



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011112989/10, 29.10.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.10.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
29.10.2008 US 61/109,481

(43) Дата публикации заявки: 10.12.2012 Бюл. № 34

(45) Опубликовано: 10.06.2015 Бюл. № 16

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO2006122786 A2, 23.11.2006. YOSHINISA HAGIHARA et al, "Stabilization of an Immunoglobulin Fold Domain by an Engineered Disulfide Bond at the Buried Hydrophobic Region", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2007, vol. 282, no. 50, стр.36489-36495. HARINARAYAN et al., "An exclusion mechanism in ion exchange chromatography", Biotechnology and (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 30.05.2011

(86) Заявка РСТ:
US 2009/062651 (29.10.2009)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/056550 (20.05.2010)

Адрес для переписки:
191036, Санкт-Петербург, а/я 24, "НЕВИНПАТ",
А.В. Поликарпову

(72) Автор(ы):

БРАУН, Пол Р. (US),
ТОБЛЕР, Скотт Андреас (US),
ВУД, Эндрю М. (US),
БОЕШ, Остин Уэйн (US)

(73) Патентообладатель(и):

Аблинкс Н.В. (BE)

(54) СПОСОБЫ ОЧИСТКИ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИХ МОЛЕКУЛ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области получения и выделения однодоменных молекул (SDAB). Описан способ выделения или очистки SDAB молекулы, которая представляет собой трехвалентную молекулу нанотела ATN-103, направленную на TNF α и HAS, из смеси, содержащей указанную SDAB молекулу и одно или более загрязняющих веществ. Приводят смесь в контакт с катионообменным носителем в

условиях, которые позволяют SDAB молекуле связываться с носителем или абсорбироваться на носителе. Удаляют одно или более загрязняющих веществ и селективно элюируют SDAB с носителя. При этом проводимость среды для кондиционирования (CM), используемой для загрузки носителя, составляет от примерно 12 до 9 мСм/см и pH в условиях загрузки корректируют до величины от 4,0 до 4,3. Буфер для элюирования

соответствует примерно 50 мМ хлорида натрия или меньше и имеет pH от примерно 5,5 до 7,2. Раскрыт способ или процесс получения рекомбинантного SDAB ATN-103. Поддерживают клетку-хозяина в условиях, при которых экспрессируется рекомбинантная SDAB ATN-103. Получают смесь SDAB молекулы и одного или

более загрязняющих веществ. Очищают или выделяют SDAB ATN-103, используя катионообменную хроматографию, как указано выше. Использование изобретения обеспечивает новые способы выделения или очистки нанотела, что может найти применение при получении нанотела ATN-103. 2 н. и 17 з.п. ф-лы, 4 ил., 6 пр.

(56) (продолжение):

Bioengineering, 2006, vol.95, no.5, стр.775-787. . EP1816198 A1, 08.08.2007 . FRENKEN et al., "Isolation of antigen specific Llama VHH antibody fragments and their high level secretion by Saccharomyces cerevisiae", Journal of Biotechnology, 2000, 78, стр. 11-21. WO2005044856 A2, 19.05.2005. ОСТЕРМАН Л.А. "Хроматография белков и нуклеиновых кислот", М.: Наука, 1985, стр.270-274, 301-315, 429-434

RU 2 5 5 3 2 1 4 C 2

RU 2 5 5 3 2 1 4 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 553 214** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

B01D 15/36 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2011112989/10, 29.10.2009**

(24) Effective date for property rights:
29.10.2009

Priority:

(30) Convention priority:
29.10.2008 US 61/109,481

(43) Application published: **10.12.2012 Bull. № 34**

(45) Date of publication: **10.06.2015 Bull. № 16**

(85) Commencement of national phase: **30.05.2011**

(86) PCT application:
US 2009/062651 (29.10.2009)

(87) PCT publication:
WO 2010/056550 (20.05.2010)

Mail address:

**191036, Sankt-Peterburg, a/ja 24, "NEVINPAT",
A.V. Polikarpovu**

(72) Inventor(s):

**BRAUN, Pol R. (US),
TOBLER, Skott Andreas (US),
VUD, Ehndrju M. (US),
BOESh, Ostin Uehjn (US)**

(73) Proprietor(s):

Ablinks N.V. (BE)

(54) METHODS OF PURIFYING SINGLE-DOMAIN ANTIGEN-BINDING MOLECULES

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to the field of obtaining and separation of single-domain molecules (SDAB). Described is a method of the separation or purification of the SDAB molecule, which represents a trivalent molecule of a ATN-103 nanobody, targeting TNF α and HAS, from a mixture, containing the said SDAB molecule and one or more polluting substances. The mixture is brought in contact with a cation-exchange carrier under conditions, which make it possible for the SDAB molecule to bind with the carrier or be absorbed on the carrier. One or more polluting substances are removed and SDAB is selectively eluted from the carrier. The conductivity of a conditioning medium (CM), used for the carrier loading, constitutes from approximately 12 to 9 mS/cm and pH under

conditions of loading is corrected to a value from 4.0 to 4.3. The buffer for elution corresponds to approximately 50 mM of sodium chloride or less and has pH from approximately 5.5 to 7.2. Disclosed is a method or a process of obtaining recombinant SDAB of ATN-103. A host-cell is supported in the conditions at which recombinant ATN-103 SDAB is expressed. The mixture of molecule SDAB and one or more polluting substances is obtained. ATN-103 SDAB is purified or separated with the application of cation-exchange chromatography, as said above.

EFFECT: application of the invention provides new methods of the separation or purification of the nanobody, which can be applied in obtaining the ATN-103 nanobody.

19 cl, 4 dwg, 6 ex

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

В данной заявке заявлен приоритет согласно U.S. серийный №61/109481, поданной 29 октября 2008 г., полное содержание которой включено в данную заявку посредством ссылки во всей ее полноте.

5 Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен через EFS-Web и таким образом включен в данную заявку посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия ASCII, созданная 28 октября 2009 г., обозначена w223738w.txt и имеет размер 12853 байта.

10 ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Рекомбинантные белки, такие как антитела, обычно содержат различные примеси, которые необходимо удалять, прежде чем белковый продукт станет фармацевтически приемлемым. Некоторые из этих примесей могут включать белки клетки-хозяина (HCPs), молекулы ДНК, различные и/или неправильно свернутые формы белкового продукта
15 и высокомолекулярные агрегаты (HMWA). Образование агрегатов является проблематичным во время получения антител, так как это может отрицательно влиять на безопасность продукта, вызывая активацию комплемента или анафилаксию после введения. Образование агрегатов также может препятствовать производственным процессам, приводя к уменьшенному выходу продукта, уширению пика и потере
20 активности. Эти примеси могут иметь широкий диапазон картин удерживания при различных видах хроматографии. Удаление такого широкого спектра примесей часто является трудным, как правило, требующим множества стадий, включающих различные виды хроматографии.

Традиционные способы очистки белка основываются на различиях в размере, заряде
25 и растворимости между белком и загрязняющими веществами. Протоколы, основанные на этих параметрах, включают, но не ограничиваются этим, аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, хроматографию эксклюзионной и хроматографию гидрофобного взаимодействия. Эти хроматографические методы, однако, иногда демонстрируют технические трудности при разделении агрегированных или
30 мультимерных видов антител. Такие методы, как ионообменная хроматография и хроматография гидрофобного взаимодействия, например, могут индуцировать образование агрегатов из-за повышенной концентрации белка или необходимые изменения в буферной концентрации и/или pH во время элюции. Кроме того, в некоторых случаях антитела демонстрируют различия в изоэлектрических точках, которые слишком
35 малы для обеспечения возможности их разделения посредством ионообменной хроматографии (Tarditi, J. Immunol. Methods 599:13-20 (1992)). Эксклюзионная хроматография обычно является трудоемкой и приводит к значительному разбавлению продукта, что является помехой для крупномасштабных, эффективных производственных процессов. Также может произойти вымывание лигандов из колонок
40 для аффинной хроматографии, что приводит к нежелательному загрязнению элюированного продукта (Steindl, J. Immunol. Methods 235:61-69 (2000)).

Хотя во время очистки рекомбинантных белков можно использовать несколько различных методов хроматографии, все еще существует потребность в разработке способов очистки, которые уменьшают число используемых стадий хроматографии и
45 которые не разрушают или существенно не уменьшают биологическую активность рекомбинантного белка.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано частично на открытии, что однодоменные

антигенсвязывающие (SDAB, от англ. single domain antigen binding molecules) молекулы взаимодействуют, например, связываются с белком А или его функциональным вариантом, которое позволяет использовать аффинную хроматографию на основе белка А для очистки SDAB молекул. В другом воплощении SDAB молекулы можно
 5 очищать с использованием других хроматографических методов, таких как ионообменная (например, катионная) хроматография. SDAB молекула может включать один или более единичных антигенсвязывающих доменов, которые взаимодействуют, например, связываются с одним или более целевыми белками (например, фактором некроза опухоли и/или человеческим сывороточным альбумином). В некоторых
 10 воплощениях SDAB молекула представляет собой одноцепочечный полипептид, состоящий из одной или более молекул нанотела, по существу лишенных комплементарного домена антитела и/или константной области иммуноглобулина. Таким образом, настоящее изобретение относится к процессам и способам очистки или разделения SDAB молекул, которые включают один или более единичных связывающих
 15 доменов (например, одну или более молекул нанотела), с использованием хроматографических методов, таких как аффинная хроматография на основе белка А и ионообменная (например, катионная) хроматография, отдельно или в комбинации.

[Примечание: Напотело™ и Нанотела™ являются зарегистрированными товарными знаками Ablynx N.V.]

20 Соответственно, в одном аспекте изобретение относится к способу или процессу разделения или очистки SDAB молекулы (например, одной или более молекул нанотела) из смеси, содержащей SDAB молекулу и одно или более загрязняющих веществ (также называемый в данной заявке, как "препарат SDAB молекулы"). Способ или процесс включает: приведение смеси в контакт с носителем на основе белка А или ионо-
 25 (например, катионо-) обменным (CEX) носителем в условиях, которые позволяют SDAB молекуле связываться или абсорбироваться носителем; удаление одного или более загрязняющих веществ, например, путем промывки связавшегося носителя в условиях, когда SDAB молекула остается связанной с носителем (например, промывка связавшегося носителя по меньшей мере одним буфером для промывки белка А или
 30 CEX); и селективное элюирование SDAB молекулы с носителя, например, посредством элюирования адсорбированной SDAB молекулы по меньшей мере одним буфером для промывки белка А или CEX.

В одном из воплощений способ разделения или очистки SDAB молекулы включает приведение смеси SDAB молекулы и одного или более загрязняющих веществ в контакт
 35 с катионообменным носителем.

В другом воплощении способ разделения или очистки SDAB молекулы включает приведение смеси SDAB молекулы и одного или более загрязняющих веществ в контакт со смолой на основе белка А.

Способ или процесс можно использовать отдельно или в комбинации с по меньшей мере одним другим способом очистки, включая, но не ограничиваясь этим, одну или
 40 более из: гидроксиапатитной, аффинной хроматографии, эксклюзионной хроматографии, хроматографии гидрофобного взаимодействия, металл-аффинной хроматографии, диафильтрации, ультрафильтрации, вирусной инактивации (например, с использованием низкого pH) и/или фильтрации для удаления вирусов. Например, способ или процесс
 45 можно использовать в комбинации с одной или более из гидроксиапатитной хроматографии, ультрафильтрации, вирусной инактивации (например, с использованием низкого pH) и/или фильтрации для удаления вирусов. В тех воплощениях, где используется носитель на основе белка А, способ или процесс может дополнительно

включать ионо- (например, катионо- или анионо-) обменную хроматографию.

В воплощениях способ или процесс дополнительно включает приведение смеси в контакт с гидроксипатитной смолой и селективное элюирование SDAB молекулы с гидроксипатитной смолы. В других воплощениях, где используется носитель на основе белка А, способ или процесс дополнительно включает приведение смеси в контакт с катионообменной (СЕХ) колонкой и селективное элюирование SDAB молекулы с колонки.

Воплощения вышеупомянутых способов и процессов могут включать одну или более из следующих признаков:

В одном из воплощений SDAB молекула, выделенная или очищенная способом или процессом по изобретению, представляет собой рекомбинантный белок, полученный в виде продукта клеточной культуры, например, клетки-хозяина (например, млекопитающих, например, клетки яичника китайского хомячка (СНО)) в смеси, которая включает SDAB молекулу и загрязняющие вещества клеточной культуры. Клеточная культура может быть в масштабе маленькой или большой культуры.

В других воплощениях загрязняющие вещества в смеси, выделенной или очищенной способом или процессом по изобретению, включают один или более из высокомолекулярных белковых агрегатов, белков клетки-хозяина, ДНК и/или белка А (например, вымытый белок А). В воплощениях SDAB молекулу очищают до по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более высокой чистоты.

В другом воплощении носитель на основе белка А, используемый в способе или процессе по изобретению, включает носитель, например, смолу с иммобилизованным белком А (например, рекомбинантным или выделенным белком А) или его функциональным вариантом. В одном воплощении иммобилизованный белок А представляет собой полноразмерный стафилококковый белок А (SpA), состоящий из пяти доменов из примерно 50-60 аминокислотных остатков, известных как домены Е, D, А, В и С по порядку от N-конца. Например, белок А включает аминокислотную последовательность SpA (SEQ ID NO:11), представленную на Фиг.4А, или аминокислотную последовательность, по существу идентичную ей (например, аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:11, представленной на Фиг.4А). В других воплощениях иммобилизованный белок А представляет собой функциональный вариант SpA, который включает по меньшей мере один домен, выбранный из Е, D, А, В и/или С, или его модифицированную форму. Например, функциональный вариант SpA может включать по меньшей мере домен В из SpA, или вариант домена В, имеющие один или более замещенных остатков аспарагина, также называемый в данной заявке доменом Z. В одном из воплощений функциональный вариант SpA включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, представленную на Фиг.4В, или аминокислотную последовательность, по существу идентичную ей (например, аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:12, представленной на Фиг.4В). Могут быть использованы другие перестановки функциональных вариантов белка А, включающие домен В или вариант домена В и один или более из: доменов А и/или С; доменов Е, А и/или С; или доменов Е, D, А и/или С. Любая комбинация Е, D, А, В и/или С или их функциональных вариантов может быть использована до тех пор, пока комбинация способна связываться с SDAB молекулой. Типичные смолы с носителем на основе белка А, которые могут быть использованы, включают колонки MabSELECT™, колонки MabSELECT™ SuRe, MabSELECT™ Xtra

(GE Healthcare Products) и ProSep™ Va Ultra Plus (Millipore Corporation, Billerica MA).

В одном из воплощений, где используется носитель на основе белка А в способе или процессе по изобретению, смеси SDAB молекул и загрязняющих веществ приводят в контакт с носителем на основе белка А, например наносят на носитель на основе белка А, в условиях, которые позволяют SDAB молекуле связываться или абсорбироваться на носителе на основе белка А. В некоторых воплощениях используют белок А-загрузочный буфер, который включает кондиционированную среду. Белок-А колонку можно уравнивать с использованием белок А-уравнивающего раствора, который включает примерно от 10 до примерно 250 мМ NaCl и от примерно 10 до примерно 100 мМ Трис при pH в диапазоне от примерно 6 до 8; от примерно 50 до примерно 200 мМ NaCl и от примерно 20 до примерно 75 мМ Трис при pH в диапазоне от примерно 6,5 до 7,5; от примерно 100 до примерно 175 мМ NaCl и от примерно 40 до примерно 60 мМ Трис при pH в диапазоне от примерно 7 до 7,5; от примерно 125 до примерно 160 мМ NaCl и от примерно 45 до примерно 55 мМ Трис при pH в диапазоне от примерно 7 до 7,5; от примерно 50 до примерно 150 мМ NaCl и примерно 50 мМ Трис при pH в диапазоне от примерно 7,5; или примерно 150 мМ NaCl и примерно 50 мМ Трис при pH в диапазоне от примерно 6,5, 7,0, 7,5 или 8,0.

В еще одном воплощении, где используется носитель на основе белка А в способе или процессе по изобретению, удаляют одно или более загрязняющих веществ из смеси, например, путем промывания связавшегося носителя в условиях, когда SDAB молекула остается связанной с носителем (например, промывания связавшегося носителя по меньшей мере одним буфером для промывки белка А). В некоторых воплощениях буфер для промывки белка А включает от примерно 10 до примерно 250 мМ NaCl и от примерно 10 до примерно 100 мМ Трис при pH в диапазоне от примерно 6 до 8; от примерно 50 до примерно 200 мМ NaCl и от примерно 20 до примерно 75 мМ Трис при pH в диапазоне от примерно 6,5 до 7,5; от примерно 100 до примерно 175 мМ NaCl и от примерно 40 до примерно 60 мМ Трис при pH в диапазоне от примерно 7 до 7,5; от примерно 125 до примерно 160 мМ NaCl и от примерно 45 до примерно 55 мМ Трис при pH в диапазоне от примерно 7 до 7,5; от примерно 50 до примерно 150 мМ NaCl и примерно 50 мМ Трис при pH в диапазоне от примерно 7,5; или примерно 150 мМ NaCl и примерно 50 мМ Трис при pH в диапазоне от примерно 6,5, 7,0, 7,5, или 8,0. В некоторых воплощениях буфер для промывки включает 50 мМ NaCl и 50 мМ Трис при pH 7,5. В некоторых воплощениях буфер для промывки включает 10 мМ, 25 мМ, 50 мМ, 75 мМ, 100 мМ, 150 мМ, 200 мМ, 250 мМ, 300 мМ, 350 мМ, 400 мМ, 450 мМ или 500 мМ NaCl. В некоторых воплощениях буфер для промывки включает 10 мМ, 25 мМ, 50 мМ, 75 мМ, 100 мМ, 150 мМ, 200 мМ, 250 мМ, 300 мМ, 350 мМ, 400 мМ, 450 мМ или 500 мМ CaCl₂. В некоторых воплощениях буфер для промывки включает 10 мМ, 25 мМ, 50 мМ, 75 мМ, 100 мМ, 150 мМ, 200 мМ, 250 мМ, 300 мМ, 350 мМ, 400 мМ, 450 мМ или 500 мМ Трис. В некоторых воплощениях буфер для промывки включает 10 мМ, 25 мМ, 50 мМ, 75 мМ, 100 мМ, 150 мМ, 200 мМ, 250 мМ, 300 мМ, 350 мМ, 400 мМ, 450 мМ или 500 мМ цитрата. В некоторых воплощениях буфер для промывки включает 10 мМ, 25 мМ, 50 мМ, 75 мМ, 100 мМ, 150 мМ, 200 мМ, 250 мМ, 300 мМ, 350 мМ, 400 мМ, 450 мМ или 500 мМ HEPES. В некоторых воплощениях буфер для промывки имеет pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 или 9,0.

В еще одном воплощении, где используется носитель на основе белка А в способе или процессе по изобретению, SDAB молекулу селективно элюируют с носителя, например, путем элюирования абсорбированной SDAB молекулы по меньшей мере одним белок А-элюирующим буфером. В некоторых воплощениях элюирующий буфер

включает от примерно 5 до примерно 50 мМ NaCl и от примерно 5 мМ до примерно 100 мМ глицина при pH 4,0 или меньше. В некоторых воплощениях элюирующий буфер включает примерно 10 мМ, примерно 25 мМ, примерно 50 мМ, примерно 75 мМ, примерно 100 мМ, примерно 150 мМ, примерно 200 мМ, примерно 250 мМ, примерно 300 мМ, примерно 350 мМ, примерно 400 мМ, примерно 450 мМ или примерно 500 мМ NaCl; примерно 10 мМ, примерно 25 мМ, примерно 50 мМ, примерно 75 мМ, примерно 100 мМ, примерно 150 мМ, примерно 200 мМ или примерно 250 мМ глицина. В некоторых воплощениях элюирующий буфер имеет pH 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 или 4,0. В некоторых воплощениях белок А-элюирующий буфер включает примерно 10 мМ NaCl и примерно 50 мМ глицина при pH примерно 3,0.

В одном из воплощений хроматографию на керамическом гидроксипатите используют в комбинации с хроматографией на белке А в способе или процессе по изобретению. Хроматографию на керамическом гидроксипатите можно использовать до, или гораздо чаще, после хроматографии на основе белка А. В таких воплощениях способ включает приведение смеси SDAB молекулы (например, смеси после выделения или очистки посредством хроматографии на основе белка А) в контакт с гидроксипатитной смолой и селективное элюирование SDAB молекулы со смолы. Альтернативно, смесь можно предварительно обработать уравнивающим буфером и затем обеспечить ее протекание через гидроксипатитную смолу. Любой из этих способов также можно использовать в комбинации с очисткой смесей. В одном из воплощений элюирующий и загрузочный буферы включают от примерно 1 до примерно 20 мМ фосфата натрия и от примерно 0,2 до примерно 2,5 М хлорида натрия, где элюирующий и загрузочный буферы имеют pH от примерно 6,4 до примерно 7,6. В другом воплощении уравнивающий буфер и буфер для промывки включают от примерно 1 до примерно 20 мМ фосфата натрия, от примерно 0,01 до примерно 2,0 М хлорида натрия, от примерно 0 до примерно 200 мМ аргинина и от примерно 0 до примерно 200 мМ HEPES, где уравнивающий буфер и буфер для промывки имеют pH от примерно 6,2 до 8,0. В воплощениях полученная очищенная SDAB молекула содержит менее 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше высокомолекулярных агрегатов.

В других воплощениях ионообменную хроматографию используют в комбинации с одной или обеими из: хроматографии на основе белка А и/или гидроксипатитной хроматографии, как описано в данной заявке. Типичный способ или процесс, где хроматографию на основе белка А выполняют перед ионообменной хроматографией, включает: приведение смеси, содержащей SDAB молекулу и одно или более загрязняющих веществ, в контакт с носителем на основе белка А, позволяющим SDAB молекуле адсорбироваться на носителе, промывание носителя и адсорбированной SDAB молекулы по меньшей мере одним буфером для промывки белка А, элюирование адсорбированной SDAB молекулы по меньшей мере одним белок А-элюирующим буфером, посредством этого получение препарата SDAB молекулы. Способ или процесс дополнительно включает приведение препарата SDAB молекулы в контакт с ионообменным носителем, обеспечение протекания SDAB молекулы через носитель, промывание носителя по меньшей мере одним буфером для промывки ионообменника, посредством этого получение проточной фракции с ионообменника. В некоторых воплощениях способ или процесс дополнительно включает приведение проточной фракции с ионообменника в контакт с гидроксипатитной смолой, обеспечение адсорбции проточной фракции на смоле, промывание смолы по меньшей мере одним буфером для промывки гидроксипатита и элюирование очищенной SDAB молекулы

со смолы по меньшей мере одним гидроксипатит-элюирующим буфером.

В других воплощениях ионо- (например, катионо-) обменную хроматографию (СЕХ) используют отдельно или в комбинации с другой смолой, например, одной или обеими из: хроматографии на основе белка А и/или хроматографии на керамическом гидроксипатите. Способ или процесс включает приведение смеси, содержащей SDAB молекулу и одно или более загрязняющих веществ, в контакт с ионообменным носителем, обеспечение протекания SDAB молекулы через носитель, промывание носителя по меньшей мере одним буфером для промывки ионо- (например, катионо-) обменника. В одном из воплощений катионообменный носитель выбран из: Capto™ S (GE Healthcare), Fractogel® S03-(M) (EMD Chemicals), Toyopearl® Gigacap S-650M (Tosoh Bioscience) или Poros® HS 50 (Applied Biosystems). В одном из воплощений СЕХ смола демонстрирует емкость по меньшей мере примерно 10 г/л, 20 г/л, 30 г/л, 40 г/л, 50 г/л или 60 г/л. В другом воплощении проводимость среды для кондиционирования (СМ), используемой для нанесения на колонку, составляет от примерно 15 до 5 мСм/см, от 14 до 6 мСм/см, от 13 до 8 мСм/см, от 12 до 9 мСм/см, или от 11 до 10 мСм/см, или примерно 7 мСм/см, 8 мСм/см, 9 мСм/см, 10 мСм/см, 11 мСм/см, 12 мСм/см или 13 мСм/см. В другом воплощении рН условий загрузки корректируют до величины менее чем примерно 6, 5,5, 5, 4,5, 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4, 3,9, 3,8 или 3,7. В воплощениях буфер для элюции соответствует примерно 100 мМ хлорида натрия или менее, примерно 90 мМ хлорида натрия или менее, примерно 80 мМ хлорида натрия или менее, примерно 70 мМ хлорида натрия или менее, примерно 60 мМ хлорида натрия или менее, примерно 50 мМ хлорида натрия или менее, примерно 40 мМ хлорида натрия или менее, или примерно 30 мМ хлорида натрия или менее, 20 мМ хлорида натрия или менее, примерно 10 мМ хлорида натрия или менее, примерно 5 мМ хлорида натрия или менее, примерно 1 мМ хлорида натрия или менее, и имеет рН от примерно 4 до 8, от примерно 5 до 7,5, от примерно 5,5 до 7,2, от примерно 6 до 7,1 или от примерно 6,5 до 7, или примерно 5, 5,5, 6, 6,5 или 7. В других воплощениях СЕХ колонку можно также элюировать с использованием нисходящего сНА-уравновешивающего буфера.

В некоторых воплощениях катионообменная хроматография представляет собой единственный хроматографический способ, используемый при очистке SDAB. В другом воплощении катионообменную хроматографию используют в комбинации с другими хроматографическими методами (например, гидроксипатитной хроматографией). Типичный способ или процесс, при котором осуществляют катионообменную хроматографию, включает: приведение смеси, содержащей SDAB молекулу и одно или более загрязняющих веществ, в контакт с катионообменным носителем в условиях, которые уменьшают проводимость загрузочного буфера или кондиционированной среды (например, в условиях от примерно 15 до 5 мСм/см, от 14 до 6 мСм/см, от 13 до 8 мСм/см, от 12 до 9 мСм/см или от 11 до 10 мСм/см, или примерно 7 мСм/см, 8 мСм/см, 9 мСм/см, 10 мСм/см, 11 мСм/см, 12 мСм/см или 13 мСм/см), обеспечение адсорбции SDAB молекулы на носителе, промывание носителя и адсорбированной SDAB молекулы по меньшей мере одним буфером для промывки катионообменника, элюирование адсорбированной SDAB молекулы по меньшей мере одним буфером для элюции, посредством этого получение препарата SDAB молекулы. Способ или процесс может дополнительно включать приведение препарата SDAB молекулы в контакт с другим носителем или смолой, например, способ или процесс может дополнительно включать приведение проточной фракции с ионообменника в контакт с гидроксипатитной смолой, обеспечение адсорбции проточной фракции на смоле, промывание смолы по меньшей мере одним буфером для промывки гидроксипатита и элюирование очищенной

SDAB молекулы со смолы по меньшей мере одним гидроксиапатит-элюирующим буфером.

В других воплощениях способ или процесс дополнительно включает концентрирование элюированной SDAB молекулы, например путем осуществления 5 стадии ультрафильтрации/диафильтрации, до заданного целевого объема. Стадия концентрирования также может быть использована для замены буфера элюированной SDAB молекулы. Например, концентрированная, элюированная SDAB молекула может быть профильтрована, например посредством диафильтрации, в присутствии 10 гистидинового буфера или Трис-буфера. В воплощениях, где используется гистидиновый буфер, буфер присутствует в концентрации по меньшей мере от примерно 5 до 30 мМ, от примерно 7,5 до 28 мМ, от примерно 10 до 20 мМ, от примерно 12 до 15 мМ, или примерно 10 мМ, примерно 11 мМ, примерно 12 мМ, примерно 13 мМ, примерно 14 мМ, примерно 15 мМ, примерно 20 мМ, примерно 25 мМ, примерно 28 мМ при pH 15 примерно 7, примерно 6, примерно 5, примерно 4, примерно 3, или в диапазоне от примерно 4 до 6,5, от примерно 5 до 6, примерно 5,9, примерно 5,8, примерно 5,7, примерно 5,6 или примерно 5,5. В воплощениях небольшой объем концентрированного буфера препарата добавляют к элюированной концентрированной SDAB молекуле (например, по меньшей мере 2, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20% об./об. концентрированного буфера препарата. В воплощениях концентрированный буфер 20 препарата составляет от примерно 10 до 50 мМ гистидина (например, примерно 20 мМ, примерно 30 мМ гистидина, от примерно 10 до 60% сахара (например, сахарозы, сорбита или трегалозы), например примерно 50% сахарозы, и поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 80) в диапазоне от примерно 0,001 до примерно 0,1%, например примерно 0,06%). Типичные препараты для SDAB молекул описаны в USSN 25 12/608553, поданной 29 октября 2008 г. на имя Wyeth, содержание которой включено посредством ссылки в данную заявку.

В воплощениях SDAB молекулу концентрируют по меньшей мере до примерно 20 г/л, 30 г/л, 40 г/л, 80 г/л, 90 г/л г/л, 100 г/л, 150 г/л, 200 г/л, 210 г/л, 220 г/л, 230 г/л, 240 г/л, 250 г/л, 260 г/л, 270 г/л, 280 г/л, 290 г/л, 300 г/л, 310 г/л, 320 г/л, 330 г/л, 340 г/л, 350 г/л 30 или выше.

В некоторых воплощениях способ или процесс включает: оценку (например, обнаружение, количественную оценку и/или мониторинг) по меньшей мере одного параметра чистоты, активности, токсичности, фармакокинетики и/или фармакодинамики SDAB молекулы; (возможно) сравнение по меньшей мере одного параметра с эталонным 35 значением для того, чтобы таким образом оценить или выбрать SDAB молекулу. Сравнение может включать определение того, имеет ли по меньшей мере один параметр предварительно выбранную взаимосвязь с эталонным значением, например определение того, находится ли он в пределах эталонного значения (либо включая, либо исключая конечные точки диапазона); равняется ли он эталонному значению или превышает его. 40 В некоторых воплощениях, если по меньшей мере один параметр удовлетворяет предварительно выбранной взаимосвязи, например, находится в пределах эталонного значения, SDAB молекулу отбирают. В других воплощениях анализы, способы или указание на то, что предварительно выбранная взаимосвязь между по меньшей мере одним параметром и эталонным значением существует, записывают или фиксируют, 45 например, на машиночитаемом носителе. Такие способы, анализы или указания на существование предварительно выбранной взаимосвязи могут быть перечислены на листке-вкладыше, в руководстве (например, Фармакопее США), или любых других материалах, например маркировке, которые могут быть распространены, например,

для коммерческого применения или для представления в регулирующий орган США или иностранный регулирующий орган.

В одном из воплощений способ или процесс дополнительно включает сравнение определенного значения с эталонным значением для анализа таким образом процесса изготовления.

В одном из воплощений способ дополнительно включает поддержание процесса изготовления, основанное, по меньшей мере частично, на анализе. В одном из воплощений способ дополнительно включает изменение процесса изготовления на основании анализа.

В другом воплощении способ включает оценку процесса, например, процесса изготовления SDAB молекулы, например молекулы TNF нанотела, полученной посредством выбранного процесса, который включает вынесение заключения о процессе, основанного на способе или анализе, описанном в данной заявке. В одном из воплощений способ дополнительно включает поддержание или изменение процесса изготовления, основанного по меньшей мере частично, на способе или анализе. Таким образом, в другом воплощении оценивающая сторона не практикует способ или анализ, описанный в данной заявке, но лишь учитывают результаты, которые получены с помощью способа или анализа, описанного в данной заявке.

В другом воплощении способ включает сравнение двух или более препаратов в способе мониторинга или контролирования различия между партиями или для сравнения препарата с эталонным стандартом.

Еще в одном воплощении способ может дополнительно включать вынесение решения, например, для классификации, отбора, приема или отбраковки, выпуска или приостановки, переработки в лекарственный продукт, транспортировки, перемещения в другое место, приготовления в виде препарата, маркировки, упаковки, выпуска в торговый оборот, продажи или предложения для продажи препарата, основанных, по меньшей мере частично, на заключении.

В другом аспекте изобретение относится к способу соблюдения обязательного требования, например, пострегистрационного требования регулирующего органа, например, FDA (Управление США по надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств). Способ включает обеспечение оценки параметра SDAB молекулы, как описано в данной заявке. Пострегистрационное требование может включать измерение одного или более из вышеуказанных параметров. Способ также включает, возможно, определение того, удовлетворяет ли наблюдаемый разрешающий параметр предварительно выбранным критериям, или находится ли параметр в предварительно выбранном диапазоне; возможно, документальное фиксирование значения или результата анализа или установление связи с органом, например, посредством передачи значения или результата в регулирующий орган.

В другом аспекте изобретение относится к одному или более из: предоставления отчета органу, принимающему отчет, оценки образца SDAB молекулы, например молекулы TNF нанотела, в отношении соответствия эталонному стандарту, например требованию FDA, поиска указания от другой стороны, что препарат SDAB молекулы удовлетворяет некоторому предписанному требованию, или предоставления информации о препарате SDAB молекулы другой стороне. Типичные получающие органы или другие стороны включают правительство, например федеральное правительство США, например, государственный орган, например, FDA. Способ включает одну или более (или все) из следующих стадий: изготовление и/или тестирование SDAB молекулы в первой стране, например США; отправку по меньшей мере аликвоты образца за пределы

первой страны, например, отправку ее из Соединенных Штатов во вторую страну; приготовление или получение отчета, который включает данные о структуре препарата SDAB молекулы, например, данные, относящиеся к структуре и/или цепи, описанной в данной заявке, например, данные, полученные с помощью одного или более способов, описанных в данной заявке; и предоставление указанного отчета организации, получающей отчет.

SDAB молекула, например, молекула нанотела (например, TNF-связывающая молекула нанотела), выделенная или очищенная способом или процессом по изобретению, может включать один или более единичных связывающих доменов (например, одно или более нанотел). Например, молекула нанотела может содержать полипептид, например, одноцепочечный полипептид, содержащий по меньшей мере один вариабельный домен иммуноглобулина (включающий одну, две или три определяющие комплементарность области (CDR)), или состоять из такого полипептида. Примеры SDAB молекул включают молекулы, естественно лишенные легких цепей (например, VHH, нанотела или антитела, полученные из верблюдовых). Такие SDAB молекулы могут происходить или могут быть получены от животных семейства верблюдовых, таких как верблюд, лама, дромадер, альпака и гуанако. В других воплощениях SDAB молекула может включать однодоменные молекулы, включающие, но не ограничиваемые этим, другие природные однодоменные молекулы, такие как однодоменные полипептиды акулы (IgNAR); и однодоменные каркасы (например, фибронектиновые каркасы). Однодоменные молекулы могут происходить из акулы.

В одном из воплощений SDAB молекула, выделенная или очищенная способом или процессом по изобретению, представляет собой одноцепочечный полипептид, состоящий из одной или более однодоменных молекул. В воплощениях молекула нанотела является одновалентной или поливалентной (например, двухвалентной, трехвалентной или четырехвалентной). В других воплощениях молекула нанотела является моноспецифической или полиспецифической (например, биспецифической, триспецифической или тетраспецифической). SDAB молекула может содержать одну или более однодоменных молекул, которые являются рекомбинантными, CDR-привитыми, гуманизированными, верблюдолизированными, деиммунизированными и/или полученными *in vitro* (например, выбранными с помощью фагового дисплея). Например, SDAB молекула может представлять собой одноцепочечный слитый полипептид, содержащий одну или более однодоменных молекул, которые связываются с одним или более целевыми антигенами. Как правило, целевой антиген представляет собой антиген млекопитающего, например, белок человека. В некоторых воплощениях SDAB молекула связывается с сывороточным белком, например, с человеческими сывороточными белками, выбранными из одного или более чем одного сывороточного альбумина (человеческого сывороточного альбумина (HSA)), фибрина, фибриногена или трансферрина.

В одном типичном воплощении SDAB молекула, выделенная или очищенная способом или процессом по изобретению, представляет собой трехвалентную, биспецифическую молекулу, состоящую из слияния одноцепочечных полипептидов двух однодоменных молекул (например, двух вариабельных областей верблюдовых), которые связываются с целевым антигеном, например, фактором некроза опухоли α (TNF α), и одной однодоменной молекулы (например, вариабельной области верблюдовых), которая связывается с сывороточным белком, например, HSA. Однодоменные молекулы SDAB молекулы могут быть расположены в следующем порядке от N- к С-концу: TNF α -связывающая однодоменная молекула - HSA-связывающая однодоменная молекула -

TNF α -связывающая однодоменная молекула. Следует иметь в виду, что любой порядок или комбинация однодоменных молекул против одной или более мишеней могут быть получены, как описано в данной заявке.

В одном из воплощений SDAB молекула, выделенная или очищенная способом или процессом по изобретению, называемая в данной заявке как "ATN-103," содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, представленную на Фиг.2, или аминокислотную последовательность, по существу идентичную ей (например, аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, представленной на Фиг.2), или состоит из нее. Примеры дополнительных молекул трехвалентного, биспецифического нанотела, которые могут быть получены, как описано в данной заявке, включают TNF24, TNF25, TNF26, TNF27, TNF28, TNF60 и TNF62, раскрытые в Таблице 29 из WO 2006/122786.

В некоторых воплощениях по меньшей мере одна из однодоменных молекул SDAB молекулы, выделенной или очищенной способом или процессом по изобретению, которая связывается с TNF α , включает одну, две или три CDR, имеющих аминокислотную последовательность: DYWMY (CDR1), EINTNGLITKYPDSVKG (CDR2) и/или SPSGFN (CDR3), или имеющих CDR, которая отличается менее чем 3, 2 или 1 аминокислотными заменами (например, консервативными заменами) из одной из указанных CDR. В других воплощениях однодоменная молекула содержит вариабельную область, имеющую аминокислотную последовательность из аминокислот от примерно 1 до 115 из SEQ ID NO:1, представленной на Фиг.2, или аминокислотную последовательность, по существу идентичную ей (например, аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, представленной на Фиг.2). В воплощениях TNF α -связывающая однодоменная молекула имеет одну или более биологических активностей молекулы TNF α -связывающего однодоменного антитела из SEQ ID NO:1, представленной на Фиг.2. Например, TNF α -связывающая однодоменная молекула связывается с таким же или сходным эпитопом, что и эпитоп, распознаваемый TNF α -связывающей однодоменной молекулой из SEQ ID NO:1, представленной на Фиг.2 (например, связывается с TNF α в его тримерной форме; связывается с сайтом TNF α , взаимодействующим с рецептором TNF; связывается с эпитопом в тримере TNF α , содержащем Gin в положении 88 и Lys в положении 90 на первом мономере TNF (мономер А) и Glu в положении 146 на втором мономере TNF (мономер В), или эпитопом, описанным в WO 06/122786). В другом воплощении TNF α -связывающая однодоменная молекула имеет активность (например, аффинность связывания, константу диссоциации, специфичность связывания, TNF-ингибирующую активность), сходную с любой из TNF α -связывающих однодоменных молекул, раскрытых в WO 06/122786.

В других воплощениях молекула TNF α -связывающего нанотела содержит одно или более из нанотел, раскрытых в WO 2006/122786. Например, молекула TNF α -связывающего нанотела может представлять собой одновалентную, двухвалентную, трехвалентную молекулу TNF α -связывающего нанотела, раскрытую в WO 2006/122786. Типичные TNF α -связывающие нанотела включают, но не ограничиваются этим, TNF1, TNF2, TNF3, их гуманизированные формы (например, TNF29, TNF30, TNF31, TNF32, TNF33). Дополнительные примеры одновалентных TNF α -связывающих нанотел раскрыты в Таблице 8 из WO 2006/122786. Типичные двухвалентные молекулы TNF α -связывающего нанотела включают, но не ограничиваются этим, TNF55 и TNF56, которые содержат два нанотела TNF30, связанных через пептидный линкер с образованием

единичного слитого полипептида (раскрытого в WO 2006/122786). Дополнительные примеры двухвалентных молекул TNF α -связывающих нанотел раскрыты в Таблице 19 из WO 2006/122786 как TNF4, TNF5, TNF6, TNF7, TNF8).

В других воплощениях по меньшей мере одна из однодоменных молекул SDAB молекулы, выделенной или очищенной способом или процессом по изобретению, которая связывается с HSA, включает одну, две или три CDR, имеющих аминокислотную последовательность: SFGMS (CDR1), SISGSGSDTLYADSVKG (CDR2) и/или GGSLSR (CDR3), или имеющих CDR, которая отличается менее чем 3, 2 или 1 аминокислотными заменами (например, консервативными заменами) от одной из указанных CDR. В других воплощениях однодоменная молекула содержит вариабельную область, имеющую аминокислотную последовательность из аминокислот от примерно 125 до 239 из SEQ ID NO:1, представленной на Фиг.2, или аминокислотную последовательность, по существу идентичную ей (например, аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1, представленной на Фиг.2). В воплощениях HSA-связывающая однодоменная молекула имеет одну или более биологических активностей HSA-связывающей однодоменной молекулы из SEQ ID NO:1, представленной на Фиг.2. Например, HSA-связывающая однодоменная молекула связывается с таким же или сходным эпитопом, что и эпитоп, распознаваемый HSA-связывающей однодоменной молекулой из SEQ ID NO:1, представленной на Фиг.2. В другом воплощении HSA-связывающая однодоменная молекула имеет активность (например, аффинность связывания, константу диссоциации, специфичность связывания), сходную с любой из HSA-связывающей однодоменной молекулы, раскрытой в WO 06/122786.

В других воплощениях HSA-связывающая SDAB молекула содержит одно или более нанотел, раскрытых в WO 2006/122786. Например, HSA-связывающая SDAB молекула представлять собой одновалентную, двухвалентную, трехвалентную молекулу HSA-связывающего нанотела, раскрытую в WO 2006/122786. В других воплощениях HSA-связывающая SDAB молекула может представлять собой моноспецифическую или полиспецифическую молекулу, имеющую по меньшей мере одну из специфичностей связывания, которая связывается с HSA. Типичные TNF α -связывающие нанотела включают, но не ограничиваются этим, ALB1, их гуманизированные формы (например, ALB6, ALB7, ALB8, ALB9, ALB10), раскрытые в WO 06/122786.

В других воплощениях две или более однодоменных молекул SDAB молекулы являются слитыми, со связывающей группой или без нее, в виде генетического или полипептидного слияния. Связывающая группа может представлять собой любую связывающую группу, известную специалисту в данной области. Например, связывающая группа представлять собой биосовместимый полимер длиной от 1 до 100 атомов. В одном из воплощений связывающая группа включает или состоит из полиглициновых, полисериновых, полилизинных, полиглутаматных, полиизолейциновых или полиаргининовых остатков или их комбинации. Например, полиглициновые или полисериновые линкеры могут включать по меньшей мере пять, семь, восемь, девять, десять, двенадцать, пятнадцать, двадцать, тридцать, тридцать-пять и сорок остатков глицина и серина. Типичные линкеры, которые могут быть использованы, включают Gly-Ser повторы, например, (Gly)₄-Ser повторы в одном, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи или более повторах (SEQ ID NO:8). В воплощениях линкер имеет следующие последовательности: (Gly)₄-Ser-(Gly)₃-Ser или ((Gly)₄-Ser)_n, где n равно 4, 5 или 6 (SEQ ID NO:10).

SDAB молекулу, выделенную или очищенную способом или процессом по

изобретению, можно дополнительно модифицировать путем присоединения, например, ковалентного или нековалентного, второй группировки. Например, молекула нанотела может быть ковалентно присоединена к подходящему фармакологически приемлемому полимеру, такому как поли(этиленгликоль) (PEG) или его производное (такое как метоксиполи(этиленгликоль) или mPEG). Примеры пэгилированных молекул нанотел раскрыты как TNF55-PEG40, TNF55-PEG60, TNF56-PEG40 и TNF56-PEG60 в WO 06/122786.

В одном воплощении способ или процесс дополнительно включает одну или более из ионо- (например, катионо- или анионо-) обменной хроматографии, гидроксиапатитной хроматографии, аффинной хроматографии, эксклюзионной хроматографии, хроматографии гидрофобного взаимодействия, металл-аффинной хроматографии, диафильтрации, ультрафильтрации и/или фильтрации для удаления вирусов.

В одном из воплощений способ или процесс дополнительно включает приготовление препарата рекомбинантной SDAB молекулы в виде фармацевтической композиции.

Композиция может включать SDAB молекулу одну или в комбинации со вторым агентом, например, вторым терапевтически или фармакологически активным агентом, который является полезным в лечении TNF α -ассоциированного расстройства, например, воспалительных или аутоиммунных расстройств, включая, но не ограничиваясь этим, ревматоидный артрит (RA) (например, ревматоидный артрит от умеренного до тяжелого), артритические состояния (например, псориатический артрит, ювенильный идиопатический полиартрит (JIA), анкилозирующий спондилоартрит (AS), псориаз, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, воспалительное заболевание кишечника и/или рассеянный склероз. Например, второй агент может представлять собой антитело против TNF или его TNF-связывающий фрагмент, где второе TNF антитело связывается с другим эпитопом, чем TNF-связывающая SDAB молекула препарата. Другие неограничивающие примеры агентов, которые могут быть приготовлены в виде препарата с TNF-связывающей SDAB молекулой, включают, но не ограничиваются этим, ингибитор цитокина, ингибитор фактора роста, иммунодепрессант, противовоспалительный агент, метаболический ингибитор, ферментный ингибитор, цитотоксический агент и цитостатический агент. В одном из воплощений дополнительный агент представляет собой стандартное лечение артрита, включающий, но не ограничивающийся этим, нестероидные противовоспалительные средства (NSAIDs); кортикостероиды, включая преднизолон, преднизон, кортизон и триамцинолон; и противоревматические лекарственные средства, модифицирующие заболевание (DMARDs), такие как метотрексат, гидроксихлорохин (Plaquenil) и сульфасалазин, лефлуномид (Arava®), ингибиторы фактора некроза опухоли, включая этанерцепт (Enbrel®), инфликсимаб (Remicade®) (с метотрексатом или без него) и адалимумаб (Humira®), антитело против CD20 (например, Rituxan®), растворимый рецептор интерлейкина-1, такой как анакинра (Kineret®), золото, миноциклин (Minocin®), пеницилламин и цитотоксические агенты, включая азатиоприн, циклофосфамид и циклоспорин. В таких комбинированных терапиях можно преимущественно использовать более низкие дозировки вводимых терапевтических агентов, что позволит избежать возможных токсических эффектов или осложнений, ассоциированных с различными монотерапиями.

В другом аспекте изобретение относится к SDAB молекуле, полученной способом или процессом, описанным в данной заявке. Композиции, например, фармацевтические композиции, и препараты, содержащие SDAB молекулы, полученные способом или процессом, описанным в данной заявке, также находятся в рамках данного изобретения.

Например, препараты могут включать SDAB молекулы, описанные в данной заявке, в фармацевтически приемлемом носителе.

В одном из воплощений SDAB молекулы, полученные способом или процессом, описанным в данной заявке, являются подходящими для введения субъекту, например, субъекту-человеку (например, пациенту, имеющему TNF α -ассоциированное расстройство). Например, SDAB молекулу или ее препарат можно вводить субъекту посредством инъекции (например, подкожной, внутрисосудистой, внутримышечной или внутривенной) или посредством ингаляции.

В другом аспекте изобретение относится к способам лечения или предупреждения у субъекта (например, субъекта-человека) расстройства, ассоциированного с SDAB молекулой, описанной в данной заявке (например, TNF α -ассоциированного расстройства, например, воспалительных или аутоиммунных расстройств, включая, но не ограничиваясь этим, ревматоидный артрит (КА) (например, ревматоидный артрит от умеренного до тяжелого), артритические состояния (например, псориаз, псориаз, ювенильный идиопатический полиартрит (JIA), анкилозирующий спондилоартрит (AS), псориаз, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, воспалительное заболевание кишечника и/или рассеянный склероз). Способ включает введение субъекту, например, пациенту-человеку, фармацевтической композиции, содержащей TNF-связывающую SDAB, полученную способом или процессом, описанным в данной заявке, отдельно или в комбинации с любой комбинированной терапией, описанной в данной заявке, в количестве, таком что один или более симптомов TNF α -ассоциированного расстройства уменьшаются.

В другом аспекте изобретение относится к набору или изделию, которые включают устройство, шприц или флакон, содержащие SDAB, полученную способом или процессом, описанным в данной заявке.

Все публикации, заявки на патент, патенты и другие ссылки, упомянутые в данной заявке, включены посредством ссылки во всей своей полноте.

Подробная информация об одном или более воплощениях изобретения изложены в прилагаемых графических материалах и описании, представленном ниже. Другие признаки, объекты и преимущества изобретения будут очевидны из описания и графических материалов, и из формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг.1 представлена схема предсказанной структуры ATN-103.

На Фиг.2 представлена аминокислотная последовательность полипептидной цепи ATN-103 (SEQ ID NO:1).

На Фиг.3 представлена блок-схема процесса очистки ATN-103.

На Фиг.4А представлена аминокислотная последовательность полноразмерного стафилококкового белка А (SpA) (SEQ ID NO:11). На Фиг.4В представлена аминокислотная последовательность модифицированного домена В SpA (SEQ ID NO: 12). α -Спиральные области выделены жирным шрифтом.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на открытии, что SDAB молекула, которая включает один или более единичных связывающих доменов (например, одну или более молекул нанотела), взаимодействует, например связывается, с белком А или его функциональным вариантом, что позволяет использовать аффинные способы хроматографии на основе белка А для очистки SDAB молекулы. Таким образом, настоящее изобретение относится к процессам и способам очистки или выделения антигенсвязывающих слитых полипептидов, которые включают один или

более единичных связывающих доменов (например, одну или более молекул нанотела), лишенных комплементарного домена антитела и Fc-области иммуноглобулина, с использованием аффинной хроматографии на основе белка А.

Для того чтобы легче понять настоящее изобретение, сначала определяют некоторые термины. Дополнительные определения изложены в подробном описании.

Как использовано в данной заявке, единственное число относится к одному или более чем одному (например, к по меньшей мере одному) грамматическому объекту.

Термин "или" используют в данной заявке для обозначения термина "и/или" и используют взаимозаменяемо с ним, если контекст ясно не указывает иное.

Термины "белки" и "полипептиды" используются взаимозаменяемо в данной заявке.

"Примерно" и "примерно" должны, как правило, обозначать приемлемый уровень ошибки для измеренного количества с учетом характера и точности измерений.

Типичные уровни ошибки находятся в пределах 20 процентов (%), типично в пределах 10% и более типично в пределах 5% от заданного значения или диапазона значений.

Термин "препарат SDAB молекулы" относится к любой композиции, содержащей SDAB молекулу и/или одно или более нежелательных загрязняющих веществ. Препарат может быть частично выделен или очищен, например, путем пропускания через хроматографическую колонку, как описано в данной заявке, например, носитель на основе белка А или катионообменный носитель.

Термин "хроматография" относится к разделению химически различных молекул в смеси друг от друга посредством приведения указанной смеси в контакт с адсорбентом, где один класс молекул обратимо связывается с адсорбентом или адсорбируется на адсорбенте. Молекулы, которые наименее прочно адсорбируются или удерживаются адсорбентом, высвобождаются из адсорбента в условиях, когда молекулы, более прочно адсорбированные или удерживаемые, не высвобождаются.

Термин "проточный режим" относится к способу выделения препарата SDAB молекулы, при котором по меньшей мере одна SDAB молекула, содержащаяся в препарате, как предполагают, протекает через хроматографическую смолу или носитель, тогда как по меньшей мере одно потенциальное загрязняющее вещество или примесь связываются с хроматографической смолой или носителем. Проточный режим можно использовать, например, в гидроксипатитной хроматографии и ионообменной хроматографии.

"Режим связывания" относится к способу выделения препарата SDAB молекулы, при котором по меньшей мере одна молекула антитела, содержащаяся в препарате, связывается с хроматографической смолой или носителем, тогда как по меньшей мере одно потенциальное загрязняющее вещество или примесь протекают через них. Режим связывания можно использовать, например, в гидроксипатитной хроматографии и ионообменной хроматографии.

"Загрязняющее вещество" относится к любой чужеродной или нежелательной молекуле, в частности, биологической макромолекуле, такой как ДНК, РНК или белок, отличный от белка, который очищают, который присутствует в образце белка, который очищают. Загрязняющие вещества включают, например, другие белки клетки-хозяина из клеток, используемых для экспрессии рекомбинантного белка, который подвергают очистке, белки, которые являются частью адсорбента, используемого на стадии аффинной хроматографии, которые могут вымываться в образец во время предварительной стадии аффинной хроматографии, такие как белок А, а также неправильно свернутые варианты самого целевого белка.

"Белки клетки-хозяина" включают белки, кодируемые природным геномом клетки-

хозяина, в который вводят ДНК, кодирующую белок, который подлежит очистке. Белки клетки-хозяина могут представлять собой загрязняющие вещества белка, подвергаемого очистке, уровни которых можно уменьшить посредством очистки. Белки клетки-хозяина можно анализировать, среди прочих, любым подходящим способом, включая гель-электрофорез и окрашивание и/или ELISA (твердофазный иммуноферментный) анализ. Белки клетки-хозяина включают, например, белки (СНОР) яичника китайского хомячка (СНО), продуцируемые в виде продукта экспрессии рекомбинантных белков.

Термин "высокомолекулярные агрегаты" или "НМWA" относится к ассоциации по меньшей мере двух молекул антитела. Ассоциация может возникать любым способом, включая, но не ограничиваясь этим, ковалентное, нековалентное, дисульфидное или невосстанавливаемое сшивание. По меньшей мере две молекулы могут связываться с одними и теми же или различными антигенами.

Используемые в данной заявке термин "белок А" и связанные выражения, такие как "носитель на основе белка А", предназначены для включения белка А (например, рекомбинантного или выделенного белка А) или его функционального варианта. В одном из воплощений белок А представляет собой полноразмерный стафилококковый белок А (SpA), состоящий из пяти доменов из примерно 50 - 60 аминокислотных остатков, известных как домены E, D, A, B и C, расположенные по порядку от N-конца (Sjodhal Eur J Biochem 78: 471-490 (1977); Uhlen et al. J. Biol. Chem. 259: 1695-1702 (1984)). Эти домены содержат приблизительно 58 остатков, причем каждый имеет примерно 65%-90%-ную идентичность аминокислотной последовательности. Исследования связывания между белком А и антителами показали, что хотя все пять доменов SpA (E, D, A, B и C) связываются с IgG посредством его Fc-области, домены D и E демонстрируют значительное связывание Fab (Ljungberg et al. Mol Immunol. 30(14):1279-1285 (1993); Roben et al. J. Immunol 154:6437-6445 (1995); Starovasnik et al. Protein Sci 8: 1423-1431 (1999). Показали, что Z-домен, функциональный аналог и вариант домена B с минимизированной энергией (Nilsson et al. Protein Eng 1:107-113 (1987)), имеет пренебрежимо малое связывание с вариabельной областью домена антитела (Cedergren et al. Protein Eng 6(4):441-448 (1993); Ljungberg et al. (1993) выше; Starovasnik et al. (1999) выше). Белок А может включать аминокислотную последовательность SpA (SEQ ID NO:11), представленную на Фиг.4А, или аминокислотную последовательность, по существу идентичную ей. В других воплощениях белок А представляет собой функциональный вариант SpA, который включает по меньшей мере один домен, выбранный из E, D, A, B и/или C, или его модифицированную форму. Например, функциональный вариант SpA может включать по меньшей мере домен B из SpA, или вариант домена B, имеющий один или более замещенных аспарагиновых остатков, также называемый в данной заявке доменом Z. В одном из воплощений функциональный вариант SpA включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12), представленную на Фиг.4В, или аминокислотную последовательность, по существу идентичную ей. Можно использовать другие перестановки функциональных вариантов белка А, содержащие домен B, или вариант домена B, и один или более из: домены А и/или С; домены E, А и/или С или домены E, D, А и/или С. Любая комбинация E, D, А, В и/или С или его функционального варианта может быть использована до тех пор, пока комбинация способна связываться с SDAB молекулой.

"Керамический гидроксипатит" или "сНА" относится к нерастворимому гидроксированному фосфату кальция, например, имеющему формулу $[\text{CaO}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ или $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, который спекали при высоких температурах в сферическую,

макропористую керамическую форму. Термин "сНА" включает, но не ограничивается этим, керамический гидроксипатит I типа и II типа. Если не указано иное, "сНА" относится к частице любого размера; включая, но не ограничиваясь этим, 20, 40 и 80 мкм.

- 5 "Очистить" полипептид означает уменьшение количеств чужеродных и нежелательных элементов, особенно биологических макромолекул, таких как белки или ДНК, которые могут присутствовать в образце белка. Присутствие чужеродных белков можно оценить любым подходящим способом, включающим гель-электрофорез и окрашивание и/или ELISA-анализ. Присутствие ДНК можно проанализировать любым подходящим
- 10 способом, включающим гель-электрофорез и окрашивание и/или анализы с использованием полимеразной цепной реакции. В воплощениях полипептид, например SDAB молекула, очищен до по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более высокой чистоты.

- Полипептид является "выделенным" (или "удаленным") из смеси, содержащей белок и другие загрязняющие вещества, когда смесь подвергают такому процессу, что
- 15 концентрация целевого полипептида выше в полученном продукте, чем в исходном продукте.

- Способы и композиции по настоящему изобретению охватывают полипептиды, имеющие специфические последовательности или последовательности, по существу
- 20 идентичные или подобные ей, например, последовательности, по меньшей мере на 85%, 90%, 95% или даже более идентичные специфической последовательности. В контексте аминокислотной последовательности термин "по существу идентичные" используют в данной заявке в отношении первой аминокислотной последовательности, которая содержит достаточное или минимальное число аминокислотных остатков, которые 1)
- 25 идентичны или 2) представляют собой консервативные замены выравненных аминокислотных остатков во второй аминокислотной последовательности, таким что первая и вторая аминокислотные последовательности могут иметь общий структурный домен и/или общую функциональную активность. Например, аминокислотные последовательности, содержащие общий структурный домен, имеющий по меньшей
- 30 мере примерно 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%-ную идентичность с эталонной последовательностью.

- В качестве полипептидов по настоящему изобретению также включены фрагменты, производные, аналоги или варианты вышеупомянутых полипептидов и любая их комбинация. Термины "фрагмент", "вариант", "производное" и "аналог", когда речь
- 35 идет о белках по настоящему изобретению, включают любые полипептиды, которые сохраняют по меньшей мере некоторые из функциональных свойств соответствующего нативного антитела или полипептида. Фрагменты полипептидов по настоящему изобретению включают протеолитические фрагменты, а также делеционные фрагменты, в дополнение к специфическим фрагментам антитела, обсуждаемым в другом месте в
- 40 данной заявке. Варианты полипептидов по настоящему изобретению включают фрагменты, как описано выше, а также полипептиды с измененными аминокислотными последовательностями вследствие аминокислотных замен, делеций или вставок. Варианты могут появляться естественным или искусственным путем. Искусственные варианты могут быть получены с использованием известных методов мутагенеза.
- 45 Варианты полипептидов могут содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, делеций или добавления. Производные фрагментов по настоящему изобретению представляют собой полипептиды, которые были изменены так, чтобы демонстрировать дополнительные признаки, не обнаруженные в нативном

полипептиде. Примеры включали слитые белки. Варианты полипептидов также могут быть упомянуты в данной заявке как "полипептидные аналоги". Используемое в данной заявке "производное" полипептида относится к рассматриваемому полипептиду, имеющему один или более остатков, химически модифицированных посредством реакции функциональной побочной группы. Также в качестве "производных" включены такие полипептиды, которые содержат одно или более встречающихся в природе аминокислотных производных двадцати стандартных аминокислот. Например, пролин может быть замещен 4-гидроксипролином; лизин может быть замещен 5-гидроксилизинном; гистидин может быть замещен 3-метилгистидином; серин может быть замещен гомосерином; и лизин может быть замещен орнитинном.

Термин "функциональный вариант" относится к полипептидам, которые имеют аминокислотную последовательность, по существу идентичную природной последовательности, или кодируются по существу идентичной нуклеотидной последовательностью и способны иметь одну или более активностей природной последовательности.

Расчеты гомологии или идентичности между последовательностями (эти термины взаимозаменяемы в данной заявке) осуществляются следующим образом.

Для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей, последовательности выравнивают для целей оптимального сравнения (например, могут быть введены бреши в одну или обе первую и вторую аминокислотную последовательность или последовательность нуклеиновой кислоты для оптимального выравнивания, и негомологичные последовательности могут не приниматься во внимание для целей сравнения). В предпочтительном воплощении длина эталонной последовательности, выравненной для целей сравнения, составляет по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, 60%, и еще более предпочтительно по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 100% от длины эталонной последовательности. Аминокислотные остатки в соответствующих положениях аминокислот затем сравнивают. Когда положение в первой последовательности занято таким же аминокислотным остатком, что и соответствующее положение во второй последовательности, тогда молекулы идентичны по этому положению (как использовано в данной заявке, "идентичность" аминокислот или нуклеиновых кислот эквивалентна "гомологии" аминокислот или нуклеиновых кислот).

Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от количества идентичных положений, общих для данных последовательностей, с учетом количества брешей и длины каждой бреши, которые должны быть введены для оптимального выравнивания этих двух последовательностей.

Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма. В предпочтительном воплощении процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями определяют с использованием алгоритма Needleman и Wunsch ((1970) J. Mol. B/o/. 48:444-453), который был включен в GAP программу в пакете программ GCG (доступен на <http://www.gcg.com>), используя либо матрицу Blossum 62, либо матрицу PAM250, и массу бреши 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и массу длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В еще одном предпочтительном воплощении процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями определяют с использованием GAP программы в пакете программ GCG (доступен на <http://www.gcg.com>), используя матрицу NWSgapdna.CMP и массу бреши 40, 50, 60, 70 или 80 и массу длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Особенно предпочтительным набором параметров (и

который следует использовать, если не указано иное) является балльная матрица Blossum 62 со штрафом за брешь 12, штрафом за удлинение бреши 4 и штрафом за брешь со сдвигом рамки считывания 5.

Процент идентичности между двумя аминокислотными или нуклеотидными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма E.Meyers и W.Miller ((1989) CABIOS, 4:11-17), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицу массы остатков PAM120, штраф за длину бреши 12 и штраф за брешь 4.

Последовательности нуклеиновой кислоты и белковые последовательности, описанные в данной заявке, можно использовать в качестве "запросной последовательности" для проведения поиска по общедоступным базам данных, например, для идентификации других членов семейства или родственных последовательностей. Такие поиски можно выполнить с использованием программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) из Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Поиски нуклеотидов в BLAST могут быть осуществлены с помощью программы NBLAST, шкала = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO:1) по изобретению. Поиски белков в BLAST могут быть осуществлены с помощью программы XBLAST, шкала = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковым молекулам (SEQ ID NO:1) по изобретению. Для получения выравниваний с брешами для целей сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать значения параметров по умолчанию из соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

"Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, определены в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серином, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Различные аспекты изобретения описаны более подробно ниже.

Однодоменные антигенсвязывающие (SDAB) молекулы

В некоторых воплощениях SDAB молекулы, очищенные способами по изобретению, представляют собой одноцепочечные слитые полипептиды, состоящие из одной или более молекул нанотела. Например, SDAB молекула может представлять собой одноцепочечный слитый полипептид, состоящий из одной или более молекул нанотела, который связывается с одним или более целевыми антигенами, соединенными через линкер, например, пептидный линкер.

Используемый в данной заявке "слитый полипептид" относится к белку, содержащему два или более функционально связанных, например соединенных, фрагментов, например, белковых фрагментов. Как правило, фрагменты ковалентно связаны. Фрагменты могут быть непосредственно связаны или соединены через спейсер или линкер (например,

связывающую группу, как описано в данной заявке). Слитый полипептид можно получить с помощью стандартных методов рекомбинантных ДНК. Например, фрагменты ДНК, кодирующие различные полипептидные последовательности, лигируют вместе в пределах рамки считывания в соответствии с традиционными методами, например, с использованием тупых или ступенчатых (stagger-ended) концов для лигирования, переваривания рестрикционными ферментами для обеспечения подходящих концов, заполнения липких концов при необходимости, обработки щелочной фосфатазой во избежание нежелательного соединения и ферментативного лигирования. В другом воплощении слитый ген можно синтезировать традиционными методами, включающими автоматизированные синтезаторы ДНК. Альтернативно, ПЦР-амплификация фрагментов гена может быть осуществлена с использованием заякоривающих праймеров, которые дают комплементарные выступы между двумя следующими друг за другом фрагментами гена, которые впоследствии могут быть подвергнуты отжигу и повторной амплификации для создания последовательности химерного гена (см, например, Ausubel et al. (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 1992). Более того, многие экспрессирующие векторы, которые кодируют слитый фрагмент, имеются в продаже. В некоторых воплощениях слитые полипептиды существуют в виде олигомеров, таких как димеры или тримеры единичных смежных полипептидов или двух или более несмежных полипептидов. В другом воплощении дополнительные аминокислотные последовательности можно добавлять к N-или C-концу слитого белка для обеспечения экспрессии, стерической гибкости, обнаружения и/или выделения или очистки.

Однодоменные антигенсвязывающие (SDAB) молекулы включают молекулы, определяющие комплементарность области которых являются частью однодоменного полипептида. Примеры включают, но не ограничиваются этим, вариабельные домены тяжелой цепи, связывающие молекулы, естественно лишенные легких цепей, единичные домены, происходящие из традиционных 4-цепочечных антител, сконструированные домены и однодоменные каркасы, отличные от происходящих из антител. SDAB молекулы могут быть любыми из уровня техники или любыми будущими однодоменными молекулами. SDAB молекулы могут происходить из любых видов, включая, но не ограничиваясь этим, мышь, человека, верблюда, ламу, рыбу, акулу, козу, кролика и крупный рогатый скот. Этот термин также включает природные однодоменные молекулы антитела из видов, отличных от Camelidae и акул.

В одном аспекте изобретения SDAB молекула может происходить из вариабельной области иммуноглобулина, обнаруженного у рыбы, такого как, например, который происходит из иммуноглобулинового изоформа, известного как новый антигенный рецептор (NAR от англ. Novel Antigen Receptor), обнаруженный в сыворотке акулы. Способы получения однодоменных молекул, происходящих из вариабельной области NAR ("IgNARs"), описаны в WO 03/014161 и Streltsov (2005) *Protein Sci.* 14:2901-2909.

В соответствии с другим аспектом изобретения SDAB молекула представляет собой природную однодоменную антигенсвязывающую молекулу, известную как тяжелая цепь, лишенная легких цепей. Такие однодоменные молекулы раскрыты в WO 9404678 и Hamers-Casterman, C. et al. (1993) *Nature* 363:446-448, например. Для ясности, этот вариабельный домен, происходящий из молекулы тяжелой цепи, естественно лишенной легкой цепи, известен в данной заявке как VHH или нанотело, для того чтобы отличать его от традиционного VH из четырехцепочечных иммуноглобулинов. Такая молекула VHH может происходить из видов Camelidae, например, верблюда, ламы, дромадера, альпака и гуанако. Другие виды, кроме Camelidae, могут продуцировать молекулы

тяжелой цепи, естественно лишены легкой цепи; такие VHHs находятся в рамках изобретения.

В некоторых воплощениях SDAB молекула включает по меньшей мере один переменный домен иммуноглобулина (включающий одну, две и/или три определяющие комплементарность области (CDR)), в отсутствие комплементарной переменной цепи антитела (например, переменной области тяжелой цепи (VH) в отсутствие переменной области соответствующей легкой цепи (VL)) и/или константной области иммуноглобулина, например, Fc-области (или константной области или ее участка, способного связываться с белком А).

В некоторых воплощениях SDAB молекула не включает молекулы антитела, имеющие переменные домены тяжелых и легких цепей антитела (например, полноразмерные антитела) или их антигенсвязывающие фрагменты, имеющие фрагменты тяжелых и легких цепей антитела (например, Fab, F(ab')₂-фрагмент, scFv, имеющий переменные области легкой и тяжелой цепи в единичной полипептидной цепи, или Fv-фрагмент, состоящий из VL- и VH-доменов одного плеча антитела).

SDAB молекулы могут быть рекомбинантными, CDR-привитыми, гуманизированными, верблюдизированными, деиммунизированными и/или полученными *in vitro* (например, выбранными с помощью фагового дисплея), как описано более подробно ниже.

Термин "антигенсвязывающий" предназначен для включения части полипептида, например, однодоменной молекулы, описанной в данной заявке, которая содержит детерминанты, образующие область контакта, которая связывается с целевым антигеном или его эпитопом. Что касается белков (или белков-миметиков), то антигенсвязывающий участок, как правило, включает одну или более петель (из по меньшей мере четырех аминокислот или аминокислотных миметиков), которые образуют область контакта, которая связывается с целевым антигеном. Типично, антигенсвязывающий участок полипептида, например, молекула однодоменного антитела, включает по меньшей мере одну или две CDR или более типично по меньшей мере три, четыре, пять или шесть CDR.

VH- и VL-области могут быть подразделены на области гипервариабельности, называемые "областями, определяющими комплементарность" (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными и называются "каркасными областями" (FR). Протяженность каркасной области и CDR была точно определена различными способами (см. Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; и AbM определением, используемым программным обеспечением для моделирования антител Oxford Molecular's AbM. См. обычно, например, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). Как правило, если специально не указано, используются следующие определения:

AbM определение CDR1 переменной области тяжелой цепи и Kabat определения для других CDR. Кроме того, воплощения изобретения, описанные в отношении Kabat или AbM CDR, также можно выполнить с использованием гипервариабельных петель Chothia. Каждый VH и VL, как правило, включает три CDR и четыре FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Термин "переменный домен иммуноглобулина" часто понимают в данной области

техники как идентичный или по существу идентичный VL- или VH-домену человеческого или животного происхождения. Следует понимать, что вариабельный домен иммуноглобулина может эволюционировать у некоторых видов, например акул и лам, таким образом, чтобы отличаться по аминокислотной последовательности от VL или VH человека или млекопитающих. Однако эти домены в основном вовлечены в связывание с антигеном. Термин "вариабельный домен иммуноглобулина" типично включает по меньшей мере одну или две CDR или более типично по меньшей мере три CDR.

"Константный домен иммуноглобулина" или "константная область" предназначены включать домен иммуноглобулина, который идентичен или по существу аналогичен CL-, CH1-, CH2-, CH3- или CH4-домену человеческого или животного происхождения. См., например, Charles A Hasemann and J. Donald Capra, *Immunoglobulins: Structure and Function*, in William E. Paul, ed., *Fundamental Immunology*, Second Edition, 209, 210-218 (1989). Термин "Fc-область" относится к Fc-участку константного домена иммуноглобулина, который включает домены CH2 и CH3 иммуноглобулина или домены иммуноглобулина, по существу аналогичные им.

В некоторых воплощениях SDAB молекула представляет собой одновалентную или полиспецифическую молекулу (например, двухвалентную, трехвалентную или четырехвалентную молекулу). В других воплощениях SDAB молекула представляет собой моноспецифическую, биспецифическую, триспецифическую или тетраспецифическую молекулу. Является ли молекула "моноспецифической" или "полиспецифической", например, "биспецифической" относится к количеству различных эпитопов, с которыми реагирует связывающий полипептид. Полиспецифические молекулы могут быть специфическими в отношении различных эпитопов целевого полипептида, описанного в данной заявке или могут быть специфическими для целевого полипептида, а также в отношении гетерологичного эпитопа, такого как гетерологичный полипептид или твердый материал-подложка.

Используемый в данной заявке термин "валентность" относится к числу потенциальных связывающих доменов, например, антигенсвязывающих доменов, присутствующих в SDAB молекуле. Каждый связывающий домен специфически связывается с одним эпитопом. Когда SDAB молекула содержит более чем один связывающий домен, тогда каждый связывающий домен может специфически связываться с одним и тем же эпитопом, для антитела с двумя связывающими доменами, названного "двухвалентным моноспецифическим", или с различными эпитопами, для SDAB молекулы с двумя связывающими доменами, названной "двухвалентной биспецифической". SDAB молекула также может быть биспецифической и двухвалентной для каждой специфичности (названной "биспецифической четырехвалентной молекулой"). Биспецифические двухвалентные молекулы и способы их получения описаны, например, в пат. США №№5731168; 5807706; 5821333; и пат. публ. США №№2003/020734 и 2002/0155537, описания которых включены посредством ссылки в данную заявку. Биспецифические четырехвалентные молекулы и способы их получения описаны, например, в WO 02/096948 и WO 00/44788, описания которых включены посредством ссылки в данную заявку. См., как правило, PCT публикации WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60-69 (1991); U.S. Pat. Nos. 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,819; Kostelny et al., *J. Immunol.* 148: 1547-1553 (1992).

В некоторых воплощениях SDAB молекула представляет собой одноцепочечный слитый полипептид, содержащий одну или более однодоменных молекул (например,

нанотел), лишенных комплементарного варибельного домена или константной области иммуноглобулина, например, Fc-области, которая связывается с одним или более целевыми антигенами. Типичный целевой антиген, распознаваемый антигенсвязывающими полипептидами, включает фактор некроза опухоли α (TNF α).

- 5 В некоторых воплощениях антигенсвязывающая однодоменная молекула связывается с сывороточным белком, например, человеческими сывороточными белками, выбранными из одного или более из сывороточных альбуминов (человеческого сывороточного альбумина (HSA)) или трансферина.

TNF α

- 10 Фактор некроза опухоли альфа, как известно в данной области, ассоциирован с воспалительными расстройствами, такими как ревматоидный артрит, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит и рассеянный склероз. Как TNF α , так и рецепторы (CD120a и CD120b) были изучены в мельчайших подробностях. TNF α в своей биоактивной форме представляет тример. Несколько стратегий антагонизации действия
- 15 TNF α с использованием антител против TNF α были разработаны и в настоящее время коммерчески доступны, такие как Remicade® и Humira®. Известны молекулы антител против TNF α . Многочисленные примеры TNF α -связывающих однодоменных антигенсвязывающих молекул (например, нанотел) раскрыты в WO 2004/041862, WO 2004/041865, WO 2006/122786, содержание которых включено посредством ссылки в
- 20 данную заявку во всей своей полноте. Дополнительные примеры однодоменных антигенсвязывающих молекул раскрыты в США 2006/286066, США 2008/0260757, WO 06/003388, США 05/0271663, США 06/0106203, содержание которых включено посредством ссылки в данную заявку во всей своей полноте. В других воплощениях моно-, би-, три- и другие полиспецифические однодоменные антитела против TNF α и
- 25 сывороточного белка, например HSA, раскрыты в этих ссылках.

- В конкретных воплощениях молекула TNF α -связывающего нанотела содержит одно или более нанотел, раскрытых в WO 2006/122786. Например, молекула TNF α -связывающего нанотела может быть одновалентной, двухвалентной, трехвалентной молекулой TNF α -связывающего нанотела, раскрытой в WO 2006/122786. Типичные
- 30 TNF α -связывающие нанотела включают, но не ограничиваются этим, TNF1, TNF2, TNF3, их гуманизированные формы {например, TNF29, TNF30, TNF31, TNF32, TNF33}. Дополнительные примеры одновалентных TNF α -связывающих нанотел раскрыты в таблице 8 из WO 2006/122786. Типичные двухвалентные молекулы TNF α -связывающего нанотела включают, но не ограничиваются этим, TNF55 и TNF56, которые содержат
- 35 два нанотела TNF30, связанных посредством пептидного линкера с образованием единого слитого полипептида (раскрытого в WO 2006/122786). Дополнительные примеры двухвалентных молекул TNF α -связывающего нанотела раскрыты в таблице 19 из WO 2006/122786 как TNF4, TNF5, TNF6, TNF7, TNF8).

- В других воплощениях молекула HSA-связывающего нанотела содержит одно или
- 40 более нанотел, раскрытых в WO 2006/122786. Например, молекула HSA-связывающего нанотела может быть одновалентной, двухвалентной, трехвалентной молекулой HSA-связывающего нанотела, раскрытой в WO 2006/122786. В других воплощениях молекула HSA-связывающего нанотела может быть моносpezifической или полиспецифической молекулой, имеющей по меньшей мере одну из связывающих специфичностей, которая
- 45 связывается с HSA. Типичные TNF α -связывающие нанотела включают, но не ограничиваются этим, ALB1, их гуманизированные формы (например, ALB6, ALB7, ALB8, ALB9, ALB10), раскрытые в WO 06/122786.

В других воплощениях две или более однодоменных молекул нанотела слиты, со

связывающей группой или без нее, в виде генетического или полипептидного слияния. Связывающей группой может быть любая связывающая группа, известная специалистам в данной области. Например, связывающая группа может представлять собой биосовместимый полимер длиной от 1 до 100 атомов. В одном из воплощений связывающая группа включает или состоит из остатков полиглицина, полисерина, полилизина, полиглутамата, полиизолейцина или полиаргинина или их комбинации. Например, полиглициновые или полисериновые линкеры могут включать по меньшей мере пять, семь, восемь, девять, десять, двенадцать, пятнадцать, двадцать, тридцать, тридцать пять и сорок остатков глицина и серина. Типичные линкеры, которые могут быть использованы, включают Gly-Ser повторы, например, (Gly)₄-Ser повторы в одном, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи или более повторах (SEQ ID NO:8). В воплощениях линкер имеет следующие последовательности: (Gly)₄-Ser-(Gly)₃-Ser (SEQ ID NO:9) или ((Gly)₄-Ser)_n, где n равно 4, 5 или 6 (SEQ ID NO:10).

В одном типичном воплощении антигенсвязывающий полипептид, состоящий из одноцепочечного полипептидного слияния двух однодоменных молекул антитела (например, двух верблюжьих вариабельных областей), которые связываются с целевым антигеном, например, фактором некроза опухоли (TNF α), и одной однодоменной молекулы антитела (например, верблюжьей вариабельной области), которая связывается с сывороточным белком, например, HSA, названный в данной заявке "ATN-103", как показано, связывается с белком А или его функциональным вариантом. ATN-103 представляет собой гуманизированный трехвалентный биспецифический TNF α -ингибирующий слитый белок. Антигеном для этого белка является фактор некроза опухоли-альфа (TNF α). На Фиг.1 представлено схематическое изображение предсказанной структуры ATN-103. Этот слитый белок происходит из верблюдовых и имеет высокую степень гомологии последовательности и структурной гомологии с VH-доменами человеческих иммуноглобулинов. Его единичная полипептидная цепь состоит из двух связывающих доменов для TNF α и одного для человеческого сывороточного альбумина (HSA), с двумя состоящими из девяти аминокислот G-S линкерами, соединяющими данные домены. Подробное описание ATN-103 представлено в WO 06/122786.

Полная аминокислотная последовательность полипептидной цепи ATN-103, предсказанной на основании ДНК последовательности соответствующего экспрессирующего вектора, показана на Фиг.2 (SEQ ID NO:1) (остатки пронумерованы, начиная с NH₂-конца как Остаток номер 1). Последний аминокислотный остаток, кодируемый последовательностью ДНК, представляет собой S³⁶³ и образует COOH-конец белка. Предсказанная молекулярная масса дисульфид-связанного ATN-103 (без каких-либо посттрансляционных модификаций) составляет 38434,7 Да. ATN-103 не содержит N-связанную консенсусную последовательность для гликозилирования. Молекулярная масса, наблюдаемая для преобладающей изоформы посредством квадрупольной времяпролетной масс-спектрометрии с ионизацией нанозлектрораспылением, соответствует 38433,9 Да, что подтверждает отсутствие посттрансляционных модификаций.

На Фиг.2 области, определяющие комплементарность (CDR), подчеркнуты (SEQ ID NO:2-7). Предсказанные внутримолекулярные дисульфидные связи проиллюстрированы посредством соединения вовлеченных цистеиновых остатков. Домены, связывающиеся с TNF, выделены жирным шрифтом, а домен, связывающийся с HSA, выделен жирным курсивом. Аминокислотные линкеры, соединяющие эти связывающие домены, выделены

курсивом. Для данной полипептидной цепи также показан сигнальный пептид ($^{-19}\text{MGW...VHS}^{-1}$).

Получение SDAB молекул

SDAB молекулы могут состоять из одной или более однодоменных молекул (например, нанотел), которые являются рекомбинантными, CDR-привитыми, гуманизированными, верблюдолизированными, деиммунизированными и/или полученными *in vitro* (например, выбранными посредством фагового дисплея). Методы получения антител и SDAB молекул и их рекомбинантная модификация известны в данной области и описаны подробно ниже.

Для получения антител доступны многочисленные способы, известные специалистам в данной области. Например, моноклональные антитела можно получить путем создания гибридом в соответствии с известными способами. Гибридомы, созданные таким образом, затем подвергают скринингу с использованием стандартных методов, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и анализ методом поверхностный плазменный резонансный (BIAcore™), для идентификации одной или более гибридом, которые продуцируют нанотело, которое специфически связывается с заданным антигеном. Любая форма заданного антигена может быть использована в качестве иммуногена, например, рекомбинантный антиген, природные формы, любые его варианты или фрагменты, а также его антигенный пептид.

Один типичный способ создания антител и SDAB молекул включает скрининг белковых экспрессирующих библиотек, например, фаговых или рибосомных дисплейных библиотек. Фаговый дисплей описан, например, в Ladner et al., патенте США №5223409; Smith (1985) Science 228:1315-1317; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690 и WO 90/02809.

В дополнение к использованию дисплейных библиотек, можно использовать заданный антиген для иммунизации животного, не являющегося человеком, например грызуна, например мыши, хомяка или крысы. В одном из воплощений животное, не являющееся человеком, включает по меньшей мере часть человеческого иммуноглобулинового гена. Например, можно сконструировать мышинные линии, дефектные по продукции мышинных антител, с большими фрагментами человеческих Ig локусов. С использованием гибридомной технологии могут быть получены и выбраны антиген-специфические моноклональные антитела, происходящие из генов с желаемой специфичностью. См., например, XENOMOUSE™, Green et al. (1994) Nature Genetics 7:13-21, США 2003-0070185, WO 96/34096, опубликованную 31 октября 1996 г., и заявку PCT № PCT/US96/05928, поданную 29 апреля 1996 г.

В другом воплощении SDAB молекула, полученная из животного, не являющегося человеком, и затем модифицированная, например гуманизированная, деиммунизированная, химерная, может быть получена с использованием методов рекомбинантной ДНК, известных в данной области. Были описаны различные подходы для создания химерных антител и SDAB молекул. См., например, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda et al., Nature 314:452, 1985, Cabilly et al., патент США №4816567; Boss et al., патент США №4816397; Tanaguchi et al., Европейскую патентную публикацию EP 171496; Европейскую патентную публикацию 0173494, патент Великобритании GB 2177096 В. Гуманизированные антитела и SDAB молекулы также могут быть получены, например, с использованием трансгенных мышей, которые экспрессируют человеческие гены тяжелых и легких цепей, но не способны экспрессировать эндогенные мышинные гены тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов. Winter описывает типичный способ CDR-прививки, который можно использовать для

получения гуманизированных антител и SDAB молекулы, описанной в данной заявке (патент США №5225539). Все CDR из конкретного человеческого антитела могут быть заменены по меньшей мере частью нечеловеческого CDR, или только некоторые из CDR могут быть заменены нечеловеческими CDR. Необходимо заменить только номер CDR, необходимый для связывания гуманизированного антитела и SDAB молекулы с заранее определенным антигеном.

Гуманизированные антитела могут быть получены путем замены последовательностей Fv-вариабельного домена, которые не принимают непосредственного участия в связывании антигена с эквивалентными последовательностями из человеческих Fv-вариабельных доменов. Типичные способы получения гуманизированных антител или их фрагментов представлены в Morrison (1985) Science 229:1202-1207; в Oi et al. (1986) B/o Techniques 4:214; и US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 5859205 и US 6407213. Эти способы включают выделение, манипулирование и экспрессирование последовательностей нуклеиновой кислоты, который кодируют все или часть Fv-вариабельных доменов иммуноглобулина по меньшей мере из одной тяжелой или легкой цепи. Такие нуклеиновые кислоты могут быть получены из гибридомы, продуцирующей нанотело против заранее определенной мишени, как описано выше, а также из других источников. Рекомбинантная ДНК, кодирующая гуманизированную SDAB молекулу, например, молекулу нанотела, затем может быть клонирована в подходящий экспрессирующий вектор.

В некоторых воплощениях гуманизированная SDAB молекула, например, молекула нанотела, оптимизирована путем введения консервативных замен, замен из консенсусной последовательности, замен из зародышевой линии и/или обратных мутаций. Такие измененные молекулы иммуноглобулина могут быть созданы с помощью любого из нескольких методов, известных в данной области (например, Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308-7312, 1983; Kozbor et al., 1 мтипо1оду Today, 4: 7279, 1983; Olsson et al., Meth. Enzymol., 92: 3-16, 1982), и могут быть созданы согласно идеям публикации PCT WO 92/06193 или EP 0239400).

Способы гуманизации SDAB молекул, например молекул нанотел, раскрыты в WO 06/122786.

SDAB молекула, например молекула нанотела, может быть также модифицирована посредством специфической делеции человеческих Т-клеточных эпитопов или "деиммунизации" с помощью способов, раскрытых в WO 98/52976 и WO 00/34317. Кратко, вариабельные домены тяжелой и легкой цепи, например нанотела, могут быть проанализированы в отношении пептидов, которые связываются с МНС класса II (главный комплекс гистосовместимости); эти пептиды представляют потенциальные Т-клеточные эпитопы (как определено в WO 98/52976 и WO 00/34317). Для выявления потенциальных Т-клеточных эпитопов может быть использован подход компьютерного моделирования, названный "пептидным протягиванием" ("peptide threading"), и, кроме того, база данных человеческих связывающих пептидов МНС класса II может быть исследована в отношении мотивов, присутствующих в последовательностях V_H и V_L, как описано в WO 98/52976 и WO 00/34317. Эти мотивы связываются с любым из 18 основных аллотипов DR МНС класса II и, таким образом, представляют потенциальные Т-клеточные эпитопы. Обнаруженные потенциальные Т-клеточные эпитопы можно устранить посредством замещения небольшого числа аминокислотных остатков в вариабельных доменах или, предпочтительно, посредством единичных аминокислотных замен. Как правило, делают консервативные замены. Часто, но не исключительно, можно использовать аминокислоту, характерную для положения в последовательностях

человеческих антител эмбрионального типа. Человеческие последовательности эмбрионального типа, например, раскрыты в Tomlinson, et al. (1992) J. Mol. Biol. 227: 776-798; Cook, G.P. et al. (1995) Immunol. Today Vol.16 (5): 237-242; Chothia, D. et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:799-817; и Tomlinson et al. (1995) EMBO J. 14:4628-4638. Каталог V BASE
 5 представляет всеобъемлющий справочник последовательностей вариабельных областей иммуноглобулинов человека (составленный Tomlinson, I.A. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK). Эти последовательности могут быть использованы в качестве источника человеческой последовательности, например, для каркасных областей и CDR. Консенсусные человеческие каркасные области также могут быть
 10 использованы, например, как описано в US 6300064.

SDAB молекулы, например, молекулы нанотел, могут продуцироваться живыми клетками-хозяевами, которые были генетически сконструированы для продуцирования белка. Способы генетического конструирования клеток для продуцирования белков хорошо известны в данной области. См., например, Ausabel et al., eds. (1990), Current
 15 Protocols in Molecular Biology (Wiley, New York). Такие способы включают введение нуклеиновых кислот, которые кодируют и делают возможной экспрессию белка в живых клетках-хозяевах. Эти клетки-хозяева могут представлять собой бактериальные клетки, грибковые клетки, или предпочтительно животные клетки, растущие в культуре. Бактериальные клетки-хозяева включают, но не ограничиваются этим, клетки *Escherichia coli*.
 20 Примеры подходящих штаммов *E.coli* включают: HB101, DH5a, GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539 и любой штамм *E.coli*, который не может расщеплять чужеродную ДНК. Грибковые клетки-хозяева, которые могут быть использованы, включают, но не ограничиваются этим, клетки *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* и *Aspergillus*. Некоторые примеры животных клеточных линий, которые могут быть
 25 использованы, представляют собой CHO, VERO, ВНК, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3Т3 и WI38. Новые животные клеточные линии могут быть установлены с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области (например, посредством трансформации, вирусной инфекции или селекции). Возможно, белок может секретироваться клетками-хозяевами в среду.

30 Модифицированные SDAB молекулы

SDAB молекула, например молекула нанотела, очищенная с использованием способов по изобретению, может иметь аминокислотную последовательность, которая отличается по меньшей мере одним аминокислотным положением в одной от каркасных областей аминокислотной последовательности природного домена, например, VH-домена.

35 Следует понимать, что аминокислотные последовательности некоторых SDAB молекул по изобретению, таких как гуманизированные SDAB молекулы, могут отличаться по меньшей мере одним аминокислотным положением по меньшей мере в одной из каркасных областей от аминокислотных последовательностей природного домена, например, природных доменов VH-I.

40 Изобретение также включает способы очистки производных SDAB молекул. Такие производные, как правило, могут быть получены посредством модификации и, в частности, посредством химической и/или биологической (например, ферментативной) модификации, SDAB молекул и/или одного или более аминокислотных остатков, которые образуют SDAB молекулы, описанные в данной заявке.

45 Примеры таких модификаций, а также примеры аминокислотных остатков в пределах последовательности SDAB молекулы, которая может быть модифицирована таким образом (т.е. либо на белковом скелете, но предпочтительно на боковой цепи), способы и методы, которые можно использовать для введения таких модификаций, а также

возможные применения и преимущества таких модификаций будут понятны специалисту.

Например, такие модификации могут включать введение (например, посредством ковалентного связывания или другим подходящим способом) одной или более функциональных групп, остатков или группировок в SDAB молекулу или на SDAB молекулу и, в частности, одной или более функциональных групп, остатков или группировок, которые придают одно или более желаемых свойств или функциональных активностей SDAB молекулам. Пример таких функциональных групп будут понятны специалисту.

Например, такая модификация может включать введение (например посредством ковалентного связывания или любым другим подходящим способом) одной или более функциональных групп, которые увеличивают период полувыведения, растворимость и/или абсорбцию SDAB молекулы, которые уменьшают иммуногенность и/или токсичность SDAB молекулы, которые устраняют или уменьшают нежелательные свойства SDAB молекулы и/или которые придают другие благоприятные свойства и/или уменьшают нежелательные свойства SDAB молекулы; или любую комбинацию двух или более из вышеупомянутых элементов. Примеры таких функциональных групп и способов их введения будут очевидны специалисту и могут, как правило, включать все функциональные группы и способы, упомянутые в общем уровне техники, процитированном в данной заявке выше, а также функциональные группы и способы, известные сами по себе для модификации фармацевтических белков и, в частности, для модификации антител или фрагментов антител (включая ScFv's и 148-однодоменные антитела), на которые сделана ссылка, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980). Такие функциональные группы могут быть связаны, например, непосредственно (например, ковалентно) с нанотелом по изобретению или, возможно, через подходящий линкер или спейсер, что также будет понятно специалисту.

Один из широко используемых способов увеличения периода полувыведения и/или уменьшения иммуногенности фармацевтических белков включает присоединение подходящего фармакологически приемлемого полимера, такого как пол и (этилен гликоль) (PEG) или его производных (таких как метоксиполи(этиленгликоль) или mPEG). Как правило, можно использовать любую подходящую форму пэгилирования, такую как пэгилирование, используемое в данной области для антител и фрагментов антител (включая, но не ограничиваясь этим, (одно)доменные антитела и ScFv's); ссылка сделана, например, на Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); by Veronese and Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003), by Harris и Chess, Nat. Rev. Drug. Discov., 2, (2003) и в WO 04/060965. Различные реагенты для пэгилирования белков также имеются в продаже, например, от Nektar Therapeutics, США.

Предпочтительно, используют сайт-направленное пэгилирование, в частности, через цистеиновый остаток (см., например, Yang et al., Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003)).

Например, для этой цели PEG можно присоединить к остатку цистеина, который естественно встречается в SDAB молекуле, SDAB молекулу можно модифицировать так, чтобы соответствующим образом ввести один или более остатков цистеина для присоединения PEG, или аминокислотная последовательность, содержащая один или более цистеиновых остатков для присоединения PEG, может быть слита с N- и/или C-концом нанотела по изобретению, где все используемые методы конструирования белков известны специалисту сами по себе.

Предпочтительно, для SDAB молекулы используют PEG с молекулярной массой более 5000, такой как более 10000, и менее 200000, такой как менее 100000; например

в диапазоне 20000-80000.

Что касается пэгилирования, то следует отметить, что, как правило, изобретение также охватывает любую SDAB молекулу, которая была пэгилирована в одном или более аминокислотных положениях, предпочтительно таким способом, что указанное пэгилирование или (1) увеличивает период полувыведения *in vivo*; (2) уменьшает иммуногенность; (3) обеспечивает одно или более дополнительных полезных свойств, известных для пэгилирования как такового; (4) по существу не оказывает влияния на аффинность SDAB молекулы (например, не уменьшает указанную аффинность более чем на 90%, предпочтительно более чем на 50% и более чем на 10%, как определено с помощью подходящего анализа, такого как описанные в примерах, ниже); и/или (4) не влияет на любое из других желаемых свойств SDAB молекулы. Подходящие PEG-группы и способы для их присоединения, либо неспецифического, будут понятны специалисту.

Подходящие наборы и реактивы для такого пэгилирования можно получить, например, от Nektar (CA, США).

Другая, обычно менее предпочтительная модификация включает N-связанное или O-связанное гликозилирование, обычно как часть котрансляционной и/или посттрансляционной модификации, в зависимости от клетки-хозяина, используемого для экспрессирования SDAB молекулы.

Хроматографические способы

Способ очистки белка часто требует многочисленных стадий, где каждая стадия приводит к дальнейшему уменьшению выхода. Хроматография на основе белка А представляет собой один из многих обычно используемых методов. Очистку белка посредством хроматографии на основе белка А можно осуществлять на колонке, содержащей иммобилизованный лиганд белок А (как правило, колонка заполнена модифицированным носителем из метакрилатного сополимера или агарозных шариков, к которым прикреплен адсорбент, состоящий из белка А или его функциональных производных). Как правило, колонка уравновешена буфером с высокой концентрацией соли, и образец, содержащий смесь белков (целевой белок плюс загрязняющие белки) в совместимом неденатурирующем высокосолевым растворе наносят на колонку. По мере прохождения смеси через колонку целевой белок связывается с адсорбентом внутри колонки, тогда как несвязанные загрязняющие вещества вытекают. Связанный белок затем элюируют с колонки пониженной концентрацией соли. Как правило, целевой белок можно извлечь путем элюирования колонки концентрацией соли, используемой в постепенном или ступенчатом уменьшающемся градиенте, для селективного высвобождения различных связанных белков при определенной концентрации соли, подходящей для их высвобождения, и сбора легких фракций до тех пор, пока не будет получена фракция, содержащая большее количество очищенного белка. Собирая фракции элюата через определенные периоды времени, можно выделить фракции, содержащие специфические белки. В способе, когда целевой белок связывается с колонкой (обеспечивая протекание загрязняющих веществ), адсорбенты, имеющие большую аффинность к белку А, как правило, используют для связывания более широкого круга белков, которые собирают в специфической фракции, способствующей высвобождению белка.

Способ по изобретению может быть использован в комбинации с другими способами очистки белка, такими как осаждение солями, аффинная хроматография, гидроксиапатитная хроматография, жидкостная хроматография с обращенной фазой, ионообменная хроматография или любой другой обычно используемый метод очистки белка. Однако предполагается, что способ по настоящему изобретению устраняет или

существенно снижает потребность в других стадиях очистки.

Любую или все хроматографические стадии по настоящему изобретению можно осуществлять механическими средствами. Например, хроматографию можно осуществлять на колонке. Колонку можно запускать под давлением или без давления и сверху вниз или снизу вверх. Направление потока жидкости в колонке можно обращать во время хроматографического процесса. Хроматографию также можно осуществлять с использованием периодического процесса, при котором твердые среды отделяют от жидкости, используемой для загрузки, промывки и элюции образца, любыми подходящими способами, включая силу тяжести, центрифугирование или фильтрацию. Хроматографию также можно осуществлять путем приведения образца в контакт с фильтром, который поглощает или сохраняет некоторые молекулы в образце сильнее, чем другие. В нижеследующем описании различные воплощения настоящего изобретения описаны в контексте хроматографии, выполненной на колонке. Однако понятно, что применение колонки является лишь одним из нескольких хроматографических способов, которые могут быть использованы, и иллюстрация настоящего изобретения с использованием колонки не ограничивает применение настоящего изобретения колоночной хроматографией, поскольку специалисты в данной области легко могут использовать информацию о других способах, таких как способы с использованием периодического процесса или фильтра.

Подходящие носители могут представлять собой любые имеющиеся в настоящее время или впоследствии разработанные материалы, имеющие характеристики, необходимые для практического осуществления заявленного способа, и могут быть основаны на любых синтетических, органических или природных полимерах. Например, обычно используемые вещества-носители включают органические вещества, такие как целлюлоза, полистирол, агароза, сефароза, полиакриламид полиметакрилат, декстран и крахмал, а также неорганические вещества, такие как древесный уголь, диоксид кремния (стеклянные гранулы или песок) и керамические материалы. Подходящие твердые носители раскрыты, например, в Zaborsky "Immobilized Enzymes" CRC Press, 1973, Таблица IV на стр.28-46.

Перед уравниванием и хроматографией среды для хроматографии (носитель и адсорбент, прикрепленный к носителю) могут быть предварительно уравновешены в выбранном растворе, например растворе соли и/или буферном растворе. Предварительное уравнивание выполняет функцию замещения раствора, используемого для регенерации и/или хранения хроматографической среды. Специалисты в данной области понимают, что состав раствора для предварительного уравнивания зависит от состава раствора для хранения и раствора, используемого для последующей хроматографии. Таким образом, подходящие растворы для предварительного уравнивания могут включать такой же буфер или соль, используемые для осуществления хроматографии, возможно, с более высокой концентрацией, чем используют для проведения хроматографии. Буферы и соли, которые могут быть использованы для хроматографии, обсуждаются ниже. Например, когда раствор, используемый для проведения хроматографии, содержит фосфат натрия в заданной концентрации, предварительное уравнивание может происходить в растворе, содержащем фосфат натрия в более высокой концентрации. В качестве иллюстрации этого, если раствор, используемый для проведения хроматографии, содержит фосфат натрия от примерно 0,5 мМ до примерно 50 мМ, то предварительное уравнивание может происходить в растворе, содержащем фосфат натрия в концентрации от примерно 0,2 М до примерно 0,5 М, более предпочтительно при концентрации фосфата натрия

от примерно 0,3 М до примерно 0,4 М, включительно.

Перед нанесением образца на колонку, колонка может быть уравновешена в буфере или соли, которые будут использоваться для хроматографии белка. Как обсуждается ниже, хроматография (и нанесение белка, подвергнутого очистке) может происходить в различных буферах или солях, включающих соли натрия, калия, аммония, магния, кальция, хлорид, фторид, ацетат, фосфат и/или цитрат и/или Трис-буфер. Цитратные буферы и соли являются предпочтительными для специалистов в данной области в связи с простотой их утилизации. Такие буферы или соли могут иметь рН по меньшей мере примерно 5,5. В некоторых воплощениях уравнивание может происходить в растворе, содержащем Трис или натрий-фосфатный буфер. Возможно, натрий-фосфатный буфер находится в концентрации от примерно 0,5 мМ до примерно 50 мМ, более предпочтительно в концентрации от примерно 15 мМ до примерно 35 мМ. Предпочтительно, уравнивание происходит при рН по меньшей мере примерно 5,5. Уравнивание может происходить при рН от примерно 6,0 до примерно 8,6, предпочтительно при рН от примерно 6,5 до 7,5. Наиболее предпочтительно, раствор содержит натрий-фосфатный буфер в концентрации от примерно 25 мМ и при рН примерно 6,8.

Подходящие буферы включают, но не ограничиваются этим, фосфатные буферы, Трис-буферы, ацетатные буферы и/или цитратные буферы. Приемлемые соли могут включать, но не ограничиваются этим, хлорид натрия, хлорид аммония, хлорид калия, ацетат натрия, ацетат аммония, сульфат натрия, сульфат аммония, тиоцианат аммония, цитрат натрия, фосфат натрия, и их калиевые, магниевые и кальциевые соли и комбинацию этих солей. В другом воплощении соли включают цитрат натрия и хлорид натрия. Приемлемые уровни концентраций солей, используемых для хроматографических систем, находятся, как правило, в диапазоне от 0 до примерно 2 М цитрата натрия, от 0 до примерно 4 М хлорида натрия, от 0 до примерно 3 М сульфата аммония, от 0 до примерно 1 М сульфата натрия и от 0 до примерно 2 М фосфата натрия. Диапазоны концентрации соли могут включать от 0 до примерно 1 М цитрата натрия, от 0 до примерно 2 М хлорида натрия, от 0 до примерно 1,5 М сульфата аммония, от 0 до примерно 1 М сульфата натрия и от 0 до примерно 1,5 М фосфата натрия. Также могут быть использованы другие буферы и соли. После нанесения адсорбент может быть промыт большим количеством того же раствора для того, чтобы вызвать протекание целевого белка (несвязанного с адсорбентом) через адсорбент. Затем белок собирают во фракцию элюата. Условия для связывания загрязняющих веществ, в то время как целевой белок не будет связываться, могут быть легко оптимизированы специалистами в данной области. Концентрации соли, обсуждаемые в данной заявке, являются примерными, и другие соли и концентрации соли могут быть использованы путем изменения скоростей потока, температур и времени элюции, как известно в данной области.

Условия, при которых используют колонки, варьируются в зависимости от конкретных колонок, как известно в данной области. Для большинства интересующих белков диапазон рН может составлять от примерно 6,0 до примерно 8,6 или, альтернативно, от примерно 6,5 до примерно 7,5. Однако некоторые белки, как известно, устойчивы к крайним значениям рН, и более широкий диапазон может оказаться возможным. Типичные условия включают диапазон рН от 5 до 7 и диапазон концентрации цитрата натрия от 0 до примерно 0,8 М (например, 0,5 М цитрата натрия, рН 6,0).

Специалист в данной области будет руководствоваться знаниями в данной области

для определения того, какой буфер или соль подходят для конкретного белка, подвергаемого очистке. Кроме того, специалист может легко определить оптимальную концентрацию выбранного буфера или соли для применения, например, путем создания конкретных буферных или солевых условий, при которых загрязняющие вещества связываются с колонкой, в то время как интересующий белок поступает во фракцию элюата. Фракции стока с колонки могут быть собраны и проанализированы для определения концентрации буфера или соли, при которой целевой белок и загрязняющие вещества элюируют. Подходящие анализы включают, например, измерение электрической проводимости с помощью кондуктометра (для определения концентрации соли в образце), а также гель-электрофорез или ELISA-анализ (для определения идентичности белков в образце). Возможно, колонка может быть промыта большим количеством того же раствора, в котором наносят образец белка, и этот раствор для промывки также можно собрать и объединить с проточной жидкостью.

После сбора элюата и, возможно, промывной жидкости, которая включала подвергаемый очистке белок, белки, которые оставались связанными с колонкой, можно высвобождать путем удаления хроматографической среды с использованием раствора, содержащего буфер или соль, используемые для хроматографии, но при более низкой ионной силе для высвобождения загрязняющих белков. Тогда колонку можно регенерировать с использованием раствора, который будет влиять на высвобождение большинства или всех белков из хроматографической среды и на сокращение или устранение любого микробного загрязнения, которое может присутствовать в хроматографической среде. В одном из воплощений такой раствор может включать гидроксид натрия. Могут быть использованы также другие реагенты. Затем колонку можно промыть и хранить в растворе, который может препятствовать росту микробов. Такой раствор может содержать гидроксид натрия, но другие реагенты также могут быть подходящими.

Концентрацию белка в образце на любой стадии очистки можно определить любым подходящим способом. Такие способы хорошо известны в данной области и включают: 1) колориметрические способы, такие как анализ по Лоури, анализ по Брэдфорду, анализ по Смиту и анализ коллоидного золота; 2) способы с использованием свойств белков поглощать УФ; и 3) визуальную оценку, основанную на сравнении окрашенных полос белка на гелях со стандартными белками в известных количествах на том же геле. См., например, Stoschek (1990), Quantitation of Protein, in Guide to Protein Purification, Methods in Enzymol. 182: 50-68.

Целевой белок, а также загрязняющие белки, которые могут присутствовать в образце, можно контролировать любыми подходящими методами. Предпочтительно, метод должен быть достаточно чувствительным для обнаружения загрязняющих веществ в диапазоне от примерно 2 частей на миллион (млн^{-1}) (рассчитанных как нанограммы на миллиграмм очищенного белка) до 500 млн^{-1} . Например, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), способ, хорошо известный в данной области, можно использовать для обнаружения загрязнения белка вторым белком. См., например, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), in Basic Protein and Peptide Protocols, Methods Mol. Biol. 32: 461-466, который включен в данную заявку посредством ссылки во всей своей полноте. В одном аспекте загрязнение белка другими белками можно уменьшить благодаря способам, описанным в данной заявке, предпочтительно по меньшей мере примерно в два раза, более предпочтительно по меньшей мере примерно в три раза, более предпочтительно по меньшей мере примерно в пять раз, более предпочтительно по меньшей мере примерно в десять раз, более предпочтительно по меньшей мере

примерно в двадцать раз, более предпочтительно по меньшей мере примерно в тридцать раз, более предпочтительно по меньшей мере примерно в сорок раз, более предпочтительно по меньшей мере примерно в пятьдесят раз, более предпочтительно по меньшей мере примерно в шестьдесят раз, более предпочтительно по меньшей мере примерно в семьдесят раз, более предпочтительно по меньшей мере примерно в 80 раз, более предпочтительно по меньшей мере примерно в 90 раз и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно в 100 раз.

В другом аспекте загрязнение белка другими белками после способов, описанных в данной заявке, составляет не более чем примерно 10000 млн^{-1} , предпочтительно составляет не более чем примерно 2500 млн^{-1} , более предпочтительно составляет не более чем примерно 400 млн^{-1} , более предпочтительно составляет не более чем примерно 360 млн^{-1} , более предпочтительно составляет не более чем примерно 320 млн^{-1} , более предпочтительно составляет не более чем примерно 280 млн^{-1} , более предпочтительно составляет не более чем примерно 240 млн^{-1} , более предпочтительно составляет не более чем примерно 200 млн^{-1} , более предпочтительно составляет не более чем примерно 160 млн^{-1} , более предпочтительно составляет не более чем примерно 140 млн^{-1} , более предпочтительно составляет не более чем примерно 120 млн^{-1} , более предпочтительно составляет не более чем примерно 100 млн^{-1} , более предпочтительно составляет не более чем примерно 80 млн^{-1} , более предпочтительно составляет не более чем примерно 60 млн^{-1} , более предпочтительно составляет не более чем примерно 40 млн^{-1} , более предпочтительно составляет не более чем примерно 30 млн^{-1} , более предпочтительно составляет не более чем примерно 20 млн^{-1} , более предпочтительно составляет не более чем примерно 10 млн^{-1} и наиболее предпочтительно составляет не более чем примерно 5 млн^{-1} . Такое загрязнение может варьироваться от необнаруживаемых уровней до примерно 10 млн^{-1} или от примерно 10 млн^{-1} до примерно 10000 млн^{-1} . Если белок очищают для фармакологического применения, то специалисту в данной области понятно, что предпочтительный уровень второго белка может зависеть от еженедельной дозы белка, вводимой пациенту, с тем, чтобы пациент не получил больше определенного количества загрязняющего белка в неделю. Таким образом, если необходимая еженедельная доза белка уменьшится, то уровень загрязнения вторым белком, возможно, увеличится.

Количество ДНК, которое может присутствовать в образце очищаемого белка, может быть определено любым подходящим способом. Например, можно использовать анализ с использованием полимеразной цепной реакции. Возможно, этот метод может обнаружить ДНК загрязнение на уровне 10 пикограмм на миллиграмм белка и больше. Уровни ДНК можно уменьшить с помощью НИС (хроматография с гидрофобным взаимодействием), возможно примерно в два раза, предпочтительно примерно в пять раз, более предпочтительно примерно в десять раз, более предпочтительно примерно в пятнадцать раз, наиболее предпочтительно примерно в 20 раз. Возможно, уровни ДНК после гидроксиапатитной хроматографии составляют менее чем примерно 20 пикограмм на миллиграмм белка, предпочтительно менее 15 пикограмм на миллиграмм белка, более предпочтительно менее 10 пикограмм на миллиграмм белка, наиболее предпочтительно менее 5 пикограмм на миллиграмм белка.

Хроматография на основе белка А

В одном из воплощений собранные среды, содержащие препараты антител, могут быть очищены посредством хроматографии на основе белка А. Стафилококковый белок А (SpA) представляет собой белок 42 кДа, состоящий из пяти почти гомологичных доменов, названных E, D, A, B и C и расположенных по порядку от N-конца (Sjodhal EurJ Biochem 78: 471-490 (1977); Uhlen et al. J. Biol. Chem. 259: 1695-1702 (1984)). Эти домены содержат приблизительно 58 остатков, причем каждый имеет примерно 65%-90% идентичности аминокислотной последовательности. Исследования в отношении связывания между белком А и антителами показали, что хотя все пять доменов SpA (E, D, A, B и C) связываются с IgG через его Fc-область, домены D и E демонстрируют значительное связывание Fab (Ljungberg et al. Mol. Immunol. 30(14): 1279-1285 (1993); Roben et al. J. Immunol. 154:6437-6445 (1995); Starovasnik et al. Protein Sci 8:1423-1431 (1999). Было показано, что Z-домен, функциональный аналог и минимизированный по энергии вариант B домена (Nilsson et al. Protein Eng 1:107-113 (1987)), имел незначительное связывание с областью вариабельного домена антитела (Cedergren et al. Protein Eng 6(4):441-448 (1993); Ljungberg et al. (1993) выше; Starovasnik et al. (1999) выше).

До недавнего времени в имеющихся в продаже белок А-стационарных фазах использовали SpA (выделенный из *Staphylococcus aureus* или рекомбинантно экспрессируемый) в качестве их иммобилизованного лиганда. При применении этих колонок было невозможно использовать щелочные условия для регенерации колонки и санации, как это обычно делается с другими видами хроматографии с использованием небелковых лигандов (Ghose et al. Biotechnology and Bioengineering Vol.92 (6) (2005)). Была разработана новая смола (MabSELECT™ SuRe), устойчивая к более жестким щелочным условиям (Ghose et al. (2005) выше). Используя методы белковой инженерии, заменили ряд аспарагиновых остатков в Z-доме белка А и создали новый лиганд в виде тетрамера из четырех идентично модифицированных Z-доменов (Ghose et al. (2005) выше).

Соответственно, способы очистки можно осуществлять с использованием коммерчески доступных колонок с белком А в соответствии с инструкцией производителя. Как описано в прилагаемых примерах, могут быть использованы колонки MabSELECT™ или колонки MabSELECT™ SuRe (GE Healthcare Products). MabSELECT™ представляет собой имеющуюся в продаже смолу, содержащую рекомбинантный SpA в качестве ее иммобилизованного лиганда. Он захватывает молекулы антитела из многочисленных сред посредством хроматографии в плотном слое. Рекомбинантный лиганд белок А MabSELECT™ конструировали в пользу ориентации лиганда белка А, которая увеличивала способность связывать IgG. Специфичность лиганда белка А к связывающей области IgG сходна со специфичностью нативного белка А. Колонки MabSELECT™ SuRe имели сходную высоко сшитую агарозную матрицу, используемую для MabSELECT™, используемый лиганд представлял собой тетрамер из четырех идентично модифицированных Z-доменов (GE Healthcare Products). Другие коммерчески доступные источники белка А-колонок, которые можно эффективно использовать, включают, но не ограничиваются этим, PROSEP-ATM (Millipore, U.K.), который состоит из белка А, ковалентно связанного с пористым стеклом с контролируемым размером пор. Другие используемые белок А-композиции включают Protein A Sepharose FAST FLOW™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) и TOYOPEARL™ 650M Protein A (TosoHaas Co., Philadelphia, PA).

Гидроксипатитные смолы

Различные гидроксипатитные хроматографические смолы имеются в продаже и

любую доступную форму материала может быть использована в практике этого изобретения. Подробное описание условий, подходящих для гидроксиапатитной хроматографии, представлено в WO 05/044856, содержание которых включено в качестве ссылки в данную заявку во всей своей полноте.

5 В одном из воплощений изобретения гидроксиапатит находится в кристаллической форме. Гидроксиапатиты для применения в данном изобретении могут представлять собой гидроксиапатиты, которые подвергаются агломерации с образованием частиц и спекаются при высоких температурах в стабильную пористую керамическую массу. Размер частиц гидроксиапатита может значительно различаться, но типичный размер
10 частиц варьируется от 1 мкм до 1000 мкм в диаметре и может составлять от 10 мкм до 100 мкм. В одном из воплощений изобретения размер частиц составляет 20 мкм. В другом воплощении изобретения размер частиц составляет 40 мкм. В еще одном воплощении изобретения размер частиц составляет 80 мкм.

Ряд хроматографических носителей может быть использован для приготовления
15 сНА колонок, наиболее широко используемыми являются гидроксиапатит I типа и II типа. Тип I имеет высокую связывающую емкость белка и более высокую емкость для кислых белков. Тип II, однако, имеет более низкую связывающую емкость белка, но имеет лучшее разрешение нуклеиновых кислот и некоторых белков. Материал II типа также имеет очень низкую аффинность к альбумину и является особенно подходящим
20 для очистки многих видов и классов иммуноглобулинов. Специалист в данной области может определить выбор конкретного типа гидроксиапатита.

Данное изобретение может быть использовано с гидроксиапатитной смолой, которая является рыхлой, упакованной в колонку, или в непрерывной периодической хроматографии. В одном из воплощений изобретения керамическая гидроксиапатитная
25 смола упакована в колонку. Специалист может определить выбор размеров колонки. В одном из воплощений изобретения для маломасштабной очистки может быть использована колонка с диаметром по меньшей мере 0,5 см, с высотой слоя примерно 20 см.

В дополнительном воплощении изобретения может быть использована колонка с
30 диаметром от примерно 1 см до примерно 60 см. В еще одном воплощении изобретения может быть использована колонка с диаметром от 60 см до 85 см. В некоторых воплощениях изобретения может быть использована суспензия керамической гидроксиапатитной смолы в 200 мМ Na_2HPO_4 раствора при pH 9,0 для набивки колонки при постоянной скорости потока примерно 4 см/мин или под действием силы тяжести.

35 Буферные композиции и условия нанесения для гидроксиапатитных смол

Перед приведением гидроксиапатитной смолы в контакт с препаратом антитела, необходимо откорректировать такие параметры, как pH, ионная сила и температура, и в некоторых случаях добавление веществ различных видов. Таким образом, это является возможной стадией для выполнения уравнивания гидроксиапатитной
40 матрицы посредством ее промывания раствором (например, буфером для корректировки pH, ионной силы и т.д. или для введения детергента), придающего необходимые характеристики для очистки препарата антител.

В случае комбинированного связывания/гидроксиапатитной хроматографии в проточном режиме, гидроксиапатитную матрицу уравнивают и промывают
45 раствором, который придает необходимые характеристики для очистки препарата антител. В одном из воплощений изобретения матрицу можно уравновесить с использованием раствора, содержащего от 0,01 до 2,0 М NaCl от слегка щелочного до слегка кислого pH. Например, уравнивающий буфер может содержать от 1 до 20

мМ фосфата натрия, в другом воплощении он может содержать от 1 до 10 мМ фосфата натрия, в другом воплощении он может содержать от 2 до 5 мМ фосфата натрия, в другом воплощении он может содержать 2 мМ фосфата натрия и в другом воплощении он может содержать 5 мМ фосфата натрия. Уравновешивающий буфер может содержать от 0,01 до 2,0 М NaCl. В одном из воплощений от 0,025 до 0,5 М NaCl, в другом воплощении 0,05 М NaCl и в другом воплощении 0,1 М NaCl. pH загрузочного буфера может варьировать от 6,2 до 8,0. В одном из воплощений pH может составлять от 6,6 до 7,7, а в другом воплощении pH может составлять 7,3. Уравновешивающий буфер может содержать от 0 до 200 мМ аргинина, в другом воплощении он может содержать 120 мМ аргинина, и в еще одном воплощении он может содержать 100 мМ аргинина. Уравновешивающий буфер может содержать от 0 до 200 мМ HEPES, в другом воплощении он может содержать 20 м HEPES, и в еще одном воплощении он может содержать 100 мМ HEPES.

В препарате SDAB молекулы также можно заменить буфер на подходящий буфер или загрузочный буфер при подготовке к гидроксиапатитной хроматографии в проточном режиме. В одном из воплощений изобретения в препарате антитела можно заменить буфер на загрузочный буфер, содержащий от 0,2 до 2,5 М NaCl при pH от слегка кислого до слегка щелочного. Например, загрузочный буфер может содержать от 1 до 20 мМ фосфата натрия, в другом воплощении он может содержать от 2 до 8 мМ фосфата натрия, в другом воплощении он может содержать от 3 до 7 мМ фосфата натрия и в другом воплощении он может содержать 5 мМ фосфата натрия. Загрузочный буфер может содержать от 0,2 до 2,5 М NaCl, в одном воплощении от 0,2 до 1,5 М NaCl, в другом воплощении от 0,3 до 1,0 М NaCl, и еще в одном воплощении 350 мМ NaCl. pH загрузочного буфера может варьировать от 6,4 до 7,6. В одном из воплощений pH может составлять от 6,5 до 7,0, и в другом воплощении pH может составлять 6,8.

Приведение препарата SDAB молекулы в контакт с гидроксиапатитной смолой либо в режиме связывания, проточном режиме, либо их комбинациях, можно осуществлять в колонке с плотным слоем, колонке с псевдоожиженным/пористым слоем, содержащей твердофазную матрицу, и/или в простом периодическом режиме, где твердофазную матрицу смешивают с раствором в течение определенного времени.

После приведения гидроксиапатитной смолы в контакт с препаратом антитела, возможно, выполняют процедуру промывки. Однако в некоторых случаях, когда очень высокая чистота иммуноглобулина не является критичной или не требуется дополнительного протока антитела, процедуру промывки можно опустить, экономя на стадии способа, а также на растворе для промывки. Используемые буферы для промывки будут зависеть от природы гидроксиапатитной смолы, режима используемой гидроксиапатитной хроматографии и поэтому могут быть определены специалистом в данной области. В проточном режиме и комбинированном связывающем/проточном режиме элюированное очищенное антитело, полученное после возможной промывки колонки, можно объединить с другими очищенными фракциями антител.

В режиме связывания SDAB молекулу можно элюировать с колонки после возможной процедуры промывки. Для элюции антитела с колонки в данном изобретении используют фосфатный буфер с высокой ионной силой, содержащий от примерно 0,2 до 2,5 М NaCl при pH от слегка кислого до слегка щелочного. Например, элюирующий буфер может содержать от 1 до 20 мМ фосфата натрия, в другом воплощении он может содержать от 2 до 8 мМ фосфата натрия, в другом воплощении он может содержать от 2 до 6 мМ фосфата натрия, в другом воплощении он может содержать 3 мМ фосфата натрия, и в другом воплощении он может содержать 5 мМ фосфата натрия. Элюирующий буфер

может содержать от 0,2 до 2,5 М NaCl, в одном из воплощений от 0,2 до 1,5 М NaCl, в другом воплощении от 0,3 до 1,1 М NaCl, в другом воплощении 1,0 М NaCl и в другом воплощении 0,35 М NaCl. pH элюирующего буфера может варьировать от 6,4 до 7,6. В одном из воплощений pH может составлять от 6,5 до 7,3, в другом воплощении pH может составлять 7,2, и в другом воплощении pH может составлять 6,8. Элюирующий буфер может быть изменен для элюции антитела с колонки в непрерывном или ступенчатом градиенте.

В обоих режимах, режиме связывания и проточном режиме, а также их комбинациях, твердофазную матрицу можно, при необходимости, очистить, т.е., подвергнуть десорбции и регенерации после элюции или протекания антитела. Эту процедуру, как правило, выполняют регулярно для минимизации накопления примесей на поверхности твердой фазы и/или для стерилизации матрицы во избежание загрязнения продукта микроорганизмами.

Компоненты буфера можно скорректировать в соответствии со знаниями специалиста в данной области.

Дополнительные возможные стадии

Хотя было обнаружено, что гидроксиапатитная хроматография может быть использована сама по себе для отделения мономерного IgG от агрегатов, как упомянуто выше, способ очистки по изобретению может быть использован в комбинации с другими методами очистки белка. В одном из воплощений изобретения одна или более стадий, предшествующих гидроксиапатитной стадии, может быть желательна для уменьшения нагрузки загрязняющих веществ или примесей. В другом воплощении изобретения одна или более стадий очистки, следующих за гидроксиапатитной стадией, может быть желательной для удаления дополнительных загрязняющих веществ или примесей.

Описанная процедура сНА-очистки может быть объединена с другими стадиями очистки, включая, но не ограничиваясь этим, хроматографию на основе белка А, аффинную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, аффинную хроматографию с иммобилизованным металлом, эксклюзионную хроматографию, диафильтрацию, ультрафильтрацию, фильтрацию для удаления вирусов и/или ионообменную хроматографию.

В одном воплощении перед стадией сНА-очистки, собранная среда возможно может быть очищена сначала посредством стадии хроматографии на основе белка А.

Например, можно эффективно использовать PROSEP-ATM (Millipore, U.K.), который состоит из белка А, ковалентно связанного со стеклом с контролируемыми порами.

Другие полезные препараты белка А включают Protein A Sepharose FAST FLOW™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), TOYOPEARL™ 650M Protein A (TosoHaas Co., Philadelphia, PA) и колонки MABSELECT™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

В качестве возможной стадии перед сНА-очисткой может быть использована ионообменная хроматография. В этой связи различные анионные или катионные заместители могут быть присоединены к матрицам с целью образования анионных или катионных носителей для хроматографии. Анионообменные заместители включают диэтиламиноэтильные (DEAE), триметиламиноэтилакриламидные (ТМАЕ), четвертичные аминоэтильные (QAE) и четвертичные аминные (Q) группы. Катионообменные заместители включают карбоксиметил (CM), сульфэтил (SE), сульфопропил (SP), фосфат (P) и сульфонат (S). Целлюлозные ионообменные смолы, такие как DE23, DE32, DE52, CM-23, CM-32 и CM-52, доступны от Whatman Ltd. Maidstone, Kent, U.K. Также известны ионообменники на основе сефадекса и поперечно сшитые ионообменники. Например, DEAE-, QAE-, CM- и SP Sephadex и DEAE-, Q-, CM- и S-Sepharose и Sepharose

доступны от Amersham Biosciences, Piscataway, NJ. Кроме того, как DEAE, так и CM-derivatизированный этиленгликоль-метакрилатный сополимер, такой как TOYOPEARL™ DEAE-650S или M и TOYOPEARL™ CM-650S или M, доступны от Toso Haas Co., Philadelphia, PA.

В одном из воплощений изобретения ионообменная хроматография может быть использована в режиме связывания или проточном режиме.

В некоторых воплощениях стадия хроматографии на основе белка А выполняется первой, стадия анионообменной хроматографии выполняется второй, а сНА стадия выполняется третьей.

Удаление дополнительных примесей

В дополнение к удалению HMWA показано, что сНА хроматография полезна при удалении других примесей из препаратов антител. Другие примеси, которые можно удалить посредством сНА хроматографических способов по изобретению, включают, но не ограничиваются этим, ДНК, белок клетки-хозяина, случайные вирусы и белок А загрязняющие вещества из предыдущих стадий очистки.

В одном из воплощений изобретения можно удалить белок А из препарата антитела. В некоторых воплощениях этого изобретения количество белка А, присутствующего в конечном препарате, можно существенно уменьшить, например, от 300 млн^{-1} до менее чем 1 млн^{-1} .

Введение и способ лечения

Препараты, содержащие SDAB молекулы, очищенные способами, раскрытыми в данной заявке, можно вводить субъекту (например, субъекту-человеку) отдельно или в комбинации со вторым агентом, например, вторым терапевтически или фармакологически активным агентом, для лечения или предупреждения (например, уменьшения или облегчения одного или более симптомов, ассоциированных с) TNF α -ассоциированного расстройства, например, воспалительных или аутоиммунных расстройств. Термин "лечение" относится к проведению терапии в количестве, способом и/или в режиме, эффективном для улучшения состояния, симптома или параметра, ассоциированного с расстройством, или для предупреждения развития расстройства либо в статистически значимой степени, либо в степени, выявляемой специалистом в данной области. Эффективное количество, способ или режим может варьировать в зависимости от субъекта и может быть адаптирован к субъекту.

Неограничивающие примеры иммунных расстройств, которые можно лечить, включают, но не ограничиваются этим, аутоиммунные расстройства, например артрит (включая ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, остеоартрит, псориатический артрит, ассоциированный с волчанкой артрит или анкилозирующий спондилоартрит), склеродермию, системную красную волчанку, синдром Шегрена, васкулит, рассеянный склероз, аутоиммунный тиреоидит, дерматит (включая атопический дерматит и экзематозный дерматит), астенический бульбарный паралич, воспалительное заболевание кишечника (IBD), болезнь Крона, колит, сахарный диабет (I типа); воспалительные состояния, например, кожи (например, псориаз); острые воспалительные состояния (например, эндотоксикоз, сепсис и септицемию, синдром токсического шока и инфекционное заболевание); отторжение трансплантата и аллергию. В одном из воплощений TNF α -ассоциированное расстройство представляет собой артритическое расстройство, например, расстройство, выбранное из одного или более из ревматоидного артрита, ювенильного ревматоидного артрита (РА) (например, ревматоидного артрита от умеренного до тяжелого), остеоартрита, псориатического артрита или анкилозирующего спондилоартрита, ювенильного идиопатического

полиартрита (ЛА); или псориаза, неспецифического язвенного колита, болезни Крона, воспалительного заболевания кишечника и/или рассеянного склероза.

В некоторых воплощениях препараты включают второй терапевтический агент.

Например, для TNF-нанотел второй агент может представлять собой антитело против TNF или его TNF-связывающий фрагмент, где второе TNF антитело имеет эпитопную специфичность, отличную от TNF-связывающей SDAB молекулы препарата. Другие неограничивающие примеры агентов, которые могут быть приготовлены вместе с TNF-связывающей SDAB, включают, например, ингибитор цитокина, ингибитор фактора роста, иммунодепрессант, противовоспалительный агент, метаболический ингибитор, ингибитор фермента, цитотоксический агент и цитостатический агент. В одном из воплощений дополнительный агент представляет собой стандартное лечение артрита, включая, но не ограничиваясь этим, нестероидные противовоспалительные агенты (NSAIDs); кортикостероиды, включая преднизолон, преднизон, кортизон и триамцинолон; и модифицирующие заболевание противоревматические лекарственные средства (DMARDs), такие как метотрексат, гидроксихлорохин (Plaquenil) и сульфасалазин, лефлуномид (Arava®), ингибиторы фактора некроза опухоли, включая этанерцепт (Enbrel®), инфликсимаб (Remicade®) (с метотрексатом или без него) и адалимумаб (Humira®), анти-CD20 антитело (например, Rituxan®), растворимый рецептор интерлейкина-1, такой как анакинра (Kineret), золото, миноциклин (Minocin®), пеницилламин, и цитотоксические агенты, включая азатиоприн, циклофосфамид и циклоспорин. В таких комбинированных терапиях можно преимущественно использовать более низкие дозы вводимых терапевтических агентов, что позволит избежать возможных токсических эффектов или осложнений, связанных с различными монотерапиями.

Препараты могут находиться в форме жидкого раствора (например, растворы для инъекции и инфузии). Такие препараты можно вводить парентеральным путем (например, посредством подкожной, внутривенной, или внутримышечной инъекции) или посредством ингаляции. Фразы "парентеральное введение" и "введенные парентерально", используемые в данной описании, означают режимы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включают подкожное или внутримышечное введение, а также внутривенную, внутрисуставную, внутриглазничную, внутрисердечную, интрадермальную, интраперитонеальную, транстрахеальную, подкожную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию. В одном из воплощений препараты, описанные в данной заявке, вводят подкожно.

Фармацевтические препараты являются стерильными и стабильными в условиях изготовления и хранения. Фармацевтическая композиция также может быть протестирована для гарантии того, что она удовлетворяет регулятивным и промышленным нормам введения.

Фармацевтический препарат может быть приготовлен в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой организованной структуры, подходящей для высокой концентрации белка. Стерильные растворы для инъекции можно приготовить путем включения агента, описанного в данной заявке, в необходимом количестве в подходящем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией путем фильтрования. Как правило, дисперсии готовят путем включения агента, описанного в данной заявке, в стерильный носитель, который содержит щелочную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из тех, что перечислены

выше. Надлежащую текучесть раствора можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Длительная абсорбция инъектируемых композиций может быть обусловлена включением в композицию агента, который замедляет абсорбцию, например, моностеаратных солей и желатина.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры представлены только для иллюстративных целей.

Пример 1: Описание последовательности, кодирующей ATN-103

ATN-103 представляет собой трехвалентную молекулу нанотела, направленную на TNF α и HSA. Нанотела выделяли из фаговой библиотеки, полученной из ламы путем селекции на TNF α или HSA, как описано в WO 06/122786. Нанотела тестировали в отношении специфической активности и выбрали TNF1 в качестве нанотела-ингибитора человеческого TNF α и ALB1 человеческого анти-HSA нанотела для увеличения периода полувыведения. TNF1 и ALB1 гуманизировали путем переноса CDR на наиболее близкий человеческий каркас (DP51/DP53). При гуманизации TNF1 сохраняли 2 верблюжьих остатка (P84 и R103), и этот вариант обозначили TNF30. При гуманизации ALB1 сохраняли 7 верблюжьих остатков (N16, N73, T76, P84, T93, 194 и S103), и этот вариант обозначили ALB8. Каждое из двух TNF30 нанотел связывали с помощью 9-аминокислотного глицин-серинового линкера (Gly₄SerGly₃Ser (SEQ ID NO:9)) с центральным ALB8 нанотелом с получением трехвалентной молекулы, обозначенной в данной заявке как "ATN-103." Аминокислотная последовательность ATN-103, представленная на Фиг.3, имеет следующую конфигурацию -TNF30-(глицин-сериновый линкер)-ALB8-(глицин-сериновый линкер)-TNF30. На Фиг.2, определяющие комплементарность области (CDR) подчеркнуты (SEQ ID NO:2-7). Предсказанные внутримолекулярные дисульфидные связи проиллюстрированы посредством соединений участвующих цистеиновых остатков. Домены, связывающиеся с TNF, выделены жирным шрифтом, а домен, связывающийся с HSA, выделен жирным курсивом. Аминокислотные линкеры, соединяющие эти связывающиеся домены, выделены курсивом. Сигнальный пептид (¹⁹MGW...VHS⁻¹) также показан для полипептидной цепи.

Пример 2: Способ очистки ATN-103

Способ очистки ATN-103 состоит из двух хроматографических стадий и трех стадий мембранной фильтрации (см. Фиг.3). Все стадии выполняют при комнатной температуре, если не указано иное.

Принципы, цели и описания каждой стадии очистки представлены ниже.

Аффинная хроматография на основе белка A MabSelect и инактивации вирусов низким pH

Основные цели стадии хроматографии на основе белка MabSelect™ включают захват продукта из осветленной бесклеточной кондиционированной среды и отделение ATN-103 от примесей, получаемых в процессе (например, ДНК и белка клеток-хозяев, компонентов среды и посторонних агентов).

MabSelect Protein A представляет собой афинную смолу, состоящую из высокосшитой агарозной матрицы, которая ковалентно дериватизирована через тиоэфирную связь с рекомбинантным белком А, продуцируемым в результате Escherichia coli (E.coli) ферментации.

Колонку MabSelect Protein A уравнивали Трис-забуференным раствором хлорида натрия и загружали осветленной бесклеточной кондиционированной средой (СМ). Все буферы прогоняли со скоростью 300 см/ч. Уравнивающий буфер содержит

150 mM NaCl и 50 mM Трис при pH 7,5. ATN-103 связывается с MabSelect™ Protein A смолой и примеси протекают через колонку. Загруженную смолу промывают Трис-буференным раствором хлорида натрия (150 mM NaCl и 50 mM Трис при pH 7,5) для дополнительного снижения уровня примесей, а затем Трио-буфером с низкой концентрацией. Трис-буфер с низкой концентрацией для промывки содержит 10 mM NaCl и 10 mM Трис при pH 7,5. Связанный продукт элюируют с колонки глициновым буфером с низким pH. Глициновый элюирующий буфер с низким pH содержит 10 mM NaCl и 50 mM глицина при pH 3,0. Смолу регенерируют и дезинфицируют раствором гидроксида и затем хранят в растворе, содержащем 16% этанола. Несколько циклов стадии MabSelect Protein A можно получить из одного сбора.

Объединенный продукт выдерживают при pH не более 3,8 в течение $1,5 \pm 0,5$ ч при 18°C - 24°C . Инактивация низким pH после MabSelect™ Protein A колонки была предназначена для инактивации оболочечных вирусов. Элюированный продукт затем нейтрализуют концентрированным HEPES буфером (2 mM HEPES при pH 9,0) и фильтруют с использованием глубокой и 0,2 мкм фильтрации.

Хроматография на керамическом гидроксипатите Macro-Preo

Основными целями стадии на керамическом гидроксипатите Macro-Prep™ (сНА) является удаление высокомолекулярных агрегатов (HMWA), вымытого белка А и происходящих из клеток-хозяев примесей, таких как ДНК и белки клеток-хозяев (HCP).

Керамический гидроксипатит Macro-Prep представляет собой неуплотняемую матрицу, состоящую из шестиугольной кристаллической решетки. Молекулы кальция, фосфата и гидроксида составляют матрицу со стехиометрией $(\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}))_2$. сНА смола представляет собой мультимодовую матрицу, способную обеспечивать катионный обмен, анионный обмен и координационные взаимодействия металлов. Элюция связанных белков, как правило, достигается увеличением концентрации соли или фосфата.

сНА колонку сначала уравнивают буфером, содержащим высокую концентрацию хлорида натрия, затем буфером, содержащим низкую концентрацию хлорида натрия. Нагрузка на сНА колонку представляет собой нейтрализованный MabSelect™ Protein A пул. После загрузки колонку промывают уравнивающим буфером с низкой солью и ATN-103 извлекают с использованием буфера, содержащего высокую концентрацию соли. После элюции ATN-103, HMW и другие примеси удаляют с колонки гораздо более высокими концентрациями соли и фосфата. Колонку регенерируют и затем хранят в растворе гидроксида натрия.

Вирус-удерживающая фильтрация Planova 20N

Стадия вирус-удерживающей фильтрации (VRF) Planova 20N обеспечивает значительный уровень очистки от вируса для обеспечения безопасности продукта путем удаления частиц, которые могут представлять потенциальные случайные вирусные загрязнения.

Одноразовое устройство Planova 20N VRF уравнивают сНА элюирующим буфером и загружают собранный с керамического гидроксипатита Macro-Prep продукт. Продукт собирают в проходящем потоке. После обработки нагрузки промывной буфер используют для извлечения дополнительного продукта, оставшегося в системе.

Ультрафильтрация/диафильтрация и препарат

Стадию ультрафильтрации/диафильтрации (отсечение MW 10 кДа) используют для концентрирования и замены буфера в VRF продукте на буфер препарата.

После уравнивания мембранного модуля загрузочный раствор сначала концентрируют до заранее установленного целевого объема и затем подвергают

диафильтрации с использованием 14 мМ гистидинового буфера с pH 5,8. После дальнейшего концентрирования до приблизительно 110 г/л пул извлекают из системы путем промывки гистидиновым буфером для достижения конечной концентрации целевого белка приблизительно 90 г/л. Маленький объем (11,1% об./об.)

- 5 концентрированного исходного раствора (10 мМ гистидина, 50% сахарозы и 0,1% полисорбата 80) добавляют к пулу продукта. Полученное конечное лекарственное вещество (DS) представляет собой 80 г/л ATN-103 в 10 мМ гистидина, pH 6,0, 5% сахарозы, 0,01% полисорбата.

Конечная фильтрация

- 10 Полученное в виде препарата лекарственное вещество пропускают через одноразовый 0,2 мкм фильтр для удаления любых потенциальных случайных микробных загрязнений и частиц.

Пример 3: Сравнение захвата белком А

- Следующие матрицы на основе белка А оценивали по их способности захватывать
- 15 ATN-103: MabSelect™ (GE Healthcare), MabSelect Xtra™ (GE Healthcare), ProSep® Va Ultra Plus (Millipore) и MabSelect SuRe™ (GE Healthcare). В MabSelect™ используется белок А-лиганд, содержащий Z-домен, и основа смолы является более гидрофобной благодаря поперечным сшивкам. В MabSelect Xtra™ используется тот же лиганд, что и в MabSelect, с увеличением плотности на 30% и более мелкими шариками и большим размером пор.
- 20 ProSep® Va Ultra Plus имеет стеклянную основу и нативный белок А-лиганд. Она предназначена для более высокой емкости при более высоких скоростях потока. MabSelect SuRe™ связывает Fc-содержащие молекулы (ATN-103 не имеет Fc-области) и ее новый лиганд обеспечивает более высокую стабильность к щелочи.

- Когда использовали пиковый пул белка А, который был очищен с помощью
- 25 MabSelect™, в качестве загрузочного вещества (pH=7,0, разбавленного до 1 г/л (ожидаемая концентрация кондиционированной среды)), ProSep® Va Ultra Plus показывал самую высокую связывающую емкость (16 г/л г), а связывающая емкость MabSelect™ показала 20%-ное увеличение по сравнению с ранее продемонстрированной связывающей емкостью.

- 30 Исследовали влияние скорости потока на способность к динамическому связыванию (DBC, от англ. Dynamic Binding Capacity). Для MabSelect™ связывающая емкость составляла 7,4 г/л г при 600 см/ч по сравнению с 8,0 г/л г при 60 см/ч. Аналогичную тенденцию наблюдали при тестировании MabSelect Xtra™ и ProSep® Va Ultra Plus. Таким образом, влияние скорости потока на DBC в тестируемых условиях было минимальным.

- 35 Также исследовали влияние модификатора на связывающую емкость белка А. Результаты показали, что добавление 0,5 М Na₂SO₄ может увеличивать DBC путем усиления гидрофобных взаимодействий. Например, связывающая емкость для MabSelect™ (вместе с СМ) увеличивалась до 12,5 г/л г при скорости потока 150 см/ч. Дополнительный связанный материал впоследствии элюировали раствором без Na₂SO₄.
- 40 Высокую преципитацию определяли в СМ с Na₂SO₄. Аналогичные результаты получали при тестировании MabSelect Xtra™ (DBC=16 г/л г) и ProSep® Va Ultra Plus (DBC=17,5 г/л г).

- Чтобы исследовать влияние PEG на связывающую емкость белка А, добавляли 6%
- 45 PEG (4000 Да) в СМ. Дополнительный связанный материал затем элюировали в буфере без PEG. Результаты показали небольшое увеличение связывающей емкости и отсутствие преципитации.

Пример 4: Оценка MabSelect SuRe™ ATN-103

Во время разработки стадии MabSelect, MabSelect Sure™ использовали в экспериментах по связыванию для получения лучшего понимания механизма связывания белка А с ATN-103. Неожиданно ATN-103 связывался с MabSelect Sure™ и требовал раствора с рН 4,5 для удаления связанного продукта. MabSelect Sure представляет собой белок А-смола, которая сконструирована для связывания только молекул, содержащих Fc-область, таких как антитела. ATN-103 не содержит Fc-область. Позже при разработке определили, что MabSelect Sure™ может связывать ATN-103 вплоть до 8 г/л смолы при 10% проскока первоначальной концентрации.

Пример 5: Оценка катионообменной (СЕХ) стадии ATN-103

Стадию захвата на основе катионообменника (СЕХ) оценивали с целью увеличения емкости захватывающей колонки в способе очистки ATN-103. При снижении проводимости кондиционированных сред (СМ) от 12 до 9 мСм/см и титровании рН до величины не более 4,3 наблюдали емкость 40 г/л г. ATN-103 связывается очень слабо с СЕХ средой вследствие низкого числа заряд/моль при этих уровнях рН. Из-за этого слабого связывания ATN-103 можно элюировать с СЕХ смолы в растворах с низкой проводимостью. Условия элюирования составляли обычно не более 50 мМ NaCl при рН 6,5-7,0. СЕХ колонку можно подвергать элюированию с использованием протекания вниз сНА уравнивающего буфера.

Скрининг емкости СЕХ

Четыре катионообменника Capto™ S (GE Healthcare), Fractogel® S03-(M) (EMD Chemicals), Toyopearl® Gigacap S-650M (Tosoh Bioscience) и Poros® MS 50 (Applied Biosystems) тестировали в отношении их связывающих емкостей для ATN-103. 0,75 мл СМ TS2 с 10 мкл смолы (целевая смола 75 г/л) использовали для скрининга. Колонки промывали буфером, содержащим 50 мМ ацетата натрия при том же рН, что в условиях загрузки. Белки элюировали буфером, содержащим 1М NaCl (рН 5,5). Связанную массу измеряли посредством спектрофотометрии при А280. Затем колонки подвергали десорбции с помощью буфера, содержащего 1М NaCl и мочевины. Спектрофотометрия, измеренная при А280, показала, что после десорбции не наблюдалось значительного связывания массы. Примерно вплоть до 25 г/л г связывающей емкости наблюдалось для всех исследованных смол. Capto™ S и Toyopearl® Gigacap S-650M демонстрировали относительно слабое связывание, а Fractogel® SO3-(M) и Poros® HS 50 показали более прочное связывание. Это исследование показывает, что возможна элюция рН в условиях очень низкой проводимости.

Связывающая емкость СЕХ

СМ титровали до рН 4,0 и разбавляли 3:1 Rodi водой (3 части СМ добавляли к 1 части Rodi) до 0,75 полного разбавления (нагрузка 8 мСм/см). Связывающие емкости Capto™ S, Toyopearl® Gigacap S-650M, Poros® HS 50 и Fractogel® S03-(M) первоначально оценивали в отношении целевой связывающей емкости более чем 40 г/л, используя 2 мл колонки (0,5 см × 10 см). Связывающие емкости Capto™ S, Toyopearl® Gigacap S-650M и Fractogel® SO3-(M) дополнительно определяли в различных условиях в диапазоне рН от 4,0 до 4,3. Например, связывающую емкость для Capto™ S измеряли при рН 4,3, 9 мСм/см; рН 4,0, 11 мСм/см, рН 4,0, 9 мСм/см, и рН 4,1, 8 мСм/см, соответственно. Связывающую емкость для Toyopearl® Gigacap S-650M измеряли при рН 4,3, 9 мСм/см и рН 4,1, 8 мСм/см. Связывающую емкость для Fractogel® SO3-(M) измеряли при рН 4,3, 12 мСм/см; рН 4,3, 9 мСм/см; рН 4,0, 12 мСм/см, рН 4,1, 9 мСм/см и рН 4,0, 9 мСм/см, соответственно. Результаты показали, что Fractogel® SO3-(M) можно использовать без разбавления СМ водой. Без разбавления Fractogel® SO3-(M) показал хорошую связывающую емкость при рН от 4,0 до 4,3 (DBC диапазон: от 25 до более 40 г/л г).

При 23% разбавлении Fractogel® SO3-(M) показал отличную емкость при pH от 4,0 до 4,3 (DBC диапазон: от 40 до более 50 г/л г).

Подход с СЕХ элюцией

Градиентные элюции проводили, как описано в экспериментах для СЕХ связывающей емкости. Цитратный буфер использовали для pH элюции. Тестировали Capto™ S, Toyopearl® Gigacap S-650M, Fractogel® SO3-(M) и Poros® HS 50. Элюция с эксклюзионной хроматографии (SEC) показала высокую чистоту ATN-103 и низкий уровень HMW и LMW образцов. Степень чистоты является по меньшей мере сравнимой с белок А-элюируемыми веществами. HTS (высокоэффективный, high-throughput screening) скрининг можно осуществлять с помощью информации, полученной из градиентных элюции.

Пример 6: Ультрафильтрация/диафильтрация до высокой концентрации и препарат

Пример 6.1: Ультрафильтрация/диафильтрация до высокой концентрации и препарат

Стадию ультрафильтрации/диафильтрации (отсечение MW 10 кДа) использовали для концентрирования и замены буфера в VRF продукте на буфер препарата.

После уравнивания мембранного модуля загрузочный раствор сначала концентрируют до заранее установленного целевого объема и затем подвергают диафильтрации с 28 mM гистидиновым буфером, pH 5,8. После дальнейшего концентрирования до приблизительно 200 г/л пул извлекают из системы путем промывки гистидиновым буфером для достижения конечной концентрации целевого белка приблизительно 150 г/л. Маленький объем (17,6% об./об.) концентрированного исходного раствора (20 mM гистидина, 50% сахарозы и 0,0667% полисорбата 80) добавляют к пулу продукта. Полученное конечное DS представляет собой 80 г/л ATN-103 в 10 mM гистидина, pH 6,0, 5% сахарозы, 0,01% PS80. Полученное конечное DS представляет собой 125 г/л ATN-103 в 20 mM гистидина, pH 6,0, 7,5% сахарозы, 0,01% полисорбата.

Пример 6.2: Ультрафильтрация/диафильтрация до высокой концентрации

Стадию ультрафильтрации/диафильтрации (отсечение MW 10 кДа) использовали для концентрирования и замены буфера в VRF продукте на буфер препарата.

После уравнивания мембранного модуля загрузочный раствор сначала концентрировали до заранее установленного целевого объема 40 г/л и затем подвергали диафильтрации с 30 mM гистидиновым буфером, pH 5,8, содержащим 8,5% сахарозы. После дальнейшего концентрирования до приблизительно 300 г/л пул извлекали из системы буфером для диафильтрации для достижения конечной концентрации целевого белка приблизительно 175 г/л.

Пример 6.3: Ультрафильтрация/диафильтрация до высокой концентрации и препарат

Стадию ультрафильтрации/диафильтрации (отсечение MW 10 кДа) использовали для концентрирования и замены буфера в VRF продукте на буфер препарата.

После уравнивания мембранного модуля загрузочный раствор сначала концентрировали до заранее установленного целевого объема 40 г/л и затем подвергали диафильтрации с 30 mM гистидиновым буфером, pH 5,8. После дальнейшего концентрирования до приблизительно 320 г/л пул извлекали из системы буфером для диафильтрации для достижения конечной концентрации целевого белка приблизительно 210 г/л.

Если целевое DS составляло не менее 200 г/л, то комбинацию Примера 6.2 и Примера 6.3 можно осуществить следующим образом: стадию ультрафильтрации/диафильтрации (отсечение MW 10 кДа) можно использовать для концентрирования и замены буфера в VRF продукте на буфер препарата. После уравнивания мембранного модуля

загрузочный раствор можно сначала сконцентрировать до заранее установленного целевого объема 40 г/л и затем подвергнуть диафильтрации с гистидин-сахарозным буфером. После дальнейшего концентрирования до приблизительно 320 г/л пул можно извлечь из системы буфером для диафильтрации для достижения конечной концентрации целевого белка приблизительно не менее 200 г/л, где сахара уже присутствует. Затем пик препарата будет составлять 1,01% об./об., таким образом, UF (кльтрафильтрация) пул не будет существенно разбавлен и конечное DS будет составлять не менее 200 г/л.

Эквиваленты

Все ссылки, процитированные в данном описании, включены в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей в такой же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патент, или заявка на патент были специально и отдельно указаны для включения посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

Настоящее изобретение не следует ограничивать объемом конкретных воплощений, описанных в данной заявке. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к описанным в данной заявке, будут понятны специалистам в данной области из вышеизложенного описания и сопровождающих графических материалов. Предполагается, что такие модификации подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения.

Формула изобретения

1. Способ выделения или очистки однодоменной антигенсвязывающей (SDAB) молекулы, имеющей SEQ ID NO:1, из смеси, содержащей SDAB молекулу и одно или более загрязняющих веществ, включающий:

приведение смеси в контакт с катионообменным носителем в условиях, которые позволяют SDAB молекуле связываться с носителем или абсорбироваться на носителе; удаление одного или более загрязняющих веществ; и селективное элюирование SDAB молекулы с носителя,

где проводимость среды для кондиционирования (CM), используемой для загрузки носителя, составляет от примерно 12 до 9 мСм/см и pH в условиях загрузки корректируют до величины от 4,0 до 4,3,

где буфер для элюции соответствует примерно 50 mM хлорида натрия или меньше и имеет pH от примерно 5,5 до 7,2.

2. Способ по п. 1, где pH в условиях загрузки корректируют до величины, равной примерно 4,3; 4,2; 4,1 или 4.

3. Способ по п. 1, где стадия удаления одного или более загрязняющих веществ включает промывку связавшегося носителя в условиях, когда SDAB молекула остается связанной с носителем.

4. Способ по п. 1, где катионообменный носитель представляет собой катионообменную колонку.

5. Способ по п. 1, включающий:

приведение смеси, содержащей SDAB молекулу и одно или более загрязняющих веществ, в контакт с катионообменной (CEX) смолой, где CEX смола демонстрирует емкость по меньшей мере примерно 40 г/л;

обеспечение протекания SDAB молекулы через носитель, промывание носителя по меньшей мере одним буфером для промывки катионообменника; и элюирование SDAB молекулы буфером для элюции.

6. Способ по п. 1, где загрязняющие вещества в смеси содержат один или более из

высокомолекулярных белковых агрегатов, белков клетки-хозяина или ДНК.

7. Способ по п. 1, где SDAB молекулу очищают по меньшей мере до 90% чистоты или выше.

8. Способ по п. 1, дополнительно включающий одну или более из: гидроксиапатитной хроматографии, катионообменной хроматографии, аффинной хроматографии, эксклюзионной хроматографии, хроматографии гидрофобного взаимодействия, металл-аффинной хроматографии, диафильтрации, ультрафильтрации, вирусной инактивации или фильтрации для удаления вирусов.

9. Способ по п. 8, включающий приведение смеси в контакт с гидроксиапатитной смолой и селективное элюирование SDAB молекулы с гидроксиапатитной смолы.

10. Способ по п. 9, включающий предварительную обработку смеси уравнивающим буфером и обеспечение протекания предварительно обработанной смеси через гидроксиапатитную смолу.

11. Способ по п. 9, где стадия приведения смеси в контакт с гидроксиапатитной смолой и стадии элюции осуществляют в буферных растворах, содержащих от примерно 1 до 20 мМ фосфата натрия и от примерно 0,2 до 2,5 М хлорида натрия, при pH от примерно 6,4 до 7,6.

12. Способ по п. 10, где уравнивающий буфер содержит от примерно 1 до 20 мМ фосфата натрия, от примерно 0,01 до 2,0 М хлорида натрия, от примерно 0 до 200 мМ аргинина, от примерно 0 до 200 мМ HEPES, при pH от примерно 6,2 до 8,0.

13. Способ по п. 1, где очищенная SDAB молекула содержит менее 10% высокомолекулярных агрегатов.

14. Способ или процесс получения рекомбинантной однодоменной антигенсвязывающей (SDAB) молекулы, имеющей SEQ ID NO:1, при котором:

берут клетку-хозяина млекопитающего, содержащую нуклеиновую кислоту, которая кодирует рекомбинантную SDAB молекулу;

поддерживают клетку-хозяина в условиях, при которых экспрессируется рекомбинантная SDAB молекула;

получают смесь рекомбинантной SDAB молекулы и одного или более загрязняющих веществ;

очищают или выделяют рекомбинантную SDAB молекулу из указанной смеси с использованием катионообменной хроматографии,

где указанная стадия очистки или выделения включает приведение смеси в контакт с носителем в условиях, которые позволяют SDAB молекуле связываться или абсорбироваться носителем; и

где проводимость среды для кондиционирования (CM), используемой для загрузки носителя, составляет от примерно 12 до 9 мСм/см и pH в условиях загрузки корректируют до величины от 4,0 до 4,3;

удаление одного или более загрязняющих веществ; и
селективное элюирование SDAB молекулы с носителя, посредством этого получение препарата элюированной SDAB молекулы,

где буфер для элюции соответствует примерно 50 мМ хлорида натрия или меньше и имеет pH от примерно 5,5 до 7,2.

15. Способ по п. 14, при котором препарат элюированной SDAB молекулы дополнительно подвергают одной или более из: гидроксиапатитной хроматографии, аффинной хроматографии, эксклюзионной хроматографии, хроматографии гидрофобного взаимодействия, металл-аффинной хроматографии, диафильтрации, ультрафильтрации или фильтрации для удаления вирусов.

16. Способ по п. 14, дополнительно включающий приготовление препарата рекомбинантной SDAB молекулы в виде фармацевтической композиции.

17. Способ по любому из пп. 1-16, дополнительно включающий концентрирование элюированной SDAB молекулы до заранее выбранного целевого объема.

5 18. Способ по п. 17, где стадию концентрирования осуществляют путем выполнения стадии ультрафильтрации/диафильтрации в присутствии гистидинового буфера или Трис-буфера.

19. Способ по любому из пп. 1-16 или 18, где SDAB молекулу концентрируют по меньшей мере до примерно 80 г/л - 350 г/л.

10

15

20

25

30

35

40

45

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Вайет ЭлЭлСи

<120> СПОСОБЫ ОЧИСТКИ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИХ МОЛЕКУЛ

<130> W2023-7038WO

<140>

<141>

<150> 61/109,481

<151> 2008-10-29

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 382

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<220>

<221> сигнал

<222> (1)..(19)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (20)..(382)

<400> 1

Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly
				-15					-10					-5	

Val	His	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln
	-1	1				5						10			

Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe
15						20					25				

Ser	Asp	Tyr	Trp	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
30					35					40					45

Glu	Trp	Val	Ser	Glu	Ile	Asn	Thr	Asn	Gly	Leu	Ile	Thr	Lys	Tyr	Pro
				50					55					60	

Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn
			65					70					75		

Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
	80					85						90			

Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Pro	Ser	Gly	Phe	Asn	Arg	Gly	Gln	Gly	Thr
	95					100					105				

Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu
110					115					120					125

RU 2 553 214 C2

Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Asn	Ser	
				130					135					140		
Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe	Gly	
			145					150					155			
Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	
		160					165					170				
Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	
	175					180					185					
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Thr	Thr	Leu	Tyr	Leu	
190					195				200						205	
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	
				210					215					220		
Ile	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	
			225					230					235			
Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	
		240					245					250				
Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	
	255					260					265					
Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	Trp	Met	Tyr	Trp	Val	
270					275					280					285	
Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Glu	Ile	Asn	Thr	
				290					295					300		
Asn	Gly	Leu	Ile	Thr	Lys	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	
			305					310					315			
Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	
			320				325					330				
Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Pro	Ser	
			335			340					345					
Gly	Phe	Asn	Arg	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
350					355					360						

<210> 2

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический пептид"

<400> 2

Asp	Tyr	Trp	Met	Tyr
1				5

<210> 3

<211> 17

<212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический пептид"

<400> 3
 Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 4
 <211> 6
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический пептид"

<400> 4
 Ser Pro Ser Gly Phe Asn
 1 5

<210> 5
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический пептид"

<400> 5
 Ser Phe Gly Met Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 17
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический пептид"

<400> 6
 Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 7
 <211> 6
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический пептид"

<400> 7
 Gly Gly Ser Leu Ser Arg
 1 5

<210> 8
 <211> 35
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (6)..(10)
 <223> /замена=" "

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(10)
 <223> /примечание="Остатки, представленные в последовательности, не имеют предпочтения относительно остатков в примечаниях для указанных положений"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (11)..(15)
 <223> /замена=" "

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(15)
 <223> /примечание="Остатки, представленные в последовательности, не имеют предпочтения относительно остатков в примечаниях для указанных положений"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (16)..(20)
 <223> /замена=" "

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(20)
 <223> /примечание="Остатки, представленные в последовательности, не имеют предпочтения относительно остатков в примечаниях для указанных положений"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (21)..(25)
 <223> /замена=" "

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> /примечание="Остатки, представленные в последовательности, не имеют предпочтения относительно остатков в примечаниях для указанных положений"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (26)..(30)
 <223> /замена=" "

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(30)
 <223> /примечание="Остатки, представленные в последовательности, не имеют предпочтения относительно остатков в примечаниях для указанных положений"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (31)..(35)
 <223> /замена=" "

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(35)
 <223> /примечание="Остатки, представленные в последовательности, не имеют предпочтения относительно остатков в примечаниях для указанных положений"

<400> 8
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Ser
 35

<210> 9
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический пептид"

<400> 9
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 10
 <211> 30
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (21)..(25)
 <223> /замена=" "

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> /примечание="Остатки, представленные в последовательности, не имеют предпочтения относительно остатков в примечаниях для указанных положений"

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (26)..(30)
 <223> /замена=" "

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(30)
 <223> /примечание="Остатки, представленные в последовательности, не имеют предпочтения относительно остатков в примечаниях для указанных положений"

<400> 10
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25 30

<210> 11
 <211> 441
 <212> ППТ
 <213> Staphylococcal sp.

<400> 11
 Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Gln Val Leu Asn
 1 5 10 15
 Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu
 20 25 30
 Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys
 35 40 45
 Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Ala Gln Gln Asn Lys Phe
 50 55 60
 Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn
 65 70 75 80
 Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp
 85 90 95
 Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu
 100 105 110
 Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn
 115 120 125
 Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg
 130 135 140

RU 2553214 C2

Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn	
145	150 155 160
Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Ala	
	165 170 175
Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu	
	180 185 190
His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser	
	195 200 205
Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys	
	210 215 220
Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys	
	225 230 235 240
Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr	
	245 250 255
Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser	
	260 265 270
Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln	
	275 280 285
Ala Pro Lys Glu Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn	
	290 295 300
Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Lys	
	305 310 315 320
Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Lys	
	325 330 335
Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn	
	340 345 350
Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn	
	355 360 365
Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Gly Val His Val Val Lys Pro Gly	
	370 375 380
Asp Thr Val Asn Asp Ile Ala Lys Ala Asn Gly Thr Thr Ala Asp Lys	
	385 390 395 400
Ile Ala Ala Asp Asn Lys Leu Ala Asp Lys Asn Met Ile Lys Pro Gly	
	405 410 415
Gln Glu Leu Val Val Asp Lys Lys Gln Pro Ala Asn His Ala Asp Ala	
	420 425 430
Asn Lys Ala Gln Ala Leu Pro Glu Thr	
	435 440

<210> 12

<211> 58

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

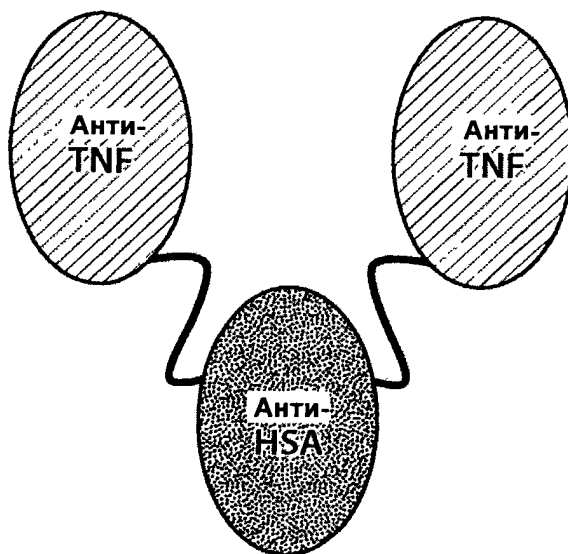
<400> 12

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
 1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
 50 55

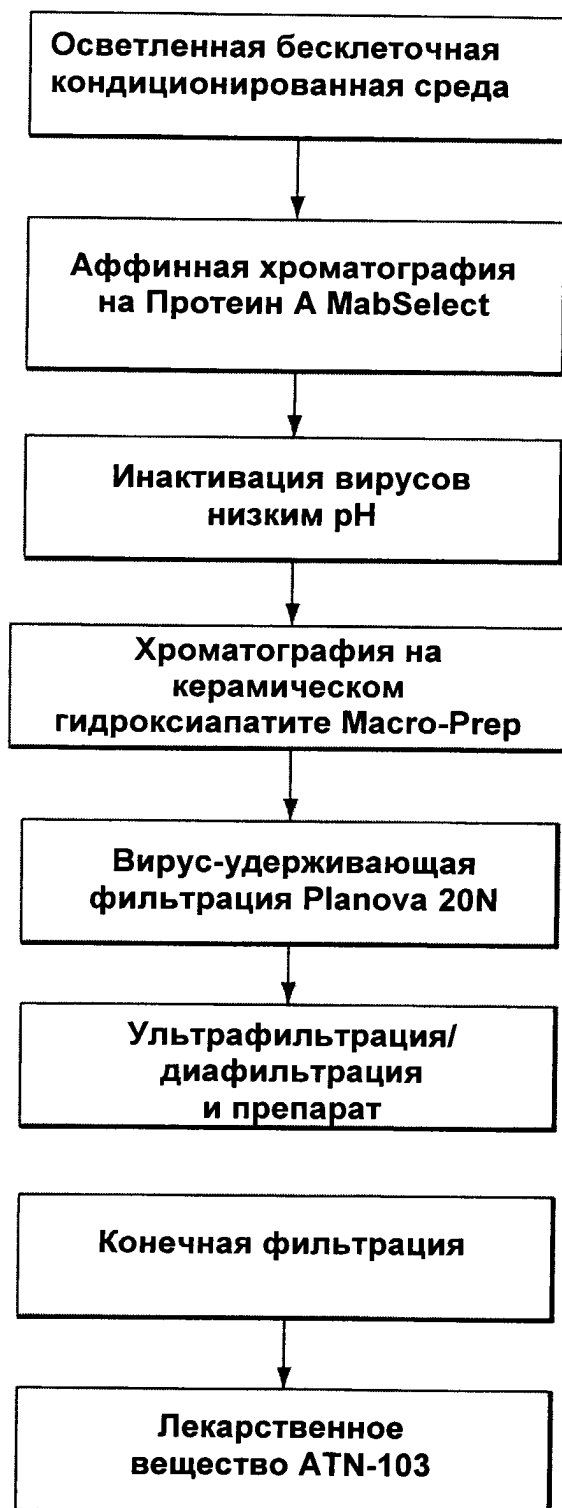


ФИГ. 1

-19 MGWSCIILFLVATATGVHS -1

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKY 60
 61 PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGLTVTVSSGGGGS 120
 121 GGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS 180
 181 DTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLTVTVSSG 240
 241 GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSEIN 300
 301 TNGLITKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCARSPSGFNRGQGLTVT 360
 361 VSS (SEQ ID NO:1)

ФИГ. 2



ФИГ. 3

1 aqhdeaqgna fyqvlmpnl nadqrngfiq slkddpsqsa nvlgeaqkln dsqapkadaq
 61 qnkfnkdqqs afyeilnmpn lneeqrngfi qslkddpsqs tnlgeakkl nesqapkadn
 121 nfnkeqgnaf yeilnmpnl eeqrngfigs lkddpsqsan llaeakkln sqapkadnkf
 181 nkeqgnafye ilhlplnlnee qrngfigslk ddpsqsanll aeakkln daq apkadnkfnk
 241 eqgnafyeil hlpnlteeqr ngfigslkdd psvskeilae akklndaqap keednnkpgk
 301 edgnkpgked gnkpgkednk kpgkedgnkp gkednkkpgk edgnkpgked gnkpgkedgn
 361 kpgkedgnkp gkedgngvhv vkpgdtvndi akangettadk iaadnkladk nmikpggelv
 421 vdkkqpanha dankaqalpe t (SEQ ID NO:11)

ФИГ. 4А

1 vdnkfnkeqq nafyeilhlp nlneeqrnaf iqlkddpsq sanllaeakk lndaqapk
 (SEQ ID NO:12)

ФИГ. 4В