

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202491350** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2024.07.31

(51) Int. Cl. *G01N 33/68* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.08.16

---

(54) **СПОСОБ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
КОЛИЧЕСТВА И ЧИСТОТЫ МУЛЬТИМЕРНОГО БЕЛКА**

---

(31) 62/719,323

(32) 2018.08.17

(33) US

(62) 202190459; 2019.08.16

(71) Заявитель:  
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Перроне Майкл, Родригез Одри,  
Тустриан Эндрю, Бак Ханн (US)**

(74) Представитель:

**Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,  
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,  
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин  
Ш.Ф. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к хроматографической системе и способу оценки количества и/или чистоты мультимерного белка в образце, причем хроматографическая система предусматривает две разные матрицы для аффинной хроматографии, соединенные посредством переключающего клапана.

**202491350**

**A2**

**A2**

**202491350**

# **СПОСОБ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА И ЧИСТОТЫ МУЛЬТИМЕРНОГО БЕЛКА**

## **ОПИСАНИЕ**

### **Область техники, к которой относится настоящее изобретение**

[0001] Настоящее изобретение относится к хроматографической системе и способу оценки количества и/или чистоты мультимерного белка в образце, причем хроматографическая система предусматривает две разные матрицы для аффинной хроматографии, соединенные посредством переключающего клапана.

### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

[0002] Биспецифические антитела представляют собой антитела, которые могут одновременно и избирательно связываться с двумя разными типами эпитопов на одном и том же или на разных антигенах. Связывание нескольких мишеней одной молекулой является перспективным терапевтическим подходом, особенно в области онкологии и при аутоиммунных заболеваниях. Указанный подход наиболее широко применяется в иммунотерапии рака, где биспецифические антитела сконструированы с возможностью одновременного связывания цитотоксической клетки и мишени, такой как подлежащая разрушению опухолевая клетка. Кроме того, нацеливание на более чем одну молекулу может быть полезно для обхода регуляции параллельных сигнальных путей и предотвращения устойчивости к лечению. Связывание или блокирование нескольких мишеней в рамках сигнального пути может быть преимущественным в отношении прекращения заболевания, поскольку большинство состояний в организме характеризуются многофакторными эффектами.

[0003] Было предложено множество форматов биспецифических антител, и они в настоящее время находятся в стадии разработки. Один из таких форматов, основанный на применении полного IgG-антитела человека с улучшенным фармакокинетическим профилем и минимальной иммуногенностью (см. заявку на выдачу патента США № 8586713 и WO2016/018740), схематически показан на **фиг. 1**. Для образования такой биспецифической молекулы объединяют одну общую легкую цепь и две отличные тяжелые цепи. Одна из тяжелых цепей содержит последовательность Fc с заменой (далее «Fc\*»), которая обеспечивает значительное снижение способности связывания Fc\* с белком А за счет замен H435R/Y436F (согласно системе нумерации EU; H95R/Y96F согласно системе нумерации экзонов IMGT) в CH3-домене. В результате коэкспрессии

Fc\*- и Fc-тяжелых цепей и общей легкой цепи образуется три продукта: два из которых (FcFc и Fc\*Fc\*) являются гомодимерными в отношении тяжелых цепей и один из которых (FcFc\*) является требуемым гетеродимерным биспецифическим продуктом. Последовательность Fc\* обеспечивает возможность избирательной очистки биспецифического продукта FcFc\* на коммерчески доступных колонках для аффинной хроматографии за счет промежуточной аффинности связывания в отношении Fc-связывающих белков, таких как белок А, в сравнении с высокой аффинностью гомодимера тяжелых цепей FcFc или слабым связыванием гомодимера Fc\*Fc\*.

[0004] Другой формат антитела представляет собой так называемое «неполное» антитело, описанное в WO2013/166604, схематически показанное на **фиг. 2А**. Такое гетеродимерное антитело состоит, например, из двух отличных тяжелых цепей и только одной легкой цепи. Согласно одному такому примеру тяжелая цепь, соединенная с легкой цепью, содержит последовательность Fc\*, при этом тяжелая цепь без легкой цепи содержит обычную последовательность Fc. Исходная реакционная смесь, таким образом, содержит три продукта, два гомодимерных (FcFc и Fc\*Fc\*) и требуемый гетеродимерный FcFc\*-продукт, который может быть отделен с применением аффинной хроматографии.

[0005] Еще один возможный формат антитела представляет собой конструкцию на основе антитела с С-концевым одноцепочечным вариабельным фрагментом (ScFv), схематически показанную на **фиг. 2В**. Такие антитела могут быть моноспецифическими или биспецифическими и содержат одну общую легкую цепь и две отличные тяжелые цепи. Согласно одному примеру, одна из тяжелых цепей имеет последовательность Fc\* и соединена с ScFv, тогда как другая тяжелая цепь имеет нативную последовательность Fc и не содержит ScFv. Согласно другому примеру, тяжелая цепь с ScFv-конструкцией имеет нативную последовательность Fc, а Fc\*-тяжелая цепь не имеет ScFv. Дополнительные примеры, в которых дополнительная мутация, которая отменяет связывание на колонке для аффинной хроматографии, представляет собой мутацию в вариабельной области тяжелой цепи (VH) в той же цепи с Fc\*-мутацией, представлены, например, в заявке на выдачу патента США 9493563 (мутации в VH3 и Fc описаны как 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86, 90 согласно IMGT), которая включена посредством ссылки во всей своей полноте. Как и в приведенных выше примерах, трехкомпонентную смесь гетеродимера FcFc\* и гомодимеров FcFc и Fc\*Fc\* можно разделять с применением аффинной хроматографии на основе дифференциального связывания.

[0006] В области промышленного изготовления биспецифических антител существует потребность в методах оценки относительных и абсолютных количества и чистоты гетеродимера на разных стадиях получения и очистки антител. Для этого

требуется эффективное разделение гетеродимера и двух гомодимерных примесей. Более того, в процессе культивирования клеток, а также в процессе очистки антител, требуются скорость и эффективность измерений в рамках контроля качества. Настоящее изобретение удовлетворяет эту и другие потребности путем обеспечения новых хроматографической системы и способа.

[0007] Вышеизложенное обсуждение представлено исключительно для лучшего понимания характера проблем, существующих в данной области, и не должно никоим образом истолковываться как признание того, что настоящее изобретение является частью предшествующего уровня техники, а также не следует толковать цитирование любой ссылки в данном документе как признание того, что такая ссылка составляет «предшествующий уровень техники» по отношению к настоящей заявке.

### **Краткое раскрытие настоящего изобретения**

[0008] Различные неограничивающие аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения описаны ниже.

[0009] В настоящем изобретении описаны новая хроматографическая система, предусматривающая переключающий клапан, и способ оценки количества и/или чистоты фракции гетеродимера в образце.

[0010] Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу измерения количества и/или чистоты белка в образце, содержащем смесь белка, первой белковой примеси и второй белковой примеси, причем белок и первая примесь связываются с первой аффинной матрицей, а вторая примесь практически не связывается с первой аффинной матрицей и связывается со второй аффинной матрицей, причем указанный способ предусматривает стадии:

[0011] а. внесения образца в хроматографическую систему, предусматривающую первую аффинную матрицу, вторую аффинную матрицу и детектор, причем первая аффинная матрица последовательно соединена со второй аффинной матрицей посредством переключающего клапана;

[0012] б. элюирования второй примеси с первой аффинной матрицы на вторую аффинную матрицу с использованием первого набора условий;

[0013] в. перевода переключающего клапана в режим обхода второй аффинной матрицы, элюирования белка через детектор с использованием второго набора условий и определения количества элюированного белка;

[0014] г. элюирования первой примеси через детектор с использованием третьего набора условий и определения количества элюированной первой примеси;

[00015] e. элюирования второй примеси со второй аффинной матрицы через детектор с использованием третьего набора условий и определения количества элюированной второй примеси, и

[00016] f. измерения количества и/или чистоты белка в образце.

[00017] Согласно одному варианту осуществления белок представляет собой мультимерный белок, например, антитело. Согласно одному варианту осуществления белок является представляющим интерес антителом и первая и вторая белковые примеси представляют собой мультимерные белки, например, антитела, которые могут быть или могут не быть структурно родственными с представляющим интерес антителом. Согласно одному варианту осуществления белок представляет собой биспецифическое антитело, т. е. гетеродимерный белок, первая белковая примесь представляет собой первый гомодимерный белок и вторая белковая примесь представляет собой второй гомодимерный белок. В некоторых случаях смесь мультимерных белков продуцируется множеством эукариотических клеток, таких как, например, клетки яичника китайского хомячка (СНО), в культуре клеток.

[00018] Согласно одному варианту осуществления белок характеризуется более низкой аффинностью к первой аффинной матрице, чем первая примесь. Согласно одному варианту осуществления белок представляет собой гетеродимерный белок, первая белковая примесь представляет собой первый гомодимерный белок и вторая белковая примесь представляет собой второй гомодимерный белок, причем гетеродимерный белок и первый гомодимерный белок связываются с первой аффинной матрицей, а второй гомодимерный белок практически не связывается с первой аффинной матрицей и связывается со второй аффинной матрицей.

[00019] Согласно одному варианту осуществления белок содержит первый иммуноглобулиновый СНЗ-домен и второй иммуноглобулиновый СНЗ-домен, причем указанные первый и второй иммуноглобулиновые СНЗ-домены отличаются по их аффинности к первой аффинной матрице, и причем образец содержит смесь, содержащую указанный белок, белок, содержащий два первых СНЗ-домена, и белок, содержащий два вторых СНЗ-домена.

[00020] Согласно одному варианту осуществления второй СНЗ-домен предусматривает аминокислотные замены Н435R и Y436F (согласно системе нумерации EU; Н95R/Y96F согласно системе нумерации экзонов IMGT). Согласно другому варианту осуществления второй СНЗ-домен предусматривает аминокислотную замену Н435R (согласно системе нумерации EU; Н95R согласно системе нумерации экзонов IMGT). Согласно некоторым вариантам осуществления второй СНЗ-домен, предусматривающий

аминокислотную замену H435R (согласно системе нумерации EU; H95R согласно системе нумерации экзонов IMGT), характеризуется слабым или невыявляемым связыванием с Fc-связывающими лигандами, такими как белок A, белок G, белок L или их производные.

[00021] Согласно одному варианту осуществления белок представляет собой антитело. Согласно одному варианту осуществления белок представляет собой биспецифическое антитело.

[00022] Согласно одному варианту осуществления первая аффинная матрица содержит белок A, а вторая аффинная матрица содержит белок G.

[00023] Согласно одному варианту осуществления первый набор условий предусматривает первый рН, второй набор условий предусматривает второй рН и третий набор условий предусматривает третий рН. Согласно одному варианту осуществления второй рН ниже первого рН, а третий рН ниже второго рН. Согласно одному варианту осуществления первый рН составляет от приблизительно рН 5,0 до приблизительно рН 7,4, второй рН составляет от приблизительно рН 4,3 до приблизительно рН 5,6 и третий рН составляет от приблизительно рН 2,0 до приблизительно рН 2,8.

[00024] Согласно одному варианту осуществления первый набор условий, второй набор условий и третий набор условий предусматривают модификатор подвижной фазы. Согласно одному варианту осуществления модификатор подвижной фазы представляет собой солевой буфер, выбранный из LiCl-, NaCl-, KCl-, MgCl<sub>2</sub>- и CaCl<sub>2</sub>-буфера.

[00025] Согласно другому аспекту представлен способ измерения количества и/или чистоты гетеродимерного белка в образце, содержащем смесь гетеродимерного белка, первого гомодимерного белка и второго гомодимерного белка, причем гетеродимерный белок и первый гомодимерный белок связываются с первой аффинной матрицей, а второй гомодимерный белок практически не связывается с первой аффинной матрицей и связывается со второй аффинной матрицей, причем указанный способ предусматривает стадии:

а. внесения образца в хроматографическую систему, предусматривающую первую аффинную матрицу, вторую аффинную матрицу и детектор, причем первая аффинная матрица последовательно соединена со второй аффинной матрицей посредством переключающего клапана;

б. элюирования второго гомодимерного белка с первой аффинной матрицы на вторую аффинную матрицу с использованием первого набора условий;

с. перевода переключающего клапана в режим обхода второй аффинной матрицы, элюирования гетеродимерного белка через детектор с использованием второго набора условий и определения количества элюированного белка;

d. элюирования первого гомодимерного белка через детектор с использованием третьего набора условий и определения количества элюированной первой примеси;

e. элюирования второго гомодимерного белка со второй аффинной матрицы через детектор с использованием третьего набора условий и определения количества элюированной второй примеси, и

f. измерения количества и/или чистоты белка в образце.

[00026] Согласно еще одному аспекту представлен способ измерения количества и/или чистоты гетеродимерного белка в образце, содержащем смесь гетеродимерного белка, первого гомодимерного белка и второго гомодимерного белка, причем гетеродимерный белок и первый гомодимерный белок связываются с содержащей белок А матрицей, а второй гомодимерный белок практически не связывается с содержащей белок А матрицей и связывается с содержащей белок G матрицей, причем указанный способ предусматривает стадии:

a. внесения образца в хроматографическую систему, предусматривающую содержащую белок А матрицу, содержащую белок G матрицу и детектор, причем содержащая белок А матрица последовательно соединена с содержащей белок G матрицей посредством переключающего клапана;

b. элюирования второго гомодимерного белка с содержащей белок А матрицы на содержащую белок G матрицу с использованием первого набора условий;

c. перевода переключающего клапана в режим обхода содержащей белок G матрицы, элюирования гетеродимерного белка через детектор с использованием второго набора условий и определения количества элюированного белка;

d. элюирования первого гомодимерного белка через детектор с использованием третьего набора условий и определения количества элюированной первой примеси;

e. элюирования второго гомодимерного белка с содержащей белок G аффинной матрицы через детектор с использованием третьего набора условий и определения количества элюированной второй примеси, и

f. измерения количества и/или чистоты белка в образце.

[00027] Согласно одному варианту осуществления гетеродимерный белок содержит FcFc\*, первый гомодимерный белок содержит FcFc и второй гомодимерный белок содержит Fc\*Fc\*.

[00028] Согласно другому аспекту представлена хроматографическая система, предусматривающая первую аффинную матрицу, вторую аффинную матрицу и детектор, причем каждое из первой аффинной матрицы, второй аффинной матрицы и детектора соединены посредством переключающего клапана.

[00029] Согласно другому аспекту представлена хроматографическая система, предусматривающая (i) хроматографическую колонку с белком А, (ii) хроматографическую колонку с белком G и (iii) детектор, предусматривающий колонку для HPLC, оснащенную УФ-детектором, детектором заряженного аэрозоля и/или масс-спектрометром, причем каждое из хроматографической колонки с белком А, хроматографической колонки с белком G и детектора соединены посредством переключающего клапана.

[00030] Эти и другие аспекты настоящего изобретения будут очевидны для специалистов в данной области после прочтения следующего подробного описания настоящего изобретения, включая прилагаемую формулу изобретения.

### **Краткое описание чертежей**

[00031] **Фиг. 1** представляет собой схематическое представление формата биспецифического антитела, подходящего для разделения с помощью способа по настоящему изобретению, на основе стандартного полностью человеческого IgG-антитела с одной общей легкой цепью и двумя отличными тяжелыми цепями, одна из которых предусматривает Fc\*-мутацию, а другая характеризуется нативной (Fc) последовательностью. Следует отметить, что показан репрезентативный пример, и что Fc\*-мутация может быть введена либо в первую, либо во вторую тяжелую цепь.

[00032] На **фигурах 2А и 2В** показаны схематические представления двух дополнительных форматов антител, подходящих для разделения в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения: на **фиг. 2(А)** показано гетеродимерное «неполное» антитело, которое состоит из двух отличных тяжелых цепей и только одной легкой цепи, причем одна тяжелая цепь не содержит Fab-фрагмент (например, содержит только константный домен тяжелой цепи). На **фиг. 2(В)** показаны две иллюстративные конструкции антитела с С-концевым одноцепочечным варибельным фрагментом (ScFv). Fc\*-мутация может быть введена в полипептид либо первой, либо второй тяжелой цепи (константный домен).

[00033] На **фиг. 3** показана хроматограмма титров, на которой проиллюстрированы результаты разделения смеси биспецифического антитела и мономерных примесей в соответствии со способом по настоящему раскрытию и использования системы в соответствии с вариантом осуществления настоящего раскрытия.

[00034] На **фигурах 4(А) и 4(В)** показаны схематические представления иллюстративных хроматографических систем в соответствии с вариантом осуществления настоящего раскрытия. В одной иллюстративной системе, показанной на **фиг. 4(А)**,

автодозатор соединен с первой аффинной матрицей (колонка), которая соединена со второй аффинной матрицей (колонка) и детектором посредством переключающего клапана. В показанной конфигурации переключающий клапан находится в положении, обеспечивающем последовательное соединение первой колонки со второй колонкой, и при этом поток элюента попадает через первую колонку на вторую колонку, а затем через детектор для количественного определения. В другой иллюстративной системе, показанной на **фиг. 4(В)**, автодозатор соединен с первой аффинной матрицей (колонка), которая соединена со второй аффинной матрицей (колонка) посредством переключающего клапана. Детектор соединен посредством переключающего клапана в обходной (без колонки) конфигурации. В настоящем документе переключающий клапан либо соединяет первую колонку со второй колонкой, которая также соединена с детектором, либо обеспечивает обход второй колонки и соединяет первую колонку непосредственно с детектором.

[00035] На **фиг. 5** показана общая компоновка системы для определения титра/чистоты биспецифического антитела в соответствии с вариантом осуществления настоящего раскрытия. На схематическом представлении показаны дегазатор растворителя, система управления растворителем, система управления образцами, система управления колоночным отделением и детектор.

[00036] На **фиг. 6** показана иллюстративная хроматографическая система в соответствии с вариантом осуществления настоящего раскрытия. В этом иллюстративном колоночном отделении системы, образец перемещается через серию последовательно соединенных колонок, содержащих первую аффинную матрицу, затем через серию последовательно соединенных колонок, содержащих вторую аффинную матрицу. Переключающий клапан соединяет первый серию колонок со второй серией колонок.

[00037] **Фиг. 7** представляет собой альтернативное схематическое изображение иллюстративной хроматографической системы в соответствии с вариантом осуществления настоящего раскрытия.

### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

[00038] В настоящем документе раскрыты подробные варианты осуществления настоящего изобретения; однако следует понимать, что раскрытые варианты осуществления являются лишь иллюстрацией настоящего изобретения, которое может быть реализовано в различных формах. Кроме того, подразумевается, что каждый из примеров, приводимых в сочетании с различными вариантами осуществления настоящего изобретения, является иллюстративным, а не ограничивающим. Следовательно,

раскрытые в настоящем документе конкретные подробности в контексте структуры и функций не должны быть истолкованы как ограничивающие, а лишь как репрезентативная основа, предусматривающая рекомендации для специалистов в данной области по разнообразному использованию настоящего изобретения.

[00039] Если не указано иное, все применяемые в настоящем документе технические и научные термины имеют те же значения, которые обычно понятны рядовому специалисту в данной области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя для реализации на практике или проверки настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, подобные или эквивалентные таковым, описанным в настоящем документе, далее будут описаны конкретные способы и материалы.

[00040] В контексте настоящего описания и прилагаемой формулы изобретения формы единственного числа включают определяемые объекты во множественном числе, если контекстом явно не указано иное. Таким образом, например, упоминание «способа» включает один или несколько способов и/или стадий описанного в настоящем документе типа и/или которые будут очевидны для специалистов в данной области при прочтении настоящего раскрытия.

[00041] Неограничивающие примеры белков, подходящих для разделения с использованием способов в соответствии с настоящим изобретением, могут включать без ограничения гетеродимерные антитела, например, биспецифические антитела, неполные антитела и ScFv-антитела. Биспецифические антитела обычно содержат две разные тяжелые цепи, при этом каждая тяжелая цепь специфически связывает отличающийся эпитоп — либо на двух разных молекулах (например, двух разных антигенах или антигене и Т-клеточном рецепторе), либо на одной и той же молекуле (например, на одном и том же антигене). Если биспецифическое антитело способно к избирательному связыванию двух разных эпитопов (первого эпитопа и второго эпитопа), аффинность первой тяжелой цепи в отношении первого эпитопа обычно будет по меньшей мере на один-два или три или четыре порядка ниже, чем аффинность первой тяжелой цепи в отношении второго эпитопа, и наоборот. Эпитопы, распознаваемые биспецифическим антителом, могут находиться на одной и той же мишени или на разных мишенях (например, на одном и том же белке или на разных белках). Биспецифические антитела могут быть получены, например, путем объединения тяжелых цепей, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена. Например, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие последовательности переменных областей тяжелых цепей, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующими разные константные области

тяжелых цепей, и такие последовательности могут быть экспрессированы в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина. Типичное биспецифическое антитело имеет две тяжелые цепи, каждая из которых имеет три CDR тяжелой цепи, за которыми следует (от N-конца к С-концу) CH1-домен, шарнир, CH2-домен и CH3-домен, и легкую цепь иммуноглобулина, которая либо не обеспечивает антигенсвязывающую специфичность, но может связываться с каждой тяжелой цепью, либо которая может связываться с каждой тяжелой цепью и которая может связывать один или несколько из эпитопов, связываемых антигенсвязывающими областями тяжелой цепи, или которая может связываться с каждой тяжелой цепью и обеспечивает связывание одной или обеих тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами.

[00042] Фраза «Fc-содержащий белок» включает антитела, биспецифические антитела, иммуноадгезины и другие связывающие белки, которые содержат по меньшей мере функциональную часть CH2- и CH3-области иммуноглобулина. «Функциональная часть» относится к CH2- и CH3-области, которая может связывать Fc-рецептор (например, FcγR; или FcRn, т. е. неонатальный Fc-рецептор) и/или которая может участвовать в активации системы комплемента. Если CH2- и CH3-область предусматривает делеции, замены и/или вставки или другие модификации, которые лишают ее способности связывать какой-либо Fc-рецептор, а также способности активировать систему комплемента, CH2- и CH3-область не считается функциональной.

[00043] Fc-содержащие белки могут предусматривать модификации в иммуноглобулиновых доменах, включая модификации, влияющие на одну или несколько эффекторных функций связывающего белка (например, модификации, которые влияют на связывание FcγR, связывание FcRn и, следовательно, время полужизни, и/или CDC-активность). Такие модификации включают без ограничения следующие модификации, и их комбинации, константной области иммуноглобулина, в соответствии с системой нумерации EU: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438 и 439.

[00044] Например, без ограничения, связывающий белок представляет собой Fc-содержащий белок и характеризуется увеличенным временем полужизни в сыворотке крови (по сравнению с таким же Fc-содержащим белком без указанной(-ых) модификации(-й)) и имеет модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256

(например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию по 428 и/или 433 (например, L/R/SI/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию по 250 и/или 428; или модификацию по 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. Согласно другому примеру модификация может предусматривать модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию по 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); модификацию по 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

[00045] Термин «замена, обозначаемая звездочкой», «Fc\*» и «HC\*», включает любую молекулу, тяжелую цепь иммуноглобулина, Fc-фрагмент, Fc-содержащую молекулу и т. д., предусматривающие мутацию, которая отменяет связывание с бактериальными белками, которые, как известно, связывают Fc-домен иммуноглобулинов, такими как белок A, белок G, белок L или их производные (см., например, аффинные лиганды-миметики SpA и SpA, описанные в Choe, W., et al. 2016, *Materials* 9, 994, doi:10.3390/ma9120994, которая включена в настоящий документ посредством ссылки). Иммуноглобулины или другие Fc-содержащие белки могут, например, содержать модифицированную последовательность в пределах CH3-домена, которая обеспечивает существенное снижение связывающей способности с белком A, как описано, например, в WO2016/018740 и в заявке на выдачу патента США № 8586713. В настоящем описании мутация в Fc-доме может быть обозначена как «замена, обозначаемая звездочкой», или Fc\*, для упрощения определения того, что один полипептид димера предусматривает мутацию, а другой не предусматривает. Таким образом, Fc\*Fc\* обозначает гомодимер, причем оба мономера содержат Fc\*, а FcFc\* или Fc\*Fc обозначает гетеродимер, в контексте Fc\*-замены. Термины FcFc\* и Fc\*Fc в настоящем документе применяют взаимозаменяемо.

[00046] Фраза «модификатор подвижной фазы» включает вещества, которые разрушают неспецифические (т. е. неаффинные) ионные и другие нековалентные взаимодействия между белками, или снижают их эффект. «Модификаторы подвижной фазы» включают, например, соли, ионные комбинации металлов I группы и II группы и ацетата, бикарбоната, карбоната, галогена (например, хлорида или фторида), нитрата, фосфата или сульфата. Неограничивающий иллюстративный перечень «модификаторов подвижной фазы» включает бериллиевые, литиевые, натриевые и калиевые соли уксусной кислоты; гидрокарбонаты натрия и калия; карбонаты лития, натрия, калия и цезия; хлориды лития, натрия, калия, цезия и магния; фториды натрия и калия; нитраты натрия, калия и кальция; фосфаты натрия и калия; и сульфаты кальция и магния.

[00047] «Модификаторы подвижной фазы» также включают хаотропные средства, которые ослабляют или иным образом нарушают нековалентные взаимодействия и повышают энтропию в биомолекулярных системах. Неограничивающие примеры хаотропных средств включают бутанол, хлорид кальция, этанол, гуанидин хлорид, перхлорат лития, ацетат лития, хлорид магния, фенол, пропанол, додецилсульфат натрия, тиомочевину и мочевину. Хаотропные средства включают соли, которые влияют на растворимость белков. Хаотропные анионы включают, например, хлорид, нитрат, бромид, хлорат, йодид, перхлорат и тиоцианат. Хаотропные катионы включают, например, литий, магний, кальций и гуанидин.

[00048] «Модификаторы подвижной фазы» включают такие молекулы, которые воздействуют на ионные или другие нековалентные взаимодействия, что, при добавлении к рН-градиенту или шагу, или при уравнивании содержащего белок А носителя в «модификаторе подвижной фазы» и применении шага или градиента рН, приводит к увеличению разницы между единицами рН для элюции гомодимерного IgG и гетеродимерного IgG (например, IgG дикого типа человека и того же IgG, но несущего одну или несколько модификаций его СН3-домена, как описано в настоящем документе). Подходящую концентрацию «модификатора подвижной фазы» можно определять по его концентрации, используемой для той же колонки, рН стадии или градиента, с повышением концентрации «модификатора подвижной фазы» до тех пор, пока не будет достигнута максимальная разница рН при данном шаге рН или градиенте рН. «Модификаторы подвижной фазы» также могут включать неполярные модификаторы, включая, например, пропиленгликоль, этиленгликоль и т. д.

[00049] Аффинная матрица представляет собой неводную матрицу в виде твердого носителя, на которую прикрепляется аффинный белок, например, белок А, белок G, белок L, белок Z или их рекомбинантные производные (Choe, W., et al, 2016, выше). Такие носители включают агарозу, сефарозу, стекло, диоксид кремния, полистирол, нитроцеллюлозу, уголь, песок, целлюлозу и любой другой подходящий материал. Такие материалы хорошо известны в данной области. Для прикрепления второго белка к твердому носителю можно применять любой подходящий способ. Способы прикрепления белков к подходящим твердым носителям хорошо известны в данной области. См., например, Ostrove, в *Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology*, 182: 357-371, 1990. Такие твердые носители, с иммобилизованным белком А и без него, доступны от многих коммерческих источников, включая, например, Vector Laboratory (Берлингейм, Калифорния), Santa Cruz Biotechnology (Санта-Круз, Калифорния), BioRad (Геркулес, Калифорния), Amersham Biosciences (филиал GE Healthcare, Уппсала, Швеция), Pall

(Порт-Вашингтон, Нью-Йорк) и EMD-Millipore (Биллерика, Массачусетс). Белок А, иммобилизованный на пористой стеклянной матрице, доступен на коммерческой основе как PROSEP®-А (Millipore). Твердая фаза также может представлять собой матрицу на основе агарозы. Белок А, иммобилизованный на агарозной матрице, доступен на коммерческой основе, например, как MABSELECT™ (GE Amersham Biosciences). Колонки для аффинной хроматографии, содержащие иммуноглобулин- или Fc-связывающий белок, могут быть изготовлены путем прикрепления любого из SpA или лигандов-миметиков SpA к твердому носителю.

[00050] В контексте настоящего документа «аффинная хроматография» представляет собой хроматографический метод, в котором для осуществления хроматографического разделения используются специфические обратимые взаимодействия между биомолекулами, а не общие свойства биомолекулы, такие как изоэлектрическая точка, гидрофобность или размер. «Аффинная хроматография с использованием белка А» или «хроматография с использованием белка А» относится к конкретному методу аффинной хроматографии, в котором используется аффинность IgG-связывающих доменов белка А в отношении Fc-части иммуноглобулиновой молекулы. Такая Fc-часть содержит константные домены CH2 и CH3 иммуноглобулина человека или животного или иммуноглобулиновые домены, в значительной степени подобные им.

[00051] Белок А представляет собой компонент клеточной стенки, продуцируемый несколькими штаммами *Staphylococcus aureus*, который состоит из одной полипептидной цепи. Продукт гена белка А состоит из пяти гомологичных повторов, тандемно прикрепленных к клеточной стенке патогенного организма. Длина пяти доменов составляет примерно 58 аминокислот, и они обозначены как EDABC, причем каждый домен проявляет иммуноглобулинсвязывающую активность (Tashiro M & Montelione G T (1995) Curr. Opin. Struct. Biol., 5(4): 471-481. Пять гомологичных иммуноглобулинсвязывающих доменов укладываются в трехспиральный пучок. Каждый домен способен к связыванию белков многих видов млекопитающих, в первую очередь IgG (Hober S et al., (2007) J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 848(1): 40-47). Белок А связывает тяжелую цепь большинства иммуноглобулинов в пределах Fc-области, но также в пределах Fab-области в случае семейства VH3 человека (Jansson B et al, (1998) FEMS Immunol. Med. Microbiol., 20(1): 69-78). Белок А связывает IgG различных видов, включая человека, мышь, кролика и морскую свинку, но не связывает IgG3 человека (Hober S et al., (2007), выше). Неспособность IgG3 человека связывать белок А можно объяснить наличием замен H435R и Y436F в Fc-области IgG3 (нумерация EU, Jendeberg et

al., (1997) J. Immunol. Methods, 201(1): 25-34). Помимо IgG, белок А также взаимодействует с IgM и IgA.

[00052] Способность белка А к связыванию антител с такой высокой аффинностью оказалась мотивирующим фактором к его применению в промышленном масштабе в области производства биологических препаратов. Белок А, применяемый для получения антител в составе биологических препаратов, как правило, получают рекомбинантным способом в *E. coli*, и он функционирует практически так же, как нативный белок А (Liu H F et al., (2010) MAbs, 2(5): 480-499). Чаще всего рекомбинантный белок А связывают с хроматографической смолой в качестве неподвижной фазы для очистки антител. Оптимальное связывание происходит при рН 8,2, хотя также надлежащее связывание происходит в нейтральных или физиологических условиях (рН 7,0-7,6). Элюция, как правило, обеспечивается за счет сдвига рН в сторону кислотного рН (глицин-НСl, рН 2,5-3,0). Это обеспечивает эффективную диссоциацию большинства связывающих взаимодействий белок-белок и антитело-антиген без необратимого воздействия на структуру белка. Тем не менее, некоторые антитела и белки повреждаются вследствие низкого рН, и в некоторых случаях лучше обеспечить нейтрализацию сразу же после выделения путем добавления 1/10 объема щелочного буфера, такого как 1 М Tris-НСl, рН 8,0, с целью минимизации продолжительности пребывания белка в условиях низкого рН.

[00053] Существуют различные доступные на коммерческой основе хроматографические смолы, содержащие белок А. Основными различиями между этими средами являются тип матрицы, модификация белка А в качестве лиганда, размер пор и размер частиц. Различия по таким факторам обуславливают различия в сжимаемости, химической и физической устойчивости, диффузионном сопротивлении и связывающей способности адсорбентов (Hober S et al., (2007), выше). Примеры содержащих белок А хроматографических смол включают без ограничения содержащую белок А смолу MabSelect SuRe™ и содержащую белок А смолу MabSelect™ от GE Healthcare, колонку с белком А EconoPac от BioRad, rProA, доступную от Applied Biosystems, и POROS® А от Thermo Fisher, как видно в примерах.

[00054] В контексте настоящего документа белок А включает нативный белок клеточной стенки *Staphylococcus aureus*, белок А, полученный с помощью рекомбинантных способов или способов синтеза, и варианты, которые сохраняют способность к связыванию с Fc-областью. Сконструированный белок А может представлять собой, например, тетрамер Z-доменов, тетрамер Y-доменов или сконструированный белок А, в котором отсутствуют D- и E-домены. Такие варианты

сконструированного белка А неспособны связываться (или, если и связываются, то с очень низкой аффинностью) с VH3-доменом иммуноглобулина, но все еще могут связываться с CH3-доменами IgG1, IgG2 и IgG4. На практике, хроматография с использованием белка А включает применение белка А, иммобилизованного на твердом носителе. См. Gagnon, Protein A Affinity Chromatography, Purification Tools for Monoclonal Antibodies, pp. 155-198, Validated Biosystems, 1996.

[00055] Белок G представляет собой белок клеточной стенки бактерий, выделенный из *Streptococci* группы С и G. ДНК-секвенирование гена нативного белка G, выделенного из разных *Streptococci*, позволило идентифицировать иммуноглобулинсвязывающие домены, а также сайты связывания альбумина и клеточной поверхности. В зависимости от штамма, как иммуноглобулинсвязывающая область, так и альбуминсвязывающая область состоят из 2-3 независимо сворачивающихся единиц (Tashiro M & Montelione G T (1995) Curr. Opin. Struct. Biol., 5(4): 471-481). Белок G штамма G148 состоит из 3 альбумин- и иммуноглобулинсвязывающих доменов, соответственно обозначаемых ABD1, ABD2 и ABD3 и C1, C2 и C3 (Olsson A et al., (1987) Eur. J. Biochem., 168(2): 319-324.). Каждый из иммуноглобулинсвязывающих доменов, обозначаемых C1, C2 и C3, имеет примерно 55 остатков и разделен линкерами из приблизительно 15 остатков. Все экспериментально определенные 3D-структуры иммуноглобулинсвязывающих доменов белка G характеризуются очень компактной глобулярной структурой без каких-либо дисульфидных мостиков или прочно связанных простетических групп (Sauer-Eriksson A E et al., (1995) Structure, 3(3): 265-278; Derrick J P & Wigley D B (1992) Nature, 359(6397): 752-754; Derrick J P & Wigley D B (1994) J. Mol. Biol., 243(5): 906-918; Lian L Y et al., (1994) Nat. Struct. Biol., 1(6): 355-357). Указанная структура содержит состоящий из четырех тяжёлых бета-лист, образованный двумя антипараллельными бета-шпильками, соединёнными альфа-спиралью.

[00056] Показано, что штаммы *Streptococcus* из групп С и G, в отличие от белка А, связываются с IgG человека всех подклассов, включая IgG3. Белок G также связывается с несколькими IgG животных, включая мышь, кролика и овцу (Bjorck L & Kronvall G (1984) J. Immunol., 133(2): 969-974; Akerstrom B et al., (1985) J. Immunol., 135(4): 2589-2592; Akerstrom B & Bjorck L (1986) J. Biol. Chem., 261(22): 10240-10247; Fahnestock S R et al., (1986) J. Bacteriol., 167(3): 870-880). Следовательно, белок G характеризуется более широким спектром связывания в отношении подклассов разных видов, в сравнении с белком А. Кроме того, белок G с высокой аффинностью связывается с Fab-частью IgG. Структура связывающего домена белка G стрептококка была определена как в отдельности (с помощью ЯМР, Lian L Y et al., (1994), выше), так и в комплексе с Fab IgG1

(с помощью рентгеноструктурного анализа, Derrick J P & Wigley D B (1992), выше, и Derrick J P & Wigley D B (1994), выше). Для всех экспериментально определенных 3D-структур было показано связывание в пределах СН1-домена тяжелых цепей IgG.

[00057] В контексте настоящего документа белок G может представлять собой встречающийся в природе или модифицированный белок G стрептококка или он может представлять собой сконструированный белок G. Сконструированный белок G может содержать V1-домен (также известный как GB1) и может быть конъюгированным или неконъюгированным. Согласно другому варианту осуществления вторая аффинная матрица содержит белок L в качестве лиганда и его производные, прикрепленные к твердому субстрату. Подобно белку A, рекомбинантный белок G, продуцируемый в *E. coli*, можно применять для очистки антител. Домены, связывающиеся с альбумином и клеточной поверхностью, были удалены из рекомбинантного белка G с целью снижения неспецифического связывания и, следовательно, их можно применять для выделения IgG из необработанных образцов. Подобно белку A, рекомбинантный белок G связывают с хроматографической смолой в качестве неподвижной фазы для очистки антител. Оптимальное связывание происходит при pH 5, хотя также надлежащее связывание происходит при pH 7,0-7,2; как и в случае белка A, элюция также обеспечивается за счет сдвига pH в сторону кислотного pH (глицин-HCl, pH 2,5-3,0). Примеры содержащих белок G хроматографических смол включают без ограничения содержащую белок G смолу Sepharose™ 4 Fast Flow и колонку с белком G HiTrap™ HP от GE Healthcare.

[00058] Подобно белку A, рекомбинантный белок G, продуцируемый в *E. coli*, обычно применяют для очистки антител. Домены, связывающиеся с альбумином и клеточной поверхностью, были удалены из рекомбинантного белка G с целью снижения неспецифического связывания и, следовательно, их можно применять для выделения IgG из необработанных образцов. Подобно белку A, рекомбинантный белок G связывают с хроматографической смолой в качестве неподвижной фазы для очистки антител. Оптимальное связывание происходит при pH 5, хотя также надлежащее связывание происходит при pH 7,0-7,2; как и в случае белка A, элюция также обеспечивается за счет сдвига pH в сторону кислотного pH (глицин-HCl, pH 2,5-3,0). Примеры содержащих белок G хроматографических смол включают без ограничения содержащую белок G смолу Sepharose™ 4 Fast Flow и колонку с белком G HiTrap™ HP от GE Healthcare, rProG, доступный от Applied Biosystems, и POROS® G от Thermo Fisher, как видно в примерах.

[00059] Другие белки, такие как белок L, белок M1 и белок H, также можно применять в аффинной хроматографии по настоящему изобретению. Белок L представляет собой иммуноглобулинсвязывающий белок, который первоначально был

получен из бактерий *Peptostreptococcus magnus*, но теперь его получают рекомбинантным способом (Bjorck L (1988) J. Immunol., 140(4): 1194-1197; Kastern W et al., (1992) J. Biol. Chem., 267(18): 12820-12825). Белок L обладает уникальной способностью к связыванию посредством взаимодействий с легкой каппа-цепью, не затрагивая антигенсвязывающий сайт антитела (Nilson B H et al., (1993) J. Immunol. Methods, 164(1): 33-40). Это дает белку L способность к связыванию с более широким спектром классов и подклассов иммуноглобулинов, в сравнении с другими антитело-связывающими белками. Белок L связывается с иммуноглобулинами всех классов (IgG, IgM, IgA, IgE и IgD). Белок L также связывает одноцепочечные варибельные фрагменты (scFv) и Fab-фрагменты (Nilson B H et al., (1993), выше; Bottomley S P et al., (1995) Bioseparation, 5(6): 359-367). Белок L связывает варибельные домены каппа-цепей I, III и IV подклассов человека и каппа-цепей I подкласса мыши (Nilson B H et al., (1992), выше). Примеры содержащих белок L хроматографических смол включают без ограничения содержащую белок L смолу от Genescript, применяемую в примерах.

[00060] Белок M1 и белок H представляют собой белки клеточной поверхности, присутствующие одновременно на поверхности определенных штаммов *Streptococcus pyogenes*. Белок H обладает аффинностью в отношении Fc-области IgG (Akesson P et al., (1990) Mol. Immunol., 27(6): 523-531; Akesson P et al., (1994) Biochem. J., 300 (Pt 3): 877-886). Белок H связывается с Fc-областью IgG человека, обезьян и кроликов (Akesson P et al., (1990), выше; Frick I M et al., (1995) EMBO J., 14(8): 1674-1679). Белки M, как известно, также связывают фибриноген (Kantor F S (1965) J Exp Med, 121: 849-859), и в предыдущей работе было продемонстрировано, что белок M1 штамма API также обладает аффинностью в отношении альбумина и поликлонального IgG (Schmidt K H & Wadstrom T (1990) Zentralbl. Bakteriол., 273(2): 216-228).

[00061] Аффинная хроматография также включает среды, которые можно применять для избирательного связывания и, следовательно, очистки антител, фрагментов антител или химерных слитых белков, которые содержат иммуноглобулиновые домены и/или последовательности. Антитела включают типы IgG, IgA, IgM, IgY, IgD и IgE. Антитела также включают одноцепочечные антитела, такие как антитела представителей верблюдовых, сконструированные антитела представителей верблюдовых, одноцепочечные антитела, однодоменные антитела, наноантитела и т. д. Фрагменты антител включают VH-, VL-, CL-, CH-последовательности. Фрагменты антител и слитые белки, содержащие последовательности антител, включают, например, F(ab')<sub>3</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fc, Fv, dsFv, (scFv)<sub>2</sub>, scFv, scAb, миниантитело, диатело, триатело, тетраатело, Fc-слитые белки, молекулы-ловушки и т. д. (см. Аyyar et al., Methods 56 (2012): 116-129).

Такие среды для аффинной хроматографии могут содержать лиганды, которые избирательно связывают антитела, их фрагменты и слитые белки, содержащие такие фрагменты. Такие лиганды включают антитело-связывающие белки, рецепторы бактериального происхождения, антигены, лектины или антитела, направленные на молекулу-мишень, антитело, для которого требуется очистка. Например, в качестве аффинных лигандов можно применять происходящие от представителя верблюдовых аффинные лиганды, направленные против любого одного или нескольких из IgG-CH1, IgG-Fc, IgG-CH3, IgG1, LC-каппа, LC-лямбда, IgG3/4, IgA, IgM и т. д. (доступны на коммерческой основе в виде хроматографических смол CAPTURESELECT, Life Technologies, Inc., Карлсбад, Калифорния).

[00062] Описаны методики, которые облегчают отделение гетеродимеров от гомодимеров за счет отличающейся аффинности гетеродимеров в отношении аффинного реагента. Первый пример методики, основанной на дифференциальной аффинности, включал применение двух разных тяжелых цепей от двух разных видов животных, причем одна из них не связывает белок А (Lindhofer H et al., (1995) *J Immunol.*, 155(1): 219-225). Эти же авторы также описали применение двух разных тяжелых цепей, происходящих от двух разных изоформ иммуноглобулина человека (IGHG1 и IGHG3), один из которых не связывает белок А (IGHG3; см. заявку на выдачу патента США № 6551592, Lindhofer H et al.). Вариант последней методики был описан в W010/151792 (Davis S et al.) и включал применение двух аминокислотных замен H435R/Y436F, описанных Jendeberg et al (Jendeberg et al., (1997) *J. Immunol. Methods*, 201(1): 25-34), предназначенных для значительного снижения аффинности в отношении белка А, в одной из тяжелых цепей гетеродимера.

[00063] В контексте настоящего документа термин «детектор» предусматривает хроматографическую колонку, оснащенную средством для детектирования и/или оценки компонентов смеси, подлежащих элюированию с хроматографической колонки. В данной области известны два основных типа детекторов: деструктивные и недеструктивные детекторы. Деструктивные детекторы осуществляют непрерывное преобразование элюата (сгорание, испарение или смешивание с реагентами) с последующим измерением определенного физического свойства полученного в результате материала (плазмы, аэрозоля или реакционной смеси). Недеструктивные детекторы позволяют напрямую измерять определенное свойство элюата (например, поглощение УФ) и, таким образом, позволяют проводить дальнейшее выделение для анализа. Примеры деструктивных детекторов включают детектор заряженного аэрозоля (CAD), пламенно-ионизационный детектор (FID), аэрозольный детектор (NQA), пламенно-фотометрический детектор (FPD),

атомно-эмиссионный детектор (AED), азотно-фосфорный детектор (NPD), испарительный детектор светорассеяния (ELSD), масс-спектрометр (MS), детектор по электролитической проводимости (ELCD), детектор подобия малых молекул (SMSD) и детектор *mira* (MD). Один из примеров неdestructивных детекторов включает УФ-детекторы, в том числе УФ-детекторы с фиксированной и изменяющейся длиной волны излучения, в том числе детектор на диодной матрице (DAD) или детектор на фотодиодной матрице (PDA). Поглощение УФ элюатом можно измерять непрерывно при одной или нескольких длинах волн. Другие примеры неdestructивных детекторов включают детектор по теплопроводности (TCD), флуоресцентный детектор (FLR), детектор по захвату электронов, фотоионизационный детектор (PID) и рефрактометрический детектор (RI или RID). Согласно одному примеру, для выявления и количественного определения элюата, вытекающего из колоночного отделения системы, можно использовать DAD/УФ-детектор. Биспецифическое FcFc\*-антитело, гомодимер FcFc и гетеродимер Fc\*Fc\* подвергаются избирательному элюированию из хроматографической системы, и сигнал улавливается посредством УФ-детектирования при 280 нм. Любой детектор может быть адаптирован для подключения системы терморегулирования, например, с использованием терморегулируемых проточных кювет с функцией охлаждения для обеспечения лучшей стабильности белкового материала.

[00064] Настоящее изобретение может быть использовано как часть хроматографической системы, например, коммерчески доступной хроматографической системы, такой как, например, HPLC-система, доступная от Shimadzu Corporation, Agilent Technologies, Waters Corporation и т. п. Согласно одному неограничивающему варианту осуществления такая система содержит, среди прочего, блок удерживания растворителя и/или реагента, систему управления растворителем/насос, систему управления образцами, систему управления колоночным отделением и детекторный блок. Один неограничивающий вариант осуществления показан на **фиг. 5**.

[00065] В блоке удерживания находятся растворители и буферы, применяемые в хроматографах, и он необязательно содержит дегазатор растворителя. Согласно одному варианту осуществления растворители и буферы проходят через дегазатор растворителя перед подачей в систему управления растворителем.

[00066] Система управления растворителем предназначена для доставки растворителя и может включать компьютерную платформу, конфигурируемую для решения задач аналитической системы в соответствии с каждым конкретным вариантом осуществления с целью улучшения разделения и разрешения пиков, и может включать, например, модули для создания бинарного или четверного градиента. Система управления

растворителем может обеспечивать контроль, среди прочего, скорости потока растворителя, состава буферов и пределов давления HPLC-системы.

[00067] Система управления образцами необязательно может предусматривать блок контроля температуры, способный изменять температуру (например, обеспечивать охлаждение и/или нагревание) или поддерживать постоянную температуру образца (например, путем охлаждения образца до постоянной температуры) до загрузки на колонки. Согласно одному варианту осуществления образцы содержатся в отделении системы управления образцами и хранятся при 4°C до тех пор, пока не начнется введение проб. Образцы подаются в автодозатор, где игла направляется прямо к образцу, указанному в очереди. Согласно одному варианту осуществления автодозатор дополнительно содержит регулятор давления для управления переполнением вводимого растворителя и/или образца. Из иглы автодозатора образец затем поступает в колоночное отделение.

[00068] Количество, или количественное значение, белка во фракции можно определять путем элюирования белка через детектор и с применением вычислительных способов, известных в данной области. Система дополнительно может содержать контроллер системы или другое компьютеризованное устройство.

[00069] Анализ для контроля чистоты и/или качества осуществляют путем проведения анализа и количественного определения соотношений трех типов белка, присутствующих в образце. Чистоту белка в смеси можно рассчитывать путем определения количества каждой фракции белка и расчета соотношения количества представляющего интерес белка и суммы количеств всех белков в смеси. В качестве примера, чистоту гетеродимерного белка в смеси, содержащей гетеродимерный белок и две или более белковых примесей, можно измерить с помощью определения количества каждой фракции белка и расчета соотношения количества гетеродимерного белка и суммы количеств гетеродимерного белка и двух или более белковых примесей.

[00070] Показатель чистоты биспецифической молекулы представляет собой процентную долю биспецифического антитела от общего количества антител, определенную по **уравнению 1**. В качестве примера, чистоту FcFc\* в смеси, содержащей FcFc, FcFc\* и Fc\*Fc\*, можно измерить следующим образом:

[00071] **Уравнение 1:** Измерение чистоты биспецифического антитела

$$\text{Чистота FcFc*} = \frac{\text{количество FcFc*}}{(\text{количество FcFc} + \text{количество FcFc*} + \text{количество Fc*Fc*})}$$

[00072] В контексте настоящего документа переключающий клапан, клапан переключения потока или клапан управления потоком представляет собой средство для направления, изменения или отсечения пути потока элюента из хроматографической колонки. Переключающий клапан может быть многоходовым, например, двухходовым, трехходовым, четырехходовым и т. д., т. е. переключающий клапан может направлять поток к двум, трем или более различным приемникам. Приемники могут быть любого типа, например, хроматографические колонки, колонки для аффинной хроматографии, детекторы или резервуар для удаляемых отходов. Смена приемников обеспечивается путем перевода переключающего клапана в разные положения.

[00073] В качестве примера, в хроматографической системе переключающий клапан может соединять первую аффинную матрицу, вторую аффинную матрицу и детектор последовательно или непоследовательно. Согласно неограничивающим вариантам осуществления, например, показанным на **фигурах 5-7**, переключающий клапан может последовательно соединять первую аффинную матрицу со второй аффинной матрицей. В такой иллюстративной системе одно положение переключающего клапана будет обеспечивать поток элюента из первой аффинной матрицы во вторую аффинную матрицу, а затем в детектор. Перевод переключающего клапана в другое положение будет обеспечивать поток элюента из первой аффинной матрицы непосредственно в детектор, в обход второй аффинной матрицы. Поток элюента из второй аффинной матрицы может попадать в детектор с вовлечением первой аффинной матрицы или без него. Вторая аффинная матрица может быть или может не быть непосредственно соединена с автодозатором. Согласно другому неограничивающему варианту осуществления, показанному на **фиг. 4В**, поток элюента из первой аффинной матрицы может попадать непосредственно в детектор, в обход второй аффинной матрицы.

[00074] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении описан способ количественной оценки количества и/или чистоты фракции гетеродимера путем использования новой хроматографической системы, предусматривающей переключающий клапан.

[00075] Согласно одному аспекту в настоящем изобретении описан способ измерения количества и/или чистоты белка в образце, содержащем смесь белка, первой белковой примеси и второй белковой примеси, причем белок и первая примесь связываются с первой аффинной матрицей, а вторая примесь практически не связывается с первой аффинной матрицей и связывается со второй аффинной матрицей, причем указанный способ предусматривает стадии:

[00076] а. внесения образца в хроматографическую систему, предусматривающую первую аффинную матрицу, вторую аффинную матрицу и детектор, причем первая аффинная матрица последовательно соединена со второй аффинной матрицей посредством переключающего клапана;

[00077] б. элюирования второй примеси с первой аффинной матрицы на вторую аффинную матрицу с использованием первого набора условий;

[00078] с. перевода переключающего клапана в режим обхода второй аффинной матрицы, элюирования белка через детектор с использованием второго набора условий и определения количества элюированного белка;

[00079] д. элюирования первой примеси через детектор с использованием третьего набора условий и определения количества элюированной первой примеси;

[00080] е. элюирования второй примеси со второй аффинной матрицы через детектор с использованием третьего набора условий и определения количества элюированной второй примеси, и

[00081] ф. измерения количества и/или чистоты белка в образце.

[00082] Согласно одному варианту осуществления белок представляет собой мультимерный белок, например, антитело. Согласно одному варианту осуществления белок является представляющим интерес антителом и первая и вторая белковые примеси представляют собой мультимерные белки, например, антитела, которые могут быть или могут не быть структурно родственными с представляющим интерес антителом. Согласно одному варианту осуществления белок представляет собой биспецифическое антитело, т. е. гетеродимерный белок, первая белковая примесь представляет собой первый гомодимерный белок и вторая белковая примесь представляет собой второй гомодимерный белок. В некоторых случаях смесь мультимерных белков продуцируется множеством эукариотических клеток, таких как, например, клетки яичника китайского хомячка (СНО), в культуре клеток.

[00083] Согласно одному варианту осуществления белок характеризуется более низкой аффинностью к первой аффинной матрице, чем первая примесь. Согласно одному варианту осуществления белок представляет собой гетеродимерный белок, первая белковая примесь представляет собой первый гомодимерный белок и вторая белковая примесь представляет собой второй гомодимерный белок, причем гетеродимерный белок и первый гомодимерный белок связываются с первой аффинной матрицей, а второй гомодимерный белок практически не связывается с первой аффинной матрицей и связывается со второй аффинной матрицей.

[00084] Согласно одному варианту осуществления белок содержит первый иммуноглобулиновый СНЗ-домен и второй иммуноглобулиновый СНЗ-домен, причем указанные первый и второй иммуноглобулиновые СНЗ-домены отличаются по их аффинности к первой аффинной матрице, и причем образец содержит смесь, содержащую указанный белок, белок, содержащий два первых СНЗ-домена, и белок, содержащий два вторых СНЗ-домена.

[00085] Согласно одному варианту осуществления второй СНЗ-домен предусматривает аминокислотные замены Н435R и Y436F (согласно системе нумерации EU; Н95R/Y96F согласно системе нумерации экзонов IMGT).

[00086] Согласно одному варианту осуществления первая аффинная матрица содержит белок А в качестве лиганда и его производные, прикрепленные к твердому субстрату. В некоторых случаях субстрат представляет собой гранулу или частицу, так что аффинная матрица представляет собой множество частиц с прикрепленным белком А. Белок А может представлять собой встречающийся в природе или модифицированный белок А стафилококка или он может представлять собой сконструированный белок А. Сконструированный белок А может представлять собой, например, тетрамер Z-доменов, тетрамер Y-доменов или сконструированный белок А, в котором отсутствуют D- и E-домены. Такие варианты сконструированного белка А неспособны связываться (или, если и связываются, то с очень низкой аффинностью) с VH3-доменом иммуноглобулина, но все еще могут связываться с СНЗ-доменами IgG1, IgG2 и IgG4.

[00087] Согласно одному варианту осуществления вторая аффинная матрица содержит белок G в качестве лиганда и его производные, прикрепленные к твердому субстрату. В некоторых случаях субстрат представляет собой гранулу или частицу, так что аффинная матрица представляет собой множество частиц с прикрепленным белком G. Белок G может представлять собой встречающийся в природе или модифицированный белок G стрептококка или он может представлять собой сконструированный белок G. Сконструированный белок G может содержать B1-домен (также известный как GB1) и может быть конъюгированным или неконъюгированным. Согласно другому варианту осуществления вторая аффинная матрица содержит белок L в качестве лиганда и его производные, прикрепленные к твердому субстрату.

[00088] Согласно одному варианту осуществления условия элюции могут предусматривать конкретный диапазон pH и буфер, содержащий модификатор подвижной фазы, например, хаотропное средство. Согласно одному варианту осуществления первый набор условий элюции для элюирования второй примеси, например, второго гомодимерного белка, предусматривает первый pH. Согласно одному варианту

осуществления второй набор условий элюции для элюирования белка, например, гетеродимерного белка, предусматривает второй рН. Согласно одному варианту осуществления третий набор условий элюции для элюирования первой примеси, например, первого гомодимерного белка, предусматривает третий рН. Согласно одному варианту осуществления второй рН может быть ниже первого рН. Согласно одному варианту осуществления третий рН может быть ниже второго рН. Согласно одному варианту осуществления второй рН может быть ниже первого рН, а третий рН может быть ниже второго рН. Согласно другому варианту осуществления первый рН может составлять более рН 5, или от приблизительно рН 5 до приблизительно рН 8, или от приблизительно рН 5,2 до приблизительно рН 7,4, или рН 6,4. Согласно одному варианту осуществления второй рН может составлять от приблизительно рН 3,5 до приблизительно рН 6 или от приблизительно 3,8 до приблизительно 5,6. Согласно одному варианту осуществления третий рН может составлять менее рН 4, или от приблизительно рН 1,5 до приблизительно рН 3,6, или от приблизительно рН 2,0 до приблизительно рН 2,8, или приблизительно рН 2,2.

[00089] Согласно одному варианту осуществления первый, второй и третий наборы условий элюции предусматривают подходящий буфер, например, цитратный, ацетатный, 4-морфолинэтансульфонатный (MES), фосфатный, сукцинатный и т. п., а также их комбинации и смеси. Согласно одному варианту осуществления первый, второй и третий наборы условий элюции предусматривают хаотропное средство. Хаотропное средство может представлять собой соль, имеющую катион, выбранный из лития, магния, кальция и гуанидина, и анион, выбранный из хлорида, нитрата, бромида, хлората, йодида, перхлората и тиоцианата. Согласно одному конкретному варианту осуществления хаотропное средство представляет собой  $\text{CaCl}_2$ , например, 250-500 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Согласно другому конкретному варианту осуществления хаотропное средство представляет собой  $\text{MgCl}_2$ , например, 250-500 мМ  $\text{MgCl}_2$ .

[00090] Согласно одному варианту осуществления гетеродимер представляет собой биспецифическое антитело. В данном случае первый полипептид содержит СНЗ-домен, который способен связываться с белком А («Fc»), а второй полипептид содержит СНЗ-домен, который не способен связываться с белком А («Fc\*»). В некоторых случаях второй полипептид предусматривает замену Н435R/Y436F (согласно системе нумерации EU; Н95R/Y96F согласно системе нумерации экзонов IMGT) в его СНЗ-домене (также «Fc\*» или «замена, обозначаемая звездочкой»). Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления первый гомодимер представляет собой моноспецифическое антитело, имеющее два СНЗ-домена без замен (т. е. FcFc); второй гомодимер представляет собой

моноспецифическое антитело, имеющее два СНЗ-домена с заменами Н435R/Y436F (т. е. Fc\*Fc\*); и гетеродимер представляет собой биспецифическое антитело, имеющее один СНЗ-домен без замен, и один СНЗ-домен с заменами Н435R/Y436F (т. е. Fc\*Fc).

[00091] Согласно другому аспекту в настоящем изобретении описан способ измерения количества и/или чистоты гетеродимерного белка в образце, содержащем смесь гетеродимерного белка, первого гомодимерного белка и второго гомодимерного белка, причем гетеродимерный белок и первый гомодимерный белок связываются с содержащей белок А матрицей, а второй гомодимерный белок практически не связывается с содержащей белок А матрицей и связывается с содержащей белок G матрицей, причем указанный способ предусматривает стадии:

[00092] а. внесения образца в хроматографическую систему, предусматривающую содержащую белок А матрицу, содержащую белок G матрицу и детектор, причем содержащая белок А матрица последовательно соединена с содержащей белок G матрицей посредством переключающего клапана;

[00093] б. элюирования второго гомодимерного белка с содержащей белок А матрицы на содержащую белок G матрицу с использованием первого набора условий;

[00094] с. перевода переключающего клапана в режим обхода содержащей белок G матрицы, элюирования гетеродимерного белка через детектор с использованием второго набора условий и определения количества элюированного белка;

[00095] д. элюирования первого гомодимерного белка через детектор с использованием третьего набора условий и определения количества элюированной первой примеси;

[00096] е. элюирования второго гомодимерного белка со второй аффинной матрицы через детектор с использованием третьего набора условий и определения количества элюированной второй примеси, и

[00097] ф. измерения количества и/или чистоты белка в образце.

[00098] Дифференциальным связыванием первого гомодимера и гетеродимера со второй аффинной матрицей можно управлять путем изменения, среди прочего, рН и/или ионной силы раствора, который проходит через аффинную матрицу. Добавление хаотропного средства к раствору усиливает элюцию каждого типа димера со второй аффинной матрицы в составе неперекрывающихся фракций, за счет чего обеспечивается повышение чистоты каждого типа димера. Согласно одному варианту осуществления первый гомодимер, например, Fc\*Fc\*, элюируется с первой аффинной матрицы на вторую аффинную матрицу в буфере, характеризующемся первым рН. Согласно одному варианту осуществления гетеродимер, например, гетеродимер FcFc\*, элюируется с первой

аффинной матрицы непосредственно в детектор, минуя вторую аффинную матрицу, в буфере, характеризующемся вторым диапазоном рН. Согласно одному варианту осуществления второй гомодимер, например, FcFc, элюируется с первой аффинной матрицы непосредственно в детектор, минуя вторую аффинную матрицу, в буфере, характеризующемся третьим диапазоном рН. Согласно одному варианту осуществления первый гомодимер, например, Fc\*Fc\*, элюируется со второй аффинной матрицы на детектор в буфере, характеризующемся третьим рН. В данном случае первый диапазон рН предусматривает более высокий рН, чем второй диапазон рН, а второй диапазон рН предусматривает более высокий рН, чем третий диапазон рН.

[00099] Согласно одному варианту осуществления первый набор условий элюции для элюирования второй примеси, например, второго гомодимерного белка, предусматривает первый рН. Согласно одному варианту осуществления второй набор условий элюции для элюирования белка, например, гетеродимерного белка, предусматривает второй рН. Согласно одному варианту осуществления третий набор условий элюции для элюирования первой примеси, например, первого гомодимерного белка, предусматривает третий рН. Согласно одному варианту осуществления второй рН может быть ниже первого рН. Согласно одному варианту осуществления третий рН может быть ниже второго рН. Согласно одному варианту осуществления второй рН может быть ниже первого рН, а третий рН может быть ниже второго рН. Согласно другому варианту осуществления первый рН может составлять более рН 5, или от приблизительно рН 5 до приблизительно рН 8, или от приблизительно рН 5,2 до приблизительно рН 7,4. Согласно одному варианту осуществления второй рН может составлять от приблизительно рН 4 до приблизительно рН 5 или от приблизительно 4,2 до приблизительно 5,0. Согласно одному варианту осуществления третий рН может составлять менее рН 4, или от приблизительно рН 2 до приблизительно рН 3,6, или от приблизительно рН 2,2 до приблизительно рН 2,8.

[000100] Согласно одному аспекту, раскрыт способ определения количества и/или чистоты FcFc\*-белка в образце, причем указанный FcFc\*-белок содержит первый иммуноглобулиновый СНЗ-домен (Fc), его фрагмент и/или производное, и второй иммуноглобулиновый СНЗ-домен (Fc\*), его фрагмент и/или производное, причем указанные первый и второй иммуноглобулиновые СНЗ-домены отличаются по их аффинности к первой матрице для аффинного связывания белков, и причем образец содержит смесь, содержащую указанный FcFc\*-белок, белок, содержащий два первых СНЗ-домена (FcFc-белок), и белок, содержащий два вторых СНЗ-домена (Fc\*Fc\*-белок), причем указанный способ предусматривает стадии:

(a) внесения образца в первую матрицу для аффинного связывания белков с использованием первого набора условий, причем указанный FcFc\*-белок и указанный FcFc-белок связываются с указанной первой матрицей для аффинного связывания белков, а указанный Fc\*Fc\*-белок практически не связывается с указанной первой матрицей для аффинного связывания белков;

(b) промывки указанной первой матрицы для аффинного связывания белков с использованием первого набора условий;

(c) внесения элюата из стадии (a) и продукта после промывки из стадии (b) во вторую матрицу для аффинного связывания белков с использованием такого набора условий, при которых Fc\*Fc\*-белок связывается с указанной второй матрицей для аффинного связывания белков;

(d) промывки указанной второй матрицы для аффинного связывания белков с использованием того же набора условий, что и на стадии (c);

(e) элюирования Fc\*Fc\*-белка из указанной второй матрицы для аффинного связывания белков и определения количества указанного элюированного Fc\*Fc\*-белка;

(f) элюирования остаточного связанного Fc\*Fc\*-белка с указанной первой матрицы для аффинного связывания белков с использованием второго набора условий и определения количества указанного элюированного Fc\*Fc\*-белка;

(g) элюирования FcFc\*-белка, связанного с указанной первой матрицей для аффинного связывания белков, с использованием третьего набора условий и определения количества указанного элюированного FcFc\*-белка;

(h) элюирования FcFc-белка, связанного с указанной первой матрицей для аффинного связывания белков, с использованием четвертого набора условий и определения количества указанного элюированного FcFc-белка, и

(i) определения количества и/или чистоты FcFc\*-белка в образце, причем стадию (d) и/или стадию (e) можно осуществлять до, после осуществления стадий (f)-(h), или одновременно с ними.

[000101] Согласно одному аспекту, раскрыт способ определения количества и/или чистоты биспецифического антитела (например, FcFc\*-антитела) в образце, причем указанное FcFc\*-антитело содержит первую тяжелую цепь иммуноглобулина (Fc) и вторую тяжелую цепь иммуноглобулина (Fc\*), причем указанные первая и вторая тяжелые цепи иммуноглобулина отличаются по их аффинности к белку А и причем образец содержит смесь, содержащую указанное FcFc\*-антитело, антитело, содержащее две первые тяжелые цепи (FcFc-антитело), и антитело, содержащее две вторые тяжелые цепи (Fc\*Fc\*-антитело), причем указанный способ предусматривает стадии:

(a) внесения образца в колонку для аффинной хроматографии с белком А (колонка с белком А) с использованием первого набора условий, причем указанное FcFc\*-антитело и указанное FcFc-антитело связываются на указанной колонке с белком А, тогда как указанное Fc\*Fc\*-антитело практически не связывается на указанной колонке с белком А, и причем колонка с белком А соединена через переключающий клапан с колонкой для аффинной хроматографии с белком G (колонка с белком G) так, что элюат из колонки с белком А может непосредственно вноситься в колонку с белком G, причем колонка с белком G также соединена с колонкой для HPLC;

(b) промывки указанной колонки с белком А с использованием первого набора условий с переключающим клапаном в положении, при котором элюат из колонки с белком А непосредственно вносится в колонку с белком G;

(c) промывки колонки с белком G при тех же условиях, что и на стадии (b);

(d) элюирования Fc\*Fc\*-антитела с колонки с белком G и определения количества указанного элюированного Fc\*Fc\*-антитела;

(e) перевода переключающего клапана в положение, при котором колонка с белком А отсоединяется от колонки с белком G и происходит соединение указанной колонки с белком А и колонки для HPLC;

(f) элюирования остаточного связанного Fc\*Fc\*-антитела с колонки с белком А с использованием второго набора условий и определения количества указанного элюированного Fc\*Fc\*-антитела;

(g) элюирования FcFc\*-антитела, связанного на указанной колонке с белком А, с использованием третьего набора условий и определения количества указанного элюированного FcFc\*-антитела;

(h) элюирования FcFc-антитела, связанного на указанной колонке с белком А, с использованием четвертого набора условий и определения количества указанного элюированного FcFc-антитела, и

(i) определения количества и/или чистоты FcFc\*-белка в образце,

причем стадию (c) и/или стадию (d) можно осуществлять до, после осуществления стадий (e)-(h), или одновременно с ними.

[000102] Согласно другому аспекту представлена хроматографическая система для очистки, анализа и/или оценки количества и/или чистоты белков. Согласно одному варианту осуществления хроматографическая система предусматривает первую аффинную матрицу, вторую аффинную матрицу и детектор, причем каждое из первой аффинной матрицы, второй аффинной матрицы и детектора соединены посредством переключающего клапана. Согласно одному варианту осуществления первая аффинная

матрица может представлять собой хроматографическую колонку с белком А. Согласно одному варианту осуществления вторая аффинная матрица может представлять собой хроматографическую колонку с белком G или белком L.

[000103] Согласно одному варианту осуществления детектор может представлять собой колонку для HPLC, оснащенную УФ-детектором, детектором заряженного аэрозоля и/или масс-спектрометром. Согласно одному варианту осуществления первая аффинная матрица и вторая аффинная матрица соединены последовательно посредством переключающего клапана. Согласно другому варианту осуществления все из первой аффинной матрицы, второй аффинной матрицы и детектора соединены последовательно посредством переключающего клапана. Согласно одному варианту осуществления первая аффинная матрица и вторая аффинная матрица соединены последовательно посредством переключающего клапана, но детектор непоследовательно соединен с первой аффинной матрицей и второй аффинной матрицей.

[000104] Согласно одному варианту осуществления представлена хроматографическая система, предусматривающая (i) хроматографическую колонку с белком А, (ii) хроматографическую колонку с белком G и (iii) детектор, предусматривающий колонку для HPLC, оснащенную УФ-детектором, детектором заряженного аэрозоля и/или масс-спектрометром, причем каждое из хроматографической колонки с белком А, хроматографической колонки с белком G и детектора соединены посредством переключающего клапана.

### **Примеры**

[000105] Нижеследующие примеры иллюстрируют конкретные аспекты настоящего описания. Примеры не должны толковаться как ограничивающие, поскольку примеры лишь обеспечивают точное понимание вариантов осуществления и их различных аспектов и возможности их реализации на практике.

[000106] Эксперименты по хроматографии осуществляли с применением HPLC-системы, адаптированной к конфигурациям, необходимым для осуществления описанного в настоящем документе способа. Клапаны InfinityLab Quick Change доступны от Agilent Technologies. Примеры подходящих клапанов включают без ограничения клапаны Agilent Quick Change G4231A/C, G4232C/D, G4234A/C, G4236A/B и G4238A/B. Неограничивающие примеры клапанов, подходящих для реализации настоящего изобретения, представлены во Всемирной паутине по адресу [agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G4232-90009\\_ValveKit\\_TN\\_EN.pdf](http://agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G4232-90009_ValveKit_TN_EN.pdf), а также в Acquity UPLC Systems with 2D Technology Capabilities Guide, Revision A, Waters

Corporation, 2012, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### [000107] Пример 1

[000108] Чистоту и количество биспецифического антитела в смеси, содержащей два загрязняющих гомодимера, определяли следующим образом (хроматограмма титров показана как **фиг. 1**). Два полипептида тяжелых цепей (IgG4 Fc- и IgG4-Fc\*-содержащие) и полипептид общей легкой цепи были коэкспрессированы в клетках CHO. Образец клеточного супернатанта, содержащего образующуюся в результате смесь гомодимеров и гетеродимера, подвергали высокоскоростному центрифугированию с целью устранения белковых агрегатов и полученный супернатант подвергали аффинной хроматографии в соответствии со способами очистки, описанными в публикации согласно РСТ № WO2016/018740, опубликованной 4 февраля 2016 года, включенной в настоящий документ посредством ссылки. Образец продукта очистки, содержащего гетеродимер FcFc\* и любые примеси, гомодимеры FcFc и Fc\*Fc\*, загружали на колонку с белком А 3 × 0,1 мл POROS® А 20 мкм (rProA, от Applied Biosystems, # 2-1001-00) в подвижной фазе с рН 6,4, содержащей 0,5 М NaCl. Колонка с белком А была последовательно соединена с колонкой с белком G 2 × 0,1 мл POROS® G 20 мкм (rProG, от Applied Biosystems, # 2-1002-00) и со стандартным УФ-детектором (скорость потока 2,0 мл/мин, УФ-детектирование пика на 280 нм) посредством переключающего клапана, как показано на **фиг. 4А**.

[000109] Для удаления технологических контаминаций, таких как ДНК CHO или белок клетки-хозяина (HCP), применяли серию промывок. Смесь элюировали с применением подвижной фазы с рН 5,6, содержащей 0,5 М CaCl<sub>2</sub>. Поскольку в гомодимере Fc\*Fc\* оба связывающих белок А сайта удалены из Fc-области, ожидается, что такая родственная примесь пройдет сквозь rProA сразу на rProG, тогда как биспецифический FcFc\* и гомодимер FcFc, как ожидается, останутся на rProA.

[000110] Затем переключающий клапан переводили в режим отключения rProG, что обеспечивает соединение rProA непосредственно с детектором. Биспецифическое FcFc\*-антитело затем подвергали избирательному элюированию с rProA на детектор с применением подвижной фазы с рН 3,8–5,6 (специфический для молекулы диапазон), содержащей 0,5 М хлорид кальция, тогда как примесь FcFc оставалась ввиду ее более прочного связывания по сравнению с биспецифическим FcFc\*-антителом. Рассчитывали количество FcFc\*. Затем примесь FcFc подвергали избирательному элюированию с rProA на детектор с применением подвижной фазы с рН 2,2, содержащей 0,5 М хлорид кальция, и рассчитывали количество FcFc.

[000111] Затем переключающий клапан переводили обратно в режим последовательно соединения с rProG в режиме реального времени, что обеспечивает соединение rProA с rProG, а rProG с детектором. Примесь Fc\*Fc\* затем элюировали на детектор с применением подвижной фазы с рН 2,2, содержащей 0,5 М хлорид кальция, и рассчитывали количество Fc\*Fc\*.

[000112] Количество и чистоту биспецифического FcFc\*-антитела определяли путем расчета соотношения фракции FcFc\* и суммы фракций FcFc, FcFc\* и Fc\*Fc\*.

[000113] Скорость потока при осуществлении способа, длительность промывки, длительность элюции биспецифической молекулы и % буфера С на стадии элюции способа были непрерывными переменными, которые были исследованы, и которые, как полагалось, вероятно, влияют на выделение всех трех типов антител. В приведенной ниже таблице 1 показаны параметры, их функция и значения, исследованные в рамках способа.

**[000114] Таблица 1. Переменные, определяющие устойчивость способа очистки биспецифической молекулы.**

Название	Функция	Значения
Скорость потока загрузки (мл/мин)	Непрерывная	0,5 - 2,5
Длительность промывки (CV)	Непрерывная	0 - 60
Длительность элюции биспецифической молекулы (CV)	Непрерывная	10 - 130
%С	Непрерывная	5 - 30
Изотип	Категориальная	IgG1*, IgG4*A, IgG4*B

[000115] В таблице 2 ниже показаны различные наборы условий для способов по настоящему изобретению оценки чистоты и количества трех образцов антител: IgG\*1, IgG4\*A и IgG4\*B.

**[000116] Таблица 2. Условия анализа устойчивости способа очистки биспецифической молекулы.**

№ Условия	Скорость потока (мл/мин)	Длительность промывки (CV)	Длительность элюции биспецифической молекулы (CV)	% Буфера С	Изотип
1	0,5	0	10	5	IgG1*
2	0,5	0	10	17,5	IgG4* В
3	0,5	0	10	30	IgG4* А

№ Условия	Скорость потока (мл/мин)	Длительность промывки (CV)	Длительность элюции биспецифической молекулы (CV)	% Буфера С	Изотип
4	0,5	0	130	5	IgG4* A
5	0,5	0	130	30	IgG1*
6	0,5	30	130	5	IgG4* B
7	0,5	60	10	5	IgG4* A
8	0,5	60	10	30	IgG1*
9	0,5	60	70	30	IgG4* B
10	0,5	60	130	5	IgG1*
11	0,5	60	130	30	IgG4* A
12	1,5	0	130	30	IgG4* B
13	1,5	30	10	5	IgG4* B
14	1,5	30	70	17,5	IgG4* A
15	1,5	60	130	5	IgG4* B
16	2,5	0	10	5	IgG4* A
17	2,5	0	10	30	IgG1*
18	2,5	0	70	5	IgG4* B
19	2,5	0	130	5	IgG1*
20	2,5	0	130	30	IgG4* A
21	2,5	30	10	30	IgG4* B
22	2,5	30	130	17,5	IgG4* B
23	2,5	60	10	5	IgG1*
24	2,5	60	10	17,5	IgG4* B
25	2,5	60	10	30	IgG4* A
26	2,5	60	130	5	IgG4* A
27	2,5	60	130	30	IgG1*

\* \* \*

[000117] Поскольку в отношении вышеописанного объекта изобретения могут быть внесены различные изменения, без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения, предполагается, что все объекты изобретения, содержащиеся в приведенном выше описании или определенные в прилагаемой формуле изобретения, истолковываются

как описательные и иллюстрирующие настоящее изобретение. В свете вышеизложенных идей возможны множество модификаций и вариаций настоящего изобретения. Соответственно, подразумевается, что настоящее описание охватывает все такие альтернативы, модификации и вариации, которые входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

[000118] Все патенты, патентные заявки, публикации, аналитические методы, литература и другие материалы, цитируемые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте, как если бы они физически присутствовали в настоящем описании.

## **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ количественной оценки количества и чистоты гетеродимерного антитела в образце, содержащем смесь гетеродимерного антитела, первой примеси гомодимерного антитела и второй примеси гомодимерного антитела, где гетеродимерное антитело и первая примесь гомодимерного антитела связываются с первой аффинной матрицей, вторая примесь гомодимерного антитела связывается со второй аффинной матрицей, но ее связывание с первой аффинной матрицей отменено, и гетеродимерное антитело имеет более низкую аффинность к первой аффинной матрице, чем первая примесь гомодимерного антитела,

причем указанный способ предусматривает стадии:

a. внесения образца в первую аффинную матрицу в хроматографической системе в условиях, при которых гетеродимерное антитело и первая примесь гомодимерного антитела связываются с первой аффинной матрицей, где хроматографическая система содержит первую аффинную матрицу, вторую аффинную матрицу, переключающий клапан и детектор, и где первая аффинная матрица последовательно соединена со второй аффинной матрицей посредством переключающего клапана,

b. промывки первой аффинной матрицы с применением первой подвижной фазы, содержащей хаотропное средство, имеющее от приблизительно рН 5,6 до приблизительно рН 7,4, с переключающим клапаном в положении, при котором элюат непосредственно вносится во вторую аффинную матрицу, где вторая примесь гомодимерного антитела в элюате связывается со второй аффинной матрицей, а гетеродимерное антитело и первая примесь гомодимерного антитела удерживаются на первой аффинной матрице,

c. перевода переключающего клапана для отключения первой аффинной матрицы от второй аффинной матрицы и соединения первой аффинной матрицы непосредственно с детектором, и затем элюирования гетеродимерного антитела с первой аффинной матрицы с применением второй подвижной фазы, содержащей хаотропное средство, имеющее от приблизительно рН 4,3 до приблизительно рН 5,0, где первая примесь гомодимерного антитела удерживается на первой аффинной матрице, и определения количества элюированного гетеродимерного антитела,

d. элюирования удержанной первой примеси гомодимерного антитела с первой аффинной матрицы через детектор с применением третьей подвижной фазы, содержащей хаотропное средство, имеющее от приблизительно рН 2,0 до приблизительно рН 2,8, и определения количества элюированной первой примеси гомодимерного антитела,

e. перевода переключающего клапана обратно для последовательного соединения

первой аффинной матрицы со второй аффинной матрицей и второй аффинной матрицы с детектором, и затем элюирования второй примеси гомодимерного антитела со второй аффинной матрицы через детектор с применением третьей подвижной фазы, и определения количества элюированной второй примеси гомодимерного антитела, и

f. количественной оценки количества гетеродимерного антитела в образце, как на стадии (с), и чистоты гетеродимерного антитела в образце,

где чистоту гетеродимерного антитела определяют по соотношению количества гетеродимерного антитела и суммы количеств первой примеси гомодимерного антитела, гетеродимерного антитела и второй примеси гомодимерного антитела.

2. Способ по п. 1, где:

гетеродимерное антитело представляет собой биспецифическое антитело, содержащее одну тяжелую цепь без замен и одну тяжелую цепь с заменами,

первая примесь гомодимерного антитела представляет собой моноспецифическое антитело, содержащее две тяжелые цепи без замен,

вторая примесь гомодимерного антитела представляет собой моноспецифическое антитело, содержащее две тяжелые цепи с заменами,

тяжелая цепь без замен связывается как с первой аффинной матрицей, так и со второй аффинной матрицей, и

тяжелая цепь с заменами связывается со второй аффинной матрицей, но ее связывание с первой аффинной матрицей отменено.

3. Способ по п. 1, где:

гетеродимерное антитело представляет собой биспецифическое антитело, содержащее один СНЗ-домен без замен и один СНЗ-домен с заменами,

первая примесь гомодимерного антитела представляет собой моноспецифическое антитело, содержащее два СНЗ-домена без замен,

вторая примесь гомодимерного антитела представляет собой моноспецифическое антитело, содержащее два СНЗ-домена с заменами,

СНЗ-домен без замен связывается как с первой аффинной матрицей, так и со второй аффинной матрицей, и

СНЗ-домен с заменами связывается со второй аффинной матрицей, но ее связывание с первой аффинной матрицей отменено.

4. Способ по п. 3, где СНЗ-домен с заменами содержит аминокислотные замены Н435R и Y436F.

5. Способ по п. 1, где:

гетеродимерное антитело представляет собой человеческое IgG1, IgG2 или IgG4

антитело,

первая примесь гомодимерного антитела представляет собой человеческое IgG1, IgG2 или IgG4 антитело, и

вторая примесь гомодимерного антитела представляет собой человеческое IgG1, IgG2 или IgG4 антитело.

6. Способ по п. 1, где первая аффинная матрица содержит белок А, и вторая аффинная матрица содержит белок G.

7. Способ количественной оценки количества и чистоты гетеродимерного антитела в образце, содержащем смесь гетеродимерного антитела, первой примеси гомодимерного антитела и второй примеси гомодимерного антитела, где гетеродимерное антитело и первая примесь гомодимерного антитела связываются с первой аффинной матрицей, вторая примесь гомодимерного антитела связывается со второй аффинной матрицей, но ее связывание с первой аффинной матрицей отменено, и гетеродимерное антитело имеет более низкую аффинность к первой аффинной матрице, чем первая примесь гомодимерного антитела,

где гетеродимерное антитело представляет собой биспецифическое человеческое IgG1, IgG2 или IgG4 антитело, содержащее один СН3-домен без замен и один СН3-домен с заменами Н435R/Y436F, т.е. FcFc\* антитело, первая примесь гомодимерного антитела представляет собой моноспецифическое человеческое IgG1, IgG2 или IgG4 антитело, содержащее два СН3-домена без замен, т.е. FcFc антитело, и вторая примесь гомодимерного антитела представляет собой моноспецифическое человеческое IgG1, IgG2 или IgG4 антитело, содержащее два СН3-домена с заменами Н435R/Y436F, т.е. Fc\*Fc\* антитело, где Fc означает тяжелую цепь, имеющую СН3-домен без замен, и Fc\* означает тяжелую цепь, имеющую СН3-домен с заменами,

где первая аффинная матрица содержит белок А, т.е. аффинная матрица белка А, и вторая аффинная матрица содержит белок G, т.е. аффинная матрица белка G, где СН3-домен без замен связывается как с аффинной матрицей белка А, так и с аффинной матрицей белка G, СН3-домен с заменами Н435R/Y436F связывается с аффинной матрицей белка G, но его связывание с аффинной матрицей белка А отменено,

причем указанный способ предусматривает стадии:

а. внесения образца в аффинную матрицу белка А в хроматографической системе в условиях, при которых FcFc\* антитело и FcFc антитело связываются с аффинной матрицей белка А, где хроматографическая система содержит аффинную матрицу белка А, аффинную матрицу белка G, переключающий клапан и детектор, и где аффинная матрица белка А последовательно соединена с аффинной матрицей белка G посредством

переключающего клапана,

b. промывки аффинной матрицы белка А с применением первой подвижной фазы, содержащей хаотропное средство, имеющее от приблизительно рН 5,6 до приблизительно рН 7,4, с переключающим клапаном в положении, при котором элюат непосредственно вносится в аффинную матрицу белка G, где Fc\*Fc\* антитело в элюате связывается с аффинной матрицей белка G, а FcFc\* антитело и FcFc антитело удерживаются на аффинной матрице белка А,

c. перевода переключающего клапана для отключения аффинной матрицы белка А от аффинной матрицы белка G и соединения аффинной матрицы белка А непосредственно с детектором, и затем элюирования FcFc\* антитела с аффинной матрицы белка А с применением второй подвижной фазы, содержащей хаотропное средство, имеющее от приблизительно рН 4,3 до приблизительно рН 5,0, где FcFc антитело удерживается на аффинной матрице белка А, и определения количества элюированного FcFc\* антитела,

d. элюирования оставшегося FcFc антитела с аффинной матрицы белка А через детектор с применением третьей подвижной фазы, содержащей хаотропное средство, имеющее от приблизительно рН 2,0 до приблизительно рН 2,8, и определения количества элюированного FcFc антитела,

e. перевода переключающего клапана обратно для последовательного соединения аффинной матрицы белка А с аффинной матрицей белка G и аффинной матрицы белка G с детектором, и затем элюирования Fc\*Fc\* антитела с аффинной матрицы белка G через детектор с применением третьей подвижной фазы, и определения количества элюированного Fc\*Fc\* антитела, и

f. количественной оценки количества гетеродимерного антитела в образце, как на стадии (c), и чистоты гетеродимерного антитела в образце, где чистоту гетеродимерного антитела определяют по соотношению количества FcFc\* антитела и суммы количеств FcFc антитела, FcFc\* антитела и Fc\*Fc\* антитела.

8. Способ по п. 1 или 7, где:

гетеродимерное антитело представляет собой человеческое IgG1 или IgG4 антитело, первая примесь гомодимерного антитела представляет собой человеческое IgG1 или IgG4 антитело, и

вторая примесь гомодимерного антитела представляет собой человеческое IgG1 или IgG4 антитело.

9. Способ по п. 1 или 7, где хаотропное средство представляет собой солевой буфер, выбранный из LiCl-, NaCl-, KCl-, MgCl<sub>2</sub>- и CaCl<sub>2</sub>-буфера.

10. Хроматографическая система, предусматривающая первую аффинную матрицу,

вторую аффинную матрицу и детектор для количественной оценки количества и чистоты гетеродимерного антитела в образце, содержащем смесь гетеродимерного антитела, первой примеси гомодимерного антитела и второй примеси гомодимерного антитела, где первая аффинная матрица последовательно соединена со второй аффинной матрицей посредством переключающего клапана, где гетеродимерное антитело и первая примесь гомодимерного антитела связываются с первой аффинной матрицей, вторая примесь гомодимерного антитела связывается со второй аффинной матрицей, но ее связывание с первой аффинной матрицей отменено, и гетеродимерное антитело имеет более низкую аффинность к первой аффинной матрице, чем первая примесь гомодимерного антитела, где первая аффинная матрица содержит белок А, т.е. аффинная матрица белка А, и вторая аффинная матрица содержит белок G, т.е. аффинная матрица белка G, и где каждое из аффинной матрицы белка А, аффинной матрицы белка G и детектора соединены посредством переключающего клапана, где переключающий клапан сконфигурирован таким образом, что находится в положении, позволяющем:

- промывку аффинной матрицы белка А,
- элюирования гетеродимерного антитела с аффинной матрицы белка А,
- элюирования первой примеси гомодимерного антитела с аффинной матрицы белка А через детектор, и
- элюирования второй примеси гомодимерного антитела с аффинной матрицы белка G через детектор.

11. Хроматографическая система по п. 10, где:

гетеродимерное антитело представляет собой биспецифическое антитело, содержащее одну тяжелую цепь без замен и одну тяжелую цепь с заменами,

первая примесь гомодимерного антитела представляет собой моноспецифическое антитело, содержащее две тяжелые цепи без замен,

вторая примесь гомодимерного антитела представляет собой моноспецифическое антитело, содержащее две тяжелые цепи с заменами,

тяжелая цепь без замен связывается как с первой аффинной матрицей, так и со второй аффинной матрицей, и

тяжелая цепь с заменами связывается со второй аффинной матрицей, но ее связывание с первой аффинной матрицей отменено.

12. Хроматографическая система по п. 10, где:

гетеродимерное антитело представляет собой биспецифическое антитело, содержащее один СНЗ-домен без замен и один СНЗ-домен с заменами,

первая примесь гомодимерного антитела представляет собой моноспецифическое

антитело, содержащее два СНЗ-домена без замен,

вторая примесь гомодимерного антитела представляет собой моноспецифическое антитело, содержащее два СНЗ-домена с заменами,

СНЗ-домен без замен связывается как с первой аффинной матрицей, так и со второй аффинной матрицей, и СНЗ-домен с заменами связывается со второй аффинной матрицей, но его связывание с первой аффинной матрицей отменено.

13. Хроматографическая система по п. 10, где:

гетеродимерное антитело представляет собой человеческое IgG1, IgG2 или IgG4 антитело,

первая примесь гомодимерного антитела представляет собой человеческое IgG1, IgG2 или IgG4 антитело, и

вторая примесь гомодимерного антитела представляет собой человеческое IgG1, IgG2 или IgG4 антитело.

14. Хроматографическая система, предусматривающая первую аффинную матрицу, вторую аффинную матрицу и детектор для количественной оценки количества и чистоты гетеродимерного антитела в образце, содержащем смесь гетеродимерного антитела, первой примеси гомодимерного антитела и второй примеси гомодимерного антитела, где первая аффинная матрица последовательно соединена со второй аффинной матрицей посредством переключающего клапана, где гетеродимерное антитело представляет собой биспецифическое человеческое IgG1, IgG2 или IgG4 антитело, содержащее один СНЗ-домен без замен и один СНЗ-домен с заменами Н435R/Y436F, т.е. FcFc\* антитело, первая примесь гомодимерного антитела представляет собой моноспецифическое человеческое IgG1, IgG2 или IgG4 антитело, содержащее два СНЗ-домена без замен, т.е. FcFc антитело, и вторая примесь гомодимерного антитела представляет собой моноспецифическое человеческое IgG1, IgG2 или IgG4 антитело, содержащее два СНЗ-домена с заменами Н435R/Y436F, т.е. Fc\*Fc\* антитело, где Fc означает тяжелую цепь, имеющую СНЗ-домен без замен, и Fc\* означает тяжелую цепь, имеющую СНЗ-домен с заменами Н435R/Y436F,

где первая аффинная матрица содержит белок А, т.е. аффинная матрица белка А, и вторая аффинная матрица содержит белок G, т.е. аффинная матрица белка G, где СНЗ-домен без замен связывается как с аффинной матрицей белка А, так и с аффинной матрицей белка G, СНЗ-домен с заменами Н435R/Y436F связывается с аффинной матрицей белка G, но его связывание с аффинной матрицей белка А отменено, и где каждое из аффинной матрицы белка А, аффинной матрицы белка G и детектора соединены посредством переключающего клапана, где переключающий клапан сконфигурирован таким образом, что находится в положении, позволяющем:

промывку аффинной матрицы белка А,  
элюирования гетеродимерного антитела с аффинной матрицы белка А,  
элюирования первой примеси гомодимерного антитела с аффинной матрицы белка А через детектор, и  
элюирования второй примеси гомодимерного антитела с аффинной матрицы белка G через детектор.

15. Способ по п. 10 или 14, где:  
гетеродимерное антитело представляет собой человеческое IgG1 или IgG4 антитело,  
первая примесь гомодимерного антитела представляет собой человеческое IgG1 или IgG4 антитело, и  
вторая примесь гомодимерного антитела представляет собой человеческое IgG1 или IgG4 антитело.

16. Хроматографическая система по п. 10 или 14, где переключающий клапан сконфигурирован таким образом, что находится в положении, позволяющем:

промывку аффинной матрицы белка А с применением первой подвижной фазы, содержащей хаотропное средство, имеющее от приблизительно рН 5,6 до приблизительно рН 7,4,

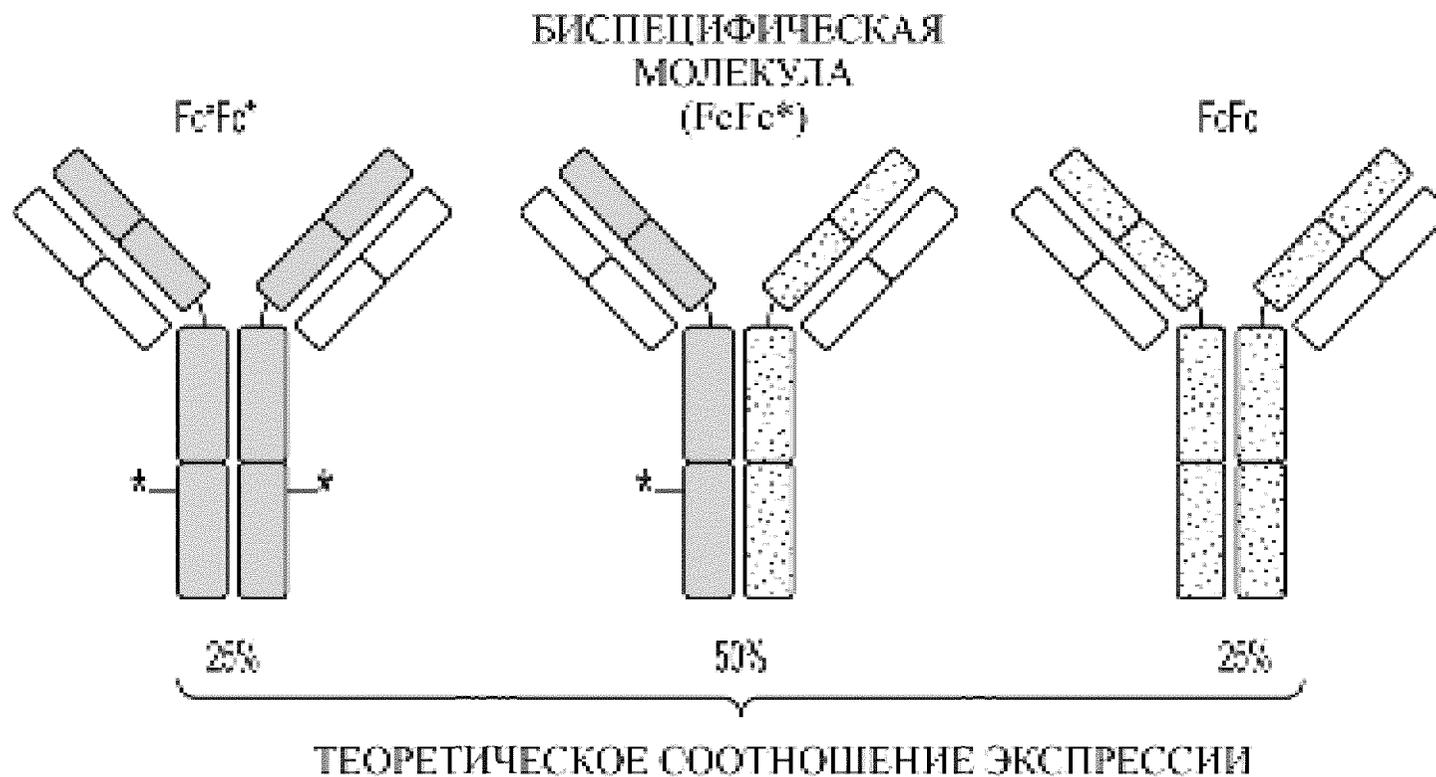
элюирования гетеродимерного антитела с аффинной матрицы белка А с применением второй подвижной фазы, содержащей хаотропное средство, имеющее от приблизительно рН 4,3 до приблизительно рН 5,0,

элюирования первой примеси гомодимерного антитела с аффинной матрицы белка А через детектор с применением третьей подвижной фазы, содержащей хаотропное средство, имеющее от приблизительно рН 2,0 до приблизительно рН 2,8, и

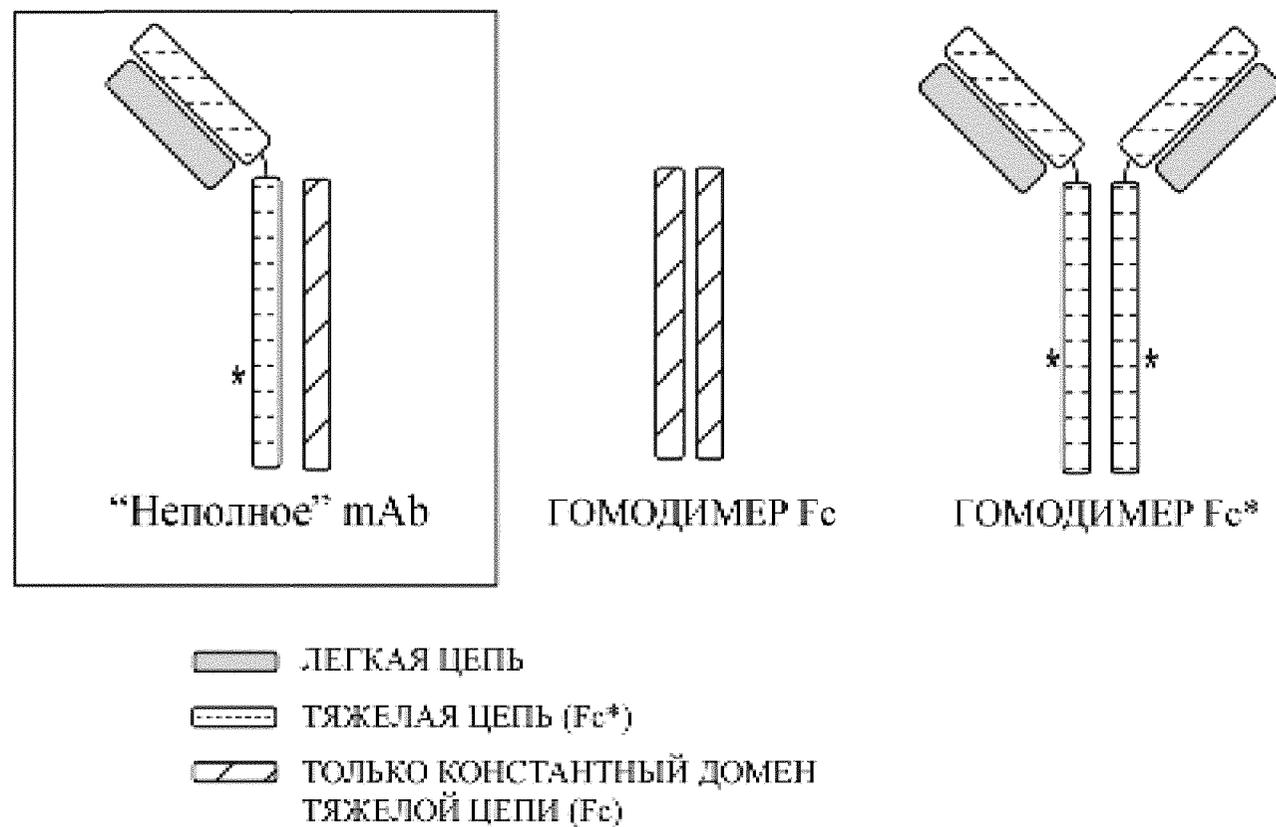
элюирования второй примеси гомодимерного антитела с аффинной матрицы белка G через детектор с применением третьей подвижной фазы.

17. Хроматографическая система по п. 16, где хаотропное средство представляет собой солевой буфер, выбранный из LiCl-, NaCl-, KCl-, MgCl<sub>2</sub>- и CaCl<sub>2</sub>-буфера.

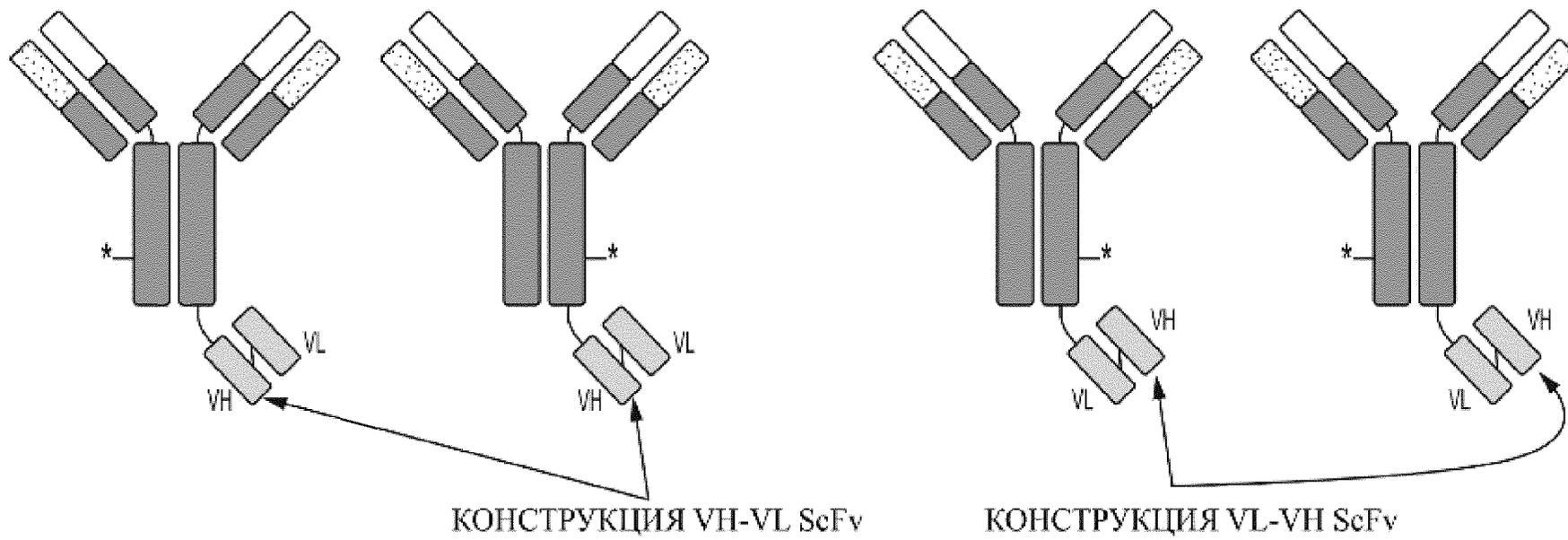
18. Хроматографическая система по п. 10 или 14, где детектор предусматривает колонку для HPLC, оснащенную УФ-детектором, детектором заряженного аэрозоля и/или масс-спектрометром.



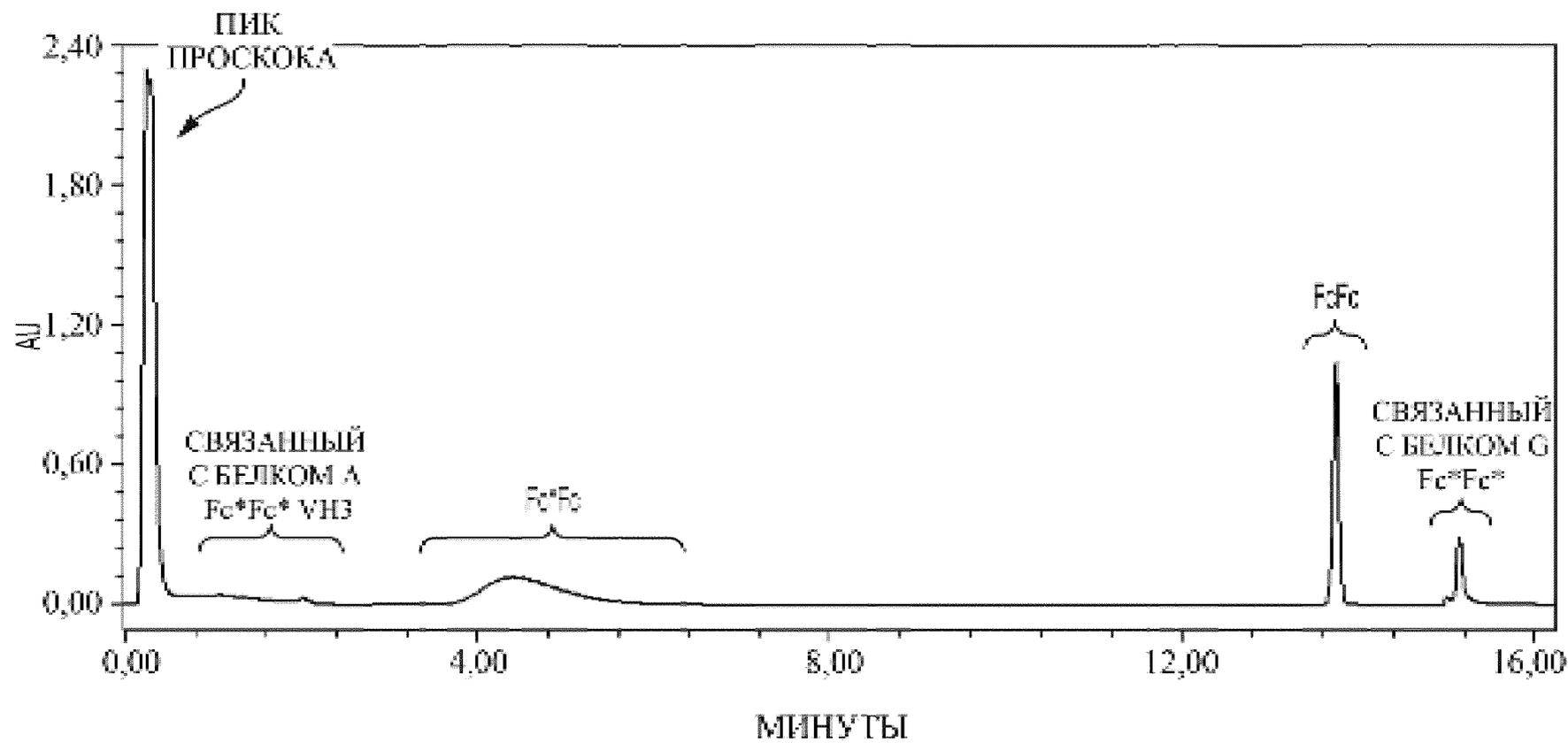
**Фиг. 1**



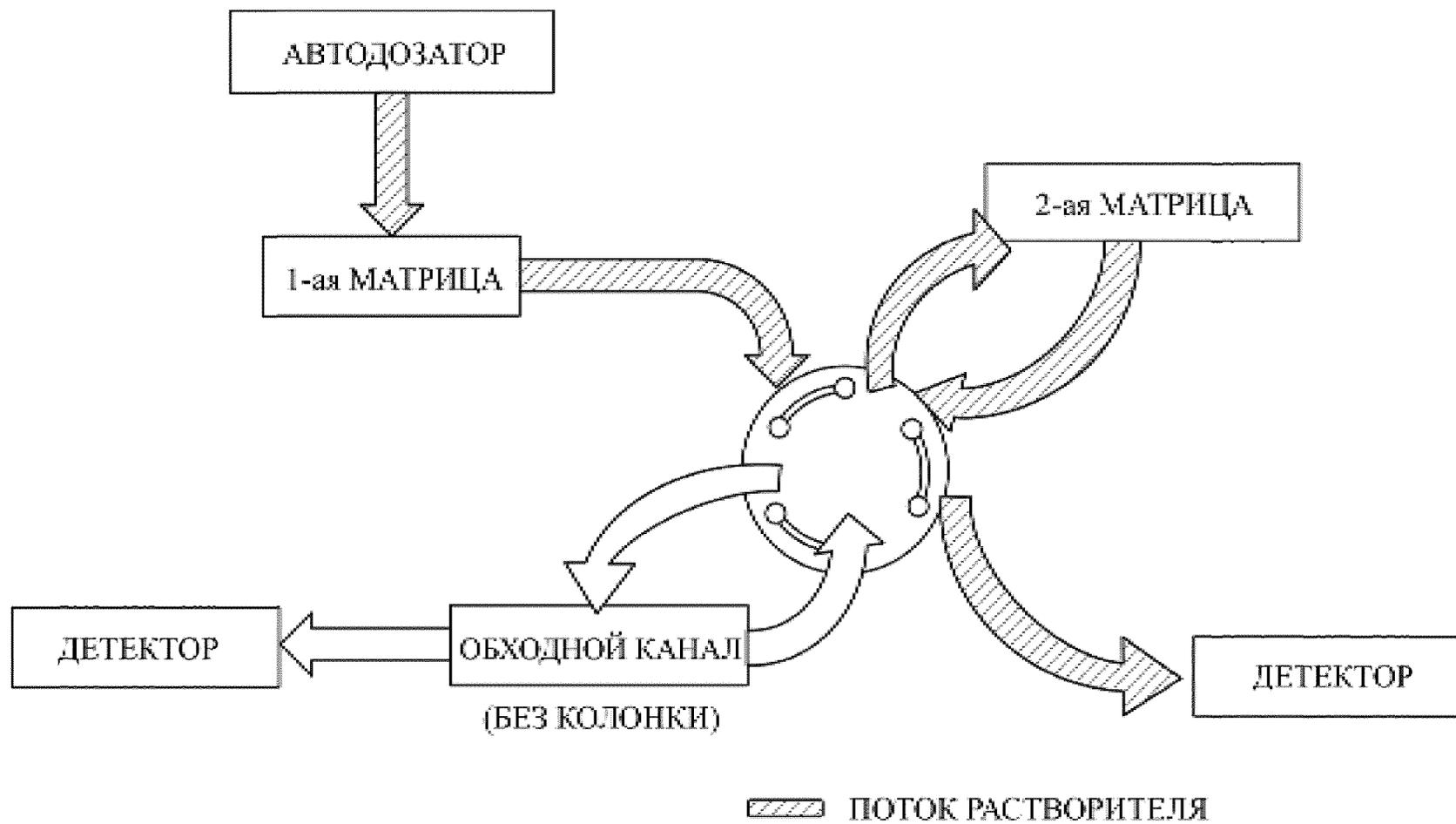
**Фиг. 2А**



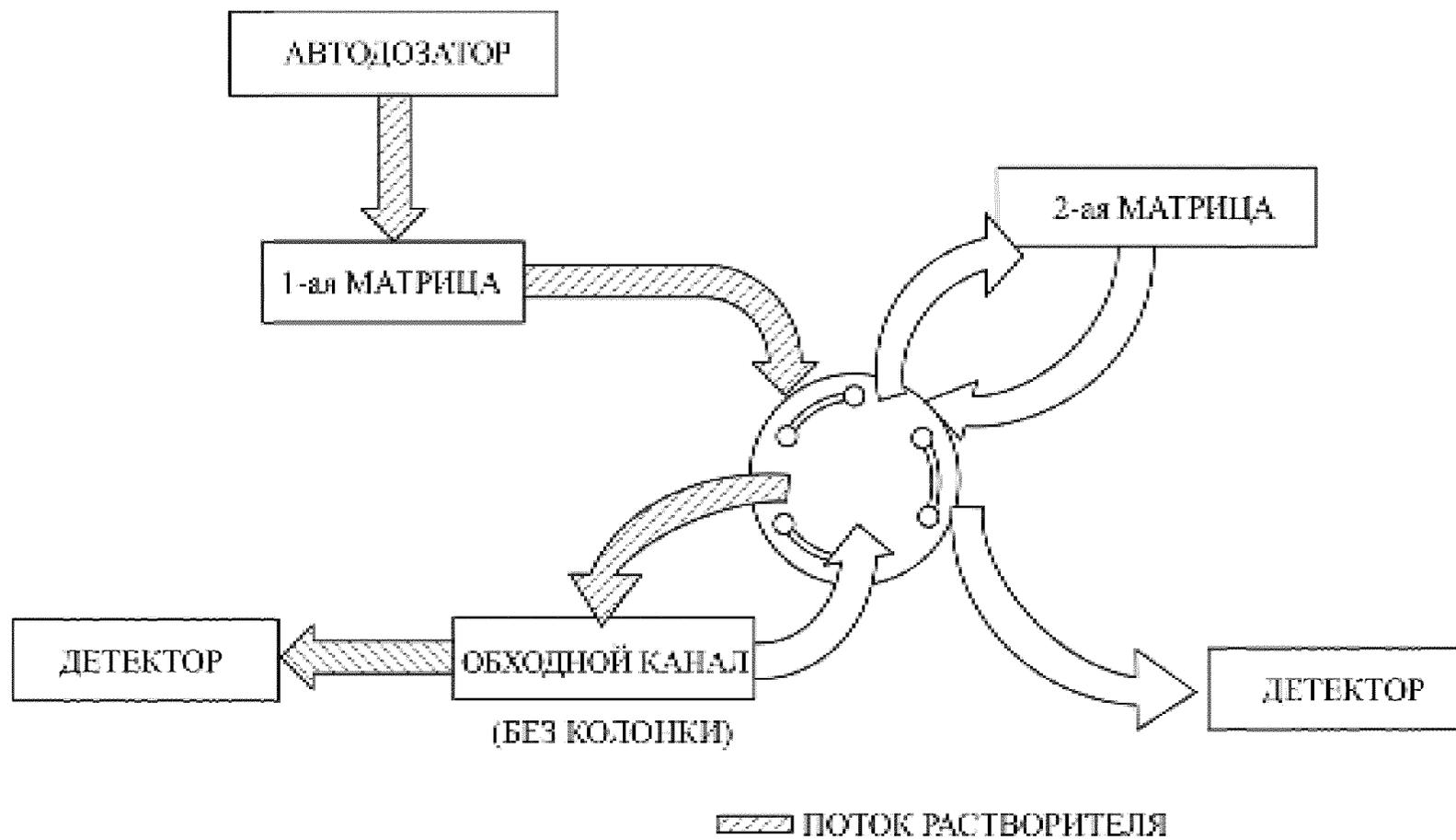
**Фиг. 2В**



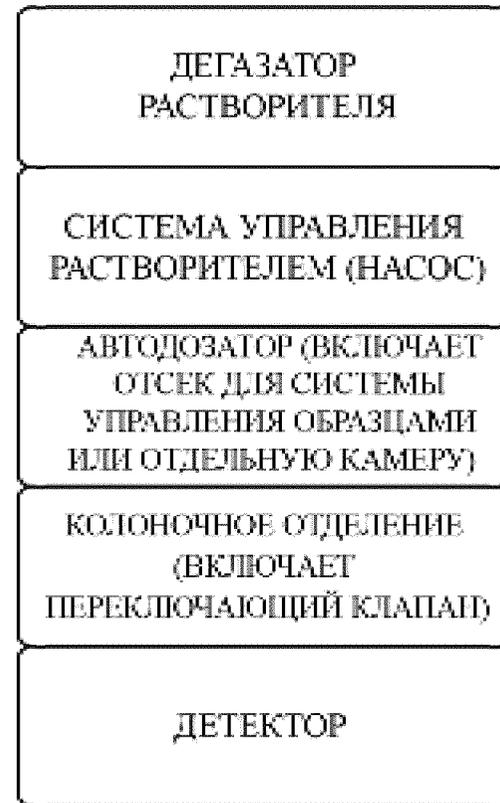
**Фиг. 3**



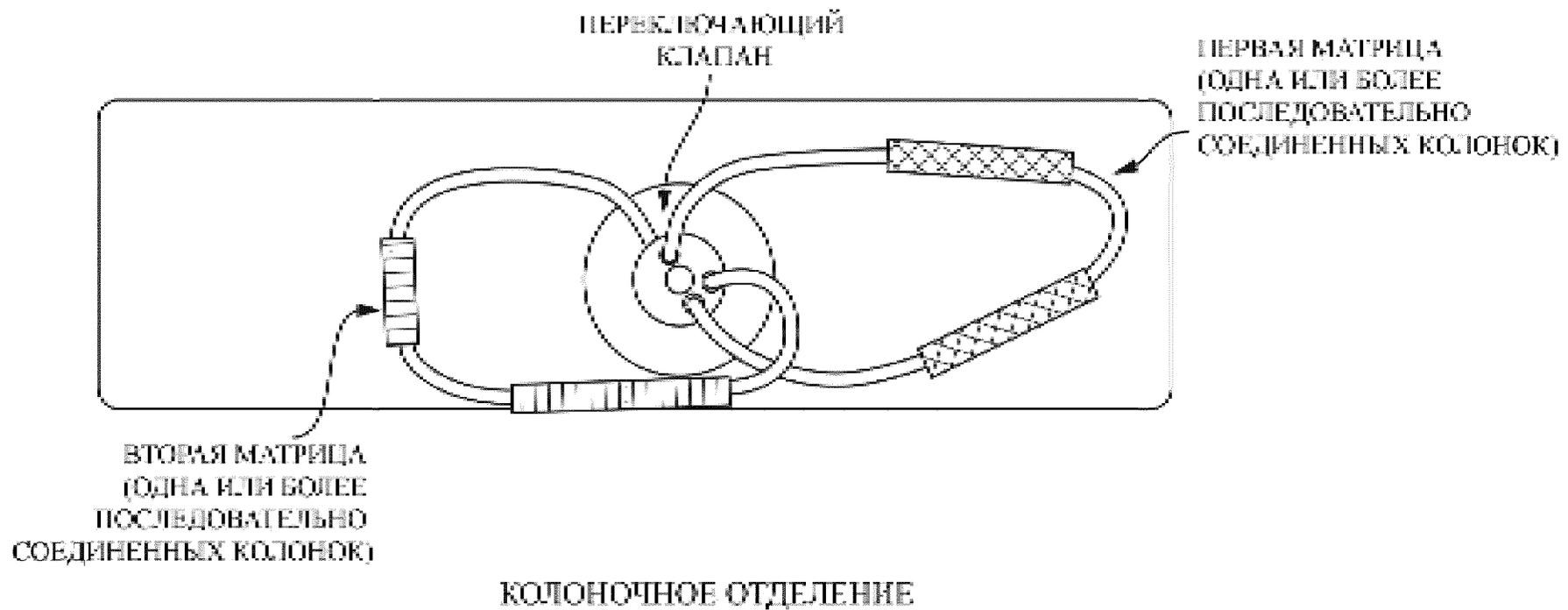
**Фиг. 4А**



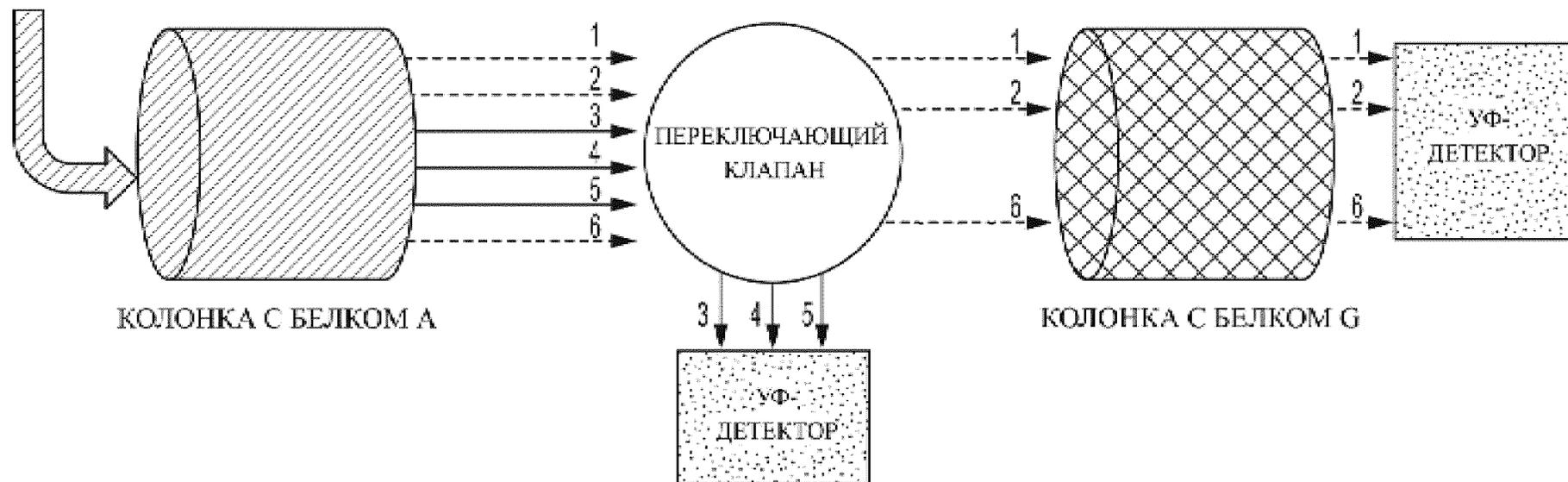
**Фиг. 4В**



**Фиг. 5**



Фиг. 6



**Фиг. 7**