

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092464 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.01.27

(22) Дата подачи заявки
2019.03.28

(51) Int. Cl. C07K 16/24 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)
C07K 1/34 (2006.01)

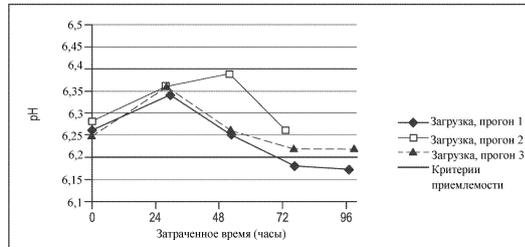
(54) СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ СТАБИЛЬНЫХ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ БЕЛКОВ

(31) 62/656,687
(32) 2018.04.12
(33) US
(86) PCT/US2019/024683
(87) WO 2019/199476 2019.10.17
(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Каллахан Уилльям, Десантьяго
Лоренцо, Талли Клеа, Векслер-
Коэн Яэль, Абель Джеффри, Каушик
Рахул, Джейкоб Нитья Мариам, Тран
Карсон, Болл Николь, Госс Моника
(US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к способам получения стабильных забуференных и не содержащих буфер композиций на основе белков. Настоящее изобретение также относится к способам очистки белков от одной или нескольких примесей.



202092464 A1

202092464 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565264EA/032

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ СТАБИЛЬНЫХ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ БЕЛКОВ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке США № 62/656687, поданной 12 апреля 2018 г., которая включена в данный документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

[1] Настоящая заявка относится к способам получения стабильных композиций на основе белка. Настоящая заявка также относится к способам очистки представляющих интерес белков с использованием процедур очистки для удаления одного или нескольких видов примесей.

Предпосылки изобретения

[2] Эффективная и экономически крупномасштабная очистка белков, например терапевтических белков, в том числе антител, становится все более важным аспектом для биотехнологической и фармацевтической промышленности. Поскольку белки, как правило, получают с использованием способов культивирования клеток, например с использованием как клеток-хозяев млекопитающих, так и бактериальных клеток-хозяев, сконструированных для продуцирования представляющих интерес белков в подходящей среде, способы очистки белков включают множество различных стадий для удаления примесей из компонентов среды и клеток-хозяев. Хотя способы очистки белков могут варьировать в зависимости от свойств конкретного представляющего интерес белка при очистке, способы, как правило, включают по меньшей мере стадии выделения белка из клеток-хозяев и/или клеточного дебриса, например с применением способов центрифугирования и/или фильтрации, и стадии очистки белков, например с применением одного или нескольких способов хроматографии и/или фильтрации, чтобы отделить белок от различных примесей.

[3] Как правило, способы очистки белка включают операцию конечной ультрафильтрации и диафильтрации (UF DF). Для многих белков характерны проблемы со стабильностью во время и после операций UF DF. Например, распространенной проблемой после операций UF DF является агрегация белков. Агрегация вызывает особое беспокойство в случае, если белки, подвергающиеся очистке, нестабильны. В результате белковые агрегаты (например, агрегаты с высокой молекулярной массой (HMW)) присутствуют или их количество может повышаться в композициях на основе белков при измерении после операции UF DF. Однако присутствие агрегатов в композициях на основе белков после UF DF нежелательно, поскольку агрегаты могут отрицательно влиять на стабильность и активность очищенного белка. Существует потребность в способах понижения степени агрегации белка во время и после операции UF DF и получения стабильных композиций на основе белков.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[4] В данном документе представлены способы получения стабильных композиций на основе белков. Настоящая заявка направлена на неожиданные результаты обнаружения, что стабильные композиции на основе белков после UF DF (например, композиции на основе белков с пониженным количеством агрегатов) могут быть получены в случае, если перед операцией UF DF соблюдены условия для снижения степени нестабильности. В частности, настоящая заявка направлена на неожиданные результаты обнаружения, согласно которым регулирование pH препарата белка, полученного в результате осуществления способа очистки, до целевого pH перед конечной операцией UF DF, дает в результате стабильную после операции UF DF композицию, содержащую белок. Композиции на основе белков, полученные способами, описанными в данном документе, обладают повышенной стабильностью по сравнению с композициями на основе белков, полученными аналогичным способом без стадии регулирования pH.

[5] В одном варианте осуществления в данном документе раскрыт способ получения композиции, содержащей белок, при этом способ включает обеспечение препарата, содержащего представляющий интерес белок, при этом препарат получают после подвергания образца, содержащего белок и одну или несколько примесей, процессу очистки, регулирование pH препарата до целевого pH перед конечной операцией ультрафильтрации и диафильтрации и получение композиции, содержащей белок, после конечной операции ультрафильтрации и диафильтрации, где целевой pH равен или приблизительно равен pH композиции, содержащей белок, полученной после конечной операции ультрафильтрации и диафильтрации. В одном варианте осуществления pH регулируют с применением средства, регулирующего pH. В одном варианте осуществления средство, регулирующее pH, представляет собой кислоту, основание или буфер. В одном варианте осуществления целевой pH составляет от pH 4,0 до приблизительно pH 7,0 или от pH 4,0 до приблизительно pH 6,0.

[6] В одном варианте осуществления кислота, используемая для регулирования pH препарата, представляет собой уксусную кислоту, адипиновую кислоту, альгиновую кислоту, аскорбиновую кислоту, аспарагиновую кислоту, бензолсульфоновую кислоту, лимонную кислоту, каприловую кислоту, муравьиную кислоту, глутаминовую кислоту, хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, гидроксикислоты, гиалуроновую кислоту, молочную кислоту, яблочную кислоту, метансульфоновую кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту, пропионовую кислоту, серную кислоту или винную кислоту. В другом варианте осуществления основание, используемое для регулирования pH препарата, представляет собой раствор аммиака, карбонат аммония, диэтанолламин, гидроксид кальция, этаноламин, лизин, полилизин, меглумин, гидроксид калия, бикарбонат натрия, борат натрия, карбонат натрия, гидроксид натрия или триэтанолламин. В одном варианте осуществления буфер, используемый для регулирования pH препарата, представляет собой ацетатный буфер, аспартатный буфер, аскорбатный буфер, цитратный буфер, фосфатный буфер, сукцинатный буфер,

глициновый буфер, карбонатный буфер, лактатный буфер, трис-буфер, бис-трис-буфер, гистидиновый буфер, буфер HEPES, буфер MOPS, буфер MES, буфер ADA, боратный буфер, тартратный буфер или бензоатный буфер.

[7] В одном варианте осуществления способ дополнительно включает концентрирование белка в препарате до целевой концентрации. В одном варианте осуществления стадию концентрирования проводят после стадии регулирования pH и перед конечной операцией UF DF. В другом варианте осуществления стадию концентрирования проводят перед стадией регулирования pH. В одном варианте осуществления целевая концентрация составляет от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, в другом варианте осуществления целевая концентрация составляет от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, в другом варианте осуществления целевая концентрация составляет от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 250 мг/мл, в другом варианте осуществления целевая концентрация составляет от приблизительно 50 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, в другом варианте осуществления целевая концентрация составляет от приблизительно 50 мг/мл до приблизительно 250 мг/мл.

[8] В одном варианте осуществления конечную операцию ультрафильтрации и диафильтрации проводят, используя среду, которая содержит буфер, в одном варианте осуществления конечную операцию ультрафильтрации и диафильтрации проводят, используя среду, которая содержит буфер в концентрации от 2 мМ до 10 мМ, от 2 мМ до 50 мМ или от 2 мМ до 300 мМ. В другом варианте осуществления конечную операцию ультрафильтрации и диафильтрации проводят, используя среду, которая практически не содержит буфер.

[9] В одном варианте осуществления композиция, полученная в результате конечной операции ультрафильтрации и диафильтрации, практически не содержит буфер и содержит белок в концентрации от приблизительно 40 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл. В одном варианте осуществления композиция, полученная в результате конечной операции ультрафильтрации и диафильтрации, содержит буфер и белок в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл. В одном варианте осуществления композиция, полученная в результате конечной операции ультрафильтрации и диафильтрации, содержит буфер в концентрации от 2 мМ до приблизительно 10 мМ и содержит белок в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл. В одном варианте осуществления композиция, полученная в результате конечной операции ультрафильтрации и диафильтрации, содержит буфер с pH, выходящим за пределы диапазона буферной емкости, и содержит белок в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл. В одном варианте осуществления композиция, полученная в результате конечной операции ультрафильтрации и диафильтрации, представляет собой фармацевтический состав, содержащий белок. В одном варианте осуществления композиция, полученная в результате конечной операции ультрафильтрации и диафильтрации, представляет собой лекарственное вещество,

содержащее белок. В одном варианте осуществления композиция, полученная в результате конечной операции ультрафильтрации и диафильтрации, более стабильна по сравнению с композицией, полученной тем же способом без стадии регулирования рН.

[10] В одном варианте осуществления операцию ультрафильтрации и диафильтрации проводят при температуре от приблизительно 25°C до приблизительно 50°C.

[11] В одном варианте осуществления белок получают в результате осуществления способа очистки, включающего одну или несколько стадий, выбранных из центрифугирования, микрофильтрации, TFF, инактивации вирусов, аффинной хроматографии, катионообменной хроматографии, анионообменной хроматографии, хроматографии с гидрофобным взаимодействием, ультрафильтрации, диафильтрации, SPTFF, глубинной фильтрации и хроматографии в смешанном режиме. В одном варианте осуществления способ очистки включает стадию фильтрации для удаления вирусов и одну или несколько стадий, выбранных из центрифугирования, микрофильтрации, TFF, инактивации вирусов, аффинной хроматографии, катионообменной хроматографии, анионообменной хроматографии, хроматографии с гидрофобным взаимодействием, хроматографии в смешанном режиме, ультрафильтрации, диафильтрации, SPTFF и глубинной фильтрации, и препарат получают в результате осуществления стадии фильтрации для удаления вирусов.

[12] В одном варианте осуществления способ очистки включает стадию катионообменной хроматографии и одну или несколько из следующих стадий: центрифугирование, микрофильтрация, TFF, инактивация вирусов, аффинная хроматография, анионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием, хроматография в смешанном режиме, ультрафильтрация, диафильтрация, SPTFF, фильтрация для удаления вирусов и глубинная фильтрация, и препарат получают в результате осуществления стадии катионообменной хроматографии. В одном варианте осуществления способ очистки включает стадию анионообменной хроматографии и одну или несколько из следующих стадий: центрифугирование, микрофильтрация, TFF, инактивация вирусов, аффинная хроматографии, катионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием, хроматография в смешанном режиме, ультрафильтрация, диафильтрация, SPTFF, фильтрация для удаления вирусов и глубинная фильтрация, и препарат получают в результате осуществления стадии анионообменной хроматографии. В одном варианте осуществления способ очистки включает стадию хроматографии с гидрофобным взаимодействием и одну или несколько из следующих стадий: центрифугирование, микрофильтрация, TFF, инактивация вирусов, аффинная хроматография, катионообменная хроматография, анионообменная хроматография, хроматография в смешанном режиме, ультрафильтрация, диафильтрация, SPTFF, фильтрация для удаления вирусов и глубинная фильтрация, и препарат получают в результате осуществления стадии хроматографии с гидрофобным взаимодействием. В одном варианте

осуществления способ очистки включает стадию хроматографии в смешанном режиме и одну или несколько из следующих стадий: центрифугирование, микрофльтрация, TFF, инактивация вирусов, аффинная хроматография, катионообменная хроматография, анионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием, ультрафльтрация, диафльтрация, SPTFF, фльтрация для удаления вирусов и глубинная фльтрация, и препарат получают в результате осуществления стадии хроматографии в смешанном режиме.

[13] В одном варианте осуществления раскрытый в данном документе способ дополнительно включает добавление стабилизатора к препарату. В одном варианте осуществления стабилизатор представляет собой один или несколько стабилизаторов, выбранных из аминокислоты, сахара, полиола, антиоксиданта, хелатирующего средства, липида или производного липида, соли, полимера, инертного белка, поверхностно-активного вещества и смешиваемого с водой совместного растворителя.

[14] В одном варианте осуществления белок, который можно использовать в раскрытом в данном документе способе, представляет собой терапевтический белок. В одном варианте осуществления белок представляет собой любой из следующих белков: этанерцепт, афлиберцепт, адалимумаб, эпоэтин альфа, дарбэпоэтин альфа, филграстим, пегфилграстим, бевацизумаб, цетуксимаб, инфликсимаб, ритуксимаб, экулизумаб, трастузумаб, эволокумаб, деносуаb, ромосозумаб, эренумаб, блинатумомаб, антитело ViTE к CD33 и к CD3, антитело ViTE к EGFRvIII и к CD3, антитело ViTE к DLL3 и к CD3 и антитело ViTE к BCMA и к CD3.

Краткое описание графических материалов

[15] На фигуре 1 показана стабильность pH кондиционированного промежуточного пула AEX при контролируемой комнатной температуре (CRT) в анализе в примере 1.

[16] На фигуре 2 показана стабильность pH (A) и проводимости (B) пула UF DF при CRT в анализе примера 1.

[17] На фигуре 3 показана стабильность этанерцепта, составленного в растворе SAS, в отношении pH (A) и проводимости (B) в анализе в примере 1.

[18] На фигуре 4 показано количество HMW после операции UF DF в составах с буфером и без буфера после регулирования pH пула VF.

[19] На фигуре 5 показаны четыре варианта производственного способа (варианты A-D) в отношении стадий регулирования pH и концентрирования.

[20] На фигуре 6 показан %HMW композиций с афлиберцептом, полученных с использованием четырех вариантов производственного способа.

[21] На фигуре 7 показан % кислотных пиков составов с адалимумабом при 4°C без транспортировки, измеренный при помощи CEX-HPLC в примере 7.

[22] На фигуре 8 показан % кислотных пиков составов с адалимумабом при 4°C с транспортировкой, измеренный при помощи CEX-HPLC в примере 7.

[23] На фигуре 9 показан % кислотных пиков составов с адалимумабом при 25°C без транспортировки, измеренный при помощи CEX-HPLC в примере 7.

[24] На фигуре 10 показан % кислотных пиков составов с адалимумабом при 25°C с транспортировкой, измеренный при помощи СЕХ-НРЛС в примере 7.

[25] На фигуре 11 показан % кислотных пиков составов с адалимумабом при 40°C без транспортировки, измеренный при помощи СЕХ-НРЛС в примере 7.

[26] На фигуре 12 показан % кислотных пиков составов с адалимумабом при 40°C без транспортировки, измеренный при помощи СЕХ-НРЛС в примере 7.

[27] На фигуре 13 показаны значения НМВ составов с адалимумабом при 4°C без транспортировки, измеренные при помощи SE-НРЛС в примере 7.

[28] На фигуре 14 показаны значения НМВ составов с адалимумабом при 4°C с транспортировкой, измеренные при помощи SE-НРЛС в примере 7.

[29] На фигуре 15 показаны значения НМВ составов с адалимумабом при 25°C без транспортировки, измеренные при помощи SE-НРЛС в примере 7.

[30] На фигуре 16 показаны значения НМВ составов с адалимумабом при 25°C с транспортировкой, измеренные при помощи SE-НРЛС в примере 7.

[31] На фигуре 17 показаны значения НМВ составов с адалимумабом при 40°C без транспортировки, измеренные при помощи SE-НРЛС в примере 7.

[32] На фигуре 18 показаны значения НМВ составов с адалимумабом при 40°C с транспортировкой, измеренные при помощи SE-НРЛС в примере 7.

[33] На фигуре 19 показано количество 5 мкМ частиц, невидимых невооруженным глазом, составов с адалимумабом, измеренное при помощи MFI в примере 7.

[34] На фигуре 20 показано количество 10 мкМ частиц, невидимых невооруженным глазом, составов с адалимумабом, измеренное при помощи MFI в примере 7.

[35] На фигуре 21 показано количество 25 мкМ частиц, невидимых невооруженным глазом, составов с адалимумабом, измеренное при помощи MFI в примере 7.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[36] В данном документе раскрыты способы получения стабильных композиций на основе белков. "Стабильная" композиция на основе белка представляет собой композицию, в которой белок, находящийся в ней, в значительной степени сохраняет свою физическую стабильность, и/или химическую стабильность, и/или биологическую активность при хранении. Стабильность композиций на основе белков может быть определена по наличию и/или процентному содержанию агрегированных белков, таких как агрегаты с высокой молекулярной массой (НМВ), в композиции, или по наличию и/или процентной степени деградации белка, например деградации вследствие окисления и/или дезамидирования, или по сдвигу рН композиции при хранении. Например, стабильная композиция на основе белка может включать не более 7%, или не более 5%, или не более 2%, или не более 1,2%, или не более 1%, или не более 0,8%, или не более 0,5% белковых агрегатов, или стабильная композиция на основе белка может не содержать поддающихся обнаружению продуктов деградации белков, например в

результате окисления и/или дезамидирования, или стабильная композиция на основе белка может демонстрировать максимальный сдвиг рН не более чем на 0,1 единицы рН или не более чем на 0,2 единицы рН при хранении.

[37] Различные аналитические методики измерения стабильности белка известны и доступны в уровне техники. Например, эксклюзионная хроматография представляет собой методику, широко используемую для оценивания белковых агрегатов. См., например, Theory and Practice of Size Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Aggregates, Fekete S. et al., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 101:161-173 (2014). Способы анализа стабильности белка и белковых агрегатов также рассматриваются, например, в Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) и в Analysis of Polypeptides and Proteins, Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993).

[38] В одном варианте осуществления способ, раскрытый в данном документе, включает обеспечение препарата, содержащего представляющий интерес белок, при этом препарат получают после подвергания образца, содержащего белок и одну или несколько примесей, процессу очистки, регулирование рН препарата до целевого рН перед конечной операцией ультрафильтрации и диафильтрации и получение композиции, содержащей белок, после конечной операции ультрафильтрации и диафильтрации, где целевой рН равен или приблизительно равен рН композиции, содержащей белок, полученной после конечной операции ультрафильтрации и диафильтрации.

Целевой рН и регулирующие рН средства

[39] Целевой рН представляет собой диапазон рН или значение рН, при котором представляющий интерес белок стабилен. В некоторых вариантах осуществления целевой рН находится в диапазоне от приблизительно 3 до приблизительно 10, от приблизительно 4,0 до приблизительно 5,0, от приблизительно 4,0 до приблизительно 6,0, от приблизительно 4,0 до приблизительно 7,0, от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0, от приблизительно 6,0 до приблизительно 7,0, от приблизительно 4,2 до приблизительно 5,2, от приблизительно 4,4 до приблизительно 5,4, от приблизительно 4,6 до приблизительно 5,6, от приблизительно 4,8 до приблизительно 5,8, от приблизительно 5,2 до приблизительно 6,2, от приблизительно 5,4 до приблизительно 6,4, от приблизительно 5,6 до приблизительно 6,6, от приблизительно 5,8 до приблизительно 6,8, от приблизительно 4,9 до приблизительно 5,6, от приблизительно 5,0 до приблизительно 5,5, от приблизительно 5,1 до приблизительно 5,4, от приблизительно 5,1 до приблизительно 5,3, от приблизительно 5,1 до приблизительно 5,2, от приблизительно 5,2 до приблизительно 5,3, от приблизительно 6,1 до приблизительно 6,5 или от приблизительно 6,1 до приблизительно 6,3. В некоторых вариантах осуществления целевой рН составляет приблизительно 4,0, приблизительно 4,2, приблизительно 4,4, приблизительно 4,6, приблизительно 4,8, приблизительно 5,0, приблизительно 5,2, приблизительно 5,4, приблизительно 5,6, приблизительно 5,8, приблизительно 6,0, приблизительно 6,2, приблизительно 6,4, приблизительно 6,6, приблизительно 6,8 или приблизительно 7,0.

[40] Используемый в данном документе термин "приблизительно", когда он применяется для модификации конкретного значения или диапазона, подразумевает, что могут быть вариации данного значения или диапазона, в том числе в пределах 20 процентов, например в пределах 10 процентов, 5 процентов, 4 процентов, 3 процентов, 2 процентов или 1 процента от заявленного значения или диапазона.

[41] В одном варианте осуществления раскрытых в данном документе способов стадию регулирования рН проводят с использованием регулирующего рН средства. В одном варианте осуществления регулирующее рН средство представляет собой кислоту, в одном варианте осуществления регулирующее рН средство представляет собой основание, в одном варианте осуществления регулирующее рН средство представляет собой буфер.

[42] В одном варианте осуществления средство, регулирующее рН, представляет собой кислоту. Кислота может применяться для регулирования рН препарата, если целевой рН ниже (или более кислый), чем рН препарата. Как правило, кислоты, которые являются нетоксичными и не оказывают отрицательного влияния на белок (например, отрицательного влияния на стабильность белка), могут быть применены в качестве регулирующих рН средств. В одном варианте осуществления кислота представляет собой неорганическую кислоту, в другом варианте осуществления кислота представляет собой органическую кислоту. Неограничивающие примеры кислот, которые могут быть применены для регулирования рН препарата, включают уксусную кислоту, адипиновую кислоту, альгиновую кислоту, аскорбиновую кислоту, аспарагиновую кислоту, бензолсульфоновую кислоту, бензойную кислоту, борную кислоту, камфорсульфоновую кислоту, лимонную кислоту, каприловую кислоту, муравьиную кислоту, глутаминовую кислоту, хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, гидроксикислоты (в том числе альфа-, бета- и омега-гидроксикислоты), гиалуроновую кислоту, молочную кислоту, яблочную кислоту, метансульфоновую кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту, пропионовую кислоту, серную кислоту, сульфоновую кислоту, трансексамовую кислоту и винную кислоту. В некоторых вариантах осуществления кислота представляет собой уксусную кислоту, аскорбиновую кислоту, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, молочную кислоту, серную кислоту, пропионовую кислоту, винную кислоту, гидроксикислоты (в том числе альфа-, бета- и омега-гидроксикислоты) или гиалуроновую кислоту. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления кислота представляет собой молочную кислоту, гидроксикислоты (в том числе альфа-, бета- и омега-гидроксикислоты) или гиалуроновую кислоту.

[43] В одном варианте осуществления регулирующее рН средство представляет собой основание. Основание можно использовать для регулирования рН препарата, если целевой рН выше (или более щелочной), чем рН препарата. Как правило, основания, которые являются нетоксичными и не оказывают отрицательного влияния на белок (например, отрицательного влияния на стабильность белка), могут быть применены в

качестве регулирующих рН средств. В одном варианте осуществления основание представляет собой неорганическое основание, в другом варианте осуществления основание представляет собой органическое основание. Неограничивающие примеры оснований, которые могут быть применены для регулирования рН препарата, включают раствор аммиака, карбонат аммония, диэтаноламин, гидроксид кальция, этаноламин, лизин, меглумин, полилизин, гидроксид калия, бикарбонат натрия, борат натрия, карбонат натрия, гидроксид натрия и триэтаноламин. В одном варианте осуществления основание представляет собой гидроксид калия или гидроксид натрия.

[44] В одном варианте осуществления регулирующее рН средство представляет собой буфер. К препарату могут быть добавлены буферы для регулирования и стабилизации рН препарата до целевого рН. Буфер, как правило, содержит два химических вещества, которые связаны изменением состояния протонирования, например кислоту и ее конъюгированное основание или основание и соответствующую ему конъюгированную кислоту. Буферная емкость или буферность представляют собой свойство буфера и определяют насколько хорошо буфер поддерживает рН. Факторы, влияющие на буферную емкость буфера, включают концентрацию буфера, как правило, чем выше концентрация, тем выше буферная емкость. Кроме того, буферы, обычно, демонстрируют диапазон буферной емкости, который составляет примерно ± 1 (одну) единицу рН от рКа соответствующей кислотной формы. Например, рКа уксусной кислоты составляет $\sim 4,8$, а ацетатный буфер имеет буферную емкость в диапазоне рН примерно приблизительно от рН 3,8 до приблизительно рН 5,8.

[45] Как правило, буферы, которые являются нетоксичными и не оказывают отрицательного влияния на белок (например, отрицательного влияния на стабильность белка), могут быть применены в качестве регулирующих рН средств. Буферы, используемые для регулирования и/или поддержания рН препаратов белков, хорошо известны в уровне техники, например *A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems*, Gueffroy, D., ed. Calbiochem Corporation (1975); Zbacnik T. J. et al., *Role of Buffers in Protein Formulations*, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 106:713-733 (2017). Неограничивающие примеры буферов, которые можно использовать для регулирования рН препарата, включают ацетатный буфер, аспартатный буфер, аскорбатный буфер, боратный буфер, бензоатный буфер, карбонатный буфер, цитратный буфер, глициновый буфер, буфер HEPES, буфер MOPS, буфер MES, буфер на основе N-(2-ацетамидо)иминодиуксусной кислоты (ADA), гистидиновый буфер, лактатный буфер, фосфатный буфер, сукцинатный буфер, трис-буфер, бис-трис-буфер и тартратный буфер.

[46] В некоторых вариантах осуществления регулирующее рН средство представляет собой буфер с низкой буферной емкостью. Этого можно достичь, например, путем использования буфера с рН в пределах диапазона буферной емкости буфера, но с низкой концентрацией, или путем использования буфера с рН, который выходит за пределы диапазона буферной емкости буфера (например, при рН, который больше на одну единицу рН от рКа соответствующей кислотной формы буфера). В некоторых вариантах

осуществления регулирующее рН средство представляет собой буфер с концентрацией от 2 мМ до 20 мМ и с рН в пределах диапазона буферной емкости буфера. В некоторых вариантах осуществления регулирующее рН средство представляет собой буфер с концентрацией от 2 мМ до 10 мМ и с рН в пределах диапазона буферной емкости буфера. В некоторых вариантах осуществления регулирующее рН средство представляет собой буфер с рН, который выходит за пределы диапазона буферной емкости буфера. В некоторых вариантах осуществления регулирующее рН средство представляет собой буфер с рН, который выходит за пределы диапазона буферной емкости буфера и концентрацией от 2 мМ до 50 мМ. Специалист в данной области может определить концентрацию буфера или диапазон концентраций конкретного буфера, который обеспечивает низкую буферную емкость. Аналогичным образом, специалист в данной области может определить диапазон буферной емкости данного буфера и надлежащее количество буфера для применения вне диапазона, который обеспечивает низкую буферную емкость.

Стадия концентрирования

[47] В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в данном документе, дополнительно включает концентрирование белка в препарате до целевой концентрации. В одном варианте осуществления стадия концентрирования выполняется перед конечной операцией UF DF. В одном варианте осуществления стадию концентрирования проводят перед стадией регулирования рН. В одном варианте осуществления стадию концентрирования проводят после стадии регулирования рН и перед конечной операцией UF DP. В одном варианте осуществления стадию концентрирования проводят после конечной операции UF DF. В одном варианте осуществления раскрытый в данном документе способ дополнительно включает первое концентрирование белка в препарате до промежуточной концентрации перед конечной операцией UF DF и последующее концентрирование белка до целевой концентрации после конечной операции UF DF. Целевая концентрация равна или близка к концентрации белка в композиции, полученной после конечной операции UF DF.

[48] Белки можно концентрировать с применением способов, известных в уровне техники. Неограничивающие иллюстративные способы, которые могут быть применены для концентрирования белков, включают ультрафильтрацию, концентрирование с применением мембранных концентраторов (например, концентраторов с целлюлозными мембранами) с использованием центробежной силы, диализ через водопоглощающий материал (например, водопоглощающий полимер), высаливание (например, с использованием сульфата аммония) и хроматографические способы (например, эксклюзионная хроматография).

[49] В некоторых вариантах осуществления целевая концентрация на стадии концентрирования равна или приблизительно равна концентрации белка в композиции, полученной в результате конечной операции UF DF. В некоторых вариантах осуществления целевая концентрация на стадии концентрирования находится в диапазоне

от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 250 мг/мл, от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 250 мг/мл, от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 20 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 30 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 40 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 50 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 60 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 80 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 90 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 100 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 110 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 120 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 130 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 140 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 150 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 160 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 170 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 180 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл или от приблизительно 190 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления целевая концентрация на стадии концентрирования составляет приблизительно 10 мг/мл, приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 30 мг/мл, приблизительно 40 мг/мл, приблизительно 50 мг/мл, приблизительно 55 мг/мл, приблизительно 60 мг/мл, приблизительно 65 мг/мл, приблизительно 70 мг/мл, приблизительно 75 мг/мл, приблизительно 80 мг/мл, приблизительно 85 мг/мл, приблизительно 90 мг/мл, приблизительно 95 мг/мл, приблизительно 100 мг/мл, приблизительно 110 мг/мл, приблизительно 120 мг/мл, приблизительно 130 мг/мл, приблизительно 140 мг/мл, приблизительно 150 мг/мл, приблизительно 160 мг/мл, приблизительно 170 мг/мл, приблизительно 180 мг/мл, приблизительно 190 мг/мл или приблизительно 200 мг/мл.

Способы очистки белка

[50] В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых в данном документе, препарат, рН которого регулируют, получают, подвергая образец, содержащий представляющий интерес белок и одну или несколько примесей, процессу очистки. Способы очистки представляющего интерес белка включают все стадии способа от сбора клеток до конечного очищенного белка и, обычно, включают по меньшей мере стадии выделения белка из клеток-хозяев и/или клеточного дебриса, например с применением способов центрифугирования и/или фильтрации, и стадии очистки белка, например с применением одного или нескольких способов хроматографии и/или фильтрации, чтобы отделить белок от различных примесей. Стадии очистки, обычно используемые в уровне техники, описаны ниже.

[51] В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес белок продуцируется в рекомбинантных системах, например с использованием клеток-хозяев. В рекомбинантных системах белки могут секретироваться из клеток-хозяев в среду для выращивания или могут продуцироваться внутриклеточно. Способы очистки начинаются

с извлечения представляющего интерес белка из клеток-хозяев или клеточной среды. В некоторых вариантах осуществления способ очистки включает одну или несколько стадий: центрифугирования, микрофльтрации, однопроходной фильтрации с тангенциальным потоком (SPTFF), ультрафльтрации и диафльтрации для извлечения представляющего интерес белка из клеток-хозяев. Например, если белок продуцируется внутриклеточно, на первом этапе клетки-хозяева подвергают лизису, например путем механической гомогенизации, осмотического шока или ферментативной обработки, для того, чтобы выделить белок. Дебрис удаляют, например, при помощи центрифугирования, микрофльтрации, ультрафльтрации и/или диафльтрации. Когда белок секретируется в среду, супернатанты из таких систем экспрессии могут быть сначала подвергнуты концентрированию ультрафльтрацией и/или диафльтрацией с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрирования белка, например устройства для ультрафльтрации Amicon™ или Millipore Pellicon™.

[52] Затем белок, извлеченный из клеток-хозяев, очищают с использованием различных известных и используемых в уровне техники способов, в том числе стадии инактивации вирусов, различные хроматографические способы и различные способы фильтрации.

[53] В некоторых вариантах осуществления способ очистки включает стадию инактивации вирусов, например с применением инактивирующих вирусы средств и/или способов, которые делают вирусы неактивными или неспособными к репликации или заражению. Многие инактивирующие вирусы средства известны и используются в данной области. См., например, Gail Sofer, "Virus Inactivation in the 1990s-and into the 21st Century, Part 4, Culture Media, Biotechnology Products, and Vaccines," Biopharm International, pp. 50-57 (2003). Иллюстративные способы инактивации вирусов предусматривают инактивацию растворителем/детергентом (например, Triton X 100): пастеризация (нагревание); инактивация кислотным рН (например, при рН 3-5) и инактивация ультрафиолетовыми лучами (УФ). Также возможно комбинировать два или более из этих способов, например выполнять инактивацию кислотным рН при повышенной температуре, для инактивации вирусов.

[54] В определенных вариантах осуществления способ очистки включает стадии аффинной хроматографии. Аффинная хроматография относится к методике разделения белков, при которой представляющий интерес белок (например, представляющий интерес белок или антитело, содержащее область Fc) специфически связывается с лигандом, специфическим для целевого белка. В определенных вариантах осуществления способ очистки включает использование аффинной смолы на основе белка А для применения на стадиях аффинной хроматографии. Белок А может представлять собой нативный белок А (из *Staph. Aureus*), рекомбинантный белок А или его функциональный вариант. Примеры смол с белком А, которые можно использовать, включают: ProSep-vA HC, ProSep Ultra Plus, MabSelect, MabSelect SuRe и другие коммерчески доступные аффинные смолы. Другие аффинные лиганды/смолы, такие как, например, белок G и другие связывающие

Fc белки (например, одноцепочечные антитела верблюдовых), могут быть использованы в способах очистки, описанных в данном документе. Представляющий интерес белок обычно сохраняет свою специфическую аффинность связывания в отношении лиганда во время стадий хроматографии, в то время как другие примеси в смеси не связываются в значительной степени или специфически с лигандом. Затем представляющий интерес белок элюируют из колонки для аффинной хроматографии с применением растворов, известных из уровня техники, например растворов, рекомендованных при производстве аффинной смолы, применяемой на стадии аффинной хроматографии.

[55] В определенных вариантах осуществления способ очистки включает стадии ионообменной хроматографии. Ионообменная хроматография может представлять собой мембранную ионообменную хроматографию или колоночную ионообменную хроматографию. При ионообменной хроматографии белки разделяются на основе разницы их относительных ионных зарядов, и она включает катионообменную хроматографию и анионообменную хроматографию. Использование катионообменной хроматографии по сравнению с анионообменной хроматографией основано на общем заряде белка. В пределах квалификации специалиста в данной области определить использовать ли только катионообменную хроматографию, только анионообменную хроматографию или их комбинацию для очистки представляющего интерес белка. В некоторых вариантах осуществления в способе очистки используется только стадия катионного обмена. В некоторых вариантах осуществления в способе очистки используется только стадия анионного обмена. В некоторых вариантах осуществления в способе очистки используется стадия анионного обмена перед применением стадии катионного обмена. В определенных вариантах осуществления в способе очистки используется стадия катионного обмена перед применением стадии анионного обмена.

[56] В ионообменной хроматографии представляющий интерес белок в препарате притягивается разноименными зарядами, фиксированных на хроматографической матрице, при условии, что ионная сила окружающего раствора или буфера низкая. Элюирование, обычно, достигается за счет увеличения ионной силы (т. е. проводимости) элюирующего раствора, чтобы он конкурировал с растворенным веществом за заряженные участки ионообменной матрицы. Проводимость препарата можно повысить, например добавлением к препарату соли. Соль, которую можно использовать, будет зависеть от pH препарата и может быть легко определена специалистом в данной области. В некоторых вариантах осуществления количество добавляемой соли составляет от 25 мМ до 500 мМ и от 100 мМ до 250 мМ. Изменение pH и тем самым изменение заряда представляющего интерес белка представляет собой еще один способ достижения элюирования белка. Изменение проводимости или pH может быть постепенным (градиентное элюирование) или ступенчатым (ступенчатое элюирование).

[57] Катионообменные материалы или смолы доступны из коммерческих источников. Неограничивающий перечень катионных материалов, подходящих для катионообменной хроматографии, включает карбоксиметил (CM), сульфэтил (SE),

сульфопропил (SP), фосфат (P), сульфонат (S) и катионообменные материалы Fractogel® EMD от Millipore. Ионообменные целлюлозные смолы, такие как DE23™, DE32™, DE52™, CM-23™, CM-32™ и CM-52™ доступны от Whatman Ltd. Maidstone, Кент, Великобритания. Также известны ионообменники на основе SEPHADEX® и сетчатые ионообменники. Например, DEAE-, QAE-, CM- и SP-SEPHADEX® и DEAE-, Q-, CM- и S-SEPHAROSE® и SEPHAROSE® Fast Flow доступны от Pharmacia AB. Кроме того, как DEAE, так и CM производные сополимеры этиленгликоля-метакрилата, такие как TOYOPEARL™ DEAE-650S или M и TOYOPEARL™ CM-650S или M доступны от Toso Haas Co., Филадельфия, штат Пенсильвания, США. Катионообменные материалы Fractogel® EMD предусматривают Fractogel® EMD SO3 - (S), Fractogel® EMD COO- (S), Fractogel® EMD SO3 - (M), Fractogel® EMD SE Hicap (M) и Fractogel® EMD COO- (M).

[58] Анионообменные материалы или смолы доступны из коммерческих источников. Неограничивающие примеры анионообменных заместителей предусматривают группы диэтиламиноэтила (DEAE), четвертичного аминоэтила (QAE) и четвертичного амина (Q). Иллюстративные анионообменные материалы, в том числе Fractogel® EMD TMAE (S), Fractogel® EMD DEAE (S), Fractogel® EMD DMAE (S), Fractogel® EMD TMAE (M), Fractogel® EMD TMAE Hicap (M), Fractogel® EMD DEAE (M), Fractogel® EMD DMAE (M), доступны от Millipore.

[59] В некоторых вариантах осуществления способ очистки включает стадии хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC). Как правило, HIC пригодна для удаления белковых агрегатов, таких как агрегаты антител, и технологических примесей. В некоторых вариантах осуществления HIC проводят после стадий осаждения солей или процедур ионного обмена, поскольку гидрофобные взаимодействия наиболее сильны в условиях высокой ионной силы. Многие колонки HIC доступны в продаже. Неограничивающие примеры включают колонку Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow с низкой или высокой степенью замещения (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Швеция); колонку Phenyl Sepharose™ High Performance (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Швеция); колонку Octyl Sepharose™ High Performance (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Швеция); колонки Fractogel™ EMD Propyl или Fractogel™ EMD Phenyl (E. Merck, Германия); Macro-Prep™ Methyl или Macro-Prep™ t-Butyl Supports (Bio-Rad, штат Калифорния, США); колонку WP HI-Propyl (C3)™ (J. T. Baker, штат Нью-Джерси, США); колонку Phenyl Sepharose HiSub FF (GE Healthcare) и Тоуопearl™ с эфиром, фенилом или бутилом (TosoHaas, штат Пенсильвания, США).

[60] В некоторых вариантах осуществления способ очистки включает хроматографию в смешанном режиме или многовариантную хроматографию (MMC). MMC представляет собой хроматографический способ, при котором растворенные вещества взаимодействуют с неподвижной фазой посредством более чем одного режима или механизма взаимодействия. MMC с использованием мультимодальных функциональных лигандов может адсорбировать представляющий интерес белок при помощи комбинации ионных взаимодействий, водородных связей и гидрофобных

взаимодействий. Смолы со смешанным режимом действия могут напрямую захватывать целевые белки при относительно высокой концентрации соли без разбавления или других добавок благодаря множеству связывающих взаимодействий. Неограничивающие примеры коммерчески доступных смол со смешанным режимом действия включают Capto MMC, Capto adhere и Capto Core 700 от GE Healthcare, PPA Hypercel, HEA Hypercel и MEP Hypercel от Pall Corporation, Eshmuno HCX от Merck Millipore, Toyopearl MX-Trp-650 M от TOSOH Bioscience и Nuvia cPrime, CHT Ceramic Hydroxyapatite и CFT Ceramic Fluoroapatite от Bio-Rad.

[61] В некоторых вариантах осуществления способ очистки белка включает стадии ультрафильтрации и/или диафильтрации. Ультрафильтрация представляет собой способ разделения через полупроницаемую мембрану, которая удерживает макромолекулы, позволяя при этом проходить растворителю и малым молекулам растворенного вещества. Способ ультрафильтрации известен в уровне техники и повсеместно применяется в способах очистки белков, например Zeman et al., *Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications*, Marcel Dekker, Inc., pp. 299-301 (1996). Ультрафильтрация может применяться для очистки и концентрирования макромолекул, таких как белки. Диафильтрация представляет собой способ, в котором применяются ультрафильтрационные мембраны для удаления, замены или снижения концентрации солей или растворителей в растворах, содержащих белки, пептиды, нуклеиновые кислоты и другие биомолекулы. В определенных вариантах осуществления в способе очистки белка применяются операции ультрафильтрации и/или диафильтрации при извлечении из клеток-хозяев представляющего интерес белка. В других вариантах осуществления ультрафильтрация и/или диафильтрация применяются на других стадиях способа очистки, в том числе в качестве предпоследней или конечной стадии очистки. Стадии ультрафильтрации и диафильтрации могут применяться для концентрирования белков, или замены буфера, или составления представляющего интерес белка с необходимым раствором или необходимым буфером.

[62] В некоторых вариантах осуществления способ очистки белка в случае необходимости включает стадию фильтрации для удаления вирусов между любыми из стадий, описанных выше, и после них. В определенных вариантах осуществления способ очистки включает стадию фильтрации для удаления вирусов после инактивации вирусов, или после аффинной хроматографии, или после катионообменной хроматографии, или после анионообменной хроматографии, или после НИС, или после хроматографии в смешанном режиме. В определенных вариантах осуществления способ очистки включает стадию фильтрации для удаления вирусов перед катионообменной хроматографией, или перед анионообменной хроматографией, или перед НИС, или перед хроматографией в смешанном режиме. В определенных вариантах осуществления способ очистки включает стадию фильтрации для удаления вирусов в качестве конечной стадии очистки или предпоследней стадии очистки, например перед конечной операцией ультрафильтрации и диафильтрации.

[63] Фильтрация для удаления вирусов может быть достигнута с помощью соответствующих фильтров. Неограничивающие примеры подходящих фильтров для фильтрации для удаления вирусов включают фильтр Ultipor DV50™ от Pall Corporation, фильтры Viresolve™ (Millipore, Биллерика, штат Массачусетс, США); фильтры Zeta Plus VR™ (CUNO; Мериден, штат Коннектикут) и фильтры Planova™ (Asahi Kasei Pharma, Planova Division, Буффало Гров, штат Иллинойс). В некоторых вариантах осуществления на стадии фильтрации для удаления вирусов используется фильтр предварительной очистки, который может быть любого формата, в том числе без ограничения мембраной, глубинным фильтром, хроматографической колонкой или их комбинациями. Неограничивающие примеры глубинных фильтров, которые могут использоваться для фильтрации для удаления вирусов, включают глубинные фильтры Cuno™ модель 30/60ZA (3M Corp.) и двухслойные фильтрующие картриджи Sartopore™ 0,45/0,2 мкм.

[64] В определенных вариантах осуществления, способ очистки может включать дополнительные стадии способа, в том числе стадии составления и/или концентрирования. В одном варианте осуществления способ очистки дополнительно включает стерилизующую фильтрацию и/или абсолютную фильтрацию. Стерилизующую фильтрацию, обычно, проводят с использованием фильтрации с нормальным потоком (NFF), где направление потока жидкости перпендикулярно фильтрующей среде (например, мембране), измеряющей приложенное давление.

[65] В некоторых вариантах осуществления раскрытых в данном документе способов препарат, рН которого регулируют, получают в результате осуществления способа очистки, который включает одну или несколько из следующих стадий: центрифугирование, микрофильтрация, фильтрация с тангенциальным потоком (TFF), инактивация вирусов, аффинная хроматография, катионообменная хроматография, анионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием, хроматография в смешанном режиме, ультрафильтрация, диафильтрация, однопроводная фильтрация с тангенциальным потоком (SPTFF), глубинная фильтрация и фильтрация для удаления вирусов.

[66] В некоторых вариантах осуществления препарат, рН которого регулируют, получают в результате осуществления способа очистки, который включает стадию фильтрации для удаления вирусов и одну или несколько из следующих стадий: центрифугирование, микрофильтрация, фильтрация с тангенциальным потоком (TFF), инактивация вирусов, аффинная хроматография, катионообменная хроматография, анионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием, хроматография в смешанном режиме, ультрафильтрация, диафильтрация, однопроводная фильтрация с тангенциальным потоком (SPTFF) и глубинная фильтрация, и при этом препарат получают в результате осуществления стадии фильтрации для удаления вирусов. В некоторых вариантах осуществления стадия фильтрации для удаления вирусов является предпоследней стадией способа очистки, и препарат получают в результате осуществления стадии фильтрации для удаления вирусов. В некоторых вариантах

осуществления стадия фильтрации для удаления вирусов является конечной стадией способа очистки, и препарат получают в результате осуществления стадии фильтрации для удаления вирусов.

[67] В некоторых вариантах осуществления препарат, рН которого регулируют, получают в результате осуществления способа очистки, который включает стадию катионообменной хроматографии и одну или несколько из следующих стадий: центрифугирование, микрофильтрация, фильтрация с тангенциальным потоком (TFF), инактивация вирусов, аффинная хроматография, анионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием, хроматография в смешанном режиме, ультрафильтрация, диафильтрация, однопроводная фильтрация с тангенциальным потоком (SPTFF), глубинная фильтрация и фильтрация для удаления вирусов, и при этом препарат получают в результате осуществления стадии катионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления стадия катионообменной хроматографии представляет собой предпоследнюю стадию или конечную стадию способа очистки, и препарат получают в результате осуществления стадии катионообменной хроматографии.

[68] В некоторых вариантах осуществления препарат, рН которого регулируют, получают в результате осуществления способа очистки, который включает стадию анионообменной хроматографии и одну или несколько из следующих стадий: центрифугирование, микрофильтрация, фильтрация с тангенциальным потоком (TFF), инактивация вирусов, аффинная хроматография, катионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием, хроматография в смешанном режиме, ультрафильтрация, диафильтрация, однопроводная фильтрация с тангенциальным потоком (SPTFF), глубинная фильтрация и фильтрация для удаления вирусов, и при этом препарат получают в результате осуществления стадии анионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления стадия анионообменной хроматографии является предпоследней стадией или конечной стадией способа очистки, и препарат получают в результате осуществления стадии анионообменной хроматографии.

[69] В некоторых вариантах осуществления препарат, рН которого регулируют, получают в результате осуществления способа очистки, который включает стадию хроматографии с гидрофобным взаимодействием и одну или несколько из следующих стадий: центрифугирование, микрофильтрация, фильтрация с тангенциальным потоком (TFF), инактивация вирусов, аффинная хроматография, катионообменная хроматография, анионообменная хроматография, хроматография в смешанном режиме, ультрафильтрация, диафильтрация, однопроводная фильтрация с тангенциальным потоком (SPTFF), глубинная фильтрация и фильтрация для удаления вирусов, и при этом препарат получают в результате осуществления стадии хроматографии с гидрофобным взаимодействием. В некоторых вариантах осуществления стадия хроматографии с гидрофобным взаимодействием является предпоследней стадией или конечной стадией способа очистки, и препарат получают в результате осуществления стадии хроматографии с гидрофобным взаимодействием.

[70] В некоторых вариантах осуществления препарат, рН которого регулируют, получают в результате осуществления способа очистки, который включает стадию хроматографии в смешанном режиме и одну или несколько из следующих стадий: центрифугирование, микрофльтрация, фильтрация с тангенциальным потоком (TFF), инаktivация вирусов, аффинная хроматография, катионообменная хроматография, анионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием, ультрафльтрация, диафльтрация, однопроходная фильтрация с тангенциальным потоком (SPTFF), глубинная фильтрация и фильтрация для удаления вирусов, и при этом препарат получают в результате осуществления стадии хроматографии в смешанном режиме. В некоторых вариантах осуществления стадия хроматографии в смешанном режиме является предпоследней стадией или конечной стадией способа очистки, и препарат получают в результате осуществления стадии хроматографии в смешанном режиме.

[71] В некоторых вариантах осуществления препарат, рН которого регулируют, получают в результате осуществления способа очистки, который включает стадию фильтрации для удаления вирусов и одну или несколько из следующих стадий: инаktivация вирусов, аффинная хроматография, катионообменная хроматография, анионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием и хроматография в смешанном режиме, и где препарат получают в результате осуществления стадии фильтрации для удаления вирусов. В некоторых вариантах осуществления стадия фильтрации для удаления вирусов является предпоследней стадией способа очистки, и препарат получают в результате осуществления стадии фильтрации для удаления вирусов. В некоторых вариантах осуществления стадия фильтрации для удаления вирусов является конечной стадией способа очистки, и препарат получают в результате осуществления стадии фильтрации для удаления вирусов.

[72] В некоторых вариантах осуществления препарат, рН которого регулируют, получают в результате осуществления способа очистки, который включает стадию катионообменной хроматографии и одну или несколько из следующих стадий: инаktivация вирусов, аффинная хроматография, анионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием, хроматография в смешанном режиме и фильтрация для удаления вирусов, и при этом препарат получают в результате осуществления стадии катионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления стадия катионообменной хроматографии представляет собой предпоследнюю стадию или конечную стадию способа очистки, и препарат получают в результате осуществления стадии катионообменной хроматографии.

[73] В некоторых вариантах осуществления препарат, рН которого регулируют, получают в результате осуществления способа очистки, который включает стадию анионообменной хроматографии и одну или несколько из следующих стадий: инаktivация вирусов, аффинная хроматография, катионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием, хроматография в смешанном режиме и

фильтрация для удаления вирусов, и при этом препарат получают в результате осуществления стадии анионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления стадия анионообменной хроматографии является предпоследней стадией или конечной стадией способа очистки, и препарат получают в результате осуществления стадии анионообменной хроматографии.

[74] В некоторых вариантах осуществления препарат, рН которого регулируют, получают в результате осуществления способа очистки, который включает стадию хроматографии с гидрофобным взаимодействием и одну или несколько из следующих стадий: инактивация вирусов, аффинная хроматография, анионообменная хроматография, катионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием, хроматография в смешанном режиме и фильтрация для удаления вирусов, и при этом препарат получают в результате осуществления стадии хроматографии с гидрофобным взаимодействием. В некоторых вариантах осуществления стадия хроматографии с гидрофобным взаимодействием является предпоследней стадией или конечной стадией способа очистки, и препарат получают в результате осуществления стадии хроматографии с гидрофобным взаимодействием.

[75] В некоторых вариантах осуществления препарат, рН которого регулируют, получают в результате осуществления способа очистки, который включает стадию хроматографии в смешанном режиме и одну или несколько из следующих стадий: инактивация вирусов, аффинная хроматография, анионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием, катионообменная хроматография и фильтрация для удаления вирусов, и при этом препарат получают в результате осуществления стадии хроматографии в смешанном режиме. В некоторых вариантах осуществления стадия хроматографии в смешанном режиме является предпоследней стадией или конечной стадией способа очистки, и препарат получают в результате осуществления стадии хроматографии в смешанном режиме.

Конечная операция ультрафильтрации и диафильтрации (UF DF) и композиции, полученные в результате осуществления этой операции

[76] В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, включают стадию получения композиции, содержащей белок, в результате осуществления конечной операции UF DF. В некоторых вариантах осуществления композиция, полученная в результате осуществления конечной операции UF DF, представляет собой лекарственное вещество (DS), содержащее белок. В некоторых вариантах осуществления композиция, полученная в результате осуществления конечной операции UF DF, представляет собой фармацевтический состав, содержащий белок. Другими словами, конечная операция UF DF помещает представляющий интерес белок в композицию, предназначенную для белка. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадии стерильной фильтрации и/или абсолютной фильтрации после конечной операции UF DF. В некоторых вариантах осуществления конечная операция UF DF является предпоследней или конечной стадией способа очистки, в

результате осуществления которой получают препарат, рН которого регулируют.

[77] В некоторых вариантах осуществления композиция, полученная в результате осуществления конечной операции UF DF, содержит представляющий интерес белок в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 250 мг/мл, от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 20 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 30 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 40 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 50 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 60 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 80 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 90 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 100 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 110 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 120 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 130 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 140 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 150 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 160 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 170 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 180 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл или от приблизительно 190 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления, композиция, полученная в результате осуществления конечной операции UF DF, содержит представляющий интерес белок в концентрации приблизительно 10 мг/мл, приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 30 мг/мл, приблизительно 40 мг/мл, приблизительно 50 мг/мл, приблизительно 55 мг/мл, приблизительно 60 мг/мл, приблизительно 65 мг/мл, приблизительно 70 мг/мл, приблизительно 75 мг/мл, приблизительно 80 мг/мл, приблизительно 85 мг/мл, приблизительно 90 мг/мл, приблизительно 95 мг/мл, приблизительно 100 мг/мл, приблизительно 110 мг/мл, приблизительно 120 мг/мл, приблизительно 130 мг/мл, приблизительно 140 мг/мл, приблизительно 150 мг/мл, приблизительно 160 мг/мл, приблизительно 170 мг/мл, приблизительно 180 мг/мл, приблизительно 190 мг/мл или приблизительно 200 мг/мл.

[78] В некоторых вариантах осуществления композиция, полученная в результате осуществления конечной операции UF DF, имеет рН или диапазон рН, который соответствует или приблизительно соответствует целевому рН на стадии регулирования рН. Значения рН для целевого рН раскрыты выше.

[79] В некоторых вариантах осуществления композиция, полученная в результате осуществления конечной операции UF DF, содержит буфер, например, для поддержания рН композиции. В композицию может входить любой буфер, раскрытый выше. В некоторых вариантах осуществления композиция, полученная в результате осуществления конечной операции UF DF, содержит буфер в концентрации от 2 мМ до 500 мМ, от 2 мМ до 50 мМ, или от 2 мМ до 10 мМ, или от приблизительно 10 мМ до 50 мМ, или от 50 до 500 мМ. В некоторых вариантах осуществления композиция, полученная в результате

осуществления конечной операции UF DF, содержит буфер в концентрации от приблизительно 50 мМ до приблизительно 300 мМ, от приблизительно 60 мМ до приблизительно 300 мМ, от приблизительно 70 мМ до приблизительно 300 мМ, от приблизительно 80 мМ до приблизительно 300 мМ, от приблизительно 90 до приблизительно 300 мМ, от приблизительно 100 мМ до приблизительно 300 мМ, от приблизительно 120 мМ до приблизительно 300 мМ, от приблизительно 140 мМ до приблизительно 300 мМ, от приблизительно 160 мМ до приблизительно 300 мМ, от приблизительно 180 мМ до приблизительно 300 мМ, от приблизительно 200 мМ до приблизительно 300 мМ, от приблизительно 220 мМ до приблизительно 300 мМ или от приблизительно 250 мМ до приблизительно 300 мМ. В некоторых вариантах осуществления композиция, полученная в результате осуществления конечной операции UF DF, содержит буфер в концентрации 2 мМ, приблизительно 2,5 мМ, приблизительно 5 мМ, приблизительно 10 мМ, приблизительно 20 мМ, приблизительно 30 мМ, приблизительно 40 мМ, приблизительно 50 мМ, приблизительно 70 мМ, приблизительно 90 мМ, приблизительно 100 мМ, приблизительно 120 мМ, приблизительно 150 мМ, приблизительно 170 мМ, приблизительно 200 мМ, приблизительно 220 мМ, приблизительно 250 мМ, приблизительно 270 мМ или приблизительно 300 мМ. В вариантах осуществления, в которых композиция, полученная в результате осуществления конечной операции UF DF, содержит буфер, представляющий интерес белок, который содержится в композиции, может быть в любой из концентраций, описанных выше.

[80] В некоторых вариантах осуществления композиция, полученная в результате осуществления конечной операции UF DF, содержит буфер с низкой буферной емкостью (например, буфер с низкой концентрацией и рН в диапазоне буферной емкости буфера, или буфер с рН, который выходит за пределы диапазона буферной емкости буфера; например, ацетатный буфер при рН, который выходит за пределы диапазона буферной емкости от примерно приблизительно рН 3,8 до приблизительно рН 5,8, имеет низкую буферную емкость) и содержит представляющий интерес белок в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления композиция, полученная в результате осуществления конечной операции UF DF, содержит буфер в концентрации от 2 мМ до 10 мМ, и имеет рН в пределах диапазона буферной емкости буфера, и содержит представляющий интерес белок в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, или от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 40 мг/мл, или приблизительно 10 мг/мл, или приблизительно 20 мг/мл, или приблизительно 30 мг/мл, или приблизительно 40 мг/мл или приблизительно 50 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления композиция, полученная в результате осуществления конечной операции UF DF, содержит буфер в концентрации от 2 мМ до 20 мМ, и имеет рН в пределах диапазона буферной емкости буфера, и содержит представляющий интерес белок в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, или от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 40 мг/мл, или приблизительно 10 мг/мл, или приблизительно 20 мг/мл, или приблизительно

30 мг/мл, или приблизительно 40 мг/мл или приблизительно 50 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления композиция, полученная в результате осуществления конечной операции UF DF, содержит буфер при рН, который выходит за пределы диапазона буферной емкости буфера, и концентрации от 2 мМ до 50 мМ и содержит представляющий интерес белок в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, или от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 40 мг/мл, или приблизительно 10 мг/мл, или приблизительно 20 мг/мл, или приблизительно 30 мг/мл, или приблизительно 40 мг/мл, или приблизительно 50 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления композиция, полученная в результате осуществления конечной операции UF DF, содержит буфер при рН, который выходит за пределы диапазона буферной емкости буфера, и концентрации от 2 мМ до 40 мМ и содержит представляющий интерес белок в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, или от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 40 мг/мл, или приблизительно 10 мг/мл, или приблизительно 20 мг/мл, или приблизительно 30 мг/мл, или приблизительно 40 мг/мл, или приблизительно 50 мг/мл.

[81] В некоторых вариантах осуществления композиция, полученная в результате осуществления конечной операции UF DF, практически не содержит буфер. Такие композиции также называют композициями без буфера. Фраза "практически не содержит буфер" или "практически не содержит буферного средства" подразумевает, что стандартного буфера меньше 2 мМ, или меньше 1 мМ, или меньше 0,5 мМ, или меньше 0,25 мМ. Как правило, в таких вариантах осуществления композиция содержит представляющий интерес белок в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл. Предпочтительно композиция содержит представляющий интерес белок в концентрации от приблизительно 40 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 50 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 60 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 80 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 90 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 100 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 110 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 120 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 130 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 140 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 150 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 160 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 170 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 180 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл или от приблизительно 190 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, или композиция содержит представляющий интерес белок в концентрации приблизительно 50 мг/мл, приблизительно 55 мг/мл, приблизительно 60 мг/мл, приблизительно 65 мг/мл, приблизительно 70 мг/мл, приблизительно 75 мг/мл, приблизительно 80 мг/мл, приблизительно 85 мг/мл, приблизительно 90 мг/мл, приблизительно 95 мг/мл, приблизительно 100 мг/мл, приблизительно 110 мг/мл, приблизительно 120 мг/мл, приблизительно 130 мг/мл, приблизительно 140 мг/мл,

приблизительно 150 мг/мл, приблизительно 160 мг/мл, приблизительно 170 мг/мл, приблизительно 180 мг/мл, приблизительно 190 мг/мл или приблизительно 200 мг/мл.

[82] В некоторых вариантах осуществления конечную операцию UF DF проводят с использованием среды, содержащей раствор композиции или раствор состава, предназначенный для белка после операции UF DF. Например, если композиция, полученная в результате осуществления конечной операции UF DF, представляет собой фармацевтический состав, содержащий белок, то конечную операцию ультрафильтрации и диалфильтрации проводят с использованием раствора состава. Если композиция, полученная в результате осуществления конечной операции UF DF, представляет собой DS, содержащее белок, то конечную операцию UF DF проводят с использованием раствора композиции, предназначенного для содержания белка. Следовательно, в вариантах осуществления, в которых композиция, полученная в результате осуществления конечной операции UF DF, содержит буфер, конечную операцию UF DF проводят с использованием среды (например, раствора композиции или раствора состава), содержащей буфер. В вариантах осуществления, в которых композиция, полученная в результате осуществления конечной операции UF DF, содержит буфер с низкой буферной емкостью, конечную операцию UF DF проводят с использованием среды (например, раствора композиции или раствора состава), содержащей буфер с низкой буферной емкостью (например, буфер с низкой концентрацией, например от 2 мМ до 10 мМ, и pH в пределах диапазона буферной емкости буфера, или буфер при pH, который выходит за пределы диапазона буферной емкости буфера). В вариантах осуществления, в которых композиция, полученная в результате осуществления конечной операции UF DF, практически не содержит буфер, конечную операцию UF DF проводят с использованием среды (например, раствора композиции или раствора состава), практически не содержащей буфер. "Раствор композиции" или "раствор состава", если иное не следует из контекста его использования, представляет собой раствор, который сам по себе не содержит представляющий интерес белок, но применяется для приготовления состава или композиции, содержащих белок. Подходящие буферы и концентрации буфера раскрыты выше.

[83] В некоторых вариантах осуществления конечную операцию UF DF проводят при температуре от приблизительно 20°C до приблизительно 50°C. В некоторых вариантах осуществления конечную операцию UF DF проводят при температуре от приблизительно 25°C до приблизительно 40°C. В некоторых вариантах осуществления конечную операцию UF DF проводят при температуре от приблизительно 30°C до приблизительно 40°C.

Стабилизирующие средства

[84] В некоторых вариантах осуществления раскрытый в данном документе способ включает добавление к препарату одного или нескольких стабилизирующих средств или стабилизаторов для повышения, стимулирования или поддержания стабильности представляющих интерес белков. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор

представляет собой аминокислоту, сахар, полиол, антиоксидант, хелатирующее средство, липид или производное липида, соль, полимер, инертный белок или полипептид, поверхностно-активное вещество, смешиваемый с водой совместный растворитель или их комбинацию. Неограничивающие примеры аминокислотных стабилизаторов, которые можно использовать в раскрытых в данном документе способах, включают гистидин, аргинин, глицин, метионин, аланин, аспарагиновую кислоту, гидрохлорид лизина, пролин, лизин, саркозин, гамма-аминомасляную кислоту и глутаминовую кислоту или ди- и трипептиды, содержащие аминокислоты. Неограничивающие примеры антиоксидантов включают аскорбиновую кислоту, глутатион, витамин Е и поли(этиленимин). Неограничивающие примеры хелатирующих средств включают этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), диэтилентриаминпентауксусную кислоту (DTPA), лимонную кислоту, гексафосфат и тиогликолевую кислоту. Неограничивающие примеры сахаров включают сахарозу, трегалозу, ксилит, мальтозу, декстрозу, глюкозу, раффинозу и лактозу. Неограничивающие примеры полиолов включают сахарные спирты (например, сорбит, инозит, маннит), глицерин, эритрит, каприлат, триптофанат и саркозин. Неограничивающие примеры полимеров и инертных белков включают сульфат протамина, полигалактуроновою кислоту, фитиновую кислоту, полифумаровую, полисебациновою кислоту, PEG-поли(лизин), блок-сополимер полиаспарагиновой кислоты, сополимер карбоксифеноксипропан:себацिनová кислота, хитозан, хитин, пальмитоилгликольхитозан, хитозангликоль, NNN, триметилхитозан, хитозан хлорогеновой кислоты, полимеры ацилированных аминокислот, поли(этилакриловую кислоту), поли(пропилакриловую кислоту), длинноцепочечную алкиламинозамещенную поли(акриловую кислоту), протеиноиды (полимеры конденсации модифицированных ацилированных аминокислот), гепарин, сульфат гепарина, сульфат декстрана, основания с конъюгациями, такие как PEG (например, PEG-сукцинат), полиротаксаны, галактозилированный поли(лизин), альфа-2-макроглобулин:поли(лизин), галактозилированный поли(этиленимин), N-(бета-гидроксиэтил)-лактамин, дендримеры поли(амидоamina), стерилполи-(L-лизин), поли(сложные фосфоэфиры), триглицериды PEG-каприлово-каприновые, лаурат сахарозы, токоферил-PEG-ацетат, токоферил-PEG-сукцинат, желатин, лактоглобулин, сывороточный альбумин (например, сывороточный альбумин человека (HSA), бычий сывороточный альбумин (BSA) и рекомбинантный HA), гиалуроновою кислоту, поливинилпирролидон (PVP), сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA) полиакриловую кислоту (PAA) и ее производные (например, Amphipol A8-35, PAA5-25C8-40C3, Carbopol® 934, Carbopol® 980), полиэтиленгликоль (PEG), гидроксипропил(гетта)крахмал, сульфатированные полисахариды, полиаминокислоты, декстран, диэтиламиноэтилдекстран, циклодекстрин и их производные (например, гидроксипропил-бета-циклодекстрин, сульфобутиловый эфир бета-циклодекстрин), полиэтиленимин (PEI) и карбоксиметилцеллюлозу. Неограничивающие примеры солей включают хлорид натрия, сульфат натрия, тиоцианат натрия, хлорид калия, фосфат калия, соли молочной кислоты (например, лактат кальция),

диолеоилпропилтриметиламмонийхлорид (DOTMA), каприлат натрия, сульфат холестерина, сульфат протамина и гидрохлорид гуанидина. Неограничивающие примеры липидов и их производных липидов включают жирные кислоты (например, олеиновая кислота), фосфолипиды и производные фосфолипидов, DEA-фосфат, DEA-цетилфосфат, олет-10-фосфат, олет-10, олет-10-фосфат, DEA-цетилфосфат, маннозилглицерат, сульфобетаинхолат, фосфолипиды и бензоат-спирты с длиной цепи C12-15. Неограничивающие примеры поверхностно-активных веществ включают неионные поверхностно-активные вещества, в том числе полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 80, поллоксамер (например, Pluronic F68 и F127), додециловые эфиры PEG (например, Brij 35 и Brij 30) и трет-октилфениловый эфир PEG (например, Triton X-100). Неограничивающие примеры смешивающихся с водой вспомогательных растворителей включают диметилсульфоксид (DMSO), диметилформамид (DMF), диметилацетамид (DMA), N-метилпирролидон (NMP), этанол, касторовое масло PEG-40 и камфорсульфоновую кислоту (CSA). Комбинация одного или нескольких стабилизаторов из приведенного выше списка может использоваться в способе, раскрытом в данном документе.

[85] Как может понять специалист в данной области, некоторые из описанных в данном документе стабилизаторов также могут влиять на pH препарата. Например, некоторые аминокислоты являются кислыми (например, аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота) или основными (например, лизин и аргинин) и могут функционировать как кислота или основание или могут образовывать буфер с соответствующим основанием или кислотой. Аналогичным образом, определенные кислоты или основания, раскрытые в данном документе, также могут функционировать в качестве стабилизатора, например аскорбиновая кислота, цитратная кислота, гиалуроновая кислота и молочная кислота обладают стабилизирующими свойствами.

[86] В определенных вариантах осуществления один или несколько стабилизаторов добавляют перед конечной операцией UF DF. В определенных вариантах осуществления один или несколько стабилизаторов добавляют после конечной операции UF DF. В определенных вариантах осуществления один или несколько стабилизаторов добавляют перед конечной операцией UF DF, а затем удаляют во время операции UF DF (например, с использованием раствора состава или раствора композиции, который не содержит стабилизаторы), так что стабилизаторы не присутствуют в композиции, содержащей представляющий интерес белок, который получают после операции UF DF. Как правило, такие стабилизаторы могут стабилизировать представляющий интерес белок до и во время операции UF DF, но могут не подходить для введения пациентам (например, людям), например не включены в базу данных неактивных ингредиентов FDA, доступную на fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ucm113978.htm.

Белки

[87] Белки, которые могут быть получены описанными в данном документе способами, включают терапевтические белки, такие как те, которые одобрены

регулирующими органами (например, FDA и ЕМА) для терапевтического использования у людей. В определенных вариантах осуществления терапевтические белки представляют собой терапевтические антитела, в том числе без ограничения химерное антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, биспецифическое антитело и доменное антитело (dAb). Раскрытые в данном документе способы особенно пригодны для создания композиций, содержащих белки (например, терапевтические белки), которые являются нестабильными.

[88] Неограничивающие примеры терапевтических белков, которые могут быть получены описанными в данном документе способами, включают афлиберцепт (Eylea®), этанерцепт (ENBREL®), эпоэтин альфа (EPOGEN®), пегфилграстим (Neulasta®), филграстим (NEUPOGEN®), дарбэпоэтин альфа (Aranesp®), дорназу альфа (Pulmozyme®), слитый белок IL-2 Fc мутеин (AMG592), бекаплермин (REGGRANEX®), альтеплазу (Activase®), ларонидазу (Aldurazyme®), алефацепт (Amevive®), интерферон бета-1b (BETASERON®), расбуриказу (Elitek®), аспарагиназу (Elspar®), агалсидазу бета (Fabrazyme®), интерферон альфакон-1 (INFERGEN®), интерферон альфакон-2a (INTRON A®), анакинру (Kineret®), опрелвекин (NEUMEGA®), денилейкин дифтитокс (Ontak®), пегинтерферон альфа-2a (PEGASYS®), альдеслейкин (Proleukin®), дорназу альфа (Pulmozyme®), интерферон бета-1a (Rebif®), бекаплермин (REGGRANEX®), ретеплазу (Retavase®), интерферон альфа-2a (Roferon-A®), тенектеплазу (TNKase®) и дротрекогин альфа (Xigris®), рилонацепт (ARCALYST®), ромиплостим (Nplate®), метоксиполиэтиленгликоль-эпоэтин бета (MIRCERA®), ингибитор C1 эстеразы (Cinryze®), идурсульфазу (Elaprase®), альглюкозидазу альфа (Myozyme®), абатацепт (ORENCIA®), галсульфазу (Naglazyme®), палифермин (Kerivance®) и интерферон гамма-1b (ACTIMMUNE®).

[89] Неограничивающие примеры антител, которые могут быть получены с использованием описанных в данном документе способов, включают бевацизумаб (Avastin®), цетуксимаб (Erbix®), адалимумаб (HUMIRA®), инфликсимаб (Remicade®), ритуксимаб (Rituxan®), натализумаб (Tysabri®), экулизумаб (Soliris®), трастузумаб (Herceptin®), алемтузумаб (Campath®), аркитумомаб (CEA-Scan), имциромаб пентетат (Myoscint®), капромаб пендетид (ProstaScint®), абциксимаб (ReoPro®), ритуксимаб (Rituxan®), базиликсимаб (Simulect®), паливизумаб (Synagis®), омализумаб (Xolair®), даклизумаб (Zenarax®), муромонаб-CD3 (Orthoclone OKT3®), эдреколомаб (Panorex®), голимумаб (Simponi®), цертолизумаб пэгол (Cimzia®), устекинумаб (Stelara®), панитумумаб (Vectibix®), тозитумомаб (Vectra®), панитумумаб (Vectibix®), эволокумаб (Repatha®), деносумаб (Prolia®), ромосозумаб (Eventy®), тезепелумаб, антитело к рецептору PAC1 (активирующему гипофизарную аденилатциклазу типа 1) (WO2014/144632), антитело к IL-15 (WO2007/087384), конъюгат биспецифическое антитело-пептид, который связывается с BAFF и лигандом ICOS (документ США 9458241), человеческое моноклональное антитело, которое ингибирует c-fms и снижает функцию ассоциированных с опухолью макрофагов (TAM) (WO2009/026303), презалумаб

(WO2007/011941), эренумаб (Aimovig™, WO2010/075238) и конструкции на основе антител, связывающих биспецифические Т-клетки (BiTE), в том числе блинатумомаб (Blicyto®), конструкцию на основе антитела BiTE к CD33 и к CD3, конструкцию на основе антитела BiTE к EGFRvIII и к CD3, конструкцию на основе антитела BiTE к DLL3 и к CD3, конструкцию на основе антитела BiTE к CD19 и к CD3, конструкцию на основе антитела BiTE к MSLN и к CD3, конструкцию на основе антитела BiTE к CDH19 и к CD3, конструкцию на основе антитела BiTE к FLT3 и к CD3, конструкцию на основе антитела BiTE к DLL3 и к CD3, конструкцию на основе антитела BiTE к CDH3 и к CD3, конструкцию на основе антитела BiTE к CD70 и к CD3, конструкцию на основе антитела BiTE к PSMA и к CD3 и конструкцию на основе антитела BiTE к BCMA и к CD3 (которые описаны в WO2008/119567 и WO2017/134140).

[90] Раскрытые в данном документе способы обладают несколькими неожиданно полезными свойствами. Например, раскрытые в данном документе способы упрощают производственные способы получения не содержащих буфер композиций от многостадийного способа до одностадийного способа и сокращают производственные площади. Кроме того, композиции на основе белка, полученные раскрытыми в данном документе способами, обладают повышенной стабильностью (например, сниженным количеством белковых агрегатов, сниженной степенью деградации белка) по сравнению с композициями на основе белка, полученными теми же способами без стадии регулирования pH.

[91] Настоящее изобретение будет более полно понято при ссылке на следующие примеры. Однако примеры не следует истолковывать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение композиций с этанерцептом с использованием операции UF DF без предварительной стадии регулирования pH

[92] В этих примерах проверяется, могут ли быть получены композиции на основе белков с приемлемым pH в результате осуществления конечной операции UF DF без предварительной стадии регулирования pH. Используемый в этих примерах белок представлял собой этанерцепт. Различные препараты этанерцепта в TMS (трис, маннит, сахароза) заменяли тестируемыми составами с использованием растворов составов SAS_100NaCl и PASS и сравнивали конечный pH с целевым pH.

[93] **Материалы.** Этанерцепт: 25 мг/мл в TMS (10 mM Трис-НСl, 4% маннита, 1% сахарозы, pH 7,4); раствор SAS_100NaCl (100 mM NaCl, 25 mM HCl L-аргинина, 1% сахарозы, pH 6,3); буфер PASS (25 mM фосфата, 100 mM NaCl, 25 mM HCl L-аргинина, 1% сахарозы, pH 6,3); 10000 центрифугированных MWCO; pH-метр Mettler Toledo MP220 и Mettler Toledo InLab MicroProbe.

[94] **Способы.** 25 мг/мл этанерцепта концентрировали до ~ 50 мг/мл в TMS путем ультрафильтрации с применением кассет 30K MWCO Pellicon 3 на мини-системе Millipore Pellicon-2. Затем материал подвергали диафильтрации против раствора SAS_100NaCl или

PASS на протяжении 7 объемов диафильтрации, после чего концентрировали ультрафильтрацией до 100 мг/мл.

Результаты

Краткое изложение результатов показано ниже в таблице 1.

Таблица 1. pH при использовании различных растворов для замены

Способ замены	Название образца	pH раствора для фильтрации	pH до проведения способа замены	pH после проведения способа	Количество замен
UF DF	PASS, pH 6,3, 100 мг/мл	6,34	7,56	6,34	7 объемов диафильтрации
UF DF	SAS_100NaCl, pH 6,3, 100 мг/мл	6,38	7,56	6,98	7 объемов диафильтрации

[95] **Заключение.** Когда образцы подвергали ультрафильтрации/диафильтрации до проведения замены при показателе pH 7,56 из раствора в буфер PASS, то достигали целевого pH 6,34. Однако, когда образцы подвергали ультрафильтрации/диафильтрации в растворе SAS_100NaCl, который не содержал буфер, достигнутый pH материала после UF DF составил 6,98, что было выше, чем ожидалось, и не было близко к конечному целевому pH 6,3.

[96] Ввиду приведенных выше результатов был разработан многостадийный способ составления белка в растворе без буфера с определенным pH, начиная с предварительного раствора для замены, имеющего другой pH: 1) выполнить UF DF до ожидаемого pH с использованием буферного состава, 2) использовать соль для вытеснения буфера и 3) поддерживать pH с помощью раствора без буфера.

Пример 2. Получение композиций с этанерцептом с использованием операции UF DF с предварительной стадией регулирования pH

[97] **Введение.** Целью было составить этанерцепт в раствора SAS состава, который не содержит буфер (120 mM хлорида натрия, 25 mM L-аргинина, 1% сахарозы, pH 6,3). Поскольку пример 1 продемонстрировал, что для составления этанерцепта в растворе состава без буфера необходим многостадийный способ, так как трудно достичь целевого pH 6,3 с применением UF DF, если начинать с этанерцепта в образце при pH 7,56, возникла необходимость в другом и более простом способе замены в составе SAS. Были оценены два способа, в которых использовался отдельный исходный материал для конечной UF DF: 1) промежуточный пул колонки 3 (AEX) в качестве исходного материала и 2) лекарственное вещество Enbrel в буфере состава с PASS (промежуточный пул PASS DS) в качестве исходного материала. Каждый способ описан ниже и резюмирует разработку стадии конечной операции установки UF DF для получения составленного с SAS этанерцепта с 50 г/л, в том числе получение раствора состава с SAS, конечное кондиционирование материала для загрузки UF DF и обработку.

[98] **Способы.** Раствор состава с SAS составлен из 120 мМ хлорида натрия, 25 мМ L-аргинина, 1% сахарозы, рН 6,3. Раствор состава с SAS титровали до рН 6,3, используя 10 н. NaOH. Объем титранта, необходимый для достижения определенного диапазона рН, составлял 4,4 мкл/л раствора состава с SAS. Во время выполнения конечной операции установки UF DF в SAS после уравнивания мембран при 10 л/м² с раствором состава с SAS, рН пермеата оставался близким к рН WFI, а не рН раствора состава с SAS. Не вдаваясь в конкретную теорию, полагают, что это является результатом низкой буферности раствора состава с SAS. Ожидаемый диапазон проводимости пермеата после уравнивания мембраны с использованием диапазона препарата раствора состава с SAS составляет 12-16 мСм/см. Ожидается более высокий рН после уравнивания, чем у раствора состава с SAS, но это не должно вызывать беспокойство или указывать на то, что мембраны не уравниваются.

[99] Исходный материал промежуточного пула AEX. Перед переносом промежуточного пула AEX в резервуар для ретентата резервуара UF/DF пул кондиционировали с использованием 2 М HCl до целевого рН 6,3 (приемлемый диапазон 6,2-6,4). Объем титранта, требуемый для достижения определенного диапазона рН, составлял примерно 2,8 мл/л промежуточного пула AEX.

[100] В таблице 2 приведены восемь примеров, выполненных во время разработки стадии конечной операции установки UF DF в SAS с использованием промежуточного пула AEX в качестве исходного материала. Исследовали два параметра: рН кондиционированного промежуточного пула AEX и рН раствора состава с SAS. В первые три прогона анализировали рН, проводимость, осмоляльность, концентрацию белка и качество продукта. В прогонах с 4 по 7 измеряли только рН, проводимость, осмоляльность и концентрацию белка, чтобы определить влияние рН раствора состава и влияние рН загрузки на рН пула UF DF.

Таблица 2. Исходный материал промежуточного пула AEX. рН загрузки, раствора для замены и конечного пула UF DF

Номер прогона	Целевой рН при загрузке	Целевой SAS	рН пула UF DF
1	6,3	6,3	6,26
2	6,3	6,3	6,33
3	6,3	6,3	6,22
4	6,3	5,6	6,22
5	6,2	5,3	6,06
6	6,4	7,3	6,94
7	6,2	5,6	6,14
8	6,4	6,5	6,43

[101] **Результаты.** Результаты в отношении качества продукта для конечного пула SAS UF DF, полученного с использованием промежуточного пула AEX в качестве

исходного материала, показаны в таблице 3. Выход на стадии для прогона 1 был вне критериев приемлемости; тем не менее, это, скорее всего, было артефактом лабораторной обработки и считалось не значимым для результатов исследования. Все три конечных прогона UF DF SAS также соответствовали критериям приемлемости качества продукта с использованием анализа SEC и HIC, как описано выше.

Таблица 3. Исходный материал промежуточного пула AEX. Качество продукта конечного пула UF/DF SAS

Параметр	Критерии приемлемости	Конечный пул UF/DF SAS		
		Прогон 1	Прогон 2	Прогон 3
pH	6,1-6,5	6,26	6,22	6,33
Концентрация белка (мг/мл)	49-51	50,08	49,68	49,90
Выход на стадии (%)	95-103	93,4	99,5	100,5

Стабильность кондиционированного промежуточного пула AEX

[102] Кондиционированный промежуточный пул AEX можно хранить до 52,6 часа при контролируемой комнатной температуре (CRT). pH пула в ходе хранения показан на фигуре 1.

Стабильность пула UF/DF

[103] Конечный пул UF DF SAS, созданный с использованием промежуточного пула AEX в качестве исходного материала, может храниться до 96,3 часа при CRT. pH и проводимость во время выдерживания показаны на фигурах 2A и 2B. В течение 96,3 часа выдерживания pH и проводимость остаются в допустимых пределах.

[104] Исходный материал промежуточного пула PASS DS. Перед переносом промежуточного пула PASS DS в резервуар для ретентата UF DF кондиционирование не требуется, поскольку промежуточный пул PASS DS уже находится в приемлемом диапазоне pH. Кроме того, поскольку исходный материал представляет собой Enbrel DS при концентрации 50 мг/мл, составленный в PASS, то пул не нужно концентрировать до 50 г/л, поскольку он уже находится в правильной концентрации для проведения диафильтрации.

[105] Один пример, выполненный во время разработки стадии конечной операции установки UF DF в SAS для оценки источника исходного материала, приведен в таблице 4. В этом примере в качестве исходного материала использовали промежуточный пул PASS DS и в нем анализировали pH, проводимость, осмоляльность, концентрацию белка и качество продукта.

Таблица 4. Исходный материал промежуточного пула PASS DS. pH загрузки, раствора для замены и конечного пула UF DF

Номер прогона	Целевой pH при загрузке	Целевой pH раствора SAS	pH пула UF/DF
1	6,3	6,3	6,23

[106] **Результаты.** Результаты в отношении качества продукта для конечного пула

SAS UF DF, полученного с использованием промежуточного пула PASS DS в качестве исходного материала, показаны в таблице 5. Выход на стадии для прогона 1 был вне критериев приемлемости; однако, скорее всего, это был артефакт лабораторной обработки и не считался значимым для выводов исследования. Конечный пул SAS UF DF также соответствовал критериям приемлемости качества продукта с применением анализов SEC и HIC, как описано выше.

Таблица 5. Исходный материал промежуточного пула PASS DS. Качество продукта конечного пула UF/DF SAS

Параметр	Критерии приемлемости	Конечный пул UF/DF SAS
		Прогон 1
рН	6,1-6,5	6,23
Концентрация белка (мг/мл)	49-51	49,60
Выход на стадии (%)	95-103	105,7

Стабильность промежуточного пула PASS DS

[107] Пул PASS не требует кондиционирования перед обработкой UF DF раствором SAS, потому что промежуточный пул уже соответствует целевому рН (6,3). Исследование хранения пула для данного промежуточного пула не проводили, поскольку условия пула не изменялись относительно Enbrel PASS DS. Пул можно хранить до 96 часов при 25°C.

Стабильность пула UF DF

[108] Конечный пул UF DF SAS, созданный с использованием промежуточного пула PASS DS в качестве исходного материала, может храниться до 96,3 часа при CRT. рН и проводимость во время выдерживания показаны на фигурах 2А и 2В. В течение 96,3 часа выдерживания рН и проводимость остаются в допустимых пределах.

Стабильность раствора состава с SAS

[109] Раствор состава с SAS можно хранить при CRT до 28 дней. рН и проводимость показаны на фигурах 3А и 3В. В течение 42 дней выдерживания в небольших камерах стабильности из нержавеющей стали с очень маленьким свободным пространством над продуктом было продемонстрировано, что раствор состава с SAS поддерживает рН в пределах от 5,6 до 6,5. В моменты времени день 35 и день 42 наблюдали образование осадка. Показатель в момент времени день 21, равный 5,09, представляется резко отклоняющимся значением по той причине, что последующие моменты времени соответствуют предлагаемым критериям приемлемости.

[110] **Выводы:** за счет включения стадии регулирования рН перед конечной операцией UF DF, конечная операция установки UF DF может производить продукт состава с SAS 50 г/л и обеспечивать стабильное качество продукта по сравнению с продуктом состава с PASS, использующим либо промежуточный пул AEX, либо промежуточный пул PASS DS в качестве исходного материала. Были также сделаны следующие наблюдения: 1) раствор с SAS можно выдерживать как минимум 28 дней при CRT и поддерживать рН от 5,6 до 6,5; 2) кондиционированный промежуточный пул AEX можно выдерживать при CRT в течение по меньшей мере 52,6 часа и поддерживать рН 6,3

± 0,1, и 3) пул UF DF в составе с SAS можно выдерживать на CRT в течение по меньшей мере 96,3 часа и поддерживать pH от 6,1 до 6,5 и проводимость от 10 до 14 мСм/см.

Пример 3. Получение составов на основе белков без буфера с использованием одной стадии

[111] Чтобы разработать состав без буфера, который можно было бы масштабировать для производственных целей, многостадийный способ, описанный выше в примере 1, был изменен. Неожиданно было обнаружено, что можно преобразовать способ получения препарата без буфера из трехстадийного в одностадийный способ. В этом подходе для материала до замены (например, объединенный материал VF) регулируют pH, чтобы предвидеть конечный pH состава, а затем заменяют раствором состава с использованием операций UF DF. В результате получается состав без буфера, с необходимым pH и с минимальным содержанием соли или без нее. Было обнаружено, что этот подход работает хорошо, с минимальным присутствием остаточной соли или ее отсутствием после операций UF DF.

[112] По сравнению с многостадийным способом, описанным в примере 1, одностадийный способ сокращает количество стадий, необходимых для получения композиций на основе белков, не содержащих буфер (композиции без буфера).

Пример 4. Регулирование pH перед операцией UF DF приводит к меньшей агрегации белка после операции UF DF

[113] Белок, использованный в исследованиях, представлял собой адалимумаб, а материалы, полученные в результате осуществления фильтрации для удаления вирусов (объединенный материал VF), были использованы в качестве материалов до замены в исследованиях. В исследованиях pH объединенных материалов VF регулировали до целевого pH, составляющего pH 5,2, или близко к нему при получении забуференных составов и составов без буфера (см. таблицу 6). Уровень присутствующих высокомолекулярных веществ (HMW) контролировали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC). Колонка, используемая для этого анализа, представляет собой TSK-GEL, G3000SWXL, размер частиц 5 мкм, размер 7,8×300 мм (Tosoh Bioscience, 08541), с белком, обнаруживаемым на длине волны 220 нм и при скорости потока 0,5 мл/мин. Инъекционная масса белка для загрузки составляла 35 мкг.

[114] После операции UF DF с использованием одностадийного подхода конечный pH состава соответствовал целевому pH. В этом примере конечное количество присутствующих агрегатов было уменьшено по сравнению с подходом UF DF, в котором pH объединенного материала VF не регулировался, как показано на фигуре 4. Кроме того, на фигуре 4 показано падение степени агрегации как в составах без буфера, так и в забуференных составах при pH, отрегулированном на или близком к целевому pH, по сравнению с теми же образцами, полученными без регулирования pH в объединенном материале VF. Обратите внимание, что, как показано на фигуре 4, агрегация после стадии UF DF была снижена более чем на 50% по сравнению с уровнем агрегации, полученным без регулирования pH объединенного материала VF.

[115] Помимо изменения способа UF DF для получения составов без буфера с трехстадийного на одностадийный производственный способ, регулирование pH перед конечной операцией UF DF до целевого pH снижает степень агрегацию после UF DF. Кроме того, таким образом могут быть получены как забуференные составы, так и составы без буфера, с помощью регулирование pH материалов до замены (например, объединенного материала VF) до целевого pH состава или близкого к нему. В своей совокупности, при этом подходе поддерживается pH как забуференных составов, так и составов без буфера, а также было показано, что он оказывает положительное влияние на стабильность. Это открытие не было предусмотрено и также считается неожиданным.

Таблица 6. Композиция забуференных составов и составов без буфера.

	Забуференные составы	Составы без буфера
pH объединенного материала VF, не регулируемый	10 mM лактата, 9% сахарозы, 25 mM CaCl ₂ , 0,006% Pluronic F 68	4% сорбита, 25 mM CaCl ₂ , 0,05% Pluronic F 68
		4% сорбита, 30 mM CaCl ₂ , 0,05% Pluronic F 68
pH объединенного материала VF, регулируемый	10 mM лактата, 6% сахарозы, 0,1% Pluronic F 68	4% сорбита, 0,09% полисорбат 20
	10 mM лактата, 8,8% сахарозы, 0,03% Pluronic F 68	

Пример 5. Получение композиций с афлиберцептом с использованием операции UF DF до стадии регулирования pH

[116] Целью этого примера было получить композиции с афлиберцептом с буфером или без него, используя операцию UF DF до стадии регулирования pH. Получали составы А-Е, но буфер содержит только состав А. Все составы имеют pH 6,2.

[117] Афлиберцепт очищали из культуры клеток с использованием колонки СЕХ в 100 mM ацетата Na, 300 mM NaCl, pH 5,0 при 3,6 мг/мл. pH исходного материала регулировали до 6,5, чтобы учесть дрейф pH между первоначальным регулированием и после замены буфера, который наблюдали в ранних исследованиях. Затем белок концентрировали до 40 мг/мл и заменяли буфер составами, представленными в таблице 7. Поверхностно-активное вещество добавляли к различным составам после UF DF. Проверяли pH после замены буфера, и образцы хранили при стрессовых условиях 40°C в течение до двух недель. Стабильность белка тестировали с помощью SE-UHPLC для анализа картины агрегации после замены буфера и во время хранения.

Таблица 7. Составы А-Е

Состав	VEGF (мг/мл)	Буфер	Тоничность	Стабилизатор	Поверхностно-активное	pH

					вещество	
A	40	10 мМ фосфата натрия	40 мМ NaCl	5% сахарозы	0,03% PS20	6,2
B	40			5% сахарозы+5% трегалозы	0,01% PS80	6,2
C	40		5 мМ NaCl	5% сахарозы+5% трегалозы	0,01% PS80	6,2
D	40		10 мМ NaCl	5% сахарозы+5% трегалозы	0,01% PS80	6,2
E	40		20 мМ NaCl	5% сахарозы+5% трегалозы	0,01% PS80	6,2
F	40			5% сахарозы+5% трегалозы		6,2

[118] Как видно из таблицы 8, целевой pH был получен в пределах 0,1 единицы pH между начальным регулированием и после замены буфера. Поскольку начальный pH исходного материала DS был отрегулирован до pH 6,5, то pH состава А составил pH 6,4 вместо исходного целевого pH 6,2. Разница между T=0 и последующими двумя неделями хранения при 40°C также составила максимум 0,2 единицы pH, с точки зрения потенциального воздействия на характеристики качества сдвиг pH незначительный, что еще раз демонстрирует, что pH оставался стабильным при хранении в стрессовых условиях для всех тестируемых составов.

Таблица 8. Тестируемые значения pH после UF DF и после хранения при 40°

Состав	После первоначального регулирования pH	T=0	T=1 нед. при 40°C	Дельта от T=0	T=2 нед. при 40°C	Дельта от T=0
A	6,4	6,4	6,4	0,0	6,5	0,1
B	6,2	6,3	6,3	0,1	6,4	0,1
C	6,2	6,2	6,2	0,0	6,3	0,1
D	6,2	6,2	6,2	0,0	6,3	0,1
E	6,2	6,2	6,3	0,1	6,4	0,2

F	6,2	6,3	6,3	0,1	6,5	0,2
---	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[119] Результаты анализа SE-UHPLC представлены в таблице 9. Все композиции без буфера, независимо от присутствия соли или поверхностно-активного вещества, демонстрировали более высокий процент основного пика, демонстрируя пониженную степень агрегации или повышенную стабильность по сравнению с составом, содержащим буферное средство (композиция А). При сравнении уровней агрегации между составом В и F, с поверхностно-активным веществом и без него соответственно, наблюдается сопоставимый процентный основной пик, демонстрирующий, что самозабуферные составы с афлиберцептом стабильны с и без поверхностно-активного вещества с точки зрения их агрегации согласно SE-UHPLC.

Таблица 9. SE-UHPLC процент основного пика для состава А-F

% основного пика	T=0	T=1 нед. при 40°C	Дельта от T=0	T=2 нед. при 40°C	Дельта от T=0
A	97,9	94,5	3,4	92,5	5,4
B	98,0	96,4	1,6	95,5	2,5
C	98,0	96,3	1,7	95,3	2,7
D	98,0	96,1	1,9	94,9	3,1
E	98,0	95,8	2,2	94,4	3,6
F	98,0	96,6	1,4	95,7	2,3

Пример 6. Предпочтительным было регулирование pH материала до замены до целевого pH, а затем концентрирование белка

[120] Исходный материал афлиберцепт (с последней стадии производства перед стадией UF DF), составленный в буфере, состоящем из 100 мМ ацетата, 300 мМ NaCl, при pH 5, при концентрации 3,6 мг/мл, заменяли буфером с использованием четырех вариантов, показанных на фигуре 5 (обозначенные А, В, С и D), с использованием пробирок Centricon объемом 50 мл для моделирования способа UF DF. В подходе А 15 мл аликвоты исходного материала при 3,6 мг/мл доводили до pH 5,0, 5,5, 5,8, 6,2, 6,4 и 6,8, соответственно, при помощи 1 М NaOH. Затем каждый раствор с отрегулированным pH концентрировали в пробирках Centricon на 50 мл до примерно 40 мг/мл. Материал с отрегулированным pH при примерно 40 мг/мл заменяли центрикон-буфером на раствор без буфера, содержащий 5% сахарозы, 3,5% трегалозы, по меньшей мере, в 10-20 раз больше исходного объема. После по меньшей мере 20 раз замены начального объема pH проверяли и сравнивали с целевым pH. Аналогичный подход был использован в отношении В по сравнению с А, за исключением того, что исходный материал сначала концентрировали до примерно 40 мг/мл, затем pH доводили до уровней, показанных в подходе А, при помощи 1 М NaOH. Наконец, стадию замены центрикон-буфера выполняли с по меньшей мере в 20 раз превышающим исходный объем в незабуференном растворе, содержащем 5% сахарозы и 3,5% трегалозы. Подход С был

идентичен подходу В, за исключением того, что стадию концентрирования и стадию замены буфера выполняли при 10 мг/мл, а не при 40 мг/мл. После стадии замены раствор концентрировали до примерно 40 мг/мл в растворе с 5% сахарозы и 3,5% трегалозы. В подходе D проводили регулирование pH исходного материала при 3,6 мг/мл до pH 6,2, затем замена центрикон-буфера материала с отрегулированным pH 6,2 без стадии концентрирования. После замены 20 раз начального объема материал концентрировали до примерно 40 мг/мл в растворе с 5% сахарозы и 3,5% трегалозы. Только pH 6,2 был исследован в подходе D по сравнению с pH 5,0, 5,5, 5,8, 6,2, 6,4 и 6,8 в подходах А, В и С.

[121] После замены буфера в растворе с 5% сахарозы и 3,5% трегалозы для создания составов без буфера, которые описаны в подходах от А до D, стабильность оценивали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) и уровень присутствующих отслеживаемых высокомолекулярных веществ (HMW) показан на фигуре 6. Колонка, используемая для этого анализа, представляла собой Waters ВЕН200, 4,6 × 250 мм, размер частиц 1,7 мкм, с белком, обнаруживаемым при длине волны 280 нм, и при скорости потока 0,4 мл/мин. Инъекционная масса белка для загрузки составляла 60 мкг. Как показано на фигуре 6, варианты А и С привели к уменьшению % HMW после моделирования операций UF DF. Это было продемонстрировано в широком диапазоне pH от pH 5 до 6,8. Вариант А был выбран как предпочтительный вариант для условий увеличения масштаба.

Пример 7. Получение композиций с адалимумабом с применением операции UF DF с предварительной стадией регулирования pH

[122] Было получено несколько составов с адалимумабом (составы 18А-18F), которые показаны в таблице 10. Как показано в таблице, молочную кислоту и гидроксид кальция или уксусную кислоту и HCl использовали для регулирования pH перед операциями UF DF.

Таблица 10. Составы с адалимумабом

Исх. №	Буфер/регулирующее pH средство	CaCl ₂ (мМ)	Наполнитель	Поверхностно-активное вещество	pH	Конц. Аб (мг/мл)	Проводимость Осмоляльность
18А	10 мМ лактата/молочной кислоты, Ca(OH) ₂	-	9% сахарозы	0,06% Pluronic F68	5,2	100	0,636 мСм/см 323 мОсм

18B	10 мМ лактата/м олочной кислоты, Ca(OH) ₂	15	7,4% сахарозы	0,06% Pluronic F68	5,2	100	2,851 мСм/см 305 мОсм
18C	10 мМ ацетата/Н Cl, Ca(OH) ₂	-	9% сахарозы	0,06% Pluronic F68	5,2	100	0,741 мСм/см 327 мОсм
18D	10 мМ ацетата/Н Cl, Ca(OH) ₂	15	7,4% сахарозы	0,06% Pluronic F68	5,2	100	2,792 мСм/см 301 мОсм
18E	10 мМ лактата/м олочной кислоты, Ca(OH) ₂	15 (Ca лактат а)	7,4% сахарозы	0,06% Pluronic F68	5,2	100	1,373 мСм/см 299 мОсм
18F	10 мМ лактата/Н Cl, Ca(OH) ₂	15	7,4% сахарозы	0,06% Pluronic F68	5,2	100	2,914 мСм/см 310 мОсм

[123] Для оценки стабильности % кислотного пика измеряли с помощью СЕХ-НPLC через 0 дней, после транспортного стресса и через 1 неделю, 2 недели и 4 недели при 4°C, 25°C и 40°C. Результаты показаны на фигурах 7-12. В нулевой момент времени образцы, которые подвергались транспортному стрессу, показали аналогичные количества % кислотного пика по сравнению с теми же образцами, которые не подвергались транспортному стрессу. Небольшие различия наблюдались в относительном количестве % кислотного пика в нулевой момент времени, однако эти различия были незначительными и не считались статистически значимыми от состава к составу. После 1 месяца хранения при 4°C наблюдался лишь небольшой видимый рост, однако это не считается значащим. После одного месяца при 25°C и при 40°C самые низкие скорости роста наблюдались в составах, содержащих хлорид кальция или лактат кальция (составы 18B, 18D, 18E, 18F).

[124] Стабильность также оценивали путем измерения HMWS с помощью SE-НPLC через 0 дней, после транспортировки и после хранения нетранспортированных и транспортированных образцов при 4°C, 25°C или 40°C в течение 1, 2 и 4 недель. Результаты показаны на фигурах 13-18. В нулевой момент времени и через 1 месяц при

4°C наименьшее количество HMWS наблюдается в составе с молочной кислотой с 9% сахарозы и в составе с молочной кислотой с 7,4% сахарозы и 15 мМ лактата кальция (составы 18А, 18Е). Хотя значения скорости роста варьируются в небольшой степени как при 25°C, так и при 40°C, количество HMWS через 1 месяц при 25°C и 40°C является самым низким в тех же двух составах (18А, 18Е) с самым низким количеством HMWS, идентифицированных в нулевой момент времени. Как правило, составы, регулируемые с использованием молочной кислоты, имели более низкие количества HMWS, чем составы, регулируемые с помощью HCl и уксусной кислоты перед операциями UF DF. Аналогично, составы забуференные молочной кислотой в целом более стабильны.

[125] Стабильность также оценивали, измеряя количество невидимых невооруженным глазом частиц 5 мкМ, 10 мкМ и 25 мкМ при помощи MFI в нетранспортируемых и транспортируемых образцах. Частицы обладали эквивалентным диаметром окружности, равным по меньшей мере 5,000, при соотношении сторон менее 0,700. Результаты показаны на фигурах 19-21. Для частиц размером <5 мкм подсчеты были низкими для всех составов. Кроме того, при транспортном стрессе значимого роста частиц в составах 18А, 18Е и 18F не наблюдалось. При размере частиц <10 мкм и <25 мкм количество частиц было низким или частицы не обнаруживались.

Пример 8. Стабилизирующие эффекты молочной кислоты

[126] pH объединенных материалов VF, содержащих адалимумаб, регулировали до целевого pH, составляющего pH 5,2, или близкого к нему с использованием либо хлористоводородной кислоты, либо молочной кислоты перед операцией UF DF. После операции UF DF адалимумаб заменяют раствором необходимой композиции, который показан ниже в таблице 11. Уровень присутствующих высокомолекулярных веществ (HMW) в композициях на основе адалимумаба контролировали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC). Колонка, используемая для этого анализа, представляет собой TSK-GEL, G3000SWXL, размер частиц 5 мкм, размер 7,8×300 мм (Tosoh Bioscience, 08541), с белком, обнаруживаемым на длине волны 220 нм и при скорости потока 0,5 мл/мин. Инъекционная масса белка для загрузки составляла 35 мкг.

[127] Как показано в таблице 11, регулирование pH с использованием молочной кислоты привело к более низкому уровню HMW, что указывает на стабилизирующие эффекты молочной кислоты.

Таблица 11. Белковые агрегаты в композициях на основе адалимумаба после операции UF DF

Конц. (мг/мл)	Состав	% HMW	Регулирующее pH средство
100	4% сорбита, 0,09% PS20	1,3	HCl/NaOH
100	4% сорбита, 0,09% PS20	1,1	HCl/NaOH
100	10 мМ лактата, 6% сахарозы, 0,1% PF68	0,81	HCl/NaOH

100	10 мМ лактата, 6% сахарозы, 0,1% PF68, 15 мМ CaCl ₂	0,59	HCl/NaOH
100	10 мМ лактата, 6% сахарозы, 0,1% PF68, 30 мМ CaCl ₂	0,65	HCl/NaOH
100	10 мМ лактата, 8,8% сахарозы, 0,03% PF68	0,39	молочная кислота/CaOH ₂
100	10 мМ лактата, 7,4% сахарозы, 0,03% PF68, 15 мМ CaCl ₂	0,41	молочная кислота/CaOH ₂
100	10 мМ лактата, 6,9% сахарозы, 0,03% PF68, 20 мМ CaCl ₂	0,41	молочная кислота/CaOH ₂

[128] Все ссылки, цитируемые в данной заявке, включены в данный документ посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения композиции, содержащей белок, при этом способ включает:
обеспечение препарата, содержащего представляющий интерес белок, препарат получают после подвергания образца, содержащего белок и одну или несколько примесей, процессу очистки,
регулирование рН препарата до целевого рН перед конечной операцией ультрафильтрации и диализации и
получение композиции, содержащей белок, в результате осуществления конечной операции ультрафильтрации и диализации, где целевой рН равен или приблизительно равен рН композиции, содержащей белок, полученной в результате конечной операции ультрафильтрации и диализации.
2. Способ по п. 1, где рН регулируют с помощью регулирующего рН средства.
3. Способ по п. 2, где регулирующее рН средство представляет собой кислоту, основание или буфер.
4. Способ по п. 3, где кислота выбрана из группы, состоящей из уксусной кислоты, адипиновой кислоты, альгиновой кислоты, аскорбиновой кислоты, аспарагиновой кислоты, бензолсульфоновой кислоты, бензойной кислоты, борной кислоты, камфорсульфоновой кислоты, лимонной кислоты, каприловой кислоты, муравьиной кислоты, глутаминовой кислоты, хлористоводородной кислоты, бромистоводородной кислоты, гидроксикислот, гиалуроновой кислоты, молочной кислоты, яблочной кислоты, метансульфоновой кислоты, азотной кислоты, фосфорной кислоты, пропионовой кислоты, серной кислоты, сульфоновой кислоты, трансексамовой кислоты и винной кислоты.
5. Способ по п. 4, где кислота выбрана из группы, состоящей из молочной кислоты, гидроксикислот и гиалуроновой кислоты.
6. Способ по п. 3, где основание выбрано из группы, состоящей из раствора аммиака, карбоната аммония, диэтаноламина, гидроксида кальция, этаноламина, лизина, меглумина, полилизина, гидроксида калия, бикарбоната натрия, бората натрия, карбоната натрия, гидроксида натрия и триэтаноламина.
7. Способ по п. 3, где буфер выбран из группы, состоящей из ацетатного буфера, аспаратного буфера, аскорбатного буфера, боратного буфера, бензоатного буфера, карбонатного буфера, цитратного буфера, глицинового буфера, буфера HEPES, буфера MOPS, буфера MES, буфера на основе N-(2-ацетамидо)иминодиуксусной кислоты (ADA), гистидинового буфера, лактатного буфера, фосфатного буфера, сукцинатного буфера, трис-буфера, бис-трис-буфера и тартратного буфера.
8. Способ по любому из пп. 1-7, где целевой рН составляет от приблизительно рН 4,0 до приблизительно рН 7,0.
9. Способ по любому из пп. 1-7, где целевой рН составляет от приблизительно рН 4,0 до приблизительно рН 6,0.
10. Способ по любому из пп. 1-9, где способ дополнительно включает концентрирование белка в препарате до целевой концентрации.

11. Способ по п. 10, где стадию концентрирования проводят перед стадией регулирования рН.

12. Способ по п. 10, где стадию концентрирования проводят после стадии регулирования рН и перед конечной операцией UF DF.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где конечную операцию ультрафильтрации и диафильтрации проводят с использованием среды, которая практически не содержит буфер.

14. Способ по п. 13, где композиция, полученная в результате осуществления конечной операции ультрафильтрации и диафильтрации, содержит белок в концентрации от приблизительно 40 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл.

15. Способ по любому из пп. 1-12, где конечную операцию ультрафильтрации и диафильтрации проводят с использованием среды, которая содержит буфер.

16. Способ по п. 15, где среда содержит буфер в концентрации от 2 мМ до приблизительно 300 мМ.

17. Способ по п. 15 или п. 16, где композиция, полученная в результате осуществления конечной операции ультрафильтрации и диафильтрации, содержит белок в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл.

18. Способ по п. 15, где среда содержит буфер в концентрации от 2 мМ до приблизительно 10 мМ, и где композиция, полученная в результате осуществления операции ультрафильтрации и диафильтрации, содержит белок в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл.

19. Способ по п. 15, где среда содержит буфер с рН за пределами диапазона буферной емкости буфера, и где композиция, полученная в результате операции ультрафильтрации и диафильтрации, содержит белок в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл.

20. Способ по любому из пп. 1-19, где способ очистки включает одну или несколько из следующих стадий: центрифугирование, микрофильтрация, TFF, инактивация вирусов, аффинная хроматография, катионообменная хроматография, анионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием, ультрафильтрация, диафильтрация, SPTFF, глубинная фильтрация и хроматография в смешанном режиме.

21. Способ по п. 20, где способ очистки включает стадию фильтрации для удаления вирусов и одну или несколько из следующих стадий: центрифугирование, микрофильтрация, TFF, инактивация вирусов, аффинная хроматография, катионообменная хроматография, анионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием, хроматография в смешанном режиме, ультрафильтрация, диафильтрация, SPTFF и глубинная фильтрация, и

где препарат получают в результате осуществления стадии фильтрации для удаления вирусов.

22. Способ по п. 20, где способ очистки включает стадию катионообменной

хроматографии и одну или несколько из следующих стадий: центрифугирование, микрофильтрация, TFF, инактивация вирусов, аффинная хроматография, анионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием, хроматография в смешанном режиме, ультрафильтрация, диафильтрация, SPTFF, фильтрация для удаления вирусов и глубинная фильтрация, и

где препарат получают в результате осуществления стадии катионообменной хроматографии.

23. Способ по п. 20, где способ очистки включает стадию анионообменной хроматографии и одну или несколько из следующих стадий: центрифугирование, микрофильтрация, TFF, инактивация вирусов, аффинная хроматография, катионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием, хроматография в смешанном режиме, ультрафильтрация, диафильтрация, SPTFF, фильтрация для удаления вирусов и глубинная фильтрация, и

где препарат получают в результате осуществления стадии анионообменной хроматографии.

24. Способ по п. 20, где способ очистки включает стадию хроматографии с гидрофобным взаимодействием и одну или несколько из следующих стадий: центрифугирование, микрофильтрация, TFF, инактивация вирусов, аффинная хроматография, катионообменная хроматография, анионообменная хроматография, хроматография в смешанном режиме, ультрафильтрация, диафильтрация, SPTFF, фильтрация для удаления вирусов и глубинная фильтрация, и

где препарат получают в результате осуществления стадии хроматографии с гидрофобным взаимодействием.

25. Способ по п. 20, где способ очистки включает стадию хроматографии в смешанном режиме и одну или несколько из следующих стадий: центрифугирование, микрофильтрация, TFF, инактивация вирусов, аффинная хроматография, катионообменная хроматография, анионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием, ультрафильтрация, диафильтрация, SPTFF, фильтрация для удаления вирусов и глубинная фильтрация, и

где препарат получают в результате осуществления стадии хроматографии в смешанном режиме.

26. Способ по любому из пп. 1-25, где способ дополнительно включает добавление стабилизатора к препарату.

27. Способ по п. 26, где стабилизатор представляет собой один или несколько стабилизаторов, выбранных из аминокислоты, сахара, полиола, антиоксиданта, хелатирующего средства, липида или производного липида, соли, полимера, инертного белка, поверхностно-активного вещества и смешиваемого с водой совместного растворителя.

28. Способ по п. 27, где аминокислота представляет собой одну или несколько аминокислот, выбранных из гистидина, аргинина, глицина, метионина, аланина,

аспарагиновой кислоты, гидрохлорида лизина, пролина, лизина, саркозина, гамма-аминомасляной кислоты и глутаминовой кислоты.

29. Способ по п. 27, где антиоксидант представляет собой один или несколько антиоксидантов, выбранных из аскорбиновой кислоты, глутатиона, витамина Е и поли(этиленimina).

30. Способ по п. 27, где сахар представляет собой один или несколько сахаров, выбранных из сахарозы, трегалозы, ксилита, мальтозы, декстрозы, глюкозы, рафинозы и лактозы.

31. Способ по п. 27, где полиол представляет собой один или несколько полиолов, выбранных из сахарного спирта, глицерина, эритрита, каприлата, триптофаната и саркозина.

32. Способ по п. 27, где полимер представляет собой один или несколько полимеров, выбранных из желатина, гиалуроновой кислоты, поливинилпирролидона (PVP), сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA), полиакриловой кислоты (PAA), амфипола А8-35, PAA5-25C8-40C3, полиэтиленгликоля (PEG), гидроксипропил(гетар)крахмала, сульфатированных полисахаридов, полиаминокислот, декстрана, диэтиламиноэтил-декстрана, гидроксипропил-бета-циклодекстрина, сульфобутиловый эфир-бета-циклодекстрина, полиэтиленimina (PEI) и карбоксиметилцеллюлозы.

33. Способ по п. 27, где инертный белок представляет собой один или несколько белков, выбранных из HSA, BSA и рекомбинантного HA.

34. Способ по п. 27, где хелатирующее средство представляет собой одно или несколько средств, выбранных из EDTA, DPTA, лимонной кислоты, гексафосфата и тиогликолевой кислоты.

35. Способ по п. 27, где соль представляет собой одну или несколько солей, выбранных из хлорида натрия, сульфата натрия, тиоцианата натрия, хлорида калия, фосфата калия, лактата кальция и гидрохлорида гуанидина.

36. Способ по п. 27, где поверхностно-активное вещество представляет собой одно или несколько поверхностно-активных веществ, выбранных из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 80, полксамера, простых додециловых эфиров PEG и трет-октилфенилового эфира PEG.

37. Способ по п. 27, где смешиваемый с водой совместный растворитель представляет собой один или несколько растворителей, выбранных из (DMSO), DMF, DMA и CSA.

38. Способ по п. 27, где липид или производное липида представляет собой одно или несколько из жирных кислот (например, олеиновая кислота), фосфолипидов и производных фосфолипидов, DEA-фосфата, DEA-цетилфосфата, олет-10-фосфата, олет-10, олет-10-фосфата, DEA-цетилфосфата, маннозилглицерата, полидоканола, сульфобетаинхолата, фосфолипидов и бензоат-спиртов с длиной цепи C12-15.

39. Способ по любому из пп. 1-38, где белок представляет собой любой из

следующих белков: этанерцепт, афлиберцепт, адалимумаб, эпоэтин альфа, дарбэпоэтин альфа, филграстим, пегфилграстим, бевацизумаб, цетуксимаб, инфликсимаб, ритуксимаб, экулизумаб, трастузумаб, эволокумаб, деносумаб, ромосозумаб, эренумаб, блинатумомаб и конструкция на основе антител ViTE.

40. Способ по п. 39, где конструкция на основе антитела ViTE представляет собой блинатумомаб, конструкцию на основе антитела ViTE к CD33 и CD3, конструкцию на основе антитела ViTE к EGFRvIII и CD3, конструкцию на основе антитела ViTE к DLL3 и к CD3, конструкцию на основе антитела ViTE к CD19 и к CD3, конструкцию на основе антитела ViTE к MSLN и к CD3, конструкцию на основе антитела ViTE к CDH19 и к CD3, конструкцию на основе антитела ViTE к FLT3 и к CD3, конструкцию на основе антитела ViTE к DLL3 и к CD3, конструкцию на основе антитела ViTE к CDH3 и к CD3, конструкцию на основе антитела ViTE к CD70 и к CD3, конструкцию на основе антитела ViTE к PSMA и к CD3 и конструкцию на основе антитела ViTE к BCMA и к CD3.

41. Способ по любому из пп. 1-40, где операцию ультрафильтрации и диафильтрации проводят при температуре от приблизительно 25°C до приблизительно 50°C.

42. Способ по любому из пп. 1-40, где операцию ультрафильтрации и диафильтрации проводят при температуре от приблизительно 25°C до приблизительно 40°C.

43. Способ по любому из пп. 1-40, где операцию ультрафильтрации и диафильтрации проводят при температуре от приблизительно 30°C до приблизительно 40°C.

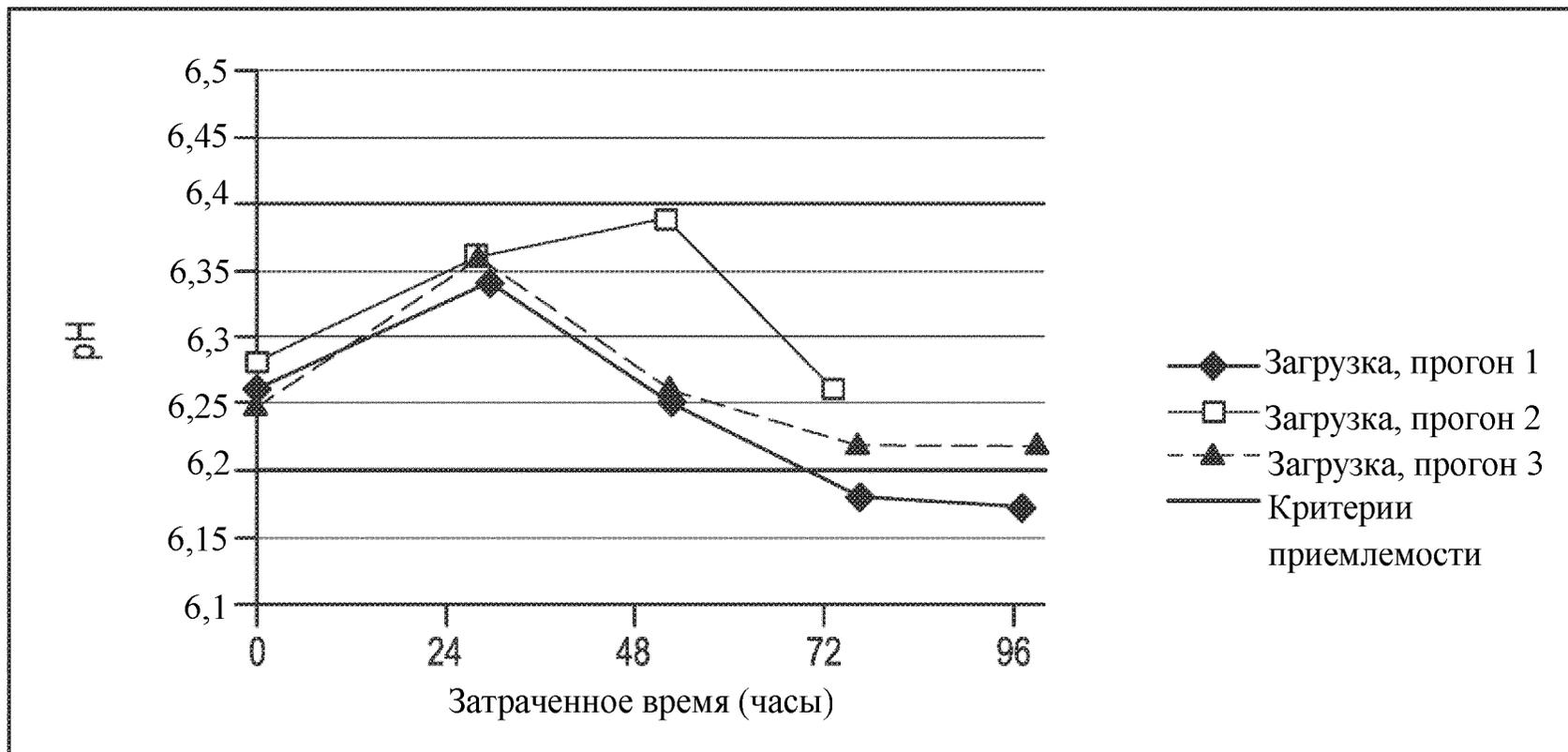
44. Способ по любому из пп. 1-43, где композиция, полученная в результате осуществления конечной операции ультрафильтрации и диафильтрации, представляет собой фармацевтический состав, содержащий белок.

45. Способ по любому из пп. 1-43, где композиция, полученная в результате осуществления конечной операции ультрафильтрации и диафильтрации, представляет собой лекарственное вещество, содержащее белок.

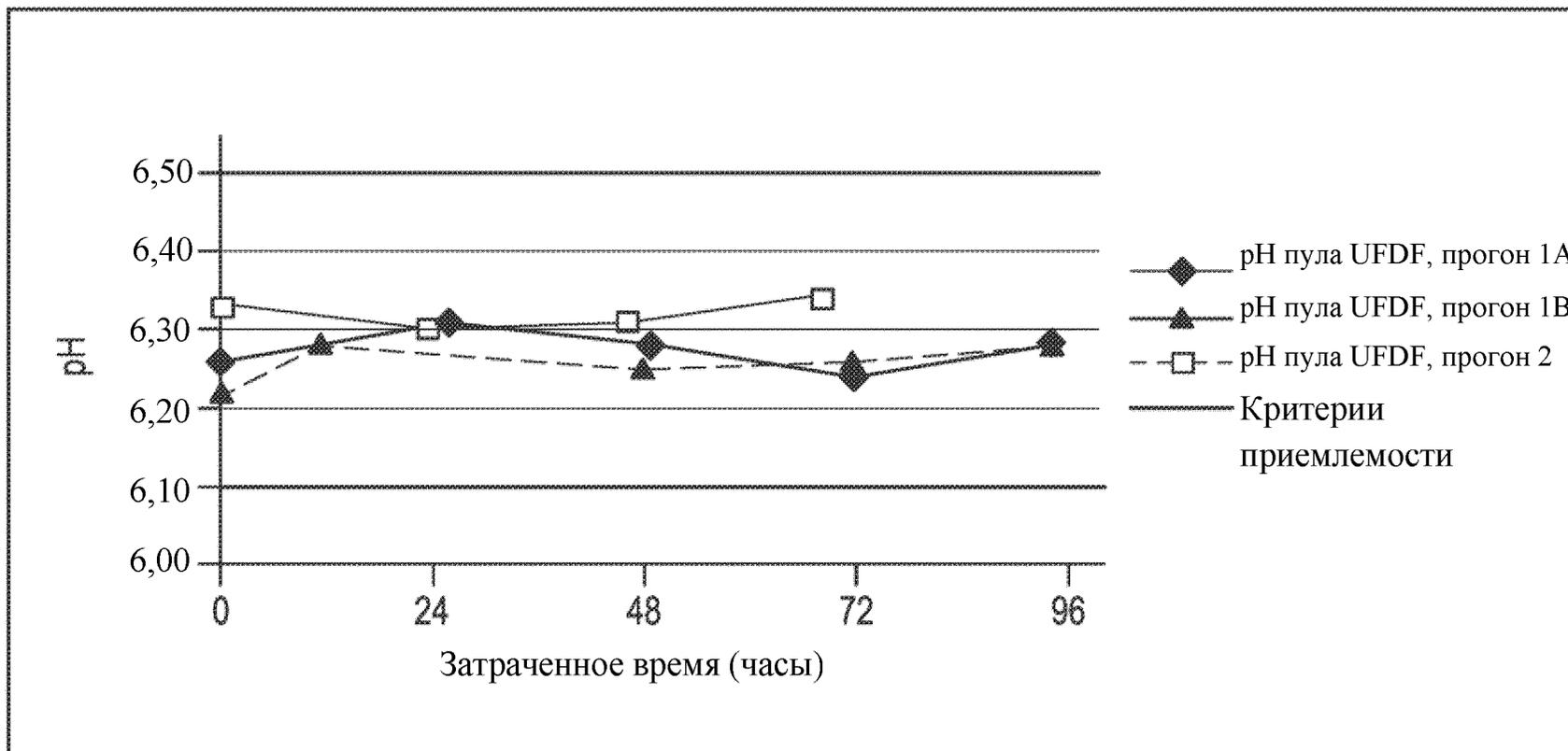
46. Способ по любому из пп. 1-45, где композиция, полученная в результате осуществления конечной операции ультрафильтрации и диафильтрации, является более стабильной по сравнению с композицией, полученной тем же способом без стадии регулирования pH.

По доверенности

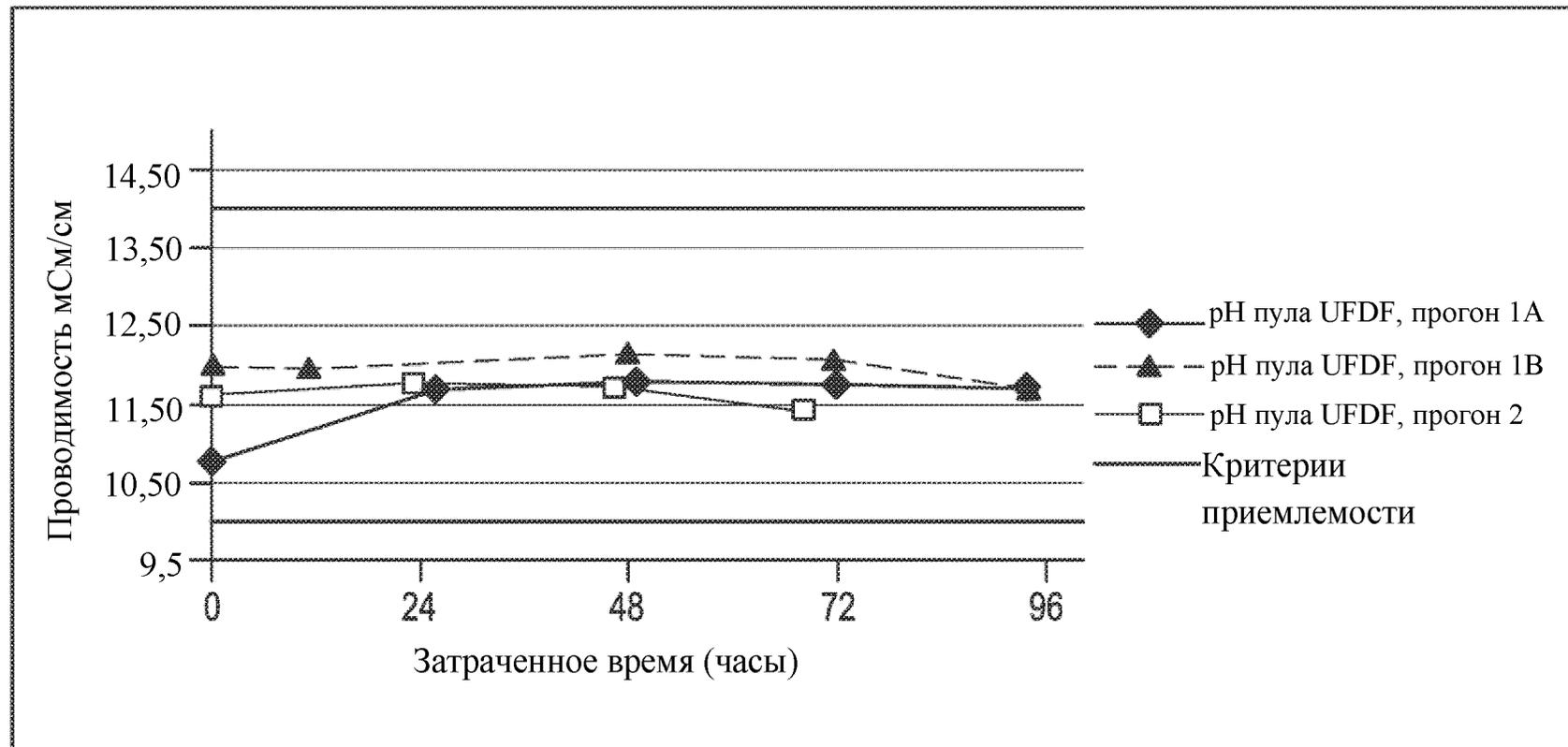
Фигура 1



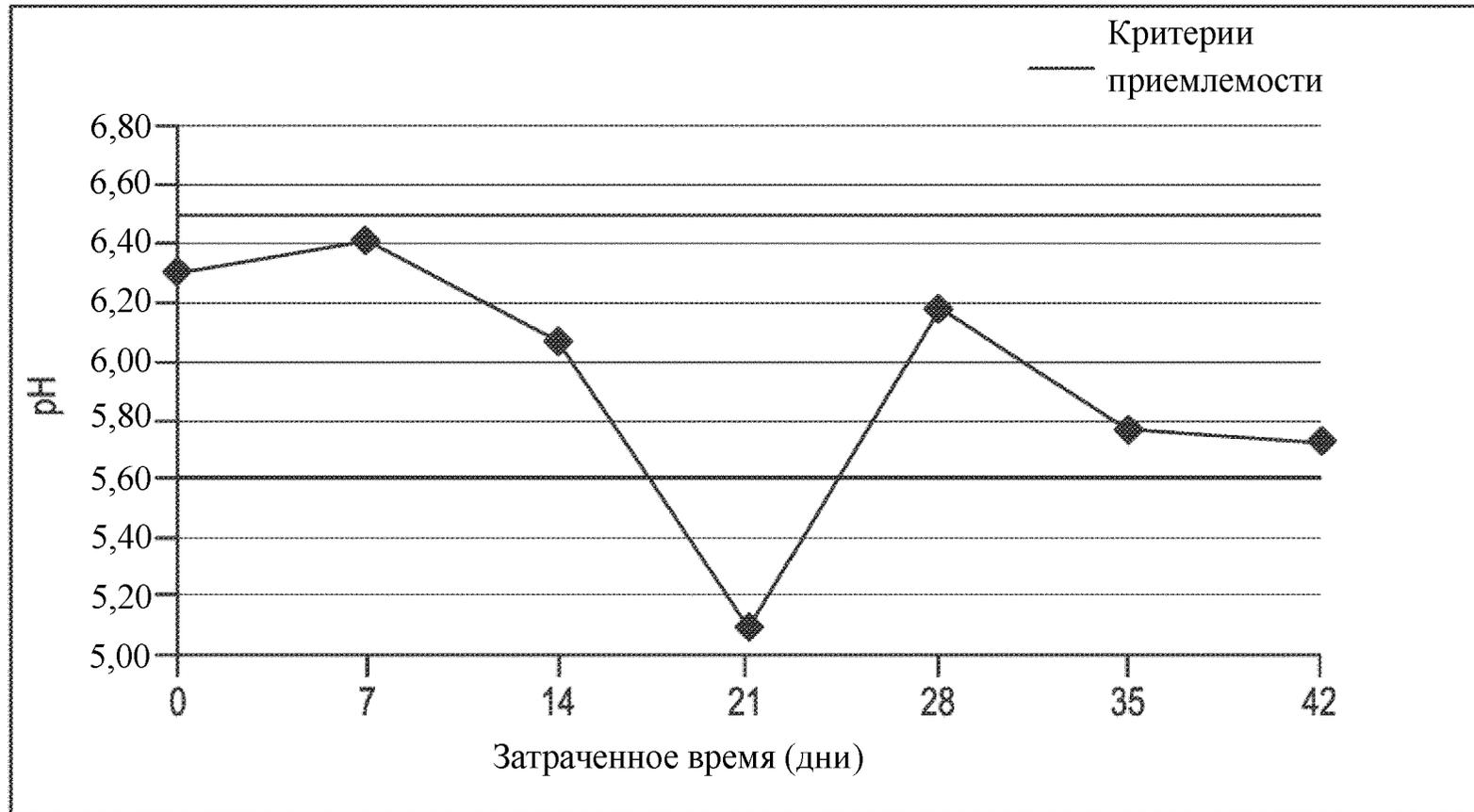
Фигура 2А



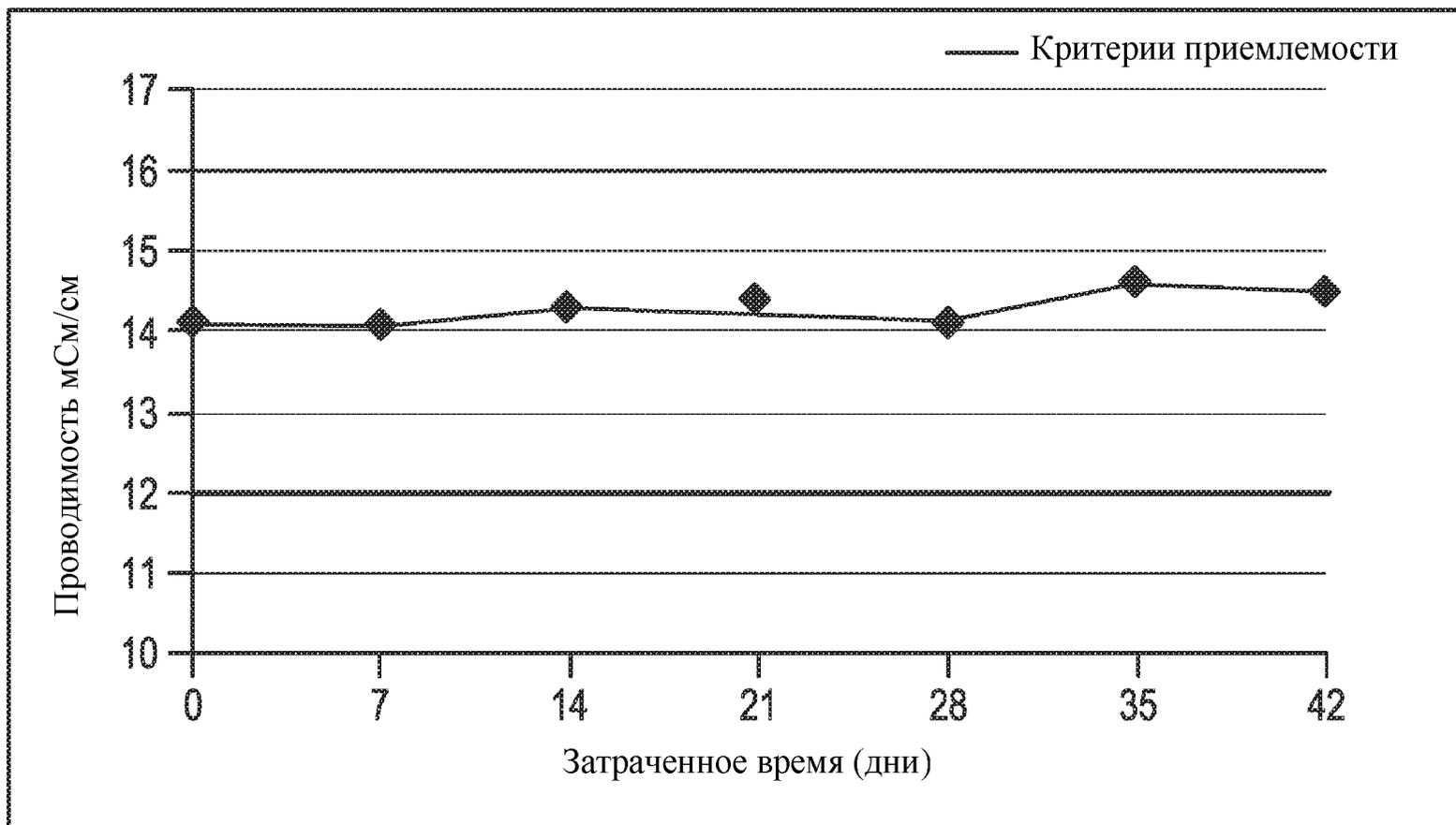
Фигура 2В



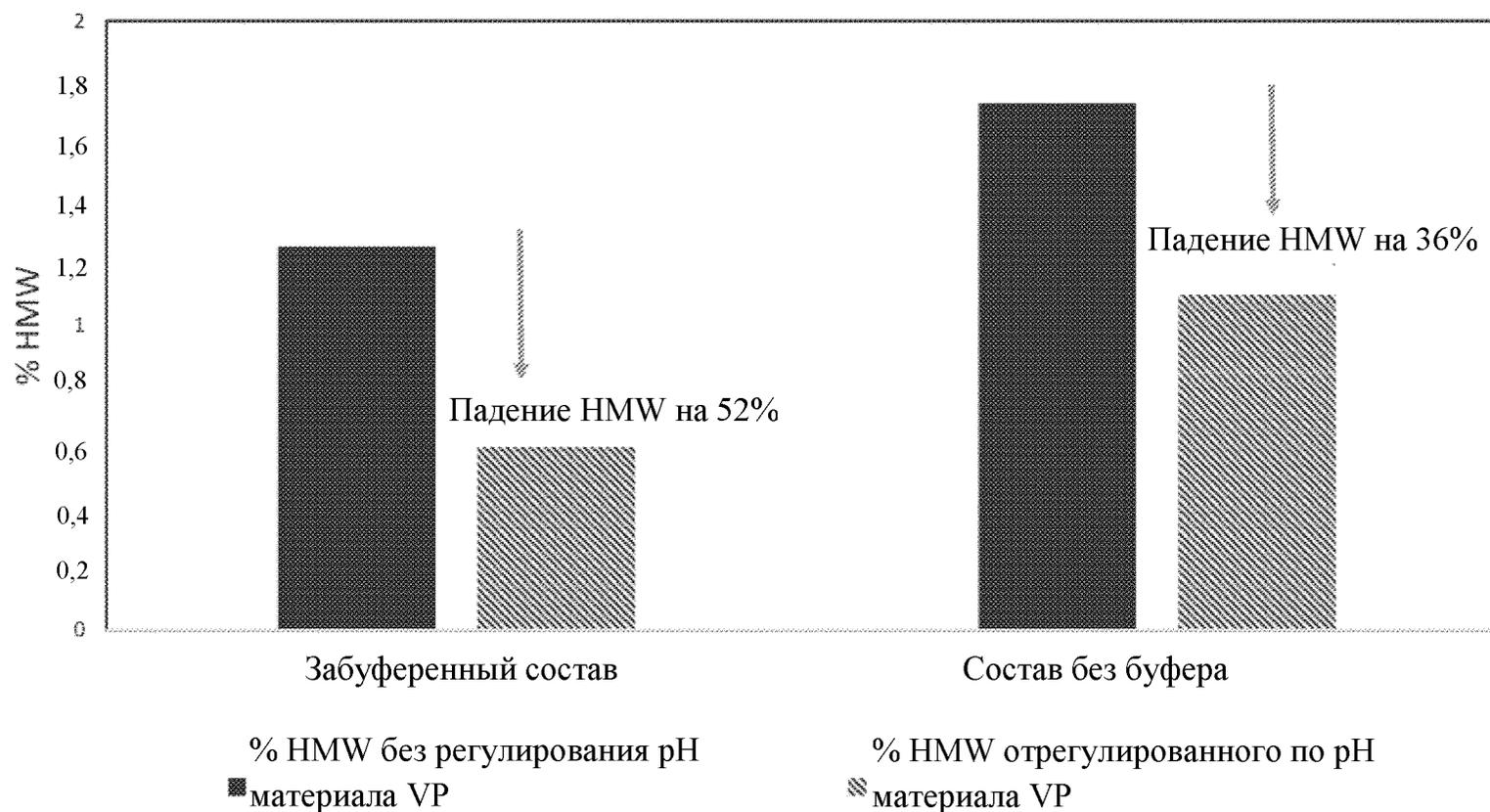
Фигура 3А



Фигура 3В



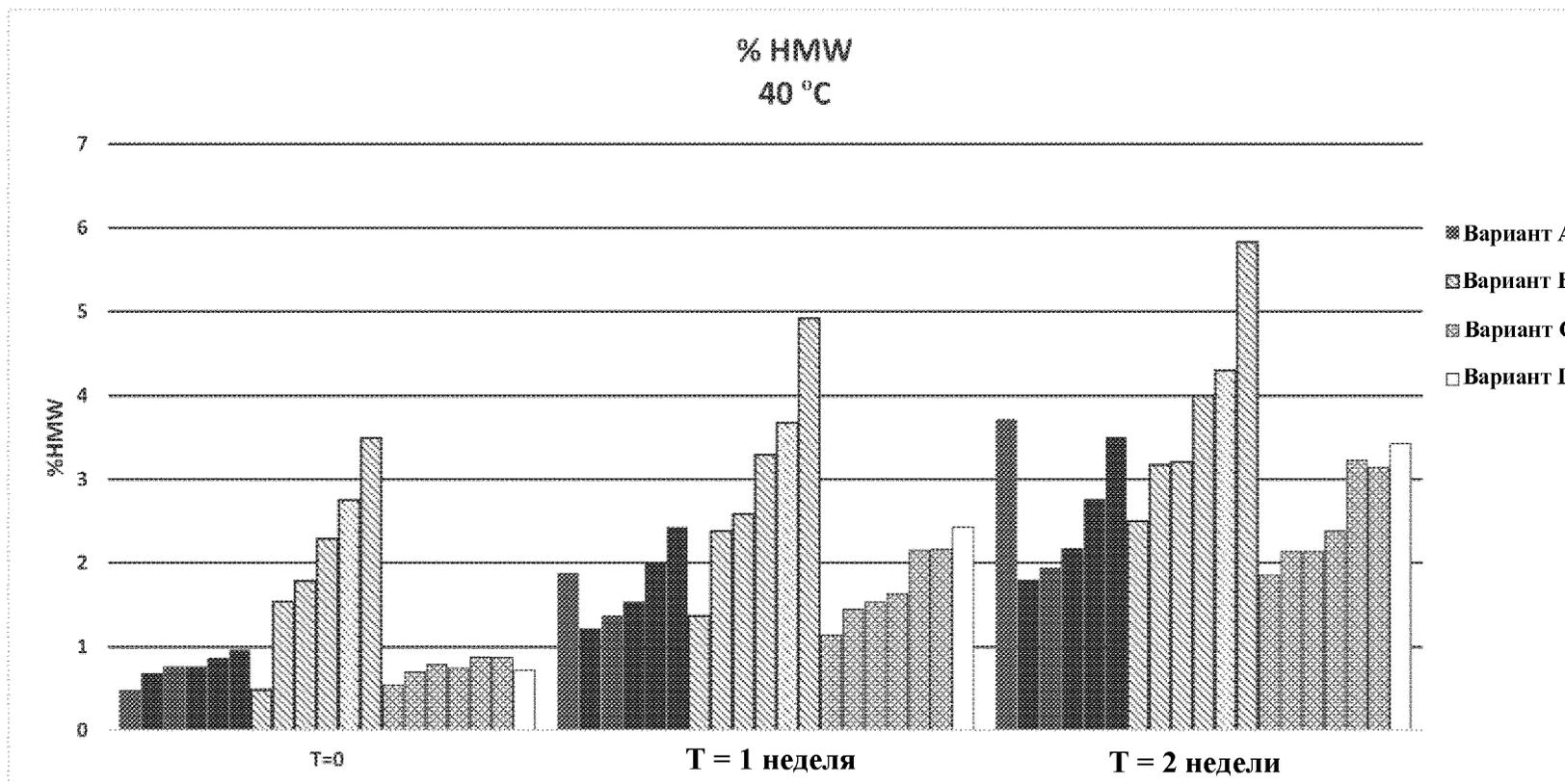
Фигура 4



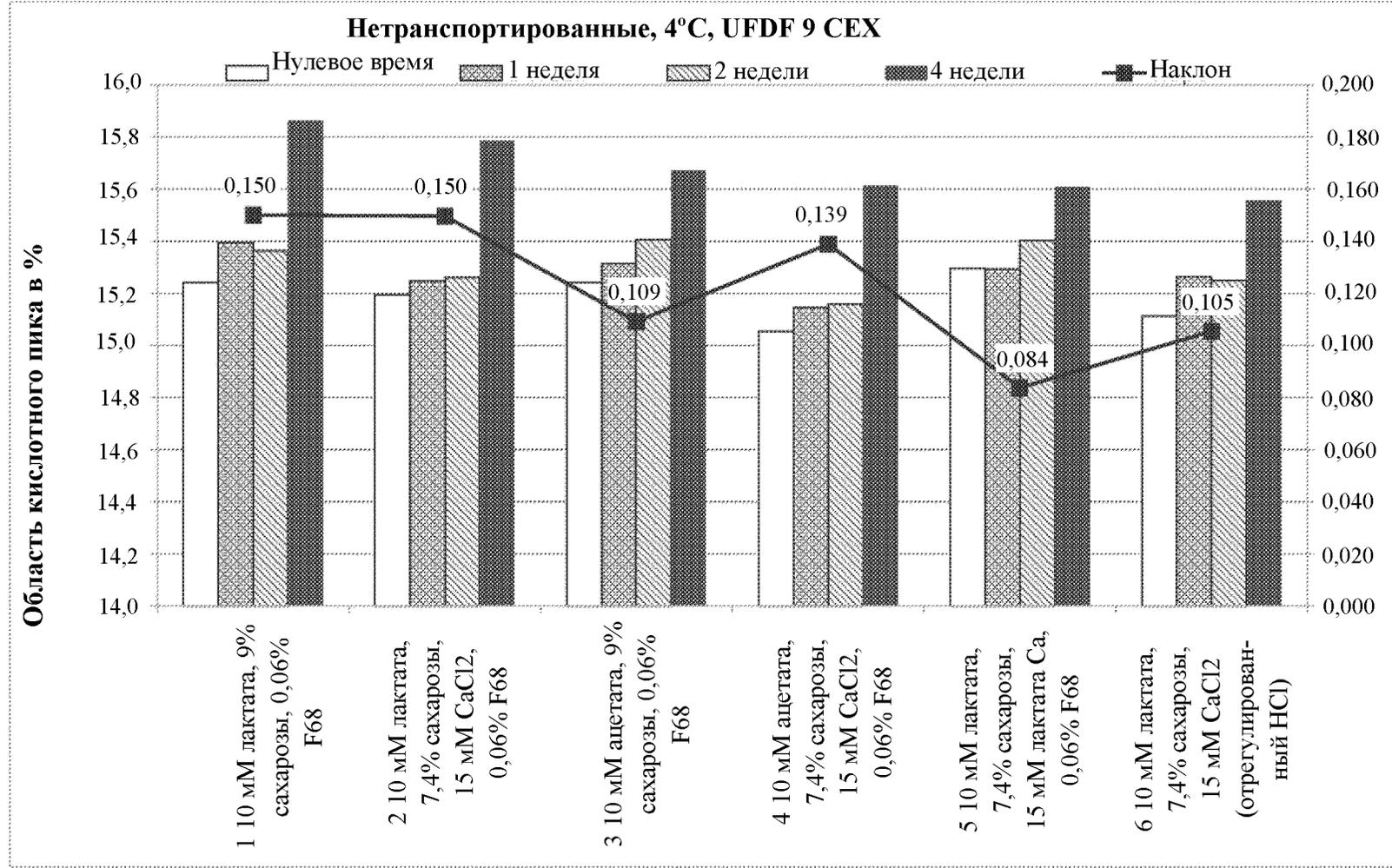
Фигура 5



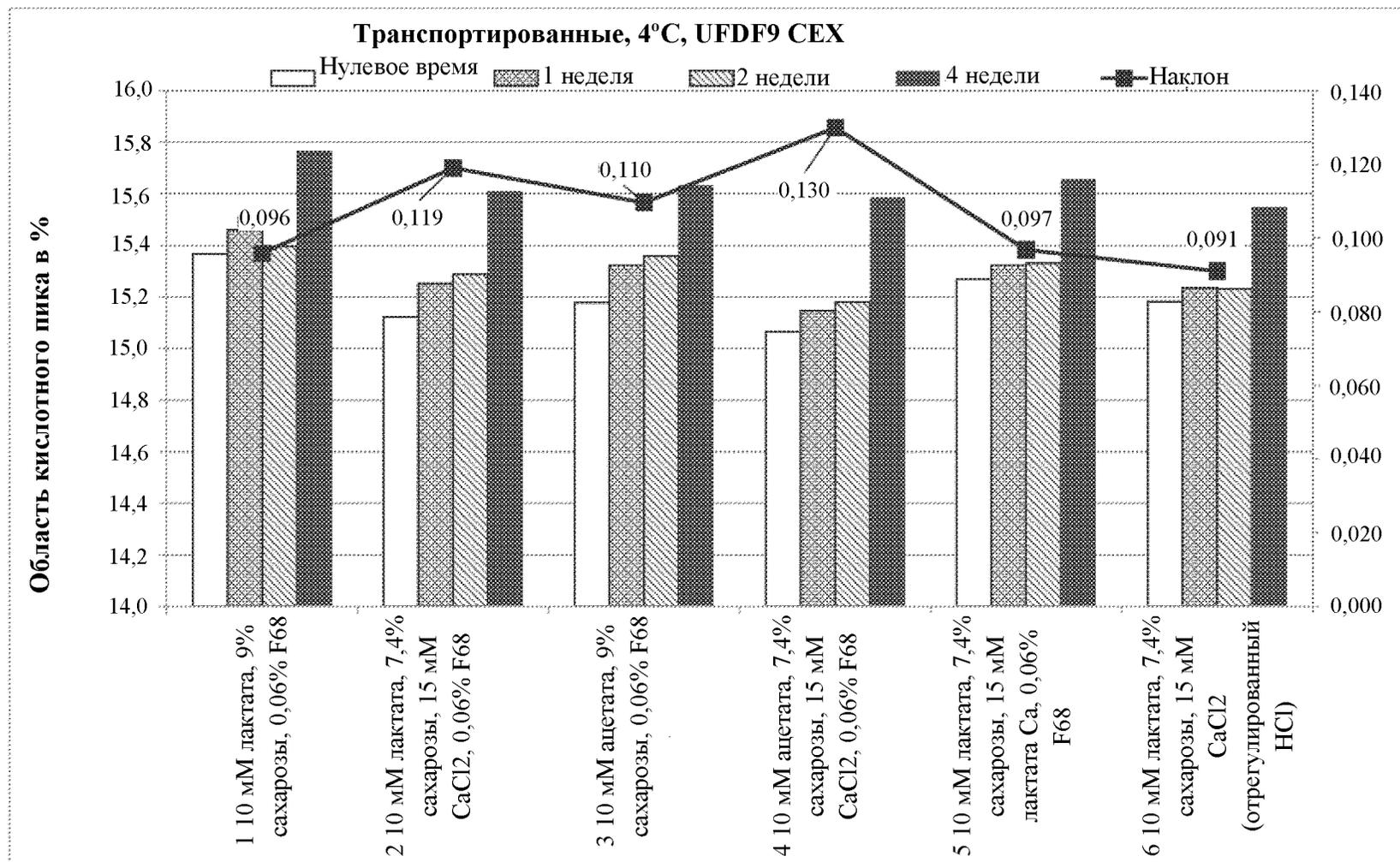
Фигура 6



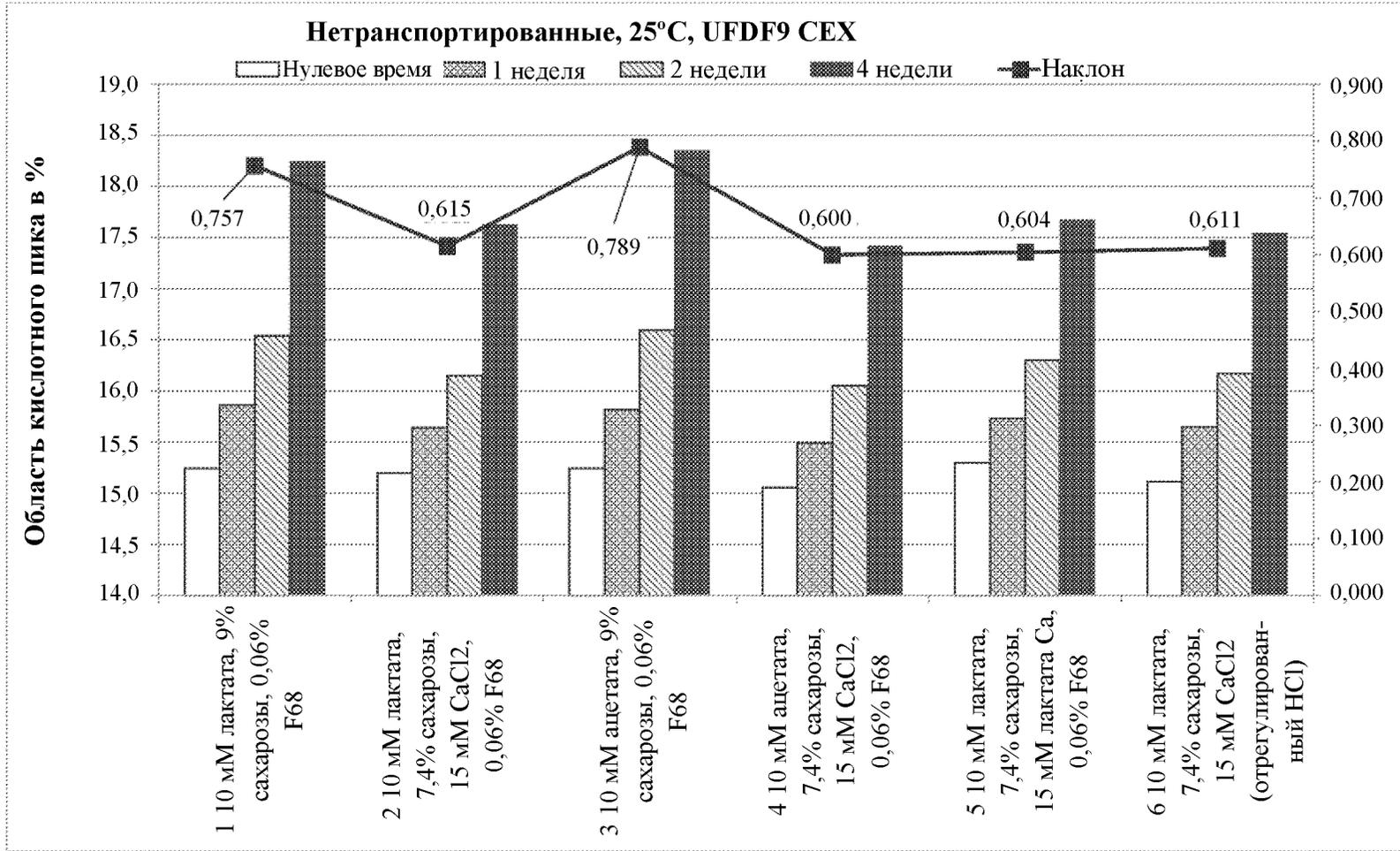
Фигура 7



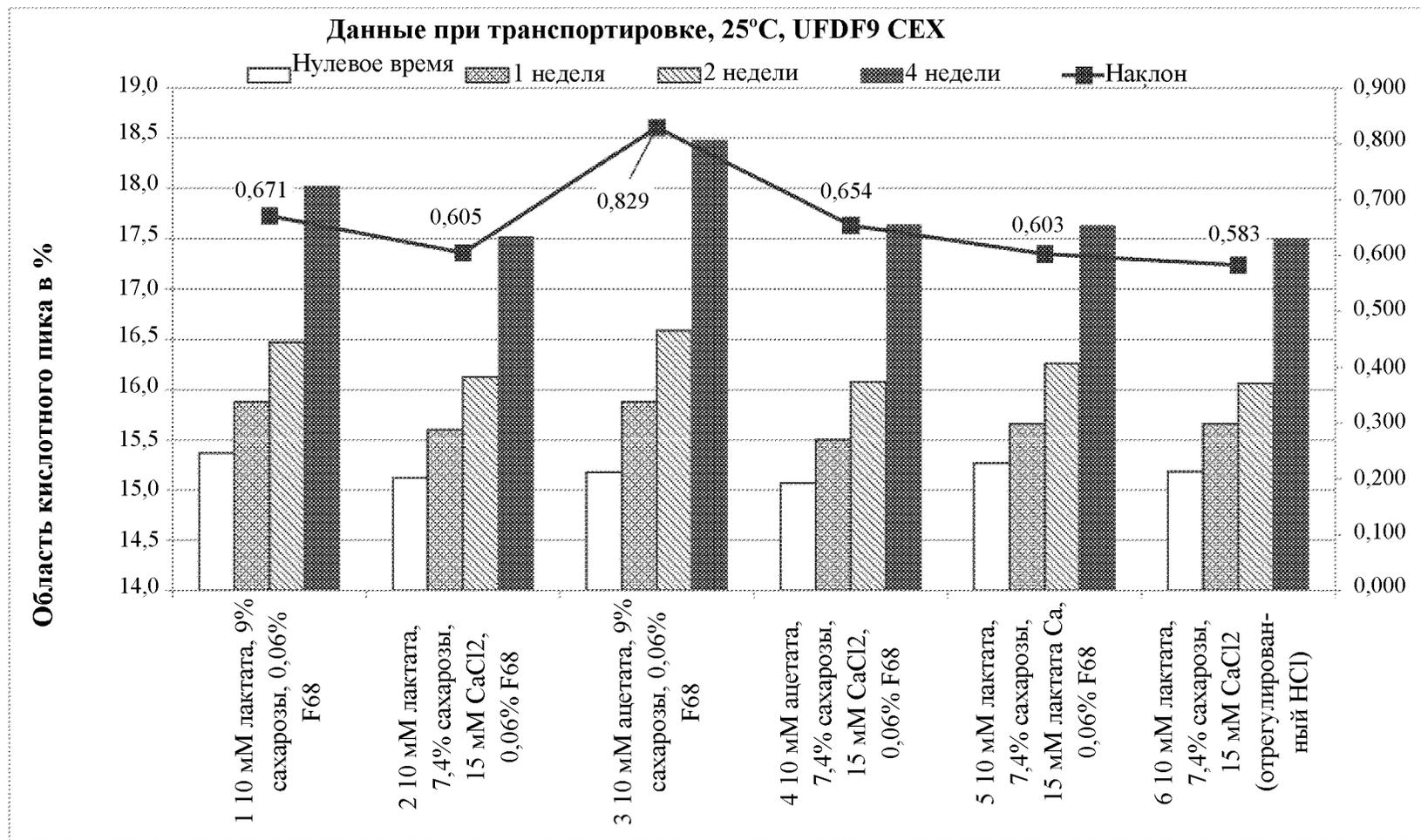
Фигура 8



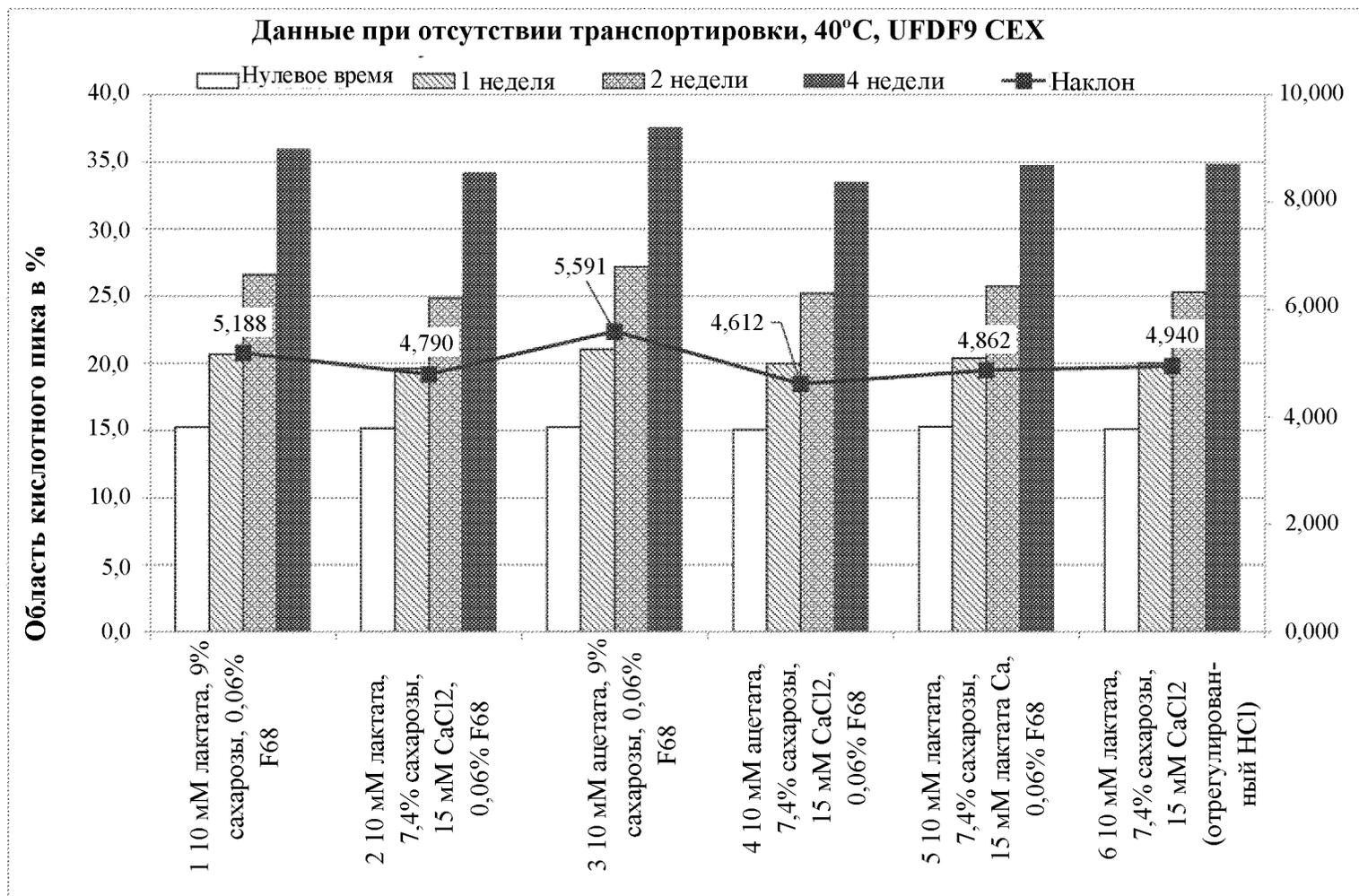
Фигура 9



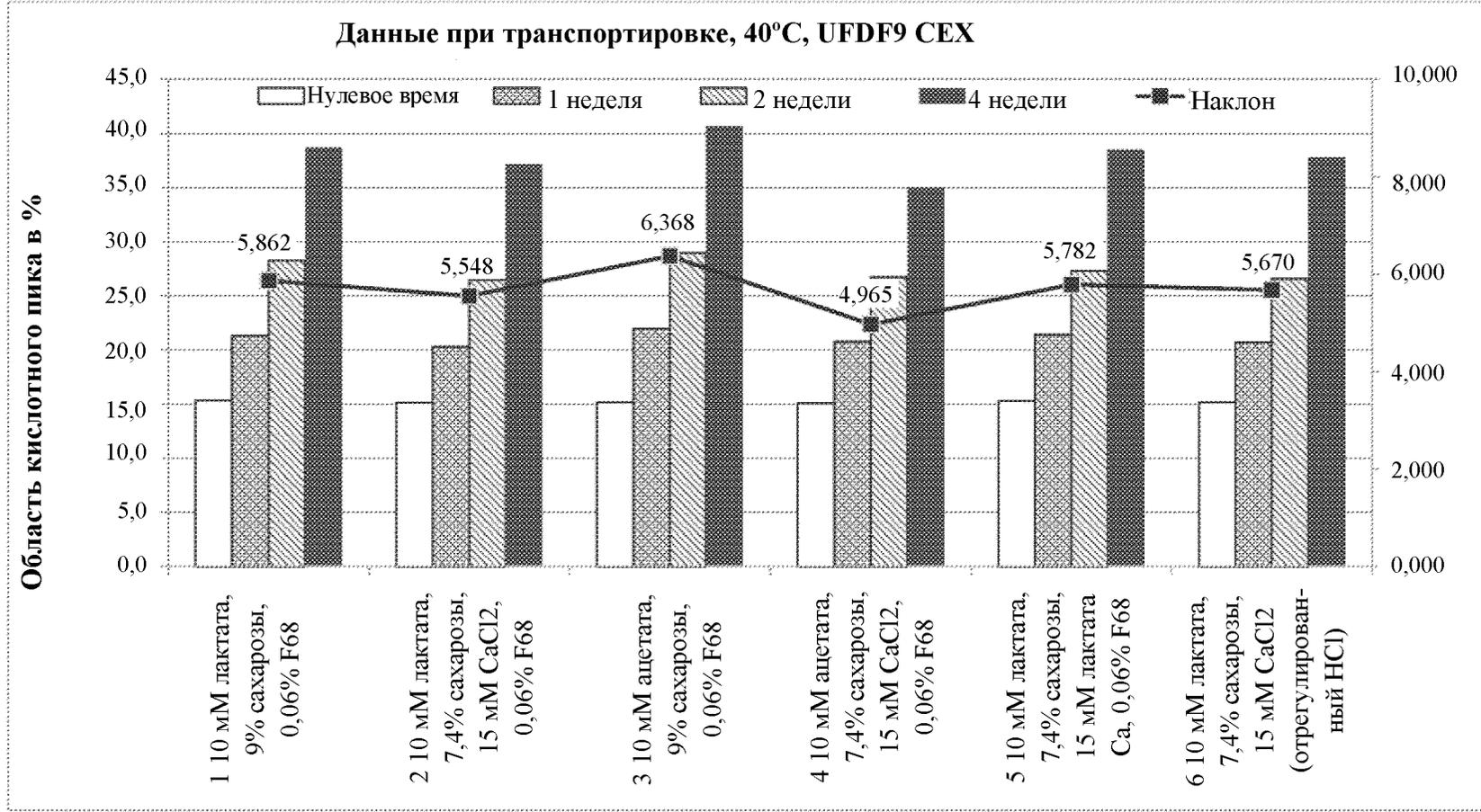
Фигура 10



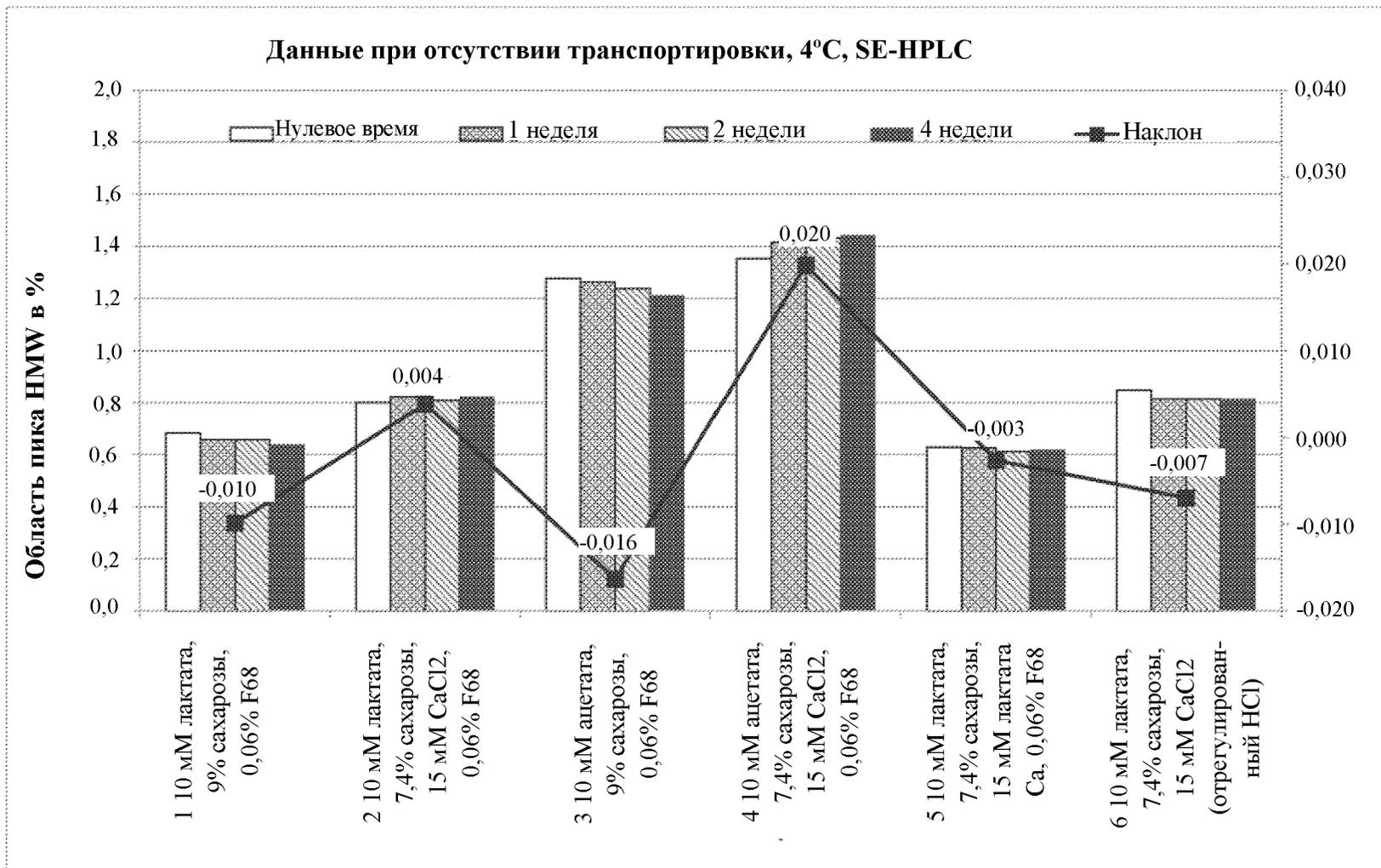
Фигура 11



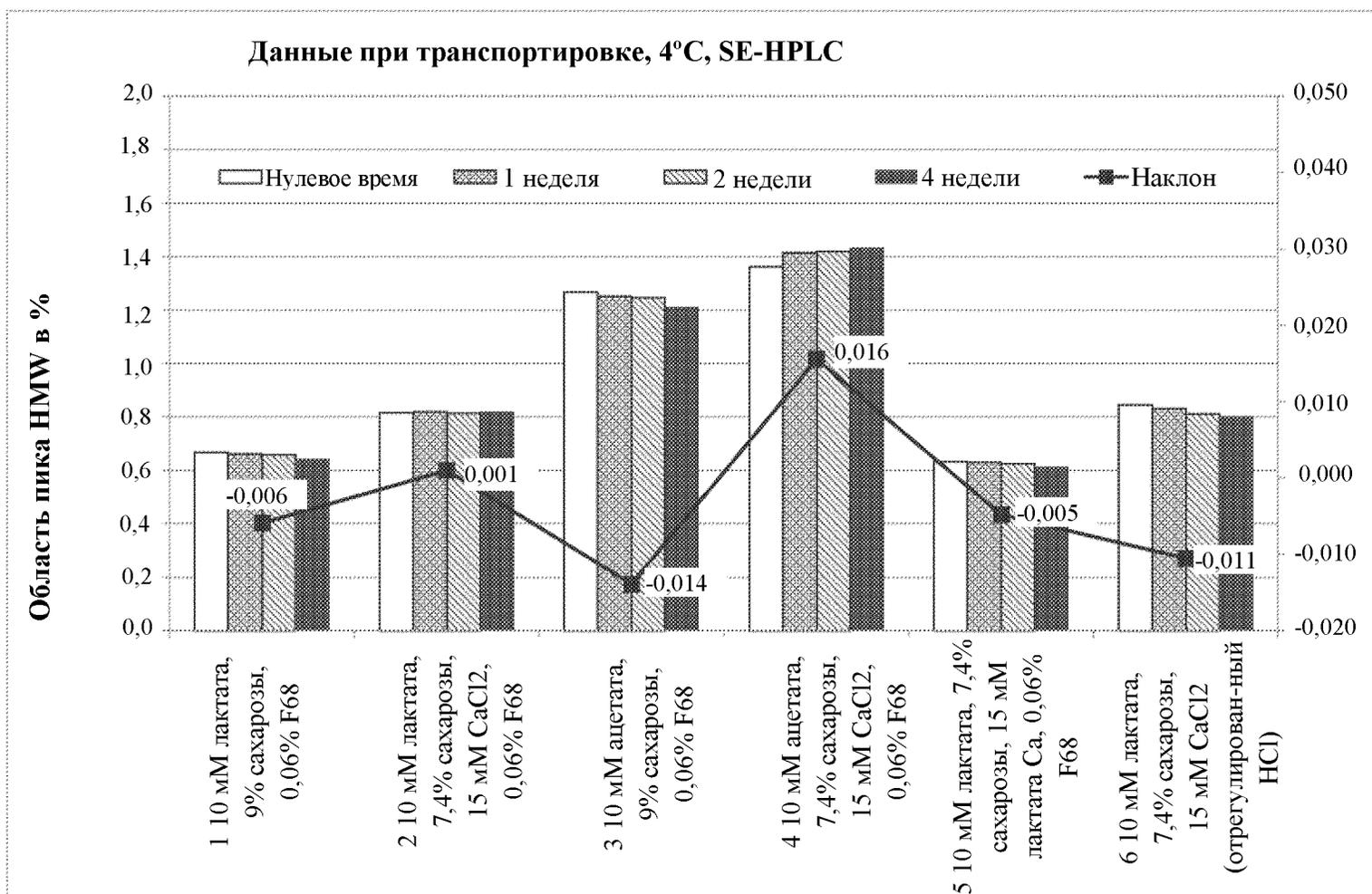
Фигура 12



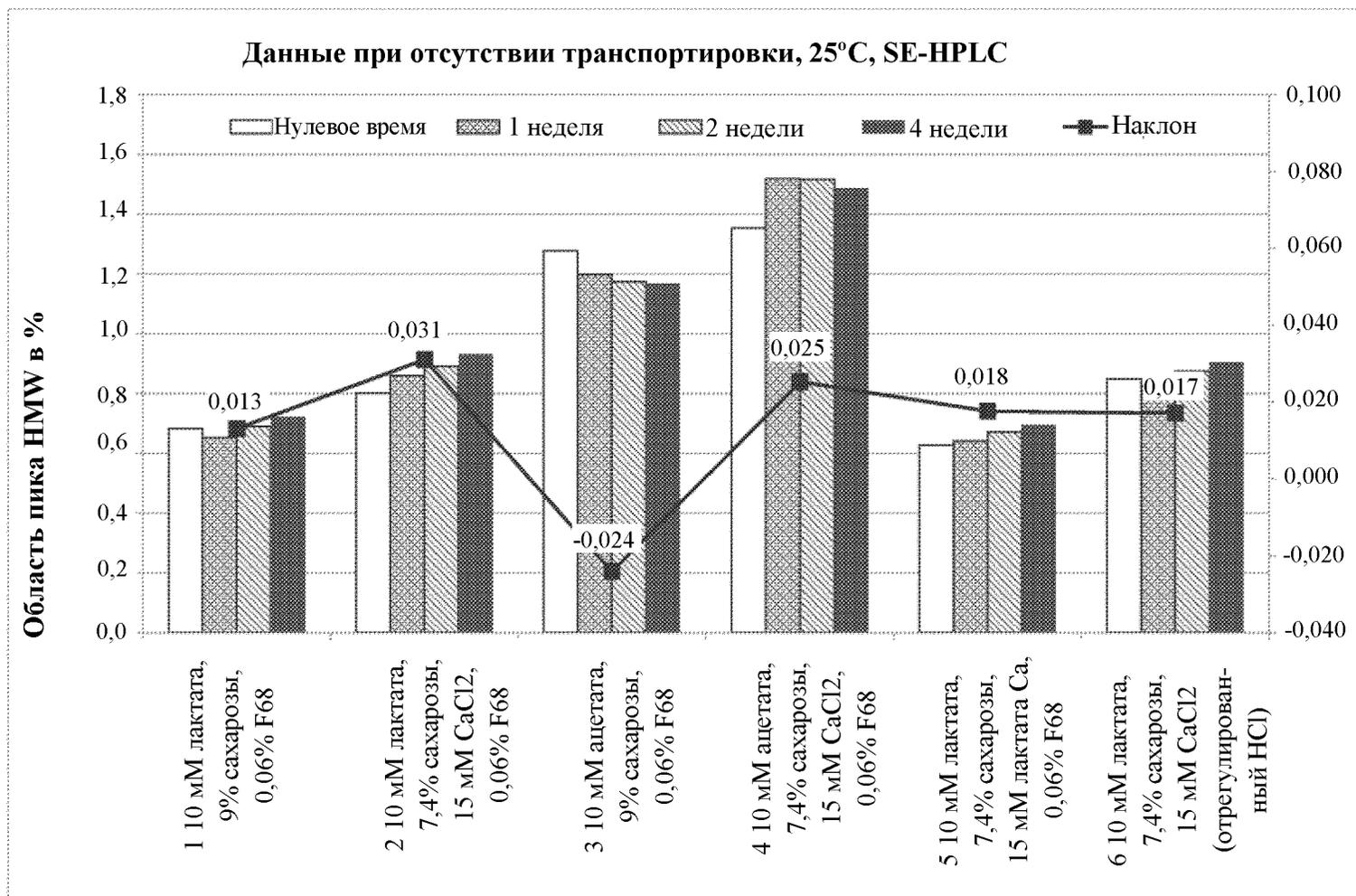
Фигура 13



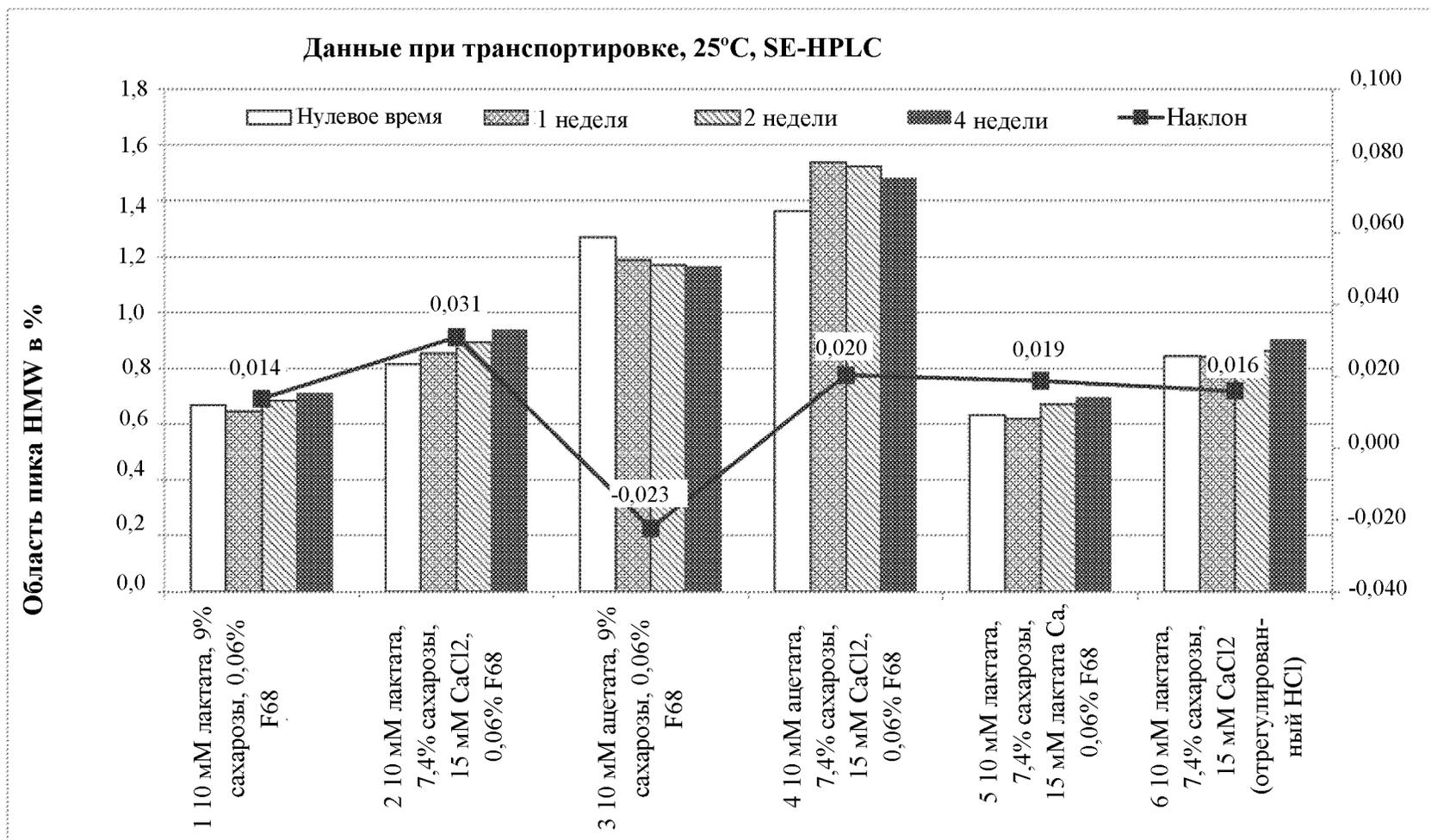
Фигура 14



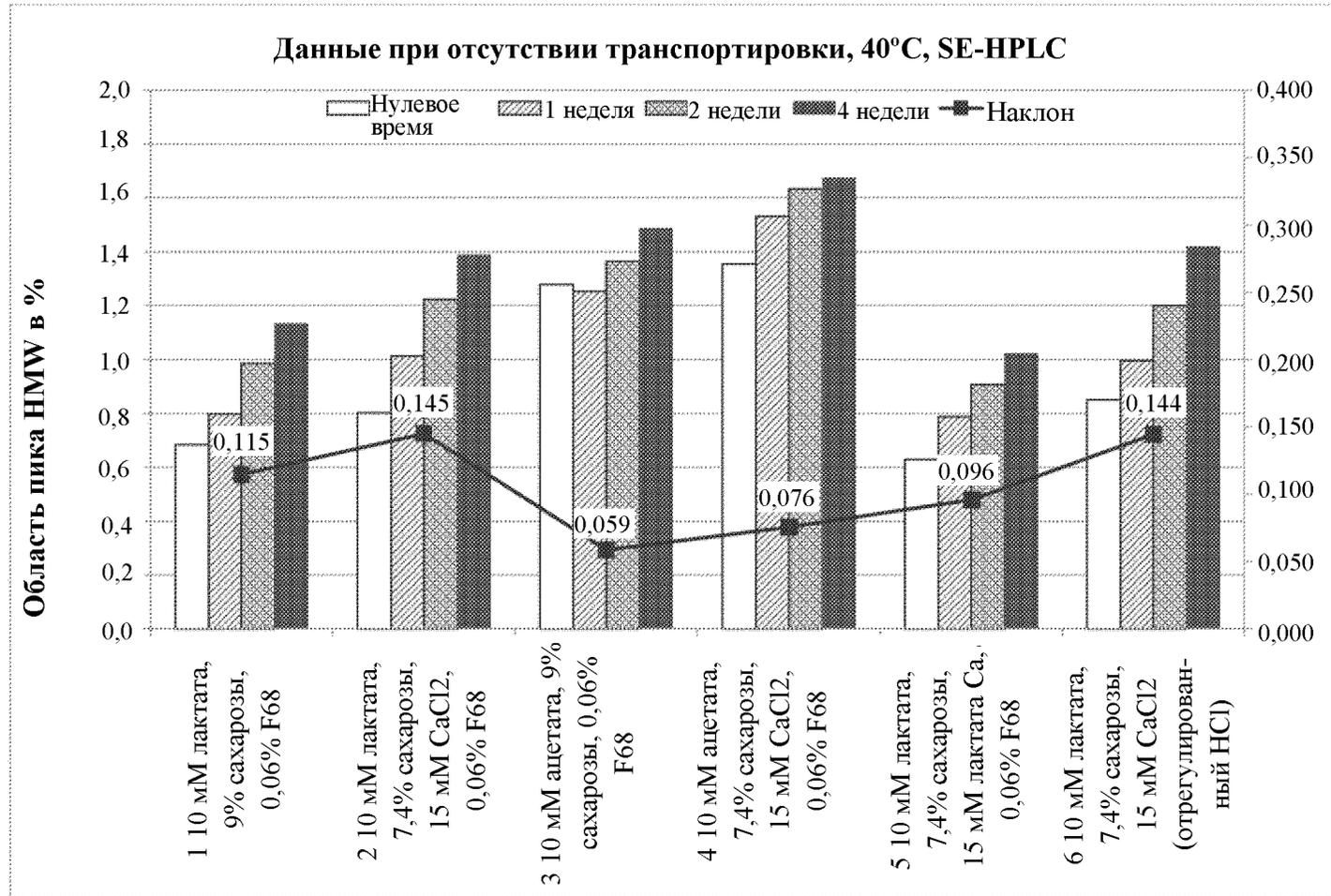
Фигура 15



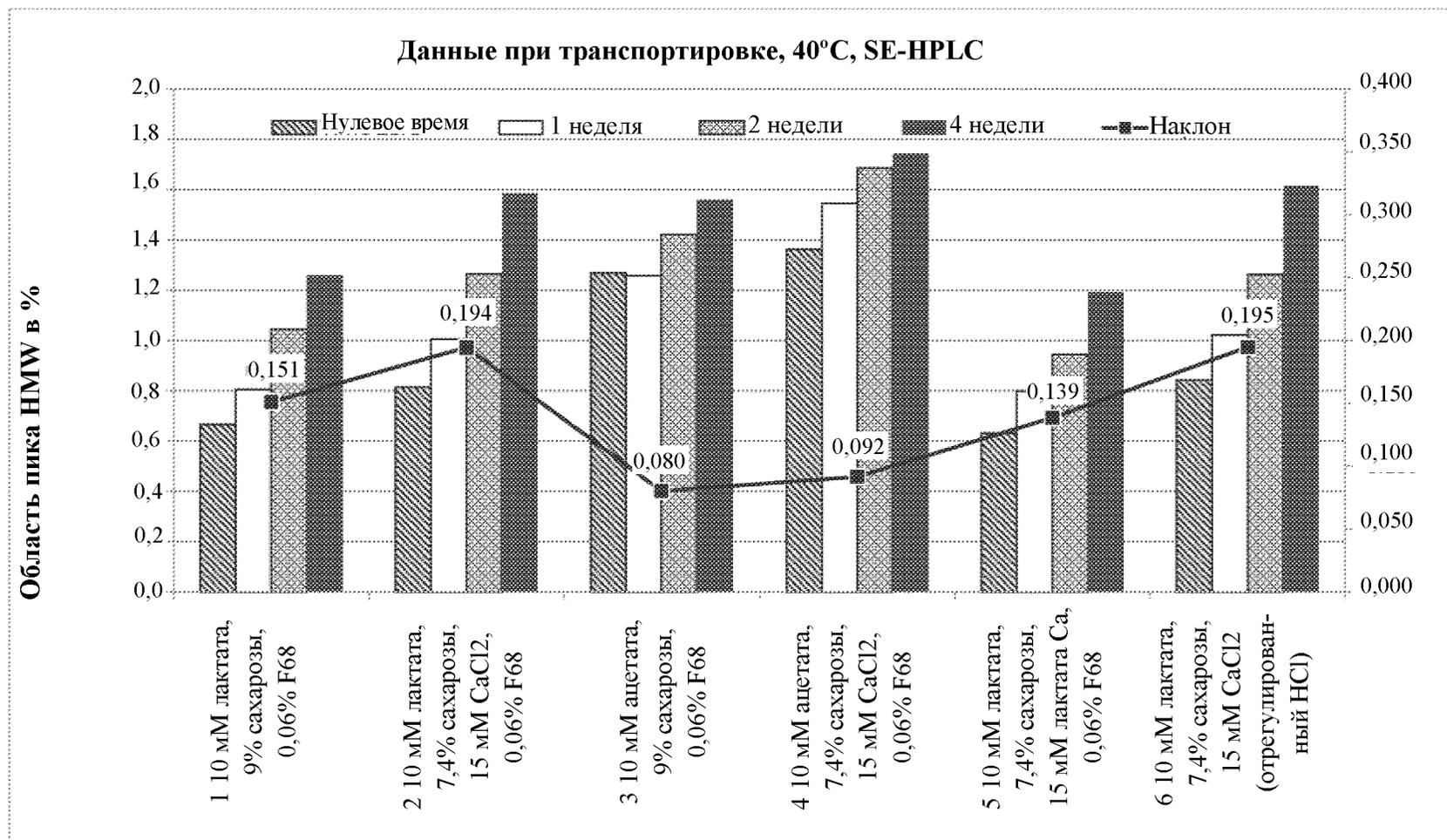
Фигура 16



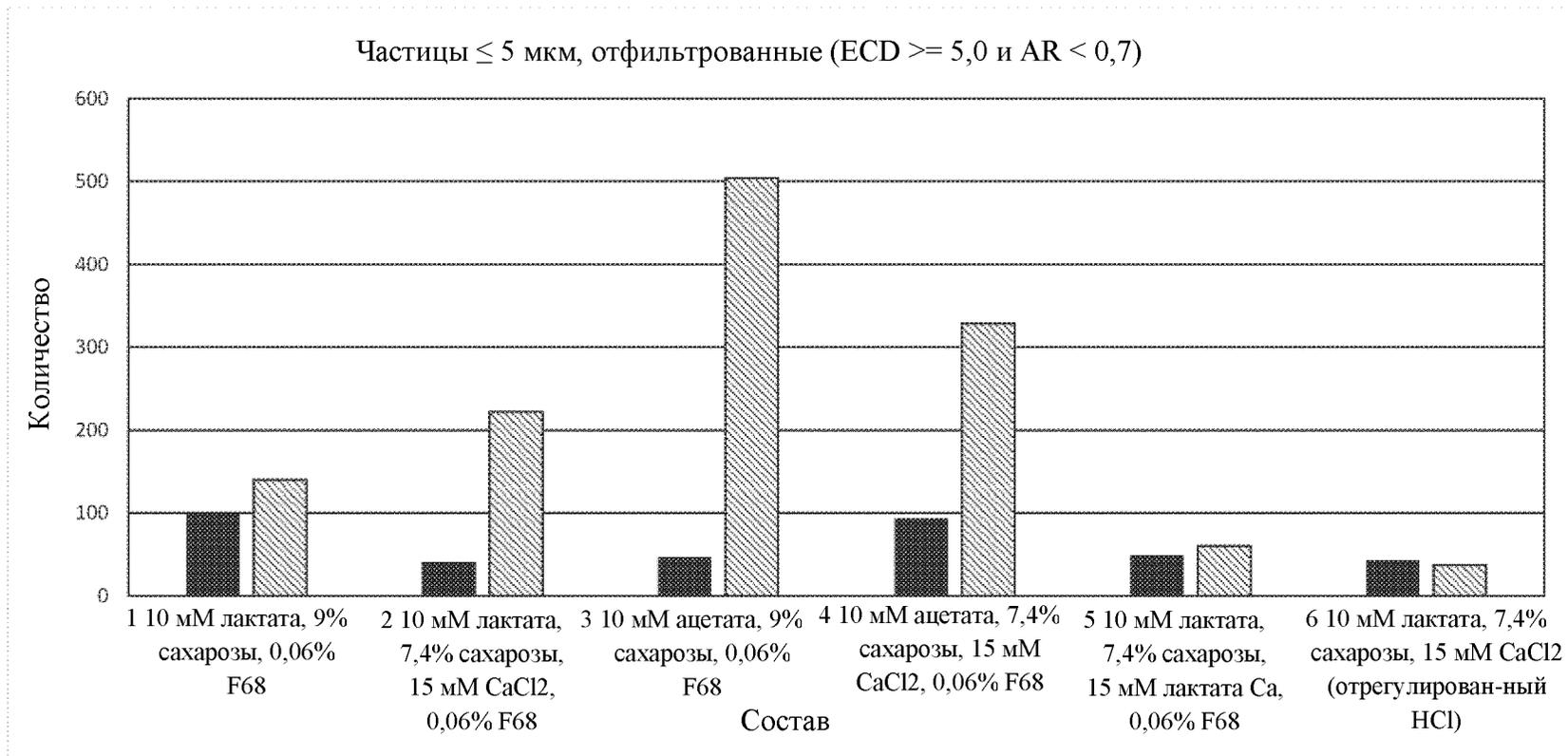
Фигура 17



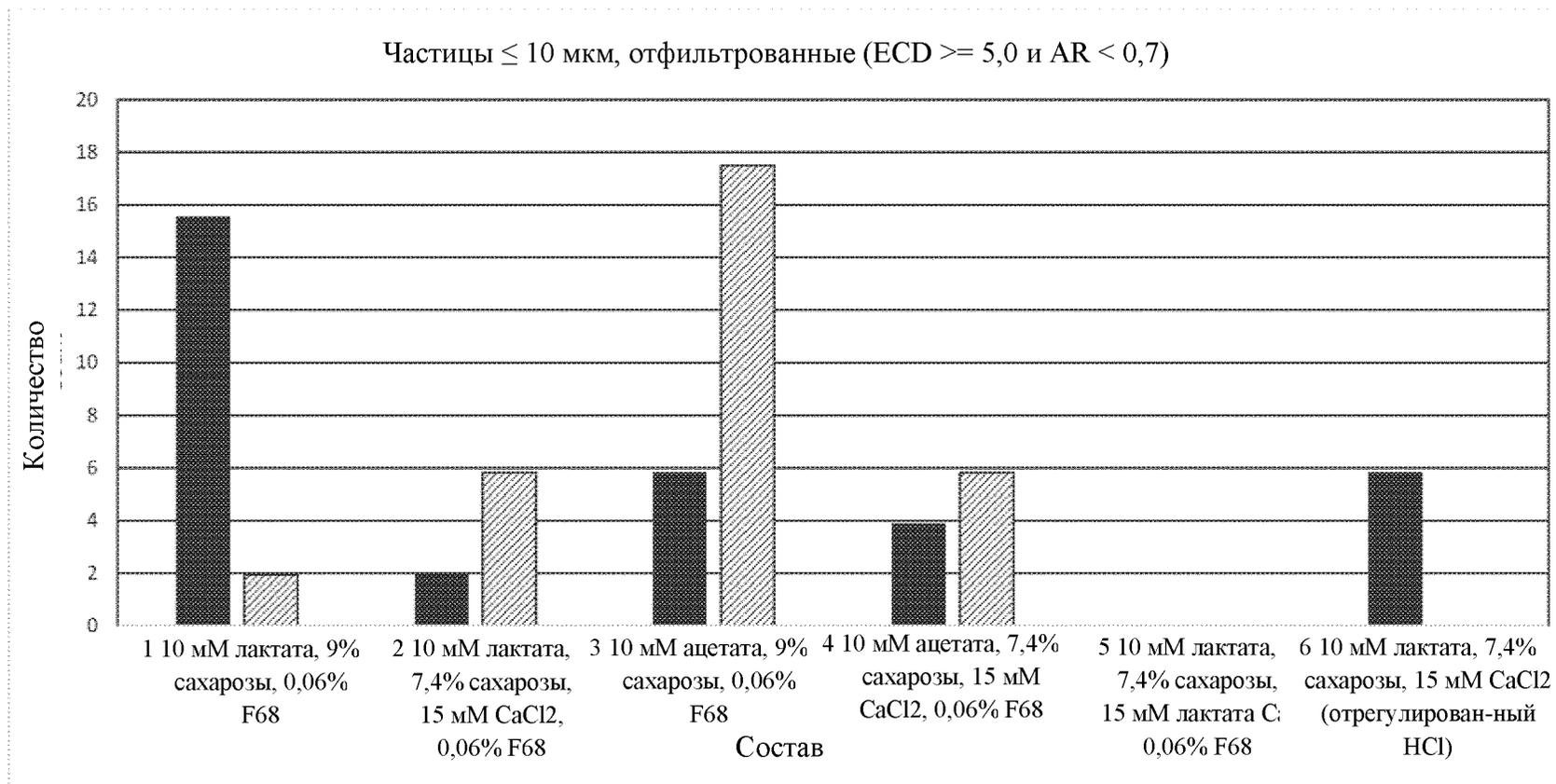
Фигура 18



Фигура 19



Фигура 20



Фигура 21

