

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090243** (13) **A1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**(43) Дата публикации заявки
2020.10.19(51) Int. Cl. *A61K 41/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2018.08.27(54) **СПОСОБЫ ИНАКТИВАЦИИ ВИРУСНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ**(31) **17188012.3**(32) **2017.08.25**(33) **EP**(86) **PCT/IB2018/056502**(87) **WO 2019/038742 2019.02.28**(71) Заявитель:
ИКНОС САЙЕНСИЗ СА (CH)

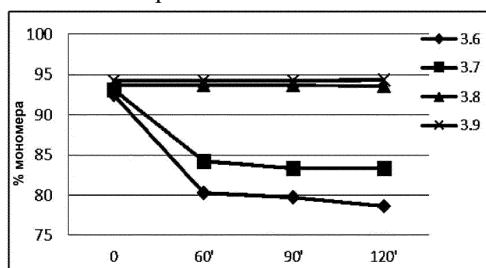
(72) Изобретатель:

**Абрантес Филипа, Летесту Соня,
Каюзак Лаура, Дуарте Лионель (CH)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу получения содержащего антитело раствора, который свободен от загрязнения вирусами, с культивируемыми клетками в качестве исходного материала. Данный способ включает стадию воздействия на раствор, содержащий антитело, смесью растворителя и детергента или высоким pH.

**A1****202090243****202090243****A1**

СПОСОБЫ ИНАКТИВАЦИИ ВИРУСНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к способам инактивации вирусов. В частности, настоящее изобретение относится к получению свободного от вирусов раствора, содержащего терапевтические антитела. Настоящее изобретение также относится к способам получения лекарственного вещества, включающим стадии очистки терапевтического антитела и обработку для инактивации вирусов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Когда биомолекулы, подобные белкам, применяют в качестве фармацевтических препаратов для лечения заболеваний, в процессе их производства требуется обеспечение здоровья человека. Культуры клеток и другие биологические материалы, обычно используемые для производства терапевтических белков, могут быть загрязнены вирусами, которые либо присутствуют в исходном материале, либо появляются в процессе производства. Если вирусные загрязнения не удалены или не инактивированы необратимым образом, они представляют опасность для здоровья людей, применяющих такое лекарственное средство. Следовательно, для производства фармацевтических препаратов, безопасных для применения у людей, получаемые белки должны быть свободны от загрязнений активными вирусами (CPMP/ICH/295/95).

Для производства терапевтических белков проводят процесс очистки, чтобы отделить их от остальной части исходного смешанного биологического материала. Стадии очистки, такие как хроматография и фильтрация, способствуют удалению вируса, и их сочетают с определенными методами инактивации вирусов для обеспечения клиренса вирусов. Способы инактивации вирусов хорошо известны в данной области техники. Способ обеспечения инактивации вирусов в продуктах плазмы состоит в обработке указанных продуктов плазмы смесью растворителя/детергента (S/D), нарушающей вирусную активность путем растворения липидной оболочки вируса, как установлено руководящими принципами из Технического отчета Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), Приложение 4. Была проведена оптимизация этой обработки, чтобы обеспечить возможность проведения S/D-обработки продукта плазмы в системе одноразового пакета (Hsieh, YT. et al. Transfusion. 2016 Jun;56(6):1384-93); и для обработки рекомбинантного

фактора VIII в условиях более низкой температуры и более короткого времени по сравнению с условиями, указанными в руководящих принципах из Технического отчета ВОЗ, Приложение 4 (WO2012082931). Кроме того, в ходе некоммерческих исследований S/D-обработку использовали в качестве дополнительной стадии удаления вирусов из образца, содержащего анти-D-антитело из линии клеток гибридомы человека (Roberts PL, Biotechnol Prog. 2014 Nov-Dec; 30(6):1341-7). Инактивация также может быть достигнута путем обработки низким pH (Shukla AA et al., Pharm. Bioprocess., 2015, 3(2): 127-138) или при высоких температурах (пастеризации) (US4749783), которые приводят к денатурации вирусных белков. Эти виды обработки эффективны против оболочечных и безоболочечных вирусов, но они могут быть не совместимыми со всеми терапевтическими белками, поскольку последние также могут быть подвержены денатурации.

Важным классом терапевтических белков являются моноклональные антитела, которые могут иметь природную структуру, подобную антителам, вырабатываемым организмом животного, и антитела, которые были модифицированы различными способами для улучшения их свойств. Антитела могут применяться в качестве лекарственных средств для лечения и диагностики различных заболеваний, в том числе различных видов рака и нарушений иммунной системы. Моноклональные антитела в коммерческих целях обычно получают с помощью трансфицированных линий клеток, содержащих кодирующую последовательность антитела, которые выращивают в большом масштабе в контролируемых условиях культивирования клеток, и затем собирают. После сбора антитело очищают, и в процессе очистки стандартная процедура для инактивации вирусов включает инкубацию образца при низком pH (WO2010048192; Liu HF et al. MAbs. 2010 Sep-Oct; 2(5):480-99).

Антитела могут быть восприимчивы к нефизиологическим условиям, таким как низкий pH, и в случае, когда они модифицированы для придания улучшенной эффекторной функции или способности избирательно образовывать гетеродимеры, а не гомодимеры, они могут быть более подвержены деградации. По мере того, как арсенал терапевтических препаратов на основе антител продолжает расширяться, и сложность этих продуктов также возрастает, требуется разработка новых стратегий инактивации вирусов.

Кроме того, процесс очистки терапевтического белка, такого как антитело, может быть несовместим с низким pH, обычно используемым для инактивации вирусов, поэтому

создание альтернативных способов инактивации вирусов будет способствовать развитию и улучшению процесса очистки.

Настоящее изобретение относится к новым способам инактивации вирусов для антител, производимых в промышленном масштабе, для которых существующие подходы для
5 инактивации вирусов неэффективны или приводят к деградации продуцируемого антитела, или к каким-либо другим нежелательным результатам, или же несовместимы с процессом очистки антитела.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к новым способам инактивации вирусов, используемым
10 в процессе очистки терапевтических белков, таких как антитела. Классическим способом, используемым в процессе очистки антител, является инкубация содержащего антитело раствора при низком pH. Тем не менее, оптимизация процесса очистки может привести к разработке стадий, несовместимых с низким pH. Кроме того, было замечено, что для антител, нестойких к низкому pH, этот способ непригоден, поскольку ухудшает
15 стабильность антитела. Новые способы инактивации вирусов, предложенные в данном изобретении, позволяют преодолеть эти проблемы.

В частности, настоящее изобретение относится к способам получения раствора антитела, свободного от вирусных загрязнений, во время процесса очистки антитела, где получение
указанного свободного от вирусов раствора антитела начинается с культивирования
20 трансфицированных клеток, экспрессирующих антитело, и включает стадии: (i) сбора материала антитела, продуцированного трансфицированными клетками, и (ii) обработки собранного материала антитела растворителем и детергентом, или высоким pH.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к способу получения раствора антитела, вирусы в котором были инактивированы, включающему стадии: (i) сбора
25 материала антитела, продуцированного трансфицированными клетками, содержащими кодирующие последовательности указанного антитела, прошедшими культивирование клеток, (ii) обработки указанного собранного материала антитела для инактивации вирусов, где указанная обработка выбрана из группы, состоящей из инкубации со смесью растворителя и детергента или инкубации при высоком pH.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения собранный материал антитела согласно настоящему изобретению продуцируют в клетках млекопитающих, отличных от человеческих.

В еще одном варианте осуществления собранный материал антитела согласно настоящему изобретению содержит моноклональное антитело. В более конкретном варианте осуществления моноклональное антитело представляет собой рекомбинантное антитело. В конкретном аспекте указанное рекомбинантное антитело является полиспецифическим.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения собранный материал антитела инкубируют со смесью растворителя и детергента, где указанный растворитель представляет собой TnBP, и где указанный детергент выбран из группы, состоящей из Triton X-100, полисорбата-80 и полисорбата-20.

В более конкретном варианте осуществления концентрация указанного TnBP равна приблизительно 0,1 масс. % или более, и равна приблизительно 1 масс. % или менее, в частности, концентрация указанного TnBP выбрана из группы, включающей: приблизительно 0,1 масс. %, приблизительно 0,3 масс. %, приблизительно 0,5 масс. % и приблизительно 1 масс. %.

В еще одном конкретном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация указанного полисорбата-80 или указанного полисорбата-20 равна приблизительно 0,1 масс. % или более, и равна приблизительно 2 масс. % или менее, в частности, концентрация указанного полисорбата-80 или указанного полисорбата-20 выбрана из группы, включающей: приблизительно 0,2 масс. %, приблизительно 0,5 масс. %, приблизительно 0,75 масс. %, приблизительно 1 масс. %, приблизительно 1,25 масс. %.

В более конкретном варианте осуществления настоящего изобретения указанная смесь растворителя и детергента выбрана из группы, состоящей из смеси 0,3 масс. % TnBP и 0,5 масс. % полисорбата-80, и смеси 0,3 масс. % TnBP и 1 масс. % полисорбата-80.

В еще более конкретном варианте указанный собранный материал антитела инкубируют со смесью 0,3 масс. % TnBP и 1 масс. % полисорбата-80 в течение по меньшей мере 5 минут.

В частном варианте осуществления настоящего изобретения указанный собранный материал антитела сначала подвергают хроматографии на белке А, и элюат, полученный на

белке А, инкубируют со смесью 0,3 масс. % ТnBP и 1 масс. % полисорбата-80 в течение по меньшей мере 10 минут при комнатной температуре.

В еще одном частном варианте осуществления настоящего изобретения указанный собранный материал антитела представляет собой осветленный сбор, и его инкубируют со смесью 0,3 масс. % ТnBP и 1 масс. % полисорбата-80 в течение приблизительно 60 минут при перемешивании при комнатной температуре.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения собранный материал антитела инкубируют при высоком рН, где высокий рН представляет собой рН, равный 9 или выше, и равный 12,5 или ниже. Более конкретно, указанный высокий рН равен по меньшей мере 10,5. Еще более конкретно, указанный высокий рН равен приблизительно 11.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения собранный материал антитела согласно настоящему изобретению сначала подвергают хроматографии на белке А, и элюат, полученный на белке А, инкубируют при указанном высоком рН.

В одном из аспектов настоящего изобретения указанный элюат, полученный на белке А, титруют буфером, выбранным из группы трис, гистидина, L-аргинина, фосфата и NaOH, до целевого высокого рН и инкубируют.

В более конкретном аспекте настоящего изобретения указанный элюат, полученный на белке А, титруют 0,5 М NaOH до целевого рН 11 в течение приблизительно 60 минут при комнатной температуре.

В одном из вариантов осуществления способ согласно настоящему изобретению включает дополнительную стадию (iii) тестирования части раствора антитела, вирусы в котором были инактивированы, с помощью анализа на инактивацию вирусов.

Настоящее изобретение также относится к способу получения нерасфасованного лекарственного вещества («балка» лекарственного вещества), включающему следующие стадии:

(а) Инактивации вирусов в собранном материале антитела путем обработки смесью растворитель/детергент (S/D), как в п. 13 формулы.

- (b) Хроматографии на белке А полученного раствора, вирусы в котором были инаktivированы.
- (c) Нейтрализации элюата, полученного на белке А, до pH 6,0 с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- 5 (d) Катионообменной хроматографии нейтрализованного элюата, полученного на белке А, с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- (e) Концентрирования элюата, полученного катионообменной хроматографией, путем ультрафильтрации и непрерывной диафильтрации с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- 10 (f) Очистки продукта путем анионообменной хроматографии в проточном режиме с использованием адсорбции на мембране с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- (g) Нанофильтрации вирусов.
- (h) Концентрирования продукта путем ультрафильтрации и непрерывной диафильтрации в предварительном буфере с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- 15 (i) Добавления вспомогательных веществ до достижения целевого значения 6 мг/мл продукта в буфере для приготовления конечного состава путем смешивания 5 мМ цитрата, 15% сахарозы, 0,06% полисорбата-80 при pH 5,9 с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- (j) Фасовки продукта в стерильные пакеты с последующим замораживанием и хранением
- 20 при -80 ± 20 °C.

Настоящее изобретение также относится к способу получения нерасфасованного лекарственного вещества, включающему следующие стадии:

- (a) Хроматографии на белке А собранного материала антитела.
- 25 (b) Инкубация полученного элюата РА при высоком pH, как в п. 18 формулы.
- (c) Нейтрализации полученного раствора, вирусы в котором были инаktivированы, до pH 5,5 с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- (d) Катионообменной хроматографии нейтрализованного элюата, полученного на белке А, вирусы в котором были инаktivированы, с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- 30 (e) Концентрирования элюата, полученного катионообменной хроматографией, путем ультрафильтрации и непрерывной диафильтрации с последующей 0,2 мкм фильтрацией.

- (f) Очистки продукта путем анионообменной хроматографии в проточном режиме с использованием адсорбции на мембране с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- (g) Нанофильтрации вирусов.
- (h) Концентрирования продукта путем ультрафильтрации и непрерывной диафильтрации в предварительном буфере с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- (i) Добавления вспомогательных веществ до достижения целевого значения 6 мг/мл продукта в буфере для приготовления конечного состава путем смешивания 5 мМ L-гистидина, 150 мМ моногидрохлорида L-аргинина, 15% сахарозы, 0,06% полисорбата-80 при pH 6,0 с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- (j) Фасовки продукта в стерильные пакеты с последующим замораживанием и хранением при -80 ± 20 °C.

Настоящее изобретение также относится к жидкому фармацевтическому составу, содержащему моноклональное антитело, буфер, поверхностно-активное вещество и стабилизирующий агент, где указанное моноклональное антитело присутствует в указанном фармацевтическом составе в концентрации, равной приблизительно 0,01 мг/мл или более, и равной приблизительно 100 мг/мл или менее, предпочтительно в концентрации приблизительно 6 мг/мл, указанный буфер представляет собой цитрат, присутствующий в указанном фармацевтическом составе в концентрации приблизительно 5 мМ, указанное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, присутствующий в указанном фармацевтическом составе в количестве приблизительно 0,06%, и указанный стабилизирующий агент представляет собой сахарозу, присутствующую в указанном фармацевтическом составе в количестве приблизительно 15%, и где указанный фармацевтический состав имеет pH приблизительно 5,9.

Настоящее изобретение также относится к жидкому фармацевтическому составу, содержащему моноклональное антитело, буфер, поверхностно-активное вещество и стабилизирующие агенты, где указанное моноклональное антитело присутствует в указанном фармацевтическом составе в концентрации, равной приблизительно 0,01 мг/мл или более, и равной приблизительно 100 мг/мл или менее, предпочтительно в концентрации приблизительно 6 мг/мл, указанный буфер представляет собой L-гистидин, присутствующий в указанном фармацевтическом составе в концентрации приблизительно 5 мМ, указанное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат,

присутствующий в указанном фармацевтическом составе в количестве приблизительно 0,06%, и указанные стабилизирующие агенты представляют собой сахарозу, присутствующую в указанном фармацевтическом составе в количестве приблизительно 15%, и моногидрохлорид L-аргинина, присутствующий в указанном фармацевтическом составе в концентрации приблизительно 120 мМ, и где указанный фармацевтический состав имеет pH приблизительно 6,0.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу удаления примесей из собранного из клеток материала, включающему стадию обработки указанного сбора из клеток при высоком pH и последующую стадию фильтрации.

В соответствии с настоящим изобретением термин «антитело» и термин «иммуноглобулин» используют взаимозаменяемо. Термин «антитело» в контексте настоящего документа включает полноразмерное антитело и фрагменты антитела. Антитела представляют собой гликопротеины, продуцируемые плазматическими клетками, играющие роль в иммунном ответе путем распознавания и инактивации молекул антигена. У млекопитающих вырабатываются пять классов иммуноглобулинов: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. В нативной форме иммуноглобулины существуют в виде одной или более копий Y-образного звена, состоящего из четырех полипептидных цепей: двух идентичных тяжелых (H) цепей и двух идентичных легких (L) цепей. Ковалентные дисульфидные связи и нековалентные взаимодействия обеспечивают возможность межцепочечных соединений; в частности, тяжелые цепи связаны друг с другом, в то время как каждая легкая цепь соединяется в пару с тяжелой цепью. Как тяжелая цепь, так и легкая цепь содержат N-концевую переменную (V) область и C-концевую константную (C) область. В тяжелой цепи переменная область состоит из одного переменного домена (VH), а константная область состоит из трех или четырех константных доменов (CH1, CH2, CH3 и CH4), в зависимости от класса антитела; тогда как легкая цепь содержит переменный домен (VL) и один константный домен (CL). Переменные области содержат три области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR). Они образуют антигенсвязывающий сайт и придают антителу специфичность. CDR расположены между четырьмя более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR), которые определяют положение CDR. Связыванию антигена способствует гибкость положения доменов; например, в иммуноглобулине, содержащем три константных тяжелых домена, между CH1 и CH2 присутствует спейсер, называемый

«шарнирной областью», который обеспечивает движение для взаимодействия с мишенью. Начиная с антитела в его интактной, нативной форме, можно получить фрагменты антител путем ферментативного расщепления. Например, инкубация IgG с эндопептидазой папаином приводит к разрыву пептидных связей в шарнирной области и к последующему

5 получению трех фрагментов: двух связывающих фрагментов антитела (Fab), каждый из которых способен связываться с антигеном, и кристаллизуемого фрагмента (Fc). Расщепление пепсином вместо этого дает один большой фрагмент, F(ab')₂, состоящий из двух Fab-звеньев, связанных дисульфидными связями, и много небольших фрагментов, являющихся результатом деградации Fc-области. В зависимости от их природы антитела и

10 фрагменты антител могут быть мономерными или мультимерными, моновалентными или поливалентными, моноспецифическими или полиспецифическими.

В контексте настоящего документа термин «полноразмерное антитело» включает антитела в их нативной интактной структуре, содержащей по меньшей мере две пары тяжелых и легких цепей.

15 В контексте настоящего документа термин «фрагменты антител» включает одну или более частей полноразмерного антитела. Неограничивающие примеры фрагментов антител включают: (i) кристаллизуемый фрагмент (Fc), состоящий из двух константных фрагментов тяжелой цепи, состоящих из доменов CH₂ и CH₃ в IgA, IgD и IgG, и доменов CH₂, CH₃ и CH₄ в IgE и IgM, соединенных в пары дисульфидными связями и нековалентными

20 взаимодействиями; (ii) фрагмент, связывающий антиген (Fab), состоящий из VL, CL и VH, CH₁, соединенных дисульфидными связями; (iii) Fab', состоящий из VL, CL и VH, CH₁, соединенных дисульфидными связями, и одного или более остатков цистеина из шарнирной области; (iv) Fab'-SH, представляющий собой Fab'-фрагмент, в котором остатки цистеина содержат свободную сульфгидрильную группу; (v) F(ab')₂, состоящий из двух Fab-

25 фрагментов, соединенных в шарнирной области дисульфидной связью; (vi) переменные фрагменты (Fv), состоящие из цепей VL и VH, соединенных в пары нековалентными взаимодействиями; (vii) одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), состоящие из цепей VL и VH, соединенных в пары посредством линкера; (ix) биспецифические димеры одноцепочечных Fv, (x) фрагмент scFv-Fc; (xi) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH₁;

30 (xii) однодоменное антитело dAb, состоящее из домена VH или домена VL; (xiii) диатела, состоящие из двух scFv-фрагментов, в которых домены VH и VL соединены коротким пептидом, предотвращающим их спаривание в одной цепи и обеспечивающим

нековалентную димеризацию двух scFv; (xiv) трехвалентные 10 триатела, в которых три scFv с доменами VH и VL, соединенными коротким пептидом, образуют тример. (xv) полу-IgG, содержащее одну тяжелую цепь и одну вариабельную цепь.

В контексте настоящего документа термин «гомодимерное антитело», или
5 «гомодимерный фрагмент», или «гомодимер» включает молекулу иммуноглобулина или ее часть, содержащую по меньшей мере первый и второй полипептид, например, первый и второй домен, где второй полипептид идентичен по аминокислотной последовательности первому полипептиду. Предпочтительно гомодимерный иммуноглобулин содержит две полипептидные цепи, где первая цепь имеет по меньшей
10 мере один идентичный домен со второй цепью и где обе цепи собираются, то есть, взаимодействуют через свои идентичные домены. В частности, гомодимерный иммуноглобулин содержит по меньшей мере два идентичных домена, где оба домена собираются, то есть, взаимодействуют через свои поверхности раздела белок-белок. Предпочтительно гомодимерный фрагмент иммуноглобулина содержит по меньшей мере
15 два домена, где первый домен идентичен второму домену и где оба домена собираются, то есть, взаимодействуют через свои поверхности раздела белок-белок.

В контексте настоящего документа термин «гетеродимерное антитело», или
«гетеродимерный фрагмент», или «гетеродимер» включает молекулу иммуноглобулина или ее часть, содержащую по меньшей мере первый и второй полипептид, например,
20 первый и второй домен, где второй полипептид отличается по аминокислотной последовательности от первого полипептида. Предпочтительно гетеродимерный иммуноглобулин содержит две полипептидные цепи, где первая цепь имеет по меньшей мере один неидентичный домен со второй цепью и где обе цепи собираются, то есть, взаимодействуют через свои неидентичные домены. В частности, гетеродимерный
25 иммуноглобулин содержит по меньшей мере два домена, где первый домен неидентичен второму домену и где оба домена собираются, то есть, взаимодействуют через свои поверхности раздела белок-белок. Более предпочтительно гетеродимерный иммуноглобулин обладает специфичностью связывания в отношении по меньшей мере двух разных лигандов, антигенов или сайтов связывания, то есть, является
30 биспецифическим.

В контексте настоящего документа термин «валентность» относится к количеству сайтов связывания в антителе. Антитело с более чем одной валентностью называется

поливалентным; неограничивающими примерами многовалентных антител являются: двухвалентное антитело, характеризующееся двумя сайтами связывания, трехвалентное антитело, характеризующееся тремя сайтами связывания, и четырехвалентное антитело, характеризующееся четырьмя сайтами связывания.

- 5 В контексте настоящего документа термин «моноспецифическое антитело» относится к любому антителу или фрагменту, имеющему один или более сайтов связывания, причем все они связывают один и тот же эпитоп.

В контексте настоящего документа термин «полиспецифическое антитело» относится к любому антителу или фрагменту, имеющему более одного сайта связывания, которые
10 могут связывать разные эпитопы одного и того же антигена или разные антигены. Неограничивающим примером полиспецифических антител являются биспецифические антитела.

Термин «биспецифическое антитело» относится к любому антителу, имеющему два сайта связывания, которые могут связывать два разных эпитопа одного и того же антигена или
15 два разных антигена.

В контексте настоящего документа термин «антиген» относится к любой молекуле, с которой антитело может специфично связываться. Примеры антигенов включают полипептиды, белки, полисахариды и молекулы липидов. В антигене могут присутствовать один или более эпитопов. В контексте настоящего документа термин «эпитоп» или
20 «антигенная детерминанта» относится к части антигена, которая вступает в непосредственное химическое взаимодействие с антителом.

В контексте настоящего документа термин «моноклональное антитело» относится к антителам, продуцируемым клонированными клетками, все из которых происходят из одной и той же клетки, и специфично связывающим один и тот же эпитоп антигена-мишени. При продуцировании терапевтических антител получение моноклональных антител является более предпочтительным по сравнению с поликлональными антителами. Фактически, в то время как моноклональные антитела продуцируются клетками, происходящими из одного клона, и связывают один и тот же эпитоп, поликлональные антитела продуцируются разными иммунными клетками и распознают несколько эпитопов
25 определенного антигена. Моноклональные антитела обеспечивают гомогенность от партии к партии, сниженную перекрестную реактивность и высокую специфичность к

мишени. Моноклональные антитела могут быть экспрессированы, например, в клетках-хозяевах, с использованием рекомбинантной ДНК, что обеспечивает получение рекомбинантного антитела.

В контексте настоящего документа термин «рекомбинантное антитело» относится к антителу, которое было получено любым способом, включающим применение рекомбинантной ДНК. Рекомбинантное антитело может быть сконструировано таким образом, чтобы улучшить такие характеристики, как иммуногенность, аффинность связывания, размер молекулы, специфичность, период полувыведения и формат. Примеры рекомбинантных антител включают, не ограничиваясь перечисленным, сконструированные антитела, химерные антитела, антитела с привитыми CDR (такие как гуманизированные антитела), полностью человеческие антитела, фрагменты антител, антитела с модифицированной Fc-областью, полиспецифическое антитело (такое как биспецифическое, триспецифическое, тетраспецифическое антитело), мономерные и мультимерные антитела (такие как гомодимерные и гетеродимерные антитела).

В контексте настоящего документа термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором переменная область получена из одного вида и слита с константной областью, полученной из другого вида; неограничивающим примером химерного антитела является антитело, в котором мышиная переменная область слита с человеческой константной областью.

В контексте настоящего документа термин «антитело с привитыми CDR» относится к антителу, в котором CDR, полученные из одного вида, привиты к каркасной области другого вида; неограничивающим примером антитела с привитыми CDR является гуманизированное антитело, в котором CDR от вида млекопитающих, такого как мышь, привиты к человеческой каркасной области.

Термин «трансфекция клеток» относится к введению чужеродного генетического материала в эукариотические клетки. Когда белок, кодируемый искусственно введенной нуклеиновой кислотой, экспрессируется клетками, он придает генетически модифицированным клеткам свойства, отличные от соответствующей формы дикого типа. Введенная нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК или РНК. Примеры методов, обычно используемых для введения экзогенной нуклеиновой кислоты в клетки-хозяева, включают химические способы, в которых трансфекция опосредуется реагентами для трансфекции, такими как фосфат кальция, липосомы, катионные полимеры или

дендримеры; физический способ, такой как электропорация и микроинъекция; и основанные на вирусах способы, в которых инфицирование вирусом опосредует доставку генов. С помощью этих методов можно достичь временной или стабильной трансфекции. При временной трансфекции последовательность нуклеиновой кислоты не встраивается в геном клетки-хозяина, поэтому экспрессия белка, кодируемого экзогенным генетическим материалом, ограничена во времени, тогда как стабильная трансфекция достигается, когда клетки встраивают чужеродный генетический материал в свой геном, давая начало стабильно трансфицированной линии клеток.

Термин «клетки-хозяева» относится ко всем клеткам, в которых экспрессируется белок, кодируемый трансфицированным материалом нуклеиновой кислоты, включая клетки, которые непосредственно введена чужеродная нуклеиновая кислота, и их потомство. Линии клеток, подходящие для экспрессии антитела, включают, не ограничиваясь перечисленным, клетки бактерий, млекопитающих, насекомых, растений и дрожжей. Линии клеток, часто используемые для экспрессии и продукции терапевтических антител, представляют собой линии клеток млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки мышинной миеломы NSO, клетки карциномы шейки матки человека (HeLa) и клетки эмбриональной почки человека (HEK). Клетки-хозяева культивируют в условиях, которые способствуют их росту и экспрессии антитела. Оптимальные условия культивирования достигаются путем контроля и регулирования нескольких параметров, включая состав среды для культивирования клеток, рабочие параметры биореактора, способ подачи питательных веществ и продолжительность культивирования. Состав культуральной среды должен быть оптимизирован для обеспечения жизнеспособности и воспроизводства клеток; примеры составляющих культуральной среды включают, не ограничиваясь перечисленным, незаменимые аминокислоты, соли, глюкозу, факторы роста и антибиотики. Важными рабочими параметрами биореактора являются: температура, pH, скорость перемешивания, уровни насыщения кислородом и углекислого газа. Питательные вещества могут подаваться различными способами: в периодическом режиме культивирования все необходимые питательные вещества присутствуют в исходной базовой среде и используются до истощения при одновременном накоплении отходов; в культивировании с подпиткой подают дополнительную питательную среду для предотвращения истощения питательных веществ и продления культивирования; в режиме перфузии, напротив, к клеткам в культуре непрерывно подают свежую среду, содержащую питательные вещества, которые поступают в биореактор, удаляя клеточные

отходы. Период культивирования важен, так как он должен быть достаточно длинным, чтобы позволить клеткам продуцировать надлежащее количество продукта, но он не может быть слишком длинным, чтобы не ухудшить жизнеспособность клеток.

5 Термин «собранный материал антитела» относится к материалу, полученному при культивировании клеток, содержащему антитело, экспрессируемое клетками-хозяевами. Собранный материал антитела может быть получен сначала путем сбора культуры клеток-хозяев, а затем подвергания сбора процессу осветления, в результате которого удаляется клеточный детрит посредством стадий центрифугирования и/или фильтрации.

10 Термин «клиренс вирусов» относится к любой обработке, эффективно удаляющей и/или инактивирующей вирусы, которые могут загрязнять представляющий интерес материал. При применении в процессе очистки терапевтического антитела клиренс вирусов относится к любому способу, который приводит к инаktivации вирусов или удалению вирусов из содержащего антитело материала.

15 Термин «инаktivация вирусов» относится к любой обработке, делающей вирус неспособным инфицировать биологические образцы или реплицироваться. Инаktivация вирусов может быть достигнута различными методами, такими как инкубация биологического образца с растворителями и детергентами (S/D), которая вызывает инаktivацию вирусов посредством солюбилизации вирусной оболочки; инкубация при низком или высоком pH, что приводит к денатурации вирусных белков; пастеризационная
20 обработка, при которой достигается денатурация вирусного белка при высоких температурах.

Термин «инкубация» относится к операции выдерживания материала в определенных условиях, включающих условия, при которых материал претерпевает модификации. В процессе инаktivации вирусов инкубация материала с раствором, имеющим химические
25 характеристики, вызывающие инаktivацию вирусов, приводит к образованию материала, свободного от активных вирусных загрязнений.

Термин «обработка смесью растворитель/детергент» относится к инкубации материала собранного антитела с растворителем, таким как органический растворитель, или с органическим растворителем и детергентом.

30 Термин «обработка при высоком pH» относится к инкубации собранного материала антитела с буферным раствором с pH более 7.

Термин «удаление вируса» относится к любой обработке, позволяющей физически отделить вирусные частицы от обрабатываемого образца. В процессе очистки терапевтического белка удаление вируса осуществляется путем стадий фильтрации. Кроме того, удалению вирусных частиц способствуют другие фазы процесса очистки, такие как

5 стадии хроматографии.

Термин «фильтрация» относится к операции отделения твердых частиц от жидкости.

Термин «хроматография» относится к операции разделения соединений смеси на основе их способности взаимодействовать с неподвижной фазой хроматографической колонки, на которой они могут удерживаться или элюироваться.

- 10 В контексте настоящего документа термины «анализ на инактивацию вирусов» и «подтверждение удаления вирусов (VRV)» являются взаимозаменяемыми и относятся к процедуре тестирования эффективного очищения от вирусов. Для проведения анализа на инактивацию вирусов наличие вируса в образцах измеряют до и после добавки известного количества стандартного вируса и сравнивают выходной титр вируса с титром вируса в
- 15 соответствующей загрузке. Затем может быть определен коэффициент $\log_{10}$ сокращения (RF) в соответствии со следующей формулой: $RF = \log_{10} \{ \text{входной титр вируса} \times \text{входной объем} / \text{выходной титр вируса} \times \text{выходной объем} \}$. Инактивацию/удаление вирусов можно описать как «эффективную», когда RF составляет более $4 \log_{10}$; «умеренно эффективную», когда RF составляет от $2 \log_{10}$ до $4 \log_{10}$; «способствующую снижению количества вирусов»,
- 20 когда RF составляет от $1 \log_{10}$ до $2 \log_{10}$; и «неэффективную», когда RF составляет менее $1 \log_{10}$.

- В соответствии с настоящим изобретением исходный собранный материал антитела содержит моноклональное антитело. Предпочтительно моноклональное антитело является рекомбинантным. В конкретном варианте осуществления настоящего
- 25 изобретения моноклональное рекомбинантное антитело представляет собой гетеродимерное биспецифическое антитело.

- В соответствии с настоящим изобретением гетеродимерное биспецифическое антитело может быть получено с помощью технологии BEAT® (WO2012131555). В одном из вариантов осуществления данного изобретения биспецифическое антитело, обозначаемое
- 30 BEAT®1, связывает кластер дифференцировки 3 (CD3), экспрессируемый Т-клетками и рецептором 2 человеческого эпидермального фактора роста (HER2), часто

сверхэкспрессируемый в клетках рака молочной железы. В еще одном варианте осуществления моноклональное биспецифическое антитело, обозначаемое BEAT[®]2 (SEQ ID NO: 1, 2 и 3), связывает CD3 и кластер дифференцировки 38 (CD38), сверхэкспрессируемые в клетках множественной миеломы. В еще одном варианте осуществления моноклональное биспецифическое антитело представляет собой BEAT[®]3 (SEQ ID NO: 4, 5 и 6), связывающееся с CD3 и EGFR, о которых известно, что они являются мишенью при различных типах рака, включая колоректальный рак. В еще одном варианте осуществления моноклональное антитело, обозначаемое Ab1 (SEQ ID NO: 7 и 8), представляет собой IgG1, нацеленное на рецептор OX40, задействованный при аутоиммунных и воспалительных расстройствах.

Антитело согласно настоящему изобретению экспрессируется в клетках-хозяевах при трансфекции клеток. Способы трансфекции клеток, используемые в данном изобретении, включают, не ограничиваясь перечисленным, химические способы, в которых используется реагент для трансфекции. Реагенты для трансфекции, подходящие для данного изобретения, включают, не ограничиваясь перечисленным, фосфат кальция, липосомы, катионные полимеры и дендримеры. В одном из вариантов осуществления данного изобретения трансфекцию клеток осуществляют катионными полимерами. Неограничивающими примерами катионного полимера являются диэтилэтаноламин и полиэтиленимин. В конкретном варианте осуществления данного изобретения катионный полимер представляет собой полиэтиленимин.

В соответствии с частным аспектом настоящего изобретения линии клеток-хозяев, используемые для продукции антитела, включают, не ограничиваясь перечисленным, линии эукариотических клеток. В одном из вариантов осуществления данного изобретения линии клеток-хозяев представляют собой линии клеток млекопитающих. В более конкретном варианте осуществления линия клеток млекопитающих представляет собой линию клеток, отличных от человеческих. В еще более конкретном варианте осуществления данного изобретения линия клеток млекопитающих представляет собой линию клеток CHO, в частности, линию клеток CHO-S.

Клетки-хозяева согласно настоящему изобретению могут быть культивированы в одноразовом биореакторе с рабочим объемом 250 л, содержащем среду, не содержащую компонентов животного происхождения (ADCF), где содержание растворенного O₂ поддерживается на уровне 40% насыщения воздуха, а температура поддерживается на

уровне 37 °С. Культура может представлять собой культуру с подпиткой, где подачу питательных веществ начинают на 3 день после высевания. В биореактор ежедневно добавляют порции питательных веществ. Культуру собирают либо через 11 дней после начала подпитки, либо когда жизнеспособность клеток достигает 80% или 85%.

- 5 В соответствии с настоящим изобретением раствор антитела, вирусы в котором были инактивированы, может быть приготовлен, начиная с собранного материала антитела. В частности, собранный материал антитела является продуктом осветления собранной массы культуры клеток-хозяев. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения собранный материал антитела получают путем осветления собранной массы посредством
- 10 стадий фильтрации, включающих «тупиковую» глубинную фильтрацию с последующей асептической фильтрацией через 0,2 мкм фильтр.

- Собранный материал антитела может быть загружен на хроматографическую колонку. В отдельных вариантах осуществления данного изобретения собранный материал антитела загружают на хроматографическую колонку с белком А (РА). Собранный материал
- 15 антитела, загруженный на хроматографическую колонку с белком А, также называют «загрузкой РА». Собранный раствор называется «элюатом РА». В данном изобретении смолу в хроматографии на белке А сначала уравнивают до pH 7,4 с помощью натрий-фосфатного буфера (PBS). В отдельном варианте осуществления данного изобретения колонку затем промывают (например, трис и/или ацетатом), и элюируют антитело из
- 20 колонки, используя элюирующие буферы, такие как глицин или ацетат. В одном из аспектов настоящего изобретения элюат, полученный на белке А, нейтрализуют до pH, равного приблизительно 5 или более, и равного 7 или менее; более конкретно, до pH, равного 5,5 или более, и равного 6,5 или менее.

- В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения инактивацию вирусов
- 25 проводят путем обработки смесью растворитель/детергент. Органические растворители, подходящие для раскрытого в настоящем документе способа, включают диалкилфосфаты, такие как три-(н-бутил)фосфат (TnBP). Концентрация органического растворителя может быть равна приблизительно 0,1 масс. % или более, и равна приблизительно 1 масс. % или менее. В частности, концентрация органического растворителя выбрана из группы,
- 30 состоящей из: приблизительно 0,1 масс. %, приблизительно 0,2 масс. %, приблизительно 0,3 масс. %, приблизительно 0,4 масс. %, приблизительно 0,5 масс. %, приблизительно 0,6 масс. %, приблизительно 0,7 масс. %, приблизительно 0,8 масс. %, приблизительно 0,9 масс.

% или приблизительно 1 масс. %. Более конкретно, концентрация органического растворителя составляет по меньшей мере приблизительно 0,1 масс. %, по меньшей мере приблизительно 0,3 масс. %, по меньшей мере приблизительно 0,5 масс. % или по меньшей мере приблизительно 1 масс. %. В отдельных предпочтительных вариантах осуществления

5 концентрация органического растворителя равна приблизительно 0,2 масс. % или более, и равна приблизительно 0,4 масс. % или менее. В частности, концентрация органического растворителя составляет приблизительно 0,2 масс. %, или приблизительно 0,3 масс. %, или приблизительно 0,4 масс. %. Более предпочтительно концентрация органического растворителя составляет приблизительно 0,3 масс. %. Настоящее изобретение также

10 включает концентрации органического растворителя с интервалами 0,1 масс. %, 0,2 масс. %, 0,3 масс. %, 0,4 масс. %, 0,5 масс. %, 0,6 масс. %, 0,7 масс. %, 0,8 масс. %, 0,9 масс. % или 1% между указанными выше концентрациями.

Детергенты, подходящие для раскрытого в настоящем документе способа, включают неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как алкиловые сложные эфиры

15 полиоксиэтиленгликоля и сорбитана, включая полисорбаты, такие как полисорбат-20 (такой как Tween 20®), полисорбат-40 (такой как Tween 40®), полисорбат-60 (такой как Tween 60®) и полисорбат-80 (такой как Tween 80®); и простой октилфениловый эфир полиоксиэтилена (такой как Triton® X-100). Термины «полисорбат» и «Tween», используемые в настоящем документе, являются взаимозаменяемыми. Концентрация

20 детергента равна приблизительно 0,1 масс. % или более, и равна приблизительно 2 масс. % или менее; в частности, концентрация детергента равна 0,2 масс. % или более, и равна 1,5 масс. % или менее. В более конкретном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация детергента равна 0,75 масс. % или более, и равна 1,25 масс. % или менее. Более конкретно, концентрация детергента выбрана из группы, состоящей из:

25 приблизительно 0,1 масс. %, приблизительно 0,2 масс. %, приблизительно 0,3 масс. %, приблизительно 0,4 масс. %, приблизительно 0,5 масс. %, приблизительно 0,6 масс. %, приблизительно 0,7 масс. %, приблизительно 0,8 масс. %, приблизительно 0,9 масс. %, приблизительно 1 масс. %, приблизительно 1,2 масс. %, приблизительно 1,5 масс. %, приблизительно 1,7 масс. % или приблизительно 2 масс. %. Более конкретно, концентрация

30 органического растворителя составляет по меньшей мере приблизительно 0,2 масс. %, по меньшей мере приблизительно 0,5 масс. %, по меньшей мере приблизительно 0,75 масс. %, по меньшей мере приблизительно 1 масс. % или по меньшей мере приблизительно 1,25 масс. %. В отдельных предпочтительных вариантах осуществления концентрация

детергента составляет приблизительно 0,75 масс. %, или приблизительно 1 масс. %, или приблизительно 1,25 масс. %. В более предпочтительном варианте осуществления концентрация детергента составляет приблизительно 1 масс. %. Настоящее изобретение также включает концентрации органического растворителя с интервалами 0,05 масс. %, 0,1
5 масс. %, 0,2 масс. %, 0,3 масс. %, 0,4 масс. %, 0,5 масс. %, 0,6 масс. %, 0,7 масс. %, 0,8 масс. %, 0,9 масс. % или 1% между указанными выше концентрациями.

В одном из аспектов настоящего изобретения материал, содержащий антитело, инкубируют с растворителем или детергентом, или смесью растворителя и детергента в течение времени инкубации, равного приблизительно 5 минутам или более, и равного
10 приблизительно 120 минутам или менее. В частности, время инкубации выбрано из группы, включающей приблизительно 5 минут, приблизительно 10 минут, приблизительно 20 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 60 минут, приблизительно 90 минут и приблизительно 120 минут. Более конкретно, указанное время инкубации составляет по меньшей мере приблизительно 5 минут, по меньшей мере приблизительно 10 минут, по
15 меньшей мере приблизительно 20 минут, по меньшей мере приблизительно 30 минут, по меньшей мере приблизительно 60 минут, по меньшей мере приблизительно 90 минут и по меньшей мере приблизительно 120 минут. Более конкретно, время инкубации равно 30 минутам или более, и равно 90 минутам или менее, предпочтительно время инкубации составляет 60 минут. Настоящее изобретение также включает время инкубации с
20 растворителем и детергентом с интервалами 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60, 75 или 90 минут между указанными выше интервалами инкубации.

В одном из вариантов осуществления данного изобретения раствор, содержащий антитело, обрабатывают TnBP и Triton X-100 таким образом, что конечная концентрация составляет приблизительно 0,3 масс. % TnBP и от приблизительно 0,2 масс. % до
25 приблизительно 1 масс. % Triton X-100. В еще одном аспекте данного варианта осуществления раствор, содержащий антитело, обрабатывают TnBP и полисорбатом-80 таким образом, что конечная концентрация составляет приблизительно 0,3 масс. % TnBP и от приблизительно 0,2 масс. до приблизительно 1 масс. полисорбата-80. В еще одном аспекте данного варианта осуществления раствор, содержащий антитело, обрабатывают
30 TnBP и полисорбатом-20 таким образом, что конечная концентрация составляет приблизительно 0,3 масс. % TnBP и от приблизительно 0,2 масс. до приблизительно 1 масс. полисорбата-20.

В одном аспекте данного изобретения раствор, содержащий антитело, представляет собой элюат РА. В конкретном аспекте элюат РА обрабатывают приблизительно 0,1 масс. % TnBP, или приблизительно 0,3 масс. % TnBP, или приблизительно 0,5 масс. % TnBP, или приблизительно 1 масс. % TnBP, или приблизительно 0,3 масс. % TnBP и приблизительно 0,2 масс. % Triton X-100, или приблизительно 0,3 масс. % TnBP и приблизительно 0,5 масс. % Triton X-100, или приблизительно 0,3 масс. % TnBP и приблизительно 1 масс. % Triton X-100, или приблизительно 0,3 масс. % TnBP и приблизительно 0,2 масс. % полисорбата-80, или приблизительно 0,3 масс. % TnBP и приблизительно 0,5 масс. % полисорбата-80, или приблизительно 0,3 масс. % TnBP и приблизительно 1 масс. % полисорбата-80, или приблизительно 0,3 масс. % TnBP и приблизительно 0,2 масс. % полисорбата-20, или приблизительно 0,3 масс. % TnBP и приблизительно 0,5 масс. % полисорбата-20, или приблизительно 0,3 масс. % TnBP и приблизительно 1 масс. % полисорбата-20. В более конкретном аспекте элюат РА обрабатывают приблизительно 0,3 масс. % TnBP в комбинации с приблизительно 0,2 масс. % Triton X-100, или приблизительно 0,5 масс. % Triton X-100, или приблизительно 0,5 масс. % полисорбата-80, или приблизительно 1 масс. % полисорбата-80, или приблизительно 0,2 масс. % полисорбата-20, или приблизительно 0,5 масс. % полисорбата-20, или приблизительно 1 масс. % полисорбата-20.

В более конкретном аспекте настоящего изобретения раствор, содержащий антитело, представляет собой элюат РА, и элюат РА инкубируют со смесью 0,3 масс. % TnBP и 1 масс. % полисорбата-80 в течение по меньшей мере 10 минут при комнатной температуре, предпочтительно в течение приблизительно 60 минут при комнатной температуре.

В еще одном аспекте данного изобретения раствор, содержащий антитело, представляет собой загрузку РА, и загрузку РА обрабатывают приблизительно 0,3 масс. % TnBP в комбинации с приблизительно 1 масс. % Triton X-100, или приблизительно 1 масс. % полисорбата-80, или приблизительно 1масс. % полисорбата-20.

В частном аспекте настоящего изобретения загрузку РА инкубируют с растворителем или детергентом, или смесью растворителя и детергента в течение времени инкубации, как указано ранее. Кроме того, указанную загрузку РА, инкубированную с указанным растворителем, или указанным детергентом, или указанной смесью растворителя и детергента, загружают в хроматографическую колонку с РА, и продолжительность загрузки составляет приблизительно 7 часов или менее. В отдельном варианте осуществления

продолжительность загрузки составляет приблизительно 3 часа. Предпочтительно сумма времени инкубации и продолжительности загрузки равна 7 часам или менее.

В более конкретном аспекте данного изобретения раствор, содержащий антитело, представляет собой загрузку РА, и загрузку РА инкубируют со смесью 0,3 масс. % ТnBP и 1 масс. % полисорбата-80 в течение по меньшей мере 5 минут, предпочтительно в течение приблизительно 60 минут при комнатной температуре перед загрузкой в колонку для хроматографии на РА.

В еще одном варианте осуществления данного изобретения способ инактивации вирусов представляет собой обработку при высоком pH. Буферные растворы, используемые в раскрытом в настоящем документе способе, включают щелочной раствор, включая, не ограничиваясь перечисленным, ацетат, цитрат, трис, гистидин, L-аргинин, фосфат, NaOH. pH буферного раствора может быть равен приблизительно 7,5 или более, и равен приблизительно 14 или менее. В частности, pH буферного раствора выбирают из группы, состоящей из приблизительно 7,5, приблизительно 8, приблизительно 8,5, приблизительно 9, приблизительно 9,5, приблизительно 10, приблизительно 10,5, приблизительно 11, приблизительно 11,5, приблизительно 12, приблизительно 12,5, или приблизительно 13, или приблизительно 13,5, или приблизительно 14. В более конкретном варианте осуществления pH буферного раствора равен приблизительно 10 или более, и равен приблизительно 12 или менее; более конкретно, pH буферного раствора равен приблизительно 10,5 или более, и равен приблизительно 11,5 или менее. В частности, pH буферного раствора составляет по меньшей мере 10,5; более конкретно, pH буферного раствора составляет приблизительно 11,5; более предпочтительно приблизительно 11,2; еще более предпочтительно приблизительно 11. Настоящее изобретение также включает значения pH с интервалами 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1 между указанными выше значениями pH. В конкретном аспекте данного варианта осуществления раствор, содержащий антитело, представляет собой элюат РА, и элюат РА обрабатывают 250 mM фосфатом, 0,1 M NaOH и 0,5 M NaOH.

В одном из варианте осуществления настоящего изобретения материал, содержащий антитело, инкубируют при высоком pH в течение времени инкубации, равного приблизительно 1 минуте или более, и равного приблизительно 4 часам или менее. В частности, время инкубации выбрано из группы, включающей приблизительно 1 минуту, приблизительно 5 минут, приблизительно 10 минут, приблизительно 30 минут,

приблизительно 45 минут, приблизительно 60 минут, приблизительно 90 минут, приблизительно 2 часа, приблизительно 3 часа и приблизительно 4 часа. Более конкретно, указанное время инкубации составляет по меньшей мере приблизительно 1 минуту, по меньшей мере приблизительно 5 минут, по меньшей мере приблизительно 10 минут, по меньшей мере приблизительно 30 минут, по меньшей мере приблизительно 45 минут, по меньшей мере приблизительно 60 минут, по меньшей мере приблизительно 90 минут, при по меньшей мере приблизительно 2 часа, по меньшей мере приблизительно 3 часа и по меньшей мере приблизительно 4 часа. Более конкретно, время инкубации равно 30 минутам или более, и равно 90 минутам или менее, предпочтительно время инкубации составляет 60 минут. Настоящее изобретение также включает время инкубации при высоком pH с интервалами 1, 5, 10, 15, 30, 60, 75, 90 или 120 минут между указанными выше интервалами инкубации.

После хроматографии на белке А и обработки для инактивации вирусов, или после обработки для инактивации вирусов и хроматографии на белке А раствор, содержащий антитело, может быть дополнительно обработан с помощью других стадий хроматографии и фильтрации для дополнительной очистки и концентрирования антитела для получения нерасфасованного лекарственного вещества, содержащего терапевтическое антитело. В одном аспекте настоящего изобретения предложены способы получения нерасфасованного лекарственного вещества. Способ получения нерасфасованного лекарственного вещества может включать следующие последовательные стадии: (a) инактивация вирусов путем обработки смесью растворитель/детергент, (b) хроматографическая очистка на белке А, (c) катионообменная хроматография (CEX), (d) ультрафильтрация/диафильтрация (UF/DF), (e) анионообменный мембранный адсорбер, (f) нанофильтрация вирусов, (g) UF/DF, (h) добавление вспомогательных веществ и регулирование концентрации; или последовательные стадии (a') хроматографической очистки на белке А, (b') инактивации вирусов путем обработки смесью растворитель/детергент, (c') CEX, (d') UF/DF, (e') анионообменного мембранного адсорбера, (f') нанофильтрации вирусов, (g') UF/DF, (h') добавления вспомогательных веществ и регулирования концентрации; или последовательные стадии (a'') хроматографической очистки на белке А, (b'') обработки при высоком pH, (c'') CEX, (d'') UF/DF, (e'') анионообменного мембранного адсорбера, (f'') нанофильтрации вирусов, (g'') UF/DF, (h'') добавления вспомогательных веществ и регулирования концентрации.

В более конкретном аспекте данного изобретения способ получения нерасфасованного лекарственного вещества состоит в первоначальном проведении инактивации вирусов в собранном материале антитела путем обработки смесью растворитель/детергент с помощью 0,3 масс. % ТnBP и 1 масс. % полисорбата-80 в течение 60 мин при перемешивании. Затем проводят хроматографию на белке А раствора, вирусы в котором были инаktivированы, и полученный элюат РА нейтрализуют до pH 6,0 и подвергают 0,2 мкм фильтрации; затем нейтрализованный промежуточный элюат РА загружают в колонку для катионообменной хроматографии и пропускают продукт через 0,2 мкм фильтр. Затем антитело концентрируют до целевого значения 25 мг/мл и подвергают диализу с 50 мМ гистидином, pH 6,5, с помощью системы ультрафильтрации/диафильтрации (UF/DF). Затем продукт фильтруют через 0,2 мкм и очищают на положительно заряженной одноразовой мембране NatriFlo для анионообменной (AEX) хроматографии в проточном режиме. Затем элюат подвергают 0,2 мкм фильтрации. Затем продукт подвергают нанофильтрации через Virosart® HF, асептически соединенный с одноразовым пакетом для смешивания для физического удаления вирусов. Вторую стадию UF/DF проводят для замены буфера на предварительный буфер, подвергнутый 0,2 мкм фильтрации, 5 мМ цитрат, pH 6,0. Полученный продукт затем фильтруют через 0,2 мкм фильтр. Для достижения конечной концентрации 6 мг/мл в буфере для приготовления конечного состава продукт смешивают с рассчитанным количеством 5 мМ цитрата, 15% сахарозы, 0,06% полисорбата-80, pH 5,9 и подвергают 0,2 мкм фильтрации. Полученный продукт затем фильтруют через 0,2 мкм фильтр, после чего фасуют в стерильные пакеты, состоящие из полиолефиновой однослойной пленки, замораживают и хранят при температуре 80 ± 20 °C.

В еще одном конкретном варианте осуществления данного изобретения способ получения нерасфасованного лекарственного вещества заключается сначала в подвергании осветленного сбора хроматографии на белке А, а затем в инкубации элюата РА при высоком pH (целевой pH=11) в течение времени инкубации 60 мин при комнатной температуре. Затем раствор, вирусы в котором были инаktivированы, нейтрализуют до pH 5,5 и подвергают 0,2 мкм фильтрации. Затем нейтрализованный промежуточный элюат РА загружают на катионообменную хроматографическую колонку и пропускают продукт через 0,2 мкм фильтр. Затем антитело концентрируют до целевого значения 25 мг/мл и подвергают диализу с 50 мМ гистидином, pH 6,5, с помощью системы ультрафильтрации/диафильтрации (UF/DF). Затем продукт подвергают 0,2 мкм фильтрации и очищают на положительно заряженной одноразовой мембране NatriFlo для

анионообменной (АЕХ) хроматографии в проточном режиме. Затем элюат подвергают 0,2 мкм фильтрации. Затем продукт подвергают нанофильтрации через Virosart® HF, асептически соединенный с одноразовым пакетом для смешивания для физического удаления вирусов. Вторую стадию UF/DF проводят для замены буфера на предварительный

5 буфер, подвергнутый 0,2 мкм фильтрации, 5 мМ гистидин, 150 мМ моногидрохлорид аргинина, pH 6,0. Для достижения конечной концентрации 6 мг/мл в буфере для приготовления конечного состава продукт смешивают с рассчитанным количеством 5 мМ гистидина, 150 мМ моногидрохлорида L-аргинина, 15% сахарозы, 0,06% полисорбата-80, pH 6,0. Полученный продукт затем фильтруют через 0,2 мкм фильтр, после чего фасуют в

10 стерильные пакеты, состоящие из полиолефиновой однослойной пленки, замораживают и хранят при температуре 80 ± 20 °C.

В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения раскрыт жидкий фармацевтический состав, содержащий моноклональное антитело, буфер, поверхностно-активное вещество и стабилизирующий агент.

15 В контексте настоящего документа «жидкий» состав представляет собой состав, приготовленный в жидкой форме. Такой состав может быть подходящим для непосредственного введения субъекту или, в качестве альтернативы, может быть упакован для хранения в жидкой форме, в замороженном состоянии или в высушенной форме (например, лиофилизированной) для последующего восстановления в жидкую форму или

20 другие формы, подходящие для введения субъекту.

В контексте настоящего документа термин «буфер» относится к забуференному раствору, который препятствует изменениям pH благодаря действию сопряженных кислотно-основных пар в его составе. Буфер согласно данному изобретению имеет pH от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,0, и предпочтительно равный $6,0 \pm 0,5$. Примеры

25 буферов, способных контролировать pH в этом диапазоне, включают ацетатный (например, ацетат натрия), сукцинатный (такой как сукцинат натрия), глюконатный, гистидиновый (например, L-гистидин), цитратный, фосфатный и другие буферы на основе органических кислот.

Примеры иллюстративного поверхностно-активного вещества включают: неионогенные

30 поверхностно-активные вещества (ГЛБ от 6 до 18), такие как сложные эфиры сорбитана и жирных кислот (например, сорбитанмонокаприлат, сорбитанмонолаурат, сорбитанмонопальмитат), сложные эфиры глицерина и жирных кислот (например,

глицеринмонокаприлат, глицеринмономиратат, глицеринмоностеарат), сложные эфиры полиглицерина и жирных кислот (например, декаглицерилмоностеарат, декаглицерилдистеарат, декаглицерилмоноинолеат), сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот (например,

5 полиоксиэтиленсорбитанмонолаурат, полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат, полиоксиэтиленсорбитанмоностеарат, полиоксиэтиленсорбитанмонопальмитат, полиоксиэтиленсорбитантриолеат, полиоксиэтиленсорбитантристеарат), сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитола и жирных кислот (например, полиоксиэтиленсорбитолтерастеарат, полиоксиэтиленсорбитолтетраолеат), сложные

10 эфиры полиоксиэтиленглицерина и жирных кислот (например, полиоксиэтиленглицерилмоностеарат), сложные эфиры полиэтиленгликоля и жирных кислот (например, полиэтиленгликольдистеарат), полиоксиэтиленалкиловые простые эфиры (например, полиоксиэтиленлауриловый эфир), полиоксиэтиленполиоксипропиленалкиловые простые эфиры (например,

15 полиоксиэтиленполиоксипропиленгликолевый эфир, полиоксиэтиленполиоксипропиленпропиловый эфир, полиоксиэтиленполиоксипропиленцетиловый эфир), полиоксиэтиленалкилфениловые простые эфиры (например, полиоксиэтиленнонилфениловый эфир), полиоксиэтилен-гидрогенизированные касторовые масла (например, полиоксиэтиленовое касторовое

20 масло, полиоксиэтилен-гидрогенизированное касторовое масло), полиоксиэтиленовые производные пчелиного воска (например, полиоксиэтиленсорбитоловый пчелиный воск), полиоксиэтиленовые производные ланолина (например, полиоксиэтиленовый ланолин) и полиоксиэтиленовые амиды жирных кислот (например, полиоксиэтиленстеариламид); анионные поверхностно-активные вещества, такие как соли C10-C18 алкилсульфатов

25 (например, цетилсульфат натрия, лаурилсульфат натрия, олеилсульфат натрия), соли полиоксиэтилированных C10-C18 алкилэфирсульфатов со средним содержанием этиленоксида 2-4 моль (например, полиоксиэтиленлаурилсульфат натрия) и соли простых C8-C18-алкиловых эфиров сульфоянтарной кислоты (например, лаурилсульфосукцинат натрия); и природные поверхностно-активные вещества, такие как лецитин,

30 глицерофосфолипид, сфингофосфолипиды (например, сфингомиелин) и сложные эфиры сахарозы и C12-C18 жирных кислот. Предпочтительно поверхностно-активное вещество выбрано из сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот. Особенно

предпочтительно поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат-20, -21, -40, -60, -65, -80, -81 и -85, наиболее предпочтительно полисорбат-80.

В состав может быть добавлен стабилизирующий агент для стабилизации белка. Указанный стабилизирующий агент выбран из группы, включающей ацетат натрия, бикарбонат натрия, карбонат натрия, хлорид натрия, ацетат калия, бикарбонат калия, карбонат калия, хлорид калия, сахарозу, многоатомные спирты, сахара, аминокислоты, такие как гистидин, аргинин, гидрохлорид L-аргинина, моногидрохлорид L-аргинина, глицин, метионин, пролин, лизин, глутаминовую кислоту, амины и трегалозу.

В частном варианте осуществления настоящего изобретения предложенный жидкий фармацевтический состав содержит моноклональное антитело, буфер, поверхностно-активное вещество и стабилизирующий агент, где указанное моноклональное антитело присутствует в указанном фармацевтическом составе в концентрации, равной приблизительно 0,01 мг/мл или более, и равной приблизительно 100 мг/мл или менее, предпочтительно в концентрации приблизительно 6 мг/мл, указанный буфер представляет собой цитрат, присутствующий в указанном фармацевтическом составе в концентрации приблизительно 5 мМ, указанное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, присутствующий в указанном фармацевтическом составе в количестве приблизительно 0,06%, и указанный стабилизирующий агент представляет собой сахарозу, присутствующую в указанном фармацевтическом составе в количестве приблизительно 15%, и где указанный фармацевтический состав имеет pH приблизительно 5,9.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения предложенный жидкий фармацевтический состав содержит моноклональное антитело, буфер, поверхностно-активное вещество и стабилизирующие агенты, где указанное моноклональное антитело присутствует в указанном фармацевтическом составе в концентрации, равной приблизительно 0,01 мг/мл или более, и равной приблизительно 100 мг/мл или менее, предпочтительно в концентрации приблизительно 6 мг/мл, указанный буфер представляет собой L-гистидин, присутствующий в указанном фармацевтическом составе в концентрации приблизительно 5 мМ, указанное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, присутствующий в указанном фармацевтическом составе в количестве приблизительно 0,06%, и указанные стабилизирующие агенты представляют собой сахарозу, присутствующую в указанном фармацевтическом составе в количестве приблизительно 15%, и моногидрохлорид L-аргинина, присутствующий в указанном

фармацевтическом составе в концентрации приблизительно 120 мМ, и где указанный фармацевтический состав имеет pH приблизительно 6,0.

Анализы на инактивацию вирусов необходимы для проверки чистоты раствора антитела и обеспечения вирусной безопасности. В предпочтительном варианте осуществления
 5 данного изобретения в раствор, содержащий антитело, вносят добавку модельного вируса и измеряют наличие вируса в образцах до и после внесения добавки. Модельные вирусы включают, не ограничиваясь перечисленным, вирус лейкоза мышей (MLV), мелкий вирус мышей (MMV), вирус псевдобешенства (PRV).

В соответствии с настоящим изобретением предложены способы инактивации вирусов,
 10 которые могут применяться в качестве альтернативы традиционной обработки низким pH. Эти альтернативы особенно предпочтительны, когда подлежащее очистке терапевтическое антитело нестойко к низкому pH и/или низкий pH несовместим с процессом очистки.

Фиг. 1: инактивация вирусов низким pH, анализ 1, % мономера по данным эксклюзионной
 15 ВЭЖХ

Фиг. 2: инактивация вирусов низким pH, анализ 1; (A) агрегаты и (B) плечо по данным эксклюзионной ВЭЖХ

Фиг. 3: профиль эксклюзионной ВЭЖХ деградировавшего образца после обработки низким pH

20 Фиг. 4: результаты ВЭЖХ-ХГВ после обработки низким pH, % главного пика

Фиг. 5: результаты ВЭЖХ-ХГВ после обработки низким pH, % агрегатов + плечо

Фиг. 6: инактивация вирусов при низком pH + добавка NaCl: результаты эксклюзионной ВЭЖХ

25 Фиг. 7: инактивация вирусов при низком pH + добавка NaCl: результаты капиллярного гель-электрофореза

Фиг. 8: инкубация с каприловой кислотой: результаты эксклюзионной ВЭЖХ

Фиг. 9: инкубация с каприловой кислотой: результаты ВЭЖХ-ХГВ

Фиг. 10: влияние времени выдерживания при высоком pH на BEAT®2 - по данным эксклюзионной ВЭЖХ

30 Фиг. 11: влияние времени выдерживания при высоком pH на BEAT®2 - по данным капиллярного гель-электрофореза в невосстанавливающих условиях

- Фиг. 12: влияние времени выдерживания при высоком pH на BEAT®2 - по данным капиллярного гель-электрофореза в восстанавливающих условиях
- Фиг. 13: влияние времени выдерживания при высоком pH на BEAT®2 - по данным ICE
- Фиг. 14: кривая доза-ответ и значения EC50
- 5 Фиг. 15: % мономера по данным эксклюзионной ВЭЖХ после инкубации при низком pH
- Фиг. 16: % плечевых компонентов и агрегатов по данным эксклюзионной ВЭЖХ после инкубации при низком pH
- Фиг. 17: профиль эксклюзионной ВЭЖХ деградировавшего образца после инкубации при низком pH
- 10 Фиг. 18: профиль капиллярного гель-электрофореза в невосстанавливающих условиях Caliper образца t0 после инкубации при низком pH
- Фиг. 19: профиль капиллярного гель-электрофореза в невосстанавливающих условиях Caliper образца T48h после инкубации при низком pH
- Фиг. 20: сравнение профилей капиллярного гель-электрофореза в невосстанавливающих условиях для разного времени инкубации при высоком pH
- 15 Фиг. 21: сравнение профилей ICE для разного времени инкубации при высоком pH
- Фиг. 22: сравнение профилей капиллярного гель-электрофореза в невосстанавливающих условиях для анализов на инактивацию вирусов при высоком pH в опытном масштабе
- Фиг. 23: Сравнение профилей ICE для анализов на инактивацию вирусов при высоком pH в опытном масштабе
- 20 Фиг. 24: кривая доза-ответ и EC50 в зависимости от длительности обработки высоким pH
- Фиг. 25: кинетика обработки высоким pH
- Фиг. 26: влияние времени выдерживания при высоком pH на Ab1 - по данным эксклюзионной ВЭЖХ
- 25 Фиг. 27: влияние времени выдерживания при высоком pH на Ab1 - по данным капиллярного гель-электрофореза в невосстанавливающих условиях
- Фиг. 28: влияние времени выдерживания при высоком pH на Ab1 - по данным капиллярного гель-электрофореза в восстанавливающих условиях
- Фиг. 29: влияние времени выдерживания при высоком pH на Ab1 - по данным ICE
- 30 Фиг. 30: кривая доза-ответ и значения EC50

Пример 1. Обработка низким pH, обычно используемая в качестве стадии инактивации вирусов в процессе очистки терапевтических белков, ухудшает стабильность антител, нестойких к низкому pH

Метод, обычно используемый для инактивации вирусов в процессе терапевтической очистки белка, состоит в инкубации раствора, содержащего белок, при низком pH. В данном примере была исследована способность обработки низким pH инактивировать вирусы и ее влияние на стабильность моноклональных гетеродимерных антител. Результаты этого исследования дают основания полагать, что условия с низким pH, при которых инактивация вирусов эффективна и стабильность антител, как правило, сохраняется, как в случае антитела BEAT®1, не подходят для антител, нестойких к низкому pH, таких как BEAT®2. Чтобы преодолеть эту проблему, были проведены дополнительные исследования для проверки влияния альтернативных способов инактивации вирусов на стабильность и активность BEAT®2. Этот пример иллюстрирует (а) исследования по подтверждению удаления вирусов (VRV) в отношении обработки элюата низким pH, полученного хроматографией на белке А (элюата РА), содержащего BEAT®1; (b) влияние эффективных низких уровней pH на стабильность BEAT®2; исследования (с) стабильности и (d) активности BEAT®2, проведенные для случаев использования альтернативных методов инактивации вирусов.

а. Исследования VRV в отношении обработки низким pH элюата РА, содержащего молекулы BEAT®1

Сначала была исследована эффективность инактивации вирусов инкубацией элюата РА, содержащего BEAT®1, при низком pH в качестве стадии процесса очистки антител BEAT®1.

Материалы, методы и оборудование

Модельным вирусом, использованным для этого исследования VRV, был вирус лейкоза мышей (MLV), представляющий собой релевантную модель эндогенного вируса. Основные характеристики этой вирусной модели приведены в таблице 1.

Таблица 1. Свойства модельного вируса MLV

Вирус	Семейство	Структура, геном	Размер (нм)	Физико-химическая устойчивость
MLV	Ретровирусы	Оболочечный, оцРНК	80-110	Низкая

Обработку низким pH применяли к элюату РА, содержащему молекулы BEAT®1. Исходные материалы, использованные во время исследований VRV, проведенных в отношении процесса очистки BEAT®1, приведены в таблице 2.

Таблица 2. Промежуточный загруженный материал

Исследование	Описание	Концентрация (г/л)
Инаktivация низким pH	Элюат РА	5,8

5 Для исследования VRV тестируемые образцы отбирали до обработки низким pH и анализировали на титр вируса. В образец вносили добавку известного количества стандартного вируса; выходной титр вируса сравнивали с титром вируса в соответствующей загрузке для расчета коэффициента сокращения. Эту операцию проводили в условиях

10 «наихудшего случая», как показано в таблице 3.

Таблица 3. Условия "наихудшего случая"

Стадия процесса сокращения вирусов	Наихудший случай	Температура
Инаktivация низким pH	16 °C, установленное значение pH + 0,2	16 ± 1 °C

Эту стадию проводили в двух параллельных анализах с 3 различными условиями pH (установленное значение, +0,2 и -0,2), как показано в таблице 4. Температурные (Т) условия для стадии инаktivации низким pH составляли 20-25 °C. Однако целевая температура во

15 время анализа составляла 16 °C, чтобы получить данные в условиях "наихудшего случая":

Таблица 4. Сводные данные по условиям pH и температуры для инаktivации вирусов низким pH

Условия pH	Температура
3,5 ± 0,1 (целевой pH 3,5)	16 ± 1 °C (целевая 16 °C)
3,7 ± 0,1 (целевой pH 3,7)	16 ± 1 °C (целевая 16 °C)
3,9 ± 0,1 (целевой pH 3,9)	16 ± 1 °C (целевая 16 °C)

Коэффициенты log сокращения рассчитывают относительно нейтрализованного

20 загруженного (L) образца; образцы отбирают после различного времени инкубации (t), через 5, 10, 30 и 60 минут, а затем нейтрализуют при pH 6,0-8,0, используя 0,25 М гистидин, pH 12,0, для получения сведений о кинетике разных вариантов обработки при низких значениях pH. Затем образцы помещают на лед непосредственно перед титрованием. Загруженный выдержанный (H) образец выдерживают при 16 ± 1 °C в течение всего

25 процесса и собирают с образцом t = 60 мин. Помимо стандартного титрования проводили

посев в большом объеме (LVP) для образца $t = 60$ мин. Сводные данные анализов, проведенных на стадии инактивации низким pH, приведены в таблице 5:

Таблица 5. Сводные данные анализов, проведенных во время исследования с добавкой вируса на инактивацию вирусов низким pH

Вирус	Титр стандарта	LVP
MLV	L, H, $t = 5$ мин, $t = 10$ мин, $t = 30$ мин, $t = 60$ мин	$t = 60$ мин

5

Результаты и выводы

Если в титре вируса не было обнаружено статистически значимого различия (примечание: разница менее чем в $1 \log_{10}$ считается несущественной) между загруженным образцом и выдержанным образцом, для расчета коэффициентов сокращения использовали загруженный образец или выдержанный образец 2, в случаях, когда проводили дополнительную фильтрацию (только для стадии VRF). Никаких существенных различий титра вируса между результатами для загруженного образца и выдержанного образца не наблюдалось независимо от стадии (за исключением VRF, когда была проведена дополнительная фильтрация), и, следовательно, результат для загрузки использовали для расчета коэффициента $\log_{10}$ сокращения.

15

Стадию инактивации вирусов в BEAT®1 низким pH оценивали по ее эффективности в отношении клиренса MLV при pH 3,5, pH 3,7 и pH 3,9 с использованием элюата PA. В таблице 6 приведены значения $\log_{10}$, полученные для различных низких уровней pH, и коэффициент $\log_{10}$ сокращения, рассчитанный для каждого анализа.

Таблица 6. Значение $\log_{10}$ сокращения вируса для MLV для инактивации низким pH (стандартный анализ)

Образец	$\log_{10}$ общего количества вируса					
	pH 3,5		pH 3,7		pH 3,9	
	Анализ 1	Анализ 2	Анализ 1	Анализ 2	Анализ 1	Анализ 2
Фактический pH	3,50	3,47	3,69	3,70	3,86	3,85
Загрузка	6,02	6,37	6,37	6,02	6,54	6,54
5 мин	3,57	1,73	5,23	5,49	5,58	5,67
10 мин	2,40	1,73	4,88	5,49	5,76	5,49
30 мин	1,28	1,73	4,62	5,23	5,49	5,58
60 мин	0,08	1,66	4,18	4,27	5,49	5,49

20

коэффициент log₁₀ сокращения	5,94	4,71	2,19	1,75	1,05	1,05
Загруженный выдержанный	6,28	6,02	6,37	6,19	6,37	6,37

Исследования инактивации вирусов показывают, что:

- 5 - Инаktivация низким pH при pH 3,5 приводит к коэффициентам сокращения 5,94 и 4,71 log₁₀ для анализа 1 и анализа 2, соответственно, что означает, что инаktivация низким pH была эффективной для MLV при pH 3,5. Однако результаты, представленные в таблице 6, демонстрируют, что разница между анализами 1 и 2 была значимой и составила более 1 log₁₀ (0,08 log₁₀ для анализа 1 и 1,66 log₁₀ для анализа 2, соответственно) и, следовательно, результаты повторных анализов не были сопоставимы. Однако инаktivация низким pH при pH 3,5 была проведена только для получения данных об инаktivации MLV при pH 3,5, и, следовательно, эти результаты не использовались для расчета общего коэффициента log сокращения.
- 10 - Инаktivация низким pH при pH 3,7 способствовала инаktivации вирусов MLV, как определено в стандартном анализе (LVP, проведенный для момента времени t = 60 мин). Из анализов инаktivации низким pH были получены коэффициенты сокращения 2,19 и 1,75 log₁₀ (анализ 1 и анализ 2, соответственно). Результаты, представленные в таблице 6, демонстрируют, что различия между анализами 1 и 2 были незначимыми и составили 4,18 log₁₀ для анализа 1 и 4,27 log₁₀ для анализа 2, и, следовательно, результаты повторных анализов сопоставимы.
- 15 - Инаktivация низким pH при pH 3,9 способствовала инаktivации вирусов MLV, как определено в стандартном анализе (LVP, проведенный для момента времени t = 60 мин). Из анализов инаktivации низким pH были получены коэффициенты сокращения 1,05 и 1,05 log₁₀ (анализ 1 и анализ 2, соответственно). Результаты, представленные в таблице 6, демонстрируют, что различия между анализами 1 и 2 были незначимыми и составили 5,49 log₁₀ для обоих анализов 1 и 2, и, следовательно, результаты повторных анализов сопоставимы.
- 20 - Инаktivация низким pH при pH 3,9 способствовала инаktivации вирусов MLV, как определено в стандартном анализе (LVP, проведенный для момента времени t = 60 мин). Из анализов инаktivации низким pH были получены коэффициенты сокращения 1,05 и 1,05 log₁₀ (анализ 1 и анализ 2, соответственно). Результаты, представленные в таблице 6, демонстрируют, что различия между анализами 1 и 2 были незначимыми и составили 5,49 log₁₀ для обоих анализов 1 и 2, и, следовательно, результаты повторных анализов сопоставимы.
- 25 - Инаktivация низким pH при pH 3,9 способствовала инаktivации вирусов MLV, как определено в стандартном анализе (LVP, проведенный для момента времени t = 60 мин). Из анализов инаktivации низким pH были получены коэффициенты сокращения 1,05 и 1,05 log₁₀ (анализ 1 и анализ 2, соответственно). Результаты, представленные в таблице 6, демонстрируют, что различия между анализами 1 и 2 были незначимыми и составили 5,49 log₁₀ для обоих анализов 1 и 2, и, следовательно, результаты повторных анализов сопоставимы.

На основании полученных результатов было показано, что инаktivация низким pH при pH 3,5 является эффективной для инаktivации вирусов MLV с минимальным коэффициентом сокращения 4,71 log₁₀. Было показано, что инаktivация низким pH при pH 3,7 способствует

инактивации вирусов MLV с минимальным коэффициентом сокращения $1,75 \log_{10}$. Было показано, что инаktivация низким pH при pH 3,9 способствует инаktivации вирусов MLV с минимальным коэффициентом сокращения $1,05 \log_{10}$.

Эти результаты показывают, что обработка низким pH, традиционно используемая для инаktivации вирусов в процессе производства моноклональных антител, может эффективно инаktivировать вирус MLV при pH 3,5.

b. Исследование стабильности BEAT®2, подвергнутого воздействию низкого pH

Затем были проведены исследования стабильности других антител для оценки влияния обработки низким pH. В частности, при низком pH инкубировали BEAT®2.

10 Материалы, методы и оборудование

Исходным материалом, использованным в этом исследовании, был элюат РА, полученный в ходе аффинной хроматографии с использованием смолы KanCarA от Kaneka.

Культивирование клеток обычно прекращали, когда жизнеспособность была ниже 80%, и клеточный детрит удаляли путем «тупиковой» глубинной фильтрации с последующей
15 фильтрацией через 0,2 мкм фильтр. Супернатанты клеточных культур были получены из клеток CHO.

Для этого исследования использовали разные исходные материалы, полученные из нерепрезентативных собранных масс (два клон, клон 1 и клон 2, полученные из мелкомасштабного биореактора или культур в биореакторе wave bag) и из
20 репрезентативной собранной массы (отобранный клон 1, одноразовый биореактор на 250 л).

Стадии 0,2 мкм фильтрации в ходе процесса обычно проводили с использованием фильтров TPP с верхней загрузкой объемом 250 мл, фильтров Steriflip (Millipore) или Sartopore 2 (Sartorius). Стадии 0,2 мкм фильтрации проводили для всех буферов и всех
25 промежуточных продуктов, если только эти промежуточные продукты незамедлительно не подвергались дальнейшей обработке. Буферы хранили при комнатной температуре, а промежуточные продукты процесса обычно хранили при $+5 \pm 3$ °C. Для исследований инаktivации вирусов использовали только магнитные мешалки и измеритель pH.

Элюат РА, использованный в качестве исходного материала, получали в результате
30 экспериментальных хроматографических анализов в малом масштабе на белке А на

системах ÄKTA Explorer и ÄKTA Purifier (GE Healthcare) с использованием колонок Vantage L диаметром 1,1 см (Millipore).

Титры сбора определяли с помощью ВЭЖХ на белке А. Элюаты РА анализировали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ для оценки процентного содержания агрегатов и фрагментов. Однако эксклюзионной ВЭЖХ было недостаточно для оценки оставшегося процентного содержания примесей гомодимеров. Поэтому образцы элюата РА также анализировали с помощью капиллярного гель-электрофореза в невосстанавливающих условиях в установленном порядке. Для некоторых анализов с использованием элюата РА в качестве исходного материала рассчитывали выход стадии инактивации вирусов, измеряя концентрации до и после обработки с помощью оборудования Nanodrop (спектрофотометр Nanodrop 2000, Thermo Scientific) при 280 нм. Молярный коэффициент экстинкции BEAT®2 составляет 1,52. Для анализа в некоторых из экспериментов использовали ВЭЖХ-ХГВ и iCE3, чтобы выяснить, оказывала ли обработка какое-либо влияние на гидрофобные компоненты и на варианты, отличающиеся зарядами.

15 *Результаты и выводы*

Небольшие объемы элюатов РА (приблизительно 3 мл) из культуры клеток клона 1 и клона 2 подкисляли до pH 3,6, 3,7, 3,8 и 3,9 с использованием 3,7% HCl. BEAT®2 инкубировали при низком pH в течение 60-120 минут при комнатной температуре (комн. темп.) при перемешивании. Для остановки реакции pH повышали до pH 6,0 или 5,5 с использованием 250 мМ гистидина, pH 12,0. Этот эксперимент повторяли несколько раз для подтверждения результатов. Чтобы увидеть, оказывает ли соль защитное действие на молекулу, то же самое исследование проводили, сначала внося в элюат РА добавку NaCl перед инкубацией при низком pH. Были протестированы различные концентрации NaCl: 150 мМ, 500 мМ и 1 М, в сочетании с подкислением при pH 3,7 в течение 90 минут. Затем продукт анализировали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, ВЭЖХ-ХГВ и капиллярного гель-электрофореза (в невосстанавливающих условиях). В таблице 7 приведены сводные данные по условиям, протестированным для инкубации при низком pH.

Таблица 7. Условия инкубации при низком pH

Целевой pH	3,6 - 3,7 - 3,8 - 3,9
Время инкубации (мин)	0 - 60 - 90 - 120
Добавка NaCl (мМ)	0 - 150 - 500 - 1000

Элюат РА без NaCl

Показаны только результаты, полученные с клоном 1, поскольку эксперименты, проведенные с клоном 2, дали аналогичные результаты. Было проведено четыре параллельных эксперимента при низком pH для элюата РА, результаты были схожими и сопоставимыми для всех из них. Процентное содержание мономеров по данным эксклюзионной ВЭЖХ при разных значениях pH для разных моментов времени показано на фиг. 1. Как показано на графике, наиболее кислые условия при pH 3,6 приводят к значительному снижению процентного содержания мономеров, который падает с 95% до 80% через 60 минут инкубации. Обработка при pH 3,7 также оказала отрицательное влияние на стабильность BEAT®2. Только менее кислые условия при pH 3,8 и 3,9 не оказывали отрицательного влияния на антитело. На фиг. 2 показано увеличение содержания других компонентов во время деградации мономера, агрегатов и «плечевых» компонентов. Плечевой компонент появлялся перед главным пиком мономера. На фиг. 3 показан пример профиля эксклюзионной ВЭЖХ, содержащего значительное количество (13%) «плечевого» компонента. Результаты капиллярного гель-электрофореза (в невосстанавливающих условиях) для двух разных обработок низким pH приведены ниже в таблице 8, где была проведена нейтрализация до pH 6,0 или pH 5,5.

Таблица 8. Профиль эксклюзионной ВЭЖХ деградировавшего образца после воздействия низкого pH:

	Анализ 2, нейтрализация до pH 6,0					Анализ 4, нейтрализация до pH 5,5				
	pH3,6 t0	pH3,6 t120	pH3,7 t120	pH3,8 t120	pH3,9 t120	pH3,6 t0	pH3,6 t120	pH3,7 t120	pH3,8 t120	pH3,9 t120
% LC	0,7	0,6	0,6	0,6	0,7	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5
% неизвестных	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
% HC	0,8	0,8	0,9	1	0,7	0,7	0,7	0,6	0,6	0,7
% неизвестных	0,2	0,3	0,2	0	0	0,7	0,7	0,6	0,5	0,6
% фрагментов 75 кДа	0	0	0	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1
% фрагментов 80 кДа	0,4	0,5	0,3	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3

% фрагментов 100 кДа	6,7	6,9	6,6	6,4	6,4	5,6	5,7	5,7	5,5	5,6
% BEAT'	3,5	3,7	3,1	3,3	3,3	3,8	3,6	3,6	3,6	3,6
% BEAT	83	80,8	82,7	82,2	83,7	84	84,5	84,4	84,6	84,7
Общий % BEAT	86,5	84,5	85,8	85,5	87	87,8	88,1	88,0	88,2	88,3
% BEAT''	4,2	5,6	4,4	4,8	4,2	3,2	3,2	3,8	3,8	3,3
% IgG	0,4	0,7	1	1,3	0,5	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5
% агрегатов	0,2	0	0,1	0	0	0,3	0,3	0	0	0

Данные капиллярного гель-электрофореза показывают, что pH и продолжительность инкубации не влияют на количество BEAT®2, так как процентное содержание фрагментов и других компонентов было одинаковым для всех условий. Нейтрализация при pH 5,5 была
5 лучше по сравнению с нейтрализацией при pH 6,0, поскольку процентное содержание BEAT®2 было на 1% меньше. Дegradацию контролировали с помощью ВЭЖХ-ХГВ, как показано на фиг. 4 и фиг. 5, процент главного пика снижался при более кислом pH с течением времени с увеличением содержания агрегатов. Эти результаты показывают, что BEAT®2 стабильно только в условиях с pH 3,9; тем не менее, предыдущие эксперименты на
10 BEAT®1 показали, что этот pH недостаточно кислый, чтобы оказывать эффективное инактивирующее вирусы действие.

Элюат РА с NaCl

Соль использовали для увеличения стабильности белков, один из экспериментов проводили с различными концентрациями NaCl перед обработкой при низком pH, чтобы
15 увидеть, была ли улучшена стабильность BEAT®2 при обработке низким pH. Были протестированы различные концентрации, от 0,15 М до 1 М NaCl, перед подкислением при pH 3,7 в течение 90 минут, результаты эксклюзионной ВЭЖХ и капиллярного гель-электрофореза в невосстанавливающих условиях показаны на фиг. 6 и фиг. 7, соответственно. Результаты показывают, что BEAT®2 нестабильно при низких значениях pH
20 даже при внесении добавки NaCl. По данным ВЭЖХ-ХГВ (не приведены) наблюдалась деградация, главный пик снижался с 82% до 60% через 90 минут инкубации для всех условий с добавлением соли. На фиг. 7 по данным капиллярного гель-электрофореза различий не наблюдалось.

Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что обработка низким pH не является подходящей стадией инаktivации вирусов для процесса очистки антитела BEAT®2.

с. Тестирование стабильности BEAT®2 при альтернативных методах обработки для инаktivации вирусов

Учитывая, что обработка низким pH ухудшает стабильность BEAT®2, были протестированы другие методы инаktivации вирусов и исследовано их влияние на стабильность антитела. Протестированные виды обработки включают: пастеризационную обработку элюата РА, обработку элюата РА каприловой кислотой (CA), обработку элюата РА аргинином, обработку элюата РА растворителем и детергентом (S/D), S/D-обработку осветленного сбора и обработку элюата РА высоким pH.

Материалы, методы и оборудование

Материалы, методы и оборудование, использованные для приведенных ниже исследований стабильности BEAT®2, представляют собой такие же, как описаны в разделе «б. Исследование стабильности BEAT®2, подвергнутого воздействию низкого pH». Кроме того, для пастеризации использовали термостат.

Результаты и выводы

Пастеризационная обработка элюата РА

Пастеризация, обычно используемая в коммерческих процессах для инаktivации вирусов, была протестирована как альтернатива обработке низким pH. Элюат РА из клона 1 и из клона 2 использовали для тестирования влияния пастеризации на стабильность антитела BEAT®2. Элюаты РА нейтрализовали до pH 6,0, используя 250 мМ гистидина, pH 12,0. Были протестированы различные условия инкубации, включая инкубацию при комнатной температуре (комн. темп.) и при 60 °C в течение 30 и 60 минут с использованием водяной бани. После эксперимента продукт анализировали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, ВЭЖХ-ХГВ и капиллярного гель-электрофореза (в невозстанавливающих условиях).

При всех условиях наблюдалось образование осадка. В таблице 9 приведены сводные данные для результатов после обработки.

Таблица 9. Эксклюзионная ВЭЖХ, ВЭЖХ-ХГВ и капиллярный гель-электрофорез после пастеризации

Клон 1

		Комн. темп.	Т 60 °С, 30 мин	Т 60 °С, 60 мин
Эксклюзионная ВЭЖХ	% агрегатов	4,53	39,52	54,04
	% мономера	94,55	43,39	13,16
	% фрагментов	0,9	17,09	32,8
ВЭЖХ-ХГВ	% до главного	2,2	16,1	12,9
	% главного пика	88,1	13,3	4,9
	% после пика	9,7	70,6	82,2
Капиллярный гель- электрофорез в невосстанавливающих условиях	% неизвестных	0,0	0,0	0,5
	% LC	0,7	0,6	0,7
	% неизвестных	0,1	0,1	0,1
	% HC	0,6	0,5	0,7
	% неизвестных	0,1	0,1	0,2
	% фрагментов 75 кДа	0,1	0,1	0,1
	% фрагментов 80 кДа	0,4	0,3	0,3
	% фрагментов 100 кДа	6,6	6,3	10,3
	% BEAT'	3,2	3,1	3,5
	% BEAT	81,0	86,0	77,5
	% BEAT''	6,2	2,5	2,8
	% IgG	1,0	0,5	0,4
	% агрегатов	0,0	0,0	2,9

Результаты эксклюзионной ВЭЖХ и ВЭЖХ-ХГВ показывают, что BEAT®2 нестабильно при высокой температуре с существенным снижением процента главного пика для обоих анализов уже через 30 минут (с 94,6 до 43,4% по данным эксклюзионной ВЭЖХ и с 88,1 до 13,3 по данным ВЭЖХ-ХГВ).

На основании этих результатов пастеризация не была выбрана для дальнейших исследований и разработок.

Обработка элюата РА каприловой кислотой

Каприловая кислота является осаждающим агентом, который может применяться для инактивации вирусов для осаждения вирусных белков. Элюат РА из клона 1 использовали для тестирования влияния каприловой кислоты на стабильность антитела BEAT®2. Использовали несколько концентраций каприловой кислоты с получением конечной концентрации 0,2%, 0,5%, 0,7% и 1%. Элюат РА после элюирования (приблизительно pH 4,3) или нейтрализованный при pH 5,5 (с помощью 250 mM гистидина, pH 12,0) использовали в качестве исходного материала. Время инкубации составляло 30, 60 и 90 минут. Для

остановки реакции использовали диатомовую землю (DE) в соотношении 0,5 г DE на 2 мл продукта элюата РА. Для очистки продукта через DE использовали 0,2 мкм фильтр steriflip. После обработки продукт анализировали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, ВЭЖХ-ХГВ и капиллярного гель-электрофореза (в невозстанавливающих условиях). В таблице 10

5 приведены сводные данные по условиям, протестированным для обработки каприловой кислотой.

Таблица 10: условия обработки каприловой кислотой

% каприловой кислоты	0,2 - 0,5 - 0,7 - 1,0
Время инкубации (мин)	0 - 30 - 60 - 90
pH исходного материала	4,3 - 5,5

Результаты при pH 5,5 не показаны из-за образования осадка, наблюдаемого в случае

10 применения более 0,2% каприловой кислоты. Результаты для pH 4,3 приведены на фиг. 8, фиг. 9 и в таблице 11. Результаты эксклюзионной ВЭЖХ демонстрируют деградацию с течением времени при сравнении $t = 0$ с $t = 30$, $t = 60$ и $t = 90$ минут, со снижением содержания мономера (приблизительно 6%) и повышением содержания агрегатов.

Таблица 11. Обработка каприловой кислотой: результаты капиллярного гель-электрофореза

15

	Элюат РА, анализ 1	Элюат РА, pH 4,3 + 0,2% СА		Элюат РА, pH 4,3 + 0,5% СА		Элюат РА, pH 4,3 + 0,7% СА		Элюат РА, pH 4,3 + 1% СА	
Время инкубации (мин)		0	90	0	90	0	90	0	90
% LC	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	0,6	0,6
% неизвестных после LC	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
% HC	0,8	0	0,7	0	0,9	0	1,0	0,1	1,0
% неизвестных после HC	0,7	0	0,8	0	0,8	0	0,7	0,2	0,9
% фрагментов 75 кДа	0,1	0	0	0	0,1	0	0,1	0	0,1
% фрагментов 80 кДа	0,2	0,4	0,4	0,3	0,2	0,4	0,3	0,3	0,2
% фрагментов 100 кДа	6,3	6,0	6,7	6,0	6,5	6,3	6,6	6,2	6,4
% BEAT'	4,2	3,4	4,4	3,4	4,7	3,4	4,2	3,6	4,7
% BEAT	82,2	84,0	80,3	84,4	80,7	84,6	81,4	84,6	81,7
% BEAT''	4,0	4,4	4,1	4,2	4,4	4,0	4,6	3,9	3,9
% IgG	0,8	1,2	1,9	1,1	1,1	0,5	0,6	0,5	0,6

По данным капиллярного гель-электрофореза и ВЭЖХ-ХГВ не наблюдалось значительной деградации. Согласно результатам эксклюзионной ВЭЖХ BEAT®2 нестабильно через 30 минут даже при более низкой концентрации каприловой кислоты (0,2%). Тем не менее,

учитывая токсичность каприловой кислоты и необходимость фильтрации через DE для удаления реагента, эта альтернатива была отброшена и не выбрана в качестве варианта вирусной инактивации.

Обработка элюата РА аргинином

- 5 Известно, что применение аргинина эффективно инактивирует оболочечный модельный вирус. В этом исследовании элюат РА из клона 1 использовали в качестве исходного материала. рН элюата РА доводили до рН 4,0, рН 4,75, рН 4,79 и рН 5,5. Добавляли различные количества аргинина (в 30 мМ ацетате) для достижения конечных концентраций 0,38 М, 0,4 М и 0,8 М аргинина. Эксперимент проводили с различным временем инкубации:
- 10 без инкубации, в течение 60 или 120 минут (см. таблицу 12). Для остановки реакции использовали PD10 для замены буфера на PBS.

Таблица 12. Условия обработки аргинином

Целевой рН	4,0 - 4,75 - 4,79 - 5,5
Время инкубации (мин)	0 - 60 - 120
Аргинин (М)	0 - 0,4 - 0,8

В таблице 13 представлены результаты этих экспериментов.

- 15 Таблица 13. Результаты обработки аргинином

		Элюа т РА, рН 4,3	Элюат РА, рН 4,0				Элюа т РА, рН 4,75	Элюа т РА, рН 4,79	Элюат РА, рН 5,5		
Концентрация аргинина (М)		н/д	0	0,4	0,8		0,8	0,38	0	0,8	
Время инкубации (мин)			0	60	0	120	60	120	0	0	120
Эксклюзион -ная ВЭЖХ	% агрегатов	4,1	5,9	18, 6	7,5	13, 3	4,6	3,2	5,0	4,3	4,5
	% мономера	94,2	92, 7	79, 3	90, 9	82, 5	94,2	95,3	93, 7	94, 4	94, 2
	% фрагментов	1,7	1,3	2,1	1,6	4,2	1,2	1,6	1,3	1,3	1,3
ВЭЖХ-ХГВ	% до главного	1,7	1,9	1,6	1,7	1,5	1,9	1,9	1,9	1,9	2,0
	% главного пика	90,9	89, 5	73, 7	85, 2	66, 5	90,6	91,2	91, 2	91, 1	91, 3
	% после главного	7,4	8,7	24, 7	13, 0	32, 1	7,5	6,9	7,0	7,1	6,7
Капилляр-	% LC	0,6	н/д				0,6	0,6		0,9	0,6
	% неизвестных после LC	0,1					0,5	0,1		0,6	0,1
	% HC	0,8					0,7	0,6		0,2	0,7

ный гель-электрофорез в невосстанавливающих условиях	% неизвестных после НС	0,7		0,6	0,5	н/д	0,0	0,5
	% фрагментов 75 кДа	0,1		0,0	0,0		0,2	0,1
	% фрагментов 80 кДа	0,2		0,7	0,4		0,6	0,5
	% фрагментов 100 кДа	6,3		9,6	7,7		16,1	6,5
	% BEAT'	4,2		5,1	4,5		1,5	4,4
	% BEAT	82,2		77,2	80,4		75,1	81,4
	% BEAT''	4,0		3,8	4,4		3,2	4,3
	% IgG	0,8		0,3	0,8		0,8	0,9
	% агрегатов	0		0,9	0		0	0

Наблюдали, что элюат РА при pH 4,0 был нестабилен при инкубации с аргинином, действительно, по данным эксклюзионной ВЭЖХ потери мономера составляли 13% уже через 60 минут инкубации с применением 0,4 М аргинина (с 92,7 до 79,3%) и 8% при инкубации в течение 120 минут с 0,8 М аргинина (с 90,9 до 82,5%). Для условий pH, равного 4,75 или более, дегградации не наблюдали даже при использовании 0,8 М аргинина при pH 5,5 в течение до 120 минут. Обработку аргинином с использованием pH, равного 4,75 или более, рассматривали в качестве потенциальной альтернативы обработке низким pH.

Обработка смесью растворитель/детергент элюата РА

10 Растворитель и детергенты могут быть использованы для инактивации вирусов из-за их способности растворять липиды оболочки оболочечных вирусов.

Элюат РА из клона 1 использовали в качестве исходного материала. Сначала (исследование 1) тестировали обработку TnBP в различных концентрациях: 0,1%, 0,3%, 0,5% и 1%. Затем (исследование 2) тестировали обработку комбинацией TnBP с Tween 80 и другими детергентами, такими как Triton X-100 и Tween 20 (смесь S/D готовили и перемешивали за 15 минут до инкубации с продуктом). Замена буфера с использованием PD10 была неэффективной для удаления S/D, и чтобы попытаться остановить реакцию, использовали одно разведение от 4 г/л до 0,3 г/л в PBS. В таблице 14 приведены сводные данные для 14 различных условий, протестированных при применении S/D на элюате РА.

20 Таблица 14. Условия S/D-обработки элюата РА

Анализ	Условия растворителя/детергента
1	0,1% TnBP
2	0,3% TnBP
3	0,5% TnBP
4	1% TnBP

5	0,3% TnBP + 1% Tween 80
6	0,3% TnBP + 0,2% Triton X-100
7	0,3% TnBP + 0,5% Triton X-100
8	0,3% TnBP + 1% Triton X-100
9	0,3% TnBP + 0,2% Tween 80
10	0,3% TnBP + 0,5% Tween 80
11	0,3% TnBP + 1% Tween 80
12	0,3% TnBP + 0,2% Tween 20
13	0,3% TnBP + 0,5% Tween 20
14	0,3% TnBP + 1% Tween 20

Результаты первой части исследования (исследование 1) представлены в таблице 15. В этом эксперименте в каждый момент времени проводили одну замену буфера на PD-10.

Таблица 15. Результаты S/D-обработки элюата РА, исследование 1

		Элюат РА	0,1% TnBP				0,3% TnBP				0,5% TnBP				1% TnBP ⁽¹⁾			0,3% TnBP + 1% Tween 80			
Время инкубации (мин)		н/д	0	60	90	120	0	60	90	120	0	60	90	120	0	60	90	0	60	90	120
Эксклюзионная хроматография	% агрегатов	4,1	4,5	5,6	5,6	5,7	5,5	5,5	5,5	5,6	5,3	5,2	5,3	5,3	5,3	5,3	4	12,6	13,2	13,4	13,5
	% мономера	94,2	88,5	93,2	93,2	93,1	93,3	93,3	93,3	93,2	93,4	93,6	93,6	93,6	93,4	93,5	93,6	86,0	85,5	85,3	85,3
	% фрагментов	1,7	7,0	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,1	1,3	1,2	1,1	1,1	1,2	1,2	1,1	1,4	1,4	1,3	1,2
ВЭЖХ-ХГВ	% до главного пика	1,7	4,6	2,1	2,1	2,0	2,1	2,2	2,0	1,9	2,5	2,2	2,0	1,9	2,3	2,2	1,9	2,3	2,1	1,9	1,9
	% главного пика	90,9	90,1	91,6	91,5	91,5	91,5	91,6	91,4	91,5	91,4	91,5	91,7	91,7	91,3	91,6	91,6	92,6	92,1	92,0	92,2
	% после главного	7,4	5,3	6,3	6,5	6,6	6,4	6,3	6,6	5,0	6,4	6,3	6,4	6,4	6,4	6,3	6,4	5,1	5,8	6,0	5,9
Капиллярный гель-электрофорез, исследование 1	% LC	0,6	0,6	н/д		0,5	0,6	н/д		0,5	0,5	н/д		0,5	0,5	н/д		0,5	н/д		0,6
	% неизвестных	0,1	2,1			0,1	0,1			0,1	0,3			0,1	0,2			0,7			0,1
	% HC	0,8	0,2			0,3	0,3			0,3	0,3			0,4	0,2			0			0,4
	% неизвестных	0,7	0			0	0			0	0			0	0			0			0
	% 75 кДа	0,1	0			0,1	0,1			0	0			0	0			0,0			0
	% 80 кДа	0,2	0,4			0,6	0,5			0,4	0,9			0,4	0,5			1,1			0,5

	% 100 кДа	6,3	13,8		5,5	5,8		5,8	6,6		5,9	6,0		8,7		6,1
	% BEAT'	4,2	3,0		3,8	4,1		3,6	4,9		3,4	4,1		8,7		3,3
	% BEAT	82,2	77,8		84,2	84,0		85,1	82,6		84,7	83,1		74,4		82,6
	% BEAT''	4,0	2,0		3,5	3,9		3,6	3,4		3,3	4,2		4,8		5,1
	% IgG	0,8	0,2		0,5	0,7		0,5	0,6		0,4	1,1		1,1		1,3
	% агрегатов	0	0		0,9	0		0	0		0,9	0		0		0

⁽¹⁾ Условия инкубации с 1% TnBP в течение 120 минут привели к полному осаждению и не анализировались

Эти результаты показывают, что BEAT®2 стабильно для всех условий TnBP, за исключением 1% TnBP при инкубации в течение 120 минут, при котором наблюдалось образование осадка и аналитические результаты не были получены. Деградацию наблюдали при условии 0,3% TnBP + 1% Tween 80 с момента времени t0 по данным эксклюзионной ВЭЖХ, но не было подтверждено капиллярным гель-электрофорезом и ВЭЖХ-ХГВ. После анализа исходных данных эксклюзионной ВЭЖХ процентные содержания агрегатов повышаются из-за Tween 80, оставшегося в образце после обработки и искажающего результаты этого метода, поскольку время удерживания Tween 80 действительно очень близко к времени удерживания агрегатов. Следовательно, деградации образца при условии 0,3% TnBP + 1% Tween 80 не наблюдалось. Этот первый эксперимент не был оптимальным, поскольку реакция не была остановлена заменой буфера на PD-10, и Tween 80 все еще присутствовал в образце во время анализа методом эксклюзионной ВЭЖХ. Затем были протестированы два других детергента, Tween 20 и Triton X-100, к каждому образцу в каждый момент времени применяли разведение до 0,3 г/л с использованием буфера PBS, чтобы остановить реакцию (исследование 2). В таблице 16 приведены результаты анализа методом эксклюзионной ВЭЖХ и ВЭЖХ-ХГВ.

Таблица 16. Результаты S/D-обработки элюата PA, исследование 2

А		Стандартное BEAT®2-04	Элюат PA, разведенный до 0,3 г/л	0,3% TnBP + 0,2% Triton X- 100		0,3% TnBP + 0,5% Triton X-100		0,3% TnBP + 1% Triton X- 100	
				0	90	0	90	0	90
Эксклю- зионна я ВЭЖХ	Время инкубации (мин)		Н/Д	0	90	0	90	0	90
	% агрегатов	2,2	2,6	4,6	4,5	8,3	5,7	15,4	7,6
	% мономера	97,5	96,5	94,2	94,3	91,1	93,6	76,1	83,7
	% фрагментов	0,2	0,9	1,2	1,0	0,6	0,7	8,4	8,6

ВЭЖХ-ХГВ	% до главного	1,3	1,7	1,3	1,4	1,1	1,1	0,8	0,8
	% главного пика	95,6	76,8	67,0	67,1	58,6	60,0	44,7	45,1
	% плеча после главного	0	15,8	14,1	14,1	9,8	8,8	7,3	7,2
	% главного + плечо	95,6	92,6	81,1	81,2	68,4	68,8	52,0	52,3
	% после главного	3	5,7	17,6	17,5	30,4	30,0	47,1	46,9

В		0,3% TnBP + 0,2% Tween 80⁽¹⁾		0,3% TnBP + 0,5% Tween 80		0,3% TnBP + 1% Tween 80		0,3% TnBP + 0,2% Tween 20		0,3% TnBP + 0,5% Tween 20		0,3% TnBP + 1% Tween 20	
Эксклюзионная ВЭЖХ	Время инкубации (мин)	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90	0	90
	% агрегатов	33,7	30,3	4,6	4,5	4,7	5,4	4,6	4,8	4,9	4,7	5,2	5,0
	% мономера	59,3	62,5	94,3	94,3	94,0	93,5	94,2	94,1	94,0	94,2	93,6	93,9
	% фрагментов	7,0	7,3	1,1	1,1	1,3	1,1	1,2	1,1	1,1	1,1	1,3	1,2
ВЭЖХ-ХГВ	% до главного	1,6	1,6	1,7	1,6	1,6	1,6	1,7	1,6	1,7	1,7	1,6	1,6
	% главного пика	75,6	75,7	75,6	76,9	76,8	75,2	76,0	76,3	75,6	77,0	74,1	77,3
	% плеча после главного	15,7	15,9	15,7	15,0	14,2	16,6	15,1	15,0	15,4	14,4	17,4	14,8
	% главного + плечо	91,3	91,6	91,3	91,9	91,0	91,8	91,1	91,3	91,0	91,4	91,5	92,1
	% после главного	6,9	6,7	7,1	6,5	7,5	6,5	7,0	7,0	7,2	6,9	6,8	6,3

Таблица 16 демонстрирует, что: для образцов, обработанных 0,3% TnBP в комбинации с Triton X-100, деградация проявлялась при более высокой концентрации Triton X-100 (1%), по данным эксклюзионной ВЭЖХ наблюдалось приблизительно 15% агрегатов и 8% фрагментов. В образцах, обработанных 0,3% TnBP в комбинации с Tween 80 и Tween 20, за исключением условий с 0,2% Tween 80, по данным эксклюзионной ВЭЖХ и ВЭЖХ-ХГВ не было обнаружено никаких признаков деградации по сравнению с разведенным элюатом РА. Никакой разницы между $t = 0$ и $t = 90$ минут для образцов при всех условиях не наблюдали.

В целом эти результаты демонстрируют, что BEAT®2 стабильно при большинстве условий S/D-обработки в течение вплоть до 120 минут, и поэтому S/D-обработка является пригодным вариантом инактивации вирусов в растворе, содержащем BEAT®2.

15 S/D-обработка осветленного сбора (загрузка РА)

На основании результатов, полученных в исследованиях S/D-обработки элюата РА, было принято решение о тестировании S/D-обработки осветленного сбора для обеспечения лучшего удаления растворителя и детергента и, следовательно, для повышения безопасности.

Первые две стадии очистки представляли собой инактивацию вирусов и хроматографию на белке А вместо хроматографии на белке А с последующей инактивацией вирусов.

Таблица 17. Условия S/D-обработки осветленного сбора

	Условия растворителя/детергента
S/D осветленного сбора, анализ 1	0,3% TnBP + 1% Tween 80
S/D осветленного сбора, анализ 2	0,3% TnBP + 1% Tween 20
S/D осветленного сбора, анализ 3	0,3% TnBP + 1% Triton X-100

- 5 Для этой стадии были протестированы различные условия с использованием TnBP в комбинации с Tween 20, Tween 80 и Triton X-100. Смесь растворителя и детергента добавляли к загрузке РА, инкубировали в течение приблизительно 20 минут и загружали в колонку со смолой Kaneka KanCarA. Все результаты представлены в таблице 18.

Таблица 18. Результаты S/D-обработки осветленного сбора

		Анализ 1	Анали з 2	Анали з 3	Анали з 4
Приготовление смеси S/D	Условия	Без обрабо тки	0,3% TnBP + 1% Tween 80	0,3% TnBP + 1% Tween 20	0,3% TnBP + 1% Triton X-100
Добавление смеси S/D	Продолжительность загрузки РА (ч)		3ч10	3ч20	3ч12
	Время инкубации (мин)		19	12	22
	Продолжительность контакта (инкубация + загрузка РА)		3ч29	3ч32	3ч34
Коэффициент загрузки г/л		35	35	35	35
Параметры элюата РА	pH	4,3	4,3	4,3	4,3
	Проводимость (мСм/см)	1,25	1,28	1,26	1,32
	Объем (объем колонки)	3,5	4,5	5,0	4,9
	Титр Nanodrop (г/л)	7,0	5,2	4,7	4,7
	Выход РА	70%	67%	66%	66%
Эксклюзионная ВЭЖХ элюата РА	% агрегатов	4,0	4,7	3,3	4,3
	% мономера	89,3	89,2	90,4	89,8
	% размытия пика	6,1	5,4	5,5	5,1
	% фрагментов	0,6	0,8	0,9	0,8
ВЭЖХ-ХГВ элюата РА	% до главного	4,4	4,5	4,4	4,6

	% главного пика	89,5	89,1	89,1	88,8
	% после главного	6,1	6,4	6,5	6,6
Капиллярный гель-электрофорез в невосстанавливающих условиях элюата РА	% LC	0,6	0,6	0,6	0,6
	% неизвестных	0,1	0,1	0,2	0,1
	% HC	0,6	0,6	0,7	0,6
	% неизвестных	0	0	0	0
	% 75 кДа	0	0	0	0
	% 80 кДа	0,6	0,6	0,7	0,6
	% неизвестных	0	0	0	0
	% 100 кДа	8,1	8,1	8,4	8,1
	% BEAT'	3,1	3,1	3,5	3,6
	% BEAT	83,8	83,8	82,5	82,2
	% неизвестных после BEAT	2,5	2,5	2,8	3,5
	% IgG	0,6	0,6	0,6	0,7
	% агрегатов	0,1	0,1	0	0,1
iCE3 элюата РА	% главного	39,5	40,2	43,6	41,6
	% кислых	60,5	59,8	56,4	58,4
Tween 80	Содержание Tween 80, % (масс./об.)	н/д	0,0002 7	н/д	н/д

Схожие характеристики были получены при всех условиях S/D, результаты обработки элюата РА (анализы 2, 3 и 4) сравнимы с анализом 1 (без инкубации с S/D) по выходу и всем аналитическим данным, но они имеют немного более высокое значение элюированных 5 объемов колонки (от 3,5 до приблизительно 5) и более низкие значения концентрации (от 7,0 г/л до приблизительно 5 г/л). Удаление Tween 80 было эффективным, только некоторые следы Tween 80 присутствовали после очистки РА.

Было продемонстрировано, что S/D-обработка, проведенная до стадии РА, может применяться для инактивации вирусов, так как реакцию останавливали очисткой на РА, и 10 на чистоту она не влияла. Кроме того, последующая катионообменная хроматография дополнительно удаляет оставшиеся следы S/D, присутствующие после хроматографии на белке А.

Поскольку результаты, полученные с различными детергентами, были схожими, Tween 80 был выбран для последующих анализов, поскольку уже использовался для других стадий 15 процесса. Таким образом, условие с комбинацией 0,3% TnBP + 1% Tween 80 было выбрано

для S/D-обработки осветленного сбра, и обработку рассматривали для инактивации вирусов в растворе, содержащем BEAT®2.

Обработка элюата РА высоким pH

Небольшой объем (20 мл) элюата РА из клона 1 использовали для тестирования стабильности BEAT®2 при инкубации при высоком pH. Сначала тестировали несколько буферов для достижения целевого значения pH 11,0, 0,5 М ацетат, pH 12,0, 0,5 М цитрат, pH 12,0, 1 М Трис, pH 12,0, 0,25 М гистидин, pH 12,0, 0,5 М L-аргинин, pH 12,0, 0,25 М фосфат, pH 12,0, 0,1 М NaOH и, наконец, 0,5 М NaOH, как показано в таблице 19.

10 Таблица 19. Буферы и соотношение для обработки высоким pH

	Соотношение (мл/л)	Достигнутый pH
Ацетат, 0,5 М, pH 12,0	820	5,8
Цитрат, 0,5 М, pH 12,0	1300	6,8
Трис, 1 М, pH, 12,0	1500	10,4
Гистидин, 0,25 М, pH 12,0	1200	10,2
L-аргинин, 0,5 М, pH 12,0	1400	10,8
Фосфат, 0,25 М, pH 12,0	230	11,0
NaOH, 0,1 М	440	11,0
NaOH, 0,5 М	85	11,0

Целевой pH 11,0 не был достигнут со всеми буферами, например, с 0,5 М ацетатом и цитратом - pH 12,0 и 1 М Трис - pH 12,0. Объемное соотношение для корректировки pH было одним из критериев выбора буфера, целью было получение минимального соотношения, чтобы избежать больших объемов на следующей стадии.

После этого первого скрининга для проведения дальнейших исследований были отобраны 0,25 М фосфат, pH 12,0, 0,1 М NaOH и 0,5 М NaOH.

Инкубацию при pH 11,2 проводили в течение 30, 45 и 60 минут с выбранными буферами, см. таблицу 20. Для всех экспериментов после обработки продукт анализировали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, ВЭЖХ-ХГВ, капиллярного гель-электрофореза (в невозстанавливающих условиях) и iCE3. Результаты представлены в Таблице 21.

Таблица 20. Условия обработки высоким pH

Целевой pH	11,2			
Время инкубации (мин)	0	30	45	60

Таблица 21. Результаты обработки высоким pH

		Элюат РА	Фосфат, 0,25 М, рН 12,0				NaOH, 0,1 М				NaOH, 0,5 М				
	Соотношение (мл/л) после N+		270				460				92				
	Достигнутый рН		11,2				11,2				11,2				
	Проводимость (мСм/см)	1,21	11,10				3,95				3,10				
	Выход, %		96,8				92,5				95,1				
	Время инкубации (мин)		0	30	45	60	0	30	45	60	0	30	45	60	
Экскл юзион ная ВЭЖХ	% агрегатов	4,1	8,0	8,4	8,8	9,2	6,5	6,0	6,4	6,0	4,8	4,9	5,2	5,1	
	% мономера	94,2	90,9	90,4	90,1	89,7	92,4	93,0	92,6	93,0	94,1	94,1	93,7	93,9	
	% фрагментов	1,7	1,2	1,2	1,2	1,2	1,1	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,1	1,0	
ВЭЖХ- ХГВ	ВЭЖХ-ХГВ: % до главного	1,7	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,7	1,6	1,6	1,7	1,6	
	ВЭЖХ-ХГВ: % главного пика	90,9	91,8	91,4	91,0	91,1	92,1	92,7	92,3	92,5	93,0	92,9	92,9	92,9	
	ВЭЖХ-ХГВ: % после главного	7,4	6,7	7,0	7,5	7,3	6,3	5,7	6,1	5,9	5,3	5,5	5,5	5,5	
Капил лярны й гель- электр офоре з в невос станав ливаю щих услов иях	% LC, капиллярный гель- электрофорез	0,6	0,6	н/д			0,5	0,6	н/д		0,6	0,6	н/д		0,5
	% неизвестных после LC	0,1	0,1				0,1	0,1			0,1	0,1			
	% HC	0,8	0,4				0,5	0,7			0,7	0,6			
	% неизвестных после HC	0,7	0,0				0,2	0,5			0,4	0,3			0,4
	% фрагментов 75 кДа	0,1	0,0				0,1	0,1			0,1	0,1			0,1
	% фрагментов 80 кДа	0,2	0,3				0,3	0,3			0,2	0,3			0,3
	% фрагментов 100 кДа	6,3	5,5				5,6	6,0			5,4	5,8			5,5
	% BEAT'	4,2	3,2				3,6	3,9			3,2	3,4			3,4

	% BEAT	82,2	85,5		85,0	83,4		84,0	84,7		84,8
	% BEAT"	4,0	3,9		3,3	3,8		3,9	3,7		3,6
	% IgG	0,8	0,5		0,5	0,7		1,1	0,5		0,5
	% агрегатов	0,0	0,0		0,2	0,1		0,2	0,0		0,0
iCE3	% кислых	n/a	59,5		60,7	59,4		61,6	60,1		61,4
	% главного		40,5		39,3	40,6		38,4	39,9		38,6

Во время всех экспериментов наблюдалось образование осадка приблизительно при pH 6,0, которое исчезало при pH 11,0. Выходы в анализах составили приблизительно 95%, предполагалось, что это являлось результатом осаждения примесей, даже если анализ на

5 примеси не проводился, такое же явление наблюдалось и для других проектов при нейтрализации после инкубации при низком pH без потери продукта. BEAT®2 было стабильным при pH 11,2 для инкубации в течение вплоть до 60 минут. Действительно, с 0,5 М буфером NaOH процентное содержание мономера по данным эксклюзионной ВЭЖХ было стабильным через 60 минут при pH 11,2, эквивалентные результаты были получены

10 посредством капиллярного гель-электрофореза (были протестированы только последние моменты времени), iCE3 и ВЭЖХ-ХГВ, деградации по сравнению с исходным материалом не наблюдали. При повторении этого эксперимента результаты были подтверждены. На основании этих результатов обработку посредством pH с использованием 0,5 М буфера NaOH рассматривали как потенциальную альтернативу инактивации вирусов низким pH.

15 d. Тестирование активности BEAT®2

Материал, методы и оборудование

Для исследования влияния обработки растворителем/детергентом, аргинином и высоким pH проводили анализы аффинности связывания на различных образцах, прошедших

20 обработку смесью растворитель/детергент (0,3% TnBP + 1% Tween 80); после инкубации с 0,8 М аргинина при pH 4,0 и при pH 5,5, и после обработки высоким pH (0,5 М NaOH, pH 11,2). Были протестированы два антигена-мишени, CD38 и CD3.

Результаты и выводы

Для всех образцов никаких существенных различий не наблюдалось. Действительно, значения Kd сопоставимы. Таким образом, всех эти обработки не оказывали никакого

25 влияния на активность антител. Результаты этого анализа приведены в таблице 22.

Таблица 22. Результаты анализов аффинности связывания

A. hsCD38

Образец	Обработка	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	KD (нМ)	Относительная KD (% от RS)	EC50	% отклонения EC50
RS (контрольный образец)	-	1,034e6	4,568e-4	442	100	1,914	0
1	S/D	1,106e6	3,755e-4	341	77,1	1,620	-15,4
2	0,8 M Arg, pH 4,0	1,027e6	5,205e-4	507	114,7	1,981	+3,5
3	0,8 M Arg, pH 5,5	1,047e6	4,594e-4	439	99,3	1,927	+0,7
4	Высокий pH	1,037e6	4,826e-4	467	105,6	1,947	+1,7

B. hsCD3e 1-26Fc

Образец	Обработка	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	KD (нМ)	Относительная KD (% от RS)	EC50	% отклонения EC50
RS	-	2,2e5	1,31e-2	59,4	100	8,24	0
1	S/D	2,12e5	8,22e-3	38,7	65,1	5,41	-34,4
2	0,8 M Arg, pH 4,0	1,93e5	4,75e-3	24,8	41,7	4,00	-51,5
3	0,8 M Arg, pH 5,5	2,22e5	7,38e-3	33,3	56,0	4,34	-47,3
4	Высокий pH	2,12e5	7,07e-3	33,4	56,2	4,50	-45,4

Пример 2: обработка аргинином элюата РА, содержащего антитела, нестойкие к низкому pH, приводит к эффективной инактивации вирусов только при уровнях pH, ухудшающих стабильность антитела

На основании исследований стабильности и активности, приведенных в примере 1, наиболее перспективные методы инактивации вирусов были дополнительно протестированы на их способность инактивировать вирусы. Эффективность инактивации вирусов оценивали, выполняя исследование методом добавок в Bioreliance. Тестовые образцы отбирали до и после каждой обработки и анализировали на титр вируса. Сначала было проведено исследование VRV в отношении обработки аргинином.

Материалы, методы и оборудование

Для этого исследования был использован только один вирус, MLV, который является типичным модельным вирусом, используемым для биологических продуктов, полученных из линий клеток CHO, таких как моноклональное антитело. Всего было выполнено 7 анализов. Элюат РА из экспериментальных анализов использовали в качестве исходного материала. Различные исходные буферы аргинина при разных значениях pH (pH 4,0, pH 4,75, pH 4,79 и pH 5,5) использовали для достижения целевого значения pH и концентрации. Образцы нейтрализовали с использованием 250 мМ гистидинового буфера с pH 12,0 при pH приблизительно 6,0 для остановки реакции. В таблице 23 приведены сводные данные по условиям, протестированным в ходе исследования VRV.

Таблица 23. Условия исследования VRV в отношении обработки аргинином

Анализ	Концентрация аргинина (мМ)	pH	Моменты времени (мин)
1	0	4,0	0, 120
2	0,40	4,0	0, 60
3	0,80	4,0	0, 120
4	0,80	4,75	0, 60
5	0,38	4,79	0, 120
6	0	5,5	0, 60, 120
7	0,80	5,5	0, 120

Значения log сокращения рассчитывали относительно нейтрализованного загруженного образца, для образца с t = 60 мин проводили крупномасштабный посев на 5 планшетах, а также стандартное титрование. Нейтрализованный загруженный выдержанный образец выдерживали при температуре от 16,0 °C до 20,0 °C в течение 60 минут (анализы 2, 4 и 6) или 120 минут (анализы 1, 3, 5 и 7).

Результаты и выводы

Результаты исследования VRV в отношении обработки аргинином приведены в таблице 24.

Таблица 24. Результаты исследования VRV в отношении обработки аргинином

Аргинин				
Анализ	Концентрация аргинина (мМ)	pH	Моменты времени	Коэффициент $\log_{10}$ сокращения
1	0	4	L, H, 0-1, 120 мин	1,14 +/- 0,46

2	0,4	4	L, H, 0-1, 60 мин	4,16 +/- 0,32
3	0,8	4	L, H, 0-1, 120 мин	4,10 +/- 0,35
4	0,8	4,75	L, H, 0-1, 60 мин	2,82 +/- 0,4
5	0,38	4,79	L, H, 0-1, 120 мин	сокращение отсутствует
6	0	5,5	L, H, 0-1, 60, 120 мин	0,35 +/- 0,4
7	0,8	5,5	L, H, 0-1, 120 мин	сокращение отсутствует

Поскольку только обработка при pH 4,0 обеспечивает эффективный клиренс вируса, и было показано, что при этом условии pH BEAT®2 претерпевает деградацию (пример 1), обработка аргинином была исключена из возможных вариантов обработки растворов, содержащих

5 BEAT®2, для инактивации вирусов.

Пример 3. S/D-обработка элюата РА, содержащего антитела, нестойкие к низкому pH, приводит к эффективной инактивации вирусов

Затем была протестирована способность обработки смесью растворитель/детергент элюата РА, содержащего BEAT®2, в отношении инактивации вирусов.

10 *Материалы, методы и оборудование*

Эффективность инактивации вирусов путем S/D-обработки элюата РА оценивали, выполняя исследование методом добавок в Bioreliance. Для этого исследования был использован только один вирус, MLV, который является типичным модельным вирусом, используемым для биологических продуктов, полученных из линий клеток CHO, таких как

15 моноклональное антитело. Целевые концентрации составляли 0,3% TnBP и 1% Tween 80. Исследование проводили для элюата РА (приблизительно pH 4,2) и нейтрализованного элюата РА (pH 6,0). Рабочие условия для температуры составляли 15 °C +/- 2 °C, что является наихудшим случаем химической инактивации (более низкая температура приводит к более медленной инактивации). Условия проведения процесса обычно представляют собой от 18

20 до 25 °C в зависимости от производственного предприятия. Кинетику исследовали в моменты времени 0, 10, 30 и 60 мин. Сводные данные в отношении условий, протестированных для BEAT®2, приведены в таблице 25.

Таблица 25. Условия для исследования VRV в отношении S/D-обработки элюата РА

Условия	Тип образца	% добавки TnBP	% добавки Tween 80
1	Элюат на белке А	0,3	1

2	Нейтрализованный элюат на белке А (рН 6,0)		
---	---	--	--

Результаты исследований VRV в таблице 26 демонстрируют, что S/D-обработка элюата РА приводит к эффективной инаktivации вирусов, когда элюат РА не нейтрализован, и к умеренной инаktivации, когда элюат РА нейтрализуют через 60 минут инкубации, что

5 подтверждает, что S/D-обработка элюата РА является эффективным способом инаktivации вирусов в процессе очистки BEAT®2.

Таблица 26. Результаты исследования VRV в отношении S/D-обработки элюата РА

S/D-обработка, 0,3% TnBP + 1% Tween 80							
Исходный материал	CL (95%)	Нейтрализованный загруженный Титр/мл	t0 Титр/мл	t10 мин Титр/мл	t30 мин Титр/мл	t60 мин Титр/мл	Коэффициент $\log_{10}$ сокращения
Элюат РА, рН 4,2	Нижнее	6,52	3,66				$\geq 5,54 \pm 0,38$
	Среднее	6,89	3,83	3,13	3,13	1,35	
	Верхнее	7,27	4,01				
Элюат РА, нейтрализованный до рН 6,0	Нижнее	6,39	4,57	3,87	3,44	3,24	$3,42 \pm 0,34$
	Среднее	6,72	4,88	4,18	3,74	3,30	
	Верхнее	7,05	5,19	4,49	4,05	3,36	

Пример 4. S/D-обработка очищенного сбора, содержащего антитела, нестойкие к

10 **низкому рН, приводит к эффективной инаktivации вирусов**

Были дополнительно проведены исследования VRV для обработки осветленного сбора, содержащего BEAT®2, растворителем и детергентами.

Исследование VRV 1

Материалы, методы и оборудование

15 Для этого исследования был использован только один вирус, MLV, который является типичным модельным вирусом, используемым для биологических продуктов, полученных из линий клеток CHO, таких как моноклональное антитело. Всего было проведено 3 анализа

- с использованием смеси TnBP и Tween 80. Испытывали одно и то же процентное содержание TnBP (0,3%) и разные процентные содержания Tween 80 (0,25, 0,5 и 1,0%). После внесения добавки S/D продукт перемешивали до конца инкубации. После взятия образца в каждый момент времени реакцию в нем сразу же гасили, разводя в соотношении 1/25 и нейтрализуя до pH 6,00-8,00. В таблице 27 приведены условия, протестированные в BioReliance в ходе исследования VRV в отношении S/D-обработки:

Таблица 27. Условия для исследования VRV в отношении S/D-обработки осветленного сбора

Анализ	% TnBP	% Tween 80	Моменты времени (мин)
1	0,3	0,25	0, 10, 30 и 60
2	0,3	0,5	0, 10, 30 и 60
3	0,3	1,0	0, 10, 30 и 60

- Значения log сокращения рассчитывали относительно погашенного загруженного образца, для образца с $t = 60$ мин проводили крупномасштабный посев на 5 планшетах, а также стандартное титрование. Погашенный загруженный выдержанный образец выдерживали при температуре от 16,0 до 20,0 °C в течение 60 минут.

Результаты и выводы

- В таблице 28 представлены сводные данные для результатов исследования VRV.

Таблица 28. Результаты исследования VRV в отношении S/D-обработки очищенного сбора

Обработка S/D			
Анализ	% Tween 80	% TnBP	коэффициент $\log_{10}$ сокращения
1	0,25	0,3	$\geq 4,93 \pm 0,25$
2	0,5	0,3	$\geq 4,50 \pm 0,00$
3	1	0,3	$\geq 4,88 \pm 0,44$

- В результате S/D-обработка осветленного сбора оказалась эффективной в отношении инактивации вируса MLV при всех протестированных условиях, даже при использовании более низкой концентрации Tween 80 (0,25%).

Исследование VRV 2

Дополнительно оценивали влияние обработки смесью растворитель/детергент осветленного сбора на инактивацию вирусов MLV и PRV в условиях наихудшего случая.

Материалы, методы и оборудование

В загруженные образцы вносили добавки стандартных вирусов и анализировали в Bioreliance.

Эту операцию проводили в условиях «наихудшего случая», как показано в таблице 29. Для каждой пары анализов сообщается самый низкий коэффициент клиренса.

5 Таблица 29. Условия «наихудшего случая» в исследованиях подтверждения VRV

Стадия процесса сокращения вирусов	Наихудший случай	Температура [°C]
Инактивация вирусов S/D	Tween 80: 0,75% / 1,25% TnBP: 0,2% / 0,4%	15 °C ± 2 °C

Результаты и выводы

Стадия химической инактивации вирусов, разработанная для BEAT®2, была оценена на ее эффективность в отношении инактивации MLV и PRV с использованием смеси S/D, представляющей собой 0,2% TnBP + 0,75% Tween 80 и 0,4% TnBP + 1,25% Tween 80 с использованием сбора в анализе 1 и анализе 2.

Для обоих экспериментов с вирусами был применен один и тот же протокол, сравнение процесса в уменьшенном масштабе с процессом в клиническом масштабе приведено в таблице 30.

15 Таблица 30. Модель химической инактивации в уменьшенном масштабе

Параметры	Уменьшение масштаба	Промышленный масштаб	
	Исследование VRV	Анализ 1	Анализ 2
Инактивация вирусов	Растворитель/детергент (TnBP + Tween 80)		
% TnBP	0,2% и 0,4%	0,3%	
% Tween 80	0,75% и 1,25%	1,0%	
Продолжительность инактивации	1 час	6,5 часов	
Концентрация белка	0,4 г/л	0,4 г/л	
Температура	15,0 ± 2,0 °C	22,5 ± 2,5 °C	

В таблице 31 для MLV приведен коэффициент log сокращения, рассчитанный для каждого анализа.

20 Таблица 31. Значение $\log_{10}$ сокращения вируса для MLV для химической инактивации вирусов (стандартный анализ)

Образец	log₁₀ общего количества вируса			
	0,75% Tween 80 / 0,2% TnBP		1,25% Tween 80 / 0,4% TnBP	
	Анализ 1	Анализ 2	Анализ 3	Анализ 4
Загрузка	6,19	6,46	6,72	6,37
5 мин	4,88	5,41	3,13	3,21
10 мин	3,75	4,36	3,13	3,13
30 мин	3,31	3,83	3,13	3,13
60 мин	2,16	2,67	1,35	1,35
Коэффициент log₁₀ сокращения	4,03	3,79	≥5,37	≥5,02
Загруженный выдержанный	6,37	6,46	6,46	6,63

Эти результаты демонстрируют, что инаktivация вирусов эффективна в ходе S/D-обработки, общий log₁₀ вирусов снижается с течением времени, составляя менее 1,31 log₁₀, 2,44 log₁₀, 2,88 log₁₀ и 4,03 log₁₀ соответственно через 5, 10, 30 и 60 мин инкубации.

- 5 Кроме того, в ходе S/D-обработки отбирали аликвоты, замораживали и анализировали на процентное содержание Tween 80 и TnBP, результаты проиллюстрированы ниже в таблице 32.

Таблица 32. Результаты по Tween 80 и TnBP для химической инаktivации вирусов в отношении MLV

Образец	0,75% Tween 80 / 0,2% TnBP		1,25% Tween 80 / 0,4% TnBP	
	Анализ 1	Анализ 2	Анализ 3	Анализ 4
Tween 80, масс. % -t0	0,71	0,52	0,91	0,89
Tween 80, масс. % -t60 мин	0,70	0,54	0,92	0,88
TnBP, масс. % - t0	0,21	0,15	0,47	0,45
TnBP, масс. % - t60 мин	0,21	0,16	0,48	0,42

Эти результаты свидетельствуют о том, что:

- 15 Химическая инаktivация при низкой концентрации (0,75% Tween 80 / 0,2% TnBP) показала коэффициенты сокращения, равные 4,03 и 3,79 log₁₀ для анализа 1 и анализа 2, соответственно, что означает, что низкая концентрация S/D была умеренно эффективной для инаktivации MLV. Однако, результаты, представленные в таблице 31, демонстрируют, что разница между анализом 1 и 2 (0,71% и 0,52%) была значимой в отношении процентного содержания Tween 80. В анализе 2 было измерено только 0,52% Tween 80 и 0,15% TnBP, но данный анализ представляет собой наихудший случай, так как эти

концентрации являются низкими. Можно сделать вывод, что целевые содержания 0,75% Tween 80 и 0,2% TnBP не были достигнуты. Сокращение было ниже для анализа, проведенного с более низкими концентрациями Tween 80 и TnBP, 0,52% Tween 80 и 0,15% TnBP (анализ 2), что считается наихудшим случаем.

- 5 Химическая инаktivация при высокой концентрации (1,25% Tween 80 / 0,4% TnBP) показала коэффициенты сокращения $\geq 5,37$ и $\geq 5,02 \log_{10}$ для анализа 3 и анализа 4, соответственно, что означает, что, как и ожидалось, более высокая концентрация S/D была более эффективной для инаktivации MLV. Результаты, представленные в таблице 31, демонстрируют, что различия между анализом 3 и 4 в отношении процентного содержания
- 10 Tween 80 (0,91 и 0,89) были незначимыми. Однако, опять же, целевое содержание 1,25% Tween 80 не было достигнуто для обоих анализов, в действительности в анализах 3 и 4 было измерено лишь 0,91% и 0,89%. Что касается данных по TnBP, анализы проводили с 0,48% вместо 0,40% (анализ 3, t60 мин). Опять же, результаты по инаktivации вирусов очень логичны: анализ 3 с более высоким процентным содержанием Tween 80 и TnBP позволяет
- 15 достичь наилучшей инаktivации вирусов. Таким образом, даже в наихудшем случае инаktivации вируса MLV (анализ 2, 0,52% Tween 80 и 0,15% TnBP) было достигнуто умеренно эффективное сокращение, составившее 3,79 $\log_{10}$.

- В таблице 33 для PRV показаны измеренные процентные содержания Tween 80 и TnBP и значения $\log_{10}$, достигнутые для образцов с различной химической инаktivацией вирусов, и коэффициент $\log$ сокращения, рассчитанный для каждого анализа:
- 20

Таблица 33. Значение $\log_{10}$ сокращения вируса PRV для химической инаktivации вирусов (стандартный анализ)

Образец	$\log_{10}$ общего количества вируса			
	0,75% Tween 80 / 0,2% TnBP		1,25% Tween 80 / 0,4% TnBP	
	Анализ 1	Анализ 2	Анализ 3	Анализ 4
Загрузка	6,11	5,84	5,84	6,37
5 мин	2,43	3,38	2,43	3,21
10 мин	2,43	2,43	2,43	3,13
30 мин	2,43	2,43	2,43	3,13
60 мин	0,62	0,65	0,65	1,35
Коэффициент $\log_{10}$ сокращения	$\geq 5,46$	$\geq 5,19$	$\geq 5,19$	$\geq 5,46$
Загруженный выдержанный	6,37	6,46	5,84	5,93

Инактивация вирусов эффективна во время инкубации, общий $\log_{10}$ вируса снижается с течением времени, составляя менее 3,68 $\log_{10}$ сразу через 5 мин обработки и 5,49 $\log_{10}$ через 60 мин инкубации. В ходе S/D-обработки отбирали аликвоты, замораживали и анализировали на процентное содержание Tween 80 и TnBP, результаты проиллюстрированы ниже в таблице 34.

Таблица 34. Результаты по Tween 80 и TnBP для химической инактивации вирусов в отношении PRV

Образец	0,75% Tween 80 / 0,2% TnBP		1,25% Tween 80 / 0,4% TnBP	
	Анализ 1	Анализ 2	Анализ 3 ⁽⁶⁾	Анализ 4 ⁽⁶⁾
Tween 80, масс. % -t0	0,74	0,57	0,80	1,17
Tween 80, масс. % -t60 мин	0,70	0,57	1,01	0,88
TnBP, масс. % - t0	0,15	<0,15	0,27	0,37
TnBP, масс. % - t60 мин	<0,15	<0,15	0,33	0,29

10

Результаты для PRV демонстрируют, что:

Химическая инактивация при низкой концентрации (0,75% Tween 80 / 0,2% TnBP) показала коэффициенты сокращения, равные $\geq 5,46$ и $\geq 5,19 \log_{10}$ для анализа 1 и анализа 2, соответственно, что означает, что низкая концентрация S/D была эффективной для инактивации PRV. Однако, результаты, представленные в таблице 33, демонстрируют, что различия между анализом 1 и 2 были значимыми в отношении результатов по процентному содержанию Tween 80 (0,74% и 0,57%). Целевое содержание 0,75% Tween 80 не было достигнуто для анализа 2, действительно, было измерено лишь 0,57%, что является наихудшим случаем из-за низкой концентрации детергента. Для TnBP оба анализа демонстрируют сопоставимые значения ниже целевого, 0,15% вместо 0,20%. Как и ожидалось, при меньшем процентном содержании Tween 80 анализ 2 показал более низкое сокращение вируса по сравнению с анализом 1 с $\geq 5,19 \log_{10}$.

20

Химическая инактивация при высокой концентрации (1,25% Tween 80 / 0,4% TnBP) показала коэффициенты сокращения $\geq 5,19$ и $\geq 5,46 \log_{10}$ для анализа 3 и анализа 4, соответственно, что означает, что, как и ожидалось, более высокая концентрация S/D была более эффективной для инактивации PRV. Результаты, представленные в таблице 33, демонстрируют, что для значений Tween 80 и TnBP имелись различия между моментом

25

времени t_0 и моментом времени t_{60} минут для обоих анализов. Действительно, для анализа 3 содержание Tween 80 в момент времени t_0 составляет 0,80%, а в момент времени t_{60} мин - 1,01%, а для TnBP оно составляет в момент времени t_0 - 0,27%, а в момент времени t_{60} мин - 0,33%. Опять же, целевое содержание 1,25% Tween 80 должно было быть достигнуто для обоих анализов, однако это является наихудшим случаем инактивации вирусов из-за низкой концентрации S/D. Что касается данных по TnBP, анализы проводили до 0,48% вместо 0,40% (анализ 3, t_{60} мин). Опять же, результаты по сокращению вирусов очень логичны, анализ 3 с более высоким процентным содержанием Tween 80 и TnBP обеспечил лучший клиренс вирусов.

- 10 Более высокая инаktivация вирусов, достигнутая с вирусом PRV по сравнению с MLV с использованием идентичной химической инаktivации, была ожидаемой, так как PRV имеет более низкую физико-химическую устойчивость.

Таким образом, в наихудшем случае (анализ 2) обеспечивается эффективная инаktivация вируса PRV с 5,19 $\log_{10}$.

- 15 В совокупности результаты исследования 1 и исследования 2 демонстрируют, что инаktivация вирусов достигается с помощью S/D-обработки загрузки РА.

Пример 5. Обработка при высоком pH элюата РА, содержащего антитела, нестойкие к низкому pH, приводит к умеренно эффективной инаktivации вирусов при pH, при котором сохраняется стабильность антитела

- 20 *Материалы, методы и оборудование*

Были проведены исследования VRV обработки при высоком pH элюата РА, содержащего BEAT®2. Только один вирус, MLV, был использован для этого исследования. Эксперимент проводили за один анализ при pH 10,8 (представляющего собой наихудший случай с более низким pH, исходя из целевого значения pH процесса, равного 11,0). Для этого исследования использовали элюат РА из экспериментальных анализов, pH увеличивали с использованием выбранного буфера, 0,5 М NaOH. После сбора все образцы нейтрализовали до pH 6-8 с помощью 3,7% HCl.

- 25 Значения $\log$ сокращения рассчитывали по отношению к нейтрализованному загруженному образцу, для образца с $t = 60$ мин проводили крупномасштабный посев на 5 планшетах, а также стандартное титрование. Нейтрализованный загруженный
- 30

выдержанный образец выдерживали при температуре от 16,0 до 20,0 °C в течение 60 минут.

Результаты и выводы

В таблице 35 представлены результаты VRV, полученные в ходе данного исследования.

5 Таблица 35. Результаты VRV для обработки высоким pH

CL (95%)	Нейтрализованный загруженный Титр/мл	0-1 мин Титр/мл	10 мин Титр/мл	30 мин Титр/мл	60 мин Титр/мл	Коэффициент сжатия $\log_{10}$
нижнее	5,16	2,28	2,43	1,07	2,14	3,18 ± 0,26
среднее	5,41	2,51	2,85	1,98	2,23	
верхнее	5,66	2,75	3,27	2,89	2,31	

Инкубация элюата РА, содержащего BEAT®2, при высоком pH является умеренно эффективной для инактивации вируса MLV через 1 мин инкубации и вплоть до 60 мин инкубации, когда коэффициент сжатия составляет 3,18 $\log_{10}$. Таким образом, обработку высоким pH можно рассматривать как приемлемую альтернативу обработке низким pH в процессе очистки BEAT®2.

Пример 6. Обработка высоким pH элюата РА является эффективной стадией инактивации в процессе очистки антитела BEAT®2, нестойкого к низкому pH

Для дальнейшего изучения возможности применения обработки высоким pH в качестве стадии инактивации вирусов в процессе получения BEAT®2 были проведены дополнительные исследования стабильности и активности. Влияние времени выдерживания оценивали в разные моменты времени, включая наихудшие случаи, например, в течение 24 часов инкубации.

Материалы, методы и оборудование

20 Исходный материал, использованный в этом исследовании, представлял собой репрезентативный элюат РА.

Все химические вещества имели фармацевтическую степень чистоты (согласно Фармакопее США или Европы). Стадии 0,2 мкм фильтрации в ходе процесса обычно проводили для всех буферов и всех промежуточных продуктов. Кроме того, использовали магнитную мешалку, измеритель pH и кондуктометр.

Протестированные моменты времени составляли 1 час, 2 часа и 4 часа при комнатной температуре, и после этой точки продукт выдерживали при 5 ± 3 °C в течение вплоть до 24 часов инкубации. Приблизительно 100 мл элюата РА подщелачивали при перемешивании с использованием магнитной мешалки до pH 11,2 в бутылке Nalgene использованием 0,5 М NaOH. Этот pH был выбран в качестве наихудшего случая в отношении качества продукта, чтобы подтвердить целевое значение pH процесса, равное 11,0. Продукт инкубировали при высоком pH за исключением момента времени t_0 , в который сразу проводили нейтрализацию, как описано ниже. В каждый момент времени приблизительно 10 мл продукта с высоким pH переносили в пробирку от TPP на 50 мл и нейтрализовали, снижая pH до pH 6,0, используя 3,7% HCl (стадия нейтрализации), чтобы остановить реакцию инактивации вирусов перед заморозкой.

Качество продукта анализировали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, ВЭЖХ-ХГВ и капиллярного гель-электрофореза для всех моментов времени. Элюат РА, не нейтрализованный и без какой-либо обработки в целях инактивации вирусов, также анализировали и использовали в качестве контроля.

Таблица 36. Условия тестирования при высоком pH

Время инкубации (ч)	Моменты времени				
	-	1	2	4	24
+ 5 ± 3 °C	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Х
Комнатная температура	Х	Х	Х	Х	Н/Д

Некоторые образцы из описанных выше были отобраны для тестирования методом поверхностного плазмонного резонанса (таблица 37). Цель состояла в том, чтобы проверить, влияет ли обработка высоким pH на аффинности связывания молекулы BEAT®2 с ее мишенями CD3ε 1-26-Fc и CD38 и, таким образом, косвенно, на ее активность. Кроме того, был проведен функциональный клеточный анализ, чтобы непосредственно проверить влияние высокого pH на активность молекулы BEAT®2.

Таблица 37. Образцы, протестированные на аффинность связывания и посредством функциональных клеточных анализов

Время инкубации (ч)	Моменты времени		
	-	1	2
+ 5 ± 3 °C	Х	Н/Д	Н/Д
Комнатная температура		Х	Х

Результаты и выводы

Влияние времени выдерживания при высоком pH на BEAT®2 было проанализировано с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, чтобы установить чистоту образца после инкубации в
5 разные моменты времени, как показано в таблице 38 и на фиг. 10.

Таблица 38. Результаты эксклюзионной ВЭЖХ

	Промежуточный продукт	Элюат РА	Нейтрализованный, инаktivация вирусов				
	Момент времени	Элюат РА	t0	t1 ч	t2 ч	t4 ч	t24 ч
Эксклюзионная ВЭЖХ	% агрегатов	4,7	4,4	4,7	4,8	5,2	5,1
	% мономеров	92,9	93,2	92,8	92,5	91,7	91,4
	% мономеров + размытия пика	93,9	94,2	93,8	93,6	93,0	92,8

Как показано в таблице 38, процентное содержание мономеров было сопоставимо для различных условий, и при обработке высоким pH в течение вплоть до 24 часов не
10 наблюдалось значительной агрегации, фактически, наблюдаемые изменения находятся в пределах вариабельности метода.

Эти результаты свидетельствуют о том, что BEAT®2 стабильно в течение вплоть до 24 часов, что с запасом покрывает время проведения процесса, обычно составляющее $\geq 60 - \leq 90$ минут.

15 Кроме того, был проведен капиллярный гель-электрофорез в невосстанавливающих условиях, что дополнительно подтвердило стабильность BEAT®2, как показано в таблице 39 и на фиг. 11.

Таблица 39. Результаты капиллярного гель-электрофореза в невосстанавливающих условиях

	Промежуточный продукт	Элюат РА	Нейтрализованный, инаktivация вирусов				
	Момент времени	Элюат РА	t0	t1 ч	t2 ч	t4 ч	t24 ч
Капиллярный	% LC	0,9	0,8	0,7	0,7	0,7	0,8
	% фрагментов 80 кДа	1,0	0,8	0,8	1,0	0,8	1,3

	% фрагментов 100 кДа	7,4	6,5	6,7	6,9	6,5	7,2
	Общий % BEAT	88,2	89,8	89,8	88,3	89,0	86,6
	% неизвестных	0,8	0,7	0,5	0,9	1,3	1,0

% BEAT сопоставим с контрольным образцом (элюат РА), и значительного образования фрагментов не наблюдалось в течение вплоть до 4 часов. BEAT®2 стабильно в течение вплоть до 2 часов, что с запасом покрывает время проведения процесса, обычно составляющее $\geq 60 - \leq 90$ минут.

Кроме того, результаты капиллярного гель-электрофореза в невосстанавливающих условиях демонстрируют, что BEAT®2 стабильно в течение вплоть до 24 часов, что с запасом покрывает время проведения процесса, обычно составляющее $\geq 60 - \leq 90$ минут (см. таблицу 40 и фиг. 12).

10 Таблица 40. Результаты капиллярного гель-электрофореза в восстанавливающих условиях

Капиллярный гель-электрофорез	Промежуточный продукт	Элюат РА	Нейтрализованный, инактивация вирусов				
	Момент времени	Элюат РА	t0	t1 ч	t2 ч	t4 ч	t24 ч
	% LC	17,5	17,7	17,8	17,6	17,9	17,7
	% HC, агликозилированной	1,0	0,8	1,1	1,0	1,2	1,6
	% HC	35,3	35,5	35,3	35,4	35,8	35,4
	% ScFv-Fc	39,1	39,4	39,5	39,6	38,8	38,4
	% неизвестных	2,3	2,1	1,9	1,9	1,9	2,6

Чтобы оценить вариации вариантов, отличающихся зарядами, был проведен iCE (фиг. 13 и таблица 41).

15 Таблица 41. Результаты iCE

Промежуточный продукт	Элюат РА	Нейтрализованный, инактивация вирусов
------------------------------	-----------------	--

	Момент времени	Элюат РА	t0	t1 ч	t2 ч	t4 ч	t24 ч
ICE	% кислых	67,0	67,0	68,0	70,0	72,6	76,2
	% главного	33,0	33,0	32,0	30,0	27,4	23,8

Со временем наблюдается увеличение содержания кислых компонентов. Тем не менее, вариабельность метода составляет $\leq 10\%$, поэтому различия, наблюдаемые в течение вплоть до 2 часов, находятся в пределах вариабельности метода и могут рассматриваться как приемлемые и статистически незначимые. Наблюдаемое увеличение % кислых компонентов является ожидаемой тенденцией, но 2-часовой запас покрывает время проведения процесса (и более), которое обычно составляет $\geq 60 - \leq 90$ минут.

Результаты функционального клеточного анализа приведены на фиг. 14 и в таблице 42. Полумаксимальную эффективную концентрацию (EC50) определяли на основании кривых доза-ответ. Полученные значения EC50 позволили определить относительную активность каждого образца, принимая в качестве контроля образец с временем инкубации при высоком pH, равным нулю.

Таблица 42. Относительные активности в зависимости от длительности обработки высоким pH.

	Относительная активность (%)
Элюат РА BEAT®2 (контроль)	100
BEAT®2 t0	114
BEAT®2 t1 ч	71,7
BEAT®2 t2 ч	88,5

В относительных значениях активности какой-либо тенденции с течением времени не наблюдается. Обработка высоким pH в течение t1 ч и t2 ч обеспечивает очень схожую активность с элюатом РА, использованным в качестве контроля. Принимая во внимание вариабельность метода, составляющую $\leq 25\%$, обработка высоким pH не оказывает значительного влияния на функциональные свойства BEAT®2 даже после 2 часов инкубации, покрывая время проведения процесса, которое обычно составляет $\geq 60 - \leq 90$ минут.

Аффинности связывания антитела BEAT®2 с его мишенями CD3 и CD38, оцененные в разные моменты времени, перечислены в таблице 43.

Таблица 43. Относительные аффинности BEAT®2 к его мишеням

Образец	Измеренная аффинность	Средняя KD (нМ)	СКО (нМ)	%CV	Относительная KD (% от RS)
Элюат РА	человеческий CD3ε 1-26 N-концевой	42,2	2,14	5,1	100
t0	человеческий CD3ε 1-26 N-концевой	28,5	0,85	3,0	68
t1	человеческий CD3ε 1-26 N-концевой	39,1	0,76	2,0	93
t2	человеческий CD3ε 1-26 N-концевой	41,1	0,52	1,3	97
Элюат РА	человеческий CD38	0,483	0,006	1,2	100
t0	человеческий CD38	0,504	0,013	2,7	104
t1	человеческий CD38	0,547	0,008	1,4	113
t2	человеческий CD38	0,485	0,019	3,9	100

- 5 Между элюатом на белке А и всеми образцами, инкубированными при высоком pH, не наблюдается никаких различий в активности связывания с человеческим CD38. Кроме того, между элюатом на белке А и всеми образцами, инкубированными при высоком pH, не наблюдается никаких различий в функциональной значимости в активности связывания с человеческим CD3. Небольшая разница в аффинности к человеческому CD3ε наблюдалась между образцом t0 и всеми другими образцами, но аффинность, тем не менее, находилась в том же диапазоне (низкий наномолярный, на 32% выше, чем у элюата РА) и, вероятно, это связано с небольшой разницей в введенных концентрациях.

Таким образом, инкубация при высоком pH не влияет на стабильность и активность BEAT®2 и может использоваться в процессе производства BEAT®2.

- 15 **Пример 7. Обработка высоким pH элюата РА является эффективной стадией инактивации процесса очистки антитела BEAT®3, нестойкого к низкому pH**

- Для оценки наиболее подходящего способа инактивации вирусов для третьего антитела BEAT, BEAT®3, были проведены исследования стабильности, активности и VRV с целью изучения влияния обработки элюата РА низким и высоким pH, а также обработки осветленного сбора растворителем/детергентом.

Исходными материалами, использованными в этом исследовании, были осветленный сбор и элюат РА после проведения аффинной хроматографии с использованием смолы KanCarA от Kaneka.

5 Культивирование клеток обычно прекращали, когда жизнеспособность была ниже 80%, и клеточный детрит удаляли путем «тупиковой» глубинной фильтрации с последующей
 10 фильтрацией через 0,2 мкм фильтр. Супернатанты клеточных культур были получены из клеток СНО. Начальное экспериментальное тестирование проводили с использованием нерепрезентативного материала, полученного из родительского клона окончательно
 15 выбранного клона. Последующие экспериментальные анализы проводили с использованием репрезентативного материала, полученного из окончательно выбранного
 20 клона.

Стадии 0,2 мкм фильтрации в ходе процесса обычно проводили для всех буферов и всех промежуточных продуктов. Для исследований инактивации вирусов использовали только магнитную мешалку, измеритель pH и кондуктометр.

15 Элюат РА - инаktivация вирусов низким pH

Приблизительно 25 мл элюата РА подкисляли до pH 3,7 в пробирке от TPP объемом 50 мл с использованием 3,7% HCl. Продукт инкубировали при низком pH при перемешивании с помощью магнитной мешалки, за исключением момента времени t_0 , в который сразу проводили нейтрализацию, как описано ниже. Протестированные моменты времени
 20 составляли 1 час, 2 часа, 4 часа и 6 часов при комнатной температуре, и после этой точки продукт выдерживали при 5 ± 3 °C в течение вплоть до 24 и 48 часов инкубации. В каждый момент времени приблизительно 3 мл продукта с низким pH переносили в пробирку от TPP на 15 мл и нейтрализовали, повышая pH до pH 5,0, используя 250 мМ гистидин, pH 12,0 (стадия нейтрализации), чтобы остановить реакцию инаktivации вирусов перед
 25 заморозкой.

Высокопроизводительную эксклюзионную ВЭЖХ использовали для определения характеристик всех моментов времени. Капиллярный гель-электрофорез (невосстанавливающие условия) Caliper и анализ iCE проводили только для t_0 и T48 часов. Результаты анализировали путем сравнения различных моментов времени с моментом
 30 времени t_0 (образец инкубировали при низком pH и сразу нейтрализовали при pH 5,0).

Элюат РА, не нейтрализованный и без какой-либо обработки в целях инактивации вирусов, также анализировали и использовали в качестве контроля для сравнения с t0.

Таблица 44. Условия тестирования при низком pH

Время инкубации (ч)	Моменты времени						
	-	1	2	4	6	24	48
+ 5 ± 3 °С	X	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	X	X
Комнатная температура		X	X	X	X	Н/Д	Н/Д

5 Осветленный сбор - обработка растворителем и детергентом

Готовили смесь 0,3% TnBP и 1% Tween 80 и перемешивали за 15 минут до инкубации, чтобы обеспечить однородность смеси. Смесь инкубировали и смешивали с осветленным сбором с использованием магнитной мешалки в течение минимум 60 минут перед стадией загрузки РА, чтобы обеспечить достаточную инактивацию вирусов, наблюдаемую в предыдущем проекте. Обработанный материал сразу же очищали, чтобы остановить реакцию инактивации вирусов, используя колонку диаметром 1,1 см со смолой Kaneka KanCar A. Элюат РА, выдержанный при 5 ± 3 °С, затем анализировали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, ВЭЖХ-ХГВ, капиллярного гель-электрофореза (в невозстанавливающих условиях) и iCE.

15 Элюат РА - инактивация вирусов высоким pH

Протестированные моменты времени составляли 1 час, 2 часа, 4 часа и 6 часов при комнатной температуре, и после этой точки продукт выдерживали при 5 ± 3 °С в течение вплоть до 24 и 48 часов инкубации. Приблизительно 25 мл элюата РА подщелачивали до pH 11,2 в пробирке от TPP объемом 50 мл использованием 0,5 M NaOH. Этот pH был выбран в качестве наихудшего случая для качества продукта, чтобы подтвердить целевое значение pH процесса, равное 11,0. Продукт инкубировали при высоком pH при перемешивании с помощью магнитной мешалки, за исключением момента времени t0, в который сразу проводили нейтрализацию, как описано ниже. В каждый момент времени приблизительно 3 мл продукта с высоким pH переносили в пробирку от TPP на 15 мл и нейтрализовали, снижая pH до pH 6,0, используя 3,7% HCl (стадия нейтрализации), чтобы остановить реакцию инактивации вирусов перед заморозкой.

Качество продукта анализировали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, ВЭЖХ-ХГВ и капиллярного гель-электрофореза для всех моментов времени. Результаты анализа анализировали путем сравнения различных моментов времени с моментом времени t_0 (образец, инкубированный при высоком pH и сразу нейтрализованный при pH 6,0). Элюат

5 РА, не нейтрализованный и без какой-либо обработки в целях инактивации вирусов, также анализировали и использовали в качестве контроля для сравнения с t_0 .

Таблица 45. Условия тестирования при высоком pH

Время инкубации (ч)	Моменты времени						
	-	1	2	4	6	24	48
+ 5 ± 3 °C	X	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	X	X
Комнатная температура		X	X	X	X	Н/Д	Н/Д

Анализы аффинности связывания

- 10 Некоторые образцы из экспериментальных анализов при высоком pH (см. таблицу 46) были выбраны для тестирования методом поверхностного плазмонного резонанса. Цель состояла в том, чтобы проверить, влияет ли обработка высоким pH на аффинности связывания молекулы BEAT®3 с ее мишенями CD3ε 1-26-Fc и EGFR и, таким образом, косвенно, на ее активность.
- 15 Первый анализ был направлен на определение аффинности связывания с человеческим антигеном CD3ε 1-26-Fc. Он был проведен с помощью сенсорного чипа серии S CM5 (GE Healthcare). Человеческий CD3ε 1-26-Fc готовили в концентрации 25 нМ в ацетатном буфере с pH 4,5. Образцы BEAT®3 готовили в концентрациях от 1000 нМ до 1,37 нМ в конечных объемах 200 мкл на разведение. Анализ проводили с использованием технологической
- 20 установки Biacore T200 (GE Healthcare).

Второй анализ был направлен на определение аффинности связывания с человеческим антигеном EGFR-his. Он был проведен с помощью сенсорного чипа серии S Protein G (GE Healthcare). Образцы BEAT®3 разводили до концентрации 25 нМ каждый в буфере HBS-EP+ (GE Healthcare). EGFR готовили в концентрациях от 100 нМ до 0,13 нМ, в конечных объемах

25 250 мкл на разведение.

Таблица 46. Образцы, протестированные в анализах аффинности связывания

Время инкубации (ч)	Моменты времени			
	-	2	4	24
+ 5 ± 3 °C	X	Н/Д	Н/Д	X
Комнатная температура		X	X	Н/Д

Функциональные клеточные анализы

Цель функционального клеточного анализа состояла в том, чтобы проверить, влияет ли

- 5 обработка высоким pH на активность молекулы BEAT®3. Выбранные образцы, обработанные высоким pH, тестировали, как описано в таблице 47:

Таблица 47. Образцы, протестированные в функциональных клеточных анализах

Время инкубации (ч)	Моменты времени			
	-	2	4	24
+ 5 ± 3 °C	X	Н/Д	Н/Д	X
Комнатная температура		X	X	Н/Д

- В анализе клеточной активности использовали специально разработанную линию Т-клеток Jurkat, коммерчески доступную от Promega. Эти клетки стабильно трансфицировали репортерной конструкцией, в которой последовательность кДНК люциферазы находилась под контролем элемента ответа NFAT (RE). Продукция люциферазы напрямую зависит от сигналов, которые активируют фактор транскрипции NFAT, таких как сигналы, происходящие от CD3ε (и Т-клеточного рецепторного комплекса). Анализ проводили путем
- 10 совместной инкубации клеток Jurkat-NFAT (клетки-респондеры) (CD3ε+, EGFR-) с клетками-мишенями SK-BR-3 (EGFR+ CD3ε-) и BEAT®3 или контрольными антителами. Активацию клеток-респондеров количественно определяли по люминесцентному ответу. Линию клеток Jurkat NFAT культивировали в течение 6 недель (P6), а линию клеток SK-BR-3 культивировали в течение 3 недель (P3).
- 15 Анализ проводили в 96-луночном планшете для ELISA с U-образным дном (TPP). Линию клеток SK-BR-3, экспрессирующих EGFR (ATCC), повторно суспендировали при 3×10^5 клеток/мл и вносили по 100 мкл в каждую лунку 96-луночного планшета. Планшет для анализа инкубировали в течение ночи при 37 °C и 5% CO₂. На следующий день 25 мкл линии клеток SK-BR-3, экспрессирующих EGFR, выдерживали в планшете для анализа, и в разные
- 20 лунки вносили по 25 мкл разных образцов BEAT®3, разведенных до 6 мкг/мл (конечная концентрация 2 мкг/мл). Клетки Jurkat NFAT (Promega) повторно суспендировали при $1,2 \times$
- 25

10⁶ клеток/мл и вносили по 25 мкл в каждую лунку планшета для анализа. Планшет накрывали и инкубировали 5 ч при 37 °C, 5% CO₂. В конце инкубации в лунки добавляли 75 мкл субстрата для анализа с люциферазой Bio-Glo™ (Promega) и помещали планшет в устройство для считывания микропланшетов. Люминесценцию измеряли с использованием следующих настроек: считывание ленты - конечная точка; время интеграции - 1 минута; испускание - дырка; расположение оптики - верхнее; усиление 135; высота считывания - 1,00 мм. Затем данные наносили на график и анализировали с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad). После преобразования $X = \text{Log}(X)$ применяли нелинейную регрессионную аппроксимацию, и ко всем наборам данных для определения значений EC₅₀ применяли сигмоидальную аппроксимацию кривой доза-ответ. Относительную активность для каждого образца рассчитывали с использованием следующего расчета: Относительная активность, % = EC₅₀контроля / EC₅₀образца x 100.

Анализы на остаточные ДНК и НСР

Основная цель стадии инактивации вирусов заключается в эффективной инактивации вирусов при одновременном обеспечении качества продукта. Тем не менее, в последующем процессе каждая стадия может оказывать влияние на уровни примесей. Целью анализов, описанных ниже, было оценить влияние обработки высоким pH на уровни остаточных ДНК и НСР из клеток CHO.

Для количественной оценки НСР использовали два различных анализа: набор 3G НСР Elisa от Cygnus technologies и набор Anti-CHO НСР Detection от ForteBio-Cygnus с использованием прибора Octet Red 96 от Pall ForteBio для обработки данных. Оба метода использовали в первую очередь для оценки удаления НСР с помощью обработки высоким pH, а также для сравнения обоих методов, а именно, высокопроизводительного octet, который, как известно, является более чувствительным, и ELISA.

Подготовку образца для ELISA проводили с использованием набора 3G Elisa НСР (Cygnus technologies) и с разведением 1/100. Образцы подвергали реакции с аффинно-очищенным антителом, меченным пероксидазой хрена, в лунках для микротитрования, покрытых иммобилизованным антителом к CHO НСР. После промывки проводили реакцию субстрата тетраметилбензидина (TMB). Количество гидролизованного субстрата было прямо пропорционально концентрации присутствующих белков CHO. Количественную оценку осуществляли путем сравнения сигнала образцов с одновременно анализируемыми

стандартами НСР. Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения PRISM.

В отношении Octet были протестированы два разведения образцов (1/200 и 1/400) с использованием набора для детекции НСР CHO (ForteBio-Cygnus). Измерение включало в себя сэндвич-анализ на биосенсоре к НСР CHO, который был предварительно покрыт антителом к CHO НСР gold-standard 3G от Cygnus Technologies. Подготовленный 96-луночный планшет был непосредственно считан на приборе Octet Red 96 от Pall ForteBio. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения для сбора данных системы Octet.

- 10 Для количественной оценки остаточной ДНК анализы включали обработку образцов протеиназой К для удаления белков. Затем ДНК извлекали с помощью магнитных гранул, промывали и, наконец, элюировали. После этого определяли количество ДНК методом ПЦР (полимеразная цепная реакция) в реальном времени с использованием оборудования для проведения ПЦР Fast 5000 (Applied Biosystem). Подготовку образцов проводили с помощью набора resDNASEQ™ Quantitative CHO DNA kit V3.0 (Applied Biosystems).

Некоторые образцы, полученные в результате исследования обработки высоким pH, перечисленные в таблице 48, были выбраны для тестирования с помощью анализов на остаточные ДНК и НСР, описанных выше. Также тестировали 0,2 мкм фильтрацию после инактивации вирусов.

- 20 Таблица 48. Образцы, протестированные в анализах на остаточные ДНК и НСР

Испытанный материал	Масштаб получения	Инактивация вирусов	Время инкубации для инактивации вирусов	Материал, прошедший 0,2 мкм фильтрацию после инактивации вирусов
Элюат РА	Опытный	-	-	-
Содержащий инаktivированные вирусы, нейтрализованный		Высокий pH	90 мин	Нет
Содержащий инаktivированные вирусы, нейтрализованный		Высокий pH	90 мин	Да

Все элюаты РА также фильтровали через 0,2 мкм фильтр перед стадией инактивации вирусов.

Данные из экспериментов по инаktivации вирусов были проанализированы, и для исследования VRV NRT в отношении качества полученного продукта была выбрана обработка высоким pH. Целью этого исследования клиренса вирусов, проведенного BioReliance, была оценка способности этой обработки эффективно инаktivировать вирусы.

- 5 Это исследование было проведено на ксенотропном вирусе лейкоза мышей (MLV), который является типичным модельным вирусом, используемым для биологических продуктов, полученных из линий клеток CHO, таких как моноклональное антитело. Также известно, что MLV чувствителен к физико-химической обработке (см. таблицу 49).

Таблица 49. Физико-химические характеристики MLV

Вирус	Штамм	Геном	Оболочка	Семейство	Размер (нм)	Устойчивость к физическим/химическим реагентам
MLV	pNFS Th-1	оцРНК	Да	Ретровирусы	80-110	Низкая

10

Один анализ выполняли при pH $10,8 \pm 0,05$, что является наихудшим случаем целевого pH процесса, равного 11,0 (т. е. предполагается, что нижний предел диапазона pH инаktivирует меньшее количество вирусов). Параметры температуры при обработке высоким pH составляли $\geq 20 - \leq 25$ °C, тем не менее, добавку MLV вносили при 16 °C ± 1 °C,

15 чтобы получить данные для наихудшего случая в случае выхода за пределы технических требований (OOS). Элюат РА из экспериментальных анализов использовали в качестве исходного материала. pH повышали, используя 0,5 M NaOH, и образцы инкубировали при высоком pH при различном времени выдерживания, описанном в таблице 50, для получения сведений о кинетике инаktivации вирусов. Для остановки реакции образцы

20 нейтрализовали до pH 6,0-8,0 с помощью 3,7% HCl.

Таблица 50. Условия для образцов в ходе исследования VRV

Время инкубации (мин)	Моменты времени			
	t0-1	t10	t30	t60
16 °C ± 1 °C	X	X	X	X

Исследования VRV для проверки высокого pH как стадии процесса очистки BEAT®3

Кроме того исследовали способность другой стадии процесса очистки BEAT®3

- 25 инаktivировать или удалять вирусы в независимых параллельных анализах. Среди них была оценена способность обработки высоким pH на элюате РА. Эксперименты

проводили в BioReliance. Коэффициенты log сокращения рассчитывают относительно нейтрализованного загруженного образца; образцы отбирают после различного времени инкубации (t), через 5, 10, 30 и 60 минут, а затем нейтрализуют.

Результаты и выводы

5 а. Элюат РА - инаktivация вирусов низким pH

Результаты эксклюзионной ВЭЖХ в различные испытанные моменты времени показаны в таблице 51 и проиллюстрированы на фиг. 15 и фиг. 16.

Таблица 51. Результаты эксклюзионной ВЭЖХ в отношении инаktivации вирусов низким pH

Промежуточный продукт		Элюат РА	Содержащий инаktivированные вирусы, нейтрализованный						
Момент времени		Н/Д	t0	t1 ч	t2 ч	t4 ч	t6 ч	t24 ч	t48 ч
Температура		Н/Д	Н/Д	комн. темп.	комн. темп.	ком н. темп .	ком н. темп .	5 ± 3 °C	5 ± 3 °C
Эксклюзионная ВЭЖХ	% агрегатов	2,4	13,1	10,0	10,0	9,3	9,2	6,8	6,0
	% плеча	0,0	6,9	8,0	8,6	10,0	10,4	11,0	12,0
	% мономера	96,1	78,3	80,3	79,8	79,1	78,8	80,6	80,5
	% фрагментов	1,5	1,7	1,7	1,7	1,6	1,7	1,7	1,6

10 Результаты эксклюзионной ВЭЖХ продемонстрировали значительное снижение % мономера для всех образцов, обработанных при низком pH, включая момент времени t0, показывая высокую степень деградации продукта сразу после инкубации при низком pH и нейтрализации. Эта деградация напрямую связано с увеличением содержания агрегатов и

15 «плечевых» компонентов. Фактически, обработка низким pH сразу же повлияла на процентное содержание агрегатов, которое возросло с 2,4% для элюата РА до 13,1% для момента времени t0. Кроме того, повышение содержания «плечевых» компонентов наблюдалось с течением времени в диапазоне от 6,9% для t0 до 12,0% для T48 ч. Эти «плечевые» компоненты появились перед главным пиком мономера. На фиг. 17 приведен

20 один из примеров профиля аналитической эксклюзионной ВЭЖХ, содержащего значительное количество (12%) «плечевых» компонентов.

Кроме того, в таблице 52 приведены результаты Caliper в невозстанавливающих условиях, позволяющие идентифицировать и оценить процентное содержание различных фрагментов. В свете важной и критической деградации, наблюдаемой по результатам эксклюзионной ВЭЖХ, анализировали только моменты времени t_0 и t_{24} часа.

- 5 Таблица 52. Результаты Caliper в невозстанавливающих условиях для инактивации вирусов низким pH

Промежуточный продукт		Элюат РА	Содержащий инаktivированные вирусы, нейтрализованный	
Момент времени		Н/Д	t_0	t_{48} ч
Температура		Н/Д	Н/Д	$5 \pm 3^\circ \text{C}$
Капиллярный гель-электрофорез Caliper	% LC	0,4	0,4	0,4
	% неизвестных фрагментов	2,0	1,6	1,7
	% фрагментов 100 кДа	4,0	3,6	3,7
	% BEAT'	3,1	12,4	3,8
	% BEAT	88,2	80,1	88,9
	% BEAT''	1,9	1,5	1,2
	Общий % BEAT	93,2	94,0	93,9
	% агрегатов	0,5	0,3	0,3

- Инкубация при низком pH показала фрагментацию продукта, что привело к повышению процентного содержания BEAT' с 3,1% в элюате РА до 12,4% для продукта, прошедшего инактивацию вирусов, нейтрализованного в момент времени t_0 . Эти данные капиллярного
- 10 гель-электрофореза, по-видимому, коррелируют с данными эксклюзионной ВЭЖХ, обсуждаемыми выше, где «плечевые компоненты», наблюдаемые в эксклюзионной ВЭЖХ, могут быть эквивалентны компонентам BEAT'. Тем не менее, в момент времени 48 часов наблюдалось более низкое процентное содержание BEAT', чем в t_0 , равное
- 15 приблизительно 3,8%. Этот результат был неожиданным и непоследовательным. Эти данные могут быть объяснены с помощью используемого аналитического метода. Фактически, после обсуждения с аналитической группой разработчиков, капиллярный гель-электрофорез Caliper мог рассматриваться только как метод скрининга, в котором детекция и количественное определение недостаточно точны или даже несопоставимы с
- 20 капиллярным гель-электрофорезом. Для информации профили анализов для t_0 и t_{24} ч

представлены на фиг. 18 и фиг. 19. По этим результатам невозможно было сделать однозначный вывод, и анализ Caliper был окончательно заменен классическим капиллярным гель-электрофорезом для цели разработки стадии инактивации вирусов.

Результаты для вариантов, отличающихся зарядами, полученные с помощью анализа ICE3, описаны в таблице 53. Что касается анализа Caliper, анализировали только моменты времени t0 и t24 часа.

Таблица 53. Результаты ICE3 для инактивации вирусов низким pH

Промежуточный продукт		Элюат РА	Содержащий инаktivированные вирусы, нейтрализованный	
Момент времени		Н/Д	t0	t48 ч
Температура		Н/Д	Н/Д	5 ± 3 °C
ICE	% кислых	50,0	48,7	49,4
	% главного	41,2	42,3	41,2
	% основных	8,8	9,0	9,3

После обработки низким pH разницы в процентном содержании вариантов, отличающихся зарядами, не наблюдалось. Процентное содержание кислых компонентов осталось на уровне приблизительно 49-50%, основных компонентов - на уровне приблизительно 9%, а главного пика - на уровне приблизительно 41%. Обработка низким pH не оказывала влияние на варианты молекулы BEAT®3, отличающиеся зарядами, в течение вплоть до 48 часов инкубации.

Таким образом, пригодность инактивации вирусов низким pH в качестве подходящей альтернативы процесса инактивации вирусов была окончательно опровергнута в свете высокой степени деградации продукта, наблюдаемой по данным эксклюзионной ВЭЖХ.

в. Осветленный сбор - обработка растворителем/детергентом

S/D-обработку осветленного сбора проводили дважды, используя репрезентативный материал. За S/D-обработкой следовала стадия РА для остановки реакции, и качество продукта проверяли непосредственно в полученных элюатах РА. Их сравнивали с двумя контрольными анализами, которые ранее не подвергались S/D-обработке, полученными со стадии разработки РА. Эти два контрольных анализа проводили с одинаковым исходным материалом и при сопоставимых коэффициентах загрузки. Отличался только pH элюирующего буфера, равный pH 4,3 и 4,25 для контрольного и S/D анализов, соответственно.

В таблице 54 приведены сводные данные, полученные по этим анализам:

Таблица 54. Стадия РА с осветленным сбором + S/D, параметры процесса, выходы и результаты в отношении качества продукта

5

Осветленный сбор (+ S/D)	Номер анализа		1	2	Контроль 1	Контроль 2
	Титр РА [г/л]		0,9	0,9	0,9	0,9
	рН (20-25 °С)		7,1	7,1	7,0	7,0
	Проводимость [мСм/см] (24-26 °С)		15,1	15,1	14,9	14,9
	Концентрация Tween 80 [%]		1,1	1,1		
	Концентрация TnBP [%]		0,3	0,3		
	Продолжительность инкубации с S/D [мин]		61,0	65,0		
	Коэффициент загрузки [г/л]		10,0	34,0	10	29
Элюат РА	рН (20-25 °С)		4,3	4,4	4,4	4,4
	Проводимость [мСм/см] (24-26 °С)		1,3	1,6	1,4	1,6
	Объем (объем колонки)		3,8	4,2	5,1	5,2
	Концентрация (г/л)		1,5	5,5	1,1	3,7
	Концентрация Tween 80 [%]		0,001	0,001		
	Концентрация TnBP [мг/л]		<1	<1		
	Эксклюзионная ВЭЖХ	% агрегатов	1,4	4,3	0,8	2,6
		% мономера	98,0	94,9	99,2	96,9
		% фрагментов	0,6	0,9	0,0	0,5
	Капиллярный гель-электрофорез в невосстанавливающих условиях	% LC	0,7	0,6	0,6	0,6
		% Fc	0,1	0,2	0,1	0,2
		% HC-ScFv	1,4	0,7	0,2	0,5
		% неизвестных фрагментов	0,1	0,0	0,2	0,1
		% фрагментов 100 кДа	2,7	3,1	3,2	2,7
		% BEAT'	2,6	2,7	2,5	2,4
		% BEAT	87,5	87,8	88,6	91,0
		% BEAT''	4,3	4,6	4,5	2,3
		Общий % BEAT	94,4	95,1	95,6	95,7
	Капиллярный гель-электрофорез в восстанавливающих условиях	% LC	17,3	17,5	17,7	17,5
		% Fc	23,1	23,3	22,7	22,5
		% HC-ScFv	51,7	51,8	53,2	53,5
		% неизвестных после HC-ScFv	3,6	3,1	3,6	3,4
	iCE	Кислые [%]	54,2	52,4	47,9	50,3
		Главный [%]	37,8	39,8	38,6	38,3

	Основные [%]	8,0	7,7	13,6	11,0
	Стадия выделения [%]	58	67	58	66

Анализы 1 и 2, соответствующие анализам с предварительной S/D-обработкой, проводили соответственно при минимальном и максимальном коэффициенте загрузки (т.е. 10 и 34 г/л). Эта разница оказала влияние на выход стадий, составивший соответственно 58% и 67% для минимального и максимального коэффициента загрузки. Эти результаты были сопоставимы с результатами контрольных анализов без S/D.

Что касается качества, анализ методом эксклюзионной ВЭЖХ показал % мономера для элюата РА в диапазоне от 94,9% до 99,2%, а в отношении агрегатов процентное содержание составило от 0,8% до 4,3%. Процентное содержание фрагмента оставалось ниже 1% для всех анализов. Различия процентного содержания мономеров и агрегатов были напрямую связаны с концентрациями элюата РА. Фактически, чем выше была концентрация, тем выше было процентное содержание агрегатов. Тем не менее, процентное содержание мономера все еще было приемлемым и составляло более 95%. Кроме того, что касается результатов капиллярного гель-электрофореза в восстанавливающих условиях, не было обнаружено различий между анализами (например, общее % содержание BEAT составило от 94,4% до 95,7% для всех анализов), и не было обнаружено фрагментации продукта из-за применения S/D. Наконец, профили для вариантов, отличающихся зарядами, показали процент главного пика от 37,8 до 39,8%, и наблюдалось любое появление кислых или основных компонентов. Деградация продукта после S/D-обработки не происходила.

Кроме того, концентрации Tween 80 и TnBP измеряли до и после стадии РА, чтобы оценить способность стадии РА удалять S/D. Концентрация Tween 80 в сборе составляла 1,1 масс. % по сравнению с 0,001 масс. % в элюате РА, и измеренное содержание TnBP составило 0,3 масс. % в сборе и 1 мг/л в элюате РА (что соответствует приблизительно 0,01 масс. %). Следовательно, стадия с использованием белка А эффективно удаляла S/D.

Таким образом, S/D-обработка перед стадией РА была подходящим вариантом для инактивации вирусов в BEAT®3.

с. Элюат РА - инактивация вирусов высоким pH

Разработка в малом масштабе

В этом разделе представлены данные о качестве продукта, полученные в малом масштабе для обработки высоким pH. Сводные результаты эксклюзионной ВЭЖХ приведены в

таблице 55, ниже соответственно в таблице 56 и таблице 57 приведены результаты капиллярного гель-электрофореза в невосстанавливающих условиях и результаты по вариантам, отличающимся зарядами.

Таблица 55. Результаты эксклюзионной ВЭЖХ для обработки высоким pH

Промежуточный продукт		Элюат РА	Нейтрализованный, инаktivация вирусов						
Момент времени		Н/Д	t0	t1 ч	t2 ч	t4 ч	t6 ч	t24 ч	t48 ч
Температура		Н/Д	Н/Д	комн. темп.	комн. темп.	комн. темп.	комн. темп.	5 ± 3 °C	5 ± 3 °C
Эксклюзионная ВЭЖХ	% агрегатов	2,4	3,7	3,5	3,6	3,3	3,3	3,2	3,2
	% мономеров	96,1	95,0	94,8	94,6	94,9	94,9	94,9	94,9
	% фрагментов	1,5	1,3	1,7	1,8	1,8	1,9	1,9	2,0

5

Процентное содержание мономеров было сопоставимо для условий (например, 95,0% для T0 и 94,9% для T48 ч), что позволило подтвердить, что при обработке высоким pH при инкубации в течение вплоть до 48 ч не происходило агрегации. Тем не менее, между образцом элюата РА и образцами, обработанными высоким pH, наблюдалась разница, составлявшая 1%. Это было связано с небольшим увеличением % агрегатов, что могло быть результатом инкубации при высоком pH. Однако разница в 1% находится в пределах вариабельности метода и, вероятно, не является статистически значимой. Кроме того, образцы не хранили в одних и тех же условиях: элюат РА без обработки хранили при 5 ± 3 °C, а образцы, обработанные высоким pH, замораживали, что приводило к большему содержанию обратимых агрегатов в замороженных образцах.

10

15

Результаты капиллярного гель-электрофореза в невосстанавливающих условиях приведены в таблице 56

Таблица 56. Результаты капиллярного гель-электрофореза в невосстанавливающих условиях для инаktivации вирусов высоким pH

Промежуточный продукт	Нейтрализованный, инаktivация вирусов						
Момент времени	t0	t1 ч	t2 ч	t4 ч	t6 ч	t24 ч	t48 ч
Температура	Н/Д	комн. темп.	комн. темп.	комн. темп.	комн. темп.	5 ± 3 °C	5 ± 3 °C

Капиллярный гель-электрофорез в невосстанавливающих условиях	% LC	0,5	0,5	0,5	0,7	0,5	0,6	0,5
	% Fc	0,3	0,6	0,6	0,7	0,6	0,7	1,1
	% HC-ScFv	1,3	1,3	1,2	1,1	1,4	1,1	1,3
	% неизвестных фрагментов	0,1	0,2	0,2	0,4	0,3	0,4	0,5
	% фрагментов 100 кДа	2,3	2,1	2,2	2,2	2,4	2,1	2,4
	% BEAT'	3,0	2,8	2,7	2,9	3,0	2,6	3,0
	% BEAT	87,1	87,8	88,8	87,3	87,4	88,4	87,2
	% BEAT''	4,8	3,6	3,0	4,5	3,9	3,2	3,4
	Общий % BEAT	94,9	94,2	94,5	94,7	94,3	94,2	93,6
	% неизвестных компонентов	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,4	0,6
	% агрегатов	0,4	0,3	0,7	0,4	0,5	0,6	0,2

Процентное содержание BEAT по данным капиллярного гель-электрофореза в невосстанавливающих условиях оставалось одинаковым для всех тестируемых образцов по сравнению с t0 (например, % BEAT составлял 87,1% для t0 и 87,2% для T48 ч). Более того, не наблюдалось какого-либо повышения содержания фрагментов в течение вплоть до 48 ч. Эти данные были подтверждены наложением сопоставимых профилей капиллярного

Результаты ICE3 для вариантов, отличающихся зарядами, приведены ниже в таблице 57:

Таблица 57. Результаты ICE3 для инактивации вирусов высоким pH

Промежуточный продукт		Элюат РА	Нейтрализованный, инаktivация вирусов						
Момент времени		Н/Д	t0	t1 ч	t2 ч	t4 ч	t6 ч	t24 ч	t48 ч
Температура		Н/Д	Н/Д	комн. темп.	комн. темп.	комн. темп.	комн. темп.	5 ± 3 °C	5 ± 3 °C
ICE	% кислых	50,0	49,2	50,2	50,9	54,0	54,1	56,6	59,6
	% главного	41,2	42,8	42,5	41,8	39,1	38,5	35,8	33,7
	% основных	8,8	8,0	7,4	7,4	6,9	7,4	7,5	6,6

Результаты ICE3 показали % главного пика, равный приблизительно 42,8% для T0, 42,5% для 1 ч и 41,8% для 2 ч. Соответственно для тех же самых моментов времени % кислых компонентов был на уровне 49,2%, 50,2% и 50,9%. Варианты, отличающиеся зарядами, сопоставимы в течение вплоть до 2 часов. После 2 часов инкубации % кислого варианта увеличивается, составляя 54,0% через 4 часа и 59,6% через 48 часов. Тем не менее, вариабельность метода составляет $\leq 10\%$, и различия, наблюдаемые для % главного пика для 4 часов и 6 часов, могут быть статистически незначимыми, так как значение находится в пределах вариабельности метода (например, главный пик при 42,8% в момент времени t0 и 39,1% в момент времени T4 ч). Однако, наблюдаемое увеличение % кислых компонентов является ожидаемой тенденцией, но 2-часовой запас покрывает время проведения процесса (и более), которое обычно составляет $\geq 60 - \leq 90$ минут. Наложения профилей для каждого момента времени инкубации при высоком pH показаны на фиг. 21.

Таким образом, данные показали отсутствие влияния обработки высоким pH на качество продукта в течение вплоть до 2 часов. Выход за пределы 2 часов не приведет к какой-либо агрегации или фрагментации. Тем не менее, 7% увеличение содержания кислых компонентов наблюдалось через 24 часа, и 10% - через 48 часов. Это убедительно подтверждает, что инкубация при с высоким pH является подходящей альтернативой низкому pH.

В свете данных, представленных выше для S/D-обработки и обработки высоким pH, стратегия с высоким pH была выбрана в качестве предпочтительного варианта. Фактически для двух стратегий инактивации вирусов были получены сопоставимые данные в отношении качества продукта. Тем не менее, необходимо принимать во внимание другие параметры, такие как масштабируемость, стоимость перевода в промышленное производство, безопасность или клиренс вирусов.

25 Эксперименты по увеличению масштаба

Масштаб процесса, разработанного в малом масштабе, был увеличен до опытного масштаба. Эти анализы позволили подтвердить результаты, определенные ранее, и получить данные для процесса в более высоком масштабе. Параметры процесса и результаты для двух анализов описаны в таблице 58.

30 Таблица 58: Параметры процесса, выходы и результаты в отношении стабильности продукта для анализов в опытном масштабе при высоком pH

	Анализ		1	2
	Коэффициент загрузки белка А [г/л]		11	22
Инактивация вирусов при высоком рН	рН элюата РА		4,3	4,4
	рН инактивации вирусов после подщелачивания		11,2	11,2
	Объемное соотношение добавленное основание/объем [мл/л]		77,9	83,4
Нейтрализованный, инактивация вирусов	Объемное соотношение добавленная нейтрализация/объем [мл/л]		4,1	5,6
	рН (20-25 °С)		6,0	6,1
	Проводимость [мСм/см] (24-26 °С)		4,0	4,4
	Концентрация (г/л)		1,7	3,3
	Продолжительность инкубации при высоком рН [мин]		108	94
	Общая продолжительность инактивации вирусов [мин]		146	139
	Эксклюзионная ВЭЖХ	% агрегатов	5,1	5,0
		% мономера	94,3	94,3
		% фрагментов	0,7	0,7
	Капиллярный гель-электрофорез в невосстанавливающих условиях	% LC	0,7	0,8
		% HC-ScFv	0,2	0,2
		% фрагментов 100 кДа	3,0	3,3
		% BEAT'	2,3	2,2
		% BEAT	89,9	87,6
		% BEAT''	2,8	4,1
		Общий % BEAT	95,0	93,9
		% неизвестных фрагментов	1,0	1,7
	ICE	% кислых	51,3	53,1
		% главного	40,0	36,0
		% основных	8,8	10,9
	Выход стадии инактивации вирусов [%]		94	94

5

Два анализа проводили после стадии РА в опытном масштабе с коэффициентом загрузки при 11 г/л для анализа 1 и 22 г/л для анализа 2. Целевой рН составлял 11,2, а время инкубации превышало 90 минут, чтобы имитировать наихудший случай. Некоторые входные рабочие диапазоны были получены с соотношением подщелачивания от 77,9 до

83,4 мл/л и соотношением нейтрализации от 4,1 до 5,6 мл/л. Для сравнения, во время нерепрезентативных анализов в малом масштабе соотношения находились в этих пределах: 81,5 мл/л для подщелачивания и 4,7 мл/л для нейтрализации. Кроме того, выходные рабочие диапазоны показали значение pH, колеблющееся при приблизительно 6,0, проводимость в диапазоне от 4,0 до 4,4 мСм/см и концентрацию элюата РА в диапазоне от 1,7 до 3,3 г/л, что напрямую связано с коэффициентом загрузки. Наконец, выход стадии, равный 94%, является обычным для стадии инактивации низким/высоким pH.

Что касается результатов в отношении качества продукта, эксклюзионная ВЭЖХ показала схожие результаты для двух анализов, составившие 94,3% мономеров, и сопоставимые с данными в малом масштабе, где наблюдалось 94,8% через 1 час инкубации и 94,6% через 2 часа. Кроме того, результаты капиллярного гель-электрофореза в невозстанавливающих условиях, показавшие % BEAT, равный 89,9% для анализа 1 и 87,6% для анализа 2, были близки к данным, полученным в малом масштабе, где наблюдался % BEAT, составивший приблизительно 88%. Небольшая разница, наблюдаемая для % BEAT, была напрямую связана с варьированием % BEAT". Фактически, % BEAT" составил 2,8% для анализа 1 и 4,1% для анализа 2. Вариабельность метода, равная $\leq 10\%$, и аналитическое интегрирование пиков могут объяснить эти различия. Наложение профилей, представленное на фиг. 22, не демонстрирует какой-либо существенной фрагментации.

Наконец, появилась разница в 4% для главного пика вариантов, отличающихся зарядами: 40% для анализа 1 и 36% для анализа 2. Это изменение напрямую связано с увеличением содержания кислых компонентов на 2% между анализом 1 и анализом 2, и тем же для основных компонентов, что привело к незначительному снижению на 4%, находящегося в пределах вариабельности метода. Для сравнения, наложение профилей представлено на фиг. 23. Близкие значения наблюдались в малом масштабе, главный пик составил приблизительно 42%.

Таким образом, повышение масштаба при высоком pH показало хорошие результаты в отношении качества продукта, сопоставимые с данными в малом масштабе. Были проведены другие анализы, такие как функциональные клеточные анализы и анализы аффинности связывания, для сбора дополнительных данных.

Анализ аффинности связывания

Относительные аффинности к CD3ε 1-26-Fc и EGFR приведены соответственно в таблице 59 и таблице 60.

Таблица 59. Относительные аффинности BEAT®3 к мишени CD3ε 1-26-Fc.

Относительная KD к hsCD3ε (нМ)						
Образец	Относительная KD R1	Относительная KD R2	Количество параллельных анализов	Средняя отн. KD	СКО отн. KD	% CV отн. KD
Контроль № 1 t0	0,972	0,955	4	1,00	0,04	4,4
Контроль № 2 t0	1,028	1,045				
Высокий pH t0	0,951	0,975	2	0,96	0,02	1,8
Высокий pH t2 ч	0,996	0,989	2	0,99	0,01	0,5
Высокий pH t4 ч	1,035	1,017	2	1,03	0,01	1,2
Высокий pH t24 ч	1,030	1,100	2	1,07	0,05	4,7

5 Таблица 60. Относительные аффинности BEAT®3 к мишени EGFR.

Относительная KD к hsEGFR (пМ)						
Образец	Относительная KD R1	Относительная KD R2	Количество параллельных анализов	Средняя отн. KD	СКО отн. KD	% CV отн. KD
Контроль № 1 t0	0,949	1,046	4	1,00	0,06	5,6
Контроль № 2 t0	1,051	0,954				
Высокий pH t0	0,988	0,967	2	0,98	0,01	1,5
Высокий pH t2 ч	1,025	1,020	2	1,02	0,01	0,4
Высокий pH t4 ч	1,106	1,073	2	1,09	0,02	2,1
Высокий pH t24 ч	1,166	1,133	2	1,15	0,02	2,1

Никакой разницы в аффинности к мишени CD3ε 1-26-Fc не наблюдалось между образцами, обработанными при высоком pH. Средняя относительная константа диссоциации составила 1,0 для контроля и соответственно 1,07 через 24 часа инкубации при высоком pH.

10 В отношении мишени EGFR через более чем 2 часа инкубации появилось лишь небольшое увеличение. Среднее значение относительных констант диссоциации составило 1,02 через 2 часа, 1,09 через 4 часа и 1,15 через 24 часа.

Таким образом, не наблюдалось никакой разницы в аффинности BEAT®3 к EGFR и CD3ε 1-26-Fc при высоком pH в течение вплоть до 2 часов инкубации, что покрывает время проведения процесса, обычно составляющее ≥ 60 - ≤ 90 минут.

15

Функциональные клеточные анализы

Результаты функционального клеточного анализа приведены на фиг. 24. Полумаксимальные эффективные концентрации (EC50) определяли на основании кривых доза-ответ. Сравнение различных кривых доза-ответ показало небольшие различия между условиями высокого pH. Фактически, при увеличении времени инкубации наблюдается

5 небольшой сдвиг вправо по оси x. Этот сдвиг отражает снижение активности продукта, которая напрямую связана с увеличением значений EC50 (например, EC50 = 0,0063 в момент времени t0 и 0,0094 в момент времени 24 ч).

Полученные значения EC50 позволили определить относительную активность каждого образца, принимая в качестве контроля образец с временем инкубации при высоком pH,

10 равным нулю. Результаты представлены в таблице 61.

Таблица 61. Относительные активности в зависимости от длительности обработки высоким pH.

	Относительная активность (%)
Контрольное BEAT®3 при высоком pH, t0	-
BEAT®3 при высоком pH, t2 ч	97%
BEAT®3 при высоком pH, t4 h	85%
BEAT®3 при высоком pH, t24 h	67%

Результаты показали относительную активность на уровне 97% через 2 часа инкубации, 85%

15 через 4 часа и 67% через 24 часа. При вариабельности метода, составляющей $\leq 25\%$, относительную активность считали стабильной в течение вплоть до 2 часов инкубации, а затем наблюдаемое снижение, по-видимому, отражает изменение активности BEAT®3. Фактически, например, через 24 часа инкубации для получения того же уровня активности концентрация BEAT®3 должна быть выше, чем концентрация контрольного образца (т.е.

20 время инкубации, равное нулю). Это снижение процента относительной активности может быть связано с потенциальным окислением молекулы, которое влечет снижение активации клеток-респондеров и, следовательно, снижение люминесцентного ответа. Эта гипотеза представлялось коррелирующей с результатами ICE, описанными ранее, где наблюдалось повышение содержания кислых компонентов с течением времени.

25 Фактически, окисление может повлечь за собой потерю отрицательно заряженных электронов и, следовательно, косвенно повлечь увеличение содержания положительно заряженных кислых компонентов.

Таким образом, по-видимому обнаруживается снижение активности BEAT®3 при увеличении времени инкубации при высоком pH. Тем не менее, активность BEAT®3 не изменялась в течение вплоть до 2 часов инкубации, что покрывает время проведения процесса, обычно составляющее $\geq 60 - \leq 90$ минут. Обработка при высоком pH снова была

5 подтверждена как подходящая.

Анализы на остаточные ДНК и НСР

Анализы на остаточные ДНК, проведенные на образцах, обработанных высоким pH, в опытном масштабе, представлены в таблице 62.

Таблица 62. Результаты анализов на остаточную ДНК

Тестируемый материал	Инактивация вирусов	Время инкубации для инактивации вирусов	Прошедший 0,2 мкм фильтрацию после стадии инактивации вирусов	Концентрация (пг ДНК/мг белка)	% удаления
Элюат РА	-	-	-	182	-
Содержащий инаktivированные вирусы, нейтрализованный	Высокий pH	90 мин	Нет	159	13
Содержащий инаktivированные вирусы, нейтрализованный	Высокий pH	90 мин	Да	30	84

10 Все элюаты РА фильтровали через 0,2 мкм фильтр перед стадией инактивации вирусов.

Остаточные концентрации ДНК выражали в пикограммах ДНК на миллиграмм белка, что позволяло сравнивать все образцы друг с другом независимо от концентрации белка в каждом образце. После обработки при высоком pH концентрация ДНК составляла 159 пг/мг (против 182 пг/мг в загрузке = элюат РА) и 30 пг/мг после фильтрации. Образование осадка

15 наблюдалось во время инкубации при высоком pH, вероятно, из-за осаждения примесей, включая ДНК и белки клеток-хозяев (НСР). Следовательно, стадия при высоком pH удаляет ДНК путем осаждения, а затем осадки удаляются путем 0,2 мкм фильтрации. Общий процент стадии удаления составил приблизительно 84%.

Было оценено влияние стадии при высоком pH на уровень загрязнения НСР, и результаты

20 представлены в таблице 63.

Таблица 63. Результаты анализа на НСР с использованием метода Octet и ELISA.

Тестируемый материал	Инактивац ия вирусов	Время инкубации для инактивац ии вирусов	Прошедши й 0,2 мкм филтраци ю после стадии инактивац ии вирусов	НСР (Octet)		НСР (ELISA)	
				Концентрац ия [нг НСР/мг белка]	% удалени я	Концентрац ия [нг НСР/мг белка]	% удалени я
Элюат РА	-	-	-	1425	-	2803	-
Содержащий инактивированн ые вирусы, нейтрализованн ый	Высокий рН	90 мин	Нет	1154	19	1348	52
Содержащий инактивированн ые вирусы, нейтрализованн ый	Высокий рН	90 мин	Да	185	87	726	74

Все элюаты РА фильтровали через 0,2 мкм фильтр перед стадией инактиваии вирусов.

Концентрации остаточных НСР выражали в нанограммах НСР на миллиграмм белка, чтобы сравнивать все образцы друг с другом независимо от концентрации белка в каждом образце. В первом образце концентрация остаточных НСР составляет 1425 нг/мг по методу Octet и 2803 нг/мг по методу ELISA. Эти результаты не были ожидаемы, потому что анализ с использованием Octet был описан поставщиком как более чувствительный по сравнению с классическими анализами ELISA. Эти два необработанных образца были независимо использованы в качестве контроля для каждого метода.

- 10 Что касается результатов Octet, после обработки высоким рН концентрация НСР составляла 1154 нг/мг против 1425 нг/мг на элюате РА без обработки. После фильтрации концентрация составляла 185 нг/мг. Как наблюдалось в анализах на остаточную ДНК, была показана возможность удаления НСР обработкой высоким рН, которые, вероятно, осаждались во время инкубации при высоком рН и удалялись путем 0,2 мкм фильтрации. Для анализа
- 15 ELISA была показана лучшая чувствительность (т.е. была измерена более высокая концентрация), тем не менее, процент удаления НСР был сопоставим в обоих методах и составил приблизительно 80% для обоих инактиваций вирусов.

Таким образом, обработка высоким рН показала интересный потенциал для удаления примесей ДНК и НСР. Фильтрация через 0,2 мкм фильтр, проведенная в конце стадии, была

необходима для физического удаления НСР и ДНК, осажденных во время инкубации при высоком pH.

Исследование VRV NRT

Обработку высоким pH тестировали на ее способность эффективно инактивировать вирусы.

- 5 Нерегламентное исследование было проведено в Bioreliance, и сводные результаты в отношении клиренса вирусов приведены в таблице 64

Таблица 64. Сводные данные по клиренсу вирусов для MLV после обработки высоким pH.

Образец	Обработка высоким pH	CL (95%)	Нейтрализованный загруженный (Титр/мл)	t0-1 мин (Титр/мл)	t10 мин (Титр/мл)	t30 мин (Титр/мл)	t60 мин (Титр/мл)	коэффициент $\log_{10}$ сокращения
Элюат РА	pH 10,8 (+/- 0,05)	Нижнее	6,58	4,83	1,93	1,30	1,13	5,65 ± 0,34
		Среднее	6,89	5,15	2,23	1,83	1,24	
		Верхнее	7,21	5,46	2,53	2,36	1,36	

- 10 Клиренс вирусов, проведенный на ксенотропном вирусе лейкоза мышей (MLV), показал коэффициент $\log_{10}$ сокращения, равный 5,65, через 60 минут обработки высоким pH при pH 10,8 (+/- 0,05). Следовательно, обработка высоким pH оказалось очень эффективной с точки зрения клиренса вирусов.

- 15 Кроме того, при тестировании клиренса вирусов с использованием инкубации BEAT®3 при высоком pH в качестве стадии инактивации вирусов в процессе очистки BEAT®3 результаты в отношении клиренса были эффективными, как показано кинетикой обработки высоким pH на фиг. 25.

Сводные данные по титрам вируса и рассчитанным коэффициентам $\log$ сокращения приведены ниже в таблице 66:

Таблица 65. $\log$ сокращения вирусов при обработке высоким pH

Образец	Анализ	Нейтрализованный загруженный выдержанный [$\log_{10}/\text{мл}$]	Нейтрализованный загруженный [$\log_{10}/\text{мл}$]	Нейтрализованный загруженный при различном времени инкубации [$\log_{10}/\text{мл}$]	коэффициент $\log_{10}$ сокращения
---------	--------	--	--	--	------------------------------------

				0-5 ми н	10 ми н	30 ми н	60 ми н	
Нейтрализованный загруженный [log ₁₀ / мл]	1	6,72	7,24	2,1 5	1,8 1	1,6 2	1,4 7	5,77
	2	7,07	6,98	1,9 2	2,3 8	1,2 8	1,3 3	5,65

Оба параллельных анализа показали схожую кинетику инактивации со значимым и быстрым снижением с течением времени (например, 2,15 log₁₀, 1,81 log₁₀, 1,62 log₁₀ и 1,47 log₁₀ через 5, 10, 30 и 60 минут инкубации), и через 5 минут инкубации систематически

наблюдалось значительное снижение. Коэффициенты сокращения MLV, равные 5,77 log₁₀ и 5,65 log₁₀ (т. е. анализ 1 и анализ 2, соответственно), полученные для обработки высоким pH, позволили сделать вывод, что инактивация вирусов была эффективной для инактивации вируса MLV (т. е. все LRF > 4,00 log₁₀).

Таким образом, были рассмотрены разные стратегии инактивации вирусов, чтобы выбрать наиболее подходящую обработку для антитела BEAT®3. Критериями выбора для условия инактивации вирусов были, во-первых, стабильность молекулы после обработки, во-вторых, эффективность метода инактивации вирусов с приемлемым log сокращения и, наконец, простота внедрения процесса производства с соблюдением правил производства и контроля качества лекарственных средств.

Инкубация при низком pH на элюате РА показала значительную деградацию продукта с увеличением содержания высокомолекулярных компонентов. Эту стратегию сочли неподходящей для данного проекта.

Обнаружено, что как обработка растворителем/детергентом (S/D) собранной массы, так и высоким pH - элюата РА, демонстрирующие схожие результаты с точки зрения качества продукта в отношении только физико-химических свойств, являются подходящими. Кроме того, была успешно подтверждена пригодность инактивации вирусов высоким pH, представляющая собой новый вид обработки, с помощью других анализов, основанных на активности продукта или клиренсе вирусов.

Таким образом, с учетом всех параметров, обсуждаемых в данном отчете, обработка высоким pH была выбрана в качестве наиболее подходящей стратегии инактивации

вирусов для проекта с BEAT®3 и была реализована в процессе между стадиями РА и СЕХ. S/D-обработку рассматривали в качестве резервного варианта.

Кроме того, при тестировании удаления вирусов при инкубации BEAT®3 при высоком pH в качестве стадии инактивации вирусов в процессе очистки BEAT®3 результаты удаления
5 будут эффективными, как показано кинетикой обработки высоким pH на фиг. 25.

Сводные данные по титрам вируса и рассчитанным коэффициентам log сокращения приведены в таблице 66:

Таблица 66. log сокращения при обработке высоким pH

Образец	Анализ	Нейтрализованный загруженный выдержанный [log ₁₀ /мл]	Нейтрализованный загруженный [log ₁₀ / мл]	Нейтрализованный загруженный при различном времени инкубации [log ₁₀ /мл]				Коэффициент log ₁₀ сокращения [log ₁₀]
				0-5 мин	10 мин	30 мин	60 мин	
Нейтрализованный загруженный [log ₁₀ / мл]	1	6,72	7,24	2,15	1,81	1,62	1,47	5,77
	2	7,07	6,98	1,92	2,38	1,28	1,33	5,65

10 Оба параллельных анализа показали схожую кинетику инактивации со значительным и быстрым снижением с течением времени (например, 2,15 log₁₀, 1,81 log₁₀, 1,62 log₁₀ и 1,47 log₁₀ через 5, 10, 30 и 60 минут инкубации), и через 5 минут инкубации систематически наблюдалось значительное снижение.

15 Коэффициенты сокращения MLV, равные 5,77 log₁₀ и 5,65 log₁₀ (т. е. анализ 1 и анализ 2, соответственно), полученные для обработки высоким pH, позволили сделать вывод, что инактивация вирусов была эффективной для инактивации вируса MLV (т. е. все LRF > 4,00 log₁₀).

Пример 8. Высокий pH также является допустимой альтернативой обработке низким pH в процессе очистки антител, не относящихся к нестойким к низкому pH

20 Чтобы проверить возможность применения высокого pH в качестве альтернативы инкубации при низком pH в процессе очистки антител, не относящихся к нестойким к низкому pH, были исследованы влияния инкубации при высоком pH на стабильность и активность гуманизированного IgG1 (обозначенного в настоящем документе как Ab1).

Материалы, методы и оборудование

Исходный материал, использованный в этом исследовании, представлял собой элюат РА.

Все химические вещества имели фармацевтическую степень чистоты (согласно Фармакопее США или Европы). Стадии 0,2 мкм фильтрации в ходе процесса обычно проводили для всех буферов и всех промежуточных продуктов. Кроме того, использовали магнитную мешалку, измеритель pH и кондуктометр.

Протестированные моменты времени составляли 1 час, 2 часа и 4 часа при комнатной температуре, и после этой точки продукт выдерживали при 5 ± 3 °C в течение вплоть до 24 часов инкубации. Приблизительно 100 мл элюата РА подщелачивали при перемешивании с использованием магнитной мешалки до pH 11,2 в бутылке Nalgene использованием 0,5 М NaOH. Этот pH был выбран в качестве наихудшего случая для качества продукта, чтобы подтвердить целевое значение pH процесса, равное 11,0. Продукт инкубировали при высоком pH за исключением момента времени t_0 , в который сразу проводили нейтрализацию, как описано ниже. В каждый момент времени приблизительно 10 мл продукта с высоким pH переносили в пробирку от TPP на 50 мл и нейтрализовали, снижая pH до pH 5,2, используя 3,7% HCl (стадия нейтрализации), чтобы остановить реакцию инактивации вирусов перед заморозкой.

Качество продукта анализировали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, ВЭЖХ-ХГВ и капиллярного гель-электрофореза для всех моментов времени. Элюат РА, не нейтрализованный и без какой-либо обработки в целях инактивации вирусов, также анализировали и использовали в качестве контроля.

Таблица 67. Условия тестирования при высоком pH

Время инкубации (ч)	Моменты времени				
	-	1	2	4	24
+ 5 ± 3 °C	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Х
Комнатная температура	Х	Х	Х	Х	Н/Д

Некоторые образцы из описанного выше тестирования были выбраны для тестирования методом поверхностного плазмонного резонанса (таблица 37). Цель состояла в том, чтобы проверить, влияет ли обработка высоким pH на аффинности связывания молекулы Ab1 с ее мишенями OX40R и FcγR3a и, таким образом, косвенно, на ее активность. Кроме того, был проведен функциональный клеточный анализ, чтобы непосредственно проверить влияние высокого pH на активность молекулы Ab1.

Таблица 68. Образцы, протестированные на аффинность связывания и посредством функциональных клеточных анализов

Время инкубации (ч)	Моменты времени		
	-	1	2
+ 5 ± 3 °C	X	Н/Д	Н/Д
Комнатная температура		X	X

Результаты и вывод

- 5 Влияние времени выдерживания в ходе инкубации Ab1 при высоком pH анализировали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, результаты показаны на фиг. 26 и в таблице 69.

Таблица 69. Результаты эксклюзионной ВЭЖХ

	Промежуточный продукт	Элюат РА	Нейтрализованный, инактивация вирусов				
	Момент времени	Элюат РА	t0	t1 ч	t2 ч	t4 ч	t24 ч
Эксклюзионная ВЭЖХ	% агрегатов	2,0	2,6	3,0	3,2	3,5	3,0
	% мономеров + размытия пика	97,9	97,3	96,9	96,7	96,4	96,8
	% мономеров	97,1	96,5	96,0	95,7	95,5	95,6

- Исследование демонстрирует, что процентное содержание мономеров сопоставимо для разных условий, кроме того, не наблюдается агрегации при обработке высоким pH в течение вплоть до 24 часов. Наблюдаемые изменения находятся в пределах вариабельности метода и не являются статистически значимыми. Следовательно, согласно данным результатам Ab1 стабильно в течение вплоть до 24 часов, что с запасом покрывает время проведения процесса, обычно составляющее $\geq 60 - \leq 90$ минут.
- 15 Чтобы дополнительно исследовать чистоту и идентичность образца при обработке высоким pH, анализировали влияние времени выдерживания с помощью капиллярного гель-электрофореза в невозстанавливающих условиях, см. таблицу 70 и фиг. 27. Также эти эксперименты демонстрируют, что процентные содержания промежуточных продуктов сравнимы с контрольным образцом (элюат РА), и в течение вплоть до 2 часов никакой
- 20 значительной фрагментации не происходит. Небольшое увеличение процентного содержания фрагмента 125 кДа наблюдается через 2 часа и коррелирует со снижением процентного содержания IgG.

В совокупности эти результаты демонстрируют, что Ab1 стабильно в течение вплоть до 2 часов, что с запасом покрывает время проведения процесса, обычно составляющее $\geq 60 - \leq 90$ минут.

Таблица 70. Результаты капиллярного гель-электрофореза в невосстанавливающих условиях

5

	Промежуточный продукт	Элюат РА	Нейтрализованный, инактивация вирусов				
	Момент времени	Элюат РА	t0	t1 ч	t2 ч	t4 ч	t24 ч
Капиллярный гель-электрофорез в невосстанавливающих условиях	% LC	1,7	1,5	1,7	1,7	1,9	2,0
	% фрагментов 75 кДа	0,5	0,5	0,6	0,7	1,0	1,0
	% фрагментов 100 кДа	1,2	1,5	1,1	1,2	1,4	1,7
	% фрагментов 125 кДа	6,0	6,5	6,2	6,1	7,2	8,7
	% IgG'	3,1	3,4	3,5	3,5	3,8	4,2
	% IgG	87,5	86,4	86,9	86,9	84,7	82,3

Капиллярный гель-электрофорез в восстанавливающих условиях (на фиг. 28 и в таблице 71) также свидетельствует о том, что не наблюдается значительного повышения содержания фрагментов в течение вплоть до 2 часов, в то время как через 2 часа происходит небольшое повышение процентных содержаний «неизвестного фрагмента», что коррелирует со снижением % HC.

10

Эти результаты подтверждают, что Ab1 стабильно в течение вплоть до 2 часов, что с запасом покрывает время проведения процесса, обычно составляющее $\geq 60 - \leq 90$ минут.

Таблица 71. Результаты капиллярного гель-электрофореза в восстанавливающих условиях

	Промежуточный продукт	Элюат РА	Нейтрализованный, инактивация вирусов				
	Момент времени	Элюат РА	t0	t1 ч	t2 ч	t4 ч	t24 ч
Капиллярный гель-электрофорез в восстанавливающих условиях	% LC	31,7	31,6	31,7	32,3	32,0	31,7
	% неизвестных	2,0	2,4	2,5	2,0	2,4	2,2
	% NG HC	1,0	0,9	0,8	0,8	0,9	0,9
	% HC	63,2	63,2	62,9	63,0	62,2	61,7
	% неизвестных	0,8	0,7	0,6	0,4	0,5	0,7

	% неизвестных	0,2	0,1	0,4	0,5	1,1	1,8
--	---------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Влияние времени выдерживания при высоком pH было дополнительно проанализировано методом **iCE для оценки** вариантов, отличающихся зарядами. Результаты в таблице 72 и на фиг. 29 демонстрируют снижение содержания кислых компонентов с течением времени, тем не менее, вариабельность метода составляет $\leq 10\%$, поэтому различия, наблюдаемые в течение вплоть до 2 часов, находятся в пределах вариабельности метода и могут рассматриваться как приемлемые и статистически незначимые. Другими словами, наблюдаемое увеличение процентного содержания кислых компонентов является ожидаемой тенденцией, и 2-часовой запас покрывает время проведения процесса (и более), которое обычно составляет $\geq 60 - \leq 90$ минут.

Таблица 72. Результаты iCE

	Промежуточный продукт	Элюат РА	Нейтрализованный, инактивация вирусов				
	Момент времени	Элюат РА	t0	t1 ч	t2 ч	t4 ч	t24 ч
iCE	% кислых	35,7	37,2	38,8	39,6	43,4	50,7
	% главного	40,5	39,6	38,5	38,6	35,8	30,2
	% основных	23,8	23,2	22,7	21,8	20,8	19,1

Был проведен функциональный клеточный анализ для оценки влияния времени выдерживания при высоком pH на активность молекулы. Согласно результатам, представленным на фиг. 30 и в таблице 73, с течением времени не наблюдается тенденции в отношении относительных значений активности. Обработка высоким pH для t1 ч и t2 ч обеспечивает очень схожую активность по сравнению с элюатом РА, использованным в качестве контроля. Принимая во внимание, что вариабельность метода составляет $\leq 25\%$, обработка высоким pH не влияет существенным образом на активность Ab1 в течение вплоть до 2 часов инкубации, что покрывает время проведения процесса, обычно составляющее $\geq 60 - \leq 90$ минут.

Таблица 73. Относительная активность в зависимости от длительности обработки высоким pH

Относительная активность (%)	
Элюат РА (контроль)	100%
t0	163%
t1 ч	94%
t2 ч	101%

Для оценки влияния инкубации при высоком pH на активность Ab1 был проведен анализ аффинности связывания (в Biacore) (таблица 74).

Таблица 74. Относительные аффинности Ab1 к его мишени

Образец	Измерение аффинности	Средняя KD (нМ)	СКО (нМ)	%CV	Относительная KD (% от элюата РА)
Элюат РА	человеческий OX40	198	51	25,8	100
t0	человеческий OX40	229	8	3,3	116
t1	человеческий OX40	207	4	1,9	105
t2	человеческий OX40	224	3	1,4	113
Элюат РА	человеческий FcγR3a	689	13	1,9	100
t0	человеческий FcγR3a	760	27	3,6	110
t1	человеческий FcγR3a	744	9	1,2	108
t2	человеческий FcγR3a	638	27	4,2	93

5

Между элюатом на белке А и всеми образцами, инкубированными при высоком pH, не наблюдается различий функциональной значимости в активности связывания с человеческим OX40. Небольшие различия могут быть вызваны введением немного разных концентраций.

- 10 Между элюатом на белке А и всеми образцами, инкубированными при высоком pH, не наблюдается различий функциональной значимости в активности связывания с человеческим FcγR3a. Небольшие различия могут быть вызваны введением немного разных концентраций.

В совокупности эти результаты показывают, что обработка элюата РА высоким рН является приемлемой альтернативой обработке низким рН также в процессе очистки антител, не относящихся к нестойким к низкому рН.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения раствора антитела, вирусы в котором были инаktivированы, включающий стадии: (i) сбора материала антитела, продуцированного находившимися в клеточной культуре трансфицированными клетками, содержащими кодирующие последовательности для указанного антитела; (ii) обработки указанного собранного материала антитела для инаktivации вирусов, где указанная обработка выбрана из группы, состоящей из инкубации со смесью растворителя и детергента, или инкубации при высоком pH.
2. Способ по п. 1, согласно которому указанный собранный материал антитела продуцируют в клетках отличных от человека млекопитающих.
3. Способ по п. 1, согласно которому указанный собранный материал антитела содержит моноклональное антитело.
4. Способ по п. 3, согласно которому указанное моноклональное антитело представляет собой рекомбинантное антитело.
5. Способ по п. 4, согласно которому указанное рекомбинантное антитело является мультиспецифическим.
6. Способ по любому из пп. 1-5, согласно которому указанный растворитель представляет собой TnBP, и согласно которому указанный детергент выбран из группы, состоящей из Triton X-100, полисорбата-80 и полисорбата-20.
7. Способ по п. 6, согласно которому концентрация указанного TnBP равна приблизительно 0,1 масс. % или более, и равна приблизительно 1 масс. % или менее, в частности, концентрация указанного TnBP выбрана из группы, включающей: приблизительно 0,1 масс. %, приблизительно 0,3 масс. %, приблизительно 0,5 масс. % и приблизительно 1 масс. %.
8. Способ по п. 6, согласно которому концентрация указанного полисорбата-80 или указанного полисорбата-20 равна приблизительно 0,1 масс. % или более, и равна приблизительно 2 масс. % или менее, в частности, концентрация указанного полисорбата-80 или указанного полисорбата-20 выбрана из группы, включающей: приблизительно 0,2 масс. %, приблизительно 0,5 масс. %, приблизительно 0,75 масс. %, приблизительно 1 масс. %, приблизительно 1,25 масс. %.

9. Способ по любому из пп. 1-8, согласно которому указанная смесь растворителя и детергента выбрана из группы, состоящей из смеси 0,3 масс. % TnBP и 0,5 масс. % полисорбата-80, и смеси 0,3 масс. % TnBP и 1 масс. % полисорбата-80.
10. Способ по любому из пп. 1-9, согласно которому указанный собранный материал антитела инкубируют со смесью 0,3 масс. % TnBP и 1 масс. % полисорбата-80 в течение по меньшей мере 5 минут.
11. Способ по п. 10, согласно которому указанный собранный материал антитела сначала подвергают хроматографии на белке А, и при этом элюат, полученный на белке А, инкубируют со смесью 0,3 масс. % TnBP и 1 масс. % полисорбата-80 в течение по меньшей мере 10 минут при комнатной температуре.
12. Способ по п. 10, согласно которому указанный собранный материал антитела представляет собой осветленный сбор, и его инкубируют со смесью 0,3 масс. % TnBP и 1 масс. % полисорбата-80 в течение приблизительно 60 минут при перемешивании при комнатной температуре.
13. Способ по пп. 1-5, согласно которому указанный высокий pH равен 9 или выше, и равен 12,5 или ниже.
14. Способ по п. 13, согласно которому указанный высокий pH равен по меньшей мере 10,5.
15. Способ по п. 14, согласно которому указанный высокий pH равен приблизительно 11.
16. Способ по любому из пп. 13-15, согласно которому указанный собранный материал антитела сначала подвергают хроматографии на белке А, и при этом элюат, полученный на белке А, инкубируют при указанном высоком pH.
17. Способ по п. 16, согласно которому указанный элюат, полученный на белке А, титруют буфером, выбранным из группы Трис, гистидина, L-аргинина, фосфата и NaOH, до целевого высокого pH и инкубируют.
18. Способ по любому из пп. 13-17, согласно которому указанный элюат, полученный на белке А, титруют 0,5 М NaOH до целевого значения pH 11 в течение приблизительно 60 минут при комнатной температуре.
19. Способ по любому из пп. 1-18, включающий дополнительную стадию (iii) тестирования части раствора антитела, вирусы в котором были инаktivированы, по п. 1 с помощью анализа на инаktivацию вирусов.

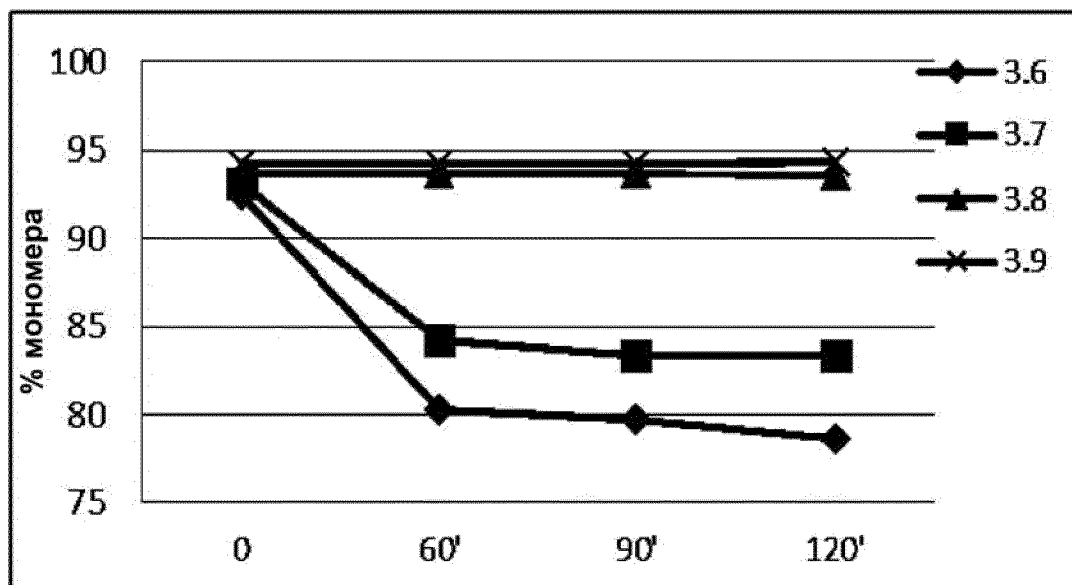
20. Способ получения нерасфасованного лекарственного вещества, включающий следующие стадии:

- (a) Инактивации вирусов в собранном материале антитела путем обработки растворителем -детергентом, как в п. 12.
- 5 (b) Хроматографии на белке А полученного раствора, вирусы в котором были инаktivированы.
- (c) Нейтрализации элюата, полученного на белке А, до pH 6,0 с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- (d) Катионообменной хроматографии нейтрализованного элюата, полученного на белке А,
10 с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- (e) Концентрирования элюата, полученного катионообменной хроматографией, путем ультрафильтрации и непрерывной диафильтрации с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- (f) Очистки продукта путем анионообменной хроматографии в проточном режиме с
15 использованием адсорбции на мембране с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- (g) Нанофильтрации вирусов.
- (h) Концентрирования продукта путем ультрафильтрации и непрерывной диафильтрации в предварительном буфере с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- (i) Добавления вспомогательных веществ до достижения целевого значения 6 мг/мл
20 продукта в буфере для приготовления конечного состава путем смешивания 5 мМ цитрата, 15% сахарозы, 0,06% полисорбата-80 при pH 5,9 с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- (j) Наполнения указанным продуктом стерильных пакетов с последующим замораживанием и хранением при -80 ± 20 °C.

25 21. Способ получения нерасфасованного лекарственного вещества, включающий следующие стадии:

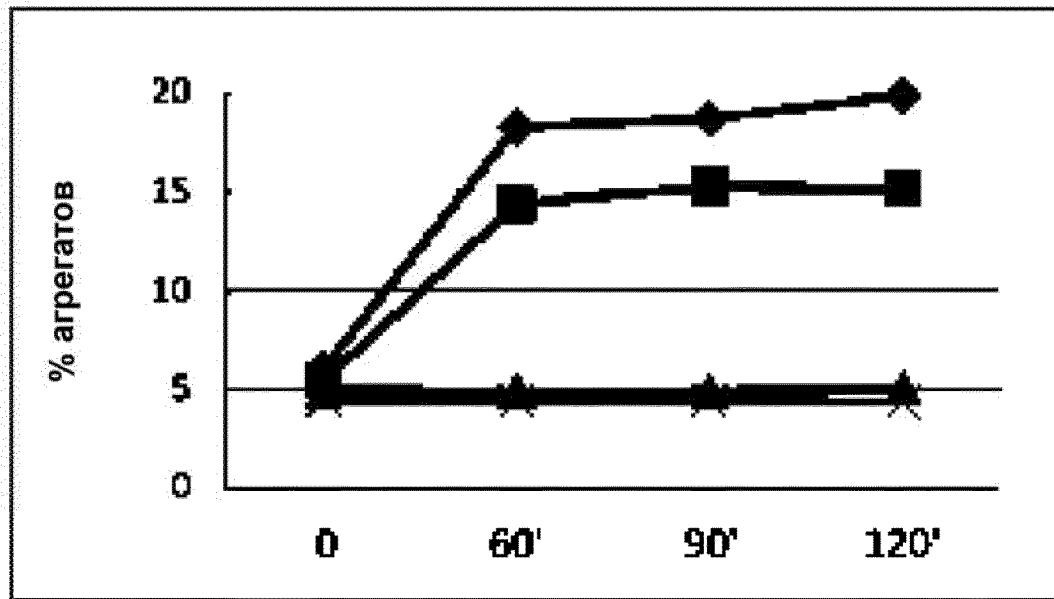
- (a) Хроматографии на белке А собранного материала антитела.
- (b) Инкубации элюата, полученного на белке А, при высоком pH, как в п. 18.

- (c) Нейтрализации полученного раствора, вирусы в котором были инаktivированы, до pH 5,5 с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- (d) Катионообменной хроматографии нейтрализованного элюата, полученного на белке А, вирусы в котором были инаktivированы, с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- 5 (e) Концентрирования элюата, полученного катионообменной хроматографией, путем ультрафильтрации и непрерывной диафильтрации с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- (f) Очистки продукта путем анионообменной хроматографии в проточном режиме с использованием адсорбции на мембране с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- 10 (g) Нанофильтрации вирусов.
- (h) Концентрирования продукта путем ультрафильтрации и непрерывной диафильтрации в предварительном буфере с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- (i) Добавления вспомогательных веществ до достижения целевого значения 6 мг/мл продукта в буфере для приготовления конечного состава путем смешивания 5 мМ L-гистидина, 150 мМ моногидрохлорида L-аргинина, 15% сахарозы, 0,06% полисорбата-80 при pH 6,0 с последующей 0,2 мкм фильтрацией.
- 15 (j) Фасовки продукта в стерильные пакеты с последующим замораживанием и хранением при -80 ± 20 °C.
- 21. Способ удаления примесей из собранного из клеток материала, включающий стадию
- 20 обработки указанного собранного из клеток материала при высоком pH и последующую стадию фильтрации.

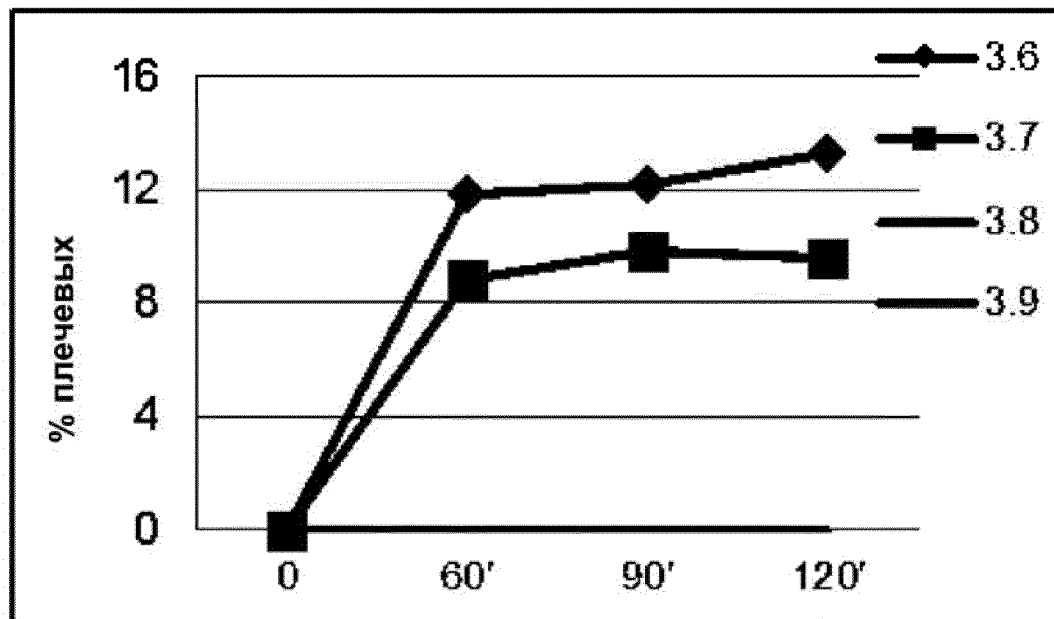


Фиг. 1

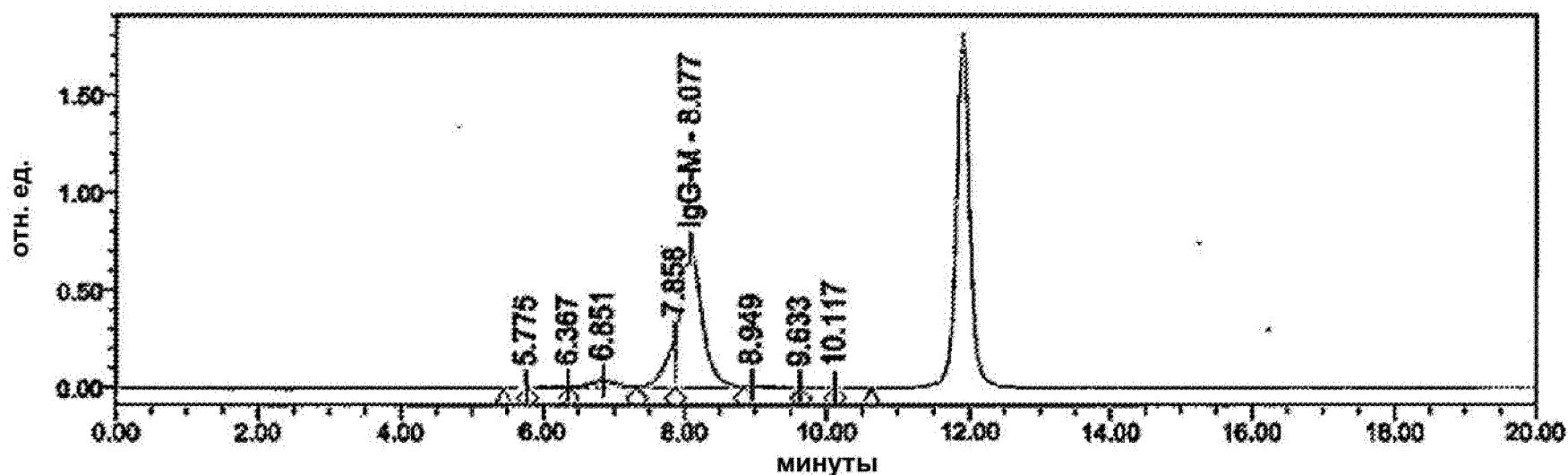
A



B

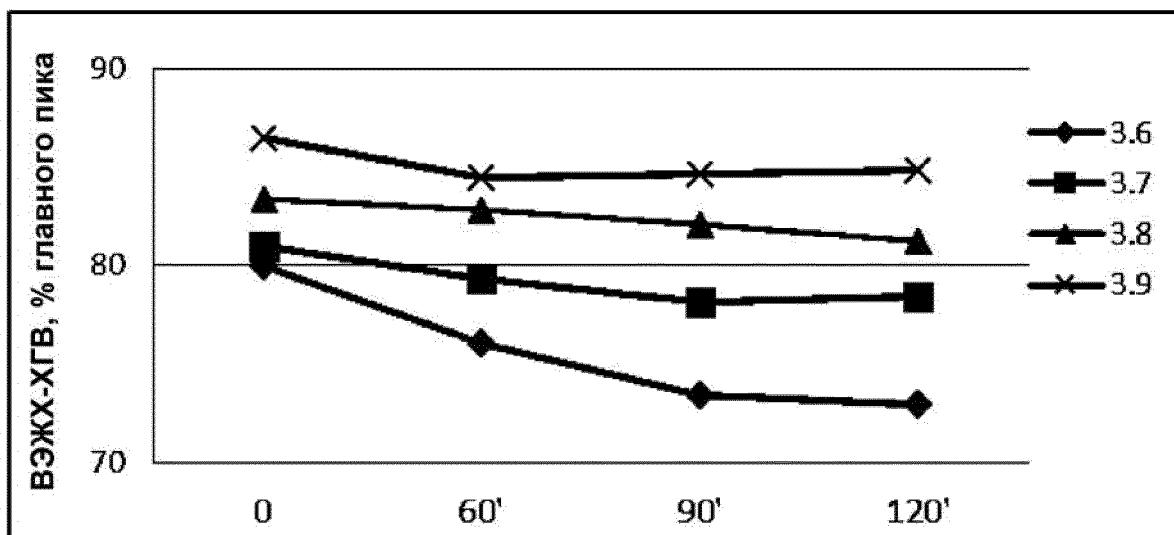


Фиг. 2

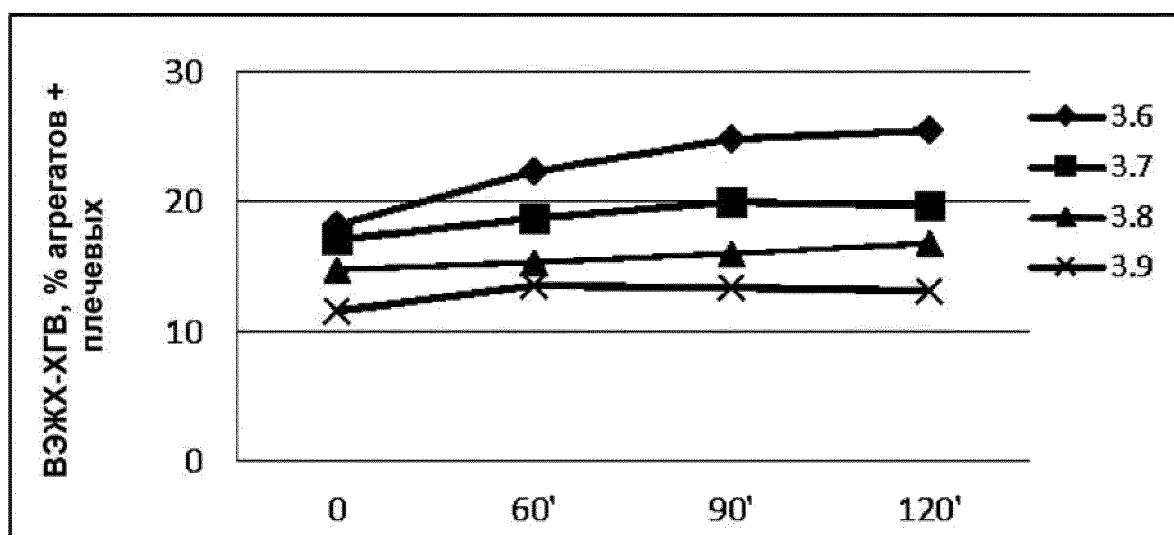


Название образца: CX754; Пробирка: 35

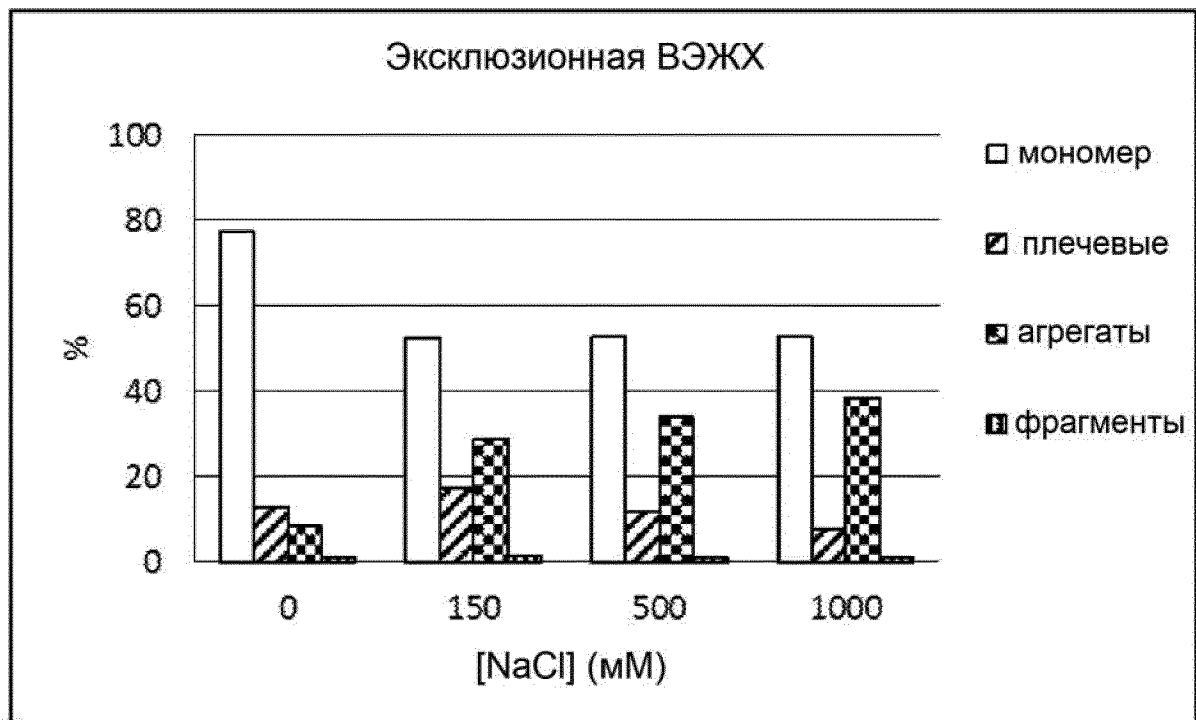
	Название образца	Пробирка	Введение	Название	Время удерживания (мин)	Введенный объем (мкл)	Описание канала	Разведение	Площадь (мкВ*с)	% площади
1	CX754	35	1		5.775	50.00	2998 Ch2 214nm@1.2nm	1.0000	21287	0.11
2	CX754	35	1		6.367	50.00	2998 Ch2 214nm@1.2nm	1.0000	147291	0.78
3	CX754	35	1		6.851	50.00	2998 Ch2 214nm@1.2nm	1.0000	1088809	5.88
4	CX754	35	1		7.858	50.00	2998 Ch2 214nm@1.2nm	1.0000	2493039	13.25
5	CX754	35	1	IgG-M	8.077	50.00	2998 Ch2 214nm@1.2nm	1.0000	14802026	78.67
6	CX754	35	1		8.949	50.00	2998 Ch2 214nm@1.2nm	1.0000	256136	1.36
7	CX754	35	1		9.633	50.00	2998 Ch2 214nm@1.2nm	1.0000	21477	0.11
8	CX754	35	1		10.117	50.00	2998 Ch2 214nm@1.2nm	1.0000	6149	0.03



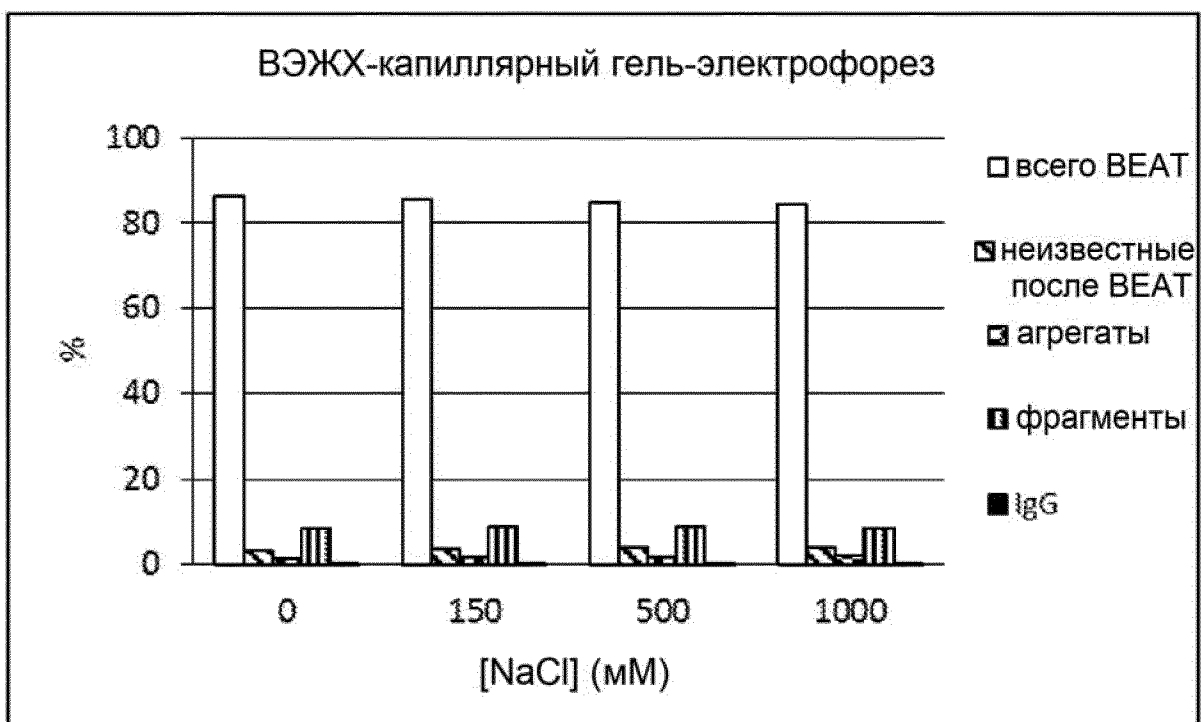
Фиг. 4



Фиг. 5



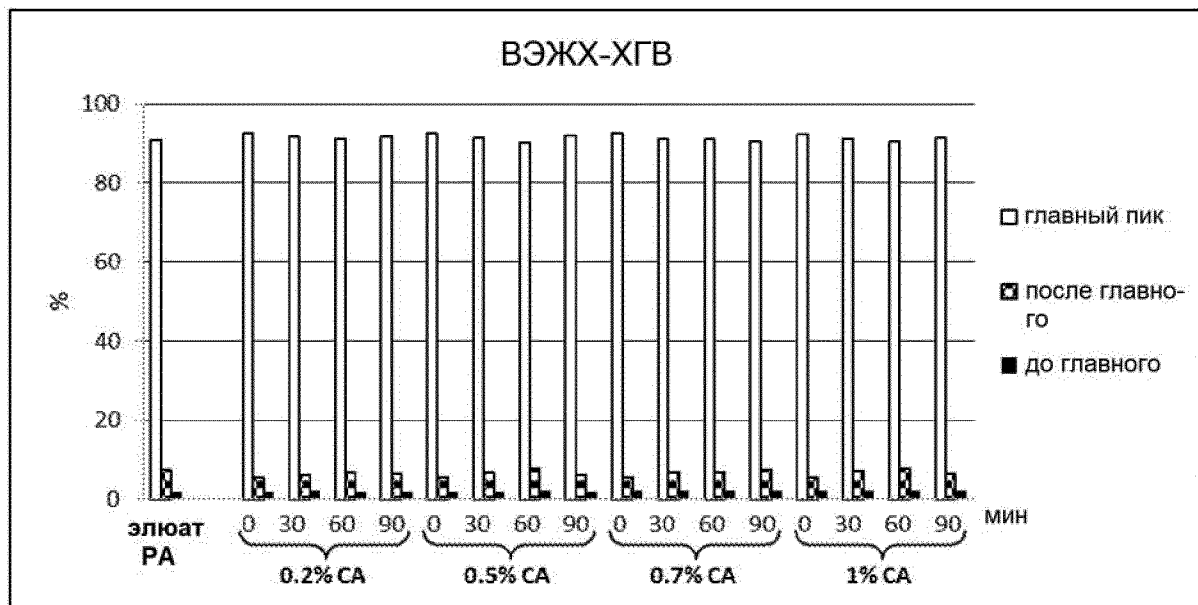
Фиг. 6



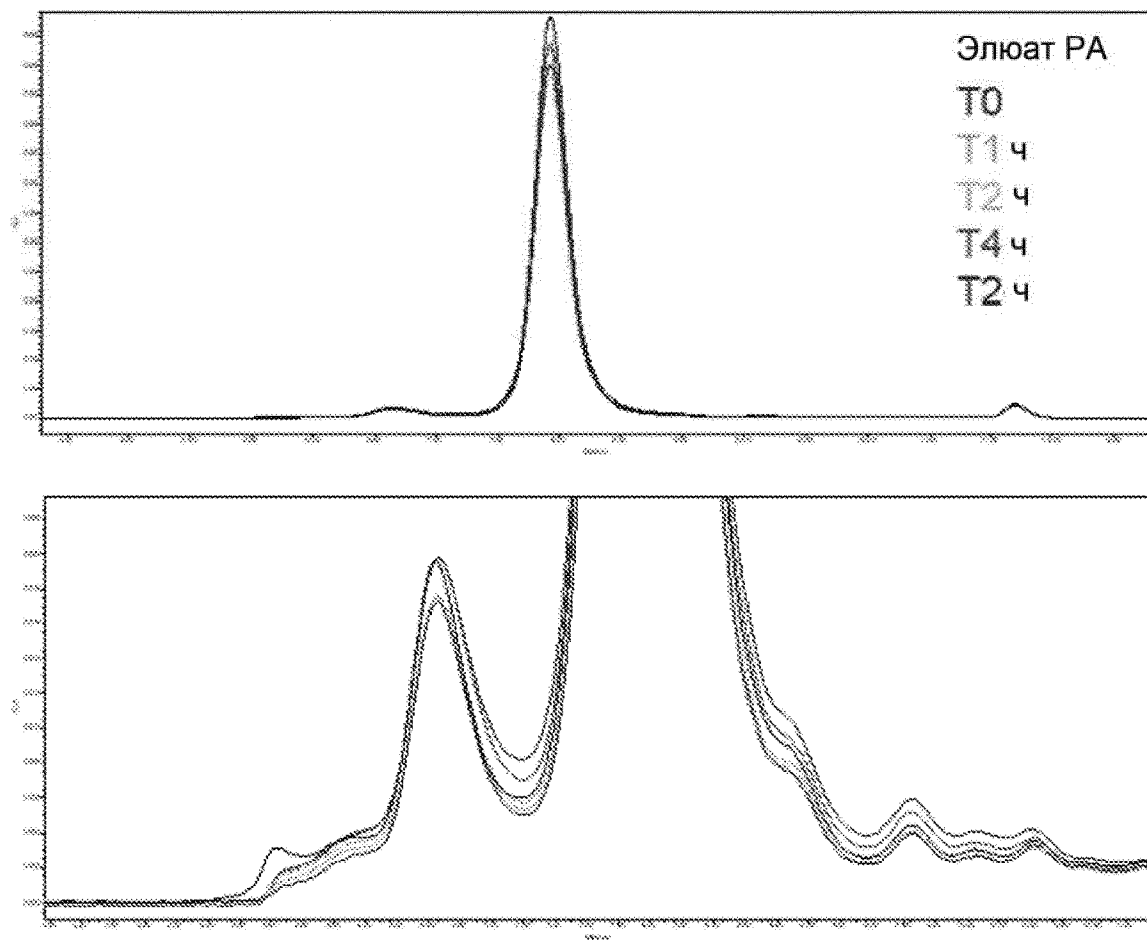
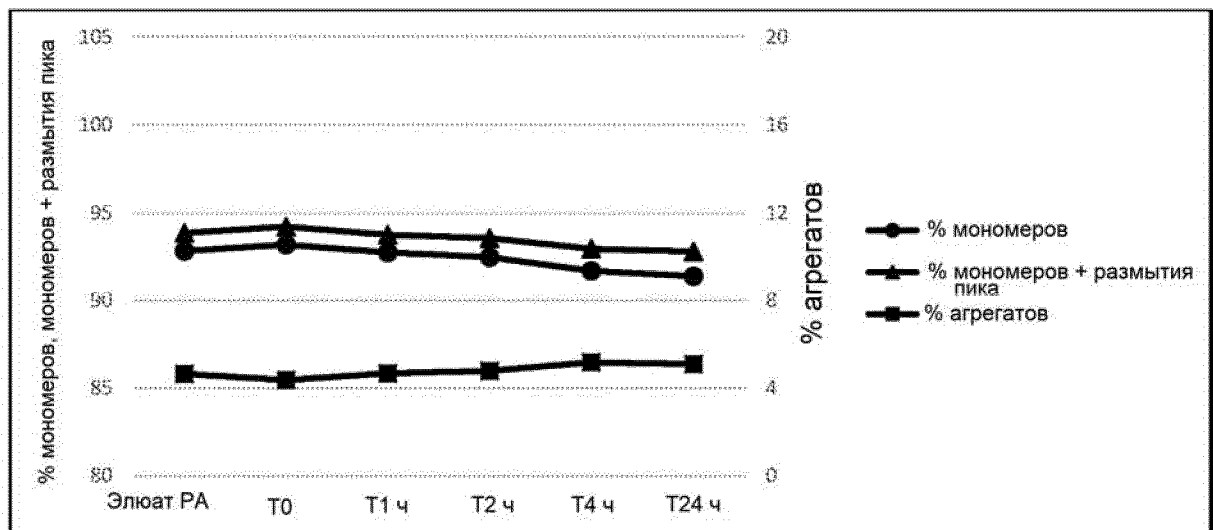
Фиг. 7



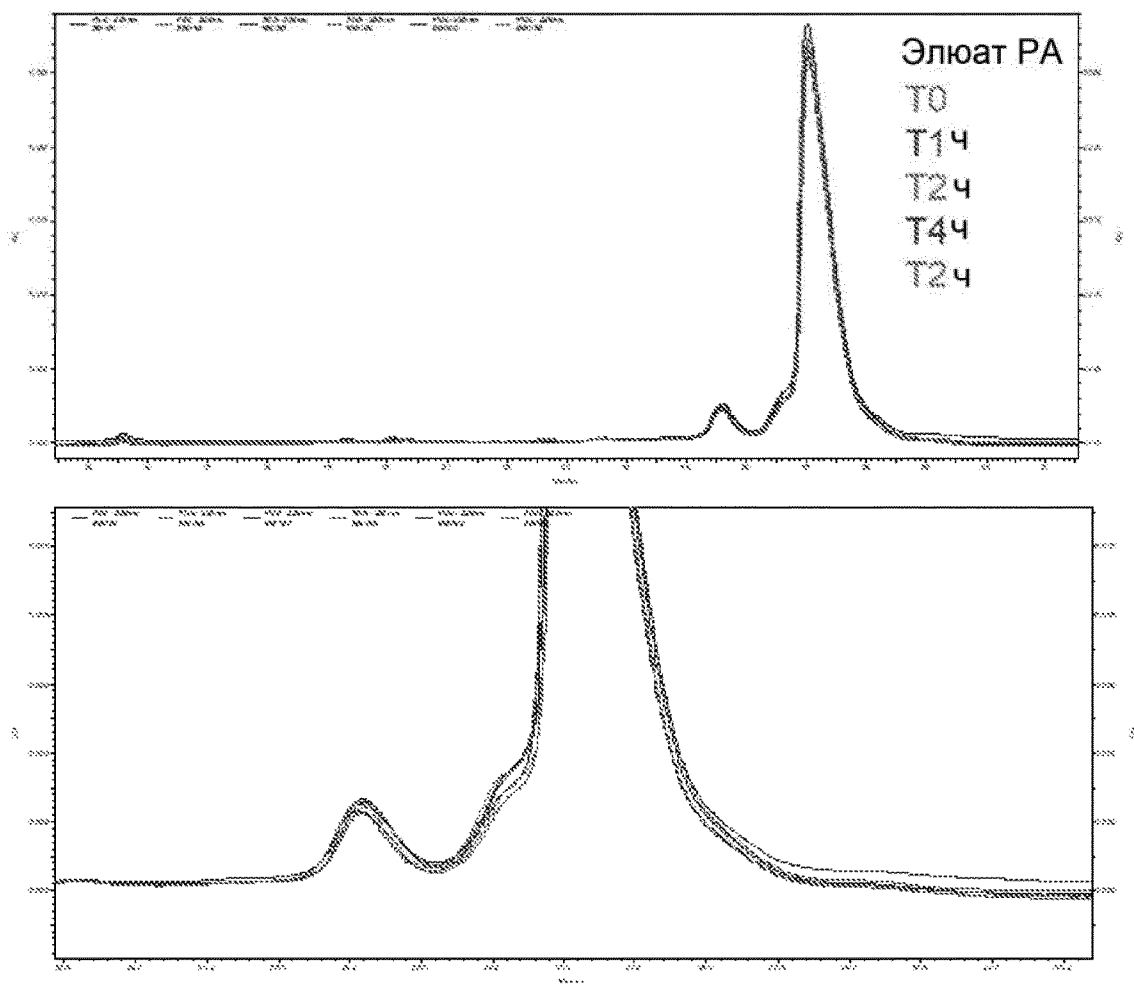
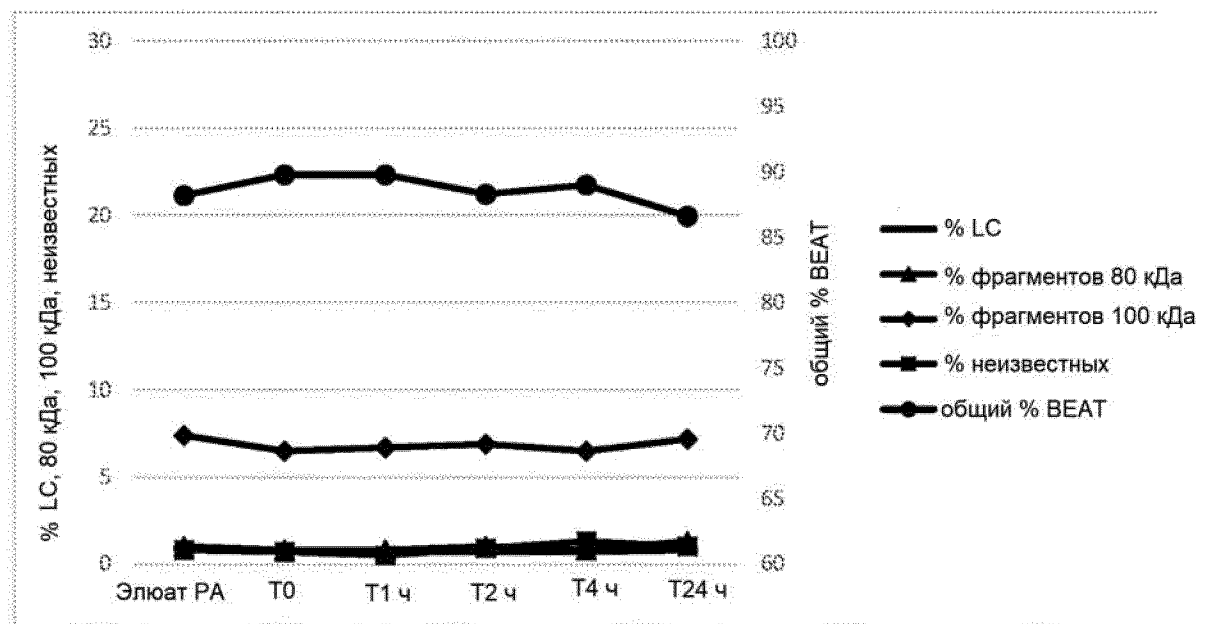
Фиг. 8



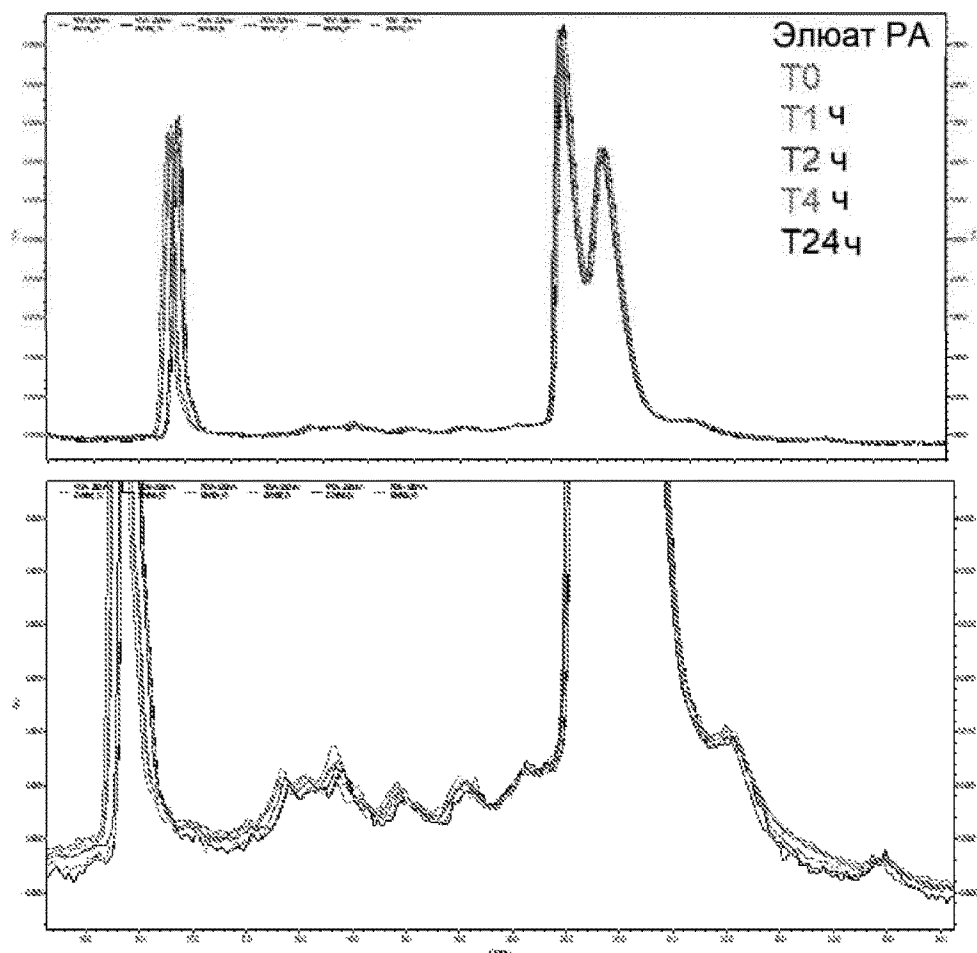
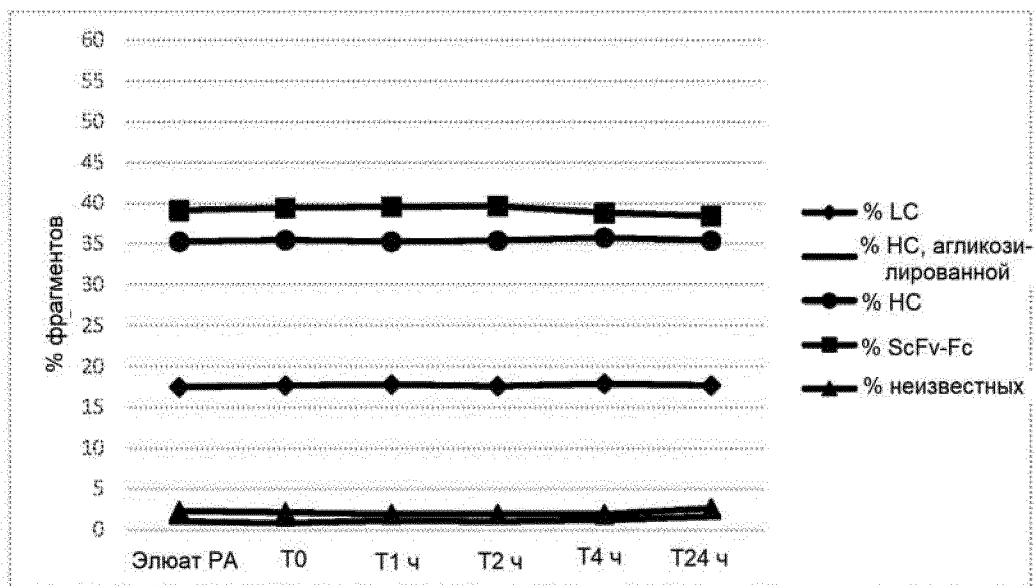
Фиг. 9



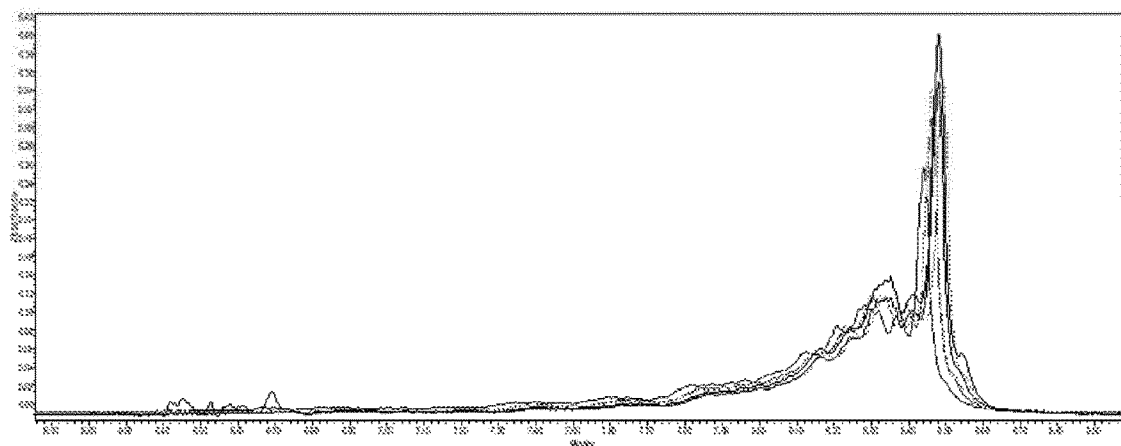
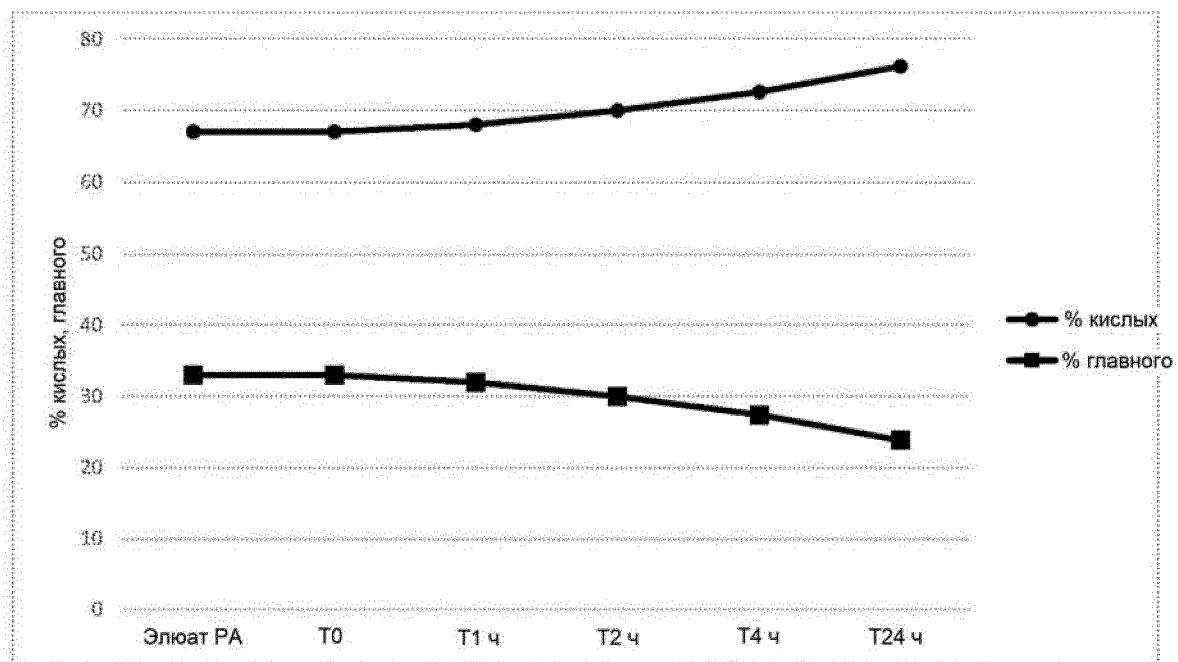
Фиг. 10



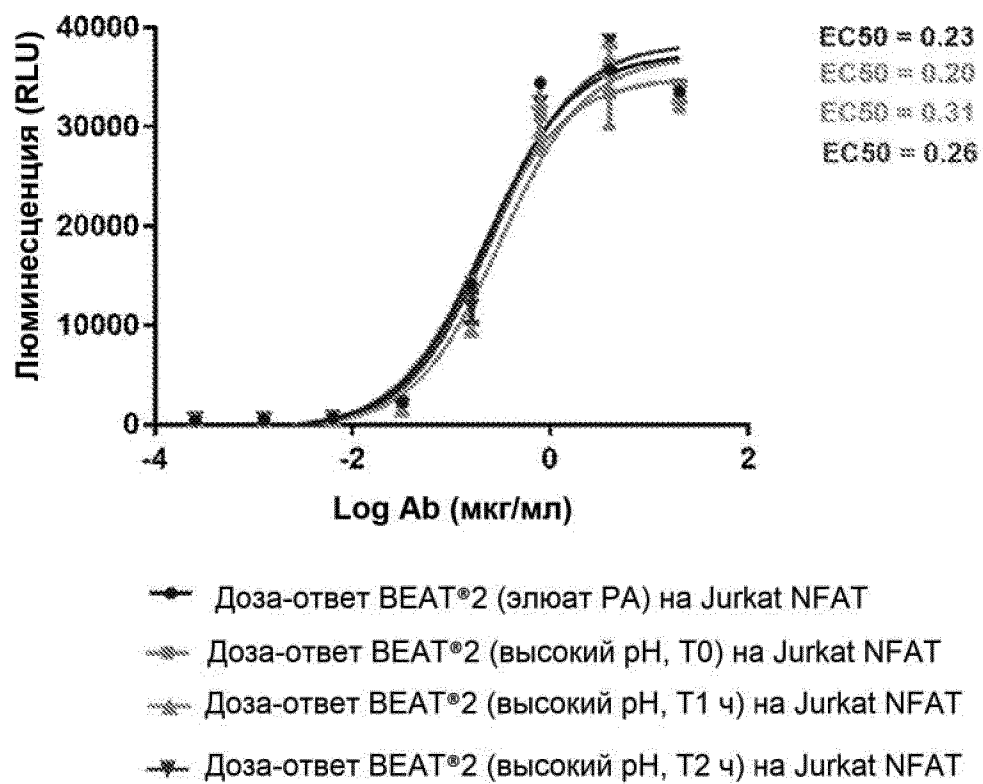
Фиг. 11



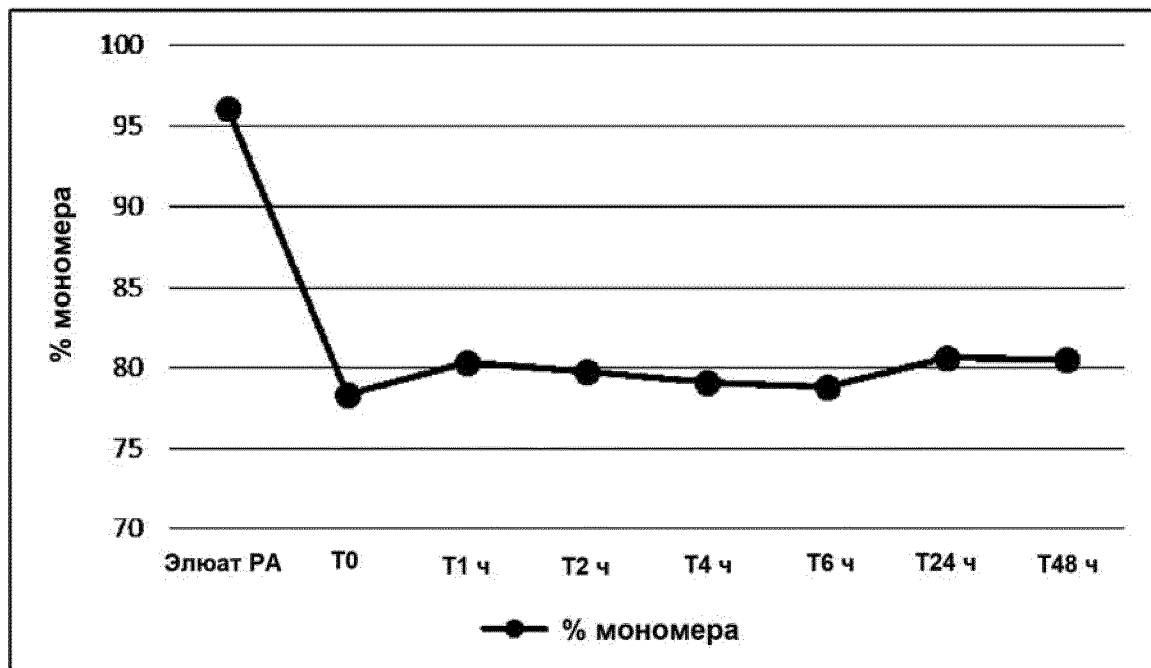
Фиг. 12



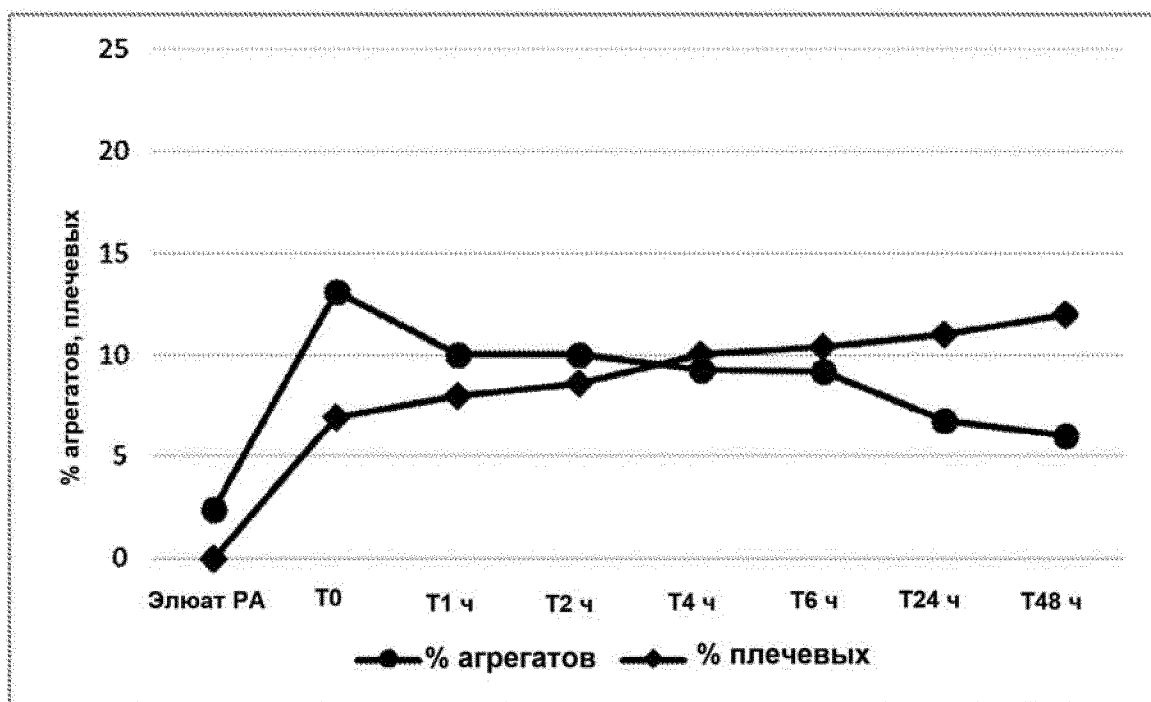
Фиг. 13



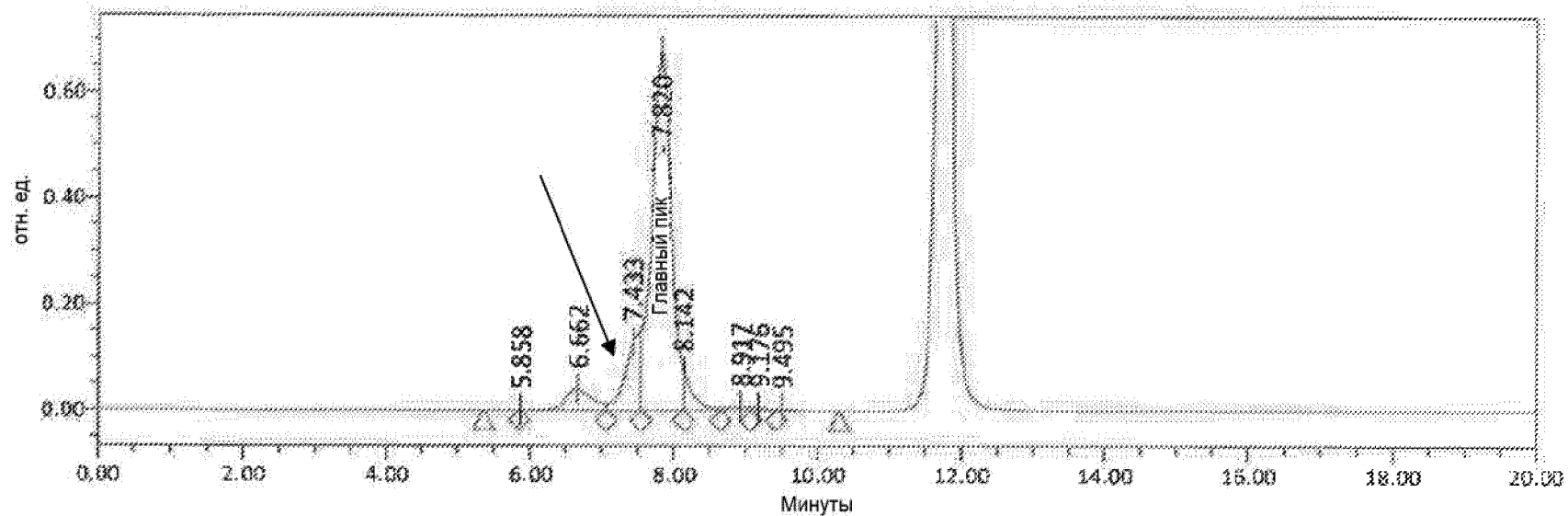
Фиг. 14



Фиг. 15



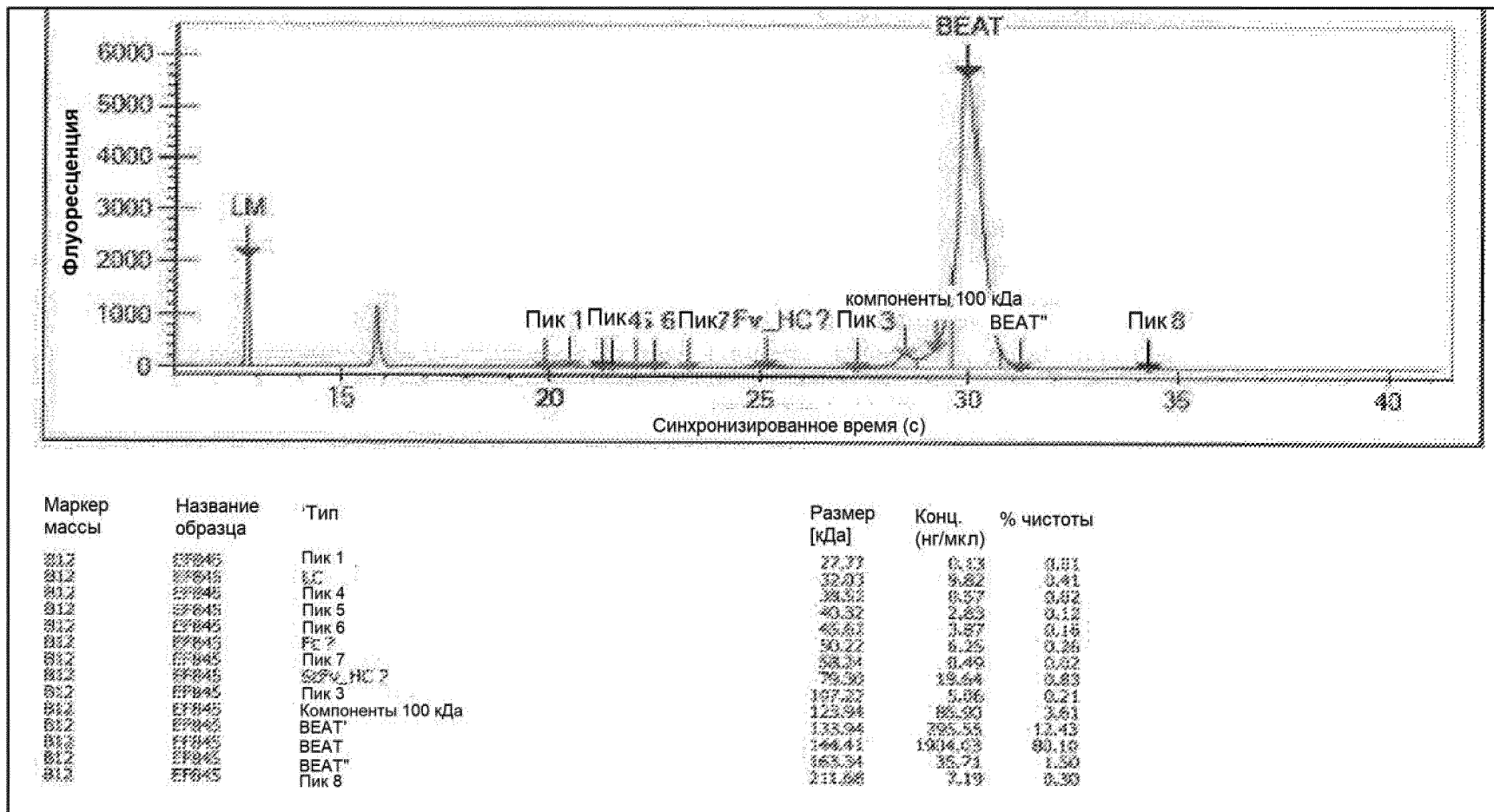
Фиг. 16



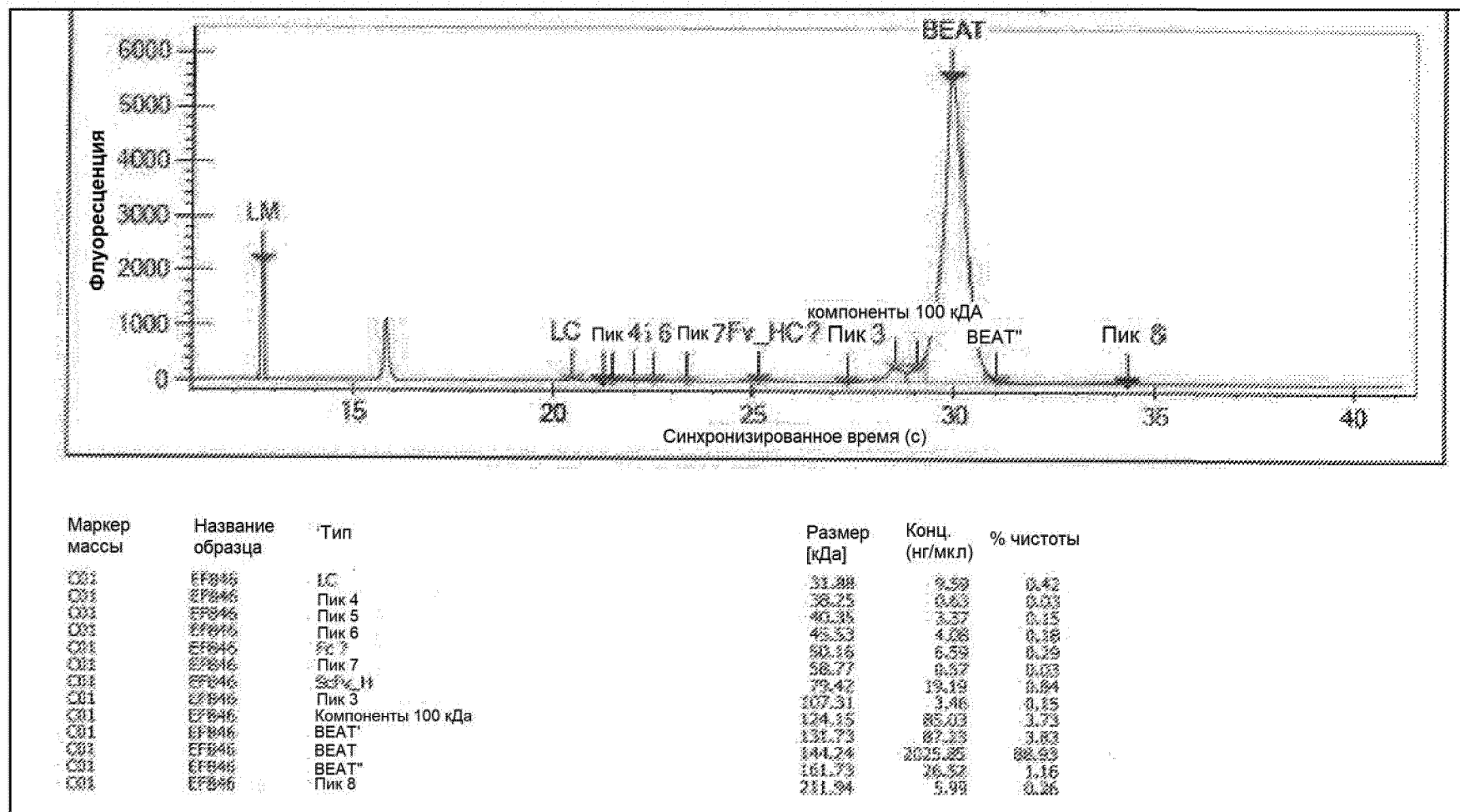
	Название образца	Название	Время удерживания (мин)	Площадь (мкВ*с)	% площади
1	EF664		5.858	7048	0.04
2	EF664		6.662	979460	5.94
3	EF664	Главный пик	7.433	1975623	11.97
4	EF664		7.820	12684483	76.88
5	EF664		8.142	589306	3.57
6	EF664		8.917	130044	0.79
7	EF664		9.176	90706	0.55
8	EF664		9.495	42951	0.26

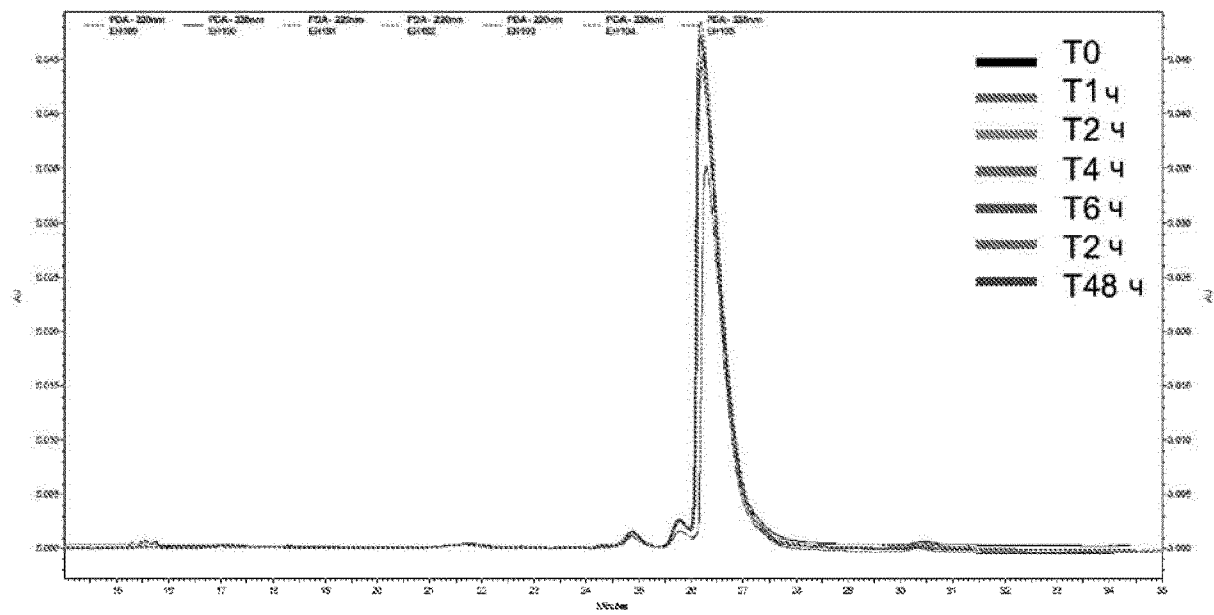
Фиг. 17

Фиг. 18

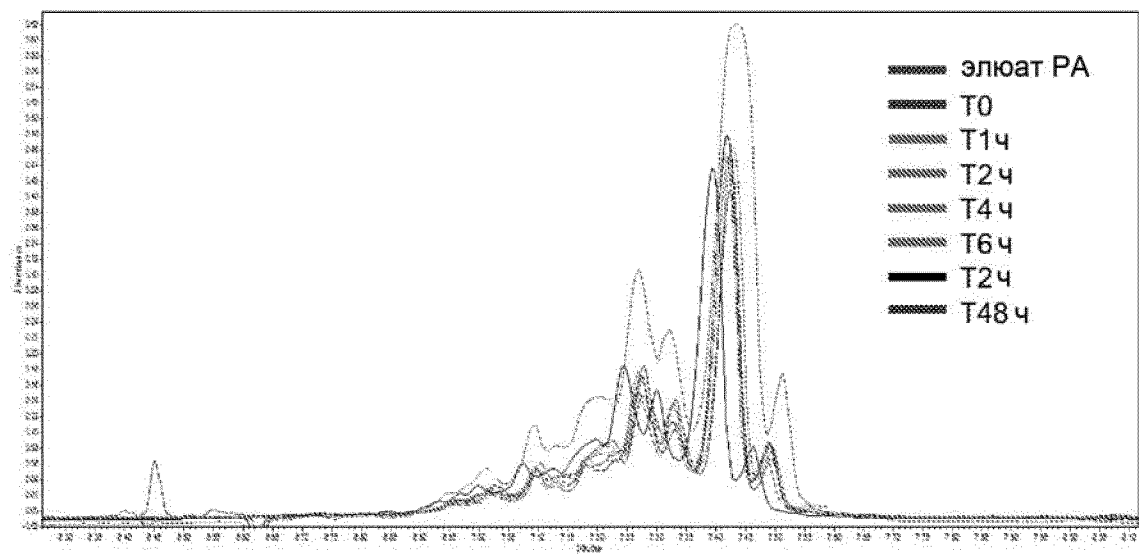


Фиг. 19

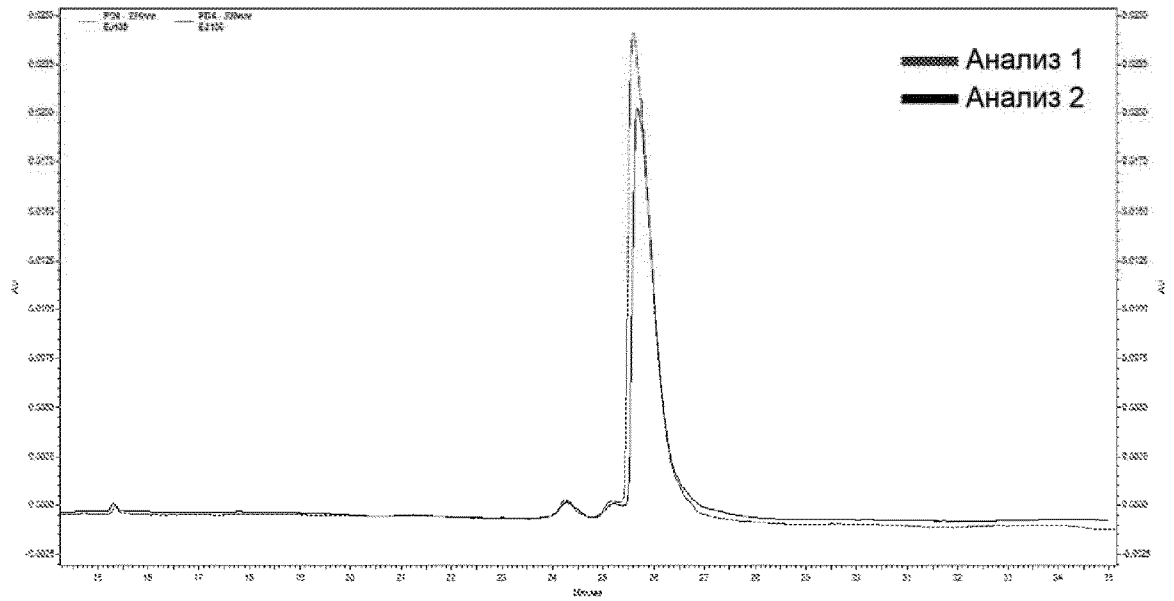




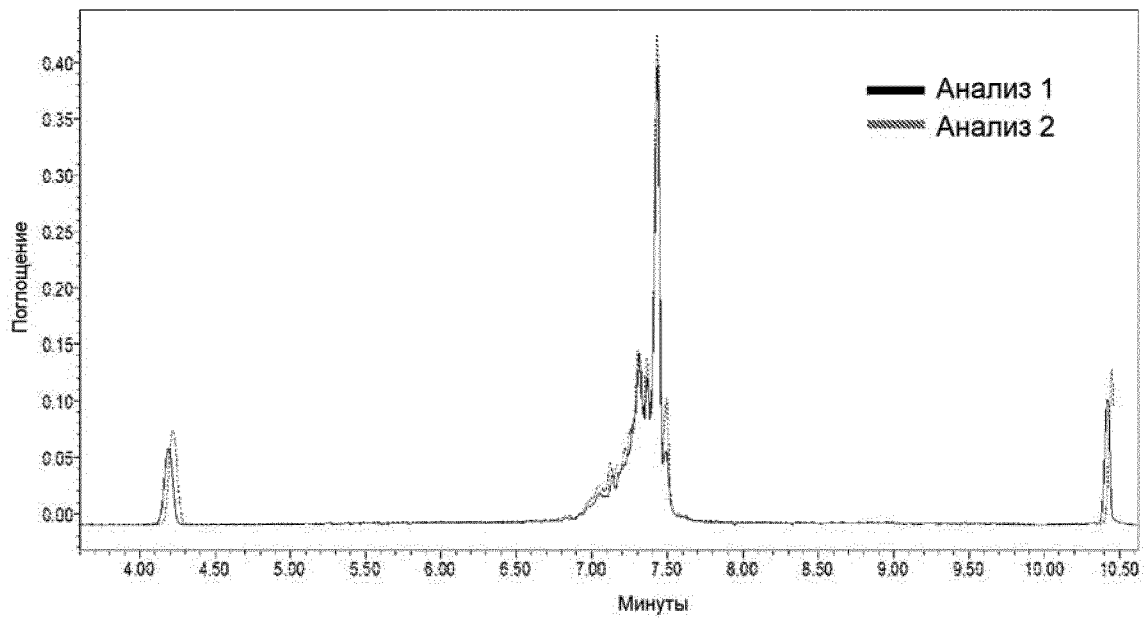
Фиг. 20



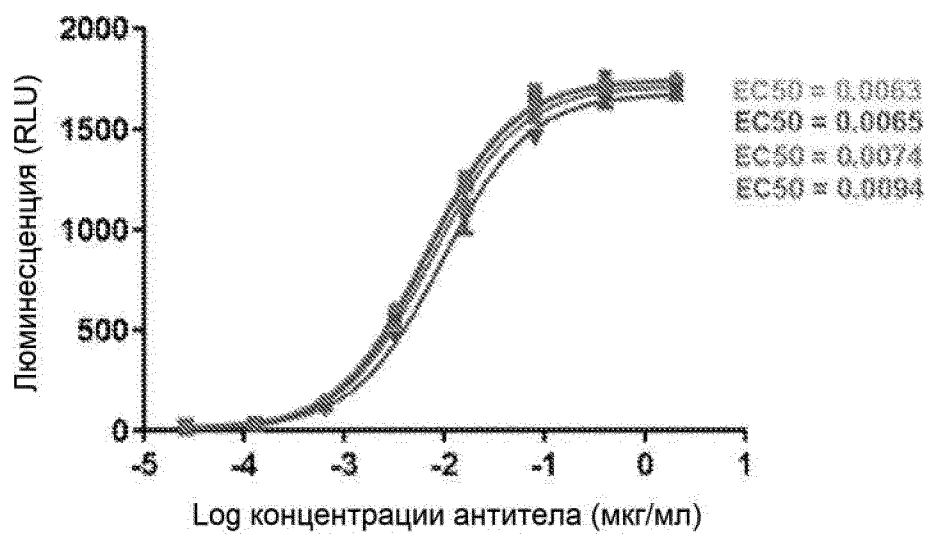
Фиг. 21



Фиг. 22

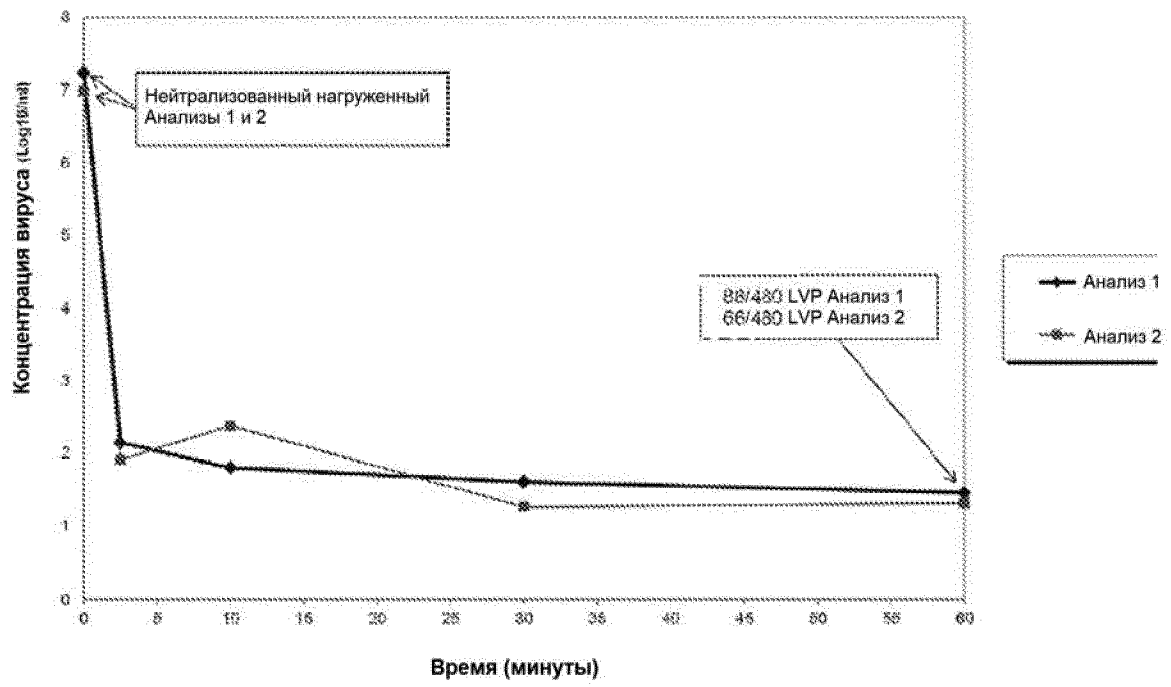


Фиг. 23

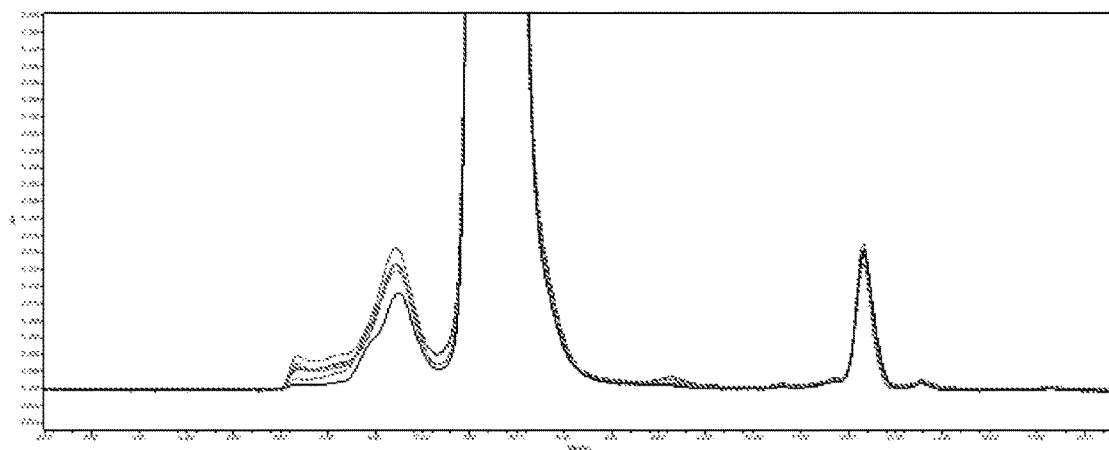
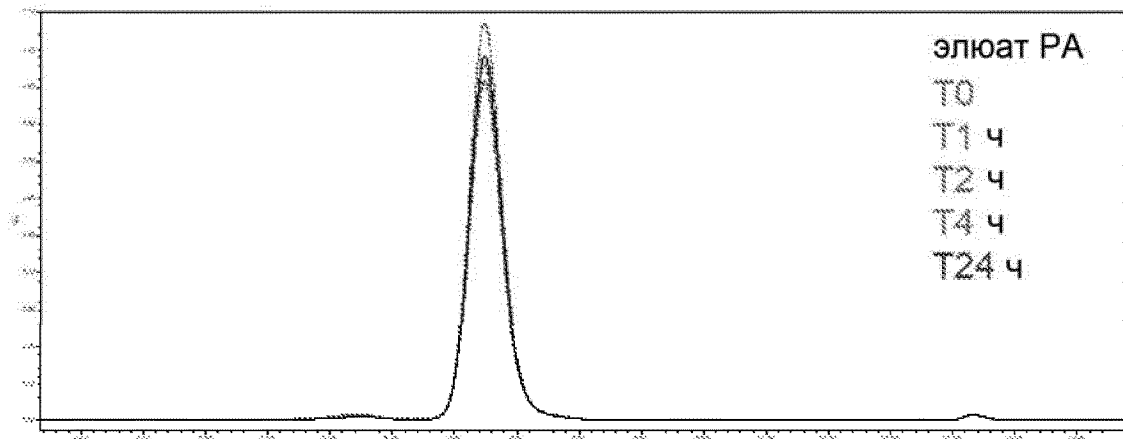
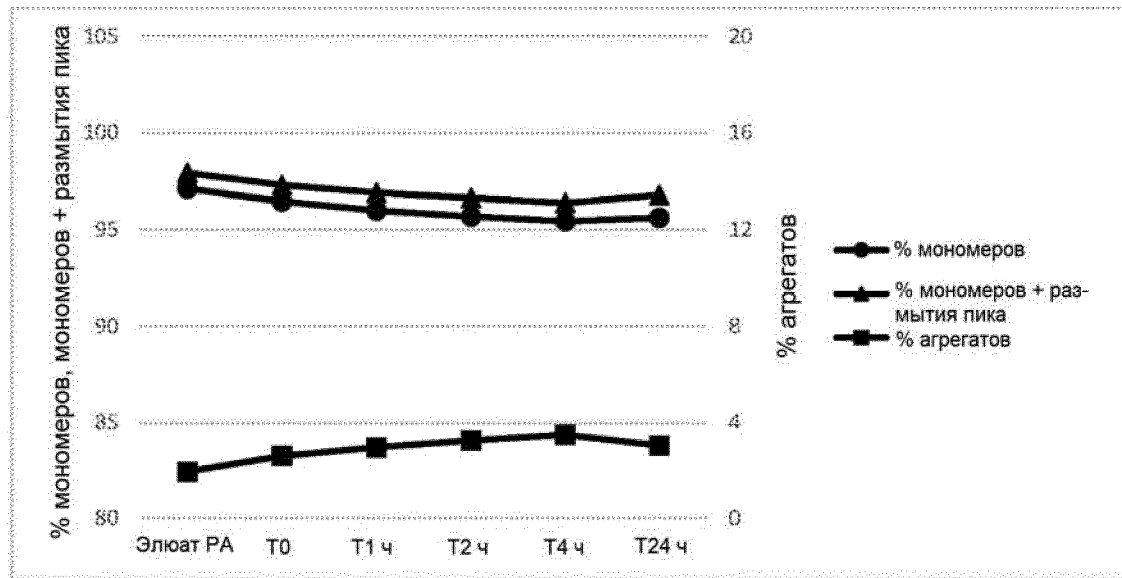


- BEAT®3, высокий pH, T0, на Jurkat-NFAT и SK-BR-3
- BEAT®3, высокий pH, T2 ч, на Jurkat-NFAT и SK-BR-3
- BEAT®3, высокий pH, T4 ч, на Jurkat-NFAT и SK-BR-3
- BEAT®3, высокий pH, T24 ч, на Jurkat-NFAT и SK-BR-3

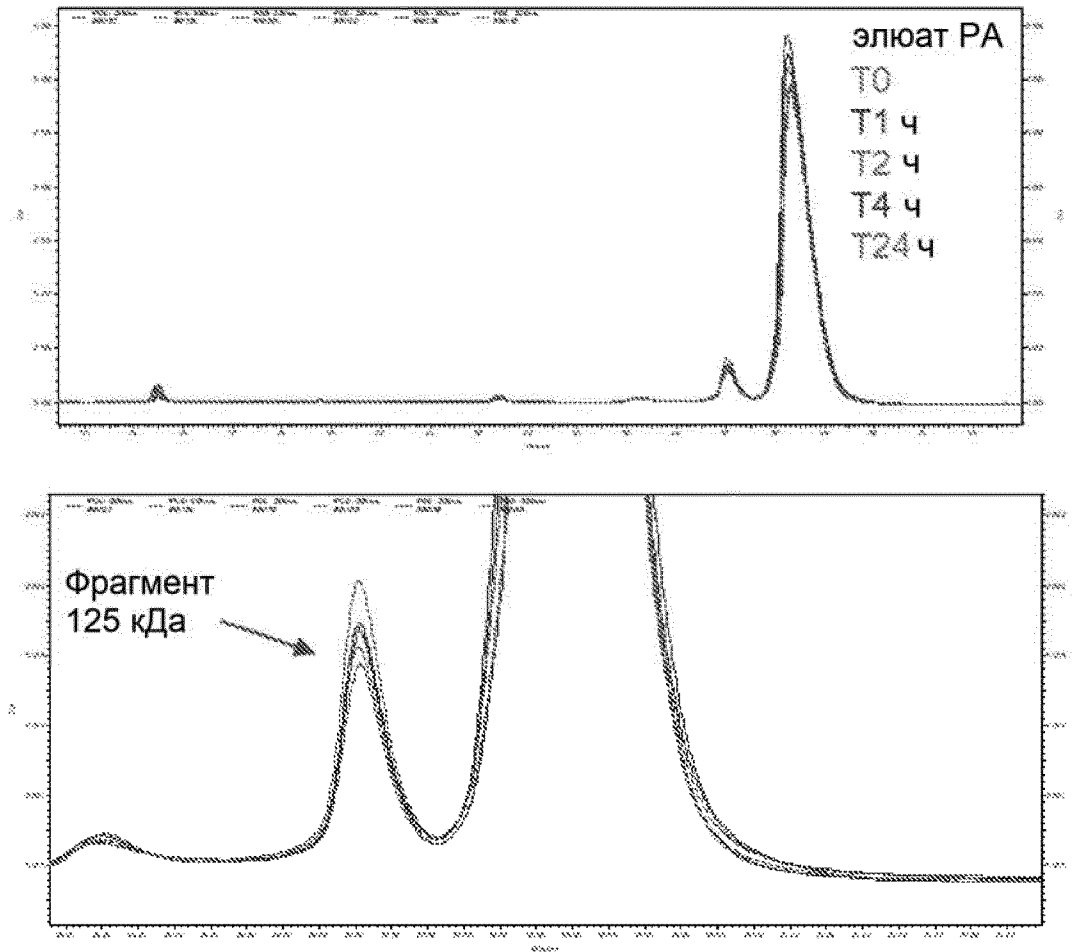
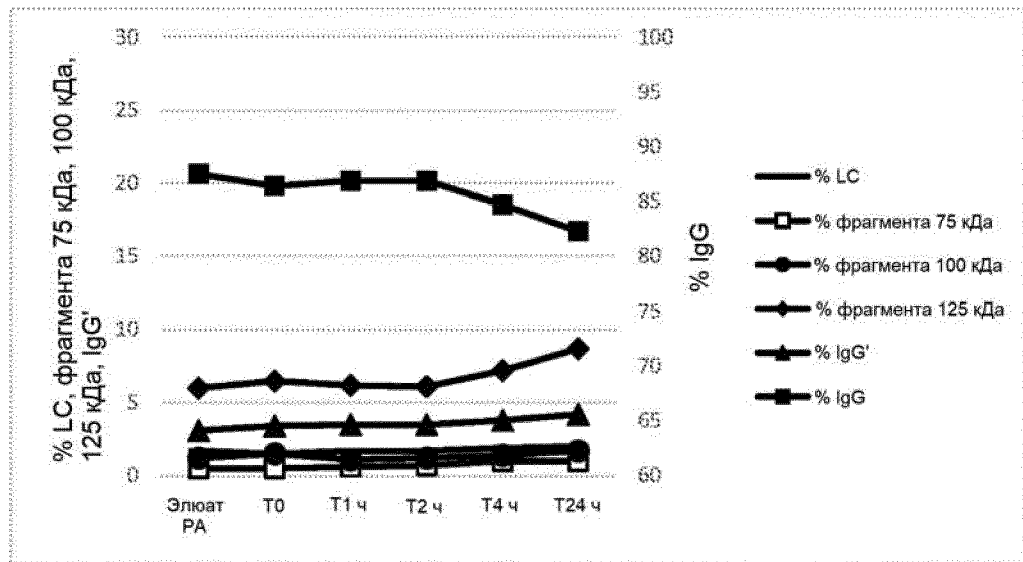
Фиг. 24



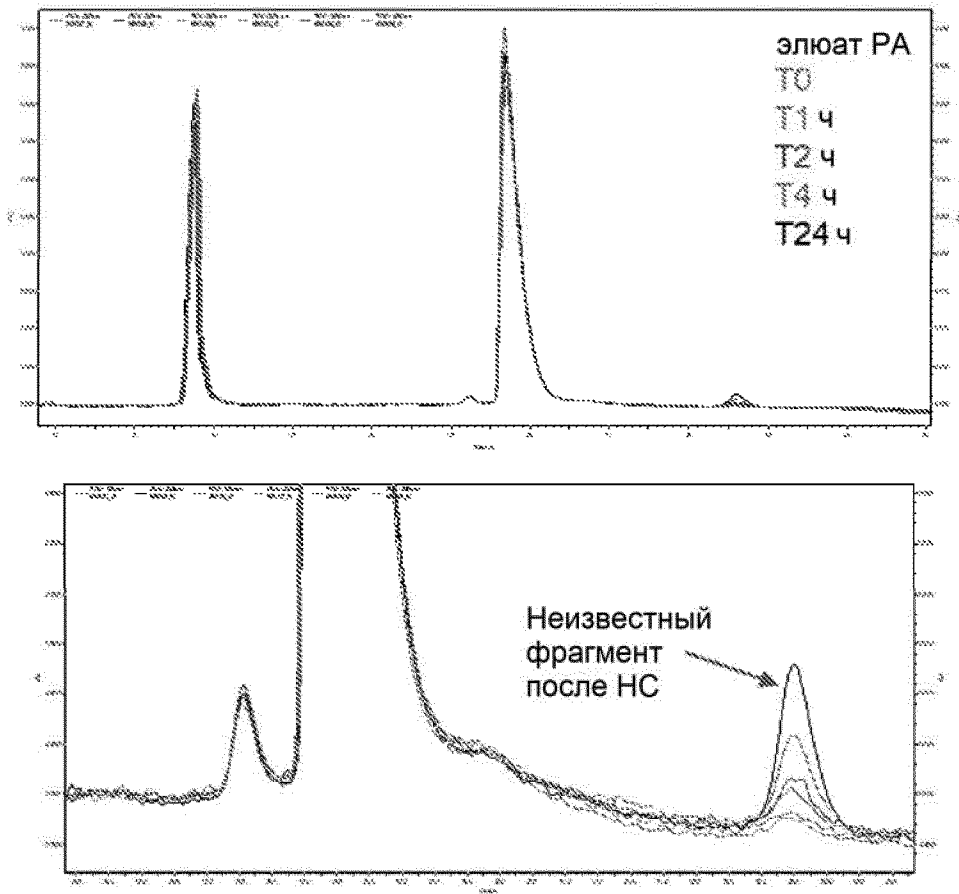
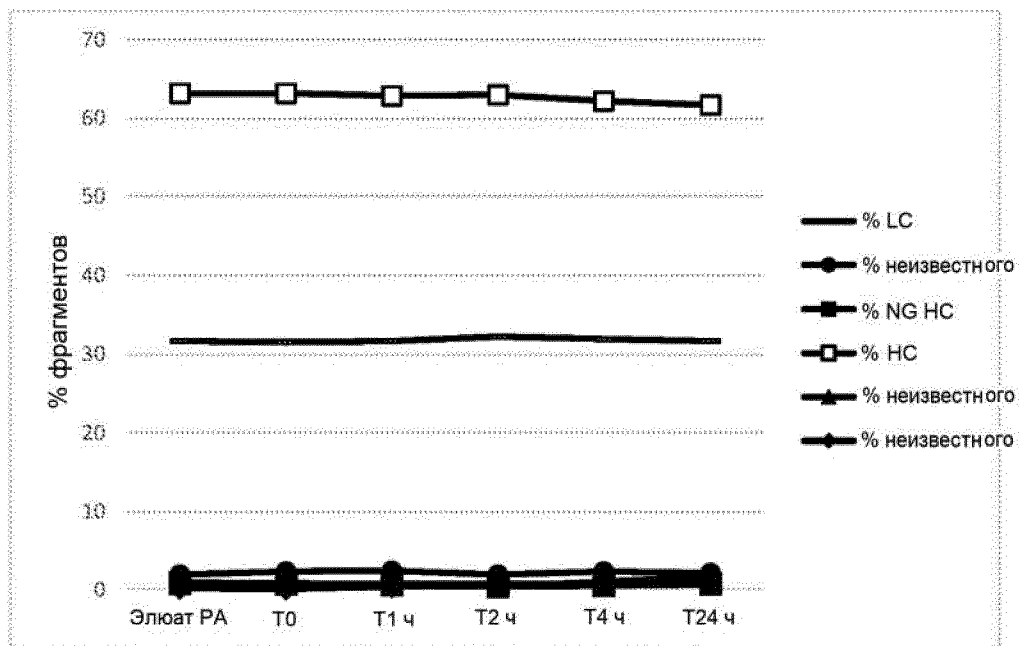
Фиг. 25



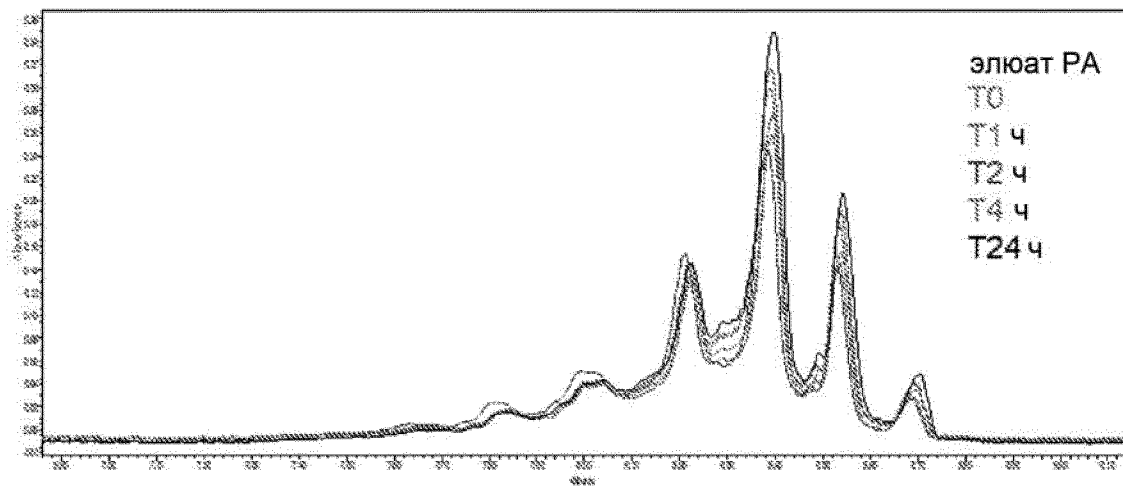
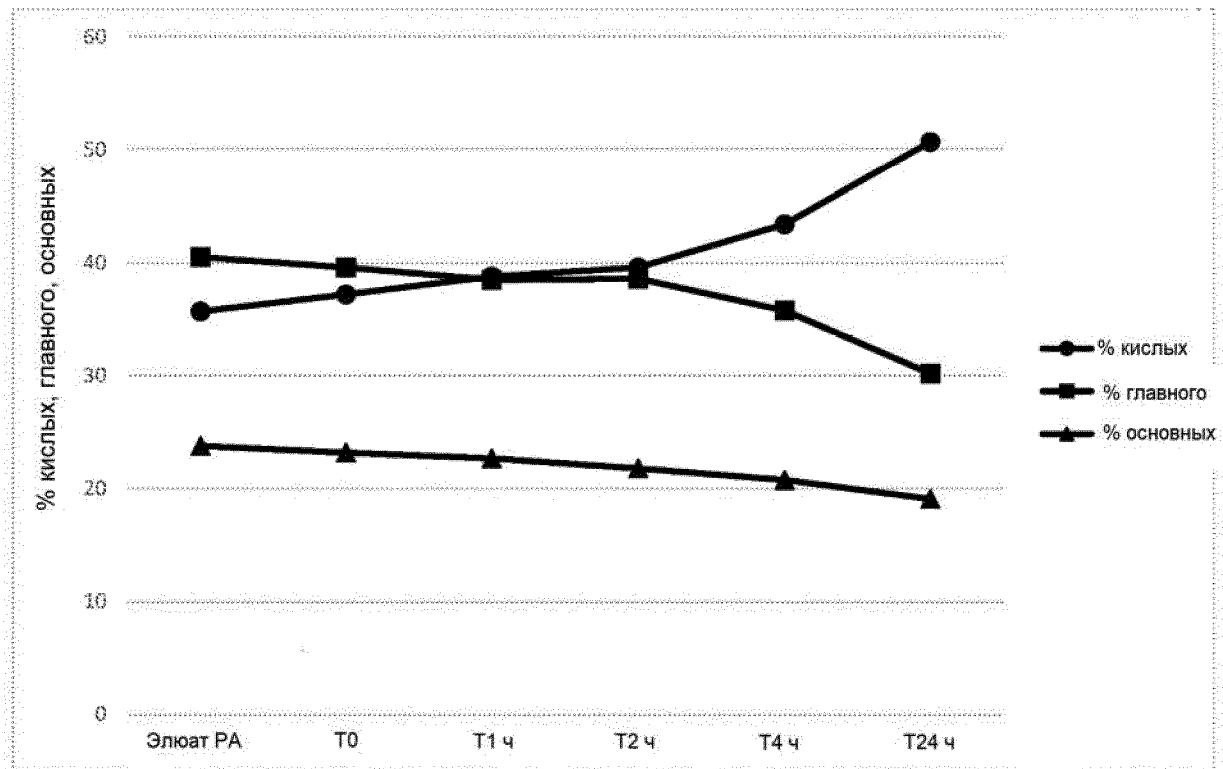
Фиг. 26



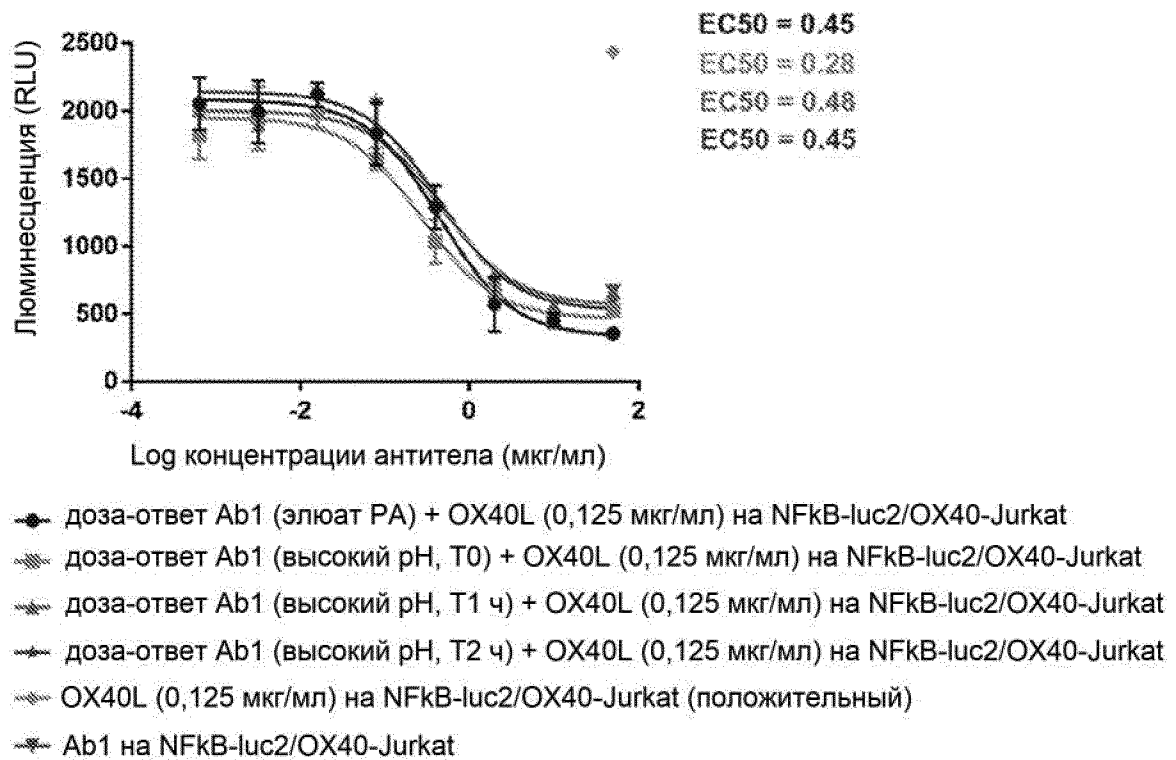
Фиг. 27



Фиг. 28



Фиг. 29



Фиг. 30