

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190163** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.03.30

(51) Int. Cl. *C07K 1/20* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.07.01

(54) **СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИПЕПТИДА ИЗ СМЕСИ**

(31) 62/693,024

(72) Изобретатель:

(32) 2018.07.02

Ливиньи Изабелле, Макдермотт

(33) US

Стефани, Рейлли Джеймс, Маттила

(86) PCT/US2019/040148

Джон (US)

(87) WO 2020/010004 2020.01.09

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Медведев В.Н. (RU)

**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(57) Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам получения целевого полипептида из смеси, включающей целевой полипептид. Способ может включать контакт смеси с устройством для хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC), включающим несколько хроматографических зон. Способ может дополнительно включать пропускание целевого полипептида через выпускные отверстия по меньшей мере первой и второй зон устройства HIC. Время пребывания смеси, включающей целевой полипептид, в первой зоне может быть приблизительно таким же, как время пребывания одной или более подвижных фаз во второй зоне.

A1

202190163

202190163

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566353EA/050

СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИПЕПТИДА ИЗ СМЕСИ

Область техники

Родственная Заявка

[001] По этой заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент № 62/693024, поданной 2 июля 2018 г., полное раскрытие которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[002] Это раскрытие в целом относится к способам получения полипептида. Более конкретно, это раскрытие относится к способам получения полипептида из смеси с использованием хроматографического метода.

Уровень техники

[003] Хроматография, такая как хроматография гидрофобного взаимодействия (НИС), аффинная хроматография и т. п., может выполняться как часть способа получения лекарственного продукта. В некоторых случаях хроматография может быть особенно полезной при получении лекарственных продуктов, включающих полипептиды. Однако оборудование, материалы, время подготовки и время выполнения стандартных стадий периодического процесса НИС или других стадий периодической хроматографии могут привести к дополнительным затратам или снижению эффективности способов получения лекарственного продукта. В частности, время, необходимое для выполнения каждой стадии в НИС или другом процессе хроматографического разделения, количество используемого буфера и/или среды разделения и любые неавтоматизированные аспекты процесса могут снизить эффективность получения лекарственного продукта.

[004] Раскрытые в настоящем описании способы и системы могут повысить эффективность и/или производительность способов получения полипептидов. Раскрытые в настоящем описании способы и системы могут также повысить эффективность и/или производительность способов получения лекарственного продукта и могут решить одну или больше проблем, указанных выше.

Сущность изобретения

[005] Варианты осуществления настоящего раскрытия могут относиться к способу получения целевого полипептида из смеси, включающей целевой полипептид. Способ может включать контакт смеси, включающей целевой полипептид, с первой зоной устройства НИС, контакт подвижных фаз со второй зоной устройства НИС и пропускание целевого полипептида через выпускные отверстия первой и второй зон устройства НИС, где каждая из первой и второй зоны может иметь одну или больше хроматографических колонок и выпускное отверстие. В некоторых вариантах осуществления время пребывания смеси, включающей целевой полипептид, в первой зоне может быть сконфигурировано таким образом, чтобы оно было приблизительно таким же, как время пребывания подвижных фаз во второй зоне.

[006] В некоторых вариантах осуществления целевой полипептид может быть

моноклональным антителом. Целевой полипептид может быть получен с производительностью, большей или равной 50 г/л · час. Альтернативно или дополнительно подвижные фазы могут включать уравнивающий буфер и промывочный буфер. В некоторых вариантах осуществления способы настоящего раскрытия могут дополнительно включать пропускание элюата, содержащего целевой полипептид, из первой зоны устройства НИС во вторую зону устройства НИС. В некоторых вариантах осуществления контакт подвижных фаз со второй зоной устройства НИС может включать контакт промывочного буфера со вторым из устройства НИС, и после контакта промывочного буфера со второй зоной устройства НИС регенерацию второй зоны. В некоторых вариантах осуществления регенерация второй зоны может включать контакт воды со второй зоной устройства НИС, контакт щелочного раствора со второй зоной устройства НИС, контакт спиртового раствора со второй зоной устройства НИС и контакт уравнивающего буфера со второй зоной устройства НИС. Целевой полипептид может пропускаться через выпускное отверстие второй зоны устройства НИС после того, как промывочный буфер контактирует со второй зоной устройства НИС. В некоторых вариантах осуществления одно или больше из поглощения ультрафиолетового излучения, электропроводности или рН резидентного раствора могут быть измерены на выпускном отверстии либо первой зоны, либо второй зоны. Первая зона или вторая зона могут включать более чем одну хроматографическую колонку. В некоторых вариантах осуществления устройство НИС может дополнительно включать третью зону, имеющую хроматографическую колонку и выпускное отверстие. В некоторых вариантах осуществления способ может дополнительно включать выполнение цикла регенерации в третьей зоне, при этом выполнение цикла регенерации включает контакт подвижных фаз с третьей зоной, где продолжительность цикла регенерации конфигурируется так, чтобы быть приблизительно такой же, как время пребывания для смеси, включающей целевой полипептид в первой зоне.

[007] В некоторых вариантах осуществления настоящего раскрытия способ получения целевого полипептида из смеси, включающей целевой полипептид, может включать пропускание смеси, включающей целевой полипептид, в первую колонку из множества хроматографических колонок в устройстве НИС, пропускание элюата, включающего целевой полипептид, из первой колонки во вторую колонку из множества колонок, пропускание одной или более подвижных фаз в третью колонку из множества колонок и пропускание целевого полипептида через выпускные отверстия каждой из множества колонок, где каждая из множества колонок включает выпускное отверстие, соединяемое с другой колонкой из множества колонок, и сумма времени пребывания смеси, включающей целевой полипептид, в первой колонке и второй колонке, по существу, такая же, как сумма времени пребывания одной или более подвижных фаз в третьей колонке.

[008] В некоторых вариантах осуществления способ может дополнительно включать пропускание одной или более подвижных фаз в каждую из множества колонок.

В некоторых вариантах осуществления пропускание одной или более подвижных фаз в колонку может включать пропускание промывочного буфера в колонку и после пропускания промывочного буфера в колонку регенерацию колонки, причем регенерация колонки включает пропускание в колонку воды, щелочного раствора, спиртового раствора или уравнивающего буфера. В некоторых вариантах осуществления стадия пропускания целевого полипептида через выпускное отверстие колонки может происходить после пропускания промывочного буфера в колонку. В некоторых вариантах осуществления одно или более из поглощения ультрафиолетового излучения, электропроводности или рН резидентного раствора измеряются на выпускном отверстии либо первой, либо второй колонки. В некоторых вариантах осуществления способ может включать получение целевого полипептида с производительностью, большей или равной 50 г/л · час. В дополнительных вариантах осуществления устройство НИС может включать четыре колонки, и сумма времени пребывания смеси, включающей целевой полипептид, в первой колонке и второй колонке может быть по существу такой же, как сумма времени регенерации третьей колонки и четвертой колонки.

[009] Дополнительные варианты осуществления настоящего раскрытия могут включать способ получения антитела с использованием множества хроматографических колонок, где каждая из множества хроматографических колонок включает среду для гидрофобного взаимодействия. Способ может включать на первой стадии загрузку количества смеси, включающей антитело, в первую колонку из множества колонок, загрузку количества смеси во вторую колонку из множества колонок через первую колонку и выполнение стадии без загрузки, включающей, по меньшей мере, один из процессов промывки, стриппинга и уравнивания в третьей колонке из множества колонок; на второй стадии загрузка некоторого количества смеси, включающей антитело, во вторую колонку, загрузка некоторого количества смеси в третью колонку через вторую колонку и выполнение стадии без загрузки, включающей по меньшей мере один из процессов промывки, стриппинга и уравнивания в первой колонке; и на третьей стадии загрузку некоторого количества смеси, включающей антитело, в третью колонку, загрузку некоторого количества смеси в третью колонку через вторую колонку и выполнение стадии без загрузки, включающей по меньшей мере один из процессов промывки, стриппинга и уравнивания во второй колонке.

[010] В некоторых вариантах осуществления способ может дополнительно включать непрерывное повторение первой, второй и третьей стадий в цикле, при этом каждая стадия включает одновременное выполнение стадий загрузки и без загрузки. В некоторых вариантах осуществления продолжительность одной из стадий загрузки конфигурируется так, чтобы быть приблизительно такой же, как продолжительность стадии без загрузки.

Краткое описание чертежей

[011] Прилагаемые чертежи, которые включены в эту спецификацию и составляют ее часть, иллюстрируют различные примерные варианты осуществления и вместе с

описанием служат для объяснения принципов раскрытых вариантов осуществления. Любые особенности варианта осуществления или примера, описанные в настоящем документе (например, композиция, состав, способ и т. д.), могут быть объединены с любым другим вариантом осуществления или примером, и все такие комбинации охватываются настоящим раскрытием. Более того, описанные системы и способы не ограничиваются ни одним их аспектом или вариантом осуществления, ни какими-либо комбинациями или перестановками таких аспектов и вариантов осуществления. Для краткости определенные перестановки и комбинации не обсуждаются и/или не иллюстрируются в настоящем описании отдельно.

[012] ФИГ. 1 представляет собой схематическое изображение, изображающее часть зоны хроматографического устройства согласно некоторым вариантам осуществления настоящего раскрытия.

[013] ФИГ. 2 представляет собой схематическое изображение хроматографического устройства согласно некоторым вариантам осуществления настоящего раскрытия.

[014] ФИГ. 3А представляет собой графическое изображение иллюстративного способа получения целевого полипептида в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия; и

[015] ФИГ. 3В-3Д представляют собой упрощенные иллюстрации, изображающие способ получения целевого полипептида, как показано на ФИГ. 3А.

[016] ФИГ. 4 представляет собой схематическое изображение хроматографического устройства в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия.

[017] ФИГ. 3А представляет собой графическое изображение иллюстративного способа получения целевого полипептида в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия; и

[018] ФИГ. 5В-5Е представляют собой упрощенные иллюстрации, изображающие способ получения целевого полипептида, как показано на ФИГ. 5А.

[019] ФИГ. 6 представляет собой блок-схему способа получения целевого полипептида в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия.

[020] ФИГ. 7А представляет собой график зависимости процентного содержания молекул с высокой молекулярной массой от загрузки в соответствии с аспектом настоящего раскрытия.

[021] ФИГ. 7В представляет собой график зависимости количества белка в клетке-хозяине от загрузки в соответствии с аспектом настоящего раскрытия.

[022] ФИГ. 7С представляет собой график зависимости процента молекул с высокой молекулярной массой от концентрации загрузки в соответствии с аспектом настоящего раскрытия.

[023] Используемые в настоящем описании термины «содержит», «содержащий»

или любые другие их варианты предназначены для охвата неисключительного включения, так что процесс, способ, изделие или устройство, которые содержат список элементов, не включают только эти элементы, но могут включать другие элементы, не перечисленные явно или не присущие такому процессу, способу, изделию или устройству. Термин «иллюстративный» используется в смысле «пример», а не «идеал». Для терминов «например» и «такой как» и их грамматических эквивалентов выражение «и без ограничений» понимается следующим образом, если явно не указано иное.

[024] Используемый в настоящем описании термин «примерно» предназначен для учета вариаций, связанных с экспериментальной ошибкой. Применительно к числовым значениям термин «примерно» может указывать на отклонение $\pm 10\%$ (если не указано иное изменение) от раскрытого числового значения. При использовании в настоящем описании, формы в единственном числе включают ссылку на множественное число, если контекст явно не предписывает иное.

[025] Следует отметить, что все числовые значения, раскрытые в настоящем документе (включая все раскрытые значения, пределы и диапазоны), могут иметь отклонение на $\pm 10\%$ (если не указано иное изменение) от раскрытого числового значения. Более того, в формуле изобретения значения, пределы и/или диапазоны означают значение, предел и/или диапазон $\pm 10\%$. Точно так же выражение «примерно такой же» в контексте настоящего описания может означать эквивалент в пределах $\pm 10\%$. Кроме того, все диапазоны должны включать конечные точки, например, от 1 сантиметра (см) до 5 см будут включать длины от 1 см, 5 см и все расстояния от 1 см до 5 см.

Подробное описание

[026] Это раскрытие не ограничивается конкретными композициями, составами, производителем материала, лекарственными продуктами, устройствами, системами, экспериментальными условиями или конкретными методами, раскрытыми в настоящем описании, так как многие варианты возможны в пределах компетенции специалиста в данной области. Терминология, используемая в настоящем описании, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения.

[027] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится это раскрытие. Хотя любые методы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего раскрытия, теперь описаны конкретные методы. Все упомянутые публикации включены сюда в качестве ссылки.

[028] Используемый в настоящем описании термин «контакт» относится к встрече, соединению, границе раздела или другому физическому взаимодействию двух или более поверхностей, растворов или соединений. Хотя конкретные жидкости могут быть описаны в настоящем описании как пропускаемые в область, пропускаемые из области,

пропускаемые к области или пропускаемые через область, подразумевается, что жидкость обязательно будет контактировать с любой областью, в которую, из которой, к которой или через которую она пропускается. Точно так же введение жидкости или компонента в область будет составлять жидкость или компонент, контактирующий с областью.

[029] Используемый в настоящем описании термин «полипептид» относится к любому аминокислотному полимеру, содержащему более чем примерно 20 аминокислот, ковалентно связанных через амидные связи. Белки содержат одну или более аминокислотных полимерных цепей (например, полипептидов). Таким образом, полипептид может быть белком, а белок может содержать несколько полипептидов с образованием единой функционирующей биомолекулы.

[030] Посттрансляционные модификации могут дополнительно модифицировать или изменять структуру полипептида. Например, в некоторых белках могут присутствовать дисульфидные мостики (например, связи S-S между остатками цистеина). Некоторые дисульфидные мостики необходимы для правильной структуры, функции и взаимодействия полипептидов, иммуноглобулинов, белков, кофакторов, субстратов и тому подобного. Помимо образования дисульфидной связи, белки могут подвергаться другим посттрансляционным модификациям. Эти модификации включают липидирование (например, миристоилирование, пальмитоилирование, фарнезоилирование, геранилгеранилирование и образование якоря гликозилфосфатидилинозитола (GPI)), алкилирование (например, метилирование), ацилирование, амидирование, гликозилирование (например, добавление гликозильных групп в аргинине, аспарагине, цистеине, гидроксизине, серине, треонине, тирозине и/или триптофане) и фосфорилирование (т.е. добавление фосфатной группы к серину, треонину, тирозину и/или гистидину). Посттрансляционные модификации могут влиять на гидрофобность, электростатические свойства поверхности или другие свойства, которые определяют взаимодействия поверхность-поверхность, в которых участвует полипептид.

[031] Используемый в настоящем описании термин «белок» включает биотерапевтические белки, рекомбинантные белки, используемые в исследованиях или терапии, белки-ловушки и другие Fc-слитые с белки, химерные белки, антитела, моноклональные антитела, человеческие антитела, биспецифические антитела, фрагменты антител, антитело-подобные молекулы, нанотела, химеры рекомбинантных антител, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т. п. Представляющий интерес белок (POI) может включать любой полипептид или белок, который желателно выделить, очистить или получить иным образом. POI могут включать целевые полипептиды или другие полипептиды, продуцируемые клеткой, включая антитела.

[032] Используемый в настоящем описании термин «антитело» включает иммуноглобулины, состоящие из четырех полипептидных цепей: двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями. Обычно антитела имеют молекулярную массу более 100 кДа, например от 130 кДа до 200 кДа, например примерно 140 кДа, 145 кДа, 150 кДа, 155 кДа или 160 кДа. Каждая тяжелая цепь

включает переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначенную в настоящем документе как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи включает три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначенную в настоящем документе как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен, CL. Области VH и VL могут быть далее разделены на области гипервариабельности, называемыми областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежаются областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от амино-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (CDR тяжелой цепи могут сокращенно обозначаться как HCDR1, HCDR2 и HCDR3; CDR легкой цепи могут сокращенно обозначаться как LCDR1, LCDR2 и LCDR3).

[033] Класс иммуноглобулинов, называемый иммуноглобулином G (IgG), например, распространен в сыворотке крови человека и состоит из четырех полипептидных цепей - двух легких цепей и двух тяжелых цепей. Каждая легкая цепь связана с одной тяжелой цепью через дисульфидную связь цистина, а две тяжелые цепи связаны друг с другом через две дисульфидные связи цистина. Другие классы иммуноглобулинов человека включают IgA, IgM, IgD и IgE. В случае IgG существует четыре подкласса: IgG 1, IgG 2, IgG 3 и IgG 4. Каждый подкласс отличается своими постоянными областями и, как следствие, может иметь разные эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, POI может содержать целевой полипептид, включая IgG, по меньшей мере в одном варианте осуществления целевой полипептид включает IgG 4.

[034] Используемый в настоящем документе термин «антитело» также включает антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антител. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и тому подобное, используемые в настоящем описании, включают любой встречающийся в природе, ферментативно полученный, синтетический или генно-инженерный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антитела, используя любые подходящие стандартные методы, такие как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной генной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующих переменные и необязательно константные домены. Такая ДНК известна и/или легко доступна из, например, коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител) или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и подвергать химическим манипуляциям или с помощью методов молекулярной биологии, например, для размещения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания остатков цистеина,

модификации, добавления или удаления аминокислот, и т. д.

[035] Целевые полипептиды могут быть получены с использованием систем продуцирования на основе рекомбинантных клеток, таких как бакуловирусовая система насекомых, дрожжевые системы (например, *Pichia* sp.), системы млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1). Термин «клетка» включает любую клетку, которая подходит для экспрессии рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Клетки включают клетки прокариот и эукариот (одноклеточные или многоклеточные), бактериальные клетки (например, штаммы *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. и т. д.), клетки микобактерий, грибные клетки, дрожжевые клетки (например, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica* и т. д.), растительные клетки, клетки насекомых (например, SF-9, SF-21, клетки насекомых, инфицированные бакуловирусом, *Trichoplusia* и т. д.), клетки животных, но не человека, человеческие клетки или слитые клетки, такие как, например, гибридомы или квадромы. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, обезьяны, человекообразной обезьяны, хомяка, крысы или мыши. В некоторых вариантах осуществления клетка является эукариотической и выбрана из следующих клеток: CHO (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), клетки сетчатки, Vero, CV1, почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (например, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (эпидермальные), CV-1, U937, 3T3, L-клетки, C127-клетки, SP2/0, NS-0, MMT 060562, клетки Сертоли, клетка BRL 3A, клетка HT1080, миеломные клетки, опухолевые клетки и клеточные линии, полученные из вышеупомянутых клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит один или более вирусных генов, например клетка сетчатки, которая экспрессирует вирусный ген (например, клетка PER.C6™). Белок или полипептид, отличный от целевого полипептида или POI, продуцируемых клеткой, может обозначаться как белок клетки-хозяина (HCP). Когда POI производится в клетках-хозяевах и/или очищается из них, HCP могут быть охарактеризованы как загрязнители или примеси, связанные с продуктом и процессом.

[036] Некоторые HCP (например, ферменты) могут совместно очищаться с POI (например, целевыми полипептидами) и могут влиять на компоненты смесей, составов или лекарственных продуктов, включающих POI. Например, присутствие некоторых HCP может повлиять на стабильность продукта, сократить срок годности лекарственного продукта или даже привести к несоответствию продукта фармакопейному качеству или нормативным требованиям к твердым частицам (например, спецификациям Управления по продовольствию и лекарствам США). В качестве дополнительного примера, некоторые HCP могут вызывать клинические эффекты, такие как иммуногенная реакция при введении. Хотя HIC или другая хроматография, отдельно или в комбинации, может использоваться для очистки и/или разделения POI и удаления HCP из смеси, состава или лекарственного продукта, тем самым снижая потенциальное влияние HCP на лекарственный продукт, добавление HIC или стадии аффинной хроматографии требует

добавления оборудования, материалов (например, среды для гидрофобного взаимодействия) и подготовки. Это равносильно добавленному времени, ресурсам, экспериментам и затратам. Следовательно, желательно иметь эффективный метод проведения хроматографического процесса для отделения ROI (например, целевого полипептида) от одного или более совместно очищенных НСР или других примесей.

[037] Термин «хроматография», используемый в настоящем описании, относится к любому процессу, который разделяет компоненты смеси путем пропускания смеси через среду, так что компоненты смеси проходят через среду с разными скоростями, включая, но не ограничиваясь этим, колоночную хроматографию, плоскостную хроматографию, тонкослойную хроматографию, вытесняющую хроматографию, газовую хроматографию, аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, хроматографию с обращенной фазой, хроматографию гидрофобного взаимодействия (НС), быструю жидкостную хроматографию белков, высокоэффективную жидкостную хроматографию, противоточную хроматографию, периодическую противоточную хроматографию или хиральную хроматографию. Хотя варианты осуществления в настоящем документе могут быть раскрыты в отношении примерного типа хроматографического процесса (например, НС) или устройства, варианты осуществления, раскрытые в настоящем документе, могут быть применимы к любому типу хроматографии.

[038] Используемый в настоящем описании термин «вода» может относиться к любому подходящему типу воды лабораторного качества, такому как деионизированная вода или вода для инъекций. В некоторых вариантах осуществления, например, хроматографические устройства могут контактировать либо с деионизированной водой, либо с водой для инъекций. Любая ссылка на использование в настоящем описании «воды» может относиться к деионизированной воде, воде для инъекций или другому типу воды лабораторного качества.

[039] Используемый в настоящем описании термин «подвижная фаза» может относиться к любой текучей среде, подходящей для контакта с хроматографической зоной или колонкой в рамках процесса разделения или очистки. Подвижная фаза может включать, например, воду, буферный раствор, раствор кислоты, раствор щелочи и/или раствор, содержащий спирт. Термины «промывочный буфер», «стриппинг-буфер» и «уравновешивающий буфер» могут быть использованы для описания подвижных фаз, имеющих определенные характеристики, как описано ниже.

[040] В некоторых вариантах осуществления способ получения целевого полипептида из смеси, включающей целевой полипептид, может включать контакт смеси с хроматографическим устройством. Хроматографическое устройство может содержать множество зон, где каждая зона включает одну или более хроматографических колонок, где одна или более хроматографических колонок содержат среды для гидрофобного взаимодействия. Такие устройства для хроматографии могут включать предварительно изготовленные устройства (например, Cadence™ BioSMB (Pall Biosciences), BioSC®

(novasep), Varicol® (novasep) или Octave (Semba® Biosciences)), собранные вручную устройства или просто два или больше стандартных устройств периодической хроматографии, используемых в тандеме.

[041] Аспекты настоящего раскрытия могут обеспечить различные преимущества для процесса получения целевого полипептида или другой молекулы. Например, одновременное использование множества зон в хроматографическом устройстве может позволить более эффективную и более полную загрузку отдельных колонок и/или выполнение процессов разделения с использованием меньшего количества хроматографических сред, чем в стандартном хроматографическом процессе. Дополнительная польза и преимущества аспектов настоящего раскрытия будут очевидны для специалистов в данной области техники.

[042] Теперь будет сделана ссылка на чертежи настоящего раскрытия.

[043] На ФИГ. 1 изображена секция 100 хроматографической колонки устройства НИС согласно некоторым вариантам осуществления настоящего раскрытия. Хроматографическая колонка содержит среду для гидрофобного взаимодействия. Среды гидрофобного взаимодействия содержат структуру подложки 110 и гидрофобную часть 120, где гидрофобный фрагмент 120 прикреплен к конструкции 110 структуры подложки. Среда может быть в форме хроматографической среды, например гранул или других частиц, удерживаемых в формате колонки с набивным слоем, в форме мембраны или в любом формате, который может вместить смесь или другую жидкость, содержащую целевой полипептид (или другие РОИ) и загрязняющие вещества (например, НСР). Таким образом, пример среды для гидрофобного взаимодействия может включать гранулы агарозы (например, сефарозы), гранулы диоксида кремния, целлюлозные мембраны, целлюлозные гранулы, гранулы гидрофильного полимера и т. п.

[044] Хроматографическая колонка устройства НИС настоящего раскрытия может быть сконфигурирована так, чтобы среда для гидрофобного взаимодействия имела глубину (например, высоту слоя) от примерно 0,5 сантиметра (см) до примерно 40 см. В некоторых вариантах осуществления, например, хроматографическая колонка устройства НИС может иметь высоту слоя от примерно 0,5 см до примерно 30 см, от примерно 0,5 см до примерно 20 см, от примерно 0,5 см до примерно 10 см, от примерно 0,5 см примерно до 5 см, примерно от 1 см до 20 см, от примерно 1 см до примерно 10 см или от примерно 1 см до примерно 5 см. В некоторых вариантах осуществления хроматографическая колонка может быть сконфигурирована таким образом, чтобы внутренний диаметр хроматографической колонки составлял от примерно 0,5 см до примерно 150 см. В некоторых вариантах осуществления, например, внутренний диаметр хроматографической колонки составляет от примерно 0,5 см до примерно 140 см, от примерно 0,5 см до примерно 120 см, от примерно 0,5 см до примерно 100 см, от примерно 0,5 см до примерно 80 см, от примерно 0,5 см до примерно 60 см, от примерно 0,5 см до примерно 40 см, от примерно 0,5 см до примерно 20 см, от примерно 0,5 см до примерно 10 см, от примерно 0,75 см до примерно 8 см, от примерно 1 см до примерно 6

см, от примерно 1 см до примерно 5 см, от примерно 1 см до примерно 3 см, от примерно 1,5 см до примерно 5 см, от примерно 1,5 см до примерно 3 см или от примерно 1 см до примерно 2 см. Например, в некоторых вариантах осуществления внутренний диаметр хроматографической колонки составляет примерно 0,5 см, примерно 1 см, примерно 5 см, примерно 8 см, примерно 10 см, примерно 15 см, примерно 20 см, примерно 30 см, примерно 40 см, примерно 50 см, примерно 60 см, примерно 80 см, примерно 100 см, примерно 125 см или примерно 150 см. В некоторых вариантах осуществления хроматографическая колонка устройства НИС согласно настоящему раскрытию имеет общий объем (например, общую емкость для удерживания смеси, подвижной фазы или другого вещества) от примерно 0,4 миллилитра (мл) до примерно 175 л. В некоторых вариантах осуществления, например, хроматографическая колонка устройства НИС согласно настоящему раскрытию имеет общий объем от примерно 0,5 мл до примерно 150 л, от примерно 0,5 мл до примерно 130 л, от примерно 0,5 мл до примерно 115 л, от примерно 0,5 мл до примерно 100 л, от примерно 0,5 мл до примерно 80 л, от примерно 0,5 мл до примерно 60 л, от примерно 0,5 мл до примерно 40 л, от примерно 0,5 мл до примерно 20 л, от примерно 0,5 мл до примерно 15 л, от примерно 0,5 мл до примерно 10 л, от примерно 0,5 мл до примерно 5 л, от примерно 0,5 мл до примерно 1 л, от примерно 1 мл до примерно 750 мл, от примерно 1 мл до примерно 600 мл, от примерно 1 мл до примерно 500 мл, от примерно 1 мл до примерно 300 мл, от примерно 1 мл до примерно 250 мл, от примерно 1 мл до примерно 200 мл или от примерно 1 мл до примерно 150 мл. Например, в некоторых вариантах осуществления хроматографическая колонка согласно настоящему раскрытию может иметь общий объем примерно 0,5 мл, примерно 1 мл, примерно 5 мл, примерно 10 мл, примерно 50 мл, примерно 100 мл, примерно 150 мл, примерно 300 мл, примерно 400 мл, примерно 500 мл, примерно 1 л, примерно 5 л, примерно 10 л, примерно 50 л, примерно 80 л, примерно 100 л, примерно 120 л или примерно 150 л.

[045] В некоторых вариантах осуществления гидрофобный фрагмент 120 связывается с гидрофобными областями и гидрофобными поверхностями полипептидов. Гидрофобные поверхности могут быть частью структуры аминокислот, составляющих пептиды, вышеупомянутой или другой посттрансляционной модификации или их комбинации. Степень гидрофобности среды для гидрофобного взаимодействия может контролироваться путем выбора подходящего гидрофобного фрагмента 120. Гидрофобный фрагмент 120 может быть выбран для связывания с конкретным целевым полипептидом или ROI, и он может быть любым известным в настоящее время или разрабатываемым в будущем гидрофобным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления гидрофобный фрагмент 120 может включать метильную, пропильную, изопропильную, бутильную, гексильную, октильную и/или фенильную группу. Специалисты в данной области поймут, что гидрофобность выбранного гидрофобного фрагмента 120 может варьироваться в зависимости от целевых полипептидов и/или НСР/других примесей для данного применения, а также от типа и степени разделения или

очистки, желаемых в процессе хроматографии.

[046] Среда для гидрофобного взаимодействия может использоваться для отделения целевых полипептидов или других РОИ от загрязняющих веществ и примесей, связанных с продуктом и процессом (например, НСР). По-прежнему обращаясь к ФИГ. 1, в некоторых вариантах осуществления смесь, содержащая целевой полипептид 140 и другие компоненты, такие как загрязняющие вещества 130 (например, примеси, НСР и т. п.), загружают в устройство НИС. Смесь может включать раствор (например, буфер), предназначенный для стимулирования связывания гидрофобных групп в целевом полипептиде 140 с гидрофобным фрагментом 120 среды для гидрофобного взаимодействия. Некоторый целевой полипептид 140 прикрепляется к среде путем связывания с помощью внутримолекулярной силы с гидрофобным фрагментом 120, в то время как другой целевой полипептид 140 может пропускаться через хроматографическую колонку. Дополнительно или альтернативно, пока смесь проходит через колонку, некоторые загрязнители 130 из смеси могут прикрепляться к средам для гидрофобного взаимодействия посредством связывания посредством внутримолекулярной силы с гидрофобным фрагментом 120, в то время как другие загрязнители 130 не могут связываться с гидрофобным фрагментом 120. В некоторых вариантах осуществления целевой полипептид 140 содержит определенные гидрофобные области из составляющих аминокислот, посттрансляционные модификации или их комбинацию, которые позволяют ему прикрепляться к гидрофобному фрагменту 120 с более высокой аффинностью, чем определенные загрязнители или примеси (например, НСР). Как более подробно описано ниже, дополнительные подвижные фазы могут быть затем введены в колонку для снижения аффинности между целевым полипептидом 140 и гидрофобным фрагментом 120, позволяя целевому полипептиду 140 проходить через хроматографическую колонку устройства НИС.

[047] В дополнительных вариантах осуществления загрязнители 130 могут присоединяться к гидрофобному фрагменту 120 с более высокой аффинностью, чем целевой полипептид 140. Затем в колонку могут быть введены дополнительные подвижные фазы для снижения аффинности между загрязнителями 130 и гидрофобным компонентом 120, позволяя загрязнителям 130 проходить через хроматографическую колонку устройства НИС.

[048] Состав смеси, включающей целевой полипептид 140, может быть изменен путем введения добавки, включающей соль, такую как, например, соль натрия, калия, фосфат, Tris (гидроксиметил) аминметан (Tris), цитрат или ацетат. Другие добавки могут быть добавлены для изменения гидрофобных или других внутримолекулярных взаимодействий целевого полипептида 140, загрязняющих веществ 130, гидрофобного фрагмента 120 или их комбинаций.

[049] Примерное устройство 200 НИС схематично изображено на ФИГ. 2, согласно некоторым вариантам осуществления, описанным в настоящем документе. Устройство 200 НИС может содержать первую зону 210, вторую зону 220 и третью зону 230. Каждая из

первой зоны 210, второй зоны 220 и третьей зоны 230 может включать одну или более хроматографических колонок, таких как хроматографические колонки, описанные со ссылкой на ФИГ. 1. Первая зона 210 может иметь первое впускное отверстие 212, сконфигурированное таким образом, что смесь, включающая целевой полипептид, одну или более подвижных фаз или другие жидкости, может пропускаться в первую зону 210. Первая зона 210 может также иметь первое выпускное отверстие 214, через которое элюат (например, текучая среда, прошедшая через первую зону 210) может пропускаться из устройства 200 НИС для сбора или удаления. Элюат также может пропускаться из первой зоны 210 во вторую зону 220 через первое межсоединение 216. Первая зона 210 может также принимать элюат из третьей зоны 230 через третье межсоединение 236.

[050] Вторая зона 220 может принимать элюат из первой зоны 210 через первое межсоединение 216. Вторая зона 220 может также иметь второе впускное отверстие 222, сконфигурированное таким образом, что смесь, включающая целевой полипептид, одну или более подвижных фаз или другие жидкости, может пропускаться во вторую зону 220. Вторая зона 220 может также иметь второе выпускное отверстие 224, через которое элюат (например, текучая среда, прошедшая через вторую зону 220) может пропускаться из устройства 200 НИС для сбора или удаления. Элюат также может пропускаться из второй зоны 220 в третью зону 230 через второе межсоединение 226.

[051] Третья зона 230 может принимать элюат из второй зоны 220 через второе межсоединение 226. Третья зона 230 может иметь третье впускное отверстие 232, сконфигурированное так, чтобы смесь, включающая целевой полипептид, одну или более подвижных фаз или другие жидкости, могла пропускаться в третью зону 230. Третья зона 230 может также иметь выпускное отверстие 234, через которое элюат (например, текучая среда, прошедшая через третью зону 230) может пропускаться из устройства 200 НИС для сбора или удаления. Элюат также могут пропускаться из третьей зоны 230 в первую зону 220 через третье межсоединение 236.

[052] Как понятно специалистам в данной области техники, различные компоненты, которые, как известно, используются в хроматографических устройствах (например, фильтры, сенсоры, датчики, термометры), могут быть включены в устройство 200 НИС, хотя и не показаны на упрощенной схеме на ФИГ. 2. В некоторых вариантах осуществления одно или более из поглощения УФ-излучения, электропроводности, рН или резидентного раствора могут быть измерены в одной или более точках устройства 200 НИС. Подходящие точки для измерения поглощения УФ-излучения, электропроводности или рН включают на впускном отверстии 212, 222, 232, в зоне 210, 220, 230, на межсоединении 216, 226, 236 или на выпускном отверстии 214, 224, 234. Впускные отверстия 212, 222, 232, межсоединения 216, 226, 236 и выпускные отверстия 214, 224, 234 могут быть выполнены с возможностью перехода от открытой конфигурации к закрытой конфигурации: открытая конфигурация, позволяющая жидкости проходить через впускное отверстие 212, 222, 232, межсоединение 216, 226, 236 или выпускное отверстие 214, 224, 234 и закрытая конфигурация, препятствующая прохождению жидкости через

выпускное отверстие 212, 222, 232, межсоединение 216, 226, 236 или выпускное отверстие 214, 224, 234. Устройство 200 НИС может включать один или более насосов, которые обеспечивают давление для передачи жидкости между зонами 210, 220, 230, впускными отверстиями 212, 222, 232, межсоединениями 216, 226, 236 и выпускными отверстиями 214, 224, 234. В некоторых вариантах осуществления одно или более межсоединений 216, 226, 236 можно перемещать для соединения разных зон 210, 220, 230. Например, во время процесса с использованием устройства 200 НИС может быть желательной перестановка, где межсоединение 226 пропускает элюат из зоны 220. В этих ситуациях межсоединение 226 может быть переконфигурировано без прерывания хроматографического процесса, чтобы пропускать элюат из зоны 220 в зону 210. Это всего лишь один пример; в общем, любое межсоединение 216, 226, 236 может быть переконфигурировано для соединения разных зон без прерывания текущего хроматографического процесса.

[053] ФИГ. 3А представляет собой графическое изображение способа согласно некоторым вариантам осуществления настоящего раскрытия. На левой оси графика три отдельных ряда определены метками С1, С2 и С3, представляющими первую колонку, вторую колонку и третью колонку устройства НИС. Верхняя ось представляет время, неограниченно простирающееся влево и вправо. Непрерывное заполнение каждой колонки является примером вариантов осуществления, описанных в настоящем документе; такая расстановка сокращает или устраняет время простоя для колонок (например, «мертвое время») по сравнению с традиционными методами НИС. Отрезок времени, полностью показанный на ФИГ. 3А, представляет один примерный цикл повторяющегося шаблона, который может повторяться до и/или после временного сегмента, показанного на ФИГ. 3А. Четыре значения времени обозначены как Т1, Т2, Т3 и Т4 и являются примерами любой линии Т0, которая может быть проведена вертикально через график. В некоторых вариантах осуществления интервал между Т1 и Т2 по существу такой же, как интервал между Т2 и Т3, который в некоторых вариантах осуществления практически такой же, как интервал между Т3 и Т4. В некоторых вариантах осуществления интервал между соседними отмеченными моментами времени (например, между Т1 и Т2 или между Т3 и Т4) может быть больше или равен 30 секундам (с), меньше или равен 90 минутам (мин), от 30 с до 60 мин, от 30 с до 30 мин, от 30 с до 15 мин, от 30 с до 10 мин, от 30 с до 8 мин, от 30 с до 7 мин, от 30 с до 6 мин, от 30 с до 5 мин, от 30 с до 4 мин, 30 с до 3 мин, от 1 мин до 5 мин или от 2 мин до 5 мин. Рамки 410, 412, 414, 415, 417, 419, 424, 420, 422, 424, 425, 427, 429, 430, 432, 434, 435, 437 и 439 представляют событие, происходящее в каждой колонке С1, С2 и С3 в интервале времени, в котором появляется каждая рамка. Например, каждая рамка может обозначать присутствие смеси, подвижной фазы или другой резидентной жидкости в ряду колонок, в котором она появляется.

[054] Переходя по ФИГ. 3А слева направо, продвигаясь «вперед» во времени, от Т1 до Т2, вторичная загрузка смеси может происходить в первой колонке С1 (рамка 410). От Т2 до Т3 первичная загрузка смеси может быть в первой колонке С1 (рамка 412), а от Т3

до Т4 одна или более подвижных фаз могут быть в первой колонке С1 (рамка 414). В некоторых вариантах осуществления колонка может принимать либо первичную загрузку смеси, либо вторичную загрузку смеси. «Первичная загрузка» смеси относится к загрузке смеси, переданной в колонку устройства НИС без предварительного пропуска через другую колонку аппарата НИС. «Вторичная загрузка» смеси относится к загрузке смеси, прошедшей через другую колонку устройства НИС перед подачей в данную колонку (например, элюат из первичной загрузки смеси вводится в другую колонку в качестве вторичной загрузки смеси). Пропуск элюата из одной колонки в другую вместе с элюатом, включающим целевой пептид, может позволить полностью загрузить колонку без опасения потери переполнения, и может повысить эффективность использования каждой колонки и может уменьшить объем расходуемой среды для гидрофобного взаимодействия. Путем пропуска перелива через среду для гидрофобного взаимодействия, которая могла принимать или может принимать первичную загрузку смеси, включая целевой полипептид, объем потребляемой среды для гидрофобного взаимодействия по отношению к количеству обрабатываемой смеси загрузки может быть уменьшен.

[055] В некоторых вариантах осуществления контакт одной или более подвижных фаз с колонкой может включать контакт промывочного буфера с колонкой, контакт стриппинг-буфера с колонкой и/или контакт уравнивающего буфера с колонкой. В некоторых вариантах осуществления промывочный буфер может содержать одну или более солей, таких как, например, соли натрия, калия, магния, кальция, цитрат, ацетат, фосфат, сульфат, Tris или другие соли.

[056] В некоторых вариантах осуществления стриппинг-буфер может содержать воду, щелочной раствор или раствор, содержащий спирт. Деионизированная вода, например, может содержать менее чем 5 об.% растворенных ионов, менее чем 1 об.% растворенных ионов, менее чем 0,1 об.% растворенных ионов или даже менее чем 0,01 об.% растворенных ионов. Согласно некоторым вариантам осуществления щелочной раствор может содержать одно или более щелочных ионных соединений, таких как LiOH, NaOH, KOH, Ca(OH)₂, NH₄OH или другое щелочное соединение. Концентрация щелочного соединения в стриппинг-буфере может варьироваться, например, от примерно 0,1 Н до примерно 1,5 Н, от примерно 0,1 Н до примерно 1 Н, от примерно 0,1 Н до примерно 1,5 Н, от примерно 0,5 Н до примерно 1,5 н., от примерно 0,1 Н до примерно 0,8 Н, от примерно 0,1 Н до примерно 0,6 Н, от примерно 0,1 Н до примерно 0,5 Н, от примерно 0,1 Н до примерно 0,4 Н, или от примерно 0,1 Н до примерно 0,3 Н. Например, концентрация щелочного соединения в стриппинг-буфере может составлять примерно 0,1 Н, примерно 0,2 Н, примерно 0,3 Н, примерно 0,4 Н, примерно 0,5 Н, примерно 0,6 Н, примерно 0,7 Н, примерно 0,8 Н, примерно 0,9 Н, примерно 1 Н, примерно 1,1 Н, примерно 1,2 Н, примерно 1,3 Н, примерно 1,4 Н или примерно 1,5 Н. стриппинг-буфер, содержащий спирт, может включать метанол, этанол, пропанол, бензиловый спирт или другой спирт. Концентрация спирта в стриппинг-буфере может составлять от примерно 0,1 об.% до примерно 30 об.%, Например от примерно 0, 5 об.% до примерно 30 об.%, от

примерно 0,5 до примерно 25 об.%, от примерно 0,5 об.% до примерно 25 об.%, от примерно 0,5 до примерно 25 об.%, от примерно 1 об.% до примерно 20 об.%, от примерно 1 об.% до примерно 15 об.%, от примерно 1 об.% до примерно 10 об.%, от примерно 10 об.% до примерно 50 об.%, от примерно 10 об.% до примерно 40 об.%, от примерно 10 об.% до примерно 30 об.%, от примерно 10 об.% до примерно 25 об.%, от примерно 15 об.% до примерно 25 об.% или от примерно 20 об.% до примерно 25 об.% в пересчете на общую массу стриппинг-буфера. Например, концентрация спирта в стриппинг-буфере может составлять примерно 0,1 об.%, примерно 0,5 об.%, примерно 1 об.%, примерно 2 об.%, примерно 3 об.%, примерно 5 об.%, примерно 10 об.%, примерно 15 об.%, примерно 20 об.% или примерно 25 об.%.

[057] В некоторых вариантах осуществления уравнивающий буфер может быть аналогичным или идентичным по составу промывочному буферу. В других вариантах осуществления уравнивающий буфер может отличаться по составу по сравнению с промывочным буфером. В некоторых вариантах осуществления уравнивающий буфер может содержать одну или более солей, таких как, например, соли натрия, калия, магния, кальция, цитрат, ацетат, фосфат, сульфат, Tris или другие соли.

[058] Что касается ФИГ. 3А, контакт одной или более подвижных фаз в первой колонке 414 может быть разделен на отдельные фазы, включая промывочный буфер в первой колонке (рамка 415), стриппинг-буфер в первой колонке (рамка 417) и уравнивающий буфер в первой колонке (рамка 419). В следующем ряду (представляющем С2), от Т1 до Т2, одна или более подвижных фаз могут находиться во второй колонке (рамка 424). Это также может быть разделено на отдельные фазы, включая промывочный буфер во второй колонке (рамка 425), стриппинг-буфер во второй колонке (рамка 427) и уравнивающий буфер во второй колонке (рамка 429). Двигаясь вправо, от Т2 к Т3 вторичная загрузка смеси может быть во второй колонке (рамка 420), а от Т3 до Т4 первичная загрузка смеси может быть во второй колонке (рамка 422).

[059] В следующем ряду, от Т1 до Т2, первичная загрузка смеси может быть в третьей колонке (рамка 432). Затем, от Т2 до Т3, одна или более подвижных фаз могут находиться в третьей колонке (рамка 434), а от Т3 до Т4а вторичная загрузка смеси может быть в третьей колонке (рамка 430). Одна или более подвижных фаз в третьей колонке (рамка 434) могут быть разделены на отдельные фазы, включая промывочный буфер в третьей колонке (рамка 435), стриппинг-буфер в третьей колонке (рамка 437) и уравнивающий буфер в третьей колонке (рамка 439).

[060] В данный момент времени Т0 вертикальная линия может быть проведена через график, так что каждая пронумерованная рамка, с которой контактирует вертикальная линия от Т0, представляет раствор в колонке в это время. Таким образом, например, в момент времени Т1 вторичная загружаемая смесь вводится в первую колонку С1 (рамка 410), одна или более подвижных фаз пропускаются во вторую колонку С2 (рамка 424), например, промывочный буфер передается в С2 (рамка 425), а смесь

первичной загрузки пропускается в третью колонку С3 (рамка 432). Хотя подразделения более широких фаз, такие как, например, подразделения 425, 427 и 429, кажутся занимающими равные части одной или более подвижных фаз во второй колонке 424, в некоторых вариантах осуществления подразделения могут занимать неравные части более широкой фазы. Также следует понимать, что способ, изображенный на ФИГ. 3А, представляет собой всего лишь одну примерную последовательность действий согласно вариантам осуществления настоящего раскрытия. Другие порядки, конфигурации и стадии предполагаются и рассматриваются в пределах объема настоящего раскрытия.

[061] ФИГ. 3В-3D иллюстрируют примерный цикл для способа получения целевого полипептида из смеси, включающей целевой полипептид, как описано ранее. ФИГ. 3В изображает серию событий, которые могут произойти в течение временного интервала от T1 до T2, показанного на ФИГ. 3А. Таким образом, на ФИГ. 3В показано устройство НС на первой стадии 301, где первая зона 310 принимает вторичную загрузку смеси 306, включающей целевой полипептид, и элюирует элюат вторичной загрузки 307, который может быть собран или удален. Вторая зона 320 принимает одну или более подвижных фаз 315 и элюирует элюат одной или более подвижных фаз 316, которые могут быть собраны или удалены. Третья зона 330 принимает первичную загрузку смеси 305 и пропускает вторичную загрузку смеси 306 в другую колонку.

[062] На ФИГ. 3С показано устройство НС на второй стадии 302 (в интервале от T2 до T3, как показано на ФИГ. 3А), где первая зона 310 принимает первичную загрузку смеси 305 и пропускает вторичную загрузку смеси 306 в другую колонку. Вторая зона 320 принимает вторичную загрузку смеси 306 и элюирует элюат вторичной загрузки 307, который может быть собран или удален. Третья зона 330 принимает одну или более подвижных фаз 315 и элюирует элюат одной или более подвижных фаз 316, который может быть собран или удален.

[063] На ФИГ. 3D показано устройство НС на третьей стадии 303 (в интервале от T3 до T4, как показано на ФИГ. 3А), где первая зона 310 принимает одну или более подвижных фаз 315 и элюирует элюат одной или более подвижных фаз 316, который может быть собран или удален. Вторая зона 320 принимает основную загрузку смеси 305 и пропускает вторую загрузку смеси 306 в другую колонку. Третья зона 330 принимает одну или более подвижных фаз 315 и элюирует элюат одной или более подвижных фаз 316, который может быть собран или удален.

[064] Другое примерное устройство 500 НС схематично изображено на ФИГ. 4, согласно некоторым вариантам осуществления, описанным в настоящем документе. Устройство 500 НС может включать первую зону 510, вторую зону 520, третью зону 530 и четвертую зону 540. Первая зона 510 может иметь первое впускное отверстие 512, сконфигурированное таким образом, что смесь, включающая целевой полипептид, одну или более подвижных фаз или другие жидкости, может пропускаться в первую зону 510. Первая зона 510 также может иметь первое выпускное отверстие 514, через которое элюат (например, текущая среда, пропущенная через первую зону 510) может пропускаться из

устройства 500 НИС для сбора или удаления. Элюат также может пропускаться из первой зоны 510 во вторую зону 520 через первое межсоединение 516. Первая зона 510 может также принимать элюат из четвертой зоны 540 через четвертое межсоединение 546.

[065] Вторая зона 520 может принимать потоки из первой зоны 510 через первое межсоединение 516. Вторая зона 520 может также иметь второе впускное отверстие 522, сконфигурированное таким образом, что смесь, включающая целевой полипептид, одну или более подвижных фаз или другие жидкости, может пропускаться во вторую зону 520. Вторая зона 520 также может иметь второе выпускное отверстие 524, через которое элюат (например, текучая среда, прошедшая через вторую зону 520) может пропускаться из устройства 500 НИС для сбора или удаления. Элюат также может пропускаться из второй зоны 520 в третью зону 530 через второе межсоединение 526.

[066] Третья зона 530 может принимать элюат из второй зоны 520 через второе межсоединение 526. Третья зона 530 может иметь третье впускное отверстие 532, сконфигурированное таким образом, чтобы смесь, включающая целевой полипептид, одну или более подвижных фаз или другие жидкости, могла пропускаться в третью зону 530. Третья зона 530 может также иметь выпускное отверстие 534, через которое элюат (например, текучая среда, прошедшая через третью зону 530) может пропускаться из устройства 500 НИС для сбора или удаления. Элюат также может пропускаться из третьей зоны 530 в четвертую зону 540 через третье межсоединение 536.

[067] Четвертая зона 540 может принимать элюат из третьей зоны 530 через третье межсоединение 536. Четвертая зона 540 может иметь четвертое впускное отверстие 542, сконфигурированное таким образом, что смесь, включающая целевой полипептид, одну или более подвижных фаз или другие жидкости, может пропускаться в четвертую зону 540. Четвертая зона 540 может также иметь выпускное отверстие 544, через которое элюат (например, текучая среда, прошедшая через четвертую зону 540) может пропускаться из устройства 500 НИС для сбора или удаления. Элюат также может пропускаться из четвертой зоны 540 в первую зону 510 через четвертое межсоединение 546.

[068] Различные компоненты, которые, как известно, используются в хроматографических устройствах (например, фильтры, сенсоры, датчики, термометры), могут быть включены в устройство 500 НИС, хотя и не показаны на упрощенной схеме на ФИГ. 4. В некоторых вариантах осуществления одно или более из поглощения УФ-излучения, электропроводности, рН или постоянного раствора могут быть измерены в одной или более точках устройства 500 НИС. Подходящие точки для измерения поглощения УФ-излучения, электропроводности или рН включают на впускном отверстии 512, 522, 532, 542 в зоне 510, 520, 530, 540 на межсоединении 516, 526, 536, 546 или на выпускном отверстии 514, 524, 534, 544. Впускные отверстия 512, 522, 532, 542, межсоединения 516, 526, 536, 546 и выпускные отверстия 514, 524, 534, 544 могут использоваться для перехода от открытой конфигурации к закрытой конфигурации: открытая конфигурация, позволяющая жидкости пропускаться через впускное отверстие 512, 522, 532, 542, межсоединение 516, 526, 536, 546 или выпускное отверстие 514, 524,

534, 544 и закрытая конфигурация, не позволяющая жидкости проходить через впускное отверстие 512, 522, 532, 542, межсоединение 516, 526, 536, 546 или выпускное отверстие 514, 524, 534, 544. Устройство 500 НИС может включать один или более насосов, которые обеспечивают давление для передачи жидкости между зонами 510, 520, 530, 540, впускными отверстиями 512, 522, 532, 542, межсоединениями 516, 526, 536, 546 и выпускными отверстиями 514, 524, 534, 544. В некоторых вариантах осуществления одно или более межсоединений 516, 526, 536, 546 могут быть перемещены для присоединения к различным зонам 510, 520, 530, 540. Например, во время одного или более хроматографических процессов с использованием устройства 500 НИС может быть желательной перестройка, где межсоединение 536 пропускает элюат из зоны 530. В этих ситуациях межсоединение 536 может быть переконфигурировано, не прерывая хроматографический процесс, для пропуска элюата из зоны 530 в зону 520. Это всего лишь один пример, и в целом любое межсоединение 516, 526, 536, 546 может быть реконфигурировано для соединения различных зон 510, 520, 530, 540 без прерывания текущего хроматографического процесса.

[069] ФИГ. 5А представляет собой графическое изображение одного или более способов согласно настоящему раскрытию. На левой оси графика четыре отдельных ряда определены метками С1, С2, С3 и С4, представляющими, вторую колонку, третью колонку и четвертую колонку устройства НИС. Верхняя ось представляет время, неограниченно простирающееся влево и вправо. Непрерывное заполнение каждой колонки является примером вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, такая расстановка сокращает или устраняет время простоя для колонок (например, «мертвое время») по сравнению с традиционными методами НИС. Показанный отрезок времени представляет собой один цикл повторяющегося шаблона, при этом, понимая, что шаблон пронумерованных рамок, описанный ниже, может повторяться с обеих сторон сегмента, показанного на ФИГ. 5А. Пять значений времени обозначены как Т1, Т2, Т3, Т4 и Т5 и являются примерами любой линии Т0, которая может быть проведена вертикально через график. В некоторых вариантах осуществления интервал между Т1 и Т2 может быть по существу таким же, как интервал между Т2 и Т3, который в некоторых вариантах осуществления может быть по существу таким же, как интервал между Т3 и Т4, который в некоторых вариантах осуществления может быть по существу таким же, как интервал между Т4 и Т5. В некоторых вариантах осуществления интервалы между каждым из этих значений времени могут отличаться. В некоторых вариантах осуществления интервал между соседними отмеченными значениями времени (например, между Т1 и Т2 или между Т4 и Т5) может быть больше или равен 30 с, меньше или равен 90 мин, от 30 с до 60 мин, от 30 с до 30 мин, от 30 с до 15 мин, от 30 с до 10 мин, от 30 с до 8 мин, от 30 с до 7 мин, от 30 с до 6 мин, от 30 с до 5 мин, от 30 с до 4 мин, от 30 с до 3 мин, от 1 мин до 5 мин или от 2 мин до 5 мин. Рамки 710, 712, 714, 724, 720, 722, 734, 730, 732, 742, 744 и 740 представляют смесь, буфер или другую остаточную жидкость в каждой колонке С1, С2, С3 и С4.

[070] Переходя по ФИГ. 5А слева направо, в первом ряду (представляющем С1), от Т1 до Т2, вторичная загрузка смеси может находиться в первой колонке (рамка 710). От Т2 до Т3 первичная загрузка смеси может находиться в первой колонке (рамка 712), а от Т3 до Т5 одна или более подвижных фаз могут находиться в первой колонке (рамка 714).

[071] По-прежнему что касается ФИГ. 5А, то одна или более подвижных фаз в первой колонке 714 могут быть разделены на отдельные фазы, включая промывочный буфер в первой колонке (рамка 715), стриппинг-буфер в первой колонке (рамка 717) и уравнивающий буфер в первой колонке (рамка 719). В следующем ряду (представляющем вторую колонку С2), от Т1 до Т2, одна или более подвижных фаз могут находиться во второй колонке (рамка 724), продолжаясь от Т4 до Т5 предыдущего цикла. Это также может быть разделено на отдельные фазы, включая промывочный буфер во второй колонке (рамка 725), стриппинг-буфер во второй колонке (рамка 727) и уравнивающий буфер во второй колонке (рамка 729). Двигаясь вправо, от Т2 к Т3 вторичная загрузка смеси может быть во второй колонке (рамка 720), а от Т3 до Т4 первичная загрузка смеси может быть во второй колонке (рамка 722).

[072] В следующем ряду (представляющем колонку С3) от Т1 до Т3 одна или более подвижных фаз могут находиться в третьей колонке (рамка 734). Одна или более подвижных фаз в третьей колонке 734 могут быть разделены на отдельные фазы, включая промывочный буфер в третьей колонке (рамка 735), стриппинг-буфер в третьей колонке (рамка 737) и уравнивающий буфер в третьей колонке (рамка 739). Затем, от Т3 до Т4, вторичная загрузка смеси может находиться в третьей колонке (рамка 730), а от Т4 до Т5 первичная загрузка смеси может находиться в третьей колонке (рамка 732).

[073] В следующем ряду (представляющем колонку С4), от Т1 до Т2, первичная загрузка смеси может быть в четвертой колонке (рамка 742). Затем, от Т2 до Т4, одна или более подвижных фаз могут находиться в четвертой колонке (рамка 744), а от Т4 до Т5 вторичная загрузка смеси может находиться в третьей колонке (рамка 740). Одна или более подвижных фаз в четвертой колонке 744 могут быть разделены на отдельные фазы, включая промывочный буфер в третьей колонке (рамка 745), стриппинг-буфер в третьей колонке (рамка 747) и уравнивающий буфер в третьей колонке (рамка 749).

[074] В данный момент времени Т0 вертикальная линия может быть проведена через график, так что каждая пронумерованная рамка, с которой контактирует вертикальная линия от Т0, представляет раствор в колонке в это время. Так, например, в момент времени Т1, смесь вторичной загрузки вводится в первую колонку 710, одна или более подвижных фаз находятся во второй колонке 724, например, стриппинг-буфер 727, и смесь первичной загрузки пропускается в третью колонку 732. Следует отметить, что хотя подразделения более широких фаз, такие как, например, подразделения 725, 727 и 729, по всей видимости, занимают равные части одной или более подвижных фаз во второй колонке 724, в некоторых вариантах осуществления подразделения могут занимать неравные части более широкой фазы. Также следует понимать, что способ, изображенный на ФИГ. 5А, является лишь одним примером способов варианта осуществления. Другие

порядки, конфигурации и стадии предполагаются и рассматриваются в пределах объема настоящего раскрытия.

[075] ФИГ. 5В-5Е иллюстрируют примерный цикл способа получения целевого полипептида из смеси, включающей целевой полипептид, как описано ранее. ФИГ. 5В изображает серию событий, которые происходят в интервале от T1 до T2 на ФИГ. 5А. На ФИГ. 5В показано устройство НИС на первой стадии 601, где первая зона 610 принимает вторичную загрузку смеси 606, включающей целевой полипептид, и элюирует элюат вторичной загрузки 607, который может быть собран или удален. Вторая зона 620 принимает одну или более подвижных фаз 615 и элюирует элюат одной или более подвижных фаз 616, который может быть собран или удален. Третья зона 630 принимает одну или более подвижных фаз 615 и элюирует элюат одной или более подвижных фаз 616, который может быть собран или удален. Четвертая зона 640 принимает первичную загрузку смеси 605 и пропускает вторичную загрузку смеси 606 в другую колонку.

[076] На ФИГ. 5С показано устройство НИС на второй стадии 602 (в интервале от T2 до T3, как показано на ФИГ. 5А), где первая зона 610 принимает первичную загрузку смеси 605 и пропускает вторичную загрузку смеси 606 в другую колонку, включающую целевой полипептид, который может быть собран или удален. Вторая зона 620 принимает вторичную загрузку смеси 606, включающую целевой полипептид, и элюирует элюат вторичной загрузки 607, который может быть собран или удален. Третья зона 630 принимает одну или более подвижных фаз 615 и элюирует элюат одной или более подвижных фаз 616, который может быть собран или удален. Четвертая зона 640 принимает одну или более подвижных фаз 615 и элюирует элюат одной или более подвижных фаз 616, который может быть собран или удален.

[077] На ФИГ. 5D показано устройство НИС на третьей стадии 603 (в интервале от T3 до T4, как показано на ФИГ. 3А), где первая зона 610 принимает одну или более подвижных фаз 615 и элюирует элюат одной или более подвижных фаз 616, который может быть собран или удален. Вторая зона 620 принимает первичную загрузку смеси 605 и пропускает вторичную загрузку смеси 606 в другую колонку, содержащую целевой полипептид, который может быть собран или удален. Третья зона 630 принимает вторичную загрузку смеси 606, включающую целевой полипептид, и элюирует элюат вторичной загрузки 607, который может быть собран или удален. Четвертая зона 640 принимает одну или более подвижных фаз 615 и элюирует элюат одной или более подвижных фаз 616, который может быть собран или удален.

[078] На ФИГ. 5Е показано устройство НИС на четвертой стадии 604 (в интервале от T2 до T3, как показано на ФИГ. 5А), где первая зона 610 принимает одну или более подвижных фаз 615 и элюирует элюат одной или более подвижных фаз 616, который может быть собран или удален. Вторая зона 620 принимает одну или более подвижных фаз 615 и элюирует элюат одной или более подвижных фаз 616, который может быть собран или удален. Третья зона 630 принимает первичную загрузку смеси 605 и пропускает вторичную загрузку смеси 606 в другую колонку, содержащую целевой

полипептид, который может быть собран или удален. Четвертая зона 640 принимает вторичную загрузку смеси 606, включающую целевой полипептид, и элюирует элюат вторичной загрузки 607, который может быть собран или удален.

[079] На ФИГ.6 изображена блок-схема примерного способа 800 получения целевого полипептида из смеси, включающей целевой полипептид. Способ может включать пропускание смеси, включающей целевой полипептид, в первую колонку из множества колонок (например, рамка 410 на ФИГ. 3А) (стадия 810). Способ может дополнительно включать пропускание элюата, включающего целевой полипептид, из первой колонки во вторую колонку из множества колонок (например, вторая загрузка смеси 306, как показано на ФИГ. 3В) (стадия 820). Способ может дополнительно включать пропускание одной или более подвижных фаз в первую колонку (например, рамка 414) (стадия 830). В некоторых вариантах осуществления способ может дополнительно включать пропускание целевого полипептида через выпускные отверстия каждой из множества колонок (например, элюат одной или более подвижных фаз 316, как показано на ФИГ. 3В-3D) (стадия 840). При сравнении с ФИГ. 3А-3D, обычному специалисту в данной области техники будет очевидно, что сравнения также могут быть выполнены с ФИГ. 5А-5Е.

[080] В вариантах осуществления настоящего раскрытия смесь, содержащая целевой полипептид, может также содержать один или более НСР. После получения целевого полипептида из смеси с использованием одного или более способов варианта осуществления может быть получено несколько образцов элюата. Образцы могут быть собраны из элюата одной или более загрузок смеси и/или элюата одной или более подвижных фаз. Например, образцы могут быть собраны из элюата первичной загрузки смеси или вторичной загрузки смеси (или любой другой загрузки смеси). В некоторых вариантах осуществления образцы можно собирать только из элюата одного или более промывочных буферов. В других вариантах осуществления образцы могут быть собраны из элюата других подвижных фаз и/или первичной или вторичной загрузки смеси. Совокупная коллекция всех собранных образцов, содержащих целевой полипептид, называется пулом.

[081] В некоторых вариантах осуществления можно провести одно или более измерений, чтобы убедиться в эффективности применяемого метода получения целевого полипептида. В контексте настоящего описания эффективность относится к комбинации трех различных факторов: фактора клиренса высокомолекулярных молекул (НМВ CF), выхода и производительности. В некоторых вариантах осуществления более эффективный способ имеет более высокий CF НМВ, более высокий выход и более высокую производительность, чем менее эффективный способ. В других вариантах осуществления более эффективный способ имеет более высокую производительность, чем менее эффективный способ, при сохранении CF НМВ больше или равном 1,3 и поддержании выхода на уровне больше или равном 80%. В дополнительных вариантах осуществления более эффективный способ имеет более высокую производительность, чем менее

эффективный способ, при сохранении CF HMW на уровне больше или равном 1,5 и поддержании выхода на уровне больше или равном 90%.

[082] Фактор клиренса высокомолекулярных молекул (HMW CF) представляет собой приблизительное относительное содержание белка в собранном пуле по сравнению с загруженной смесью. В некоторых вариантах осуществления аналитическая эксклюзионная хроматография может быть проведена для определения процентного содержания в образце молекул с высокой молекулярной массой (например, белков) (HMW%). В других вариантах осуществления может использоваться метод центрифугирования - когда образец центрифугируется, он разделяется на слои в зависимости от массы составляющих компонентов образца, самый тяжелый слой, нижний слой, как правило, содержит самые тяжелые молекулы, включая белки. HMW% может быть рассчитан путем массирования инфранатанта центрифугированного образца и деления на общую массу образца. Используя любой метод, HMW CF можно рассчитать согласно уравнению 1, как показано ниже.

$$\text{HMW CF} = \text{HMW\%загрузки} / \text{HMW\%пула} \text{ Ур. (1)}$$

[083] Как показано в Ур. (1) CF HMW может быть рассчитан путем деления HMW% загруженной смеси на HMW% пула. В некоторых вариантах осуществления способ получения целевого полипептида из смеси имеет HMW CF больше или равный 1,3. В других вариантах осуществления способ получения целевого полипептида из смеси имеет HMW CF больше или равный 1,4, больше или равный 1,5, больше или равный 1,6, больше или равный 1,8, или больше или равно 2,0.

[084] Выход представляет собой измерение количества целевого полипептида, собранного в пуле, по сравнению с тем, сколько целевого полипептида было в загрузочной смеси. Количество целевого полипептида в образце можно количественно определить с помощью поглощения УФ-излучения, электропроводности или иммуноферментного анализа (например, ИФА). Выход может быть рассчитан в соответствии с Уравнением 2, как показано ниже.

$$\text{Выход(\%)} = (\text{Масса}_{\text{пула}} / \text{Масса}_{\text{загрузки}}) \times 100 = ((\text{Конц}_{\text{пула}})(\text{Об}_{\text{пула}}) / (\text{Конц}_{\text{загрузки}})(\text{Об}_{\text{загрузки}})) \times 100 \text{ Ур. (2)}$$

[085] Как показано в Ур. 2, выход может быть рассчитан путем деления массы целевого полипептида, загруженного в устройство НИС, на массу целевого полипептида, собранного в пуле. Поскольку массу целевого полипептида в образце нельзя измерить напрямую, концентрация (рассчитанная с помощью поглощения УФ-излучения, электропроводности или иммуноферментного анализа) может быть умножена на объем для определения массы. В некоторых вариантах осуществления способ получения целевого полипептида из смеси имеет выход, превышающий или равный 55%. В других вариантах осуществления способ получения целевого полипептида из смеси имеет выход, больший или равный 60%, больший или равный 65%, больший или равный 70%, больший или равный 75%, больший чем или равно 80%, больший или равный 85%, больший или равный 90% или больший или равный 95%.

[086] Производительность представляет собой количественную оценку времени и затрат, необходимых для получения определенного количества целевого полипептида. Производительность можно рассчитать по Уравнению 3, как показано ниже.

$$\text{Производительность} = \text{Масса}_{\text{пуля}} / \text{Об}_{\text{среды}} \times (\text{Время цикла} \times \text{Количество циклов}) \text{ Ур. (3)}$$

[087] Как показано в Ур. 3, производительность может быть рассчитана путем деления массы целевого полипептида, собранного в пуле, на произведение объема используемой среды для гидрофобного взаимодействия и времени, затраченного на получение массы полипептида, собранного в пуле (например, времени цикла). В некоторых вариантах осуществления способ получения целевого полипептида из смеси имеет производительность, больше или равную примерно 35 г/л · час. В других вариантах осуществления способ получения целевого полипептида из смеси имеет производительность больше или равную примерно 40 г/л · час, больше или равную примерно 50 г/л · час, больше или равную примерно 75 г/л · час, больше или равную примерно 100 г/л · час, больше или равную примерно 125 г/л · час, больше или равную примерно 150 г/л · час, больше или равную примерно 175 г/л · час, больше или равную примерно 200 г/л · час или больше или равную примерно 220 г/л · час.

Примеры

[088] Следующие ниже примеры предназначены для иллюстрации настоящего раскрытия без ограничения по сути. Понятно, что настоящее раскрытие охватывает дополнительные аспекты и варианты осуществления, согласующиеся с предшествующим описанием и следующими примерами.

[089] В следующих примерах целевой полипептид получали из смеси, включающей целевой полипептид и НСР. Целевой полипептид был получен с использованием трех различных методов согласно вариантам осуществления настоящего раскрытия. Целевой полипептид также получали с использованием обычного способа периодической обработки в качестве сравнительного примера.

ПРИМЕР 1

[090] В первом примере получали целевое антитело. 300 мл смеси 12,2 г/л, включающей целевое антитело, загружали в трехколоночное устройство НИС при скорости потока загрузки 1,67 мл/мин, где каждая колонка имела высоту слоя 2,5 см, внутренний диаметр 1,6 см и объем колонки 5 мл. Загрузочный буфер/смесь включал 30 миллимолярный (мМ) раствор цитрата натрия, рН и доводили до 6,0 с помощью 2М раствора уксусной кислоты. Загрузочный буфер/смесь загружали в первую и вторую колонки из трех колонок. Вторую колонку загружали через первую колонку (то есть выпускное отверстие из первой колонки позволяло пропускать загрузочный буфер во вторую колонку). После того, как смесь была загружена в первую и вторую колонки аппарата НИС, смесь загружали во вторую и третью из трех колонок, при этом третья колонка загружалась через вторую колонку (т. е. выпускное отверстие из второй колонки позволяло пропускать загрузочный буфер в третью колонку).

[091] Пока загрузочный буфер/смесь загружались во вторую и третью колонки, ряд

подвижных фаз пропускали в первую колонку аппарата НИС, чтобы отделить целевое антитело от других компонентов смеси в первой колонке и собрать целевое антитело, с последующим пропуском ряда стриппинг-буферов в первую колонку для регенерации колонки. Загрузка второй и третьей колонок происходила одновременно с промывкой и стриппингом первой колонки. После этой стадии загрузочный буфер/смесь загружали в третью и первую колонки, причем первая колонка загружалась через третью колонку (т. е. выпускное отверстие из третьей колонки позволяло пропускать загрузочный буфер в первую колонку), во время чего буферы пропускали во вторую колонку, чтобы отделить и собрать целевое антитело из смеси, загруженной во вторую колонку, после чего ряд стриппинг-буферов пропускали во вторую колонку для регенерации второй колонки. Загрузка третьей и первой колонок происходила одновременно с промывкой и стриппингом второй колонки. Наконец, загрузочный буфер/смесь снова загружали в первую и вторую колонки, причем вторую колонку загружали через первую колонку, как описано ранее, во время чего буферы пропускали в третью колонку для отделения и сбора целевого антитела из смеси, загруженной в третью колонку, после чего ряд стриппинг-буферов пропускали в третью колонку для регенерации третьей колонки. Загрузка первой и второй колонок происходила одновременно с промывкой и стриппингом третьей колонки. Этот процесс повторялся циклически дважды.

[092] Ряд подвижных фаз включал промывочный буфер, ряд стриппинг-буферов и уравнивающий буфер. Промывочный буфер включал 40 мМ Tris и 30 мМ цитрат натрия, и его рН довели до 6,0. Для промывки каждой колонки в колонку добавляли четыре объема промывочного буфера.

[093] После нанесения промывочного буфера и сбора элюата, включающего целевое антитело, из колонки как части пула, в колонку пропускали ряд стриппинг-буферов как часть процесса регенерации колонки. Первый стриппинг-буфер содержал деионизированную воду, в каждую колонку добавляли два объема этого буфера. В контексте настоящего описания под объемом колонки понимается объем жидкости, который может удерживать данная колонка. Следующий стриппинг-буфер включает 1 Н NaOH, два объема этого буфера были добавлены в каждую колонку после первого стриппинг-буфера. Следующий стриппинг-буфер содержал деионизированную воду, два объема этого буфера добавляли в каждую колонку после предыдущего щелочного стриппинг-буфера. Следующий стриппинг-буфер включал 20 об.% этанола, и два объема этого буфера добавляли к каждой колонке после предыдущего стриппинг-буфера с деионизированной водой. В колонку добавляли последний стриппинг-буфер, включающий деионизированную воду (в количестве, равном двум объемам колонки). После нанесения стриппинг-буферов в колонку добавляли четыре объема уравнивающего буфера. Уравнивающий буфер включал 40 мМ Tris и 30 мМ цитрат натрия, и его рН довели до 6,0.

[094] После сбора пула в ходе выполнения способа в Примере 1 измеряли и рассчитывали NMW CF, выход и производительность метода, как описано ранее в

настоящем документе. Результаты приведены ниже в Таблице 1.

Пример 2

[095] Во втором примере получали целевое антитело. 729 мл смеси 12,4 г/л, включающей целевой полипептид, загружали в трехколоночное устройство НИС при скорости потока загрузки 1,67 мл/мин, где каждая колонка имела высоту слоя 2,5 см, внутренний диаметр 1,6 см и объем колонки 5 мл. Загрузочный буфер/смесь включал 30 миллимолярный (мМ) раствор цитрата натрия, рН и доводили до 6,0 с помощью 2М раствора уксусной кислоты. Загрузочный буфер/смесь загружали в первую и вторую колонки из трех колонок. Вторую колонку загружали через первую колонку (то есть выпускное отверстие из первой колонки позволяло пропускать загрузочный буфер во вторую колонку). После того, как смесь была загружена в первую и вторую колонки аппарата НИС, смесь загружали во вторую и третью из трех колонок, при этом третья колонка загружалась через вторую колонку (т. е. выпускное отверстие из второй колонки позволяло пропускать загрузочный буфер в третью колонку).

[096] Пока загрузочный буфер/смесь загружали во вторую и третью колонки, ряд подвижных фаз пропускали в первую колонку устройства НИС, чтобы отделить целевое антитело от других компонентов смеси в первой колонке и собрать целевое антитело, с последующим пропуском ряда стриппинг-буферов в первую колонку для регенерации колонки. Загрузка второй и третьей колонок происходила одновременно с промывкой и стриппингом первой колонки. После этой стадии загрузочный буфер/смесь загружали в третью и первую колонки, причем первая колонка загружалась через третью колонку (т. е. выпускное отверстие из третьей колонки позволяло пропускать загрузочный буфер в первую колонку), во время чего буферы пропускали во вторую колонку, чтобы отделить и собрать целевое антитело из смеси, загруженной во вторую колонку, после чего ряд стриппинг-буферов пропускали во вторую колонку для регенерации второй колонки. Загрузка третьей и первой колонок происходила одновременно с промывкой и стриппингом второй колонки. Наконец, загрузочный буфер/смесь снова загружали в первую и вторую колонки, причем вторую колонку загружали через первую колонку, как описано ранее, во время чего буферы пропускали в третью колонку для отделения и сбора целевого антитела из смеси, загруженной в третью колонку, после чего ряд стриппинг-буферов пропускали в третью колонку для регенерации третьей колонки. Загрузка первой и второй колонок происходила одновременно с промывкой и стриппингом третьей колонки. Этот процесс повторялся циклически четыре раза.

[097] Ряд подвижных фаз включал промывочный буфер, ряд стриппинг-буферов и уравнивающий буфер. Промывочный буфер включал 40 мМ Tris и 30 мМ цитрат натрия, и его рН доводили до 6,0. Для промывки каждой колонки в колонку добавляли четыре объема промывочного буфера.

[098] После нанесения промывочного буфера и сбора элюата, включающего целевое антитело, из колонки как части пула, в колонку пропускали ряд стриппинг-буферов как часть процесса регенерации колонки. Первый стриппинг-буфер содержал

деионизированную воду, в каждую колонку добавляли два объема этого буфера. В контексте настоящего описания под объемом колонки понимается объем жидкости, который может удерживать данная колонка. Следующий стриппинг-буфер включает 1 Н NaOH, два объема этого буфера были добавлены в каждую колонку после первого стриппинг-буфера. Следующий стриппинг-буфер содержал деионизированную воду, два объема этого буфера добавляли в каждую колонку после предыдущего щелочного стриппинг-буфера. Следующий стриппинг-буфер включал 20 об.% этанола, и два объема этого буфера добавляли к каждой колонке после предыдущего стриппинг-буфера с деионизированной водой. В колонку добавляли последний стриппинг-буфер, включающий деионизированную воду (в количестве, равном двум объемам колонки). После нанесения стриппинг-буферов в колонку добавляли четыре объема уравнивающего буфера. Уравнивающий буфер включал 40 мМ Tris и 30 мМ цитрат натрия, и его pH доводили до 6,0.

[099] После сбора пула в ходе выполнения способа в Примере 2 измеряли и рассчитывали NMW CF, выход и производительность, как описано ранее в настоящем документе. Результаты приведены ниже в Таблице 1.

Пример 3

[0100] В третьем примере получали целевой полипептид. 726 мл смеси 12,4 г/л, включающей целевой полипептид, загружали в трехколоночное устройство НИС при скорости потока загрузки 6,70 мл/мин, где каждая колонка имела высоту слоя 2,5 см, внутренний диаметр 1,6 см и объем колонки 5 мл. Загрузочный буфер/смесь включал 30 миллимолярный (мМ) раствор цитрата натрия и pH доводили до 6,0 с помощью 2М раствора уксусной кислоты. Загрузочный буфер/смесь загружали в первую и вторую колонки из трех колонок. Вторую колонку загружали через первую колонку (то есть выпускное отверстие из первой колонки позволяло пропускать загрузочный буфер во вторую колонку). После того, как смесь была загружена в первую и вторую колонки аппарата НИС, смесь загружали во вторую и третью из трех колонок, при этом третья колонка загружалась через вторую колонку (т. е. выпускное отверстие из второй колонки позволяло пропускать загрузочный буфер в третью колонку).

[0101] Во время загрузки буфера/смеси во вторую и третью колонки, ряд подвижных фаз пропускали в первую колонку устройства НИС, чтобы отделить целевое антитело от других компонентов смеси в первой колонке и собрать целевое антитело, с последующим пропуском ряда стриппинг-буферов в первую колонку для ее регенерации. Загрузка второй и третьей колонок происходила одновременно с промывкой и стриппингом первой колонки. После этой стадии загрузочный буфер/смесь загружали в третью и первую колонки, причем первая колонка загружалась через третью колонку (т. е. выпускное отверстие из третьей колонки позволяло пропускать загрузочный буфер в первую колонку), во время чего буферы пропускали во вторую колонку, чтобы отделить и собрать целевое антитело из смеси, загруженной во вторую колонку, после чего ряд стриппинг-буферов пропускали во вторую колонку для регенерации второй колонки.

Загрузка третьей и первой колонок происходила одновременно с промывкой и стриппингом второй колонки. Наконец, загрузочный буфер/смесь снова загружали в первую и вторую колонки, причем вторую колонку загружали через первую колонку, как описано ранее, во время чего буферы пропускали в третью колонку для отделения и сбора целевого антитела из смеси, загруженной в третью колонку, после чего ряд стриппинг-буферов пропускали в третью колонку для регенерации третьей колонки. Загрузка первой и второй колонок происходила одновременно с промывкой и стриппингом третьей колонки. Этот процесс повторялся циклически четыре раза.

[0102] Ряд подвижных фаз включал промывочный буфер, ряд стриппинг-буферов и уравнивающий буфер. Промывочный буфер включал 40 мМ Tris и 30 мМ цитрат натрия, и его pH довели до 6,0. Для промывки каждой колонки в колонку добавляли четыре объема промывочного буфера.

[0103] После нанесения промывочного буфера и сбора элюата, включающего целевое антитело, из колонки как части пула, в колонку пропускали ряд стриппинг-буферов как часть процесса регенерации колонки. Первый стриппинг-буфер содержал деионизированную воду, в каждую колонку добавляли два объема этого буфера. В контексте настоящего описания под объемом колонки понимается объем жидкости, который может удерживать данная колонка. Следующий стриппинг-буфер включает 1 Н NaOH, два объема этого буфера были добавлены в каждую колонку после первого стриппинг-буфера. Следующий стриппинг-буфер содержал деионизированную воду, два объема этого буфера добавляли в каждую колонку после предыдущего щелочного стриппинг-буфера. Следующий стриппинг-буфер включал 20 об.% этанола, и два объема этого буфера добавляли к каждой колонке после предыдущего стриппинг-буфера с деионизированной водой. В колонку добавляли последний стриппинг-буфер, включающий деионизированную воду (в количестве, равном двум объемам колонки). После нанесения стриппинг-буферов в колонку добавляли четыре объема уравнивающего буфера. Уравнивающий буфер включал 40 мМ Tris и 30 мМ цитрат натрия, и его pH довели до 6,0.

[0104] После сбора пула в ходе выполнения способа в Примере 3 измеряли и рассчитывали NMW CF, выход и производительность, как описано ранее в настоящем документе. Результаты приведены ниже в Таблице 1.

Сравнительный пример

[0105] Целевой полипептид получали из смеси с использованием обычного периодического процесса, как описано в настоящем документе, для сравнения с методами Примеров 1-3. Добавки для загрузки, промывочный буфер, стриппинг-буферы и уравнивающие буферы были идентичны тем, которые использовались в Примерах способов, но применялась обычная методика периодического процесса. 590 г загрузочной смеси 13,1 г/л добавляли в хроматографическую колонку. После пропуска смеси через колонку в колонку добавляли 4 объема промывочного буфера и собирали элюат. После сбора пула из метода сравнительного примера были охарактеризованы CF NMW, выход и

производительность. Результаты представлены в Таблице 1.

Таблица 1

Значение	Пример 1	Пример 2	Пример 3	Сравнительный Пример
Объем используемой среды для гидрофобного взаимодействия	15 мл	15 мл	15 мл	6,53 L
Скорость загрузки	1,67 мл/мин	1,67 мл/мин	6,70 мл/мин	1,05 L/мин
Время цикла	3,01 ч	2,44 ч	0,61 ч	2,26 ч
Концентрация загрузки	12,2 г/л	12,4 г/л	12,4 г/л	13,1 г/л
Объем загрузки	300 мл	726 мл	726 мл	45,0 L
Масса загрузки	3,66 г	9,00 g	9,00 g	590 g
НМW% загрузки	2,05%	2,01%	2,29%	1,71%
НМW% пула	1,10%	1,10%	1,46%	0,68%
Концентрация пула	8,07 г/л	9,06 г/л	9,69 г/л	9,75 г/л
Объем пула	359 мл	687 мл	844 мл	58,5 L
Масса пула	2,90 г	6,22 г	8,18 г	570,4 г
НМW CF	1,9	1,8	1,6	2,5
Выход	79,2%	68,7%	90,9%	96,7%
Производительность	32,1 г/л·ч	42,5 г/л·ч	223,5 г/л·ч	38,7 г/л·ч

[0106] Как видно из данных в Таблице 1, Примеры 2 и 3 имеют более высокую производительность, чем периодический метод сравнительного примера. Кроме того, в Примере 3 удалось достичь более высокой производительности, чем в других Примерах, при сохранении CF НМW больше или равного 1,5 и сохранении выхода больше или равного 90%.

Пример 4

[0107] Целевое антитело получали с использованием НИС с тремя разными скоростями загрузки для сравнения прорыва примесей при различных скоростях. Колонку готовили, как описано в Таблице 2:

Таблица 2

Материал загрузки	30 мМ Цитрат; рН 6 +/- 0,1
Высота слоя колонки	20 см
Внутренний диаметр колонки	1 см
Объем набитой колонки	15,7 мл
Концентрация загрузки	400 г/л суммарно; затем 100 г/л, фракционировали каждые 25 г/л
Очистка	Деионизированная вода обратного осмоса; 1N NaOH; Деионизированная вода обратного осмоса; 20% EtOH

[0108] Скорости загрузки в прогоне составляли по порядку: 300 см/ч (3,93 мл/мин, или время пребывания в колонке 4,0 мин), 200 см/ч (2,62 мл/мин или 6,0 мин время пребывания в колонке) и 400 см/час (5,24 мл/мин или 3,0 мин время пребывания в колонке). Все опыты выполнялись в одной колонке. Перед прогоном 400 см/ч проводили замачивание в 0,5 N NaOH в течение ночи.

[0109] Процент высокомолекулярных соединений (НМW%) наносили на график в зависимости от загрузки, как показано на ФИГ. 7А. НМW% загружаемого материала составлял 1,78%. Совокупный процент НМW% пула при 200 г/л смолы и 400 г/л смолы показан ниже в Таблице 3:

Таблица 3

	200 г/л-смола	400 г/л-смола
200 см/ч	1,10%	1,34%
300 см/ч	1,06%	1,28%
400 см/ч	1,07%	1,28%

[0110] Белки клетки-хозяина количественно определяли в миллионных долях для каждой скорости загрузки с использованием набора F665 CHO НСР ELISA (Cygnus Technologies). Полученные количества были нанесены на график в виде функции от загрузки, как показано на ФИГ. 7В. Для сравнения, белки клетки-хозяина были количественно определены из пула анионообменной хроматографии того же загружаемого материала, и было обнаружено, что их содержание составляет 549,61 м. д.

Пример 5

[0111] Целевое антитело получали с использованием НИС в двух колонках с разной высотой слоя (20 см, как использовалось в Примере 4, и 2,5 см). Оба цикла были выполнены таким образом, чтобы время пребывания в каждой колонке составляло 3 минуты (т. е. линейная скорость 400 см/час в колонке с высотой слоя 20 см). НМW% для загружаемого материала составлял 2,2%. НМW% для каждого пула колонки наносили на график как функцию загрузочной концентрации, как показано на ФИГ. 7С.

[0112] Специалисты в данной области техники поймут, что концепция, на которой основано это раскрытие, может быть легко использована в качестве основы для разработки других способов и систем для выполнения решений и целей настоящего раскрытия. Соответственно, формула изобретения не должна рассматриваться как ограниченная приведенным выше описанием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения целевого полипептида из смеси, включающей целевой полипептид, причем способ включает:

контакт смеси, включающей целевой полипептид, с первой зоной устройства для хроматографии гидрофобного взаимодействия (НИС), при этом первая зона имеет одну или более хроматографических колонок и выпускное отверстие;

контакт одной или более подвижных фаз со второй зоной устройства НИС, причем вторая зона имеет одну или более хроматографических колонок и выпускное отверстие; и

пропускание целевого полипептида через выпускные отверстия по меньшей мере первой и второй зон устройства НИС;

где время пребывания смеси, включающей целевой полипептид, в первой зоне конфигурируется так, чтобы быть приблизительно таким же, как время пребывания одной или более подвижных фаз во второй зоне.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что целевой полипептид представляет собой моноклональное антитело.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что одна или более подвижных фаз содержат уравнивающий буфер и промывочный буфер.

4. Способ по п. 1, дополнительно включающий пропускание элюата, включающего целевой полипептид, из первой зоны устройства НИС во вторую зону устройства НИС.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что контакт одной или более подвижных фаз со второй зоной устройства НИС включает:

контакт промывочного буфера со второй зоной устройства НИС; и

после контакта промывочного буфера со второй зоной устройства НИС, регенерация второй зоны, при этом регенерация второй зоны включает:

контакт воды со второй зоной устройства НИС,

контакт щелочного раствора со второй зоной устройства НИС,

контакт спиртового раствора со второй зоной устройства НИС, и

контакт уравнивающего буфера со второй зоной устройства НИС.

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что за контактом промывочного буфера со второй зоной устройства НИС следует пропускание целевого полипептида через выпускное отверстие второй зоны устройства НИС.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что на выпускном отверстии из первой или второй зоны измеряют одно или более из поглощения ультрафиолетового излучения, электропроводности или pH резидентного раствора.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что целевой полипептид получают с производительностью, большей или равной 50 г/л · час.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что первая зона или вторая зона включает более чем одну хроматографическую колонку.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что устройство НИС дополнительно включает третью зону, имеющую одну или более хроматографических колонок и

выпускное отверстие, и при этом способ дополнительно включает:

выполнение цикла регенерации в третьей зоне, при этом выполнение цикла регенерации включает контакт одной или более подвижных фаз с третьей зоной, при этом продолжительность цикла регенерации конфигурируется так, чтобы быть приблизительно такой же, как время пребывания смеси, включающей целевой полипептид, в первой зоне.

11. Способ получения целевого полипептида из смеси, включающей целевой полипептид, включающий:

пропускание смеси, включающей целевой полипептид, в первую колонку из множества хроматографических колонок в устройстве для хроматографии гидрофобного взаимодействия (НИС), в котором каждая из множества колонок содержит выпускное отверстие, соединяемое с другой колонкой из множества колонок;

пропускание элюата, включающего целевой полипептид, из первой колонки во вторую колонку из множества колонок;

пропускание одной или более подвижных фаз в третью колонку из множества колонок; и

пропускание целевого полипептида через выпускные отверстия каждой из множества колонок, при этом сумма времени пребывания смеси, включающей целевой полипептид, в первой колонке и второй колонке, по существу, такая же, как сумма времени пребывания одной или более подвижных фаз в третьей колонке.

12. Способ по п. 11, дополнительно включающий пропускание одной или более подвижных фаз в каждую из множества колонок.

13. Способ по п. 11, отличающийся тем, что пропускание одной или более подвижных фаз в колонку включает:

пропускание промывочного буфера в колонку; и

после пропускания промывочного буфера в колонку, регенерация колонки, при этом регенерация колонки включает пропускание воды, щелочного раствора, спиртового раствора или уравнивающего буфера в колонку.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что стадия пропускания целевого полипептида через выпускное отверстие колонки происходит после пропускания в колонку промывочного буфера.

15. Способ по п. 11, отличающийся тем, что на выпускном отверстии из первой или второй колонки измеряют одно или более из поглощения ультрафиолетового излучения, электропроводности или рН резидентного раствора.

16. Способ по п. 11, отличающийся тем, что целевой полипептид получают с производительностью, большей или равной 50 г/л · час.

17. Способ по п. 13, отличающийся тем, что устройство НИС включает четыре колонки, и сумма времени пребывания смеси, включающей целевой полипептид, в первой колонке и второй колонке по существу такая же, как сумма времени регенерации в третьей колонке и четвертой колонке.

18. Способ получения антитела с использованием множества хроматографических

колонок, где каждая из множества хроматографических колонок включает среду для гидрофобного взаимодействия, причем способ включает:

на первой стадии:

загрузку количества смеси, включающей антитело, в первую колонку из множества колонок;

загрузку количества смеси во вторую колонку из множества колонок через первую колонку; и

выполнение стадии без загрузки, включающей по меньшей мере один из процессов промывки, стриппинга и уравнивания в третьей колонке из множества колонок;

на второй стадии:

загрузку количества смеси, включающей антитело, во вторую колонку;

загрузку количества смеси в третью колонку через вторую колонку; и

выполнение стадии без загрузки, включающей по меньшей мере один из процессов промывки, стриппинга и уравнивания в первой колонке; и

на третьей стадии:

загрузку количества смеси, включающей антитело, в третью колонку;

загрузку количества смеси в третью колонку через вторую колонку; и

выполнение стадии без загрузки, включающей, по меньшей мере, один из процессов промывки, стриппинга и уравнивания во второй колонке.

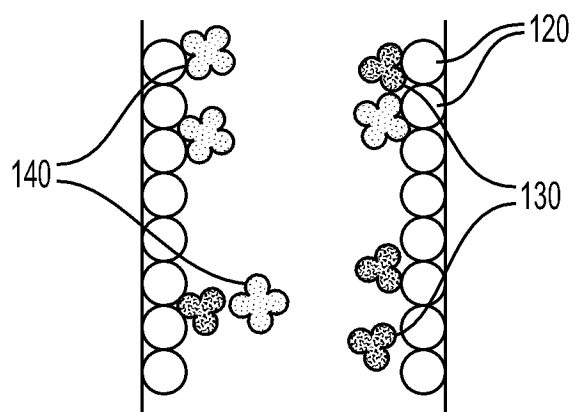
19. Способ по п. 18, дополнительно включающий непрерывное повторение первой, второй и третьей стадий в цикле, и где каждая стадия включает одновременное выполнение стадий с загрузкой и без загрузки.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что продолжительность одной из стадий загрузки конфигурируется так, чтобы быть приблизительно такой же, как продолжительность стадии без загрузки.

По доверенности

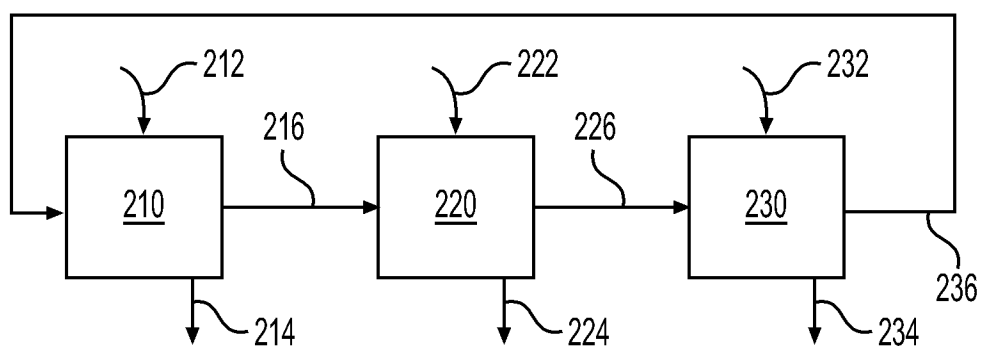
ФИГ.1

100

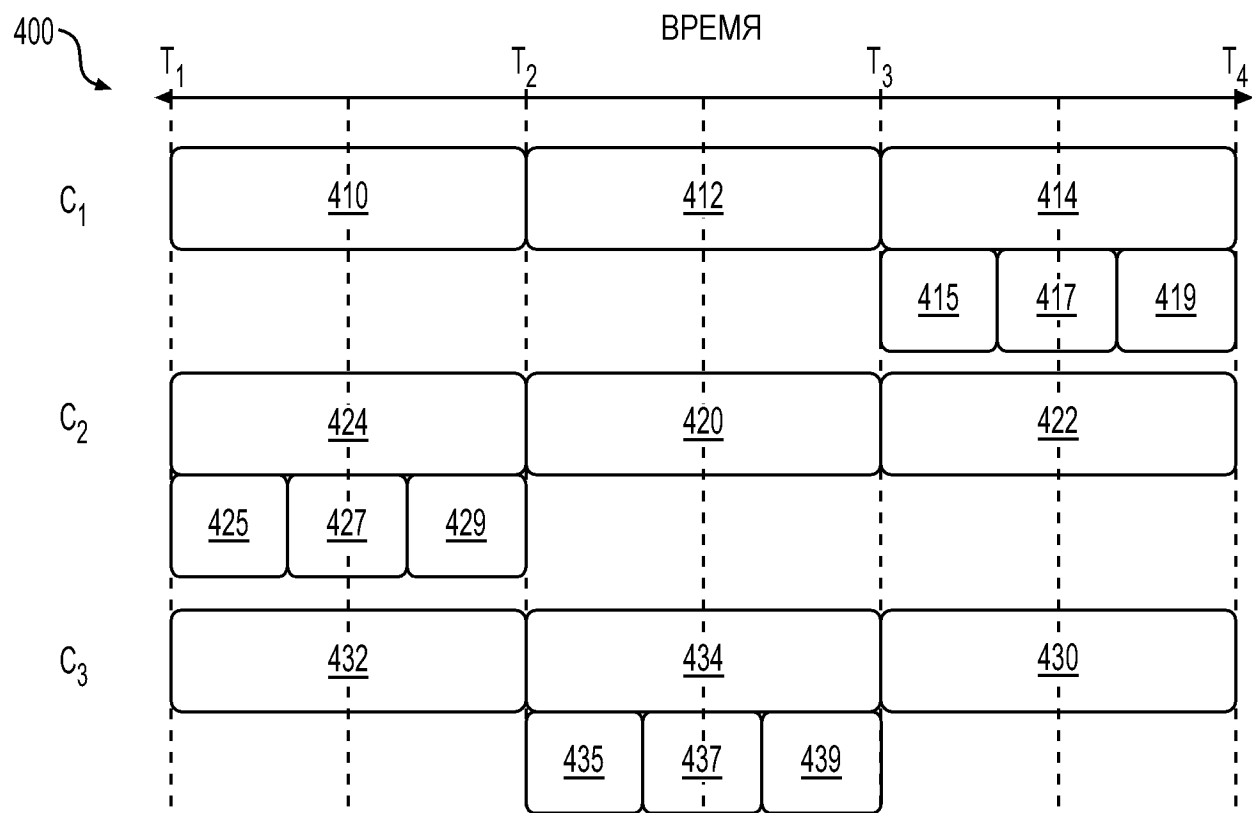


ФИГ.2

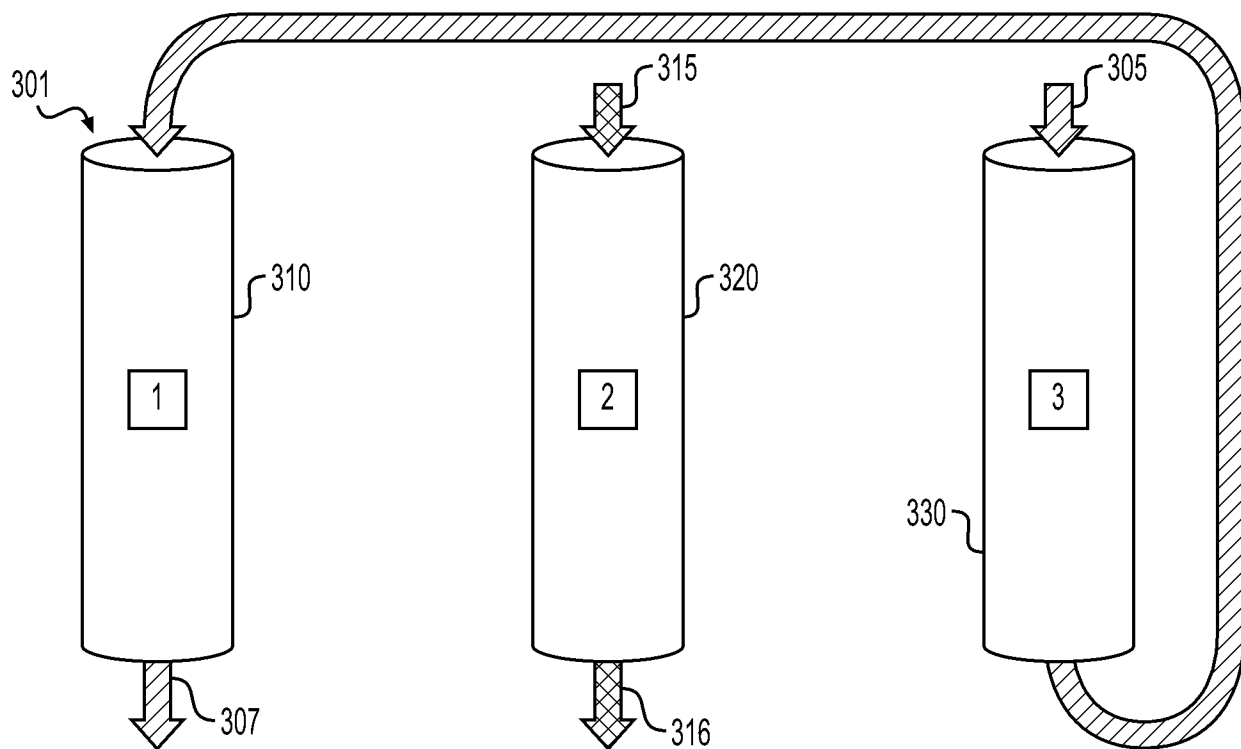
200



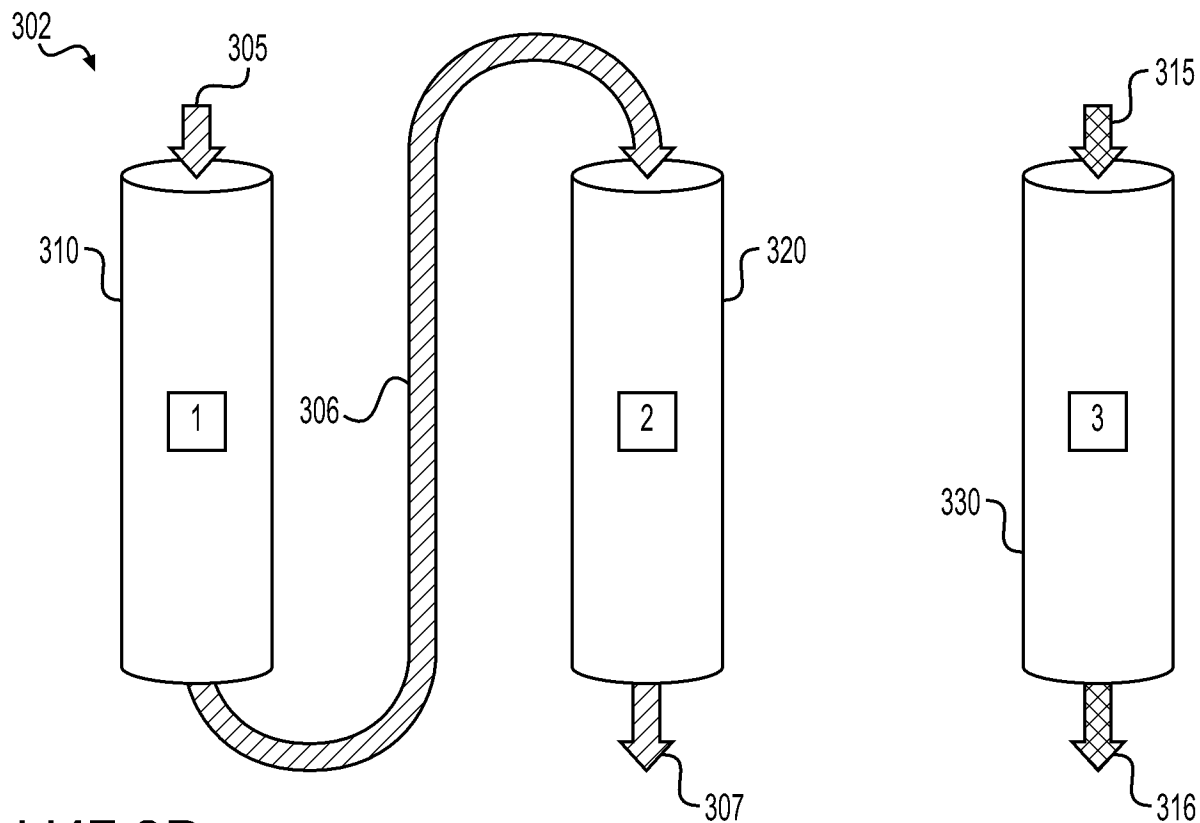
ФИГ.3А



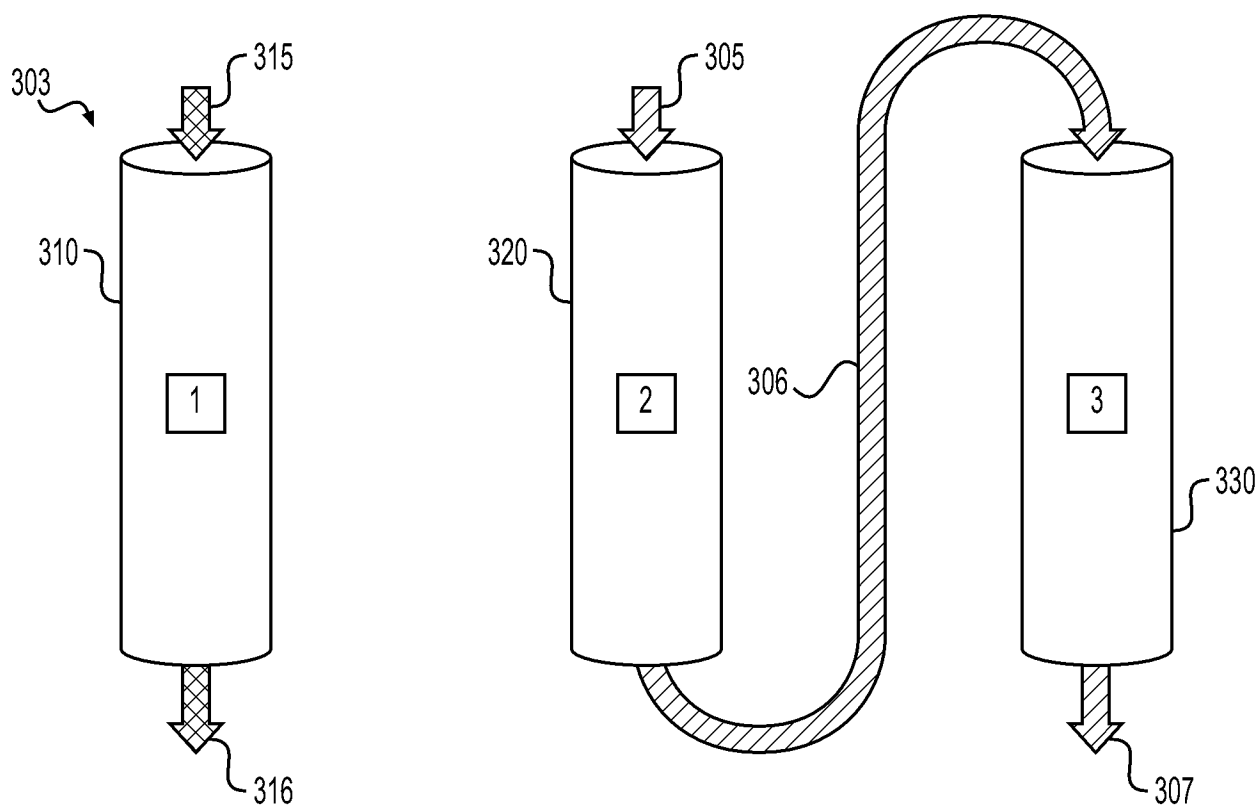
ФИГ.3В



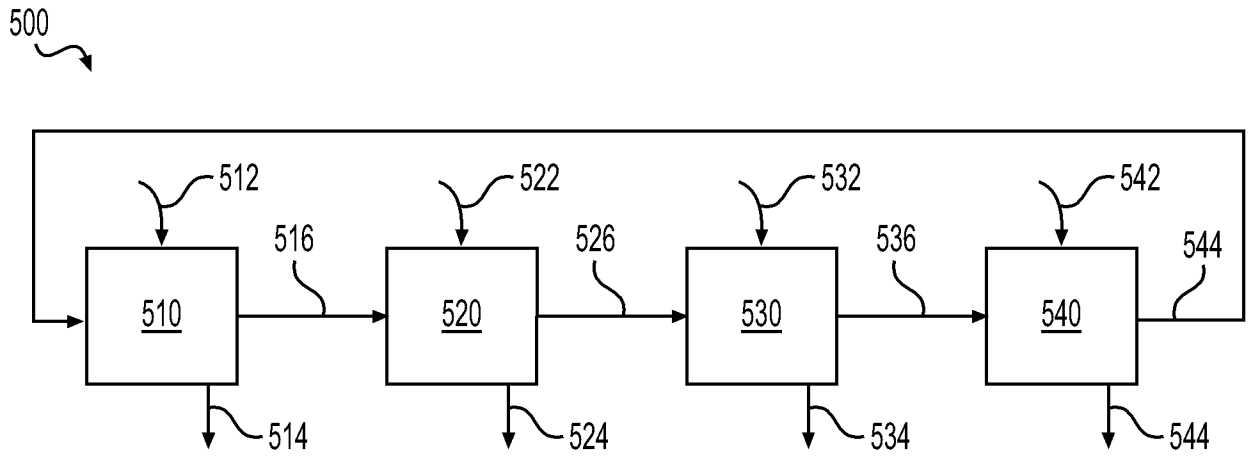
ФИГ.3С



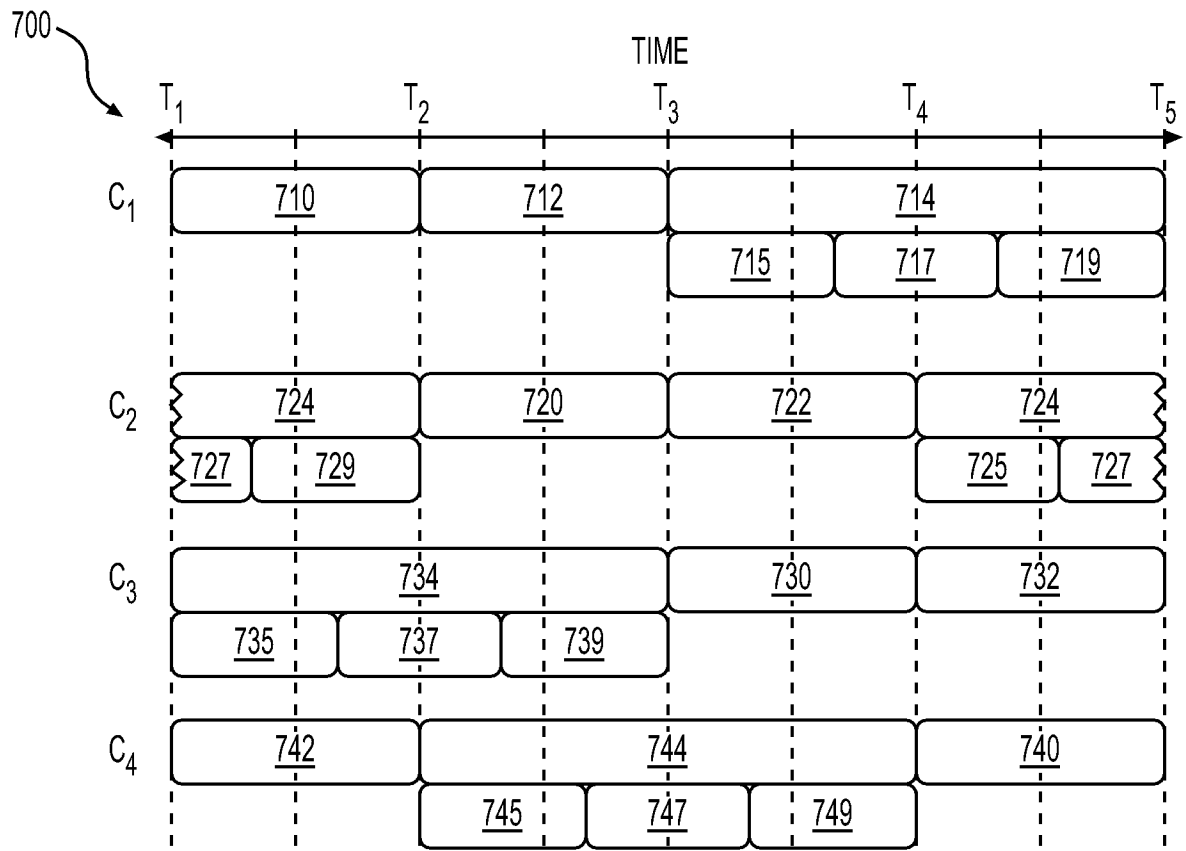
ФИГ.3D



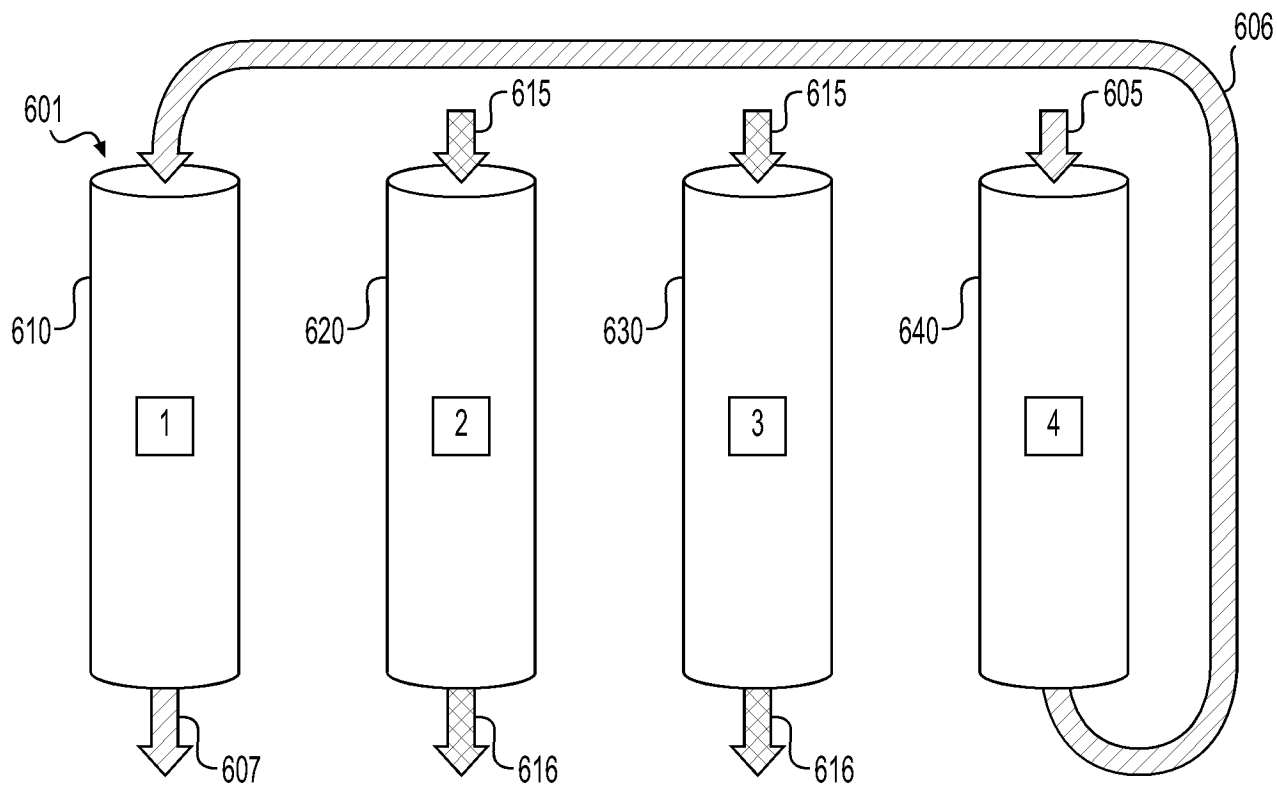
ФИГ.4



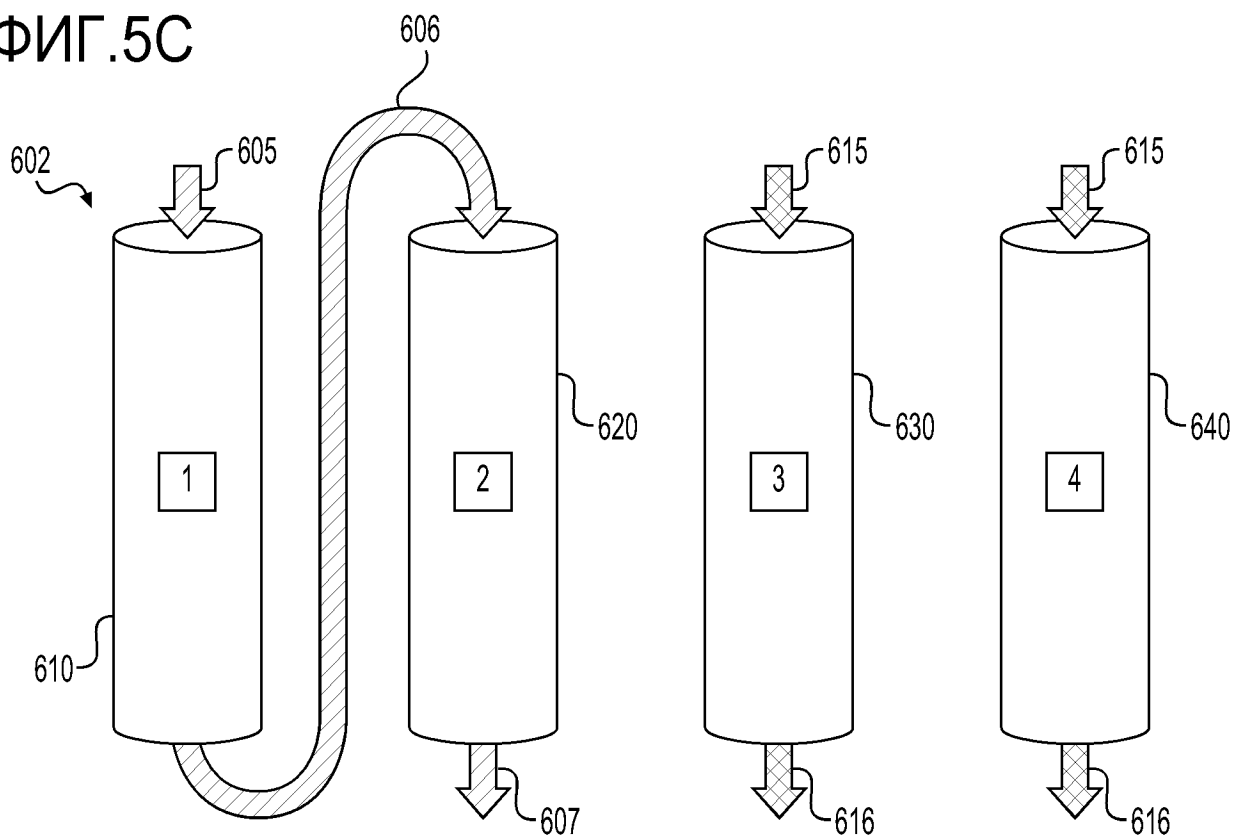
ФИГ.5А



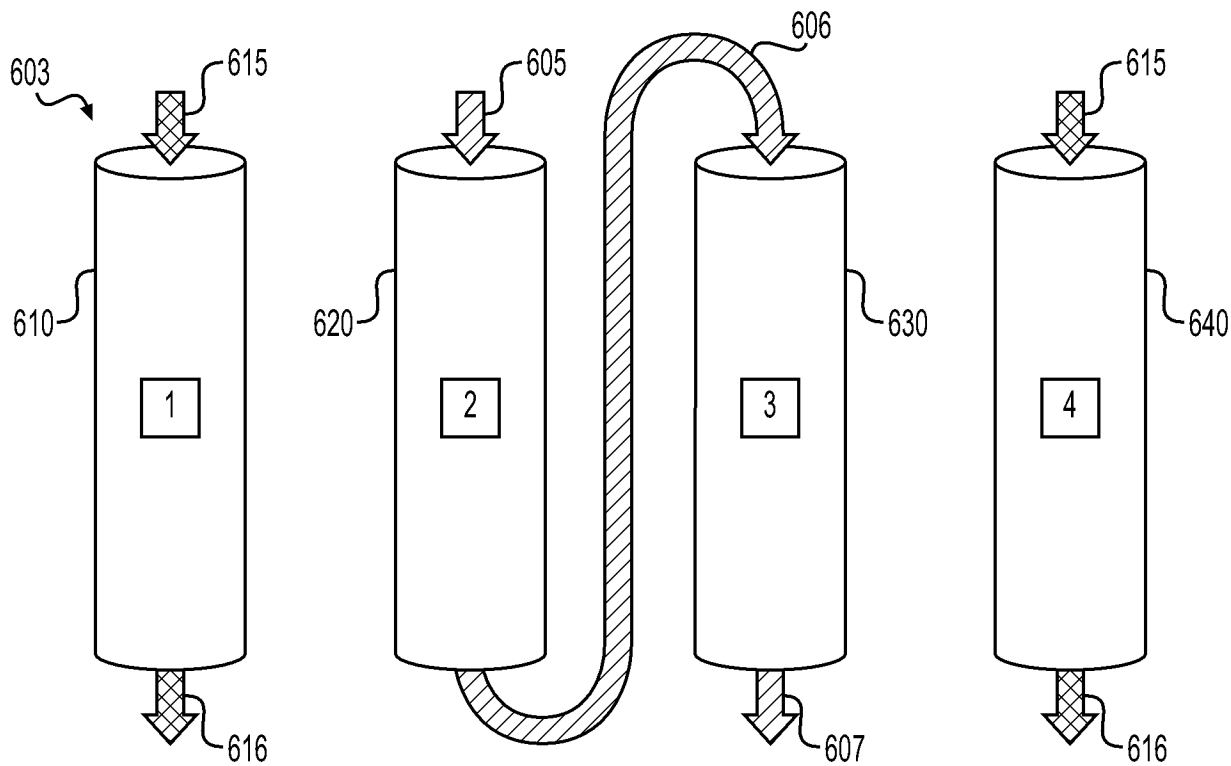
ФИГ.5В



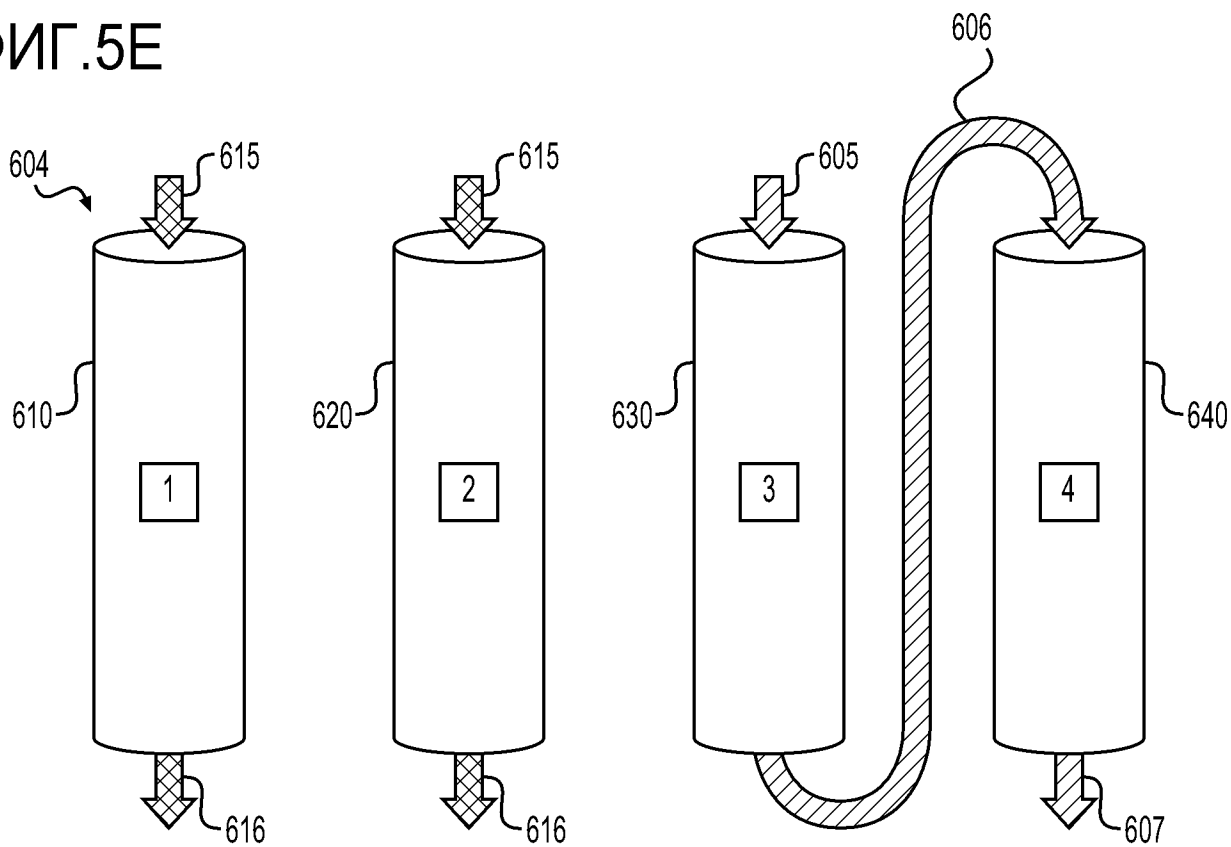
ФИГ.5С



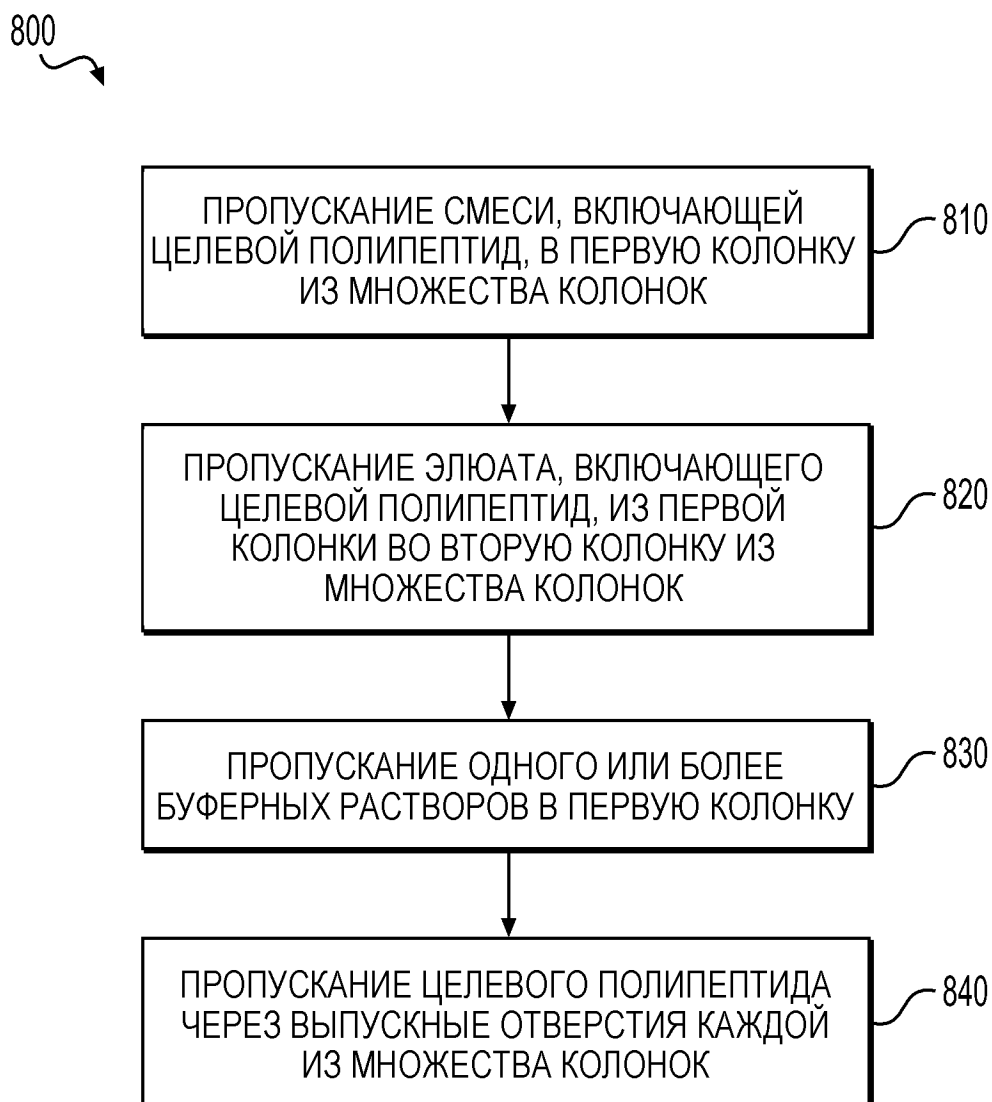
ФИГ.5D



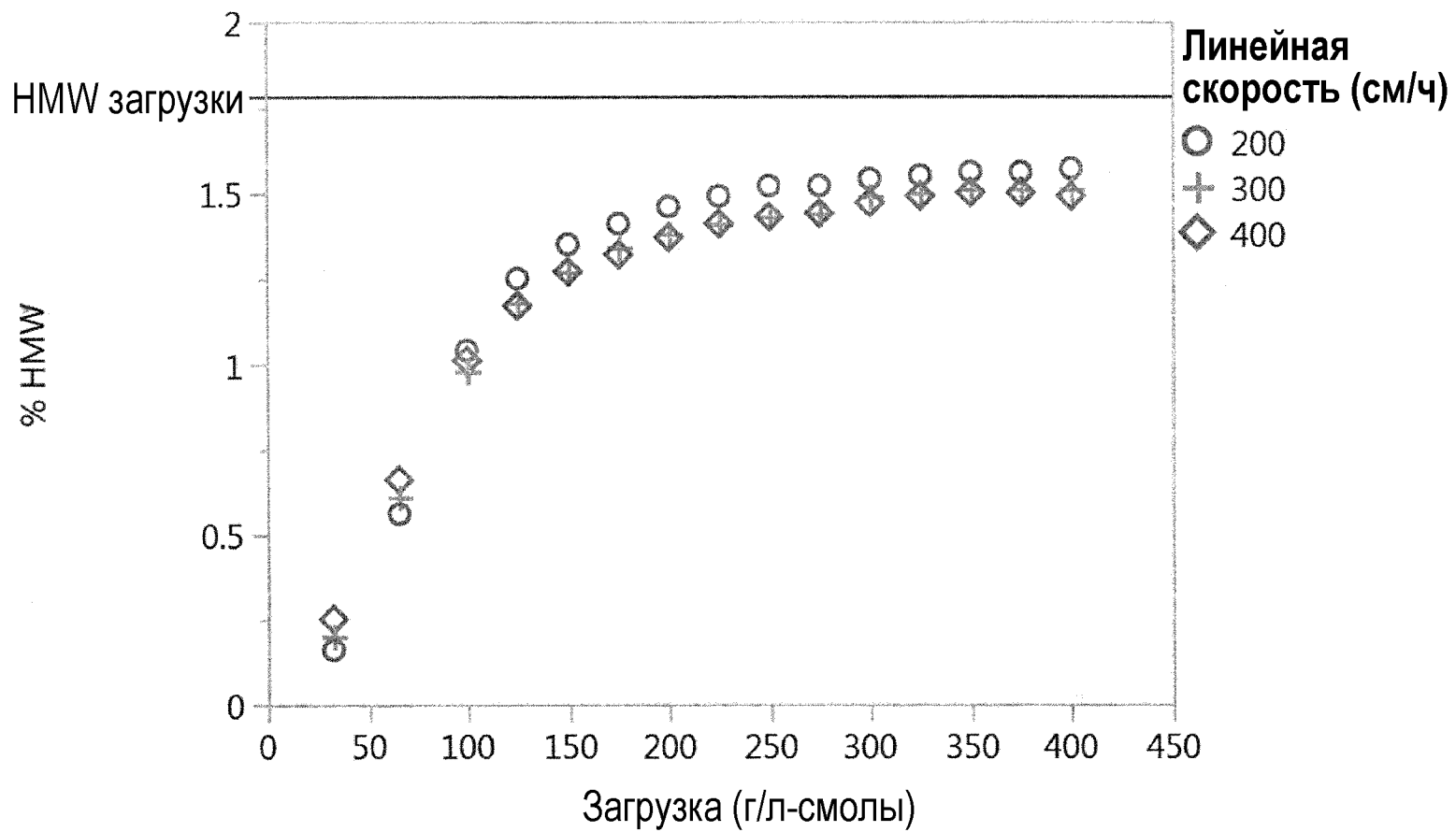
ФИГ.5E



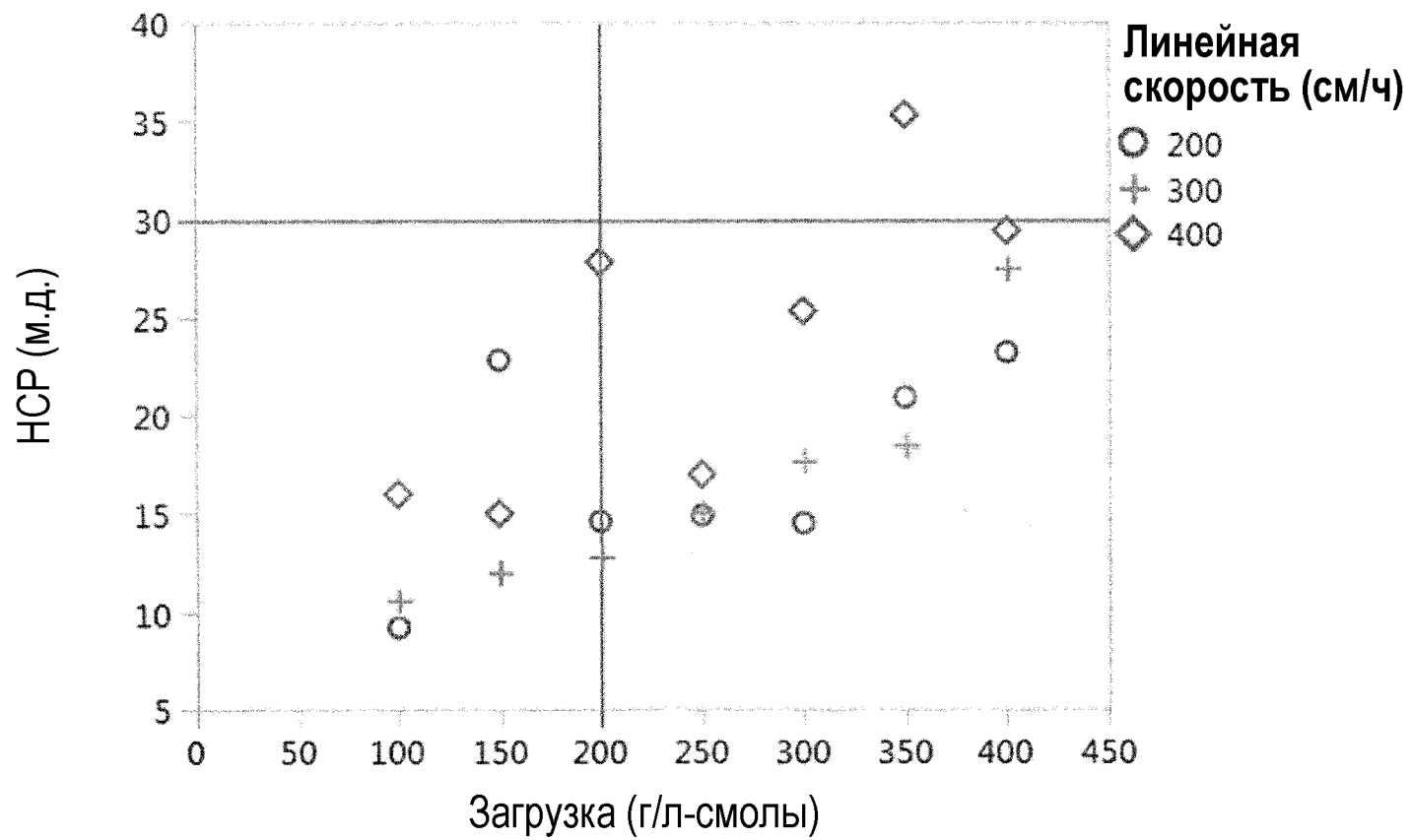
ФИГ.6



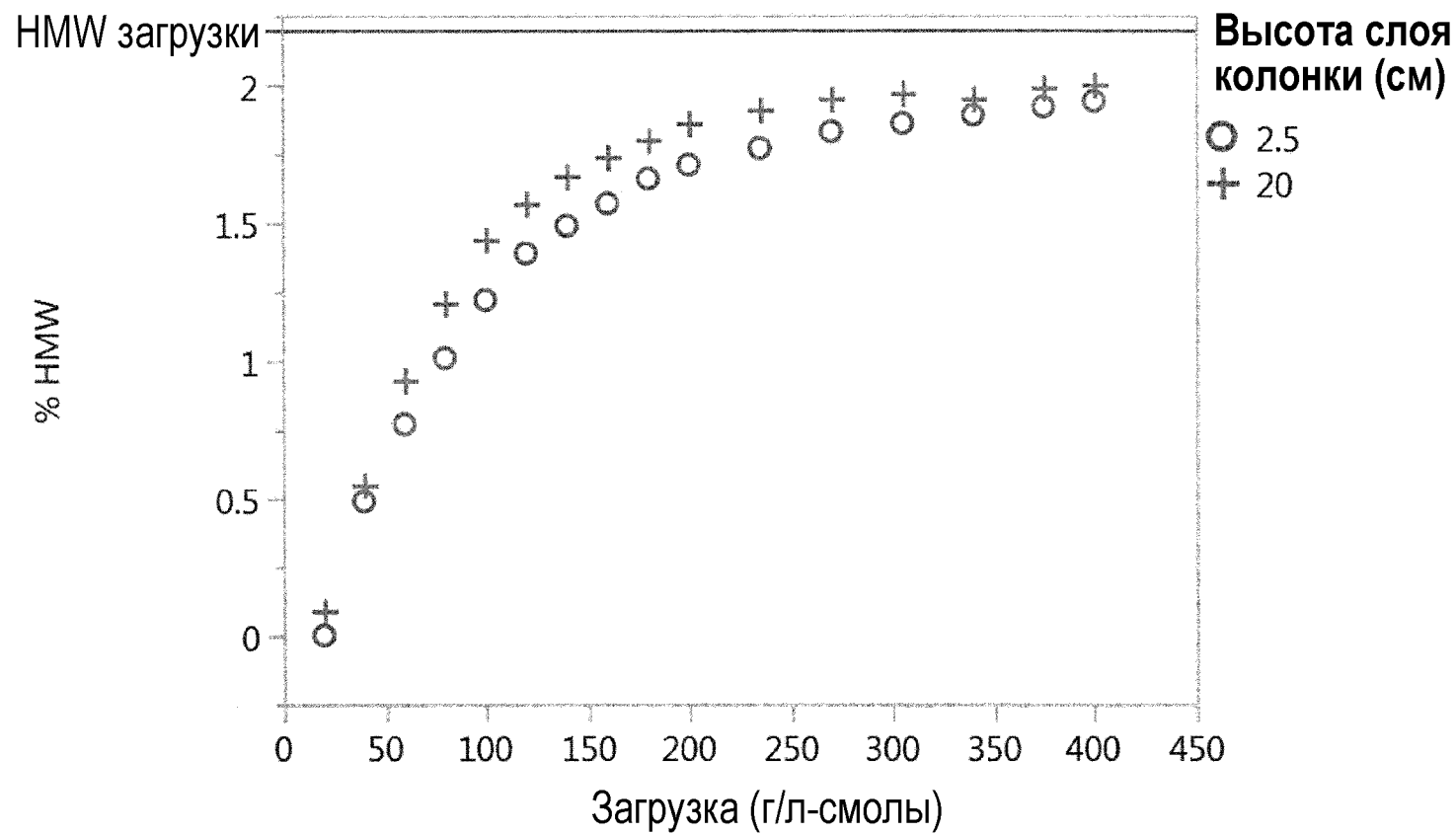
ФИГ.7А



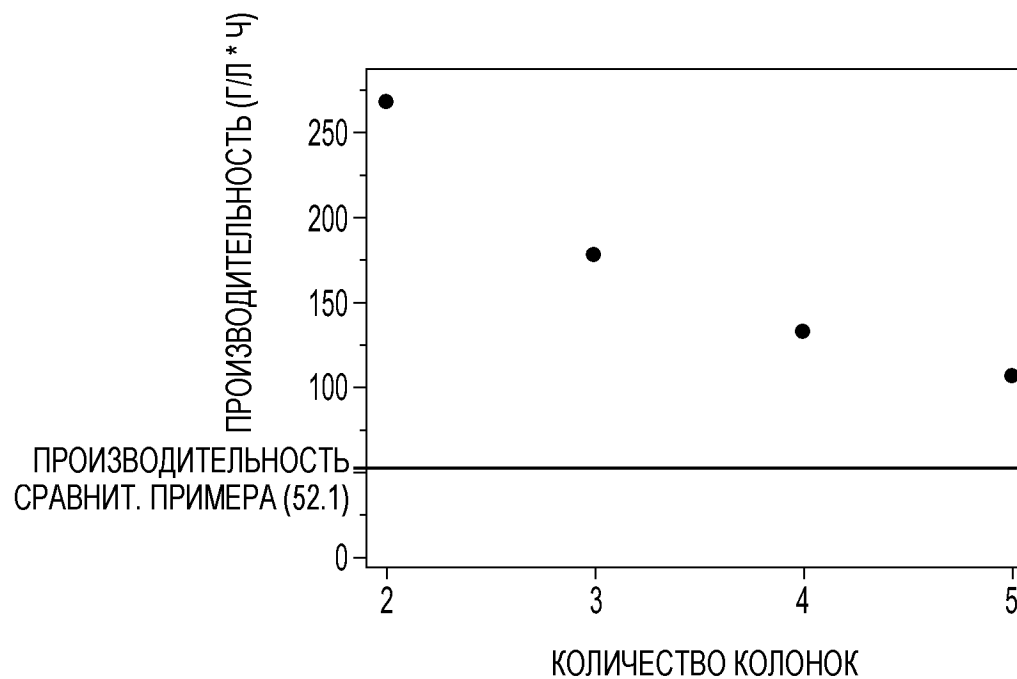
ФИГ.7В



ФИГ.7С



ФИГ.8А



ФИГ.8В

