

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202291409** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2022.08.25**

(51) Int. Cl. **C07K 16/06** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2020.11.04**

**(54) КОНДИЦИОНИРОВАНИЕ С ВЫСОКОЙ СОЛЕВОЙ НАГРУЗКОЙ В ХОДЕ  
КАТИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ СВЯЗАННЫХ С  
ПРОДУКТОМ ПРИМЕСЕЙ**

(31) **62/931,863**

(32) **2019.11.07**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/058772**

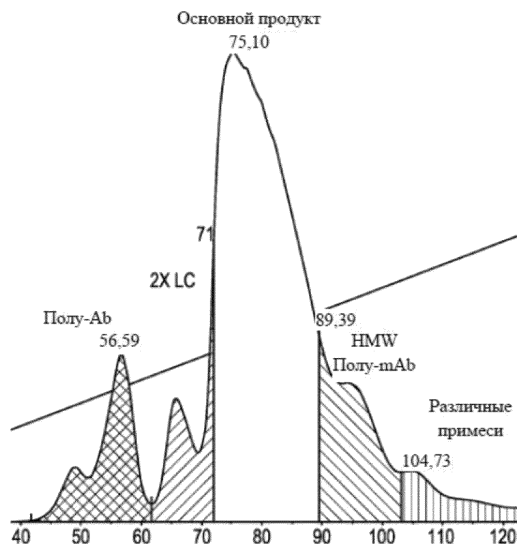
(87) **WO 2021/091932 2021.05.14**

(71) Заявитель:  
**ЭМДЖЕН ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Диас Луис, Гомес Наталия (US)**

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

(57) Изобретение относится к кондиционированию с высокой солевой нагрузкой в ходе катионообменной хроматографии для удаления связанных с продуктом примесей с низкой изоэлектрической точкой в ходе производства рекомбинантных полиспецифических белков.



**A1**

**202291409**

**202291409**

**A1**

**КОНДИЦИОНИРОВАНИЕ С ВЫСОКОЙ СОЛЕВОЙ НАГРУЗКОЙ В ХОДЕ  
КАТИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ СВЯЗАННЫХ С  
ПРОДУКТОМ ПРИМЕСЕЙ**

В данной заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США № 62/931863, поданной 7 ноября 2019 года, которая включена сюда посредством ссылки.

**ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

Настоящее изобретение относится к области производства биофармацевтических препаратов. В частности, настоящее изобретение относится к способам удаления связанных с продуктом примесей с низкой изоэлектрической точкой в ходе операций катионообменной очистки.

**УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Продукты на основе антител представляют собой крупнейший сектор рынка биофармацевтических препаратов, и на протяжении следующего десятилетия объем их продаж может легко достичь сотен миллиардов долларов. Коммерческая разработка терапевтических моноклональных антител началась в 1980-х годах с одобрения первого терапевтического моноклонального антитела и с тех пор продолжает развиваться и расширяться. Несмотря на то, что моноклональные антитела связываются с мишенью с высокой аффинностью и специфичностью и были очень успешными средствами терапевтического лечения при некоторых показаниях, они также имеют ограничения. Моноклональные антитела связываются с одной мишенью; однако многие заболевания являются многофакторными. В иммунотерапии рака лечение, направленное на одну мишень, может быть недостаточным для уничтожения или иммобилизации раковых клеток. Кроме того, некоторые пациенты, получающие виды терапии на основе моноклональных антител, могут не отвечать на лечение или у них может развиться устойчивость к лекарственному средству.

Для решения этих сложных задач были разработаны новые антителоподобные структуры, такие как Fab-фрагменты антител, Fc-слитые белки, конъюгаты антитело-лекарственное средство, антитела со сконструированным гликозилированием и, в частности, биспецифические и другие полиспецифические антителоподобные структуры. Такие антителоподобные структуры, в частности биспецифические антитела, обладают улучшениями по сравнению с традиционными терапевтическими средствами на основе моноклональных антител и зарекомендовали себя в качестве эффективных биотерапевтических средств нового поколения с огромным разнообразием форматов, которые могут быть разработаны для удовлетворения еще более трудноизлечимых терапевтических показаний.

Биспецифические антитела представляют собой самую разнообразную группу таких антителоподобных структур с неуклонно растущим разнообразием каркасов для удовлетворения потребностей в отношении терапевтических показаний. Такие структуры

сочетают в себе связывающие свойства антител со свойствами дополнительных молекул, разработанными в соответствии с необходимыми показаниями при заболевании. Биспецифические антитела разрабатываются для различных показаний и путей применения, таких как перенаправление иммунных эффекторных клеток на опухолевые клетки для иммунного ответа против рака, блокирование сигнальных путей, нацеливание на ангиогенез опухоли, блокирование цитокинов, преодоление гематоэнцефалического барьера, диагностические анализы, лечение заболеваний, вызванных патогенами, и в качестве средств доставки. (Sedykh et al., *Drug Design, Development and Therapy* 18(12), 195-208, 2018; Walsh, *Nature Biotechnology*, 32(10), 992-1000, 2014; Ecker et al., *mAbs* 7(1), 9-14, 2015; Spiess et al., *Mol Immunol* 67, 95-106, 2015; Fan et al., *J Hematol & Oncology* 8:130-143, 2015; Williams et al., *Process Design for Bispecific Antibodies*, Biopharmaceutical Processing, Development, Design and Implementation of Processes, Jagschies et al., editors, Elsevier Ltd, pages 837-855, 2018).

Разработка таких полиспецифических белков приводит к новым сложным задачам при биопроизводстве, в частности, в отношении нестабильности продукта и низких выходов экспрессии. В частности, очистка полиспецифических белков осложняется образованием связанных с продуктом вариантов, таких как гомодимеры, полуантитела, агрегаты, высокомолекулярные и низкомолекулярные разновидности и т. п. Такие варианты имеют структурные и физические свойства, например, заряд, сходные с таковыми у представляющего интерес полиспецифического белка, что затрудняет их отделение в ходе очистки. Такие связанные с продуктом примеси снижают выход и активность полиспецифического лекарственного продукта и влияют на надежность производственных процессов.

Связанные с продуктом примеси, имеющие заряд (изоэлектрическую точку), сходный с таковым у представляющего интерес полиспецифического белка, могут совместно элюироваться с полиспецифическим белком в ходе отдельных операций катионообменной хроматографии, что усложняет очистку и снижает выход. Было бы полезно отделять связанные с продуктом примеси с низкой pI перед элюированием. Настоящее изобретение, описанное в данном документе, удовлетворяет эту потребность, путем обеспечения кондиционирования с высокой солевой нагрузкой для удаления таких примесей с низкой pI в ходе катионообменной хроматографии.

### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В настоящем изобретении представлен способ очистки полиспецифического белка из композиции, содержащей полиспецифический белок и по меньшей мере одну связанную с продуктом примесь, при этом способ включает уравнивание среды для катионообменной хроматографии уравнивающим буфером, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия; загрузку композиции в катионообменную среду в загрузочном буфере, содержащем 94-105 мМ хлорида натрия; промывание колонки по меньшей мере одним буфером для промывки, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия; и элюирование полиспецифического белка из среды для катионообменной хроматографии. В одном

[illegible]

pH 4,9-5,1. В связанном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит ацетат, pH от  $5,0 \pm 0,05$  до  $5,0 \pm 0,1$ . В связанном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит 100 мМ ацетата. В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит ацетат и от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления композицию загружают при 10-27 г/л. В одном варианте осуществления композицию загружают при 15-27 г/л. В одном варианте осуществления полиспецифический белок элюируют с катионообменной смолы посредством градиента. В связанном варианте осуществления градиент является линейным. В одном варианте осуществления градиент представляет собой солевой градиент. В одном варианте осуществления полиспецифический белок представляет собой биспецифический белок. В одном варианте осуществления полиспецифический белок представляет собой биспецифическое антитело. В одном варианте осуществления представлен очищенный полиспецифический белок, полученный посредством способа, описанного выше. В одном варианте осуществления среда для катионообменной хроматографии представляет собой смолу.

В настоящем изобретении представлен способ снижения содержания примесей с низкой pI в элюате после катионообменной хроматографии, при этом способ включает уравнивание среды для катионообменной хроматографии уравнивающим буфером, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия; загрузку композиции в катионообменную среду в загрузочном буфере, содержащем 94-105 мМ хлорида натрия; промывание колонки по меньшей мере одним буфером для промывки, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия; и элюирование полиспецифического белка из среды для катионообменной хроматографии; где элюат после катионообменной хроматографии характеризуется сниженным содержанием примесей с низкой pI по сравнению с элюатом после катионообменной хроматографии, извлеченным в соответствующем способе, в котором не используется хлорид натрия на стадиях уравнивания, загрузки и промывки. В одном варианте осуществления примесь с низкой pI представляет собой связанную с продуктом примесь. В одном варианте осуществления по меньшей мере одна связанная с продуктом примесь представляет собой полуантитело или неправильную сборку легких цепей 2X, 3X или 4X.

В настоящем изобретении представлен способ проведения катионообменной хроматографии в условиях высокой солевой нагрузки для снижения содержания связанных с продуктом примесей, при этом способ включает уравнивание среды для катионообменной хроматографии уравнивающим буфером; загрузку композиции в катионообменную среду в загрузочном буфере; промывание колонки первым и вторым буферами для промывки и элюирование полиспецифического белка из среды для катионообменной хроматографии; где уравнивающий буфер, загрузочный буфер и первый буфер для промывки содержат 94-105 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления второй буфер для промывки содержит 0-26 мМ.

В настоящем изобретении представлен способ получения выделенного очищенного

рекомбинантного полиспецифического белка, при этом способ включает создание клеточной культуры в биореакторе с клеткой-хозяином, экспрессирующей полиспецифический белок; культивирование клеток-хозяев для экспрессии полиспецифического белка; сбор рекомбинантного полиспецифического белка; аффинную очистку собранного рекомбинантного полиспецифического белка; инактивацию вирусов при низком pH в пуле элюатов после аффинной очистки и нейтрализацию пула; уравнивание среды для катионообменной хроматографии уравнивающим буфером, содержащим 94-105 mM хлорида натрия; загрузку нейтрализованного подвергнутого аффинной очистке рекомбинантного полиспецифического белка в уравнивленную катионообменную среду в загрузочном буфере, содержащем 94-105 mM хлорида натрия; промывание катионообменной среды буфером для промывки, содержащим 94-105 mM хлорида натрия, а затем вторым буфером для промывки, содержащим 0-26 mM хлорида натрия; элюирование полиспецифического белка из среды для катионообменной хроматографии; загрузку элюата после катионообменной хроматографии, содержащего рекомбинантный полиспецифический белок, на вторую хроматографическую смолу в проточном режиме и концентрирование очищенного рекомбинантного полиспецифического белка в буфере для составления. В одном варианте осуществления вторая хроматографическая смола выбрана из анионообменной хроматографической смолы, катионообменной хроматографической смолы, смолы для мультимодальной хроматографии, смолы для хроматографии гидрофобных взаимодействий и гидроксипатитной хроматографической смолы. В связанном варианте осуществления представлен выделенный очищенный рекомбинантный полиспецифический белок, полученный посредством способа, описанного выше. В связанном варианте осуществления представлена фармацевтическая композиция, содержащая выделенный очищенный рекомбинантный полиспецифический белок, полученный посредством способа, описанного выше.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

На фиг. 1 показано, что примеси (полуантитела и 2X LC) элюируются с основным продуктом - биспецифической молекулой № 1.

На фиг. 2 показано, что после кондиционирования с высокой солевой нагрузкой примеси с низкой pI протекают через колонку между стадиями загрузки и первой промывки. Вторая промывка обеспечивала возвращение исходного уровня UV-спектра к нулю перед элюированием. В ходе элюирования биспецифической молекулы № 1 пик элюирования снижался с четырех пиков до одного пика.

На фиг. 3 показан один пик элюирования, полученный вследствие высокой плотности загрузки, с кондиционированием без солевой нагрузки при крутом градиенте элюирования для биспецифической молекулы № 2. Связанные с продуктом примеси с низкой pI не отделялись от основного продукта при высокой плотности загрузки и присутствовали главным образом во фракциях 1-3.

На фиг. 4 показано, что более низкая плотность загрузки (10 в сравнении с 25 г/л) и

более пологий градиент (8 в сравнении с 16 мМ/CV) обеспечивали отделение основных примесей продукта с низкой pI в виде отчетливого пика, образованного фракциями 1-4, для биспецифической молекулы № 2.

На фиг. 5 показано, что в условиях высокой солевой нагрузки число пиков примесей в профиле элюирования снижалось с двух пиков до одного пика для биспецифической молекулы № 2 с небольшим плечом (фракции 1-3), которое все еще содержало некоторое количество неправильно спаренных разновидностей (LC1/LC2=от 2 до 3).

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Поскольку в литературе не так много информации, касающейся последующей обработки полиспецифических белков, зачастую применяются платформы, разработанные для моноклональных антител (Shulka and Norman, Chapter 26 Downstream Processing of Fc Fusion Proteins, Bispecific Antibodies, and Antibody-Drug Conjugates, в Process Scale Purification of Antibodies Second Edition, Uwe Gottschalk editor, p559-594, John Wiley & Sons, 2017). Проведение с полиспецифическими белками катионообменной хроматографии (СЕХ) в режиме связывания и элюирования в условиях, типичных для антител и антителоподобных белков, приводило к множественным пикам примесей в профиле элюирования. Эти примеси характеризовались изоэлектрическими точками, как более низкими, так и более высокими, чем у основного продукта. Примеси с более низкой pI элюируются раньше основного продукта в виде препиков. Такой профиль элюирования не будет подкреплять разработку надежного, устойчивого производственного процесса в промышленных масштабах.

Природа полиспецифических белков может сделать их восприимчивыми к образованию связанных с продуктом примесей, а условия культивирования клеток могут влиять на количество таких примесей. Эти примеси усложняют очистку и могут снизить выход и активность необходимого полиспецифического белка. Было обнаружено, что стратегия высокой солевой нагрузки улучшает выход основного продукта в пуле элюатов после СЕХ благодаря удалению примесей с более низкой pI перед стадией элюирования. При установлении целевой конечной концентрации хлорида натрия 94-105 мМ для уравнивающего буфера, конечного кондиционирующего загрузочного буфера и первого буфера для промывки примеси с более низкой pI протекали через колонку со снижением числа пиков в профиле элюирования и снижением количества связанных с продуктом примесей в элюате после СЕХ. Также была добавлена вторая стадия промывки для обеспечения условий полного связывания для необходимого полиспецифического белка и восстановления исходного уровня UV-спектра до нуля перед началом элюирования, уплотняя профиль элюирования, что приводило к гораздо более эффективному сбору и лучшему качеству основного продукта. Например, кондиционирование с высокой солевой нагрузкой неожиданно сокращало продолжительность элюирования биспецифического белка с 44 объемов колонки (CV) до 20,3 CV, что позволяло сэкономить время и ресурсы, а также уменьшить объем пула

элюатов СЕХ, что очень желательно для эффективности и надежности процесса в промежуточных последующих отдельных операциях. Для обоих биспецифических продуктов условия с высокой солевой нагрузкой обеспечивали эффективное удаление примесей перед элюированием со снижением количества связанных с продуктом примесей в элюате после СЕХ, а также с упрощением критериев сбора элюата, за счет чего обеспечивается более надежный производственный процесс.

В настоящем изобретении представлен способ очистки полиспецифического белка из композиции, содержащей полиспецифический белок и по меньшей мере одну связанную с продуктом примесь, при этом способ включает уравнивание среды для катионообменной хроматографии уравнивающим буфером, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия; загрузку композиции в катионообменную среду в загрузочном буфере, содержащем 94-105 мМ хлорида натрия; промывание колонки по меньшей мере одним буфером для промывки, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия; и элюирование полиспецифического белка из среды для катионообменной хроматографии.

В настоящем изобретении также представлен способ снижения содержания примесей с низкой рI в элюате после катионообменной хроматографии, при этом способ включает уравнивание среды для катионообменной хроматографии уравнивающим буфером, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия; загрузку композиции в катионообменную среду в загрузочном буфере, содержащем 94-105 мМ хлорида натрия; промывание колонки по меньшей мере одним буфером для промывки, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия; и элюирование полиспецифического белка из среды для катионообменной хроматографии; где элюат после катионообменной хроматографии характеризуется сниженным содержанием примесей с низкой рI по сравнению с элюатом после катионообменной хроматографии, извлеченным в соответствующем способе, в котором не используется хлорид натрия на стадиях уравнивания, загрузки и промывки.

В настоящем изобретении также представлен способ проведения катионообменной хроматографии в условиях высокой солевой нагрузки для снижения содержания связанных с продуктом примесей, при этом способ включает уравнивание среды для катионообменной хроматографии уравнивающим буфером; загрузку композиции в катионообменную среду в загрузочном буфере; промывание колонки первым и вторым буферами для промывки и элюирование полиспецифического белка из среды для катионообменной хроматографии; где уравнивающий буфер, загрузочный буфер и первый буфер для промывки содержат 94-105 мМ хлорида натрия.

В настоящем изобретении также представлен способ получения представляющего интерес выделенного очищенного рекомбинантного полиспецифического белка, при этом способ включает создание клеточной культуры в биореакторе с клеткой-хозяином, экспрессирующей представляющий интерес полиспецифический белок; культивирование клеток-хозяев для экспрессии полиспецифического белка; сбор рекомбинантного полиспецифического белка; аффинную очистку собранного рекомбинантного

полиспецифического белка; инактивацию вирусов при низком pH в пуле элюатов после аффинной очистки и нейтрализацию пула; уравнивание среды для катионообменной хроматографии уравнивающим буфером, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия; загрузку нейтрализованного подвергнутого аффинной очистке рекомбинантного полиспецифического белка в уравниваемую катионообменную среду в загрузочном буфере, содержащем 94-105 мМ хлорида натрия; промывание катионообменной среды буфером для промывки, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия, а затем вторым буфером для промывки, содержащим 0-26 мМ хлорида натрия; элюирование полиспецифического белка из среды для катионообменной хроматографии; и загрузку элюата после катионообменной хроматографии, содержащего рекомбинантный полиспецифический белок, на вторую хроматографическую смолу в проточном режиме; и концентрирование очищенного рекомбинантного полиспецифического белка в буфере для составления.

В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит 94-105 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104 или 105 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит 94 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит 96 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит 98 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит 105 мМ хлорида натрия.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения загрузочный буфер содержит ацетат. В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат, pH 4,9-5,1. В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат при pH 4,9, 5,0 или 5,1. В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат при pH 4,9, 4,95, 5,0, 5,05 или 5,1. В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат, pH от  $5,0 \pm 0,05$  до  $5,0 \pm 0,1$ . В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат при pH 5,0. В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит 100 мМ ацетата. В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит 100 мМ ацетата, pH 4,9-5,1. В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит 100 мМ ацетата при pH 4,9, 5,0 или 5,1. В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит 100 мМ ацетата при pH 4,9, 4,95, 5,0, 5,05 или 5,1. В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит 100 мМ ацетата, от pH  $5,0 \pm 0,05\%$  до pH  $5,0 \pm 0,1\%$ .

В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат и от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат и от 94 мМ до 96 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат и от 96 мМ до 105 мМ хлорида натрия. В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат и 94 мМ хлорида натрия. В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат и 96 мМ хлорида натрия. В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат и 98 мМ хлорида натрия. В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит

ацетат и 105 мМ хлорида натрия. В связанном варианте осуществления концентрация ацетата составляет 100 мМ.

В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH 4,9-5,1. В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH 4,9, 5,0 или 5,1. В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат, 94-105 мМ хлорида натрия, pH 4,9, 4,95, 5,0, 5,05 или 5,1. В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH 5,0. В связанном варианте осуществления концентрация ацетата составляет 100 мМ.

В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит 100 мМ ацетата, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH от  $5,0 \pm 0,05$  до  $5,0 \pm 0,1$ . В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит 100 мМ ацетата, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH 4,9-5,1. В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит 100 мМ ацетата, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH 4,9, 4,95, 5,0, 5,05 или 5,1. В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит 100 мМ ацетата, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH 4,9, 5,0 или 5,1. В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит 100 мМ ацетата, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH 5,0.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 94-96 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 96-105 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104 или 105 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 94 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 96 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 98 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 105 мМ хлорида натрия.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, pH 4,9-5,1. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат при pH 4,9, 5,0 или 5,1. В одном варианте осуществления буфер для промывки содержит ацетат при pH 4,9, 4,95, 5,0, 5,05 или 5,1. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, pH от  $5,0 \pm 0,05$  до  $5,0 \pm 0,1$ . В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 100 мМ ацетата. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 100 мМ ацетата, pH 4,9-5,1. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 100 мМ ацетата при pH 4,9, 5,0 или 5,1. В одном варианте осуществления буфер для промывки содержит 100 мМ ацетата при pH 4,9, 4,95, 5,0, 5,05 или 5,1. В одном

варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 100 мМ ацетата, от  $\text{pH } 5,0 \pm 0,05\%$  до  $\text{pH } 5,0 \pm 0,1\%$ .

В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, от 94 мМ до 96 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, от 96 мМ до 105 мМ хлорида натрия. В связанном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, 94 мМ хлорида натрия. В связанном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, 96 мМ хлорида натрия. В связанном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, 98 мМ хлорида натрия. В связанном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, 105 мМ хлорида натрия. В связанном варианте осуществления концентрация ацетата составляет 100 мМ.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH от  $5,0 \pm 0,05$  до  $5,0 \pm 0,1$ . В связанном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH 4,9-5,1. В связанном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH 4,9, 5,0 или 5,1. В связанном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH 4,9, 4,95, 5,0, 5,05 или 5,1. В связанном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH 5,0. В связанном варианте осуществления концентрация ацетата составляет 100 мМ.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 100 мМ ацетата, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH от  $5,0 \pm 0,05$  до  $5,0 \pm 0,1$ . В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 100 мМ ацетата, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH 4,9-5,1. В связанном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 100 мМ ацетата, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH 4,9, 5,0 или 5,1. В связанном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 100 мМ ацетата, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH 4,9, 4,95, 5,0, 5,05 или 5,1. В связанном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 100 мМ ацетата, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH 5,0.

В одном варианте осуществления имеется по меньшей мере одна дополнительная стадия промывки с помощью другого буфера для промывки. В одном варианте осуществления по меньшей мере одна дополнительная промывка представляет собой вторую промывку. В одном варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный буфер для промывки содержит 0-26 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный буфер для промывки



В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, 94-105 мМ хлорида натрия, и после него следует по меньшей мере один

дополнительный буфер для промывки, содержащий ацетат, 0-26 мМ хлорида натрия, где рН буферов является одинаковым или разным. В одном варианте рН одного или нескольких буферов для промывки представляет собой рН 4,9-5,1. В одном варианте осуществления рН одного или нескольких буферов для промывки представляет собой рН 4,9, 4,95, 5,0, 5,05 или 5,1. В одном варианте рН одного или нескольких буферов для промывки представляет собой рН 4,9, 5,0 или 5,1. В одном варианте осуществления рН одного или нескольких буферов для промывки представляет собой рН 5,0. В одном варианте осуществления рН одного или нескольких буферов для промывки составляет от рН  $5,0 \pm 0,05\%$  до рН  $5,0 \pm 0,1\%$ . В одном варианте осуществления концентрация ацетата в одном или нескольких буферах для промывки составляет 100 мМ.

В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит 94-96 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит 96-105 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104 или 105 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит 94 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит 96 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит 105 мМ хлорида натрия.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения уравнивающий буфер содержит ацетат. В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит ацетат, рН 4,9-5,1. В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит ацетат при рН 4,9, 5,0 или 5,1. В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит ацетат при рН 5,0. В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит ацетат, рН от  $5,0 \pm 0,05$  до  $5,0 \pm 0,1$ . В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит 100 мМ ацетата. В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит 100 мМ ацетата, рН 4,9-5,1. В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит 100 мМ ацетата при рН 4,9, 4,95, 5,0, 5,05 или 5,1. В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит 100 мМ ацетата при рН 4,9, 5,0 или 5,1. В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит 100 мМ ацетата, от рН  $5,0 \pm 0,05\%$  до рН  $5,0 \pm 0,1\%$ .

В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит ацетат, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит ацетат, от 94 мМ до 96 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит ацетат, от 96 мМ до 105 мМ хлорида натрия. В связанном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит ацетат, 94 мМ хлорида натрия. В связанном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит ацетат, 96 мМ хлорида натрия. В связанном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит ацетат, 105 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления концентрация ацетата составляет 100 мМ.

В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит ацетат, от

94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, рН от  $5,0 \pm 0,05$  до  $5,0 \pm 0,1$ . В связанном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит ацетат, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, рН 4,9-5,1. В связанном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит ацетат, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, рН 4,9, 4,95, 5,0, 5,05 или 5,1. В связанном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит ацетат, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, рН 4,9, 5,0 или 5,1. В связанном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит ацетат, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, рН 5,0. В одном варианте осуществления концентрация ацетата составляет 100 мМ.

В одном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит 100 мМ ацетата, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, рН от  $5,0 \pm 0,05$  до  $5,0 \pm 0,1$ . В связанном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит 100 мМ ацетата, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, рН 4,9-5,1. В связанном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит 100 мМ ацетата, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, рН 4,9, 4,95, 5,0, 5,01 или 5,1. В связанном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит 100 мМ ацетата, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, рН 4,9, 5,0 или 5,1. В связанном варианте осуществления уравнивающий буфер содержит 100 мМ ацетата, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, рН 5,0.

В одном варианте осуществления композицию загружают при 10-27 г/л. В связанном варианте осуществления композицию загружают при 10-25 г/л. В связанном варианте осуществления композицию загружают при 10-23 г/л. В связанном варианте осуществления композицию загружают при 10-15 г/л. В связанном варианте осуществления композицию загружают при 15-27 г/л. В связанном варианте осуществления композицию загружают при 15-25 г/л. В связанном варианте осуществления композицию загружают при 15-23 г/л. В связанном варианте осуществления композицию загружают при 23-27 г/л. В связанном варианте осуществления композицию загружают при 23-25 г/л. В связанном варианте осуществления композицию загружают при 25-27 г/л. В одном варианте осуществления композицию загружают при 10, 15, 23, 25 или 27 г/л. В одном варианте осуществления композицию загружают при 10 г/л. В одном варианте осуществления композицию загружают при 15 г/л. В одном варианте осуществления композицию загружают при 23 г/л. В одном варианте осуществления композицию загружают при 25 г/л. В одном варианте осуществления композицию загружают при 27 г/л.

В одном варианте осуществления полиспецифический белок элюируют с катионообменной смолы посредством градиента. В связанном варианте осуществления градиент является линейным. В связанном варианте осуществления градиент представляет собой солевой градиент.

В связанном варианте осуществления примесь с низкой рI представляет собой связанную с продуктом примесь. В связанном варианте осуществления по меньшей мере одна связанная с продуктом примесь представляет собой полуантитело или неправильную сборку легких цепей 2X, 3X или 4X.

В одном варианте осуществления полиспецифический белок представляет собой биспецифический белок. В другом варианте осуществления полиспецифический белок представляет собой биспецифическое антитело.

В одном варианте осуществления среда для катионообменной хроматографии представляет собой смолу. В другом варианте осуществления вторая хроматографическая среда представляет собой смолу. В связанном варианте осуществления вторая хроматографическая смола выбрана из анионообменной хроматографической смолы, катионообменной хроматографической смолы, смолы для мультимодальной хроматографии, смолы для хроматографии гидрофобных взаимодействий и гидроксипатитной хроматографической смолы.

В настоящем изобретении представлен очищенный полиспецифический белок, полученный в соответствии со способами, описанными в данном документе. В настоящем изобретении представлены выделенные очищенные рекомбинантные полиспецифические белки, полученные в соответствии со способами, описанными в данном документе.

В настоящем изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая представляющий интерес выделенный очищенный рекомбинантный полиспецифический белок в соответствии со способами, описанными в данном документе.

"Полиспецифический", "полиспецифический белок" и "полиспецифическое антитело" в данном документе используются взаимозаменяемо для обозначения белков, которые сконструированы рекомбинантным путем для одновременного связывания и нейтрализации по меньшей мере двух разных антигенов или по меньшей мере двух разных эпитопов одного и того же антигена. Например, полиспецифические белки могут быть сконструированы для нацеливания иммунных эффекторов и цитотоксических средств на опухоли или возбудители инфекции. Было обнаружено, что такие полиспецифические белки являются применимыми во множестве вариантов применения, как, например, в иммунотерапии рака, путем перенаправления иммунных эффекторных клеток на опухолевые клетки, модификации передачи сигнала в клетках путем блокирования сигнальных путей, нацеливания на ангиогенез опухоли, блокирования цитокинов и в качестве предварительно нацеленных средств доставки для лекарственных средств, как, например, доставки химиотерапевтических средств, радиоактивных меток (для улучшения чувствительности обнаружения) и наночастиц (направленных на конкретные клетки/ткани, такие как раковые клетки).

Наиболее распространенными и наиболее разнообразными полиспецифическими белками являются те белки, которые связывают два антигена, называемые в данном документе взаимозаменяемо "биспецифическими", "биспецифическими белками" и "биспецифическими антителами". Биспецифические белки могут быть сгруппированы в две обширные категории: молекулы, подобные иммуноглобулину G (IgG), и молекулы, отличные от молекул, подобных иммуноглобулину G (IgG). IgG-подобные молекулы сохраняют Fc-опосредованные эффекторные функции, такие как антителозависимая

клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC), комплементзависимая цитотоксичность (CDC) и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), Fc-область помогает улучшить растворимость и стабильность и упростить некоторые операции очистки. Молекулы, отличные от IgG-подобных молекул, являются меньшими по размеру, что обеспечивает улучшение их проникновения в ткани. (Sedykh et al., *Drug Design, Development and Therapy* 18(12), 195-208, 2018; Fan et al., *J Hematol & Oncology* 8:130-143, 2015; Spiess et al., *Mol Immunol* 67, 95-106, 2015); Williams et al., Chapter 41 *Process Design for Bispecific Antibodies in Biopharmaceutical Processing Development, Design and Implementation of Manufacturing Processes*, Jagschies et al., eds., 2018, pages 837-855.) Биспецифические белки иногда применяют в качестве каркаса для дополнительных компонентов, характеризующихся специфичностью связывания с разными антигенами или разным количеством эпитопов, что увеличивает специфичность связывания молекулы.

Форматы для биспецифических белков, которые включают биспецифические антитела, постоянно развиваются и включают без ограничения квадромы, структуры типа "выступ во впадину", CrossMab, IgG с двойным вариабельным доменом (DVD-IgG), IgG-одноцепочечный Fv (scFv), scFv-CH3 KИH, Fab двойного действия (DAF), структуру с обменом половинами молекул, к $\lambda$ -тела, tandemный scFv, scFv-Fc, диатела, одноцепочечные диатела (sc-диатела), sc-диатела-CH3, триатело, миниантитело, минитело, минитело TriBi, tandemные диатела, sc-диатело-HAS, tandemную структуру scFv-токсин, перенацеливающие молекулы двойной аффинности (DART), нанотело, нанотело-HSA, структуру, полученную методом "стыковки и фиксации" (DNL), SEEDbody на основе сконструированных доменов с обменом цепями, TrioMab, лейциновую застежку (LUZ-Y), XmAb<sup>®</sup>; структуру с обменом Fab-фрагментами, DutaMab, DT-IgG, структуру с заряженными парами оснований, Fcab, ортогональный Fab, IgG(H)-scFv, scFV-(H)IgG, IgG(L)-scFV, IgG(L1H1)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KИH IgG-scFab, 2scFV-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zyboby, DVI-Ig4 (четыре в одном), Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFV, F(ab')<sub>2</sub>-scFv<sub>2</sub>, scFv-KИH, Fab-scFv-Fc, тетравалентное HCAb, sc-диатело-Fc, диатело-Fc, интратело, ImmTAC, HSABody, IgG-IgG, Cov-X-Body, scFv1-PEG-scFv<sub>2</sub>, конструкции на основе одноцепочечных биспецифических антител, одноцепочечные биспецифические активаторы, привлекающие Т-клетки (BiTE), биспецифические активаторы, привлекающие Т-клетки, и биспецифические активаторы, привлекающие Т-клетки, с продленным периодом полужизни (HLE BiTE) (Fan выше; Spiess выше; Sedykh выше; Seimetz et al., *Cancer Treat Rev* 36(6) 458-67, 2010; Shulka and Norman, Chapter 26 *Downstream Processing of Fc Fusion Proteins, Bispecific Antibodies, and Antibody-Drug Conjugates*, в *Process Scale Purification of Antibodies Second Edition*, Uwe Gottschalk editor, p559-594, John Wiley & Sons, 2017; Moore et al., *MAbs* 3:6, 546-557, 2011.

В некоторых вариантах осуществления биспецифические белки могут включать блинатумомаб, катумаксомаб, эртумаксомаб, солитомаб, TargomiR, лутикизумаб

(ABT981), вануцизумаб (RG7221), ремтолумаб (ABT122), озораликсумаб (ATN103), флотеузмаб (MGD006), пазотуксизумаб (AMG112, MT112), лимфомун (FBTA05), (ATN-103), AMG211 (MT111, MEDI-1565), AMG330, AMG420 (B1836909), AMG-110 (MT110), MDX-447, TF2, rM28, HER2Bi-aATC, GD2Bi-aATC, MGD006, MGD007, MGD009, MGD010, MGD011 (JNJ64052781), IMCgp100, меченный индием IMP-205, xm734, LY3164530, OMP-305BB3, REGN1979, COV322, ABT112, ABT165, RG-6013 (ACE910), RG7597 (MEDH7945A), RG7802, RG7813(RO6895882), RG7386, BITS7201A (RG7990), RG7716, BFKF8488A (RG7992), MCLA-128, MM-111, MM141, MOR209/ES414, MSB0010841, ALX-0061, ALX0761, ALX0141; BИ034020, AFM13, AFM11, SAR156597, FBTA05, PF06671008, GSK2434735, MEDI3902, MEDI0700, MEDI7352, а также молекулы или их варианты или аналоги и биоаналоги любых из вышеперечисленных.

Полиспецифические белки также включают триспецифические антитела, тетравалентные биспецифические антитела, полиспецифические белки без компонентов антител, такие как диа-, триа- или тетратела, минитела и одноцепочечные белки, способные к связыванию нескольких мишеней. Coloma, M.J., et. al., *Nature Biotech.* 15 (1997) 159-163.

В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес полиспецифические белки могут связываться с одним или несколькими белками CD, белками семейства рецепторов HER, молекулами клеточной адгезии, факторами роста, факторами роста нервов, факторами роста фибробластов, трансформирующими факторами роста (TGF), инсулиноподобными факторами роста, остеоиндуктивными факторами, инсулином и родственными инсулину белками, белками коагуляции и связанными с коагуляцией белками, колониестимулирующими факторами (CSF), другими белками крови и сыворотки крови, антигенами групп крови; рецепторами, рецептор-ассоциированными белками, гормонами роста, рецепторами гормона роста, Т-клеточными рецепторами; нейротрофическими факторами, нейротрофинами, релаксинами, интерферонами, интерлейкинами, вирусными антигенами, липопротеинами, интегринами, ревматоидными факторами, иммунотоксинами, поверхностными мембранными белками, транспортными белками, "хоминг"-рецепторами, адрессинами, регуляторными белками и иммуноадгезинами, нейтрализовать их и/или взаимодействовать с ними.

В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес полиспецифические белки связываются с одним или несколькими из следующих, по отдельности или в любой комбинации: белков CD, в том числе без ограничения CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD70, CD123, CD133, CD138, CD171 и CD174, белков семейства рецепторов HER, в том числе, например, HER2, HER3, HER4 и рецептора EGF, EGFRvIII, молекул клеточной адгезии, например, LFA-1, Mol, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM и интегрин альфа-V/бета-3, факторов роста, в том числе без ограничения, например, фактора роста эндотелия сосудов ("VEGF"); VEGFR2, гормона роста, тиреостимулирующего гормона, фолликулостимулирующего гормона, лютеинизирующего гормона, релизинг-фактора

гормона роста, паратиреоидного гормона, мюллерова ингибирующего фактора, воспалительного белка макрофагов человека (MIP-1-альфа), эритропоэтина (EPO), фактора роста нервов, такого как NGF-бета, тромбоцитарного фактора роста (PDGF), фактора роста фибробластов, в том числе, например, aFGF и bFGF, эпидермального фактора роста (EGF), Cripto, трансформирующих факторов роста (TGF), в том числе, помимо прочего, TGF- $\alpha$  и TGF- $\beta$ , в том числе TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4 или TGF- $\beta$ 5, инсулиноподобных факторов роста I и -II (IGF-I и IGF-II), des(1-3)-IGF-I (мозгового IGF-I) и остеоиндуктивных факторов, инсулинов и родственных инсулину белков, в том числе без ограничения инсулина, А-цепи инсулина, В-цепи инсулина, проинсулина и белков, связывающих инсулиноподобные факторы роста; белков коагуляции и связанных с коагуляцией белков, таких как, среди прочего, фактор VIII, тканевой фактор, фактор фон Виллебранда, протеин С, альфа-1-антитрипсин, активаторы плазминогена, такие как урокиназа и тканевой активатор плазминогена ("t-PA"), бомбазин, тромбин, тромбopoэтин и рецептор тромбopoэтина, колониестимулирующих факторов (CSF), в том числе следующих, среди прочего: M-CSF, GM-CSF и G-CSF, других белков крови и сыворотки крови, в том числе без ограничения альбумина, IgE и антигенов групп крови, рецепторов и рецептор-ассоциированных белков, в том числе, например, рецептора flk2/flt3, рецептора ожирения (OB), рецепторов гормона роста и Т-клеточных рецепторов; нейротрофических факторов, в том числе без ограничения нейротрофического фактора костной ткани (BDNF) и нейротрофина-3, -4, -5 или -6 (NT-3, NT-4, NT-5 или NT-6); А-цепи релаксина, В-цепи релаксина и прорелаксина, интерферонов, в том числе, например, интерферонов-альфа, -бета и -гамма, интерлейкинов (IL), например, IL-1 - IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-23, IL-12/IL-23, IL-2Ra, IL1-R1, рецептора IL-6, рецептора IL-4 и/или рецептора IL-13-IL-13RA2, или рецептора IL-17, IL-1RAP; вирусных антигенов, в том числе без ограничения оболочечного антигена вируса AIDS, липопротеинов, кальцитонина, глюкагона, предсердного натрийуретического фактора, легочного сурфактанта, факторов некроза опухоли альфа и бета, энкефалиназы, BCMA, каппа-цепи Ig, ROR-1, ERBB2, мезотелина, RANTES (белка, регулируемого при активации, экспрессируемого и секретируемого нормальными Т-клетками), мышиноного гонадотропин-ассоциированного пептида, ДНКазы, FR-альфа, ингибина и активина, интегрина, белка А или D, ревматоидных факторов, иммунотоксина, костного морфогенетического белка (BMP), супероксиддисмутазы, поверхностных мембранных белков, фактора ускорения распада (DAF), оболочки вируса AIDS, транспортных белков, хоминг-рецепторов, MIC (MIC-A, MIC-B), ULBP 1-6, EPCAM, адрессинов, регуляторных белков, иммуноадгезинов, антигенсвязывающих белков, соматопина, CTGF, CTLA4, зотаксина-1, MUC1, CEA, с-MET, клаудина-18, GPC-3, EPHA2, FPA, LMP1, MG7, NY-ESO-1, PSCA, ганглиозида GD2, ганглиозида GM2, BAFF, OPGL (RANKL), миостатина, Dickkopf-1 (DKK-1), Ang2, NGF, рецептора IGF-1, фактора роста гепатоцитов (HGF), TRAIL-R2, с-Kit, B7RP-1, PSMA, NKG2D-1, белка 1 запрограммированной гибели клеток и его лиганда - PD1 и PDL1, комплекса маннозный рецептор/hCG $\beta$ , вируса гепатита С, конъюгата мезотелина и (dsFv)PE38, **Legionella**

**pneumophila** (Ily), IFN-гамма, интерферон-гамма-индуцированного белка 10 (IP10), IFNAR, TALL-1, TNF $\alpha$ , TL1A, тимусного стромального лимфопоэтина (TSLP), пропротеинконвертазы субтилизин/кексин 9 типа (PCSK9), факторов стволовых клеток, Flt-3, пептида, связанного с геном кальцитонина (CGRP), OX40L,  $\alpha 4\beta 7$ , белка, специфичного к тромбоцитам (гликопротеину тромбоцитов Пб/IIIb) (PAC-1), трансформирующего фактора роста бета (TFG $\beta$ ), STEAP1, белка 3 блестящей оболочки, связывающего сперматозоиды (ZP-3), TWEAK, рецептора тромбоцитарного фактора роста альфа (PDGFR $\alpha$ ), склеростина и биологически активных фрагментов или вариантов любых из вышеперечисленных, нейтрализуют их и/или взаимодействуют с ними.

В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес полиспецифические белки могут включать биспецифические антитела, которые специфично связываются с комбинациями, включающими CD3 и CD19, EpCAM, CEA, PSA, CD33, BCMA, Her2, CD20, Р-кадгерин, CD123, gpA33 или B7H3. В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес биспецифические антитела могут включать биспецифические антитела, которые специфично связываются с комбинациями, включающими IL1 $\alpha$ +IL1 $\beta$ .

Полиспецифические белки могут представлять научный или коммерческий интерес, в частности, являться биспецифическими терапевтическими средствами. Полиспецифические белки можно получать различными способами, чаще всего с помощью рекомбинантных линий клеток животных с применением способов культивирования клеток. Полиспецифические белки могут продуцироваться внутриклеточно или секретироваться в среду для культивирования, из которой их можно извлекать и/или собирать, и они могут называться взаимозаменяемо "рекомбинантным полиспецифическим белком", "рекомбинантным полиспецифическим антителом". Термины "выделенный полиспецифический белок", "выделенное рекомбинантное полиспецифическое антитело" относятся к полиспецифическому белку, который был очищен от белков, полипептидов, ДНК и/или других контаминантов или примесей, которые могли бы помешать его терапевтическому, диагностическому, профилактическому, исследовательскому или другому применению. Также включены термины "рекомбинантный биспецифический белок", "рекомбинантное биспецифическое антитело", "выделенный рекомбинантный биспецифический белок" и "выделенное рекомбинантное биспецифическое антитело". Представляющие интерес полиспецифические белки включают полиспецифические антитела, которые оказывают терапевтический эффект путем связывания двух или более мишеней, в частности, мишеней среди перечисленных ниже, в том числе мишеней, полученных из них, мишеней, связанных с ними, и их модификаций.

В настоящем изобретении представлен способ очистки полиспецифического белка из композиции, содержащей полиспецифический белок и по меньшей мере одну связанную с продуктом примесь, при этом способ включает уравнивание среды для катионообменной хроматографии уравнивающим буфером, содержащим 94-105 мМ

хлорида натрия; загрузку композиции в катионообменную среду в загрузочном буфере, содержащем 94-105 мМ хлорида натрия; промывание колонки по меньшей мере одним буфером для промывки, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия; и элюирование полиспецифического белка из среды для катионообменной хроматографии.

Под "очисткой" подразумевают повышение степени чистоты полиспецифического белка в композиции путем удаления (частично или полностью) по меньшей мере одной связанной с продуктом примеси из композиции. Извлечение и очистку полиспецифических белков осуществляют путем последующих отдельных операций, в частности, операций, включающих ионообменную хроматографию, приводящих к более "гомогенному" составу полиспецифических белков, отвечающему целевым показателям выхода и качества продукта (таким как снижение содержания связанных с продуктом примесей, повышение качества продукта и т. п.).

"Связанная с продуктом примесь" относится к связанным с продуктом вариантам представляющего интерес полиспецифического белка. В некоторых случаях эти примеси характеризуются  $pI$ , более низкой, чем у основного продукта в пике элюирования. Связанные с продуктом примеси включают, например, гомодимеры, полуантитела, агрегаты, фрагменты антител и различные комбинации фрагментов антител, а также неправильные сборки легких цепей, такие как 2XLC, 3XLC или 4XLC, высокомолекулярные разновидности (HMW), низкомолекулярные разновидности (LMW). "Полуантитела" относятся к связанной с продуктом примеси, которая может образовываться, например, из-за неполной сборки или нарушения взаимодействия между двумя полипептидами тяжелой цепи. Полуантитела содержат один полипептид легкой цепи и один полипептид тяжелой цепи. "Гомодимеры" относятся к связанной с продуктом примеси, которая, например, может образовываться, когда тяжелая и легкая цепи, характеризующиеся специфичностью в отношении одной и той же мишени, рекомбинируют друг с другом вместо образования пар с тяжелой и легкой цепями, характеризующимися специфичностью в отношении другой мишени, с образованием необходимого биспецифического гетеродимера. Как правило, это происходит во время экспрессии в клетке-хозяине. В случае с полиспецифическими конструкциями, в которых требуется несколько цепей (таких как легкие цепи, LC) для правильного образования пар посредством сконструированных остатков (таких как мутации с введением заряженных пар оснований, "выступ во впадину" и т. п.), по-прежнему возможно наличие примесей в случае ошибки спаривания между LC и HC, когда LC1 вместо HC1 неправильно образует пару с HC2 (2x LC1) и наоборот (2x LC2). Если полиспецифический белок является бивалентным, имеющим два участка для связывания с каждым представляющим интерес антигеном, возможно наличие 3X LC1, 4X LC1 и других комбинаций неправильно спаренных разновидностей.

В настоящем изобретении представлен способ снижения содержания примесей с низкой  $pI$  в элюате после катионообменной хроматографии, при этом способ включает уравнивание среды для катионообменной хроматографии уравнивающим

буфером, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия; загрузку композиции в катионообменную среду в загрузочном буфере, содержащем 94-105 мМ хлорида натрия; промывание колонки по меньшей мере одним буфером для промывки, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия; и элюирование полиспецифического белка из среды для катионообменной хроматографии; где элюат после катионообменной хроматографии характеризуется сниженным содержанием примесей с низкой  $pI$  по сравнению с элюатом после катионообменной хроматографии, извлеченным в соответствующем способе, в котором не используется хлорид натрия на стадиях уравнивания, загрузки и промывки.

Как раскрыто в данном документе,  $pI$  связанных с продуктом примесей может быть сходной с  $pI$  необходимого полиспецифического белка. Такие связанные с продуктом примеси обнаруживаются в пике элюата с основным продуктом. Они характеризуются немного более низкой  $pI$ , поэтому они элюируются непосредственно перед основным продуктом в виде препиков. "Изоэлектрическая точка" или " $pI$ " белка относится к  $pH$ , при котором положительный заряд уравнивает отрицательный заряд белка.  $pI$  можно рассчитать/определить с применением известных способов, как, например, на основе суммарного заряда аминокислотных остатков белка или путем изоэлектрического фокусирования. Связанные с продуктом примеси, имеющие более низкую  $pI$ , чем у основного продукта, являются более кислыми, чем основной продукт.

В настоящем изобретении представлен способ получения представляющего интерес выделенного очищенного рекомбинантного полиспецифического белка, при этом способ включает создание клеточной культуры в биореакторе с клеткой-хозяином, экспрессирующей полиспецифический белок; культивирование клеток-хозяев для экспрессии полиспецифического белка; сбор рекомбинантного полиспецифического белка; аффинную очистку собранного рекомбинантного полиспецифического белка; инактивацию вирусов при низком  $pH$  в пуле элюатов после аффинной очистки и нейтрализацию пула; уравнивание среды для катионообменной хроматографии уравнивающим буфером, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия; загрузку нейтрализованного подвергнутого аффинной очистке рекомбинантного полиспецифического белка в уравновешенную катионообменную среду в загрузочном буфере, содержащем 94-105 мМ хлорида натрия; промывание катионообменной среды буфером для промывки, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия, а затем вторым буфером для промывки, содержащим 0-26 мМ хлорида натрия; элюирование полиспецифического белка из среды для катионообменной хроматографии; и загрузку элюата после катионообменной хроматографии, содержащего рекомбинантный полиспецифический белок, на вторую хроматографическую смолу в проточном режиме; и концентрирование очищенного рекомбинантного полиспецифического белка в буфере для составления.

В данном документе представлены системы и конструкции экспрессии в форме плазмид, векторов экспрессии, кассет транскрипции или экспрессии, которые содержат по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую полиспецифический белок,

представленный в данном документе, а также клетки-хозяева, содержащие такие системы или конструкции экспрессии. Используемый в данном документе "вектор" означает любую молекулу или объект (например, нуклеиновую кислоту, плазмиду, бактериофаг, транспозон, космиду, хромосому, вирус, вирусный капсид, вирион, депротеинизированную ДНК, образующую комплекс ДНК и т. п.), которые подходят для применения в переносе и/или транспортировке информации, кодирующей полиспецифический белок, в клетку-хозяина и/или в специфическое местоположение и/или компартмент в пределах клетки-хозяина. Векторы могут включать вирусные и невирусные векторы, неэписомные векторы для клеток млекопитающих. Векторы зачастую называются векторами экспрессии, например рекомбинантными векторами экспрессии и клонирующими векторами. Вектор может быть введен в клетку-хозяина для обеспечения репликации вектора самого по себе и амплификации за счет этого копий полинуклеотида, содержащегося в нем. Клонирование векторы могут содержать компоненты последовательности, которые обычно включают без ограничения точку начала репликации, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности и селективируемые маркеры. При необходимости такие элементы могут быть выбраны специалистом средней квалификации в данной области техники.

"Клетка" или "клетки" включают любую прокариотическую или эукариотическую клетку. Клетки могут находиться в условиях либо *ex vivo*, либо *in vitro*, либо *in vivo*, быть либо отдельными, либо частью структуры более высокого уровня организации, такой как ткань или орган. Клетки включают "клеток-хозяев", также называемых "линиями клеток", которые генетически сконструированы для экспрессии полиспецифического белка, представляющего коммерческий или научный интерес. Клетки-хозяева, как правило, получены из линии, происходящей от первичной культуры, которую можно поддерживать в культуре в течение неограниченного времени. Генетическое конструирование клетки-хозяина предусматривает трансфекцию, трансформацию или трансдукцию клеток рекомбинантной полинуклеотидной молекулой и/или иное изменение (например, путем гомологичной рекомбинации и активации гена или слияния рекомбинантной клетки с нерекомбинантной клеткой), чтобы заставить клетку-хозяина экспрессировать необходимый рекомбинантный полиспецифический белок. Способы и векторы для генетического конструирования клеток и/или линий клеток для обеспечения экспрессии представляющих интерес полиспецифических белков хорошо известны специалистам в данной области техники.

Клеткой-хозяином может быть любая прокариотическая клетка (например, *Escherichia coli* (*E. coli*)) или эукариотическая клетка (например, клетки дрожжей, насекомых или животных, в частности клетки млекопитающих (например, клетки CHO)). Векторную ДНК можно вводить в прокариотические или эукариотические клетки с помощью общепринятых методик трансформации или трансфекции.

В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку-хозяина. При

культивировании в соответствующих условиях клетки-хозяева экспрессируют представляющий интерес полиспецифический белок, который впоследствии можно собирать из среды для культивирования (если клетка-хозяин секретирует его в среду) или непосредственно из клетки-хозяина, продуцирующей его (если он не секретируется). Выбор соответствующей клетки-хозяина будет зависеть от различных факторов, таких как требуемые уровни экспрессии, модификации белка, которые требуются или необходимы для активности (такие как гликозилирование или фосфорилирование), и простота осуществления фолдинга в биологически активную молекулу.

Под "культурой" или "культивированием" подразумевают рост и размножение клеток за пределами многоклеточного организма или ткани. Подходящие условия культивирования для клеток млекопитающих известны в данной области техники. Среда для культивирования клеток и среда для культивирования тканей используются взаимозаменяемо для обозначения сред, подходящих для выращивания клетки-хозяина во время культивирования клеток *in vitro*. Как правило, среды для культивирования клеток содержат буфер, соли, источник энергии, аминокислоты, витамины и необходимые микроэлементы. Можно применять любые среды, способные поддерживать рост соответствующей клетки-хозяина в культуре. Среда для культивирования клеток, которые могут быть дополнительно дополнены другими компонентами для максимального увеличения роста клеток, жизнеспособности клеток и/или продуцирования рекомбинантного белка в конкретной культивируемой клетке-хозяине, являются коммерчески доступными и включают, среди прочего, среду RPMI-1640, среду RPMI-1641, модифицированную по Дульбекко среду Игла (DMEM), минимальную питательную среду Игла, среду F-12K, среду Хэма F12, модифицированную по Искову среду Дульбекко, среду МакКоя 5A, среду Лейбовица L-15, а также бессывороточные среды, такие как среды серии EX-CELL™ 300, которые можно приобрести в Американской коллекции типовых культур или SAFC Biosciences, а также у других поставщиков. Среда для культивирования клеток могут представлять собой бессывороточные среды, безбелковые среды, среды, не содержащие факторов роста, и/или среды, не содержащие пептон. Культуру клеток также можно обогащать путем добавления питательных веществ, и при этом их можно применять в концентрациях, превышающих обычные рекомендуемые концентрации.

Во время жизненного цикла культуры можно применять различные составы сред, например, для облегчения перехода от одной стадии (например, стадии или фазы роста) к другой (например, стадии или фазе продуцирования) и/или для оптимизации условий во время культивирования клеток (например, во время перфузионного культивирования обеспечивается концентрированная среда). Состав ростовой среды можно применять для содействия росту клеток и сведения к минимуму экспрессии белка. Состав среды для продуцирования можно применять для содействия продуцированию представляющего интерес белка и поддержания клеток при минимальном росте новых клеток. Питательную среду, как правило, среду, содержащую более концентрированные компоненты, такие как

питательные вещества и аминокислоты, которые потребляются в ходе фазы продуцирования при культивировании клеток, можно применять для дополнения и поддержания активной культуры, в частности культуры, эксплуатируемой в режиме подпитки, полуперфузионном или перфузионном режиме. Такая концентрированная питательная среда может содержать большинство компонентов среды для культивирования клеток в количестве, составляющем, например, приблизительно 5×, 6×, 7×, 8×, 9×, 10×, 12×, 14×, 16×, 20×, 30×, 50×, 100×, 200×, 400×, 600×, 800× или даже приблизительно 1000× от их нормального количества.

Ростовая фаза может происходить при более высокой температуре, чем фаза продуцирования. Например, ростовая фаза может происходить при первой температуре, составляющей от приблизительно 35°C до приблизительно 38°C, а фаза продуцирования может происходить при второй температуре, составляющей от приблизительно 29°C до приблизительно 37°C, необязательно от приблизительно 30°C до приблизительно 36°C или от приблизительно 30°C до приблизительно 34°C. В дополнение, химические индукторы продуцирования белка, такие как, например, кофеин, бутират и гексаметиленбисацетамид (НМВА), можно добавлять одновременно с изменением температуры, до и/или после него. Если индукторы добавляют после температурного сдвига, их можно добавлять в период от одного часа до пяти дней после температурного сдвига, необязательно от одного до двух дней после температурного сдвига. pH также может сдвигаться во время культивирования либо независимо, либо в комбинации с другими способами.

Клетки-хозяева можно культивировать в суспензии или в адгезивной форме, прикрепленными к твердому субстрату. Культуры клеток можно создавать в биореакторах с псевдооживленным слоем, волоконных биореакторах, роллерных флаконах, встряхиваемых колбах или резервуарах биореакторов с перемешиванием, содержащих или не содержащих микроносители.

Культуры клеток можно эксплуатировать в периодическом режиме, в режиме подпитки, в непрерывном, полунепрерывном или перфузионном режиме. Клетки млекопитающих, такие как клетки СНО, можно культивировать в биореакторах при более мелком масштабе, составляющем от менее 100 мл до менее 1000 мл. В качестве альтернативы можно применять биореакторы более крупного масштаба, которые содержат от 1000 мл до более 20000 литров среды. Крупномасштабные культуры клеток, как, например, для биопроизводства белковых терапевтических средств в клиническом и/или коммерческом масштабе, можно поддерживать в течение недель и даже месяцев, пока клетки продуцируют необходимый(необходимые) белок(белки).

Поскольку связанные с продуктом примеси, такие как гомодимеры, полуантитела, несовмещенные структуры 2X LC и т. п., могут напоминать необходимый полиспецифический белок, были разработаны стратегии и методики, такие как "выступ во впадину", CrossMab, DVD-IgG и другие, для повышения селективности в отношении необходимого полиспецифического белка во время культивирования клеток. Однако все

еще будет оставаться некоторое количество связанных с продуктом примесей, которые продуцируются и которые должны быть удалены в ходе последующей обработки.

Затем полученный экспрессированный рекомбинантный полиспецифический белок можно собрать из среды для культивирования клеток. Способы сбора белков из суспендированных клеток известны в данной области техники и включают без ограничения кислотное осаждение, ускоренное осаждение, такое как флокуляция, разделение под действием силы тяжести, центрифугирование, разделение акустическими волнами, фильтрацию, в том числе мембранную фильтрацию с применением ультрафильтров, микрофильтров, фильтров с тангенциальным потоком, фильтров с переменным тангенциальным потоком, глубинных фильтров и фильтров для намывной фильтрации. Рекомбинантные белки, экспрессируемые прокариотами, восстанавливают из телец включения в цитоплазме за счет процессов окислительно-восстановительного фолдинга, известных в данной области техники.

Затем собранный полиспецифический белок можно очищать или частично очищать от любых примесей, таких как оставшаяся среда для культивирования клеток, клеточные экстракты, нежелательные компоненты, белки клетки-хозяина, неправильно экспрессированные белки, связанные с продуктом примеси и т. п., задействовав одну или несколько последующих операций очистки.

Очистку полиспецифического белка из собранной жидкости культуры клеток можно начать с хроматографии с использованием захвата, в которой применяются смолы и/или мембраны, содержащие средства, которые будут связываться с представляющим интерес рекомбинантным полиспецифическим белком, например, аффинной хроматографии, эксклюзионной хроматографии, ионообменной хроматографии, хроматографии гидрофобных взаимодействий (HIC), аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металлов (IMAC) и т. п. Такие материалы известны в данной области техники и являются коммерчески доступными. Варианты аффинной хроматографии могут включать, например, механизм захвата на основе связывания с субстратом, механизм захвата на основе связывания с аптамером и механизм захвата на основе связывания с кофактором. Для полиспецифических белков, содержащих Fc-компонент, можно применять механизм захвата на основе связывания с антителом или фрагментом антитела, такой как белок A, белок G, белок A/G, белок L.

В любой момент последующей обработки можно проводить вирусную инактивацию и/или вирусную фильтрацию для удаления вирусного вещества из очищенного раствора полиспецифического белка. Одним способом для достижения вирусной инактивации является инкубация при низком pH или других условиях раствора для достижения инактивации вирусов. После вирусной инактивации при низком pH может следовать отдельная операция нейтрализации, при которой раствор с инактивированными вирусами повторно доводят до pH, более совместимого с требованиями следующих отдельных операций. Как правило, нейтрализация происходит при pH 5-7. Пулы, прошедшие вирусную инактивацию или вирусную инактивацию с последующей

нейтрализацией, также можно подвергать фильтрации, такой как глубинная фильтрация, для удаления любого образовавшегося помутнения или осадка. Наряду с глубинной фильтрацией обычно проводится стерилизующая фильтрация. Вирусную фильтрацию можно проводить с помощью микро- или нанофильтров, таких как доступные от Asahi Kasei (Plavona<sup>®</sup>) и EDM Millipore (VPro<sup>®</sup>).

Термин "тонкая очистка" применяется в данном документе в отношении одной или нескольких стадий хроматографии, проводимых для удаления оставшихся контаминантов и примесей, таких как ДНК, белки клетки-хозяина; специфические для продукта примеси, варианты продуктов и агрегаты, и адсорбции вирусов из жидкости, содержащей рекомбинантный полиспецифический белок, который близок к необходимой конечной степени чистоты. В хроматографии, обеспечивающей тонкую очистку, применяются смолы и/или мембраны, содержащие средства, которые можно применять в проточном режиме (когда представляющий интерес белок протекает через смолу/мембрану, а контаминанты и примеси связываются с хроматографической средой, и представляющий интерес белок содержится в элюенте), режиме фронтальной или перегруженной хроматографии (когда раствор, содержащий представляющий интерес белок, загружается в колонку до тех пор, пока не будут заняты сайты адсорбции и разновидность с наименьшей аффинностью к неподвижной фазе (представляющий интерес белок) начнет элюироваться) либо в режиме связывания и элюирования (когда представляющий интерес белок связывается с хроматографической средой и элюируется после того, как контаминанты и примеси протекли через хроматографическую среду или были вымыты из нее). Примеры таких способов хроматографии включают ионообменную хроматографию (IEX), в том числе анионообменную хроматографию (AEX) и катионообменную хроматографию (CEX); хроматографию гидрофобных взаимодействий (HIC); хроматографию со смешанным режимом или мультимодальную хроматографию (MM), хроматографию с гидроксиапатитом (HA); обращенно-фазовую хроматографию и гель-фильтрацию. В одном варианте осуществления способ хроматографии представляет собой катионообменную хроматографию. В одном варианте осуществления катионообменная среда представляет собой смолу.

В настоящем изобретении представлен способ проведения катионообменной хроматографии в условиях высокой солевой нагрузки для снижения содержания связанных с продуктом примесей, при этом способ включает уравнивание среды для катионообменной хроматографии уравнивающим буфером, загрузку композиции в катионообменную среду в загрузочном буфере, промывание колонки первым и вторым буферами для промывки и элюирование полиспецифического белка из среды для катионообменной хроматографии; где уравнивающий буфер, загрузочный буфер и первый буфер для промывки содержат 94-105 мМ хлорида натрия.

"Катионообменная хроматография" относится к хроматографии, проводимой на твердофазном материале, который отрицательно заряжен и имеет свободные катионы для обмена с катионами в водном растворе, пропускаемом над твердой фазой или через нее.

Заряд может быть обеспечен путем прикрепления одного или нескольких заряженных лигандов к твердой фазе, например, с помощью образования ковалентной связи. В качестве альтернативы или в дополнение заряд может быть внутренним свойством твердой фазы (например, как в случае кремнезема, который характеризуется общим отрицательным зарядом). Существуют коммерчески доступные катионообменные материалы, и они включают без ограничения, среди прочего, поглощающую среду в виде смолы и мембраны, слабые катионообменники, сильные катионообменники, сульфопропил (SP), иммобилизованный на агарозе (например, SP-SEPHAROSE FAST FLOW™, SP-SEPHAROSE FAST FLOW XL™ или SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™ от GE Healthcare), CAPTO S™, CAPTO SP ImpRes™, CAPTO S ImpAct™ (GE Healthcare), FRACTOGEL-SO3™, FRACTOGEL-SE HICAP™, FRACTOPREP™ (EMD Merck), Fractogel® EMD SO3-(M), Fractogel® EMD SE Hicap (M), смолы Eshmuno® CPX, Eshmuno® S, Fractogel® EMD COO-(M), Mustang S Acrodisc с Mustang S AcroPrep с Mustang S, CM Ceramic HyperD® F AcroSep с CM Ceramic HyperD® F.

В способе по настоящему изобретению катионообменную хроматографию проводят в режиме связывания и элюирования. Элюат или пул хранения, содержащий представляющий интерес полиспецифический белок, загружают в уравновешенную катионообменную среду таким образом, что представляющий интерес полиспецифический белок связывается с катионообменной средой. Под "связыванием" полиспецифического белка с катионообменным материалом подразумевают воздействие катионообменного материала на полиспецифический белок в соответствующих условиях (pH/электропроводность), так что полиспецифический белок обратимо иммобилизуется в катионообменном материале или на нем за счет ионных взаимодействий между представляющим интерес полиспецифическим белком и заряженной группой или заряженными группами катионообменного материала. Полиспецифический белок может находиться в элюате или пуле, поступающем из предыдущей отдельной операции, такой как операция аффинной хроматографии, вирусной инактивации при низком pH с последующей нейтрализацией, глубинной фильтрации или хроматографии, обеспечивающей тонкую очистку.

Проведение катионообменной хроматографии в режиме связывания и элюирования в способе по настоящему изобретению состоит из нескольких стадий. При подготовке к загрузке полиспецифического белка в катионообменную среду среду уравнивают до загрузки той же буферной композицией, что и композицию полиспецифического белка. "Уравнивающий буфер" представляет собой буфер, используемый для уравнивания хроматографического материала перед загрузкой композиции, содержащей представляющий интерес полиспецифический белок.

После уравнивания элюат или пул хранения, содержащий представляющий интерес полиспецифический белок из предыдущей отдельной операции, титруют составом буфера с высоким содержанием солей, так что в конечном кондиционирующем

загрузочном буфере с композицией содержится хлорид натрия в необходимой концентрации. "Загрузочный буфер" и "конечный кондиционирующий загрузочный буфер" используются в данном документе взаимозаменяемо. Загрузочный буфер имеет подходящий состав, так что представляющий интерес полиспецифический белок связывается с катионообменным материалом.

Загруженный и связанный материал для катионообменной хроматографии затем подвергают множеству промывок. Промывание катионообменного материала означает пропускание соответствующего буфера для промывки через катионообменный материал или над ним. Буфер для промывки обеспечивает удаление одного или нескольких загрязнителей, в том числе связанных с продуктом примесей, от катионообменного материала без существенного элюирования представляющего интерес полиспецифического белка. В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения имеются две стадии промывки. В одном варианте осуществления имеется "первый буфер для промывки" и "второй буфер для промывки". Буфер для промывки применяют для промывки или повторного уравнивания катионообменного материала перед элюированием представляющего интерес полиспецифического белка. Один или несколько составов буфера для промывки могут быть такими же, как составы буфера для уравнивания и/или конечного кондиционирующего загрузочного буфера. Термины "первая промывка" и "вторая промывка" не следует интерпретировать как исключаящие применение одной или нескольких дополнительных промывок или других буферов между стадиями загрузки и первой и/или второй промывки. Предпочтительно, чтобы к концу второй стадии промывки исходный уровень UV-спектра возвращался к нулю или был очень близок к нулю до начала элюирования.

В настоящем изобретении предусмотрено, что уравнивающий буфер, конечный кондиционирующий загрузочный буфер и по меньшей мере один буфер для промывки имеют состав буфера с высоким содержанием солей, и в одном варианте осуществления все они имеют один и тот же состав буфера с высоким содержанием солей. В одном варианте осуществления уравнивающий буфер, конечный кондиционирующий загрузочный буфер и по меньшей мере один буфер для промывки содержат 94-105 мМ хлорида натрия.

"Буфер" представляет собой раствор, который противостоит изменениям pH за счет действия его кислотных и основных сопряженных компонентов. В одном варианте осуществления буфер представляет собой ацетатный буфер. В одном варианте осуществления буфер представляет собой 100 мМ ацетатный буфер. В одном варианте осуществления pH буфера находится в диапазоне от  $5 \pm 0,05$  до  $5,0 \pm 0,1$ . В одном варианте осуществления диапазон pH составляет от 4,9 до 5,1. В одном варианте осуществления диапазон pH составляет от 4,95 до 5,05.

Уравнивающий буфер, конечный кондиционирующий загрузочный буфер и по меньшей мере один буфер для промывки также содержат соль. В одном варианте осуществления соль представляет собой хлорид натрия. В одном варианте осуществления

В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат и от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат и от 94 мМ до 96 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат и от 96 мМ до 105 мМ хлорида натрия. В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат и 94 мМ хлорида натрия. В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат и 96 мМ хлорида натрия. В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат и 105 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH от  $5,0 \pm 0,05$  до  $5,0 \pm 0,1$ . В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат, 94-96 мМ хлорида натрия, pH  $5,0 \pm 0,05$ . В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат, 96-105 мМ хлорида натрия, pH  $5,0 \pm 0,05$ . В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат, 96 мМ хлорида натрия, pH  $5,0 \pm 0,05$ . В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат, 105 мМ хлорида натрия, pH  $5,0 \pm 0,1$ . В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH 4,9-5,1. В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH 4,9, 5,0 или 5,1. В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия, pH 5,0. В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат, 94-96 мМ хлорида натрия, pH 4,9-5,1. В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат, 96 мМ хлорида натрия, pH  $5,0 \pm 0,05$ . В связанном варианте осуществления загрузочный буфер содержит ацетат, 105 мМ хлорида натрия, pH  $5,0 \pm 0,1$ .







осуществления второй буфер для промывки содержит 0-26 мМ хлорида натрия. В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 100 мМ ацетата, 94-96 мМ хлорида натрия,  $\text{pH } 5,0 \pm 0,05$ , и после него следует по меньшей мере один дополнительный буфер для промывки, содержащий 100 мМ ацетата, 25 мМ хлорида натрия,  $\text{pH } 5,0 \pm 0,05$ . В одном варианте осуществления по меньшей мере один буфер для промывки содержит 100 мМ ацетата, 105 мМ хлорида натрия,  $\text{pH } 5,0 \pm 0,1$ , и после него следует по меньшей мере один дополнительный буфер для промывки, содержащий 100 мМ ацетата,  $\text{pH } 5,0 \pm 0,1$ .

Затем связавшийся полиспецифический белок элюируют из материала для катионообменной хроматографии. Полиспецифический белок можно элюировать посредством градиента. Полиспецифический белок можно элюировать из катионообменного материала посредством линейного или ступенчатого градиента. Градиент предпочтительно представляет собой солевой градиент. Градиент создается с помощью по меньшей мере двух буферов для элюирования, где комбинация буферов имеет существенно повышенную электропроводность, так что представляющий интерес полиспецифический белок элюируется из катионообменного материала. Электропроводность в градиенте предпочтительно является большей, чем электропроводность в равновесном состоянии и у каждого из предыдущих буферов.

Элюат после катионообменной хроматографии можно подвергать дополнительным операциям очистки методом хроматографии, обеспечивающей тонкую очистку. Предпочтительна по меньшей мере одна дополнительная операция хроматографии, обеспечивающей тонкую очистку. Представляющий интерес полиспецифический белок предпочтительно наносят на хроматографический материал в проточном режиме.

Концентрирование очищенного полиспецифического белка и замену буфера на необходимый буфер для составления в целях хранения лекарственного вещества в нерасфасованном виде можно осуществлять с помощью операций ультрафильтрации и диализа. Также можно проводить вирусную фильтрацию в любое время в ходе последующей обработки.

Для содействия принятию более взвешенных решений, касающихся производительности каждой стадии в ходе производства, можно измерять критические показатели и параметры производительности для очищенного полиспецифического белка. Эти критические показатели и параметры можно отслеживать в режиме реального времени, почти в режиме реального времени и/или постфактум. В ходе культивирования клеток можно измерять ключевые критические параметры, такие как компоненты среды, которые потребляются (такие как глюкоза), уровни накапливаемых побочных продуктов метаболизма (таких как лактат и аммоний), а также показатели, связанные с поддержанием и выживанием клеток, такие как содержание растворенного кислорода. В ходе соответствующих стадий производственного процесса можно отслеживать критические показатели, такие как удельная продуктивность, плотность жизнеспособных клеток,  $\text{pH}$ , осмоляльность, внешний вид, цвет, агрегация, процент выхода, титр,

концентрация, жизнеспособность, активность и т. п. Отслеживание и измерения можно проводить с применением известных методик и коммерчески доступного оборудования.

Фармацевтические композиции (растворы, суспензии и т. п.) могут включать одно или несколько из следующего: буферы, такие как нейтральный забуференный солевой раствор, забуференный фосфатом солевой раствор и т. п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие средства, такие как EDTA или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты; стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический солевой раствор, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, которые могут служить в качестве растворителя или суспендирующей среды, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства, регулирующие тоничность, такие как хлорид натрия или декстроза. Препарат для парентерального введения можно заключать в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы с несколькими дозами, выполненные из стекла или пластика.

Хотя терминология, применяемая в данной заявке, является стандартной в пределах области техники, в данном документе представлены определения некоторых терминов для обеспечения ясности и определенности смысла пунктов формулы изобретения. Единицы измерения, префиксы и символы могут быть обозначены в их форме, принятой в системе СИ. Упоминаемые в данном документе числовые диапазоны включают числа, определяющие границы диапазона, и включают и поддерживают каждое целое число в пределах заданного диапазона. Способы и методики, описанные в данном документе, обычно выполняют в соответствии с общепринятыми способами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более специализированных литературных источниках, которые цитируются и обсуждаются на протяжении всего настоящего описания, если не указано иное. См., например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), и Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Все документы или части документов, цитируемые в данной заявке, включая без ограничения патенты, заявки на патенты, статьи, книги и трактаты, настоящим явно включены посредством ссылки. Описываемое в варианте осуществления настоящего изобретения можно объединять с другими вариантами осуществления настоящего изобретения.

Настоящее изобретение не должно ограничиваться по объему конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе, которые подразумеваются в

качестве отдельных иллюстраций индивидуальных аспектов настоящего изобретения, и функционально эквивалентные способы и компоненты находятся в пределах объема настоящего изобретения. Безусловно, специалистам в данной области техники из предшествующего описания и сопровождающих графических материалов станут очевидны различные модификации настоящего изобретения в дополнение к показанным и описанным в данном документе. Предусмотрено, что такие модификации попадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

## ПРИМЕРЫ

### Пример 1. Отсутствие солевой нагрузки, биспецифическая молекула № 1

Пул после прохождения очистки на белке А и нейтрализации, содержащий полностью человеческий биспецифический сконструированный иммуноглобулин (биспецифическую молекулу № 1) в ацетатном буфере, загружали на катионообменную хроматографическую смолу Eshmuno CP-FT® (GE Healthcare Bio-Science, Мальборо, Массачусетс) при условиях, указанных в таблице 1.

Таблица 1. Условия катионообменной хроматографии в условиях низкой солевой нагрузки

|                                             | Биспецифическая молекула № 1                  |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Размер колонки и скорость                   | 20 ± 2 см, линейная скорость 140 ± 10% (см/ч) |
| Концентрация<br>Уровень загрузки (г/л)      | 25                                            |
| Предварительное уравнивание                 | 500 мМ ацетата, 2,5 М хлорида натрия, pH 4,9  |
| Уравнивание                                 | 100 мМ ацетата, pH 5,0                        |
| Промывка                                    | 100 мМ ацетата, pH 5,0                        |
| Буфер для элюирования А                     | 100 мМ ацетата, pH 5,0                        |
| Буфер для элюирования В                     | 100 мМ ацетата, 500 мМ хлорида натрия, pH 5,0 |
| Градиент элюирования в начале, % В          | 0                                             |
| Градиент элюирования в конце, % В           | 70                                            |
| Продолжительность градиента элюирования, CV | 44                                            |

|                                                                           |                                                      |
|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Солевой градиент<br>элюирования, мМ/CV                                    | 8,0                                                  |
| Объемы колонки                                                            | 44                                                   |
| Выход (на основе<br>объединенных<br>фракций)                              | 73%                                                  |
| Примеси в<br>извлеченном элюате<br>(на основе<br>объединенных<br>фракций) | 1,5% HMW<br>1,5% полу-mAb<br>Соотношение LC1/LC2 0,8 |

На фиг. 1 показано, что в колонке оставались многочисленные примеси, и они элюировались с основным продуктом. Эти примеси были сходны по заряду (изоэлектрической точке) с основным продуктом и включали полуантитела, неправильные сборки легких цепей 2X и высокомолекулярные разновидности (HMW).

**Пример 2.** Кондиционирование с высокой солевой нагрузкой, биспецифическая молекула № 1

Пул, прошедший вирусную инактивацию с последующей нейтрализацией (100 мМ ацетата, pH 5,0), содержащий биспецифическую молекулу № 1, объединяли с загрузочным буфером (100 мМ ацетата, 350 мМ хлорида натрия, pH 5,00) в соотношении 1:0,378, получая конечную кондиционированную нагрузку с 100 мМ ацетата, 96 мМ хлорида натрия, pH 5,00. Кондиционированную нагрузку загружали на катионообменную хроматографическую смолу Capto-SP ImpRes® в условиях, описанных в таблице 2.

Таблица 2. Условия катионообменной хроматографии в условиях высокой солевой нагрузки

|                              | Биспецифическая молекула № 1                           |                                                        |                                                        |                                                           |
|------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
|                              | Срединный<br>уровень pH и<br>солей                     | Более низкий<br>уровень pH и<br>солей                  | Более высокий<br>уровень pH и<br>солей                 | Более<br>низкий<br>уровень<br>pH, солей<br>и загрузки     |
| Размер колонки и<br>скорость | 20 ± 2 см,<br>линейная<br>скорость 140 ±<br>10% (см/ч) | 20 ± 2 см,<br>линейная<br>скорость 140 ±<br>10% (см/ч) | 20 ± 2 см,<br>линейная<br>скорость 140 ±<br>10% (см/ч) | 20 ± 2 см,<br>линейная<br>скорость<br>140 ± 10%<br>(см/ч) |

| Концентрация<br>Уровень загрузки (г/л)                            | 25                                                        | 23                                                        | 27                                                        | 15                                                           |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Предварительное<br>уравновешивание                                | 500 мМ<br>ацетата, 1,75<br>М хлорида<br>натрия, рН 4,9    | 500 мМ<br>ацетата, 1,75<br>М хлорида<br>натрия, рН 4,9    | 500 мМ<br>ацетата, 1,75<br>М хлорида<br>натрия, рН 4,9    | 500 мМ<br>ацетата,<br>1,75 М<br>хлорида<br>натрия, рН<br>4,9 |
| Уравновешивание                                                   | 100 мМ<br>ацетата, 96<br>мМ хлорида<br>натрия, рН<br>5,00 | 100 мМ<br>ацетата, 94<br>мМ хлорида<br>натрия, рН<br>4,95 | 100 мМ<br>ацетата, 98<br>мМ хлорида<br>натрия, рН<br>5,05 | 100 мМ<br>ацетата,<br>94 мМ<br>хлорида<br>натрия, рН<br>4,95 |
| Конечная<br>кондиционированная<br>нагрузка [хлорид<br>натрия], мМ | 96                                                        | 94                                                        | 98                                                        | 94                                                           |
| Промывка 1                                                        | 100 мМ<br>ацетата, 96<br>мМ хлорида<br>натрия, рН<br>5,05 | 100 мМ<br>ацетата, 94<br>мМ хлорида<br>натрия, рН<br>4,95 | 100 мМ<br>ацетата, 98<br>мМ хлорида<br>натрия, рН<br>5,05 | 100 мМ<br>ацетата,<br>94 мМ<br>хлорида<br>натрия, рН<br>4,95 |
| Промывка 2                                                        | 100 мМ<br>ацетата, 25<br>мМ хлорида<br>натрия, рН<br>5,00 | 100 мМ<br>ацетата, 23<br>мМ хлорида<br>натрия, рН<br>4,95 | 100 мМ<br>ацетата, 26<br>мМ хлорида<br>натрия, рН<br>5,00 | 100 мМ<br>ацетата,<br>24 мМ<br>хлорида<br>натрия, рН<br>4,95 |
| Буфер для элюирования<br>А                                        | 100 мМ<br>ацетата, рН<br>5,00                             | 100 мМ<br>ацетата, рН<br>4,95                             | 100 мМ<br>ацетата, рН<br>5,05                             | 100 мМ<br>ацетата,<br>рН 4,95                                |
| Буфер для элюирования                                             | 100 мМ                                                    | 100 мМ                                                    | 100 мМ                                                    | 100 мМ                                                       |

|                                                   |                                                              |                                                              |                                                              |                                                     |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| В                                                 | ацетата, 350<br>мМ хлорида<br>натрия, рН<br>5,00             | ацетата, 350<br>мМ хлорида<br>натрия, рН<br>4,95             | ацетата, 350<br>мМ хлорида<br>натрия, рН<br>5,05             | ацетата,<br>350 мМ<br>хлорида<br>натрия, рН<br>4,95 |
| Градиент элюирования<br>в начале, % В             | 7,1                                                          | 7,0                                                          | 7,3                                                          | 7,0                                                 |
| Градиент элюирования<br>в конце, % В              | 100                                                          | 100                                                          | 100                                                          | 100                                                 |
| Продолжительность<br>градиента элюирования,<br>CV | 20,3<br>25-350 мМ<br>хлорида<br>натрия                       | 20,8<br>24-350 мМ<br>хлорида<br>натрия                       | 19,8<br>26-350 мМ<br>хлорида<br>натрия                       | 20,8<br>24-350 мМ<br>хлорида<br>натрия              |
| Солевой градиент<br>элюирования, мМ/CV            | 16,0                                                         | 15,7                                                         | 16,4                                                         | 15,7                                                |
| Объемы колонки CV                                 | 20,3                                                         | 20,8                                                         | 19,8                                                         | 20,8                                                |
| Выход                                             | 66%                                                          | 66%                                                          | 65%                                                          | 57%                                                 |
| Объем пула, CV                                    | 4,1                                                          | 3,3                                                          | 4,6                                                          | 1,9                                                 |
| Примеси в извлеченном<br>элюате                   | 0,9% HMW<br>0,6% полу-<br>mAb<br>Соотношение<br>LC1/LC2 1,0% | 0,9% HMW<br>0,5% полу-<br>mAb<br>Соотношение<br>LC1/LC2 1,0% | 0,9% HMW<br>0,6% полу-<br>mAb<br>Соотношение<br>LC1/LC2 1,0% | 0,6%<br>HMW                                         |

Было обнаружено, что при применении условий с высокой солевой нагрузкой примеси с более низкой  $pI$  удалялись со смолы перед элюированием. На фиг. 2 показано, что условия с высокой солевой нагрузкой приводили к снижению числа пиков примесей в профиле элюирования с четырех пиков до одного пика (показаны результаты для срединного уровня). Большинство примесей удалялось между стадиями загрузки и второй промывки. Полу-mAb протекали через смолу в ходе загрузки или минимально связывались с колонкой. 2X LC удалялись из колонки или минимально связывались с колонкой после первой стадии промывки. Вторая стадия промывки обеспечивала условия полного связывания для оставшихся разновидностей белков и обеспечивала восстановление исходного уровня UV-спектра до нуля перед началом элюирования, уплотняя профиль элюирования, что приводило к гораздо более эффективному сбору и лучшему качеству основного продукта.

Уравновешивающий буфер, конечный кондиционирующий загрузочный буфер и

первый буфер для промывки тестировали при концентрации хлорида натрия 94-98 мМ со сходными результатами. рН уравнивающего буфера, конечного кондиционирующего загрузочного буфера и двух составов буфера для промывки тестировали при различных концентрациях от 4,95 до 5,05 со сходными результатами. Концентрацию нагрузки тестировали при 5-27 мг/мл со сходными результатами.

В целом, условия с высокой солевой нагрузкой характеризовались более низким выходом (~ 60%) по сравнению с условиями отсутствия солевой нагрузки. Причина заключается в том, что при прогоне без солевой нагрузки элюирование может быть проведено фракциями, что обеспечивает более высокую точность и достоверность контроля качества конечного продукта. Однако в условиях отсутствия солевой нагрузки был крутой градиент 8 мМ [хлорид натрия]/CV, что не является оптимальным для надежного производственного процесса, тогда как в условиях высокой солевой нагрузки солевой градиент составлял 16 мМ [хлорид натрия]/CV. Кондиционирование с высокой солевой нагрузкой обеспечивало снижение продолжительности элюирования с 44 объемов колонки до 20 объемов колонки. Такое снижение объемов колонки экономит время и ресурсы, поскольку градиент элюирования является более коротким, что также приводит к более надежному производственному процессу.

**Пример 3.** Высокая плотность загрузки, кондиционирование без солевой нагрузки, биспецифическая молекула № 2

Пул элюатов после прохождения очистки на белке А и нейтрализации, содержащий полностью человеческий сконструированный слитый белок IgG/Fab (биспецифическую молекулу № 2), загружали на катионообменную хроматографическую смолу Capto-SP ImpRes® (GE Healthcare Bio-Science, Мальборо, Массачусетс) при условиях, указанных в таблице 3.

Таблица 3. Условия для катионообменной хроматографии с высокой плотностью загрузки с кондиционированием без солевой нагрузки

|                                          |                                               |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------|
|                                          | Биспецифическая молекула № 2                  |
| Размер колонки и скорость                | 4,66 мл<br>Линейная скорость 140 см/ч         |
| Концентрация<br>Уровень загрузки (мг/мл) | 25                                            |
| Предварительное<br>уравнивание           | 500 мМ ацетата, 1,75 М хлорида натрия, рН 4,9 |
| Уравнивание                              | 100 мМ ацетата, рН 5,0                        |
| Промывка                                 | 100 мМ ацетата, рН 5,0                        |
| Буфер для элюирования А                  | 100 мМ ацетата, рН 5,0                        |
| Буфер для элюирования В                  | 100 мМ ацетата, 500 мМ хлорида натрия, рН 5,0 |
| Градиент элюирования в                   | 0                                             |

|                                                                   |                                                                                                                                            |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| начале, % В                                                       |                                                                                                                                            |
| Градиент элюирования в<br>конце, % В                              | 100                                                                                                                                        |
| Продолжительность<br>градиента элюирования,<br>CV                 | 31                                                                                                                                         |
| Солевой градиент<br>элюирования, mM/CV                            | 16                                                                                                                                         |
| Объемы колонки пула<br>(фракции 4-6)                              | 1,5                                                                                                                                        |
| Выход                                                             | 44%                                                                                                                                        |
| Примеси в извлеченном<br>элюате (соответствующие<br>фракциям 4-6) | Сниженное соотношение LC1/LC2 согласно CE-SDS=0,9<br>HMW согласно SE (%)=1,7<br>LMW согласно SE (%)=0,9<br>Мономеры согласно SE-HPLC=97,4% |

На фиг. 3 показан один пик элюирования, полученный вследствие высокой плотности загрузки, с кондиционированием без солевой нагрузки при крутом градиенте элюирования. Связанные с продуктом примеси с низкой  $pI$  не отделялись от основного продукта при высокой плотности загрузки и присутствовали главным образом во фракциях 1, 2 и 3, как показано по сниженным соотношениям LC1 и LC2 согласно CE-SDS, составляющим от 4 до 7 (неправильно спаренные разновидности LC1) и уровню разновидностей LMW от 2 до 4%.

**Пример 4.** Более низкая плотность загрузки, кондиционирование без солевой нагрузки, биспецифическая молекула № 2

Пул элюатов после прохождения очистки на белке А и нейтрализации, содержащий полностью человеческий сконструированный слитый белок IgG/Fab (биспецифическую молекулу № 2), загружали на катионообменную хроматографическую смолу Capto-SP ImpRes<sup>®</sup> (GE Healthcare Bio-Science, Мальборо, Массачусетс) при условиях, указанных в таблице 4.

Таблица 4. Условия для катионообменной хроматографии с более низкой плотностью загрузки в условиях отсутствия солевой нагрузки

|                                          |                                       |
|------------------------------------------|---------------------------------------|
|                                          | Биспецифическая молекула № 2          |
| Размер колонки и скорость                | 4,66 мл<br>Линейная скорость 140 см/ч |
| Концентрация<br>Уровень загрузки (мг/мл) | 10                                    |

|                                                              |                                                                                                                                             |
|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Предварительное уравнивание                                  | 500 мМ ацетата, 1,75 М хлорида натрия, pH 4,9                                                                                               |
| Уравнивание                                                  | 100 мМ ацетата, pH 5,0                                                                                                                      |
| Промывка                                                     | 100 мМ ацетата, pH 5,0                                                                                                                      |
| Буфер для элюирования А                                      | 100 мМ ацетата, pH 5,0                                                                                                                      |
| Буфер для элюирования В                                      | 100 мМ ацетата, 500 мМ хлорида натрия, pH 5,0                                                                                               |
| Градиент элюирования в начале, % В                           | 0                                                                                                                                           |
| Градиент элюирования в конце, % В                            | 100                                                                                                                                         |
| Продолжительность градиента элюирования, CV                  | 62                                                                                                                                          |
| Солевой градиент элюирования, мМ/CV                          | 8                                                                                                                                           |
| Объемы колонки пула                                          | 3,0                                                                                                                                         |
| Выход                                                        | 73%                                                                                                                                         |
| Примеси в извлеченном элюате (соответствующие фракциям 5-10) | Сниженное соотношение LC1/LC2 согласно CE-SDS=1,2<br>HMW согласно SE (%)=1,4<br>LMW согласно SE (%)=0,1<br>Мономеры согласно SE-HPLC=98,54% |

Поскольку высокая плотность загрузки, условия крутого градиента элюирования в примере 3 не обеспечивали достаточного разделения основного продукта и связанных с продуктом примесей с низкой рI, плотность загрузки и условия градиента снижали. На фиг. 4 показано, что более низкая плотность загрузки (10 в сравнении с 25 г/л) и более пологий градиент (8 в сравнении с 16 мМ/CV) обеспечивали отделение основных примесей продукта с низкой рI в виде отчетливого пика, образованного фракциями 1-4. Эта фракция демонстрировала соотношение LC1 и LC2, составляющее от 3 до 10, что указывало на неправильно спаренные разновидности LC1. В отличие от этого, главный пик демонстрировал совокупное соотношение LC1 и LC2, составляющее 1,2. Хотя разделение было лучше и увеличивало выход с 44% до 73%, поскольку по-прежнему требовалось автоматическое объединение на основе OD, все еще было необходимо собирать элюат, начиная с самой высокой OD для препика, что снижает выход и делает этот процесс недостаточным для применения в производственной операции.

**Пример 5.** Кондиционирование с высокой солевой нагрузкой, биспецифическая молекула № 2

Пул, прошедший вирусную инактивацию с последующей нейтрализацией, содержащий биспецифическую молекулу № 2, объединяли с загрузочным буфером с высоким содержанием солей (100 мМ ацетата, 500 мМ хлорида натрия, pH 5,00), получая конечный кондиционирующий загрузочный буфер с концентрацией 100 мМ ацетата, 105 мМ хлорида натрия, pH 5,00. Кондиционированную нагрузку загружали на катионообменную хроматографическую смолу Capto-SP ImpRes® (GE Healthcare Bio-Science, Мальборо, Массачусетс) при условиях, указанных в таблице 4.

Таблица 5. Условия для катионообменной хроматографии в условиях высокой солевой нагрузки

|                                                          |                                               |
|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
|                                                          | Биспецифическая молекула № 2                  |
| Размер колонки и скорость                                | 4,66 мл<br>Линейная скорость 140 см/ч         |
| Концентрация<br>Уровень загрузки (г/л)                   | 10                                            |
| Предварительное уравнивание                              | 500 мМ ацетата, 1,75 М хлорида натрия, pH 4,9 |
| Уравнивание                                              | 100 мМ ацетата, 105 мМ хлорида натрия, pH 5,0 |
| Конечная кондиционированная нагрузка [хлорид натрия], мМ | 105                                           |
| Промывка 1                                               | 100 мМ ацетата, 105 мМ хлорида натрия, pH 5,0 |
| Промывка 2                                               | 100 мМ ацетата, pH 5,0                        |
| Буфер для элюирования А                                  | 100 мМ ацетата, pH 5,0                        |
| Буфер для элюирования В                                  | 100 мМ ацетата, 500 мМ хлорида натрия, pH 5,0 |
| Градиент элюирования в начале, % В                       | 0                                             |
| Градиент элюирования в конце, % В                        | 100                                           |
| Продолжительность градиента элюирования, CV              | 62                                            |
| Солевой градиент элюирования, мМ/CV                      | 8,1                                           |

|                                                                       |                                                                                                                                            |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Объемы колонки пула<br>(фракции 5-10)                                 | 3,5                                                                                                                                        |
| Выход                                                                 | 58%                                                                                                                                        |
| Примеси в извлеченном<br>элюате<br>(соответствующие<br>фракциям 4-10) | Сниженное соотношение LC1/LC2 согласно CE-SDS=1,1<br>HMW согласно SE (%)=1,0<br>LMW согласно SE (%)=0,1<br>Мономеры согласно SE-HPLC=98,9% |

Было обнаружено, что при применении условий с высокой солевой нагрузкой связанные с продуктом примеси с низкой  $pI$  удалялись из колонки для CEX перед элюированием. Эти примеси, вероятно, соответствуют неправильно спаренным разновидностям LC1, с учетом того, что соотношение LC1 и LC2 в собранном материале после промывок 1 и 2 составляло 5,0 по сравнению с ожидаемым соотношением, составляющим 1, при правильной сборке и образовании пар LC1 и LC2. На фиг. 5 показано, что в условиях высокой солевой нагрузки число пиков примесей в профиле элюирования снижалось с двух пиков до одного пика с небольшим плечом (фракции 1-3), которое все еще содержало неправильно спаренные разновидности (LC1/LC2=от 2 до 3). Вторая стадия промывки также обеспечивала восстановление исходного уровня UV-спектра до нуля перед началом элюирования, уплотняя профиль элюирования, что приводило к гораздо более эффективному сбору и лучшему качеству основного продукта. Оптимизированная процедура с более низким уровнем загрузки и более пологим градиентом в комбинации с кондиционированием с высокой солевой нагрузкой обеспечивала увеличение выхода в ходе очистки методом CEX с 44% до 58%, в то же время обеспечивая профиль элюирования для сбора очищенного пула с низким уровнем неправильно спаренных разновидностей LC1 (как видно из соотношения LC1 и LC2, близкого к 1), HMW и LMW, а также критерии объединения на основе оптического поглощения.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки полиспецифического белка из композиции, содержащей полиспецифический белок и по меньшей мере одну связанную с продуктом примесь, при этом способ включает:

уравновешивание среды для катионообменной хроматографии уравновешивающим буфером, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия;

загрузку композиции в катионообменную среду в загрузочном буфере, содержащем 94-105 мМ хлорида натрия;

промывание колонки по меньшей мере одним буфером для промывки, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия; и

элюирование полиспецифического белка из среды для катионообменной хроматографии.

2. Способ по п. 1, где загрузочный буфер содержит 94-96 мМ хлорида натрия.

3. Способ по п. 2, где загрузочный буфер содержит 96-105 мМ хлорида натрия.

4. Способ по п. 2, где загрузочный буфер содержит 94 мМ хлорида натрия.

5. Способ по п. 2, где загрузочный буфер содержит 96 мМ хлорида натрия.

6. Способ по п. 2, где загрузочный буфер содержит 98 мМ хлорида натрия.

7. Способ по п. 2, где загрузочный буфер содержит 105 мМ хлорида натрия.

8. Способ по п. 1, где загрузочный буфер содержит ацетат.

9. Способ по п. 8, где загрузочный буфер содержит ацетат, pH 4,9-5,1.

10. Способ по п. 8, где загрузочный буфер содержит ацетат, pH от  $5,0 \pm 0,05$  до  $5,0 \pm 0,1$ .

11. Способ по п. 8, где загрузочный буфер содержит 100 мМ ацетата.

12. Способ по п. 1, где загрузочный буфер содержит ацетат, 94-105 мМ хлорида натрия.

13. Способ по п. 1, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит 94-105 мМ хлорида натрия.

14. Способ по п. 13, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит 94-96 мМ хлорида натрия.

15. Способ по п. 13, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит 96-105 мМ хлорида натрия.

16. Способ по п. 13, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит 94 мМ хлорида натрия.

17. Способ по п. 13, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит 96 мМ хлорида натрия.

18. Способ по п. 13, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит 98 мМ хлорида натрия.

19. Способ по п. 13, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит 105 мМ хлорида натрия.

20. Способ по п. 1, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит

ацетат.

21. Способ по п. 20, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, pH 4,9-5,1.

22. Способ по п. 20, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, pH от  $5,0 \pm 0,05$  до  $5,0 \pm 0,1$ .

23. Способ по п. 20, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит 100 мМ ацетата.

24. Способ по п. 1, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, от 94 мМ до 105 мМ хлорида натрия.

25. Способ по п. 1, где способ предусматривает по меньшей мере один дополнительный буфер для промывки.

26. Способ по п. 25, где по меньшей мере один дополнительный буфер для промывки представляет собой второй буфер для промывки.

27. Способ по п. 25, где по меньшей мере один дополнительный буфер для промывки содержит 0-26 мМ хлорида натрия.

28. Способ по п. 25, где по меньшей мере один буфер для промывки содержит ацетат, 94-105 мМ хлорида натрия, и после него следует по меньшей мере один дополнительный буфер для промывки, содержащий ацетат, 0-25 мМ хлорида натрия.

29. Способ по п. 1, где по меньшей мере один уравнивающий буфер содержит 94-105 мМ хлорида натрия.

30. Способ по п. 29, где по меньшей мере один уравнивающий буфер содержит 94-96 мМ хлорида натрия.

31. Способ по п. 29, где по меньшей мере один уравнивающий буфер содержит 96-105 мМ хлорида натрия.

32. Способ по п. 29, где по меньшей мере один уравнивающий буфер содержит 94 мМ хлорида натрия.

33. Способ по п. 29, где по меньшей мере один уравнивающий буфер содержит 96 мМ хлорида натрия.

34. Способ по п. 29, где по меньшей мере один уравнивающий буфер содержит 98 мМ хлорида натрия.

35. Способ по п. 29, где по меньшей мере один уравнивающий буфер содержит 105 мМ хлорида натрия.

36. Способ по п. 1, где уравнивающий буфер содержит ацетат.

37. Способ по п. 36, где уравнивающий буфер содержит ацетат, pH 4,9-5,1.

38. Способ по п. 36, где уравнивающий буфер содержит ацетат, pH от  $5,0 \pm 0,05$  до  $5,0 \pm 0,1$ .

39. Способ по п. 36, где уравнивающий буфер содержит 100 мМ ацетата.

40. Способ по п. 1, где композицию загружают при 10-27 г/л.

41. Способ по п. 40, где композицию загружают при 15-27 г/л.

42. Способ по п. 1, где полиспецифический белок элюируют с катионообменной

смолы посредством градиента.

43. Способ по п. 42, где градиент является линейным.

44. Способ по п. 42, где градиент представляет собой солевой градиент.

45. Способ по п. 1, где полиспецифический белок представляет собой биспецифический белок.

46. Способ по п. 1, где полиспецифический белок представляет собой биспецифическое антитело.

47. Очищенный полиспецифический белок, полученный посредством способа по п. 1.

48. Способ по п. 1, где среда для катионообменной хроматографии представляет собой смолу.

49. Способ снижения содержания примесей с низкой  $pI$  в элюате после катионообменной хроматографии, при этом способ включает:

уравновешивание среды для катионообменной хроматографии уравновешивающим буфером, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия;

загрузку композиции в катионообменную среду в загрузочном буфере, содержащем 94-105 мМ хлорида натрия;

промывание колонки по меньшей мере одним буфером для промывки, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия; и

элюирование полиспецифического белка из среды для катионообменной хроматографии;

где элюат после катионообменной хроматографии характеризуется сниженным содержанием примесей с низкой  $pI$  по сравнению с элюатом после катионообменной хроматографии, извлеченным в соответствующем способе, в котором не используется хлорид натрия на стадиях уравновешивания, загрузки и промывки.

50. Способ по п. 49, где примесь с низкой  $pI$  представляет собой связанную с продуктом примесь.

51. Способ по п. 50, где по меньшей мере одна связанная с продуктом примесь представляет собой полуантитело или неправильную сборку легких цепей 2X, 3X или 4X.

52. Способ проведения катионообменной хроматографии в условиях высокой солевой нагрузки для снижения содержания связанных с продуктом примесей, при этом способ включает:

уравновешивание среды для катионообменной хроматографии уравновешивающим буфером;

загрузку композиции в катионообменную среду в загрузочном буфере;

промывание колонки первым и вторым буферами для промывки и

элюирование полиспецифического белка из среды для катионообменной хроматографии;

где уравновешивающий буфер, загрузочный буфер и первый буфер для промывки содержат 94-105 мМ хлорида натрия.

53. Способ по п. 52, где второй буфер для промывки содержит 0-26 мМ хлорида натрия.

54. Способ получения выделенного очищенного рекомбинантного полиспецифического белка, при этом способ включает:

создание клеточной культуры в биореакторе с клеткой-хозяином, экспрессирующей полиспецифический белок;

культивирование клеток-хозяев для экспрессии полиспецифического белка;

сбор рекомбинантного полиспецифического белка;

аффинную очистку собранного рекомбинантного полиспецифического белка;

инактивацию вирусов при низком pH в пуле элюатов после аффинной очистки и нейтрализацию пула;

уравновешивание среды для катионообменной хроматографии уравновешивающим буфером, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия;

загрузку нейтрализованного подвергнутого аффинной очистке рекомбинантного полиспецифического белка в уравновешенную катионообменную среду в загрузочном буфере, содержащем 94-105 мМ хлорида натрия;

промывание катионообменной среды буфером для промывки, содержащим 94-105 мМ хлорида натрия, а затем вторым буфером для промывки, содержащим 0-26 мМ хлорида натрия;

элюирование полиспецифического белка из среды для катионообменной хроматографии;

загрузку элюата после катионообменной хроматографии, содержащего рекомбинантный полиспецифический белок, на вторую хроматографическую смолу в проточном режиме; и

концентрирование очищенного рекомбинантного полиспецифического белка в буфере для составления.

55. Способ по п. 47, где вторая хроматографическая смола выбрана из анионообменной хроматографической смолы, катионообменной хроматографической смолы, смолы для мультимодальной хроматографии, смолы для хроматографии гидрофобных взаимодействий и гидроксипатитной хроматографической смолы.

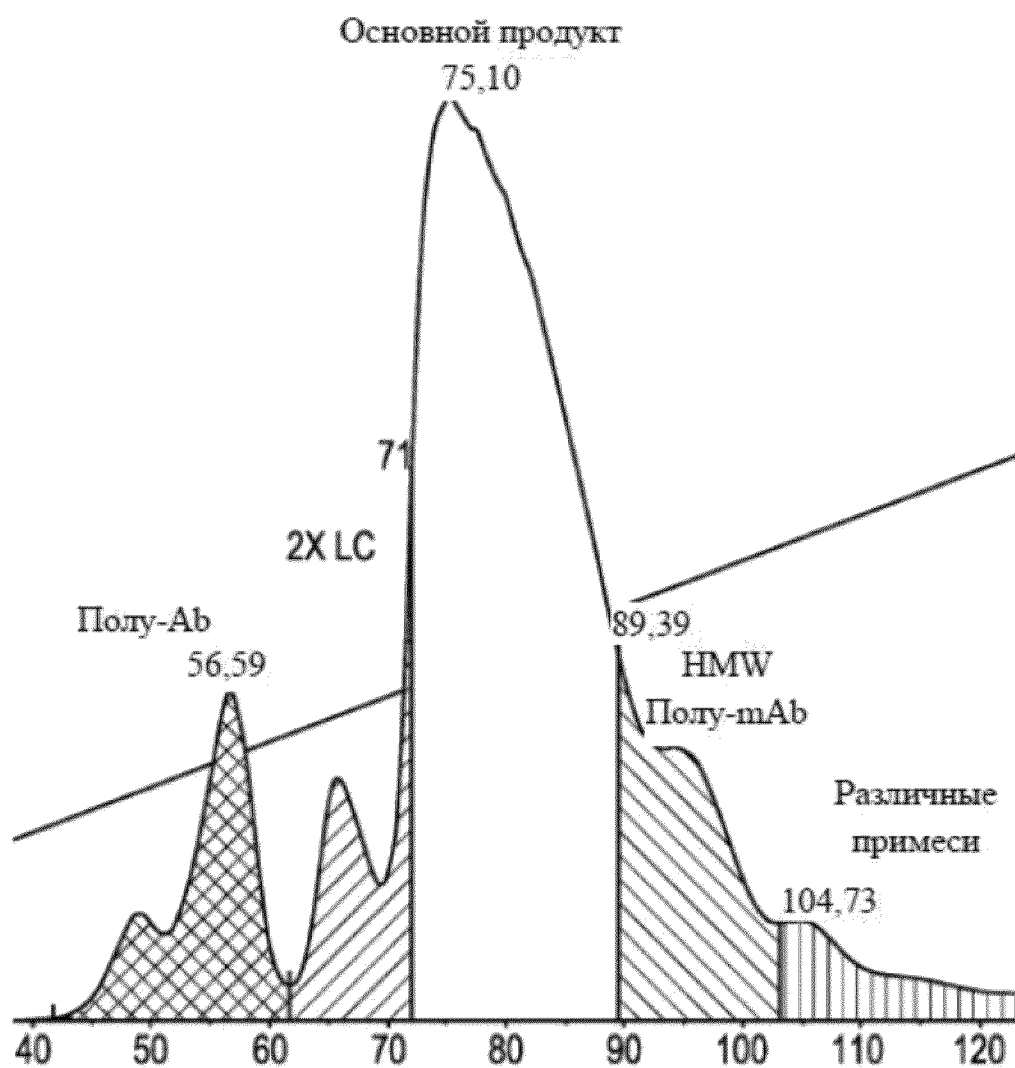
56. Выделенный очищенный рекомбинантный полиспецифический белок, полученный посредством способа по п. 55.

57. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенный очищенный рекомбинантный полиспецифический белок, полученный посредством способа по п. 55.

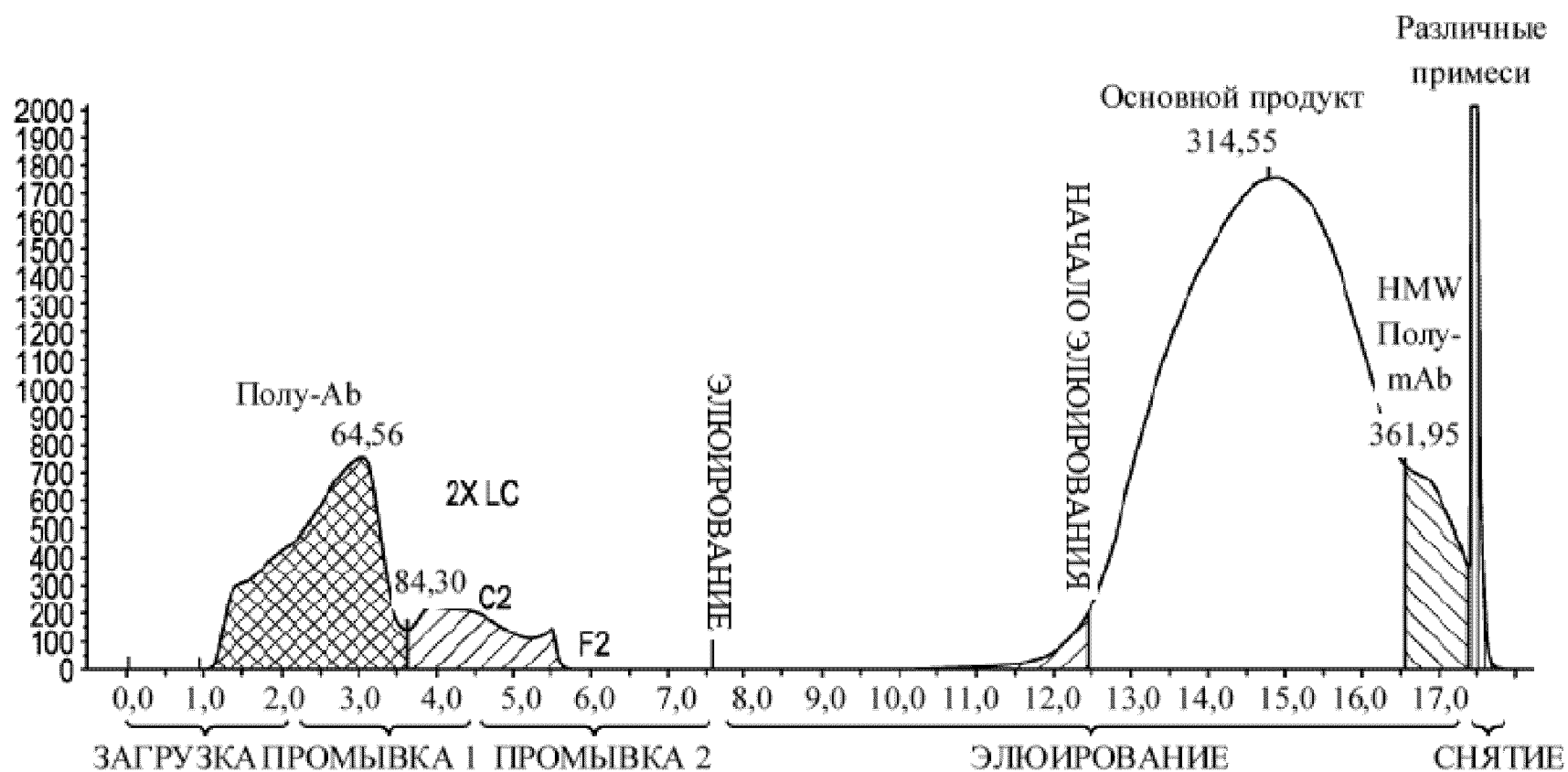
По доверенности

1/5

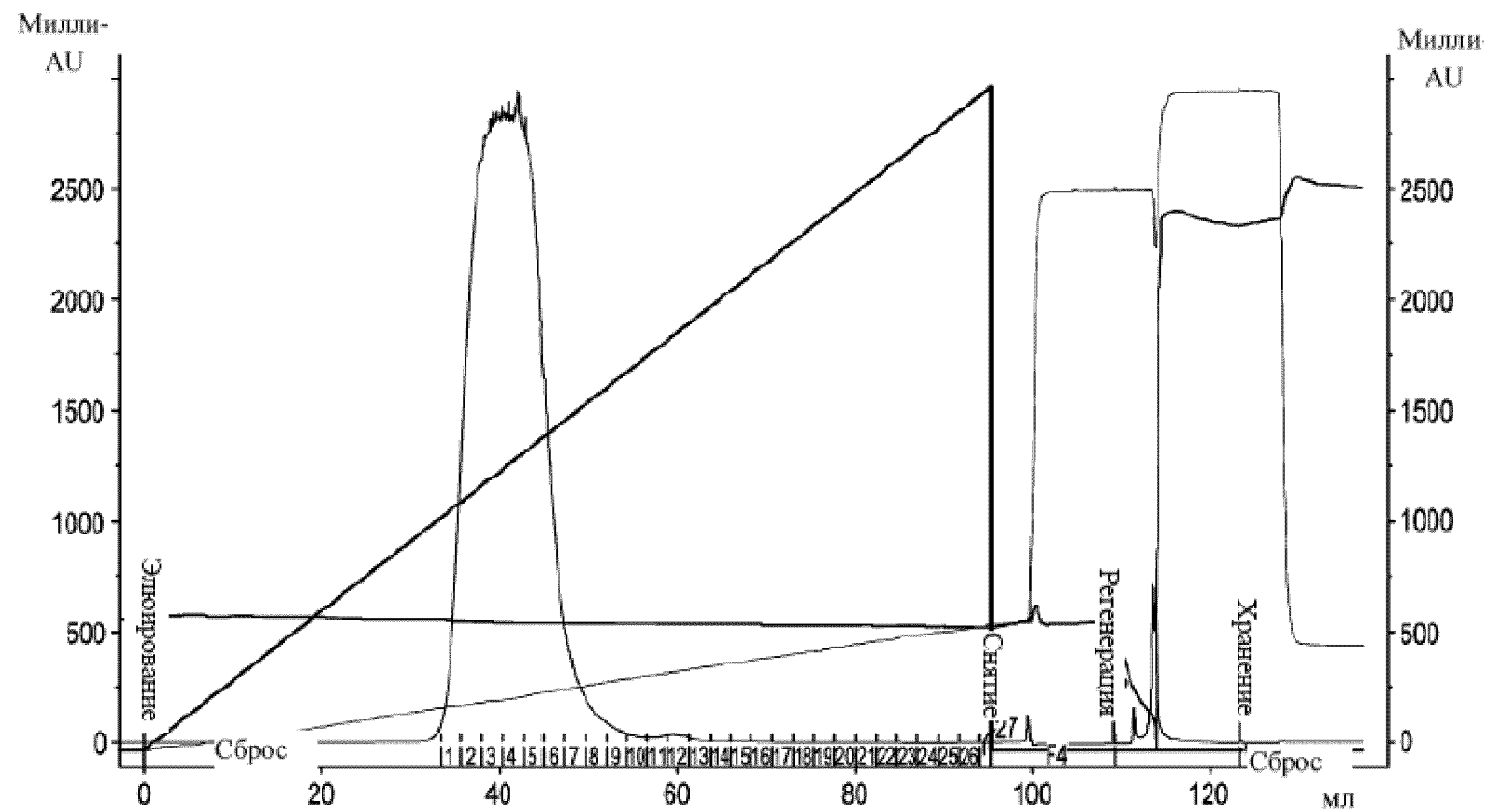
ФИГ. 1

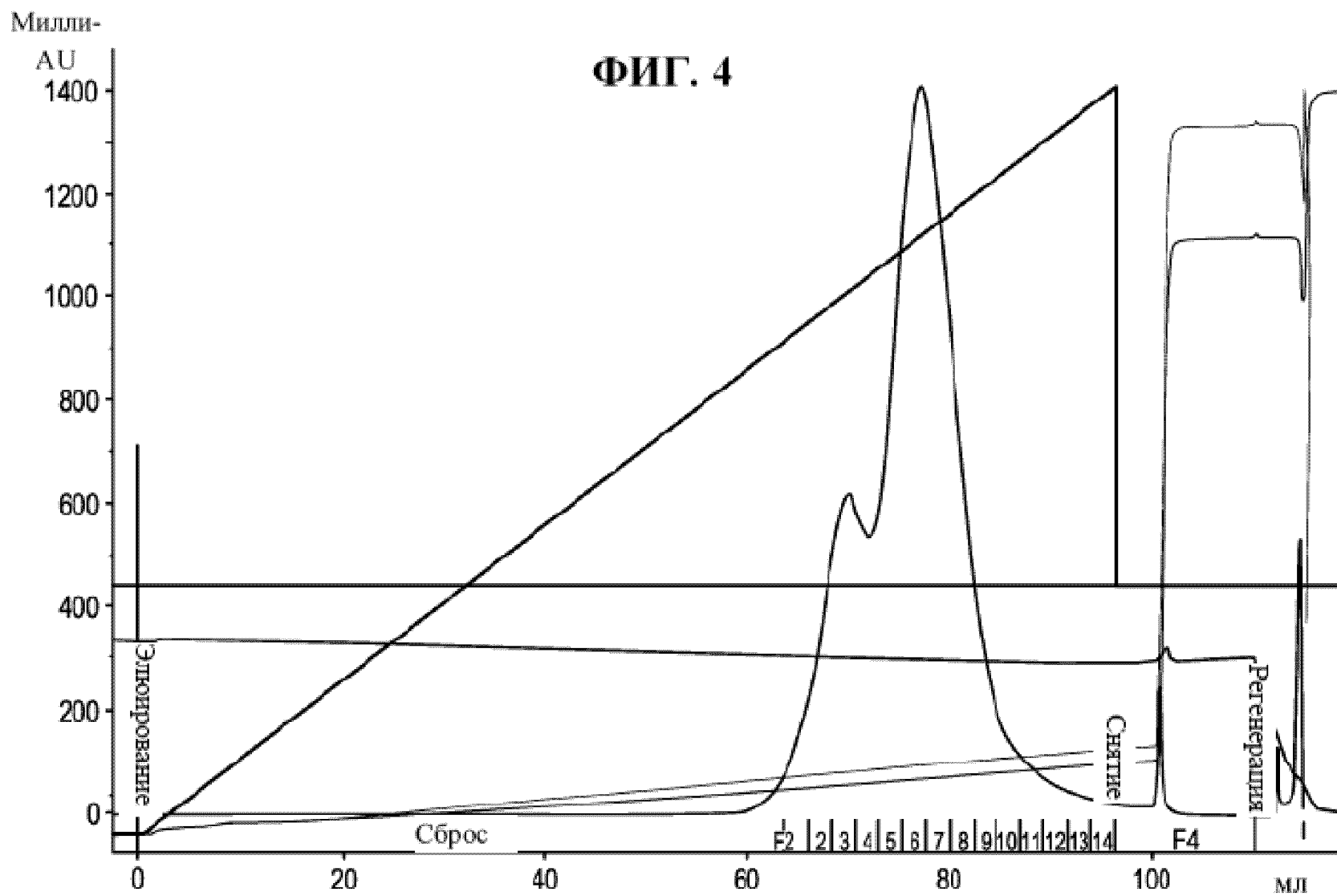


ФИГ. 2



ФИГ. 3





ФИГ. 5

