

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035635**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.07.17

(21) Номер заявки
201792012

(22) Дата подачи заявки
2016.03.11

(51) Int. Cl. **B01D 15/20** (2006.01)
B01D 15/38 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

**(54) ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЩЕЛОЧНЫХ ПРОМЫВОЧНЫХ РАСТВОРОВ ВО ВРЕМЯ
ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ ПРИМЕСЕЙ**

(31) 62/132,974

(32) 2015.03.13

(33) US

(43) 2018.01.31

(86) PCT/US2016/021984

(87) WO 2016/149088 2016.09.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:
**Ван Цзюэ, Джаффе Нил Е., Патель
Крина (US)**

(74) Представитель:
Угрюмов В.М. (RU)

(56) US-B1-6172197
EP-A2-0280578
US-B1-7763706
EP-A1-2336172
WO-A2-2008031020

(57) В некоторых вариантах осуществления в изобретении предлагается способ выделения представляющего интерес белка из смеси, которая содержит представляющий интерес белок и одно или несколько загрязняющих веществ, при этом указанный способ включает: а) подвергание смеси воздействию первой матрицы для хроматографии, при этом представляющий интерес белок связывается с первой матрицей для хроматографии; b) приведение в контакт первой матрицы для хроматографии с первым промывочным раствором, который имеет pH по меньшей мере 9,0 и не содержит аргинин или производное аргинина; и c) элюирование представляющего интерес белка с первой матрицы для хроматографии в элюионный раствор.

B1

035635

035635

B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США с серийным номером 62/132974, поданной 13 марта 2015 года, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством отсылки.

Сведения о предшествующем уровне техники

Осуществление крупномасштабного экономически выгодного выделения белков представляет чрезвычайно важную проблему в биофармацевтической индустрии. Терапевтические белки обычно получают с использованием прокариотических или эукариотических клеточных линий, сконструированных для экспрессии представляющего интерес белка из рекомбинантной плазмиды, содержащей ген, кодирующий белок. Отделение желаемого белка от смеси компонентов, питающих клетки, и клеточных побочных продуктов до адекватной чистоты, например, достаточной для его применения в качестве терапевтического средства для человека, представляет серьезную проблему для производителей биологических препаратов.

Таким образом, в данной области существует потребность в альтернативных способах выделения белков, которые могут быть использованы для ускорения крупномасштабного производства терапевтических средств на основе белков, таких как антитела, из клеточной культуры.

Краткое описание изобретения

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предлагается способ выделения представляющего интерес белка из смеси, которая содержит представляющий интерес белок и одно или несколько загрязняющих веществ, включающий: а) подвергание смеси воздействию первой матрицы для хроматографии, при этом представляющий интерес белок связывается с первой матрицей для хроматографии; б) приведение в контакт первой матрицы для хроматографии с первым промывочным раствором, который имеет pH по меньшей мере 9,0 и не содержит аргинин или производное аргинина; и с) элюирование представляющего интерес белка из первой матрицы для хроматографии в элюционный раствор. В качестве иллюстрации, загрязняющие вещества выбраны из белков клеток-хозяев, метаболитов клеток-хозяев, конститутивных белков клеток-хозяев, нуклеиновых кислот, эндотоксинов, вирусов, родственных загрязняющих веществ, липидов, добавок к питательным средам и производных сред. Необязательно первая хроматография представляет собой аффинную хроматографию (например, аффинную хроматографию на основе белка А или аффинную хроматографию на основе белка G). Предпочтительно аффинная хроматография представляет собой аффинную хроматографию на основе белка А. В качестве иллюстрации, представляющий интерес белок выбран из антитела, фрагмента антитела и белка слияния, содержащего Fc-фрагмент. Образцовым представляющим интерес белком является антитело, такое как моноклональное антитело (включая, но без ограничения, человеческое, гуманизированное и химерное антитело).

В некоторых определенных вариантах осуществления pH первого промывочного раствора находится в интервале примерно от 9 до 11. Необязательно pH первого промывочного раствора находится в интервале примерно от 9,5 до 10,5 (например, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4 или 10,5). Образцовое значение pH первого промывочного раствора составляет около 9,6. Другое образцовое значение pH первого промывочного раствора составляет около 10,4.

В некоторых определенных вариантах осуществления способ, кроме того, включает после первого промывочного раствора приведение в контакт первой матрицы для хроматографии со вторым промывочным раствором, который имеет pH по меньшей мере 9,0 и не содержит аргинин или производное аргинина. Например, первый промывочный раствор содержит карбонат натрия при концентрации в диапазоне примерно 0,01-1,0М и хлорид натрия при концентрации в диапазоне примерно 0,5-2М. Например, второй промывочный раствор содержит карбонат натрия при концентрации в диапазоне примерно 0,01-1,0М.

В некоторых определенных вариантах осуществления смесь подвергают воздействию одной или нескольких дополнительных матриц для хроматографии. В качестве иллюстрации, первая хроматография представляет собой аффинную хроматографию, и одна или несколько дополнительных матриц для хроматографии выбраны из ионообменной хроматографии (например, анионообменной хроматографии или катионообменной хроматографии), хроматографии гидрофобного взаимодействия и хроматографии смешанного типа. Необязательно смесь выбрана из собранной культуральной жидкости, супернатанта клеточной культуры и кондиционированного супернатанта клеточной культуры, клеточного лизата и осветленного раствора. Например, культура клеток представляет собой культуру клеток млекопитающих, такую как культура клеток яичников китайского хомячка (СНО).

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана общая схема стандартного процесса выделения и нового процесса;
на фиг. 2 - эффект промывочных растворов с различными значениями pH на снижение уровня СНО-НСР;
на фиг. 3 - эффект промывочного раствора с высоким значением pH на снижение уровней СНО-НСР;
на фиг. 4 - эффект промывочного раствора с высоким значением pH на снижение уровней СНО-DNA;

на фиг. 5 - эффект промывочного раствора с высоким значением pH на уровне остаточного белка А;
на фиг. 6 - сравнение эффективностей альтернативных процессов в отношении снижения уровней СНО-НСР.

Подробное описание изобретения

Изобретение обеспечивает высокоэффективный уникальный подход для удаления примесей во время выделения белка с использованием аффинной хроматографии. В частности, в этом подходе используют щелочные промывочные растворы при очень высоком значении pH (например, 9-11). Другим отличительным признаком щелочных промывочных растворов является то, что для них не требуется присутствие аргинина или производного аргинина. Щелочные промывочные растворы чрезвычайно эффективны для удаления белков клеток-хозяев (НСР) из сырьевого материала, нанесенного на матрицу для аффинной хроматографии. Как показано ниже в рабочих примерах, этот подход является надежным и может быть эффективно использован для различных подклассов моноклональных антител (mAb). Использование таких промывочных растворов в аффинной хроматографии сохраняет высокий выход процесса и целостность продукта. Кроме того, этот подход повышает эффективность процесса и сокращает сроки разработки.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предлагается способ выделения представляющего интерес белка из смеси, которая содержит представляющий интерес белок и одно или несколько загрязняющих веществ, включающий: а) подвергание смеси воздействию первой матрицы для хроматографии, при этом представляющий интерес белок связывается с первой матрицей для хроматографии; б) приведение в контакт первой матрицы для хроматографии с первым промывочным раствором, который имеет pH по меньшей мере 9,0 и не содержит аргинин или производное аргинина; и с) элюирование представляющего интерес белка с первой матрицы для хроматографии в элюирующий раствор. В качестве иллюстрации, загрязняющие вещества выбраны из белков клеток-хозяев, метаболитов клеток-хозяев, конститутивных белков клеток-хозяев, нуклеиновых кислот, эндотоксинов, вирусов, родственных загрязняющих веществ, липидов, добавок к питательным средам и производных сред. Необязательно первая хроматография представляет собой аффинную хроматографию (например, аффинную хроматографию на основе белка А или аффинную хроматографию на основе белка G). Предпочтительно аффинная хроматография представляет собой аффинную хроматографию на основе белка А. В качестве иллюстрации, представляющий интерес белок выбран из антитела, фрагмента антитела и белка слияния, содержащего Fc-фрагмент. Образцовый представляющий интерес белок представляет собой антитело, такое как моноклональное антитело (включая, но без ограничения, человеческое, гуманизированное и химерное антитело).

В некоторых определенных вариантах осуществления pH первого промывочного раствора находится в интервале примерно от 9 до 11. Необязательно pH первого промывочного раствора находится в интервале примерно от 9,5 и 10,5 (например, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4 или 10,5). Образцовое значение pH первого промывочного раствора составляет около 9,6. Другое образцовое значение pH первого промывочного раствора составляет около 10,4.

В некоторых определенных вариантах осуществления способ, кроме того, включает, после первого промывочного раствора, приведение в контакт первой матрицы для хроматографии со вторым промывочным раствором, который имеет pH по меньшей мере 9,0 и не содержит аргинин или производное аргинина. Необязательно способ, кроме того, включает, после второго промывочного раствора, приведение в контакт первой матрицы для хроматографии с третьим промывочным раствором, который имеет значение pH в интервале примерно от 6 до 7 и не содержит аргинин или производное аргинина. Например, первый промывочный раствор содержит карбонат натрия при концентрации в диапазоне примерно 0,01-1,0М и хлорид натрия при концентрации в диапазоне примерно 0,5-2М. Например, второй промывочный раствор содержит карбонат натрия при концентрации в диапазоне примерно 0,01-1,0М.

В некоторых определенных вариантах осуществления смесь подвергают воздействию одной или нескольких дополнительных матриц для хроматографии. В качестве иллюстрации, первая хроматография представляет собой аффинную хроматографию, и одна или несколько дополнительных матриц для хроматографии выбраны из ионообменной хроматографии (например, анионообменной хроматографии или катионообменной хроматографии), хроматографии гидрофобного взаимодействия и хроматографии смешанного типа. Необязательно смесь выбрана из собранной культуральной жидкости, супернатанта клеточной культуры и кондиционированного супернатанта клеточной культуры, клеточного лизата и осветленного основного раствора. Например, культура клеток представляет собой культуру клеток млекопитающих, такую как культура клеток яичников китайского хомячка (СНО).

I. Определения.

Для содействия пониманию настоящего изобретения сначала определены конкретные термины. При использовании в данной заявке, за исключением особо оговоренных здесь случаев, каждый из следующих терминов должен иметь значение, указанное ниже. Дополнительные определения содержатся по всему тексту настоящей заявки.

Используемый здесь термин "представляющий интерес белок" используется в самом широком смысле и включает любой белок (природный или рекомбинантный), присутствующий в смеси, которую

желательно подвергнуть очистке. Такие представляющие интерес белки включают без ограничения гормоны, факторы роста, цитокины, иммуноглобулины (например, антитела) и молекулы, содержащие иммуноглобулинподобный домен (например, молекулы, содержащие домен анкирина или фибронектина).

Используемый здесь термин "клеточная культура" относится к клеткам в жидкой среде. Необязательно клеточная культура содержится в биореакторе. Клетки в клеточной культуре могут быть получены от любого организма, включая, например, бактерии, грибы, насекомые, млекопитающие или растения. В конкретном варианте осуществления клетки в клеточной культуре включают клетки, трансфицированные экспрессионной конструкцией, содержащей нуклеиновую кислоту, которая кодирует представляющий интерес белок (например, антитело). Подходящая жидкая среда включает, например, питательную среду и непитательную среду. В конкретном варианте осуществления клеточная культура содержит линию клеток яичников китайского хомячка (Chinese Hamster Ovary (CHO)) в питательной среде, не подвергнутую очистке, например, путем фильтрации или центрифугирования.

Используемый здесь термин "осветленный раствор" относится к смеси, из которой, по существу, удалено конкретное вещество. Осветленный раствор включает клеточную культуру или клеточный лизат, из которого, по существу, удалены клетки или клеточный дебрис, например, путем фильтрации или центрифугирования.

Используемый здесь термин "биореактор" имеет признанное в данной области значение и относится к камере, разработанной для контролируемого выращивания культуры клеток. Биореактор может иметь любой размер, если он является пригодным для культивирования клеток, например, клеток млекопитающих. Обычно объем биореактора составляет по меньшей мере 30 мл и может быть равным по меньшей мере 1, 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10000, 12000 л или более, или какой-либо промежуточной величине. Условия внутри биореактора, включая, но без ограничения, pH и температуру, обычно контролируют в течение периода культивирования. Подходящий биореактор может состоять (т.е. быть сконструированным) из любого материала, который является подходящим для содержания клеточных культур, суспендированных в среде, в условиях культивирования и способствует росту и жизнеспособности клеток, включая стекло, пластик или металл; материал(ы) не должен влиять на экспрессию или стабильность представляющего интерес белка. Специалист в данной области сможет выбрать биореакторы, подходящие для применения при осуществлении на практике настоящего изобретения.

Используемая здесь "смесь" содержит представляющий интерес белок (для которого желательно выделение) и одно или несколько загрязняющих веществ, то есть примесей. В одном варианте осуществления смесь получают из клетки-хозяина или организма, который экспрессирует представляющий интерес белок (природно или рекомбинантно). Такие смеси включают, например, клеточные культуры, клеточные лизаты и осветленный раствор (например, осветленный супернатант клеточной культуры).

Используемые здесь термины "отделение" и "выделение" используются взаимозаменяемо и относятся к селективному удалению загрязняющих веществ из смеси, содержащей представляющий интерес белок (например, антитело).

Используемый здесь термин "загрязняющее вещество" используется в самом широком смысле и охватывает любой нежелательный компонент или соединение, содержащееся в смеси. В клеточных культурах, клеточных лизатах или осветленном растворе (например, осветленном супернатанте клеточной культуры) загрязняющие вещества включают, например, нуклеиновые кислоты клеток-хозяев (например, ДНК) и белки клеток-хозяев, присутствующие в среде для культивирования клеток. Загрязняющие белки клетки-хозяина включают без ограничения такие белки, которые природно или рекомбинантно продуцируются клеткой-хозяином, а также белки, родственные или происходящие из представляющего интерес белка (например, протеолитические фрагменты), и другие связанные с процессом загрязняющие вещества. В некоторых вариантах осуществления осадок загрязняющих веществ отделяют от клеточной культуры с использованием известных в данной области средств, таких как центрифугирование, стерильная фильтрация, глубинная фильтрация и тангенциальная поточная фильтрация.

Используемый здесь термин "центрифугирование" представляет собой процесс, который включает использование центробежной силы для осаждения гетерогенных смесей с помощью центрифуги, используемой в промышленных и лабораторных установках. Этот процесс используют для разделения двух несмешивающихся жидкостей. Например, в способе согласно настоящему изобретению центрифугирование можно использовать для удаления осадка загрязняющих веществ из смеси, включая без ограничения клеточную культуру или осветленный супернатант клеточной культуры, или элюированную с колонки фракцию.

Используемый здесь термин "стерильная фильтрация" представляет собой способ фильтрации, в котором используются мембранные фильтры, которые обычно представляют собой фильтр с размером пор 0,2 мкм, для эффективного удаления микроорганизмов или мелких частиц. Например, в способе согласно настоящему изобретению стерильная фильтрация может быть использована для удаления осадка загрязняющих веществ из смеси, включая без ограничения клеточную культуру или осветленный супернатант клеточной культуры или элюированную с колонки фракцию.

Используемый здесь термин "глубинная фильтрация" представляет собой способ фильтрации, в котором используются глубинные фильтры, которые обычно характеризуются своим дизайном, обеспечи-

вающим удержание частиц благодаря диапазону размеров пор внутри матрицы фильтра. Пропускная способность глубинного фильтра обычно определяется глубиной, например, 10 или 20 дюймов матрицы и, таким образом, способностью удерживать твердые вещества. Например, в способе согласно настоящему изобретению глубинная фильтрация может быть использована для удаления осадка загрязняющих веществ из смеси, включая без ограничения клеточную культуру или осветленный супернатант клеточной культуры, или элюированную с колонки фракцию.

Используемый здесь термин "тангенциальная поточная фильтрация" относится к процессу фильтрации, в котором смесь образцов циркулирует через верх мембраны, при этом при приложении давления определенные растворенные вещества и малые молекулы проходят через мембрану. Например, в способе согласно настоящему изобретению тангенциальную поточную фильтрацию используют для удаления осадка загрязняющих веществ из смеси, включая без ограничения клеточную культуру или осветленный супернатант клеточной культуры или элюированную с колонки фракцию.

Используемый здесь термин "хроматография" относится к процессу, с помощью которого представляющее интерес растворенное вещество, содержащееся в смеси, например, представляющий интерес белок, отделяется от других растворенных веществ, содержащихся в смеси, путем перлокации смеси через адсорбент, который адсорбирует или удерживает растворенное вещество более или менее сильно за счет свойств растворенного вещества, таких как изоэлектрическая точка (pI), гидрофобность, размер и структура, в конкретных буферных условиях процесса. В способе согласно настоящему изобретению хроматографию можно использовать для удаления загрязняющих веществ после удаления осадка из смеси, включая без ограничения клеточную культуру или осветленный супернатант клеточной культуры, или элюированную с колонки фракцию.

Термины "ионный обмен" и "ионообменная хроматография" относятся к хроматографическому процессу, в котором ионизируемое представляющее интерес растворенное вещество (например, представляющий интерес белок, содержащийся в смеси) взаимодействует с противоположно заряженным лигандом, связанным (например, с помощью ковалентной связи) с твердофазным ионообменным материалом в соответствующих условиях pH и проводимости, так что представляющее интерес растворенное вещество неспецифически взаимодействует с заряженным соединением в большей или меньшей степени, чем примеси растворенного вещества или загрязняющие вещества, присутствующие в смеси. Загрязняющие растворенные вещества, присутствующие в смеси, могут вымываться с колонки, заполненной ионообменным материалом, или связываться со смолой или вымываться из смолы быстрее или медленнее, чем представляющее интерес растворенное вещество. К "ионообменной хроматографии", в частности, относится катионообменная, анионообменная хроматография и хроматография смешанного типа.

Выражение "ионообменный материал" относится к твердой фазе, которая является отрицательно заряженной (т.е. катионообменной смоле или мембране) или положительно заряженной (т.е. анионообменной смоле или мембране). В одном варианте осуществления заряд может быть обеспечен присоединением одного или нескольких заряженных лигандов (или адсорбентов) к твердой фазе, например, путем ковалентного связывания. Альтернативно или дополнительно, заряд может являться неотъемлемым свойством твердой фазы (например, как в случае диоксида кремния, который имеет общий отрицательный заряд).

"Катионообменная смола" или "катионообменная мембрана" относится к твердой фазе, которая является отрицательно заряженной и имеет свободные катионы для обмена с катионами в водном растворе, проходящем поверх твердой фазы или через твердую фазу. Может быть использован любой отрицательно заряженный лиганд, присоединенный к твердой фазе, подходящий для формирования катионообменной смолы, например карбоксилат, сульфонат и другие, как описано ниже. Коммерчески доступные катионообменные смолы в качестве неограничивающих примеров включают, например, смолы с группой на основе сульфоната (например, MonoS, MiniS, Source 15S и 30S, SP SEPHAROSE® Fast Flow, SP SEPHAROSE® High Performance от фирмы GE Healthcare, TOYOPEARL® SP-650S и SP-650M от фирмы Tosoh, MACRO-PREP® High S от фирмы BioRad, Ceramic HyperD S, TRISACRYL® M и LS SP и Spheredex LS SP от фирмы Pall Technologies); группой на основе сульфозтила (например, FRACTOGEL® SE от фирмы EMD, POROS® S-10 и S-20 от фирмы Applied Biosystems); группой на основе сульфопропила (например, TSK Gel SP 5PW и SP-5PW-HR от фирмы Tosoh, POROS® HS-20, HS 50, и POROS® XS от фирмы Life Technologies); группой на основе сульфоизобутила (например, FRACTOGEL® EMD SO₃ от фирмы EMD); группой на основе сульфоксиэтила (например, SE52, SE53 и Express-Ion S от фирмы Whatman), группой на основе карбоксиметила (например, CM SEPHAROSE® Fast Flow от фирмы GE Healthcare, Hydrocell CM от фирмы Biochrom Labs Inc., MACRO-PREP® CM от фирмы BioRad, Ceramic HyperD CM, TRISACRYL® M CM, TRISACRYL® LS CM от фирмы Pall Technologies, Matrx CEL-LUFINE® C500 и C200 от фирмы Millipore, CM52, CM32, CM23 и Express-Ion C от фирмы Whatman, TOYOPEARL® CM-650S, CM-650M и CM-650C от фирмы Tosoh); группами на основе сульфоновой и карбоновой кислот (например, BAKERBOND® Carboxy-Sulfon от фирмы J.T. Baker); группой на основе карбоновой кислоты (например, WP CBX от фирмы J.T. Baker, DOWEX® MAC-3 от фирмы Dow Liquid Separations, AMBERLITE® Weak Cation Exchangers, DOWEX® Weak Cation Exchanger и DIAION® Weak

Cation Exchangers от фирмы Sigma-Aldrich и FRACTOGEL® EMD COO- от фирмы EMD); группой на основе сульфоновой кислоты (например, Hydrocell SP от фирмы Biochrom Labs Inc., DOWEX® Fine Mesh Strong Acid Cation Resin от фирмы Dow Liquid Separations, UNOsphere S, WP Sulfonic от фирмы J.T. Baker, мембрана SARTOBIND® S от фирмы Sartorius, AMBERLITE® Strong Cation Exchangers, DOWEX® Strong Cation и DIAION® Strong Cation Exchanger от фирмы Sigma-Aldrich); и группой на основе ортофосфата (например, PI 1 от фирмы Whatman).

"Анионообменная смола" или "анионообменная мембрана" относится к твердой фазе, которая является положительно заряженной, таким образом, она содержит один или несколько присоединенных к ней положительно заряженных лигандов. Может быть использован любой положительно заряженный лиганд, присоединенный к твердой фазе, подходящий для формирования анионообменной смолы, такой как четвертичные аминогруппы. Коммерчески доступные анионообменные смолы включают DEAE-целлюлозу, POROS® PI 20, PI 50, HQ 10, HQ 20, HQ 50, D 50 от фирмы Applied Biosystems, SARTOBIND® Q от фирмы Sartorius, MonoQ, MiniQ, Source 15Q и 30Q, Q, DEAE и ANX SEPHAROSE® Fast Flow, Q SEPHAROSE® High Performance, QAE SEPHADEX® и FAST Q SEPHAROSE® (GE Healthcare), WP PEI, WP DEAM, WP QUAT от фирмы J.T. Baker, Hydrocell DEAE и Hydrocell QA от фирмы Biochrom Labs Inc., UNOsphere Q, MACRO-PREP® DEAE и MACRO-PREP® High Q от фирмы Biorad, Ceramic HyperD Q, ceramic HyperD DEAE, TRISACRYL® M и LS DEAE, Spheredex LS DEAE, QMA SPHEROSIL® LS, QMA SPHEROSIL® M и MUSTANG® Q от фирмы Pall Technologies, анионные смолы DOWEX® Fine Mesh Strong Base Type I и Type II и DOWEX® MONOSPHER E 77, анион слабого основания от фирмы Dow Liquid Separations, мембрану INTERCEPT® Q, Matrex CELLUFINE® A200, A500, Q500 и Q800 от фирмы Millipore, FRACTOGEL® EMD TMAE, FRACTOGEL® EMD DEAE и FRACTOGEL® EMD DMAE от фирмы EMD, слабые и сильные анионообменные материалы типов I и II AMBERLITE®, слабые и сильные анионообменные материалы типов I и II DOWEX®, слабые и сильные анионообменные материалы типов I и II DIAION®, DUOLITE® от фирмы Sigma-Aldrich, гель Q TSK и DEAE 5PW и 5PW-HR, TOYOPEARL® SuperQ-650S, 650M и 650C, QAE-550C и 650S, DEAE-650M и 650C от фирмы Tosoh, QA52, DE23, DE32, DE51, DE52, DE53, Express-Ion D и Express-Ion Q от фирмы Whatman, и SARTOBIND® Q (Sartorius Corporation, New York, USA).

"Ионообменная смола смешанного типа", "ионообменная мембрана смешанного типа" или "смешанный тип" относится к твердой фазе, которая ковалентно модифицирована катионными, анионными и/или гидрофобными группами. Примеры ионообменных смол смешанного типа включают BAKER-BOND® ABX (J.T. Baker; Phillipsburg, NJ), керамический гидроксипатит типов I и II и фторидный гидроксипатит (BioRad; Hercules, CA) и MEP и MBI HyperCel (Pall Corporation; East Hills, NY).

"Смола для хроматографии гидрофобного взаимодействия" или "мембрана для хроматографии гидрофобного взаимодействия" относится к твердой фазе, которая ковалентно модифицирована фенильными, октальными или бутильными химическими соединениями. Хроматография гидрофобного взаимодействия представляет собой метод разделения, в котором используются свойства гидрофобности для разделения белков. В этом типе хроматографии гидрофобные группы, такие как фенил, октил или бутил, присоединяются к стационарной колонке. Белки, проходящие через колонку, которые имеют гидрофобные боковые цепи аминокислот на своих поверхностях, способны взаимодействовать и связываться с гидрофобными группами на колонке. Примеры смол для хроматографии гидрофобного взаимодействия включают: (1) Butyl FF, Butyl HP, Octyl FF, Phenyl FF, Phenyl HP, Phenyl FF (high sub), Phenyl FF (low sub), Capto Phenyl ImpRes, Capto Phenyl (high sub), Capto Octyl, Capto ButylImpRes, Capto Butyl (GE Healthcare, Uppsala, Sweden); (2) TOYOPEARL® Super Butyl-550C, TOYOPEARL® Hexyl-650C, Butyl-650C, Phenyl-650C, Butyl 600 M, Phenyl-600M, PPG-600M, Butyl-650M, Phenyl-650M, Ether-650M, Butyl-650S, Phenyl-650S, Ether-650S, TSKgel Pheny-5PW, TSKgel Ether-5PW (Tosoh Bioscience, Tokyo, Japan); (3) MACRO-PREP®-butyl, MACRO-PREP®-methyl (Bio-Rad); and (4) SARTOBIND® Phenyl (Sartorius corporation, New York, USA).

II. Представляющие интерес белки.

В некоторых аспектах способы согласно настоящему изобретению могут быть использованы для выделения любого представляющего интерес белка, включая, но без ограничения, белки, обладающие фармацевтическими, диагностическими, агротехническими и/или какими-либо иными из других разнообразных свойств, которые являются полезными в коммерческих, экспериментальных или других применениях. Кроме того, представляющий интерес белок может представлять собой терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления белки, выделенные с использованием способов согласно настоящему изобретению, могут быть обработаны или модифицированы. Например, представляющий интерес белок в соответствии с настоящим изобретением может быть гликозилирован.

Таким образом, настоящее изобретение можно применять для культивирования клеток для получения любого терапевтического белка, например фармацевтически или коммерчески важных ферментов, рецепторов, рецепторных белков слияния, антител (например, моноклональных или поликлональных антител), антигенсвязывающих фрагментов антитела, слитых белков, содержащих Fc-фрагмент, цитоки-

нов, гормонов, регуляторных факторов, факторов роста, факторов коагуляции/свертывания или антиген-связывающих агентов. Приведенный выше перечень белков является лишь иллюстративным и не рассматривается в качестве ограничивающего перечисления. Специалисту в данной области будет понятно, что другие белки могут быть получены в соответствии с настоящим изобретением, и он сможет применять способы, раскрытые здесь, для получения таких белков.

В одном конкретном варианте осуществления изобретения белок, выделенный с использованием способа согласно изобретению, представляет собой антитело. Термин "антитело" используется в самом широком смысле и включает моноклональные антитела (включая моноклональные антитела полной длины), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), фрагменты антител, иммуноадгезины и химеры антитело-иммуноадгезин.

Термин "фрагмент антитела" включает по меньшей мере часть антитела полной длины и обычно его антигенсвязывающую или вариабельную область. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; молекулы одноцепочечных антител; диатела; линейные антитела; и мультиспецифические антитела, образованные из сконструированных фрагментов антител.

Термин "моноклональное антитело" используется в общепринятом смысле и относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высоко специфичными, направленными против единственного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных антигенных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против единственной детерминанты на антигене. Термин "моноклональное" при описании антител указывает на характер антитела, которое получено, по существу, из гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать в качестве необходимой рекомендации получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, применяемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены с использованием общепринятого метода гибридом, впервые описанного Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), или могут быть получены с использованием способов на основе рекомбинантной ДНК (см., например, патент США 4816567). Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговых библиотек антител, например, с использованием способов, описанных в Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); и патентах США 5223409; 5403484; 5571698; 5427908; 5580717; 5969108; 6172197; 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915; и 6593081.

Моноклональные антитела, описанные здесь, включают "химерные" и "гуманизированные" антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от конкретных видов или принадлежащих конкретному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи(цепей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от других видов или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, при условии, что они проявляют желательную биологическую активность (патент США 4816567; и Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 :6851-6855 (1984)). "Гуманизированные" формы нечеловеческих (например, мышинных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. По большей части, гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки в гипервариабельной области реципиента заменены остатками из гипервариабельной области отличных от человека видов (донорное антитело), таких как мышь, крыса, кролик или отличный от человека примат, обладающие желаемой специфичностью, сродством и емкостью. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) иммуноглобулина человека заменяют соответствующими остатками, отличными от человеческих. Более того, гуманизированные антитела могут включать остатки, отсутствующие в реципиентном антителе и в донорном антителе. Такие модификации производятся для дополнительного улучшения свойств антитела. Обычно гуманизированное антитело содержит, по существу, полностью по меньшей мере один, а обычно два вариабельных домена, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют петлям отличного от человеческого иммуноглобулина, и все или по существу все области FR являются FR последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также включает по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека. Более подробное описание см. в Jones et al., *Nature*, 321 :522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992).

Химерные или гуманизированные антитела могут быть получены на основе последовательности мышинного моноклонального антитела, полученного, как описано выше. ДНК, кодирующая тяжелую и легкую цепи иммуноглобулина, может быть получена из представляющей интерес мышинной гибридомы и сконструирована стандартными методами молекулярной биологии таким образом, чтобы она содержала последовательности немышиного (например, человеческого) иммуноглобулина. Например, для создания химерного антитела мышинные вариабельные области могут быть связаны с человеческими константными областями методами, известными в данной области (см., например, патент США 4816567,

выданный Cabilly et al.). Для создания гуманизированного антитела мышинные области CDR могут быть встроены в человеческую каркасную область методами, известными в данной области (см., например, патент США 5225539, выданный Winter, и патенты США 5530101; 5585089; 5693762; и 6180370, выданные Queen et al.).

Моноклональные антитела, описанные здесь, также включают "человеческие" антитела, которые могут быть выделены из различных источников, включая, например, кровь пациента-человека, или получены рекомбинантно с использованием трансгенных животных. Примеры таких трансгенных животных включают KM-MOUSE® (Medarex, Inc., Princeton, NJ), которое содержит трансген тяжелой цепи человека и трансхромосому легкой цепи человека (см. WO 02/43478), XENOMOUSE® (Abgenix, Inc., Fremont CA; описано, например, в патентах США 5939598; 6075181; 6114598; 6150584; и 6162963, выданных Kucherlapati et al.), и HUMAB-MOUSE® (Medarex, Inc.; описано, например, в Taylor L. et al., *Nucleic Acids Research*, 20:6287-6295 (1992); Chen J. et al., *International Immunology*, 5:647-656 (1993); Tuaillon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:3720-3724 (1993); Choi et al., *Nature Genetics*, 4: 117-123 (1993); Chen, J. et al., *EMBO J.*, 12:821-830 (1993); Tuaillon et al., *J. Immunol.*, 152:2912-2920 (1994); Taylor, L. et al., *International Immunology*, 6:579-591 (1994); и Fishwild D. et al., *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); патентах США 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299; 5770429; и 5545807; и публикациях PCT WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884, WO 99/45962 и WO 01/14424, выданных Korman et al.). Человеческие моноклональные антитела согласно изобретению могут быть также получены с использованием мышей SCID, которым были введены человеческие иммунные клетки, реконструированные так, чтобы у этих мышей, после иммунизации, вырабатывалось человеческое антитело. Такие мыши описаны, например, в патентах США 5476996 и 5698767, выданных Wilson et al.

III. Смеси, содержащие представляющий интерес белок.

Способы согласно изобретению можно применять к любой смеси, содержащей представляющей интерес белок. В одном варианте осуществления смесь получена из живых клеток или продуцируется живыми клетками, которые экспрессируют белок, подлежащий выделению (например, природно или путем генной инженерии). Необязательно клетки в клеточной культуре включают клетки, трансфицированные экспрессионной конструкцией, содержащей нуклеиновую кислоту, которая кодирует представляющий интерес белок. Клеточные генно-инженерные способы получения белков хорошо известны в данной области. См., например, Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York (1990) и патенты США 5534615 и 4816567, каждый из которых специально включен в настоящий документ путем ссылки. Такие способы включают введение нуклеиновых кислот, которые кодируют и обеспечивают экспрессию белка, в живые клетки-хозяева. Эти клетки-хозяева могут представлять собой бактериальные клетки, клетки грибов, клетки насекомых или, предпочтительно, клетки животных, выращенные в культуре. Бактериальные клетки-хозяева включают, но без ограничения, клетки *E.coli*. Примеры подходящих штаммов *E.coli* включают: HB101, DH5a, GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539 и любой штамм *E.coli*, не способный расщеплять чужеродную ДНК. Грибковые клетки-хозяева, которые могут быть использованы, включают, но без ограничения, клетки *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* и *Aspergillus*. Клетки насекомых, которые могут быть использованы, включают, но без ограничения, *Bombyx mori*, *Mamestra drassicae*, *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*, *Drosophila melanogaster*.

Многочисленные клеточные линии млекопитающих являются подходящими клетками-хозяевами для экспрессии представляющих интерес белков. Клеточные линии клеток-хозяев млекопитающих включают, например, COS, PER.C6, TM4, VERO076, DXB11, MDCK, BRL-3A, W138, Hep G2, MMT, MRC 5, FS4, CHO, 293T, A431, 3T3, CV-1, C3H10T1/2, Colo205, 293, HeLa, L-клетки, BHK, HL-60, FRhL-2, U937, NaK, клетки Jurkat, Rat2, BaF3, 32D, FDCP-1, PC 12, Mix, клетки мышинной миеломы (например, SP2/0 и NSO) и клетки C2C12, а также трансформированные клеточные линии приматов, гибридомы, нормальные диплоидные клетки и клеточные штаммы, полученные в результате культивирования *in vitro* первичной ткани и первичных эксплантатов. С использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области (например, трансформацией, вирусным инфицированием и/или селекцией), могут быть разработаны новые животные клеточные линии. Любую эукариотическую клетку, которая способна экспрессировать представляющий интерес белок, можно использовать в раскрытых способах культивирования клеток. Многочисленные клеточные линии поставляются коммерческими организациями, в частности Американской коллекцией типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC®). В одном варианте осуществления изобретения для получения культуры клеток, например, культуры клеток для крупномасштабного производства, используют клетки гибридомы. Конструирование продуцирующих антитело клеток гибридомы хорошо известно в данной области. В одном варианте осуществления изобретения для получения культуры клеток, например культуры клеток в крупном масштабе, используют клетки CHO для получения представляющего интерес белка, такого как антитело (см., например, WO 94/11026). Различные типы клеток CHO хорошо известны в данной области, например, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DXB11, CHO/dhfr и CHO-S.

В определенном варианте осуществления способы согласно изобретению включают эффективное

удаление загрязняющих веществ из смеси (например, клеточной культуры, клеточного лизата или осветленного раствора), которая содержит высокую концентрацию представляющего интерес белка (например, антитело). Например, концентрация представляющего интерес белка может находиться в диапазоне примерно от 0,5 до 50 мг/мл (например, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мг/мл).

Приготовление смесей изначально зависит от способа экспрессии белка. Некоторые клеточные системы напрямую секретируют белок (например, антитело) из клеток в окружающую ростовую среду, тогда как другие системы удерживают антитело внутриклеточно. Для белков, продуцируемых внутриклеточно, клетку можно разрушить различными способами, такими как приложение механических усилий, осмотический шок и обработка ферментами. Такое разрушение приводит к высвобождению всего содержимого клеток с образованием гомогената и, кроме того, приводит к продуцированию субклеточных фрагментов, которые могут быть удалены путем центрифугирования или фильтрации. Аналогичные проблемы возникают, хотя и в меньшей степени, с непосредственно секретируемыми белками вследствие естественной гибели клеток и высвобождения внутриклеточных белков клеток-хозяев в ходе продуцирования белка.

В одном варианте осуществления клетки или клеточный дербис удаляют из смеси, например, для приготовления осветленного раствора. В способах согласно изобретению можно использовать любую подходящую методику для удаления клеток или клеточного дебриса. Если белок продуцируется внутриклеточно, в качестве первой стадии удаляют частицы дебриса, клетки-хозяева или их лизированные фрагменты, например, посредством центрифугирования или фильтрации с получением смеси, которую затем подвергают очистке в соответствии со способами, описанными здесь (т.е. из которой выделяют представляющий интерес белок). Если белок секретируется в среду, то рекомбинантные клетки-хозяева могут быть отделены от среды для культивирования клеток, например посредством центрифугирования, тангенциальной поточной фильтрации или глубинной фильтрации с получением смеси, из которой выделяют представляющий интерес белок.

IV. (Щелочные) промывочные растворы с высоким pH.

Способы согласно изобретению включают приведение в контакт первой матрицы для хроматографии (например, матрицы для аффинной хроматографии) с щелочным промывочным раствором, имеющим значение pH по меньшей мере 9,0. Для такого щелочного промывочного раствора не требуется присутствие аргинина или производного аргинина. Необязательно такой щелочной промывочный раствор может содержать или может не содержать небуферную соль.

В некоторых вариантах осуществления pH щелочного промывочного раствора находится в интервале примерно от 9 до 11. Необязательно pH первого промывочного раствора находится в интервале примерно от 9,5 до 10,5 (например, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4 или 10,5). Образцовое значение pH первого промывочного раствора составляет около 9,6. Другое образцовое значение pH первого промывочного раствора составляет около 10,4. Необязательно щелочной промывочный раствор содержит карбонат натрия. Необязательно щелочной промывочный раствор содержит хлорид натрия. В определенном варианте осуществления щелочной промывочный раствор содержит карбонат натрия при концентрации в диапазоне примерно 0,01-1,0М и хлорид натрия при концентрации в диапазоне примерно 0,5-2 М, имеющий pH в интервале примерно от 9,5 до 10,5.

Необязательно способ, кроме того, включает приведение в контакт первой матрицы для хроматографии (например, матрицы для аффинной хроматографии) со вторым щелочным промывочным раствором. Второй щелочной промывочный раствор имеет значение pH по меньшей мере 9,0 и не содержит аргинин или производное аргинина. Например, второй щелочной промывочный раствор содержит карбонат натрия при концентрации в диапазоне примерно 0,01-1,0М.

В некоторых вариантах осуществления смесь подвергают воздействию одной или нескольких дополнительных матриц для хроматографии после первой очистки хроматографией. Например, одна или несколько дополнительных матриц для хроматографии выбраны из ионообменной хроматографии (например, анионообменной хроматографии или катионообменной хроматографии), хроматографии гидрофобного взаимодействия и хроматографии смешанного типа.

Настоящее изобретение, кроме того, проиллюстрировано следующими примерами, которые не должны рассматриваться в качестве дополнительного ограничения. Содержимое всех фигур и всех ссылок, патентов и опубликованных патентных заявок, цитированных в данной заявке, включено в полном объеме в настоящем документе путем ссылки.

Пример.

Введение.

В настоящее время из-за клинической потребности разрабатывается множество моноклональных антител с целью их применения в качестве терапевтических средств. В условиях конкуренции на рынке биофармацевтические компании постоянно стремятся сократить сроки разработки и создать более эффективные процессы в доклиническом и клиническом производстве. Один из подходов заключается в улучшении и рационализации схем очистки для того, что соответствовать требуемым характеристикам продукта. По этой причине желательна максимальное удаление примесей на каждой отдельной операции [1,4]. Однако сырьевые потоки, подлежащие очистке, содержат различные примеси, которые критически

важно удалить и которые могут быть трудно удаляемыми, включая белок клетки-хозяина, ДНК, адвентициальные и эндогенные вирусы, эндотоксин и агрегаты. Разработанный способ промышленной очистки строго соответствует этим характеристикам качества продукта и придерживается четкого общего руководства, содержащего критерии приемлемости продукта (табл. 1) [2,3,4]. В идеальном случае каждая отдельная операция в многоступенчатой схеме очистки должна вносить определенный вклад в общее качество продукта, так как лишние стадии очистки часто снижают выделение белка, а также увеличивают время выполнения операции и затраты. Однако чтобы обеспечить надежность процесса, для выведения примесей часто требуются обширные схемы очистки и ортогональные подходы.

Аффинное разделение является наиболее селективным типом хроматографии, так как обеспечивает разделение на основе обратимого, высоко специфического взаимодействия между mAb и лигандом, ковалентно связанным с матрицей [1,4,16]. Аффинная хроматография с использованием белка А часто является ключевым выбором для схем последующей очистки, так как может обеспечить до 98% удаления примесей из сырьевых потоков моноклональных антител [1,5]. Однако процессы, в которых используют белок А, часто все еще требуют от двух до трех последовательных полировочных стадий хроматографии [2,3]. Кроме того, аффинная хроматография является одной из наиболее дорогостоящих отдельных операций для последовательной переработки [15]. По этим причинам усилия по разработке часто направлены на максимальное увеличение очистки от примесей с помощью аффинной захватной хроматографии на основе белка А.

Таким образом, большой интерес вызывает оптимизация характеристик аффинной хроматографии для улучшения очистки от примесей. В течение более двух десятилетий проводилась разработка улучшенных промывочных растворов, наносимых перед элюированием, для аффинной хроматографии с помощью белка А. Существует несколько подтверждений того, что добавление солей, органических растворителей, неионогенных поверхностно-активных веществ, хаотропных средств, гидрофобных модификаторов и аминокислот уменьшает содержание НРС и агрегатов элюированного IgG [1,6,7,18,19]. Несмотря на перспективность описание их общих эффектов на антитело практически отсутствует. В данном исследовании заявители провели тестирование нестандартной стратегии, состоящей в использовании щелочных промывочных растворов, для улучшения очистки от примесей во время аффинной хроматографии. Заявители представляют результаты нанесения щелочных промывочных растворов перед элюированием при pH 9,6 и 10,4, и применяют панель аналитических методов для характеристики состояния и качества элюированного антитела. Эти анализы включают SEC-UPLC (эксклюзионная хроматография/сверхпроизводительная жидкостная хроматография), IEF (изоэлектрическое фокусирование), CE-SDS (капиллярный электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия), SEC-MALS (эксклюзионная хроматография/фотометрия многоуглового рассеяния света), анализ связывания по методу ELISA, дифференциальную сканирующую калориметрию, круговой дихроизм, ELISA CHO-HCP, анализ ДНК и анализ остаточного белка А (ProA).

В "исходном" процессе захвата ProA (фиг. 1) используются условия, которые в целом считаются промышленным стандартом, при этом все буферные растворы, используемые в хроматографии, имеют значения pH, которые на одну или несколько единиц ниже изоэлектрической точки mAb. Стадии связывания и промывки выполняются при нейтральном pH и продукт элюируют при кислом pH [3,5,6]. В настоящем документе исходная стадия захвата стала более эффективной благодаря разработке уникальной "стратегии промывки с щелочным pH" (фиг. 1). После связывания наносят промывочные растворы с щелочным pH. Затем mAb промывают буфером при нейтральном pH и элюируют таким же способом, как в исходном процессе.

Реализация стратегии промывки с щелочным pH сделала схему выделения более эффективной и позволила исключить вторую стадию полировки. Одна из проблем, связанных с реализацией этой стратегии, состояла в том, что использование условий щелочного pH может быть связано с нестабильностью продукта, такой как деамидирование, разворачивание белка и образование агрегатов [3,8]. После сравнения исходного процесса хроматографии с процессом захвата с использованием промывочных растворов с высоким значением pH для 3 различных продуктов, теоретически оцененной нестабильности продукта не наблюдалось. Кроме того, реализация промывочных растворов с щелочным pH является особенно эффективной в отношении удаления родственных примесей. В настоящем документе описана нестандартная стратегия применения промывочных растворов с щелочным pH, которая устраняет необходимость в стадии процесса и тем самым позволяет создать более эффективную, рациональную технологию.

Таблица 1. Важные параметры качества и одобренные критерии приемлемости, используемые в данном исследовании

	Параметры качества	Критерии приемлемости
Присутствие примесей	Остаточный CHO-DNA	≤10 пг/мг
	Остаточный CHO-HCP	≤100 нг/мг
	Остаточный Белок А	≤100 нг/мг
	Остаточный инсулин	≤100 нг/мг
Чистота	SEC-HPLC (% мономер)	≥95%
	SEC-HPLC (% HMW)	≤4%
	pI Варианты, отличающиеся зарядами (iCIEF)	Сравнимая с эталонным стандартом
	%SDS – в невосстанавливающих условиях	≥90%
	Чистота основной полосы	
	%SDS – в невосстанавливающих условиях	≥90%
	Чистота полос тяжелой и легкой цепей	

Материалы и способы.

Клеточная культура.

Использовали супернатанты клеточных культур из клеток яичников китайского хомячка (CHO), содержащие полностью человеческие моноклональные антитела. mAb1 представляет собой молекулу IgG типа 4 со значением pI, равным 7,6, mAb2 представляет собой молекулу IgG 1 со значением pI, равным 8,4, и mAb3 представляет собой IgG1 со значением pI, равным 9,2.

Хроматография.

Смолу MabSelect от компании GE Healthcare использовали для всех экспериментов по захватной хроматографии. Эксперименты по хроматографии на препаративной колонке проводили с использованием системы AKTA Avant (GE Lifesciences), управляемой программным обеспечением Unicorn 6.3. Все колонки упаковывали в лаборатории в соответствии с рекомендациями изготовителя смолы.

Исходный захват ProA и скрининг промывочных добавок.

После нанесения образца колонку промывали сначала PBS, pH 7,4, а затем 5 mM янтарной кислотой, pH 5,8. Моноклональное антитело (mAb) элюировали с колонки с использованием буфера, содержащего 10 mM фосфорную кислоту, pH 3,0. Для оценки эффективности хроматографии при добавлении промывочных добавок между промывочным раствором 1 и промывочным раствором 2 включали дополнительный переменный промывочный раствор. Тестируемые переменные промывочные растворы включали 20 mM янтарную кислоту, 500 mM NaCl, 500 mM L-аргинин, pH 5,8; 20 mM янтарную кислоту, 0,1% Triton X-100, pH 5,8; 20 mM янтарную кислоту, 5% PEG 400, pH 5,8; и 17 mM фосфат натрия, 4% каприловую кислоту, pH 7,4.

Захват ProA с использованием стратегии промывки с высоким pH.

После нанесения образца колонку сначала промывали буфером PBS, pH 7,4, после чего следовала вторая стадия промывки буфером, содержащим 200 mM карбоната натрия, 1M хлорида натрия, pH 9,6 или 10,4. После второй стадии промывки следовала третья стадия промывки с использованием буфера, содержащего 100 mM карбоната натрия, pH 9,6 или 10,4, после чего следовала четвертая стадия промывки с использованием буфера, содержащего 35 mM фосфат натрия, pH 6,0. Моноклональное антитело (mAb) элюировали с колонки с использованием буфера, содержащего 10 mM фосфорную кислоту, pH 3,0.

Инактивация вирусов, нейтрализация и фильтрация.

После элюирования объединенные фракции продукта, полученные в результате аффинной хроматографии, подвергали вирусной инактивации при низком pH путем доведения pH продукта до низкого значения (3,4-3,6) с использованием 0,1N HCl с последующей выдержкой в течение 1 ч. Затем продукт нейтрализовали (7,0-7,4), используя 2M Tris. После нейтрализации объединенные фракции продукта фильтровали, используя 0,2-мкм фильтр.

ELISA - анализ белков клеток-хозяев клеточной линии CHO.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) для количественного определения остаточных белков клеток-хозяев (HCP) клеточной линии CHO (CHO-HCP) проводили высокопроизводительным способом с использованием системы TECAN® Liquid Handling System. Уровни белков клеток-хозяев в образцах количественно оценивали с использованием набора CHO Host Cell proteins 3rd generation kit (номер по каталогу F550, Cygnus Technologies, Southport, NC) в соответствии с протоколом производителя.

Оптическую плотность измеряли при 450/650 нм с использованием ридера TECAN® Infinite M1000 Pro reader.

Анализ остаточной ДНК.

Количественную полимеразную цепную реакцию (PCR) в реальном времени (RT-PCR) использовали для определения уровня остаточной ДНК клеток CHO (CHO-DNA) в образцах. RT-PCR проводили со смесью SYBR® green PCR master mix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)), используя систему детекции MyiQ Single-Color Real-Time PCR (Bio-Rad Lab. Hercules, CA, USA) в соответствии с инструкциями производителя.

Анализ остаточного белка А.

Анализ ELISA для количественного определения остаточного белка А (rProA) проводили высокопроизводительным способом, используя систему TECAN® Liquid Handling System. Остаточный белок А количественно оценивали с использованием набора Residual Rrotein A kit (номер по каталогу 9333-1, Repligen) в соответствии с протоколом производителя. Оптическую плотность измеряли при 450/650 нм с использованием ридера TECAN® Infinite M1000 Pro reader.

Круговой дихроизм.

Спектры кругового дихроизма снимали на спектрофотометре Jasco J-815 CD, оборудованном 6-позиционным кюветодержателем с термостатированием. Образцы mAb разбавляли в их соответствующих буферах до 0,25 мг/мл и спектры снимали в диапазоне длин волн 260-195 нм в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1,0 мм при 25°C. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения SpectraManager (Jasco) для нормализации скорректированных по буферу спектров к средней остаточной эллиптичности на основе концентрации экспериментального пептида, молекулярной массы (MW) и количества аминокислот для каждого mAb.

Дифференциальная сканирующая калориметрия.

Для определения профилей термической стабильности DSC выполняли для моноклональных антител (mAb) из каждой партии. Образцы нормализовали до 0,75 мг/мл в их соответствующем буфере для обработки. Сканирование проводили на MICROCAL® Capillary DSC, используя температурный градиент от 10 до 100°C со скоростью подъема 90°C/ч. Профили сканирования отдельно взятого буфера вычитали из сигналов образцов и данные подгоняли к модели "non-2-state" с использованием программного пакета для анализа MICROCAL® Origin 7.0 для получения значений температур максимума тепловой денатурации (T_m).

SE-UPLC.

Эксклюзионную хроматографию использовали для оценки чистоты mAb после выделения с помощью каждой стратегии захвата с использованием системы сверхэффективной жидкостной хроматографии Waters Acquity H-Class Bio UPLC®. Для выполнения этого анализа использовали колонку Acquity UPLC® BEH200 SEC 1,7 мкм (4,6 × 150 мм)), в которой подвижная фаза состояла из PBS с pH 6,8 и скорость потока составляла 1 мл/мин. Температуру колонки поддерживали при 25°C в течение всего опыта.

SEC-MALS.

Моноклональные антитела (mAb) исследовали с помощью эксклюзионной хроматографии в сочетании с детектором многоугольного рассеяния света (SEC-MALS). Изократические разделения выполняли на колонке Shodex PROTEIN KW-803, соединенной с Prominence Shimadzu UFLC, в буфере, содержащем 200 мМ фосфат калия, 150 мМ хлорид натрия, pH 6,8, содержащем 0,02% азида натрия, при скорости потока 0,5 мл/мин. Образцы по 50 мкг вводили в верхнюю часть колонки с помощью автодозатора серии Prominence SIL-20 AC фирмы Shimadzu и данные получали от трех последовательно соединенных детекторов; спектрофотометрического детектора на диодной матрице Prominence SPD-20AD UV/vis, затем детектора светорассеяния с многоугольным рассеянием света Wyatt miniDAWN TREOS®, затем рефрактометра OPTILAB® T-REX фирмы Wyatt. Данные собирали и анализировали с использованием программного обеспечения Astra (Wyatt) и Labsolutions (Shimadzu). Величины молекулярной массы и процентного содержания вариантов размеров представлены в том виде, в котором они получены и оценены экспертом-аналитиком как сопоставимые или несопоставимые.

iCIEF.

Капиллярное изoeлектрическое фокусирование с визуальным детектированием по всей длине капилляра (iCIEF) выполняли, чтобы выяснить распределение относительного содержания изоформ и продуктов разложения моноклонального антитела (mAb) в соответствии с величинами изoeлектрических точек (pI). Распределение величин pI образцов представлено в трех группах: кислотная группа, главный пик и основная группа в сравнении с распределением pI эталонного стандарта в каждом эксперименте. Маркеры pI (6,14 и 9,46) включены и используются для калибровки величины pI при каждом введении. Относительное содержание рассчитывали из каждой электроферограммы путем интегрирования площади под пиками, полученными от образцов, и представления суммы пиков в каждой группе в виде фракции интеграла относительно общей площади (% площади).

CE-SDS.

Капиллярный электрофорез в SDS-содержащих заполненных гелем капиллярах выполняли для из-

мерения распределения по молекулярным массам (MW) молекулярных фракций mAb-ассоциированных видов белков (субъединиц, загрязняющих веществ и продуктов распада). Белки разделяли по их размеру и электрофоретической подвижности. В этом способе использовали капилляры с общей длиной 30 см (внутренний диаметр (ID) 50 мкм), эффективной длиной 20 см и детекцией поглощения на фиксированной длине волны 214 нм. Перед введением относительное время миграции калибровали по внутреннему стандарту (10 кДа), присутствующему в каждом образце. Значения относительного времени миграции и скорректированные площади пиков рассчитывали и сравнивали с "bracketing" введениями эталонного стандарта. Относительное содержание распределений CE-SDS оценивали отдельно в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

Анализ связывания ELISA.

Микропланшеты покрывали антигенами при 0,5-2,0 мкг/мл. Планшеты промывали 0,05% PBST и затем блокировали. Затем планшеты снова промывали и добавляли mAb при 12 различных концентрациях и инкубировали. После промывки добавляли HRR-конъюгированное вторичное антитело. После инкубации планшеты промывали и добавляли субстрат TMB. Сигналы измеряли при 450 и 650 нм на планшетном ридере (Tecan Infinite M1000 Pro). Кривые связывания сравнивали с эталонным материалом для определения процентной связывающей способности.

Определение растворимости.

Для тестирования растворимости в каждом из тестируемых промывочных буферов моноклональные антитела (mAb) подвергали замене буфера высокопроизводительным способом с использованием пластин для обессоливания (Thermo Scientific, номер по каталогу 89808) в соответствии с протоколом производителя. После замены буфера моноклональные антитела (mAb) инкубировали при 19-25°C в течение 24 ч и растворимость оценивали с помощью SE-UPLC, как описано выше.

Картирование триптических пептидов с помощью LC/MS.

Образцы антител восстанавливали, алкилировали и расщепляли трипсином. Триптические пептиды разделяли на колонке C-18 (Waters BEN C18, 1,7 мкм, 1,2 × 100 мм, 130Å) и детектировали с помощью ультрафиолетового детектора при 215 и 280 нм с последующим масс-спектрометром (LTQ-Orbitrap-Elite). Относительный количественный анализ проводили путем сравнения площадей пиков интактных пептидов, а также модифицированных пептидов на выбранных ионных хроматограммах.

Результаты и обсуждение.

Для оценки пользы щелочных промывок при pH 9,6 и 10,4 во время аффинной хроматографии исследовали качественные характеристики процесса и продукта. Очистку от примесей исследовали с помощью анализа CHO-HCP, CHO-DNA и rProA. Профили чистоты исследовали с использованием SE-HPLC, iCIEF, CE-SDS и SEC-MALS. Функциональную и структурную целостность молекулы исследовали с использованием анализа связывания методом ELISA, CD, DSC, интактной массы, картирования N-концевых пептидов. Продукт, выделенный с помощью промывочных растворов с высоким pH и исходных промывочных растворов, показал сопоставимое извлечение. Для mAb1 извлечение составило от 90 до 99%, для mAb2 от 84 до 90% и для mAb3 от 93 до 97%.

Очистка от примесей.

Для того чтобы максимально увеличить очистку от примесей во время аффинной хроматографии, заявители сначала изучали влияние pH промывок на очистку от CHO-HCP. Обычно для хроматографии на основе белка А после нанесения образца и чейз-буфера перед элюированием наносят промывочный раствор с промежуточным pH. Промежуточная промывка предназначена для понижения pH и подготовки смолы для элюирования. В настоящем документе заявители добавили дополнительную промывку с pH в интервале от 7,0 до 10,4, используя такую же проводимость, как чейз-буфер, для установления диапазона pH для оптимальной очистки от HCP. На фиг. 2 показано, что уровни CHO-HCP в элюате снижаются по мере увеличения pH промывочного раствора. На основании этих результатов можно предположить, что наилучшая очистка от примесей наблюдалась при pH выше 9,0, и промывка была особенно эффективной при самом высоком тестируемом pH (10,4). Для подтверждения этих результатов и установления того, что это явление не было специфическим в отношении моноклонального антитела, очистку 3 различных моноклональных антител (mAb) проводили при pH 9,6 и 10,4 промывочного раствора. Исследование, представленное здесь, показало, что использование стратегии промывок с щелочным pH во время аффинного захвата является эффективным для удаления белков клеток-хозяев CHO из сырьевых потоков mAb. Использование щелочной промывки во время аффинной захватной хроматографии разрушает взаимодействия продукт/примесь и/или примесь/смола путем изменения электростатических свойств белковых поверхностей моноклонального антитела (mAb), лиганда белка А (ProA) и CHO-HCP, при этом моноклональное антитело (mAb) является связанным на колонке. Во время аффинной хроматографии CHO-HCP могут связываться с моноклональным антителом (mAb), связываться с основной матрицей или связываться с лигандом proA. Существуют подтверждения того, что преобладающим механизмом являются взаимодействия HCP с mAb [6,9,12]. Однако также ясно, что некоторая часть HCP может взаимодействовать с самой основной матрицей [1,2,6] или лигандом proA [12,17]. Например, элюирование из аффинной смолы при двух различных значениях pH может привести к значительно различающимся уровням HCP в элюате [10,11,12]. Было продемонстрировано, что независимо от взаимодействия HCP с mAb, основной

матрицей или лигандом proA, разрушение белок-белковых взаимодействий при очень высоком pH является высокоэффективным. Несмотря на то что взаимодействия продукт-примесь являются преимущественно электростатическими, связывание моноклональных тел с лигандами является более сильным. Белок A связывается с антителами в основном за счет индуцированного соответствия большей части энергии связывания, возникающей в результате гидрофобных взаимодействий, с помощью четырех стабилизирующих водородных связей [20,21]. Кроме того, взаимодействия, такие как Ван-дер-ваальсовы силы, гидрофобные взаимодействия и электростатические силы, также влияют на связывание ProA-mAb [13]. Данные, представленные в настоящем документе, дают основание предположить, что промывочные растворы с высоким значением pH можно использовать для селективного разрушения взаимодействий между примесями и mAb, и/или примесями и смолой при связывании со смолой.

Как показано на фиг. 3, очистка от CHO-НСР значительно улучшилась при использовании щелочных промывочных растворов по сравнению с исходными состояниями для всех молекул. При использовании щелочного промывочного раствора очистка от CHO-НСР увеличилась примерно в 2-3 раза для mAb1, примерно в 6-13 раз для mAb2 и примерно в 17-23 раза для mAb3. Увеличение очистки от CHO-НСР наблюдалось независимо от подкласса mAb. На основании этих результатов заявители выбрали щелочные промывочные растворы при pH 9,6 и 10,4 для последующих исследований, направленных на изучение влияния промывочного раствора на качество продукта.

Хроматография на основе белка A может также очищать от ДНК клеток-хозяев на 4-5 log [2]. Неудивительно, что наблюдались значительно более низкие уровни ДНК в элюате при использовании промывочного раствора с высоким pH. Как показано на фиг. 4, уровни CHO-DNA в элюате значительно снизились при использовании промывочных растворов с щелочным pH по сравнению с исходными состояниями для всех молекул. При использовании промывочных растворов с щелочным pH уровни CHO-DNA снизились примерно в 5-19 раз для mAb1, примерно в 209-490 раз для mAb2 и примерно в 627-1913 раз для mAb3. Улучшенная очистка от ДНК при использовании промывочного раствора с высоким значением pH во время аффинного захвата снижает важность отдельной стадии удаления ДНК, такой как анионообменная хроматография.

Кроме того, остаточный белок A контролировали для оценки влияния промывочных растворов с щелочным pH на хроматографию на основе белка A. Механизм вымывания белка A подлежит определению. Циклическое изменение pH во время аффинной хроматографии может вызвать химическое разрушение гликозидных связей в агарозной основной матрице, приводя к совместному элюированию ProA и mAb. Это будет возникать, если свободный ProA неспецифически и нековалентно связывается с IgG на смоле [4]. Заявители обнаружили, что количество вымываемого ProA составляет от 25 до 450 ppm при использовании стратегии промывки с высоким pH. Этот уровень вымывания ProA, как правило, считается низким и является приемлемым для процесса согласно изобретению. Однако влияние вымывания на циклическое изменение смолы до сих пор не было изучено. Кроме того, наблюдалось, что остаточный ProA очищается во время последующей стадии инактивации вирусов. Несмотря на то что увеличенные уровни вымывания ProA являются все еще значительно низкими и относительно простыми для удаления, существует ряд способов, которые можно использовать для предотвращения вымывания ProA, первым из которых является использование основной стабильной смолы, такой как MabSelect Sure. Кроме того, заявители наблюдали, что вымывание является не таким выраженным, когда для сырьевого потока используется очищенный продукт. Таким образом, также возможно, что примеси, содержащиеся в сырьевом потоке, такие как протеазы, которые являются активными при более высоком pH, являются причиной увеличенного количества вымывания ProA. Действительно, несколько ссылок поддерживают эту концепцию [2]. В этом случае одно из решений будет состоять в добавлении в сырьевой поток ингибиторов протеазы. Как показано на фиг. 5, наблюдались более высокие уровни вымывания rProA, который эффективно очищали на последующей стадии инактивации вирусов и фильтрации.

Таким образом, использование промывочных растворов с щелочным pH во время аффинной хроматографии обеспечивает очистку от примесей до приемлемых уровней для всех молекул, как показано в табл. 1. Этот повышенный уровень очистки в одну стадию повышает надежность процесса и потенциально может позволить исключить последующую стадию полировки для удаления этих примесей.

Чистота продукта.

Профили чистоты изучали с использованием SE-UPLC, iCIEF, CE-SDS и SEC-MALS. Как показано в табл. 2, анализ SE-UPLC показал, что использование промывочных растворов с щелочным pH увеличивает чистоту продукта более чем на один процент для все трех тестируемых mAb. Анализ качества продукта с использованием iCIEF показал, что повышенный уровень кислотных или основных видов отсутствует благодаря использованию промывочного раствора с щелочным pH, и pI молекулы не изменилось. Заявители не наблюдали деамидирования в каком-либо из mAb, тестируемых с использованием промывочных растворов с щелочным pH. Общая чистота, измеренная с помощью CE-SDS в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, не показала значительного различия по сравнению с исходным состоянием.

Таблица 2. Профили чистоты продукта mAb

Образец	SE-UPLC (% Мономер)	SE- UPLC (% HMW)	iCIEF (% Основной пик)	iCIEF (% Кислотный пик)	iCIEF (% Основной пик)	CE-SDS (R)	CE-SDS (NR)
Исх. mAb1	97,1	2,9	44,3	21,5	4,3	100,0	96,0
mAb1 pH 9,6	99,2	0,9	43,7	19,4	4,5	100,0	98,3
mAb1 pH 10,4	98,8	1,2	45,0	23,1	4,8	100,0	96,0
Исх. mAb2	98,7	1,3	44,8	21,1	5,3	98,8	95,0
mAb2	99,5	0,5	43,1	21,0	5,2	98,7	91,1
pH 9,6							
mAb2 pH 10,4	99,3	0,7	42,7	22,4	5,2	98,6	90,7
Исх. mAb3	95,4	4,6	39,8	27,1	4,3	99,2	97,5
mAb3 pH 9,6	99,6	0,4	36,2	30,1	4,2	99,2	97,5
mAb3 pH 10,4	99,5	0,5	35,8	29,3	3,9	99,1	97,6

Функциональная и структурная целостность моноклональных антител (mAb) сохранялась после использования экстенсивных промывочных растворов с щелочным pH во время захватной хроматографии.

Несмотря на то что моноклональные антитела (mAb) являются относительно стабильными белками и обеспечивают идеальных кандидатов для лекарственных средств, они могут быть подвержены химическим и физическим изменениям, таким как деградация и повреждение во время изготовления лекарственной субстанции и лекарственного продукта. Так как стратегия процесса согласно настоящему изобретению включает использование промывочных растворов с щелочным pH, исследования проводили для оценки физиохимической и структурной целостности каждого из моноклональных антител (mAb). Различий в идентичности или содержании вторичной структуры не было обнаружено с помощью кругового дихроизма. Температура плавления, другой показатель степени сворачивания моноклональных антител (mAb), также оставалась без изменений. Кроме того, активность по данным анализа связывания ELISA (показатель надлежащего сворачивания) указывала на то, что промывочные растворы с щелочным pH не оказывали влияния на сворачивание, активность и общую функциональность моноклональных антител (mAb). Различия в вариантах заряда, окислении или деамидировании не наблюдалось для моноклональных антител (mAb), промытых с использованием высокого pH по данным изоэлектрического фокусирования или картирования триптических пептидов с помощью LC/MS.

Многоугловое рассеяние света.

Для каждого набора образцов mAb два образца получали с использованием промывочных растворов с щелочным pH и два других образца получали с использованием исходного способа. В качестве контроля исходные образцы подвергали замене буфера для получения образца в таких же видах буфера, что и два образца, полученные с использованием промывочных растворов с щелочным pH. Результаты показали, что во всех образцах присутствует менее 1% агрегации. Существуют только незначительные различия в олигомерном состоянии обнаруженных агрегатов. Значения молекулярной массы для основного пика каждого образца находятся в пределах ошибки измерения.

Таблица 3. Анализ SEC-MALS

Наименование образца	SE Интергация с помощью УФ			MALS MW (кДа)	
	% Мономер	% Димер	%HMW (> Димер)	Пик 1	Пик 2
mAb1 Исходное	99,45	0,55	0,00	140,1	272,6
mAb1 pH 9,6	99,44	0,00	0,56	141,1	646,0
mAb1 pH 10,4	99,27	0,73	0,00	139,9	297,4
mAb1 (Исходное с заменой буфера)	99,12	0,88	0,00	140,1	254,5
mAb2 Исходное	99,58	0,00	0,42	143,6	3282,2
mAb2 pH 9,6	99,50	0,00	0,50	143,5	345,4
mAb2 pH 10,4	99,41	0,59	0,00	142,5	289,1
mAb2 (Исходное с заменой буфера)	99,46	0,54	0,00	143,5	265,2
mAb3 Исходное	100,0	0,00	0,00	141,8	N/A
mAb3 pH 9,6	99,71	0,29	0,00	141,6	216,9
mAb3 pH 10,4	99,75	0,25	0,00	141,6	296,3
mAb3 (Исходное с заменой буфера)	99,90	0,00	0,10	143,5	2063,9

Анализ связывания ELISA.

Анализ связывания ELISA оценивает способность молекулы связываться с ее специфическим рецептором и непосредственно связан с моноклональным антителом, свернутым надлежащим образом. Данные анализа связывания ELISA показали, что все моноклональные антитела (mAb) независимо от стратегии промывки имели сходное связывание с эталонным стандартом. Это указывает на то, что промывочные растворы с щелочным pH не оказывали значительного влияния на третичную структуру молекул.

Таблица 4. Анализ связывания ELISA

Образец	mAb1	mAb2	mAb3
	% Связывание по сравнению с эталонным стандартом		
Исходный элюат	90,0	100,5	98,0
Элюат pH 9,6	109,3	99,6	100,2
Элюат pH 10,4	113,1	87,7	96,1
Исходная смесь	106,0	95,3	98,2
Смесь pH 9,6	105,4	102,6	103,3
Смесь pH 10,4	104,6	102,8	105,5
Элюат с заменой буфера	103,7	97,0	103,7

DSC.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC) представляет собой биофизический способ,

который может указывать на структурную природу моноклональных антител (mAb), поскольку частично денатурированные моноклональные антитела (mAb) будут проявлять более низкую температуру плавления, чем при надлежащем сворачивании. Измерения методом DSC проводили для различных моноклональных антител (mAb), выделенных с использованием промывочных растворов с щелочным pH, а также исходного протокола для того, чтобы оценить влияние промывки на температуру плавления антител.

Как показано в табл. 5, для каждого набора образцов mAb первые два образца получали с использованием промывочных растворов с щелочным pH и последние два образца получали с использованием исходного способа. Образцы 3, 7 и 11 подвергали замене буфера из исходного протокола для получения образца в таких же видах буфера, что и два образца, полученные с использованием промывочных растворов с щелочным pH. Образцы подвергали замене буфера для контроля влияния буфера на DSC.

Результаты указывают на то, что значение T_m для образца 4 было на 1°C ниже других молекул из этой же группы mAb. Как показано на фиг. 6, значение T_{onset} также оказалось сдвинутым ниже, что указывает на возможную чувствительность к буферу или процессу. Поскольку значение T_m для образца (образец 3) подвергнутого замене буфера, является схожим со значением T_m для образцов, полученных с использованием промывочных растворов с щелочным pH (образец 1 и 2), можно предположить, что изменение T_m для этого образца обусловлено влиянием на DSC состава буфера образца. Таким образом, для mAb1 отсутствует значительное влияние на T_m промывочных растворов с щелочным pH. Для mAb2 значительных различий в значениях T_{m1} или T_{m2} не наблюдалось, что указывает на то, что различные условия промывок не оказывают влияния на температуру плавления этого образца. Аналогично mAb1, mAb3 имело немного более низкую T_m для образца 12 по сравнению с другими условиями, что, возможно, указывает на несколько меньшую стабильность в условиях этого буфера или процесса. Значение T_m для образца, подвергнутого замене буфера (образец 11), является сходным со значением T_m для образцов, полученных с использованием промывочных растворов с щелочным pH (образцы 9 и 10), и, следовательно, изменение T_m для этого образца обусловлено влиянием на DSC состава буфера образца. Таким образом, для mAb3 отсутствует значительное влияние на T_m промывочных растворов с щелочным pH.

Таблица 5. Дифференциальная сканирующая калориметрия

ID образца	Наименование образца	$T_{m1}, ^\circ\text{C}$	$T_{m2}, ^\circ\text{C}$
1	mAb1, pH 9,6	65,3	-
2	mAb1, pH 10,4	65,4	-
3	mAb1 (замена исходного буфера)	65,2	-
4	mAb1 Исходное	64,2	-
5	mAb2, pH 9,6	67,3	82,8
6	mAb2, pH 10,4	67,2	82,8
7	mAb2 (замена исходного буфера)	67,2	82,7
8	mAb2 Исходное	67,3	82,8
9	mAb3, pH 9,6	65,6	80,8
10	mAb3, pH 10,4	65,7	80,8
11	mAb3 (замена исходного буфера)	65,8	80,7
12	mAb3 Исходное	65,1	80,6

Круговой дихроизм.

Спектроскопию кругового дихроизма дальней УФ-области (CD) использовали для характеристики вторичной структуры трех моноклональных антител (mAb), выделенных с использованием обоих подходов. CD-спектры эталонного стандарта и моноклональных антител (mAb) оценивали в различных условиях в диапазоне длин волн 260 и 195 нм. CD-сигнал конвертировали из миллиградуса в среднюю остаточную эллиптичность с использованием рассчитанной молекулярной массы и количества аминокислотных остатков на основе аминокислотной последовательности каждого соответствующего mAb. CD-спектр в дальней УФ-области показал минимум при 217 и 229 нм для mAb1, 217-218 нм для mAb2 и 217-218 нм для mAb3. Средняя остаточная эллиптичность для mAb1 составила -3128 ± 358 град $\times$ см² $\times$ дмоль⁻¹ остатков (среднее $\pm$ стандартное отклонение для 4 условий) при 217 нм, и -1738 ± 204 град $\times$ см² $\times$ дмоль⁻¹ остатков-1 при 229 нм. Средняя остаточная эллиптичность для mAb2 составила -3477 ± 454 град $\times$ см² $\times$ дмоль⁻¹ остатков-1 при 217 нм. Средняя остаточная эллиптичность для mAb3 составила -3392 ± 83 град $\times$ см² $\times$ дмоль⁻¹ остатков-1 при 217 нм. Минимумы и форма спектра сохранялись для каждого mAb независимо от протокола, используемого для очистки mAb. Качественное сходство формы и интенсивности CD-спектра указывает на то, что стратегия промывки с щелочным pH не оказывает влияния на вторичную структуру исследуемых моноклональных антител (mAb). Несмотря на то что существуют различия между моноклональными антителами (mAb), для каждого индивидуального mAb CD-

спектры были качественно схожими при всех тестируемых условиях промывок. Спектры всех образцов согласовывались с содержанием β -листа.

Картирование триптического пептида с помощью LC/MS.

Лекарственную субстанцию из трех процессов восстанавливали, алкилировали и расщепляли трипсином. Триптические пептиды разделяли на колонке C-18 и детектировали с помощью ультрафиолетового детектора при 215 и 280 нм с последующим масс-спектрометром (LTQ-Orbitrap-Elite). Относительный количественный анализ проводили путем сравнения площадей пиков интактных пептидов, а также модифицированных пептидов на выбранных ионных хроматограммах. Окисление контролировали по процентному содержанию площади пика продукта окисления из индикаторного пептида в тяжелой цепи, и деамидирование контролировали по процентному содержанию площади пика четырех продуктов деамидирования из другого индикаторного пептида в тяжелой цепи. Уровни окисления и деамидирования являются сопоставимыми в исходных образцах и образцах, полученных с использованием промывочных растворов с щелочным pH, во всех трех моноклональных антителах (mAb).

Таблица 6. Картирование триптического пептида с помощью LC/MS

Образец	Окисление, %	Деамидирование Продукт 1 %	Деамидирование Продукт 2 %	Деамидирование Продукт 3 %	Деамидирование Продукт 4 %	Деамидирование Продукт Всего %
mAb Исходное	3,0	3,3	4,1	2,0	3,6	13,0
mAb1 pH 9,6	2,1	3,8	4,4	2,0	3,8	13,9
mAb1 pH 10,4	1,7	3,9	4,9	2,0	4,0	14,8
mAb2 Исходное	2,5	3,1	3,5	1,9	4,3	12,8
mAb2 pH 9,6	3,2	3,1	4,0	1,9	4,3	13,2
mAb2 pH 10,4	2,6	3,8	4,9	1,8	4,2	14,6
mAb3 Исходное	3,9	2,1	6,0	2,8	5,5	16,4
mAb3 pH 9,6	3,3	3,8	4,7	2,1	4,5	15,1
mAb3 pH 10,4	3,4	2,3	6,6	2,6	5,3	16,8

Стратегия использования щелочных промывочных растворов при pH от 9,6 до 10,4 возможна отчасти потому, что связывание лиганд-рецептор является сильным взаимодействием, которое удерживает mAb в его надлежащей конформации и может защитить его от денатурирования и другого повреждения. Диапазон измеренных констант сродства связывания антитело/антиген простирается от более низких чем 10^5 моль⁻¹ до больших чем 10^{12} моль⁻¹ [13] и для лиганда белка A и Fc γ составляет 10^7 - 10^8 при нейтральном pH и комнатной температуре [14]. Связывание лиганда с рецептором переводит структуру mAb в более низкое энергетическое состояние по сравнению со структурой mAb, находящейся в несвязанном состоянии. Таким образом, в связанном состоянии mAb находится дальше от переходного состояния денатурации и является защищенным. Несмотря на то что моноклональные антитела (mAb) находятся в более стабильном состоянии при связывании с лигандом, заявители также рассматривали вероятность агрегации моноклональных антител (mAb) при подвергании воздействию буферов с щелочным pH в случае отсутствия лиганда (табл. 7). Через 24 ч инкубации при комнатной температуре отсутствовали изменения в содержании мономеров, что указывает на то, что несвязанные mAb являются стабильными в этих условиях.

Таблица 7. Растворимость в буферах моноклональных антител (mAb)

Буферные условия	pH	mAb 1 (% Мономер)			mAb 2 (% Мономер)			mAb 3 (% Мономер)		
		Пов.	Пов.	Пов.	Пов.	Пов.	Пов.	Пов.	Пов.	Пов.
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
200 mM	9,6	99,6	98,4	98,5	94,9	99,2	99,2	99,8	98,6	98,6
карбонат натрия, 1M	10,0	98,5	98,3	98,4	99,3	99,3	99,3	98,6	98,6	98,6
хлорид натрия	10,4	98,4	98,4	98,4	99,3	99,3	99,3	98,7	98,6	98,6
100 mM	9,6	99,4	99,4	99,4	98,7	98,6	98,4	98,6	98,6	98,6
карбонат натрия	10,0	99,3	99,4	99,4	99,0	98,4	98,5	98,6	98,6	98,6
	10,4	99,3	99,3	99,3	98,4	98,4	98,3	98,6	98,7	98,6
1X PBS	7,4	99,4	99,6	99,5	100,5	100,5	100,5	98,7	98,6	98,7

Альтернативные стратегии улучшения очистки от примесей включают использование добавок в промывочный раствор во время захвата, таких как соли, органические растворители, неионогенные поверхностно-активные вещества, хаотропы, гидрофобные модификаторы и аминокислоты [6,7]. На фиг. 6 показано, что стратегия промывки с щелочным pH является одним из наиболее эффективных способов уменьшения уровня CHO-НСР с использованием стадии промывки. Кроме того, в стратегии промывки с щелочным pH не используются добавки, для которых может потребоваться последующая очистка и контроль. Существует также возможность включения добавок в промывочные буферы с щелочным pH для дополнительного улучшения очистки от примесей.

Shukla et al. показали, что добавление аргинина в промывочный раствор во время захвата является эффективным способом уменьшения содержания примесей в элюате [6]. Исследования выполняли для сравнения удаления примесей при использовании промывочного раствора с щелочным pH с аргинином и без аргинина (табл. 8). Результаты указывают на то, что при добавлении аргинина в щелочной промывочный раствор дополнительной очистки достигнуто не было.

Таблица 8. Сравнение качества продукта и процесса для mAb, очищенного с использованием стратегии промывки с щелочным pH и стратегии промывки с аргинином

Стратегия	%	SE-UPLC			CHO-НСП (нг/мг)	rProA (нг/мг)
		Элюат				
		% HMW	% LMW	% Мономер		
Нагрузка	N/A	N/A	N/A	N/A	716255	N/A
Буфер + 0,5 М L-Аргинин рН 9,6	80	2,5	BDL	97,5	1160	125
Буфер рН 9,6	82	2,6	BDL	97,4	1274	122

Реализация стратегии промывки с щелочным pH может устранить необходимость в дополнительных стадиях полировки в схемах выделения mAb.

В большинстве процессов выделения используют 2-3 стадии полировочной хроматографии, чтобы соответствовать промышленным стандартам качества. Несмотря на то что ортогональные способы очистки от примесей могут повысить надежность процесса, экономика производства требует создания рационализированных процессов. В настоящем документе заявители продемонстрировали, что во время аффинной хроматографии стадии промывки могут быть чрезвычайно эффективными, что может позволить исключить одну или несколько стадий полировки. В табл. 9 показано, что использование промывочного раствора с высоким pH во время захватной хроматографии улучшает очистку от примесей до степени, при которой не требуется стадия полировки СЕХ. Путем использования экстенсивной природы связывания во время аффинной хроматографии заявители показали, что промывочные растворы с агрессивным pH могут быть использованы для улучшения очистки от примесей.

Таблица 9. Сравнение 2- и 3-стадийной очистки

Анализ	2-стадийный процесс			3-стадийный процесс			
	Стратегия захвата			Базовая стратегия захвата			
	Белок А		AEX	Белок А		CEX	AEX
	Элюат	Масса		Элюат	Масса		
CHO-НСП (нг/мг)	≤44	15	BDL	679	30	8	11
CHO-DNA (нг/мг)	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	ND
гРгоА (нг/мг)	≤48	≤28	6	4	3	2	2
% Мономер (SE-HPLC)	99,4	99,2	99,2	99,5	99,6	99,3	99,6

Эквиваленты.

Специалисты в данной области узнают или смогут определить с использованием не более, чем стандартных экспериментов множество эквивалентов описанных в данной заявке конкретных вариантов осуществления изобретения. Такие эквиваленты считаются охваченными следующими пунктами формулы изобретения.

Включение путем ссылки.

Полное содержание всех патентов, находящихся на рассмотрении заявок на патенты и других публикаций, цитированных в данной заявке, включены здесь путем ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ выделения белка из смеси, которая содержит белок и одно или несколько загрязняющих веществ, включающий:

а) подвергание смеси воздействию первой матрицы для хроматографии, при этом белок связывается с первой матрицей для хроматографии;

б) приведение в контакт первой матрицы для хроматографии с первым промывочным раствором, который имеет рН по меньшей мере 9,0 и не содержит аргинин или производное аргинина; и

с) элюирование белка с первой матрицы для хроматографии в элюионный раствор.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что первая хроматография представляет собой аффинную хроматографию.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что аффинная хроматография представляет собой аффинную хроматографию на основе белка А.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что белок выбран из антитела, фрагмента антитела и белка слияния, содержащего Fc-фрагмент.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что моноклональное антитело выбрано из группы, состоящей из человеческого, гуманизированного и химерного антитела.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что рН первого промывочного раствора находится в интервале примерно от 9 до 11.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что рН первого промывочного раствора находится в интервале примерно от 9,5 до 10,5.

9. Способ по п.7, отличающийся тем, что рН первого промывочного раствора составляет около 9,6.

10. Способ по п.7, отличающийся тем, что рН первого промывочного раствора составляет около 10,4.

11. Способ по п.1, кроме того, включающий после первого промывочного раствора приведение в контакт первой матрицы для хроматографии со вторым промывочным раствором, который имеет рН по меньшей мере 9,0 и не содержит аргинин или производное аргинина.

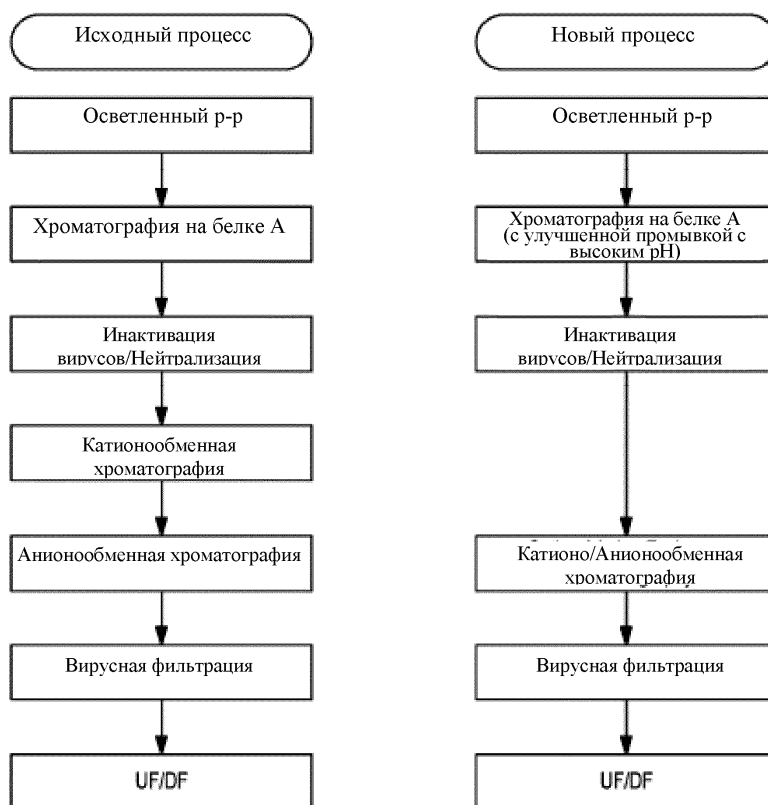
12. Способ по п.11, кроме того, включающий после второго промывочного раствора приведение в контакт первой матрицы для хроматографии с третьим промывочным раствором, который имеет рН в интервале примерно от 6 до 7 и не содержит аргинин или производное аргинина.

13. Способ по п.1, отличающийся тем, что первый промывочный раствор содержит карбонат натрия при концентрации в диапазоне примерно 0,01-1,0М и хлорид натрия при концентрации в диапазоне примерно 0,5-2М.

14. Способ по п.11, отличающийся тем, что второй промывочный раствор содержит карбонат натрия при концентрации в диапазоне примерно 0,01-1,0М.

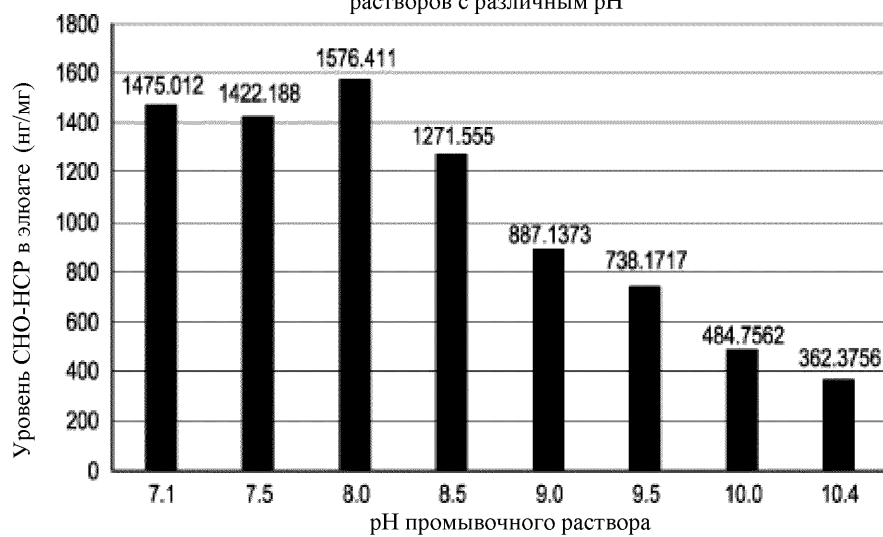
15. Способ по п.1, отличающийся тем, что смесь подвергают воздействию одной или нескольких дополнительных матриц для хроматографии.

Схема стандартного и нового процесса выделения белков

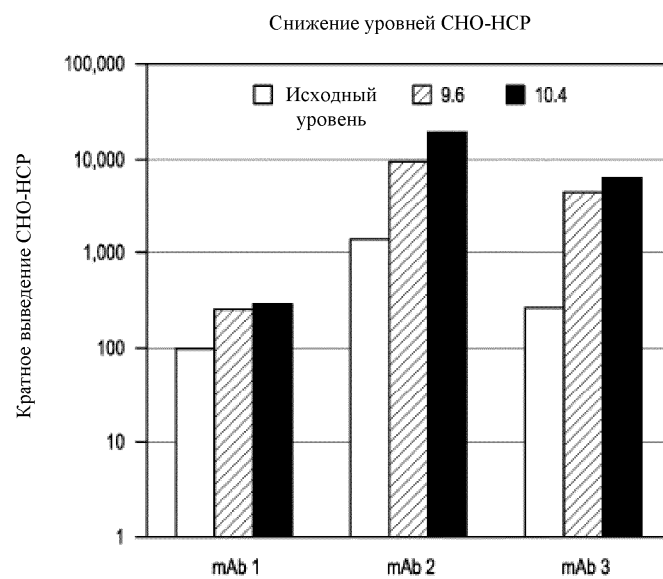


Фиг. 1

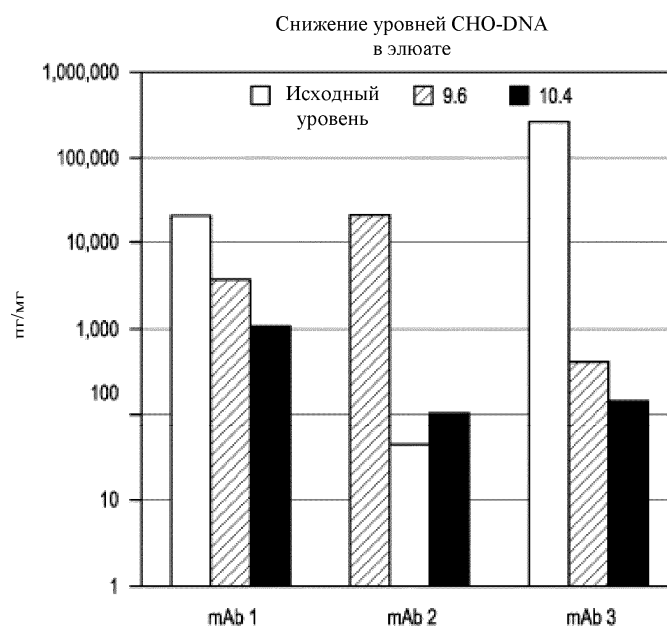
Очистка от НСР с использованием промывочных растворов с различным рН



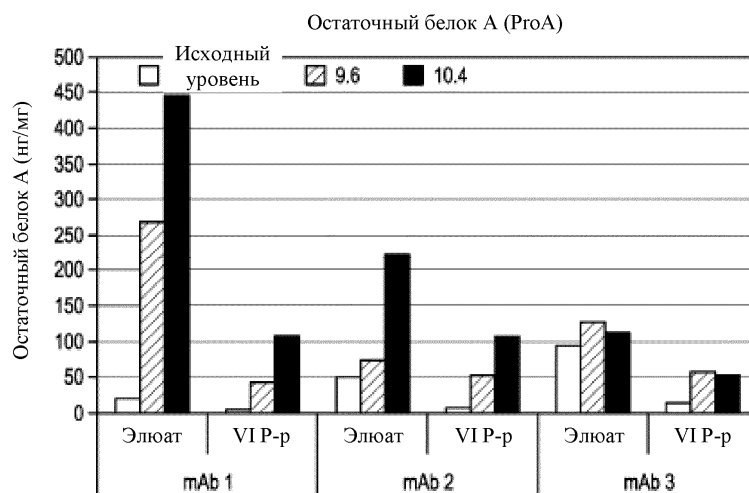
Фиг. 2



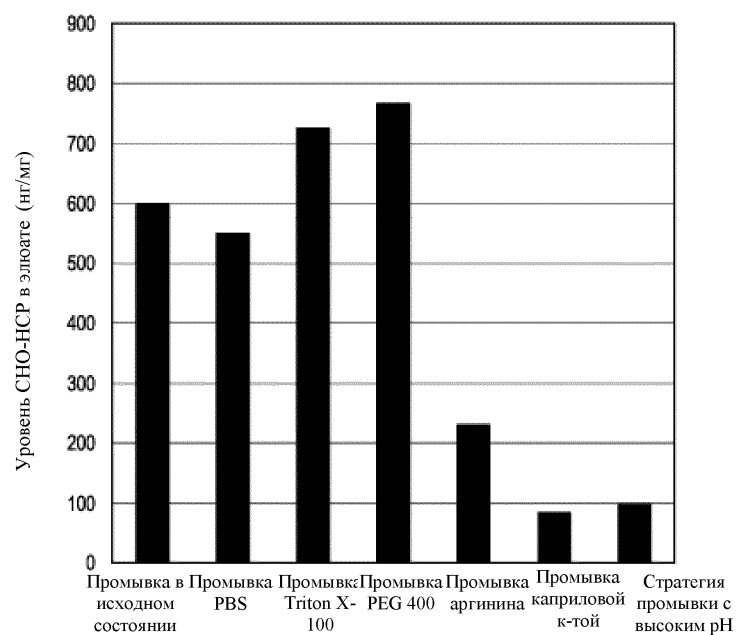
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

