```

<400> 4
Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1                      5                      10                      15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
      20                      25                      30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
      35                      40                      45
Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
      50                      55                      60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
      65                      70                      75                      80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
      85                      90                      95
Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
      100                     105

```

<210> 5
 <211> 123
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 5

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1             5             10             15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr
      20             25             30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35             40             45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50             55             60
Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65             70             75             80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85             90             95
Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
      100            105            110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115            120

```

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 6

```

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1             5             10             15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
      20             25             30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
      35             40             45
Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50             55             60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65             70             75             80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp

```

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 7
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 7
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
100 105 110
Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125
Ser

<210> 8
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 8
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln

1	5	10	15												
Thr	Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Gly	Gly	Asn	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Ser	Val
20				25				30							
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Val	Tyr
35				40				45							
Asp	Asp	Ser	Asp	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
50				55				60							
Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Gly
65				70				75				80			
Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Cys	Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Ser	Asp	His	
85				90				95							
Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln		
100				105				110							

<210> 9

<211> 463

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 9

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1	5	10	15												
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr
20				25				30							
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
35				40				45							
Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
50				55				60							
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65				70				75				80			
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
85				90				95							
Ala	Arg	Ser	Pro	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Tyr
100				105				110							
Pro	Gly	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser
115				120				125							
Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp
130				135				140							
Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn
145				150				155				160			

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu		
	165	170 175
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
	180	185 190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
	195	200 205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
	210	215 220
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His		
	225	230 235 240
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val		
	245	250 255
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
	260	265 270
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
	275	280 285
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
	290	295 300
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
	305	310 315 320
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
	325	330 335
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
	340	345 350
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro		
	355	360 365
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala		
	370	375 380
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
	385	390 395 400
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
	405	410 415
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
	420	425 430
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
	435	440 445
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	450	455 460

<210> 10

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 10

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr
			20						25					30	
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35						40					45	
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp	Phe
			50						55					60	
Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Ala	Tyr
			65						70					75	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
									85					90	
Ala	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
			100						105					110	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
			115						120					125	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
			130						135					140	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
			145						150					155	
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
									165					170	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
			180						185					190	
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
			195						200					205	
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys
			210						215					220	
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
			225						230					235	
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
									245					250	
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
			260						265					270	
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
			275						280					285	
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
			290						295					300	
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu

```

305          310          315          320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
          325          330          335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
          340          345          350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
          355          360          365
Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
          370          375          380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385          390          395          400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
          405          410          415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
          420          425          430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
          435          440          445
Leu Ser Pro Gly Lys
          450

```

<210> 11
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

```

<400> 11
Gln Pro Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
  1          5          10          15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
          20          25          30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
          35          40          45
Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65          70          75          80
Asp Glu Ala Asp Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
          85          90          95
Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser
          100          105          110

```



```

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
    115                      120                      125
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
    130                      135                      140
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
    145                      150                      155                      160
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
                      165                      170                      175
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
                      180                      185                      190
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
    195                      200                      205
Glu Pro Lys Ser Cys
    210

```

<210> 12
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

```

<400> 12
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1                      5                      10                      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
    20                      25                      30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
    35                      40                      45
Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                      55                      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
    65                      70                      75                      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
                      85                      90                      95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
    100                      105                      110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
    115                      120                      125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                      135                      140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

```

145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 13
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr
 20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60
Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

```

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
    195                200                205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
    210                215                220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
    225                230                235                240
Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                245                250                255
Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
                260                265                270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
                275                280                285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
    290                295                300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu
    305                310                315                320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala
                325                330                335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
                340                345                350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
                355                360                365
Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
    370                375                380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
    385                390                395                400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
                405                410                415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
                420                425                430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
                435                440                445
Leu Ser Pro Gly Lys
    450

```

<210> 14

<211> 463

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His
 225 230 235 240
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 245 250 255
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr
 260 265 270
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 305 310 315 320
 Val Leu Thr Val Leu Ala Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

340 345 350
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
355 360 365
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
370 375 380
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445
His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 15
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 15
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45
Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 16

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 16

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His
 85 90 95
 Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser
 100 105 110
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 115 120 125
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 130 135 140
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 145 150 155 160
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile

				180						185						190			
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val				
		195						200					205						
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys															
		210																	

【發明申請專利範圍】

【第 1 項】一種用於自包含多特異性抗體及雜質之組合物純化該多特異性抗體之方法，其中該多特異性抗體包含多個臂，各臂包含 VH/VL 單元，該方法包含依序步驟：

- a) 使該組合物經受捕捉層析以產生捕捉層析溶離物；
- b) 使該捕捉層析溶離物經受第一混合模式層析以產生第一混合模式溶離物；
- c) 使該第一混合模式溶離物經受第二混合模式層析以產生第二混合模式溶離物；及
- d) 收集包含該多特異性抗體之部分(fraction)，

其中該方法減少該組合物中之產物特異性雜質的量，其中該產物特異性雜質為非配對抗體臂、抗體均二聚體、聚集體、高分子量物質(HMWS)、低分子量物質(LMWS)、酸性變異體或鹼性變異體中之一或多者。

【第 2 項】如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該捕捉層析溶離物在該第一混合模式層析之前經受離子交換或 HIC 層析，視情況其中該離子交換層析包含四級胺。

【第 3 項】一種用於自包含多特異性抗體及雜質之組合物純化該多特異性抗體之方法，其中該多特異性抗體包含多個臂，各臂包含 VH/VL 單元，其中該多特異性抗體之各臂獨立地產生，該方法包含依序步驟：

- a) 使該多特異性抗體之各臂經受捕捉層析以針對該多特異性抗體之各臂產生捕捉溶離物，
- b) 在足以產生包含該多特異性抗體之組合物的條件下形成包含該多特異性抗體之各臂的捕捉溶離物之混合物，
- c) 使該包含該多特異性抗體之組合物經受第一混合模式層析以產生

第一混合模式溶離物，

d) 使該第一混合模式溶離物經受第二混合模式層析以產生第二混合模式溶離物；及

e) 收集包含該多特異性抗體之部分，

其中該方法減少該組合物中之產物特異性雜質的量，其中該產物特異性雜質為非配對抗體臂、抗體均二聚體、聚集體、高分子量物質(HMWS)、低分子量物質(LMWS)、酸性變異體或鹼性變異體中之一或多者。

【第 4 項】如申請專利範圍第 3 項之方法，其中該包含該多特異性抗體之組合物在該第一混合模式層析之前經受離子交換或 HIC 層析，視情況其中該離子交換層析包含四級胺。

【第 5 項】如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項之方法，其中該捕捉層析為蛋白 L 層析、蛋白 A 層析、蛋白 G 層析或蛋白 A 及蛋白 G 層析。

【第 6 項】如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項之方法，其中該第一混合模式層析及該第二混合模式層析為鄰近的。

【第 7 項】如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項之方法，其中：

- (a) 該第一混合模式層析為混合模式陰離子交換層析；
- (b) 該第二混合模式層析為混合模式陽離子交換層析；
- (c) 該第一混合模式層析為混合模式陽離子交換層析；或
- (d) 該第二混合模式層析為混合模式陰離子交換層析。

【第 8 項】如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項之方法，其中：

- (a) 該第一混合模式層析以結合及溶離模式或以流通模式進行；以及
- (b) 該第二混合模式層析以結合及溶離模式或以流通模式進行。

【第 9 項】如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該第一混合模式層析以結合及溶離模式進行，以及其中該溶離為梯度溶離。

- 【第 10 項】如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該第二混合模式層析以結合及溶離模式進行，以及其中該溶離為梯度溶離。
- 【第 11 項】如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項之方法，其進一步包含使該第二混合模式溶離物經受超濾之步驟，視情況其中該超濾依序包含第一超濾、透濾及第二超濾。
- 【第 12 項】如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該捕捉層析為蛋白 A 層析，以及其中該蛋白 A 層析使用蛋白 A 平衡緩衝液、蛋白 A 載樣緩衝液或蛋白 A 洗滌緩衝液中之一或多者，其中該平衡緩衝液、載樣緩衝液及/或洗滌緩衝液在 pH 7 與 pH 8 之間。
- 【第 13 項】如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該蛋白 A 平衡緩衝液包含 25 mM Tris 及 25 mM NaCl。
- 【第 14 項】如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該蛋白 A 層析在載樣之後用平衡緩衝液洗滌。
- 【第 15 項】如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該捕捉層析為蛋白 A 層析，以及其中該多特異性抗體藉由 pH 分步(pH step elution)溶離自該蛋白 A 層析溶離，或藉由向該蛋白 A 層析施用具有低 pH 之蛋白 A 溶離緩衝液而自該蛋白 A 溶離。
- 【第 16 項】如申請專利範圍第 15 項之方法，其中該 pH 分步溶離包含施用分步溶離，該分步溶離包含向該蛋白 A 層析施用具有低 pH 之蛋白 A 溶離緩衝液，以及其中該蛋白 A 溶離緩衝液包含約 150 mM 乙酸，約 pH 2.9。
- 【第 17 項】如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該捕捉層析為蛋白 A 層析，以及其中彙集該蛋白 A 溶離物，其中該溶離物之 OD₂₈₀ 大於 0.5。
- 【第 18 項】如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該陰離子交換混合模式層

析包含四級胺及疏水性部分。

【第 19 項】如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該陽離子交換混合模式層析包含 N-苯甲基-n-甲基乙醇胺。

【第 20 項】如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項之方法，其中：

- (a) 該第一混合模式層析使用混合模式預平衡緩衝液、混合模式平衡緩衝液、混合模式載樣緩衝液或混合模式洗滌緩衝液中之一或多者，且其中該混合模式預平衡緩衝液、該混合模式平衡緩衝液、該混合模式載樣緩衝液及/或該混合模式洗滌緩衝液在 pH 6 與 pH 7 之間；
- (b) 該第二混合模式層析使用混合模式預平衡緩衝液、混合模式平衡緩衝液、混合模式載樣緩衝液或混合模式洗滌緩衝液中之一或多者，其中該混合模式預平衡緩衝液、該混合模式平衡緩衝液及/或混合模式洗滌緩衝液在 pH 5 與 pH 8 之間，視情況約 pH 6.5；或
- (c) (a)及(b)二者。

【第 21 項】如申請專利範圍第 20 項之方法，其中該混合模式預平衡緩衝液包含 500 mM 乙酸鹽或 50 mM 乙酸鹽。

【第 22 項】如申請專利範圍第 20 項之方法，其中該第一混合模式層析、該第二混合模式層析或該第一及第二混合模式層析二者在載樣之後用洗滌緩衝液洗滌。

【第 23 項】如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該多特異性抗體藉由 pH 梯度自該第一混合模式層析、該第二混合模式層或該第一及第二混合模式層析二者溶離，或該多特異性抗體藉由向該混合模式交換層析施用具有低 pH 之混合模式溶離緩衝液自該第一混合模式層析、該第二混合模式層或該第一及第二混合模式層析二者溶離。

【第 24 項】如申請專利範圍第 2 項或第 4 項之方法，其中該離子交換層析為陰離子交換層析，且其中該陰離子交換層析使用陰離子交換預平衡緩衝液、陰離子交換平衡緩衝液或陰離子交換載樣緩衝液中之一或多者，其中該陰離子交換預平衡緩衝液、該陰離子交換平衡緩衝液及/或陰離子交換載樣緩衝液在 pH 6 與 pH 8 之間，視情況約 6.5。

【第 25 項】如申請專利範圍第 24 項之方法，其中如下列一或多者：

(a)該陰離子交換預平衡緩衝液包含約 50 mM Tris、約 500 mM 乙酸钠；

(b)該陰離子交換平衡緩衝液包含約 50 mM Tris ；

(c)該陰離子交換層析在載樣之後用陰離子交換平衡緩衝液洗滌；

(d)該多特异性抗體藉由鹽梯度自該陰離子交換層析溶離，或該多特异性抗體藉由向該陰離子交換層析施用具有增加的鹽濃度之陰離子交換溶離緩衝液而自該陰離子交換層析溶離。

【第 26 項】如申請專利範圍第 25 項之方法，其中(d)中該多特异性抗體藉由施用包含約 50 mM Tris、約 100 mM 乙酸钠、約 pH 8.5 之陰離子交換溶離緩衝液而自該陰離子交換層析溶離。

【第 27 項】如申請專利範圍第 24 項之方法，其中彙集陰離子交換溶離物，其中該溶離物之 OD₂₈₀ 大於 0.5 至 2.0。

【第 28 項】如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項之方法，其中該多特异性抗體之臂在原核細胞或真核細胞中產生，其中視情況該原核細胞為大腸桿菌細胞，視情況該大腸桿菌細胞經工程改造以表現一或多種伴侶蛋白，視情況該伴侶蛋白為 FkpA、DsbA 或 DsbC，視情況其中該真核細

胞為酵母細胞、昆蟲細胞或哺乳動物細胞，視情況其中該哺乳動物細胞為 CHO 細胞。

【第 29 項】如申請專利範圍第 28 項之方法，其中該等細胞在捕捉層析之前經溶解，視情況使用微流化器溶解，以產生包含該多特異性抗體或該多特異性抗體之臂的細胞溶解產物，視情況其中聚乙烯亞胺(PEI)在層析之前添加至該細胞溶解產物中。

【第 30 項】如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項之方法，其中該方法減少該組合物中宿主細胞蛋白(HCP)、滲出之蛋白 A、核酸、細胞培養基組分或病毒雜質中之任一者的量。

【第 31 項】如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項之方法，其中該多特異性抗體為雙特異性抗體，視情況其中該雙特異性抗體為杵臼(Knob-in-hole; KiH)雙特異性抗體或 CrossMab 雙特異性抗體。

【第 32 項】如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項之方法，其中該部分含有至少 95%多特異性抗體。

【第 33 項】如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項之方法，其中該部分含有不超過以下一或多者：

- (a) 約 5%非配對抗體臂；
- (b) 約 5%抗體均二聚體；
- (c) 約 2%聚集體或高分子量物質(HMWS)；
- (d) 約 2%低分子量物質(LMWS)；
- (e) 約 50%酸性變異體；
- (f) 約 35%鹼性變異體；或
- (g) 約 5% $\frac{3}{4}$ 抗體。

【第 34 項】如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項之方法，其中該部分含有

- a) 至少 95%-100%多特異性抗體；
- b) 不超過 1%-5%非配對抗體臂；
- c) 不超過 1%-5%抗體均二聚體；
- d) 不超過 1%或 2% HMWS；
- e) 不超過 1%或 2% LMWS；及
- f) 不超過 5% $\frac{3}{4}$ 抗體。

【第 35 項】一種用多步驟層析方法純化結合於 ANG-2 及 VEGF 之雙特異性抗體之方法，其中該方法包含親和力層析步驟、隨後多模式陰離子交換層析步驟、隨後多模式陽離子交換層析步驟，

及由此純化該結合於 ANG-2 及 VEGF 之雙特異性抗體，

其中雙特異性抗體包含：

(i)第一抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 1 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 2；及第二抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 3 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 4，或

(ii)第一抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 5 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 6；及第二抗原結合位點，其包含作為重鏈可變域(VH)之 SEQ ID NO: 7 及作為輕鏈可變域(VL)之 SEQ ID NO: 8。

【第 36 項】如申請專利範圍第 35 項之方法，其中該雙特異性抗體結合於

ANG-2 及 VEGF，視情況其中該雙特異性抗體包含

- a) 包含該第一抗原結合位點之第一全長抗體的重鏈及輕鏈；及
- b) 包含該第二抗原結合位點之全長抗體的經修飾重鏈及經修飾輕鏈，其中恆定域 CL 及 CH1 由彼此置換。

【第 37 項】一種包含結合於 ANG-2 及 VEGF 之雙特異性抗體之組合物，其中該組合物含有不超過 5%、4%、3%、2%或 1% $\frac{3}{4}$ 抗體，視情況其中該組合物係使用如申請專利範圍第 35 項之方法所獲得，視情況其中該結合於 ANG-2 及 VEGF 之雙特異性抗體包含

- a) 包含該第一抗原結合位點之第一全長抗體的重鏈及輕鏈；及
- b) 包含該第二抗原結合位點之全長抗體的經修飾重鏈及經修飾輕鏈，其中恆定域 CL 及 CH1 由彼此置換。

【第 38 項】一種用於產生結合於 ANG-2 及 VEGF 之雙特異性抗體之方法，其包含步驟

- i. 培養包含編碼該雙特異性抗體之核酸的細胞，
- ii. 自該細胞或培養基回收該雙特異性抗體，
- iii. 用如申請專利範圍第 35 項之方法純化該雙特異性抗體，

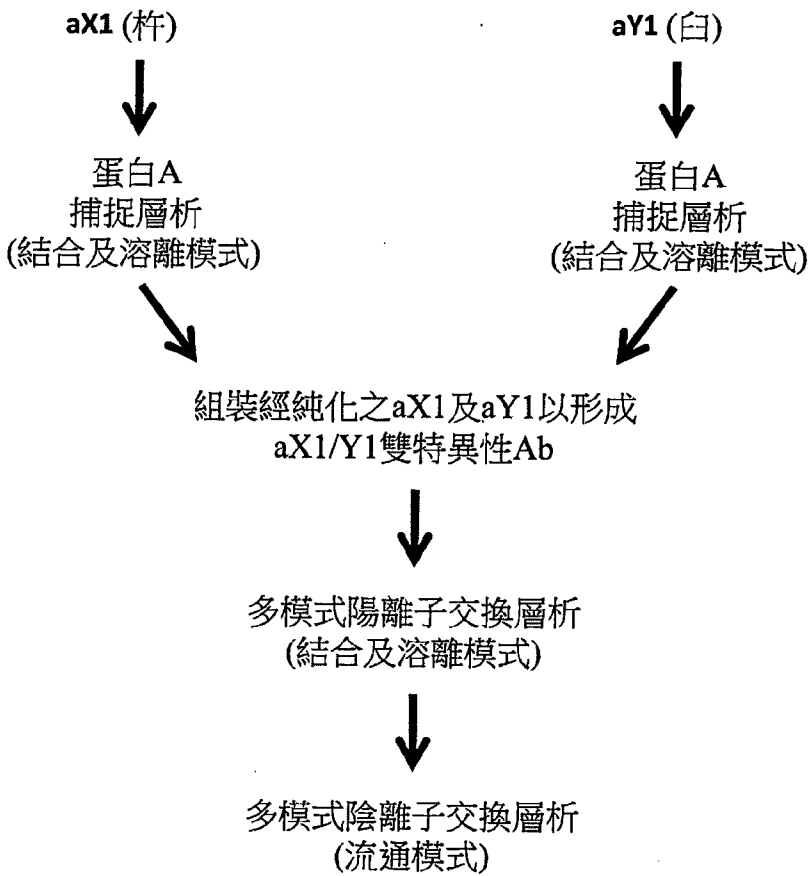
及由此產生該結合於 ANG-2 及 VEGF 之雙特異性抗體。

【第 39 項】一種製造包含多特異性抗體之組合物的方法，其中該方法包含如申請專利範圍第 1 項至第 4 項中任一項之方法。

【第 40 項】一種製造如申請專利範圍第 37 項之組合物的方法，其包含如申請專利範圍第 35 項之方法。

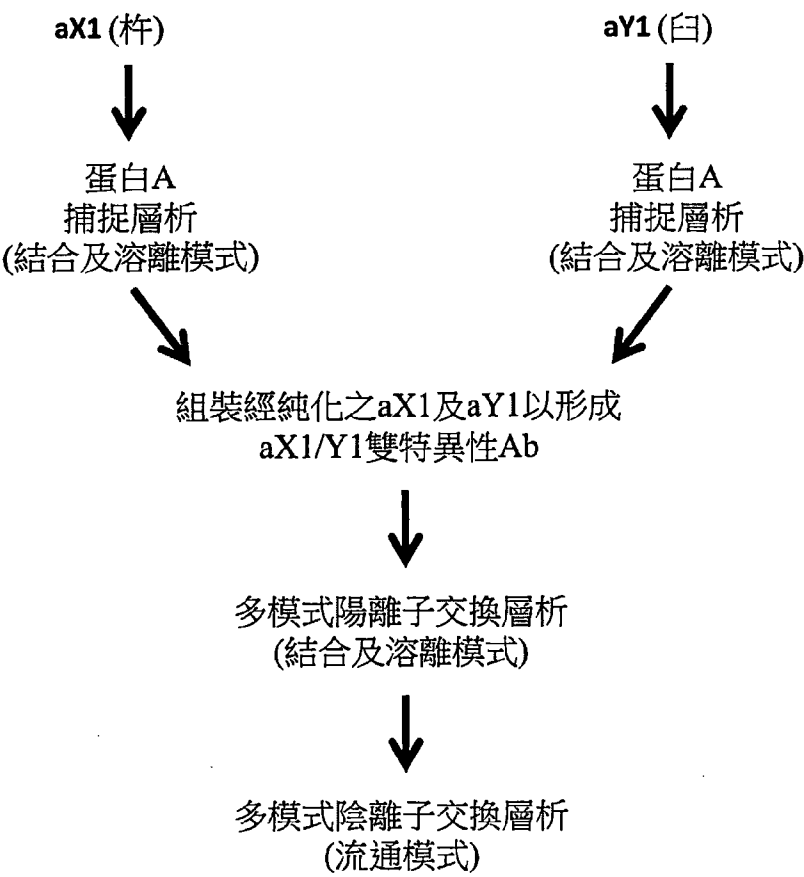
【發明圖式】

A.



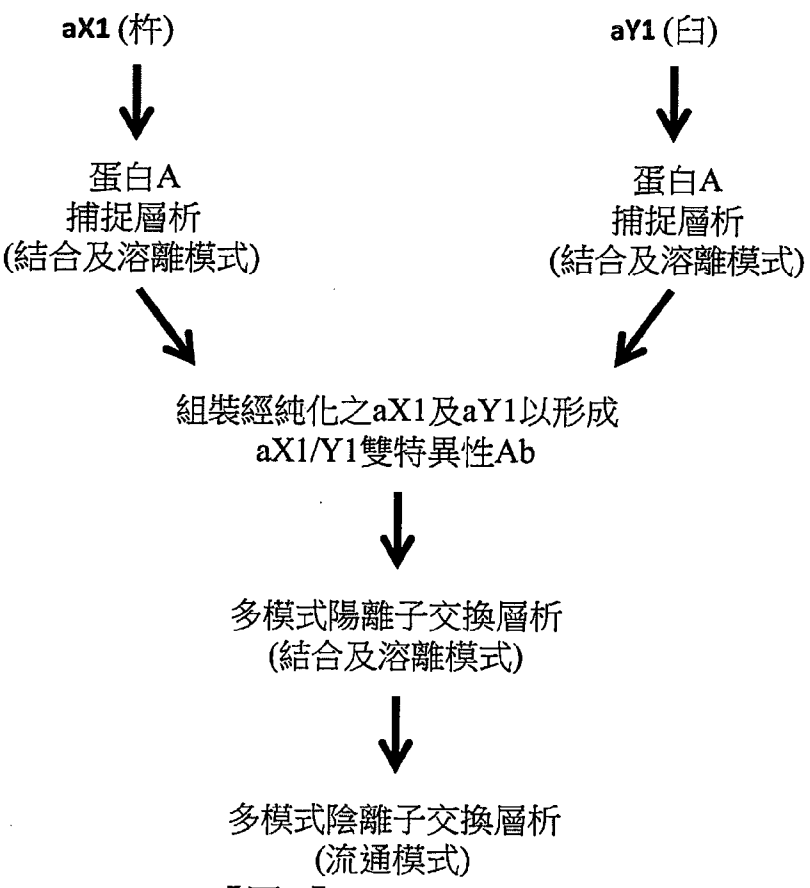
【圖 1】

B.

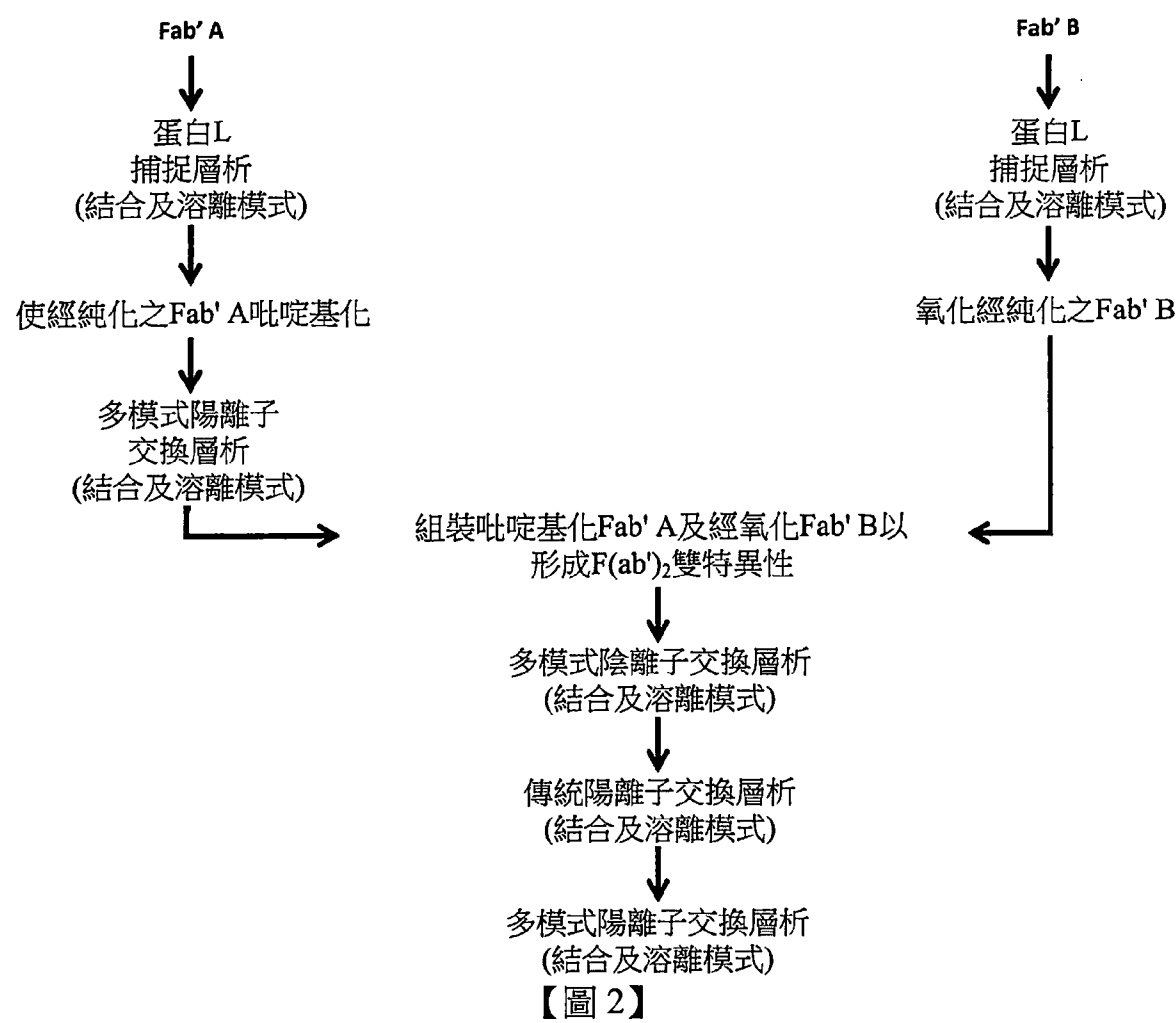


【圖 1】

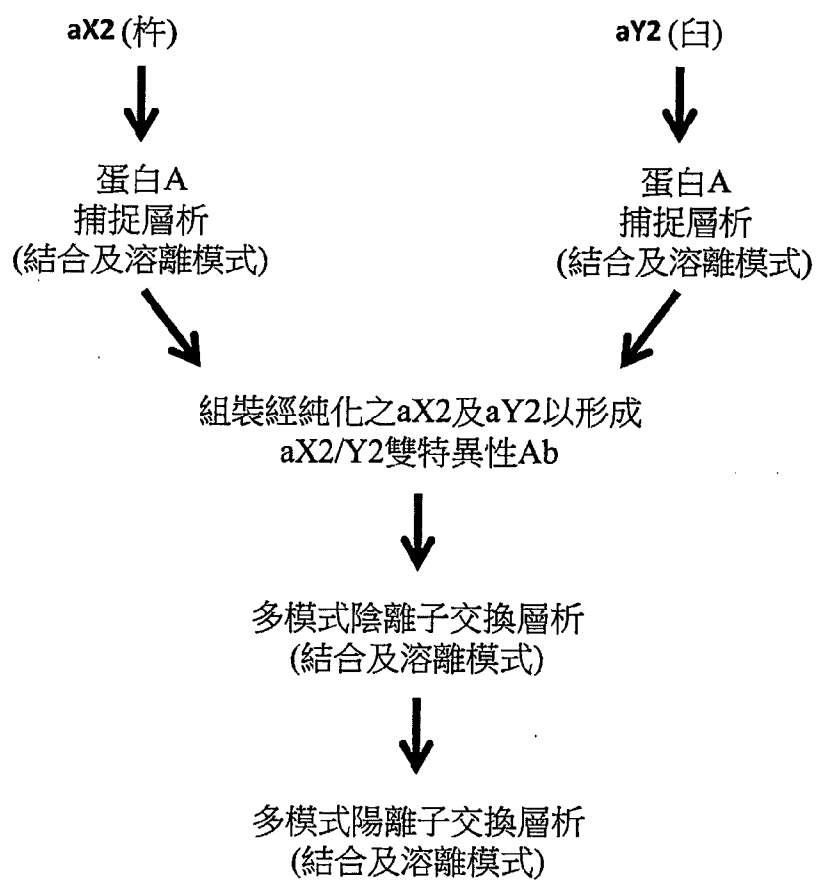
C.



【圖 1】

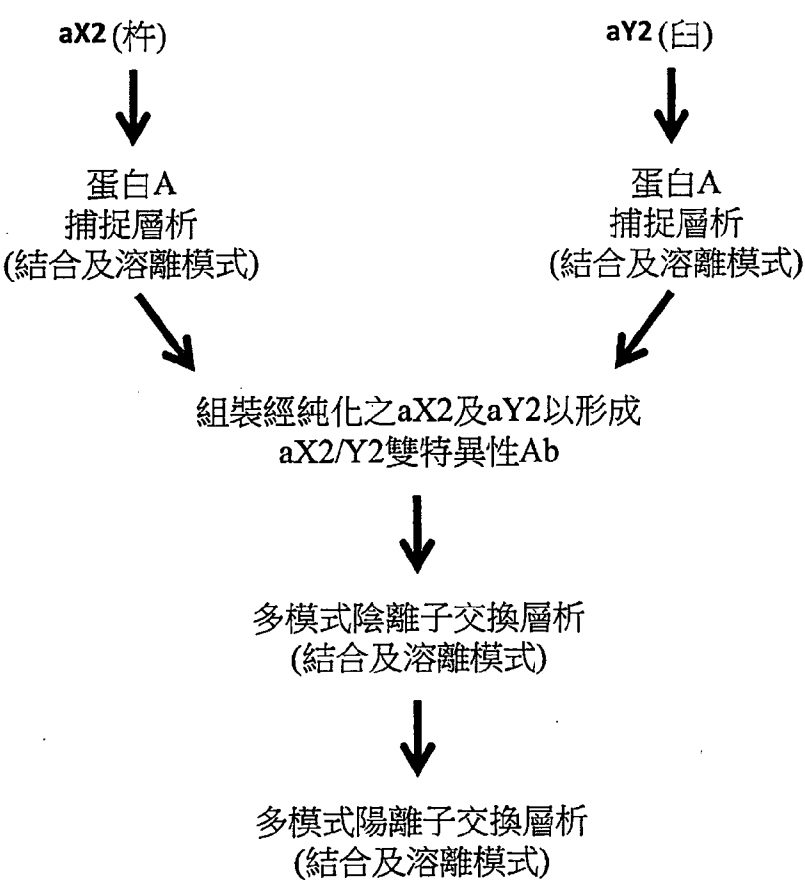


A.

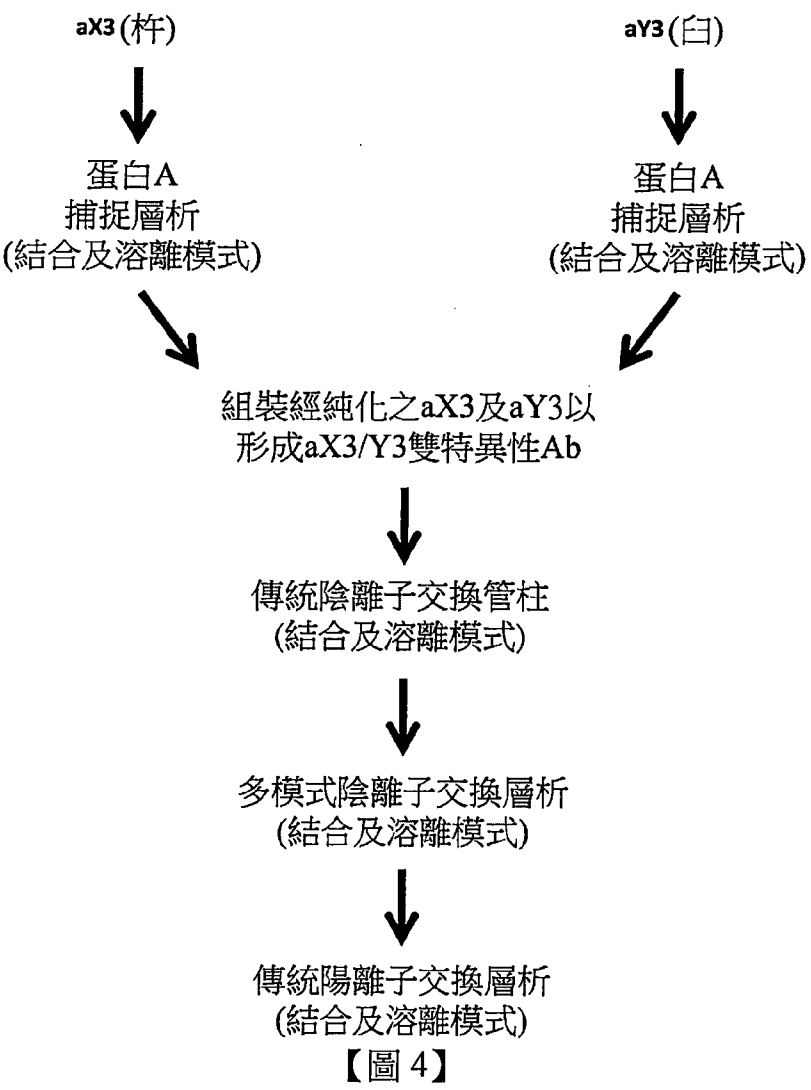


【圖 3】

B.



【圖 3】



【圖 4】

A.

自含有抗Ang2/抗VEGF-A雙特異性抗體之
CHO表現培養物收集之細胞培養液(HCCF)



蛋白A層析
(結合及溶離模式)



多模式陰離子交換層析
(結合及溶離模式)



多模式陽離子交換層析
(結合及溶離模式)

【圖 5】

B.

自含有抗Ang2/抗VEGF-A雙特異性抗體之
CHO表現培養物收集之細胞培養液(HCCF)



蛋白A層析
(結合及溶離模式)



傳統陽離子交換層析



疏水性相互作用層析



傳統陰離子交換層析

【圖 5】

A.

自含有抗VEGF-A/抗Ang2雙特異性抗體之CHO
表現培養物收集之細胞培養液(HCCF)



抗IgG親和力層析
(結合及溶離)



多模式陰離子交換層析
(結合及溶離模式)



多模式陽離子交換層析
(結合及溶離模式)

【圖 6】

B.

自含有抗VEGF-A/抗Ang2雙特異性抗體之CHO
表現培養物收集之細胞培養液(HCCF)



抗IgG親和力層析
(結合及溶離)



傳統陽離子交換層析



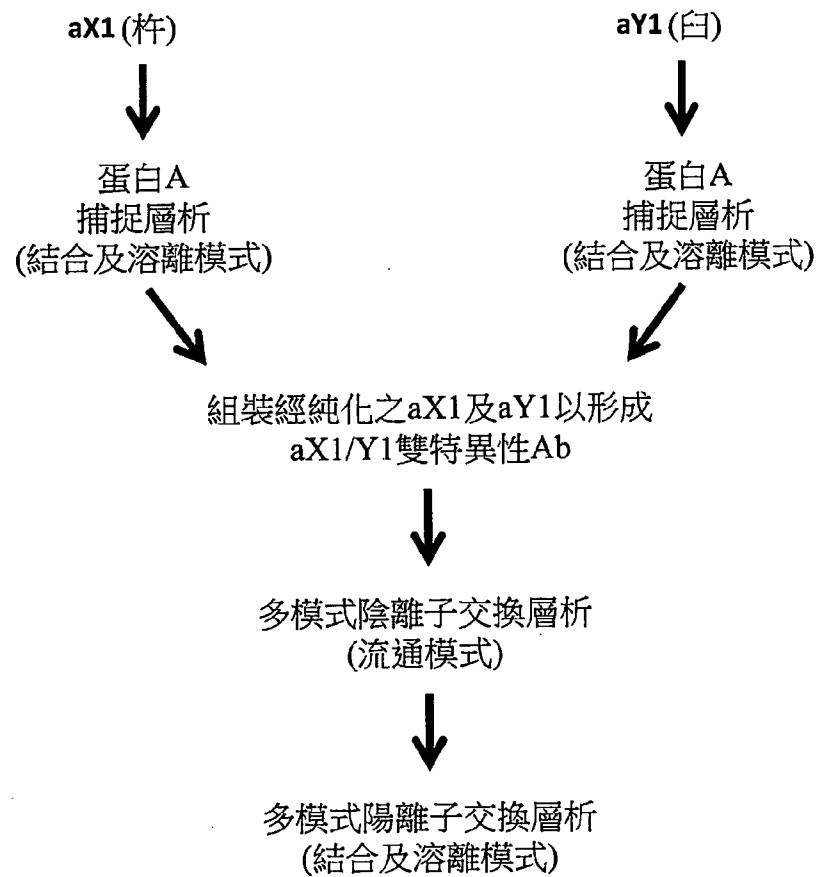
疏水性相互作用層析



傳統陰離子交換層析

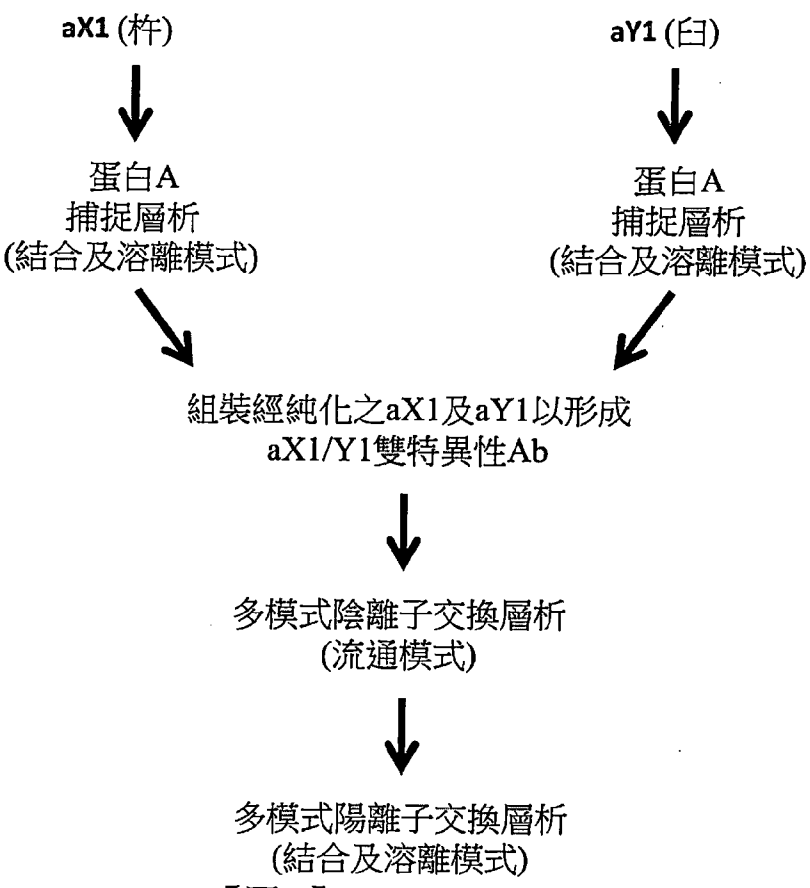
【圖 6】

A.



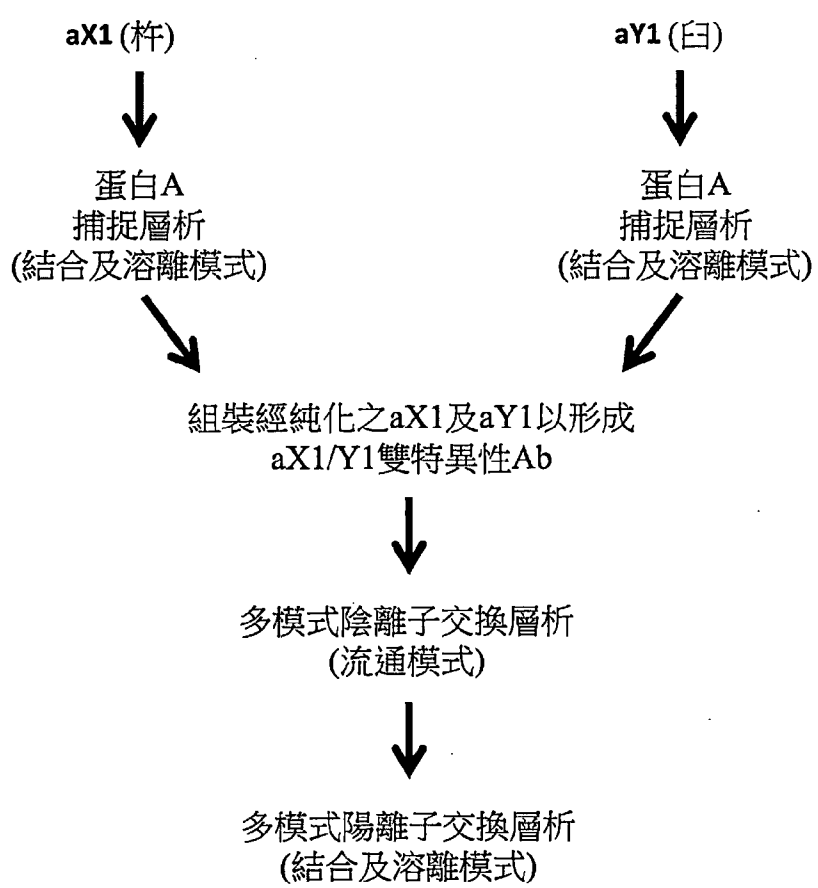
【圖 7】

B.



【圖 7】

C.



【圖 7】