

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038538**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.09.13

(21) Номер заявки
201891878

(22) Дата подачи заявки
2017.02.17

(51) Int. Cl. **C07K 1/16** (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)

(54) **ОЧИСТКА БЕЛКОВ**

(31) **1602938.1**

(32) **2016.02.19**

(33) **GB**

(43) **2019.01.31**

(86) **PCT/EP2017/053677**

(87) **WO 2017/140881 2017.08.24**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮСБ БИОФАРМА СПРЛ (BE)

(72) Изобретатель:
Роуз Майкл Гарри (GB)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A1-2014158231**

(57) Изобретение относится к способу очистки белка, содержащему стадию полунепрерывной хроматографии, посредством которой элюат собирают и повторно загружают на хроматографическую матрицу.

B1

038538

038538
B1

Область техники

Изобретение относится к области очистки белка. Более конкретно, оно относится к способу очистки интересующего белка, такого как антитело или фрагмент антитела, с использованием стадии полунепрерывной хроматографии.

Уровень техники

Крупномасштабная экономная очистка белков становится все более важной проблемой для биотехнологической отрасли. Как правило, белки продуцируются клеточной культурой с использованием клеточных линий млекопитающих или бактерий, сконструированных для получения интересующего белка путем введения рекомбинантной плазмиды, содержащей ген этого белка. Поскольку используемые клеточные линии являются живыми организмами, их нужно подпитывать комплексной питательной средой, содержащей сахара, аминокислоты и факторы роста. Интересующий белок должен быть выделен из смеси соединений, подаваемых в клетки, и из побочных продуктов самих клеток (сырьевой поток) до чистоты, достаточной для использования в качестве терапевтического средства для человека. Установленные органами здравоохранения стандарты для белков, предназначенных для введения человеку, в отношении примесей сырьевого потока, очень высоки. Многие способы очистки белков, известные в данной области, содержат стадии, требующие применения, например, низкого или высокого рН, высокой концентрацией соли или других экстремальных условий, которые могут необратимо подвергать опасности биологическую активность белка, подлежащего очистке, и поэтому не подходят для использования. Таким образом, выделение целевого белка до достаточной чистоты представляет собой серьезную проблему. Исторически схемы очистки белка были основаны на различиях в молекулярных свойствах размера, заряда и растворимости между очищаемым белком и нежелательными белковыми загрязнителями. Протоколы, основанные на этих параметрах, включают в себя эксклюзионную хроматографию, ионообменную хроматографию, дифференциальную преципитацию и тому подобное.

Антитела и фрагменты антител приобретают все большее значение в ряде терапевтических областей. Одним из наиболее важных способов получения антител и фрагментов антител является рекомбинантная технология. Такие методы используют клетку-хозяин для экспрессии целевого антитела или того, которое затем отделяют от рабочей среды и очищают.

Антитела требуют гликозилирования и поэтому, как правило, экспрессируются в эукариотических экспрессирующих системах, использующих эукариотические клетки, в частности клетки млекопитающих, такие как клетки CHO, PER.C6, NS0, BHK или Sp2/0. В эукариотических экспрессирующих системах интересующий белок, такой как антитело, обычно секретируется в среду для культивирования клеток. Затем среду можно легко отделить от клеток, секретирующих белок, например путем центрифугирования или фильтрации.

Почти все современные платформы для промышленной очистки антител используют протеин А. Протеин А представляет собой белок клеточной поверхности, обнаруженный в клеточной стенке бактерии *staphylococcus aureus*, который связывается с частью Fc иммуноглобулина млекопитающих. Протеин А имеет высокую аффинность к человеческим IgG₁ и IgG₂ и умеренную аффинность к человеческим антителам IgM, IgA и IgE. Следовательно, очистка с протеином А плохо подходит для фрагментов антител, которые не имеют Fc-области.

С помощью аффинной хроматографии разделяют белки на основе обратимого взаимодействия между интересующим белком (или группой белков) и специфическим лигандом, связанным с хроматографической матрицей. Взаимодействие между интересующим белком и лигандом, связанным с хроматографической матрицей, может быть результатом электростатических или гидрофобных взаимодействий, сил Ван-дер-Ваальса и/или водородных связей. Чтобы элюировать молекулу-мишень из аффинной среды, взаимодействие можно обратить вспять, либо специфически, используя конкурентный лиганд, либо неспецифически путем изменения рН, ионной силы или полярности. Для аффинной очистки требуется лиганд, который может быть ковалентно присоединен к хроматографической матрице. Связанный лиганд должен сохранять свою специфическую аффинность связывания к молекулам-мишеням и после вымывания несвязанного материала связывание между лигандом и молекулой-мишенью должно быть обратимым, чтобы молекулы-мишени можно было удалить в активной форме. Несмотря на свое обычное использование, аффинная хроматография является дорогостоящей, особенно в промышленном масштабе, необходимом для очистки терапевтических белков.

Ионообменная хроматография может быть использована для очистки ионизируемых молекул. Ионизированные молекулы разделяют на основе неспецифического электростатического взаимодействия их заряженных групп с противоположно заряженными молекулами, присоединенными к твердофазной подложке, тем самым задерживая те ионизированные молекулы, которые сильнее взаимодействуют с твердой фазой. Суммарный заряд каждого типа ионизированной молекулы и ее аффинность к матрице изменяется в зависимости от числа заряженных групп, заряда каждой группы и природы молекул, конкурирующих за взаимодействие с заряженной твердофазной матрицей. Эти различия приводят к разделению различных типов молекул ионообменной хроматографией. Элюирование молекул, связанных с твердой фазой, обычно достигается за счет увеличения ионной силы (т.е. проводимости) буфера, чтобы конкурировать с растворенным веществом за заряженные участки ионообменной матрицы. Изменение рН и тем

самым изменением заряда растворенного вещества является еще одним способом достижения элюирования растворенного вещества. Изменение проводимости или pH может быть постепенным (градиентное элюирование) или ступенчатым (ступенчатое элюирование). Известны два общих типа взаимодействия: анионная обменная хроматография, опосредованная отрицательно заряженными боковыми цепями аминокислот (например, аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота), взаимодействующих с положительно заряженными поверхностями, и катионная обменная хроматография, опосредованная положительно заряженными аминокислотными остатками (например, лизин и аргинин), взаимодействующими с отрицательно заряженными поверхностями. Анионообменники можно классифицировать как слабые или сильные. Заряженная группа на слабом анионообменнике является слабым основанием, которое становится депротонированным и, следовательно, теряет заряд при высоком pH. Диэтиламиноэтил (DEAE)-целлюлоза является примером слабого анионообменника, где аминогруппа может быть положительно заряжена ниже pH ~ 9 и постепенно теряет заряд при более высоких значениях pH. Например, DEAE или диэтил-(2-гидроксипропил)аминоэтил (QAE) имеют хлорид в качестве противоиона.

Альтернативой элюированию путем увеличения ионной силы элюирующего буфера (элюирующая хроматография) является элюирование с использованием молекул, которые имеют более высокую динамическую аффинность к неподвижной фазе, чем связанный белок. Этот способ проведения ионообменной хроматографии называется вытеснительной хроматографией.

Вытеснительная хроматография принципиально отличается от любых других способов хроматографии тем, что растворенное вещество не десорбируется в модификаторе подвижной фазы и разделяется по различиям в скоростях миграции. При вытеснении молекулы вынуждены мигрировать вниз по хроматографической колонке с помощью продвигающегося фронта молекулы вытеснителя, которая имеет более высокую аффинность к неподвижной фазе, чем любой компонент из сырьевого потока. Именно эта вынужденная миграция приводит к более высоким концентрациям и чистоте продукта по сравнению с другими режимами работы с высоким удерживанием, за которым следует постоянная инфузия раствора-вытеснителя в колонку.

Хроматографические матрицы, используемые для различных методов хроматографии, особенно для крупных промышленных процессов очистки, являются очень дорогостоящими. Они обычно используются повторно после очистки. Из-за жесткого характера используемых чистящих средств эффективность хроматографической матрицы уменьшается с течением времени. Как правило, хроматографические матрицы не используются очень эффективно в данной области техники, так как не используется их полная максимальная емкость связывания белка. В данной области используют хроматографические матрицы, которые загружают интересующим белком ниже их полной емкости для улучшения выхода. Когда белковые матрицы загружают интересующим белком соответственно их полной емкости, в элюате теряется много интересующего белка. Из-за высоких затрат и ограниченного срока службы хроматографических матриц в данной области существует потребность в способах с оптимальным использованием хроматографической матрицы.

Неочищенные белковые препараты из крупномасштабных процессов культивирования клеток обычно не могут быть очищены за один цикл очистки. Из-за количества белка, подлежащего очистке, для очистки продукта клеточной культуры требуется несколько циклов одного и того же процесса очистки. Таким образом, белковая смесь, подлежащая очистке, часто подвергается периодической очистке с несколькими циклами очистки, включая также многочисленные циклы хроматографии. Непрерывные процессы также были реализованы в крупных производственных процессах для биофармацевтических препаратов. При непрерывной хроматографии несколько идентичных колонок соединены в устройстве, которое позволяет использовать колонки последовательно и/или параллельно в зависимости от требований метода. По сравнению с однократной колоночной или периодической хроматографией, где один хроматографический цикл основан на нескольких последовательных этапах, таких как загрузка, промывка, элюирование и регенерация, при непрерывной хроматографии на основе нескольких идентичных колонок все эти стадии происходят одновременно, но на разных колонках каждый. Непрерывная хроматографическая операция приводит к лучшему использованию хроматографической смолы, сокращению времени обработки и снижению требований к буферу, и все это приносит экономическую пользу процессу. Конкретный способ работы с непрерывной хроматографией называется хроматографией с псевдодвижущимся слоем (SMB). В хроматографии с псевдодвижущимся слоем все хроматографические колонки, составляющие систему, периодически и одновременно перемещаются в направлении, противоположном потоку образца. Движение колонок осуществляется путем соответствующего перенаправления входного и выходного потока в/из колонок, что требует сложной настройки.

В данной области техники был описан полунепрерывный процесс хроматографии, в котором вместо одной крупной хроматографической колонки использовали ряд из нескольких меньших колонок, которые загружали до более высокой емкости связывания. Элюат каждой колонки непосредственно загружали на следующую колонку. Альтернативно, элюат первой колонки направляли обратно в первый контейнер, содержащий смесь с интересующим белком, а затем повторно загружали в первую колонку (Mahajan, George et al. 2012).

Использование нескольких хроматографических колонок подряд требует сложного устройства

управления потоком и программного обеспечения для управления, а также дополнительного оборудования для хроматографии, включая насосы, клапаны, детекторы и корпус для каждой дополнительной колонки, что увеличивает стоимость, увеличивает вероятность отказа деталей, увеличивает сложность проверки процессов и усложняет диагностику ошибок. Кроме того, чтобы выровнять элюат из одной колонки с правильным периодом в последовательности для соседней приемной колонки, необходимо ввести периоды задержки такие, чтобы они совпадали, что уменьшает скорость работы. Поскольку каждая дополнительная приемная колонка должна запускаться и останавливаться в шахматном порядке, то в результате этого в колонках, которые неактивны в течение этих периодов, каждый раз, когда операция завершается или перезапускается, возникают дополнительное ограничение производительности.

Поэтому в данной области техники все еще существует потребность в простых, эффективных и экономически выгодных способах очистки белков с использованием хроматографических матриц.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к вышеуказанной потребности с предоставлением нового способа очистки интересующего белка, причем способ включает более эффективное и экономичное использование хроматографических матриц при сохранении или улучшении выхода и чистоты очищаемого белка.

Поэтому в первом аспекте настоящее изобретение относится к способу очистки интересующего белка из смеси, включающему стадии:

а) загрузки в рабочем хроматографическом цикле первого объема смеси, содержащей интересующий белок, из первого контейнера, на хроматографическую матрицу, работающую так, что белок связывается с хроматографической матрицей до достижения 40-100%, 50-100%, 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 70-90% или 70-80%, 60-90%, 60-80% максимальной емкости статического связывания хроматографической матрицы;

б) сбора элюата, содержащего несвязанный интересующий белок, во втором контейнере; и

с) повторной загрузки в следующем рабочем хроматографическом цикле элюата из второго контейнера и загрузки второго объема интересующего белка из первого контейнера на одну и ту же хроматографическую матрицу, работающую таким образом, что интересующий белок связывается с хроматографической матрицей до достижения 40-100%, 50-100%, 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 70-90% или 70-80%, 60-90%, 60-80% емкости статического связывания хроматографической матрицы.

Во втором аспекте изобретение относится к способу очистки интересующего белка из смеси, включающему стадии:

а) загрузки в рабочем хроматографическом цикле первого объема смеси, содержащего интересующий белок, из первого контейнера на хроматографическую матрицу, работающую так, что емкость динамического связывания хроматографической матрицы превышена;

б) сбора элюата, содержащего несвязанный интересующий белок, во втором контейнере, и

с) повторной загрузки в следующем рабочем хроматографическом цикле элюата из второго контейнера и загрузки второго объема интересующего белка из первого контейнера на ту же хроматографическую матрицу, работающую так, что емкость динамического связывания хроматографической матрицы превышена.

В следующем варианте осуществления изобретение относится к способу согласно второму аспекту, где на стадии (а) загрузка интересующего белка прекращается, когда достигается по меньшей мере 40% 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% максимальной емкости статического связывания.

В следующем варианте осуществления первого или второго аспекта настоящее изобретение относится к способу, в котором сбор элюата начинают при первой заданной концентрации интересующего белка в элюате и прекращают при второй заданной концентрации интересующего белка в элюате.

В следующем варианте осуществления первого или второго аспекта изобретение относится к способу, в котором хроматографию выбирают из аффинной хроматографии, такой как хроматография с Протеином А, анионной или катионообменной хроматографии, хроматографии гидрофобного взаимодействия, хроматографии в смешанном режиме, такой как хроматография с гидроксипатитом, хиральной хроматографии или диэлектрической хроматографии.

В следующем варианте осуществления первого или второго аспекта настоящее изобретение относится к способу, в котором одна, две, три или все хроматографические матрицы для одной, двух, трех, четырех или всех стадий хроматографии представляют собой хроматографическую колонку (колонки).

В следующем варианте осуществления первого или второго аспекта настоящее изобретение относится к способу, в котором интересующий белок представляет собой антитело или фрагмент антитела.

В следующем варианте осуществления первого или второго аспекта настоящее изобретение относится к способу получения интересующего белка, включающему способ очистки согласно вариантам осуществления изобретения.

В следующем варианте осуществления первого или второго аспекта изобретение относится к белку, полученному способом получения интересующего белка, включающим способ очистки согласно вариантам осуществления изобретения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана схематическая диаграмма установки полунепрерывного процесса. Различные

жидкие буферные компоненты удерживаются в резервуарах и последовательно прокачиваются через клапан через пористую хроматографическую матрицу. После выхода из матрицы элюат проходит через детектор, который анализирует элюат. Элюат затем направляется либо для сбора, если он содержит интересующий белок в соответствующем количестве, или для сброса. В настоящем изобретении элюат может альтернативно быть направлен в отдельный резервуар рециркуляции. Содержимое этого резервуара затем может последовательно закачиваться обратно на хроматографическую матрицу вместе со свежей загрузкой в один из следующих рабочих хроматографических циклов;

на фиг. 2 - распределение концентрации интересующего белка (целевое соединение) при перегрузке хроматографической матрицы. При загрузке иммобилизованной хроматографической матрицы в динамических условиях, таких как непрерывный поток загрузочного материала, целевое соединение в потоке первоначально полностью связано матрицей. Однако по мере того как емкость матрицы для целевого соединения постепенно заполняется, часть целевого соединения связывается, а другая часть протекает и вытекает вместе с другими нежелательными белками в загрузочном потоке (например, белок клеточного происхождения или побочные белковые продукты) и сходит в элюате. Через некоторое время матрица становится полностью насыщенной целевым соединением и больше не может связываться, и все целевое соединение и любой дополнительный загрузочный материал остаются несвязанными и проходят через матрицу;

на фиг. 3 - распределение концентрации интересующего белка (целевое соединение) при перегрузке хроматографической матрицы контролируемым образом. Хроматографическую матрицу можно загружать загрузочным материалом, содержащим целевое соединение, до тех пор пока значительная часть не пройдет через матрицу без связывания, в то время как некоторое дополнительное количество целевых соединений продолжает связываться. Степень этой перегрузки не обязательно должна достигать насыщения. Этот перегружающий материал, содержащий несвязанное целевое соединение, может быть направлен в контейнер для рециркуляции, а часть, которая собирается, не обязательно включает всю фракцию и может начинаться после того, как целевое соединение начнет протекать, и заканчиваться до того, как новое целевое соединение перестанет протекать;

на фиг. 4 - схема способа по изобретению. Типичное хроматографическое разделение может включать стадию связывания, где интересующий белок (целевое соединение) связывается с иммобилизованной матрицей, и стадию элюирования, где целевое соединение химически удаляется из матрицы. Между ними обычно проводят стадии промывки и кондиционирования для удаления других примесей и поддержания качества матрицы, в течение которых эти материалы обычно направляются на сброс. В новом способе согласно настоящему изобретению загрузку, содержащую целевое соединение, производят до тех пор, пока не будет его утечки. Часть этого удерживается в контейнере для рециркуляции. В последующем цикле в способе по изобретению ее повторно наносят на матрицу перед нанесением дополнительного загрузочного материала, содержащего целевое соединение. Опять же, его наносят до тех пор, пока матрица не будет перегружена, и пока нет утечки целевого соединения. Затем его направляют в контейнер для рециркуляции. Этот процесс повторяют в течение как можно большего количества циклов, затем в конечном цикле наносят меньшее количество свежей загрузки и никакой рециркуляции не проводят;

на фиг. 5 - хроматографический график (хроматограмма) измерений из потока элюата, выходящего из хроматографической колонки, с нанесенным объемом по оси x, измеренной УФ-интенсивностью на левой оси и проводимостью на правой оси. В этом примере колонка, заполненная до высоты 20 см с матрицей Capto S (GE Healthcare), перегружается при 900 см/ч;

на фиг. 6 - математическая модель реального эксперимента проскока целевого продукта Fab, загруженного с титром 1,66 мг/мл на колонку Capto S высотой 20 см при 900 см/ч до полного насыщения, при этом модель оптимизировали к данным по нормализованной абсорбции проскока при 290 нм с вычитанием исходных данных;

на фиг. 7 - реальный пример математически оптимизированной степени перегрузки для целевого Fab на колонке Capto S при 900 см/ч с равномерной расчетной загрузкой для производительности (продукт/время) и производительной способности (количество продукта/время/матрица), заштриховано черным. Соответствующая зона сбора для рециркуляции показана в виде серой линии, математически оптимизированная с допустимой потерей продукта до 2%;

на фиг. 8 - таблица параметров рабочего блока в объемах колонки для каждого из трех типов циклов (начальный цикл, рабочий цикл и конечный цикл), оперируя в предложенной методологии;

на фиг. 9 - хроматограмма работы начального цикла в способе согласно изобретению с абсорбцией, показанной на левой оси, проводимостью, показанной на правой оси, и объемом, показанном на оси x;

на фиг. 10 - три наложенные хроматограммы работы 2-, 3- и 4-го циклов в способе согласно изобретению с абсорбцией, показанной на левой оси, проводимостью, показанной на правой оси, и объемом, показанным на оси x;

на фиг. 11 - хроматограмма работы пятого и конечного циклов в способе согласно изобретению с абсорбцией, показанной на левой оси, проводимостью, показанной на правой оси, и объемом, показанным на оси x;

на фиг. 12 - таблица суммированных результатов для работы способа согласно изобретению для Fab

при 900 см/ч на колонке Carto S 20 см. Выход рассчитывали на основе высвобожденного элюата против продукта, загруженного для этого цикла. Поскольку цикл запуска дополнительно перегружен, производя рециркуляцию для следующего цикла, его выход искусственно подавляют, и поскольку конечный цикл относительно недогружен для предотвращения избыточной рециркуляции, его выход искусственно высокий, поскольку он получает рециркуляцию из предыдущего цикла в дополнение к нанесению свежей загрузки, которая элюируется вся вместе, давая кажущийся выход более 100%. Общий выход этого процесса незначительно превышает 100%, что находится в пределах допустимости измерений и указывает на практически полное извлечение загруженного белка;

на фиг. 13 - таблица суммированных результатов для работы способа согласно изобретению для МАВ при 500 см/ч на колонке MabSelect SuRE LX 20 см. Выход рассчитывали на основе высвобожденного элюата против загруженного продукта. Поскольку цикл запуска дополнительно перегружен, производя рециркуляцию для следующего цикла, его выход искусственно подавлен, а поскольку конечный цикл относительно недогружен, чтобы предотвратить избыточную рециркуляцию, его выход искусственно завышен, поскольку он получает рециркуляцию из предыдущего цикла в дополнение к нанесению свежей загрузки, которая элюируется вся вместе, с получением кажущегося выхода более 100%. Общее усовершенствование дает точный показатель общего выхода по отношению к общему вводу;

на фиг. 14 - таблица суммированных результатов для осуществления способа согласно изобретению для МАВ при 150 см/ч на 10 см колонке MabSelect SuRE LX. Выход рассчитывали на основе высвобожденного элюата против загруженного продукта. Поскольку цикл запуска дополнительно перегружен, производя рециркуляцию для следующего цикла, его выход искусственно подавлен, а поскольку конечный цикл относительно недогружен, чтобы предотвратить избыточную рециркуляцию, его выход искусственно превышен, поскольку он получает рециркуляцию из предыдущего цикла в дополнение к нанесению свежей загрузки, которая элюируется вся вместе, давая кажущийся выход более 100%. Общее усовершенствование дает точный показатель общего выхода по отношению к общему вводу.

Подробное описание изобретения

Авторами изобретения был разработан новый способ очистки интересующего белка, который включает более эффективное и экономичное использование хроматографических матриц при сохранении или улучшении выхода и чистоты очищаемого белка.

В первом аспекте изобретение относится к способу очистки интересующего белка из смеси, включающему стадии:

а) загрузки в рабочем хроматографическом цикле смеси, содержащей интересующий белок, из первого контейнера в хроматографическую матрицу, работающую так, что белок связывается с хроматографической матрицей до достижения 40-100%, 50-100%, 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 70-90% или 70-80%, 60-90%, 60-80% емкости статического связывания хроматографической матрицы;

б) сбора элюата, содержащего несвязанный интересующий белок, во втором контейнере; и

с) в следующем рабочем хроматографическом цикле повторной загрузки элюата из второго контейнера на ту же хроматографическую матрицу, работающую так, что интересующий белок связывается с хроматографической матрицей до достижения 40-100%, 50-100%, 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 70-90% или 70-80%, 60-90%, 60-80% емкости статического связывания хроматографической матрицы.

В варианте первого аспекта настоящее изобретение относится к способу очистки интересующего белка из смеси, включающему стадии:

д) загрузки смеси в рабочем хроматографическом цикле, содержащей интересующий белок, из первого контейнера в хроматографическую матрицу, работающую так, что белок связывается с хроматографической матрицей до достижения 40-100%, 50-100%, 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 70-90% или 70-80%, 60-90%, 60-80% емкости статического связывания хроматографической матрицы;

е) сбора элюата, содержащего несвязанный интересующий белок, во втором контейнере; и

ф) повторной загрузки элюата из второго контейнера на ту же хроматографическую матрицу и дополнительной загрузки свежей загрузочной смеси в следующем рабочем хроматографическом цикле, работающем так, что интересующий белок связывается с хроматографической матрицей до достижения 40-100%, 50-100%, 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 70-90% или 70-80%, 60-90%, 60-80% емкости статического связывания хроматографической матрицы.

В другом варианте первого аспекта изобретение относится к способу очистки интересующего белка из смеси, включающему стадии:

г) в рабочем хроматографическом цикле загрузки первого объема смеси, содержащей интересующий белок из первого контейнера, к хроматографической матрице, работающей так, что белок связывается с хроматографической матрицей до достижения 40-100%, 50-100%, 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 70-90% или 70-80%, 60-90%, 60-80% емкости статического связывания хроматографической матрицы;

h) сбора элюата, содержащего несвязанный интересующий белок, во втором контейнере; и

и) повторной загрузки элюата из второго контейнера и загрузки второго объема интересующего белка из первого контейнера на ту же хроматографическую матрицу в следующем рабочем хроматографическом цикле, работающем таким образом, что интересующий белок связывается с хроматографиче-

ской матрицей до достижения 40-100%, 50-100%, 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 70-90% или 70-80%, 60-90%, 60-80% емкости статического связывания хроматографической матрицы.

Повторная загрузка элюата из второго контейнера на ту же хроматографическую матрицу может быть выполнена в способе по изобретению после, вместе или предпочтительно до загрузки второго объема интересующего белка из первого контейнера.

Во втором аспекте изобретение относится к способу очистки интересующего белка из смеси, включающему стадии:

а) в рабочем хроматографическом цикле загрузки первого объема смеси, содержащей интересующий белок, из первого контейнера в хроматографическую матрицу, работающую так, что емкость динамического связывания хроматографической матрицы превышена;

б) сбора элюата, содержащего несвязанный интересующий белок, во втором контейнере; и

с) в следующем рабочем хроматографическом цикле повторной загрузки элюата из второго контейнера и загрузки второго объема интересующего белка из первого контейнера на ту же хроматографическую матрицу, которая работает так, что емкость динамического связывания хроматографической матрицы превышена.

В следующем варианте осуществления изобретение относится к способу согласно второму аспекту, где на стадии (а) загрузка интересующего белка прекращается при достижении по меньшей мере 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% максимальной емкости статического связывания.

Во втором варианте осуществления изобретение относится к способу согласно первому или второму варианту осуществления аспектов изобретения, где следующий рабочий хроматографический цикл представляет собой хроматографический цикл, следующий сразу после.

В третьем варианте осуществления изобретение относится к способу согласно первому и второму вариантам осуществления аспектов изобретения, где концентрация интересующего белка в элюате измеряется в режиме "онлайн", в режиме "у линии" или в автономном режиме. Концентрация интересующего белка в элюате может быть измерена в способе согласно изобретению в режиме "онлайн", например, с использованием детектора, соединенного с выходом хроматографической матрицы, для измерения в реальном времени, в режиме "у линии", например, с использованием образцов, взятых на выходе из хроматографической матрицы и измеренных с помощью детектора, расположенного вблизи матрицы, или в автономном режиме, например, с образцами, взятыми на выходе хроматографической матрицы и измеренными после задержки на детекторе, расположенном дистанционно от матрицы, например, в отдельной комнате.

Концентрация белка или любой другой интересующей молекулы в элюате может быть измерена в способе в соответствии с любыми вариантами осуществления изобретения любым способом, известным в данной области, таким как, но не ограничиваясь этим, измерение оптического поглощения или флуоресценции.

Интересующий белок может быть определен в элюате в способе в соответствии с любыми вариантами осуществления изобретения путем наблюдения увеличения или уменьшения с течением времени ультрафиолетового поглощения или сигнала флуоресценции за границей установленного уровня ультрафиолетового поглощения или сигнала флуоресценции, вызванного другими белковыми примесями в элюате.

Концентрацию интересующего белка в элюате можно измерить в способе в соответствии с любыми вариантами осуществления изобретения с помощью ультрафиолетового поглощения или флуоресценции при любой подходящей длине волны, известной в данной области, например при 280 нм, и предпочтительно с использованием субоптимальной длины волны возбуждения и/или излучения, как, например, 290, 300 или 310 нм, чтобы обеспечить обнаружение интересующего белка в элюате из хроматографической матрицы, даже когда имеется избыточный сигнал от белковых примесей в элюате.

В четвертом варианте осуществления изобретение относится к способу согласно первому, второму и третьему вариантам осуществления аспектов изобретения, где сбор элюата начинают при первой заданной концентрации интересующего белка в элюате и прекращают при второй заданной концентрации интересующего белка в элюате. В других вариантах осуществления изобретения сбор интересующего белка в элюате начинают, например, при концентрации 0,05, 0,1 или 0,2 мг/мл интересующего белка в элюате и прекращают, например, при концентрации 0,6, 1, 2, 3, 4 или 5 мг/мл интересующего белка в элюате.

В пятом варианте осуществления изобретение относится к способу согласно первому, второму, третьему и четвертому вариантам осуществления аспектов изобретения, где собирают заданную фракцию элюата, как например, 50, 40, 30, 20, 10 или 5% элюата собирают во втором контейнере.

В шестом варианте осуществления изобретение относится к способу согласно первому, второму, третьему, четвертому и пятому вариантам осуществления аспектов изобретения, где элюат, собранный во втором контейнере, не обрабатывается до или во время повторной загрузки на хроматографическую матрицу в следующем рабочем хроматографическом цикле.

В седьмом варианте осуществления изобретение относится к способу согласно первому, второму, третьему, четвертому пятому и шестому вариантам осуществления аспектов изобретения, где элюат, собранный во втором контейнере, после завершения хроматографического цикла непосредственно повтор-

но загружают на хроматографическую матрицу в следующем рабочем хроматографическом цикле.

В восьмом варианте осуществления изобретение относится к способу согласно первому, второму, третьему, четвертому, пятому, шестому и седьмому вариантам осуществления аспектов изобретения, где элюат, собранный во втором контейнере, обрабатывают до или во время повторной загрузки на хроматографическую матрицу в следующем рабочем хроматографическом цикле. Обработка может представлять собой, например, перемешивание или встряхивание, разбавление (например, в воде или буфере), доведение концентрации (например, с использованием установки вакуумного фильтра), доведение рН, доведение проводимости, замену буфера или растворителя, охлаждение или нагревание или любую их комбинацию.

В девятом варианте осуществления изобретение относится к способу согласно первому, второму, третьему, четвертому, пятому, шестому, седьмому и восьмому вариантам осуществления аспектов изобретения, где элюат из нескольких отдельных рабочих хроматографических циклов, собранный во втором контейнере, объединяют и повторно загружают на одну и ту же хроматографическую матрицу в другом цикле. Элюат из двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более чем десяти рабочих хроматографических циклов может быть собран в единственном втором контейнере или во втором, третьем, четвертом или дополнительных контейнерах и повторно загружен на хроматографическую матрицу в следующем рабочем хроматографическом цикле.

В десятом варианте осуществления изобретение относится к способу согласно первому, второму, третьему, четвертому, пятому, шестому, седьмому, восьмому и девятому вариантам осуществления аспектов изобретения, где способ включает более чем одну стадию хроматографии и две, три, четыре или все стадии хроматографии работают так, что элюат, содержащий несвязанный интересующий белок, собирают в контейнере, отличном от контейнера, из которого загружают хроматографическую матрицу, и элюат повторно загружают из такого контейнера на ту же хроматографическую матрицу в более позднем рабочем хроматографическом цикле.

В одиннадцатом варианте осуществления изобретение относится к способу согласно первому, второму, третьему, четвертому, пятому, шестому, седьмому, восьмому, девятому и десятому вариантам осуществления аспектов изобретения, где способ включает одну, две, три, четыре или более чем четыре стадии хроматографии. Предпочтительно одну, две, три, четыре или все стадии хроматографии проводят на хроматографической колонке.

В двенадцатом варианте осуществления изобретение относится к способу согласно одиннадцатому варианту осуществления аспектов изобретения, где три стадии хроматографии представляют собой хроматографию с Протеином А с последующей катионообменной хроматографией и с последующей анионообменной хроматографией. В одном варианте осуществления способа по изобретению элюат хроматографии с Протеином А подвергают катионообменной хроматографии, работающей в режиме связывания и элюирования, в результате чего выделяют элюат, содержащий интересующий белок, и такой элюат подвергают анионообменной хроматографии с получением элюата, содержащего интересующий белок. Специалисту в данной области техники понятно, что способ согласно изобретению может включать другие стадии между каждой из трех стадий хроматографии, такие как, например, диафильтрация.

В тринадцатом варианте осуществления изобретение относится к способу согласно первому, второму, третьему, четвертому, пятому, шестому, седьмому, восьмому, девятому, десятому, одиннадцатому и двенадцатому вариантам осуществления аспектов изобретения, где хроматографию выбирают из аффинной хроматографии, такой как хроматография с Протеином А, анионная или катионообменная хроматография, хроматография гидрофобного взаимодействия, хроматография в смешанном режиме, такая как хроматография с гидроксипатитом, хиральная хроматография или диэлектрическая хроматография.

В четырнадцатом варианте осуществления изобретение относится к способу согласно первому, второму, третьему, четвертому, пятому, шестому, седьмому, восьмому, девятому, десятому, одиннадцатому, двенадцатому и тринадцатому вариантам осуществления аспектов изобретения, где хроматографическая матрица/матрицы для одной, двух, трех, четырех или всех стадий хроматографии является/являются хроматографической колонкой (колонками).

В пятнадцатом варианте осуществления изобретение относится к способу в соответствии с первым, вторым, третьим, четвертым, пятым, шестым, седьмым, восьмым, девятым, десятым, одиннадцатым, двенадцатым, тринадцатым и четырнадцатым вариантами осуществления изобретения, где интересующий белок представляет собой антитело или фрагмент антитела.

В шестнадцатом варианте осуществления изобретение относится к способу в соответствии с первым, вторым, третьим, четвертым, пятым, шестым, седьмым, восьмым, девятым, десятым, одиннадцатым, двенадцатым, тринадцатым, четырнадцатым и пятнадцатым вариантами осуществления аспектов изобретения, где смесь содержит интересующий белок и прокариотические, например бактериальные, загрязнители клеток-хозяев, такие как белки, нуклеиновые кислоты или липиды клеток-хозяев.

В семнадцатом варианте осуществления изобретение относится к способу в соответствии с первым, вторым, третьим, четвертым, пятым, шестым, седьмым, восьмым, девятым, десятым, одиннадцатым, двенадцатым, тринадцатым, четырнадцатым, пятнадцатым и шестнадцатым вариантами осуществления аспектов изобретения, где смесь содержит интересующий белок и эукариотические загрязнители, напри-

мер, загрязнители клеток-хозяев млекопитающих, такие белки, нуклеиновые кислоты или липиды клеток-хозяев.

В восемнадцатом варианте осуществления изобретение относится к способу получения интересующего белка, включающему способ очистки в соответствии с первым, вторым, третьим, четвертым, пятым, шестым, седьмым, восьмым, девятым, десятым, одиннадцатым, двенадцатым, тринадцатым, четырнадцатым, пятнадцатым, шестнадцатым и семнадцатым вариантами осуществления аспектов изобретения.

В девятнадцатом варианте осуществления аспектов изобретение относится к белку, такому как анти-тело или фрагмент антитела, полученному способом шестнадцатого варианта осуществления изобретения.

В других вариантах осуществления аспектов изобретения по меньшей мере одна из хроматографических колонок в способе согласно любому из вариантов осуществления имеет объем слоя более чем 1 л, более чем 20 л, более чем 30 л, более чем 50 л, более чем 75 л, более чем 100 л или более чем 200 л, предпочтительно от 20 л до 200 л, от 30 л до 100 л или от 50 л до 100 л.

В других вариантах осуществления аспектов изобретения относится к способу в соответствии с любым из вариантов осуществления, где одна, две, три, четыре или все стадии хроматографии/работают на мембранном или монолитном адсорбере.

В других вариантах осуществления аспектов изобретения относится к способу в соответствии с любым из вариантов осуществления, где одна, две, три, четыре или все стадии хроматографии представляют собой/работают на единственной хроматографической колонке, мембранном адсорбере или монолитном адсорбере.

Еще в одном варианте осуществления аспектов изобретения относится к способу согласно любому из вариантов осуществления, где собранный элюат повторно загружают из второго контейнера на хроматографическую матрицу в последующем рабочем хроматографическом цикле до того, как новую партию смеси из первого контейнера, содержащего интересующий белок, загружают на указанную хроматографическую матрицу. Повторная загрузка элюата в последующем цикле хроматографии перед смесью из первого контейнера, содержащего интересующий белок, позволяет полностью связать рециркулированный интересующий белок с помощью пустой колонки, что обеспечивает его захват всего за два цикла.

В следующем варианте осуществления аспектов изобретения относится к способу согласно любому из вариантов осуществления, где собранный элюат повторно загружают из второго контейнера на хроматографическую матрицу в последующем рабочем хроматографическом цикле после или вместе с новой партией смеси из первого контейнера, содержащего интересующий белок.

В других вариантах осуществления аспектов изобретения относится к способу в соответствии с любым из вариантов осуществления, где элюат, собранный во втором контейнере, хранится в течение по меньшей мере 30 мин, 1, 2, 5, 10, 24 часов, 1, 2, 7, 14 дней, 1, 2, 6 месяцев или года.

Используемый в настоящем описании термин "анионообменная хроматография" относится к хроматографии, в которой твердая фаза положительно заряжена, например имеет один или более положительно заряженных лигандов, таких как четвертичные аминогруппы, присоединенными к ней. Коммерчески доступные анионообменные матрицы включают DEAE целлюлозу, QAE SEPHADEX™, FAST Q SEPHAROSE™ Capto Q и Capto Q Impres (GE Healthcare), Unosphere и Nuvia Q (BioRad), GigaCap Q (Tosoh), Mustang Q XT (Pall), Fractogel Q и Eshmuno Q (Merck Millipore) и анионообменные мембранные адсорберы, такие как SartoBind Q (Sartorius), и монолитные адсорберы, такие как монолиты QA (Bia Separations).

Используемый в настоящем описании термин "антитело" или "антитела" относится к моноклональным или поликлональным тетрамерным полноразмерным антителам, содержащим две тяжелые и две легкие цепи. Две тяжелые цепи и две легкие цепи могут быть одинаковыми или разными, как например, в биспецифичных антителах, таких как Bioclones® или DuoBody®. Термин иммуноглобулин или иммуноглобулины используют синонимично с "антителом" или "антителами" соответственно. Используемый в настоящем описании термин "антитело" или "антитела" включает, но не ограничивается ими, рекомбинантные антитела, которые генерируются рекомбинантными технологиями, известными в данной области. "Антитело" или "антитела" могут быть любого происхождения, в том числе из видов млекопитающих, таких как человек, примат, отличный от человека (например, человек, шимпанзе, бабуин, макака-резус или яванская макака), из грызунов (например, из мыши, крысы, кролика или морской свинки), козы, крупного рогатого скота или лошади. Антитело в настоящем описании направлено против представляющего интерес "антигена". Предпочтительно антигеном является биологически важный полипептид, и введение антитела к млекопитающему, страдающему заболеванием или расстройством, может привести к терапевтической пользе для этого млекопитающего. Однако также рассматриваются антитела, направленные против неполипептидных антигенов. Если антигеном является полипептид, он может представлять собой трансмембранную молекулу (например, рецептор) или лиганд, такой как фактор роста или цитокин. Предпочтительные молекулярные мишени для антител, охваченных настоящим изобретением, включают CD-полипептиды, такие как CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34, CD38, CD40 и CD40-L; FcRn; OX40; члены семейства рецепторов HER, такие как рецептор EGF, рецептор HER2, HER3 или HER4; молекулы клеточной адгезии, такие как LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM и av/b3, в

том числе их субъединицы α или β (например, антитела против CD11a, против CD18 или против CD11b); хемокины и цитокины или их рецепторы, такие как IL-1 и β , IL-2, IL-6, рецептор IL-6, IL-12, IL-13, IL-17A и/или IL-17F, IL-18, IL-21, IL-23, TNF α и TNF β ; факторы роста, такие как VEGF; IgE; антигены группы крови; рецептор flk2/flt3; рецептор ожирения (OB); mpl-рецептор; CTLA-4; полипептид C; PD1, PD-L1, PCSK9; склеростин; и т.п.

Термин "фрагмент антитела" или "фрагменты антител", используемый в настоящем описании, обозначает часть антитела, как правило антигенсвязывающую или вариабельную область. Примеры фрагментов антител включают любое антитело, которое лишено или не содержит Fc-части. Примеры фрагментов антител включают также такие, как Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv и scFv фрагменты; а также диатела, включая такие форматы, как BiTE® (биспецифичные активаторы привлекающие Т-клетки) и DART™ (технология двойного аффинного повторного таргетинга), триатела, тетратела, мини-антитела, доменные антитела (dAb), такие как sdAb, VHH и фрагменты VNAR, одноцепочечные антитела, биспецифичные, триспецифичные, тетраспецифичные или мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител или антител, включая, но не ограничиваясь ими, Fab-Fv, Fab-scFv, Fab(Fv)₂ или Fab-(scFv)₂ конструкции. Фрагменты и производные антитела, как определено выше, известны в данной области (Kontermann, 2012). Для ясности следует понимать, что Fab-Fv относится к конструкции, содержащей одну область Fv и одну область Fab, соединенные в любом порядке, то есть Fab-Fv или Fv-Fab, причем последние аминокислоты в одной области следуют за первыми аминокислотами в следующей области или наоборот. Аналогично, Fab-scFv следует понимать как относящуюся к конструкции, содержащей одну область scFv и одну область Fab, соединенные в любом порядке, а в случае Fab - с любой полипептидной цепью, т.е. с Fab-scFv или scFv-Fab, причем последняя аминокислота в одной области следует за первой аминокислотой в следующей области или наоборот. Таким же образом следует понимать, что Fab-(Fv)₂ относится к конструкции, содержащей две области Fv и одну область Fab, соединенные в любом порядке, т.е. Fab-Fv-Fv, Fv-Fab-Fv или Fv-Fv-Fab, где последние аминокислоты в одной области следуют за первыми аминокислотами в следующей области или наоборот. Аналогично, Fab-(scFv)₂ следует понимать как относящуюся к конструкции, содержащей две области scFv и одну область Fab, соединенные в любом порядке, а в случае Fab - с каждой полипептидной цепью, что приводит к 20 возможным комбинациям. Обычно эти конструкции включают пептидный линкер между первой областью (например, Fab) и второй областью (например, Fv). Такие линкеры хорошо известны в данной области и могут быть одной или несколькими аминокислотами, обычно оптимизированными по длине и составу специалистом в данной области. Альтернативно, указанные области могут быть связаны непосредственно, т.е. без пептидного линкера. Примеры подходящих линкерных областей для связывания вариабельного домена с Fab или Fab' описаны в WO 2013/068571, включенной в настоящее описание посредством ссылки, и включают, но не ограничиваясь ими, гибкие линкерные последовательности и жесткие линкерные последовательности. Фрагменты антител могут быть агликозилированы или гликозилированы. Термин "фрагмент антитела" или "фрагменты антитела" также относится к производным антител, которые содержат по меньшей мере один антигенсвязывающий домен антитела или домен антитела, связывающий fc-рецептор, который ковалентно связан с другим доменом антитела, другим белком или небелковой молекулой.

Используемый в настоящем описании термин "катионообменная хроматография" относится к хроматографии, в которой твердая фаза отрицательно заряжена, например имеет один или несколько отрицательно заряженных лигандов, таких как, например, карбоксилатная или сульфонатная группа. Коммерчески доступные катионообменные матрицы включают карбоксиметилцеллюлозу, сульфопропил (SP), иммобилизованный на агарозе, и сульфонил, иммобилизованный на агарозе, такие как Capto S, Capto Adhere и Capto S Impres (GE Healthcare), Unosphere S и Nuvia S (BioRad), GigaCap S (Tosoh), Fractogel S и Eshmuno S (Merck Millipore) или катионообменные мембранные адсорберы, такие как SartoBind S (Sartorius), и монолитные адсорберы, такие как монолиты SO₃ (Bia Separations).

Используемый в настоящем описании в связи с хроматографией термин "хроматографическая колонка" или "колонка" относится к контейнеру, часто в форме цилиндра или полой колонки, который заполнен хроматографической матрицей. Хроматографическая матрица представляет собой материал, который обеспечивает физические и/или химические свойства, которые используются для очистки.

Используемый в настоящем описании термин "хроматографический цикл" или "рабочий хроматографический цикл" относится к работе одного цикла последовательности стадий процесса на данном участке хроматографической матрицы, который может включать, но не ограничивается этим, одну или более в последовательной комбинации следующих стадий: стадию уравнивания, стадию повторной загрузки, стадию загрузки, стадию перегрузки, стадию промывки после загрузки, стадию вторичной промывки, стадию элюирования, стадию регенерации, стадию очистки, стадию хранения и периоды паузы или удерживания. Следовательно, следующий цикл может включать повторение одной и той же последовательности стадий процесса.

Используемый в настоящем описании в связи с хроматографией термин "емкость динамического связывания" относится к количеству интересующего белка или другого целевого соединения, которое может связываться с хроматографической матрицей при постоянном потоке без значительного количест-

ва интересующего белка или другого целевого соединения в элюате. Емкость динамического связывания хроматографической матрицы определяют путем загрузки образца, содержащего известную концентрацию интересующего белка. Загрузка белкового образца на колонку контролируется, и он будет связываться с матрицей до определенной точки разрыва перед тем, как несвязанный белок будет проходить через матрицу. Из кривой проскока при потере, например, 10% белка детектируют емкость динамического связывания, и эксперимент прекращают. Часто емкость динамического связывания определяется количеством интересующего белка, которое может связываться с матрицей при постоянном потоке при потерях не более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17 или 20% интересующего белка в элюате, предпочтительно с концентрацией интересующего белка, загружаемого в тот же момент времени.

Используемый в настоящем описании термин "элюат" относится к жидкой композиции, которую получают путем пропускания смеси через или по хроматографической матрице.

Используемый в настоящем описании термин "хроматография гидрофобного взаимодействия" относится к хроматографии, в которой твердая фаза является гидрофобной, например содержит один или более гидрофобных лигандов, таких как, например, фенильная или бутильная группа. Коммерчески доступные матрицы гидрофобного взаимодействия включают фенил или бутил, иммобилизованные на агарозе, такие как *Capto Phenyl* или *Capto Butyl* (GE Healthcare), *ToyoPearl HIC* (Tosoh) и *Fractogel EMD Phenyl* (Merck Millipore), или иммобилизованные на мембранном адсорбере, таком как *SartoBind HIC* (Sartorius).

Используемый в настоящем описании в связи с хроматографией термин "мембранный адсорбер" или "мембранная хроматография", относится к формату хроматографии, в котором полупроницаемая мембрана размещается в контейнере, через который подается сырьевой поток, и поверхности которого закреплены с помощью смолы или лигандов, которые являются материалами, обеспечивающими физические и/или химические свойства, которые используются для очистки.

Используемый в настоящем описании в связи с хроматографией термин "монолитная хроматография" или "монолитные адсорберы" относится к формату хроматографии, в котором непрерывный объем пористого полимера помещается в контейнер, через который подают сырьевой поток, и чьи поверхности закреплены смолой или лигандами, которые представляют собой материалы, которые обеспечивают физические и/или химические свойства, которые используются для очистки.

Используемый в настоящем описании термин "хроматография смешанного режима" относится к хроматографии, в которой твердая фаза может иметь смесь различных заряженных или незаряженных лигандов, таких как, например, гидроксипатит. Другие коммерчески доступные смешанные матрицы включают в себя керамический гидроксипатит (*BioRad*) или *Capto Adhere* (GE Healthcare) и *HA Ультрогель гидроксипатит* (*Pall*).

Используемый в настоящем описании термин "смесь" относится, по меньшей мере, частично к жидкой композиции, содержащей по меньшей мере один интересующий белок, который требуется очистить от других веществ, таких как белки клеток-хозяев, ДНК или другие компоненты клетки-хозяина, которые могут также присутствовать. Смеси могут представлять собой, например, суспензии, водные растворы, системы органических растворителей или смеси или растворы водных/органических растворителей. Смеси часто представляют собой сложные смеси или растворы, содержащие множество биологических молекул (таких как белки, антитела, гормоны, полинуклеотиды и вирусы), низкомолекулярные соединения (такие как соли, сахара, липиды и т.д.), и даже твердые частицы. Хотя типичная смесь биологического происхождения может брать начало в виде водного раствора или суспензии, она может также содержать органические растворители, используемые на более ранних стадиях разделения, такие как осаждение растворителей, экстракции и тому подобное.

Используемый в настоящем описании в связи с хроматографией термин "емкость статического связывания" относится к максимальному количеству интересующего белка или другого целевого соединения, которое может связываться с хроматографической матрицей в статических условиях без значительного количества интересующего белка или другого целевого соединения в элюате. Емкость статического связывания обычно измеряется в периодическом режиме в химическом стакане и обычно обозначается как максимальное количество белка, связанного с хроматографической средой при заданных условиях концентрации растворителя и белка.

Интересующий белок, такой как антитело или фрагмент антитела, который может быть очищен в соответствии со способом по настоящему изобретению, может быть получен путем культивирования клеток-хозяев, трансформированных одним или более экспрессирующими векторами, кодирующими рекомбинантное антитело или фрагмент антитела.

Клетки-хозяева согласно вариантам осуществления изобретения представляют собой, например, прокариотические клетки, дрожжи (например, без ограничений *Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia methanolica*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluveromyces lactis* и другие *Kluveromyces* spp., *Yarrowia lipolytica*), микомицеты (например, без ограничения *Dictyostelium discoideum*), нитевидные грибы (например, без ограничений *Trichoderma reesei* и другие виды *Trichoderma* spp., *Aspergillus niger* и другие виды *Aspergillus*), мхи (например, без ограничения *Physcomitrella patens*, *Atrichum undulatum*), клетки насекомых или млекопитающих. Клетки-хозяева млекопитаю-

щих представляют собой, например, без ограничения NSO, SP2.0, 3T3 клетки, клетки COS, клетки остеосаркомы человека, клетки MRC-5, клетки почки детеныша хомяка (ВНК), клетки VERO, клетки CHO, клетки rCHO-tPA, клетки rCHO-Нер В-клеточного поверхностного антигена, клетки CHO-S, клетки НЕК 293, клетки rНЕК 293, клетки C127, клетки rC127-Нер В-клеточного поверхностного антигена, клетки фибробластов человека, стромальные клетки, клетки гепатоцитов или клетки PER.C6.

Клетки-хозяева предпочтительно представляют собой эукариотические клетки-хозяева, предпочтительно клетки-хозяева млекопитающих, более предпочтительно клетки яичника китайского хомячка (CHO), например штамма DG44.

Для эукариотических клеток-хозяев (например, дрожжей, клеток насекомых или млекопитающих) могут использоваться различные транскрипционные и трансляционные регуляторные последовательности в зависимости от природы хозяина. Они могут быть получены из вирусных источников, таких как аденовирус, вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус Simian или тому подобное, где регуляторные сигналы связаны с конкретным геном, который имеет высокий уровень экспрессии. Примерами являются промотор ТК вируса герпеса, ранний промотор SV40, промотор гена дрожжей gal4 и т.д. Могут быть выбраны регуляторные сигналы инициации транскрипции, которые позволяют подавлять и активировать экспрессию генов. Клетки, которые были стабильно трансформированы введенной ДНК, могут быть отобраны путем введения одного или нескольких маркеров, которые позволяют отбирать клетки-хозяева, которые содержат экспрессирующий вектор. Маркер также может обеспечивать фототрофию у ауксотропного хозяина, резистентность к биоцидам, например без ограничения, к антибиотикам или тяжелым металлам, таким как медь, или тому подобное. Селективный маркерный ген может быть либо непосредственно связан с последовательностями ДНК гена, которые должны быть экспрессированы, либо введены в одну и ту же клетку путем совместной трансфекции. Для оптимального синтеза белков по изобретению могут потребоваться дополнительные элементы.

Эукариотические клетки-хозяева трансфецируют одним или более экспрессирующими векторами, кодирующими интересующий белок, и затем культивируют в любой среде, которая будет поддерживать их рост и экспрессию интересующего белка. Среда представляет собой среду определенного химического состава, свободную от продуктов, полученных из животных, таких как сыворотка животных и пептон. Специалисту в данной области доступны различные клеточные культуральные среды, включающие различные комбинации витаминов, аминокислот, гормонов, факторов роста, ионов, буферов, нуклеозидов, глюкозы или эквивалентных источников энергии, присутствующих в соответствующих концентрациях для обеспечения роста клеток и продуцирования белка. Дополнительные компоненты культуральной среды могут быть включены в среду для культивирования клеток в соответствующих концентрациях в разное время в течение цикла культивирования, как известно специалистам в данной области.

Культивирование клеток млекопитающих может осуществляться в любом подходящем контейнере, таком как встряхиваемая колба или биореактор, который может работать или не работать в режиме периодического дозирования в зависимости от требуемого масштаба производства. Эти биореакторы могут представлять собой реакторы с мешалкой или барботажные. Доступны различные крупномасштабные биореакторы емкостью более чем 1000-50000 л или 100000 л, предпочтительно от 5000 до 20000 л или до 10000 л. Альтернативно, биореакторы меньшего масштаба, такие как от 2 до 100 л, могут также могут быть использованы для получения антитела в соответствии со способом по изобретению.

Интересующий белок, такой как антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который продуцируется в эукариотической клетке-хозяине, такой как клетка CHO, в соответствии со способом и методами по настоящему изобретению, обычно находится в супернатанте клеточной культуры. В одном варианте осуществления изобретения указанный супернатант представляет собой смесь, очищенную в способе по изобретению.

Поэтому в конкретном варианте осуществления изобретения способ и методы по изобретению включают стадию центрифугирования супернатанта и извлечения жидкой фазы после центрифугирования с целью получения смеси, содержащей интересующий белок для дальнейшей очистки в соответствии со способом по настоящему изобретению.

Альтернативно, указанный супернатант может быть выделен с использованием методов осветления, известных специалисту в данной области, таких как, например, глубинная фильтрация. Поэтому в конкретном варианте осуществления изобретения способ включает стадию глубинной фильтрации с получением смеси, содержащей интересующий белок для дальнейшей очистки в соответствии со способом по изобретению.

Альтернативно, клетки-хозяева представляют собой прокариотические клетки, предпочтительно грамотрицательные бактерии, предпочтительно прокариотические клетки *E.coli*. Прокариотические клетки-хозяева для экспрессии белка хорошо известны в данной области. Клетки-хозяева представляют собой рекомбинантные клетки, которые были генетически сконструированы для получения интересующего белка, такого как фрагмент антитела. Рекомбинантные клетки-хозяева *E.coli* могут быть получены из любого подходящего штамма *E.coli*, включая MC4100, TG1, TG2, DHB4, DH5 α , DH1, BL21, K12, XL1Blue и JM109. Одним из примеров является штамм *E.coli* W3110 (ATCC 27 325), обычно используемый штамм-хозяин для ферментации рекомбинантных белков. Фрагменты антител также могут быть

получены путем культивирования модифицированных штаммов *E.coli*, например метаболических мутантов или штаммов *E.coli*, дефицитных по протеазе.

Фрагмент антитела, который может быть очищен в соответствии со способами по настоящему изобретению, обычно находится либо в периплазме клетки-хозяина *E.coli*, либо в супернатанте культуры клеток-хозяев, в зависимости от природы белка, масштаба производства и используемого штамма *E.coli*. Способы направленной доставки белков к этим компартментам хорошо известны в данной области. Примеры подходящих сигнальных последовательностей для направления белков в периплазму *E.coli* включают сигнальные последовательности *E.coli* PhoA, OmpA, OmpT, LamB и OmpF. Белки могут быть направлены в супернатант на основе естественных секреторных путей или путем индукции ограниченной проницаемости наружной мембраны, чтобы вызвать секрецию белков, примеры которой представляют собой использование лидера *relB*, лидера протеина A, ко-экспрессии белка высвобождения бактериоцина, белка высвобождения бактериоцина, индуцированного митомицином, а также добавление глицина в культуральную среду и ко-экспрессия гена *kil* для пермеабиллизации мембраны. Наиболее предпочтительно в способах по изобретению рекомбинантный белок экспрессируется в периплазме хозяина *E.coli*.

Экспрессия рекомбинантного белка в клетках-хозяевах *E.coli* также может находиться под контролем индуцируемой системы, в результате чего экспрессия рекомбинантного антитела в *E.coli* находится под контролем индуцируемого промотора. Многие индуцируемые промоторы, пригодные для использования в *E.coli*, хорошо известны в данной области, и в зависимости от промотора экспрессия рекомбинантного белка может индуцироваться варьирующимися факторами, такими как температура или концентрация конкретного вещества в ростовой среде. Примеры индуцируемых промоторов включают промоторы *E.coli* *lac*, *tac* и *trc*, которые индуцируются лактозой или негидролизующим аналогом лактозы, изопропил-bD-1-тиогактопиранозидом (IPTG), и промоторы *phoA*, *trp* и *agaBAD*, которые индуцируются фосфатом, триптофаном и L-арабинозой соответственно. Экспрессия может индуцироваться, например, добавлением индуктора или изменением температуры в случае, если индукция зависит от температуры. Когда индукция экспрессии рекомбинантного белка достигается добавлением индуктора к культуре, индуктор может быть добавлен любым подходящим способом в зависимости от системы ферментации и индуктора, например, путем добавления одной или более ударных доз или путем постепенного добавления индуктора путем подпитки. Понятно, что может быть задержка между добавлением индуктора и фактической индукцией экспрессии белка, например, когда индуктором является лактоза, может иметь место задержка до индукции экспрессии белка в случае, если перед лактозой использовали любой существующий источник углерода.

Культуры клеток-хозяев *E.coli* (ферментации) могут поддерживаться в любой среде, которая будет поддерживать рост *E.coli* и экспрессию рекомбинантного белка. Средой может быть любая среда определенного химического состава.

Культивирование клеток-хозяев *E.coli* может происходить в любом подходящем контейнере, таком как встряхиваемая колба или ферментер, в зависимости от требуемого масштаба производства. Доступны различные крупномасштабные ферментеры емкостью более чем 1000 и до 100000 л. Предпочтительно используются ферментеры от 1000 до 50000 л, более предпочтительно от 1000 до 10000 л или 12000 л. Также могут использоваться ферментеры меньшей емкости от 0,5 до 1000 л.

Ферментация клеток-хозяев, таких как СНО или *E.coli*, может быть проведена в любой подходящей системе, например непрерывном, периодическом режиме или в периодическом режиме с подпиткой в зависимости от белка и требуемых выходов. Периодический режим может использоваться с добавлением инъекций питательных веществ или индукторов, где это необходимо. В качестве альтернативы может использоваться периодический режим культивирования с подпиткой, и культуры, выращиваемые в периодическом режиме предварительной индукции с максимальной удельной скоростью роста, которая может поддерживаться с использованием питательных веществ, первоначально присутствующих в ферментере, и одного или более режимов подачи питательных веществ, используемых для контроля роста до завершения ферментации.

В одном варианте осуществления способ по настоящему изобретению включает перед загрузкой на первую хроматографическую матрицу стадию захвата, стадию центрифугирования собранной клеточной культуры с последующим суспендированием клеток-хозяев путем добавления экстрагирующего буфера.

Для способов ферментации *E.coli*, в которых интересующий белок, такой как фрагмент антитела, присутствует в периплазматическом пространстве клетки-хозяина, требуется высвобождение белка из клетки-хозяина. Высвобождение может быть достигнуто любым подходящим способом, таким как лизис клеток путем механической обработки или обработки давлением, замораживанием-оттаиванием, осмотический шок, экстрагирующие агенты или термообработка. Такие способы экстракции для высвобождения белка хорошо известны в данной области.

В конкретном варианте осуществления способа по изобретению смесь в способе по изобретению в соответствии с любым вариантом осуществления генерируется путем элюирования антитела или фрагмента антитела, связанного с Протеином A, например с использованием буфера для элюции с рН, подходящим для разрушения связывания антитела или фрагмента антитела. Указанное значение рН зависит от

конкретной молекулы и в целом определяется эмпирически специалистом в данной области и регулируется для достижения желаемого результата.

Специалисту в данной области доступно много хроматографических материалов, содержащих указанный нативный рекомбинантный Протеин А, таких как, например, MabSelect® (GE Healthcare), Absolute® (Novasep), Captiv A® (Repligen) или Amsphere® (JSR).

Буферы, пригодные для использования в качестве промывочных и элюирующих буферов в хроматографии с Протеином А, легко доступны в данной области и могут быть выбраны в виде неограничивающих примеров из фосфатно-буферного солевого раствора (PBS), трис, гистидинового, ацетатного, цитратного буферов или буфера MES (2-(N-морфолино)этансульфокислота), имидазолового, BES (N,N-(бис-2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфокислота), MOPS (3-(N-морфолино)пропансульфокислота) или HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфокислота).

После полного описания настоящего изобретения специалистам в данной области теперь понятно, что то же самое может быть осуществлено в широком диапазоне эквивалентных параметров, концентраций и условий без отклонения от сущности и объема изобретения и без чрезмерного экспериментирования. Хотя настоящее изобретение описано в связи с его конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что возможны его дальнейшие модификации. Настоящая заявка предназначена для охвата любых изменений, применений или приспособлений изобретения, в целом, принципов изобретения и включая такие отклонения от настоящего раскрытия, которые входят в известную или обычную практику в области, к которой относится изобретение, и могут применяться к существенным признакам, изложенным выше, в объеме прилагаемой формулы изобретения.

Используемый в настоящем описании термин в единственном числе может означать один или более. Использование термина "или" в настоящем описании означает "и/или", если явно не указано только на альтернативы или если альтернативы не являются взаимоисключающими, хотя раскрытие поддерживает определение, которое относится только к альтернативам и "и/или". Используемый в настоящем описании термин "другой" может означать, по меньшей мере, второй или более.

Используемый в настоящем описании термин "от X до Y" может означать диапазон, включающий X и Y.

Все цитируемые в настоящем описании ссылки, в том числе журнальные статьи или рефераты, опубликованные или неопубликованные заявки на патент США или иностранные, выданные США или иностранные патенты или любые другие ссылки, полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки, включая все данные, таблицы, чертежи и текст, представленные в цитированной ссылке. Кроме того, полное содержание ссылок, цитируемых в настоящем описании, также полностью включено в качестве ссылки.

Ссылка на известные стадии способа, стадии стандартных способов, известные способы или обычные способы не является признаком того, что какой-либо аспект, описание или вариант осуществления настоящего изобретения раскрыты, известны или предлагаются в соответствующем уровне техники.

Примеры

Пример 1.

Проводили эксперимент по перегрузке колонки, чтобы установить параметры производительности перегрузки для последующего периодического процесса. 2X GE HiScreen CaptoS. 4,67 мл заранее набитые до 10 см ионообменные колонки (GE Healthcare Life Sciences 28-9269-79) прикрепляли друг к другу с получением катионообменной колонки с высотой слоя 20 см. Их прикрепляли капиллярной трубкой к системе очистки GE Akta Avant (код продукта 28930842). Буферы присоединяли и загружали во входные отверстия. Колонки предварительно десорбировали и очищали от любого связанного материала, используя высокопроводимый буфер в количестве двух объемов колонки (CV), состоящий из 50 мМ ацетата натрия, 1М хлорида натрия при pH 4,5 и с проводимостью 85 мСм/см, с последующим каустическим буфером, состоящим из двух CV 0,5М гидроксида натрия, прокачанных со скоростью 900 см/ч в нисходящем направлении, и инкубировали без потока при 20°C в течение 15 мин перед тем, как его вымыли, чтобы уравновесить матрицу колонки, используя 3 CV 50 мМ натрий ацетатного буфера при pH 4,5 и с проводимостью 4,0 мСм/см в нисходящем потоке. Встроенный монитор проводимости и три датчика поглощения были прикреплены и откалиброваны для наблюдения за элюатом. Датчики поглощения были установлены на 280, 290 и 305 нм, каждый с длиной пропускания 2 мм. Получали экстракт клеток E.coli, содержащий сверхэкспрессированный фрагмент антитела (Fab), представляющий интерес, вместе с примесями клеток-хозяев и разбавляли водой, так что титр Fab составил 1,66 мг/мл с проводимостью 10 мСм/см и pH 4,5. Его загружали в колонку со скоростью 900 см/ч в общей сложности 400 мл в нисходящем потоке для общего нанесения 71,3 мг на 1 мл хроматографической матрицы, полностью насыщая и превышая емкость статического связывания или максимальную емкость связывания заряженных лигандов матрицы для интересующего Fab при такой концентрации. После этого в колонку добавляли еще три CV 50 мМ натрий ацетатного буфера при pH 4,5 и с проводимостью 4,0 мСм/см для вымывания слабо-связанных компонентов. Наносили пять CV буфера с 50 мМ ацетатом натрия и 225 мМ хлоридом натрия при pH 4,5 и проводимостью 15 мСм/см для вытеснения сильносвязанных целевых компонентов, кото-

рые собирали в контейнере, когда они выходили из колонки, этот собранный материал составлял очищенный элюат. Повторение стадий десорбирования и очистки затем последовательно применяли для подготовки к дальнейшему использованию (фиг. 5).

УФ-детекторы использовали для контроля и регистрации относительного количества примеси и продукта, выходящих из колонки во время фазы загрузки, и зарегистрированное количество приложенной нагрузки по сравнению с уровнем возникающего сигнала, измеренное по поглощению эфлюента при 290 нм, было введено для подгонки вычислительной модели к данным для расчета средней емкости проскока продукта и связанной с ним кинетики процесса связывания (фиг. 6). Эта модель была основана на сигмоидальной подгонке проскока интересующего белка, появляющегося в элюате, до загруженного количества, приложенного к экспоненциальному затуханию, что моделирует оставшийся несвязанный интересующий белок, появляющийся в элюате после того, как прекращали нанесение свежей загрузки, с дополнительными параметрами для учета фонового сигнала примеси белка.

В условиях, описанных выше для матрицы CaptoS, работающей на сырьевом потоке с Fab, представляющим интерес, с титрами 1,66 мг/мл, наносили при 900 см/ч. Рассчитанная емкость динамического связывания составляла 20,03 мг/мл матрицы за цикл при 90%-ной загрузке 10%-ного уровня проскока, и рассчитанная производительность составляла 23,52 мг/мл матрицы/ч. Емкость статического связывания определяли как 32,8 мг/мл, что соответствует 161% емкости динамического связывания. Это использовали для прогнозирования достижимой емкости и производительности всего процесса перегрузки в предлагаемой полунепрерывной методологии с частью возникающей перегрузки, собираемой в отдельном контейнере и перезагружаемой на хроматографическую матрицу в последующем цикле процесса. Эту модель осуществляли повторно с помощью вычислительных методик путем изменения степени перегрузки и начальной и конечной точек для собранной перегрузки для достижения желаемого баланса оптимизированных емкости и производительности, при этом пользователь определял допустимый предел потерь продукта с установленным максимумом 2% и, как прогнозировалось, работал с реальной емкостью 31,40 мг/мл матрицы за цикл и с производительностью 25,65 мг/мл матрицы/ч, что представляет собой улучшение производительности на 9,1% и улучшение емкости на 56,8% за цикл (фиг. 7).

Процесс очистки повторяли с использованием этих прогнозируемых параметров, при этом колонку десорбировали, очищали и уравнивали таким же образом. Затем колонку загружали 23,56 CV той же партии загрузки, рассчитанной с помощью вычислительной модели и контролируемой непрерывным измерением загружаемого объема, и загружали перегруженным эфлюентом, собираемым после нанесения 15,44 CV загрузки, и собираемым в контейнер (второй контейнер) в течение следующих 9,45 CV, выходящих за пределы фазы загрузки, и 1,33 CV в последующей стадии промывки. Затем эту же промывку наносили так же, как и в предыдущем эксперименте, и после этого проводили тот же процесс элюирования, на этот раз с появляющимся элюатом, собираемым в третьем контейнере. Этот процесс составлял первый цикл с частью перегрузки, собираемой во втором контейнере, и сохраняемой для дальнейшего использования, и частью элюата в третьем контейнере, составляющим очищенный продукт, который анализировали на объем, концентрацию и чистоту (фиг. 9). Для второго цикла хроматографии и последующего третьего и четвертого циклов хроматографии стадии восстановления, мойки без разборки и уравнивания повторяли в начале, как и раньше, и затем все содержимое собранных рециркулирующих (вторых) контейнеров наносили в сумме с 9,45 CV, а затем 19,39 CV дополнительной партии экстракта E.coli. Для каждого из них снова 9,45 CV перегрузки собирали обратно в исходный второй контейнер, увеличивая 1,33 CV в той же последующей стадии промывки, и за ней следовал тот же процесс элюирования для каждого цикла, при этом элюаты снова тестировали на производительность. Эти хроматографические циклы представляли собой типичные рабочие циклы хроматографии в предлагаемом способе (фиг. 10). Для пятого цикла хроматографии десорбирование, очистку, уравнивание и повторную загрузку собранной перегрузки повторяли также как ранее, но свежий экстракт E.coli наносили только в точке традиционной рабочей емкости динамического связывания при 90% загруженной емкости, соответствующей той, что дает 10% проскок, что эквивалентно 7,89 CV дополнительной загрузки. Затем последующие стадии промывки и элюирования выполняли полностью. Это составляло конечный цикл хроматографии без какой-либо операции перегрузки и последующего цикла (фиг. 11). Настройки можно увидеть на (фиг. 8). Фактическая емкость, достигнутая на матрице в течение цикла хроматографии в этом эксперименте, составляла 32,2 мг/мл, что соответствует 98,2% максимальной емкости статического связывания матрицы. Для сравнения, процесс также работал с идентичными условиями в традиционном периодическом режиме, но без стадий перегрузки и рециркуляции, а с фазой загрузки, которую наносили только к 20,03 мг/мл емкости хроматографической матрицы, которая равна 90% от загрузочной емкости 10% уровня проскока, что согласуется со сравнимым традиционным процессом. Результаты и сравнение с традиционным процессом показаны на фиг. 12.

Пример 2.

Методология.

В параллельном примере метода 2X GE HiScreen MAb Select SuRE LX 4,67 мл предварительно набитые хроматографические колонки с Протеином А (GE Healthcare Life Sciences 17-5474-05) были соединены друг с другом с получением аффинной колонки с Протеином А с высотой слоя 9,313 мл 20 см.

Их прикрепляли капиллярной трубкой к системе очистки GE Akta PURE (код продукта 29-0182-24). Как и в предыдущем примере, буферы присоединялись и вводились во входные отверстия. Колонки аналогичным образом десорбировали и очищали от любого связанного материала, используя два объема колонки (CV) буфера лимонной кислоты с pH 2,1 и два CV 0,1M каустического буфера гидроксида натрия, прокачанного со скоростью 500 см/ч в нисходящем направлении потока, и инкубировали при отсутствии потока при 20°C в течение 15 мин. Четыре CV уравнивающего буфера с составом 50 мМ фосфата натрия при pH 7 и проводимостью 6 мСм/см использовали перед нанесением загрузки на все хроматографические циклы, дополнительные три CV того же буфера использовали после нанесения загрузки для смывания слабосвязанных соединений и пять CV 30 мМ ацетата натрия при pH 3,7 использовали для элюирования связанного продукта во всех циклах. Применяли те же детекторы, что и в соответствии с предыдущей методологией. Загрузка содержала внеклеточно экспрессированное моноклональное антитело с титром 2,9 мг/мл из клеток-хозяев млекопитающего, которые подвергали глубинной фильтрации для удаления цельных клеток и крупных фрагментов, и фильтрат наносили на колонку в нисходящем потоке до 90 мг целевого антитела/мл матрицы, превышая типичную емкость статического связывания матрицы. Измерения выходящего элюата аналогичным образом использовали для моделирования процесса проскока и определения оптимизированных параметров для перегрузки и рециркуляции в соответствии с предлагаемой методологией. Эти настройки затем использовали для управления процессом очистки с перегруженным начальным циклом, тремя перегруженными и рециркулируемыми последующими циклами хроматографии и недогруженным конечным циклом хроматографии. Их сравнивали с эквивалентным традиционным периодическим режимом в идентичных условиях, но без стадий перегрузки и рециркуляции, а в фазе загрузки наносили только до 29,68 мг/мл емкости хроматографической матрицы, что равнялось 90% от загрузочной емкости 10% уровня проскока, что согласуется с сопоставимым традиционным процессом. Результаты и сравнение с традиционным процессом показаны на фиг. 13.

Пример 3.

Методология.

В крупномасштабном примере метода 190 мл хроматографической смолы MAb Select SuRE LX 190 Протеин А (GE Healthcare Life Sciences, код продукта: 17-5474-04) упаковывали до высоты 10 см в колонку AxiChrom (GE Healthcare Life Science 28901831) и прикреплены трубкой к пилотной системе для очистки АКТА (GE Healthcare Life Sciences Product Code 29-0086-12). Контейнеры с буферами были прикреплены и подавались на входные линии, как описано в предыдущих примерах. Колонки предварительно десорбировали и очищали от любого связанного материала, используя два объема колонки (CV) буфера лимонной кислоты с pH 2,1 и два CV 0,1M каустического буферного раствора гидроксида натрия, который прокачивали со скоростью 150 см/ч в нисходящем направлении потока и инкубировали при отсутствии потока при 20°C в течение 15 мин, как описано в предыдущих примерах. Использовали пять CV уравнивающего буфера с составом 50 мМ фосфата натрия при pH 7 и проводимостью 6 мСм/см перед нанесением загрузки во всех хроматографических циклах, еще три CV того же буфера использовали после нанесения загрузки для смывания слабосвязанных соединений и пять CV 60 мМ ацетата натрия при pH 3,6 использовали для элюирования связанного продукта на всех циклах. Применяли те же самые контролируемые устройства, что и в предыдущей методологии. Загрузка содержала внеклеточно экспрессированное моноклональное антитело с титром 3,9 мг/мл из клеток-хозяев млекопитающего, которые подвергали глубинной фильтрации для удаления цельных клеток и крупных фрагментов, и фильтрат наносили на колонку со скоростью 150 см/ч. Рассчитанная емкость динамического связывания составляла 47,9 мг/мл матрицы за цикл при 90%-ной загрузке 10%-ного уровня проскока, а рассчитанная производительность составила 20,9 мг/мл матрицы/ч для традиционного периодического процесса. Емкость статического связывания определяли как 77,2 мг/мл, что соответствует 143% емкости динамического связывания в нисходящем потоке, превышая типичную емкость статического связывания матрицы. Измерения выходящего элюата также использовали для моделирования процесса проскока и определения оптимизированных параметров для перегрузки и рециркуляции в соответствии с предлагаемой методологией. Затем эти настройки использовали для управления процессом очистки с перегруженным начальным циклом до введения загрузки 84,1 мг/мл, тремя перегруженными и рециркулируемыми последующими хроматографическими циклами до рабочей емкости 68,5 мг/мл и недогруженным конечным хроматографическим циклом до емкости 22,9 мг/мл. Фактическая емкость, достигнутая на матрице в течение хроматографического цикла в этом эксперименте, составляла 68,5 мг/мл, что соответствует 88,7% максимальной емкости статического связывания матрицы, и матрица работает с производительностью 21 мг/мл матрицы/час для рабочих циклов. Это было сопоставлено с эквивалентным традиционным периодическим режимом в идентичных условиях, но без стадий перегрузки и рециркуляции. Результаты и сравнение с традиционным процессом показаны на фиг. 14.

Ссылки

- Kontermann R.E. (2012). "Dual targeting strategies with bispecific antibodies." *MAbs* 4 (2): 182-197.
 Mahajan E., A. George and B. Wolk (2012). "Improving affinity chromatography resin efficiency using semi-continuous chromatography", *J. Chromatogr. A* 1227: 154-162.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки белка из смеси, включающий стадии:

а) загрузки в рабочем хроматографическом цикле первого объема смеси, содержащей белок, из первого контейнера, на хроматографическую матрицу, работающую так, что белок связывается с хроматографической матрицей до достижения 40-100% емкости статического связывания хроматографической матрицы;

б) сбора элюата, содержащего несвязанный интересующий белок, во втором контейнере; и

с) повторной загрузки в следующем рабочем хроматографическом цикле элюата из второго контейнера и загрузки второго объема белка из первого контейнера на ту же хроматографическую матрицу, чтобы белок связывался с ней до достижения 40-100% максимальной емкости статического связывания хроматографической матрицы,

где повторную загрузку элюата из второго контейнера на хроматографическую матрицу осуществляют до загрузки второго объема смеси, содержащей белок, из первого контейнера.

2. Способ очистки белка из смеси, включающий стадии:

а) загрузки в рабочем хроматографическом цикле первого объема смеси, содержащей белок, из первого контейнера, на хроматографическую матрицу, чтобы емкость динамического связывания хроматографической матрицы была превышена;

б) сбора элюата, содержащего несвязанный интересующий белок, во втором контейнере; и

с) повторной загрузки в следующем рабочем хроматографическом цикле элюата из второго контейнера и загрузки второго объема белка из первого контейнера на ту же хроматографическую матрицу, чтобы емкость динамического связывания хроматографической матрицы была превышена,

где повторную загрузку элюата из второго контейнера на хроматографическую матрицу осуществляют до загрузки второго объема смеси, содержащей белок, из первого контейнера.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что на стадии (а) загрузку белка прекращают при достижении по меньшей мере 40% максимальной емкости статического связывания.

4. Способ по пп.1, 2 или 3, отличающийся тем, что следующий рабочий хроматографический цикл представляет собой хроматографический цикл, следующий непосредственно после.

5. Способ по пп.1-3 или 4, отличающийся тем, что сбор элюата начинают при первой заданной концентрации указанного белка в элюате и прекращают при второй заданной концентрации указанного белка в элюате.

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что заданную фракцию элюата собирают во втором контейнере.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что элюат обрабатывают перед повторной загрузкой на хроматографическую матрицу, причем обработку выбирают из перемешивания или встряхивания, разбавления, доведения концентрации, доведения рН, доведения проводимости, замены буфера или растворителя, охлаждения или нагревания или любой их комбинации.

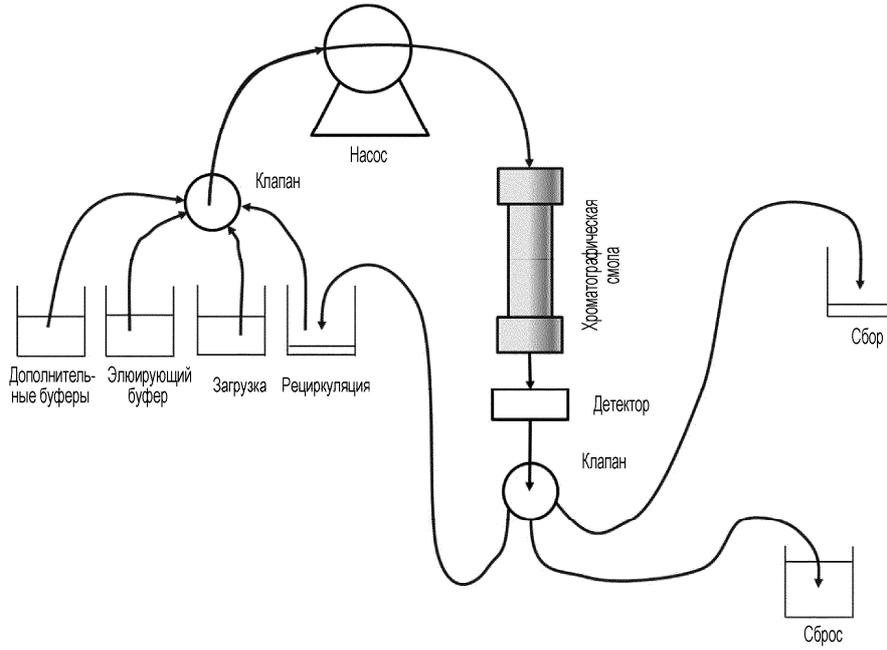
8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что хроматографию выбирают из аффинной хроматографии, ионообменной хроматографии, хроматографии гидрофобного взаимодействия, хроматографии смешанного режима, хиральной хроматографии или диэлектрической хроматографии.

9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что способ включает три стадии хроматографии.

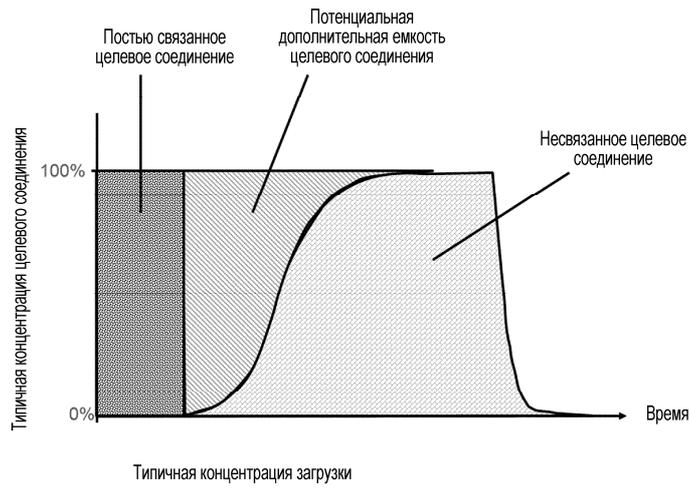
10. Способ по п.9, отличающийся тем, что способ включает хроматографию с Протеином А с последующей катионообменной хроматографией и с последующей анионообменной хроматографией.

11. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что одна, две, три или все из хроматографических матриц представляют собой хроматографическую колонку.

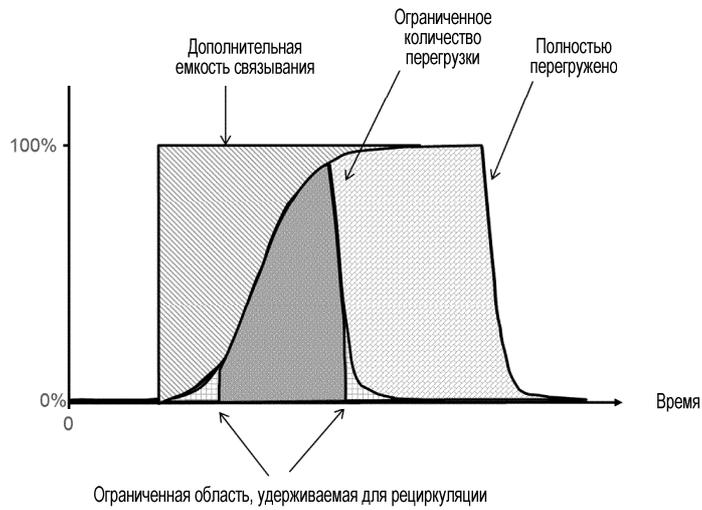
12. Способ по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что белок представляет собой антитело или фрагмент антитела.



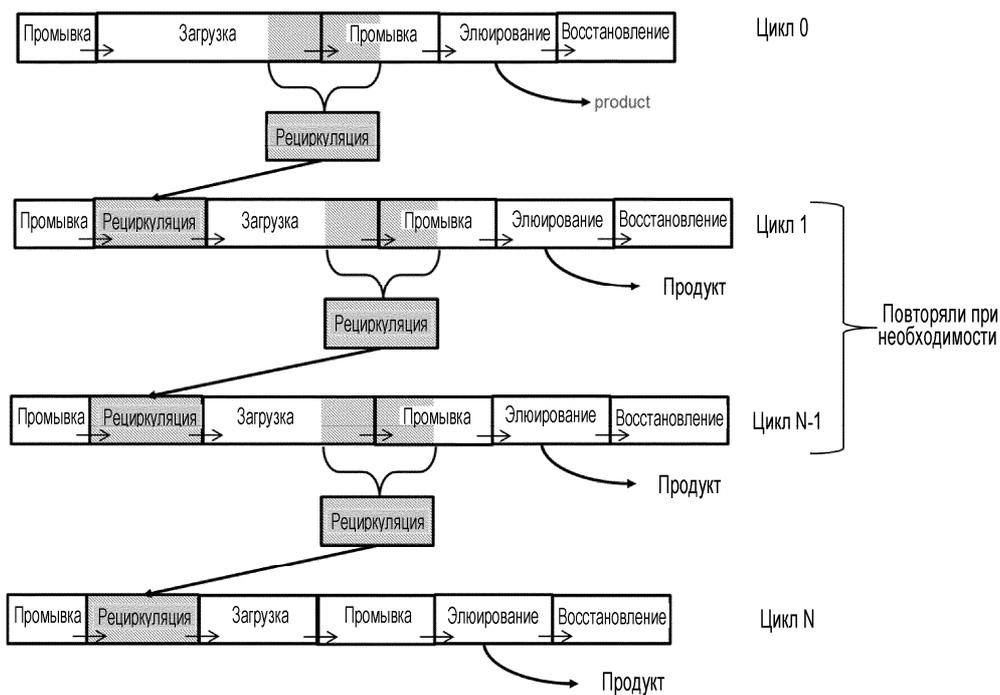
Фиг. 1



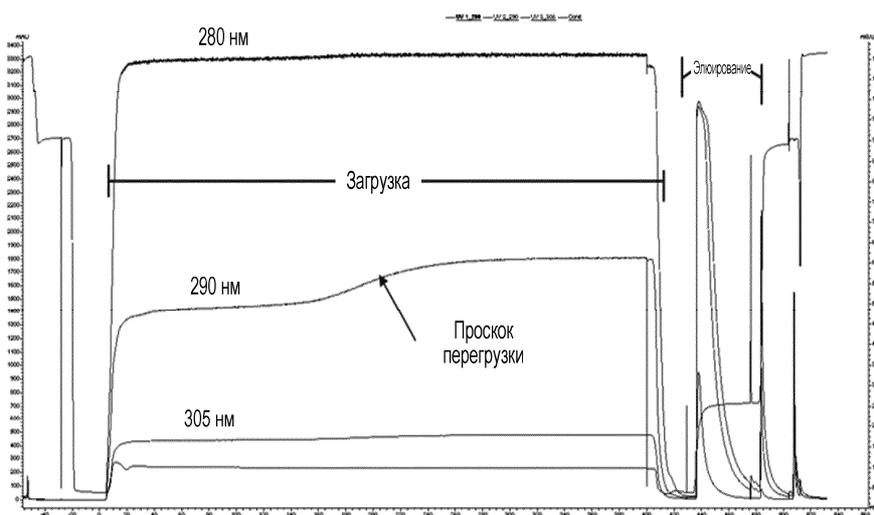
Фиг. 2



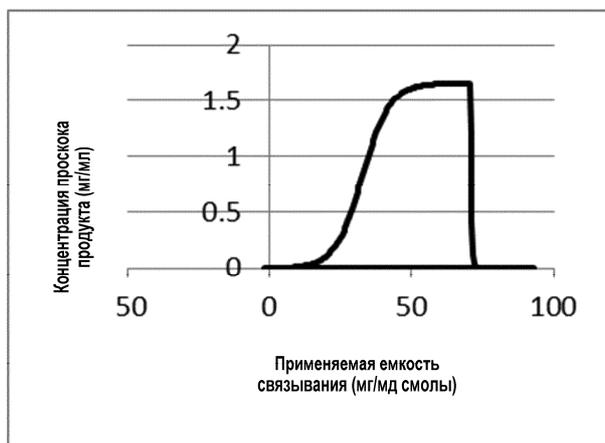
Фиг. 3



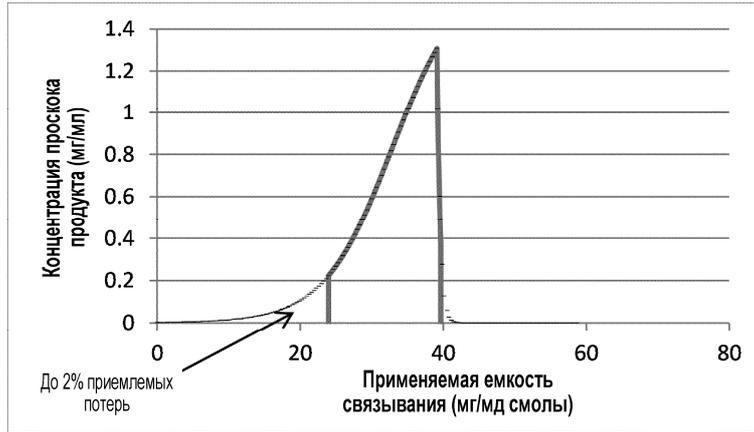
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



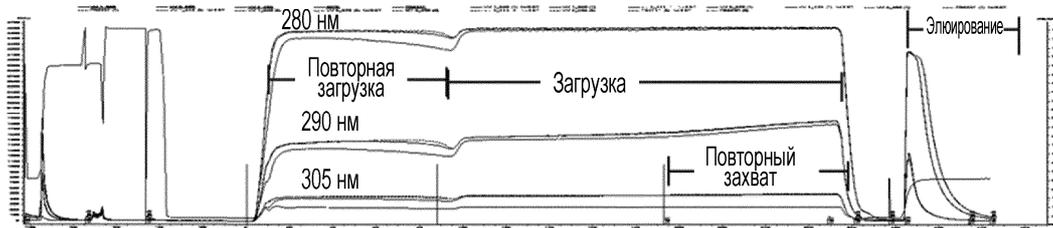
Фиг. 7

	Цикл 1	Циклы 2-4	Цикл 5
Десорбирование (CV)	2	2	2
Очистка (CV)	2	2	2
Мойка без разборки (минуты)	15	15	15
Уравновешивание (CV)	3	3	3
Рециркуляция (CV)	0	9.45	9.45
Свежая загрузка (CV)	15.44	11.27	7.89
Свежая загрузка и сбор рециркуляции (CV)	8.12	8.12	0
Промывка и сбор рециркуляции (CV)	1.33	1.33	0
Промывка (CV)	1.67	1.67	3
Элюирование (CV)	5	5	5
Суммарное время (минуты)	66.42	73.45	58.12

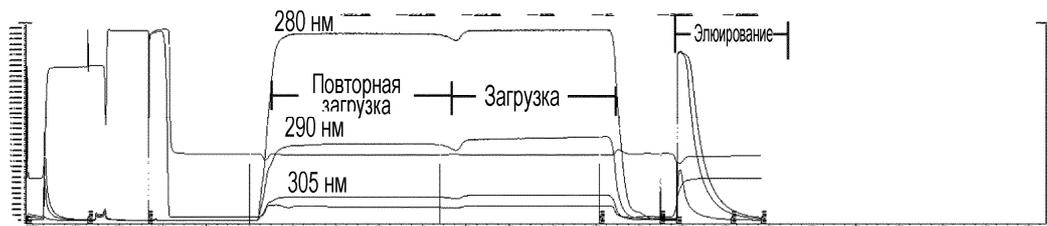
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11

	Традиционный процесс	Начальный цикл	Рабочий цикл 1	Рабочий цикл 2	Рабочий цикл 3	Конечный цикл	Новый рабочий цикл среднее	Новый итог	Новое итоговое улучшение
Загрузка мг/мл (матрица)	20.03	39.11	32.19	32.19	32.19	7.89	32.19	28.71	43.30%
Конц. элюата мг/мл	6.98	9.63	9.72	9.75	9.71	7.58	9.73	9.28	32.92%
Объем элюата мл	26.16	30.43	30.23	29.80	30.08	25.41	30.04	29.19	11.58%
Количество элюата мг	182.60	293.04	293.84	290.55	292.08	192.61	292.16	270.82	48.32%
Выход %	97.86%	80.46%*	98.02%	96.93%	97.44%	262.12%*	97.46%	101.28%	3.82%
Примеси %	11.54%	7.66%	7.98%	7.79%	7.77%	12.19%	7.85%	8.66%	33.26%
Продуктивность мг/мл/час	23.52	28.37	25.65	25.65	25.65	20.68	25.65	25.34	7.74%

Фиг. 12

	Традиционный процесс	Начальный цикл	Рабочий цикл 1	Рабочий цикл 2	Рабочий цикл 3	Конечный цикл	Новый рабочий цикл среднее	Новый итог	Новое итоговое улучшение
Загрузка мг/мл (матрица)	29.68	63.21	56.98	56.98	56.98	30.96	56.98	53.03	78.66%
Конц. элюата мг/мл	~	14.20	14.30	14.30	14.20	11.90	14.27	13.78	~
Объем элюата мл	~	34.76	36.60	36.41	36.52	33.26	36.51	35.51	~
Количество элюата мг	~	493.59	523.38	520.66	518.58	395.79	520.88	489.33	~
Выход %	>98%	83.84%*	98.62%	98.11%	97.72%	137.26%*	98.15%	99.09%	~1%
Продуктивность мг/мл/час	15.25	35.72	28.90	28.90	28.90	17.47	25.65	17.42	14.25%

Фиг. 13

	Традиционный процесс	Начальный цикл	Рабочий цикл 1	Рабочий цикл 2	Рабочий цикл 3	Конечный цикл	Новый рабочий цикл среднее	Новый итог	Новое итоговое улучшение
Загрузка мг/мл (матрица)	47.9	84.1	68.5	68.5	68.5	22.9	68.5	62.5	30.5%
Конц. элюата мг/мл	21.0	32.9	31.9	31.3	31.4	17.2	31.2	28.8	37.8%
Объем элюата, CV	2.2	2.1	2.1	2.1	2.1	1.9	2.1	2.1	93.6%
Количество элюата мг	8780	12900	12600	12400	12400	6200	12500	11300	28.7%
Выход %	96.2	80.7*	96.5	95.2	95.3	142.4*	95.7	94.9	-1.3%
Продуктивность мг/мл/час	20.9	16.3	21.1	20.9	20.9	41.6	21.0	19.7	-5.7%

Фиг. 14

