

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202291434 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.02.06

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.04.09

(54) КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ АКТИВИРУЕМЫЕ АНТИТЕЛА

(31) 63/007,776

(32) 2020.04.09

(33) US

(86) PCT/US2021/026661

(87) WO 2021/207657 2021.10.14

(71) Заявитель:  
САЙТОМКС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.  
(US)

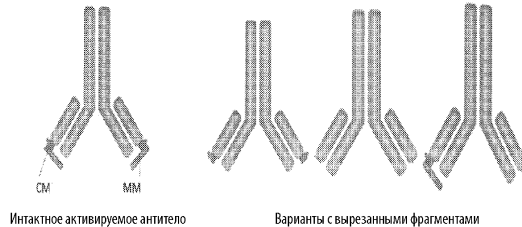
(72) Изобретатель:

Патрик Сара (US), Креббер Клаус  
(DE), Вишванатан Шридхар, Дувур  
Шанти Гонела, Урено Эрик (US)

(74) Представитель:

Тагбергенова А.Т., Тагбергенова М.М.  
(KZ)

(57) В настоящем изобретении представлена композиция, содержащая интактное активируемое антитело и его вариант с вырезанными фрагментами, способы отделения вариантов с вырезанными фрагментами интактных активируемых антител от интактных активируемых антител и родственные способы, включая способы определения или мониторинга относительного процентного содержания активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами в способе получения композиции.



A1

202291434

202291434

A1

## КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ АКТИВИРУЕМЫЕ АНТИТЕЛА

### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

В настоящей заявке заявляется приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/007776 поданной 9 апреля 2020 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

### ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка была подана вместе с перечнем последовательностей в электронной форме. Файл перечня последовательностей называется «СУТХ-056-RCT\_ST25.txt», создан 31 марта 2021 г. и имеет размер 88000 байт. Информация о перечне последовательностей в электронном формате включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к композициям и способам, относящимся к интактным активируемым антителам и их вариантам с вырезанными фрагментами, включая композиции и способы получения, очистки, измерения, мониторинга и применения композиций.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Моноклональные антитела представляют собой растущий класс терапевтических соединений, каждое из которых предназначено для связывания с антигеном-мишенью, имеющим отношение к одному из ряда клинических показаний. На сегодняшний день существует обширный список продуктов моноклональных антител, которые либо находятся на стадии исследования, либо одобрены в качестве нового лекарственного средства. В то время как стремительный рост этого класса продуктов привел к значительному прогрессу в процессах, используемых для их производства, агрегация продуктов остается серьезной проблемой, которую необходимо решать при разработке производственного процесса для каждого нового препарата моноклонального антитела. Varsha, et al. *BioPharm International* vol. 26, Issue 3. Агрегация продукта нежелательна, поскольку она приводит к снижению выхода лекарственного препарата и потенциальным проблемам безопасности, если не удалить его из состава лекарственного препарата. (*там же*) Например, агрегация может вызвать образование невидимых частиц, которые могут подвергаться воздействию

обычно не подвергающиеся воздействию эпитопы, что приводит к потенциально повышенной иммуногенности при введении пациенту. (*там же*).

Агрегаты обычно представляют собой большие запутанные кластеры денатурированных молекул антител, которые необратимо образуются либо во время экспрессии продукта в клеточной культуре, либо во время очистки продукта в последующей обработке, либо во время хранения. (*там же*). Разнообразие факторов может способствовать образованию агрегатов. Были предприняты попытки улучшить безопасность и/или эффективность терапевтических средств на основе антител, и в некоторых случаях они были достигнуты путем модификации структуры молекулы. Однако в некоторых случаях эти структурные изменения создают дополнительные проблемы в отношении производства очищенных терапевтических средств на основе антител.

Соответственно, весьма желательны новые способы производства терапевтических соединений на основе антител.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте настоящее изобретение включает композицию, включающую интактное активируемое антитело и его вариант с вырезанными фрагментами, при этом вариант с вырезанными фрагментами присутствует в уменьшенном количестве. В некоторых аспектах его вариант с вырезанными фрагментами включает антигенсвязывающий домен (AB) и по меньшей мере часть расщепляемого фрагмента (CM). В некоторых аспектах у варианта с вырезанными фрагментами отсутствует маскирующий фрагмент (MM) по меньшей мере из одного продомена.

В некоторых аспектах композиция содержит по меньшей мере приблизительно 90% интактного активируемого антитела, как измерено с помощью восстанавливающего SDS-cGE, менее чем приблизительно 10% варианта с вырезанными фрагментами, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE, менее чем приблизительно 5% высокомолекулярных соединений (HMWS), как определено с помощью SE-HPLC, и менее приблизительно 150 ppm белков клетки-хозяина (HCP), как определено с помощью соответствующего ELISA HCP. В некоторых аспектах композиция включает более 95% интактного активируемого антитела и от 0,05 до 5% варианта с вырезанными фрагментами. В некоторых аспектах композиция включает более 90% интактного активируемого антитела, от 0,05 до 5% варианта с вырезанными фрагментами, менее 150 ppm белков клетки-хозяина (HCP) и/или менее 5% HMWS. В некоторых аспектах композиция включает более чем 96%

интактного активируемого антитела, от 0,05 до 4% варианта с вырезанными фрагментами, менее чем 150 ppm НСР и менее чем 5% НМWS. В некоторых аспектах композиция включает более 97% интактного активируемого антитела, от 0,05 до 3% варианта с вырезанными фрагментами, менее 150 ppm белков клетки-хозяина (НСР) и менее 5% НМWS. В некоторых аспектах композиция включает более 98% интактного активируемого антитела, от 0,05 до 2% варианта с вырезанными фрагментами, менее 150 ppm белков клетки-хозяина (НСР) и менее 5% НМWS. В некоторых аспектах композиция включает более 99% интактного активируемого антитела, от 0,05 до 1% варианта с вырезанными фрагментами, менее 150 ppm белков клетки-хозяина (НСР) и менее 5% НМWS. В некоторых аспектах настоящее раскрытие включает контейнер, флакон, шприц или инъекторное устройство, содержащее композицию.

В одном аспекте настоящее изобретение включает способ получения композиции, включающей: (А) более 95% интактного активируемого антитела, содержащего MM, CM и AB; и (B) от 0,05 до 5% их варианта с вырезанными фрагментами, способ включает загрузку водного исходного материала, содержащего воду, (А), (B) и первую соль, в хроматографическую колонку, при этом хроматографическая колонка содержит неподвижную фазу, содержащую матрицу подложки и гидрофобные лиганды, связанные с ней, и элюирование хроматографической колонки элюентом, содержащим воду и вторую соль, с получением композиции. В одном аспекте способ включает уменьшение количества варианта с вырезанными фрагментами в технологическом потоке на 75-90%. В одном аспекте способ включает снижение количества НСР в технологическом потоке на 75-90%. В одном аспекте способ включает снижение количества НМWS в технологическом потоке на 75-90%. В одном аспекте способ включает снижение количества варианта с вырезанными фрагментами, НСР и НМWS в технологическом потоке на 70-95%.

В одном аспекте настоящее изобретение включает способ отделения интактного активируемого антитела от его варианта с вырезанными фрагментами, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности интактного активируемого антитела, включая (i) загрузку исходного водного материала, содержащего воду, интактное активируемое антитело, его вариант с вырезанными фрагментами и первую соль на хроматографическую колонку, при этом хроматографическая колонка содержит неподвижную фазу, которая содержит матрицу подложки и связанные с ней гидрофобные лиганды, и (ii)

элюирование хроматографической колонки элюентом, содержащим воду и вторую соль, с получением композиции, в которой количество варианта с вырезанными фрагментами в технологическом потоке на по меньшей мере 70%. В некоторых вариантах осуществления количество варианта с вырезанными фрагментами в технологическом потоке снижено на по меньшей мере 75%, 80%, 85% или 90%.

В одном аспекте настоящее изобретение включает композицию и способ получения композиции, содержащей по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% общего белка по массе в композиции в виде интактного активируемого антитела и от 0,1 до 10% общего белка по массе в виде его агрегированных и вариантов с вырезанными фрагментами.

В одном аспекте настоящее изобретение включает способ получения фармацевтической композиции, включающей интактное активируемое антитело и менее 5% его варианта с вырезанными фрагментами, менее 5% его агрегатов, менее 150 ppm НСР или их комбинацию, при этом указанный способ включает загрузку водного исходного материала, содержащего воду, (А), (В) и первую соль, в хроматографическую колонку, при этом хроматографическая колонка содержит неподвижную фазу, которая включает матрицу подложки и связанные с ней гидрофобные лиганды, и элюируют хроматографическую колонку элюент, содержащий воду и вторую соль, с получением композиции.

В некоторых аспектах настоящее изобретение включает введение композиции, раскрытой в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом, например, пациенту, страдающему раком, воспалительным заболеванием, аутоиммунным заболеванием или их комбинацией. В некоторых аспектах настоящее изобретение включает введение композиции, раскрытой в данном документе, с субтоксической дозой варианта с вырезанными фрагментами активируемого антитела и дозой активируемого антитела, которое активируется в микроокружении заболевания. В некоторых аспектах настоящее изобретение включает расширение терапевтического диапазона лечения субъекта путем введения композиции согласно настоящему изобретению.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения очищенной композиции интактного активируемого антитела, включающий:

(а) загрузку водного исходного материала, содержащего воду, интактное активируемое антитело, вырезанное включение и первую соль, на хроматографическую колонку,

при этом хроматографическая колонка содержит неподвижную фазу, которая содержит матрицу подложки и связанные с ней лиганды,

при этом лиганды содержат гидрофобный заместитель, и

при этом интактное активируемое антитело содержит (i) по меньшей мере первый антигенсвязывающий домен (АВ), который имеет специфическую аффинность связывания к первой биологической мишени, и (ii) первый продомен,

при этом по меньшей мере первый АВ содержит первый переменный домен легкой цепи антитела (VL) и первый переменный домен тяжелой цепи антитела (VH),

при этом первый продомен содержит первый маскирующий фрагмент (ММ) и первый расщепляемый фрагмент (СМ), и

при этом первый АВ соединен с первым продоменом; и

(b) элюирование хроматографической колонки элюентом, содержащим воду и вторую соль, с получением элюата, который содержит очищенную композицию, содержащую интактное активируемое антитело,

при этом элюат по сути деплетирован по вырезанному включению.

В другом аспекте водный исходный материал дополнительно содержит другие включения, такие как, например, белки клетки-хозяина (HCP) и/или высокомолекулярные соединения (HMWS), при этом количество этих примесей в элюате существенно снижено.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к очищенным композициям интактных активируемых антител, не содержащих или имеющих очень низкие остаточные количества вырезанного включения.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к очищенным композициям интактных активируемых антител, не содержащих или имеющих очень низкие остаточные количества вырезанной примеси, белка клетки-хозяина (HCP) и высокомолекулярных соединений (HMWS).

В другом аспекте настоящее изобретение включает способ определения или мониторинга относительного количества активируемого антитела и его усеченного варианта в процессе получения композиции путем воздействия на образец композиции, содержащий популяцию активируемого антитела и популяцию его вариантов с вырезанными фрагментами, процедуры гель-капиллярного электрофореза; отделение популяции активируемых антител от популяции их вариантов с вырезанными фрагментами в процедуре гель-капиллярного электрофореза; и количественное определение относительных количеств популяции активируемого антитела и популяции его вариантов с вырезанными фрагментами путем определения площади пика, соответствующей интактному полипептиду, кодирующему продомен, и площади

пика, соответствующей кодирующему(им) вырезанный продомен полипептиду(ам).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фигуре 1А представлены результаты масс-спектрофотометрического анализа образца, полученного из биосбора активируемого антитела к PDL1. Результаты показывают один пик, соответствующий ожидаемой молекулярной массе соответствующего включения с одним вырезанным фрагментом. Никаких пиков при ожидаемых молекулярных массах для включения с полностью вырезанными фрагментами не наблюдалось.

На фигуре 1В представлены результаты масс-спектрофотометрического анализа образца, полученного из биосбора активируемого антитела к PD1. Результаты показывают один пик, соответствующий ожидаемой молекулярной массе соответствующего включения с одним вырезанным фрагментом. Никаких пиков при ожидаемых молекулярных массах для включения с полностью вырезанными фрагментами не наблюдалось.

На фигуре 1С представлены результаты масс-спектрофотометрического анализа образца, полученного из биосбора активируемого антитела к CD166. Результаты показывают один пик, соответствующий ожидаемой молекулярной массе соответствующего включения с одним вырезанным фрагментом. Никаких пиков при ожидаемых молекулярных массах для включения с полностью вырезанными фрагментами не наблюдалось.

На фигуре 2А схематически изображены структуры интактного активируемого антитела и его вариантов с вырезанными фрагментами.

На фигуре 2В схематически изображена смесь интактного активируемого антитела и его вариантов с вырезанными фрагментами, которые могут присутствовать в композиции до лечения способом по настоящему изобретению.

На фигуре 3А схематически изображены: (1) введение смеси, показанной на фигуре 2В, в клетки субъекта; (2) связывание интактного активируемого антитела и его вариантов с вырезанными фрагментами с клетками субъекта после введения; (3) связывание вариантов с вырезанными фрагментами из композиции со здоровыми тканями; и (4) активация интактного активируемого антитела в среде пораженных (например, опухолевых) тканей и связывание с ними активированных антител.

На фигуре 3В схематически изображено: (1) связывание интактного активируемого антитела, присутствующего в композиции, после лечения способом по

настоящему изобретению при введении субъекту; (2) отсутствие связывания со здоровыми тканями введенных интактных активируемых антител; и (3) активация интактного активируемого антитела в среде только пораженных (например, опухолевых) тканей и связывание с ними активированных антител.

На фигуре 4А представлены результаты капиллярного гель-электрофореза с восстановлением додецилсульфата натрия (SDS) (SDS-cGE), проведенного на образце, содержащем активируемое антитело к CD-166, после очистки с помощью хроматографии с белком А.

На фигуре 4В представлены результаты восстановления SDS-cGE, проведенного на образце элюата после анионообменной хроматографии (анионной IEX) для образца, содержащего активируемое антитело к CD-166. Водный исходный материал для стадии анионной IEX содержал элюат стадии хроматографии с белком А, анализ которого показан на фигуре 4А.

На фигуре 4С представлены результаты восстанавливающего SDS-капиллярного гель-электрофореза (SDS-cGE), проведенного на образце, содержащем активируемое антитело к CD-166, после очистки хроматографией с гидрофобными взаимодействиями (HIC). Водный исходный материал для стадии HIC содержал элюат стадии анионной IEX, анализ которого показан на фигуре 4В.

На фигуре 5 представлена оценка катионообменной хроматографии для очистки исходного водного материала, содержащего интактное активируемое антитело к CD166 и соответствующее вырезанное включение, как описано в примере 2. Колонку элюировали градиентом NaCl путем смешивания первого буфера (25 mM NaOAc, 500 mM NaCl, pH 5,0 (град. 80 CV)) во втором буфере (25 mM NaOAc, 25 mM NaCl, pH 5,0). Линия «А» представляет поглощение при 280 нм, линия «В» представляет поглощение при 254 нм, линия «С» представляет проводимость в мСм/см, а линия «D» представляет процент первого буфера, смешанного со вторым буфером. На левой оси Y представлено поглощение в mAU, на правой оси Y представлена проводимость в мСм/см, а на оси X представлены фракции в мл.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Токсичность из-за широкой экспрессии мишеней ограничивает терапевтическую эффективность терапии моноклональными антителами. Чтобы решить эту проблему, получали рекомбинантно получены активируемые антитела, которые включают антигенсвязывающий домен (AB), расщепляемый фрагмент (CM) и маскирующий фрагмент (MM), которые способны ингибировать специфическое связывание AB с его



мишенью. Такие активируемые антитела ведут себя как антитела в отношении специфичности связывания с биологической мишенью только после активации путем воздействия определенных протеаз, в частности, протеаз, которые активируются в среде локализованного заболевания (например, в микроокружении опухоли).

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что благодаря протеазам, присутствующим в клетках-хозяевах во время производственного процесса, и относительной лабильности протеазных субстратов композиции, содержащие активируемые антитела, часто содержат значительную долю вариантов с вырезанными фрагментами, в которых отсутствует ММ и, следовательно, они свободны для беспорядочного связывания с мишенями на здоровых клетках, тем самым потенциально вызывая дозозависимую токсичность и побочные эффекты, связанные с моноклональными антителами. Наличие вариантов с вырезанными фрагментами в терапевтической дозе может иметь эффект снижения дозы интактного активируемого антитела в большом круге кровообращения, доступного для достижения тканевых мишеней (например, раковой ткани) из-за секвестрации вариантов с вырезанными фрагментами в нормальной ткани. В дополнение к наличию вариантов с вырезанными фрагментами, авторы настоящего изобретения также обнаружили, что некоторые композиции, содержащие активируемые антитела, также содержат значительные части высокомолекулярных соединений вследствие агрегации, что может снижать эффективность и повышать иммуногенность. В частности, авторы настоящего изобретения обнаружили, что варианты с вырезанными фрагментами сходны по размеру и идентичны по аминокислотной последовательности активируемому исходному антителу, за исключением укорочения, вызванного расщеплением. Из-за сходства размера, структуры и физико-химических свойств варианта с вырезанными фрагментами и интактного активируемого антитела сложно отделить варианты с вырезанными фрагментами от исходного интактного активируемого антитела, чтобы получить композицию, имеющую высокую чистоту (например, высокий процент интактного антитела, неагрегированное активируемое антитело) с высоким выходом. Как описано ниже, авторы настоящего изобретения открыли способы очистки композиций активируемых антител для селективного удаления вариантов с вырезанными фрагментами, что приводит к получению композиций, содержащих высокие уровни интактного активируемого антитела с низкими уровнями или отсутствием обнаруживаемых уровней вариантов с вырезанными фрагментами.

#### Определения

Термины «активируемое антитело», «антитело, активируемое протеазой» и

«интактное активируемое антитело» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения рекомбинантно полученного «замаскированного» связывающего соединения, которое сконструировано так, чтобы вести себя как антитело в отношении специфичности связывания с биологическую мишень только после ее активации воздействием определенных протеаз. Структурно активируемые антитела включают: (1) антигенсвязывающий домен (АВ), который, если он не замаскирован, специфически связывается с биологической мишенью; и (2) продомен, связанный (через пептидную связь) с АВ, который содержит или состоит из маскирующего фрагмента (ММ) и расщепляемого фрагмента (СМ).

Термин «анион аминокислоты» относится в данном документе к анионной форме аминокислоты. Анионный фрагмент может, например, представлять собой депротонированный альфа-карбоксил или карбоксильную группу R (например, карбоксильную группу R-группы в аспарагиновой кислоте, глутаминовой кислоте и т.п.) и т.п.

Термин «катион аминокислоты» относится в данном документе к катионной форме аминокислоты. Катионный фрагмент может, например, представлять собой протонированный альфа-амин или амин R-группы (например, фрагмент амина R-группы в аргинине (т.е. гуанидиновый фрагмент), триптофан, аспарагин, глутамин, лизин, гистидин и т.п.), и т.п.

Термин «соль аминокислоты» в данном документе относится к соли аминокислоты. Иллюстративные соли аминокислот включают, например, гидрохлорид аргинина, гидрохлорид лизина и т.п.

Термины «антигенсвязывающий домен» и «АВ» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения связывающего домена, обладающего специфической аффинностью связывания с биологической мишенью, который образован из одного или нескольких полипептидов, кодирующих легкий вариабельный домен антитела (VL), и вариабельный домен тяжелой цепи антитела (VH).

Используемый в данном документе термин «биологическая мишень» относится к белку, который является нативным для видов млекопитающих.

Используемый в данном документе термин «продомен» относится к пептиду, имеющему аминокислотную последовательность, которая кодирует, как минимум, маскирующий фрагмент (ММ) и расщепляемый фрагмент (СМ). Продомен может включать другие элементы последовательности, такие как, например, спейсер, один или несколько линкеров (например, расположенных между ММ и СМ, и/или между ММ и VL, и/или между ММ и VH, и/или между СМ и VL, и/или между СМ и VH и т.п.)

и т.п.

Термины «маскирующий фрагмент» и «ММ» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения пептида, который при расположении проксимальнее АВ препятствует связыванию АВ с биологической мишенью.

Термины «расщепляемый фрагмент» и «СМ» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения пептида, который содержит субстрат по меньшей мере для одной протеазы.

Термины «вырезанное включение» и «вариант с вырезанными фрагментами» используются в данном документе взаимозаменяемо для молекулы, которая образуется после опосредованного протеазой расщепления интактного активируемого антитела. Вырезанное включение содержит АВ соответствующего активируемого антитела, но лишено всей или части ММ (и, таким образом, лишено всего или части продомена, например, лишено всего или части по меньшей мере одного СМ и лишено всех соответствующий ММ). Термины «вырезанное включение» и «вариант с вырезанными фрагментами» могут включать как молекулы «с одним вырезанными фрагментом», так и соединения «с полностью вырезанными фрагментами».

Используемый в данном документе термин «специфическая аффинность связывания» относится к предпочтительному связыванию АВ с конкретной биологической мишенью.

Термин «включение с одним вырезанным фрагментом» или «молекулы с одним вырезанным фрагментом» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения вырезанного включения, в котором отсутствует весь или часть только одного продомена соответствующего интактного активируемого антитела. Термин «с одним вырезанным фрагментом» используется в связи с вариантами активируемых антител, где интактное активируемое антитело содержит два или более антигенсвязывающих домена (АВ) и два или более продомена.

Термин «включение с полностью вырезанными фрагментами» или «молекулы с полностью вырезанными фрагментами» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения вырезанного включения, в котором отсутствует весь или часть каждого продомена соответствующего интактного активируемого антитела.

Используемые в данном документе термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо для обозначения полимера или олигомера, содержащего встречающиеся в природе или не встречающиеся в природе аминокислотные остатки или аналоги аминокислот.

Термины «процент вырезанного включения», «% вырезанного включения»,

«процент кодирующего продомен полипептида с вырезанными фрагментами» и «% кодирующего продомен полипептида с вырезанными фрагментами» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения относительного количества кодирующего продомен полипептида с вырезанными фрагментами, присутствующего в композиции в процентах от общего количества кодирующих продомен полипептидов с вырезанными фрагментами и кодирующих продомен интактных полипептидов, где количества определяют путем восстанавливающего SDS-капиллярного гель-электрофореза («восстанавливающий SDS-cGE»). Анализ на основе восстанавливающего SDS-cGE проиллюстрирован в примере 1. Процент вырезанного включения вычисляют на основе относительного процента площади пика для кодирующего продомен полипептида с вырезанными фрагментами, и кодирующего продомен интактного полипептида следующим образом:

$$\% \text{ вырезанного включения} = \frac{\% \text{ площади пика, вырезанной}}{(\% \text{ площади пика, вырезанная} + \% \text{ площади пика, интактная})} \times 100$$

где:

$$\% \text{ Площадь пика, вырезанная} = \frac{(\text{Площадь пика кодирующего продомен полипептида с вырезанными фрагментами})}{(\text{Общая площадь пика, соответствующая всем обнаруженным молекулам})} \times 100$$

$$\% \text{ Площадь пика, интактная} = \frac{(\text{Площадь пика кодирующего продомен интактного полипептида})}{(\text{Общая площадь пиков, соответствующая всем обнаруженным молекулам})} \times 100$$

Общая площадь пиков, соответствующая всем обнаруженным молекулам, относится к сумме площадей всех пиков на хроматографе SDS-cGE.

Термины «процент интактного активируемого антитела», «% интактного активируемого антитела», «процент кодирующего продомен интактного полипептида» и «% кодирующего продомен интактного полипептида» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения относительного количества кодирующего продомен интактного полипептида, присутствующего в композиции в процентах от общего количества кодирующих продомен полипептидов с вырезанными фрагментами и кодирующих продомен полипептидов интактных полипептидов, где количества определяют путем восстанавливающего SDS-cGE, например, в анализе на основе восстанавливающего SDS-cGE, показанном в примере 1. Процент интактного активируемого антитела рассчитывают на основе относительного процента площади пика для кодирующего продомен полипептида с вырезанными фрагментами, и кодирующего продомен интактного полипептида, следующим образом:

$$\% \text{ интактного активируемого антитела} = \frac{\% \text{ площади пика, интактных}}{100} \times 100$$

(% площади пика, вырезанная + % площади пика, интактная)

где:

$$\% \text{ Площадь пика, вырезанная} = \frac{\text{(Площадь пика кодирующего продомен полипептида с вырезанными фрагментами)}}{\text{(Общая площадь пика, соответствующая всем обнаруженным молекулам)}} \times 100$$

$$\% \text{ Площадь пика, интактная} = \frac{\text{(Площадь пика кодирующего продомен интактного полипептида)}}{\text{(Общая площадь пика, соответствующая всем обнаруженным молекулам)}} \times 100$$

Термин «кодирующий продомен полипептид» относится к полипептиду в активированном антителе, который содержит аминокислотную последовательность, которая кодирует продомен. Кодирующие продомен полипептиды могут содержать аминокислотную(ые) последовательность(и), которые помимо продомена кодируют другие элементы активированного антитела. Например, если продомен находится внутри полипептида, кодирующего легкую цепь антитела, кодирующий продомен полипептид также кодирует по меньшей мере VL. Аналогичным образом, в других вариантах осуществления, если продомен находится в полипептиде, кодирующем тяжелую цепь антитела, полипептид, кодирующий продомен, также кодирует по меньшей мере VH. Аналогичным образом, если продомен находится в полипептиде, кодирующем цепь scFv, кодирующий продомен полипептид также кодирует по меньшей мере VL и VH.

Термин «кодирующий продомен полипептид с вырезанными фрагментами» относится в данном документе к кодирующему продомен полипептиду с вырезанными фрагментами, который образуется после вырезания продомена.

Термин «кодирующий продомен интактный полипептид» относится в данном документе к кодирующему продомен полипептиду, который не был вырезан и который содержит интактный продомен.

Термин «по сути деплетированный» используется в данном документе для обозначения композиции элюата, в котором либо отсутствуют поддающиеся обнаружению вырезанное включение, либо относительный уровень вырезанного включения снижено на по меньшей мере 20% по сравнению с уровнем вырезанного включения, присутствующего в водном исходном материале, где процентное снижение рассчитывается следующим образом:

$$\frac{\text{«% вырезанного включения»}_{\text{водный исходный материал}} - \text{«% вырезанного включения»}_{\text{элюат}}}{100},$$

где «% вырезанного включения» является таким же, как определено выше.

Термин «по сути не содержит» используется в данном документе в связи с вариантом с вырезанными фрагментами и вырезанным включением для обозначения

композиции, в которой либо не присутствует поддающееся обнаружению вырезанное включение, либо присутствует вырезанное включение, в котором % вырезанного включения составляет менее чем 5%, как определено с помощью SDS-cGE, например, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% или любое числовое значение или диапазон от нуля до 5%.

Термины «связанное соответствующее вырезанное включение» и «связанное вырезанное включение» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения вырезанного включения, которое удерживается в хроматографической колонке.

Термин «спейсер» относится в данном документе к аминокислотному остатку или пептиду, включенному в свободный конец продомена. В некоторых аспектах спейсер (или «заголовок») может содержать остатки глутамина (Q). В некоторых аспектах остатки в спейсере минимизируют действие аминопептидазы и/или экзопептидазы для предотвращения расщепления N-концевых аминокислот.

Термин «линкер» относится в данном документе к аминокислотному остатку или пептиду, функция которого заключается в обеспечении дополнительного физического разделения между элементами MM, CM и/или AB активируемого антитела.

Используемые в данном документе термины «высокомолекулярные соединения» и «HMWS» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения примесей в композиции (например, агрегатов), имеющих эффективную молекулярную массу, превышающую эффективную молекулярную массу мономерного интактного активируемого антитела, как определено с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC, такой как анализ, описанный в примере 1).

Термин «эффективная молекулярная масса» относится к молекулярной массе, определенной с помощью анализа SE-HPLC, такого как анализ, описанный в примере 1.

Используемый в данном документе термин «изократический» относится к использованию элюента, имеющего по сути постоянный или фиксированный состав на протяжении стадии элюирования.

Используемый в данном документе термин «неподвижная фаза хроматографии гидрофобного взаимодействия» или «неподвижная фаза HIC» взаимозаменяемо относится к типу неподвижной фазы, которая имеет лиганды, предназначенные для взаимодействия с соединениями посредством исключительно гидрофобных взаимодействий.

Термин «неподвижная фаза хроматографии на мультимодальных разделительных матрицах» или «неподвижная фаза ММС» взаимозаменяемо относится в данном документе к типу неподвижной фазы, которая имеет лиганды, взаимодействующие с соединениями посредством гидрофобных взаимодействий, а также к одному или нескольким дополнительным типам взаимодействий, которые не являются гидрофобными взаимодействиями (такие как, например, электростатические (через заряженные заместители лиганда), водородные связи, тиофильность и т.п.).

Используемые в данном документе термины «белки клетки-хозяина» и «НСР» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения белков, которые являются нативными для клетки-хозяина, из которой экспрессируется интактное активируемое антитело.

Используемый в данном документе термин «общий выход белка» относится к проценту общего белка, извлеченного в хроматографическом элюате, на основе общего белка в водном исходном материале и измеренному по поглощению при длине волны 280 нм в анализе УФ-спектрометрии.

Используемый в данном документе термин «промежуточная единичная операция» относится к стадии процесса, который происходит между стадией процесса культивирования клеток и стадией процесса гидрофобной хроматографии.

Термин «композиция нерасфасованного промежуточного продукта» относится к композиции продукта промежуточной единичной операции.

Используемый в данном документе термин «композиция биосбора» относится к композиции, полученной на стадии культивирования клеток, которая продуцирует композицию, содержащую активируемое антитело, представляющее интерес.

Термин «последовательный», когда он используется в связи с описанием взаимосвязи между единичными операциями, используется в данном документе для обозначения двух или более единичных операций, выполняемых последовательно по времени и порядку, либо пакетно, полунепрерывно, либо непрерывно, сначала, затем второй и так далее.

Используемый в данном документе термин «реагент для конъюгации» относится к реактивной форме фрагмента конъюгации, который содержит фрагмент конъюгации, ковалентно связанный с реактивным линкером.

Используемый в данном документе термин «по сути соответствует», когда он используется в связи с двумя аминокислотными последовательностями, относится к уровню идентичности по меньшей мере приблизительно 90% при оптимальном выравнивании.

Две полипептидные последовательности являются «оптимально выровненными», когда они выровнены с использованием определенных параметров, т.е. определенной матрицы аминокислотных замен, штрафа за наличие гэпа (также называемого штрафом за открытие гэпа) и штрафа за удлинение гэпа, чтобы получить максимальный возможный балл за сходство для этой пары последовательностей. Матрица BLOSUM62 (Henikoff and Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(22):10915-10919) часто используется в качестве матрицы замен по умолчанию в алгоритмах выравнивания полипептидных последовательностей (таких как BLASTP). Штраф за существование гэпа налагается за введение одного аминокислотного гэпа в одну из выровненных последовательностей, а штраф за удлинение гэпа налагается за каждое положение остатка в гэпе. Если не указано иное, в данном документе используются следующие параметры выравнивания: матрица оценок BLOSSUM62, штраф-11 за наличие пробела и штраф-1 за расширение пробела. Показатель выравнивания определяется аминокислотными позициями каждой последовательности, с которых начинается и заканчивается выравнивание (например, окно выравнивания), и, необязательно, вставкой гэпа или нескольких гэпов в одну или обе последовательности, чтобы получить максимально возможная оценка сходства.

Что касается любых и всех числовых диапазонов, представленных в данном документе, предполагается, что диапазоны включают числовые пределы, которые определяют диапазон.

#### Способы и композиции по настоящему изобретению

Настоящее изобретение относится к получению очищенных композиций интактного активируемого протеазой антитела, по сути не содержащего вырезанного включения, и способам получения таких композиций. Способ получения очищенных композиций также эффективен для удаления других примесей. Структурно активируемые антитела содержат: (1) антигенсвязывающий домен (АВ), который, если он не замаскирован, специфически связывается с биологической мишенью; и (2) продомен, связанный с АВ, который содержит маскирующий фрагмент (ММ) и расщепляемый фрагмент (СМ). СМ расположен относительно компонентов ММ и АВ таким образом, что расщепление СМ приводит к отсоединению ММ от его положения проксимальнее АВ. Таким образом, расщепление обычно приводит к образованию активированного антитела, способного специфически связываться с биологической мишенью. Часто активируемое антитело представляет собой гомодимер, состоящий из двух идентичных АВ, двух идентичных СМ и двух идентичных ММ. В таких случаях вариант с вырезанными фрагментами активируемого антитела может представлять



собой вариант с одним вырезанным фрагментом, в котором расщеплен только один из двух СМ, так что вариант с вырезанными фрагментами содержит один полный СМ и один полный ММ, но не содержит часть один СМ и все один ММ.

Активируемые антитела могут быть сконструированы для избирательной активации в пораженной ткани путем включения в СМ субстрата для протеазы, которая в большей степени находится в активном состоянии в пораженной ткани. Таким образом, активируемые антитела обладают потенциалом для смягчения опосредованной мишенью токсичности, которая может возникнуть, когда моноклональные антитела связываются с биологической мишенью, которая широко распространена за пределами очага заболевания. См. Desnoyers, et al., *Science Translational Medicine* (16 October 2013) 5(207): 207ra144. Активируемые антитела описаны в ряде публикаций, включая, например, WO 2009/025846, WO 2010/096838, WO 2010/081173, WO 2013/163631, WO 2013/192546, WO 2013/192550, WO 2014/026136, WO 2014/052462, WO 2014/107599, WO 2014/197612, WO 2015/013671, WO 2015/048329, WO 2015/066279, WO 2015/116933, WO 2016/014974, WO 2016/118629, WO 2016/149201, WO 2016/179285, WO 2016/179257, WO 2016/179335, WO 2017/011580, PCT/US2017/059740, серийные номера предварительной заявки США 62/469429, 62/572467 и 62/613358, WO 2012/025525, WO 2017/025698, WO 2016/046778, WO 2016/179003, WO 2016/182064, WO 2017/156178, WO 2017/143094, WO 2017/162587, WO 2013/128194, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Дополнительные иллюстративные примеры активируемых антител, применимых для использования в способах и композициях по настоящему изобретению, более подробно описаны ниже.

Хотя это очень желательный продукт, получение очищенных композиций активируемых антител становится более сложным из-за их активируемой природы. Анализ биосбора активируемых антител выявил наличие вырезанного включения – соединения, однозначно ассоциированного с активируемыми антителами. Из-за потенциальных эффектов нецелевой токсичности и снижения эффективности нежелательно иметь в композиции или фармацевтическом продукте значительные количества вырезанного включения, т.е. «активированного» активируемого антитела, которое может свободно связываться со своей биологической мишенью. Наличие вариантов с вырезанными фрагментами в лекарственном препарате нежелательно из-за потенциального влияния на профиль безопасности препарата.

Удаление вырезанного включения из композиций интактного активируемого антитела затруднено из-за относительно небольших различий между желаемым

продуктом и вырезанным включением в отношении таких свойств, как размер молекулы, структура, аминокислотный состав, а также того факта, что их аминокислотные последовательности могут быть на 100% идентичными по большинству их соответствующих структур. Структурно отличие интактного активируемого антитела от соответствующего вырезанного включения заключается в отсутствии всего или части по меньшей мере одного продомена в вырезанном включении. В некоторых вариантах осуществления маскирующий фрагмент представляет собой относительно короткую пептидную последовательность, например, менее чем 50 аминокислот, менее чем 40, 30, 20, 15, 14, 13, 12, 11 или 10 аминокислот в длину, и молекулы с вырезанными фрагментами и интактное активируемое антитело может отличаться приблизительно количеством аминокислот в маскирующем фрагменте. Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что варианты с одним вырезанным фрагментом являются преобладающим вариантом с вырезанными фрагментами, так что вся разница между интактным активируемым антителом и вариантом с вырезанными фрагментами заключается в отсутствии части одного продомена, например, вариант с вырезанными фрагментами отличается от интактного активируемого антитела только в том случае, когда отсутствует MM и часть CM. Таким образом, размер и физико-химические свойства интактного активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами аналогичны, что затрудняет разделение молекул.

Характеристика композиций биосбора, содержащих активируемое антитело, имеющее две легкие цепи, каждая из которых кодирует продомен, и две тяжелые цепи, показала, что все или почти все вырезанное включение представляет собой включение с одним вырезанным фрагментом (т.е. включение с не полностью вырезанными фрагментами), как показано масс-спектрами трех различных композиций активируемых антител на фигурах 1A-C. Таким образом, когда активируемое антитело имеет более одного кодирующего продомен полипептида, разделение интактного активируемого антитела и вырезанного включения усугубляется тем фактом, что преобладающие виды молекул с вырезанными фрагментами, включение с одним вырезанными фрагментом, структурно очень сходны с соответствующим интактным активируемым антителом. В некоторых аспектах молекулярная масса вырезанного включения составляет приблизительно 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% от молекулярной массы интактного активируемого антитела. В некоторых аспектах молекулярная масса кодирующего продомен полипептида с вырезанными фрагментами составляет приблизительно 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% от молекулярной массы кодирующего

продомен интактного полипептида. В некоторых аспектах вырезанное включение на приблизительно 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентично аминокислотной последовательности интактного активируемого антитела.

В некоторых аспектах вариант с вырезанными фрагментами может содержать 1, 2, 3, 4 или более аминокислотных остатков продомена. В некоторых аспектах вариант с вырезанными фрагментами может содержать 1, 2, 3, 4 или более аминокислотных остатков СМ. В некоторых аспектах вариант с вырезанными фрагментами может содержать 1, 2, 3, 4 или более аминокислотных остатков линкера. В некоторых аспектах вариант с вырезанными фрагментами может содержать 1, 2, 3, 4 или более аминокислотных остатков линкера и СМ.

Несмотря на эту проблему, был обнаружен способ, который чрезвычайно эффективен при отделении интактного активируемого антитела от соответствующего вырезанного включения с относительно высоким выходом. Способ получения очищенных композиций интактного активируемого антитела включает:

(a) загрузку водного исходного материала, содержащего воду, интактное активируемое антитело, вырезанное включение и первую соль, на хроматографическую колонку,

при этом хроматографическая колонка содержит неподвижную фазу, которая содержит матрицу подложки и связанные с ней лиганды,

при этом лиганды содержат гидрофобный заместитель, и

при этом интактное активируемое антитело содержит (i) по меньшей мере первый антигенсвязывающий домен (АВ), который имеет специфическую аффинность связывания к первой биологической мишени, и (ii) первый продомен,

при этом по меньшей мере первый АВ содержит первый переменный домен легкой цепи антитела (VL) и первый переменный домен тяжелой цепи антитела (VH),

при этом первый продомен содержит первый маскирующий фрагмент (ММ) и первый расщепляемый фрагмент (СМ), и

при этом первый АВ соединен с первым продоменом; и

(b) элюирование хроматографической колонки элюентом, содержащим воду и вторую соль, с получением элюата, который содержит очищенную композицию, содержащую интактное активируемое антитело,

при этом элюат по сути деплетирован по вырезанному включению.

Стадии (a) и (b) вместе обозначаются в данном документе как «процесс гидрофобной хроматографии». Элюат и, таким образом, очищенная композиция по

сути деплетированы по вырезанному включению. В продукте элюирования из хроматографической колонки наблюдали отчетливые и отдельные пики интактного активируемого антитела и соответствующего вырезанного включения. Несмотря на сходство в структуре интактного и вырезанного включения, соединения легко разделялись на хроматографических колонках, которые, по меньшей мере частично, основывались на гидрофобных взаимодействиях. Образовавшийся интактный элюат, богатый активируемыми антителами, был по сути лишен соответствующего вырезанного включения. Этот процесс представляет собой легко масштабируемый и высокопроизводительный процесс для создания высокочистых композиций интактного активируемого антитела с высоким выходом общего белка.

Было обнаружено, что интактное активируемое антитело элюируется в виде отчетливого пика перед соответствующим вырезанным включением, а также перед другими включениями, такими как, например, высокомолекулярные соединения («НМWS») и белок клетки-хозяина (НСП). Это явление наблюдалось для различных композиций водного исходного материала, содержащих интактное активируемое антитело и соответствующее вырезанное включение, имеющую разные аминокислотные последовательности и специфичность к разным биологическим мишеням, как показано в примерах. Ввиду достигнутого разрешения и профилей пиков, в некоторых вариантах осуществления стадию элюирования (b) проводят в изократических условиях.

Во многих вариантах осуществления после выполнения стадии (b) процесс дополнительно включает стадию очистки колонки, которая включает промывку хроматографической колонки очищающим средством. Часто в этих вариантах осуществления способ по настоящему изобретению не включает стадию элюирования связанной соответствующей вырезанного включения и/или других включений, если они присутствуют в водном исходном материале (таких как, например, НМWS, НСП и т.п.) из хроматографическую колонки со вторым элюентом перед стадией очистки колонки. Поскольку примеси по сути остаются на колонке после элюирования интактного активируемого антитела, может быть желательным проводить стадию очистки без отдельного элюирования примесей, таким образом, дополнительно повышая высокопроизводительный характер способа по настоящему изобретению. Подходящие чистящие средства включают любые из множества известных в данной области техники средств, включая, например, водный раствор кислоты; водный раствор основания, органический растворитель, смешанный органический растворитель (например, содержащий два или более различных органических растворителя), водную

смесь одного или более органических растворителей, смесь любого из вышеперечисленных и т.п. Иллюстративные чистящие средства включают водный раствор гидроксида натрия, этанол, изопропанол, этиленгликоль, раствор гидрохлорида гуанидина, кислый раствор пепсина, раствор лауроилсаркозината натрия и т.п., а также любую комбинацию двух или более из них.

Что касается неподвижной фазы, используемой в способе по настоящему изобретению, можно использовать любой из большого разнообразия известных материалов матрицы подложки. Иллюстративные материалы поддерживающей матрицы, которые подходят, включают гидрофильный полимер, такой как, например, углевод (такой как, например, агароза (например, торговая марка SEPHAROSE (GE Healthcare Lifesciences), Capto™ ImpRes (GE Healthcare Lifesciences), сшитая целлюлоза (например, среда Cellufine™ HIC (Amsbio) и т.п.), смола на основе полиметакрилата (например, смола Macro-Prep® HIC (Bio-Rad, Inc.) и т.п.), смола на основе полистирола (например, смола Bio-Beads™ SM-2 (Bio-Rad, Inc.) и т.п.), диоксид кремния, синтетический сополимер, а также любые другие матричные материалы для хроматографии, известные в данной области техники. Поддерживающая матрица может быть в любой из множества форм, включая, например, форму частиц, форму гранул, форму мембраны и т.п.

Любой из множества известных видов лигандов, имеющих гидрофобный заместитель, может быть использован в способах по настоящему изобретению. Примеры гидрофобных заместителей включают, например, алкильный заместитель с прямой цепью (включая, например, метил, этил, *n*-пропил, *n*-бутил, *n*-пентил, *n*-гексил, *n*-гептил, *n*-октил и аналогичный), разветвленный алкильный заместитель (такой как, например, изопропил, *трет*-бутил и т.п.), арильный заместитель (такой как, например, фенил, алкилзамещенный фенил и т.п.) и т.п., а также любую комбинацию двух или более типов гидрофобных заместителей. В некоторых вариантах осуществления гидрофобный заместитель содержит C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub> алкильный заместитель (т.е. C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub> или C<sub>10</sub> заместитель) и/или фенильный заместитель. Часто C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub> алкильный заместитель выбирают из группы, состоящей из бутильного заместителя (т.е. C<sub>4</sub>) или октильного заместителя (т.е. C<sub>8</sub>). Гидрофобные заместители могут быть связаны с матрицей подложки посредством любой из множества связей, включая, например, O-эфир, S-эфир и т.п. Примеры лигандов (включая -O-линкер), подходящих для использования в практике настоящего изобретения, включают -O-Ph, -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub> (-S-бутил), -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub> (O-бутил), -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CH<sub>3</sub> (O-октил), -O-CH<sub>2</sub>-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-OH, -O-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> и т.п. В некоторых вариантах осуществления, как более подробно описано

ниже, лиганды могут дополнительно содержать дополнительные заместители, которые облегчают разделение посредством взаимодействий, отличных от гидрофобных, таких как, например, электростатические, водородные связи, тиофильные и т.п.

В некоторых вариантах осуществления неподвижная фаза представляет собой неподвижную фазу гидрофобной хроматографии (НГС), которая облегчает разделение только за счет гидрофобных взаимодействий. Типичные лиганды НГС с неподвижной фазой могут содержать любой из гидрофобных заместителей, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления лиганды содержат заместитель, выбранный из группы, состоящей из фенила, бутила, октила и изопропила. Неподвижные фазы НГС легко доступны в продаже. В конкретных вариантах осуществления неподвижная фаза содержит лиганд, выбранный из группы, состоящей из -О-фенила, -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub> (т.е. -S-бутил), -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub> (т.е. О-бутил), -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CH<sub>3</sub> (т.е. О-октил), -O-CH<sub>2</sub>-СНОН-СН<sub>2</sub>-ОН, -O-СН -(СН<sub>3</sub>)<sub>2</sub> и т.п., а также любую комбинацию двух или более различных лигандов.

В других вариантах осуществления неподвижная фаза представляет собой неподвижную фазу хроматографии на мультимодальных разделительных матрицах (ММС). В этих вариантах осуществления лиганды содержат один или несколько гидрофобных заместителей и по меньшей мере один дополнительный заместитель, облегчающий разделение на основе взаимодействия, отличного от гидрофобности, такого как, например, электростатическое, водородное связывание, тиофильность и подобное. Иллюстративные неподвижные фазы ММС, подходящие для использования в практике настоящего изобретения, включают лиганды, которые имеют, например, гидрофобный заместитель и один или несколько заместителей, выбранных из группы, состоящей из сульфидного заместителя, карбоксильного заместителя и аминного заместителя. Часто карбоксильный заместитель и/или аминный заместитель загружают в соответствии с используемыми условиями процесса. Неподвижные фазы ММС, подходящие для использования в практике настоящего изобретения, включают те, которые имеют лиганд, выбранный из группы, состоящей из N-бензилметилэтанолamina, N-бензилметилэтанолamina, N-бензоилгомоцистеина, N-бензоилгомоцистеина, октиламина и т.п.

Наличие гидрофобного заместителя в иммобилизованном лиганде, по-видимому, оказывает существенное влияние на облегчение отделения интактного активируемого антитела от вырезанного включения. Отделение интактного активируемого антитела от вырезанного включения было достигнуто в высокой степени с использованием процесса гидрофобной хроматографии, как показано в

примерах 3 (с использованием неподвижной фазы НИС), 4 (с использованием неподвижной фазы НИС) и 5 (с использованием неподвижной фазы ММС).

В отличие от этого, отделение интактного активируемого антитела от вырезанного включения не было достигнуто с помощью катионообменной хроматографии, как описано в примере 2. Аналогичным образом, использование анионной хроматографии также не оказало влияния на отделение интактного активируемого антитела от выделенного включения, как описано в примерах 3-5.

Процесс гидрофобной хроматографии инициируют путем загрузки в хроматографическую колонку водного исходного материала, содержащего воду, интактное активируемое антитело, вырезанное включение и первую соль. В некоторых вариантах осуществления водный исходный материал может содержать дополнительные компоненты, в том числе дополнительные включения, такие как, например, один или несколько продуктов стадии процесса культивирования клеток (например, белки клетки-хозяина, ДНК и т.п.), одно или несколько остаточных соединений из расположенной выше единичной операции очистки (например, белок А, белок G и т.п.), HMWS (например, агрегаты мономерных активируемых антител, присутствующих в водном исходном материале, и т.п.), низкомолекулярные соединения (LMWS), и т.п.

Соли, пригодные для использования в качестве первой соли в водном исходном материале, могут представлять собой любую соль, которая способствует связыванию интактного активируемого антитела и вырезанного включения с неподвижной фазой колонки. Подходящие первые соли и концентрации первой соли для водного исходного материала, а также вторые соли и концентрации второй соли для элюента можно легко определить, выполнив серию испытаний с использованием градиента концентрации соли и идентифицировав соль и концентрацию соли, которая влияет на связывание интактного активируемого антитела с неподвижной фазой, позволяя включениям либо вымываться через неподвижную фазу, либо оставаться связанными со неподвижной фазой, и определять вторую соль и концентрацию соли, которая влияет на избирательное элюирование желаемого интактного активируемого антитела из неподвижной фазы. В некоторых вариантах осуществления первая соль и вторая соль представляют собой одну и ту же соль. В других вариантах осуществления первая соль и вторая соль представляют собой разные соли. Каждая из первой и/или второй соли может независимо также содержать смесь видов солей.

Иллюстративные первая соль и вторая соль, каждая независимо, содержат анион, выбранный из группы, состоящей из  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  (ацетат-

ион), цитрат-ион,  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $H_2PO_4^-$ ,  $I^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $ClO_4^-$ ,  $SCN^-$ , анион аминокислоты и т.п. В некоторых вариантах осуществления каждая из первой соли и второй соли может независимо содержать катион, выбранный из группы, состоящей из  $N(CH_3)_4^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Rb^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$ ,  $Ca^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ , катион аминокислоты и т.п. Первая соль может быть введена в водную композицию, содержащую интактное активируемое антитело и соответствующее вырезанное включение, непосредственно перед технологической стадией гидрофобной хроматографии, или она может быть введена в связи с технологической стадией перед технологической стадией гидрофобной хроматографии (например, в промежуточной единичной операции, как описано ниже). В этой последней ситуации в композицию необязательно может быть добавлена дополнительная первая соль, и/или композиция может быть разбавлена, чтобы соответствовать желаемым условиям загрузки колонки.

Когда хроматографическая колонка содержит неподвижную фазу НИС, первая соль обычно проявляет космотропное (высаливающее) поведение. Такие соли легко идентифицировать, например, по ряду ионов Гофмейстера. См., например, Tadeo, et al., *Biophysical Journal* (2009) 97:2595, и Hyde, et al., *Org. Process Res. Dev.* (2017) 21:1355, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления каждая из первой соли и второй соли независимо содержит анион и/или катион, который является более космотропным, чем хаотропным. В некоторых из этих вариантов осуществления каждая из первой соли и второй соли независимо содержит анион, выбранный из группы, состоящей из  $PO_4^{3-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $OH^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $F^-$ ,  $CH_3COO^-$  (ацетат-ион), цитрат-ион, анион аминокислоты и  $Cl^-$ . В других вариантах осуществления первая соль и вторая соль, каждая независимо, содержат анион, выбранный из группы, состоящей из  $PO_4^{3-}$ ,  $SO_4^{2-}$  и  $HPO_4^{2-}$ .

В некоторых из этих вариантов осуществления первая соль и вторая соль, каждая независимо, содержат катион, выбранный из группы, состоящей из  $N(CH_3)_4^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Rb^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$ ,  $Ca^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  и катиона аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления первая соль и вторая соль, каждая независимо, содержат катион, выбранный из группы, состоящей из  $NH_4^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$  и  $Mg^{2+}$ . В определенных вариантах осуществления каждая из первой соли и второй соли независимо содержит катион, выбранный из группы, состоящей из  $NH_4^+$ ,  $K^+$  и  $Na^+$ . В некоторых вариантах осуществления первая соль и вторая соль, каждая независимо, содержат катион, выбранный из группы, состоящей из  $NH_4^+$ ,  $K^+$  и  $Na^+$ , и анион, выбранный из группы, состоящей из  $PO_4^{3-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $OH^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $CH_3COO^-$  (ацетат-ион), цитрат-ион,  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,



$\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\Gamma^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  и  $\text{SCN}^-$ .

В некоторых вариантах осуществления каждая из первой соли и второй соли независимо выбрана из группы, состоящей из  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$  и  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ . В некоторых вариантах осуществления каждая из первой соли и второй соли независимо выбрана из группы, состоящей из  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  и  $\text{K}_3\text{PO}_4$ . В других вариантах осуществления каждая из первой соли и второй соли независимо выбрана из группы, состоящей из  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из первой соли и второй соли содержит  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . В некоторых из этих вариантов осуществления как первая соль, так и вторая соль содержат  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . В других вариантах осуществления по меньшей мере одна из первой соли и второй соли содержит  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . В некоторых из этих вариантов осуществления как первая соль, так и вторая соль содержат  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Когда хроматографическая колонка содержит неподвижную фазу НИС, элюент обычно менее полярен, чем водный исходный материал. В некоторых вариантах осуществления первая концентрация соли (т.е. в водном исходном материале) больше, чем вторая концентрация соли (т.е. в элюенте). Например, первая концентрация соли может быть в приблизительно 1,5 раза больше, приблизительно 2 раза больше, приблизительно 3 раза больше, приблизительно 4 раза больше, приблизительно 5 раз больше, приблизительно 6 раз больше, приблизительно 7 раз больше, приблизительно 8 раз больше, приблизительно 9 раз больше или приблизительно 10 раз больше, чем вторая концентрация соли. Например, первая соль может содержать приблизительно 1,5 М сульфата аммония, а вторая соль может содержать приблизительно 0,25 М сульфата аммония (концентрация первой соли в приблизительно 6 раз выше, чем концентрация второй соли). Когда желательно использовать вторую соль, которая отличается от первой соли, вторая соль обычно имеет более низкую космотропную силу по сравнению с первой солью. Катионы и анионы, обладающие большей или меньшей космотропной силой, легко идентифицировать по ряду ионной силы Хофмейстера. См., например, Tadeo, et al., *Biophysical Journal* (2009) 97:2595, и Hyde, et al., *Org. Process Res. Dev.* (2017) 21:1355, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления элюент дополнительно содержит смешивающийся с водой органический растворитель, такой как, например, спирт, диол, полиол и т.п.

Когда хроматографическая колонка содержит неподвижную фазу ММС, первая соль обычно проявляет хаотропное (всаливающее) поведение. Как и в случае солей, используемых в связи с неподвижной фазой НИС, соли, подходящие для использования

в процессе на основе ММС, также могут быть легко идентифицированы по ряду ионов Хофмейстера. В некоторых вариантах осуществления каждая из первой и второй соли независимо содержит анион и/или катион, который является более хаотропным, чем космотропным. См., например, Tadeo, et al., *Biophysical Journal* (2009) 97:2595, и Hyde, et al., *Org. Process Res. Dev.* (2017) 21:1355, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых из этих вариантов осуществления первая соль и вторая соль, каждая независимо, содержат анион, выбранный из группы, состоящей из  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\Gamma$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ , аниона аминокислоты, а  $\text{SCN}^-$ . В некоторых из этих вариантов осуществления каждая из первой соли и второй соли независимо содержит анион, выбранный из группы, состоящей из  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\Gamma$ ,  $\text{NO}_3^-$ , аниона аминокислоты и  $\text{ClO}_4^-$  и  $\text{SCN}^-$ .

В некоторых вариантах осуществления каждая из первой соли и второй соли независимо содержит катион, выбранный из группы, состоящей из  $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ba}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  и катион аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления катион выбран из группы, состоящей из  $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  и катиона аминокислоты. Когда используется катион аминокислоты, это часто катион аргинина (например, с положительно заряженным фрагментом гуанидино).

Иллюстративные первые соли включают, например, хлорид аргинина или гидрохлорид аргинина,  $\text{NaCl}$  и т.п. Когда хроматографическая колонка содержит неподвижную фазу ММС, первая соль и вторая соль часто представляют собой одну и ту же соль. В этих вариантах осуществления элюент обычно содержит соль в концентрации, превышающей концентрацию соли в исходном водном материале. Например, концентрация соли элюента (второй соли) может быть в приблизительно 1,5 раза больше, приблизительно 2 раза больше, приблизительно 3 раза больше, приблизительно 4 раза больше, приблизительно 5 раз больше, приблизительно 6 раз больше, приблизительно 7 раз больше, приблизительно 8 раз больше, приблизительно 9 раз больше или приблизительно 10 раз больше, чем концентрация соли исходного материала (первой соли). Когда первая соль и вторая соль различаются, часто выбирают вторую соль, которая имеет более высокую хаотропную силу по сравнению с первой солью. Катионы и анионы, обладающие большей или меньшей хаотропной силой, легко идентифицируются в соответствии с рядом ионной силы Хофмейстера. См., например, Tadeo, et al., *Biophysical Journal* (2009) 97:2595, и Hyde, et al., *Org. Process Res. Dev.* (2017) 21:1355, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В определенных вариантах осуществления, где первая соль и вторая соль различны, элюент содержит как первую соль, так и вторую

соль. В некоторых аспектах первая соль может содержать приблизительно 30 мМ хлорида натрия в качестве единственной соли, а вторая соль может содержать приблизительно 30 мМ хлорида натрия и приблизительно 90 мМ гидрохлорида аргинина.

Водный исходный материал и элюент, каждый независимо, также могут содержать один или несколько буферных средств. Подходящие буферные средства включают одну или несколько солей, таких как, например, любую из перечисленных выше в качестве подходящей первой соли; кислоту, такую как, например, 2-(N-морфолино)этансульфокислота (MES), (3-(N-морфолино)пропансульфокислота) (MOPS), (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфокислота) (HEPES), хлористый водород и т.п.; и/или основание, такое как, например, гидроксид натрия, гидроксид калия и т.п.

В определенных вариантах осуществления вырезанное включение состоит из включения с одним вырезанным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления, в которых интактное активируемое антитело содержит несколько АВ и, соответственно, несколько продоменов, вырезанное включение может содержать смесь соединений вырезанных включений. В некоторых из этих вариантов осуществления смесь соединений вырезанных включений включает включение с одним вырезанным фрагментом и включение с полностью вырезанными фрагментами. В других вариантах осуществления, в которых интактное активируемое антитело содержит несколько АВ и, соответственно, несколько продоменов, включение с вырезанными фрагментами состоит по сути из включения с одним вырезанным фрагментом. В некоторых из этих вариантов осуществления соединения с вырезанными фрагментами состоят из включения с одним вырезанным фрагментом. Включение с одним вырезанным фрагментом и включение с полностью вырезанными фрагментами можно легко определить с помощью масс-спектрометрии.

В некоторых вариантах осуществления водный исходный материал имеет рН в диапазоне от приблизительно 5,0 до приблизительно 8,0, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,5, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,0, или от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,5, или от приблизительно 5,7 до приблизительно 6,3, или от приблизительно 5,8 до приблизительно 6,2, или от приблизительно 5,6 до приблизительно 6,0. Температура, при которой проводят стадии загрузки и элюирования, может быть одинаковой или разной. В некоторых вариантах осуществления каждую стадию загрузки и элюирования независимо проводят при температуре в диапазоне от приблизительно 10 °С до приблизительно 30 °С, или в

диапазоне от приблизительно 15 °С до приблизительно 30 °С, или в диапазоне от приблизительно 15 °С до приблизительно 29 °С, или в диапазоне от приблизительно 15 °С до приблизительно 28 °С, или в диапазоне от приблизительно 15 °С до приблизительно 27 °С, или в диапазоне от приблизительно 15 °С до приблизительно 26 °С, или в диапазоне от приблизительно 15 °С до приблизительно 25 °С, или в диапазоне от приблизительно 16 °С до приблизительно 25 °С, или в диапазоне от от приблизительно 17 °С до приблизительно 25 °С или в диапазоне от приблизительно 18 °С до приблизительно 25 °С. Как правило, стадии загрузки и элюирования проводят при температуре в одном и том же температурном диапазоне. Часто целевая температура приблизительно одинакова для стадий загрузки и элюирования. В некоторых вариантах осуществления может быть желательно проводить стадию элюирования при температуре, отличной от температуры, при которой проводят стадию загрузки. В некоторых вариантах осуществления может быть желательно проводить стадии процесса при температуре, которая выше или ниже, чем конечные точки диапазонов, описанных выше. Например, когда используется неподвижная фаза НИС, более высокая температура, используемая во время стадии загрузки, может усилить гидрофобные взаимодействия с колонкой, а более низкая температура во время стадии элюирования может способствовать высвобождению компонентов из колонки за счет уменьшения гидрофобных взаимодействий с колонкой.

Хроматографическую колонку можно предварительно кондиционировать, чтобы иметь рН, первую концентрацию соли и температуру, которые приблизительно такие же, как у водного исходного материала. Это может быть достигнуто путем загрузки в хроматографическую колонку достаточных количеств (например, одного или нескольких объемов колонки) буфера, имеющего тот же рН, первую концентрацию соли и/или температуру, что и водный исходный материал, до тех пор, пока в колонке не будут достигнуты целевые условия.

После стадии загрузки колонку можно промыть промывочным буфером для удаления несвязывающих компонентов из колонки перед стадией элюирования. В некоторых вариантах осуществления промывочный буфер содержит соль приблизительно в той же концентрации или в концентрации, которая выше, чем концентрация первой соли в водном исходном материале, и часто имеет приблизительно такое же значение рН, что и водный исходный материал.

Было обнаружено, что водный исходный материал, содержащий интактное активируемое антитело и включения, может быть очищен с высоким выходом общего белка с использованием описанных в данном документе способов. В некоторых

вариантах осуществления выход общего белка в элюате составляет по меньшей мере приблизительно 60%, или по меньшей мере приблизительно 65%, или по меньшей мере приблизительно 70%, или по меньшей мере приблизительно 71%, или по меньшей мере приблизительно 72%, или по меньшей мере приблизительно 73%, или по меньшей мере приблизительно 74%, или по меньшей мере приблизительно 75%, или по меньшей мере приблизительно 76%, или по меньшей мере приблизительно 77%, или по меньшей мере приблизительно 78%, или по меньшей мере приблизительно 79%, или по меньшей мере приблизительно 80% или по меньшей мере приблизительно 81%, или по меньшей мере приблизительно 82%, или по меньшей мере приблизительно 83%, или по меньшей мере приблизительно 84%, или по меньшей мере приблизительно 85%, или по меньшей мере приблизительно 86%, или по меньшей мере приблизительно 87%, или по меньшей мере приблизительно 88%, или по меньшей мере приблизительно 89%, или по меньшей мере приблизительно 90%, или по меньшей мере приблизительно 91%, или по меньшей мере приблизительно 92%, или по меньшей мере приблизительно 93%, или по меньшей мере приблизительно 94%, или по меньшей мере приблизительно 95%, как определено по поглощению при длине волны 280 нм. Иллюстративный анализ поглощения для определения общего белка описан в примере 1 ниже.

Процесс гидрофобной хроматографии очень эффективен при удалении вырезанного включения из технологического потока (т.е. совместно потока водного исходного материала в гидрофобный процесс и потока элюента из гидрофобного процесса). В некоторых вариантах осуществления уровень снижения относительного количества вырезанного включения в исходном водном материале по сравнению с относительным количеством вырезанного включения в элюате составляет по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз, по меньшей мере приблизительно в 6 раз, по меньшей мере приблизительно в 7 раз, или по меньшей мере приблизительно в 8 раз, или по меньшей мере приблизительно в 9 раз, или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, или по меньшей мере приблизительно в 15 раз или по меньшей мере приблизительно в 20 раз больше, как измерено с помощью SDS-капиллярного гель-электрофореза (SDS-cGE). В некоторых вариантах осуществления в элюате не обнаруживают вырезанного включения. Термин «относительное количество вырезанного включения» относится в данном документе к «% вырезанного включения», как определено ниже.

Используемая в данном документе фраза «уровень снижения» или «снижение» (и их грамматические варианты) при использовании в связи с включением, таким как

вырезанное включение, НСР, НWMS и т.п., относится к степени снижения количества включения, определяемого путем сравнения количества примеси в водном исходном материале с количеством включения в элюате. Уровень снижения содержания включения может быть представлен в виде соотношения (или, что то же самое, в виде кратного уменьшения) или в виде процентного уменьшения.

При наличии вырезанного включения в элюате кратность снижения уровня вырезанного включения определяется по следующей формуле:

$$\text{Кратность уменьшения количества вырезанного включения} = \frac{(\% \text{ вырезанного включения})_{\text{водного исходного материала}}}{(\% \text{ вырезанного включения})_{\text{элюат}}}$$

где «% вырезанного включения» в каждом водном исходном растворе и элюате определяют по следующей формуле:

$$(\% \text{ вырезанного включения})_{\text{водный исходный материал}} = \frac{(\% \text{ площади пика}_{\text{вырезанная}})_{\text{водный исходный материал}}}{(\% \text{ площади пика}_{\text{вырезанная}} + \% \text{ площади пика}_{\text{интактная}})_{\text{исходный водный материал}}} \times 100$$

где:

$$(\% \text{ площади пика}_{\text{вырезанная}})_{\text{водный исходный материал}} = \frac{(\text{площадь пика кодирующего продомен полипептида с вырезанными фрагментами})_{\text{водный исходный материал}}}{100, \text{ и}} \times 100, \text{ и}$$

$$(\text{Общая площадь пика, соответствующая всем обнаруженным молекулам})_{\text{водный исходный материал}}$$

$$(\% \text{ площади пика}_{\text{интактная}})_{\text{водный исходный материал}} = \frac{(\text{Площадь пика кодирующего продомен интактного полипептида})_{\text{водный исходный материал}}}{(\text{Общая площадь пика, соответствующая всем обнаруженным молекулам})_{\text{водный исходный материал}}} \times 100;$$

и,

$$(\% \text{ вырезанного включения})_{\text{элюат}} = \frac{(\% \text{ площади пика}_{\text{вырезанная}})_{\text{элюат}}}{(\% \text{ площади пика}_{\text{вырезанная}} + \% \text{ площади пика}_{\text{интактная}})_{\text{элюат}}} \times 100$$

где:

$$(\% \text{ площади пика}_{\text{вырезанная}})_{\text{элюат}} = \frac{(\text{площадь пика кодирующего продомен полипептида с вырезанными фрагментами})_{\text{элюат}}}{(\text{Общая площадь пика, соответствующая всем обнаруженным молекулам})_{\text{элюат}}} \times 100, \text{ и}$$

$$(\% \text{ площади пика}_{\text{интактная}})_{\text{элюат}} = \frac{(\text{Площадь пика кодирующего продомен интактного полипептида})_{\text{элюат}}}{(\text{Общая площадь пика, соответствующая всем обнаруженным молекулам})_{\text{элюат}}} \times 100.$$

В приведенных выше формулах вырезанное включение количественно определяется полипептидом, на который воздействует вырезание, т.е. кодирующим продомен полипептидом. Кодирующий продомен полипептид может представлять собой легкую цепь антитела, тяжелую цепь антитела, scFv и т.п., в зависимости от того, кодируют ли эти полипептиды также продомен. Например, когда продомен связан с

легкой цепью антитела, относительное количество вырезанного включения (т.е. % вырезанного включения) рассчитывают путем деления % площади пика вырезанного включения легкой цепи в элюате на сумму: а) % площади пика вырезанного включения легкой цепи в элюате и б) % площади пика интактной легкой цепи в элюате. Площади пиков для кодирующего продомен полипептида с вырезанными фрагментами и кодирующего продомен интактного полипептида легко определить с помощью анализа на основе восстанавливающего SDS-cGE, такого как анализ, описанный в примере 1.

Таким образом, в этих вариантах осуществления соотношение % вырезанного включения в водном исходном материале к % вырезанного включения в элюате составляет соответственно по меньшей мере приблизительно 2, или по меньшей мере приблизительно 3, или по меньшей мере приблизительно 4, или по меньшей мере приблизительно 5, или по меньшей мере приблизительно 6, или по меньшей мере приблизительно 7, или по меньшей мере приблизительно 8, или по меньшей мере приблизительно 9, или по меньшей мере приблизительно 10, или по меньшей мере приблизительно 15, или по меньшей мере приблизительно 20, как измерено с помощью анализ на основе восстанавливающего SDS-капиллярного гель-электрофореза (SDS-cGE), такого как анализ, описанный в примере 1.

В некоторых вариантах осуществления относительное количество вырезанного включения в исходном водном материале по сравнению с относительным количеством вырезанного включения в элюате соответствует уровню снижения, который составляет по меньшей мере приблизительно 50%, или по меньшей мере приблизительно 55%, или по меньшей мере приблизительно 60%, или по меньшей мере приблизительно 65%, или по меньшей мере приблизительно 70%, или по меньшей мере приблизительно 75%, или по меньшей мере приблизительно 76%, или по меньшей мере приблизительно 77%, или по меньшей мере приблизительно 78%, или по меньшей мере приблизительно 79%, или по меньшей мере приблизительно 80%, или по меньшей мере приблизительно 81%, или по меньшей мере приблизительно 82%, или по меньшей мере приблизительно 83%, или по меньшей мере приблизительно 84%, или по меньшей мере приблизительно 85%, или по меньшей мере приблизительно 86%, или по меньшей мере приблизительно 87%, или по меньшей мере приблизительно 88%, или по меньшей мере приблизительно 89%, или по меньшей мере приблизительно 90%, или по меньшей мере приблизительно 91%, или по меньшей мере приблизительно 92% или по меньшей мере приблизительно 93%, или по меньшей мере приблизительно 94%, или по меньшей мере приблизительно 95%, или по меньшей мере приблизительно 96%, или по меньшей мере приблизительно 97%, или по меньшей мере приблизительно 98%, или по меньшей мере приблизительно 99%, как

определено с помощью восстановления SDS-cGE, такого как анализ, описанный в примере 1. Процент (%) снижения вырезанного включения определяется по следующей формуле:

% снижения вырезанного включения =

$$\frac{(\% \text{ вырезанного включения})_{\text{водный исходный материал}} - (\% \text{ вырезанного включения})_{\text{элюат}}}{(\% \text{ вырезанного включения})_{\text{водный исходный материал}}} \times 100,$$

где % вырезанного включения для каждого исходного водного материала и элюата такой же, как определено выше.

В некоторых вариантах осуществления элюат содержит менее чем приблизительно 50%, или менее чем приблизительно 45%, или менее чем приблизительно 40%, или менее чем приблизительно 35%, или менее чем приблизительно 30%, или менее чем приблизительно 25%, или менее чем приблизительно 24%, или менее чем приблизительно 23%, или менее чем приблизительно 22%, или менее чем приблизительно 21%, или менее чем приблизительно 20%, или менее чем приблизительно 19%, или менее чем приблизительно 18% или менее чем приблизительно 17%, или менее чем приблизительно 16%, или менее чем приблизительно 15%, или менее чем приблизительно 14%, или менее чем приблизительно 13%, или менее чем приблизительно 12%, или менее чем приблизительно 11%, или менее чем приблизительно 10% от относительного количества вырезанного включения, присутствующего в водном исходном материале. Относительное количество вырезанного включения в элюате в процентах от вырезанного включения в водном исходном материале определяется следующим образом:

$$\frac{(\% \text{ вырезанного включения})_{\text{элюат}}}{(\% \text{ вырезанного включения})_{\text{водный исходный материал}}} \times 100,$$

где % вырезанного включения для каждого исходного водного материала и элюата такой же, как определено выше.

В некоторых вариантах осуществления элюат содержит менее чем приблизительно 15%, или менее чем приблизительно 14%, или менее чем приблизительно 13%, или менее чем приблизительно 12%, или менее чем приблизительно 11%, или менее чем приблизительно 10%, или менее чем приблизительно 10%, или менее чем приблизительно 9%, или менее чем приблизительно 8%, или менее чем приблизительно 7%, или менее чем приблизительно 6% относительного количества вырезанного включения, присутствующего в водном



исходном материале, как определено с помощью снижения SDS-cGE. В некоторых вариантах осуществления элюат содержит от приблизительно 2% до 15%, или от приблизительно 3% до приблизительно 15%, или от приблизительно 4% до приблизительно 15%, или от приблизительно 5% до приблизительно 15%, или от приблизительно 2% до приблизительно 10%, или от приблизительно 3% до приблизительно 10% относительного количества вырезанного включения, присутствующего в водном исходном материале, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

Таким образом, гидрофобный процесс эффективен для получения элюата (и соответствующей очищенной композиции интактного активируемого антитела), имеющего относительно низкий уровень вырезанного включения. В определенных вариантах осуществления элюат (и соответствующая очищенная композиция интактного активируемого антитела) содержит относительное количество вырезанного включения в диапазоне от приблизительно 0,1% до приблизительно 15% вырезанного включения или от приблизительно 0,1% до приблизительно 10% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 10% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 5% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 4% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 3% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 2% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 1% вырезанного включения, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE. Процент вырезанного включения рассчитывается, как определено выше. Процент вырезанного включения может быть измерен в образце, взятом из элюата сразу после завершения процедуры разделения, и может быть либо немедленно проанализирован с помощью SDS-cGE, либо заморожен до проведения анализа с помощью SDS-cGE.

В некоторых вариантах осуществления элюат (и соответствующая очищенная композиция интактного активируемого антитела) содержит менее чем приблизительно 5%, или менее чем приблизительно 4%, или менее чем приблизительно 3%, или менее чем приблизительно 2%, или менее чем приблизительно 1%, или менее чем приблизительно 0,9%, или менее чем приблизительно 0,8%, или менее чем приблизительно 0,7%, или менее чем приблизительно 0,6%, или менее чем приблизительно 0,5% вырезанного включения, как измерено с помощью восстанавливающего SDS-cGE. В других вариантах осуществления указанный элюат содержит менее чем приблизительно 2% или менее чем приблизительно 1%, или менее

чем приблизительно 0,9%, или менее чем приблизительно 0,8%, или менее чем приблизительно 0,7%, или менее чем приблизительно 0,6%, или менее чем приблизительно 0,5% от вырезанного включения, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE. В определенных вариантах осуществления элюат (и соответствующая очищенная композиция интактного активируемого антитела) не содержит поддающегося обнаружению вырезанного включения.

В некоторых вариантах осуществления водный исходный материал содержит одну или несколько дополнительных включений, выбранных из группы, состоящей из белка клетки-хозяина (HCP), высокомолекулярных соединений (HMWS) и их комбинации. Способы по настоящему изобретению также эффективны для существенного снижения количества этих включений. Как HCP, так и HMWS, по видимому, в значительной степени остаются в колонке вместе с вырезанным включением во время стадии элюирования.

В определенных вариантах осуществления дополнительное включение представляет собой HCP. В этих вариантах осуществления процесс является высокоэффективным при удалении HCP из технологического потока. В некоторых вариантах осуществления уровень снижения, обеспечиваемый процессом гидрофобной хроматографии, составляет по меньшей мере приблизительно в 3 раза меньше, или по меньшей мере приблизительно в 4 раза меньше, или по меньшей мере приблизительно в 5 раз меньше, или по меньшей мере приблизительно в 6 раз меньше или по меньшей мере приблизительно в 7 раз меньше, или по меньшей мере приблизительно в 8 раз меньше, или по меньшей мере приблизительно в 9 раз меньше, или по меньшей мере приблизительно в 10 раз меньше в пересчете на части на миллион (ppm), как определено с помощью соответствующего анализа на основе ELISA HCP. Кратность снижения HCP определяют путем деления количества HCP в исходном водном материале на количество HCP в элюате на основе ppm, как определено с помощью соответствующего анализа на основе ELISA HCP, т.е.

$$\frac{(\text{HCP в ppm})_{\text{водный исходный материал}}}{(\text{HCP в ppm})_{\text{элюат}}}$$

Количество HCP можно легко определить с использованием наборов ELISA для белка клетки-хозяина, которые имеются в продаже для ряда различных клеток-хозяев, включая, например, виды млекопитающих, дрожжей, бактерий и трансгенных хозяев. Термин «соответствующий анализ ELISA HCP» используется в данном документе для обозначения анализа на основе ELISA белка клетки-хозяина, в котором используются антитела к белкам, связанным с клеткой-хозяином, используемой для получения

активируемого антитела. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления соотношение количества НСР в исходном водном материале к количеству НСР в элюате составляет по меньшей мере приблизительно 4, или по меньшей мере приблизительно 5, или по меньшей мере приблизительно 6, или по меньшей мере приблизительно 7, или по меньшей мере приблизительно 8, или по меньшей мере приблизительно 9, или по меньшей мере приблизительно 10 в частях на миллион (ppm), как определено с помощью соответствующего анализа на основе ELISA НСР .

Что касается процентного (%) снижения НСР, в определенных вариантах осуществления уровень снижения составляет по меньшей мере приблизительно 50%, или по меньшей мере приблизительно 55%, или по меньшей мере приблизительно 60%, или по меньшей мере приблизительно 65%, или по меньшей мере приблизительно 70%, или по меньшей мере приблизительно 75%, или по меньшей мере приблизительно 76%, или по меньшей мере приблизительно 77%, или по меньшей мере приблизительно 78%, или по меньшей мере приблизительно 79%, или по меньшей мере приблизительно 80%, или по меньшей мере приблизительно 81%, или по меньшей мере приблизительно 82%, или по меньшей мере приблизительно 83%, или по меньшей мере приблизительно 84%, или по меньшей мере приблизительно 85%, или по меньшей мере приблизительно 86%, или по меньшей мере приблизительно 87%, или по меньшей мере приблизительно 88%, или по меньшей мере приблизительно 89%, или по меньшей мере приблизительно 90% в расчете на ppm, как определено с помощью соответствующего анализа на основе ELISA НСР. Процент снижения НСР определяют по формуле:

$$\frac{[(\text{ppm НСР})_{\text{водный исходный материал}} - (\text{ppm НСР})_{\text{элюат}}]}{(\text{ppm НСР})_{\text{водный исходный материал}}} \times 100$$

Соответственно в некоторых вариантах осуществления элюат содержит менее чем приблизительно 50%, или менее чем приблизительно 45%, или менее чем приблизительно 40%, или менее чем приблизительно 35%, или менее чем приблизительно 25%, или менее чем приблизительно 24%, или менее чем приблизительно 23%, или менее чем приблизительно 22%, или менее чем приблизительно 21%, или менее чем приблизительно 20%, или менее чем приблизительно 19%, или менее чем приблизительно 18% или менее чем приблизительно 17%, или менее чем приблизительно 16%, или менее чем приблизительно 15%, или менее чем приблизительно 14%, или менее чем приблизительно 13%, или менее чем приблизительно 12%, или менее чем приблизительно 11%, или менее чем приблизительно 10% от НСР, присутствующего в водном исходном материале. Относительное количество НСР в элюате в виде процента

НСП, присутствующего в водном исходном материале, определяется по формуле:

$$\frac{(\text{ppm НСП})_{\text{элюат}}}{(\text{ppm НСП})_{\text{водный исходный материал}}} \times 100$$

В некоторых вариантах осуществления элюат (и соответствующая очищенная композиция интактного активируемого антитела) содержит менее чем приблизительно 150 ppm, или менее чем приблизительно 140 ppm, или менее чем приблизительно 130 ppm, или менее чем приблизительно 120 ppm, или менее чем приблизительно 110 ppm, или менее чем приблизительно 100 ppm, или менее чем приблизительно 90 ppm, или менее чем приблизительно 80 ppm, или менее чем приблизительно 70 ppm, или менее чем приблизительно 60 ppm, или менее чем приблизительно 50 ppm, или менее чем приблизительно 45 ppm, или менее чем приблизительно 40 ppm, или менее чем приблизительно 35 ppm, или менее чем приблизительно 30 ppm, или менее чем приблизительно 25 ppm, или менее чем приблизительно 20 ppm, или менее чем приблизительно 15 ppm, или менее чем приблизительно 10 ppm НСП, как измерено с помощью соответствующего ELISA НСП. В определенных вариантах осуществления элюат (и соответствующая очищенная композиция интактного активируемого антитела) не содержит поддающегося обнаружению НСП.

В других вариантах осуществления элюат (и соответствующая очищенная композиция активируемого антитела) содержит количество НСП в диапазоне от приблизительно 0,5 ppm НСП до приблизительно 150 ppm НСП, или от приблизительно 0,5 ppm НСП до приблизительно 140 ppm НСП, или от приблизительно 0,5 ppm НСП до приблизительно 130 ppm НСП, или от приблизительно 0,5 ppm НСП до приблизительно 120 ppm НСП, или от приблизительно 0,5 ppm НСП до приблизительно 110 ppm НСП, или от приблизительно 0,5 ppm НСП до приблизительно 100 ppm НСП, или от приблизительно 0,5 ppm НСП до приблизительно 90 ppm НСП, или от приблизительно 0,5 ppm НСП до приблизительно 80 ppm НСП, или от приблизительно 0,5 ppm до приблизительно 70 ppm НСП, от приблизительно 0,5 ppm до приблизительно 60 ppm НСП, от приблизительно 0,5 ppm НСП приблизительно 50 ppm НСП, или от приблизительно 0,5 ppm НСП до приблизительно 45 ppm НСП, или от приблизительно 0,5 ppm НСП до приблизительно 40 ppm НСП, или от приблизительно 0,5 ppm НСП до приблизительно 35 ppm НСП, или от приблизительно 0,5 ppm НСП до приблизительно 30 ppm НСП, или от приблизительно 1 ppm НСП до приблизительно 25 ppm НСП, или от приблизительно 1 ppm НСП до приблизительно 20 ppm НСП, или от приблизительно 0,5 ppm НСП до приблизительно 15 ppm НСП, или от приблизительно 0,5 ppm НСП до приблизительно 10 ppm НСП.

В определенных вариантах осуществления элюат (и соответствующая очищенная композиция активируемого антитела) содержит количество НСР в диапазоне от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 150 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 140 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 130 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 120 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 110 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 100 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 90 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 80 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm до приблизительно 70 ppm НСР, от приблизительно 1 ppm до приблизительно 60 ppm НСР, от приблизительно 1 ppm НСР приблизительно 50 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 45 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 40 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 35 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 30 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 25 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 20 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 15 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 10 ppm НСР.

В других вариантах осуществления дополнительная примесь представляет собой HMWS либо отдельно, либо в комбинации с НСР. HMWS можно обнаружить и количественно определить с помощью эксклюзионной (SE)-HPLC. Иллюстративный анализ SE-HPLC описан в примере 1. Высокомолекулярные соединения (HMWS) обнаруживаются слева от основного пика на хроматограмме. В этих вариантах осуществления процесс гидрофобной хроматографии является высокоэффективным при удалении HMWS из технологического потока. В некоторых вариантах осуществления уровень снижения количества HMWS, вызванный процессом гидрофобной хроматографии, составляет по меньшей мере приблизительно в 2 раза, или по меньшей мере приблизительно в 3 раза, или по меньшей мере приблизительно в 4 раза, или по меньшей мере приблизительно в 5 раз больше, где HMWS количественно определяют с помощью эксклюзионной (SE)-HPLC. Иллюстративный анализ SE-HPLC описан в примере 1. Кратность снижения HMWS и соответственно соотношение количества HMWS в водном исходном материале к количеству HMWS в элюате определяют по формуле:

$$\frac{(\% \text{ площади пика HMWS})_{\text{водный исходный материал}}}{(\% \text{ площади пика HMWS})_{\text{элюат}}}$$

где:

$(\% \text{ площади пика HMWS})_{\text{водный исходный материал}}$  представляет собой сумму всех пиков, соответствующих HMWS в водном исходном материале, деленную на общую площадь всех пиков (т.е. общую площадь пика), как определено с помощью анализа SE-HPLC; и  $(\% \text{ площади пика HMWS})_{\text{элюат}}$  представляет собой сумму всех пиков, соответствующих HMWS в элюате, деленную на общую площадь всех пиков (общую площадь пика), как определено с помощью SE-HPLC.

Таким образом, в этих вариантах осуществления соотношение количества HMWS в исходном водном материале к количеству HMWS в элюате составляет соответственно по меньшей мере приблизительно 2, или по меньшей мере приблизительно 3, или по меньшей мере приблизительно 4, или по меньшей мере приблизительно 5, где количество HMWS определяется с помощью SE-HPLC.

В некоторых вариантах осуществления уровень снижения HMWS, вызванный процессом гидрофобной хроматографии, в пересчете на процент (%) снижения HMWS составляет по меньшей мере приблизительно 50%, или составляет по меньшей мере приблизительно 55%, или составляет по меньшей мере приблизительно 60%, или составляет по меньшей мере приблизительно 65%, или составляет по меньшей мере приблизительно 70%, или составляет по меньшей мере приблизительно 75%, или составляет по меньшей мере приблизительно 76%, или составляет по меньшей мере приблизительно 77%, или составляет по меньшей мере приблизительно 78%, или составляет по меньшей мере приблизительно 79%, или составляет по меньшей мере приблизительно 80%, или составляет по меньшей мере приблизительно 81%, или составляет по меньшей мере приблизительно 82%, или составляет по меньшей мере приблизительно 83%, или составляет по меньшей мере приблизительно 84%, или составляет по меньшей мере приблизительно 85%, или составляет по меньшей мере приблизительно 86%, или составляет по меньшей мере приблизительно 87%, или составляет по меньшей мере приблизительно 88%, или составляет по меньшей мере приблизительно 89%, или составляет по меньшей мере приблизительно 90%, или составляет по меньшей мере приблизительно 91%, или составляет по меньшей мере приблизительно 92%, или составляет по меньшей мере приблизительно 93%, или составляет по меньшей мере приблизительно 94%, или составляет по меньшей мере приблизительно 95%, или составляет по меньшей мере приблизительно 96%, или составляет по меньшей мере приблизительно 98%, или составляет по меньшей мере приблизительно 99%, как определено с помощью SE-HPLC. Процент снижения HMWS определяют по следующей формуле:

$$\frac{[(\% \text{ площади пика HMWS})_{\text{водный исходный материал}} - (\% \text{ площади пика HMWS})_{\text{элюат}}]}{100} \times$$

$$(\% \text{ площади пика HMWS})_{\text{водного исходного материала}}$$

где % площади пика HMWS для исходного водного материала и элюата определены выше.

В некоторых вариантах осуществления относительное количество HMWS в элюате в виде процента HMWS, присутствующего в водном исходном материале, составляет менее чем приблизительно 50%, или менее чем приблизительно 45%, или менее чем приблизительно 40%, или менее чем приблизительно 35%, или менее чем приблизительно 25%, или менее чем приблизительно 30%, или менее чем приблизительно 25%, или менее чем приблизительно 20%, или менее чем приблизительно 15%, или менее чем приблизительно 15% HMWS, присутствующих в водном исходном материале, как определено с помощью SE-HPLC. Относительное количество HMWS в элюате в виде процента HMWS, присутствующего в водном исходном материале, рассчитывается как:

$$\frac{(\% \text{ площади пика HMWS})_{\text{элюат}}}{(\% \text{ площади пика HMWS})_{\text{водный исходный материал}}} \times 100$$

где % площади пика HMWS для исходного водного материала и элюата определены выше.

В некоторых вариантах осуществления элюат (и соответствующая очищенная композиция интактного активируемого антитела) содержит менее чем приблизительно 5%, или менее чем приблизительно 4%, или менее чем приблизительно 3%, или менее чем приблизительно 2%, или менее чем приблизительно 1% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC, где % HMWS соответствует элюату  $(\% \text{ площади пика HMWS})_{\text{элюат}}$  и определяется, как описано выше.

В других вариантах осуществления элюат (и соответствующая очищенная композиция интактного активируемого антитела) содержит менее чем приблизительно 3%, или менее чем приблизительно 2%, или менее чем приблизительно 1% HMWS. В некоторых вариантах осуществления элюат содержит менее чем приблизительно 2% или менее чем приблизительно 1% HMWS.

В некоторых вариантах осуществления элюат (и соответствующая очищенная композиция интактного активируемого антитела) содержит количество HMWS в диапазоне от приблизительно 0,1%, 0,2% или 0,3% HMWS до приблизительно 5% HMWS, или от приблизительно 0,2% HMWS до приблизительно 4% HMWS, или от приблизительно 0,2% HMWS до приблизительно 3% HMWS, или от приблизительно

0,2% HMWS до приблизительно 2% HMWS, или от приблизительно 0,2% HMWS до приблизительно 1% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC, где % определяют на основе общей площади пика. В определенных вариантах осуществления элюат (и соответствующая очищенная композиция интактного активируемого антитела) не содержит поддающегося обнаружению HMWS.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, водный исходный материал содержит более чем приблизительно 0,5% вырезанного включения, или более чем приблизительно 0,6%, или более чем приблизительно 0,7%, или более чем приблизительно 0,8%, или более чем приблизительно 0,9%, или более чем приблизительно 1%, или более чем приблизительно 1,5%, или более чем приблизительно 2%, или более чем приблизительно 2,5%, или более чем приблизительно 3%, или более чем приблизительно 3,5%, или более чем приблизительно 4%, или более чем приблизительно 4,5%, или более чем приблизительно 5%, или более чем приблизительно 5,5%, или более чем приблизительно 6%, или более чем приблизительно 6,5%, или более чем приблизительно 7%, или более чем приблизительно 7,5%, или более чем приблизительно 8%, или более чем приблизительно 8,5%, или более чем приблизительно 9%, или более чем приблизительно 9,5%, или более чем приблизительно 10%, или более чем приблизительно 10,5%, или более чем приблизительно 11%, или более чем приблизительно 11,5%, или более чем приблизительно 12%, или более чем приблизительно 12,5%, или более чем приблизительно 13%, или более чем приблизительно 13,5% вырезанного включения, как измерено с помощью восстанавливающего SDS-cGE. Процент вырезанного включения определен выше.

Способы по настоящему изобретению приводят к образованию элюата, представляющего собой композицию интактного активируемого антитела высокой чистоты. Полученный элюат (и соответствующая очищенная композиция интактного активируемого антитела) часто содержит по меньшей мере приблизительно 90%, или по меньшей мере приблизительно 91%, или по меньшей мере приблизительно 92%, или по меньшей мере приблизительно 93%, или по меньшей мере приблизительно 94%, или по меньшей мере приблизительно 95%, или по меньшей мере приблизительно 96%, или по меньшей мере приблизительно 97%, или по меньшей мере приблизительно 98%, или по меньшей мере приблизительно 98,5%, или по меньшей мере приблизительно 99% интактного активируемого антитела, как измерено с помощью восстанавливающего SDS-cGE. Иллюстративный анализ SDS-cGE описан в примере 1. Процент интактного



включения рассчитывают, как описано выше (т.е. (% интактного активируемого антитела)<sub>элюат</sub>).

В одном аспекте настоящее изобретение включает способ получения композиции, содержащей: (А) более 95% интактного активируемого антитела, содержащего MM, CM и AB; и (В) от 0,05 до 5% их варианта с вырезанными фрагментами, способ включает загрузку водного исходного материала, содержащего воду, (А), (В) и первую соль, в хроматографическую колонку, при этом хроматографическая колонка содержит неподвижную фазу, содержащую матрицу подложки и гидрофобные лиганды, связанные с ней, и элюирование хроматографической колонки элюентом, содержащим воду и вторую соль, с получением композиции. В одном аспекте способ включает уменьшение количества варианта с вырезанными фрагментами в технологическом потоке на 75-90%. В одном аспекте способ включает снижение количества НСР в технологическом потоке на 75-90%. В одном аспекте способ включает снижение количества HMWS в технологическом потоке на 75-90%. В одном аспекте способ включает снижение количества варианта с вырезанными фрагментами, НСР и HMWS в технологическом потоке на 70-95%.

Активируемое антитело обычно получают биологически путем культивирования клеток, сконструированных для экспрессии желаемого интактного активируемого антитела. Например, клетки могут представлять собой клетки-хозяева млекопитающих. В некоторых аспектах клетки могут представлять собой клетки почки эмбриона человека (НЕК), например, клетки НЕК293 или клетки яичника китайского хомяка (СНО). В этих способах активируемое антитело собирают из клеточной культуры в виде супернатанта клеточной культуры, клеточного лизата или другой подобной композиции, полученной из клеточной культуры, которая содержит активируемое антитело. Композицию биосбора получают путем отделения клеток и клеточных остатков от супернатанта или лизата с использованием, например, центрифугирования, фильтрации или другого процесса разделения твердой и жидкой фаз.

Процесс гидрофобной хроматографии часто применяется после стадии культивирования клеток, при необходимости, с одной или несколькими промежуточными одиночными операциями с удалением по меньшей мере части неиммуноглобулиновых белков, белков клеток-хозяев и других включений, которые могут присутствовать в композиции биосбора, и, если применимо, любой нерасфасованной композиции промежуточного продукта.

Каждая стадия культивирования клеток, необязательная одна или несколько

промежуточных единичных операций и процесс гидрофобной хроматографии могут проводиться как периодический процесс, или, необязательно, любые две или более из вышеперечисленных единичных операций могут проводиться как непрерывный или полунепрерывный процесс в необязательно интегрированной системе. В некоторых вариантах осуществления стадию культивирования клеток выполняют как операцию с периодической подпиткой. В некоторых вариантах осуществления стадию культивирования клеток выполняют как операцию с непрерывной подпиткой или перфузией.

В некоторых вариантах осуществления композиция биосбора и/или одна или несколько нерасфасованных композиций промежуточных продуктов стадируются в течение определенного периода времени перед подачей на следующую единичную операцию. Нерасфасованные композиции промежуточных продуктов могут быть необязательно кондиционированы добавлением одного или нескольких кондиционирующих средств, чтобы сделать их пригодными для использования в качестве исходного материала для следующей единичной операции. Иллюстративные кондиционирующие средства включают, например, буфер (т.е. один или несколько буферных средств), соль (например, первую соль), основание, кислоту и т.п.

Таким образом, водный исходный материал, используемый в практике настоящего изобретения, может содержать композицию биосбора или композицию нерасфасованного промежуточного продукта. В некоторых вариантах осуществления перед стадией (а) способ включает:

(a<sup>0</sup>) подвергание композиции биосбора, содержащей интактное активируемое антитело, активируемое антитело и соответствующее вырезанное включение, одной или нескольким промежуточным единичным операциям, выбранным из группы, состоящей из стадии центрифугирования, стадии фильтрации, стадии аффинной хроматографии, стадии вирусной инактивации, стадии эксклюзионной хроматографии, стадии вирусной фильтрации и стадии ионообменной (ИЕХ) хроматографии с получением одной или нескольких нерасфасованных композиций промежуточного продукта, где исходный водный материал содержит по меньшей мере одну нерасфасованную композицию промежуточного продукта. В некоторых вариантах осуществления способ включает комбинацию по меньшей мере двух или более промежуточных единичных операций.

В некоторых вариантах осуществления композиция биосбора подвергается по меньшей мере двум или более или, в некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере трем или более последовательным промежуточным единичным операциям,

выбранным из группы, состоящей из стадии центрифугирования, стадии фильтрации, стадии аффинной хроматографии, этап инактивации вируса, стадии эксклюзионной хроматографии, стадии фильтрации вируса и стадии ионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления композиция биосбора подвергается стадии аффинной хроматографии и часто дополнительно стадии инактивации вируса и необязательной стадии ионообменной хроматографии. Например, аффинную хроматографию можно использовать для отделения компонентов, содержащих иммуноглобулин (Ig), от других компонентов в композиции биосбора с использованием иммобилизованного лиганда, такого как, например, белок А (т.е. стадия «хроматографии с использованием белка А»), белок G (т.е. стадия «хроматографии с использованием белка G») и т.п. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько промежуточных единичных операций стадии ( $a^0$ ) включают стадию аффинной хроматографии и стадию ионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько промежуточных единичных операций стадии ( $a^0$ ) включают стадию аффинной хроматографии, стадию инактивации вируса, стадию фильтрации (например, стадию тангенциальной проточной фильтрации, стадию ультрафильтрации, стадию диафильтрации, и т.п.) и стадию ионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления стадия ионообменной хроматографии представляет собой стадию анионообменной хроматографии. В некоторых аспектах способ по настоящему изобретению включает способы, которые исключают любую одну или комбинацию операций, описанных в настоящем изобретении. Например, способ по настоящему изобретению может исключать стадию анионного обмена. Например, способ по настоящему изобретению может исключать стадию катионного обмена. В качестве другого примера способ по настоящему изобретению может исключать стадию эксклюзионной хроматографии.

Когда в процессе используется одна или несколько промежуточных стадий, нерасфасованная композиция промежуточного продукта, полученная в результате промежуточной технологической операции непосредственно перед процессом гидрофобной хроматографии, называется в данном документе «предварительной подпиткой». В некоторых вариантах осуществления предварительный исходный материал может быть использован непосредственно в качестве водного исходного материала. В определенных вариантах осуществления предварительный исходный материал может быть кондиционирован добавлением одного или нескольких компонентов, таких как, например, первая соль, один или несколько буферных средств (таких как, например, соль, кислота и/или основание) и т.п.

Элюат (и соответствующая очищенная композиция интактного активируемого антитела), обогащенный интактным активируемым антителом по отношению к вырезанному включению, может быть необязательно подвергнут одной или нескольким последовательным операциям для получения композиции расположенного ниже продукта. Иллюстративные расположенные ниже единичные операции включают, например, процесс (дальнейшей) очистки, процесс химического синтеза, процесс разбавления, процесс замены растворителя, процесс приготовления состава, процесс лиофилизации или любую комбинацию двух или более из них. Например, в одном варианте осуществления способ дополнительно включает обработку элюата одной или несколькими последовательными операциями, выбранными из группы, состоящей из стадии центрифугирования, стадии фильтрации (например, фильтрации с тангенциальным потоком, ультрафильтрации, диафильтрации и т.п.), стадию аффинной хроматографии, стадию инактивации вируса, стадию эксклюзионной хроматографии, стадию вирусной фильтрации, стадию ионообменной хроматографии и любую комбинацию двух или более из них. Композиции элюата и последующих продуктов часто либо не содержат поддающихся обнаружению количеств, либо имеют очень малые количества вырезанного включения, и/или НСР, и/или НМWS. Композиции элюата и расположенных ниже продуктов могут практически не содержать вырезанного включения.

В некоторых вариантах осуществления очищенную интактную композицию активируемого антитела, полученную способами по настоящему изобретению (например, элюат или композицию расположенного ниже продукта), подвергают химической реакции конъюгации путем приведения элюата или композиции расположенного ниже продукта в контакт с реагентом для конъюгации в условиях, достаточных для создания конъюгированного активируемого антитела. Фрагменты конъюгации придают активируемому антителу дополнительные свойства, такие как, например, увеличенный период полужизни (например, когда фрагмент конъюгации представляет собой фрагмент, удлиняющий период полужизни, такой как, например, фрагмент полиэтиленгликоля (PEG), человеческий сывороточный альбумин (фрагмент HSA) и т.п.); цитотоксичность (где фрагмент конъюгации полностью или частично представляет собой токсин, такой как, например, доластин или его производное (например, ауристатин E, AFP, MMAF, MMAE, MMAD, DMAF, DMAE и т.п., и их производные), майтансиноид или его производное, DM1, DM4, дуомицин или его производное, калихеамицин или его производное, пирролобензодиазепин или его производное или димер, тяжелый металл (например, барий, золото, платина и т.п.),

вариант токсина *Pseudomonas A* (например, PE38, ZZ-PE38 и т.п.), ZJ-101, OSW-1, 4-нитробензилоксикарбонильное производное Об-бензилгуанина, ингибитор топоизомеразы, гемиастерлин, цефалотаксин, гомохаррингонин, димер пирролобензодиазепина, пирролобензодиазепен, функционализированный пирролобензодиазепен, функционализированный димер пирролобензодиазепена, калихеамицин, подофиллотоксин, таксан, алкалоид барвинка и т.п., а также любой из множества других известных цитотоксических средств); противовирусная активность (например, где фрагмент конъюгации представляет собой весь или часть ацикловира, Vira A, симетрела, турбостатина, фенстатина, гидроксифенстатина, спонгистатина 5, спонгистатина 7, галистатина 1, галистатина 2, галистатина 3, модифицированного бриостатина, галокомстатин, пирролобензимадазол, цибростатинб, доксалиформ, аналог антрациклина, аналог цемадотина (например, CemCH<sub>2</sub>-SH) и т.п.); противогрибковая активность (например, где фрагмент конъюгации полностью или частично представляет собой нистатин и т.п.); противоопухолевая активность (например, где фрагмент конъюгации представляет собой весь или часть адриамицина, церубидина, блеомицина, алкерана, велбана, онковина, фторурацила, метотрексата, тиотепа, бисантрена, новантрона, тиогуанина, прокарабизина, цитарабина и т.п.); антибактериальная активность (например, где фрагмент конъюгации представляет собой весь или часть аминогликозида, стрептомицина, неомицина, канамицина, амикацина, гентамицина, тобрамицина, стрептомицина В, спектиномицина, ампициллина, сульфаниламида, полимиксина, хлорамфеникола и т.п.); антимикоплазменная активность (например, когда фрагмент конъюгации полностью или частично представляет собой тилозин, спектиномицин и т.п.); а также любое из множества других желательных дополнительных свойств.

Фрагменты конъюгации, которые придают такие желательные свойства и функции, могут быть легко конъюгированы с активируемым антителом с использованием способов и реактивных линкеров, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления композиции конъюгированного активируемого антитела, приготовленные из композиций очищенного активируемого антитела, как описано в данном документе, также по сути не содержат вырезанного включения и/или НСР, и/или НМWS. Что касается вырезанного включения, НСР и НМWS, то эти композиции конъюгированных активируемых антител часто имеют такие же профили чистоты и включений, что и композиции элюатов и очищенных интактных активируемых антител, описанные в данном документе.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к

очищенным композициям интактных активируемых антител, которые могут быть получены способами по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления очищенная композиция интактного активируемого антитела содержит по меньшей мере приблизительно 90% интактного активируемого антитела, как измерено с помощью восстанавливающего SDS-cGE, где % интактного активируемого антитела определен выше; менее чем приблизительно 15% вырезанного включения, как измерено с помощью восстанавливающего SDS-cGE, где % вырезанного включения определен выше; менее чем приблизительно 5% HMWS, как измерено с помощью SE-HPLC, где % HMWS определен выше; и менее чем приблизительно 150 ppm HCP, как измерено с помощью соответствующего анализа на основе ELISA HCP. В некоторых из этих вариантов осуществления очищенная композиция интактного активируемого антитела содержит по меньшей мере приблизительно 91%, или по меньшей мере приблизительно 92%, или по меньшей мере приблизительно 93%, или по меньшей мере приблизительно 94%, или по меньшей мере приблизительно 95%, или по меньшей мере приблизительно 96%, или по меньшей мере приблизительно 97%, или по меньшей мере приблизительно 98%, или по меньшей мере приблизительно 99% интактного активируемого антитела.

В некоторых из этих композиций очищенных интактных активируемых антител композиция содержит менее чем приблизительно 14%, или менее чем приблизительно 13%, или менее чем приблизительно 12%, или менее чем приблизительно 11%, или менее чем приблизительно 10%, или менее чем приблизительно 9%, или менее чем приблизительно 8%, или менее чем приблизительно 7%, или менее чем приблизительно 6% вырезанного включения, как измерено с помощью SDS-cGE. В определенных вариантах осуществления очищенная композиция интактного активируемого антитела содержит менее чем приблизительно 5%, или менее чем приблизительно 4%, или менее чем приблизительно 3%, или менее чем приблизительно 2%, или менее чем приблизительно 1%, или менее чем приблизительно 0,9%, или менее чем приблизительно 0,8%, или менее чем приблизительно 0,7%, или менее чем приблизительно 0,6%, или менее чем приблизительно 0,5% вырезанного включения, как измерено с помощью анализа на основе восстанавливающего SDS-cGE. В других вариантах осуществления очищенная композиция интактного активируемого антитела содержит менее чем приблизительно 2% или менее чем приблизительно 1%, или менее чем приблизительно 0,8%, или менее чем приблизительно 0,8%, или менее чем приблизительно 0,7%, или менее чем приблизительно 0,6%, или менее чем приблизительно 0,5% от вырезанного включения, как измерено с помощью SDS-cGE.

Иллюстративный анализ SDS-cGE описан в Примере 1. В некоторых вариантах осуществления очищенная интактная активируемая композиция антитела не содержит поддающихся обнаружению усеченных примесей, как измерено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

В определенных вариантах осуществления очищенная композиция интактного активируемого антитела содержит относительное количество вырезанного включения в диапазоне от приблизительно 0,1% до приблизительно 15% вырезанного включения или от приблизительно 0,1% до приблизительно 10% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 10% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 5% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 4% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 3% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 2% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 1% вырезанного включения, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE. В определенных вариантах осуществления очищенная композиция интактного активируемого антитела не содержит поддающегося обнаружению вырезанного включения, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

В некоторых вариантах осуществления очищенная композиция интактного активируемого антитела содержит менее чем приблизительно 140 ppm НСР, или менее чем приблизительно 130 ppm НСР, или менее чем приблизительно 120 ppm НСР, или менее чем приблизительно 110 ppm НСР, или менее чем приблизительно 100 ppm НСР, или менее чем приблизительно 90 ppm НСР, или менее чем приблизительно 80 ppm НСР, или менее чем приблизительно 70 ppm НСР, или менее чем приблизительно 60 ppm НСР, или менее чем приблизительно 50 ppm НСР, или менее чем приблизительно 45 ppm НСР, или менее чем приблизительно 40 ppm НСР, или менее чем приблизительно 35 ppm НСР, или менее чем приблизительно 30 ppm НСР, или менее чем приблизительно 25 ppm НСР, или менее чем приблизительно 20 ppm НСР, или менее чем приблизительно 15 ppm НСР или менее чем приблизительно 10 ppm НСР, как измерено с помощью соответствующего ELISA НСР. В некоторых из этих вариантов осуществления очищенная композиция активируемого антитела содержит менее чем приблизительно 50 ppm, или менее чем приблизительно 45 ppm, или менее чем приблизительно 40 ppm, или менее чем приблизительно 35 ppm, или менее чем приблизительно 30 ppm, или менее чем приблизительно 25 ppm, или менее чем приблизительно 20 ppm, или менее чем приблизительно 15 ppm, или менее чем

приблизительно 10 ppm НСР, как измерено с помощью соответствующего анализа на основе ELISA НСР. В определенных вариантах осуществления очищенная композиция интактного активируемого антитела не содержит обнаружимого НСР, как измерено с помощью соответствующего ELISA клеток-хозяев.

В других вариантах осуществления очищенная композиция интактного активируемого антитела содержит количество НСР в диапазоне от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 150 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 140 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 130 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 120 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 110 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 100 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 90 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 80 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm до приблизительно 70 ppm НСР, от приблизительно 0,5 ppm до приблизительно 60 ppm НСР, от приблизительно 0,5 ppm НСР приблизительно 50 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 45 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 40 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 35 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 30 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 25 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 20 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 15 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 10 ppm НСР.

В определенных вариантах осуществления очищенная композиция интактного активируемого антитела содержит количество НСР в диапазоне от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 150 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 140 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 130 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 120 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 110 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 100 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 90 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 80 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm до приблизительно 70 ppm НСР, от приблизительно 1 ppm до приблизительно 60 ppm НСР, от приблизительно 1 ppm НСР приблизительно 50 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 45 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 40 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 35 ppm НСР, или от



приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 30 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 25 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 20 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 15 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 10 ppm НСР.

В некоторых вариантах осуществления очищенная композиция интактного активируемого антитела содержит менее чем приблизительно 4%, или менее чем приблизительно 3%, или менее чем приблизительно 2%, или менее чем приблизительно 1% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC, где % HMWS определен выше в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления очищенная композиция интактного активируемого антитела содержит количество HMWS в диапазоне от приблизительно 0,2% HMWS до приблизительно 5% HMWS, или от приблизительно 0,2% HMWS до приблизительно 4% HMWS, или от приблизительно 0,2% HMWS до приблизительно 3% HMWS, или от приблизительно 0,2% HMWS до приблизительно 2% HMWS, или от приблизительно 0,2% HMWS до приблизительно 1% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC. В некоторых вариантах осуществления очищенная композиция интактного активируемого антитела не содержит поддающуюся обнаружению HMWS.

В некоторых аспектах очищенная композиция интактного активируемого антитела содержит более 90% интактного активируемого антитела и от 0,05 до 5% варианта с вырезанными фрагментами, как измерено с помощью SDS-cGE. В некоторых аспектах композиция содержит более 90% интактного активируемого антитела и от 0,05 до 5% варианта с вырезанными фрагментами (как определено с помощью SDS-cGE), менее чем 150 ppm белков клетки-хозяина (НСР) (как определено с помощью ELISA клетки-хозяина) и менее чем 5% высокомолекулярных соединений (HMWS) (по данным SE-HPLC). В некоторых аспектах композиция включает более 96% интактного активируемого антитела, от 0,05 до 4% варианта с вырезанными фрагментами, менее 150 ppm белков клетки-хозяина (НСР) и менее 5% HMWS. В некоторых аспектах композиция включает более 97% интактного активируемого антитела, от 0,05 до 3% варианта с вырезанными фрагментами, менее 150 ppm белков клетки-хозяина (НСР) и менее 5% HMWS. В некоторых аспектах композиция включает более 98% интактного активируемого антитела, от 0,05 до 2% варианта с вырезанными фрагментами, менее 150 ppm белков клетки-хозяина (НСР) и менее 5% HMWS. В некоторых аспектах композиция включает более 95% интактного активируемого антитела, от 0,05 до 5% варианта с вырезанными фрагментами, менее 100 ppm белков клетки-хозяина (НСР) и менее 3% HMWS. В некоторых аспектах композиция включает



с вырезанными фрагментами представляет собой соединение с одним вырезанным фрагментом.

Настоящее изобретение также обеспечивает фармацевтическую композицию, включающую очищенную композицию интактного активируемого антитела по настоящему изобретению и один или несколько фармацевтически приемлемых компонентов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый компонент представляет собой фармацевтически приемлемый наполнитель. Такие композиции могут быть получены путем добавления фармацевтически приемлемого наполнителя к очищенной композиции, полученной способом по настоящему изобретению, такой как, например, очищенная композиция интактного активируемого антитела по настоящему изобретению или дополнительная композиция, полученная из нее. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, подходящие для использования в композициях по настоящему изобретению, хорошо известны в данной области техники и включают, например, стерильную воду, поверхностно-активное вещество (например, неионогенное поверхностно-активное вещество, катионоактивное поверхностно-активное вещество и/или анионогенное поверхностно-активное вещество), буферное средство (кислоту, основание и/или соль), спирт, диол, полиол, сахар (например, моносахарид, дисахарид и/или полисахарид), гидрофильный полимер (например, полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт, солюбилизующее средство (например, циклодекстрин и т.п.) и т.п. Композиция может быть либо в жидкой форме, либо в твердой форме, например, в виде частиц. Например, твердая форма может быть получена путем лиофилизации соответствующей жидкой композиции с образованием лиофилизированной фармацевтической композиции.

Когда фармацевтическая композиция находится в жидкой форме, она обычно дополнительно содержит воду (например, стерильную воду). В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит воду и один или несколько компонентов, выбранных из группы, состоящей из поверхностно-активного вещества, буферного средства, сахара и любой комбинации двух или более из них. Когда фармацевтическая композиция находится в твердой (например, лиофилизированной) форме, она обычно содержит один или несколько компонентов, выбранных из группы, состоящей из сахара и буферного средства. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит сахар.

Способы и композиции по настоящему изобретению могут использовать любое из большого разнообразия активируемых антител. Как показано в приведенных ниже примерах, показано, что способ позволяет получать очищенные композиции

интактного активируемого антитела со значительным снижением количества вырезанного включения, а также НСР и НМWS. В каждом случае, когда водный исходный материал, содержащий эти активируемые антитела, очищали с использованием способов по настоящему изобретению, элюат, обогащенный интактными активируемыми антителами и по сути деплетированный по включениям, которые содержали вырезанное включение, НМWS, элюировали первым. Это наблюдение было постоянным для различных аминокислотных последовательностей активируемых антител. Таким образом, считается, что способы по настоящему изобретению применимы к любой из разнообразных неочищенных композиций активируемых антител независимо от конкретных аминокислотных последовательностей (например, MM, CM, AB) активируемого антитела. Соответственно, композиции, которые могут быть очищены с использованием способов по настоящему изобретению, могут содержать активируемое антитело, имеющее компонент AB, способный специфически связываться с любой из ряда биологических мишеней, известных в данной области техники (если они не маскируются), например, включения аминокислотных последовательностей CDR VL и VH из антител, о которых известно, что они связываются с желаемой биологической мишенью, или, в качестве альтернативы, или идентифицированных с использованием любой из множества известных платформ скрининга обнаружения антител, известных в данной области техники.

Иллюстративные классы биологических мишеней включают рецепторы клеточной поверхности и секретируемые связывающие белки (например, факторы роста), растворимые ферменты, структурные белки (например, коллаген, фибронектин) и т.п. Подходящие биологические мишени включают, например, 1-02-LFA-3,  $\alpha$ 4-интегрин,  $\alpha$ -V-интегрин,  $\alpha$ 4 $\beta$ 1-интегрин, AGR2, анти-Льюис-У, рецептор апелина J, APRIL, B7-H4, BAFF, BTLA, фактор системы комплемента C5, C-242, CA9, CA19-9 (Lewis a), карбоангидразу 9, CD2, CD3, CD6, CD9, CD11a, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD40, CD40L, CD41, CD44, CD44v6, CD47, CD51, CD52, CD56, CD64, CD70, CD71, CD74, CD80, CD81, CD86, CD95, CD117, CD125, CD132 (IL-2RG), CD133, CD137, CD137, CD138, CD166, CD172A, CD248, CDH6, CEACAM5 (CEA), CEACAM6 (NCA-90), CLAUDIN-3, CLAUDIN-4, cMet, коллаген, Cripto, CSFR, CSFR-1, CTLA-4, CTGF, CXCL10, CXCL13, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CYR61, DL44, DLK1, DLL4, DPP-4, DSG1, EGFR, EGFRviii, рецептор эндотелина B (ETBR), ENPP3, EpCAM, EPHA2, ERBB3, белок F RSV, FAP, FGF-2, FGF-8, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, рецептор фолиевой кислоты, GAL3ST1, G-CSF, G-CSFR, GD2, GITR, GLUT1, GLUT4,

GM-CSF, GM-CSFR, рецепторы GP IIb/IIIa, GP130, GPIIb/IIIa, GPNMB, GRP78, Her2/neu, HVEM, гиалуронидазу, ICOS, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ HGF, hGH, гиалуронидазу, ICOS, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , IgE, рецептор IgE (Fc $\epsilon$ R1), IGF, IGF1R, IL1B, IL1R, IL2, IL11, IL12p40, IL-12R, IL-12R $\beta$ 1, IL13, IL13R, IL15, IL17, IL18, IL21, IL23, IL23R, IL27/IL27R (wsx1), IL29, IL-31R, IL31/IL31R, IL-2R, IL4, IL4-R, IL6, IL-6R, рецептор инсулина, лиганды Jagged, Jagged 1, Jagged 2, LAG-3, LIF-R, Lewis X, LIGHT, LRP4, LRRC26, MCSP, мезотелин, MRP4, MUC1, муцин-16 (MUC16, CA-125), Na/K АТФазу, нейтрофильную эластазу, NGF, никастрин, рецепторы Notch, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, NOV, OSM-R, OX-40, PAR2, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , PD-1, PD-L1, PD-L2, фосфатидилсерин, P1GF, PSCA, PSMA, RAAG12, RAGE, SLC44A4, сфингозин-1 фосфат, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TAPA1, TGF $\beta$ , TIGIT, TIM-3, TLR2, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TMEM31, TNF $\alpha$ , TNFR, TNFRS12A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, трансферрин, рецептор трансферрина, TRK-A, TRK-B, uPAR, VAP1, VCAM-1, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VISTA, WISP-1, WISP-2, WISP-3 и т.п.

АВ образован (и, таким образом, активируемое антитело содержит) VL и VH, которые связаны друг с другом непосредственно или опосредованно, например, посредством ковалентной или нековалентной связи. В некоторых вариантах осуществления VL и VH связаны вместе одной или несколькими дисульфидными связями (например, через один или несколько дисульфидных мостиков Cys-Cys), пептидным линкером, синтетическим линкером, встречающимся в природе линкером и т.п. Структурно каждый АВ может быть независимо представлен в любом из множества форматов, таких как, например, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, моноспецифический Fab<sub>2</sub>, биспецифический Fab<sub>2</sub>, триспецифический Fab<sub>3</sub>, scFv, биспецифическое диатело, триспецифическое триатело, scFv-Fc, минитело, биспецифический рекрутер Т-клеток (например, BiTE™), антитело с двойной аффинностью для повторного нацеливания (антитело DART) и т.п. Подходящие биспецифические форматы включают любой из ряда форматов биспецифических антител, известных в данной области техники, в том числе описанные в Kontermann, et al., "Bispecific Antibodies", *Drug Discovery Today* (2015) 20(7):838-847, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела содержат первый VL, имеющий набор первых CDR VL (т.е. первую CDR1 VL, первую CDR2 VL и первую CDR3 VL), и первый VH, имеющий набор первых CDR VH (т.е., первую CDR1 VH, первую CDR2 VH и первую CDR3 VH), где VL и VH вместе образуют

соответствующий АВ. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело также содержит второй АВ, обладающий специфической аффинностью связывания со второй биологической мишенью, где второй АВ содержит второй VL, второй VH и второй продомен, который содержит второй MM и второй CM, при этом второй АВ соединен со вторым продоменом. В этих вариантах осуществления второй VL содержит набор вторых CDR VL (т.е. вторую CDR1 VL, вторую CDR2 VL и вторую CDR3 VL), а второй VH содержит набор вторых CDR VH (т.е. вторую CDR1 VH, вторую CDR2 VH и вторую CDR3 VH), где VL и VH вместе образуют соответствующий второй АВ. Очищенные композиции активируемых антител, содержащих дополнительные АВ (из аминокислотных последовательностей третьей VL и третьей VH и т.д.), могут быть получены с использованием способа по настоящему изобретению, где каждый дополнительный АВ имеет связанные с ним соответствующие MM и CM. Каждый набор VL и VH, соответствующий АВ, может кодироваться одним полипептидом (таким как, например, scFv и т.п.) или двумя полипептидами (такими как легкая цепь антитела и тяжелая цепь антитела). Последовательности CDR VH и VL, обладающие специфичностью связывания с широким спектром биологических мишеней, известны в данной области техники и могут быть включены в активируемые антитела, используемые в способах и композициях по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления, когда активируемое антитело содержит второй VL и второй VH, аминокислотная последовательность каждой CDR в наборе первых CDR VL идентична аминокислотной последовательности соответствующей CDR в наборе вторых CDR VL. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность каждой CDR в наборе первых CDR VH идентична аминокислотной последовательности соответствующей CDR в наборе вторых CDR VH. В этих вариантах осуществления первый АВ и второй АВ (т.е. если они не замаскированы) обычно обладают специфичностью связывания для одних и тех же биологических видов-мишеней.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность по меньшей мере одной CDR в наборе первых CDR VL не идентична аминокислотной последовательности соответствующей CDR в наборе вторых CDR VL и/или аминокислотной последовательности по меньшей мере одного CDR в наборе первых CDR VH не идентична аминокислотной последовательности соответствующей CDR в наборе вторых CDR VH. В этих вариантах осуществления первая биологическая мишень и вторая биологическая мишень могут быть одинаковыми или разными.

Например, первый АВ и второй АВ могут связываться с разными эпитопами или связываться с перекрывающимися эпитопами на одной и той же биологической мишени. В некоторых из этих вариантов осуществления первая биологическая мишень и вторая биологическая мишень не являются одними и теми же (т.е. активируемое антитело представляет собой «мультиспецифическое» активируемое антитело, такое как биспецифическое активируемое антитело и т.п.). Часто в этих вариантах осуществления по меньшей мере одна из первой и второй биологических мишеней представляет собой рецептор клеточной поверхности или лиганд, связанный, например, с раком, пролиферацией клеток или воспалительным процессом. В некоторых из биспецифических вариантов осуществления первой биологической мишенью является корцептор Т-клеток кластера дифференцировки 3 (CD3). Обычно по меньшей мере одна из других из первой и второй биологических мишеней представляет собой белок, связанный с внеклеточной мембраной, экспрессия которого из клетки или присутствие клетки связаны с болезненным состоянием.

В некоторых вариантах осуществления домены VL и VH активируемого антитела находятся в легкой и тяжелой цепях антитела соответственно, каждый из которых содержит по меньшей мере один дополнительный компонент. Например, легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность, кодирующую VL, и по меньшей мере один дополнительный компонент, выбранный из группы, состоящей из продомена, линкера, легкого константного домена ( $\lambda$  или  $\kappa$ ) и комбинации любых двух или более из них, и тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность, кодирующую VH, и по меньшей мере один дополнительный компонент, выбранный из группы, состоящей из продомена, линкера, одного или нескольких константных доменов тяжелой цепи (т.е. CH1, CH2, и/или домен CH3), и/или шарнирную область, и комбинацию любых двух или более из них, при условии, что по меньшей мере одна из легкой цепи и тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, кодирующую продомен. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая кодирует область Fc, которая по сути соответствует классу иммуноглобулина человека (Ig), выбранному из группы, состоящей из IgA, IgD, IgG, IgE и IgM.

Часто домен Fc содержит нативный домен Fc человека. В некоторых вариантах осуществления домен Fc представляет собой сконструированный домен Fc человека, аминокислотная последовательность которого отличается от нативного домена Fc человека. Сконструированные домены Fc часто проявляют измененную эффекторную функцию по сравнению с соответствующим нативным доменом Fc. Такие функции

включают, например, усиленную антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), усиленный антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), усиленную комплементзависимую цитотоксичность (CDC), снижение эффекторной функции, увеличение периода полужизни, усиление связывания FcγRIIb, повышенное связывание FcγRIIIa и т.п.

Дополнительные примеры сконструированных доменов Fc человека известны специалистам в данной области техники. Примеры аминокислот константной области тяжелой цепи Ig<sub>g</sub>, в которых мутации по меньшей мере в одной аминокислоте приводят к снижению функции Fc, включают без ограничения мутации в аминокислоте 228, 233, 234, 235, 236, 237, 239, 252, 254, 256, 265, 270, 297, 318, 320, 322, 327, 329, 330 и 331 константой области тяжелой цепи. Примеры комбинаций мутантных аминокислот также известны в данной области техники, такие как без ограничения комбинация мутаций в аминокислотах 234, 235 и 331, такая как L234F, L235E и P331S, или комбинация аминокислот 318, 320 и 322, например, E318A, K320A и K322A.

Дополнительные примеры сконструированных доменов Fc включают F243L/R292P/Y300L/V305I/P396 IgG1; S239D/I332E IgG1; S239D/I332E/A330L IgG1; S298A/E333A/K334A; в одной тяжелой цепи L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A IgG1, и в противоположной тяжелой цепи D270E/K326D, A330M/K334E IgG; G236A/S239D/I332E IgG1; K326W/E333S IgG1; S267E/H268F/S324T IgG1; E345R/E430G/S440Y IgG1; N297A или N297Q or N297G IgG1; L235E IgG1; L234A/L235A IgG1; F234A/L235A IgG4; H268Q/V309L/A330S/P331S IgG2; V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S IgG2; M252Y/S254T/T256E IgG1; M428L/N434S IgG1; S267E/L328F IgG1; N325S/L328F IgG1 и т.п. В некоторых вариантах осуществления сконструированный домен Fc содержит одну или несколько замен, выбранных из группы, состоящей из N297A IgG1, N297Q IgG1 и S228P IgG4. Нумерация аминокислотных остатков основана на системе нумерации EU.

Активируемые антитела, используемые в практике настоящего изобретения, могут существовать в различных структурных конфигурациях. Иллюстративные формулы активируемых антител представлены ниже. Также следует отметить, что хотя MM и CM указаны как отдельные компоненты в формулах выше, во всех иллюстративных вариантах осуществления (включая формулы), описанных в данном документе, предполагается, что аминокислотные последовательности MM и CM могут перекрываться, например, так, что CM полностью или частично содержится в MM.

В активируемом антителе CM может быть расположен между MM и AB



непосредственно или опосредованно посредством одного или нескольких линкеров. Часто каждый из компонентов MM, CM и AB активируемого антитела расположен в структуре, выбранной из группы, состоящей из, от N-конца до C-конца:

(MM)-(CM)-(AB); или же

(AB)-(CM)-(MM)

где MM, CM и AB определены ранее, и где каждый «-» независимо относится к прямой или опосредованной (т.е. через линкер, как описано ниже) связи.

Во многих вариантах осуществления активируемое антитело может содержать один или несколько линкеров для придания гибкости одному или нескольким из связи MM-CM, связи CM-AB или обоим. Например, в некоторых вариантах осуществления активируемое антитело может содержать компоненты MM, CM и AB, расположенные в структуре, выбранной из группы, состоящей либо от N-конца к C-концу, либо от C-конца к N-концу:

(MM)-L1-(CM)-(AB);

(MM)-(CM)-L2-(AB); или

(MM)-L1-(CM)-L2-(AB)

где MM, CM и AB определены выше в данном документе; где каждый линкер, L1 и L2, может быть одинаковым или различным, и каждый независимо может необязательно присутствовать или отсутствовать.

В некоторых вариантах осуществления интактное активируемое антитело содержит первый AB, при этом первая VL кодируется первой легкой цепью, и при этом первая VH кодируется первой тяжелой цепью, и при этом первая легкая цепь дополнительно кодирует один или несколько компонентов, выбранных из группы, состоящей из продомена, линкера, константного домена легкой цепи и комбинации любых двух или более из них, и при этом первая тяжелая цепь дополнительно кодирует один или несколько компонентов, выбранных из группы, состоящей из продомена, линкера, одного или нескольких константных доменов тяжелой цепи, шарнирной области и комбинации любых двух или более из них, при условии, что только одна из легкой цепи и тяжелой цепи кодирует продомен. В определенных вариантах осуществления интактное активируемое антитело дополнительно содержит домен Fc, как более подробно описано выше в данном документе. В некоторых из этих вариантов осуществления активируемое антитело содержит первый AB (содержащий первый VL и первый VH) и второй AB (содержащий второй VL и второй VH). В конкретном варианте осуществления первый VL и второй VH связаны друг с другом линкером, и второй VL и первый VH связаны

друг с другом линкером. В дополнительном конкретном варианте осуществления активируемое антитело содержит первое одноцепочечное антитело, содержащее первый VL, первый линкер и первый VH, и второе одноцепочечное антитело, содержащее второй VL, второй линкер и второй VH, причем первое одноцепочечное антитело и второе одноцепочечное антитело связаны вместе третьим линкером.

Активируемые антитела, используемые в композициях и способах по настоящему изобретению, могут включать любые из большого разнообразия CM, имеющих аминокислотную последовательность, которая функционирует как субстрат для протеазы. Подходящие аминокислотные последовательности субстрата могут быть идентифицированы с использованием любого из множества известных способов, включая способы, описанные в патенте США № 7666817, патенте США № 8563269, публикации PCT № WO 2014/026136 и Boulware et al. "Evolutionary optimization of peptide substrates for proteases that exhibit rapid hydrolysis kinetics," *Biotechnol Bioeng.* 106.3 (2010): 339-46, каждый из которых включено посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления CM содержит субстрат для протеазы, которая активна, например, активируется или иным образом не регулируется в болезненном состоянии или пораженной ткани, так что протеаза расщепляет CM в активируемом антителе, когда активируемое антитело подвергается воздействию протеазы. Иллюстративные болезненные состояния включают, например, рак (например, когда пораженная ткань представляет собой опухолевую ткань) и воспалительное или аутоиммунное состояние (например, когда пораженная ткань представляет собой воспаленную ткань). В некоторых вариантах осуществления CM содержит субстрат для внеклеточной протеазы. Как показано на фигурах 3А и 3В, CM интактного активируемого антитела по настоящему изобретению может расщепляться в микроокружении пораженных тканей, где протеазы, расщепляющие CM, сверхэкспрессированы по сравнению со здоровой тканью. Соответственно, очищенные композиции активируемого антитела по настоящему изобретению обеспечивают доставку целевой терапевтической дозы интактного активируемого антитела к соответствующей пораженной ткани, сводя к минимуму возможность доставки субтерапевтической дозы к пораженной ткани и, кроме того, избегая доставки антитела с вырезанными фрагментами, и, таким образом, активного антитела, к здоровым тканям субъекта.

Подходящие субстраты могут быть легко идентифицированы с использованием

любого из множества известных способов, включая способы, описанные в патенте США № 7666817, патенте США № 8563269, публикации PCT № WO 2014/026136, Boulware, et al., "Evolutionary optimization of peptide substrates for proteases that exhibit rapid hydrolysis kinetics," *Biotechnol. Bioeng.* (2010) 106.3: 339-46, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Иллюстративные субстраты включают субстраты, которые являются субстратами для любой одной или нескольких из следующих протеаз: ADAM, ADAM-подобные или ADAMTS (такие как, например, ADAM8, ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAMDEC1, ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5); аспарагиновая протеаза (такая, например, как BACE, ренин и т.п.); аспарагиновый катепсин (такой как, например, катепсин D, катепсин E и т.п.); каспаза (такая как, например, каспаза 1, каспаза 2, каспаза 3, каспаза 4, каспаза 5, каспаза 6, каспаза 7, каспаза 7, каспаза 8, каспаза 9, каспаза 10, каспаза 14 и т.п.); цистеинпротеиназа (такая, например, как крузипаин, легумаин, отубаин-2 и т.п.); родственная калликреину пептидаза (KLK) (такая как, например, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK13, KLK14 и т.п.); металлопротеиназы (такие как, например, меприн, неприлизин, простатспецифический мембранный антиген (PSMA), костный морфогенетический белок 1 (BMP-1) и т.п.); матричная металлопротеиназа (MMP) (такая как, например, MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP19, MMP20, MMP23, MMP24, MMP26, MMP27 и т.п.); сериновая протеаза (такая, как, например, активированный протеин C, катепсин А, катепсин G, химаза, протеаза фактора свертывания крови (такая, например, как FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa и т.п.)); эластаза, гранзим В, гуанидинобензоатаза, HtrA1, нейтрофильная эластаза человека, лактоферрин, марапсин, NS3/4A, PACE4, плазмин, простатспецифический антиген (PSA), тканевый активатор пламиногена (tPA), тромбин, триптаза, урокиназа (uPA), трансмембранная сериновая протеаза типа II (TTSP) (такая как, например, DESC1, DPP-4, FAP, гепсин, матриптаза-2, MT-SP1/матриптаза, TMPRSS2, TMPRSS3, TMPRSS4 и т.п.), и т.п. Конкретные активируемые СМ антител описаны, например, в WO 2010/081173, WO 2015/048329, WO 2015/116933 и WO 2016/118629, каждая из которых полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один или несколько СМ, присутствующих в интактном активируемом антителе (например, один или оба из первого и второго СМ (если присутствуют)) содержат субстрат по меньшей мере для одной MMP. В некоторых из этих вариантов осуществления MMP выбирают из группы, состоящей из MMP9, MMP14, MMP1, MMP3, MMP13, MMP17, MMP11 и

MMP19. В конкретном варианте осуществления по меньшей мере один или несколько СМ, присутствующих в интактном активируемом антителе (например, один или оба из первого и второго СМ (если присутствуют)) содержат субстрат для MMP14. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для по меньшей мере одной протеазы, выбранной из группы, состоящей из матричной металлопротеазы (MMP), тромбина, нейтрофильной эластазы, цистеиновой протеазы, легумаина и сериновой протеазы, такой как матриптаза (MT-SP1) и урокиназа (uPA). Не ограничиваясь какой-либо теорией, считается, что эти протеазы активируются или иным образом повышается их экспрессия, по меньшей мере, при раке, воспалении или аутоиммунитете.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько СМ, присутствующих в интактном активируемом антителе (например, один или оба из первого и второго СМ (если они присутствуют)) содержат аминокислотную последовательность, содержащую субстраты для по меньшей мере двух разных протеаз (т.е. по меньшей мере первую протеазу и по меньшей мере вторую протеазу). В этих вариантах осуществления сайт расщепления может быть одинаковым или различным для по меньшей мере двух разных протеаз. Подходящие первая и вторая протеазы включают любые из описанных выше в данном документе. В некоторых из этих вариантов осуществления первая протеаза выбрана из группы, состоящей из MMP, тромбина, нейтрофильной эластазы, цистеиновой протеазы, uPA, легумаина и матриптазы, а вторая протеаза выбрана из группы, состоящей из любой из описанных выше в данном документе. В некоторых вариантах осуществления первая протеаза представляет собой матричную металлопротеазу (MMP), а вторая протеаза представляет собой сериновую протеазу (SP).

СМ может быть разработан таким образом, чтобы он содержал два или более известных субстрата для по меньшей мере двух или более различных протеаз, при этом два или более субстрата ковалентно связаны последовательно, непосредственно или опосредованно друг с другом, и при этом СМ связан с АВ. Например, СМ может содержать первый субстрат, ковалентно связанный непосредственно или опосредованно со вторым субстратом, где первый субстрат является субстратом для первой протеазы, а второй субстрат является субстратом для второй протеазы, в которой первая и вторая протеазы представляют собой разные протеазы, и где СМ соединен с АВ. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого субстрата и второго субстрата представляет собой пептид длиной не более чем приблизительно 25 аминокислотных остатков, или не более чем приблизительно 24, или не более чем

приблизительно 23, или не более чем приблизительно 22, или не более чем приблизительно 21, или не более чем приблизительно 20, или не более чем приблизительно 19, или не более чем приблизительно 18, или не более чем приблизительно 17, или не более чем приблизительно 15 аминокислотных остатков.

В некоторых вариантах осуществления интактное активируемое антитело содержит по меньшей мере один субстрат для протеазы, выбранной из группы, состоящей из ММР, тромбина, нейтрофильной эластазы, цистеиновой протеазы, uPA, лугумаина и матриптазы. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит два продомена и, следовательно, первый СМ и второй СМ. В определенных из этих вариантов осуществления первый СМ и второй СМ содержат субстрат для одной и той же протеазы. В некоторых из этих вариантов осуществления первый СМ содержит первый субстрат, а второй СМ содержит второй субстрат, где первый субстрат и второй субстрат являются субстратами для двух разных протеаз.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один СМ в активируемом антителе (например, если в активируемом антителе присутствует второй продомен, по меньшей мере один из первого СМ и второго СМ) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-67. В некоторых вариантах осуществления каждый СМ, присутствующий в активируемом антителе (например, если второй продомен присутствует в активируемом антителе, как первого СМ, так и второго СМ), независимо содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-67. В некоторых из этих вариантов осуществления каждый СМ, присутствующий в активируемом антителе, содержит одну и ту же аминокислотную последовательность (например, если в активируемом антителе присутствует второй продомен, первый СМ и второй СМ содержат одну и ту же аминокислотную последовательность).

Компоненты ММ активируемых антител, используемых в композициях и способах по настоящему изобретению, могут иметь разную длину. В некоторых вариантах осуществления каждый ММ, присутствующий в активируемом антителе (например, первый ММ, первый ММ и второй ММ и т.п.), представляет собой пептид длиной не более чем приблизительно 30 аминокислотных остатков или не более чем приблизительно 29, или не более чем приблизительно 28, или не более чем приблизительно 27, или не более чем приблизительно 26, или не более чем приблизительно 25, или не более чем приблизительно 24, или не более чем приблизительно 23, или не более чем приблизительно 22, или не более чем приблизительно 21, или не более чем приблизительно 20 аминокислотных остатков в

длину. Каждый присутствующий ММ снижает способность соответствующего АВ специфически связываться с соответствующей биологической мишенью.

ММ может ингибировать связывание активируемого антитела с биологической мишенью различными способами. Например, ММ может связываться с АВ, тем самым ингибируя связывание активируемого антитела с биологической мишенью. ММ может аллостерически или стерически ингибировать связывание активируемого антитела с биологической мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ специфически связывается с АВ. Подходящие ММ могут быть идентифицированы с использованием любого из множества известных способов, включая способы, описанные в публикациях патентных заявок США № 2009/0062142 и 2012/0244154 и публикации РСТ № WO 2014/026136, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Константа диссоциации ( $K_d$ ) содержащего активируемого антитела по отношению к мишени является более высокой, чем  $K_d$  соответствующего АВ (отсутствует ММ) по отношению к биологической мишени.

В некоторых вариантах осуществления ММ снижает связывание АВ с биологической мишенью на по меньшей мере приблизительно 50%, или по меньшей мере приблизительно 60%, или по меньшей мере приблизительно 65%, или по меньшей мере приблизительно 70%, или по меньшей мере приблизительно 75%, или по меньшей мере приблизительно 80%, или по меньшей мере приблизительно 85%, или по меньшей мере приблизительно 90%, или по меньшей мере приблизительно 91%, или по меньшей мере приблизительно 92%, или по меньшей мере приблизительно 93%, или по меньшей мере приблизительно 94%, или по меньшей мере приблизительно 95%, или по меньшей мере приблизительно 96%, или по меньшей мере приблизительно 97%, или по меньшей мере приблизительно 98%, или по меньшей мере приблизительно 99%, и даже 100% в течение по меньшей мере приблизительно 2 часов, или по меньшей мере приблизительно 4 часов, или по меньшей мере приблизительно 6 часов, или по меньшей мере приблизительно 8 часов, или по меньшей мере приблизительно 12 часов, или по меньшей мере приблизительно 24 часа, или по меньшей мере приблизительно 28 часов, или по меньшей мере приблизительно 30 часов, или по меньшей мере приблизительно 36 часов, или по меньшей мере приблизительно 48 часов, или по меньшей мере приблизительно 60 часов, или по меньшей мере приблизительно 72 часа, или по меньшей мере приблизительно 84 часа, или по меньшей мере приблизительно 96 часов, или по меньшей мере приблизительно 5 дней, или по меньшей мере приблизительно 10 дней, или по меньшей мере приблизительно 15 дней, или по

меньшей мере приблизительно 30 дней, или по меньшей мере приблизительно 45 дней, или по меньшей мере приблизительно 60 дней, или по меньшей мере приблизительно 90 дней, или по меньшей мере приблизительно 120 дней, или по меньшей мере приблизительно 150 дней, или по меньшей мере приблизительно 180 дней, или по меньшей мере приблизительно 1 месяца, или по меньшей мере приблизительно 2 месяцев, или по меньшей мере приблизительно 3 месяцев, или по меньшей мере приблизительно 4 месяцев, или по меньшей мере приблизительно 5 месяцев, или по меньшей мере приблизительно 6 месяцев, или по меньшей мере приблизительно 7 месяцев, или по меньшей мере приблизительно 8 месяцев, или по меньшей мере приблизительно 9 месяцев, или по меньшей мере приблизительно 10 месяцев, или по меньшей мере приблизительно 11 месяцев, или по меньшей мере приблизительно 12 месяцев или больше. Иллюстративные ММ включают описанные, например, в WO 2009/025846, WO 2010/096838, WO 2010/081173, WO 2013/163631, WO 2013/192546, WO 2013/192550, WO 2014/026136, WO 2014/052462, WO 2014/107599, WO 2014/197612, WO 2015/013671, WO 2015/048329, WO 2015/066279, WO 2015/116933, WO 2016/014974, WO 2016/118629, WO 2016/149201, WO 2016/179285, WO 2016/179257, WO 2016/179335, WO 2017/011580, PCT/US2017/059740 и предварительных заявках США с серийными номерами 62/469429, 62/572467, каждое из которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Активируемые антитела, используемые в практике настоящего изобретения, могут содержать один или несколько дополнительных структурных элементов, таких как, например, один или несколько линкеров, или другой аминокислотный остаток или пептид, которые могут придавать структурные преимущества, такие как N-концевой спейсерный аминокислотный остаток или аминокислотная последовательность и т.п.

Линкеры, подходящие для использования в активируемых антителах композиций и способов по настоящему изобретению, могут иметь любую длину. Подходящие линкеры включают линкеры, имеющие длину в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 20 аминокислотных остатков, или от приблизительно 1 до приблизительно 19 аминокислотных остатков, или от приблизительно 1 до приблизительно 18 аминокислотных остатков, или от приблизительно 1 до приблизительно 17 аминокислотных остатков, или от приблизительно 1 до приблизительно 16 аминокислотных остатков, или от приблизительно 1 до приблизительно 15 аминокислотных остатков, или от приблизительно 2 до приблизительно 15 аминокислотных остатков, или от приблизительно 3 до приблизительно 15 аминокислотных остатков, или от

приблизительно 3 до приблизительно 14 аминокислотных остатков, или от приблизительно 3 до приблизительно 13 аминокислотных остатков, или от приблизительно 3 до приблизительно 12 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит один или несколько линкеров, каждый из которых независимо содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных остатков.

Как правило, линкер представляет собой гибкий линкер, содержащий один или несколько аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из Gly, Ser, Ala и Thr, и часто линкер содержит один или несколько аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из Gly и Ser. Иллюстративные гибкие линкеры включают гомополимер глицина  $(G)_n$  (где  $n$  представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, или целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 30, или целое число в диапазоне от приблизительно от приблизительно 1 до приблизительно 25, или целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 20, или целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 15, или целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 10); сополимер глицина и серина, включая, например,  $(GS)_n$  (где  $n$  представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, или целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 30, или целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 25, или целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 20, или целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 15, или целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 10),  $(GSGGS)_n$  (SEQ ID NO:68) (где  $n$  представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, или целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 30, или целое число в диапазоне от приблизительно от 1 до приблизительно 25, или целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 20, или целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 15, или целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 10),  $(GGGS)_n$  (SEQ ID NO:69) (где  $n$  представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, или целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 30, или целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 25, или целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 20, или целое число в в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 15 или целое число в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 10); линкер, который содержит или состоит из



остатков глицина и серина, такой как, например, GGSG (SEQ ID NO:70), GGS GG (SEQ ID NO:71), GSGSG (SEQ ID NO:72), GSGGG (SEQ ID NO:73), GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO:74), GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:75), GSSGGSGGSGGSGGGS (SEQ ID NO:76), GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO:77), GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:78), GGGG (SEQ ID NO:79), GSSG (SEQ ID NO:80), GGGSSGGSGGSGG (SEQ ID NO:81), GGGSG (SEQ ID NO:82), GGGSGG (SEQ ID NO:152), GSGGGG (SEQ ID NO:153), GSGGGG (SEQ ID NO:154), GGS и т.п.; линкер, который содержит или состоит из остатков глицина, серина и треонина, такой как, например, GSSGT (SEQ ID NO:83); сополимер глицина и аланина; аланин-сериновый сополимер; а также другие гибкие линкеры, известные в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела, используемые в практике настоящего изобретения, могут также содержать спейсер, расположенный, например, на амино-конце MM. В некоторых вариантах осуществления спейсер соединен непосредственно с каждым MM активируемого антитела, например, в структурном расположении от N-конца к C-концу спейсер-MM-СМ-АВ, где каждый «-» независимо относится к непосредственному или опосредованному (т.е. через любой из описанных в данном документе линкеров). Иллюстративные спейсерные аминокислотные последовательности могут включать или состоять из любой из следующих иллюстративных аминокислотных последовательностей: QGQSGS (SEQ ID NO:84); GQSGS (SEQ ID NO:85); QSGS (SEQ ID NO:86); SGS; GS; S; QGQSGQG (SEQ ID NO:87); GQSGQG (SEQ ID NO:88); QSGQG (SEQ ID NO:89); SGQG (SEQ ID NO:90); GQG; QG; G; QGQSGQ (SEQ ID NO:91); GQSGQ (SEQ ID NO:92); QSGQ (SEQ ID NO:93); QGQSG (SEQ ID NO:94); QGQS (SEQ ID NO:95); SGQ; GQ; и Q.

Как описано выше, композиции очищенных активируемых антител могут быть получены для любого из множества активируемых антител. Иллюстративные активируемые антитела могут содержать набор CDR VL и VH, которые обеспечивают специфичность связывания с любой из множества биологических мишеней. Иллюстративные специфические CDR включают, например, CDR в VL и VH, которые вместе образуют АВ, обладающий специфичностью связывания с CD166 человека, где VL содержит CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:96, CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97 и CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98, и VH содержит CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99, CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:100, и CDR3, VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:101. В некоторых

вариантах осуществления активируемое антитело содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 102-119. Специфическое активируемое антитело к CD166, содержащее эти CDR, содержит первую легкую цепь и вторую легкую цепь, которые идентичны, и первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь, которые идентичны, при этом каждая из первой и второй легких цепей содержит идентичные аминокислотные последовательности первого и второго VL, идентичные первой и второй MM и идентичные первой и второй CM, где каждая из первой и второй легких цепей содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:120, и где каждая из первой и второй тяжелых цепи содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:121 и SEQ ID NO:122.

Другой набор иллюстративных CDR включают CDR в VL и VH, которые вместе образуют АВ, обладающий специфичностью связывания с PD1 человека, где VL содержит CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:123 или SEQ ID NO:129, CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:124 и CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:125, и VH содержит CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:126, CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:127, и CDR3, VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:128. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 130-280. Специфическое активируемое антитело к PD1, содержащее эти CDR, содержит первую легкую цепь и вторую легкую цепь, которые идентичны, и первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь, которые идентичны, где каждая из первой и второй легких цепей содержит идентичные аминокислотные последовательности первого и второго VL, идентичные первая и вторая MM, идентичные первая и вторая CM и идентичные первый и второй константные домены легкой цепи, где каждая из первой и второй легких цепей содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:281, и где каждая из первой и второй тяжелых цепей содержит идентичные аминокислотные последовательности первого и второго VH и идентичные константные домены первой и второй тяжелой цепи, и где каждая из первой и второй тяжелых цепей содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:282.

Другой иллюстративный набор CDR содержит CDR в VL и VH, которые вместе образуют АВ, обладающий специфичностью связывания с PDL1 человека, где VL

содержит CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:283, CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:284 и CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:285, и VH содержит CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:286, CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:287, и CDR3, VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:288. В некоторых вариантах осуществления MM содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 289-313. Специфическое активируемое антитело к PDL1, содержащее эти CDR, содержит первую легкую цепь и вторую легкую цепь, которые являются идентичными, и первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь, которые являются идентичными, при этом каждая из первой и второй легких цепей содержит идентичные первые и вторые аминокислотные последовательности VL, идентичные первому и второму MM, идентичным первому и второму CM и идентичным первому и второму константным доменам легкой цепи, где каждая из первой и второй легких цепей содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:314, и при этом каждая из первой и второй тяжелых цепей содержит идентичные аминокислотные последовательности первого и второго VH и идентичные константные домены первой и второй тяжелой цепи, и при этом каждая из первой и второй тяжелых цепей содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:315.

В другом аспекте настоящее изобретение включает способ определения или мониторинга относительного количества активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами в процессе получения композиции путем воздействия на образец композиции, содержащий популяцию активируемого антитела и популяцию его вариантов с вырезанными фрагментами, процедуры гель-капиллярного электрофореза. Процедура гель-капиллярного электрофореза может быть восстанавливающей SDS-cGE или невосстанавливающей SDS-cGE. В одном аспекте способ включает отделение популяции интактного полипептида, кодирующего продомен, от популяции его вариантов с вырезанными фрагментами с использованием процедуры восстанавливающего SDS-cGE и количественное определение относительных количеств популяции активируемого антитела и популяции его вариантов с вырезанными фрагментами с помощью определения площади пика, соответствующей кодирующему продомену интактному полипептиду, и площади пика, соответствующей его кодирующему продомену полипептиду с вырезанными фрагментами. В другом аспекте способ включает отделение популяции активируемого

антитела от популяции его вариантов с вырезанными фрагментами с использованием процедуры невосстанавливающего SDS-cGE и количественную оценку относительных количеств популяции активируемого антитела и популяции его вариантов с вырезанными фрагментами путем определения площади пика, соответствующего интактному активируемому антителу, а площадь пика соответствует его варианту с вырезанными фрагментами.

В некоторых аспектах метод гель-капиллярного электрофореза, описанный в данном документе, может идентифицировать наличие вариантов с вырезанными фрагментами, которые не обнаруживаются другими методами хроматографии, такими как эксклюзионная хроматография (например, SE-HPLC), анионообменная хроматография или катионообменная хроматография.

Таким образом, в некоторых аспектах метод количественного гель-капиллярного электрофореза, описанный в данном документе, можно использовать для оценки качества продукта и процесса для активируемого антитела, например, для мониторинга контроля качества в процессе фармацевтического производства. В некоторых аспектах способ можно использовать для определения того, подходит ли очищенная композиция, содержащая активируемое антитело, для получения фармацевтической композиции. В некоторых аспектах настоящее изобретение включает способ получения фармацевтической композиции, содержащей активируемое антитело, включающий а) получение очищенной композиции, содержащей интактное активируемое антитело и его вариант с вырезанными фрагментами, б) отделение соединений интактного активируемого антитела от его вариантов с вырезанными фрагментами путем воздействия на образец процедуры восстанавливающего или невосстанавливающего SDS-cGE, в) количественное определение относительных количеств популяции активируемого антитела и популяции его вариантов с вырезанными фрагментами путем определения площади пика, соответствующей интактному активируемому антителу или интактному содержащему продомен полипептиду, и площади пика, соответствующей антителу с вырезанными фрагментами или его содержащему продомен полипептиду(ам) с вырезанными фрагментами, и г) выбор очищенной композиции для использования в получении фармацевтической композиции, когда относительное количество варианта с вырезанными фрагментами в образце меньше порогового значения. В некоторых аспектах пороговое значение составляет 3% варианта с вырезанными фрагментами. В некоторых аспектах пороговое значение составляет 2,5%, 2%, 1,9%, 1,8%, 1,7%, 1,6%, 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1,0%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3% или 0,2%.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлен способ определения или мониторинга относительного процентного содержания активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами в процессе получения композиции, причем способ включает:

- a) подвергание композиции образца, содержащей популяцию активируемых антител и популяцию их вариантов с вырезанными фрагментами, процедуре гель-капиллярного электрофореза;
- b) отделение популяции активируемого антитела от популяции его вариантов с вырезанными фрагментами в процедуре гель-капиллярного электрофореза; и
- c) количественную оценку относительных количеств популяции активируемого антитела и популяции его вариантов с вырезанными фрагментами с помощью определения площади пика, соответствующей содержащему продомен интактному полипептиду, и площади пика, соответствующей содержащему его продомен с вырезанными фрагментами полипептиду (полипептидам).

В некоторых аспектах композиция образца представляет собой композицию сбора клеток, экспрессирующих активируемое антитело. В некоторых аспектах композиция образца была подвергнута аффинной хроматографии с помощью белка. В некоторых аспектах состав образца был подвергнут ионообменной хроматографии. В некоторых аспектах композиция образца была подвергнута анионообменной хроматографии. В некоторых аспектах композиция образца была подвергнута катионообменной хроматографии. В некоторых аспектах композиция образца была подвергнута хроматографии гидрофобного взаимодействия. В некоторых аспектах композиция образца была подвергнута хроматографии на мультимодальных разделительных матрицах. В некоторых аспектах указанное относительное процентное содержание подвергают мониторингу с помощью количественной оценки относительного процентного содержания популяции активируемого антитела и популяции его вариантов с вырезанными фрагментами после каждого из двух или более сборов клеток, аффинной хроматографии на основе белка, ионообменной хроматографии, хроматографии гидрофобного взаимодействия и хроматографии на мультимодальных разделительных матрицах. В некоторых аспектах стадия a) включает приведение активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами в композиции образца в контакт с восстанавливающим средством. В некоторых аспектах восстанавливающее средство представляет собой дитиоэритрит (DTE), дитиотреитол

(DTT), бета-меркаптоэтанол или их комбинацию. В некоторых аспектах стадия а) включает приведение активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами в композиции образца в контакт с денатурирующим средством. В некоторых аспектах денатурирующее средство представляет собой додецилсульфат натрия (SDS). В некоторых аспектах способ дополнительно включает проведение процедуры гель-капиллярного электрофореза с использованием стандартов SDS определения молекулярной массы белка и получение стандартной калибровочной кривой молекулярной массы. В некоторых аспектах стадия с) включает получение электрофореграммы, содержащей пик, соответствующий каждому из активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами, подвергнутых процедуре гель-капиллярного электрофореза. В некоторых аспектах способ дополнительно включает выполнение интеграции пика для каждого пика, соответствующего каждому из активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами, с получением площади пика кодирующего продомен полипептида с вырезанными фрагментами и площади пика кодирующего продомен интактного полипептида.

Следующие примеры дополнительно иллюстрируют осуществление настоящего изобретения на практике, и их не следует считать как ограничивающие объем настоящего изобретения никоим образом.

## ПРИМЕРЫ

### ПРИМЕР 1

#### Аналитические методы

##### A. Общая концентрация белка

Общую концентрацию белка в водном исходном материале и очищенном продукте определяли с помощью УФ-спектроскопии. Образцы каждого элюата отбирали непосредственно после стадии разделения и замораживали до использования в анализах, описанных в данном документе, например, анализах общего белка, SDS-cGE, SE-HPLC и ELISA НСР. Образцы последовательно разбавляли сверхчистой водой и измеряли поглощение белка с использованием УФ-спектрофотометра (УФ-Vis-спектрофотометр Cary 60, Agilent Technologies, Inc.) при длине волны 280 нм. Концентрацию белка определяли в соответствии с законом Бера-Ламберта при длине волны 280 нм с использованием рассчитанного молярного коэффициента экстинкции, основанного на аминокислотной последовательности. См., например, Pace, et al., *Protein Science* (1995) 4:2411.

Общий выход белка рассчитывали следующим образом:

Общий выход белка =

$$\frac{(\text{объем} \times \text{концентрация белка при 280 нм})_{\text{элюат}}}{(\text{объем} \times \text{концентрация при 280 нм})_{\text{водный исходный материал}}} \times 100$$

В. Количественное определение активируемых антител путем капиллярного электрофореза в восстанавливающем геле с использованием додецилсульфата натрия (SDS-cGE)

Чистоту композиций активируемых антител (% интактного активируемого антитела) определяли с использованием методики электрофореза в капиллярном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-cGE) и детекции на УФ-фотодиодной матрице (PDA) (система фармацевтического анализа PA 800 Plus, Beckman Coulter, Inc., Бреа, Калифорния). Образцы, содержащие активируемые антитела, восстанавливали с использованием 0,5 М 1,4-дитиозритритола (Sigma Aldrich, кат. № D8255-5G), затем денатурировали нагреванием в присутствии додецилсульфата натрия (SDS). После денатурации образцы разделяли по размеру в капилляре, содержащем полимерную матрицу SDS, которая обеспечивает селективность просеивания для электрофоретического разделения.

Анализ чистоты и гетерогенности IgG проводили в соответствии с инструкциями производителя с использованием реагентов, включающих стандарты определения размера белка SDS, буферы и компоненты, входящие в набор для анализа чистоты и гетерогенности IgG от SCIEX, как описано в инструкции производителя.

Калибровочную кривую стандарта молекулярной массы строили в соответствии с инструкциями производителя. Выполняли интеграцию пиков и анализировали электрофореграмму для идентификации пиков полипептидов. Пики, соответствующие кодирующему продомен полипептиду с вырезанными фрагментами, появляются перед ожидаемым пиком кодирующего продомен интактного полипептида.

Процент интактного активируемого антитела (т.е. % интактного активируемого антитела или «чистота») и процент вырезанного включения определяют следующим образом:

$$\% \text{ интактного активируемого антитела} = \frac{\% \text{ площади пика}_{\text{интактных}}}{(\% \text{ площади пика, вырезанная} + \% \text{ площади пика, интактная})} \times 100$$

интактная)

$$\% \text{ вырезанного включения} = \frac{\% \text{ площадь пика}_{\text{вырезанной}}}{\% \text{ площадь пика}_{\text{вырезанной}}} \times$$

100

(% площади пика, вырезанная + % площади пика, интактная)

где:

% Площадь пика, вырезанная =  $\frac{\text{Площадь пика кодирующего продомен полипептида с вырезанными фрагментами}}{\text{Общая площадь пика, соответствующая всем обнаруженным молекулам}} \times 100$

% Площадь пика, интактная =  $\frac{\text{Площадь пика кодирующего продомен интактного полипептида}}{\text{Общая площадь пика, соответствующая всем обнаруженным молекулам}} \times 100$

C. Количественное определение HMWS методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC)

Эксклюзионную высокоэффективную жидкостную хроматографию (SE-HPLC) использовали для количественного определения количества HMWS в композициях, описанных в данном документе.

Готовили подвижную фазу, содержащую 200 мМ K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 150 мМ KCl в ультрарасистой воде (pH 6,8 ± 0,1). Анализ проводили на системе HPLC с автоматическим пробоотборником (Dionex U3000 HPLC, термостатированный биосовместимый автоматический пробоотборник Ultimate™ WPS-3000TBRS, Thermofisher Scientific) с колонкой: аналитическая колонка (TSKgel G3000SWxl, кат. № 08541, Tosoh Bioscience LLC), защитная колонка (TSKgel Guard SWxl, 6 мм x 40 мм, кат. № 08543, Tosoh Bioscience LLC) и предколонка с фриттой (предколониная фритта 0,5 мкм, Upchurch Scientific, кат. № A-318). Колонку уравнивали подвижной фазой при скорости потока 0,5 мл/мин. перед анализом образца. Образцы для анализа разбавляли по мере необходимости до целевой концентрации 1 мг/мл деионизированной водой или водой более высокого качества. Эталонным материалом было соответствующее мономерное активируемое антитело (т.е. неагрегированное активированное антитело). Эталонный материал при необходимости разбавляли до целевой концентрации 1 мг/мл фосфатно-солевым буфером (PBS).

Анализ образцов проводили при длинах волн 220 нм (полоса пропускания 4 нм) и 280 нм (полоса пропускания 4 нм) для УФ-детекции; температура окружающего воздуха в печи колонки; температура образца в автодозаторе 5° ± 3°С; скорость потока 0,5 мл/мин.; и время работы 30 мин./образец. В начале каждой серии образцов перед введением эталонного материала проводили введение холостого буфера состава. Вводили 20 мкг эталонного материала, а затем 40 мкг испытуемого образца. 20 мкг эталонного материала вводили после каждой серии инъекций каждой серии испытуемых образцов.

Хроматограммы тестовых образцов интегрировали с помощью Smart Cobra



Wizard в Chromeleon 7 CDS (Thermo Scientific). Низкомолекулярные соединения (LMWS) обнаруживаются справа от основного пика (эталонный материал). Пик(и), соответствующий(ие) высокомолекулярным соединениям (HMWS), обнаруживают слева от основного пика. Относительный процент площади пика рассчитывали на основе суммы всех площадей пиков для всех пиков на хроматограмме (общая площадь пиков). Площадь пика каждого наблюдаемого пика HMWS суммировали, сумму делили на общую площадь пика и умножали на 100, чтобы получить процент площади пика, соответствующий HMWS (т.е. % HMWS).

#### D. Белок клетки-хозяина (HCP)

Количественное определение HCP (в ppm (нг/мл продукта)) определяли с использованием имеющегося в продаже набора для ELISA HCP в соответствии с указаниями производителя (набор для ELISA CHO HCP, (F550), Cygnus Technologies, Inc.).

## ПРИМЕР 2

### Сравнительный пример: Катионообменная хроматография

Катионообменную хроматографию оценивали как метод очистки водного исходного материала, содержащего интактное активируемое антитело к CD166 и соответствующее вырезанное включение. % вырезанного включения в водном исходном материале превышал 7,5%. Водный исходный материал содержал > 98% мономера. Активируемое антитело к CD166 имеет две легкие цепи и две тяжелые цепи. Каждая легкая цепь кодирует MM, CM, VL и константную область, и каждая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120. Каждая тяжелая цепь кодирует VH и константную область, и каждая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121. VH и VL каждой пары тяжелой цепи и легкой цепи вместе образуют Fab, способный связывать CD166 человека, если он не замаскирован. Водный исходный материал имел общую белковую нагрузку 10 мг/мл, что определяли по поглощению при длине волны 280 нм, как описано в примере 1A. Водный исходный материал доводили до pH 5,0 путем разбавления 1:10 уравнивающим буфером и наносили на катионообменную смолу (Capto S ImpAct, GE Lifesciences). Колонку элюировали градиентом NaCl при pH 5 путем смешивания первого буфера (25 mM NaOAc, 500 mM NaCl, pH 5,0 (град. 80 CV)) со вторым буфером (25 mM NaOAc, 25 mM NaCl, pH 5,0). Собирали фракции по 1 мл. На хроматограмме наблюдали один пик, из которого собирали фракции объемом 1 мл и анализировали с помощью восстанавливающего

SDS-cGE. На фигуре 5 представлена результирующая хроматограмма (линия «А» показывает оптическую плотность при 280 нм). Результаты показали, что присутствовали как интактные активируемые антитела, так и вырезанное включение, но разделения (пика) не было достигнуто. Соответственно, катионообменная хроматография не приводила к эффективному отделению интактных активируемых антител от вариантов с вырезанными фрагментами.

### ПРИМЕР 3

#### Получение очищенной композиции активируемого антитела

Водный исходный материал, содержащий такое же активируемое антитело к CD166, как описано в примере 2, обрабатывали с использованием процесса гидрофобной хроматографии по настоящему изобретению.

Супернатант сбора биореактора, содержащий интактное активируемое антитело и вырезанное включение, подвергали стадии аффинной хроматографии с белком А с последующей стадией инактивации вируса и стадией анионообменной хроматографии (анионной IEX). Эти процессы не приводили к эффективному отделению интактных активируемых антител от вариантов с вырезанными фрагментами. На фигуре 4А представлены результаты анализа SDS-cGE образца элюата со стадии аффинной хроматографии с белком А. Наблюдается значительный пик, содержащий вариант с вырезанными фрагментами (пик 1, «LC с вырезанными фрагментами»). На фигуре 4В представлены результаты анализа SDS-cGE образца элюата со стадии анионной IEX. Наблюдается значительный пик, содержащий вариант с вырезанными фрагментами (пик 1, «LC с вырезанными фрагментами»), и площадь пика варианта с вырезанными фрагментами не уменьшается по сравнению с элюатом с более ранней стадии хроматографии с белком А. Продукт со стадии анионной IEX собирали для дальнейшей обработки в процессе гидрофобной хроматографии, в котором использовали хроматографическую колонку, загруженную неподвижной фазой для хроматографии гидрофобного взаимодействия (т.е. колонку для хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC)).

Исследование на колонке HIC проводили в режиме связывания и элюирования с использованием Capto™ Phenyl ImpRes (GE Healthcare) в качестве смолы (т.е. неподвижной фазы). Эта смола представляет собой смолу на основе агарозы с фенилсодержащими лигандами. Водный исходный материал готовили путем кондиционирования продукта, собранного на стадии анионной IEX, буфером, содержащим 20 mM 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES) и 1,5 M сульфата аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 6. Водный исходный материал разделяли на две

аликвоты, «аликвоту 1» и «аликвоту 2», для обработки через хроматографическую колонку гидрофобного взаимодействия в двух циклах, «цикл 1» и «цикл 2» соответственно. Хроматографическое оборудование, включая колонку и буферы, помещали в термошкаф, поддерживаемый при  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Две аликвоты загружали в колонку в два цикла. Плотность нагрузки устанавливали на максимум 20 мг/мл (смола) для цикла 1 и 16 мг/мл (смола) для цикла 2. Колонку элюировали буфером, содержащим 20 mM MES и 0,26 M аммония сульфат, pH 6,0. Критерии пикового среза (УФ-ячейка с длиной оптического пути 2 мм) устанавливали на 50 mAU при восходящем перегибе и 600 mAU при нисходящем перегибе. Собирали элюат и очищали колонку 1 M раствором NaOH. Концентрацию общего белка определяли по поглощению УФ, как описано в примере 1, и выходы общего белка рассчитывали на основе объема и концентрации белка в водном исходном материале и элюате. Общий выход белка на стадии процесса гидрофобной хроматографии представлен в таблице 1 ниже.

Таблица 1. Процесс гидрофобной хроматографии (HIC)

Образец	Выход (%, общий белок)
Цикл 1	>75%
Цикл 2	>75%

Относительные количества интактного активируемого антитела и вырезанного включения определяли с помощью анализа восстановления SDS-cGE, как описано в примере 1. Расчет % интактного активируемого антитела и % вырезанного включения проводили на основе легкой цепи, которая представляла собой кодирующий продомен полипептид.

Обобщение показателей эффективности процесса для стадии гидрофобной хроматографии представлена в таблице 2 ниже.

Таблица 2. Стадия гидрофобной хроматографии – эффективность процесса

Образец	% интактного активируемого	% вырезанного включения, как	Уменьшение кратности, вырезанное	% снижения вырезанного включения	Количество вырезанного включения в элюате в виде % вырезанного

	антитела, как определено с помощью восстановления с помощью SDS-сGE	определено с помощью восстанавливающего SDS-сGE	включение		включения в водном исходном материале
Подача на стадию анионной ИЕХ	>93%	>4%	---	---	
Продукт анионной ИЕХ/исходный материал для циклов 1, 2 НИС	>93%	>4%	Снижение не обнаружено	Снижение не обнаружено	~100%
Элюат для НИС, цикл 1	>95%	<1%	>7	>85%	<13%
Элюат для НИС, цикл 2	>95%	<1%	>9	>88%	<11%

Стадия анионной ИЕХ (непосредственно перед стадией гидрофобной хроматографии), по-видимому, не оказала заметного влияния на уменьшение количества вырезанного включения из промежуточной композиции. См. фиг. 4А и 4В. В отличие от этого, стадия процесса гидрофобной хроматографии (с использованием колонки НИС) оказала значительное влияние на удаление вырезанного включения. См. фиг. 4С, на которой представлены результаты анализа SDS-сGE образца элюата со стадии гидрофобной хроматографии. На фиг. 4С не наблюдается пика, соответствующего варианту с вырезанными фрагментами. Количество соединений с вырезанными фрагментами в элюате по сравнению с их количеством в исходном водном растворе указывает на то, что процесс гидрофобной хроматографии был эффективен для снижения количества вырезанного включения в технологическом потоке в приблизительно 8-9,6 раз. Остаточные уровни вырезанного включения в каждом элюате были значительно меньше, чем уровни, присутствующие в водном

водный исходном материале для обоих циклов. Уровень чистоты (% интактного активируемого антитела) оставался высоким в элюате обоих циклов, при этом остаточные уровни вырезанного включения в элюате составляли менее 1% вырезанного включения, как измерено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

Уровни белка клетки-хозяина в композициях водного исходного материала и элюата характеризовали с использованием аналитического метода ELISA НСР, описанного в примере 1. Результаты показаны ниже в таблице 3. Количество НСР указано в ppm (т.е. НСР в нг/мл (как определено с помощью соответствующего ELISA НСР), разделенное на концентрацию продукта в мг/мл (как определено по поглощению при длине волны 280 нм, как описано в примере 1А)).

Таблица 3. Количественное определение белка клетки-хозяина

Образец	Белок клетки-хозяина (ppm)	Кратность снижения	% снижения	Количество НСР в элюате, в % от НСР в водном исходном материале
НС, (водный) исходный материал для цикла 1, цикла 2	>20 ppm	---	---	
Элюат для НС, цикл 1	<4 ppm	7	>85%	<15%
Элюат для НС, цикл 2	<3 ppm	> 7	>85%	<15%

Стадия процесса гидрофобной хроматографии с использованием неподвижной фазы НС была эффективной для снижения уровней НСР в технологическом потоке приблизительно в 7 раз или больше. Остаточные уровни НСР в элюате составляли менее приблизительно 15% от уровней водного исходного материала.

Уровни HMWS также оценивали в водном исходном материале и элюате с использованием анализа SE-HPLC, описанного в примере 1. Результаты показаны ниже в таблице 4.

Таблица 4. Количественное определение HMWS

Образец	% HMWS	% снижения	Кратность	Количество
---------	--------	------------	-----------	------------

	(% площади пика)	HMWS	снижения HMWS	HMWS в элюате, в % от HMWS в водном исходном материале
Исходный материал для НИС, цикл 1	>1	---	---	---
Исходный материал для НИС, цикл 2	>1	---	---	---
Элюат для НИС, цикл 1	<1	>85%	>7	<15%
Элюат для НИС, цикл 2	<1	>90%	>13	<10%

Результаты показали, что процесс был эффективен для удаления 85% или более HMWS из технологического потока. Полученные композиции элюатов содержали менее приблизительно 15% (цикл 1) и 10% (цикл 2) HMWS, присутствующих в водных исходных материалах.

Обобщение относительных количеств интактного активируемого антитела, вырезанного включения, НСР и HMWS в (очищенных) композициях элюата представлена в таблице 5 ниже.

Таблица 5. Очищенные композиции

Композиция элюата	Элюат, цикл 1	Элюат, цикл 2
% интактного активируемого антитела*	>95%	>95%
% вырезанного включения*	<1%	<1%
НСР (ppm) (определено с	<5 ppm	<5 ppm

помощью ELISA НСП, как описано в примере 1)		
% HMWS**	<0,5%	<0,5%

\* Определено с помощью SDS-cGE, как описано в примере 1, на основе % площади пика, соответствующей общей легкой цепи (интактной и с вырезанными фрагментами).

\*\*Определено с помощью SE-HPLC, как описано в примере 1.

Было достигнуто пиковое разделение между вырезанным включением и интактным активируемым антителом, что привело к успешному разделению этих соединений, имеющих очень близкие молекулярные массы и аминокислотные последовательности. Результаты показывают, что стадия процесса гидрофобной хроматографии была высокоэффективной для получения композиций, которые являются высокочистыми по отношению к интактным активируемым антителам с низкими остаточными уровнями вырезанного включения, НСП и HMWS.

#### ПРИМЕР 4

##### Получение очищенной композиции активируемого антитела к PD1

Культуральный продукт, содержащий активируемое антитело к PD1, полученный в результате двух циклов биореактора (в масштабе 50 л («прогон 1») и в масштабе 1000 л («прогон 2»)), очищали для удаления различных включений, включая вырезанное включение. Активируемое антитело к PD1 имеет две легкие цепи, каждая из которых кодирует MM, CM, VL и константную область, и каждая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 281, и две тяжелые цепи, каждая из которых кодирует VH и константную область, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:282. Каждый VH и VL вместе образуют Fab, способный связывать мишень, PD1 человека, если он не замаскирован.

Последующий процесс очистки для каждого прогона биореактора был одинаковым. Супернатант сбора биореактора, содержащий продукт активируемого антитела к PD1, подвергали стадии аффинной хроматографии с белком А с последующей стадией инактивации вируса и стадией анионообменной хроматографии (анионной IEX). Эти процессы не приводили к эффективному отделению интактных активируемых антител от вариантов с вырезанными фрагментами. Продукт собирали для дальнейшей обработки в колонке НИС. Проводимость продукта со стадии анионной IEX доводили до  $127,0 \pm 13$  мСм/см для прогона 1 и  $126$  мСм/см  $\pm 13$  для прогона 2 с 20

мМ MES и 1,8 М сульфата аммония, pH 6,0. Продукт разделяли на алиquotы, размеры которых соответствовали нагрузочной способности колонки HIC. Каждую алиquotу (водный исходный материал) затем загружали в колонку HIC (Capto™ Phenyl ImpRes, GE Healthcare), функционирующую в режиме связывания/элюирования (B/E) при температуре  $22 \pm 1$  °C. Колонку элюировали водным раствором 20 мМ MES, 0,4 М сульфата аммония, pH 6,0. Элюат собирали и колонку очищали 0,01 М раствором NaOH.

Концентрацию общего белка определяли по поглощению УФ, как описано в примере 1, и выходы общего белка рассчитывали на основе объема и концентрации белка в водном исходном материале и элюате. Общий выход белка для каждой алиquotы, нанесенной на колонку HIC, представлен в таблице 6 ниже.

Таблица 6. Процесс гидрофобной хроматографии (HIC), общий выход белка

Прогон	Аликота	Выход (%, общий белок)
1	1	>80%
	2	> 80%
2	1	>75%
	2	>75%
	3	>80%
	4	>80%

Результаты показывают, что общий выход белка был относительно высоким для обоих прогонов.

Относительные количества интактного активируемого антитела и вырезанного включения определяли с помощью анализов восстанавливающего SDS-cGE, как описано в примере 1. Расчет % интактного активируемого антитела и % вырезанного включения проводили на основе легкой цепи, которая представляла собой кодирующий продомен полипептид.

Обобщение показателей эффективности процесса для стадии процесса гидрофобной хроматографии для прогона 1 и прогона 2 представлена в таблицах 7А и 7В соответственно ниже.

Таблица 7А. Стадия гидрофобной хроматографии – производительность процесса, прогон 1



Образец	% интактного активируемого антитела, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE	% активируемых антител с вырезанными и фрагментами, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE	Уменьшение кратности, вырезанное включение	% снижения вырезанного включения	Количество молекул с вырезанными и фрагментами в элюате в виде % вырезанного включения в водном исходном материале
Подача на стадию анионной ИЕХ	>95%	>3%	—	—	—
Продукт анионной ИЕХ/исходный материал для ИС	>95%	>3%	Снижение не обнаружено	Снижение не обнаружено	~100%
Элюат для ИС, прогон 1	>97%	<1%	>37	>96%	<4%
Элюат для ИС, прогон 2	>97%	<1%	>18%	>94%	<6%

Таблица 7В. Стадия гидрофобной хроматографии – производительность процесса, прогон 2

Образец	% интактного активируемого антитела,	% вырезанного включения, как	Уменьшение кратности, вырезанное включение	% снижения вырезанного включения	Количество вырезанного включения в элюате в

	как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE	определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE			виде % вырезанного включения в водном исходном материале
Подача на стадию анионной ИЕХ	>96%	>3%	---	---	---
Продукт анионной ИЕХ/исходный материал для НИС	>96%	>3%	Снижение не обнаружено	Снижение не обнаружено	~100%
Элюат для НИС, аликвота 1	>97%	<1%	>35	>95%	<3%
Элюат для НИС, аликвота 2	>97%	<1%	>17	>93%	<6%
Элюат для НИС, аликвота 3	>97%	<1%	>35	>95%	<3%
Элюат для НИС, аликвота 4	>97%	<1%	>17	>93%	<6%

Как и в схеме процесса, описанной в примере 3, стадия анионной ИЕХ перед стадией гидрофобной хроматографии, по-видимому, не оказывала заметного влияния на уменьшение количества вырезанного включения из промежуточной композиции. В противоположность этому, стадия процесса гидрофобной хроматографии была очень эффективной для снижения количества вырезанного включения в технологическом потоке. Промежуточные композиции также анализировали в отношении наличия НСР с использованием анализа на основе ELISA НСР, описанного в примере 1. Результаты

показаны в таблицах 8А (прогон 1) и 8В (прогон 2).

Таблица 8А. Количественное определение белка клетки-хозяина (прогон 1)

Образец	Белок клетки- хозяина (ppm НСР)	Кратность снижения	% снижения	НСР в элюате в виде % НСР в водном исходном материале
Исходный материал для НС	>4 ppm	---	---	
Элюат для НС, аликвота 1	<2 ppm	>4	>75%	<25
Элюат для НС, аликвота 2	<2 ppm	>4	>75%	<25

Таблица 8В. Количественное определение белка клетки-хозяина (прогон 2)

Образец	Белок клетки- хозяина (ppm НСР)	Кратность снижения	% снижения	НСР в элюате в виде % НСР в исходном материале
Исходный материал для НС	>3 ppm	---	---	---
Элюат для НС, аликвота 1	<1 ppm	> 4	>75%	<25%
Элюат для НС, аликвота 2	<1 ppm	> 4	>75%	<25%
Элюат для НС, аликвота 3	<1 ppm	> 4	>75%	<25%
Элюат для НС, аликвота 4	<1 ppm	> 4	>75%	<25%

Результаты показывают, что стадия процесса гидрофобной хроматографии была

эффективна для снижения количества НСР в технологическом потоке по меньшей мере в 4 раза.

Уровни HMWS также оценивали в образцах водного исходного материала и элюата с использованием анализа SE-HPLC, описанного в примере 1. Результаты количественного определения HMWS представлены в таблицах 9А (прогон 1) и 9В (прогон 2).

Таблица 9А. Количественное определение HMWS (прогон 1)

Образец	HMWS (% площади)	Кратность снижения HMWS	% снижения HMWS	HMWS в элюате в виде % HMWS в водном исходном материале
Подача в НИС	>2%	---	---	---
Элюат для НИС – аликвота 1	<1,5%	>2	>55%	<45%
Элюат для НИС – аликвота 2	<1%	>2,5	>65%	<35%

Таблица 9В. Количественное определение HMWS (прогон 2)

Образец	HMWS (% площади)	Кратность снижения HMWS	% снижения HMWS	HMWS в элюате в виде % HMWS в водном исходном материале
Подача в НИС	>2%	---	---	---
Элюат для НИС – аликвота 1	<1%	>2,5	>65%	<35%

Элюат для НИС аликовота 2	<1%	>2,5	>65%	<35%
Элюат для НИС аликовота 3	<1%	>2,5	>65%	<35%
Элюат для НИС аликовота 4	<1%	>4	>75%	<25%

Результаты показывают, что процесс гидрофобной хроматографии был высокоэффективным в снижении уровней HMWS в технологическом потоке.

Обобщение относительных количеств интактного активируемого антитела, вырезанного включения, НСР и HMWS в очищенных композициях, полученных в процессе гидрофобной хроматографии по настоящему изобретению, представлена в таблице 10А (прогон 1) и таблице 10В (прогон 2) ниже.

Таблица 10А. Очищенные композиции, прогон 1 (50 л)

Композиция элюата	Элюат, аликовота 1	Элюат, аликовота 2
% интактного активируемого антитела*	>95%	>95%
% вырезанного включения*	<1%	<1%
НСР (ppm) (определено с помощью ELISA НСР, как описано в примере 1)	<1,5 ppm	<1,5 ppm
% HMWS**	<1,5%	<1%

\* Определено с помощью SDS-cGE, как описано в примере 1, на основе % площади пика, соответствующей общей легкой цепи (интактной и с вырезанными фрагментами).

\*\*Определено с помощью SE-HPLC, как описано в примере 1.

Таблица 10В. Очищенные композиции, прогон 2 (1000 л)

Композиция элюата	Элюат, аликвота 1	Элюат, аликвота 2	Элюат, аликвота 3	Элюат, аликвота 4
% интактного активированного антитела*	>95%	>95%	>95%	>95%
% вырезанного включения*	<1%	<1%	<1%	<1%
НСП (ppm) (ELISA НСП)	< 1 ppm	<1 ppm	< 1 ppm	< 1 ppm
% HMWS**	<1%	<1%	<1%	<1%

\* Определено с помощью SDS-cGE, как описано в примере 1, на основе % площади пика, соответствующей общей легкой цепи (интактной и с вырезанными фрагментами).

\*\*Определено с помощью SE-HPLC, как описано в примере 1.

Результаты показывают, что процесс гидрофобной хроматографии по настоящему изобретению, в данном случае с использованием колонки НИС, был успешным для удаления соединений с вырезанными фрагментами, НСП и HMWS из технологического потока, таким образом приводя к получению высокочистых композиций интактного активированного антитела.

#### ПРИМЕР 5

##### Получение очищенной композиции активированного антитела к PDL1

Продукт культуры, содержащий активированное антитело к PDL1, обрабатывали с использованием процесса гидрофобной хроматографии по настоящему изобретению с удалением различных включений. Активированное антитело к PDL1 имеет две легкие цепи, каждая из которых кодирует MM, CM, VL и константную область, и каждая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 314, и две тяжелые цепи, каждая из которых кодирует VH и константную область, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:315. Каждый VH и VL вместе образуют Fab, способный связывать мишень, PDL1 человека, если он не замаскирован.

Супернатант сбора биореактора, содержащий интактное активированное антитело и вырезанное включение, подвергали стадии аффинной хроматографии с белком А с последующей стадией инактивации вируса и стадией анионной ИЕХ. Эти процессы не приводили к эффективному отделению интактных активированных антител от вариантов

с вырезанными фрагментами. Продукт со стадии анионного ИЕХ собирали для дальнейшей обработки в процессе гидрофобной хроматографии, в котором использовали хроматографическую колонку, загруженную неподвижной фазой для хроматографии на мультимодальных разделительных матрицах (т.е. колонку для хроматографии на мультимодальных разделительных матрицах (ММС)).

Исследование на колонке для ММС проводили в режиме связывания и элюирования с использованием Capto™ ММС ImpRes (GE Healthcare) в качестве смолы (т.е. неподвижной фазы с N-бензоил-гомоцистеиновыми лигандами) при температуре  $22 \pm 4$  °С.

Композицию промежуточного продукта (рН 5,9) кондиционировали 25 мМ MES, 30 мМ NaCl, затем делили на две аликвоты (водный исходный материал) и обрабатывали в два цикла. Плотность загрузки составляла 30 мг/мл<sub>смолы</sub> для каждого прогона. Колонку промывали, затем элюировали 25 мМ MES, 30 мМ NaCl, 90 мМ аргинина HCl при рН 5,9. Собирали элюат и очищали колонку 1 М раствором NaOH. Концентрацию общего белка определяли по поглощению УФ, как описано в примере 1, и выходы общего белка рассчитывали на основе объема и концентрации белка в водном исходном материале и элюате. Общий выход белка на стадии процесса гидрофобной хроматографии представлен в таблице 11 ниже.

Таблица 11. Процесс гидрофобной хроматографии (ММС)

Образец	Выход (%, общий белок)
Исходный материал для ММС	---
Элюат, аликвота 1	>75%
Элюат, аликвота 2	>75%

Результаты показывают, что в этом процессе были получены относительно высокие общие выходы белка.

Относительные количества интактного активируемого антитела и вырезанного включения определяли с помощью восстанавливающего SDS-cGE, как описано в примере 1. Результаты обобщены в таблице 12.

Таблица 12. Стадия гидрофобной хроматографии с использованием ММС – эффективность процесса

Образец	% интактного активируемо го антитела, как определено с помощью восстанавли вающего SDS-cGE	% вырезанного включения, как определено с помощью восстанавли вающего SDS-cGE	Уменьшение кратности, вырезанное включение	% снижения вырезанного включения	Количество вырезанного включения в элюате в виде % вырезанного включения в водном исходном материале
Подача на стадию анионной ИЕХ	>95%	>0,5%	---	---	---
Продукт анионной ИЕХ/водный исходный материал для ММС	>95%	>0,5%	Снижение не обнаружено	Снижение не обнаружено	~100%
Элюат для ММС, аликвота 1	>98%	<0,5%	>8	>85%	<12%
Элюат для ММС, аликвота 2	>98%	<0,5%	>8	>85%	<12%

Результаты показывают, что осуществление процесса гидрофобной хроматографии, в данном случае с использованием колонки ММС, эффективно удаляет более 85% вырезанного включения из технологического потока, что приводит к снижению уровня этой примеси в более чем 8 раз. Уровни интактного активируемого антитела (чистота) были высокими в обоих образцах элюента и превышали 98%. В противоположность этому, стадия анионной ИЕХ оказалась неэффективной для снижения уровня вырезанного включения в технологическом потоке.

Исходный материал для ММС и композиции элюатов также анализировали в



отношении наличия НСР. Результаты приведены в таблице 13.

Таблица 13. Количественное определение белка клетки-хозяина

Образец	Белок клетки-хозяина (ppm НСР)	Кратность снижения	% снижения	Количество НСР в элюате в % от НСР в исходном материале для ММС
Водный исходный материал для ММС	>55 ppm	---		---
Элюат для ММС, аликвота 1	<9 ppm	> 6	>84%	< 16%
Элюат для ММС, аликвота 2	<6 ppm	>11	>90%	< 9%

Результаты показывают, что стадия гидрофобной хроматографии с использованием хроматографической колонки ММС была эффективна для снижения количества НСР в исходной композиции ММС более чем в 6 раз (более 84%) для аликвоты 1 и более чем в 11 раз (более 90%) для аликвоты 2. Остаточное количество НСР в элюате составляло менее 16% и приблизительно 9% от уровня исходного материала для аликвоты 1 и 2 соответственно.

Количества HMWS также оценивали в образцах исходного материала и элюата с использованием анализа SE-HPLC, описанного в примере 1. Результаты количественного определения HMWS представлены в таблице 14 ниже.

Таблица 14. Количественное определение HMWS

Образец	%HMWS (% площади)	Кратность снижения	% снижения	Количество HMWS в элюате в % от HMWS в водном исходном

				материале
Продукт стадии анионной ИХ/исходный материал для ММС	>3%	---	---	---
Элюат для ММС – аликвота 1	<1%	>4	>75%	<25
Элюат для ММС – аликвота 2	<1%	>9	>85%	<12

Результаты показывают, что стадия процесса гидрофобной хроматографии, в данном случае с использованием колонки ММС, была высокоэффективной для удаления значительной доли НМWS из технологического потока.

Обобщение относительных количеств интактного активируемого антитела, вырезанного включения, НСР и НМWS в очищенных композициях, полученных в процессе гидрофобной хроматографии по настоящему изобретению, представлена в таблице 15 ниже.

Таблица 15. Очищенные композиции

Композиция элюата	Элюат, прогон 1	Элюат, прогон 2
% интактного активируемого антитела*	>98%	>98%
% вырезанного включения*	<0,5%	<0,5%
НСР (ppm) (определено с помощью ELISA НСР, как описано в примере 1)	< 9 ppm	<5 ppm
%НМWS**	<1	<1

\* Определено с помощью SDS-cGE, как описано в примере 1, на основе % площади

пика, соответствующей общей легкой цепи (интактной и с вырезанными фрагментами).

\*\*Определено с помощью SE-HPLC, как описано в примере 1.

Результаты показывают, что стадия процесса гидрофобной хроматографии была высокоэффективной для получения относительно чистых композиций интактного активируемого антитела, которые имеют, если присутствуют вообще, низкие остаточные уровни вырезанного включения, НСР и НМWS.

#### ПРИМЕР

6

#### Получение очищенной композиции активируемого антитела к PDL1 из исходного водного исходного материала с высоким уровнем вырезанного включения

##### A. Водный исходный материал: 3,1 % вырезанного включения

Водный исходный материал, содержащий антитело к PDL1, описанное в примере 5, загружали в колонку для MMC. В состав водного исходного материала входило 3,1% вырезанного включения и более 98% активируемого антитела в мономерной форме (т.е. менее 2% НМWS).

Исследование на колонке для MMC проводили в режиме связывания и элюирования с использованием Capto™ MMC ImpRes (GE Healthcare) в качестве смолы (т.е. неподвижной фазы с N-бензоил-гомоцистеиновыми лигандами) при температуре  $22 \pm 4$  °C. Водный исходный материал кондиционировали 25 мМ MES, 30 мМ NaCl (pH 6). Колонку промывали 25 мМ MES, 30 мМ NaCl, 20 мМ аргинина HCl при pH 6, затем элюировали 25 мМ MES, 30 мМ NaCl, 90 мМ аргинина HCl при pH 6. Элюат собирали и колонку очищали 1 М раствором NaOH.

Концентрацию общего белка определяли по поглощению УФ, как описано в примере 1, и выходы общего белка рассчитывали на основе объема и концентрации белка в водном исходном материале и элюате. Уровень вырезанного включения в полученном элюате уменьшился более чем в 7,5 раз, так что в элюате осталось менее чем приблизительно 13% вырезанного включения в водном исходном материале. Количество мономерного активируемого антитела оставалось выше 98%. Общий выход белка превышал 65%.

##### B. Водный исходный материал: 13,5 % вырезанного включения

Водный исходный материал, содержащий антитело к PDL1, описанное в

примере 5, загружали в колонку для ММС (загруженную смолой Capto™ ImpRes (GE Healthcare) и обрабатывали, как описано в части А выше. В состав водного исходного материала входило 13,5% вырезанного включения и 96,8% активируемого антитела в мономерной форме (т.е. более 3% HMWS). Уровень вырезанного включения в полученном элюате был снижен более чем в 7 раз (< 14% вырезанного включения в водном исходном материале), а количество мономерных активируемых антител превышало 98% (т.е. менее чем 2% HMWS). Общий выход белка превышал 65%.

Результаты этих экспериментов позволяют предположить, что процесс гидрофобной хроматографии можно использовать для очистки водного исходного материала с относительно высоким содержанием вырезанного включения. Процесс гидрофобной хроматографии приводит к образованию композиции, которая практически деплетирована по вырезанному включению.

Перечень последовательностей показан ниже в таблице 16.

Таблица 16. Аминокислотная последовательность

SEQ ID NO.	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
1	CM	LSGRSDNH
2	CM	TGRGPSWV
3	CM	PLTGRSGG
4	CM	TARGPSFK
5	CM	NTLSGRSENHSG
6	CM	NTLSGRSGNHGS
7	CM	TSTSGRSANPRG
8	CM	TSGRSANP
9	CM	VHMPLGFLGP
10	CM	AVGLLAPP
11	CM	AQNLLGMV
12	CM	QNQALRMA
13	CM	LAAPLGLL
14	CM	STFPFGMF
15	CM	ISSGLLSS
16	CM	PAGLWLDP
17	CM	VAGRSMRP
18	CM	VVPEGRRS

19	CM	ILPRSPAF
20	CM	MVLGRSLL
21	CM	QGRAITFI
22	CM	SPRSIMLA
23	CM	SMLRSMPL
24	CM	ISSGLLSGRSDNH
25	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDNH
26	CM	ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH
27	CM	LSGRSGNH
28	CM	SGRSANPRG
29	CM	LSGRSDDH
30	CM	LSGRSDIH
31	CM	LSGRSDQH
32	CM	LSGRSDTH
33	CM	LSGRSDYH
34	CM	LSGRSDNP
35	CM	LSGRSANP
36	CM	LSGRSANI
37	CM	LSGRSDNI
38	CM	MIAPVAYR
39	CM	RPSPMWAY
40	CM	WATPRPMR
41	CM	FRLLDWQW
42	CM	ISSGL
43	CM	ISSGLLS
44	CM	ISSGLL
45	CM	ISSGLLSGRSANPRG
46	CM	AVGLLAPPTSGRSANPRG
47	CM	AVGLLAPPSGRSANPRG
48	CM	ISSGLLSGRSDDH
49	CM	ISSGLLSGRSDIH
50	CM	ISSGLLSGRSDQH
51	CM	ISSGLLSGRSDTH
52	CM	ISSGLLSGRSDYH

53	CM	ISSGLLSGRSDNP
54	CM	ISSGLLSGRSANP
55	CM	ISSGLLSGRSANI
56	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDDH
57	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDIH
58	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDQH
59	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDTH
60	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDYH
61	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDNP
62	CM	AVGLLAPPGGLSGRSANP
63	CM	AVGLLAPPGGLSGRSANI
64	CM	ISSGLLSGRSDNI
65	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDNI
66	CM	GLSGRSDNHGGAVGLLAPP
67	CM	GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP
68	Линкер	GSGGS
69	Линкер	GGGS
70	Линкер	GGSG
71	Линкер	GGSGG
72	Линкер	GSGSG
73	Линкер	GSGGG
74	Линкер	GSSGGSGGSGG
75	Линкер	GSSGGSGGSGGS
76	Линкер	GSSGGSGGSGGSGGGS
77	Линкер	GSSGGSGGSGG
78	Линкер	GSSGGSGGSGGS
79	Линкер	GGGS
80	Линкер	GSSG
81	Линкер	GGGSSGGSGGSGG
82	Линкер	GGGSG
83	Линкер	GSSGT
84	Спейсер	QQQSGS
85	Спейсер	GQSGS
86	Спейсер	QSGS

87	Спейсер	QGQSGQG
88	Спейсер	GQSGQG
89	Спейсер	QSGQG
90	Спейсер	SGQG
91	Спейсер	QGQSGQ
92	Спейсер	GQSGQ
93	Спейсер	QSGQ
94	Спейсер	QGQSG
95	Спейсер	QGQS
96	CDR1 VL	RSSKSLLSHNGITYLY
97	CDR2 VL	QMSNLAS
98	CDR3 VL	AQNLELPYT
99	CDR1 VH	GFSLSTYGMGVG
100	CDR2 VH	NIWVSEDKH
101	CDR3 VH	IDYGNDYAFTY
102	MM	LCHPLVLSAWESCSS
103	MM	LCHPAVLSAWESCSS
104	MM	LCHPLVASAWESCSS
105	MM	LEGWCLHPLCLWGAG
106	MM	LCAPLVLSAWESCSS
107	MM	LCHALVLSAWESCSS
108	MM	LCHPLALSAWESCSS
109	MM	LCHPLVLSAAESCSS
110	MM	LCHPLVLSAWASCSS
111	MM	HPLVL
112	MM	LEGACLHPLCLWGAG
113	MM	LEGWCAHPLCLWGAG
114	MM	LEGWCLAPLCLWGAG
115	MM	LEGWCLHACLWGAG
116	MM	LEGWCLHPACLWGAG
117	MM	LEGWCLHPLCAWGAG
118	MM	LEGWCLHPLCLAGAG
119	MM	CLHPLC
120	Легкая цепь	QGQSGQGLCHPAVLSAWESCSSG

	человека $\alpha$ CD166 CX-191/CX-2009 (спейсер-ММ- LP1-СМ-LP2-Ab)	GGSSGGS AVGLLAPPGLSGRSDN HGGSDIVMTQSPLSLPVT PGEPASI SCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKP GQSPQLLIYQMSNLASGV PDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC AQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTL SKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
121	Тяжелая цепь человека $\alpha$ CD166 (HuCD166_HcCD des-HC))	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFS GFSLSTYGMGVGWIRQPPGKALE WLANIWWSEDKHYSPSLKSRLTIT KDTSKNQVVLITNVDPVDTATYY CVQIDYGNDYAFTYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
122	Тяжелая цепь человека $\alpha$ CD166 (HuCD166_HcC)	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFS GFSLSTYGMGVGWIRQPPGKALE WLANIWWSEDKHYSPSLKSRLTIT



		KDTSKNQVVLITITNVDPVDTATYY CVQIDYGN DYAF TYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
123	CX-188 1.5 CDR1 VL	RASESVDAYGISFMN
124	1.5 CDR2 VL	AASNQGS
125	1.5 CDR3 VL	QQSKDVPWT
126	1.5 CDR1 VH	GFTFSGYAMS
127	1.5 CDR2 VH	YISNSGGNAH
128	1.5 CDR3 VH	EDYGTSPFVY
129	1.4 CDR1 VL	RASESVDSYGISFMN
130	PD001-Mask	AMSGCSWSAFCPYLA
131	PD002	DVNCAIWYSVCTTVP
132	PD003	LVCPLYALSSGVCMG
133	PD004	SVNCRIWSAVCAGYE
134	PD005	MLVCSLQPTAMCERV
135	PD006	APRCYMFASYCKSQY
136	PD007	VGPCELTPKPV CNTY
137	PD008	ETCNQYERSSGLCFA
138	PD009	APRTCYTYQCSSFYT

139	PD010	GLCSWYLSSSGLCVD
140	PD011	VPWCQLTPRVMCMWA
141	PD012	NWLDCQFYSECSVYG
142	PD013	SCPLYVMSSFGGCWD
143	PD014	MSHCWMFSSSCDGVK
144	PD015	VSYCTWLIEVTCLRG
145	PD016	VLCAAYALSSGICGG
146	PD017	TTCNLYQQSSMFCNA
147	PD018	APRCYMFASYCKSQY
148	PD019	PCDQNPYFYPYVCHA
149	PD020	SVCPMYALSSMLCGA
150	PD021	LSVECYVFSRCSSLP
151	PD022	FYCTYLVSLTCHPQ
152	Линкер	GGGSGG
153	Линкер	GSGGGS
154	Линкер	GSGGSG
155	PD023	SMAGCQWSSFCVQRD
156	PD024	IYSCYMFASRCTSDK
157	PD025	SRCVYEVSSGLCDW
158	PD026	GMCSAYAYSSKLCTI
159	PD027	MTTNTCNLLCQQFLT
160	PD028	FQPCLMFASSCFTSK
161	PD029	WNCHPAGVGPVFCEV
162	PD030	ALCSMYLASSGLCNK
163	PD031	NYLSCQFFQNCYETY
164	PD032	GWCLFSDMWLGLCSA
165	PD033	EFCARDWLPHYQCSSF
166	PD034	TSYCSIEHYPCNTHH
167	PD035	PYICSSFPLDCQAGQ
168	PD036	VGCEWYMSSSGMCSR
169	PD037	EVCGGCSMQSVSCWP
170	PD038	FTECQLSPKAICMSN
171	PD039	KYCLFSEYVEGTCLN
172	PD040	SGCPMYAWGWDECWR

173	PD041	VDCPWYASSSAICSR
174	PD042	DMLLCQIRGSCAAWG
175	PD043	ECHPYQASASLWCGY
176	PD044	MMMGCMWSAWCPPSR
177	PD045	NAYFRCSLMCNMIMF
178	PD046	ACCKESVHSVHDCKR
179	PD047	ACIGINSYMSNYCYL
180	PD048	ANCSFLELTNKFCTI
181	PD049	AYCSYLMFASNPCI
182	PD050	CFTSKCPCLCYSLLA
183	PD051	CLCRDINCWLGCST
184	PD052	CWCDIYCSPYQCSSF
185	PD053	DCIYYYQQSANLCSY
186	PD054	DCTGVNYYIDKHCTN
187	PD055	DECHGYLRSSGLCGG
188	PD056	DICSAYAASSGFCYY
189	PD057	DIICVLTPTAWCGRT
190	PD058	DNCCMYCSWWIACRD
191	PD059	DSCQWYMLSADLCGT
192	PD060	DSVCFSSSSFLCHKS
193	PD061	DTMCAIWWTVCSGGR
194	PD062	ECTYQTSSFHEACMS
195	PD063	EGCNLYERSSYGNN
196	PD064	EGCTAFAMSAGICGG
197	PD065	EQSCSLTPIAFCWSE
198	PD066	EWCNAYISSSKLCST
199	PD067	FEVCYMFASACRNGM
200	PD068	FSCSWYAESSLCDI
201	PD069	FVCQMFEASSGLCGG
202	PD070	FYCPCCMFASSCGSR
203	PD071	FYCSYLPGASHQCSH
204	PD072	FYCSYLYMCEVCCYE
205	PD073	GFCTQHTVLTWCPTS
206	PD074	GSCPSYAVSAGLCYA

207	PD075	GSQCFLTPTAFCTHT
208	PD076	GTCHPYMQSSKICNN
209	PD077	GVECFVFTGGCGGYG
210	PD078	HELKNGHWVPCWAY
211	PD079	ICDSYYAVSSGLCLL
212	PD080	IGCAWYVSSAGWCSP
213	PD081	INLCWMFASECGEHH
214	PD082	KCWLAEMTNLEHCNM
215	PD083	KHCSDFAYSRLCDR
216	PD084	KVCSSYASSSGLCGW
217	PD085	LDSCYMFASYCVQAV
218	PD086	LLACHPIFVTVCQTR
219	PD087	LLSCPYNPEHVCHTS
220	PD088	LMCSLYALSSNLCGR
221	PD089	LMWCVLFLWSWCCRI
222	PD090	LPICHLTPTAVCTHI
223	PD091	LSNMCLAFGSCLYAW
224	PD092	LSRCHPIWYTICQNP
225	PD093	LTQCMSVHKECGGYE
226	PD094	LVNCRIWSWVCEEAT
227	PD095	LYCSWYQMSSAVCKE
228	PD096	MECGWYALSARFCEV
229	PD097	MTCSPYAMSAHFCNE
230	PD098	MVCSLYAYSASLCGA
231	PD099	NALCWSTFSWWCDMD
232	PD-100	NFTCMLTPKAYCVQT
233	PD-101	NGACIFTLWCTNKT
234	PD-102	NGCELYAAASGLCRT
235	PD-103	NIECSVFGRCDDNY
236	PD-104	PACRPMFWNRSCDNI
237	PD-105	PCRVSNMFFPYNCLD
238	PD-106	PIMCMLLPESYCWIW
239	PD-107	PQSCYMFASLCMPNG
240	PD-108	PRCPQGLPLYQCSSF

241	PD-109	PSVECLVFKRCYALP
242	PD-110	PVCQRSATIYN CNWF
243	PD-111	QCAAYYISSFGGCSN
244	PD-112	QFGCFMLARDFCGTY
245	PD-113	QMMCPYNPEHKCHQK
246	PD-114	QRECWMFASSCNSKN
247	PD-115	QSNMCTTYICSSFNY
248	PD-116	QSRCHSLAPYLCSSF
249	PD-117	RAYCSLLFADSCNNN
250	PD-118	RCIGINQYIDSNCYN
251	PD-119	RLSCFMFASQCALEF
252	PD-120	RQCIILMNHRQCFFK
253	PD-121	RSCTPYMMSSSLCNT
254	PD-122	RYCHYWKMPYECSSF
255	PD-123	SCVSLSWFDMLKCYE
256	PD-124	SDNCEIWWTVCSAAM
257	PD-125	SFCWSYLVSSGLCGV
258	PD-126	SMCMNNYGTTIMCGN
259	PD-127	SMVGCGWSTFCPSRG
260	PD-128	SSLHCANGHTCPFCL
261	PD-129	SVCSYYEESSGICSP
262	PD-130	SWCGWYAASSGVCAL
263	PD-131	TCISQTIDSYLN CVN
264	PD-132	TFCNLYTKSSNICMS
265	PD-133	TYCVFHEYLDNTCNN
266	PD-134	VATGCPNLMLCGSWP
267	PD-135	VEYCSLLLGNRCDYW
268	PD-136	VGCNMYLMSAGLCVD
269	PD-137	VLYCSWDSGTCVGSB
270	PD-138	VMFSCYYLET CAPGV
271	PD-139	VRIGLCPESCLVSGF
272	PD-140	VTCTYYATSSSLCNT
273	PD-141	VTGCILLPKAWCWGD
274	PD-142	VWCSIY EYSSNLCSR

275	PD-143	WMLECQYNNTCNNMT
276	PD-144	WPCSPLEYNNICNV
277	PD-145	WTYDCHLNQTCPTY
278	PD-146	YCSINMYLIGGNCMY
279	PD-147	YFCSLYANSAGFCGG
280	PD-148	YVSCYMFSSSCPSTW
281	LC CX-188	<p>QGQSGQGTSYCSIEHYPCNTHHGG  GSSGGSISSGLLSGRSDNPGGSDI  QLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASE  SVDAYGISFMNWFQQKPGKAPKL  LIYAASNQSGVPSRFSGSGSGTDF  TLTISSMQPEDFATYYCQQSKDVP  WTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP  SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA  KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD  SKDSTYSLSSTLTLKADYEKHKV  YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
282	HC CX-188	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA  SGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEW  VAYISNSGGNAHYADSVKGRFTIS  RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY  YCTREDYGTSPFVYWGQGLVTV  SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA  ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL  TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT  VPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKV  DKRVEISKYGPCCPCPEFLGGPS  VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV  DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN  AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH  QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE  KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE  MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE</p>

		WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLG
283	CDRL1-PDL1 VL	RASQSISSYLN
284	CDRL2	AASSLQS
285	CDRL3	DNGYPST
286	CDRH1	SYAMS
287	CDRH2	SSIWRNGIVTVYADS
288	CDRH3	WSAAFDY
289	MM-PDL1	YCEVSELFVLPWCMG
290	MM	SCLMHPHYAHDYCYV
291	MM	LCEVLMLLQHPWCMG
292	MM	IACRHFMEQLPFCHH
293	MM	FGPRCGEASTCVPYE
294	MM	ILYCDSWGAGCLTRP
295	MM	GIALCPSHFCQLPQT
296	MM	DGPRCFVSGECSPIG
297	MM	LCYKLDYDDRSYCHI
298	MM	PCHPHPYDARPYCNV
299	MM	PCYWHPFFAYRYCNT
300	MM	VCYYMDWLGRNWCSS
301	MM	LCDLFKLREFPYCMG
302	MM	YLPCHFVPIGACNNK
303	MM	IFCHMGVVVPQCANY
304	MM	ACHPHPYDARPYCNV
305	MM	PCHPAPYDARPYCNV
306	MM	PCHPHAYDARPYCNV
307	MM	PCHPHPADARPYCNV
308	MM	PCHPHPYAARPYCNV
309	MM	PCHPHPYDAAPYCNV
310	MM	PCHPHPYDARPACNV
311	MM	PCHPHPYDARPYCAV
312	MM	PCHAHPYDARPYCNV

313	MM	PCHPHYDARAYCNV
314	Легкая цепь CX-072	<p>           QGQSGSGIALCPSHFCQLPQTGGG            SSGGSGGSGGISSGLLSGRSDNHG            GSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC            RASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL            IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT            LTISSLQPEDFATYYCQQDNGYPST            FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD            EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV            QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK            DSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYA            CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC         </p>
315	Тяжелая цепь CX-072 (+IgG4 S228P)	<p>           EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA            SGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW            VSSIWRNGIVTVYADSVKGRFTISR            DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY            CAKWSAAFQYWGQGTLVTVSSAS            TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC            LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV            HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS            LGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRV            ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLF            PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS            QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT            KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD            WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI            SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK            NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN            GPENNYKTPPVLDSDGSFFFLYS            RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA            LHNHYTQKSLSLGLG         </p>

АСПЕКТЫ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ



Далее следуют неограничивающие аспекты настоящего изобретения, описанными в данном документе:

1. Способ получения очищенной композиции интактного активируемого антитела, включающий:

(a) загрузку водного исходного материала, содержащего воду, интактное активируемое антитело, вырезанное включение и первую соль, на хроматографическую колонку,

при этом хроматографическая колонка содержит неподвижную фазу, которая содержит матрицу подложки и связанные с ней лиганды,

при этом лиганды содержат гидрофобный заместитель, и

при этом интактное активируемое антитело содержит (i) по меньшей мере первый антигенсвязывающий домен (AB), который имеет специфическую аффинность связывания к первой биологической мишени, и (ii) первый продомен,

при этом по меньшей мере первый AB содержит первый переменный домен легкой цепи антитела (VL) и первый переменный домен тяжелой цепи антитела (VH),

при этом первый продомен содержит первый маскирующий фрагмент (MM) и первый расщепляемый фрагмент (CM), и

при этом первый AB соединен с первым продоменом; и

(b) элюирование хроматографической колонки элюентом, содержащим воду и вторую соль, с получением элюата, который содержит очищенную композицию, содержащую интактное активируемое антитело,

при этом элюат по сути деплетирован по вырезанному включению.

2. Способ по аспекту 1, отличающийся тем, что указанную стадию элюирования (b) проводят в изократических условиях.

3. Способ по любому из аспектов 1-2, отличающийся тем, что после указанной стадии (b) способ дополнительно включает стадию очистки колонки, которая включает промывку хроматографической колонки очищающим средством, и при этом процесс не включает стадию элюирования связанного вырезанного включения перед стадией очистки.

4. Способ по любому из аспектов 1-3, отличающийся тем, что каждая из указанной первой соли и второй соли независимо содержит анион, выбранный из группы, состоящей из  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , цитрат-иона, анион аминокислоты,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  и  $\text{SCN}^-$ .

5. Способ по любому из аспектов 1-4, отличающийся тем, что каждая из

указанной первой и второй солей независимо содержит катион, выбранный из группы, состоящей из  $N(CH_3)_4^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Rb^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$ ,  $Ca^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ , и катиона аминокислоты.

6. Способ по любому из аспектов 1-5, отличающийся тем, что указанные лиганды содержат один или несколько гидрофобных заместителей, выбранных из группы, состоящей из алкильного заместителя с прямой цепью, алкильного заместителя с разветвленной цепью и арильного заместителя.

7. Способ по любому из аспектов 1-6, отличающийся тем, что указанные лиганды содержат  $C_4 - C_{10}$  алкильный заместитель.

8. Способ по любому из аспектов 1-7, отличающийся тем, что указанные лиганды содержат разветвленный алкильный заместитель.

9. Способ по любому из аспектов 1-8, отличающийся тем, что указанные лиганды содержат арильный заместитель.

10. Способ по аспекту 9, отличающийся тем, что указанный арильный заместитель представляет собой фенил.

11. Способ по любому из аспектов 1-10, отличающийся тем, что указанная неподвижная фаза представляет собой неподвижную фазу хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC).

12. Способ по аспекту 11, отличающийся тем, что каждая из первой соли и второй соли независимо содержит анион, выбранный из группы, состоящей из

$PO_4^{3-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $OH^-$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $F^-$ ,  $CH_3COO^-$ , цитрат-иона, аниона аминокислоты и  $Cl^-$ .

13. Способ по любому из аспектов 11-12, отличающийся тем, что каждая из указанной первой соли и второй соли независимо содержит анион, выбранный из группы, состоящей из  $PO_4^{3-}$ ,  $SO_4^{2-}$  и  $HPO_4^{2-}$ .

14. Способ по любому из аспектов 11-13, отличающийся тем, что каждая из указанной первой и второй соли независимо содержит катион, выбранный из группы, состоящей из  $N(CH_3)_4^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Rb^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$ ,  $Ca^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ , и катиона аминокислоты.

15. Способ по любому из аспектов 11-14, отличающийся тем, что каждая из указанной первой и второй соли независимо содержит катион, выбранный из группы, состоящей из  $NH_4^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$  и  $Mg^{2+}$ .

16. Способ по любому из аспектов 11-15, отличающийся тем, что каждая из указанной первой и второй соли независимо содержит катион, выбранный из группы, состоящей из  $NH_4^+$ ,  $K^+$  и  $Na^+$ .

17. Способ по любому из аспектов 11-16, отличающийся тем, что каждая из

первой и второй соли независимо содержит катион, выбранный из группы, состоящей из  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$ , и анион, выбранный из группы, состоящей из  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , цитрат-ион,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ , и  $\text{SCN}^-$ .

18. Способ по любому из аспектов 11-17, отличающийся тем, что каждая из первой и второй соли независимо выбрана из группы, состоящей из  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$  и  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ .

19. Способ по любому из аспектов 11-18, отличающийся тем, что каждая из указанной первой и второй соли независимо выбрана из группы, состоящей из  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  и  $\text{K}_3\text{PO}_4$ .

20. Способ по любому из аспектов 11-19, отличающийся тем, что каждая из указанной первой и второй соли независимо выбрана из группы, состоящей из  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

21. Способ по любому из аспектов 11-20, отличающийся тем, что указанная первая соль и вторая соль представляют собой одну и ту же соль.

22. Способ по любому из аспектов 11-20, отличающийся тем, что указанная первая соль и вторая соль представляют собой разные соли.

23. Способ по любому из аспектов 11-22, отличающийся тем, что указанный водный исходный материал и элюент имеют первую концентрацию соли и вторую концентрацию соли соответственно, и при этом первая концентрация соли является более высокой, чем вторая концентрация соли.

24. Способ по любому из аспектов 1-10, отличающийся тем, что указанная неподвижная фаза представляет собой стационарную фазу мультимодальной хроматографии (ММС), при этом лиганды дополнительно содержат по меньшей мере один дополнительный заместитель, облегчающий разделение на основе взаимодействия, отличного от гидрофобности.

25. Способ по аспекту 24, отличающийся тем, что по меньшей мере один указанный дополнительный заместитель облегчает разделение на основе взаимодействия, выбранного из группы, состоящей из электростатического взаимодействия, образования водородных связей и тиофильности.

26. Способ по любому из аспектов 24-25, отличающийся тем, что по меньшей мере один указанный дополнительный заместитель выбран из группы, состоящей из сульфидного заместителя, карбоксильного заместителя и аминного заместителя.

27. Способ по любому из аспектов 24-26, отличающийся тем, что по меньшей мере один указанный дополнительный заместитель содержит карбоксильный

заместитель.

28. Способ по любому из аспектов 24-27, отличающийся тем, что по меньшей мере один указанный дополнительный заместитель содержит аминовый заместитель.

29. Способ по любому из аспектов 24-28, отличающийся тем, что по меньшей мере один указанный дополнительный заместитель содержит сульфидный заместитель.

30. Способ по любому из аспектов 24-29, отличающийся тем, что каждая из указанной первой соли и второй соли независимо содержит анион, выбранный из группы, состоящей из  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , аниона аминокислоты,  $\text{ClO}_4^-$  и  $\text{SCN}^-$ .

31. Способ по любому из аспектов 24-30, отличающийся тем, что каждая из указанной первой и второй соли независимо содержит катион, выбранный из группы, состоящей из  $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ba}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  и катион аминокислоты.

32. Способ по любому из аспектов 24-31, отличающийся тем, что по меньшей мере одна из указанной первой и второй солей представляет собой катион аминокислоты.

33. Способ по аспекту 32, отличающийся тем, что указанный катион аминокислоты представляет собой катион аргинина.

34. Способ по любому из аспектов 24-33, отличающийся тем, что указанная первая соль и вторая соль являются одинаковыми.

35. Способ по любому из аспектов 24-33, отличающийся тем, что указанная первая соль и вторая соль являются разными.

36. Способ по любому из аспектов 24-31, отличающийся тем, что указанная первая соль содержит катион  $\text{Na}^+$ , а вторая соль содержит как катион  $\text{Na}^+$ , так и катион аргинина.

37. Способ по любому из аспектов 24-36, отличающийся тем, что указанный водный исходный материал и элюат имеют первую концентрацию соли и вторую концентрацию соли соответственно, и при этом вторая концентрация соли является более высокой, чем первая концентрация соли.

38. Способ по аспекту 37, отличающийся тем, что указанная концентрация второй соли по меньшей мере в 2 раза превышает концентрацию первой соли.

39. Способ по аспекту 37, отличающийся тем, что указанная концентрация второй соли по меньшей мере в 3 раза превышает концентрацию первой соли.

40. Способ по аспекту 36 или аспекту 37, отличающийся тем, что указанная концентрация катиона  $\text{Na}^+$  во второй соли такая же, как концентрация катиона  $\text{Na}^+$  в

первой соли, и при этом вторая соль дополнительно содержит катион аргинина, отсутствующий в первой соли.

41. Способ по любому из аспектов 11-20, отличающийся тем, что указанная первая и вторая соли являются одинаковыми и выбраны из группы, состоящей из  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

42. Способ по аспекту 23 или аспекту 41, отличающийся тем, что указанная первая концентрация соли по меньшей мере в 2 раза превышает концентрацию второй соли.

43. Способ по аспекту 23 или аспекту 41, отличающийся тем, что указанная первая концентрация соли по меньшей мере в 3 раза превышает концентрацию второй соли.

44. Способ по любому из аспектов 1-43, отличающийся тем, что указанный водный материал имеет рН в диапазоне от приблизительно 5,0 до приблизительно 8,0, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,5, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,0, или от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,5.

45. Способ по любому из аспектов 1-44, отличающийся тем, что указанный рН водного исходного материала выше, чем рН элюента.

46. Способ по любому из аспектов 1-44, отличающийся тем, что указанный рН водного исходного материала ниже, чем рН элюента.

47. Способ по любому из аспектов 1-44, отличающийся тем, что указанный рН водного исходного материала является таким же, как рН элюента.

48. Способ по аспекту 47, отличающийся тем, что указанный рН водного исходного материала и рН элюента составляют от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,5.

49. Способ по аспекту 47, отличающийся тем, что указанный рН водного исходного материала и рН элюента составляют от приблизительно 5,8 до приблизительно 6,2.

50. Способ по аспекту 11, отличающийся тем, что указанные первая и вторая соли отдельно выбраны из группы, состоящей из  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , и при этом рН исходного водного материала и рН элюента составляют от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,5.

51. Способ по аспекту 50, отличающийся тем, что указанная концентрация первой соли составляет от приблизительно 1,0 до 2,0 М, а концентрация второй соли составляет от приблизительно 0,2 до приблизительно 0,6 М.

52. Способ по аспекту 50, отличающийся тем, что указанная концентрация первой соли по меньшей мере в два выше, по меньшей мере в три раза выше, по меньшей мере в четыре раза выше или по меньшей мере в пять раз выше, чем концентрация второй соли.

53. Способ по аспекту 24, отличающийся тем, что указанная первая соль представляет собой NaCl, а вторая соль представляет собой NaCl и аргинин HCl, и при pH исходного водного материала и pH элюента составляют от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,5.

54. Способ по аспекту 53, отличающийся тем, что указанная концентрация первой соли составляет приблизительно 30 mM NaCl, а концентрация второй соли составляет приблизительно 30 mM NaCl и приблизительно 90 mM аргинина HCl.

55. Способ по аспекту 53, отличающийся тем, что указанная концентрация второй соли по меньшей мере в два выше, по меньшей мере в три раза выше, по меньшей мере в четыре раза выше или по меньшей мере в пять раз выше, чем концентрация первой соли.

56. Способ по любому из аспектов 1-55, отличающийся тем, что указанные стадии (a) и (b) проводят при температуре в диапазоне от приблизительно 3 °C до приблизительно 40 °C или в диапазоне от приблизительно 10 °C до приблизительно 30 °C, или в диапазоне от приблизительно 15 °C до приблизительно 30 °C, или в диапазоне приблизительно 22 °C +/- 4 °C.

57. Способ по аспекту 56, отличающийся тем, что указанные стадии (a) и (b) осуществляют при температуре 22 °C +/- 4 °C.

58. Способ по любому из аспектов 1-57, отличающийся тем, что в результате общий выход белка составляет по меньшей мере приблизительно 70%, или по меньшей мере приблизительно 71%, или по меньшей мере приблизительно 72%, или по меньшей мере приблизительно 73%, или по меньшей мере приблизительно 74%, или по меньшей мере приблизительно 75%, или по меньшей мере приблизительно 76%, или по меньшей мере приблизительно 77%, или по меньшей мере приблизительно 78%, или по меньшей мере приблизительно 79%, или по меньшей мере приблизительно 80%, или по меньшей мере приблизительно 81%, или по меньшей мере приблизительно 82%, или по меньшей мере приблизительно 83%, или по меньшей мере приблизительно 84%, или по меньшей мере приблизительно 85%, или по меньшей мере приблизительно 86%, или по меньшей мере приблизительно 87%, или по меньшей мере приблизительно 88%, или по меньшей мере приблизительно 89%, или по меньшей мере приблизительно 90%, или по меньшей мере приблизительно 91%, или по меньшей мере приблизительно 92%, или по

меньшей мере приблизительно 93%, или по меньшей мере приблизительно 94%, или по меньшей мере приблизительно 95%, как определено по поглощению при длине волны 280 нм.

59. Способ по любому из аспектов 1-58, отличающийся тем, что указанное соотношение количества вырезанного включения в водном исходном материале к количеству вырезанного включения в элюате в процентах от вырезанного включения составляет по меньшей мере приблизительно 2, или по меньшей мере приблизительно 3, или по меньшей мере приблизительно 4, или по меньшей мере приблизительно 5, или по меньшей мере приблизительно 6, или по меньшей мере приблизительно 7, или по меньшей мере приблизительно 8, или по меньшей мере приблизительно 9, или по меньшей мере приблизительно 10, или по меньшей мере приблизительно 15, или по меньшей мере приблизительно 20, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

60. Способ по любому из аспектов 1-59, отличающийся тем, что указанный элюат содержит менее чем приблизительно 15%, или менее чем приблизительно 14%, или менее чем приблизительно 13%, или менее чем приблизительно 12%, или менее чем приблизительно 11% или менее чем приблизительно 10%, или менее чем приблизительно 9%, или менее чем приблизительно 8%, или менее чем приблизительно 7%, или менее чем приблизительно 6% от относительного количества присутствующего вырезанного включения в водном исходном материале, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

61. Способ по аспекту 60, отличающийся тем, что указанный элюат содержит менее чем приблизительно 5%, или менее чем приблизительно 4%, или менее чем приблизительно 3%, или менее чем приблизительно 2% или менее чем приблизительно 1%, или менее чем приблизительно 0,9%, или менее чем приблизительно 0,8%, или менее чем приблизительно 0,7%, или менее чем приблизительно 0,6%, или менее чем приблизительно 0,5% от вырезанного включения, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

62. Способ по аспекту 61, отличающийся тем, что указанный элюат содержит менее чем приблизительно 2% или менее чем приблизительно 1%, или менее чем приблизительно 0,9%, или менее чем приблизительно 0,8%, или менее чем приблизительно 0,7%, или менее чем приблизительно 0,6%, или менее чем приблизительно 0,5% от вырезанного включения, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

63. Способ по любому из аспектов 1-62, отличающийся тем, что указанный

элюат содержит относительное количество вырезанного включения в диапазоне от приблизительно 0,1% до приблизительно 15% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 10% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 10% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 5% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 4% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 3% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 2% вырезанного включения или от приблизительно 0,1% до приблизительно 1% вырезанного включения, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

64. Способ по любому из аспектов 1-62, отличающийся тем, что указанный элюат не содержит поддающегося обнаружению вырезанного включения, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

65. Способ по любому из аспектов 1-64, отличающийся тем, что указанный водный исходный материал и элюат, каждый независимо, содержат буфер, выбранный из группы, состоящей из MES, MOPS или HEPES.

66. Способ по любому из аспектов 59-64, отличающийся тем, что первый АВ содержит легкую цепь антитела и тяжелую цепь антитела, и при этом первый продомен связан с легкой цепью антитела первого АВ посредством пептидной связи, и при этом относительное количество вырезанного включения определяют на основе усеченного варианта легкой цепи и легкой цепи интактного активируемого антитела, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

67. Способ по любому из аспектов 1-64, отличающийся тем, что первый продомен соединен с первым АВ посредством пептидной связи.

68. Способ по любому из аспектов 1-67, отличающийся тем, что исходный водный материал дополнительно содержит примесь, выбранную из группы, состоящей из белка клетки-хозяина (HCP) и высокомолекулярных частиц (HMWS).

69. Способ по аспекту 68, отличающийся тем, что исходный водный материал дополнительно содержит HCP.

70. Способ по аспекту 69, отличающийся тем, что соотношение количества HCP в исходном водном материале к количеству HCP в элюате в ppm составляет по меньшей мере приблизительно 2, или по меньшей мере приблизительно 3, или по меньшей мере приблизительно 4, или по меньшей мере приблизительно 5, или по меньшей мере приблизительно 6, или по меньшей мере приблизительно 7, или по меньшей мере приблизительно 8, или по меньшей мере приблизительно 9, или по



меньшей мере приблизительно 10, как определено с помощью соответствующего анализа на основе ELISA НСР.

71. Способ по любому из аспектов 69-70, отличающийся тем, что элюат содержит менее чем приблизительно 150 ppm, или менее чем приблизительно 140 ppm, или менее чем приблизительно 130 ppm, или менее чем приблизительно 120 ppm, или менее чем приблизительно 110 ppm, или менее чем приблизительно 100 ppm, или менее чем приблизительно 90 ppm, или менее чем приблизительно 80 ppm, или менее чем приблизительно 70 ppm, или менее чем приблизительно 60 ppm, или менее чем приблизительно 50 ppm, или менее чем приблизительно 45 ppm, или менее чем приблизительно 40 ppm, или менее чем приблизительно 35 ppm, или менее чем приблизительно 30 ppm, или менее чем приблизительно 25 ppm, или менее чем приблизительно 20 ppm, или менее чем приблизительно 15 ppm, или менее чем приблизительно 10 ppm, или менее чем приблизительно 5 ppm НСР или менее чем приблизительно 1 ppm НСР, как измерено с помощью соответствующего ELISA НСР.

72. Способ по любому из аспектов 69-70, отличающийся тем, что элюат содержит количество НСР в диапазоне от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 150 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 140 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 130 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 120 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 110 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 100 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 90 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 80 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm до приблизительно 70 ppm НСР, от приблизительно 0,5 ppm до приблизительно 60 ppm НСР, от приблизительно 0,5 ppm НСР приблизительно 50 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 45 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 40 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 35 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 30 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 25 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 20 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 15 ppm НСР, или от приблизительно 0,5 ppm НСР до приблизительно 10 ppm НСР.

73. Способ по любому из аспектов 69-70, отличающийся тем, что элюат не содержит обнаруживаемых НСР, что определяется с помощью соответствующего

анализа на основе ELISA НСР.

74. Способ по любому из аспектов 1-73, отличающийся тем, что исходный водный материал дополнительно содержит HMWS.

75. Способ по аспекту 74, отличающийся тем, что соотношение количества HMWS в водном исходном материале к количеству HMWS в элюате в процентах от площади пика составляет по меньшей мере приблизительно 2, или по меньшей мере приблизительно 3, или по меньшей мере приблизительно 4, или по меньшей мере приблизительно 5, что определяется с помощью эксклюзионной (SE)-HPLC.

76. Способ по любому из аспектов 74-75, отличающийся тем, что элюат содержит менее чем приблизительно 5% HMWS, или менее чем приблизительно 4% HMWS, или менее чем приблизительно 3% HMWS, или менее чем приблизительно 2% HMWS, или менее чем приблизительно 1% HMWS, что определяется с помощью SE-HPLC.

77. Способ по любому из аспектов 74-75, отличающийся тем, что элюат содержит количество HMWS в диапазоне от приблизительно 0,2% HMWS до приблизительно 5% HMWS, или от приблизительно 0,2% HMWS до приблизительно 4% HMWS, или от приблизительно 0,2% HMWS до приблизительно 3% HMWS, или от приблизительно 0,2% HMWS до приблизительно 2% HMWS, или от приблизительно 0,2% HMWS до приблизительно 1% HMWS, что определяется с помощью SE-HPLC.

78. Способ по любому из аспектов 74-75, отличающийся тем, что элюат не содержит обнаруживаемых HMWS, что определяется с помощью SE-HPLC.

79. Способ по любому из аспектов 1-78, отличающийся тем, что элюат содержит по меньшей мере приблизительно 90% интактного активируемого антитела, или по меньшей мере приблизительно 91%, или по меньшей мере приблизительно 92%, или по меньшей мере приблизительно 93%, или по меньшей мере приблизительно 94%, или по меньшей мере приблизительно 95% интактного активируемого антитела, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

80. Способ по аспекту 79, отличающийся тем, что первый АВ содержит легкую цепь антитела и тяжелую цепь антитела, и при этом первый продомен связан с легкой цепью антитела первого АВ посредством пептидной связи, и при этом определяют процент интактного активируемого антитела на основе легкой цепи интактного активируемого антитела и варианта с вырезанными фрагментами легкой цепи, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

81. Способ по любому из аспектов 1-80, отличающийся тем, что перед

стадией (а) способ дополнительно включает:

(a<sup>0</sup>) подвергание композиции биосбора, содержащей интактно активируемое антитело и вырезное включение, одной или нескольким промежуточным единичным операциям, выбранным из группы, состоящей из стадии центрифугирования, стадии фильтрации, стадии аффинной хроматографии, стадии инактивации вируса, стадии эксклюзионной хроматографии, стадии фильтрации вирусов, стадии ионообменной хроматографии и комбинации любых двух или более из них с получением одной или нескольких композиций нерасфасованного промежуточного продукта, где водный исходный материал содержит по меньшей мере одну композицию нерасфасованного промежуточного продукта.

82. Способ по любому из аспектов 1-81, отличающийся тем, что элюат подвергают одной или нескольким расположенными ниже последовательным единичным операциям с получением расположенной ниже композиции продукта.

83. Способ по аспекту 82, отличающийся тем, что одна или несколько расположенных ниже операций выбраны из группы, состоящей из процесса дополнительной очистки, процесса химического синтеза, процесса разбавления, процесса замены растворителя, процесса составления, процесса лиофилизации и любой комбинации двух или более из них.

84. Способ по аспекту 82 или аспекту 83, отличающийся тем, что одна или несколько расположенных ниже единичных операций включают дополнительный процесс очистки, выбранный из группы, состоящей из стадии центрифугирования, стадии фильтрации, стадии аффинной хроматографии, стадии инактивации вируса, стадии эксклюзионной хроматографии, стадию вирусной фильтрации, стадии ионообменной хроматографии и любой комбинацию двух или более из них.

85. Способ по любому из аспектов 82-84, отличающийся тем, что одна или несколько расположенных ниже единичных операций включают процесс лиофилизации.

86. Способ по любому из аспектов 82-85, отличающийся тем, что одна или несколько расположенных ниже единичных операций включают процесс химического синтеза.

87. Способ по аспекту 86, отличающийся тем, что процесс химического синтеза представляет собой реакцию химического сопряжения.

88. Способ по любому из аспектов 1-87, отличающийся тем, что исходный водный материал содержит более чем приблизительно 0,5% отщепленных примесей, или более чем приблизительно 0,6%, или более чем приблизительно 0,7%, или более

чем приблизительно 0,8%, или более чем приблизительно 0,9% или более чем приблизительно 1%, или более чем приблизительно 1,5%, или более чем приблизительно 2%, или более чем приблизительно 2,5%, или более чем приблизительно 3%, или более чем приблизительно 3,5%, или более чем приблизительно 4%, или более чем приблизительно 4,5% вырезанного включения, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

89. Способ по любому из аспектов 1-88, отличающийся тем, что интактное активируемое антитело содержит второй АВ и второй продомен, и при этом вырезанное включение содержит включение с одним вырезанным фрагментом, как определено с помощью масс-спектрометрии.

90. Способ по аспекту 89, отличающийся тем, что второй АВ является таким же, как и первый АВ, и при этом второй продомен является таким же, как и первый продомен.

91. Способ по аспекту 89 или аспекту 90, отличающийся тем, что вырезанное включение состоит по сути из включения с одним вырезанными фрагментом, как определено с помощью масс-спектрометрии.

92. Способ по аспекту 89 или аспекту 90, отличающийся тем, что вырезанное включение состоит из включения с одним вырезанными фрагментом, как определено с помощью масс-спектрометрии.

93. Очищенная композиция интактного активируемого антитела, полученная с помощью способа по любому из аспектов 1-92.

94. Очищенная композиция продукта, содержащая композицию расположенную ниже продукта по любому из аспектов 82-87.

95. Способ по любому из аспектов 1-92, отличающийся тем, что элюат содержит по меньшей мере приблизительно 90% интактного активируемого антитела, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE, менее чем приблизительно 15% вырезанного включения, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE, менее чем приблизительно 5% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC, и менее чем приблизительно 150 ppm HCP, как определено с помощью соответствующего ELISA HCP.

96. Способ по аспекту 95, отличающийся тем, что элюат содержит менее чем приблизительно 5% вырезанного включения, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

97. Способ по аспекту 96, отличающийся тем, что элюат содержит менее чем приблизительно 3% вырезанного включения, как определено с помощью

восстанавливающего SDS-cGE.

98. Очищенная композиция интактного активируемого антитела, содержащая элюат, полученная с помощью способа по любому из аспектов 1-97.

99. Очищенная композиция интактного активируемого антитела, содержащая по меньшей мере приблизительно 90% интактного активируемого антитела, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE, менее чем приблизительно 15% вырезанного включения, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE, менее чем приблизительно 5% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC, и менее чем приблизительно 150 ppm HCP, как определено с помощью соответствующего ELISA HCP.

100. Очищенная композиция интактного активируемого антитела по аспекту 98 или аспекту 99, отличающаяся тем, что композиция содержит менее чем приблизительно 14% вырезанного включения, или менее чем приблизительно 13% вырезанного включения, или менее чем приблизительно 12% вырезанного включения, или менее чем приблизительно 11% вырезанного включения, или менее чем приблизительно 10% вырезанного включения, или менее чем приблизительно 9% вырезанного включения, или менее чем приблизительно 8% вырезанного включения, или менее чем приблизительно 7% вырезанного включения, или менее чем приблизительно 6% вырезанного включения, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

101. Очищенная композиция интактного активируемого антитела по любому из аспектов 98-100, отличающаяся тем, что композиция содержит менее чем приблизительно 5% вырезанного включения, или менее чем приблизительно 4% вырезанного включения, или менее чем приблизительно 3% вырезанного включения, или менее чем приблизительно 2% вырезанного включения, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

102. Очищенной композиция интактного активируемого антитела по любому из аспектов 98-101, отличающаяся тем, что композиция содержит менее чем приблизительно 1% вырезанного включения, менее чем приблизительно 0,9% вырезанного включения, менее чем приблизительно 0,8% вырезанного включения, или менее чем приблизительно 0,7% вырезанного включения, или менее чем приблизительно 0,6% вырезанного включения, или менее чем приблизительно 0,5% вырезанного включения, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

103. Очищенная композиция интактного активируемого антитела по аспекту 98 или аспекту 99, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит

относительное количество вырезанного включения в диапазоне от приблизительно 0,1% до приблизительно 15% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 10% вырезанного включения, или от приблизительно от 0,1% до приблизительно 10% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 5% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 4% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 3% вырезанного включения, или от приблизительно 0,1% до приблизительно 2% вырезанного включения или от приблизительно 0,1% до приблизительно 1% вырезанного включения, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

104. Очищенная композиция интактного активируемого антитела по аспекту 98 или аспекту 99, отличающаяся тем, что композиция не содержит поддающегося обнаружению вырезанного включения, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

105. Очищенная композиция интактного активируемого антитела по любому из аспектов 98-104, отличающаяся тем, что композиция содержит менее чем приблизительно 140 ppm НСР, или менее чем приблизительно 130 ppm НСР, или менее чем приблизительно 120 ppm НСР, или менее чем приблизительно 110 ppm НСР, или менее чем приблизительно 100 ppm НСР, или менее чем приблизительно 90 ppm НСР, или менее чем приблизительно 80 ppm НСР, или менее чем приблизительно 70 ppm НСР, или менее чем приблизительно 60 ppm НСР, или менее чем приблизительно 50 ppm НСР, или менее чем приблизительно 45 ppm НСР, или менее чем приблизительно 40 ppm НСР, или менее чем приблизительно 35 ppm НСР, или менее чем приблизительно 30 ppm НСР, или менее чем приблизительно 25 ppm НСР, или менее чем приблизительно 20 ppm НСР, или менее чем приблизительно 15 ppm НСР или менее чем приблизительно 10 ppm НСР, как определено с помощью соответствующего анализа на основе ELISA НСР.

106. Очищенная композиция интактного активируемого антитела по любому из аспектов 98-105, отличающаяся тем, что элюат содержит количество НСР в диапазоне от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 150 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 140 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 130 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 120 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 110 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 100 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 90 ppm НСР, или от приблизительно

1 ppm НСР до приблизительно 80 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm до приблизительно 70 ppm НСР, от приблизительно 1 ppm до приблизительно 60 ppm НСР, от приблизительно 1 ppm НСР приблизительно 50 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 45 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 40 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 35 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 30 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 25 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 20 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 15 ppm НСР, или от приблизительно 1 ppm НСР до приблизительно 10 ppm НСР.

107. Очищенная композиция интактного активируемого антитела по любому из аспектов 98-106, отличающаяся тем, что композиция содержит менее чем приблизительно 4% HMWS, или менее чем приблизительно 3% HMWS, или менее чем приблизительно 2% HMWS, или менее чем приблизительно 1% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC.

108. Очищенная композиция интактного активируемого антитела по аспекту 98 или аспекту 99, отличающаяся тем, что композиция содержит количество HMWS в диапазоне от приблизительно 0,2% HMWS до приблизительно 5% HMWS, или от приблизительно 0,2% HMWS до приблизительно 4% HMWS, или от приблизительно 0,2% HMWS до приблизительно 3% HMWS, или от приблизительно 0,2% HMWS до приблизительно 2% HMWS, или от приблизительно 0,2% HMWS до приблизительно 1% HMWS, что определяется с помощью SE-HPLC.

109. Очищенная композиция интактного активируемого антитела по любому из аспектов 98-108, отличающаяся тем, что композиция содержит по меньшей мере приблизительно 91%, или по меньшей мере приблизительно 92%, или по меньшей мере приблизительно 93%, или по меньшей мере приблизительно 94%, или по меньшей мере приблизительно 95% интактного активируемого антитела, как определено с помощью восстанавливающего SDS-cGE.

110. Очищенная композиция интактного активируемого антитела по любому из аспектов 98-109, отличающаяся тем, что композиция является лиофилизированной.

111. Фармацевтически приемлемая композиция, содержащая композицию по любому из аспектов 98-110 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

112. Способ по любому из аспектов 1-92 или 95-97, очищенная композиция интактного активируемого антитела по любому из аспектов 93 или 98-110, очищенная композиция продукта по аспекту 94 или фармацевтически приемлемая композиция по

аспекту 111, отличающиеся тем, что первый СМ в интактном активируемом антителе содержит субстрат для протеазы, которая сверхэкспрессируется в пораженной ткани по сравнению со здоровой тканью.

113. Способ по любому из аспектов 1-92, 95-97 или 112, очищенная композиция интактного активируемого антитела по любому из аспектов 93, 98-110, очищенная композиция продукта по любому из аспектов 94 или 112, или фармацевтически приемлемая композиция по любому из аспектов 110 или 111, отличающиеся тем, что интактное активируемое антитело дополнительно содержит (iii) второй АВ, который имеет специфическую аффинность связывания со второй биологической мишенью, и (iv) второй продомен,

при этом второй АВ содержит второй VL и второй VH,

при этом второй продомен содержит второй MM и второй CM, и

при этом второй АВ соединен со вторым продоменом.

114. Способ, очищенная композиция интактного активируемого антитела, очищенная композиция продукта или фармацевтически приемлемая композиция по аспекту 113,, где второй СМ содержит субстрат для протеазы, которая сверхэкспрессируется в пораженной ткани по сравнению со здоровой тканью.

115. Способ, очищенная композиция интактного активируемого антитела, очищенная композиция продукта или фармацевтически приемлемая композиция по любому из аспектов 113-114, где первый СМ и второй СМ содержат идентичные аминокислотные последовательности.

116. Способ, очищенная композиция интактного активируемого антитела, очищенная композиция продукта или фармацевтически приемлемая композиция по любому из аспектов 113-115, отличающиеся тем, что первый СМ и второй СМ содержат различные аминокислотные последовательности.

117. Способ, очищенная композиция интактного активируемого антитела, очищенная композиция продукта или фармацевтически приемлемая композиция по любому из аспектов 113-116, отличающиеся тем, что первая биологическая мишень и вторая биологическая мишень являются различными.

118. Способ, очищенная композиция интактного активируемого антитела, очищенная композиция продукта или фармацевтически приемлемая композиция по любому из аспектов 113-117, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна из первой биологической мишени и второй биологической мишени представляет собой T-клеточный корцептор.

119. Способ, очищенная композиция интактного активируемого антитела,



очищенная композиция продукта или фармацевтически приемлемая композиция по аспекту 118, отличающиеся тем, что Т-клеточный корецептор представляет собой Т-клеточный корецептор кластера дифференцировки 3 (CD3).

120. Способ, очищенная композиция интактного активируемого антитела, очищенная композиция продукта или фармацевтически приемлемая композиция по любому из аспектов 113-115, отличающиеся тем, что второй АВ идентичен первому АВ, и при этом второй продомен идентичен первому продомону.

121. Способ, очищенная композиция интактного активируемого антитела, очищенная композиция продукта или фармацевтически приемлемая композиция по аспекту 120, отличающиеся тем, что первая биологическая мишень и вторая биологическая мишень представляют собой CD166.

122. Способ, очищенная композиция интактного активируемого антитела, очищенная композиция продукта или фармацевтически приемлемая композиция по аспекту 120, отличающиеся тем, что первая биологическая мишень и вторая биологическая мишень представляют собой PD-1.

123. Способ, очищенная композиция интактного активируемого антитела, очищенная композиция продукта или фармацевтически приемлемая композиция по аспекту 120, отличающиеся тем, что первая биологическая мишень и вторая биологическая мишень представляют собой PDL-1.

Несмотря на то, что вышеизложенное изобретение было описано более подробно в целях ясности и понимания, специалисту в данной области техники из прочтения настоящего изобретения будет ясно, что могут быть выполнены различные изменения в форме и деталях, без отклонения от истинного объема настоящего изобретения. Следует понимать, что материалы, примеры и варианты осуществления, описанные в данном документе, предназначены только для иллюстративных целей и различные модификации или изменения в свете этого будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в сущность и объем прилагаемой формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая интактное активируемое антитело и его вариант с вырезанными фрагментами, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит по меньшей мере 95% интактного активируемого антитела и от 0,05 до 5% его варианта с вырезанными фрагментами, как определено с помощью SDS-cGE, при этом общее процентное содержание интактного активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами составляет 100%.
2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что вариант с вырезанными фрагментами содержит антигенсвязывающий домен (AB) и по меньшей мере часть расщепляемого фрагмента (CM).
3. Композиция по п. 1 или п. 2, дополнительно содержащая менее чем 150 ppm белков клетки-хозяина (HCP), как определено с помощью соответствующего ELISA HCP, и/или от 0,1 до 5% высокомолекулярных соединений (HMWS), как определено с помощью SE-HPLC.
4. Композиция по п. 1, дополнительно содержащая от приблизительно 0,5 ppm до 100 ppm белков клетки-хозяина (HCP), как определено с помощью соответствующего ELISA HCP, и от 0,1 до 3% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC.
5. Композиция по п. 1, содержащая по меньшей мере 97% интактного активируемого антитела, от 0,05 до 3% варианта с вырезанными фрагментами, как определено с помощью SDS-cGE, от приблизительно 0,5 ppm до 100 ppm белков клетки-хозяина (HCP), как определено с помощью соответствующего ELISA HCP, и от 0,1 до 3% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC, при этом общее процентное содержание интактного активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами составляет 100%.
6. Композиция по п. 1, содержащая по меньшей мере 97% интактного активируемого антитела, от 0,05 до 3% варианта с вырезанными фрагментами, как определено с помощью SDS-cGE, и от 0,1 до 3% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC, при этом общее процентное содержание интактного активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами составляет 100%.
7. Водная композиция, содержащая интактное активируемое антитело и его вариант с вырезанными фрагментами, а также анион, выбранный из  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\Gamma^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  и  $\text{SCN}^-$ , катион, выбранный из  $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ba}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cs}^+$ ,

Rb<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, или комбинация аниона и катиона.

8. Композиция по любому из пп. 1-7 или из их комбинации, содержащая 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES), MOPS, HEPES, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, KCl и CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, или их комбинацию.
9. Композиция по любому из пп. 1-9 или из их комбинации, содержащая от 10 мМ до 100 мМ аниона, катиона, сольвата, MES, MOPS, HEPES, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, KCl и CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, или их комбинацию.
10. Композиция по любому из пп. 1-7 или из их комбинации, содержащая аргинин, триптофан, аспарагин, глутамин, лизин, гистидин, серин, пролин или их соль.
11. Композиция по п. 10, содержащая от 10 мМ до 150 мМ аргинина, триптофана, аспарагина, глутамина, лизина, гистидина, серина, пролина или их соли.
12. Композиция по любому из пп. 1-11 или из их комбинации, отличающаяся тем, что указанная композиция представляет собой водную композицию, имеющую рН от приблизительно 5,0 до приблизительно 8,0, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,5, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,0, или от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,5.
13. Композиция по любому из пп. 1-12 или из их комбинации, отличающаяся тем, что указанная композиция представляет собой водную композицию, имеющую проводимость от 110 до 150 мСм/см, от 115 до 145 мСм/см, от 120 до 140 мСм/см, от 125 до 135 мСм/см или приблизительно 130 мСм/см.
14. Композиция по любому из пп. 1-7 или из их комбинации, отличающаяся тем, что указанная композиция не содержит буферных средств.
15. Композиция по любому из пп. 1-7 или из их комбинации, отличающаяся тем, что указанная композиция имеет рН за пределами буферной способности буферного средства, присутствующего в композиции.
16. Композиция по любому из пп. 1-13 или из их комбинации, содержащая буферное средство, имеющее рКа от 6,0 до 9,0.
17. Контейнер, флакон, шприц или устройство для инъекций, содержащие композицию по любому из пп. 1-16 или из их комбинации.
18. Водный исходный материал для хроматографической колонки НИС или ММС, содержащий воду, интактное активируемое антитело, по меньшей мере 2% варианта с вырезанными фрагментами интактного активируемого антитела, как определено с помощью SDS-cGE, по меньшей мере 10 ppm НСР, как определено с помощью соответствующего ELISA НСР, и по меньшей мере 1% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC.

19. Водный исходный материал для хроматографической колонки НИС или MMC по п. 18, содержащий по меньшей мере 90% интактного активируемого антитела, как определено с помощью SDS-cGE, по меньшей мере от 2 до 15% варианта с вырезанными фрагментами интактного активируемого антитела, как определено с помощью SDS-cGE, по меньшей мере 10 ppm НСР, как определено с помощью ELISA, и по меньшей мере от 1 до 6% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC.
20. Элюат НИС водного исходного материала по п. 18 или п. 19, содержащий по меньшей мере 95% интактного активируемого антитела, как определено с помощью SDS-cGE, менее чем 2% варианта с вырезанными фрагментами интактного активируемого антитела, как определено с помощью SDS-cGE, менее чем 5 ppm НСР, как определено с помощью ELISA, и менее чем 1% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC, при этом общее процентное содержание интактного активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами составляет 100%.
21. Элюат НИС по п. 20, содержащий по меньшей мере 97% интактного активируемого антитела, как определено с помощью SDS-cGE, менее чем 1% варианта с вырезанными фрагментами интактного активируемого антитела, как определено с помощью SDS-cGE, менее чем 2 ppm НСР, как определено с помощью ELISA, и менее чем 0,5% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC, при этом общее процентное содержание интактного активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами составляет 100%.
22. Элюат MMC водного исходного материала по п. 18 или п. 19, содержащий по меньшей мере 97% интактного активируемого антитела, как определено с помощью SDS-cGE, менее чем 1% варианта с вырезанными фрагментами интактного активируемого антитела, как определено с помощью SDS-cGE, менее чем 6 ppm НСР, как определено с помощью ELISA, и менее чем 1% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC, при этом общее процентное содержание интактного активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами составляет 100%.
23. Элюат MMC по п. 22, содержащий по меньшей мере 98% интактного активируемого антитела, как определено с помощью SDS-cGE, менее чем 0,5% варианта с вырезанными фрагментами интактного активируемого антитела, как определено с помощью SDS-cGE, менее чем 5 ppm НСР, как определено с помощью ELISA, и менее чем 0,5% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC,

при этом общее процентное содержание интактного активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами составляет 100%.

24. Элюат НИС по п. 20 или 21 или элюат ММС по п. 22 или п. 23, содержащий интактное активируемое антитело с выходом, составляющим по меньшей мере 75% интактного активируемого антитела, присутствующего в водном исходном материале по п. 18 или п. 19.
25. Элюат НИС по п. 20 или п. 21 или элюат ММС по п. 22 или п. 23, отличающийся тем, что указанный уровень снижения относительного количества варианта с вырезанными фрагментами в водном исходном материале по сравнению с относительным количеством варианта с вырезанными фрагментами в элюате составляет от двух до двадцати раз.
26. Элюат НИС по п. 20 или п. 21 или элюат ММС по п. 22 или п. 23, отличающийся тем, что указанный уровень снижения относительного количества варианта с вырезанными фрагментами в водном исходном материале по сравнению с относительным количеством варианта с вырезанными фрагментами в элюате составляет от двух до десяти раз.
27. Элюат НИС по п. 20 или п. 21 или элюат ММС по п. 22 или п. 23, отличающийся тем, что указанный уровень снижения относительного количества варианта с вырезанными фрагментами в водном исходном материале по сравнению с относительным количеством варианта с вырезанными фрагментами в элюате составляет от пяти до десяти раз.
28. Способ получения композиции, содержащей: (А) более чем 95% интактного активируемого антитела, содержащего MM, CM и AB; и (B) от 0,05 до 5% его варианта с вырезанными фрагментами, как определено с помощью SDS-cGE, при этом способ включает:
  - (i) загрузку водного исходного материала, содержащего воду, (A), (B) и первую соль, в хроматографическую колонку, при этом хроматографическая колонка содержит неподвижную фазу, которая содержит матрицу подложки и связанные с ней гидрофобные лиганды; и
  - (ii) элюирование хроматографической колонки элюентом, содержащим воду и вторую соль, с получением композиции.
29. Способ по п. 28, включающий снижение относительного количества варианта с вырезанными фрагментами в водном исходном материале на 75-90%.
30. Способ по п. 28, включающий снижение количества НСР в водном исходном материале на 75-90%.

31. Способ по п. 28, включающий снижение количества HMWS в водном исходном материале на 75-90%.
32. Способ по п. 28, включающий снижение количества активного варианта с вырезанными фрагментами, НСР и HMWS в водном исходном материале на 70-95%.
33. Способ по п. 28, отличающийся тем, что указанная композиция содержит по меньшей мере 95% интактного активируемого антитела и от 0,1 до 5% варианта с вырезанными фрагментами, как определено с помощью SDS-cGE, при этом общее процентное содержание интактного активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами составляет 100%.
34. Способ по любому из пп. 28-33 или из их комбинации, отличающийся тем, что указанный вариант с вырезанными фрагментами имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с интактным активируемым антителом.
35. Способ по любому из пп. 28-34 или из их комбинации, отличающийся тем, что указанный вариант с вырезанными фрагментами имеет молекулярную массу, которая составляет 85-98% от массы интактного активируемого антитела.
36. Способ по любому из пп. 28-33 или из их комбинации, отличающийся тем, что указанный вариант с вырезанными фрагментами отличается от интактного активируемого антитела только тем, что в нем отсутствует MM и часть CM.
37. Способ по любому из пп. 28-36 или их комбинации, отличающийся тем, что указанное активируемое антитело представляет собой гомодимер, который содержит два идентичных АВ, два идентичных CM и два идентичных MM, и при этом вариант с вырезанными фрагментами представляет собой вариант с одним вырезанным фрагментом.
38. Способ получения композиции, содержащей интактное активируемое антитело и менее чем 5% его варианта с вырезанными фрагментами, как определено с помощью SDS-cGE, менее чем 5% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC, и менее чем 100 ppm НСР, как определено с помощью соответствующего ELISA НСР, или их комбинацию, при этом способ, включает (i) загрузку водного исходного материала, содержащего воду, интактное активируемое антитело, его вариант с вырезанными фрагментами, HMWS, НСР и первую соль, на хроматографическую колонку, при этом хроматографическая колонка содержит неподвижную фазу, которая содержит матрицу подложки и связанные с ней гидрофобные лиганды, и (ii) элюирование хроматографической колонки элюентом, содержащим воду и вторую соль, с получением композиции.

39. Способ отделения интактного активируемого антитела от его варианта с вырезанными фрагментами, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности интактного активируемого антитела, включающий (i) загрузку водного исходного материала, содержащего воду, интактное активируемое антитело, его вариант с вырезанными фрагментами и первую соль на хроматографическую колонку, при этом хроматографическая колонка содержит неподвижную фазу, которая содержит матрицу подложки и связанные с ней гидрофобные лиганды, и (ii) элюирование хроматографической колонки элюентом, содержащим воду и вторую соль, с получением композиции, в которой относительное количество варианта с вырезанными фрагментами в водном исходном материале снижено на по меньшей мере 90%.
40. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по любому из пп. 1-16 или из их комбинации, или композицию, полученную с помощью процесса или способа по любому из пп. 28-39 или из их комбинации, и фармацевтически приемлемый носитель.
41. Способ получения фармацевтической композиции, включающий комбинирование композиции по любому из пп. 1-16 или из их комбинации, или композицию, полученную с помощью процесса или способа по любому из пп. 28-39 или из их комбинации, с фармацевтически приемлемым носителем.
42. Способ лечения субъекта, страдающего раком, воспалительным заболеванием, аутоиммунным заболеванием или их комбинацией, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции по п. 40 субъекту, нуждающемуся в этом.
43. Способ лечения субъекта, страдающего раком, воспалительным заболеванием, аутоиммунным заболеванием или их комбинацией, включающий введение композиции, содержащей субтоксическую дозу варианта с вырезанными фрагментами активируемого антитела и дозу интактного активируемого антитела, при этом относительное количество интактного активируемого антитела составляет по меньшей мере 95%, а относительное количество его варианта с вырезанными фрагментами составляет менее чем 5%, как определено с помощью SDS-cGE.
44. Способ снижения количества варианта с вырезанными фрагментами интактного активируемого антитела в 7-10 раз, как определено с помощью SDS-cGE, снижения количества НСР в 8-10 раз, как определено с помощью ELISA, и

снижения количества HMWS в 7-13 раз, как определено с помощью SE-HPLC в биособранной композиции или элюате из аффинной хроматографии на основе белка, с получением 75-85% выхода интактного активируемого антитела, включающий:

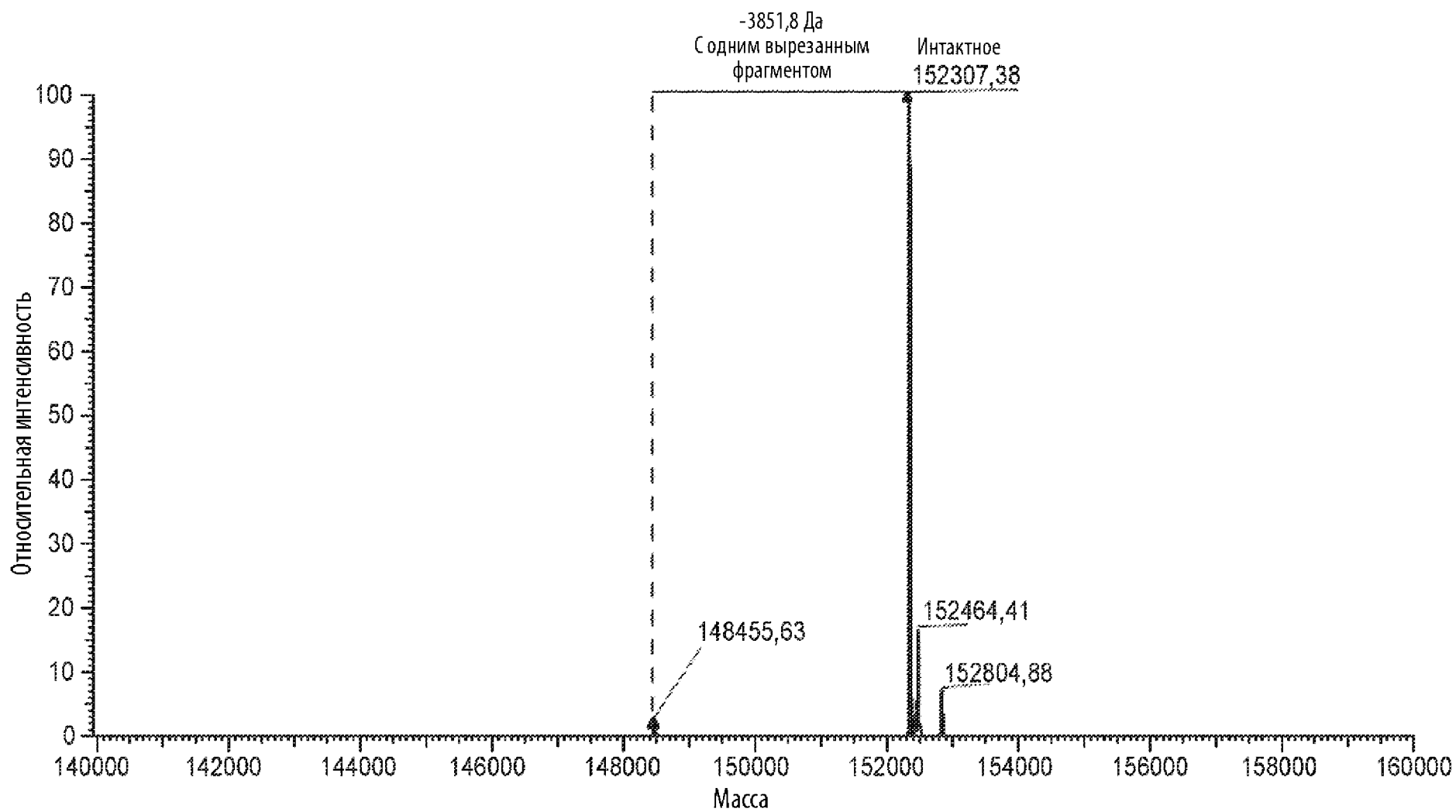
- (а) загрузку биособранной композиции или элюата из аффинной хроматографии на основе белка в хроматографическую колонку, содержащую неподвижную фазу, которая включает матрицу подложки и лиганды, содержащие гидрофобный заместитель, связанный с ней, и загрузку первой соли и воды на хроматографическую колонку; и
  - (b) элюирование хроматографической колонки элюентом, содержащим воду и вторую соль, с получением элюата.
45. Способ по п. 44, отличающийся тем, что указанный элюат содержит по меньшей мере 95% интактного активируемого антитела, как определено с помощью SDS-cGE, менее чем 2% варианта с вырезанными фрагментами интактного активируемого антитела, как определено с помощью SDS-cGE, менее чем 5 ppm НСР, как определено с помощью ELISA, и менее чем 1% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC, при этом общее процентное содержание интактного активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами составляет 100%.
46. Способ по п. 44, отличающийся тем, что указанный элюат содержит по меньшей мере 97% интактного активируемого антитела, как определено с помощью SDS-cGE, менее чем 1% варианта с вырезанными фрагментами интактного активируемого антитела, как определено с помощью SDS-cGE, менее чем 2 ppm НСР, как определено с помощью ELISA, и менее чем 0,5% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC, при этом общее процентное содержание интактного активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами составляет 100%.
47. Способ по п. 44, отличающийся тем, что указанный элюат содержит по меньшей мере 97% интактного активируемого антитела, как определено с помощью SDS-cGE, менее чем 1% варианта с вырезанными фрагментами интактного активируемого антитела, как определено с помощью SDS-cGE, менее чем 6 ppm НСР, как определено с помощью ELISA, и менее чем 1% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC, при этом общее процентное содержание интактного активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами составляет 100%.



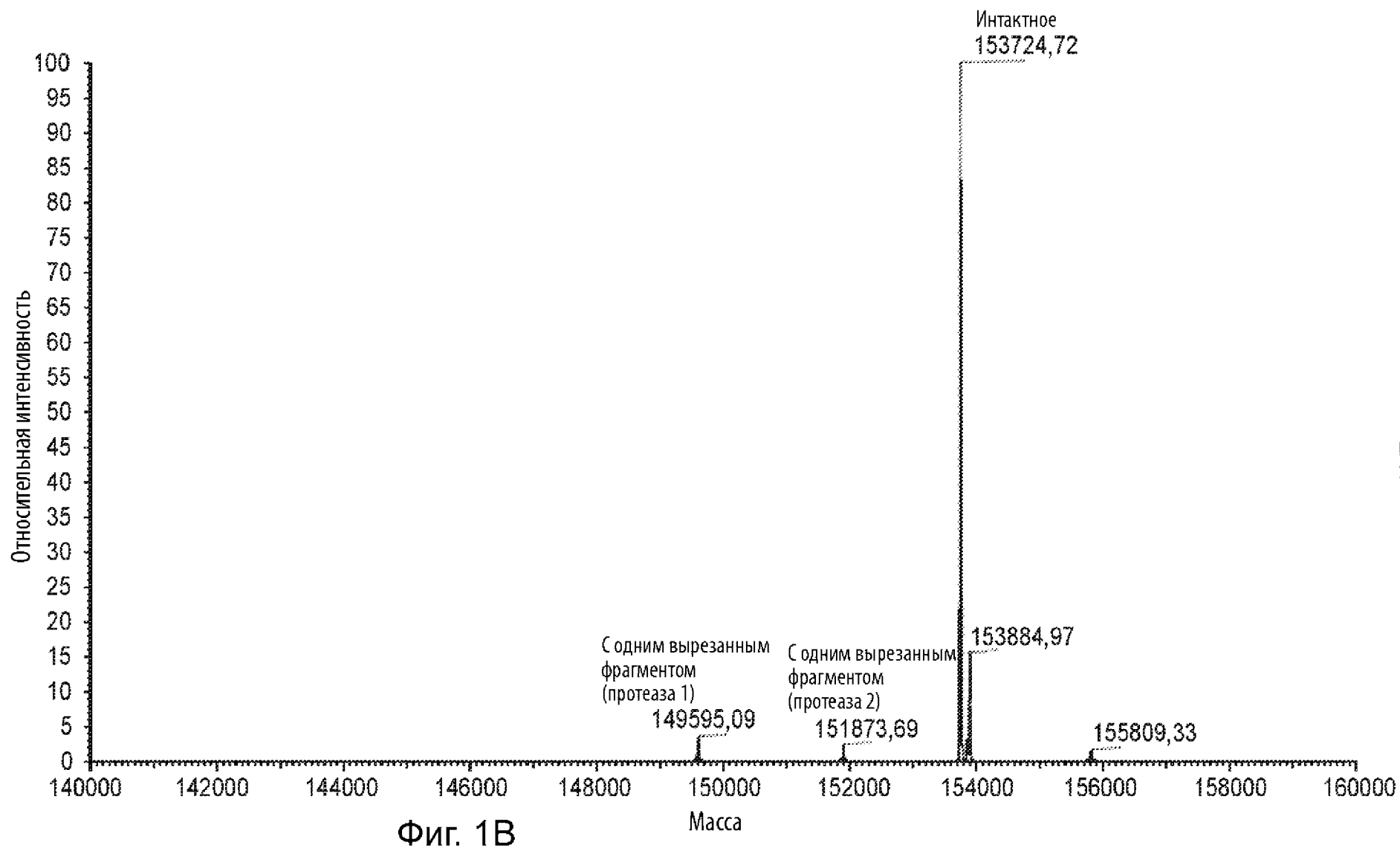
48. Способ по п. 44, отличающийся тем, что указанный элюат содержит по меньшей мере 98% интактного активируемого антитела, как определено с помощью SDS-cGE, менее чем 0,5% варианта с вырезанными фрагментами интактного активируемого антитела, как определено с помощью SDS-cGE, менее чем 5 ppm НСР, как определено с помощью ELISA, и менее чем 0,5% HMWS, как определено с помощью SE-HPLC, при этом общее процентное содержание интактного активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами составляет 100%.
49. Способ по любому из пп. 44-48 или из их комбинации, отличающийся тем, что указанный вариант с вырезанными фрагментами имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с интактным активируемым антителом.
50. Способ определения или мониторинга относительного процентного содержания активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами в способе получения композиции, включающий:
  - а) подвергание композиции образца, содержащей популяцию активируемых антител и популяцию их вариантов с вырезанными фрагментами, процедуре гель-капиллярного электрофореза;
  - б) отделение популяции активируемого антитела от популяции его вариантов с вырезанными фрагментами в процедуре гель-капиллярного электрофореза; и
  - с) количественную оценку относительных количеств популяции активируемого антитела и популяции его вариантов с вырезанными фрагментами с помощью определения площади пика, соответствующей содержащему продомен интактному полипептиду, и площади пика, соответствующей содержащему его продомен с вырезанными фрагментами полипептиду (полипептидам).
51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что указанная композиция образца представляет собой композицию собранных клеток из клеток, экспрессирующих активируемое антитело.
52. Способ по любому из пп. 50-51, отличающийся тем, что указанную композицию образца подвергали аффинной хроматографии на основе белка.
53. Способ по любому из пп. 50-52, отличающийся тем, что указанную композицию образца подвергали ионообменной хроматографии.
54. Способ по любому из пп. 50-53, отличающийся тем, что указанную композицию образца подвергали анионообменной хроматографии.
55. Способ по любому из пп. 50-54, отличающийся тем, что указанную композицию

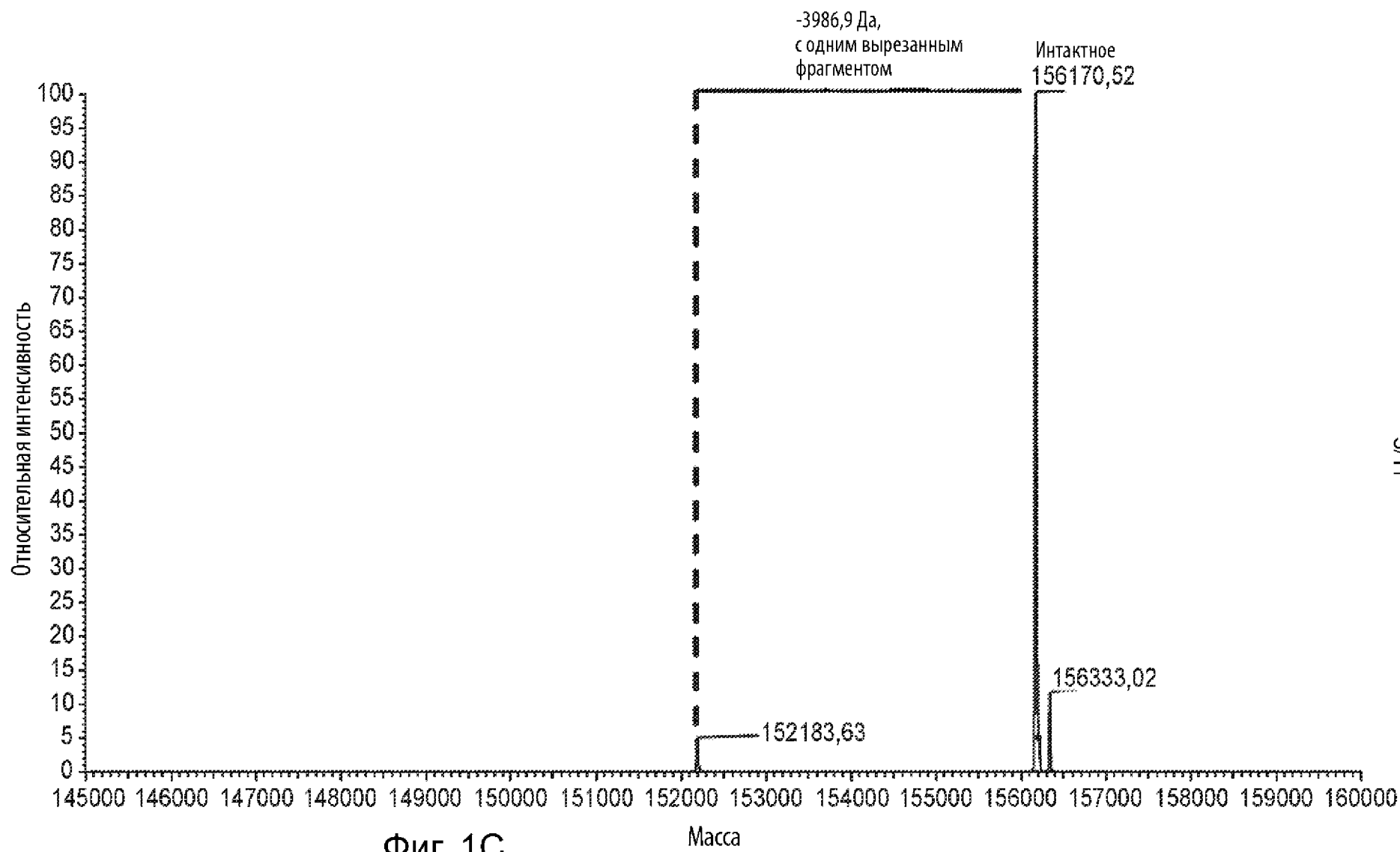
образца подвергали хроматографии гидрофобного взаимодействия.

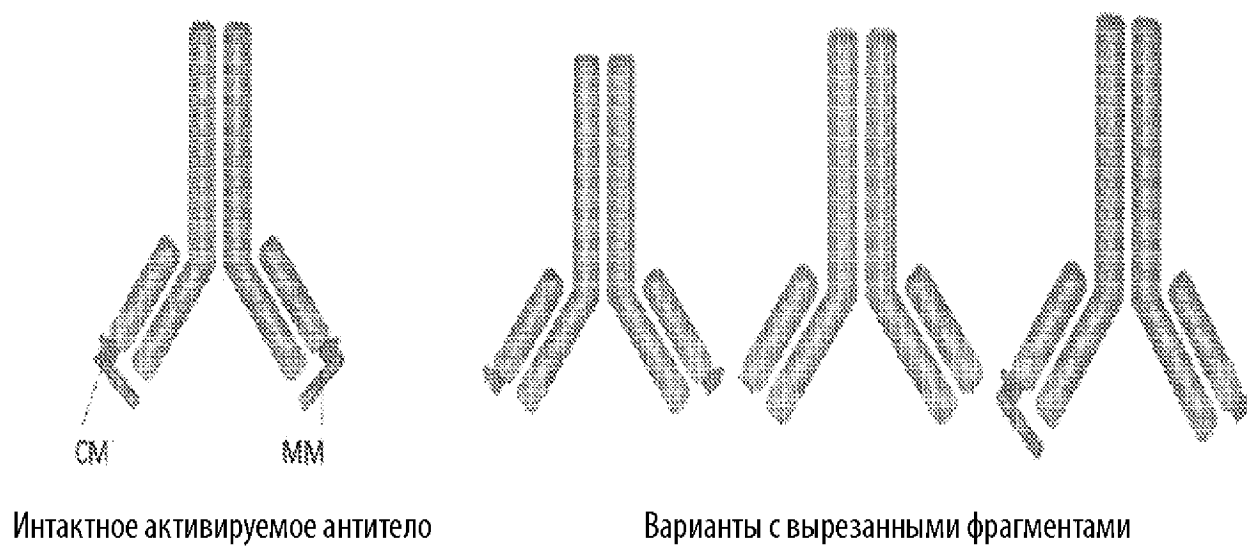
56. Способ по любому из пп. 50-55, отличающийся тем, что указанную композицию образца подвергали хроматографии на мультимодальных разделительных матрицах.
57. Способ по п. 50, отличающийся тем, что указанное относительное процентное содержание подвергают мониторингу с помощью количественной оценки относительного процентного содержания популяции активируемого антитела и популяции его вариантов с вырезанными фрагментами после каждого из двух или более сборов клеток, аффинной хроматографии на основе белка, ионообменной хроматографии, хроматографии гидрофобного взаимодействия и хроматографии на мультимодальных разделительных матрицах.
58. Способ по п. 50, отличающийся тем, что указанная стадия а) включает приведение активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами в композиции образца в контакт с восстанавливающим средством.
59. Способ по п. 58, отличающийся тем, что восстанавливающее средство представляет собой дитиоэритритол (DTE), дитиотреитол (DTT), бета-меркаптоэтанол или их комбинацию.
60. Способ по п. 50 или п. 58, отличающийся тем, что указанная стадия а) включает приведение активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами в композиции образца в контакт с денатурирующим средством.
61. Способ по п. 60, отличающийся тем, что указанное денатурирующее средство представляет собой додецилсульфат натрия (SDS).
62. Способ по п. 61, дополнительно включающий проведение процедуры гель-капиллярного электрофореза с использованием стандартов SDS определения молекулярной массы белка и получение стандартной калибровочной кривой молекулярной массы.
63. Способ по любому из пп. 50-62, отличающийся тем, что стадия с) включает получение электрофореграммы, содержащей пик, соответствующий каждому из активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами, подвергнутых процедуре гель-капиллярного электрофореза.
64. Способ по п. 63, дополнительно включающий выполнение интеграции пика для каждого пика, соответствующего каждому из активируемого антитела и его варианта с вырезанными фрагментами, с получением площади пика кодирующего продомен полипептида с вырезанными фрагментами и площади пика кодирующего продомен интактного полипептида.



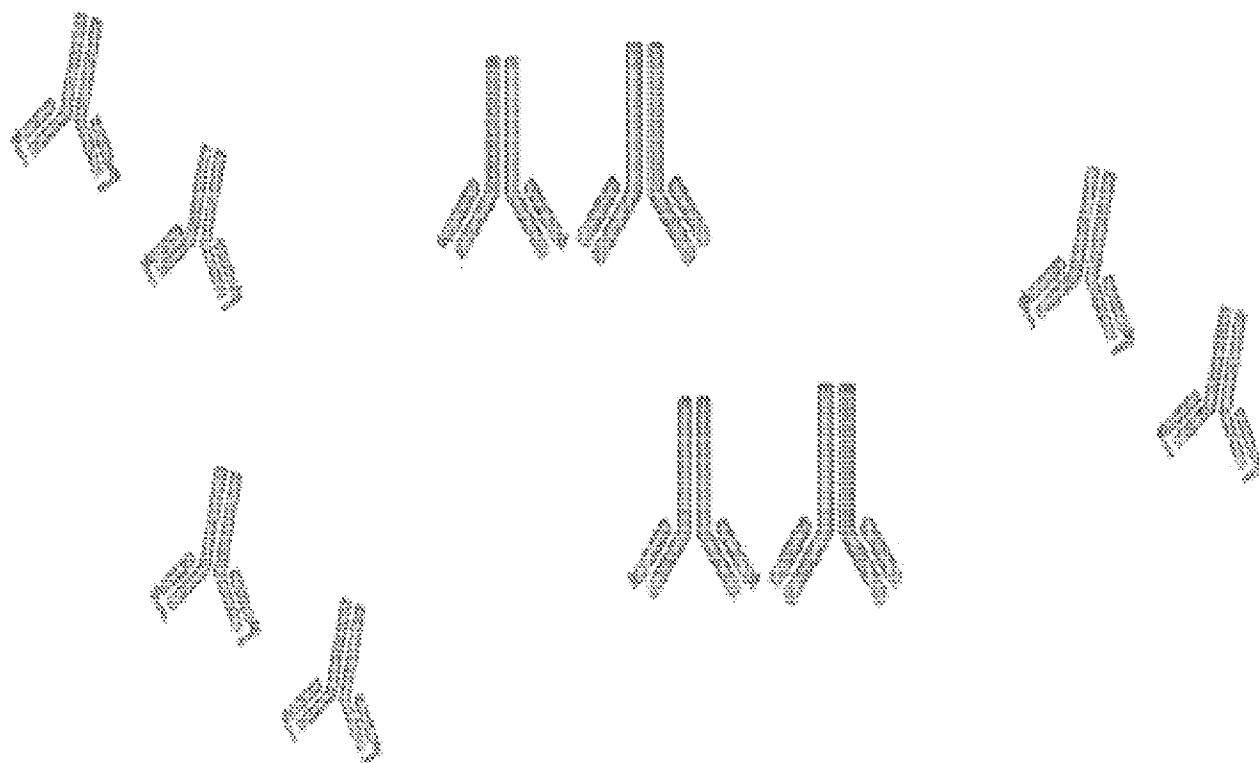
Фиг. 1А



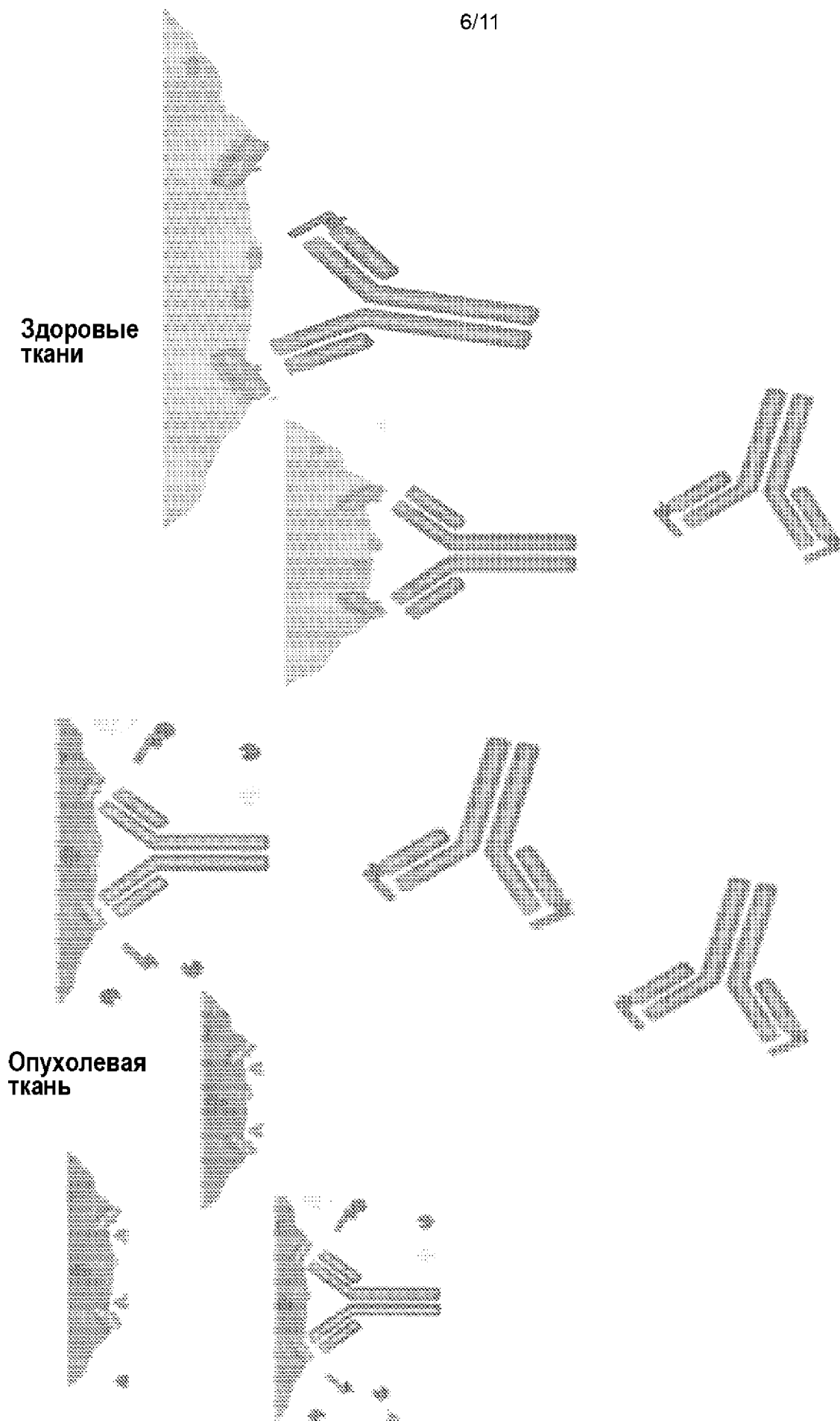




Фиг. 2А

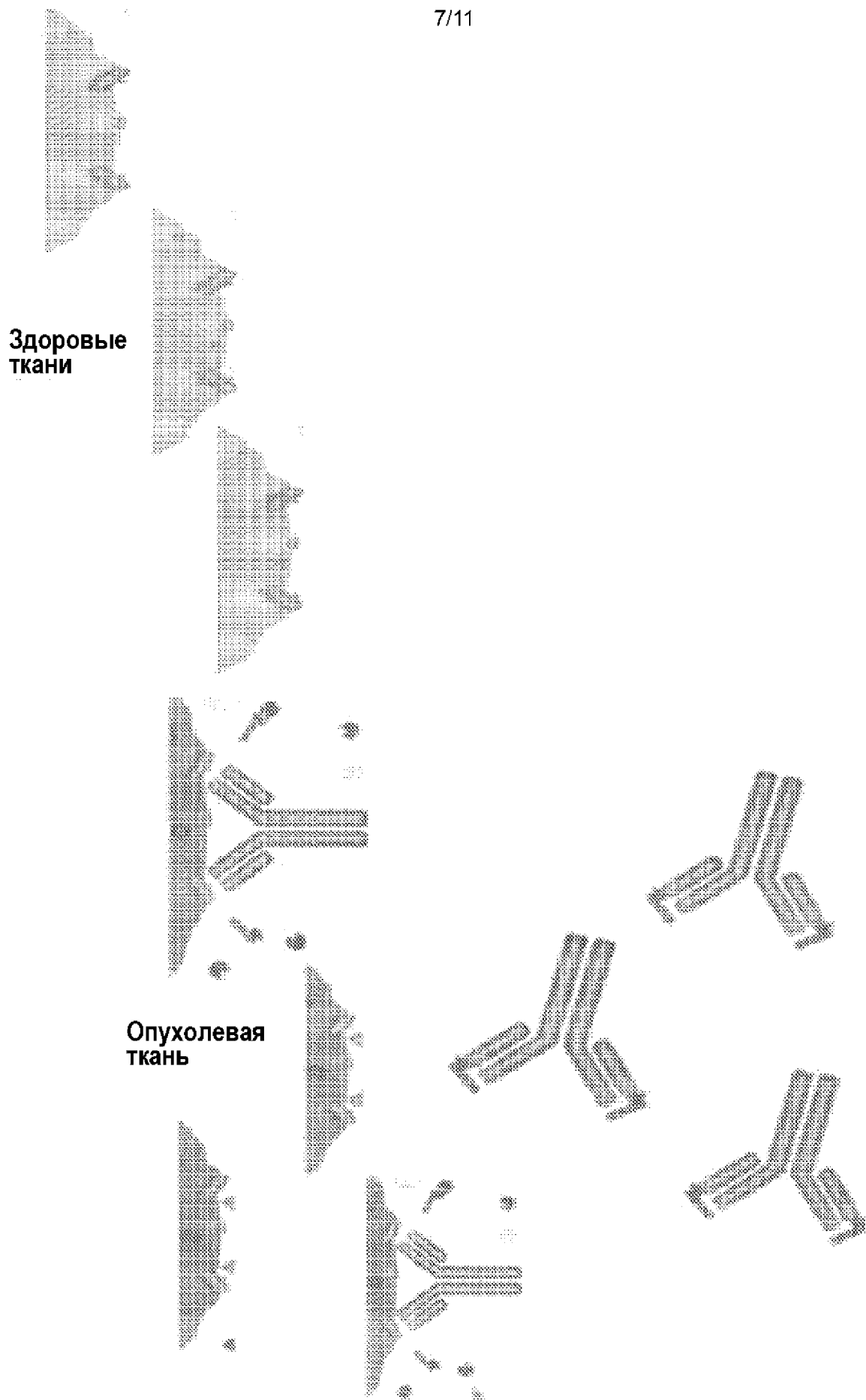


Фиг. 2В

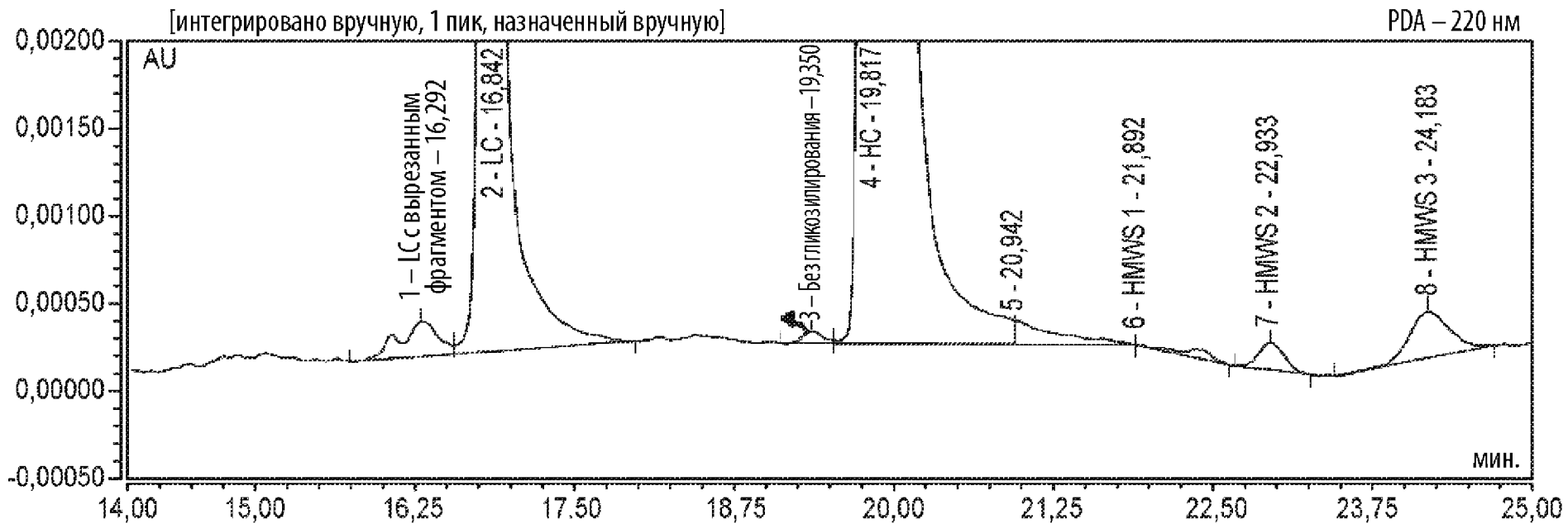


Фиг. 3А





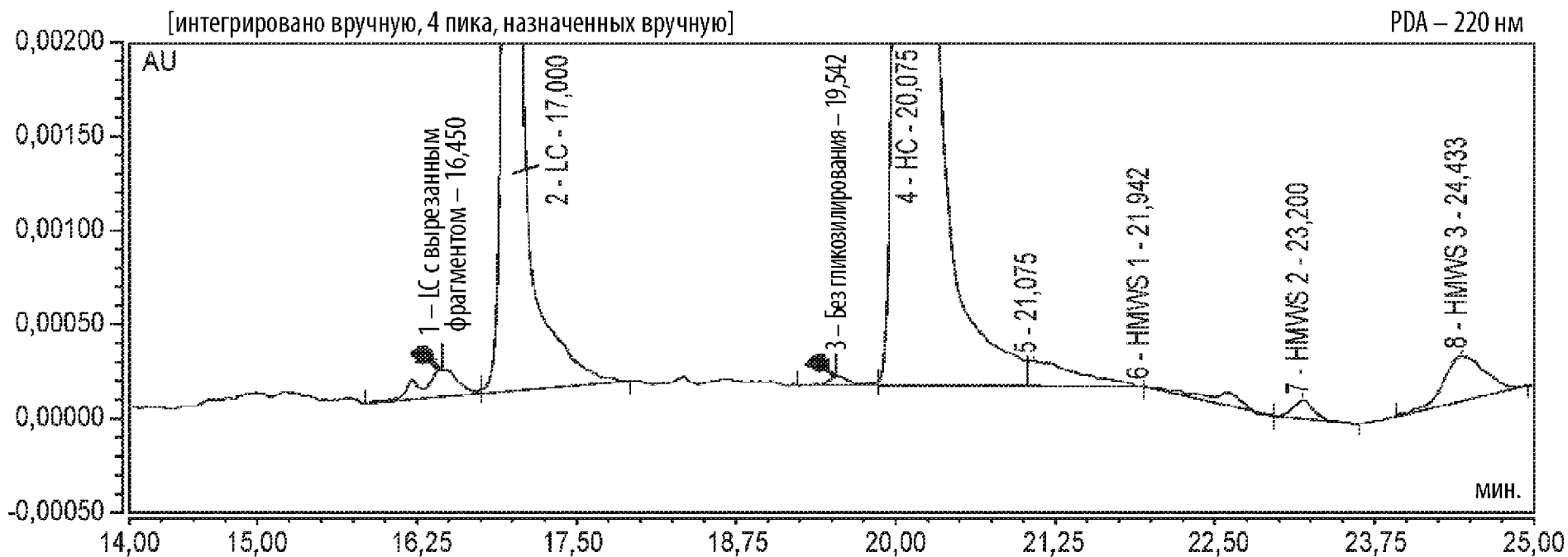
Фиг. 3В



8/11

Число пиков	Название пиков	Время удерживания
1	Легкая цепь с вырезанным фрагментом	16,292
2	Интактная легкая цепь	16,842
3	Без гликозилирования	19,350
4	Тяжелая цепь	19,817
5		20,942
6	HMWS 1	21,892
7	HMWS 2	22,933
8	HMWS 3	24,183

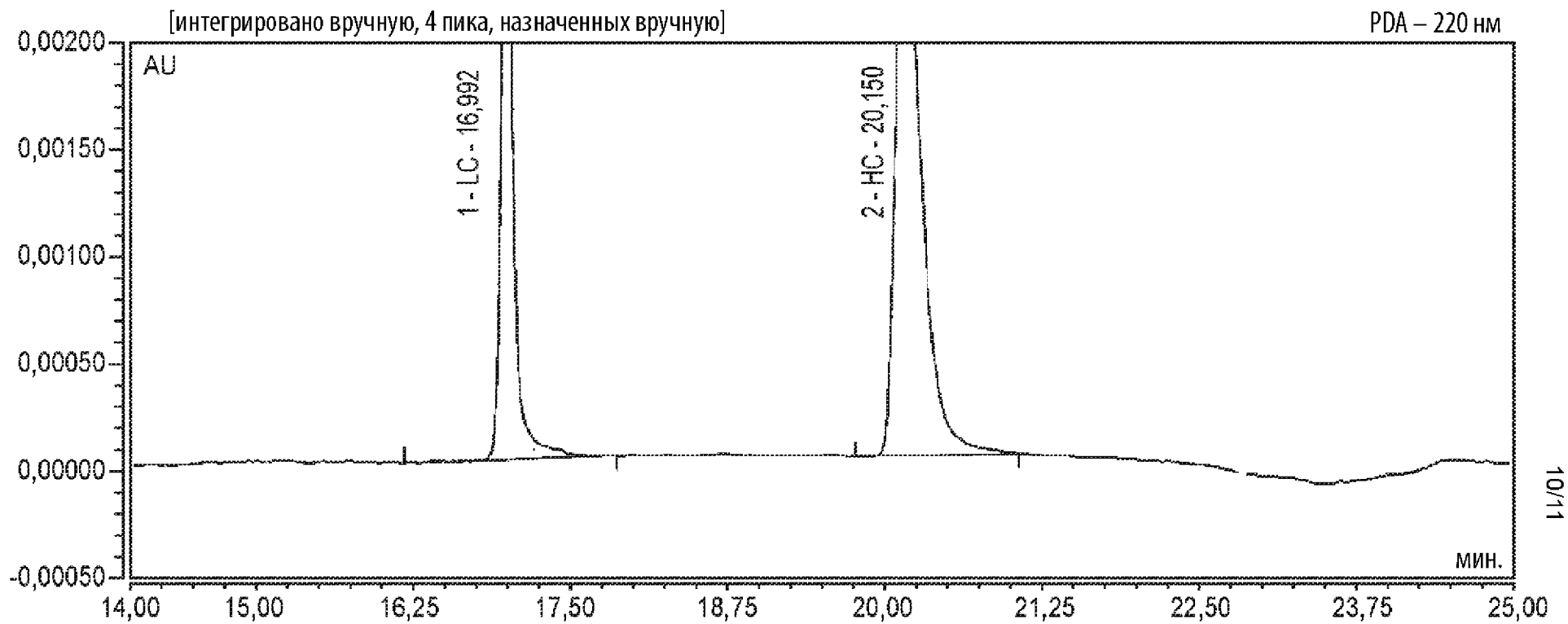
Фиг. 4А



9/11

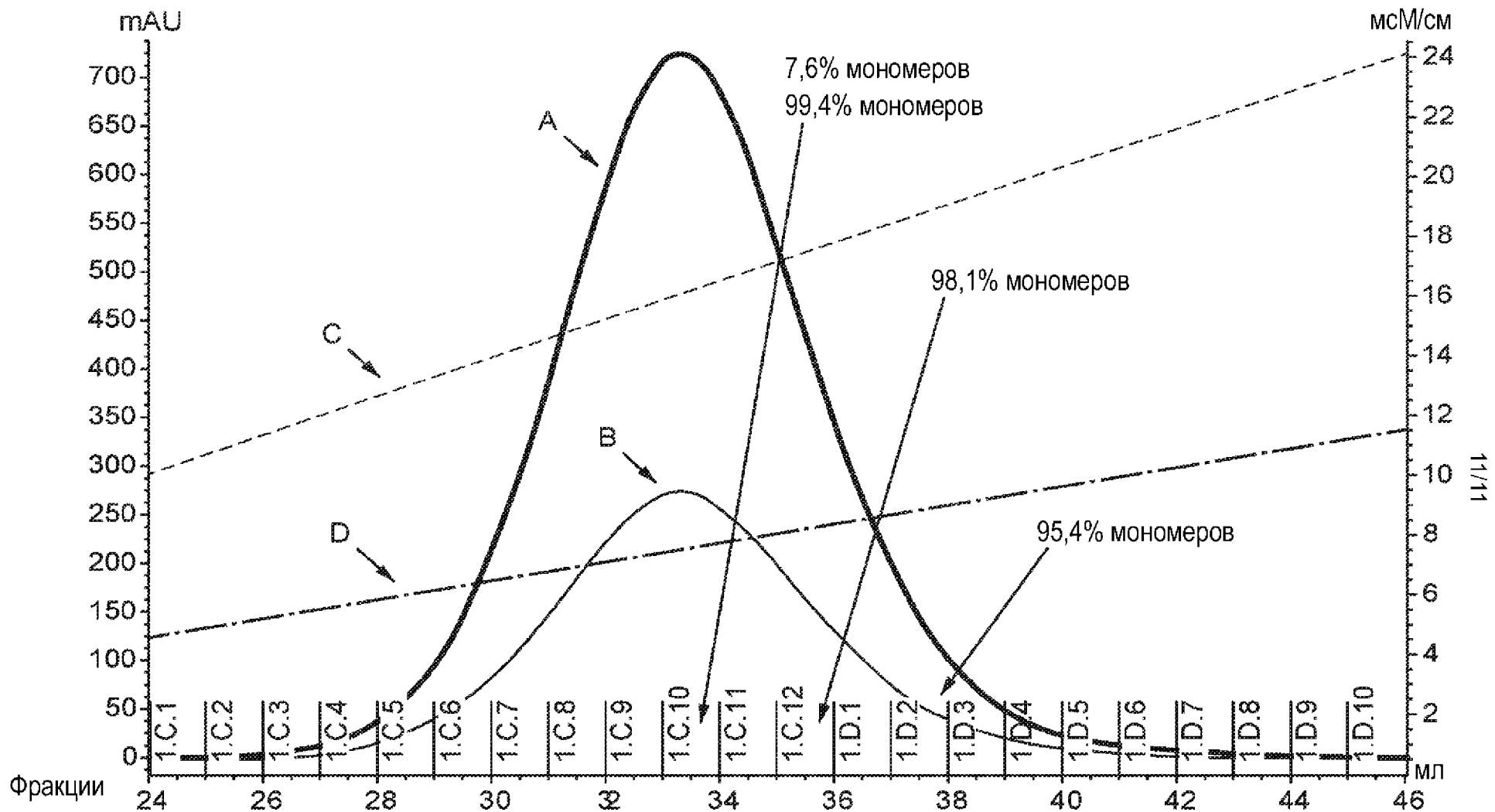
Число пиков	Название пиков	Время удерживания
1	Легкая цепь с вырезанным фрагментом	16,450
2	Интактная легкая цепь	17,000
3	Без гликозилирования	19,542
4	Тяжелая цепь	20,075
5		21,075
6	HMWS 1	21,942
7	HMWS 2	23,200
8	HMWS 3	24,433

Фиг. 4В



Число пиков	Название пиков	Время удерживания
1	Интактная легкая цепь	16,992
2	Тяжелая цепь	20,150

Фиг. 4С



Фиг. 5

11/11