

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491800** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.09.10

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

(22) Дата подачи заявки
2023.01.11

(54) **СПОСОБЫ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ОТДЕЛЕНИЯ ГЕТЕРОДИМЕРНЫХ БЕЛКОВ ОТ ПРИМЕСЕЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

(31) **63/298,745; 63/430,477**

(72) Изобретатель:

(32) **2022.01.12; 2022.12.06**

Чнь Синди, Бармасс Эндрю,

(33) **US**

Чибороски Марк, Севински

(86) **PCT/US2023/010594**

Кристофер, Динн Шон (US)

(87) **WO 2023/137062 2023.07.20**

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Медведев В.Н. (RU)

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(57) Описаны способы очистки гетеродимерного белка (например, биспецифического антитела) от примесей в рамках последовательности хроматографических циклов. В разных вариантах реализации pH элюирующего буфера повышают с каждым последующим циклом в последовательности для поддержания минимального уровня загрязнения связывающей примесью и в отсутствие значительного снижения уровня выделения гетеродимерного белка.



A1

202491800

202491800

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581684EA/055

СПОСОБЫ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ОТДЕЛЕНИЯ ГЕТЕРОДИМЕРНЫХ БЕЛКОВ ОТ ПРИМЕСЕЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее изобретение относится к продлению срока сохранения свойств разделения колонки для аффинной хроматографии для очистки белковых продуктов, например, очистки гетеродимерных белков в сложной смеси белков. В частности, способы включают проведение последовательности хроматографических циклов, в которой увеличивают рН элюирования в каждом последующем цикле для минимизации загрязнения примесями, при этом потери гетеродимерного белка (например, биспецифического антитела) во время выделения сводятся к минимуму.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Очистка белковых продуктов часто требует применения разных стадий хроматографии для удаления примесей, таких как белки клетки-хозяина, ДНК и нежелательные частицы белкового продукта.

[0003] Гетеродимерные белки, включая поли- или биспецифические антитела, можно подвергать обработке для очистки с применением аффинной хроматографии. Один из указанных форматов обработки основан на стандартном полностью человеческом антителе IgG, имеющем улучшенный фармакокинетический профиль и минимальную иммуногенность (см. патент США №8586713, содержание которого включено в настоящий документ во всей полноте). Одна общая легкая цепь и две отдельные тяжелые цепи объединяются с образованием биспецифического антитела. Одна из тяжелых цепей содержит замещенную последовательность Fc (далее в настоящем документе «Fc*»), которая снижает или устраняет связывание Fc* с белком А. Например, одна из указанных последовательностей Fc* содержит замены H435R/Y436F (по системе нумерации EU; H95R/Y96F по системе нумерации экзонов IMGT) в CH3-домене. Совместная экспрессия двух тяжелых цепей и общей легкой цепи приводит к получению трех продуктов: два из которых имеют гомодимерный статус тяжелых цепей, а еще один является требуемым гетеродимерным биспецифическим продуктом. Последовательность Fc* позволяет селективно очищать биспецифический продукт FcFc* на коммерчески доступных аффинных колонках благодаря промежуточной аффинности связывания с белком А по сравнению высокой авидностью в отношении гомодимера тяжелой цепи FcFc или слабым связыванием с гомодимером Fc*Fc*.

[0004] Для проведения очистки гетеродимерного белка (например, биспецифического антитела) в промышленных масштабах требуется хорошее разделение гомодимера FcFc, гетеродимера Fc*Fc и гомодимера Fc*Fc*. Тем не менее, повторное использование аффинной колонки в течение нескольких циклов обычно приводит к повышенному загрязнению в результате связывания примесей, что может приводить к порче всей партии. Несмотря на то, что указанные проблемы могут быть решены заменой

смолы в колонке (связывающего белок лиганда, прикрепленного к субстрату), замена колонки является дорогостоящей (~15 тыс. долл./л смолы) и приводит к задержкам, связанным с продолжительностью распаковки и повторной упаковки колонки. При очистке путем аффинной хроматографии затраты на получение очищенного гетеродимерного белка зависят от количества циклов, которые можно проводить с использованием аффинной смолы при сохранении приемлемой чистоты и скорости выделения. Таким образом, желательными являются способы продления функционирования колонки на протяжении большего количества циклов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Согласно одному из аспектов в настоящем изобретении предложен способ очистки гетеродимерного белка, включающий: (а) проведение последовательности хроматографических циклов, при этом каждый цикл включает: (i) введение смеси гетеродимерного белка и примесей в аффинную матрицу, содержащую лиганд, связывающий белок, причем гетеродимерный белок содержит первый и второй полипептиды с разной аффинностью в отношении лиганда, связывающего белок, и где по меньшей мере одна примесь связывается с лигандом, связывающим белок, и по меньшей мере одна примесь не связывается с лигандом, связывающим белок; (ii) промывку аффинной матрицы первым промывочным буфером при первом рН от 5 до 9 для удаления несвязывающих примесей; (iii) элюирование гетеродимерного белка из аффинной матрицы в первом элюирующем буфере при втором рН; и (iv) промывку аффинной матрицы вторым промывочным буфером при третьем рН менее 4 для удаления связывающих примесей; при этом второй рН имеет предварительное значение рН во время предварительной последовательности циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, после чего второй рН повышают до последующего значения рН, которое выше предварительного значения рН во время последующей последовательности циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, причем значения предварительного рН и последующего рН составляют от 4,0 до 5,2, и (b) сбор гетеродимерного белка из аффинной матрицы в элюате.

[0006] В некоторых вариантах реализации предварительная последовательность циклов состоит из 20 циклов. В некоторых вариантах реализации предварительная последовательность циклов состоит из 30 циклов. В некоторых вариантах реализации предварительная последовательность циклов состоит из 40 циклов. В некоторых вариантах реализации предварительная последовательность циклов состоит из 50 циклов. В некоторых вариантах реализации предварительная последовательность циклов состоит по меньшей мере из 50 циклов, по меньшей мере 60 циклов, по меньшей мере 70 циклов или по меньшей мере 80 циклов или более.

[0007] В некоторых вариантах реализации последующая последовательность циклов состоит по меньшей мере из 20 циклов. В некоторых вариантах реализации последующая последовательность циклов состоит по меньшей мере из 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70 или по меньшей мере 80 циклов.

[0008] В некоторых вариантах реализации предварительный рН составляет от 4,0 до 4,2. В некоторых случаях предварительный рН составляет $4,1 \pm 0,05$. В некоторых вариантах реализации последующий рН составляет от 4,3 до 4,7. В некоторых случаях последующий рН составляет $4,5 \pm 0,05$.

[0009] Согласно одному из аспектов в настоящем изобретении предложен способ очистки гетеродимерного белка, включающий: (а) проведение последовательности хроматографических циклов, при этом каждый цикл включает: (i) введение смеси гетеродимерного белка и примесей в аффинную матрицу, содержащую лиганд, связывающий белок, причем гетеродимерный белок содержит первый и второй полипептиды с разной аффинностью в отношении лиганда, связывающего белок, и где по меньшей мере одна примесь связывается с лигандом, связывающим белок, и по меньшей мере одна примесь не связывается с лигандом, связывающим белок; (ii) промывку аффинной матрицы первым промывочным буфером при первом рН от 5 до 9 для удаления несвязывающих примесей; (iii) элюирование гетеродимерного белка из аффинной матрицы в первом элюирующем буфере при втором рН; и (iv) промывку аффинной матрицы вторым промывочным буфером при третьем рН менее 4 для удаления связывающих примесей; (b) измерение уровня связывающей примеси в элюате, содержащем гетеродимерный белок, после любого одного или более циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, и сравнение измеренного уровня связывающей примеси с эталонным уровнем связывающей примеси, при этом если измеренный уровень связывающей примеси превышает эталонный уровень связывающей примеси, то затем второй рН увеличивают во время последующего цикла в рамках последовательности хроматографических циклов, причем второй рН составляет от 4,0 до 5,2 во время каждого цикла или последующего цикла в рамках последовательности хроматографических циклов; и (c) сбор гетеродимерного белка из аффинной матрицы в элюате.

[0010] В некоторых вариантах реализации эталонный уровень связывающей примеси составляет от 2% до 10%. В некоторых случаях эталонный уровень связывающей примеси составляет от 3% до 7%. В некоторых случаях эталонный уровень связывающей примеси составляет $5\% \pm 0,5\%$.

[0011] В некоторых вариантах реализации уровень связывающей примеси в элюате измеряют после каждого цикла в рамках последовательности хроматографических циклов. В некоторых вариантах реализации уровень связывающей примеси в элюате измеряют после каждого пятого цикла в рамках последовательности хроматографических циклов. В некоторых вариантах реализации уровень связывающей примеси в элюате измеряют после каждого десятого цикла в рамках последовательности хроматографических циклов. В некоторых вариантах реализации уровень связывающей примеси в элюате измеряют после каждого двадцатого цикла в рамках последовательности хроматографических циклов. В некоторых вариантах реализации уровень связывающей примеси в элюате измеряют после каждого сорокового цикла или пятидесятого цикла в рамках последовательности хроматографических циклов. В некоторых случаях элюат собирают во время нескольких

циклов (например, пяти циклов или десяти циклов), и уровень связывающей примеси измеряют в объединенном пуле элюатов.

[0012] В некоторых вариантах реализации второй рН повышают от диапазона от 4,0 до 4,2 до диапазона от 4,3 до 4,7, если измеренный уровень связывающей примеси превышает эталонный уровень связывающей примеси. В некоторых случаях второй рН повышают от $4,1 \pm 0,05$ до $4,5 \pm 0,05$, если измеренный уровень связывающей примеси превышает эталонный уровень связывающей примеси.

[0013] Согласно одному из аспектов в настоящем изобретении предложен способ очистки гетеродимерного белка, включающий: (а) проведение последовательности хроматографических циклов, при этом каждый цикл включает: (i) введение смеси гетеродимерного белка и примесей в аффинную матрицу, содержащую лиганд, связывающий белок, причем гетеродимерный белок содержит первый и второй полипептиды с разной аффинностью в отношении лиганда, связывающего белок, и где по меньшей мере одна примесь связывается с лигандом, связывающим белок, и по меньшей мере одна примесь не связывается с лигандом, связывающим белок; (ii) промывку аффинной матрицы первым промывочным буфером при первом рН от 5 до 9 для удаления несвязывающих примесей; (iii) элюирование гетеродимерного белка из аффинной матрицы в первом элюирующем буфере при втором рН; и (iv) промывку аффинной матрицы вторым промывочным буфером при третьем рН менее 4 для удаления связывающих примесей; при этом второй рН имеет первичное значение рН во время первичной последовательности циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, второй рН повышают до вторичного значения рН, превышающего первичное значение рН, во время вторичной последовательности циклов, которая следует за первичной последовательностью циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, и второй рН повышают до третичного значения рН, превышающего вторичное значение рН, во время третичной последовательности циклов, которая следует за вторичной последовательностью циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, при этом первичное значение рН, вторичное значение рН и третичное значение рН составляют от 4,0 до 5,2; и (b) сбор гетеродимерного белка из аффинной матрицы в элюате.

[0014] В некоторых вариантах реализации первичная последовательность циклов включает от 5 до 50 циклов. В некоторых случаях первичная последовательность циклов включает вплоть до 20 циклов. В некоторых случаях первичная последовательность циклов включает вплоть до 40 циклов.

[0015] В некоторых вариантах реализации вторичная последовательность циклов включает от 5 до 50 циклов. В некоторых случаях вторичная последовательность циклов включает от 10 до 25 циклов.

[0016] В некоторых вариантах реализации третичная последовательность циклов включает от 5 до 50 циклов. В некоторых случаях третичная последовательность циклов включает от 10 до 25 циклов.

[0017] В некоторых вариантах реализации первичный рН составляет от 4,0 до 4,2. В

некоторых случаях первичный рН составляет $4,1 \pm 0,05$. В некоторых вариантах реализации вторичный рН составляет от 4,2 до 4,4. В некоторых случаях вторичный рН составляет $4,3 \pm 0,05$. В некоторых вариантах реализации третичный рН составляет от 4,4 до 4,6. В некоторых случаях третичный рН составляет $4,5 \pm 0,05$.

[0018] В некоторых вариантах реализации второй рН повышают до 4-го значения рН, превышающего третичное значение рН, во время 4-й последовательности циклов, которая следует за третичной последовательностью циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, при этом 4-е значение рН составляет от 4,0 до 5,2.

[0019] В некоторых вариантах реализации второй рН повышают до 5-го значения рН, превышающего 4-е значение рН, во время 5-й последовательности циклов, которая следует за 4-й последовательностью циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, при этом 5-е значение рН составляет от 4,0 до 5,2.

[0020] В некоторых вариантах реализации второй рН повышают до 6-го значения рН, превышающего 5-е значение рН, во время 6-й последовательности циклов, которая следует за 5-й последовательностью циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, при этом 6-е значение рН составляет от 4,0 до 5,2.

[0021] В некоторых случаях вторичное значение рН превышает первичное значение рН на величину от 0,1 до 0,9, третичное значение рН превышает вторичное значение рН на величину от 0,1 до 0,9, 4-е значение рН превышает третичное значение рН на величину от 0,1 до 0,9, 5-е значение рН превышает 4-е значение рН на величину от 0,1 до 0,9, и/или 6-е значение рН превышает 5-е значение рН на величину от 0,1 до 0,9, при этом первичное значение рН составляет от 4,0 до 4,2. В некоторых вариантах реализации первичный рН составляет $4,1 \pm 0,05$.

[0022] В некоторых вариантах реализации каждая из первичной последовательности циклов, вторичной последовательности циклов, третичной последовательности циклов, 4-й последовательности циклов, 5-й последовательности циклов и/или 6-й последовательности циклов включает от 5 до 50 циклов в рамках последовательности хроматографических циклов.

[0023] В разных вариантах реализации в любом из способов, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, примеси содержат гомодимерные частицы первого и второго полипептидов.

[0024] В разных вариантах реализации в любом из способов, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, лиганд, связывающий белок, представляет собой белок А, и аффинная матрица содержит лиганд на основе белка А, прикрепленный к субстрату.

[0025] В некоторых случаях лиганд на основе белка А представляет собой сконструированный белок А, содержащий тетрамер Z-домена, сконструированный белок А, содержащий тетрамер Y-домена, или сконструированный белок А, в котором отсутствуют домены D и E.

[0026] В некоторых случаях субстрат представляет собой частицу, и аффинная матрица содержит совокупность частиц, имеющих средний диаметр от 25 мкм до 100 мкм.

В некоторых вариантах реализации частицы имеют средний диаметр от 40 мкм до 60 мкм.
В некоторых вариантах реализации частицы имеют средний диаметр от 45 мкм до 55 мкм.
В некоторых вариантах реализации частицы имеют средний диаметр примерно 50 мкм.

[0027] В некоторых случаях субстрат содержит любое одно или более из агарозы, поли(стиролдвинилбензола), полиметакрилата, целлюлозы, стекла с заданным размером пор и сферического диоксида кремния.

[0028] В некоторых случаях частицы содержат поры, имеющие средний диаметр примерно 1100 Å.

[0029] В разных вариантах реализации в любом из способов, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, элюирующий буфер содержит соль в концентрации по меньшей мере 250 мМ. В некоторых случаях концентрация соли составляет более 300 мМ или более 400 мМ. В некоторых случаях концентрация соли составляет примерно 500 мМ.

[0030] В некоторых вариантах реализации соль выбрана из соли, содержащей (i) Cl⁻, Br⁻, I⁻, NO₃⁻, N(CH₃)₄⁺, NH₄⁺, Cs⁺, Rb⁺, K⁺, Na⁺, H⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺; (ii) комбинации Na⁺, H⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ или Al³⁺ с Cl⁻, Br⁻, I⁻, NO₃⁻ или ClO₄⁻, или (iii) CaCl₂, MgCl₂ или NaCl.

[0031] В разных вариантах реализации в любом из способов, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, первый полипептид содержит СНЗ-домен, который может связываться с лигандом, связывающим белок, и второй полипептид содержит СНЗ-домен, который не может связываться с лигандом, связывающим белок.

[0032] В разных вариантах реализации в любом из способов, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, в котором лиганд, связывающий белок, представляет собой белок А, первый полипептид содержит СНЗ-домен, который может связываться с белком А, и второй полипептид содержит СНЗ-домен, который не может связываться с белком А. В некоторых случаях второй полипептид содержит модификацию Н435R и модификацию Y436F (по системе нумерации EU) в СНЗ-домене.

[0033] В разных вариантах реализации в любом из способов, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, первый рН составляет от 6 до 8.

[0034] В разных вариантах реализации в любом из способов, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, третий рН составляет от 2,8 до 3,5.

[0035] В разных вариантах реализации в любом из способов, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, гетеродимерный белок представляет собой антитело. В разных вариантах реализации в способах гетеродимерный белок представляет собой биспецифический антигенсвязывающий белок. В некоторых вариантах реализации биспецифический антигенсвязывающий белок представляет собой биспецифическое антитело.

[0036] В разных вариантах реализации в любом из способов, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, по меньшей мере 85% гетеродимерного белка выделяется в элюат в каждом цикле в рамках последовательности хроматографических циклов. В некоторых случаях по меньшей мере 87% гетеродимерного белка выделяется в элюат в каждом цикле в рамках последовательности хроматографических циклов. В некоторых

случаях по меньшей мере 89% гетеродимерного белка выделяется в элюат в каждом цикле в рамках последовательности хроматографических циклов.

[0037] В разных вариантах реализации в любом из способов, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, последовательность хроматографических циклов включает 100 или более циклов.

[0038] В разных вариантах реализации в любом из способов, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, аффинную матрицу можно приводить в контакт с основным раствором, имеющим рН по меньшей мере 11, после каждого цикла. В некоторых случаях аффинную матрицу приводят в контакт с основным раствором, имеющим рН по меньшей мере 11, после каждых трех циклов. В некоторых случаях аффинную матрицу приводят в контакт с основным раствором, имеющим рН по меньшей мере 11, после каждых пяти циклов. В некоторых случаях аффинную матрицу приводят в контакт с основным раствором, имеющим рН по меньшей мере 11, после каждых семи циклов. В некоторых вариантах реализации рН основного раствора составляет по меньшей мере 12. В некоторых вариантах реализации основной раствор содержит основание в концентрации от 0,1 н. до 0,5 н. В некоторых случаях концентрация основания составляет от 0,1 н. до 0,3 н. В некоторых вариантах реализации основной раствор содержит NaOH.

[0039] В разных вариантах реализации в любом из способов, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, каждый цикл может дополнительно включать (v) очистку аффинной матрицы путем приведения аффинной матрицы в контакт с основным раствором, имеющим рН по меньшей мере 11. В некоторых случаях рН основного раствора составляет по меньшей мере 12. В некоторых вариантах реализации основной раствор содержит основание в концентрации от 0,1 н. до 0,5 н. В некоторых случаях концентрация составляет от 0,1 н. до 0,3 н. В некоторых вариантах реализации основной раствор содержит NaOH. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере 75% гетеродимерного белка выделяется в элюат в каждом цикле в рамках последовательности хроматографических циклов, и количество связывающих примесей не превышает 6,5%. В некоторых случаях по меньшей мере 78% гетеродимерного белка выделяется в элюат в каждом цикле в рамках последовательности хроматографических циклов. В некоторых случаях по меньшей мере 80% гетеродимерного белка выделяется в элюат в каждом цикле в рамках последовательности хроматографических циклов.

[0040] В разных вариантах реализации любые из отличительных признаков или компонентов вариантов реализации, осуждаемых выше или далее в настоящем документе, могут быть объединены, и такие комбинации включены в объем настоящего изобретения. Любое конкретное значение, обсуждаемое выше или далее в настоящем документе, может быть объединено с другим связанным значением, обсуждаемым выше или далее в настоящем документе, для указания диапазона, при этом данные значения представляют верхний и нижний пределы диапазона, и такие диапазоны включены в объем настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0041] На ФИГ. 1 проиллюстрирован типовой гетеродимерный белок (например, биспецифический Fc*Fc) и родственные примеси (гомодимерные частицы) в соответствии с одним из вариантов реализации изобретения. Гетеродимерный белок содержит один полипептид, который связывается с лигандом, связывающим белок, и один полипептид, который не связывается лигандом, связывающим белок (Ø). Две проиллюстрированные примеси представляют собой гомодимеры, при этом несвязывающая примесь состоит из двух полипептидов, которые не связываются с (Ø) лигандом, связывающим белок, и связывающая примесь состоит из двух полипептидов, которые связываются с лигандом, связывающим белок.

[0042] На ФИГ. 2 проиллюстрирован типовой хроматографический цикл в соответствии с одним из вариантов реализации изобретения. Как показано, цикл включает внесение смеси гетеродимерного белка и примесей в аффинную матрицу, промывку аффинной матрицы для удаления несвязывающих примесей, элюирование гетеродимерного белка и промывку аффинной матрицы для удаления связывающих примесей. Связывание связывающей примеси и гетеродимерного белка с лигандом, связывающим белок, в аффинной матрице проиллюстрировано на первых двух панелях.

[0043] На ФИГ. 3 проиллюстрирована взаимосвязь между значением pH элюирования и присутствием связывающей примеси в элюате и соответствующей скоростью выделения гетеродимерного белка (например, биспецифического антитела) в обычной хроматографической колонке.

[0044] На ФИГ. 4А и 4В проиллюстрировано влияние повышения pH элюирования в обычной колонке (7 циклов) и используемой циклически колонке (84 цикла) на присутствие связывающей примеси в элюате (фиг. 4А) и соответствующую скорость выделения гетеродимерного белка (например, биспецифического антитела) (фиг. 4В). «Цель <5%», показанная на фиг. 4А, касающаяся уровня связывающей примеси, приведена в качестве примера и может варьироваться в зависимости от гетеродимерного белка, который подлежит очистке.

[0045] На ФИГ. 5А и 5В проиллюстрированы параметры для оценки плана, включая анализ мощности (фиг. 5А) и график доли проектного поля (фиг. 5В). В анализе мощности определяют вероятность того, что предлагаемый план позволит выявить влияние параметра при определенном размере выборки. Как показано на фиг. 5А, мощность параметров, связанных с основным эффектом, составляет >0,7. Как показано на фиг. 5В, относительная погрешность прогноза составляет менее 0,32 на 50% проектного поля.

[0046] На ФИГ. 6 проиллюстрирована выполненная с градацией по оттенкам серого карта корреляций, оцениваемых в примере 3. Как показано, все корреляции составляют менее 0,6, что указывает на надлежащий ортогональный план. Таблица данных, соответствующих карте, также включена на фиг. 6.

[0047] На ФИГ. 7А и 7В проиллюстрированы параметры, описывающие предсказательный профиль модели, для % выхода биспецифического продукта (фиг. 7А) и % связывающей примеси (фиг. 7В). По мере уменьшения pH элюирующего буфера, в

котором проводят разделение, и увеличения продолжительности контакта с гидроксидом, увеличиваются и выход биспецифического антителя, и уровень связывающей примеси. Кроме того, по мере увеличения нагрузки колонки увеличивается выход биспецифического антителя.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0048] Перед приведением описания настоящего изобретения следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена только для описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения, так как объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[0049] Если отсутствуют иные определения, то все технические и научные термины в настоящем документе имеют значение, общепринятое специалистами в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. В настоящем документе термин «примерно» при использовании в отношении конкретного указанного числового значения означает, что значение может отличаться от указанного значения на не более чем 1%. Например, в настоящем документе выражение «примерно 100» включает 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

[0050] Хотя при практической реализации или тестировании настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, схожие с описанными в настоящем документе или эквивалентные им, далее будут описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки на патент и непатентные публикации, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте.

Общие сведения

[0051] Очистка биспецифических антител путем аффинной хроматографии была описана ранее. Вкратце, представляющий интерес гетеродимерный белок, который содержит один полипептид, который связывается с лигандом, связывающим белок, и один полипептид, который не связывается с лигандом, связывающим белок, вводят в аффинную матрицу (содержащую лиганд, связывающий белок) вместе с гомодимерными примесями. Должно быть очевидно, что две гомодимерные частицы включают либо пару полипептидов, которые связываются с лигандом, связывающим белок, в аффинной матрице, либо пару полипептидов, которые не связываются с лигандом, связывающим белок, в аффинной матрице (см., например, фиг. 1).

[0052] Многократное применение колонки для аффинной хроматографии в течение нескольких циклов приводит к снижению функциональной плотности белок-лиганд, что приводит к увеличению уровня примесей. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, полагают, что снижение функциональной плотности белок-лиганд является результатом накопления примесей, структурных изменений лиганда и/или

физической утраты лиганда. В некоторых случаях считается, что снижение функциональной плотности белок-лиганд по меньшей мере отчасти связано с воздействием гидроксидных ионов (например, от NaOH), используемых для периодической очистки хроматографической колонки. Независимо от причины, снижение функциональной плотности белок-лиганд приводит к снижению avidности аффинной матрицы в отношении как связывающих примесей, так и гетеродимерного белка, представляющего интерес. Более низкая avidность в сочетании со сниженной вероятностью протекания повторного связывания могут приводить к преждевременному удалению гетеродимерного белка, представляющего интерес, совместно с несвязывающей примесью или к преждевременному удалению связывающей примеси совместно с гетеродимерным белком, представляющим интерес, во время элюирования.

[0053] Настоящее изобретение основано по меньшей мере отчасти на неожиданном открытии, что повышение pH элюирования в используемой циклически колонке для аффинной хроматографии может улучшать отделение гетеродимерного белка (например, биспецифического антитела) от связывающих примесей, поддерживая при этом высокий уровень выделения гетеродимерного белка. Стоимость материалов для крупномасштабного коммерческого производства и очистки терапевтических белков (например, биспецифических антител) является значительной проблемой, где стоимость замены 100 л колонки легко может превышать 1,5 млн. долл. США, это также связано с задержками в процессах очистки. Таким образом, продление срока службы колонки для аффинной хроматографии на большее количество циклов может обеспечивать значительные экономические преимущества.

[0054] Как более подробно обсуждается далее, способы продления свойств разделения аффинной колонки и поддержания уровня выделения гетеродимерного белка включают: (i) проведение предварительной последовательности циклов при предварительном значении pH элюирования и последующей последовательности циклов при последующем (и более высоком) значении pH; (ii) проведение последовательности циклов, в которых уровень примесей в элюате измеряют после каждого цикла, или периодически, и повышение pH элюирования в последующем цикле или циклах для поддержания минимального уровня примесей на протяжении последовательности циклов; и (iii) проведение последовательности циклов, в которой pH элюирования повышают постадийно за несколько блоков циклов (например, pH элюирования повышают от 0,1 до 1 пункта после каждых 5, 10, 15, 20, или 25 циклов). Кроме того, в некоторых вариантах реализации снижение частоты очистки хроматографической колонки (например, путем приведения колонки в контакт с основным раствором, имеющим pH по меньшей мере 11) или снижение концентрации основания в растворе, применяемом для очистки хроматографической колонки, также может продлевать свойства разделения аффинной колонки.

Определения

[0055] Термин «антитело» в настоящем документе включает молекулы

иммуноглобулинов, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные друг с другом дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в настоящем документе как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в настоящем документе как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен CL. VH- и VL-области могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (CDR тяжелой цепи могут быть сокращены как HCDR1, HCDR2 и HCDR3; CDR легкой цепи могут быть сокращены как LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Термин «высокоаффинное» антитело относится к антителам, имеющим аффинность связывания с мишенью по меньшей мере 10^{-9} M, по меньшей мере 10^{-10} M; по меньшей мере 10^{-11} M; или по меньшей мере 10^{-12} M, при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, или методом определения аффинности в растворе путем ELISA.

[0056] Фраза «биспецифическое антитело» включает антитело, способное селективно связывать два или более эпитопов. Биспецифические антитела в общем случае содержат две разные тяжелые цепи, при этом каждая тяжелая цепь специфически связывается с отдельным эпитопом - либо на двух разных молекулах (например, антигенах), либо на одной молекуле (например, на одном антигене). Если биспецифическое антитело способно селективно связываться с двумя разными эпитопами (первым эпитопом и вторым эпитопом), то аффинность первой тяжелой цепи по отношению к первому эпитопу, в общем случае, будет по меньшей мере на один, два, или три, или четыре порядка ниже аффинности первой тяжелой цепи по отношению ко второму эпитопу, и наоборот. Эпитопы, распознаваемые биспецифическим антителом, могут находиться на одной или на разных мишенях (например, на одном или на разных белках). Биспецифические антитела могут быть получены, например, путем объединения тяжелых цепей, которые распознают разные эпитопы одного антигена. Например, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие переменные последовательности тяжелой цепи, которые распознают разные эпитопы одного антигена, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими разные константные области тяжелой цепи, и такие последовательности могут быть экспрессированы в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина. Типичное биспецифическое антитело имеет две тяжелые цепи, каждая из которых содержит три CDR тяжелой цепи, за которыми следует (от N-конца к C-концу) CH1-домен, шарнир, CH2-домен и CH3-домен, и легкую цепь иммуноглобулина, либо которая не обеспечивает антигенсвязывающую специфичность, но которая при этом

может ассоциироваться с каждой тяжелой цепью, либо которая может ассоциироваться с каждой тяжелой цепью и которая может связываться с одним или более эпитопами, связываемыми антигенсвязывающими областями тяжелой цепи, либо которая может ассоциироваться с каждой тяжелой цепью и обеспечивать связывание либо одной, либо обеих тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами.

[0057] В разных вариантах реализации в способах, обсуждаемых в настоящем документе, гетеродимерные белки, биспецифические антитела, Fc-содержащие белки и т.д. могут относиться к изотипу IgG. В некоторых случаях гетеродимерные белки, биспецифические антитела, Fc-содержащие белки и т.д. относятся к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых случаях гетеродимерные белки, биспецифические антитела, Fc-содержащие белки и т.д. относятся к изотипу IgG1. В некоторых случаях гетеродимерные белки, биспецифические антитела, Fc-содержащие белки и т.д. относятся к изотипу IgG4. В разных вариантах реализации гетеродимерные белки, биспецифические антитела, Fc-содержащие белки и т.д. являются полностью человеческими.

[0058] Фраза «тяжелая цепь» или «тяжелая цепь иммуноглобулина» включает последовательность константной области тяжелой цепи иммуноглобулина из любого организма и, если не указано иное, включает переменный домен тяжелой цепи. Переменные домены тяжелой цепи содержат три CDR и четыре FR-области тяжелой цепи, если не указано иное. Фрагменты тяжелых цепей включают CDR, CDR и FR, а также их комбинации. Типичная тяжелая цепь после переменного домена содержит (от N-конца к C-концу) домен CH1, шарнирную область, домен CH2 и домен CH3. Функциональный фрагмент тяжелой цепи включает в себя фрагмент, который способен специфически распознавать антиген (например, распознавать антиген с KD в микромолярном, наномолярном или пикомолярном диапазонах), который может быть экспрессирован и секретирован клеткой и который содержит по меньшей мере одну CDR.

[0059] Фраза «легкая цепь» включает последовательность константной области легкой цепи иммуноглобулина из любого организма и, если не указано иное, включает каппа и лямбда легкие цепи человека. Переменные (VL) домены легкой цепи, как правило, включают три CDR легкой цепи и четыре каркасных (FR) области, если не указано иное. Как правило, полноразмерная легкая цепь содержит от аминоконца к карбоксильному концу: домен VL, который содержит FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, и константный домен легкой цепи. Легкие цепи, которые можно применять согласно настоящему изобретению, включают, например, цепи, которые не связываются селективно ни с первым, ни со вторым антигеном, селективно связываемым антигенсвязывающим белком. Подходящие легкие цепи включают цепи, которые могут быть идентифицированы путем скрининга по наиболее часто используемым легким цепям в имеющихся библиотеках антител (библиотеках WET или *in silico*), при этом легкие цепи существенно не нарушают аффинность и/или селективность антигенсвязывающих доменов антигенсвязывающих белков. Подходящие легкие цепи включают цепи, которые могут связываться с одним или обоими эпитопами, которые связываются антигенсвязывающими областями

антигенсвязывающего белка.

[0060] Фраза «вариабельный домен» включает аминокислотную последовательность легкой или тяжелой цепей иммуноглобулина (модифицированных, если требуется), которые содержат следующие аминокислотные области, в последовательности от N-конца к С-концу (если не указано иное): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. «Вариабельный домен» включает аминокислотную последовательность, способную укладываться в канонический домен (VH или VL), имеющий структуру двойных бета-складчатых слоев, где бета-складчатые слои соединяются дисульфидной связью между остатками первого бета-складчатого слоя и второго бета-складчатого слоя.

[0061] Фраза «область, определяющая комплементарность», или термин «CDR», включает аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты генов иммуноглобулина организма, которая в норме (т.е. у животного дикого типа) находится между двух каркасных областей в вариабельной области легкой или тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина (например, антитела или Т-клеточного рецептора). CDR может кодироваться, например, последовательностью зародышевой линии, или перегруппированной, или неперегруппированной последовательностью, и, например, наивной или зрелой В-клеткой или Т-клеткой. В некоторых случаях (например, для CDR3) CDR могут кодироваться двумя или более последовательностями (например, последовательностями зародышевой линии), которые не являются смежными (например, в неперегруппированной последовательности нуклеиновой кислоты), но являются смежными в последовательности нуклеиновой кислоты В-клетки, например, в результате сплайсинга или соединения последовательностей (например, рекомбинации V-D-J с образованием CDR3 тяжелой цепи).

[0062] Фраза «Fc-содержащий белок» включает антитела, биспецифические антитела, гетеродимерные белки и иммуноадгезины и другие связывающие белки, которые содержат по меньшей мере функциональную часть областей CH2 и CH3 иммуноглобулина. «Функциональная часть» относится к областям CH2 и CH3, которые могут связывать Fc-рецептор (например, FcγR; или FcRn, т.е. неонатальный Fc-рецептор) и/или которые могут участвовать в активации комплемента. Если области CH2 и CH3 содержат делеции, замены и/или вставки или другие модификации, которые делают их неспособными связывать какой-либо Fc-рецептор, а также неспособными активировать комплемент, то области CH2 и CH3 не являются функциональными.

[0063] Fc-содержащие белки могут содержать модификации в доменах иммуноглобулина, включая те модификации, что нарушают одну или более из эффекторных функций связывающего белка (например, модификации, которые нарушают связывание с FcγR, связывание с FcRn и, таким образом, период полувыведения и/или активность CDC). Такие модификации включают без ограничения следующие модификации и их комбинации, обозначенные на основании нумерации константной области иммуноглобулина согласно 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.

[0064] В качестве примера, но не ограничения, связывающий белок представляет собой Fc-содержащий белок и характеризуется увеличенным периодом полувыведения из сыворотки (по сравнению с таким же Fc-содержащим белком, не содержащим указанную(-ые) модификацию(-ии)) и имеет модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, L/R/SI/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F), и 434. В другом примере модификация может включать модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I), и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

[0065] Термины «замена со звездочкой», «Fc*» и «HC*» включают любую молекулу, тяжелую цепь иммуноглобулина, Fc-фрагмент, Fc-содержащую молекулу, гетеродимерный белок и т.д., которые содержат последовательность в пределах СН3-домена, которая подавляет связывание с белком А. Специфические модификации, такие как H95R и Y96F, которые могут ослаблять или подавлять связывание белка А в СН3-домене, обсуждаются в патенте США №8586713. Указанная дипептидная мутация обозначена как «замена со звездочкой».

[0066] Термин «клетка» включает любую клетку, которая подходит для экспрессии рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Клетки включают клетки прокариот и эукариот (одноклеточных или многоклеточных), бактериальные клетки (например, штаммы *E. coli*, *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.* и т.д.), клетки микобактерий, клетки грибов, клетки дрожжей (например, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica* и т.д.), растительные клетки, клетки насекомых (например, SF-9, SF-21, клетки насекомых, инфицированные бакуловирусом, *Trichoplusia ni* и т.д.), клетки животного, отличного от человека, клетки человека или продукты слияния клеток, такие как, например, гибридомы или квадромы. В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой клетку человека, обезьяны, человекообразной обезьяны, хомяка, крысы или мыши. В некоторых вариантах реализации клетка является эукариотической и выбрана из следующих клеток: CHO (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), клетки сетчатки, Vero, CV1, клетки почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60 (например, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (эпидермальные), CV-1, U937, 3T3, L-клетки, клетки C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, клетки Сертоли, клетки BRL 3A, клетки HT1080, клетки

миеломы, опухолевые клетки и клеточные линии, полученные из вышеупомянутых клеток.

[0067] Фраза «модификатор подвижной фазы» включает фрагменты, которые ослабляют эффект неспецифических (т.е. неаффинных) ионных и других нековалентных взаимодействий между белками или нарушают их. «Модификаторы подвижной фазы» включают, например, соли, ионные комбинации металлов группы I и группы II с ацетатом, бикарбонатом, карбонатом, галогенидом (например, хлоридом или фторидом), нитратом, фосфатом или сульфатом. Неограничивающий иллюстративный перечень «модификаторов подвижной фазы» включает ацетатные соли бериллия, лития, натрия и калия; бикарбонаты натрия и калия; карбонаты лития, натрия, калия и цезия; хлориды лития, натрия, калия, цезия и магния; фториды натрия и калия; нитраты натрия, калия и кальция; фосфаты натрия и калия; и сульфаты кальция и магния.

[0068] «Модификаторы подвижной фазы» также включают хаотропные агенты, которые ослабляют или иным образом нарушают нековалентные взаимодействия и увеличивают энтропию в биомолекулярных системах. Неограничивающие примеры хаотропных агентов включают бутанол, хлорид кальция, этанол, хлорид гуанидиния, перхлорат лития, ацетат лития, хлорид магния, фенол, пропанол, додецилсульфат натрия, тиомочевину и мочевину. Хаотропные агенты включают соли, которые отрицательно влияют на растворимость белков. Более хаотропные анионы включают, например, хлорид, нитрат, бромид, хлорат, йодид, перхлорат и тиоцианат. Более хаотропные катионы включают, например, литий, магний, кальций и гуанидиний.

[0069] «Модификаторы подвижной фазы» включают те фрагменты, которые отрицательно влияют на ионные или другие нековалентные взаимодействия, и которые в совокупности с градиентным или ступенчатым изменением pH или при установлении равновесия подложки с белком А в «модификаторе подвижной фазы» и приложении ступенчатого или градиентного изменения pH приводят к увеличению разницы в единицах pH между элюированием гомодимерного IgG и гетеродимерного IgG (например, IgG человека дикого типа и такого же IgG, который имеет одну или более модификаций СН3-домена, как описано в настоящем документе). Подходящая концентрация «модификатора подвижной фазы» может быть определена путем его концентрирования с использованием той же колонки, ступенчатого или градиентного изменения pH при повышении концентрации «модификатора подвижной фазы» до тех пор, пока не будет достигнута максимальная разница в pH при заданном ступенчатом или градиентном изменении pH. «Модификаторы подвижной фазы» также могут включать неполярные модификаторы, включая, например, пропиленгликоль, этиленгликоль и т.д.

[0070] В настоящем документе «аффинная хроматография» представляет собой хроматографический способ, в котором для осуществления хроматографического разделения используют специфические обратимые взаимодействия между биомолекулами, а не общие свойства биомолекулы, такие как изоэлектрическая точка, гидрофобность или размер. «Аффинная хроматография с белком А» или «хроматография с белком А» относится к способу специфической аффинной хроматографии, в котором используют

аффинность IgG-связывающих доменов белка А в отношении Fc-области молекулы иммуноглобулина. Указанная Fc-область содержит константные домены CH2 и CH3 иммуноглобулина человека или животного или домены иммуноглобулина, по существу схожие с ними. Белок А включает нативный белок из клеточной стенки *Staphylococcus aureus*, белок А, полученный рекомбинантными или синтетическими способами, и варианты, которые сохраняют способность связываться с Fc-областью. На практике хроматография с белком А включает применение белка А, иммобилизованного на твердой подложке. См. Gagnon, Protein A Affinity Chromatography, Purification Tools for Monoclonal Antibodies, стр. 155-198, Validated Biosystems, 1996. Белок G и белок L также можно применять для аффинной хроматографии. Твердая подложка представляет собой неводную матрицу, к которой прикрепляется белок А. Указанные подложки включают агарозу, сефарозу, стекло, диоксид кремния, полистирол, нитроцеллюлозу, древесный уголь, песок, целлюлозу и любой другой подходящий материал. Указанные материалы хорошо известны из уровня техники. Любой подходящий способ можно применять для прикрепления второго белка к твердой подложке. Способы прикрепления белков к подходящим твердым подложкам хорошо известны из уровня техники. См., например, Ostrove (Остров), в Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology, 182: 357-371, 1990. Указанные твердые подложки с иммобилизованным белком А и без него легко доступны из многих коммерческих источников, включая Vector Laboratory (Burlingame, Calif.), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif.), BioRad (Hercules, Calif.), Cytiva (Marlborough, Massachusetts), Pall (Port Washington, NY) и EMD-Millipore (Billerica, Mass.). Белок А, иммобилизованный на пористой стеклянной матрице, коммерчески доступен как PROSEP®-А (Millipore). Твердая фаза может также представлять собой матрицу на основе агарозы. Белок А, иммобилизованный на агарозной матрице, коммерчески доступен как MABSELECT™ (Cytiva).

[0071] Аффинная хроматография также включает среду, которую можно применять для селективного связывания и, таким образом, очистки антител, фрагментов антител или химерных слитых белков, которые содержат домены и/или последовательности иммуноглобулинов. Антитела включают типы IgG, IgA, IgM, IgY, IgD и IgE. Антитела также включают одноцепочечные антитела, такие как верблюжьи антитела, сконструированные верблюжьи антитела, одноцепочечные антитела, однодоменные антитела, нанотела и т.д. Фрагменты антител включают последовательности VH, VL, CL, CH. Фрагменты антител и слитые белки, содержащие последовательности антител, включают, например, F(ab')₃, F(ab')₂, Fab, Fc, Fv, dsFv, (scFv)₂, scFv, scAb, минитело, диатело, триатело, тетратело, Fc-слитые белки, молекулы-ловушки и т.д. (см. Ауяр *et al.*, Methods 56 (2012): 116-129). Указанные среды для аффинной хроматографии могут содержать лиганды, которые селективно связывают антитела, их фрагменты и слитые белки, которые содержат такие фрагменты. Указанные лиганды включают белки, связывающие антитела, рецепторы, выделенные у бактерий, антигены, лектины или анти-антитела, нацеленные на молекулярную мишень (т.е. молекулу, требующую очистки).

Например, выделенные у верблюжьих аффинные лиганды, нацеленные на любые одно или более из IgG-CH1, IgG-Fc, IgG-CH3, IgG1, LC-каппа, LC-лямбда, IgG3/4, IgA, IgM и т.д., можно применять в качестве аффинных лигандов (коммерчески доступные как хроматографические смолы CAPTURESELECT, Life Technologies, Inc., Carlsbad, Calif.).

Способы очистки гетеродимерных белков

[0072] Варианты реализации, касающиеся способов очистки гетеродимерных белков (посредством продления свойств разделения аффинной колонки и поддержания уровня выделения гетеродимерного белка) в соответствии с настоящим изобретением включают: (i) проведение предварительной последовательности циклов при предварительном значении рН элюирования и последующей последовательности циклов при последующем (и более высоком) значении рН; (ii) проведение последовательности циклов, в которых уровень примесей в элюате измеряют после каждого цикла, или периодически, и повышение рН элюирования в последующем цикле или циклах для поддержания минимального уровня примесей на протяжении последовательности циклов; и (iii) проведение последовательности циклов, в которой рН элюирования повышают постадийно за несколько блоков циклов (например, рН элюирования повышают на 0,5, 0,75 или 1 пункт после каждых 10, 15, 20, или 25 циклов).

[0073] Каждый из способов очистки гетеродимерного белка включает: (a) проведение последовательности хроматографических циклов, при этом каждый цикл включает: (i) введение смеси гетеродимерного белка и примесей в аффинную матрицу, содержащую лиганд, связывающий белок, причем гетеродимерный белок содержит первый и второй полипептиды с разной аффинностью в отношении лиганда, связывающего белок, и где по меньшей мере одна примесь связывается с лигандом, связывающим белок, и по меньшей мере одна примесь не связывается с лигандом, связывающим белок; (ii) промывку аффинной матрицы первым промывочным буфером при первом рН от 5 до 9 для удаления несвязывающих примесей; (iii) элюирование гетеродимерного белка из аффинной матрицы в первом элюирующем буфере при втором рН; и (iv) промывку аффинной матрицы вторым промывочным буфером при третьем рН менее 4 для удаления связывающих примесей; при этом второй рН составляет от 4,0 до 5,2.

[0074] В разных вариантах реализации внесение смеси гетеродимерного белка и примесей в аффинную матрицу включает внесение очищенной клеточной культуры из одного или более биореакторов, содержащей клетки, экспрессирующие нуклеотидные последовательности, кодирующие гетеродимерный белок. Например, клетки могут экспрессировать нуклеотиды, кодирующие каждую из тяжелой и легкой цепей, формирующих биспецифическое антитело. В некоторых случаях каждое из антигенсвязывающих плеч биспецифического антитела содержит общую легкую цепь. Очищенная клеточная культура может включать гетеродимерный белок (например, биспецифическое антитело) наряду с примесями, такими как гомодимерные частицы, белки клетки-хозяина и ДНК. В некоторых случаях гетеродимерный белок может вырабатываться в эукариотических клетках, таких как, например, клетки яичника китайского хомячка

(СНО).

[0075] В некоторых вариантах реализации смесь, вносимая в аффинную матрицу, включает смесь белков, содержащую (i) первый гомодимер, содержащий две копии первого полипептида, (ii) гетеродимер, содержащий первый полипептид и второй полипептид, и (iii) второй гомодимер, содержащий две копии второго полипептида. Первый и второй полипептиды имеют разную аффинность в отношении аффинной матрицы, таким образом, первый гомодимер, гетеродимер и второй гомодимер могут быть разделены на основании различий в связывании с аффинной матрицей. Различия связывания с аффинной матрицей можно регулировать путем изменения, помимо прочего, рН и/или ионной силы раствора, пропускаемого через аффинную матрицу.

[0076] После внесения очищенной клеточной культуры аффинную матрицу промывают промывочным буфером (первым промывочным буфером), имеющим рН от 5 до 9. В некоторых случаях рН промывочного буфера составляет от 6 до 8. В некоторых случаях рН промывочного буфера составляет от примерно 7 до примерно 7,5. В разных вариантах реализации рН промывочного буфера составляет или составляет примерно 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 или 9,0. В некоторых вариантах реализации рН промывочного буфера составляет или составляет примерно 7,2. В разных вариантах реализации буфер может представлять собой любой буфер, который может поддерживать желаемое значение или желаемый диапазон рН. В разных вариантах реализации концентрация буфера может составлять от примерно 5 мМ до примерно 100 мМ. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от примерно 5 мМ до примерно 15 мМ. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от примерно 5 мМ до примерно 50 мМ. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от примерно 10 мМ до примерно 25 мМ. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от примерно 20 мМ до примерно 40 мМ. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от примерно 30 мМ до примерно 50 мМ. В разных вариантах реализации концентрация буфера составляет или составляет примерно 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 11 мМ, 12 мМ, 13 мМ, 14 мМ, 15 мМ, 16 мМ, 17 мМ, 18 мМ, 19 мМ, 20 мМ, 21 мМ, 22 мМ, 23 мМ, 24 мМ, 25 мМ, 26 мМ, 27 мМ, 28 мМ, 29 мМ, 30 мМ, 31 мМ, 32 мМ, 33 мМ, 34 мМ, 35 мМ, 36 мМ, 37 мМ, 38 мМ, 39 мМ, 40 мМ, 41 мМ, 42 мМ, 43 мМ, 44 мМ, 45 мМ, 46 мМ, 47 мМ, 48 мМ, 49 мМ или 50 мМ. В некоторых вариантах реализации концентрация промывочного буфера составляет или составляет примерно 10 мМ. В некоторых вариантах реализации концентрация промывочного буфера составляет или составляет примерно 40 мМ. В некоторых вариантах реализации промывочный буфер представляет собой фосфат натрия. Промывочный буфер (первый промывочный буфер) также может содержать соль, как обсуждается ниже.

[0077] В некоторых случаях промывочный буфер содержит соль в концентрации от примерно 200 мМ до примерно 800 мМ. В некоторых случаях промывочный буфер содержит соль в концентрации от примерно 250 мМ до примерно 750 мМ. В некоторых

случаях промывочный буфер содержит соль в концентрации от примерно 300 мМ до примерно 700 мМ. В некоторых случаях промывочный буфер содержит соль в концентрации от примерно 350 мМ до примерно 650 мМ. В некоторых случаях промывочный буфер содержит соль в концентрации от примерно 400 мМ до примерно 600 мМ. В некоторых случаях промывочный буфер содержит соль в концентрации от примерно 450 мМ до примерно 550 мМ. В некоторых случаях промывочный буфер содержит соль в концентрации, составляющей или составляющей примерно 200 мМ, 210 мМ, 220 мМ, 225 мМ, 230 мМ, 240 мМ, 250 мМ, 260 мМ, 270 мМ, 275 мМ, 280 мМ, 290 мМ, 300 мМ, 310 мМ, 320 мМ, 325 мМ, 330 мМ, 340 мМ, 350 мМ, 360 мМ, 370 мМ, 375 мМ, 380 мМ, 390 мМ, 400 мМ, 410 мМ, 420 мМ, 425 мМ, 430 мМ, 440 мМ, 450 мМ, 460 мМ, 470 мМ, 475 мМ, 480 мМ, 490 мМ, 500 мМ, 510 мМ, 520 мМ, 525 мМ, 530 мМ, 540 мМ, 550 мМ, 560 мМ, 570 мМ, 575 мМ, 580 мМ, 590 мМ, 600 мМ, 610 мМ, 620 мМ, 625 мМ, 630 мМ, 640 мМ, 650 мМ, 660 мМ, 670 мМ, 675 мМ, 680 мМ, 690 мМ, 700 мМ, 710 мМ, 720 мМ, 725 мМ, 730 мМ, 740 мМ, 750 мМ, 760 мМ, 770 мМ, 780 мМ, 790 мМ или 800 мМ. В некоторых вариантах реализации концентрация соли в промывочном буфере составляет или составляет примерно 500 мМ. В некоторых вариантах реализации промывочный буфер содержит примерно 500 мМ NaCl. В некоторых случаях при данной промывке аффинной матрицы удаляются несвязанные примеси, такие как белок клетки-хозяина, ДНК и гомодимерные частицы, которые имеют малую аффинность к материалу аффинной матрицы (например, к белку А) или не имеют ее вовсе.

[0078] В некоторых вариантах реализации способы включают необязательную вторую промывку, перед элюированием гетеродимерного белка, промывочным буфером, содержащим небольшое количество (< 25 мМ) или не содержащим соль, с рН от 5 до 9. В некоторых вариантах реализации указанный промывочный буфер содержит от примерно 10 мМ до примерно 50 мМ Tris [трис(гидроксиэтил)аминометан]], фосфата или ацетата натрия или их комбинации. В разных вариантах реализации указанный промывочный буфер имеет рН, равный рН первого промывочного буфера, обсуждаемого выше.

[0079] После промывки или промывок, обсуждаемых выше, гетеродимерный белок элюируют из аффинной матрицы в элюирующем буфере и собирают в элюате. Элюирующий буфер имеет рН от примерно 4 до примерно 5,2 (или от 4,0 до 4,9) и содержит соль в концентрации более 200 мМ. Как более подробно обсуждается ниже в отношении разных способов, в некоторых вариантах реализации рН элюирующего буфера составляет от примерно 4,0 до примерно 4,2. В некоторых вариантах реализации рН элюирующего буфера составляет от примерно 4,4 до примерно 4,6. В разных вариантах реализации рН элюирующего буфера составляет или составляет примерно 4,0, 4,05, 4,1, 4,15, 4,2, 4,25, 4,3, 4,35, 4,4, 4,45, 4,5, 4,55, 4,6, 4,65, 4,7, 4,75, 4,8, 4,85, 4,9, 4,95 или 5,0. В некоторых вариантах реализации рН элюирующего буфера составляет $4,1 \pm 0,05$. В некоторых вариантах реализации рН элюирующего буфера составляет $4,5 \pm 0,05$. В разных вариантах реализации буфер может представлять собой любой буфер, который может поддерживать желаемое значение или желаемый диапазон рН. В разных вариантах реализации концентрация буфера

может составлять от примерно 5 мМ до примерно 100 мМ. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от примерно 25 мМ до примерно 55 мМ. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от примерно 30 мМ до примерно 50 мМ. В разных вариантах реализации концентрация буфера составляет или составляет примерно 30 мМ, 31 мМ, 32 мМ, 33 мМ, 34 мМ, 35 мМ, 36 мМ, 37 мМ, 38 мМ, 39 мМ, 40 мМ, 41 мМ, 42 мМ, 43 мМ, 44 мМ, 45 мМ, 46 мМ, 47 мМ, 48 мМ, 49 мМ или 50 мМ. В некоторых вариантах реализации концентрация элюирующего буфера составляет или составляет примерно 40 мМ. В некоторых вариантах реализации элюирующий буфер представляет собой уксусную кислоту. В некоторых вариантах реализации элюирующий буфер представляет собой ацетат.

[0080] В некоторых случаях элюирующий буфер содержит соль в концентрации от примерно 200 мМ до примерно 800 мМ. В некоторых случаях элюирующий буфер содержит соль в концентрации от примерно 250 мМ до примерно 750 мМ. В некоторых случаях элюирующий буфер содержит соль в концентрации от примерно 300 мМ до примерно 700 мМ. В некоторых случаях элюирующий буфер содержит соль в концентрации от примерно 350 мМ до примерно 650 мМ. В некоторых случаях элюирующий буфер содержит соль в концентрации от примерно 400 мМ до примерно 600 мМ. В некоторых случаях элюирующий буфер содержит соль в концентрации от примерно 450 мМ до примерно 550 мМ. В некоторых случаях элюирующий буфер содержит соль в концентрации, составляющей или составляющей примерно 200 мМ, 210 мМ, 220 мМ, 225 мМ, 230 мМ, 240 мМ, 250 мМ, 260 мМ, 270 мМ, 275 мМ, 280 мМ, 290 мМ, 300 мМ, 310 мМ, 320 мМ, 325 мМ, 330 мМ, 340 мМ, 350 мМ, 360 мМ, 370 мМ, 375 мМ, 380 мМ, 390 мМ, 400 мМ, 410 мМ, 420 мМ, 425 мМ, 430 мМ, 440 мМ, 450 мМ, 460 мМ, 470 мМ, 475 мМ, 480 мМ, 490 мМ, 500 мМ, 510 мМ, 520 мМ, 525 мМ, 530 мМ, 540 мМ, 550 мМ, 560 мМ, 570 мМ, 575 мМ, 580 мМ, 590 мМ, 600 мМ, 610 мМ, 620 мМ, 625 мМ, 630 мМ, 640 мМ, 650 мМ, 660 мМ, 670 мМ, 675 мМ, 680 мМ, 690 мМ, 700 мМ, 710 мМ, 720 мМ, 725 мМ, 730 мМ, 740 мМ, 750 мМ, 760 мМ, 770 мМ, 780 мМ, 790 мМ или 800 мМ. В некоторых вариантах реализации концентрация соли в элюирующем буфере составляет или составляет примерно 500 мМ. В некоторых вариантах реализации элюирующий буфер содержит примерно 500 мМ NaCl. В некоторых вариантах реализации элюирующий буфер содержит примерно 500 мМ CaCl₂. В некоторых вариантах реализации элюирующий буфер содержит примерно 500 мМ MgCl₂.

[0081] После элюирования и сбора гетеродимерного белка из аффинной матрицы аффинную матрицу промывают промывочным буфером (вторым промывочным буфером) с рН менее чем примерно 4. В некоторых вариантах реализации рН промывочного буфера составляет от примерно 2,5 до примерно 3,5. В некоторых вариантах реализации рН промывочного буфера составляет $3,0 \pm 0,2$. В разных вариантах реализации рН промывочного буфера составляет или составляет примерно 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8 или 3,9. Промывочный буфер может содержать любой подходящий материал для обеспечения рН или диапазона рН, указанного выше. В некоторых вариантах реализации промывочный буфер содержит уксусную кислоту в

концентрации от примерно 20 мМ до примерно 60 мМ. В некоторых вариантах реализации промывочный буфер содержит уксусную кислоту в концентрации от примерно 30 мМ до примерно 50 мМ. В некоторых случаях промывочный буфер содержит примерно 40 мМ уксусной кислоты. В некоторых случаях при данной промывке аффинной матрицы удаляются ранее связанные примеси, такие как гомодимерные частицы с более высокой аффинностью к материалу аффинной матрицы (например, к белку А) по сравнению с гетеродимерным белком. В некоторых случаях способы согласно настоящему изобретению могут также включать дополнительную промывку аффинной матрицы буфером, имеющим более низкий рН (например, $2,45 \pm 0,2$) и более высокую концентрацию буферного вещества (например, 500 мМ уксусной кислоты), чем промывочный буфер, обсуждаемый непосредственно выше.

[0082] После удаления дополнительных примесей путем промывки (или промывок), обсуждаемой выше, в аффинной матрице можно повторно устанавливать равновесие при рН от 5 до 9 перед началом следующего цикла. В разных вариантах реализации в аффинной матрице устанавливают равновесия при рН, составляющем или составляющем примерно 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 или 9,0. В некоторых вариантах реализации в аффинной матрице устанавливают равновесие при рН примерно 7,2. Установление равновесия можно проводить при помощи уравнивающего буфера, имеющего желаемый рН. В разных вариантах реализации буфер может представлять собой любой буфер, который может поддерживать желаемое значение или желаемый диапазон рН. В разных вариантах реализации концентрация буфера может составлять от примерно 5 мМ до примерно 100 мМ. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от примерно 10 мМ до примерно 30 мМ. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от примерно 30 мМ до примерно 50 мМ. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от примерно 40 мМ до примерно 60 мМ. В разных вариантах реализации концентрация буфера составляет или составляет примерно 10 мМ, 11 мМ, 12 мМ, 13 мМ, 14 мМ, 15 мМ, 16 мМ, 17 мМ, 18 мМ, 19 мМ, 20 мМ, 21 мМ, 22 мМ, 23 мМ, 24 мМ, 25 мМ, 26 мМ, 27 мМ, 28 мМ, 29 мМ, 30 мМ, 31 мМ, 32 мМ, 33 мМ, 34 мМ, 35 мМ, 36 мМ, 37 мМ, 38 мМ, 39 мМ, 40 мМ, 41 мМ, 42 мМ, 43 мМ, 44 мМ, 45 мМ, 46 мМ, 47 мМ, 48 мМ, 49 мМ, 50 мМ, 51 мМ, 52 мМ, 53 мМ, 54 мМ, 55 мМ, 56 мМ, 57 мМ, 58 мМ, 59 мМ или 60 мМ. В некоторых вариантах реализации концентрация буфера составляет или составляет примерно 20 мМ. В некоторых вариантах реализации концентрация буфера составляет или составляет примерно 40 мМ. В некоторых вариантах реализации концентрация буфера составляет или составляет примерно 50 мМ. В некоторых вариантах реализации буфер представляет собой фосфат натрия. В некоторых вариантах реализации указанный буфер содержит от примерно 10 мМ до примерно 50 мМ Tris, фосфата или ацетата натрия или их комбинации.

[0083] После установления равновесия в аффинной матрице нейтрализованный элюат, содержащий гетеродимерный белок (уже очищенный от гомодимерных

загрязняющих веществ и других примесей), повторно наносят в ту же аффинную матрицу, что использовалась на стадиях способа очистки, обсуждаемых выше, при рН от 5 до 9. В разных вариантах реализации нейтрализованный элюат повторно наносят в аффинную матрицу при рН, составляющем или составляющем примерно 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 или 9,0. В некоторых вариантах реализации рН составляет или составляет примерно 7,2.

[0084] В некоторых вариантах реализации способ очистки гетеродимерного белка включает: (а) проведение последовательности хроматографических циклов, при этом каждый цикл включает: (i) введение смеси гетеродимерного белка и примесей в аффинную матрицу, содержащую лиганд, связывающий белок, причем гетеродимерный белок содержит первый и второй полипептиды с разной аффинностью в отношении лиганда, связывающего белок, и где по меньшей мере одна примесь связывается с лигандом, связывающим белок, и по меньшей мере одна примесь не связывается с лигандом, связывающим белок; (ii) промывку аффинной матрицы первым промывочным буфером при первом рН от 5 до 9 для удаления несвязывающих примесей; (iii) элюирование гетеродимерного белка из аффинной матрицы в первом элюирующем буфере при втором рН; и (iv) промывку аффинной матрицы вторым промывочным буфером при третьем рН менее 4 для удаления связывающих примесей, при этом второй рН имеет предварительное значение рН во время предварительной последовательности циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, после чего второй рН повышают до последующего значения рН, которое выше предварительного значения рН во время последующей последовательности циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, причем значения предварительного рН и последующего рН составляют от 4,0 до 5,2; и (b) сбор гетеродимерного белка из аффинной матрицы в элюате.

[0085] В разных вариантах реализации предварительная последовательность циклов состоит из 20 циклов. В некоторых вариантах реализации предварительная последовательность циклов состоит из 30 циклов. В некоторых вариантах реализации предварительная последовательность циклов состоит из 40 циклов. В некоторых вариантах реализации предварительная последовательность циклов состоит из 50 циклов. В некоторых вариантах реализации предварительная последовательность циклов состоит из 60 циклов. В некоторых вариантах реализации предварительная последовательность циклов состоит из 70 циклов. В некоторых вариантах реализации предварительная последовательность циклов состоит из 80 циклов. В некоторых случаях предварительная последовательность циклов включает или состоит из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 циклов или более.

[0086] В некоторых вариантах реализации последующая последовательность циклов состоит по меньшей мере из 20 циклов. В некоторых вариантах реализации последующая последовательность циклов состоит по меньшей мере из 50, по меньшей мере 60, по

меньшей мере 70 или по меньшей мере 80 циклов. В некоторых случаях последующая последовательность циклов включает или состоит из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 85, 90, 95 или 100 циклов или более.

[0087] В некоторых вариантах реализации предварительный рН составляет от 4,0 до 4,2. В некоторых случаях предварительный рН составляет $4,1 \pm 0,05$. В некоторых случаях предварительное значение рН составляет 4,0, 4,025, 4,05, 4,075, 4,1, 4,125, 4,15, 4,175 или 4,2. В некоторых вариантах реализации последующий рН составляет от 4,3 до 4,7. В некоторых случаях последующее значение рН составляет $4,5 \pm 0,05$. В некоторых случаях последующее значение рН составляет 4,4, 4,425, 4,45, 4,475, 4,5, 4,525, 4,55, 4,575 или 4,6.

[0088] В некоторых вариантах реализации способ очистки гетеродимерного белка включает: (а) проведение последовательности хроматографических циклов, при этом каждый цикл включает: (i) введение смеси гетеродимерного белка и примесей в аффинную матрицу, содержащую лиганд, связывающий белок, причем гетеродимерный белок содержит первый и второй полипептиды с разной аффинностью в отношении лиганда, связывающего белок, и где по меньшей мере одна примесь связывается с лигандом, связывающим белок, и по меньшей мере одна примесь не связывается с лигандом, связывающим белок; (ii) промывку аффинной матрицы первым промывочным буфером при первом рН от 5 до 9 для удаления несвязывающих примесей; (iii) элюирование гетеродимерного белка из аффинной матрицы в первом элюирующем буфере при втором рН; и (iv) промывку аффинной матрицы вторым промывочным буфером при третьем рН менее 4 для удаления связывающих примесей; (b) измерение уровня связывающей примеси в элюате, содержащем гетеродимерный белок, после любого одного или более циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, и сравнение измеренного уровня связывающей примеси с эталонным уровнем связывающей примеси, при этом если измеренный уровень связывающей примеси превышает эталонный уровень связывающей примеси, то затем второй рН увеличивают во время последующего цикла в рамках последовательности хроматографических циклов, причем второй рН составляет от 4,0 до 5,2 во время каждого цикла или последующего цикла в рамках последовательности хроматографических циклов; и (c) сбор гетеродимерного белка из аффинной матрицы в элюате.

[0089] В некоторых вариантах реализации эталонный уровень связывающей примеси составляет от 2% до 10%. В некоторых случаях эталонный уровень связывающей примеси составляет от 3% до 7%. В некоторых случаях эталонный уровень связывающей примеси составляет $5\% \pm 0,5\%$. В разных вариантах реализации эталонный уровень связывающей примеси составляет или составляет примерно 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5% или 10%.

[0090] В некоторых вариантах реализации уровень связывающей примеси в элюате измеряют после каждого цикла в рамках последовательности хроматографических циклов.

В некоторых вариантах реализации уровень связывающей примеси в элюате измеряют после каждого пятого цикла в рамках последовательности хроматографических циклов. В некоторых вариантах реализации уровень связывающей примеси в элюате измеряют после каждого десятого цикла в рамках последовательности хроматографических циклов. В некоторых вариантах реализации уровень связывающей примеси в элюате измеряют после каждого двадцатого цикла в рамках последовательности хроматографических циклов. В некоторых вариантах реализации уровень связывающей примеси в элюате измеряют после каждого сорокового цикла или пятидесятого цикла в рамках последовательности хроматографических циклов. В разных вариантах реализации уровень связывающей примеси в элюате измеряют после цикла 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и/или цикла 100. В разных вариантах реализации уровень связывающей примеси в элюате измеряют после каждых 2 циклов, каждых 3 циклов, каждых 4 циклов, каждых 5 циклов, каждых 6 циклов, каждых 7 циклов, каждых 8 циклов, каждых 9 циклов, каждых 10 циклов, каждых 15 циклов, каждых 20 циклов, каждых 25 циклов, каждых 30 циклов, каждых 35 циклов, каждых 40 циклов, каждых 45 циклов или каждых 50 циклов. В некоторых случаях элюат собирают во время нескольких циклов (например, пяти циклов или десяти циклов), и уровень связывающей примеси измеряют в объединенном пуле элюатов. В разных вариантах реализации объединенный пул элюатов собирают для последовательности из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 циклов или более.

[0091] В некоторых вариантах реализации второй рН повышают от диапазона от 4,0 до 4,2 до диапазона от 4,2 до 5,2 (или от 4,3 до 4,7), если измеренный уровень связывающей примеси превышает эталонный уровень связывающей примеси. В некоторых случаях второй рН повышают от $4,1 \pm 0,05$ до $4,5 \pm 0,05$, если измеренный уровень связывающей примеси превышает эталонный уровень связывающей примеси. В некоторых случаях второй рН составляет 4,0, 4,025, 4,05, 4,075, 4,1, 4,125, 4,15, 4,175 или 4,2, и его повышают до 4,4, 4,425, 4,45, 4,475, 4,5, 4,525, 4,55, 4,575 или 4,6, если измеренный уровень связывающей примеси превышает эталонный уровень связывающей примеси.

[0092] В некоторых вариантах реализации второй рН составляет от 4,0 до 4,2, и его повышают на 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,25, 2,5, 2,75, 3, 3,25, 3,5, 3,75, 4, 4,25, 4,5, 4,75 или 5 пунктов в последующих циклах, если измеренный уровень связывающей примеси превышает эталонный уровень связывающей примеси. Таким образом, в некоторых случаях второй рН может быть увеличен с некоторым приращением в последующем цикле, если измеренный

уровень связывающей примеси превышает эталонный уровень связывающей примеси, а затем увеличен с некоторым приращением еще раз (и еще раз, и еще раз и т.д., при необходимости), если измеренный уровень связывающей примеси превышает эталонный уровень связывающей примеси в следующем цикле, для которого проводят измерение. Таким образом, рН элюирования можно поддерживать на уровне, который обеспечивает минимальное количество связывающей примеси в элюате, сохраняя при этом максимальный уровень выделения гетеродимерного белка в течение последовательности хроматографических циклов.

[0093] В некоторых вариантах реализации способ очистки гетеродимерного белка включает: (а) проведение последовательности хроматографических циклов, при этом каждый цикл включает: (i) введение смеси гетеродимерного белка и примесей в аффинную матрицу, содержащую лиганд, связывающий белок, причем гетеродимерный белок содержит первый и второй полипептиды с разной аффинностью в отношении лиганда, связывающего белок, и где по меньшей мере одна примесь связывается с лигандом, связывающим белок, и по меньшей мере одна примесь не связывается с лигандом, связывающим белок; (ii) промывку аффинной матрицы первым промывочным буфером при первом рН от 5 до 9 для удаления несвязывающих примесей; (iii) элюирование гетеродимерного белка из аффинной матрицы в первом элюирующем буфере при втором рН; и (iv) промывку аффинной матрицы вторым промывочным буфером при третьем рН менее 4 для удаления связывающих примесей; при этом второй рН имеет первичное значение рН во время первичной последовательности циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, второй рН повышают до вторичного значения рН, превышающего первичное значение рН, во время вторичной последовательности циклов, которая следует за первичной последовательностью циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, и второй рН повышают до третичного значения рН, превышающего вторичное значение рН, во время третичной последовательности циклов, которая следует за вторичной последовательностью циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, при этом первичное значение рН, вторичное значение рН и третичное значение рН составляют от 4,0 до 5,2; и (b) сбор гетеродимерного белка из аффинной матрицы в элюате.

[0094] В некоторых вариантах реализации первичная последовательность циклов включает от 5 до 50 циклов. В некоторых случаях первичная последовательность циклов включает вплоть до 20 циклов. В некоторых случаях первичная последовательность циклов включает вплоть до 40 циклов. В некоторых случаях первичная последовательность циклов включает или включает вплоть до 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 циклов или более.

[0095] В некоторых вариантах реализации вторичная последовательность циклов включает от 5 до 50 циклов. В некоторых случаях вторичная последовательность циклов включает от 10 до 25 циклов. В некоторых случаях вторичная последовательность циклов

включает или включает вплоть до 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 циклов или более.

[0096] В некоторых вариантах реализации третичная последовательность циклов включает от 5 до 50 циклов. В некоторых случаях третичная последовательность циклов включает от 10 до 25 циклов. В некоторых случаях третичная последовательность циклов включает или включает вплоть до 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 циклов или более.

[0097] В некоторых вариантах реализации первичное значение рН составляет от 4,0 до 4,2. В некоторых случаях первичное значение рН составляет $4,1 \pm 0,05$. В некоторых случаях первичное значение рН составляет 4,0, 4,025, 4,05, 4,075, 4,1, 4,125, 4,15, 4,175 или 4,2. В некоторых вариантах реализации вторичное значение рН составляет от 4,2 до 4,4. В некоторых случаях вторичное значение рН составляет $4,3 \pm 0,05$. В некоторых случаях вторичное значение рН составляет 4,2, 4,225, 4,25, 4,275, 4,3, 4,325, 4,35, 4,375 или 4,4. В некоторых вариантах реализации третичное значение рН составляет от 4,4 до 4,6. В некоторых случаях третичное значение рН составляет $4,5 \pm 0,05$. В некоторых случаях третичное значение рН составляет 4,4, 4,425, 4,45, 4,475, 4,5, 4,525, 4,55, 4,575 или 4,6.

[0098] В некоторых вариантах реализации второй рН повышают до 4-го значения рН, превышающего третичное значение рН, во время 4-й последовательности циклов, которая следует за третичной последовательностью циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, при этом 4-е значение рН составляет от 4,0 до 5,2.

[0099] В некоторых вариантах реализации второй рН повышают до 5-го значения рН, превышающего 4-е значение рН, во время 5-й последовательности циклов, которая следует за 4-й последовательностью циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, при этом 5-е значение рН составляет от 4,0 до 5,2.

[0100] В некоторых вариантах реализации второй рН повышают до 6-го значения рН, превышающего 5-е значение рН, во время 6-й последовательности циклов, которая следует за 5-й последовательностью циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, при этом 6-е значение рН составляет от 4,0 до 5,2.

[0101] В некоторых случаях вторичное значение рН превышает первичное значение рН на величину от 0,1 до 0,9, третичное значение рН превышает вторичное значение рН на величину от 0,1 до 0,9, 4-е значение рН превышает третичное значение рН на величину от 0,1 до 0,9, 5-е значение рН превышает 4-е значение рН на величину от 0,1 до 0,9, и/или 6-е значение рН превышает 5-е значение рН на величину от 0,1 до 0,9, при этом первичное значение рН составляет от 4,0 до 4,2. В некоторых вариантах реализации первичное значение рН составляет $4,1 \pm 0,05$.

[0102] В некоторых вариантах реализации вторичное, третичное, 4-е, 5-е или 6-е значение рН (или 7-е, 8-е, 9-е и т.д. значение рН) увеличивают на 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 или 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,25,

2,5, 2,75, 3, 3,25, 3,5, 3,75, 4, 4,25, 4,5, 4,75 или 5 пунктов относительно непосредственно предшествующего значения рН (например, вторичное значение рН увеличивают относительно первичного значения рН, а третичное значение рН увеличивают относительно вторичного значения рН, и т.д.) в следующей последовательности циклов. Таким образом, в некоторых случаях рН элюирования может быть увеличен с некоторым приращением в каждой последующей последовательности циклов. Таким образом, рН элюирования можно поддерживать на уровне, который обеспечивает минимальное количество связывающей примеси в элюате, сохраняя при этом максимальный уровень выделения гетеродимерного белка в течение последовательности хроматографических циклов.

[0103] В некоторых вариантах реализации каждая из первичной последовательности циклов, вторичной последовательности циклов, третичной последовательности циклов, 4-й последовательности циклов, 5-й последовательности циклов и/или 6-й последовательности циклов (или дополнительной последовательности, по мере необходимости) включает от 5 до 50 циклов в рамках последовательности хроматографических циклов. В разных вариантах реализации каждая последовательность циклов включает или включает по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 циклов или более.

[0104] В разных вариантах реализации внесение в аффинную матрицу очищенной клеточной культуры или нейтрализованного элюата, содержащего гетеродимерный белок, может включать добавление материала в количестве вплоть до примерно 75 г/л смолы, составляющей аффинную матрицу. В разных вариантах реализации в аффинную матрицу вносят материал в количестве 65 г/л, 60 г/л, 55 г/л или 50 г/л или менее.

[0105] В некоторых вариантах реализации аффинная матрица содержит лиганд (например, белок А), прикрепленный к субстрату. В некоторых случаях субстрат представляет собой гранулу или частицу, таким образом, аффинная матрица представляет собой совокупность частиц, прикрепленных к лиганду. В разных вариантах реализации лиганд представляет собой белок А или белок G. Если лиганд представляет собой белок А, то 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-домена, тетрамер Y-домена или сконструированный белок А, в котором отсутствуют домены D и E. Указанные примеры сконструированного белка А не могут связываться (или, если связываются, то с очень низкой аффинностью) с VH3-доменом иммуноглобулина, но тем не менее могут связываться с CH3-доменами IgG1, IgG2 и IgG4.

[0106] В некоторых случаях субстрат аффинной матрицы содержит или выполнен из агарозы, поли(стиролдивинилбензола), полиметакрилата, стекла с заданным размером пор, сферического диоксида кремния, целлюлозы и т.д. В тех вариантах реализации, в которых субстрат имеет форму гранулы или частицы, средний диаметр частиц составляет от 25 мкм

до 100 мкм. В некоторых вариантах реализации средний диаметр частиц составляет от примерно 40 мкм до примерно 60 мкм. В некоторых вариантах реализации средний диаметр частиц составляет от примерно 45 мкм до примерно 55 мкм. В некоторых вариантах реализации средний диаметр частиц составляет от примерно 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 или 55 мкм. В некоторых случаях средний диаметр частиц составляет примерно 45 мкм. В некоторых случаях средний диаметр частиц составляет примерно 50 мкм. В некоторых вариантах реализации частицы имеют средний диаметр 35 мкм, 45 мкм, 60 мкм, 75 мкм или 85 мкм. В некоторых вариантах реализации частицы содержат поры, имеющие средний диаметр примерно 1000 Å, 1050 Å, 1100 Å, 1150 Å или 1200 Å. В некоторых вариантах реализации частицы содержат поры, имеющие средний диаметр примерно 1100 Å.

[0107] В разных вариантах реализации элюирующий буфер или промывочные буферы могут содержать соль. В некоторых случаях соль содержит Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- , $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$, NH_4^+ , Cs^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} или Al^{3+} . В некоторых вариантах реализации соль содержит Na^+ , H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} или Al^{3+} . В некоторых вариантах реализации соль содержит Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- или ClO_4^- . В некоторых вариантах реализации соль содержит комбинации Na^+ , H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} или Al^{3+} с Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- или ClO_4^- . В некоторых вариантах реализации соль выбрана из CaCl_2 , MgCl_2 или NaCl . В некоторых вариантах реализации соль представляет собой NaCl . В некоторых вариантах реализации соль представляет собой CaCl_2 . В некоторых вариантах реализации соль представляет собой MgCl_2 .

[0108] В некоторых вариантах реализации в предложенных способах гетеродимерный белок представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первый полипептид, содержащий СНЗ-домен, который может связываться с белком А («Fc»), и второй полипептид, содержащий СНЗ-домен, который не может связываться с белком А («Fc*»). В некоторых случаях второй полипептид содержит замену Н435R/У436F (согласно системе нумерации EU; Н95R/У96F согласно системе нумерации экзонов IMGT) в СНЗ-домене (также называемую «Fc*» или «замена со звездочкой»). Таким образом, в некоторых вариантах реализации первый гомодимер представляет собой моноспецифическое антитело, содержащее два незамещенных СНЗ-домена (т.е. FcFc); второй гомодимер представляет собой моноспецифическое антитело, содержащее два СНЗ-домена с заменой Н435R/У436F (т.е. Fc*Fc*); и гетеродимерный белок представляет собой биспецифическое антитело, содержащее один незамещенный СНЗ-домен и один СНЗ-домен с заменой Н435R/У436F (т.е. Fc*Fc).

[0109] В некоторых вариантах реализации в предложенных способах частота, с которой хроматографическую колонку подвергают очистке (например, приводя колонку в контакт с основным раствором, имеющим рН по меньшей мере 11), может быть уменьшена для минимизации влияния на функцию белок-лиганд. Аналогичным образом, в некоторых вариантах реализации в предложенных способах концентрация основания в растворе, применяемом для очистки хроматографической колонки, может быть снижена до диапазона от 0,1 н. до 0,5 н. для максимизации свойств разделения колонки на протяжении большего

числа циклов.

[0110] В разных вариантах реализации аффинную матрицу можно приводить в контакт с основным раствором, имеющим рН по меньшей мере 11, после каждого цикла. В некоторых случаях аффинную матрицу приводят в контакт с основным раствором, имеющим рН по меньшей мере 11, после каждых трех циклов. В некоторых случаях аффинную матрицу приводят в контакт с основным раствором, имеющим рН по меньшей мере 11, после каждых пяти циклов. В некоторых случаях аффинную матрицу приводят в контакт с основным раствором, имеющим рН по меньшей мере 11, после каждых семи циклов. В разных вариантах реализации аффинную матрицу приводят в контакт с основным раствором, имеющим рН по меньшей мере 11, только после каждых 2 циклов, каждых 3 циклов, каждых 4 циклов, каждых 5 циклов, каждых 6 циклов, каждых 7 циклов, каждых 8 циклов, каждых 9 циклов или каждых 10 циклов.

[0111] В некоторых вариантах реализации рН основного раствора составляет по меньшей мере 12. В некоторых вариантах реализации рН основного раствора составляет по меньшей мере 11, по меньшей мере 11,1, по меньшей мере 11,2, по меньшей мере 11,3, по меньшей мере 11,4, по меньшей мере 11,5, по меньшей мере 11,6, по меньшей мере 11,7, по меньшей мере 11,8, по меньшей мере 11,9, по меньшей мере 12, по меньшей мере 12,1, по меньшей мере 12,2, по меньшей мере 12,3, по меньшей мере 12,4, по меньшей мере 12,5, по меньшей мере 12,6, по меньшей мере 12,7, по меньшей мере 12,8, по меньшей мере 12,9 или по меньшей мере 13.

[0112] В некоторых вариантах реализации основной раствор содержит основание в концентрации от 0,1 н. до 0,5 н. В некоторых случаях концентрация основания составляет от 0,1 н. до 0,3 н. В некоторых случаях концентрация основания составляет 0,1 н., 0,15 н., 0,2 н., 0,25 н., 0,3 н., 0,35 н., 0,4 н., 0,45 н. или 0,5 н. В некоторых вариантах реализации основной раствор содержит гидроксид щелочного металла. В некоторых случаях основание представляет собой NaOH. В некоторых случаях основание представляет собой KOH.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1: Оценка влияния рН элюирования на наличие связывающей примеси и уровень выделения гетеродимерного белка в аффинной хроматографии

[0113] Наполняли 16,2 мл колонку MabSelect SuRe™ рсс (внутренний диаметр 1,0 см, высота слоя 20,6 см) ранее не использовавшейся смолой и устанавливали в контроллер настольного жидкостного хроматографа АКТА Avant 25 для проведения данного эксперимента. Проводили способ аффинного разделения, как указано ниже в таблице 1, но с изменением рН элюирования от 3,90 до 4,30.

[0114] **Таблица 1:** Способ определения элюирующего буфера для аффинной хроматографии для разделения bsAb1 с использованием MabSelect SuRe™ рсс

Стадия	Описание	Раствор	Объем	Время пребывания (мин)

1	Удаление этанола, используемого для хранения	RODI	2 CV	10
2	Предварительная очистка	500 мМ уксусная кислота, pH 2,45 ± 0,20	2 CV	6
3	Установление равновесия	40 мМ фосфат натрия, 500 мМ NaCl, pH 7,20 ± 0,10	2 CV	6
4	Внесение пробы	Очищенная клеточная культура	55,0 г связывающих частиц/л смолы ^а	6
5	Промывка 1	40 мМ фосфат натрия, 500 мМ NaCl, pH 7,20 ± 0,10	3 CV	6
6	Промывка 2	40 мМ Tris, 10 мМ ацетат, pH 7,20 ± 0,10	2 CV	6
7	Элюирование	40 мМ ацетат, 500 мМ NaCl pH 4,10 ± 0,05	6 CV ^б	6
8	Очистка 1	40 мМ уксусная кислота, pH 3,00 ± 0,10	2 CV	6
9	Очистка 2	500 мМ уксусная кислота, pH 2,45 ± 0,20	2 CV	6
10	Повторное установление равновесия	20 мМ фосфат натрия, pH 7,20 ± 0,10	2 CV	6
11	Хранение	20% (об./об.) этанола	2 CV	10

а Связывающие частицы относятся к биспецифическим и связывающим примесям. Для определения нагрузки колонки использовали титр связывающих антител.

б Сбор элюата начинали с 0,5 CV в блоке элюирования.

CV, объем колонки; RODI, вода, деионизированная методом обратного осмоса

[0115] Элюаты после аффинного разделения фракционировали для обеспечения получения холостых пулов, соответствующих композиции элюата при продолжительности элюирования 5, 6 и 7 CV. Сбор элюата начинали с 0,5 CV в блоке элюирования. CV 0,5 - 5 собирали вместе, затем по отдельности собирали CV 5 - 6 и CV 6 - 7. После фракционирования объединяли надлежащие объемы каждой фракции для получения холостых пулов для 6 CV и 7 CV; затем проводили статистическую оценку пулов для 5, 6 и 7 CV в отдельных экспериментах.

[0116] Концентрацию каждого холостого пула определяли методом УФ-спектроскопии (280 нм) при помощи прибора Solo VPE. Для каждого холостого пула анализировали чистоту биспецифического продукта, измеренную при помощи хроматографического исследования в смешанном режиме. Данные об объеме элюата, концентрации белка в элюате, связывающей примеси и несвязывающей примеси для каждого холостого пула использовали для вычисления выхода биспецифического продукта после аффинного разделения для каждого эксперимента. Создавали модели с использованием факторов, выбранных из инструмента обратной пошаговой регрессии, в котором задавали вероятность для включения фактора 0,25, вероятность для удаления фактора 0,05 и правило остановки с пороговым значением р-критерия 95%, и использовали для вычисления уровня связывающих примесей и уровня выделения гетеродимерного белка.

[0117] Как показано на фиг. 3, как относительное содержание связывающей примеси в элюате, так и относительный уровень выделения гетеродимерного белка снижались при повышении рН в ранее не использовавшейся колонке (0 предыдущих циклов). Видно, что рН 4,1 обеспечивал минимальный уровень связывающей примеси в элюате (например, 2,0%), при этом сохранялся значительный уровень выделения гетеродимерного белка (например, 92,5%). Примечательно, что повышение рН элюирующего буфера даже до 4,2 значительно снижало уровень выделения гетеродимерного белка (например, примерно до 80%).

ПРИМЕР 2: Оценка влияния рН элюирования на наличие связывающей примеси и уровень выделения гетеродимерного белка в используемых впервые и циклически колонках для аффинной хроматографии

[0118] Для проведения данного эксперимента использовали колонку MabSelect SuRe™ рсс (внутренний диаметр 1,0 см, высота слоя 20 см), установленную в систему жидкостной хроматографии Akta Avant 25 (Cytiva). Проводили способ аффинного разделения, как указано ниже в таблице 2, но изменяли рН элюирования и число циклов, как показано ниже в таблице 3.

[0119] **Таблица 2:** Способ определения элюирующего буфера для аффинной хроматографии для разделения bsAb1 с использованием MabSelect SuRe™ рсс в используемых впервые и циклически колонках

Стадия	Описание	Раствор	Объем	Время пребывания (мин)
1	Удаление этанола, используемого для хранения	Вода, деионизированная методом обратного осмоса	2 CV	10
2	Предварительная очистка	500 мМ уксусная кислота, рН 2,45 ± 0,20	2 CV	6
3	Установление равновесия	20 мМ фосфат натрия, рН 7,20 ± 0,10	2 CV	6

4	Внесение пробы	Очищенная клеточная культура	52-63 г связывающих частиц (связывающая примесь+биспецифический продукт) на л смолы	6
5	Промывка 1	10 мМ фосфат натрия, 525 мМ NaCl, pH 7,10 ± 0,10	3 CV	6
6	Промывка 2	20 мМ фосфат натрия, pH 7,20 ± 0,10	2 CV	6
7	Элюирование	40 мМ ацетат, 500 мМ NaCl, pH 4,10 ± 0,05 ИЛИ 40 мМ ацетат, 500 мМ NaCl, pH 4,50 ± 0,05	≤ 7,25 CV	8
8	Очистка 1	40 мМ уксусная кислота, 9 мМ NaCl, pH 3,10 ± 0,10	2 CV	6
9	Очистка 2	500 мМ уксусная кислота, pH 2,45 ± 0,20	2 CV	6
10	Повторное установление равновесия	20 мМ фосфат натрия, pH 7,20 ± 0,10	2 CV	6
11	Очистка 3	0,5 М NaOH	2 CV	7,5
12	Повторное установление равновесия	20 мМ фосфат натрия, pH 7,20 ± 0,10	2 CV	6
13	Хранение	20% (об./об.) этанола	2 CV	10

[0120] Таблица 3: pH и число циклов использования смолы

Цикл	Число циклов для смолы
4.1 ранее не использовавшаяся колонка	1
4.1 используемая циклически колонка	78
4.5 ранее не использовавшаяся колонка	6
4.5 используемая циклически колонка	83

[0121] Как показано на фиг. 4А, повышение pH элюирования (от 4,1 до 4,5) в ранее не использовавшейся колонке (≤6 циклов) приводит к небольшому снижению относительного содержания связывающей примеси в элюате (от 2,7% до 1,2%), тогда как

повышение pH элюирования (от 4,1 до 4,5) в используемой циклически колонке (78-83 циклов) приводит к значительному и неожиданному снижению относительного содержания связывающей примеси в элюате (от 17,4% до 2,0%). На фиг. 4В показано, что повышение pH элюирования (от 4,1 до 4,5) также отрицательно влияет на уровень выделения гетеродимерного белка (например, биспецифического антитела), но снижение уровня выделения в используемой циклически колонке неожиданно является намного менее значимым (меньше в ~10 раз по сравнению с ранее не использовавшейся колонкой). Как показано на фиг. 4В, выделение гетеродимерного белка снижалось на ~40% в ранее не использовавшейся колонке при повышении pH элюирования от 4,1 до 4,5, тогда как снижение в циклической колонке составляло только ~4% для такого же повышения pH.

ПРИМЕР 3: Оценка влияния входных параметров на измеренные выходные данные в исследовании pH элюирования

[0122] Для проведения данного эксперимента использовали три колонки MabSelect SuRe™ рсс (внутренний диаметр 1,0 см, высота слоя 21 см; объем колонки 16,5 мл), установленных по отдельности в систему жидкостной хроматографии АКТА pure 150 (Cytiva). Проводили способ аффинного разделения, как указано ниже в таблице 4, но при разной нагрузке колонки (33-55 г связывающих частиц (биспецифический продукт+связывающая примесь) на л смолы), pH элюирования (4,0-4,5) и числе циклов взаимодействия с гидроксидом или продолжительности воздействия гидроксида (1-109 циклов или 0,28-30,56 часа), как показано ниже в таблице 5. Измеряли взаимосвязь выхода (% биспецифического продукта+связывающей примеси), связывающей примеси (%) и агрегации (% высокомолекулярных продуктов, определенный путем SE-UPLC) с нагрузкой колонки, pH элюирования и числом циклов взаимодействия с гидроксидом (или продолжительностью воздействия).

[0123] Таблица 4: Способ исследования pH элюирования для bsAb1

Стадия	Описание	Раствор	Объем	Время пребывания (мин)
1	Промывка водой	Очищенная вода	3 CV	31,5
2	Предварительная очистка	500 мМ уксусная кислота, pH 2,45 ± 0,2	2 CV	12,6
3	Установление равновесия	20 мМ фосфат натрия, pH 7,20 ± 0,1	2 CV	12,6
4	Внесение пробы	Очищенная клеточная культура	См. таблицу x	51,4-85,7
5	Промывка 1	10 мМ фосфат натрия, 500 мМ хлорид натрия, pH 7,20 ± 0,1	3 CV	18,9

6	Промывка 2	20 мМ фосфат натрия, рН 7,20 ± 0,1	2 CV	12,6
7	Элюирование	40 мМ ацетат, 500 мМ хлорид натрия рН раствора: См. таблицу 5	6 CV	37,8
8	Очистка 1	40 мМ уксусная кислота, рН 3,00 ± 0,2	2 CV	12,6
9	Очистка 2	500 мМ уксусная кислота, рН 2,45 ± 0,2	2 CV	12,6
10	Повторное установление равновесия	20 мМ фосфат натрия, рН 7,20 ± 0,1	2 CV	12,6

[0124] Таблица 5: Вариация параметров в экспериментах

Цикл	рН для разделения	Нагрузка (г/л)	Циклы взаимодействия с гидроксидом	Продолжительность контакта с гидроксидом (ч)
1	4,00	55	105	29,44
2	4,50	33	1	0,28
3	4,00	33	2	0,56
4	4,25	44	106	29,72
5	4,25	44	50	14,02
6	4,50	55	3	0,84
7	4,00	55	4	1,12
8	4,25	33	51	14,30
9	4,25	55	52	14,58
10	4,25	44	53	14,86
11	4,50	44	54	15,14
12	4,25	44	55	15,42
13	4,50	55	107	30,00
14	4,00	33	108	30,28
15	4,00	44	56	15,70
16	4,25	44	5	1,40
17	4,50	33	109	30,56

[0125] Экспериментальные циклы выполняли в порядке, указанном выше в таблице

5. Оценка плана исследования представлена на фигурах 5А, 5В и 6. Эксперименты проводили в трех колонках, как указано выше, которые использовали в малом (1-5), среднем (50-56) или высоком (105-109) количестве циклов взаимодействия с гидроксидом. Для облегчения анализа число циклов взаимодействия с гидроксидом переводили в продолжительность циклов взаимодействия с гидроксидом. Продолжительность контакта с гидроксидом составляла 16,82 мин (0,28 ч) на цикл. Элюирующие буферы для разделения готовили с погрешностью $pH \pm 0,05$. Сбор элюата начинали с 0,5 объема колонки (CV) в блоке элюирования.

[0126] Концентрацию каждого пула определяли методом УФ-спектроскопии (280 нм) при помощи прибора Solo VPE. Объем элюата и концентрацию белка в элюате использовали для вычисления выхода биспецифического продукта после аффинного разделения для каждого эксперимента, предполагая, что пул содержал только биспецифический белок (т.е. вследствие наличия примесей (связывающая примесь) итоговый измеренный выход мог составлять $>100\%$). Чистоту биспецифического продукта измеряли в исследовании хроматографии гидрофобных взаимодействий (ХГВ). Агрегацию измеряли в исследовании эксклюзионной сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UPLC).

[0127] Создавали модели с использованием факторов, выбранных из инструмента обратной пошаговой регрессии, начиная с полной модели, использовали комбинированное правило и пороговое значение р-значения 0,05 для исключения фактора. Знания о процессе и/или дополнительный статистический анализ также использовали для добавления или удаления параметров модели в соответствующих случаях. Регрессионный анализ проводили для выхода биспецифического продукта (%), связывающей примеси (%) и агрегации (% ВМС).

[0128] Параметры, описывающие предсказательный профиль модели, показаны на фигурах 7А и 7В. Для выхода биспецифического продукта и связывающей примеси создавали модели со значимыми параметрами. Значимые параметры, влияющие на агрегацию, обнаружены не были. Более низкое значение pH и более высокая нагрузка колонки, а также продолжительность контакта с гидроксидом обеспечивали более высокий выход биспецифического продукта. Основная составляющая указанного увеличения выхода была связана с наличием повышенного количества связывающей примеси, как показано на фигуре 7В, для которого наблюдалась такая же зависимость от pH и продолжительности контакта с гидроксидом.

[0129] Проводили три контрольных эксперимента для оценки способности указанных моделей прогнозировать новые данные. Очищали прошедшую предварительную очистку клеточную культуру на каждой из трех колонок при средней нагрузке колонки 44 г/л смолы. Использовали модели для прогнозирования pH, который следует использовать для достижения фиксированного уровня связывающих примесей (~6%) в колонках на разных стадиях срока службы смолы. Результаты представлены ниже в таблице 6.

[0130] Таблица 6. Эксперименты для подтверждения модели

Цикл	рН элюирующего буфера для разделения	Нагрузка (г/л смолы)	Циклы взаимодействия с гидроксидом	Продолжительность контакта с гидроксидом (ч)	Выход биспецифического продукта на стадии разделения (% , прогноз)	Выход биспецифического продукта на стадии разделения (% , фактический)	Связывающая примесь (% , прогноз)	Связывающая примесь (% , фактический)
1	4,10	44	6	1,68	76,3	80,4	6,41	6,20
2	4,25	44	57	15,98	71,7	78,7	6,43	5,97
3	4,35	44	110	30,84	80,4	83,2	6,24	6,22

[0131] Модель для выхода биспецифического продукта неизменно давала заниженные прогнозируемые результаты во всем оцениваемом диапазоне, но они отличались от фактических значений не более чем на 7%. Нагрузка колонки не являлась значительным фактором при прогнозировании уровня связывающей примеси. Прогнозируемые моделью уровни связывающей примеси были выше фактического уровня, но не более чем на 0,5%.

[0132] Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами реализации, описанными в настоящем документе. Действительно, разные модификации изобретения, помимо тех, что описаны в настоящем документе, будут очевидны специалистам в данной области техники на основании вышеизложенного описания. Предполагается, что указанные модификации включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки гетеродимерного белка, включающий:

(а) проведение последовательности хроматографических циклов, при этом каждый цикл включает:

(i) введение смеси гетеродимерного белка и примесей в аффинную матрицу, содержащую лиганд, связывающий белок, причем гетеродимерный белок содержит первый и второй полипептиды с разной аффинностью к лиганду, связывающему белок, и где по меньшей мере одна примесь связывается с лигандом, связывающим белок, и по меньшей мере одна примесь не связывается с лигандом, связывающим белок;

(ii) промывку аффинной матрицы первым промывочным буфером при первом рН от 5 до 9 для удаления несвязывающих примесей;

(iii) элюирование гетеродимерного белка из аффинной матрицы в первом элюирующем буфере при втором рН; и

(iv) промывку аффинной матрицы вторым промывочным буфером при третьем рН менее 4 для удаления связывающих примесей;

где второй рН имеет предварительное значение рН во время предварительной последовательности циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, после чего второй рН повышают до последующего значения рН, которое выше предварительного значения рН во время последующей последовательности циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, причем значения предварительного рН и последующего рН составляют от 4,0 до 5,2; и

(б) сбор гетеродимерного белка из аффинной матрицы в элюате.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная предварительная последовательность циклов состоит из 20 циклов.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная предварительная последовательность циклов состоит из 30 циклов или 40 циклов.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная предварительная последовательность циклов состоит из 50 циклов или 60 циклов.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная предварительная последовательность циклов состоит из 70 циклов или 80 циклов.

6. Способ по любому из пп. 2-5, отличающийся тем, что указанная последующая последовательность циклов состоит по меньшей мере из 20 циклов.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что указанная последующая последовательность циклов состоит по меньшей мере из 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70 или по меньшей мере 80 циклов.

8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанное предварительное значение рН составляет от 4,0 до 4,2.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что указанное предварительное значение рН составляет $4,1 \pm 0,05$.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что указанное последующее

значение рН составляет от 4,3 до 4,7.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что указанное последующее значение рН составляет $4,5 \pm 0,05$.

12. Способ очистки гетеродимерного белка, включающий:

(а) проведение последовательности хроматографических циклов, при этом каждый цикл включает:

(i) введение смеси гетеродимерного белка и примесей в аффинную матрицу, содержащую лиганд, связывающий белок, причем гетеродимерный белок содержит первый и второй полипептиды с разной аффинностью к лиганду, связывающему белок, и где по меньшей мере одна примесь связывается с лигандом, связывающим белок, и по меньшей мере одна примесь не связывается с лигандом, связывающим белок;

(ii) промывку аффинной матрицы первым промывочным буфером при первом рН от 5 до 9 для удаления несвязывающих примесей;

(iii) элюирование гетеродимерного белка из аффинной матрицы в первом элюирующем буфере при втором рН; и

(iv) промывку аффинной матрицы вторым промывочным буфером при третьем рН менее 4 для удаления связывающих примесей;

(b) измерение уровня связывающей примеси в элюате, содержащем гетеродимерный белок, после любого одного или более циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, и сравнение измеренного уровня связывающей примеси с эталонным уровнем связывающей примеси, при этом если измеренный уровень связывающей примеси превышает эталонный уровень связывающей примеси, то затем второй рН увеличивают во время последующего цикла в рамках последовательности хроматографических циклов, причем второй рН составляет от 4,0 до 5,2 во время каждого цикла или последующего цикла в рамках последовательности хроматографических циклов; и

(c) сбор гетеродимерного белка из аффинной матрицы в элюате.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанный эталонный уровень связывающей примеси составляет от 2% до 10%.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что указанный эталонный уровень связывающей примеси составляет от 3% до 7%.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что указанный эталонный уровень связывающей примеси составляет $5\% \pm 0,5\%$.

16. Способ по любому из пп. 12-15, отличающийся тем, что указанный уровень связывающей примеси в элюате измеряют после каждого цикла в рамках последовательности хроматографических циклов.

17. Способ по любому из пп. 12-15, отличающийся тем, что указанный уровень связывающей примеси в элюате измеряют после каждого пятого цикла в рамках последовательности хроматографических циклов.

18. Способ по любому из пп. 12-15, отличающийся тем, что указанный уровень

связывающей примеси в элюате измеряют после каждого десятого цикла или каждого двадцатого цикла в рамках последовательности хроматографических циклов.

19. Способ по любому из пп. 12-15, отличающийся тем, что указанный уровень связывающей примеси в элюате измеряют после сорокового цикла или пятидесятого цикла в рамках последовательности хроматографических циклов.

20. Способ по любому из пп. 12-15, отличающийся тем, что указанный уровень связывающей примеси в элюате измеряют в объединенном пуле элюата, собранном в последовательности циклов.

21. Способ по любому из пп. 12-20, отличающийся тем, что указанный второй рН повышают от диапазона от 4,0 до 4,2 до диапазона от 4,3 до 4,7, если измеренный уровень связывающей примеси превышает эталонный уровень связывающей примеси.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что указанный второй рН повышают от $4,1 \pm 0,05$ до $4,5 \pm 0,05$, если измеренный уровень связывающей примеси превышает эталонный уровень связывающей примеси.

23. Способ очистки гетеродимерного белка, включающий:

(а) проведение последовательности хроматографических циклов, при этом каждый цикл включает:

(i) введение смеси гетеродимерного белка и примесей в аффинную матрицу, содержащую лиганд, связывающий белок, причем гетеродимерный белок содержит первый и второй полипептиды с разной аффинностью к лиганду, связывающему белок, и где по меньшей мере одна примесь связывается с лигандом, связывающим белок, и по меньшей мере одна примесь не связывается с лигандом, связывающим белок;

(ii) промывку аффинной матрицы первым промывочным буфером при первом рН от 5 до 9 для удаления несвязывающих примесей;

(iii) элюирование гетеродимерного белка из аффинной матрицы в первом элюирующем буфере при втором рН; и

(iv) промывку аффинной матрицы вторым промывочным буфером при третьем рН менее 4 для удаления связывающих примесей;

где второй рН имеет первичное значение рН во время первичной последовательности циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, второй рН повышают до вторичного значения рН, превышающего первичное значение рН, во время вторичной последовательности циклов, которая следует за первичной последовательностью циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, и второй рН повышают до третичного значения рН, превышающего вторичное значение рН, во время третичной последовательности циклов, которая следует за вторичной последовательностью циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, при этом первичное значение рН, вторичное значение рН и третичное значение рН составляют от 4,0 до 5,2; и

(b) сбор гетеродимерного белка из аффинной матрицы в элюате.

24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что указанная первичная

последовательность циклов включает от 5 до 50 циклов.

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанная первичная последовательность циклов включает вплоть до 20 циклов.

26. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанная первичная последовательность циклов включает вплоть до 40 циклов.

27. Способ по любому из пп. 23-26, отличающийся тем, что указанная вторичная последовательность циклов включает от 5 до 50 циклов.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что указанная вторичная последовательность циклов включает от 10 до 25 циклов.

29. Способ по любому из пп. 23-28, отличающийся тем, что указанная третичная последовательность циклов включает от 5 до 50 циклов.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что указанная третичная последовательность циклов включает от 10 до 25 циклов.

31. Способ по любому из пп. 23-30, отличающийся тем, что указанное первичное значение рН составляет от 4,0 до 4,2.

32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что указанное первичное значение рН составляет $4,1 \pm 0,05$.

33. Способ по любому из пп. 23-32, отличающийся тем, что указанное вторичное значение рН составляет от 4,2 до 4,4.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что указанное вторичное значение рН составляет $4,3 \pm 0,05$.

35. Способ по любому из пп. 23-34, отличающийся тем, что указанное третичное значение рН составляет от 4,4 до 4,6.

36. Способ по п. 35, отличающийся тем, что указанное третичное значение рН составляет $4,5 \pm 0,05$.

37. Способ по любому из пп. 23-30, отличающийся тем, что указанный второй рН повышают до 4-го значения рН, превышающего третичное значение рН, во время 4-й последовательности циклов, которая следует за третичной последовательностью циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, при этом 4-е значение рН составляет от 4,0 до 5,2.

38. Способ по п. 37, отличающийся тем, что указанный второй рН повышают до 5-го значения рН, превышающего 4-е значение рН, во время 5-й последовательности циклов, которая следует за 4-й последовательностью циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, при этом 5-е значение рН составляет от 4,0 до 5,2.

39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что указанный второй рН повышают до 6-го значения рН, превышающего 5-е значение рН, во время 6-й последовательности циклов, которая следует за 5-й последовательностью циклов в рамках последовательности хроматографических циклов, при этом 6-е значение рН составляет от 4,0 до 5,2.

40. Способ по любому из пп. 37-39, отличающийся тем, что указанное вторичное значение рН превышает первичное значение рН на величину от 0,1 до 0,9, третичное

значение рН превышает вторичное значение рН на величину от 0,1 до 0,9, 4-е значение рН превышает третичное значение рН на величину от 0,1 до 0,9, 5-е значение рН превышает 4-е значение рН на величину от 0,1 до 0,9, и/или 6-е значение рН превышает 5-е значение рН на величину от 0,1 до 0,9, при этом первичное значение рН составляет от 4,0 до 4,2.

41. Способ по п. 40, отличающийся тем, что указанное первичное значение рН составляет $4,1 \pm 0,05$.

42. Способ по любому из пп. 37-41, отличающийся тем, что каждая из первичной последовательности циклов, вторичной последовательности циклов, третичной последовательности циклов, 4-й последовательности циклов, 5-й последовательности циклов и/или 6-й последовательности циклов включает от 5 до 50 циклов в рамках последовательности хроматографических циклов.

43. Способ по любому из пп. 1-42, отличающийся тем, что указанные примеси содержат гомодимерные частицы на основе первого и второго полипептидов.

44. Способ по любому из пп. 1-43, отличающийся тем, что указанный лиганд, связывающий белок, представляет собой белок А, и аффинная матрица содержит лиганд на основе белка А, прикрепленный к субстрату.

45. Способ по п. 44, отличающийся тем, что указанный лиганд на основе белка А представляет собой сконструированный белок А, содержащий тетрамер Z-домена, сконструированный белок А, содержащий тетрамер Y-домена, или сконструированный белок А, в котором отсутствуют домены D и E.

46. Способ по пп. 44 или 45, отличающийся тем, что указанный субстрат представляет собой частицу, и аффинная матрица содержит совокупность частиц, имеющих средний диаметр от 25 мкм до 100 мкм.

47. Способ по п. 46, отличающийся тем, что указанные частицы имеют средний диаметр от 40 мкм до 60 мкм.

48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что указанные частицы имеют средний диаметр от 45 мкм до 55 мкм.

49. Способ по п. 48, отличающийся тем, что указанные частицы имеют средний диаметр примерно 50 мкм.

50. Способ по любому из пп. 44-49, отличающийся тем, что указанный субстрат содержит любое одно или более из агарозы, поли(стиролдивинилбензола), полиметакрилата, целлюлозы, стекла с заданным размером пор и сферического диоксида кремния.

51. Способ по любому из пп. 46-50, отличающийся тем, что указанные частицы содержат поры, имеющие средний диаметр примерно 1100 \AA .

52. Способ по любому из пп. 1-51, отличающийся тем, что указанный элюирующий буфер содержит соль в концентрации по меньшей мере 250 мМ.

53. Способ по п. 52, отличающийся тем, что концентрация указанной соли составляет более 300 мМ или более 400 мМ.

54. Способ по п. 53, отличающийся тем, что концентрация указанной соли

составляет примерно 500 мМ.

55. Способ по любому из пп. 52-54, отличающийся тем, что указанная соль выбрана из соли, содержащей (i) Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- , $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$, NH_4^+ , Cs^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} ; (ii) комбинации Na^+ , H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} или Al^{3+} с Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- или ClO_4^- ; или (iii) CaCl_2 , MgCl_2 или NaCl .

56. Способ по любому из пп. 1-55, отличающийся тем, что указанный первый полипептид содержит СНЗ-домен, который может связываться с лигандом, связывающим белок, и второй полипептид содержит СНЗ-домен, который не может связываться с лигандом, связывающим белок.

57. Способ по п. 44, отличающийся тем, что указанный первый полипептид содержит СНЗ-домен, который может связываться с белком А, и второй полипептид содержит СНЗ-домен, который не может связываться с белком А.

58. Способ по п. 57, отличающийся тем, что указанный второй полипептид содержит модификацию Н435R и модификацию Y436F (по системе нумерации EU) в СНЗ-домене.

59. Способ по любому из пп. 10-58, отличающийся тем, что указанный первый рН составляет от 6 до 8.

60. Способ по любому из пп. 1-59, отличающийся тем, что указанный третий рН составляет от 2,8 до 3,5.

61. Способ по любому из пп. 1-60, отличающийся тем, что указанный гетеродимерный белок представляет собой антитело.

62. Способ по любому из пп. 1-60, отличающийся тем, что указанный гетеродимерный белок представляет собой биспецифический антигенсвязывающий белок.

63. Способ по п. 62, отличающийся тем, что указанный биспецифический антигенсвязывающий белок представляет собой биспецифическое антитело.

64. Способ по любому из пп. 1-63, отличающийся тем, что по меньшей мере 85% гетеродимерного белка выделяется в элюат в каждом цикле в рамках последовательности хроматографических циклов.

65. Способ по п. 64, отличающийся тем, что по меньшей мере 87% гетеродимерного белка выделяется в элюат в каждом цикле в рамках последовательности хроматографических циклов.

66. Способ по п. 65, отличающийся тем, что по меньшей мере 89% гетеродимерного белка выделяется в элюат в каждом цикле в рамках последовательности хроматографических циклов.

67. Способ по любому из пп. 1-66, отличающийся тем, что указанная последовательность хроматографических циклов включает 100 или более циклов.

68. Способ по любому из пп. 1-67, отличающийся тем, что указанную аффинную матрицу приводят в контакт с основным раствором, имеющим рН по меньшей мере 11, после каждого цикла.

69. Способ по любому из пп. 1-67, отличающийся тем, что указанную аффинную матрицу приводят в контакт с основным раствором, имеющим рН по меньшей мере 11,

после каждых трех циклов.

70. Способ по любому из пп. 1-67, отличающийся тем, что указанную аффинную матрицу приводят в контакт с основным раствором, имеющим рН по меньшей мере 11, после каждых пяти циклов.

71. Способ по любому из пп. 1-67, отличающийся тем, что указанную аффинную матрицу приводят в контакт с основным раствором, имеющим рН по меньшей мере 11, после каждых семи циклов.

72. Способ по любому из пп. 68-72, отличающийся тем, что рН указанного основного раствора составляет по меньшей мере 12.

73. Способ по любому из пп. 68-72, отличающийся тем, что указанный основной раствор содержит основание в концентрации от 0,1 н. до 0,5 н.

74. Способ по п. 73, отличающийся тем, что указанная концентрация составляет от 0,1 н. до 0,3 н.

75. Способ по любому из пп. 68-74, отличающийся тем, что указанный основной раствор содержит NaOH.

76. Способ по любому из пп. 1-63, отличающийся тем, что каждый цикл дополнительно включает (v) очистку аффинной матрицы путем приведения аффинной матрицы в контакт с основным раствором, имеющим рН по меньшей мере 11.

77. Способ по п. 76, отличающийся тем, что рН указанного основного раствора составляет по меньшей мере 12.

78. Способ по пп. 76 или 77, отличающийся тем, что указанный основной раствор содержит основание в концентрации от 0,1 н. до 0,5 н.

79. Способ по п. 78, отличающийся тем, что указанная концентрация составляет от 0,1 н. до 0,3 н.

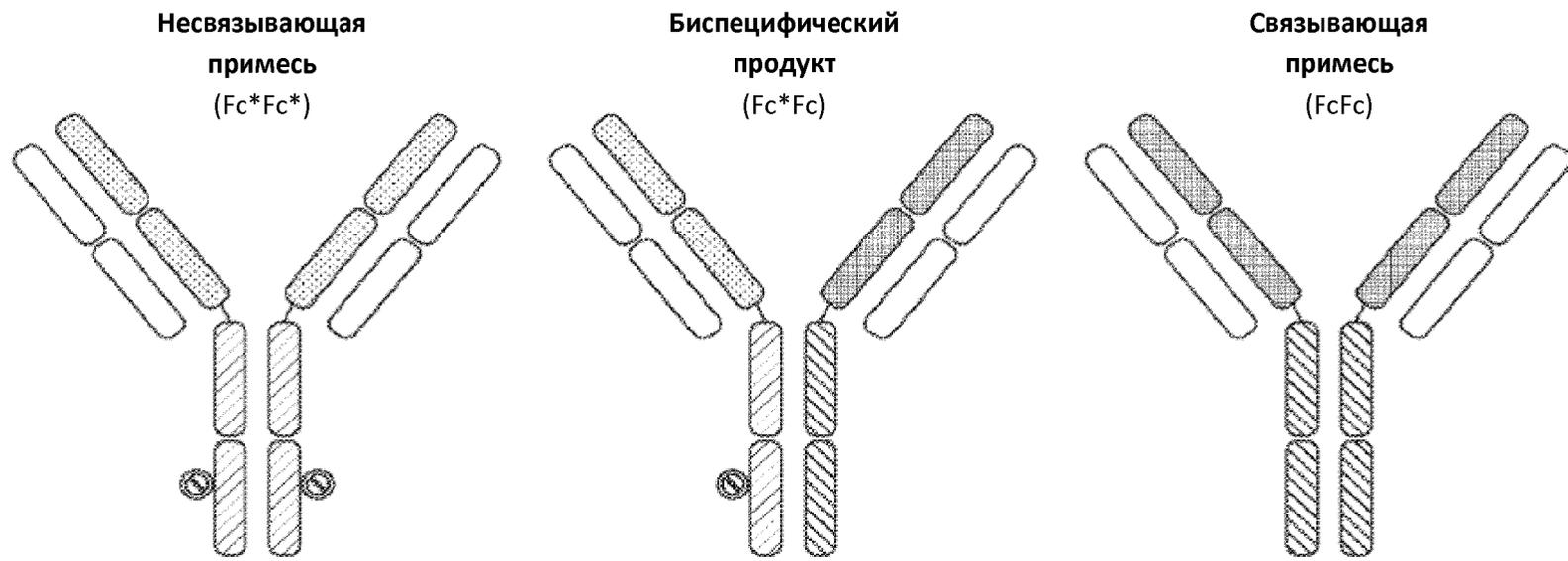
80. Способ по любому из пп. 76-79, отличающийся тем, что указанный основной раствор содержит NaOH.

81. Способ по любому из пп. 76-80, отличающийся тем, что по меньшей мере 75% гетеродимерного белка выделяется в элюат в каждом цикле в рамках последовательности хроматографических циклов, и количество связывающих примесей не превышает 6,5%.

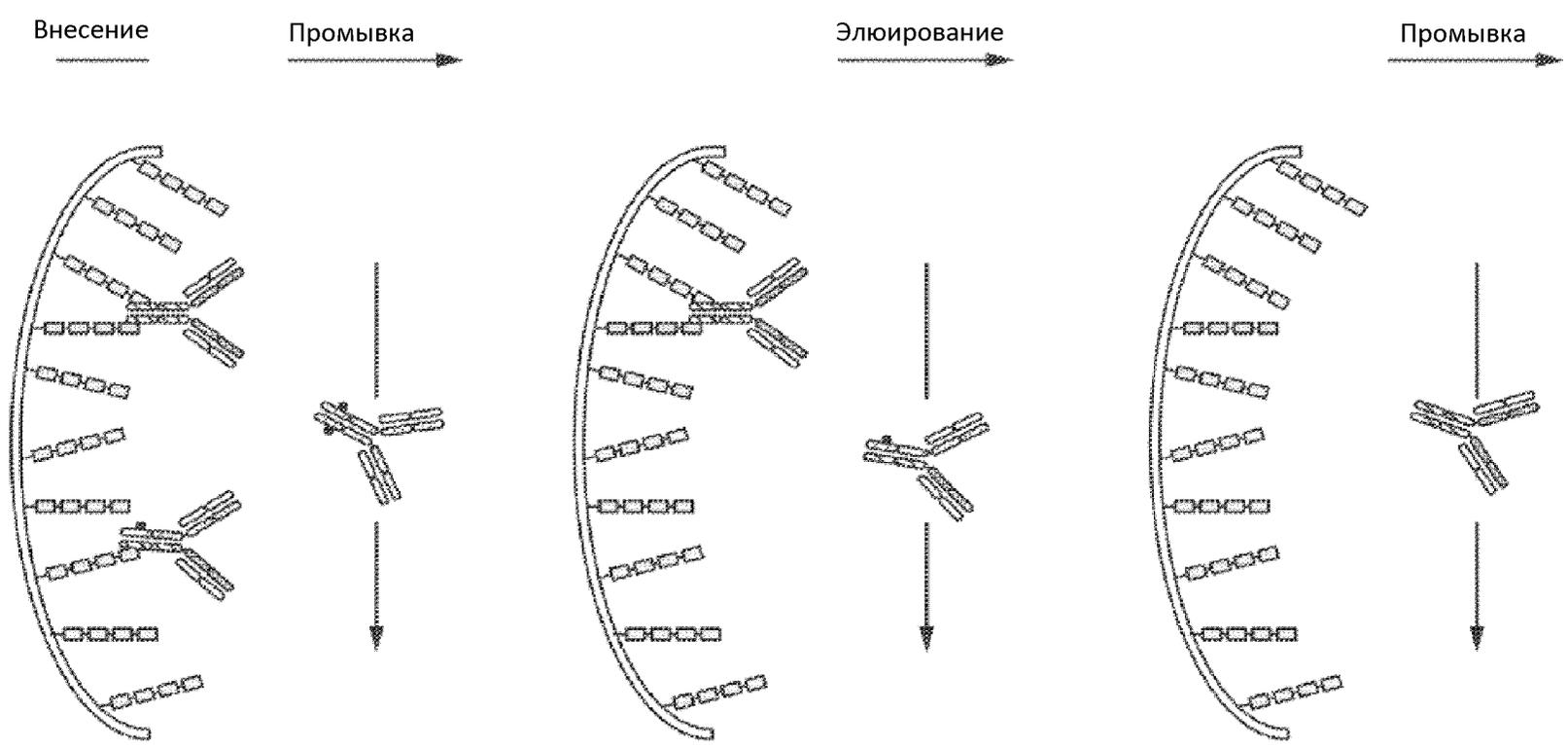
82. Способ по п. 81, отличающийся тем, что по меньшей мере 78% гетеродимерного белка выделяется в элюат в каждом цикле в рамках последовательности хроматографических циклов.

83. Способ по п. 82, отличающийся тем, что по меньшей мере 80% гетеродимерного белка выделяется в элюат в каждом цикле в рамках последовательности хроматографических циклов.

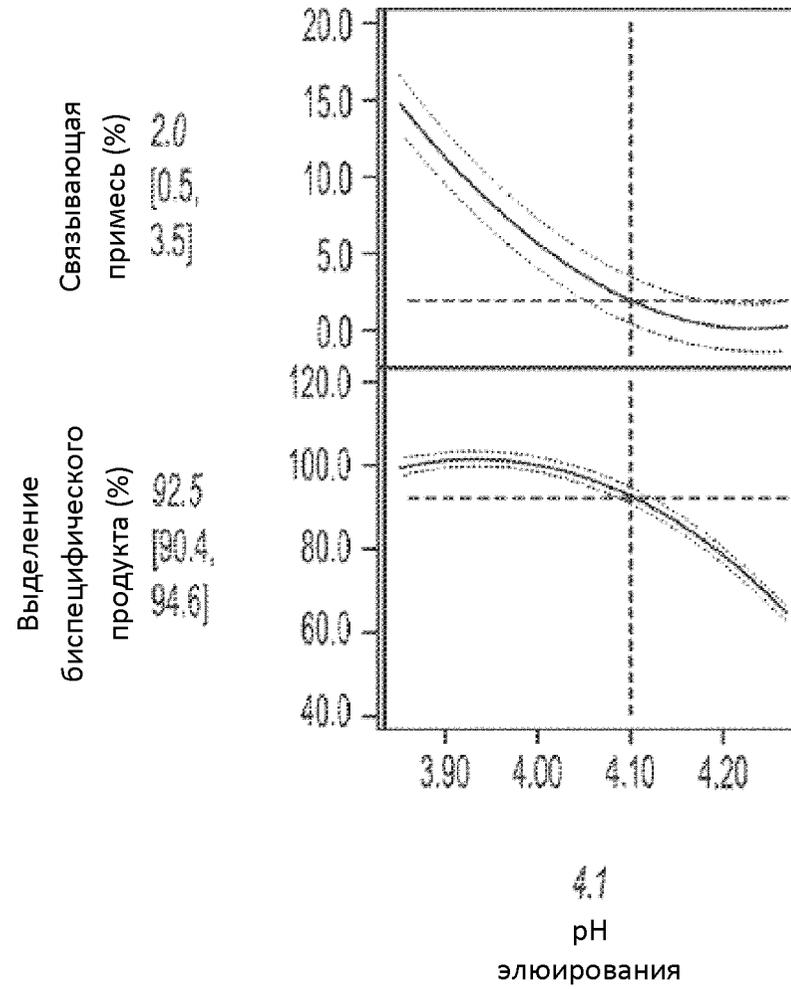
По доверенности



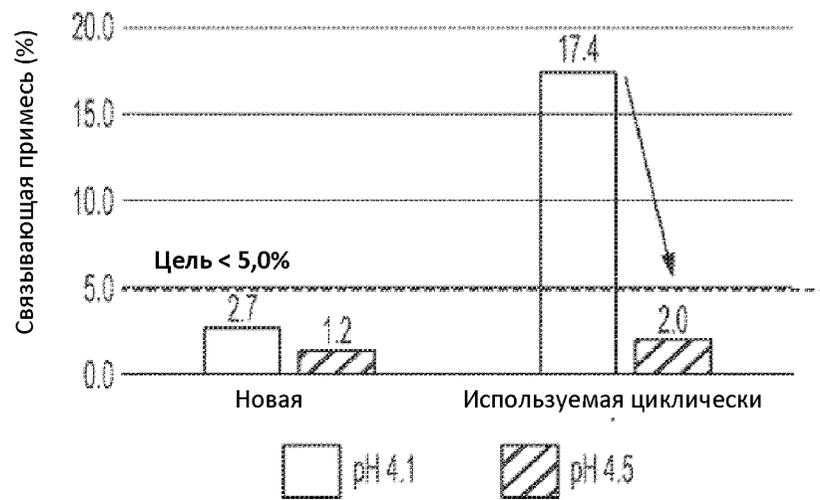
Фиг. 1



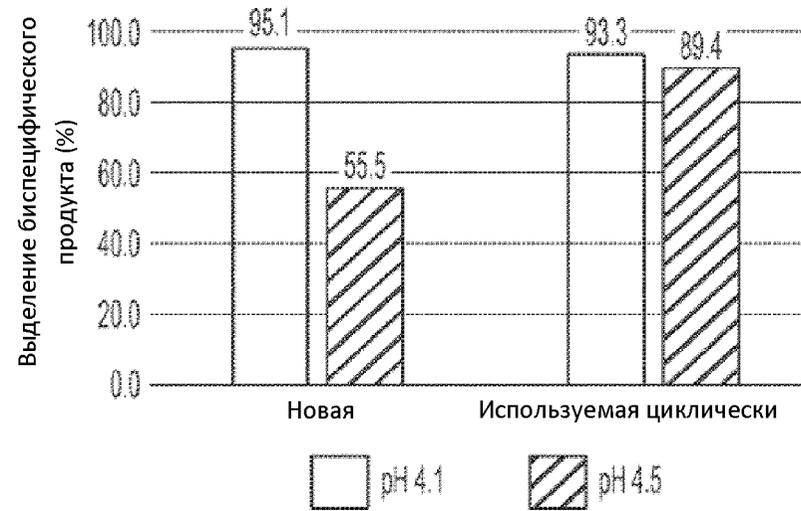
Фиг. 2



Фиг. 3



ФИГ. 4А



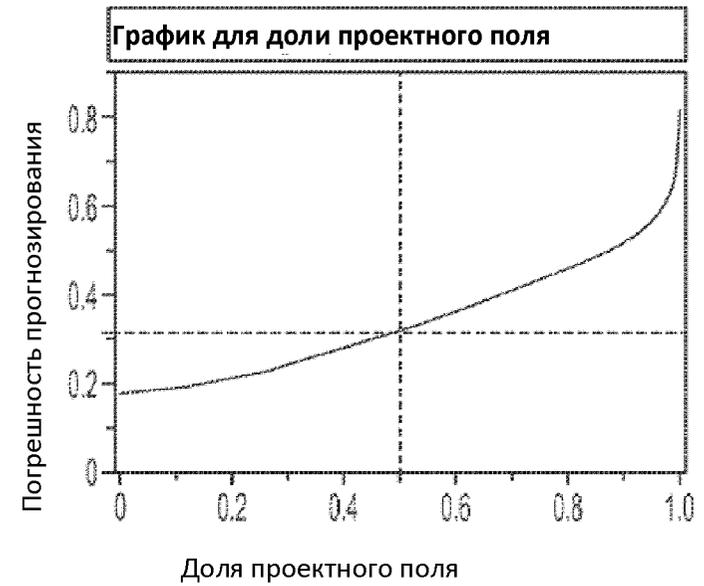
ФИГ. 4В

Анализ мощности

Уровень значимости 0,05

Ожидаемое RMSE 1

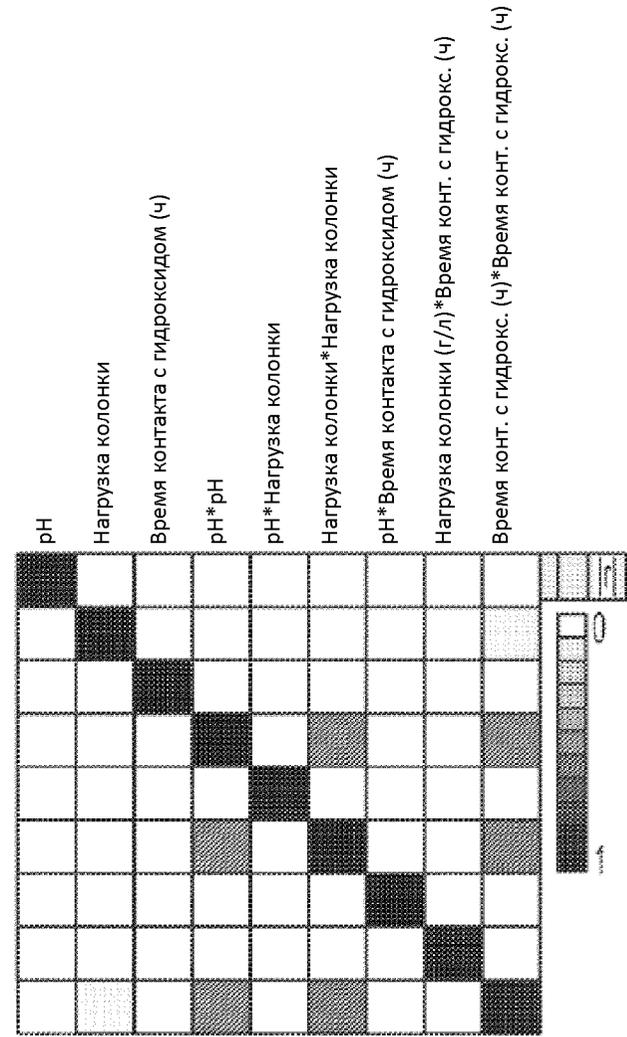
Параметр	Предпол. коэффициент	Ст.мощ.
Отсекаемый отрезок	1	0.525
pH элюирования при разделении	1	0.773
Нагрузка колонки (г/л)	1	0.772
Продолжительность контакта с гидроксидом (ч)	1	0.743
pH элюирования при разделении*pH элюирования при разделении	1	0.289
pH элюирования при разделении*Нагрузка колонки (г/л)	1	0.681
Нагрузка колонки (г/л)*Нагрузка колонки (г/л)	1	0.289
pH элюирования при разделении*Время контакта с гидроксидом (ч)	1	0.655
Нагрузка колонки (г/л)*Время контакта с гидроксидом (ч)	1	0.655
Время контакта с гидроксидом (ч)*Время контакта с гидроксидом (ч)	1	0.247



5/8

ФИГ. 5В

Цветовая карта корреляции



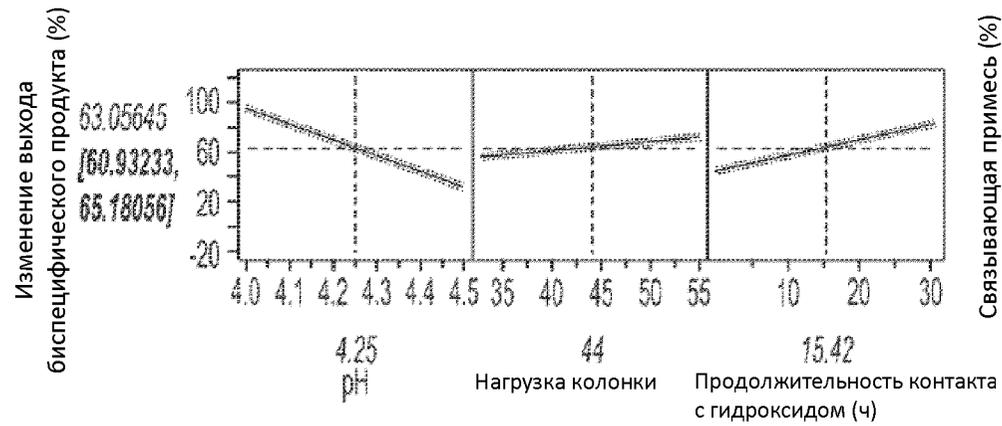
Фиг. 6

Эффект	pH	Нагрузка колонки	Время конт. с гидроксидом (ч)	pH*pH	pH* Нагрузка колонки	Нагрузка колонки* Нагрузка колонки	pH*Время контакта с гидроксидом (ч)	Нагр. колонки (г/л)*Время контакта с гидрокс. (ч)	Время конт. с гидрокс. (ч)* Время конт. с гидрокс. (ч)
pH	1	0	0.0019208	0	0	0	0.002133902	0.002132783	0.02998511
Нагрузка колонки	0	1	0	0	0	0	0.002133902	0.017062263	0.054560238
Время контакта с гидроксидом (ч)	0.001921	0	1	0.021658	0.002147507	0.000704	0.021320862	0.038836002	0.024438458
pH*pH	0	0	0.0216576	1	0	0.514286	0.001369302	0.003323702	0.539073007
pH*Нагрузка колонки	0	0	0.0021475	0	1	0	0.002385775	0.002384524	0.005984197
Нагрузка колонки*Нагрузка колонки	0	0	0.0007043	0.514286	0	1	0.005281592	0	0.541135873
pH*Время конт. с гидроксидом (ч)	0.002134	0.002134	0.0213209	0.001369	0.002385775	0.005282	1	0.00423257	0.011352856
Нагрузка колонки (г/л)*Время контакта с гидроксидом (ч)	0.002133	0.017062	0.038836	0.003324	0.002384524	0	0.00423257	1	0.009346036
Время конт. с гидроксидом (ч)*Время конт. с гидроксидом (ч)	0.029985	0.05456	0.0244385	0.539073	0.005984197	0.541136	0.011352856	0.009346036	1

Фиг. 6

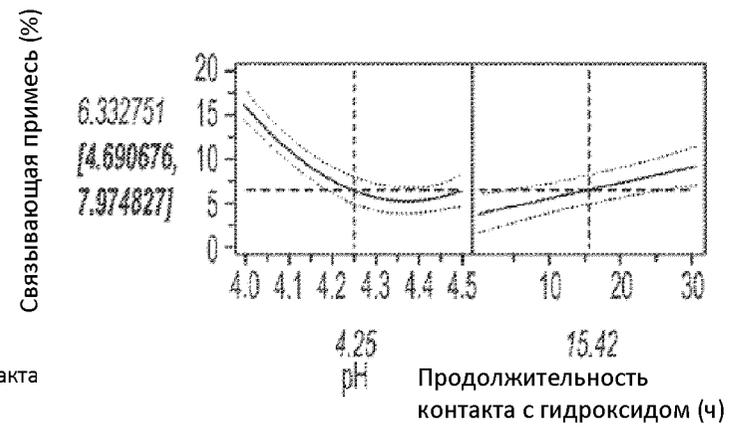
ПРОДОЛЖЕНИЕ

Параметр для оценки профиля прогнозирования



ФИГ. 7А

Параметр для оценки профиля прогнозирования



ФИГ. 7В