

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046702**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.11

(51) Int. Cl. **C07K 16/06** (2006.01)

(21) Номер заявки
202291412

(22) Дата подачи заявки
2020.11.04

(54) **СПОСОБЫ ОЧИСТКИ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ПРИ ПОМОЩИ КАТИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОМЫВКИ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ СОЛИ**

(31) **62/931,874**

(32) **2019.11.07**

(33) **US**

(43) **2022.08.25**

(86) **PCT/US2020/058774**

(87) **WO 2021/091933 2021.05.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(56) **JP-A-2016183113**

WRZOSEK K ET AL: "Influence of ligand density on antibody binding capacity of cation-exchange adsorbents", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1216, no. 25, 19 June 2009 (2009-06-19), pages 5039-5044, XP026130528, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/J.CHROMA.2009.04.073 [retrieved on 2009-05-03] e.g. fig. 2; the whole document
WO-A1-2019184549

(72) Изобретатель:
**Амбхайкар Малхар Р., Диас
Луис, Гомес Наталия, Тиллотсон
Бенджамин Дж. (US)**

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

(57) Настоящее изобретение относится к области производства биофармацевтических препаратов. В частности, настоящее изобретение относится к способам удаления связанных с продуктом примесей с низкой изоэлектрической точкой в ходе операций катионообменной очистки полиспецифических белков. Предлагается способ очистки биспецифического антитела, включающий: загрузку образца, содержащего биспецифическое антитело, в среду для катионообменной хроматографии; промывание катионообменной среды по меньшей мере одним буфером для промывки с рН от 4,9 до 5,1, содержащим 100-147 мМ хлорида натрия; и элюирование биспецифического антитела из смолы для катионообменной хроматографии. Также предлагаются способ снижения содержания связанных с биспецифическим антителом примесей с низким рI в элюате из катионообменной хроматографии, способ проведения катионообменной хроматографии в условиях промывки с высоким содержанием соли и способ получения выделенного очищенного рекомбинантного биспецифического антитела, включающие стадию промывания катионообменной среды буфером для промывки с рН от 4,9 до 5,1, содержащим 100-147 мМ хлорида натрия. Изобретение позволяет эффективно отделять связанные с полиспецифическим белком примеси с низкой рI перед элюированием.

B1

046702

046702

B1

В данной заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/931874, поданной 7 ноября 2019 года, которая настоящим включена посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области производства биофармацевтических препаратов. В частности, настоящее изобретение относится к способам удаления связанных с продуктом примесей из операций катионообменной очистки полиспецифических белков.

Уровень техники

Продукты на основе антител представляют собой крупнейший сектор рынка биофармацевтических препаратов, и на протяжении следующего десятилетия объем их продаж может легко достичь сотен миллиардов долларов. Коммерческая разработка терапевтических антител началась в 1980-х годах с одобрения первого терапевтического моноклонального антитела и с тех пор продолжает развиваться и расширяться. Несмотря на то, что моноклональные антитела способны связываться с мишенью с высокой аффинностью и специфичностью и были очень успешными для лечения некоторых показаний, они также имеют ограничения как терапевтические средства. Моноклональные антитела могут связываться только с одной мишенью; однако многие заболевания являются многофакторными. В иммунотерапии рака лечения, лечение, направленное на одну мишень, может быть недостаточным для полного уничтожения или иммобилизации раковых клеток. Кроме того, некоторые пациенты, получающие виды терапии на основе моноклональных антител, могут не отвечать на лечение, или через некоторое время у них может даже развиться устойчивость к лекарственному средству.

Для решения этих сложных задач были разработаны новые антителоподобные структуры, такие как Fab-фрагменты антител, Fc-слитые белки, конъюгаты антитело-лекарственное средство, антитела, сконструированного гликозилированием и, в частности, биспецифические и другие полиспецифические антителоподобные структуры. Такие антителоподобные структуры, в частности биспецифические антитела, обладают улучшениями по сравнению с традиционными терапевтическими средствами на основе моноклональных антител, такими как аффинность к нескольким мишеням, и зарекомендовали себя в качестве эффективных биотерапевтических средств нового поколения с огромным разнообразием форматов, которые могут быть разработаны для удовлетворения еще более трудноизлечимых терапевтических показаний.

Биспецифические антитела представляют собой самую разнообразную группу таких антителоподобных структур с неуклонно растущим разнообразием каркасов для решения сложных задач еще более широкого спектра терапевтических показаний. Такие структуры сочетают в себе связывающие свойства антител со свойствами дополнительных молекул, сконструированных в каркасы, для удовлетворения потребностей показаний целевого заболевания. Биспецифические антитела разрабатываются для различных показаний и путей применения, таких как перенаправление иммунных эффекторных клеток на опухолевые клетки для иммунного ответа против рака, блокирование сигнальных путей, нацеливание на ангиогенез опухоли, блокирование цитокинов, преодоление гематоэнцефалического барьера, диагностические анализы, лечение заболеваний, вызванных патогенами, и в качестве средств доставки. (Sedykh et al., Drug Design, Development and Therapy 18(12), 195-208, 2018; Walsh, Nature Biotechnology, 32(10), 992-1000, 2014; Ecker et al., mAbs 7(1), 9-14, 2015; Spiess et al., Mol Immunol 67, 95-106, 2015; Fan et al., J Hematol & Oncology 8:130-143, 2015; Williams et al., Process Design for Bispecific Antibodies, Biopharmaceutical Processing, Development, Design and Implementation of Processes, Jagschies et al., editors, Elsevier Ltd, pages 837-855, 2018).

Разработка таких полиспецифических белков приводит к новым сложным задачам при биопроизводстве, в частности, в отношении нестабильности продукта и низких выходов экспрессии. В частности, очистка полиспецифических белков осложняется образованием связанных с продуктом вариантов, таких как гомодимеры, полуантитела, агрегаты, высокомолекулярные и низкомолекулярные разновидности и т.п. Такие связанные с продуктом варианты имеют структурные и физические свойства, например заряд, сходные с таковыми у представляющего интерес полиспецифического белка, что затрудняет их отделение в ходе очистки. Такие связанные с продуктом примеси снижают выход и активность полиспецифического лекарственного продукта.

Связанные с продуктом примеси, имеющие заряд (изоэлектрическая точка, pI), сходные с таковым у представляющего интерес полиспецифического белка, могут совместно элюироваться с полиспецифическим белком в ходе отдельных операций катионообменной хроматографии, что усложняет очистку и снижает выход. Было бы полезно отделять связанные с продуктом примеси с низкой pI перед элюированием. Настоящее изобретение, описанное в данном документе, удовлетворяет эту потребность путем обеспечения условий промывки с высоким содержанием соли для удаления таких связанных с продуктом примесей с низкой pI в ходе катионообменной хроматографии.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении представлен способ очистки полиспецифического белка, а более конкретно, биспецифического антитела, включающий загрузку образца, содержащего биспецифическое антитело, в среду для катионообменной хроматографии; промывание катионообменной среды по меньшей мере одним буфером для промывки с pH от 4,9 до 5,1, содержащим 100-147 mM хлорида на-

один из буферов, применяемых для создания градиента элюирования, содержит 70-500 мМ хлорида натрия. В другом связанном варианте осуществления по меньшей мере один из буферов, применяемых для создания градиента элюирования, содержит 125 мМ хлорида натрия. В связанном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки и один буфер для элюирования содержат 125 мМ хлорида натрия.

В одном варианте осуществления в катионообменную среду загружают по меньшей мере 10 г/л биспецифического антитела. В другом варианте осуществления в катионообменную среду загружают от 10 г/л до 40 г/л биспецифического антитела. В связанном варианте осуществления в катионообменную среду загружают от 15 г/л до 30 г/л. В связанном варианте осуществления в катионообменную среду загружают 25 г/л - 40 г/л. В одном варианте осуществления в катионообменную среду загружают 10 г/л биспецифического антитела, промывают буфером для промывки, содержащим 105 мМ хлорида натрия, и элюируют в солевом градиенте при 8 мМ/СV. В другом варианте осуществления в катионообменную среду загружают от 15 г/л до 30 г/л биспецифического антитела, промывают буфером для промывки, содержащим 147 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления в катионообменную среду загружают от 25 г/л до 40 г/л биспецифического антитела, при этом по меньшей мере один буфер для промывки и один буфер для элюирования содержат 125 мМ хлорида натрия.

В одном варианте осуществления по меньшей мере одна связанная с продуктом примесь представляет собой гомодимер, высокомолекулярную разновидность, полуантитело, агрегат, низкомолекулярную разновидность, фрагмент антитела или неправильную сборку легких цепей. В одном варианте осуществления способ очистки, который включает отдельную операцию, предусматривающую катионообменную хроматографию, выполняют в соответствии со способом, описанным выше.

В одном варианте осуществления указанный выше способ дополнительно включает до и/или после стадии катионообменной хроматографии одну или несколько отдельных операций для очистки биспецифического антитела, предусматривающих аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, колоночную хроматографию гидрофобных взаимодействий и/или колоночную хроматографию со смешанным режимом.

В настоящем изобретении полиспецифический белок представляет собой биспецифический белок, и более конкретно, представляет собой биспецифическое антитело. В одном варианте осуществления очищенное биспецифическое антитело получают в соответствии со способом, описанным выше. В одном варианте осуществления среда для катионообменной хроматографии представляет собой смолу.

В настоящем изобретении представлен способ снижения содержания связанных с продуктом примесей с низкой рI в элюате после катионообменной хроматографии, причем способ включает загрузку композиции, содержащей биспецифическое антитело и по меньшей мере одну связанную с продуктом примесь, характеризующуюся более низкой рI, чем у биспецифического антитела, в среду для катионообменной хроматографии; промывание катионообменной среды первым буфером для промывки, промывание катионообменной среды вторым буфером для промывки с рН от 4,9 до 5,1, содержащим 100-147 мМ хлорида натрия; элюирование биспецифического антитела из смолы для катионообменной хроматографии; где элюат катионообменной хроматографии характеризуется сниженным содержанием связанных с продуктом примесей с низкой рI, по сравнению с элюатом катионообменной хроматографии, извлеченным в соответствующем способе, в котором хлорид натрия не включен в состав буфера для промывки. В одном варианте осуществления катионообменную среду дополнительно промывают третьим буфером для промывки.

В настоящем изобретении представлен способ выполнения катионообменной хроматографии в условиях промывки с высоким содержанием соли для снижения содержания связанных с продуктом примесей, причем способ включает загрузку композиции, содержащей биспецифическое антитело и по меньшей мере одну связанную с продуктом примесь, в уравновешенную катионообменную колонку; промывание катионообменной среды по меньшей мере двумя буферами для промывки, где один буфер для промывки имеет рН от 4,9 до 5,1 и содержит 100-147 мМ хлорида натрия; и элюирование связанного биспецифического антитела из смолы для катионообменной хроматографии. В одном варианте осуществления перед загрузкой композиции катионообменную среду уравновешивают буфером, не содержащим хлорид натрия.

В настоящем изобретении представлен способ получения выделенного очищенного рекомбинантного биспецифического антитела, причем способ включает создание клеточной культуры в биореакторе с клеткой-хозяином, экспрессирующей биспецифическое антитело; культивирование клеток-хозяев для экспрессии биспецифического антитела; сбор рекомбинантного биспецифического антитела из клеточной культуры; аффинную очистку рекомбинантного биспецифического антитела; загрузку прошедшего аффинную очистку рекомбинантного биспецифического антитела на смолу для катионообменной хроматографии; промывание катионообменной смолы по меньшей мере одной промывкой, содержащей 100-147 мМ хлорида натрия; элюирование биспецифического антитела из смолы для катионообменной хроматографии и загрузку элюата катионообменной хроматографии, содержащего рекомбинантное биспецифическое антитело, в дополнительную хроматографическую среду в проточном режиме. В одном варианте осуществления дополнительная среда для хроматографии выбрана из среды

для катионообменной хроматографии, среды для мультимодальной хроматографии, среды для хроматографии гидрофобных взаимодействий и среды для хроматографии с гидроксипатитом. В одном варианте осуществления прошедшее аффинную очистку биспецифическое антитело находится в пуле элюатов, и его подвергают вирусной инаktivации при низком pH, а затем нейтрализации перед загрузкой в катионообменную среду. В одном варианте осуществления фильтрат из третьей хроматографической среды подвергают отдельной операции ультрафильтрации и диафильтрации. В одном варианте осуществления выделенное очищенное рекомбинантное биспецифическое антитело получают в соответствии со способом, описанным выше.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показаны связанные с продуктом примеси (гомодимер, NCG), элюирующиеся с основным продуктом, биспецифической молекулой № 1.

На фиг. 2 показано, что в условиях промывки с высоким содержанием соли все связанные с продуктом примеси, pI которых ниже, чем у основного продукта, вымываются из колонки между второй и третьей стадией промывки. Перед элюированием обеспечивалось возвращение исходного уровня к нулю. Пик элюирования сокращался до одного пика.

На фиг. 3 показано, что в колонке оставались многочисленные примеси, и они элюировались с основным продуктом. Эти примеси включали полуантитела (фракции 1-4 с ~50% полуантител), неправильные сборки 2X легких цепей (фракции 5 и 6) и высокомолекулярные разновидности (фракции 12-21).

На фиг. 4 показано, что промывка с высоким содержанием соли привела к уменьшению числа пиков в профиле элюирования от четырех пиков до одного пика с небольшим "плечом", которое все еще содержало разновидности с неправильным спариванием 2X LC2 (LC1/LC2 <0,11 по сравнению с ожидаемым соотношением 1).

На фиг. 5 показан один пик элюирования, полученный в результате высокой плотности загрузки при крутом градиенте элюирования. Связанные с продуктом примеси с низкой pI не отделялись от основного продукта при высокой плотности загрузки и в основном находились во фракциях 1-3, как видно по снижению CE-SDS.

На фиг. 6 показано, что уменьшение плотности загрузки с более пологим градиентом привело к разделению основных связанных с продуктом примесей с низкой pI в отчетливый пик, содержащий разновидности с неправильным спариванием LC1.

На фиг. 7 показаны результаты промывки с высоким содержанием соли. В профиле элюирования наблюдали уменьшение числа пиков примесей, при этом большая часть примесей удалялась в ходе второй и третьей стадий промывки. Третья стадия промывки обеспечивала восстановление исходного уровня UV-спектра до нуля перед началом элюирования, уплотняя профиль элюирования, что приводило к гораздо более эффективному сбору и лучшему качеству основного продукта.

На фиг. 8 показано, что в условиях промывки с высоким содержанием соли все примеси, относящиеся к продуктам с низкой pI (гомодимерные разновидности с pI 6,8 и любые агрегированные разновидности с низкой pI), проходили через колонку в отходы, или их собирали отдельно в "пул промывки" для тестирования их состава. Перед элюированием обеспечивалось возвращение исходного уровня к нулю. Пик элюирования сокращался до одного пика.

Подробное описание изобретения

Поскольку в литературе не так много информации, касающейся последующей обработки полиспецифических белков, зачастую применяются платформы, разработанные для моноклональных антител (Shulka and Norman, Chapter 26 Downstream Processing of Fc Fusion Proteins, Bispecific Antibodies, and Antibody-Drug Conjugates, в Process Scale Purification of Antibodies Second Edition, Uwe Gottschalk editor, p559-594, John Wiley & Sons, 2017). Полиспецифические белки являются высокотехнологичными, и подвергание таких белков катионообменной хроматографии (CEX) в режиме связывания и элюирования в условиях, типичных для антител, может быть недостаточным для стабилизации полиспецифических белков и/или обращения со связанными с продуктом примесями, которые элюируются с основным продуктом. Такие связанные с продуктом примеси характеризуются изоэлектрическими точками, которые как ниже, так и выше, чем у основного продукта. Обнаружили, что связанные с продуктом примеси с pI ниже, чем у основного продукта, элюируются с основным продуктом в виде препиков. Такой профиль элюирования не укрепляет разработку надежного, стабильного производственного процесса в промышленных масштабах.

Обнаружили, что применение стратегии промывки с высоким содержанием соли привело к лучшему выходу и чистоте основного продукта и улучшению производственного процесса. Добавление промывки с высоким содержанием соли снижало содержание связанных с продуктом примесей с более низкой pI в пуле элюата за счет их удаления перед стадией элюирования. Добавление стадии промывки с содержанием хлорида натрия в диапазоне 105-147 mM привело к тому, что связанные с продуктом примеси с pI, которые были ниже, чем у основного продукта, вымывались или элюировались из катионообменной среды перед стадией элюирования, уменьшая число пиков в профиле элюирования. Автоматическое объединение элюата на основе OD становится затруднительным при наличии препиков. Обнаружили, что включение в протокол катионообменной хроматографии перед элюированием стадии промывки с

высоким содержанием соли уменьшало число препиков, ассоциированных со связанными с продуктом примесями с низкой pI , уменьшая потребность в более консервативной стратегии, подлежащей применению в ходе сбора основного продукта в ходе элюирования, которая, вероятно, будет приводить к более низким выходам и менее стабильному производственному процессу.

В настоящем изобретении представлен способ очистки полиспецифического белка, включающий загрузку образца, содержащего полиспецифический белок, в среду для катионообменной хроматографии; промывание катионообменной среды по меньшей мере одним буфером для промывки, содержащим 100-147 мМ хлорида натрия; и элюирование полиспецифического белка из смолы для катионообменной хроматографии.

В настоящем изобретении представлен способ снижения содержания связанных с продуктом примесей с низкой pI в элюате после катионообменной хроматографии, причем способ включает загрузку композиции, содержащей полиспецифический белок (здесь и далее в тексте описания настоящего изобретения термин "полиспецифический белок" относится главным образом к биспецифическим белкам, и более конкретно, к биспецифическому антителу) и по меньшей мере одну связанную с продуктом примесь, характеризующуюся более низкой pI , чем у полиспецифического белка, в среду для катионообменной хроматографии; промывание катионообменной среды первым буфером для промывки, промывание катионообменной среды вторым буфером для промывки, содержащим 100-147 мМ хлорида натрия; элюирование полиспецифического белка из смолы для катионообменной хроматографии; где элюат катионообменной хроматографии характеризуется сниженным содержанием связанных с продуктом примесей с низкой pI , по сравнению с элюатом катионообменной хроматографии, извлеченным в соответствующем способе, в котором хлорид натрия не включен в состав буфера для промывки.

В настоящем изобретении представлен способ выполнения катионообменной хроматографии в условиях промывки с высоким содержанием соли для снижения содержания связанных с продуктом примесей, причем способ включает загрузку композиции, содержащей полиспецифический белок и по меньшей мере одну связанную с продуктом примесь, в уравновешенную катионообменную колонку; промывание катионообменной среды по меньшей мере двумя буферами для промывки, где один буфер содержит 100-147 мМ хлорида натрия; и элюирование связанного полиспецифического белка из смолы для катионообменной хроматографии.

В настоящем изобретении представлен способ получения выделенного очищенного рекомбинантного полиспецифического белка, причем способ включает создание клеточной культуры в биореакторе с клеткой-хозяином, экспрессирующей полиспецифический белок; культивирование клеток-хозяев для экспрессии полиспецифического белка; сбор рекомбинантного полиспецифического белка из клеточной культуры; аффинную очистку рекомбинантного полиспецифического белка; загрузку прошедшего аффинную очистку рекомбинантного полиспецифического белка на смолу для катионообменной хроматографии; промывание катионообменной смолы по меньшей мере одной промывкой, содержащей 100-147 мМ хлорида натрия; элюирование полиспецифического белка из смолы для катионообменной хроматографии и загрузку элюата катионообменной хроматографии, содержащего рекомбинантный полиспецифический белок, в третью хроматографическую среду в проточном режиме.

В настоящем изобретении представлен способ очистки, который включает отдельную операцию, предусматривающую катионообменную хроматографию, выполняемую в соответствии со способами, раскрытыми в данном документе.

В настоящем изобретении представлен очищенный полиспецифический белок, полученный в соответствии со способами, раскрытыми в данном документе.

В настоящем изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая выделенный очищенный рекомбинантный полиспецифический белок, полученный в соответствии с любым из способов, описанных в данном документе.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 0-147 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 70-147 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 100-147 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 100-125 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 100-105 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 105-147 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 105-125 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 125-147 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 0, 70, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 142, 144, 145, 146 или 147 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 0 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 70 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 100 мМ хлорида на-

тый буфер для промывки составляет 100 мМ ацетата, 70 мМ хлорида натрия.

В одном варианте осуществления катионообменную смолу промывают 2,5 мМ/СV буфера для промывки, содержащего 147 мМ хлорида натрия.

В одном варианте осуществления полиспецифический белок элюируют из катионообменной среды посредством градиента. В связанном варианте осуществления градиент представляет собой линейный или ступенчатый градиент. В связанном варианте осуществления градиент представляет собой солевой градиент. В связанном варианте осуществления по меньшей мере один из буферов, применяемых для создания градиента элюирования, содержит 0-1 М хлорида натрия. В связанном варианте осуществления по меньшей мере один из буферов, применяемых для создания градиента элюирования, содержит 70-500 мМ хлорида натрия.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из буферов, применяемых для создания градиента элюирования, содержит 125 мМ хлорида натрия. В связанном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки и один буфер для элюирования содержат 125 мМ хлорида натрия.

В одном варианте осуществления перед загрузкой композиции катионообменную среду уравнивают буфером, не содержащим хлорид натрия.

В одном варианте осуществления в катионообменную среду загружают 10 г/л полиспецифического белка, промывают буфером для промывки, содержащим 105 мМ хлорида натрия, и элюируют в солевом градиенте при 8 мМ/СV.

В одном варианте осуществления по меньшей мере одна связанная с продуктом примесь представляет собой гомодимер, высокомолекулярную разновидность, полуантитело, агрегат, низкомолекулярную разновидность, фрагмент антитела или неправильную сборку легких цепей.

В одном варианте осуществления прошедший аффинную очистку полиспецифический белок находится в пуле элюатов, и его подвергают вирусной инаktivации при низком рН, а затем нейтрализации перед загрузкой в катионообменную среду.

В одном варианте осуществления среда для катионообменной хроматографии представляет собой смолу.

В одном варианте осуществления третья среда для хроматографии выбрана из среды для катионообменной хроматографии, среды для мультимодальной хроматографии, среды для хроматографии гидрофобных взаимодействий и среды для хроматографии с гидроксипатитом. В одном варианте осуществления фильтрат из третьей хроматографической среды подвергают отдельной операции ультрафильтрации и диалитрации.

В одном варианте осуществления до и/или после стадии катионообменной хроматографии представлены одна или несколько отдельных операций для очистки полиспецифического белка, предусматривающих аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, колоночную хроматографию гидрофобных взаимодействий и/или колоночную хроматографию со смешанным режимом.

В одном варианте осуществления полиспецифический белок представляет собой биспецифический белок. В одном варианте осуществления полиспецифический белок представляет собой биспецифическое антитело.

"Полиспецифический", "полиспецифический белок" и "полиспецифическое антитело" используются в данном документе для обозначения белков, которые сконструированы рекомбинантным путем для одновременного связывания и нейтрализации по меньшей мере двух различных антигенов или по меньшей мере двух различных эпитопов одного и того же антигена. Например, полиспецифические белки можно конструировать для нацеливания иммунных эффекторов в комбинации с нацеливанием цитотоксических средств на опухоли или возбудители инфекций. Было обнаружено, что такие полиспецифические белки являются применимыми во множестве вариантов применения, как например в иммунотерапии рака путем перенаправления иммунных эффекторных клеток к клеткам опухоли, модификации передачи сигнала в клетках путем блокирования сигнальных путей, нацеливания на ангиогенез опухоли, блокирования цитокинов и в качестве предварительно нацеленных средств доставки для лекарственных средств, как, например, доставки химиотерапевтических средств, радиоактивных меток (для улучшения чувствительности обнаружения) и наночастиц (направленных на конкретные клетки/ткани, такие как раковые клетки).

Наиболее распространенной и наиболее разнообразной группой полиспецифических белков являются те белки, которые связывают два антигена, обозначенные в данном документе как "биспецифические", "биспецифические белки" и "биспецифические антитела". Биспецифические белки могут быть сгруппированы в две обширные категории: молекулы, подобные иммуноглобулину G (IgG), и молекулы, отличные от молекул, подобных иммуноглобулину G (IgG). IgG-подобные молекулы сохраняют Fc-опосредованные эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC), комплементзависимая цитотоксичность (CDC) и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), Fc-область помогает улучшить растворимость и стабильность и упрощает некоторые операции очистки. Молекулы, отличные от IgG-подобных молекул, меньше по размеру, что улучшает их проникновения в ткани (см. Sedykh et al., Drug Design, Development and Therapy 18(12), 195-208, 2018;

Fan et al., *J Hematol & Oncology* 8:130-143, 2015; Spiess et al., *Mol Immunol* 67, 95-106, 2015; Williams et al., Chapter 41 *Process Design for Bispecific Antibodies in Biopharmaceutical Processing Development, Design and Implementation of Manufacturing Processes*, Jagschies et al., eds., 2018, pages 837-855). Биспецифические белки иногда применяют в качестве каркаса для дополнительных компонентов, характеризующихся специфичностью связывания с разными антигенами или большим числом эпитопов, что увеличивает специфичность связывания молекулы.

Форматы для биспецифических белков, которые включают биспецифические антитела, постоянно развиваются и включают без ограничения квадромы, структуры типа "выступ-во-впадину", CrossMab, IgG с двойным варибельным доменом (DVD-IgG), IgG-одноцепочечный Fv (scFv), scFv-CH3 K1H, Fab двойного действия (DAF), структуру с обменом половинами молекул, κλ-тела, tandemный scFv, scFv-Fc, диатела, одноцепочечные диатела (sc-диатела), sc-диатела-CH3, триатело, миниантитело, минитело, минитело TriBi, tandemные диатела, sc-диатело-HAS, tandemную структуру scFv-токсин, перенацеливающие молекулы двойной аффинности (DART), нанотело, нанотело-HSA, структуру, полученную методом "стыковки и фиксации" (DNL), SEEDbody на основе сконструированных доменов с обменом нитями, Triomab, лейциновую застежку (LUZ-Y), XmAb®; структуру с обменом Fab-плечами, DutaMab, DT-IgG, структуру с заряженными парами, Fcab, ортогональный Fab, IgG(H)-scFv, scFV-(H)IgG, IgG(L)-scFV, IgG(L1H1)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V V(L)-IgG, K1H IgG-scFab, 2scFV-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zyboby, DVI-Ig4 (четыре в одном), Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFV, F(ab')₂-scFv₂, scFv-K1H, Fab-scFv-Fc, тетравалентное HCAb, sc-диатело-Fc, диатело-Fc, интратело, ImmTAC, HSAbody, IgG-IgG, Cov-X-Body, scFv1-PEG-scFv2, биспецифические активаторы, привлекающие T-клетки (BITE®), и биспецифические активаторы, привлекающие T-клетки, с продленным периодом полужизни (ULE BITE®) (Fan выше; Spiess выше; Sedykh выше; Seimetz et al., *Cancer Treat Rev* 36(6) 458-67, 2010; Shulka and Norman, Chapter 26 *Downstream Processing of Fc Fusion Proteins, Bispecific Antibodies, and Antibody-Drug Conjugates*, в *Process Scale Purification of Antibodies Second Edition*, Uwe Gottschalk editor, p559-594, John Wiley & Sons, 2017; Moore et al., *MAbs* 3:6, 546-557, 2011).

В некоторых вариантах осуществления биспецифические белки могут включать блинатумаб, катумаксомаб, эртумаксомаб, солиномаб, targomiR, лутикизумаб (ABT981), вануцизумаб (RG7221), ремтолмаб (ABT122), озораликсумаб (ATN103), флотеузумаб (MGD006), пасотуксизумаб (AMG112, MT112), лимфомун (FBTA05), (ATN-103), AMG211 (MT111, Medi-1565), AMG330, AMG420 (B1836909), AMG-110 (MT110), MDX-447, TF2, rM28, HER2Bi-aATC, GD2Bi-aATC, MGD006, MGD007, MGD009, MGD010, MGD011 (JNJ64052781), IMCgp100, меченный индием IMP-205, xm734, LY3164530, OMP-305BB3, REGN1979, COV322, ABT112, ABT165, RG-6013 (ACE910), RG7597 (MEDH7945A), RG7802, RG7813 (RO6895882), RG7386, BITS7201A (RG7990), RG7716, BFKF8488A (RG7992), MCLA-128, MM-111, MM141, MOR209/ES414, MSB0010841, ALX-0061, ALX0761, ALX0141; ВП034020, AFM13, AFM11, SAR156597, FBTA05, PF06671008, GSK2434735, MEDI3902, MEDI0700, MEDI7352, а также молекулы или их варианты или аналоги и биоаналоги любого из вышеперечисленных.

Полиспецифические белки также включают триспецифические антитела, тетравалентные биспецифические антитела, полиспецифические белки без компонентов антител, такие как диа-, триа- или тетра- тела, минитела и одноцепочечные белки, способные к связыванию нескольких мишеней. Coloma, M.J., et al., *Nature Biotech.* 15 (1997) 159-163.

В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес полиспецифические белки связываются, нейтрализуют и/или специфически взаимодействуют с одним или несколькими белками CD, белками семейства рецепторов HER, молекулами клеточной адгезии, факторами роста, факторами роста нервов, факторами роста фибробластов, трансформирующими факторами роста (TGF), инсулиноподобными факторами роста, остеоиндуктивными факторами, инсулином и родственными инсулину белками, белками коагуляции и связанными с коагуляцией белками, колониестимулирующими факторами (CSF), другими белками крови и сыворотки крови, антигенами групп крови; рецепторами, рецептор-ассоциированными белками, гормонами роста, рецепторами гормонов роста, T-клеточными рецепторами; нейротрофическими факторами, нейротрофинами, релаксинами, интерферонами, интерлейкинами, вирусными антигенами, липопротеинами, интегринами, ревматоидными факторами, иммунотоксинами, поверхностными мембранными белками, транспортными белками, "хоминг"-рецепторами, адрессинами, регуляторными белками и иммуноадгезинами.

В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес полиспецифические белки связываются, нейтрализуют и/или взаимодействуют с одним или несколькими из следующего, по отдельности или в любой комбинации: белками CD, в том числе, но без ограничения, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD70, CD123, CD133, CD138, CD171 и CD174, белками семейства рецепторов HER, в том числе, например, HER2, HER3, HER4 и рецептором EGF, EGFRvIII, молекулами клеточной адгезии, например, LFA-1, Mol, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM и интегрином альфа-v/бета 3, факторами роста, в том числе без ограничения, например, фактором роста эндотелия сосудов ("VEGF"); VEGFR2, гормоном роста, тиреостимулирующим гормоном, фолликулостимулирующим гормоном, лютеинизирующим гормоном, рилизинг-фактором гормона роста, парати-

реидным гормоном, мюллеровым ингибирующим фактором, воспалительным белком макрофагов человека (MIP-1-альфа), эритропоэтином (EPO), фактором роста нервов, таким как NGF-бета, фактором роста тромбоцитов (PDGF), фактором роста фибробластов, в том числе, например, aFGF и bFGF, эпидермальным фактором роста (EGF), Crip1, трансформирующими факторами роста (TGF), в том числе, помимо прочего, TGF- α и TGF- β , в том числе TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 или TGF- β 5, инсулиноподобными факторами роста-I и -II (IGF-I и IGF-II), дез(1-3)-IGF-I (IGF-I головного мозга) и остеоиндуктивными факторами, инсулинами и родственными инсулину белками, в том числе ограничения инсулином, А-цепью инсулина, В-цепью инсулина, проинсулином и белками, связывающими инсулиноподобные факторы роста; белками коагуляции и связанными с коагуляцией белками, такими как, среди прочего, фактор VIII, тканевой фактор, фактор фон Виллебранда, белок С, альфа-1-антитрипсин, активаторы плазминогена, такие как урокиназа и тканевый активатор плазминогена ("t-PA"), бомбазин, тромбин, тромбозитин и рецептор тромбозитина, колониестимулирующими факторами (CSF), в том числе следующими, среди прочего, M-CSF, GM-CSF и G-CSF, другими белками крови и сыворотки крови, в том числе без ограничения альбумином, IgE и антигенами групп крови, рецепторами и ассоциированными с рецептором белками, в том числе, например, рецептором flk2/flt3, рецептором ожирения (OB), рецепторами гормона роста и Т-клеточными рецепторами; нейротрофическими факторами, в том числе без ограничения нейротрофическим фактором костной ткани (BDNF) и нейротрофином-3, -4, -5 или -6 (NT-3, NT-4, NT-5 или NT-6); А-цепью релаксина, В-цепью релаксина и прорелаксином, интерферонами, в том числе, например, интерфероном-альфа, -бета и -гамма, интерлейкинами (IL), например, IL-1-IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-23, IL-12/IL-23, IL-2Ra, IL1-R1, рецептором IL-6, рецептором IL-4 и/или рецепторами IL-13, IL-13RA2 или рецептором IL-17, IL-1RAP; вирусными антигенами, в том числе без ограничения антигеном оболочки вируса СПИДа, липопротеинами, кальцитонином, глюкагоном, предсердным натрийуретическим фактором, легочным сурфактантом, факторами некроза опухоли альфа и бета, энкефалиназой, BCMA, STEAP1, каппа-цепью Ig, ROR-1, ERBB2, мезотелином, RANTES (белком, регулируемым при активации, экспрессируемым и секретируемым нормальными Т-клетками), мышинным гонадотропин-ассоциированным пептидом, ДНКазой, FR-альфа, ингибином и активином, интегрином, белком А или D, ревматоидными факторами, иммунотоксинами, костным морфогенетическим белком (BMP), супероксиддисмутазой, поверхностными мембранными белками, фактором ускорения распада (DAF), оболочкой вируса СПИДа, транспортными белками, хоминг-рецепторами, MIC (MIC-a, MIC-b), ULBP 1-6, EPCAM, адресинами, регуляторными белками, иммуноадгезинами, антигенсвязывающими белками, соматропином, CTGF, CTLA4, зотаксином-1, MUC1, CEA, с-MET, клаудином-18, GPC-3, EPHA2, FPA, LMP1, MG7, NY-ESO-1, PSCA, ганглиозидом GD2, гланглиозидом GM2, BAFF, OPGL (RANKL), миостатином, Dickkopf-1 (DKK-1), Ang2, NGF, рецептором IGF-1, фактором роста гепатоцитов (HGF), TRAIL-R2, c-Kit, B7RP-1, PSMA, NKG2D-1, белком 1 запрограммированной гибели клеток и лигандом, PD1 и PDL1, маннозным рецептором/hCG β , TNF, TL1A, вирусом гепатита С, конъюгатом мезотелина dsFv[PE38, Legionella pneumophila (ly), IFN-гамма, интерферон-гамма-индуцированным белком 10 (IP10), IFNAR, TALL-1, тимусным стромальным лимфопоэтином (TSLP), пропротеинконвертазой субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9), факторами стволовых клеток, Flt-3, пептидом, связанным с геном кальцитонина (CGRP), OX40L, α 4 β 7, белком, специфичным для тромбоцитов (гликопротеином тромбоцитов Iib/IIIb (PAC-1)), трансформирующим фактором роста бета (TGF β), белком 3 блестящей оболочки, связывающим сперматозоиды (ZP-3), TWEAK, рецептором тромбоцитарного фактора роста альфа (PDGFR α), склеростином и биологически активными фрагментами или вариантами любого из вышеперечисленного.

В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес полиспецифические белки могут включать биспецифические антитела, которые специфически связываются с комбинациями, включающими CD3 и CD19, EPCAM, CEA, PSA, CD33, BCMA, Her2, CD20, Р-кадгерин, CD123, grA33 или B7H3. В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес биспецифические антитела могут включать биспецифические антитела, которые специфически связываются с комбинациями, включающими IL1 α +IL1 β .

Полиспецифические белки могут представлять научный или коммерческий интерес, в частности, являться биспецифическими терапевтическими средствами. Полиспецифические белки можно получать различными способами, чаще всего с помощью линий рекомбинантных клеток животных с применением способов культивирования клеток. Полиспецифические белки могут продуцироваться внутриклеточно или секретироваться в среду для культивирования, из которой их можно извлекать и/или собирать, и они могут обозначаться как "рекомбинантный полиспецифический белок", "рекомбинантное полиспецифическое антитело", "рекомбинантный биспецифический белок" и "рекомбинантное биспецифическое антитело". Термины "выделенный полиспецифический белок", "выделенное рекомбинантное полиспецифическое антитело", "выделенный биспецифический белок" и "выделенное биспецифическое антитело" относятся к полиспецифическому белку, в том числе биспецифическим белкам, которые были очищены от белков, полипептидов, ДНК и/или других контаминантов или примесей, таких как связанные с продуктом примеси, в частности связанные с продуктом примеси с низкой рI, которые могли бы помешать его терапевтическому, диагностическому, профилактическому, исследовательскому или другому приме-

нению. Представляющие интерес полиспецифические белки включают полиспецифические антитела, которые оказывают терапевтический эффект путем связывания двух или более мишеней, в частности, мишеней среди перечисленных ниже, в том числе мишеней, полученных из них, мишеней, связанных с ними, и их модификаций.

Под "очисткой" подразумевают повышение степени чистоты полиспецифического белка в композиции путем удаления (частично или полностью) по меньшей мере одной связанной с продуктом примеси из композиции. Извлечение и очистку полиспецифических белков осуществляют путем последующих отдельных операций, в частности, операций, включающих ионообменную хроматографию, приводящих к более "гомогенному" составу полиспецифических белков, отвечающему целевым показателям выхода и качества продукта (таким как снижение содержания связанных с продуктом примесей и повышение качества продукта).

"Связанная с продуктом примесь" относится к связанным с продуктом вариантам представляющего интерес полиспецифического белка. В некоторых случаях эти примеси характеризуются pI ниже, чем у основного продукта в пике элюирования. Связанные с продуктом примеси включают, например, гомодимеры, высокомолекулярные разновидности (HMW), полуантитела, агрегаты, низкомолекулярные разновидности (LMW), фрагменты антител и различные комбинации фрагментов антител, а также неправильные сборки легких цепей, такие как 2XLC, 3XLC или 4XLC. "Полуантитела" относятся к связанной с продуктом примеси, которая может образовываться, например, из-за неполной сборки или нарушения взаимодействия между двумя полипептидами тяжелой цепи. Полуантитела содержат один полипептид легкой цепи и один полипептид тяжелой цепи. "Гомодимеры" относятся к связанной с продуктом примеси, которая, например, может образовываться, когда тяжелая и легкая цепи, характеризующиеся специфичностью в отношении одной и той же мишени, рекомбинируют друг с другом вместо образования пары с образованием необходимого биспецифического гетеродимера. Как правило, это происходит в ходе экспрессии в клетке-хозяине. В случае полиспецифических конструкций, для которых требуется, чтобы несколько цепей (таких как легкие цепи, LC) правильно образовывали пары с помощью сконструированных остатков (таких как заряженные парные мутации, выступ-во-впадину и т.д.), все еще возможно присутствие примесей, если имеется ошибочное спаривание между LC и HC, при этом LC1 вместо образования пары с HC1 образует неправильную пару с HC2 ($2 \times LC1$) и наоборот ($2 \times LC2$). Если полиспецифический белок является бивалентным, имеющим два сайта для связывания с каждым представляющим интерес антигеном, возможно присутствие 3X LC1, 4X LC1 и других комбинаций разновидностей с неправильным спариванием.

Как раскрыто в данном документе, pI связанных с продуктом примесей может быть ниже, чем pI необходимого полиспецифического белка, и при этом они элюируются с основным продуктом. Связанные с продуктом примеси, характеризующиеся более низкой pI , элюируются перед основным продуктом в виде преиков. "Изоэлектрическая точка" или " pI " белка относится к pH , при котором положительный заряд уравнивает отрицательный заряд белка, pI можно рассчитать/определить с применением известных способов, таких как на основе суммарного заряда аминокислотных остатков белка или путем изоэлектрического фокусирования. В одном варианте осуществления разница между pI связанной с продуктом примеси и основного продукта составляет по меньшей мере 0,5 единицы pI . В другом варианте осуществления разница составляет от 0,5 до 3 единиц pI . В другом варианте осуществления разница составляет от 0,5 до 2 единиц pI . В другом варианте осуществления разница составляет от 0,5 до 1 единиц pI . В другом варианте осуществления разница составляет от 1 до 3 единиц pI . В другом варианте осуществления разница составляет от 2 до 3 единиц pI . В другом варианте осуществления разница составляет по меньшей мере 0,5, 1, 2, 3 или более единиц pI .

В данном документе представлены системы и конструкции экспрессии в форме плазмид, векторов экспрессии, кассет транскрипции или экспрессии, которые содержат один или несколько полинуклеотидов, кодирующих представляющий интерес полиспецифический белок, а также клетки-хозяева, содержащие такие системы или конструкции экспрессии. Используемый в данном документе "вектор" означает любую молекулу или объект (например, нуклеиновую кислоту, плазмиду, бактериофаг, транспозон, космиду, хромосому, вирус, вирусный капсид, вирион, депротенинизированную ДНК, образующую комплекс ДНК и т.п.), которые подходят для применения в переносе и/или транспортировке информации, кодирующей полиспецифический белок, в клетку-хозяина и/или в специфическое местоположение и/или компартмент в пределах клетки-хозяина. Векторы могут включать вирусные и невирусные векторы, непатогенные векторы для клеток млекопитающих. Векторы зачастую называются векторами экспрессии, например рекомбинантными векторами экспрессии и клонирующими векторами. Вектор может быть введен в клетку-хозяина для обеспечения репликации вектора самого по себе, и за счет этого амплификации копий полинуклеотида, содержащегося в нем. Клонированные векторы могут содержать компоненты последовательности, которые обычно включают без ограничения точку начала репликации, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности и селективируемые маркеры. При необходимости такие элементы могут быть выбраны специалистом средней квалификации в данной области техники.

"Клетка" или "клетки" включают любую прокариотическую или эукариотическую клетку. Клетки

могут находиться в условиях либо *ex vivo*, либо *in vitro*, либо *in vivo*, быть либо отдельными, либо частью структуры более высокого уровня организации, такой как ткань или орган. Клетки включают "клеток-хозяев", также называемых "линиями клеток", которые генетически сконструированы для экспрессии полиспецифического белка, представляющего коммерческий или научный интерес. Клетки-хозяева, как правило, получены из линии, происходящей от первичной культуры, которую можно поддерживать в культуре в течение неограниченного времени. Генетическое конструирование клетки-хозяина предусматривает трансфекцию, трансформацию или трансдукцию клеток рекомбинантной полинуклеотидной молекулой и/или иное изменение (например, путем гомологичной рекомбинации и активации гена или слияния рекомбинантной клетки с нерекombинантной клеткой), чтобы заставить клетку-хозяина экспрессировать необходимый рекомбинантный полиспецифический белок. Способы и векторы для генетического конструирования клеток и/или линий клеток для обеспечения экспрессии представляющих интерес полиспецифических белков хорошо известны специалистам в данной области техники.

Клеткой-хозяином может быть любая прокариотическая клетка (например, *E. coli*) или эукариотическая клетка (например, клетки дрожжей, насекомых или животных (например, клетки CHO)). Векторную ДНК можно вводить в прокариотические или эукариотические клетки с помощью общепринятых методик трансформации или трансфекции.

При культивировании в соответствующих условиях клетки-хозяева экспрессируют представляющий интерес полиспецифический белок, который впоследствии можно собирать из среды для культивирования (если клетка-хозяин секретирует его в среду) или непосредственно из клетки-хозяина, продуцирующей его (если он не секретируется). Выбор соответствующей клетки-хозяина будет зависеть от различных факторов, таких как требуемые уровни экспрессии, модификации белка, которые требуются или необходимы для активности (такие как гликозилирование или фосфорилирование), и простота осуществления фолдинга в биологически активную молекулу.

Под "культурой" или "культивированием" подразумевают рост и размножение клеток за пределами многоклеточного организма или ткани. Подходящие условия культивирования для клеток млекопитающих известны в данной области техники. Среда для культивирования клеток и среда для культивирования тканей используются взаимозаменяемо для обозначения сред, подходящих для выращивания клетки-хозяина в ходе культивирования клеток *in vitro*. Как правило, среда для культивирования клеток содержит буфер, соли, источник энергии, аминокислоты, витамины и необходимые микроэлементы. Можно применять любые среды, способные поддерживать рост соответствующей клетки-хозяина в культуре. Среда для культивирования клеток, которые помимо этого могут быть дополнены другими компонентами для максимального увеличения роста клеток, жизнеспособности клеток и/или продуцирования рекомбинантного белка в конкретной культивируемой клетке-хозяине, коммерчески доступны и включают, среди прочего, среду RPMI-1640, среду RPMI-1641, модифицированную по Дульбекко среду Игла (DMEM), минимально обогащенную среду Игла, среду F-12K, среду Хэма F12, модифицированную по Искову среду Дульбекко, среду МакКоя 5A, среду Лейбовица L-15, а также бессывороточные среды, такие как среды серии EX-CELL™ 300, которые можно приобрести у Американской коллекции типовых культур или SAFC Biosciences, а также у других поставщиков. Среда для культивирования клеток представляющая собой бессывороточные среды, безбелковые среды, среды, не содержащие факторов роста, и/или среды, не содержащие пептон. Культуру клеток также можно обогащать путем добавления питательных веществ, и при этом их можно применять в концентрациях, превышающих обычные рекомендуемые концентрации.

Во время жизненного цикла культуры можно применять различные составы сред, например, для облегчения перехода от одной стадии (например, стадии или фазы роста) к другой (например, стадии или фазе продуцирования) и/или для оптимизации условий в ходе культивирования клеток (например, во время перфузионного культивирования обеспечивается концентрированная среда). Состав ростовой среды можно применять для содействия росту клеток и сведения к минимуму экспрессии белка. Состав среды для продуцирования можно применять для содействия продуцированию представляющего интерес белка и поддержания клеток при минимальном росте новых клеток. Питательную среду, как правило среду, содержащую более концентрированные компоненты, такие как питательные вещества и аминокислоты, которые потребляются в ходе фазы продуцирования при культивировании клеток, можно применять для дополнения и поддержания активной культуры, в частности культуры, эксплуатируемой в режиме подпитки, полуперфузионном или перфузионном режиме. Такая концентрированная питательная среда может содержать большинство компонентов среды для культивирования клеток в количестве, составляющем, например, приблизительно 5×, 6×, 7×, 8×, 9×, 10×, 12×, 14×, 16×, 20×, 30×, 50×, 100×, 200×, 400×, 600×, 800× или даже приблизительно 1000× от их нормального количества.

Ростовая фаза может происходить при более высокой температуре, чем фаза продуцирования. Например, ростовая фаза может происходить при первой температуре, составляющей от приблизительно 35°C до приблизительно 38°C, а фаза продуцирования может происходить при второй температуре, составляющей от приблизительно 29°C до приблизительно 37°C, необязательно от приблизительно 30°C до приблизительно 36°C или от приблизительно 30°C до приблизительно 34°C. В дополнение химические

индукторы продуцирования белка, такие как, например, кофеин, бутират и гексаметилен-бисацетамид (НМВА), можно добавлять одновременно, до и/или после изменения температуры. Если индукторы добавляются после изменения температуры, их можно добавлять через промежуток времени, составляющий от одного часа до пяти дней после изменения температуры, необязательно от одного до двух дней после изменения температуры.

Клетки-хозяева можно культивировать в суспензии или в адгезивной форме, прикрепленными к твердому субстрату. Культуры клеток можно создавать в биореакторах с псевдооживленным слоем, волоконных биореакторах, роллерных флаконах, встряхиваемых колбах или резервуарах биореакторов с перемешиванием, содержащих или не содержащих микроносители.

Культуры клеток можно эксплуатировать в периодическом режиме, в режиме подпитки, в непрерывном, полунепрерывном или перфузионном режиме. Клетки млекопитающих, такие как клетки CHO, можно культивировать в биореакторах при более мелком масштабе, составляющем от менее 100 мл до менее 1000 мл. В качестве альтернативы можно применять биореакторы более крупного масштаба, которые содержат от 1000 мл до более 20000 л среды. Крупномасштабные культуры клеток, как, например, для биопроизводства белковых терапевтических средств в клиническом и/или коммерческом масштабе, можно поддерживать в течение недель и даже месяцев, пока клетки продуцируют необходимый(-ые) белок (белки).

Поскольку связанные с продуктом примеси, например, гомодимеры, полуантитела и т.п., могут быть похожими на необходимый полиспецифический белок, были разработаны стратегии и методики, такие как "выступ-во-впадину", CrossMab, DVD IgG и другие, для повышения селективности в отношении необходимого полиспецифического белка в ходе культивирования клеток. Однако все еще будет оставаться часть связанных с продуктом примесей, которые продуцируются и которые должны быть удалены в ходе последующей обработки.

Затем полученный экспрессированный рекомбинантный полиспецифический белок можно собрать из среды для культивирования клеток. Способы сбора белков из суспензионных клеток известны в данной области техники и включают без ограничения кислотное осаждение, ускоренное осаждение, такое как флокуляция, разделение под действием силы тяжести, центрифугирование, разделение акустическими волнами, фильтрацию, в том числе мембранную фильтрацию с применением ультрафильтров, микрофильтров, фильтров с тангенциальным потоком, фильтров с переменным тангенциальным потоком, глубинных фильтров и фильтров для намывной фильтрации. Рекомбинантные белки, экспрессируемые прокариотами, восстанавливают из телец включения в цитоплазме за счет процессов окислительно-восстановительного фолдинга, известных в данной области техники.

Затем собранный полиспецифический белок можно очищать или частично очищать от любых примесей, таких как оставшаяся среда для культивирования клеток, клеточные экстракты, нежелательные компоненты, белки клетки-хозяина, неправильно экспрессированные белки, связанные с продуктом примеси и т.п., задействовав одну или несколько последующих отдельных операций.

Очистку полиспецифического белка из собранной от культуры клеток жидкости можно начинать с помощью хроматографии на основе захвата. В хроматографии на основе захвата применяются среды, такие как смолы, мембраны, гели и т.п., которые будут связываться с представляющим интерес рекомбинантным полиспецифическим белком, например, в аффинной хроматографии, эксклюзионной хроматографии, ионообменной хроматографии, хроматографии гидрофобных взаимодействий (HIC), аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металла (IMAC) и т.п. Такие материалы известны в данной области техники и являются коммерчески доступными. Варианты аффинной хроматографии могут включать, например, механизм захвата на основе связывания с субстратом, механизм захвата на основе связывания с аптамером или механизм захвата на основе связывания с кофактором. Для полиспецифических белков, содержащих Fc-компонент, можно применять механизм захвата на основе связывания с антителом или фрагментом антитела, такой как белок A, белок G, белок A/G и белок L. Представляющий интерес рекомбинантный белок можно пометить полигистидиновой меткой или эпитопом, таким как FLAG®, а впоследствии очищать с применением специфического антитела, нацеленного на такой эпитоп.

В любой момент последующей обработки можно выполнять вирусную инактивацию и/или фильтрацию для удаления вирусного вещества из композиции, содержащей представляющий интерес полиспецифический белок. Одним способом для достижения вирусной инактивации является инкубация при низком pH или других приемлемых условиях раствора для достижения инактивации вирусов. После вирусной инактивации при низком pH может следовать операция нейтрализации, при которой раствор с инактивированными вирусами повторно доводят до pH, более совместимого с требованиями следующих отдельных операций. Как правило нейтрализация происходит при pH 5-7. Пулы, прошедшие вирусную инактивацию или вирусную инактивацию с последующей нейтрализацией, также можно подвергать фильтрации, такой как глубинная фильтрация, для удаления любого образовавшегося помутнения или осадка. Вирусную фильтрацию можно выполнять с помощью микро- или нанофильтров, таких как доступные от Asahi Kasei (Plavona®) и EDM Millipore (VPro®).

Термин "тонкая очистка" применяется в данном документе в отношении одной или нескольких стадий хроматографии, выполняемых для удаления оставшихся контаминантов и примесей, таких как ДНК, белки клетки-хозяина; специфические для продукта примеси, варианты продуктов и агрегаты, и адсорбции вирусов из жидкой композиции, содержащей рекомбинантный полиспецифический белок, который близок к необходимой конечной степени чистоты. Например, тонкую очистку можно выполнять в режиме связывания и элюирования путем пропускания жидкости, содержащей рекомбинантный полиспецифический белок, через хроматографическую(-ие) колонку(-и) или мембранный(-ые) адсорбер(-ы), которые селективно связываются либо с целевым рекомбинантным полиспецифическим белком, либо с контаминантами или примесями, присутствующими в жидкой композиции. В таком примере элюат/фильтрат из хроматографической(-их) колонки (колонок) или мембранного(-ых) адсорбера(-ов) содержит рекомбинантный полиспецифический белок.

В хроматографии, обеспечивающей тонкую очистку, применяется среда, такая как смолы и/или мембраны, содержащие средства, которые можно применять либо в проточном режиме (если полиспецифический белок протекает через смолу/мембрану и содержится в протекающем элюенте, а контаминанты и примеси связываются с хроматографической средой), режиме фронтальной или перегруженной хроматографии (если раствор, содержащий представляющий интерес белок загружают в колонку до тех пор, пока не будут заняты сайты адсорбции и разновидность с наименьшей аффинностью к неподвижной фазе (представляющий интерес белок) начинает элюироваться) или режиме связывания и элюирования (если представляющий интерес белок связывается с хроматографической средой и элюируется после того, как контаминанты и примеси протекли через хроматографическую среду или были вымыты из нее). Примеры таких операций хроматографии включают ионообменную хроматографию (IEX), в том числе анионообменную хроматографию (АЕХ) и/или катионообменную хроматографию (СЕХ); хроматографию гидрофобных взаимодействий (НІС); хроматографию со смешанным режимом или мультимодальную хроматографию (ММ), хроматографию с гидроксипатитом (НА); обращенно-фазовую хроматографию, эксклюзионную хроматографию (SEC) и гель-фильтрацию. В одном варианте осуществления способ хроматографии представляет собой катионообменную хроматографию. В одном варианте осуществления катионообменная среда представляет собой смолу.

"Катионообменная хроматография" относится к хроматографии, выполняемой на твердофазной среде, которая отрицательно заряжена и имеет свободные катионы для обмена с катионами в водном растворе, пропускаемом над твердой фазой или через нее. Заряд может быть обеспечен путем прикрепления одного или нескольких заряженных лигандов к твердой фазе, например, с помощью образования ковалентной связи. В качестве альтернативы или в дополнение заряд может быть внутренним свойством твердой фазы (например, как в случае кремнезема, который характеризуется общим отрицательным зарядом). Существуют коммерчески доступные катионообменные среды, и они включают без ограничения, среди прочего, сульфопропил (SP), иммобилизованный на агарозе (например, SP-SEPHAROSE FAST FLOW™, SP-SEPHAROSE FAST FLOW XL™ или SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™ от GE Healthcare), CAPTO S™, CAPTO SP ImpRes™, CAPTO S ImpAct™ (GE Healthcare), FRACTOGEL-SO3™, FRACTOGEL-SE HICAP™, FRACTOPREP™ (EMD Merck), Fractogel® EMD SO3-(M), Fractogel® EMD SE Hicap (M), Eshmuno® CPX, смолы Eshmuno® S, Fractogel® EMD COO-(M), Mustang S Acrodisc с Mustang S AcroPrep с Mustang S, CM Ceramic HyperD® F AcroSep с CM Ceramic HyperD® F.

В способе по настоящему изобретению катионообменную хроматографию выполняют в режиме связывания и элюирования. Полиспецифический белок в элюате или пула хранения из предыдущей стадии последующей обработки загружают в катионообменную среду, так что представляющий интерес полиспецифический белок связывается с катионообменной средой. Под "связыванием" полиспецифический белок в соответствующих условиях (рН/электропроводность), так что полиспецифический белок обратимо иммобилизуется в катионообменной среде или на ней за счет ионных взаимодействий между представляющим интерес полиспецифическим белком и заряженной группой или заряженными группами катионообменной среды. Элюат или пул могут поступать из предыдущей отдельной операции, такой как аффинная хроматография, вирусная инактивации при низком рН с последующей нейтрализацией, глубинная фильтрация или операция сбора и/или хроматографии, обеспечивающей тонкую очистку. К элюату или пулу можно добавлять дополнительный буфер, чтобы конечная загрузка полиспецифического белка соответствовала необходимой концентрации.

Затем загруженную среду для катионообменной хроматографии подвергают по меньшей мере одной стадии промывки. Промывка катионообменной среды означает пропускание соответствующего буфера для промывки через катионообменную среду или над ней. Функция буфера для промывки заключается в удалении одного или нескольких контаминантов из катионообменной среды без существенного элюирования представляющего интерес полиспецифического белка. Под "буфером" подразумевают раствор, который противостоит изменениям рН за счет действия его компонентов, являющихся конъюгатами кислоты-основания. В одном варианте осуществления буфер представляет собой ацетат. В одном варианте осуществления обеспечивается 100 мМ ацетата. В одном варианте рН буфера для

промывки находится в диапазоне от $5,0 \pm 0,05\%$ до $5,0 \pm 0,1\%$. В одном варианте pH буфера для промывки находится в диапазоне от 4,9 до 5,1. В одном варианте осуществления pH буфера для промывки составляет 4,9, 5,0 или 5,1. В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, pH 5,0. Для стабильного удаления связанных с продуктом примесей буферы для промывки могут характеризоваться pH на 0,05-0,1 единиц выше и ниже с различной проводимостью.

По меньшей мере один буфер для промывки также содержит соль. В одном варианте осуществления соль представляет собой хлорид натрия. В одном варианте осуществления концентрация хлорида натрия в буфере для промывки составляет от 0 мМ до 147 мМ. В одном варианте осуществления концентрация хлорида натрия в буфере для промывки составляет от 70 мМ до 147 мМ. В одном варианте осуществления концентрация хлорида натрия в буфере для промывки составляет от 100 мМ до 147 мМ. В одном варианте осуществления концентрация хлорида натрия в буфере для промывки составляет от 100 мМ до 125 мМ. В одном варианте осуществления концентрация хлорида натрия в буфере для промывки составляет от 100 мМ до 105 мМ. В одном варианте осуществления концентрация хлорида натрия в буфере для промывки составляет от 105 мМ до 147 мМ. В одном варианте осуществления концентрация хлорида натрия в буфере для промывки составляет от 105 мМ до 125 мМ. В одном варианте осуществления концентрация хлорида натрия в буфере для промывки составляет от 125 мМ до 147 мМ. В одном варианте осуществления концентрация хлорида натрия в буфере для промывки составляет 0 мМ. В одном варианте осуществления концентрация хлорида натрия в буфере для промывки составляет 70 мМ. В одном варианте осуществления концентрация хлорида натрия в буфере для промывки составляет 100 мМ. В одном варианте осуществления концентрация хлорида натрия в буфере для промывки составляет 105 мМ. В одном варианте осуществления концентрация хлорида натрия в буфере для промывки составляет 125 мМ. В одном варианте осуществления концентрация хлорида натрия в буфере для промывки составляет 147 мМ.

На стадии промывки катионообменную среду промывают после загрузки и перед элюированием представляющего интерес полиспецифического белка. В настоящем изобретении представлена по меньшей мере одна стадия промывки, предусматривающая буфер для промывки с высокой концентрацией соли. Обнаружили, что буфер для промывки с высоким содержанием соли вымывает или элюирует связанные с продуктом примеси с низкой pI из катионообменной среды перед элюированием основного продукта. В дополнение к стадии промывки с высоким содержанием соли может быть одна или несколько дополнительных стадий промывки, в которых применяются буферы, не содержащие соли, и/или буферы, содержащие соль при более низкой концентрации по сравнению с буфером для промывки с высоким содержанием соли. Предпочтительно в конце последней стадии промывки перед началом элюирования исходный уровень UV-спектра возвращался к нулю или был очень близок к нему. В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения имеется по меньшей мере две стадии промывки. В одном варианте осуществления имеется "первый буфер для промывки" и "второй буфер для промывки". В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения имеется по меньшей мере три стадии промывки. В одном варианте осуществления имеется "первый буфер для промывки", "второй буфер для промывки" и "третий буфер для промывки". Термины "первая промывка", "вторая промывка" и/или "третья промывка" не следует интерпретировать как исключаящие применение одной или нескольких дополнительных промывок или других буферов между одной или несколькими стадиями промывки. Буфер для промывки применяют для промывки или повторного уравнивания катионообменного материала перед элюированием представляющего интерес полиспецифического белка. Один или несколько составов буфера для промывки могут быть такими же, как составы буфера для уравнивания и/или конечного кондиционирования загрузки.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения первая промывка содержит буфер для промывки, содержащий ацетат, от pH $5,0 \pm 0,5$ до pH $5,0 \pm 0,1\%$. В одном варианте осуществления настоящего изобретения первый буфер для промывки содержит ацетат при pH от 4,9 до 5,1. В одном варианте осуществления настоящего изобретения первый буфер для промывки содержит ацетат при pH 4,9, 5,0 или 5,1. В одном варианте осуществления настоящего изобретения первый буфер для промывки содержит ацетат при pH 5,0. В одном варианте осуществления настоящего изобретения первый буфер для промывки содержит 100 мМ ацетата. В одном варианте осуществления настоящего изобретения первый буфер для промывки содержит 100 мМ ацетата, pH 5,0. В одном варианте осуществления настоящего изобретения первый буфер для промывки содержит ацетат, 0-147 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления настоящего изобретения первая промывка содержит буфер для промывки, содержащий 100 мМ ацетата, 0 мМ хлорида натрия, от pH $5,0 \pm 0,5$ до pH $5,0 \pm 0,1\%$.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения вторая промывка содержит буфер для промывки, содержащий ацетат, от pH $5,0 \pm 0,5$ до pH $5,0 \pm 0,1\%$. В одном варианте осуществления настоящего изобретения второй буфер для промывки содержит ацетат при pH от 4,9 до 5,1. В одном варианте осуществления настоящего изобретения второй буфер для промывки содержит ацетат при pH 4,9, 5,0 или 5,1. В одном варианте осуществления настоящего изобретения второй буфер для промывки содержит

хлорида натрия; второй буфер для промывки выбран из 100 мМ ацетата, 100 мМ хлорида натрия и 100 мМ ацетата, 105 мМ хлорида натрия; и третий буфер для промывки составляет 100 мМ ацетата, 0 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления первый буфер для промывки составляет 100 мМ ацетата, 0 мМ хлорида натрия; второй буфер для промывки составляет 100 мМ ацетата, 147 мМ хлорида натрия, и третий буфер для промывки составляет 100 мМ ацетата, 70 мМ хлорида натрия.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в катионообменную среду загружают по меньшей мере 10 г/л полиспецифического белка. В одном варианте осуществления настоящего изобретения в катионообменную среду загружают от 10 г/л до 40 г/л полиспецифического белка. В связанном варианте осуществления настоящего изобретения в катионообменную среду загружают от 15 г/л до 40 г/л полиспецифического белка. В связанном варианте осуществления настоящего изобретения в катионообменную среду загружают от 20 г/л до 40 г/л полиспецифического белка. В связанном варианте осуществления настоящего изобретения в катионообменную среду загружают от 25 г/л до 40 г/л полиспецифического белка. В связанном варианте осуществления настоящего изобретения в катионообменную среду загружают от 35 г/л до 40 г/л полиспецифического белка. В связанном варианте осуществления настоящего изобретения в катионообменную среду загружают от 15 г/л до 35 г/л полиспецифического белка. В связанном варианте осуществления настоящего изобретения в катионообменную среду загружают от 15 г/л до 25 г/л полиспецифического белка. В одном варианте осуществления в катионообменную среду загружают от 15 г/л до 20 г/л полиспецифического белка. В связанном варианте осуществления настоящего изобретения в катионообменную среду загружают от 15 г/л до 35 г/л полиспецифического белка. В связанном варианте осуществления настоящего изобретения в катионообменную среду загружают от 20 г/л до 35 г/л полиспецифического белка. В связанном варианте осуществления настоящего изобретения в катионообменную среду загружают от 20 г/л до 30 г/л полиспецифического белка. В связанном варианте осуществления настоящего изобретения в катионообменную среду загружают от 20 г/л до 25 г/л полиспецифического белка. В связанном варианте осуществления настоящего изобретения в катионообменную среду загружают от 25 г/л до 35 г/л полиспецифического белка. В связанном варианте осуществления настоящего изобретения в катионообменную среду загружают от 25 г/л до 30 г/л полиспецифического белка.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено, что в катионообменную среду загружают 10 г/л полиспецифического белка, промывают по меньшей мере одним буфером для промывки, содержащим 105 мМ хлорида натрия, и элюируют в солевом градиенте при 8 мМ/СV.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено, что в катионообменную среду загружают от 15 г/л до 30 г/л полиспецифического белка и промывают по меньшей мере одним буфером для промывки, содержащим 147 мМ хлорида натрия.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в катионообменную среду загружают от 25 г/л до 40 г/л полиспецифического белка, при этом по меньшей мере один буфер для промывки и один буфер для элюирования содержат 125 мМ хлорида натрия.

Затем связавшийся полиспецифический белок элюируют из твердой фазы среды для катионообменной хроматографии. Полиспецифический белок можно элюировать посредством градиента. Градиент может представлять собой линейный или ступенчатый градиент. Градиент может представлять собой солевой градиент. Градиент может представлять собой линейный солевой градиент или ступенчатый солевой градиент. В случае солевого градиента концентрация соли (ионная сила) изменяется со временем в ходе градиента. Для нарушения связывания полиспецифического белка и высвобождения его в элюат необходима надлежащая концентрация соли. Примеры солей, которые можно применять, включают хлорид натрия, хлорид калия и ацетат.

Далее элюат катионообменной хроматографии можно подвергать последующим отдельным операциям очистки с хроматографией, обеспечивающей тонкую очистку. В одном варианте осуществления после катионообменной хроматографии представляющий интерес полиспецифический белок наносят на среду для хроматографии, обеспечивающей тонкую очистку, в проточном режиме.

После операций с хроматографией, обеспечивающей тонкую очистку, концентрирование очищенного полиспецифического белка и замена буфера на необходимый буфер для состава, предназначенный для хранения лекарственного вещества в нерасфасованном виде, могут быть выполнены с помощью операции ультрафильтрации и диализа.

Для содействия принятию более взвешенных решений, касающихся производительности каждой стадии в ходе производства, можно измерять критические показатели и параметры производительности очищенного полиспецифического белка. Эти критические показатели и параметры можно отслеживать в режиме реального времени, почти в режиме реального времени и/или постфактум. В ходе культивирования клеток можно измерять ключевые критические показатели, такие как компоненты среды, которые потребляются (например, глюкоза), уровни накапливаемых побочных продуктов метаболизма (таких как лактат и аммоний), а также показатели, связанные с поддержанием и выживанием клеток, такие как содержание растворенного кислорода. В ходе соответствующих стадий производственного процесса можно отслеживать критические показатели, такие как удельная продуктивность, плотность жизнеспособных клеток, pH, осмоляльность, внешний вид, цвет, агрегация, процент выхода и титр. Отслеживание и изме-

рения можно проводить с применением известных методик и коммерчески доступного оборудования.

Фармацевтические композиции (растворы, суспензии и т.п.) могут включать одно или несколько из следующего: буферы, такие как нейтральный забуференный солевой раствор, забуференный фосфатом солевой раствор и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие средства, такие как EDTA или глутатион; адьюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты; стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический солевой раствор, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, которые могут служить в качестве растворителя или суспендирующей среды, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства, регулирующие тоничность, такие как хлорид натрия или декстроза. Препарат для парентерального введения можно заключать в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы с несколькими дозами, выполненные из стекла или пластика.

Хотя терминология, применяемая в данном изобретении, является стандартной в пределах области техники, в данном документе представлены определения некоторых терминов для обеспечения ясности и определенности смысла пунктов формулы изобретения. Единицы измерения, префиксы и символы могут быть обозначены в их форме, принятой в системе СИ. Упомянутые в данном документе числовые диапазоны включают числа, определяющие границы диапазона, и включают и поддерживают каждое целое число в пределах заданного диапазона. Способы и методики, описанные в данном документе, обычно выполняют в соответствии с общепринятыми способами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более специализированных литературных источниках, которые цитируются и обсуждаются на протяжении всей настоящей заявки, если не указано иное. См., например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), и Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Все документы или части документов, цитируемые в данной заявке, включая без ограничения патенты, заявки на патенты, статьи, книги и трактаты, настоящим явно включены посредством ссылки.

Настоящее изобретение не должно ограничиваться по объему конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе, которые подразумеваются в качестве отдельных иллюстраций индивидуальных аспектов настоящего изобретения, и функционально эквивалентные способы и компоненты находятся в пределах объема настоящего изобретения. Описываемое в варианте осуществления настоящего изобретения можно объединять с другими вариантами осуществления настоящего изобретения. Безусловно, специалистам в данной области техники из предшествующего описания и сопровождающих графических материалов станут очевидны различные модификации настоящего изобретения в дополнение к показанным и описанным в данном документе. Предусмотрено, что такие модификации попадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

Следующие примеры, в том числе проведенные эксперименты и достигнутые результаты, представлены только для иллюстративных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие объем прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

Пример 1. Однократная промывка без соли, биспецифическая молекула № 1.

Пул после прохождения очистки на белке А и нейтрализации, содержащий полностью человеческий биспецифический сконструированный иммуноглобулин (биспецифическая молекула № 1) в ацетатном буфере, загружали на смолу для катионообменной хроматографии Capto-SP ImpRes® (GE Healthcare Bio-Science, Мальборо, Массачусетс, США) при условиях, отмеченных в табл. 1.

Таблица 1

Условия для катионообменной хроматографии с применением промывки с низким содержанием соли

Биспецифическая молекула № 1	
Размер колонки и скорость	20±2 см, 180 см/ч ± 10%
Концентрация, г/л	20
Предварительное уравнивание	500 мМ ацетата, 1,75 М хлорида натрия, pH 4,9
Уравнивание	100 мМ ацетата, pH 5,0
Промывка 1	100 мМ ацетата, pH 5,0, CV 2,0
Буфер для элюирования А	100 мМ ацетата, pH 5,0
Буфер для элюирования В	100 мМ ацетата, 500 мМ хлорида натрия, pH 5,0
Градиент элюирования в начале, %В	0
Градиент элюирования в конце, %В	100
Продолжительность градиента элюирования, CV	31,25
Солевой градиент элюирования, мМ/CV	16,0
Объемы колонок CV	17,5
Выход	70%
Примеси в извлеченном элюате	Всю стадию элюирования собирали по фракциям. В лучших фракциях было 0,9% HMW, 0% NCG.

На фиг. 1 показаны три пика в профиле элюирования, указывающие на то, что в колонке остались многочисленные примеси, и они элюировались с основным продуктом. Эти примеси включали гомодимер, NCG (несогласованное гликозилирование) и высокомолекулярные разновидности (HMW).

Пример 2. Промывки с высоким содержанием соли, биспецифическая молекула № 1.

Пул после прохождения вирусной инактивации и нейтрализации, содержащий биспецифическую молекулу № 1 в ацетатном буфере, загружали на смолу для катионообменной хроматографии Capto-SP ImpRes® в условиях, описанных в табл. 2.

Условия для катионообменной хроматографии с применением промывок с высоким содержанием соли

	Биспецифическая молекула № 1
Размер колонки и скорость	20±2 см, линейная скорость 180 см/ч
Концентрация	30 г/л
Предварительное уравнивание	500 мМ ацетата, 1,75 М хлорида натрия, pH 4,9
Уравнивание	100 мМ ацетата, pH 5,0
Промывка 1	100 мМ ацетата, pH 5,0
Промывка 2	100 мМ ацетата, 147 мМ хлорида натрия, pH 5,0, CV 2,5
Промывка 3	100 мМ ацетата, 70 мМ хлорида натрия, pH 5,0
Буфер для элюирования А	100 мМ ацетата, pH 5,00
Буфер для элюирования В	100 мМ ацетата, 350 мМ хлорида натрия, pH 5,0
Градиент элюирования в начале, %В	20
Градиент элюирования в конце, %В	100
Продолжительность градиента элюирования, CV	17,5
Солевой градиент элюирования, мМ/CV	16,0
Объемы колонок CV	17,5
Выход	70%
Примеси в извлеченном элюате	1,6% HMW 0,5% NCG

Обнаружили, что при добавлении промывки с высоким содержанием соли примеси с более низкой pI , которые ранее удалялись в элюате при элюировании, теперь удалялись из смолы при промывке перед элюированием. На фиг. 2 показано, что добавление промывки с высоким содержанием соли приводило к уменьшению числа пиков примесей в профиле элюирования от трех пиков до одного пика. Большинство примесей удалялись между второй и третьей стадиями промывки, при этом удалялось $\geq 68\%$ NCG и $\geq 80\%$ гомодимера. Гомодимеры и NCG преимущественно удалялись из смолы в ходе второй промывки или минимальное количество оставалось связавшимся со смолой. Третья стадия промывки обеспечивала восстановление исходного уровня UV-спектра до нуля перед началом элюирования, уплотняя профиль элюирования, что приводило к гораздо более эффективному сбору и лучшему качеству основного продукта. Добавление стадии промывки с высоким содержанием соли оптимизировало очистку, сделав ее более стабильным и удобным для производства процессом, что снизило результаты, не соответствующие техническим требованиям, в отношении качества продукта и сохранило приемлемый выход.

Эти условия были эффективны при концентрациях загрузки 15-30 г/л, биспецифическая молекула № 1.

Кроме того, тестировали буферы для промывки на 0,05 единицы pH выше и ниже pH 5,0 (pH 4,95-

5,05) и обнаружили, что они эффективны в удалении связанных с продуктом примесей с низкой рI, что согласуется с приведенными выше результатами.

Обнаружили, что применение 2,5 объема колонки второго буфера для промывки было достаточным для вымывания/элюирования связанных с продуктом примесей из катионообменной среды. Меньшие объемы колонки были не столь эффективны в удалении связанных с продуктом примесей, а применение более 2,5 объема колонки приводило к элюированию основного продукта.

Пример 3. Однократная промывка без соли, биспецифическая молекула № 2.

Пул элюатов после прохождения очистки на белке А и нейтрализации (100 мМ ацетата, рН 5,0), содержащий сконструированное полностью человеческое биспецифическое гетеро-IgG антитело (биспецифическая молекула № 2), загружали на смолу для катионообменной хроматографии Capto-SP ImpREs® (GE Healthcare Bio-Science, Мальборо, Массачусетс, США) в условиях, указанных в табл. 3.

Таблица 3

Условия для катионообменной хроматографии в условиях промывки с низким содержанием соли

	Биспецифическая молекула № 2
Размер колонки и скорость	4,66 мл, линейная скорость 140% (см/ч)
Концентрация Уровень загрузки (г/л)	25
Предварительное уравнивание	500 мМ ацетата, 1,75 М хлорида натрия, рН 4,9
Уравнивание	100 мМ ацетата, рН 5,0
Промывка	100 мМ ацетата, рН 5,0
Буфер для элюирования А	100 мМ ацетата, рН 5,0
Буфер для элюирования В	100 мМ ацетата, 500 мМ хлорида натрия, рН 5,0
Градиент элюирования в начале, %В	0
Градиент элюирования в конце, %В	100
Продолжительность градиента элюирования, CV	31
Солевой градиент элюирования, мМ/CV	16
Объемов колонки пула	2,5
Выход (на основе объединенных фракций 7-11)	65%
Примеси в извлеченном элюате (на основе объединенных фракций 7-11)	SE-HPLC HMW (%)=1,5% SE-HPLC LMW (%)=0,9% Полуантитела=0% Соотношение LC1/LC2 в условиях восстановленного CE-SDS=1,40

На фиг. 3 показано, что в колонке оставались многочисленные примеси, и они элюировались с основным продуктом. Эти примеси включали полуантитела (фракции 1, 2, 3, 4 с ~50% полуантител), неправильные сборки 2× легких цепей (фракции 5 и 6 с отношением LC1 к LC2 < 0,4, что указывает на то, что LC2 неправильно собрана с HC1), и высокомолекулярные разновидности (HMW, фракции с 12=21). Хотя разрешение хроматографического разделения было приемлемым с отчетливыми пиками, содержащими примеси, в производственном процессе применялось автоматическое объединение на основе OD; так что необходимо было собирать элюат, начиная с самой высокой OD для пиков, что снижает выход и делает этот процесс недостаточным для применения в производственной операции.

Пример 4. Промывка с высоким содержанием соли, биспецифическая молекула № 2.

Пул элюатов после прохождения очистки на белке А и нейтрализации (100 мМ ацетата, pH 5,0), содержащий биспецифическую молекулу № 2, загружали на смолу для катионообменной хроматографии Capto-SP ImpRES® (GE Healthcare Bio-Science, Мальборо, Массачусетс, США) в условиях, указанных в табл. 4.

Таблица 4

Условия для катионообменной хроматографии в условиях промывки с высоким содержанием соли

	Биспецифическая молекула № 2
Размер колонки и скорость	4,66 мл, линейная скорость 140% (см/ч)
Концентрация Уровень загрузки (г/л)	20
Предварительное уравнивание	500 мМ ацетата, 1,75 М хлорида натрия, pH 4,9
Уравнивание	100 мМ ацетата, pH 5,0
Промывка 1	100 мМ ацетата, pH 5,0
Промывка 2	100 мМ ацетата, 100 мМ хлорида натрия, pH 5,0
Промывка 3	100 мМ ацетата, pH 5,0
Буфер для элюирования А	100 мМ ацетата, pH 5,0
Буфер для элюирования В	100 мМ ацетата, 500 мМ хлорида натрия, pH 5,0
Градиент элюирования в начале, %В	0
Градиент элюирования в конце, %В	100

Продолжительность градиента элюирования, CV	31
Солевой градиент элюирования, мМ/CV	16,0
Объемов колонки пула	3
Выход (на основе объединенных фракций 5-10)	73%
Примеси в извлеченном элюате (соответствует фракциям 5-10)	SE-HPLC HMW (%)=1,4 SE-HPLC LMW (%)=0,6 Полуантитела=0,4% Соотношение LC1/LC2 в условиях восстановленного CD-SDS=0,8

Обнаружили, что при добавлении стадии промывки с высоким содержанием соли (промывка 2 с 100 мМ хлорида натрия) примеси в виде полуантител удалялись из смолы CEX перед элюированием (100% полуантител обнаруживали в собранных промывках 2 и 3). На фиг. 4 показано, что промывка с высоким содержанием соли привела к уменьшению числа пиков в профиле элюирования от четырех пиков до одного пика с небольшим "плечом", которое все еще содержало разновидности с неправильным спариванием $2 \times LC2$ ($LC1/LC2 < 0,11$ по сравнению с ожидаемым соотношением 1, когда LC1 и LC2 правильно собраны с HC1 и HC2 соответственно). Третья стадия промывки также обеспечивала восстановление исходного уровня UV-спектра до нуля перед началом элюирования, уплотняя профиль элюирования, что приводило к гораздо более эффективному сбору и лучшему качеству основного продукта. Эта оптимизированная процедура с промывкой с более высоким содержанием соли подходит для применения на производственном участке. Выход очистки CEX увеличивался с 65% до 73% при надлежащем профиле элюирования для сбора очищенного пула с низкими уровнями полуантител, разновидностей с неправильным спариванием LC2 (о чем свидетельствует отношение LC1 к LC2, близкое к 1), HMW и LMW, и критерии объединения на основании поглощения.

Пример 5. Однократная промывка без соли, биспецифическая молекула № 3.

Пул элюатов после прохождения очистки на белке А и нейтрализации, содержащий полностью человеческий сконструированный слитый белок IgG/Fab (биспецифическая молекула № 3), загружали на смолу для катионообменной хроматографии Capto-SP ImpREs® (GE Healthcare Bio-Science, Мальборо, Массачусетс, США) в условиях, указанных в табл. 5.

Условия для катионообменной хроматографии с высокой плотностью загрузки без кондиционирования с солевой загрузкой

	Биспецифическая молекула № 3
Размер колонки и скорость	4,66 мл Линейная скорость 140 см/ч.
Концентрация Уровень загрузки (мг/мл)	25
Предварительное уравновешивание	500 мМ ацетата, 1,75 М хлорида натрия, pH 4,9
Уравновешивание	100 мМ ацетата, pH 5,0
Промывка	100 мМ ацетата, pH 5,0
Буфер для элюирования А	100 мМ ацетата, pH 5,0
Буфер для элюирования В	100 мМ ацетата, 500 мМ хлорида натрия, pH 5,0
Градиент элюирования в начале, %В	0
Градиент элюирования в конце, %В	100
Продолжительность градиента элюирования, CV	31
Солевой градиент элюирования, мМ/CV	16
Объемов колонки пула	1,5
Выход	44%
Примеси в извлеченном элюате (соответствуют фракциям 3, 5 и 6)	Соотношение LC1/LC2 в условиях восстановленного CR/SDS=0,9 SE-HPLC HMW (%)=1,7 SE-HPLC LMW (%)=0,9 Мономер SE-HPLC=97,4%

На фиг. 5 показан один пик элюирования, полученный в результате высокой плотности загрузки при крутом градиенте элюирования. Связанные с продуктом примеси с низкой pI не отделялись от основного продукта при высокой плотности загрузки и в основном находились во фракциях 1, 2 и 3, как видно по снижению отношений LC1 к LC2 при CE-SDS от 4 до 7 (разновидности с неправильным спариванием LC) и LMW разновидностям, составляющим от 2 до 4%.

Пример 6. Более низкая плотность загрузки, однократная промывка без соли, биспецифическая молекула № 3.

Пул после прохождения очистки на белке А и нейтрализации, содержащий полностью человеческий сконструированный слитый белок IgG/Fab (биспецифическая молекула № 3), загружали на смолу для катионообменной хроматографии Capto-SP ImpREs® (GE Healthcare Bio-Science, Мальборо, Массачусетс, США) в условиях, указанных в табл. 6.

Условия для катионообменной хроматографии с более низкой плотностью загрузки в условиях отсутствия солевой загрузки

	Биспецифическая молекула № 3
Размер колонки и скорость	4,66 мл Линейная скорость 140 см/ч.
Концентрация Уровень загрузки (мг/мл)	10
Предварительное уравновешивание	500 мМ ацетата, 1,75 М хлорида натрия, pH 4,9
Уравновешивание	100 мМ ацетата, pH 5,0
Промывка	100 мМ ацетата, pH 5,0
Буфер для элюирования А	100 мМ ацетата, pH 5,0
Буфер для элюирования В	100 мМ ацетата, 500 мМ хлорида натрия, pH 5,0
Градиент элюирования в начале, %В	0
Градиент элюирования в конце, %В	100
Продолжительность градиента элюирования, CV	62
Солевой градиент элюирования, мМ/CV	8
Объемов колонки пула	3,0
Выход	73%
Примеси в извлеченном элюате (соответствуют фракциям 5, 6, 7, 8, 9 и 10)	Соотношение LC1/LC2 в условиях восстановленного CE- SDS=1,2 SE-HLPC HMW (%)=1,4 SE-HPLC LMW (%)=0,1 Мономер SE-HPLC=98,4%

Поскольку высокая плотность загрузки, условия крутого градиента элюирования в примере 5 не обеспечивали достаточного разделения основного продукта и связанных с продуктом примесей с низкой pI, плотность загрузки и условия градиента снижали. На фиг. 6 показано, что более низкая плотность загрузки (10 в сравнении с 25 г/л) и более пологий градиент (8 в сравнении с 16 мМ/CV) обеспечивали отделение основных примесей продукта с низкой pI в виде отчетливого пика, образованного фракциями 1-4. Эта фракция показала отношение LC1 к LC2 от 3 до 10, что указывает на разновидности с неправильным спариванием LC1. Напротив, основной пик показал совокупное отношение LC1 к LC2, составляющее 1,2. Хотя разрешение было лучше и увеличивало выход с 44% до 73%, поскольку по-прежнему требовалось автоматическое объединение на основе OD, все еще было необходимо собирать элюат, начиная с самой высокой OD для препика, что снижает выход и делает этот процесс недостаточным для применения в производственной операции.

Пример 7. Промывка с высоким содержанием соли, биспецифическая молекула № 3.

Пул после прохождения очистки на белке А и нейтрализации, содержащий биспецифическую молекулу № 3, загружали на смолу для катионообменной хроматографии Capto-SP ImpREs® (GE Healthcare Bio-Science, Мальборо, Массачусетс, США) в условиях, указанных в табл. 7.

Таблица 7

Условия для катионообменной хроматографии в условиях высокой солевой загрузки	
	Биспецифическая молекула № 3
Размер колонки и скорость	4,66 мл Линейная скорость 140 см/ч.
Концентрация, г/л	10
Предварительное уравнивание	500 мМ ацетата, 1,75 М хлорида натрия, pH 4,9
Уравнивание	100 мМ ацетата, pH 5,0
Промывка 1	100 мМ ацетата, pH 5,0
Промывка 2	100 мМ ацетата, 105 мМ хлорида натрия, pH 5,0
Промывка 3	100 мМ ацетата, pH 5,0
Буфер для элюирования А	100 мМ ацетата, pH 5,0
Буфер для элюирования В	100 мМ ацетата, 500 мМ хлорида натрия, pH 5,0
Градиент элюирования в начале, %В	0
Градиент элюирования в конце, %В	100
Продолжительность градиента элюирования, CV	62
Солевой градиент элюирования, мМ/CV	8,1
Объемов колонки пула	3,0
Выход	66
Примеси в извлеченном элюате (соответствуют фракциям 7, 8, 9, 10, 11 и 12)	Соотношение LC1 и LC2 в условиях восстановленного CE-SDS=1,1 SE-HPLC HMW=1,4% SE HPLC LMW=0,0 Мономер SE-HPLC=98,6%

Обнаружили, что при добавлении стадии промывки с высоким содержанием соли (промывка 2) примеси удалялись из смолы СЕХ перед элюированием. Эти примеси, вероятно, соответствовали различным фракциям с неправильным спариванием LC1, учитывая, что соотношение LC1 и LC2 в собранных промывке 2 и промывке 3 составляло 8,0 по сравнению с ожидаемым соотношением 1, когда LC1 и LC2 правильно собираются и образуют пары. На фиг. 7 показано, что промывка с высоким содержанием соли привела к уменьшению числа пиков примесей в профиле элюирования от двух пиков до одного пика с

небольшим "плечом", которое все еще содержало неправильно спаренные разновидности (LC1/LC2=от 2 до 4). Большинство примесей удалялось в ходе второй и третьей стадий промывки. Третья стадия промывки также обеспечивала восстановление исходного уровня UV-спектра до нуля перед началом элюирования, уплотняя профиль элюирования, что приводило к гораздо более эффективному сбору и лучшему качеству основного продукта. Такая оптимизированная процедура с применением промывки с более высоким содержанием соли в сочетании с более низким уровнем загрузки и более пологим градиентом подходит для применения на производственном участке. Выход очистки СЕХ увеличивался с 44% до 66% при профиле элюирования для сбора очищенного пула с низкими уровнями разновидностей с неправильным спариванием LC1 (о чем свидетельствует отношение LC1 к LC2, близкое к 1), HMW и LMW, и критерии объединения на основании поглощения.

Пример 8. Промывка с высоким содержанием соли, биспецифическая молекула № 4.

Пул элюатов после прохождения очистки на белке А, вирусной инактивации при низком значения pH и нейтрализации, содержащий полностью человеческий сконструированный иммуноглобулин биспецифическое антитело (биспецифическая молекула № 4), загружали на смолу для катионообменной хроматографии Carto-SP ImpREs® (GE Healthcare Bio-Science, Мальборо, Массачусетс) в условиях, указанных в табл. 7.

Таблица 7

Условия для катионообменной хроматографии в условиях промывки с высоким содержанием соли

	Биспецифическая молекула № 4
Скорость колонки	20 см, линейная скорость 180 см/ч
Концентрация, г/л	35
Предварительное уравнивание	200 мМ ацетата, 1,0 М хлорида натрия, pH 5,0
Уравнивание	100 мМ ацетата, pH 5,0
Промывка 1	100 мМ ацетата, pH 5,0
Промывка 2	100 мМ ацетата, 125 мМ хлорида натрия, pH 5,0
Буфер для элюирования А	100 мМ ацетата, 125 мМ хлорида натрия, pH 5,0
Буфер для элюирования В	100 мМ ацетата, 500 мМ хлорида натрия, pH 5,0
Градиент элюирования в начале, %В	0
Градиент элюирования в конце, %В	100

Продолжительность градиента элюирования, CV	10
Солевой градиент элюирования, mM/CV	37,5
Среднее значение объемов колонок пула (CV)	2,5 2-3 (второй цикл)
Выход	66% 77,7% (второй цикл)
Примеси в извлеченном элюате	SE-HPLC HMW=1,3% (второй цикл 1,2) SE HPLC LMW=0,6 (второй цикл 0,5) % основного пика=98,1% (второй цикл 98,3) % постпиков=0,0 для обоих циклов % препиков=0,0 для обоих циклов

Обнаружили, что при добавлении стадии промывки при высокой концентрации соли (промывка 2) связанные с продуктом примеси с низкой *pI* (гомодимеры и агрегированные разновидности) удалялись из катионообменной среды перед элюированием. На фиг. 8 показано, что промывка с высоким содержанием соли приводила к уменьшению числа пиков примесей в профиле элюирования до одного пика. Первая промывка без хлорида натрия приводила проводимость к исходному уровню. Связанные с продуктом примеси с низкой *pI* удалялись в ходе последующей стадии промывки с высоким содержанием соли и исходный уровень проводимости возвращался к нулю перед элюированием. Проводимость поддерживали с помощью буфера для элюирования А, который имел тот же состав с высоким содержанием соли, что и буфер для промывки с высоким содержанием соли. Это обеспечивало поддержание стабильной проводимости до начала элюирования и сужение профиля элюирования, что привело к гораздо более стабильному и эффективному сбору и лучшему качеству основного продукта, поскольку отделение было основано на *pI*.

Кроме того, тестировали буферы для промывки на 0,1 единицы *pH* выше и ниже *pH* 5,0 (*pH* 4,9-5,1) и обнаружили, что они в равной степени эффективны в удалении связанных с продуктом примесей с низкой *pI*.

Кроме того, тестировали концентрации загрузки биспецифической молекулы № 4 от 25 до 40 г/л и обнаружили, что они характеризуются удалением примесей, подобным условию при 35 г/л, описанному выше.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки биспецифического антитела, включающий: загрузку образца, содержащего биспецифическое антитело, в среду для катионообменной хроматографии; промывание катионообменной среды по меньшей мере одним буфером для промывки с *pH* от 4,9 до 5,1, содержащим 100-147 mM хлорида натрия; и элюирование биспецифического антитела из смолы для катионообменной хроматографии.
2. Способ по п.1, дополнительно включающий до и/или после стадии катионообменной хроматографии одну или несколько отдельных операций для очистки биспецифического антитела, представляющих собой аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, колоночную хроматографию гидрофобных взаимодействий и/или колоночную хроматографию со смешанным режимом.
3. Способ по п.1, где среда для катионообменной хроматографии представляет собой смолу.
4. Способ по п.1, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит 100-125 mM хлорида натрия.
5. Способ по п.1, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит 100-105 mM хлорида натрия.
6. Способ по п.1, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит 105-147 mM хлорида натрия.
7. Способ по п.1, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит 105-125 mM хлорида на-

трия.

8. Способ по п.1, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит 125-147 мМ хлорида натрия.

9. Способ по п.1, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат.

10. Способ по п.9, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, от pH $5,0 \pm 0,05\%$ до pH $5,0 \pm 0,1\%$.

11. Способ по п.9, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, pH 4,91-5,1.

12. Способ по п.9, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, pH 4,9, 5,0 или 5,1.

13. Способ по п.7, где буфер для промывки содержит 100 мМ ацетата.

14. Способ по п.1, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, 100-125 мМ хлорида натрия.

15. Способ по п.1, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, 100-105 мМ хлорида натрия.

16. Способ по п.1, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, 105-147 мМ хлорида натрия.

17. Способ по п.1, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, 105-125 мМ хлорида натрия.

18. Способ по п.1, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, 125-147 мМ хлорида натрия.

19. Способ по п.1, где катионообменную среду промывают по меньшей мере двумя буферами для промывки.

20. Способ по п.1, где катионообменную среду промывают по меньшей мере тремя буферами для промывки.

21. Способ по п.19, где катионообменную среду промывают по меньшей мере двумя буферами для промывки, причем по меньшей мере один из буферов для промывки содержит 0-147 мМ хлорида натрия.

22. Способ по п.21, где катионообменную среду промывают по меньшей мере двумя буферами для промывки, причем по меньшей мере один из буферов для промывки содержит 0-70 мМ хлорида натрия.

23. Способ по п.1, где катионообменную среду промывают по меньшей мере двумя буферами для промывки, а именно, по меньшей мере одним буфером для промывки, содержащим ацетат, 0 мМ хлорида натрия, а затем буфером для промывки, содержащим ацетат, 100-147 мМ хлорида натрия.

24. Способ по п.23, где катионообменную среду промывают буфером для промывки, содержащим ацетат, 0 мМ хлорида натрия, а затем буфером для промывки, выбранным из группы, состоящей из буфера для промывки, содержащего ацетат, 100 мМ хлорида натрия, буфера для промывки, содержащего ацетат, 105 мМ хлорида натрия, или буфера для промывки, содержащего ацетат, 125 мМ хлорида натрия.

25. Способ по п.23, где дополнительно используют третий буфер для промывки, содержащий ацетат, 0-70 мМ хлорида натрия.

26. Способ по п.25, где катионообменную среду промывают буфером для промывки, содержащим ацетат, 100-147 мМ хлорида натрия, а затем буфером для промывки, содержащим ацетат, 0 мМ хлорида натрия.

27. Способ по п.25, где катионообменную среду промывают буфером для промывки, содержащим ацетат, 100-147 мМ хлорида натрия, а затем буфером для промывки, содержащим 70 мМ хлорида натрия.

28. Способ по п.20, где катионообменную среду промывают по меньшей мере тремя буферами для промывки, а именно:

первым буфером для промывки, содержащим ацетат, 0 мМ хлорида натрия, а затем вторым буфером для промывки, содержащим ацетат, 100-147 мМ хлорида натрия, а затем третьим буфером для промывки, содержащим ацетат, 0 мМ хлорида натрия, или буфером для промывки, содержащим ацетат, 70 мМ хлорида натрия.

29. Способ по п.28, где катионообменную среду промывают первым буфером для промывки, содержащим ацетат, 0 мМ хлорида натрия, а затем вторым буфером для промывки, выбранным из группы, состоящей из буфера для промывки, содержащего ацетат, 100 мМ хлорида натрия, буфера для промывки, содержащего ацетат, 105 мМ хлорида натрия, или буфера для промывки, содержащего ацетат, 125 мМ хлорида натрия, а затем третьим буфером для промывки, содержащим ацетат, 0 мМ хлорида натрия.

30. Способ по п.28, где катионообменную среду промывают первым буфером для промывки, содержащим ацетат, 0 мМ хлорида натрия, а затем вторым буфером для промывки, содержащим ацетат, 147 мМ хлорида натрия, а затем третьим буфером для промывки, содержащим ацетат, 70 мМ хлорида натрия.

31. Способ по п.1, где катионообменную среду промывают 2,5 мМ/CV буфера для промывки, содержащего 147 мМ хлорида натрия.

32. Способ по п.1, где биспецифическое антитело элюируют из катионообменной среды посредством градиента.

33. Способ по п.32, где градиент представляет собой линейный или ступенчатый градиент.
34. Способ по п.32, где градиент представляет собой солевой градиент.
35. Способ по п.32, где по меньшей мере один из буферов, применяемых для создания градиента элюирования, содержит 0-1 М хлорида натрия.
36. Способ по п.35, где по меньшей мере один из буферов, применяемых для создания градиента элюирования, содержит 70-500 мМ хлорида натрия.
37. Способ по п.35, где по меньшей мере один из буферов, применяемых для создания градиента элюирования, содержит 125 мМ хлорида натрия.
38. Способ по п.1, где по меньшей мере один буфер для промывки и один буфер для элюирования содержат 125 мМ хлорида натрия.
39. Способ по п.1, где в катионообменную среду загружают по меньшей мере 10 г/л биспецифического антитела.
40. Способ по п.1, где в катионообменную среду загружают от 10 до 40 г/л биспецифического антитела.
41. Способ по п.38, где в катионообменную среду загружают от 15 до 30 г/л.
42. Способ по п.38, где в катионообменную среду загружают 25-40 г/л.
43. Способ по п.1, где в катионообменную среду загружают 10 г/л биспецифического антитела, промывают буфером для промывки, содержащим 105 мМ хлорида натрия, и элюируют в солевом градиенте при 8 мМ/СV.
44. Способ по п.1, где в катионообменную среду загружают от 15 до 30 г/л биспецифического антитела, промывают буфером для промывки, содержащим 147 мМ хлорида натрия.
45. Способ по п.1, где в катионообменную среду загружают от 25 до 40 г/л биспецифического антитела, где по меньшей мере один буфер для промывки и один буфер для элюирования содержат 125 мМ хлорида натрия.
46. Способ по п.1, где биспецифическое антитело очищают от по меньшей мере одной связанной с биспецифическим антителом примеси, выбранной из гомодимера, высокомолекулярной разновидности, полуантитела, агрегата, низкомолекулярной разновидности, фрагмента антитела или неправильной сборки легких цепей.
47. Способ очистки биспецифического антитела, который включает отдельную операцию, включающую катионообменную хроматографию, выполняемую в соответствии со способом по п.1.
48. Способ снижения содержания связанных с биспецифическим антителом примесей с низким рI в элюате из катионообменной хроматографии, причем способ включает:
загрузку композиции, содержащей биспецифическое антитело и по меньшей мере одну связанную с биспецифическим антителом примесь, характеризующуюся более низким рI, чем у биспецифического антитела, в среду для катионообменной хроматографии;
промывание катионообменной среды первым буфером для промывки,
промывание катионообменной среды вторым буфером для промывки с рН от 4,9 до 5,1, содержащим 100-147 мМ хлорида натрия;
элюирование биспецифического антитела из смолы для катионообменной хроматографии;
где элюат катионообменной хроматографии характеризуется сниженным содержанием связанных с биспецифическим антителом примесей с низким рI по сравнению с элюатом катионообменной хроматографии, извлеченным в соответствующем способе, в котором хлорид натрия не включен в состав буфера для промывки.
49. Способ по п.48, где катионообменную среду дополнительно промывают третьим буфером для промывки.
50. Способ проведения катионообменной хроматографии в условиях промывки с высоким содержанием соли для снижения содержания связанных с биспецифическим антителом примесей, включающий:
загрузку композиции, содержащей биспецифическое антитело и по меньшей мере одну связанную с биспецифическим антителом примесь, в уравновешенную катионообменную колонку;
промывание катионообменной среды по меньшей мере двумя буферами для промывки, где один буфер для промывки имеет рН от 4,9 до 5,1 и содержит 100-147 мМ хлорида натрия; и
элюирование связанного биспецифического антитела из смолы для катионообменной хроматографии.
51. Способ по п.50, где перед загрузкой композиции катионообменную среду уравнивают буфером, не содержащим хлорид натрия.
52. Способ получения выделенного очищенного рекомбинантного биспецифического антитела, включающий:
создание клеточной культуры в биореакторе с клеткой-хозяином, экспрессирующей биспецифическое антитело;
культивирование клеток-хозяев для экспрессии биспецифического антитела;
сбор рекомбинантного биспецифического антитела из клеточной культуры;
аффинную очистку рекомбинантного биспецифического антитела;

загрузку прошедшего аффинную очистку рекомбинантного биспецифического антитела на смолу для катионообменной хроматографии;

промывание катионообменной смолы по меньшей мере одной промывкой с рН от 4,9 до 5,1, содержащей 100-147 мМ хлорида натрия;

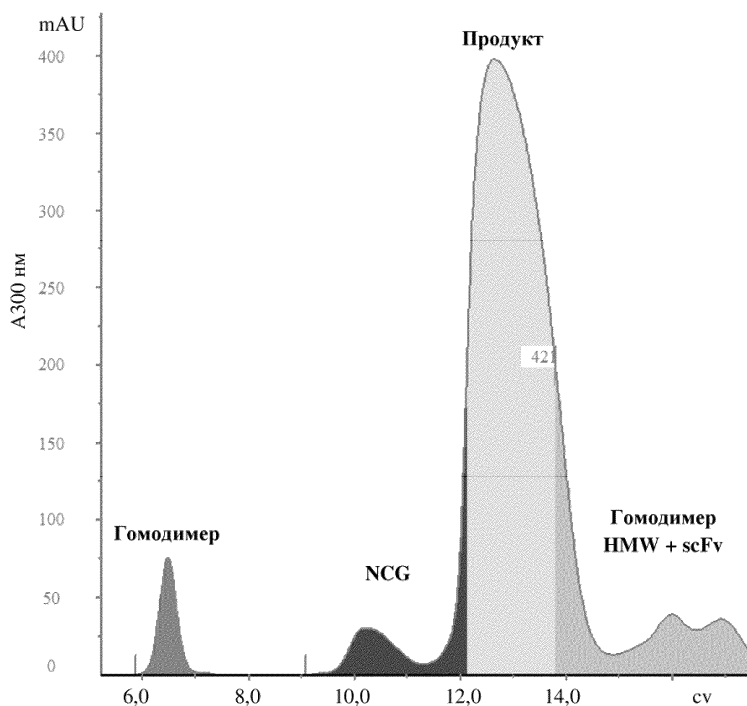
элюирование биспецифического антитела из смолы для катионообменной хроматографии и

загрузку элюата катионообменной хроматографии, содержащего рекомбинантное биспецифическое антитело, в дополнительную хроматографическую среду в проточном режиме.

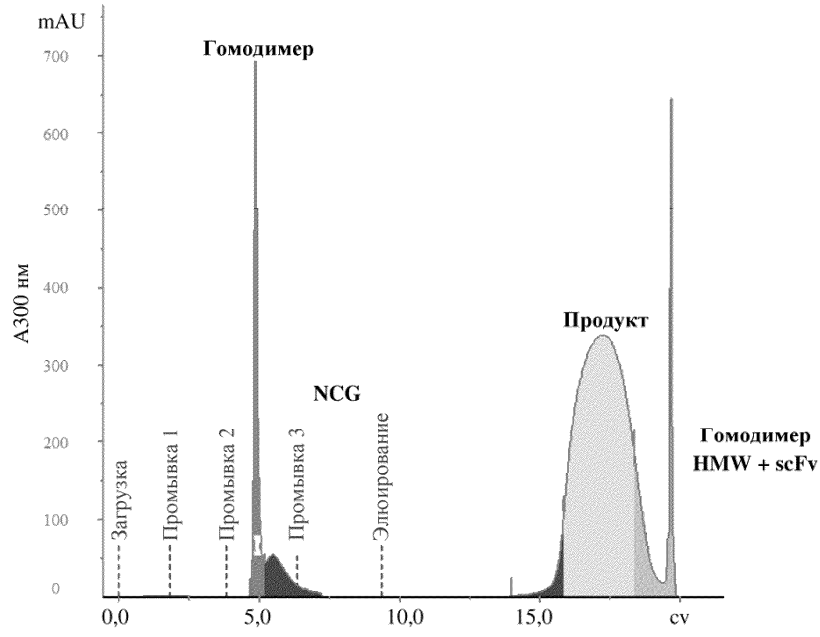
53. Способ по п.52, где дополнительная среда для хроматографии выбрана из среды для катионообменной хроматографии, среды для мультимодальной хроматографии, среды для хроматографии гидрофобных взаимодействий и среды для хроматографии с гидроксипатитом.

54. Способ по п.52, где прошедшее аффинную очистку биспецифическое антитело находится в пуле элюатов, и его подвергают вирусной инаktivации при низком рН, а затем нейтрализации перед загрузкой в катионообменную среду.

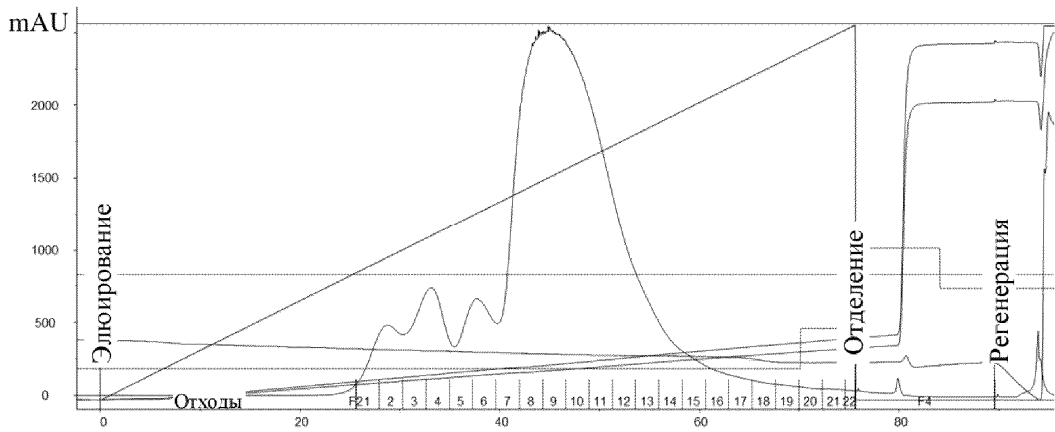
55. Способ по п.52, где фильтрат из дополнительной хроматографической среды подвергают отдельной операции ультрафильтрации и диалфильтрации.



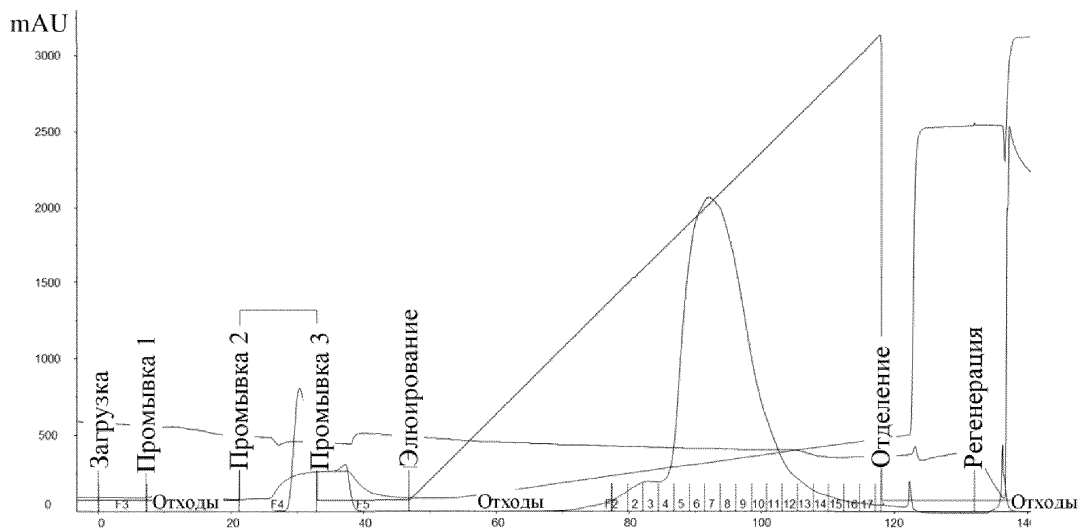
Фиг. 1



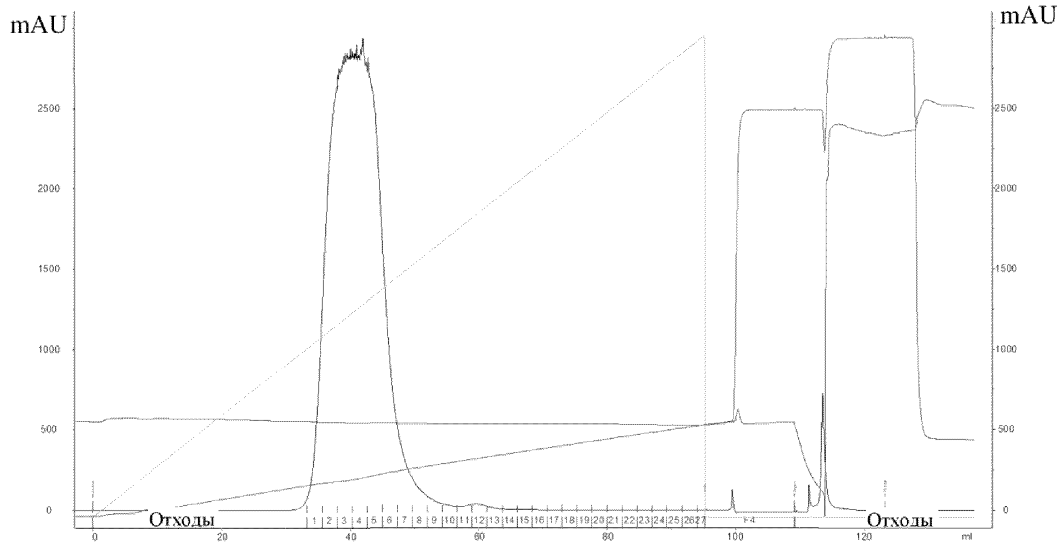
Фиг. 2



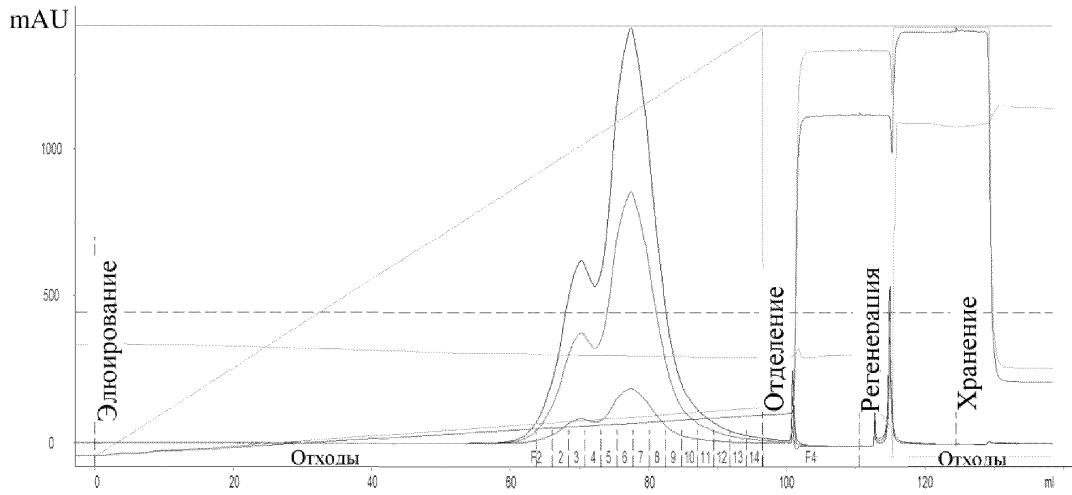
Фиг. 3



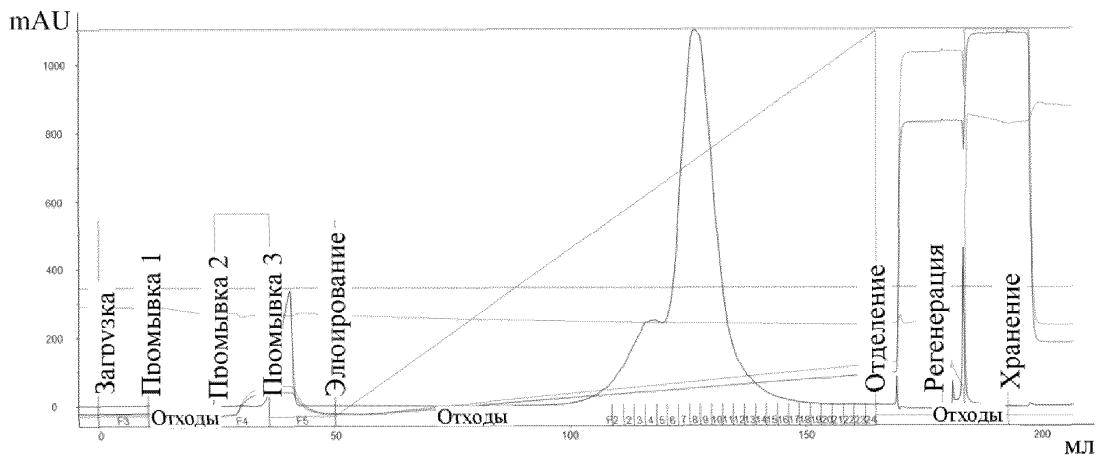
Фиг. 4



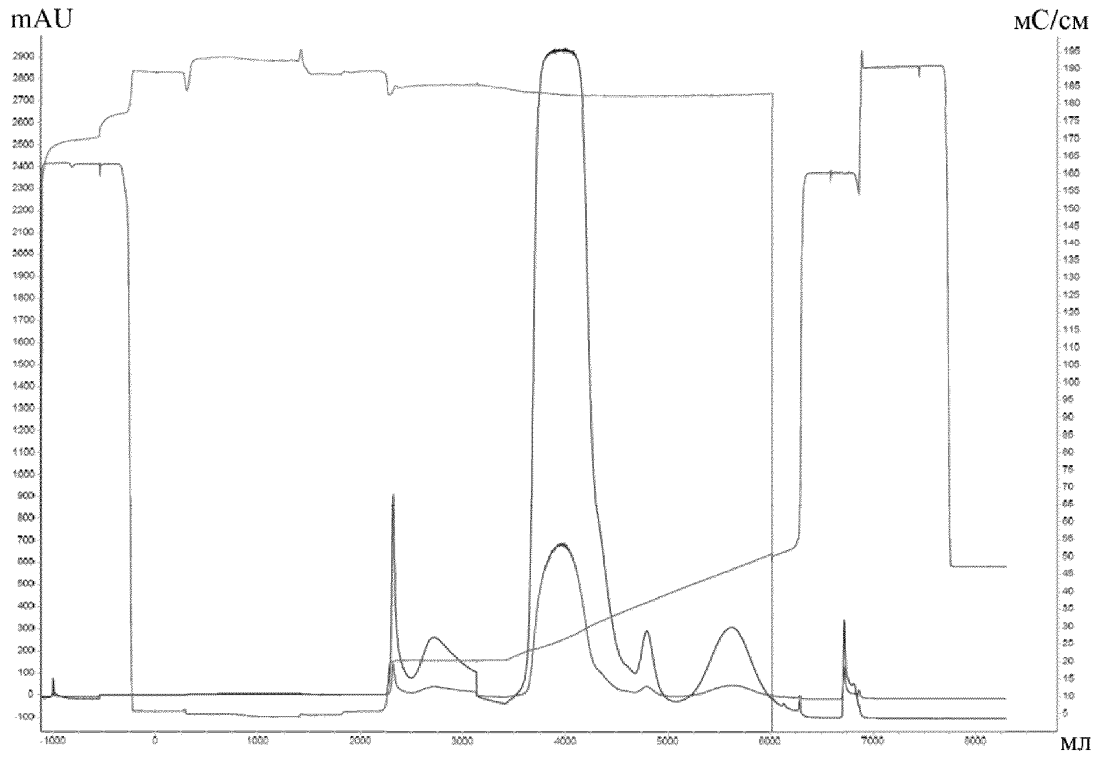
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8