

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **034347**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.01.30**

(51) Int. Cl. *A61L 2/10* (2006.01)  
*A61L 2/00* (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201490867**

(22) Дата подачи заявки  
**2012.10.25**

**(54) СПОСОБ ИНАКТИВАЦИИ ВИРУСОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ АНТИТЕЛ**

(31) **61/551,822**

(32) **2011.10.26**

(33) **US**

(43) **2014.12.30**

(86) **PCT/US2012/061965**

(87) **WO 2013/063298 2013.05.02**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**АМГЕН ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Шульц Джозеф Эдвард, Харт Роджер,  
Велборн Брент (US)**

(74) Представитель:  
**Лыу Т.Н., Угрюмов В.М. (RU)**

(56) EP-A1-1415669  
US-A-5981163

MARX G. ET AL.: "PROTECTING FIBRINOGEN WITH RUTIN DURING UVC IRRADIATION FOR VIRAL INACTIVATION", PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, INC, US, vol. 63, no. 4, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 541-546, XP000607648, ISSN: 0031-8655, DOI: 10.1111/J.1751-1097.1996.TB03081.X the whole document

CHIN S. ET AL.: "VIRUCIDAL SHORT WAVELENGTH ULTRAVIOLET LIGHT TREATMENT OF PLASMA AND FACTOR VIII CONCENTRATE: PROTECTION OF PROTEINS BY ANTIOXIDANTS", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 86, no. 11, 1 December 1995 (1995-12-01), pages 4331-4336, XP000608313, ISSN: 0006-4971 the whole document  
WO-A1-03026704  
US-A1-2003161753

(57) В изобретении представлен способ инактивации вируса при получении терапевтического антитела, заключающийся в том, что (а) обеспечивают образец, содержащий терапевтическое антитело, при этом указанный образец представляет собой выходящий поток после стадии очистки антитела, и известно либо предполагается, что указанный образец содержит вирус; (b) вводят защитное средство в выходящий поток с получением стабилизированной смеси, при этом защитное средство включает тирозин, триптофан или их комбинацию; (с) измеряют поглощение стабилизированной смеси с помощью встроенного абсорбционного спектроскопа, где поглощение стабилизированной смеси измеряют при длине волны 254 нм с помощью встроенного абсорбционного спектроскопа; (d) пропускают стабилизированную смесь через устройство, конфигурация которого позволяет непрерывно воздействовать УФС-излучением таким образом, чтобы целевая доза УФС-излучения, при которой происходит инактивация вируса, доставлялась к смеси; (е) причем на основе оценки поглощения корректирование воздействия УФС-излучения осуществляют таким образом, чтобы целевая доза УФС-излучения непрерывно доставлялась к стабилизированной смеси, проходящей через указанное устройство, при этом стадии (с), (d) и (е) осуществляют в режиме реального времени в качестве автоматизированного элемента обратной связи, при этом доставляемую целевую дозу корректируют, принимая во внимание изменяющуюся поглощающую способность стабилизированной смеси, для поддержания постоянства целевой получаемой дозы по формуле  $\text{доза} \sim (P/Q) \exp(-al) = (P_0/Q_0) \exp(-a_0l)$ , где  $a$  - поглощающая способность раствора,  $l$  - длина пути по кольцевым зазорам,  $P$  представляет собой выходную мощность лампы,  $Q$  представляет собой объемную скорость потока смеси с поглощающей способностью  $=a$ ,  $P_0$  и  $Q_0$  представляют собой мощность и скорость потока эталонной смеси с поглощающей способностью  $=a_0$ . Предложенный способ может быть реализован в любом масштабе.

**B1****034347****034347 B1**

### Область техники

Настоящее изобретение относится, в целом, к соединениям и способам для защиты молекул на основе белков от разложения и модификации при операциях, включающих воздействие УФ-излучением на указанные молекулы на основе белков, в частности в способах вирусной инактивации, в которых задействован свет в УФС-диапазоне длин волн, а также позволяющим проводить усиленное облучение УФС без повреждения белков.

### Уровень техники

Вирусное загрязнение клеточных сред и супернатантов представляет собой проблему для производителей биофармацевтических продуктов во всем мире. Для инактивации и/или удаления из клеточных супернатантов вирусных частиц, больших или малых, на основе ДНК или РНК, в оболочке или без оболочки ("naked"), применялись различные способы. Примеры таких способов включают технологию фильтрации с диаметром пор 20 нм, хроматографии на анионообменных мембранах, инкубацию при низком рН и технологию глубинной фильтрации.

Помимо описанных выше методов для инактивации вирусов применяли также обработку содержащих белки растворов ультрафиолетовым излучением. Однако для достижения эффективной инактивации вирусов в раствор должна поступить достаточная доза УФ-излучения в УФС-диапазоне. В некоторых случаях требуемый уровень воздействия УФС-излучением может вызывать нежелательную модификацию и/или разложение белка в растворе. Например, в некоторых случаях в растворе могут образовываться реакционноспособные вещества, что может приводить к непрямоу окислению или модификации белков в растворе; также возможны другие механизмы не прямой модификации, обусловленной воздействием УФС (см., например, Cabiscol, et al., (2010) *Int. Microbiol*, 3:315; Bandyopadhyay et al. (1999) *Curr. Sci.* 77:658-666; Schoneich, (2005) *Biochim Biophys Acta* 1703:111-19; Stadtman et al., (2003) *Antioxid. Redox. Signal* 5:577-82; Stadtman, (1993) *Ann. Rev. Biochem.* 62:797-821 и Dean et al., (1997) *Biochem. J.* 324:1-18.

В документе EP 1415669 раскрывается способ стерилизации биологических композиций путем воздействия на такие композиции облучением в присутствии ванилина или его производных для защиты представляющих интерес белков, входящих в состав таких биологических композиций.

Настоящее изобретение направлено на решение указанных и других проблем путем обеспечения способов уменьшения окисления, модификации и разложения белка в растворе, подвергнутому воздействию излучением в УФ-диапазоне, и в частности УФС-излучением. Воздействие УФС может быть согласно приведенному описанию компонентом процедуры вирусной инактивации, а белок в растворе может представлять собой белок любого типа, например белок, такой как антигенсвязывающий белок (например, что-либо одно или более из (i) антигенсвязывающего белка, содержащего что-либо одно или более из моноклонального антитела, антитела человека, гуманизированного антитела, химерного антитела, рекомбинантного антитела, одноцепочечного антитела, диатела, триатела, тетратела, Fab-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, IgD-антитела, IgE-антитела, IgM-антитела, IgG1-антитела, IgG2-антитела, IgG3-антитела или IgG4-антитела и их фрагментов, (ii) Fc-домена; (iii) пептида; (iv) гибридного белка с Fc-фрагментом и (v) терапевтического белка).

### Сущность изобретения

Предложен способ инактивации вируса при получении терапевтического антитела, заключающийся в том, что:

(a) обеспечивают образец, содержащий терапевтическое антитело, при этом указанный образец представляет собой выходящий поток после стадии очистки антитела и известно либо предполагается, что указанный образец содержит вирус;

(b) вводят защитное средство в выходящий поток с получением стабилизированной смеси, при этом защитное средство включает тирозин, триптофан или их комбинацию;

(c) измеряют поглощение стабилизированной смеси с помощью встроенного абсорбционного спектроскопа, где поглощение стабилизированной смеси измеряют при длине волны 254 нм с помощью встроенного абсорбционного спектроскопа;

(d) пропускают стабилизированную смесь через устройство, конфигурация которого позволяет непрерывно воздействовать УФС-излучением таким образом, чтобы целевая доза УФС-излучения, при которой происходит инактивация вируса, доставлялась к смеси;

(e) причем на основе оценки поглощения корректируют воздействие УФС-излучения осуществляют таким образом, чтобы целевая доза УФС-излучения непрерывно доставлялась к стабилизированной смеси, проходящей через указанное устройство, при этом стадии (c), (d) и (e) осуществляют в режиме реального времени в качестве автоматизированного элемента обратной связи;

при этом доставляемую целевую дозу корректируют, принимая во внимание изменяющуюся поглощающую способность стабилизированной смеси, для поддержания постоянства целевой получаемой дозы по формуле

$$\text{доза} \sim (P/Q)\exp(-al)=(P_0/Q_0)\exp(-a_0l),$$

где  $a$  - поглощающая способность раствора,

$l$  - длина пути по кольцевым зазорам,

P представляет собой выходную мощность лампы,

Q представляет собой объемную скорость потока смеси с поглощающей способностью  $=a$ ,

$P_0$  и  $Q_0$  представляют собой мощность и скорость потока эталонной смеси с поглощающей способностью  $=a_0$ .

Согласно одному из вариантов реализации образец представляет собой выходящий поток из хроматографической колонки с белком А.

Согласно одному из вариантов реализации образец представляет собой выходящий поток после стадии глубинной фильтрации.

Согласно одному из вариантов реализации указанное антитело представляет собой моноклональное антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, рекомбинантное антитело, одноцепочечное антитело, IgD-антитело, IgE-антитело, IgM-антитело, IgG1-антитело, IgG2-антитело, IgG3-антитело или IgG4-антитело.

Согласно одному из вариантов реализации вирус включает один или более из дцДНК-вируса, оцДНК-вируса, дцРНК-вируса и оцРНК-вируса.

Согласно одному из вариантов реализации вирус включает вирус из одного или более из семейств вирусов adenoviridae, asfarviridae, herpesviridae, iridoviridae, papillomaviridae, polyomaviridae, poxviridae, circoviridae, hepadnaviridae, parvoviridae, birnaviridae, reoviridae, arenaviridae, bornaviridae, bunyaviridae, deltaviridae, filoviridae, orthomyxoviridae, paramyxoviridae, rhabdoviridae, arterioviridae, astroviridae, caliciviridae, coronaviridae, flaviviridae, гепатит Е-подобных вирусов, nodaviridae, picornaviridae, togaviridae и retroviridae.

Согласно одному из вариантов реализации указанный вирус представляет собой парвовирус MVM, ретровирус MuLV или буньявирус CVV.

Согласно одному из вариантов реализации указанное защитное средство добавляют в образец при отношении концентраций, составляющем более чем 1 часть защитного средства на 200 частей антитела.

Согласно одному из вариантов реализации целевая доза равна одной или более из: около 1 мДж/см<sup>2</sup>, около 10 мДж/см<sup>2</sup>, около 25 мДж/см<sup>2</sup>, около 50 мДж/см<sup>2</sup>, около 75 мДж/см<sup>2</sup>, около 100 мДж/см<sup>2</sup>, около 125 мДж/см<sup>2</sup>, около 200 мДж/см<sup>2</sup>, около 250 мДж/см<sup>2</sup>, около 300 мДж/см<sup>2</sup>, около 350 мДж/см<sup>2</sup>, около 400 мДж/см<sup>2</sup>, около 450 мДж/см<sup>2</sup>, около 500 мДж/см<sup>2</sup>, около 600 мДж/см<sup>2</sup>, около 700 мДж/см<sup>2</sup>, около 800 мДж/см<sup>2</sup>, около 900 мДж/см<sup>2</sup> и около 1000 мДж/см<sup>2</sup>.

Согласно одному из вариантов реализации образец содержит выходящий из хроматографической колонки поток, где выходящий поток содержит один или более из следующих потоков, содержащих терапевтическое антитело:

выходящий из колонки с белком А поток;

выходящий из колонки с белком G поток;

выходящий из колонки для гидрофобной хроматографии (ГХ) поток;

выходящий из колонки для эксклюзионной хроматографии (ЭХ) поток;

выходящий из колонки для ионообменной хроматографии (ИОХ) поток и

выходящий из гидроксипатитовой колонки поток.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой график изменений главного пика в процентах в трех разных образцах моноклонального антитела (Mab X, Mab Y, Mab Z) как функции от воздействия УФС, отслеживаемых при трех разных уровнях pH (pH 4,3; 5,0 и 7,0) с помощью эксклюзионной ВЭЖХ (ЭХ-ВЭЖХ); по оси y откладывают изменения значения в процентах относительно дозы 0 мДж, поступающей на поверхность раствора, а по оси x откладывают расчетную дозу, поступающую (мДж/см<sup>2</sup>) на поверхность раствора. Все образцы представляли собой профильтрованные вирус-инактивированные пулы (FVIP).

Фиг. 2 представляет собой график чистоты главного пика, кислотного пика и основного пика для двух разных образцов моноклонального антитела (Mab X, Mab Z) как функции от воздействия УФС, отслеживаемой при трех разных уровнях pH (pH 4,3, 5,0 и 7,0) с помощью анализа КОХ-ВЭЖХ; по оси y откладывают % распределения измеряемого вещества относительно дозы 0 мДж/см<sup>2</sup>, поступающей на поверхность раствора, а по оси x откладывают расчетную дозу (мДж/см<sup>2</sup>), поступающую на поверхность раствора. Все образцы представляли собой профильтрованные вирус-инактивированные пулы (FVIP).

Фиг. 3 представляет собой график изменений главного пика в % для трех разных образцов моноклонального антитела (Mab X, Mab Y, Mab Z) как функции от воздействия УФС, отслеживаемого при трех разных уровнях проводимости (низком (30мМ НОAc), стандартном (100 мМ НОAc) и высоком (300 мМ НОAc)) с помощью анализа ЭХ-ВЭЖХ; по оси y откладывают % изменения величины относительно дозы 0 мДж/см<sup>2</sup>, поступающей на поверхность раствора, а по оси x откладывают расчетную дозу (мДж/см<sup>2</sup>), поступающую на поверхность раствора.

Фиг. 4 представляет собой график чистоты главного пика, кислотного пика и основного пика двух разных образцов моноклонального антитела (Mab X, Mab Z) как функции от воздействия УФС, отслеживаемого при трех разных уровнях проводимости (низком (30мМ НОAc), стандартном (100 мМ НОAc) и высоком (300 мМ НОAc)) с помощью анализа КОХ-ВЭЖХ; по оси y откладывают распределение измеряемого вещества в % относительно дозы 0 мДж/см<sup>2</sup>, поступающей на поверхность раствора; по оси x

откладывают расчетную дозу ( $\text{мДж}/\text{см}^2$ ), поступающую на поверхность раствора. Все образцы представляли собой профильтрованные вирус-инактивированные пулы (FVIP).

На фиг. 5 представлен график концентрации главного пика моноклонального антитела (Mab X) как функции от воздействия УФС, отслеживаемой при трех разных концентрациях (низкой (6 г/л), стандартной (12 г/л), высокой (24 г/л)) с помощью анализа ЭХ-ВЭЖХ; по оси у откладывают % изменения величины относительно дозы 0  $\text{мДж}/\text{см}^2$ , поступающей на поверхность раствора, а по оси х откладывают расчетную полученную дозу ( $\text{мДж}/\text{см}^2$ ) с учетом поглощающей способности в отношении УФ-компонентов раствора.

На фиг. 6 представлен график чистоты и три контура главного пика для моноклонального антитела (Mab X) как функции от воздействия УФС по данным мониторинга с применением анализа ЭХ-ВЭЖХ. На графике представлены две пептидные карты Mab X: для анализа 1 с УФ-облучением и для анализа 2 с УФ-облучением. По оси у откладывают % изменения величины относительно дозы 0  $\text{мДж}/\text{см}^2$ , поступающей на поверхность раствора, а по оси х откладывают расчетную дозу ( $\text{мДж}/\text{см}^2$ ), поступающую на поверхность раствора.

Фиг. 7 представляет собой пептидную карту, демонстрирующую эффекты окисления, наблюдаемые на аминокислотных остатках моноклонального антитела (Mab X) после воздействия дозой УФС 10000  $\text{мДж}/\text{см}^2$ , поступающей на поверхность раствора. Окисление остатков метионина в положениях 425 и 249 наблюдалось при воздействии указанной экстремальной дозой УФС.

Фиг. 8 представляет собой таблицу обобщенных данных по чистоте и трендам активности для моноклонального антитела (Mab X) как функции от воздействия УФС в дозах 0, 150, 375 и/или 1000  $\text{мДж}/\text{см}^2$ . Результаты пептидного картирования свидетельствуют об окислении конкретных остатков метионина на белке, содержание которых возрастает по мере увеличения дозы. Mab X обозначен как "Контроль"; тирозин обозначен как "Добавка 1".

Фиг. 9 представляет собой график чистоты главного пика моноклонального антитела (Mab X) как функции от воздействия УФС в присутствии и в отсутствие защитного средства по данным мониторинга при помощи анализа ЭХ-ВЭЖХ; по оси у откладывают % от главного пика как показатель распределения измеряемого вещества; по оси х откладывают расчетную дозу, поступающую на поверхность раствора ( $\text{мДж}/\text{см}^2$ ). На графике представлены три пептидные карты Mab X: для анализа 1 с УФ-облучением и анализа 2 с УФ-облучением, для повторных анализов без обработки и для анализа с "Добавкой №2" при УФ-облучении и с защитой триптофаном.

Фиг. 10 представляет собой график инактивации  $\text{хтmLV}$  как функции от воздействия УФС в присутствии и в отсутствие защитного средства и моноклонального антитела (Mab Y). По оси у откладывают относительное логарифмическое снижение относительно заданной известной вирусной нагрузки (значение логарифмического снижения (LRV)). По оси х откладывают расчетную полученную дозу с учетом поглощающей способности компонентов раствора в отношении УФ ( $\text{мДж}/\text{см}^2$ ). Концентрация белка в образце "Контроль" (Mab Y) составляет 2 и 30 г/л, концентрация белка в образце "Добавка 1" (Mab Y+тирозин) составляет 2 и 30 г/л.

На фиг. 11а и 11б представлены таблицы доз УФС, необходимых для инактивации ДНК-вирусов (фиг. 11а) и РНК-вирусов (фиг. 11б).

На фиг. 12 представлена таблица, где приведены спрогнозированные значения логарифмического снижения (LRV) в зависимости от дозы УФ, необходимой для инактивации различных вирусов.

Фиг. 13 представляет собой схематическое изображение нескольких источников УФС, работающих параллельно для обеспечения обработки больших объемов стабилизированного образца.

Фиг. 14 представляет собой график чистоты главного пика моноклонального антитела (Mab X) как функции от воздействия УФС в присутствии различных защитных средств, включая тирозин (TYR), триптофан (TRP), фенилаланин (PHE), фолиевую кислоту, метионин (MET) и гистидин (HIS) по данным мониторинга при помощи анализа ЭХ-ВЭЖХ; по оси у откладывают % от главного пика как показатель распределения измеряемого вещества; по оси х откладывают расчетную дозу, поступающую на поверхность раствора. Молярное отношение аминокислоты к Mab X составляет 20:1. Также представлен контроль Mab X.

Фиг. 15 представляет собой график чистоты главного пика моноклонального антитела (Mab X) как функции от воздействия УФС в присутствии различных защитных средств, включая тирозин (TYR), триптофан (TRP), фенилаланин (PHE), фолиевую кислоту, метионин (MET) и гистидин (HIS) по данным мониторинга при помощи анализа ЭХ-ВЭЖХ, и представлен в виде изменения исходной чистоты в процентах; по оси у откладывают нормализованное процентное изменение чистоты главного пика; по оси х откладывают расчетную дозу, поступающую на поверхность раствора. Молярное отношение аминокислоты к Mab X составляет 20:1. Также представлен контроль Mab X.

#### **Подробное описание изобретения**

В описанном в настоящей заявке изобретении предложены способы обработки растворов, содержащих белки, излучением, соответствующим С-участку спектра УФ-диапазона (УФС, примерно 254 нм). В частности, в описанном в настоящей заявке изобретении предложен способ обработки растворов, содержащих белки, излучением, соответствующим С-участку спектра УФ-диапазона (УФС, примерно 254

нм) в присутствии химических веществ, стабилизирующих указанный белок или минимизирующих модификацию белков, например, окисление остатков, таких как остатки метионина и триптофана.

Предложенные в настоящей заявке способы вирусной инактивации ориентированы на достижение точного баланса, при котором повреждения, модификации или ухудшение качества белка минимизированы, и в то же время максимально использована возможность инактивации вирусных и связанных с вирусами частиц. В настоящей заявке предложены различные добавки для растворов, способные обеспечить защиту белков в растворе от не прямой модификации веществами, образующимися при обработке раствора излучением в УФС-диапазоне. Были собраны данные для ряда полипептидных молекул, в частности антигенсвязывающих белков (например, молекулы моноклональных антител), для определения эффектов УФС на модификацию белков. Установлена связь между уровнем дозы (мДж переданного УФС/см<sup>2</sup>) и уровнем модификации белков согласно оценке с помощью ЭХ-ВЭЖХ (для анализа агрегации и димеризации), КОХ-ВЭЖХ (для анализа изменений заряда), пептидного картирования (для анализа молекулярной модификации, окисления и других эффектов) и биологической активности (для анализа молекулярной эффективности).

Соответственно согласно одному из аспектов настоящее изобретение относится к способу инактивации вируса в образце, содержащем белковый компонент. Указанный способ включает применение УФ-излучения для инактивации вируса. Один из благоприятных аспектов описываемого способа заключается в том, что он задействует защитное средство, способное минимизировать возможность разложения или модификации белкового компонента образца. Указанный способ может включать компонент обратной связи, в котором образец, содержащий защитное средство, подвергается мониторингу для подтверждения того, что указанный образец получает дозу УФ-излучения, достаточную для инактивации вируса, наряду с минимизацией воздействия на белковый компонент доз УФ-излучения, способных повредить белок. Указанный способ позволяет эффективно уничтожать вирусы в образце, в то же самое время минимизируя разложение белка, и может быть полезен при работе в больших масштабах, в отношении как объема образцов, так и параллельности процедур, в частности постольку, поскольку данный способ позволяет масштабирование от лабораторного масштаба, включающего культуры объемом порядка нескольких литров, до производственных масштабов, включающих культуры, объем которых составляет тысячи литров.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу уменьшения разложения или модификации белка в присутствии реакционноспособных веществ, таких как реакционноспособные вещества, которые могут образовываться при воздействии на раствор УФ-излучения. Было отмечено, что белки могут разрушаться или подвергаться модификациям в результате продолжительного воздействия УФ-излучения. Благодаря включению защитного средства в образец, содержащий белковый компонент, повреждение белка может быть уменьшено или полностью устранено. Указанный способ может включать компонент обратной связи, где образец, содержащий защитное средство, подвергается мониторингу для подтверждения того, что указанный образец получает дозу УФ-излучения, достаточную для инактивации вируса, наряду с минимизацией воздействия на белковый компонент доз УФ-излучения, способных повредить белок. Указанный способ позволяет эффективно защитить белковый компонент образца от разложения или модификации белка и может быть полезен при работе в больших масштабах в отношении как объема образцов, так и параллельности процедур, в частности постольку, поскольку данный способ позволяет масштабирование от лабораторного масштаба, включающего культуры объемом порядка нескольких литров, до производственных масштабов, включающих культуры, объем которых составляет тысячи литров.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение относится к способу уменьшения окисления остатков метионина, остатков триптофана, либо и остатков метионина, и остатков триптофана в белке, подвергаемом воздействию УФ-излучения. Было отмечено, что триптофан и метионин могут окисляться в результате продолжительного воздействия УФ-излучения. За счет включения защитного средства в образец, содержащий белковый компонент, такое окисление может быть уменьшено или полностью устранено. Указанный способ может включать компонент обратной связи, в котором образец, содержащий защитное средство, подвергается мониторингу для подтверждения того, что указанный образец получает дозу УФ-излучения, достаточную для инактивации вируса, наряду с минимизацией воздействия на белковый компонент доз УФ-излучения, способных повредить белок. Указанный способ позволяет эффективно защитить белковый компонент образца от разложения или модификации белка и может быть полезен при работе в больших масштабах в отношении как объема образцов, так и параллельности процедур, в частности постольку, поскольку данный способ позволяет масштабирование от лабораторного масштаба, включающего культуры объемом порядка нескольких литров, до производственных масштабов, включающих культуры, объем которых составляет тысячи литров.

Одно из преимуществ описываемых способов заключается в том, что они могут быть реализованы в различных масштабах, от лабораторного масштаба (как правило, масштаб исчисляется миллилитрами или литрами), масштаба пилотной установки (как правило, сотни литров) или в промышленных масштабах (как правило, тысячи литров). Кроме того, указанный способ также может быть реализован многократно, параллельно или последовательно. Соответственно указанный способ легко может быть автома-

тизирован. Применение описываемых способов в больших масштабах может быть целесообразным, в частности, в процессе производства биомолекул.

#### 1. Определения.

Используемые в настоящей заявке в единственном числе термины означают "один или более", если специально не указано иное.

Используемый в настоящей заявке термин "антиген" относится к молекуле или части молекулы, способной к связыванию с селективным связывающим агентом, таким как антигенсвязывающий белок (включая, например, антитело или его иммунологически функциональный фрагмент), и может также подходить для применения в организме животного для получения антител, способных связывать указанный антиген. Антиген может содержать один или более эпитопов, способных взаимодействовать с разными антигенсвязывающими белками, например антителами.

Используемый в настоящей заявке термин "антигенсвязывающий белок" относится к белку, содержащему часть, которая связывается с антигеном или мишенью, и необязательно скаффолд, или каркасную часть, позволяющую указанному антигенсвязывающему участку принимать конформацию, способствующую связыванию указанного антигенсвязывающего белка с антигеном. Примеры антигенсвязывающих белков включают моноклональное антитело; антитело человека; гуманизированное антитело; химерное антитело; рекомбинантное антитело; одноцепочечное антитело; диатело; триатело; тетратело; доменное антитело; Fab-фрагмент; F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент; IgD-антитело; IgE-антитело; IgM-антитело; IgG1-антитело; IgG2-антитело; IgG3-антитело или IgG4-антитело и их фрагменты. Антигенсвязывающий белок может содержать, например, альтернативный вариант белкового скаффолда или искусственный скаффолд с привитыми областями CDR или производными областей CDR. Такие скаффолды включают, не ограничиваясь перечисленными, полученные из антител скаффолды, содержащие модификации, введенные, например, с целью стабилизации трехмерной структуры антигенсвязывающего белка, а также полностью синтетические скаффолды, содержащие, например, биосовместимый полимер (см., например, Korndorfer et al., (2003) *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 53(1): 121-129; Roque et al., (2004) *Biotechnol. Prog.* 20:639-654). Кроме того, скаффолд может быть образован пептидными миметиками антител ("РАМ"); также скаффолды могут быть основаны на миметиках антител с фибронектиновыми компонентами.

Антигенсвязывающий белок может обладать, например, структурой встречающегося в природе иммуноглобулина. "Имуноглобулин" представляет собой тетрамерную молекулу. Во встречающемся в природе иммуноглобулине каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара содержит одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепи (приблизительно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает вариабельную область длиной приблизительно 100-110 или более аминокислот, несущую основную ответственность за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, несущую основную ответственность за эффекторную функцию. Легкие цепи человека подразделяют на легкие цепи каппа и ламбда. Тяжелые цепи подразделяются на мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон, и определяют изотип антитела IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. Вариабельные и константные области в составе легких и тяжелых цепей соединяет "J"-область, состоящая приблизительно из 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также включает "D"-область, состоящую из приблизительно 10 дополнительных аминокислот (см., в целом, источник *Fundamental Immunology* 2<sup>nd</sup> ed. Ch. 7 (Paul, W., ed., Raven Press, N.Y. (1989)), включенный в данный документ посредством ссылки полностью и для любых целей. Вариабельные области каждой пары легкой/тяжелой цепей образуют сайт связывания антитела, так что интактный иммуноглобулин содержит два сайта связывания.

У встречающихся в природе цепей иммуноглобулина обнаруживается та же общая структура с относительно консервативными каркасными областями (FR), соединенными тремя гипервариабельными областями, также называемыми определяющими комплементарность областями, или CDR. От N-конца в направлении С-конца обе цепи, легкая и тяжелая, содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Нумерация аминокислот в каждом из доменов может осуществляться в соответствии с определениями Kabat et al., (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5<sup>th</sup> Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242. Хотя раскрываемые в настоящей заявке CDR описаны с применением номенклатуры по Kabat, по желанию, они могут также быть переопределены в соответствии с альтернативной номенклатурной схемой, например, Chothia (см. Chothia & Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia et al., (1989) *Nature* 342:878-883 или Honegger & Pluckthun, (2001) *J. Mol. Biol.* 309:657-670).

Используемый в настоящей заявке термин "антитело" относится к интактному иммуноглобулину или его антигенсвязывающему участку, конкурирующему с интактным антителом за специфическое связывание, если не оговорено иное. Антигенсвязывающие участки могут быть получены с помощью техник рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных антител. Антигенсвязывающие участки включают, в том числе, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, доменные антитела (dAb), фрагменты, включающие определяющие комплементарность области (CDR), одноцепочечные антитела (scFv), химерные антитела, диатела, триатела, тетратела и полипептиды, которые содержат по

меньшей мере часть иммуноглобулина, достаточную для придания специфической антигенсвязывающей способности указанному полипептиду.

Fab-фрагмент представляет собой моновалентный фрагмент, содержащий домены  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  и  $C_{H1}$ ;  $F(ab')_2$ -фрагмент представляет собой бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, соединенные дисульфидным мостиком в шарнирной области; Fd-фрагмент содержит  $V_H$  и  $C_{H1}$  домены; Fv-фрагмент содержит  $V_L$  и  $V_H$  домены антитела с одним плечом; и dAb-фрагмент содержит  $V_H$  домен,  $V_L$  домен или антигенсвязывающий фрагмент домена  $V_H$  или домена  $V_L$  (патенты США №№ 6846634 и 6696245; опубликованные заявки на патент США №№ 05/0202512, 04/0202995, 04/0038291, 04/0009507, 03/0039958, Ward et al., Nature 341:544-546 (1989)).

Одноцепочечное антитело (scFv) представляет собой антитело, в котором области  $V_L$  и  $V_H$  соединены линкером (например, синтетической последовательностью аминокислотных остатков) с получением непрерывной белковой цепи, при этом длина линкера достаточна, чтобы позволять указанной белковой цепи сворачиваться и образовывать моновалентный сайт связывания антигена (см., например, Bird et al., (1988) Science 242:423-26 и Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83). Диатела представляют собой бивалентные антитела, содержащие две полипептидных цепи, при этом каждая полипептидная цепь содержит домены  $V_H$  и  $V_L$ , соединенные линкером, слишком коротким, чтобы обеспечить образование пар между двумя доменами одной и той же цепи, таким образом обеспечивая образование пар каждого домена с комплементарным доменом другой полипептидной цепи (см., например, Holliger et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48 и Poljak et al., (1994) Structure 2:1121-23). Если две полипептидные цепи диатела идентичны, образующееся при образовании из них пар диатело содержит два идентичных антигенсвязывающих сайта. Для получения диатела с двумя разными антигенсвязывающими сайтами могут быть использованы полипептидные цепи, имеющие разные последовательности. Аналогичным образом, триатела и тетраатела представляют собой антитела, содержащие три и четыре полипептидных цепи соответственно, образующих три и четыре антигенсвязывающих сайта соответственно, которые могут быть одинаковыми или разными.

Определяющие комплементарность области (CDR) и каркасные области (FR) конкретного антитела могут быть определены с применением системы, описанной в источнике: Kabat et al. (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5<sup>th</sup> Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242. Хотя раскрываемые в настоящей заявке CDR описаны с использованием номенклатуры по Kabat, по желанию, они могут также быть переопределены в соответствии с альтернативной номенклатурной схемой, например, по Chothia (см. Chothia & Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., (1989) Nature 342:878-883 или Honegger & Pluckthun, (2001) J. Mol. Biol. 309:657-670). Одна или более областей CDR могут быть включены в молекулу путем ковалентного или нековалентного связывания с получением антигенсвязывающего белка. Антигенсвязывающий белок может включать область(и) CDR в качестве части большей полипептидной цепи, может ковалентно связывать указанную(ые) CDR с другой полипептидной цепью или может включать указанную(ые) CDR за счет нековалентной связи. Области CDR позволяют антигенсвязывающему белку специфически связываться с конкретным представляющим интерес антигеном.

Антигенсвязывающий белок может содержать один или более сайтов связывания. При наличии более чем одного сайта связывания указанные сайты связывания могут быть идентичными или разными. Например, встречающийся в природе иммуноглобулин человека, как правило, содержит два идентичных сайта связывания, тогда как "биспецифическое" или "бифункциональное" антитело содержит два разных сайта связывания. Антигенсвязывающие белки указанной биспецифической формы включают аспекты настоящего изобретения.

Используемый в настоящей заявке термин "антитело человека" относится ко всем антителам, содержащим одну или более переменных и константных областей, полученных из последовательностей иммуноглобулина человека. Согласно одному из вариантов реализации все переменные и константные домены получают из последовательностей иммуноглобулина человека (полностью принадлежащее человеку антитело). Указанные антитела могут быть получены разнообразными способами, примеры которых приведены ниже, в том числе с помощью иммунизации представляющим интерес антигеном мыши, генетически модифицированной для экспрессирования антител, полученных из генов, кодирующих тяжелые и/или легкие цепи человека; например мыши, полученной с помощью системы Xenomouse®, UltiMab™, HuMab-Mouse®, Velocimouse®, Velocimmune®, KyMouse или AlivaMab; или могут быть получены из несущей трансген тяжелой цепи человека мыши, из спектра антител человека трансгенной крысы, спектра антител человека трансгенного кролика или репертуара антител человека от коровы; или они могут быть получены с применением технологии HuTarg™. Могут также применяться методики, основанные на применении фагов.

Гуманизированное антитело имеет последовательность, отличающуюся от последовательности антитела, полученного от отличного от человека вида одной или более заменами, удалениями и/или добавлениями аминокислот(ы) таким образом, что такое гуманизированное антитело с меньшей вероятностью индуцирует иммунный ответ и/или индуцирует менее тяжелый иммунный ответ по сравнению с антите-

лом отличного от человека вида при введении субъекту-человеку. Согласно одному из вариантов реализации определенные аминокислоты в каркасных и константных доменах тяжелой и/или легкой цепей антитела отличного от человека вида изменены для получения гуманизированного антитела. Согласно другому варианту реализации константный(ые) домен(ы) антитела человека слит с переменным(и) доменом(ами) отличного от человека вида. Согласно другому варианту реализации один или более аминокислотных остатков одной или более последовательностей CDR не принадлежащего человеку антитела изменены для снижения вероятности иммуногенности указанного не принадлежащего человеку антитела при введении субъекту-человеку, при этом указанные измененные аминокислотные остатки либо не являются критически важными для иммуноспецифического связывания указанного антитела с антигеном, либо произведенные изменения аминокислотной последовательности являются консервативными, так что связывание указанного гуманизированного антитела с антигеном существенно не ухудшается по сравнению со связыванием не принадлежащего человеку антитела с антигеном. Примеры способов получения гуманизированных антител приведены в патентах США №№ 6054297, 5886152 и 5877293.

Используемый в настоящей заявке термин "химерное антитело" относится к антителу, содержащему одну или более областей одного антитела и одну или более областей одного или более других антител. Согласно одному из вариантов реализации одну или более из областей CDR получают из антитела человека, связывающегося с выбранной мишенью. Согласно другому варианту реализации все области CDR получают из антитела человека, связывающегося с выбранной мишенью. Согласно другому варианту реализации области CDR из более чем одного антитела человека, связывающегося с выбранной мишенью, смешивают и помещают в химерное антитело. Например, химерное антитело может содержать CDR1 легкой цепи первого антитела человека, связывающегося с выбранной мишенью, CDR2 и CDR3 легкой цепи второго антитела человека, связывающегося с выбранной мишенью, и области CDR тяжелой цепи третьего антитела, связывающегося с выбранной мишенью. Далее каркасные области могут быть получены из одного из антител, которые связываются с выбранной мишенью; из одного или более других антител, например антител человека или гуманизированных антител. Согласно одному из примеров химерного антитела часть тяжелой и/или легкой цепи идентична, гомологична или получена из антитела конкретного вида либо принадлежащего к конкретному классу или подклассу антител, тогда как оставшая часть цепи(ей) идентична, гомологична или получена из антитела или антител другого вида, либо принадлежащего(их) к другому классу или подклассу антител. Также включены фрагменты таких антител, проявляющие требуемую биологическую активность (например, способные специфически связываться с выбранной мишенью).

Используемые в настоящей заявке термины "Fc" и "Fc-область" используются взаимозаменяемо и относятся к фрагменту антитела, который содержит домены C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub> иммуноглобулина человека или не человека (например, мыши) или содержит две непрерывные области, по меньшей мере на 90% идентичные доменам C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub> иммуноглобулина человека или не человека. Указанные два фрагмента тяжелой цепи удерживают вместе две или более дисульфидных связей и гидрофобных взаимодействий C<sub>H3</sub>-доменов. Fc может, но не обязательно должен обладать способностью к взаимодействию с рецептором Fc (см., например, Hasemann & Capra, "Immunoglobulins: Structure and Function", в источнике: William E. Paul, ed., Fundamental Immunology, Second Edition, 209, 210-218 (1989), полностью включенном в настоящую заявку посредством ссылки).

В настоящей заявке термины "Fc-гибрид" и "гибридный белок с Fc-фрагментом" используются взаимозаменяемо и относятся к пептиду или полипептиду, ковалентно связанному с Fc-доменом.

Используемые в настоящей заявке термины "белок" и "полипептид" используются взаимозаменяемо и означают любую цепь, составленную по меньшей мере пятью встречающимися в природе или не встречающимися в природе аминокислотами, соединенными пептидной связью.

Используемый в настоящей заявке термин "пептитело" относится к полипептиду, содержащему один или более биоактивных пептидов, соединенных, необязательно, посредством линкеров с Fc-доменом. Примеры пептител см. в патенте США № 6660843, патенте США № 7138370 и патенте США № 7511012.

Используемый в настоящей заявке термин "Fab'-фрагмент" относится к а структуре, содержащей одну легкую цепь и часть одной тяжелой цепи, которая включает домен VH и домен C<sub>H1</sub>, а также область между доменами C<sub>H1</sub> и C<sub>H2</sub>, так что между двумя тяжелыми цепями двух Fab'-фрагментов может быть образована межцепочечная дисульфидная связь с получением F(ab')<sub>2</sub>-молекулы.

Используемый в настоящей заявке термин "F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент" относится к структуре, содержащей две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области между доменами C<sub>H1</sub> и C<sub>H2</sub>, так что между двумя тяжелыми цепями образуется межцепочечная дисульфидная связь. Таким образом, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент состоит из двух Fab'-фрагментов, которые удерживаются вместе дисульфидной связью между двумя тяжелыми цепями.

Используемый в настоящей заявке термин "Fv-область" относится к структуре, содержащей переменные области как тяжелой, так и легкой цепей, но не содержащей константных областей.

Используемый в настоящей заявке термин "доменное антитело" относится к иммунологически функциональному фрагменту иммуноглобулина, содержащему только переменную область тяжелой



цепи или вариабельную область легкой цепи. В некоторых случаях две или более  $V_H$ -областей ковалентно связаны пептидным линкером с получением бивалентного доменного антитела. Мишенями указанных двух  $V_H$ -областей бивалентного доменного антитела может быть один и тот же антиген или разные антигены.

Используемый в настоящей заявке термин "хемитело" относится к иммунологически функциональной иммуноглобулиновой конструкции, содержащей полную тяжелую цепь, полную легкую цепь и  $F_c$ -область второй тяжелой цепи, спаренную с  $F_c$ -областью полной тяжелой цепи. Для соединения  $F_c$ -области тяжелой цепи и  $F_c$ -области второй тяжелой цепи может, но не обязательно должен быть использован линкер. Согласно конкретным вариантам реализации хемитело представляет собой моновалентную форму описанного в настоящей заявке антигенсвязывающего белка. Согласно другим вариантам реализации пары заряженных остатков могут применяться для связывания одной  $F_c$ -области с второй  $F_c$ -областью.

Используемые в настоящей заявке термины "бивалентный антигенсвязывающий белок" или "бивалентное антитело" относятся к антигенсвязывающему белку или антителу, содержащему два антигенсвязывающих сайта. В некоторых случаях указанные два сайта связывания обладают идентичной антигенной специфичностью. Бивалентные антигенсвязывающие белки и бивалентные антитела могут быть биспецифическими согласно приведенному в настоящей заявке описанию и представлять собой аспекты настоящего изобретения.

В настоящей заявке термины "мультиспецифический антигенсвязывающий белок" или "мультиспецифическое антитело" при использовании в контексте белкового компонента относятся к такому компоненту, имеющему более чем один целевой антиген или эпитоп и образующему дополнительный аспект настоящего изобретения.

Используемые в настоящей заявке термины "биспецифический", "с двойной специфичностью" или "бифункциональный" при использовании в контексте антигенсвязывающего белка или белкового компонента антитела означают гибридный антигенсвязывающий белок или антитело соответственно, содержащее два разных антигенсвязывающих участка. Биспецифические антигенсвязывающие белки и антитела представляют собой формы мультиспецифического антигенсвязывающего белка или мультиспецифического антитела и могут быть получены различными способами, включая, но не ограничиваясь перечисленными, слияние гибридом или соединение  $Fab'$ -фрагментов (см., например, Songsivilai и Lachmann, (1990) Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny et al., (1992) J. Immunol. 148:1547-1553). Два сайта связывания биспецифического антигенсвязывающего белка или антитела связываются с двумя разными эпитопами, которые могут располагаться на одном или на разных белках-мишенях.

Используемый в настоящей заявке термин "белок А" означает любой белок, идентичный или, по существу, аналогичный белку А стафилококка, включая коммерчески доступные и/или рекомбинантные формы белка А. Для целей настоящего изобретения белок А включает, в частности, среды на основе рекомбинантного белка А, например среды Mab Select SuRe™ (GE Healthcare), в котором одна субъединица (например, субъединица В) реплицирована два или более раз и соединена в непрерывную последовательность с получением молекулы рекомбинантного белка А, и другие не встречающиеся в природе молекулы белка А.

Используемый в настоящей заявке термин "белок G" означает любой белок, идентичный или, по существу, аналогичный белку стрептококка G, включая коммерчески доступные и/или рекомбинантные формы белка G. Белки А и G часто применяются для очистки антигенсвязывающих белков (например, антитела, пептитела и другие гибридные белки, содержащие  $F_c$ -область) с помощью аффинной хроматографии (см., например, Vola et al. (1994), Cell Biophys. 24-25: 27-36; Aybay и Imir (2000), J. Immunol. Methods 233(1-2): 77-81; Ford et al. (2001), J. Chromatogr. B 754: 427-435). Белки А и G подходят для этой цели, так как они связываются с  $F_c$ -областью указанных типов белков. Рекомбинантные гибридные белки, содержащие  $F_c$ -область IgG-антитела, могут быть очищены с применением аналогичных способов. Белки А и G могут применяться в описываемых способах в качестве адсорбирующего компонента разделительной матрицы.

Используемые в настоящей заявке термины "выделять" и "очищать" используются взаимозаменяемо и означают снижение на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 и 99% или более количества гетерогенных элементов, например биологических макромолекул, таких как белки или ДНК, которые могут присутствовать в образце, содержащем представляющий интерес белок. Присутствие гетерогенных белков может быть определено с помощью любого подходящего способа анализа, включая высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), гель-электрофорез и окрашивание и/или ИФА-анализ ELISA. Анализ на присутствие ДНК и других нуклеиновых кислот может быть выполнен любым подходящим способом, в том числе с применением гель-электрофореза и окрашивания и/или с применением полимеразной цепной реакции.

Используемые в настоящей заявке термины "защитное средство" и "добавка" используются взаимозаменяемо и означают соединение, способное ограничивать или модулировать степень модификации белков в ответ на дозу УФС. Неограничивающий перечень защитных средств, подходящих для применения в описываемых способах, включает что-либо одно или более из тирозина, триптофана, метионина,

пиридоксина и рибофлавина. Термин "защитное средство" охватывает отдельные соединения, а также комбинации соединений, таких как тирозин и триптофан, которые могут присутствовать в любом соотношении друг относительно друга. Согласно приведенному в настоящей заявке описанию тирозин вносит наименьший вклад в общее поглощение УФ.

Используемый в настоящей заявке термин "доза УФ-излучения" означает количество энергии, поступившей в мишень в форме УФ-излучения. Доза УФ-излучения, поступившая в мишень, представляет собой функцию от интенсивности и времени воздействия. Неограничивающий перечень примеров "дозы УФ-излучения" включает приблизительно 1 мДж/см<sup>2</sup>, приблизительно 10 мДж/см<sup>2</sup>, приблизительно 25 мДж/см<sup>2</sup>, приблизительно 50 мДж/см<sup>2</sup>, приблизительно 75 мДж/см<sup>2</sup>, приблизительно 100 мДж/см<sup>2</sup>, приблизительно 125 мДж/см<sup>2</sup>, приблизительно 200 мДж/см<sup>2</sup>, приблизительно 250 мДж/см<sup>2</sup>, приблизительно 300 мДж/см<sup>2</sup>, приблизительно 350 мДж/см<sup>2</sup>, приблизительно 400 мДж/см<sup>2</sup>, приблизительно 450 мДж/см<sup>2</sup>, приблизительно 500 мДж/см<sup>2</sup>, приблизительно 600 мДж/см<sup>2</sup>, приблизительно 700 мДж/см<sup>2</sup>, приблизительно 800 мДж/см<sup>2</sup>, приблизительно 900 мДж/см<sup>2</sup>, приблизительно 1000 мДж/см<sup>2</sup> и более чем приблизительно 1000 мДж/см<sup>2</sup>.

Используемый в настоящей заявке термин "УФ-излучение" означает область светового спектра, включающую длины волн в диапазоне по меньшей мере от 10 и максимум до 400 нм. К примеру, термин "УФ-излучение" охватывает свет, имеющий длину волны в диапазоне от приблизительно 200 до приблизительно 280 нм, включая длину волны, составляющую приблизительно 254 нм. Согласно способам, предложенным в настоящей заявке, УФ-излучение может поступать в виде однородного коллимированного и фильтрованного света; соответственно термином "УФ-излучение" охвачен как однородное коллимированное, так и неколлимированное УФ-излучение, а также фильтрованное УФ-излучение и нефильтованное УФ-излучение.

Используемый в настоящей заявке термин "образец, содержащий белковый компонент" означает аликвоту жидкости, содержащую, по меньшей мере, водный компонент и белковый компонент. Согласно различным вариантам реализации указанный водный компонент может содержать буфер. Указанный белковый компонент может содержать любые вещества, содержащие две или более аминокислот, соединенных пептидной связью. Белковый компонент может содержать все или некоторые из 20 встречающихся в природе аминокислот или не содержать ни одной, а остальная часть белкового компонента может содержать любую не встречающуюся в природе аминокислоту. Соответственно предложенные в настоящей заявке способы могут быть реализованы в отношении образца, содержащего белок, содержащий одну или более встречающихся в природе аминокислот или одну или более не встречающихся в природе аминокислот. Согласно различным вариантам реализации белок в образце, содержащем белковый компонент, представляет собой антигенсвязывающий белок, содержащий что-либо одно или более из моноклонального антитела, антитела человека, гуманизированного антитела, химерного антитела, рекомбинантного антитела, одноцепочечного антитела, диатела, триатела, тетратела, Fab-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, IgD-антитела, IgE-антитела, IgM-антитела, IgG1-антитела, IgG2-антитела, IgG3-антитела или IgG4-антитела и их фрагментов, Fc-домена; пептида; гибридного белка с Fc-фрагментом и терапевтического белка.

Используемый в настоящей заявке термин "реакционноспособные вещества" означает любой компонент раствора, который способен или может вступать в реакцию с другим компонентом, приводя к модификации или окислению вступившего в реакцию компонента. Неограничивающий перечень примеров "реакционноспособных веществ" включает ионы кислорода (например, O<sup>2-</sup>), ионы гидроксидов (например, OH<sup>-</sup>) и пероксиды (например, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Используемый в настоящей заявке термин "водное число" представляет собой значение, рассчитанное по следующему уравнению: водное число =  $\frac{1 - 10^{-at}}{at \ln(10)}$ , где a - поглощающая способность раствора и l - длина пути в метрах.

## II. Способ инактивации вируса в образце.

Вирусная инактивация представляет собой важнейший этап при получении белковых растворов для терапевтического применения. Более того, различными контролирующими органами установлены стандарты вирусной инактивации, и многие производители предпринимали попытки решения этой проблемы. Технологии вирусной инактивации развивались по нескольким направлениям, включая технологию фильтрации, технологию кратковременной высокотемпературной обработки (HTST) и УФС. Хотя каждая из указанных технологий имеет свои сильные стороны, у каждой из них имеются также и недостатки. В случае УФС было отмечено, что длительное воздействие на белки УФС-излучением, представляющее собой эффективный и результативный способ инактивации вирусов, может, тем не менее, приводить к разложению и/или окислению белка. Соответственно, хотя технология УФС представляет собой эффективный метод инактивации вирусов, воздействие на содержащий белок образец высокими дозами УФС-излучения может приводить к нежелательным эффектам на собственно белок. Соответственно согласно одному из аспектов описываемого изобретения предложен способ, позволяющий применять высокие дозы УФС, необходимые для инактивации вируса в образце, содержащем белковый компонент, наряду с

уменьшением или полным устранением возможности повреждения собственно белка. Соответственно предложен способ инактивации вируса в образце, содержащем белковый компонент. Согласно одному из вариантов реализации указанный способ может быть реализован следующим образом.

Сначала получают образец, содержащий белковый компонент; при этом известно, либо предполагается, что указанный образец содержит вирус. Указанный образец, содержащий белковый компонент, может иметь любой состав с той оговоркой, что указанный образец содержит белок. Например, указанный образец может содержать элюент из хроматографической колонки, собранный в пул. Согласно данному варианту реализации полученный на хроматографической колонке пул может быть собран в ходе любой хроматографической манипуляции. Примеры полученных на хроматографической колонке пулов включают полученный на колонке с белком А пул элюента, содержащий белковый компонент, полученный на колонке с белком G пул элюента, содержащий белковый компонент, полученный на колонке для гидрофобной хроматографии (ГХ) пул, содержащий белковый компонент, полученный на колонке для эксклюзионной хроматографии (ЭХ) пул, содержащий белковый компонент, полученный на колонке для ионообменной хроматографии (ИОХ) пул, содержащий белковый компонент, и полученный на гидроксиапатитовой колонке пул, содержащий белковый компонент.

Образец, содержащий белковый компонент, также может содержать выходящий из хроматографической колонки элюент. Например, указанный выходящий элюент может быть получен на выходе из хроматографической колонки; соответственно указанный способ может быть реализован *in situ* и в реальном времени. Примеры хроматографических элюентов включают выходящий из колонки с белком А поток, содержащий белковый компонент, выходящий из колонки с белком G поток, содержащий белковый компонент, выходящий из колонки для гидрофобной хроматографии (ГХ) поток, содержащий белковый компонент, выходящий из колонки для эксклюзионной хроматографии (SEC) поток, содержащий белковый компонент, выходящий из колонки для ионообменной хроматографии (ИОХ) поток, содержащий белковый компонент, и выходящий из гидроксиапатитовой колонки поток, содержащий белковый компонент.

Хотя описанный способ может применяться для образца, содержащего белковый компонент любого типа, описываемый способ может, в частности, иметь преимущества в контексте терапевтического средства на основе белка, представляющем собой область, где приняты стандарты вирусной инактивации. Соответственно согласно одному из примеров образец, содержащий белковый компонент, представляет собой образец, содержащий фармацевтическую молекулу на основе белка. Согласно конкретным вариантам реализации белковый компонент образца согласно описываемому способу содержит антигенсвязывающий белок (например, что-либо одно или более из (i) антигенсвязывающего белка, содержащего что-либо одно или более из моноклонального антитела, антитела человека, гуманизированного антитела, химерного антитела, рекомбинантного антитела, одноцепочечного антитела, диатела, триатела, тетратела, Fab-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, IgD-антитела, IgE-антитела, IgM-антитела, IgG1-антитела, IgG2-антитела, IgG3-антитела или IgG4-антитела и их фрагментов, (ii) Fc-домена; (iii) пептида; (iv) гибридного белка с Fc-фрагментом и (v) терапевтического белка), Fc-домен, пептид и терапевтический белок. Указанные типы молекул являются распространенными атрибутами терапевтических молекул. Что касается антигенсвязывающих белков-антител, в настоящем описании термин "антитело" подразумевает полностью принадлежащие человеку (полностью человеческие) антитела, гуманизированные антитела или полностью не принадлежащие человеку антитела (например, антитела мыши), и описываемый способ может быть применен ко всем указанным типам молекул.

Согласно различным вариантам реализации описываемого способа образец, подвергаемый обработке с применением описываемых способов, может представлять собой образец, содержащий клетки, в которых требуется инактивировать вирус. Примеры таких образцов включают образец, содержащий тромбоциты, клетки СНО или бактериальные клетки, такие как *E. coli*, в которых требуется инактивировать вирусы. Такой образец может содержать культуры клеток. Согласно указанным вариантам реализации указанный способ может быть реализован в соответствии с приведенным описанием с заменой образца, содержащего клетки, на образец, содержащий белковый компонент.

Вирусной инактивации УФС чаще всего подвергают образцы, содержащие белковый компонент, или образец, содержащий такие клетки, как тромбоциты, хотя это не является обязательным требованием; согласно другим вариантам реализации описываемые способы могут также применяться для удаления вируса из образца, который не содержит белкового компонента.

Согласно одному из аспектов описываемые способы направлены на инактивацию вирусов, которые могут быть непреднамеренно привнесены в образцы, содержащие белковый компонент. Возможные источники непреднамеренного привнесения вирусов в процесс получения белков включают загрязненные сырьевые материалы или контакт с производственным персоналом. Одним из преимуществ описываемых способов является то, что они подходят для вирусов любого типа, и независимо от того, имеет ли указанный вирус оболочку или не имеет оболочки. Таким образом, указанный способ может применяться для двуцепочечных ДНК-вирусов, одноцепочечных ДНК-вирусов, двуцепочечных РНК-вирусов и одноцепочечных РНК-вирусов. Примеры семейств вирусов, по умолчанию включающих всех представителей указанного семейства, которые могут быть инактивированы с применением описываемых способов,

включают adenoviridae, asfarviridae, herpesviridae, iridoviridae, papillomaviridae, polyomaviridae, poxviridae, circoviridae, hepadnaviridae, parvoviridae, birnaviridae, reoviridae, arenaviridae, vovnaviridae, bunyaviridae, deltaviridae, Jiloviridae, orthomyxoviridae, pammuxoviridae, rhabdoviridae, arterioviridae, astroviridae, caliciviridae, coronaviridae, flaviviridae, гепатит Е-подобных вирусов, nodaviridae, picornaviridae, togaviridae и tertroviridae. Согласно конкретным вариантам реализации, которые могут подходить, в частности, для применения в способах получения терапевтических белков, вирусы, которые могут быть инактивированы с применением описываемых способов, включают парвовирус MVM, ретровирус MuLV или буньявирус CVV.

Следуя указанному способу далее, определяют целевую дозу УФ-излучения, под воздействием которой происходит инактивация вируса. Для того чтобы наиболее эффективно и результативно инактивировать вирус с применением УФС, желательно определить целевую дозу УФС, которая обеспечит требуемый результат. Хотя описанные способы могут быть реализованы без оптимизации условий воздействия УФС (которые в совокупности составляют "дозу УФС") для подлежащего инактивации типа вируса, и для реализации указанного способа может использоваться любая удобная доза УФС, эффективность указанного способа может быть увеличена за счет определения целевой дозы, специфичной для подлежащего инактивации вируса. Отмечено, что для некоторых вирусов условия инактивации УФС-излучением одинаковы, и можно инактивировать вирусы двух или более типов с помощью единственной процедуры согласно описанному способу, подобрав подходящие условия воздействия. Проводились различные исследования для определения чувствительности к УФ различных ДНК- и РНК-содержащих вирусов (см., например, Lytle & Sagripanti, (2005) *J Virol.* 79:14244-252, и Knipe et al., (2007) *Field's Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, включенный в настоящую заявку посредством ссылки и фиг. 11 и 12).

Затем в образец добавляют защитное средство для получения стабилизированной смеси. Одна из функций защитного средства состоит в захвате реакционноспособных веществ, способных разрушать или модифицировать компоненты образца, например белка в образце, чтобы уменьшить или полностью предотвратить какие-либо модификации или разложение, которые могут происходить в результате воздействия на образец УФС-излучения. В частности, воздействие на раствор дозами УФС-излучения, необходимыми для определенной процедуры, например для инактивации вирусов, может приводить к образованию реакционноспособных веществ. В некоторых случаях присутствие указанных реакционноспособных веществ в образце может приводить к нежелательным модификациям, например, за счет прямого окисления компонентов образца, в том числе белков. В других случаях присутствие реакционноспособных веществ в образце может также способствовать непрямой модификации компонентов образца. Как было отмечено в настоящем описании, вероятность модификации и/или разложения белков представляет собой одну из проблем, связанных с применением УФС-излучения в способах вирусной инактивации.

Примеры реакционноспособных веществ, способных разрушать или модифицировать белки, включают такие реакционноспособные вещества, как ионы кислорода (например,  $O^2$ ), ионы гидроксидов (например,  $OH^-$ ) и пероксиды (например,  $H_2O_2$ ). Поскольку указанные и другие реакционноспособные вещества часто образуются при воздействии на раствор высокими дозами УФС-излучения, которые часто необходимы для эффективной вирусной инактивации, предпочтительно добавление защитного средства до воздействия на образец УФ-излучением.

Не все химические вещества могут быть использованы в качестве защитного средства. На самом деле для определения подходящих защитных средств в соответствии с изложенным в приведенных примерах проводили подробное исследование. Подходящее защитное средство представляет собой соединение, обладающее способностью захватывать любые реакционноспособные вещества, присутствующие в образце, например, образующиеся при воздействии УФС, так что эффект указанных реакционноспособных веществ на компоненты образца (например, на белок) уменьшается по сравнению с эффектом указанных реакционноспособных веществ на компоненты образца в отсутствие защитного средства. В некоторых случаях разложение или модификация компонентов образца, обусловленные воздействием реакционноспособных веществ, образующихся при УФС-процедуре, может быть предотвращено(а) с помощью применения защитного средства.

Помимо эффективности для нейтрализации нежелательных последствий присутствия в образце любых реакционноспособных веществ при выборе защитного средства также необходимо учитывать затруднение, связанное с его удалением из образца после воздействия УФС. При реализации описываемого способа в отношении образца, содержащего терапевтическую молекулу, такую как антигенсвязывающий белок (например, что-либо одно или более из (i) антигенсвязывающего белка, содержащего что-либо одно или более из моноклонального антитела, антитела человека, гуманизированного антитела, химерного антитела, рекомбинантного антитела, однопочечного антитела, диатела, триатела, тетратела, Fab-фрагмента,  $F(ab')_2$ -фрагмента, IgD-антитела, IgE-антитела, IgM-антитела, IgG1-антитела, IgG2-антитела, IgG3-антитела или IgG4-антитела, и их фрагментов, (ii) Fc-домена; (iii) пептида; (iv) гибридного белка с Fc-фрагментом и (v) терапевтического белка) или терапевтический белок, указанное соображение приобретает большую важность. В связи с нормативными ограничениями, налагаемыми на качество продукции, желательным свойством защитного средства является возможность его удаления из образца после

реализации защитной функции.

Предложен перечень подходящих защитных средств, учитывающий все описанные выше необходимые для защитного средства свойства; он включает, не ограничиваясь перечисленными, тирозин, триптофан, метионин, пиридоксин и рибофлавин. Согласно различным вариантам реализации защитное средство содержит два или более соединений в различных пропорциях. Например, защитное средство может содержать тирозин, триптофан либо и тирозин, и триптофан в любых нужных пропорциях. Точный состав и пропорции в комбинации защитных средств могут быть определены эмпирически и/или согласно приведенному в настоящей заявке описанию.

Дополнительные варианты защитных средств могут быть легко определены с применением настоящего описания в качестве руководства. Согласно одному из таких вариантов скрининга потенциальное защитное средство может быть добавлено в содержащий белок образец, подвергаемый воздействию УФС-излучения в дозе, подходящей для инактивирования одного или более вирусов (фиг. 11 и 12, а также источники, цитируемые в настоящей заявке, могут быть использованы в качестве руководства при определении релевантной дозы УФС); затем проводится анализ для определения степени разложения или модификации белка. С этой целью могут применяться стандартные хроматографические и аналитические техники. Например, для оценки модификации белка может применяться ИОХ, а ЭХ или масс-спектроскопия может применяться для анализа разложения белка.

Используемое в описанных способах защитное средство может быть добавлено в любой концентрации. Согласно предпочтительному варианту реализации защитное средство добавляют до концентрации, эффективно уменьшающей или полностью устраняющей модификацию или разложение компонента образца. Количество защитного средства может быть определено аналогичным идентификации защитного средства образом, то есть выбранное защитное средство может быть добавлено в образец в начальной концентрации, указанный образец подвергают воздействию УФС-излучения, и определяют степень разложения и/или модификации компонента образца (например, белка) с применением общепринятого метода. Как и при идентификации защитного средства, подходящие техники включают ИОХ, ЭХ и масс-спектроскопию. В том случае, если нужная степень защиты белкового компонента не достигнута, оценка может проводиться повторно до тех пор, пока не будет определена концентрация, обеспечивающая требуемую степень защиты. Согласно конкретному варианту реализации защитное средство добавляют в образец при отношении концентраций, составляющем более чем 1 часть защитного средства на 200 частей белка. Иными словами, указанное защитное средство может быть добавлено в образец в относительной концентрации более чем 1 мМ защитного средства на 200 мМ белка (т.е. 1:200). Другие подходящие для применения относительные концентрации включают 1:180, 1:170, 1:160, 1:150, 1:140, 1:130, 1:120, 1:110, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20 или 1:10.

Хотя предлагаемые защитные средства и концентрации защитных средств согласно приведенному описанию подходят для применения, легко могут быть определены дополнительные варианты защитных средств и концентрации защитных средств с применением эмпирического матричного метода. Согласно одному из примеров такого подхода может быть построена матрица, на одной из осей которой представлены различные потенциальные защитные средства, а на другой оси представлены различные уровни концентрации. Для заполнения матрицы предпочтительными защитными средствами и предпочтительными концентрациями указанных защитных средств могут быть проведены эксперименты согласно приведенному описанию (например, с применением ЭХ, ИОХ и/или масс-спектроскопии для оценки эффекта конкретного защитного средства и конкретной концентрации). Указанный подход позволит обнаружить дополнительные варианты защитных средств и концентраций защитных средств.

После получения стабилизированной смеси, содержащей образец, содержащий белковый компонент и защитное средство, указанную стабилизированную смесь подвергают воздействию УФ-излучения, поступающего из источника, работающего на выбранном уровне мощности и на выбранной длине волны на протяжении выбранного периода времени. Для обозначения комбинации указанных параметров в настоящей заявке используют собирательный термин "доза УФС". Примеры источников, подходящих для применения в описываемом способе, включают источники УФС Newport Oriel® Flood, например, модель 97536.

Источник УФС предпочтительно выполнен с возможностью настройки для работы в диапазоне уровней мощности. Предпочтительные уровни мощности варьируют в диапазоне от приблизительно 1 мДж до приблизительно 1000 мДж. Согласно конкретным примерам источник УФС способен обеспечивать приблизительно 1 мДж, приблизительно 10 мДж, приблизительно 25 мДж, приблизительно 50 мДж, приблизительно 75 мДж, приблизительно 100 мДж, приблизительно 125 мДж, приблизительно 200 мДж, приблизительно 250 мДж, приблизительно 300 мДж, приблизительно 350 мДж, приблизительно 400 мДж, приблизительно 500 мДж, приблизительно 600 мДж, приблизительно 700 мДж, приблизительно 800 мДж, приблизительно 900 мДж или приблизительно 1000 мДж. Желательно также, чтобы имелась возможность переключать источник УФС с первого уровня мощности на второй уровень мощности, либо автоматически в ответ на сигнал обратной связи от датчика, либо вручную силами оператора.

Источник УФС также предпочтительно выполнен с возможностью доставки УФС-излучения в определенном диапазоне длин волн. Предпочтительным является диапазон длин волн от приблизительно

200 до приблизительно 280 нм, что соответствует полному диапазону С-участка УФ-спектра. Согласно конкретным предпочтительным вариантам реализации длина волны составляет приблизительно 254 нм.

При добавлении защитного средства или комбинации защитных средств в образец с получением стабилизированной смеси поглощающая способность указанной стабилизированной смеси может изменяться по сравнению с поглощающей способностью образца без добавления защитного средства. Например, добавленное(ые) защитное(ые) средство(а) или другие соединения, присутствующие в стабилизированном образце (например, буферные компоненты, солибилизирующие агенты и т.д.), могут поглощать часть УФ-излучения, воздействующего на образец. Это может приводить к уменьшению эффективного количества УФ-излучения, получаемого любым присутствующим в образце вирусом, и в результате к уменьшению эффективности вирусной инактивации.

Для учета поглощающей способности, присущей защитному(ым) средству(ам) и/или другим компонентам раствора, и подтверждения того, что в стабилизированную смесь поступила целевая доза УФС-излучения, может использоваться обратная связь, обеспечивающая изменение параметров воздействия УФ-излучением в зависимости от оценки поглощения смесью УФ-излучения. Соответственно после оценки поглощающей способности смеси, попадающей в устройство для облучения УФС, параметры излучения внутри устройства (например, мощность лампы, время нахождения или др.) могут быть временно изменены, чтобы обеспечить поступление целевой дозы в стабилизированную смесь, выходящую из устройства. Такая оценка может, как вариант, быть проведена путем измерения поглощающей способности смеси, выходящей из устройства, либо путем измерения параметров смеси внутри устройства. Согласно одному из вариантов реализации такая оценка может быть выполнена путем мониторинга поглощающей способности образца при заданной длине волны, например 254 нм. Показатели поглощения могут быть использованы для определения полученной дозы и могут быть определены как скорректированные данные о доставленной дозе энергии, учитывающие поглощающую способность компонентов, которые могут содержаться в образце (например, белка, защитных химических веществ или других присутствующих в растворе химикатов) в отношении ультрафиолетового излучения. Согласно одному из вариантов реализации указанная оценка может быть выполнена путем измерения мощности источника излучения на поверхности раствора. Как вариант, мощность источника излучения может быть измерена на поверхности лампы. Также для оценки мощности источника излучения может быть измерена электрическая мощность, потребляемая лампой.

Ожидается, что указанная оценка позволит определить уменьшение полученной дозы, обусловленное поглощающей способностью защитного(ых) средств(а) в стабилизированном образце. Соответственно что-либо одно или более из длины волны, мощности источника УФ-излучения и времени воздействия УФ-излучением затем модулируют, если согласно указанной оценке в стабилизированную смесь не поступила целевая доза УФ-облучения.

Согласно одному из вариантов реализации для сосуда с интенсивным перемешиванием, в который поступает коллимированный пучок УФС-излучения, доза может быть скорректирована с помощью при-

менения формулы водное число  $= \frac{1 - 10^{-aL}}{aL \ln(10)}$  где  $a$  - поглощающая способность раствора и  $L$  - длина пути (см., например, Bolton, (2003) ASCE, 129(3): 209-215). После определения водного числа для конкретной процедуры вирусной инактивации целевую дозу УФ-излучения делят на указанное водное число для определения времени воздействия для обработки. Согласно другому варианту реализации для сосуда без перемешивания, в который поступает УФС-излучение (например, тонкопленочного реактора или аналога) доза может быть скорректирована с помощью применения формулы доза  $\sim (P/Q)\exp(-aL) = (P_0/Q_0)\exp(-a_0L)$ , где  $a$  - поглощающая способность раствора, и  $L$  - длина пути по кольцевым зазорам. В указанной формуле  $P$  представляет собой выходную мощность лампы, а  $Q$  представляет собой объемную скорость потока смеси с поглощающей способностью  $=a$ ;  $P_0$  и  $Q_0$  представляют собой мощность и скорость потока эталонной смеси с поглощающей способностью  $=a_0$  (см., например, Ye, Z (2007) "UV Disinfection Between Concentric Cylinders" (диссертация на соискание степени PhD, Технологический институт штата Джорджия (Georgia Institute of Technology)).

Следует отметить, что любые или все стадии описываемых способов могут быть выполнены в ручном режиме или любым удобным автоматизированным способом, например, с использованием автоматизированных или компьютеризированных систем. Согласно некоторым вариантам реализации процесс может быть полностью автоматизирован. Согласно другим вариантам реализации один или более этапов могут быть автоматизированы. Например, измерение доставленной дозы и модулирование в ответ на изменения уровней целевой дозы могут представлять собой один автоматизированный этап. Согласно одному из вариантов реализации стабилизированный образец подвергают воздействию УФ-излучения и одновременно отслеживают отклонения от целевой дозы. Если отклонения от целевой дозы обнаружены, модуль управления способен регулировать время воздействия, длину волны излучения или мощность источника УФ, обеспечивая получение целевой дозы. Это может происходить в режиме реального времени с помощью элемента обратной связи.

Описываемый способ может быть реализован в любом масштабе, и либо в виде отдельной процеду-

ры, либо в виде непрерывного поточного процесса. Согласно одному из вариантов реализации отдельной процедуры в сосуде образуется стабилизированный образец любого объема. Затем указанный сосуд подвергают воздействию УФ-излучения (например, УФС-излучения), и затем проводят оценку инактивации вирусов. Указанная процедура может быть повторена до инактивации любых присутствующих в образце вирусов. Как вариант, указанная оценка может проводиться в непрерывном режиме одновременно с воздействием УФ-излучением. После инактивации вируса образец может быть перенесен в другой сосуд для дальнейшей обработки или упаковки.

Согласно варианту реализации непрерывного поточного процесса стабилизированный образец может быть получен из выходящего потока с предыдущей стадии очистки, причем защитное средство добавляют в выходящий поток при вытекании из первой колонки. Защитное средство может быть смешано с выходящим потоком за счет любых сил сдвига, связанных с введением защитного средства в выходящий поток. Затем стабилизированный образец может быть проведен через устройство, конфигурация которого позволяет непрерывно воздействовать УФ-излучением на проходящий через него образец. После доставки целевой дозы УФ-излучения выходящий продукт может быть направлен на вторую процедуру очистки, например на стадию очистки от защитного(ых) средств(а), присутствие которого(ых) нежелательно, или других соединений, присутствующих в стабилизированном образце.

Согласно другому аспекту описываемый способ может быть реализован в любом масштабе, от лабораторного масштаба до промышленного масштаба. При реализации указанного способа в промышленном масштабе целесообразным может оказаться разделение стабилизированного образца на аликвоты и параллельная обработка каждой аликвоты. Например, несколько источников УФС могут работать параллельно для обеспечения обработки больших объемов стабилизированного образца. На фиг. 13 представлен схематический пример подобной конфигурации.

III. Способ уменьшения разложения или модификации белка, обусловленного присутствием реакционноспособных веществ, образующихся при воздействии УФ.

Согласно приведенному в настоящей заявке описанию и фиг. 1-8 образец, содержащий белковый компонент, может подвергаться разложению или модификации при воздействии УФ-излучения, в частности излучения в УФС-диапазоне. УФС-диапазон, однако, представляет собой область спектра, наиболее эффективную для достижения различных целей, например для инактивации вирусов, и подходит, в частности, для применения на производстве. Наблюдаемое разложение и/или модификация белка могут быть обусловлены присутствием реакционноспособных веществ, которые образуются при облучении растворяющего компонента образца ультрафиолетом или ионизирующим излучением. Примеры реакционноспособных веществ включают ионы кислорода (например,  $O_2^-$ ), ионы гидроксила (например,  $OH^-$ ) и пероксидные соединения (например,  $H_2O_2$ ). Присутствие реакционноспособных веществ может оказывать разрушительное действие на белки (см., например, Cabiscol, et al., (2010) *Int. Microbiol.* 3:315 и Bandyopadhyay et al. (1999) *Curr. Sci.* 77:658-666).

В ходе процедуры получения белка УФ-излучение может применяться для инактивации вирусов, однако оно также может способствовать разложению и/или модификации белка. Соответственно согласно одному из аспектов в описанном в настоящей заявке изобретении предложен способ уменьшения разложения или модификации белка, обусловленного присутствием реакционноспособных веществ, образующихся при воздействии УФ. Согласно одному из вариантов реализации описываемый способ может быть реализован следующим образом.

Сначала получают образец, содержащий белковый компонент, заведомо или предположительно разлагающийся или претерпевающий модификацию в присутствии реакционноспособных веществ. Образец, содержащий белковый компонент, может иметь любой состав, с той оговоркой, что указанный образец содержит белок. Например, указанный образец может содержать элюент хроматографической колонки, собранный в пул. Согласно данному варианту реализации полученный на хроматографической колонке пул может быть собран в ходе любой хроматографической манипуляции. Примеры полученных на хроматографической колонке пулов включают пул элюента колонки с белком А, содержащий белковый компонент, полученный на колонке с белком G пул элюента, содержащий белковый компонент, полученный на колонке для гидрофобной хроматографии (ГХ) пул, содержащий белковый компонент, полученный на колонке для эксклюзионной хроматографии (ЭХ) пул, содержащий белковый компонент, полученный на колонке для ионообменной хроматографии (ИОХ) пул, содержащий белковый компонент, и полученный на гидроксипатитовой колонке пул, содержащий белковый компонент.

Образец, содержащий белковый компонент, также может содержать выходящий из хроматографической колонки элюент. Например, указанный выходящий элюент может быть получен на выходе из хроматографической колонки; соответственно указанный способ может быть реализован *in situ* и в реальном времени. Примеры хроматографических элюентов включают выходящий из колонки с белком А поток, содержащий белковый компонент, выходящий из колонки с белком G поток, содержащий белковый компонент, выходящий из колонки для гидрофобной хроматографии (ГХ) поток, содержащий белковый компонент, выходящий из колонки для эксклюзионной хроматографии (ЭХ) поток, содержащий белковый компонент, выходящий из колонки для ионообменной хроматографии (ИОХ) поток, содержащий белковый компонент, и выходящий из гидроксипатитовой колонки поток, содержащий белковый

компонент.

Хотя описанный способ может применяться для образца, содержащего белковый компонент любого типа, описываемый способ может, в частности, иметь преимущества в контексте терапевтического средства на основе белка - области, где разложение и/или модификация белка может(ут) представлять значительные затруднения. Соответственно согласно одному из примеров образец, содержащий белковый компонент, представляет собой образец, содержащий фармацевтическую молекулу на основе белка. Согласно конкретным вариантам реализации белковый компонент образца согласно описываемому способу содержит антигенсвязывающий белок (например, что-либо одно или более из (i) антигенсвязывающего белка, содержащего что-либо одно или более из моноклонального антитела, антитела человека, гуманизированного антитела, химерного антитела, рекомбинантного антитела, одноцепочечного антитела, диатела, триатела, тетраатела, Fab-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, IgD-антитела, IgE-антитела, IgM-антитела, IgG1-антитела, IgG2-антитела, IgG3-антитела или IgG4-антитела и их фрагментов, (ii) Fc-домена; (iii) пептида; (iv) гибридного белка с Fc-фрагментом и (v) терапевтического белка), Fc-домен, пептид и терапевтический белок. Указанные типы молекул являются распространенными атрибутами терапевтических молекул. Что касается антител, в настоящем описании термин "антитело" подразумевает полностью принадлежащие человеку антитела, гуманизированные антитела или полностью не принадлежащие человеку антитела (например, антитела мыши); описываемый способ может быть применен ко всем указанным типам молекул.

Согласно различным вариантам реализации описываемого способа образец, подвергаемый обработке с применением описываемых способов, может представлять собой образец, содержащий клетки, в которых требуется инактивировать вирус. Примеры таких образцов включают образец, содержащий тромбоциты, клетки СНО или бактериальные клетки, такие как *E. coli*, в которых требуется инактивировать вирусы. Такой образец может содержать культуры клеток. Согласно указанным вариантам реализации указанный способ может быть реализован в соответствии с приведенным описанием с заменой образца, содержащего клетки, на образец, содержащий белковый компонент.

Следуя указанному способу далее, определяют целевую дозу УФ-излучения. Указанная целевая доза может быть выбрана на любом основании, однако согласно одному из предпочтительных вариантов реализации в качестве целевой дозы выбирают дозу, при которой инактивируется представляющий интерес вирус. При выборе целевой дозы, соответствующей дозе УФ для заведомой или вероятной инактивации, например, конкретного представляющего интерес вируса, для наиболее эффективной и результативной инактивации вируса с применением УФС желательно определить целевую дозу УФС, которая обеспечит требуемый результат. Хотя описанные способы могут быть реализованы без оптимизации условий воздействия УФС (которые в совокупности составляют "дозу УФС") для подлежащего инактивации типа вируса и для реализации указанного способа может использоваться любая удобная доза УФС, эффективность указанного способа может быть увеличена за счет определения целевой дозы, специфичной для подлежащего инактивации вируса. Отмечено, что для некоторых вирусов условия инактивации УФС-излучением одинаковы, и подобрав подходящие условия воздействия, можно инактивировать вирусы двух или более типов с помощью единственной процедуры согласно описанному способу. Проводились различные исследования для определения чувствительности к УФ различных ДНК- и РНК-содержащих вирусов (см., например, Lytle & Sagripanti, (2005) *J Virol.* 79:14244-252, и Knipe et al., (2007) *Field's Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, включенный в настоящую заявку посредством ссылки, и фиг. 11 и 12).

Затем, следуя далее указанному способу, в образец добавляют защитное средство для получения стабилизированной смеси. Одна из функций защитного средства состоит в захвате реакционноспособных веществ, способных разрушать или модифицировать компоненты образца, например белка в образце, чтобы уменьшить или полностью предотвратить какие-либо модификации или разложение, которые могут происходить в результате воздействия на образец УФС-излучения. В частности, воздействие на раствор требуемыми дозами УФС-излучения может приводить к образованию реакционноспособных веществ согласно приведенному в настоящей заявке описанию. Действительно, в этом заключается одна из проблем, связанных с применением УФС-излучения в способах вирусной инактивации. Присутствие указанных реакционноспособных веществ в образце может приводить к непрямому окислению компонентов образца, включая белки. Кроме того, присутствие реакционноспособных веществ может также способствовать непрямой модификации компонентов образца.

Примеры реакционноспособных веществ, способных разрушать или модифицировать белки, включают такие реакционноспособные вещества, как ионы кислорода (например, O<sup>2</sup>), ионы гидроксила (например, OH<sup>•</sup>) и пероксиды (например, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Поскольку указанные и другие реакционноспособные вещества часто образуются при воздействии на раствор высокими дозами УФС-излучения, которые часто необходимы для эффективной вирусной инактивации, предпочтительно добавление защитного средства до воздействия на образец УФ-излучением.

Не все химические вещества могут быть использованы в качестве защитного средства. Более того, для определения подходящих защитных средств в соответствии с изложенным в приведенных примерах проводилось подробное исследование. Подходящее защитное средство представляет собой соединение,



обладающее способностью захватывать любые присутствующие в образце реакционноспособные вещества, например, образующиеся при воздействии УФС, так что эффект указанных реакционноспособных веществ на компоненты образца (например, на белок) уменьшается по сравнению с эффектом указанных реакционноспособных веществ на компоненты образца в отсутствие защитного средства. В некоторых случаях разложение или модификация компонентов образца, обусловленное воздействием реакционноспособных веществ, образующихся при УФС-процедуре, может быть полностью предотвращено с помощью применения защитного средства.

Помимо эффективности для нейтрализации нежелательных последствий присутствия в образце любых реакционноспособных веществ, при выборе защитного средства также необходимо учитывать затруднение, связанное с его удалением из образца после воздействия УФС. При реализации описываемого способа в отношении образца, содержащего терапевтическую молекулу, такую как антигенсвязывающий белок (например, что-либо одно или более из (i) антигенсвязывающего белка, содержащего один или более из моноклонального антитела, антитела человека, гуманизированного антитела, химерного антитела, рекомбинантного антитела, одноцепочечного антитела, диатела, триатела, тетратела, Fab-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, IgD-антитела, IgE-антитела, IgM-антитела, IgG1-антитела, IgG2-антитела, IgG3-антитела или IgG4-антитела и их фрагментов, (ii) Fc-домена; (iii) пептида; (iv) гибридного белка с Fc-фрагментом и (v) терапевтического белка) или терапевтический белок, указанный вопрос приобретает большую важность. В связи с нормативными ограничениями, налагаемыми на качество продукции, желательным свойством защитного средства является возможность его удаления из образца после реализации защитной функции.

Предложен перечень подходящих защитных средств, учитывающий все описанные выше требуемые свойства защитного средства; он включает, не ограничиваясь перечисленными, тирозин, триптофан, метионин, пиридоксин и рибофлавин. Согласно различным вариантам реализации защитное средство содержит два или более соединения в различных пропорциях. Например, защитное средство может содержать тирозин, триптофан либо и тирозин, и триптофан в любых нужных пропорциях. Точный состав и пропорция комбинации защитных средств могут быть определены эмпирически и/или согласно приведенному в настоящей заявке описанию.

Дополнительные варианты защитных средств могут быть легко определены с применением настоящего описания в качестве руководства. Согласно одному из таких вариантов скрининга потенциальное защитное средство может быть добавлено в содержащий белок образец, подвергаемый воздействию УФС-излучения в дозе, подходящей для инактивации одного или более вирусов (фиг. 11 и 12, а также источники, цитируемые в настоящей заявке, могут быть использованы в качестве руководства при определении релевантной дозы УФС); затем проводится анализ для определения степени разложения или модификации белка. Для этого могут применяться стандартные хроматографические и аналитические техники. Например, ИОХ может применяться для оценки модификации белка, а ЭХ или масс-спектроскопия может применяться для анализа разложения белка.

Используемое в описанных способах защитное средство может быть добавлено в любой концентрации. Согласно предпочтительному варианту реализации защитное средство добавляют до концентрации, эффективно уменьшающей или полностью устраняющей модификацию или разложение компонента образца. Количество защитного средства может быть определено аналогичным идентификации защитного средства образом, то есть выбранное защитное средство может быть добавлено в образец в начальной концентрации, указанный образец подвергают воздействию УФС-излучения, и определяют степень разложения и/или модификации компонента образца (например, белка) с применением общепринятого метода. Как и в случае идентификации защитного средства, подходящие техники включают ИОХ, ЭХ и масс-спектроскопию. Если нужная степень защиты белкового компонента не достигнута, оценка может проводиться повторно до тех пор, пока не будет определена концентрация, обеспечивающая требуемую степень защиты. Согласно конкретному варианту реализации защитное средство добавляют в образец при отношении концентраций, составляющем более чем 1 часть защитного средства на 200 частей белка. Иными словами, указанное защитное средство может быть добавлено в образец в относительной концентрации более чем 1 мМ защитного средства на 200 мМ белка (т.е. 1:200). Другие подходящие для применения относительные концентрации включают 1:180, 1:170, 1:160, 1:150, 1:140, 1:130, 1:120, 1:110, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20 или 1:10.

Хотя для применения подходят предлагаемые защитные средства и концентрации защитных средств согласно приведенному описанию, легко могут быть определены дополнительные варианты защитных средств и концентраций защитных средств с применением эмпирического матричного метода. Согласно одному из примеров такого подхода может быть построена матрица, на одной из осей которой представлены различные потенциальные защитные средства, а на другой оси представлены различные уровни концентрации. Для заполнения матрицы предпочтительными защитными средствами и предпочтительными концентрациями указанных защитных средств могут быть реализованы эксперименты согласно приведенному описанию (например, с применением ЭХ, ИОХ и/или масс-спектроскопии для оценки эффекта конкретного защитного средства и конкретной концентрации). Указанный подход позволит обнаружить дополнительные варианты защитных средств и концентраций защитных средств.

После получения стабилизированной смеси, содержащей образец, содержащий белковый компонент и защитное средство, указанную стабилизированную смесь подвергают воздействию УФ-излучения, поступающего из источника, работающего на выбранном уровне мощности и на выбранной длине волны на протяжении выбранного периода времени. Для обозначения комбинации указанных параметров в настоящей заявке используют собирательный термин "доза УФС". Примеры источников, подходящих для применения в описываемом способе, включают источники УФС Newport Oriol® Flood, например, модель 97536.

Источник УФС предпочтительно выполнен с возможностью настройки для работы в диапазоне уровней мощности. Предпочтительные уровни мощности варьируют в диапазоне от приблизительно 1 мДж до приблизительно 1000 мДж. Согласно конкретным примерам источник УФС способен обеспечивать мощность приблизительно 1 мДж, приблизительно 10 мДж, приблизительно 25 мДж, приблизительно 50 мДж, приблизительно 75 мДж, приблизительно 100 мДж, приблизительно 125 мДж, приблизительно 200 мДж, приблизительно 250 мДж, приблизительно 300 мДж, приблизительно 350 мДж, приблизительно 400 мДж, приблизительно 450 мДж, приблизительно 500 мДж, приблизительно 600 мДж, приблизительно 700 мДж, приблизительно 800 мДж, приблизительно 900 мДж, приблизительно 1000 мДж или более чем 1000 мДж. Желательно также, чтобы имелась возможность переключать источник УФС с первого уровня мощности на второй уровень мощности, либо автоматически в ответ на сигнал обратной связи от датчика, либо вручную силами оператора.

Источник УФС также предпочтительно выполнен с возможностью доставки УФС-излучения в определенном диапазоне длин волн. Предпочтительным является диапазон длин волн от приблизительно 200 до приблизительно 280 нм, что соответствует полному диапазону С-участка УФ-спектра. Согласно конкретным предпочтительным вариантам реализации длина волны составляет приблизительно 254 нм.

При добавлении защитного средства или комбинации защитных средств в образец с получением стабилизированной смеси поглощающая способность указанной стабилизированной смеси может изменяться по сравнению с поглощающей способностью образца без добавления защитного средства. Например, добавленное(ые) защитное(ые) средство(а) или другие соединения, присутствующие в стабилизированном образце (например, буферные компоненты, солибилизирующие агенты и т.д.), могут поглощать часть УФ-излучения, действующего на образец. Это может приводить к уменьшению эффективного количества УФ-излучения, получаемого любым присутствующим в образце вирусом, и в результате к уменьшению эффективности вирусной инактивации.

Для учета поглощающей способности, присущей защитному(ым) средству(ам) и/или другим компонентам раствора, и подтверждения того, что в стабилизированную смесь доставлена целевая доза УФС-излучения, может использоваться обратная связь, обеспечивающая изменение параметров воздействия УФ-излучения в зависимости от оценки поглощения УФ-излучения смесью. Соответственно после оценки поглощающей способности смеси, попадающей в устройство для облучения УФС, параметры излучения внутри устройства (например, мощность лампы, время нахождения или др.) могут быть временно изменены, чтобы обеспечить доставку целевой дозы в стабилизированную смесь, выходящую из устройства. Такая оценка может, как вариант, быть проведена путем измерения поглощающей способности смеси, выходящей из устройства, либо путем измерения параметров смеси внутри устройства. Согласно одному из вариантов реализации такая оценка может быть выполнена путем мониторинга поглощающей способности образца при заданной длине волны, например 254 нм. Показатели поглощения могут быть использованы для определения полученной дозы и могут быть определены как скорректированные данные о доставленной дозе энергии, учитывающие способность компонентов, которые могут содержаться в образце (например, белка, защитных химических веществ или других присутствующих в растворе химикатов), поглощать ультрафиолетовое излучение. Согласно одному из вариантов реализации указанная оценка может быть выполнена путем измерения мощности источника излучения на поверхности раствора. Как вариант, мощность источника излучения может быть измерена на поверхности лампы. Также для оценки мощности источника излучения может быть измерена электрическая мощность, потребляемая лампой.

Ожидается, что указанная оценка позволит оценить уменьшение полученной дозы, обусловленное поглощающей способностью защитного(ых) средства в стабилизированном образце. Соответственно что-либо одно или более из длины волны, мощности источника УФ-излучения и времени воздействия УФ-излучением затем модулируют, если согласно указанной оценке в стабилизированную смесь не поступила целевая доза УФ-облучения.

Согласно одному из вариантов реализации для сосуда с интенсивным перемешиванием, в который поступает коллимированный пучок УФС-излучения, доза может быть скорректирована с помощью при-

менения формулы: водное число =  $\frac{1 - 10^{-al}}{al \ln(10)}$ , где  $a$  - поглощающая способность раствора и  $l$  - длина пути (см., например, Bolton, (2003) ASCE, 129(3): 209-215). После определения водного числа для конкретной процедуры вирусной инактивации целевую дозу УФ-излучения делят на указанное водное число для определения времени воздействия для обработки. Согласно другому варианту реализации для сосуда без

перемешивания, в который поступает УФС-излучение (например, тонкопленочного реактора или аналога), доза может быть скорректирована с помощью применения формулы  $\text{доза} \sim (P/Q) \exp(-a l) = (P_0/Q_0) \exp(-a_0 l)$ , где  $a$  - поглощающая способность раствора и  $l$  - длина пути по кольцевым зазорам. В указанной формуле  $P$  представляет собой выходную мощность лампы;  $Q$  представляет собой объемную скорость потока смеси с поглощающей способностью  $=a$ ;  $P_0$  и  $Q_0$  представляют собой мощность и скорость потока эталонной смеси с поглощающей способностью  $=a_0$  (см., например, Ye, Z (2007) "UV Disinfection Between Concentric Cylinders" (диссертация на соискание степени PhD, Технологический институт штата Джорджия (Georgia Institute of Technology))).

Следует отметить, что любые или все стадии описываемых способов могут быть выполнены в ручном режиме или любым удобным автоматизированным способом, например с использованием автоматизированных или компьютеризированных систем. Согласно некоторым вариантам реализации процесс может быть полностью автоматизирован. Согласно другим вариантам реализации один или более этапов могут быть автоматизированы. Например, измерение доставленной дозы и модулирование в ответ на изменения уровней целевой дозы могут представлять собой один автоматизированный этап. Согласно одному из вариантов реализации стабилизированный образец подвергают воздействию УФ-излучения и одновременно отслеживают отклонения от целевой дозы. Если обнаружены отклонения от целевой дозы, модуль управления способен модулировать время воздействия, длину волны излучения или мощность источника УФ, обеспечивая получение целевой дозы. Это может происходить в режиме реального времени с помощью элемента обратной связи.

Описываемый способ может быть реализован в любом масштабе, либо в виде отдельной процедуры, либо в виде непрерывного поточного процесса. Согласно одному из вариантов реализации отдельной процедуры в сосуде образуется стабилизированный образец любого объема. Затем указанный сосуд подвергают воздействию УФ-излучения (например, УФС-излучения), и затем проводят оценку инактивации вирусов. Указанная процедура может быть повторена до инактивации любых присутствующих в образце вирусов. Как вариант, указанная оценка может проводиться в непрерывном режиме одновременно с воздействием УФ-излучением. После инактивации вируса образец может быть перенесен в другой сосуд для дальнейшей обработки или упаковки.

Согласно варианту реализации непрерывного поточного процесса стабилизированный образец может быть получен из выходящего потока, полученного на предыдущей стадии очистки, причем защитное средство добавляют в выходящий поток при его выходе из первой колонки. Защитное средство может быть смешано с выходящим потоком за счет любых сил сдвига, связанных с введением защитного средства в выходящий поток. Затем стабилизированный образец может быть проведен через устройство, конфигурация которого позволяет непрерывно воздействовать УФ-излучением на проходящий через него образец. После доставки целевой дозы УФ-излучения выходящий продукт может быть направлен на вторую процедуру очистки, например, на стадию очистки от защитного(ых) средств(а), присутствие которого(ых) нежелательно, или других соединений, присутствующих в стабилизированном образце.

Согласно другому аспекту описываемый способ может быть реализован в любом масштабе от лабораторного до промышленного масштаба. При реализации указанного способа в промышленном масштабе целесообразным может оказаться разделение стабилизированного образца на аликвоты и параллельная обработка каждой аликвоты. Например, несколько источников УФС могут работать параллельно для обеспечения обработки больших объемов стабилизированного образца. На фиг. 13 представлен схематический пример подобной конфигурации.

IV. Способ уменьшения окисления остатков метионина, остатков триптофана либо и остатков метионина, и остатков триптофана в белке, подвергаемом воздействию УФ-излучения.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ уменьшения окисления остатков метионина, остатков триптофана либо и остатков метионина, и остатков триптофана в белке, подвергаемом воздействию УФ-излучения. Согласно приведенному в настоящей заявке описанию и релевантным опубликованным данным остатки метионина и триптофана подвержены окислению и могут обуславливать инактивацию белка (см., например, Schoneich, (2005) *Biochim Biophys Acta* 1703:111-19; Stadtman et al., (2003) *Antioxid. Redox. Signal* 5:577-82; Stadtman, (1993) *Ann. Rev. Biochem.* 62:797-821 и Dean et al., (1997) *Biochem. J.* 324:1-18). Как отмечалось на протяжении всего настоящего описания, УФ-излучение эффективно используется в различных областях, например, для вирусной инактивации, представляющей собой наиболее распространенное промышленное применение, однако может обуславливать нежелательные модификации и разложение белков. В некоторых случаях модификация и/или разложение белков может быть прямо или непрямо обусловлена присутствием реакционноспособных веществ, образующихся при воздействии УФ. На молекулярном уровне указанные реакционноспособные вещества могут агрессивно воздействовать на остатки боковых цепей белков, в частности боковые цепи остатков метионина и триптофана. В контексте терапевтического средства на основе белка указанные модификации могут в конечном итоге приводить к образованию высокомолекулярных веществ (например, агрегатов и мультимеров) и низкомолекулярных веществ (например, фрагментированных белков). Присутствие указанных веществ в терапевтическом средстве может приводить к серьезным проблемам у пациентов, принимающих указанное терапевтическое средство.

Ввиду указанных потенциальных проблем желательно устранить возможность модификации и/или разложения белка, в частности терапевтического средства на основе белка. Соответственно предложен способ уменьшения окисления остатков метионина, остатков триптофана либо и остатков метионина, и остатков триптофана в белке, подвергнутом воздействию УФ-излучения. Согласно одному из вариантов реализации описываемый способ может быть реализован следующим образом.

Сначала получают образец, содержащий белковый компонент, содержащий остаток метионина, остаток триптофана либо и остаток метионина, и остаток триптофана. Образец, содержащий белковый компонент, может иметь любой состав с той оговоркой, что указанный образец содержит белок, а указанный белок содержит остаток метионина, остаток триптофана либо и остаток метионина, и остаток триптофана. Например, указанный образец может содержать элюент из хроматографической колонки, собранный в пул. Согласно данному варианту реализации полученный на хроматографической колонке пул может быть собран в ходе любой хроматографической манипуляции. Примеры полученных на хроматографической колонке пулов включают пул элюента колонки с белком А, содержащий белковый компонент, полученный на колонке с белком G пул элюента, содержащий белковый компонент, полученный на колонке для гидрофобной хроматографии (ГХ) пул, содержащий белковый компонент, полученный на колонке для эксклюзионной хроматографии (ЭХ) пул, содержащий белковый компонент, полученный на колонке для ионообменной хроматографии (ИОХ) пул, содержащий белковый компонент, и полученный на гидроксипатитовой колонке пул, содержащий белковый компонент.

Образец, содержащий белковый компонент, также может содержать выходящий из хроматографической колонки элюент. Например, указанный выходящий элюент может быть получен на выходе из хроматографической колонки; соответственно указанный способ может быть реализован *in situ* и в реальном времени. Примеры хроматографических элюентов включают выходящий из колонки с белком А поток, содержащий белковый компонент, выходящий из колонки с белком G поток, содержащий белковый компонент, выходящий из колонки для гидрофобной хроматографии (ГХ) поток, содержащий белковый компонент, выходящий из колонки для эксклюзионной хроматографии (ЭХ) поток, содержащий белковый компонент, выходящий из колонки для ионообменной хроматографии (ИОХ) поток, содержащий белковый компонент, и выходящий из гидроксипатитовой колонки поток, содержащий белковый компонент.

Хотя описанный способ может применяться для образца, содержащего белковый компонент любого типа, раскрытый способ может, в частности, иметь преимущества в контексте терапевтического средства на основе белка, представляющем собой область, где модификация белков и/или разложение за счет окисления остатка метионина, остатка триптофана либо и остатка метионина, и остатка триптофана может превращать терапевтическое средство на основе белка в неактивное или вредное для пациента. Так согласно одному из примеров образец, содержащий белковый компонент, представляет собой образец, содержащий фармацевтическую молекулу на основе белка. Согласно конкретным вариантам реализации белковый компонент образца согласно описываемому способу содержит антигенсвязывающий белок (например, что-либо одно или более из (i) антигенсвязывающего белка, содержащего что-либо одно или более из моноклонального антитела, антитела человека, гуманизированного антитела, химерного антитела, рекомбинантного антитела, однопочечного антитела, диатела, триатела, тетратела, Fab-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, IgD-антитела, IgE-антитела, IgM-антитела, IgG1-антитела, IgG2-антитела, IgG3-антитела или IgG4-антитела и их фрагментов, (ii) Fc-домена; (iii) пептида; (iv) гибридного белка с Fc-фрагментом и (v) терапевтического белка), Fc-домен, пептид и терапевтический белок. Указанные типы молекул являются распространенными атрибутами терапевтических молекул. Что касается антител, в настоящем описании термин "антитело" подразумевает полностью принадлежащие человеку антитела, гуманизированные антитела или полностью не принадлежащие человеку антитела (например, антитела мыши); описываемый способ может быть применен ко всем указанным типам молекул.

Согласно различным вариантам реализации описываемого способа образец, подвергаемый обработке с применением описываемых способов, может представлять собой образец, содержащий клетки, в которых требуется инактивировать вирус. Примеры таких образцов включают образец, содержащий тромбоциты, клетки СНО или бактериальные клетки, например *E. coli*. Такой образец может содержать культуры клеток. Согласно указанным вариантам реализации указанный способ может быть реализован в соответствии с приведенным описанием с заменой образца, содержащего клетки, на образец, содержащий белковый компонент.

Чаще всего вирусной инактивации с помощью УФС, представляющей собой один из вариантов применения описанного способа, подвергают образцы, содержащие белковый компонент, или образец, содержащий такие клетки, как тромбоциты, хотя это не является обязательным требованием; согласно другим вариантам реализации описываемые способы могут также применяться для удаления вируса из образца, который не содержит белкового компонента.

Следуя указанному способу далее, определяют целевую дозу УФ-излучения. Указанная целевая доза может быть выбрана на любом основании, однако согласно одному из предпочтительных вариантов реализации в качестве целевой дозы выбирают дозу, при которой происходит инактивация представляющего интерес вируса. При выборе целевой дозы, соответствующей дозе УФ для заведомой или веро-

ятной инактивации, например, конкретного представляющего интерес вируса, для наиболее эффективной и результативной инактивации вируса с применением УФС желательнее определить целевую дозу УФС, которая обеспечит требуемый результат. Хотя описанные способы могут быть реализованы без оптимизации условий воздействия УФС (которые в совокупности составляют "дозу УФС") для подлежащего инактивации типа вируса, и для реализации указанного способа может использоваться любая удобная доза УФС, эффективность указанного способа может быть увеличена за счет определения целевой дозы, специфичной для подлежащего инактивации вируса. Отмечено, что для некоторых вирусов условия инактивации УФС-излучением одинаковы, и можно инактивировать вирусы двух или более типов с помощью единственной процедуры согласно описанному способу, подобрав подходящие условия воздействия. Проводились различные исследования для определения чувствительности к УФ различных ДНК- и РНК-содержащих вирусов (см., например, источник Lytle & Sagripanti, (2005) J Virol. 79:14244-252; Knipe et al., (2007) Field's Virology, Lippincott Williams & Wilkins, включенный в настоящую заявку посредством ссылки; а также фиг. 11 и 12).

Затем, следуя указанному способу далее, в образец добавляют защитное средство для получения стабилизированной смеси. Одна из функций защитного средства состоит в захвате реакционноспособных веществ, способных разрушать или модифицировать компоненты образца, например белка в образце, чтобы уменьшить или полностью предотвратить какие-либо модификации или разложение, которые могут происходить в результате воздействия на образец УФС-излучения. В частности, воздействие на раствор требуемыми дозами УФС-излучения может приводить к образованию реакционноспособных веществ согласно приведенному в настоящей заявке описанию. Действительно, в этом заключается одна из проблем, связанных с применением УФС-излучения в способах вирусной инактивации. Присутствие указанных реакционноспособных веществ в образце может приводить к непрямоу окислению компонентов образца, в том числе белков. Далее присутствие реакционноспособных веществ может также способствовать непрямоу модификации компонентов образца.

Примеры реакционноспособных веществ, способных разрушать или модифицировать белки, включают такие реакционноспособные вещества, как ионы кислорода (например,  $O^2$ ), ионы гидроксила (например,  $OH$ ) и пероксиды (например,  $H_2O_2$ ). Поскольку указанные и другие реакционноспособные вещества часто образуются при воздействии на раствор высокими дозами УФС-излучения, которые часто необходимы для эффективной вирусной инактивации, предпочтительно добавление защитного средства до воздействия на образец УФ-излучением.

Не все химические вещества могут быть использованы в качестве защитного средства. Более того, для определения подходящих защитных средств в соответствии с изложенным в приведенных примерах проводилось подробное исследование. Подходящее защитное средство представляет собой соединение, обладающее способностью захватывать любые реакционноспособные вещества, присутствующие в образце, например, образующиеся при воздействии УФС, так что эффект указанных реакционноспособных веществ на компоненты образца (например, на белок) уменьшается по сравнению с эффектом указанных реакционноспособных веществ на компоненты образца в отсутствие защитного средства. В некоторых случаях разложение или модификация компонентов образца, обусловленные воздействием реакционноспособных веществ, образующихся при УФС-процедуре, может быть полностью предотвращено(а) с помощью применения защитного средства.

Помимо эффективности для нейтрализации нежелательных последствий присутствия в образце любых реакционноспособных веществ, при выборе защитного средства также необходимо учитывать затруднение, связанное с его удалением из образца после воздействия УФС. При реализации описываемого способа в отношении образца, содержащего терапевтическую молекулу, такую как антигенсвязывающий белок (например, что-либо одно или более из (i) антигенсвязывающего белка, содержащего что-либо одно или более из моноклонального антитела, антитела человека, гуманизированного антитела, химерного антитела, рекомбинантного антитела, одноцепочечного антитела, диатела, триатела, тетратела, Fab-фрагмента,  $F(ab')_2$ -фрагмента, IgD-антитела, IgE-антитела, IgM-антитела, IgG1-антитела, IgG2-антитела, IgG3-антитела или IgG4-антитела и их фрагментов, (ii) Fc-домена; (iii) пептида; (iv) гибридного белка с Fc-фрагментом и (v) терапевтического белка) или терапевтический белок, указанный вопрос приобретает большую важность. В связи с нормативными ограничениями, налагаемыми на качество продукции, желательным свойством защитного средства является возможность его удаления из образца после реализации защитной функции.

Предложен перечень подходящих защитных средств, учитывающий все описанные выше требуемые свойства защитного средства; он включает, не ограничиваясь перечисленными, тирозин, триптофан, метионин, пиридоксин и рибофлавин. Согласно различным вариантам реализации защитное средство содержит два или более соединений в различных пропорциях. Например, защитное средство может содержать тирозин, триптофан либо и тирозин, и триптофан в любых нужных пропорциях. Точный состав и пропорции в комбинации защитных средств могут быть определены эмпирически и/или согласно приведенному в настоящей заявке описанию.

Дополнительные защитные средства могут быть легко определены с применением настоящего описания в качестве руководства. Согласно одному из таких вариантов скрининга потенциальное защитное

средство может быть добавлено в содержащий белок образец, подвергаемый воздействию УФС-излучения в дозе, подходящей для инактивирования одного или более вирусов (фиг. 11 и 12, а также источники, цитируемые в настоящей заявке, могут быть использованы в качестве руководства при определении релевантной дозы УФС); затем проводится анализ для определения степени разложения или модификации белка. С этой целью могут применяться стандартные хроматографические и аналитические техники. Например, для оценки модификации белка может применяться ИОХ, а ЭХ или масс-спектроскопия может применяться для анализа разложения белка.

Используемое в описанных способах защитное средство может быть добавлено в любой концентрации. Согласно предпочтительному варианту реализации указанное защитное средство добавляют до концентрации, эффективно уменьшающей или полностью устраняющей модификацию или разложение компонента образца. Количество защитного средства может быть определено аналогичным идентификации защитного средства образом, то есть выбранное защитное средство может быть добавлено в образец в начальной концентрации; указанный образец подвергают воздействию УФС-излучения и определяют степень разложения и/или модификации компонента образца (например, белка) с применением общепринятого метода. Как и в случае идентификации защитного средства, подходящие техники включают ИОХ, ЭХ и масс-спектроскопию. В том случае, если нужная степень защиты белкового компонента не достигнута, оценка может проводиться повторно до тех пор, пока не будет определена концентрация, обеспечивающая требуемую степень защиты. Согласно конкретному варианту реализации защитное средство добавляют в образец при отношении концентраций, составляющем более чем 1 часть защитного средства на 200 частей белка. Иными словами, защитное средство может быть добавлено в образец в относительной концентрации более чем 1 мМ защитного средства на 200 мМ белка (т.е. 1:200). Другие подходящие для применения относительные концентрации включают 1:180, 1:170, 1:160, 1:150, 1:140, 1:130, 1:120, 1:110, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20 или 1:10.

Хотя предлагаемые защитные средства и концентрации защитных средств согласно приведенному описанию подходят для применения, легко могут быть определены дополнительные варианты защитных средств и концентрации защитных средств с применением эмпирического матричного метода. Согласно одному из примеров такого подхода может быть построена матрица, на одной из осей которой представлены различные потенциальные защитные средства, а на другой оси представлены различные уровни концентрации. Для заполнения матрицы предпочтительными защитными средствами и предпочтительными концентрациями указанных защитных средств могут быть реализованы эксперименты согласно приведенному описанию (например, с применением ЭХ, ИОХ и/или масс-спектроскопии для оценки эффекта конкретного защитного средства и конкретной концентрации). Указанный подход позволит обнаружить дополнительные варианты защитных средств и концентраций защитных средств.

После получения стабилизированной смеси, содержащей образец, содержащий белковый компонент и защитное средство, указанную стабилизированную смесь подвергают воздействию УФ-излучения, поступающего из источника, работающего на выбранном уровне мощности и на выбранной длине волны на протяжении выбранного периода времени. Для обозначения комбинации указанных параметров в настоящей заявке используют собирательный термин "доза УФС". Примеры источников, подходящих для применения в описываемом способе, включают источники УФС Newport Oriel® Flood, например, модель 97536.

Источник УФС предпочтительно выполнен с возможностью настройки для работы в диапазоне уровней мощности. Предпочтительные уровни мощности варьируют в диапазоне от приблизительно 1 мДж до приблизительно 1000 мДж. Согласно конкретным примерам источник УФС способен обеспечивать мощность приблизительно 1 мДж, приблизительно 10 мДж, приблизительно 25 мДж, приблизительно 50 мДж, приблизительно 75 мДж, приблизительно 100 мДж, приблизительно 125 мДж, приблизительно 200 мДж, приблизительно 250 мДж, приблизительно 300 мДж, приблизительно 350 мДж, приблизительно 400 мДж, приблизительно 450 мДж, приблизительно 500 мДж, приблизительно 600 мДж, приблизительно 700 мДж, приблизительно 800 мДж, приблизительно 900 мДж, приблизительно 1000 мДж или более чем 1000 мДж. Желательно также, чтобы имелась возможность переключать источник УФС с первого уровня мощности на второй уровень мощности, либо автоматически в ответ на сигнал обратной связи от датчика, либо вручную силами оператора.

Источник УФС также предпочтительно выполнен с возможностью доставки УФС-излучения в определенном диапазоне длин волн. Предпочтительным является диапазон длин волн от приблизительно 200 до приблизительно 280 нм, что соответствует полному диапазону С-участка УФ-спектра. Согласно конкретным предпочтительным вариантам реализации длина волны составляет приблизительно 254 нм.

При добавлении защитного средства или комбинации защитных средств в образец с получением стабилизированной смеси поглощающая способность указанной стабилизированной смеси может изменяться по сравнению с поглощающей способностью образца без добавления защитного средства. Например, добавленное(ые) защитное(ые) средство(а) или другие соединения, присутствующие в стабилизированном образце (например, буферные компоненты, солибилизирующие агенты и т.д.), могут поглощать часть УФ-излучения, воздействующего на образец. Это может приводить к уменьшению эффективного количества УФ-излучения, получаемого любым присутствующим в образце вирусом, и в результате к

уменьшению эффективности вирусной инактивации.

Для учета поглощающей способности, присущей защитному(ым) средству(ам) и/или другим компонентам раствора, и подтверждения того, что в стабилизированную смесь поступила целевая доза УФС-излучения, может использоваться обратная связь, обеспечивающая изменение параметров воздействия УФ-излучения в зависимости от оценки поглощения УФ-излучения смесью. Соответственно после оценки поглощающей способности смеси, попадающей в устройство для облучения УФС, параметры излучения внутри устройства (например, мощность лампы, время нахождения или др.) могут быть временно изменены, чтобы обеспечить доставку целевой дозы в стабилизированную смесь, выходящую из устройства. Такая оценка может, как вариант, быть проведена путем измерения поглощающей способности смеси, выходящей из устройства, либо путем измерения параметров смеси внутри устройства. Согласно одному из вариантов реализации такая оценка может быть выполнена путем мониторинга поглощающей способности образца при заданной длине волны, например 254 нм. Показатели поглощения могут быть использованы для определения полученной дозы и могут быть определены как скорректированные данные о доставленной дозе энергии, учитывающие способность компонентов, которые могут содержаться в образце (например, белков, защитных химических веществ или других присутствующих в растворе химикатов), поглощать ультрафиолетовое излучение. Согласно одному из вариантов реализации указанная оценка может быть выполнена путем измерения мощности источника излучения на поверхности раствора. Как вариант, мощность источника излучения может быть измерена на поверхности лампы. Также для оценки мощности источника излучения может быть измерена электрическая мощность, потребляемая лампой.

Ожидается, что указанная оценка позволит оценить уменьшение полученной дозы, обусловленное поглощающей способностью защитного(ых) средства в стабилизированном образце. Соответственно что-либо одно или более из длины волны, мощности источника УФ-излучения и времени воздействия УФ-излучением затем модулируют, если согласно указанной оценке в стабилизированную смесь не поступила целевая доза УФ-облучения.

Согласно одному из вариантов реализации для сосуда с интенсивным перемешиванием, в который поступает коллимированный пучок УФС-излучения, доза может быть скорректирована с помощью при-

менения формулы водное число =  $\frac{1 - 10^{-al}}{al \ln(10)}$  где  $a$  - поглощающая способность раствора и  $l$  - длина пути (см., например, Bolton (2003) ASCE 129(3):209-215). После определения водного числа для конкретной процедуры вирусной инактивации целевую дозу УФ-излучения делят на указанное водное число для определения времени воздействия для обработки. Согласно другому варианту реализации для сосуда без перемешивания, принимающего УФС-излучение (например, тонкопленочный реактор или аналог), доза может быть скорректирована с помощью формулы доза  $\sim (P/Q) \exp(-al) = (P_0/Q_0) \exp(-a_0l)$ , где  $a$  - поглощающая способность раствора и  $l$  - длина пути по кольцевым зазорам. В указанной формуле  $P$  представляет собой выходную мощность лампы, а  $Q$  представляет собой объемную скорость потока смеси с поглощающей способностью  $=a$ ;  $P_0$  и  $Q_0$  представляют собой мощность и скорость потока эталонной смеси с поглощающей способностью  $=a_0$  (Ye, Z (2007) "UV Disinfection Between Concentric Cylinders" (диссертация на соискание степени PhD, Технологический институт штата Джорджия (Georgia Institute of Technology))).

Следует отметить, что любые или все стадии описываемых способов могут быть выполнены в ручном режиме или любым удобным автоматизированным способом, например с использованием автоматизированных или компьютеризированных систем. Согласно некоторым вариантам реализации процесс может быть полностью автоматизирован. Согласно другим вариантам реализации один или более этапов могут быть автоматизированы. Например, оценка доставленной дозы и модулирование в ответ на отклонения от целевых уровней дозы могут представлять собой один автоматизированный этап. Согласно одному из вариантов реализации стабилизированный образец подвергают воздействию УФ-излучения и одновременно отслеживают отклонения от целевой дозы. Если обнаружены отклонения от целевой дозы, модуль управления способен модулировать время воздействия, длину волны излучения или мощность источника УФ, обеспечивая получение целевой дозы. Это может происходить в режиме реального времени с помощью элемента обратной связи.

Описываемый способ может быть реализован в любом масштабе и либо в виде отдельной процедуры, либо в виде непрерывного поточного процесса. Согласно одному из вариантов реализации отдельной процедуры в сосуде образуется стабилизированный образец любого объема. Затем указанный сосуд подвергают воздействию УФ-излучения (например, УФС-излучения), и затем проводят оценку инактивации вирусов. Указанная процедура может быть повторена до инактивации любых присутствующих в образце вирусов. Как вариант, указанная оценка может проводиться в непрерывном режиме одновременно с воздействием УФ-излучением. После инактивации вируса образец может быть перенесен в другой сосуд для дальнейшей обработки или упаковки.

Согласно варианту реализации непрерывного поточного процесса стабилизированный образец может быть получен из выходящего потока, полученного на предыдущей стадии очистки, причем защитное

средство добавляют в выходящий поток при вытекании из первой колонки. Защитное средство может смешиваться с выходящим потоком за счет любых сил сдвига, связанных с введением защитного средства в выходящий поток. Затем стабилизированный образец может быть проведен через устройство, конфигурация которого позволяет непрерывно воздействовать УФ-излучением на проходящий через него образец. После доставки целевой дозы УФ-излучения поток может быть направлен на вторую процедуру очистки, например, на стадию очистки от защитного(ых) средства, присутствие которого(ых) нежелательно, или других соединений, присутствующих в стабилизированном образце.

Согласно другому аспекту описываемый способ может быть реализован в любом масштабе от лабораторного до промышленного масштаба. При реализации указанного способа в промышленном масштабе целесообразным может оказаться разделение стабилизированного образца на аликвоты и параллельная обработка каждой из аликвот. Например, несколько источников УФС могут работать параллельно для обеспечения обработки больших объемов стабилизированного образца. На фиг. 13 представлен схематический пример подобной конфигурации.

В настоящем описании приведен ряд ссылок на источники. Все цитируемые источники включены в настоящую заявку во всей полноте для любых целей.

### Примеры

Следующие примеры иллюстрируют варианты реализации и аспекты описываемых способов и не предназначены для ограничения.

Пример 1. Оценка влияния химических условий технологического процесса на модификацию белков при воздействии дозы УФС.

Три разных рекомбинантных белка, содержащих Fc-фрагмент, а именно моноклональные IgG2-антитела, Mab X, Mab Y и Mab Z, экспрессировали в экспрессионной системе на основе клеток млекопитающих, а именно клеток CHO. Белок отделяли от клеток и другого дебриса центрифугированием и очищали с применением хроматографической смолы с белком А. Белок переходил в растворы с разными условиями, включая диапазон концентраций соли ацетата натрия 50-300 мМ, рН в диапазоне от 4,3 до 7,4 и концентраций белка от 2 до 30 г/л.

После очищения каждую из указанных белковых аликвот обрабатывали УФС-излучением с длиной волны 254 нм, поступающим из индивидуально настроенного источника излучения Newport Oriel® Flood Hg 500 Вт (Модель 97536). Источник излучения конфигурировали для получения однородного коллимированного и фильтрованного излучения в диапазоне от 0 до 1000 мДж/см<sup>2</sup> получаемой целевой дозы. Полученную дозу определяли как доставленную дозу энергии, скорректированную с учетом способности компонентов, которые могут содержаться в образце (например, белка, защитных химических веществ или других присутствующих в растворе химикатов), поглощать ультрафиолетовое излучение. Указанную

дозу корректировали по формуле водное число =  $\frac{1 - 10^{-al}}{al \ln(10)}$  где  $a$  - поглощающая способность раствора и  $l$  - длина пути. Требуемую полученную дозу делили на водное число для определения задаваемого значения целевой доставляемой дозы для обработки. Дозирование осуществляли путем измерения мощности источника излучения на поверхности раствора и коррекции времени воздействия.

Каждый образец анализировали на модификацию белков, используя что-либо одно или все из перечисленного: ЭХ-ВЭЖХ для определения уровня агрегатов, КОХ-ВЭЖХ-анализ на уровне заряженных изоформ, пептидное картирование модификаций аминокислотных остатков и анализ биологической активности с использованием клеток для сравнения эффективности.

Наблюдаемые результаты указывают на то, что рН, проводимость и концентрация белка не оказывали влияния на уровень модификации белков существенно. Указанные эксперименты подтвердили, что основной причиной изменения чистоты белка и/или модификаций белка являлся уровень дозы УФС. На фиг. 1-8 обобщен эффект воздействия УФС на три исследованных моноклональных антитела.

Пример 2. Оценка влияния добавок для растворов на модификацию белков и вирусную инактивацию при воздействии дозой УФС.

После подтверждения того, что воздействие УФС, а не рН, проводимость или концентрация белка обуславливают модификацию и/или разложение белков моноклональных антител, было проведено подробное исследование для выявления соединений, которые позволили бы защитить белки от нежелательных эффектов, связанных с воздействием УФС.

Рекомбинантный белок, содержащий Fc-фрагмент, моноклональное антитело Mab X, экспрессировали в экспрессионной системе на основе клеток млекопитающих, а именно клеток CHO. Белок отделяли от клеток и другого дебриса центрифугированием и очищали с применением хроматографической смолы с белком А. Значение рН элюируемого пула колонки с белком А доводили до 5,0 и либо разбавляли, либо концентрировали до концентраций белка 2, 12 или 30 г/л.

После очищения образец каждой концентрации объединяли с добавкой в соотношении 1 мМ добавки на 20 мМ белка. Указанные добавки включали что-либо одно или более из тирозина, триптофана, метионина, гистидина, фолиевой кислоты, фенилаланина, пиридоксина и рибофлавина. Каждую из указанных аликвот белка обрабатывали воздействием УФС-излучением с длиной волны 254 нМ, поступающим



из индивидуально настроенного источника излучения Newport Oriel® Flood (Модель 97536). Источник излучения конфигурировали для получения однородного коллимированного и фильтрованного излучения в диапазоне от 0 до 1000 мДж/см<sup>2</sup> получаемой целевой дозы. Полученную дозу определяли как доставленную дозу энергии, скорректированную с учетом способности компонентов, которые могут содержаться в образце (например, белка, защитных химических веществ или других присутствующих в растворе химикатов), поглощать ультрафиолетовое излучение. Коррекцию осуществляют по формуле вод-

ное число =  $\frac{1 - 10^{-aI}}{aI \ln(10)}$  где  $a$  - поглощающая способность раствора и  $l$  - длина пути. Требуемую полученную дозу делили на водное число для определения задаваемого значения целевой доставляемой дозы для обработки. Дозирование осуществляли путем измерения мощности источника излучения на поверхности раствора и коррекции времени воздействия.

Каждый образец анализировали на модификацию белков, используя что-либо одно или все из перечисленного: ЭХ-ВЭЖХ-анализ на уровень агрегатов, КОХ-ВЭЖХ-анализ на уровни заряженных изоформ, пептидное картирование модификаций аминокислотных остатков и анализ биологической активности с использованием клеток для сравнения эффективности. Результаты указанных анализов представлены на фиг. 1-9.

Наблюдаемые результаты указывают на то, что некоторые добавки, а именно фолиевая кислота и гистидин, не оказывали существенного позитивного влияния на уровень модификации белков, а метионин демонстрировал слабый благоприятный эффект. Однако другие добавки, такие как триптофан или тирозин, оказывали существенный положительный эффект на ограничение степени модификации белков, связанной с уровнем дозы УФ-излучения; на фиг. 9, 10 и 14, 15 обобщены результаты указанного исследования. Неожиданным образом оказалось, что тирозин и триптофан являются эффективными защитными средствами, тогда как гистидин и фенилаланин обеспечивали существенно меньшую степень защиты или не обеспечивали защитного эффекта. Кольцевые структуры, обнаруживаемые в тирозине и триптофане, аналогичны структурам, обнаруживаемым в фенилаланине и гистидине. Тирозин и фенилаланин представляют собой очень близкие структурно аминокислоты. Далее неожиданно было обнаружено, что метионин не является эффективным защитным средством, так как было отмечено его существенное окисление в белке при обработке высокими дозами УФС (фиг. 7 и 8), при этом триптофан представлял собой эффективное защитное средство; было также отмечено его окисление в белке при обработке высокими дозами УФС.

Кроме того, было показано, что достигаемый уровень вирусной инактивации (например, xmuLV) чувствителен к уровню дозы УФС и может иметь практическое значение (см. фиг. 10) независимо от присутствия добавок. Результаты указанных экспериментов показывают, что добавки обеспечивают защиту от УФС-опосредованной модификации и не влияют отрицательно на вирусную инактивацию, обеспечиваемую уровнем дозы УФ.

Пример 3. Оценка реализации обработки УФС без остановки технологического процесса.

Два разных рекомбинантных белка, содержащих Fc фрагмент, а именно моноклональные IgG2-антитела, Mab W и Mab X, экспрессировали в экспрессионной системе на основе клеток млекопитающих, а именно клеток CHO. Белок отделяли от клеток и другого дебриса центрифугированием и глубокой фильтрацией. После очищения, кондиционирования и оценивания получали партию подлежащих обработке образцов. Получали две фазы образцов: первую, полученную из центрифугированного и прошедшего глубокую фильтрацию материала, и вторую, полученную при дальнейшей очистке на хроматографической смоле с белком А и нейтрализации этого пула. Каждый из указанных пулов объединяли с меткой на основе микросфер с флуоресцентным покрытием и далее подразделяли на пулы с добавлением и без добавления защитной добавки, а именно тирозина. С помощью спектроскопии оценивали поглощающую способность индивидуальных стабилизированных смесей при длине волны 254 нм. Каждую из указанных стабилизированных белковых смесей затем обрабатывали воздействием варьирующих доз УФС-излучения. Обработку выполняли путем проведения смеси через тонкопленочный реактор Atlantic UV Infinity®, оборудованный 33-ваттной ртутной лампой высокого давления (HQ lamp). Смесь протекает через 0,9 мм кольцевой зазор, образованный кварцевым рукавом, вмещающим 1,5 м лампу, и кожухом из нержавеющей стали.

Каждый подлежащий обработке пул разделяли на отдельные пулы для дозирования облучением. Доставляемую в реактор дозу корректировали, изменяя время воздействия за счет регуляции скорости. Доставляемую дозу корректировали по формуле доза  $\sim (P/Q) \exp(-al) = (P_0/Q_0) \exp(-a_0l)$ , где  $a$  - поглощающая способность раствора и  $l$  - длина пути по кольцевым зазорам. В указанной формуле  $P$  представляет собой выходную мощность лампы, а  $Q$  представляет собой объемную скорость потока смеси с поглощающей способностью  $=a$ ;  $P_0$  и  $Q_0$  представляют собой мощность и скорость потока эталонной смеси с поглощающей способностью  $=a_0$ .

Каждый образец затем анализировали на модификацию белков, проводя ЭХ-ВЭЖХ-анализ на уровень агрегатов (см. таблицу).

Mab W с защитой тирозином и без защиты тирозином

	Тип образца	Поглощающая способность при 254 нМ	Защитное средство	Скорость потока	СД	10% Дз	90% Дз	%
1	ГФ	24,8	Нет	1,16	8			-0,2
2	ГФ	24,8	Нет	0,232	17			-0,7
3	ГФ	24,8	Нет	0,116	30			-1,8
4	ГФ	24,8	Нет	0,058	58			-4,6
5	ГФ	24,8	Тур	1,16	14			-0,3
6	ГФ	24,8	Тур	0,232	28			-0,8
7	ГФ	24,8	Тур	0,116	39			-1,9
8	ГФ	24,8	Тур	0,058	58			-4,6
9	Б-А	10,4	Нет	2,60	19	7	42	-1,1
10	Б-А	10,4	Нет	0,53	64	27	132	-5,5
11	Б-А	10,4	Нет	0,26	83	31	172	-7,9
12	Б-А	10,4	Нет	0,13	116	39	231	-11,5
13	Б-А	10,4	Тур	2,60	16	5	33	-0,5
14	Б-А	10,4	Тур	0,53	45	15	95	-2,7
15	Б-А	10,4	Тур	0,26	76	25	169	-4,2
16	Б-А	10,4	Тур	0,13	111	37	229	-7,8

ГФ - образец центрифугированного и прошедшего глубокую фильтрацию материала; Б-А - образец, полученный очисткой на хроматографической смоле с нейтрализацией; Тур - тирозин; скорость потока - л/мин, СД - среднее значение дозы; 10% Дз - 10-й процентиль дозы; 90% Дз - 90-й процентиль дозы; % - изменение чистоты главного пика в %, ЭХ.

Пример 4. Оценка реализации поточной обработки УФС без остановки технологического процесса.

Три разных рекомбинантных белка, содержащих Fc-фрагмент, а именно моноклональные антитела, экспрессируют в экспрессионной системе на основе клеток млекопитающих, а именно клеток CHO. Белок может быть отделен от клеток и другого дебриса центрифугированием и очищен с применением хроматографической смолы с белком А. Очищенный белок в потоке, выходящем из колонки с белком А, проходит через буферный резервуар, где его кондиционируют защитным средством с получением стабилизированной смеси, и затем оценивают поглощение при длине волны 254 нм с помощью встроенного абсорбционного спектрометра.

Стабилизированные и проанализированные белковые смеси, выходящие из буферного резервуара, подвергают обработке УФС-излучением. Обработку выполняют путем проведения смеси через тонкопленочный реактор Atlantic UV Infinity®, оборудованный 33-ваттной ртутной лампой высокого давления (HQ lamp). Смесь протекает через 0,9 мм кольцевой зазор, образованный кварцевым рукавом, вмещающим 1,5 м лампу, и кожухом из нержавеющей стали.

Доставляемую в реактор дозу корректируют, изменяя мощность лампы или скорость потока. Доставляемую дозу корректируют, принимая во внимание изменяющуюся поглощающую способность стабилизированной смеси, выходящей из буферного резервуара, для поддержания постоянства целевой получаемой дозы по формуле  $\text{доза} \sim (P/Q) \exp(-a l) = (P_0/Q_0) \exp(-a_0 l)$ , где  $a$  - поглощающая способность раствора и  $l$  - длина пути по кольцевым зазорам. В указанной формуле  $P$  представляет собой выходную мощность лампы, а  $Q$  представляет собой объемную скорость потока смеси с поглощающей способностью  $=a$ ;  $P_0$  и  $Q_0$  представляют собой мощность и скорость потока эталонной смеси с поглощающей способностью  $=a_0$ .

Каждый образец затем анализировали на модификацию белков, используя что-либо одно или все из перечисленного: ЭХ-ВЭЖХ-анализ на уровень агрегатов, КОХ-ВЭЖХ-анализ на уровни заряженных изоформ, пептидное картирование модификаций аминокислотных остатков и анализ биологической активности с использованием клеток для сравнения эффективности.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ инактивации вируса при получении терапевтического антитела, заключающийся в том, что:

(а) обеспечивают образец, содержащий терапевтическое антитело, при этом указанный образец представляет собой выходящий поток после стадии очистки антитела, и известно либо предполагается, что указанный образец содержит вирус;

(б) вводят защитное средство в выходящий поток с получением стабилизированной смеси, при этом защитное средство включает тирозин, триптофан или их комбинацию;

(в) измеряют поглощение стабилизированной смеси с помощью встроенного абсорбционного спектрометра, где поглощение стабилизированной смеси измеряют при длине волны 254 нм с помощью встроенного абсорбционного спектрометра;

(г) пропускают стабилизированную смесь через устройство, конфигурация которого позволяет непрерывно воздействовать УФС-излучением таким образом, чтобы целевая доза УФС-излучения, при ко-

торой происходит инактивация вируса, доставлялась к смеси;

(е) причем на основе оценки поглощения корректирование воздействия УФС-излучения осуществляют таким образом, чтобы целевая доза УФС-излучения непрерывно доставлялась к стабилизированной смеси, проходящей через указанное устройство, при этом стадии (с), (d) и (е) осуществляют в режиме реального времени в качестве автоматизированного элемента обратной связи;

при этом доставляемую целевую дозу корректируют, принимая во внимание изменяющуюся поглощающую способность стабилизированной смеси, для поддержания постоянства целевой получаемой дозы по формуле

$$\text{доза} \sim (P/Q)\exp(-al) = (P_0/Q_0)\exp(-a_0l),$$

где  $a$  - поглощающая способность раствора,

$l$  - длина пути по кольцевым зазорам,

$P$  представляет собой выходную мощность лампы,

$Q$  представляет собой объемную скорость потока смеси с поглощающей способностью  $=a$ ,

$P_0$  и  $Q_0$  представляют собой мощность и скорость потока эталонной смеси с поглощающей способностью  $=a_0$ .

2. Способ по п.1, в котором образец представляет собой выходящий поток из хроматографической колонки с белком А.

3. Способ по п.1, в котором образец представляет собой выходящий поток после стадии глубинной фильтрации.

4. Способ по п.1, в котором указанное антитело представляет собой моноклональное антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, рекомбинантное антитело, одноцепочечное антитело, IgD-антитело, IgE-антитело, IgM-антитело, IgG1-антитело, IgG2-антитело, IgG3-антитело или IgG4-антитело.

5. Способ по п.1, в котором вирус включает один или более из дцДНК-вируса, оцДНК-вируса, дцРНК-вируса и оцРНК-вируса.

6. Способ по п.5, в котором вирус включает вирус из одного или более из семейств вирусов adenoviridae, asfarviridae, herpesviridae, iridoviridae, papillomaviridae, polyomaviridae, poxviridae, circoviridae, hepadnaviridae, parvoviridae, birnaviridae, reoviridae, arenaviridae, bornaviridae, bunyaviridae, deltaviridae, filoviridae, orthomyxoviridae, paramyxoviridae, rhabdoviridae, arterioviridae, astroviridae, caliciviridae, coronaviridae, flaviviridae, гепатит Е-подобных вирусов, nodaviridae, picornaviridae, togaviridae и retroviridae.

7. Способ по п.6, в котором указанный вирус представляет собой парвовирус MVM, ретровирус MuLV или буньявирус CVV.

8. Способ по п.1, в котором указанное защитное средство добавляют в образец при отношении концентраций, составляющем более чем 1 часть защитного средства на 200 частей антитела.

9. Способ по п.1, в котором целевая доза равна одной или более из около 1 мДж/см<sup>2</sup>, около 10 мДж/см<sup>2</sup>, около 25 мДж/см<sup>2</sup>, около 50 мДж/см<sup>2</sup>, около 75 мДж/см<sup>2</sup>, около 100 мДж/см<sup>2</sup>, около 125 мДж/см<sup>2</sup>, около 200 мДж/см<sup>2</sup>, около 250 мДж/см<sup>2</sup>, около 300 мДж/см<sup>2</sup>, около 350 мДж/см<sup>2</sup>, около 400 мДж/см<sup>2</sup>, около 450 мДж/см<sup>2</sup>, около 500 мДж/см<sup>2</sup>, около 600 мДж/см<sup>2</sup>, около 700 мДж/см<sup>2</sup>, около 800 мДж/см<sup>2</sup>, около 900 мДж/см<sup>2</sup> и около 1000 мДж/см<sup>2</sup>.

10. Способ по п.1, в котором образец содержит выходящий из хроматографической колонки поток, где выходящий поток содержит один или более из следующих потоков, содержащих терапевтическое антитело:

выходящий из колонки с белком А поток;

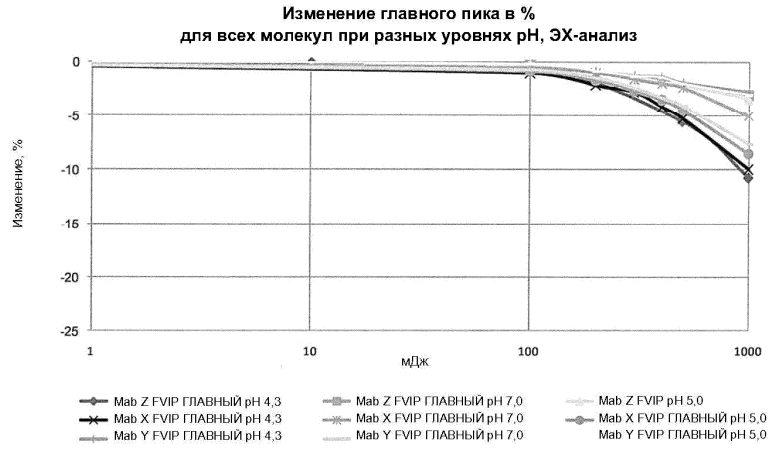
выходящий из колонки с белком G поток;

выходящий из колонки для гидрофобной хроматографии (ГХ) поток;

выходящий из колонки для эксклюзионной хроматографии (ЭХ) поток;

выходящий из колонки для ионообменной хроматографии (ИОХ) поток и

выходящий из гидроксипатитовой колонки поток.



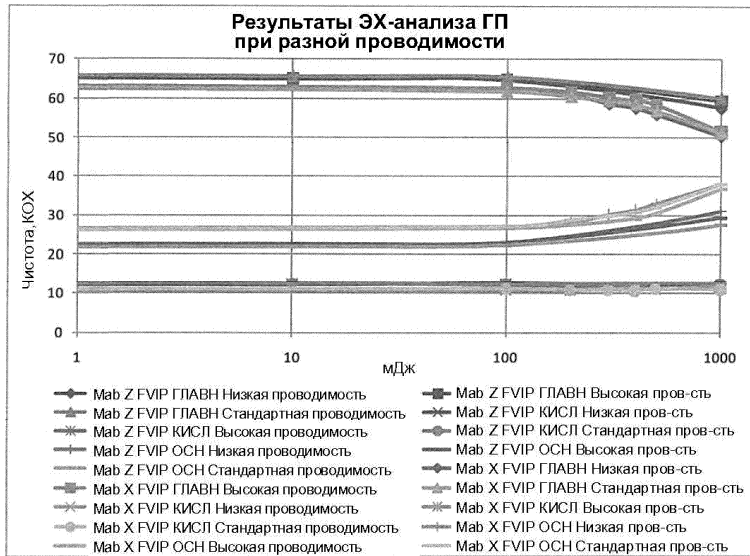
Фиг. 1



Фиг. 2

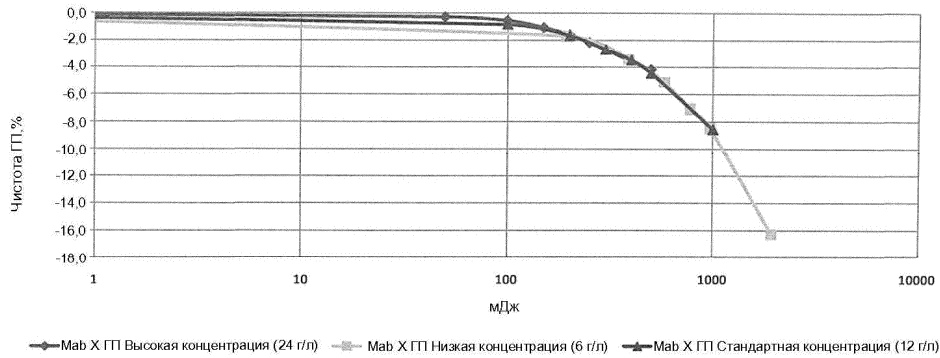


Фиг. 3

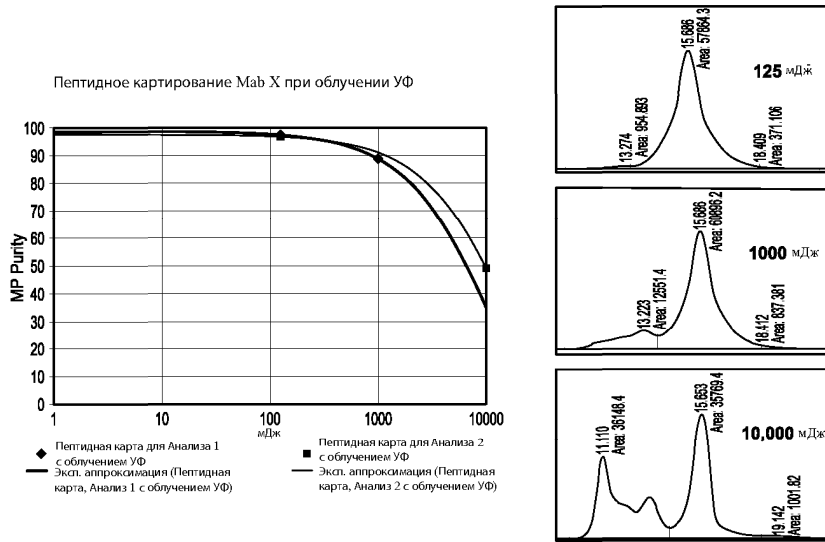


Фиг. 4

Результаты ЭХ-анализа изменений концентрации ГП для Mab X, %

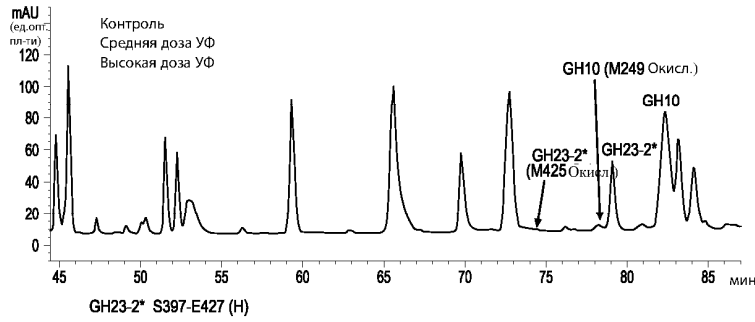


Фиг. 5



Фиг. 6

Glu-C карта образцов Mab X, обработанных УФ (масштабировано)

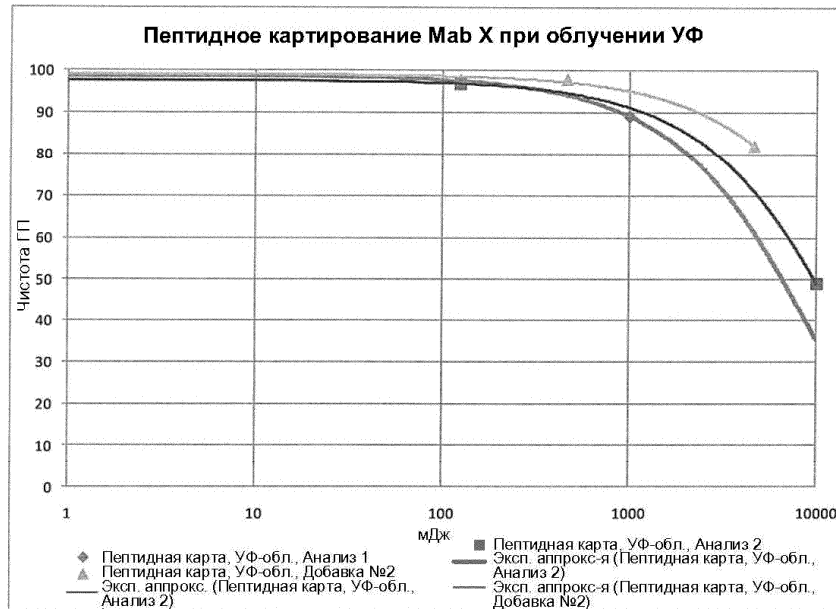


Фиг. 7

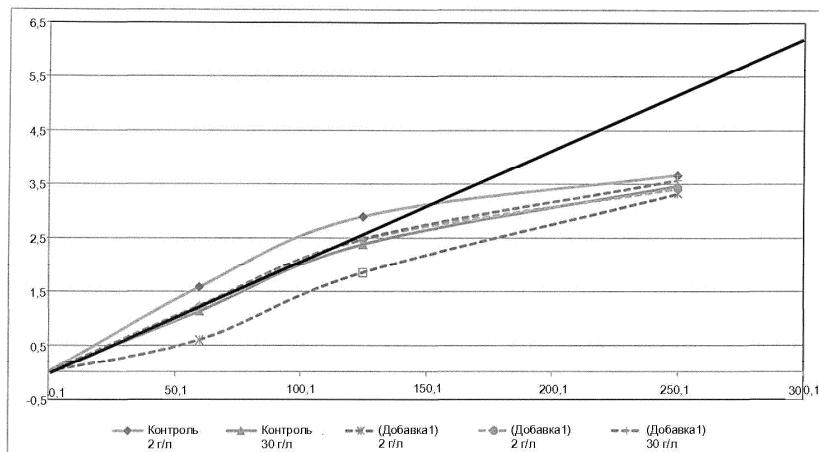
Результаты пептидного картирования				
	Контроль (0 мДж)	Средний уровень (≈15 мДж)	Высокий уровень (≈150 мДж)	Экстремальный уровень (≈1000 мДж)
Окисл. Met-249	2,4%	2,9%	6,8%	35,6%
Окисл. Met-425	1,1%	1,4%	4,2%	29,3%

Биологическая активность in vitro	
Образец	Относительная эффективность, %
Контроль (0 мДж)	86
Контроль (125 мДж)	86
Контроль (375 мДж)	86
Контроль с Добавкой 1 (0 мДж)	89
Контроль с Добавкой 1 (125 мДж)	87
Контроль с Добавкой 1 (375 мДж)	89

Фиг. 8



Фиг. 9

Инактивация ХМ<sub>у</sub>LV в зависимости от облучения

Фиг. 10

## Опубликованные данные относительно необходимых для инактивации ДНК-вирусов доз УФС

Семейство <sup>a</sup>	Измеренный УФ <sub>254</sub> D <sub>37</sub> (Дж/м <sup>2</sup> ) <sup>b</sup>	Диапазон размеров генома <sup>c</sup>	Измеренная или предсказанная SnS* (Дж/м <sup>2</sup> · кб) <sup>d</sup>	Репрезентативный(ые) вирус(ы) <sup>e</sup>	Предсказанный диапазон УФ <sub>254</sub> D <sub>37</sub> для всего семейства (Дж/м <sup>2</sup> ) <sup>f</sup>
дцДНК-вирусы					
<i>Adenoviridae</i>	130 (100–220)	26–45	9200(7300–16 000) 5100p	SAdV-7, HAAdV-5, -40, -41	100–180 13–15
<i>Asfarviridae</i>	19 (6,2–28) 2 <sup>a</sup> 140 <sup>g</sup>	170–190	6400(1600–9600) 2 <sup>a</sup> 54 000 <sup>g</sup>	HHV-1, -2, -5, SuHV-1, MuHV-1, EHV-1	13–26 2 <sup>a</sup> 110–220 <sup>g</sup>
<i>Herpesviridae</i>	(38–490) 16	125–240	(12 000–120 000) 5100	FV-3	15–26
<i>Iridoviridae</i>		98–170	5100		300–380
<i>Papillomaviridae</i>		6,8–8,4	5100p		250–280
<i>Polyomaviridae</i>	250	4,7–5,3	2600	MPyV, SV40	6,8–16
<i>Poxviridae</i>	11	130–300	4100	VACV	
оцДНК-вирусы					
<i>Circoviridae</i>		1,8–2,3	46p		20–26
<i>Hepadnaviridae</i>		3,0–3,3	46p		14–15
<i>Parvoviridae</i>	9,2 (8,6–10,0)	4–6	46 (43–50)	KRV, MMV, H-1PV	7,7–12

SnS\*: нормализованная по размеру чувствительность

Фиг. 11a

## Опубликованные данные относительно необходимых для инактивации РНК-вирусов доз УФС

Семейство <sup>b</sup>	Измеренный УФ <sub>254</sub> D <sub>37</sub> (Дж/м <sup>2</sup> )	Диапазон размеров генома	Измеренная или предсказанная SnS (Дж/м <sup>2</sup> · кб)	Репрезентативный(ые) вирус(ы)	Предсказанный диапазон УФ <sub>254</sub> D <sub>37</sub> для всего семейства (Дж/м <sup>2</sup> )
дцРНК-вирусы					
<i>Birnaviridae</i>	120(110–170)	5,7–6,2	1400(1300–1900)	1PNV	110–120
<i>Reoviridae</i>	89 (46–123)	18,6–26,4	3800 (1700–5800)	MRV-1, -2 -3 RV-A KEMV-10, -91	72–100
оцРНК-вирусы					
<i>Arenaviridae</i> <sup>*</sup>		11	140p		13
<i>Bornaviridae</i> <sup>*</sup>	34	8,9	300	BDV	34
<i>Bunyaviridae</i> <sup>*</sup>		11–19	140p		7,4–13
<i>Deltavirus</i> <sup>*</sup>		1,7	140 p		82
<i>Filoviridae</i> <sup>*</sup>		19	140 p		7,4
<i>Orthomyxoviridae</i> <sup>*</sup>	7,5 (4,8–10)	10–15	110(70–140)	FLUAV, ISAV	7,3–11
<i>Paramyxoviridae</i> <sup>*</sup>	11(10–12)	15–16	170(150–190)	NDV, MeV	11
<i>Rhabdoviridae</i> <sup>*</sup>	4,3(1,1–2,3)	11–15	51(12–260)	VSV, RABV, VHSV	3,4–4,6
<i>Arterioviridae</i> <sup>**</sup>		13–16	295p		18–23
<i>Astroviridae</i> <sup>**</sup>		6,8–7,9	295 p		37–44
<i>Caliciviridae</i> <sup>**</sup>		7,4–8,3	295p		36–40
<i>Coronaviridae</i> <sup>**</sup>	3,1	20–31	78	BEV	2,5–3,9
<i>Flaviviridae</i> <sup>**</sup>		9,6–12	295p		25–31
«Гепатит Е-подобные» вирусы <sup>**</sup> (HEV-подобные)		7,2	295p		41
<i>Nodaviridae</i> <sup>**</sup>	140	4,5	630	SBNN	140
<i>Picornaviridae</i> <sup>**</sup>	48(25–70)	7–8,5	370(190–540)	PV-1, -2, -3, E-1, -11, CV-A9 - B1, -B5, HHAV, EMCV	44–53
<i>Togaviridae</i> <sup>**</sup>	19(7,3–23)	9–12	220 (83–260)	SINV, VEEV, SFV	18–24
<i>Retroviridae</i> <sup>***</sup>	89(88–120)	7–11	740 (620–980)	MLV, FeLV, MoMSV, RSV	67–130

Фиг. 11b

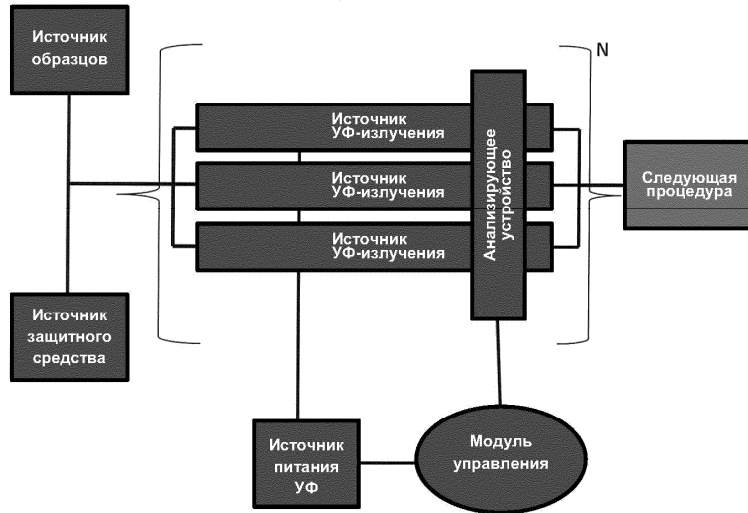
Предсказанные значения LRV как функция от дозы УФ

Семейство вирусов	Чувств-сть	Измер. УФ254 D37 (Дж/м <sup>2</sup> )	Расчит. УФ254 4LRV (Дж/м <sup>2</sup> )	Расчит. УФ254 6LRV (Дж/м <sup>2</sup> )	Расчит. УФ254 8LRV (Дж/м <sup>2</sup> )	Расчит. УФ254 12LRV (Дж/м <sup>2</sup> )	Расчит. УФ254 4LRV (Дж/см <sup>2</sup> )	УФ254 6LRV (мДж/см <sup>2</sup> )	Расчит. УФ254 8LRV (мДж/см <sup>2</sup> )	Расчит. УФ254 12LRV (мДж/см <sup>2</sup> )
<i>Adenoviridae</i>	Низкая	220	2024	3036	4048	6072	202,4	303,6	404,8	607,2
	Средняя	130	1196	1794	2392	3588	119,6	179,4	239,2	358,8
	Высокая	100	920	1380	1840	2760	92	138	184	276
<i>Polioviridae</i>	Средняя	250	2300	3450	4600	6900	230	345	460	690
<i>Parvoviridae</i>	Низкая	10	92	138	184	276	9,2	13,8	18,4	27,6
	Средняя	9,2	84,64	126,96	169,28	253,92	6,464	12,696	16,928	25,392
	Высокая	8,6	79,12	118,68	158,24	237,36	7,912	11,868	15,824	23,736
<i>Меткий вирус мышей (MVM)</i>	Низкая	120	1104	1656	2208	3312	110,4	165,6	220,8	331,2
	Средняя	89	818,8	1228,2	1637,6	2456,4	81,88	122,82	163,76	245,64
	Высокая	88	809,6	1214,4	1619,2	2428,8	80,96	121,44	161,92	242,88
<i>Bunyaviridae</i>	Низкая	13	119,6	179,4	239,2	358,8	11,96	17,94	23,92	35,88
	Средняя	10,2	93,84	140,76	187,68	281,52	9,384	14,076	18,768	28,152
	Высокая	7,4	68,08	102,12	136,16	204,24	6,808	10,212	13,616	20,424

$\ln(n/n_0) = -kD$   
 $k = 1/(D37)$   
 $\log_{10}(x) = \{\log_e(x) / \log_e(10)\}$   
 $\log_{10}(x) = \{\ln(x) / 2,3\}$   
 $LRV = -\log_{10}(n/n_0) = -\{\ln(n/n_0) / 2,3\} = (1/2,3) \cdot (D/D37)$   
 $D = 2,3 \cdot D37 \cdot LRV$

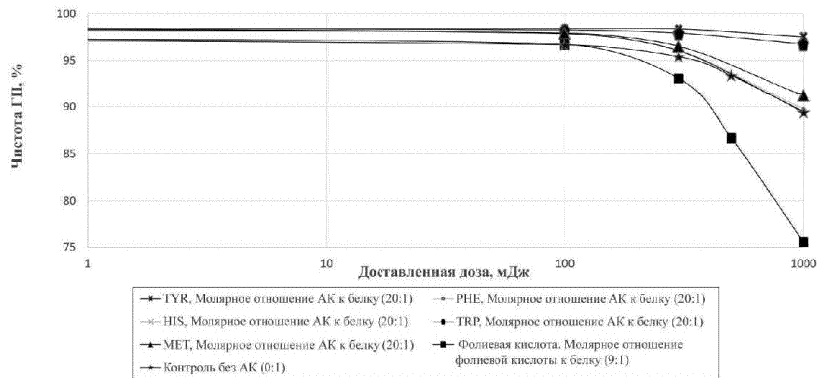
$n_0 = 100$   
 $D = \text{полученная доза}$   
 $n/n_0 = \% \text{ отсутствия повреждений}$   
 Кривая:  $x = -\log_{10}(n/n_0)$ ,  $y = \text{доза}$   
 Наклон  $= -(1/2,3) \cdot 1/D37 = -(D37/2,3)$   
 $= -\log_{10}(n/n_0) = (1/2,3) \cdot (D/D37)$   
 $D37 = (1/\text{наклон}) \cdot (-1/2,3) = (-\text{наклон}/2,3)$   
 Фактор защиты = D37 обработ. /D37 необработ.

Фиг. 12



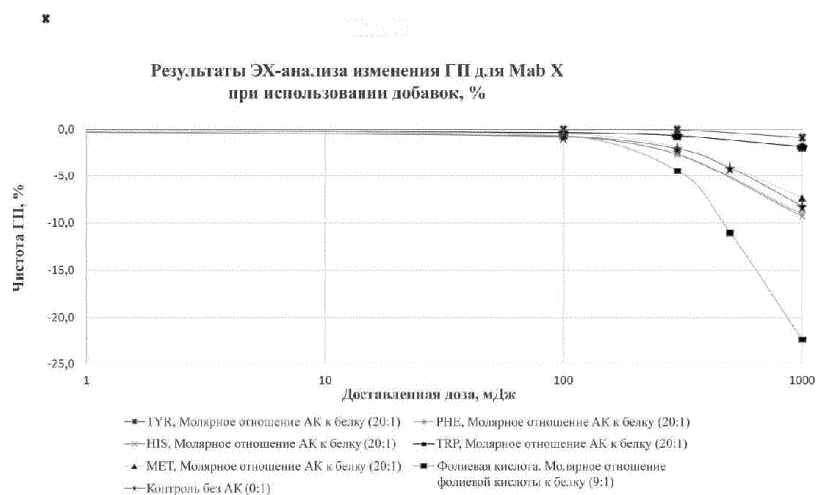
Фиг. 13

Результаты ЭХ-анализа для Mab X при использовании добавок



Фиг. 14





Фиг. 15

