(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 034123 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.30

(21) Номер заявки
201691094

(22) Дата подачи заявки
2014.11.21

(51) Int. Cl. ***A61K 39/395*** (2006.01)
C07K 1/14 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(54) ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ ДЛЯ КОНЪЮГАЦИИ ИЗ КУЛЬТУР КЛЕТОК CHO

(31) **61/908,568**
(32) **2013.11.25**
(33) **US**
(43) **2016.09.30**
(86) **PCT/US2014/066889**
(87) **WO 2015/077605 2015.05.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СИЭТЛ ДЖЕНЕТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Хейз Брэдли, Бим Кевин, Мейер Дэймон, Лайон Роберт, Валльер-Дуглас Джон (US)

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

(56) US-A1-20130309223
Sledziecka. COVALENT LIPOPROTEIN(A) ASSEMBLY: Characterization of Oxidase Activity Responsible for Catalyzing Covalent Lipoprotein(a) Assembly. Masters Thesis (September 2008) Queen's University, Kingston, Ontario, Canada, abstract, pg 26, para 1, pg 33, para 1, pg 34, para 2, pg 36, para 1-2
Liu et al. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. MAbs. (September-October 2010), vol. 2, no. 5, p. 480-499, pg 480, col. 1, para 1, 3, col. 2, para 1-2, pg 483, col. 1, para 4, pg 491, col. 2, para 6, pg 494, col. 2, para 2
WO-A1-2013132495

(57) Изобретение частично основано на наблюдении того, что окислительный фермент из клеток CHO, в частности QSOX1, может переносить, по-видимому, способ жесткой очистки антитела со снижением эффективности последующей конъюгации антитела с лекарственным средством. Перенесет ли окислительный фермент очистку, зависит от того, какие способы очистки используют, что может варьироваться от одного антитела к другому. Зная, что загрязнение окислительным ферментом из клеток CHO является потенциальной проблемой для последующей конъюгации, для любого антитела можно разрабатывать подходящую схему очистки, устраняющую или, по меньшей мере, снижающую окислительные ферменты из CHO до приемлемого уровня.

034123 B1

034123 B1

По заявке на данное изобретение испрашивается приоритет по предварительной патентной заявке США № 61/908568, зарегистрированной 25 ноября 2013 г., включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме для всех целей.

Список последовательностей

В настоящее описание в качестве ссылки включен список последовательностей размером 11 КБ, обозначенный как 3100-00111PC-ST25.txt и созданный 21 ноября 2014 г.

Уровень техники

К настоящему времени после сотен клинических испытаний FDA одобрило приблизительно 30 моноклональных антител для лечения множества показаний, включая злокачественное новообразование, аутоиммунное заболевание и возбудителей инфекции. Одной из причин того, что не одобрено больше антител, является то, что механизмы действия, обеспечиваемые антителом в отдельности, такие как эффекторная функция или блокирование взаимодействий рецептор-лиганд, могут не быть достаточно мощными для возникновения значительного терапевтического эффекта. Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) имеют дополнительные механизмы, в частности доставку токсического остатка, соединенного с антителом, внутрь клетки и, таким образом, уничтожение клетки или иное ингибирование ее пролиферации. В настоящее время на рынке есть два ADC: брентуксимаб ведотин и трастузумаб эмтанзин. Многие другие ADC находятся на разных стадиях разработки. Получение ADC включает экспрессию и очистку антител с последующей химической конъюгацией антитела с лекарственным средством, как правило, через линкер.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Влияние окислительной примеси на нагрузку лекарственным средством. Образцы восстанавливали и конъюгировали в указанные моменты времени. Тенденция, при которой уровень конъюгации снижается с течением времени, свидетельствует о наличии окислительной примеси.

Фиг. 2A-2C. Окислительная активность в препарате антитела (партия DEVNKB-1) во фракциях после разделения с помощью SEC (фиг. 2A). Вестерн-блоттинг фракций после SEC, окрашенных с помощью антител против ALR (активатора регенерации печени) и против QSOX1 (фиг. 2B и 2C соответственно).

Фиг. 3A-3C. Фракционирование препарата антитела (партия DEVNKB-1) на колонке Poros Protein A (фиг. 3A); окислительная активность в каждой фракции (фиг. 3B) и изображение геля электрофореза в ПААГ в присутствии SDS, на котором показано содержание белков объединенных фракций 3 и 4 (фиг. 3C). Стрелкой показана молекулярная масса, соответствующая 70 кДа QSOX1 и 76 кДа QSOX2.

Определения

Выделенное антитело или ADC, как правило, является по меньшей мере на 50% мас./мас. чистым в отношении примесных белков и других загрязнений, возникающих при его получении или очистке, но не исключают возможность того, что моноклональное антитело комбинируют с избытком фармацевтически приемлемых носителей или другого наполнителя, предназначенного для облегчения его использования. Иногда моноклональные антитела или ADC являются по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95 или 99% мас./мас. чистыми в отношении примесных белков и загрязнений, возникающих при получении или очистке.

Специфическое связывание моноклонального антитела в отдельности или в качестве компонента ADC с его антигеном-мишенью означает аффинность по меньшей мере 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 или 10^{10} M^{-1}. Специфическое связывание является определимо более высоким по значению и отличимым от неспецифического связывания, происходящего по меньшей мере с одной неродственной мишенью. Специфическое связывание может являться результатом образования связей между конкретными функциональными группами или конкретной пространственной формой (например, тип "замка и ключа"), в то время как неспецифическое связывание, как правило, является результатом ван-дер-ваальсовых сил. Однако специфическое связывание необязательно означает, что моноклональное антитело связывает только одну мишень.

Основной структурной единицей антитела является тетрамер из субъединиц. Каждый тетрамер включает две пары полипептидных цепей, где каждая пара содержит одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает вариабельную область приблизительно из 100-110 или более аминокислот, главным образом, ответственную за распознавание антигена. Эта вариабельная область исходно экспрессируется связанной с расщепляемым сигнальным пептидом. Вариабельную область без сигнального пептида иногда обозначают как зрелую вариабельную область. Таким образом, например, зрелая вариабельная область легкой цепи является вариабельной областью легкой цепи без сигнального пептида легкой цепи. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область. Константная область тяжелой цепи, главным образом, отвечает за эффекторную функцию.

Легкие цепи классифицируют как каппа- или лямбда-цепи. Тяжелые цепи классифицируют как гамма-, мю-, альфа-, дельта- или эпсилон-цепи, и они определяют изотип антитела как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. В легких и тяжелых цепях вариабельные и константные области соединены посредством "J"-области приблизительно из 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также вклю-

чает "D"-область приблизительно из 10 или более аминокислот (в целом, см., Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7), включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме для всех целей).

Зрелые вариабельные области каждой пары легкой/тяжелой цепи образуют участок связывания антитела. Таким образом, интактное антитело имеет два участка связывания. За исключением бифункциональных или биспецифических антител, два участка связывания являются одинаковыми. Все цепи демонстрируют одну и ту же общую структуру относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гипервариабельными областями, также называемыми определяющими комплементарность областями или CDR. CDR из двух цепей в каждой паре выравнивают по каркасным областям, делая возможным связывание с конкретным эпитопом. С N-конца к С-концу легкие и тяжелые цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Присваивание аминокислот каждому домену соответствует определениям по Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 и 1991), или Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989). Kabat также представил широко распространенный способ нумерации (нумерацию по Kabat), в котором соответствующим остаткам между разными тяжелыми цепями или между разными легкими цепями присваивают один и тот же номер.

Термин "антитело" включает интактные антитела и их связывающие фрагменты. Как правило, фрагменты антител конкурируют с интактным антителом, из которого их получали, за специфическое связывание с мишенью, включая отдельные тяжелые цепи, легкие цепи, Fab, Fab', $F(ab')_2$, F(ab)c, диатела, Dab, нанотела и Fv. Фрагменты можно получать способами рекомбинантной ДНК или ферментативным или химическим разделением интактных иммуноглобулинов. Термин "антитело" также включает диатело (гомодимерный Fv-фрагмент) или мини-антитело (V_L-V_H-C_H3), биспецифическое антитело или т.п. Биспецифическое или бифункциональное антитело является искусственным гибридным антителом, имеющим две разные пары тяжелой/легкой цепи и два разных участка связывания (см., например, Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Rostelny et al., J. Immunol., 148:1547-53 (1992)). Термин "антитело" включает само антитело (выделенное антитело) или антитело, конъюгированное с цитотоксическим или цитостатическим лекарственным средством.

Термин "эпитоп" относится к участку на антигене, с которым связывается антитело. Эпитоп может образовываться из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, располагающихся рядом в результате третичного фолдинга одного или нескольких белков. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, сохраняются после воздействия денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, образованные в результате третичного фолдинга, как правило, исчезают после обработки денатурирующими растворителями. Как правило, эпитоп включает по меньшей мере 3 и более типично по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеноструктурный анализ и 2-мерный ядерный магнитный резонанс. См., например, Epitope Mapping Protocols в Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

Антитела, распознающие одни и те же или перекрывающиеся эпитопы, можно идентифицировать с помощью простого иммунологического анализа, показывающего способность одного антитела конкурировать со связыванием другого антитела с антигеном-мишенью. Эпитоп антитела также можно определять с помощью рентгеноструктурного анализа антитела, связавшегося с его антигеном, для идентификации остатков области контакта. Альтернативно, два антитела имеют один и тот же эпитоп, если все мутации аминокислот в антигене, снижающие или устраняющие связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые мутации аминокислот, снижающие или устраняющие связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого.

Конкуренцию между антителами определяют с помощью анализа, в котором антитело в условиях теста ингибирует специфическое связывание референсного антитела с общим антигеном (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990). Тестовое антитело конкурирует с референсным антителом, если избыток тестового антитела (например, по меньшей мере 2-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный) ингибирует связывание референсного антитела по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75, 90 или 99%, как измеряют посредством анализа конкурентного связывания. Антитела, идентифицированные посредством конкурентного анализа (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с одним и тем же эпитопом, в качестве референсного антитела и антитела, связывающиеся со смежным эпитопом, расположенным проксимально к эпитопу, связанному референсным антителом, с возникновением стерического препятствия.

Термин "пациент" включает человека и других млекопитающих, которым проводят профилактическое или терапевтическое лечение.

В целях классификации замен аминокислот на консервативные или неконсервативные аминокислоты группируют следующим образом:

группа I (гидрофобные боковые цепи): met, ala, val, leu, ile;

группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): cys, ser, thr;

группа III (кислые боковые цепи): asp, glu;

группа IV (основные боковые цепи): asn, gln, his, lys, arg;

группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепи): gly, pro; и

группа VI (ароматические боковые цепи): trp, tyr, phe.

Консервативные замены включают замены между аминокислотами одного класса. Неконсервативные замены представляют собой замену члена одного из этих классов членом другого.

Процентную долю идентичности последовательностей определяют с использованием последовательностей антител, максимально выровненных способом нумерации по Kabat. После выравнивания, если область исследуемого антитела (например, полная зрелая вариабельная область тяжелой или легкой цепи) сравнивают с той же областью референсного антитела, процентная доля идентичности последовательности между областями исследуемого и референсного антитела является количеством положений, занятых одной и той же аминокислотой в этой области исследуемого и референсного антитела, разделенным на общее количество выровненных положений двух областей без учета пропусков, умноженным на 100 для преобразования в процентную долю.

Композиции или способы, "содержащие" один или несколько указанных элементов, могут включать другие элементы, не определенные конкретно. Например, композиция, содержащая антитело, может содержать антитело в отдельности или в комбинации с другими ингредиентами.

Обозначение диапазона значений включает все целые числа в пределах диапазона или определяющие его.

Эффекторная функция антитела относится к функции, обеспечиваемой Fc-доменами Ig. Такими функциями могут являться, например, антителозависимая клеточная цитотоксичность, антителозависимый клеточный фагоцитоз или комплементзависимая цитотоксичность. Такая функция может осуществляться, например, посредством связывания эффекторных Fc-доменов с Fc-рецептором на иммунной клетке с фагоцитарной или литической активностью или посредством связывания эффекторных Fc-доменов с компонентами системы комплемента. Как правило, эффекты, опосредуемые Fc-связывающими клетками или компонентами комплемента, приводят к ингибированию и/или истощению клеток-мишеней. Fc-области антител могут рекрутировать клетки, экспрессирующие Fc-рецептор (FcR), и располагать их рядом с покрытыми антителом клетками-мишенями. Клетки, экспрессирующие поверхностный FcR для IgG, включая FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD64), могут действовать в качестве эффекторных клеток для деструкции клеток, покрытых IgG. Такие эффекторные клетки включают моноциты, макрофаги, естественные киллеры (NK), нейтрофилы и эозинофилы. Вовлечение FcγR посредством IgG активирует антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). ADCC опосредована $CD16^+$ эффекторными клетками посредством секреции мембранных порообразующих белков и протеаз, в то время как фагоцитоз опосредован $CD32^+$ и $CD64^+$ эффекторными клетками (см. Fundamental Immunology, 4^{th} ed., Paul ed., Lippincott-Raven, N.Y., 1997, Chapters 3, 17 and 30; Uchida et al., 2004, J. Exp. Med. 199:1659-69; Akewanlop et al., 2001, Cancer Res. 61:4061-65; Watanabe et al., 1999, Breast Cancer Res. Treat. 53:199-207). Помимо ADCC и ADCP, Fc-области связанных с клетками антител также могут активировать классический путь комплемента для индукции комплементзависимой цитотоксичности (CDC). C1q из системы комплемента связывается с Fc-областями антител, когда они находятся в комплексе с антигенами. Связывание C1q со связанными с клеткой антителами может инициировать каскад явлений, включающих протеолитическую активацию C4 и C2 для образования C3-конвертазы. Расщепление C3 до C3b C3-конвертазой делает возможной активацию терминальных компонентов комплемента, включая C5b, C6, C7, C8 и C9. В совокупности, эти белки образуют поры мембраноатакующего комплекса на покрытых антителом клетках. Эти поры нарушают целостность мембраны клетки, уничтожая клетку-мишень (см. Immunobiology, 6^{th} ed., Janeway et al., Garland Science, N. Y., 2005, Chapter 2).

Термин "антителозависимая клеточная цитотоксичность", или ADCC, относится к механизму индукции гибели клетки, зависящему от взаимодействия покрытых антителом клеток-мишеней с иммунными клетками, обладающими литической активностью (также обозначаемыми как эффекторные клетки). Такие эффекторные клетки включают естественные киллеры, моноциты/макрофаги и нейтрофилы. Эффекторные клетки прикрепляются к эффекторным Fc-доменам Ig-связанных клеток-мишеней через их антигенсвязывающие участки. Гибель покрытой антителом клетки-мишени происходит в результате активности эффекторных клеток.

Термин "антителозависимый клеточный фагоцитоз", или ADCP, относится к процессу, посредством которого покрытые антителом клетки интернализуются, полностью или частично, фагоцитарными иммунными клетками (например, макрофагами, нейтрофилами и дендритными клетками), связывающимися с эффекторными Fc-доменами Ig.

Термин "комплементзависимая цитотоксичность", или CDC, относится к механизму индукции гибели клеток, в котором эффекторные Fc-домены связанного с мишенью антитела активируют серию ферментативных реакций, приводящих к образованию отверстий в мембране клетки-мишени. Как правило, комплексы антиген-антитело, такие как комплексы на покрытых антителом клетках-мишенях, связы-

вают и активируют компонент комплемента C1q, в свою очередь, активирующий каскад комплемента, приводящий к гибели клетки-мишени. Активация комплемента также может приводить к депонированию компонентов комплемента на поверхности клетки-мишени, способствующих ADCC посредством связывания рецепторов комплемента (например, CR3) на лейкоцитах.

"Цитотоксический эффект" относится к истощению, элиминации и/или уничтожению клетки-мишени. "Цитотоксическое средство" относится к средству, имеющему цитотоксический эффект в отношении клетки. Цитотоксические средства можно конъюгировать с антителом или вводить в комбинации с антителом.

Термин "цитостатический эффект" относится к ингибированию клеточной пролиферации.

Термин "цитостатическое средство" относится к средству, имеющему цитостатический эффект в отношении клетки, таким образом ингибирующему рост и/или размножение конкретной субпопуляции клеток. Цитостатические средства можно конъюгировать с антителом или вводить в комбинации с антителом.

Термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный или заслуживающий одобрения регуляторным органом федерального правительства или правительства штата или указанный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных, и более конкретно - у людей.

Термин "фармацевтически совместимый ингредиент" относится к фармацевтически приемлемому дилюенту, адъюванту, эксципиенту или наполнителю, с которым комбинируют антитело или ADC.

Фраза "фармацевтически приемлемая соль" относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям антитела или его конъюгата или средства, вводимого с антителом. Примеры солей включают соли сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, йодид, нитрат, бисульфаты, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, фумарат, глюконат, глюкуронат, сахарат, формиат, бензоат, глутамат, метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат и памоат (т.е. 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоат)). Фармацевтически приемлемая соль может содержать включение другой молекулы, такой как ацетат-ион, сукцинат-ион или другой противоион.

Противоион может являться любым органическим или неорганическим остатком, стабилизирующим заряд на родительском соединении. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может иметь несколько заряженных атомов в своей структуре. Примеры, в которых множество заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, могут содержать множество противоионов. Таким образом, фармацевтически приемлемая соль может содержать один или несколько заряженных атомов и/или один или несколько противоионов.

Клетки CHO относятся к клеткам яичника китайского хомяка и включают различные линии, включая, например, DG44, Dxb11, CHO-K, CHO-K1 и CHO-S.

Фраза "нагрузка лекарственного средства" или "степень конъюгации" относится к среднему количеству лекарственных средств на антитело в растворе или композиции ADC или реакционной смеси.

Если иное не очевидно из контекста, термин "приблизительно" включает значения в пределах стандартного отклонения указанного значения.

Подробное описание

I. Общие сведения.

Изобретение частично основано на наблюдении того, что окислительный фермент из клеток CHO, в частности квиесцин-Q6-сульфгидрилоксидаза 1 (QSOX1), может переносить, по-видимому, жесткий способ очистки антитела и присутствовать в препарате антитела в количестве, достаточном для снижения эффективности последующей конъюгационной нагрузки антитела с лекарственным средством. Хотя способ очистки, по-видимому, может приводить к получению антитела, имеющего приемлемо низкую долю фоновых загрязнений/примесей антитела, все же могут присутствовать количества окислительного фермента, достаточные для того, чтобы сульфгидрильные группы на антителе были окисленными после восстановления антитела и, таким образом, недоступными для конъюгации с лекарственным средством. Хотя практическое осуществление изобретения не зависит от понимания механизма, наличие QSOX1 в очищенном продукте антитела может являться результатом взаимодействия между антителом и QSOX1 в некоторых условиях очистки. Переносит ли окислительный фермент очистку, зависит от того, какие способы очистки используют, что может варьироваться от антитела к антителу. Перед идентификацией потенциала наличия, по-видимому, чистого препарата антитела с малыми, но значительными количествами окислительного фермента из клеток CHO, плохую эффективность конъюгационной нагрузки (которую отражает недостаточное среднее соотношение лекарственных средств и антитела) можно ошибочно приписать какой-либо из многочисленных причин. Однако, зная, что загрязнение окислительным ферментом из клеток CHO является потенциальной проблемой для последующей конъюгации, для любого антитела можно разрабатывать подходящую схему очистки, устраняющую или, по меньшей мере, снижающую окислительные ферменты из CHO до приемлемого уровня.

II. Окислительные ферменты клеток CHO.

QSOX1 является гомологом QSOX1 человека, Swiss-Prot 000391, из клеток китайского хомяка. Фермент катализирует окисление сульфгидрильных групп до дисульфидов с восстановлением кислорода. Ссылка на QSOX1 относится к полноразмерному ферменту QSOX1 (с сигнальным пептидом или без него) и любому его фрагменту, включая его природные варианты, сохраняющие способность окислять сульфгидрильные группы, высвобождаемые клетками CHO или высвобождаемые в результате способа очистки антитела. QSOX1 в средах для культивирования клеток CHO приводит к получению полосы кажущегося диапазона размеров 65-75 кДа или более конкретно - 68-72 кДа. Примеры фрагментов QSOX1 могут содержать внеклеточный домен, тиоредоксиновый домен и/или сульфгидрилоксидазный домен ERV/ALR. Ранее идентифицировали предсказанную белковую последовательность изоформы X1 QSOX1, приведенную в SEQ ID NO: 1 и обнаруживаемую в Genbank под инвентарным номером XP 003500174.1. С тех пор предсказанную белковую последовательность изоформы X1 QSOX1 обновляют. Обновленная последовательность приведена в SEQ ID NO: 2, и ее можно найти в Genbank под инвентарным номером XP 007639037.1. В некоторых аспектах QSOX1 относится к окислительному ферменту из клеток CHO, имеющему 90% или более (91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, или 99, или 100%) идентичности последовательности по отношению к SEQ ID NO: 2 и сохраняющему способность окислять сульфгидрильные группы. В некоторых аспектах QSOX1 относится к окислительному ферменту из клеток CHO, содержащему аминокислотную последовательность в диапазоне от 94-й аминокислоты до 571-й аминокислоты SEQ ID NO: 2 и сохраняющему способность окислять сульфгидрильные группы.

Другие ферменты клеток CHO, которые могут присутствовать в качестве примесей, включают QSOX2 (гомолог Swiss-Prot Q6ZRP7 человека из CHO) и сульфгидрилоксидазу ALR (активатор регенерации печени). В кратком изложении, следующее описание, главным образом, относится к QSOX1, но следует понимать, что оно альтернативно или дополнительно относится к QSOX2, ALR или другим окислительным ферментам клеток CHO, переносящим очистку.

III. Способы очистки для удаления QSOX1 и других окислительных ферментов из клеток CHO.

Изобретение относится к нескольким доступным способам идентификации и удаления QSOX1 и других окислительных ферментов из клеток CHO, таких как QSOX2 или ALR (более подробную информацию см. в примерах). Одним из способов является нагрузка препарата антитела на колонку с протеином A и промывание в условиях умеренной или высокой солености (например, по меньшей мере 150 мМ NaCl или 150-500 мМ NaCl). QSOX1 элюируют из колонки, в то время как антитело остается связанным. Другим способом является глубинная фильтрация с использованием, например, мембраны Millipore X0HC. Антитело пропускают через фильтр, в то время как фильтр удерживает QSOX1. Другим способом является анионообменная хроматография, предпочтительно с использованием сильного анионного обменника с группами четвертичного аммония. Подходящей является колонка Capto-Q от GE Healthcare. В соответствующих условиях (например, pH приблизительно 8 и проводимость приблизительно 5-7 мСм/см) антитело проходит через колонку, в то время как QSOX1 остается связанной. Дополнительным способом является фильтрация через фенильную мембрану. Разделение с помощью этого типа мембраны основано на гидрофобных взаимодействиях. В соответствующих условиях (например, pH 6-8 и 0,35-0,4 М цитрат натрия) антитело пропускают через мембрану и QSOX1 связывается с мембраной.

IV. Тестирование для удаления.

QSOX1 можно определять с помощью различных анализов, как описано ниже в примерах, включая вестерн-блоттинг с антителом, специфичным для QSOX1. QSOX1 также можно определять посредством анализа пептидной последовательности или LC-MS/MS на полосе с соответствующей молекулярной массой (приблизительно 65-70 кДа в зависимости от состояния гликозилирования), вырезанной из геля. QSOX1 также можно определять с помощью функционального анализа. В результате активности QSOX1 образуется пероксид водорода, который, в свою очередь, можно определять просто по изменению цвета, являющемуся результатом окисления Fe^{2+} в присутствии ксиленолового оранжевого. Характерную функциональную активность QSOX1 специфически ингибирует Zn^{2+} (например, по меньшей мере 90%), но не ЭДТА и многие другие соли (KI, $MnSO_4$, NaCl) или мочевина. QSOX1 также можно определять с помощью анализа DTNB, как показано в примере 2.

QSOX1 считают присутствующей, если ее определяют на уровне выше уровней отрицательного контроля (выше ошибки эксперимента) в любом из анализов, описываемых ниже или в примерах. В некоторых аспектах такие низкие уровни QSOX1, как 1 мкг/мл или 66 м.д., могут ингибировать эффективность лекарственной нагрузки антитела. Таким образом, в некоторых аспектах приемлемый уровень может означать менее 0,5 мкг/мл или 33 м.д., предпочтительно менее 0,1 мкг/мл или 6 м.д. или менее 0,01 мкг/мл или 0,6 м.д. Предпочтительно уровень QSOX1 находится в пределах уровней отрицательного контроля, определяемых с помощью любого из форматов анализов, описываемых в примерах.

Альтернативно или дополнительно, приемлемый уровень QSOX1 можно определять как уровень, при котором можно достигать приемлемой степени конъюгации лекарственного средства с антителом, или ниже него. Приемлемая степень конъюгации предпочтительно находится в пределах 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% целевой степени конъюгации. Параметры, которые могут влиять на степень конъюгации и которые можно контролировать для достижения целевой степени конъюгации, включают,

например, восстановительные условия для антитела (например, тип восстановителя и его концентрацию относительно концентрации антитела), концентрацию лекарственного средства-линкера относительно антитела, время реакции конъюгации и температуру реакции конъюгации. Предпочтительно уровень QSOX1 является таким, что (а) он не препятствует правильной степени восстановления по сравнению с достигнутой при реакции восстановления антитела и/или (и) он не окисляет повторно восстановленные тиолы непосредственно после восстановления, но перед конъюгацией. Другими словами, предпочтительно уровень QSOX1 является таким, что он не мешает восстановлению антитела или стабильности восстановленного антитела.

Альтернативно или дополнительно, приемлемый уровень QSOX1 можно определять как уровень, приводящий к значению 0,1 или меньше оптических единиц в анализе DTNB или анализе окисления двухвалентного железа в присутствии ксиленолового оранжевого. В кратком изложении, анализ DTNB является анализом, в котором измеряют и сравнивают реакцию между свободными тиоловыми группами в контрольном образце и тестовом образце. См., например, пример 2. В анализе окисления двухвалентного железа в присутствии ксиленолового оранжевого в качестве индикатора активности измеряют пероксид водорода. См., например, пример 1.

V. Схема хода работ.

Клетки CHO трансформируют с использованием векторов, кодирующих цепи антитела, подлежащие экспрессии, и культивируют их для экспрессии антитела. Как правило, экспрессию исходно осуществляют в относительно небольшом объеме культуры (например, 1-50 л) в целях получения достаточного количества антитела для определения схемы очистки. Затем среды для культивирования, содержащие экспрессируемое антитело, подвергают по меньшей мере одному этапу схемы очистки антитела для достижения уровня чистоты, подходящего для химической конъюгации или фармацевтического применения (например, по меньшей мере 90, 95, 97, 98 или 99% мас./мас. антитела относительно макромолекулярных загрязнений/примесей). Как правило, схема очистки включает по меньшей мере два этапа хроматографии на колонке, по меньшей мере один и, как правило, несколько этапов фильтрации, этап инактивации вирусов и этап концентрирования и ресуспендирования/разведения. После завершения любого или всех этапов очистки препарат антитела можно тестировать на наличие QSOX1. Если определяют QSOX выше фонового уровня при анализе отрицательного контроля (выше ошибки эксперимента) или определяют выше уровня, считающегося неприемлемым для последующей конъюгации, очистку первичной культуры (или другой аналогичной культуры, если доступно недостаточное количество первичной культуры) повторяют с использованием второго (другого) этапа и/или схемы очистки. Второй этап и/или схема очистки могут отличаться от первой, среди прочих вариантов, по типу очистки (например, анионообменная и катионообменная хроматография, тип мембраны, используемой для фильтрации) или буферам, используемым для нагрузки или элюирования.

После осуществления второго этапа/схемы очистки или в течение него полученный препарат антитела можно тестировать на QSOX1. Если определяют QSOX1 выше фонового уровня или выше уровня, иным образом определенного в качестве приемлемого, то осуществляют очистку с использованием дополнительной схемы очистки с тестированием на фермент QSOX1 или без него. После первой схемы очистки, второй или последующих в конечном итоге получают препарат антитела, в котором не определяют QSOX1 выше фонового уровня или определяют ее, но на уровне, считающемся приемлемым.

Определив схему очистки, снижающую QSOX1 ниже предела чувствительности или, по меньшей мере, до приемлемого уровня, получают вторую культуру клеток CHO, иногда обозначаемую как производственная культура. Среду для культивирования подвергают этапу/схеме очистки, как уже определено, эффективной для очистки антитела и удаления QSOX1. Полученное очищенное антитело восстанавливают, а затем конъюгируют со средством, например лекарственным средством.

Вторая или производственная культура, как правило, является большей, чем первичная культура, используемая для определения схемы очистки. Например, производственная культура может быть по меньшей мере в 100 или 1000 раз больше по объему, чем первичная культура. Производственное культивирование, как правило, осуществляют повторно (периодическая культура) или непрерывно в течение по меньшей мере 1 года (например, в течение периода по меньшей мере пяти лет), как и очистку антитела из этой культуры с помощью схемы очистки, посредством которой, как определено ранее, успешно выделяют антитела без QSOX1.

В альтернативном ходе работ среду для культивирования от клеток CHO подвергают очистке антитела без обязательного тестирования на фермент QSOX1 и очищенный препарат подвергают химической конъюгации с лекарственным средством. Если эффективность нагрузки при конъюгации (среднее соотношение лекарственного средства/антитела) является неожиданно низкой (т.е. количество молекул лекарственного средства на антитело меньше целевого), то очищенный препарат тестируют на наличие QSOX1. Если фермент присутствует на уровне выше фонового уровня или уровня, считающегося приемлемым, то антитело очищают от среды для культивирования клеток CHO другим способом очистки с последующим тестированием на фермент QSOX1. Затем, при необходимости, несколько раз осуществляют очистку другим способом с последующим тестированием на QSOX1 до тех пор, пока не обнаруживают, что с помощью способа очистки очищают антитело от загрязнений/примесей, в целом, для получе-

ния приемлемой чистоты и удаляют QSOX1 до фонового уровня или уровня, иным образом считающегося приемлемым для конъюгации. При обнаружении такого способа очистки его можно использовать для получения антитела из второй культуры клеток CHO. Затем очищенное антитело конъюгируют с лекарственным средством через одну или несколько свободных сульфгидрильных групп.

VI. Конъюгация антител с лекарственными средствами.

Антитела можно конъюгировать с цитотоксическими или цитостатическими остатками (включая их фармацевтически совместимые соли) для получения лекарственного конъюгата антитела (ADC). Антитела можно конъюгировать со средствами, иными, чем лекарственные средства, например стабилизирующими средствами (например, остатками PEG). В частности, подходящими остатками для конъюгации с антителами являются цитотоксические средства (например, химиотерапевтические средства), ферменты, конвертирующие пролекарства, радиоактивные изотопы или соединения или токсины (эти остатки в совокупности обозначают как лекарственные средства). Например, антитело можно конъюгировать с цитотоксическим средством, таким как химиотерапевтическое средство, или токсином (например, цитостатическим или цитотоксическим средством, таким как, например, абрин, рицин A, псевдомонадный экзотоксин или дифтерийный токсин).

В целях по настоящему изобретению лекарственные средства конъюгируют с антителами через сульфгидрильные группы на антителе. Сульфгидрильные группы могут являться сульфгидрильными группами на боковых цепях цистеина. Остатки цистеина могут от природы присутствовать в антителе (например, межцепочечные дисульфиды) или их можно встраивать иным образом, например посредством мутагенеза. Способы конъюгации лекарственных средств с сульфгидрильными группами на антителах хорошо известны в этой области (см., например, патенты США № 7659241, 7498298 и международную публикацию № WO 2011/130613). Перед конъюгацией антитела восстанавливают для поддержания сульфгидрильных групп доступными для конъюгации. Антитела можно восстанавливать с использованием условий, известных в этой области. Восстановительными условиями являются те, которые, как правило, не вызывают существенной денатурации антитела и, как правило, не влияют на аффинность связывания антигена антителом. В одном из аспектов восстановителем, используемым на этапе восстановления, является TCEP (трис-(2-карбоксиэтил)фосфин), и TCEP добавляют в избытке в течение 30 мин при комнатной температуре. Например, 250 мкл 10 мМ раствора TCEP при pH 7,4 легко восстановят межцепочечные дисульфиды в 1-100 мкг антитела за 30 мин при комнатной температуре. Однако можно использовать другие восстановители и условия. Примеры условий реакции включают температуры от 5 до 37°C в диапазоне pH от 5 до 8. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что окисление сульфгидрильных групп до дисульфидов окислительным ферментом, таким как QSOX1, после восстановления с помощью восстановителя может делать сульфгидрильные группы недоступными для конъюгации.

Лекарственное средство можно конъюгировать с антителом таким образом, чтобы снижать его активность, если только оно не отщепляется от антитела (например, с помощью гидролиза, деградации антитела или расщепляющего средства). Такое лекарственное средство прикрепляют к антителу с использованием расщепляемого линкера, чувствительного к расщеплению во внутриклеточном окружении клетки-мишени, но недостаточно чувствительного к внеклеточному окружению таким образом, что лекарственное средство отщепляется от антитела, когда ADC интернализуется клеткой-мишенью (например, в эндосомальное окружение или, например, благодаря чувствительности к pH или чувствительности к протеазам, в лизосомальное окружение или в кавеолярное окружение).

Как правило, ADC содержит линкер между лекарственным средством и антителом. Как указано выше, линкер может расщепляться во внутриклеточных условиях таким образом, что расщепление линкера высвобождает лекарственное средство из антитела во внутриклеточное окружение (например, в лизосому, или эндосому, или кавеолу). Линкер может являться, например, пептидильным линкером, расщепляемым внутриклеточной пептидазой или протеазой, включая лизосомальную или эндосомальную протеазу. Как правило, пептидильный линкер составляет по меньшей мере две аминокислоты в длину или по меньшей мере три аминокислоты в длину. Расщепляющие средства могут включать катепсины B и D и плазмин (см., например, Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics, 83:67-123). Наиболее типичными являются пептидильные линкеры, расщепляемые ферментами, присутствующими в клетках-мишенях. Например, можно использовать пептидильный линкер, расщепляемый тиолзависимой протеазой катепсином B, высоко экспрессирующимся в злокачественной ткани (например, линкер, содержащий пептид Phe-Leu или Gly-Phe-Leu-Gly). Другие такие линкеры описывают, например, в патенте США № 6214345. Пример пептидильного линкера, расщепляемого внутриклеточной протеазой, содержит линкер Val-Cit или дипептид Phe-Lys (см., например, патент США № 6214345, в котором описывают синтез доксорубицина с линкером Val-Cit). Одним из преимуществ использования внутриклеточного протеолитического высвобождения лекарственного средства является то, что средство, как правило, аттенуировано в конъюгированном состоянии и стабильность конъюгатов в сыворотке, как правило, является высокой.

Расщепляемый линкер может являться pH-чувствительным, т.е. чувствительным к гидролизу при конкретных значениях pH. Как правило, pH-чувствительный линкер гидролизуется в кислых условиях. Например, можно использовать кислотонеустойчивый линкер, гидролизуемый в лизосоме (например, гидразон, семикарбазон, тиосемикарбазон, амид цис-аконитовой кислоты, ортоэфир, ацеталь, кеталь или

т.п.) (см., например, патенты США № 5122368; 5824805; 5622929; Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics, 83:67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661.). Такие линкеры относительно стабильны в условиях нейтрального pH, таких как условия в крови, но нестабильны при более низком pH 5,5 или 5,0, приблизительном pH лизосомы.

Другие линкеры расщепляются в восстановительных условиях (например, дисульфидный линкер). Дисульфидные линкеры включают линкеры, которые можно получать с использованием SATA (N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетата), SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионата), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутирата) и SMPT (N-сукцинимидил-оксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридил-дитио)толуола), SPDB и SMPT (см., например, Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., В Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer (C.W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987). Также см. патент США № 4880935).

Линкер также может являться малонатным линкером (Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15:1387-93), малеимидобензоильным линкером (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304) или 3'-N-амидным аналогом (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3 (10):1305-12).

Линкер также может являться нерасщепляемым линкером, таким как малеимидо-алкилен- или малеимид-арильный линкер, напрямую присоединяемым к лекарственному средству (например, лекарственному средству) и высвобождаемому при деградации антитела.

Линкер является линкером, содержащим функциональную группу, являющуюся реакционноспособной в отношении группы, присутствующей на антителе. В некоторых аспектах линкер соединяют с антителом посредством дисульфидной связи между атомом серы линкера и атомом серы антитела. В других аспектах линкер образует связь с атомом серы антитела через малеимидную группу линкера. В некоторых аспектах атом серы является атомом из остатка цистеина межцепочечного дисульфида или из остатка цистеина, встроенного в антитело (например, в положении 239 согласно индексу EU).

Применимые классы цитотоксических средств для конъюгации с антителами включают, например, антитубулиновые средства, средства, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, ингибиторы репликации ДНК, химиотерапевтические сенсибилизаторы, димеры пирролобензодиазепина или т.п. Другие примеры классов цитотоксических средств включают антрациклины, ауристатины, камптотецины, дуокармицины, этопозиды, майтанзиноиды и алкалоиды барвинка. Некоторые примеры цитотоксических средств включают ауристатины (например, ауристатин E, AFP, MMAF, MMAE), средства, связывающиеся с малой бороздкой ДНК (например, ендиины и лекситропсины), дуокармицины, таксаны (например, паклитаксел и доцетаксел), майтанзиноиды, бензодиазепины (например, пирроло[1,4]бензодиазепины, индолинобензодиазепины, и оксазолидинобензодиазепины), алкалоиды барвинка, доксорубицин, морфолино-доксорубицин и цианоморфолино-доксорубицин.

Цитотоксическое средство может являться химиотерапевтическим средством, таким как, например, доксорубицин, паклитаксел, мелфалан, алкалоиды барвинка, метотрексат, митомицин C или этопозид. Средство также может являться аналогом CC-1065, калихимицином, майтанзином, аналогом доластатина 10, ризоксином или палитоксином.

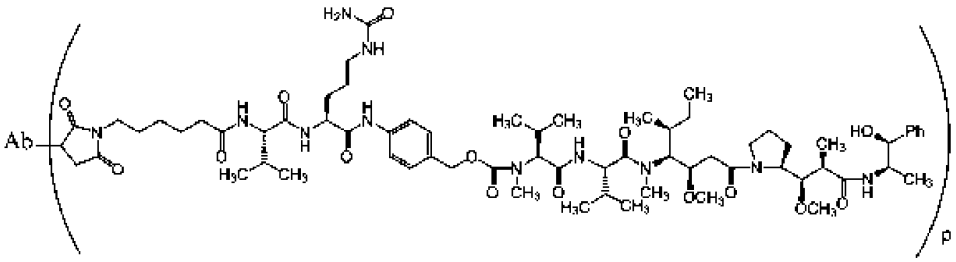
Цитотоксическое средство также может являться ауристатином. Ауристатин может являться производным ауристатина E, например, сложным эфиром, образованным между ауристатином E и кетокислотой. Например, можно проводить реакцию ауристатина E с параацетилбензойной кислотой или бензоилвалериановой кислотой для получения AEB и AEVB соответственно. Другие ауристатины включают AFP, MMAF и MMAE. Синтез и структуру различных ауристатинов описывают, например, в US2005-0238649 и US2006-0074008.

Цитотоксическое средство может являться средством, связывающимся с малой бороздкой ДНК (см., например, патент США № 6130237). Например, средство, связывающееся с малой бороздкой ДНК, может являться соединением CBI или ендиином (например, калихимицином).

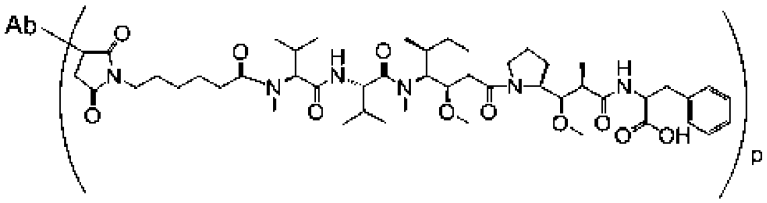
Цитотоксическое или цитостатическое средство может являться антитубулиновым средством. Примеры антитубулиновых средств включают таксаны (например, Taxol® (паклитаксел), Taxotere® (доцетаксел)), T67 (Tularik), алкалоиды барвинка (например, винкристин, винбластин, виндезин и винорелбин) и ауристатины (например, ауристатин E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). Другие подходящие антитубулиновые средства включают, например, производные баккатина, аналоги таксана (например, эпотилон A и B), нокодазол, колхицин и колцемид, эстрамустин, криптофизины, цемадотин, майтанзиноиды, комбретастатины, дискодермолид и элеутеробин.

Цитотоксическое средство может представлять собой майтанзиноид, другую группу антитубулиновых средств. Например, майтанзиноид может являться майтанзином или майтанзинсодержащим линкером для лекарственного средства, таким как DM-1 или DM-4 (ImmunoGen, Inc.; также см. Chari et al., 1992, Cancer Res. 52:127-131).

Примеры лекарственных конъюгатов антител включают следующие лекарственные конъюгаты антител vcMMAE и mcMMAF, где p представляет собой нагрузку лекарственным средством и находится в диапазоне от 1 до 20 и Ab представляет собой антитело:



vcMMAE



mcMMAF

или их фармацевтически приемлемую соль.

VII. Способы очистки антител.

Известен большой репертуар способов очистки белка из супернатанта CHO. Эти способы включают центрифугирование, фильтрацию, осаждение, инактивацию вирусов и различные типы хроматографии на колонках, включая хроматографию с протеином A, протеином G, протеином L, анионообменную, катионообменную, комбинированную, гидроксиапатитную, эксклюзионную и аффинную хроматографию. На этапах хроматографии, как правило, используют по меньшей мере два буфера, один для нагрузки и один для элюирования. Буферы, помимо прочих факторов, могут варьироваться по pH и ионной силе. Пример очистки антитела включает по меньшей мере один этап фильтрации, по меньшей мере один этап инактивации вирусов, хроматографию на колонке с протеином A и по меньшей мере одной другой колонке. Учитывая количество различных способов и вариантов буферов, pH и других эксципиентов в растворах для нагрузки и элюирования, количество различных способ очистки очень велико. Таким образом, подходящие способы очистки для различных антител часто определяют эмпирически для идентификации способа, с помощью которого очищают антитело до уровня, приемлемого для фармацевтического применения (определяемого по соотношению антитела и макромолекулярных загрязнений/примесей в целом) и при котором QSOX1 и/или другие окислительные ферменты из клеток CHO снижают ниже определяемого уровня или, по меньшей мере, до приемлемого уровня.

Для обогащения и концентрирования антител из сыворотки, асцитной жидкости или супернатанта культуры клеток можно использовать осаждение сульфатом аммония. С повышением концентрации этой лиотропной соли в образце белки и другие макромолекулы становятся все менее растворимыми, пока не осядут. Антитела осаждаются при более низких концентрациях сульфата аммония, чем большинство других белков и компонентов сыворотки. Селективность, выход, чистота и воспроизводимость осаждения зависят от нескольких факторов, включая время, температуру, pH и содержание соли.

Клеточные загрязнения антител можно подвергать флокуляции с использованием кислых или катионных полиэлектролитов. Полиэлектролиты в норме действуют посредством адсорбции к частице с образованием противоположно заряженного участка на поверхности. Затем в результате электростатического притяжения этот участок может сцепляться с пустым участком на поверхности противоположной частицы.

В очистке культуральных жидкостей можно использовать глубинные фильтры для поддержания емкости мембранных фильтров или для защиты колонок для хроматографии или противовирусных фильтров. Как правило, глубинные фильтры получают из целлюлозы, пористого фильтровального материала, такого как диатомовая земля и ионная заряженная связующая смола. В глубинных фильтрах для разделения можно использовать эксклюзионное и адсорбционное связывание.

Мембранная хроматография или мембранные адсорбенты функционируют аналогично наполненным хроматографическим колонкам, но в формате общепринятых фильтрационных модулей. В мембранной хроматографии используют микропористые мембраны, как правило, во множестве слоев, содержащих функциональные лиганды, прикрепленные к внутренней поверхности пор на всем протяжении структуры мембраны. Коммерчески доступные Q-мембраны включают ChromaSorb™ (Millipore), Mustang® (Pall) и Sartobind® (Sartorius). При приблизительно нейтральном слабо основном pH и при низких проводимостях вирусы, ДНК, эндотоксин, большая популяция белков клеток-хозяев и подвергнутый вымыванию протеин A связываются с Q-мембраной, в то время как основные молекулы антитела, как правило, протекают через матрицу мембраны без связывания.

Ультрафильтрация является мембранным способом разделения под давлением, широко используе-

мым для концентрирования антитела и замены буфера. Ультрафильтрация является разделением по размеру, при котором удерживаются молекулы крупнее пор мембраны, и а молекулы меньшего размера проходят свободно. Разделения при ультрафильтрации достигают за счет различий в скоростях фильтрации различных компонентов через мембрану под действием указанной силы давления. Замены буфера достигают с использованием режима диафильтрации, при котором буфер с желаемой конечной композицией добавляют в систему ретентата при той же скорости, при которой удаляют фильтрат, таким образом поддерживая постоянный объем ретентата. Ультрафильтрация при порах мембраны в диапазоне от 1 до 20 нм может обеспечивать разделение молекул в диапазоне молекулярных масс от 500 Да до 1000 кДа.

Высокоэффективная фильтрация тангенциальным потоком (HPTFF) является двумерным типовым способом, в котором в целях очистки и разделения используют различия по размеру и заряду. Концентрирование белка и замену буфера можно осуществлять с помощью того же типового способа.

Вирусы можно инактивировать посредством обработки при низком pH и/или удалять различными способами, включая фильтрацию. Существующими в настоящее время фильтрами, задерживающими вирусы, являются ультрафильтры или микрофильтры с очень небольшими порами. Мембраны для фильтрации вирусов получают из гидрофильного полиэфирсульфона (PES), гидрофильного дифторида поливинилидена (PVDF) и регенерированной целлюлозы.

В ионообменной хроматографии используют положительно или отрицательно заряженные смолы для связывания белков на основе их суммарных зарядов в указанной буферной системе. Можно определять условия (например, pH и ионную силу), в которых происходит связывание и высвобождение антитела-мишени с высокой степенью специфичности. С другой стороны, можно находить условия, в которых происходит связывание почти всех других компонентов образца, за исключением антител. В анионообменной хроматографии используют положительно заряженную группу, которая может являться слабо основной, такой как диэтиламиноэтил (DEAE) или диметиламиноэтил (DMAE), или сильно основной, такой как этил триметиламмония (TMAE) или четвертичный аминоэтил (QAE).

В катионообменной хроматографии используют смолу, модифицированную с помощью отрицательно заряженных функциональных групп. Катионообменная и анионообменная хроматография являются взаимодополняющими способами: молекулы, сильно связывающиеся с одним, слабо связываются, если вообще связываются, с другим.

Катионообменные колонки могут содержать сильные кислые лиганды, такие как сульфопропильные, сульфоэтильные и сульфоизобутильные группы, или слабый кислый лиганд, такой как карбоксильная группа. Катионообменную хроматографию используют в способах очистки многих mAb со значениями pI в диапазоне от приблизительно нейтрального или немного ниже (например, приблизительно 6) до основного. Большинство гуманизированных подклассов IgG1 и IgG2 являются хорошими кандидатами для катионообменной хроматографии, при которой антитело связывается на смоле на этапе нагрузке, и его элюируют, повышая проводимость или повышая pH в элюирующем буфере. Отрицательно заряженные примеси, связанные со способом очистки, такие как ДНК, некоторые белки клетки-хозяина, подвергнутый вымыванию протеин A и эндотоксин, удаляют во фракции нагрузки и промывания. С помощью катионообменной хроматографии также можно разделять дезамидированные продукты, окисленные молекулы и формы, укороченные с N-конца, а также высокомолекулярные молекулы из желаемого антитела. Связывание антител на катионообменных смолах зависит от pH, проводимости и типа смолы. Сефароза SP FF и сефароза SP XL являются двумя распространенными коммерчески доступными смолами.

Хроматография гидрофобного взаимодействия (HIC) является полезным инструментом для разделения белков по их гидрофобности и дополняет другие способы, с помощью которых белки разделяют по заряду, размеру или аффинности. Как правило, образец нагружают на колонку для HIC в высокосолевом буфере. Соль в буфере взаимодействует с молекулами воды со снижением сольватации молекул белка в растворе, таким образом, экспонируя гидрофобные области молекул белка в образце, таким образом, связывающиеся со смолой для HIC. Чем более гидрофобна молекула, тем меньше соли необходимо для стимуляции связывания.

В хроматографии с иммобилизованными хелатами металлов используют иммобилизованные в виде хелатов двухвалентные ионы металлов (например, меди, кобальта или никеля) для связывания белков или пептидов, содержащих кластеры трех или более последовательных остатков гистидина. Эту стратегию чаще всего используют для очистки рекомбинантных белков, сконструированных содержащими концевую слитую метку 6xHis. IgG являются одними из немногих распространенных белков в сыворотке (или супернатанте моноклональной гибридомной культуры клеток), содержащих гистидиновые кластеры, способные связываться с иммобилизованным никелем. Для обеспечения осторожной и надежной очистки антитела можно оптимизировать условия связывания и элюирования для конкретных образцов.

Протеин A, протеин G и протеин L, включая их рекомбинантные версии, являются примерами белков, общепринято используемых для аффинной очистки ключевых типов антител множества видов. Как правило, хроматография с протеином A включает пропускание очищенного супернатанта культуры клеток через колонку при pH 6-8, в этих условиях антитела связываются, а нежелательные компоненты, такие как белки клетки-хозяина и компоненты сред для культивирования клеток и вирусы, протекают сквозь колонку. Можно осуществлять необязательный промежуточный этап промывки для удаления не-

специфически связавшихся примесей из колонки с последующим элюированием продукта при pH 2,5-4. В настоящее время существует три основных типа смол с протеином А, классифицируемых с учетом композиции остова смолы: на основе стекла или диоксида кремния, например Prosep vA, Prosep vA Ultra (Millipore); на основе агарозы, например Protein A Sepharose Fast Flow, MabSelect (GE Healthcare); и на основе органического полимера, например полистирол-дивинилбензоловая Poros A и MabCapture (Applied Biosystems). В зависимости от антитела можно использовать несколько компонентов элюирующего буфера, таких как уксусная кислота, лимонная кислота, фосфорная кислота, аргинин HCl и глицин HCl. Выбор pH для элюирования также зависит от аффинности связывания антитела со смолой, для антител с более высокой аффинностью связывания необходим более низкий pH элюирования.

Керамический гидроксиапатит $(Ca_5(PO_4)_3OH)_2$ является формой фосфата кальция, которую часто можно использовать с элюированием в градиенте фосфата натрия для отделения антител, помимо прочих загрязнений, от димеров, агрегатов и подвергнутого вымыванию протеина А.

Способы удаления QSOX1, в частности, представлены в настоящем описании и в разделе "Примеры", и их можно использовать в дополнение к любому из указанных выше способов или в комбинации с ним.

VIII. Примеры антител.

Описываемые способы очистки и ход работ можно использовать для любого антитела, включая не принадлежащие человеку гуманизированные, человеческие, химерные, венированные антитела, нанотела, dAb, scFv, Fab и т.п. Способы по настоящему изобретению наиболее применимы для антител, подлежащих конъюгации со средством для диагностического или терапевтического применения. Например, способ применим для антител, подлежащих конъюгации с лекарственным средством для терапевтического применения. Некоторые такие антитела являются иммуноспецифическими для антигена злокачественной клетки, предпочтительно антигена на поверхности клетки, интернализуемого в клетку после связывания антитела. Мишени, против которых могут быть направлены антитела, включают рецепторы на злокачественных клетках и их лиганды или контррецепторы (например, CD3, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD40, CD44, CD52 CD70, CD79a, Her-2, VEGF или VEGFR, CTLA-4, LIV-1 и нектин-4).

Способы по настоящему изобретению также применимы для очистки антител, подлежащих использованию для получения ADC для лечения или профилактики аутоиммунного заболевания.

Способы по настоящему изобретению также применимы для очистки антител, связывающихся с рецептором или рецепторным комплексом, экспрессирующимся на активированном лимфоците.

Способы по настоящему изобретению также применимы для очистки антител, специфичных для вирусного или микробного антигена.

Некоторые примеры коммерческих антител и их мишеней, подходящих для использования в способах по настоящему изобретению, включают алемтузумаб, CD52, ритуксимаб, CD20, трастузумаб, Her/neu, нимотузумаб, цетуксимаб, EGFR, бевацизумаб, VEGF, паливизумаб, RSV, абциксимаб, GpIIb/IIIa, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб, голимумаб, ФНО, базиликсимаб, даклизумаб, ИЛ-2, омализумаб, IgE, гемтузумаб, CD33, натализумаб, VLA-4, ведолизумаб, интегрин-альфа-4-бета-7, белимумаб, BAFF, отеликсизумаб, теплизумаб, CD3, офатумумаб, окрелизумаб, CD20, эпратузумаб, CD22, алемтузумаб, CD52, экулизумаб, C5, канакинумаб, ИЛ-1бета, меполизумаб, ИЛ-5, реслизумаб, тоцилизумаб, ИЛ-6R, устекинумаб и бриакинумаб, ИЛ-12. Необязательно, антитело не является брентуксимабом.

IX. Способы лечения и фармацевтические композиции.

ADC, получаемые описываемыми выше способами, вводят по эффективной схеме, означающей дозу, путь введения и частоту введения, замедляющие дебют, снижающие тяжесть, ингибирующие дальнейшее ухудшение и/или улучшающие по меньшей мере один признак или симптом заболевания, подлежащего лечению, такого как злокачественное новообразование, аутоиммунное заболевание или инфекция, включая любое из описываемых выше показаний. Если пациент уже страдает заболеванием, схему можно обозначать как терапевтически эффективную схему. Если у пациента повышен риск развития заболевания относительно общей популяции, но у него еще не развились симптомы, схему можно обозначать как профилактически эффективную схему. В некоторых случаях терапевтическую или профилактическую эффективность у отдельного пациента можно наблюдать относительно исторических контролей или прошлого опыта у того же пациента. В других случаях терапевтическую или профилактическую эффективность можно демонстрировать в доклиническом или клиническом испытании в выборке подвергнутых лечению пациентов относительно контрольной выборки неподвергнутых лечению пациентов.

Дозы ADC, как правило, варьируются в зависимости от лекарственного компонента ADC. Примеры доз могут включать, например, от 1,0 мкг/кг до 7,5 мг/кг, или от 2 до 7,5 мг/кг, или от 3 до 7,5 мг/кг массы тела индивидуума, или 0,1-20 или 0,5-5 мг/кг массы тела (например, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг), или 10-1500 или 200-1500 мг в качестве фиксированной дозы. В некоторых способах пациенту вводят дозу по меньшей мере 1,5 мг/кг, по меньшей мере 2 мг/кг или по меньшей мере 3 мг/кг, вводимую раз в три или больше недель. Доза, помимо прочих факторов, зависит от частоты введения, состояния пациента и ответа на предшествующее лечение, если таковое проводили, являлось ли лечение профилактическим или терапевтическим и являлось ли нарушение острым или хроническим.

Введение может являться парентеральным, внутривенным, пероральным, подкожным, внутриартериальным, интракраниальным, интратекальным, интраперитонеальным, местным, интраназальным или внутримышечным. Введение также может являться непосредственно локализованным, таким как введение в опухоль. Введение в системный кровоток посредством внутривенного или подкожного введения является предпочтительным. Внутривенное введение, например, можно осуществлять посредством инфузии в течение периода времени, такого как 30-90 мин, или посредством однократной болюсной инъекции.

Частота введения, помимо прочих факторов, зависит от времени полужизни ADC в кровотоке, состояния пациента и пути введения. Частота может представлять собой ежедневное, еженедельное, ежемесячное, ежеквартальное введение или введение с неравными временными интервалами в ответ на изменения состояния пациента или прогрессирование злокачественного новообразования, подвергаемого лечению. Примером частоты внутривенного введения является введение от двух раз в неделю до одного раза в квартал в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможно более или менее частое введение. Другими примерами частоты внутривенного введения является введение от одного раза в неделю до трех раз за четыре недели в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможно более или менее частое введение. В случае подкожного введения примером частоты введения является введение от ежедневного до ежемесячного, хотя также возможно более или менее частое введение.

Количество вводимых доз зависит от природы заболевания (например, присутствуют ли острые или хронические симптомы) и ответа нарушения на лечение. В случае острых нарушений или обострений хронического нарушения часто достаточными являются от 1 до 10 доз. Иногда в случае острого нарушения или обострений хронического нарушения достаточно одной болюсной дозы, необязательно, в делящейся форме. Лечение можно повторять в случае рецидива острого нарушения или обострения. В случае хронических нарушений антитело можно вводить через равные интервалы, например, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально, каждые шесть месяцев в течение по меньшей мере 1, 5 или 10 лет или жизни пациента.

Фармацевтические композиции для парентерального введения предпочтительно являются стерильными и, по существу, изотоническими (240-360 мОсм/кг), и их производят в соответствии с требованиями GMP. Фармацевтические композиции можно предоставлять в стандартной лекарственной форме (т.е. дозе для однократного введения). Фармацевтические композиции можно составлять с использованием одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, дилюентов, эксципиентов или вспомогательных средств. Состав зависит от выбранного пути введения. В случае инъекций ADC можно составлять в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера, или физиологический раствор, или ацетатный буфер (для снижения дискомфорта в месте инъекции). Раствор может содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства. Альтернативно, антитела могут находиться в лиофилизированной форме для восстановления подходящим наполнителем, например стерильной апирогенной водой, перед применением. Концентрация антитела в жидком составе может составлять, например, 1-100 мг/мл, например 10 мг/мл.

Лечение с использованием ADC по изобретению можно комбинировать с химиотерапией, лучевой терапией, лечением стволовыми клетками, хирургическим вмешательством, противовирусными средствами, антибиотиками, иммуносупрессорами или стимуляторами или другими способами лечения, являющимися эффективными против нарушения, подвергаемого лечению. Применимые классы других средств, которые можно вводить с ADC для лечения злокачественных новообразований или аутоиммунного заболевания, включают, например, антитела к другим рецепторам, экспрессирующимся на злокачественных клетках, антитубулиновые средства (например, ауристатины), средства, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, ингибиторы репликации ДНК, алкилирующие средства (например, комплексы платины, такие как цисплатин, моно(платина), бис-(платина), трициклические комплексы платины и карбоплатин), антрациклины, антибиотики, антифолаты, антиметаболиты, химиотерапевтические сенсибилизаторы, дуокармицины, этопозиды, фторированные пиримидины, ионофоры, лекситропсины, нитрозомочевину, платинолы, соединения-предшественники, антиметаболиты пурина, пуромицины, сенсибилизаторы для лучевой терапии, стероиды, таксаны, ингибиторы топоизомераз, алкалоиды барвинка и т.п.

В некоторых аспектах лечение с использованием ADC может повышать медиану выживаемости без прогрессирования или время общей выживаемости пациентов с опухолями, особенно с рецидивирующей или рефрактерной формой, по меньшей мере на 30 или 40%, но предпочтительно на 50, 60-70% или даже 100% или более по сравнению с тем же лечением (например, химиотерапией), но без ADC. В некоторых аспектах лечение (например, стандартная химиотерапия) может повышать долю пациентов с полным ответом, долю пациентов с частичным ответом или долю пациентов с объективным ответом (полный + частичный) из пациентов с опухолями по меньшей мере на 30 или 40%, но предпочтительно на 50, 60-70% или даже 100% по сравнению с тем же лечением (например, химиотерапией), но без ADC.

Как правило, в клиническом испытании (например, испытании фазы II, фазы II/III или фазы III) указанные выше повышения медианы выживаемости без прогрессирования и/или доли пациентов с ответом, подвергнутых стандартной терапии с ADC, относительно контрольной группы пациентов, подвергнутых только стандартной терапии (или с плацебо), являются статистически значимыми, например, при уровне p=0,05 или 0,01 или даже 0,001. Доли пациентов с полным и частичным ответом определяют по объективным критериям, общеупотребительным в клинических испытаниях в случае злокачественного новообразования, например, как указано или одобрено National Cancer Institute и/или Food and Drug Administration.

Примеры

Пример 1. Доказательство того, что QSOX1 присутствует в препаратах антител, выделенных из культур клеток CHO.

Партия DEVNKB-1, полученная при очистке антитела, экспрессирующегося в клетках CHO, неожиданно демонстрировала плохую конъюгацию с лекарственным средством. В отличие от этого, партия L22042/E демонстрировала желаемый уровень конъюгации с лекарственным средством. Так как конъюгация лекарственного средства с антителом опосредована свободными сульфгидрильными группами, предполагали наличие в партии DEVNKB-1 примеси, имеющей окислительную активность. На фиг. 1 показано влияние окислительной примеси на эффективность конъюгации лекарственного средства с антителом. Антитело из партии DEVNKB-1 (показано ромбами) демонстрировало сниженную нагрузку лекарственным средством, так как время восстановления повышалось в течение 50 мин, в то время как антитело из партии L22042/E (показано квадратами) демонстрировало устойчивый и ожидаемый уровень нагрузки лекарственным средством в течение времени восстановления.

Так как наблюдали, что конкретные препараты других антител, продуцируемых в клетках CHO, имеют окислительную активность, схожую с таковой в партии DEVNKB-1, источник окислительной активности представлял интерес. Для определения источника окислительной активности партию DEVNKB-1 анализировали на наличие сульфгидрилоксидазы посредством электрофореза в геле, вестерн-блоттинга и жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS).

Электрофорез в геле и вестерн-блоттинг.

При сравнении партий DEVNKB-1 и L22042/E после разделения с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии SDS и окрашивания серебром не выявляли какие-либо белковые полосы, явно соответствующие окислительной активности (данные не представлены). Для достижения лучшего разрешения партию DEVNKB-1 фракционировали посредством эксклюзионной хроматографии. Фракции анализировали на окислительную активность, как описано в примере 2. См. фиг. 2A. Фракции, соответствующие пиковой активности, разделяли с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии SDS, подвергали блоттингу, затем окрашивали с использованием антител против сульфгидрилоксидазных белков-кандидатов, включая QSOX1, QSOX2 и ALR (усилитель регенерации печени). На фиг. 2B и 2C представлены результаты анализа вестерн-блоттинга с использованием первичных антител против ALR и против QSOX1 соответственно, а затем вторичного антитела кролика против IgG козы. С помощью блоттинга выявляли обширную перекрестную реактивность между вторичным антителом и многими молекулами, относящимися к продукту. Тем не менее, при блоттинге с антителом против QSOX1 определяли полосу во фракциях с пиковой активностью 27-29, соответствующих молекулярной массе от 65 до 70 кДа (фиг. 2C), что соответствует прогнозируемой массе QSOX1 хомяка (70356 Да).

Анализ LC-MS/MS.

Для идентификации белка массой 65-70 кДа, определенного при вестерн-блоттинге с антителом против QSOX1, партию DEVNKB-1 фракционировали посредством аффинной хроматографии на колонке Poros Protein A. См. фиг. 3A. Фракции анализировали на окислительную активность, как описано в примере 2. См. фиг. 3B. По существу, вся окислительная активность соответствовала фракциям 3 и 4. Фракции 3 и 4 из серии объединяли и анализировали с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. См. фиг. 3C. Наиболее значительная полоса находилась в диапазоне 65-70 кДа и была образована одной диффузной полосой или дублетом, что соответствует с результатами вестерн-блоттинга. Используя расщепление геля и LC-MS/MS, полосу положительно идентифицировали как QSOX1.

Характеристика окислителя.

Далее, для определения характеристики окислительной активности в партии DEVNKB-1 ее тестировали на сульфгидрильную окислительную активность с использованием анализа окисления двухвалентного железа в присутствии ксиленолового оранжевого (FOX). Сульфгидрилоксидазы катализируют следующую реакцию:

$$2\ R\text{-}SH + O_2 \rightarrow R\text{-}S\text{-}S\text{-}R + H_2O_2$$

При прохождении реакции кислород потребляется и образуется пероксид водорода. Можно легко и достоверно определять побочный продукт пероксид водорода, и, таким образом, он служит в качестве показателя активности сульфгидрилоксидазы. В анализе FOX пероксид водорода окисляет двухвалентное железо (Fe^{2+}) с образованием трехвалентного железа (Fe^{3+}). Затем двухвалентное железо образует комплексы с ксиленоловым оранжевым с образованием соединения, поглощающего свет при 560 нм. Таким образом, осуществляя мониторинг поглощения света при 560 нм (например, с использованием

спектрофотометра), можно определять степень активности окисления сульфгидрильных групп в образце. Значение в отрицательном контроле сравнивают со значением в тестовом образце, определяя различие в считывании при 560 нм. Если полученное значение составляет более 0,1 оптических единиц, то образцы являются положительными на окислительную примесь. Как показано в табл. 1, наличие DEVNKB-1 приводило к поглощению при 560 нм 0,70-0,80. Однако добавление DEVNKB-1 и 1 мМ Zn^{2+} давало лишь 0,008. Результаты свидетельствуют о том, что 1 мМ Zn^{2+}, по существу, может устранять окислительную активность в партии DEVNKB-1. Это соответствует окислителю, имеющему флавинзависимый сульфгидрилоксидазный домен, такому как QSOX1.

Таблица 1

	DEVNKB-1			
Добавка	+	-	Различие	% активности
-	0,81047	1,53920	0,72873	100%
-	0,80907	1,58360	0,77453	
1 мМ Zn^{2+}	1,48020	1,48810	0,00790	1%

Осуществляли дальнейшие анализы для определения того, может ли ЭДТА реверсировать Zn^{2+}-зависимое устранение окислительной активности в партии DEVNKB-1. В этих экспериментах в буфер для анализа добавляли Zn^{2+} с ЭДТА или без нее. Кроме того, оценивали буфер для анализа, содержащий ЭДТА. Как показано в табл. 2, окислительная активность, связанная с партией DEVNKB-1, снижалась на 95% в присутствии Zn^{2+} относительно буфера для анализа, содержащего дополнительную ЭДТА. Однако добавление Zn^{2+} и дополнительной ЭДТА снижало окислительную активность только на 6%. Таким образом, ЭДТА эффективно реверсировала Zn^{2+}-зависимое ингибирование окислительной активности. И снова, это было ожидаемым для окислителя, имеющего флавинзависимый сульфгидрилоксидазный домен, такого как QSOX1.

Таблица 2

	DEVNKB-1			
Добавка	+	-	Различие	% активности
1 мМ Zn^{2+}	1,50550	1,53647	0,03097	5%
1 мМ Zn^{2+} + ЭДТА	0,99833	1,53647	0,53814	94%
ЭДТА	0,96444	1,53647	0,57203	100%

Основываясь на данных вестерн-блоттинга, данных LC-MS/MS (не представлены) и характеристике окислительной активности, окислительную активность в партии DEVNKB-1 определяли как активность сульфгидрилоксидазы QSOX1.

Пример 2. Анализы для определения OSOX1 в культурах клеток CHO.

Для обеспечения определения окислительной активности в препаратах антител (например, если антитело предназначено для конъюгации с лекарственным средством) разрабатывали анализ, в котором в качестве субстрата использовали частично восстановленное SGN-30 (антитело cAC10, являющееся антительным компонентом брентуксимаба ведотина). В качестве субстрата выбирали SGN-30, так как антитело cAC10 последовательно очищено от загрязнения QSOX1. Вместо SGN-30 можно использовать другие хорошо охарактеризованные субстраты, содержащие свободные тиолы.

Анализ включает инкубацию субстрата (например, SGN-30) с тестовым образцом в течение фиксированного периода времени, затем определение количества свободных сульфгидрильных групп в субстрате с использованием DTNB (5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной кислоты), также известной как реактив Элмана).

Свободные тиоловые группы в субстрате реагируют с DTNB, расщепляя дисульфидную связь и образуя 2-нитро-5-тиобензоат (NTB^-), ионизирующийся до NTB^{2-} в воде при нейтральном и щелочном pH. NTB^{2-} имеет желтый цвет, и его можно быстро количественно анализировать с использованием спектрофотометра и измерения поглощения видимого света при 412 нм. Если в тестовом образце присутствуют окислительные примеси, свободные сульфгидрильные группы на субстрате (например, в остатках цистеина, не вовлеченных в дисульфидную связь) окисляются в дисульфидные связи, приводящие к меньшему количеству свободных тиолов. Таким образом, происходит снижение реакции между субстратом и DTNB, что приводит к меньшему проявлению желтой окраски и, соответственно, меньшему поглощению образцом света при 412 нм.

Реакция между DTNB и свободными тиоловыми группами является быстрой и стехиометрической. Таким образом, при желании, количество свободных сульфгидрильных групп в субстрате можно анали-

зировать количественно с использованием молярного коэффициента экстинкции 14,150 M^{-1}/см (подходящего для разведенных буферных растворов).

Материалы, используемые в анализе, включают спектрофотометр (например, Agilent, модель 8453); кварцевую кювету (например, Starna, 16, 50-Q-10/Z15); 1 М Tris HCl, pH 7,4; 0,5 М ЭДТА, pH 8,0; одно-замещенный фосфат калия; двухосновный фосфат калия; полисорбат 80; DTNB (например, Sigma D218200).

Анализ включает спектрофотометрический анализ, по меньшей мере, образца отрицательного контроля, положительного контроля, тестового образца и спектрофотометрического контроля. По мере необходимости можно анализировать дополнительные контрольные и/или тестовые образцы. Композиция контрольных и тестовых образцов представлена в табл. 3. Буфером, используемым в анализе, является 10 мМ фосфат калия, 0,2 мг/мл полисорбата 80, pH 6,0. Однако также подходят другие разбавленные буферы в зависимости от буфера тестового образца, подлежащего анализу. Конечный объем образцов, подлежащих анализу, составляет 150 мкл, но его также можно корректировать по мере необходимости. Для упрощения анализа можно получать мастер-микс, содержащий буфер, ЭДТА, воду и субстрат (например, частично восстановленное cAC10), при этом анализ начинают добавлением 50 мкл образца к 100 мкл мастер-микса.

Таблица 3

	1М Tris, pH 7,4	0,5М ЭДТА, pH 8,0	Вода	Частично восстановленное cAC10	Образец
Отрицательный контроль	15,0 мкл	3,0 мкл	7,0 мкл	75,0 мкл	50,0 мкл буфера
Положительный контроль	15,0 мкл	3,0 мкл	7,0 мкл	75,0 мкл	50,0 мкл REFNKB-1
Тестовый образец	15,0 мкл	3,0 мкл	7,0 мкл	75,0 мкл	50,0 мкл тесто-вого образца
Спектрофото-метрический контроль	75,0 мкл	15,0 мкл	35,0 мкл	625,0 мкл	

Получение и анализ образца осуществляют следующим образом. Микроцентрифужные пробирки метят в соответствии с образцами и контролями, подлежащими анализу. В каждую пробирку помещают 100 мкл мастер-микса. 50 мкл каждого образца добавляют в соответствующую пробирку контроля/тестового образца. Пробирки перемешивают с помощью центрифуги типа вортекс. Пробирки помещают на водяную баню с температурой 37°С или в инкубатор и инкубируют в течение 2 ч. Метят вторую микроцентрифужную пробирку для каждого образца и в каждую пробирку помещают 100 мкл 1 мМ DTNB. По завершении 2 ч инкубации образцы вынимают из водяной бани/инкубатора и 100 мкл образца переносят в соответствующую микроцентрифужную пробирку, содержащую 100 мкл DTNB. Пробирки перемешивают с помощью центрифуги типа вортекс. Образцы инкубируют при комнатной температуре в течение по меньшей мере 5 мин, затем определяют поглощение. Поглощение измеряют при 412 нм и корректируют по поглощению при 700 нм (т.е. определяют A_{412}-A_{700}). Можно регистрировать спектры от 200 до 700 нм.

Для оценки наличия окислительной примеси в тестируемом образце значение (412-700 нм) отрицательного контроля (буфера) сравнивают со значением тестового образца, определяя различие в считывании при 412 нм. Если полученное значение больше 0,1 оптических единиц, то образец является положительным на окислительную примесь.

При тестировании среды для культивирования из культуры для получения антитела, как правило, в анализе получают высокие значения (~0,5 о.е.), позволяя предполагать высокие уровни окислителя. Однако считывание при анализе основано на окраске, и цвет сред для культивирования клеток имеет тенденцию мешать считыванию при анализе. Таким образом, трудно точно измерить окислительную примесь в очищенном супернатанте с использованием этого анализа. Окислительную примесь предпочтительно измеряют после по меньшей мере одного этапа очистки, например после по меньшей мере одного этапа хроматографии (например, после хроматографии с протеином А, ионообменной или HIC-

хроматографии).

В этом анализе измеряют сульфгидрилоксидазную активность, как правило, включающую активность, имеющую своим источником QSOX1, QSOX2, ALR и другие ферменты. Также можно использовать более специфичные анализы на конкретные сульфгидрилоксидазы, например, как описано в примере 1.

Пример 3. Способы удаления QSOX1.

Восстановление окислительной примеси посредством солевой обработки на протеине А

Обнаруживали, что препарат второго антитела, обозначаемого в настоящем описании как антитело 2, имеет неприемлемо высокие уровни окислительной активности (после очистки посредством центрифугирования и фильтрации). Для удаления окислительной примеси анализировали хроматографию с протеином А с солевыми обработками различной силы.

Слой диаметром 3,2 см и высотой 23,2 см (объем слоя 193,2 мл) колонки MabSelect Sure Protein A уравновешивали 25 мМ Tris, 50 мМ NaCl, pH 7,5, а затем нагружали до 25 г mAb/л уплотненного слоя. После нагрузки колонку промывали 50 мМ буферными растворами с Tris, содержащими различные уровни NaCl, как показано в табл. 4. Осуществляли элюирование антитела с использованием 25 мМ ацетата с pH 3,4. Поддерживали постоянную скорость потока при продолжительности обработки 4 мин.

Уровень окислительной примеси в элюатах колонки анализировали с использованием анализа из примера 2. Данные (см. табл. 4) свидетельствуют о том, что окислительная примесь не содержалась в элюате после протеина А при промывании с умеренной (150 мМ NaCl) или высокой (500 мМ NaCl) концентрацией соли. Промывание, включающее низкую концентрацию соли (50 мМ NaCl), являлось неэффективным в снижении уровня окислительной примеси ниже порога поглощения 0,1. Промывочный раствор после обработки солью высокой концентрации содержал высокий уровень окислительной примеси, что свидетельствует о том, что при обработке солью высокой концентрации десорбировали примесь из смолы колонки или mAb.

В целом, результаты свидетельствуют о том, что аффинность окислительной примеси для лиганда протеина А, остова смолы и/или mAb нарушается растворами высокой ионной силы, что соответствует ионному взаимодействию.

Таблица 4

ID образца	Различие A412	Наличие окислительной примеси
Элюат (Низкая, 50 мМ, солевая обработка)	0,407	положительное
Элюат Умеренная, 150 мМ, солевая обработка	0,095	отрицательное
Элюат Высокая, 500 мМ, солевая обработка	0,053	отрицательное
Фракция промывочного раствора с высокой концентрацией NaCl	0,910	положительное
DEVNKB_1 (Положительный контроль)	0,573	положительное
Буфер_1 (Отрицательный контроль)	-0,020	отрицательное

Глубинная фильтрация.

Глубинную фильтрацию также тестировали на способность удалять окислительную примесь. Глубинный фильтр, фильтр Millipore X0HC, увлажняли 50-100 л/м^2 воды и уравновешивали по меньшей мере 15 л/м^2 уравновешивающего буфера (например, pH 7,5-8 и концентрация NaCl 50-100 мМ). Осуществляли фильтрацию при 230 л/м^2/ч. (LMH) при целевом коэффициенте нагрузки 20-60 л/м^2. Для выделения продукта фильтр промывали достаточным объемом уравновешивающего буфера для обеспечения достижения сбора целевого пика. Фильтрат собирали по поглощению при 280 нм. Используя такие условия, удаляли окислительную примесь.

Анионный обмен - Capto Q.

Наблюдали, что использование сильной анионообменной колонки Capto Q (GE Healthcare Life Sciences, кат. № 17-5316) приводило к удалению окислительной примеси при работе в проточном режиме с буфером при pH 8,0 и проводимостью <8 мСм/см (например, 5-7 мСм/см). Эти условия обеспечивают начальную точку для оценки удаления окислительной примеси с использованием колонки Capto Q. В

случае антитела 1 показано, что для эффективного выведения окислительной примеси необходим буфер, имеющий низкую проводимость и высокий pH. Колонку Capto Q использовали в проточном режиме. В подходящих условиях mAb не удерживалось смолой, в то время как окислительная примесь адсорбировалась смолой. Затем окислительную примесь вымывали из смолы с использованием высокосолевого буфера. В случае второго антитела, антитела 2, как показано в табл. 5, эффективную очистку наблюдали при pH 7,5 (эффективным является pH 7,5-8) при условии, что проводимость буфера составляла 11 мСм/см (необходима проводимость 11 или менее). Буферы, имеющие pH 7 и проводимость в диапазоне от 11 до 15 мСм/см, являлись неэффективными в отделении примеси от mAb в проточном режиме, как и буфер, имеющий pH 7,5 и проводимость 15 мСм/см.

Таблица 5

ID образца	Различие, A412 нм	Наличие окислительной примеси
pH 7/проводимость 11	0,200	положительное
pH 7/проводимость 15	0,227	положительное
pH 7,5/проводимость 11	-0,006	отрицательное
pH 7,5/проводимость 15	0,190	положительное
Нагрузка Capto Q	0,415	положительное
Контрольный буфер	-0,020	отрицательное

Фениловая мембрана.

Обнаруживали, что Sartobind Phenyl® при работе в проточном режиме эффективно очищает окислительную примесь из препаратов антител, продуцируемых в клетках CHO. В соответствующих условиях окислительная примесь удерживается мембраной, а mAb - нет. Затем окислительную примесь можно вымывать из смолы с использованием низкосолевого буфера. Разводя антитело до целевой молярности цитрата (как правило, 0,3-0,4 М цитрат натрия) и pH (как правило, 6-8), получают нагрузку. Мембрану уравновешивают 5 объемами мембраны (MV) уравновешивающего буфера, выбранного так, чтобы соответствовать разведенной нагрузке антитела. Затем разведенную нагрузку наносят на мембрану и промывают ее 10 MV уравновешивающего буфера. Препарат антитела, не содержащий окислительную примесь, выходит с элюатом. Связавшийся материал элюируют, например, 50 мМ Tris, pH 8 и регенерируют мембрану, например, 5 MV 25 мМ фосфата натрия, 20% IPA при pH 6,5. Способ осуществляют при 10 мл/мин или 3,3 MV/мин. Собирают целый пик элюата, например, 0,1-0,1 о.е. при 280 нм с использованием 2 мм пути фильтрации.

В табл. 6 представлены данные для этапа очистки на фениловой мембране. Уровень окислительной примеси, измеряемый в фениловом элюате, находится в диапазоне от 0,1 до 0,04 оптических единиц.

Таблица 6

Образец	Δ A412	Примесь окислителя
Нагрузка фениловой мембраны	0,41	Положительная
FT фениловой мембраны	-0,06	Отрицательная

Для определения операционной надежности для использования фениловой мембраны, окислительной примеси, присутствующей в антителе 2, препараты оценивали после этапа очистки с помощью фениловой мембраны в различных условиях pH и молярности цитрата. См. табл. 7. Для снижения уровня окислительной примеси в элюате предпочтительно молярность цитрата находилась на уровне верхнего предела 0,4 М.

Таблица 7

pH	Молярность цитрата	Окислительная примесь (Δ 412 нм)	Наличие окислительной примеси
6	0,35	0,05	Отрицательное
8	0,40	0,00	Отрицательное
6	0,40	-0,04	Отрицательное
7	0,40	-0,03	Отрицательное
7	0,30	0,10	Положительное
8	0,35	0,02	Отрицательное
8	0,30	0,09	Отрицательное
6	0,30	0,12	Положительное
7	0,35	0,04	Отрицательное
7	0,35	0,03	Отрицательное

Все патентные заявки, веб-сайты, другие публикации, инвентарные номера и т.п., процитированные выше или ниже, включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме для всех целей до той же степени, как если бы каждый отдельный пункт конкретно и отдельно указывал как включенный в качестве ссылки. Если различные версии последовательности ассоциированы с инвентарным номером в различные моменты времени, подразумевают версию, ассоциированную с инвентарным номером с эффективной датой подачи этой заявки. Эффективная дата подачи означает более раннюю действительную дату подачи или дату подачи приоритетной заявки, относящуюся к инвентарному номеру в соответствующих случаях. Аналогично, если различные версии публикации, веб-сайта или т.п. опубликованы в различные моменты времени, подразумевают наиболее позднюю опубликованную версию на момент эффективной даты подачи заявки, если не указано иначе. Любой признак, этап, элемент, вариант осуществления или аспект изобретения можно использовать в комбинации с любым другим, если конкретно не указано иное. Хотя настоящее изобретение в целях ясности и понимания довольно подробно описано с помощью иллюстраций и примеров, очевидно, что конкретные изменения и модификации можно осуществлять на практике в объеме формулы изобретения.

Список последовательностей

SEQ ID NO: 1:

MATGLRRREYIWLLWALTITVSYLVALFSHLLRILTVKKLQWRPVLNLAVLDCAEETN
TAVCRDFNISGFPTVRFFKAFSKNGSGITLPVADASVETLRRKLIDALESHSDMWSSSRPKLK
PAKLVEINEFFAETNEDYLVLIFEDKDSYVGREVTLDLFQHHIPVHRVLNTERNAVSKFGVVE
FPSCYLLFRNGSFSRVPVVMESRLFYTSYLKGMSGPILVDPPTTTISTDAPVTTDVVPTVWKV
ANHARIYMADLESSLHYIFLVEVGKFSVLEGQRLLALKKLVAVLAKYFPGRPLAQNFLHSIHD
WLQRQQRKKIPYKFFRAALDNRKEGIVLTEKVNWVGCQGSKPHFRGFPCSLWILFHFLTVQAS
RYSENHPQEPADGQEVLQAMRSYVQWFFGCRDCAEHFENMAASTMHRVRSPTSAVLWLWTSHN
KVNARLSGAPSEDPYFPKVQWPLRELCFDCHNEINGREPVWDLEATYRFLKAHFSSENIILDT
PVAGLATQRNPQILGATPEPVMDALELETRNSVLGHERAASTESPGATALNVPVGKPEASGPQ
ALYTGQGPPEHMEEPQRVTQGHTQGQQHLSKRDTEVLTLPEVNHLQGPLELRRGGRSPKQLVN
IPEGEPEAPAIRGQGPWLQVLGRGFSHLDISLCVGLYSVSFVCLLAMYTYFRARLRTPKGHLV
TQ

SEQ ID NO: 2:

MRRCGRHSGS PSQMLLLLLP PLLLAVPGAG AVQVSVLYSS SDPVTVLNAN
TVRSTVLRSN GAWAVEFFAS WCGHCIAFAP TWKELAYDVR EWRPVLNLAV
LDCAEETNTA VCRDFNISGF PTVRFFKAFS KNGSGITLPV ADASVETLRR
KLIDALESHS DMWSSSRPKL KPAKLVEINE FFAETNEDYL VLIFEDKDSY
VGREVTLDLF QHHIPVHRVL NTERNAVSKF GVVEFPSCYL LFRNGSFSRV
PVVMESRLFY TSYLKGMSGP ILVDPPTTTI STDAPVTTDV VPTVWKVANH
ARIYMADLES SLHYIFLVEV GKFSVLEGQR LLALKKLVAV LAKYFPGRPL
AQNFLHSIHD WLQRQQRKKI PYKFFRAALD NRKEGIVLTE KVNWVGCQGS
KPHFRGFPCS LWILFHFLTV QASRYSENHP QEPADGQEVL QAMRSYVQWF
FGCRDCAEHF ENMAASTMHR VRSPTSAVLW LWTSHNKVNA RLSGAPSEDP
YFPKVQWPLR ELCFDCHNEI NGREPVWDLE ATYRFLKAHF SSENIILDTP
VAGLATQRNP QILGATPEPH M

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения конъюгированных антител, включающий:

(a) осуществление по меньшей мере одной стадии очистки с получением по крайней мере одного частично очищенного препарата антитела из первичной культуры клеток CHO, экспрессирующих антитело;

(b) тестирование препарата на наличие квиесцин-Q6-сульфгидрилоксидазного фермента;

(c) в случае определения в препарате на стадии (b) уровня фермента выше 0,5 мкг/мл или 33 частей на миллион (м.д.), повторение стадий (a) и (b);

(d) в случае определения в препарате на стадии (b) уровня фермента ниже 0,5 мкг/мл или 33 м.д. проведение по крайней мере одной стадии очистки в указанной первичной культуре или во второй культуре клеток CHO, экспрессирующих антитело, с получением, по крайней мере, частично очищенного препарата антитела;

(e) конъюгирование, по крайней мере, частично очищенного антитела через одну или несколько сульфгидрильных групп с лекарственным средством с получением конъюгированных антител.

2. Способ по п.1, где ферментом является QSOX1.

3. Способ по п.1 или 2, где объем второй культуры на стадии (d) больше объема культуры на стадии (a).

4. Способ по п.3, где объем второй культуры на стадии (d) по крайней мере в 1000 раз больше объема культуры на стадии (a).

5. Способ по п.1, где стадии (d) и (e) осуществляют многократно на различных культурах клеток, экспрессирующих антитела, в течение по крайней мере 1 года.

6. Способ по любому из пп.1-5, дополнительно включающий по крайней мере одну стадию промывки солью колонки с протеином A при концентрации соли 150-500 мМ NaCl, используя глубинную фильтрацию, анионный обмен на колонке с ионами четвертичного аммония или фильтрацию через фениловую мембрану.

7. Способ по любому из пп.1-6, в котором тестирование включает идентификацию полосы 65-75 кДа в геле.

8. Способ по п.7, где полосу идентифицируют с помощью вестерн-блоттинга или окрашивания серебром.

9. Способ по любому из пп.1-6, где тестирование включает проведение функционального теста на активность QSOX1.

10. Способ по п.9, в котором в функциональном тесте в качестве индикатора активности продуцируется перекись водорода.

11. Способ по п.10, в котором активность ингибируют ионами цинка, где ингибирование прекращают с помощью ЭДТА.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, где лекарственное средство выбрано из антитубулиновых средств, средств, связывающихся с малой бороздкой ДНК, ингибиторов репликации ДНК, химиотерапевтических сенсибилизаторов и димера пирролобензодиазепина.

13. Способ очистки антитела из культуры клеток CHO, включающий:

(a) осуществление способа очистки с получением по крайней мере одного частично очищенного препарата антитела из культуры клеток CHO, экспрессирующих антитело;

(b) тестирование препарата на наличие фермента QSOX1 из CHO;

(c) в случае определения в препарате на стадии (b) уровня фермента выше 0,5 мкг/мл или 33 м.д. повторение стадий (a) и (b).

14. Способ получения конъюгированных антител, включающий

очистку антитела из культуры клеток CHO способом, включающим по меньшей мере одну стадию промывки солью колонки с протеином A при концентрации соли 25-100 мМ NaCl, используя глубинную фильтрацию, анионный обмен на колонке с ионами четвертичного аммония или фильтрацию через фениловую мембрану, где антитело отделяют от фермента QSOX1 в культуре; и

конъюгирование очищенного антитела через одну или несколько сульфгидрильных групп с цитотоксическим лекарственным средством с получением конъюгированных антител.

15. Способ получения конъюгированных антител, включающий:

(a) получение препарата антитела;

(b) тестирование препарата на наличие квиесцин-Q6-сульфгидрилоксидазного фермента;

(c) в случае определения в препарате на стадии (b) уровня фермента выше 0,5 мкг/мл или 33 м.д. осуществление стадии очистки препарата антитела для снижения уровня фермента ниже 0,5 мкг/мл или 33 м.д.;

(d) конъюгирование, по крайней мере, частично очищенного антитела через одну или несколько сульфгидрильных групп с лекарственным средством с получением конъюгированных антител.

16. Способ определения пригодности препарата антитела для применения в качестве фармацевтического средства, включающий

стадию тестирования препарата на наличие квиесцин-Q6-сульфгидрилоксидазного фермента;

в случае определения в препарате антитела уровня фермента выше 0,5 мкг/мл или 33 м.д. идентификацию препарата как неподходящего для конъюгирования и для которого требуется проведение дополнительной очистки;

в случае определения в препарате антитела уровня фермента ниже 0,5 мкг/мл или 33 м.д. идентификацию препарата как подходящего для конъюгирования и, таким образом, для применения в качестве фармацевтического препарата.

17. Способ определения пригодности препарата антитела для конъюгации с лекарственным средством, включающий

стадию тестирования препарата на наличие квиесцин-Q6-сульфгидрилоксидазного фермента;

в случае определения в препарате антитела уровня фермента выше 0,5 мкг/мл или 33 м.д. идентификацию препарата как неподходящего для конъюгирования и для которого требуется проведение дополнительной очистки;

в случае определения в препарате антитела уровня фермента ниже 0,5 мкг/мл или 33 м.д. идентификацию препарата как неподходящего для конъюгирования.

18. Способ определения пригодности препарата антитела для применения в качестве фармацевтического средства, включающий стадию тестирования препарата на наличие квиесцин-Q6-сульфгидрилоксидазного фермента, где препарат антитела подходит для использования в качестве фармацевтического средства, если уровень фермента ниже 0,5 мкг/мл или 33 м.д.

19. Способ определения пригодности препарата антитела для конъюгирования с лекарственным средством, включающий стадию тестирования препарата на наличие квиесцин-Q6-сульфгидрилоксидазного фермента, причем препарат антитела подходит для конъюгации, если уровень фермента ниже 0,5 мкг/мл или 33 м.д.

20. Способ по любому из предшествующих пунктов, где препарат антитела уже подвергали по меньшей мере одной стадии очистки.

21. Способ по п.20, где стадия очистки представляет собой стадию хроматографической очистки.

22. Способ по любому из пп.13, 15-21, в котором тестирование включает идентификацию полосы 65-75 кДа в геле.

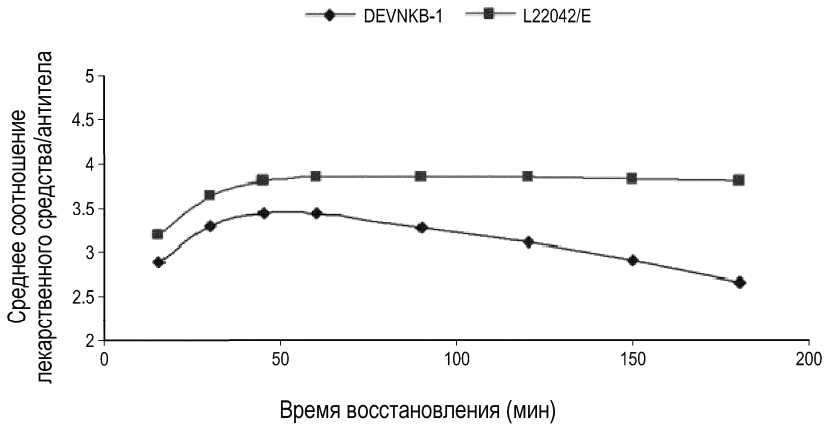
23. Способ по п.22, где полосу идентифицируют с помощью вестерн-блоттинга или окрашивания серебром.

24. Способ по любому из пп.13, 15-21, в котором тестирование включает проведение функционального теста на активность QSOX1.

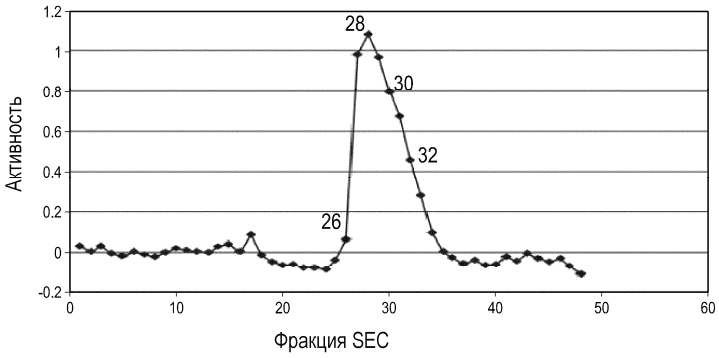
25. Способ по п.24, в котором в функциональном тесте в качестве индикатора активности продуцируется перекись водорода.

26. Способ по п.25, где активность ингибируют ионами цинка, где ингибирование прекращают с помощью ЭДТА.

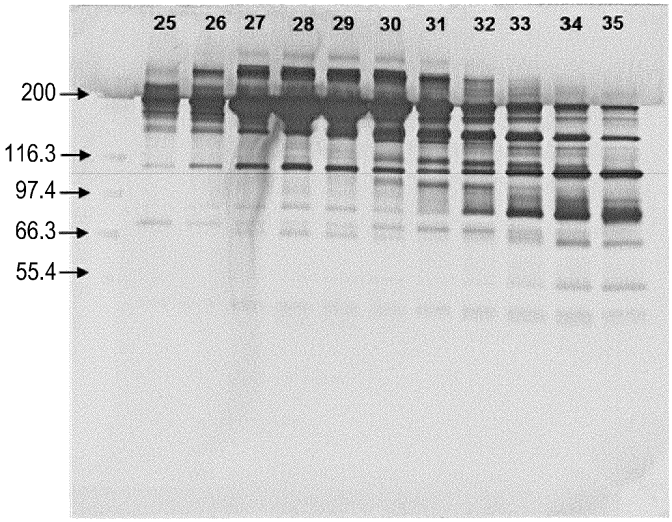
27. Способ по любому из пп.1-6, 13, 15-21, где тестирование включает мониторинг реакции между свободными тиоловыми группами и DTNB в контрольном образце и тестовом образце и их сравнение.



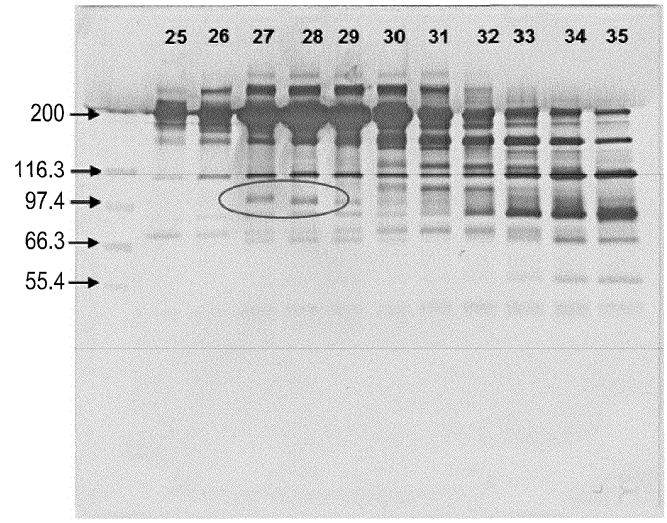
Фиг. 1



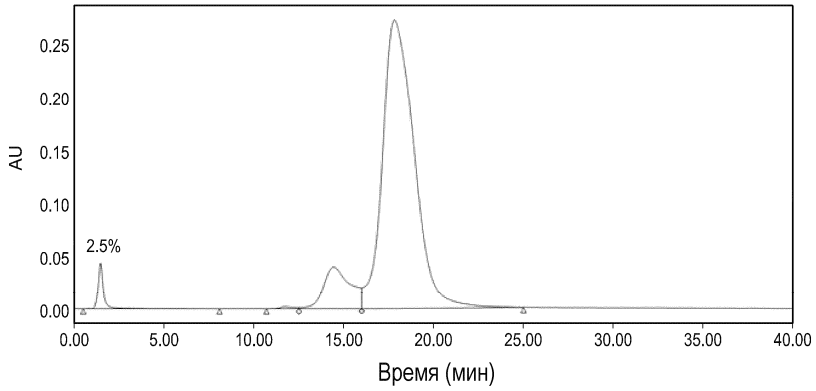
Фиг. 2A



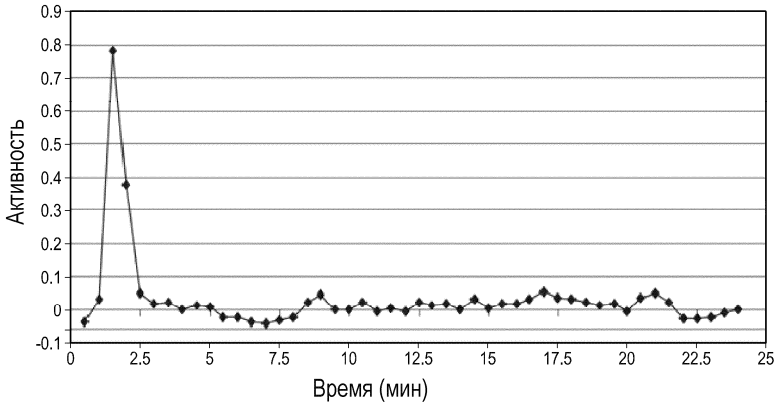
Фиг. 2B



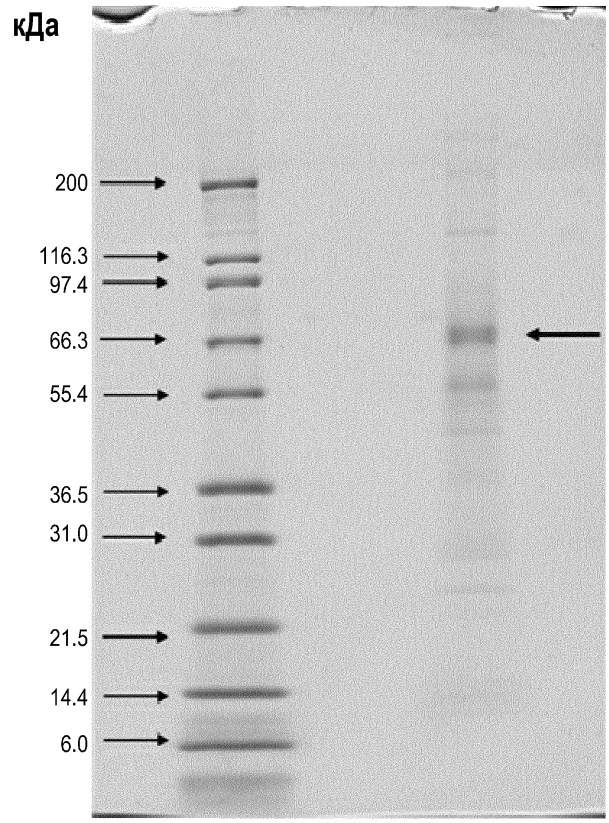
Фиг. 2C



Фиг. 3А



Фиг. 3В



Фиг. 3С