

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039002**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.19

(51) Int. Cl. **C07K 1/18** (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)

(21) Номер заявки
201791423

(22) Дата подачи заявки
2015.12.18

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКА

(31) 14199722.1

(32) 2014.12.22

(33) EP

(43) 2017.10.31

(86) PCT/EP2015/080526

(87) WO 2016/102378 2016.06.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮСБ БИОФАРМА СПРЛ (BE)

(72) Изобретатель:
**Иллидж Кристофер Марк, Уотсон
Нейл Алэн (GB)**

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

(56) C. WANG ET AL.: "High Recovery Refolding of rhG-CSF from Escherichia coli, Using Urea Gradient Size Exclusion Chromatography", BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 24, no. 1, 1 February 2008 (2008-02-01), pages 209-213, XP055200242, ISSN: 8756-7938, DOI: 10.1021/bp070263y, abstract, page 210, left-hand column, page 212, left-hand column

WO-A2-2008076933
WO-A1-2007003898

ROBERTS M J ET AL.: "Chemistry for peptide and protein PEGylation", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 54, no. 4, 17 June 2002 (2002-06-17), pages 459-476, XP002354432, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/S0169-409X(02)00022-4 page 466

CHAPMAN A P ED - MATTOUSSI HEDI ET AL.: "PEGYLATED ANTIBODIES AND ANTIBODY FRAGMENTS FOR IMPROVED THERAPY: A REVIEW", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 54, no. 4, 17 June 2002 (2002-06-17), pages 531-545, XP001199533, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/S0169-409X(02)00026-1, the whole document

HUMPHREYS DAVID P ET AL.: "Alternative antibody Fab' fragment PEGylation strategies: combination of strong reducing agents, disruption of the interchain disulphide bond and disulphide engineering", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, OXFORD JOURNAL, LONDON, GB, vol. 20, no. 5, 1 May 2007 (2007-05-01), pages 227-234, XP002523873, ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/PROTEIN/GZM015, abstract, page 228; figure 2, page 233 - page 234

(57) Настоящее изобретение предоставляет новый способ получения белка, в частности, где указанный белок должен быть соединен с другой молекулой. Изобретение дополнительно предоставляет способ получения белка в производственных масштабах с целью получения белков, например, для лечебных целей.

B1

039002

039002 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области очистки белка. Более конкретно оно относится к способу очистки антител и фрагментов антител.

Уровень техники, к которому относится изобретение

В области терапевтических средств всегда имело место и обладало важностью применение белков и антител, а также полученных из антител молекул в частности и, следовательно, одновременно с этим развивалась потребность в контролируемом способе их получения. Коммерциализация терапевтических белков требует их получения в большом количестве. С этой целью белок часто экспрессируют в клетке-хозяине с его последующим восстановлением и очисткой, предшествующим его переводу в применяемую форму.

В зависимости от белка, которому предстоит экспрессирование, выбираемая клетка-хозяин может представлять собой клетку-хозяина млекопитающего, часто клетку СНО (яичника китайского хомячка), или бактериальную клетку-хозяина. В первом случае белок обычно выделяется в надосадочную жидкость клеточной культуры, которую восстанавливают и раствор далее подвергают процедуре очистки белка.

В случае когда клетка-хозяин представляет собой грамтрицательную прокариотическую клетку, часто предпочтительная экспрессирующая система включает только что синтезированный белок, аккумуляруемый в ней и выделяемый из периплазматического пространства. В этом случае после достижения желаемого уровня экспрессии белка именно клетки собирают и подвергают обработке. Белок далее восстанавливают посредством подвергания собранных клеток процессу выделения белка, который включает высвобождение белка из периплазмы в раствор с последующим удалением клеточного детрита и прочих примесей. Эти стадии с момента сбора клеток до высвобождения белка обычно включены в понятие того, что называют первичным восстановлением. Полученный раствор, содержащий белок, далее подвергают процедуре очистки белка. Предпочтительные грамтрицательные прокариотические клетки, применяемые для периплазматической экспрессии, в целом представляют собой штаммы *Escherichia coli* или клетки *Pseudomonas fluorescens*.

Очистка белка от сложных смесей адаптирована к целевому белку. В случае антител и продуктов, полученных из антител, очистка обычно включает первую стадию захвата продукта при помощи хроматографии, что обеспечивает первичную очистку и значительное концентрирование продукта. За первой стадией обычно следует одна или более дополнительных стадий хроматографии, используемых для снижения количества нежелательных примесей, таких как примеси клетки-хозяина, среды, технологические примеси и родственные примеси.

В последние годы все более часто различные белки, включая антитела и полученные из антител фрагменты, связывают с другой молекулой, выполняющей определенную функцию, это применимо как к диагностической, так и к терапевтической целям, и это всего лишь несколько примеров воздействия на антитело определенным набором клеток, и в качестве альтернативы это может быть лекарственное средство, чье место приложения действия является целью антитела, или молекула может быть предназначена для повышения периода полувыведения антитела у животного. Последнее является, в частности, случаем, касающимся антигенсвязывающих фрагментов антитела, которые обладают склонностью быстро вымываться из кровотока животных.

Различные молекулы можно связывать с белком при помощи реактивной группы в белке, которая либо имеется в белке изначально, либо вводится в него искусственно при помощи методов белковой инженерии. Часто предпочитаемыми реактивными группами для связывания белка со второй молекулой являются тиольные группы, присутствующие в непарных остатках цистеина. В этом смысле шарниры антитела представляют собой типичные области для сайт-специфической реакции, поскольку они содержат остатки цистеина и удалены от других областей антитела, которые могут быть вовлечены в связывание антигена. Например, реакция с полиэтиленгликолем (PEG, ПЭГ) или пегилирование тиольных групп является хорошо известным подходом к сайт-специфическому пегилированию, для которого доступно множество тиоло-специфических реагентов.

Несмотря на это, в нативных белках остатки цистеина обычно включены в дисульфидные мостики или отвечают за взаимодействие с металлами или другими белками. Таким образом, с целью достижения сайт-специфического связывания эти реакционно-способные группы должны находиться в правильной конформации, т.е. их тиольные группы должны быть свободны, чтобы обеспечить их реакцию. Например, пегилирование Г-КСФ (гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, G-CSF) по одному цистеиновому остатку описано у Veronese et al. *Bioconjugate Chemistry* 2007 Nov-Dec;18(6):1824-30, в соответствии с которым пегилирование проводят в переходных денатурирующих условиях. Также в известном уровне техники имеют место попытки оптимизировать способы для получения белка оптимальной конформации с целью обеспечения его последующей реакции с желаемой молекулой. Например, в заявке WO 2007/003898 описывается определенная стадия диавосстановления, включенная после очистки Fab' для его приготовления к последующей реакции с ПЭГ. Во многих случаях, как и с Fab', желательно селективно воздействовать на один или более целевые цистеины для конъюгации без восстановления других цистеинов, присутствующих в белке. Например, в этом случае Fab' имеет нативную внутрицепо-

чечную дисульфидную связь между тяжелой и легкой цепью константной области, и поэтому для селективного восстановления целевого цистеина на других участках антитела, например, в шарнирной области восстановление следует проводить таким образом, чтобы дисульфидная цепь оставалась интактной, а реакция с межцепочечными цистеинами была исключена. Обычно этого достигают при помощи того, что считают умеренными восстанавливающими условиями. Несмотря на это, принимая во внимание то, что восстановление является типичной химической реакцией, даже в указанных умеренных восстанавливающих условиях различные соединения, присутствующие в сложной смеси, способны реагировать в восстанавливающей среде, что приводит к изменению свойств, таких как характер связывания, но не ограничиваясь им, что может повлиять на дальнейшую очистку белка. По этой причине стадии восстановления, описанные в известном уровне техники, проводят сразу после очистки белка. Далее желаемый конъюгат белка должен быть очищен от непрореагировавшего белка или других нежелательных конъюгатов. Эффективность этой реакции связывания напрямую связана с производственной эффективностью и ассоциированными производственными затратами.

С учетом вышеизложенного в области техники существует дополнительная потребность в предоставлении улучшенных способов получения белка, в частности, в которых получаемый белок должен быть соединен со второй молекулой.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 демонстрирует проведенный при помощи эксклюзионной ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии) анализ образцов, полученных в реакции пегилирования Fab'1, восстановленного из двух параллельных процессов очистки, проводимых в периплазматическом экстракте *E. coli*, полученном от клеток, экспрессирующих Fab'1. Один способ осуществляют в контролируемых условиях, т.е. без глутатиона, в то время как во втором способе белок поддерживают в присутствии 1 ммоль глутатиона с первой стадии хроматографии для захвата белка до конечной стадии хроматографии. HMWS обозначает количество соединений или агрегатов с высокой молекулярной массой, мономер обозначает количество Fab'1, соединенного с ПЭГ, diFab' обозначает количество димеров Fab', и Fab' обозначает количество оставшегося несвязанным Fab'1.

Фиг. 2 демонстрирует проведенный при помощи эксклюзионной ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии) анализ образцов, полученных в реакции пегилирования CDP870 Fab', восстановленного из периплазматического экстракта *E. coli*, полученного из клеток, экспрессирующих CDP870 Fab', с последующей очисткой при поддержании белка в присутствии 1 ммоль глутатиона с первой стадии хроматографии для захвата белка до конечной стадии хроматографии. HMWS обозначает количество соединений или агрегатов с высокой молекулярной массой, мономер обозначает количество CDP870 Fab', соединенного с ПЭГ, diFab' обозначает количество димеров CDP870 Fab'Fab'2, и Fab' обозначает оставшееся несоединенным количество.

Фиг. 3 демонстрирует проведенный при помощи эксклюзионной ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии) анализ образцов, полученных в реакции пегилирования Fab'1, восстановленного из периплазматического экстракта *E. coli* и очищенного в соответствии со способом известного уровня техники. HMWS обозначает количество соединений или агрегатов с высокой молекулярной массой, мономер обозначает количество Fab'1, соединенного с ПЭГ, diFab' обозначает количество димеров Fab'1, и Fab' обозначает количество оставшегося несвязанным Fab'1.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение решает определенную ранее потребность в предоставлении нового способа получения белка, в частности, где указанный белок должен быть связан с другой молекулой, в частности, в промышленном получении белка для получения белков, например, для терапевтических целей.

В первом варианте осуществления изобретение предоставляет способ получения белка, включающий

а) экспрессию белка в клетке-хозяине;

б) очистку указанного белка от смеси, содержащей клетки-хозяева и другие загрязняющие вещества, где эта очистка включает по меньшей мере одну стадию хроматографии и где восстанавливающее средство добавляют к указанной смеси, и белок поддерживают в присутствии указанного восстанавливающего средства с первой стадии хроматографии до последней стадии хроматографии.

Обычно первая стадия хроматографии выступает в качестве стадии захвата белка, для которого существуют различные стадии хроматографии, доступные специалисту в данной области техники, например, такие как хроматография с применением гранулированных смол или мембран с подходящей функциональностью в качестве твердой фазы для применения в аффинной хроматографии, катионная хроматография, анионная хроматография, хроматография со смешанным режимом, гидрофобная хроматография или гидрофобная хроматография с индуцированием заряда. Захват продукта обычно происходит в режиме связывания с последующим элюированием, где связывание белка, представляющего интерес, твердой фазой позволяет примесям, таким как загрязняющие примеси, проходить через хроматографическую среду, в то время как интересующий белок остается связанным с твердой фазой. Связанный белок, представляющий интерес, далее восстанавливают из твердой фазы при помощи элюирующего буфера, который разрывает механизм, при помощи которого белок, представляющий интерес, связывается с указанной твердой фазой. Наиболее подходящая стадия захвата продукта будет определяться на основании

природы белка, предназначенного для очистки, например, часто применяемой стадией захвата при получении полноразмерного антитела является аффинная хроматография на основе белка А.

В конкретном варианте осуществления изобретения указанная первая стадия хроматографии представляет собой стадию катионообменной хроматографии, где белок, представляющий интерес, связывается с хроматографической средой и далее элюируется в первый элюат, содержащий белок.

В дополнительном конкретном варианте осуществления способа изобретения восстанавливающее средство присутствует в буферах, применяемых в процессе указанной катионообменной хроматографии. Более конкретно восстанавливающее средство присутствует в загрузочном буфере, промывочном буфере и элюирующем буфере.

Как обсуждалось в предыдущем разделе, за первой стадией хроматографии в целом следует одна или более последующих стадий хроматографии для помощи в дополнительном удалении примесей, обычно остаточных технологических примесей и родственных примесей. В целом эти стадии будут использовать стадию неаффинной хроматографии с применением твердой фазы с подходящей функциональностью для применения в гельфильтрационной хроматографии, катионной хроматографии, анионной хроматографии, хроматографии со смешанным режимом, гидрофобной хроматографии или гидрофобной хроматографии с индуцированием заряда. Это может происходить в режиме связывания с последующим элюированием или в проточном режиме. В проточном режиме примеси связываются или имеют пониженную подвижность в твердой фазе, в то время как целевой белок восстанавливается в элюате или проходит через фракцию.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения за первой стадией хроматографии следует стадия анионообменной хроматографии для захвата примесей и получения фильтрата, содержащего белок.

В дополнительном конкретном варианте осуществления способа изобретения восстанавливающее средство присутствует в буферах, применяемых в процессе указанной анионообменной хроматографии для захвата примесей и получения фильтрата, содержащего белок. Более конкретно восстанавливающее средство присутствует в загрузочном буфере и в элюирующем буфере.

В дополнительном конкретном варианте осуществления способа изобретения стадия очистки белка смеси включает первую стадию хроматографии, которая представляет собой катионообменную хроматографию, при которой элюируется первый элюат, содержащий белок, и вторую стадию хроматографии, которая представляет собой анионообменную хроматографию для получения фильтрата, содержащего белок.

В дополнительном конкретном варианте осуществления способа изобретения восстанавливающее средство присутствует в процессе указанной катионообменной хроматографии и в процессе указанной анионообменной хроматографии. Более конкретно, указанное восстанавливающее средство присутствует в буферах, применяемых в процессе указанной катионообменной хроматографии и указанной анионообменной хроматографии. В дополнительных вариантах осуществления одна или более стадий ультрафильтрации и диафильтрации (UF/DF) проводятся между стадиями хроматографии. При получении белка в производственных масштабах это обычно осуществляют при помощи стадии тангенциальной поточной фильтрации на основе мембран, проводимой с целью концентрирования продукта и замены буфера. Эти мембраны обычно незначительно связывают белки и имеют специфическое номинальное отсечение по молекулярной массе для предотвращения потери продукта, например, они включают полиэфирсульфоновые (PES) мембраны с номинальным отсечением по молекулярной массе 10 кДа (T-series Omega PES membrane от Pall Life Sciences) или регенерированную целлюлозу с номинальным отсечением по молекулярной массе 10 кДа (Delta Regenerated Cellulose Membrane от Pall Life Sciences).

Стратегия очистки может включать любые из этих стадий в различных комбинациях для соответствия физико-химическим свойствам целевого белка. Конкретная стратегия очистки, которую можно применять в соответствии со способом настоящего изобретения, раскрыта в заявке WO 2012/013682, включенной в эту заявку во всех полноте.

В дополнительном конкретном варианте осуществления способа изобретения стадия очистки белка от смеси включает первую стадию хроматографии, которая представляет собой катионообменную хроматографию, при которой элюируют первый элюат, содержащий белок, первую стадию ультрафильтрации или диафильтрации, применяемые к первому элюату, вторую стадию хроматографии, которая представляет собой анионообменную хроматографию для получения фильтрата, содержащего белок; и вторую стадию ультрафильтрации или диафильтрации, применяемые к фильтрату. Более конкретно, восстанавливающее средство присутствует во всех буферах, применяемых в процессе указанной катионообменной хроматографии, при которой элюируют первый элюат, в процессе указанной первой стадии ультрафильтрации или диафильтрации, применяемым к первому элюату, и в процессе указанной второй стадии хроматографии, которая представляет собой анионообменную хроматографию для получения фильтрата, содержащего белок.

В альтернативном варианте осуществления стадия очистки белка от смеси включает первую стадию хроматографии, при которой элюируют первый элюат, первую стадию ультрафильтрации или диафильтрации, применяемые к первому элюату, вторую стадию хроматографии, проводимую в режиме связыва-

ния с последующим элюированием, при которой элюируют второй элюат, содержащий белок. Предпочтительно восстанавливающее средство присутствует во всех буферах, применяемых в процессе указанной первой стадии хроматографии, при которой элюируют первый элюат, содержащий белок, и в процессе указанной первой стадии ультрафильтрации и диафильтрации, применяемых к первому элюату, где белок восстанавливают в присутствии восстанавливающего средства и применяют к указанной второй стадии хроматографии, где белок, восстановленный в элюате из указанной второй стадии хроматографии, обычно не содержит восстанавливающее средство.

Существует несколько восстанавливающих средств, доступных для специалисту в области техники. Наиболее подходящее восстанавливающее средство можно определить эмпирически, например, путем определения восстановленного состояния целевого тиола в образце восстановленного белка, например, применяя анализ свободного тиола, как описано у Lyons et al. 1990, Protein Engineering 3, 703. Наиболее подходящее восстанавливающее средство также можно выбирать посредством определения количества нежелательных разрывов интра- и интердисульфидных связей в образце восстановленного белка или, в качестве альтернативы, посредством определения количества желаемых прореагировавших молекул белка, восстановленных, например, при помощи аналитической эксклюзионной или обращенно-фазовой ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии). Эксклюзионная ВЭЖХ разделяет частицы на основании размера молекул, при этом крупные молекулы проходят через колонку быстрее, чем более мелкие. С другой стороны, обращенно-фазовая ВЭЖХ работает по принципу гидрофобных взаимодействий, при этом связывание молекулы с неподвижной фазой пропорционально площади поверхности контакта вокруг неполярного сегмента молекулы с лигандом неподвижной фазы; время удерживания больше для молекул, которые обладают меньшей молярностью. В обоих случаях наличие или отсутствие дисульфидных связей приводит к получению соединений, имеющих разные профили элюции.

Во втором варианте осуществления способа изобретения восстанавливающее средство выбирают из глутатиона, β -меркаптоэтанола, β -меркаптоэтиламина, трис(2-карбокsetил)фосфин цистеина и комбинаций вышеперечисленных веществ.

В третьем варианте осуществления способа изобретения восстанавливающее средство представляет собой от 0,1 до 100 ммоль глутатиона. Количество восстанавливающего средства можно корректировать в зависимости от белка, который требуется получить. В дополнительном конкретном варианте осуществления изобретения указанное восстанавливающее средство представляет собой от 0,1 до 20 ммоль, от 0,1 до 10 ммоль, от 0,5 до 5 ммоль, предпочтительно от 0,5 до 2 ммоль глутатиона.

Во избежание сомнений термин "глутатион" согласно настоящему документу обозначает мономерный или восстановленный глутатион, в соответствии с регистрационным номером CAS 70-18-8.

В четвертом варианте осуществления способа изобретения восстанавливающее средство удаляют из восстановленного белка.

Существуют различные способы для удаления восстанавливающих средств из раствора, известные специалисту в области техники, любой из которых может быть подходящим для настоящего способа, включая диафильтрацию, гель-фильтрацию, диализ или дополнительную стадию хроматографии. В альтернативном варианте осуществления способа изобретения восстанавливающее средство удаляют из образца белка при помощи диафильтрации.

В пятом варианте осуществления изобретения белок соединяют с другой молекулой.

В целом, этот процесс связывания белка с другой молекулой проводят в сольвенте, например, в водном буферном растворе, таком как фосфатный, цитратный или ацетатный. Обычно он представляет собой буфер, в который белок диафильтруют или переносят путем гель-фильтрации. Реакцию в целом можно проводить при любой подходящей температуре, например, между приблизительно 5°C и приблизительно 70°C, например, при комнатной температуре, т.е. при 20, 21 или 22°C. Буфер может опционально содержать хелатообразующее средство, такое как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК, EDTA), этиленгликольтетрауксусная кислота (EGTA), циклогексантранс-1,2-диаминтетрауксусная кислота (CDTA) или диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТРА). В качестве альтернативы или дополнения буфер может являться хелатирующим буфером, таким как лимонная кислота, щавелевая кислота, фолиевая кислота, бисцин, трицин или трис. Молекулу в целом применяют, по меньшей мере, в эквивалентной концентрации относительно концентрации белка, т.е. по меньшей мере в соотношении 1:1. Обычно молекулу применяют в избыточной концентрации относительно концентрации белка. Обычно молекулу применяют в 1,1-100-кратном молярном избытке, предпочтительно в 1,1-, 1,5-, 2-, 3-, 5-, 10- или 50-кратном молярном избытке. Дополнительные примеры подходящих концентраций включают 1,2-, 1,25-, 1,3- и 1,4-кратный молярный избыток. В качестве альтернативы, при соединении двух или более белков с одной молекулой указанная молекула может не находиться в избыточном количестве, например, соотношение молекулы и белка может быть между 0,1 и 1, предпочтительно составляет 0,5. Продолжительность реакции специалист в области техники может определить эмпирически, обычно она происходит в течение периода времени между 1 и 20 ч. В одном варианте осуществления реакция происходит в течение периода времени, равного 17 ч.

При необходимости желаемый белок, соединенный с другими молекулами, можно отделить от лю-

бых исходных материалов или других продуктов, образующихся в процессе, при помощи традиционных способов, например при помощи хроматографических методов, таких как ионообменная, эксклюзионная хроматография или хроматография с гидрофобным взаимодействием. Таким образом, в одном варианте осуществления способ настоящего изобретения дополнительно включает дополнительную стадию, в которой восстанавливают белок, соединенный с другой молекулой.

Указанное соединение может проходить с одним или более цистеинов. Специалист в области техники может эмпирически установить количество цистеинов в белке, доступных для соединения, например, путем определения количества свободных тиолов, полученных после того, как белок обработали восстанавливающим средством. Способы определения количества свободных тиолов хорошо известны в области техники, обратитесь, например, к Lyons et al., 1990, *Protein Engineering*, 3, 703. В качестве альтернативы специалист в области техники может анализировать конечные соединения, полученные из вышеупомянутой реакции, например, при помощи аналитической обращенно-фазовой или эксклюзионной ВЭЖХ. В качестве альтернативы белки можно модифицировать при помощи различных техник генной инженерии или белковой инженерии для введения цистеинов в белок с целью применения в качестве сайтов соединения. Таким образом, цистеины, применяемые для соединения, могут появляться в белке естественным путем и/или могут быть встроены в белок при помощи технологии рекомбинантных ДНК. Соответственно количество и локализацию цистеинов, доступных для соединения, можно специфически контролировать в зависимости от предполагаемого применения белка и количества требуемых конъюгированных молекул.

В шестом варианте осуществления способа изобретения белок соединяют с другой молекулой при помощи ковалентного связывания с остатком цистеина белка.

В альтернативном варианте осуществления способа изобретения белок соединен с двумя или более молекулами при помощи остатков цистеина.

В седьмом варианте осуществления способ изобретения дополнительно включает стадию восстановления белка, соединенного с другой молекулой.

В восьмом варианте осуществления способа изобретения белок представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В девятом варианте осуществления способа изобретения указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab'.

В дополнительном альтернативном варианте осуществления указанный Fab' специфически связывается с фактором некроза опухолей альфа (ФНО альфа). В еще одном дополнительном более специфическом варианте осуществления указанный Fab', который специфически связывает с ФНО альфа, представляет собой CDP870, как раскрыто в заявке WO 01/094585, которая включена в эту заявку во всей полноте.

В десятом варианте осуществления способа изобретения указанный цистеин в указанном антителе или антигенсвязывающем фрагменте представляет собой шарнир антитела.

Как известно специалисту в области техники, возможно соединить указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент с различными молекулами в зависимости от желаемого эффекта. Таким образом, указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент можно соединить, например, с противоопухолевым средством, лекарственным средством, токсином или биологически активным пептидом. С другой стороны, указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент можно связывать с инертной частицей, чтобы увеличить ее период полувыведения из кровотока, например, с существующим в природе белком, таким как альбумин, или с синтетическим полимером, таким как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

В одиннадцатом варианте осуществления способа изобретения указанная молекула представляет собой молекулу полиэтиленгликоля (ПЭГ).

Молекулы ПЭГ получают при полимеризации этилен оксида, и они имеются в продаже в широком диапазоне молекулярных масс от 300 до 10000000 Да. Молекулы ПЭГ в соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения могут быть линейными или разветвленными, могут быть приобретены коммерчески или химически синтезированы в соответствии с известными способами. В то время как молекулы ПЭГ с различной молекулярной массой находят свое применение в различных условиях применения и имеют различные физические свойства, такие как вязкость, по причине влияния длины цепи, их химические свойства значительно не различаются. Размер полимера можно, в частности, выбирать на основании предполагаемого применения продукта, например, по способности локализоваться в определенных тканях, таких как опухолевые, или продлевать период полувыведения из кровотока (для обзора обратитесь к Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Таким образом, в случае когда продукт предназначен для покидания кровотока и прохождения в ткани, например при лечении опухоли, может быть выгодно применять полимеры с низкой молекулярной массой, например, имеющие молекулярную массу в диапазоне от 25000 до 40000 Да.

Молекулы ПЭГ имеются в продаже и могут быть синтезированы, как соединения полиалкиленгликоля или его производное, со связывающими средствами, или без них, или путем дериватизации со связывающими или активирующими молекулами (например, с тиолом, трифталатом, трезилатом, азирдином, оксираном или предпочтительно с малеимидной частицей, например, ПЭГ-малеимидом). Другие подходящие соединения полиалкиленгликоля включают, но не ограничиваются малеимид-монометокси-

ПЭГ, активированным ПЭГ полипропиленгликолем, но также заряженными или нейтральными полимерами следующих видов: декстраном, коломиновыми кислотами или другими полимерами на основе углевода, полимерами из аминокислот и биотином, а также другими производными аффинных реагентов. Присоединение ПЭГ частиц часто называют пегилированием, что обозначает способ реагирования белка с молекулой ПЭГ, где результатом такой реакции указанной молекулы ПЭГ является ковалентное связывание с указанным белком.

В отношении присоединения ПЭГ фрагментов в целом ссылаются на "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J.Milton Harris (ed), Plenum Press, New York; "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC and "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York.

При рассмотрении пегилирования и пегилированных белков следует учитывать различные аспекты процесса, такие как сайт присоединения белка, тип активации ПЭГ реагента, природу (постоянную или легко распадающуюся), длину и форму линкера, а также длину, форму и структуру ПЭГ реагента. Пегилирование может быть случайным, когда целью являются аминокислоты белка, что приводит к сложным смесям различных пегилированных соединений. В качестве альтернативы пегилирование может быть сайт-специфическим, обычно при помощи N-концевых и цистеин-специфических реакций. Остатки цистеина могут естественно присутствовать в нативных белках. В качестве альтернативы применяют генетически введенные цистеины для направления молекулы ПЭГ к точно определенному сайту молекулы. Соответственно количество и локализацию цистеинов, доступных для пегилирования, можно специфически контролировать в зависимости от предполагаемого применения белка и требуемого количества ПЭГ молекул. Доступно множество тиол-специфических реагентов, таких как малеимид, пиридилдисульфид, винилсульфон, тиоловые реагенты и т.д. Благодаря стабильности образованных связей малеимид-ПЭГ реагенты часто являются предпочтительным вариантом.

В дополнительном варианте осуществления способа изобретения молекула ПЭГ ковалентно связана при помощи малеимидной группы с одним цистеином белка.

В конкретном варианте осуществления молекула ПЭГ ковалентно связана при помощи малеимидной группы с одним цистеином белка, присутствующим в шарнирной области антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В двенадцатом варианте осуществления способа изобретения указанная молекула ПЭГ представляет собой 40000 ПЭГ-малеимид.

В конкретном варианте осуществления указанная молекула ПЭГ представляет собой разветвленный 40000 ПЭГ-малеимид. Более конкретно указанная молекула ПЭГ имеет две ветви.

В тринадцатом варианте осуществления способ по одиннадцатому и двенадцатому вариантам осуществления изобретения дополнительно включает восстановление белка, где указанный белок соединен с указанной молекулой ПЭГ при помощи цистеина.

В конкретном варианте осуществления способа по двенадцатому варианту осуществления изобретения белок, соединенный с указанной молекулой ПЭГ, восстановлен и дополнительно очищен от неспаренного белка и молекул ПЭГ при помощи способов, известных в области техники, таких как, например, дополнительная стадия хроматографии.

В еще одном конкретном варианте осуществления белок, соединенный с указанной молекулой ПЭГ, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, более конкретно указанный белок представляет собой Fab'.

В конкретном варианте осуществления способа изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связан с более чем одной молекулой ПЭГ. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязанный фрагмент пегилированы по одной или обеими тяжелыми цепями, или по одной или обеими легкими цепями, или обеими тяжелыми и легкими цепями.

В еще одном конкретном варианте осуществления этого изобретения антитело или его антигенсвязывающий участок, которые соединены с молекулой ПЭГ, представляют собой Fab', соединенный с молекулой ПЭГ по тяжелой цепи, легкой цепи или по обеим цепям. В предпочтительном варианте осуществления белок представляет собой Fab', соединенный с молекулой ПЭГ при помощи цистеина в шарнирной области антитела. В конкретных вариантах осуществления пегилированное антитело имеет гидродинамический размер, равный по меньшей мере 24 кДа. В других вариантах осуществления размер ПЭГ может варьироваться в пределах от 20 до 60 кДа (включительно). В дополнительных вариантах осуществления ПЭГ-связанное антитело имеет гидродинамический размер, равный по меньшей мере 200 кДа. В вариантах осуществления настоящего изобретения, где антитело связано с ПЭГ фрагментом, пегилированное антитело может иметь удлиненный период полувыведения *in vivo* по сравнению с антителом, у которого отсутствует ПЭГ-фрагмент.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения относится к способу получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, соединенного с молекулой ПЭГ, включающему:

а) культивирование клетки-хозяина в условиях, способствующих экспрессии на ней антитела или его антигенсвязывающего фрагмента,

b) очистку указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента от смеси, содержащей клетки-хозяева и другие загрязняющие вещества, где указанная очистка включает по меньшей мере одну стадию хроматографии и где восстанавливающее средство добавляют к указанной смеси и антитело или его антиген-связывающий фрагмент поддерживают в присутствии указанного восстанавливающего средства с первой стадии хроматографии до последней стадии хроматографии,

c) добавление ПЭГ к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту,

d) восстановление указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, соединенного с ПЭГ.

В качестве альтернативы настоящее изобретение относится к способу очистки белка, где указанный белок экспрессирован в клетках-хозяевах в условиях, способствующих экспрессии белка, где способ включает очистку указанного белка от смеси, содержащей клетки-хозяева и другие загрязняющие вещества, где указанная очистка включает по меньшей мере одну стадию хроматографии и где восстанавливающее средство добавляют к указанной смеси и белок поддерживают в присутствии указанного восстанавливающего средства с первой стадии хроматографии до последней стадии хроматографии.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент можно получать в соответствии со способом настоящего изобретения путем культивирования эукариотических клеток-хозяев, трансфектированных с одним или более экспрессионными векторами, кодирующими фрагмент рекомбинантного антитела. Эукариотические клетки-хозяева предпочтительно представляют собой клетки млекопитающих, более предпочтительно клетки яичника китайского хомячка (СНО).

Клетки млекопитающих можно культивировать на любой среде, которая поддерживает их рост и экспрессию рекомбинантного белка, предпочтительно такая среда представляет собой среду с определенным химическим составом, которая свободна от продуктов животного происхождения, таких как сыворотка крови животного и пептон. Существуют различные среды для культур клеток, известные специалистам в области техники, включающие различные комбинации витаминов, аминокислот, гормонов, факторов роста, ионов, буферов, нуклеозидов, глюкозы или эквивалентного источника энергии, присутствующих в подходящих концентрациях для обеспечения роста клеток и получения белка. Дополнительные компоненты сред для культуры клеток могут быть включены в среду для культуры клеток в подходящих концентрациях на различных этапах на протяжении цикла культивирования клеток, что будет известно специалистам в области техники.

Культура клеток млекопитающих может находиться в любом подходящем контейнере, таком как встряхиваемая колба или биореактор, которые могут находиться в режиме периодического культивирования, с подпиткой или нет, в зависимости от требуемого масштаба производства. Эти биореакторы могут представлять собой либо реактор с баком-мешалкой, либо аэролифтный реактор. Различные крупные биореакторы доступны при имеющейся вместительности, превышающей 1000-50000 л, предпочтительно между 5000 и 20000 л или до 10000 л. В качестве альтернативы биореакторы меньшего размера, такие как имеющие вместительность между 2 и 100 л, также можно использовать для получения антитела или фрагмента антитела в соответствии со способом изобретения.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые можно получать в соответствии со способами настоящего изобретения, обычно обнаруживают в надосадочной жидкости культуры клеток млекопитающих, обычно культуре клеток СНО. Для способов культивирования СНО, где белок, представляющий интерес, такой как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, секретируется в надосадочную жидкость, указанную надосадочную жидкость собирают при помощи способов, известных в области техники, обычно при помощи центрифугирования.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретения способ включает стадию центрифугирования и восстановления надосадочной жидкости перед очисткой белка. В еще одном конкретном варианте осуществления указанное центрифугирование представляет собой непрерывное центрифугирование. Во избежание сомнений надосадочная жидкость обозначает жидкость, лежащую над осажденными клетками, полученными в результате центрифугирования культуры клеток.

В качестве альтернативы клетки-хозяева предпочтительно представляют собой прокариотические клетки, предпочтительно грам-отрицательные бактерии. Более предпочтительно клетки-хозяева представляют собой клетки *E. coli*. Прокариотические клетки-хозяева для экспрессии белков хорошо известны в области техники (Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 72, 211-222.). Клетки-хозяева представляют собой рекомбинантные клетки, которые были созданы при помощи генной инженерии для получения белка, представляющего интерес, такого как фрагмент антитела. Рекомбинантные клетки-хозяева *E. coli* можно получить от любого подходящего штамма *E. coli*, включая MC4100, TGI, TG2, DHB4, DH5 α , DH1, BL21, K12, XL1Blue и JM109. Один пример представляет собой штамм *E. coli* W3110 (ATCC 27,325), штамм-хозяин, часто применяемый для ферментации рекомбинантного белка. Фрагменты антитела также можно получать путем культивирования модифицированных штаммов *E. coli*, например метаболических мутантов или штаммов *E. coli*, лишенных протеазы.

Фрагмент антитела, который можно очистить в соответствии со способами настоящего изобретения, обычно обнаруживают либо в периплазме клетки-хозяина *E. coli*, либо в надосадочной жидкости

культуры клетки-хозяина, в зависимости от природы белка, объема производства и применяемого штамма *E. coli*. Способы для направления белков в этот компартмент хорошо известны в области техники (Makrides, S.C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 60, 512-538.). Примеры подходящих сигнальных последовательностей для направления белков в периплазму *E. coli* включают сигнальные последовательности *E. coli* PhoA, OmpA, OmpT, LamB и OmpF. Белки можно направлять в надосадочную жидкость, полагаясь на природные секреторные пути, или путем индукции ограниченной утечки наружной мембраны для запуска секреции белка, примерами которой являются применение лидерного белка pelB, лидерного белка A, коэкспрессия релизинг-белка бактериоцина, митомицин-опосредованного релизинг-белка бактериоцина, наряду с добавлением глицина в культуральную среду, и коэкспрессия *kil* гена для изменения проницаемости мембраны клетки.

Экспрессия рекомбинантного белка в клетках-хозяевах *E. coli* также может происходить под контролем индуцируемой системы, в результате чего экспрессия рекомбинантного антитела в *E. coli* находится под контролем индуцируемого промотора. Множество индуцируемых промоторов, подходящих для применения в *E. coli*, известны в области техники и, в зависимости от экспрессии промотора рекомбинантного белка, могут быть индуцированы при помощи различных факторов, таких как температура или концентрация определенного вещества в среде для роста. Примеры индуцируемых промоторов включают промоторы *E. coli* *lac*, *tac*, и *trc*, которые индуцируются лактозой или негидролизующим аналогом лактозы, изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ, IPTG), а также *phoA*, *trp* и *araBAD* промоторы, которые индуцируются фосфатом, триптофаном и L-арабинозой соответственно. Экспрессия может быть индуцирована при помощи, например, добавления индуктора или изменения температуры в случае, когда индукция является температурозависимой. В случае когда индукция экспрессии рекомбинантного белка достигается добавлением индуктора к культуре, индуктор можно добавлять при помощи любого подходящего способа, в зависимости от ферментационной системы и индуктора, например при помощи однократного или многократных впрыскиваний или при помощи постепенного добавления индуктора через систему подачи. Специалистам должно быть ясно, что может иметься задержка между добавлением индуктора и непосредственной индукцией экспрессии белка, например в случае, когда индуктор представляет собой лактозу, может иметься задержка перед индукцией экспрессии белка, поскольку любой уже существующий источник углерода утилизируется до лактозы.

Культуры клеток-хозяев *E. coli* (ферментации) можно культивировать в любой среде, которая поддерживает рост *E. coli* и экспрессию рекомбинантного белка. Среда может представлять собой любую среду с определенным химическим составом, как, например, описано у Durany O, C.G.d.M.C.L.-S.J. (2004). Studies on the expression of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in *Escherichia coli*. *Process Biochem* 39, 1677-1684.

Культивирование клеток-хозяев *E. coli* может происходить в любом подходящем контейнере, таком как встряхиваемая колба или ферментер, в зависимости от требуемого объема производства. Доступны различные крупные ферментеры при имеющейся вместительности, превышающей 1000 л, и до 100000 л. Предпочтительно используют ферментеры вместительностью от 1000 до 50000 л, более предпочтительно от 1000 до 25000, 15000, 12000 или 10000 л. Также можно использовать ферментеры меньшего размера, имеющие вместительность между 0,5 и 1000 л.

Ферментация *E. coli* может происходить в любой подходящей системе, например в непрерывном, периодическом режиме или режиме периодического культивирования с подпиткой в зависимости от белка, который требуется получить. Периодический режим можно использовать с впрыскиваниями питательных веществ или индукторов при необходимости. В качестве альтернативы можно использовать культуру с подпиткой и культуры, выращенные в периодическом режиме перед индукцией при максимальной удельной скорости роста, которую можно поддерживать при помощи питательных веществ, изначально присутствующих в ферментере, и одного или более режимов подачи питательной среды, применяемых для контролирования скорости роста, до завершения ферментации. Режим периодического культивирования с подпиткой также можно применять перед индукцией для контролирования метаболизма клеток-хозяев *E. coli* и для обеспечения достижения более высокой плотности клеток.

При желании клетки-хозяева могут быть предметом сбора из культуральной среды, например, клетки-хозяева можно собирать из образца при помощи центрифугирования, фильтрации или концентрирования.

В одном варианте осуществления способ в соответствии с настоящим изобретением включает стадию центрифугирования и восстановления клеток перед выделением белка.

Для процессов ферментации *E. coli*, где белок, представляющий интерес, такой как фрагмент антитела, обнаруживают в периплазматическом пространстве клетки-хозяина, необходимо высвобождение белка из клетки-хозяина. Высвобождения можно достичь при помощи любого подходящего способа, такого как лизис клеток в результате механической обработки или воздействия давлением, воздействия циклов замерзания-оттаивания, осмотического шока, воздействия экстракционных средств или тепловой обработки. Такие способы выделения для высвобождения белка хорошо известны в области техники. Таким образом, в конкретном варианте осуществления способ изобретения включает дополнительную стадию выделения белка перед очисткой белка. В более конкретном варианте осуществления указанная

стадия выделения белка происходит в присутствии восстанавливающего средства.

В дополнительном варианте осуществления способ в соответствии с изобретением дополнительно включает восстановление клеток-хозяев из среды для культивирования клеток, сбор белка при помощи стадии выделения белка, проводимой в присутствии восстанавливающего средства, восстановление содержащей белок смеси, полученной на стадии выделения белка, и очистку указанного белка от смеси, где указанная очистка включает по меньшей мере одну стадию хроматографии, где восстанавливающее средство добавляют в указанную смесь и белок поддерживают в присутствии указанного восстанавливающего средства с первой стадии хроматографии до последней стадии хроматографии.

В дополнительном варианте осуществления способа в соответствии с изобретением восстанавливающее средство, присутствующее в процессе указанной стадии выделения белка в соответствии вышеупомянутым вариантом осуществления, может быть таким же или отличаться от восстанавливающего средства, присутствующего на стадии очистки белка способа изобретения.

В предпочтительном варианте осуществления экстракционный буфер добавляют к образцу, и образец далее подвергают стадии тепловой обработки. Стадия тепловой обработки предпочтительно протекает так, как подробно описано в заявке US 5655866.

Стадия тепловой обработки обеспечивает возможность получения образца растворимого, правильно уложенного и собранного фрагмента антитела посредством облегчения удаления прочих материалов, родственных антителу.

Стадию тепловой обработки проводят путем воздействия на образец желаемой повышенной температурой. Наиболее предпочтительно стадию тепловой обработки проводят в пределах диапазона от 30 до 70°C. Температуру можно выбирать в соответствии с желанием, и она может зависеть от стабильности антитела для очистки. В другом варианте осуществления температура находится в пределах диапазона от 40 до 65°C или предпочтительно в пределах диапазона от 40 до 60°C, более предпочтительно в пределах диапазона от 45 до 60°C, еще более предпочтительно в пределах диапазона от 50 до 60°C и наиболее предпочтительно от 55 до 60°C, от 58 до 60°C или может быть равна 59°C. Таким образом, минимальные температуры составляют 30, 35 или 40°C и максимальные температуры составляют 60, 65 или 70°C.

Стадию тепловой обработки предпочтительно проводят в течение длительного периода времени. Длительность тепловой обработки предпочтительно находится в промежутке времени от 1 до 24 ч, более предпочтительно от 4 до 18 ч, еще более предпочтительно от 6 до 16 ч и наиболее предпочтительно от 10 до 14 ч или от 10 до 12 ч, например в течение 12 ч. Таким образом, минимальное время для тепловой обработки составляет 1, 2 или 3 ч и максимальное составляет 20, 22 или 24 ч.

В конкретном варианте осуществления тепловую обработку проводят при температуре от 50 до 60°C в течение периода времени от 10 до 16 ч и наиболее предпочтительно при температуре 59°C в течение периода времени от 10 до 12 ч. Специалисту в области техники будет ясно, что температуру и время можно выбирать подходящим образом для образца и характеристик получаемого антитела.

После стадии выделения смесь, содержащую белок, представляющий интерес, такой как фрагмент антитела, можно подвергать стадии центрифугирования и/или фильтрации.

В дополнительном конкретном варианте осуществления способ изобретения может включать стадию регулирования pH смеси, содержащей белок, представляющий интерес, после стадии выделения и перед очисткой белка из указанной смеси.

В дополнительном варианте осуществления способа получения белка в соответствии с изобретением восстанавливающее средство также присутствует во время стадии тепловой обработки. В конкретном варианте осуществления экстракционный буфер, который добавляют к образцу, содержит указанное восстанавливающее средство. В этом смысле восстанавливающее средство, присутствующее во время указанной стадии тепловой обработки, может быть таким же или отличаться от восстанавливающего средства, присутствующего во время очистки белка в соответствии со способом изобретения.

В дополнительном конкретном варианте осуществления способа изобретения восстанавливающее средство, присутствующее во время стадии тепловой обработки, выбирают из глутатиона, β -меркаптоэтанола, β -меркаптоэтиламина, трис (2-карбоксиэтил)фосфин цистеина и комбинаций вышеперечисленных веществ.

В дополнительном конкретном варианте осуществления способа изобретения восстанавливающее средство, присутствующее во время стадии тепловой обработки, представляет собой глутатион в количестве от 0,1 до 100 ммоль. Количество восстанавливающего средства может быть скорректировано в зависимости от получаемого белка. В дополнительно конкретном варианте осуществления изобретения указанный глутатион присутствует в количестве от 0,5 до 80 ммоль, от 1 до 50 ммоль, от 1 до 25 ммоль, предпочтительно от 1 до 10 ммоль.

Определения

Термин "антитело" или "антитела", как применяют в данном описании, относится к моноклональным или поликлональным антителам.

Термин "антитело" или "антитела", как применяют в данном описании, включает, но не ограничивается рекомбинантными антителами, которые создают при помощи рекомбинантных технологий, как

известно в области техники. Термин "антитело" или "антитела" включает антитела любых видов, в частности видов млекопитающих; такие как антитела человека любого изотипа, включая IgA₁, IgA₂, IgD, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgG₄, IgE и IgM, а также их модифицированные варианты, антитела приматов, например полученные от шимпанзе, бабуина, резус- или яванского макака; антитела грызунов, например, полученные от мыши, крысы или кролика; антитела козлов или лошадей; а также антитела семейства верблюдовых (например, полученные от верблюдов или лам, такие как Nanobodies™), а также производные вышеперечисленных веществ; или антитела, полученные от видов птиц, такие как антитела цыплят, или от видов рыб, такие как антитела акул. Термин "антитело" или "антитела" также относится к "химерным" антителам, в которых одна порция по меньшей мере одной последовательности тяжелой и/или легкой цепи антитела получена от одних видов и другая порция последовательности тяжелой и/или легкой цепи антитела получена от других видов. Химерные антитела, представляющие интерес, в данном описании включают "приматизированные" антитела, включающие переменный участок антигенсвязывающей области, полученный от низшего примата (например, от обезьяны Старого Света, такой как бабуин, резус-или яванский макака), и последовательности константного участка человека. "Гуманизированные" антитела представляют собой химерные антитела, которые содержат последовательность, полученную из антитела животного происхождения. Во многих случаях гуманизированные антитела представляют собой антитела человека (реципиентное антитело), в которых остатки гипервариабельного участка реципиента замещаются остатками гипервариабельного участка (или участка, определяющего комплементарность, CDR) видов, не являющихся человеком (донорское антитело), таких как мышь, крыса, кролик, цыпленок или низший примат, которые имеют желаемую специфичность, аффинность и активность. В большинстве случаев остатки антитела человека (реципиентного) за пределами CDR, т.е. в каркасной области (FR) дополнительно замещаются соответствующими остатками, не принадлежащими человеку. Более того, гуманизированные антитела могут включать остатки, которые не обнаруживаются в реципиентном антителе или в донорском антителе. Эти модификации производят для дополнительного улучшения действия антитела. Гуманизация снижает иммуногенность антител животного происхождения у людей, таким образом, облегчая применение антител для лечения заболеваний человека. Гуманизированные антитела и некоторые различные технологии для их создания хорошо известны в области техники. Термин "антитело" или "антитела" также относится к антителам человека, которые можно создать в качестве альтернативы гуманизации. Например, можно создавать трансгенных животных (например, мышей), которые способны после иммунизации вырабатывать полный спектр антител человека при отсутствии выработки эндогенных мышинных антител. Например, описано, что гомозиготная делеция тяжелой цепи J-сегмента (JH) гена у химерных и мышей с терминальной мутацией приводит к полному ингибированию выработки эндогенных антител. Перенос генной матрицы иммуноглобулина клеток зародышевой линии человека в такую мышь с терминальной мутацией приведет к выработке антител человека со специфичностью в отношении определенного антигена после иммунизации трансгенного животного, которое является носителем генов иммуноглобулина клеток зародышевой линии человека, указанным антигеном. Технологии создания таких трансгенных животных и технологии выделения и получения антител человека от таких трансгенных животных известны в области техники. В качестве альтернативы у трансгенных животных, например у мыши, замещают только гены иммуноглобулина, кодирующие переменные участки антитела мыши, соответствующими переменными последовательностями гена иммуноглобулина человека. Гены иммуноглобулинов зародышевой линии мышей, кодирующие константные участки антитела, остаются преимущественно неизменными. Таким образом, эффекторные функции антитела в иммунной системе трансгенной мыши и, следовательно, выработка В-клеток, остаются неизменными, что может привести к улучшенному ответу антитела на провокацию антигеном *in vivo*. Сразу после выделения генов, кодирующих конкретное антитело, представляющее интерес, из таких трансгенных животных гены, кодирующие константные участки, можно заменить генами константных участков человека для получения полностью гуманизированного антитела. Прочие способы получения антител/фрагментов антител человека *in vitro* основаны на технологии дисплея, например технологии фагового или рибосомного дисплея, где используют библиотеки рекомбинантной ДНК, которые либо создаются, по меньшей мере частично, искусственно, либо берутся из репертуара гена переменного участка (V) иммуноглобулина доноров. Технологии фагового и рибосомного дисплея для создания антител человека хорошо известны в области техники. Антитела человека также можно получать из выделенных В-клеток человека, которые иммунизируют *ex vivo* антигеном, представляющим интерес, и далее объединяют для создания гибридом, которые далее можно проверять на предмет оптимального антитела человека. Термин "антитело" или "антитела", как применяют в настоящем описании, также относится к агликозилированному антителу.

Термин "фрагмент антитела", как применяют в данном описании, относится к молекуле антитела, которая включает по меньшей мере один участок тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина, как известно в области техники, и связывается с антигеном. Примеры фрагментов антитела в соответствии с изобретением включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, и Fv, а также scFv; а также диатела; триатела; тетраатела; миниантитела; доменные антитела; (dAbs), такие как sdAbs, V_HH и V_{NAR} фрагменты, одноцепочечные антитела; биспецифические, триспецифические, тетраспецифические или мультиспецифические

антитела, образованные из фрагментов антител или антител, включая, но не ограничиваясь Fab-Fv или Fab-Fv-Fv конструкциями. Фрагменты антител, как определено ранее, известны в области техники.

Термин "хроматография", как применяют в данном описании, относится к способу, при помощи которого растворенное вещество в смеси, представляющее интерес, отделяют от других растворенных веществ в смеси в результате различных скоростей, с которыми отдельные растворенные вещества в смеси мигрируют через неподвижную среду под влиянием подвижной фазы.

Термин "анионообменная хроматография", как применяют в данном описании, относится к хроматографии, где твердая фаза имеет положительный заряд, например имеет один или более положительно заряженных лигандов, таких как четвертичные аминогруппы, прикрепленные к ней. Имеющиеся в продаже анионообменные смолы включают DEAE-целлюлозу, QAE SEPHADEX™. и FAST Q SEPHAROSE™. (GE Healthcare).

Термин "катионообменная хроматография", как применяют в данном описании, относится к хроматографии, где твердая фаза, которая заряжена отрицательно, например, имеет один или более отрицательно заряженных лигандов, таких как, например, карбоксилатная и сульфонатная группы. Имеющиеся в продаже катионообменные смолы включают карбоксиметилцеллюлозу, сульфопропил (SP), иммобилизованный на агарозе, и сульфонил, иммобилизованный на агарозе.

Термин "отмывочный буфер", как применяют в данном описании, относится к буферу, применяемому для промывания или повторного уравнивания ионообменных смол перед элюированием полипептидной молекулы, представляющей интерес. Удобным образом отмывочный буфер и загрузочный буфер могут быть одинаковыми, но этого не требуется.

Термин "загрузочный буфер", как применяют в данном описании, относится к буферу, применяемому для загрузки белка, представляющего интерес, в твердую фазу.

Термин "элюирующий буфер", как применяют в данном описании, относится к буферу, применяемому для элюирования белка, представляющего интерес, из твердой фазы. Это можно осуществить путем применения добавок, и/или электропроводности, и/или диапазонов pH элюирующего буфера таким образом, чтобы полипептид, представляющий интерес, элюировался из твердой фазы при хроматографии.

Термин "ультрафильтрация", как применяют в данном описании, относится к процессу, управляемому давлением, где смесь, такая как раствор, например, содержащий белок, представляющий интерес, проходит через мембрану с целью концентрирования или очистки. Мембраны для ультрафильтрации обычно имеют средний размер пор между 1 и 50 нм, что находится между средним размером пор мембран для осмоса и микрофильтрационных мембран. Размер пор обычно определяют по их способности задерживать белки определенной молекулярной массы и обычно выражают относительно номинальной границы отсеки по молекулярному весу задерживаемых компонентов (NMWCO) в кДа. Ультрафильтрация разделяет растворенные вещества на основании разницы в скорости фильтрации различных веществ через мембрану в ответ на прикладываемую силу, создаваемую давлением, чья скорость зависит от размера растворенного вещества. Таким образом, растворенные вещества в смеси или растворе разделяются на основании разницы в размерах. Ультрафильтрацию часто применяют для последующей переработки с целью концентрирования белка, замены буфера и деминерализации, очистки белка, удаления вируса и очищения. Термин "ультрафильтрация" включает тангенциальную потоковую фильтрацию (TFF), при которой смесь, такая как раствор, проходит горизонтально через ультрафильтрационную мембрану. Термин "ультрафильтрация" не включает высокоэффективную тангенциальную потоковую фильтрацию (HPTFF), при которой растворенные вещества разделяются на основании не только их размера, но на основании размера и заряда.

Термин "диафильтрация", как применяют в данном описании, относится к типу техники с применением ультрафильтрационной мембраны для существенного замещения концентрации солей или сольвентов из растворов, содержащих белки, пептиды, нуклеиновые кислоты и другие биомолекулы. В способе селективно применяют проницаемые мембранные фильтры для разделения компонентов растворов и суспензий на основании их молекулярного веса. Более мелкие молекулы, такие как соли, сольвенты и вода, свободно проходят через ультрафильтрационную мембрану, которая задерживает более крупные молекулы. Образец белка, обычно в буфере, диафильтруют через мембрану, которая задерживает белок и обеспечивает замену буфера. Со временем исходный буфер, содержащий белок, замещается новым буфером.

В качестве альтернативы, в зависимости от масштабов эксперимента, может представлять интерес использование геле-фильтрации (например, колонок для обессоливания Sephadex G-25, управляемых потоком под действием силы тяжести) в качестве средства замещения исходного буфера новым буфером. В этом случае замена буфера происходит тогда, когда более крупные, чем поры смол, молекулы удаляются из указанных полимерных пор и быстрее проходят через твердую фазу по сравнению с более мелкими молекулами, которые диффундируют через поры смол и, таким образом, задерживаются для более медленного прохождения через фазу. Более крупные молекулы, такие как желаемый белок, собирают во фракции, элюированные в выравнивающем буфере со смолой.

Термин "пегелированный", как применяют в данном описании, относится к белку, который ковалентно связан с молекулой ПЭГ.

Примеры

Пример 1.

Fab'1 (Fab' фрагмент антитела, содержащий один тиол в шарнире, предназначенный для сайт-специфического пегилирования) экспрессируют в виде гетерологичного белка в клетках-хозяевах *E. coli* W3110 и гетерологичный белок выделяют из периплазматического пространства клеток-хозяев путем добавления буфера 100 ммоль трис/10 ммоль-ЭДТК со скорректированным до 7,4 рН при тепловой обработке 57,5°C. Клеточный материал удаляют при помощи центрифугирования и клеточный экстракт, содержащий гетерологичный белок, корректируют путем добавления уксусной кислоты до достижения рН 4,5. Скорректированный по рН клеточный экстракт далее очищают при помощи комбинации центрифугирования и 0,2 мкм фильтрации. Очищенный экстракт (поток поступающего материала) далее разбавляют водой для достижения электропроводности, приблизительно равной 6,0 мСм/см.

Поток поступающего материала, содержащий Fab'1, далее загружают в катионообменную колонку *Capto STM* от GE Healthcare (гранулированная агароза с высоким содержанием поперечных сшивок (средний размер частиц 90 мкм) с сульфонатным катионообменным лигандом, прикрепленным при помощи декстранового линкера (ионная емкость 0,11-0,14 ммоль Na⁺/мл)). Колонку уравнивают перед загрузкой потока поступающего материала 6 объемами колонки 50 ммоль буфера ацетата натрия со скорректированным до 4,5 рН при помощи уксусной кислоты.

После загрузки колонку промывают 50 ммоль буфера ацетата натрия, скорректированного до рН 4,5 при помощи уксусной кислоты, до тех пор, пока весь несвязанный материал не вымывается. Фракцию, содержащую Fab'1, элюируют при помощи 50 ммоль ацетата натрия и 190 ммоль NaCl, скорректированного до рН 4,5 при помощи уксусной кислоты.

Конечный элюат, содержащий Fab'1, подвергают ультрафильтрации при помощи полиэфирсульфоновой ультрафильтрационной мембраны с номинальным отсечением по молекулярной массе 10 кДа (T-series membrane (Pall Corporation)), при целевой концентрации приблизительно равной пятой части объема, и диафильтрации с применением 8 объемов 20 ммоль трис буфера, скорректированного до рН 8,2.

Пул Fab'1 загружают в колонку для анионообменной хроматографии *Capto QTM* от GE Healthcare (гранулированная агароза с высоким содержанием поперечных сшивок (средний размер частиц 90 мкм) с четвертично аммониевым анионообменным лигандом, прикрепленным при помощи декстранового линкера (ионная емкость 0,16-0,22 ммоль Cl⁻/мл)). Колонку уравнивают перед загрузкой белка при помощи 20 ммоль трис буфера, скорректированного до рН 8,2.

После загрузки колонки колонку промывают при помощи 20 ммоль трис буфера, скорректированного до рН 8,2. Fab'1, восстанавливают в проточной фракции, полученной после стадий загрузки и промывания.

Полученный в результате анионообменной хроматографии элюат, содержащий Fab'1, загружают в колонку для обессоливания PD-10 от GE Healthcare (гель-фильтрационная хроматография с матрицей *SephadexTM* G25, имеющей диапазон размера частиц от 85 до 260 мкм и эксклюзионный предел 5000 Да) с применением 20 ммоль буфера ацетата натрия, скорректированного до рН 4,5, в качестве предуровне-вешивания, промывания после загрузки и элюирующего буфера.

Элюат Fab'1 восстанавливают и добавляют 40 кДа ПЭГ-малеимид, имеющий две ветви по 20 кДа (3-бис(метилполиоксиэтилен-окси)-1-([3-(6-малеимидо-1-оксогексил)амино]пропилокси)пропан, NOF Corporation, Tokyo, Japan) при молярном соотношении Fab'1-PEG 1:2 и позволяют им реагировать в течение 17 ч при 18-22°C.

Эффективность пегилирования, как определяют при помощи эксклюзионной ВЭЖХ, приводит к получению 43% Fab'1-PEG мономера (фиг. 1).

Пример 2.

CDP870 Fab' экспрессируют в виде гетерологичного белка в клетках-хозяевах *E. coli* W3110, и гетерологичный белок выделяют из периплазматического пространства клеток-хозяев путем добавления буфера 100 ммоль трис/10 ммоль, скорректированного до рН 7,4 при тепловой обработке 59°C. Клеточный материал удаляют при помощи центрифугирования, и клеточный экстракт, содержащий гетерологичный белок, корректируют путем добавления уксусной кислоты до достижения рН 4,5. Скорректированный по рН клеточный экстракт далее очищают при помощи комбинации центрифугирования и 0,2 мкм фильтрации.

Очищенный экстракт (поток поступающего материала) далее разбавляют водой для достижения целевой электропроводности, приблизительно равной 4 мСм/см, и дополняют 1 ммоль глутатиона.

Поток поступающего материала, содержащий CDP870 Fab'1, далее загружают в катионообменную колонку *Capto STM* от GE Healthcare (гранулированная агароза с высоким содержанием поперечных сшивок (средний размер частиц 90 мкм) с сульфонатным катионообменным лигандом, прикрепленным при помощи декстранового линкера (ионная емкость 0,11-0,14 ммоль Na⁺/мл)). Колонку уравнивают перед загрузкой потока поступающего материала 6 объемами колонки 50 ммоль буфера ацетата натрия, скорректированного до рН 4,5 при помощи уксусной кислоты, содержащего 1 ммоль глутатиона.

После загрузки колонку промывают 50 ммоль буфера ацетата натрия, скорректированного до рН 4,5 при помощи уксусной кислоты, содержащего 1 ммоль глутатиона, до тех пор, пока весь несвязан-

ный материал не вымывается. Фракцию CDP870 Fab'1 элюируют при помощи 50 ммоль ацетата натрия и 250 ммоль NaCl (со скорректированным рН до 4,5 при помощи уксусной кислоты), содержащего 1 ммоль глутатиона.

Конечный элюат, содержащий CDP870 Fab'1, подвергают ультрафильтрации при помощи полиэфирсульфоновой ультрафильтрационной мембраны с номинальным отсечением по молекулярной массе 10 кДа (мембрана T-series membrane (Pall Corporation)), при целевой концентрации, приблизительно равной половине объема, и диафильтрации с применением 20 ммоль трис буфера, скорректированного до рН 8,5, содержащего 1 ммоль глутатиона. Для диафильтрации применяют 7 объемов буфера.

Пул загружают в колонку для анионообменной хроматографии Capto Q™ от GE Healthcare (гранулированная агароза с высоким содержанием поперечных сшивок (средний размер частиц 90 мкм) с четвертично аммониевым анионообменным лигандом, прикрепленным при помощи декстранового линкера (ионная емкость 0,16-0,22 ммоль Cl-/мл)). Колонку уравнивают перед загрузкой белка при помощи 20 ммоль трис буфера, скорректированного до рН 8,2, содержащего 1 ммоль глутатиона.

После загрузки колонки колонку промывают при помощи 20 ммоль трис буфера, скорректированного до рН 8,2, содержащего 1 ммоль глутатиона. CDP870 Fab'1 восстанавливают в проточной фракции, полученной после стадий загрузки и промывания. Полученный в результате анионообменной хроматографии элюат, содержащий CDP870 Fab'1, загружают в колонку для обессоливания PD-10 от GE Healthcare (гель-фильтрационная хроматография с матрицей Sephadex™ G25, имеющей диапазон размера частиц от 85 до 260 мкм и эксклюзивный предел 5000 Да) с применением 20 ммоль буфера ацетата натрия, скорректированного до рН 4,5 в качестве предуравнивающего, отмывочного и элюирующего буфера после загрузки.

Элюат, содержащий CDP870 Fab'1, восстанавливают и добавляют 40 кДа ПЭГ, имеющий две ветви по 20 кДа (малеимидпропионамид бис-(метоксиполи-(этиленгликоля)): модифицированный лизин, Nektar Therapeutics Corporation, California, US), содержащий малеимидный линкер, при избытке молярного соотношения PEG 1:2,8 и позволяют им реагировать при 18-22°C.

Эффективность пегилирования, как определяют при помощи эксклюзивной ВЭЖХ, приводит к получению 78,1% CDP870 Fab'1-PEG мономера (фиг. 2).

Пример 3.

CDP870 Fab'1 экспрессируют в виде гетерологичного белка в клетках-хозяевах E. coli W3110, и гетерологичный белок выделяют из периплазматического пространства клеток-хозяев путем добавления буфера 100 ммоль Трис/10 ммоль-ЭДТК, скорректированного до рН 7,4, содержащего 1 ммоль глутатиона, при тепловой обработке 59°C. Клеточный материал удаляют при помощи центрифугирования, и клеточный экстракт, содержащий гетерологичный белок, корректируют путем добавления уксусной кислоты до достижения рН 4,5. Скорректированный по рН клеточный экстракт далее очищают при помощи 0,2 мкм фильтрации.

Очищенный экстракт (поток поступающего материала) далее разбавляют водой для достижения целевой электропроводимости, равной 4 мСм/см, и дополняют 1 ммоль глутатиона.

Поток поступающего материала, содержащий CDP870 Fab', далее загружают в катионообменную колонку Capto S™ от GE Healthcare (гранулированная агароза с высоким содержанием поперечных сшивок (средний размер частиц 90 мкм) с сульфонатным катионообменным лигандом, прикрепленным при помощи декстранового линкера (ионная емкость 0,11-0,14 ммоль Na+/мл)). Колонку уравнивают перед загрузкой потока поступающего материала 6 объемами колонки 50 ммоль буфера ацетата натрия, содержащего 1 ммоль глутатиона, скорректированного до рН 4,5 при помощи уксусной кислоты.

После загрузки колонку промывают 50 ммоль буфера ацетата натрия, скорректированного до рН 4,5 при помощи уксусной кислоты, содержащего 1 ммоль глутатиона, до тех пор, пока весь несвязанный материал не вымывается. Фракцию CDP870 Fab'1 элюируют при помощи 50 ммоль ацетата натрия и 250 ммоль NaCl, содержащего 1 ммоль глутатиона, скорректированного до рН 4,5 при помощи уксусной кислоты. Конечный элюат, содержащий CDP870 Fab', подвергают ультрафильтрации при помощи полиэфирсульфоновой ультрафильтрационной мембраны с номинальным отсечением по молекулярной массе 10 кДа при целевой концентрации приблизительно равной одной трети объема, и диафильтрации с применением 9 объемов 20 ммоль трис буфера, скорректированного до рН 8,5, содержащего 1 ммоль глутатиона. Пул CDP870 Fab'1 загружают в колонку для анионообменной хроматографии Capto Q™ от GE Healthcare (гранулированная агароза с высоким содержанием поперечных сшивок (средний размер частиц 90 мкм) с четвертично аммониевым анионообменным лигандом, прикрепленным при помощи декстранового линкера (ионная емкость 0,16-0,22 ммоль Cl-/мл)). Колонку уравнивают перед загрузкой белка при помощи 20 ммоль трис буфера, скорректированного до рН 8,2, содержащего 1 ммоль глутатиона. После загрузки колонки колонку промывают при помощи 20 ммоль трис буфера, скорректированного до рН 8,2, содержащего 1 ммоль глутатиона. CDP870 Fab'1 восстанавливают в проточной фракции, полученной после стадий загрузки и промывания.

Конечный элюат, содержащий CDP870 Fab', подвергают ультрафильтрации при помощи полиэфирсульфоновой ультрафильтрационной мембраны с номинальным отсечением по молекулярной массе 10 кДа

и диалфильтрации с применением 20 ммоль ацетата натрия с рН 4,5 в качестве подготовки к пегилированию.

К восстановленному белку добавляют 40 кДа ПЭГ-малеимид, имеющий две ветви по 20 кДа (малеимидопропионамид бис-(метоксиполи-(этиленгликоля)): модифицированный лизин, Nektar Therapeutics Corporation, California, US), при молярном соотношении CDP870 Fab':PEG 1:1,4 и 1:2, и позволяют им реагировать в течение 17 ч при 18-22°C.

Эффективность пегилирования, как определяют при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ, выявила получение 74% и 74,4% CDP870 Fab'-PEG мономера для 1:1,4 и 1:2 соотношения CDP870 Fab': PEG соответственно.

Пример 4.

Fab'1 (Fab' фрагмент антитела, содержащий один тиол в шарнире, предназначенный для сайт-специфического пегилирования) экспрессируют в виде гетерологичного белка в клетках-хозяевах *E. coli* W3110 и гетерологичный белок выделяют из периплазматического пространства клеток-хозяев путем добавления буфера 100 ммоль трис/10 ммоль-ЭДТК, скорректированного до рН 7,4, содержащего 10 ммоль глутатиона, при тепловой обработке 57,5°C. Клеточный материал удаляют при помощи центрифугирования и клеточный экстракт, содержащий гетерологичный белок, корректируют путем добавления уксусной кислоты до достижения рН 4,5. Скорректированный по рН клеточный экстракт далее очищают при помощи комбинации центрифугирования и 0,2 мкм фильтрации.

Очищенный экстракт (поток поступающего материала) далее разбавляют водой для достижения диапазона электропроводимости, равного 6 мСм/см (коэффициент разведения приблизительно равен 4). Поток поступающего материала, содержащий Fab'1, далее загружают в катионообменную колонку Capto S™ от GE Healthcare (гранулированная агароза с высоким содержанием поперечных сшивок (средний размер частиц 90 мкм) с сульфонатным катионообменным лигандом, прикрепленным при помощи декстранового линкера (ионная емкость 0,11-0,14 ммоль Na+/мл)). Колонку уравнивают перед загрузкой потока поступающего материала 6 объемами колонки 50 ммоль буфера ацетата натрия, содержащего 1 ммоль глутатиона, скорректированного до рН 4,5 при помощи уксусной кислоты.

После загрузки колонку промывают 50 ммоль буфера ацетата натрия, содержащего 1 ммоль глутатиона, скорректированного до рН 4,5 при помощи уксусной кислоты до тех пор, пока весь несвязанный материал не вымывается. Фракцию, содержащую Fab'1, элюируют при помощи 50 ммоль ацетата натрия и 190 ммоль NaCl, содержащего 1 ммоль глутатиона, скорректированного до рН 4,5 при помощи уксусной кислоты.

Конечный элюат, содержащий Fab'1, подвергают ультрафильтрации при помощи полиэфирсульфоновой ультрафильтрационной мембраны с номинальным отсечением по молекулярной массе 10 кДа при целевой концентрации приблизительно равной одной пятой объема и диалфильтрации с применением 8 объемов 20 ммоль трис буфера, содержащего 1 ммоль глутатиона, скорректированного до рН 8,2.

Пул Fab'1 загружают в колонку для анионообменной хроматографии Capto Q™ от GE Healthcare (гранулированная агароза с высоким содержанием поперечных сшивок (средний размер частиц 90 мкм) с четвертично аммониевым анионообменным лигандом, прикрепленным при помощи декстранового линкера (ионная емкость 0,16-0,22 ммоль Cl-/мл)). Колонку уравнивают перед загрузкой белка при помощи 20 ммоль трис буфера, содержащего 1 ммоль глутатиона, скорректированного до рН 8,2.

После загрузки колонки колонку промывают при помощи 20 ммоль трис буфера, содержащего 1 ммоль глутатиона, скорректированного до рН 8,2. Fab'1 восстанавливают в проточной фракции, полученной после стадий загрузки и промывания.

Полученный в результате анионообменной хроматографии элюат, содержащий Fab'1, загружают в колонку для обессоливания PD-10 от GE Healthcare (гель-фильтрационная хроматография с матрицей Sephadex™ G25, имеющей диапазон размера частиц от 85 до 260 мкм и эксклюзионный предел 5000 Да) с применением 20 ммоль буфера ацетата натрия, скорректированного до рН 4,5, в качестве преуравнивающего, отмывочного и буфера.

Элюат Fab'1 восстанавливают и добавляют 40 кДа ПЭГ-малеимид, имеющий две ветви по 20 кДа (3-бис(метилполиоксиэтилен-окси)-1-([3-(6-малеимидо-1-оксогексил)амино]пропилокси)пропан, NOF Corporation, Tokyo, Japan) при молярном соотношении Fab'1-PEG 1:2 и позволяют им реагировать в течение 17 ч при 20°C.

Эффективность пегилирования, как определяют при помощи эксклюзионной ВЭЖХ, приводит к получению 71,5% Fab'1-PEG мономера (фиг. 1).

Пример 5.

Fab'1 (Fab' фрагмент антитела, содержащий один тиол в шарнире, предназначенный для сайт-специфического пегилирования) экспрессируют в виде гетерологичного белка в клетках-хозяевах *E. coli* W3110, и гетерологичный белок выделяют из периплазматического пространства клеток-хозяев путем добавления буфера 100 ммоль трис/10 ммоль-ЭДТК, скорректированного до рН 7,4 при тепловой обработке 57,5°C. Клеточный материал удаляют при помощи центрифугирования, и клеточный экстракт, содержащий гетерологичный белок, корректируют путем добавления уксусной кислоты до достижения рН 4,5. Скорректированный по рН клеточный экстракт далее очищают при помощи комбинации центрифугиро-

вания и 0,2 мкм фильтрации.

Очищенный экстракт (поток поступающего материала) далее разбавляют водой для достижения электропроводимости 6 мСм/см.

Поток поступающего материала, содержащий Fab'I, далее загружают в катионообменную колонку *Capto STM* от GE Healthcare (гранулированная агароза с высоким содержанием поперечных сшивок (средний размер частиц 90 мкм) с сульфонатным катионообменным лигандом, прикрепленным при помощи декстранового линкера (ионная емкость 0,11-0,14 ммоль Na⁺/мл)). Колонку уравнивают перед загрузкой потока поступающего материала 50 ммоль буфера ацетата натрия, скорректированного до pH 4,5 при помощи уксусной кислоты.

После загрузки колонку промывают 50 ммоль буфера ацетата натрия, скорректированного до pH 4,5 при помощи уксусной кислоты до тех пор, пока весь несвязанный материал не вымывается. Фракцию, содержащую Fab'I, элюируют при помощи 50 ммоль ацетата натрия и 190 ммоль NaCl, скорректированного до pH 4,5 при помощи уксусной кислоты.

Конечный элюат, содержащий Fab'I, подвергают ультрафильтрации при помощи полиэфирсульфоновой ультрафильтрационной мембраны с номинальным отсечением по молекулярной массе 10 кДа при целевой концентрации, приблизительно равной одной пятой объема, и диафильтрации с применением 8 объемов 20 ммоль трис буфера, содержащего 1 ммоль глутатиона, скорректированного до pH 8,2. Пул Fab'I загружают в колонку для анионообменной хроматографии *Capto QTM* от GE Healthcare (гранулированная агароза с высоким содержанием поперечных сшивок (средний размер частиц 90 мкм) с четвертично аммониевым анионообменным лигандом, прикрепленным при помощи декстранового линкера (ионная емкость 0,16-0,22 ммоль Cl⁻/мл)). Колонку уравнивают перед загрузкой белка при помощи 20 ммоль трис буфера, скорректированного до pH 8,2.

После загрузки колонки колонку промывают при помощи 20 ммоль трис, скорректированного до pH 8,2. Fab'I восстанавливают в проточной фракции, полученной после стадий загрузки и промывания.

Восстановленный в результате анионообменной хроматографии элюат, содержащий Fab'I, далее подвергают ультрафильтрации при помощи полиэфирсульфоновой ультрафильтрационной мембраны с номинальным отсечением по молекулярной массе 10 кДа при целевой концентрации 20 мг/мл и диафильтрации с применением 0,1 моль фосфатного буфера с pH 6,8, содержащего 2 ммоль ЭДТК.

Полученный в результате образец, содержащий Fab'I, далее восстанавливают при помощи диафильтрации с применением такой же мембраны и 0,1 моль фосфатного буфера, содержащего 2 ммоль ЭДТК и 1 ммоль 2-меркаптоэтиламина, скорректированного до pH 6,8, в течение 6,5 ч.

Дополнительную ультрафильтрацию/диафильтрацию в 20 ммоль буфера ацетата натрия, скорректированного до pH 4,5, проводят на такой же мембране для удаления восстанавливающего средства с целью подготовки к пегилированию.

К восстановленному Fab'I белку добавляют 40 кДа ПЭГ-малеимид, имеющий две ветви по 20 кДа (3-бис(метоксиполиэтилен-окси)-1-([3-(6-малеимида-1-оксогексил)амино]пропилокси)пропан, NOF Corporation, Tokyo, Japan), в весовом соотношении Fab'-PEG 1:1,25 и позволяют им реагировать в течение 17 ч при 18-22°C.

Эффективность пегилирования, как определяют при помощи эксклюзионной ВЭЖХ, приводит к получению 77,4% Fab'I-PEG мономера (фиг. 3).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий:

а) культивирование клеток-хозяев *E. coli* в таких условиях, в которых они экспрессируют антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в периплазме,

б) очистку указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента от смеси, содержащей клетки-хозяева и другие загрязняющие вещества, где указанная очистка включает по меньшей мере одну стадию хроматографии и где восстанавливающее средство добавляют к указанной смеси и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент поддерживают в присутствии указанного восстанавливающего средства с первой стадии хроматографии до последней стадии хроматографии,

с) добавление ПЭГ к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту,

д) сбор указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, соединенного с ПЭГ;

где восстанавливающее средство выбирают из глутатиона, β-меркаптоэтанола, β-меркаптоэтиламина, дитиотреитола, трис(2-карбоксиэтил)фосфин цистеина и комбинаций вышеперечисленных веществ.

2. Способ по п.1, где восстанавливающее средство представляет собой глутатион в количестве от 0,1 до 100 ммоль.

3. Способ по п.2, где восстанавливающее средство представляет собой глутатион в количестве от 0,5 до 2 ммоль.

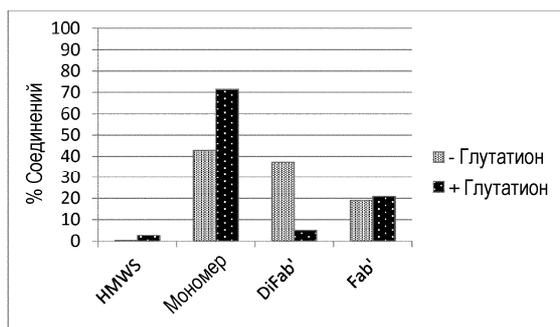
4. Способ по любому из предшествующих пунктов, где восстанавливающее средство удаляют из восстановленного белка на стадии б).

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанный антигенсвязывающий фрагмент представляют собой Fab'.

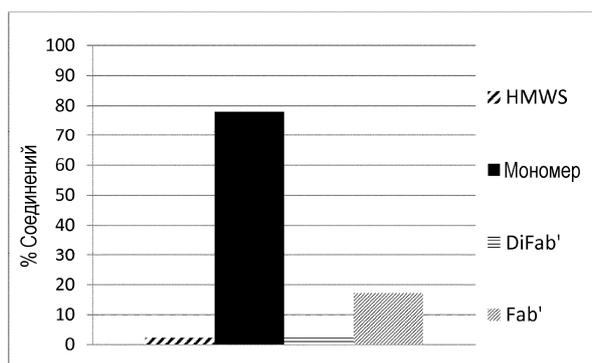
6. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент связан с ПЭГ посредством ковалентного связывания с остатком цистеина в шарнире антитела.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанная молекула ПЭГ представляет собой 40000 ПЭГ-малеимид.

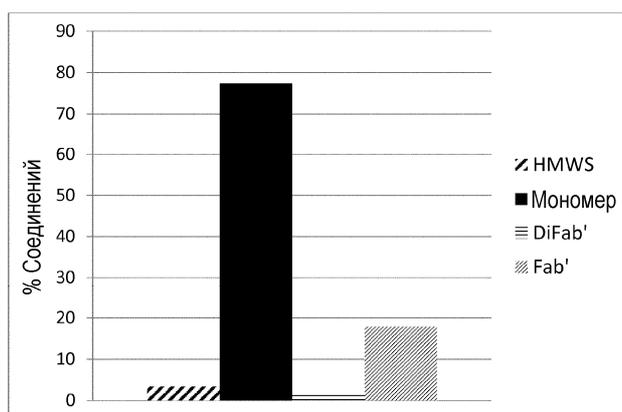
8. Способ по любому из предшествующих пунктов, где очистка антитела или его антигенсвязывающего фрагмента на стадии б) включает первую стадию хроматографии, которая представляет собой катионообменную хроматографию, на которой элюируют первый элюат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и вторую стадию хроматографии, которая представляет собой анионообменную хроматографию с получением фильтрата, содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

