

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390736** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.06.02

(51) Int. Cl. *C07K 1/22* (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.10.04

(54) **СПОСОБЫ СНИЖЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА В СПОСОБАХ
ОЧИСТКИ БЕЛКА**

(31) **63/086,915**

(32) **2020.10.02**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/053318**

(87) **WO 2022/072919 2022.04.07**

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

(72) Изобретатель:

**Боувс Брайан Дэвид, Кребс Лара
Эллен (US)**

(74) Представитель:

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

(57) Изобретение относится к способам снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, полученном рекомбинантным путем в клетке-хозяине, в способе изготовления белков, предназначенных для введения пациенту.

A1

202390736

202390736

A1

СПОСОБЫ СНИЖЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА В СПОСОБАХ ОЧИСТКИ БЕЛКА

Настоящее изобретение относится к области изготовления рекомбинантного белка. Более конкретно, согласно настоящему изобретению предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, в способе изготовления белков, предназначенных для введения пациенту, таких как терапевтические или диагностические белки.

Белки клетки-хозяина (НСР) представляют собой белки клеток-хозяев, которые участвуют в поддержании и росте клеток, а также в синтезе и процессинге белков. Однако в области терапевтических или диагностических белков присутствие НСР угрожает качеству продукта и безопасности пациентов, вызывая такие проблемы как агрегация, фрагментация продукта в результате каталитической активности и/или иммуногенность. Следовательно, НСР идентифицируют как критический показатель качества (CQA) белковых составов. Образование нецелевых агрегатов и фрагментация продукта требуют дополнительных этапов очистки для снижения/удаления НСР, и эти дополнительные этапы очистки часто приводят к снижению выхода целевого белка и увеличению общих затрат на изготовление.

Раскрыты сложности устранения НСР из способов изготовления и попытки усовершенствовать способы, чтобы снизить содержание НСР, например, как изложено в Gilgunn et al; Goey et al., *Biotechnology Advances* 36 (2018) 1223–1237; и *Current Opinion in Chemical Engineering* 2018, 22:98–106. Однако эти способы удаления НСР имеют ограничения. Например, в некоторых случаях эти раскрытия демонстрируют одно или более из неполного удаления НСР, расхождения в способах удаления НСР, приводящего к агрегации, совместной очистки целевых белков и НСР, нарушения функции продукта, проблем с иммуногенностью у пациентов и/или сниженных фармакокинетических свойств, таких как период полужизни. Кроме того, способы, разработанные для удаления НСР, часто требуют, например, необходимости работать с увеличенными объемами и дополнительными этапами очистки, что часто приводит к увеличению затрат на изготовление и снижению выхода. В некоторых случаях применимость способа ограничена конкретной молекулой и/или форматом. Таким образом, остается потребность в альтернативных способах снижения содержания НСР в способе очистки терапевтических или диагностических белков. С помощью таких альтернативных способов снижают содержание НСР, предпочтительно без влияния на стабильность, выход или стоимость продукта, чтобы в конечном итоге сохранить качество продукта, и

они пригодны для крупномасштабного изготовления и гарантируют безопасность пациентов.

Соответственно, настоящее изобретение направлено на решение одной или более из вышеперечисленных проблем путем обеспечения альтернативных способов снижения содержания НСР в препарате терапевтических или диагностических белков. Способы согласно настоящему изобретению обеспечивают воспроизводимые способы, которые являются высокоэффективными в удалении НСР, сохраняя при этом стабильность белка, снижая агрегацию, сохраняя выход продукта, и могут снижать риск иммуногенности. С помощью таких способов можно эффективно удалять НСР без потребности в увеличении объема белкового препарата. Способы согласно настоящему изобретению неожиданно обеспечили количество НСР, которое значительно ниже приемлемых для промышленности стандартов <100 м.д. В вариантах реализации способы согласно настоящему изобретению неожиданно обеспечили количество НСР <50 м.д., сохраняя при этом стабильность белка, снижая агрегацию и поддерживая выход продукта. Еще более неожиданно, другие варианты реализации настоящего изобретения обеспечили количество НСР <20 м.д., сохраняя при этом стабильность белка, снижая агрегацию и поддерживая выход продукта. Кроме того, согласно вариантам реализации настоящего изобретения предложены способы удаления НСР, которые применимы к широкому кругу молекул. Другие варианты реализации настоящего изобретения позволяют исключить дополнительные этапы очистки, что приводит к сокращению времени обработки партии и уменьшению затрат на изготовление.

Соответственно, согласно конкретным вариантам реализации предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, включающий обработку белкового препарата, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на колонке для аффинной хроматографии, элюирование представляющего интерес белка из хроматографической колонки комбинацией кислот, состоящей из слабой кислоты и сильной кислоты, с получением элюата, содержащего представляющий интерес белок, повышение рН элюата выше примерно рН 6,0, обработку элюата на глубинном фильтре и получение отфильтрованного белкового препарата. Согласно некоторым вариантам реализации ионная сила элюата с этапа повышения рН выше примерно 6,0 составляет от примерно 10 мМ до примерно 45 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации слабая кислота имеет не более одного значения рКа менее 7,0, и сильная кислота имеет не более одного значения рКа менее 7,0. Предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено. Более

предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено до менее чем примерно 100 м.д., до менее чем примерно 50 м.д. или до менее чем примерно 20 м.д.

Соответственно, согласно конкретным вариантам реализации предложен способ
5 снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, включающий обработку белкового препарата, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на колонке для аффинной хроматографии, элюирование представляющего
10 интерес белка из хроматографической колонки комбинацией кислот, состоящей из слабой кислоты и сильной кислоты, с получением элюата, содержащего представляющий интерес белок, выполнение вирусной инактивации элюата, повышение рН элюата выше примерно рН 6,0, обработку элюата на глубинном фильтре и получение отфильтрованного
15 белкового препарата. Согласно некоторым вариантам реализации ионная сила элюата с этапа повышения рН выше примерно 6,0 составляет от примерно 10 мМ до примерно 45 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации слабая кислота имеет не более одного значения рКа менее 7,0, и сильная кислота имеет не более одного значения рКа менее 7,0. Предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом
20 препарате снижено. Более предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено до менее чем примерно 100 м.д., до менее чем примерно 50 м.д. или до менее чем примерно 20 м.д.

Соответственно, согласно конкретным вариантам реализации предложен способ
25 снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, включающий обработку белкового препарата, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на колонке для аффинной хроматографии, элюирование представляющего
30 интерес белка из хроматографической колонки комбинацией кислот, состоящей из слабой кислоты и сильной кислоты, с получением элюата, содержащего представляющий интерес белок, выполнение вирусной инактивации, включающей доведение рН элюата с указанного этапа элюирования белка из хроматографической колонки ниже примерно рН
35 4,0, и при этом указанный элюат поддерживают при рН ниже примерно 4,0 в течение от примерно 0 минут до примерно 180 минут, повышение рН элюата выше примерно рН 6,0, обработку элюата, содержащего белок, на глубинном фильтре и получение отфильтрованного белкового препарата. Согласно некоторым вариантам реализации ионная сила элюата с этапа повышения рН выше примерно 6,0 составляет от примерно 10 мМ до примерно 45 мМ. Предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в

отфильтрованном белковом препарате снижено. Более предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено до менее чем примерно 100 м.д., до менее чем примерно 50 м.д. или до менее чем примерно 20 м.д.

Соответственно, согласно конкретным вариантам реализации предложен способ
5 снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, включающий обработку белкового препарата, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на колонке для аффинной хроматографии, элюирование представляющего
10 интерес белка из хроматографической колонки комбинацией кислот, состоящей из слабой кислоты и сильной кислоты, с получением элюата, содержащего представляющий интерес белок, причем указанная слабая кислота представляет собой уксусную кислоту и указанная сильная кислота представляет собой фосфорную кислоту или молочную кислоту, доведение рН элюата, содержащего белок, с указанного этапа элюирования белка
15 поддерживают при рН ниже примерно 4,0 в течение от примерно 0 минут до примерно 180 минут, повышение рН элюата выше примерно рН 6,0, обработку элюата, содержащего белок, на глубинном фильтре и получение отфильтрованного белкового препарата. Согласно некоторым вариантам реализации ионная сила элюата с этапа повышения рН
20 выше примерно 6,0 составляет от примерно 10 мМ до примерно 45 мМ. Предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено. Более предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено до менее чем примерно 100 м.д., до менее чем примерно 50 м.д. или до менее чем примерно 20 м.д.

Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в настоящем
25 раскрытии предложен способ снижения содержания белка в клетке-хозяине в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, включающий обработку белкового препарата, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на колонке для аффинной хроматографии, элюирование представляющего интерес
30 интерес белка из хроматографической колонки комбинацией кислот, состоящей из слабой кислоты и сильной кислоты, с получением элюата, содержащего представляющий интерес белок, причем указанная слабая кислота представляет собой уксусную кислоту и указанная сильная кислота представляет собой фосфорную кислоту, при этом концентрация указанной уксусной кислоты составляет примерно 20 мМ, и при этом концентрация указанной фосфорной кислоты составляет от
35 примерно 5 мМ до примерно 10 мМ, доведение рН элюата, содержащего белок, с

указанного этапа элюирования белка из хроматографической колонки ниже примерно рН 4,0, и при этом указанный элюат поддерживают при рН ниже примерно 4,0 в течение от примерно 0 минут до примерно 180 минут, повышение рН элюата выше примерно рН 6,0, обработку элюата, содержащего белок, на глубинном фильтре и получение отфильтрованного белкового препарата. Согласно некоторым вариантам реализации ионная сила элюата с этапа повышения рН выше примерно 6,0 составляет от примерно 10 мМ до примерно 45 мМ. Предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено. Более предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено до менее чем примерно 100 м.д., до менее чем примерно 50 м.д. или до менее чем примерно 20 м.д.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в настоящем раскрытии предложен способ снижения содержания белка в клетке-хозяине в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, включающий обработку белкового препарата, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на колонке для аффинной хроматографии, элюирование представляющего интерес белка из хроматографической колонки комбинацией кислот, состоящей из слабой кислоты и сильной кислоты, с получением элюата, содержащего представляющий интерес белок, причем указанная слабая кислота представляет собой уксусную кислоту и указанная сильная кислота представляет собой молочную кислоту, при этом концентрация указанной уксусной кислоты составляет примерно 20 мМ, и при этом концентрация указанной молочной кислоты составляет примерно 5 мМ, доведение рН элюата, содержащего белок, с указанного этапа элюирования белка из хроматографической колонки ниже примерно рН 4,0, и при этом указанный элюат поддерживают при рН ниже примерно 4,0 в течение от примерно 0 минут до примерно 180 минут, повышение рН элюата выше примерно рН 6,0, обработку элюата, содержащего белок, на глубинном фильтре и получение отфильтрованного белкового препарата. Согласно некоторым вариантам реализации ионная сила элюата с этапа повышения рН выше примерно 6,0 составляет от примерно 10 мМ до примерно 45 мМ. Предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено. Более предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено до менее чем примерно 100 м.д., до менее чем примерно 50 м.д. или до менее чем примерно 20 м.д.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине,

включающий обработку белкового препарата, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на колонке для аффинной хроматографии, элюирование представляющего интерес белка из хроматографической колонки комбинацией кислот, состоящей из слабой кислоты и сильной кислоты, с получением элюата, содержащего представляющий интерес белок, причем указанная слабая кислота представляет собой уксусную кислоту и указанная сильная кислота представляет собой фосфорную кислоту или молочную кислоту, доведение рН элюата, содержащего белок, с указанного этапа элюирования белка из хроматографической колонки, при этом указанный этап доведения рН элюата включает добавление примерно 20 мМ HCl к элюату, при этом указанный рН элюата доводят до уровня от примерно рН 3,3 до примерно рН 3,7, и при этом указанный элюат поддерживают при рН от примерно 3,3 до примерно рН 3,7 в течение от примерно 0 минут до примерно 180 минут, повышение рН элюата выше примерно рН 6,0, обработку элюата, содержащего белок, на глубинном фильтре и получение отфильтрованного белкового препарата. Согласно некоторым вариантам реализации ионная сила элюата с этапа повышения рН выше примерно 6,0 составляет от примерно 10 мМ до примерно 45 мМ. Предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено. Более предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено до менее чем примерно 100 м.д., до менее чем примерно 50 м.д. или до менее чем примерно 20 м.д.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, включающий обработку белкового препарата, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на колонке для аффинной хроматографии, элюирование представляющего интерес белка из хроматографической колонки комбинацией кислот, состоящей из слабой кислоты и сильной кислоты, с получением элюата, содержащего представляющий интерес белок, причем указанная слабая кислота представляет собой уксусную кислоту и указанная сильная кислота представляет собой фосфорную кислоту или молочную кислоту, доведение рН элюата, содержащего белок, с указанного этапа элюирования белка из хроматографической колонки, при этом указанный этап доведения рН элюата включает добавление примерно 20 мМ HCl к элюату, при этом указанный рН элюата доводят до примерно 3,5, и при этом указанный элюат поддерживают при рН 3,5 в течение от примерно 0 минут до примерно 180 минут, повышение рН элюата выше примерно рН 6,0, обработку элюата, содержащего белок, на глубинном фильтре и получение отфильтрованного белкового препарата. Согласно некоторым вариантам реализации

ионная сила элюата с этапа повышения рН выше примерно 6,0 составляет от примерно 10 мМ до примерно 45 мМ. Предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено. Более предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено до менее чем примерно 100 м.д., до менее чем примерно 50 м.д. или до менее чем примерно 20 м.д.

Согласно некоторым конкретным вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, включающий обработку белкового препарата, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на колонке для аффинной хроматографии, элюирование представляющего интерес белок из хроматографической колонки комбинацией кислот, состоящей из слабой кислоты и сильной кислоты, с получением элюата, содержащего представляющий интерес белок, причем указанная слабая кислота представляет собой уксусную кислоту и указанная сильная кислота представляет собой фосфорную кислоту или молочную кислоту, доведение рН элюата, содержащего белок, с указанного этапа элюирования белка из хроматографической колонки до рН ниже примерно 4,0, и при этом указанный элюат поддерживают при рН ниже примерно рН 4,0 в течение от примерно 0 минут до примерно 180 минут, повышение рН элюата до уровня от примерно рН 6,5 до примерно рН 7,5, включающее добавление к элюату примерно 250 мМ трис-буфера, и обработку элюата, содержащего белок, на глубинном фильтре и получение отфильтрованного белкового препарата. Согласно некоторым вариантам реализации повышение рН элюата до уровня от примерно рН 6,5 до примерно рН 7,5 включает добавление к элюату от примерно 100 мМ до примерно 1000 мМ трис-буфера. Согласно некоторым вариантам реализации ионная сила элюата с этапа повышения рН выше от примерно 6,5 до примерно рН 7,5 составляет от примерно 10 мМ до примерно 45 мМ. Предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено. Более предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено до менее чем примерно 100 м.д., до менее чем примерно 50 м.д. или до менее чем примерно 20 м.д.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, включающий обработку белкового препарата, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на колонке для аффинной хроматографии, элюирование представляющего интерес белок из хроматографической колонки комбинацией кислот, состоящей из слабой

кислоты и сильной кислоты, с получением элюата, содержащего представляющий интерес белок, причем указанная слабая кислота представляет собой уксусную кислоту и указанная сильная кислота представляет собой фосфорную кислоту или молочную кислоту, доведение рН элюата, содержащего белок, с указанного этапа элюирования белка из хроматографической колонки до рН ниже примерно 4,0, и при этом указанный элюат поддерживают при рН ниже примерно рН 4,0 в течение от примерно 0 минут до примерно 180 минут, повышение рН элюата до примерно рН 7,0, включающее добавление к элюату примерно 250 мМ трис-буфера, обработку элюата, содержащего белок, на глубинном фильтре и получение отфильтрованного белкового препарата. Согласно некоторым вариантам реализации повышение рН элюата до уровня от примерно рН 6,5 до примерно рН 7,5 включает добавление к элюату от примерно 100 мМ до примерно 1000 мМ трис-буфера. Согласно некоторым вариантам реализации ионная сила элюата с этапа повышения рН до примерно 7,0 составляет от примерно 10 мМ до примерно 45 мМ. Предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено. Более предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено до менее чем примерно 100 м.д., до менее чем примерно 50 м.д. или до менее чем примерно 20 м.д.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, включающий обработку белкового препарата, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на колонке для аффинной хроматографии, элюирование представляющего интерес белка из хроматографической колонки комбинацией кислот, состоящей из слабой кислоты и сильной кислоты, с получением элюата, содержащего представляющий интерес белок, причем указанная слабая кислота представляет собой уксусную кислоту и указанная сильная кислота представляет собой фосфорную кислоту или молочную кислоту, доведение рН элюата, содержащего белок, с указанного этапа элюирования белка из хроматографической колонки до рН ниже примерно 4,0, и при этом указанный элюат поддерживают при рН ниже примерно 4,0 в течение от примерно 0 минут до примерно 180 минут, повышение рН элюата до рН выше примерно 6,0, обработку элюата, содержащего белок, на глубинном фильтре и получение отфильтрованного белкового препарата, при этом указанный элюат, обработанный на глубинном фильтре, имеет ионную силу от примерно 10 мМ до примерно 45 мМ. Предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено. Более предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено до

менее чем примерно 100 м.д., до менее чем примерно 50 м.д. или до менее чем примерно 20 м.д.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, включающий обработку белкового препарата, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на колонке для аффинной хроматографии, элюирование представляющего интерес белка из хроматографической колонки комбинацией кислот, состоящей из слабой кислоты и сильной кислоты, с получением элюата, содержащего представляющий интерес белок, причем указанная слабая кислота представляет собой уксусную кислоту и указанная сильная кислота представляет собой фосфорную кислоту или молочную кислоту, доведение рН элюата, содержащего белок, с указанного этапа элюирования белка из хроматографической колонки до рН ниже примерно 4,0, и при этом указанный элюат поддерживают при рН ниже примерно рН 4,0 в течение от примерно 0 минут до примерно 180 минут, и при этом обеспечивается вирусная инактивация.

Согласно настоящему изобретению предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, включающий обработку белкового препарата, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на колонке для аффинной хроматографии, элюирование представляющего интерес белка из хроматографической колонки комбинацией кислот, состоящей из слабой кислоты и сильной кислоты, с получением элюата, содержащего представляющий интерес белок, причем указанная слабая кислота включает уксусную кислоту в концентрации примерно 20 мМ, и причем указанная сильная кислота включает любую из фосфорной кислоты, муравьиной кислоты или молочной кислоты, при этом концентрация указанной сильной кислоты составляет от примерно 5 мМ до примерно 10 мМ, доведение рН элюата, содержащего белок, с указанного этапа элюирования белка из хроматографической колонки, при этом указанный этап доведения рН элюата включает добавление к элюату любой из HCl, фосфорной кислоты, лимонной кислоты или комбинации уксусной кислоты и фосфорной кислоты, при этом указанный рН доводят до рН ниже примерно 4,0, и при этом указанный элюат поддерживают при рН ниже примерно рН 4,0 в течение от примерно 0 минут до примерно 180 минут, повышение рН элюата выше уровня от примерно рН 6,0 до примерно рН 7,5, обработку элюата, содержащего белок, на глубинном фильтре и получение отфильтрованного белкового препарата. Согласно некоторым вариантам реализации ионная сила элюата с этапа повышения рН выше уровня

- от примерно 6,0 до примерно 7,5 составляет от примерно 10 мМ до примерно 45 мМ. Предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено. Более предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено до менее чем примерно 100 м.д. Согласно
- 5 дополнительным вариантам реализации этап элюирования включает комбинацию кислот, состоящую из уксусной кислоты и фосфорной кислоты, уксусной кислоты и молочной кислоты или уксусной кислоты и муравьиной кислоты, и при этом указанный этап доведения рН ниже примерно рН 4,0 включает добавление любой из HCl, фосфорной кислоты, лимонной кислоты или комбинации уксусной кислоты и фосфорной кислоты.
- 10 Согласно дополнительным вариантам реализации этап элюирования включает комбинацию любой из примерно 20 мМ уксусной кислоты и примерно 10 мМ фосфорной кислоты, примерно 20 мМ уксусной кислоты и примерно 5 мМ фосфорной кислоты или примерно 20 мМ уксусной кислоты и примерно 5 мМ муравьиной кислоты, и при этом указанный этап доведения рН ниже примерно рН 4,0 включает добавление любой из
- 15 примерно 20 мМ HCl, от примерно 15 мМ до примерно 200 мМ фосфорной кислоты, примерно 1000 мМ лимонной кислоты или комбинации примерно 20 мМ уксусной кислоты и примерно 10 мМ фосфорной кислоты. Согласно таким вариантам реализации ионная сила элюата с этапа повышения рН выше рН примерно 6,0 составляет от примерно 10 мМ до примерно 45 мМ.
- 20 Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, включающий этапы:
- обработки белкового препарата, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на колонке для аффинной хроматографии;
- 25 элюирования представляющего интерес белка из хроматографической колонки комбинацией кислот, состоящей из слабой кислоты и сильной кислоты, с получением элюата, содержащего представляющий интерес белок; причем указанная слабая кислота представляет собой уксусную кислоту и указанная сильная кислота представляет собой фосфорную кислоту или молочную кислоту;
- 30 доведения рН элюата, содержащего белок, с указанного этапа элюирования белка из хроматографической колонки до рН ниже примерно 4,0, и при этом указанный элюат поддерживают при рН ниже примерно 4,0 в течение от примерно 0 минут до примерно 180 минут;
- повышения рН элюата выше примерно рН 6,0;
- 35 обработки элюата, содержащего белок, на глубинном фильтре, и

получения отфильтрованного белкового препарата.

Предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено. Более предпочтительно содержание белка клетки-хозяина в отфильтрованном белковом препарате снижено до менее чем примерно 100 м.д., до менее чем примерно 50 м.д. или до менее чем примерно 20 м.д.

Согласно некоторым вариантам реализации белок представляет собой терапевтический или диагностический белок, например, антитело, слитый белок Fc, пептид, иммуноадгезин, фермент, фактор роста, рецептор, гормон, регуляторный фактор, цитокин, антиген, пептид или связывающий агент. Согласно некоторым вариантам реализации белок представляет собой антитело, например, моноклональное антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело, человеческое антитело, биспецифичное антитело или фрагмент антитела. Согласно некоторым вариантам реализации белок представляет собой антитело IgG1 или содержит часть Fc антитела IgG1. Согласно некоторым вариантам реализации белок представляет собой антитело к SARS-COV-2.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в препарате антитела к SARS-COV-2, полученном рекомбинантным путем в клетке-хозяине, включающий этапы:

обработки препарата антитела к SARS-COV-2, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на колонке для аффинной хроматографии, например, на колонке для аффинной хроматографии с белком А;

элюирования антитела к SARS-COV-2 комбинацией кислот, состоящей из уксусной кислоты и фосфорной кислоты, или комбинацией уксусной кислоты и молочной кислоты, с получением элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2;

доведения pH элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, путем добавления примерно 20 mM HCl, причем указанный pH доводят до уровня от примерно pH 3,3 до примерно pH 3,7, и при этом указанный элюат поддерживают при pH от примерно pH 3,3 до примерно pH 3,7 в течение от примерно 0 минут до примерно 180 минут;

повышения pH элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, путем добавления примерно 250 mM трис-буфера, при этом указанный pH повышают до уровня от примерно pH 6,5 до примерно pH 7,5; и

обработки элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, на глубинном фильтре и получения отфильтрованного препарата антитела к SARS-COV-2,

причем содержание белка клетки-хозяина в указанном отфильтрованном препарате антитела к SARS-COV-2 после глубинной фильтрации снижено до уровня от примерно 0

м.д. до примерно 100 м.д., и при этом указанное антитело к SARS-COV-2 представляет собой антитело IgG1.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в настоящем раскрытии предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в препарате антитела к SARS-COV-2, полученном рекомбинантным путем в клетке-хозяине, включающий обработку препарата антитела к SARS-COV-2, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на хроматографической колонке с белком А, элюирование антитела к SARS-COV-2 из хроматографической колонки комбинацией кислот, состоящей из примерно 20 мМ уксусной кислоты и примерно 5 мМ фосфорной кислоты, или комбинацией кислот, состоящей из примерно 20 мМ уксусной кислоты и примерно 10 мМ фосфорной кислоты, или комбинацией кислот, состоящей из примерно 20 мМ уксусной кислоты и примерно 5 мМ молочной кислоты, с получением элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, доведение рН элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, путем добавления примерно 20 мМ HCl, при этом указанный рН снижают до уровня от примерно 3,3 до примерно 3,7, и при этом указанный элюат поддерживают при рН от примерно 3,3 до примерно 3,7 в течение от примерно 0 минут до примерно 180 минут, повышение рН элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, путем добавления примерно 250 мМ Трис-буфера, при этом указанный рН повышают до уровня от примерно рН 6,5 до примерно рН 7,5, обработку элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, на глубинном фильтре и получение отфильтрованного препарата антитела к SARS-COV-2, при этом содержание белка клетки-хозяина в указанном отфильтрованном препарате антитела к SARS-COV-2 составляет от примерно 0 м.д. до примерно 100 м.д., и при этом указанное антитело к SARS-COV-2 представляет собой антитело IgG1. Согласно некоторым вариантам реализации повышение рН элюата до уровня от примерно рН 6,5 до примерно рН 7,5 включает добавление к элюату от примерно 100 мМ до примерно 1000 мМ трис-буфера.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в настоящем раскрытии предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в препарате антитела к SARS-COV-2, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, включающий обработку препарата антитела к SARS-COV-2, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на хроматографической колонке с белком А, элюирование антитела к SARS-COV-2 из хроматографической колонки комбинацией кислот, состоящей из примерно 20 мМ уксусной кислоты и примерно 5 мМ фосфорной кислоты, или комбинацией кислот, состоящей из примерно 20 мМ уксусной кислоты и примерно 10 мМ фосфорной кислоты, или комбинацией кислот, состоящей из примерно

20 мМ уксусной кислоты и примерно 5 мМ молочной кислоты, с получением элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, доведение рН элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, используя примерно 20 мМ HCl, при этом указанный рН доводят до рН примерно 3,5, и при этом указанный элюат поддерживают при рН примерно 3,5 в течение от примерно 0 минут до примерно 180 минут, повышение рН элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, используя примерно 250 мМ трис-буфера, при этом указанный рН повышают до уровня от примерно рН 6,5 до примерно рН 7,5, обработку элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, на глубинном фильтре и получение отфильтрованного препарата антитела к SARS-COV-2, при этом содержание белка клетки-хозяина в указанном отфильтрованном препарате антитела к SARS-COV-2 составляет от примерно 0 м.д. до примерно 100 м.д., и при этом указанное антитело к SARS-COV-2 представляет собой антитело IgG1. Согласно некоторым вариантам реализации повышение рН элюата до уровня от примерно рН 6,5 до примерно рН 7,5 включает добавление к элюату от примерно 100 мМ до примерно 1000 мМ трис-буфера.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в настоящем раскрытии предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в препарате антитела к SARS-COV-2, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, включающий обработку препарата антитела к SARS-COV-2, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на хроматографической колонке с белком А, элюирование антитела к SARS-COV-2 из хроматографической колонки комбинацией кислот, состоящей из примерно 20 мМ уксусной кислоты и примерно 5 мМ фосфорной кислоты, или комбинацией кислот, состоящей из примерно 20 мМ уксусной кислоты и примерно 10 мМ фосфорной кислоты, или комбинацией кислот, состоящей из примерно 20 мМ уксусной кислоты и примерно 5 мМ молочной кислоты, с получением элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, доведение рН элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, путем добавления примерно 20 мМ HCl, при этом указанный рН снижают до рН примерно 3,5, и при этом указанный элюат поддерживают при рН примерно 3,5 в течение от примерно 0 минут до примерно 180 минут, и при этом обеспечивается вирусная инактивация.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в настоящем раскрытии предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в препарате антитела к SARS-COV-2, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, включающий обработку препарата антитела к SARS-COV-2, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на хроматографической колонке с белком А, элюирование антитела к SARS-COV-2 из хроматографической колонки комбинацией

кислот, состоящей из примерно 20 мМ уксусной кислоты и примерно 5 мМ фосфорной кислоты, или комбинацией кислот, состоящей из примерно 20 мМ уксусной кислоты и примерно 10 мМ фосфорной кислоты, или комбинацией кислот, состоящей из примерно 20 мМ уксусной кислоты и примерно 5 мМ молочной кислоты, с получением элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, доведение рН элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, путем добавления примерно 20 мМ HCl, при этом указанный рН снижают до уровня от примерно 3,3 до примерно 3,7, и при этом указанный элюат поддерживают при рН от примерно 3,3 до примерно 3,7 в течение от примерно 0 минут до примерно 180 минут, повышение рН элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, используя примерно 250 мМ трис-буфера, при этом указанный рН повышают до примерно рН 7,25, обработку элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, на глубинном фильтре и получение отфильтрованного препарата антитела к SARS-COV-2, при этом содержание белка клетки-хозяина в указанном отфильтрованном препарате антитела к SARS-COV-2 составляет от примерно 0 м.д. до примерно 100 м.д., и при этом указанное антитело к SARS-COV-2 представляет собой антитело IgG1. Согласно некоторым вариантам реализации повышение рН элюата до примерно рН 7,25 включает добавление к элюату от примерно 100 мМ до примерно 1000 мМ трис-буфера.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в настоящем раскрытии предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в препарате антитела к SARS-COV-2, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, включающий обработку препарата антитела к SARS-COV-2, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на хроматографической колонке с белком А, элюирование антитела к SARS-COV-2 из хроматографической колонки комбинацией кислот, состоящей из примерно 20 мМ уксусной кислоты и примерно 5 мМ фосфорной кислоты, или комбинацией кислот, состоящей из примерно 20 мМ уксусной кислоты и примерно 5 мМ фосфорной кислоты, или комбинацией кислот, состоящей из примерно 20 мМ уксусной кислоты и примерно 5 мМ молочной кислоты, с получением элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, доведение рН элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, путем добавления примерно 20 мМ HCl, при этом указанный рН снижают до примерно рН 3,5, и при этом указанный элюат поддерживают при рН примерно 3,5 в течение от примерно 0 минут до примерно 180 минут, повышение рН элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, путем добавления примерно 250 мМ трис-буфера, при этом указанный рН повышают до примерно рН 7,25, обработку элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, на глубинном фильтре и получение отфильтрованного препарата антитела к SARS-COV-2, при этом содержание белка клетки-хозяина в указанном

отфильтрованном препарате антитела к SARS-COV-2 составляет от примерно 0 м.д. до примерно 100 м.д., и при этом указанное антитело к SARS-COV-2 представляет собой антитело IgG1. Согласно некоторым вариантам реализации повышение рН элюата до примерно рН 7,25 включает добавление к элюату от примерно 100 мМ до примерно 1000 мМ трис-буфера.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены способы снижения содержания белка клетки-хозяина в препарате антитела к SARS-COV-2, полученном рекомбинантным путем в клетке-хозяине.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело к SARS-COV-2 представляет собой бамланивимаб. Согласно некоторым вариантам реализации антитело к SARS-COV-2 содержит переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам реализации антитело к SARS-COV-2 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. Согласно другим вариантам реализации антитело к SARS-COV-2 представляет собой этесевимаб. Согласно другим вариантам реализации антитело к SARS-COV-2 содержит переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. Согласно другим вариантам реализации антитело к SARS-COV-2 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Согласно некоторым вариантам реализации антитело к SARS-COV-2 представляет собой бербтемовимаб. Согласно другим вариантам реализации антитело к SARS-COV-2 содержит переменную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. Согласно другим вариантам реализации антитело к SARS-COV-2 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

Согласно некоторым вариантам реализации белок, например, терапевтический или диагностический белок, продуцируется в клетках млекопитающих. Согласно некоторым вариантам реализации клетка млекопитающего представляет собой клетки яичника китайского хомяка (СНО) или клетки почки детеныша хомяка (ВНК), клетки мышинной гибридомы или клетки мышинной миеломы. Согласно некоторым вариантам реализации

терапевтический или диагностический белок продуцируется в бактериальных клетках. Согласно другим вариантам реализации терапевтический или диагностический белок продуцируется в дрожжевых клетках.

5 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены способы, характеризующиеся тем, что в указанном способе снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, после обработки на глубинном фильтре дополнительно выполняют ионообменную хроматографию.

10 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, причем указанное содержание белка клетки-хозяина в белковом препарате снижено до менее чем примерно 100 м.д. Согласно другим вариантам реализации содержание белка клетки-хозяина в белковом препарате снижено до менее чем примерно 50 м.д. Согласно другим вариантам реализации содержание белка клетки-хозяина в белковом препарате снижено до менее чем примерно 20 м.д. Согласно другим вариантам реализации содержание белка клетки-хозяина в белковом препарате снижено до менее чем примерно 10 м.д. Согласно другим вариантам реализации содержание белка клетки-хозяина в белковом препарате снижено до примерно 0 м.д.

20 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, причем указанное содержание белка клетки-хозяина в белковом препарате включает PLBL2, и при этом содержание указанного PLBL2 снижено до менее чем примерно 100 м.д. Согласно другим вариантам реализации содержание PLBL2 снижено до менее чем примерно 50 м.д. Согласно другим вариантам реализации содержание PLBL2 снижено до менее чем примерно 20 м.д. Согласно другим вариантам реализации содержание PLBL2 снижено до менее чем примерно 10 м.д. Согласно другим вариантам реализации содержание PLBL2 снижено до примерно 0 м.д.

30 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, причем указанное содержание белка клетки-хозяина в белковом препарате снижено на примерно 97% после глубинной фильтрации из элюата с захватом белка. Согласно другим вариантам реализации содержание белка клетки-хозяина в белковом препарате снижено

35

на примерно 99%. Согласно другим вариантам реализации содержание белка клетки-хозяина в белковом препарате снижено на примерно 99,9%. Согласно другим вариантам реализации содержание белка клетки-хозяина в белковом препарате снижено на примерно 99,99%. Согласно другим вариантам реализации содержание белка клетки-хозяина в белковом препарате снижено на примерно 100%.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, причем указанное содержание белка клетки-хозяина в белковом препарате включает PLBL2, и при этом содержание указанного PLBL2 снижено до менее чем примерно 100 м.д. Согласно другим вариантам реализации содержание PLBL2 снижено до менее чем примерно 50 м.д. Согласно другим вариантам реализации содержание PLBL2 снижено до менее чем примерно 20 м.д. Согласно другим вариантам реализации содержание PLBL2 снижено до менее чем примерно 10 м.д. Согласно другим вариантам реализации содержание PLBL2 снижено до примерно 0 м.д.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены способы снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, причем указанный белковый препарат подвергают глубинной фильтрации. Согласно некоторым вариантам реализации глубинный фильтр представляет собой один или более из X0SP, C0SP, X0HC, Emphaze™ AEX Hybrid Purifier, Zeta Plus (ZB Media), такой как Zeta Plus (60ZB05A), Zeta Plus (90ZB05A) или Zeta Plus (90ZB08A).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, характеризующийся тем, что ионная сила элюата с этапа повышения pH до pH выше примерно 6,0 составляет от примерно 10 mM до примерно 45 mM. Согласно некоторым вариантам реализации ионная сила составляет менее чем примерно 30 mM. Согласно некоторым вариантам реализации ионная сила составляет менее чем примерно 20 mM. Согласно другим вариантам реализации ионная сила составляет менее чем примерно 15 mM.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены способы, в которых белковый препарат, содержащий представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, обрабатывают на хроматографической колонке. Согласно некоторым вариантам реализации

хроматографическая колонка представляет собой одну или более из аффинной колонки, ионообменной колонки, колонки для гидрофобного взаимодействия, колонки с гидроксипатитом или колонки смешанного типа. Согласно некоторым вариантам реализации колонка для аффинной хроматографии представляет собой колонку с белком А, колонку с белком G или колонку с белком L. Согласно другим вариантам реализации колонка для ионообменной хроматографии представляет собой анионообменную колонку или катионообменную колонку. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены способы, в которых НСР в достаточной степени удалены из конечного продукта.

10 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены способы снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, причем указанный белок представляет собой терапевтический или диагностический белок. Согласно дополнительным вариантам реализации терапевтический или

15 диагностический белок представляет собой антитело, слитый белок Fc, иммуноадгезин, фермент, фактор роста, рецептор, гормон, регуляторный фактор, цитокин, антиген или связывающий агент. Согласно дополнительным вариантам реализации антитело представляет собой моноклональное антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело, человеческое антитело, биспецифичное антитело или фрагмент антитела.

20 Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие белковый препарат, нуклеиновую кислоту или вектор, описанный в настоящем документе. Согласно дополнительным аспектам настоящего изобретения предложена композиция, полученная способами, описанными в настоящем документе. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предложена

25 композиция, полученная способами, описанными в настоящем документе, причем содержание белка клетки-хозяина в указанной композиции составляет менее чем примерно 100 м.д.

Термин «белки клетки-хозяина» (НСР) представляют собой белки клеток-хозяев, которые участвуют в поддержании и росте клеток, а также в синтезе и процессинге

30 белков. Такие НСР включают, например, НСР из клеток яичника китайского хомяка (СНО), например, фосфолипаза В-подобный белок 2 (PLBL2), vLPL (липопротеинлипазу), vLAL (лизосомальную кислую липазу, лизосомальную липазу, LIPA), vPLA2 (фосфолипазу А2), vPPT1 (пальмитоилпротеинтиоэстеразу 1), PLBD2 и/или пероксиредоксин.

Термин «слабая кислота» относится к кислоте с самой низкой $pK_a > \sim 4$. Примеры слабых кислот включают, но не ограничиваются ими, уксусную кислоту, янтарную кислоту и 2-(*N*-морфолино)этансульфоновую кислоту.

5 Термин «сильная кислота» относится к кислоте с самой низкой $pK_a < \sim 4$. Примеры сильных кислот включают, но не ограничиваются ими, фосфорную кислоту, молочную кислоту, муравьиную кислоту, яблочную кислоту, малоновую кислоту, гликолевую кислоту, лимонную кислоту, винную кислоту и соляную кислоту.

10 Термин «глубинный фильтр» относится к фильтрационному элементу, в котором используется пористая фильтрационная среда, которая удерживает частицы по всей среде (внутри среды и на среде), а не только на поверхности среды. Глубинные фильтры могут дополнительно обладать адсорбционными свойствами, обусловленными химическими свойствами материалов, из которых они состоят. Примеры коммерчески доступных глубинных фильтров включают, но не ограничиваются перечисленными, X0SP, C0SP, X0HC, Emphaze™ AEX Hybrid Purifier, Zeta Plus (60ZB05A), Zeta Plus (90ZB05A) и Zeta Plus (90ZB08A). Термин «глубинная фильтрация» относится к процессу пропускания жидкого материала, который может быть гетерогенным или гомогенным, через глубинный фильтр. Согласно некоторым вариантам реализации жидкий материал содержит белковый препарат, содержащий представляющий интерес белок.

20 Термин «ионная сила» применительно к раствору является мерой концентрации ионов в этом растворе. Ионная сила (I) является функцией концентрации иона, c_i , и суммарного заряда, z_i , для всех ионных соединений. Для определения ионной силы используют Формулу 1.

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad (1)$$

25 «Белковый препарат» представляет собой материал или раствор, предназначенный для процесса или способа очистки, который содержит представляющий интерес терапевтический или диагностический белок и который также может содержать различные примеси. Неограничивающие примеры могут включать, например, собранную жидкость клеточной культуры (HCCF), собранный материал клеточной культуры, осветленную жидкость клеточной культуры, осветленный материал клеточной культуры, захваченный пул, извлеченный пул и/или собранный пул, содержащий терапевтический или диагностический белок, представляющий интерес, после одного или более этапов центрифугирования и/или этапов фильтрации, захваченный пул, извлеченный пул белка и/или собранный пул, содержащий терапевтический или диагностический белок, представляющий интерес, после одного или более этапов очистки.

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

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

Термин «антитело» в контексте настоящего документа относится к молекуле иммуноглобулина, которая связывает антиген. Варианты реализации антитела включают моноклональное антитело, поликлональное антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, биспецифичное или полиспецифичное антитело или конъюгированное антитело. Антитела могут относиться к любому классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA) и любому подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4).

Примерное антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело типа иммуноглобулина G (IgG), состоящее из четырех полипептидных цепей: двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), которые сшиты посредством межцепочечных дисульфидных связей. Аминоконцевая часть каждой из четырех полипептидных цепей включает переменную область из примерно 100-125 или более аминокислот, в первую очередь, отвечающую за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой из четырех полипептидных цепей содержит константную область, в первую очередь, отвечающую за эффекторную функцию. Каждая тяжелая цепь

состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи. Изотип IgG можно дополнительно разделить на подклассы (например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4).

5 Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), перемежающиеся с участками, которые являются более консервативными и называются каркасными участками (FR). CDR экспонируются на поверхности белка и являются важными участками антитела для специфичности связывания антигена. Каждая VL и VH
10 состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В данном документе три CDR тяжелой цепи обозначены как «HCDR1, HCDR2 и HCDR3», а три CDR легкой цепи обозначены как «LCDR1, LCDR2 и LCDR3». CDR содержат большинство остатков, которые формируют специфичные взаимодействия с антигеном. Отнесение
15 аминокислотных остатков к CDR может быть выполнено в соответствии с хорошо известными схемами, в том числе описанными у Kabat (Kabat et al., «Sequences of Proteins of Immunological Interest,» National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)), Chothia (Chothia et al., «Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins», Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani et al., «Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins», Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)), North (North et al., «A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations», Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011)) или IMGT (международной базе данных ImMunoGeneTics, доступной на сайте www.imgt.org; см. Lefranc et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

25 Варианты реализации настоящего изобретения также включают фрагменты антител или антигенсвязывающие фрагменты, которые, в контексте настоящего документа, содержат по меньшей мере часть антитела, сохраняющую способность специфично взаимодействовать с антигеном или эпитопом антигена, такие как фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv-фрагменты антител, scFab, дисульфидсвязанные Fv (sdFv), Fd-фрагмент.

30 Термин «антитело к SARS-CoV2» в контексте настоящего документа относится к антителу, которое связывает спайк (S) белок SARS-CoV-2. Аминокислотная последовательность спайк (S) белка SARS-CoV-2 была описана ранее, например, номер доступа GenBank: YP_009724390.1.

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

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

5 Термины «ультрафильтрационная мембрана», «ультрафильтрационный фильтр», «фильтрационная мембрана» и «фильтрационный фильтр» могут использоваться взаимозаменяемо. Примеры фильтрационных мембран включают, но не ограничиваются перечисленными, мембрану из поливинилидендифторида (PVDF), ацетата целлюлозы, нитрата целлюлозы, политетрафторэтилена (PTFE, тефлон), поливинилхлорида,
10 полиэфирсульфона, стекловолокна или других фильтрационных материалов, подходящих для использования согласно действующим требованиям Надлежащей производственной практики в производственной среде.

В настоящем документе числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон.

15 Термин «нумерация ЕС», признанный в данной области техники, относится к системе нумерации аминокислотных остатков молекул иммуноглобулинов. Нумерация ЕС описана, например, в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991); Edelman, G.M, et al., *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969); и
20 http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html#refs. Термин «нумерация по Kabat» признан в данной области техники как относящийся к системе нумерации аминокислотных остатков, которые являются более переменными (т.е. гиперпеременными), чем другие аминокислотные остатки в переменных областях тяжелой и легкой цепей (см., например, Kabat, et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-93 (1971);
25 Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)). Термин «нумерация по North» относится к системе нумерации аминокислотных остатков, которые являются более переменными (т.е. гиперпеременными), чем другие аминокислотные остатки в переменных областях тяжелой и легкой цепей, она основана, по меньшей мере частично,
30 на кластеризации распределения аффинности с большим числом кристаллических структур, как описано в North et al., *A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations*, *Journal of Molecular Biology*, 406:228-256 (2011).

В настоящем документе термин «аффинная хроматография» относится к хроматографическому методу разделения биохимических смесей (например, белка и
35 нецелевых соединений биомолекул), основанному на специфичных обратимых

взаимодействиях между биомолекулами. Примерные варианты реализации аффинной хроматографии включают аффинную хроматографию с белком А, аффинную хроматографию с белком G, аффинную хроматографию с белком L, хроматографию с аффинным лигандом для каппа-цепи (такую как CaptureSelect™, КаппаXL™, КаппаSelect™, КаппаХР™) или хроматографию с аффинным лигандом для лямбда-цепи.

Белок согласно настоящему изобретению может быть включен в фармацевтическую композицию, которая может быть приготовлена способами, хорошо известными в данной области техники, и содержит белок согласно настоящему изобретению и один или более фармацевтически приемлемых носителей и/или разбавителей (например, Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 22nd Edition, Loyd V., Ed., Pharmaceutical Press, 2012, в котором представлен сборник методик приготовления, общеизвестных практикующим специалистам). Подходящие носители для фармацевтических композиций включают любой материал, который сохраняет активность молекулы и не вступает в реакцию с иммунной системой пациента при комбинировании с белком.

Векторы экспрессии, способные управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны, хорошо известны в данной области техники. Векторы экспрессии могут кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию полипептида(ов) из клетки-хозяина. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид. Каждый из экспрессируемых полипептидов может экспрессироваться независимо с разных промоторов, с которыми функционально связаны указанные полипептиды, в одном векторе или, альтернативно, может экспрессироваться независимо с разных промоторов, с которыми функционально связаны указанные полипептиды, в нескольких векторах. Векторы экспрессии, как правило, реплицируются в организмах-хозяевах либо как эписомы, либо как неотъемлемая часть хромосомной ДНК хозяина. Обычно векторы экспрессии будут содержать селективные маркеры, например, тетрациклин, неомицин и дигидрофолатредуктазу, чтобы обеспечить возможность детектирования тех клеток, которые трансформированы целевыми последовательностями ДНК.

Клетка-хозяин относится к клеткам, стабильно или временно трансфицированным, трансформированным, трансдуцированным или инфицированным одним или более векторами экспрессии, экспрессирующими один или более белков согласно настоящему изобретению. Создание и выделение линий клеток-хозяев, продуцирующих белки согласно настоящему изобретению, можно осуществлять, используя стандартные методики, известные в данной области техники. Клетки млекопитающих являются

предпочтительными клетками-хозяевами для экспрессии белков согласно настоящему изобретению. Конкретные клетки млекопитающих включают НЕК 293, NS0, DG-44 и СНО. Предпочтительно белки секретируются в среду, в которой культивируют клетки-хозяева, из которой белки могут быть выделены или очищены, например, с использованием обычных методик. Например, среду можно вносить в колонку для аффинной хроматографии с белком А и/или колонку для хроматографии с аффинным лигандом для каппа-цепи или аффинным лигандом для лямбда-цепи и элюировать из нее. Нецелевые соединения биомолекул, включая растворимый агрегат и мультимеры, могут быть эффективно удалены с помощью обычных методик, включая эксклюзионную хроматографию (ЭХ), хроматографию гидрофобного взаимодействия, ионообменную или гидроксиапатитную хроматографию. Продукт может быть немедленно заморожен, например, при -70°C , помещен в холодильник, или может быть лиофилизирован. Можно применять различные способы очистки белка, и такие способы известны в данной области техники и описаны, например, в Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-89 (1990) и Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd Edition, Springer, NY (1994).

ПРИМЕРЫ

Измерения белка клетки-хозяина (НСП) с помощью ЖХ-МС: для оценки влияния очистки на уровни белка клетки-хозяина (НСП) в следующих примерах образцы анализируют с помощью картирования пептидов/ЖХ-МС/МС-профилирования НСП, например, методом ультраэффективной жидкостной хроматографии (UPLC) в сочетании с масс-спектрометром Thermo Scientific. В этом анализе образцы подвергают расщеплению трипсином, восстановлению/осаждению дитиотреитолом (ДТТ) с последующим переносом и подкислением супернатанта во флаконе ВЭЖХ для анализа ЖХ-МС/МС. Данные ЖХ-МС/МС анализируют с помощью Proteome Discoverer по базе данных белков СНО-К1 с добавлением последовательностей антител, спайк-белка и контрольного белка. Содержание НСП сообщается в виде общего числа долей на миллион (м.д.) НСП на образец в случае общего содержания НСП (например, нг НСП на мг продукта). Кроме того, также приведено содержание фосфолипаза В-подобного белка 2 (PLBL2).

Измерения НСП с помощью ИФА: содержание НСП в образцах также оценивают в примерах ниже с помощью анализа методом ИФА с использованием набора Gyrolab[®] СНО-НСП 1 (Cygnus Technologies, выполнен в соответствии с инструкциями производителя). Содержание НСП сообщается в виде общего числа долей на миллион (м.д.) НСП на образец в случае общего содержания НСП.

Пример 1 – Снижение содержания НСП в способе очистки МАТ 1 (этесевимаба)

Этап захвата белка: продезинфицированную колонку с белком А (среда MabSelect SuRe с белком А) уравнивают, и МАТ 1 (этесевимаб), собранное из бесклеточного биореактора, загружают на колонку с белком А и выполняют три промывки колонки с белком А с использованием 20 мМ триса (рН 7,0) в качестве последней промывки. МАТ 1 элюируют из колонки, используя 5 объемов колонки (CV) 20 мМ уксусной кислоты + 5 мМ фосфорной кислоты. Фракцию основного продукта собирают в одну общую фракцию с использованием отсечения пика на основе поглощения по передней и задней сторонам.

Этап вирусной инактивации при низком рН и этап нейтрализации: вирусную инактивацию проводят путем доведения рН собранной фракции основного продукта (общая фракция элюата с захваченным белком), содержащей МАТ 1, до рН от 3,30 до 3,60 путем добавления 20 мМ HCl. Смесь инкубируют при температуре от 18°C до 25°C в течение примерно 180 мин. Затем смесь нейтрализуют до рН 7,0 с использованием 250 мМ трис-основного буфера без доведения рН.

Этап глубинной фильтрации: Глубинный фильтр (X0SP, Millipore) промывают водой для инъекций (WFI). Смесь МАТ 1, полученную на этапе вирусной инактивации при низком рН и этапе нейтрализации, наносят на глубинный фильтр с загрузкой 1200 г/м² (граммы МАТ на м² площади мембраны глубинного фильтра). Загруженный глубинный фильтр промывают WFI. Фильтрат с глубинного фильтра, необязательно включая промывку WFI после загрузки, нейтрализуют до рН 8,0 с использованием 250 мМ трис-основного буфера без доведения рН.

Этап анионообменной (АО) хроматографии: продезинфицированную колонку (среда для анионообменной хроматографии Q Sepharose Fast Flow или QFF) уравнивают 2 CV 20 мМ триса (рН 8,0). Раствор МАТ 1, полученный на этапе глубинной фильтрации, загружают на колонку при загрузке от 25 г до 100 г на литр смолы и выполняют дополнительную промывку уравнивающим буфером. МАТ 1 собирают путем отсечения пика на основе поглощения по передней и задней сторонам области пика, образованной несвязанной фракцией, плюс дополнительная промывка.

Результаты: При использовании описанного способа очистки общий уровень НСР, измеренный с помощью ЖХ-МС, составляет:

- 23299 м.д. после элюирования с белка А;
- 13 м.д. после глубинной фильтрации X0SP;
- 2 м.д. после АО-хроматографии.

Оценка набора 1 глубинных фильтров для МАТ 1: МАТ 1 обрабатывают с использованием белка А, этапов вирусной инактивации при низком рН, нейтрализации и глубинной фильтрации по существу, как описано выше. Четыре различных глубинных

5 фильтра: Emphaze™ AEX Hybrid Purifier, Zeta Plus BC25 –60ZB05A, Zeta Plus BC25 – 90ZB05A и Zeta Plus BC25 – 90ZB08A (3M) тестируют при загрузке 2000 г/м², как показано в Таблице 1. Результаты в Таблице 1 показывают значительное снижение общего содержания НСР после глубинной фильтрации согласно ЖХ-МС (в диапазоне от 24 до 31 м.д.) и/или ИФА (в диапазоне от 6 до 16 м.д.) для 4 протестированных глубинных фильтров по сравнению с общим содержанием НСР, наблюдаемым после элюирования с белка А согласно ЖХ-МС (28901 м.д.) и ИФА (527 м.д.).

Таблица 1. Общее содержание НСР МАТ 1 до и после глубинной фильтрации

| Общее содержание НСР после элюирования с белка А (м.д.) | | Глубинный фильтр | Общее содержание НСР после глубинной фильтрации (м.д.) | |
|---|-----|------------------------------|--|-----|
| ЖХ-МС | ИФА | | ЖХ-МС | ИФА |
| 28901 | 527 | Emphaze™ AEX Hybrid Purifier | недоступно | 16 |
| | | Zeta Plus BC25 – (60ZB05A) | 31 | 8 |
| | | Zeta Plus BC25 – (90ZB05A) | 29 | 7 |
| | | Zeta Plus BC25 – (90ZB08A) | 24 | 6 |

10 **Пример 2 – Снижение содержания НСР в способе очистки МАТ 2 (бамланивимаба)**

Сравнение буфера для элюирования с белка А: МАТ 2 (бамланивимаб) готовят по существу так же, как описано для МАТ 1 в Примере 1, со следующими исключениями: 1) МАТ 2 элюируют из колонки для захвата с белком А с использованием комбинаций буферов, перечисленных в Таблице 2; 2) после этапа вирусной инактивации при низком рН и перед этапом глубинной фильтрации раствор МАТ 2 нейтрализуют до рН 7,25 вместо 7,0 с использованием 250 мМ трис-основного буфера без доведения рН, и 3) АО-хроматографию выполняют с использованием смолы Poros XQ. Содержание НСР (как общее содержание НСР, так и содержание PLBL2) оценивают с помощью ЖХ-МС после отдельных операций очистки, как указано в Таблицах 2 и 3.

20 Результаты в Таблицах 2 и 3 показывают, что общее содержание НСР и содержание PLBL2 после этапа глубинной фильтрации было снижено для всех трех протестированных комбинаций кислот. В частности, комбинации 20 мМ уксусной кислоты + 5 мМ фосфорной кислоты и 20 мМ уксусной кислоты + 5 мМ L-молочной кислоты показали

большее снижение общего содержания НСР до менее чем 20 м.д. после глубинной фильтрации по сравнению с комбинацией 20 мМ уксусной кислоты + 5 мМ лимонной кислоты. Кроме того, содержание PLBL2 после этапа глубинной фильтрации с использованием комбинаций 20 мМ уксусной кислоты + 5 мМ фосфорной кислоты и 20 мМ уксусной кислоты + 5 мМ L-молочной кислоты было снижено ниже предела количественного определения.

Таблица 2. Общее содержание НСР МАТ 2 с использованием различных буферов для элюирования с белка А

| Буфер для элюирования с белка А | Общее содержание НСР согласно детектированию ЖХ-МС после элюирования с белка А (м.д.) | Общее содержание НСР согласно детектированию ЖХ-МС после глубинной фильтрации X0SP (м.д.) | Общее содержание НСР согласно детектированию ЖХ-МС после АО-хроматографии (м.д.) |
|---|--|--|---|
| 20 мМ уксусной кислоты + 5 мМ лимонной кислоты | 71022 | 469 | 55 |
| 20 мМ уксусной кислоты + 5 мМ фосфорной кислоты | 77892 | 7 | 11 |
| 20 мМ уксусной кислоты + 5 мМ L-молочной кислоты | 78669 | 16 | Ниже предела количественного определения |

10 **Таблица 3. Содержание PLBL2 МАТ 2 при использовании различных буферов для элюирования с белка А**

| Буфер для элюирования с белка А | PLBL2 согласно детектированию ЖХ-МС после элюирования с белка А (м.д.) | PLBL2 согласно детектированию ЖХ-МС после глубинной фильтрации X0SP (м.д.) | PLBL2 согласно детектированию ЖХ-МС после АО-хроматографии (м.д.) |
|--|---|---|--|
| | | | |

| | | | |
|---|-----|--|--|
| 20 мМ уксусной кислоты + 5 мМ лимонной кислоты | 356 | 454 | 8 |
| 20 мМ уксусной кислоты + 5 мМ фосфорной кислоты | 351 | Ниже предела количественного определения | Ниже предела количественного определения |
| 20 мМ уксусной кислоты + 5 мМ L-молочной кислоты | 404 | Ниже предела количественного определения | Ниже предела количественного определения |

Оценка набора 2 глубинных фильтров: МАТ 2 готовят по существу так же, как описано для МАТ 1, со следующими исключениями: 1) после этапа вирусной инактивации при низком рН и перед этапом глубинной фильтрации раствор МАТ 2 нейтрализуют до рН 7,25 вместо 7,0 с использованием 250 мМ трис-основного буфера без доведения рН, и 2) этап глубинной фильтрации выполняют с использованием глубинных фильтров, показанных в Таблице 4.

Результаты в Таблице 4 показывают, что общее содержание НСР и содержание PLBL2 после глубинной фильтрации со всеми тремя глубинными фильтрами набора 2 (X0SP, C0SP, X0HC, (Millipore)) с загрузкой 1500 г/м² было снижено до менее чем 20 м.д. после этапа глубинной фильтрации.

Таблица 4. Общее содержание НСР и содержание PLBL2 МАТ 2 до и после глубинной фильтрации

| Общее содержание НСР согласно ЖХ-МС после элюирования с белка А (м.д.) | Содержание PLBL2 согласно ЖХ-МС после элюирования с белка А (м.д.) | Глубинный фильтр | Общее содержание НСР согласно ЖХ-МС после глубинной фильтрации (м.д.) | Содержание PLBL2 согласно ЖХ-МС после глубинной фильтрации (м.д.) |
|---|---|-------------------------|--|--|
| 74528 | 543 | X0SP | 3 | Ниже предела количественного определения |
| | | C0SP | 18 | 5 |

| | | | | |
|--|--|------|---|--|
| | | ХОНС | 2 | Ниже предела количественного определения |
|--|--|------|---|--|

Пример 3. Снижение содержания НСР в способе очистки МАТ 3 (белтеловимаба)

МАТ 3 (белтеловимаб) готовят с использованием этапов захвата белка, вирусной инактивации при низком рН, нейтрализации и глубинной фильтрации по существу так же, как описано для МАТ 1 в Примере 1, за исключением использования глубинного фильтра Х0SP с загрузкой 900 г/м². При использовании описанного способа очистки общий уровень НСР, измеренный с помощью ЖХ-МС, составляет:

- 179964 м.д. после элюирования с белка А,
- 77 м.д. после глубинной фильтрации Х0SP (Millipore).

Пример 4. Снижение содержания НСР в способе очистки биспецифичного антитела (МАТ 4)

Биспецифичное антитело МАТ 4 готовят, используя этап захвата белка по существу так же, как описано для МАТ 1 в Примере 1, за исключением использования колонки для аффинного захвата с белком L (Cytiva) и элюирования буферными системами, показанными в Таблице 5. Общее содержание НСР измеряют с помощью ИФА, что дает диапазон от примерно 1300 до примерно 2500 м.д. После захвата белка выполняют вирусную инактивацию при низком рН по существу так же, как описано для МАТ 1 в Примере 1, за исключением использования титрантов, перечисленных в Таблице 5, с последующей нейтрализацией до рН 7,0 с использованием 500 мМ трис-основного буфера без доведения рН. Этап глубинной фильтрации выполняют по существу так же, как описано для МАТ 1 в Примере 1, с использованием глубинного фильтра Х0SP при загрузке 1200 г/м². Содержание НСР измеряют после глубинной фильтрации с помощью ИФА.

Результаты в Таблице 5 показывают значительное снижение общего содержания НСР до менее чем ≤ 50 м.д. для записей 1-7 после глубинной фильтрации, где ионная сила смесей, нанесенных на глубинный фильтр, была менее примерно 45 мМ. Кроме того, наблюдали корреляцию между ионной силой смесей, нанесенных на глубинный фильтр, и общим содержанием НСР после глубинной фильтрации. Кроме того, запись 2 показывает, что, хотя ионная сила может быть уменьшена путем разбавления буфера, что обеспечивает низкое содержание НСР после глубинной фильтрации, однако увеличение объема в результате разбавления может быть неблагоприятным для способов изготовления.

Таблица 5. Уровни НСР в препаратах МАТ 4 после элюирования с белка L и глубинной фильтрации

| Запись | Буфер для элюирования с белка L | Титрант для вирусной инактивации при низком рН | Ионная сила смеси, нанесенной на глубинный фильтр (мМ) | Общее содержание НСР согласно ИФА после глубинной фильтрации Х0SP (м.д.) |
|---------------|--|---|---|---|
| 1 | 20 мМ уксусной кислоты + 10 мМ фосфорной кислоты | 20 мМ уксусной кислоты + 10 мМ фосфорной кислоты | 38 | 38 |
| 2 | 20 мМ уксусной кислоты + 10 мМ фосфорной кислоты | 20 мМ уксусной кислоты + 10 мМ фосфорной кислоты | 13 (после разбавления H ₂ O 1:2)* | 18 |
| 3 | 20 мМ уксусной кислоты + 10 мМ фосфорной кислоты | 20 мМ HCl | 36 | 35 |
| 4 | 20 мМ уксусной кислоты + 5 мМ фосфорной кислоты | 20 мМ HCl | 27 | 30 |
| 5 | 20 мМ уксусной кислоты + 5 мМ муравьиной кислоты | 20 мМ HCl | 23 | 26 |
| 6 | 20 мМ уксусной кислоты + 10 мМ фосфорной кислоты | 200 мМ фосфорной кислоты | 43 | 50 |
| 7 | 20 мМ уксусной кислоты + 10 мМ | 15 мМ фосфорной кислоты | 37 | 36 |

| | | | | |
|----------|--|--------------------------|----|-----|
| | фосфорной кислоты | | | |
| 8 | 20 мМ уксусной кислоты + 10 мМ фосфорной кислоты | 1000 мМ лимонной кислоты | 64 | 209 |

*после вирусной инактивации при низком рН и нейтрализации до рН 7,0 с использованием 500 мМ трис раствор МАТ 4 разбавляют 2 частями воды (соотношение 1:2 раствор МАТ 4:H₂O)

Пример 5. Снижение содержания НСР в способах очистки МАТ 5

5 МАТ 5 готовят, используя этап захвата белка по существу так же, как описано для МАТ 1 в Примере 1, за исключением того, что этап элюирования выполняют с использованием буферных систем, показанных в Таблице 6. Общее содержание НСР измеряют с помощью ИФА, что дает диапазон от примерно 2800 до примерно 3200 м.д. После захвата белка выполняют этап вирусной инактивации при низком рН по существу так же, как описано для МАТ 1 в Примере 1, с последующим этапом нейтрализации либо при рН 5,0, либо при рН 7,0 с использованием 500 мМ трис-основного буфера без доведения рН. Этап глубинной фильтрации выполняют по существу так же, как описано для МАТ 1 в Примере 1, с использованием глубинного фильтра XOSP при загрузке 1000 г/м². Содержание НСР после этапа глубинной фильтрации измеряют с помощью ИФА.

15 Результаты в Таблице 6 показывают значительное снижение общего содержания НСР до менее чем ≤50 м.д. для МАТ 5 после глубинной фильтрации, когда рН смеси, нанесенной на глубинный фильтр, составляет рН 7,0. Общее содержание НСР снижается в меньшей степени, когда рН смеси, нанесенной на глубинный фильтр, составляет рН 5,0.

20 **Таблица 6. Уровни НСР в препаратах МАТ 5 после элюирования с белка А и глубинной фильтрации**

| Антитело | Буфер для элюирования с белка А | рН материала, нанесенного на глубинный фильтр | Содержание НСР после глубинной фильтрации |
|--------------|---|---|---|
| МАТ 5 | 20 мМ уксусной кислоты + 5 мМ молочной кислоты | рН 5 | 338 |
| | | рН 7 | 41 |
| | 20 мМ уксусной кислоты + 5 мМ фосфорной кислоты | рН 5 | 331 |
| | | рН 7 | 9 |

Пример 6. Метод определения ионной силы во время способов очистки биомолекул

Описан способ оценки ионной силы, основанный на том, что известно о буферных композициях во время отдельных способов очистки биомолекул. Ионная сила (I) раствора является мерой концентрации ионов в этом растворе и является функцией концентрации соединения, c_i , и суммарного заряда, z_i , для всех ионных соединений. Для определения ионной силы используют Формулу 1.

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad (1)$$

Сильные электролиты: для сильных электролитов в низких концентрациях (например, ниже 50 мМ) предполагается полная диссоциация. При полной диссоциации композиция легко рассчитывается, что упрощает расчеты ионной силы. Например, раствор 50 мМ NaCl диссоциирует с образованием 50 мМ каждого из Na^+ и Cl^- с ионной силой $0,5 \times [50 \text{ мМ} \times 1^2 + 50 \text{ мМ} \times (-1)^2] = 50 \text{ мМ}$. В качестве другого примера, 50 мМ Na_2SO_4 диссоциирует с образованием 100 мМ Na^+ и 50 мМ SO_4^{2-} , что дает ионную силу $0,5 \times [100 \text{ мМ} \times 1^2 + 50 \text{ мМ} \times (-2)^2] = 150 \text{ мМ}$. При отсутствии буферных соединений в этих расчетах ожидается почти нейтральный pH, поэтому концентрации ионов в результате диссоциации воды не вносят значимого вклада в ионную силу. Константа диссоциации воды принята равной $K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-] = 10^{-14}$ с $[\text{H}^+] = 10^{-\text{pH}}$, где квадратные скобки указывают концентрации. Для целей расчетов в данном документе не требуется физическая интерпретация ионов H^+ (в отличие, например, от ионов гидроксония), а также нет необходимости различать концентрацию и активность H^+ .

Буферные системы: для буферных систем нельзя предполагать полную диссоциацию. Константы кислотной диссоциации буферов должны использоваться для определения доли буфера в кислотной и основной формах. Для родовой кислоты HA, которая диссоциирует на H^+ и A^- , Формула 2 относится к константе кислотной диссоциации, K_a , и концентрациям соединений:

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (2)$$

Константа кислотной диссоциации часто используется в логарифмической форме $\text{p}K_a = -\log_{10}(K_a)$. Термодинамическое значение $\text{p}K_a$, обозначаемое как $\text{p}K_{a,0}$, доступно в литературе для многих представляющих интерес буферов. Однако эффективная $\text{p}K_a$ буфера отличается от термодинамического значения, за исключением очень разбавленного раствора, из-за отклонения коэффициентов активности от единицы. В случае умеренно разбавленных растворов, рассматриваемых в данном раскрытии, для учета коэффициентов активности, отличных от единицы, использовали расширенное уравнение Дебая-Хюккеля или уравнение Дэвиса. Значения некоторых констант,

найденных в литературе, могут незначительно отличаться, но давать сходные результаты в диапазоне значений ионной силы, представляющих интерес в настоящем изобретении. Расширенное уравнение Дебая-Хюккеля представлено в виде Формулы 3:

$$pK_a = pK_{a,0} + \frac{0,51n\sqrt{I}}{1 + 1,6\sqrt{I}} \quad (3)$$

5 Уравнение Дэвиса представлено в виде Формулы 4:

$$pK_a = pK_{a,0} + 0,51n \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0,3\sqrt{I} \right) \quad (4)$$

где $n = 2z - 1$, и z представляет собой суммарный заряд кислой буферной формы для расчета n (Scopes, Protein Purification: Principles and Practices, 2013).

Поскольку pK_a является функцией ионной силы, композиция и ионная сила не
10 могут быть определены независимо, а являются частью системы уравнений. Система уравнений включает вышеупомянутые уравнения для ионной силы, константы кислотной диссоциации для каждого буфера и уравнения pK_a для каждого буфера, а также включает условие электронейтральности и общий баланс соединений для каждого буфера. С помощью этой системы уравнений можно оценить несколько значений. Например,
15 известное значение рН раствора можно использовать для оценки кислотно-щелочного соотношения для буферного состава или, наоборот, кислотно-щелочное соотношение можно использовать для оценки рН раствора и соответствующих объемов титрования. В любом из этих приложений можно оценить ионную силу, чтобы помочь в рациональном выборе вариантов элюента и титранта.

20 Для расчета ионной силы, относящейся к буферным системам в настоящем изобретении, например, ионной силы исходного материала для глубоинной фильтрации, необходима буферная композиция раствора. Эту композицию можно обоснованно оценить на основании объемов и композиций буферов и титрантов, используемых в способе. Для оценки композиции также могут быть использованы методики измерения
25 ионов, известные в данной области техники.

В качестве отправной точки для оценки композиции раствора одна из возможных методологий состоит в том, чтобы предположить, что пул элюатов с аффинной колонки имеет буферную композицию, идентичную таковой элюента, за исключением того, что она забуферена при измеренном рН пула элюатов. Например, если представляющий
30 интерес белок элюируют из колонки с белком А с использованием 20 мМ уксусной кислоты, 5 мМ молочной кислоты и пул элюатов имеет измеренный рН 4,2, то можно предположить, что буферная композиция пула элюатов представляет собой 20 мМ ацетата, 5 мМ лактата и достаточное количество NaOH, чтобы довести рН до 4,2; это

будет соответствовать примерно ~8,2 мМ NaOH. Поскольку для расчета важно только общее содержание катионов натрия, Na⁺, не имеет значения, исходит ли содержание натрия в элюате, как предполагается, из ацетата натрия, фосфата натрия, гидроксида натрия или любой их комбинации, поэтому правило об отнесении натрия к NaOH используется для удобства.

После использования композиции элюента и pH элюата для оценки буферной композиции элюата затем рассматривают титрования раствора. Например, в случае оцененной композиции элюата 20 мМ ацетата, 5 мМ лактата, ~8,2 мМ NaOH при pH 4,2, если объем 20 мМ HCl, необходимый для снижения pH до целевого значения 3,45 для вирусной инактивации, был равен начальному объему, умноженному на 0,305, то композиция этого промежуточного продукта способа при pH 3,45 будет известна из разбавления. Ацетат, лактат и NaOH будут присутствовать в количествах, соответствующих исходным значениям, умноженным на 1/1,305 (т. е. ~15,3 мМ ацетата, ~3,8 мМ лактата и ~6,2 мМ NaOH), а HCl будет присутствовать в 0,305/1,305-кратном количестве от его значения в титранте (~4,7 мМ HCl). Аналогичным образом, для нейтрализации с использованием 250 мМ трис-основания, если соотношение для повышения pH до целевого значения pH 7,0 представляло собой 0,0743-кратное значение от объема раствора pH 3,45, то для определения конечных концентраций в нейтрализованном растворе будут применяться соотношения 1/1,0743 и 0,0743/1,0743 (~14,3 мМ ацетата, ~3,6 мМ лактата, ~5,8 мМ NaOH, ~4,4 мМ HCl и ~17,3 мМ триса). Все известные значения подставляются в систему уравнений (Формулы 5-15) для расчета ионной силы:

$$I = \frac{1}{2} ([H^+] \cdot \{1\}^2 + [Na^+] \cdot \{1\}^2 + [\text{трис}H^+] \cdot \{1\}^2 + [OH^-] \cdot \{-1\}^2 + [\text{Ацетат}^-] \cdot \{-1\}^2 + [\text{Лактат}^-] \cdot \{-1\}^2 + [Cl^-] \cdot \{-1\}^2) \quad (5)$$

$$[H^+] + [Na^+] + [\text{трис}H^+] = [OH^-] + [\text{Ацетат}^-] + [\text{Ацетат}^-] + [Cl^-] \quad (6)$$

$$K_{a,трис} = \frac{[H^+][трис]}{[трисH^+]} \quad (7)$$

$$pK_{a,трис} = pK_{a,0,трис} + 0,51(2 \cdot \{+ 1\} - 1) \left(\frac{\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} - 0,3\sqrt{I} \right) \quad (8)$$

$$K_{a,Ацетат} = \frac{[H^+][Ацетат^-]}{[HАцетат]} \quad (9)$$

$$pK_{a,Ацетат} = pK_{a,0,Ацетат} + 0,51(2 \cdot \{- 1\} - 1) \left(\frac{\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} - 0,3\sqrt{I} \right) \quad (10)$$

$$K_{a,Лактат} = \frac{[H^+][Лактат^-]}{[HЛактат]} \quad (11)$$

$$pK_{a,Лактат} = pK_{a,0,Лактат} + 0,51(2 \cdot \{- 1\} - 1) \left(\frac{\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} - 0,3\sqrt{I} \right) \quad (12)$$

$$\text{Всего трис} = [трис] + [трисH^+] \quad (13)$$

$$\text{Всего ацетат} = [HАцетат] + [Ацетат^-] \quad (14)$$

$$5 \quad \text{Всего лактат} = [HЛактат] + [Лактат^-] \quad (15)$$

где соответствующие значения $pK_{a,o}$ для триса, ацетата и лактата были приняты равными 8,15, 4,76 и 3,86 при 22°C. Полученная оценка ионной силы исходного материала для глубинной фильтрации составляет 22,1 мМ.

10 Как описано в настоящем документе, буферная емкость белкового продукта напрямую не моделируется. Таким образом, при использовании сильной кислоты или основания для титрования могут возникать некоторые расхождения между расчетами и эмпирическими результатами титрования. Например, при титровании элюата с белка А до низкого рН для вирусной инактивации расчеты буфера обычно занижают необходимое эмпирическое количество 20 мМ HCl; необходимое эмпирическое количество может быть

15 примерно на 50% больше рассчитанной оценки. Один из способов учета этого различия состоит в том, чтобы смоделировать материал элюата аффинной колонки при более высоком рН, эмпирически корректируя значение до тех пор, пока оцененный объем титрования не совпадет с экспериментальным значением. Например, в приведенном выше примере, если количество 20 мМ HCl было на 50% выше соотношения 0,305, чем

20 первоначально оценивалось, элюат с белка А будет моделироваться, как имеющий рН примерно 4,45 вместо рН 4,2. В результате этого эмпирического изменения в моделировании расчетная ионная сила в примере направленно снижается, но лишь на небольшую величину: 21,9 мМ, что ниже исходной оценки 22,1 мМ. Соответственно, делается вывод, что любой подход достаточен для оценки ионной силы, чтобы сделать

25 вывод о предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения.

Альтернативные методы: Чтобы определить буферную композицию исходного материала для глубинной фильтрации можно использовать методы измерения содержания ионов для расчета ионной силы. Это требует подтверждения того, что измерения дают самосогласованные результаты с любыми известными количествами, такими как количества добавленного титранта. Поскольку предполагается, что буферная композиция элюата аффинной колонки эквивалентна таковой элюента, но с другим рН, различие в истинной композиции можно определить путем измерений содержания ионов. Например, для расчета ионной силы буферных компонентов в элюенте можно использовать либо количество, основанное на композиции элюента, либо измеренное значение.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

В раскрытие данного изобретения включены ссылки на нижеследующие нуклеиновые и/или аминокислотные последовательности, и они приводятся ниже для справки.

5

SEQ ID NO: 1 – переменная тяжелая цепь (VH) бамланивимаба

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIAN
YAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGYYEARHYYYYYAMDVWG
QGTAVTVSS

10

SEQ ID NO: 2 – переменная легкая цепь (VL) бамланивимаба

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCQQSYSTPRTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 3 – тяжелая цепь (HC) бамланивимаба

15

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIAN
YAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGYYEARHYYYYYAMDVWG
QGTAVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKRVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

SEQ ID NO: 4 – легкая цепь (LC) бамланивимаба

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCQQSYSTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLS
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

25

SEQ ID NO: 5 – переменная тяжелая цепь (VH) этесевимаба

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGSTF
YADSVKGRFTISRDNMNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARVLPMYGDYLDYWGQGLV
TVSS

30

SEQ ID NO: 6 – переменная легкая цепь (VL) этесевимаба

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPEYTFGQGTKLEIKRTV

SEQ ID NO: 7 – тяжелая цепь (HC) этесевимаба

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGSTF
YADSVKGRFTISRDNMNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARVLP MYGDYLDYWGQGTLV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
5 AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

SEQ ID NO: 8 – легкая цепь (LC) этесевимаба

10 DIVMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQISIRYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPEYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLST
LTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 9 – переменная тяжелая цепь (VH) бестеловимаба

15 QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLISG VGVGWL RQPPGKALEWLALIYWDDDKR
YPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKMTNIDPVDATYYCAHHSISTIFDHWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO: 10 – переменная легкая цепь (VL) бестеловимаба

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTATSSDVG DYNVSWYQQHPGKAPKLMIFEVSDRPSGI
SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTTSSAVFGGGTKLTVL

20 **SEQ ID NO: 11 – тяжелая цепь (HC) бестеловимаба**

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLISG VGVGWL RQPPGKALEWLALIYWDDDKR
YPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKMTNIDPVDATYYCAHHSISTIFDHWGQGT LVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
25 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

SEQ ID NO: 12 – легкая цепь (LC) бестеловимаба

30 QSALTQPASVSGSPGQSITISCTATSSDVG DYNVSWYQQHPGKAPKLMIFEVSDRPSGI
SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTTSSAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL
FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASS
YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ снижения содержания белка клетки-хозяина в белковом препарате, содержащем представляющий интерес белок, полученный рекомбинантным путем в клетке-хозяине, где указанный способ включает этапы:
 - 5 а. обработки указанного белкового препарата на колонке для аффинной хроматографии;
 - б. элюирования указанного представляющего интерес белка из хроматографической колонки комбинацией кислот, состоящей из слабой кислоты и сильной кислоты, с получением элюата, содержащего указанный представляющий интерес белок;
 - 10 в. повышения рН указанного элюата выше примерно рН 6,0; и
 - д. обработки указанного элюата на глубинном фильтре и получения отфильтрованного белкового препарата.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная хроматографическая колонка включает колонку для аффинной хроматографии с белком А, белком G или белком L.
- 15 3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная слабая кислота имеет не более одного значения рКа меньше 7,0, и указанная сильная кислота имеет не более одного значения рКа меньше 7,0.
4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная слабая кислота представляет собой уксусную кислоту, и указанная сильная кислота представляет собой фосфорную кислоту или молочную кислоту.
- 20 5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что концентрация указанной уксусной кислоты составляет примерно 20 мМ, и тем, что указанная сильная кислота представляет собой фосфорную кислоту, и при этом концентрация указанной фосфорной кислоты составляет от примерно 5 мМ до примерно 10 мМ.
- 25 6. Способ по п. 4, отличающийся тем, что концентрация указанной уксусной кислоты составляет примерно 20 мМ, и тем, что указанная сильная кислота представляет собой молочную кислоту, и при этом концентрация указанной молочной кислоты составляет примерно 5 мМ.
7. Способ по п. 1, дополнительно включающий этап выполнения вирусной инактивации.
- 30 8. Способ по п. 1, дополнительно включающий этап выполнения вирусной инактивации, включающий доведение рН элюата с указанного этапа элюирования белка из хроматографической колонки до рН ниже примерно 4,0, и при этом указанный элюат поддерживают при рН ниже примерно 4,0 в течение от примерно 0 минут до примерно 180 минут.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что указанный этап доведения рН элюата включает доведение рН указанного элюата до уровня от примерно рН 3,3 до примерно рН 3,7.
10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанный рН указанного элюата доводят до примерно рН 3,5.
- 5 11. Способ по любому из пп. 8-10, отличающийся тем, что доведение рН указанного элюата включает добавление любой из HCl, фосфорной кислоты или комбинации уксусной кислоты и фосфорной кислоты.
12. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный этап повышения рН указанного элюата включает повышение рН до уровня от примерно рН 6,5 до примерно рН 7,5.
- 10 13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанный рН указанного элюата повышают до примерно рН 7,0.
14. Способ по любому из пп. 12 или 13, отличающийся тем, что указанный этап повышения рН указанного элюата включает добавление триса.
15. Способ по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что указанный элюат на указанном этапе повышения рН выше примерно 6,0 имеет ионную силу от примерно 10 мМ до примерно 45 мМ.
- 15 16. Способ по любому из пп. 1-15, дополнительно включающий этап проведения ионообменной хроматографии указанного белкового препарата, подвергнутого глубинной фильтрации.
- 20 17. Способ по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что указанное содержание белка клетки-хозяина в указанном отфильтрованном белковом препарате снижено до менее чем 100 м.д.
18. Способ по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что указанное содержание белка клетки-хозяина в указанном отфильтрованном белковом препарате включает PLBL2, и при этом содержание указанного PLBL2 снижено до менее чем 100 м.д.
- 25 19. Способ по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что указанный белковый препарат содержит собранную жидкость культуры клеток, захваченный пул или извлеченный пул белка.
20. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой терапевтический или диагностический белок.
- 30 21. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой антитело, слитый белок Fc, пептид, иммуноадгезин, фермент, фактор роста, рецептор, гормон, регуляторный фактор, цитокин, антиген, пептид или связывающий агент.
- 35 22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой

моноклональное антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело, человеческое антитело, биспецифичное антитело или фрагмент антитела.

23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой антитело IgG1.
- 5 24. Способ по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой антитело к SARS-COV-2.
25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанное антитело к SARS-COV-2 представляет собой бамланивимаб.
26. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанное антитело к SARS-COV-2 содержит
10 VH, имеющую SEQ ID NO: 1, и VL, имеющую SEQ ID NO: 2.
27. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанное антитело к SARS-COV-2 содержит HC, имеющую SEQ ID NO: 3, и LC, имеющую SEQ ID NO: 4.
28. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанное антитело к SARS-COV-2 представляет собой этесевимаб.
- 15 29. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанное антитело к SARS-COV-2 содержит VH, имеющую SEQ ID NO: 5, и VL, имеющую SEQ ID NO: 6.
30. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанное антитело к SARS-COV-2 содержит HC, имеющую SEQ ID NO: 7, и LC, имеющую SEQ ID NO: 8.
31. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанное антитело к SARS-COV-2
20 представляет собой бибтеловимаб.
32. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанное антитело к SARS-COV-2 содержит VH, имеющую SEQ ID NO: 9, и VL, имеющую SEQ ID NO: 10.
33. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанное антитело к SARS-COV-2 содержит HC, имеющую SEQ ID NO: 11, и LC, имеющую SEQ ID NO: 12.
- 25 34. Способ снижения содержания белка клетки-хозяина в препарате антитела к SARS-COV-2, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, включающий:
- а. обработку указанного препарата антитела к SARS-COV-2, полученного рекомбинантным путем в клетке-хозяине, на колонке для аффинной хроматографии с белком А;
- 30 б. элюирование указанного антитела к SARS-COV-2 комбинацией кислот, состоящей из уксусной кислоты и фосфорной кислоты, или комбинацией уксусной кислоты и молочной кислоты, с получением элюата, содержащего указанное антитело к SARS-COV-2;
- 35 в. доведение pH указанного элюата, содержащего указанное антитело к SARS-COV-2, путем добавления примерно 20 мМ HCl, причем указанный pH снижают до уровня

от примерно pH 3,3 до примерно pH 3,7, и при этом указанный элюат поддерживают при pH от примерно pH 3,3 до примерно pH 3,7 в течение от примерно 0 минут до примерно 180 минут;

- 5 d. повышение pH указанного элюата, содержащего указанное антитело к SARS-COV-2, путем добавления примерно 250 мМ трис-буфера, при этом указанный pH повышают до уровня от примерно pH 6,5 до примерно pH 7,5; и
- e. обработку указанного элюата, содержащего указанное антитело к SARS-COV-2, на глубинном фильтре и получение отфильтрованного препарата антитела к SARS-COV-2,
- 10 причем содержание белка клетки-хозяина в указанном отфильтрованном препарате антитела к SARS-COV-2 снижено до уровня от примерно 0 м.д. до примерно 20 м.д., и при этом указанное антитело к SARS-COV-2 представляет собой антитело IgG1.
35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанная комбинация кислот на этапе b содержит 20 мМ уксусной кислоты и 5 мМ фосфорной кислоты, или 20 мМ уксусной
- 15 кислоты и 5 мМ фосфорной кислоты, или 20 мМ уксусной кислоты и 5 мМ молочной кислоты.
36. Способ по п. 34, отличающийся тем, что этап с доведения pH указанного элюата включает доведение pH указанного элюата до примерно 3,5.
37. Способ по любому из пп. 34-36, отличающийся тем, что указанный этап доведения pH
- 20 указанного элюата, содержащего антитело к SARS-COV-2, путем добавления примерно 20 мМ HCl обеспечивает инактивацию вируса.
38. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанный этап повышения pH указанного элюата включает повышение указанного pH до примерно pH 7,25.
39. Способ по любому из пп. 34 или 38, отличающийся тем, что указанный элюат после
- 25 указанного этапа повышения pH имеет ионную силу от примерно 10 мМ до примерно 45 мМ.
40. Способ по любому из пп. 34-39, дополнительно включающий этап проведения ионообменной хроматографии указанного препарата антитела к SARS-COV-2, подвергнутого глубинной фильтрации.
- 30 41. Способ по любому из пп. 34-40, отличающийся тем, что указанное антитело к SARS-COV-2 представляет собой бамланивимаб.
42. Способ по любому из пп. 34-40, отличающийся тем, что указанное антитело к SARS-COV-2 содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

43. Способ по любому из пп. 34-40, отличающийся тем, что указанное антитело к SARS-COV-2 содержит HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.
44. Способ по любому из пп. 34-40, отличающийся тем, что указанное антитело к SARS-COV-2 представляет собой этесевимаб.
45. Способ по пп. 34-40, отличающийся тем, что указанное антитело к SARS-COV-2 содержит VH, имеющую SEQ ID NO: 5, и VL, имеющую SEQ ID NO: 6.
46. Способ по пп. 34-40, отличающийся тем, что указанное антитело к SARS-COV-2 содержит HC, имеющую SEQ ID NO: 7, и LC, имеющую SEQ ID NO: 8.
47. Способ по любому из пп. 34-40, отличающийся тем, что указанное антитело к SARS-COV-2 представляет собой бектеловимаб.
48. Способ по любому из пп. 34-40, отличающийся тем, что указанное антитело к SARS-COV-2 содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.
49. Способ по любому из пп. 34-40, отличающийся тем, что указанное антитело к SARS-COV-2 содержит HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.
50. Способ по любому из пп. 1-49, отличающийся тем, что указанный глубинный фильтр содержит C0SP, X0SP, X0HC, Emphaze AEX Hybrid Purifier или Zeta Plus (ZB Media).
51. Способ по любому из пп. 1-50, отличающийся тем, что указанная клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.
52. Способ по п. 51, отличающийся тем, что указанная клетка млекопитающего представляет собой клетку CHO.
53. Композиция, полученная способом по любому из пп. 1-52.
54. Композиция по п. 53, отличающаяся тем, что указанное содержание белка клетки-хозяина в указанной композиции составляет менее чем примерно 100 м.д.