

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036154**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.06

(51) Int. Cl. **C07K 1/22** (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201790247

(22) Дата подачи заявки
2015.07.24

(54) ПЛАТФОРМА ДЛЯ ОЧИСТКИ БИСПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ

(31) **62/029,463**

(32) **2014.07.26**

(33) **US**

(43) **2017.08.31**

(86) **PCT/US2015/041936**

(87) **WO 2016/018740 2016.02.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Тастриан Эндрю, Эдикотт Кристин,
Адамс Бенджамин, Матгила Джон,
Бак Ханн (US)**

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

(56) WO-A1-2010151792
WO-A1-2014049003
US-A1-2002062010
WO-A2-2013136186
JESUS FERNANDEZ-RODRIGUEZ ET AL.:
"Induced heterodimerization and purification of two
target proteins by a synthetic coiled-coil tag",
PROTEIN SCIENCE, vol. 21, no. 4, 23 February 2012
(2012-02-23), pages 511-519, XP55233485, US ISSN:
0961-8368, DOI: 10.1002/pro.2035, figure 3B
WO-A1-2008121865
US-A1-2014112914
WO-A1-2012123520

(57) Хроматография высокого разрешения на белке А с использованием хаотропного агента и рН-градиентного или рН-ступенчатого элюирующего буфера приводит к улучшенному разделению пиков между близкородственными видами молекул. Биспецифичные антитела, содержащие СНЗ-домен, имеющий замены, устраняющие связывание с белком А, спаренный с СНЗ-доменом, связывающим белок А, разделяются при высоком разрешении пиков с моноспецифичными антителами, содержащими СНЗ-домен, имеющий замены, устраняющие связывание с белком А, спаренный с СНЗ-доменом, имеющим замены, устраняющие связывание с белком А, и моноспецифичными антителами, содержащими СНЗ-домен, связывающий белок А, спаренный с СНЗ-доменом, связывающим белок А. Подходящие хаотропные агенты включают хлорид магния и хлорид кальция

036154
B1

036154
B1

Область техники

Изобретение относится к способу очистки определенного мультимерного белка из сложной смеси белков с помощью аффинной хроматографии. В частности, изобретение относится к способу выделения гетеродимеров (в том числе биспецифичных антител) из сложной смеси мономеров и гомодимеров с помощью аффинной хроматографии (включая хроматографию на белке А) с использованием хаотропного агента.

Уровень техники

В настоящее время предложены и находятся в стадии разработки множество форматов биспецифичных антител. Один такой формат основан на обычном IgG-антителе человека с улучшенным фармакокинетическим профилем и минимальной иммуногенностью (см. патент США № 8586713, который полностью включен в настоящее описание). Одна общая легкая цепь и две различные тяжелые цепи объединяются с образованием биспецифичного антитела. Одна из тяжелых цепей содержит замещенную последовательность Fc (в дальнейшем "Fc*"), которая уменьшает или устраняет связывание Fc* с белком А. Например, одна из таких Fc*-последовательностей содержит замены H435R/Y436F (по EU-системе нумерации; и H95R/Y96F по IMGT-системе нумерации экзонов) в CH3-домене. В результате совместной экспрессии двух тяжелых цепей и общей легкой цепи образуются три продукта, два из которых являются гомодимерными по тяжелым цепям, а один является целевым гетеродимерным биспецифичным продуктом. Последовательность Fc* позволяет селективную очистку биспецифичного продукта FcFc* на коммерчески доступных аффинных колонках со средней аффинностью связывания с белком А по сравнению с высокой avidностью гомодимера тяжелых цепей FcFc или слабым связыванием гомодимера Fc*Fc*.

Для очистки биспецифичного гетеродимера в коммерческих масштабах требуется хорошее разрешение между гомодимером FcFc, гетеродимером Fc*Fc и гомодимером Fc*Fc*. В данной заявке авторы описывают усовершенствованный способ разделения, который оптимизирует разделение этих трех молекулярных форм.

Сущность изобретения

В одном или нескольких аспектах и вариантах осуществления изобретение относится к способам очистки гетеродимерного белка, такого как, например, биспецифичное антитело, из сложной смеси белков, которая включает гомодимеры и гетеродимеры, путем использования процесса аффинного захвата и элюирования. В одном аспекте изобретение относится к очищенному гетеродимерному белку, полученному любым одним из этих способов.

В первом аспекте изобретение относится к способу получения белка, включающему стадии нанесения смеси мультимерных белков на аффинный матрикс, и последующих элюирования и сбора гетеродимерного белка с этого матрикса в определенном диапазоне pH и в буфере, содержащем хаотропный агент. В одном варианте осуществления на аффинный матрикс изначально наносят от 5 до 50 г белка на литр аффинного матрикса. В некоторых случаях смесь мультимерных белков продуцируется множеством эукариотических клеток, таких как, например, клетки яичника китайского хомячка (CHO) в клеточной культуре.

В одном варианте осуществления смесь мультимерных белков содержит (i) первый гомодимер, содержащий две копии первого полипептида, (ii) гетеродимер, содержащий первый полипептид и второй полипептид, и, необязательно, (iii) второй гомодимер, содержащий две копии второго полипептида. В данном изобретении первый и второй полипептиды имеют разное сродство к аффинному матриксу, так что первый гомодимер, гетеродимер и второй гомодимер могут быть разделены на основе дифференциального связывания с аффинным матриксом.

Дифференциальным связыванием с аффинным матриксом можно манипулировать путем изменения, среди прочего, pH и/или ионной силы раствора, пропускаемого через аффинный матрикс. Добавление хаотропного агента к раствору улучшает элюирование каждого вида димеров с аффинного матрикса, таким образом увеличивая чистоту каждого отдельного вида димера. В одном варианте осуществления гетеродимер элюируют с аффинного матрикса в буфере, имеющем первый диапазон pH, а первый гомодимер элюируют с аффинного матрикса в буфере, имеющем второй диапазон pH. Гетеродимер собирают. В необязательном варианте осуществления, где второй гомодимер включен в смесь мультимеров, второй гомодимер либо проходит через колонку без связывания, либо элюируется с аффинного матрикса в промывочном буфере, имеющем третий диапазон pH.

В одном варианте осуществления аффинный матрикс содержит лиганд, белок А, прикрепленный к подложке. В некоторых случаях подложка представляет собой шарик или частицы, так что аффинный матрикс представляет собой множество частиц с прикрепленным белком А. Белок А может представлять собой природный или модифицированный стафилококковый белок А, или же он может представлять собой генно-инженерный белок А. Генно-инженерный белок А может представлять собой, например, тетрамер Z-домена, тетрамер Y-домена, или же может представлять собой генно-инженерный белок А, в котором отсутствуют в D- и E-домены. Эти генно-инженерные варианты белка А неспособны связываться (или связываются с очень низким сродством) с VH3-доменом иммуноглобулинов, но все еще могут связываться с CH3-доменами IgG1, IgG2 и IgG4.

В некоторых случаях аффинный матрикс содержит или изготовлен из агарозы, поли(стирол-

дивинилбензола), полиметакрилата, стекла с контролируемым размером пор, сферических частиц диоксида кремния, целлюлозы и т.п. В вариантах осуществления изобретения, где подложка выполнена в виде шарика или частицы, средний диаметр частиц составляет от 25 до 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления частицы имеют средний диаметр 35, 45, 60, 75 или 85 мкм. В конкретном варианте осуществления частицы имеют средний диаметр 45 мкм и содержат поры, имеющие средний диаметр 1100 ангстрем.

В некоторых вариантах осуществления после первоначального нанесения смеси белков на аффинный матрикс его промывают буфером с рН выше рН 5. В некоторых случаях буфер содержит 20 мМ фосфат натрия с рН 7,2. Если в смесь белков входит второй гомодимер, то второй гомодимер вымывается из аффинного матрикса в промывочном буфере. Таким образом, в данном изобретении промывочный буфер имеет третий диапазон рН.

В некоторых вариантах осуществления аффинный матрикс с нанесенным белком элюируют градиентом рН в буфере или, в альтернативном варианте, проводят последовательное элюирование буферами, каждый из которых имеет отличающиеся значения рН. В одном варианте осуществления градиент рН составляет от рН 6 до рН 3. Первый диапазон рН, в котором гетеродимер элюируется с аффинной матрицы, составляет от примерно рН 5,5 до примерно рН 3,6. В некоторых случаях элюирующий буфер и/или градиент рН в буфере включают подходящий буфер, такой как цитратный, ацетатный, 4-морфолинэтансульфонатный (MES), цитрат-фосфатный, сукцинатный и т.п., который в одном варианте осуществления представляет собой 40 мМ ацетат, и хаотропный агент. Хаотропный агент может представлять собой соль, содержащую катион, выбранный из лития, магния, кальция и гуанидина, и анион, выбранный из хлорида, нитрата, бромида, йодида, хлората, перхлората и тиоцианата. В одном конкретном варианте осуществления хаотропным агентом является CaCl_2 , например 250-500 мМ CaCl_2 . В другом конкретном варианте осуществления хаотропным агентом является MgCl_2 , например, 250-500 мМ MgCl_2 .

В одном варианте осуществления гетеродимер представляет собой биспецифичное антитело. При этом первый полипептид содержит СНЗ-домен, который способен связываться с белком А ("Fc"), а второй полипептид содержит СНЗ-домен, который не способен связываться с белком А ("Fc*"). В некоторых случаях второй полипептид содержит замены Н435R/Y436F (по EU-системе нумерации; и Н95R/Y96F по IMGТ-системе нумерации экзонов) в своем СНЗ-доме (так называемый "Fc*" или "замена со звездочкой"). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления первый гомодимер представляет собой моноспецифичное антитело, имеющее два незамещенных СНЗ-домена (т.е. FcFc); второй гомодимер представляет собой моноспецифичное антитело, имеющее два Н435R/Y436F-замещенных СНЗ-домена (т.е. Fc*Fc*); а гетеродимер представляет собой биспецифичное антитело, имеющее один незамещенный СНЗ-домен и один Н435R/Y436F-замещенный СНЗ-домен (т.е. Fc*Fc).

В одном варианте осуществления изобретения гетеродимер, который собирают с аффинного матрикса, затем наносят на хроматографическую среду при более кислом рН и элюируют из этой среды более щелочным буфером, в котором отсутствует хаотропный агент (или он содержит меньшее количество или следовые количества хаотропа). В одном случае хроматографическая среда представляет собой мультимодальную хроматографическую смолу. Таким образом, гетеродимер может быть очищен дополнительно.

Во втором аспекте второй гомодимер сначала удаляют из смеси белков нанесением смеси на первый аффинный матрикс, так что первый гомодимер и гетеродимер остаются связанными с матриксом, тогда как второй гомодимер проходит сквозь него и отбрасывается. После этого первый гомодимер и гетеродимер элюируют с первого аффинного матрикса, а затем наносят на второй аффинный матрикс. В одном варианте осуществления на первый аффинный матрикс изначально наносят от 5 до 50 г белка на литр аффинного матрикса. Смесь мультимерных белков продуцируется множеством эукариотических клеток, таких как, например, клетки яичника китайского хомячка (СНО) в клеточной культуре.

В одном варианте осуществления смесь мультимерных белков, наносимая на первый аффинный матрикс, содержит (i) первый гомодимер, содержащий две копии первого полипептида, (ii) гетеродимер, содержащий первый полипептид и второй полипептид, и, необязательно, (iii) второй гомодимер, содержащий две копии второго полипептида. В контексте изобретения первый и второй полипептиды имеют разное сродство в отношении первой аффинной матрицы, а также в отношении второй аффинной матрицы, так что первый гомодимер, гетеродимер и второй гомодимер могут быть разделены на основе дифференциального связывания с первым и/или вторым аффинным матриксом.

В одном варианте осуществления первый аффинный матрикс включает прикрепленный к подложке лиганд, генно-инженерный белок А, у которого отсутствует способность связывать иммуноглобулиновый V_H3-домен. В некоторых случаях у белка А отсутствует D-домен и E-домен, например генно-инженерный белок А, который содержит Z-тетрамер или Y-тетрамер.

Дифференциальным связыванием первого гомодимера и гетеродимера с вторым аффинным матриксом можно манипулировать путем изменения, среди прочего, рН и/или ионной силы раствора, который пропускают через аффинный матрикс. Добавление хаотропного агента к раствору улучшает элюирование каждого вида димера с второго аффинного матрикса в неперекрывающихся фракциях, тем самым увеличивая чистоту каждого вида димеров. В одном варианте осуществления гетеродимер элюиру-

ют с второго аффинного матрикса в буфере, имеющем первый диапазон pH, а первый гомодимер элюируют с второго аффинного матрикса в буфере, имеющем второй диапазон pH. Гетеродимер собирают. При этом первый диапазон pH имеет более высокий pH, чем второй диапазон pH.

В одном варианте осуществления второй аффинный матрикс содержит белковый лиганд, прикрепленный к подложке. В некоторых случаях подложка представляет собой шарик или частицу, так что второй аффинный матрикс представляет собой множество частиц с прикрепленным лигандом белком А. Белок А может представлять собой природный или модифицированный стафилококковый белок А, или же он может представлять собой генно-инженерный белок А. Генно-инженерный белок А может представлять собой, например, тетрамер Z-домена, тетрамер Y-домена, или же он может представлять собой другой генно-инженерный белок А, в котором отсутствуют в D- и E-домены. Эти молекулы генно-инженерного белка А неспособны связываться (или связываются с очень низким сродством) с VH3-доменом иммуноглобулинов, но все еще могут связываться с CH3-доменами IgG1, IgG2 и IgG4.

В некоторых случаях подложка содержит или изготовлена из агарозы, поли(стирол-дивинилбензола), полиметакрилата, стекла с контролируемым размером пор, сферических частиц оксида кремния, целлюлозы (например, HYPERCEL) и т.п. В тех вариантах осуществления, где подложка выполнена в виде шарика или частицы, средний диаметр частиц составляет от 30 до 90 мкм. В некоторых вариантах частицы имеют средний диаметр 35, 45, 60, 75 или 85 мкм. В конкретном варианте осуществления частицы имеют средний диаметр 45 мкм как и содержат поры, имеющие средний диаметр 1100 ангстрем.

В некоторых вариантах осуществления после первоначального нанесения смеси, содержащей первый гомодимер и гетеродимер, на второй аффинный матрикс, его промывают буфером с pH выше pH 5. В некоторых случаях буфер содержит 20 mM фосфат натрия с pH pH 5-8,5, например pH 7,2. В некоторых вариантах осуществления второй аффинный матрикс с нанесенным белком элюируют градиентом pH в буфере или, в альтернативном варианте, проводят последовательное элюирование буферами, каждый из которых имеет отличающиеся значения pH. В одном варианте осуществления градиент pH составляет от pH 6 до pH 2,5. Первый диапазон pH, в котором гетеродимер элюируется с аффинной матрицы, составляет от примерно pH 5,5 до примерно pH 3,6. В некоторых случаях элюирующий буфер и/или градиент pH в буфере содержат ацетат, который в одном варианте осуществления представляет собой 40 mM ацетат, и хаотропный агент. Хаотропный агент может представлять собой соль, содержащую катион, выбранный из лития, магния, кальция и гуанидина, и анион, выбранный из хлорида, нитрата, бромида, йодида, хлората, перхлората и тиоцианата. В одном конкретном варианте осуществления хаотропным агентом является CaCl₂, например 500 mM CaCl₂. В другом конкретном варианте осуществления хаотропным агентом является MgCl₂, например 500 mM MgCl₂.

В одном варианте осуществления гетеродимер представляет собой биспецифичное антитело. При этом первый полипептид содержит CH3-домен, который способен связываться с белком А ("Fc"), а второй полипептид содержит CH₃-домен, который не способен связываться с белком А ("Fc*"). В некоторых случаях второй полипептид содержит замены H435R/Y436F (также называемые "со звездочкой") в своем CH3-домене ("Fc*"). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления первый гомодимер представляет собой моноспецифичное антитело, имеющее два незамещенных CH3-домена (т.е. FcFc); второй гомодимер представляет собой моноспецифичное антитело, имеющее два H435R/Y436F-замещенных CH3-домена (т.е. Fc*Fc*); а гетеродимер представляет собой биспецифичное антитело, имеющее один незамещенный CH3-домен и один H435R/Y436F-замещенный CH3-домен (т.е. Fc*Fc).

В одном варианте осуществления гетеродимер, который собирают с второго аффинного матрикса, затем наносят на хроматографическую среду при кислом значении pH и элюируют из этой среды в более щелочной буфер и без хаотропного агента (или со сниженным уровнем или следовыми количествами хаотропа). В одном случае хроматографическая среда представляет собой мультимодальную хроматографическую смолу. Таким образом, гетеродимер может быть очищен дополнительно.

В третьем аспекте изобретение относится к очищенному гетеродимеру, полученному в соответствии со способами по аспектам, описанным выше. В одном из вариантов осуществления гетеродимер представляет собой биспецифичное антитело.

Описание чертежей

На фиг. 1 представлены хроматограммы, иллюстрирующие pH (пунктир) и оптическую плотность при длине волны 280 нм (сплошная линия) в течении стадии элюирования при очистке bsAb E на смоле с рекомбинантным белком А (MABSELECT XTRA™, панель А) и на смоле на основе генно-инженерного белка А, который не способен связывать VH (MABSELECT SURE™, панель В).

На фиг. 2 изображено разрешение пиков (Rs), получаемое для биспецифичного (Fc*Fc) и незамещенного в CH3 гомодимерного (FcFc) пиков как функции от времени удерживания при градиентном элюировании 30 объемами колонки ("CV") 40 mM ацетатом, 500 mM хлоридом кальция либо на MABSELECT SURE™ (пустые кружки), либо на POROS MABCAPTURE A™ (заштрихованные квадраты) в качестве стационарной фазы.

На фиг. 3 показаны хроматограммы, иллюстрирующие pH (пунктир) и оптическую плотность при

длине волны 280 нм (сплошная линия) в течение стадии элюирования при очистке bsAb А с любым из цитрата натрия (панель А), хлорида натрия (панель В), хлорида магния (панель С) или хлорида кальция (панель D), добавленными в качестве модификаторов к элюирующей подвижной фазе. Фракционирование биспецифичного пика отмечено вертикальными пунктирными линиями.

На фиг. 4 изображена схема последовательности операций процессов очистки для содержащих замену со звездочкой (замещенных в СНЗ, Fc*) биспецифичных антител (Fc*Fc), способных (панель А) и не способных (панель В) к связыванию белка SpA через VH-домен.

Подробное описание

Настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьировать. Кроме того, следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена для описания конкретных вариантов осуществления изобретения и не предназначена для ограничения изобретения, поскольку объем настоящего изобретения определяется его формулой.

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, которое обычно понимает средний специалист в данной области, к которой принадлежит данное изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобретения, ниже описаны конкретные способы и материалы. Все указанные публикации включены в данное описание путем ссылки.

Термин "антитело, используемый в описании, включает в себя иммуноглобулиновые молекулы, состоящие из четырех полипептидных цепей - двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно называемую в данном описании HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов - CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно называемую в данном описании LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен CL. Области VH и VL могут дополнительно подразделяться на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH- и VL-область состоит из трех CDR и четырех FR, располагающихся от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (CDR тяжелой цепи могут сокращенно называться как HCDR1, HCDR2 и HCDR3, CDR легкой цепи могут сокращенно называться как LCDR1, LCDR2 и LCDR3). Термин "высокоаффинное" антитело относится к таким антителам, которые имеют аффинность связывания с мишенью по меньшей мере 10^{-9} М, по меньшей мере 10^{-1} М, по меньшей мере 10^{-11} М или по меньшей мере 10^{-12} М, измеренную с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™ или методом ELISA для определения сродства в растворе.

Фраза "биспецифичное антитело" включает антитело, способное селективно связываться с двумя или несколькими эпитопами. Биспецифичные антитела обычно включают две различных тяжелых цепи, причем каждая из тяжелых цепей специфично связывается с разными эпитопами - либо на двух различных молекулах (например, антигенах), либо на одной молекуле (например, на одном антигене). Если биспецифичное антитело способно селективно связываться с двумя различными эпитопами (первый эпитоп и второй эпитоп), сродство первой тяжелой цепи к первому эпитопу обычно будет по меньшей мере на один или два, три или четыре порядка ниже, чем сродство первой тяжелой цепи к второму эпитопу, и наоборот. Эпитопы, распознаваемые биспецифичным антителом, могут находиться на одной или разных мишенях (например, на одном белке или на разных белках). Биспецифичные антитела могут быть получены, например, путем объединения тяжелых цепей, которые распознают различные эпитопы одного и того же антигена. Например, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие переменные последовательности тяжелых цепей, которые распознают различные эпитопы одного и того же антигена, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующих другие константные области тяжелой цепи, и такие последовательности могут быть проэкспрессированы в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина. Типичное биспецифичное антитело имеет две тяжелые цепи, каждая из которых имеет три CDR тяжелой цепи со следующими далее (в направлении от N-конца к C-концу) CH1-доменом, шарниром, CH2-доменом и CH3-доменом, и легкую цепь иммуноглобулина, которая не обеспечивает антигенсвязывающую специфичность, но может связываться с каждой тяжелой цепью, либо которая может связываться с каждой тяжелой цепью и может связывать один или несколько эпитопов, связываемых антигенсвязывающими областями тяжелых цепей, либо которая может связываться с каждой тяжелой цепью и обеспечивать возможность связывания одной или обеих тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами.

Фраза "тяжелая цепь" или "тяжелая цепь иммуноглобулина" включает в себя последовательность константной области тяжелой цепи иммуноглобулина из любого организма и, если не указано иное, включает переменный домен тяжелой цепи. Переменные домены тяжелой цепи включают в себя три CDR- и четыре FR-области тяжелой цепи, если не указано иное. Фрагменты тяжелых цепей включают

CDR, CDR и FR и их комбинации. Типичная тяжелая цепь имеет после переменного домена (в направлении от N-конца к C-концу) CH1-домен, шарнир, CH2-домен и CH3-домен. Функциональный фрагмент тяжелой цепи включает в себя фрагмент, который способен специфично распознавать антиген (например, распознавать антиген с КД в микромолярном, наномолярном или пикомолярном диапазоне), который способен экспрессироваться и секретироваться из клетки, и который содержит по меньшей мере один CDR.

Фраза "легкая цепь" включает в себя последовательность константной области легкой цепи иммуноглобулина из любого организма и, если не указано иное, включает в себя каппа- и лямбда-легкие цепи иммуноглобулинов человека. Переменные домены легких цепей (VL), как правило, включают в себя три CDR- и четыре каркасных (FR-) области легкой цепи, если не указано иное. Как правило, полноразмерная легкая цепь включает в себя в направлении от аминоконца к карбоксильному концу VL-домен, который включает FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 и константный домен легкой цепи. Легкие цепи, которые могут быть использованы в данном изобретении, включают, например, такие, которые не связываются избирательно с первым или вторым антигеном, селективно связываемым с антигенсвязывающим белком. Подходящие легкие цепи включают те, которые могут быть идентифицированы путем скрининга наиболее часто используемых легких цепей в существующих библиотеках антител (библиотеки в растворе или *in silico*), где легкие цепи не оказывают существенного влияния на аффинность и/или селективность антигенсвязывающих доменов антигенсвязывающих белков. Подходящие легкие цепи включают те, которые могут связывать один или оба эпитопа, которые связываются с антигенсвязывающими областями антигенсвязывающего белка.

Фраза "переменный домен" включает в себя аминокислотную последовательность легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина (модифицированной по желанию), которая включает следующие аминокислотные области в следующей последовательности в направлении от N-конца к C-концу (если не указано иное): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. "Переменный домен" включает в себя аминокислотную последовательность, способную укладываться в каноническую область (VH или VL), имеющую структуру двойного бета-листа, где бета-листы соединены дисульфидной связью между остатком первого бета-листа и второго бета-листа.

Фраза "определяющая комплементарность область" или термин "CDR" включают аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеотидной последовательностью генов иммуноглобулинов организма, которая обычно (т.е. у животного дикого типа) находится между двумя каркасными областями в переменной области легкой или тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина (например, антитела или Т-клеточного рецептора).

CDR может кодироваться, например, последовательностью зародышевой линии или перестроенной или неперестроенной последовательностью, и, например, неактивированными или зрелыми В-клетками или Т-клетками. В некоторых случаях (например, в случае CDR3) CDR может кодироваться двумя или несколькими последовательностями (например, зародышевыми последовательностями), которые не являются непрерывными (например, в перестроенной нуклеотидной последовательности), но являются непрерывными в нуклеотидной последовательности В-клеток, например, в результате сплайсинга или соединения последовательностей (например, V-D-J-рекомбинации с образованием CDR3 тяжелой цепи).

Фраза "Fc-содержащий белок" включает в себя антитела, биспецифичные антитела, иммуноадгезины и другие связывающие белки, которые содержат, по меньшей мере, функциональный участок CH2- и CH3-областей иммуноглобулина. "Функциональный участок" относится к CH2 и CH3, которые могут связываться с Fc-рецептором (например, FcγR; или FcRn, т.е. неонатальным Fc-рецептором), и/или которые могут участвовать в активации комплемента. Если CH2- и CH3-области содержат делеции, замены и/или вставки, или другие модификации, которые делают их неспособными связывать какой-либо Fc-рецептор, также активировать комплемент, то CH2- и CH3-области являются нефункциональными.

Fc-содержащие белки могут содержать модификации в иммуноглобулиновых доменах, включая те случаи, когда модификации влияют на одну или несколько эффекторных функций связывающего белка (например, модификации, которые влияют на связывание FcγR, связывание FcRn и, таким образом, на время полужизни и/или CDC-активность). Такие модификации включают, но не ограничиваются ими, модификации и их комбинации следующих аминокислот (в соответствии с EU-нумерацией) константной области иммуноглобулинов: 38, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438 и 439.

Например, а не в качестве ограничения, связывающий белок представляет собой Fc-содержащий белок и имеет увеличенное время полужизни в сыворотке (по сравнению с тем же Fc-содержащим белком без указанной модификации (указанных модификаций)) и имеет модификацию в положении 250 (например, E или Q); в положениях 250 и 428 (например, L или P); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификации в положениях 428 и/или 433

(например, L/R/SI/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y) ; или модификации в положениях 250 и/или 428; или модификации в положениях 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В другом примере, модификация может включать модификации 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификации 428L, 2591 (например, V2591) и 308F (например, V308F); модификации 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификации в положениях 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификации 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); модификации в положениях 3 07 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Термин "замена со звездочкой", "Fc*" и "HC*" включает любую молекулу, тяжелую цепь иммуноглобулина, Fc-фрагмент, Fc-содержащую молекулу и т.п., которые содержат последовательность в СН3-домене, которая устраняет связывание с белком А. Ранее было отмечено (Lindhofer, H. et al (1995) *J. Immunol.* 155: 219-225)), что, поскольку человеческий IgG3 не связывается с белком А, его потенциально можно использовать совместно с любым из трех других подклассов IgG человека в стратегии очистки, подобной той, которая используется для гибридов мышь-крыса. Однако несмотря на то, что последовательность всех четырех подклассов IgG человека являются высоко гомологичными, неизвестно, как легко Fc-участки из IgG1, IgG2 и IgG4 образуют гетеродимеры с IgG3; даже немного предпочтительное образование гомодимеров окажет отрицательное влияние на общий выход желаемых гетеродимеров при определенных обстоятельствах (например, выделение из квадром). Сообщалось (Jendeberg, L. et al. (1997) *J. Immunological Meth.* 201:25-34)), что неспособность IgG3 связывать белок А определяется одним аминокислотным остатком, Arg435 (по EU-нумерации; и Arg95 по IMGT-нумерации), причем соответствующая позиция в других подклассах IgG занята остатком гистидина. Поэтому предположительно возможно вместо IgG3 использовать последовательность IgG1, в которой His435 заменен на Arg. Таким образом, одной точечной мутации в IgG1 должно быть достаточно, чтобы создать другую аффинность связывания, подходящую для новой схемы очистки. Эта модификация будет называться IgG1 AA, чтобы обозначить неспособность полученного мутанта связывать белок А (и, аналогично, IgG2AA и IgG4AA - или в более общем плане, FcAA).

Однако указанная точечная мутация дает новую пептидную последовательность из-за мутации, которая потенциально может быть иммуногенной. Точечная мутация может, теоретически, привести к связыванию с молекулами МНС класса II и представлению Т-клеткам, и, таким образом, может вызывать иммунный ответ. Чтобы избежать этой проблемы, может использоваться дипептидная мутация, H435R/Y436F (по EU-нумерации; H95R/Y96F по IMGT-нумерации). Полученная последовательность в месте замены является идентичной IgG3, и, следовательно, можно было бы ожидать, что она будет иммунологически "невидимой" благодаря отсутствию чужеродных коротких пептидов, доступных для представления Т-клеткам. Сообщалось, что этот двойной мутант все еще не связывается с белком А (Jendeberg, L. et al. (1997) *J. Immunological Meth.* 201:25-34). И, наконец, дипептидная мутация не включает какой-либо из остатков, которые образуют поверхность соприкосновения в димере Fc, так что она не может препятствовать образованию гетеродимеров. Эта дипептидная мутация обозначается как "замена со звездочкой".

Термин "клетка" включает в себя любую клетку, которая является подходящей для экспрессии рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Клетки включают клетки прокариот и эукариот (одноклеточных или многоклеточных организмов), бактериальные клетки (например, штаммы *E. coli*, *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.* и т.д.), клетки микобактерий, клетки грибов, клетки дрожжей (например, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica* и т.д.), клетки растений, клетки насекомых (например, SF-9, SF-21, зараженные бакуловirusами клетки насекомых, *Trichoplusia ni* и т.д.), клетки животных, клетки человека или слитые клетки, такие как, например, гибридомы или квадromы. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, низших обезьян, высших обезьян, хомяка, крысы или мыши. В некоторых вариантах осуществления клетка является эукариотической и выбрана из следующих клеток: CHO (например, CHO (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), клетки сетчатки, Vero, CV1, клетки почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (например, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (эпидермальных), CV-1, U937, 3T3, клетки L, клетки C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, клетки Сертоли, клетки BRL 3A, клетки HT1080, клетки миеломы, опухолевой клетки и клеточной линии, полученной из вышеуказанных клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит один или несколько вирусных генов, например, клетка сетчатки, которая экспрессирует вирусный ген (например, клетка PER.C6™).

Фраза "модификатор подвижной фазы" включает в себя остатки, которые уменьшают эффект или нарушают неспецифичные (т.е. неаффинные) ионные и другие нековалентные взаимодействия между белками. "Модификаторы подвижной фазы" включают, например, соли, ионные комбинации металлов I и II групп с ацетатом, бикарбонатом, карбонатом, галогеном (например, хлоридом или фторидом), нитратом, фосфатом или сульфатом. Неограничивающий иллюстративный список "модификаторов подвижной фазы" включает бериллиевую, литиевую, натриевую и калиевую ацетатные соли; бикарбонаты натрия и калия; карбонаты лития, натрия, калия и цезия; хлориды лития, натрия, калия, цезия и магния; фториды

натрия и калия; соли нитраты натрия, калия и кальция; фосфаты натрия и калия; и сульфаты кальция и магния.

"Модификаторы подвижной фазы" также включают хаотропные агенты, которые ослабляют или иным образом препятствуют нековалентным силам и увеличивают энтропию в системах биомолекул. Неограничивающие примеры хаотропных агентов включают бутанол, хлорид кальция, этанол, хлорид гуанидина, перхлорат лития, ацетат лития, хлорид магния, фенол, пропанол, додецилсульфат натрия, тиомочевину и мочевину. Хаотропные агенты включают соли, которые оказывают влияние на растворимость белков. Более хаотропные анионы включают, например, хлорид, нитрат, бромид, йодид, хлорат, перхлорат и тиоцианат. Более хаотропные катионы включают, например, литий, магний, кальций и гуанидин.

"Модификаторы подвижной фазы" включают такие молекулы, которые влияют на ионные или другие нековалентные взаимодействия таким образом, что при добавлении на стадии элюирования ступенчатым или градиентным рН, либо при уравнивании подложки с белком А в "модификаторе мобильной фазы" и элюирования ступенчатым или градиентным рН, приводят к увеличению дистанции в единицах рН между элюцией гомодимерного IgG и гетеродимерного IgG (например, человеческого IgG дикого типа и такого же IgG, но несущего одну или несколько модификаций в своем СH3-домене, описанных в настоящем документе). Подходящая концентрация "модификатора подвижной фазы" может быть определена по его концентрации с использованием одной колонки, элюирования ступенчатым или градиентным рН с увеличивающейся концентрацией "модификатора подвижной фазы", при которой достигается максимальная дистанция в рН при заданной элюирования ступенчатым или градиентным рН. "Модификаторы подвижной фазы" могут также включать неполярные модификаторы, в том числе, например, пропиленгликоль, этиленгликоль и т.п.

Используемый в данном описании термин "аффинная хроматография" представляет собой хроматографический способ, в котором используются специфичные обратимые взаимодействия между биомолекулами, а не общие свойства биомолекул, такие как изоэлектрическая точка, гидрофобность или размер, для осуществления хроматографического разделения. "Аффинная хроматография на белке А" или "хроматография на белке А" относится к специфичному аффинному хроматографическому способу, в котором используется сродство IgG-связывающих доменов белка А к Fc-участку молекулы иммуноглобулина. Этот Fc-участок включает константные домены СH2 и СH3 иммуноглобулинов человека или животного или иммуноглобулиновые домены, по существу, аналогичные им. Белок А включает природный белок из клеточной стенки *Staphylococcus aureus*, белок А, полученный рекомбинантными или синтетическими способами, и варианты, которые сохраняют способность связываться с Fc-областью. На практике, хроматография на белке А включает в себя использование белка А, иммобилизованного на твердой подложке. См. Gagnon, Protein A Affinity Chromatography, Purification Tools for Monoclonal Antibodies, pp. 155-198, Validated Biosystems, 1996. Белок G и белок L также могут быть использованы для аффинной хроматографии. Твердая подложка представляет собой неводный матрикс, на котором прикреплен белок А. Такие подложки включают в себя агарозу, сефарозу, стекло, кварц, полистирол, нитроцеллюлозу, древесный уголь, песок, целлюлозу и любой другой подходящий материал. Такие материалы хорошо известны в данной области техники. Любой подходящий способ может быть использован для прикрепления второго белка на твердую подложку. Способы прикрепления белков к подходящим твердым подложкам хорошо известны в данной области техники. См., Ostrove, in Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology, 182: 357-371, 1990. Такие твердые подложки с иммобилизованным белком А и без него легко доступны от многих коммерческих источников, включая такие как Vector Laboratory (Burlingame, Calif.), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif.), BioRad (Hercules, Calif.), Amersham Biosciences (входит в GE Healthcare, Uppsala, Sweden), Pall (Port Washington, NY) и EMD-Millipore (Billerica, Mass.). Белок А, иммобилизованный на пористом стеклянном матриксе, является коммерчески доступным под названием PROSEP®-А (Millipore). Твердая фаза также может представлять собой матрикс на агарозной основе. Белок А, иммобилизованный на агарозном матриксе, является коммерчески доступным под названием MabSelect™ (Amersham Biosciences).

Аффинная хроматография также включает в себя носители, которые могут быть использованы для селективного связывания и, таким образом, очистки антител, фрагментов антител или химерных слитых белков, которые содержат иммуноглобулиновые домены и/или последовательности. Антитела включают IgG, IgA, IgM, IgD, IgY и IgE-типы. Антитела также включают одноцепочечные антитела, такие как антитела верблюдовых, генно-инженерно модифицированные антитела верблюдовых, одноцепочечные антитела, однодоменные антитела, наноантитела и т.п. Фрагменты антител включают последовательности VH, VL, CL и CH. Фрагменты антител и слитые белки, содержащие последовательности антител, включают, например, F(ab')₃, F(ab')₂, Fab, Fc, Fv, dsFv, (scFv)₂, scFv, scAb, миниантитела, диантитела, триантитела, тетраантитела, Fc-слитые белки, молекулы-ловушки и т.п. (см. Аyyar et al., Methods 56 (2012): 116-129). Такие аффинные хроматографические среды могут содержать лиганды, которые селективно связываются с антителами, их фрагменты и слитые белки, содержащие такие фрагменты. Такие лиганды включают антителосвязывающие белки, бактериальные рецепторы, антигены, лектины или ан-

ти-антитела, направленные на молекулу-мишень, антитело, требующее очистки. Например, полученные из верблюдовых аффинные лиганды, направленные против какого-либо одного или нескольких из IgG-CH1, IgG-Fc, IgG-CH3, IgG1, LC-каппа, LC-лямбда, IgG3/4, IgA, IgM и т.п., могут использоваться в качестве аффинных лигандов (коммерчески доступны в качестве хроматографических смол с названием CAPTURESELECT от Life Technologies, Inc., Carlsbad, Calif.).

Пример 1. Способ разрешения пиков

Биспецифичные антитела были отделены от загрязняющих гомодимеров с помощью хроматографии на белке А с использованием замены со звездочкой, следующим образом. Поскольку у гомодимера Fc*Fc* удалены оба сайта связывания белка А из Fc области, ожидается, что эта примесь, связанная с продуктом, уйдет с проскоком, тогда как биспецифичный и FcFc-гомомер, как ожидается, будут оставаться на колонке. Серию промывок используют для удаления связанных с процессом загрязнений, таких как ДНК клеток CHO или белки клеток-хозяев (HCP). Биспецифичные антитела затем избирательно элюировали ступенчатым или градиентным рН, тогда как примесь FcFc оставалась на колонке благодаря своему более сильному связыванию относительно биспецифичных антител.

Значительная вариабельность эффективности разделения наблюдалась в зависимости от конкретного биспецифичного антитела при проведении первичных экспериментов с использованием хроматографической смолы с рекомбинантным стафилококковым белком А (SpA). Хотя в некоторых случаях было получено базовое разрешение между связыванием гомодимеров FcFc и биспецифичного продукта, подгруппа биспецифичных антител ("bsAb") давала очень плохое разрешение. Для этих молекул хорошее разрешение было достижимо при выполнении разделения на аффинной смоле, модифицированной для улучшения стабильности основания. Одним примером таких антител является bsAb E, для которого собранную осветленную клеточную культуральную жидкость наносят в количестве 5 г/л на любую SpA-смолу (MABSELECT XTRA™, фиг. 1A) или на смолу на основе генно-инженерного белка А (MABSELECT SURE™, фиг. 1B). После ряда стадий промывки буфером (например, при рН 6-8), проводят градиентную элюирование 40 объемами колонки («CV») от рН 5 до 3 в 40 мМ ацетате и 500 мМ NaCl для снятия связавшихся белков. На MABSELECT XTRA™ (фиг. 1A) пик элюирования между 25-35 CV содержал неразделенные биспецифичный продукт и гомодимер FcFc. Кроме того, несмотря на неспособность примеси Fc*Fc* связываться с белком А в Fc-области, первый наблюдаемый пологий пик (0-25 CV) состоял из гомодимера Fc*Fc*. Однако такая же нагрузка BsAb E на MABSELECT SURE™ давала два хорошо разрешенных пика, содержащих биспецифичный продукт и гомодимер FcFc соответственно (фиг. 1B), причем весь гомодимер Fc*Fc* уходил в проскок колонки во время нанесения. Это может быть вызвано отличиями во взаимодействии между IgG с нативным белком А ("SpA") и генно-инженерным SuRe-лигандом.

В дополнение к классическим участкам связывания некоторые антитела, как было показано, содержат альтернативной сайт связывания SpA в вариабельной области тяжелой цепи ("VH"). В частности, было показано, что некоторые IgG, которые включают тяжелые цепи из VH3-семейства генов человека, имеют такое свойство, причем почти половина VH-генов зародышевой линии человека принадлежат к подсемейству VH3. (См. Sasso et al., Journal of Immunology 1989; 142:2778-83; Sasso et al., Journal of Immunology 1991; 147:1877-83; Schroeder et al., International immunology 1990; 2:41-50; и Walter, M.A., and D.W. Cox, American Journal of Human Genetics 1988; 42:446-51). Поэтому представляется вероятным, что на смолах на основе SpA биспецифичные антитела, такие как BsAb E, будут иметь плохое разделение двух связывающихся форм и удерживание "несвязывающегося" гомодимера Fc*Fc* за счет связывания с VH. Таким образом, полагают, что VH-связывание уменьшает разницу в avidности биспецифичного продукта и гомодимера FcFc и обуславливает низкоаффинное связывание Fc*Fc*.

Эта гипотеза подтверждается улучшением очистки, наблюдаемым на смоле MABSELECT SURE™. Исследования связывания между SpA и антителами показали, что, тогда как все пять доменов SpA (E, D, A, B и C) связываются с IgG в Fc-области, только домены D и E показывают значительное связывание с Fab. (См., например, Starovasnik et al., Protein Science 1999; 8:1423-31). Генно-инженерный аффинный лиганд MABSELECT SURE™ представляет собой тетрамер Z-домена, генно-инженерный вариант белка из нативного, не связывающего Fab B-домена белка SpA. Z-домен, как известно, имеет незначительное связывание с вариабельной областью антител (Starovasnik, см. выше). Поэтому при использовании этой смолы несущий лиганд MABSELECT SURE™, увеличенная разница в avidности между биспецифичным продуктом и гомодимером FcFc позволяет улучшить разрешение этих пиков; а гомодимер Fc*Fc* не удерживается на смоле.

Проводили скрининг множества хроматографических смол на основе белка А с целью идентификации смолы для клинического и коммерческого получения биспецифичного продукта. Для оценки были выбраны два bsAb, одно из которых, как ранее было показано, связывается с SpA через VH-область (bsAb A), а другое не обладает этой способностью (bsAb B). Наносимый материал предварительно подвергали стандартной положительной аффинной хроматографии для удаления примеси Fc*Fc*. Исходная степень чистоты биспецифичного продукта (Fc*Fc/[Fc*Fc+Fc*Fc*+FcFc]) составляла 84 и 76% для BsAb A и BsAb B соответственно. На все смолы наносили до 10 г общего белка/л смолы. После серии промыв-

вок антитела элюировали с использованием 30 CV градиентом pH от 6 до 3 с 500 мМ NaCl или 500 мМ или CaCl₂ в качестве модификаторов подвижной фазы.

Шесть отобранных коммерчески доступных смол с белком А демонстрируют разнообразие матрикс-носителей, размеров шариков и типов лигандов. В четырех смолах используется SpA, в одной - тетрамер Z-домена (MABSELECT SURE™), а в другой используется мультимер стабилизированного по основанию варианта несвязывающего Fab C-домена, называемого Y-доменом (TOYOPEARL AF-rProtein A-650F). Эти данные и разрешение пиков ($R_s=1, 18([t_{R2}-t_{R1}]/[W1/2_2+W1/2_1])$, где R_s является разрешением пиков, $W1/2$ представляет собой ширину пика на половине высоты, а t_R является временем удерживания), полученные для биспецифичного продукта и связывающегося гомодимера FcFc, подробно описаны в табл. 1.

Табл. 1: сравнение эффективности разделения биспецифичного продукта и связывающихся примесей, получаемого при использовании ряда носителей с белком А с двумя антителами: связывающегося с белком А через V_H (BsAb А) и не связывающегося с белком А через V_H (BsAb В).

Разрешение рассчитывается с использованием ширины на половине высоты. Если ширина пика на половине высоты не может быть вычислена из-за близости пиков, разрешение отмечается как отсутствие ("нет") разрешения.

Смола	Средний размер частиц (мкм)	Матрикс-носитель	Источник белка А	Полученное разрешение ^a (Rs)		
				bsAb А (модификатор: NaCl)	bsAb А (модификатор: CaCl ₂)	bsAb В (модификатор: NaCl)
MABSELECT SURE	85	Агароза	Тетрамер z-домена (модифицированного B-домена)	0,92	1,08	N/M
POROS MABCAPTURE A	45	Поли (стирол дивинилбензол)	Рекомбинантный	0,70	1,83	2,50
TOYOPEARL AF-rProtein A-650F	45	Полиметакрилат	Тетрамер Y-домена (модифицированного C-домена)	0,87	N/M	2,37
ProSep Ultra Plus Affinity	60	Стекло с контролируемым размером пор	Рекомбинантный	Нет разрешения	N/M	N/M
AbSolute High Cap	35	Сферический диоксид кремния, модифицированный для высокой резистентности к pH	Рекомбинантный	0,49	N/M	2,41
MabSelect Xtra	75	Агароза	Рекомбинантный	Нет разрешения	N/M	N/M

При использовании NaCl в качестве модификатора подвижной фазы в буфере для элюирования было отмечено увеличение разрешения в обратной зависимости с размером шариков, с отсутствием разрешения, наблюдаемым для SpA-смол со средним размером частиц более 45 мкм. Интересно, что MABSELECT SURE™ ($R_s=0,92$) имела сравнимую производительность с TOYOPEARL AF-rProtein A-650F ($R_s=0,87$) для bsAb А. Это было неожиданным, вследствие: (i) меньшего среднего размера шариков у TOYOPEARL AF-rProtein A-650F (45 относительно 85 мкм) и (ii) сходства аффинного лиганда, который основан на Y-доме (полученном из C-домена) и поэтому, как ожидается, не имеет связывания через V_H (Starovasnik, см. выше). В случае антител bsAb В, POROS MABCAPTURE A™ обеспечивала превосходное разрешение по сравнению с TOYOPEARL AF-rProtein A-650F и ABSOLUTE HICAP™ (2,50 по сравнению с 2,37 и 2,41 соответственно), несмотря на то, что она не имела меньшего размера частиц. Предположительно, это являлось следствием элемента перфузионного потока в этом матрикс-носителе, обусловленного большими сквозными порами, и средним диаметром пор 1100 ангстрем, способствующим массопередаче. POROS MABCAPTURE A™ также показала лучшее разрешение для bsAb А, чем любая другая SpA-смола с сопоставимым разрешением с не связывающимися с V_H смолами TOYOPEARL AF-rProtein A-650F и MABSELECT SURE™ (0,70 по сравнению с 0,87 и 0,92, соответственно).

Когда NaCl был заменен на CaCl₂ в качестве модификатора подвижной фазы, наблюдалось значительное улучшение разрешающей способности POROS MABCAPTURE A™, опережающей MABSELECT SURE™ со значительным отрывом (R_s 1,83 относительно 1,08, соответственно). На основе совокупности этих данных проводили дополнительную оценку POROS MABCAPTURE A™ и MABSELECT SURE™ в

качестве потенциальных разделяющих хроматографических смол для изократической элюирования.

Поскольку сравнение смол проводили при относительно высокой линейной скорости 400 см/ч, эффективность смолы MABSELECT SURE могла быть снижена относительно POROS MABCAPTURE A из-за (i) большего размера шариков и (ii) отсутствия перфузионного потока. Поэтому, смолы сравнивались при соответствующем диапазоне времени удерживания. Антитело bsAb A было выбрано в качестве модельной молекулы из-за его наблюдаемого связывания с SpA через свою VH-область (таким образом давая большую разницу в avidности между биспецифичным продуктом и примесью FcFc в отношении не связывающейся с VH смолы MABSELECT SURE). Следует обратить внимание, что для этой оценки было выбрано связывающееся через VH антитело, так как без этого можно было бы ожидать, что преимущество в avidности для

MABSELECT SURE было бы ниже из-за меньшего размера шариков MABCAPTURE A. Использовали тот же аффиннозахваченный материал для нанесения bsAb A, который использовали в исследовании по оценке смол, в количестве 10 г общего белка/л смолы. Все хроматографические стадии проводили с 3-минутным временем удерживания, за исключением времени элюирования, которое варьировало в диапазоне от 2 до 8 мин (600-150 см/ч). Расчет разрешения пика биспецифичного продукта и пика гомодимера FcFc показал, что хотя разрешение смол увеличивается с временем удерживания, эффект был более выражен для MABSELECT SURE, чем для POROS MABCAPTURE A (увеличение Rs на 0,7 и 0,3, соответственно, на фиг. 2). Кроме того, смола POROS MABCAPTURE показала лучшее разрешение чем MABSELECT SURE при всех испытанных условиях, несмотря на недостаток VH-связывания для этой смолы, подтверждая общее превосходство смолы в отношении разрешающей способности для двух связывающихся форм антител.

Включение модификаторов подвижной фазы в буфер для элюирования изменяло и потенциально улучшало разрешение биспецифичного продукта и гомодимера FcFc (табл. 1). Таким образом, предполагают, что использование солей, имеющих различное положение в рядах Гофмейстера, улучшает селективность смолы путем ослабления гидрофобных взаимодействий между формами антител и лигандом белком A. Связывающееся через VH антитело bsAb A наносили в количестве 10 г/л на смолу MABCAPTURE A. После серии промывок антитело элюировали с использованием 30 CV градиентом pH от 6 до 3 со следующими модификаторами подвижной элюирующей фазы: цитратом натрия, хлоридом натрия, хлоридом магния и хлоридом кальция, располагающимися в порядке от космотропов к хаотропам в рядах Гофмейстера. Содержание соли 500 мМ использовали для всех солей, кроме цитрата натрия, для которого использовали 250 мМ из-за осаждения белка в наносимом материале при концентрациях выше 300 мМ. Наилучшее разрешение между биспецифичным продуктом и связывающимся гомодимером FcFc было получено с более хаотропными солями (фиг. 3). Пики с биспецифичным антителом собирали от начала подъема первого пика, до перегиба в конце пика, как подробно описано на фиг. 3. Были измерены процент выхода биспецифичного продукта, чистота биспецифичного продукта в процентах, разрешение пиков (Rs) и процент растворимых агрегатов (табл. 2). Значение pH на вершине пика биспецифичного продукта также было рассчитано из хроматограмм. Использование более хаотропных солей (хлорида кальция и хлорида магния) давало повышение выхода и чистоты биспецифичного продукта. Белок также элюировался при более высоком значении pH при использовании хлорида магния и хлорида кальция. Ни наиболее хаотропная, ни наиболее космотропная используемая соль не вызывали существенной агрегации во время элюирования биспецифичного продукта. Таким образом было показано, что использование хаотропных солей, таких как хлорид кальция, в качестве модификаторов подвижной фазы в элюирующем буфере улучшает разрешение пиков и последующую очистку bsAb.

Табл. 2: выход, растворимые агрегаты, pH вершины пика, разрешение пиков и чистота биспецифичного продукта, измеренные для фракций биспецифичного продукта, собранных в ходе градиентной элюирования bsAb A с POROS MABCAPTURE A™ с использованием различных модификаторов мобильной элюирующей фазы.

Модификатор элюирования	pH вершины пика биспецифичного продукта	Выход биспецифичного продукта (%)	Чистота биспецифичного продукта (%)	Пул растворимых агрегатов (%)	Полученное разрешение (Rs)
Цитрат натрия	4,4	83	79	1,9	Нет разрешения
Хлорид натрия	4,2	67	97	N/M	0,54
Хлорид магния	4,6	76	97	N/M	1,66
Хлорид кальция	4,6	100	100	0,79	1,83

Пример 2. Разработка коммерческого процесса

Для определения осуществимости создания платформы для очистки биспецифичных антител на ос-

нове замены со звездочкой был разработан масштабируемый способ очистки bsAb C. Этот белок был выбран в качестве наихудшего тестового соединения для платформы, поскольку было установлено, что он имеет значительное связывание с SpA через VH. Основными целями разработки были: (i) достижение изократической (ступенчатой) элюирования, упрощающей производственное внедрение и перенос технологий при одновременном сокращении потребления буфера и продолжительности процесса, (ii) определение стадии дополнительной очистки, сочетающейся со стадией аффинного разделения с минимальными изменениями условий нанесения или без них.

Первичный скрининг параметров и оценка проектного поля были выполнены с использованием высокопроизводительного скрининга в 96-луночном планшетном формате (HTPD). pH элюирования, загрузка колонки (г общего белка/л) и концентрация модификатора подвижной фазы были определены в качестве ключевых входных технологических параметров (фиг. 2). Также учитывали время удерживания при элюирования. Наносимый материал для этого исследования предварительно подвергали стандартной положительной аффинной хроматографии для удаления примеси Fc*Fc*, что давало чистоту биспецифичного продукта 64%. Чтобы оценить MABSELECT SURE и POROS MABCAPTURE A в режиме изократической элюирования были проведены два исследования по 18 прогонов с использованием центрального композиционного планирования (CCD DoE). Факторами, оцениваемыми для смолы POROS MABCAPTURE, являлись нагрузка на колонку (диапазон 10-25 г общего белка/л), pH элюирования (4,5-5,5) и концентрация хлорида кальция в буфере для элюирования (250-500 мМ). Время удерживания оставляли постоянным, и оно составляло 3 мин (400 см/ч). MABSELECT SURE затем оценивали в отношении нагрузки колонки (диапазон 10-25 г общего белка/л), pH элюирования (3,8-5,0) и времени удерживания при элюирования (5-11 мин). Концентрацию хлорида кальция в буфере для элюирования поддерживали постоянной на уровне 500 мМ.

Для MABCAPTURE A хорошие модели были получены как для выхода биспецифичного продукта ($R^2=0,97$), так и для чистоты биспецифичного продукта ($R^2=0,92$) с использованием стандартного алгоритма аппроксимации методом наименьших квадратов. При всех условиях наблюдалось, что повышение содержания хлорида кальция от 250 до 500 мМ в буфере для элюирования повышало выход биспецифичного продукта на 10-20% без снижения чистоты биспецифичного продукта (данные не показаны). С использованием этой модели был проведен анализ оптимальной точки при 500 мМ CaCl₂. Анализ показал, что элюирование при pH 5,0-5,1 позволила бы достичь чистоты >95% и выхода >80% при загрузке смолы 17-25 г/л. Аналогичные условия хроматографии были использованы для производственных масштабов до 2 тыс.л, а степень чистоты биспецифичного продукта выше 99% была получена после дальнейшей оптимизации.

При оценке данных для MABSELECT SURE было достигнуто хорошее соответствие моделям с выходом биспецифичного продукта ($R^2=0,99$) и чистотой биспецифичного продукта ($R^2=1,00$). Не было показано, что время удерживания является важным фактором для любого ответа. В отношении MABCAPTURE A на кривые были наложены ограничения на 8-й минуте времени удерживания, чтобы исключить области, в которых получаемый биспецифичный продукт имел выход <80%, а степень чистоты биспецифичного продукта составляла <95%. Предпочтительное рабочее окно или оптимальная точка были намного меньше, чем наблюдаемые для MABCAPTURE A. Поэтому использование MABSELECT SURE может дать способ, недостаточно надежный в промышленном масштабе, поскольку небольшие изменения pH или нагрузки могут привести к неприемлемым чистоте или выходу биспецифичного продукта.

Пример 3. Постаффинная доочистка

После стадии аффинного разделения биспецифичное антитело может подвергаться доочистке, предназначенной для удаления связанных с процессом и продуктом примесей, путем, весьма схожим с доочисткой обычных моноклональных антител. Однако использование высокой концентрации хлорида кальция в буфере для элюирования на разделяющей аффинной стадии потенциально может усложнить последующие операции.

Ультрафильтрация/диафильтрация (UF/DF) могут быть использованы для уменьшения проводимости пула антител, для того чтобы облегчить традиционные стадии доочистки mAb, например катионную или анионообменную хроматографию. Однако идентификация стадии солеустойчивой хроматографии в положительном режиме могла бы позволить избежать введения этой дополнительной операции.

Хроматография мультимодальная или в смешанном режиме сочетает в себе различные типы взаимодействий, такие как гидрофобные взаимодействия, образование водородных связей и ионные взаимодействия, на одной смоле. Было отмечено, что это может способствовать солеустойчивой адсорбции.

Множество мультимодальных смол были исследованы для стадии доочистки: (i) CAPTO ADHERE и (ii) CAPTO ADHERE IMPRES (N-метил-бензилэтаноламинный лиганд обеих из них содержит группы, позволяющие анионный обмен, гидрофобные взаимодействия и водородные связи), (iii) керамический гидроксипатит и (iv) CAPTO MMC, мультимодальный катионит с потенциалом гидрофобных взаимодействий и образованием водородных связей. В конечном итоге CAPTO MMC была выбрана для одновременного удаления связанных с процессом и продуктом примесей при одновременном снижении проводимости технологического потока. После разработки процесса правильность концепции была под-

тверждена в промышленном масштабе с использованием хроматографии на CAPTO MMC в положительном режиме с bsAb C и bsAb D (табл.3). В обоих случаях была получена разумная емкость динамического связывания (19-25 г/л) с выходом >85%, вплоть до 3-кратного снижения содержания растворимых агрегатов и умеренной очисткой (уменьшение на 0,2-0,7 лог) от белков клетки-хозяина (CHO).

Табл. 3: выход и удаление загрязнений, достигаемые при мультимодальной хроматографии в положительном режиме с использованием смолы CAPTOMMC, на которую наносят пул после аффинного разделения, содержащий 250 мМ CaCl₂.

Биспецифичная молекула	Загрузка колонки (г общего белка/л)	Растворимые агрегаты в наносимом материале (%)	Растворимые агрегаты в сходящем пуле (%)	Удаление НСР (LRV)	Выход (%)
bsAb C	19	2,4	0,7	0,7	96
bsAb D	23	12,6	4,8	0,2	85

Пример 4. Стратегии очистки

На основании сделанных открытий, описанных выше, предложены две платформы нисходящих процессов очистки биспецифичных антител (фиг. 4). Если биспецифичное антитело получено из семейства VH3-генов и способно связываться с SpA через VH-область, может использоваться дополнительная стадия аффинной хроматографии, называемая захватывающей аффинной хроматографией (фиг. 4A). После удаления клеток и дебриса при сборе, проводят захватывающую аффинную хроматографию с использованием смолы MABSELECT SURE, поскольку отсутствие VH-связывания Z-доменом обеспечивает удаление примеси Fc*Fc*. Эта стадия может быть выполнена с использованием стандартных условий связывания с белком А, промывки и элюирования для коммерческих моноклональных антител, а также повышает концентрацию белка и удаляет связанные с процессом и продуктом примеси. Поскольку белок элюируется при низком pH, снижение pH также подходит для инактивации вирусов в пуле продукта. Вслед за этим, удаление примесей FcFc достигается с помощью второй стадии на белке А в положительном режиме, называемой "аффинной разделяющей хроматографией". Использование смолы POROS MABCAPTURE A в сочетании с хаотропными модификаторами в буфере для элюирования может дать пулы с чистотой >95% по биспецифичному антителу. После аффинной разделяющей хроматографии использование солеустойчивой мультимодальной хроматографии в положительном режиме облегчает прямой переход от аффинной разделяющей хроматографии, таким образом исключая необходимость в промежуточной стадии ультрафильтрации/диафильтрации для удаления хаотропной соли из технологического потока. В сочетании с дополнительной стадией доочистки, такой как анионообменная хроматография и удаляющая вирусы фильтрация, это позволяет удалить агрегаты, НСР, ДНК, вирусы и другие примеси до приемлемого уровня. И наконец, очищенный продукт концентрируют в конечном рецептурном буфере с помощью стандартных методик ультрафильтрации/диафильтрации. Эта последовательность процессов очистки может быть упрощена, если биспецифичная молекула не имеет VH-связывания с SpA, за счет исключения аффинной захватывающей стадии (фиг. 4B). В этом случае удаление обеих примесей, FcFc и Fc*Fc* может быть выполнено с помощью аффинной разделяющей хроматографии.

Пример 5. Материалы и способы

Все биспецифичные антитела и клеточные культуральные жидкости, используемые в данных примерах, были проэкспрессированы (получены) в клетках CHO. Хроматографические смолы были приобретены от их производителей: MABSELECT SURE, MABSELECT XTRA, CAPTO MMC (GE Healthcare), POROS MABCAPTURE A (Life Technologies), TOYOPEARL AF-rProtein A-650F (TOSOH Biosciences), ABSOLUTE HIGH CAP (Novasep Inc.), PROSEP ULTRA PLUS (EMD Millipore). Все используемые химические соединения были поставлены компанией J.T. Baker.

Хроматографические разделения в лабораторном масштабе проводили с использованием хроматографической системы AVANT AKTA от GE Healthcare и хроматографических колонок OMNIFIT BENCHMARK с внутренним диаметром (I.D.) 1,0 см (OmniFit Ltd). Хроматографию в полупромышленном масштабе проводили на хроматографической системе AKTA PILOT и хроматографических колонках INDEX с I.D. 7,0 см от компании GE Healthcare. Промышленную хроматографию проводили на хроматографическом агрегате AKTAPROCESS и колонках CHROMOFLOW с I.D. 40 см (GE Healthcare). UPLC-анализ проводили с использованием UPLC-системы ACQUITY от Waters Corporation. Культивирование клеток проводили с использованием либо 2-литрового настольного биореактора BIOSTAT B-DCU (Sartorius), 50-, 250- или 2000-литрового одноразового биореактора HYCLONE (Thermo Scientific), либо 160-литрового биореактора из нержавеющей стали (ABEC Inc.).

Если осветленная клеточная культуральная жидкость не используется напрямую, то материал для аффинной разделяющей хроматографии получали с помощью аффинной захватывающей хроматографии с использованием колонок MABSELECT SURE с высотой слоя 20±1 см. После уравнивания двумя объемами колонки (CV) 20 мМ фосфата натрия, pH 7,2, на колонки наносили по 10-40 г связывающегося антитела/л с осветленной клеточной культуральной жидкостью. Концентрацию связывающегося антите-

ла определяли путем суммирования титров биспецифичного антитела и FcFc. Колонки промывали, и белок элюировали запатентованной буферной системой перед отмывкой колонки 2 CV. Весь элюирующийся пик собирали и нейтрализовали до pH $7,5 \pm 0,5$ с использованием 2M Tris-основания.

Аффинную разделяющую хроматографию проводили с использованием колонки с высотой слоя 20 ± 1 см. Исследуемые колонки с белком А уравнивали двумя объемами колонки 2 0 мМ фосфата натрия, pH 7,2, перед нанесением материала. После нанесения материала колонки промывали запатентованной буферной системой и белок элюировали градиентной или изократической элюцией, как указано. При изократических прогонах использовали четыре CV в качестве объема элюирования, собирая пул от 0,5 до 4 CV после начала стадии элюирования. Оба буфера для градиентной и изократической элюирования содержали 40 мМ ацетат в составе буфера. После элюирования колонки отмывали 2 CV буфера. Если не указано иное, то все стадии выполняли с линейной скоростью 400 см/ч. Программное обеспечение UNICORN 6.1 (GE Healthcare) использовали для хроматографического анализа, включая вычисление разделения пиков (Rs), предполагая гауссовое распределение пиков с использованием метода ширины на половине высоты. При проведении автоматизированного фракционирования начало пика определяли как превышение на 50 mAu относительно базовой линии при длине волны 280 нм. Статистическое планирование экспериментов, анализ и моделирование проводили с использованием JMP 11.1.1 (SAS Institute Inc.).

Хроматографию на CAPTO MMC проводили с использованием 2 5,1-литровых колонок (высота слоя 20 см; I.D. 40 см) со всеми стадиями, выполняемых при 4-минутном времени удерживания (линейная скорость 300 см/ч). Пулы после аффинного разделения разбавляли на 50% водой и подводили pH до $5,0 \pm 0,1$. Колонки предварительно уравнивали 2 CV 2M NaCl перед уравниванием 2 CV 40 мМ ацетата натрия, 250 мМ хлорида кальция, pH $5,0 \pm 0,1$. После нанесения материала колонки промывали 3 CV 40 мМ Tris, 40 мМ ацетата, pH $5,0 \pm 0,1$, и продукт затем элюировали 8 CV либо 20 мМ Tris, 60 мМ ацетата, pH $8,0 \pm 0,1$ (BsAb C), либо 20 мМ Tris, 40 мМ ацетата, pH $8,0 \pm 0,1$ (BsAb D). Пулы собирали, начиная от подъема базовой линии при 280 нм до конца стадии элюирования. После элюирования колонки отмывали 2 CV 2M NaCl, а затем 2 CV 1M NaOH.

Количественную оценку содержания белков клеток-хозяев ("HCP") проводили с использованием коммерчески доступного набора ELISA, кат.№ F550 (Cygnus Technologies). Количественную оценку содержания растворимых агрегатов проводили последовательно на двух эксклюзионных колонках ACQUITY UPLC Prst, 200 ангстрем, 1,7 мкм, 4,6 мм × 150 мм, кат. № 186005225 в подвижной фазе, содержащей 10 мМ фосфат натрия, 500 мМ хлорид натрия, pH 7,0. Чистоту биспецифичного продукта измеряли с использованием последовательно трех предварительно набитых колонок POROS A 20 мкм (2,1 мм × 30 мм, 0,1 мл), кат. № 2-1001-00 и изократической элюирующей буферной системы. Титры биспецифичного антитела и FcFc-антитела измеряли с использованием колонки POROS A 20 мкм (2,1 мм × 30 мм, 0,1 мл), кат. № 2-1001-00, а титры Fc*Fc*-антитела измеряли, нанося проскок на колонку POROS G 20 мкм (2,1 мм × 30 мм, 0,1 мл).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки белка, включающий:

(a) нанесение на аффинный матрикс смеси мультимерных белков, содержащей (i) первый гомодимер, содержащий две копии первого полипептида, и (ii) гетеродимер, содержащий первый полипептид и второй полипептид, где первый полипептид обладает большей аффинностью к аффинному матриксу, чем второй полипептид, где аффинный матрикс содержит лиганд инженерного белка А, который содержит тетрамер Z-домена, прикрепленный к подложке, где подложка представляет собой частицу, и аффинный матрикс содержит множество частиц со средним диаметром от 45 до 60 мкм; и

(b) элюирование и сбор гетеродимера с аффинного матрикса в буфере, содержащем хаотропный агент и имеющем первый диапазон pH от 3,6 до 5,5,

где первый гомодимер элюируется с аффинного матрикса в буфере при втором диапазоне pH, более низком, чем первый диапазон pH.

2. Способ по п.1, в котором смесь мультимерных белков содержит второй гомодимер, содержащий две копии второго полипептида, и в котором второй гомодимер элюируется с аффинного матрикса в буфере при третьем диапазоне pH, где третий диапазон pH имеет более высокое значение pH, чем первый диапазон pH, который включает более высокий pH, чем второй диапазон pH.

3. Способ по п.2, включающий стадии:

(c) вымывание второго гомодимера из первого аффинного матрикса в промывочном буфере;

(d) элюирование и сбор первого гомодимера и гетеродимера с аффинного матрикса и

(e) нанесение на второй аффинный матрикс смеси, содержащей первый гомодимер и гетеродимер, собранный на стадии (d);

где стадии (c), (d) и (e) предшествуют стадии (b).

4. Способ по п.1 или 3, включающий стадии:

(f) нанесение собранного гетеродимера из стадии (b) или стадии на мультимодальную хроматогра-

фическую смолу в буфере, имеющем кислый pH;

(g) элюирование гетеродимера с мультимодальной хроматографической смолы в буфере, имеющем более щелочной pH; и

(h) сбор гетеродимера.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором подложка включает один или несколько из агарозы, поли(стиролдивинилбензола), полиметакрилата, целлюлозы, стекла с контролируемым размером пор и сферического диоксида кремния.

6. Способ по любому из пп.1-4, в котором частицы имеют средний диаметр 45 мкм.

7. Способ по любому из пп.1-4, в котором частицы имеют средний диаметр 60 мкм.

8. Способ по п.6, в котором частицы имеют средний диаметр 45 мкм и содержат поры со средним диаметром 1100 ангстрем.

9. Способ по любому из пп.1-8, в котором от 5 до 50 г белка наносят на литр аффинного матрикса.

10. Способ по любому из пп.1-9, включающий промывку нагруженного аффинного матрикса из стадии (a) раствором при pH 6-8 перед элюированием и сбором гетеродимера.

11. Способ по п.1, в котором буфер содержит ацетат.

12. Способ по п.11, в котором буфер содержит 40 mM ацетата.

13. Способ по любому из пп.1-12, в котором соль содержит анион, выбранный из списка, состоящего из хлорида, нитрата, бромиды, хлората, йодида, перхлората и тиоцианата; и катион, выбранный из группы, состоящей из лития, магния, кальция и гуанидина.

14. Способ по п.13, в котором хаотропный агент включает CaCl_2 или MgCl_2 .

15. Способ по п.14, в котором хаотропный агент содержит 250-500 mM CaCl_2 .

16. Способ по п.1, в котором первый полипептид содержит СНЗ-домен, который способен связываться с белком А, и второй полипептид содержит СНЗ-домен, который не способен связываться с белком А.

17. Способ по п.16, в котором второй полипептид содержит замену НУ на RF в своем СНЗ-доме.

18. Способ по п.16 или 17, в котором гетеродимер содержит биспецифичное антитело.

19. Способ по п.18, в котором биспецифичное антитело содержит VH3-домен IgG.

20. Способ по п.1, в котором смесь мультимерных белков получают с помощью множества эукариотических клеток в клеточной культуре, необязательно, где эукариотические клетки включают клетки яичника китайского хомячка (СНО) или их производные.

21. Гетеродимер, полученный способом по любому из пп.1-20.

22. Способ очистки белка, включающий:

(a) нанесение на аффинный матрикс смеси мультимерных белков, содержащей (i) первый гомодимер, содержащий две копии первого полипептида, и (ii) гетеродимер, содержащий первый полипептид и второй полипептид, где первый полипептид обладает большей аффинностью к аффинному матриксу, чем второй полипептид, где аффинный матрикс содержит лиганд белка А, прикрепленный к подложке, где подложка представляет собой частицу, и аффинный матрикс содержит множество частиц со средним диаметром 45 мкм и включающих поры со средним диаметром 1100Å; и

(b) элюирование и сбор гетеродимера с аффинного матрикса в буфере, содержащем CaCl_2 или MgCl_2 и имеющем первый диапазон pH от 3,6 до 5,5,

где первый гомодимер элюируется с аффинного матрикса в буфере при втором диапазоне pH, более низком, чем первый диапазон pH.

23. Способ по п.22, в котором смесь мультимерных белков содержит второй гомодимер, содержащий две копии второго полипептида, и в котором второй гомодимер элюируется с аффинного матрикса в буфере при третьем диапазоне pH, где третий диапазон pH имеет более высокое значение pH, чем первый диапазон pH.

24. Способ по п.22, в котором буфер содержит CaCl_2 .

25. Способ по п.22, в котором буфер содержит MgCl_2 .

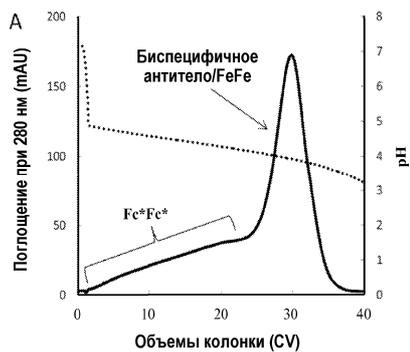
26. Способ по п.24, в котором буфер содержит 250-500 mM CaCl_2 .

27. Способ по п.25, в котором буфер содержит 250-500 mM MgCl_2 .

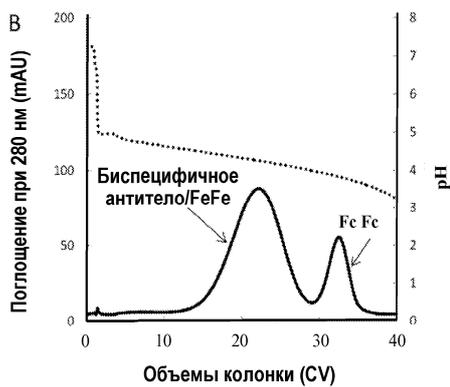
28. Способ по любому из пп.22-27, в котором первый полипептид содержит СНЗ-домен, который способен связываться с белком А, и второй полипептид содержит СНЗ-домен, который не способен связываться с белком А.

29. Способ по п.28, в котором второй полипептид содержит замену НУ на RF в своем СНЗ-доме.

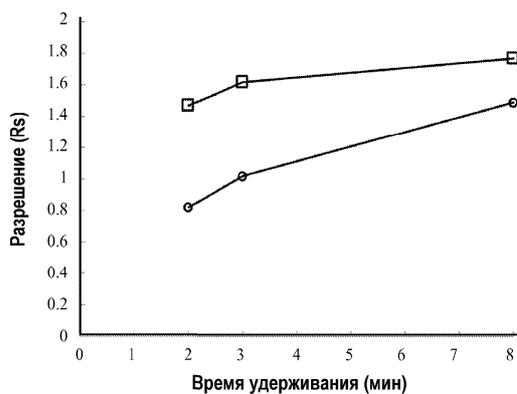
30. Способ по п.28 или 29, в котором гетеродимер представляет собой биспецифичное антитело.



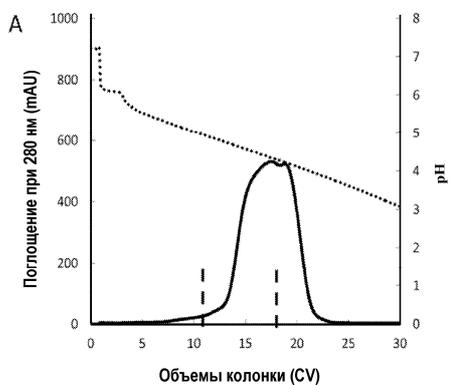
Фиг. 1А



Фиг. 1В

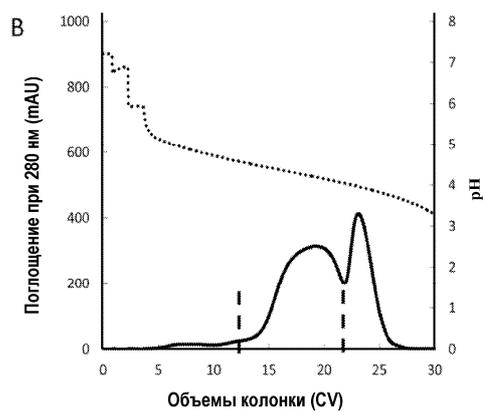


Фиг. 2

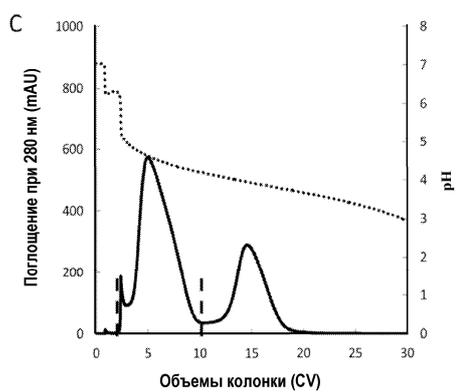


Фиг. 3А

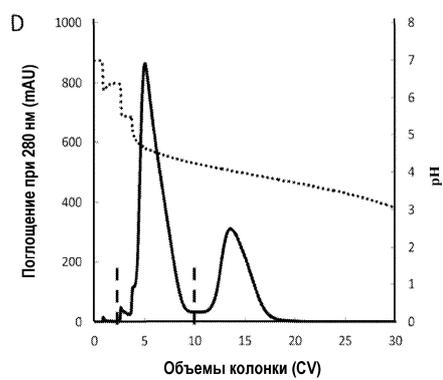
036154



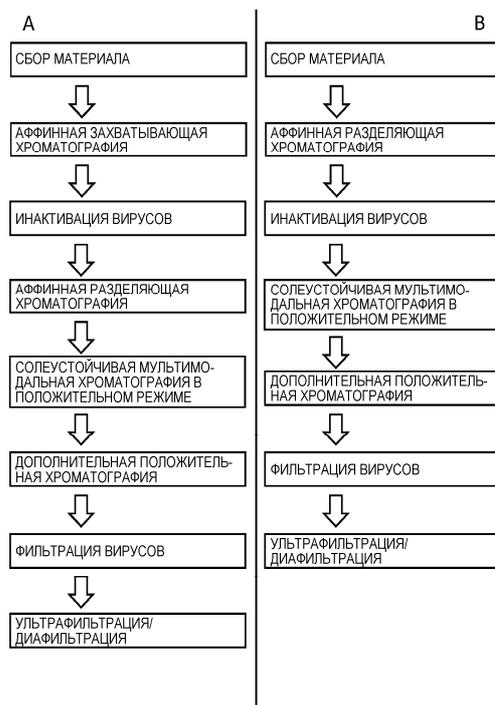
Фиг. 3В



Фиг. 3С



Фиг. 3Д



Фиг. 4