

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292141** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.11.02

(51) Int. Cl. **C07K 1/36** (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.01.15

(54) **ГИДРОФОБНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ДЛЯ ОЧИСТКИ ОТ ВИРУСОВ**

(31) 62/962,506

(32) 2020.01.17

(33) US

(86) PCT/US2021/013739

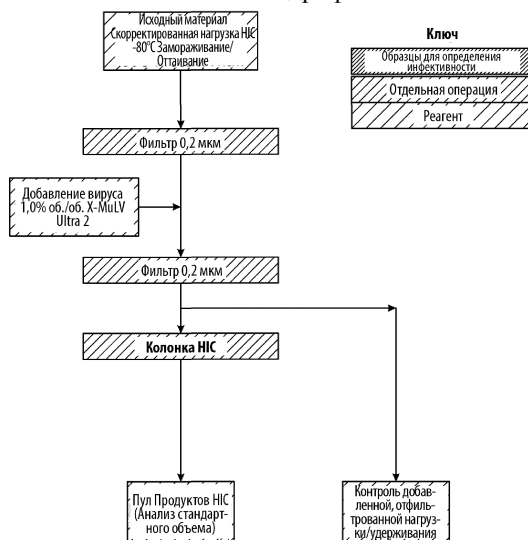
(87) WO 2021/146630 2021.07.22

(71) Заявитель:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Руппино Джон, Маттила Джон, Стэрс
Роберт (US)**

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

(57) В изобретении предложен способ характеристики и/или определения способности гидрофобной хроматографии (НХ) к очистке от вирусов, включая план эксперимента для многофакторного анализа очистки от вирусов с помощью НХ. Данный способ обеспечивает понимание механизма очистки от вирусов с использованием НХ путем проведения D-оптимального плана эксперимента, включающего оценку множества факторов, таких как pH, концентрация буфера, концентрация нагрузки колонки, скорость потока колонки или гидрофобная сила колонки НХ.



A1

202292141

202292141

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575099EA/019

ГИДРОФОБНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ДЛЯ ОЧИСТКИ ОТ ВИРУСОВ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение в основном относится к способам определения способности гидрофобной хроматографии к очистке от вирусов, включая планы экспериментов для многофакторного анализа.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Биологические препараты могут быть контаминированы нежелательными вирусами, что создает риск передачи вирусных заболеваний. Органы Всемирной организации здравоохранения требуют оценки очистки от вирусов для производства биологических препаратов или биотехнологических препаратов, поскольку вирусная нагрузка может увеличиваться во время роста культуры клеток млекопитающих. Эффективные исследования по очистке от вирусов являются важной частью валидации процесса, которая имеет решающее значение для обеспечения безопасности лекарственных препаратов. Контаминация вирусами может повлиять на сырье, процессы культивирования клеток, биореактор и последующие процессы очистки.

Валидационные исследования на вирусы предназначены для получения доказательств того, что выбранные рабочие условия будут эффективно инактивировать и/или удалять вирусы. План эксперимента исследований по очистке от вирусов включает характеристику производственного процесса, чтобы убедиться в его способности удалять вирусы и улучшить понимание условий процесса. При оценке очистки от вирусной контаминации оправдан выбор наихудших условий проведения испытания для оценки.

Процессы инактивации или удаления вирусов включают воздействие на pH, термообработку, фильтрацию или хроматографию. Этапы хроматографии можно использовать для очистки биологических препаратов, при этом потенциально обеспечивается снижение количества вирусов во время очистки от вирусов, такой как хроматография с белком А, анионообменная хроматография или гидрофобная хроматография (HIC, hydrophobic interaction chromatography). Когда для захвата моноклонального антитела используется этап хроматографии, вирус может взаимодействовать с антителом и/или хроматографической смолой. Что касается очистки антител с использованием HIC, существует ограниченное понимание очистки от вирусов, связанное с проточным режимом HIC, например, селективным связыванием нежелательных компонентов, когда антитело появляется в потоке.

Следует понимать, что существует потребность в способах, позволяющих эффективно охарактеризовать способность производственных процессов к очистке от вирусов для обеспечения безопасности лекарственных препаратов, включая создание ретроспективной базы данных по очистке от вирусов для объяснения механизмов и обоснования выбора наихудших условий проведения испытаний, например, улучшение понимания способности HIC к очистке от вирусов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном раскрытии предложены способы определения влияния факторов протекания процесса на способность НИС к удалению вирусов, включая план эксперимента для многофакторного анализа очистки от вирусов с помощью НИС. В данном раскрытии также предложено понимание механизма очистки от вирусов и понимание наихудших условий для очистки от вирусов для повышения безопасности лекарственного препарата. Кроме того, в данном раскрытии предложены способы создания ретроспективной базы данных по очистке от вирусов с помощью НИС для объяснения механизмов и обоснования выбора наихудших условий. Для того чтобы использовать НИС для очистки от вирусов, в данном раскрытии предложена характеристика НИС, связанная с очисткой от модельного ретровируса, для понимания процесса.

В данном раскрытии также предложен способ очистки антитела из образца, содержащего одну или более примесей, включая вирусные частицы, при этом способ включает следующие этапы: (а) получение образца, содержащего антитело, продуцируемое в клетке-хозяине, (b) доведение pH образца до диапазона от около 4,2 до около 8,0, (с) загрузка образца в колонку для гидрофобной хроматографии (НИС), при этом концентрация образца составляет от около 40 г/л до около 200 г/л, и (d) сбор образца, очищенного с помощью НИС.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения цитратный буфер используется для регулирования pH образца по данному способу, при этом концентрация цитратного буфера составляет от около 10 mM до около 200 mM. В некоторых аспектах смола колонки НИС по данному способу представляет собой фенильную или каптофенильную смолу. В некоторых аспектах гидрофобная сила колонки НИС по данному способу находится в диапазоне от слабой гидрофобной силы до сильной гидрофобной силы, при этом слабая гидрофобная сила достигается с использованием фенильной смолы или ее эквивалента, при этом сильная гидрофобная сила достигается с использованием каптофенильной смолы или ее эквивалента.

В некоторых аспектах антитело по данному способу представляет собой моноклональное антитело или биспецифическое антитело, при этом антитело относится к изотипу IgG1 или изотипу IgG4. В некоторых аспектах скорость потока через колонку НИС по данному способу представляет собой линейную скорость от около 100 см/ч до около 300 см/ч.

В некоторых аспектах способ по данной заявке дополнительно включает измерение наличия копий вирусного генома и/или измерение наличия вирусных частиц. В некоторых аспектах способ по данной заявке дополнительно включает измерение как наличия копий вирусного генома, так и вирусных частиц.

В данном раскрытии, по меньшей мере частично, предложен способ очистки антитела из образца, содержащего одну или более примесей, включая вирусные частицы, при этом способ включает следующие этапы: (а) получение образца, содержащего

антитело, продуцируемое в клетке-хозяине, (b) доведение pH образца до диапазона от около 4,2 до около 8,0, (c) загрузка образца в колонку для гидрофобной хроматографии (НИС), при этом концентрация образца составляет от около 40 г/л до около 200 г/л, и (d) сбор образца, очищенного с помощью НИС и (e) измерение наличия копий вирусного генома и/или инфекционных вирусных частиц в образце, очищенном с помощью НИС, собранного во время этапа (d).

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ по данной заявке дополнительно включает оптимизацию удаления копий вирусного генома и/или вирусных частиц путем проведения D-оптимального плана эксперимента. В некоторых аспектах D-оптимальный план эксперимента по данной заявке оценивает следующие факторы: (a) pH образца от около 4,2 до около 8,0, (b) нагрузку колонки, при этом концентрация образца составляет от около 40 г/л до около 200 г/л, (c) линейную скорость потока через колонку НИС от около 100 см/ч до около 300 см/ч, и (d) гидрофобную силу колонки НИС от слабой гидрофобной силы до сильной гидрофобной силы; при этом слабая гидрофобная сила достигается с использованием фенильной смолы или ее эквивалента, при этом сильная гидрофобная сила достигается с использованием каптофенильной смолы или ее эквивалента. В некоторых аспектах D-оптимальный план эксперимента по данной заявке дополнительно оценивает изотип антитела, при этом антитело представляет собой моноклональное антитело или биспецифическое антитело.

В данном раскрытии, по меньшей мере частично, предложен способ очистки антитела из образца, содержащего одну или более примесей, включая вирусные частицы, при этом способ включает следующие этапы: (a) получение образца, содержащего антитело, продуцируемое в клетке-хозяине, (b) добавление цитратного буфера к образцу, (c) доведение pH образца до диапазона от около 4,2 до около 8,0, (d) загрузка образца в колонку для гидрофобной хроматографии (НИС), при этом концентрация образца составляет от около 40 г/л до около 200 г/л, и (e) сбор образца, очищенного с помощью НИС и (f) измерение наличия копий вирусного генома и/или вирусных частиц в образце, очищенном с помощью НИС, собранного во время этапа (e).

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ по данной заявке дополнительно включает оптимизацию удаления копий вирусного генома и/или вирусных частиц путем проведения D-оптимального плана эксперимента, при этом D-оптимальный план эксперимента оценивает следующие факторы: (a) pH образца от около 4,2 до около 8,0, (b) концентрацию цитратного буфера от около 10 mM до около 200 mM, (c) нагрузку колонки, при этом концентрация образца составляет от около 40 г/л до около 200 г/л, (d) линейную скорость потока через колонку НИС от около 100 см/ч до около 300 см/ч, и (e) гидрофобную силу колонки НИС от слабой гидрофобной силы до сильной гидрофобной силы; при этом слабая гидрофобная сила достигается с использованием фенильной смолы или ее эквивалента, при этом сильная гидрофобная сила достигается с использованием каптофенильной смолы или ее эквивалента. В некоторых аспектах антитело по данному способу представляет собой моноклональное

антитело или биспецифическое антитело.

Эти и другие аспекты изобретения будут лучше оценены и поняты при рассмотрении вместе со следующим описанием и прилагаемыми графическими материалами. Следующее описание, хотя и указывает на различные варианты реализации данного изобретения и его многочисленные конкретные детали, дано лишь в качестве иллюстрации, а не ограничения. Множество замен, модификаций, дополнений или перестановок могут быть выполнены в рамках объема данного изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 изображена краткая схема иллюстративного процесса количественного определения удаления вируса с использованием анализов на наличие вирусов согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 2 представлен расчет общего логарифмического коэффициента уменьшения (LRF, logarithmic reduction factor) для количественного определения удаления вируса согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 3 представлена матрица диаграммы рассеяния для D-оптимальных планов, которые использовались для объяснения основных эффектов, взаимодействий и квадратичных значений для оценки широкого диапазона факторов протекания хроматографии, включая pH, цитрат, нагрузку колонки, линейную скорость или смолу HIC, согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 4 представлен количественный анализ вируса для контроля исходного вируса, контроля нагрузки удерживания HIC и пула продуктов HIC согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 5 изображен предполагаемый график, построенный на основе фактического зарегистрированного LRF и предполагаемого зарегистрированного LRF для оценки очистки от вируса X-MuLV в соответствии с иллюстративными вариантами реализации данного изобретения.

На Фиг. 6 представлен однофакторный анализ инфективности остаточного X-MuLV с помощью программы путем применения представленной модели выведения к ретроспективному набору данных для прогнозирования поведения специфических моноклональных антител согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения. Двадцать три моноклональных антитела исследовали с использованием однофакторного анализа инфективности остаточного X-MuLV с помощью программы согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 7 представлена оценка очистки от вируса X-MuLV путем построения предполагаемого графика на основе фактического LRF кПЦР и предполагаемого LRF кПЦР согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения. Модель LRF кПЦР использовали для идентификации нескольких значимых факторов протекания хроматографии согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 8 представлен однофакторный анализ кПЦР остаточного вируса с помощью программы с применением модели кПЦР для прогнозирования поведения

специфических моноклональных антител согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения. Двадцать одно моноклональное антитело исследовали с использованием однофакторного анализа кПЦР GenReg остаточного вируса с помощью программы согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 9А представлены график и профилировщик прогнозов, полученные путем применения DoE для оптимизации факторов протекания хроматографии как для выхода, так и для LRF вируса путем применения представленных моделей LRF к процессам очистки от вирусов с помощью НИС согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 9В представлен профилировщик прогнозов, примененный к IgG4 путем применения DoE для предоставления указаний по оптимизации факторов протекания хроматографии как для выхода, так и для LRF вируса.

На Фиг. 10 представлено сравнение относительной гидрофобности молекул нескольких смол НИС с использованием моноклональных антител (mAb) согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 11 представлен однофакторный анализ LRF инфективности X-MuLV с данными DoE или без них, проведенный путем применения исследований DoE для очистки от вируса с помощью НИС с различными диапазонами факторов протекания хроматографии согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 12 представлен анализ данных, полученных в исследованиях DoE с использованием двумерного соответствия LRF инфективности X-MuLV с помощью LRF кПЦР X-MuLV для подтверждения взаимосвязи между LRF по анализу инфективности и анализу кПЦР согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 13 представлен анализ данных, полученных в результате исследований DoE, в отношении профиля взаимодействия представленной модели DoE LRF НИС согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 14А представлена исходная модель ретроспективной базы данных для анализов инфективности до применения данных DoE по очистке от вирусов с помощью НИС согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 14В представлена улучшенная модель с помощью применения данных DoE по очистке от вирусов с помощью НИС к ретроспективной базе данных для анализов инфективности согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 15А представлена исходная модель до применения данных DoE по очистке от вирусов с помощью НИС к ретроспективной базе данных для модели кПЦР согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 15В представлена модифицированная модель путем применения данных DoE по очистке от вирусов с помощью НИС к ретроспективной базе данных для модели кПЦР согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 16 представлен предполагаемый график и масштабированные оценки, полученные путем применения данных DoE по очистке от вирусов с помощью НИС к

ретроспективной базе данных, для изоштапа IgG1 мАТ11 согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 17 представлен предполагаемый график и масштабированные оценки, полученные путем применения данных DoE по очистке от вирусов с помощью НИС к ретроспективной базе данных, для изоштапа IgG4 мАТ14 согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 18А представлен предполагаемый график, полученный путем применения данных DoE по очистке от вирусов с помощью НИС к ретроспективной базе данных, для случая использования смолы каптофенил HS согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 18В представлены оценки параметров и профилировщик прогнозов, полученные путем применения данных DoE по очистке от вирусов с помощью НИС к ретроспективной базе данных, для случая использования смолы каптофенил HS согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 19А представлен предполагаемый график, полученный путем применения данных DoE по очистке от вирусов с помощью НИС к ретроспективной базе данных, для случая использования смолы фенилсефарозы 6 FF HS согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 19В представлены оценки параметров и профилировщик прогнозов, полученные путем применения данных DoE по очистке от вирусов с помощью НИС к ретроспективной базе данных, для случая использования смолы фенилсефарозы 6 FF HS согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

На Фиг. 20 представлены предполагаемый график и профилировщик прогнозов, оптимизирующий выход путем применения модели выхода DoE НИС для отслеживания тренда между LRF и выходом согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Поскольку вирусная контаминация может многократно расти во время роста культуры клеток млекопитающих, оценка очистки от вирусов для производства биологических препаратов или биотехнологических препаратов имеет важное значение и играет решающее значение для обеспечения безопасности лекарственных препаратов. Органы здравоохранения предоставили руководство, которое равносильно «Используйте хорошие научные данные» для управления рисками пациента для оценки того, очищает ли тот или иной этап от вируса, путем понимания как происходит удаление вируса, когда этапы работают независимо друг от друга, является ли их способность к удалению аддитивной или нет, и понимания, что влияет на производительность. Оценка очистки от вируса должна включать демонстрацию удаления определенного модельного вируса для ретровирусоподобных частиц, присущих геному клеток яичника китайского хомячка (CHO) (Anderson et al., Endogenous origin of defective retroviruslike particles from a recombinant Chinese hamster ovary cell line, Virology 181(1): 305-311, 1991). Ксенотропный

вирус мышиноного лейкоза (X-MuLV) можно использовать в качестве модельного вируса для оценки вирусной инактивации фармацевтических белков, полученных из клеток СНО. Вирус мышиноного лейкоза (MuLV) представляет собой ретровирус и имеет положительную одноцепочечную смысловую РНК, которая реплицируется с помощью обратной транскрипции. MuLV может вызывать лейкоз у инокулированных мышей.

При разработке процесса очистки важно обеспечить очистку от вирусов. Типичный рабочий процесс для изучения очистки от вирусов в производственном процессе включает добавление вируса в образец, запуск процесса в масштабированном эксперименте, чтобы имитировать крупномасштабный этап, и документирование возможности очистки от вируса. В нормативных документах рекомендуется использовать валидацию данных о наличии вирусов для расчета ограничений в ходе процесса для определения критических параметров процесса, например, для проведения валидаций в крайних точках процесса. Исследования необходимо проводить в наихудших условиях, чтобы продемонстрировать минимальную очистку, которую может обеспечить этап процесса (1998, Q5A Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin. T. I. C. f. H. o. T. R. f. P. f. H. Use). Наихудшие условия могут быть определены факторами, влияющими на механизм очистки от вируса в зависимости от используемого процесса. Наихудшие условия можно исследовать, чтобы продемонстрировать минимальное снижение количества вирусов на конкретном этапе процесса (Aranha et al., Viral clearance strategies for biopharmaceutical safety, part II: a multifaceted approach to process validation, BioPharm 14 (5), 43-54, 90, 2001).

Исследования по валидации на вирусы могут быть разработаны для документирования выбранных рабочих условий в отношении качества препарата и специфики процесса для обеспечения вирусной безопасности. Процессы инактивации или удаления вирусов включают воздействие на pH, термообработку, воздействие растворителем/детергентом, фильтрацию или хроматографию. Инкубация при низком значении pH может быть использована для инактивации вируса в оболочке, например, для необратимой денатурации капсида (Brorson et al., Bracketed generic inactivation of rodent retroviruses by low pH treatment for monoclonal antibodies and recombinant proteins, Biotechnol Bioeng 82(3): 321-329, 2003). Фильтрация представляет собой удаление на основе размера, которое можно использовать для удаления вирусов как с оболочкой, так и без оболочки (Lute et al., Phage passage after extended processing in small-virus-retentive filters, Biotechnol Appl Biochem 47(Pt 3): 141-151, 2007). Этапы хроматографии можно использовать для очистки биологических препаратов, при этом потенциально обеспечивается снижение количества вирусов во время очистки от вирусов, такой как хроматография с белком А (Bach et al., Clearance of the rodent retrovirus, XMuLV, by protein A chromatography, Biotechnol Bioeng 112(4): 743-750, 2015) или анионообменная хроматография (Strauss et al., Anion exchange chromatography provides a robust, predictable process to ensure viral safety of biotechnology products, Biotechnol Bioeng 102(1): 168-175, 2009a).

Некоторые этапы хроматографии могут способствовать очистке от вирусов, например, использование анионообменной хроматографии или гидрофобной хроматографии (ННС) для логарифмического снижения порядка 4-5 логарифмических значений (Brown et al., A step-wise approach to define binding mechanisms of surrogate viral particles to multi-modal anion exchange resin in a single solute system. *Biotechnol. Bioeng.*, 114(7), p. 1487-1494, 2017). Мультимодальные анионообменные смолы часто демонстрируют высокую и надежную очистку от вирусов в очень широком диапазоне pH и проводимости. Катионообменная хроматография и хроматография с белком А также способствуют уменьшению количества вирусов в пределах от 2 до 3 логарифмических значений (Ruppach, Log 10 Reduction Factors in Viral Clearance Studies, *BioProcess. J.*, 12(4), 24-30 <https://www.bioprocessingjournal.com/>, online posting date January 7, 2014). Несколько критических переменных в хроматографических процессах могут влиять на очистку от вирусов, в том числе концентрации нагрузки образца (например, нагрузка антителами), концентрации загрязнителей, буферы, pH, скорости потока, объемы промывки и температуры, в зависимости от смолы и режима связывания. Изменение этих условий может дать представление о возможностях процесса по уменьшению количества вирусов.

Требования к оценке очистки от вирусов для производства биологических препаратов или биотехнологических препаратов со стороны всемирной организации здравоохранения привели к увеличению спроса на характеристику способности производственного процесса к очистке от вирусов. В данном раскрытии предложен план эксперимента для многофакторного анализа очистки от вируса с помощью ННС для удовлетворения вышеупомянутой потребности, которая может обеспечить понимание механизма очистки от вируса для повышения безопасности лекарственного препарата.

В данном раскрытии предложены способы характеристики способности ННС к очистке от вирусов для оценки и валидации ННС путем определения влияния факторов протекания хроматографии, включая план эксперимента для многофакторного анализа. Экспериментальный план, например, план эксперимента или DoE, для многофакторного анализа включает критические характеристики процесса ННС путем выявления важных факторов протекания хроматографии для улучшения понимания условий воздействия для максимальной очистки от вируса. В данном раскрытии предложена возможность создания ретроспективной базы данных ННС по очистке от вирусов, чтобы объяснить механизм и обосновать выбор наихудших условий.

DoE представляет собой процедуру исследования, которая допускает систематические изменения нескольких факторов протекания процесса в контексте одного плана эксперимента. Результаты DoE можно использовать для создания математических моделей исследуемого процесса. Применяя данные математические модели, можно определить истинный оптимум исследуемого процесса. Применение результатов DoE включает устранение несущественных факторов протекания процесса, определение критических факторов протекания процесса для дальнейшего изучения и прогнозирования эффективности исследуемого процесса. DoE выполняется в систематическом логическом

потоке, включая постановку целей, выбор переменных факторов и моделей, создание планов эксперимента для поддержки моделей, сбор данных на основе планов, выполнение анализа, проверку моделей с помощью контрольных точек и отчет о результатах.

Типичный рабочий процесс для изучения очистки от вирусов на этапе хроматографии включает добавление вируса в пробу, выполнение этапа хроматографии на колонке в уменьшенном масштабе и документирование способности к очистке от добавленного вируса. Исследования очистки от вирусов обычно проводятся с использованием модели в уменьшенном масштабе с использованием мелкомасштабной хроматографической колонки для имитации крупномасштабного этапа с той же высотой слоя и скоростью потока. DoE может облегчить определение наихудших условий для выявления факторов протекания процесса, влияющих на механизм очистки от вируса в зависимости от используемого процесса. Затем можно исследовать наихудшие условия, чтобы продемонстрировать минимальное снижение количества вирусов на конкретном этапе процесса.

Что касается очистки антител существует ограниченное понимание очистки от вирусов, связанное с негативным режимом (проточным режимом) НИС, например, селективным связыванием нежелательных компонентов, когда антитело появляется в потоке. Ограничением НИС является то, что для связывания белка необходимы высокие концентрации соли с учетом агрегации белка. Для того чтобы использовать НИС для очистки от вирусов, в данном раскрытии предложена характеристика НИС, связанная с очисткой от модельного ретровируса, для понимания процесса. Влияние факторов протекания процесса на способность НИС к очистке от вирусов можно определить, чтобы улучшить понимание наихудших условий воздействия для очистки от вирусов на пути к максимальной очистке.

Исследования по очистке от вирусов представляет собой измерение способности отдельных этапов производственного процесса инактивировать или удалять вирусы. Модельные вирусы могут быть добавлены в конкретный процесс, а затем могут быть проведены эксперименты, чтобы продемонстрировать инактивацию или удаление добавленных вирусов на последующих этапах очистки. Вирусная нагрузка добавленных промежуточных технологических продуктов и технологических образцов, относящихся к препарату, может быть определена для оценки коэффициентов уменьшения. Способы количественного определения вируса по данной заявке включают анализы инфективности на основе вирусспецифических клеток и количественную полимеразную цепную реакцию (кПЦР). Вирусы состоят из ДНК или РНК, инкапсулированных или не инкапсулированных белковой оболочкой.

Уменьшение количества вирусов относится к разнице между общим количеством вирусов в исходном образце и конечном образце после выполнения определенного этапа процесса, такого как процесс хроматографии. Способность к уменьшению количества вирусов может быть определена как логарифмическое значение уменьшения (LRV, logarithmic reduction value) или логарифмический коэффициент уменьшения (LRF,

logarithmic reduction factor) для этапа процесса. Коэффициент уменьшения рассчитывается на основе общей вирусной нагрузки до применения этапа очистки и общего количества вируса после применения этапа очистки. Валидационные исследования на вирусы могут быть проведены для документального подтверждения очистки от известных вирусов, связанных с продуктом, и для оценки эффективности процесса по очистке от потенциальных посторонних вирусных контаминаций путем определения способности процесса к очистке от неспецифических модельных вирусов.

Оценка и валидация процесса уменьшения содержания вирусов включают критический анализ процесса для определения потенциальных патогенных источников вирусной контаминации или для характеристики процесса, чтобы определить, какие этапы производственного процесса могут привести к очистке от вирусов. Каждый исследуемый технологический этап можно оценить на предмет механизма очистки от вирусов, такого как инактивация, удаление или их комбинация. Предпочтительно выбрать эффективный и надежный этап, который может удалить вирусные контаминации независимо от переменных параметров процесса (Aranha et al.).

В данном раскрытии также предложены способы определения влияния факторов протекания процесса на способность НИС к очистке от вирусов путем определения нескольких значимых факторов протекания процесса, включая pH буфера, концентрацию цитрата натрия в буфере, нагрузку образца, линейную скорость потока, гидрофобную силу смолы НИС и изотип моноклонального антитела. В данном раскрытии также предложено объяснение наихудших условий воздействия для очистки от вируса. Факторы протекания процесса при общей очистке от вирусов с помощью НИС с применением наихудших условий включают высокий уровень pH, низкую-среднюю концентрацию цитратного буфера, высокую нагрузку колонки, высокую линейную скорость, изотип моноклонального антитела IgG4 и смолу фенилсефароза 6 FF HS (слабая смола НИС). Результаты DoE и полученные модели могут быть использованы для подтверждения, отклонения или изменения существующего понимания механизма НИС для очистки от вирусов.

Иллюстративные варианты реализации данного изобретения, раскрытые в данном документе, удовлетворяют вышеупомянутым требованиям, предлагая способы и системы для характеристики способности НИС к очистке от вирусов, включая план эксперимента для многофакторного анализа для определения влияния факторов протекания процесса.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения предложены способы очистки антитела из образца, содержащего одну или более примесей, включая вирусные частицы. Удаление вирусных частиц и/или копий вирусного генома оценивают с использованием НИС для очистки от вирусов.

Термин в единственном числе следует понимать как означающий «по меньшей мере, один»; и термины «около» и «приблизительно» следует понимать как допускающие стандартные вариации, как их понимают специалисты в данной области техники; и там, где указаны диапазоны, включаются и конечные точки.

Используемые в контексте данного документа термины «включают», «включает» и «включающий» не имеют ограничительного характера и понимаются как означающие «содержат», «содержит» и «содержащий», соответственно.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в данном раскрытии предложен способ очистки антитела из образца, содержащего одну или более примесей, включая вирусные частицы, при этом способ включает следующие этапы: (a) получение образца, содержащего антитело, продуцируемое в клетке-хозяине, (b) доведение pH образца до диапазона от около 4,2 до около 8,0 и (c) загрузка образца в колонку для гидрофобной хроматографии (HIC), при этом концентрация образца составляет от около 40 г/л до около 200 г/л, и (d) сбор образца, очищенного с помощью HIC, на этапе (c).

Используемый в контексте данного документа термин «антитело» относится к молекулам иммуноглобулина, состоящим из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет переменную область тяжелой цепи (HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь имеет переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (C_L). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L может состоять из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает, но не ограничивается ими, антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью рекомбинантных средств, такие как антитела или биспецифические антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. IgG включает подмножество антител.

Используемый в контексте данного документа термин «примесь» может включать любой нежелательный белок, присутствующий в белковом биофармацевтическом препарате. Примеси могут включать производственные примеси и родственные примеси. Кроме того, примесь может иметь известную структуру, частично охарактеризованную или неидентифицированную. Производственные примеси могут возникать в процессе производства и могут включать три основные категории: происходящие из клеточного субстрата, происходящие из клеточной культуры и образующиеся вследствие последующего воздействия. Примеси, происходящие из клеточного субстрата, включают, но не ограничиваются ими, белки, полученные из организма-хозяина, и нуклеиновую кислоту (геномную, векторную или тотальную ДНК клетки-хозяина). Примеси, происходящие из клеточных культур, включают, но не ограничиваются ими, индукторы,

антибиотики, сыворотку и другие компоненты питательной среды. Примеси, образующиеся вследствие последующего воздействия, включают, но не ограничиваются ими, ферменты, реагенты для химического и биохимического воздействия (например, бромистый циан, гуанидин, окислители и восстановители), неорганические соли (например, тяжелые металлы, мышьяк, неметаллический ион), растворители, носители, лиганды (например, моноклональные антитела) и другие вымываемые вещества. Родственные примеси (например, предшественники, некоторые продукты деградации) могут представлять собой молекулярные варианты, возникающие во время производства и/или хранения, которые не обладают свойствами, сравнимыми со свойствами целевого препарата в отношении активности, эффективности и безопасности. Такие варианты могут потребовать значительных усилий по выделению и характеристике, чтобы определить тип модификации (модификаций). Родственные примеси могут включать усеченные формы, модифицированные формы и агрегаты. Усеченные формы образуются под действием гидролитических ферментов или химических веществ, катализирующих расщепление пептидных связей. Модифицированные формы включают, но не ограничиваются ими, дезамидированные, изомеризованные, с нарушенной S-S связью, окисленные формы или формы с некорректными конъюгированными остатками (например, гликозилирование, фосфорилирование). Модифицированные формы могут также включать любую форму посттрансляционной модификации. Агрегаты включают димеры и полимеры целевого продукта. (Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, ICH August 1999, U.S. Dept. of Health and Human Services).

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ по данной заявке дополнительно включает оптимизацию удаления копий вирусного генома и/или вирусных частиц путем проведения D-оптимального плана эксперимента, при этом D-оптимальный план эксперимента по данной заявке оценивает следующие факторы: (a) pH образца от около 4,2 до около 8,0, (b) нагрузку колонки, при этом концентрация образца составляет от около 40 г/л до около 200 г/л, (c) линейную скорость потока через колонку НИС от около 100 см/ч до около 300 см/ч, и (d) гидрофобную силу колонки НИС от слабой гидрофобной силы до сильной гидрофобной силы, и (e) изотип антитела.

Используемый в контексте данного документа термин «изотип» относится к различным изотипам иммуноглобулинов. Иммуноглобулины представляют собой гетеродимерные белки, состоящие из двух тяжелых и двух легких цепей. Иммуноглобулин содержит вариабельные домены, которые связывают антигены, и константные домены, определяющие эффекторные функции. Fc-область тяжелых цепей определяет класс антител, которых у млекопитающих пять: IgG, IgA, IgM, IgD и IgE. Классы отличаются своими биологическими свойствами, также известными как эффекторные функции, и их функциональной локализацией для обеспечения соответствующего иммунного ответа на данный антиген. Существует пять основных

классов константных доменов тяжелой цепи. Каждый класс определяет изотипы IgM, IgG, IgA, IgD и IgE. IgG можно разделить на четыре подкласса, например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgA можно разделить на IgA1 и IgA2. Когда антитело может представлять собой антитело человека, изотип антитела человека может представлять собой IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM или IgE. Когда антитело представляет собой антитело обезьяны, изотип антитела обезьяны может представлять собой IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM или IgA.

Иллюстративные варианты реализации данного изобретения

В вариантах реализации данного изобретения, описанных в данном документе, предложены способы очистки антитела из образца, содержащего одну или более примесей, включая вирусные частицы. Способ включает оптимизацию удаления копий вирусного генома и/или вирусных частиц путем проведения D-оптимального плана эксперимента.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в данном раскрытии предложен способ очистки антитела из образца, содержащего одну или более примесей, включая вирусные частицы, при этом способ включает следующие этапы: (a) получение образца, содержащего антитело, продуцируемое в клетке-хозяине (b) доведение pH образца до диапазона от около 4,2 до около 8,0 и (c) загрузка образца в колонку НИС, при этом концентрация образца составляет от около 40 г/л до около 200 г/л, и (d) сбор образца, очищенного с помощью НИС, на этапе (c).

В некоторых аспектах смола колонки НИС по данному способу представляет собой смолу фенилсефароза 6 FF HS (phenyl Sepharose 6 FF HS) или смолу каптофенил HS (capto phenyl HS). В некоторых аспектах гидрофобная сила колонки НИС по данному способу находится в диапазоне от слабой гидрофобной силы до сильной гидрофобной силы, при этом слабая гидрофобная сила достигается с использованием смолы фенилсефароза 6 FF HS или ее эквивалента, при этом сильная гидрофобная сила достигается с использованием смолы каптофенил HS или ее эквивалента. В некоторых аспектах смола НИС содержит гидрофобную группу, которая представляет собой фенил, каптофенил, октил, бутил, гексил или пропил.

Стоит понимать, что способ или система не ограничены какой-либо из вышеупомянутых гидрофобных хроматографий или условиями ее протекания. Последовательная маркировка этапов способа цифрами и/или буквами, как предложено в данном документе, не предназначена для ограничения способа или любых его вариантов реализации конкретным указанным порядком. Различные публикации, включая патенты, заявки на патенты, опубликованные заявки на патенты, номера доступа, технические статьи и научные статьи цитируются на протяжении всего данного описания изобретения. Каждая из этих цитируемых ссылок включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки для всех целей. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в контексте данного документа, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение.

Данное раскрытие будет более полно понято со ссылкой на следующие примеры, которые предоставлены для более подробного описания раскрытия. Они предназначены для иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничивающие объем данного раскрытия.

ПРИМЕРЫ

Способы планирования экспериментов

1.1 Выбор факторов протекания процесса

Различные факторы (параметры) протекания процесса для планирования экспериментов (DoE) НИС были выбраны для изучения влияния факторов протекания на способность НИС к очистке от вирусов, чтобы улучшить понимание условий воздействия для максимального очищения от вирусов. Были выбраны факторы протекания процесса, теоретически влияющие на очистку от вирусов с помощью НИС. Также были выбраны факторы протекания процесса, которые обычно изучались для планов фаз, относящихся к низкоуровневой оценке риска (LLRA, low level risk assessment). Факторы протекания процесса были оценены для расширения понимания механизма очистки от вирусов для связи с органами государственного регулирования и контроля, например, оценены изотипы моноклональных антител или гидрофобная сила смолы НИС. Выбранные факторы протекания процесса и их рейтинг риска безопасности ретровирусов перечислены в Таблице 1, включая концентрацию образца, загруженного в колонку (г/л), pH буфера, линейную скорость потока (см/ч), нагрузку белка клетки-хозяина (HCP в ч./млн), нагрузку высокомолекулярным (HMW) димерным белком (%), нагрузку высокомолекулярным (HMW) полимерным белком (%), концентрацию цитрата натрия (мМ), число циклов использования смолы НИС, концентрацию белка и рабочую температуру (по Цельсию). Другие факторы протекания процесса, которые не были выбраны в исследованиях, оценивались путем остаточного анализа ранее полученных экспериментальных данных.

Результаты указывают на то, что факторы рабочей температуры, как ожидается, будут иметь ограниченное влияние на планирование фаз. Контроль факторов рабочей температуры было трудно реализовать в вирусной лаборатории (Lu et al., Recent Advancement in Application of Hydrophobic Interaction Chromatography for Aggregate Removal in Industrial Purification Process, Current Pharmaceutical Biotechnology, 2009, 10, 427-433). Многократно используемая (повторно используемая) смола НИС не оказала влияния на исследования очистки от вирусов. Факторы нагрузки примесями было трудно измерить (отдельное исследование) и контролировать.

Таблица 1. Выбор факторов протекания процесса

Факторы (X)	Рейтинг рисков безопасности ретровирусов
Нагрузка (г/л)	9
pH	6
Линейная скорость (см/ч)	6

Нагрузка НСР (ч./млн)	6
Нагрузка НМW димером (%)	3
Нагрузка НМW полимером (%)	3
Концентрация цитрата натрия (мМ)	3
Количество повторных использований	3
Концентрация нагрузки	3
Рабочая температура (по Цельсию)	3

2.1 Выбор факторов протекания процесса для планов экспериментов по очистке от вирусов с помощью НИС

Различные диапазоны факторов протекания процесса были выбраны для планирования экспериментов (DoE) по очистке от вирусов (VC, viral clearance) с помощью НИС. Чтобы максимизировать соотношение сигнал/шум, были выбраны широкие диапазоны факторов протекания процесса, как представлено в Таблице 2, включая диапазон pH, концентрацию цитрата, нагрузку колонки, линейную скорость, гидрофобную силу (смолы НИС) и изотипы моноклональных антител. Обоснование выбора диапазона pH 4,2-8,0 заключается в том, что низкий уровень pH продемонстрировал улучшение очистки от белка клетки-хозяина для некоторых программ. В частности, уровень pH 4,2 был выбран в качестве нижнего предела pH, который, как ожидается, не будет влиять на качество продукта. Обоснованием выбора диапазона концентрации цитрата в 10-200 мМ является выбор широкого диапазона концентрации цитрата, поскольку сила космотропа может модулировать адсорбцию вируса на колонке. Обоснование выбора диапазона нагрузки колонки 40-200 г/л заключается в том, что более высокая нагрузка колонки может представлять наихудший вариант очистки от вирусов из-за конкурентного связывания. Обоснованием выбора линейной скорости на уровне 100-300 см/ч является то, что изменения времени контакта может ограничивать адсорбцию вирусов. В частности, ожидается, что более короткое время контакта может снизить диффузию, что может ограничить адсорбцию вирусов. Изотипы IgG1 и IgG4 были выбраны для включения свойства нагрузки для удовлетворения потенциальных нормативных требований.

Таблица 2. Диапазон выбора факторов протекания процесса для DoE для очистки от вирусов с помощью НИС

Факторы	Диапазоны DoE VC	Ссылки на планирование фаз	Диапазоны ранее полученных экспериментальных данных
pH	4,2-8,0	Обычный диапазон многофакторного DoE для НИС составляет 4,5-6,0.	4,4-8,0

Цитрат	10-200 мМ	Обычный диапазон многофакторного DoE для НИС составляет 10-50 мМ	20-150
Нагрузка колонки	40-200 г/л	Обычный диапазон многофакторного DoE для НИС составляет 50-150 г/л	80-160
Линейная скорость	100-300 см/ч	Диапазон многофакторного DoE для НИС	150-200
Гидрофобная сила (смола НИС)	Слабая (Фенилсефароза 6 FF HS); сильная (Каптофенил HS)	10 смол, оцененных с помощью высокопроизводительного скрининга	Только каптофенил
изотип мАт	IgG1, IgG4	IgG1/IgG4	В основном IgG4

Диапазоны факторов протекания процесса были дополнительно проверены, чтобы гарантировать, что широкие диапазоны факторов не приводят к невозможным комбинациям факторов, поскольку операции с такими широкими диапазонами факторов могут иметь риск неудачи в прогонах НИС, возможно, из-за необратимого связывания или повышенного давления в колонке. Были проведены предварительные эксперименты, чтобы подтвердить поле проектных параметров при наихудших характеристиках НИС, таких как % выхода и стратегия очистки. Предварительные эксперименты включают: скрининг при низком уровне pH 4,2, низкой нагрузки при концентрации 40 г/л, высокой концентрации цитрата при 200 мМ для каждого моноклонального антитела (мАт) на каждой смоле; оценку площади под кривой анализа (AUC) для проверки эффектов очистки колонки с использованием 6N гуанидина HCl; и оценку воздействия процесса замораживания/оттаивания на загружаемый материал. Как представлено в Таблице 3, предварительные прогоны не выявили существенных неудачных вариантов.

Таблица 3. Предварительные эксперименты

мАт	Смола	Выход (%)	Фактор Очистки от %HMW	AUC после использования гуанидина (% от общего количества)
мАт14	Каптофенил HS	57,0	19	0,01
мАт14	Фенилсефароза 6 FF HS	87,0	5,6	0,05
мАт11	Каптофенил HS	28,0	16	0,09
мАт11	Фенилсефароза 6 FF HS	72,0	3,3	0,01

Поскольку могут присутствовать некоторые неконтролируемые переменные, контролировались определенные условия, такие как мониторинг количества циклов колонки, температурный режим воздействия (например, комнатная температура), консистенция партии вируса или система АКТА (система для препаративной хроматографии для безопасной разработки масштабируемых способов и процессов),

путем фиксации неконтролируемых переменных в остатках или RMSE (квадратном корне из дисперсии остатков). Для разных значений pH нагрузки или разных концентраций цитрата (мМ) использовались различные концентрации переменной нагрузки, чтобы обеспечить загрузку колонки, представленную в Таблице 2. Для валидационных исследований по очистке от вирусов предварительное исследование проводилось только при наихудших условиях, таких как низкий уровень pH или высокая концентрация цитрата. Кроме того, ко всем прогонам применяли предварительное тестовое разбавление для наихудших условий.

3.1 Обзор процесса

Количественное определение вирусов проводилось с использованием двух анализов на вирусы, например, анализ инфективности и кПЦР (Xu et al., An overview of quantitative PCR assays for biologicals: quality and safety evaluation, Dev Biol (Basel) 113: 89-98, 2003). Анализ инфективности представляет собой клеточный анализ, относящийся к конкретному вирусу, который проводится путем измерения инфекционных вирусных частиц. Отсутствие инфективности означает либо инактивацию вируса, либо удаление вируса. Анализы инфективности важны для безопасности пациента, поскольку они представляют вирус, который потенциально может заразить пациента. Количественное определение с использованием кПЦР детектирует только наличие копий вирусного генома. Отсутствие геномных копий означает удаление вируса. Чтобы максимизировать количество прогонов, планы выборочного контроля были ограничены. Использование анализов со стандартным объемом может ограничивать чувствительность анализа, однако диапазоны LRF от 0 до 4 были достижимы.

Обзор типового процесса проиллюстрирован на Фиг. 1. Исходный материал, например, со скорректированной нагрузкой НИС при замораживании -80°C/оттаивании, подвергали фильтрации с использованием фильтра 0,2 мкм. Затем к материалу добавляли модельный вирус, например, X-MuLV в концентрации 1,0% об./об., с последующей фильтрацией с использованием фильтра 0,2 мкм. Затем добавленный и отфильтрованный материал подвергали очистке на колонке НИС для получения пула продуктов НИС, которые затем подвергали стандартному объемному анализу. Некоторое количество добавленного и отфильтрованного материала было оставлено в качестве контроля удерживания.

Общий LRF можно рассчитать путем объединения результатов при инаktivации с помощью pH, инаktivации с помощью смолы НИС и физического удаления с помощью НИС. LRF, полученные в результате инаktivации с помощью смолы НИС и физического удаления с помощью НИС, можно количественно оценить с помощью анализов инфективности. LRF, полученный в результате физического удаления с помощью НИС, также можно количественно оценить с помощью кПЦР. Что касается LRF, полученного в результате инаktivации с помощью pH, потеря инфективности может быть достигнута в контроле удерживания из-за удержания низкого уровня pH, как представлено на Фиг. 2.

Способ НИС включает использование объема трех колонок для уравнивания, использование этапа объема шести колонок для промывки и использование 6 М

гуанидина HCl для очистки колонки после каждого цикла. Примеры способа DoE для очистки от вирусов с помощью HIC представлены в Таблице 4.

Таблица 4. Способы DoE для очистки от вирусов с помощью HIC

Название этапа	Раствор	Объем колонки	Линейная Скорость (см/ч)	Направление потока
Предочистка	Очищенная вода	2	200	Нисходящий поток
Уравновешивание	Н/Д	3	200	Нисходящий поток
Загрузка	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Нисходящий поток
Промывка	Н/Д	6	Н/Д	Нисходящий поток
Очистка 1	6 N гуанидин-HCl	4	200	Восходящий поток
Очистка 2	Очищенная вода	2	200	Восходящий поток
Очистка 3	1N NaOH	2	200	Нисходящий поток
Консервация колонок	0,1N NaOH	2	200	Нисходящий поток

4.1 D-оптимальный план для оценки диапазонов факторов

D-оптимальные планы использовались для объяснения основных эффектов, взаимодействий и квадратичных значений, как представлено на Фиг. 3. Двадцать восемь запусков D-оптимального DoE были использованы для оценки широкого диапазона факторов протекания процесса, включая: pH при 4,2, 6,1 или 8,0; концентрацию цитратного буфера 10 mM, 105 mM или 200 mM; концентрацию загрузки колонки 40 г/л, 120 г/л или 200 г/л; линейную скорость при 100 см/ч или 300 см/ч; смолу HIC с фенолсефарозой 6 FF (слабая смола) или каптофенилом HS (сильная смола); или моноклональное антитело IgG1 или IgG4.

D-оптимальные планы были созданы с помощью компьютерных алгоритмов для корреляции предполагаемых эффектов. Оптимизации D-оптимальных планов были созданы на основе выбранных критериев оптимальности и подогнанных моделей. Оптимальность данного D-оптимального плана зависела от модели. Компьютерный алгоритм выбрал оптимальный набор прогонов планов из набора-кандидата возможных прогонов планов воздействия в соответствии с запрошенным общим количеством прогонов воздействия для эксперимента и указанной модели. Набор-кандидат представлял собой набор комбинаций воздействий, из которых D-оптимальный алгоритм выбирал комбинации воздействий для включения в план. Набор-кандидат прогонов воздействия включал возможные комбинации различных уровней факторов, которые должны быть включены в эксперимент.

Было получено три ответа, включая LRF X-MuLV по инфективности (физическое удаление и инаktivация), LRF X-MuLV по кПЦР (только физическое удаление) и поэтапный выход (%). Все взаимодействия и квадратичные значения были включены в планы.

Пример 1. Низкий уровень pH для вирусной инаktivации для характеристики многофакторного анализа DoE

Двадцать восемь прогонов D-оптимального DoE использовали для оценки широкого диапазона факторов протекания процесса, включая pH при 4,2, 6,1 или 8,0. Данные кПЦР служили репрезентативными измерениями остаточного вируса в условиях низкого уровня pH, поскольку предыдущие исследования продемонстрировали, что количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией с детекцией результатов в режиме реального времени (кОТ-ПЦР) может использоваться для замены анализа инфективности, когда механизм очистки от вирусов заключается в физическом удалении. Предыдущее исследование демонстрирует, что анализ инфективности и кОТ-ПЦР тесно коррелируют ($r=0,85$, $P < 0,05$, $n=22$) (Anwaruzzaman et al., Evaluation of infectivity and reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction assays for detection of xenotropic murine leukemia virus used in virus clearance validation, *Biologicals* 43: 256-265, 2015).

Одиннадцать прогонов из двадцати восьми прогонов с низким уровнем pH 4,2 продемонстрировали полную инаktivацию инфективности вирусной нагрузки, которая не зависела от других свойств нагрузки. Количественное определение вируса проводили для контроля исходного вируса, контроля удерживания нагрузки НИС и пула продуктов НИС, как представлено на Фиг. 4. Средняя разница между инфективностью и кПЦР в ретроспективном наборе данных составляет 0,5 LRF, что находится в пределах принятой вариабельности анализа.

На основании экспериментальных результатов были созданы две различные модели очистки от вирусов с помощью DoE НИС: зарегистрированная модель LRF и модель LRF кПЦР. Зарегистрированная модель LRF была создана из комбинации LRF, определенных с помощью анализов инфективности и кПЦР. Заявленная модель LRF включала данные кПЦР для прогонов при низком уровне pH, поскольку нецелесообразно использовать анализ инфективности, основанный на наблюдаемой химической инаktivации, не связанной с НИС. В зарегистрированной модели LRF использовали LRF инфективности для прогонов с pH 6,1 и pH 8,0. Модель LRF кПЦР была создана исключительно из LRF, полученных с помощью данных кПЦР, которые измеряют наличие копий вирусного генома (физическое удаление). Обе модели демонстрируют ортогональную стратегию очистки в сравнении с другими отдельными операциями по инаktivации вирусов, такими как удерживание специально предназначенного низкого уровня pH около 3,60. Модель LRF кПЦР менее вариабельна по сравнению с зарегистрированной моделью LRF из-за единственного механизма очистки при использовании кПЦР.

Пример 2. Выявление значимых факторов протекания процесса с использованием зарегистрированной модели LRF

Очистку от вируса X-MuLV оценивали путем построения предполагаемого графика на основе фактического зарегистрированного LRF и предполагаемого зарегистрированного LRF, как представлено на Фиг. 5. Зарегистрированная модель LRF использовалась для идентификации нескольких значимых факторов протекания процесса, как представлено на Фиг. 5. Все коэффициенты инфляции дисперсии (VIF, variance inflation factor) составляли около 1 без исключения каких-либо выбросов. Когда данные кПЦР были опущены, это привело к плохому соответствию модели из-за низкого соотношения сигнал-шум. Несмотря на то, что некоторые масштабированные оценки были статистически значимыми, их нельзя считать практически значимыми при применении к каждой программе моноклональных антител в контексте стандартного допуска параметров процесса. Кроме того, влияние конкретного изотипа моноклонального антитела не может быть выявлен.

Пример 3. Предсказуемость за счет применения зарегистрированной модели очистки от вирусов для моноклональных антител

Зарегистрированная модель очистки от вирусов использовалась для прогнозирования поведения специфических моноклональных антител. Когда зарегистрированную модель очистки от вирусов применяли к ретроспективному набору данных, результаты демонстрируют адекватное прогнозирование поведения специфических моноклональных антител, как представлено на Фиг. 6. Двадцать три моноклональных антитела были исследованы с использованием однофакторного анализа остаточной инфективности (т.е. фактической - прогнозируемой) X-MuLV с помощью программы. Девятнадцать моноклональных антител из двадцати трех исследованных моноклональных антител демонстрируют 95% ДИ (доверительные интервалы) среднего остаточного LRF, который находится в пределах 0,5 LRF от нуля (при этом фактический=прогнозируемый). LRF мАт4 находился за пределами 0,5 LRF. мАт4 имело самую низкую pI в наборе данных - 6,2 при самой высокой, не относящейся к DoE, концентрации цитратного буфера - 150 mM.

Пример 4. Выявление значимых факторов протекания процесса с использованием модели LRF кПЦР

Очистку от вируса X-MuLV оценивали путем построения предполагаемого графика на основе фактического LRF и предполагаемого LRF, как представлено на Фиг. 7. Модель LRF кПЦР использовалась для идентификации нескольких значимых факторов протекания процесса, как представлено на Фиг. 7. Результаты демонстрируют различия по сравнению с зарегистрированной моделью LRF. Все коэффициенты инфляции дисперсии (VIF) составляли около 1 с исключением двух выбросов. Результаты демонстрируют более высокий R-квадрат с более низкой RMSE по сравнению с зарегистрированной моделью LRF из-за измерения единственного механизма очистки от вируса с помощью кПЦР. Результаты, полученные из модели LRF кПЦР, указывают на большее влияние pH

по сравнению с зарегистрированной моделью LRF. Результаты демонстрируют, что фактор протекания процесса - концентрация цитрата, может быть не значимым для удаления вируса.

Пример 5. Предсказуемость за счет применения модели кПЦР для моноклональных антител

Модель кПЦР использовалась для прогнозирования поведения специфических моноклональных антител. Когда модель кПЦР применяли к ретроспективному набору данных, результаты демонстрировали адекватное прогнозирование поведения специфических моноклональных антител, как представлено на Фиг. 8. Двадцать одно моноклональное антитело было исследовано с использованием однофакторного анализа остаточного LRF (т.е. фактического - прогнозируемого) с помощью программы. Двадцать моноклональных антител из двадцати одного исследованного моноклонального антитела демонстрируют 95% ДИ (доверительные интервалы) среднего остаточного LRF, который находится в пределах 0,5 LRF от прогнозируемого без наличия данных кПЦР для мАт4. Результаты указывают на более низкую вариацию между прогонами по сравнению с зарегистрированным LRF (в основном инфективности).

Набор данных DoE сравнивали с ретроспективной базой данных, чтобы получить представление об очистке от вирусов с помощью НИС, как представлено в Таблице 5. Ретроспективный набор данных имеет большее количество специфических моноклональных антител с ограниченной вариативностью процесса. Набор данных DoE имеет меньшее количество специфических моноклональных антител с более широкими диапазонами вариативности процесса. Когда модели DoE применялись только к исследованиям очистки от вируса с менее чем 1 LRF, результаты приводили к лучшему пониманию процесса очистки от вируса с помощью НИС, как представлено в Таблице 6. мАт означает моноклональное антитело, а мАт12 означает моноклональное антитело 12 во время процесса НИС в Таблице 6.

Таблица 5. Понимание процесса очистки от вирусов с помощью НИС

Ретроспективный набор данных	Набор данных DoE
(+) Количество мАт (большое)	(-) количество мАТ (небольшое)
(-) Ограниченная вариативность процесса	(+) Широкая вариативность процесса

Таблица 6. Применение модели DoE к исследованию VC с менее чем 1 LRF

мАт	рН	Цитрат (мМ)	Нагрузка Колонки (г/л)	Измеренный LRF (Log 10)	Предполагаемый LRF Модель DoE (Log 10)
мАт12	8,0 (высокое)	30 (низкое-среднее)	260 (самая высокая)	0,48 (инфективность) 0,98 (кПЦР)	1,15 (зарегистрированный LRF) 0,95 (кПЦР)

Пример 6. Применение DoE для направления улучшения очистки от вирусов с помощью НИС

Когда DoE применяется, план может дать указания по оптимизации факторов протекания процесса для большего улучшения процессов очистки от вирусов с помощью НИС. Например, когда несколько моделей LRF были применены к процессам очистки от вирусов с помощью НИС, была достигнута лучшая очистка от вирусов. Например, был достигнут более чем 90%-ный выход моноклонального антитела при обеспечении более чем 2 LRF. Результаты демонстрируют, что условия факторов протекания процесса, которые привели к высокопродуктивному негативному режиму НИС, также могут обеспечить высокое удаление вируса. Большинство условий, которые могут способствовать адсорбции моноклональных антител, также могут способствовать адсорбции X-MuLV. Как представлено на Фиг. 9А, три наблюдаемые точки данных имеют 2-3 LRF с выходом моноклональных антител более 90%, при этом все значения pH были меньше или равны 6, концентрация цитрата была низкой и составляла 10 мМ, а нагрузка колонки была высокой, большей или равной 120 г/л.

На Фиг. 9В представлен профилировщик прогнозов, примененный к IgG4 путем применения DoE для предоставления указаний по оптимизации факторов протекания процесса как для выхода, так и для LRF вируса. Высокий выход около 95% все еще может поддерживаться при вспомогательной очистке 2-3 LRF. Ожидался более низкий средний уровень очистки по сравнению с IgG1, что соответствовало выводам DoE.

Пример 7. Относительная гидрофобность смол НИС

Сравнивали относительную гидрофобность молекул нескольких смол НИС (GE Healthcare Life Sciences) с использованием моноклональных антител (mAb), как представлено на Фиг. 10. Относительная гидрофобность молекул каптофенила HiSub и фенилсефарозы 6 Fast Flow HiSub (PS6FFHS) сопоставима. Некоторые реверсии наблюдались для фенилсефарозы HP (low sub) и каптобутила (алифатический). mAb2 в основном удерживалось при всех условиях. mAb9 не являлось наиболее прочно удерживаемым смолой при любых условиях.

Пример 8. Исследование DoE для очистки от вирусов с помощью НИС

Исследования DoE по очистке от вирусов с помощью НИС с различными диапазонами факторов протекания процесса были применены к ретроспективной базе данных для сравнения. Исследования DoE по очистке от вирусов с помощью НИС с различными диапазонами факторов развития применяли с использованием однофакторного анализа LRF инфективности X-MuLV с данными DoE или без них, как представлено на Фиг. 11. Данные DoE были сопоставимы с большим набором данных НИС об очистке от вирусов, при этом диапазон значений LRF, наблюдаемых для DoE, находится в диапазоне 0,52-3,95 LRF, что аналогично диапазону 0,48-4,01 LRF в базе данных. Данные DoE имеют немного более низкий средний LRF с более высоким стандартным отклонением (SD), что статистически эквивалентно большему набору данных по очистке от вирусов, как представлено на Фиг. 11.

Данные, полученные в исследованиях DoE, подтверждают взаимосвязь между LRF по анализам инфективности и анализам кПЦР. Анализы инфективности и кПЦР

демонстрируют значительную сопоставимость (R-квадрат 0,73) для ретроспективного набора данных, как представлено на Фиг. 12 с использованием двумерного соответствия LRF инфективности X-MuLV с помощью LRF кПЦР X-MuLV. Наблюдаемая взаимосвязь анализов может быть смоделирована в виде формулы (I):

Формула (I) LRF Инфективности X-MuLV = $-0,516447 + (1,6481014 \times \text{LRF кПЦР X-MuLV})$

Профилировщик взаимодействий зарегистрированной модели DoE LRF для НИС представлен на Фиг. 13. Когда данные DoE об очистке от вирусов с помощью НИС были применены к ретроспективной базе данных для анализов инфективности, это способствовало значимому улучшению модели за счет улучшения R-квадрата с 0,37 до 0,48 с аналогичной RMSE, как представлено на Фиг. 14А и 14В. На Фиг. 14А представлена исходная модель. На Фиг. 14В представлена улучшенная модель с применением прогонов DoE. Некоторые значимые параметры в исходной модели были пропущены. Были смоделированы два механизма, например, инактивация и удаление.

Когда данные DoE об очистке от вирусов с помощью НИС применяли к ретроспективной базе данных для модели кПЦР, это способствовало минимальному снижению R-квадрата с 0,78 до 0,76 с увеличением RMSE с 0,36 до 0,42, как представлено на Фиг. 15А и 15В. На Фиг. 15А представлена исходная модель. На Фиг. 15В представлена модифицированная модель с применением прогонов DoE. Данные DoE поддерживают ретроспективную модель кПЦР, на которую сильно влияют три момента. Выяснилось, что фактор протекания процесса - pH нагрузки, оказался самым сильным фактором. Поле проектных параметров модифицированной модели было заполнено специфическими для продукта данными, которые подтверждали диапазон LRF исходной модели. Выяснилось, что проще моделировать один механизм, например, удаление.

Данные DoE по очистке от вирусов с помощью НИС применяли к ретроспективной базе данных для изо типов моноклональных антител. Зарегистрированный DoE LRF для НИС по изо типу моноклонального антитела к IgG1 мАт11 представлен на Фиг. 16. На Фиг. 16 представлен предполагаемый график и масштабированные оценки, полученные путем применения данных DoE по очистке от вирусов с помощью НИС к ретроспективной базе данных, для изо типа IgG1 мАТ11 согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения. Модифицированная модель имеет значительное соответствие модели с более высоким RMSE по сравнению с общей моделью DoE. Было обнаружено, что значимыми являются только факторы протекания процесса - pH нагрузки и концентрация цитрата. Средний ответ 2,6 LRF в модифицированной модели выше, чем общий набор данных DoE при 2,3 LRF.

Данные DoE по очистке от вирусов с помощью НИС применяли к ретроспективной базе данных для изо типов моноклональных антител. Зарегистрированный DoE LRF для НИС по изо типу моноклонального антитела к IgG4 мАт14 представлен на Фиг. 17. На Фиг. 17 представлен предполагаемый график и масштабированные оценки, полученные путем применения данных DoE по очистке от вирусов с помощью НИС к ретроспективной базе

данных, для изотипа IgG4 мАТ14 согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения. Модифицированная модель IgG4 имеет большую чувствительность по сравнению с моделью IgG1 с более низким средним значением LRF (2,1 в сравнении с 2,6 $\log_{10}$). Было установлено, что наибольшая оценка характерна для квадратичных значений pH нагрузки и концентрации цитрата. Различные структуры между IgG4 и IgG1 могут способствовать связыванию вируса из-за более слабого разделения. Соответствующие задействованные механизмы могут включать специфические свойства моноклональных антител, такие как гидрофобность, показатель агрегации или молекулярный заряд.

Данные DoE по очистке от вирусов с помощью НИС применяли к ретроспективной базе данных для различных типов смол. Зарегистрированный DoE LRF для НИС по смоле для каптофенила представлен на Фиг. 18А и 18В. На Фиг. 18А представлен предполагаемый график, полученный путем применения данных DoE по очистке от вирусов с помощью НИС к ретроспективной базе данных, для случая использования смолы каптофенил согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения. На Фиг. 18В представлены оценки параметров и профилировщик прогнозов, полученные путем применения данных DoE по очистке от вирусов с помощью НИС к ретроспективной базе данных, для случая использования смолы каптофенил согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения. Результаты демонстрируют сильное соответствие модели с R-квадратом больше 0,9. Значимость изотипа моноклонального антитела является такой же, как и согласно результатам, представленным ранее, в которых IgG4 является наихудшим вариантом.

Данные DoE по очистке от вирусов с помощью НИС применяли к ретроспективной базе данных для различных типов смол. Зарегистрированный DoE LRF для НИС по смоле для фенилсефарозы 6 FF HS представлен на Фиг. 19А и 19В. На Фиг. 19А представлен предполагаемый график, полученный путем применения данных DoE по очистке от вирусов с помощью НИС к ретроспективной базе данных, для случая использования смолы фенилсефарозы 6 FF HS согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения. На Фиг. 19В представлены оценки параметров и профилировщик прогнозов, полученные путем применения данных DoE по очистке от вирусов с помощью НИС к ретроспективной базе данных, для случая использования смолы фенилсефарозы 6 FF HS согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения. Результаты демонстрируют сильное соответствие модели с R-квадратом более 0,95 и низким RMSE на уровне 0,19. Среднее значение LRF составляет около 0,5 $\log_{10}$, что ниже, чем у модели с использованием каптофенила (2,1 в сравнении с 2,6 $\log_{10}$). Факторы протекания процесса - pH нагрузки и изотип антител обладают наибольшим воздействием.

Пример 9. Применение модели выхода DoE для НИС

Модель выхода DoE для НИС применялась для отслеживания тренда между LRF и выходом, как представлено на Фиг. 20. На Фиг. 20 представлены предполагаемый график и профилировщик прогнозов, с применением модели выхода DoE НИС для отслеживания

тренда между LRF и выходом согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения. Было обнаружено, что применение модели выхода DoE НИС указывает на инверсию тренда между LRF и выходом. Большой диапазон факторов протекания процесса был связан с типичным этапом планирования DoE для НИС. Широкий ответ выхода на уровне 34-101% соответствовал ретроспективному набору данных на уровне 80-100%. Максимизация LRF X-MuLV НИС на уровне $4,3 \log_{10}$ может привести к ступенчатому выходу на уровне 28%. Условия, которые способствовали значительной адсорбции моноклональных антител, могут также способствовать значительной адсорбции X-MuLV. Результаты демонстрируют, что вирус связывается со смолой в условиях, которые также вызывают адсорбцию моноклонального антитела при НИС, поскольку гидрофобные сайты вируса могут потенциально подвергаться воздействию во время процесса НИС.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки антитела из образца, содержащего одну или более примесей, включая вирусные частицы, при этом способ включает следующие этапы:
получение образца, содержащего антитело, продуцируемое в клетке-хозяине,
доведение pH образца до диапазона от около 4,2 до около 8,0,
загрузка образца в колонку для гидрофобной хроматографии (HIC), при этом концентрация образца составляет от около 40 г/л до около 200 г/л, и
сбор образца, очищенного с помощью HIC.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что для регулирования pH образца используется цитратный буфер, при этом концентрация цитратного буфера составляет от около 10 mM до около 200 mM.
3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что смола колонки HIC представляет собой фенильную смолу.
4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что смола колонки HIC представляет собой каптофенильную смолу.
5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что гидрофобная сила колонки HIC находится в диапазоне от слабой гидрофобной силы до сильной гидрофобной силы.
6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что слабая гидрофобная сила достигается с использованием фенильной смолы или ее эквивалента.
7. Способ по п. 5, отличающийся тем, что высокая гидрофобная сила достигается с помощью использования каптофенильной смолы или ее эквивалента.
8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело или биспецифическое антитело.
9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что антитело относится к изотипу IgG1 или изотипу IgG4.
10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что скорость потока через колонну HIC представляет собой линейную скорость от около 100 см/ч до около 300 см/ч.
11. Способ по п. 1, дополнительно включающий измерение наличия копий вирусного генома.
12. Способ по п. 1, дополнительно включающий измерение наличия вирусных частиц.
13. Способ по п. 1, дополнительно включающий измерение наличия как копий вирусного генома, так и вирусных частиц.
14. Способ очистки антитела из образца, содержащего одну или более примесей, включая вирусные частицы, при этом способ включает следующие этапы:
получение образца, содержащего антитело, продуцируемое в клетке-хозяине,
доведение pH образца до диапазона от около 4,2 до около 8,0,
загрузка образца в колонку для гидрофобной хроматографии (HIC), при этом концентрация образца составляет от около 40 г/л до около 200 г/л,
сбор образца, очищенного с помощью HIC, и

измерение наличия копий вирусного генома и/или вирусных частиц в собранном образце, очищенном с помощью НИС.

15. Способ по п. 14, дополнительно включающий оптимизацию удаления копий вирусного генома и/или вирусных частиц путем проведения D-оптимального плана эксперимента.

16. Способ по п. 14, отличающийся тем, что D-оптимальный план эксперимента оценивает следующие факторы:

рН образца от около 4,2 до около 8,0,

нагрузку колонки, при этом концентрация образца составляет от около 40 г/л до около 200 г/л,

линейную скорость потока через колонку НИС от около 100 см/ч до около 300 см/ч,

и

гидрофобную силу колонки НИС от слабой гидрофобной силы до сильной гидрофобной силы.

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что слабая гидрофобная сила достигается с помощью использования фенильной смолы или ее эквивалента, при этом сильная гидрофобная сила достигается с помощью использования каптофенильной смолы или ее эквивалента.

18. Способ по п. 16, отличающийся тем, что D-оптимальный план эксперимента оценивает изотип антитела.

19. Способ по п. 14, отличающийся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело или биспецифическое антитело.

20. Способ очистки антитела из образца, содержащего одну или более примесей, включая вирусные частицы, при этом способ включает следующие этапы:

получение образца, содержащего антитело, продуцируемое в клетке-хозяине,

добавление цитратного буфера к образцу,

доведение рН образца до диапазона от около 4,2 до около 8,0,

загрузка образца в колонку для гидрофобной хроматографии (НИС), при этом концентрация образца составляет от около 40 г/л до около 200 г/л,

сбор образца, очищенного с помощью НИС, и

измерение наличия копий вирусного генома и/или вирусных частиц в собранном образце, очищенном с помощью НИС.

21. Способ по п. 20, дополнительно включающий оптимизацию удаления копий вирусного генома и/или вирусных частиц путем проведения D-оптимального плана эксперимента.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что D-оптимальный план эксперимента оценивает следующие факторы:

рН образца от около 4,2 до около 8,0,

концентрацию цитратного буфера от около 10 мМ до около 200 мМ,

нагрузку колонки, при этом концентрация образца составляет от около 40 г/л до около 200 г/л,

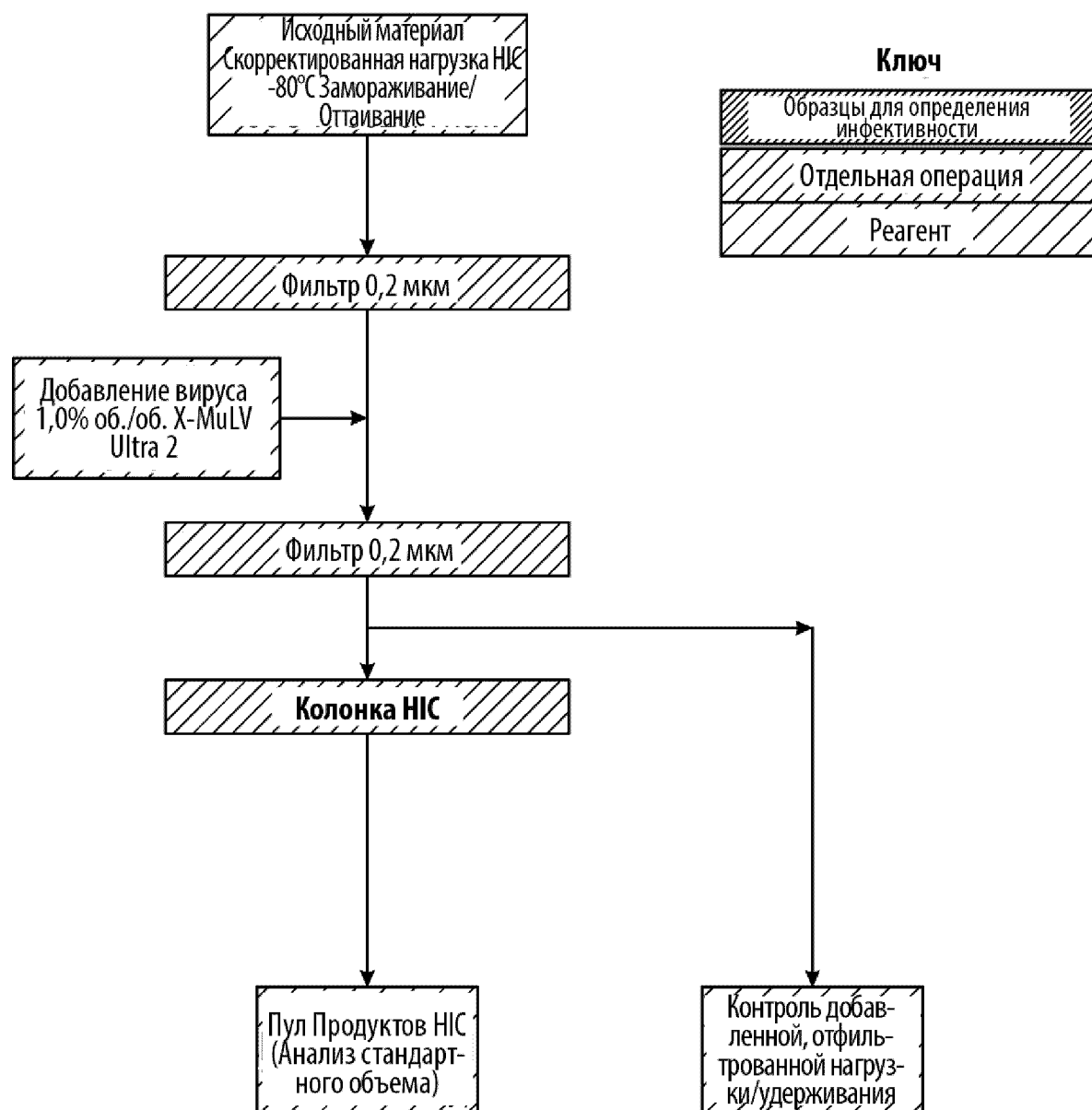
линейную скорость потока через колонку НИС от около 100 см/ч до около 300 см/ч,
и

гидрофобную силу колонки НИС от слабой гидрофобной силы до сильной гидрофобной силы.

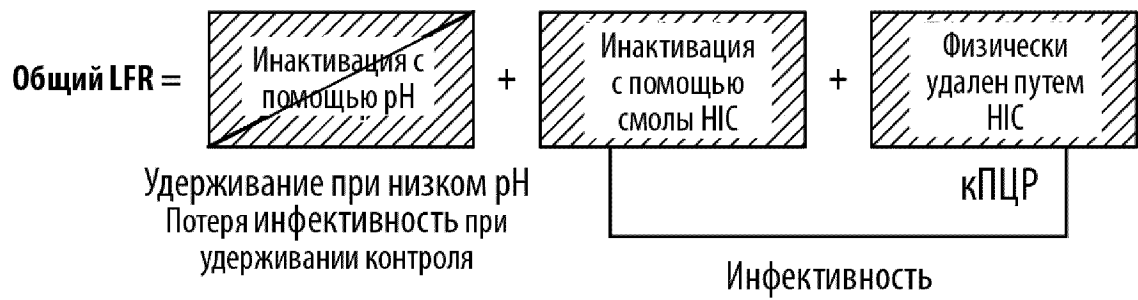
23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что слабая гидрофобная сила достигается с помощью использования фенильной смолы или ее эквивалента, при этом сильная гидрофобная сила достигается с помощью использования каптофенильной смолы или ее эквивалента.

24. Способ по п. 20, отличающийся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело или биспецифическое антитело.

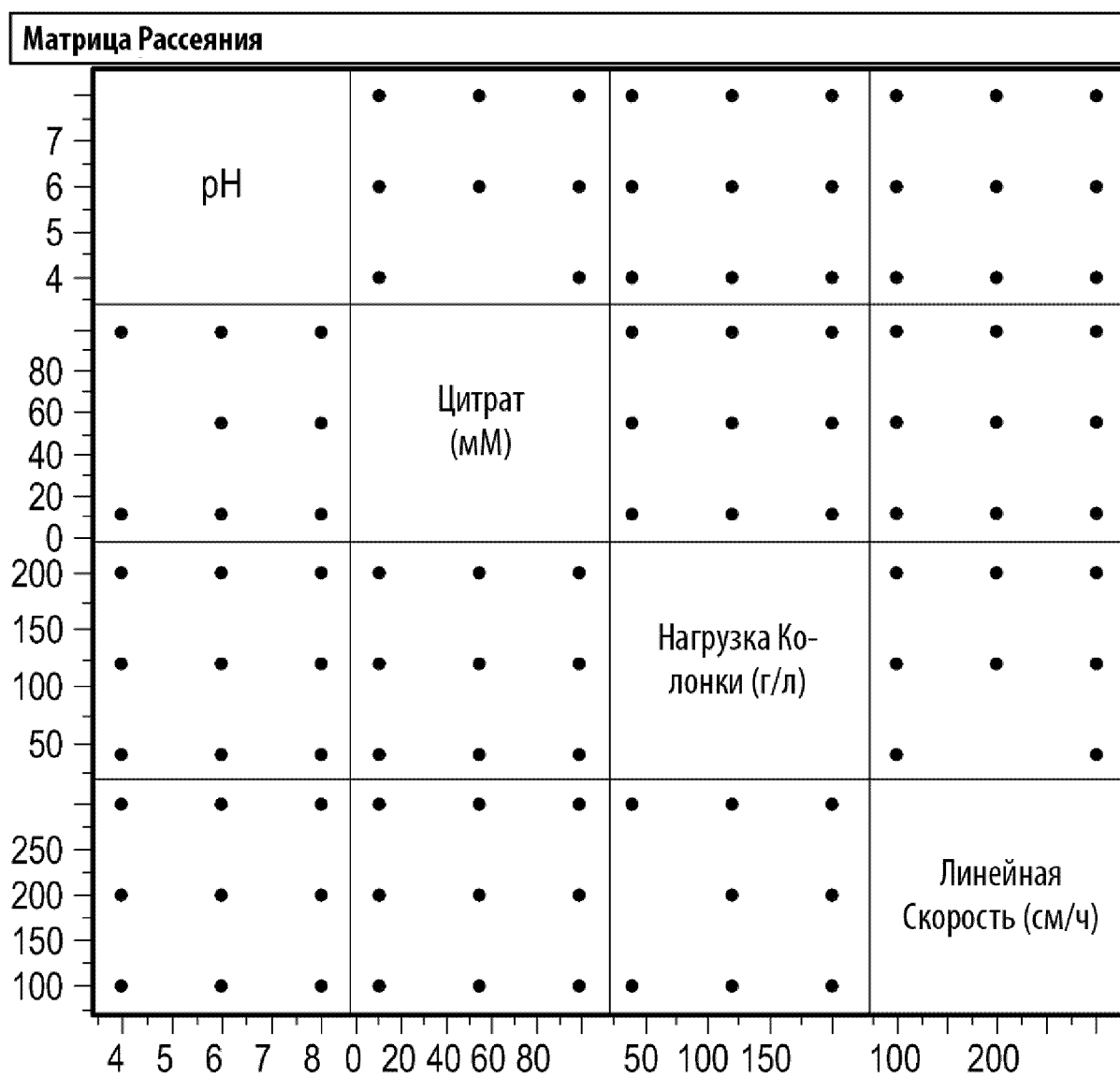
По доверенности



Фиг. 1



Фиг. 2

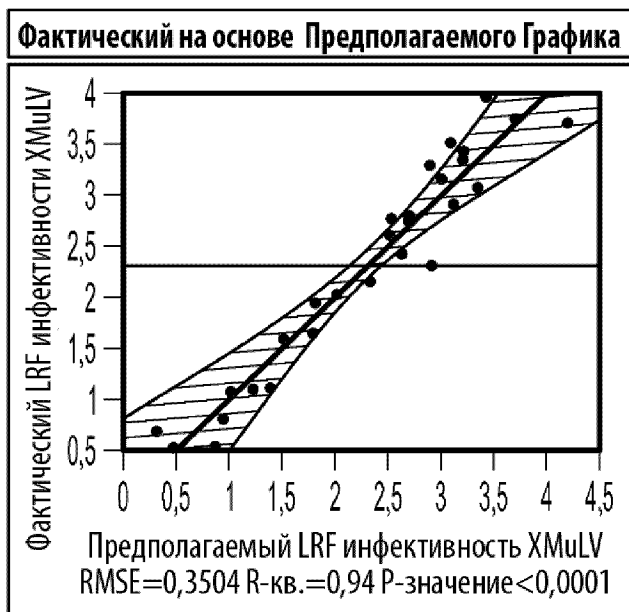


Фиг. 3

	Log ₁₀ скорректированного титра (PFU)	95% Конц. Log ₁₀ скорректированного титра	Log ₁₀ Уменьшения	95% Конц. Log ₁₀ уменьшения
Контроль исходного вируса	8,13	0,17	НД	НД
Контроль нагрузки удерживания НИС	3,33	0,35	4,80	0,39
Пул продуктов НИС	<3,47	НД	> None	0,35



Фиг. 4



Сводная статистика соответствия

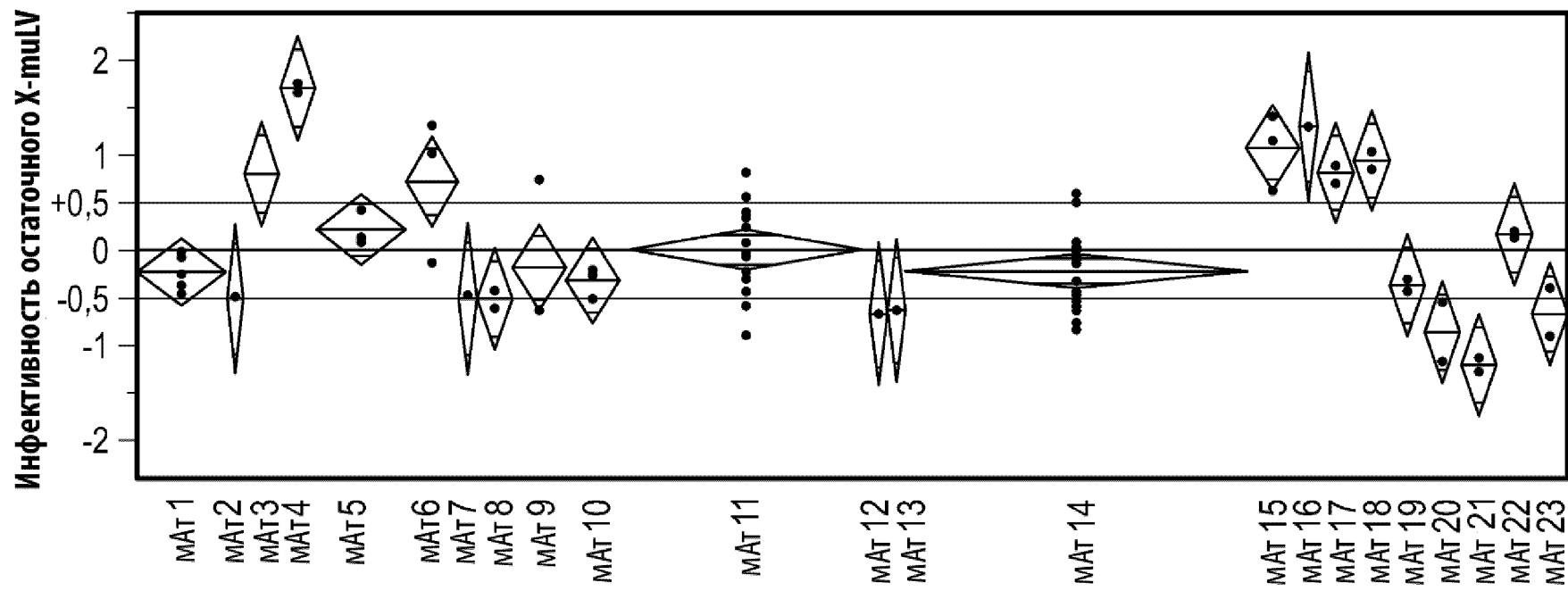
R-квадрат	0,935825
Скоррект. R-квадрат	0,891705
Средняя квадратическая ошибка	0,350429
Среднее Ответа	2,3175
Наблюдения (или Сумма весов)	28

Масштабированные оценки

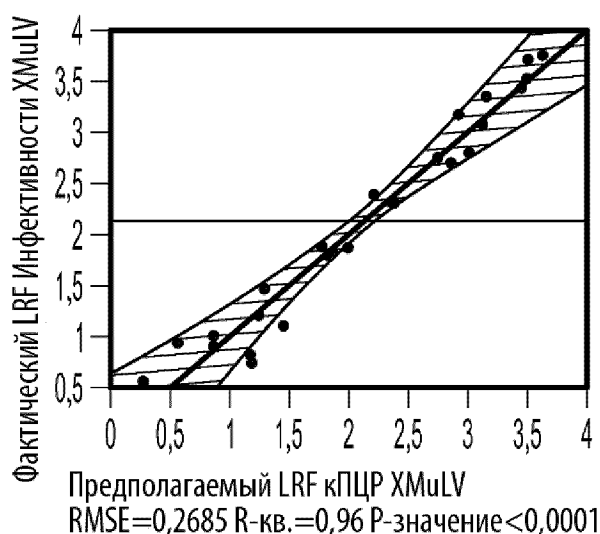
Номинальные коэффициенты расширены на все уровни
Непрерывные факторы, центрированные по среднему значению,
масштабированные по диапазону/2

Параметр	Масштабированные оценки	Станд. ошибка	Prob> t
рН нагрузки	-0,646652	0,077686	<,0001 *
Изотип[IgG4]	-0,309316	0,068483	0,0004 *
Фактическая нагрузка	-0,295325	0,078163	0,0016 *
Линейная скорость нагрузки (см/ч)	-0,291998	0,067744	0,0005 *
(Нагрузка рН-6,23036)*(Фактическая нагрузка-130,911)	-0,279022	0,084232	0,0044 *
Смола[PS6FFHS]	-0,277465	0,067414	0,0008 *
(рН нагрузки-6,23036)*Смола[PS6FFHS]	-0,234759	0,076489	0,0073 *
([мМ Цитрат]-98,2143)*(Линейная Скорость Нагрузки (см/ч)-192,857)	-0,221741	0,073586	0,0082 *
([мМ Цитрат]-98,2143)*(Фактическая Нагрузка-130,911)	-0,208124	0,081534	0,0213 *
[мМ Цитрат]	-0,108531	0,078945	0,1882
(рН нагрузки-6,23036)*Смола[CPHS]	0,2347587	0,076489	0,0073 *
смола[CPHS]	0,2774654	0,067414	0,0008 *
Изотип[IgG1]	0,3093164	0,068483	0,0004 *
([мМ Цитрат]-98,2143)*([мМ Цитрат]-98,2143)	1,005377	0,197641	0,0001 *
Перехват	1,4694785	0,181215	<,0001 *

Фиг. 5



Фиг. 6

Фактический на основе Предполагаемого Графика

Сводная статистика соответствия

R-квадрат	0,961739
Скоррект. R-квадрат	0,931676
Средняя квадратическая ошибка	0,268474
Среднее Ответа	2,122692
Наблюдения (или Сумма весов)	26

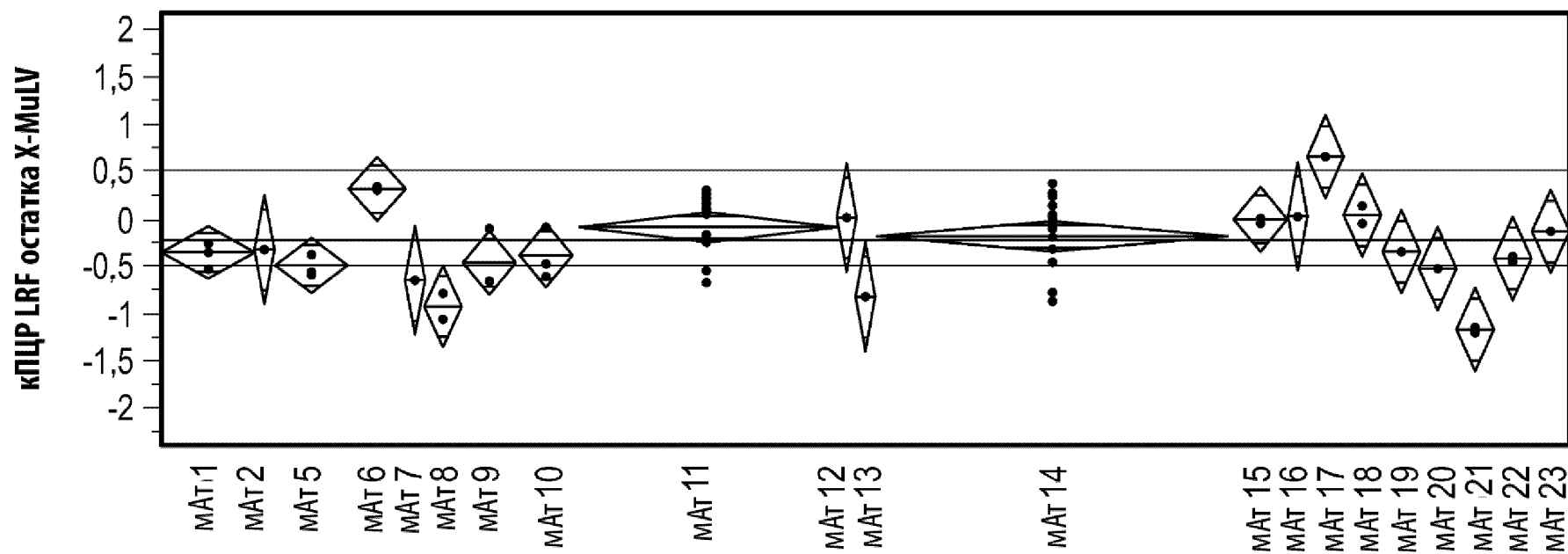
Масштабированные оценки

Номинальные коэффициенты расширены на все уровни

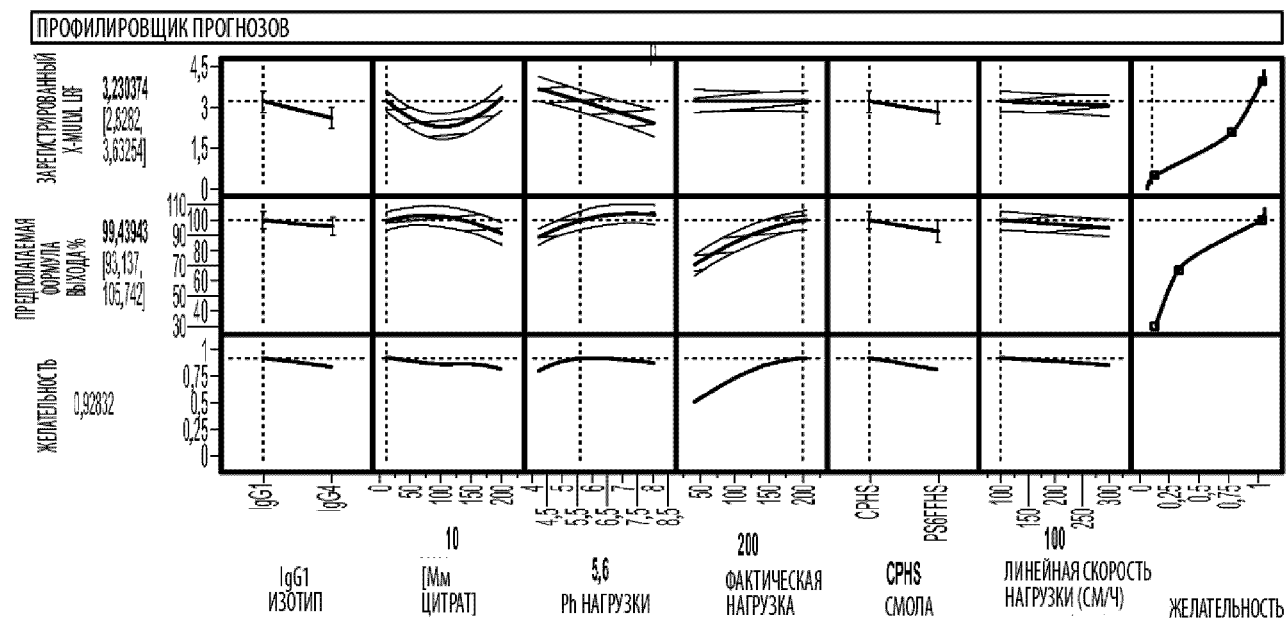
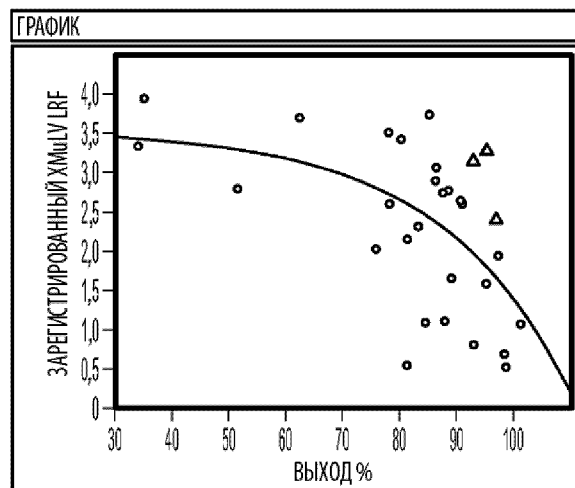
Непрерывные факторы, центрированные по среднему значению, масштабированные по диапазону/2

Параметр	Масштаб. оценки	Станд. ошибка	t-критерий	Prob> t
Перехват	2,1214534	0,053334	39,78	<,0001 *
Изотип[IgG1]	0,2247768	0,054302	4,14	0,0010 *
Фактическая Нагрузка	0,1415737	0,053872	2,63	0,0199 *
Смола[Каптофенил HS]	0,1114237	0,058589	1,90	0,0780
(рН нагрузки-6,24385)*Смола[Каптофенил HS]	0,0926505	0,05356	1,73	0,1056
Смола[PS6FFHS]*(Линейная Скорость Нагрузки (см/ч)-200)	0,0186909	0,059071	0,32	0,7564
[мМ Цитрат]	-0,09265	0,05356	-1,73	0,1056
Смола[Каптофенил HS]*(Линейная Скорость Нагрузки (см/ч)-200)	-0,111424	0,058589	-1,90	0,0780
(рН нагрузки-6,24385)*Смола[PS6FFHS]	-0,115767	0,057548	-2,01	0,0639
([мМ Цитрат]-101,346)*(Линейная Скорость Нагрузки (см/ч)-200)	-0,141574	0,053872	-2,63	0,0199 *
Фактическая нагрузка-131,52)*(Линейная Скорость Нагрузки (см/ч)-200)	-0,177887	0,058966	-3,02	0,0092 *
(рН нагрузки-6,24385)*(Фактическая нагрузка-131,52)	-0,210714	0,064876	-3,25	0,0058 *
Изотип[IgG4]	-0,224777	0,054302	-4,14	0,0010 *
Линейная Скорость Нагрузки (см/ч)	-0,2701	0,053608	-5,04	0,0002 *
Фактическая Нагрузка	-0,323665	0,058946	-5,49	<,0001 *
рН нагрузки	-0,903634	0,057297	-15,77	<,0001 *

Фиг. 7

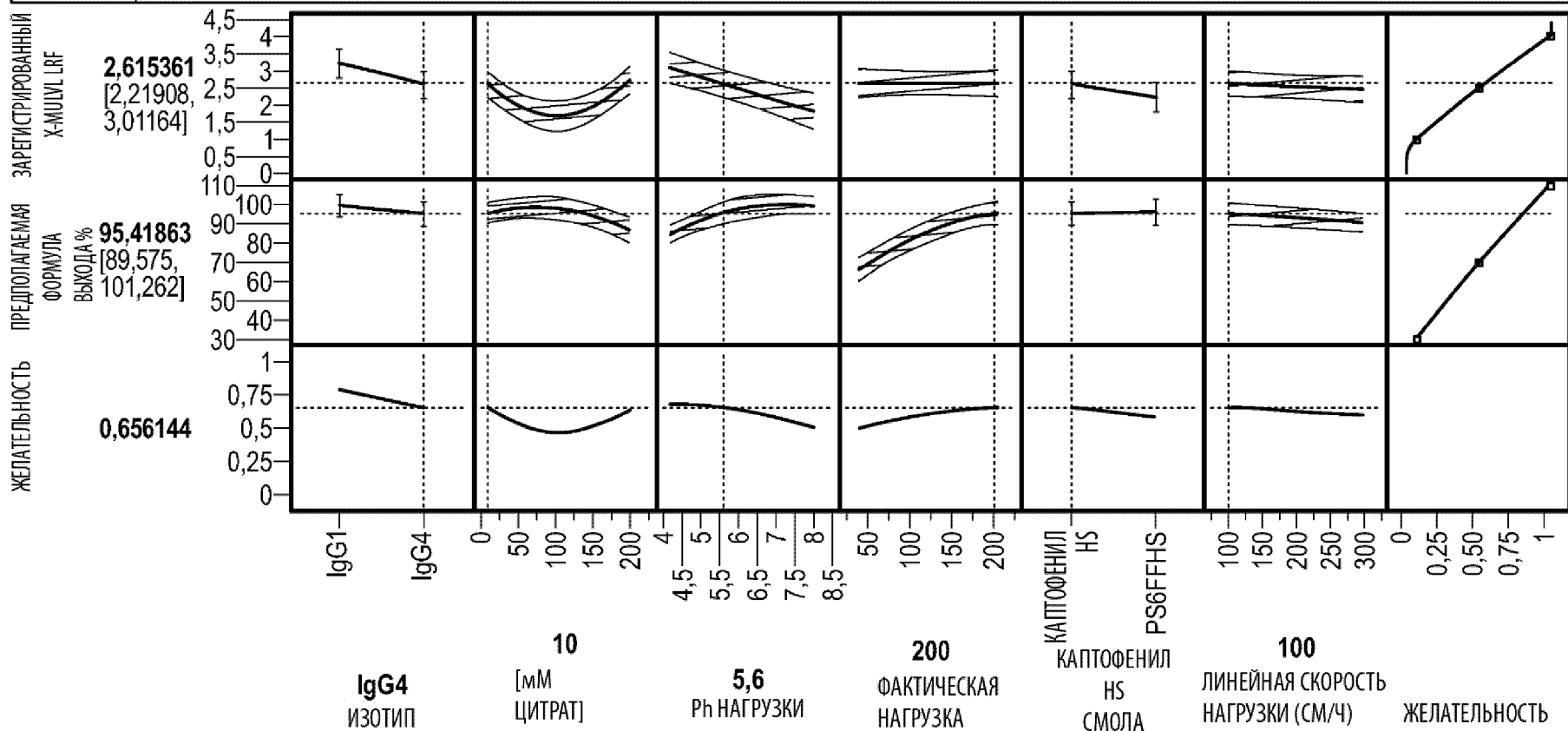


Фиг. 8

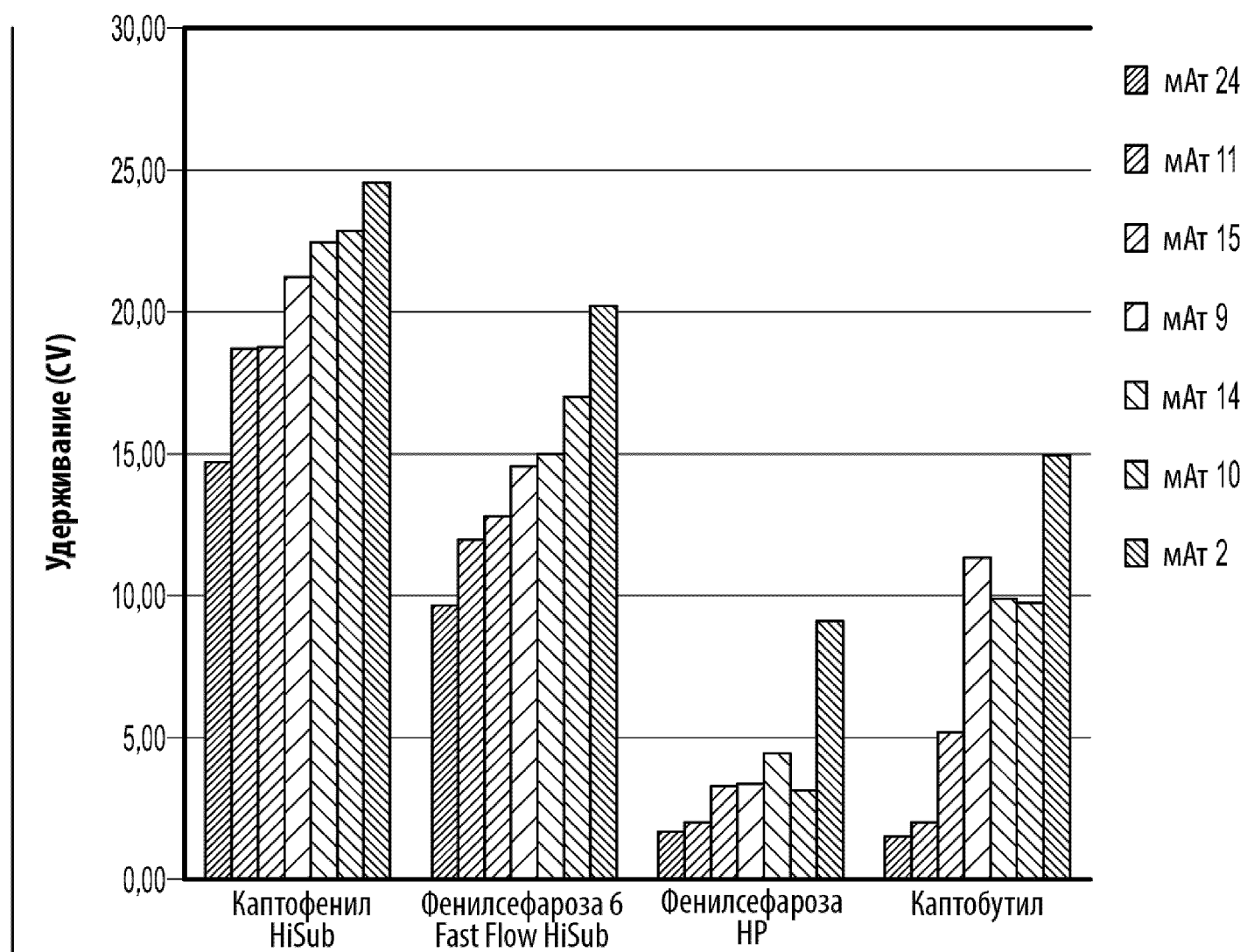


Фиг. 9А

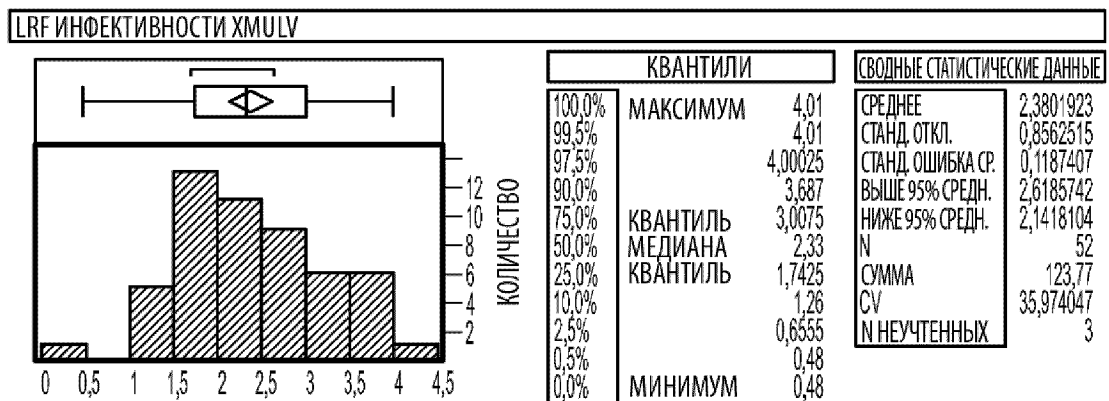
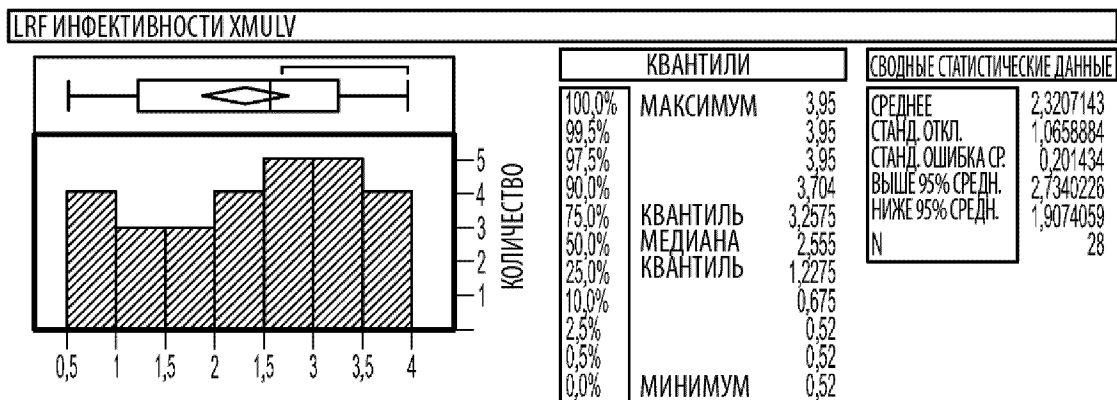
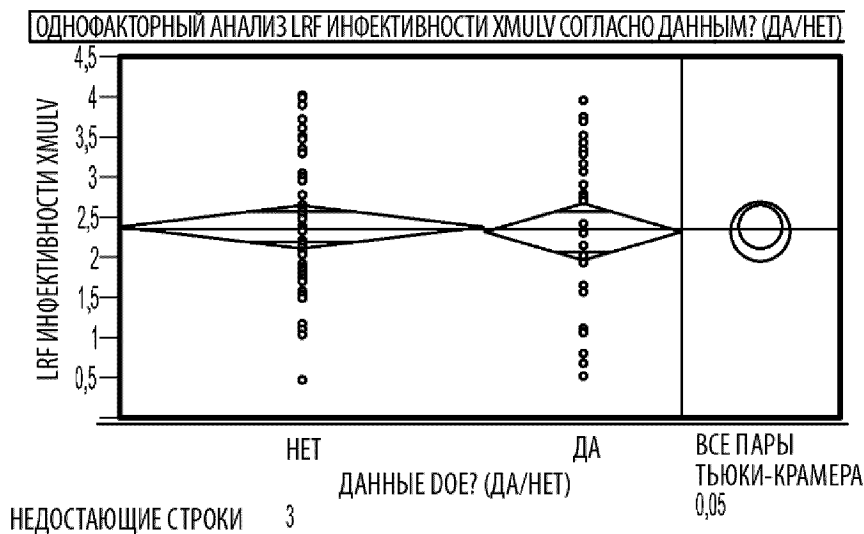
ПРОФИЛИРОВЩИК ПРОГНОЗОВ



Фиг. 9В

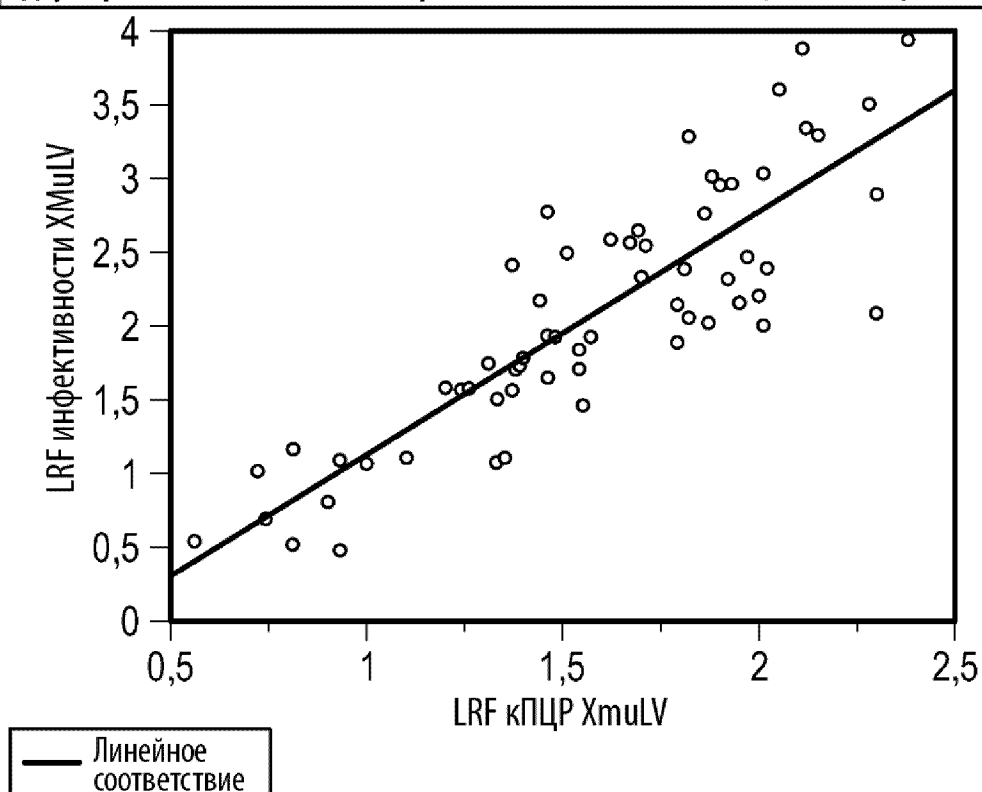


Фиг. 10



Фиг. 11

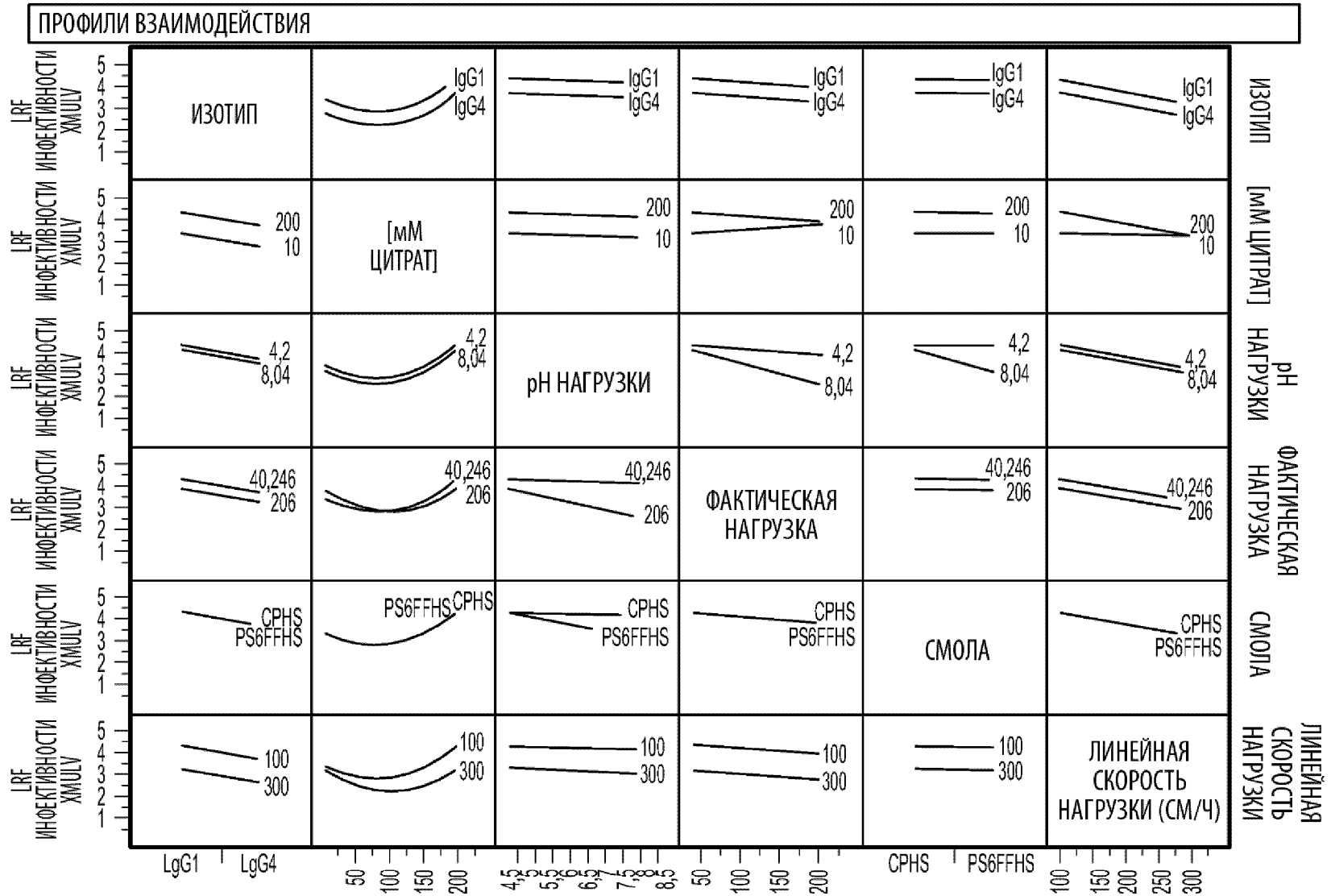
Двумерное соответствие LRF инфективности XMuLV с помощью LRF кПЦР XmuLV



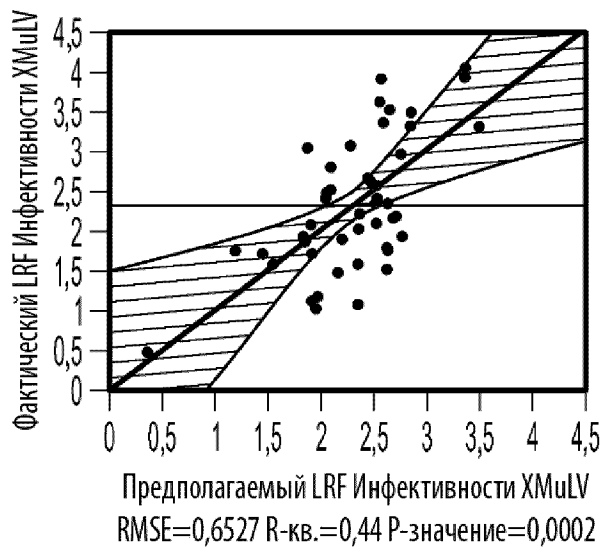
Сводная статистика соответствия

R-квадрат	0,73649
Скоррект. R-квадрат	0,732098
Средняя квадратическая ошибка	0,434463
Среднее Ответа	2,085161
Наблюдения (или Сумма весов)	62

Фиг. 12



Фиг. 13

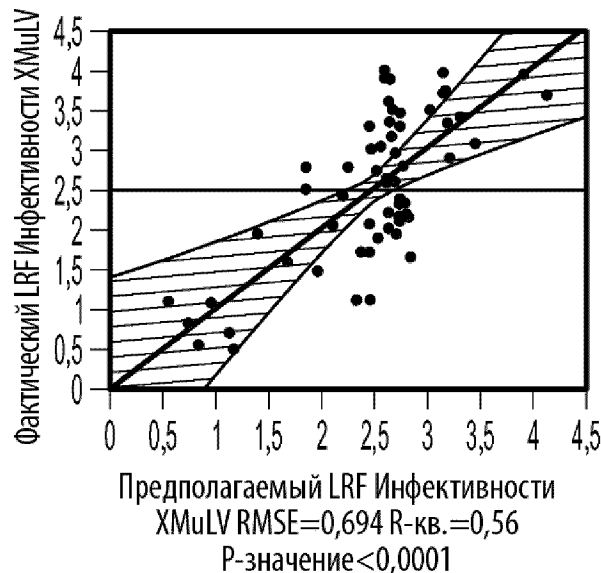
Фактический На Основе Предполагаемого Графика

Сводная статистика соответствия

R-квадрат	0,442568
Скоррект. R-квадрат	0,364786
Средняя квадратическая ошибка	0,652715
Среднее Ответа	2,3214
Наблюдения (или Сумма весов)	50

Масштабированные оценки					
Параметр	Оценка	Станд. ошибка	t-критерий	Prob> t	VIF
[мМ Цитрат]	0,0182235	0,004511	4,04	0,0002*	1,7115157
Фактическая Нагрузка	-0,013599	0,00353	-3,85	0,0004*	2,5069875
Перехват	4,1889276	1,395733	3,00	0,0045*	.
Изотип[IgG1]	0,6890127	0,265014	2,60	0,0127*	2,9673096
([мМ Цитрат]-41,3)*(Фактическая Нагрузка-119,748)	0,0003119	0,00013	2,39	0,0213*	1,6030162
pH нагрузки	-0,254398	0,15366	-1,66	0,1051	1,8591425
Линейная скорость нагрузки (см/ч)	0,0055556	0,006429	0,86	0,3923	1,0914692

Фиг. 14А

Фактический На Основе Предполагаемого Графика



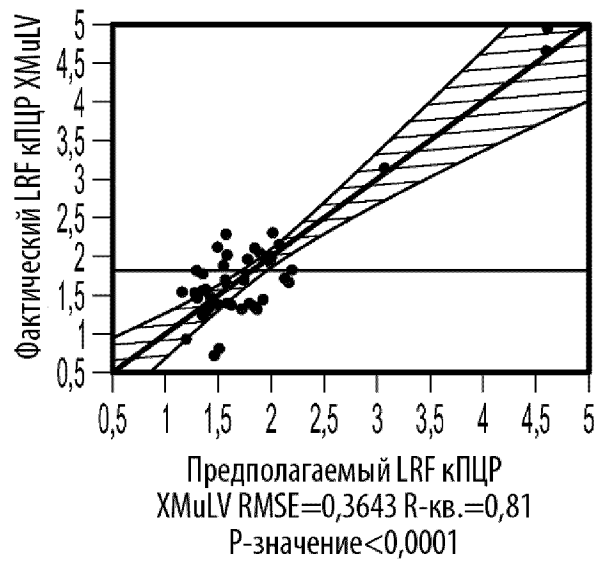
Сводная статистика соответствия

R-квадрат	0,561226
Скоррект. R-квадрат	0,476846
Средняя квадратическая ошибка	0,69403
Среднее Ответа	2,48926
Наблюдения (или Сумма весов)	63

Масштабированные оценки

Параметр	Оценка	Станд. ошибка	t-критерий	Prob> t	VIF
Изотип[IgG1]	5,2564777	0,533905	9,85	<,0001*	.
Перехват	0,1931753	0,104003	1,86	0,0689	1,1919576
[мМ Цитрат]	0,0016132	0,001395	1,16	0,2528	1,2027004
pH нагрузки	-0,320798	0,068947	-4,65	<,0001*	1,1143738
Фактическая Нагрузка	-0,005525	0,001647	-3,36	0,0015*	1,1766006
Смола[Каптофенил HS]	0,03157272	0,113452	2,78	0,0075*	1,1638796
Линейная Скорость Нагрузки (см/ч)	-0,001584	0,00139	-1,14	0,2597	1,145904
([мМ Цитрат]-66,1111)*(Фактическая Нагрузка-122,275)	-1,836e-5	0,000019	-0,96	0,3395	1,130044
([мМ Цитрат]-66,1111)*(Линейная Скорость Нагрузки (см/ч)-194,444)	-2,73e-5	1,516e-5	-1,80	0,0776	1,1619228
(pH нагрузки-6,10222)*(Фактическая нагрузка Loading-122,275)	-0,002423	0,00095	-2,55	0,0137*	1,0544607
(pH нагрузки-6,10222)* Смола[Каптофенил HS]	0,1391314	0,070442	1,98	0,0536	1,1632253

Фиг. 14В

Фактический На Основе Предполагаемого Графика

Сводная статистика соответствия

R-квадрат	0,810867
Скоррект. R-квадрат	0,778576
Средняя квадратическая ошибка	0,364317
Среднее Ответа	1,841837
Наблюдения (или Сумма весов)	49

Масштабированные оценки

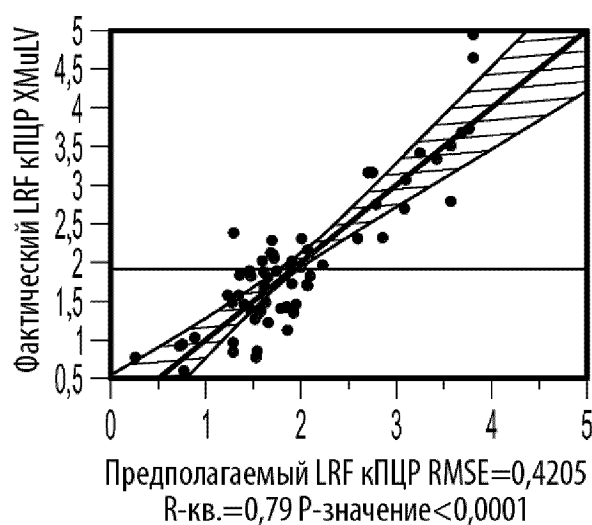
Номинальные коэффициенты расширены на все уровни

Непрерывные факторы, центрированные по среднему значению, масштабированные по диапазону/2

Параметр	Масштаб. оценки		Станд. ошибка	t-критерий	Prob> t
Перехват	1,7698405		0,113227	15,63	<,0001 *
(рН нагрузки-5,9049)*(рН нагрузки-5,9049)	1,4875583		0,190619	7,80	<,0001 *
Выход %	0,6261473		0,175922	3,56	0,0010 *
Изотип[IgG1]	0,3340423		0,114503	2,92	0,0057 *
Каптофенил	0,1867508		0,094504	1,98	0,0549
	0		0	0,00	<,0001 *
Линейная Скорость Нагрузки (см/ч)	-0,028155		0,097228	-0,29	0,7736
Изотип[IgG4]	-0,334042		0,114503	-2,92	0,0057 *
Целевая нагрузка колонки (г/л-смола)	-0,928742		0,185822	-5,00	<,0001 *
рН нагрузки	-1,470515		0,167872	-8,76	<,0001 *

Фиг. 15А

Фактический На Основе Предполагаемого Графика



Сводная статистика соответствия

R-квадрат	0,789147
Скоррект. R-квадрат	0,764341
Средняя квадратическая ошибка	0,420504
Среднее Ответа	1,925584
Наблюдения (или Сумма весов)	77

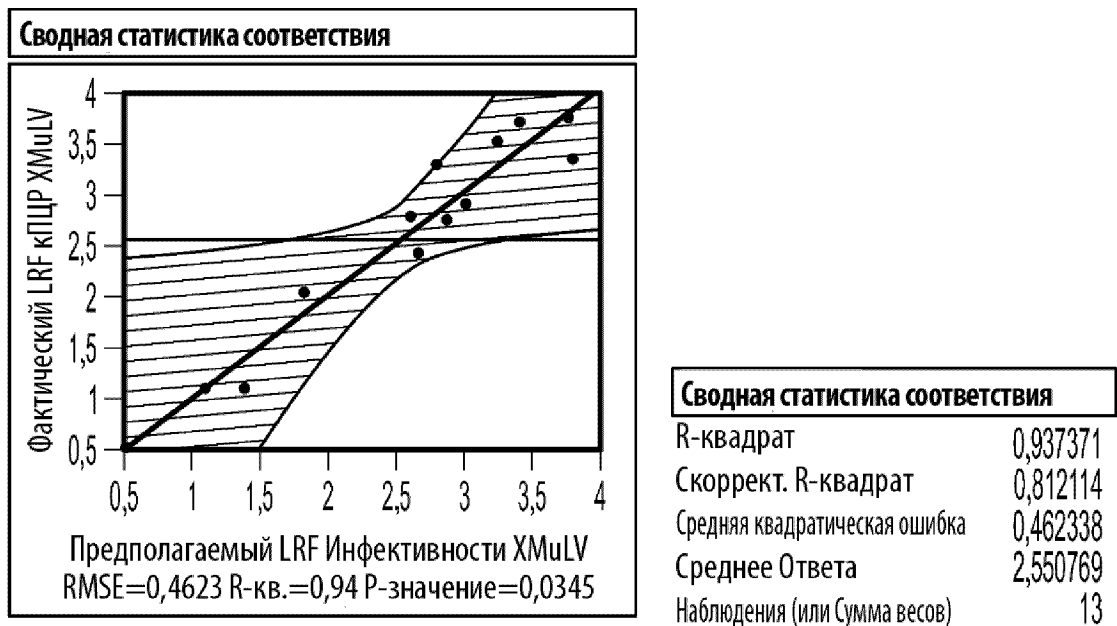
Масштабированные оценки

Номинальные коэффициенты расширены на все уровни

Непрерывные факторы, центрированные по среднему значению, масштабированные по диапазону/2

Параметр	Масштаб. оценки		Станд. ошибка	t-критерий	Prob> t
Перехват	1,3307279		0,112918	11,78	<,0001*
(pH нагрузки-6,02325)*(pH нагрузки-6,02325)	1,2247685		0,159149	7,70	<,0001*
Выход %	0,5085596		0,189558	2,68	0,0092*
Смола[Каптофенил Hs]	0,3039153		0,073364	4,14	<,0001*
Изотип[IgG1]	0,2158708		0,065474	3,30	0,0016*
Каптофенил	0,1384423		0,09655	1,43	0,1562
Линейная Скорость Нагрузки (см/ч)	-0,184566		0,078944	-2,34	0,0223*
Изотип[IgG4]	-0,215871		0,065474	-3,30	0,0016*
Смола[PS6FFHS]	-0,303915		0,073364	-4,14	<,0001*
Целевая нагрузка колонки (г/л-смола)	-0,610456		0,12037	-5,07	<,0001*
pH нагрузки	-1,149347		0,086098	-13,35	<,0001*

Фиг. 15B



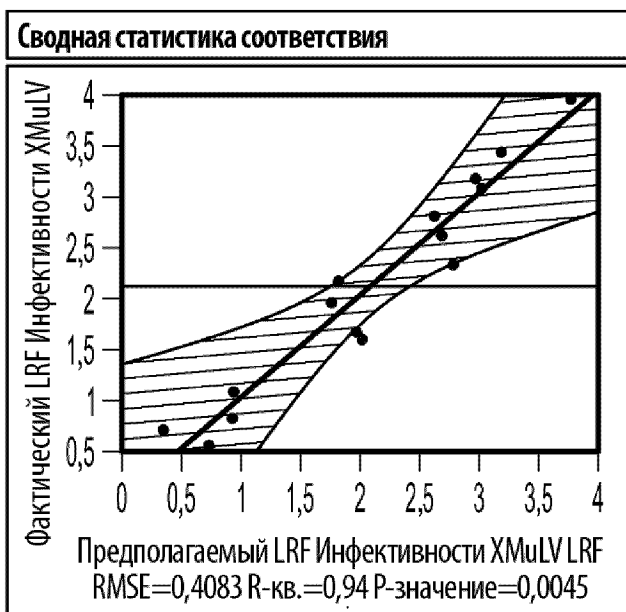
Масштабированные оценки

Номинальные коэффициенты расширены на все уровни

Непрерывные факторы, центрированные по среднему значению, масштабированные по диапазону/2

Параметр	Масштаб. оценки	Станд. ошибка	Prob> t
рН нагрузки	-0,659953	0,1625	0,0153*
Смола[PS6FFHS]	-0,359408	0,132149	0,0530
Фактическая нагрузка	-0,202466	0,149919	0,2482
[мМ Цитрат]	-0,193134	0,152747	0,2747
Линейная Скорость Нагрузки (см/ч)	-0,160022	0,131883	0,2917
(рН нагрузки-6,25)*(Фактическая Нагрузка-128,775)	-0,01078	0,160973	0,9498
([мМ Цитрат]-97,6923)*(Фактическая Нагрузка-128,775)	0,0773832	0,154846	0,6435
Смола[CPHS]	0,3594077	0,132149	0,0530
([мМ Цитрат]-97,6923)*([мМ Цитрат]-97,6923)	1,2940374	0,409046	0,0341*
Перехват	1,5042462	0,371368	0,0155*

Фиг. 16



Сводная статистика соответствия	
R-квадрат	0,936064
Скоррект. R-квадрат	0,850816
Средняя квадратическая ошибка	0,408289
Среднее Ответа	2,115333
Наблюдения (или Сумма весов)	15

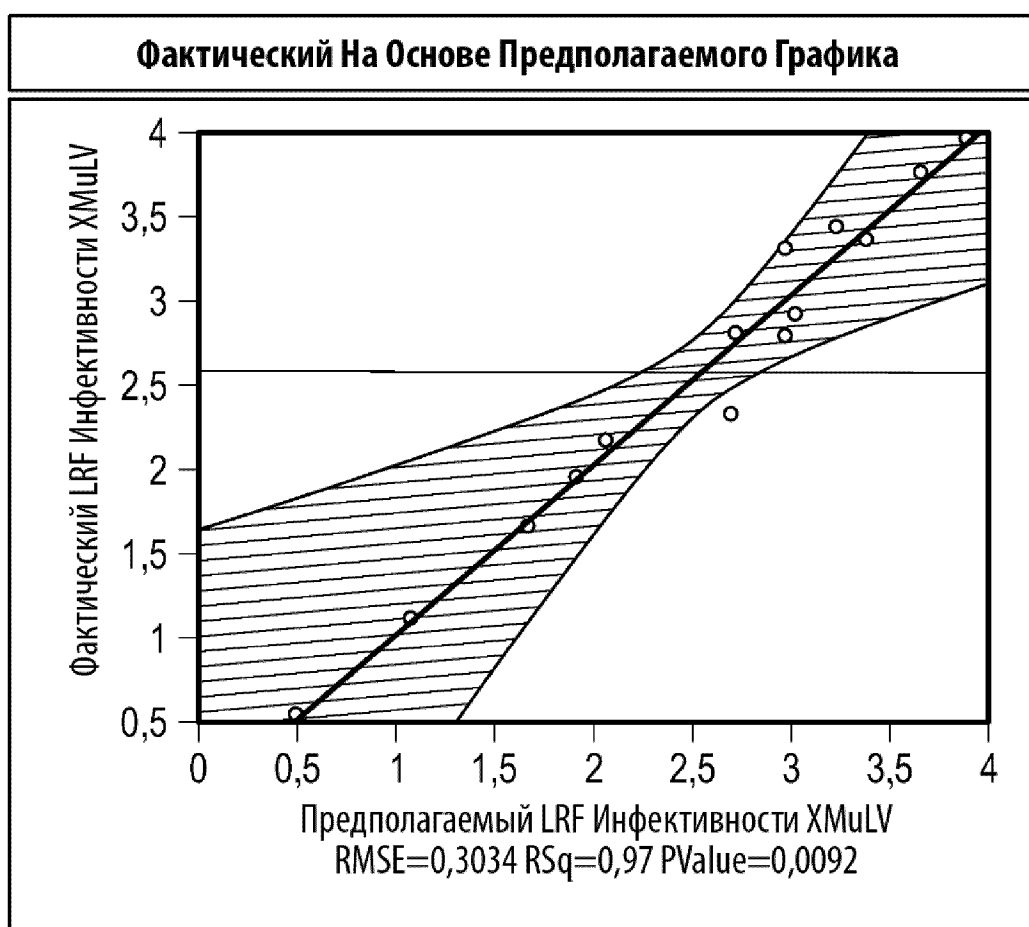
Масштабированные оценки

Номинальные коэффициенты расширены на все уровни

Непрерывные факторы, центрированные по среднему значению, масштабированные по диапазону/2

Параметр	Масштаб. оценки		Станд. ошибка	Prob> t
рН нагрузки	-0,523094		0,121605	0,0051*
(рН нагрузки-6,21333)*(Фактическая Нагрузка -132,762)	-0,416391		0,134634	0,0213*
([мм Цитрат]-98,6667)*(Фактическая Нагрузка -132,762)	-0,398288		0,131794	0,0233*
Фактическая Нагрузка	-0,377996		0,123334	0,0221*
Линейная Скорость Нагрузки (см/ч)	-0,35225		0,109745	0,0184*
Смола[PS6FFHS]	-0,2511		0,106755	0,0569
[мм Цитрат]	0,0656154		0,125892	0,6209
Смола[CPHS]	0,2511005		0,106755	0,0569
([мм Цитрат]-98,6667)*([мм Цитрат]-98,6667)	0,8682188		0,315792	0,0333*
Перехват	1,3502834		0,292103	0,0036*

Фиг. 17



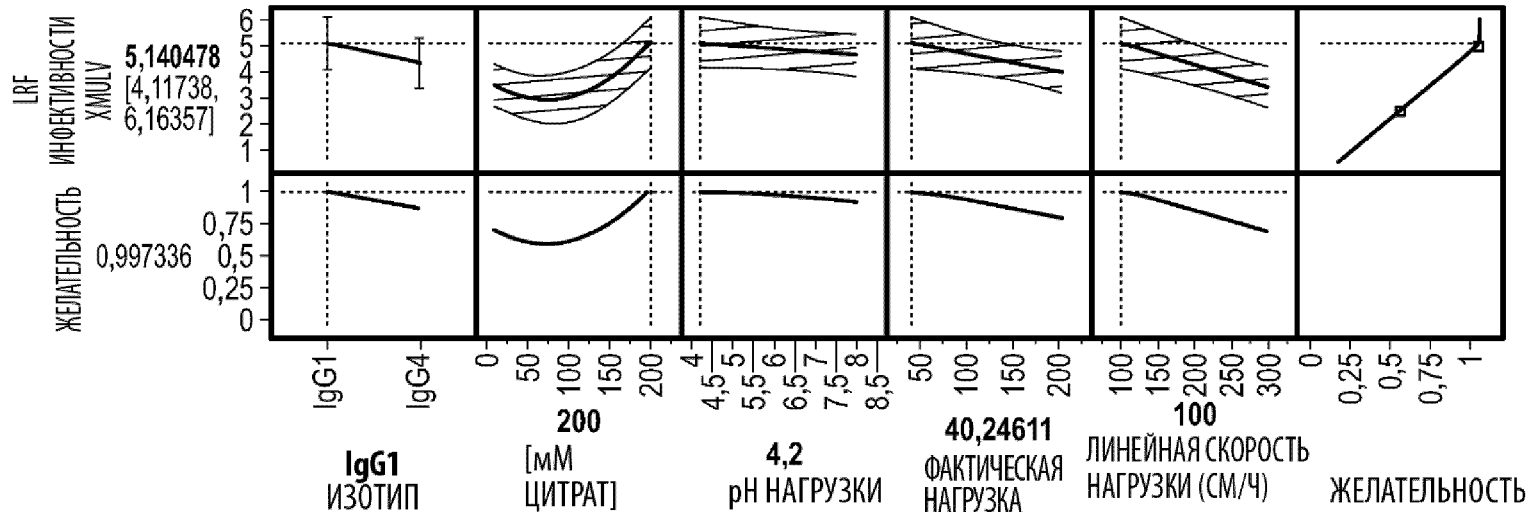
Сводная статистика соответствия	
R-квадрат	0,971775
Скоррект. R-квадрат	0,908268
Средняя квадратическая ошибка	0,303381
Среднее Ответа	2,564286
Наблюдения (или Сумма весов)	14

Фиг. 18А

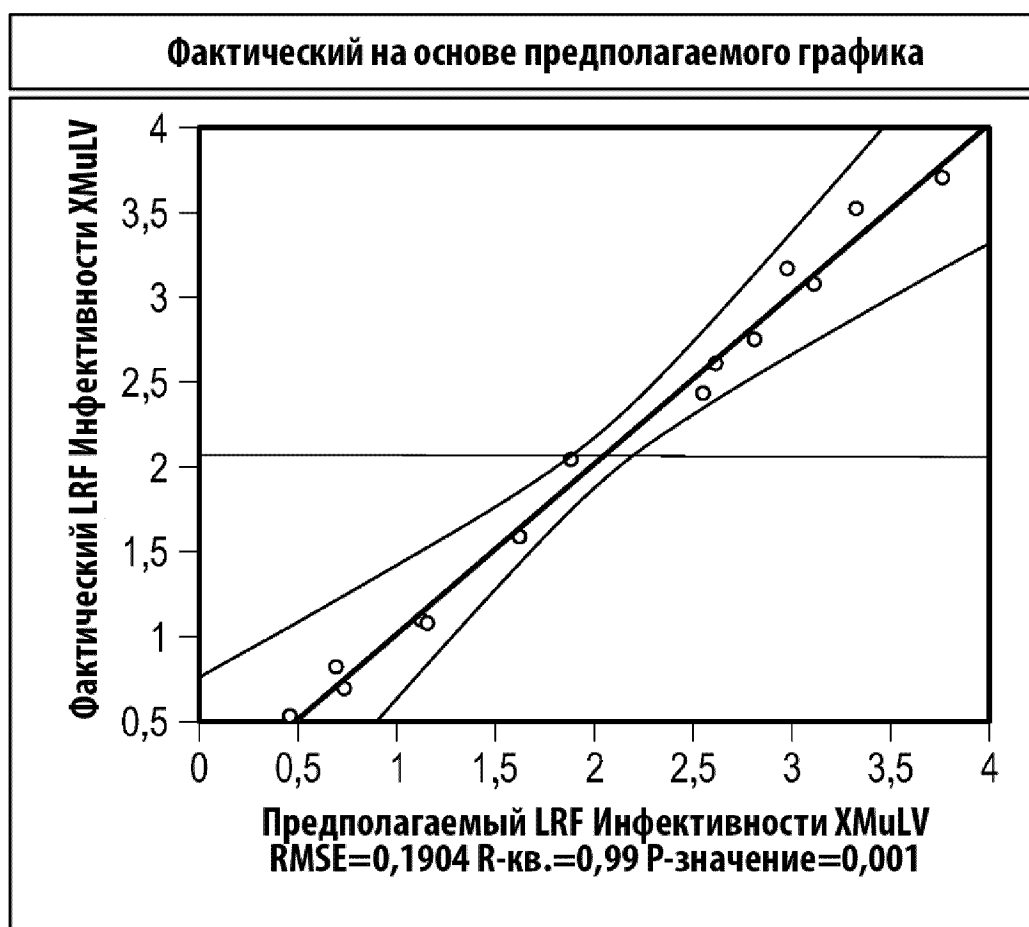
ОЦЕНКИ ПАРАМЕТРОВ

ПАРАМЕТР	ОЦЕНКА	Станд. ошибка	t-критерий	PROB> t	VIF
ПЕРЕХВАТ	4,45441	0,446394	9,98	0,0006*	.
([мм ЦИТРАТ]-91,4286)*([мм ЦИТРАТ]-91,4286)	0,0001409	2,617e-5	5,38	0,0058*	1,5200752
ЛИНЕЙНАЯ СКОРОСТЬ НАГРУЗКИ (СМ/Ч)	-0,004278	0,000842	-5,08	0,0071*	1,0553282
ИЗОТИП[IgG1]	0,3836797	0,08525	4,50	0,0108*	1,0828925
pH НАГРУЗКИ	-0,204897	0,050758	-4,04	0,0156*	1,1320731
ФАКТИЧЕСКАЯ НАГРУЗКА	-0,04258	0,001121	-3,80	0,0191*	1,0560158
([мм ЦИТРАТ]-91,4286)*(ЛИНЕЙНАЯ СКОРОСТЬ НАГРУЗКИ (СМ/Ч)-185,741)	-4,057e-5	1,18e-5	-3,44	0,0263*	1,5514466
([мм ЦИТРАТ]-91,4286)*(ФАКТИЧЕСКАЯ НАГРУЗКА-133,939)	-4,244e-5	1,239e-5	-3,43	0,0266*	1,1250284
[мм ЦИТРАТ]	-0,002691	0,001191	-2,26	0,0867	1,6285024
(pH НАГРУЗКИ-6,35429)*(ФАКТИЧЕСКАЯ НАГРУЗКА-133,939)	-0,000839	0,000775	-1,08	0,3402	1,5696998

ПРОФИЛИРОВЩИК ПРОГНОЗОВ



Фиг. 18В



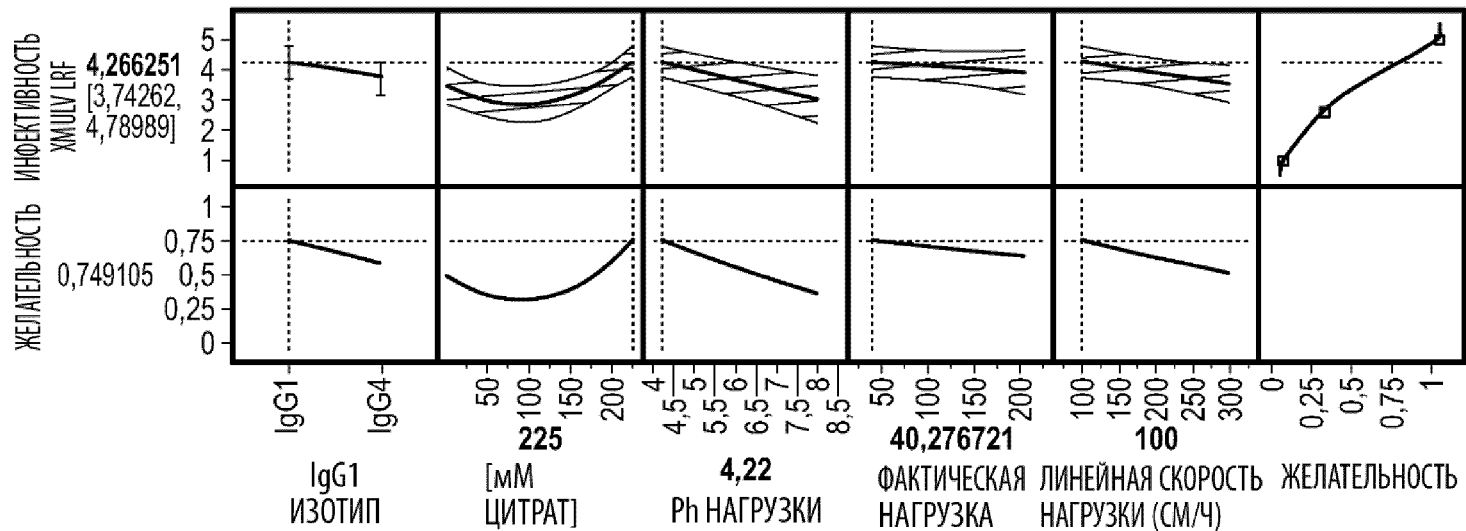
Сводная статистика соответствия	
R-квадрат	0,990865
Скоррект. R-квадрат	0,970312
Средняя квадратическая ошибка	0,190358
Среднее Ответа	2,070714
Наблюдения (или Сумма весов)	14

Фиг. 19А

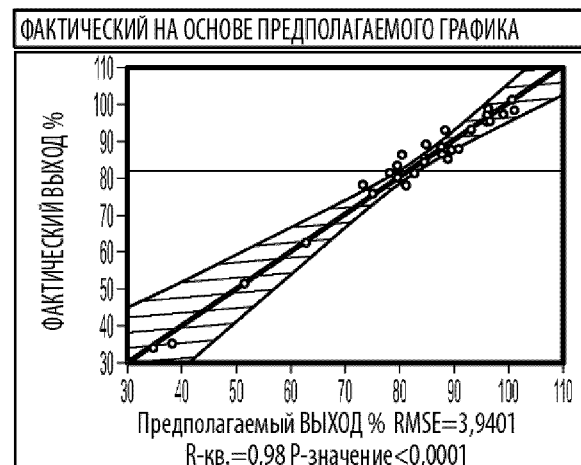
ОЦЕНКИ ПАРАМЕТРОВ

ПАРАМЕТР	ОЦЕНКА	СТАНД. ОШИБКА	t-КРИТЕРИЙ	PROB> t	VIF
Ph НАГРУЗКИ	-0,479224	0,032026	-14,96	0,0001*	1,1912779
ПЕРЕХВАТ	5,3086768	0,359427	14,77	0,0001*	.
ИЗОТИП[IgG1]	0,249966	0,053029	4,71	0,0092*	1,0864592
ФАКТИЧЕСКАЯ НАГРУЗКА	-0,003765	0,000818	-4,60	0,0100*	1,3343698
([мм ЦИТРАТ]-105)*([мм ЦИТРАТ]-105)	8,0048e-5	1,931e-5	4,15	0,0143*	1,4367341
ЛИНЕЙНАЯ СКОРОСТЬ НАГРУЗКИ (см/ч)	-0,001724	0,000518	-3,33	0,0292*	1,0368236
(рН НАГРУЗКИ-6,10643)*(ФАКТИЧЕСКАЯ НАГРУЗКА-127,883)	-0,00172	0,000587	-2,93	0,0428*	2,151491
([мм ЦИТРАТ]-105)*([ЛИНЕЙНАЯ СКОРОСТЬ НАГРУЗКИ (см/ч)-200)	-1,631e-5	8,19e-6	-1,99	1,1174	2,0072074
([мм ЦИТРАТ]-105)*(ФАКТИЧЕСКАЯ НАГРУЗКА -127,883)	-1,37e-5	8,644e-6	-1,58	0,1882	1,1114233
[мм ЦИТРАТ]	-0,000685	-0,000609	-1,12	0,3239	1,109493

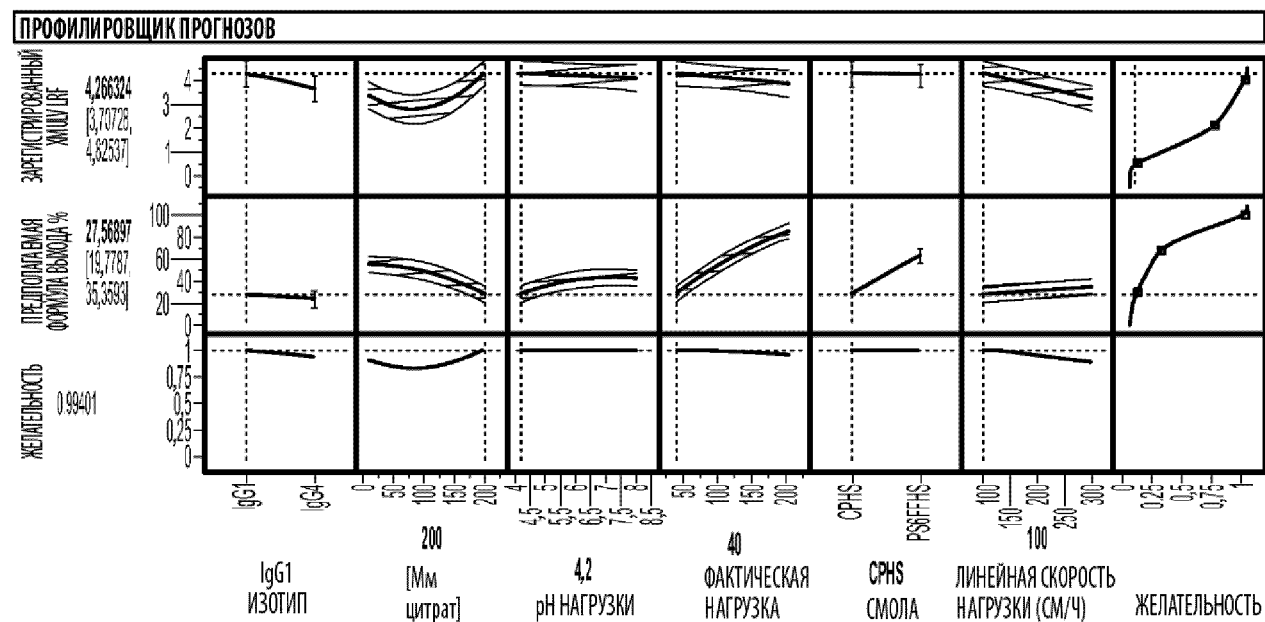
ПРОФИЛИРОВЩИК ПРОГНОЗОВ



Фиг. 19В



СВОДНАЯ СТАТИСТИКА СООТВЕТСТВИЯ	
R-квадрат	0,976814
Скоррект. R-квадрат	0,947831
Средняя квадратическая ошибка	3,940098
Среднее Ответа	82,22154
Наблюдения (или Сумма весов)	28



Фиг. 20