

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291402** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.09.08

(51) Int. Cl. *A61L 2/00* (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.07

(54) **СПОСОБЫ ВИРУСНОЙ ИНАКТИВАЦИИ ЭКОЛОГИЧЕСКИ СОВМЕСТИМЫМИ
ДЕТЕРГЕНТАМИ**

(31) **62/947,276**

(32) **2019.12.12**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/063531**

(87) **WO 2021/118900 2021.06.17**

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

Ло Вэнь, О'Доннелл Шон Майкл (US)

(74) Представитель:

**Гизатуллин Ш.Ф., Христофоров А.А.,
Угрюмов В.М., Прищепный С.В.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Джермакян Р.В.
(RU)**

(57) Изобретение обеспечивает способы использования экологически безопасных детергентов в области производства рекомбинантных белков для инактивации вирусов в питательном потоке при процессе производства белков, предназначенных для введения пациенту, таких как терапевтические или диагностические белки. Изобретение дополнительно предлагает способы, в которых экологически безопасный детергент, используемый в настоящем изобретении, сохраняет качество продукта терапевтического или диагностического белка, эффективно инактивируя вирусы.

202291402

A1

A1

202291402

СПОСОБЫ ВИРУСНОЙ ИНАКТИВАЦИИ ЭКОЛОГИЧЕСКИ СОВМЕСТИМЫМИ ДЕТЕРГЕНТАМИ

Настоящее изобретение относится к области производства рекомбинантного белка. В частности, настоящее изобретение обеспечивает способ инактивации вирусов при подаче питательных веществ в процессе производства белков, предназначенных для введения пациенту, таких как терапевтические или диагностические белки. Настоящее изобретение дополнительно предлагает способ, в котором экологически безопасный детергент эффективно обеспечивает противовирусную активность и поддерживает качество терапевтического или диагностического белка. Способы обеспечивают важные преимущества при производстве биологических продуктов в реальном мире, например, по сравнению со способами, использующими Тритон X-100, и/или способами, в которых не используется детергент.

Детергенты являются ключевыми реагентами в процессе производства терапевтических или диагностических белков для обеспечения безопасности конечного биологического продукта. Вирусная контаминация конечного биологического продукта может иметь серьезные клинические последствия, возникающие, например, в результате контаминации исходных клеточных линий или адвентивного введения вирусов на различных стадиях производства. Таким образом, детергенты используются для удаления вирусных контаминантов, присутствующих в сырьевом потоке в процессе производства терапевтического или диагностического белка. После очистки желаемого белка ростовая среда и буферы, используемые в процессе производства и очистки продукта, инактивируются и сбрасываются в сточные воды. Однако, такие отходы содержащие детергенты, которые используются в процессе производства и очистки, могут вызвать экологические проблемы, согласно системе оценок рисков для окружающей среды (ERA) для детергентов.

Современные способы инактивации вирусов в процессе производства биопродуктов, таких как терапевтические или диагностические белки, в значительной степени зависят от использования детергента Тритон X-100. Тритон X-100 представляет собой полиоксиэтиленовый эфир, который обычно обеспечивает надежную инактивацию вируса с оболочкой, превышающую 4 log, в различных экспериментальных условиях. Однако 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенол (также известный как 4-трет-октилфенол), продукт разложения Тритон X-100, был идентифицирован как потенциальный токсин окружающей среды для живой природы, включающий возможные эстрогенные эффекты. Таким образом, желательным является удаление 4-трет-октилфенола из потоков отходов, но потребует сложных, длительных и дорогостоящих действий. По этой причине, из-за

проблем с токсичностью комитет EU-REACH проголосовал за добавление Тритон X-100 в Приложение XIV - список запрещенных веществ в ЕС, запрещающий использование Тритон X-100 в производстве рекомбинантных белков после 2021 года. Альтернативные агенты для замены Тритон X-100 в производстве биопрепаратов недостаточно хорошо разработаны. Как следствие, существует острая, оперативная потребность в способах эффективной инактивации вирусов при процессе производства биологических препаратов, таких как терапевтические или диагностические белки, которые менее токсичны для окружающей среды, чем способы, с использованием Тритон X-100.

Экологически совместимые альтернативы Тритон X-100 для инактивации вирусов, особенно вирусов с оболочкой, в процессе производства белка были исследованы в WO 2019/121846, а также в WO 2015/073633. Однако, эффекты использования различных детергентов для инактивации вирусов могут отличаться. Некоторые детергенты не подходят для использования в производственном процессе из-за их нерастворимости или их трудно удалить из потока сырья. Кроме того, некоторые детергенты увеличивают мутность и/или пенообразование потока питательных веществ, что требует дополнительных мер по снижению мутности и/или пенообразования потока сырья. Другие детергенты не так эффективны в широком диапазоне температур и значениях pH, а также требуют более высоких концентраций для инактивации вирусов. Комбинация этих вариантов может привести к дополнительным затратам и увеличению времени в процессе производства белка. Также, эффективность многих детергентов при производстве исходного потока белков различных типов и размеров недостаточна.

Таким образом, сохраняется потребность в способах эффективной инактивации вирусов при производстве терапевтических или диагностических белков различных типов и размеров с использованием экологически безопасного детергента, который эффективно инактивирует различные вирусы с оболочкой как при низких, так и при высоких температурах и диапазонах pH, в разумные сроки и при рациональных концентрациях такого(их) детергента(ов), и/или является водным, растворимым и/или легко растворимым, и/или не влияет на мутность питательного потока, что делает его пригодным для промышленного производства. В дополнение к этому, предпочтительно, чтобы детергент был в достаточной степени удален из питательного потока продукта (для соответствия нормативным требованиям) на этапе очистки без добавления сложных, длительных и/или дорогостоящих мер, и чтобы сохранялось качество продукта терапевтического или диагностического белка.

Соответственно, настоящее изобретение направлено на решение одной или нескольких из вышеперечисленных проблем путем предоставления методов инактивации

вирусов в процессе производства терапевтических или диагностических белков.

Удивительно, но способы данного изобретения обеспечивают экологически безопасные детергенты, которые высокоэффективны при инактивации вирусов в широком диапазоне температур и/или значениях рН при производстве различных типов белков, в разумные
5 сроки и в рациональных диапазонах концентрации без токсического воздействия на окружающую среду. На удивление, способы текущего изобретения дополнительно обеспечивают использование экологически безопасных детергентов, которые легко достигают полной инактивации вирусов, по меньшей мере, сравнимой с Тритон-Х 100, и в которых экологически безопасные детергенты не обладают известной токсичностью в
10 используемых концентрациях для окружающей среды. К тому же, способы изобретения обеспечивают полную вирусную инактивацию с логарифмическим коэффициентом снижения вирусной нагрузки («LRF») от около более 3 до около более 6 чем в диапазоне температур около 4° С до, по меньшей мере, 30 ° С и в широком диапазоне рН, при производстве терапевтических или диагностических белков различных типов и размеров в
15 умеренные сроки с надлежащим диапазоном концентраций без воздействия на окружающую среду. Удивительно, но использования способов текущего изобретения также позволило достичь вирусной инактивации во всех вирусах с оболочкой, протестированных в диапазоне температур начиная от около 4°С С до по меньшей мере 30 ° С в пределах от более чем 1 до около 180 минут, в широком диапазоне рН, при
20 производстве терапевтических или диагностических белков различных типов и размеров в пределах уместного диапазона концентраций.

Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает способ инактивации вирусов в потоке питательных веществ, включающий добавление в исходный поток детергентов, которые совместимы с окружающей средой. Детергенты, которые были использованы в
25 способах данного изобретения, представляют собой водные растворы, которые незначительно влияют на мутность потока сырья и, таким образом, пригодны для крупномасштабного производства терапевтических или диагностических белков. Далее, детергенты используемые в текущем изобретении удаляются в достаточной степени и эффективно (в соответствии с нормативными требованиями) на стадии очистки с
30 предварительной стадией фильтрации или без нее. Кроме того, не требуется никаких сложных, длительных и/или дорогостоящих действий по удалению детергентов из потока сырья. В дополнение, детергенты, которые использовались в текущих способах изобретения, не оказывают отрицательного влияния на конечное качество
35 терапевтического или диагностического белка. Детергенты, используемые в способах по настоящему изобретению, эффективно инактивируют вирусы с оболочкой в широком

диапазоне температур и значений pH без токсического воздействия на окружающую среду.

В соответствии с одним аспектом изобретения, предоставлен способ для инактивации вирусов детергентом на основе алкилглюкозида в потоке сырья при процессе производства терапевтических или диагностических белков. В соответствии с другим аспектом изобретения, детергент, используемый в способах изобретения, содержит более чем около 40% ундецил алкил глюкозида. В другом аспекте изобретения, спользуемый детергент содержит более чем около 40% ундецил алкил глюкозида и менее чем около 20% других алкил глюкозидов. В еще одном составе изобретения, детергент содержит более чем около 40% ундецил алкил глюкозида и менее чем около 10% децил алкилглюкозида. В еще одном варианте осуществления изобретения, детергент содержал от около 40% до около 60% ундецил алкил глюкозида. Также в дополнительном варианте осуществления изобретения, используемый в способах детергент содержит от около 53% до около 57% ундецил алкил глюкозида. В еще одном аспекте изобретения, детергент данного изобретения содержит более чем около 50% ундецил алкил глюкозида. В другой модификации, детергент, используемый в способах изобретения, содержит от около 40% до около 60% ундецил алкил глюкозида и менее чем около 20% других алкилглюкозидов. В еще одном варианте, детергент изобретения содержит от около 40% до около 60% ундецил алкил глюкозида и менее чем около 10% децил алкилглюкозида. При другом варианте осуществления, в способе данного изобретения применялся детергент, содержащий от около 53% до около 57% ундецил алкил глюкозида и менее около 20% других алкилглюкозидов. В еще одном варианте осуществления, детергент используемый в способах по настоящему изобретению содержит от около 53% до около 57% ундецил алкил глюкозида и менее около 10% децил алкилглюкозида. В еще одном варианте осуществления способов данного изобретения, детергент содержит ноль или менее около 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% других алкил глюкозидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения другие алкил глюкозиды включают смесь нонил алкил глюкозида, децил алкил глюкозида и/или лаурил алкил глюкозида. В другом варианте в способах изобретения использовался детергент, содержащий ноль или менее чем около 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10% децил алкил глюкозида. В одном варианте применения изобретения используемый детергент содержит ундецил алкил глюкозид.

В одном варианте осуществления изобретения используемый детергент, имеет регистрационный номер CAS 98283-67-1. Другие варианты подразумевали использование детергента, который представляет собой SIMULSOL™ SL 11W. В другом варианте

SIMULSOL™ SL 11W, используемый в способах настоящего изобретения содержит более чем около 40% ундецил алкил глюкозида. В еще одном варианте применения, SIMULSOL™ SL 11W, из числа в способов данного изобретения, содержит от около 40% до около 60% ундецил алкил глюкозида. В еще одном варианте, SIMULSOL™ SL 11W, используемый в способах, содержит от около 53% до около 57% ундецил алкил глюкозида. В дополнительном применении данного изобретения, SIMULSOL™ SL 11W, содержит от около 40% до около 60% ундецил алкил глюкозида и менее чем около 10% децил алкилглюкозида. Еще один вариант, используемый в способах данного изобретения, подразумевал использование SIMULSOL™ SL 11W, который содержит от около 53% до около 57% ундецил алкил глюкозида и менее чем около 10% децил алкил глюкозида. В других вариантах применения, SIMULSOL™ SL 11W содержал ноль или менее чем около 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% других алкил глюкозидов. В вариантах осуществления изобретения другие алкил глюкозиды в составе SIMULSOL™ SL 11W, содержали смесь нонил алкил глюкозида, децил алкил глюкозида и/или лаурил алкил глюкозида. В дополнительных вариантах, в способах данного изобретения использовался SIMULSOL™ SL 11W, содержащий ноль или менее чем около 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10% децил алкил глюкозида. В одном из вариантов способов данного изобретения, SIMULSOL™ SL 11W представляет собой ундецил алкил глюкозид.

Еще один способ осуществлялся с использованием SIMULSOL™ SL 82. В другом варианте применялся SIMULSOL™ SL 82, содержащий от около 40% до около 60% ундецил алкилглюкозида.

В другом варианте осуществления, изобретение обеспечивает способы инактивации вирусов в потоке питательных веществ, включало добавление к потоку экологически безопасного детергента с конечной концентрацией от около 0,05% мас./мас. до около 1% мас./мас., при этом экологически безопасный очищающий компонент включает более чем около 40% децил алкилглюкозида. В некоторых вариантах осуществления, используемый в методах текущего изобретения детергент добавляют к питательному потоку до уровня конечной концентрации от около 0,1% мас./мас. до около 1% мас./мас. При некоторых вариантах, использованный детергент добавляют к потоку питательных веществ до конечной концентрации от 0,1% мас./мас. до 1% мас./мас. При некоторых способах данного изобретения, детергент добавляют к потоку питательных веществ до достижения конечной концентрации от около 0,3% мас./мас. до около 1% мас./мас. В некоторых вариантах осуществления детергент, используемый в способах по настоящему изобретению, добавляют к питательному потоку до достижения конечной

концентрации от 0,3% мас./мас. до 1% мас./мас. В некоторых вариантах, используемый в способах по настоящему изобретению, детергент добавляют к потоку исходных материалов до конечной концентрации от около 0,1% мас./мас. до около 0,3% мас./мас. В некоторых примерах осуществления текущего изобретения, детергент добавляют к потоку исходных материалов до уровня конечной концентрации от 0,1% мас./мас. до 0,3% мас./мас. При других способах осуществления текущего изобретения, детергент добавляют к питательному потоку до конечной концентрации около 0,3% мас./мас. При других вариантах осуществления, используемый в способах детергент добавляют к потоку сырья до конечной концентрации 0,3%. В еще одном варианте осуществления, детергент, используемый в способах по данному изобретению, добавляют в сырьевой поток до конечной концентрации по массе около 0,01%, около 0,05%, около 0,1%, около 0,2%, около 0,3%, около 0,4%, около 0,5%, около 0,6%, около 0,7%, около 0,5%, около 0,9% или около 1%.

В некоторых вариантах изобретения, температура потока сырья составляет от около 4 ° С до около 30 ° С. В других вариантах осуществления изобретения, температура поток сырья составляет от 4 ° С до 30 ° С. В еще других вариантах осуществления, температура потока питательных веществ составляет от около 15 ° С до около 30 ° С. В другом варианте, питательный поток имеет температуру от около 15 ° С до около 20 ° С. В еще других вариантах осуществления изобретения, температура потока исходных материалов составляет от около 4 ° С, около 15 ° С, около 18 ° С, около 20 ° С, около 25 ° С или около 30 ° С.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, значение pH сырьевого потока от около 5,5 до около 8,0. В других вариантах осуществления изобретения, значение pH потока исходных материалов было от 5,5 до 8,0. В еще других вариантах осуществления изобретения, исходный поток имел pH от около 5,5, около 6,0, около 6,5, около 7,0, около 7,5 или около 8,0.

В некоторых вариантах осуществления, сырьевой поток инкубируют с детергентом в течении времени от менее около 1 минуты до около 180 минут. При другом осуществлении, сырьевой поток инкубируют с детергентом в течении около от около 6 до около 180 минут. При других способах, сырьевой поток инкубируют с детергентом в течении около от 10 до приблизительно 180 минут. Также, при других вариантах, питательный поток инкубируют с детергентом в течении от около 120 до около 180 минут. В других вариантах осуществления, питательный поток веществ инкубируют с детергентом на протяжении около 180 минут. При других вариантах осуществления, сырьевой поток инкубируют с детергентом в течении приблизительно 120 минут. В

других вариантах осуществления, сырьевой поток инкубируют с детергентом в течение около 60 минут. В других вариантах осуществления сырьевой поток инкубируют с детергентом в течении около 1, около 5, около 6, около 10, около 15, около 30, около 45, около 60, около 75, около 90, около 105, около 120, около 135, около 150, около 165 или 5 около 180 минут.

В вариантах осуществления изобретения, детергент в потоке питательных веществ имеет вирусную LRF более чем около 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, очищающее средство в питательном потоке имеет LRF вируса более чем около 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения, детергент в питательном 10 поток имеет LRF вируса более чем около 5. В некоторых вариантах применения изобретения, детергент в потоке исходных материалов имеет LRF вируса более чем около 6. В некоторых вариантах осуществления текущего изобретения, детергент в потоке питательных веществ имеет LRF вируса более чем около 7. В некоторых вариантах осуществления изобретения детергент в потоке сырья обеспечивает полную инактивацию 15 вирусов. В еще других вариантах осуществления изобретения детергент в потоке исходных материалов имеет вирусную LRF более около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6 или около 7.

При некоторых способах осуществления изобретения, вирус представляет собой оболочечный вирус. При некоторых вариантах осуществления, вирус представляет собой 20 ретровирус, герпесвирус, флавивирус, поксвирус, гепаднавирус, вирус гепатита, ортомиксовирус, парамиксовирус, рабдовирус или тогавирус.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ инактивации вируса в сырьевом потоке включает стадию инкубации питательного потока и экологически безопасного детергента в течение от около 15 минут до около 180 минут при температуре 25 от около 4°C до около 30°C. Значение pH было от около 5,5 до около 8,0, при этом детергент добавляют к потоку сырья в конечной концентрации от около 0,1% мас./мас. до около 1,0% мас./мас., и при этом детергент в питательном потоке имеет вирусный LRF больше, чем около 2.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ инактивации вируса в сырьевом потоке включает стадию инкубации питательного потока и экологически 30 безопасного детергента в течение от около 6 минут до около 180 минут при температуре от около 4°C до около 30°C. Значение pH было от около 5,5 до около 8,0, при этом детергент добавляют к потоку сырья в конечной концентрации от около 0,3% мас./мас. до около 1,0% мас./мас., и при этом детергент в питательном потоке имеет вирусный LRF 35 больше, чем около 4.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение предоставляет способ инактивации вируса в сырьевом потоке включающий стадию инкубации питательного потока и экологически безопасного детергента в течении около 180 минут при температуре от около 4°C до около 30°C, а также при значении рН от около 5,5 до около 8,0, при этом детергент добавляют к потоку сырья в конечной концентрации от около 0,1% мас./мас. до около 1,0% мас./мас., и при этом детергент в питательном потоке имеет вирусный LRF больше, чем около 5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ инактивации вируса в сырьевом потоке включает стадию инкубации питательного потока и экологически безопасного детергента в течении от около 60 минут до около 180 минут при температуре от около 4°C до около 30°C, при значении рН от около 5,5 до около 8,0, при этом детергент добавляют к потоку сырья в конечной концентрации от около 0,3% мас./мас., а также детергент в питательном потоке имеет вирусный LRF больше, чем около 5.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ инактивации вируса в сырьевом потоке включает стадию инкубации питательного потока и экологически безопасного детергента в течении от около 120 минут до около 180 минут при температуре от около 4°C до около 30°C, при значении рН от около 5,5 до около 8,0, при этом детергент добавляют к потоку сырья в конечной концентрации около 0,3% мас./мас., а также детергент в питательном потоке имеет вирусный LRF больше, чем около 6.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение обеспечивает инактивацию вируса в питательном потоке, при этом поток питательных веществ включает собранную культуральную жидкость клеток, пул улавливания или пул извлеченных продуктов. В некоторых вариантах осуществления, изобретение обеспечивает способы инактивации вируса в потоке питательных веществ, где поток включает собранную культуральную жидкость клеток, пул улавливания или пул выделенных продуктов, и где пул улавливания или пул выделенных продуктов представляет собой пул аффинной хроматографии. В еще одном варианте, пул улавливания или пул извлеченных продуктов представляет собой пул белка А, пул белка G или пул белка L. В других вариантах осуществления пул улавливания или пул извлеченных продуктов представляет собой пул хроматографии смешанного режима.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение предлагает способы, где исходный поток, инкубированный с детергентом, не подвергают стадии фильтрации. В некоторых вариантах, изобретение предоставляет способы при которых питательный поток, инкубированный с детергентом, подвергают минимум одной стадии фильтрации.

В других вариантах осуществления, изобретение предлагает способы, при которых поток

сырья инкубируют с детергентами подвергают по меньшей мере одной, или по меньшей мере двум, или по меньшей мере трем стадиям фильтрации. В некоторых вариантах, исходный поток, инкубированный с детергентом, подвергают первому этапу фильтрации с фильтром 0,22 мкм, за которым следуют второй и третий этапы фильтрации с PVDF

5 фильтром 0,45 мкм. Согласно конкретному варианту осуществления, метод изобретения использует фильтрующую мембрану на первой, и/или на второй, и/или третьей стадиях фильтрации, включает, но не ограничен поливинилиденфторидом, (PVDF), ацетатом целлюлозы, нитратом целлюлозы, политетрафторэтиленом (PTFE, тефлон),

10 поливинилхлоридом, полиэфирсульфоном или другими фильтрующими материалами, подходящими для применения в производственной среде в соответствии с cGMP. Согласно предпочтительному варианту, изобретение предлагает способы, при которых мембрана фильтра как на втором, так и на третьем этапе фильтрации содержит PVDF. Согласно специфическому варианту осуществления, изобретение предоставляет метод при котором фильтрующая мембрана имеет размер пор около 0,45 мкм как на второй, так

15 и на третьей стадии фильтрации. Согласно предпочтительному варианту осуществления, фильтрующая мембрана на второй и третьей стадиях фильтрации является мембраной из PVDF с размером пор 0,45 мкм. В специфическом варианте применения, изобретение использует способ при котором фильтрующая мембрана имеет размер пор около 0,22 мкм на первой стадии фильтрации.

20 При некоторых вариантах осуществления, изобретение предлагает способы, в которых питательный поток, инкубированный с детергентом, подвергают аффинной хроматографии. В некоторых примерах выполнения, аффинная хроматография представляет собой аффинную колонку с белком А.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение предлагает способы, в

25 которых сырьевой поток содержащий детергент, подвергается воздействию хроматографической колонки. В некоторых вариантах, хроматографическая колонка представляет собой одну или несколько аффинных колонок, ионообменных колонок, колонок гидрофобного взаимодействия, колонок с гидроксипатитом или колонок смешанного типа. В некоторых вариантах осуществления, колонка для аффинной

30 хроматографии представляет собой колонку с белком А, колонку с белком G или колонку с белком L. В других вариантах осуществления, колонка для ионообменной хроматографии представляет собой анионообменную колонку или катионообменную колонку. В некоторых вариантах, изобретение предлагает способы, при которых детергент в достаточной степени удаляется из конечного продукта. В некоторых способах

осуществления изобретения, обеспечивается полное удаление детергента из конечного продукта.

В некоторых вариантах осуществления, изобретение обеспечивает способы инактивации вируса в питательном потоке, при этом способ включает стадию добавления детергента в указанный исходный поток и инкубацию детергента, а также питательного потока, в котором терапевтический или диагностический белок представляет собой антитело, гибридный белок Fc, иммуноадгезин, фермент, фактор роста, рецептор, гормон, регуляторный фактор, цитокин, антиген или связывающий агент. В дополнительных вариантах осуществления, антитело является собой моноклональное антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело, человеческое антитело, биспецифическое антитело или фрагмент антитела. В некоторых вариантах, терапевтический или диагностический белок продуцируется в клетках млекопитающих. В некоторых примерах осуществления, клетка млекопитающего представляет собой клетки яичника китайского хомячка (СНО) или клетки почки детеныша хомяка (ВНК), клетки мышины гибридомы или клетки мышины миеломы. В некоторых вариантах, терапевтический или диагностический белок продуцируется в бактериальных клетках. В других вариантах осуществления, терапевтический или диагностический белок продуцируется в дрожжевых клетках.

В нескольких примерах осуществления изобретения, питательный поток содержит детергент, используемое в методах данного изобретения, и имеет низкую мутность. В некоторых вариантах осуществления, добавление детергента к потоку сырья не приводит к значительному увеличению или изменению мутности потока питательных веществ. В другом варианте, очищающее средство, используемое в способах изобретения, не влияет на качество продукта терапевтического или диагностического белка.

В некоторых вариантах, детергент, используемый в способах изобретения, содержит консервант и/или стабилизатор. Для некоторых примеров осуществления, стабилизатор представляет собой монопропиленгликоль. В некоторых вариантах осуществления, стабилизатор в детергенте составляет от около 1% до около 5%. В дополнительном варианте осуществления изобретения, стабилизирующий агент, используемый в способах изобретения, не влияет на свойства детергента инактивировать вирусы и не влияет на качество продукта терапевтического или диагностического белка. В дополнительном варианте осуществления изобретения, монопропиленгликоль не влияет на свойства детергента инактивировать вирусы и не влияет на качество продукта терапевтического или диагностического белка.

В вариантах осуществления изобретения, используемый в способах изобретения детергент, является экологически безопасным. При одном варианте осуществления

изобретения, использовался детергент из способов изобретения, который не содержит и не образует 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенол (он же 4-трет-октилфенол). В других вариантах осуществления, детергент используемый в способах по изобретению, не содержит и не образует пероксид. В других вариантах осуществления изобретения, используемый в способах изобретения детергент, является биоразлагаемым.

В одном аспекте изобретения, предлагается способ инактивации вируса в питательном потоке, содержащим следующие стадии:

добавление к питательному потоку ундецил алкилглюкозида в концентрации от около 0,1% мас./мас. до около 0,3% мас./мас.;

инкубация ундецил алкилглюкозида в питательном потоке в течение около 180 минут, при этом логарифмический коэффициент снижения вирусной нагрузки (LRF) ундецил алкилглюкозида в потоке превышает около 5;

фильтрацию указанного питательного потока, содержащего ундецил алкилглюкозид; и обработку указанного отфильтрованного исходного потока на колонке аффинной хроматографии с белком А;

при этом на указанной стадии добавления и инкубации поток сырья имеет температуру от около 4°C до около 30°C и pH от около 5,5 до около 8,0.

В одном аспекте изобретения, предлагается способ инактивации вируса в питательном потоке, содержащим следующие стадии:

добавление к исходному потоку SIMULSOL™ SL 11W в концентрации от около 0,1% мас./мас. до около 0,3% мас./мас.;

инкубация SIMULSOL™ SL 11W в питательном на протяжении около 180 минут, при этом логарифмический коэффициент снижения вирусной нагрузки (LRF) SIMULSOL™ SL 11W в потоке превышает около 5;

фильтрацию указанного потока, содержащего SIMULSOL™ SL 11W; обработку указанного отфильтрованного потока на колонке аффинной хроматографии с белком А;

при этом, на стадии добавления и инкубации питательный поток имеет температуру от около 4°C до около 30°C и значение pH от около 5,5 до около 8,0. В еще одном аспекте изобретения, стадия фильтрации в способах изобретения включает первую стадию фильтрации с использованием фильтра 0,22 мкм. В другом аспекте стадия фильтрации из способов изобретения содержит вторую стадию фильтрации с 0,45мкмPVDF фильтром. В еще одном аспекте, стадия фильтрации включает третью стадию фильтрации с 0,45мкмPVDF фильтром. Согласно определённому варианту осуществления способа изобретения, фильтрующая мембрана используется на первой, и/или на второй, и/или третьей стадиях фильтрации, содержит, но не ограничена

поливинилиденфторидом, (PVDF), ацетатом целлюлозы, нитратом целлюлозы, политетрафторэтиленом (PTFE, тефлон), поливинилхлоридом, полиэфирсульфоном или другими фильтрующими материалами, подходящими для применения в производственной среде в соответствии с cGMP. Согласно предпочтительному варианту осуществления, 5 фильтрующая мембрана содержит PVDF. Согласно конкретному варианту осуществления, фильтрующая мембрана, как на второй, так и на третьей стадии фильтрации, представляет собой мембрану с размером пор около 0,45 мкм. Согласно предпочтительному варианту осуществления, фильтрующая мембрана представляет собой мембрану из PVDF с размером пор 0,45 мкм.

10 Используемый здесь термин «экологически совместимый» детергент или соединение, или вещество, или агент, упоминающийся в настоящем документе, вызывает минимальный и/или приемлемый уровень вредного воздействия на окружающую среду. Например, Организация экономического сотрудничества и развития («ОЭСР») предоставляет рекомендации по проверке химической безопасности. Варианты 15 экологически безопасных агентов согласно текущим отчетностям также могут быть биоразлагаемыми. Способы определения того, совместим ли агент, такой как детергент, с окружающей средой, например, в условиях производства белка, известны в области техники. Экологическая совместимость также может быть оценена с помощью оценки экологического риска, которая представляет собой процесс оценки того, насколько 20 вероятно воздействие на окружающую среду в результате воздействия одного или нескольких факторов стресса окружающей среды, таких как химические вещества, изменение земли, болезни, инвазивные виды и изменение климата. Эти рекомендации можно найти, например, на веб-сайте Агентства по охране окружающей среды США. Кроме того, на веб-сайте Европейской комиссии REACH можно найти инструкции по 25 регистрации, оценке, разрешению и ограничению использования химических веществ в ЕС.

«Прогнозируемая концентрация в окружающей среде» представляет собой прогнозируемую концентрацию вещества в отходах, сбрасываемых в принимающий водный объект в окружающей среде. Например, прогнозируемая концентрация в 30 окружающей среде детергента, используемого для инактивации вирусов при подготовке терапевтического или диагностического белка, представляет собой концентрацию детергента в потоке отходов, который выбрасывается в окружающую среду.

Термин «детергент», используемый в данном документе, относится к агенту, который может содержать соли длинноцепочечных алифатических оснований или кислот, 35 или гидрофильные фрагменты, такие как сахара, и который обладает как гидрофильными,

так и гидрофобными свойствами. Используемые здесь детергенты могут обладать способностью разрушать вирусные оболочки и инактивировать вирусы. Механизм инактивации вируса детергентами объясняется взаимодействием между детергентом и липидными компонентами внешней мембраны вируса, что приводит к разрушению мембраны и, в конечном итоге, к потере вирулентности. В некоторых примерах, детергент может представлять собой композицию, включающую «поверхностно-активное вещество» или «поверхностно-действующий агент» и один или несколько других агентов, таких как хелатирующие агенты, консерванты или стабилизаторы. Детергенты или поверхностно-активные вещества могут быть классифицированы в зависимости от заряда.

5 Поверхностно-активные вещества могут быть неионогенными, катионогенными или анионогенными. Используемое здесь поверхностно-активное вещество обладает способностью разрушать вирусные оболочки и инактивировать вирусы. Варианты осуществления детергентов в соответствии с настоящим изобретением содержат алкил глюкозид, при котором алкил глюкозид может представлять собой алкилглюкозид.

10 «Алкил глюкозид» в соответствии с настоящим изобретением относится к любому сахару, соединенному связью с любым гидрофобным алкилом. «Алкил глюкозид», используемый здесь, состоит из алкильной группы, связанной с сахаром, где сахар представляет собой глюкозу. Алкил глюкозидом может быть, например, ундецил алкилглюкозид. Ундецил алкилглюкозид может содержать ундецильную цепь с O-гликозидной связью с моно-D-глюкопиранозой (например, n-ундецил-β-D-глюкопиранозой) или олиго- или полисахаридами D-глюкопиранозы или их смесями. Химический синтез алкил глюкозидов, таких которые используются в способах данного изобретения, может привести к гетерогенному смешиванию соединений, а не к полностью гомогенному препарату. Таким образом, если не указано иное, используемые здесь

15 ссылки на конкретную форму алкил глюкозида означают, что, по меньшей мере, большинство компонентов любой гетерогенной смеси представляет собой форму алкил глюкозида, такую как ундецил алкил глюкозид. Примеры таких алкил глюкозидов, которые содержат ундецил алкил глюкозиды включают, но не ограничиваются SIMULSOL™ SL 11W и SIMULSOL™ SL 82.

20 «Питательный поток продуктов» или «поток питательных веществ» представляет собой материал или раствор, предназначенный для метода очистки, который содержит представляющий интерес терапевтический или диагностический белок и который также может содержать различные примеси. Неограниченные примеры могут включать, например, собранную жидкость клеточной культуры, собранный материал клеточной

25 культуры, осветленную жидкость клеточной культуры, осветленный материал клеточной

30 культуры, осветленную жидкость клеточной культуры, осветленный материал клеточной

35 культуры, осветленную жидкость клеточной культуры, осветленный материал клеточной

культуры, пул захвата, восстановленный пул и/или собранный пул, содержащий терапевтический или представляющий интерес диагностический белок после одной или нескольких стадий центрифугирования и/или стадий фильтрации, пул улавливания, восстановленный пул белка и/или собранный пул, содержащий представляющий интерес терапевтический или диагностический белок, после одной или нескольких стадий очистки.

Термин «примеси» относится к материалам, которые отличаются от желаемого белкового продукта. Примесь включает, без ограничений: материалы клетки-хозяина, такие как СНОР; выщелоченный белок А; нуклеиновую кислоту; вариант, вариант размера, фрагмент, агрегат или производное желаемого белка; другой белок; эндотоксин; вирусный контаминант; компонент среды для культивирования клеток и т. д.

Термины «белок» и «полипептид» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может быть прерван не аминокислотами. Эти термины также охватывают полимер аминокислоты, который был модифицирован естественным путем или путем искусственного вмешательства; например, вследствие образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидизации, ацетилирования, фосфорилирования или с помощью любых других манипуляций или модификаций, таких как конъюгация с метящим компонентом. Также в данное определение включены, например, белки, содержащие один или более аналогов аминокислоты (включая, например, неприродные аминокислоты и т. д.), а также другие модификации, известные в данной области техники. Примеры белков включают, но не ограничиваются ими, антитела, пептиды, ферменты, рецепторы, гормоны, регуляторные факторы, антигены, связывающие агенты, цитокины, гибридные Fc-белки, молекулы иммуноадгезина и т. д.

Термин «антитело» или «антитела» используется в самом широком смысле и конкретно охватывает, например, моноклональные антитела (включая агонистические, антагонистические и нейтрализующие антитела), химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, композиции антител с полиэпитопной специфичностью, поликлональные антитела, одноцепочечные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), иммуноадгезины и фрагменты антител пока они проявляют желаемую биологическую или иммунологическую активность. Термин «иммуноглобулин» (Ig) используется здесь взаимозаменяемо с антителом.

Термин «ультрафильтрация» или «фильтрация» представляет собой форму мембранной фильтрации, при которой гидростатическое давление прижимает жидкость к

полупроницаемой мембране. Взвешенные вещества и растворенные вещества с высокой молекулярной массой задерживаются, а вода и растворенные вещества с низкой молекулярной массой проходят через мембрану. В некоторых примерах ультрафильтрационные мембраны имеют размеры пор в диапазоне от 1 мкм до 100 мкм.

- 5 Термины «ультрафильтрационная мембрана», «ультрафильтрационный фильтр», «фильтрационная мембрана» и «фильтрационный фильтр» могут использоваться взаимозаменяемо. Примеры фильтрующих мембран включают, но не ограничены мембраной из поливинилиденфторида (PVDF), ацетата целлюлозы, нитрата целлюлозы, политетрафторэтилена (PTFE, тефлон), поливинилхлорида, полиэфирсульфона,
- 10 стекловолокна или других фильтрующих материалов, подходящих для использования в соответствии сGMP в производственной среде.

Используемый здесь числовой диапазон включает числа, определяющие диапазон.

- Термин «вирус с оболочкой» или «вирус, содержащий липидную оболочку» относится к любому вирусу, содержащему мембрану или оболочку, включающую липид, такой как, например, оболочечный вирус. Капсид вирусов с оболочкой заключен в
- 15 липопротеиновую мембрану или оболочку. Эта оболочка происходит от клетки-хозяина, когда вирус «отпочковывается» от ее поверхности, и состоит в основном из липидов, не кодируемых вирусным геномом. Несмотря на то, что он несет молекулярные детерминанты для прикрепления и проникновения в клетки-мишени и необходим для
- 20 инфекционности оболочечных вирусов, он не подвержен лекарственной устойчивости или антигенному сдвигу. Размер вирусов с оболочкой варьируется от около 45-55 нм до около 120-200 нм. Неограничивающие примеры вирусов, содержащих липидную оболочку, которые могут инфицировать клетки млекопитающих, включают ДНК-вирусы, такие как вирус герпеса, вирус поксвируса или вирус гепаднавируса; РНК-вирусы, такие как вирус
- 25 флавивирусов, вирус тогавирусов, вирус коронавируса, вирус дельтавирусов, вирус ортомиксовирусов, вирус парамиксовирусов, вирус рабдовирусов, вирус буньявирусов или вирус филовирусов; и вирусы с обратной транскрипцией, такие как вирус ретровирусов или вирус гепаднавирусов. В одном из вариантов, изобретение предлагает способы инактивации субвирусного агента в потоке сырья продукта, включающие
- 30 обработку потока сырья экологически безопасным детергентом. В некоторых аспектах субвирусный агент представляет собой вирион или сателлит. В другом варианте, изобретение обеспечивает способы инактивации вирусоподобного агента в питательном потоке продукта, включающие обработку исходного потока экологически безопасным моющим средством.

Способы измерения вирусной активности или вирусной инфекционности известны в данной области. Примеры включают, но не ограничиваются ими, анализом TCID₅₀ (т.е. определение средней инфекционной дозы культуры тканей, которая вызывает патологические изменения в 50% инокулированных клеточных культур) и анализы 5
 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 380
 385
 390
 395
 400
 405
 410
 415
 420
 425
 430
 435
 440
 445
 450
 455
 460
 465
 470
 475
 480
 485
 490
 495
 500
 505
 510
 515
 520
 525
 530
 535
 540
 545
 550
 555
 560
 565
 570
 575
 580
 585
 590
 595
 600
 605
 610
 615
 620
 625
 630
 635
 640
 645
 650
 655
 660
 665
 670
 675
 680
 685
 690
 695
 700
 705
 710
 715
 720
 725
 730
 735
 740
 745
 750
 755
 760
 765
 770
 775
 780
 785
 790
 795
 800
 805
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995

Инактивацию вируса в питательном потоке продукта можно измерить, используя способы, известные в данной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусная инактивация выражается в виде логарифмического коэффициента 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 380
 385
 390
 395
 400
 405
 410
 415
 420
 425
 430
 435
 440
 445
 450
 455
 460
 465
 470
 475
 480
 485
 490
 495
 500
 505
 510
 515
 520
 525
 530
 535
 540
 545
 550
 555
 560
 565
 570
 575
 580
 585
 590
 595
 600
 605
 610
 615
 620
 625
 630
 635
 640
 645
 650
 655
 660
 665
 670
 675
 680
 685
 690
 695
 700
 705
 710
 715
 720
 725
 730
 735
 740
 745
 750
 755
 760
 765
 770
 775
 780
 785
 790
 795
 800
 805
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995

снижения («LRF») или логарифмического снижения значения («LRV»). LRF
 рассчитывается как:
$$R = \log_{10} \frac{V_i T_i}{V_o T_o}$$
 Где R = логарифмический коэффициент уменьшения (LRF), V_i = входной объем в мл, T_i = входной титр вируса, V_o = выходной объем и T_o = выходной титр вируса.

ПРИМЕРЫ**Пример 1. Инактивация вирусов неионогенными гликозидными детергентами****Детергенты и реагенты**

- 5 Исходный раствор для приведенных в качестве примера детергентов, перечисленных в таблице 1 (Seppic Inc. Fairfield, NJ), и 1,2-пропандиола (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) готовят в воде в процентном соотношении масса/объем (мас./мас.).

Таблица 1: Типы детергентов

Название детергента	Содержание алкил глюкозида	Физические свойства
СИМУЛСОЛ™ SL 11W	D-глюкопираноза, олигомер, ундецил глюкозид (40-60%), пропан-1,2-диол (1-5%)	Прозрачная жидкость
СИМУЛСОЛ™ AS 48	2-этилгексил моно-D-глюкопиранозид, 2-этилгексил ди-D-глюкопиранозид (40-60%)	Белый Полужидкий
СИМУЛСОЛ™ SL 4	D-глюкопираноза, олигомер, бутилглюкозид (40-60%)	Прозрачная жидкость
СИМУЛСОЛ™ SL 10	D-глюкопираноза, олигомер, C10-16 (четные)-алкилглюкозиды (40-60%)	Белый Полужидкий
СИМУЛСОЛ™ SL 26 C	D-глюкопираноза, олигомер, C10-16 (четные)-алкилглюкозиды (40-60%)	Белый Полужидкий
СИМУЛСОЛ™ SL 82	D-глюкопираноза, олигомер, ундецил глюкозид (40-60%), D-глюкопираноза, олигомер, C10-16 (четные)-алкил глюкозиды (10-20%), пропан-1,2-диол (1-5%)	Прозрачная жидкость
СИМУЛСОЛ™ SL 8	D-глюкопираноза, олигомер, децил октил глюкозиды (40-60%)	Прозрачная жидкость
СИМУЛСОЛ™ SL 826	D-глюкопираноза, олигомер, децил октил глюкозиды (20-40%), D-глюкопираноза, олигомер, C10-16 (четные)-алкил глюкозиды (20-40%), (2-метоксиметилэтокси)пропанол (0,1-1%)	Прозрачная жидкость

10

Вирусы и индикаторные клетки

Ксенотропный мышинный лейкоз (XMuLV), парвовирус свиней (PPV), штамм NADL-2 и вирус псевдобешенства (PRV) для использования в этих исследованиях можно приобрести в ATCC, Manassas, VA. В таблице 2 показаны свойства этих вирусов.

15

Таблица 2. Характеристики вируса

Вирус	Геном	Род	Размер (нм)	Физико-химическая стойкость	Оболочка (да или нет)
Ксенотропный мышинный лейкоз	ДНК	Ретровирусы	80-100	Низкая	Да
Вирус псевдобешенства	РНК	Герпесвирусы	120-140	Низкая	Да
Парвовирус свиней	ДНК	Парвовирусы	18-22	Высокая	Нет

РК13 (эпителиальные клетки свиньи), PG-4 (клетки головного мозга кошек) и Vero (клетки африканской зеленой обезьяны) для использования в этих исследованиях можно приобрести в ATCC, Manassas, VA. Клетки РК-13 культивируют в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM, Gibco, Grand Island, NY). Клетки PG-4 культивируют в среде McCoy's 5a (ATCC, Manassas, VA), а клетки Vero культивируют в модифицированной Earl's среде Игла (EMEM, Gibco, Grand Island, NY). Все клетки дополняют 10% FBS (HyClone, Logan, UT).

Анализ титрования вируса TCID₅₀ на основе клеток

Анализ инфекционной дозы 50 на основе клеточной культуры ткани (TCID₅₀) используется для титрования вируса XMuLV с индикаторными клетками PG-4, PPV с индикаторными клетками РК-13 и PRV с индикаторными клетками Vero. 96-луночные планшеты для тканевых культур засевают $2,5 \times 10^4$ клеток/мл индикаторными клетками по 200 мкл/лунку и инкубируют при 37°C в течение ночи или около 16-24 часов. Затем планшеты инокулируют вирусом в серии 10-кратных разведений по 50 мкл/лунку при минимуме n=8 на разведение. Засеянные чашки инкубируют в течение 7-9 дней (XMuLV и PRV) и 10-13 дней (PPV) при 37°C. Затем планшеты исследуют и оценивают положительно или отрицательно по лункам под микроскопом на цитопатические эффекты (CPE), титры вируса рассчитывают стандартными методами.

Вирусная цитотоксичность и интерференция в очищенном материале биореактора

Анализ TCID₅₀, приведенный в качестве примера выше, используется для определения цитотоксического действия вирусов в осветленном биореакторном собранном материале моноклонального антитела (mAb), биспецифического антитела и Fc-гибридных белков. Материалы сбора биореактора очищают центрифугированием с последующей полирующей фильтрацией. Примеси, такие как белки клетки-хозяина,

липиды и ДНК клетки-хозяев, также автоматически концентрируются в процессе центрифугирования. Очищенный собранный биореакторный материал для различных белков, содержащих от 0,05% мас./мас. до 1% мас./мас. детергентов, разводят в инокуляционной среде в 10, 50 и 100 раз. Каждое разведение добавляют при $n=8$ в 96-луночные планшеты с засеянными индикаторными клетками и инкубируют в соответствии с анализом TCID₅₀. В конце периода инкубации каждую лунку осматривают под микроскопом на наличие CPE и определяют соответствующее разведение, необходимое для каждого детергента. Результаты показали, что 50-кратного разведения было достаточно для преодоления цитотоксичности детергента.

Очищенные материалы сбора биореактора для различных типов белков оценивают на любые внутренние эффекты репликации вируса собранного материала клеточной культуры. Каждый вирус разбавляют в 10 раз в очищенном собранном материале биореактора и инокулируют в планшеты, засеянные индикаторными клетками, и проводят эксперимент в соответствии с анализом TCID₅₀. Включен положительный контроль (вирус, добавленный в материал культуры ткани). Титры вируса сравнивают с вирусом положительного контроля. Титры, которые находятся в пределах $\pm 0,5 \log_{10}$ от титров положительного контроля, не вызывают вирусной интерференции. Все титры вирусных тестов находились в пределах $\pm 0,5 \log_{10}$ от титров положительного контроля, и, таким образом, не наблюдалось вирусной интерференции ни для одного из материалов сбора биореактора, независимо от типа белка.

Общая процедура вирусной инактивации

Вирусная инактивация различных оболочечных вирусов каждым детергентом оценивается в диапазоне различных концентраций, температур и pH в очищенных материалах биореактора, содержащих mAb, биспецифические и гибридные Fc-белки. Вирусы XMuLV, PPV или PRV вносятся в собранный материал в концентрации не более 5% мас./мас., а раствор детергента добавляется к материалу для достижения заданной конечной концентрации детергента. Затем образцы инкубируют при определенных диапазонах температуры и значениях pH. Инактивация вируса начинается, как только детергент добавляется к материалу, содержащему вирус. Кинетику инактивации вируса отслеживают путем отбора аликвот в различные моменты времени из собранных образцов, а титр вируса оценивают с помощью анализа TCID₅₀. Контрольные матрицы включены в исследования, чтобы продемонстрировать, что инактивация вируса является результатом обработки детергентом, а не самой матрицей.

Инактивация XMuLV при 30°C неионогенными детергентами

Вирусную инактивацию XMuLV детергентами, перечисленными в таблице 1, тестируют при оптимальных условиях, определенных для инактивации XMuLV. В соответствии с процедурой вирусной инактивации, приведенной в качестве примера выше, каждый детергент добавляют в количестве 0,6% мас./мас. к собранному очищенному материалу биореактора mAb с добавлением XMuLV при 30°C. Инактивацию вируса отслеживают в различные моменты времени, при этом максимальное время инактивации составляет 180 минут после инокуляции вируса.

Результаты, представленные в Таблице 3, показывают, что для инактивации XMuLV при оптимальных условиях, XMuLV быстро и полностью инактивируется для всех протестированных моющих средств через 180 минут, за исключением SIMULSOL™ SL 4 и SIMULSOL™ AS 48. Поскольку при использовании SIMULSOL™ SL 4 инактивации вируса не наблюдалось, концентрацию SIMULSOL™ SL 4 повышают до 30 мМ (1%) и контролируют инактивацию XMuLV при 30°C в течение 180 минут. Однако инактивации XMuLV не наблюдалось при повышенной концентрации SIMULSOL™ SL 4 (данные не представлены). Удивительно, но эти результаты свидетельствуют о том, что не все глюкозиды способны к надежной инактивации вирусов или что для достижения надежной инактивации требуются чрезвычайно высокие концентрации, как это наблюдалось для SIMULSOL™ AS 48. Тем не менее, SIMULSOL™ SL 11W продемонстрировал полную вирусную инактивацию, превышающую LRF, равную 4, в течение 0–5 минут после добавления его к очищенному собранному материалу биореактора mAb. Кроме того, хотя другие глюкозиды эффективно инактивировали XMuLV, другие факторы ограничивают применимость некоторых из этих детергентов в крупномасштабном производственном процессе. Такие характеристики детергента включали растворимость, влияние на мутность собранного материала, активность при различных температурах и диапазонах pH, неизвестные или ограниченные данные о токсичности для окружающей среды и простоту обращения.

Таблица 3. Инактивация XMuLV при 30°C неионогенными детергентами в очищенном собранном материале биореактора mAb

Детергент (0,6% мас./мас.)	LRF достигается при 30 °C		
	0-5 мин	90 мин	180 мин ⁵
СИМУЛСОЛ™ SL 11W	≥4,55	≥4,55	≥4,55
СИМУЛСОЛ™ AS 48	0,50 ± 0,56	2,13 ± 0,56	3,20 ± 0,44
СИМУЛСОЛ™ SL 4	0,88 ± 0,40	0,38 ± 0,50	0,88 ± 0,40 ¹⁰
СИМУЛСОЛ™ SL 10	≥3,10	≥4,62	≥4,62
СИМУЛСОЛ™ SL 26 C	≥3,60	≥5,12	≥5,12
СИМУЛСОЛ™ SL 82	≥3,60	≥5,12	≥5,12
СИМУЛСОЛ™ SL 8	≥3,10	≥4,62	≥4,62 ¹⁵
СИМУЛСОЛ™ SL 826	≥3,10	≥4,62	≥4,62

Мутность SIMULSOL™ SL 11W в очищенном собранном материале биореактора mAb.

20 Мутность оценивали при концентрациях SIMULSOL™ SL 11W 0 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,3 %, 0,5 % и 1 % мас./мас. в XMuLV, добавленном в очищенный собранный материал биореактора mAb при 18 °C. Вирусная инактивация отслеживается в течение 180 минут, а мутность измеряется в нефелометрических единицах мутности (NTU) с использованием портативного турбидометра 2100P (Hach®).

25 Результаты, показанные в Таблице 4, показывают, что SIMULSOL™ SL 11W при концентрациях в диапазоне от 0% до 1% мас./мас. был стабилен с течением времени, и в собранном материале не наблюдалось больших осадков в течение 180 минут.

30 **Таблица 4. Мутность SIMULSOL™ SL 11W в очищенном собранном материале биореактора mAb, инкубированном при 18 °C**

% мас./мас. SIMULSOL™ SL 11W	Мутность (NTU)			
	Время 0 (2 измерения)		Время 180 (2 измерения)	
0	7,92	7,92	7,6	7,59
0,05	11,61	11,6	15,7	16,2
0,1	51,5	52,1	49,4	49,1
0,3	75,8	75	91,6	91,5
0,5	355	357	377	375
1	834	836	754	760

Характеристика и оптимизация вирусной инактивации с помощью SIMULSOL™ SL 11W

Использование SIMULSOL™ SL 11W в качестве пригодного экологически безопасного детергента для применения в процессах производства белков дополнительно оценивается на очищенном собранном материале mAb в биореакторе в соответствии с описанной выше процедурой вирусной инактивации. Вкратце, активность SIMULSOL™ SL 11W оценивают при концентрациях 0,05 %, 0,1 %, 0,3 %, 0,5 % и 1 % мас./мас. в очищенном материале биореактора mAb с добавлением XMuLV при 4 различных температурах 4 °С, 18°С, 25°С и 30°С. Вирусную инактивацию отслеживают через 0, 10, 30, 60, 120 и 180 минут после инокуляции XMuLV в содержащий SIMULSOL™ SL 11W очищенный материал сбора биореактора mAb. Результаты, как показано в Таблицах 5-9 показывают, что концентрация SIMULSOL™ SL 11W, время инкубации и температура являются факторами, влияющими на инактивацию XMuLV. SIMULSOL™ SL 11W достиг полной инактивации вируса XMuLV при концентрациях $\geq 0,1$ % мас./мас. (≥ 3 мМ) через 120 минут и при концентрациях $\geq 0,3$ % мас./мас. через 10 минут при всех 4 оцениваемых температурах.

15 **Таблица 5. Инактивация XMuLV 1,5 мМ (0,05%) SIMULSOL™ SL 11W в очищенном материале сбора биореактора mAb**

Момент времени (мин)	Достигнут LRF			
	4°С	18°С	25°С	30°С
0	-0,38	0,13	0,13	0,25
10	-0,13	0,00	0,13	0,75
30	0,50	1,38	1,88	1,37
60	0,62	2,25	2,00	1,37
120	1,25	2,25	2,59	1,75
180	2,12	3,94	3,33	2,12

20 **Таблица 6. Инактивация XMuLV 3,0 мМ (0,1%) SIMULSOL™ SL 11W в очищенном материале сбора биореактора mAb**

Момент времени (мин)	Достигнут LRF			
	4°С	18°С	25°С	30°С
0	0,62	3,25	2,12	3,25
10	2,50	3,41	2,55	3,50
30	4,58	3,42	2,71	4,08
60	5,43	4,99	3,64	5,00
120	$\geq 5,42$	$\geq 5,92$	$\geq 4,92$	$\geq 6,05$
180	$\geq 5,88$	$\geq 6,38$	$\geq 5,38$	$\geq 6,51$

Таблица 7. Инактивация XMuLV 9,0 мМ (0,3%) SIMULSOL™ SL 11W в осветленный материал урожая биореактора mAb

Момент времени (мин)	Достигнут LRF			
	4°C	18°C	25°C	30°C
0	1,50	3,21	2,25	≥5,17
10	≥5,13	≥5,05	≥5,05	≥5,17
30	≥5,30	≥5,05	≥5,05	≥5,17
60	≥5,30	≥5,05	≥5,05	≥5,17
120	≥5,30	≥5,05	≥5,05	≥5,17
180	≥5,76	≥5,51	≥5,51	≥5,63

5 **Таблица 8. Инактивация XMuLV 15 мМ (0,5%) SIMULSOL™ SL 11W в очищенном материале сбора биореактора mAb**

Момент времени (мин)	Достигнут LRF			
	4°C	18°C	25 °C	30°C
0	2,61	5,36	≥5,05	≥4,55
10	≥4,67	≥5,05	≥5,05	≥4,55
30	≥4,67	≥5,05	≥5,05	≥4,55
60	≥4,67	≥5,04	≥5,05	≥4,55
120	≥4,67	≥5,05	≥5,05	≥4,55
180	≥5,13	≥5,51	≥5,51	≥5,01

Таблица 9. Инактивация XMuLV 30 мМ (1,0%) SIMULSOL™ SL 11W в очищенном материале сбора биореактора mAb

Момент времени (мин)	Достигнут LRF			
	4°C	18°C	25°C	30°C
0	2,91	5,61	≥4,67	≥5,42
10	≥5,42	≥5,30	≥4,67	≥5,42
30	≥5,42	≥5,30	≥4,67	≥5,42
60	≥5,42	≥5,30	≥4,67	≥5,42
120	≥5,42	≥5,30	≥4,67	≥5,42
180	≥5,88	≥5,76	≥5,13	≥5,88

10 **Инактивация XMuLV с помощью SIMULSOL™ SL 11W в различных исходных матрицах**

Оценена способность SIMULSOL™ SL 11W инактивировать вирус в концентрации 9 мМ (0,3% мас./мас.) в различных исходных матрицах, таких как вода, среда для культивирования клеток и фосфатно-солевой буфер Дульбекко (DPBS) при 4°C и 30°C.

15 Инактивацию вируса отслеживают через 0, 60, 120 и 180 минут после инокуляции XMuLV.

Результаты, показанные в Таблице 10, показывают устойчивую инактивацию XMuLV как при 4°C, так и при 30°C через 120 минут во всех трех исходных матрицах. DPBS при 4°C через 180 минут выявил несколько живых вирусных частиц в анализе TCID

50, но LRF 5,63 все же был достигнут. В целом эти результаты свидетельствуют о том, что SIMULSOL™ SL 11W способен эффективно инактивировать вирус независимо от исходной матрицы. Это предполагает потенциальное использование SIMULSOL™ SL 11W на биофармацевтических производственных платформах и гибкость использования SIMULSOL™ SL 11W на разных этапах процесса производства белка.

Таблица 10. Инактивация XMuLV с помощью SIMULSOL™ SL 11W в различных исходных матрицах

Время (мин.)	LRF (0,3 % мас./мас. SIMULSOL™ SL 11W)					
	4°C			30°C		
	Вода	Среда для культивирования клеток	Натрий-фосфатный буфер Дульбекко	Вода	Среда для культивирования клеток	Натрий-фосфатный буфер Дульбекко
0	4,12	2	1,5	≥4,40	≥4,40	4,41
60	≥4,52	≥4,52	4,53	≥4,40	≥4,40	≥4,40
120	≥4,52	≥4,52	≥4,52	≥4,40	≥4,40	≥4,40
180	≥5,31	≥5,31	5,63	≥5,05	≥5,05	≥5,05

10 **Кинетика инактивации XMuLV при 0,3% SIMULSOL™ SL 11W при 4°C и 30°C**

Оценивается способность SIMULSOL™ SL 11W инактивировать вирус в более короткие промежутки времени. SIMULSOL™ SL 11W добавляют в концентрации 9 мМ (0,3% мас./мас.) к очищенному материалу, собранному в биореакторе при 4°C и 30°C. Инактивацию вируса отслеживают через 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20 и 180 минут после инокуляции XMuLV.

15 Результаты, показанные в Таблице 11, показывают, что полная инактивация XMuLV происходит через ≥ 6 минут при 4°C и через ≥ 2 минут при 30°C с 9 мМ (0,3% вес./вес.) SIMULSOL™ SL 11W в очищенном собранном материале моноклональных антител в биореакторе.

Таблица 11. Инактивация XMuLV с помощью 9 мМ (0,3%) SIMULSOL™ SL 11W при 4°C и 30°C в очищенном материале сбора биореактора mAb

Момент времени (минуты)	Достигнут LRF	
	4°C	30°C
0	1,75	3,62
2	3,32	≥5,05
4	4,27	≥5,05
6	≥4,92	≥5,05
8	≥4,92	≥5,05
10	≥4,92	≥5,05
20	≥4,92	≥5,05
180	≥5,38	≥5,51

Влияние стабилизирующего агента монопропиленгликоля на инактивацию вируса

- 5 Оценено влияние монопропиленгликоля на инактивацию вирусов в концентрациях 0,1% и 0,5% в очищенных материалах сбора биореактора mAb при 30°C. Инактивацию вируса отслеживают через 0 и 180 минут после инокуляции XMuLV. SIMULSOL™ SL 11W содержит от 1% до 5% монопропиленгликоля. Максимальная концентрация монопропиленгликоля, приведённая здесь в процедурах инактивации, составляет 0,05%.
- 10 Результаты, продемонстрированные в таблице 12, показывают, что монопропиленгликоль в концентрациях 0,1% и 0,5% не инактивирует XMuLV в очищенном материале сбора биореактора mAb при 30°C. Кроме того, концентрации монопропиленгликоля, представленные в Таблице 11, как минимум в 10 раз превышают максимальную концентрацию, которая может быть обнаружена в очищенном материале сбора
- 15 биореактора mAb, обработанном SIMULSOL™ SL 11W. Это указывает на то, что SIMULSOL™ SL 11W отвечает за наблюдаемую инактивацию вируса

Таблица 12. Инактивация XMuLV монопропиленгликолем в очищенном материале сбора биореактора mAb

Момент времени (минуты)	LRF при 30°C	
	0,1% монопропиленгликоля	0,5% монопропиленгликоля
0	0,25	0,00
180	0,25	0,13

20

Инактивация вирусов с оболочкой и без оболочки с помощью SIMULSOL™ SL 11W

- Оценивается способность SIMULSOL™ SL 11W инактивировать PRV, оболочечный вирус, и PPV, вирус без оболочки. SIMULSOL™ SL 11W добавляют в
- 25 концентрации 9 мМ (0,3% мас./мас.) к очищенному материалу собранному в биореакторе

при 4 °С, 18°С и 30°С. Инактивацию вируса контролируют через 0, 10, 30, 60, 120 и 180 минут после инокуляции

Результаты, показанные в Таблице 13, показывают устойчивую инактивацию вируса с оболочкой PRV, происходящую через 10 минут при всех трех температурах, при этом устойчивая инактивация вируса с оболочкой PRV происходит даже при более низких временных точках в пределах от 0 до 5 минут при 30°С. Инактивация PPV не наблюдалась для SIMULSOL™ SL 11W. Эти результаты в совокупности позволяют предположить, что SIMULSOL™ SL 11W не только надежно инактивирует различные оболочечные вирусы в осветленных материалах, собранных в биореакторе, но и что вирусная инактивация с помощью SIMULSOL™ SL 11W специфична для оболочечных вирусов.

Таблица 13. PRV инактивация 9 мМ (0,3% мас./мас.) SIMULSOL™ SL 11W в очищенном материале сбора биореактора mAb

Момент времени (мин)	Достигнут LRF		
	4°С	18°С	30°С
0-5	2,93	1,30	≥3,30
10	≥2,92	≥2,92	≥3,30
30	≥2,92	≥3,23	≥3,30
60	≥2,92	≥2,92	≥3,30
120	≥2,92	≥2,92	≥3,30
180	≥ 3,38	≥ 3,38	≥3,76

15

Влияние pH на инактивацию XMuLV с помощью SIMULSOL™ SL 11W

Оценивается способность SIMULSOL™ SL 11W инактивировать XMuLV при pH 5,5 и pH 8,0. SIMULSOL™ SL 11W добавляют в концентрации 9 мМ (0,3% мас./мас.) к очищенному материалу сбора биореактора mAb при 18°С. Вирусную инактивацию отслеживают через 0, 10, 30, 60, 120 и 180 минут после инокуляции XMuLV с помощью SIMULSOL™ SL 11W, содержащийся в материале сбора биореактора mAb.

Результаты, показанные в таблице 14, показывают быструю и полную инактивацию XMuLV с помощью SIMULSOL™ SL 11W как при pH 5,5, так и при pH 8,0 за 10 минут, что указывает на потенциальную применимость SIMULSOL™ SL 11W в широком диапазоне pH в процессе производства белков.

25

Таблица 14. Инактивация XMuLV 9 мМ (0,3%) SIMULSOL™ SL 11W при 18°C, pH 5,5 и pH 8,0 в очищенном материале сбора биореактора mAb

Момент времени (мин)	Достигнут LRF	
	pH 5,5	pH 8,0
0	3,48	3,47
10	≥5,42	≥5,42
30	≥5,42	≥5,42
60	≥5,42	≥5,42
120	≥5,42	≥5,42
180	≥ 5,88	≥ 5,88

Влияние источника собранного материала биореактора на инактивацию XMuLV с помощью SIMULSOL™ SL 11W

Оценивается способность SIMULSOL™ SL 11W инактивировать XMuLV в очищенных биореакторных материалах, содержащих различные рекомбинантные белки, такие как mAb, биспецифические антитела и гибридные Fc-белки. SIMULSOL™ SL 11W добавляется в концентрации 9 мМ (0,3% мас./мас.) к очищенным материалам сбора биореактора различных белков при 4°C и 18°C. Инактивацию вируса отслеживают в моменты времени инкубации 0, 10, 30, 60, 120 и 180 минут. Результаты, показанные в Таблице 15, показывают полную инактивацию XMuLV с помощью SIMULSOL™ SL 11W за 120 минут как при 4°C, так и при 30°C во всех трех очищенных собранных материалах биореактора. Кроме того, полная инактивация Fc-гибридного материала и белка mAb, содержащего собранный материал, наблюдалась через 10 минут при 4°C. Кинетика инактивации биспецифического антитела была немного медленнее при 4°C, чем у двух других очищенных материалов, собранных в биореакторе, при 4°C. Однако при 18°C полная инактивация SIMULSOL™ SL 11W наблюдалась для всех 3 белков в течение 10 минут.

20

Таблица 15. Инактивация XMuLV 9 мМ (0,3%) SIMULSOL™ SL 11W в очищенном материале рекомбинантного белка биореактора

Момент времени (мин)	4 ° C			18 ° C		
	Fc-слитый белок	Биспецифическое антитело	mAb	Fc-слитый белок	Биспецифическое антитело	mAb
0	2,96	1,87	1,50	3,55	2,25	≥5,17
10	≥5,17	2,55	≥5,13	≥5,17	≥4,92	≥5,17
30	≥5,17	3,27	≥5,30	≥5,17	≥4,92	≥5,17
60	≥5,17	4,32	≥5,30	≥5,17	≥4,92	≥5,17
120	≥5,17	≥4,92	≥5,30	≥5,17	≥4,92	≥5,17
180	≥5,63	≥5,38	≥5,76	≥5,63	≥5,38	≥5,63

Влияние уровней примесей на вирусную инактивацию в очищенном биореакторном собранном материале различных белков

Оценивается влияние уровней примесей в материалах сбора биореактора на три различных рекомбинантных белка: слитый белок Fc, биспецифическое антитело и mAb.

Собранные материалы очищают центрифугированием с последующей полирующей фильтрацией. Примеси, такие как белки клетки-хозяина, липиды и ДНК клетки-хозяина, также автоматически концентрируются в процессе центрифугирования. Образец очищенного материала сбора mAb дополнительно концентрируют около в 4 раза с помощью процесса тангенциальной проточной фильтрации (TFF) с отсечкой молекулярной массы 5 кДа. Измеряют рекомбинантный белок, ДНК и другие примеси НСР в трех очищенных материалах и концентрированном материале TFF. Результаты, показанные в Таблице 16, показывают профили содержания рекомбинантного белка, ДНК клетки-хозяина и НСР в трех очищенных материалах рекомбинантного белка и концентрированном очищенном материале mAb. Наблюдалось более чем 3-кратное увеличение примесей ДНК и НСР в собранном концентрированном очищенном материале mAb по сравнению с неконцентрированным очищенным материалом собранного mAb.

15

Таблица 16. Количество компонентов в очищенном материале, собранном в биореакторе рекомбинантного белка

Очищенный белок	Компоненты собранного материала биореактора		
	Рекомбинантный белок (мг/мл)	ДНК (пг/мл)	НСР (нг/мл)
Fc-слитый белок	1,65	72180600	94364
Биспецифические mAb	3,40	202617600	915413
mAb	3,14	142781780	969014
Концентрированные mAb	10,93	431469600	3314549

Влияние концентрированного биореакторного собранного материала на инактивацию XMuLV с помощью SIMULSOL™ SL 11W

Испытывается влияние SIMULSOL™ SL 11W на инактивацию вирусов в концентрированном очищенном материале mAb собранном в биореакторе. Очищенный материал mAb, собранный в биореакторе, содержащий mAb и другие примеси, концентрируют около в четыре раза с помощью процесса тангенциально-поточной фильтрации (TFF) с отсечкой молекулярной массы 5 кДа. Затем концентрированный материал, содержащий mAb и примеси, немедленно подвергают стерильной фильтрации. Затем к очищенному концентрированному отфильтрованному материалу добавляют SIMULSOL™ SL 11W в конечной концентрации 0,1% мас./мас. (3 мМ). Материал, содержащий SIMULSOL™ SL 11W, затем инкубируют при 3 различных температурах: 4°C, 18°C и 30°C. Вирусная инаktivация при различных температурах измеряется в моменты времени в диапазоне от 0 до 180 минут. Результаты, показанные в Таблице 17, показывают полную инаktivацию XMuLV через 180 минут при всех 3 протестированных температурах, даже несмотря на то, что кинетика инаktivации снижается при более низких температурах по сравнению с образцом при 30°C. Не наблюдалось влияния на кинетику инаktivации концентрированного материала биореактора по сравнению с неконцентрированным собранным материалом биореактора (данные не показаны). Это говорит о том, что повышенный уровень примесей не влияет на инаktivацию вирусов с помощью SIMULSOL™ SL 11W.

Таблица 17. Инаktivация вируса 3 мМ (0,1%) SIMULSOL™ SL 11W в собранном в 4-кратном концентрировании очищенном mAb материале биореактора

Момент времени (мин)	Достигнут LRF		
	4°C	18°C	30°C
0	2,25	2,50	2,25
10	2,00	5,13	5,36
30	3,28	5,73	≥5,05
60	5,06	≥5,42	≥5,05
120	≥5,05	≥5,42	≥5,05
180	≥5,51	≥5,88	≥5,51

Пример 2. Определение удаления SIMULSOL™ SL 11W при последующей очистке рекомбинантных белков

Количественное определение ундецил глюкозида с помощью жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (ЖХ-МС) – Метод А

Количественное определение ЖХ-МС проводят на очищенных образцах mAb, собранных в биореакторе, содержащих SIMULSOL™ SL 11W в диапазоне концентраций от 0,03 мМ до 3 мМ.

Один микролитр инкубированного образца вводят в ВЭЖХ Waters Acquity®, соединенную с Waters SYNAPT® G2-Si масс-спектрометром. Для количественного определения, разделение проводят на обращенно-фазовой колонке Varian PLRP-S (1 × 50 мм, 300 Å, 5 мкм) при 80 °С с использованием 0,05% трифторуксусной кислоты (TFA) с использованием H₂O в качестве подвижной фазы А и 0,04 % TFA в ацетонитриле (ACN) в качестве подвижной фазы Б. Колонку уравнивают 15% подвижной фазы Б в течение 10 1 минуты и линейно увеличивают от 15 % до 30 % в течение 3 минут, затем выдерживают при 30% фазы Б в течение 2 минут, а затем удерживается на 100% в течение 1 минуты. После того, как колонка выдерживается при 100% в течение 1 минуты, она повторно уравнивается на 15% подвижной фазы Б. SIMULSOL™ SL 11W отделяется со скоростью 0,3 мл/мин. от 1 до 6 минут и анализируется с использованием источника ионизации электрораспылением (ESI). Масс-спектрометр работает при положительной модели чувствительности, в диапазоне сканирования от 100 до 1000 а.е.м., капиллярном напряжении 3,2 кВ, температуре десольватации 450°С, потоке десольватирующего газа 900 л/ч, температуре источника 150°С и напряжением на конусе с образцом 40 В. Для характеристики разделение проводят на колонке Waters Acquity® UPLC ВНЕ 300 Å С4 (2,1 20 × 100 мм, размер частиц 1,7 мкм) с теми же подвижными фазами. Уравнивают колонку при 20% подвижной фазы Б в течение 1 минуты, линейно увеличивая от 20% до 25% в течение 14 минут, а затем до 90% в течение 1 минуты. После выдержки при 100 % в течение 1,0 минуты повторно уравнивают колонку при 20 % подвижной фазы Б.

Выделенную пиковую зону насыщенного ундецил глюкозида измеряют. В 25 условиях анализа ЖХ-МС наблюдалась линейная зависимость между областью пика извлеченных ионов и концентрациями SIMULSOL™ SL 11W от 0,03 до 3 мМ. Когда концентрация SIMULSOL™ SL 11W превышала 3 мМ, детектор МС насыщался.

Количественное определение ундецил глюкозида с помощью жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС) – метод Б

Стандартные растворы, содержащие SIMULSOL™ SL 11W в диапазоне концентраций от 0,0008 мМ до 0,012 мМ, готовят в основном потоке воды или белка А. После добавления SIMULSOL™ SL 11W эти образцы подвергали анализу ЖХ-МС/МС (MRM). Инкубированный образец (100 мкл) вводят в ЖХ и разделяют 1/20 постколоники 35 на МС. Для анализа использовали ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II, соединенную с масс-

спектрометром Sciex Triple Quad 5500. Для количественного определения разделение проводят на колонке с обращенной фазой Agilent Zorbax, 300SB-C8 (4,6 × 50 мм, 300Å, 3,5 мкм) при 80 °С с использованием 0,5 мМ ацетата натрия в воде в качестве подвижной фазы А и 0,5 мМ ацетата натрия в разведении 95:5 ацетонитрил: вода в качестве подвижной фазы Б. Колонку уравнивают при 20% подвижной фазы Б в течение 2 минут, линейно увеличивают от 20% до 90% в течение 10 минут, выдерживают при 90% фазы Б в течение 2 минут, колонка повторно уравнивается при 20% подвижной фазы Б. SIMULSOL™ SL 11 W отделяется со скоростью 1,0 мл/мин в течение от 4,5 до 5,5 минут и анализируется с использованием источника ионизации электрораспылением (ESI). Масс-спектрометр работает в положительном режиме MRM со сканированием переходных ионов (от 357,0 до 185,0), капиллярным напряжением 5,5 кВ, температурой десольватации 450 °С и потоком газа десольватации 55 л/ч.

Мониторинг выбранных реакций (SRM/MRM (мониторинг множественных реакций)), метод ЖХ-МС/МС, используется для селективного обнаружения насыщенного солями SIMULSOL™ SL 11W. Сканирование SRM для одиночного иона-предшественника (масса натриевого SIMULSOL™ SL 11W, 357,0 m/z) и после фрагментации обнаруживается ион-продукт (наиболее преобладающий фрагмент натриевого SIMULSOL™ SL 11W, 185,0 m/z) и пиковая зона соответствует этому выделенному переходному иону.

В условиях анализа ЖХ-МС/МС графики линейны между концентрациями SIMULSOL™ SL 11W от 0,0008 мМ до 0,012 мМ в воде и основным потоком белка А. Эти результаты показывают, что ЖХ-МС/МС способна обнаруживать SIMULSOL™ SL 11W в диапазоне концентраций от 0,0008 до 0,012 мМ, а линейность графиков не зависит от матрицы. Следовательно, этот метод ЖХ-МС/МС (SRM/MRM) является чувствительным и специфичным для обнаружения SIMULSOL™ SL 11W и не зависит от матрицы, в которой находится детергент. Предел обнаружения (LOD) составляет 0,001 мМ, рассчитанный по линейности.

Хроматография с белком А и обнаружение SIMULSOL™ SL 11W

Очищенные растворы собранного материала биореактора mAb, содержащие 0 % (контроль), 0,3 % и 1,0 % мас./мас. SIMULSOL™ SL 11W, подвергают хроматографии MabSelect™ с белком А. Хроматографию с белком А проводят на нефилтрованном очищенном собранном материале mAb, содержащем SIMULSOL™ SL 11W. После того, как колонка загружена, шесть объемов колонки Tris/NaCl используются для промывки колонки перед элюированием mAb буфером уксусной/лимонной кислоты. Элюированный

основной поток mAb собирают и анализируют с помощью ЖХ-МС на присутствие SIMULSOL™ SL 11W.

5 Результаты анализа с использованием ЖХ-МС (метод А) показывают <0,03 мМ уровней SIMULSOL™ SL 11W в основном потоке белка А из растворов собранного материала биореактора mAb, содержащих 0,3% и 1,0% мас./мас. SIMULSOL™ SL 11W. С
10 помощью ЖХ-МС/МС (метод Б) было обнаружено, что количество SIMULSOL™ SL 11W составляет 0,0005 мМ в основном потоке белка А из растворов собранного материала биореактора mAb, содержащих 0,3% мас./мас. SIMULSOL™ SL 11W, что ниже предела обнаружения (LOD) 0,001 мМ. Эти результаты показывают, что хроматография с белком
15 А способна удалять SIMULSOL™ SL 11W Simulsol SL 11W из потока питательных веществ до уровня следовых количеств, даже без стадий фильтрации перед загрузкой колонки.

Пример 3. Влияние SIMULSOL™ SL 11W на качество рекомбинантного белка

15 Влияние SIMULSOL™ SL 11W на качество рекомбинантных белков проверяется путем сравнения очищенных образцов mAb, собранных в биореакторе, с 0,3% SIMULSOL™ SL 11W и без него при 20°C в течение 3 ч, с последующим инкубированием при 4°C в течение 16 ч. Образцы сначала фильтруют через фильтры из стекловолокна 0,2 мкм, затем через фильтры из ПВДФ 0,45 мкм, а затем подвергают очистке с
20 использованием белка А. Образцы анализируют на аналитические свойства, как показано в Таблице 18, с использованием методов, известных в данной области техники, таких как капиллярный электрофорез (КЭ), эксклюзионная хроматография (ЭХ), измерение изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) на приборе iCE™. Результаты, показанные в Таблице 18, показывают, что обработка SIMULSOL™ SL 11W не оказывала
25 значительного влияния ни на одно из измеряемых качеств по сравнению с отсутствием обработки SIMULSOL™ SL 11W.

Таблица 18. Аналитические данные качества продукта mAb с SIMULSOL™ SL 11W и без него

Аналитичность	Без детергента	0,3% SIMULSOL™ SL 11W
СЕ уменьшенная тяжелая цепь (%)	65,9	65,9
СЕ уменьшенная легкая цепь (%)	31,7	31,6
СЕ основной пик без снижения (%)	98,2	98,2
SEC мономер (%)	98,5	98,5
SEC совокупность (%)	1,5	1,5
Главный пик IEF (%)	75,5	74,8
Всего кислотных вариантов IEF (%)	23,0	23,5
Всего базовых вариантов IEF (%)	1,5	1,6
Белок клетки-хозяина (HCP) яичника китайского хомячка (CHO) (ppm)	336	283
Остаточный белок А (ppm)	13,3	7,3
ДНК (ppb)	21527	21473

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ инактивации вируса в питательном потоке, включающий добавление к потоку экологически безопасного детергента в конечной концентрации от около 0,05% мас./мас. до около 1% мас./мас., при этом экологически безопасный детергент
5 содержит более чем около 40% ундецил алкилглюкозида.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что детергент содержит от около 40% до около 60% ундецил алкилглюкозида.
3. Способ по любому из пп. 1-2, отличающийся тем, что детергент содержит от около 53% до около 57% ундецил алкилглюкозида.
- 10 4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что детергент содержит более чем около 50% ундецил алкилглюкозида.
5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что детергент содержит менее чем около 10% децил алкилглюкозида.
6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что при использовании детергента
15 SIMULSOL™ SL 11W.
7. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что детергент представляет собой ундецил алкилглюкозид.
8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что детергент добавляют к питательному потоку в концентрации от около 0,1% мас./мас. до около 1% мас./мас.
- 20 9. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что детергент добавляют к потоку сырья в конечной концентрации от около 0,3% мас./мас. до около 1% мас./мас.
10. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что детергент добавляют к потоку в конечной концентрации от около 0,1% мас./мас. до около 0,3% мас./мас.
11. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что детергент добавляют к потоку
25 сырья в конечной концентрации около 0,3% мас./мас.
12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что во время указанной стадии добавления детергента питательный поток имеет температуру от около 4°C до около 30°C.

13. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что во время указанной стадии добавления детергента температура потока составляет от около 15°C до около 30°C.
14. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что во время указанной стадии добавления детергента температура потока питательных веществ составляет от около 5 15°C до около 20°C.
15. Способ по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что во время указанной стадии добавления детергента питательный поток имеет значение pH от около 5,5 до около 8,0.
16. Способ по любому из пп. 1-15, дополнительно включающий стадию инкубации 10 детергента в питательном потоке в течение от около 1 до около 180 минут.
17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что после указанной стадии инкубации детергент имеет логарифмический коэффициент снижения вирусной нагрузки (LRF) в потоке питательных веществ более чем около одного или более чем около двух.
18. Способ по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что вирус представляет собой 15 оболочечный вирус.
19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что оболочечный вирус представляет собой ретровирус, герпесвирус, флавивирус, поксвирус, гепаднавирус, вирус гепатита, ортомиксовирус, парамиксовирус, рабдовирус или тогавирус.
20. Способ по п. 1, дополнительно включающий стадию инкубации питательного потока 20 и детергента в течение от около 15 минут до около 180 минут при температуре от около 4°C до около 30°C, при значении pH от около 5,5 до около 8,0, где в поток добавляют детергент в конечной концентрации от около 0,1% мас./мас. до около 1,0% мас./мас., при этом детергент в потоке имеет логарифмический коэффициент снижения вирусной нагрузки (LRF) более чем около 2.
- 25 21. Способ по п. 1, дополнительно включающий стадию инкубации потока сырья и детергента в течение от около 6 минут до около 180 минут при температуре от около 4°C до около 30°C и при pH от около 5,5 до около 8,0, где детергент добавляют в питательный поток в конечной концентрации от около 0,3% мас./мас. до около 1,0% мас./мас., при этом детергент в потоке имеет логарифмический коэффициент

снижения вирусной нагрузки (LRF) более чем около 4.

22. Способ по п. 1, дополнительно включающий стадию инкубации потока сырья и детергента в течение около 180 минут при температуре от около 4°C до около 30°C и при рН от около 5,5 до около 8,0, при этом детергент добавляют к потоку питательных веществ в конечной концентрации от около 0,1% мас./мас. до около 1,0% мас./мас., и при этом детергент в потоке имеет логарифмический коэффициент снижения вирусной нагрузки (LRF) более чем около 5.
23. Способ по п. 1, дополнительно включающий стадию инкубации потока сырья и детергента в течение от около 60 до около 180 минут при температуре от около 4°C до около 30°C и при рН от около 5,5 до около 8,0, где детергент добавляют к питательному потоку в конечной концентрации около 0,3% мас./мас., при этом детергент в потоке исходных материалов имеет логарифмический коэффициент снижения вирусной нагрузки (LRF) более чем около 5.
24. Способ по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что питательный поток представляет собой собранную культуральную жидкость клеток, улавливающий пул или пул извлеченных продуктов.
25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что пул улавливания или пул извлеченных продуктов представляет собой пул аффинной хроматографии.
26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что е пул аффинной хроматографии представляет собой пул белка А, пул белка G или пул белка L.
27. Способ по п. 24, отличающийся тем, что пул улавливания или пул извлеченных продуктов представляет собой пул хроматографии смешанного режима.
28. Способ по любому из пп. 1-27, дополнительно включающий стадию фильтрации потока питательных веществ, содержащий детергент, при этом поток подвергают по меньшей мере одной стадии фильтрации.
29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что е поток питательных веществ подвергают по меньшей мере второму этапу фильтрации.
30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что питательный поток подвергают по меньшей мере третьей стадии фильтрации.

31. Способ по любому из пп. 28-30, дополнительно включающий стадию обработки отфильтрованного потока питательных веществ на колонке для аффинной хроматографии.
- 5 32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что колонка для аффинной хроматографии представляет собой колонку с белком А.
33. Способ по любому из пп. 1-30, отличающийся тем, что поток, содержащий детергент, подвергают аффинной хроматографии.
- 10 34. Способ по любому из пп. 1-33, отличающийся тем, что питательный поток содержит белок, при этом белок представляет собой антитело, гибридный белок Fc, иммуноадгезин, фермент, фактор роста, рецептор, гормон, регуляторный фактор, цитокин, антиген, пептид или связывающий агент.
35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что, антитело представляет собой моноклональное антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело, человеческое антитело, биспецифическое антитело или фрагмент антитела.
- 15 36. Способ по любому из пп. 34-35, отличающийся тем, что белок продуцируют в клетке млекопитающего.
37. Способ по любому из пп. 1-36, отличающийся тем, что стадия добавления детергента к потоку питательных веществ существенно не изменяет мутность питательного потока.
- 20 38. Способ по любому из пп. 1-36, отличающийся тем, что стадия добавления детергента в питательный поток не изменяет качество конечного продукта потока очищенного белка.
39. Способ по любому из пп. 1-38, отличающийся тем, что детергент содержит стабилизирующий агент.
- 25 40. Способ по п. 39, отличающийся тем, что стабилизатор представляет собой монопропиленгликоль.
41. Способ инактивации вируса в питательном потоке, включающий следующие стадии:
добавление к потоку SIMULSOL™ SL 11W в концентрации от около

0,1% мас./мас. до около 0,3% мас./мас.;

инкубирование SIMULSOL™ SL 11W в питательном потоке в течение около 180 минут, при этом логарифмический коэффициент снижения вирусной нагрузки (LRF) SIMULSOL™ SL 11W в потоке превышает около 5;

5 фильтрацию указанного питательного потока, содержащего SIMULSOL™ SL 11W; и

 обработку указанного отфильтрованного потока на колонке для аффинной хроматографии с белком А;

10 при этом указанная стадия добавления и инкубирования питательного потока при температуре от около 4°C до около 30°C и при значении рН от около 5,5 до около 8,0.

42. Способ инактивации вируса в питательном потоке, включающий следующие стадии:

 добавление к потоку SIMULSOL™ SL 11W в концентрации от около 0,1% мас./мас. до около 0,3% мас./мас.;

15 инкубирование SIMULSOL™ SL 11W в питательном потоке в течение около 180 минут, при этом логарифмический коэффициент снижения вирусной нагрузки (LRF) SIMULSOL™ SL 11W в потоке превышает около 5;

 фильтрацию указанного питательного потока, содержащего SIMULSOL™ SL 11W; и

20 воздействие указанного отфильтрованного потока на колонку для аффинной хроматографии с белком А;

 при этом на указанной стадии добавления и инкубации поток имеет температуру от около 4°C до около 30°C и рН от около 5,5 до около 8,0.

43. Способ по п. 42, отличающийся тем, что указанная стадия фильтрации включает первую стадию фильтрации с помощью фильтра 0,22 мкм.

25 44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что указанная стадия фильтрации включает вторую стадию фильтрации с использованием фильтра из ПВДФ с размером пор 0,45 мкм.

30 45. Способ по п. 44, отличающийся тем, что указанная стадия фильтрации включает третью стадию фильтрации с использованием фильтра из ПВДФ с размером пор 0,45 мкм.