

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 042536

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.22

(21) Номер заявки
201791424

(22) Дата подачи заявки
2015.12.18

(51) Int. Cl. C07K 1/14 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(54) ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКА

(31) 14199717.1

(32) 2014.12.22

(33) EP

(43) 2017.10.31

(86) PCT/EP2015/080561

(87) WO 2016/102383 2016.06.30

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

(72) Изобретатель:
Бассетт Филип, Дэвис Ричард,
Гонсалес Элена, Пирс-Хиггинз Марк
(GB)

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

(56) SIEGEL D.L. ET AL.: "EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT ANTI-RH(D) ANTIBODIES ON FILAMENTOUS PHAGE: A MODEL SYSTEM FOR ISOLATING HUMANRED BLOOD CELL ANTIBODIES BY REPERTOIRE CLONING", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 83, № 8, 15 April 1994 (1994-04-15), pages 2334-2344, XP000609017, ISSN: 0006-4971, page 2336, paragraph 3 - column 2, line 17

US-A1-2003219838
WO-A2-2012013930
WO-A1-2006054063

GRASLUND SUSANNE ET AL.: "Protein production and purification", NATURE METHODS, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 5, № 2, 1 February 2008 (2008-02-01), pages 135-146, XP002488686, ISSN: 1548-7091, DOI: 10.1038/NMETH.F.202 [retrieved on 2008-01-30], the whole document

(57) Изобретение предоставляет новый способ получения белка, где белок экспрессируется в клетке-хозяине, и более конкретно относится к способу получения белка, который приводит к пониженному содержанию родственных примесей.

042536 B1

042536 B1

042536

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способу получения белка, экспрессированного в клетке-хозяине; более конкретно, изобретение относится к способу получения белка, который приводит к получению белка, имеющего пониженное содержание родственных примесей.

Уровень техники, к которому относится изобретение

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

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

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

Восстановление гетерологичного белка, экспрессированного в прокариотической клетке-хозяине во время первичной экстракции из периплазматического пространства часто представляет собой проблему. В этом направлении в известном уровне техники описаны различные способы. Например, в заявке US 5655866 описано применение тепловой обработки для облегчения последующей экстракции функциональных Fab' фрагментов антител. В заявке WO 2006/054063 описано включение нелизирующей обработки в комбинации с тепловой обработкой на стадии первичной экстракции. В заявке 2005/019466 описано включение стадии прерывания после стадии ферментации, но перед экстракцией. В заявке US 2013/0060009 описана коррекция pH образцов перед их тепловой обработкой во время стадии экстракции.

Несмотря на это другой значительной проблемой является высокая концентрация примесей, присутствующих после первичной экстракции, что повышает нагрузку на последующие стадии очистки и общую эффективность всего процесса очистки. Эти примеси могут иметь форму клеточного детрита, белков клетки-хозяина (HCP), ДНК или родственных примесей, таких как процессированные формы экспрессированных продуктов, агрегаты или другие модифицированные формы, такие как дезамидированные, изомеризованные, окисленные и другие конъюгированные формы. Среди них продукты деградации рекомбинантного белка, также называемые родственными примесями, часто вызывают наибольшие затруднения для удаления во время процесса экстракции нагреванием и первичного восстановления, поскольку они имеют сходные с целевым белком физико-химические свойства, такие как температура плавления (T_m).

Хотя конечный раствор белка, полученный после экстракции, далее будет подвергнут процессу очистки белка, степень чистоты этого раствора влияет на общую эффективность и затраты, ассоциированные со стадиями очистки и, таким образом, на получение терапевтического белка в целом. Конкретно родственные примеси влияют на профиль качества конечного продукта, контроль которого является в частности важным для постоянства в различных партиях.

По этой причине в области техники сохраняется потребность в способах, которые улучшают удаление примесей в процессе экстракции белка из культуры клеток.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показан редокс-потенциал и температурные профили экстрактов. Как можно заметить, поддержание подачи слоя азота во время стадии тепловой обработки поддерживает низкие показатели редокс-потенциала на всем протяжении, где минимум составляет приблизительно -435 мВ и обычно составляет -375 мВ при поддержании температуры 59°C. Сходный низкий редокс-потенциал наблюдается при барботировании азота. Когда на буфер, содержащий клетки-хозяева, подают воздух вместо азота, можно заметить, что величины редокс-потенциала значительно повышаются во время экстракции на стадии нагревания и становятся положительными (обычно приблизительно равны +45 мВ) при поддержании температуры 59°C. Сходный высокий редокс-потенциал наблюдают при барботировании воздуха. Барбо-

тирование газа переводят на подачу слоя по ходу экстракции по причине наблюдаемых высоких уровней пенообразования.

На фиг. 2 показан электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ, SDS-PAGE) образцов, полученных после экстракции. Полоса М отображает стандартные маркеры молекулярной массы (Mark 12, Invitrogen). Полоса 1 представляет собой эталонный стандарт анти-ФНО (TNF) альфа Fab'. Полоса 2 представляет собой DsbC стандарт (протеиндисульфидизомераза). Линия 3 представляет собой образец после экстракции, где во время экстракции применяют подачу слоя азота. Линия 4 представляет собой образец после экстракции, где во время экстракции применяют подачу воздуха. Линия 5 представляет собой образец после экстракции, где во время экстракции через образец барботируют азот. Линия 6 представляет собой образец после экстракции, где во время экстракции через образец барботируют воздух. Фигура демонстрирует, что в присутствии азота восстанавливающих условий во время процесса экстракции нагреванием достаточно для обеспечения значительного снижения концентрации родственных примесей по сравнению с экстракциями, проводимыми в присутствии воздуха.

На фиг. 3 показано общее количество фрагментов Fab', выражаемое в % от всех родственных соединений, что измеряют при помощи катионообменной (СЕХ) (высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ, HPLC) после очистки белка L. Можно наблюдать очевидный эффект, который оказывает подача слоя азота на очистку от родственных примесей. В экстракте #8, где подача слоя азота не применяется, имеется более высокая концентрация родственных примесей. С другой стороны, фигура также предполагает, что скорость подачи слоя азота может оказывать влияние на очистку от этих примесей при сравнении экстрактов 1 и 2, а также 7 и 8.

На фиг. 4 показано общее количество фрагментов Fab', выражаемое в % от всех родственных соединений, что измеряют при помощи катионообменной ВЭЖХ после очистки белка L. Результаты снова демонстрируют преимущество присутствия азота, что приводит к значительному снижению концентраций родственных примесей, сохраняющихся после экстракции нагреванием. Дополнительный благоприятный эффект получают при коррекции pH, проводимой перед экстракцией нагреванием, поскольку оказывается, что концентрации родственных примесей дополнительно снижаются по сравнению с предыдущими примерами.

На фиг. 5 показана конечная точка измерения редокс-потенциала в зависимости от номинального объема встряхиваемой колбы. Эти результаты демонстрируют, что встряхиваемые колбы, которые изготавливают в присутствии подачи слоя азота, поддерживают более восстанавливающую среду экстракта по сравнению с колбами, которые изготавливают в присутствии воздуха. Фигура также демонстрирует, что колбы с большим номинальным объемом являются более восстанавливающими по сравнению с колбами, имеющими меньший номинальный объем, скорее всего по причине меньшей скорости окисления экстракта из-за меньшей площади поверхности при отсутствии корреляции с номинальным объемом.

На фиг. 6 показано общее количество фрагментов Fab', выражаемое в % от всех родственных соединений, что измеряют при помощи катионообменной ВЭЖХ после очистки белка L. Эти результаты демонстрируют, что встряхиваемые колбы, которые изготавливают в присутствии азота, имеют значительно более низкие концентрации родственных примесей после экстракции. Все колбы, изготовленные в присутствии азота (диапазон конечной точки редокс-потенциала от -10 до -116 мВ), демонстрируют значительно более низкие концентрации родственных примесей по сравнению со всеми колбами, приготовленными в присутствии воздуха (диапазон конечной точки редокс-потенциала от +79 до +97 мВ).

На фиг. 7 показано влияние pH и восстанавливающей среды на T_m очищенных Fab' фрагментов. Фигура демонстрирует результаты определения термостабильности для двух главных соединений родственных примесей. Продемонстрирована корреляция между редокс-потенциалом и термостабильностью (температурой плавления); чем ниже редокс-потенциал, тем ниже температура плавления белка. Сходный эффект можно описать для pH, когда его значение становится более нейтральным. Оба показателя обеспечивают большую склонность родственных примесей к деградации, таким образом облегчая их удаление.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение решает обозначенную выше потребность в предоставлении нового способа для получения белка, где белок экспрессируется в клетке-хозяине. В частности, настоящее изобретение предоставляет способ, подходящий для промышленного получения.

В первом варианте осуществления изобретение предоставляет способ получения белка, представляющего интерес, где указанный белок экспрессируется в клетке-хозяине, включающий культивирование указанных клеток-хозяев в условиях, способствующих тому, что они экспрессируют указанный белок;

сбор клеток-хозяев из культуральной жидкости;

добавление буфера к клеткам-хозяевам; и

подвергание клеток-хозяев в буфере тепловой обработке, где редокс-потенциал буфера поддерживают ниже 0 мВ во время указанной стадии тепловой обработки.

В конкретном варианте осуществления клетки-хозяева представляют собой прокариотические клетки, предпочтительно грамотрицательные бактерии. В другом варианте осуществления клетки-хозяева

представляют собой клетки *E.coli* или клетки *P. fluorescens*. Прокариотические клетки-хозяева для экспрессии белков хорошо известны в области техники (Terpe, K. (2006), Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems, Appl. Microbiol. Biotechnol., 72, 211-222). Клетки-хозяева в соответствии с изобретением включают рекомбинантные клетки, которые были созданы при помощи генной инженерии для получения белка, представляющего интерес, такого как фрагмент антитела. Рекомбинантные клетки-хозяева *E.coli* можно получить от любого подходящего штамма *E.coli*, включая MC4100, TG1, TG2, DHB4, DH5 α , DH1, BL21, K12, XL1Blue и JM109. Один пример представляет собой штамм *E.coli* W3110 (ATCC 27,325), штамм-хозяин, часто применяемый для ферментации рекомбинантного белка. Фрагменты антитела также можно получать путем культивирования модифицированных штаммов *E.coli*, например, метаболических мутантов или штаммов *E.coli*, лишенных протеазы, таких как раскрытые в заявках WO 2011/086138, WO 2011/086139, WO 2011/086136 и WO 2013/007388, которые включены в данную заявку во всей полноте.

Белок, представляющий интерес, который можно очистить в соответствии со способами настоящего изобретения, обычно экстрагируют из периплазмы клетки-хозяина *E.coli*. Способы для направления белков в этот компартмент хорошо известны в области техники (Makrides, S.C. (1996), Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*, Microbiol. Rev., 60, 512-538). Примеры подходящих сигнальных последовательностей для направления белков в периплазму *E.coli* включают сигнальные последовательности *E.coli* PhoA, OmpA, OmpT, LamB и OmpF.

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

В качестве альтернативы белок, представляющий интерес, который можно очистить в соответствии со способами настоящего изобретения, экстрагируют из периплазмы *P. fluorescens*. Подходящие последовательности, которые направляют белки в периплазматический компартмент *P. fluorescens*, включают лидерные белки секреции sec-типа, как описано в области техники (D.M. Retallack et al., Transport of heterologous proteins to the periplasmic space of *Pseudomonas fluorescens* using a variety of native signal sequences, Biotechnol. Lett., 29 (2007), p. 1483-1491). Экспрессия белка, представляющего интерес, может находиться под контролем индуцируемой системы, где экспрессия находится под контролем индуцируемого промотора, как описано в предыдущем параграфе. В этом случае можно применять хорошо известные индукторы, такие как ИПТГ, и в качестве альтернативы индукторы, такие как бензоат антранилата, который индуцирует промоторы Pben509 и Pben278 соответственно, которые описаны в экспрессирующих системах *P. fluorescens*.

Прокариотические культуры клеток-хозяев (ферментации) можно культивировать в любой среде, которая поддерживает рост клеток-хозяев и экспрессию рекомбинантного белка. Среда может представлять собой любую среду с определенным химическим составом, такую как, например, описана для *E.coli* у Durany O. et al. (2004), Studies on the expression of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in *Escherichia coli*, Process. Biochem., 39, 1677-1684.

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

плотности клеток.

Далее клетки-хозяева собирают из культуральной среды, например клетки-хозяева собирают из образца при помощи центрифугирования, фильтрации или концентрирования.

В одном варианте осуществления способа в соответствии с настоящим изобретением стадия сбора клеток включает стадию центрифугирования и восстановления клеток. В конкретном предпочтительном варианте осуществления указанная стадия центрифугирования представляет собой непрерывное центрифугирование, при котором восстанавливается клеточная суспензия.

Для процессов культивирования прокариотической клетки-хозяина (например, *E.coli*), где белок, представляющий интерес, такой как фрагмент антитела, обнаруживают в периплазматическом пространстве клетки-хозяина, необходимо высвобождение белка из клетки-хозяина. Высвобождения можно достичь при помощи любого подходящего способа или комбинации способов, таких как лизис клеток в результате механической обработки или воздействия давлением, воздействия циклов заморозания-оттаивания, осмотического шока, воздействия экстракционных средств или тепловой обработки. Такие способы экстракции для высвобождения белка хорошо известны в области техники. В способе настоящего изобретения экстракции белка достигают при помощи стадии тепловой обработки, т.е. поддержания образца при повышенной температуре в течение определенного периода времени.

В соответствии со способом настоящего изобретения буфер добавляют к клеткам, собранным из культуральной жидкости, до стадии тепловой обработки. В конкретном варианте осуществления способа изобретения указанный буфер представляет собой 100 ммоль Трис и 10 ммоль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) при pH 7,4; в дополнительном варианте осуществления указанный экстрагирующий буфер представляет собой 75 ммоль Трис и 7,5 ммоль ЭДТК при pH 7,4, 200 ммоль Трис и 20 ммоль ЭДТК при pH 7,4 или 300 ммоль Трис и 30 ммоль ЭДТК при pH 7,4. В одном варианте осуществления изобретения буфер имеет pH, которая гарантирует, что pH образца составляет от 6 до 9, например pH от 6 до 8, до стадии тепловой обработки, как описано в заявке WO 2012/013930, которая включена в данную заявку во всей полноте. Предпочтительно указанный pH составляет от 6,5 до 8, от 6,8 до 7,8 или от 7 до 7,6.

Специалистам в области техники известны дополнительные подходящие буферы, описанные в области техники для применения с целью экстракции белка.

В дополнительном альтернативном варианте осуществления редокс-потенциал указанного буфера поддерживается ниже -100 мВ, ниже -200 мВ, ниже -300 мВ или ниже -400 мВ.

Редокс-потенциал окружающей среды является, в частности, важным для динамики дисульфидных связей между тиольными группами остатков цистеина, присутствующих в молекулах белков. После восстановления указанные дисульфидные связи разрываются, освобождая соответствующие тиольные группы (-SH). Молекулы антител имеют несколько дисульфидных связей, которые являются важными для поддержания их структуры и, таким образом, их биологической активности. Некоторые из этих дисульфидных связей являются более доступными для восстанавливающих и/или окислительных соединений, присутствующих в окружающей среде, чем другие, с учетом их позиции в молекуле и, таким образом, являются более подверженными разрыву.

В отношении настоящего изобретения родственные примеси являются на самом деле фрагментами белка, представляющего интерес, и, таким образом, имеют меньший размер и более простую структуру. Без ограничений теорией можно сказать, что цистеиновые связи в указанных родственных примесях являются более доступными и, таким образом, более подверженными разрыву вследствие редокс-потенциала окружающей среды.

Во втором варианте осуществления способа изобретения указанную тепловую обработку проводят в контейнере и указанный редокс-потенциал поддерживают путем снижения количества кислорода (O_2), присутствующего в газообразной фазе в контейнере во время тепловой обработки.

В целом в контейнере находится объем воздуха (называемый здесь газообразной фазой) над образцом, состоящего из буфера и клеток-хозяев. В соответствии со смыслом изобретения снижение количества кислорода в газообразной фазе означает изменение композиции указанной газообразной фазы таким образом, что она содержит меньше кислорода, чем воздух. Как известно в области техники, воздух обычно содержит приблизительно 21% кислорода (по объему).

С целью поддержания редокс-потенциала ниже 0 мВ в соответствии со способом изобретения специалист в области техники осведомлен о различных средствах, доступных для предотвращения окисления экстрагируемого образца. Это можно осуществлять путем удаления кислорода и других окисляющих газов, присутствующих в газообразной фазе в контейнере, обычно путем их замещения другим инертным газом. Указанное замещение можно осуществить при помощи подачи слоя азота (N_2), т.е. поддержания образца в контейнере в контакте с газообразной фазой, содержащей N_2 , или путем барботирования, т.е. пузырения или пропуска инертного газа через образец в контейнер. Прочие инертные газы, которые можно применять для поддержания редокс-потенциала в соответствии со способом изобретения, включают аргон и гелий.

В качестве альтернативы существует выбор восстанавливающих средств, доступных в области техники, которые имеют различные степени активности. Следовательно, специалист в области техники выбирает наиболее подходящее восстанавливающее средство в зависимости от желаемого редокс-

потенциала и времени, в течение которого его следует поддерживать. Известные восстанавливающие средства в области техники включают, но не ограничиваются глутатионом, меркаптоэтанолом, дитиотреитолом или трис(2-карбоксиэтил)фосфином.

Культивирование прокариотических клеток-хозяев может происходить в любом подходящем контейнере, таком как встряхиваемая колба или ферментер, в зависимости от требуемого масштаба производства. Различные крупные ферментеры доступны при имеющейся вместительности, превышающей 1000 л и достигающей приблизительно 100000 л. Предпочтительно используют ферментеры вместительностью от 1000 до 50000 л, более предпочтительно от 1000 до 25000 л, от 1000 до 20000 л, от 1000 до 15000 л, от 1000 до 10000 л, от 1000 до 5000 л, вместительностью 20000, 15000, 12000, 10000, 5000 или 2000 л. Также можно использовать ферментеры меньшего размера, имеющие вместительность между 0,5 и 1000 л.

В предпочтительном варианте осуществления указанная газообразная фаза содержит менее 20, 15, 12, 10, 8, 5, 2 или 1% кислорода (по объему) во время стадии тепловой обработки.

В предпочтительном варианте осуществления указанный кислород фактически исключается из газообразной фазы во время стадии тепловой обработки.

В третьем варианте осуществления способа изобретения азот (N_2) добавляют к газообразной фазе контейнера.

В четвертом варианте осуществления способа изобретения указанная газообразная фаза содержит по меньшей мере 80% N_2 , по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% N_2 , по меньшей мере 95% N_2 или по меньшей мере 97% или 99% N_2 . В дополнительном альтернативном варианте осуществления указанная газообразная фаза преимущественно представлена N_2 .

Обычно указанный N_2 добавляют к газообразной фазе контейнера в виде подачи слоя и поддерживают в пространстве над продуктом в контейнере, содержащем буфер и клетки хозяева путем добавления 100% газа N_2 в пространство над продуктом при 0,1-1 об/об/мин (объем газа на объем жидкости в минуту, т.е. 1 л/мин для 1 л объема экстракции).

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения белка, представляющего интерес, где указанный белок экспрессируется в клетке-хозяине, включающему культивирование указанных клеток-хозяев в условиях, способствующих тому, что они экспрессируют указанный белок;

сбор клеток-хозяев из культуральной жидкости;

добавление буфера к клеткам-хозяевам; и

подвергание клеток-хозяев в буфере тепловой обработке в контейнере, где газообразная фаза контейнера преимущественно представлена N_2 .

В зависимости от конфигурации контейнера указанный N_2 можно добавлять в газообразную фазу контейнера, где контейнер далее запечатывается, т.е. внутренняя часть контейнера изолируется от внешней среды, оставляя N_2 в газообразной фазе во время тепловой обработки. В качестве альтернативы можно применять режим постоянного потока N_2 через газообразную фазу контейнера во время стадии тепловой обработки, например, для контейнеров, которые не допускают возможности изолирования внутренней части от внешней окружающей среды.

В одном варианте осуществления N_2 добавляют или вводят в газообразную фазу перед стадией тепловой обработки для гарантирования поддержания желаемой величины редокс-потенциала во время стадии тепловой обработки.

В конкретном варианте осуществления способ изобретения включает

культивирование указанных клеток-хозяев в условиях, способствующих тому, что они экспрессируют белок, представляющий интерес;

сбор клеток-хозяев из культуральной жидкости;

добавление буфера к клеткам-хозяевам в контейнере;

добавление N_2 к газообразной фазе контейнера;

запечатывание указанного контейнера; и

подвергание клеток-хозяев в буфере тепловой обработке в контейнере, где редокс-потенциал указанного буфера поддерживают ниже 0 мВ во время указанной тепловой обработки.

Таким образом, в дополнительном варианте осуществления способа изобретения указанный N_2 вводят в виде подачи слоя с использованием по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 99 или 100% N_2 .

В качестве альтернативного варианта осуществления изобретения указанный N_2 вводят путем барботирования N_2 через буфер во время тепловой обработки, предпочтительно путем барботирования практически чистого N_2 .

В пятом варианте осуществления изобретения указанный N_2 добавляют в контейнер в виде подачи слоя в газообразную фазу контейнера или путем барботирования N_2 через буфер.

Способ в соответствии с изобретением включает стадию тепловой обработки, которая делает возможным получения образца растворимого, правильно уложенного и собранного белка, такого как фрагмент антитела, посредством облегчения удаления прочих материалов, родственных белку.

Белок, который "правильно уложен и собран", демонстрируется наличием одной полосы, соответ-

вующей ожидаемой молекулярной массе собранной белковой цепи при помощи ДСН-ПААГ-электрофореза в невосстанавливающих условиях. Другой материал, родственный белку, будет представлять собой частично деградированные фрагменты правильно уложенного и собранного белка.

Стадия тепловой обработки в способе настоящего изобретения представляет собой стадию поддержания температуры образца на желаемом повышенном уровне температуры после того, как этот делаемый повышенный уровень температуры достигнут во время стадии нагревания.

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

В шестом варианте осуществления способа изобретения указанную стадию тепловой обработки проводят при температуре от 30 до 70°C.

В седьмом варианте осуществления способа изобретения указанную стадию тепловой обработки проводят при температуре от 55 до 65°C.

Стадию тепловой обработки предпочтительно проводят в течение длительного периода времени. Длительность тепловой обработки предпочтительно находится в промежутке времени от 1 до 24 ч или от 1 до 18 ч, более предпочтительно от 4 до 18 ч, еще более предпочтительно от 6 до 16 ч и наиболее предпочтительно от 8 до 14 ч или от 8 до 12 ч, например, в течение 10 ч. Таким образом, минимальное время для тепловой обработки составляет 1, 2 или 3 ч и максимальное составляет 20, 22 или 24 ч.

В восьмом варианте осуществления способа изобретения стадию тепловой обработки шестого или седьмого варианта осуществления поддерживают в течение периода времени от 1 до 18 ч.

Как известно специалисту в области техники, в целом существует обратно-пропорциональная взаимосвязь между временем реакции и температурой, при этом, чем выше температура, при которой протекает реакция, тем короче период времени, необходимый для протекания реакции.

В конкретном варианте осуществления тепловая обработка проводится при температуре от 50 до 60°C в течение периода времени от 10 до 16 ч и более предпочтительно при температуре 59°C в течение периода времени от 10 до 12 ч. Специалисту в области техники будет ясно, что температуру и время можно выбирать подходящим для соответствующего образца образом в отношении характеристик получаемого белка, представляющего интерес, такого как антитело или фрагмент антитела.

В дополнительном альтернативном варианте осуществления способа изобретения экстракцию указанного белка проводят при температуре от 58 до 60°C в течение периода времени от 8 до 12 ч.

Стадию тепловой обработки предпочтительно проводят с перемешиванием образца, таким как в шейкере или мешалке, установленным на подходящую скорость перемешивания, например, 200 оборотов в минуту (об/мин). Несмотря на это скорость перемешивания будет варьироваться в зависимости от масштаба способа.

В девятом варианте осуществления способа изобретения образец имеет или подвергается коррекции pH до 6-9 перед стадией тепловой обработки. В дополнительном конкретном варианте осуществления способа изобретения pH указанного образца составляет от 6,5 до 8, 6,5 до 7,5 или от 6,8 до 7,2 перед стадией тепловой обработки.

В конкретном варианте осуществления pH образца измеряют или корректируют перед стадией тепловой обработки для гарантирования того, что pH образца во время стадии тепловой обработки составляет от 5 до 9, предпочтительно pH образца во время стадии тепловой обработки составляет от 6 до 7.

В дополнительном варианте осуществления pH корректируют при помощи основания, такого как неорганическое основание, например гидроксид натрия, или органического основания, такого как триэтиламин или триметиламин или трис основание.

Для коррекции pH образца можно применять любое подходящее средство. Средство может представлять собой буфер или может добавляться перед и/или после буфера. Типичные средства, которые можно применять для коррекции pH, включают или состоят из одного или больше следующих веществ, NaOH, NH₄OH, серная кислота, ЭДТК, трис-буфер.

В дополнительном конкретном варианте осуществления pH образца измеряют или корректируют до стадии тепловой обработки и перед добавлением инертного газа, такого как азот, в газообразную фазу контейнера с целью поддержания редокс-потенциала ниже 0 мВ. В качестве альтернативы в другом варианте осуществления изобретения pH образца измеряют и/или корректируют до стадии тепловой обработки, и инертный газ, такой как азот, пропускают через образец во время стадии тепловой обработки.

Измерения pH, упоминаемые в данной заявке, в целом приведены к 20°C.

В контексте настоящего изобретения словосочетание "до стадии тепловой обработки" означает "перед" и включает момент времени, при котором образец достигает желаемой повышенной температуры, и начинается стадия тепловой обработки (поддержания повышенной температуры). С целью достижения

желаемой повышенной температуры во время стадии тепловой обработки образец подвергают "фазе нагревания", на протяжении которой температура образца является повышенной до желаемой температуры. В одном варианте осуществления способ в соответствии с изобретением включает подвергание образца фазе нагревания и стадии тепловой обработки. В варианте осуществления, где способ включает подвергание образца фазе нагревания и стадии тепловой обработки, образец может иметь требуемый уровень pH до начала фазы нагревания и/или требуемый pH уровень во время фазы нагревания.

В конкретном варианте осуществления N₂ добавляют в газообразную фазу контейнера до начала фазы нагревания. Предпочтительно образец имеет требуемый уровень pH до указанной фазы нагревания.

В десятом варианте осуществления способа изобретения белок, представляющий интерес, представляет собой рекомбинантный белок, закодированный экспрессионным вектором.

В одиннадцатом варианте осуществления способа в соответствии с восьмым вариантом осуществления изобретения белок представляет собой рекомбинантное антитело.

В двенадцатом варианте осуществления указанное рекомбинантное антитело представляет собой фрагмент рекомбинантного антитела. В области техники существует множество известных фрагментов рекомбинантного антитела, включая Fab, Fab', F(ab')₂, Fv и scFv фрагменты. В качестве альтернативы рекомбинантные антитела выбирают из диатела, триатела, тетраатела, миниантитела, доменных антител, одноцепочечных антител, биспецифических, триспецифических, тетраспецифических или мультиспецифических антител, образованных из фрагментов антител или антител, включая, но не ограничиваясь Fab-Fv конструкциями.

В тринадцатом варианте осуществления способа изобретения указанное рекомбинантное антитело или фрагмент рекомбинантного антитела специфически связывается с ФНО-альфа (TNF-alpha) или с CD154.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предоставляет способ получения рекомбинантного антитела, где указанное рекомбинантное антитело экспрессируется в клетке-хозяине, включающий культивирование указанных клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих их экспрессирование указанного белка, сбор клеток-хозяев из культуральной жидкости, добавление буфера к клеткам-хозяевам и подвергание клеток-хозяев тепловой обработке для экстракции рекомбинантного антитела из указанных клеток-хозяев в контейнере, где редокс-потенциал указанного буфера поддерживается ниже 0 мВ, ниже -100 мВ, ниже -200 мВ, ниже -300 мВ или ниже -400 мВ на протяжении указанной экстракции.

В другом конкретном варианте осуществления настоящее изобретение предоставляет способ получения рекомбинантного антитела, где указанное рекомбинантное антитело экспрессируется в клетке-хозяине, включающий культивирование указанных клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих их экспрессирование указанного белка, сбор клеток-хозяев из культуральной жидкости, добавление буфера к клеткам-хозяевам в контейнере, добавление N₂ в газообразную фазу контейнера, подвергание клеток-хозяев тепловой обработке и восстановление указанного белка.

В другом конкретном варианте осуществления настоящее изобретение предоставляет способ получения рекомбинантного антитела, где указанное рекомбинантное антитело экспрессируется в клетке-хозяине, включающий культивирование указанных клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих их экспрессирование указанного белка, сбор клеток-хозяев из культуральной жидкости, добавление буфера к клеткам-хозяевам в контейнере, добавление N₂ в газообразную фазу контейнера, подвергание клеток-хозяев тепловой обработке и восстановление указанного белка, где указанный восстановленный белок имеет более низкое содержание родственных примесей по сравнению с белком, восстановленным в способе получения, который включает тепловую обработку, проведенную в присутствии N₂ в газообразной фазе контейнера.

Способ в соответствии с настоящим изобретением может включать одну или более дополнительных стадий, таких как процедуры очистки, например, фильтрация и/или центрифугирование. Также включена хроматография псевдооживленного слоя.

Предпочтительные дополнительные процедуры очистки включают ионообменную хроматографию, микрофильтрацию, ультрафильтрацию, диафильтрацию, поглощение на закрепленном слое и поглощение в расширяющемся слое, а также комбинацию любых этих процедур.

Термин "антитело" или "антитела", как применяют в данной заявке, относится к моноклональным или поликлональным антителам. Термин "антитело" или "антитела", применяемые в данной заявке, включает, но не ограничивается рекомбинантными антителами, которые создают при помощи рекомбинантных технологий, как известно в области техники. Термин "антитело" или "антитела" включает антитела любых видов, в частности видов млекопитающих, такие как

антитела человека любого изотипа, включая IgA₁, IgA₂, IgD, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgG₄, IgE и IgM, а также их модифицированные варианты, антитела приматов, например полученные от шимпанзе, бабуина, резус- или яванского макака;

антитела грызунов, например, полученные от мыши, крысы или кролика;

антитела козлов или лошадей; а также

антитела семейства верблюдовых (например, полученные от верблюдов или лам, такие как Nano-

bodies™), а также производные вышеперечисленных веществ; или

антитела, полученные от видов птиц, такие как антитела цыплят, или от видов рыб, такие как антитела акул.

Термин "антитело" или "антитела" также относится к "химерным" антителам, в которых одна порция по меньшей мере одной последовательности тяжелой и/или легкой цепи антитела получена от одних видов и другая порция последовательности тяжелой и/или легкой цепи антитела получена от других видов. Химерные антитела, представляющие интерес, в данной заявке включают "приматизированные" антитела, включающие вариабельный участок антигенсвязывающей области, полученный от низшего примата (например, от обезьяны Старого Света, такой как бабуин, резус-или яванский макак), и последовательности константного участка человека. "Гуманизированные" антитела представляют собой химерные антитела, которые содержат последовательность, полученную из антител животного происхождения. Во многих случаях гуманизированные антитела представляют собой антитела человека (реципиентное антитело), в котором остатки гипервариабельного участка реципиента замещаются остатками гипервариабельного участка [или участка, определяющего комплементарность, CDR] видов, не являющихся человеком (донорское антитело), таких как мышь, крыса, кролик, цыпленок или низший примат, которые имеют желаемую специфичность, аффинность и активность. В большинстве случаев остатки антитела человека (реципиентного) за пределами CDR, т.е. в каркасной области (FR), дополнительно замещаются соответствующими остатками, не принадлежащими человеку. Более того, гуманизированные антитела могут включать остатки, которые не обнаруживаются в реципиентном антителе или в донорском антителе. Эти модификации производят для дополнительного улучшения действия антитела. Гуманизация снижает иммуногенность антител животного происхождения у людей, таким образом облегчая применение антител для лечения заболеваний человека. Гуманизированные антитела и некоторые различные технологии для их создания хорошо известны в области техники. Термин "антитело" или "антитела" также относится к антителам человека, которые можно создать в качестве альтернативы гуманизации. Например, можно создавать трансгенных животных (например, мышей), которые способны после иммунизации вырабатывать полный спектр антител человека при отсутствии выработки эндогенных мышинных антител. Например, описано, что гомозиготная делеция тяжелой цепи J-сегмента (JH) гена у химерных и мышей с герминальной мутацией приводит к полному ингибированию выработки эндогенных антител. Перенос генной матрицы иммуноглобулина клеток зародышевой линии человека в такую мышь с герминальной мутацией приведет к выработке антител человека со специфичностью в отношении определенного антигена после иммунизации трансгенного животного, которое является носителем генов иммуноглобулина клеток зародышевой линии человека, указанным антигеном. Технологии создания таких трансгенных животных и технологии экстракции и получения антител человека от таких трансгенных животных известны в области техники. В качестве альтернативы у трансгенных животных, например мышей, замещают только гены иммуноглобулина, кодирующие вариабельные участки антитела мыши, соответствующими вариабельными последовательностями гена иммуноглобулина человека. Гены иммуноглобулинов зародышевой линии мышей, кодирующие константные участки антитела, остаются преимущественно неизмененными. Таким образом, эффекторные функции антитела в иммунной системе трансгенной мыши и, следовательно, выработка В-клеток, остаются неизмененными, что может привести к улучшенному ответу антитела на провокацию антигеном *in vivo*. Сразу после экстракции генов, кодирующих конкретное антитело, представляющее интерес, из таких трансгенных животных гены, кодирующие константные участки, можно заменить генами константных участков человека для получения полностью гуманизированного антитела. Прочие способы получения антител/фрагментов антител человека *in vitro* основаны на технологии дисплея, например, технологии фагового или рибосомного дисплея, где используют библиотеки рекомбинантной ДНК, которые либо создаются, по меньшей мере частично, искусственно, либо берутся из репертуара гена вариабельного участка (V) иммуноглобулина доноров. Технологии фагового и рибосомного дисплея для создания антител человека хорошо известны в области техники. Антитела человека также можно получать из выделенных В-клеток человека, которые иммунизируют *ex vivo* антигеном, представляющим интерес, и далее объединяют для создания гибридом, которые далее можно проверять на предмет оптимального антитела человека. Термин "антитело" или "антитела", как применяют в настоящей заявке, также относится к агликозилированному антителу.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела представляют собой антитела, которые модифицированы ковалентным присоединением функциональных фрагментов, таких как

водорастворимые полимеры, такие как полиэтиленгликоль;
сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля;
карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт;
поливинилпирролидон или полипролин,

для всех из которых известно, что они демонстрируют существенно более длительный период полувыведения из крови после внутривенного введения по сравнению с соответствующими немодифицированными белками.

В некоторых вариантах осуществления антитела настоящего изобретения представляют собой антитела, прикрепленные к функциональным фрагментам, таким как фрагменты полиэтиленгликоля (ПЭГ).

В одном конкретном варианте изобретения антитело представляет собой фрагмент антитела и молекулы ПЭГ могут прикрепляться при помощи любой доступной боковой цепи аминокислоты или концевой функциональной группы аминокислоты, локализующейся во фрагменте антитела, например при помощи любой свободной amino-, imino-, thiol, hydroxyl или carboxyl группы. Такие аминокислоты могут появляться во фрагменте антитела естественным путем или могут встраиваться во фрагмент при помощи технологии рекомбинантных ДНК (см., например, заявки US 5219996, US 5667425, WO 98/25971).

Термин "антитело" или "антитела", как применяют в данной заявке, относится не только к неусеченным антителам любых видов, включая полученные от человека (например, IgG) и других видов млекопитающих, но также относится к фрагменту антитела. Фрагмент антитела включает по меньшей мере одну тяжелую или одну легкую цепь домена иммуноглобулина, как известно в области техники, и связывается с одним или более антигенами. Примеры фрагментов антитела в соответствии с изобретением включают Fab, Fab', F(ab')₂, и Fv, а также scFv фрагменты, а также диатела, триатела, тетратела, миниантитела, доменные антитела (dAbs), такие как sdAbs, V_HH и V_{NAR} фрагменты, одноцепочечные антитела, биспецифические, триспецифические, тетраспецифические или мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител или антител, включая, но не ограничиваясь Fab-Fv или Fab-Fv-Fv конструкциями. Фрагменты антител, как определено ранее, известны в области техники.

Термин "редокс-потенциал", как применяют в данной заявке, относится к измерению тенденции химических частиц к присоединению электронов и, таким образом, к восстановлению. Редокс-потенциал измеряют в вольтах (В) или милливольты (мВ). Каждая частица имеет свой собственный внутренний восстановительный потенциал; чем более положительным является потенциал, тем больше аффинность частиц к электронам и тенденция к восстановлению.

Термин "экстракция" или "экстракция белка", как применяют в данной заявке, относится к удалению белка, экспрессированного в клетке-хозяине, из клетки-хозяина. Экстракция может включать разрыв клетки-хозяина и выделение внутриклеточной жидкости из клеточного детрита или управление хозяином для обеспечения протечки наружной клеточной мембраны грамотрицательных бактерий или других клеток, имеющих наружную клеточную мембрану, с целью высвобождения жидкости из периплазматического пространства этих клеток.

Примеры

Способы.

Процесс ферментации А.

E. coli W3110, трансфицированные вектором таким образом, чтобы экспрессировать Fab', связывающийся специфически с ФНО-альфа человека, используют в качестве клеток-хозяев.

Сосуд с замороженным банком клеток, содержащий эти клетки, применяют для инокуляции во встряхиваемой колбе (общий объем 700 мл), содержащей среду с 6× пептон-дрожжевым экстрактом (6×P-Y) и тетрациклином. Эту встряхиваемую колбу инкубируют при 30°C и 230 об/мин. При требуемом диапазоне оптической плотности (OD₆₀₀=2-3) встряхиваемую колбу используют для инокуляции в инокуляторе (общий объем 10 л), который содержит SM6 среду с определенным химическим составом (Porplewell et al., Expression of Antibody Fragments by Periplasmic Secretion in *Escherichia coli*, Methods in Molecular Biology, vol. 308: Therapeutic Proteins: Methods and Protocols, 2005) и тетрациклин с глицерином в качестве источника углерода. Клеточную культуру в инокуляторе поддерживают в условиях 30°C, концентрацию растворенного кислорода (pO₂) поддерживают на уровне 30%, pH контролируют на уровне 7,0.

При требуемом диапазоне OD (OD₆₀₀=30-37) применяют культуру для посева для инокуляции промышленного ферментера (общий объем 600 л), содержащего среду с определенным химическим составом с глицерином в качестве источника углерода. Промышленный ферментер исходно поддерживают в условиях 30°C, 30% pO₂, и pH поддерживают на уровне 7,0, рост клеток в порционной фазе до индукции. Во время порционной фазы температуру снижают до 25°C и добавляют MgSO₄, для того чтобы избежать истощения этого метаболита.

При отдельном диапазоне OD (OD₆₀₀=43-47), при котором развивается деплегия глицерина, производят болюсное добавление раствора лактозы к культуре. Лактоза далее утилизируется клетками в качестве основного источника углерода и также действует как индуктор экспрессии Fab'. Концентрацию лактозы поддерживают на протяжении фазы индукции при помощи непрерывной подпитки и клетки собирают через 30 ч после индукции.

Процесс ферментации В.

Сосуд с замороженным банком клеток, содержащий *E. coli* MXE012 клетки-хозяева Fab', экспрессирующие Fab', специфически связывающийся с ФНО-альфа человека, применяют для инокуляции встряхиваемой колбы (общий объем 700 мл), содержащей среду с 6× пептонно-дрожжевым экстрактом (6×P-Y) и тетрациклином. Эту встряхиваемую колбу инкубируют при 30°C и 230 об/мин. При требуемом диапазоне оптической плотности (OD₆₀₀=2-3) встряхиваемую колбу используют для инокуляции в инокуляторе (общий объем 10 л), который содержит MD среду с определенным химическим составом (Durany et al., 2004, Studies on the expression of recombinant fucose-1-phosphate aldolase in *Escherichia coli*, Process.

Biochem., 39:1677-1684) и тетрациклин с глицерином в качестве источника углерода. Клеточную культуру в инокуляторе поддерживают в условиях 30°C, концентрацию растворенного кислорода (pO₂) поддерживают на уровне 30%, pH контролируют на уровне 6,9.

При требуемом диапазоне OD (OD₆₀₀=30-37) применяют культуру для посева для инокуляции промышленного ферментера (общий объем 600 л), содержащего среду с определенным химическим составом с глицерином в качестве источника углерода. Производственный ферментер исходно поддерживают в условиях 30°C, 30% pO₂, и pH поддерживают на уровне 6,9, и роста в порционной фазе до истощения глицерина. В это время добавляют MgSO₄, для того чтобы избежать истощения этого метаболита.

В конце порционной фазы включают экспоненциальную подпитку глицерином и культуру подпитывают определенным количеством глицерина для достижения OD₆₀₀, приблизительно равным 70 единицам. В этот момент подпитку глицерина переключают с экспоненциальной подпитки на линейную подпитку и экспрессию Fab' индуцируют путем добавления ИПТГ (38,79 г/кг культуры). Клетки собирают через 40 ч после индукции.

Штамм E.coli MXE012 представляет собой метаболический мутант E.coli, содержащий мутацию sprH145A в гене sprg, как описано в заявке WO 2011/086136 (включенной в данную заявку во всей полноте).

Способы восстановления и экстракции.

Клетки собирают при помощи непрерывного центрифугирования при помощи тарельчатой центрифуги Westfalia PSC 5.

Концентрированную суспензию клеток ресуспендируют до исходной концентрации собранных клеток в двухлитровых или пятилитровых стеклянных сосудах путем добавления воды или экстракционного буфера при pH 7,4 до конечной концентрации экстракционного буфера 10 ммоль ЭДТК, 100 ммоль Трис.

При необходимости ресуспендированные клетки корректируют до pH 7,2 путем добавления 2,5 моль Трис основания к экстракционному буферу до экстракции белка путем стадии нагревания. Для экстракции нагреванием клетки нагревают до 59°C в течение 10 ч. Температуру и перемешивание поддерживают при помощи программного обеспечения Biostat BPlus control units (Sartorius) и Multiple Fermenter Control System (MFCS®).

Очистка образца.

Родственные Fab' частицы очищают из образцов экстракции для обеспечения оценки родственных примесей. Образцы экстракции сначала очищают при помощи центрифугирования, сбора очищенной надосадочной жидкости и фильтрации через 0,2 мкм фильтр. Очищенную надосадочную жидкость далее загружают в колонки с 1 мл Белка L (Pierce #89928), промывают фосфатным буфером низкой концентрации при pH 7,4 и элюируют с глициновым буфером при pH 2.8. Продемонстрировано, что смола на основе белка L может захватывать фрагменты Fab' и что восстановление является линейным и воспроизводимым в диапазоне эксперимента.

Анализ образца.

Очищенные образцы анализируют и подсчитывают при помощи катионообменной хроматографии. Образцы загружают в аналитическую колонку Dionex Pro Pac SCX-10 (Thermo Scientific) и элюируют при помощи солевого градиента. Элюированные белки мониторируют при 280 нм, а также подсчитывают и интерпретируют хроматографические пики в соответствии со стандартной процедурой.

Пример 1.

Ферментацию проводят в соответствии с процессом В, и белок экстрагируют описанным выше способом. Редокс-потенциал измеряют на протяжении процесса экстракции в контейнерах, применяя пробы ORP (окислительно-восстановительного потенциала) (Broadley James Corporation, Irvine CA) и мониторируют при помощи программного обеспечения MFCS® (Sartorius, Bethlehem PA).

Для оценки эффекта поддержания редокс-потенциала окружающей среды некоторые контейнеры с экстрактами подвергают воздействию азота, другие подвергают воздействию воздуха во время экстракции, также газ либо пропускают через образец в контейнеры, либо поддерживают его поток в пространстве над продуктом в контейнерах.

Табл. 1, расположенная далее, демонстрирует обзор условий газа-потока контейнера. Все потоки газа поддерживают при скорости потока 1 об/об/мин (объем газа на объем жидкости в минуту, т.е. 1 л/мин для 1 л объема экстракции) при помощи подвода 100% азота или сжатого воздуха.

Таблица 1

# экстракции	Условие
1	Поток слоя N ₂
2	Поток слоя воздуха
3	Барботируемый N ₂
4	Барботируемый воздух

Фиг. 1 и 2 демонстрируют соответствующие редокс- и температурные профили экстракций (фиг. 1)

и ДСН-ПААГ-электрофореза образцов после экстракции (фиг. 2).

Как можно понять из этих фигур, поддержание слоя азота в течение стадии тепловой обработки поддерживает постоянно низкие показатели редокс-потенциала при минимальном значении приблизительно равном -435 мВ, обычно равном -375 мВ при удержании температуры на уровне 59°C. Подобный низкий редокс-потенциал наблюдается при барботировании азота. Когда буфер, содержащий клетки-хозяева, покрывают воздухом вместо азота, можно заметить, что величины редокс-потенциала значительно повышаются во время стадии экстракции нагреванием и становятся положительными (обычно приблизительно равны +45 мВ) при удержании температуры на уровне 59°C. Подобный высокий редокс-потенциал наблюдается при барботировании воздуха. Барботирование газа переводят на подачу слоя по ходу экстракции по причине наблюдаемых высоких уровней пенообразования.

Фиг. 2 демонстрирует значительное различие в концентрации родственных примесей, что измеряют при помощи ДСН-ПААГ-электрофореза. Фигура демонстрирует, что в присутствии азота восстанавливающих условий во время процесса экстракции нагреванием достаточно для обеспечения значительного снижения концентрации родственных примесей по сравнению с экстракциями, проводимыми в присутствии воздуха.

Пример 2.

Ферментацию в соответствии с процессом А и последующую экстракцию проводят так, как описано ранее. Скорость потока азота в свободном пространстве над продуктом варьируется от 0,1 об/об/мин до 1 об/об/мин в комбинации с варьирующимся перемешиванием и номинальными объемами в соответствии с табл. 2.

Таблица 2

Номер экстракции	Подача слоя азота (об/об/мин)	Об/мин	Номинальный объем
1	0,1	150	1,5
2	1	150	1,5
3	0,1	450	3
4	1	450	3
5	0,55	300	2,25
6	0,55	300	2,25
7	0,55	300	2,25
8	0	300	2,25

Как можно отметить на фиг. 3, можно наблюдать четкое влияние подачи слоя азота на клиренс родственных примесей. В экстракции #8, где слой азота не применяется, наблюдаются значительно более высокие концентрации родственных примесей. С другой стороны, фигура также предполагает, что скорость подачи слоя азота может оказывать влияние на клиренс этой примеси при сравнении экстракций 1 и 2, а также 7 и 8.

Пример 3.

Ферментацию в соответствии с процессом А и сбор клеток проводят так, как описано ранее. Ресуспендированные клетки-хозяева корректируют до pH 7,2 путем добавления 2,5 моль Трис основания к экстракционному буферу непосредственно перед экстракцией нагреванием. Эту экстракцию нагреванием проводят либо в присутствии, либо в отсутствии подачи слоя азота. Где применимо, подачу слоя азота поддерживают путем насыщения газом свободного пространства над продуктом в контейнере при 1 об/об/мин, применяя 100% азот.

На фиг. 4 экстракции 1-3 проводят в присутствии подачи слоя азота, в то время как экстракции 4-6 проводят при подаче воздуха. Результаты снова демонстрируют преимущество присутствия азота, которое приводит к значительно сниженным концентрациям родственных примесей, сохраняющихся после экстракции нагреванием. Дополнительный положительный эффект получают от коррекции pH, проводимой перед экстракцией нагреванием, поскольку кажется, что концентрации родственных примесей еще более снижаются по сравнению с предыдущими примерами.

Пример 4.

Влияние экстракции в восстанавливающих условиях также анализируют при меньших объемах, т.е. при применении встряхиваемых колб.

25-100 мл культуры клеток, индуцированной белком, собирают и ресуспендируют в конической колбе Эрлонмейера объемом 250 мл путем добавления воды и 3× экстракционного буфера (pH 7,4) до конечной 1× концентрации экстракционного буфера (10 ммоль ЭДТК, 100 ммоль Трис). Колбы имеют

уплотняющую пробку и изготовлены из поликарбоната для минимизации проникновения кислорода в колбу. Подачу слоя азота осуществляют в газообразную фазу колб при помощи одноразовой перчаточной сумки (Aldrich AtmosBag, кат. #Z530220) с непрерывным потоком азота, проходящим через перчаточную сумку. Колбы запаивают перед удалением из перчаточной сумки и проведением экстракции нагреванием. Образцы также изготавливают на лабораторном столе (с воздухом в качестве слоя в газообразной фазе колб) для сравнения. Экстракцию нагреванием проводят при 60°C в течение 10 ч в инкубаторе для встряхиваемых колб (New Brunswick Innova42). Редокс-потенциал измеряют в каждой колбе после экстракции, применяя пробы Broadley James ORP. Стадию тепловой обработки также проводят на встряхиваемых колбах различных номинальных объемов для оценки влияния соотношений различных площадей поверхности к объему на экстракцию белка. В табл. 3 резюмированы изучаемые условия проведения эксперимента.

Таблица 3

# экстракции	Состав	Номинальный объем (мл)
1	Азот	25
2	Азот	50
3	Азот	100
4	Воздух	25
5	Воздух	50
6	Воздух	100

Фиг. 5 демонстрирует, что встряхиваемые колбы, которые изготавливают в присутствии подачи слоя азота, поддерживают более восстанавливающую среду в экстракте по сравнению с встряхиваемыми колбами, которые изготавливают в присутствии воздуха. Фигура также демонстрирует, что встряхиваемые колбы с большим номинальным объемом являются более восстанавливающими по сравнению с колбами меньшего номинального объема, скорее всего по причине более низкой скорости окисления экстракта из-за меньшего соотношения площади поверхности к объему. Все колбы, изготавливаемые с воздухом, имеют положительную конечную точку величины редокс-потенциала при отсутствии корреляции с номинальным объемом.

Фиг. 6 демонстрирует, что встряхиваемые колбы, которые изготавливают в присутствии азота, имеют значительно более низкие концентрации родственных примесей после экстракции. Все колбы, изготовленные с азотом (конечная точка диапазона редокс-потенциала от -10 до -116 mV) демонстрируют значительно более низкие концентрации родственных примесей по сравнению с колбами, изготавливаемыми с воздухом (конечная точка диапазона редокс-потенциала от +79 до +97 mV).

Пример 5.

Fab', специфически связывающийся с ФНО-альфа человека, имеет более высокую температуру плавления (T_m) по сравнению с НСР (белками клетки-хозяина) - свойство, которое используют во время стадии тепловой обработки. Нагревание денатурирует значительное количество НСР и родственных примесей, вызывая агрегацию и удаление во время стадий экстракции. Несмотря на это, как описано в предыдущих примерах, удаление этих примесей значительно улучшается при применении подачи слоя азота, принимая во внимание сниженный редокс-потенциал. Считают, что восстанавливающая среда облегчает удаление примесей из-за восстановления внутрицепочечных связей в этих соединениях во время нагревания, что приводит к снижению температуры плавления примесей.

Для того чтобы подтвердить сказанное выше измеряют температуру плавления двух основных соединений родственных примесей в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях. Эти восстанавливающие условия достигаются путем применения ТСЕР-НСЛ (трис-(2-карбоксиэтил)фосфингидрохлорида) для имитации окружающей среды, созданной потоком слоя азота, применяемым во время экстракции.

Измерения проводят при помощи анализа ThermoFluor, основанного на применении гидрофобного флуорофора, который связывается с белком, при условии, что все его гидрофобные области доступны. В этом конкретном случае флуорофор представляет собой SYPRO orange (5000× концентрация в диметилсульфоксиде (ДМСО, DMSO); Life Technologies S-6650). Это обеспечивает мониторинг процесса разворачивания в условиях денатурации (например, повышения температуры) путем определения флуоресценции, испускаемой красителем, когда он связан с белком, с применением системы ПЦР в реальном времени (7900HT fast realtime PCR system от Life Technologies). Образцы инкубируют при повышающейся температуре (с 25 до 99°C при 30-секундном задержании и увеличении на 0,5°C) и регистрируют испускание флуоресценции. Данные наносят на схему, и точку плавления белка определяют путем нахождения точки перегиба кривой.

В этом случае две очищенные родственные примеси определяют в цитратно-фосфатном буфере с pH 5,0 и 7,0 и натрий-фосфатном буфере с pH 7,4. Применяют две различные концентрации ТСЕР-НСЛ

для получения молярного соотношения белок:восстанавливающее средство 2:1 и 10:1 и образец без ТСЕР-HCL изучают параллельно в качестве контроля.

Фиг. 7 демонстрирует результаты определения термостабильности для двух основных соединений родственных примесей. Продemonстрирована корреляция редокс-потенциала и термостабильности (температура плавления); чем ниже редокс-потенциал, тем ниже температура плавления белка. Подобный эффект описывают для pH, когда значение pH становится более нейтральным. Оба показателя обеспечивают большую склонность родственных примесей к деградации, таким образом облегчая их удаление.

Выводы.

В целом данные демонстрируют важность поддержания восстанавливающей среды (низкого редокс-потенциала) во время стадии нагревания для обеспечения значительного снижения концентрации родственных примесей во время экстракции белка. Более того, данные демонстрируют, что эта восстанавливающая среда обеспечивается путем применения потока слоя азота и в случае отсутствия потока слоя азота редокс-потенциал окружающей среды является значительно менее восстанавливающим, что приводит в более высоким концентрациям родственных примесей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения белка, представляющего интерес, где указанный белок экспрессирован в периплазме клетки-хозяина, представляющей собой *E.coli*, включающий

а) культивирование указанных клеток-хозяев в условиях, способствующих тому, что они экспрессируют указанный белок;

б) сбор клеток-хозяев из культуральной жидкости;

с) добавление экстракционного буфера к клеткам-хозяевам; и

д) подвержение клеток-хозяев в буфере тепловой обработке, где редокс-потенциал буфера поддерживают ниже 0 мВ путем добавления азота к газообразной фазе контейнера в качестве потока слоя во время указанной стадии тепловой обработки и указанную тепловую обработку проводят при температуре от 30 до 70°C,

причем белок, представляющий интерес, экстрагируется таким образом из периплазмы.

2. Способ по п.1, где тепловую обработку проводят в контейнере и указанный редокс-потенциал поддерживают путем снижения содержания кислорода (O_2), присутствующего в газообразной фазе в контейнере во время экстракции белка.

3. Способ по п.1 или 2, где азот (N_2) добавляют в газообразную фазу контейнера, причем указанная газообразная фаза содержит по меньшей мере 50% N_2 .

4. Способ по п.1, где указанную стадию нагревания проводят при температуре от 55 до 65°C.

5. Способ по любому из пп.1-4, где указанную температуру поддерживают в течение периода времени от 1 до 18 ч.

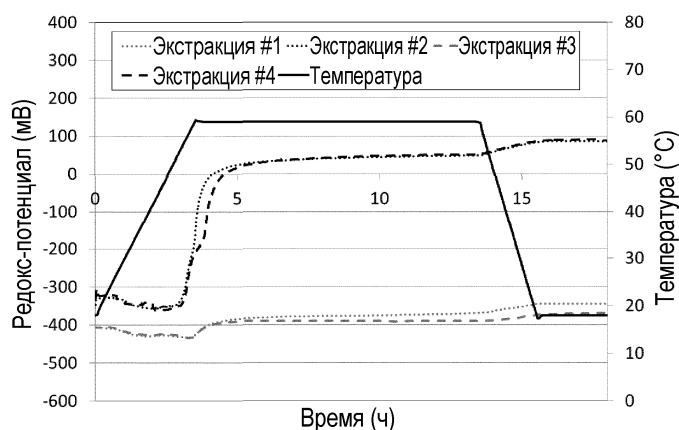
6. Способ по любому из пп.1-5, где pH буфера измеряют после добавления к клеткам-хозяевам и перед тепловой обработкой.

7. Способ по п.6, где pH буфера составляет или скорректирован до значений pH от 6 до 9.

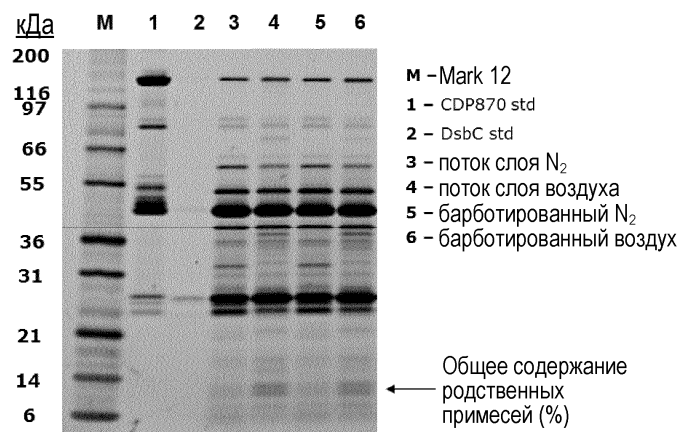
8. Способ по любому из пп.1-7, где белок представляет собой рекомбинантный белок, кодируемый экспрессионным вектором.

9. Способ по п.8, где белок представляет собой рекомбинантное антитело или фрагмент рекомбинантного антитела.

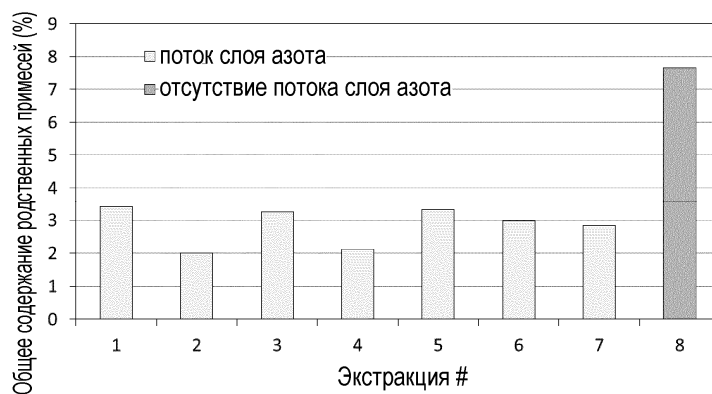
10. Способ по п.8 или 9, где указанное рекомбинантное антитело или фрагмент рекомбинантного антитела специфически связывается с ФНО-альфа или CD154.



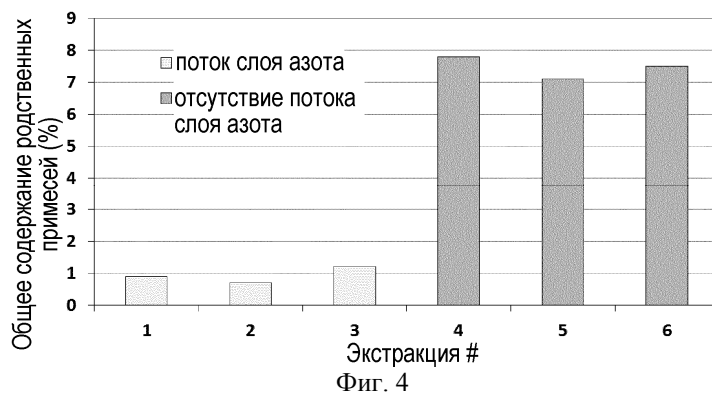
Фиг. 1



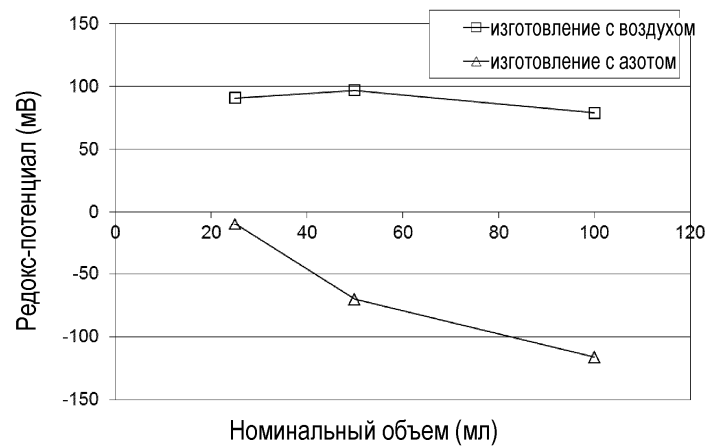
Фиг. 2



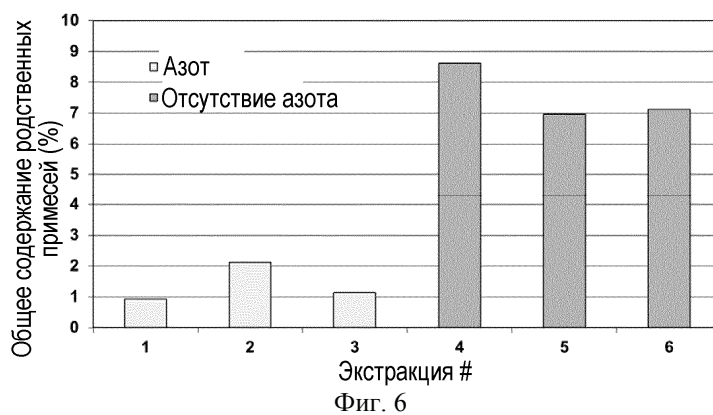
Фиг. 3



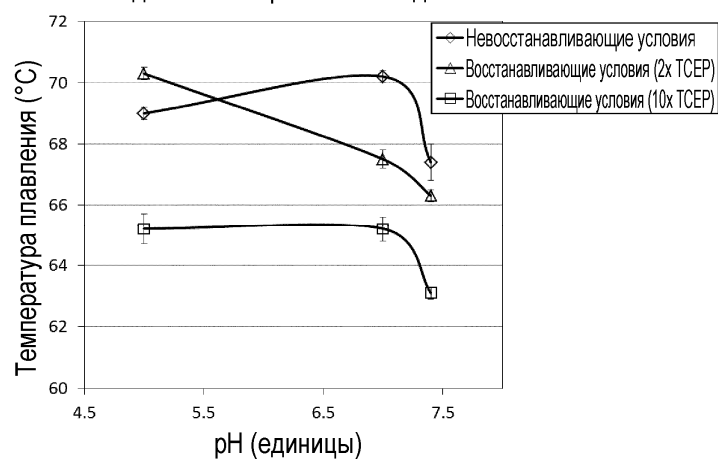
Фиг. 4



Фиг. 5



Родственные примеси - Соединения 1



Родственные примеси - Соединения 2

