



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021002724-6 A2



(22) Data do Depósito: 16/08/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 20/07/2021

(54) **Título:** MÉTODO PARA QUANTIFICAR UMA QUANTIDADE DE UM ANTICORPO HETERODIMÉRICO, E, SISTEMA DE CROMATOGRAFIA

(51) **Int. Cl.:** G01N 33/68.

(30) **Prioridade Unionista:** 17/08/2018 US 62/719,323.

(71) **Depositante(es):** REGENERON PHARMACEUTICALS, INC..

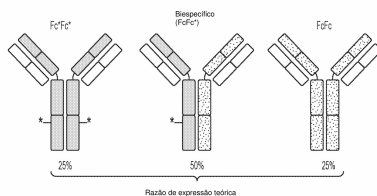
(72) **Inventor(es):** MICHAEL PERRONE; AUDREY RODRIGUEZ; ANDREW TUSTIAN; HANNE BAK.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2019046769 de 16/08/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2020/037182 de 20/02/2020

(85) **Data da Fase Nacional:** 12/02/2021

(57) **Resumo:** MÉTODO PARA QUANTIFICAR UMA QUANTIDADE DE UM ANTICORPO HETERODIMÉRICO, E, SISTEMA DE CROMATOGRAFIA. A invenção se refere a um sistema e método de cromatografia para avaliar quantidade e/ou pureza de uma proteína multimérica em uma amostra, em que o sistema de cromatografia compreende duas matrizes de cromatografia de afinidades diferentes conectadas por meio de uma válvula de comutação.



MÉTODO PARA QUANTIFICAR UMA QUANTIDADE DE UM ANTICORPO HETERODIMÉRICO, E, SISTEMA DE CROMATOGRAFIA CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se refere a um sistema e método de cromatografia para avaliar uma quantidade e/ou a pureza de uma proteína multimérica em uma amostra, em que o sistema de cromatografia compreende duas matrizes de cromatografia de afinidades diferentes conectadas por meio de uma válvula de comutação.

FUNDAMENTOS

[002] Anticorpos biespecíficos são anticorpos que podem simultaneamente e seletivamente se ligar a dois tipos diferentes de epítomos no mesmo ou em diferentes antígenos. A ligação de múltiplos alvos com uma única molécula é um conceito terapêutico atraente, especialmente nos campos de oncologia e doença autoimune. A aplicação mais amplamente usada é na imunoterapia do câncer, onde anticorpos biespecíficos são modificados para se ligar simultaneamente a uma célula citotóxica e um alvo, tal como uma célula de tumor a ser destruída. Adicionalmente, direcionar mais do que uma molécula pode ser útil para contornar a regulação de vias paralelas e evitar resistência ao tratamento. Ligar ou bloquear alvos múltiplos em uma via pode ser benéfico para interromper a doença, como a maioria das condições têm efeitos multifacetados complicados através de todo o corpo.

[003] Formatos múltiplos de anticorpos biespecíficos foram propostos e estão atualmente em desenvolvimento. Um tal formato é com base em um anticorpo IgG totalmente humano padrão tendo um perfil farmacocinético melhorado e imunogenicidade mínima (ver, Patente US No. 8.586.713, e WO2016/018740), mostrados esquematicamente em **Figura 1**. Uma cadeia leve comum simples e duas cadeias pesadas distintas se combinam para formar um tal biespecífico. Uma das cadeias pesadas contém uma sequência Fc substituída (nas partes que se seguem, “Fc*”) que reduz

muito a ligação de Fc* á proteína A devido a substituições H435R/Y436F (por sistema de numeração EU; H95R/Y96F por sistema de numeração de éxon IMGT) no domínio CH3. Como um resultado de coexpressão de cadeias pesadas Fc* e Fc e a cadeia leve comum, três produtos são criados: dois dos quais (FcFc e Fc*Fc*) são homodiméricos com relação às cadeias pesadas, e um dos quais (FcFc*) é o produto biespecífico heterodimérico desejado. A sequência Fc* permite purificação seletiva do produto biespecífico FcFc* em colunas de cromatografia de afinidade disponíveis comercialmente, devido à afinidade de ligação intermediária para proteínas de ligação a Fc, como proteína A, em comparação com o homodímero de cadeia pesada FcFc de alta afinidade, ou o homodímero Fc*Fc* de ligação fraca.

[004] Outro formato de anticorpo é um chamado anticorpo de “um braço” descrito em WO2013/166604, mostrado esquematicamente em **Figura 2A**. Este anticorpo heterodimérico consiste em, por exemplo, duas cadeias pesadas distintas e apenas uma cadeia leve. Em tal exemplo, a cadeia pesada acoplada à cadeia leve contém uma sequência Fc*, enquanto a cadeia pesada sem a cadeia leve contém a sequência Fc regular. A mistura de reação inicial contém, assim, três produtos, dois homodiméricos (FcFc e Fc*Fc*) e o produto FcFc* heterodimérico desejado, que são separados usando cromatografia de afinidade.

[005] Ainda outro formato de anticorpo possível é um construto de anticorpo com um fragmento variável de cadeia simples C-terminal (ScFv), mostrado esquematicamente em **Figura 2B**. Estes anticorpos podem ser monoespecíficos ou biespecíficos, e compreendem uma cadeia leve comum simples e duas cadeias pesadas distintas. Em um exemplo, uma cadeia pesada tem a sequência Fc* e é acoplada a um ScFv, enquanto a outra cadeia pesada tem a sequência Fc nativa e nenhum ScFv. Em outro exemplo, a cadeia pesada com o construto ScFv tem a sequência Fc nativa, e a cadeia pesada Fc* não tem ScFv. Exemplos adicionais, onde uma mutação adicional que

anula a ligação a colunas de afinidade é uma mutação para a região variável de cadeia pesada (VH) na mesma cadeia com a mutação Fc*, são providos em, por exemplo, US 9.493.563 (mutações em VH3 e Fc descritas como IMGT 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86, 90), que é incorporada por referência em sua totalidade. Como nos exemplos acima, a mistura de três componentes de heterodímero FcFc* e dos homodímeros FcFc e Fc*Fc* pode ser separada usando a cromatografia de afinidade de ligação diferencial.

[006] Existe uma necessidade no campo de produção em escala comercial de anticorpos biespecíficos para avaliar a quantidade relativa e absoluta e pureza do heterodímero em vários estágios de produção e purificação de anticorpos. Para isso, resolução eficaz entre o heterodímero, e as duas impurezas de homodímero é desejada. Além disso, velocidade e eficiência de medições de controle de qualidade são desejadas durante o processo de cultura de células, assim como o processo de purificação de anticorpos. A presente invenção se dirige a estas e outras necessidades provendo um novo sistema e método de cromatografia.

[007] A discussão anterior é apresentada apenas para oferecer uma melhor compreensão da natureza dos problemas confrontando a técnica e não deve ser interpretada de modo algum como uma admissão de técnica anterior, nem a citação de qualquer referência aqui deve ser interpretada como uma admissão de que tal referência constitui “técnica anterior” para o presente pedido.

SSUMÁRIO DA INVENÇÃO

[008] Vários aspectos e modalidades não limitativas da invenção são descritos abaixo.

[009] A presente invenção descreve um novo sistema de cromatografia compreendendo uma válvula de comutação e um método de avaliar quantitativamente a quantidade e/ou a pureza da fração de heterodímero em uma amostra.

[0010] Em um aspecto, a presente invenção provê um método para quantificar uma quantidade e/ou pureza de uma proteína em uma amostra compreendendo uma mistura da proteína, uma primeira impureza de proteína e uma segunda impureza de proteína, em que a proteína e a primeira impureza se ligam a uma primeira matriz de afinidade e a segunda impureza não se liga substancialmente à primeira matriz de afinidade e se liga a uma segunda matriz de afinidade, o dito método compreendendo as etapas de:

a. aplicação da amostra a um sistema de cromatografia compreendendo a primeira matriz de afinidade, a segunda matriz de afinidade e um detector, em que a primeira matriz de afinidade é conectada em série à segunda matriz de afinidade por meio de uma válvula de comutação;

b. eluição da segunda impureza a partir da primeira matriz de afinidade para a segunda matriz de afinidade sob um primeiro conjunto de condições;

c. comutação da válvula de comutação para desviar da segunda matriz de afinidade, eluição da proteína através do detector sob um segundo conjunto de condições e determinação da quantidade da proteína eluída;

d. eluição da primeira impureza através do detector sob um terceiro conjunto de condições e determinação da quantidade da primeira impureza eluída;

e. eluição da segunda impureza a partir da segunda matriz de afinidade através do detector sob o terceiro conjunto de condições e determinação da quantidade da segunda impureza eluída, e

f. quantificação da quantidade e/ou da pureza da proteína na amostra.

[0011] Em uma modalidade a proteína é uma proteína multimérica, por exemplo, um anticorpo. Em uma modalidade, a proteína é um anticorpo de interesse, e a primeira e a segunda impurezas de proteína são proteínas multiméricas, por exemplo, anticorpos que podem ou não podem estar

estruturalmente relacionados ao anticorpo de interesse. Em uma modalidade, a proteína é um anticorpo biespecífico, isto é, uma proteína heterodimérica, a primeira impureza de proteína é uma primeira proteína homodimérica e a segunda impureza de proteína é uma segunda proteína homodimérica. Em alguns casos, a mistura de proteínas multiméricas é produzida por uma pluralidade de células eucarióticas, tais como, por exemplo, células de ovário de hamster chinês (CHO) em uma cultura de célula.

[0012] Em uma modalidade, a proteína tem uma afinidade menor em relação à primeira matriz de afinidade do que a primeira impureza. Em uma modalidade, a proteína é uma proteína heterodimérica, a primeira impureza de proteína é uma primeira proteína homodimérica, e a segunda impureza de proteína é uma segunda proteína homodimérica, a proteína heterodimérica e a primeira proteína homodimérica se ligam à primeira matriz de afinidade, e a segunda proteína homodimérica não se liga substancialmente à primeira matriz de afinidade e se liga à segunda matriz de afinidade.

[0013] Em uma modalidade, a proteína compreende um primeiro domínio de imunoglobulina CH3 e um segundo domínio de imunoglobulina CH3, em que os ditos primeiro e segundo domínios de imunoglobulina CH3 são diferentes em sua afinidade em relação à primeira matriz de afinidade, e em que a amostra compreende uma mistura compreendendo a dita proteína, uma proteína compreendendo dois primeiros domínios CH3, e uma proteína compreendendo dois segundos domínios CH3.

[0014] Em uma modalidade, o segundo domínio CH3 compreende substituições de aminoácidos H435R e Y436F (por sistema de numeração EU; H95R/Y96F por sistema de numeração de éxon IMGT). Em outra modalidade, o segundo domínio CH3 compreende uma substituição de aminoácidos H435R (por sistema de numeração EU; H95R por sistema de numeração de éxon IMGT). Em algumas modalidades, o segundo domínio CH3 compreendendo uma substituição de aminoácido H435R (por sistema de

numeração EU; H95R por sistema de numeração de éxon IMGT) e exibe ligação fraca ou não detectável a ligandos de ligação a Fc, tal como proteína A, proteína G, proteína L, ou derivados das mesmas.

[0015] Em uma modalidade, a proteína é um anticorpo. Em uma modalidade, a proteína é um anticorpo biespecífico.

[0016] Em uma modalidade, a primeira matriz de afinidade compreende proteína A e a segunda matriz de afinidade compreende proteína G.

[0017] Em uma modalidade, o primeiro conjunto de condições compreende um primeiro pH, o segundo conjunto de condições compreende um segundo pH, e o terceiro conjunto de condições compreende um terceiro pH. Em uma modalidade, o segundo pH é menor do que o primeiro pH, e o terceiro pH é menor do que o segundo pH. Em uma modalidade, o primeiro pH é de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,4, o segundo pH é de cerca de pH 4,3 a cerca de pH 5,6, e o terceiro pH é de cerca de pH 2,0 a cerca de pH 2,8.

[0018] Em uma modalidade, o primeiro conjunto de condições, o segundo conjunto de condições, e o terceiro conjunto de condições compreendem um modificador de fase móvel. Em uma modalidade, o modificador de fase móvel é um tampão salino selecionado a partir de tampão LiCl, NaCl, KCl, MgCl₂ e CaCl₂.

[0019] Em outro aspecto, um método para quantificar uma quantidade e/ou pureza de uma proteína heterodimérica em uma amostra é provido, compreendendo uma mistura da proteína heterodimérica, uma primeira proteína homodimérica e uma segunda proteína homodimérica, em que a proteína heterodimérica e a primeira proteína homodimérica se ligam a uma primeira matriz de afinidade e a segunda proteína homodimérica não se liga substancialmente à primeira matriz de afinidade e se liga a uma segunda matriz de afinidade, o dito método compreendendo as etapas de:

a. aplicação da amostra a um sistema de cromatografia

compreendendo a primeira matriz de afinidade, a segunda matriz de afinidade, e um detector, em que a primeira matriz de afinidade é conectada em série à segunda matriz de afinidade por meio de uma válvula de comutação;

b. eluição da segunda proteína homodimérica a partir da primeira matriz de afinidade para a segunda matriz de afinidade sob um primeiro conjunto de condições;

c. comutação da válvula de comutação para desviar da segunda matriz de afinidade, eluição da proteína heterodimérica através do detector sob um segundo conjunto de condições e determinação da quantidade da proteína eluída;

d. eluição da primeira proteína homodimérica através do detector sob um terceiro conjunto de condições e determinação da quantidade da primeira impureza eluída;

e. eluição da segunda proteína homodimérica a partir da segunda matriz de afinidade através do detector sob o terceiro conjunto de condições e determinação da quantidade da segunda impureza eluída, e

f. quantificação da quantidade e/ou da pureza da proteína na amostra.

[0020] Em ainda outro aspecto, um método para quantificar uma quantidade e/ou pureza de uma proteína heterodimérica em uma amostra é provido, compreendendo uma mistura da proteína heterodimérica, uma primeira proteína homodimérica e uma segunda proteína homodimérica, em que a proteína heterodimérica e a primeira proteína homodimérica se ligam a uma matriz de proteína A e a segunda proteína homodimérica não se liga substancialmente à matriz de proteína A e se liga a uma matriz de proteína G, o dito método compreendendo as etapas de:

a. aplicação da amostra a um sistema de cromatografia compreendendo a matriz de proteína A, a matriz de proteína G, e um detector, em que a matriz de proteína A é conectada em série à matriz de proteína G

por meio de uma válvula de comutação;

b. eluição da segunda proteína homodimérica a partir da matriz de proteína A para a matriz de proteína G sob um primeiro conjunto de condições;

c. comutação da válvula de comutação para desviar da matriz de proteína G, eluição da proteína heterodimérica através do detector sob um segundo conjunto de condições e determinação da quantidade da proteína eluída;

d. eluição da primeira proteína homodimérica através do detector sob um terceiro conjunto de condições e determinação a quantidade da primeira impureza eluída;

e. eluição da segunda proteína homodimérica a partir da matriz de afinidade de proteína G através do detector sob o terceiro conjunto de condições e determinação da quantidade da segunda impureza eluída, e

f. quantificação da quantidade e/ou da pureza da proteína na amostra.

[0021] Em uma modalidade, a proteína heterodimérica compreende FcFc*, a primeira proteína homodimérica compreende FcFc, e a segunda proteína homodimérica compreende Fc*Fc*.

[0022] Em outro aspecto, um sistema de cromatografia compreendendo uma primeira matriz de afinidade, uma segunda matriz de afinidade, e um detector é provido, em que cada da primeira matriz de afinidade, a segunda matriz de afinidade e o detector estão conectados por meio de uma válvula de comutação.

[0023] Em outro aspecto, um sistema de cromatografia é provido compreendendo (i) uma coluna de cromatografia de proteína A, (ii) uma coluna de cromatografia de proteína G, e (iii) um detector compreendendo uma coluna de HPLC equipada com um detector de UV, um detector de aerossol de carga, e/ou um espectrômetro de massa, em que cada da coluna de

cromatografia de proteína A, a coluna de cromatografia de proteína G e o detector são conectados por meio de uma válvula de comutação.

[0024] Estes e outros aspectos da presente invenção se tornarão evidentes para os versados na técnica após uma leitura da descrição detalhada seguinte da invenção, incluindo as reivindicações em anexo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0025] **Figura 1** é uma representação esquemática de um formato de anticorpo biespecífico apropriado para a separação com o método da invenção com base em um anticorpo IgG totalmente humano padrão tendo uma cadeia leve comum simples e duas cadeias pesadas distintas, uma compreendendo uma mutação Fc* e uma com uma sequência (Fc) nativa. Note-se que um exemplo representativo é desenhado, e que a mutação Fc* pode ser incorporada na primeira ou na segunda cadeia pesada.

[0026] **Figuras 2A e 2B** mostram representações esquemáticas de dois formatos adicionais de anticorpo apropriados para a separação de acordo com modalidades da invenção: **Figura 2(A)** mostra um anticorpo de “um braço” heterodimérico, que consiste em duas cadeias pesadas distintas e apenas uma cadeia leve, onde uma cadeia pesada não contém um fragmento Fab (por exemplo, contém apenas o domínio constante de cadeia pesada). **Figura 2(B)** mostra dois construtos de anticorpo exemplares com um fragmento variável de cadeia simples C-terminal (ScFv). A mutação Fc* humana pode ser incorporada ou no primeiro ou no segundo polipeptídeo de cadeia pesada (domínio constante).

[0027] **Figura 3** descreve um cromatograma de título ilustrando separação de uma mistura de um anticorpo biespecífico e impurezas monoméricas de acordo com o método da divulgação e utilizando o sistema de acordo com uma modalidade da divulgação.

[0028] **Figuras 4(A) e 4(B)** descrevem representações esquemáticas de sistemas de cromatografia exemplares de acordo com uma modalidade da

divulgação. Em um sistema exemplar, mostrado em **Figura 4(A)**, um autoamostrador é conectado a uma primeira matriz de afinidade (coluna), que é conectada a uma segunda matriz de afinidade (coluna) e um detector por meio de uma válvula de comutação. Na configuração mostrada, a válvula de comutação é posicionada para conectar em série a primeira coluna com a segunda coluna, e o eluente flui através da primeira coluna para a segunda coluna, e, subsequentemente através do detector para quantificação. Em outro sistema exemplar, mostrado em **Figura 4(B)**, um autoamostrador é conectado a uma primeira matriz de afinidade (coluna), que é conectada a uma segunda matriz de afinidade (coluna) por meio de uma válvula de comutação. O detector é conectado por meio da válvula de comutação em uma configuração de desvio (sem coluna). Aqui, a válvula de comutação conecta a primeira coluna à segunda coluna, que é conectada adicionalmente ao detector, ou desvia da segunda coluna e conecta a primeira coluna diretamente ao detector.

[0029] **Figura 5** mostra uma configuração de título/pureza de anticorpo biespecífico de acordo com uma modalidade da divulgação. A representação esquemática descreve um desgaseificador de solvente, um gerenciador de solvente, um gerenciador de amostras, um gerenciador de compartimento de coluna e um detector.

[0030] **Figura 6** apresenta um sistema de cromatografia exemplar de acordo com uma modalidade da divulgação. Neste compartimento de coluna exemplar do sistema, a amostra se move através de diversas colunas conectadas em série contendo a primeira matriz de afinidade, seguida por diversas colunas conectadas em série contendo a segunda matriz de afinidade. A válvula de comutação conecta o primeiro conjunto de colunas ao segundo conjunto de colunas.

[0031] **Figura 7** representa uma vista esquemática alternativa de um sistema de cromatografia exemplar de acordo com uma modalidade da divulgação.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0032] Modalidades detalhadas da presente invenção são divulgadas aqui; no entanto, deve ser entendido que as modalidades divulgadas são meramente ilustrativas da invenção que pode ser corporificada de várias formas. Em adição, cada um dos exemplos dados em conexão com as várias modalidades da invenção se destina a ser ilustrativo, e não restritivo. Portanto, detalhes estruturais e funcionais específicos divulgados aqui não devem ser interpretados como limitativos, mas meramente como uma base representativa para ensinar aos versados na técnica como empregar de modo variado a presente invenção.

[0033] Salvo definido em contrário, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado como comumente entendido pelos versados na técnica à qual esta invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes aos descritos aqui possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, métodos e materiais particulares são agora descritos.

[0034] Como usado neste relatório e nas reivindicações em anexo, as formas singulares “um”, “uma”, e “o, a” incluem referências no plural salvo se o contexto ditar claramente o contrário. Assim, por exemplo, uma referência a “um método” inclui um ou mais métodos, e/ou etapas dos tipos descritos aqui e/ou que se tornarão evidentes para os versados na técnica após a leitura desta divulgação.

[0035] Exemplos não limitativos de proteínas apropriadas para a separação com métodos de acordo com a invenção podem incluir, sem limitação, anticorpos heterodiméricos, por exemplo, anticorpos biespecíficos, anticorpos de um braço, e anticorpos ScFv. Anticorpos biespecíficos geralmente compreendem duas cadeias pesadas diferentes, com cada cadeia pesada ligando especificamente um epítopo diferente—ou em duas moléculas diferentes (por exemplo, dois antígenos diferentes ou um antígeno e um

receptor de células T) ou na mesma molécula (por exemplo, no mesmo antígeno). Se um anticorpo biespecífico é capaz de ligar seletivamente dois epítopos diferentes (um primeiro epítipo e um segundo epítipo), a afinidade da primeira cadeia pesada para o primeiro epítipo será geralmente de pelo menos uma a duas, ou três a quatro ordens de magnitude menor do que a afinidade da primeira cadeia pesada para o segundo epítipo, e vice-versa. Os epítopos reconhecidos pelo anticorpo biespecífico podem estar no mesmo alvo ou em alvos diferentes (por exemplo, na mesma proteína ou em uma proteína diferente). Anticorpos biespecíficos podem ser feitos, por exemplo, pela combinação de cadeias pesadas que reconhecem diferentes epítopos do mesmo antígeno. Por exemplo, sequências de ácido nucleico codificando sequências variáveis de cadeia pesada que reconhecem diferentes epítopos do mesmo antígeno podem ser fundidas em sequências de ácido nucleico codificando diferentes regiões constantes de cadeia pesada, e tais sequências podem ser expressadas em uma célula que expressa uma cadeia leve de imunoglobulina. Um anticorpo biespecífico típico tem duas cadeias pesadas cada uma tendo três CDRs de cadeia pesada, seguido por (N-terminal a C-terminal) um domínio CH1, uma dobradiça, um domínio CH2, e um domínio CH3, e uma cadeia leve de imunoglobulina que não confere especificidade de ligação ao antígeno, mas que pode se associar com cada cadeia pesada, ou que pode se associar com cada cadeia pesada que pode se ligar a um ou mais dos epítopos ligados pelas regiões de ligação ao antígeno da cadeia pesada, ou que pode se associar com cada cadeia pesada e permitir a ligação de uma ou ambas as cadeias pesadas a um ou ambos epítopos.

[0036] A frase “proteína contendo Fc” inclui anticorpos, anticorpos biespecíficos, imunoadesinas, e outras proteínas de ligação que compreendem pelo menos uma porção funcional de uma região CH2 e CH3 da imunoglobulina. Uma “porção funcional” refere-se a uma região CH2 e CH3 que pode se ligar a um receptor Fc (por exemplo, um FcγR; ou um FcRn, isto

é, um receptor Fc neonatal), e/ou que pode participar na ativação de complemento. Se a região CH2 e CH3 contém deleções, substituições, e/ou inserções ou outras modificações que tornam a mesma incapaz de se ligar a qualquer receptor FC e também incapaz de ativar o complemento, a região CH2 e CH3 não é funcional.

[0037] Proteínas contendo Fc podem compreender modificações nos domínios de imunoglobulina, incluindo onde as modificações afetam uma ou mais função efetora da proteína de ligação (por exemplo, modificações que afetam a ligação de FcγR, ligação de FcRn e, assim, meia-vida, e/ou atividade de CDC). Tais modificações incluem, mas não são limitadas a, as modificações e combinações seguintes das mesmas, com referência à numeração EU de uma região constante de imunoglobulina: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438, e 439.

[0038] Por exemplo, e não a título de limitação, a proteína de ligação é uma proteína contendo Fc e exibe meia-vida sérica intensificada (em comparação com a mesma proteína contendo Fc sem a(s) modificação(ões) citada(s) e tem uma modificação na posição 250 (por exemplo, E ou Q); 250 e 428 (por exemplo, L ou F); 252 (por exemplo, L/Y/F/W ou T), 254 (por exemplo, S ou T), e 256 (por exemplo, S/R/Q/E/D ou T); ou uma modificação em 428 e/ou 433 (por exemplo, L/R/SI/P/Q ou K) e/ou 434 (por exemplo, H/F ou Y); ou uma modificação em 250 e/ou 428; ou uma modificação em 307 ou 308 (por exemplo, 308F, V308F), e 434. Em outro exemplo, a modificação pode compreender uma modificação 428L (por exemplo, M428L) e 434S (por exemplo, N434S); uma modificação 428L, 259I (por exemplo, V259I), e uma

308F (por exemplo, V308F); uma modificação 433K (por exemplo, H433K) e uma 434 (por exemplo, 434Y); uma modificação 252, 254, e 256 (por exemplo, 252Y, 254T, e 256E); uma modificação 250Q e 428L (por exemplo, T250Q e M428L); uma modificação 307 e/ou 308 (por exemplo, 308F ou 308P).

[0039] O termo “substituição estrela,” “Fc*,” e “HC*” inclui qualquer molécula, cadeia pesada de imunoglobulina, fragmento Fc, molécula contendo Fc e similares que contêm uma mutação que anula a ligação às proteínas bacterianas conhecidas por se ligarem ao domínio Fc de imunoglobulinas, como proteína A, proteína G, proteína L ou derivados das mesmas (ver, por exemplo, ligandos por afinidade mimética SpA e SpA, descritos em Choe, W., *et al.* 2016, *Materials* 9, 994, doi:10.3390/ma9120994, que é incorporado aqui por referência). Imunoglobulinas ou outras proteínas contendo Fc podem, por exemplo, conter uma sequência modificada dentro do domínio CH3 que reduz muito a ligação à proteína A, como descrito, por exemplo, em WO2016/018740 e Patente US No. 8.586.713. Uma mutação no domínio Fc pode ser designada como a “substituição estrela” ou Fc* do início ao fim do relatório para facilitar a observação de que um polipeptídeo de um dímero contém uma mutação, e outro não. Assim, Fc*Fc* denota um homodímero em que ambos os monômeros compreendem um Fc*, e FcFc*, ou Fc*Fc, denota um heterodímero com relação à substituição Fc*. Os termos FcFc* e Fc*Fc são usados de modo interpermutável aqui.

[0040] A frase “modificador de fase móvel” inclui porções que reduzem o efeito de, ou rompem, interações iônicas não específicas (isto é, não afinidade) e outras não covalentes entre proteínas. “Modificadores de fase móvel” incluem, por exemplo, sais, combinações iônicas de metais do Grupo I e Grupo II com acetato, bicarbonato, carbonato, um halogênio (por exemplo, cloreto ou fluoreto), nitrato, fosfato ou sulfato. Uma lista ilustrativa não

limitativa de “modificadores de fase móvel” inclui sais de acetato de berílio, lítio, sódio e potássio; bicarbonatos de sódio e potássio; carbonatos de lítio, sódio, potássio e cério; cloretos de lítio, sódio, potássio, cério e magnésio; fluoretos de sódio e potássio; nitratos de sódio, potássio e cálcio; fosfatos de sódio e potássio; e sulfatos de cálcio e magnésio.

[0041] “Modificadores de fase móvel” também incluem agentes caotrópicos, que enfraquecem ou de outro modo interferem com forças não covalentes e aumentam a entropia dentro dos sistemas biomoleculares. Exemplos não limitativos de agentes caotrópicos incluem butanol, cloreto de cálcio, etanol, cloreto de guanidínio, perclorato de lítio, acetato de lítio, cloreto de magnésio, fenol, propanol, dodecilsulfato de sódio, tiourea e ureia. Agentes caotrópicos incluem sais que afetam a solubilidade de proteínas. Os ânions mais caotrópicos incluem, por exemplo, cloreto, nitrato, brometo, clorato, iodeto, perclorato e tiocianato. Os cátions mais caotrópicos incluem, por exemplo, lítio, magnésio, cálcio e guanidínio.

[0042] “Modificadores de fase móvel” incluem aquelas porções que afetam interações iônicas ou outras não covalentes que, em adição a um gradiente ou etapa de pH, ou em equilíbrio de um suporte de proteína A em um “modificador de fase móvel” e aplicação de um gradiente ou etapa de pH, resulta em um aumento da distância de unidade de pH entre a eluição de uma IgG homodimérica e uma IgG heterodimérica (por exemplo, uma IgG humana do tipo selvagem e a mesma IgG, mas contendo uma ou mais modificações de seu domínio CH3, como descrito aqui). Uma concentração apropriada de um “modificador de fase móvel” pode ser determinada por sua concentração empregando a mesma coluna, gradiente ou etapa de pH, com concentração crescente de “modificador de fase móvel” até que uma distância máxima de pH é alcançada em uma dada gradiente ou etapa de pH de pH. “Modificadores de fase móvel” também podem incluir modificadores não polares, incluindo, por exemplo, propileno glicol, etileno glicol e similares.

[0043] Uma matriz de afinidade é a matriz não aquosa de suporte sólido sobre a qual uma proteína de afinidade, por exemplo, proteína A, proteína G, proteína L, proteína Z, ou derivados recombinantes das mesmas, adere (Choe, W., *et al*, 2016 *supra*). Tais suportes incluem agarose, sefarose, vidro, sílica, poliestireno, nitrocelulose, carvão, areia, celulose e qualquer outro material apropriado. Tais materiais são bem conhecidos na técnica. Qualquer método apropriado pode ser usado para fixar a segunda proteína no suporte sólido. Métodos para fixar proteínas em suportes sólidos apropriados são bem conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Ostrove, em *Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology*, 182: 357-371, 1990. Tais suportes sólidos, com ou sem proteína A imobilizada, estão prontamente disponíveis a partir de muitas fontes comerciais incluindo Vector Laboratory (Burlingame, Calif.), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif.), BioRad (Hercules, Calif.), Amersham Biosciences (parte de GE Healthcare, Uppsala, Sweden), Pall (Port Washington, NY) e EMD-Millipore (Billerica, Mass.). Proteína A imobilizada em uma matriz de vidro de poro é comercialmente disponível como PROSEP®-A (Millipore). A fase sólida também pode ser uma matriz à base de agarose. Proteína A imobilizada em uma matriz de agarose é disponível comercialmente como, por exemplo, MABSELECT™ (GE Amersham Biosciences). Colunas de afinidade contendo uma proteína de ligação à imunoglobulina ou Fc podem ser fabricadas fixando qualquer um dos ligandos SpA ou SpA miméticos a um suporte sólido.

[0044] Como usado aqui, “cromatografia de afinidade” é um método cromatográfico que faz uso das interações específicas, reversíveis entre biomoléculas, em vez de propriedades gerais da biomolécula, tais como ponto isoelétrico, hidrofobicidade, ou tamanho, para efetuar separação cromatográfica. “Cromatografia de afinidade de proteína A” ou “cromatografia de proteína A” refere-se a um método cromatográfico de afinidade específico que utiliza a afinidade dos domínios de ligação à IgG da

proteína A para a porção Fc de uma molécula de imunoglobulina. Esta porção Fc compreende domínios constantes de imunoglobulina humana ou animal CH2 e CH3 ou domínios de imunoglobulina substancialmente similares aos mesmos.

[0045] Proteína A é um componente da parede da célula produzido por várias cepas de *Staphylococcus aureus* que consiste em uma única cadeia de polipeptídeos. O produto do gene da proteína A consiste em cinco repetições homólogas fixada em um modo *tandem* na parede da célula dos patógenos. Os cinco domínios têm aproximadamente 58 aminoácidos de comprimento e denotam EDABC, cada exibindo atividade de ligação à imunoglobulina (Tashiro M & Montelione G T (1995) Curr. Opin. Struct. Biol., 5(4): 471-481. Os cinco domínios de ligação à imunoglobulina homólogos duplicam em um feixe de três hélices. Cada domínio é capaz de ligar proteínas de muitas espécies de mamíferos, mais notavelmente IgGs (Hober S *et al.*, (2007) J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 848(1): 40-47). Proteína A se liga à cadeia pesada da maioria das imunoglobulinas dentro da região Fc, mas também dentro da região Fab no caso da família VH3 humana (Jansson B *et al.*, (1998) FEMS Immunol. Med. Microbiol., 20(1): 69-78). Proteína A se liga à IgG de várias espécies incluindo humano, camundongo, coelho e porquinho da índia, mas não se liga à IgG3 humana (Hober S *et al.*, (2007) *supra*). A incapacidade de IgG3 humana de se ligar à proteína A pode ser explicada pelas substituições H435R e Y436F na região Fc da IgG3 humana (numeração EU, Jendeberg *et al.*, (1997) J. Immunol. Methods, 201(1): 25-34). Além de IgG, proteína A também interage com IgM e IgA.

[0046] A capacidade de proteína A de se ligar a anticorpos com uma tal elevada afinidade é a motivação motriz para seu uso em escala industrial em produtos farmacêuticos biológicos. Proteína A usada para produção de anticorpos em produtos biofarmacêuticos é produzida geralmente de modo

recombinante em *E. coli* e funciona essencialmente da mesma forma que a proteína A nativa (Liu H F *et al.*, (2010) MABs, 2(5): 480-499). Mais comumente, proteína A recombinante é ligada a uma resina de cromatografia em fase estacionária para purificação de anticorpos. Ligação ótima ocorre a pH 8,2, embora a reação também seja boa em condições neutras ou fisiológicas (pH 7,0-7,6). Eluição é alcançada geralmente através de troca de pH para pH ácido (glicina-HCl, pH 2,5-3,0). Isto efetivamente dissocia a maioria das interações proteína-proteína e anticorpo-antígeno sem afetar permanentemente a estrutura da proteína. Porém, alguns anticorpos e proteínas são danificados pelo baixo pH e, em alguns casos, pode ser melhor neutralizar imediatamente após a recuperação por adição de 1/10 volume de tampão alcalino tal como 1 M Tris-HCl, pH 8,0 para minimizar a duração de tempo na condição de baixo pH.

[0047] Existem várias resinas de cromatografia de proteína A comercialmente disponíveis. As diferenças principais entre estes meios são o tipo de matriz de suporte, modificação de ligando de proteína A, tamanho de poro e tamanho de partícula. As diferenças nestes fatores dão lugar a diferenças na compressibilidade, robustez química e física, resistência à difusão e capacidade de ligação dos adsorventes (Hober S *et al.*, (2007), *supra*). Exemplos de resinas de cromatografia de proteína A incluem, mas não estão limitados a, resina de proteína A MabSelect SuRe™ e resina de proteína A MabSelect™ de GE Healthcare, coluna de proteína A EconoPac de BioRad, rProA, disponível em Applied Biosystems, e POROS® A de Thermo Fisher, como visto nos exemplos.

[0048] Proteína A, como usada aqui, engloba proteína nativa a partir da parede da célula de *Staphylococcus aureus*, proteína A produzida por métodos recombinantes ou sintéticos, e variantes que retêm a capacidade de se ligar a uma região Fc. Proteína A modificada pode ser, por exemplo, um tetrâmetro de domínio Z, um tetrâmetro de domínio Y, ou uma proteína A

modificada que não tem domínios D e E. Estas proteínas A exemplares modificadas são incapazes de se ligar (ou se ligam com afinidade muito baixa, se de todo) ao domínio VH3 de uma imunoglobulina, mas ainda podem se ligar aos domínios CH3 de IgG1, IgG2 e IgG4. Na prática, cromatografia de proteína A envolve o uso de proteína A imobilizada em um suporte sólido. Ver, Gagnon, Protein A Affinity Chromotography, Purification Tools for Monoclonal Antibodies, páginas 155-198, Validated Biosystems, 1996.

[0049] Proteína G é uma proteína da parede celular bacteriana isolada de *Streptococci* do grupo C e G. Sequenciamento de DNA de proteína G isolada de diferentes *Streptococci* identificou domínios de ligação de imunoglobulina, assim como sítios para ligação à albumina e superfície celular. Dependendo da cepa, tanto a região de ligação à imunoglobulina como a região de ligação à albumina consistem em 2-3 unidades de duplicação independentes (Tashiro M & Montelione G T (1995) Curr. Opin. Struct. Biol., 5(4): 471-481). Proteína G da cepa G148 consiste em 3 domínios de ligação à albumina e imunoglobulina denotados respectivamente ABD1, ABD2, e ABD3, e C1, C2, e C3 (Olsson A *et al.*, (1987) Eur. J. Biochem., 168(2): 319-324.). Cada domínio de ligação à imunoglobulina denotado C1, C2, e C3 é aproximadamente 55 resíduos e separado pelos ligadores de cerca de 15 resíduos. Todas as estruturas 3D solvidas experimentalmente de domínios de ligação à imunoglobulina da proteína G mostram uma estrutura globular altamente compacta sem quaisquer pontes de dissulfeto ou grupos protéticos fortemente ligados (Sauer-Eriksson A E *et al.*, (1995) Structure, 3(3): 265-278; Derrick J P & Wigley D B (1992) Nature, 359(6397): 752-754; Derrick J P & Wigley D B (1994) J. Mol. Biol., 243(5): 906-918; Lian L Y *et al.*, (1994) Nat. Struct. Biol., 1(6): 355-357). A estrutura compreende uma folha beta de quatro fitas feita de dois ‘grampos-de-cabelo’ beta anti-paralelos conectados por uma hélice alfa.

[0050] Cepas de *Streptococcus* dos grupos C e G mostram ligação

com todas as subclasses humanas de IgG incluindo IgG3 em contraste com a proteína A. Proteína G também se liga a várias IgG de animais incluindo camundongo, coelho e ovelha (Bjorck L & Kronvall G (1984) *J. Immunol.*, 133(2): 969-974; Akerstrom B *et al.*, (1985) *J. Immunol.*, 135(4): 2589-2592; Akerstrom B & Bjorck L (1986) *J. Biol. Chem.*, 261(22): 10240-10247; Fahnestock S R *et al.*, (1986) *J. Bacteriol.*, 167(3): 870-880). Consequentemente, proteína G exibe um espectro de ligação mais amplo para subclasses de diferentes espécies em comparação com proteína A. Em adição, proteína G se liga à porção Fab de IgGs com alta afinidade. A estrutura do domínio de ligação de proteína G de estreptococos foi determinada tanto sozinha (por NMR, Lian L Y *et al.*, (1994) *supra*), como em complexo com um Fab IgG1 (por cristalografia de raios X, Derrick J P & Wigley D B (1992) *supra* e Derrick J P & Wigley D B (1994) *supra*). Todas as estruturas 3D resolvidas experimentalmente mostraram uma ligação com o domínio CH1 de cadeias pesadas de IgG.

[0051] A proteína G, como usada aqui, pode ser uma proteína G estreptocócica de ocorrência natural ou modificada, ou pode ser uma proteína G modificada. Proteína G modificada pode compreender o domínio B1 (aka GB1) e, pode ser conjugada ou não conjugada. Em outra modalidade, a segunda matriz de afinidade compreende um ligando de proteína L e seus derivados fixados em um substrato sólido. Similarmente a proteína A, proteína G recombinante produzida em *E. coli* pode ser usada para purificar anticorpos. Os domínios de ligação à albumina e superfície da célula foram eliminados da proteína G recombinante para reduzir ligação não específica e, portanto, podem ser usados para separar IgG de amostras brutas. Similarmente à proteína A, proteína G recombinante é ligada a uma resina de cromatografia de fase estacionária para purificação de anticorpos. Ligação ótima ocorre a pH 5, embora a ligação também seja boa a pH 7,0-7,2; como para proteína A, eluição também é alcançada através de troca de pH para pH

ácido (glicina-HCl, pH 2,5-3,0). Exemplos de resinas de cromatografia de proteína G incluem, mas não são limitados a, resina de Proteína G Sepharose™ 4 –Fast Flow e coluna de Proteína G HP HiTrap™ de GE Healthcare.

[0052] Similarmente à proteína A, proteína G recombinante produzida em *E. coli* é usada rotineiramente para purificar anticorpos. Os domínios de ligação a albumina e superfície celular foram eliminados da proteína G recombinante para reduzir ligação não específica e, portanto, podem ser usados para separar IgG de amostras brutas. Similarmente à proteína A, proteína G recombinante é ligada a uma resina de cromatografia de fase estacionária para purificação de anticorpos. Ligação ótima ocorre a pH 5, embora a ligação também seja boa a pH 7,0-7,2; como para proteína A, eluição também é alcançada através de troca de pH para pH ácido (glicina-HCl, pH 2,5-3,0). Exemplos de resinas de cromatografia de proteína G incluem, mas não estão limitados à resina de Proteína G Sepharose™ 4 Fast Flow e coluna de Proteína G HP HiTrap™ de GE Healthcare, rProG, disponível em Applied Biosystems, e POROS® G de Thermo Fisher, como visto nos exemplos.

[0053] Outras proteínas, tais como proteína L, proteína M1 e proteína H, também podem ser usadas na cromatografia de afinidade da presente invenção. Proteína L é uma proteína de ligação à imunoglobulina que foi derivada originalmente da bactéria *Peptostreptococcus magnus*, mas agora é produzida de modo recombinante (Bjorck L (1988) J. Immunol., 140(4): 1194-1197; Kastern W *et al.*, (1992) J. Biol. Chem., 267(18): 12820-12825). Proteína L tem a capacidade única de se ligar através de interações da cadeia leve kappa sem interferir com um sítio de ligação de um anticorpo (Nilson B H *et al.*, (1993) J. Immunol. Methods, 164(1): 33-40). Isto confere à proteína L a capacidade de se ligar a uma faixa mais ampla de classes e subclasses de imunoglobulina do que outra proteína de ligação a anticorpo. Proteína L se

ligará a todas as classes de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA, IgE e IgD). Proteína L se ligará também a fragmentos variáveis de cadeia simples (scFv) e fragmentos Fab (Nilson B H *et al.*, (1993) *supra*; Bottomley S P *et al.*, (1995) *Bioseparation*, 5(6): 359-367). Proteína L se liga aos domínios variáveis humanos de subclasses kappa I, III, e IV e subclasse kappa I de camundongo (Nilson B H *et al.*, (1992) *supra*). Exemplos de resinas de cromatografia de proteína L incluem, mas não são limitados a, resina de proteína L de Genescript, como usada nos exemplos.

[0054] Proteína M1 e proteína H são proteínas de superfície presentes simultaneamente na superfície de certas cepas de *Streptococcus pyogenes*. Proteína H tem afinidade para a região Fc de IgG (Akesson P *et al.*, (1990) *Mol. Immunol.*, 27(6): 523-531; Akesson P *et al.*, (1994) *Biochem. J.*, 300 (Pt 3): 877-886). Proteína H se liga à região Fc de IgGs de humanos, macacos e coelhos (Akesson P *et al.*, (1990), *supra*; Frick I M *et al.*, (1995) *EMBO J.*, 14(8): 1674-1679). Proteínas M também são conhecidas por se ligarem ao fibrinogênio (Kantor F S (1965) *J Exp Med*, 121: 849-859), e trabalhos anteriores demonstraram que a proteína M1 da cepa API também tem afinidade para albumina e IgG policlonal (Schmidt K H & Wadstrom T (1990) *Zentralbl. Bakteriol.*, 273(2): 216-228).

[0055] Cromatografia de afinidade também inclui meios que podem ser usados para ligar seletivamente e, assim, purificar anticorpos, fragmentos de anticorpos, ou proteínas de fusão quiméricas que contêm domínios e/ou sequências de imunoglobulina. Anticorpos incluem os tipos IgG, IgA, IgM, IgY, IgD e IgE. Anticorpos também incluem anticorpos de cadeia simples tais como anticorpos de camelídeos, anticorpos de camelídeos modificados, anticorpos de cadeia simples, anticorpos de domínio único, nanocorpos e similares. Fragmentos de anticorpos incluem sequências VH, VL, CL, CH. Fragmentos de anticorpos e proteínas de fusão contendo sequências de anticorpos incluem, por exemplo, F(ab')₃, F(ab')₂, Fab, Fc, Fv, dsFv,

(scFv)₂, scFv, scAb, minicorpo, diacorpo, triacorpo, tetracorpo, proteínas de fusão Fc, moléculas armadilha e similares (ver, Ayyar *et al.*, *Methods* 56 (2012): 116-129). Tais meios de cromatografia de afinidade podem conter ligandos que se ligam seletivamente aos anticorpos, seus fragmentos, e proteínas de fusão contêm estes fragmentos. Tais ligandos incluem proteínas de ligação a anticorpos, receptores derivados de bactérias, antígenos, lecitinas ou anti-anticorpos dirigidos à molécula alvo. O anticorpo requer purificação. Por exemplo, ligandos de afinidade derivados de camelídeos, dirigidos contra qualquer uma ou mais dentre IgG-CH1, IgG-Fc, IgG-CH3, IgG1, LC-kappa, LC-lambda, IgG3/4, IgA, IgM e similares, podem ser usados com ligandos de afinidade (disponíveis comercialmente como resinas de cromatografia CAPTURESELECT, Life Technologies, Inc., Carlsbad, Calif.).

[0056] Técnicas que facilitam a recuperação de heterodímeros a partir de homodímeros com base em uma afinidade diferencial dos heterodímeros para um reagente de afinidade foram descritas. O primeiro exemplo de técnica de afinidade diferencial envolveu o uso de duas cadeias pesadas diferentes de duas espécies diferentes de animal, em que uma das quais não se liga à proteína A (Lindhofer H *et al.*, (1995) *J Immunol.*, 155(1): 219-225). Os mesmos autores também descreveram o uso de duas cadeias pesadas diferentes originadas de dois isótopos diferentes de imunoglobulina humana (IGHG1 e IGHG3), uma das quais não se liga à proteína A (IGHG3; ver, Patente US No. 6.551,592 Lindhofer H *et al.*). Uma variação da última técnica foi descrita em W010/151792 (Davis S *et al.*) e envolveu o uso de duas substituições de aminoácidos H435R/Y436F descritas por Jendeberg *et al* (Jendeberg *et al.*, (1997) *J. Immunol. Methods*, 201(1): 25-34) para reduzir significativamente a afinidade para proteína A em uma das cadeias pesadas de heterodímero.

[0057] Como usado aqui, o termo “detector” compreende uma coluna de cromatografia equipada com meios para detectar e/ou avaliar componentes

de uma mistura sendo eluída da coluna de cromatografia. Dois tipos gerais de detectores são conhecidos na técnica: detectores destrutivos e não destrutivos. Os detectores destrutivos realizam transformação contínua do efluente da coluna (queima, evaporação ou mistura com reagentes) com medição subsequente de alguma propriedade física do material resultante (plasma, aerossol ou mistura de reação). Os detectores não destrutivos estão medindo diretamente algumas propriedades do eluente da coluna (por exemplo, absorção de UV) e, assim, permitem a recuperação de análise adicional. Exemplos de detectores destrutivos incluem detector de aerossol carregado (CAD), detector de ionização de chama (FID), detector com base em aerossol (NQA), detector fotométrico de chama (FPD), detector de emissão atômica (AED), detector de nitrogênio e fósforo (NPD), detector de dispersão de luz evaporativa (ELSD), espectrômetro de massa (MS), detector de condutividade eletrolítica (ELCD), detector summon (SMSD), e detector mira (MD). Um exemplo de detectores não destrutivos inclui detectores de UV, incluindo detectores de UV de comprimento fixo e variável, incluindo detector de arranjo de diodos (DAD) ou detector de arranjo de fotodiodos (PDA). A absorção de UV do efluente pode ser medida continuamente em comprimentos de onda únicos ou múltiplos. Outros exemplos de detectores não destrutivos incluem detector de condutividade térmica (TCD), detector de fluorescência (FLR), detector de captura de elétrons, detector de fotoionização (PID), e detector de índice de refração (RI ou RID). Em um exemplo, um detector de DAD/UV pode ser utilizado para detectar e quantificar o material eluato do compartimento da coluna do sistema. O anticorpo biespecífico FcFc*, homodímero FcFc, e heterodímero Fc*Fc* eluem seletivamente do sistema de cromatografia, o sinal é captado por detecção de UV a 280 nM. Qualquer detector pode ser adaptado para conectar um sistema de controle de temperatura, tais como células de fluxo controladas em temperatura com funções de resfriamento para permitir melhor

estabilidade do material de proteína.

[0058] A presente invenção pode ser configurada como parte de um sistema de cromatografia, por exemplo, um sistema de cromatografia disponível comercialmente, tal como, por exemplo, um sistema HPLC disponível em Shimadzu Corporation, Agilent Technologies, Waters Corporation, ou similares. Em uma modalidade não limitativa, tal sistema compreende, *inter alia*, uma unidade de retenção de solvente e/ou reagente, um gerenciador/bomba de solvente, um gerenciador de amostra, um gerenciador de compartimento de coluna e uma unidade de detector. Uma modalidade não limitativa é descrita em **Figura 5**.

[0059] A unidade de retenção aloja solventes e tampões usados em aplicações cromatográficas, e compreende opcionalmente um desgaseificador de solvente. Em uma modalidade, solventes e tampões passam através do desgaseificador de solvente antes de fluir para o gerenciador de solvente.

[0060] O gerenciador de solvente é responsável pela entrega de solvente e pode incluir uma plataforma de computador configurável para atender às necessidades do sistema analítico de acordo com cada modalidade particular a fim de melhorar a separação e resolução, e pode incluir, por exemplo, módulos de gradiente binário ou quaternário. O gerenciador de solvente pode controlar, *inter alia*, taxas de solvente, composições de tampão, e limites de pressão do sistema de HPLC.

[0061] O gerenciador de amostra pode compreender opcionalmente uma unidade de controle de temperatura capaz de mudar a temperatura (por exemplo, resfriando e/ou aquecendo), ou mantendo a temperatura da amostra constante (por exemplo, por resfriamento da amostra a uma temperatura constante) antes do carregamento nas colunas. Em uma modalidade, amostras estão contidas no compartimento do gerenciador e mantidas a 4°C enquanto aguardando injeção. Amostras são levadas para o autoamostrador onde uma agulha vai diretamente para a amostra indicada na fila. Em uma modalidade, o

autoamostrador compreende adicionalmente um regulador de pressão para manipular o excesso de fluxo de solvente injetado e/ou amostra. A partir da agulha do autoamostrador, a amostra então se move para o compartimento da coluna.

[0062] A quantidade, ou montante, de uma proteína em uma fração, pode ser determinada por eluição da proteína através do detector e usando métodos computacionais conhecidos na técnica. O sistema pode compreender adicionalmente uma unidade do controlador de sistema, ou outro dispositivo auxiliado por computador.

[0063] A análise de controle de pureza e/ou qualidade é realizada analisando e quantificando as razões das três espécies de proteína presentes na amostra. A pureza de uma proteína em uma mistura pode ser calculada determinando a quantidade de cada fração de proteína e calculando a razão da quantidade da proteína de interesse para a soma das quantidades de todas as proteínas a mistura. A título de exemplo, a pureza de uma proteína heterodimérica em uma mistura compreendendo a proteína heterodimérica e duas ou mais impurezas de proteína pode ser quantificada determinando a quantidade de cada fração de proteína e calculando a razão da quantidade da proteína heterodimérica para a soma das quantidades da proteína heterodimérica e as duas ou mais impurezas de proteína.

[0064] A pureza métrica de bioespecífico fornece a porcentagem de anticorpo biespecífico em comparação com a quantidade total de anticorpo, como definido pela **Equação 1**. A título de exemplo, a pureza de FcFc* em uma mistura compreendendo FcFc, FcFc*, e Fc*Fc* pode ser quantificada como a seguir:

Equação 1: Quantificação de pureza de um anticorpo biespecífico

$$\text{Pureza de FcFc*} = \frac{\text{quantidade de FcFc*}}{(\text{quantidade de FcFc} + \text{quantidade de FcFc*} + \text{quantidade de Fc*Fc*})}$$

[0065] Uma válvula de comutação, uma válvula de comutação de fluxo ou uma válvula de controle de fluxo, como usadas aqui, são meios para dirigir, variar, ou cortar o trajeto de fluxo do eluente para fora de uma coluna de cromatografia. A válvula de comutação pode ser de múltiplas vias, por exemplo, duas vias, três vias, quatro vias, e similares, isto é a válvula de comutação é capaz de direcionar o fluxo para dois, três ou mais receptáculos diferentes. Receptáculos podem ser de qualquer origem, por exemplo, colunas de cromatografia, colunas de cromatografia de afinidade, detectores, ou um recipiente de descarte de resíduos. A mudança dos receptáculos é alcançada por comutação da válvula de comutação entre posições diferentes.

[0066] A título de exemplo, em um sistema de cromatografia, uma válvula de comutação pode conectar uma primeira matriz de afinidade, uma segunda matriz de afinidade, e um detector de um modo em série ou não em série. Em modalidades não limitativas, por exemplo, mostradas em **Figuras 5-7**, uma válvula de comutação pode conectar em série uma primeira matriz de afinidade a uma segunda matriz de afinidade. Neste sistema exemplar, uma posição da válvula de comutação permitirá que o eluente escoe da primeira matriz de afinidade para a segunda matriz de afinidade e, subsequentemente, para o detector. A comutação da válvula de comutação para outra posição permitirá que o eluente escoe da primeira matriz de afinidade diretamente para o detector, desviando da segunda matriz de afinidade. O eluente da segunda matriz de afinidade pode fluir para o detector com ou sem envolvimento da primeira matriz de afinidade. A segunda matriz de afinidade pode ou não estar diretamente conectada a uma autoamostrador. Em outra modalidade não limitativa descrita em **Figura 4B**, o eluente da primeira matriz de afinidade é capaz de fluir diretamente para o detector, desviando da segunda matriz de afinidade.

[0067] Em um aspecto, a presente invenção descreve um método de avaliar quantitativamente a quantidade e/ou a pureza da fração de

heterodímero utilizando um novo sistema de cromatografia compreendendo uma válvula de comutação.

[0068] Em um aspecto, a presente invenção descreve um método para quantificar uma quantidade e/ou pureza de uma proteína em uma amostra compreendendo uma mistura da proteína, uma primeira impureza de proteína e uma segunda impureza de proteína, em que a proteína e a primeira impureza se ligam a uma primeira matriz de afinidade e a segunda impureza não se liga substancialmente à primeira matriz de afinidade e se liga a uma segunda matriz de afinidade, o dito método compreendendo as etapas de:

a. aplicação da amostra a um sistema de cromatografia compreendendo a primeira matriz de afinidade, a segunda matriz de afinidade, e um detector, em que a primeira matriz de afinidade é conectada em série à segunda matriz de afinidade por meio de uma válvula de comutação;

b. eluição da segunda impureza a partir da primeira matriz de afinidade para a segunda matriz de afinidade sob um primeiro conjunto de condições;

c. comutação da válvula de comutação para desviar da segunda matriz de afinidade, eluição da proteína através do detector sob um segundo conjunto de condições e determinação da quantidade da proteína eluída;

d. eluição da primeira impureza através do detector sob um terceiro conjunto de condições e determinação da quantidade da primeira impureza eluída;

e. eluição da segunda impureza a partir da segunda matriz de afinidade através do detector sob o terceiro conjunto de condições e determinação da quantidade da segunda impureza eluída, e

f. quantificação da quantidade e/ou da pureza da proteína na amostra.

[0069] Em uma modalidade a proteína é uma proteína multimérica, por exemplo, um anticorpo. Em uma modalidade, a proteína é um anticorpo

de interesse, e a primeira e segunda impurezas de proteína são proteínas multiméricas, por exemplo, anticorpos que podem ou não podem estar estruturalmente relacionados ao anticorpo de interesse. Em uma modalidade, a proteína é um anticorpo biespecífico, isto é, uma proteína heterodimérica, a primeira impureza de proteína é uma primeira proteína homodimérica, e a segunda impureza de proteína é uma segunda proteína homodimérica. Em alguns casos, a mistura de proteínas multiméricas é produzida por uma pluralidade de células eucarióticas, tais como, por exemplo, células de ovário de hamster chinês (CHO) em uma cultura de célula.

[0070] Em uma modalidade, a proteína tem uma afinidade menor em relação à primeira matriz de afinidade do que a primeira impureza. Em uma modalidade a proteína é uma proteína heterodimérica, a primeira impureza de proteína é uma primeira proteína homodimérica, e a segunda impureza de proteína é uma segunda proteína homodimérica, a proteína heterodimérica e a primeira proteína homodimérica se ligam à primeira matriz de afinidade e a segunda proteína homodimérica não se liga substancialmente à primeira matriz de afinidade e se liga à segunda matriz de afinidade.

[0071] Em uma modalidade, a proteína compreende um primeiro domínio de imunoglobulina CH3 e um segundo domínio de imunoglobulina CH3 em que os ditos primeiro e segundo domínios de imunoglobulina CH3 são diferentes em sua afinidade em relação à primeira matriz de afinidade, e em que a amostra compreende uma mistura compreendendo a dita proteína, uma proteína compreendendo dois primeiros domínios CH3, e uma proteína compreendendo dois segundos domínios CH3.

[0072] Em uma modalidade, o segundo domínio CH3 compreende substituições de aminoácidos H435R e Y436F (por sistema de numeração EU; H95R/Y96F por sistema de numeração de éxon IMGT).

[0073] Em uma modalidade, a primeira matriz de afinidade compreende um ligando de proteína A e seus derivados fixados em um

substrato sólido. Em alguns casos, o substrato é uma conta ou partícula, de modo que a matriz de afinidade é uma pluralidade de partículas fixadas com proteína A. A proteína A pode ser uma proteína A de estafilococo de ocorrência natural ou modificada, ou pode ser uma proteína A modificada. Proteína A modificada pode ser, por exemplo, um tetrâmetro de domínio Z, um tetrâmetro de domínio Y, ou uma proteína A modificada que não tem domínios D e E. Estas proteínas A modificadas exemplares são incapazes de se ligar (ou se ligar com afinidade muito baixa, se de todo) ao domínio VH3 de uma imunoglobulina, mas ainda podem se ligar ao domínio CH3 de IgG1, IgG2 e IgG4.

[0074] Em uma modalidade, a segunda matriz de afinidade compreende um ligando de proteína G e seus derivados fixados em um substrato sólido. Em alguns casos, o substrato é uma conta ou partícula, de modo que a matriz de afinidade é uma pluralidade de partículas fixadas com proteína G. A proteína G pode ser uma proteína G estreptocócica de ocorrência natural ou modificada, ou pode ser uma proteína G modificada. Proteína G modificada pode compreender o domínio B1 (aka GB1) e pode ser conjugada ou não conjugada. Em outra modalidade, a segunda matriz de afinidade compreende um ligando de proteína L e seus derivados fixados em um substrato sólido.

[0075] Em uma modalidade, as condições de eluição podem compreender uma faixa de pH particular e um tampão compreendendo um modificador de fase móvel, por exemplo, um agente caotrópico. Em uma modalidade, o primeiro conjunto de condições de eluição para eluir a segunda impureza, por exemplo, a segunda proteína homodimérica, compreende um primeiro pH. Em uma modalidade, o segundo conjunto de condições de eluição para eluir a proteína, por exemplo, a proteína heterodimérica, compreende um segundo pH. Em uma modalidade, o terceiro conjunto de condições de eluição para eluir a primeira impureza, por exemplo, a primeira

proteína homodimérica, compreende um terceiro pH. Em uma modalidade, o segundo pH pode ser menor do que o primeiro pH. Em uma modalidade, o terceiro pH pode ser menor do que o segundo pH. Em uma modalidade, o segundo pH pode ser menor do que o primeiro pH, e o terceiro pH pode ser menor do que o segundo pH. Em outra modalidade, o primeiro pH pode ser maior do que pH 5, ou cerca de pH 5 a cerca de pH 8, ou cerca de pH 5,2 a cerca de pH 7,4, ou pH 6,4. Em uma modalidade, o segundo pH pode ser cerca de pH 3,5 a cerca de pH 6, ou cerca de 3,8 a cerca de 5,6. Em uma modalidade, o terceiro pH pode ser menor do que pH 4, ou cerca de pH 1,5 a cerca de pH 3,6, ou cerca de pH 2,0 a cerca de pH 2,8, ou cerca de pH 2,2.

[0076] Em uma modalidade, o primeiro, o segundo e o terceiro conjuntos de condições de eluição compreendem um tampão apropriado, por exemplo, um citrato, acetato, 4-morfolinoetanossulfonato (MES), fosfato, succinato, e similares, assim como combinações e misturas dos mesmos. Em uma modalidade, o primeiro, segundo, e terceiro conjuntos de condições de eluição compreendem um agente caotrópico. O agente aotrópico pode ser um sal, tendo um cátion selecionado a partir de lítio, magnésio, cálcio, e guanidínio, e um ânion selecionado a partir de cloreto, nitrato, brometo, clorato, iodeto, perclorato e tiocianato. Em uma modalidade particular, o agente caotrópico é CaCl_2 , por exemplo, 250 - 500 mM CaCl_2 . Em outra modalidade particular, o agente caotrópico é MgCl_2 , por exemplo, 250 - 500 mM MgCl_2 .

[0077] Em uma modalidade, o heterodímero é um anticorpo biespecífico. Aqui, o primeiro polipeptídeo compreende um domínio CH3 que é capaz de se ligar à proteína A (“Fc”) e o segundo polipeptídeo compreende um domínio CH3 que é capaz de se ligar à proteína A (“Fc*”). Em alguns casos, o segundo polipeptídeo compreende uma substituição H435R/Y436F (por sistema de numeração EU; H95R/Y96F por sistema de numeração de éxon IMGT) em seu domínio CH3 (a.k.a “Fc*” ou “substituição em estrela”).

Assim, em algumas modalidades, o primeiro homodímero é um anticorpo monoespecífico tendo dois domínios CH3 não substituídos (isto é, FcFc); o segundo homodímero é um anticorpo monoespecífico tendo dois domínios CH3 substituídos H435R/Y436F (isto é, Fc*Fc*); o heterodímero é um anticorpo biespecífico tendo um domínio CH3 não substituído e um domínio CH3 substituído H435R/Y436F (isto é, Fc*Fc).

[0078] Em outro aspecto, a presente invenção descreve um método para quantificar uma quantidade e/ou pureza de uma proteína heterodimérica em uma amostra compreendendo uma mistura da proteína heterodimérica, uma primeira proteína homodimérica e uma segunda proteína homodimérica, em que a proteína heterodimérica e a primeira proteína homodimérica se ligam a uma matriz de proteína A, e a segunda proteína homodimérica não se liga substancialmente à matriz de proteína A e se liga a uma matriz de proteína G, o dito método compreendendo as etapas de:

a. aplicação da amostra a um sistema de cromatografia compreendendo a matriz de proteína A, a matriz de proteína G, e um detector, em que a matriz de proteína A é conectada em série à matriz de proteína G por meio de uma válvula de comutação;

b. eluição da segunda proteína homodimérica a partir da matriz de proteína A para a matriz de proteína G sob um primeiro conjunto de condições;

c. comutação da válvula de comutação para desviar da matriz de proteína G, eluição da proteína heterodimérica através do detector sob um segundo conjunto de condições e determinação da quantidade da proteína eluída;

d. eluição da primeira proteína homodimérica através do detector sob um terceiro conjunto de condições e determinação da quantidade da primeira impureza eluída;

e. eluição da segunda proteína homodimérica a partir da

segunda matriz de afinidade através do detector sob o terceiro conjunto de condições e determinação da quantidade da segunda impureza eluída, e

f. quantificação da quantidade e/ou da pureza da proteína na amostra.

[0079] Ligação diferencial do primeiro homodímero e do heterodímero à segunda matriz de afinidade pode ser manipulada mudando *inter alia* o pH e/ou potência iônica de uma solução que é passada sobre a matriz de afinidade. A adição de um agente caotrópico à solução intensifica a eluição de cada espécie de dímero da segunda matriz de afinidade em frações não sobrepostas, assim aumentando a pureza de cada espécie de dímero. Em uma modalidade, o primeiro homodímero, por exemplo, Fc*Fc*, é eluído a partir da primeira matriz de afinidade para a segunda matriz de afinidade em um tampão tendo um primeiro pH. Em uma modalidade, o heterodímero, por exemplo, o heterodímero FcFc*, é eluído a partir da primeira matriz de afinidade desviando da segunda matriz de afinidade diretamente para o detector em um tampão tendo uma segunda faixa de pH. Em uma modalidade, o segundo homodímero, por exemplo, FcFc é eluído a partir da primeira matriz de afinidade desviando da segunda matriz de afinidade diretamente para o detector em um tampão tendo uma terceira faixa de pH. Em uma modalidade, o primeiro homodímero, por exemplo, Fc*Fc*, é eluído a partir da segunda matriz de afinidade para o detector em um tampão tendo um terceiro pH. Aqui, a primeira faixa de pH compreende um pH mais alto do que a segunda faixa de pH, e a segunda faixa de pH compreende um pH mais alto do que a terceira faixa de pH.

[0080] Em uma modalidade, o primeiro conjunto de condições de eluição para eluir a segunda impureza, por exemplo, a segunda proteína homodimérica, compreende um primeiro pH. Em uma modalidade, o segundo conjunto de condições de eluição para eluir a proteína, por exemplo, a proteína heterodimérica, compreende um segundo pH. Em uma modalidade, o

terceiro conjunto de condições de eluição para eluir a primeira impureza, por exemplo, a primeira proteína homodimérica, compreende um terceiro pH. Em uma modalidade, o segundo pH pode ser menor do que o primeiro pH. Em uma modalidade, o terceiro pH pode ser menor do que o segundo pH. Em uma modalidade, o segundo pH pode ser menor do que o primeiro pH, e o terceiro pH pode ser menor do que o segundo pH. Em outra modalidade, o primeiro pH pode ser maior do que pH 5, ou cerca de pH 5 a cerca de pH 8, ou cerca de pH 5,2 a cerca de pH 7,4. Em uma modalidade, o segundo pH pode ser cerca de pH 4 a cerca de pH 5, ou cerca de 4,2 a cerca de 5,0. Em uma modalidade, o terceiro pH pode ser menor do que pH 4, ou cerca de pH 2 a cerca de pH 3,6, ou cerca de pH 2,2 a cerca de pH 2,8.

[0081] Em um aspecto, um método para determinar a quantidade e/ou a pureza de uma proteína FcFc* em uma amostra é divulgado, em que a dita proteína FcFc* compreende um primeiro domínio de imunoglobulina CH3 (Fc), um fragmento e/ou um derivado do mesmo, e um segundo domínio de imunoglobulina CH3 (Fc*), um fragmento e/ou um derivado do mesmo em que os ditos primeiro e segundo domínios de imunoglobulina CH3 são diferentes em sua afinidade para uma primeira matriz de afinidade de proteína, e em que a amostra compreende uma mistura compreendendo a dita proteína FcFc*, uma proteína compreendendo dois primeiros domínios CH3 (proteína FcFc), e uma proteína compreendendo dois segundos domínios CH3 (proteína Fc*Fc*), o dito método compreendendo as etapas de:

(a) aplicação da amostra à primeira matriz de afinidade de proteína sob um primeiro conjunto de condições, em que a dita proteína FcFc* e dita proteína FcFc se ligam à dita matriz de afinidade de proteína e a dita proteína Fc*Fc* não se liga substancialmente à dita primeira matriz de afinidade de proteína;

(b) lavagem de dita primeira matriz de afinidade de proteína sob o primeiro conjunto de condições;

(c) aplicação de fluxo passante a partir de etapa (a) e da lavagem de etapa (b) em uma segunda matriz de afinidade de proteína sob tal conjunto de condições em que a proteína Fc*Fc* se liga à dita segunda matriz de afinidade de proteína;

(d) lavagem de dita segunda matriz de afinidade de proteína sob o mesmo conjunto de condições como em etapa (c);

(e) eluição da proteína Fc*Fc* de dita segunda matriz de afinidade de proteína e determinação da quantidade de dita proteína Fc*Fc* eluída;

(f) eluição da proteína Fc*Fc* ligada restante de dita primeira matriz de afinidade de proteína sob um segundo conjunto de condições e determinação da quantidade de dita proteína Fc*Fc* eluída;

(g) eluição da proteína FcFc* ligada à dita primeira matriz de afinidade de proteína sob um terceiro conjunto de condições e determinação da quantidade de dita proteína FcFc* eluída;

(h) eluição da proteína FcFc ligada à dita primeira matriz de afinidade de proteína sob um quarto conjunto de condições e determinação da quantidade de dita proteína FcFc eluída, e

(i) determinação da quantidade e/ou da pureza da proteína FcFc* na amostra,

em que a etapa (d) e/ou etapa (e) podem ser realizadas simultaneamente com, antes ou após as etapas (f)-(h).

[0082] Em um aspecto, um método para a determinação da quantidade e/ou a pureza de um anticorpo biespecífico (por exemplo, um anticorpo FcFc*) em uma amostra é divulgado, em que o dito anticorpo FcFc* compreende uma primeira cadeia pesada de imunoglobulina (Fc) e uma segunda cadeia pesada de imunoglobulina (Fc*) em que ditas primeira e segunda cadeias pesadas de imunoglobulina são diferentes em sua afinidade para proteína A, e em que a amostra compreende uma mistura

compreendendo o dito anticorpo FcFc*, um anticorpo compreendendo duas primeiras cadeias pesadas (anticorpo FcFc), e um anticorpo compreendendo duas segundas cadeias pesadas (anticorpo Fc*Fc*), o dito método compreendendo as etapas de:

(a) aplicação da amostra em uma coluna de afinidade de proteína A (coluna de proteína A) sob um primeiro conjunto de condições, em que o dito anticorpo FcFc* e o dito anticorpo FcFc se ligam à dita coluna de proteína A, enquanto o dito anticorpo Fc*Fc* não se liga substancialmente à dita coluna de proteína A, e em que a coluna de proteína A é conectada através de uma válvula de comutação a uma coluna de afinidade de proteína G (coluna de proteína G) de modo que o fluxo passante da coluna de proteína A pode ser aplicado diretamente à coluna de proteína G, coluna de proteína G que é conectada adicionalmente a uma coluna de HPLC;

(b) lavagem de dita coluna de proteína A sob o primeiro conjunto de condições com a válvula de comutação em uma posição de modo que o fluxo passante da coluna de proteína A é aplicado diretamente em uma coluna de proteína G;

(c) lavagem da coluna de proteína G sob as mesmas condições como em etapa (b);

(d) eluição do anticorpo Fc*Fc* da coluna de proteína G e determinação da quantidade de dito anticorpo Fc*Fc* eluído;

(e) colocação da válvula de comutação na posição desconectando a coluna de proteína A da coluna de proteína G e conectando dita coluna de proteína A com uma coluna de HPLC;

(f) eluição do anticorpo Fc*Fc* ligado restante da coluna de proteína A sob um segundo conjunto de condições e determinação da quantidade de dito anticorpo Fc*Fc* eluído usado;

(g) eluição do anticorpo FcFc* ligado a dita coluna de proteína A sob um terceiro conjunto de condições e determinação da quantidade de

dito anticorpo FcFc* eluído;

(h) eluição do anticorpo FcFc ligado a dita coluna de proteína A sob um quarto conjunto de condições e determinação da quantidade de dito anticorpo FcFc eluído, e

(i) determinação da quantidade e/ou da pureza da proteína FcFc* na amostra,

em que a etapa (c) e/ou etapa (d) pode ser realizada simultaneamente com, antes ou após as etapas (e)-(h).

[0083] Em outro aspecto, um sistema de cromatografia para purificação, análise, e/ou avaliação da quantidade e/ou da pureza de proteínas é provido. Em uma modalidade, o sistema de cromatografia compreende uma primeira matriz de afinidade, uma segunda matriz de afinidade, e um detector, em que cada da primeira matriz de afinidade, a segunda matriz de afinidade e o detector são conectados por meio de uma válvula de comutação. Em uma modalidade, a primeira matriz de afinidade pode ser uma coluna de cromatografia de proteína A. Em uma modalidade, uma segunda matriz de afinidade pode ser uma proteína G ou uma coluna de cromatografia proteína L.

[0084] Em uma modalidade, o detector pode ser uma coluna de HPLC equipada com um detector de UV, um detector de aerossol de carga, e/ou um espectrômetro de massa. Em uma modalidade, a primeira matriz de afinidade e a segunda matriz de afinidade são conectadas em série por meio de uma válvula de comutação. Em outra modalidade, a primeira matriz de afinidade, a segunda matriz de afinidade, e o detector são conectados em série por meio de uma válvula de comutação. Em uma modalidade, a primeira matriz de afinidade e a segunda matriz de afinidade são conectadas em série por meio de uma válvula de comutação, mas o detector não está conectado em série à primeira matriz de afinidade e à segunda matriz de afinidade.

[0085] Em uma modalidade, um sistema de cromatografia é provido

compreendendo (i) uma coluna de cromatografia de proteína A, (ii) uma coluna de cromatografia de proteína G, e (iii) um detector compreendendo uma coluna de HPLC equipada com um detector de UV, um detector de aerossol de carga, e/ou um espectrômetro de massa, em que cada um dentre a coluna de cromatografia de proteína A, a coluna de cromatografia de proteína G e o detector são conectados por meio de uma válvula de comutação.

EXEMPLOS

[0086] Os exemplos seguintes ilustram aspectos específicos da presente descrição. Os exemplos não devem ser interpretados como limitativos, à medida que os exemplos proveem apenas compreensão e prática específicas das modalidades e seus vários aspectos.

[0087] Experimentos de cromatografia foram realizados usando um sistema de HPLC, adaptado para a configuração necessária para realizar o método descrito aqui. Válvulas de troca rápida InfinityLab estão disponíveis na Agilent Technologies. Exemplos de válvulas apropriadas incluem, mas não são limitados a, válvula de troca rápida Agilent G4231A/C, G4232C/D, G4234A/C, G4236A/B, e G4238A/B. Exemplos não limitativos de válvulas apropriadas para a prática da invenção são apresentados na internet em agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G4232-90009_ValveKit_TN_EN.pdf, e também em sistemas Acquity UPLC com 2D Technology Capabilities Guide, Revisão A, Waters Corporation, 2012, cada um sendo incorporado aqui por referência em sua totalidade.

EXEMPLO 1

[0088] A pureza e a quantidade de um anticorpo biespecífico em uma mistura compreendendo dois homodímeros contaminantes foram determinadas como a seguir (cromatograma de título é descrito na **Figura 1**). Dois polipeptídeos de cadeia pesada (contendo IgG4 Fc- e IgG4-Fc*) e um polipeptídeo de cadeia leve comum foram co-expressados em células CHO. Uma amostra do sobrenadante da célula compreendendo a mistura resultante

de homodímeros e heterodímero foi submetida a centrifugação em alta velocidade para eliminar agregados de proteína, e o sobrenadante foi submetido a cromatografia de afinidade, de acordo com métodos de purificação descritos na Publicação PCT No. WO2016/018740, publicada em 4 de fevereiro de 2016, incorporada aqui por referência. Uma amostra do produto de purificação, contendo heterodímero FcFc* e quaisquer produtos de impurezas, homodímeros FcFc e Fc*Fc*, foi carregada em uma coluna de proteína A de 3 x 0,1mL POROS® A 20 µm (rProA, obtida de Applied Biosystems, # 2-1001-00) em fase móvel de pH 6,4 contendo 0,5 M NaCl. A coluna de proteína A foi conectada em série a uma coluna de proteína G 2 x 0,1mL POROS® G 20 µm (rProG, obtida de Applied Biosystems, # 2-1002-00) e a um detector de UV padrão (taxa de fluxo 2,0 mL/min, detecção de pico UV@280 nm) por meio de uma válvula de comutação como descrito em **Figura 4A**.

[0089] Uma série de lavagens foi aplicada para remover contaminantes relacionados ao processo, como DNA de CHO ou proteína de célula hospedeira (HCP). A mistura foi eluída usando fase móvel a pH 5,6 contendo 0,5 M CaCl₂. Uma vez que o homodímero Fc*Fc* tem ambos os sítios de ligação à proteína A deletados da região Fc, esperava-se que esta impureza relacionada ao produto fluísse através de rProA até rProG, enquanto esperava-se que o FcFc* biespecífico e o homodímero FcFc fossem retidos no rProA.

[0090] A válvula de comutação foi, então, comutada para colocar o rProG *offline*, conectando o rProA diretamente ao detector. O anticorpo FcFc* biespecífico foi, então, seletivamente eluído do rProA no detector usando fase móvel a pH 3,8 – 5,6 (específico da molécula) contendo 0,5 M cloreto de cálcio, enquanto a impureza FcFc foi retida devido à sua ligação mais forte em relação ao anticorpo FcFc* biespecífico. A quantidade de FcFc* foi calculada. Então, a impureza FcFc foi seletivamente eluída do rProA usando

fase móvel a pH 2,2 contendo 0,5 M cloreto de cálcio para o detector, e a quantidade de FcFc foi calculada.

[0091] A válvula de comutação foi, então, comutada novamente para conectar em série rProG online, conectando rProA a rProG, e rProG ao detector. A impureza Fc*Fc* foi, então, eluída usando fase móvel a pH 2,2 contendo 0,5 M cloreto de cálcio para o detector, e a quantidade de Fc*Fc* foi calculada.

[0092] A quantidade e pureza de anticorpo biespecífico FcFc* foi determinada calculando a razão da fração FcFc* para a soma das frações FcFc, FcFc*, e Fc*Fc*.

[0093] Taxa de fluxo do método, comprimento de lavagem, comprimento de eluição de biespecífico, e % de tampão C na etapa de eluição do método foram fatores contínuos que foram estudados e considerados prováveis de ter um efeito na recuperação de todas as três espécies de anticorpos. Tabela 1, abaixo, mostra os parâmetros, seu papel e os valores estudados no método.

Tabela 1: Fatores de robustez de pureza de biespecíficos

Nome	Função	Valores
Taxa de fluxo de carga (mL/min)	Contínua	0,5 - 2,5
Comprimento de lavagem (CV)	Contínuo	0 - 60
Comprimento de eluição de biespecífico (CV)	Contínuo	10 - 130
% C	Contínuo	5 - 30
Isótopo	Catagórica	IgG1*, IgG4*A, IgG4*B

[0094] Tabela 2, abaixo, mostra os vários conjuntos de condições de ciclos para os métodos inventivos de avaliação de pureza e quantidade de três amostras de anticorpos: IgG*1, IgG4*A e IgG4*B.

Tabela 2: Condições de operação de robustez de pureza de biespecífico

Condição #	Taxa de fluxo (mL/min)	Comprimento de lavagem (CV)	Comprimento de eluição de biespecífico (CV)	% de tampão C	Isótopo
1	0,5	0	10	5	IgG1*
2	0,5	0	10	17,5	IgG4* B
3	0,5	0	10	30	IgG4* A
4	0,5	0	130	5	IgG4* A
5	0,5	0	130	30	IgG1*
6	0,5	30	130	5	IgG4* B
7	0,5	60	10	5	IgG4* A
8	0,5	60	10	30	IgG1*

Condição #	Taxa de fluxo (mL/min)	Comprimento de lavagem (CV)	Comprimento de eluição de biespecífico (CV)	% de tampão C	Isótopo
9	0,5	60	70	30	IgG4* B
10	0,5	60	130	5	IgG1*
11	0,5	60	130	30	IgG4* A
12	1,5	0	130	30	IgG4* B
13	1,5	30	10	5	IgG4* B
14	1,5	30	70	17,5	IgG4* A
15	1,5	60	130	5	IgG4* B
16	2,5	0	10	5	IgG4* A
17	2,5	0	10	30	IgG1*
18	2,5	0	70	5	IgG4* B
19	2,5	0	130	5	IgG1*
20	2,5	0	130	30	IgG4* A
21	2,5	30	10	30	IgG4* B
22	2,5	30	130	17,5	IgG4* B
23	2,5	60	10	5	IgG1*
24	2,5	60	10	17,5	IgG4* B
25	2,5	60	10	30	IgG4* A
26	2,5	60	130	5	IgG4* A
27	2,5	60	130	30	IgG1*

[0095] Como várias mudanças podem ser realizadas na matéria descrita acima sem sair do escopo e espírito da presente invenção, pretende-se que toda a matéria contida na descrição acima, ou definida nas reivindicações em anexo, seja interpretada como descritiva e ilustrativa da presente invenção. Muitas modificações e variações da presente invenção são possíveis tendo em vista os ensinamentos acima. Consequentemente, a presente descrição se destina a englobar todas tais alternativas, modificações e variações que estão dentro do escopo das reivindicações em anexo.

[0096] Todas as patentes, pedidos, publicações, métodos de teste, literatura e outros materiais citados aqui são incorporados aqui por referência em sua totalidade como se fisicamente presentes neste relatório.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para quantificar uma quantidade de um anticorpo heterodimérico em uma amostra compreendendo uma mistura do anticorpo heterodimérico, uma primeira impureza de anticorpo homodimérico e uma segunda impureza de anticorpo homodimérico, em que a anticorpo heterodimérico e a primeira impureza se liga a uma primeira matriz de afinidade, e a segunda impureza não se liga substancialmente à primeira matriz de afinidade e se liga a uma segunda matriz de afinidade, e em que o anticorpo heterodimérico tem uma afinidade menor em relação à primeira matriz de afinidade do que a primeira impureza de anticorpo homodimérico, o dito método caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a. aplicação da amostra a um sistema de cromatografia compreendendo a primeira matriz de afinidade, a segunda matriz de afinidade e um detector, em que a primeira matriz de afinidade é conectada em série à segunda matriz de afinidade por meio de uma válvula de comutação;

b. eluição da segunda impureza a partir da primeira matriz de afinidade para a segunda matriz de afinidade sob um primeiro conjunto de condições;

c. comutação da válvula de comutação para desviar da segunda matriz de afinidade, eluição do anticorpo heterodimérico através do detector sob um segundo conjunto de condições e determinação da quantidade do anticorpo heterodimérico eluído;

d. eluição da primeira impureza através do detector sob um terceiro conjunto de condições e determinar a quantidade da primeira impureza eluída;

e. eluição da segunda impureza a partir da segunda matriz de afinidade através do detector sob o terceiro conjunto de condições e determinação a quantidade da segunda impureza eluída, e

f. quantificação da quantidade do anticorpo heterodimérico na

amostra.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo heterodimérico compreende um primeiro domínio de imunoglobulina CH3 e um segundo domínio de imunoglobulina CH3, em que os ditos primeiro e segundo domínios de imunoglobulina CH3 são diferentes em sua afinidade em relação à primeira matriz de afinidade, e em quem a amostra compreende uma mistura compreendendo o dito anticorpo heterodimérico, um anticorpo homodimérico compreendendo dois primeiros domínios CH3, e um anticorpo homodimérico compreendendo dois segundos domínios CH3.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o segundo domínio CH3 compreende substituições de aminoácido H435R e Y436F.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo heterodimérico é um anticorpo biespecífico.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a primeira matriz de afinidade compreende proteína A, e a segunda matriz de afinidade compreende proteína G.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o primeiro conjunto de condições compreende um primeiro pH, o segundo conjunto de condições compreende o segundo pH, e o terceiro conjunto de condições compreende um terceiro pH.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o segundo pH é menor do que o primeiro pH, e o terceiro pH é menor que o segundo pH.

8. Método de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizado pelo fato de que o primeiro pH é de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,4, o segundo pH é de cerca de pH 4,3 a cerca de pH 5,6, e o terceiro pH é de cerca de pH 2,0 a cerca de pH 2,8.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o primeiro conjunto de condições, o segundo conjunto de condições e o terceiro conjunto de condições compreendem um modificador de fase móvel.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o modificador de fase móvel é um tampão salino selecionado a partir de tampão LiCl, NaCl, KCl, MgCl₂ e CaCl₂.

11. Método para quantificar uma quantidade de um anticorpo heterodimérico em uma amostra compreendendo uma mistura do anticorpo heterodimérico, um primeiro anticorpo homodimérico e um segundo anticorpo homodimérico, em que o anticorpo heterodimérico e o primeiro anticorpo homodimérico se liga a uma matriz de proteína A, e o segundo anticorpo homodimérico não se liga substancialmente à matriz de proteína A e se liga a uma matriz de proteína G, o dito método caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a. aplicação da amostra a um sistema de cromatografia compreendendo a matriz de proteína A, a matriz de proteína G e um detector, em que a matriz de proteína A é conectada em série à matriz de proteína G por meio de uma válvula de comutação;

b. eluição do segundo anticorpo homodimérico a partir da matriz de proteína A para a matriz de proteína G sob um primeiro conjunto de condições;

c. comutação da válvula de comutação para desviar da matriz de proteína G, eluição do anticorpo heterodimérico através do detector sob um segundo conjunto de condições e determinar a quantidade do anticorpo heterodimérico eluído;

d. eluição do primeiro anticorpo homodimérico através do detector sob um terceiro conjunto de condições e determinação da quantidade do primeiro anticorpo homodimérico;

- e. eluição do segundo anticorpo homodimérico a partir da matriz de proteína G através do detector sob o terceiro conjunto de condições e determinação da quantidade do segundo anticorpo homodimérico eluído, e
- f. quantificação da quantidade do anticorpo heterodimérico na amostra.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o anticorpo heterodimérico compreende $FcFc^*$, o primeiro anticorpo homodimérico compreende $FcFc$, e o segundo anticorpo homodimérico compreende Fc^*Fc^* .

13. Sistema de cromatografia, caracterizado pelo fato de que compreende uma primeira matriz de afinidade, uma segunda matriz de afinidade e um detector, em que cada um dentre a primeira matriz de afinidade, a segunda matriz de afinidade e o detector são conectados por meio de uma válvula de comutação.

14. Sistema de cromatografia, caracterizado pelo fato de que compreende (i) uma coluna de cromatografia de proteína A, (ii) uma coluna de cromatografia de proteína G, e (iii) um detector compreendendo uma coluna de HPLC equipada com um detector de UV, um detector de aerossol de carga e/ou um espectrômetro de massa, em que cada um dentre a coluna de cromatografia de proteína A, a coluna de cromatografia de proteína G e o detector são conectados por meio de uma válvula de comutação.

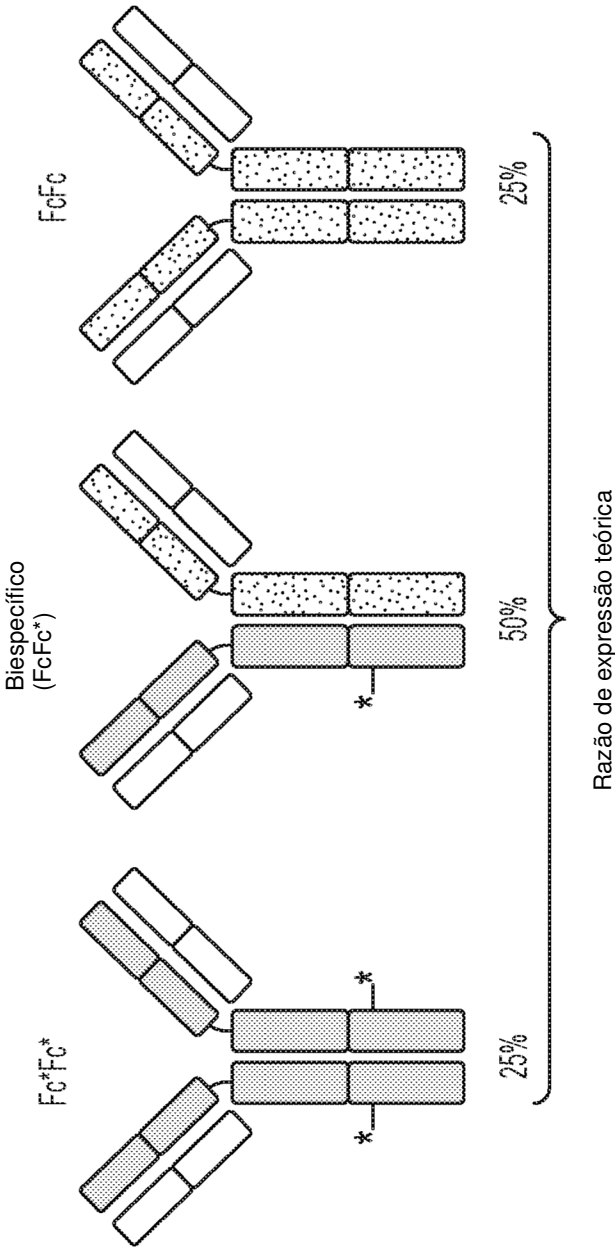
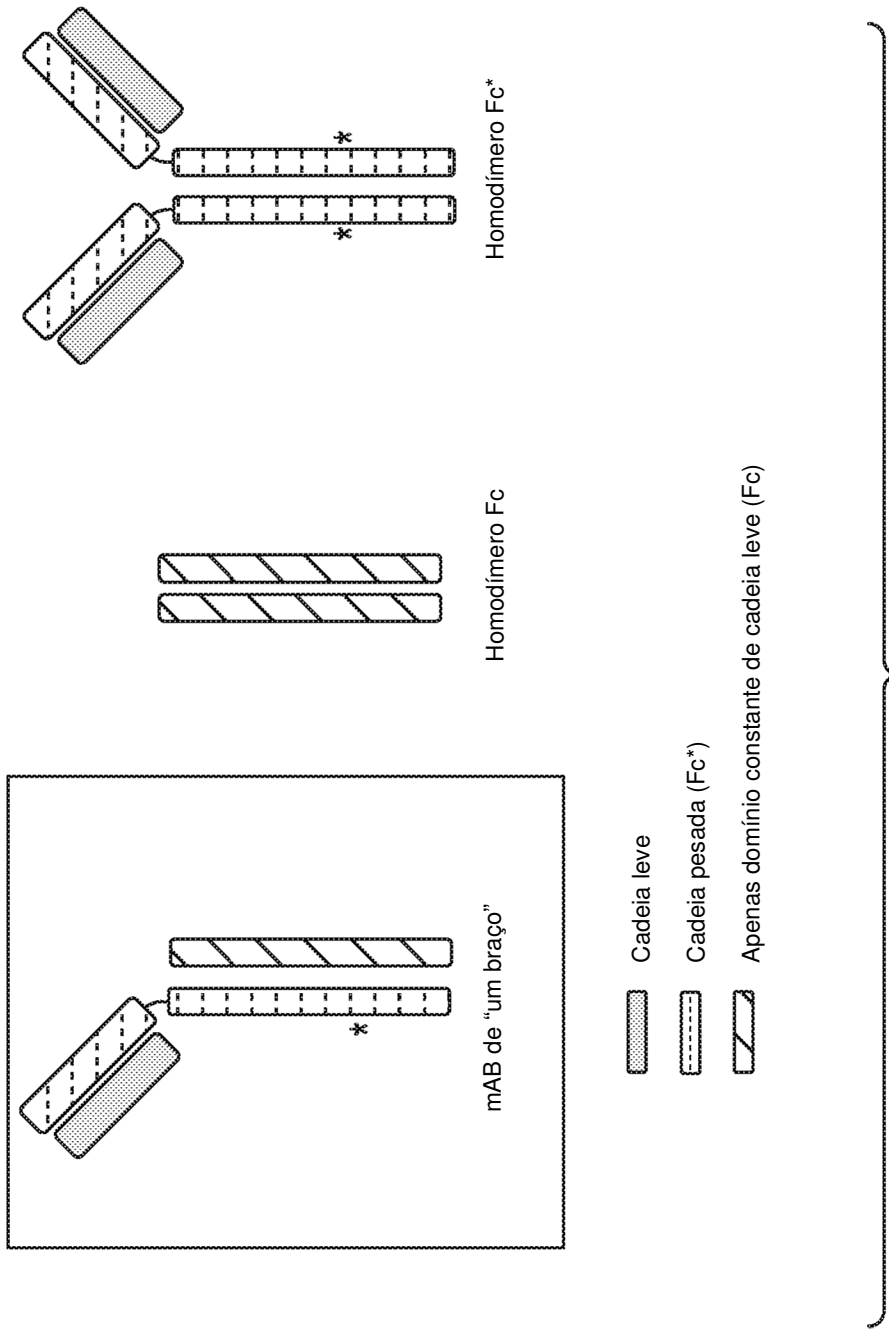


FIG. 1



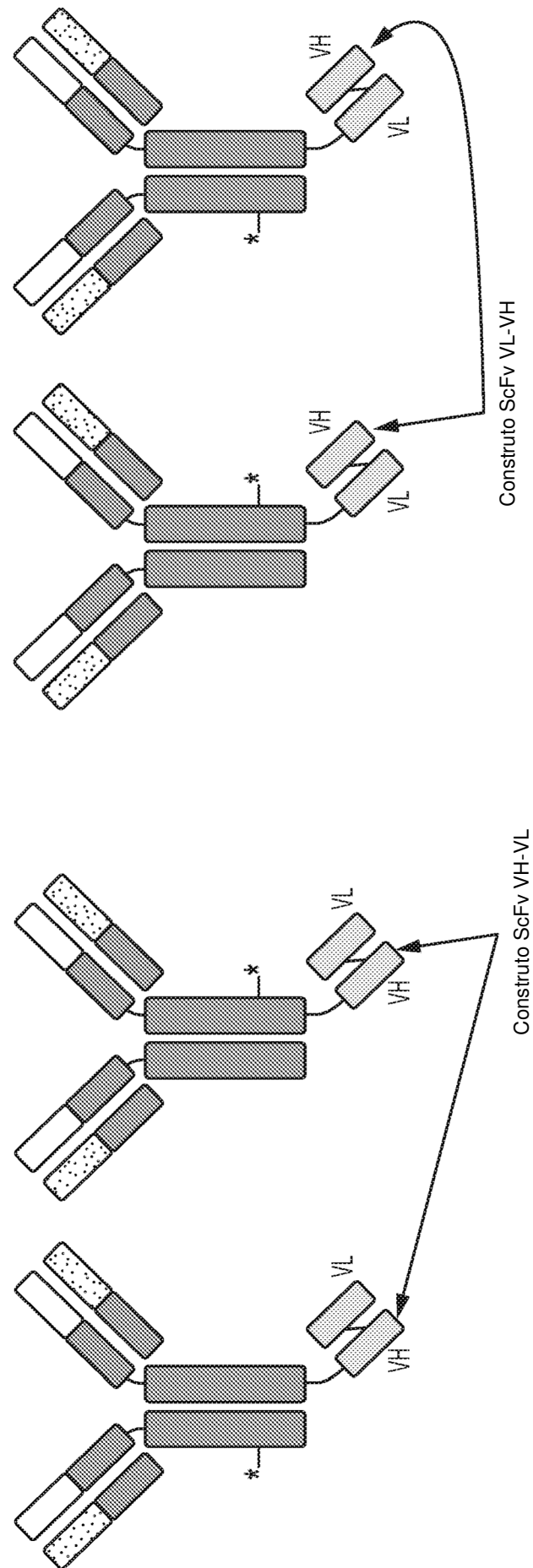


FIG. 2B

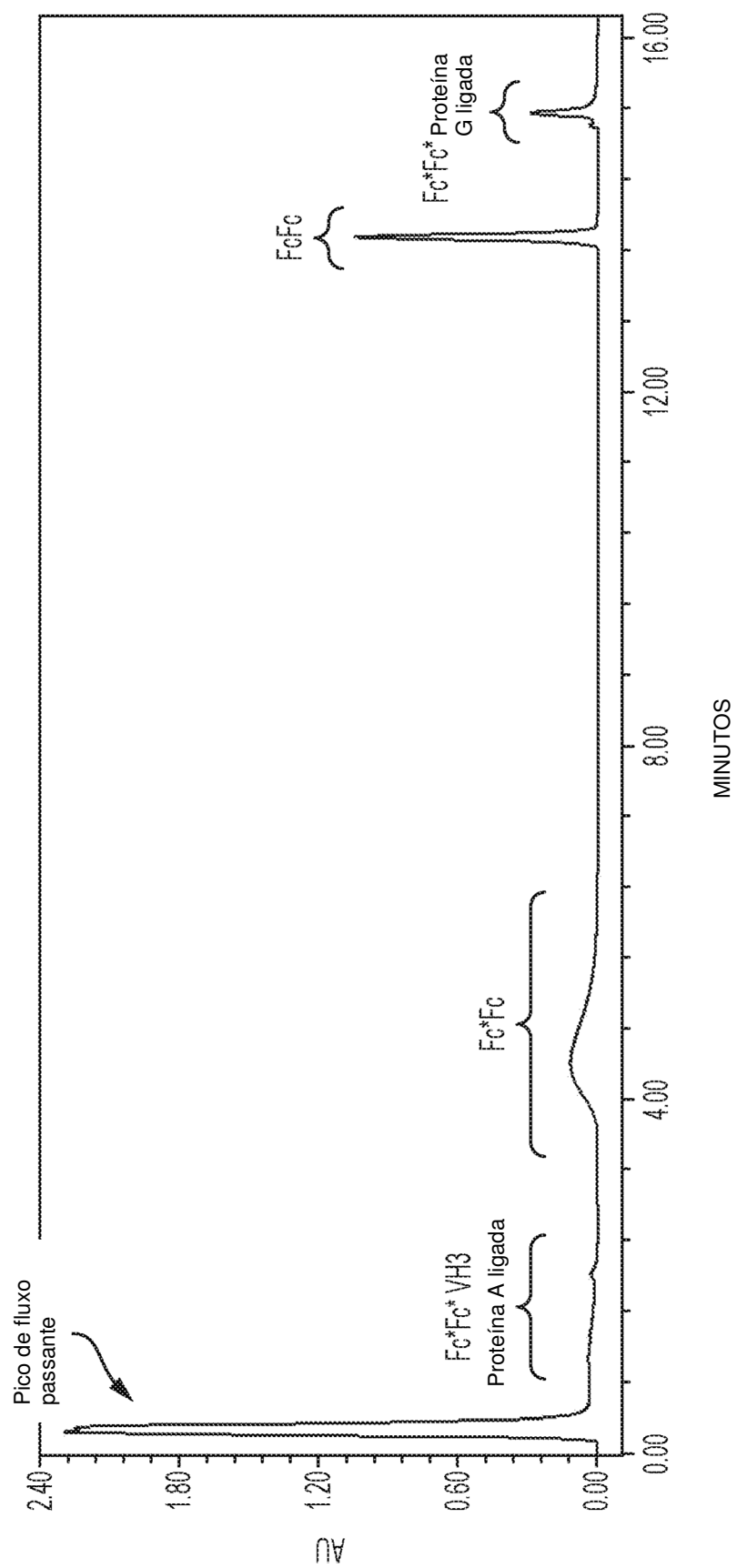


FIG. 3

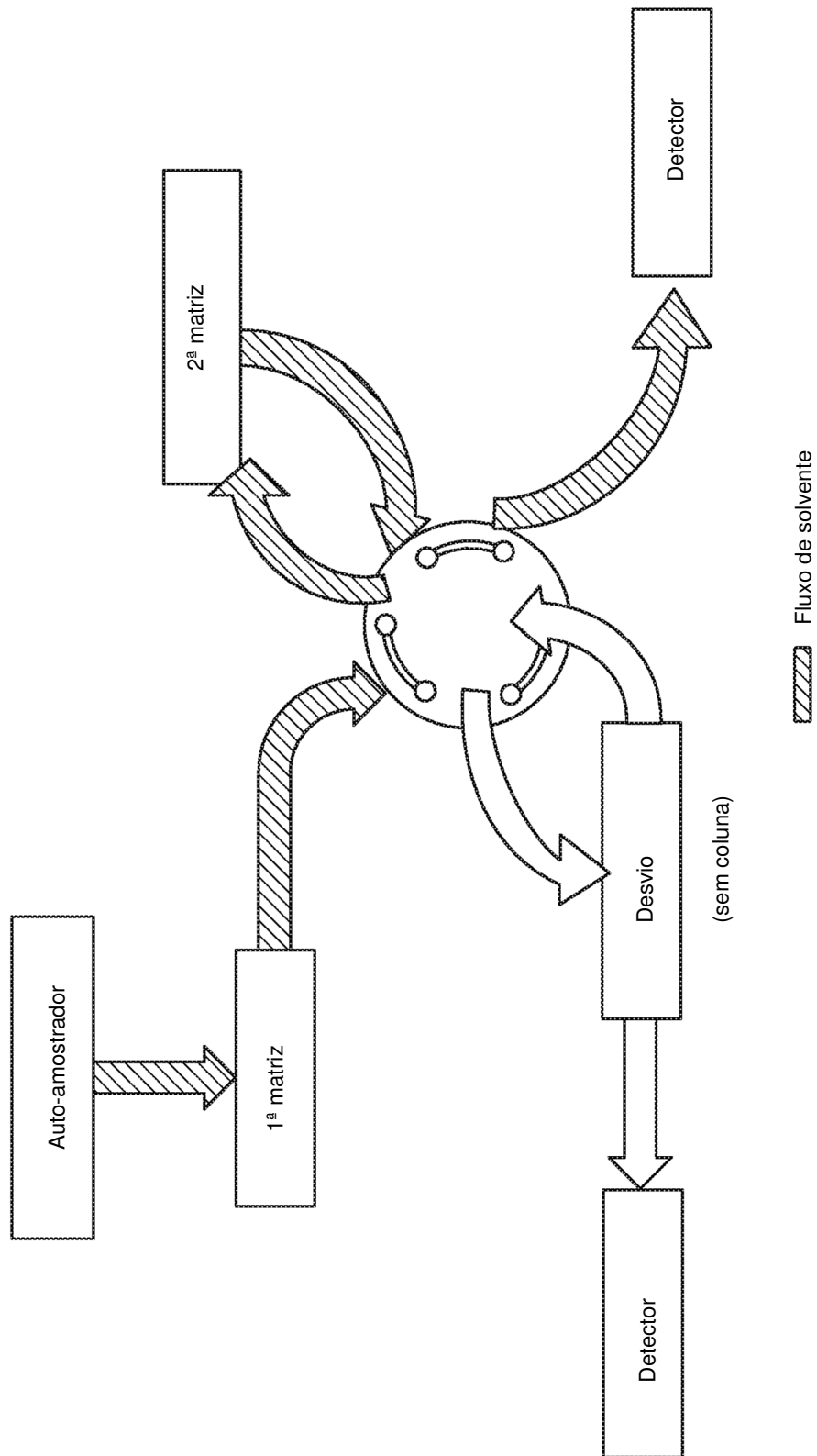


FIG. 4A

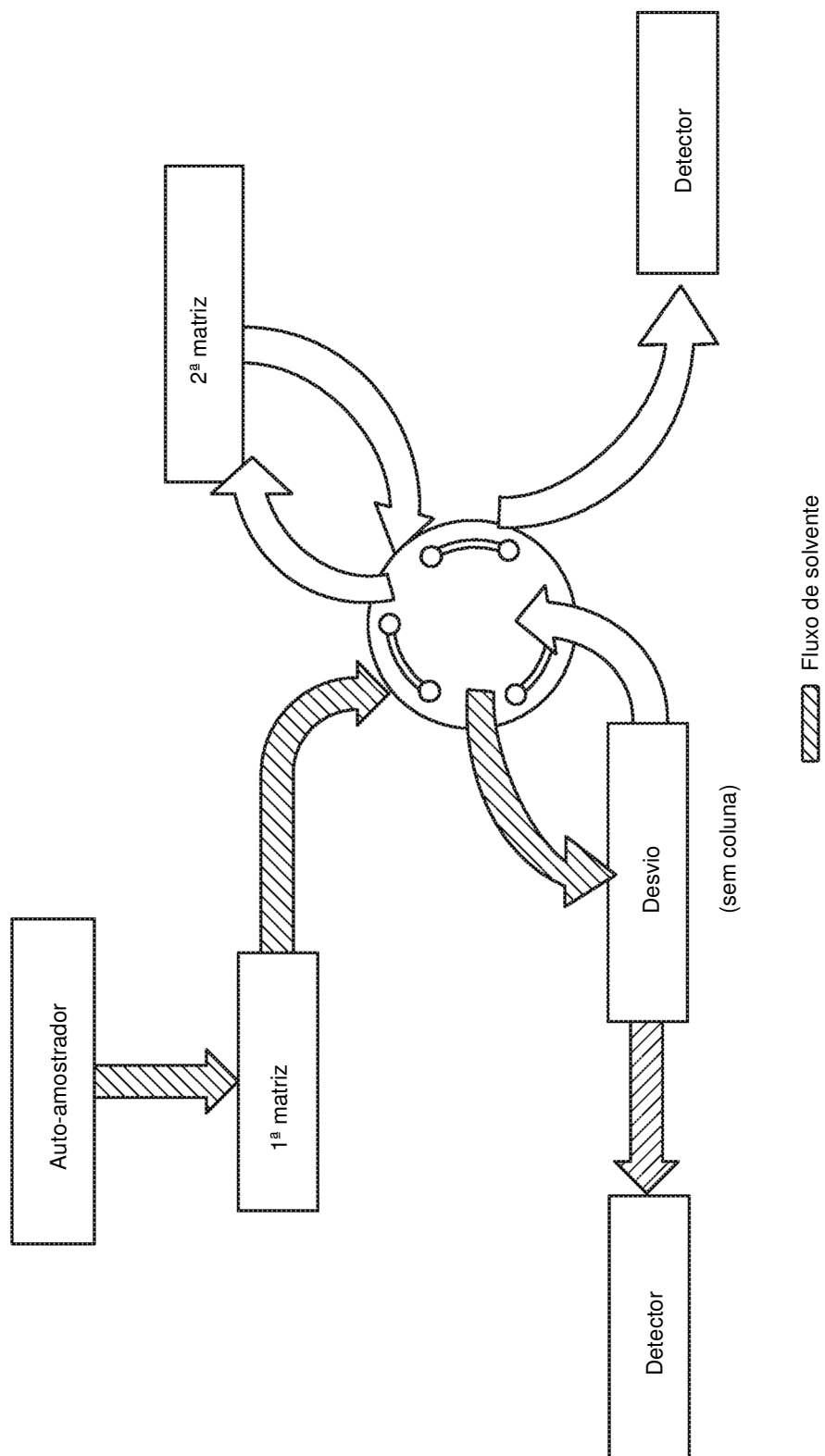


FIG. 4B

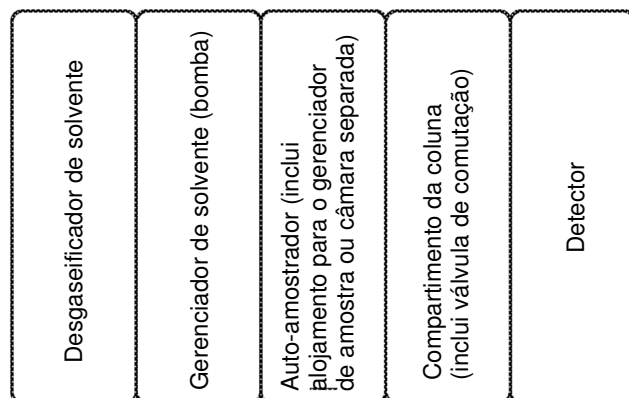


FIG. 5

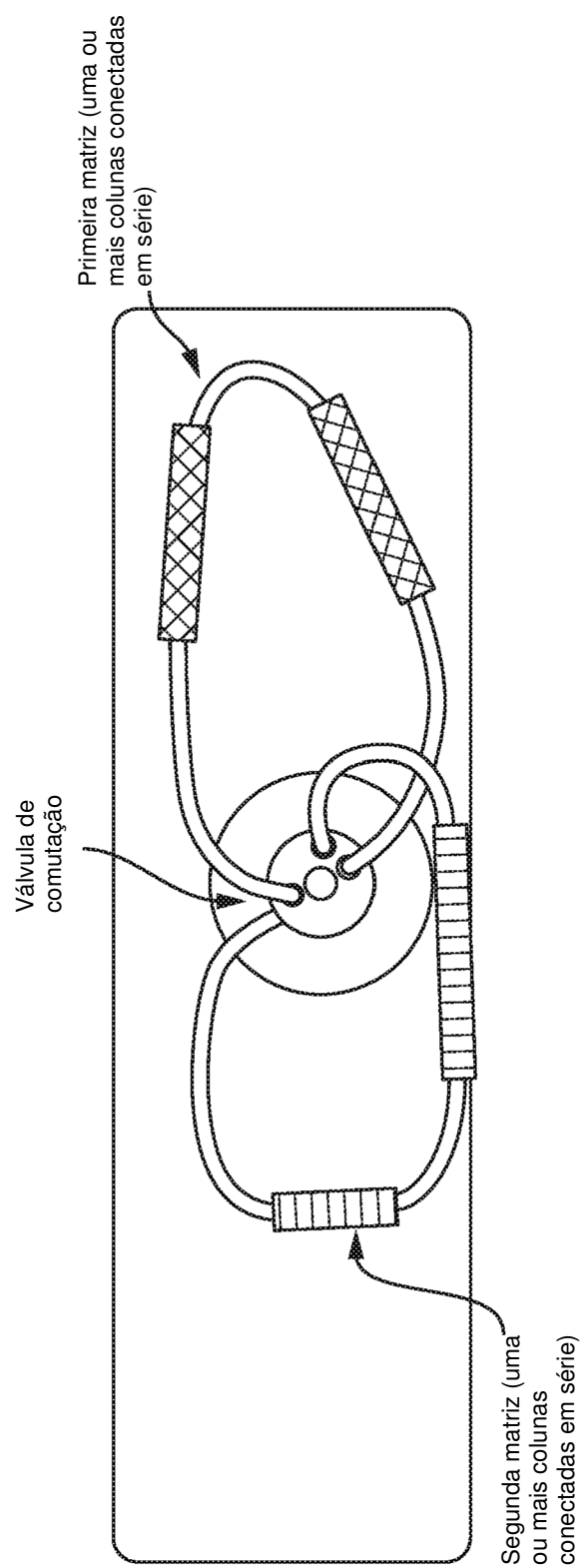


FIG. 6

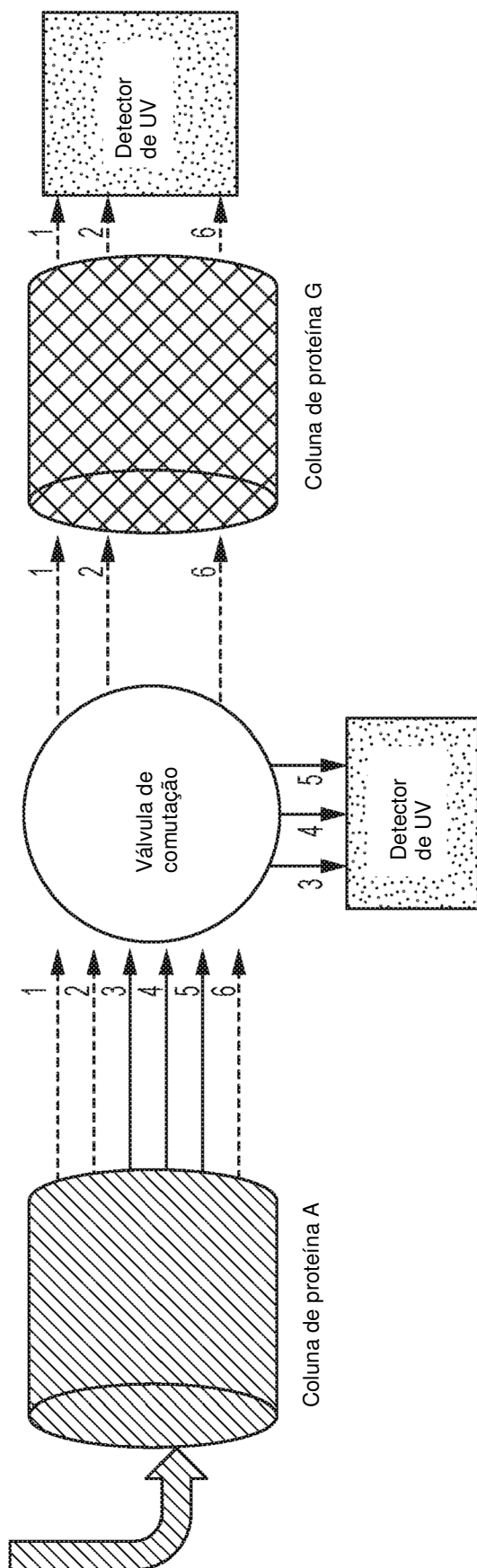


FIG. 7

RESUMO

MÉTODO PARA QUANTIFICAR UMA QUANTIDADE DE UM ANTICORPO HETERODIMÉRICO, E, SISTEMA DE CROMATOGRAFIA

A invenção se refere a um sistema e método de cromatografia para avaliar quantidade e/ou pureza de uma proteína multimérica em uma amostra, em que o sistema de cromatografia compreende duas matrizes de cromatografia de afinidades diferentes conectadas por meio de uma válvula de comutação.