

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045004**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.26

(21) Номер заявки
202290040

(22) Дата подачи заявки
2020.06.12

(51) Int. Cl. **C07K 1/16** (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

(54) **СПОСОБЫ УДАЛЕНИЯ НЕЖЕЛАТЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ В
МНОГОСТАДИЙНЫХ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ**

(31) **62/860,980**

(32) **2019.06.13**

(33) **US**

(43) **2022.03.05**

(86) **PCT/US2020/037433**

(87) **WO 2020/252260 2020.12.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Трэн Трэвис, Тастиан Эндрю,
Чибороски Марк (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) EP-A2-0177882
WO-A1-2009029847
WO-A2-2017134440

(57) Аффинная хроматография с высоким разделением, объединяющая процессы аффинного разделения и аффинного захвата с использованием одной матрицы для хроматографии, что приводит к улучшенному разделению между близкородственными молекулярными соединениями и значительно увеличивает общий выход продукта для крупномасштабного коммерческого производства гетеродимерных белков, таких как биспецифические антитела. Более того, требования к емкостям и оборудованию снижаются за счет возможности снижения концентрации соли при одновременном повышении чистоты и концентрации продукта без необходимости разбавления, ультрафильтрации или диафильтрации.

B1

045004

045004

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к способам удаления нежелательных компонентов из потока хроматографического процесса для очистки белковых продуктов, например очистки гетеродимерных белков из сложной смеси белков с помощью аффинной хроматографии. В частности, указанные способы включают выделение гетеродимера (содержащего биспецифическое антитело) из сложной смеси мономеров и гомодимеров с помощью аффинной хроматографии (включая хроматографию с белком А), в которой очищенный гетеродимер собирается в элюате с низким содержанием соли и проводимостью для облегчения дальнейшей последующей обработки гетеродимерного белка.

Уровень техники

Для очистки белковых продуктов часто требуется многостадийный процесс с использованием различных стадий хроматографии для удаления примесей, таких как белки клетки-хозяина, ДНК и нежелательные соединения белкового продукта. Во многих случаях компоненты хроматографических колонок или буферов образуют часть элюата, выделяемого на каждой стадии хроматографии, но эти компоненты могут быть нежелательными на последующих стадиях процесса. Например, высокие концентрации соли могут использоваться для облегчения отделения белкового продукта от примесей или нежелательных соединений молекул, но соль может быть несовместима с последующими стадиями процесса, такими как дополнительные стадии хроматографии или инактивация вирусов.

Было предложено множество форматов биспецифических антител, которые в настоящее время находятся на стадии разработки. Один из таких форматов основан на стандартном полностью человеческом антителе к IgG, имеющем улучшенный фармакокинетический профиль и минимальную иммуногенность (см. патент США № 8586713, который полностью включен в настоящий документ). Одна общая легкая цепь и две отдельные тяжелые цепи объединяются с образованием биспецифического антитела. Одна из тяжелых цепей содержит замещенную последовательность Fc (далее "Fc*"), которая снижает или устраняет связывание Fc* с белком А. Например, одна такая последовательность Fc* содержит замещения H435R/Y436F (по системе нумерации ЕС; H95R/Y96F по системе нумерации экзонов IMGT) в CH3-домене. Коэкспрессия двух тяжелых цепей и общей легкой цепи приводит к образованию трех продуктов: два из них являются гомодимерными для тяжелых цепей, а один из них является требуемым гетеродимерным биспецифическим продуктом. Последовательность Fc* обеспечивает селективную очистку биспецифического продукта FcFc* на коммерчески доступных колонках для аффинной хроматографии благодаря промежуточной аффинности связывания с белком А по сравнению с гомодимером тяжелой цепи FcFc с высокой авидностью или гомодимером Fc*Fc* со слабым связыванием.

Для достижения очистки биспецифического гетеродимера в промышленном масштабе требуется хорошее разделение между гомодимером FcFc, гетеродимером Fc*Fc и гомодимером Fc*Fc*, наряду с такими факторами, как объем обрабатываемого материала, а также стоимость и необходимая площадь для оборудования и материалов, используемых в процессе очистки.

Сущность изобретения

В одном или более аспектах или вариантах реализации данное изобретение относится к способам удаления компонента из хроматографического элюата, включающим: (а) выполнение первой стадии хроматографии, на которой компонент присутствует в первом буфере, нанесенном на колонку для хроматографии; (b) сбор промежуточного элюата с первой стадии хроматографии, при этом промежуточный элюат содержит белковый продукт и компонент; (с) повторное нанесение промежуточного элюата на колонку для хроматографии и элюирование белкового продукта вторым буфером, содержащим компонент в концентрации ниже, чем концентрация промежуточного элюата; (d) сбор хроматографического элюата со стадии (с), при этом компонент присутствует в хроматографическом элюате в концентрации ниже, чем концентрация промежуточного элюата; и (е) нанесение хроматографического элюата на следующую стадию процесса. В некоторых вариантах реализации компонент отсутствует во втором буфере.

В некоторых вариантах реализации компонент представляет собой соль. В некоторых случаях концентрация соли в промежуточном элюате превышает 50 ммоль. В некоторых случаях концентрация соли в промежуточном элюате составляет ≥ 100 ммоль, ≥ 250 ммоль, ≥ 500 ммоль, ≥ 600 ммоль, ≥ 700 ммоль, ≥ 800 ммоль, ≥ 900 ммоль или ≥ 1000 ммоль. В некоторых случаях концентрация соли в промежуточном элюате составляет 500 ммоль ± 50 ммоль.

В некоторых вариантах реализации первая стадия хроматографии выбрана из аффинной хроматографии или ионообменной хроматографии. В некоторых вариантах реализации последующая стадия процесса представляет собой вторую стадию хроматографии. В некоторых случаях последующую стадию процесса выбирают из аффинной хроматографии, ионообменной хроматографии, хроматографии со смешанным режимом, хроматографии гидрофобного взаимодействия или инактивации вирусов.

В некоторых вариантах реализации белковый продукт представляет собой антитело (например, биспецифическое антитело).

В одном или более аспектах и вариантах реализации данное изобретение относится к способам очистки гетеродимерного белка, такого как, например, биспецифическое антитело, от сложной смеси белков, которые содержат гомодимеры и гетеродимеры, с использованием процесса аффинного захвата и элюи-

рования.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ очистки гетеродимерного белка, включающий: (a) введение смеси гетеродимерного белка и примесей в аффинную матрицу, содержащую белок-связывающий лиганд, при этом гетеродимерный белок содержит первый и второй полипептиды с различной аффинностью для белок-связывающего лиганда, и при этом по меньшей мере одна примесь связывает белок-связывающий лиганд, и по меньшей мере одна примесь не связывает белок-связывающий лиганд; (b) промывку аффинной матрицы первым промывочным буфером, имеющим концентрацию соли более 200 ммоль и первый pH от 5 до 9, для удаления примесей; (c) элюирование и сбор гетеродимерного белка из аффинной матрицы в первом элюирующем буфере, содержащем соль в концентрации более 200 ммоль и вторым pH от 4 до 5, для получения очищенного гетеродимерного белка в первом элюате; (d) промывку аффинной матрицы вторым промывочным буфером, имеющим третий pH менее 4, для удаления примесей; (e) уравнивание аффинной матрицы до четвертого pH от 5 до 9; (f) нейтрализацию первого элюата до pH от 5 до 9 с последующим повторным нанесением первого элюата на аффинную матрицу; (g) промывку аффинной матрицы третьим промывочным буфером, содержащим менее 100 ммоль соли; и (h) элюирование и сбор очищенного гетеродимерного белка во втором элюате, при этом второй элюат содержит менее 100 ммоль соли. В различных вариантах реализации способа очищенный гетеродимерный белок элюируют и собирают во втором элюате посредством третьего промывочного буфера. В некоторых вариантах реализации способа третий промывочный буфер содержит менее 50 ммоль соли.

В некоторых вариантах реализации примеси содержат гомодимерные соединения первого и второго полипептидов.

В некоторых вариантах реализации белок-связывающий лиганд представляет собой белок А, а аффинная матрица содержит лиганд белка А, прикрепленный к субстрату. В некоторых случаях лиганд белка А представляет собой сконструированный белок А, содержащий тетрамер Z-домена, сконструированный белок А, содержащий тетрамер Y-домена, или сконструированный белок А, в котором отсутствуют D-домены и E-домены. В одном варианте реализации лиганд белка А содержит тетрамер Z-домена.

В некоторых вариантах реализации белок-связывающий лиганд представляет собой белок G, а аффинная матрица содержит лиганд белка G, прикрепленный к субстрату.

В различных вариантах реализации способа субстрат представляет собой частицу, а аффинная матрица содержит совокупность частиц со средним диаметром от 25 до 100 мкм. В некоторых вариантах реализации частицы имеют средний диаметр от 40 до 60 мкм. В некоторых вариантах реализации частицы имеют средний диаметр от 45 до 55 мкм. В некоторых вариантах реализации частицы имеют средний диаметр около 50 мкм. В некоторых случаях частицы содержат поры, имеющие средний диаметр около 1100 Å.

В различных вариантах реализации субстрат содержит любое одно или более из агарозы, поли(стиролдвинилбензола), полиметакрилата, целлюлозы, стекла с заданным размером пор и сферического диоксида кремния.

В некоторых вариантах реализации способа первый элюирующий буфер содержит соль в концентрации более 250 ммоль. В некоторых случаях концентрация соли составляет более 300 ммоль или более 400 ммоль. В некоторых вариантах реализации концентрация соли составляет около 500 ммоль.

В различных вариантах реализации способа соль выбрана из соли, содержащей: (i) Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- , $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$, NH_4^+ , Cs^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} ; или (ii) CaCl_2 , MgCl_2 или NaCl .

В различных вариантах реализации способа второй элюат содержит менее 50 ммоль соли. В некоторых вариантах реализации второй элюат содержит менее 10 ммоль соли.

В различных вариантах реализации способа первый полипептид содержит СНЗ-домен, который способен связываться с белок-связывающим лигандом, а второй полипептид содержит СНЗ-домен, который не способен связываться с белок-связывающим лигандом. В некоторых вариантах реализации первый полипептид содержит СНЗ-домен, который способен связываться с белком А, а второй полипептид содержит СНЗ-домен, который не способен связываться с белком А. В некоторых вариантах реализации первый полипептид содержит СНЗ-домен, который способен связываться с белком G, а второй полипептид содержит СНЗ-домен, который не способен связываться с белком G. В различных вариантах реализации второй полипептид содержит замещение НУ на RF в своем СНЗ-доме.

В различных вариантах реализации способа первый pH составляет от 6 до 8. В некоторых вариантах реализации второй pH составляет от 4,0 до 4,25. В некоторых случаях второй pH составляет $4,10 \pm 0,05$. В некоторых вариантах реализации третий pH составляет от 2,8 до 3,5. В некоторых вариантах реализации четвертый pH составляет от 6 до 8.

В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает дополнительную стадию хроматографии или стадию инактивации вирусов после элюирования и сбора очищенного гетеродимерного белка в элюате с низким содержанием соли (например, менее 100 ммоль, менее 50 ммоль или менее 25 ммоль). В некоторых случаях проводимость очищенной композиции снижается до $< 5,0$ мСм/см. В некоторых случаях проводимость очищенной композиции снижается до $< 2,0$ мСм/см. В некоторых вариантах

тах реализации стадию дополнительной хроматографии или стадию инактивации вирусов проводят в условиях с содержанием соли менее 100 ммоль. В некоторых случаях дополнительная стадия хроматографии включает ионообменную хроматографию. В некоторых вариантах реализации ионообменная хроматография представляет собой анионообменную хроматографию и проводится в условиях с содержанием соли менее 50 ммоль.

В различных вариантах реализации способа гетеродимерный белок представляет собой биспецифический антигенсвязывающий белок. В некоторых вариантах реализации биспецифический антигенсвязывающий белок представляет собой биспецифическое антитело.

В различных вариантах реализации любые отличительные признаки или компоненты вариантов реализации, описанных выше или далее в настоящем документе, можно комбинировать, и такие комбинации включены в объем настоящего изобретения. Любое конкретное значение, указанное выше или далее в настоящем документе, можно комбинировать с другим связанным значением, указанным выше или далее в настоящем документе, для приведения диапазона, в котором указанные значения представляют собой верхний и нижний пределы диапазона, и такие диапазоны включены в объем настоящего изобретения.

Краткое описание графических материалов

На чертеже представлено изображение процесса очистки в соответствии с вариантом реализации изобретения.

Подробное описание изобретения

Прежде чем обратиться к описанию настоящего изобретения, следует понять, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, так как указанные способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов реализации и не является ограничивающей, так как объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если отсутствуют иные определения, то все технические и научные термины в настоящем документе имеют значения, общепринятые специалистами в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Используемый в данном документе термин "около" при использовании в отношении конкретного приведенного числового значения означает, что значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 1%. Например, в настоящем документе выражение "около 100" включает 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, могут использоваться при практическом осуществлении или испытании настоящего изобретения, предпочтительные способы и материалы описаны далее. Содержание всех патентов, заявок и непатентных публикаций, упомянутых в настоящем описании, включено в настоящий документ во всей полноте посредством ссылок.

Общие сведения

Настоящее изобретение основано по меньшей мере частично на открытии того, что повторное нанесение нейтрализованного элюата, содержащего очищенный гетеродимерный белок (например, биспецифическое антитело), на ту же аффинную матрицу, которую используют для очистки белка, может значительно повысить общий выход продукта и свести к минимуму присутствие высокомолекулярных соединений при одновременном снижении затрат и занимаемой площади системы очистки для крупномасштабного коммерческого производства. Стоимость материалов и требуемая площадь для крупномасштабного производства и очистки терапевтических биспецифических антител представляют собой серьезные вопросы. Повторное использование хроматографических колонок для нескольких процессов сводит к минимуму стоимость материалов колонок (например, хроматографическая среда или смола), а также площадь, занимаемую оборудованием, необходимым для получения требуемого продукта. Очистка биспецифических антител с помощью аффинной хроматографии была описана ранее, но в этих процессах обычно используют две отдельные колонки для аффинной хроматографии (например, MabSelect SuRe™ и MabCapture A™) и используют ультрафильтрацию/диафильтрацию или солеустойчивые мультимодальные смолы для удаления солей из стадии процесса аффинной хроматографии. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что при использовании одной колонки для обеих стадий обработки с помощью аффинной хроматографии общий выход продукта может быть значительно улучшен (в среднем примерно до 92% по сравнению со средним показателем около 77% при использовании двух отдельных колонок), и соли, используемые для обеспечения надежного отделения гетеродимера от гомодимерных примесей, могут быть удалены без необходимости ультрафильтрации или диафильтрации, что снижает затраты и занимаемую площадь, обеспечивая при этом поток продукта для дополнительной хроматографии или других стадий заключительной очистки без необходимости в дорогостоящих солеустойчивых материалах.

Определения

Используемый в данном документе термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина, состоящие из четырех полипептидных цепей - двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей - соединен-

ных дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в настоящем документе как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в настоящем документе как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен, CL. В VH- и VL-областях можно дополнительно выделить области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), которые разделены более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (CDR тяжелой цепи можно сокращенно обозначить как HCDR1, HCDR2 и HCDR3; CDR легкой цепи можно сокращенно обозначить как LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Термин "высокоаффинное" антитело относится к тем антителам, которые имеют аффинность связывания с их мишенью по меньшей мере 10^{-9} моль, по меньшей мере 10^{-11} моль; не менее 10^{-11} моль; или по меньшей мере 10^{-12} моль, как измерено методом поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™ или определением аффинности в растворе методом трехфазного ИФА.

Фраза "биспецифическое антитело" включает антитело, способное селективно связывать два или более эпитопов. Биспецифические антитела обычно содержат две разные тяжелые цепи, причем каждая тяжелая цепь специфически связывает другой эпитоп - либо с двумя разными молекулами (например, антигенами), либо с одной и той же молекулой (например, с одним и тем же антигеном). Если биспецифическое антитело способно селективно связывать два разных эпитопа (первый эпитоп и второй эпитоп), аффинность первой тяжелой цепи для первого эпитопа обычно будет по меньшей мере на один к двум, трем или четырем порядкам величины ниже, чем аффинность первой тяжелой цепи для второго эпитопа, и наоборот. Эпитопы, распознаваемые биспецифическим антителом, могут быть на одной и той же или на другой мишени (например, на одном и том же или другом белке). Биспецифические антитела могут быть получены, например, путем комбинирования тяжелых цепей, распознающих разные эпитопы одного и того же антигена. Например, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие переменные последовательности тяжелой цепи, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими разные константные области тяжелой цепи, и такие последовательности могут быть экспрессированы в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина. Типичное биспецифическое антитело содержит две тяжелые цепи, каждая из которых содержит три CDR тяжелой цепи, за которыми следует (от N-конца к C-концу) CH1-домен, шарнир, CH2-домен и CH3-домен, а также легкая цепь иммуноглобулина, которая либо не придает антигенсвязывающей специфичности, но может связываться с каждой тяжелой цепью, либо может связываться с каждой тяжелой цепью и может связывать один или более эпитопов, связанных антигенсвязывающими областями тяжелой цепи, либо может связываться с каждой тяжелой цепью и обеспечивает связывание одной или обеих тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами.

В различных вариантах реализации способов, обсуждаемых в данном документе, гетеродимерные белки, биспецифические антитела, Fc-содержащие белки и т.п. могут иметь изотип IgG. В некоторых случаях гетеродимерные белки, биспецифические антитела, Fc-содержащие белки и т.п. имеют изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых случаях гетеродимерные белки, биспецифические антитела, Fc-содержащие белки и т.п. имеют изотип IgG1. В некоторых случаях гетеродимерные белки, биспецифические антитела, Fc-содержащие белки и т.п. имеют изотип IgG4. В различных вариантах реализации гетеродимерные белки, биспецифические антитела, Fc-содержащие белки и т.п. являются полностью человеческими.

Фраза "тяжелая цепь" или "тяжелая цепь иммуноглобулина" включает последовательность константной области тяжелой цепи иммуноглобулина из любого организма и, если не указано иное, включает переменную область тяжелой цепи. Переменные домены тяжелой цепи включают три CDR тяжелой цепи и четыре области FR, если не указано иное. Фрагменты тяжелых цепей включают CDR, CDR и FR и их комбинации. Типичная тяжелая цепь за переменной областью (от N-конца к C-концу) имеет CH1-домен, шарнир, CH2-домен и CH3-домен. Функциональный фрагмент тяжелой цепи включает фрагмент, который способен специфически распознавать антиген (например, распознавать антиген с KD в микромолярном, наномолярном или пикомолярном диапазоне), который способен экспрессироваться и секретироваться из клетки и который содержит по меньшей мере одну CDR.

Фраза "легкая цепь" включает последовательность константной области легкой цепи иммуноглобулина из любого организма и, если не указано иное, включает легкие цепи каппа и лямбда человека. Переменные (VL) домены легкой цепи обычно содержат три CDR легкой цепи и четыре каркасных (FR) области, если не указано иное. Обычно полноразмерная легкая цепь содержит от аминоконца до карбоксильного конца VL домен, который содержит FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, и константный домен легкой цепи. Легкие цепи, которые можно использовать с данным изобретением, включают цепи, которые, например, не связывают селективно ни первый, ни второй антиген, селективно связываемый антигенсвязывающим белком. Подходящие легкие цепи включают цепи, которые могут быть идентифицированы путем скрининга наиболее часто используемых легких цепей в существующих библиотеках

антител (влажные библиотеки или компьютерное моделирование эксперимента), причем легкие цепи существенно не влияют на аффинность и/или селективность антигенсвязывающих доменов антигенсвязывающих белков. Подходящие легкие цепи включают цепи, которые могут связывать один или оба эпитопа, которые связаны антигенсвязывающими областями антигенсвязывающего белка.

Фраза "вариабельный домен" включает аминокислотную последовательность легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина (при необходимости модифицированную), которая содержит следующие аминокислотные области в последовательности от N-конца к С-концу (если не указано иное): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. "Вариабельный домен" включает аминокислотную последовательность, способную складываться в канонический домен (VH или VL), имеющий структуру двойного бета-листа, при этом бета-листы соединены дисульфидной связью между остатком первого бета-листа и второго бета-листа.

Фраза "определяющая комплементарность область" или термин "CDR" включает аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты генов иммуноглобулинов организма, которая в норме (т.е. у животного дикого типа) появляется между двумя каркасными областями в вариабельной области легкой или тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина (например, антитело или рецептор Т-клетки). CDR может кодироваться, например, последовательностью зародышевой линии или перегруппированной или неперегруппированной последовательностью, и, например, наивной или зрелой В-клеткой или Т-клеткой. В некоторых случаях (например, для CDR3) CDR могут кодироваться двумя или более последовательностями (например, последовательностями зародышевой линии), которые не являются смежными (например, в неперегруппированной последовательности нуклеиновой кислоты), но являются смежными в последовательности нуклеиновой кислоты В-клетки, например, в результате сплайсинга или соединения последовательностей (например, рекомбинация V-D-J с образованием CDR3 тяжелой цепи).

Фраза "Fc-содержащий белок" включает антитела, биспецифические антитела, гетеродимерные белки и иммуноадгезины и другие связывающие белки, которые включают по меньшей мере функциональную часть CH2-области и CH3-области иммуноглобулина. "Функциональная часть" относится к CH2-области и CH3-области, которая может связываться с рецептором Fc (например, FcγR; или FcRn, т.е. неонатальным рецептором Fc) и/или которая может участвовать в активации комплемента. Если CH2-область и CH3-область содержит делеции, замещения и/или вставки или другие модификации, которые делают ее неспособной связывать какой-либо рецептор Fc, а также неспособной активировать комплемент, CH2-область и CH3-область не является функциональной.

Fc-содержащие белки могут содержать модификации в доменах иммуноглобулинов, в том числе случаи, когда модификации влияют на одну или более эффекторных функций связывающего белка (например, модификации, которые влияют на связывание FcγR, связывание FcRn и, следовательно, время полужизни и/или активность CDC). Такие модификации включают, но не ограничиваются ими, следующие модификации и их комбинации со ссылкой на нумерацию ЕС константной области иммуноглобулина: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438 и 439.

Например, и не в качестве ограничения, связывающий белок представляет собой Fc-содержащий белок и демонстрирует увеличенное время полужизни в сыворотке крови (по сравнению с тем же Fc-содержащим белком без указанной(ых) модификации(й)) и имеет модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, L/R/SI/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В другом примере модификация может включать модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L) и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Термин "звездообразное замещение", "Fc*" и "HC*" включает любую молекулу, тяжелую цепь иммуноглобулина, фрагмент Fc, Fc-содержащую молекулу, гетеродимерный белок и т.п., которые содержат последовательность в CH3-домене, которая отменяет связывание с белком А. Специфические модификации, такие как H95R и Y96F, которые могут уменьшать или отменять связывание белка А в CH3-домене, обсуждаются в US 8,586,713. Эта дипептидная мутация обозначается как "звездообразное замещение".

Термин "клетка" включает любую клетку, которая подходит для экспрессии последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Клетки включают клетки прокариот и эукариот (одноклеточные или многоклеточные), бактериальные клетки (например, штаммы *E. coli*, *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.* и т.д.), клетки микобактерий, грибковые клетки, дрожжевые клетки (например, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P.*

pastoris, P. methanolica и т.д.), растительные клетки, клетки насекомых (например, SF-9, SF-21, клетки насекомых, инфицированные бакуловирусом, Trichoplusia ni и т.д.), клетки животных, не относящиеся к человеку, клетки человека или слитые клетки, такие как, например, гибридомы или квадрогибридомы. В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой клетку человека, обезьяны, примата, хомяка, крысы или мыши. В некоторых вариантах реализации клетка является эукариотической и выбрана из следующих клеток: CHO (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), клетки сетчатки глаза, Vero, CV1, почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (например, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (эпидермальная), CV-1, U937, 3T3, L-клетки, C127-клетки, SP2/0, NS-0, MMT 060562, клетки Сертоли, клетки BRL 3A, клетки HT1080, миеломной клетки, опухолевой клетки и клеточной линии, полученной из вышеупомянутой клетки. В некоторых вариантах реализации клетка содержит один или более вирусных генов, например клетку сетчатки глаза, экспрессирующую вирусный ген (например, клетка PER.C6™).

Фраза "модификатор подвижной фазы" включает функциональные группы, которые снижают эффект или нарушают неспецифические (т.е. неаффинные) ионные и другие нековалентные взаимодействия между белками. "Модификаторы подвижной фазы" включают, например, соли, ионные комбинации металлов группы I и группы II с ацетатом, бикарбонатом, карбонатом, галогеном (например, хлоридом или фторидом), нитратом, фосфатом или сульфатом. Неограничивающий иллюстративный список "модификаторов подвижной фазы" включает соли ацетата бериллия, лития, натрия и калия; бикарбонаты натрия и калия; карбонаты лития, натрия, калия и цезия; хлориды лития, натрия, калия, цезия и магния; фториды натрия и калия; нитраты натрия, калия и кальция; фосфаты натрия и калия и сульфаты кальция и магния.

"Модификаторы подвижной фазы" также включают хаотропные агенты, которые ослабляют нековалентные силы или иным образом препятствуют им и увеличивают энтропию в биомолекулярных системах. Неограничивающие примеры хаотропных агентов включают бутанол, хлорид кальция, этанол, хлорид гуанидиния, перхлорат лития, ацетат лития, хлорид магния, фенол, пропанол, додецилсульфат натрия, тиомочевину и мочевину. Хаотропные агенты включают соли, влияющие на растворимость белков. Более хаотропные анионы включают, например, хлорид, нитрат, бромид, хлорат, йодид, перхлорат и тиоцианат. Более хаотропные катионы включают, например, литий, магний, кальций и гуанидиний.

"Модификаторы подвижной фазы" включают функциональные группы, которые влияют на ионные или другие нековалентные взаимодействия, которые при добавлении к градиенту или стадии pH или при уравнивании носителя белка А в "модификаторе подвижной фазы" и применении стадии или градиента pH приводит к увеличению расстояния единицы pH между элюированием гомодимерного IgG и гетеродимерного IgG (например, человеческого IgG дикого типа и того же IgG, но содержащего одну или более модификаций его СН3-домена, как описано в данном документе). Подходящая концентрация "модификатора подвижной фазы" может быть определена по его концентрации с использованием той же колонки, стадии или градиента pH с увеличением концентрации "модификатора подвижной фазы" до тех пор, пока не будет достигнуто максимальное расстояние pH при данной стадии pH или градиенте pH. "Модификаторы подвижной фазы" могут также включать неполярные модификаторы, включая, например, пропиленгликоль, этиленгликоль и тому подобное.

Используемый в данном документе термин "аффинная хроматография" представляет собой хроматографический способ, в котором используют специфические обратимые взаимодействия между биомолекулами, а не общие свойства биомолекулы, такие как изоэлектрическая точка, гидрофобность или размер, для реализации хроматографического разделения. "Аффинная хроматография с белком А" или "хроматография с белком А" относится к способу специфической аффинной хроматографии, в котором используют аффинность IgG связывающих доменов белка А к Fc-части молекулы иммуноглобулина. Эта Fc-часть содержит константные СН2- и СН3-домены иммуноглобулина человека или животного или домены иммуноглобулина, по существу аналогичные им. Белок А включает нативный белок из клеточной стенки *Staphylococcus aureus*, белок А, полученный рекомбинантными или синтетическими способом, и варианты, которые сохраняют способность связываться с областью Fc. На практике хроматография с белком А включает использование белка А, иммобилизованного на твердой подложке. См. Gagnon, Protein A Affinity Chromatography, Purification Tools for Monoclonal Antibodies, pp. 155-198, Validated Biosystems, 1996. Белок G и белок L также можно использовать для аффинной хроматографии. Твердая подложка представляет собой неводную матрицу, с которой сцепляется белок А. Такие подложки включают агарозу, сефарозу, стекло, диоксид кремния, полистирол, нитроцеллюлозу, древесный уголь, песок, целлюлозу и любой другой подходящий материал. Такие материалы хорошо известны в данной области техники. Для прикрепления второго белка к твердой подложке можно использовать любой подходящий способ. Способы прикрепления белков к подходящим твердым подложкам хорошо известны в данной области техники. См., например, Ostrove, in Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology, 182: 357-371, 1990. Такие твердые подложки с иммобилизованным белком А и без него легко доступны из многих коммерческих источников, включая такие, как Vector Laboratory (Бурлингем, Калифорния), Santa Cruz Biotechnology (Санта-Крус, Калифорния), BioRad (Геркулес, Калифорния), Amersham Biosciences (часть GE Healthcare, Упсала, Швеция), Pall (Порт Вашингтон, Нью-Йорк) и EMD-Millipore (Биллерика, Масса-

чусетс). Белок А, иммобилизованный на матрице из пористого стекла, коммерчески доступен как PROSEP®-А (миллипор). Твердая фаза также может представлять собой матрицу на основе агарозы. Белок А, иммобилизованный на агарозной матрице, коммерчески доступен как MABSELECT™ (Amersham Biosciences).

Аффинная хроматография также включает среды, которые можно использовать для селективного связывания и, следовательно, очистки антител, фрагментов антител или химерных слитых белков, которые содержат домены и/или последовательности иммуноглобулинов. Антитела включают типы IgG, IgA, IgM, IgY, IgD и IgE. Антитела также включают одноцепочечные антитела, такие как антитела верблюдовых, сконструированные антитела верблюдовых, одноцепочечные антитела, однодоменные антитела, наноантитела и т.п. Фрагменты антител включают последовательности VH, VL, CL, CH. Фрагменты антител и слитые белки, содержащие последовательности антител, включают, например, F(ab')₃, F(ab')₂, Fab, Fc, Fv, dsFv, (scFv)₂, scFv, scAb, миниантитела, диатела, триатела, тетратела, слитые с Fc белки, молекулы-ловушки и т.п. (см. Аууар et al., Methods 56 (2012): 116-129). Такие среды для аффинной хроматографии могут содержать лиганды, которые селективно связывают антитела, их фрагменты, а слитые белки содержат эти фрагменты. Такие лиганды включают связывающие антитела белки, рецепторы бактериального происхождения, антигены, лектины или анти-антитела, направленные на молекулу-мишень, антитело, требующее очистки. Например, аффинные лиганды, происходящие от верблюдовых, направленные против любого одного или более из IgG-CH1, IgG-Fc, IgG-CH3, IgG1, LC-каппа, LC-лямбда, IgG3/4, IgA, IgM и т.п., используемые в качестве аффинных лигандов (коммерчески доступные как смолы для хроматографии CAPTURESELECT, Life Technologies, Inc., Карлсбад, Калифорния).

Способы удаления нежелательных компонентов из потоков очистки

Варианты реализации способов по настоящему изобретению включают способы удаления нежелательных компонентов из технологического потока для очистки белковых продуктов. Указанные способы предназначены для удаления одного или более компонентов (например, химического компонента или соли) из элюата, полученного на стадии хроматографии, который может быть вредным для последующей стадии процесса. В некоторых вариантах реализации способ включает: (а) выполнение первой стадии хроматографии, на которой компонент присутствует в первом буфере, нанесенном на колонку для хроматографии; (b) сбор промежуточного элюата с первой стадии хроматографии, при этом промежуточный элюат содержит белковый продукт и компонент; (с) повторное нанесение промежуточного элюата на колонку для хроматографии и элюирование белкового продукта вторым буфером, содержащим компонент в концентрации ниже, чем концентрация промежуточного элюата; (d) сбор хроматографического элюата со стадии (с), при этом компонент присутствует в хроматографическом элюате в концентрации ниже, чем концентрация промежуточного элюата; и (е) нанесение хроматографического элюата на следующей стадии процесса. В некоторых вариантах реализации компонент отсутствует во втором буфере.

Как более подробно обсуждается ниже в связи со способами очистки гетеродимерных белков, в некоторых вариантах реализации компонент представляет собой соль. В некоторых случаях концентрация соли в промежуточном элюате превышает 50 ммоль. В некоторых случаях концентрация соли в промежуточном элюате составляет ≥ 100 ммоль, ≥ 150 ммоль, ≥ 200 ммоль, ≥ 250 ммоль, ≥ 300 ммоль, ≥ 350 ммоль, ≥ 400 ммоль, ≥ 450 ммоль, ≥ 500 ммоль, ≥ 600 ммоль, ≥ 700 ммоль, ≥ 800 ммоль, ≥ 900 ммоль или ≥ 1000 ммоль. В некоторых случаях концентрация соли в промежуточном элюате составляет 500 ммоль \pm 50 ммоль. В некоторых вариантах реализации концентрация соли в промежуточном элюате составляет 250 ммоль, 300 ммоль, 350 ммоль, 400 ммоль, 450 ммоль, 500 ммоль, 550 ммоль или 600 ммоль, причем каждое значение включает отклонение $\pm 10\%$.

В некоторых вариантах реализации первая стадия хроматографии выбрана из аффинной хроматографии или ионообменной хроматографии. В некоторых вариантах реализации последующая стадия процесса представляет собой вторую стадию хроматографии. В некоторых случаях последующую стадию процесса выбирают из аффинной хроматографии, ионообменной хроматографии, хроматографии со смешанным режимом или инактивации вирусов. В некоторых случаях обсуждаемые в данном документе способы можно использовать между двумя стадиями ионного обмена, при этом первая стадия ионного обмена увеличивает проводимость пула выше верхнего предела, при котором последующую стадию ионного обмена можно выполнять надлежащим образом. В некоторых случаях обсуждаемые в данном документе способы можно использовать между двумя стадиями хроматографии, при этом на первой стадии вводят химический компонент, который должен быть удален для того, чтобы последующая стадия хроматографии выполнялась надлежащим образом. В некоторых случаях обсуждаемые в данном документе способы можно использовать перед вирусной фильтрацией, чтобы снизить проводимость и, следовательно, повысить эффективность фильтрации и сократить время анализа. В некоторых случаях обсуждаемые в данном документе способы можно использовать перед хроматографией со смешанным режимом (ММС) для удаления химических компонентов, которые мешают среде ММС или разрушают ее. Например, желательно удалить из потока цитрат, который несовместим с керамическим гидроксипатитом.

В некоторых вариантах реализации белковый продукт представляет собой антитело (например,

биспецифическое антитело).

Способы очистки гетеродимерных белков

Варианты реализации способов по настоящему изобретению включают стадии, проиллюстрированные на фиг. 1. Например, способы очистки гетеродимерного белка включают: (а) загрузку смеси гетеродимерного белка и примесей на аффинную матрицу, (b) промывку аффинной матрицы первым промывочным буфером при рН 5-8 и концентрации соли более 200 ммоль, (с) элюирование и сбор гетеродимерного белка с помощью первого элюирующего буфера при рН 4-5 и концентрации соли более 200 ммоль, (d) промывку аффинной матрицы вторым промывочным буфером при рН менее 4, (е) уравнивание аффинной матрицы до рН от 5-9, (f) нейтрализацию элюата, содержащего гетеродимерный белок, до рН 5-9 и повторное нанесение нейтрализованного элюата на аффинную матрицу, (g) промывку аффинной матрицы третьим промывочным буфером, содержащим менее 100 ммоль соли, и (h) элюирование и сбор гетеродимерного белка в элюате, содержащем менее 100 ммоль соли. В некоторых вариантах реализации способы дополнительно включают стадию начального уравнивания, на которой аффинная матрица уравнивается до рН 5-9. В некоторых вариантах реализации способы дополнительно включают промывку аффинной матрицы промывочным буфером с содержанием соли менее 100 ммоль после промывки первым промывочным буфером, но перед элюированием и сбором гетеродимерного белка.

В различных вариантах реализации загрузка смеси гетеродимерного белка и примесей на аффинную матрицу включает загрузку осветленной клеточной культуры из одного или более биореакторов, содержащих клетки, экспрессирующие нуклеотидные последовательности, кодирующие гетеродимерный белок. Например, клетки могут экспрессировать нуклеотиды, кодирующие каждую из тяжелых и легких цепей, образующих биспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело CD3×CD20, биспецифическое антитело MET×MET, в котором два плеча связывают отдельные эпитопы MET, биспецифическое антитело CD3×BCMA, биспецифическое антитело CD22×CD28, биспецифическое антитело PSMA×CD28, биспецифическое антитело CD3×PSMA, биспецифическое антитело CD3×MUC16, биспецифическое антитело CD3×STEAP2 и т.п.). В некоторых случаях каждое из антигенсвязывающих плеч биспецифического антитела содержит общую легкую цепь. Осветленная клеточная культура будет содержать гетеродимерный белок (например, биспецифическое антитело), а также примеси, такие как гомодимерные соединения, белки клетки-хозяина и ДНК. В некоторых случаях гетеродимерный белок может продуцироваться в эукариотических клетках, таких как, например, клетки яичника китайского хомячка (СНО).

В некоторых вариантах реализации смесь, загруженная на аффинную матрицу, включает смесь белков, содержащих: (i) первый гомодимер, содержащий две копии первого полипептида, (ii) гетеродимер, содержащий первый полипептид и второй полипептид, и (iii) второй гомодимер, содержащий две копии второго полипептида. Первый и второй полипептиды имеют различную аффинность для аффинной матрицы таким образом, что первый гомодимер, гетеродимер и второй гомодимер могут быть разделены на основании дифференциального связывания с аффинной матрицей. Дифференциальным связыванием с аффинной матрицей можно манипулировать, изменяя, среди прочего, рН и/или ионную силу раствора, прошедшего через аффинную матрицу.

В различных вариантах реализации соль, обсуждаемая ниже или далее в настоящем документе в связи с любым буфером или элюатом (или иным образом), представляет собой соль, содержащую Cl⁻, Br⁻, I⁻, NO₃⁻, N(CH₃)₄⁺, NH₄⁺, Cs⁺, Rb⁺, K⁺, Na⁺, H⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ или Al³⁺. В некоторых вариантах реализации соль содержит Na⁺, H⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ или Al³⁺. В некоторых вариантах реализации соль содержит комбинации Na⁺, H⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ или Al³⁺ с Cl⁻, Br⁻, I⁻, NO₃⁻ или IO₄⁻. В некоторых вариантах реализации соль выбрана из CaCl₂, MgCl₂ или NaCl. В некоторых вариантах реализации соль представляет собой NaCl. В некоторых вариантах реализации соль представляет собой CaCl₂. В некоторых вариантах реализации соль представляет собой MgCl₂.

После загрузки осветленной клеточной культуры аффинную матрицу промывают промывочным буфером (первым промывочным буфером на фиг. 1), содержащим более 200 ммоль соли и имеющим рН от 5 до 9. В некоторых случаях рН промывочного буфера составляет от 6 до 8. В некоторых случаях рН промывочного буфера составляет от около 7 до около 7,5. В различных вариантах реализации рН промывочного буфера составляет или составляет около 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 или 9,0. В некоторых вариантах реализации рН промывочного буфера составляет или составляет около 7,2. В различных вариантах реализации буфер может представлять собой любой буфер, способный поддерживать рН в требуемой точке или в требуемом диапазоне. В различных вариантах реализации концентрация буфера может составлять от около 5 до около 100 ммоль. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от около 5 до около 15 ммоль. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от около 5 до около 50 ммоль. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от около 10 до около 25 ммоль. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от около 20 до около 40 ммоль. В

некоторых случаях концентрация буфера составляет от около 30 до около 50 ммоль. В различных вариантах реализации концентрация буфера составляет или составляет около 5 ммоль, 6 ммоль, 7 ммоль, 8 ммоль, 9 ммоль, 10 ммоль, 11 ммоль, 12 ммоль, 13 ммоль, 14 ммоль, 15 ммоль, 16 ммоль, 17 ммоль, 18 ммоль, 19 ммоль, 20 ммоль, 21 ммоль, 22 ммоль, 23 ммоль, 24 ммоль, 25 ммоль, 26 ммоль, 27 ммоль, 28 ммоль, 29 ммоль, 30 ммоль, 31 ммоль, 32 ммоль, 33 ммоль, 34 ммоль, 35 ммоль, 36 ммоль, 37 ммоль, 38 ммоль, 39 ммоль, 40 ммоль, 41 ммоль, 42 ммоль, 43 ммоль, 44 ммоль, 45 ммоль, 46 ммоль, 47 ммоль, 48 ммоль, 49 ммоль или 50 ммоль. В некоторых вариантах реализации концентрация промывочного буфера составляет или составляет около 10 ммоль. В некоторых вариантах реализации концентрация промывочного буфера составляет или составляет около 40 ммоль. В некоторых вариантах реализации промывочный буфер представляет собой фосфат натрия.

В некоторых случаях промывочный буфер содержит соль в концентрации от около 200 до около 800 ммоль. В некоторых случаях промывочный буфер содержит соль в концентрации от около 250 до около 750 ммоль. В некоторых случаях промывочный буфер содержит соль в концентрации от около 300 до около 700 ммоль. В некоторых случаях промывочный буфер содержит соль в концентрации от около 350 до около 650 ммоль. В некоторых случаях промывочный буфер содержит соль в концентрации от около 400 до около 600 ммоль. В некоторых случаях промывочный буфер содержит соль в концентрации от около 450 до около 550 ммоль. В некоторых случаях промывочный буфер содержит соль в концентрации около 200 ммоль, 210 ммоль, 220 ммоль, 225 ммоль, 230 ммоль, 240 ммоль, 250 ммоль, 260 ммоль, 270 ммоль, 275 ммоль, 280 ммоль, 290 ммоль, 300 ммоль, 310 ммоль, 320 ммоль, 325 ммоль, 330 ммоль, 340 ммоль, 350 ммоль, 360 ммоль, 370 ммоль, 375 ммоль, 380 ммоль, 390 ммоль, 400 ммоль, 410 ммоль, 420 ммоль, 425 ммоль, 430 ммоль, 440 ммоль, 450 ммоль, 460 ммоль, 470 ммоль, 475 ммоль, 480 ммоль, 490 ммоль, 500 ммоль, 510 ммоль, 520 ммоль, 525 ммоль, 530 ммоль, 540 ммоль, 550 ммоль, 560 ммоль, 570 ммоль, 575 ммоль, 580 ммоль, 590 ммоль, 600 ммоль, 610 ммоль, 620 ммоль, 625 ммоль, 630 ммоль, 640 ммоль, 650 ммоль, 660 ммоль, 670 ммоль, 675 ммоль, 680 ммоль, 690 ммоль, 700 ммоль, 710 ммоль, 720 ммоль, 725 ммоль, 730 ммоль, 740 ммоль, 750 ммоль, 760 ммоль, 770 ммоль, 780 ммоль, 790 ммоль или 800 ммоль. В некоторых вариантах реализации концентрация соли промывочного буфера составляет или составляет около 500 ммоль. В некоторых вариантах реализации промывочный буфер содержит около 500 ммоль NaCl. В некоторых случаях эта промывка аффинной матрицы удаляет несвязанные примеси, такие как белок клетки-хозяина, ДНК и гомодимерные соединения с небольшой аффинностью или без аффинности для материала аффинной матрицы (например, белок А).

В некоторых вариантах реализации способы включают необязательную вторую промывку перед элюированием гетеродимерного белка промывочным буфером, содержащим небольшое количество соли (< 25 ммоль) или не содержащим соль, при pH от 5 до 9. В некоторых вариантах реализации этот промывочный буфер содержит от около 10 до около 50 ммоль трис [трис(гидроксиэтил)аминометан], фосфат натрия, или ацетат, или их комбинации. В различных вариантах реализации этот промывочный буфер имеет pH, равный pH первого промывочного буфера, описанного выше.

После промывки или промывок, описанных выше, гетеродимерный белок элюируют из аффинной матрицы в элюирующем буфере (первый элюирующий буфер на фиг. 1) и собирают в элюате. Элюирующий буфер имеет pH от около 4 до около 5 и содержит соль в концентрации более 200 ммоль. В некоторых вариантах реализации pH элюирующего буфера составляет от около 4,0 до около 4,2. В некоторых вариантах реализации pH элюирующего буфера составляет от около 4,4 до около 4,6. В различных вариантах реализации pH элюирующего буфера составляет или составляет около 4,0, 4,05, 4,1, 4,15, 4,2, 4,25, 4,3, 4,35, 4,4, 4,45, 4,5, 4,55, 4,6, 4,65, 4,7, 4,75, 4,8, 4,85, 4,9, 4,95 или 5,0. В некоторых вариантах реализации pH элюирующего буфера составляет 4,1. В некоторых вариантах реализации pH элюирующего буфера составляет 4,55. В различных вариантах реализации буфер может представлять собой любой буфер, способный поддерживать pH в требуемой точке или в требуемом диапазоне. В различных вариантах реализации концентрация буфера может составлять от около 5 до около 100 ммоль. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от около 25 до около 55 ммоль. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от около 30 до около 50 ммоль. В различных вариантах реализации концентрация буфера составляет или составляет около 30 ммоль, 31 ммоль, 32 ммоль, 33 ммоль, 34 ммоль, 35 ммоль, 36 ммоль, 37 ммоль, 38 ммоль, 39 ммоль, 40 ммоль, 41 ммоль, 42 ммоль, 43 ммоль, 44 ммоль, 45 ммоль, 46 ммоль, 47 ммоль, 48 ммоль, 49 ммоль или 50 ммоль. В некоторых вариантах реализации концентрация элюирующего буфера составляет или составляет около 40 ммоль. В некоторых вариантах реализации элюирующий буфер представляет собой уксусную кислоту. В некоторых вариантах реализации элюирующий буфер представляет собой ацетат.

В некоторых случаях элюирующий буфер содержит соль в концентрации от около 200 до около 800 ммоль. В некоторых случаях элюирующий буфер содержит соль в концентрации от около 250 до около 750 ммоль. В некоторых случаях элюирующий буфер содержит соль в концентрации от около 300 до около 700 ммоль. В некоторых случаях элюирующий буфер содержит соль в концентрации от около 350 до около 650 ммоль. В некоторых случаях элюирующий буфер содержит соль в концентрации от около 400 до около 600 ммоль. В некоторых случаях элюирующий буфер содержит соль в концентрации от около 450 до около 550 ммоль. В некоторых случаях элюирующий буфер содержит соль в концентрации,

составляющей ровно или около 200 ммоль, 210, ммоль, 220 ммоль, 225 ммоль, 230 ммоль, 240 ммоль, 250 ммоль, 260 ммоль, 270 ммоль, 275 ммоль, 280 ммоль, 290 ммоль, 300 ммоль, 310 ммоль, 320 ммоль, 325 ммоль, 330 ммоль, 340 ммоль, 350 ммоль, 360 ммоль, 370 ммоль, 375 ммоль, 380 ммоль, 390 ммоль, 400 ммоль, 410 ммоль, 420 ммоль, 425 ммоль, 430 ммоль, 440 ммоль, 450 ммоль, 460 ммоль, 470 ммоль, 475 ммоль, 480 ммоль, 490 ммоль, 500 ммоль, 510 ммоль, 520 ммоль, 525 ммоль, 530 ммоль, 540 ммоль, 550 ммоль, 560 ммоль, 570 ммоль ммоль, 575 ммоль, 580 ммоль, 590 ммоль, 600 ммоль, 610 ммоль, 620 ммоль, 625 ммоль, 630 ммоль, 640 ммоль, 650 ммоль, 660 ммоль, 670 ммоль, 675 ммоль, 680 ммоль, 690 ммоль, 700 ммоль, 710 ммоль, 720 ммоль, 725 ммоль, 730 ммоль, 740 ммоль, 750 ммоль, 760 ммоль, 770 ммоль, 780 ммоль, 790 ммоль или 800 ммоль. В некоторых вариантах реализации концентрация соли в элюирующем буфере составляет или составляет около 500 ммоль. В некоторых вариантах реализации элюирующий буфер содержит около 500 ммоль NaCl. В некоторых вариантах реализации элюирующий буфер содержит около 500 ммоль CaCl₂. В некоторых вариантах реализации элюирующий буфер содержит около 500 ммоль MgCl₂.

После элюирования и сбора гетеродимерного белка из аффинной матрицы аффинную матрицу промывают промывочным буфером (вторым промывочным буфером на фиг. 1) при pH менее около 4. В некоторых вариантах реализации pH промывочного буфера составляет от около 2,5 до около 3,5. В некоторых вариантах реализации pH промывочного буфера составляет $3,0 \pm 0,2$. В различных вариантах реализации pH промывочного буфера составляет или составляет около 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8 или 3,9. Промывочный буфер может содержать любой подходящий материал для обеспечения pH или диапазона pH, указанных выше. В некоторых вариантах реализации промывочный буфер содержит уксусную кислоту в концентрации от около 20 до около 60 ммоль. В некоторых вариантах реализации промывочный буфер содержит уксусную кислоту в концентрации от около 30 до около 50 ммоль. В некоторых случаях промывочный буфер содержит около 40 ммоль уксусной кислоты. В некоторых случаях эта промывка аффинной матрицы удаляет ранее связанные примеси, такие как гомодимерные соединения с большей аффинностью к материалу аффинной матрицы (например, белок А), чем у гетеродимерного белка. В некоторых случаях способы по настоящему изобретению могут также включать дополнительную промывку аффинной матрицы буфером, имеющим более низкий pH (например, $2,45 \pm 0,2$) и более высокую концентрацию буферного материала (например, 500 ммоль уксусной кислоты), чем у промывочного буфера, обсуждаемого непосредственно выше.

После удаления дополнительных примесей с помощью промывки (или промывок), описанной выше, аффинную матрицу повторно уравнивают до pH от 5 до 9. В различных вариантах реализации аффинная матрица уравновешена до pH, составляющего ровно или около 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 или 9,0. В некоторых вариантах реализации аффинная матрица уравновешена до pH около 7,2. Уравнивание может быть выполнено с помощью уравнивающего буфера, имеющего требуемый pH. В различных вариантах реализации буфер может представлять собой любой буфер, способный поддерживать pH в требуемой точке или в требуемом диапазоне. В различных вариантах реализации концентрация буфера может составлять от около 5 до около 100 ммоль. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от около 10 до около 30 ммоль. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от около 30 до около 50 ммоль. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от около 40 до около 60 ммоль. В различных вариантах реализации концентрация буфера составляет или составляет около 10 ммоль, 11 ммоль, 12 ммоль, 13 ммоль, 14 ммоль, 15 ммоль, 16 ммоль, 17 ммоль, 18 ммоль, 19 ммоль, 20 ммоль, 21 ммоль, 22 ммоль, 23 ммоль, 24 ммоль, 25 ммоль, 26 ммоль, 27 ммоль, 28 ммоль, 29 ммоль, 30 ммоль, 31 ммоль, 32 ммоль, 33 ммоль, 34 ммоль, 35 ммоль, 36 ммоль, 37 ммоль, 38 ммоль, 39 ммоль, 40 ммоль, 41 ммоль, 42 ммоль, 43 ммоль, 44 ммоль, 45 ммоль, 46 ммоль, 47 ммоль, 48 ммоль, 49 ммоль, 50 ммоль, 51 ммоль, 52 ммоль, 53 ммоль, 54 ммоль, 55 ммоль, 56 ммоль, 57 ммоль, 58 ммоль, 59 ммоль или 60 ммоль. В некоторых вариантах реализации концентрация буфера составляет или составляет около 20 ммоль. В некоторых вариантах реализации концентрация буфера составляет или составляет около 40 ммоль. В некоторых вариантах реализации концентрация буфера составляет или составляет около 50 ммоль. В некоторых вариантах реализации буфер представляет собой фосфат натрия. В некоторых вариантах реализации указанный буфер содержит от около 10 ммоль до около 50 ммоль трис, фосфата натрия, или ацетата, или их комбинаций.

После уравнивания аффинной матрицы нейтрализованный элюат, содержащий гетеродимерный белок (теперь очищенный от гомодимерных примесей и других примесей), повторно наносят на ту же аффинную матрицу, которую использовали в стадиях процесса очистки, описанных выше, при pH от 5 до 9. В различных вариантах реализации нейтрализованный элюат повторно наносят на аффинную матрицу при pH около 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 или 9,0. В некоторых вариантах реализации pH составляет или составляет около 7,2.

После повторного нанесения нейтрализованного элюата на аффинную матрицу матрицу промывают промывочным буфером (третьим промывочным буфером на фиг. 1) при нейтральном pH и концентрации

соли менее 100 ммоль. В общем, рН этого промывочного буфера будет точно соответствовать рН нейтрализованного элюата, повторно нанесенного на аффинную матрицу, как обсуждалось выше. В различных вариантах реализации концентрация соли в этом промывочном буфере будет составлять от около 0 до около 100 ммоль, от около 0 до около 75 ммоль, от около 0 до около 50 ммоль, от около 0 до около 25 ммоль или от около 0 до около 10 ммоль. В различных вариантах реализации концентрация соли в этом промывочном буфере составляет или составляет около 99 ммоль, 95 ммоль, 90 ммоль, 85 ммоль, 80 ммоль, 75 ммоль, 70 ммоль, 65 ммоль, 60 ммоль, 55 ммоль, 50 ммоль, 45 ммоль, 40 ммоль, 35 ммоль, 30 ммоль, 25 ммоль, 20 ммоль, 15 ммоль, 10 ммоль, 5 ммоль или меньше, равно или 0 ммоль. В различных вариантах реализации буфер может представлять собой любой буфер, способный поддерживать рН в требуемой точке или в требуемом диапазоне. В различных вариантах реализации концентрация буфера может составлять от около 5 до около 100 ммоль. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от около 10 до около 30 ммоль. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от около 30 до около 50 ммоль. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от около 40 до около 60 ммоль. В различных вариантах реализации концентрация буфера составляет или составляет около 10 ммоль, 11 ммоль, 12 ммоль, 13 ммоль, 14 ммоль, 15 ммоль, 16 ммоль, 17 ммоль, 18 ммоль, 19 ммоль, 20 ммоль, 21 ммоль, 22 ммоль, 23 ммоль, 24 ммоль, 25 ммоль, 26 ммоль, 27 ммоль, 28 ммоль, 29 ммоль, 30 ммоль, 31 ммоль, 32 ммоль, 33 ммоль, 34 ммоль, 35 ммоль, 36 ммоль, 37 ммоль, 38 ммоль, 39 ммоль, 40 ммоль, 41 ммоль, 42 ммоль, 43 ммоль, 44 ммоль, 45 ммоль, 46 ммоль, 47 ммоль, 48 ммоль, 49 ммоль, 50 ммоль, 51 ммоль, 52 ммоль, 53 ммоль, 54 ммоль, 55 ммоль, 56 ммоль, 57 ммоль, 58 ммоль, 59 ммоль или 60 ммоль. В некоторых вариантах реализации концентрация промывочного буфера составляет или составляет около 20 ммоль. В некоторых вариантах реализации концентрация промывочного буфера составляет или составляет около 40 ммоль. В некоторых вариантах реализации концентрация промывочного буфера составляет или составляет около 50 ммоль. В некоторых вариантах реализации промывочный буфер представляет собой фосфат натрия. В некоторых вариантах реализации этот промывочный буфер содержит от около 10 ммоль до около 50 ммоль трис, фосфата натрия, или ацетата, или их комбинаций.

После промывки, описанной выше, очищенный гетеродимерный белок элюируют и собирают из аффинной матрицы в элюате, содержащем менее около 100 ммоль соли. В различных вариантах реализации концентрация соли в элюате составляет или составляет около 99 ммоль, 95 ммоль, 90 ммоль, 85 ммоль, 80 ммоль, 75 ммоль, 70 ммоль, 65 ммоль, 60 ммоль, 55 ммоль, 50 ммоль, 45 ммоль, 40 ммоль, 35 ммоль, 30 ммоль, 25 ммоль, 20 ммоль, 15 ммоль, 10 ммоль, 5 ммоль или меньше, равно или 0 ммоль. Как правило, элюирование гетеродимерного белка проводят с помощью буфера с рН менее около 4. В некоторых вариантах реализации рН буфера для элюирования составляет от около 2,5 до около 3,5. В некоторых вариантах реализации рН буфера для элюирования составляет $3,0 \pm 0,2$. В различных вариантах реализации рН буфера для элюирования составляет или составляет около 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8 или 3,9. Буфер для элюирования может содержать любой подходящий материал для обеспечения рН или диапазона рН, указанного выше. В некоторых вариантах реализации элюирующий буфер содержит уксусную кислоту в концентрации от около 20 до около 60 ммоль. В некоторых вариантах реализации элюирующий буфер содержит уксусную кислоту в концентрации от около 30 ммоль до около 50 ммоль. В некоторых случаях элюирующий буфер содержит около 40 ммоль уксусной кислоты.

В различных вариантах реализации загрузка аффинной матрицы из осветленной клеточной культуры или из нейтрализованного элюата, содержащего гетеродимерный белок, может включать добавление материала с концентрацией до около 75 г/л смолы аффинной матрицы. В различных вариантах реализации аффинная матрица загружена менее или ровно 65 г/л, 60 г/л, 55 г/л или 50 г/л материала.

В различных вариантах реализации способов, описанных в данном документе, ни диафильтрацию, ни ультрафильтрацию не используют для удаления солей из очищенного гетеродимерного белкового элюата. Разбавление требуемого продукта также не является необходимым для снижения концентрации соли для последующей обработки. Это снижение концентрации соли без разбавления, ультрафильтрации или диафильтрации уменьшает количество оборудования и площадь резервуаров, необходимых для очистки этих биспецифических антител.

В некоторых вариантах реализации аффинная матрица содержит лиганд (например, белок А), прикрепленный к субстрату. В некоторых случаях субстрат представляет собой шарик или частицу таким образом, что аффинная матрица представляет собой совокупность частиц, прикрепленных к лиганду. В различных вариантах реализации лиганд представляет собой белок А или белок G. Когда лиганд представляет собой белок А, белок А может представлять собой природный или модифицированный стафилококковый белок А, или он может представлять собой сконструированный белок А. Конструированный белок А может представлять собой, например, тетрамер Z-домена, тетрамер Y-домена или сконструированный белок А, в котором отсутствуют домены D и E. Эти сконструированные образцы белка А не способны связываться (или связываться с очень низкой аффинностью, если вообще связываются) с VH3-доменом иммуноглобулина, но все же могут связываться с CH3-доменами IgG1, IgG2 и IgG4.

В некоторых случаях субстрат аффинной матрицы содержит агарозу, полистиролдивинилбензол, полиметакрилат, стекло с заданным размером пор, сферический диоксид кремния, целлюлозу и т.п. или

изготовлен из них. В вариантах реализации, в которых субстрат имеет форму шарика или частицы, средний диаметр частиц составляет от 25 до 100 мкм. В некоторых вариантах реализации средний диаметр частиц составляет от около 40 до около 60 мкм. В некоторых вариантах реализации средний диаметр частиц составляет от около 45 до около 55 мкм. В некоторых вариантах реализации средний диаметр частиц составляет около 40 мкм, 41 мкм, 42 мкм, 43 мкм, 44 мкм, 45 мкм, 46 мкм, 47 мкм, 48 мкм, 49 мкм, 50 мкм, 51 мкм, 52 мкм, 53 мкм, 54 мкм или 55 мкм. В некоторых случаях средний диаметр частиц составляет около 45 мкм. В некоторых случаях средний диаметр частиц составляет около 50 мкм. В некоторых вариантах реализации средний диаметр частиц составляет 35 мкм, 45 мкм, 60 мкм, 75 мкм или 85 мкм. В некоторых вариантах реализации частицы содержат поры, имеющие средний диаметр около 1000 Å, 1050 Å, 1100 Å, 1150 Å или 1200 Å. В некоторых вариантах реализации частицы содержат поры, имеющие средний диаметр около 1100 Å.

В некоторых вариантах реализации способов гетеродимерный белок представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первый полипептид, содержащий СНЗ-домен, который способен связываться с белком А ("Fc"), и второй полипептид, содержащий СНЗ-домен, который не способен связываться с белком А ("Fc*"). В некоторых случаях второй полипептид содержит замещение H435R/Y436F (по системе нумерации ЕС; H95R/Y96F по системе нумерации экзонов IMGT) в своем СНЗ-доме (также известном как "Fc*" или "звездообразное замещение"). Таким образом, в некоторых вариантах реализации первый гомодимер представляет собой моноспецифическое антитело, имеющее два незамещенных СНЗ-домена (т.е. FcFc); второй гомодимер представляет собой моноспецифическое антитело, имеющее два замещенных СНЗ-домена H435R/Y436F (т.е. Fc*Fc*); и гетеродимерный белок представляет собой биспецифическое антитело, имеющее один незамещенный СНЗ-домен и один замещенный СНЗ-домен H435R/Y436F (т.е. Fc*Fc).

Примеры

Пример 1. Очистка биспецифического антитела (BsAb1) CD3×CD20.

Очистку BsAb1 выполняли в виде двухстадийного процесса, включая стадию хроматографии с аффинным разделением и стадию хроматографии с аффинным захватом. На стадии аффинного разделения биспецифическое антитело захватывается из осветленной кондиционированной среды, тем самым уменьшая объем продукта, повышая концентрацию белка и повышая биспецифическую чистоту за счет удаления гомодимерных соединений Fc*Fc* и FcFc. После элюирования биспецифического антитела в процессе аффинного разделения элюат доводили до более высокого pH (~7,2) для подготовки к последующей повторной загрузке на ту же аффинную колонку с целью замены буфера и инактивации вирусов. На стадии аффинного захвата биспецифическое антитело захватывалось из пула разделения нейтральной аффинности, тем самым уменьшая объем продукта, увеличивая концентрацию белка и удаляя соль из элюата, используемого на стадии аффинного разделения: все это без необходимости ультрафильтрации, диафильтрации или разбавления, что могло бы привести к повышенным требованиям к оборудованию и емкости. На обеих хроматографических стадиях использовали одну и ту же матрицу, содержащую смолу pcc MabSelect SuRe™ (GE Healthcare Life Sciences), которая содержит тетрамер Z-домена.

За процессом аффинного захвата следовала инактивация вирусов, которая включала поддержание пула биспецифических антител при pH 3,50-3,65 (с 0,25 ммоль глицина HCl) в течение 30-50 мин. За фильтрацией пула биспецифических антител следовала инактивация вирусов при нейтральном pH.

Процесс очистки включал стадии аффинного разделения и аффинного захвата, показанные в табл. 1 и 2 соответственно.

Таблица 1. Стадии процесса аффинного разделения

Описание	Раствор	Объем	Время пребывания (мин)
Уравновешивание	20 ммоль фосфата натрия, pH 7,2 ± 0,1	2 CV	6
Загрузка	Осветленная клеточная культура	≤ 65,0 г/л смолы	6
Промывка 1	10 ммоль фосфата натрия, 500 ммоль NaCl, pH 7,2 ± 0,1	3 CV	6
Промывка 2	20 ммоль фосфата натрия, pH 7,2 ± 0,1	2 CV	6

	0,1		
Элюирование	40 ммоль уксусной кислоты, 500 ммоль NaCl, pH 4,10 ± 0,05	6 CV	6
Очистка 1	40 ммоль уксусной кислоты, pH 3,0 ± 0,2	2 CV	6
Очистка 2	500 ммоль уксусная кислота, pH 2,45 ± 0,20	2 CV	6

CV - объем колонки

Таблица 2. Стадии процесса аффинного захвата

Описание	Раствор	Объем	Время пребывания (мин)
Уравновешивание	20 ммоль фосфата натрия, pH 7,2 ± 0,1	2 CV	6
Загрузка	Нейтрализованный пул аффинного разделения	≤ 65,0 г/л смолы	6
Промывка	20 ммоль фосфата натрия, pH 7,2 ± 0,1	2 CV	6
Элюирование	40 ммоль уксусной кислоты, pH 3,0 ± 0,2	3,5 CV	8
Очистка	500 ммоль уксусной кислоты, pH 2,45 ± 0,20	2 CV	6

CV - объем колонки

Результаты: многократные циклы очистки дали среднюю биспецифическую чистоту 97,1% с биспецифическим выходом через фильтрацию после инактивации вирусов 92,8% для BsAb1. Было достигнуто снижение проводимости с около 71,79 мСм/см до < 2,0 мСм/см. Сравнимые результаты были достигнуты для BsAb1, причем на стадии элюирования процесса аффинного разделения использовали 500 ммоль CaCl₂ при pH 4,45 вместо хлорида натрия, указанного в табл. 1.

Пример 2. Очистка биспецифического антитела (BsAb2) METxMET (различные эпитопы).

Очистку BsAb2 выполняли в соответствии с процессом, описанным в примере 1, но включали стадии аффинного разделения и аффинного захвата, показанные в табл. 3 и 4, соответственно.

Таблица 3. Стадии процесса аффинного разделения

Описание	Раствор	Объем	Время пребывания (мин)
Уравновешивание	10 ммоль фосфата натрия, 500 ммоль NaCl, pH 7,2 ± 0,1	3 CV	6
Загрузка	Осветленная клеточная культура	≤ 60,0 г/л смолы	6
Промывка 1	10 ммоль фосфата натрия, 500 ммоль NaCl, pH 7,2 ± 0,1	5 CV	6
Промывка 2	50 ммоль Трис, pH 7,2 ± 0,1	2 CV	6
Элюирование	40 ммоль ацетата, 500 ммоль CaCl ₂ , pH 4,55 ± 0,05	7 CV	6
Очистка 1	40 ммоль уксусной кислоты, pH 3,0 ± 0,2	2 CV	6
Очистка 2	500 ммоль уксусной кислоты	2 CV	6

CV - объем колонки

Таблица 4. Стадии процесса аффинного захвата

Описание	Раствор	Объем	Время пребывания (мин)
Уравновешивание	50 ммоль Трис, pH 7,2 ± 0,1	4 CV	6
Загрузка	Нейтрализованный пул аффинного разделения	≤ 60,0 г/л смолы	6
Промывка	50 ммоль Трис, pH 7,2 ± 0,1	2 CV	6
Элюирование	40 ммоль уксусной кислоты, pH 3,0 ± 0,2	3,5 CV	8
Очистка	500 ммоль уксусной кислоты	2 CV	6

CV - объем колонки

Результаты: многократные циклы очистки дали среднюю биспецифическую чистоту 96,0 ± 0,7% с биспецифическим выходом через фильтрацию после инактивации вирусов 90,9% для BsAb2. Было достигнуто снижение проводимости с около 70,75 мСм/см до < 2,0 мСм/см.

Пример 3. Очистка биспецифического антитела (BsAb3) ВСМА×CD3.

Очистку BsAb3 проводили в соответствии с процессом, описанным в примере 1, но включали стадии аффинного разделения и аффинного захвата, показанные в табл. 5 и 6 соответственно.

Таблица 5. Стадии процесса аффинного разделения

Описание	Раствор	Объем	Время пребывания (мин)
Уравновешивание	10 ммоль фосфата натрия, 500 ммоль NaCl, pH 7,2 ± 0,1	3 CV	6
Загрузка	Осветленная клеточная культура	≤ 60,0 г/л смолы	6
Промывка 1	10 ммоль фосфата натрия, 500 ммоль NaCl, pH 7,2 ± 0,1	3 CV	6
Промывка 2	50 ммоль Трис, pH 7,2 ± 0,1	2 CV	6
Элюирование	40 ммоль ацетата, 500 ммоль CaCl ₂ , pH 4,55 ± 0,05	6 CV	6
Очистка 1	40 ммоль уксусной кислоты, pH 3,0 ± 0,2	2 CV	6
Очистка 2	500 ммоль уксусной кислоты	2 CV	6

CV - объем колонки

Таблица 6. Стадии процесса аффинного захвата

Описание	Раствор	Объем	Время пребывания (мин)
Уравновешивание	50 ммоль Трис, pH 7,2 ± 0,1	4 CV	6
Загрузка	Нейтрализованный пул аффинного разделения	≤ 50,0 г/л смолы	6
Промывка	50 ммоль Трис, pH 7,2 ± 0,1	2 CV	6
Элюирование	40 ммоль уксусной кислоты, pH 3,0 ± 0,2	3,5 CV	8
Очистка	500 ммоль уксусной кислоты	2 CV	6

CV - объем колонки

Результаты: многократные циклы очистки дали среднюю биспецифическую чистоту 97,4% ± 0,5% с биспецифическим выходом через фильтрацию после инактивации вирусов 93,4% для BsAb3. Было достигнуто снижение проводимости с около 72,80 мСм/см до < 2,0 мСм/см.

Пример 4. Очистка биспецифического антитела (BsAb4) ВСМА×CD3.

Очистку BsAb4 проводили в соответствии с процессом, описанным в примере 1, но включали стадии аффинного разделения и аффинного захвата, показанные в табл. 7 и 8 соответственно.

Таблица 7. Стадии процесса аффинного разделения

Описание	Раствор	Объем	Время пребывания (мин)
Уравновешивание	10 ммоль фосфата натрия, 500 ммоль NaCl, pH 7,2 ± 0,1	3 CV	6
Загрузка	Осветленная клеточная культура	≤ 55,0 г/л смолы	6
Промывка 1	10 ммоль фосфата натрия, 500 ммоль NaCl, pH 7,2 ± 0,1	3 CV	6
Промывка 2	50 ммоль Трис, pH 7,2 ± 0,1	2 CV	6
Элюирование	40 ммоль ацетата, 500 ммоль CaCl ₂ , pH 4,55 ± 0,05	6 CV	6
Очистка 1	40 ммоль уксусной кислоты, pH 3,0 ± 0,2	2 CV	6
Очистка 2	500 ммоль уксусной кислоты	2 CV	6

CV - объем колонки

Таблица 8. Стадии процесса аффинного захвата

Описание	Раствор	Объем	Время пребывания (мин)
Уравновешивание	50 ммоль Трис, pH 7,2 ± 0,1	4 CV	6
Загрузка	Нейтрализованный пул аффинного разделения	≤ 55,0 г/л смолы	6
Промывка	50 ммоль Трис, pH 7,2 ± 0,1	2 CV	6
Элюирование	40 ммоль уксусной кислоты, pH 3,0 ± 0,2	3,5 CV	8
Очистка	500 ммоль уксусной кислоты	2 CV	6

CV - объем колонки

Результаты: многократные циклы очистки дали среднюю биспецифическую чистоту 94,6% ± 1,0% с биспецифическим выходом через фильтрацию после инактивации вирусов 86,0% для BsAb4. Достигнуто снижение проводимости с около 70,78 мСм/см до < 2,0 мСм/см.

Пример 5. Очистка биспецифического антитела (BsAb5) PSMA×CD28.

Очистку BsAb5 проводили в соответствии с процессом, описанным в примере 1, но включали стадии аффинного разделения и аффинного захвата, показанные в табл. 9 и 10 соответственно.

Таблица 9. Стадии процесса аффинного разделения

Описание	Раствор	Объем	Время пребывания (мин)
Уравновешивание	10 ммоль фосфата натрия, 500 ммоль NaCl, pH 7,2 ± 0,1	4 CV	6
Загрузка	Осветленная клеточная культура	≤ 55,0 г/л смолы	6
Промывка 1	10 ммоль фосфата натрия, 500 ммоль NaCl, pH 7,2 ± 0,1	5 CV	6
Промывка 2	50 ммоль Трис, pH 7,2 ± 0,1	2 CV	6
Элюирование	40 ммоль ацетата, 500 ммоль CaCl ₂ , pH 4,50 ± 0,05	7 CV	6
Очистка 1	40 ммоль уксусной кислоты, pH 3,0 ± 0,2	3 CV	6
Очистка 2	500 ммоль уксусной кислоты	2 CV	6

CV - объем колонки

Таблица 10. Стадии процесса аффинного захвата

Описание	Раствор	Объем	Время пребывания (мин)
Уравновешивание	50 ммоль Трис, pH 7,2 ± 0,1	5 CV	6
Загрузка	Нейтрализованный пул аффинного разделения	≤ 58,0 г/л смолы	6
Промывка	50 ммоль Трис, pH 7,2 ± 0,1	2 CV	6
Элюирование	40 ммоль уксусной кислоты, pH 3,0 ± 0,2	3,5 CV	8
Очистка	500 ммоль уксусной кислоты	2 CV	6

CV - объем колонки

Результаты: многократные циклы очистки дали среднюю биспецифическую чистоту 96,1% ± 0,9% с биспецифическим выходом через фильтрацию после инактивации вирусов 92,4% для BsAb5. Достигнуто снижение проводимости с около 75,09 мСм/см до < 2,0 мСм/см.

Пример 6. Очистка биспецифического антитела (BsAb6) CD22×CD28.

Очистку BsAb6 проводили в соответствии с процессом, описанным в примере 1, но включали стадии аффинного разделения и аффинного захвата, показанные в табл. 11 и 12 соответственно.

Таблица 11. Стадии процесса аффинного разделения

Описание	Раствор	Объем	Время пребывания (мин)
Уравновешивание	40 ммоль фосфата натрия, 500 ммоль NaCl, pH 7,2 ± 0,1	2 CV	6
Загрузка	Осветленная клеточная культура	≤ 55,0 г/л смолы	6
Промывка 1	40 ммоль фосфата натрия, 500 ммоль NaCl, pH 7,2 ± 0,1	5 CV	6
Промывка 2	40 ммоль Трис, 10 ммоль ацетата, pH 7,2 ± 0,1	2 CV	6
Элюирование	40 ммоль ацетата, 500 ммоль CaCl ₂ , pH 4,55 ± 0,05	7 CV	6
Очистка 1	40 ммоль уксусной кислоты, pH 3,0 ± 0,2	2 CV	6
Очистка 2	500 ммоль уксусной кислоты	2 CV	6

CV - объем колонки

Таблица 12. Стадии процесса аффинного захвата

Описание	Раствор	Объем	Время пребывания (мин)
Уравновешивание	40 ммоль Трис, 10 ммоль ацетата, pH 7,2 ± 0,1	2,5 CV	6
Загрузка	Нейтрализованный пул аффинного разделения	≤ 60,0 г/л смолы	6
Промывка	40 ммоль Трис, 10 ммоль ацетата, pH 7,2 ± 0,1	2 CV	6
Элюирование	40 ммоль уксусной кислоты, pH 3,0 ± 0,2	3,5 CV	8
Очистка	500 ммоль уксусной кислоты	2 CV	6

CV - объем колонки

Результаты: многократные циклы очистки дали среднюю биспецифическую чистоту 96,5% ± 0,7% с биспецифическим выходом через фильтрацию после инактивации вирусов 92,8% для BsAb6. Было достигнуто снижение проводимости с около 71,78 мСм/см до < 2,0 мСм/см.

Пример 7. Повышение качества продукта, полученного методом аффинного обессоливания, по сравнению с ультрафильтрацией/диафильтрацией (UFDF)

Измерения высокомолекулярных (НМВ) соединений, присутствующих в композиции BsAb1 (CD3×CD20), демонстрируют дополнительное преимущество использования повторного нанесения очищенного гетеродимерного продукта на существующую аффинную колонку по сравнению с использованием ультрафильтрации/диафильтрации (UFDF). Как показано ниже в табл. 13, повторное нанесение очищенного биспецифического антитела на существующую аффинную колонку дополнительно уменьшило НМВ соединения на 0,88%, тогда как использование UFDF увеличивало НМВ того же очищенного биспецифического антитела на 0,12%.

Таблица 13. Изменение высокомолекулярных соединений

Удаление соли	Загрузка НМВ%	Пул НМВ%	Δ НМВ%
UFDF	0,73	0,85	+0,12
Повторное нанесение на колонку для аффинной хроматографии	4,78	3,90	-0,88

Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами реализации, описанными в данном документе. Напротив, разные модификации изобретения, помимо тех, что описаны в настоящем документе, станут очевидными специалистам в данной области техники после изучения приведенного выше описания. Предполагается, что указанные модификации включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки гетеродимерного белка, включающий:

(а) введение смеси гетеродимерного белка и примесей в аффинную матрицу, содержащую белок-связывающий лиганд, при этом гетеродимерный белок содержит первый и второй полипептиды с разной аффинностью к белок-связывающему лиганду, и при этом по меньшей мере одна примесь связывает белок-связывающий лиганд и по меньшей мере одна примесь не связывает белок-связывающий лиганд;

(b) промывку аффинной матрицы первым промывочным буфером, содержащим соль в концентрации более 200 ммоль и первый рН от 5 до 9, для удаления примесей;

(c) элюирование и сбор гетеродимерного белка из аффинной матрицы в первом элюирующем буфере, содержащем соль в концентрации более 200 ммоль и второй рН от 4 до 5, для получения очищенного гетеродимерного белка в первом элюате;

(d) промывку аффинной матрицы вторым промывочным буфером, имеющим третий рН менее 4, для удаления примесей;

(e) уравнивание аффинной матрицы до четвертого рН от 5 до 9;

(f) нейтрализацию первого элюата до рН от 5 до 9 с последующим повторным нанесением первого элюата на аффинную матрицу;

(g) промывку аффинной матрицы третьим промывочным буфером, содержащим менее 100 ммоль соли; и

(h) элюирование и сбор очищенного гетеродимерного белка во втором элюате, при этом второй элюат содержит менее 100 ммоль соли.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что третий промывочный буфер содержит менее 50 ммоль соли.

3. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что примеси содержат гомодимерные соединения первого и второго полипептидов.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что белок-связывающий лиганд представляет собой белок А, а аффинная матрица содержит лиганд белка А, прикрепленный к субстрату.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что лиганд белка А представляет собой сконструированный белок А, содержащий тетрамер Z-домена, сконструированный белок А, содержащий тетрамер Y-домена, или сконструированный белок А, в котором отсутствуют D- и E-домены.

6. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что белок-связывающий лиганд представляет собой белок G, а аффинная матрица содержит лиганд белка G, прикрепленный к субстрату.

7. Способ по любому из пп. 4-6, отличающийся тем, что субстрат представляет собой частицу, а аффинная матрица содержит совокупность частиц, имеющих средний диаметр от 25 до 100 мкм.

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что частицы имеют средний диаметр от 40 до 60 мкм.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что частицы имеют средний диаметр от 45 до 55 мкм.

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что частицы имеют средний диаметр около 50 мкм.

11. Способ по любому из пп.4-10, отличающийся тем, что субстрат содержит любое одно или более из агарозы, поли(стиролдивинилбензола), полиметакрилата, целлюлозы, стекла с заданным размером пор и сферического диоксида кремния.
12. Способ по любому из пп.4-11, отличающийся тем, что частицы содержат поры, имеющие средний диаметр около 1100Å.
13. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что первый элюирующий буфер содержит соль в концентрации более 250 ммоль.
14. Способ по п.13, отличающийся тем, что концентрация соли составляет более 300 ммоль или более 400 ммоль.
15. Способ по п.14, отличающийся тем, что концентрация соли составляет около 500 ммоль.
16. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что соль выбрана из соли, содержащей:
 - (i) Cl⁻, Br⁻, I⁻, NO₃⁻, N(CH₃)₄⁺, NH₄⁺, Cs⁺, Rb⁺, K⁺, Na⁺, H⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺;
 - (ii) комбинации Na⁺, H⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ или Al³⁺ с Cl⁻, Br⁻, I⁻, NO₃⁻, или ClO₄⁻, или
 - (iii) CaCl₂, MgCl₂ или NaCl.
17. Способ по любому из пп.1-16, отличающийся тем, что второй элюат содержит менее 50 ммоль соли.
18. Способ по п.17, отличающийся тем, что второй элюат содержит менее 10 ммоль соли.
19. Способ по любому из пп.1-18, отличающийся тем, что очищенный гетеродимерный белок элюируют и собирают во втором элюате посредством третьего промывочного буфера.
20. Способ по любому из пп.1-19, отличающийся тем, что первый полипептид содержит СНЗ-домен, который способен связываться с белок-связывающим лигандом, а второй полипептид содержит СНЗ-домен, который не способен связываться с белок-связывающим лигандом.
21. Способ по любому из пп.1-20, отличающийся тем, что первый полипептид содержит СНЗ-домен, который способен связываться с белком А, а второй полипептид содержит СНЗ-домен, который не способен связываться с белком А.
22. Способ по любому из пп.1-20, отличающийся тем, что первый полипептид содержит СНЗ-домен, который способен связываться с белком G, а второй полипептид содержит СНЗ-домен, который не способен связываться с белком G.
23. Способ по п.21, отличающийся тем, что второй полипептид содержит замещение НУ на RF в своем СНЗ-домене.
24. Способ по любому из пп.1-23, отличающийся тем, что первый рН составляет от 6 до 8.
25. Способ по любому из пп.1-24, отличающийся тем, что второй рН составляет от 4,0 до 4,25.
26. Способ по п.25, отличающийся тем, что второй рН составляет 4,10 ± 0,05.
27. Способ по любому из пп.1-26, отличающийся тем, что третий рН составляет от 2,8 до 3,5.
28. Способ по любому из пп.1-27, отличающийся тем, что четвертый рН составляет от 6 до 8.
29. Способ по любому из пп.1-28, дополнительно включающий дополнительную стадию хроматографии или стадию инактивации вирусов после стадии (h).
30. Способ по п.29, отличающийся тем, что дополнительную стадию хроматографии или стадию инактивации вирусов проводят в условиях с содержанием соли менее 100 ммоль.
31. Способ по п.30, отличающийся тем, что дополнительная стадия хроматографии включает ионообменную хроматографию.
32. Способ по п.31, отличающийся тем, что ионообменная хроматография представляет собой анионообменную хроматографию и проводится в условиях с содержанием соли менее 50 ммоль.
33. Способ по любому из пп.1-32, отличающийся тем, что гетеродимерный белок представляет собой биспецифический антигенсвязывающий белок.
34. Способ по п.33, отличающийся тем, что биспецифический антигенсвязывающий белок представляет собой биспецифическое антитело.

045004

