

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043448**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.25

(51) Int. Cl. **C07K 1/18** (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)

(21) Номер заявки
202090262

(22) Дата подачи заявки
2018.07.16

(54) ОЧИСТКА БЕЛКА

(31) **1711481.0**

(32) **2017.07.17**

(33) **GB**

(43) **2020.05.12**

(86) **PCT/EP2018/069298**

(87) **WO 2019/016154 2019.01.24**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮСБ БИОФАРМА СРЛ (BE)

(72) Изобретатель:
Роуз Майкл Гарри (GB)

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

(56) WEN-HUI K. KUO ET AL.: "A new strategy for the on-column exopeptidase cleavage of poly-histidine tagged proteins", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL SCIENCES & APPLICATIONS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 879, no. 28, 30 August 2011 (2011-08-30), pages 3028-3033, XP028307515, ISSN: 1570-0232, DOI: 10.1016/J.JCHROMB.2011.08.041 [retrieved on 2011-09-03] paragraph [02.8]
WO-A1-2016009221
WO-A1-2017140881

PERSSON OLIVER ET AL.: "Design of two-column batch-to-batch recirculation to enhance performance in ion-exchange chromatography", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1531, 21 November 2017 (2017-11-21), pages 112-121, XP085308959, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/J.CHROMA.2017.11.035, the whole document

(57) Изобретение относится к области очистки и, в частности, очистки белка. В изобретении предложены улучшенные способы очистки белков и других биомолекул в промышленных масштабах. Более конкретно, оно относится к способу очистки представляющего интерес соединения, такого как белок, предпочтительно антитело или фрагмент антитела, с помощью стадии хроматографии, предпочтительно стадии полунепрерывной хроматографии.

B1

043448

043448

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области очистки и, в частности, очистки белка. В изобретении предложены улучшенные способы очистки белков и других биомолекул в промышленных масштабах. Более конкретно, оно относится к способу очистки представляющего интерес соединения, такого как белок, предпочтительно антитела или фрагмента антитела, с применением стадии хроматографии, предпочтительно стадии полунепрерывной хроматографии.

Уровень техники

Крупномасштабная промышленная очистка молекул белков и нуклеиновых кислот становится все более важной проблемой для биотехнологической промышленности. Как правило, белки получают путем культивирования клеток при использовании линий клеток млекопитающих или бактерий, модифицированных для продукции представляющего интерес белка путем вставки рекомбинантной плазмиды, содержащей ген этого белка. Поскольку используемые клеточные линии являются живыми организмами, их нужно подпитывать сложной средой для выращивания, содержащей сахара, аминокислоты и факторы роста. Представляющий интерес белок требуется выделять из смеси соединений, питающих клетки, и очищать от побочных продуктов самих клеток (поток сырья) до чистоты, достаточной для применения в качестве терапевтического средства для медицинского применения. Стандарты, установленные органами здравоохранения для белков, предназначенных для введения человеку, в отношении примесей из потока сырья, являются очень высокими.

Промышленную очистку белка обычно производят в очень большом масштабе. Коммерческие биореакторы для получения терапевтических белков, таких как антитела, обычно содержат сотни, тысячи или даже десятки тысяч литров культуральной среды. Клетки обычно выращивают до необходимого уровня, который может быть определен, например, при измерении оптической плотности среды для выращивания при соответствующей длине волны, такой как приблизительно 600 нм, при этом увеличение оптической плотности соответствует повышению концентрации клеток в среде для выращивания.

Как только требуемый уровень достигнут, обычно получают неочищенный белковый экстракт. Неочищенный экстракт может быть получен стандартными способами получения неочищенного экстракта, такими как лизис, фильтрация и/или первичное концентрирование и т.д. Большие объемы среды культивирования, подлежащей обработке из коммерческих биореакторов, дают соответственно большие объемы неочищенного экстракта. Например, клеточная культура объемом 2000 л обычно может давать сотни литров неочищенного белкового экстракта, часто содержащего килограммы целевого белка.

Большие объемы неочищенного белкового экстракта, полученные в методах промышленного синтеза белка, требуют специальных методов очистки. Методы лабораторного масштаба, предназначенные для очистки очень малых объемов (обычно от десятков до сотен миллилитров) неочищенного белкового экстракта (сырья), как правило, плохо удается масштабировать до промышленного уровня из-за сложностей при предотвращении контаминации, необходимости эффективной переработки, требований к автоматизации и т.д. Таким образом, были разработаны методы очистки промышленного масштаба для крупномасштабной очистки биомолекул, таких как белки.

Очистку белков обычно производят с помощью хроматографических методов, таких как аффинная хроматография (которая позволяет разделять белки на основе обратимого взаимодействия представляющего интерес белка и конкретного лиганда, связанного с хроматографической матрицей); ионообменная хроматография (которая позволяет разделять белки на основе неспецифического электростатического взаимодействия их заряженных групп с противоположно заряженными молекулами, присоединенными к хроматографической матрице); вытеснительная хроматография (которая позволяет разделять белки на основе их динамической аффинности к хроматографической матрице); и эксклюзионная хроматография (которая позволяет разделять белки в зависимости от их размера). Одним из общих признаков этих и других хроматографических методов, используемых для разделения биомолекул, является присутствие подходящей разделительной матрицы, часто называемой смолой. Хроматографические матрицы обычно дорогостоящие и имеют ограниченный срок использования из-за необратимого загрязнения, разложения материала матрицы, нежелательных реакций функциональных групп на матрице и т.д. Большие объемы неочищенного белкового экстракта, которые нужно перерабатывать при промышленной очистке белка, требуют соответственно больших количеств хроматографической матрицы. Высокая стоимость таких матриц является фактором, требующим максимально повышать эффективность технологии очистки, насколько это возможно.

Еще одним аспектом, который нужно учитывать при разработке способов очистки белка, являются свойства примесей, которые требуется удалять из представляющего интерес белка. Как правило, неочищенные белковые экстракты содержат примеси, обладающие существенно отличающимися свойствами связывания с хроматографической матрицей по сравнению с целевым белком. Такие примеси обычно легко удаляются. Другие примеси обычно обладают сходными свойствами связывания с представляющим интерес белком. Как правило, такие примеси можно совместно элюировать с матрицы, по меньшей мере, частично с нужным белком, при этом наблюдается некоторая степень перекрытия. Соответственно, исходное сырье, содержащее интересующий белок и примеси, как правило, может рассматриваться как содержащее три компонента: представляющий интерес продукт (то есть биомолекула-продукт);

примеси, которые связываются с хроматографической матрицей слабее, чем целевой продукт; и примеси, которые связываются с хроматографической матрицей сильнее, чем целевой продукт.

Традиционные методы разделения таких компонентов основаны на периодической колоночной хроматографии. Исходное сырье наносят на колонку и собирают элюент с колонки малыми фракциями. Компоненты исходного сырья, которые слабее всего связываются с колонкой, элюируются первыми. Соответственно, в дополнение к фракциям, содержащим только целевой продукт, первые фракции включают как целевой продукт, так и примеси, которые связываются с хроматографической матрицей менее сильно, чем целевой продукт; и последние фракции содержат как целевой продукт, так и примеси, которые связываются с хроматографической матрицей сильнее, чем целевой продукт. Из-за строгих требований к чистоте белков, применяемых в терапевтических целях, такие "перекрывающиеся фракции" (то есть первая и последняя фракции) обычно отбрасывают, что снижает эффективность всего процесса очистки.

Еще одним аспектом традиционных методов хроматографии является понятие перегрузки. Хроматографические матрицы имеют ограниченную связывающую способность. Как только эта емкость превышает, избыточный целевой продукт не может связываться с матрицей и обычно теряется в виде "перегрузки". Кроме того, селективность матрицы обычно снижается по мере приближения к предельной способности связывания. В традиционных методиках образцы с перегрузкой белка могут быть потеряны или должны быть подвергнуты дополнительной обработке, что повышает риск контаминации.

Одной из стандартных промышленных технологий является многоколоночная противоточная очистка в градиенте растворителя (MCSGP). MCSGP представляет собой метод хроматографии, основанный на применении нескольких хроматографических колонок для очистки неочищенных белковых экстрактов до нужного уровня. При MCSGP несколько хроматографических колонок переключают в положение, противоположное направлению потока неочищенного белкового экстракта. Таким образом, неочищенный белковый экстракт вводят в первую колонку, чтобы целевой белок связался с хроматографической матрицей (смолой). После смыва слабо абсорбируемых примесей с матрицы начинается элюирование представляющего интерес белка. Чистые фракции требуемого белка сохраняют, тогда как первые и последние перекрывающиеся фракции направляют во вторую колонку и объединяют со следующей порцией сырья (неочищенного раствора белка). Затем процесс повторяют во второй колонке, а перекрывающиеся фракции направляют в следующую колонку. Теоретически, перекрывающиеся фракции можно направлять обратно в первую колонку, хотя на практике обычно используется последовательность колонок, чтобы обеспечить время для очистки, повторного уравнивания, и т.д., каждой колонки перед повторным использованием. Таким образом, требуемый белок может быть получен с высокой степенью чистоты, поскольку перекрывающиеся контаминирующие фракции подвергаются многократным циклам очистки.

Хотя MCSGP предназначена для крупномасштабного применения в промышленности, она связана со значительными недостатками. Как будет ясно из вышеприведенного описания, MCSGP требует минимум две сопряженные хроматографические колонки, а на практике часто используют больше двух колонок, чтобы максимально повысить эффективность процесса, насколько это возможно. Высокая стоимость матрицы (смола), используемой в хроматографии, означает, что потребность в нескольких колонках значительно повышает стоимость получения белка. Другая проблема, связанная с методом MCSGP, заключается в очень высокой сложности необходимого оборудования, в дополнение к нескольким сопряженным колонкам, сложному устройству управления потоками и управляющему программному обеспечению, а также дополнительному оборудованию для хроматографии, включая поточные смесители, насосы, клапаны, детекторы, при этом для каждой дополнительной колонки требуется корпус, и все это увеличивает стоимость, повышает вероятность отказа какого-либо элемента, усложняет процесс проверки и усложняет диагностику ошибок. Еще одна сложность, связанная с методом MCSGP, заключается в необходимости непрерывной работы процесса. Это может представлять проблему, так как время, необходимое для очистки (например, неочищенных белковых экстрактов из больших объемов культуры), нельзя определить в соответствии со стандартной рабочей практикой; например, это требует, чтобы операторы работали круглосуточно в течение длительных периодов времени. Еще одна проблема заключается в том, что для достижения достаточного разделения требуются низкие скорости потока и/или большие объемы матрицы.

С учетом таких факторов авторы изобретения осознали потребность в улучшенных методах крупномасштабной очистки белка. Таким образом, изобретение предоставляет улучшенный способ очистки белков и других биомолекул в промышленных масштабах, и предназначено для решения некоторых или всех вышеуказанных задач.

Краткое описание изобретения

Хотя MCSGP применяли в крупномасштабной промышленной очистке белка, авторы изобретения осознали, что значительные преимущества достигаются при разделении целевого продукта (то есть биомолекулы-продукта) и рециркуляции перекрывающихся и, необязательно, перегруженных фракций на одной хроматографической матрице, например, на одной колонке. Применение одной матрицы связано со значительными преимуществами по сравнению с известными способами с применением нескольких

колонок. Стоимость требуемой матрицы (смолы) может быть значительно снижена, поскольку требуется только одна колонка, а не несколько колонок. Сложность оборудования (например, устройства управления потоками и управляющего программного обеспечения, требуемого для работы колонок) также значительно снижается, и потребность в оборудовании для хроматографии, таком как поточные смесители, насосы, клапаны, детекторы и т.д., уменьшается. Важно то, что процесс можно вести периодически (асинхронно), что позволяет проводить очистку в рабочие дни и даже прерывать ее на длительные периоды времени. Достаточное разделение также может быть достигнуто при использовании относительно высоких скоростей потока и/или малых объемов матрицы по сравнению с ранее известными методами.

Ранее автор настоящего изобретения в WO 2017/140881 сообщал о хроматографическом способе очистки белков из смесей. Способ, описанный в WO 2017/140881, включает нанесение на хроматографическую матрицу таким образом, что емкость связывания матрицы превышает, что приводит к тому, что проскок, содержащий несвязавшийся белок, проходит через матрицу, после чего проскок повторно наносят на матрицу в следующем рабочем цикле хроматографии. В настоящее время автор настоящего изобретения разработал новый хроматографический метод, который включает нанесение сырья из запаса сырья на хроматографическую матрицу, элюирование продукта и повторное нанесение на матрицу фракций элюата, содержащих как биомолекулу-продукт, так и по меньшей мере одну примесь. Такие способы отличаются от способов, описанных в WO 2017/140881, и связаны со значительными полезными эффектами, включая повышенные выходы при очистке. Способы согласно настоящему изобретению особенно подходят для стадий "заключительной очистки" после первичной частичной очистки сырья из неочищенного экстракта.

Таким образом, в настоящем изобретении предложен способ очистки биомолекулы-продукта (представляющего интерес соединения и, в частности, представляющего интерес белка), который включает более эффективное и рентабельное применение хроматографических матриц с сохранением или повышением выхода и чистоты очищенного соединения.

Таким образом, в изобретении предложен промышленный способ очистки биомолекулы-продукта из запаса сырья, содержащего биомолекулу-продукт и по меньшей мере одну примесь, где способ включает следующие этапы:

- а) нанесение сырья из запаса сырья на хроматографическую матрицу таким образом, что биомолекула-продукт связывается с хроматографической матрицей;
- б) элюирование биомолекулы-продукта с хроматографической матрицы в элюате при нанесении элюирующего раствора на хроматографическую матрицу;
 - где элюат включает
 - первую фракцию, включающую очищенную биомолекулу-продукт; и
 - вторую фракцию, включающую биомолекулу-продукт и по меньшей мере одну примесь, причем вторая фракция включает одну или более головных и/или хвостовых фракций;
 - и где первую фракцию собирают отдельно от второй фракции;
- с) хранение второй фракции в одном или более контейнерах;
- д) нанесение второй фракции из контейнера(ов) и дополнительного сырья из запаса сырья на хроматографическую матрицу таким образом, что биомолекула-продукт во второй фракции связывается с хроматографической матрицей; где дополнительное сырье наносят одновременно или последовательно со второй фракцией; и
- е) элюирование биомолекулы-продукта с хроматографической матрицы в элюате при нанесении элюирующего раствора на хроматографическую матрицу, где элюат включает очищенную биомолекулу-продукт;

где хроматографическая матрица в этапе (а), этапе (б), этапе (д) и этапе (е) является одной и той же хроматографической матрицей.

Предпочтительно в настоящем изобретении биомолекула-продукт представляет собой белок, анти-тело, фрагмент антитела, полинуклеотид или полипептид.

Также предложен способ согласно изобретению, дополнительно включающий смешивание очищенной биомолекулы-продукта с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, разбавителем или адъювантом. В изобретении также предложена очищенная биомолекула-продукт, полученная способом согласно изобретению.

Описание фигур

На фиг. 1 показана принципиальная схема установки для применения в способе согласно настоящему изобретению. Различные жидкие буферные компоненты содержатся в резервуарах и последовательно прокачиваются с помощью клапана через пористую хроматографическую матрицу. После выхода из хроматографической матрицы фракции элюата проходят через детектор, который анализирует отдельные объемы элюата, которые также именуется в настоящем документе как фракции элюата. "Первые фракции", содержащие очищенную биомолекулу-продукт (то есть одна или более фракций элюата, демонстрирующие требуемые свойства представляющего интерес соединения, такие как концентрация указанного соединения или чистота указанного соединения), собирают. Из оставшихся фракций для повторного нанесения на ту же хроматографическую матрицу собирают "вторые фракции", содержащие как

биомолекулу-продукт, так и по меньшей мере одну примесь (т.е. те фракции, которые не демонстрируют требуемых свойств, но при этом содержат представляющее интерес соединение и в принципе пригодны для дальнейшей переработки). На схеме, показанной на фиг. 1, присутствуют две фракции, которые отдельно собирают в контейнеры "Рециркуляция 1" и "Рециркуляция 2".

На фиг. 2-7 показаны диаграммы способов согласно изобретению. Типичное хроматографическое разделение может включать стадию связывания, в которой биомолекула-продукт (представляющий интерес белок/целевое соединение) связывается с иммобилизованной матрицей, и стадию элюирования, в которой биомолекула-продукт (целевое соединение) химически удаляется с матрицы. Между ними, как правило, присутствуют этапы промывки и кондиционирования для удаления дополнительных примесей и сохранения качества матрицы, во время которых эти материалы, как правило, направляют на утилизацию. В способах, показанных на фиг. 2-7, согласно настоящему изобретению смесь, включающая биомолекулу-продукт (представляющее интерес соединение) и по меньшей мере одну примесь, наносят на хроматографическую матрицу, указанную нагруженную хроматографическую матрицу промывают и элюируют биомолекулу-продукт (представляющее интерес соединение) с хроматографической матрицы. Одну или более "первых фракций" элюата, включающих очищенную биомолекулу-продукт (т.е. те фракции, которые демонстрируют требуемые свойства для представляющего интерес соединения, такие как концентрацию указанного соединения или чистоту указанного соединения), собирают и удаляют из процесса в качестве продукта. В способах, показанных на фиг. 2-7, по меньшей мере одну фракцию элюата, предшествующую одной или более первым фракциям, и/или по меньшей мере одну фракцию элюата после одной или более первых фракций повторно наносят на ту же хроматографическую матрицу. Эту процедуру могут повторять несколько раз, при этом процесс, как правило, продолжается до тех пор, пока весь объем смеси, включающей биомолекулу-продукт (т.е. суммарный объем запаса сырья), не будет израсходован.

На фиг. 2 показан пример способа согласно изобретению. После нанесения запаса сырья на хроматографическую матрицу элюируется первая фракция, содержащая очищенную биомолекулу-продукт. Вторая фракция включает головные и/или хвостовые фракции (определенные в настоящем документе), которые необязательно подвергаются обработке (например, разбавлению) перед повторным нанесением на хроматографическую матрицу. Цикл повторяют многократно. Хотя на фиг. 2 показаны повторно наносимые головные и хвостовые фракции, специалистам в данной области будет очевидно, что способ согласно изобретению не требует такого повторного нанесения и тех, и других фракций, например, на матрицу могут повторно наносить только одну из хвостовых (последующих) и/или головных (опережающих) фракций.

На фиг. 3 показан другой пример способа согласно изобретению. В способе, показанном на фиг. 3, по меньшей мере одна опережающая (головная) фракция и/или по меньшей мере одна последующая (хвостовая) фракция подвергается обработке перед их отдельным повторным нанесением на ту же хроматографическую матрицу в следующем рабочем хроматографическом цикле.

В способе, показанном на фиг. 4, по меньшей мере одну опережающую (головную) фракцию и по меньшей мере одну последующую (хвостовую) фракцию объединяют и обрабатывают в виде комбинированной фракции перед повторным нанесением на ту же хроматографическую матрицу в следующем рабочем хроматографическом цикле.

На фиг. 5 показан способ, очень похожий на способ, показанный на фиг. 4, за исключением того, что объем комбинированной фракции элюата значительно увеличен. Общий объем комбинированной фракции может быть увеличен, например, в результате разбавления. Разбавление является примером обработки комбинированной фракции перед ее повторным нанесением на матрицу.

В способе, показанном на фиг. 6, по меньшей мере одну опережающую (головную) фракцию и по меньшей мере одну последующую (хвостовую) фракцию объединяют с дополнительным сырьем из запаса сырья (т.е. с дополнительным объемом или с дополнительной частью объема смеси, наносимой в рабочем хроматографическом цикле на хроматографическую матрицу), и наносят на хроматографическую матрицу. Опять же, эту процедуру могут повторять несколько раз. Хотя на фиг. 6 показано повторное нанесение хвостовых и головных фракций, специалистам в данной области будет очевидно, что способ согласно изобретению не требует повторного нанесения и тех, и других фракций, например, на матрицу могут повторно наносить только одну из хвостовых и/или головных фракций.

В способе, показанном на фиг. 7, по меньшей мере одну опережающую (головную) фракцию и по меньшей мере одну последующую (хвостовую) фракцию объединяют с проскоком (указанным как "Рециркуляция" на фиг. 7). Такой проскок получают, когда вводимый материал, содержащий биомолекулу-продукт (представляющее интерес соединение), наносят на хроматографическую матрицу, пока он не выходит из колонки. На этой фигуре, таким образом, представлен пример перегрузки, как более подробно описано в настоящем документе. Хотя на фиг. 7 показано повторное нанесение хвостовых и головных фракций, специалистам в данной области будет очевидно, что способ согласно изобретению не требует повторного нанесения и тех, и других фракций, например, на матрицу могут повторно наносить только одну из хвостовых и/или головных фракций.

На фиг. 8-14 показаны хроматограммы, зарегистрированные во время многократных циклов способа согласно изобретению. На фиг. 8-14 представлен пример способов согласно изобретению, включающих 7 рабочие циклы (т.е. со ссылкой на способ согласно п.1, этапы (b), (c) и (d) повторяют 5 раз). На

фиг. 8-14 показана воспроизводимость многократных циклов и продемонстрировано, что представляющее интерес соединение (например, биомолекула-продукт) может быть воспроизводимо получено с высоким выходом с применением способов согласно изобретению. На фиг. 8 показана начальная стадия уравнивания хроматографической матрицы с последующей стадией нанесения (этап (a) способов изобретения). После завершения нанесения матрица может быть промыта, а затем представляющее интерес соединение (биомолекула-продукт) элюируется с матрицы, например, при градиентном элюировании (этап (b) способа). Пик, регистрируемый при 260 нм, 280 нм и 305 нм, указывает на элюцию белка с матрицы. На фиг. 9-14 показаны последующие циклы способов изобретения. На фиг. 9-14 стадия нанесения соответствует этапу (d) способов изобретения. Таким образом, на фиг. 8 показана хроматограмма цикла 1 примера. На фиг. 9 показана хроматограмму цикла 2 из примера. На фиг. 10 показана хроматограмма цикла 3 примера. На фиг. 11 показана хроматограмма цикла 4 примера. На фиг. 12 показана хроматограмма цикла 5 примера. На фиг. 13 показана хроматограмма цикла 6 примера. На фиг. 14 показана хроматограмма цикла 7 примера.

На фиг. 15 показано наложение хроматограмм циклов 1-7. На фиг. 15 показан высокий выход целевой биомолекулы в способах согласно изобретению.

Фиг. 16 является диаграммой, на которой показаны перекрывающиеся пики примесей и пики Fab при градиентном элюировании СЕХ, определенные с помощью ВЭЖХ с белком G.

Фиг. 17 является таблицей, в которой приведены % значения выхода Fab в удерживаемых пулах (исследуемые количества в сохраненных пулах (фракции 9-20, интерес преимущественно представляют не содержащие Fab фракции и фракции 23-31, содержащие преимущественно Fab)).

Фиг. 18 является таблицей, в которой приведены % значения выхода долго удерживаемого пика катионообменной хроматографии.

На фиг. 19 представлена таблица, в которой приведено % повышение чистоты в долго удерживаемом пуле катионообменной хроматографии (обратите внимание, что для фиг. 17-19 цикл 7 имеет другой диапазон включенных фракций - 1-8 для ранних пиков и 24-31 для позднего пика).

Фиг. 20 является диаграммой, на которой показано увеличение выхода и чистоты в позднем катионообменном пике в циклах по сравнению с исходными уровнями (следует обратить внимание, что, поскольку объемы в каждой фракции постоянные, увеличение общего выхода также приравнивается к увеличению общей концентрации). Эксперименты, приводящие к получению этих данных, и данные, представленные на фиг. 17-20, описаны в примере.

Подробное описание изобретения

Многие способы очистки белков, известные в уровне техники, содержат стадии, требующие применения, например, низкого или высокого pH, высокой концентрации соли или других экстремальных условий, которые могут необратимо нарушить биологическую активность очищаемого белка и, следовательно, являются неподходящими. Таким образом, выделение требуемого белка достаточной чистоты представляет собой сложную задачу. Исторически сложилось, что схемы очистки белка были основаны на различиях в таких молекулярных свойствах, как размер, заряд и растворимость между очищаемым белком и нежелательными белковыми примесями. Методики, основанные на этих параметрах, включают эксклюзионную хроматографию, ионообменную хроматографию, дифференциальное осаждение и т.п.

Антитела и фрагменты антител приобретают все большее значение в ряде терапевтических областей. Одним из наиболее важных способов получения антител и фрагментов антител является рекомбинантная технология. В таких методах клетка-хозяин используется для экспрессии требуемого антитела, которое затем выделяют из среды для продуцирования и очищают.

Антитела требуют гликозилирования и поэтому их обычно экспрессируют в эукариотических системах экспрессии с использованием эукариотических клеток, в частности клеток млекопитающих, такие как клетки CHO, PER.C6, NS0, BHK или Sp2/0. В эукариотических системах экспрессии экспрессируемый белок, представляющий интерес, такой как антитело, обычно секретируется в среду культивирования клеток. Затем среду можно легко отделить от секретирующих белок клеток, например, с помощью центрифугирования или фильтрации. Представляющий интерес белок обычно требует дополнительной очистки, например, с помощью хроматографии.

Хроматографические матрицы, применяемые для различных методов хроматографии, особенно для процессов очистки крупного, промышленного масштаба, очень дорогостоящие. Обычно их используют повторно после очистки. Из-за агрессивной природы используемых очищающих средств эффективность хроматографической матрицы со временем снижается. Как правило, хроматографические матрицы не очень эффективно используются в данной области, например, поскольку не используется их максимальная способность связывать белок. В уровне техники хроматографические матрицы используют так, что на них наносят целевой белок в количестве ниже их полной способности для повышения выхода. Когда белковые матрицы нагружают представляющим интерес белком до их полной емкости, большое количество целевого белка теряется в проскоке. Из-за высокой стоимости и ограниченного срока службы хроматографических матриц в уровне техники существует потребность в способах, которые обеспечивают оптимальное использование хроматографической матрицы.

Неочищенные препараты белков, полученные в результате крупномасштабных процессов культивирования клеток, обычно не удается очистить за один цикл очистки. Из-за количества очищаемого белка

требуется несколько циклов одного и того же процесса очистки для очистки продукта из культуры клеток. Следовательно, очищаемую белковую смесь часто очищают партиями в нескольких циклах очистки, включающих также несколько циклов хроматографии. Непрерывные процессы также были реализованы в крупномасштабных процессах производства биофармацевтических средств. В непрерывной хроматографии несколько идентичных колонок соединяют в такой конфигурации, которая позволяет колонкам работать последовательно и/или параллельно, в зависимости от требований способа. По сравнению с однокOLONочной или периодической хроматографией, в которых один цикл хроматографии основан на нескольких последовательных этапах, таких как нанесение, промывка, элюирование и регенерация, в непрерывной хроматографии, основанной на применении нескольких идентичных колонок, все эти стадии проходят одновременно, но в разных колонках. Непрерывный процесс хроматографии приводит к лучшему использованию хроматографической смолы, уменьшению времени обработки и уменьшению требований к буферу, и все это способствует экономичности процесса. Конкретный режим работы непрерывной хроматографии называется хроматографией в псевдоподвижном слое (SMB). При хроматографии в псевдоподвижном слое все хроматографические колонки, входящие в систему, периодически и одновременно перемещаются в направлении, противоположном потоку пробы. Перемещение колонок осуществляется путем соответствующего перенаправления входящего и выходящего потока в колонки/из колонок, что требует сложной регулировки. Таким образом, непрерывные хроматографические процессы, такие как процессы SMB, связаны со значительными сложностями.

В уровне техники был описан полунепрерывный хроматографический процесс, в котором вместо одной большой хроматографической колонки использовали несколько небольших колонок, расположенных последовательно, при этом их нагружали до более высокой способности связывания. Проскок с каждой колонки непосредственно вводили в следующую колонку. В альтернативе проскок с первой колонки направляли обратно в первый контейнер, в котором находилась смесь с целевым белком, а затем снова вводили в первую колонку (Mahajan, George et al. 2012). Используемые колонки были очень малого лабораторного масштаба, и авторы пришли к выводу, что хроматография в непрерывном режиме с использованием нескольких колонок обеспечивает преимущества, связанные с уменьшением времени обработки.

Для использования нескольких хроматографических колонок в последовательной схеме требуется сложное устройство управления потоками и управляющее программное обеспечение, а также дополнительное оборудование для хроматографии, включая насосы, клапаны, детекторы и корпус для каждой дополнительной колонки, которые увеличивают стоимость, увеличивают вероятность отказа элементов, увеличивают сложность проверки процессов и усложняют диагностику ошибок. Кроме того, чтобы выровнять проскок с одной колонки до необходимого правильного периода в последовательности с сопряженной приемной колонкой, нужно ввести такие периоды задержки, чтобы они совпадали, что снижает скорость процесса. Поскольку каждая дополнительная приемная колонка должна начинать и прекращать работу в определенное время в последовательности, в результате чего колонки в течение этих периодов будут неактивны, каждый раз при остановке или перезапуске процесса возникает дополнительная потеря производительности.

Таким образом, существует потребность в простых, эффективных и рентабельных процессах очистки белков, например, антител, включающих применение хроматографических матриц. Способы согласно изобретению предназначены для удовлетворения этой потребности.

Способы согласно изобретению

Проблема, лежащая в основе данного изобретения, решается предложенными в настоящем документе способами.

В изобретении предложен способ промышленной очистки биомолекулы-продукта из запаса сырья, включающего биомолекулу-продукт и по меньшей мере одну примесь, включающий следующие этапы:

а) нанесение запаса сырья на хроматографическую матрицу таким образом, что биомолекула-продукт связывается с хроматографической матрицей;

б) элюирование биомолекулы-продукта с хроматографической матрицы в элюате при нанесении элюирующего раствора на хроматографическую матрицу;

где элюат включает

первую фракцию, включающую очищенную биомолекулу-продукт; и

вторую фракцию, включающую биомолекулу-продукт и по меньшей мере одну примесь, где вторая фракция включает одну или более головных и/или хвостовых фракций;

и где первую фракцию собирают отдельно от второй фракции;

с) хранение второй фракции в одном или более контейнерах;

д) нанесение второй фракции из контейнера(ов) и дополнительного сырья из запаса

сырья на хроматографическую матрицу таким образом, что биомолекула-продукт во второй фракции связывается с хроматографической матрицей; где дополнительное сырье наносят одновременно или последовательно со второй фракцией; и

е) элюирование биомолекулы-продукта с хроматографической матрицы в элюате при нанесении элюирующего раствора на хроматографическую матрицу, где элюат включает очищенную биомолекулу-продукт;

где хроматографическая матрица в этапе (а), этапе (b), этапе (d) и этапе (е) является одной и той же хроматографической матрицей.

Как более подробно описано ниже, этап (d) включает нанесение дополнительного сырья из запаса сырья на хроматографическую матрицу одновременно или последовательно со второй фракцией.

Предпочтительно в способе изобретения этапы (b), (с) и (d) повторяют. Предпочтительно этапы (b), (с) и (d) выполняют по меньшей мере два раза, более предпочтительно по меньшей мере три раза, например по меньшей мере четыре раза, как, например, по меньшей мере пять раз, например, по меньшей мере 10 раз или больше. Специалисты в данной области сумеют подобрать соответствующее число повторов этих этапов в зависимости от объема запасов сырья, чистоты биомолекулы-продукта в запасах сырья, свойств примесей, присутствующих в запасах сырья; и т.д.

Будет очевидно, что когда этапы (b), (с) и (d) повторяют один раз, процесс включает три цикла нанесения/элюирования (т.е. первый цикл нанесения в этапе (а); первый цикл элюирования в этапе (b); второй цикл нанесения в этапе (d); второй цикл элюирования во втором этапе (b); третий цикл нанесения во втором этапе (d) и третий цикл элюирования в этапе (е)). Если этапы (b), (с) и (d) повторяют два раза, то способы изобретения включают четыре цикла нанесения/элюирования (т.е. первый цикл нанесения в этапе (а); первый цикл элюирования в этапе (b); второй цикл нанесения в этапе (d); второй цикл элюирования во втором этапе (b); третий цикл нанесения во втором этапе (d); третий цикл элюирования в третьем этапе (b); четвертый цикл нанесения в третьем этапе (d) и четвертый цикл элюирования в этапе (е)). Другими словами, когда этапы (b), (с) и (d) повторяют n раз (где n является положительным целым числом), процесс включает $(n+2)$ циклов нанесения/элюирования.

Предпочтительно этапы (а) и (b) повторяют множество раз. Таким образом, сырье из запаса сырья могут наносить на хроматографическую матрицу во множестве объемов, и первые и вторые фракции, элюируемые с хроматографической матрицы после каждого нанесения сырья. Собранные вторые фракции могут предпочтительно объединять. Этап (с) предпочтительно включает хранение объединенных вторых фракций в одном или более контейнерах. В альтернативе вторые фракции, полученные после каждого повтора этапов (а) и (b), могут отдельно содержать в одном или более контейнерах. Вторые фракции могут затем повторно наносить в одном объеме или во множестве объемов на хроматографическую матрицу таким образом, что биомолекула-продукт во второй фракции связывается с хроматографической матрицей. Предпочтительно, таким образом, этапы (а) и (b) повторяют многократно; вторые фракции, собранные в каждом этапе (b), объединяют вместе; этап (с) включает хранение объединенных вторых фракций в контейнере(ах); и этап (d) включает нанесение объединенных вторых фракций из контейнера(ов) на хроматографическую матрицу таким образом, что биомолекула-продукт в объединенных вторых фракциях связывается с хроматографической матрицей.

Во втором аспекте предложен способ очистки представляющего интерес соединения из смеси, включающей представляющее интерес соединение, где процесс включает следующие этапы:

а) в первом рабочем хроматографическом цикле, нанесение смеси, включающей представляющее интерес соединение, из первого контейнера на хроматографическую матрицу, осуществляемое таким образом, что соединение связывается с хроматографической матрицей;

б) элюирование представляющего интерес соединения с хроматографической матрицы и сбор элюата, содержащего представляющее интерес соединение, в виде фракций элюата;

с) повторное нанесение одной или более фракций элюата на ту же хроматографическую матрицу, осуществляемое таким образом, что представляющее интерес соединение связывается с хроматографической матрицей.

Во втором аспекте, предпочтительно, повторное нанесение в этапе с) является повторным нанесением в другом рабочем хроматографическом цикле одной или больше фракций элюата на ту же хроматографическую матрицу, осуществляемое таким образом, что представляющее интерес соединение связывается с хроматографической матрицей. В соответствии с этим, способ согласно второму аспекту может, таким образом, включать следующие этапы:

а) в первом рабочем хроматографическом цикле, нанесение смеси, включающей представляющее интерес соединение, из первого контейнера на хроматографическую матрицу, осуществляемое таким образом, что соединение связывается с хроматографической матрицей;

б) элюирование представляющего интерес соединения с хроматографической матрицы и сбор элюата, содержащего представляющее интерес соединение, в виде фракций элюата;

с) повторное нанесение в другом хроматографическом цикле одной или более фракций элюата на ту же хроматографическую матрицу, осуществляемое таким образом, что представляющее интерес соединение связывается с хроматографической матрицей.

Предпочтительно во втором аспекте другой рабочий хроматографический цикл является непосредственно следующим хроматографическим циклом.

В альтернативе, в другом варианте осуществления второго аспекта, повторное нанесение в этапе с) является повторным нанесением в том же рабочем хроматографическом цикле одной или более фракций элюата на ту же хроматографическую матрицу, осуществляемым таким образом, что представляющее интерес соединение связывается с хроматографической матрицей. В соответствии с этим процесс может,

таким образом, включать следующие этапы:

а) в первом рабочем хроматографическом цикле, нанесение смеси, включающей представляющее интерес соединение, из первого контейнера на хроматографическую матрицу, осуществляемое таким образом, что соединение связывается с хроматографической матрицей;

б) элюирование представляющего интерес соединения с хроматографической матрицы и сбор элюата, содержащего представляющее интерес соединения, в виде фракций элюата;

с) повторное нанесение в том же хроматографическом цикле одной или более фракций элюата на ту же хроматографическую матрицу, т.е. в первом рабочем хроматографическом цикле, осуществляемое таким образом, что представляющее интерес соединения связывается с хроматографической матрицей.

Предпочтительно представляющее интерес соединения является биомолекулой-продуктом, как определено в настоящем документе.

Из представленного выше обсуждения будет очевидно, что способы согласно изобретению включают нанесение исходного сырья (то есть смеси, содержащей представляющее интерес соединения, то есть биомолекулу-продукт) на матрицу; элюирование биомолекулы-продукта (представляющего интерес соединения) с матрицы; сбор "первых фракций", которые содержат очищенную биомолекулу-продукт (т.е. фракции, обладающие требуемым свойством), и "вторых фракций", которые включают биомолекулу-продукт и по меньшей мере одну примесь (то есть фракции, которые обладают нежелательным свойством); и повторное нанесение одной или более таких вторых фракций на ту же хроматографическую матрицу. Эти и другие аспекты изобретения подробно описаны ниже.

Сохраняемые фракции.

Как описано выше, способы согласно изобретению включают нанесение сырья из запаса сырья на хроматографическую матрицу и элюирование представляющего интерес соединения, т.е. биомолекулы-продукта, с матрицы. Элюат, таким образом, включает одну или более "первых фракций", которые включают очищенную биомолекулу-продукт. Элюат также включает одну или более "вторых фракций", которые включают биомолекулу-продукт и по меньшей мере одну примесь.

Первая фракция(и) также именуется в настоящем документе как "фракции, обладающие требуемым свойством", или "фракции элюата, которые не наносят повторно на ту же хроматографическую матрицу". Вторые фракции также именуется в настоящем документе как "фракции, обладающие нежелательным свойством" или "фракции элюата, повторно наносимые на ту же хроматографическую матрицу".

Специалисты в данной области с легкостью сумеют определить фракции элюата, которые требуется (повторно) нанести на хроматографическую матрицу в этапе (d) способов согласно изобретению, и отличить такие фракции от фракций, включающих очищенную биомолекулу-продукт. Любые подходящие средства могут использоваться для определения фракций элюата, которые требуется (повторно) нанести на хроматографическую матрицу в этапе (d) способов согласно изобретению. Например, фракции, которые требуется (повторно) наносить, могут быть определены путем определения объема полученного элюата или времени выполнения способа (т.е. основанного на предварительно изученном знании свойств запаса сырья и свойств первых и вторых фракций). В альтернативе фракции, которые требуется (повторно) наносить, могут быть определены на основе измерений, выполняемых в ходе осуществления способа. Например, первые фракции предпочтительно содержат минимальную концентрацию биомолекулы-продукта (представляющего интерес соединения) и/или максимальную концентрацию других соединений кроме биомолекулы-продукта, т.е. примесей. Предпочтительно первые фракции содержат минимальную концентрацию биомолекулы-продукта (представляющего интерес соединения).

Аналогичным образом, вторые фракции, которые требуется (повторно) наносить на хроматографическую матрицу в этапе (d) способов согласно изобретению, предпочтительно имеют максимальную концентрацию представляющего интерес соединения или биомолекулы-продукта и/или минимальную концентрацию других соединений кроме представляющего интерес соединения, т.е. примесей. Предпочтительно вторые фракции содержат минимальную концентрацию других соединений кроме представляющего интерес соединения (примесей).

Концентрация белка или любой другой представляющей интерес молекулы в одной или более фракциях элюата и/или в проскоке (см. ниже) может быть измерена в способах согласно изобретению с помощью любого метода, известного в уровне техники, такого как, без ограничения перечисленным, измерение оптического поглощения или флуоресценции.

Представляющее интерес соединения и, в частности, представляющий интерес белок могут быть определены в образце (например, в первой фракции, второй фракции и/или проскоке) в способах согласно изобретению при наблюдении увеличения или уменьшения динамики поглощения в ультрафиолетовой области или сигнала флуоресценции вне стационарного уровня фонового поглощения в ультрафиолетовой области, или сигнала флуоресценции, обусловленного другими белковыми примесями в образце.

Концентрация представляющего интерес соединения и, в частности, представляющего интерес белка в образце (например, в первой фракции, второй фракции и/или проскоке) может быть измерена в способах согласно изобретению по поглощению в ультрафиолетовой области или флуоресценции при любой подходящей длине волны, как известно в уровне техники, например, при 280 нм, и предпочтительно при использовании субоптимальной длины волны возбуждения и/или эмиссии, такой как 290 нм, 300 нм или

310 нм, чтобы обеспечить обнаружение представляющего интерес белка в образце в случае присутствия избыточного сигнала от белковых примесей в образце.

Концентрация представляющего интерес соединения в образце может быть определена в потоке, у потока или вне потока. Определение концентрации в потоке означает, что концентрацию определяют в ходе процесса изобретения, например, с помощью датчика, подключенного к выпуску с хроматографической матрицы, или расположенного на или в контейнере(ах), в который собирают указанный образец, в режиме реального времени. Определение концентрации у потока означает, что концентрацию определяют в образце, отобранном из выпуска с хроматографической матрицы или контейнера(ов), в который собирают указанный образец. Определение концентрации вне потока означает, что концентрацию определяют в образце, отобранном из выпуска с хроматографической матрицы или контейнера(ов), в который собирают указанный образец и измеряют после некоторой задержки на датчике, расположенном удаленно, т.е. в отдельной комнате, от матрицы. Предпочтительно, концентрацию образца определяют в потоке или у потока, более предпочтительно в потоке.

Специалистам в данной области будет очевидно, что концентрация примесей в образце может быть измерена так же, как измеряют концентрацию биомолекулы-продукта в образце.

Специалистам в данной области также будет очевидно, что в изобретении первая фракция(и) отличается от второй фракции(й). Первую фракцию собирают отдельно от второй фракции. Первую фракцию обычно не наносят (повторно) на хроматографическую матрицу, тогда как вторую фракцию наносят (повторно) на хроматографическую матрицу для дополнительной очистки. Первая фракция содержит очищенную биомолекулу-продукт, тогда как вторая фракция(и) содержит биомолекулу-продукт и по меньшей мере одну примесь; то есть вторая фракция(и) не содержит очищенную биомолекулу-продукт.

Используемый в настоящем документе термин "очищенная" биомолекула-продукт не требует обязательно, чтобы биомолекула-продукт являлась на 100% чистой. Очищенная биомолекула-продукт может содержать не более чем приемлемый уровень примесей при условии, что такой уровень ниже, чем уровень примесей в сырье. Очищенная биомолекула-продукт может по существу не содержать примесей (например, являться по меньшей мере на 50% чистой, например по меньшей мере на 70% чистой, более предпочтительно по меньшей мере на 90% чистой, например, по меньшей мере на 95% чистой, по меньшей мере на 97% чистой, предпочтительно по меньшей мере на 98 или 99% чистой, при определении, например, по отношению ко всем биомолекулам во фракции, например, в % по весу). Примеси могут содержать биомолекулы, отличные от биомолекулы-продукта, или могут содержать модифицированную или расщепленную биомолекулу-продукт. Примеси, присутствующие во второй фракции, обычно отличаются от каких-либо примесей, которые могут присутствовать или сохраняться в первой фракции.

Аналогичным образом, с конкретной ссылкой на второй аспект, обсуждаемый выше, одна или более фракций элюата, повторно наносимых на ту же хроматографическую матрицу, отличаются от одной или более фракций элюата, обладающих требуемым свойством. Одну или более фракций элюата, обладающих требуемым свойством, не наносят повторно на ту же хроматографическую матрицу. В рамках настоящего изобретения, как дополнительно описано ниже, такие не наносимые повторно фракции либо дополнительно обрабатывают способом, отличным от хроматографической обработки, либо они готовы к применению. Количество не наносимых повторно фракций будет определять специалист в данной области в зависимости от цели, лежащей в основе хроматографической обработки. Например, если некоторое содержание или концентрация представляющего интерес соединения достигается в одной или более фракциях элюата, такую одну или более фракций не будут повторно наносить на ту же хроматографическую матрицу. Другим критерием для определения того, следует ли повторно наносить одну или более из одной или более фракций элюата на ту же хроматографическую матрицу, является отсутствие или сниженная концентрация нежелательных соединений, таких как, например, примеси.

Головные и хвостовые фракции.

Как описано выше, неочищенные экстракты биомолекул обычно содержат примеси, обладающие аналогичными характеристиками связывания с хроматографической матрицей, что и представляющее интерес соединение биомолекулы-продукта. Профиль элюирования таких примесей обычно перекрывается, по меньшей мере частично, с биомолекулой-продуктом. Таким образом, "головные фракции" включают как биомолекулу-продукт (представляющее интерес соединение), так и примеси, которые связываются с хроматографической матрицей с меньшей силой, чем биомолекула-продукт. "Хвостовые фракции" включают как биомолекулу-продукт (представляющее интерес соединение), так и примеси, которые связываются с хроматографической матрицей сильнее, чем биомолекула-продукт. Головные фракции элюируются с хроматографической матрицы перед биомолекулой-продуктом (представляющим интерес соединением); а хвостовые фракции элюируются с хроматографической матрицы после биомолекулы-продукта (представляющего интерес соединения). Головные фракции также именуется "опережающими фракциями". Хвостовые фракции также именуется "последующими фракциями".

В способах согласно изобретению вторая фракция включает одну или более головных фракций и/или одну или более хвостовых фракций, как определено в настоящем документе.

Предпочтительно вторая фракция включает или состоит из одной или более головных фракций. Другими словами, с конкретной ссылкой на второй аспект, одна или более фракций элюата, повторно

наносимых на ту же хроматографическую матрицу, предпочтительно является по меньшей мере одной фракцией элюата, элюируемой с хроматографической матрицы перед одной или более фракциями элюата, обладающими требуемым свойством. Специалист в данной области сумеет определить количество таких одной или более фракций элюата, элюируемых с хроматографической матрицы перед одной или более фракциями элюата, обладающими требуемым свойством, как более подробно описано в настоящем документе. Другими словами, специалисты в данной области легко сумеют определить подходящие головные фракции для включения во вторую фракцию с целью применения в способе согласно изобретению. Параметры, которые могут использоваться для идентификации подходящих головных фракций для включения во вторую фракцию, включают минимальную концентрацию представляющего интерес соединения или биомолекулы-продукта и/или максимальную концентрацию соединений, отличных от представляющего интерес соединения, то есть примесей; которая может быть определена, как описано выше.

Предпочтительно вторая фракция предпочтительно включает или состоит из головной фракции, непосредственно предшествующей первой фракции. Другими словами, одна или более фракций элюата, отличающихся от одной или более фракций элюата, обладающих требуемым свойством, предпочтительно включают фракцию, элюирующуюся с хроматографической матрицы непосредственно перед одной или более фракций элюата, обладающих требуемым свойством. Таким образом, вторая фракция предпочтительно включает или состоит из фракции, непосредственно граничащей с первой фракцией и элюирующейся с хроматографической матрицы непосредственно перед первой фракцией. При включении такой фракции элюата очистка и/или обогащение представляющего интерес соединения особенно улучшаются. Например, головная фракция, непосредственно предшествующая первой фракции, как правило, содержит более высокие концентрации представляющего интерес соединения/биомолекулы-продукта, чем головные фракции, которые также предшествуют первой фракции. При сохранении таких головных фракций повышается общий выход очистки всего процесса.

Предпочтительно вторая фракция включает или состоит из хвостовой фракции. Другими словами, с конкретной ссылкой на второй аспект, одна или более фракций элюата, повторно наносимых на ту же хроматографическую матрицу, предпочтительно являются по меньшей мере одной фракцией элюата, элюирующейся с хроматографической матрицы после одной или более фракций элюата, обладающих требуемым свойством. Как и в том случае, когда вторая фракция будет включать или будет состоять из головной фракции (описанной выше), специалисты в данной области с легкостью сумеют определить подходящие хвостовые фракции для включения во вторую фракцию с целью применения в способе согласно изобретению. Параметры, которые могут использоваться для определения подходящих хвостовых фракций для включения во вторую фракцию, включают минимальную концентрацию представляющего интерес соединения или биомолекулы-продукта и/или максимальную концентрацию других соединений кроме представляющего интерес соединения, т.е. примесей; которая может быть определена, как описано выше.

Предпочтительно вторая фракция включает или состоит из хвостовой фракции, следующей непосредственно после первой фракции. Другими словами, одна или более фракций элюата, отличающегося от одной или более фракций, обладающих требуемым свойством, предпочтительно включают фракцию, элюирующуюся с хроматографической матрицы непосредственно после одной или более фракций элюата, обладающих требуемым свойством. Таким образом, вторая фракция предпочтительно включает или состоит из фракции, непосредственно граничащей с первой фракцией и элюирующейся с хроматографической матрицы непосредственно после первой фракции. Как и в случае с повторным нанесением фракции элюата, элюирующейся непосредственно перед одной или более фракциями элюата, обладающими требуемым свойством, включение такой фракции элюата специфично улучшает очистку и/или обогащение представляющего интерес соединения. Например, хвостовая фракция, следующая непосредственно после первой фракции, как правило, содержит более высокие концентрации представляющего интерес соединения/биомолекулы-продукта, чем хвостовые фракции, которые также следуют после первой фракции. При сохранении таких хвостовых фракций повышается общий выход очистки всего процесса.

Предпочтительно вторая фракция включает или состоит из головной фракции, непосредственно предшествующей первой фракции, и из хвостовой фракции, следующей непосредственно после первой фракции. Другими словами, с конкретной ссылкой на второй аспект, одна или более фракций элюата, отличающихся от одной или более фракций, обладающих требуемым свойством, и, таким образом, одна или более фракций, которые подлежат повторному нанесению на ту же хроматографическую матрицу, включают фракцию, элюирующуюся с хроматографической матрицы непосредственно перед одной или более фракциями элюата, обладающими требуемым свойством, и фракцию, элюирующуюся с хроматографической матрицы непосредственно после одной или более фракций элюата, обладающих требуемым свойством. Таким образом, вторая фракция предпочтительно включает или состоит из фракции, непосредственно граничащей с первой фракцией и элюирующейся с хроматографической матрицы непосредственно перед первой фракцией, и фракции, непосредственно граничащей с первой фракцией и элюирующейся с хроматографической матрицы непосредственно после первой фракции.

Включение головных и хвостовых фракций увеличивает общий выход очистки всего процесса и

может также позволить упростить оборудование, применяемое в способе согласно изобретению. Например, количество контейнеров для хранения, используемых для хранения вторых фракций, может быть уменьшено, что приводит к уменьшению количества линий подачи сырья и требуемых положений клапанов. Другое преимущество состоит в том, что головную фракцию и хвостовую фракцию можно наносить гомогенно на хроматографическую матрицу, что является удобным, так как, например, позволяет легко прогнозировать параметры обработки, такие как время элюирования и т.д.

Таким образом, в способах согласно изобретению вторая фракция предпочтительно включает или состоит из головной фракции, непосредственно предшествующей первой фракции, и/или хвостовой фракции, следующей непосредственно после первой фракции. Предпочтительно головную фракцию и хвостовую фракцию повторно наносят на хроматографическую матрицу по отдельности или объединяют и повторно наносят на одну и ту же хроматографическую матрицу.

Аналогичным образом, с конкретной ссылкой на второй аспект, обсуждаемый выше, предпочтительно:

i) одна или более фракций элюата, повторно наносимых на одну и ту же хроматографическую матрицу, отличаются от одной или более фракций элюата, обладающих требуемым свойством;

ii) одна или более фракций элюата, повторно наносимых на хроматографическую матрицу, элюируются с хроматографической матрицы перед одной или более фракциями элюата, обладающими требуемым свойством; и/или

одна или более фракций элюата, повторно наносимых на хроматографическую матрицу, элюируются с хроматографической матрицы после одной или более фракций элюата, обладающих требуемым свойством;

и, необязательно,

iii) одну или более фракций элюата, повторно наносимых на хроматографическую матрицу, которые элюируются с хроматографической матрицы перед одной или более фракциями элюата, обладающими требуемым свойством; и одну или более фракций элюата, повторно наносимых на хроматографическую матрицу, которые элюируются с хроматографической матрицы после одной или более фракций элюата, обладающих требуемым свойством:

i) повторно наносят на одну и ту же хроматографическую матрицу по отдельности или

ii) объединяют и повторно наносят на одну и ту же хроматографическую матрицу.

Множество фракций.

Как описано выше, способы согласно изобретению включают нанесение сырья на хроматографическую матрицу и элюирование целевой биомолекулы (представляющего интерес соединения) с матрицы. В дополнение к первым фракциям, включающим очищенную биомолекулу-продукт (и, таким образом, обладающим требуемым свойством, как определено в настоящем документе), элюат также включает вторые фракции, включающие по меньшей мере одну примесь (и, таким образом, обладающие нежелательным свойством, как определено в настоящем документе). Способы согласно изобретению могут давать одну или множество таких вторых фракций. Как более подробно описано ниже, множество вторых фракций могут быть получены различными способами, в том числе при сборе множества вторых фракций из одного цикла способов согласно изобретению, или при выполнении множества циклов способов согласно изобретению и сборе одной или множества вторых фракций в каждом цикле.

Предпочтительно в способах согласно изобретению может быть собрано больше одной второй фракции. При таких обстоятельствах множество собранных вторых фракций могут либо индивидуально (повторно) наносить на хроматографическую матрицу, либо могут объединять ("смешивать друг с другом") и повторно наносить на хроматографическую матрицу в виде комбинированной фракции. Другими словами, если одна или более фракций элюата представляют собой две или более фракций элюата, две или более фракций элюата индивидуально повторно наносят на одну и ту же хроматографическую матрицу. В альтернативе две или более фракций элюата могут объединять и повторно наносить на одну и ту же хроматографическую матрицу в виде комбинированной фракции.

Способ согласно изобретению может давать множество вторых фракций различными способами. Например, запас сырья, включающий биомолекулу-продукт (т.е. смесь, включающая представляющее интерес соединение), можно наносить на хроматографическую матрицу во множестве частей, при этом каждая часть дает первую фракцию и вторую фракцию. При таких обстоятельствах собранные вторые фракции можно индивидуально (повторно) наносить на хроматографическую матрицу. В альтернативе вторые фракции могут смешивать друг с другом и наносить смешанные вторые фракции на хроматографическую матрицу таким образом, что биомолекула-продукт во второй фракции связывается с хроматографической матрицей.

Другим примером является случай, когда вторую фракцию, включающую головную фракцию, собирают отдельно от второй фракции, включающей хвостовую фракцию. Вторая фракция, включающая головную фракцию, и вторая фракция, включающая хвостовую фракцию, таким образом, могут быть индивидуально (повторно) нанесены на хроматографическую матрицу. В альтернативе вторые фракции могут смешивать вместе и наносить смешанные вторые фракции на хроматографическую матрицу таким образом, что биомолекула-продукт в смешанных вторых фракциях связывается с хроматографической

матрицей.

Стадия хранения.

В способах согласно изобретению, после нанесения сырья из запаса сырья на хроматографическую колонку и элюирования первой и второй фракций, вторую фракцию(и) хранят в одном или более контейнерах до повторного нанесения на хроматографическую матрицу. Эта стадия хранения соответствует этапу (с) в заявленном способе.

Время хранения можно регулировать согласно рассматриваемому способу. Предпочтительно время хранения составляет по меньшей мере 5 мин, более предпочтительно по меньшей мере 30 мин, например, по меньшей мере 1 ч, например по меньшей мере 2 ч. Также подходит более длительное время хранения, такое как время хранения по меньшей мере 5, 10 ч, 24 ч, один день, два дня, 7 дней, 14 дней, один месяц, 2 месяца, 6 месяцев или год.

Таким образом, в изобретении этап (с) предпочтительно включает хранение второй фракции(й) по меньшей мере в течение 5 мин. Этап (с) предпочтительно может включать хранение второй фракции(й) в течение ночи.

Преимущество этапа хранения в способах согласно изобретению состоит в том, что при необходимости можно внести модификации в хроматографическое оборудование или фракции. Например, как дополнительно описано ниже, фракции, элюируемые с хроматографической матрицы, могут быть дополнительно обработаны перед повторным нанесением на колонку. В альтернативе хроматографическая матрица может быть заменена, очищена или восстановлена в течение времени хранения. Длительное время хранения также может быть выгодным с точки зрения повышения удобства для оператора. Например, время хранения может быть намечено на ночь или на выходные и, таким образом, может позволить избежать потребности в сверхурочной работе операторов. Другое преимущество этапа хранения состоит в том, что фракция(и), элюируемая с хроматографической матрицы (в частности, вторая фракция(и)), может быть подвергнута анализу, как описано в настоящем документе, во время этапа хранения.

Обработка.

В способах согласно изобретению вторая фракция(и), которую повторно наносят на хроматографическую матрицу, может быть обработана, чтобы ускорить связывание биомолекулы с хроматографической матрицей. Вторую фракцию(и) предпочтительно обрабатывают до или во время повторного нанесения на хроматографическую матрицу, чтобы вызвать связывание биомолекулы с хроматографической матрицей. Однако вторую фракцию(и) можно обрабатывать во время элюирования с хроматографической матрицы. Таким образом, в заявленном способе согласно изобретению обработка предпочтительно происходит во время этапа (b) и/или этапа (с), и/или этапа (d) способа, предпочтительно во время этапа (с) и/или этапа (d); наиболее предпочтительно во время этапа (с) способа.

В способах согласно изобретению обработка второй фракции(й) предпочтительно включает изменение pH, ионной силы, концентрации, температуры и/или растворителя второй фракции(й) (т.е., со ссылкой на второй аспект способа выше, одной или более фракций элюата, которые обрабатывают до или во время повторного нанесения). Обработка также может включать смешивание и/или дегазирование. Обработка может также включать перемешивание или встряхивание. Подходящие способы обработки образцов, как описано в настоящем документе, известны в уровне техники. Например, изменение pH образца может включать добавление кислоты или основания. Изменение ионной силы может быть достигнуто путем добавления или удаления ионных веществ, таких как соли, или при разбавлении (например, в воде или буфере). Изменение концентрации может быть достигнуто путем концентрирования образца (например, при использовании вакуум-фильтра) или при разбавлении (например, в воде или буфере). Изменение температуры может быть достигнуто при нагревании или охлаждении с использованием стандартного оборудования. Изменение растворителя в образце может быть достигнуто при замене буфера или растворителя, например, с помощью диафильтрации.

Способы согласно изобретению могут предпочтительно включать анализ второй фракции(й). Предпочтительно такой анализ является неразрушающим анализом, предпочтительно анализом в потоке, как описано в настоящем документе. Как более подробно описано ниже, анализ второй фракции(й) предпочтительно включает определение одного или более из концентрации биомолекулы-продукта; концентрации примесей; идентичности примесей; pH; ионной силы; температуры; растворителя; и/или концентрации газов во второй фракции(й).

Для эффективной обработки фракции элюата (т.е. второй фракции(й)), обычно сначала нужно определить свойства таких фракций, которые оказывают влияние на связывание представляющего интерес соединения с хроматографической матрицей. Например, перед изменением pH образца обычно требуется определить pH образца. Аналогичным образом, перед изменением ионной силы, концентрации и/или температуры образца обычно требуется определить ионную силу, концентрацию и/или температуру образца, соответственно. Способы определения указанных свойств известны специалисту в данной области.

Этапы определения указанных свойств и обработки фракций могут быть непосредственно связаны друг с другом, т.е. свойства определяют и, сразу после определения, одно или более указанных свойств изменяют таким образом, что представляющее интерес соединение, содержащееся в обрабатываемой

фракции, может связываться с хроматографической матрицей при нанесении. В альтернативе этапы определения указанных свойств и обработки могут быть отделены друг от друга. Такое разделение может быть разделением во времени, т.е. между определением указанных свойств и обработкой одной или более фракций элюата присутствует некоторый временной интервал, т.е. свойства определяют и только по истечении некоторого периода времени одно или более указанных свойств изменяют таким образом, что представляющее интерес соединение, содержащееся в обрабатываемой фракции, может связываться с хроматографической матрицей при нанесении. Как правило, такой временной интервал составляет по меньшей мере 30 мин, 1, 2, 5, 10, 24 ч, один день, два дня, 7 дней, 14 дней, один месяц, 2 месяца, 6 месяцев или год. Короткие временные интервалы, такие как временные интервалы продолжительностью не больше 2 дней, более предпочтительно не больше 24 ч, например, не больше 10 ч, например не больше 5 ч, например не больше 2 ч, более предпочтительно не больше 1 ч, например не больше 30 мин, могут быть полезными, поскольку можно свести к минимуму вероятность разложения и/или контаминации представляющего интерес соединения (т.е. биомолекулы-продукта). Более длительные временные интервалы, такие как временные интервалы продолжительностью больше 2 дней, например, по меньшей мере 7 дней, например по меньшей мере 14 дней, один месяц, 2 месяца, 6 месяцев или год или больше, могут быть полезными, если нужно очищать множество партий белка; как правило, в таких случаях фракции элюата (т.е. вторые фракции) замораживают на некоторый период, чтобы свести к минимуму вероятность разложения и/или контаминации.

Свойства одной или более фракций элюата (то есть второй фракции) могут быть определены в потоке, у потока или вне потока. Определение указанных характеристик в потоке предпочтительно означает, что указанные характеристики определяют в процессе осуществления способа согласно изобретению, например, с помощью детектора, подключенного к выпуску с хроматографической матрицы или расположенного на или в контейнере(ах), в который собирают указанную одну или более фракций элюата, в режиме реального времени. Определение указанных свойств у потока предпочтительно означает, что указанные свойства определяют при отборе проб из выпуска с хроматографической матрицы или контейнера(ов), в который собирают одну или более фракций элюата. Определение указанных свойств вне потока предпочтительно означает, что указанные свойства определяют при отборе проб из выпуска с хроматографической матрицы или контейнера(ов), в который собирают указанные одну или более фракций элюата, и измерении после некоторой задержки на детекторе, установленном удаленно, т.е. в отдельной комнате, от матрицы. Предпочтительно свойства фракций определяют в потоке или у потока, более предпочтительно в потоке.

Дополнительный запас сырья.

В изобретении вторую фракцию повторно наносят на хроматографическую матрицу с дополнительным сырьем из запаса сырья (т.е. с дополнительной смесью, включающей представляющее интерес соединение). Дополнительное сырье наносят одновременно или последовательно со второй фракцией. Дополнительное сырье может быть добавлено ко второй фракции(ям), удерживаемой в контейнере(ах), после чего полученную смесь наносят на хроматографическую матрицу. В альтернативе дополнительное сырье могут наносить на хроматографическую матрицу до, во время или после нанесения второй фракции(й) из контейнера(ов).

Таким образом, этап (d) включает нанесение дополнительного сырья из запаса сырья на хроматографическую матрицу одновременно или последовательно со второй фракцией. Другими словами, с конкретной ссылкой на второй аспект, обсуждаемый выше, одну или более фракций элюата повторно наносят на ту же хроматографическую матрицу вместе со смесью, включающей представляющее интерес соединение, или по меньшей мере с частью указанной смеси. Смесью, включающей представляющее интерес соединение, которую наносят на хроматографическую матрицу вместе с фракциями элюата, предпочтительно не подвергалась рабочему хроматографическому циклу в процессе осуществления способа настоящего изобретения. Впрочем, в рамках изобретения предусмотрено, что такая смесь уже была подвергнута любой форме последующей обработки.

В изобретении этап (d) включает нанесение дополнительного сырья из запаса сырья на хроматографическую матрицу одновременно или последовательно со второй фракцией. Вторую фракцию предпочтительно обрабатывают до или во время повторного нанесения с сырьем. Другими словами, с конкретной ссылкой на второй аспект, обсуждаемый выше, в изобретении фракции элюата, повторно наносимые на хроматографическую матрицу вместе со всей смесью или частью смеси, включающей представляющее интерес соединение, и предпочтительно одну или более фракций элюата, объединяемые со смесью, включающей представляющее интерес соединение, обрабатывают до или во время повторного нанесения таким образом, что представляющее интерес соединение, содержащееся в одной или более фракциях элюата, объединяемых со смесью, включающей представляющее интерес соединение, связывается с хроматографической матрицей при повторном нанесении.

Комбинация второй фракции(й) с дополнительным сырьем из запаса сырья (т.е. комбинация одной или более фракций элюата со смесью, включающей представляющее интерес соединение), также указана в настоящем документе как комбинированный наносимый образец. Что касается такой обработки комбинированного наносимого образца, то же применимо, как описано в общем в настоящем документе, в от-

ношении обработки одной или более фракций элюата, описанной выше.

Нанесение сырья.

Как будет очевидно из представленного выше описания изобретения, способы согласно изобретению включают нанесение сырья из запаса сырья (т.е. смеси, включающей биомолекулу-продукт, т.е. представляющее интерес соединение) на хроматографическую матрицу таким образом, что биомолекула-продукт связывается с хроматографической матрицей.

Изобретение не требует, чтобы весь запас сырья был нанесен на хроматографическую матрицу в одном объеме, хотя это не исключается. Изобретение, таким образом, может включать нанесение всего запаса сырья на хроматографическую матрицу в одном объеме. Более предпочтительно, тем не менее, на хроматографическую матрицу наносят часть общего объема запаса сырья (т.е. сырье из запаса сырья) и осуществляют способ согласно изобретению. Затем на хроматографическую матрицу могут наносить дополнительное сырье в соответствии с изобретением, как описано в настоящем документе. Например, как объяснено выше, этап (d) способа включает нанесение дополнительного сырья из запаса сырья на хроматографическую матрицу одновременно или последовательно со второй фракцией.

Другими словами, с конкретной ссылкой на второй аспект, обсуждаемый выше, первый объем смеси, включающий представляющее интерес соединение, предпочтительно наносят в первом рабочем хроматографическом цикле из первого контейнера на хроматографическую матрицу таким образом, что представляющее интерес соединение связывается с хроматографической матрицей. Таким образом, в таком варианте осуществления не всю смесь, включающую представляющее интерес соединение, которую требуется подвергнуть способу согласно изобретению, наносят в первом рабочем хроматографическом цикле на хроматографическую матрицу.

Предпочтительно в изобретении запас сырья наносят на хроматографическую матрицу, пока не будет достигнута требуемая нагрузка. Например, запас сырья могут предпочтительно наносить на хроматографическую матрицу, пока не будет достигнуто 40-100%, например, от 50% или 60% до 90%, например от 70% до 80%, статической связывающей способности хроматографической матрицы. Другими словами, когда нанесение смеси, включающей представляющее интерес соединение, из первого контейнера на хроматографическую матрицу осуществляют таким образом, что представляющее интерес соединение связывается с хроматографической матрицей, нанесение, как правило, является таким, что представляющее интерес соединение связывается с хроматографической матрицей, пока не будет достигнуто 40-100%, 50-100%, 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 70-90% или 70-80%, 60-90%, 60-80% статической связывающей способности хроматографической матрицы. Нанесение запаса сырья на хроматографическую матрицу до нагрузки ниже 100% статической связывающей способности матрицы иногда может быть выгодным, например, в случае применений, когда требуется усиленное разделение целевой биомолекулы и примесей.

Проскок.

Как будет очевидно специалистам в данной области, при нанесении запаса сырья, включающего биомолекулу-продукт, на хроматографическую матрицу, все количество или только часть общего количества биомолекулы-продукта в сырье может связаться с хроматографической матрицей. Избыток биомолекулы-продукта (представляющего интерес соединения), который не связывается с хроматографической матрицей, остается незахваченным матрицей и может быть собран с хроматографической матрицы в виде проскока. Это может произойти, когда на хроматографическую матрицу избыток сырья наносят, в результате чего превышает статическая связывающая способность матрицы.

Проскок в случае присутствия может, при некоторых обстоятельствах, включать высокий уровень биомолекулы-продукта (представляющего интерес соединения) и, таким образом, может быть эффективно собран для очистки. Проскок может появляться, если избыток сырья из запаса сырья добавляют на хроматографическую матрицу, в результате чего превышает статическая связывающая способность матрицы, например, если статическая связывающая способность матрицы превышает по меньшей мере на 10%, как, например, по меньшей мере на 20%, например, по меньшей мере на 50%, например, статическая связывающая способность матрицы может быть превышена по меньшей мере на 100% или больше. Избыточную нагрузку могут специально наносить в способах изобретения, например, для максимального повышения скорости очистки. Таким образом, этап (a) заявленного способа может включать нанесение сырья из запаса сырья на хроматографическую матрицу таким образом, что превышает динамическая связывающая способность хроматографической матрицы, и сбор проскока, содержащего несвязавшуюся биомолекулу-продукт. Проскок, собранный таким образом, может быть повторно нанесен на хроматографическую матрицу, например, в другом цикле процесса или вместе со второй фракцией элюата и/или дополнительным сырьем из запаса сырья в этапе (d) процесса.

Высокая потенциальная ценность проскока означает, что его сбор и очистка с получением представляющего интерес соединения (биомолекулы-продукта) являются желательными.

Таким образом, этап (a) заявленного способа согласно изобретению предпочтительно дополнительно включает сбор проскока, содержащего несвязавшуюся биомолекулу-продукт, которая не связывается с хроматографической матрицей; и этап (d) предпочтительно дополнительно включает нанесение проскока на хроматографическую матрицу одновременно или последовательно со второй фракцией(ями)

и/или дополнительным сырьем. Этап (d) может включать нанесение всего или только части проскока. В случае нанесения только части проскока в этапе (d), оставшуюся часть проскока предпочтительно сохраняют и затем наносят на хроматографическую матрицу, например, вместе с дополнительным сырьем из запаса сырья. Проскок предпочтительно хранят в одном или более контейнерах в течение времени хранения, как обсуждается ниже. Контейнер(ы) может быть таким же контейнером(ами), который используется для содержания второй фракции(й). В альтернативе контейнер(ы), используемый для содержания проскока, может быть отдельным от контейнера(ов), используемого для содержания второй фракции(й). Проскок предпочтительно могут обрабатывать, чтобы вызвать связывание биомолекулы-продукта с хроматографической матрицей. Может использоваться любой подходящий этап обработки, такой как любой из этапов обработки, описанных выше для второй фракции(й).

Хотя проскок могут наносить на хроматографическую матрицу одновременно или последовательно со второй фракцией(ями), в альтернативном варианте проскок могут повторно наносить на хроматографическую матрицу отдельно от второй фракции(й). Например, проскок могут наносить на хроматографическую матрицу одновременно или последовательно с дополнительным сырьем из запаса сырья (т.е. в этапе (a) способа).

При повторном нанесении проскока на хроматографическую матрицу, либо в этапе (d), либо в этапе (a) способа, на хроматографическую матрицу предпочтительно наносят 40-100%, например, достигается от 50% или 60% до 90%, например от 70% до 80%, статической связывающей способности хроматографической матрицы. Это уменьшает вероятность того, что биомолекула-продукт будет многократно проходить через хроматографическую матрицу, не связываясь с матрицей.

Таким образом, с конкретной ссылкой на способ второго аспекта, обсуждаемого выше, такой способ предпочтительно включает, перед элюированием представляющего интерес соединения с хроматографической матрицы и сбора элюата, содержащего представляющее интерес соединение, в виде фракций элюата, следующие этапы:

ab) сбор проскока, содержащего несвязавшееся представляющее интерес соединение, во второй контейнер, и

ac) в другом рабочем хроматографическом цикле, повторное нанесение проскока из второго контейнера на ту же хроматографическую матрицу, осуществляемое таким образом, что представляющее интерес соединение связывается с хроматографической матрицей.

Такой способ также может предпочтительно включать, до элюирования представляющего интерес соединения с хроматографической матрицы и сбора элюата, содержащего представляющее интерес соединение, в виде фракций элюата, следующие этапы:

ab) сбор проскока, содержащего несвязавшееся представляющее интерес соединение, во второй контейнер и

ac) повторное нанесение проскока из второго контейнера на ту же хроматографическую матрицу и дополнительное нанесение свежей смеси наносимого образца в другом рабочем хроматографическом цикле, осуществляемое таким образом, что представляющий интерес белок связывается с хроматографической матрицей.

Свежая смесь наносимого образца может быть вторым объемом сырья из запаса сырья. Таким образом, способ предпочтительно включает этап повторного нанесения проскока из второго контейнера и нанесение второго объема представляющего интерес соединения из первого контейнера на ту же хроматографическую матрицу в другом рабочем хроматографическом цикле, осуществляемое таким образом, что представляющий интерес белок связывается с хроматографической матрицей. В рамках настоящего изобретения предусмотрено, что такой второй объем представляющего интерес соединения является вторым объемом смеси, включающей представляющее интерес соединение.

Предпочтительно в этапе повторного нанесения проскока из второго контейнера хроматографическая матрица работает в таком режиме, что достигается до 40-100%, 50-100%, 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 70-90% или 70-80%, 60-90%, 60-80% статической связывающей способности хроматографической матрицы. Предпочтительно может быть достигнуто 40-100%, например, от 50% или 60% до 90%, например от 70% до 80%, статической связывающей способности хроматографической матрицы.

Предпочтительно, с конкретной ссылкой на процесс второго аспекта, обсуждаемого выше, проскок, собранный во второй контейнер и одну или более фракций элюата отдельно повторно наносят в рабочем хроматографическом цикле. В рамках настоящего изобретения предусмотрено, что только часть проскока, т.е. часть объема проскока, и/или только часть одной или более фракций элюата, т.е. только часть объема одной или более фракций элюата, отдельно повторно наносят в рабочем хроматографическом цикле. Предпочтительно проскок, собранный во второй контейнер, и одну или более фракций отдельно повторно наносят в одном и том же рабочем хроматографическом цикле, предпочтительно хроматографическом цикле, следующем непосредственно после первого рабочего хроматографического цикла.

В альтернативе проскок, собранный во второй контейнер, и одну или более фракций могут предпочтительно отдельно повторно наносить в разных рабочих хроматографических циклах. В рамках настоящего изобретения предусмотрено, что одну или более фракций элюата повторно наносят на ту же хроматографическую матрицу перед проскоком, собранным во второй контейнер. Впрочем, в рамках

настоящего изобретения также предусмотрено, что проскок, собранный во второй контейнер, повторно наносят на ту же хроматографическую матрицу перед одной или более фракциями элюата.

В альтернативном варианте осуществления проскок и одну или более фракций элюата могут объединять и повторно наносить в виде комбинации на ту же хроматографическую матрицу, работающую в таком режиме, что представляющее интерес соединение связывается с хроматографической матрицей. В рамках настоящего изобретения предусмотрено, что указанная комбинация обработана, как раскрыто в настоящем документе в отношении обработки одной или более фракций элюата.

Таким образом, во втором аспекте изобретения, первый объем смеси, включающей представляющее интерес соединение, может быть предпочтительно нанесен в первом рабочем хроматографическом цикле из первого контейнера на хроматографическую матрицу, работающую в таком режиме, что динамическая связывающая способность хроматографической матрицы превышает, при этом процесс включает, перед элюированием представляющего интерес соединения с хроматографической матрицы и сбором элюата, содержащего представляющее интерес соединение, в виде фракций элюата, следующие этапы:

ab) сбор проскока, содержащего несвязавшееся представляющее интерес соединение, во второй контейнер и

ac) в другом рабочем хроматографическом цикле, повторное нанесение проскока из второго контейнера и нанесение второго объема представляющего интерес соединения из первого контейнера на ту же хроматографическую матрицу, работающую в таком режиме, что динамическая связывающая способность хроматографической матрицы превышает.

В рамках настоящего изобретения предусмотрено, что такой второй объем представляющего интерес соединения является вторым объемом смеси, включающей представляющее интерес соединение.

Предпочтительно, в этапе нанесения первого объема смеси, включающей представляющее интерес соединение, в первом рабочем хроматографическом цикле из первого контейнера на хроматографическую матрицу, осуществляемого таким образом, что динамическая связывающая способность хроматографической матрицы превышает, нанесение представляющего интерес белка останавливают при достижении по меньшей мере 40% 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% максимальной статической связывающей способности.

Предпочтительно в способах согласно изобретению сбор проскока начинают при заданной первой концентрации биомолекулы-продукта (представляющего интерес белка) в проскоке и останавливают при заданной второй концентрации биомолекулы-продукта (представляющего интерес белка) в проскоке. Сбор биомолекулы-продукта (представляющего интерес белка) в проскоке предпочтительно начинают при концентрации 0,05 мг/мл, 0,1 мг/мл или 0,2 мг/мл представляющего интерес белка в проскоке и/или останавливают при концентрации 0,6 мг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл или 5 мг/мл представляющего интерес белка в проскоке. Предпочтительно заданную фракцию проскока, такую как, например, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или 5% проскока, собирают во второй контейнер.

Предпочтительно в одном варианте осуществления собранный проскок (например, во втором контейнере) не обрабатывают до или во время повторного нанесения на хроматографическую матрицу, например, в другом рабочем хроматографическом цикле.

Предпочтительно собранный проскок (например, во втором контейнере) после завершения хроматографического цикла непосредственно повторно наносят на хроматографическую матрицу в следующем рабочем хроматографическом цикле. Предпочтительно в другом варианте осуществления собранный проскок (например, во втором контейнере) обрабатывают до или во время повторного нанесения на хроматографическую матрицу, например, в другом рабочем хроматографическом цикле. Обработкой может быть, например перемешивание или встряхивание, разбавление (например, в воде или буфере), регулирование концентрации (например, при помощи вакуум-фильтра), регулирование pH, регулирование проводимости, замена буфера или растворителя, охлаждение или нагревание или их любая комбинация. Обработка может быть выполнена, как описано выше для второй фракции.

Предпочтительно собранный (например, во второй контейнер) проскок из множества отдельных рабочих хроматографических циклов (т.е. нескольких циклов способа изобретения) объединяют и повторно наносят на ту же хроматографическую матрицу в другом цикле. Проскок из двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или больше десяти рабочих хроматографических циклов может быть собран (например, в один второй контейнер или во второй, третий, четвертый или другие контейнеры) и повторно нанесен на хроматографическую матрицу, например, в другом рабочем хроматографическом цикле.

Предпочтительно в одном варианте осуществления способов согласно изобретению собранный проскок повторно наносят (например, из второго контейнера) на хроматографическую матрицу в следующем рабочем хроматографическом цикле перед нанесением новой партии смеси из первого контейнера, содержащего представляющий интерес белок, на указанную хроматографическую матрицу. Повторное нанесение проскока в следующем хроматографическом цикле перед смесью из первого контейнера, содержащего представляющее интерес соединение, предпочтительно представляющий интерес белок, обеспечивает полное связывание возвращенного в процесс представляющего интерес соединения, предпочтительно представляющего интерес белка, на пустой колонке, что гарантирует его захват всего в

двух циклах. В альтернативе, в другом варианте осуществления, собранный проскок предпочтительно повторно наносят из второго контейнера на хроматографическую матрицу в следующем рабочем хроматографическом цикле после или вместе с нанесением новой партии смеси из первого контейнера, содержащего представляющее интерес соединение, предпочтительно представляющий интерес белок, на указанную хроматографическую матрицу. Другими словами, проскок может быть нанесен на хроматографическую матрицу либо отдельно от дополнительного сырья из запаса сырья, либо вместе с дополнительным сырьем из запаса сырья.

Предпочтительно проскок, собранный во второй контейнер, хранят в течение по меньшей мере 30 мин, 1, 2, 5, 10, 24 ч, одного дня, двух дней, 7 дней, 14 дней, одного месяца, 2 месяцев, 6 месяцев или года. Короткие периоды хранения (времени хранения), такие как время хранения не больше 2 дней, более предпочтительно не больше 24 ч, например не больше 10 ч, например не больше 5 ч, например не больше 2 ч, более предпочтительно не больше 1 ч, например не больше 30 мин, могут быть полезными, так как вероятность разложения и/или контаминации биомолекулы-продукта (т.е. представляющего интерес соединения) в проскоке может быть сведена к минимуму. Более длительное время хранения, такое как время хранения больше 2 дней, такое как время хранения по меньшей мере 7 дней, такое как по меньшей мере 14 дней, один месяц, 2 месяца, 6 месяцев или год, или больше могут быть полезными, если требуется очищать множество партий проскока; как правило, в таких случаях проскок замораживают на время хранения, чтобы свести к минимуму вероятность разложения и/или контаминации.

Запас сырья.

Как описано в настоящем документе, смесь, содержащая биомолекулу-продукт (т.е. представляющее интерес соединение), также известна как запас сырья. В способах согласно изобретению сырье из запаса сырья наносят на хроматографическую матрицу.

Предпочтительно в одном варианте осуществления запас сырья (смесь) включает биомолекулу-продукт (т.е. представляющее интерес соединение, предпочтительно представляющий интерес белок); и примеси из прокариотических, например бактериальных, клеток-хозяев, такие как белок, нуклеиновую кислоту или липид клетки-хозяина. Предпочтительно в другом варианте осуществления запас сырья (смесь) включает биомолекулу-продукт (представляющее интерес соединение, предпочтительно представляющий интерес белок) и примеси из эукариотических клеток-хозяев, например, клеток млекопитающих, такие как белок, нуклеиновую кислоту или липид клетки-хозяина.

Предпочтительно в изобретении запас сырья (т.е. смесь, включающая представляющее интерес соединение), имеет объем по меньшей мере 20 л, например, по меньшей мере 50 л, такой как по меньшей мере 60 л, например, по меньшей мере 80 л, более предпочтительно по меньшей мере 100 л, например, по меньшей мере 500 л, например, по меньшей мере 1000 л или больше, например, по меньшей мере 5000 л, такой как по меньшей мере 10000 л, например, по меньшей мере до 50000 л, 100000 л или больше. Смеси/запас сырья, таким образом, может предпочтительно иметь объем больше 1000 л, например, от 1000 л до 50000 л или 100000 л, предпочтительно от 5000 л до 20000 л, например, приблизительно 10000 л. Также могут использоваться меньшие объемы от 2 л до 100 л, например, от 20 л до 50 л.

Предпочтительно биомолекула-продукт (т.е. представляющее интерес соединение) выбрана из группы, включающей белок, антитело, фрагмент антитела, молекулу нуклеиновой кислоты (т.е. полинуклеотид), полипептид и малую молекулу, например представляющее интерес соединение (т.е. биомолекула-продукт) предпочтительно выбрана из группы, включающей белок, антитело, фрагмент антитела, полинуклеотид и полипептид. Предпочтительно биомолекула-продукт (т.е. представляющее интерес соединение) выбрана из группы, включающей белок, антитело, фрагмент антитела, молекулу нуклеиновой кислоты и малую молекулу. Предпочтительно биомолекула-продукт (т.е. представляющее интерес соединение) является белком. Предпочтительно биомолекула-продукт (т.е. представляющее интерес соединение) является антителом или фрагментом антитела.

Хроматографические матрицы.

Множество хроматографических методов известно в уровне техники и совместимо со способами согласно изобретению.

Почти во всех современных промышленных платформах очистки антител используется Белок А. Белок А - белок клеточной поверхности, обнаруженный в клеточной стенке бактерий *Staphylococcus aureus*, который связывается с Fc-фрагментом иммуноглобулина млекопитающих. Белок А обладает высокой аффинностью к человеческим IgG1 и IgG2 и умеренной аффинностью к человеческим IgM, IgA и IgE антителам. Следовательно, очистка на белке А не очень подходит для фрагментов антитела, которые не имеют Fc-фрагмента. Однако хроматография с белком А хорошо подходит для некоторых антител (особенно тех, которые имеют Fc-фрагмент) и совместима со способами изобретения. Аффинная хроматография позволяет разделять белки на основе обратимого взаимодействия между целевым белком (или группой белков) и специфичным лигандом, соединенным с хроматографической матрицей. Взаимодействие между целевым белком и лигандом, соединенным с хроматографической матрицей, может быть результатом электростатических или гидрофобных взаимодействий, сил Ван-дер-Ваальса и/или образования водородных связей. Для элюирования молекулы-мишени из аффинной среды взаимодействие может быть устранено либо специфично, при использовании конкурентного лиганда, либо неспецифично, пу-

тем изменения рН, ионной силы или полярности. Для аффинной очистки требуется лиганд, который можно ковалентно присоединить к хроматографической матрице. Связанный лиганд должен сохранять свою специфическую аффинность связывания с молекулами-мишенями, и после удаления несвязавшегося материала при промывке связывание между лигандом и молекулой-мишенью должно быть обратимым, чтобы молекулы-мишени можно было удалить в активной форме. Несмотря на стандартное применение, аффинная хроматография является дорогостоящей, особенно в промышленном масштабе, требуемом для очистки терапевтических белков. Способы согласно изобретению совместимы с аффинной хроматографией и, поскольку они предназначены для максимального повышения эффективности процесса, они, по меньшей мере, частично направлены на устранение связанных с этим высоких затрат.

Ионообменная хроматография может использоваться для очистки ионизируемых молекул. Ионизированные молекулы разделяют на основе неспецифического электростатического взаимодействия их заряженных групп с противоположно заряженными молекулами, присоединенными к твердофазной матрице-носителю, удерживающей эти ионизированные молекулы, которые сильнее взаимодействуют с твердой фазой. Суммарный заряд ионизированной молекулы каждого типа и ее аффинность к матрице варьирует в зависимости от количества заряженных групп, заряда каждой группы и природы молекул, конкурирующих за взаимодействие с заряженной твердофазной матрицей. Эти различия приводят к разделению молекул разных типов с помощью ионообменной хроматографии. Элюирование молекул, которые связаны с твердой фазой, обычно достигается путем повышения ионной силы (то есть проводимости) буфера, конкурирующего с растворенным веществом за заряженные участки ионообменной матрицы. Изменение рН и, таким образом, изменение заряда растворенного вещества является еще одним способом обеспечить элюирование растворенного вещества. Изменение проводимости или рН может быть постепенным (градиентное элюирование) или ступенчатым (ступенчатое элюирование). Известны два основных типа взаимодействия: анионообменная хроматография, опосредованная отрицательно заряженными боковыми цепями аминокислот (например, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты), взаимодействующими с положительно заряженными поверхностями, и катионообменная хроматография, опосредованная положительно заряженными остатками аминокислот (например, лизина и аргинина), взаимодействующими с отрицательно заряженными поверхностями. Анионообменные смолы можно подразделить на слабые или сильные. Зарядовая группа на слабой анионообменной смоле является слабым основанием, которое подвергается депротонированию и, следовательно, теряет свой заряд при высоком рН. Диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ-целлюлоза) является примером слабой анионообменной смолы, где аминогруппа может быть положительно заряженной при рН ниже ~9 и постепенно теряет свой заряд при более высоких значениях рН. ДЭАЭ или диэтил-(2-гидроксипропил)аминоэтил (QAE) имеют, например, хлорид-ион в качестве противоиона.

Альтернативой элюированию при повышении ионной силы элюирующего буфера (элюиционная хроматография) является элюирование с использованием молекул, которые обладают более высокой динамической аффинностью к неподвижной фазе, чем связанный белок. Этот режим проведения ионообменной хроматографии называется вытеснительной хроматографией. Вытеснительная хроматография принципиально отличается от любых других режимов хроматографии тем, что растворенные вещества не десорбируются в модификаторе подвижной фазы и разделяются по различиям в скорости миграции. При вытеснении молекулы вынуждены перемещаться вниз по хроматографической колонке под воздействием фронта молекулы вытеснителя, которая обладает более высокой аффинностью к неподвижной фазе, чем любой компонент из потока сырья. Именно эта вынужденная миграция приводит к более высоким концентрациям и чистоте продукта по сравнению с другими режимами работы с высоким удерживанием, с последующим постоянным введением вытеснительного раствора в колонку.

Эти и другие хроматографические методы, известные в уровне техники, совместимы со способами изобретения. Как будет очевидно из предыдущего обсуждения, способы согласно изобретению требуют нанесения биомолекулы-продукта (представляющего интерес белка) на хроматографическую матрицу таким образом, что биомолекула-продукт связывается с хроматографической матрицей. Этот тип режима хроматографии известен как режим связывания и элюирования. Такая хроматография отличается от режима проскока, такого как описанный в WO 2014/158231.

Предпочтительно способ включает больше одной стадии хроматографии, причем две, три, четыре или все стадии хроматографии могут работать так, что проскок, содержащий несвязавшийся целевой белок, собирают (например, в контейнер, отличный от контейнера, из которого вели нанесение на хроматографическую матрицу), после чего проскок повторно наносят (например, из такого контейнера) на ту же хроматографическую матрицу в следующем рабочем цикле хроматографии. Предпочтительно способ включает одну, две, три, четыре или больше четырех стадий хроматографии. Предпочтительно одну, две, три, четыре или все стадии хроматографии проводят на хроматографической колонке. Предпочтительно способ включает три стадии хроматографии, где три стадии хроматографии представляют собой хроматографию на белке А с последующей катионообменной хроматографией и последующей анионообменной хроматографией. В одном варианте осуществления способа согласно изобретению элюат хроматографии на белке А подвергают катионообменной хроматографии, работающей в режиме связывания и элюирования, в результате которой выделяют элюат, содержащий целевой белок, после чего такой элюат

подвергают анионообменной хроматографии с получением проскока, содержащего представляющий интерес белок. Специалисту в данной области будет очевидно, что способ согласно изобретению может включать другие стадии между каждой из трех стадий хроматографии, такие как, например, диафильтрацию.

Предпочтительно хроматография выбрана из аффинной хроматографии, такой как хроматография на белке А, анионообменная или катионообменная хроматография, хроматография гидрофобных взаимодействий, хроматография в смешанном режиме, такая как хроматография на гидроксипатите, хиральная хроматография или диэлектрическая хроматография. Таким образом, хроматографическая матрица предпочтительно выбрана из

- ионнообменной хроматографической матрицы;
- хроматографической матрицы гидрофобных взаимодействий;
- аффинной хроматографической матрицы;
- хроматографической матрицы смешанного режима;
- хиральной хроматографической матрицы и
- диэлектрической хроматографической матрицы.

Предпочтительно хроматографическая матрица/матрицы для одного, двух, трех, четырех или всех хроматографических этапов является хроматографической колонкой(ами). Другими словами, предпочтительно в способах согласно изобретению хроматографическая матрица находится в хроматографической колонке.

Предпочтительно хроматографическая матрица имеет объем слоя по меньшей мере 1 л, например по меньшей мере 4 л, такой как по меньшей мере 5 л, более предпочтительно по меньшей мере 10 л, например по меньшей мере 20 л, например по меньшей мере 30 л, предпочтительно больше 50 л, как правило, больше 75 л, более предпочтительно по меньшей мере 100 л или по меньшей мере 200 л, например, предпочтительно от 20 л до 200 л, например от 30 л до 100 л, например от 50 л до 100 л. Другими словами, предпочтительно по меньшей мере одна хроматографическая матрица является хроматографической колонкой, имеющей объем слоя больше 1 л, больше 20 л, больше 30 л, больше 50 л, больше 75 л, больше 100 л или больше 200 л, предпочтительно от 20 л до 200 л, от 30 л до 100 л или от 50 л до 100 л.

Предпочтительно в способах изобретения, в этапе (b), объем элюата, по меньшей мере, равен объему слоя хроматографической матрицы. Более предпочтительно объем элюата по меньшей мере в 2 раза превышает объем слоя хроматографической матрицы, например по меньшей мере в 5 раз превышает объем слоя хроматографической матрицы, например по меньшей мере в 10 раз превышает объем слоя хроматографической матрицы, например по меньшей мере в 15 раз превышает объем слоя хроматографической матрицы, например по меньшей мере в 20 раз превышает объем слоя хроматографической матрицы или больше. Предпочтительно объем элюата составляет от 2 до 20 объемов слоя хроматографической матрицы.

В других вариантах осуществления хроматографическая матрица предпочтительно является хроматографическим мембранным или монолитным адсорбером.

Предпочтительно один, два, три, четыре или все хроматографические этапы осуществляют на мембранном или монолитном адсорбере.

Предпочтительно один, два, три, четыре или все хроматографические этапы осуществляют на одной хроматографической колонке, мембранном адсорбере или монолитном адсорбере.

В изобретении могут использоваться более высокие скорости потока, чем обычно используемые в стандартных методах хроматографии. Частично это может быть достигнуто, поскольку любое снижение разделения целевой биомолекулы (представляющего интерес соединения) и примесей в запасе сырья (смеси, содержащей представляющее интерес соединение) компенсируется при нанесении вторых фракций на хроматографическую матрицу для дополнительной очистки. Таким образом, способы согласно изобретению могут предпочтительно включать элюирование биомолекулы-продукта (представляющего интерес соединения) с хроматографической матрицы при скорости потока по меньшей мере от 0,05 до 0,5 объема хроматографической матрицы в 1 мин, такой как, по меньшей мере, от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,4 объема хроматографической матрицы в 1 мин, например по меньшей мере от приблизительно 0,2 до приблизительно 0,3 объема хроматографической матрицы в 1 мин.

Способы согласно изобретению предпочтительно могут включать элюирование биомолекулы-продукта (представляющего интерес соединения) с хроматографической матрицы при скорости потока от приблизительно 60 до приблизительно 900 см/ч (где обозначение см относится к высоте слоя хроматографической матрицы; как правило, от приблизительно 20 см до приблизительно 30 см, предпочтительно приблизительно 20 см; и где h=час), такой как от приблизительно 120 до приблизительно 720 см/ч, например от приблизительно 240 до приблизительно 540 см/ч, например от приблизительно 300 до приблизительно 450 см/ч.

Как будет очевидно из предыдущего обсуждения, преимущество способов согласно изобретению состоит в том, что продолжительность процесса не ограничивается объемом хроматографической матрицы. Другими словами, сбор вторых фракций перед их повторным нанесением позволяет в соответствии со способами изобретения обрабатывать объемы запасов сырья с превышением объема хроматографиче-

ской матрицы. Таким образом, в способах согласно изобретению продолжительность процесса предпочтительно превышает объем хроматографической матрицы. Это с преимуществами достигается при использовании контейнера для хранения второй фракции(й) (т.е. тех фракций элюата, которые повторно наносят на хроматографическую матрицу).

Любой подходящий контейнер может использоваться, например, для хранения второй фракции(й) и/или проскока. Специалистам в данной области известно, что второй контейнер может быть расположен на линии с хроматографическим оборудованием или может быть внешним контейнером. Подходящие клапаны и т.д. позволяют направлять фракции в контейнер соответствующим образом.

Дополнительные этапы процесса.

Предпочтительно первые фракции из множества циклов способов согласно изобретению могут быть объединены или смешаны вместе. Таким образом, способ согласно изобретению предпочтительно включает объединение каждой из первых фракций.

Способы согласно изобретению могут предпочтительно включать диафильтрацию и/или концентрирование первых фракций (фракций элюата, включающих целевую биомолекулу, т.е. представляющее интерес соединение). Первые фракции предпочтительно концентрируют после необязательной диафильтрации до конечной требуемой концентрации, подходящей для терапевтического применения.

Способы согласно изобретению могут предпочтительно включать нанофильтрацию очищенной биомолекулы-продукта. Нанофильтрация может быть проведена при использовании любого подходящего аппарата. Как правило, нанофильтрацию проводят при использовании полимерной (например, из полиэтилентерефталата) или металлической (например, из алюминия) мембраны, имеющей размер пор от приблизительно 1 нм до приблизительно 10 нм.

Способы согласно изобретению предпочтительно могут дополнительно включать дополнительную хроматографическую очистку очищенной биомолекулы-продукта. Может использоваться любая подходящая хроматографическая очистка, такая как любой из хроматографических процессов, обсуждаемых в настоящем документе.

Способы согласно изобретению могут предпочтительно включать химическую модификацию очищенной биомолекулы-продукта. Может быть выполнена любая подходящая химическая модификация. Например, биомолекула-продукт может быть модифицирована путем восстановления и/или пэгирования. Биомолекула-продукт может быть модифицирована путем ее присоединения к одному или более соединениям, выбранным из радионуклидов, лекарственных средств, токсинов, полимеров (например, ПЭГ), металлохелатов, флуорофоров, гаптенных и т.п. Присоединение может быть выполнено любыми подходящими способами, такими как сшивание EDC/NHS или путем образования дисульфидных связей между реакционноспособными тиольными группами белков. Восстановление может быть выполнено при использовании химических восстановителей.

Способы согласно изобретению предпочтительно могут дополнительно включать включение целевой биомолекулы/представляющего интерес соединения в композицию с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, разбавителем или адьювантом.

Таким образом, в изобретении также предложен способ производства представляющего интерес белка, где указанный способ включает способ согласно изобретению, включающий его любой вариант осуществления, где представляющее интерес соединение целевой биомолекулы является белком. В изобретении также предложен белок, такой как антитело или фрагмент антитела, полученные таким способом.

В изобретении также предложено представляющее интерес соединение или целевая биомолекула, которые могут быть получены способом согласно изобретению, как раскрыто в настоящем документе.

Определения.

Термин "анионообменная хроматографии" при использовании в настоящем документе относится к хроматографии, где твердая фаза положительно заряжена, например, имеет один или более положительно заряженных лигандов, таких как четвертичные аминогруппы, присоединенных к ней. Доступные в продаже анионообменные матрицы включают ДЭАЭ-целлюлозу, QAE SEPHADEX™, FAST Q SEPHAROSE™ Capto Q и Capto Q Impres (GE Healthcare), Unosphere и Nuvia Q (BioRad), GigaCap Q (Tosoh), Mustang Q XT (Pall), Fractogel Q и Eshmuno Q (Merck Millipore) и анионообменные мембранные адсорберы, такие как SartoBind Q (Sartorius), и монолитные адсорберы, такие как монолиты QA (Bia Separations).

Термин "антитело" или "антитела" при использовании в настоящем документе относится к моноклональным или поликлональным тетрамерным полноразмерным антителам, включающим два тяжелых и две легких цепи. Две тяжелых цепи и две легких цепи могут быть идентичными или разными, например, в биспецифичных антителах, таких как Biclomics® или DuoBody®. Термин иммуноглобулин или иммуноглобулины используется синонимично с "антителом" или "антителами", соответственно. Термин "антитело" или "антитела" при использовании в настоящем документе включает, без ограничения, рекомбинантные антитела, которые получены рекомбинантными технологиями, известными в уровне техники. "Антитело" или "антитела" могут иметь любое происхождение, включая виды млекопитающих, таких как человек, не относящийся к человеку примат (например, человек, такие как из шимпанзе, ба-

буина, макака-резуса или яванского макака), грызун (например, из мыши, крысы, кролика или морской свинки), коза, виды коров или лошадей. Антитело в настоящем документе направлено против представляющего интерес "антигена". Предпочтительно антиген является биологически важным полипептидом, и введение антитела млекопитающему, страдающему заболеванием или нарушением, может привести к терапевтическому эффекту у такого млекопитающего. Однако также предусмотрены антитела, направленные против неполипептидных антигенов. В случае, когда антиген является полипептидом, он может быть трансмембранной молекулой (например, рецептором) или лигандом, таким как фактор роста или цитокин. Предпочтительные молекулярные мишени антител, охваченные настоящим изобретением, включают CD полипептиды, такие как CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34, CD38, CD40 и CD40-L; FcRN; OX40; представители семейства рецептора HER, такие как рецептор EGF, HER2, HER3 или рецептор HER4; молекулы клеточной адгезии, такие как LFA-1, MacI, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM и α /b3 интегрин, включая его α или β -субъединицы (например, антитела против CD11a, против CD18 или против CD11b); хемокины и цитокины или их рецепторы, такие как IL-1 α и β , IL-2, IL-6, рецептор IL-6, IL-12, IL-13, IL-17A и/или IL-17F, IL-18, IL-21, IL-23, TNF α и TNF β ; факторы роста, такие как VEGF; IgE; групповые антигены крови; рецептор flk2/flt3; рецептор ожирения (OB); рецептор mpl; CTLA-4; полипептид C; PD-1, PD-L1, PCSK9; склероти; и т.д.

Термин "фрагмент антитела" или "фрагменты антител" при использовании в настоящем документе относится к части антитела, обычно его антигенсвязывающей или вариательной области. Примеры фрагментов антител включают любое антитело, которое не содержит или не имеет Fc-фрагмента. Примеры фрагментов антитела включают также такие фрагменты, как Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, и scFv фрагменты; а также диатела, включая такие форматы, как BiTE® (биспецифичные активаторы Т-клеток) и DART™ (технология перенаправляемых антител двойной аффинности), триатела, тетратела, минитела, доменные антитела (dAb), такие как sdAbs, VHH и VNAR фрагменты, одноцепочные антитела, биспецифичные, триспецифичные, тетраспецифичные или мультиспецифичные антитела, полученные из фрагментов антител или антител, включающих, без ограничения, Fab-Fv, Fab-scFv, Fab(Fv)₂ или Fab-(scFv)₂ конструкции. Фрагменты антител и производные, как определено выше, известны в уровне техники (Kontermann 2012). Для ясности следует понимать, что Fab-Fv относится к конструкции, содержащей одну Fv область и одну Fab область, соединенные в любом порядке, т.е. Fab-Fv или Fv-Fab, где за последними аминокислотами одной области следуют первые аминокислоты следующей области или наоборот. Аналогично следует понимать, что Fab-scFv относится к конструкции, содержащей одну scFv область и одну Fab область, соединенные в любом порядке, а в случае Fab с любой полипептидной цепью, т.е. Fab-scFv или scFv-Fab, где за последней аминокислотой одной области следует первая аминокислота следующей области или наоборот. Таким же образом следует понимать, что Fab-(Fv)₂ относится к конструкции, содержащей две Fv области и одну Fab область, соединенные в любом порядке, то есть Fab-Fv-Fv, Fv-Fab-Fv или Fv-Fv-Fab, где за последними аминокислотами одной области следуют первые аминокислоты следующей области или наоборот. Аналогичным образом, следует понимать, что Fab-(scFv)₂ относится к конструкции, содержащей две scFv области и одну Fab область, соединенные в любом порядке, а в случае Fab с любой полипептидной цепи, что приводит к 20 возможным перестановкам. Обычно такие конструкции включают пептидный линкер между первой областью (например, Fab) и второй областью (например, Fv). Такие линкеры хорошо известны в уровне техники и могут быть одной или более аминокислотами, обычно оптимизированными по длине и составу специалистом в данной области. В альтернативе указанные области могут быть соединены напрямую, т.е. без пептидного линкера. Примеры подходящих линкерных областей для связывания вариательного домена с Fab или Fab' описаны в WO 2013/068571, включенной в настоящий документ посредством отсылки, и включают, без ограничения перечисленным, гибкие линкерные последовательности и жесткие линкерные последовательности. Фрагменты антител могут быть агликозилированными или гликозилированными. Термин "фрагмент антитела" или "фрагменты антител" также относится к производным антител, которые содержат по меньшей мере один антигенсвязывающий или fc-рецептор-связывающий домен антитела, который ковалентно связан с другим доменом антитела, другим белком или небелковой молекулой.

Термин "молекулы нуклеиновой кислоты" при использовании в настоящем документе относится к одноцепочечной или двухцепочечной нуклеиновой кислоте. Молекула нуклеиновой кислоты может быть выбрана из группы, включающей плазмиду, мРНК, праймер и зонд. В варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты включает или состоит из D-нуклеотидов. В альтернативном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты включает или состоит из L-нуклеотидов. Термины "молекула нуклеиновой кислоты" и "полинуклеотид" могут использоваться попеременно.

Термин "полипептид" при использовании в настоящем документе относится к множеству аминокислот, соединенных пептидными связями. Полипептиды, как правило, включают от 2 до 100 аминокислот, например от 10 до 50 аминокислот. Полипептиды могут включать исключительно природные аминокислоты или могут включать одну или более не природных аминокислот, таких как β -аминокислоты (β 3 и β 2); гомо-аминокислоты; пролин и производные пировиноградной кислоты; 3-замещенные производные аланина; производные глицина; производные фенилаланина и тирозина с заместителями в коль-

це; аминокислоты с линейным ядром и N-метил-аминокислоты.

Термин "катионообменная хроматография" при использовании в настоящем документе относится к хроматографии, где твердая фаза отрицательно заряжена, например, имеет один или более отрицательно заряженных лигандов, таких как, например, карбоксильная или сульфоновая группа. Доступные в продаже катионообменные матрицы включают карбоксиметилцеллюлозу, сульфопропил (SP), иммобилизованную на агарозе, и сульфонил, иммобилизованную на агарозе, такую как Capto S, Capto Adhere и Capto S Impres (GE Healthcare), Unosphere S и Nuvia S (BioRad), GigaCap S (Tosoh), Fractogel S и Eshmuno S (Merck Millipore) или катионообменные мембранные адсорберы, такие как SartoBind S (Sartorius), и монокитные адсорберы, такие как монолиты SO₃ (Bia Separations).

Термин "хроматографическая колонка" или "колонка", в отношении хроматографии, при использовании в настоящем документе относится к контейнеру, часто в форме цилиндра или трубки, которая заполнена хроматографической матрицей. Хроматографическая матрица представляет собой материал, который обеспечивает физические и/или химические свойства, которые используются для очистки.

Термин "хроматографический цикл" или "рабочий хроматографический цикл" при использовании в настоящем документе относится к работе в одном цикле последовательности этапов процесса на данном распределении хроматографической матрицы, который может включать, без ограничения, некоторые один или более этапов в последовательной комбинации следующих этапов: этап уравнивания, этап повторного нанесения, этап нанесения, этап перегрузки, этап промывки после нанесения, этап вторичной промывки, этап элюирования, этап регенерации, этап очистки, этап хранения и какие либо этапы прерыва или выдерживания. Другой цикл, таким образом, может включать повтор такой же последовательности этапов процесса.

Термины "связывает" и "связывающий" в отношении взаимодействия представляющего интерес соединения/целевой биомолекулы с хроматографической матрицей относится к захвату соединения или биомолекулы матрицей. Специалистам в данной области будет очевидно, что способ, посредством которого представляющее интерес соединение/целевая биомолекула взаимодействует с хроматографической матрицей, зависит от природы рассматриваемой матрицы. Термин "связывается с" не предполагает обязательно ковалентное связывание. В случае ионообменной хроматографии "связывание" является ионным взаимодействием между представляющим интерес соединением/целевой биомолекулой и матрицей. В случае афинной хроматографии "связывание" является аффинным взаимодействием между представляющим интерес соединением/целевой биомолекулой и матрицей. В случае хроматографии гидрофобных взаимодействий "связывание" является гидрофобным взаимодействием между представляющим интерес соединением/целевой биомолекулой и матрицей. Соответствующие способы связывания, применимые к другим типам хроматографии, будут очевидны для специалистов в данной области.

Термин "динамическая связывающая способность", в отношении хроматографии, при использовании в настоящем документе относится к количеству представляющего интерес белка или другого целевого соединения, которое может связаться с хроматографической матрицей в условиях постоянного потока без присутствия существенного количества представляющего интерес белка или другого целевого соединения в проскоке. Динамическую связывающую способность хроматографической матрицы определяют при нанесении образца, содержащего известную концентрацию представляющего интерес белка. Нанесение белкового образца на колонку контролируют, при этом он будет связываться с матрицей до некоторой критической точки, после чего несвязавшийся белок будет проскакивать через матрицу. Из кривой проскока при потере, например, 10% белка, находят динамическую связывающую способность и останавливают эксперимент. Часто динамическая связывающая способность определяет количество представляющего интерес белка, который может связаться с матрицей в условиях постоянного потока с потерей не больше 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 15%, 17% или 20% представляющего интерес белка в проскоке, предпочтительно от концентрации представляющего интерес белка, наносимого в одной временной точке.

Термин "проскок" при использовании в настоящем документе относится к жидкой композиции, которую получают, позволяя смеси проходить через хроматографическую матрицу.

Термин "хроматография гидрофобных взаимодействий" при использовании в настоящем документе относится к хроматографии, где твердая фаза является гидрофобной, например, имеет один или более гидрофобных лигандов, таких как, например, бутильная или фенильная группа. Доступные в продаже матрицы гидрофобного взаимодействия включают Фенил или Бутил, иммобилизованные на агарозе, такие как Capto Phenyl или Capto Butyl (GE Healthcare), ToyoPearl HIC (Tosoh) и Fractogel EMD Phenyl (Merck Millipore), или иммобилизованные на мембранном адсорбере, таком как SartoBind HIC (Sartorius).

Термин "мембранный адсорбер" или "мембранная хроматография", в отношении хроматографии, при использовании в настоящем документе относится к хроматографическому формату, в котором полупроницаемая мембрана помещена в контейнер, через который подается поток сырья, и к поверхностям которой прикреплены смола или лиганды, которые представляют собой материалы, которые обеспечивают физические и/или химические свойства, которые используются для очистки.

Термин "хроматография на монолитном носителе" или "монокитные адсорберы" в связи с хроматографией при использовании в настоящем документе, относится к хроматографическому формату, в кото-

ром сплошной объем пористого полимера помещен в контейнер, через который подается поток сырья, и к поверхностям которого прикреплены смола или лиганды, которые представляют собой материалы, которые обеспечивают физические и/или химические свойства, которые используются для очистки.

Термин хроматография в "смешанном режиме" при использовании в настоящем документе относится к хроматографии, в которой твердая фаза может содержать смесь различных заряженных или незаряженных лигандов, такие как, например, гидроксипатит. Доступные в продаже матрицы смешанного режима включают керамический гидроксипатит (BioRad) или Capto Adhere (GE Healthcare) и гидроксипатит HA Ultrogel (Pall).

Термин "смесь" при использовании в настоящем документе относится, по меньшей мере частично, к жидкой композиции, включающей по меньшей мере один представляющий интерес белок, который пытаются очистить от других веществ, таких как белки клетки-хозяина, ДНК или другие компоненты клетки-хозяина, которые также могут присутствовать. Смеси могут, например, быть суспензиями, водными растворами, системами органических растворителей или смесями воды/органических растворителей или растворами. Смеси часто являются сложными смесями или растворами, содержащими множество биологических молекул (таких как белки, антитела, гормоны, полинуклеотиды и вирусы), малых молекул (таких как соли, сахара, липиды и т.д.) и даже частиц. Хотя типичная смесь биологического происхождения может возникать в виде водного раствора или суспензии, она также может содержать органические растворители, используемые на более ранних этапах разделения, таких как осаждение из растворителей, экстракция и т.п. При использовании в настоящем документе термин "смесь" может быть отождествлен с термином "запас сырья". Некий объем смеси/запасов сырья может именоваться как "сырье из запаса сырья".

Термин "статическая связывающая способность", в отношении хроматографии, при использовании в настоящем документе относится к максимальному количеству представляющего интерес белка или другого целевого соединения, которое может связаться с хроматографической матрицей при статических условиях, без присутствия существенного количества представляющего интерес белка или другого целевого соединения в проскоке. Статическая связывающая способность обычно измеряется в периодическом режиме в химическом стакане и обычно указывается как максимальное количество белка, связанного с хроматографическим носителем в данном растворителе и данной концентрации белка.

Термин "фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель или адъювант" относится к другим компонентам терапевтических композиций помимо биомолекулы-продукта. Разбавители включают, например, лактозу, декстрозу, сахарозу, целлюлозу, кукурузный крахмал или картофельный крахмал; Вспомогательные вещества включают смазывающие вещества, например, диоксид кремния, тальк, стеариновую кислоту, стеарат магния или кальция и/или полиэтиленгликоли; связующие вещества; например, крахмалы, гуммиарабик, желатин, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу или поливинилпирролидон; разрыхляющие вещества, например, крахмал, альгиновую кислоту, альгинаты или крахмалгликолят натрия; шипучие смеси; красители; подсластители; смачивающие вещества, такие как лецитин, полисорбаты, лаурилсульфаты; и, как правило, нетоксичные и фармакологически неактивные вещества, используемые в фармацевтических составах. Адъюванты включают анальгетики, неорганические соединения, например, квасцы, гидроксид алюминия, фосфат алюминия и гидроксифосфат кальция; минеральные масла, например, парафиновое масло; детергенты; сапонины, цитокины и пищевые масла. Специалисты в данной области способны подобрать подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, разбавители или адъюванты в зависимости от применения биомолекулы-продукта.

Дополнительная информация.

Представляющий интерес белок, такой как антитело или фрагмент антитела, который может быть очищен в соответствии со способом настоящего изобретения, может быть получен при культивировании клеток-хозяев, трансформированных одним или более векторами экспрессии, кодирующими рекомбинантное антитело или фрагмент антитела.

Клетками-хозяевами согласно вариантам осуществления изобретения являются, например, прокариотические клетки, дрожжи (например, без ограничения *Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia methanolica*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluveromyces lactis* и другие виды *Kluveromyces*, *Yarrowia lipolytica*), миксомицеты (например, без ограничения *Dictyostelium discoideum*), гифомицеты (например, без ограничения *Trichoderma reesei* и другие виды *Trichoderma*, *Aspergillus niger* и другие виды *Aspergillus*), мхи (например, без ограничения *Physcomitrella patens*, *Atrichum undulatum*), клетки насекомых или млекопитающих. Клетками-хозяевами млекопитающих являются, например, без ограничения, клетки NSO, SP2.0, 3T3, клетки COS, клетки остеосаркомы человека, клетки MRC-5, клетки почки новорожденного хомяка (БНК), клетки VERO, клетки CHO, клетки rCHO-tPA, клетки rCHO с поверхностным антигеном гепатита В, клетки CHO-S, клетки НЕК 293, клетки rНЕК 293, клетки C127, клетки rC127 с поверхностным антигеном гепатита В, фибробластные клетки человека, клетки стромы, гепатоциты или клетки PER.C6.

Клетки-хозяева предпочтительно являются эукариотическими клетками-хозяевами, предпочтительно клетками-хозяевами млекопитающих, более предпочтительно клетками яичников китайского хомячка

(CHO), например, штамма DG44.

Для эукариотических клеток-хозяев (например, дрожжей, клеток насекомых или млекопитающих) могут использоваться различные последовательности регуляции транскрипции и трансляции в зависимости от природы хозяина. Они могут быть получены из вирусных источников, таких как аденовирус, вирус папилломы коров, вирус обезьян или т.п., где регуляторные сигналы связаны с конкретным геном, который имеет высокий уровень экспрессии. Примерами являются ТК-промотор вируса герпеса, ранний промотор SV40, дрожжевой промотор гена *gal4* и т.д. Могут быть выбраны регуляторные сигналы инициации транскрипции, которые обеспечивают репрессию и активацию, в результате чего можно модулировать экспрессию генов. Клетки, которые были стабильно трансформированы введенной ДНК, могут быть отобраны также путем введения одного или более маркеров, которые позволяют отбирать клетки-хозяева, которые содержат вектор экспрессии. Маркер также может придавать фототрофию ауксотропному хозяину, устойчивость к биоцидам, например, без ограничения, антибиотикам или тяжелым металлам, таким как медь и т.п. Селективный маркерный ген может быть либо непосредственно соединен с ДНК последовательностями гена, которые нужно экспрессировать, либо введен в ту же клетку путем котрансфекции. Дополнительные элементы также могут быть необходимы для оптимального синтеза белков согласно изобретению.

Эукариотические клетки-хозяева трансфицируют одним или более векторами экспрессии, кодирующими представляющий интерес белок, а затем культивируют в любой среде, которая будет поддерживать их рост и экспрессию представляющего интерес белка. Среда является химически определенной средой, которая не содержит продуктов животного происхождения, таких как животная сыворотка и пептон. Специалисту в данной области доступны различные среды для культивирования клеток, включающие различные комбинации витаминов, аминокислот, гормонов, факторов роста, ионов, буферов, нуклеозидов, глюкозы или эквивалентного источника энергии, присутствующих в подходящих концентрациях для обеспечения роста клеток и продукции белка. Дополнительные компоненты среды для культивирования клеток могут быть включены в среду для культивирования клеток в подходящих концентрациях в разное время в течение цикла культивирования клеток, что известно специалистам в данной области.

Культура клеток млекопитающих может содержаться в любом подходящем контейнере, таком как колба для культивирования или биореактор, который может работать или может не работать в режиме периодического культивирования с подпиткой в зависимости от требуемого масштаба производства. Такие биореакторы могут быть реакторами с механическим перемешиванием или реакторами с газоструйным перемешиванием. Доступны различные биореакторы крупного масштаба с емкостью больше 1000-50000 л или 100000 л, предпочтительно от 5000 л до 20000 л или до 10000 л. В альтернативе биореакторы меньшего масштаба, такие как от 2 л до 100 л, также могут использоваться для получения антитела согласно способу изобретения.

Представляющий интерес белок, такой как антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который продуцируют в эукариотической клетке-хозяине, такой как клетка CHO, в соответствии со способами настоящего изобретения, как правило, находится в супернатанте клеточной культуры. В варианте осуществления изобретения указанный супернатант представляет собой смесь, очищаемую в способе изобретения.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретения способы изобретения включают этап центрифугирования супернатанта и сбора жидкой фазы после центрифугирования с получением смеси, содержащей представляющий интерес белок, для дальнейшей очистки согласно способу изобретения.

В альтернативе указанный супернатант может быть получен при использовании методов осветления, известных специалисту, таких как, например, глубинная фильтрация. Поэтому в конкретном варианте осуществления изобретения способ включает этап глубинной фильтрации с получением смеси, содержащей представляющий интерес белок, для дальнейшей очистки согласно способу изобретения.

В альтернативе клетки-хозяева являются прокариотическими клетками, предпочтительно грамотрицательными бактериями, предпочтительно, прокариотическими клетками *E. coli*. Прокариотические клетки-хозяева для экспрессии белков известны в уровне техники. Клетки-хозяева представляют собой рекомбинантные клетки, которые были генетически модифицированы для продукции представляющего интерес белка, такого как фрагмент антитела. Рекомбинантные клетки-хозяева *E. coli* могут быть получены из любого подходящего штамма *E. coli*, в том числе из MC4100, TG1, TG2, DHB4, DH5 α , DH1, BL21, K12, XL1Blue и JM109. Одним из примеров штамма *E. coli* является W3110 (ATCC 27,325), часто используемый штамм для получения рекомбинантных белков. Фрагменты антител также могут быть получены при культивировании модифицированных штаммов *E. coli*, например метаболических мутантов или протеадефицитных штаммов *E. coli*.

Фрагмент антитела, который может быть очищен в соответствии со способами настоящего изобретения, как правило, присутствует в периплазме хозяйской клетки *E. coli* или в супернатанте культуры клетки-хозяина, в зависимости от природы белка, масштаба производства и используемого штамма *E. coli*. Способы направления белков в эти компартменты известны в уровне техники. Примеры подходящих сигнальных последовательностей для направления белков в периплазму *E. coli* включают сигналь-

ные последовательности *E. coli* PhoA, OmpA, OmpT, LamB и OmpF. Белки могут направляться в супернатант при помощи природных секреторных путей или путем создания ограниченной утечки через внешнюю мембрану, чтобы вызвать секрецию белка, примерами чего является использование лидерной последовательности *relB*, лидерной последовательности белка A, коэкспрессии с белком высвобождения бактериоцинов, митомицином-индуцированного белка высвобождения бактериоцинов, в сочетании с добавлением глицина в среду культивирования и коэкспрессией гена *kil* для пермеабилзации мембраны. Наиболее предпочтительно в способах согласно изобретению рекомбинантный белок экспрессируется в периплазме хозяина *E. coli*.

Экспрессия рекомбинантного белка в клетках-хозяевах *E. coli* также может находиться под контролем индуцируемой системы, при этом экспрессия рекомбинантного антитела в *E. coli* находится под контролем индуцируемого промотора. Многие индуцируемые промоторы, подходящие для применения в *E. coli*, хорошо известны в данной области и, в зависимости от промотора, экспрессия рекомбинантного белка может быть вызвана различными факторами, такими как температура или концентрация конкретного вещества в питательной среде. Примеры индуцируемых промоторов включают промоторы *E. coli* *lac*, *tac* и *tet*, которые индуцируются лактозой или негидролизуемым аналогом лактозы, изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG), и промоторы *phoA*, *trp* и *araBAD*, которые индуцируются фосфатом, триптофаном и L-арабинозой соответственно. Экспрессия может быть индуцирована, например, добавлением индуктора или изменением температуры, когда индукция является температурно-зависимой. Когда индукция экспрессии рекомбинантного белка происходит при добавлении индуктора в культуру, индуктор могут добавлять любым подходящим способом в зависимости от системы ферментации и индуктора, например, путем однократного или многократного добавления или постепенного добавления индуктора при подпитке. Следует понимать, что между добавлением индуктора и фактической индукцией экспрессии белка может быть некоторая задержка, например, если индуктором является лактоза, может наблюдаться задержка до момента индукции экспрессии белка при утилизации любого ранее присутствовавшего источника углерода до лактозы.

Культуры клеток-хозяев *E. coli* (ферментации) могут культивировать в любой питательной среде, которая поддерживает рост *E. coli* и экспрессию рекомбинантного белка. Питательная среда может быть любой химически средой определенного состава такой как, например, описано.

Культивирование клеток-хозяев *E. coli* может проходить в любом подходящем контейнере, таком как колба для культивирования или ферментер, в зависимости от масштаба требуемого производства. Доступны различные ферментеры крупного масштаба с емкостью больше 1000 л и до 100000 л. Предпочтительно используются ферментеры от 1000 л до 50000 л, более предпочтительно от 1000 л до 10000 л или 12000 л. Ферментеры меньшего масштаба также могут использоваться с емкостью от 0,5 л до 1000 л.

Культивирование клеток-хозяев, таких как СНО или *E. coli*, могут проводить в любой подходящей системе, например, в непрерывном, периодическом или периодическом режиме с подпиткой в зависимости от требуемого белка и выхода. Периодический режим может использоваться с циклическим добавлением питательных веществ или индукторов при необходимости. В альтернативе может использоваться периодическая культура с подпиткой, при этом культуры выращивают до индукции в периодическом режиме при максимальной удельной скорости роста, который можно поддерживать при использовании питательных веществ, изначально присутствующих в ферментере, и используют один или более режимов подпитки питательными веществами для регулирования скорости роста, пока ферментация не будет завершена.

В одном варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению включает перед нанесением на первую хроматографическую матрицу этап захвата, этап центрифугирования или сбора культуры клеток с последующим суспендированием клеток-хозяев при добавлении буфера для экстракции.

В процессах ферментации *E. coli*, в которых представляющий интерес белок, такой как фрагмент антитела, находится в периплазматическом пространстве клетки-хозяина, требуется высвобождение белка из клетки-хозяина. Высвобождение может быть достигнуто любым подходящим способом, таким как лизис клеток путем механической обработки или обработки давлением, обработка путем замораживания-оттаивания, осмотический шок, с помощью экстрагирующих веществ или термической обработки. Такие способы экстракции для высвобождения белка хорошо известны в данной области.

В конкретном варианте осуществления способа согласно изобретению смесь в способе согласно изобретению в соответствии с любым вариантом осуществления получают путем элюирования антитела или фрагмента антитела, связанного с белком A, например, с помощью элюирующего буфера с pH, подходящим для нарушения связывания антитела или фрагмента антитела. Указанный pH зависит от конкретной молекулы и, как правило, его определяет опытным путем специалист и регулирует для достижения желаемого конечного результата.

Существует множество хроматографических материалов, доступных специалисту, содержащих указанный нативный рекомбинантный белок A, такие как, например, MabSelect® (GE Healthcare), Absolute® (Novasep), Captiv A® (Repligen) или Amsphere® (JSR).

Буферы, подходящие для использования в качестве промывочных и элюирующих буферов в хроматографии с белком А, легко доступны в данной области и могут быть выбраны, в качестве неограничивающих примеров, из фосфатно-солевого буфера (PBS), Трис, гистидинового, ацетатного, цитратного буферов или буферов на основе MES (2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты), имидазола, BES (N,N-(бис-2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфоновой кислоты), MOPS (3-(N-морфолино)пропансульфоновой кислоты) или HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновой кислоты).

Следующий пример иллюстрирует изобретение. Однако он никоим образом не ограничивает изобретение. В связи с этим важно понимать, что конкретные способы, описанные в примере, и способы, используемые для демонстрации чистоты и выхода, предназначены лишь для того, чтобы дать представление о способах согласно изобретению. Существует множество способов, доступных для определения выхода и чистоты биомолекулы, и поэтому отрицательный результат в каком-либо конкретном анализе не является определяющим.

Пример.

Замороженную осветленную жидкость клеточной культуры, которую центрифугировали и экстрагировали при нагревании из культуры *E.coli*, содержащую голый Fab при концентрации 2,18 г/л и имеющую проводимость приблизительно 14 мСм/см, разбавляли деионизированной водой до концентрации 0,5 г/л при pH приблизительно 4,5 и проводимости приблизительно 3,76 мСм/см. Проводили хроматографический процесс в режиме связывания и элюирования, в котором 3 колонных объема (CV) промывочного буфера (50 mM ацетат натрия, pH 4,5, пров. 4,0 мСм/см) пропускали через хроматографическую матрицу на основе колонки со скоростью 150 см/ч для уравнивания колонки, с последующим нанесением образца, содержащего представляющие интерес белки, до нагрузки 17,5 г/л объема смолы с помощью насоса со скоростью 225 см/час, с последующим пропуском 5 CV такого же промывочного буфера при 150 см/ч, с последующим линейным градиентом элюирующего буфера при повышении с низкой проводимости промывочного буфера до высокой проводимости элюирующего буфера (50 mM ацетата натрия, 225 mM хлорида натрия при pH 4,5, пров. 26,4 мСм/см) в количестве 10 CV при 150 см/час, с последующим введением 2 CV регенерирующего буфера с высокой проводимостью (50 mM ацетата натрия, 1 M хлорида натрия, pH 4,5, проводимость 85 мСм/см) со скоростью 300 см/час, затем 2 CV буфера для очистки с высоким pH, вводимого со скоростью 300 см/час и удерживаемого в этот момент на 15 мин промывки еще 2 CV промывочного буфера. В качестве хроматографической матрицы использовали катионообменную колонку GE 4,66 мл, 10 см Capto S HiScreen, процесс проводили на приборе GE Akta Avant. В течение всего хроматографического процесса проводимость, pH, оптическую плотность при 280 нм, оптическую плотность при 260 нм и оптическую плотность при 305 нм элюата, выходящего из колонки, измеряли в потоке и контролировали и регистрировали в режиме реального времени, и выходящую жидкость во время элюирования 10 CV, собирали и хранили во фракциях объемом 1,55 мл в 96-луночных микротитровальных планшетах с глубокими лунками при 6 градусах Цельсия. При наблюдении амплитуды измерения в процессе градиентного элюирования 10 CV, два основных, частично разделенных пика появлялись с сильным перекрытием; малый пик с четкой вершиной в области 17-й фракции, непосредственно предшествующий более крупному асимметричному пику с вершиной в области приблизительно 22-й фракции. По 30 мкл каждой фракции отбирали и анализировали в стадии аффинной аналитической ВЭЖХ с белком G с целью определения состава фракций, и интегрирование значений оптической плотности при A280 для отдельного пика проскока и пика элюата в каждом образце, исследованном на ВЭЖХ с белком G, позволило отдельно определить количества неиммуноглобулиновых компонентов (проскок на ВЭЖХ, далее именуемый не-Fab), которые соответствовали раннему малому пику при градиентном элюировании Capto S, и количество иммуноглобулиновых компонентов (элюат на ВЭЖХ, далее именуемый Fab), который соответствовал более позднему большому пику при градиентном элюировании Capto S, с получением их реального профиля.

Оставшийся удержанный объем (представляющий подавляющее большинство каждой фракции, меньше 5% каждой из которых использовали для анализа ВЭЖХ с белком G) двух конкретных фракций (21-й и 22-й из 32 в общей сложности) из перекрывающейся области между двумя пиками в градиентном элюировании CEX в этом первом цикле объединяли и добавляли к такому же объему свежего образца, что и в предыдущей процессе хроматографии, в контейнере и снова разбавляли до такой же проводимости 3,76 мСм/см при использовании деионизированной воды для повторного нанесения в следующем цикле хроматографии Capto S. Эти фракции были выбраны потому, что они обладали высоким содержанием представлявшего интерес Fab и значительным содержанием не-Fab, при этом эффективному отбору могла способствовать компьютерная модель (см. ниже). Между тем, основную массу оставшегося сохраненного объема фракций после отбора этих двух фракций (с 23-й по 31-ю, далее именуемые "сохраненным пулом") и содержащих преимущественно Fab, объединяли в пул и вычисляли выход Fab и содержание остаточных примесей в этом пуле. В каждом случае чистоту для каждого пула вычисляли как количество Fab, деленное на количество не-Fab, а выход вычисляли как количество Fab в сохраненном пуле, деленное на общее количество Fab во всех фракциях, охватывающих оба элюируемых пика (фракции 9-31).

Комбинированный наносимый образец/рециркулированную фракцию повторно наносили на колон-

ку в последующем 2-м цикле хроматографии, состоящем из одинаковых операций, и снова собирали такие же фракции, и такую же небольшую часть каждой фракции отбирали для анализа с помощью ВЭЖХ с белком G, и опять же, такие же две фракции сохраняли и объединяли в пул с дополнительным свежим наносимым образцом для нанесения в 3-м цикле, и снова фракции 23-31 смешивали для вычисления количества и выхода Fab и не-Fab в этой части. То же самое повторяли в 3-ем и 4-ом циклах. Это привело к значительному повышению выхода Fab в удерживаемом пуле во 2-ом, 3-ем и 4-ом циклах, в которых возвращали рециркулированные фракции из предыдущих циклов в количестве 22%, 23% и 25% соответственно по сравнению с начальным циклом, в котором вводили только неочищенное свежее сырье, который, таким образом, использовали в качестве традиционного периодического процесса и контроля процесса с рециркуляцией согласно изобретению. В то же время относительная чистота, которая была вычислена как отношение не-Fab на единицу Fab, измеренное в собранном пуле, оставалась близкой к отношению чистоты, наблюдаемому в начальном цикле на уровне -4%, -4% и +1%, и после нескольких циклов уравнивалось до того же уровня, что и в начальном цикле. Поэтому, когда сохраненный пул первого цикла представлял собой традиционное хроматографическое разделение в режиме связывания и элюирования, дающее конкретный выход и чистоту в данной области сохраненного пула, последующие хроматографические циклы, включающие рециркулированные фракции из предыдущего цикла в соответствии с изобретением, позволяли повысить выход в той же области удерживаемого пула при сохранении данной чистоты. Хранение фракций для последующей рециркуляции в контейнерах позволяло достичь увеличения выхода согласно изобретению на одной хроматографической матрице и обеспечивало гибкий временной промежуток между отдельными циклами хроматографии, не оказывая существенного влияния на способность процесса к уравниванию, что, в свою очередь, также давало время для использования анализов вне потока для проверки эффективности фракций между циклами, а разбавление свежим наносимым материалом также исключало необходимость в отдельном буфере для разбавления этих фракций. Наконец, концентрация сохраненного Fab в элюате также повышалась в циклах 2, 3 и 4 по сравнению с традиционным циклом 1.

Те же две фракции, отобранные для рециркуляции, снова сохраняли после 4-го цикла для повторного нанесения в 5-м цикле, а в 5-м цикле свежий наносимый материал разбавляли деионизированной водой до целевой проводимости 3,76 мСм/см так же, как в 1-м цикле до смешивания рециркулированных 21-й и 22-й фракций, и на этот раз дополнительную деионизированную воду не добавляли, чтобы снова снизить проводимость до 3,76 мСм/см после поступления дополнительной соли из элюирующего буфера, содержащегося в двух фракциях. Поскольку проводимость свежего наносимого сырья, которое предстояло наносить в следующем цикле, была намного ниже, чем требуется для обеспечения связывания, и его объем был намного больше, чем общий объем двух рециркулированных фракций, их смешивание обеспечивало бы разбавление соли с высокой проводимостью во фракциях на достаточном уровне, чтобы она не мешала связыванию обычных связываемых компонентов во время нанесения в следующем цикле. В сохраненном пуле после 5-го цикла наблюдали меньшее, но все же существенное увеличение выхода по сравнению с начальным (контрольным) циклом на 13% и немного сниженную, но все же сопоставимую чистоту с потерей 6% при общем увеличении чистоты*, с получением баланса 106%, демонстрирующего, что можно добиться дополнительного общего увеличения эффективности даже без дополнительного разбавления комбинированного сырья.

Еще раз такие же две фракции собирали и рециркулировали с 5-го по 6-й цикл, в этот раз с разбавлением комбинированного сырья до 3,76 мСм/см, как и раньше, и в этом цикле было достигнуто значительное повышение и выхода, и чистоты в сохраненном пуле одновременно. Проводили последний седьмой цикл, в котором 20-ю, 21-ю, 22-ю и 23-ю фракции из 6-го цикла объединяли со свежим сырьем и разбавляли до 3,76 мСм/см деионизированной водой перед нанесением в 7-м цикле. В случае если потенциальные будущие циклы будут продолжены с рециркуляцией в этом новом расширенном диапазоне фракций, фракции, включенные в удерживаемый пул, обязательно будут уменьшены на одну, начиная с 24-й до 31-й фракций. В этом случае сохраненный пул будет иметь примерно такой же выход (97%) и повышенную на 8% чистоту по сравнению с исходным диапазоном оставшегося пула начального цикла, демонстрируя способность повышения чистоты при сохранении выхода, и давать на 32% больший выход и повышенную на 11% чистоту по сравнению с сохраненным пулом начального цикла, включавшего те же фракции. В случае если этот цикл не будет продолжаться после 7-го цикла, сохраненный пул, включающий 23-31 фракции из 7-го цикла, дает повышенный на 34% выход и повышенную на 12% чистоту по сравнению с тем же рециркулированным пулом из начального цикла, демонстрируя, что оба этих показателя могут быть значительно повышены.

Увеличение чистоты в результате всего процесса вычисляли как чистоту сохраняемого пула в данном цикле, деленную на чистоту сохраненного пула в начальном цикле, а повышение выхода в результате всего вычисляли как выход в сохраняемом пуле в данном цикле, деленный на выход в сохраненном пуле в начальном цикле.

Таким образом, было продемонстрировано, что рециркуляция выбранных фракций, взятых в области перекрывания частично разделенных пиков из одного цикла, в наносимом материале следующего цикла может быть направлена на повышение выхода или чистоты, или их комбинаций, в оставшемся не рециркулированном сохраненном материале для улучшения эффективной очистки целевого продукта.

Рациональному выбору фракций для рециркуляции может способствовать компьютерное моделирование -после определения количеств Fab и не-Fab в образцах в начальном цикле, была создана компьютерная модель распределений пиков, которая позволила вычислить количество Fab и не-Fab в данном наборе фракций для потенциальной рециркуляции, и смоделировать изменение состава и количества пиков в следующем сохраненном пуле, если их потребуется рециркулировать, и посредством итерации позволила предсказать итоговое изменение чистоты и выхода во множестве циклов. Затем фракции, выбранные для рециркуляции, в этом моделировании были изменены с целью итерационного поиска условий, при которых с высокой вероятностью произойдет повышение чистоты и/или выхода, по желанию. Этот процесс можно направлять в любом направлении, способствующем либо присутствию Fab в сохраненном пуле на одной стороне рециркулированных фракций (последних фракций), либо не-Fab на другой стороне рециркулированных фракций (ранних фракций). Соответственно концентрации целевого продукта также могут быть повышены с помощью этого направленного способа. Этот процесс, направляющий выбор рециркуляции 21-й 22-й фракций в первых 6 циклах, и данные анализа из 6-го цикла использовали для повторной калибровки моделирования, которое в этом случае указывало на рециркуляцию 20-й - 23-й фракций в 7-го цикле.

Этот метод рециркуляции будет естественно распространяться на любую хроматографию любых компонентов с пиками, которые элюируются с перекрыванием, аналогичным описанному примеру, независимо от того, было ли их частичное разделение вызвано градиентным элюированием, при условии, что разделение пиков с точки зрения времени проскока и формы пиков остаются такими же, как и в случае той или иной хроматографии, где дифференциальное разделение между подвижными компонентами, приводящее к разному времени проскока и форме пиков, зависит от дифференциального химического и/или электростатического взаимодействия между ними и иммобилизованным лигандом. Кроме того, этот подход к рециркуляции естественным образом будет распространяться на любую систему с несколькими пиками с несколькими парными перекрываниями, такими как три последовательных пика, имеющих два перекрывания, или 4 пика, имеющих 3 перекрывания, или 4 пика, разделенных на две пары, каждая из которых имеет одно перекрывание, и так далее. В каждом случае можно использовать оптимизацию области каждого перекрывания для повторного использования в следующих циклах, чтобы дифференцированно способствовать повышению выхода (и концентрации) и/или чистоты требуемого компонента, преобладающего в сохраняемом пуле целевого пика относительно нежелательного компонента, преобладающего в перекрывающемся пике-партнере или, например, в случае пика требуемого компонента, окруженного двумя перекрывающимися пиками нежелательного компонента впереди и позади него, участки перекрывающихся областей обоих из них могут быть рециркулированы с предпочтением среднему целевому пику по сравнению с его обоими соседними пиками.

В приведенном выше примере показано, что с помощью способа в соответствии с изобретением могут быть реализованы различные преимущества, включая повышение чистоты, повышение выхода, повышение концентрации, разбавление без затрат, возможность перерыва в работе, работа с одной колонкой, произвольный порядок повторного нанесения материала.

Признаки настоящего изобретения, раскрытые в описании, формуле изобретения и/или чертежах, могут как отдельно, так и в любой их комбинации служить материалом для реализации изобретения в различных его формах.

Использованные источники.

Kontermann, R.E. (2012). "Dual targeting strategies with bispecific antibodies". MAbs 4(2): 182-197.

Mahajan, E.A. George and B. Wolk (2012). "Improving affinity chromatography resin efficiency using semi-continuous chromatography". J Chromatogr A 1227: 154-162.

Далее, после полного описания настоящего изобретения, специалистам в данной области будет очевидно, что то же самое может быть выполнено в широком диапазоне эквивалентных параметров, концентраций и условий без отступления от сущности и объема изобретения и без излишних экспериментов. Хотя данное изобретение было описано в связи с его конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что оно допускает дополнительные модификации. Настоящая заявка предназначена для охвата любых вариаций, применений или адаптаций изобретения, соответствующих, в целом, принципам изобретения и включающих такие отступления от настоящего описания, которые соответствуют известной или общепринятой практике в области техники, к которой относится изобретение, и которые могут применяться к существенным признакам, изложенным выше, в объеме прилагаемой формулы изобретения.

При использовании в настоящем документе "между X и Y" может означать диапазон, включающий X и Y.

Все источники, цитируемые в настоящем документе, включая журнальные статьи или рефераты, опубликованные или неопубликованные заявки на патент США или других стран, выданные патенты США или других стран, или любые другие источники полностью включены в настоящий документ посредством отсылки, включая все данные, таблицы, рисунки и текст, представленные в цитируемом источнике. Кроме того, все содержание источников, цитируемых в источниках, цитируемых в настоящем документе, также полностью включено посредством отсылки.

Ссылка на этапы известного способа, этапы стандартных способов, известные способы или стан-

дартные способы никоим образом не является признанием того, что какой-либо аспект, описание или вариант осуществления настоящего изобретения раскрыт, описан или предложен в соответствующем уровне техники. Далее представлены аспекты изобретения:

1. Способ очистки представляющего интерес соединения из смеси, включающей представляющее интерес соединение, где способ включает следующие этапы:

а) в первом рабочем хроматографическом цикле, нанесение смеси, включающей представляющее интерес соединение, из первого контейнера на хроматографическую матрицу, осуществляемое таким образом, что соединение связывается с хроматографической матрицей;

б) элюирование представляющего интерес соединения с хроматографической матрицы и сбор элюата, содержащего представляющее интерес соединение, в виде фракций элюата; и

с) повторное нанесение одной или более фракций элюата на ту же хроматографическую матрицу, осуществляемое таким образом, что представляющее интерес соединение связывается с хроматографической матрицей.

2. Способ согласно аспекту 1, где повторное нанесение в этапе с) является повторным нанесением в другом рабочем хроматографическом цикле одной или более фракций элюата на ту хроматографическую матрицу, осуществляемым таким образом, что представляющее интерес соединение связывается с хроматографической матрицей.

3. Способ согласно аспекту 2, где другой рабочий хроматографический цикл является непосредственно последующим хроматографическим циклом.

4. Способ согласно любому из аспектов 1-3, где одна или более фракций элюата, повторно наносимых на ту же хроматографическую матрицу, отличается от одной или более фракций элюата, обладающих требуемым свойством.

5. Способ согласно аспекту 4, где одна или более фракций элюата, повторно наносимых на ту же хроматографическую матрицу, является по меньшей мере одной или более фракциями элюата, элюируемыми с хроматографической матрицы перед одной или более фракциями элюата, обладающими требуемым свойством, и по меньшей мере одной или более фракциями элюата, элюируемыми с хроматографической матрицы после одной или более фракций элюата, обладающих требуемым свойством.

6. Способ согласно аспекту 5, где по меньшей мере одну или более фракций элюата, элюируемых с хроматографической матрицы перед одной или более фракциями элюата, обладающими требуемым свойством, и по меньшей мере одну или более фракций элюата, элюируемых с хроматографической матрицы после одной или более фракций элюата, обладающих требуемым свойством, повторно наносят на ту же хроматографическую матрицу отдельно.

7. Способ согласно аспекту 5, где по меньшей мере одну или более фракций элюата, элюируемых с хроматографической матрицы перед одной или более фракциями элюата, обладающими требуемым свойством, и по меньшей мере одну или более фракций элюата, элюируемых с хроматографической матрицы после одной или более фракций элюата, обладающих требуемым свойством, объединяют и повторно наносят такую комбинированную фракцию на ту же хроматографическую матрицу.

8. Способ согласно любому из аспектов 1-7, где одну или более фракций элюата обрабатывают до или во время повторного нанесения, где обработанные одна или более фракций элюата позволяют связываться представляющему интерес соединению с хроматографической матрицей после повторного нанесения.

9. Способ согласно любому из аспектов 1-8, где способ включает перед элюированием представляющего интерес соединения с хроматографической матрицы и сбором элюата, содержащего представляющее интерес соединение, в виде фракций элюата, следующие этапы:

аб) сбор проскока, содержащего несвязавшееся представляющее интерес соединение, во второй контейнер и

ас) в другом рабочем хроматографическом цикле, повторное нанесение проскока из второго контейнера на ту же хроматографическую матрицу, осуществляемое таким образом, что представляющее интерес соединение связывается с хроматографической матрицей.

10. Способ согласно любому из аспектов 1-8, где способ включает, до элюирования представляющего интерес соединения с хроматографической матрицы и сбора элюата, содержащего представляющее интерес соединение, в виде фракций элюата, следующие этапы

аб) сбор проскока, содержащего несвязавшееся представляющее интерес соединение, во второй контейнер и

ас) повторное нанесение проскока из второго контейнера на ту же хроматографическую матрицу и дополнительное нанесение смеси свежего наносимого материала в другом рабочем хроматографическом цикле, осуществляемое таким образом, что представляющий интерес белок связывается с хроматографической матрицей.

11. Способ согласно любому из аспектов 9-10, где проскок, собранный во второй контейнер, и одну или более фракций элюата отдельно повторно наносят в рабочем хроматографическом цикле.

12. Способ согласно любому из аспектов 9-10, где проскок и одну или более фракций элюата объединяют и повторно наносят в виде комбинации на ту же хроматографическую матрицу, работающую в

таком режиме, что представляющее интерес соединение связывается с хроматографической матрицей.

13. Способ согласно любому из аспектов 1-12, где представляющее интерес соединение выбрано из группы, включающей белок, антитело, фрагмент антитела, молекулу нуклеиновой кислоты и малую молекулу.

14. Способ производства представляющего интерес белка, включающий способ очистки, определенный в любом из аспектов 1-13, где в способе очистки представляющее интерес соединение является белком.

15. Белок, такой как антитело или фрагмент антитела, полученный способом производства представляющего интерес белка, как определено в аспекте 14.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ промышленной очистки биомолекулы-продукта из запаса сырья, включающего биомолекулу-продукт и по меньшей мере одну примесь, включающий следующие этапы:

а) нанесение сырья из запаса сырья на хроматографическую матрицу таким образом, что биомолекула-продукт связывается с хроматографической матрицей;

б) элюирование биомолекулы-продукта с хроматографической матрицы в элюате при нанесении элюирующего раствора на хроматографическую матрицу;

где элюат включает

первую фракцию, включающую очищенную биомолекулу-продукт; и

вторую фракцию, включающую биомолекулу-продукт и по меньшей мере одну примесь, где вторая фракция включает одну или более головных и/или хвостовых фракций;

и где первую фракцию собирают отдельно от второй фракции;

с) хранение второй фракции в одном или более контейнерах;

д) нанесение второй фракции из контейнера(ов) и дополнительного сырья из запаса сырья на хроматографическую матрицу таким образом, что биомолекула-продукт во второй фракции связывается с хроматографической матрицей; где дополнительное сырье наносят одновременно или последовательно со второй фракцией; и

е) элюирование биомолекулы-продукта с хроматографической матрицы в элюате при нанесении элюирующего раствора на хроматографическую матрицу, где элюат включает очищенную биомолекулу-продукт;

где хроматографическая матрица в этапах (а), (б), (д) и (е) является одной и той же хроматографической матрицей; и

указанные одна или более головных фракций представляют собой одну или более фракций, которые элюируются с хроматографической матрицы перед биомолекулой-продуктом, а указанные одна или более хвостовых фракций представляют собой одну или более фракций, которые элюируются с хроматографической матрицы после биомолекулы-продукта.

2. Способ по п.1, где этапы (б)-(д) повторяют.

3. Способ по п.1, где этапы (б)-(д) проводят по меньшей мере дважды.

4. Способ по любому из предыдущих пунктов, где вторая фракция включает: (i) головную фракцию, непосредственно предшествующую первой фракции; и/или (ii) хвостовую фракцию, следующую непосредственно после первой фракции.

5. Способ по любому из предыдущих пунктов, где

этапы (а) и (б) повторяют многократно;

вторые фракции, собранные в каждом этапе (б), смешивают вместе;

этап (с) включает хранение смешанных вторых фракций в контейнере(ах) и

этап (д) включает нанесение смешанных вторых фракций из контейнера(ов) на хроматографическую матрицу таким образом, что биомолекула-продукт в смешанных вторых фракциях связывается с хроматографической матрицей.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, где этап (а) дополнительно включает сбор проскока, содержащего несвязавшуюся биомолекулу-продукт, которая не связывается с хроматографической матрицей; и этап (д) дополнительно включает нанесение проскока на хроматографическую матрицу одновременно или последовательно со второй фракцией и/или дополнительным сырьем.

7. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий обработку второй фракции(й) с целью вызвать связывание биомолекулы на хроматографической матрице.

8. Способ по п.7, где указанная обработка происходит во время этапа (с) и/или этапа (д).

9. Способ по п.7 или 8, где указанная обработка включает изменение pH, ионной силы, концентрации, температуры и/или растворителя второй фракции(й) и/или перемешивание и/или дегазирование второй фракции(й).

10. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий анализ второй фракции(й), где анализ второй фракции(й) включает определение одного или более из концентрации биомолекулы-продукта; концентрации примесей; идентичности примесей; pH; ионной силы; температуры; рас-

творителя и/или концентрации газа во второй фракции(ях).

11. Способ по любому из предыдущих пунктов, где этап (с) включает хранение второй фракции(й) в течение по меньшей мере 5 мин.

12. Способ по любому из предыдущих пунктов, где этап (с) включает хранение второй фракции(й) в течение ночи.

13. Способ по п.11 или 12, где хроматографическую матрицу очищают в течение времени хранения.

14. Способ по любому из предыдущих пунктов, где биомолекула-продукт является белком, антителом, фрагментом антитела или полинуклеотидом.

15. Способ по любому из предыдущих пунктов, где запас сырья имеет объем по меньшей мере 20 л, необязательно по меньшей мере 100 л.

16. Способ по любому из предыдущих пунктов, где хроматографическая матрица имеет объем слоя по меньшей мере 4 л.

17. Способ по любому из предыдущих пунктов, где в этапе (b) объем элюата по меньшей мере в 2 раза превышает объем слоя хроматографической матрицы, необязательно где объем элюата от 2 до 20 раз превышает объем слоя хроматографической матрицы.

18. Способ по любому из предыдущих пунктов, где хроматографическая матрица выбрана из ионообменной хроматографической матрицы;
хроматографической матрицы гидрофобных взаимодействий;
аффинной хроматографической матрицы;
хроматографической матрицы смешанного режима;
хиральной хроматографической матрицы и
дизлектрической хроматографической матрицы.

19. Способ по любому из предыдущих пунктов, где хроматографическая матрица находится в хроматографической колонке.

20. Способ по любому из пп.1-19, где хроматографическая матрица является хроматографическим мембранным или монокитным адсорбером.

21. Способ по любому из предыдущих пунктов, где элюирование биомолекулы-продукта с хроматографической матрицы проводят при скорости потока по меньшей мере приблизительно 0,2 объема хроматографической матрицы в 1 мин.

22. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий объединение каждой из первых фракций.

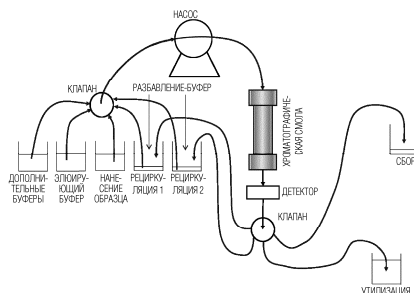
23. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий диафильтрацию и/или концентрирование очищенной биомолекулы-продукта.

24. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий нанофильтрацию очищенной биомолекулы-продукта.

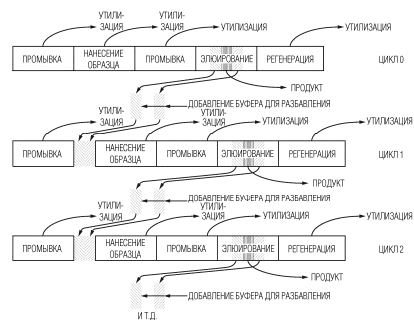
25. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий дополнительную хроматографическую очистку очищенной биомолекулы-продукта.

26. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий химическую модификацию очищенной биомолекулы-продукта.

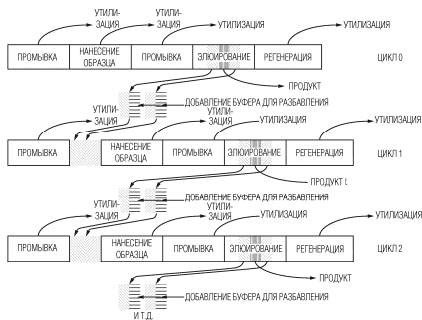
27. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий включение очищенной биомолекулы-продукта в композицию с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, разбавителем или адьювантом.



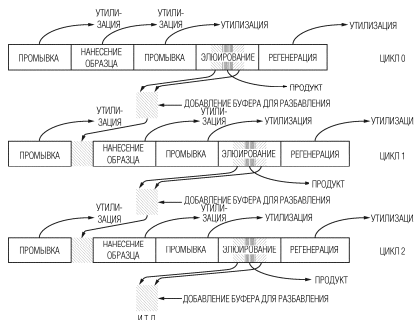
Фиг. 1



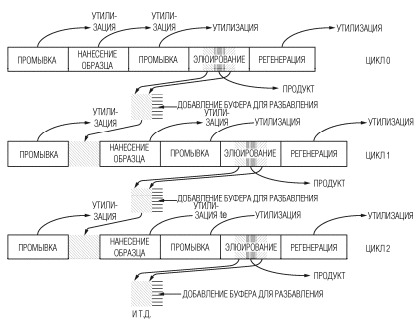
Фиг. 2



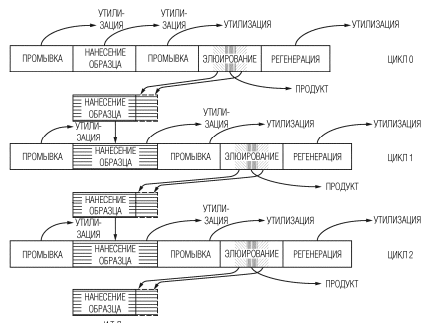
Фиг. 3



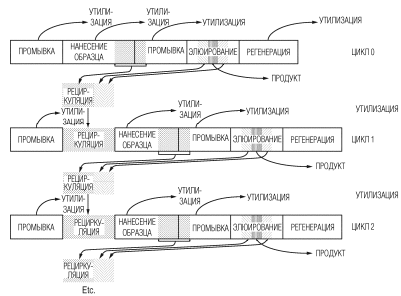
Фиг. 4



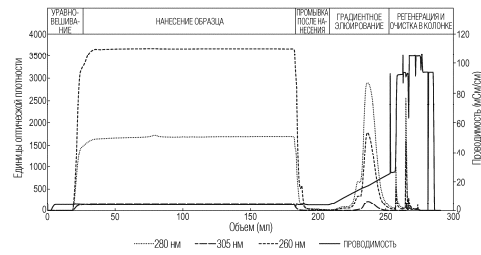
Фиг. 5



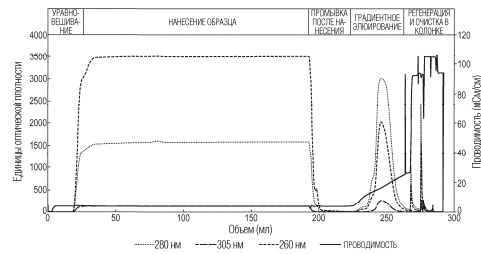
Фиг. 6



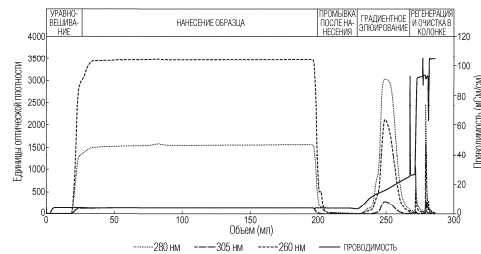
Фиг. 7



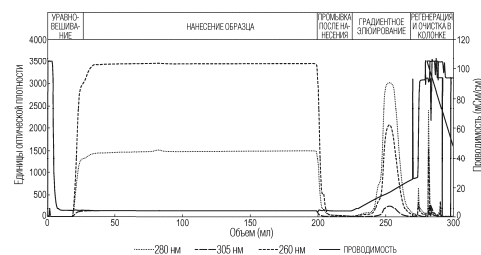
Фиг. 8



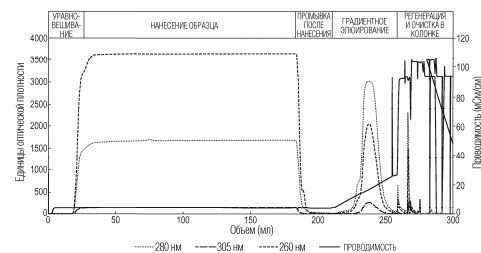
Фиг. 9



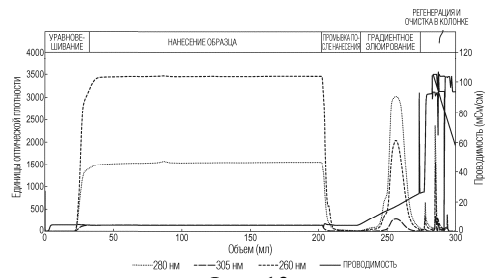
Фиг. 10



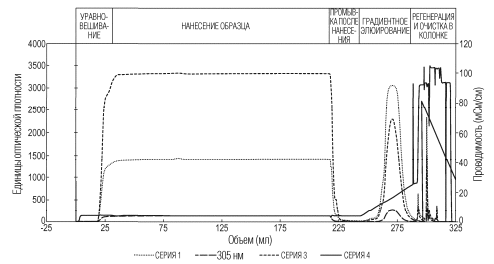
Фиг. 11



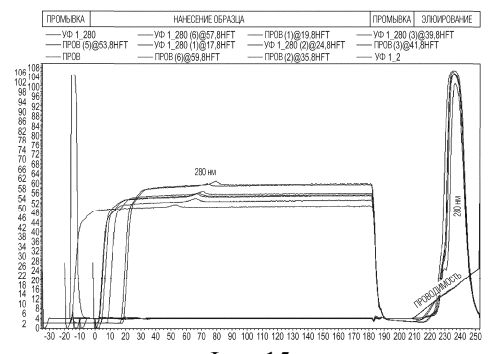
Фиг. 12



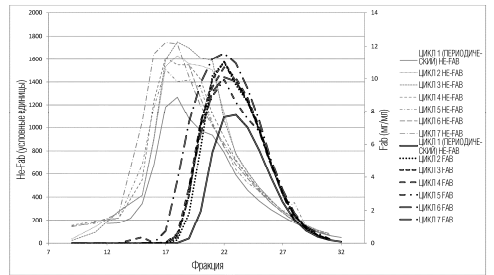
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16

	СОХРАНЯЕМЫЙ ПУЛ (РАННИЙ КАТИОНООБМЕННЫЙ ПИК)		СОХРАНЯЕМЫЙ ПУЛ (ПОЗДНИЙ КАТИОНООБМЕННЫЙ ПИК)	
ЦИКЛ	НЕ-FAV (УСЛОВНЫЕ ЕДИНИЦЫ)	FAV (мл)	НЕ-FAV (УСЛОВНЫЕ ЕДИНИЦЫ)	FAV (мл)
1	6083.10	2.26	2404.45	29.63
2	8023.39	7.78	3067.92	36.24
3	8380.01	10.50	3091.54	36.39
4	8476.27	11.73	2993.96	37.17
5	2525.75	10.53	2899.82	33.48
6	2800.57	9.97	2813.99	36.39
7*	8202.97	11.89	2871.66	39.72

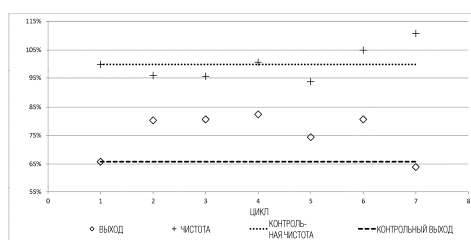
Фиг. 17

	СОХРАНЯЕМЫЙ ПУЛ (ЦЕЛЕВОЙ ПИК FAV)	
ЦИКЛ	HE-FAB	FAB (мг)
1	100%	100%
2	128%	122%
3	129%	123%
4	125%	125%
5	121%	113%
6	117%	123%
7*	119%	134%

Фиг. 18

	СОХРАНЯЕМЫЙ ПУЛ (ЦЕЛЕВОЙ ПИК FAV)	
ЦИКЛ	HE-FAB	FAB (мг)
1	100%	100%
2	104%	96%
3	105%	96%
4	99%	101%
5	107%	94%
6	95%	105%
7*	89%	112%

Фиг. 19



Фиг. 20

