

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202292184** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2022.12.07**

(51) Int. Cl. *C07K 14/54* (2006.01)  
*C07K 14/71* (2006.01)  
*C07K 14/715* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2021.01.21**

---

(54) **СПОСОБЫ ОЧИСТКИ**

---

(31) **62/965,578**

(32) **2020.01.24**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/014306**

(87) **WO 2021/150674 2021.07.29**

(71) Заявитель:  
**АЛКЕРМЕС ФАРМА АЙЭЛЕНД  
ЛИМИТЕД (IE)**

(72) Изобретатель:

**Макнилл Р. Блэр, Сарасватхи Радж  
Прабу Виджаякумар, Пит Мэттью Дж.  
(US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) В настоящем изобретении предлагаются способы очистки полипептидов, содержащих циклически пермутированный интерлейкин-2 (IL-2), слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R $\alpha$ .

**202292184**  
**A1**

**202292184**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575154EA/026

### СПОСОБЫ ОЧИСТКИ

#### РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[001] По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/965,578, поданной 24 января 2020 г., полное раскрытие которой включено в настоящее описание посредством ссылки.

#### СПИСКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[002] Настоящая заявка содержит список последовательностей, который представлен в электронном виде в формате ASCII и настоящим полностью включен посредством ссылки (упомянутая копия ASCII, созданная 20 января 2021 г., называется «ALW-028\_ST25» и имеет размер 3713 байтов).

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[003] Настоящее изобретение относится к способам очистки полипептидов, содержащих циклически пермутированный интерлейкин-2 (IL-2), слитый с внеклеточной частью IL-2R $\alpha$  цепи.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[004] Полипептиды, содержащие циклически пермутированный интерлейкин-2 (IL-2), слитый с внеклеточной частью альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 (IL-2) (IL-2R $\alpha$ ), имеют большие перспективы в качестве антигипертензивных противораковых средств. Эти полипептиды сохраняют полную способность передавать сигнал через комплекс IL-2R, обладающий средней аффинностью, который экспрессируется на CD8<sup>+</sup> Т-клетках памяти и клетках, естественных киллерах (NK), но имеют стерические препятствия для связывания с высокоаффинным комплексом IL-2R, который предпочтительно экспрессируется на CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> регуляторных Т-клетках (CD4<sup>+</sup> Treg) и эндотелиальных клетках. В результате этого селективного связывания IL-2R слитые белки избирательно активируют CD8<sup>+</sup> Т-клетки и NK-клетки, тем самым способствуя уничтожению опухолевых клеток. Неспособность активировать высокоаффинный IL-2R на эндотелиальных клетках также позволяет уменьшить риск токсичности, обусловленный синдромом капиллярной утечки, который является известным риском при терапии IL-2.

[005] Для того, чтобы вышеупомянутые полипептиды можно было использовать в качестве терапевтических средств, сначала их нужно отделить от других загрязняющих биомолекул, присутствующих в процессе производства. Соответственно, в данной области техники существует потребность в способах очистки таких полипептидов.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[006] В настоящем изобретении представлены способы очистки полипептидов, содержащих циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью IL-2R $\alpha$  цепи.

[007] Соответственно, в одном из аспектов настоящего изобретения представлен способ очистки полипептида, содержащего циклически пермутированный IL-2, слитый с

внуклеточной частью  $\text{IL-2R}\alpha$  цепи, включающий: а. приведение осветленного клеточного супернатанта, содержащего полипептид и белок клетки-хозяина (НСР), в контакт с первой хроматографической матрицей в условиях, при которых полипептид связывается с матрицей, и селективное элюирование полипептида из матрицы в первый элюат; б. доведение значения рН первого элюата из этапа (а) до по меньшей мере 10,5 и не более 14,0 (например, до примерно 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9, 11,1, 11,2, 11,3, 11,4, 11,5, 11,6, 11,7, 11,8, 11,9, 12,0, 12,1, 12,2, 12,3, 12,4, 12,5, 12,6, 12,7, 12,8, 12,9, 13,0, 13,1, 13,2, 13,3, 13,4, 13,5, 13,6, 13,7, 13,8, 13,9 или 14,0) с получением элюата с отрегулированным рН; и с. приведение элюата с отрегулированным рН из этапа (б) в контакт со второй хроматографической матрицей, при котором полипептид связывается с матрицей, и селективное элюирование полипептида из матрицы во второй элюат, таким образом очищая полипептид.

[008] В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 1.

[009] В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

[010] В некоторых вариантах осуществления первая хроматографическая матрица содержит матрицу для анионообменной хроматографии (АЕХ).

[011] В некоторых вариантах осуществления перед контактом с АЕХ матрицей в осветленном клеточном супернатанте осуществляют замену буфера на раствор с проводимостью примерно 1-2 мСм/см и рН примерно 8,0-8,5.

[012] В некоторых вариантах осуществления АЕХ матрица содержит четвертичные аминогруппы.

[013] В некоторых вариантах осуществления АЕХ матрица содержит гранулы гидроксированного метакрилового полимера, связанные (функционализированные) с четвертичными аминогруппами.

[014] В некоторых вариантах осуществления средний диаметр гранул составляет примерно 75 мкм. В некоторых вариантах осуществления средний размер пор гранул составляет примерно 100 нм.

[015] В некоторых вариантах осуществления полипептид элюируют из АЕХ матрицы при концентрации соли, эквивалентной проводимости от примерно 15 до примерно 25 мСм/см.

[016] В некоторых вариантах осуществления полипептид элюируют из АЕХ матрицы при концентрации соли, эквивалентной проводимости от примерно 20 до примерно 25 мСм/см.

[017] В некоторых вариантах осуществления полипептид элюируют из АЕХ матрицы при концентрации соли, эквивалентной проводимости примерно 15 мСм/см, примерно 16 мСм/см, примерно 17 мСм/см, примерно 18 мСм/см, примерно 19 мСм/см, примерно 20 мСм/см, примерно 21 мСм/см, примерно 22 мСм/см, примерно 23 мСм/см, примерно 24 мСм/см, примерно 25 мСм/см.

[018] В некоторых вариантах осуществления полипептид элюируют из АЕХ матрицы, используя примерно 0,20-0,25 М раствор хлорида натрия при рН примерно 8,4-8,6.

[019] В некоторых вариантах осуществления рН первого элюата регулируют (например, повышают) с помощью карбоната натрия и/или гидроксида натрия.

[020] В некоторых вариантах осуществления рН первого элюата регулируют (например, повышают) с помощью карбоната натрия или гидроксида натрия в соотношении примерно 0,1 кг карбоната натрия или гидроксида натрия на примерно 1 кг первого элюата.

[021] В некоторых вариантах осуществления рН элюата с отрегулированным рН поддерживают на уровне, равном 10,5 или выше, но ниже 12,0 (например, при 10,7 или выше, но ниже 11,0 (например, примерно 10,7, 10,8 или 10,9)) в течение по меньшей мере 30 минут (например, по меньшей мере 1 часа).

[022] В некоторых вариантах осуществления значение рН элюата с отрегулированным рН поддерживают на уровне 10,5 или выше, но ниже 12,0 (например, на уровне 10,7 или выше, но ниже 11,0 (например, примерно 10,7, 10,8 или 10,9)) в течение по меньшей мере 30 минут (например, по меньшей мере 1 часа), где рН на уровне 10,5 или выше, но ниже 12,0 (например, 10,7 или выше, но ниже 11,0 (например, примерно 10,7, 10,8 или 10,9)) получают путем добавления карбоната натрия или гидроксида натрия в соотношении примерно 0,1 кг карбоната натрия или гидроксида натрия на примерно 1 кг первого элюата.

[023] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает снижение рН элюата с отрегулированным рН путем добавления лимонной кислоты (например, перед приведением элюата с отрегулированным рН в контакт со второй хроматографической матрицей).

[024] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает снижение рН элюата с отрегулированным рН до примерно рН 8,3-8,7 (например, перед приведением элюата с отрегулированным рН в контакт со второй хроматографической матрицей).

[025] В некоторых вариантах осуществления перед контактом со второй хроматографической матрицей проводимость элюата с отрегулированным рН изменяют до примерно 130-160 мСм/см, и рН изменяют до примерно  $8,5 \pm 0,2$ .

[026] В некоторых вариантах осуществления перед контактом со второй хроматографической матрицей проводимость элюата с отрегулированным рН изменяют до примерно 130 мСм/см, примерно 131 мСм/см, примерно 132 мСм/см, примерно 133 мСм/см, примерно 134 мСм/см, примерно 135 мСм/см, примерно 136 мСм/см, примерно 137 мСм/см, примерно 138 мСм/см, примерно 139 мСм/см, примерно 140 мСм/см, примерно 141 мСм/см, примерно 142 мСм/см, примерно 143 мСм/см, примерно 144 мСм/см, примерно 145 мСм/см, примерно 146 мСм/см, примерно 147 мСм/см, примерно 148 мСм/см, примерно 149 мСм/см, примерно 150 мСм /см, примерно 151 мСм/см, примерно 152 мСм/см, примерно 153 мСм/см, примерно 154 мСм/см, примерно 155 мСм/см, примерно 156 мСм/см, примерно

157 мСм/см, примерно 158 мСм/см, примерно 159 мСм/см или примерно 160 мСм/см, и рН изменяют до примерно  $8,5 \pm 0,2$ .

[027] В некоторых вариантах осуществления перед контактом со второй хроматографической матрицей проводимость элюата с отрегулированным рН изменяют до примерно 134-160 мСм/см, и рН изменяют до примерно  $8,5 \pm 0,2$ .

[028] В некоторых вариантах осуществления перед контактом со второй хроматографической матрицей проводимость элюата с отрегулированным рН изменяют до примерно 155-160 мСм/см, и рН изменяют до примерно  $8,5 \pm 0,2$ .

[029] В некоторых вариантах осуществления проводимость элюата с отрегулированным рН изменяют с помощью сульфата аммония.

[030] В некоторых вариантах осуществления вторая хроматографическая матрица содержит матрицу для хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC).

[031] В некоторых вариантах осуществления перед контактом с HIC матрицей элюат с отрегулированным рН изменяют таким образом, чтобы он содержал примерно 1-1,2 М сульфата аммония.

[032] В некоторых вариантах осуществления HIC матрица содержит полипропиленгликольные группы.

[033] В некоторых вариантах осуществления HIC матрица содержит гранулы гидроксированного метакрилового полимера, связанные с полипропиленгликольными группами.

[034] В некоторых вариантах осуществления средний диаметр гранул находится в пределах от примерно 40 до примерно 90 мкм.

[035] В некоторых вариантах осуществления средний размер пор гранул составляет примерно 75 нм.

[036] В некоторых вариантах осуществления полипептид элюируют из HIC матрицы, используя концентрацию соли, эквивалентную проводимости от примерно 100 до примерно 140 мСм/см.

[037] В некоторых вариантах осуществления полипептид элюируют из HIC матрицы, используя концентрацию соли, эквивалентную проводимости от примерно 125 до примерно 140 мСм/см.

[038] В некоторых вариантах осуществления полипептид элюируют из HIC матрицы, используя последовательный многоступенчатый градиент уменьшающейся концентрации соли.

[039] В некоторых вариантах осуществления полипептид элюируют из HIC матрицы с помощью буфера, содержащего от примерно 0,85 до примерно 0,95 М сульфата аммония при рН  $8,5 \pm 0,2$ .

[040] В некоторых вариантах осуществления перед контактом с HIC матрицей элюат с отрегулированным рН фильтруют через 0,2 мкм фильтр.

[041] В некоторых вариантах осуществления перед контактом с HIC матрицей элюат с отрегулированным рН подвергают вирусной инактивации.

[042] В некоторых вариантах осуществления вирусную инактивацию осуществляют путем смешивания элюата с отрегулируемым рН с три-н-бутилфосфатом и полисорбатом 20.

[043] В некоторых вариантах осуществления выполняют дополнительную очистку полипептида из второго элюата с помощью хроматографии в смешанном режиме (ММС).

[044] В некоторых вариантах осуществления выполняют дополнительную очистку полипептида из второго элюата с помощью ММС с последующей АЕХ.

[045] В некоторых вариантах осуществления осветленный клеточный супернатант получают из культуры клеток яичника китайского хомячка (СНО).

[046] В некоторых вариантах осуществления чистота полипептида во втором элюате составляет не менее 90%. В некоторых вариантах осуществления чистоту полипептида определяют методом ВЭЖХ с обращенной фазой (ОФ).

[047] В другом аспекте настоящего изобретения представлен способ уменьшения содержания белка клетки-хозяина (НСР) в осветленном клеточном супернатанте, содержащем полипептид, содержащий циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью IL-2R $\alpha$  цепи, где способ включает приведение частично очищенного полипептида в контакт с АЕХ матрицей в условиях, при которых полипептид связывается с АЕХ матрицей, и селективное элюирование полипептида из АЕХ матрицы в условиях градиентного элюирования, тем самым уменьшая содержание НСР относительно полипептида.

[048] В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 1; или содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

[049] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение в контакт осветленного клеточного супернатанта, содержащего полипептид и НСР, с одной или более хроматографическими смолами с получением частично очищенного полипептида.

[050] В некоторых вариантах осуществления содержание НСР до приведения частично очищенного полипептида в контакт с АЕХ матрицей находится на уровне  $\geq$  примерно 300 м.д. (миллионных долей, ppm). В некоторых вариантах осуществления содержание НСР до приведения частично очищенного полипептида в контакт с АЕХ матрицей находится на уровне  $\geq$  примерно 150 м.д.

[051] В некоторых вариантах осуществления содержание НСР после элюирования полипептида из АЕХ матрицы в условиях градиентного элюирования находится на уровне  $\leq$  примерно 100 м.д. В некоторых вариантах осуществления содержание НСР после элюирования полипептида из АЕХ матрицы в условиях градиентного элюирования находится на уровне  $\leq$  примерно 50 м.д. В некоторых вариантах осуществления содержание НСР после элюирования полипептида из АЕХ матрицы в условиях градиентного элюирования находится на уровне  $\leq$  примерно 25 м.д.

[052] В некоторых вариантах осуществления условия градиентного элюирования

включают одно или более из следующего: увеличение проводимости элюирующего буфера с течением времени; увеличение концентрации соли элюирующего буфера с течением времени; или уменьшение рН элюирующего буфера с течением времени.

[053] В некоторых вариантах осуществления проводимость элюирующего буфера увеличивают от примерно  $\leq 5$  мСм/см до примерно  $\geq 15$  мСм/см. В некоторых вариантах осуществления проводимость элюирующего буфера увеличивают от примерно  $\leq 2$  мСм/см до примерно  $\geq 15$  мСм/см. В некоторых вариантах осуществления проводимость элюирующего буфера увеличивают от примерно  $\leq 2$  мСм/см до примерно  $\geq 20$  мСм/см. В некоторых вариантах осуществления проводимость элюирующего буфера увеличивают до значения от примерно 15 мСм/см до примерно 100 мСм/см. В некоторых вариантах осуществления проводимость элюирующего буфера увеличивают до значения от примерно 20 мСм/см до примерно 50 мСм/см. В некоторых вариантах осуществления конечная проводимость элюирующего буфера составляет от примерно 20 мСм/см до примерно 50 мСм/см. В некоторых вариантах осуществления начальная проводимость элюирующего буфера составляет примерно  $\leq 5$  мСм/см. В некоторых вариантах осуществления начальная проводимость элюирующего буфера составляет примерно  $\leq 2$  мСм/см.

[054] В некоторых вариантах осуществления концентрацию соли в элюирующем буфере увеличивают от примерно 0 М соли до примерно 1,5 М соли. В некоторых вариантах осуществления концентрацию соли в элюирующем буфере увеличивают от примерно 0 М соли до примерно 1,0 М соли. В некоторых вариантах осуществления концентрацию соли в элюирующем буфере увеличивают от примерно 0 М соли до примерно 0,5 М соли. В некоторых вариантах осуществления конечная концентрация соли в элюирующем буфере составляет от примерно 0,2 М соли до примерно 1,0 М соли. В некоторых вариантах осуществления конечная концентрация соли в элюирующем буфере составляет примерно 0,2 М соли. В некоторых вариантах осуществления соль включает хлорид натрия.

[055] В некоторых вариантах осуществления рН элюирующего буфера находится в пределах от примерно 7,0 до примерно 9,0. В некоторых вариантах осуществления рН элюирующего буфера оставляет примерно 8,0.

[056] В некоторых вариантах осуществления одну или более хроматографических смол для получения частично очищенного полипептида выбирают из группы, состоящей из АЕХ, НИС и ММС.

[057] В некоторых вариантах осуществления получение частично очищенного полипептида включает следующие этапы: а1) приведение осветленного клеточного супернатанта, содержащего полипептид и НСР, в контакт с первой АЕХ матрицей в условиях, при которых полипептид связывается с АЕХ матрицей, и селективное элюирование полипептида из АЕХ матрицы в первый элюат; а2) приведение первого элюата с этапа (а1) в контакт с НИС матрицей таким образом, что полипептид связывается с НИС матрицей, и селективное элюирование полипептида из НИС матрицы во второй элюат; и а3) приведение второго элюата с этапа (а2) в контакт с ММС матрицей таким образом, что полипептид связывается с ММС матрицей, и селективное элюирование полипептида из

ММС матрицы в третий элюат с получением таким образом частично очищенного полипептида.

[058] В некоторых вариантах осуществления перед контактом с первой АЕХ матрицей буфер осветленного клеточного супернатанта заменяют раствором с проводимостью примерно 1-2 мСм/см и рН примерно 8,0-8,5.

[059] В некоторых вариантах осуществления первая АЕХ матрица содержит четвертичные аминогруппы. В некоторых вариантах осуществления первая АЕХ матрица содержит гранулы гидроксированного метакрилового полимера, функционализированные четвертичными аминогруппами. В некоторых вариантах осуществления средний диаметр гранул составляет примерно 75 мкм. В некоторых вариантах осуществления средний размер пор гранул составляет примерно 100 нм.

[060] В некоторых вариантах осуществления полипептид элюируют из первой АЕХ матрицы, используя раствор с концентрацией соли, эквивалентной проводимости от примерно 15 до примерно 25 мСм/см.

[061] В некоторых вариантах осуществления полипептид элюируют из первой АЕХ матрицы, используя раствор с концентрацией соли, эквивалентной проводимости от примерно 20 до примерно 25 мСм/см.

[062] В некоторых вариантах осуществления полипептид элюируют из АЕХ матрицы при концентрации соли, эквивалентной проводимости примерно 15 мСм/см, примерно 16 мСм/см, примерно 17 мСм/см, примерно 18 мСм/см, примерно 19 мСм./см, примерно 20 мСм/см, примерно 21 мСм/см, примерно 22 мСм/см, примерно 23 мСм/см, примерно 24 мСм/см, примерно 25 мСм/см.

[063] В некоторых вариантах осуществления полипептид элюируют из первой АЕХ матрицы, используя примерно 0,20-0,25 М водный раствор хлорида натрия при рН примерно 8,4-8,6.

[064] В некоторых вариантах осуществления рН первого элюата регулируют (например, повышают) с помощью карбоната натрия и/или гидроксида натрия с получением первого элюата с отрегулированным рН.

[065] В некоторых вариантах осуществления рН первого элюата регулируют (например, повышают) с помощью карбоната натрия или гидроксида натрия при соотношении примерно 0,1 кг карбоната натрия или гидроксида натрия на примерно 1 кг первого элюата.

[066] В некоторых вариантах осуществления рН элюата с отрегулированным рН поддерживают на уровне 10,5 или выше, но ниже 12,0 (например, на уровне 10,7 или выше, но ниже 11,0 (например, примерно 10,7, 10,8 или 10,9)) в течение по меньшей мере 30 минут (например, не менее 1 часа).

[067] В некоторых вариантах осуществления рН элюата с отрегулированным рН поддерживают на уровне 10,5 или выше, но ниже 12,0 (например, на уровне 10,7 или выше, но ниже 11,0 (например, примерно 10,7, 10,8 или 10,9)) в течение по меньшей мере 30 минут (например, по меньшей мере 1 часа), где рН на уровне 10,5 или выше, но ниже 12,0

(например, на уровне 10,7 или выше, но ниже 11,0 (например, примерно 10,7, 10,8 или 10,9)) получают путем добавления карбоната натрия или гидроксида натрия при соотношении примерно 0,1 кг карбоната натрия или гидроксида натрия на примерно 1 кг первого элюата.

[068] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает снижение рН первого элюата с отрегулированным рН путем добавления лимонной кислоты. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает снижение рН первого элюата с отрегулированным рН до примерно рН 8,3-8,7.

[069] В некоторых вариантах осуществления перед контактом с НИС матрицей проводимость первого элюата с отрегулированным рН изменяют до примерно 155-160 мСм/см, и рН изменяют до примерно  $8,5 \pm 0,2$ .

[070] В некоторых вариантах осуществления проводимость первого элюата с отрегулированным рН изменяют с помощью сульфата аммония. В некоторых вариантах осуществления перед контактом с НИС матрицей первый элюат с отрегулированным рН изменяют таким образом, чтобы он содержал примерно 1-1,2 М сульфата аммония.

[071] В некоторых вариантах осуществления НИС матрица содержит полипропиленгликольные группы. В некоторых вариантах осуществления НИС матрица содержит гранулы гидроксированного метакрилового полимера, связанные с полипропиленгликольными группами. В некоторых вариантах осуществления средний диаметр гранул составляет от примерно 40 до примерно 90 мкм. В некоторых вариантах осуществления средний размер пор гранул составляет примерно 75 нм.

[072] В некоторых вариантах осуществления полипептид элюируют из НИС матрицы, используя раствор с концентрацией соли, эквивалентной проводимости от примерно 100 до примерно 140 мСм/см.

[073] В некоторых вариантах осуществления полипептид элюируют из НИС матрицы, используя раствор с концентрации соли, эквивалентной проводимости от примерно 125 до примерно 140 мСм/см.

[074] В некоторых вариантах осуществления полипептид элюируют из НИС матрицы с помощью последовательного многоступенчатого градиента уменьшающейся концентрации соли.

[075] В некоторых вариантах осуществления полипептид элюируют из НИС матрицы, используя буфер, содержащий от примерно 0,85 до примерно 0,95М сульфата аммония, при рН  $8,5 \pm 0,2$ .

[076] В некоторых вариантах осуществления перед контактом с НИС матрицей элюат с отрегулированным рН фильтруют через 0,2 мкм фильтр.

[077] В некоторых вариантах осуществления перед контактом с НИС матрицей первый элюат с отрегулированным рН подвергают вирусной инактивации.

[078] В некоторых вариантах осуществления вирусную инактивацию осуществляют путем смешивания элюата с отрегулированным рН с три-н-бутилфосфатом и полисорбатом 20.

[079] В некоторых вариантах осуществления осветленный клеточный супернатант

получают из культуры клеток яичника китайского хомячка (СНО).

[080] В одном из аспектов настоящего изобретения представлен способ уменьшения содержания белка клетки-хозяина (НСП) в осветленном клеточном супернатанте, содержащем полипептид, содержащий циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью IL-2R $\alpha$  цепи, где способ включает этапы: приведения осветленного клеточного супернатанта, содержащего полипептид и НСП, в контакт с первой АЕХ матрицей в условиях, при которых полипептид связывается с первой АЕХ матрицей, и селективного элюирования полипептида из первой АЕХ матрицы в первый элюат; приведение первого элюата в контакт с НИС матрицей таким образом, что полипептид связывается с НИС матрицей, и селективное элюирование полипептида из НИС матрицы во второй элюат; приведение второго элюата в контакт с ММС матрицей таким образом, что полипептид связывается с ММС матрицей, и селективное элюирование полипептида из ММС матрицы в третий элюат; и контактирование третьего элюата со второй АЕХ матрицей в условиях, при которых полипептид связывается со второй АЕХ матрицей, и селективное элюирование полипептида из второй АЕХ матрицы в условиях градиентного элюирования, тем самым уменьшая содержание НСП относительно полипептида, при этом после этапа (d) содержание НСП составляет  $\leq$  примерно 50 м.д.

[081] В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит: аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 1; или содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

[082] В некоторых вариантах осуществления этап аффинной очистки не используют.

[083] В одном из аспектов настоящего изобретения представлена композиция, содержащая полипептид, содержащий циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью IL-2R $\alpha$  цепи, где содержание НСП в композиции находится на уровне  $\leq$  примерно 100 м.д.

[084] В некоторых вариантах осуществления содержание НСП в композиции находится на уровне  $\leq$  примерно 50 м.д.

[085] В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит: аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 1; или содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

[086] В некоторых вариантах осуществления композицию получают способом, указанным выше.

[087] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу улучшения периода полувыведения из сыворотки композиции, содержащей множество полипептидов, где каждый полипептид из множества содержит циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью IL-2R $\alpha$  цепи, причем способ включает этапы: приведения осветленного клеточного супернатанта, содержащего полипептид, в контакт с первой АЕХ матрицей в условиях, при которых полипептид связывается с первой АЕХ матрицей, и

селективного элюирования полипептида из первой АЕХ матрицы в первый элюат; приведение первого элюата в контакт с НИС матрицей таким образом, что полипептид связывается с НИС матрицей, и селективное элюирование полипептида из НИС матрицы во второй элюат; приведение второго элюата в контакт с ММС матрицей таким образом, что полипептид связывается с ММС матрицей, и селективное элюирование полипептида из ММС матрицы в третий элюат; и контактирование третьего элюата со второй АЕХ матрицей в условиях, при которых полипептид связывается со второй АЕХ матрицей, и селективное элюирование полипептида из второй АЕХ матрицы, тем самым улучшая время полувыведения композиции из сыворотки.

[088] В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит: аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 1; или содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

[089] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает регулирование рН первого элюата с этапа (а) до по меньшей мере 10,5 и не более 11,5 перед приведением первого элюата в контакт с матрицей НИС с этапа (b).

[090] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к композиции, содержащей множество полипептидов, причем каждый полипептид из множества содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, связанную с одним или более видами гликанов, где один или более видов гликанов связаны с полипептидом в одном или более аминокислотных положениях из N187, N206 и T212 SEQ ID NO: 1.

[091] В некоторых вариантах осуществления виды гликанов в аминокислотном положении N187 SEQ ID NO: 1 выбирают из группы, состоящей из: Hex5HexNAc4FucNeuAc2; Hex6HexNAc5FucNeuAc2; Hex5HexNAc4FucNeuAc; Hex6HexNAc5FucNeuAc3; Hex4HexNAc4FucNeuAc; Hex5HexNAc5NeuAc2; Hex5HexNAc4Fuc; Hex3HexNAc4Fuc; Hex4HexNAc4Fuc; Hex6HexNAc5Fuc; и Hex5HexNAc5Fuc; где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминную кислоту, Fuc представляет собой фукозу, и число представляет собой номер каждой гликановой структуры.

[092] В некоторых вариантах осуществления виды гликанов в аминокислотном положении N206 SEQ ID NO: 1 выбирают из группы, состоящей из: Hex6HexNAc5FucNeuAc3; Hex5HexNAc4FucNeuAc2; Hex6HexNAc5FucNeuAc2; Hex7HexNAc6FucNeuAc3; Hex6HexNAc5FucNeuAc; Hex5HexNAc4FucNeuAc; Hex5HexNAc4Fuc; и Hex4HexNAc4Fuc; где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминную кислоту, Fuc представляет собой фукозу, и число представляет собой номер каждой гликановой структуры.

[093] В некоторых вариантах осуществления виды гликанов в аминокислотном положении T212 SEQ ID NO: 1 выбирают из группы, состоящей из: HexHexNAc;

HexHexNAcNeuAc; и HexHexNAcNeuAc<sub>2</sub>; где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминую кислоту, и число представляет собой номер каждой гликановой структуры.

[094] В некоторых вариантах осуществления общий процент гликанов в аминокислотном положении N187 SEQ ID NO: 1 множества полипептидов в композиции составляет от примерно 60% до примерно 70% Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>FucNeuAc<sub>2</sub>; от примерно 4% до примерно 6% Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>FucNeuAc<sub>2</sub>; от примерно 7% до примерно 10% Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>FucNeuAc; от примерно 15% до примерно 17% Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>FucNeuAc<sub>3</sub>; и от примерно 3% до примерно 4% Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>5</sub>NeuAc<sub>2</sub>; где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминую кислоту, Fuc представляет собой фукозу, и число представляет собой номер каждой гликановой структуры.

[095] В некоторых вариантах осуществления общий процент гликанов в аминокислотном положении N187 SEQ ID NO: 1 множества полипептидов в композиции составляет от примерно 60% до примерно 70% Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>FucNeuAc<sub>2</sub>; от примерно 4% до примерно 6% Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>FucNeuAc<sub>2</sub>; от примерно 7% до примерно 10% Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>FucNeuAc; от примерно 15% до примерно 17% Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>FucNeuAc<sub>3</sub>; от примерно 0,5% до примерно 1,5% Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>4</sub>FucNeuAc; от примерно 3% до примерно 4% Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>5</sub>NeuAc<sub>2</sub>; от примерно 0% до примерно 0,5% Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>Fuc; от примерно 0% до примерно 0,5% Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>4</sub>Fuc; от примерно 0% до примерно 0,5% Hex<sub>4</sub>HexNAc<sub>4</sub>Fuc; от примерно 0% до примерно 0,5% Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>Fuc; и от примерно 0% до примерно 0,5% Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>5</sub>Fuc; где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминую кислоту, Fuc представляет собой фукозу, и число представляет собой номер каждой гликановой структуры.

[096] В некоторых вариантах осуществления общий процент гликанов в аминокислотном положении N206 SEQ ID NO: 1 множества полипептидов в композиции составляет от примерно 3% до примерно 5% Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>FucNeuAc<sub>3</sub>; от примерно 75% до примерно 85% Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>FucNeuAc<sub>2</sub>; от примерно 2% до примерно 4% Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>FucNeuAc<sub>2</sub>; от примерно 5% до примерно 12% Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>FucNeuAc; от примерно 1% до примерно 3% Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>Fuc; где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминую кислоту, Fuc представляет собой фукозу, и число представляет собой номер каждой гликановой структуры.

[097] В некоторых вариантах осуществления общий процент гликанов в аминокислотном положении N206 SEQ ID NO: 1 множества полипептидов в композиции составляет от примерно 3% до примерно 5% Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>FucNeuAc<sub>3</sub>; от примерно 75% до примерно 85% Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>4</sub>FucNeuAc<sub>2</sub>; от примерно 2% до примерно 4% Hex<sub>6</sub>HexNAc<sub>5</sub>FucNeuAc<sub>2</sub>; от примерно 0,5% до примерно 1,5% Hex<sub>7</sub>HexNAc<sub>6</sub>FucNeuAc<sub>3</sub>;

от примерно 0% до примерно 1% Hex6HexNAc5FucNeuAc; от примерно 5% до примерно 12% Hex5HexNAc4FucNeuAc; от примерно 1% до примерно 3% Hex5HexNAc4Fuc; и от примерно 0,5% до примерно 2% Hex4HexNAc4Fuc; где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминую кислоту, Fuc представляет собой фукозу, и число представляет собой номер каждой гликановой структуры.

[098] В некоторых вариантах осуществления общий процент гликанов в аминокислотном положении T212 SEQ ID NO: 1 множества полипептидов в композиции составляет от примерно 14% до примерно 18% HexHexNAcNeuAc; и от примерно 8% до примерно 13% HexHexNAcNeuAc2; где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминую кислоту, и число представляет собой номер каждой гликановой структуры.

[099] В некоторых вариантах осуществления общий процент гликанов в аминокислотном положении T212 SEQ ID NO: 1 множества полипептидов в композиции составляет от примерно 0% до примерно 1% HexHexNAc; от примерно 14% до примерно 18% HexHexNAcNeuAc; и от примерно 8% до примерно 13% HexHexNAcNeuAc2; где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминую кислоту, и число представляет собой номер каждой гликановой структуры.

[0100] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к композиции, содержащей множество полипептидов, причем каждый полипептид из множества содержит циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью IL-2R $\alpha$  цепи, где композиция имеет профиль капиллярной изоэлектрической фокусировки (сIEF), показанный на фиг. 15.

[0101] В некоторых вариантах осуществления композиция имеет пик на сIEF профиле при одном или более из примерно pI 5,73, примерно pI 5,93, примерно pI 6,09, примерно pI 6,28, примерно pI 6,38, примерно pI 6,48, примерно pI 6,53, примерно pI 6,66, примерно pI 6,82 и примерно pI 7,02.

[0102] В некоторых вариантах осуществления композиция имеет площадь пика в процентах: от примерно 8% до примерно 12% при pI 5,93; от примерно 18% до примерно 26% при pI 6,09; от примерно 22% до примерно 26% при pI 6,38; и от примерно 18% до примерно 28% при pI 6,66.

[0103] В некоторых вариантах осуществления композиция имеет площадь пика в процентах: от примерно 1,5% до примерно 2,5% при pI 5,73; от примерно 8% до примерно 12% при pI 5,93; от примерно 18% до примерно 26% при pI 6,09; от примерно 3,5% до примерно 4,5% при pI 6,28; от примерно 22% до примерно 26% при pI 6,38; от примерно 3% до примерно 5% при pI 6,48; от примерно 4% до примерно 6% при pI 6,53; от примерно 18% до примерно 28% при pI 6,66; от примерно 2% до примерно 6% при pI 6,82; и от примерно 0% до примерно 3% при pI 7,02.

[0104] В некоторых вариантах осуществления пик при примерно рI 5,73 содержит комбинацию пиков при примерно рI 5,70 и при примерно рI 5,76. В некоторых вариантах осуществления пик при примерно рI 5,93 содержит комбинацию пиков при примерно рI 5,89 и при примерно рI 5,97.

[0105] В некоторых вариантах осуществления композицию получают способами, указанными выше.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

[0106] На фиг. 1 представлена блок-схема процесса получения полипептида А.

[0107] На фиг. 2 представлен гель SDS-PAGE в редуцирующих и нередуцирующих условиях для образцов, взятых из биореактора в определенные дни.

[0108] На фиг. 3А-3С показаны стабильность и активность полипептида А после этапа очистки АЕХ I. Стабильность измеряли с помощью SDS-PAGE (фиг. 3А) и эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ЭВЭЖХ, SE-HPLC) (фиг. 3В) после инкубации образца АЕХ I пула при 5 или 25°C в течение 1, 7 или 10 дней. Активность измеряли с помощью клеточного анализа и ELISA рSTAT5 по кривым доза-ответ (фиг. 3С).

[0109] На фиг. 4 показан раскрытый в настоящем описании этап выдерживания при повышенном рН и кривые ВЭЖХ с обращенной фазой (ОФ) для образцов до и после выдерживания при повышенном рН.

[0110] На фиг. 5 показаны профили элюирования при хроматографии гидрофобного взаимодействия (НІС) для 4 протестированных НІС смол. Протестированные смолы представляли собой Butyl-650M, Phenyl-650M, Hexyl-650C и PPG-600M.

[0111] На фиг. 6А-6С показаны стабильность и активность полипептида А после этапа очистки НІС. Стабильность измеряли с помощью SDS-PAGE (фиг. 6А) и ЭВЭЖХ (фиг. 6В) после инкубации образца НІС пула при 5 или 25°C в течение 1, 7 или 10 дней. Активность измеряли с помощью клеточного анализа и ELISA рSTAT5 по кривым доза-ответ (фиг. 6С).

[0112] На фиг. 7А-7С показаны стабильность и активность полипептида А после этапа очистки ММС. Стабильность измеряли с помощью SDS-PAGE (фиг. 7А) после инкубации образца НІС пула при 5 или 25°C в течение 1, 6 или 11 дней. Стабильность также измеряли с помощью ЭВЭЖХ (фиг. 7В) через 4 месяца при 2-8°C. Активность измеряли с помощью клеточного анализа и ELISA рSTAT5 по кривым доза-ответ (фиг. 7С).

[0113] На фиг. 8 показан гель SDS-PAGE в редуцирующих и нередуцирующих условиях для образцов АЕХ II пула, которые хранили при -80°C, 2-8°C и температуре окружающей среды.

[0114] На фиг. 9 показаны две схемы очистки, в которых выдерживание при повышенном рН использовали перед этапом АЕХ I и после этапа АЕХ I.

[0115] На фиг. 10 показана кривая ВЭЖХ с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ) для образца АЕХ I после выдерживания собранного материала при повышенном рН.

[0116] На фиг. 11 показана кривая ОФ-ВЭЖХ для НІС образца после выдерживания

собранного материала при повышенном рН.

[0117] На фиг. 12 показана кривая ОФ-ВЭЖХ для АЕХ I образца после выдерживания при повышенном рН.

[0118] На фиг. 13 показана кривая ОФ-ВЭЖХ для НИС образца после выдерживания образца АЕХ I пула при повышенном рН.

[0119] На фиг. 14 показана концентрация полипептида А в сыворотке (нМ) у мышей в зависимости от времени (часы). Сравнивали фармакокинетику трех разных партий очищенного полипептида А. Одну из трех партий обрабатывали сиалидазой (треугольники), тогда как две другие партии не были обработаны сиалидазой (кружки и квадраты).

[0120] На фиг. 15 показан профиль капиллярной изоэлектрической фокусировки (сIEF) трех разных партий очищенного полипептида А.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

[0121] В настоящем описании представлены способы очистки полипептидов, содержащих циклически пермутированный интерлейкин-2 (IL-2), слитый с внеклеточной частью IL-2R $\alpha$  цепи.

#### **Некоторые определения**

[0122] Научные и технические термины, используемые в настоящем описании, если в настоящем описании не определено иное, имеют значения, в которых их обычно понимают специалисты в данной области техники. В случае любой возможной неоднозначности приведенные в настоящем описании определения имеют приоритет над любым словарным или известным из других источников определением. Если иное не следует из контекста, термины в единственном числе включают формы множественного числа, а термины во множественном числе включают формы единственного числа. Использование «или» означает «и/или», если не указано иное. Использование термина «включающий», а также других форм, таких как «включает» и «включенный», не является ограничивающим.

[0123] Используемые в настоящем описании термины «циклическая пермутация» и «циклически пермутированный» относятся к процессу получения линейного белка или родственной ему последовательности нуклеиновой кислоты и слияния нативных N- и C-концов (непосредственно или через линкер методами получения рекомбинантного белка или ДНК) с образованием кольцевой молекулы, и затем разрезания (открытия) кольцевой молекулы в другом месте с образованием нового линейного белка или родственной молекулы нуклеиновой кислоты с концами, отличными от концов в исходной молекуле. Таким образом, циклическая пермутация сохраняет последовательность, структуру и функцию белка, приводит к созданию новых C- и N-концов в других местах, позволяя улучшить ориентацию для слияния с желательным партнером по слиянию полипептида по сравнению с исходной молекулой.

[0124] Используемый в настоящем описании термин «примерно» понятен специалистам в данной области техники и изменяется до некоторой степени в зависимости

от контекста, в котором используется. Используемый в настоящем описании термин «примерно» применительно к измеряемому значению, такому как количество, продолжительность по времени и т.п., означает, что он охватывает отклонения  $\pm 20\%$  или  $\pm 10\%$ , включая  $\pm 5\%$ ,  $\pm 1\%$ , и  $\pm 0,1\%$  от указанного значения, поскольку такие отклонения являются допустимыми при осуществлении раскрытых способов.

### **Способы очистки**

[0125] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способам очистки полипептидов, содержащих циклически пермутированный интерлейкин-2 (IL-2), слитый с внеклеточной частью IL-2R $\alpha$  цепи. Такие полипептиды демонстрируют предпочтительное связывание с комплексом IL-2R со средней аффинностью, включающим IL-2R $\beta$  и общую гамма-цепь, IL-2R $\gamma$ , по сравнению с комплексом IL-2R с высокой аффинностью (включающим IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  и IL-2R $\gamma$ ), и ведут себя как селективные агонисты комплекса IL-2R со средней аффинностью. Конструирование и получение иллюстративных полипептидов этого типа описаны в патенте США № 9359415, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

[0126] Иллюстративный полипептид приведен ниже в SEQ ID NO: 1:

SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL  
TGGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKATELKHLLQCL  
EEELKPLEEVLNLAQSGGGSELCDPPPEIPHATFKAMAYKEGTMNCECKRGFRRIK  
SGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVD  
QASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGK  
TRWTQPQLICTG (SEQ ID NO: 1)

[0127] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность полипептида содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность полипептида состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

[0128] Специалисту в данной области техники будет понятно, что в раскрытых в настоящем описании композициях также можно использовать варианты аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1. Например, в некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность полипептида содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 80% (например, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность полипептида содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

[0129] Специалист в данной области техники также поймет, что аминокислотная последовательность полипептидов, используемых в композициях, раскрытых в настоящем описании, может быть дериватизирована или модифицирована, например пегилирована, амидирована и т.д.

[0130] В некоторых вариантах осуществления способы очистки, раскрытые в настоящем описании, позволяют удалять примеси или уменьшать их количество. В некоторых вариантах осуществления примесь представляет собой белок клетки-хозяина. Термин «белок клетки-хозяина» (НСП), используемый в настоящем описании, означает неполипептидные белковые примеси, полученные из клеток-хозяев, например клеток-хозяев, используемых для получения полипептида. В некоторых вариантах осуществления НСП может представлять собой НСП, полученный из СНО клетки. В некоторых вариантах осуществления содержание НСП в композиции полипептидов, содержащих циклически пермутированный интерлейкин-2 (IL-2), слитый с внеклеточной частью IL-2R $\alpha$  цепи, может быть больше или может быть равным примерно 150 м.д., примерно 200 м.д., примерно 250 м.д., примерно 300 м.д., примерно 350 м.д., примерно 400 м.д., примерно 450 м.д., примерно 500 м.д., примерно 1000 м.д., примерно 1500 м.д., примерно 2000 м.д., примерно 2500 м.д. или примерно 3000 м.д. В качестве альтернативы содержание НСП может быть описано в единицах нг/мл. В некоторых вариантах осуществления «частично очищенный» полипептид представляет собой полипептид, который является частью композиции, содержащей НСП в количестве, большем или равном примерно 150 м.д., и который был уже подвергнут одному или более методам очистки. Частично очищенный полипептид может быть подвергнут дополнительным методам очистки для дальнейшего уменьшения содержания НСП. В некоторых вариантах осуществления содержание НСП уменьшают до количества, меньшего или равного примерно 100 м.д., примерно 75 м.д., примерно 50 м.д. или примерно 25 м.д.

[0131] В некоторых вариантах осуществления примесь представляет собой нуклеиновую кислоту клетки-хозяина. Термин «нуклеиновые кислоты клетки-хозяина», используемый в настоящем описании, относится к нуклеиновым кислотам, полученным из клеток-хозяев, например клеток-хозяев, используемых для получения полипептида, раскрытого в настоящем описании.

[0132] В конкретном варианте осуществления примесь представляет собой вещество, относящееся к продукту. Используемый в настоящем описании термин «относящееся к продукту вещество» относится к варианту полипептида, раскрытому в настоящем описании, который образуется в процессе производства и/или хранения полипептида. Конкретные примеры имеющих отношение к продукту веществ включают вещества, разрушающие полипептид, укороченные формы полипептида, высокомолекулярные соединения, низкомолекулярные соединения, фрагменты полипептида, модифицированные формы полипептида, включая деамидированные формы, изомеризованные формы, формы, связанные неправильно образованными дисульфидными связями, окисленные формы или измененные формы конъюгатов (например, гликозилирование, фосфорилирование), агрегаты, включающие димеры и полипептиды более высокой мерности, и варианты заряда. В конкретном варианте осуществления примесь представляет собой агрегат полипептида. Используемый в настоящем описании термин «агрегат» относится к агломерации или олигомеризации двух или более отдельных

молекул полипептида с образованием, например, димеров, тримеров, тетрамеров, олигомеров и других высокомолекулярных соединений. Агрегаты могут быть растворимыми или нерастворимыми. В конкретном варианте осуществления агрегат представляет собой мультимер раскрытого в настоящем описании полипептида. В конкретном варианте осуществления агрегат представляет собой мультимер полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

[0133] В некоторых вариантах осуществления композиция полипептидов, содержащих циклически пермутированный интерлейкин-2 (IL-2), слитый с внеклеточной частью IL-2R $\alpha$  цепи, может быть очищена до чистоты, превышающей или равной примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или примерно 100%. В некоторых вариантах осуществления чистоту определяют методом ВЭЖХ с обращенной фазой (ОФ).

#### **Ионообменная хроматография (ИEX)**

[0134] В некоторых вариантах осуществления образец, содержащий раскрытый в настоящем описании полипептид, подвергают очистке ионообменной хроматографией (ИEX). Дополнительно или альтернативно промывочные и/или проточные фракции, полученные способами по настоящему изобретению, могут быть подвергнуты ионообменной хроматографии для дополнительной очистки полипептида. В некоторых вариантах осуществления для очистки полипептида выполняют один или более этапов ионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления перед этапом очистки хроматографией гидрофобного взаимодействия (HIC) выполняют один или более этапов ионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления один или более этапов ионообменной хроматографии выполняют после этапа очистки HIC.

[0135] В контексте настоящего описания, ионообменное разделение включает любой метод, с помощью которого выполняют разделение двух веществ на основе различия их соответствующих ионных зарядов либо на полипептиде и/или хроматографическом материале в целом, либо локально на определенных участках полипептида и/или хроматографическом материале, и, следовательно, можно использовать либо катионообменный (СEX), либо анионообменный (АEX) материал.

[0136] Использование катионообменного материала либо анионообменного материала зависит от локальных зарядов полипептида в заданном растворе. Таким образом, в объем настоящего изобретения входит использование этапа анионного обмена или этапа катионного обмена. В объем настоящего изобретения также входит использование только этапа катионного обмена, только этапа анионного обмена или любой последовательной комбинации этих двух этапов до или после выполнения любого другого этапа хроматографии, такого как этап HIC или этап ММС.

[0137] При разделении образец, содержащий полипептид, раскрытый в настоящем описании (например, циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью IL-2R $\alpha$  цепи), можно привести в контакт с ионообменным материалом любым из множества различных методов, например методом периодической очистки или хроматографическим

методом. Кроме того, образец, содержащий полипептид, может быть приведен в контакт с ионообменным материалом в режиме связывания-элюирования, при котором полипептид связывается с ионообменной смолой, при этом примеси могут протекать через смолу или могут связываться со смолой более слабо, чем полипептид. Для удаления или уменьшения количества примесей, слабо связанных с ионообменной смолой, можно выполнить этап промывки. Для удаления полипептида из ионообменной смолы в виде части элюата или пула можно выполнить последующий этап элюирования. Элюат или пул может состоять из нескольких фракций или может быть получен как результат одной большой элюции. В качестве альтернативы образец, содержащий полипептид, может быть приведен в контакт с ионообменным материалом в проточном режиме, при котором полипептид не связывается или связывается слабо с ионообменной смолой, при этом примеси могут связываться со смолой или могут связываться со смолой сильнее, чем полипептид. Этап промывки или элюирования можно не выполнять в проточном режиме.

[0138] Разделение молекул при ионообменной хроматографии происходит за счет различий между локальными зарядами представляющих интерес полипептидов и локальными зарядами хроматографического материала. Насадочная колонка для ионообменной хроматографии или устройство с ионообменной мембраной могут работать в режиме связывания-элюирования, проточном или гибридном режиме. После промывки колонки или мембранного устройства уравнивающим буфером или другим буфером с другим рН и/или проводимостью извлечение продукта достигается за счет увеличения ионной силы (т.е. проводимости) элюирующего буфера, что создает конкуренцию с растворенным веществом за заряженные участки ионообменной матрицы. Изменение рН и, следовательно, изменение заряда растворенного вещества - еще один способ достижения элюции растворенного вещества. Проводимость или рН можно изменять плавно (градиентное элюирование) или ступенчато (ступенчатое элюирование). Затем перед следующим использованием колонку регенерируют.

[0139] В некоторых вариантах осуществления условия градиентного элюирования включают одно или более из следующего: увеличение проводимости элюирующего буфера с течением времени; увеличение концентрации соли элюирующего буфера с течением времени; или уменьшение рН элюирующего буфера с течением времени. В некоторых вариантах осуществления буфер для градиентной элюции имеет начальную проводимость, которая меньше или равна примерно 5 мСм/см. В некоторых вариантах осуществления буфер для градиентной элюции имеет начальную проводимость примерно 5 мСм/см, примерно 4 мСм/см, примерно 3 мСм/см, примерно 2 мСм/см, примерно 1 мСм/см или примерно 0 мСм/см. В некоторых вариантах осуществления буфер для градиентной элюции имеет конечную проводимость, более высокую или равную примерно 15 мСм/см. В некоторых вариантах осуществления буфер для градиентной элюции имеет конечную проводимость, равную примерно 15 мСм/см, примерно 16 мСм/см, примерно 17 мСм/см, примерно 18 мСм/см, примерно 19 мСм/см, примерно 20 мСм/см, примерно 30 мСм/см, примерно 40 мСм/см, примерно 50 мСм/см, примерно 60 мСм/см, примерно 70 мСм/см,

примерно 80 мСм/см, примерно 90 мСм/см или примерно 100 мСм/см. В некоторых вариантах осуществления проводимость элюирующего буфера увеличивают от примерно  $\leq 2$  мСм/см до примерно  $\geq 15$  мСм/см. В некоторых вариантах осуществления проводимость элюирующего буфера увеличивают от примерно  $\leq 2$  мСм/см до примерно  $\geq 20$  мСм/см. В некоторых вариантах осуществления проводимость элюирующего буфера увеличивают до значения от примерно 15 мСм/см до примерно 100 мСм/см. В некоторых вариантах осуществления проводимость элюирующего буфера увеличивают до значения от примерно 20 мСм/см до примерно 50 мСм/см.

[0140] В некоторых вариантах осуществления буфер для градиентной элюции содержит соль в начальной концентрации, равной примерно 0 М, примерно 0,01 М, примерно 0,02 М, примерно 0,03 М, примерно 0,04 М или примерно 0,05 М. В некоторых вариантах осуществления конечная концентрация соли в буфере для градиентной элюции составляет примерно 0,15 М, примерно 0,20 М, примерно 0,25 М, примерно 0,30 М, примерно 0,35 М, примерно 0,40 М, примерно 0,45 М или примерно 0,50 М. В некоторых вариантах осуществления концентрацию соли в элюирующем буфере увеличивают от примерно 0 М соли до примерно 1,0 М. В некоторых вариантах осуществления концентрацию соли в элюирующем буфере увеличивают от примерно 0 М до примерно 0,5 М.

[0141] В некоторых вариантах осуществления соль включает хлорид натрия, хлорид калия, хлорид магния или хлорид кальция. В некоторых вариантах осуществления соль включает хлорид натрия.

[0142] В некоторых вариантах осуществления элюирующий буфер дополнительно имеет рН от примерно 7,0 до примерно 9,0. В некоторых вариантах осуществления элюирующий буфер дополнительно имеет рН, равный примерно 8,0.

[0143] К матрицам могут быть присоединены анионные или катионные заместители с образованием анионных или катионных подложек для хроматографии. Неограничивающие примеры анионообменных заместителей включают диэтиламиноэтильные (DEAE) группы, группы четвертичного аминоэтила (QAE) и четвертичного амина (Q). Катионные заместители включают карбоксиметил (CM), сульфозетил (SE), сульфопропил (SP), фосфат (P) и сульфонат (S). Целлюлозные ионообменные среды, такие как DE23, DE32, DE52, CM-23, CM-32 и CM-52, доступны от Whatman Ltd. Maidstone, Kent, U.K. Также известны ионообменники на основе SEPHADEX и с перекрестной связью. Например, DEAE-, QAE-, CM- и SP-SEPHADEX, а также DEAE-, Q-, CM- и S-SEPHAROSE, и SEPHAROSE, Fast Flow и Capto S доступны от GE Healthcare. Кроме того, этиленгликоль-метакрилатный сополимер, дериватизированный DEAE и CM, такой как TOYOPEARL, DEAE-650S или M и TOYOPEARL CM-650S или M, доступен от Toso Haas Co., Philadelphia, Pa., или Nuvia S и UNOSpher S можно приобрести у BioRad, Hercules, Калифорния, Eshmuno S можно приобрести у EMD Millipore, Billerica, Калифорния. Кроме того, TOYOPEARL GigaCap Q-650M можно приобрести у Tosoh Biosciences.

### **Рефолдинг при высоком рН**

[0144] В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящем описании, включают этап выдерживания при повышенном рН, например, после первоначального этапа очистки ИЕХ (например, АЕХ или СЕХ) и перед дополнительным этапом очистки (например, этапом очистки НИС). Не ограничиваясь какой-либо теорией, предполагается, что в некоторых вариантах осуществления этот этап выдерживания при повышенном рН способствует рефолдингу полипептида и снижает уровень примеси веществ, связанных с продуктом. В некоторых вариантах осуществления этап выдерживания при повышенном рН выполняют путем доведения рН образца, содержащего полипептид, до примерно 10,0-12,0. В некоторых вариантах осуществления рН доводят до примерно 10,0, примерно 10,1, примерно 10,2, примерно 10,3, примерно 10,4, примерно 10,5, примерно 10,6, примерно 10,7, примерно 10,8, примерно 10,9, примерно 11,0, примерно 11,1, примерно 11,2, примерно 11,3, примерно 11,4, примерно 11,5, примерно 11,6, примерно 11,7, примерно 11,8, примерно 11,9 или примерно 12,0. В некоторых вариантах осуществления рН доводят до  $\geq 10,7$ . В некоторых вариантах осуществления рН доводят до примерно 10,8.

[0145] В некоторых вариантах осуществления рН регулируют путем добавления основания или щелочного буфера, например карбоната натрия и/или гидроксида натрия. Специалист в данной области легко определит подходящий способ регулирования рН.

[0146] В некоторых вариантах осуществления образец, содержащий полипептид, раскрытый в настоящем описании, выдерживают при повышенном рН (например, рН примерно 10,8) в течение инкубационного периода. Инкубационный период может составлять, например, от примерно 30 минут до примерно 3 часов. Инкубационный период может составлять примерно 30 минут, 45 минут, 60 минут, 75 минут, 90 минут, 105 минут, 120 минут, 135 минут, 150 минут, 165 минут или 180 минут. В определенном варианте осуществления время инкубации может составлять примерно 60 минут или может быть равным по меньшей мере 60 минутам. В некоторых вариантах осуществления образец, содержащий раскрытый в настоящем описании полипептид, выдерживают при повышенном рН (например, рН, составляющем примерно 10,8) в течение инкубационного периода при перемешивании образца.

[0147] После инкубации образца при повышенном рН в течение соответствующего периода значение рН образца можно понизить путем добавления кислоты, включая, без ограничения, лимонную кислоту. В некоторых вариантах осуществления рН образца снижают до рН в диапазоне от примерно 8,0 до примерно 9,0. В некоторых вариантах осуществления рН образца снижают до примерно 8,0, примерно 8,1, примерно 8,2, примерно 8,3, примерно 8,4, примерно 8,5, примерно 8,6, примерно 8,7, примерно 8,8, примерно 8,9 или примерно 9,0. В некоторых вариантах осуществления рН образца снижают до примерно 8,5. Специалист в данной области легко определит подходящий способ регулирования рН, позволяющий уменьшить его значение.

### **Хроматография гидрофобного взаимодействия (НИС)**

[0148] В некоторых вариантах осуществления образец, содержащий полипептид, раскрытый в настоящем описании, подвергают хроматографии гидрофобного взаимодействия (НИС) для очистки полипептида. Дополнительно или альтернативно промывочные и/или проточные фракции, полученные способами по настоящему изобретению, могут быть подвергнуты НИС для дальнейшей очистки полипептида. В некоторых вариантах осуществления для очистки полипептида выполняют один или более этапов НИС. В некоторых вариантах осуществления перед этапом очистки НИС выполняют один или более этапов ионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления один или более этапов ионообменной хроматографии выполняют после этапа очистки НИС.

[0149] Очистка НИС полипептида включает обратимое связывание полипептида и связывание одной или более примесей посредством гидрофобного взаимодействия с гидрофобными фрагментами, прикрепленными к твердой матричной подложке (например, агарозе). Гидрофобное взаимодействие между молекулами является результатом тенденции полярной среды вытеснять неполярные (т.е. гидрофобные) молекулы. НИС основана на этом принципе гидрофобности молекул (т.е. склонности заданного белка к адсорбционному связыванию с гидрофобными участками на гидрофобном адсорбирующем теле), используемом для разделения биомолекул на основе их относительной силы взаимодействия с гидрофобными фрагментами (см., например, патент США 4,000,098 и патент США 3,917,527). Преимуществом этого метода разделения являются отсутствие денатурации и стабилизирующие эффекты растворов солей, используемых во время загрузки, промывки и/или элюирования.

[0150] В хроматографии гидрофобного взаимодействия используются гидрофобные свойства молекул (например, белков, полипептидов, липидов) для разделения даже близкородственных молекул. Гидрофобные группы на молекулах взаимодействуют с гидрофобными группами на носителе или мембране. В некоторых вариантах осуществления чем более гидрофобной является молекула, тем сильнее она будет взаимодействовать с колонкой или мембраной. Таким образом, этапы НИС, такие как раскрытые в настоящем описании, можно использовать для удаления различных примесей, например примесей, связанных с процессом (например, ДНК), а также примесей, связанных с продуктом (например, высоко и низкомолекулярных веществ, связанных с продуктом, таких как белковые агрегаты и фрагменты).

[0151] В некоторых вариантах осуществления адсорбирующий материал в НИС состоит из хроматографической основной цепи с боковыми лигандами, обеспечивающими гидрофобное взаимодействие. Например, среда НИС может состоять, без ограничения, из конвективных мембранных сред с боковыми лигандами, обеспечивающими гидрофобное взаимодействие, конвективных монолитных сред с боковыми лигандами, обеспечивающими гидрофобное взаимодействие, и/или конвективных фильтровальных сред со встроенными средами, содержащими боковые лиганды, обеспечивающие гидрофобное взаимодействие.

[0152] В некоторых вариантах осуществления адсорбирующий материал для НИС может содержать основную матрицу (например, производные целлюлозы, полистирол, синтетические полиаминокислоты, синтетические полиакриламидные гели, сшитый декстран, сшитую агарозу, синтетический сополимерный материал или даже стеклянную поверхность), к которой присоединены или ковалентно присоединены гидрофобные лиганды (например, алкил, арил и их комбинации) посредством бифункциональных связывающих групп, таких как -NH-, -S-, -COO- и т.д. Гидрофобный лиганд может заканчиваться водородом, но также может заканчиваться функциональной группой, такой как, например, NH<sub>2</sub>, SO<sub>3</sub>H, PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>, SH, имидазолы, фенольные группы или неионогенные радикалы, такие как OH и CONH<sub>2</sub>. В некоторых вариантах осуществления среда НИС содержит по меньшей мере один гидрофобный лиганд. В другом варианте осуществления гидрофобный лиганд выбирают из группы, состоящей из бутильных, гексильных, фенильных, октильных или полипропиленгликольных лигандов.

[0153] Одним из не ограничивающих примеров подходящей среды НИС является агарозная среда или мембрана, функционализированная фенильными группами (например, Phenyl Sepharose от GE Healthcare или Phenyl Membrane от Sartorius). Многие среды НИС являются коммерчески доступными. Примеры включают, без ограничения, Tosoh Hexyl, CaptoPhenyl, Phenyl Sepharose 6 Fast Flow с низкой или высокой степенью замещения, Phenyl Sepharose High Performance, Octyl Sepharose High Performance (GE Healthcare); Fractogel EMD Propyl или Fractogel EMD Phenyl (E. Merck, Германия); колонки Macro-Prep Methyl или Macro-Prep t-Butyl (Bio-Rad, Калифорния); WP HI-Propyl (C3) (J.T. Baker, Нью-Джерси); эфир Toyopearl, фенил или бутил (TosoHaas, PA); ToyoScreen PPG, Toyopearl PPG-600M, ToyoScreen Phenyl, ToyoScreen Butyl и ToyoScreen Hexyl представляют собой гранулы жесткого метакрилового полимера. GE HiScreen Butyl FF и HiScreen Octyl FF представляют собой гранулы на основе агарозы с высокой текучестью.

#### **Хроматография в смешанном режиме (ММС)**

[0154] В некоторых вариантах осуществления образец, содержащий раскрытый в настоящем описании полипептид, подвергают хроматографии в смешанном режиме (ММС) для очистки полипептида. Дополнительно или альтернативно промывочные и/или проточные фракции, полученные способами по настоящему изобретению, могут быть подвергнуты хроматографии в смешанном режиме для дополнительной очистки полипептида. В некоторых вариантах осуществления после этапа очистки НИС можно использовать один или более этапов хроматографии в смешанном режиме. В некоторых вариантах осуществления перед этапом очистки НИС можно использовать один или более этапов хроматографии в смешанном режиме. В некоторых вариантах осуществления после этапа ионообменной очистки можно использовать один или более этапов хроматографии в смешанном режиме. В некоторых вариантах осуществления перед этапом ионообменной очистки можно использовать один или более этапов хроматографии в смешанном режиме.

[0155] Хроматография в смешанном режиме представляет собой хроматографию, в которой используется среда для смешанного режима, включая, без ограничения,

CaptoAdhere или Capto MMC ImpRes, доступные от GE Healthcare. Такая среда содержит лиганд для хроматографии в смешанном режиме. В некоторых вариантах осуществления такой лиганд относится к лиганду, который способен обеспечивать по меньшей мере два разных, но совместно действующих сайта, которые взаимодействуют со связываемым веществом. Один из этих сайтов обеспечивает привлекательный тип взаимодействия заряд-заряд между лигандом и полипептидом. Другой сайт обычно обеспечивает электронное донорно-акцепторное взаимодействие и/или гидрофобное и/или гидрофильное взаимодействие. Электронное донорно-акцепторное взаимодействие включает такие взаимодействия, как водородные связи,  $\pi$ - $\pi$  связи, катион- $\pi$  связи, перенос заряда, диполь-дипольные связи, индуцированный диполь и т.д. Функциональность смешанного режима позволяет получить другую селективность по сравнению с традиционными анионообменниками. Лиганды в хроматографии в смешанном режиме также известны как «мультимодалные» лиганды для хроматографии. Capto Adhere представляет собой жесткую агарозную матрицу с высокой текучестью, функционализированную N-бензил-N-метилэтанолламинным лигандом. Capto MMC представляет собой жесткую агарозную матрицу с высокой текучестью, функционализированную бензоил гомоцистеиновым лигандом.

[0156] В некоторых вариантах осуществления хроматографическая среда для смешанного режима состоит из лигандов смешанного типа, связанных непосредственно или через спейсер с органической или неорганической подложкой, иногда называемой основной матрицей. В некоторых вариантах осуществления лиганд смешанного типа может представлять собой мультимодалный слабый катионообменник. Подложка может быть в форме частиц, таких как практически сферические частицы, монолит, фильтр, мембрана, поверхность, капилляры и т.д. В некоторых вариантах подложку готовят из нативного полимера, такого как сшитый углеводный материал, такой как агароза, агар, целлюлоза, декстран, хитозан, конжак (konjac), каррагинан, геллан, альгинат и т.д. Для получения высокой адсорбционной способности носитель может быть пористым, к внешней поверхности которого, а также к поверхностям пор которого впоследствии присоединяют лиганды. Такие нативные полимерные носители могут быть получены стандартными способами, такими как обратное гелеобразование в суспензии (S. Hjerten: *Biochim Biophys Acta* 79(2), 393-398 (1964)). Альтернативно, носитель можно приготовить из синтетического полимера, такого как сшитые синтетические полимеры, например, стирола или производных стирола, дивинилбензола, акриламидов, сложных эфиров акрилата, сложных эфиров метакрилата, сложных виниловых эфиров, виниламидов и т.д. Такие синтетические полимеры могут быть получены стандартными методами, см., например, «Styrene based polymer support developed by suspension polymerization» (R Arshady: *Chimica e L'Industria* 70(9), 70-75 (1988)). Пористые природные или синтетические полимерные носители также доступны из коммерческих источников, таких как Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden.

### **Вирусная фильтрация**

[0157] В некоторых вариантах осуществления образец, содержащий раскрытый в

настоящем описании полипептиды, подвергают вирусной фильтрации для дальнейшей очистки полипептида. Дополнительно или альтернативно промывочные и/или проточные фракции, полученные способами по настоящему изобретению, могут быть подвергнуты вирусной фильтрации для дополнительной очистки полипептида.

[0158] Вирусная фильтрация является специальным этапом уменьшения количества вирусов в процессе очистки в целом. В некоторых вариантах осуществления этот этап выполняют как этап дополнительной очистки после хроматографии. Уменьшение количества вирусов может быть достигнуто за счет использования подходящих фильтров, включая, без ограничения, фильтры Planova 20N, 50 N или BioEx от Asahi Kasei Pharma, фильтры Viresolve от EMD Millipore, фильтры ViroSart CPV от Sartorius или фильтры Ultipor DV20 или DV50 от Pall Corporation. Специалисту в данной области будет очевидно, как выбрать подходящий фильтр для получения требуемой эффективности фильтрации.

#### **Ультрафильтрация/диафильтрация**

[0159] В некоторых вариантах осуществления способы очистки полипептида, раскрытые в настоящем описании, могут включать один или более этапов ультрафильтрации (UF) и/или диафильтрации (DF) для увеличения концентрации полипептида и замены буфера полипептида. В некоторых вариантах осуществления на этапе ультрафильтрации концентрация полипептида может быть увеличена в разы, от примерно 2X до примерно 100X. В некоторых вариантах осуществления этап ультрафильтрации позволяет увеличить концентрацию полипептида примерно в 2 раза, примерно в 5 раз, примерно в 10 раз, примерно в 20 раз, примерно в 30 раз, примерно в 40 раз, примерно в 50 раз, примерно в 60 раз, примерно в 70 раз, примерно в 80 раз, примерно в 90 раз или примерно 100 раз. В некоторых вариантах осуществления этап ультрафильтрации позволяет увеличить концентрацию полипептида примерно в 10 раз.

[0160] Ультрафильтрация подробно описана, например, в «Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications», L. Zeman and A. Zydney (Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1996); и в Ultrafiltration Handbook, Munir Cheryan (Technomic Publishing, 1986; ISBN No. 87762-456-9). Одним из способов фильтрации является фильтрация в тангенциальном потоке, например, описанная в каталоге Millipore, озаглавленном «Pharmaceutical Process Filtration Catalogue» pp.177-202 (Bedford, Mass., 1995/96). Ультрафильтры включают, без ограничения, ультрафильтры Sartorius Hydrosart. В некоторых вариантах осуществления ультрафильтрация включает фильтрацию через фильтры с размером пор менее 0,1 мкм. При использовании фильтров с таким малым размером пор объем образца может быть уменьшен за счет прохождения буфера для образца через фильтр, в то время как представляющие интерес полипептиды остаются за фильтром. Ультрафильтры могут быть определены значениями отсечки молекулярной массы (MWCO), такими как MWCO 2 кДа, 5 кДа, 10 кДа, 30 кДа или 100 кДа. В некоторых вариантах осуществления ультрафильтры могут иметь MWCO 10 кДа.

[0161] Диафильтрация является методом, в котором ультрафильтры используются для удаления и замены солей, сахаров и неводных растворителей, для отделения свободных

частиц от связанных, для удаления низкомолекулярного материала и/или для быстрого изменения ионных сред и/или pH среды. Удаление микрорастворов наиболее эффективно происходит при добавлении растворителя к подвергнутому ультрафильтрации раствору со скоростью, примерно равной скорости ультрафильтрации. Это позволяет вымывать микроорганизмы из раствора при постоянном объеме, эффективно очищая оставшиеся представляющие интерес полипептиды. В некоторых вариантах осуществления раскрытых в настоящем описании способов этап диафильтрации используется для замены различных используемых буферов, необязательно перед дополнительным этапом хроматографии или другими этапами очистки, а также для удаления примесей из полипептидных препаратов.

#### **Дополнительные методы очистки**

[0162] В некоторых вариантах осуществления для получения препаратов полипептида с пониженным уровнем примесей может быть использована комбинация методов ионообменной хроматографии, хроматографии в смешанном режиме и хроматографии гидрофобного взаимодействия, включая определенные варианты осуществления, в которых один метод используется вместе/дополнительно с другим методом. В некоторых вариантах осуществления такие комбинации включают использование дополнительных промежуточных этапов хроматографии, фильтрации, регулирования pH, UF/DF (ультрафильтрации/диафильтрации) для достижения желаемого качества продукта, концентрации ионов и/или уменьшения количества вирусов.

[0163] В некоторых вариантах осуществления полипептид, раскрытый в настоящем описании, может быть очищен из культуры клеток-хозяев с помощью конкретного метода или схемы очистки. В некоторых вариантах осуществления полипептид (например, циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью IL-2R $\alpha$  цепи) может быть очищен с помощью следующих последовательных этапов хроматографии: 1) первый этап анионообменной хроматографии (АЕХ), 2) этап хроматографии гидрофобного взаимодействия (НС), 3) этап хроматографии в смешанном режиме (ММС) и 4) второй этап АЕХ. Один или более этапов фильтрации можно применить в любой момент в описанных выше этапах хроматографии. В некоторых вариантах осуществления полипептид может быть очищен с помощью следующих последовательных этапов очистки: 1) первый этап ультрафильтрации/диафильтрации, 2) первый этап анионообменной хроматографии (АЕХ), 3) этап инкубации при высоком pH (например, инкубации при pH примерно 10,8 в течение не менее 60 минут), 4) этап вирусной инактивации, 5) этап хроматографии гидрофобного взаимодействия (НС), 6) второй этап ультрафильтрации/диафильтрации, 7) этап хроматографии в смешанном режиме (ММС), 8) третий этап ультрафильтрации/диафильтрации, 9) второй этап АЕХ, 10) этап вирусной фильтрации и 11) четвертый этап ультрафильтрации/диафильтрации.

#### **Полипептидные композиции со специфическими гликановыми профилями и способы улучшения периода полувыведения из сыворотки**

[0164] В некоторых вариантах осуществления способы очистки, раскрытые в настоящем описании, могут быть использованы для улучшения периода полувыведения

полипептидной композиции из сыворотки. Очищенная композиция содержит множество полипептидов, причем каждый полипептид из множества содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, связанную с одним или более видами гликанов, где один или более видов гликанов связаны с полипептидом в одном или более аминокислотных положениях из N187, N206 и T212 SEQ ID NO: 1. Количество и тип гликанов в полипептидах композиции могут влиять на время полувыведения композиции из сыворотки после введения пациенту. Гликановый профиль композиции представляет собой процент каждого вида гликана в аминокислотных положениях N187, N206 и T212 SEQ ID NO: 1 во всех полипептидах, взятых вместе. Изменения гликанового профиля композиции могут увеличивать или уменьшать период полувыведения композиции из сыворотки.

[0165] В некоторых вариантах осуществления виды гликанов в аминокислотном положении N187 SEQ ID NO: 1 выбирают из группы, состоящей из:

- Hex5HexNAc4FucNeuAc2;
- Hex6HexNAc5FucNeuAc2;
- Hex5HexNAc4FucNeuAc;
- Hex6HexNAc5FucNeuAc3;
- Hex4HexNAc4FucNeuAc;
- Hex5HexNAc5NeuAc2;
- Hex5HexNAc4Fuc;
- Hex3HexNAc4Fuc;
- Hex4HexNAc4Fuc;
- Hex6HexNAc5Fuc; и
- Hex5HexNAc5Fuc;

где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминную кислоту, Fuc представляет собой фукозу, и число представляет собой номер каждой гликановой структуры.

[0166] В некоторых вариантах осуществления виды гликанов в аминокислотном положении N206 SEQ ID NO: 1 выбирают из группы, состоящей из:

- Hex6HexNAc5FucNeuAc3;
- Hex5HexNAc4FucNeuAc2;
- Hex6HexNAc5FucNeuAc2;
- Hex7HexNAc6FucNeuAc3;
- Hex6HexNAc5FucNeuAc;
- Hex5HexNAc4FucNeuAc;
- Hex5HexNAc4Fuc; и
- Hex4HexNAc4Fuc;

где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминную кислоту, Fuc представляет собой фукозу, и число представляет собой номер каждой гликановой

структуры.

[0167] В некоторых вариантах осуществления виды гликанов в аминокислотном положении T212 SEQ ID NO: 1 выбирают из группы, состоящей из:

- HexHexNAc;
- HexHexNAcNeuAc; и
- HexHexNAcNeuAc2;

где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминую кислоту, и число представляет собой номер каждой гликановой структуры.

[0168] В некоторых вариантах осуществления общий процент гликанов в аминокислотном положении N187 SEQ ID NO: 1 множества полипептидов в композиции составляет:

- от примерно 60% до примерно 70% Hex5HexNAc4FucNeuAc2, например примерно 60%, примерно 61%; примерно 62%, примерно 63%, примерно 64%, примерно 65%, примерно 66%, примерно 67%, примерно 68%, примерно 69% или примерно 70%;
- от примерно 4% до примерно 6% Hex6HexNAc5FucNeuAc2, например примерно 4%, примерно 5% или примерно 6%;
- от примерно 7% до примерно 10% Hex5HexNAc4FucNeuAc, например примерно 7%, примерно 8%, примерно 9% или примерно 10%;
- от примерно 15% до примерно 17% Hex6HexNAc5FucNeuAc3, например примерно 15%, примерно 16% или примерно 17%; и
- от примерно 3% до примерно 4% Hex5HexNAc5NeuAc2.

[0169] В некоторых вариантах осуществления общий процент гликанов в аминокислотном положении N187 SEQ ID NO: 1 множества полипептидов в композиции составляет:

- от примерно 60% до примерно 70% Hex5HexNAc4FucNeuAc2;
- от примерно 4% до примерно 6% Hex6HexNAc5FucNeuAc2;
- от примерно 7% до примерно 10% Hex5HexNAc4FucNeuAc;
- от примерно 15% до примерно 17% Hex6HexNAc5FucNeuAc3;
- от примерно 0,5% до примерно 1,5% Hex4HexNAc4FucNeuAc;
- от примерно 3% до примерно 4% Hex5HexNAc5NeuAc2;
- от примерно 0% до примерно 0,5% Hex5HexNAc4Fuc;
- от примерно 0% до примерно 0,5% Hex3HexNAc4Fuc;
- от примерно 0% до примерно 0,5% Hex4HexNAc4Fuc;
- от примерно 0% до примерно 0,5% Hex6HexNAc5Fuc; и
- от примерно 0% до примерно 0,5% Hex5HexNAc5Fuc.

[0170] В некоторых вариантах осуществления общий процент гликанов в аминокислотном положении N206 SEQ ID NO: 1 множества полипептидов в композиции составляет:

- от примерно 3% до примерно 5% Hex6HexNAc5FucNeuAc3, например примерно

3%, примерно 4% или примерно 5%;

- от примерно 75% до примерно 85% Hex5HexNAc4FucNeuAc2, например примерно 75%, примерно 76%; примерно 77%, примерно 78%, примерно 79%, примерно 80%, примерно 81%, примерно 82%, примерно 83%, примерно 84% или примерно 85%;

- от примерно 2% до примерно 4% Hex6HexNAc5FucNeuAc2, например примерно 2%, примерно 3% или примерно 4%;

- от примерно 5% до примерно 12% Hex5HexNAc4FucNeuAc, например примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9%, примерно 10%, примерно 11% или примерно 12%; и

- от примерно 1% до примерно 3% Hex5HexNAc4Fuc, например примерно 1%, примерно 2% или примерно 3%.

[0171] В некоторых вариантах осуществления общий процент гликанов в аминокислотном положении N206 SEQ ID NO: 1 множества полипептидов в композиции составляет:

- от примерно 3% до примерно 5% Hex6HexNAc5FucNeuAc3;

- от примерно 75% до примерно 85% Hex5HexNAc4FucNeuAc2;

- от примерно 2% до примерно 4% Hex6HexNAc5FucNeuAc2;

- от примерно 0,5% до примерно 1,5% Hex7HexNAc6FucNeuAc3;

- от примерно 0% до примерно 1% Hex6HexNAc5FucNeuAc;

- от примерно 5% до примерно 12% Hex5HexNAc4FucNeuAc;

- от примерно 1% до примерно 3% Hex5HexNAc4Fuc; и

- от примерно 0,5% до примерно 2% Hex4HexNAc4Fuc.

[0172] В некоторых вариантах осуществления общий процент гликанов в аминокислотном положении T212 SEQ ID NO: 1 множества полипептидов в композиции составляет:

- от примерно 14% до примерно 18% HexHexNAcNeuAc, например примерно 14%, примерно 15%, примерно 16%, примерно 17% или примерно 18%; и

- от примерно 8% до примерно 13% HexHexNAcNeuAc2, например примерно 8%, примерно 9%, примерно 10%, примерно 11%, примерно 12% или примерно 13%.

[0173] В некоторых вариантах осуществления общий процент гликанов в аминокислотном положении T212 SEQ ID NO: 1 множества полипептидов в композиции составляет:

- от примерно 0% до примерно 1% HexHexNAc;

- от примерно 14% до примерно 18% HexHexNAcNeuAc; и

- от примерно 8% до примерно 13% HexHexNAcNeuAc2.

[0174] В некоторых вариантах осуществления общий процент негликозилированной аминокислоты в аминокислотном положении N206 SEQ ID NO: 1 множества полипептидов в композиции составляет от примерно 65% до примерно 80%.

[0175] В некоторых вариантах осуществления способы очистки, раскрытые в настоящем описании, могут быть использованы для получения композиции, содержащей

множество полипептидов, каждый из которых содержит циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью IL-2R $\alpha$  цепи, где композиция содержит специфический профиль капиллярной изоэлектрической фокусировки (сIEF), например, сIEF профиль, показанный на фиг. 15. сIEF профиль представляет собой сигнатуру неоднородности зарядов композиции множества полипептидов.

[0176] В некоторых вариантах осуществления пик сIEF профиля композиции находится при одном или более из примерно pI 5,73, примерно pI 5,93, примерно pI 6,09, примерно pI 6,28, примерно pI 6,38, примерно pI 6,48, примерно pI 6,53, примерно pI 6,66, примерно pI 6,82 и примерно pI 7,02.

[0177] В некоторых вариантах осуществления процент площади пика композиции составляет:

- от примерно 8% до примерно 12% при pI 5,93;
- от примерно 18% до примерно 26% при pI 6,09;
- от примерно 22% до примерно 26% при pI 6,38; и
- от примерно 18% до примерно 28% при pI 6,66.

[0178] В некоторых вариантах осуществления процент площади пика композиции составляет:

- от примерно 1,5% до примерно 2,5% при pI 5,73;
- от примерно 8% до примерно 12% при pI 5,93;
- от примерно 18% до примерно 26% при pI 6,09;
- от примерно 3,5% до примерно 4,5% при pI 6,28;
- от примерно 22% до примерно 26% при pI 6,38;
- от примерно 3% до примерно 5% при pI 6,48;
- от примерно 4% до примерно 6% при pI 6,53;
- от примерно 18% до примерно 28% при pI 6,66;
- от примерно 2% до примерно 6% при pI 6,82; а также
- от примерно 0% до примерно 3% при pI 7,02.

[0179] В некоторых вариантах осуществления пик при примерно pI 5,73 включает комбинацию пиков при примерно pI 5,70 и при примерно pI 5,76. В некоторых вариантах осуществления пик при примерно pI 5,93 включает комбинацию пиков при примерно pI 5,89 и при примерно pI 5,97.

[0180] Специалистам в данной области будет очевидно, что другие подходящие модификации и адаптации способов, раскрытых в настоящем описании, могут быть выполнены с использованием подходящих эквивалентов, не выходя за рамки раскрытых в настоящем описании вариантов осуществления. Теперь, после подробного описания некоторых вариантов осуществления, они станут более понятными со ссылкой на приведенные ниже примеры, которые включены исключительно с целью иллюстрации и не предназначены для ограничения.

## **ПРИМЕРЫ**

[0181] Изобретение дополнительно проиллюстрировано приведенными ниже

примерами, которые не следует рассматривать как дополнительные ограничения. При практическом применении настоящего изобретения можно использовать, если не указано иное, обычные методы органического синтеза, клеточной биологии, культуры клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии и иммунологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области.

#### **Пример 1 - Предварительное получение полипептида А**

[0182] Полипептид А получали из клона одной клетки клеточной линии СНОК1SV, трансфицированной для экспрессии полипептида А. Предварительный процесс получения посевного материала для получения полипептида А включал этапы, начиная от хранения банка клеток в криогенных условиях (примерно  $1 \times 10^7$  жизнеспособных клеток) до получения минимальной критической массы, составляющей примерно  $5 \times 10^{10}$  жизнеспособных клеток с  $>95\%$  жизнеспособностью, для инокуляции 200 л биореактора из расчета примерно  $3 \times 10^5$  жизнеспособных клеток/мл (минимальная плотность посева) в среду для продуцирования, составляющую 70% рабочего объема (140 л). Для достижения этой конечной критической массы клетки размножали в стерильных встряхиваемых колбах и мешках для шейкера постепенно увеличивающегося размера с интервалами в 3-4 дня. Масштабирование и продуцирование полипептида А осуществляли в течение примерно 10-14 дней перед сбором и очисткой клеточной культуры. SDS-PAGE осуществляли на 8, 10, 12, 13 и 14 день для определения относительной чистоты и количества полипептида А (фиг. 2).

#### **Пример 2. Последующее получение/очистка полипептида А**

##### Сбор и осветление (очистка)

[0183] Сбор клеточных культур и очистку выполняли с помощью фильтров EMD ROD для глубинной фильтрации с последующим окончательным осветлением через 10-дюймовый картриджный фильтр Dugarone с размером пор 0,2 мкм.

##### Ультрафильтрация (UF)/диафильтрация (DF) I

[0184] Для увеличения концентрации продукта и для замены буфера, соответственно, использовали этапы обработки UF и DF. Во время производства, чтобы предотвратить любой потенциальный перенос между отдельными операциями UF/DF, все UF/DF картриджи использовали только один раз. В зависимости от размера полипептида А (~40 кД) на всех трех этапах UF/DF использовали мембранную кассету Sartorius Hydrosart с отсечением по молекулярной массе 10 кДа (MWCO). Первые два этапа UF/DF использовали в основном для увеличения концентрации разбавленного раствора продукта и замены буфера, что делало их пригодными для дальнейшей обработки с помощью этапов колоночной хроматографии, в то время как последний этап UF/DF использовали для включения очищенного белка в состав и буфер и доведения его концентрации до конечной перед получение лекарственного препарата.

[0185] Первый этап ультрафильтрации использовали для увеличения концентрации продукта примерно в 10 раз или более. Кассеты промывали WFI и PBS для удаления раствора для хранения. Осветленный собранный материал подавали со скоростью потока

600-700 л/ч; давление на входе поддерживали в пределах  $10 \times 10^4$ - $20 \times 10^4$  Па (15-29 фунтов на квадратный дюйм), давление ретентата - в пределах  $7 \times 10^4$ - $10 \times 10^4$  Па (10-14 фунтов на квадратный дюйм), и трансмембранное давление (TMP) - в пределах  $9 \times 10^4$ - $15 \times 10^4$  Па (12,5-21,5 фунтов на квадратный дюйм). После увеличения концентрации технологический поток подвергали диафильтрации в 20 мМ Tris буфере, pH  $8,5 \pm 0,5$  с проводимостью 1-2 мСм для 5 DV. Конечный раствор извлеченного продукта тестировали с помощью ЭВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ на чистоту и концентрацию, соответственно. Общий выход на этом этапе обычно составлял >90%, и раствор продукта хранили при температуре от 2 до 8°C до дальнейшей обработки.

#### Анионообменная хроматография (АЕХ) I

[0186] После этапа UF/DF I использовали первый этап АЕХ (АЕХ I) для захвата полипептида А из осветленного сбора. Смолу GigaBar Q 650 M (Tosoh Biosciences) использовали с 20-сантиметровым насадочным слоем и динамической связывающей емкостью (DBC) 30 г/л смолы. Сначала колонку АЕХ уравнивали, пропуская всего 4 объема колонки АЕХ I буфера В (АЕХ В) и АЕХ I буфера А (АЕХ А), которые чередовали, со скоростью потока 300 см<sup>3</sup>/ч.

[0187] Продукт этапа UF/DF I загружали в колонку АЕХ I со скоростью потока 300 см<sup>3</sup>/ч. После этапа загрузки колонку промывали 5 объемами, соответствующими одной колонке, буфера АЕХ I С (АЕХ С) со скоростью потока 300 см<sup>3</sup>/ч.

[0188] Затем полипептид А элюировали из колонки АЕХ I буфером АЕХ I D (АЕХ D), используя 10 объемов колонки, со скоростью потока 300 см<sup>3</sup>/ч. Элюаты собирали с отсечкой пика элюции 300 mAU. В таблице 1 ниже перечислены используемые буферы АЕХ I. В приведенной ниже таблице 2 показано сравнение загрузки АЕХ I образцом объединенной элюции АЕХ I. Показаны количество полипептида А, выход на этапе и количество белка клетки-хозяина CHO (НСР).

Таблица 1 - Буферы АЕХ I

Название буфера	Состав буфера	pH	Проводимость (мС/см)	Функция
АЕХ А	20 мМ Tris-HCl	8,5 +/- 0,1	1-2	Колонка EQ, загрузка
АЕХ В	20 мМ Tris-HCl+1 М NaCl	8,5 +/- 0,1	80-92	Колонка EQ, отгонка
АЕХ С	20 мМ Tris-HCl	7,5 +/- 0,1	1-2	Колонка промывка
АЕХ D	20 мМ Tris-HCl+0,2 М NaCl	8,5 +/- 0,1	~20 (18-24)	Колонка Элюция

Таблица 2 - Результаты этапа очистки АЕХ I

Описание	Титр	Объем	Полипептид	Этап сбора	CHO НСР
----------	------	-------	------------	------------	---------

	(мг/мл)	(л)	А (г)	(%)	нг/мл	м.д.
АЕХ I, загрузка	11,36	15,6	177	N/A	789380	69488
АЕХ I, пул	15,88	9,9	157	89%	319040	20091

[0189] Стабильность и активность полипептида А определяли после этапа АЕХ I после хранения при 5 и 25°C в течение 1, 7 и 10 дней. Как показали данные SDS-PAGE и ЭВЭЖХ, стабильность полипептида А сохраняется в дни 1, 7 и 10 при 5°C и в день 1 при 25°C, хотя в дни 7 и 10 наблюдается некоторая деградация (фиг. 3А и фиг. 3В). Активность полипептида А измеряли с помощью клеточного анализа. Индикаторная клеточная линия, клетки НН (АТСС: CRL-2105), представляет собой человеческий Т-лимфоцит, в котором отсутствует субъединица IL-2R $\alpha$  рецептора IL-2. Полипептид А сконструирован для более специфического связывания с рецептором с более низким сродством IL-2R $\beta/\gamma$ , что приводит к стимуляции и фосфорилированию pSTAT5. Затем с помощью сэндвич-ELISA измеряют уровень активации pSTAT5 в ответ на полипептид А в клеточной линии НН. Результаты анализа активности показывают, что полипептид А сохраняет активность с течением времени при обеих температурах (фиг. 3С).

#### Рефолдинг белка/выдерживание при повышенном рН

[0190] Затем продукт АЕХ I выдерживали при повышенном рН. Буфер на основе карбоната натрия (2М)/гидроксида натрия (0,2М) добавляли к пулу АЕХ I для повышения рН до примерно 10,8. Пул АЕХ I поддерживали при этом значении рН в течение примерно 1 часа, перемешивая и поддерживая значение рН на уровне  $\geq 10,7$ . После инкубации при повышенном рН к пулу АЕХ I добавляли 1М раствор лимонной кислоты для снижения рН до примерно 8,5 $\pm$ 0,2. После регулирования рН образец фильтровали через 0,2 мкм фильтр. Неожиданно было обнаружено, что сохранение повышенного рН после этапа АЕХ I улучшало чистоту продукта. Перед выдерживанием при повышенном рН образец загрузки АЕХ I и образец пула АЕХ I анализировали с помощью ОФ-ВЭЖХ, и после выдерживания при повышенном рН образец (загрузка НИС) анализировали с помощью ОФ-ВЭЖХ. Как видно на фиг. 4, справа от основного пика, соответствующего полипептиду А, виден второстепенный пик, относящийся к загрязняющему веществу. Этот второстепенный пик исчезает после этапа выдерживания при повышенном рН, как видно на кривой ОФ-ВЭЖХ образца НИС загрузки.

#### Вирусная инаktivация

[0191] Затем образец белка подвергали этапу вирусной инаktivации. В процессе вирусной инаktivации для инаktivации оболочечных вирусов использовали растворитель/детергент. Этот метод, в частности, имеет много преимуществ по сравнению с другими методами, поскольку он не приводит к денатурации белка, совместим с большинством буферных систем, имеет высокую степень извлечения в процессе и требует относительно простого оборудования. Основной целью этого этапа является инаktivация любых потенциально оболочечных вирусов, которые могут присутствовать в технологическом потоке. В качестве растворителя и детергента, используемых в этом

процессе, использовали ТпВР (три(н-бутил)фосфат) и холат натрия. Готовили 10-кратный раствор растворителя и детергента из 3% ТпВР и 10% холата натрия. Для инактивации вируса растворитель/детергент добавляли в основной пул колонки АЕХ до конечной концентрации 1X, раствор перемешивали и инкубировали в течение 4 часов при температуре окружающей среды. После завершения инкубации добавляли 1М сульфат аммония, чтобы подготовить основной пул для дальнейшей последующей обработки на колонке НИС.

#### Хроматография гидрофобного взаимодействия (НИС)

[0192] НИС была вторым этапом очистки в последующем процессе полипептида А. Матрица из смолы, используемая на этом этапе хроматографии, представляла собой Toyopearl PPG 600 M (Tosoh Biosciences) со средним размером гранул 40-90 мкм. Работу осуществляли в режиме связывания и элюирования при температуре окружающей среды, при этом для элюирования полипептида А использовали многоступенчатый обратный градиент сульфата аммония.

#### Скрининг смолы НИС

[0193] Для определения оптимальной смолы НИС выполняли начальный скрининг. Во время начального скрининга смолы к пулу элюата колонки АЕХ добавляли 1,5 М сульфат аммония, и рН доводили до  $8,0 \pm 0,2$ . Затем этот образец наносили на различные смолы НИС для оценки связывания полипептида А. В частности, тестировали смолу Butyl-650M, Phenyl-650M, Hexyl-650C и PPG-600M. Колонки промывали, и применяли обратный линейный градиент уменьшающейся концентрации соли для элюирования связанного полипептида А. Полипептид А связывали со смолой Toyopearl PPG 600M в присутствии 1,5 М сульфата аммония при обратном линейном градиенте уменьшающейся концентрации соли. На основании профиля элюирования и анализа SDS-PAGE в качестве смолы для дальнейшей оценки выбрали Toyopearl PPG 600M (фиг. 5).

[0194] Смола Toyopearl PPG 600M использовали для создания 20-сантиметрового уплотненного слоя смолы с DBC 5 г/л. Сначала НИС колонку уравнивали, пропуская всего 4 объема колонки НИС-буфера В (НИС В) и НИС-буфера А (НИС А), которые чередовали, со скорости потока 179 см<sup>3</sup>/ч.

[0195] Продукт этапа АЕХ I загружали в колонку НИС со скоростью потока 179 см<sup>3</sup>/ч. После этапа загрузки колонку промывали 5 объемами колонки НИС-буфера А со скоростью потока 179 см<sup>3</sup>/ч.

[0196] Затем полипептид А элюировали из НИС колонки 10 объемами колонки НИС буфера D (НИС D) со скоростью потока 179 см<sup>3</sup>/ч. Элюаты собирали с отсечкой пика элюции 25 mAU. В таблице 3 ниже указаны используемые НИС буферы. В приведенной ниже таблице 4 показано сравнение загрузки НИС образцом объединенной элюции НИС. Показаны количество полипептида А, выход этапа и количество белка клетки-хозяина СНО (НСР). Все фракции, собранные во время этапа элюирования, анализировали с помощью ЭВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ на чистоту и концентрацию, соответственно. Фракции, чистота которых по данным ЭВЭЖХ составляла  $\geq 95\%$ , объединяли в пул НИС для дальнейшей обработки.

Таблица 3 - Буферы НИС

Название буфера	Состав буфера	pH	Проводимость (мС/см)	Функция
НИС А	20 мМ Tris-HCl+1,1М сульфат аммония	8,5 +/- 0,2	155-160 или 134-154 в качестве альтернативы	Колонка EQ, загрузка и промывка
НИС В	20 мМ Tris-HCl	8,5 +/- 0,2	< 2	Колонка EQ, отгонка
НИС D	20 мМ Tris-HCl+0,85 М сульфат аммония	8,5 +/- 0,1	125-130 или 108-126 в качестве альтернативы	Колонка, элюция

Таблица 4 - Результаты этапа очистки НИС

Описание	Титр (мг/мл)	Объем (л)	Полипептид А (г)	Выход этапа (%)	СНО НСР	
					нг/мл	м.д.
НИС, загрузка	10,52	11,42	120	N/A	247010	23480
Фракция № 1	0,18	15,8	3		5188	28822
Фракция № 2	1,23	15,9	20		4444	3613
Фракция № 3	1,5	15,9	24		3093	2062
Фракция № 4	1,12	17,1	19		1175	1049
Фракция № 5	0,79	15,9	13		653	827
Фракция № 6	0,54	15,9	9		427	791
Фракция № 7	0,39	15,9	6		362	928
Фракция № 8	0,28	15,9	4		312	1114
Фракция № 9	0,19	15,9	3		287	1511
Фракция № 10	0,15	17,1	3		231	1540
Фракция № 11	0,11	14,5	2		204	1855
Фракция № 12	0,09	17,1	2		186	2067
Фракция № 13	0,06	14,6	1		149	2483
Фракция № 14	0,05	12	1	122	2440	
Пул НИС (Фракции №№ 2 до 11)	0,6	160	96	80%	1899	3165

[0197] Стабильность и активность полипептида А определяли после этапа НИС после хранения при 5 и 25°C в течение 1, 7 и 10 дней. Как показали SDS-PAGE и ЭВЭЖХ, стабильность полипептида А сохраняется в дни 1, 7 и 10 при 5 и 25°C (фиг. 6А и фиг. 6В).

Активность полипептида А измеряли с помощью клеточного анализа, описанного ранее. Результаты анализа активности показывают, что активность полипептида А сохраняется при обеих температурах с течением времени (фиг. 6С).

#### UF/DF II

[0198] Второй этап UF проводили с фильтром Sartorius Hydrosart MWCO 10 кДа с площадью поверхности мембраны 1,8 м<sup>2</sup> (3×0,6 м<sup>2</sup>). Второй этап ультрафильтрации использовали для увеличения концентрации продукта примерно в 10 раз или более. После увеличения концентрации значение pH пула НИС доводили до 5,5 с помощью ледяной уксусной кислоты, фильтровали через 0,2 мкм фильтр и подвергали диафильтрации в 50 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5,5±0,2, с проводимостью 3,0-4,0 мСм для 5 DV. Конечный раствор извлеченного продукта тестировали с помощью ЭВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ на чистоту и концентрацию, соответственно. Общий выход на этом этапе обычно составлял >90%, и раствор продукта хранили при температуре от 2 до 8°C до дальнейшей обработки.

#### Хроматография в смешанном режиме (ММС)

[0199] ММС представляет собой третий этап процесса получения полипептида А. Смолой, выбранной для этого этапа хроматографии, была Capto ММС ImpRes (GE Healthcare), которая представляет собой мультимодальную слабую катионообменную смолу со средним размером частиц 36-44 мкм. Ее использовали для очистки полипептида А в режиме связывания и элюирования при температуре окружающей среды. На этом этапе для элюции использовали многоступенчатый градиент хлорида натрия, разработанный для улучшения разрешения и воспроизводимости.

[0200] Смолу Capto ММС ImpRes использовали для создания 20-сантиметрового уплотненного слоя смолы с DBC 20 г/л. Сначала колонку ММС уравнивали, пропуская всего 4 объема колонки ММС буфера В (ММС В) и ММС буфера А (ММС А), которые чередовали, со скоростью потока 238 см/час.

[0201] Продукт этапа НИС загружали в ММС колонку при скорости потока 238 см/ч. После этапа загрузки колонку промывали 5 объемами колонки ММС буфера А со скоростью потока 238 см/ч, и затем 5 объемами колонки ММС буфера С (ММС С) со скоростью потока 238 см/ч.

[0202] Затем полипептид А элюировали из колонки ММС в процессе этапа элюции 15 объемами колонки ММС буфера D (ММС D) со скоростью потока 238 см/ч. Элюаты собирали с отсечкой пика элюции 50 mAU. Этап дополнительной промывки выполняли с помощью 5 объемов колонки ММС буфера E (ММС E) со скоростью потока 238 см/ч. В таблице 5 ниже указаны использованные ММС буферы. В приведенной ниже таблице 6 показано сравнение загрузки ММС с образцом объединенной элюции ММС. Показаны количество полипептида А, поэтапный выход и количество белка клетки-хозяина СНО (НСР).

Таблица 5 - ММС буферы

Название буфера	Состав буфера	pH	Проводимость (мС/см)	Функция
-----------------	---------------	----	----------------------	---------

ММС А	50 мМ NaOAc	5,5 +/- 0,2	3-4	Колонка загрузка и промывка	EQ,
ММС В	50 мМ NaOAc+1 М NaCl	5,5 +/- 0,2	84-92	Кологкка отгонка	EQ,
ММС С	50 мМ NaOAc+0,25 М NaCl	5,5 +/- 0,2	24-30	Колонка, элюция второго по величине пика	
ММС D	50 мМ NaOAc+0,65 М NaCl	5,5 +/- 0,2	55-66	Колонка, элюция основного пика	
ММС Е	50 мМ NaOAc+0,70 М NaCl	5,5 +/- 0,2	69-71	Колонка, элюция после элюции основного пика	

Таблица 6 - Результаты этапов очистки ММС

Описание	Титр (мг/мл)	Объем (л)	Полипептид А (г)	Выход этапа (%)	СНО НСР	
					нг/мл	м.д.
Загрузка ММС	3,85	21,6	83	N/A	5831	1514
Фракция № 1	1,95	7,6	15		1427	732
Фракция № 2	2,52	6,46	16		312	124
Фракция № 3	1,43	6,8	10		70	49
Фракция № 4	0,86	6,7	6		44	51
Фракция № 5	0,79	7,4	6		35	44
Фракция № 6	0,57	6,85	4		29	51
Фракция № 7	0,44	7	3		23	52
Фракция № 8	0,34	7	2		22	65
Фракция № 9	0,28	7,1	2		21	75
Фракция № 10	0,22	6,9	2		20	91
Фракция № 11	0,18	7	1		19	106
Фракция № 12	0,14	7	1		19	136
Фракция № 13	0,12	7,4	1		18	150
Фракция № 14	0,08	7,3	1		17	213
Фракция № 15	0,08	3	0		17	213
Фракция № 16	0,08	6,3	1	19	238	

Фракция № 17	0,1	7,2	1		22	220
Пул ММС (Фракции №№ 1 до 13)	N/A	91,21	68	82%	724	181

[0203] После этапа ММС определяли стабильность и активность полипептида А после хранения при 5 и 25°C в течение 1, 6 и 11 дней. Как показал SDS-PAGE, стабильность полипептида А сохраняется в дни 1, 6 и 11 при 5 и 25°C (фиг. 7А). Стабильность полипептида А также сохраняется при 2-8°C в течение 4 месяцев, как показано с помощью ОФ-ВЭЖХ (фиг. 7В). Активность полипептида А измеряли с помощью клеточного анализа, описанного выше. Результаты анализа активности показывают, что полипептид А сохраняет активность при обеих температурах с течением времени (фиг. 7С).

#### UF/DF III

[0204] Третий этап ультрафильтрации использовали для увеличения концентрации продукта примерно в 10 раз или более. После увеличения концентрации пул ММС подвергали диафильтрации в буфере 20 мМ Tris, рН 8,0, с проводимостью 2,0-3,0 мСм для 5 DV.

#### Анионообменная хроматография (АЕХ) II

[0205] После этапа UF/DF III использовали второй этап АЕХ (АЕХ II) в качестве дополнительной очистки полипептида А. Использовали смолу GigaBap Q 650 M (Tosoh Biosciences) с 20-сантиметровым насадочным слоем и динамической связывающей емкостью (DBC) смолы 20 г/л. Сначала АЕХ колонку уравнивали, пропуская всего 4 объема колонки АЕХ II буфера F (АЕХ F) и АЕХ II буфера E (АЕХ E), которые чередовали, со скоростью потока 300 см/ч.

[0206] Продукт этапа UF/DF III загружали в АЕХ II колонку со скоростью потока 300 см/ч. После этапа загрузки колонку промывали 5 объемами колонки АЕХ II буфера E со скоростью потока 300 см/ч.

[0207] Затем полипептид А элюировали из АЕХ II колонки на одном из двух разных этапов градиентного элюирования. Выполняли одно градиентное элюирование, начиная с АЕХ II буфера E до АЕХ II буфера F. Градиент формировали при скорости потока подвижной фазы 300 см/ч, начиная с 0-20% буфера E до буфера F за 15 объемов колонки. Элюаты собирали с отсечкой пика элюции 200 mAU. В таблице 7 ниже показаны использованные АЕХ II буферы. В приведенной ниже таблице 8 показано сравнение загрузки АЕХ II образцом объединенной фракции элюции АЕХ II. Показаны количество полипептида А, выход на этапе и количество белка клетки-хозяина СНО (HCP). Второй альтернативный этап элюции выполняли, начиная с АЕХ II буфера E до АЕХ II буфера G. Градиент формировали при скорости потока подвижной фазы 300 см<sup>3</sup>/ч, начиная с 0-100% буфера E до буфера G за 15 объемов колонки.

Таблица 7 - АЕХ II буферы

Название	Состав буфера	рН	Проводимость	Функция
----------	---------------	----	--------------	---------

буфера			(мС/см)	
АЕХ Е	20 мМ Tris-HCl	8,0 +/- 0,2	≤ 2	Колонка EQ, загрузка, промывка и элюция
АЕХ F	20 мМ Tris-HCl+1 М NaCl	8,0 +/- 0,2	80-92	Колонка EQ, элюция и отгонка
АЕХ G	20 мМ Tris- HCl+0,2 М NaCl	8,0 +/- 0,2	~20 (18-24)	Элюция

Таблица 8 - Результаты этапа очистки АЕХ II

Описание	Титр (мг/мл)	Объем (л)	Полипептид А (г)	Выход этапа (%)	СНО НСР	
					нг/мл	м.д.
АЕХ II, загрузка	4,01	17,8	71	N/A	724	181
Фракция № 1	0,49	3,1	2		11	22
Фракция № 2	1,77	3	5		22	12
Фракция № 3	2,35	3,1	7		27	11
Фракция № 4	2,49	3	7		33	13
Фракция № 5	2,33	3,2	7		38	16
Фракция № 6	2,12	3,1	7		41	19
Фракция № 7	1,9	3	6		41	22
Фракция № 8	1,55	3	5		42	27
Фракция № 9	1,39	3,1	4		46	33
Фракция № 10	1,06	2,9	3		55	52
Фракция № 11	0,84	3	3		62	74
Фракция № 12	0,59	2,8	2		75	127
Фракция № 13	0,38	3,1	1		111	292
Фракция № 14	0,24	2,7	1		172	717
АЕХ II пул (Фракции №№ 1 до 11)	1,81	33,5	61	85%	29	23

[0208] После этапа АЕХ II определяли стабильность полипептида А после хранения при 2-8, 25 и -80°C в течение 14 дней. Как показал SDS-PAGE, стабильность полипептида А сохраняется в течение 14 дней при 2-8, 25 и -80°C (фиг. 8).

#### Уменьшение содержания белка клетки-хозяина (НСР)

[0209] Содержание НСР в фармацевтической композиции может повышать риск

иммуногенности при введении пациенту. Уменьшение содержания НСР связано с уменьшением уровня специфических воспалительных цитокинов (Wang et al. *Biotechnology & Bioengineering*. 103(3):446-58, 2009). Следовательно, выгодным является максимально возможное снижение содержания НСР в фармацевтической композиции. Несмотря на три этапа хроматографии (АЕХ I, НИС и ММС) и несколько этапов фильтрации, содержание НСР при очистке полипептида А оставалось выше 150 м.д. Неожиданно было обнаружено, что описанный выше этап АЕХ II важен для уменьшения содержания НСР до более низкого уровня, например, до содержания НСР  $\leq$  примерно 100 м.д. или  $\leq$  примерно 50 м.д. В частности, применение этапа градиентного элюирования, а не элюирования одним буфером на этапе АЕХ I, оказалось полезным для уменьшения содержания НСР до  $\leq$  примерно 100 мкм. Заключительный этап АЕХ II позволил снизить содержание НСР до приемлемых уровней без необходимости выполнения этапа аффинной очистки.

#### Вирусная фильтрация

[0210] Затем образец АЕХ II пула подвергали этапу вирусной фильтрации с помощью EMD Viresolve Pro Modus 1.3 Shield Prefilter (1,3 дюйма) и устройства (0,22 м<sup>2</sup>). Этап фильтрации осуществляли при скорости потока 2600 мл/мин (диапазон 990-2750 мл/мин).

#### UF/DF IV и наполнение нефасованным лекарственным веществом

[0211] Четвертый этап ультрафильтрации использовали для увеличения концентрации продукта примерно в 10 раз или более. После увеличения концентрации АЕХ II пул подвергали диафильтрации в буферном составе (50 мг/мл сахарозы, 2,03 мг/мл трехосновного дигидрата цитрата натрия и 0,97 мг/мл лимонной кислоты, рН 6,1) для 10 DV. Затем к подвергнутому диафильтрации образцу добавляли полисорбат 20 до конечной концентрации 0,1 мг/мл. Конечную концентрацию полипептида А доводили до 1,05 мг/мл (диапазон 1,0-1,09 мг/мл). Наконец, образец фильтровали через 0,1 мкм фильтр Millipore Durapore.

#### Краткая информация по очистке

[0212] В приведенной ниже таблице 9 суммированы результаты приведенной выше схемы очистки относительно титра полипептида А и примеси НСР.

Таблица 9 - титры полипептида А и белка клетки-хозяина СНО (НСР) в образцах на разных этапах схемы очистки, определенные с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (ОФ)

Образец	Титр ОФ-ВЭЖХ (мг/мл)	СНО НСР	
		нг/мл	м.д.
АЕХ I, загрузка	11,36	789380	69488
АЕХ I, пул	15,88	319040	20091
НИС, загрузка	10,52	247010	23480
НИС, пул	0,60	1899	3165
ММС, загрузка	3,85	5831	1515

АЕХ 2, загрузка	4,01	724	181
АЕХ 2, пул	1,28	29	23

### Пример 3. Оптимизация этапа выдерживания при рН для повышения чистоты

[0213] В попытке улучшить чистоту полипептида А во время процесса очистки был оптимизирован этап рефолдинга белка/выдерживания при повышенном рН. Результаты этого примера привели к этапу рефолдинга белка/выдерживания при повышенном рН, как описано выше в примере 2. Выдерживание при рН, равном 10,8, в течение 1 часа выполняли перед этапом АЕХ I или после этапа АЕХ I, и результаты сравнивали. Схема двух проведенных экспериментов показана на фиг. 9.

#### рН-обработка перед АЕХ I

[0214] Собранный материал инкубировали перед этапами UF/DF I и АЕХ I при рН 10,8 в течение 1 часа при перемешивании. рН-обработанный образец затем обрабатывали, как описано в примере 2, включая этап UF/DF I, этап АЕХ I, этап вирусной инактивации и этап НИС. Результаты этапа АЕХ I показаны в таблице 10 ниже и на фиг. 10. Результаты последующего этапа НИС показаны в таблице 11 ниже и на фиг. 11.

Таблица 10 - Результаты этапа АЕХ I для собранного рН-обработанного образца

Образец	Титр (г/мл)	Объем (мл)	Полипептид А (мг)	Выход (%)	СНО НСР	
					нг/мл	м.д.
АЕХ I, загрузка 2	5,46	218	1190	n/a	1107300	202802
АЕХ I, фракция 1	29,37	20	587	49	1156700	39384
АЕХ I, фракция 2	11,33	20	227	19	1359100	119956
АЕХ I, фракция 3	4,47	20	89	8	963200	215481
АЕХ I, фракция 4	2,29	20	46	4	902900	394279
АЕХ I, фракция 5	1,25	20	25	2	713800	571010
АЕХ I, фракция 6	0,86	9,5	8	1	478500	556395
			Общий выход	83	Не определено	Не определено
			Фракции 1 и 2	68	79670	в 2,5 раза
			Фракции 1-3	76	124940	в 1,6 раз

Таблица 11 - Результаты этапа НИС для собранного рН-обработанного образца

Образец	Титр (мг/мл)	Объем м (мл)	Полипепти д А (мг)	СНО НСР		Выход д %	Кратность улучшения прозрачности
				нг/мл	м.д.		
НИС, загрузка	7,49	27	202	731060	97605	N/A	
НИС, фракция 1	0,08	20	1,6	15909	198863		
НИС, фракция 2	0,46	20	9,2	14667	31885		
НИС, фракция 3	1,05	20	21	11287	10750		
НИС, фракция 4	0,85	20	17	5407	6361		
НИС, фракция 5	0,54	20	10,8	4309	7980		
НИС, фракция 6	0,25	20	5	3249	12996		
НИС, пул (фракции 1- 7)	0,58	220	127,6	9377	16167	63	6

рН-обработка после АЕХ I

[0215] Материал, полученный после этапов UF/DF I и АЕХ I, инкубировали при рН 10,8 в течение 1 часа при перемешивании. Затем рН-обработанный образец обрабатывали, как описано в примере 2, включая этап вирусной инактивации и этап НИС. Результаты этапа АЕХ I показаны в таблице 12 ниже и на фиг. 12. Результаты последующего этапа НИС показаны в таблице 13 ниже и на фиг. 13.

Таблица 12 - Результаты этапа АЕХ I до рН-обработки

Образец	Титр (мг/мл)	Объем (мл)	Полипептид А (mg)	Выход (%)	СНО НСР	
					нг/мл	м.д.
АЕХ I, загрузка 1	4,15	285	1183	n/a	762900	183831
АЕХ I,	18,73	54	1011	86	954000	50934

пул 1						
						в 4 раза

Таблица 13 - Результаты этапа НС для рН-обработанного образца АЕХ I

Образец	Титр (мг/мл)	Полипептид А (мг)	СНО НСР		Выхо д %	Кратность улучшения прозрачности
			нг/мл	м.д.		
НС, загрузка	7,95	174,9	483730	60847	N/A	
НС, фракция 1	0,10	2	15646	156460		
НС, фракция 2	0,48	9,6	10511	21898		
НС, фракция 3	1,02	20,4	4763	4670		
НС, фракция 4	0,66	13,2	3428	5194		
НС, фракция 5	0,43	8,6	3126	7270		
НС Fraction 6	0,29	5,8	2714	9359		
НС, фракция 7	0,21	4,2	2348	11181		
НС, фракция 8	0,15	3	2043	1362		
НС, пул (фракции 1-7)	0,56	123,2	5762	10289	70	6

[0216] Как можно видеть из данных, описанных выше, АЕХ I колонка не устраняет мелкие пиковые примеси. Однако, как показано на фиг. 13, второстепенный пик не наблюдается, когда образец пула АЕХ I подвергают обработке при повышенном значении рН.

**Пример 4. Получение сайт-специфического профиля гликанов полипептида А после очистки.**

[0217] Сайт-специфический профиль гликанов полипептида А определяли после проведения процесса очистки, описанного в примере 2. Очищенная композиция содержит смесь полипептидов Полипептида А с различными гликановыми структурами на выбранных аминокислотах. Для определения гликанового профиля выполняли картирование пептидов. Вкратце, восстановленный и алкилированный белок полипептида

А подвергали неполному расщеплению с помощью трипсиновой протеазы, и расщепленную смесь разделяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой и масс-спектрометрии (ОФ-ВЭЖХ/МС). Это дало большой набор перекрывающихся пептидов, и анализ подтвердил теоретическую последовательность. Общая ионная хроматограмма пептидной карты, полученной с помощью трипсина, для трех разных партий очищенного полипептида А подтвердила сопоставимость партий. Было установлено, что N-связанные гликаны присутствуют в Asn187 (N187) и Asn206 (N206). Эти гликаны были преимущественно сиалированными, сложными фукозилированными типами. О-гликаны основного типа 1 также присутствовали в Thr212 (T212).

[0218] Относительный процент изоформы гликана на каждом сайте гликозилирования вычисляли по интенсивности ионов, и результаты суммированы ниже в таблице 14. Три партии имеют очень похожие гликановые профили с одинаковыми основными видами гликанов в каждой из партий.

Таблица 14 Сайт-специфические профили гликанов полипептида А

Остаток	Последовательность	Форма гликана	Относительный процент (%)		
			партия 1	партия 2	партия 3
177-205	SGSLYMLCTGN <sub>187</sub> S SHSSWDNQCQCTSS ATR (SEQ ID NO: 2)	Hex5HexNAc4FucNeuAc2	67,72	63,79	63,69
		Hex6HexNAc5FucNeuAc2	4,20	5,84	5,90
		Hex5HexNAc4FucNeuAc	7,49	8,88	8,89
		Hex6HexNAc5FucNeuAc3	15,29	16,57	16,31
		Hex4HexNAc4FucNeuAc	1,04	0,55	0,59
		Hex5HexNAc5NeuAc2	3,80	3,63	3,86
		Hex5HexNAc4Fuc	0,18	0,33	0,33
		Hex3HexNAc4Fuc	0,09	0,15	0,13
		Hex4HexNAc4Fuc	0,15	0,18	0,20
		Hex6HexNAc5Fuc	0,04	0,06	0,07
		Hex5HexNAc5Fuc	0,03	0,03	0,04
206-209	N <sub>206</sub> TTK (SEQ ID NO: 3)	Hex6HexNAc5FucNeuAc3	4,44	4,39	3,92
		Hex5HexNAc4FucNeuAc2	82,92	77,79	76,65
		Hex6HexNAc5FucNeuAc2	2,71	3,91	3,69

		Hex7HexNAc6FucNeuAc3	0,49	0,71	0,53
		Hex6HexNAc5FucNeuAc	0,21	0,74	0,88
		Hex5HexNAc4FucNeuAc	6,79	9,40	10,68
		Hex5HexNAc4Fuc	1,39	2,11	2,11
		Hex4HexNAc4Fuc	1,04	0,94	1,52
210- 221	QVT <sub>212</sub> PQP <sub>EE</sub> QKER (SEQ ID NO: 4)	HexHexNAc	0,18	0,21	0,27
		HexHexNAcNeuAc	15,56	17,69	17,75
		HexHexNAcNeuAc2	9,15	10,99	12,05
		негликозилированный	75,11	71,11	69,94

Hex: гексоза; HexNAc: N-ацетилгексозамин; NeuAc: N-ацетилнейраминная кислота; Fuc: фукоза

[0219] Чтобы продемонстрировать важность гликановых структур очищенного полипептида А, в фармакокинетическом анализе, проводимом на мышах, использовали три разные партии очищенного полипептида А для определения времени полужизни в сыворотке. Одну из трех партий обрабатывали сиалидазой для удаления следов сиалирования, а две другие партии не обрабатывали. Как показано на фиг. 14, удаление меток сиалирования значительно уменьшило время полужизни полипептида А в сыворотке. Дальнейший процесс очистки, описанный в примере 2, дает очищенную композицию, содержащую смесь полипептидов полипептида А с различными гликановыми структурами в выбранных аминокислотах. Здесь показано, что гликановые структуры важны для сохранения периода полужизни в сыворотке.

#### **Пример 5. Распределение заряда полипептида А после очистки**

[0220] Профиль распределения заряда определяли после процесса очистки, описанного в примере 2. Очищенная композиция содержит смесь полипептидов полипептида А с различными зарядами. Для определения профиля распределения заряда три разные партии очищенного полипептида А анализировали с помощью капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF) для получения сIEF профилей. Затем для определения относительных количеств каждого варианта заряда в композиции очищенного полипептида А измеряли процент площади пика рI. Результаты представлены ниже в таблице 15. сIEF профили трех партий показаны на фиг. 15.

Таблица 15 - Процент площади сIEF пика для вариантов заряда полипептида А

рI	партия 1 (%)	партия 2 (%)	партия 3 (%)
5,73	1,7	2,2	2,3
5,93	8,9	11,6	11,5
6,09	20,9	24,7	24,9
6,28	3,8	4,0	4,1

6,38	23,2	25,0	25,0
6,48	3,6	3,6	3,8
6,53	4,6	4,8	4,7
6,66	26,4	20,7	20,6
6,82	4,8	3,4	3,1
7,02	2,2	Не обнаружено	Не обнаружено
5,73a	1,7	2,2	2,3
5,93b	8,9	11,6	11,5

pI 5,73 представляет собой объединенные пики pI 5,70 и pI 5,76.

pI 5,93 представляет собой объединенные пики pI 5,89 и pI 5,97.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки полипептида, содержащего циклически пермутированный  $\text{IL-2}$ , слитый с внеклеточной частью  $\text{IL-2R}\alpha$  цепи, включающий:

а) приведение осветленного клеточного супернатанта, содержащего полипептид и белок клетки-хозяина (HCP), в контакт с первой хроматографической матрицей в условиях, при которых полипептид связывается с матрицей, и селективное элюирование полипептида из матрицы в первый элюат;

б) доведение pH первого элюата с этапа (а) до по меньшей мере 10,5 и не более 11,5 с получением элюата с отрегулированным pH; и

с) приведение элюата в контакт с отрегулированным pH с этапа (б) со второй хроматографической матрицей таким образом, что полипептид связывается с матрицей, и селективное элюирование полипептида из матрицы во второй элюат, тем самым очищая полипептид.

2. Способ по п.1, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 1; или содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

3. Способ по любому из предшествующих пунктов, где первая хроматографическая матрица содержит анионообменную хроматографическую (AEX) матрицу.

4. Способ по п.3, где перед контактом с AEX матрицей в осветленном клеточном супернатанте осуществляют замену буфера на раствор с проводимостью примерно 1-2 мСм/см и pH примерно 8,0-8,5.

5. Способ по любому из п.3-4, где AEX матрица содержит четвертичные аминогруппы.

6. Способ по любому из пп.3-5, где AEX матрица содержит гранулы гидроксированного метакрилового полимера, функционализированные четвертичными аминогруппами.

7. Способ по п.6, где средний диаметр гранул составляет примерно 75 мкм.

8. Способ по п.6 или п.7, где средний размер пор гранул составляет примерно 100 нм.

9. Способ по любому из пп.3-8, где полипептид элюируют из AEX матрицы с помощью раствора, имеющего концентрацию соли, эквивалентную проводимости от примерно 15 до примерно 25 мСм/см.

10. Способ по любому из пп.3-9, где полипептид элюируют из AEX матрицы с помощью водного раствора примерно 0,20-0,25 М хлорида натрия при pH примерно 8,4-8,6.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, где pH первого элюата регулируют с помощью карбоната натрия и/или гидроксида натрия.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, где pH первого элюата регулируют с помощью карбоната натрия или гидроксида натрия в соотношении примерно 0,1 кг карбоната натрия или гидроксида натрия на примерно 1 кг первого элюата.

13. Способ по любому из предшествующих пунктов, где pH элюата с

отрегулированным поддерживают при рН 10,7 или выше, но ниже 11,0 в течение по меньшей мере 1 часа.

14. Способ по любому из предшествующих пунктов, где рН элюата с отрегулированным рН поддерживают на уровне 10,7 или выше, но ниже 11,0 в течение по меньшей мере 1 часа, причем значения рН на уровне 10,7 или выше, но ниже 11,0 достигают путем добавления карбоната натрия или гидроксида натрия в соотношении примерно 0,1 кг карбоната натрия или гидроксида натрия на примерно 1 кг первого элюата.

15. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий снижение рН элюата с отрегулированным рН путем добавления лимонной кислоты.

16. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий снижение рН элюата с отрегулированным рН примерно до рН 8,3-8,7.

17. Способ по любому из предшествующих пунктов, где перед контактом с НИС матрицей проводимость элюата с отрегулированным рН изменяют до примерно 130-160 мСм/см, и рН изменяют до примерно  $8,5 \pm 0,2$ .

18. Способ по п.16, где проводимость элюата с отрегулированным рН изменяют с помощью сульфата аммония.

19. Способ по любому из предшествующих пунктов, где вторая хроматографическая матрица содержит матрицу для хроматографии гидрофобного взаимодействия (НС).

20. Способ по п.19, где перед контактом с НИС матрицей элюат с отрегулированным рН изменяют, чтобы он содержал примерно 1-1,2 М сульфата аммония.

21. Способ по любому из пп.19-20, где НИС матрица содержит полипропиленгликольные группы.

22. Способ по любому из пп.19-21, где НИС матрица содержит гранулы гидроксированного метакрилового полимера, связанные с полипропиленгликольными группами.

23. Способ по п.22, где средний диаметр гранул составляет от примерно 40 до примерно 90 мкм.

24. Способ по п.22 или п.23, где средний размер пор гранул составляет примерно 75 нм.

25. Способ по любому из пп.19-24, где полипептид элюируют из НИС матрицы с помощью раствора, имеющего концентрацию соли, эквивалентную проводимости от примерно 100 до примерно 140 мСм/см.

26. Способ по любому из пп.19-25, где полипептид элюируют из НИС матрицы путем последовательного многоступенчатого градиента уменьшающейся концентрации соли.

27. Способ по любому из пп.19-26, где полипептид элюируют из НИС матрицы с помощью буфера, содержащего от примерно 0,85 до примерно 0,95 М сульфата аммония при рН  $8,5 \pm 0,2$ .

28. Способ по любому из пп.19-26, где перед контактом с НИС матрицей элюат с отрегулированным рН фильтруют через 0,2 мкм фильтр.

29. Способ по любому из предшествующих пунктов, где перед контактом со второй

хроматографической матрицей элюат с отрегулируемым рН подвергают вирусной инаktivации.

30. Способ по п.29, где вирусная инаktivация достигается путем смешивания элюата с отрегулируемым рН с три-н-бутилфосфатом и полисорбатом 20.

31. Способ по любому из предшествующих пунктов, где полипептид дополнительно очищают из второго элюата с помощью хроматографии в смешанном режиме (ММС).

32. Способ по любому из предшествующих пунктов, где полипептид дополнительно очищают из второго элюата с помощью ММС с последующим АЕХ.

33. Способ по любому из предшествующих пунктов, где осветленный клеточный супернатант получают из культуры клеток яичника китайского хомяка (СНО).

34. Способ по любому из предшествующих пунктов, где полипептид во втором элюате имеет чистоту не менее 90%.

35. Способ по п.34, где чистоту полипептида определяют с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (ОФ).

36. Способ уменьшения содержания белка клетки-хозяина (НСР) в осветленном клеточном супернатанте, содержащем полипептид, содержащий циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью IL-2R $\alpha$  цепи, где способ включает приведение частично очищенного полипептида в контакт с АЕХ матрицей в условиях, при которых полипептид связывается с АЕХ матрицей, и селективное элюирование полипептида из АЕХ матрицы в условиях градиентного элюирования, тем самым снижая содержание НСР относительно полипептида.

37. Способ по п.36, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 1; или содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

38. Способ по любому из п.36 или п.37, дополнительно включающий приведение в контакт осветленного клеточного супернатанта, содержащего полипептид и НСР, с одной или более хроматографическими смолами для получения частично очищенного полипептида.

39. Способ по любому из пп.34-36, где до контакта частично очищенного полипептида с АЕХ матрицей содержание НСР составляет  $\geq$  примерно 300 м.д.

40. Способ по любому из пп.36-39, где до контакта частично очищенного полипептида с АЕХ матрицей содержание НСР составляет  $\geq$  примерно 150 м.д.

41. Способ по любому из пп.36-40, где после элюирования полипептида из АЕХ матрицы в условиях градиентного элюирования содержание НСР составляет  $\leq$  примерно 100 м.д.

42. Способ по любому из пп.36-41, где после элюирования полипептида из АЕХ матрицы в условиях градиентного элюирования содержание НСР составляет  $\leq$  примерно 50 м.д.

43. Способ по любому из пп.36-42, где условия градиентного элюирования включают одно или более из следующего:

увеличение проводимости элюирующего буфера с течением времени;  
увеличение концентрации соли элюирующего буфера с течением времени; или  
снижение рН элюирующего буфера с течением времени.

44. Способ по п.43, где проводимость элюирующего буфера увеличивают от примерно  $\leq 5$  мСм/см до примерно  $\geq 15$  мСм/см.

45. Способ по п.43, где проводимость элюирующего буфера увеличивают от примерно  $\leq 2$  мСм/см до примерно  $\geq 15$  мСм/см.

46. Способ по п.43, где проводимость элюирующего буфера увеличивают от примерно  $\leq 2$  мСм/см до примерно  $\geq 20$  мСм/см.

47. Способ по п.43, где проводимость элюирующего буфера увеличивают до значения от примерно 15 мСм/см до примерно 100 мСм/см.

48. Способ по п.43, где проводимость элюирующего буфера увеличивают до значения от примерно 20 мСм/см до примерно 50 мСм/см.

49. Способ по п.43, где элюирующий буфер имеет конечную проводимость от примерно 20 мСм/см до примерно 50 мСм/см.

50. Способ по п.43, где элюирующий буфер изначально имеет проводимость примерно  $\leq 5$  мСм/см.

51. Способ по п.43, где элюирующий буфер изначально имеет проводимость примерно  $\leq 2$  мСм/см.

52. Способ по п.43, где концентрацию соли в элюирующем буфере повышают от примерно 0 М соли до примерно 1,5 М соли.

53. Способ по п.43, где концентрацию соли в элюирующем буфере повышают от примерно 0 М соли до примерно 1,0 М соли.

54. Способ по п.43, где концентрацию соли в элюирующем буфере повышают от примерно 0 М соли до примерно 0,5 М соли.

55. Способ по п.43, где элюирующий буфер содержит соль с конечной концентрацией от примерно 0,2 М соли до примерно 1,0 М соли.

56. Способ по п.43, где элюирующий буфер содержит соль с конечной концентрацией примерно 0,2 М соли.

57. Способ по любому из пп.43-56, где соль включает хлорид натрия.

58. Способ по любому из пп.43-57, где элюирующий буфер дополнительно имеет рН от примерно 7,0 до примерно 9,0.

59. Способ по любому из пп.43-58, где элюирующий буфер дополнительно имеет рН примерно 8,0.

60. Способ по любому из пп.43-59, где одну или более хроматографических смол для получения частично очищенного полипептида выбирают из группы, состоящей из АЕХ, НИС и ММС.

61. Способ по п.60, где получение частично очищенного полипептида включает этапы:

а1) приведения осветленного клеточного супернатанта, содержащего полипептид и

НСР, в контакт с первой АЕХ матрицей в условиях, при которых полипептид связывается с АЕХ матрицей, и селективное элюирование полипептида из АЕХ матрицы в первый элюат;

а2) приведение первого элюата с этапа (а1) в контакт с НИС матрицей таким образом, что полипептид связывается с НИС матрицей, и селективное элюирование полипептида из НИС матрицы во второй элюат; и

а3) приведение второго элюата с этапа (а2) в контакт с ММС матрицей таким образом, что полипептид связывается с ММС матрицей, и селективное элюирование полипептида из ММС матрицы в третий элюат с получением, таким образом, частично очищенного полипептида.

62. Способ по п.61, где перед контактом с первой АЕХ матрицей в осветленном клеточном супернатанте осуществляют замену буфера на раствор с проводимостью примерно 1-2 мСм/см и рН примерно 8,0-8,5.

63. Способ по любому из п.61 или п.62, где первая АЕХ матрица содержит четвертичные аминокруппы.

64. Способ по любому из пп.61-63, где первая АЕХ матрица содержит гранулы гидроксированного метакрилового полимера, функционализированные четвертичными аминокруппами.

65. Способ по п.64, где средний диаметр гранул составляет примерно 75 мкм.

66. Способ по п.64 или п.65, где средний размер пор гранул составляет примерно 100 нм.

67. Способ по любому из пп.61-66, где полипептид элюируют из первой АЕХ матрицы с помощью раствора, имеющего концентрацию соли, эквивалентную проводимости от примерно 15 до примерно 25 мСм/см.

68. Способ по любому из пп.61-67, где полипептид элюируют из первой АЕХ матрицы с помощью водного раствора примерно 0,20-0,25 М хлорида натрия при рН примерно 8,4-8,6.

69. Способ по любому из пп.61-68, где рН первого элюата регулируют с помощью карбоната натрия и/или гидроксида натрия с получением первого элюата с отрегулированным рН.

70. Способ по любому из пп.61-69, где рН первого элюата регулируют с помощью карбоната натрия или гидроксида натрия в соотношении примерно 0,1 кг карбоната натрия или гидроксида натрия на примерно 1 кг первого элюата.

71. Способ по п.69 или п.70, где рН первого элюата с отрегулированным рН поддерживают на уровне 10,7 или выше, но ниже 11,0 в течение по меньшей мере 1 часа.

72. Способ по любому из пп.61-71, где рН элюата с отрегулированным рН поддерживают на уровне 10,7 или выше, но ниже 11,0 в течение по меньшей мере 1 часа, при этом значения рН на уровне 10,7 или выше, но ниже 11,0 достигают путем добавления карбоната натрия или гидроксида натрия в соотношении примерно 0,1 кг карбоната натрия или гидроксида натрия на примерно 1 кг первого элюата.

73. Способ по п.71 или п.72, дополнительно включающий снижение рН первого элюата с отрегулированным рН путем добавления лимонной кислоты.

74. Способ по любому из пп.69-73, дополнительно включающий снижение рН первого элюата с отрегулированным рН до примерно рН 8,3-8,7.

75. Способ по любому из пп.61-74, где перед контактом с НИС матрицей проводимость первого элюата с отрегулированным рН изменяют до примерно 130-160 мСм/см, и рН изменяют до примерно  $8,5 \pm 0,2$ .

76. Способ по п.75, где проводимость первого элюата с отрегулированным рН изменяют с помощью сульфата аммония.

77. Способ по п.76, где перед контактом с НИС матрицей первый элюат с отрегулированным рН изменяют, чтобы он содержал примерно 1-1,2 М сульфата аммония.

78. Способ по любому из пп.61-77, где НИС матрица содержит полипропиленгликольные группы.

79. Способ по любому из пп.61-78, где НИС матрица содержит гранулы гидроксированного метакрилового полимера, связанные с полипропиленгликольными группами.

80. Способ по п.79, где средний диаметр гранул составляет от примерно 40 до примерно 90 мкм.

81. Способ по п.79 или п.80, где средний размер пор гранул составляет примерно 75 нм.

82. Способ по любому из пп.61-81, где полипептид элюируют из НИС матрицы с помощью раствора с концентрацией соли, эквивалентной проводимости от примерно 100 до примерно 140 мСм/см.

83. Способ по любому из пп.61-82, где полипептид элюируют из НИС матрицы путем последовательного многоступенчатого градиента уменьшающейся концентрации соли.

84. Способ по любому из пп.61-83, где полипептид элюируют из НИС матрицы с помощью буфера, содержащего от примерно 0,85 до примерно 0,95 М сульфата аммония при рН  $8,5 \pm 0,2$ .

85. Способ по любому из пп.61-84, где перед контактом с НИС матрицей элюат с отрегулированным рН фильтруют через 0,2 мкм фильтр.

86. Способ по любому из пп.61-85, где перед контактом с НИС матрицей первый элюат с отрегулированным рН подвергают вирусной инаktivации.

87. Способ по п.86, где вирусная инаktivация достигается путем смешивания элюата с отрегулированным рН с три-н-бутилфосфатом и полисорбатом 20.

88. Способ по любому из пп.61-87, где осветленный клеточный супернатант получают из культуры клеток яичника китайского хомяка (СНО).

89. Способ уменьшения содержания белка клетки-хозяина (НСР) в осветленном клеточном супернатанте, содержащем полипептид, содержащий циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью IL-2R $\alpha$  цепи, где способ включает этапы:

a. приведение осветленного клеточного супернатанта, содержащего полипептид и НСР, в контакт с первой АЕХ матрицей в условиях, при которых полипептид связывается с первой АЕХ матрицей, и селективное элюирование полипептида из первой АЕХ матрицы в первый элюат;

b. приведение первого элюата в контакт с НИС матрицей таким образом, что полипептид связывается с НИС матрицей, и селективное элюирование полипептида из НИС матрицы во второй элюат;

c. приведение второго элюата в контакт с ММС матрицей таким образом, что полипептид связывается с ММС матрицей, и селективное элюирование полипептида из ММС матрицы в третий элюат; и

d. Приведение третьего элюата в контакт со второй АЕХ матрицей в условиях, при которых полипептид связывается со второй АЕХ матрицей, и селективное элюирование полипептида из второй АЕХ матрицы в условиях градиентного элюирования, тем самым снижая содержание НСР относительно полипептида, где содержание НСР после этапа (d) составляет  $\leq$  примерно 50 м.д.

90. Способ по п.89, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 1; или содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

91. Способ по пп.36-90, где не используют этап аффинной очистки.

92. Композиция, содержащая полипептид, содержащий циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью IL-2R $\alpha$  цепи, где содержание НСР в композиции составляет  $\leq$  примерно 100 м.д.

93. Композиция по п.92, где содержание НСР в композиции составляет  $\leq$  примерно 50 м.д.

94. Композиция по п.92, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 1; или содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

95. Композиция по п.92, полученная способом по любому из пп.30-83.

96. Способ улучшения периода полувыведения из сыворотки композиции, содержащей множество полипептидов, причем каждый полипептид из множества содержит циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью IL-2R $\alpha$  цепи, где способ включает этапы:

a. приведение осветленного клеточного супернатанта, содержащего полипептид, в контакт с первой АЕХ матрицей в условиях, при которых полипептид связывается с первой АЕХ матрицей, и селективное элюирование полипептида из первой АЕХ матрицы в первый элюат;

b. приведение первого элюата в контакт с НИС матрицей таким образом, что полипептид связывается с НИС матрицей, и селективное элюирование полипептида из НИС матрицы во второй элюат;

c. приведение второго элюата в контакт с ММС матрицей таким образом, что

полипептид связывается с ММС матрицей, и селективное элюирование полипептида из ММС матрицы в третий элюат; и

d. приведение третьего элюата в контакт со второй АЕХ матрицей в условиях, при которых полипептид связывается со второй АЕХ матрицей, и селективное элюирование полипептида из второй АЕХ матрицы, тем самым улучшая время полувыведения композиции из сыворотки.

97. Способ по п.96, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 1; или содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

98. Способ по п.96, дополнительно включающий регулирование рН первого элюата с этапа (а) до по меньшей мере 10,5 и не более 11,5 перед приведением первого элюата в контакт с НИС матрицей на этапе (b).

99. Композиция, содержащая множество полипептидов, где каждый полипептид из множества содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, связанную с одним или более видами гликанов, где один или более видов гликанов связаны с полипептидом в одном или более из аминокислотных положений N187, N206 и T212 SEQ ID NO: 1.

100. Композиция по п.99, где виды гликанов в аминокислотном положении N187 SEQ ID NO: 1 выбирают из группы, состоящей из:

Hex5HexNAc4FucNeuAc2;

Hex6HexNAc5FucNeuAc2;

Hex5HexNAc4FucNeuAc;

Hex6HexNAc5FucNeuAc3;

Hex4HexNAc4FucNeuAc;

Hex5HexNAc5NeuAc2;

Hex5HexNAc4Fuc;

Hex3HexNAc4Fuc;

Hex4HexNAc4Fuc;

Hex6HexNAc5Fuc; и

Hex5HexNAc5Fuc;

где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминную кислоту, Fuc представляет собой фукозу, и число представляет собой номер каждой гликановой структуры.

101. Композиция по п.99, где виды гликанов в аминокислотном положении N206 SEQ ID NO: 1 выбирают из группы, состоящей из:

Hex6HexNAc5FucNeuAc3;

Hex5HexNAc4FucNeuAc2;

Hex6HexNAc5FucNeuAc2;

Hex7HexNAc6FucNeuAc3;

Hex6HexNAc5FucNeuAc;

Hex5HexNAc4FucNeuAc;

Hex5HexNAc4Fuc; и

Hex4HexNAc4Fuc;

где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминую кислоту, Fuc представляет собой фукозу, и число представляет собой номер каждой гликановой структуры.

102. Композиция по п.99, где виды гликанов в аминокислотном положении T212 SEQ ID NO: 1 выбирают из группы, состоящей из:

HexHexNAc;

HexHexNAcNeuAc; и

HexHexNAcNeuAc2;

где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминую кислоту, и число представляет собой номер каждой гликановой структуры.

103. Композиция по п.99, где общий процент гликанов в аминокислотном положении N187 SEQ ID NO: 1 множества полипептидов в композиции включает:

от примерно 60% до примерно 70% Hex5HexNAc4FucNeuAc2;

от примерно 4% до примерно 6% Hex6HexNAc5FucNeuAc2;

от примерно 7% до примерно 10% Hex5HexNAc4FucNeuAc;

от примерно 15% до примерно 17% Hex6HexNAc5FucNeuAc3; и

от примерно 3% до примерно 4% Hex5HexNAc5NeuAc2;

где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминую кислоту, Fuc представляет собой фукозу, и число представляет собой номер каждой гликановой структуры.

104. Композиция по п.99, где общий процент гликанов в аминокислотном положении N187 SEQ ID NO: 1 множества полипептидов в композиции включает:

от примерно 60% до примерно 70% Hex5HexNAc4FucNeuAc2;

от примерно 4% до примерно 6% Hex6HexNAc5FucNeuAc2;

от примерно 7% до примерно 10% Hex5HexNAc4FucNeuAc;

от примерно 15% до примерно 17% Hex6HexNAc5FucNeuAc3;

от примерно 0,5% до примерно 1,5% Hex4HexNAc4FucNeuAc;

от примерно 3% до примерно 4% Hex5HexNAc5NeuAc2;

от примерно 0% до примерно 0,5% Hex5HexNAc4Fuc;

от примерно 0% до примерно 0,5% Hex3HexNAc4Fuc;

от примерно 0% до примерно 0,5% Hex4HexNAc4Fuc;

от примерно 0% до примерно 0,5% Hex6HexNAc5Fuc; и

от примерно 0% до примерно 0,5% Hex5HexNAc5Fuc;

где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминную кислоту, Fuc представляет собой фукозу, и число представляет собой номер каждой гликановой структуры.

105. Композиция по п.99, где общий процент гликанов в аминокислотном положении N206 SEQ ID NO: 1 множества полипептидов в композиции включает:

- от примерно 3% до примерно 5% Hex6HexNAc5FucNeuAc3;
- от примерно 75% до примерно 85% Hex5HexNAc4FucNeuAc2;
- от примерно 2% до примерно 4% Hex6HexNAc5FucNeuAc2;
- от примерно 5% до примерно 12% Hex5HexNAc4FucNeuAc;
- от примерно 1% до примерно 3% Hex5HexNAc4Fuc; и

где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминную кислоту, Fuc представляет собой фукозу, и число представляет собой номер каждой гликановой структуры.

106. Композиция по п.99, где общий процент гликанов в аминокислотном положении N206 SEQ ID NO: 1 множества полипептидов в композиции включает:

- от примерно 3% до примерно 5% Hex6HexNAc5FucNeuAc3;
- от примерно 75% до примерно 85% Hex5HexNAc4FucNeuAc2;
- от примерно 2% до примерно 4% Hex6HexNAc5FucNeuAc2;
- от примерно 0,5% до примерно 1,5% Hex7HexNAc6FucNeuAc3;
- от примерно 0% до примерно 1% Hex6HexNAc5FucNeuAc;
- от примерно 5% до примерно 12% Hex5HexNAc4FucNeuAc;
- от примерно 1% до примерно 3% Hex5HexNAc4Fuc; и
- от примерно 0,5% до примерно 2% Hex4HexNAc4Fuc;

где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминную кислоту, Fuc представляет собой фукозу, и число представляет собой номер каждой гликановой структуры.

107. Композиция по п.99, где общий процент гликанов в аминокислотном положении T212 SEQ ID NO: 1 множества полипептидов в композиции включает:

- от примерно 14% до примерно 18% HexHexNAcNeuAc; и
- от примерно 8% до примерно 13% HexHexNAcNeuAc2;

где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминную кислоту, и число представляет собой номер каждой гликановой структуры.

108. Композиция по п.99, где общий процент гликанов в аминокислотном положении T212 SEQ ID NO: 1 множества полипептидов в композиции включает:

- от примерно 0% до примерно 1% HexHexNAc;
- от примерно 14% до примерно 18% HexHexNAcNeuAc; и

от примерно 8% до примерно 13% HexHexNAcNeuAc<sub>2</sub>;

где Hex представляет собой гексозу, HexNAc представляет собой N-ацетилгексозамин, NeuAc представляет собой N-ацетилнейраминную кислоту, и число представляет собой номер каждой гликановой структуры.

109. Композиция, содержащая множество полипептидов, где каждый полипептид из множества содержит циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью IL-2R $\alpha$  цепи, где композиция имеет профиль капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF), показанный на фиг. 15.

110. Композиция по п.109, которая имеет пик на сIEF профиле при одном или более из примерно pI 5,73, примерно pI 5,93, примерно pI 6,09, примерно pI 6,28, примерно pI 6,38, примерно pI 6,48, примерно pI 6,53, примерно pI 6,66, примерно pI 6,82 и примерно pI 7,02.

111. Композиция по п. 110, которая имеет площадь пика, в процентах:

от примерно 8% до примерно 12% при pI 5,93;

от примерно 18% до примерно 26% при pI 6,09;

от примерно 22% до примерно 26% при pI 6,38; и

от примерно 18% до примерно 28% при pI 6,66.

112. Композиция по п. 110, которая имеет площадь пика, в процентах:

от примерно 1,5% до примерно 2,5% при pI 5,73;

от примерно 8% до примерно 12% при pI 5,93;

от примерно 18% до примерно 26% при pI 6,09;

от примерно 3,5% до примерно 4,5% при pI 6,28;

от примерно 22% до примерно 26% при pI 6,38;

от примерно 3% до примерно 5% при pI 6,48;

от примерно 4% до примерно 6% при pI 6,53;

от примерно 18% до примерно 28% при pI 6,66;

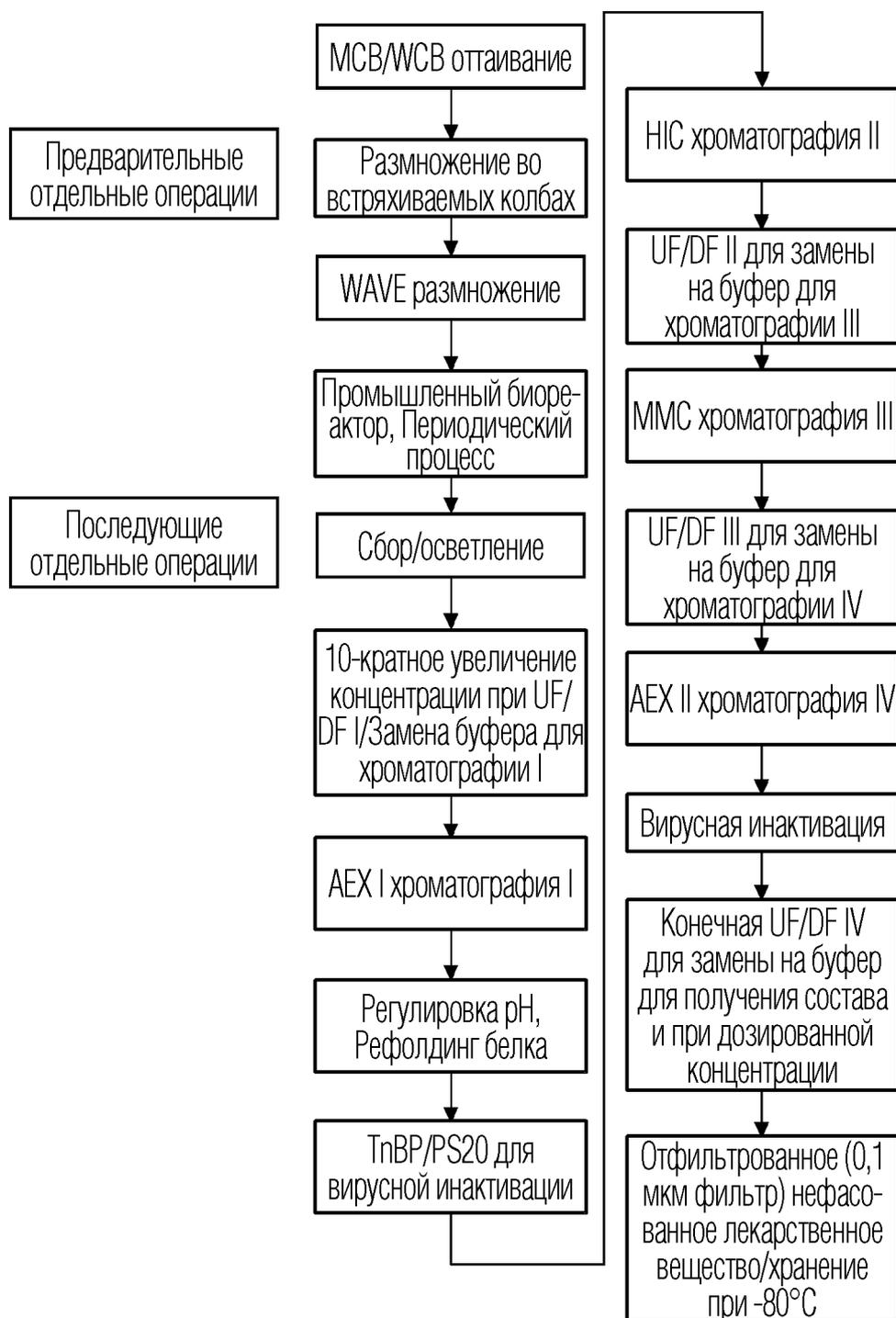
от примерно 2% до примерно 6% при pI 6,82; и

от примерно 0% до примерно 3% при pI 7,02.

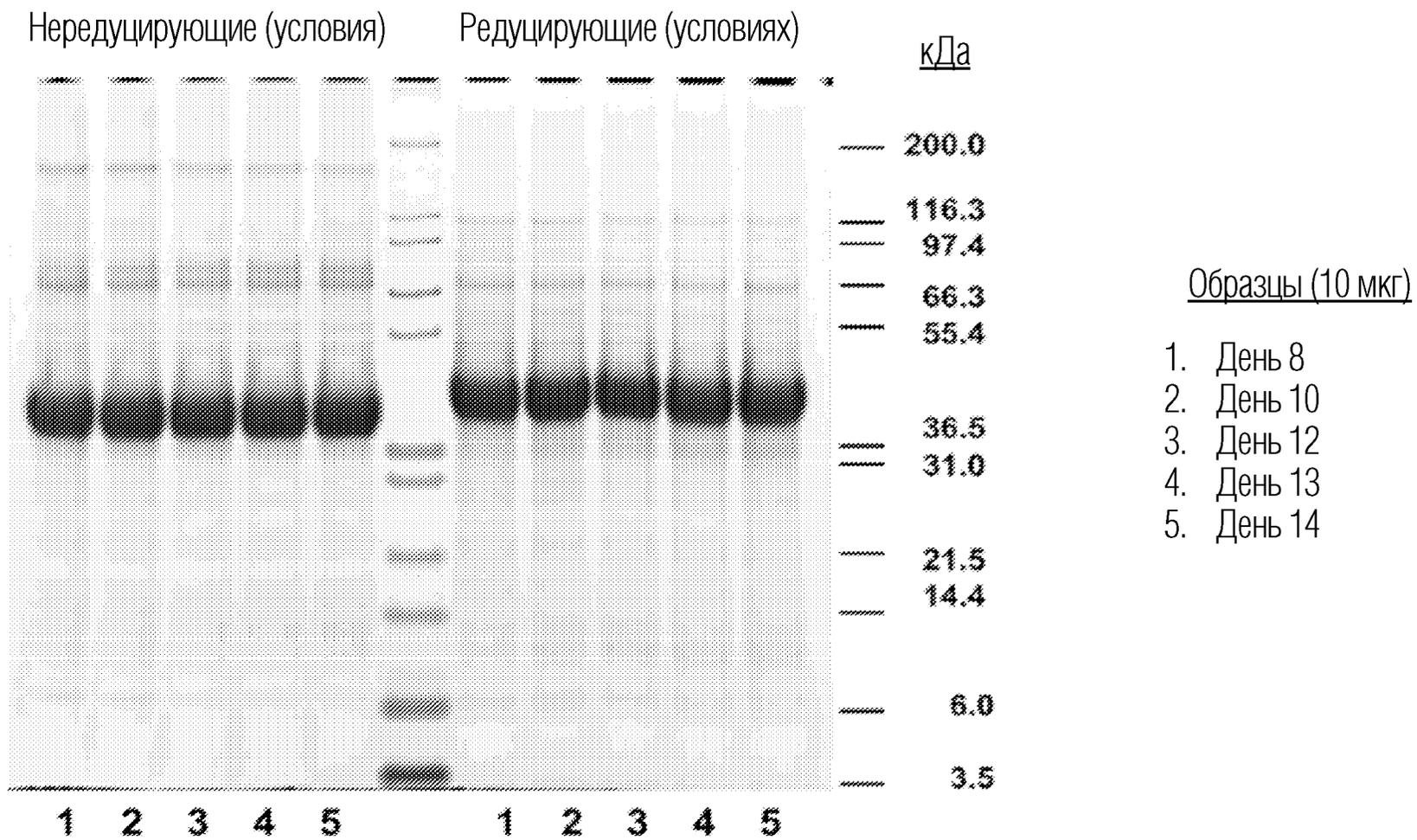
113. Композиция по п.110, где пик при примерно pI 5,73 включает комбинацию пиков при примерно pI 5,70 и при примерно pI 5,76.

114. Композиция по п.110, где пик при примерно pI 5,93 включает комбинацию пиков при примерно pI 5,89 и при примерно pI 5,97.

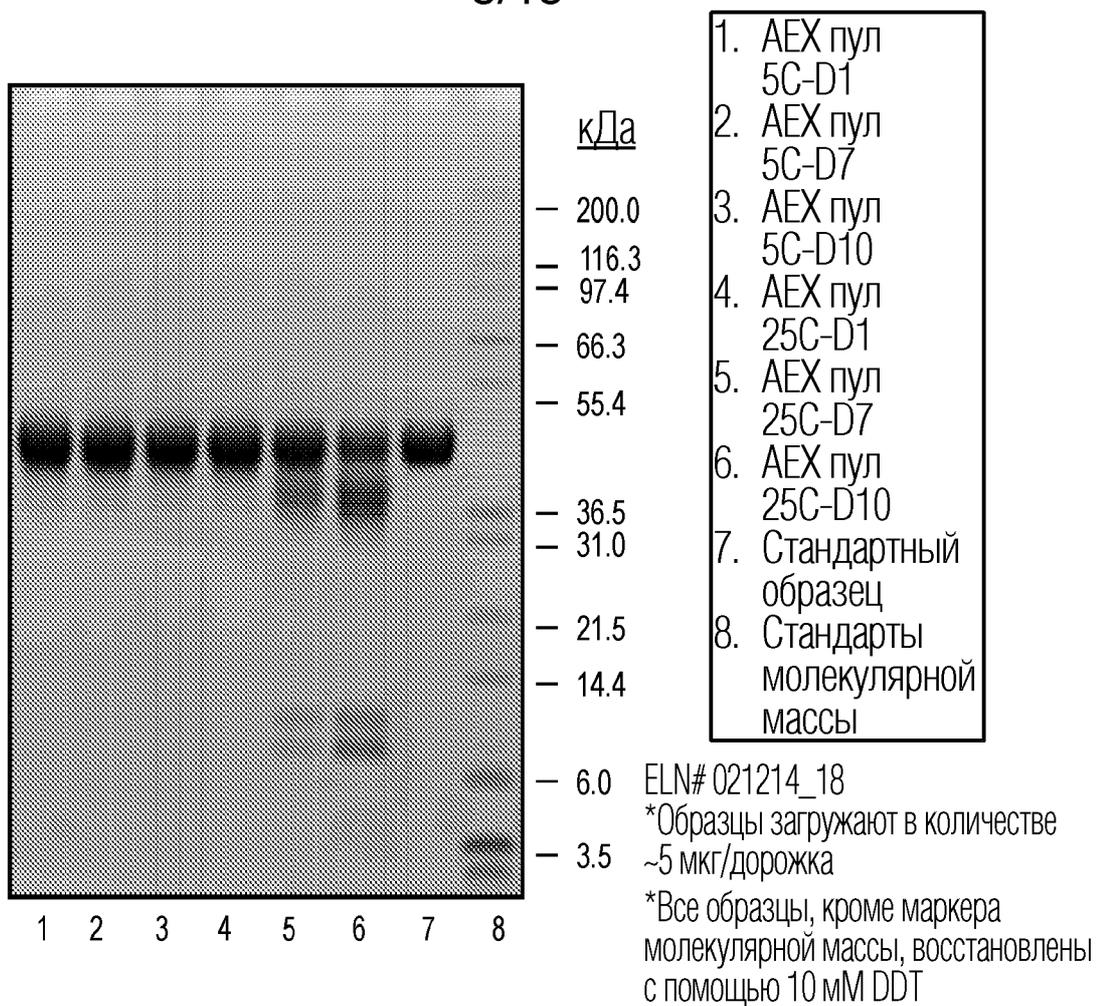
115. Композиция по любому из пп.99-114, полученная способами по любому из пп.1-98.



ФИГ. 1



ФИГ. 2

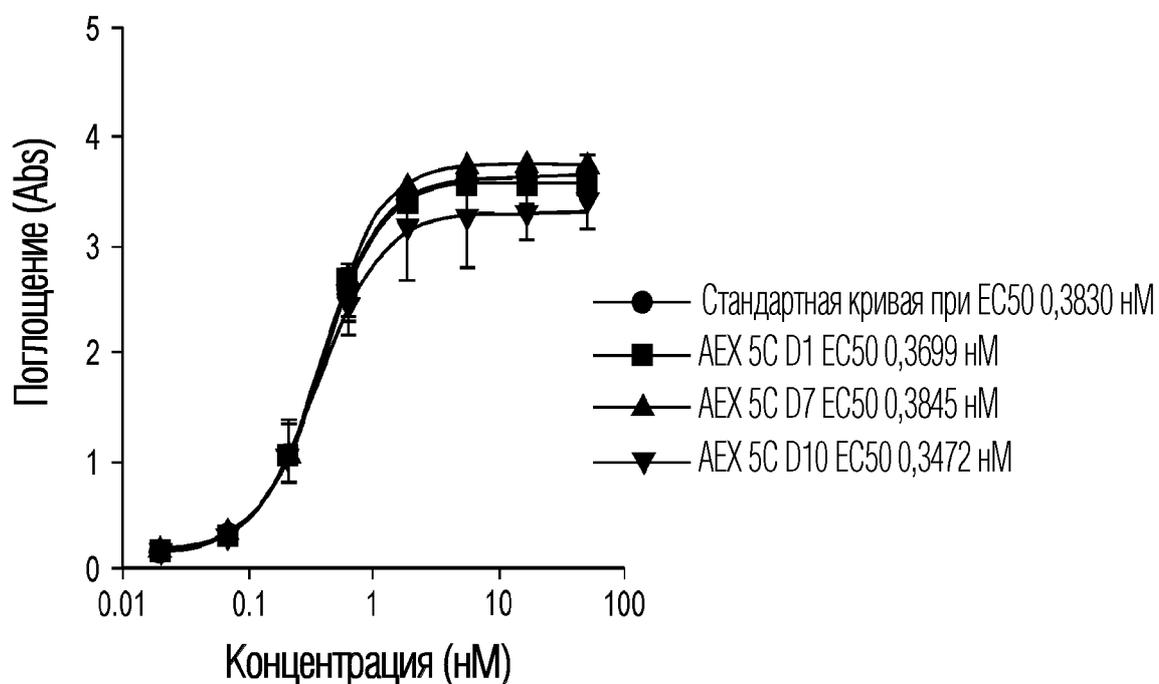


ФИГ. 3А

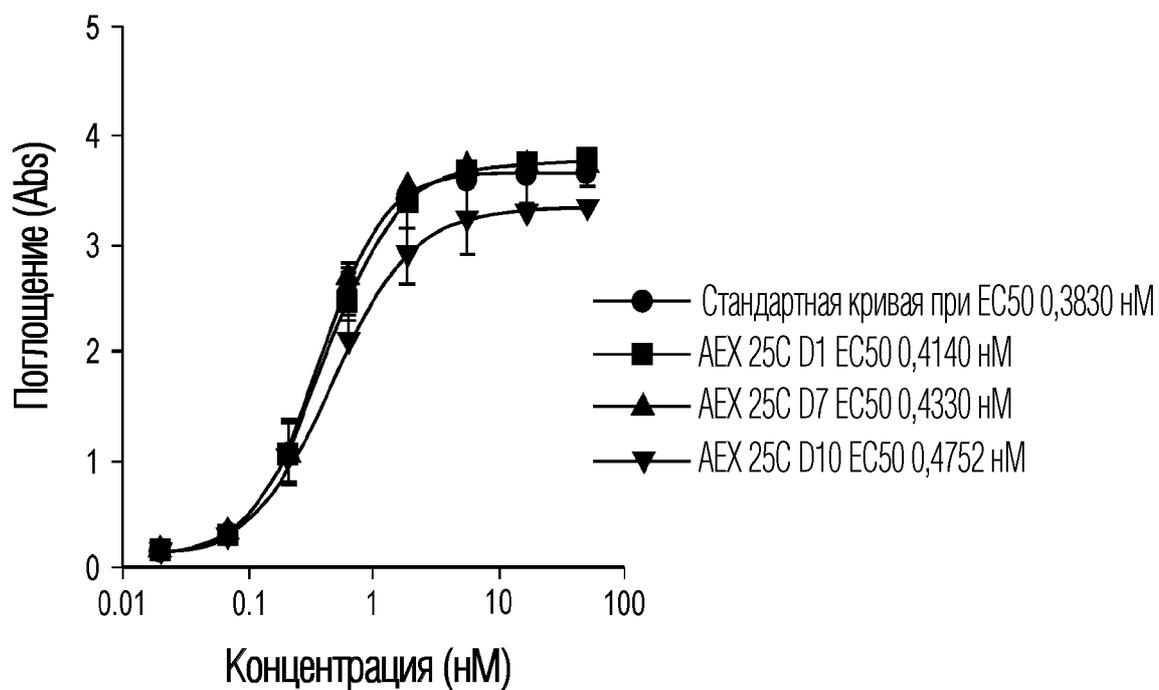


ФИГ. 3В

## 5C pSRAT5 ELISA для оценки стабильности после AEX

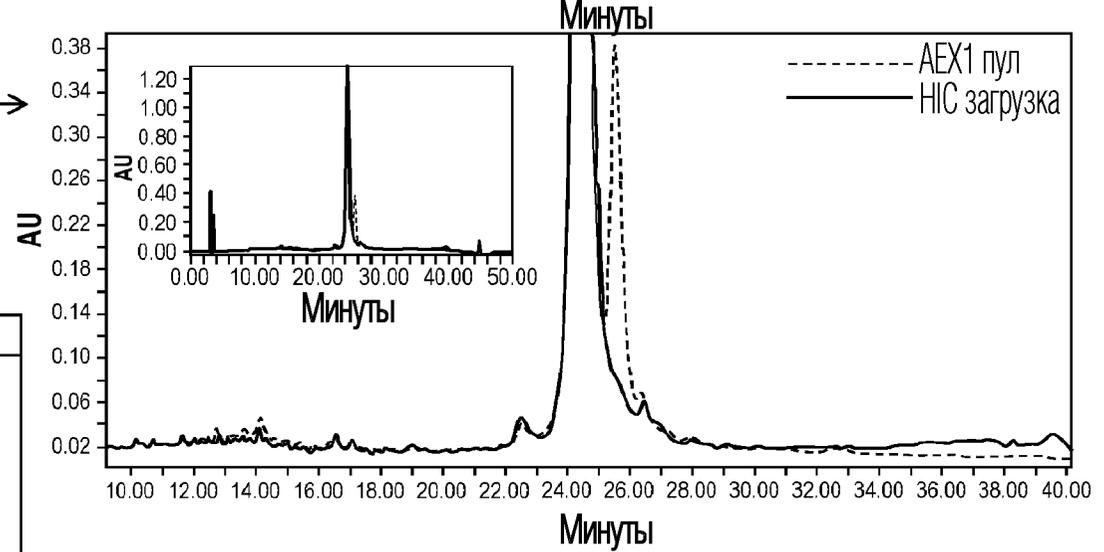
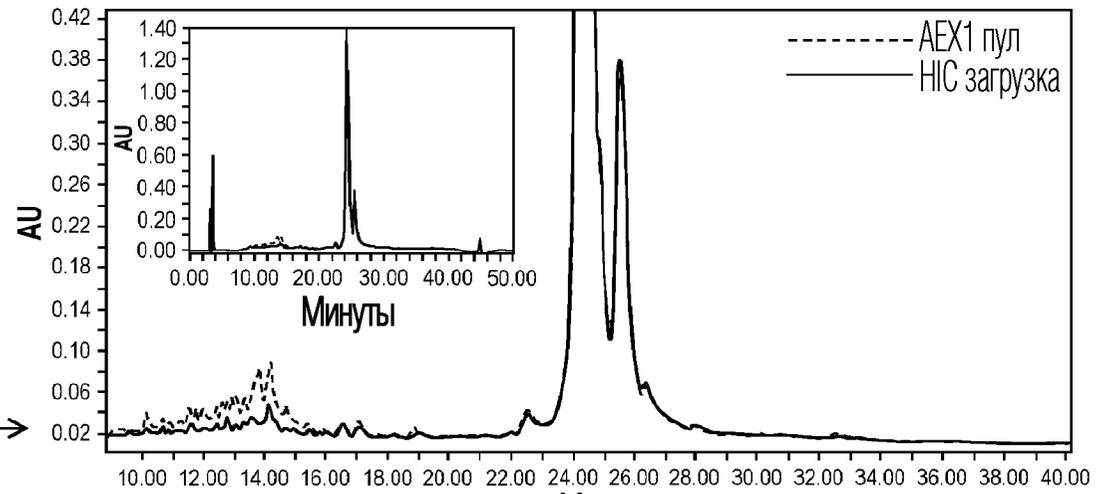
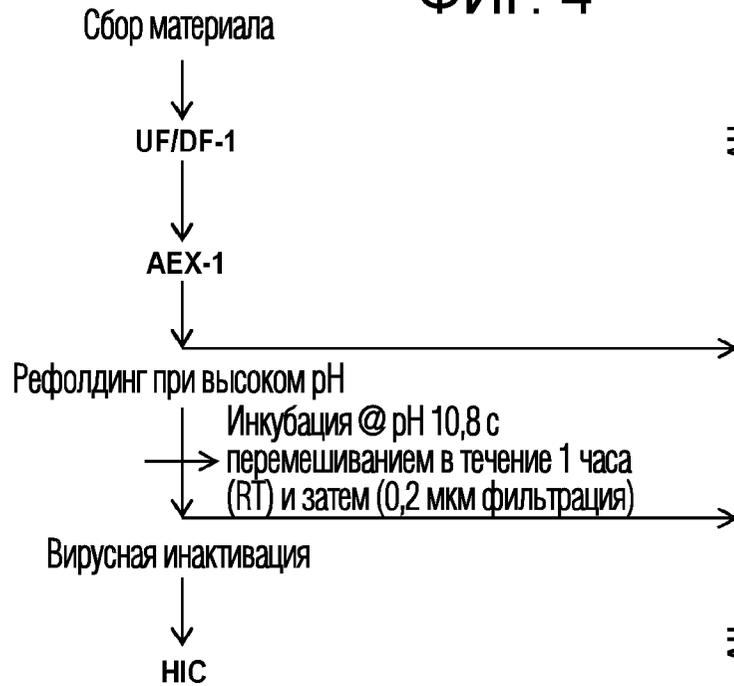


## 25C pSRAT5 ELISA для оценки стабильности после AEX



ФИГ. 3С

ФИГ. 4

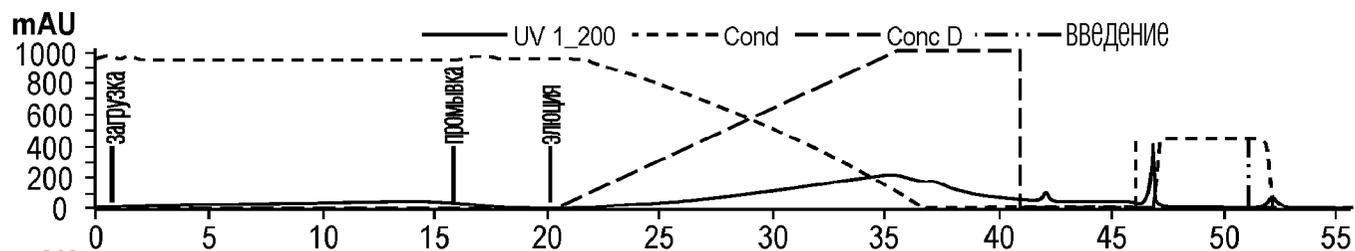


**Обработка при высоком рН**

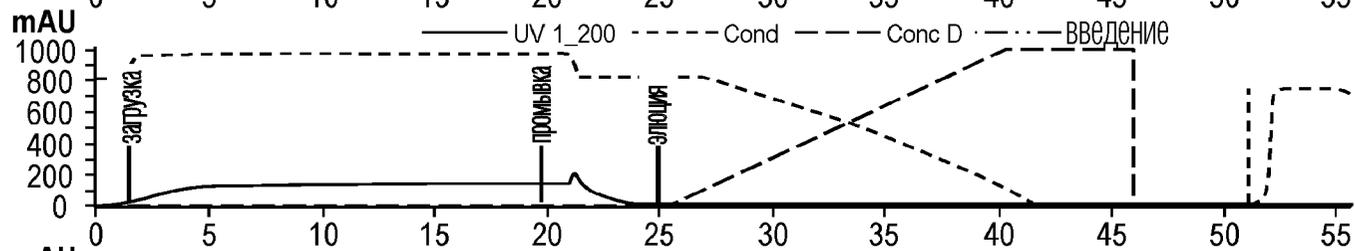
Увеличение рН собранного материала до рН 10,8 с помощью раствора 2M карбоната натрия/0,2M гидроксида натрия.  
 Выдерживание при рН 10,8 и инкубация в течение одного часа при перемешивании  
 Понижение рН до рН 8,5 с помощью 1M лимонной кислоты

— U.V. 280  
 - - - - - Градиент согласно программе  
 - - - - - Градиент соли

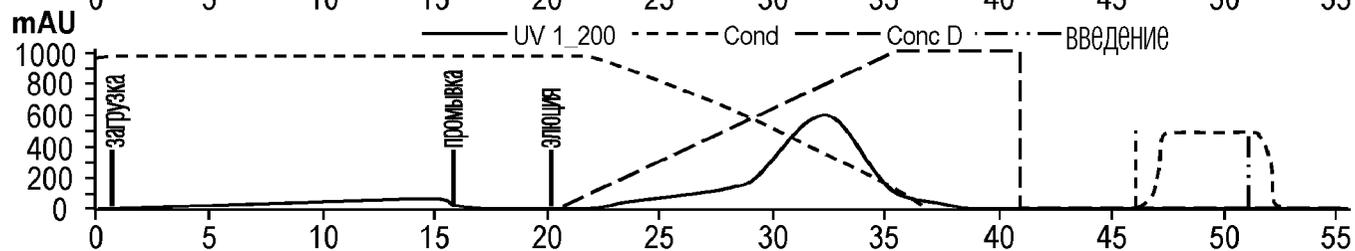
A. TOSOH Butyl - 650M



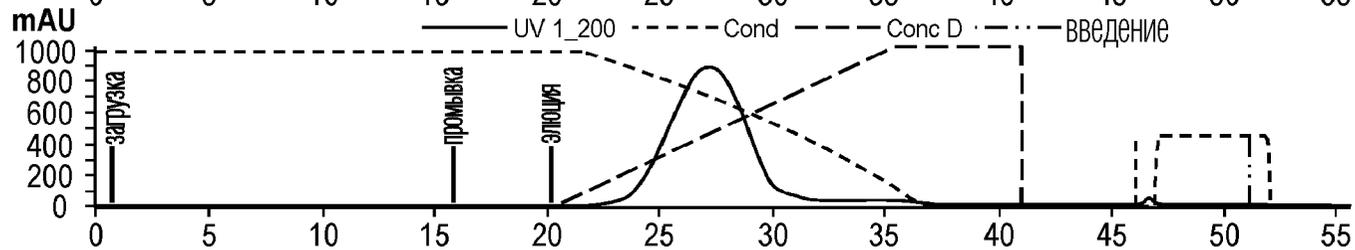
B. TOSOH Phenyl - 650 M



C. TOSOH Hexyl - 650 C

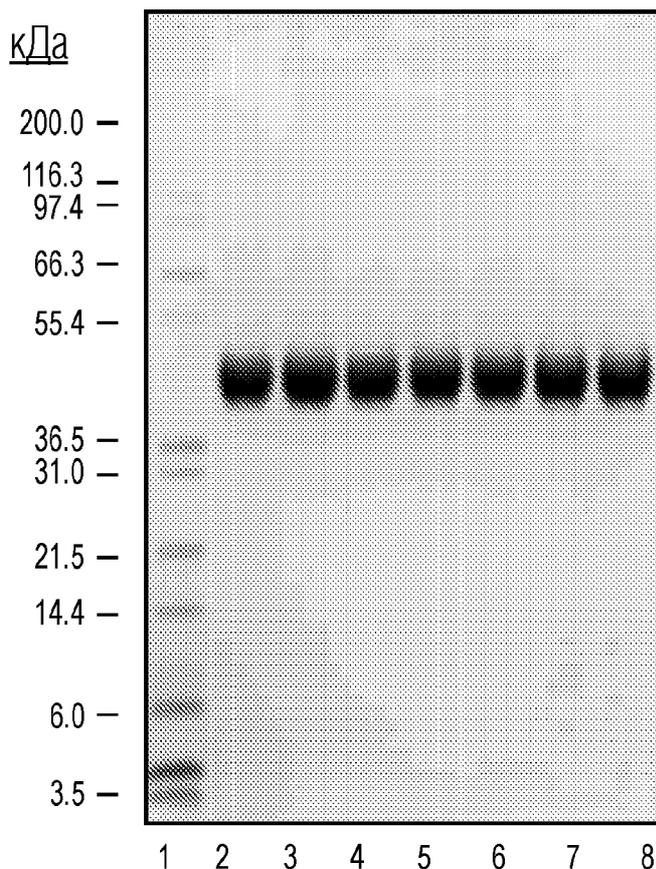


C. TOSOH PPG - 600 M



ФИГ. 5

## Промежуточная стабильность НИС пула



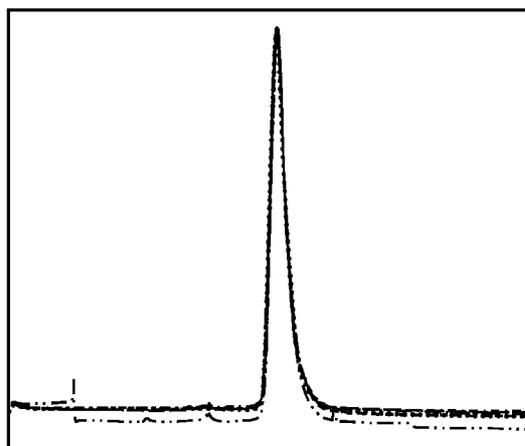
1. Стандарты молекулярной массы
2. НИС t0
3. НИС пул 5C-D1
4. НИС пул 5C-D7
5. НИС пул 5C-D10
6. НИС пул 25C-D1
7. НИС пул 25C-D7
8. НИС пул 25C-D10

ELN# 0211114\_27

\*образцы загружают в количестве ~6 мкг/дорожка

\*Все образцы, кроме маркера молекулярной массы, восстановлены с помощью 10 мМ DDT

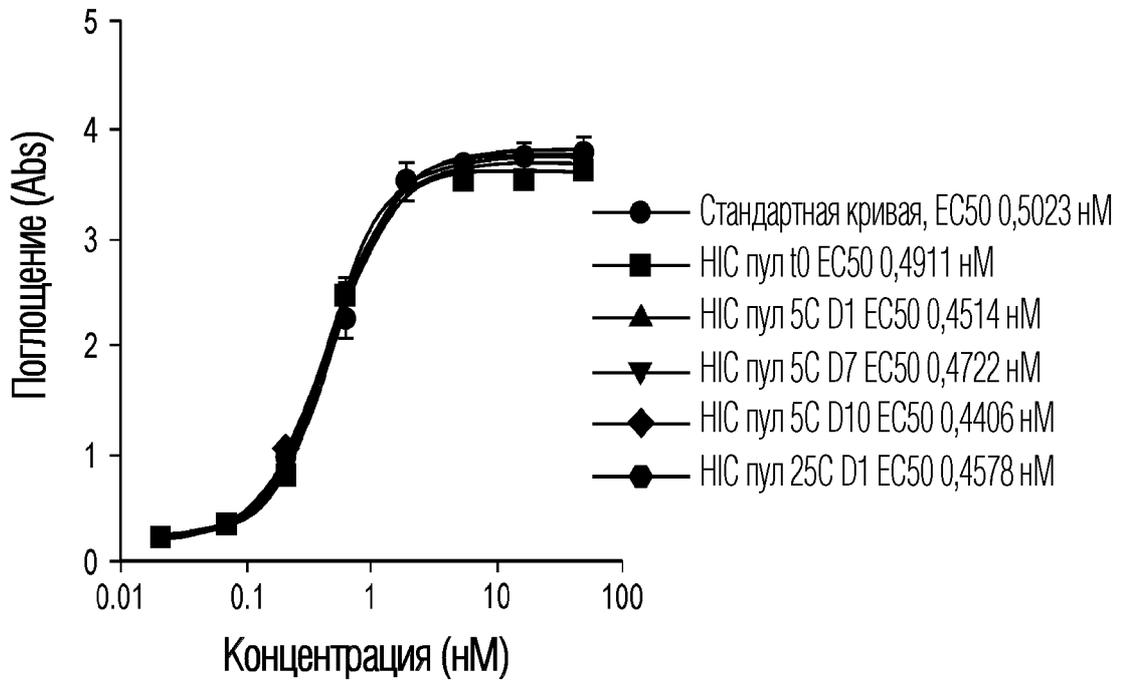
ФИГ. 6А



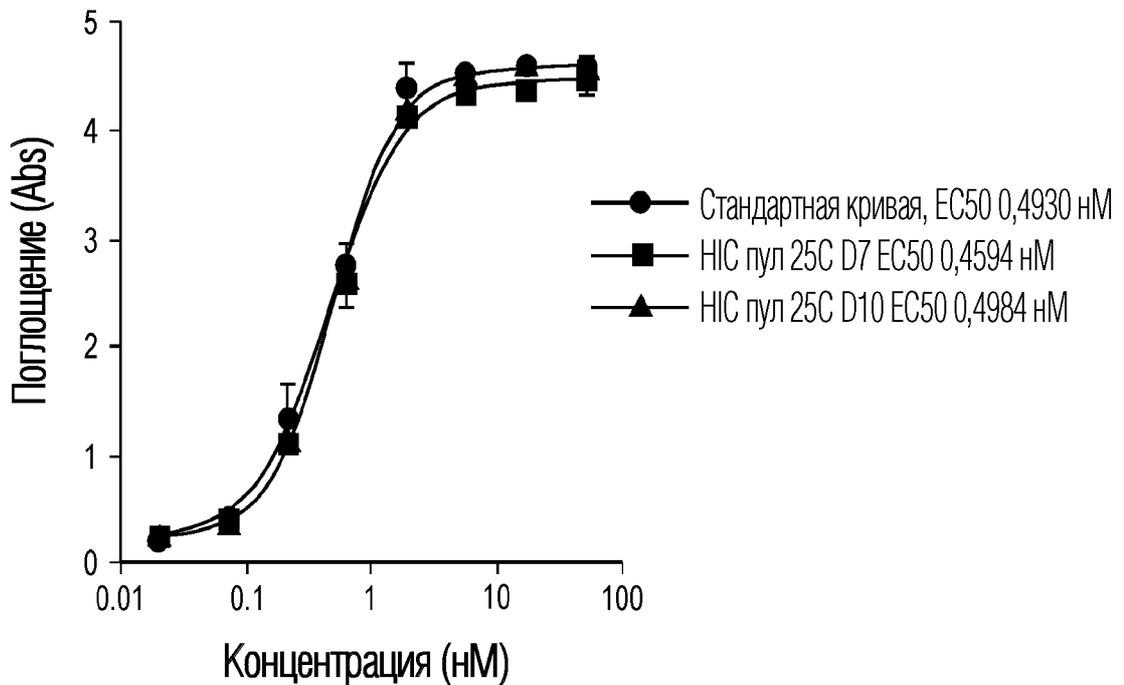
Легенда хроматограммы	Температура инкубации (°C)	День	Чистота, % (ЭВЭЖХ)
.....	5	1	98.2
-----		7	98.1
-----		10	98.1
-----	25	1	97.9
.....		7	98.3
-----		10	98.3

ФИГ. 6В

## 260914\_07 pSTAT5 Анализ Активности



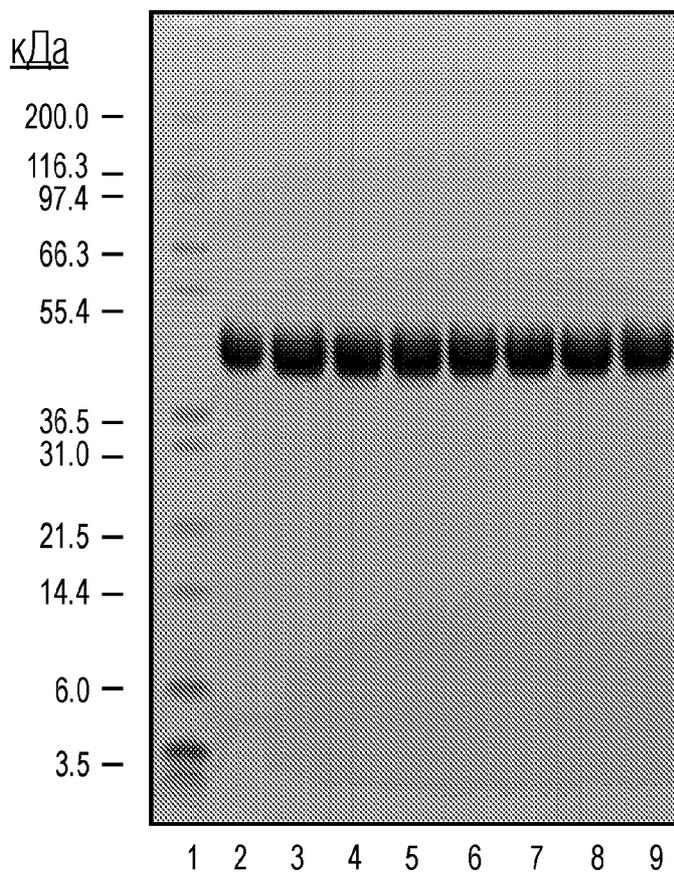
## 260914\_07 pSTAT5 Анализ Активности



ФИГ. 6С

9/18

Промежуточная стабильность ММС пула



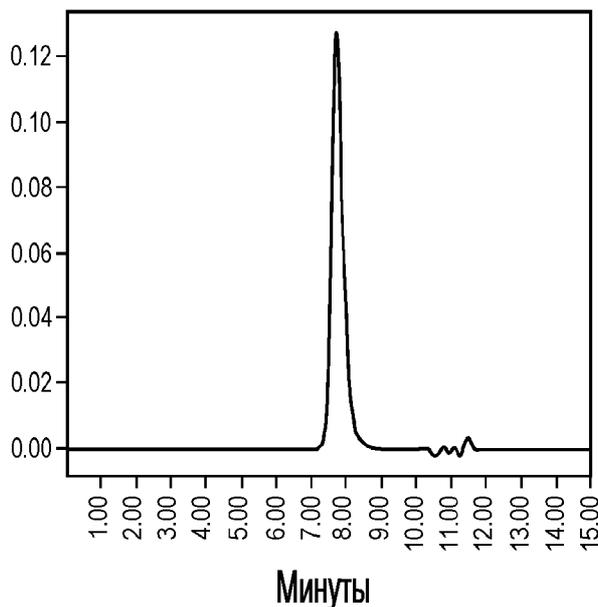
1. Стандарты молекулярной массы
2. стандартный образец
3. ММС t0
4. ММС пул 5C-D1
5. ММС пул 5C-D6
6. ММС пул 5C-D11
7. ММС пул 25C-D1
8. ММС пул 25C-D6
9. ММС пул 25C-D11

ELN# 021214\_18

\*образцы загружают в количестве ~5 мкг/дорожка

\*Все образцы, кроме маркера молекулярной массы, восстановлены с помощью 10 мМ DDT

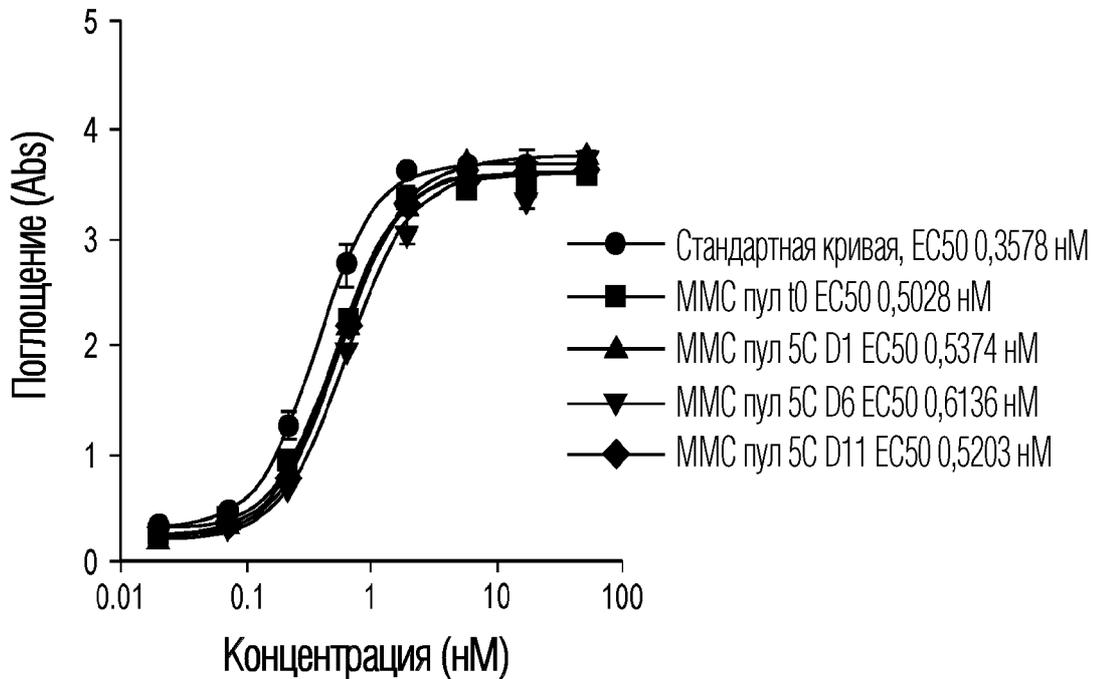
ФИГ. 7А



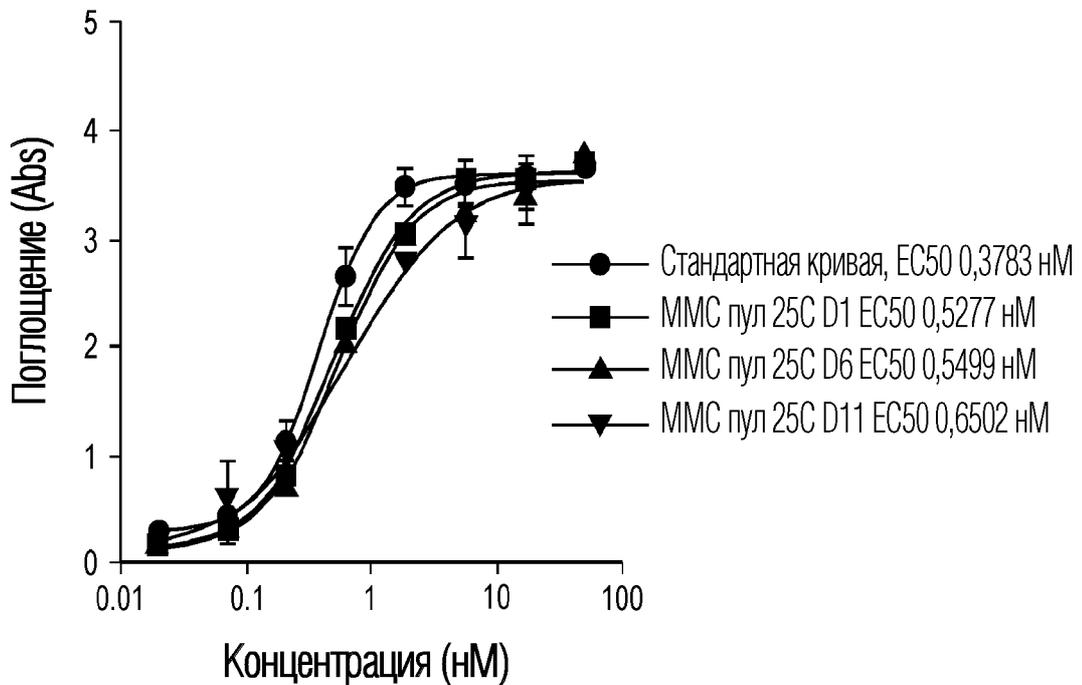
Температура инкубации (°C)	Продолжительность	Чистота, % (ЭВЭЖХ)
2-8	> 4 месяцев	99.8

ФИГ. 7В

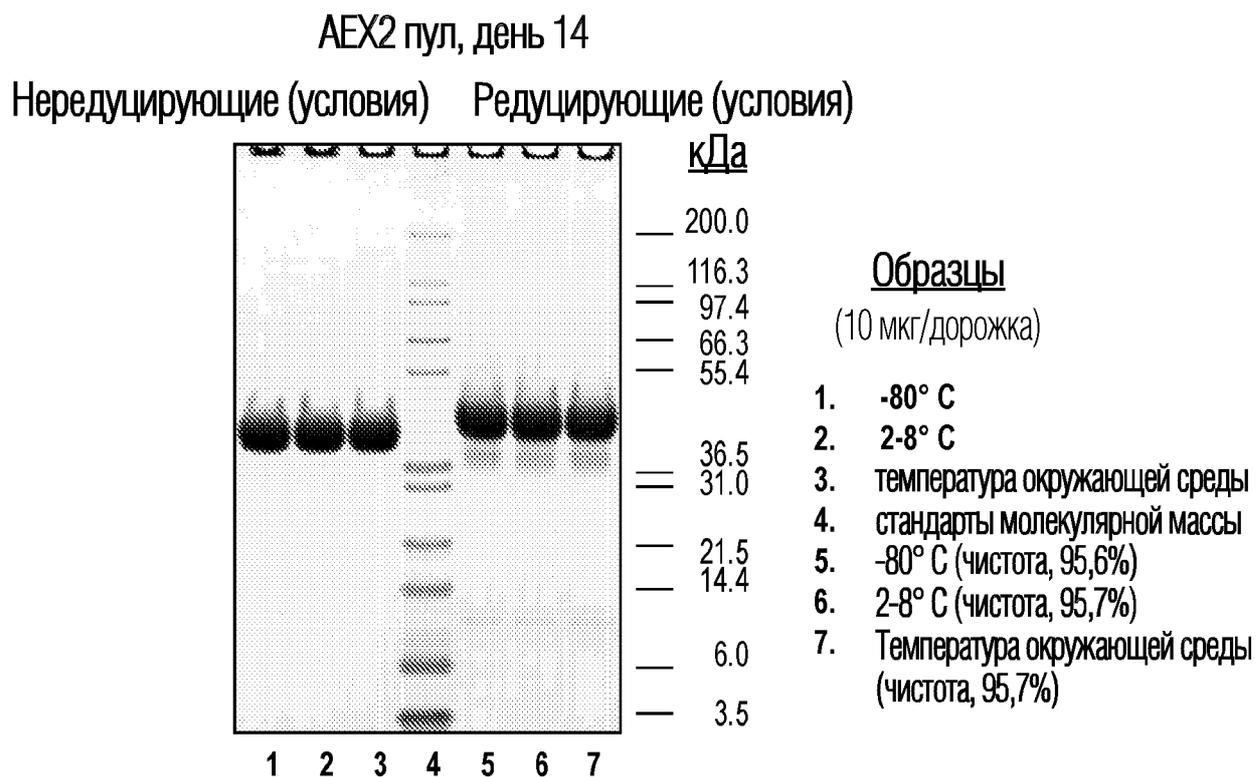
## 260914\_07 pSTAT5 анализ активности



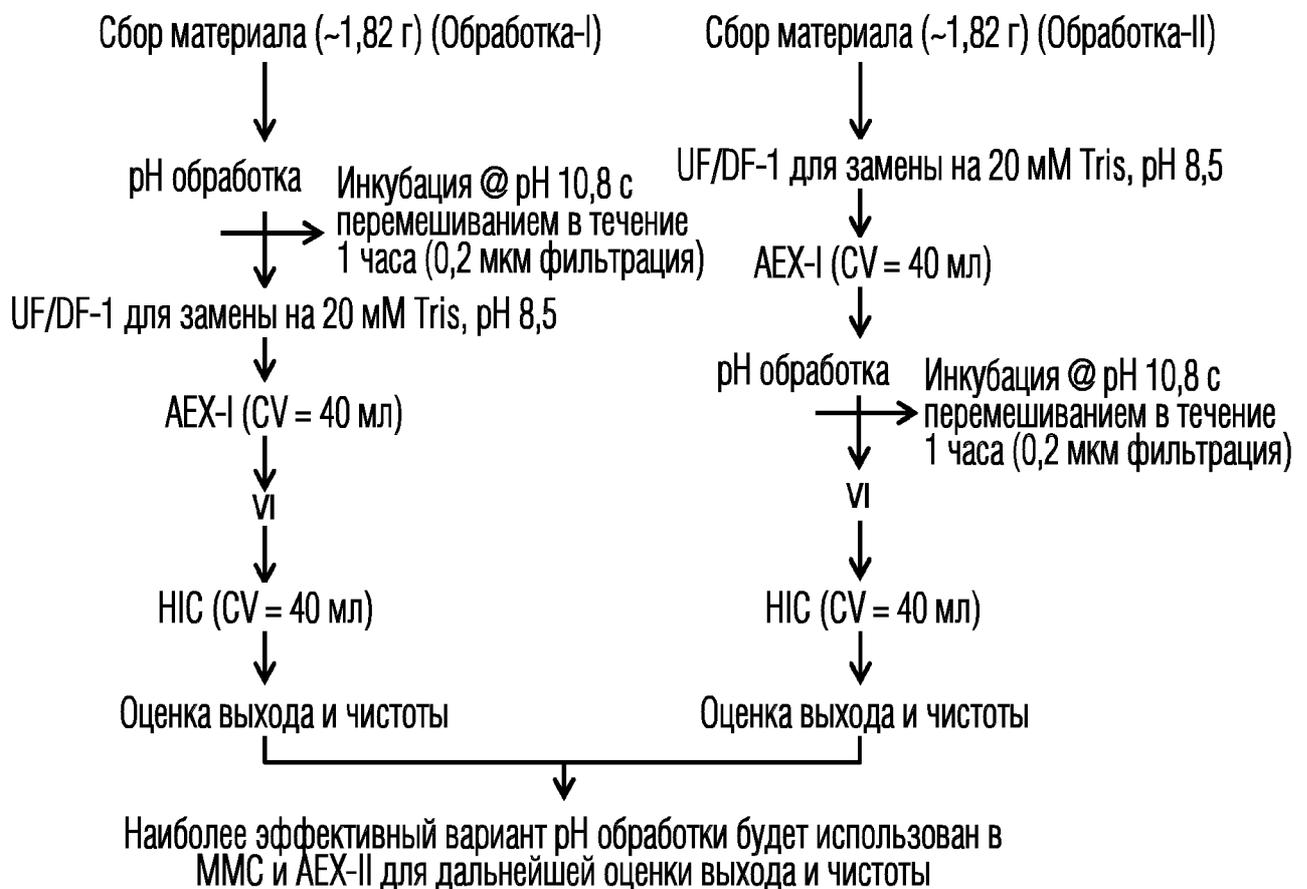
## 260914\_07 pSTAT5 анализ активности



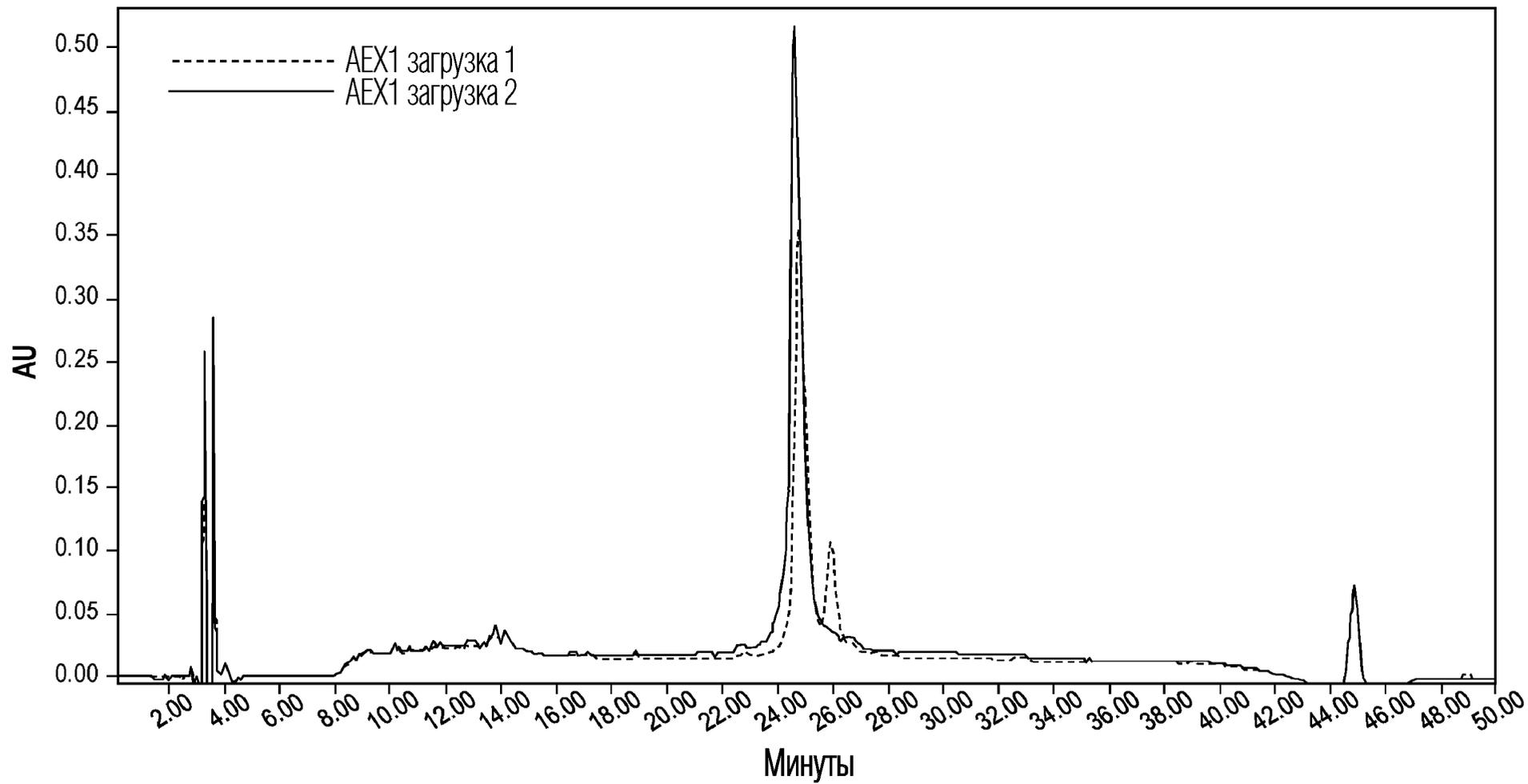
ФИГ. 7С



ФИГ. 8

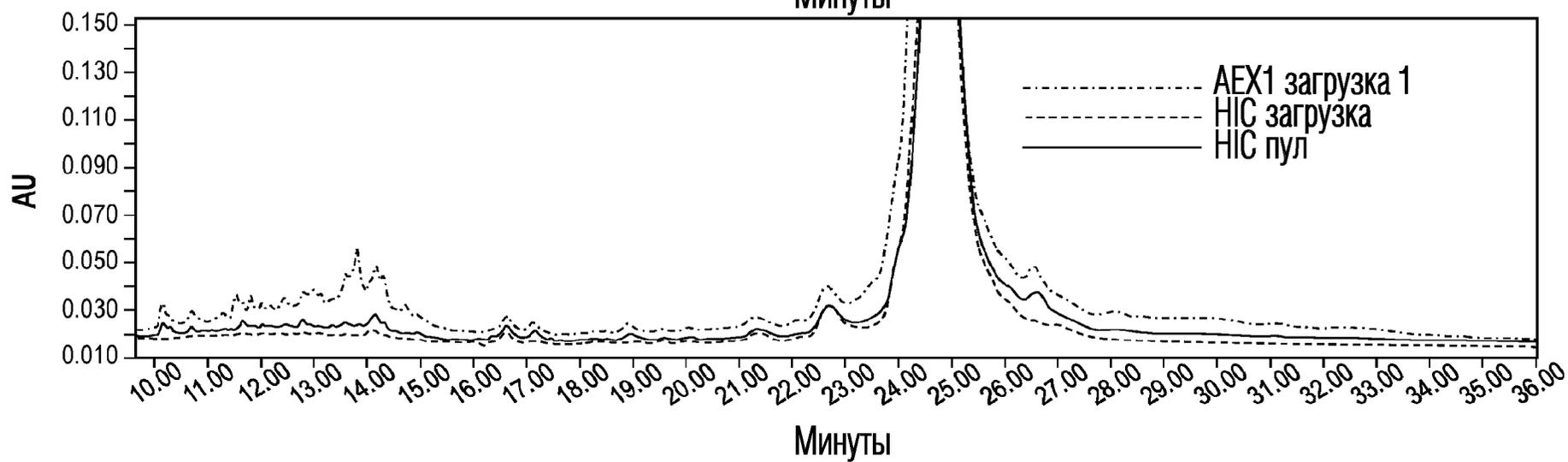
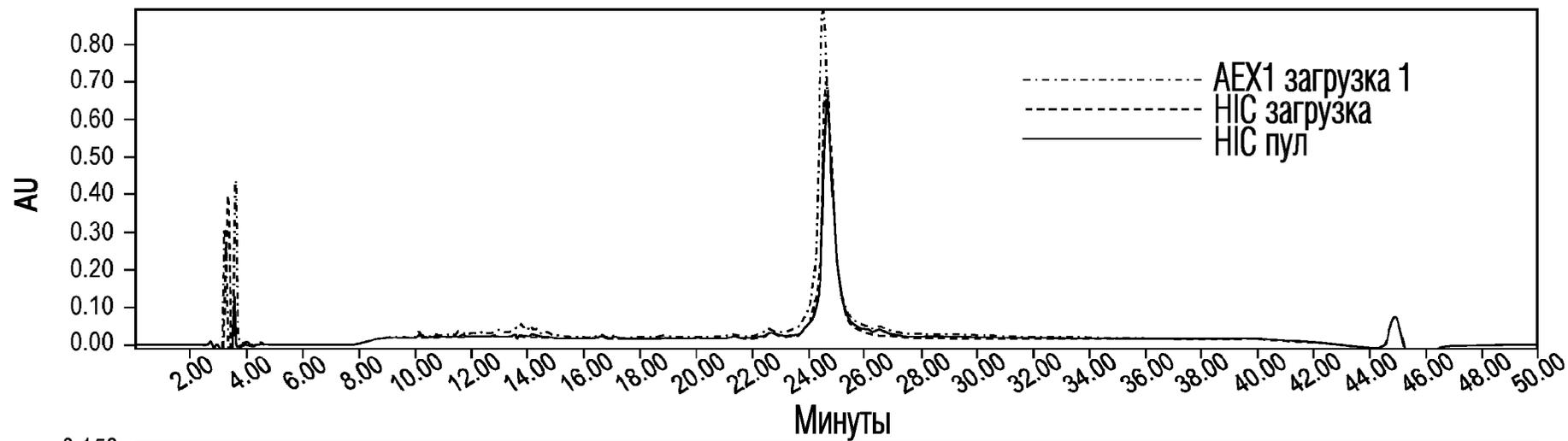


ФИГ. 9

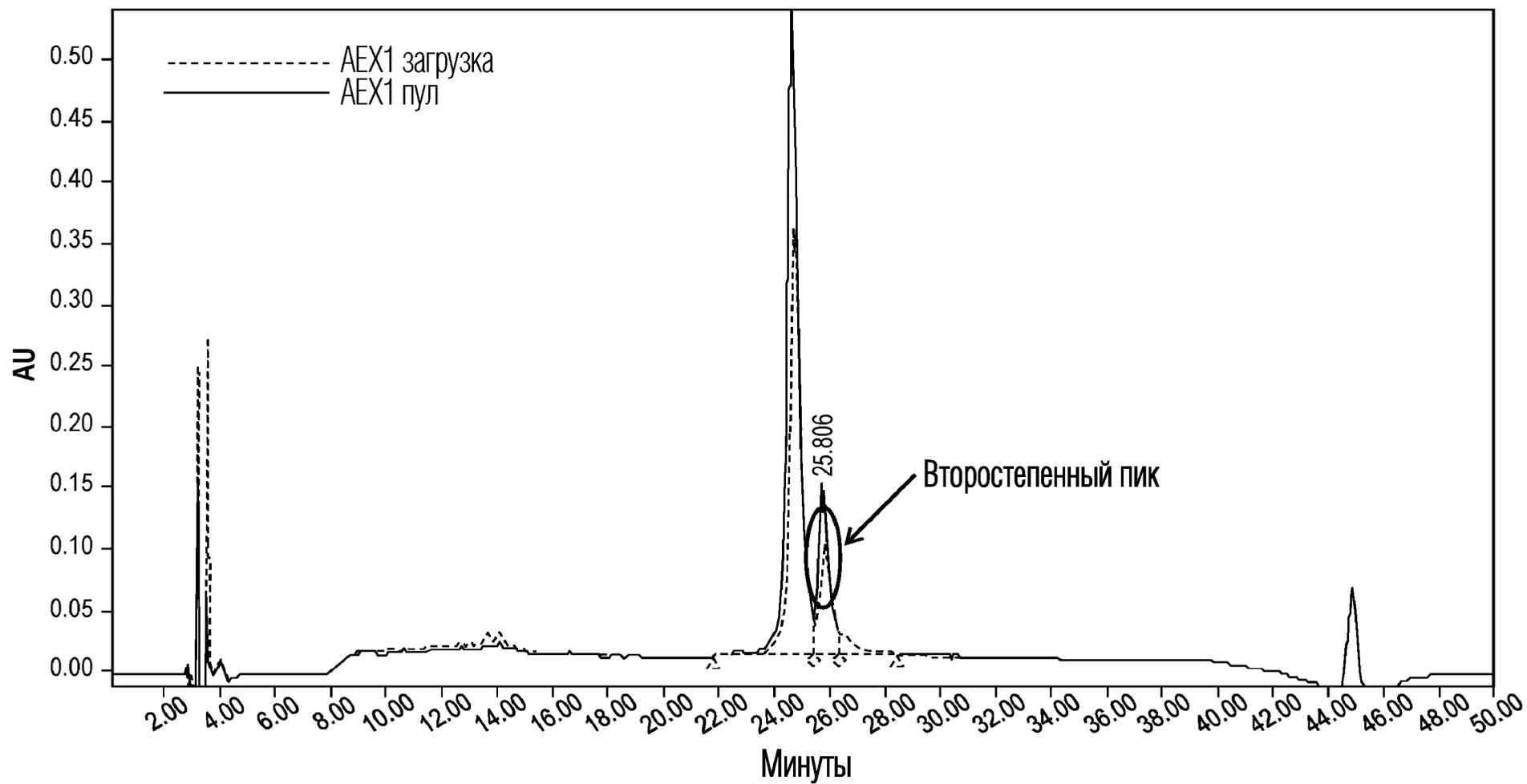


13/18

ФИГ. 10

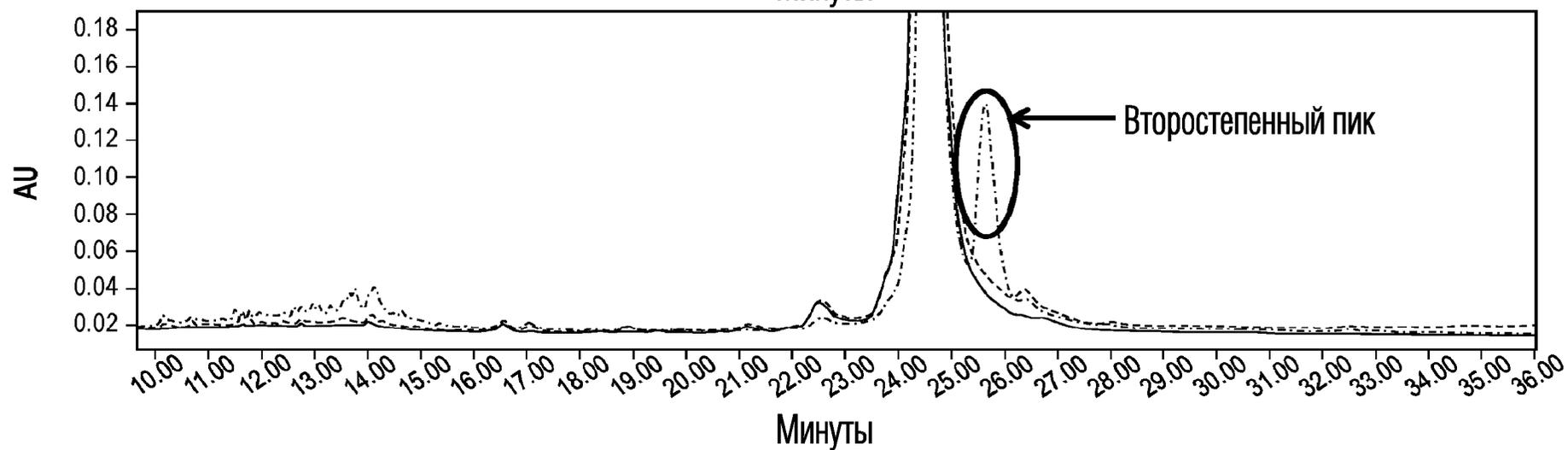
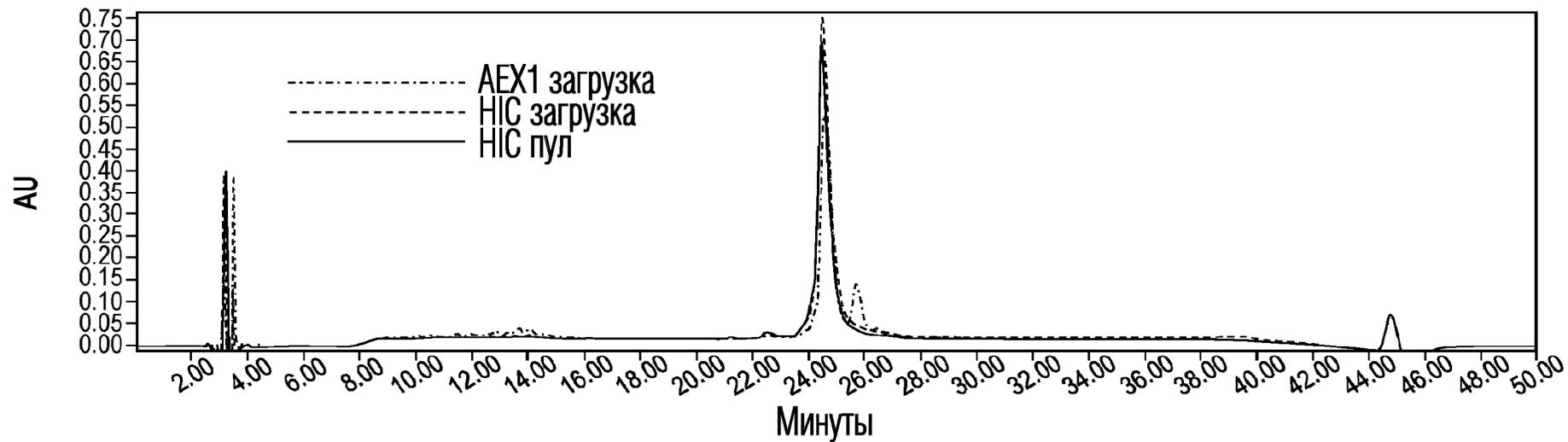


ФИГ. 11



15/18

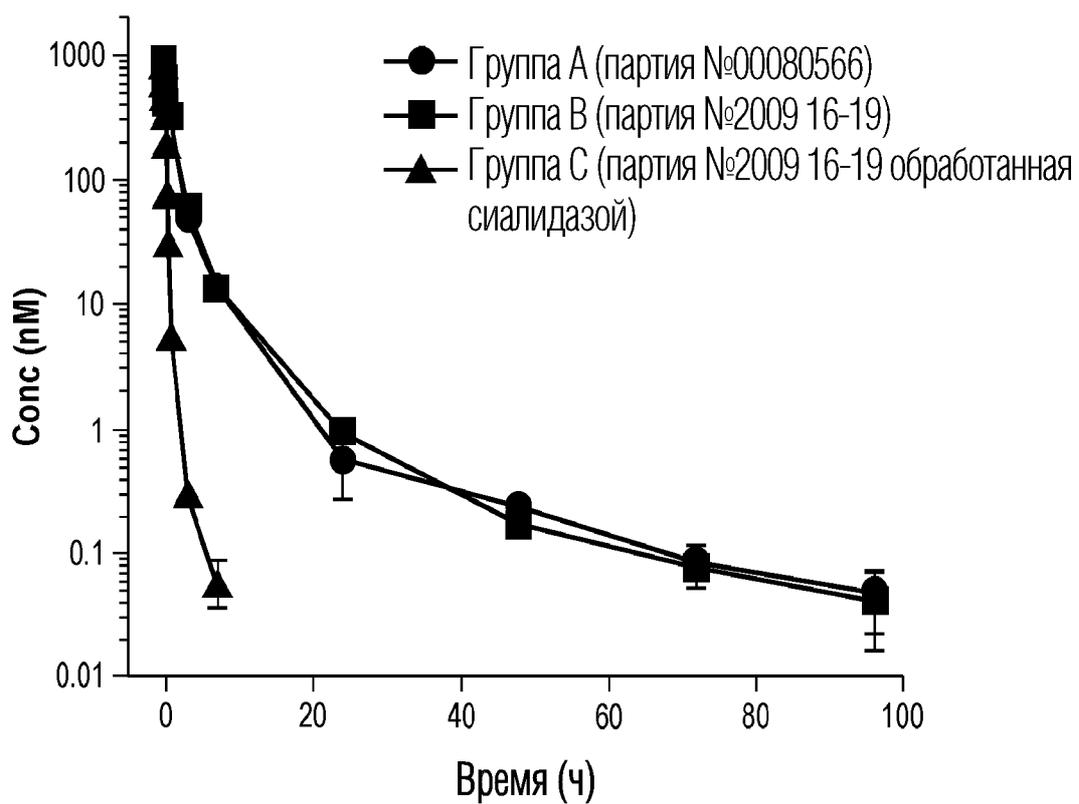
ФИГ. 12



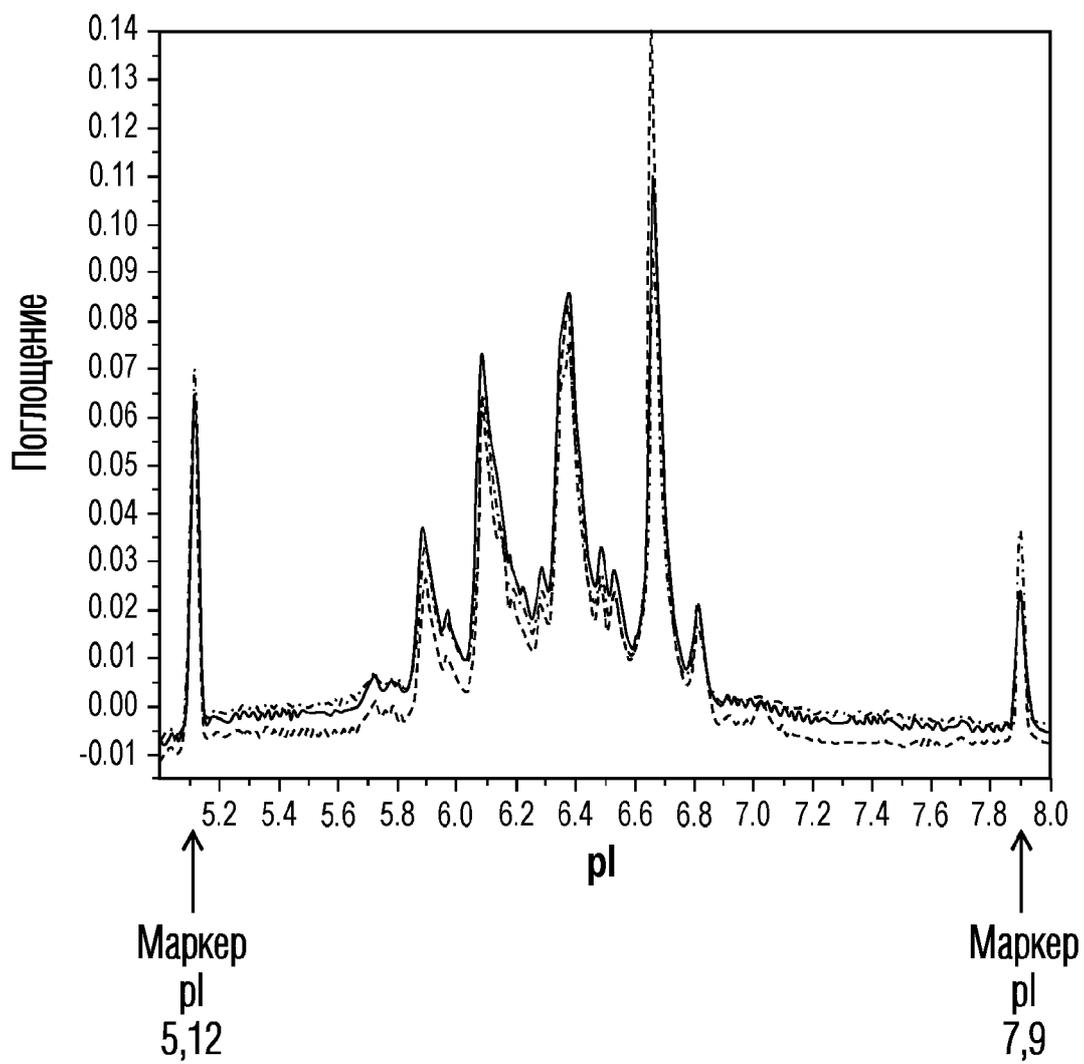
ФИГ. 13

Крысиный полипептид (в/в, 1 мг/кг) Сравнение фармакокинетики 3 разных партий

A



ФИГ. 14



ФИГ. 15