

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202391161 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.06.13

(22) Дата подачи заявки  
2021.10.15

(51) Int. Cl. C12Q 1/686 (2018.01)  
C12Q 1/6851 (2018.01)  
C12Q 1/6806 (2018.01)  
G01N 31/02 (2006.01)  
C12N 15/10 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)

(54) ВЫЯВЛЕНИЕ И УДАЛЕНИЕ ПОЛИВИНИЛСУЛЬФОНАТА ИЗ БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПОЗИЦИЙ

(31) 63/093,120

(32) 2020.10.16

(33) US

(86) PCT/US2021/055117

(87) WO 2022/081939 2022.04.21

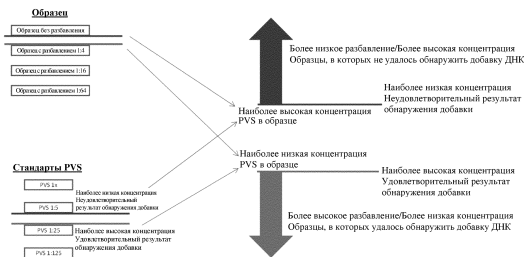
(88) 2022.06.02

(71) Заявитель:  
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Соис Нил, Кунс Скотт, Чордаш Эндрю  
(US)

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

(57) Изобретение предусматривает материалы и способы для оценки присутствия и уровня полианионных соединений в образце, которые ингибируют ПЦР-реакции, в том числе анализы на присутствие и, необязательно, количество поливинилсульфоната, а также материалы и способы для уменьшения количества или удаления таких соединений из буферных растворов и из растворов белка с помощью различных подходов, в том числе методик на основе титрования.



202391161

A1

A1

202391161

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577396EA/032

### ВЫЯВЛЕНИЕ И УДАЛЕНИЕ ПОЛИВИНИЛСУЛЬФОНАТА ИЗ БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПОЗИЦИЙ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[1] Данная заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 63/093120, поданной 16 октября 2020 года, которая настоящим включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Включение посредством ссылки материала, поданного в электронном виде

[2] Перечень последовательностей, который представляет собой часть настоящего изобретения, подается одновременно с описанием в виде текстового файла. Название текстового файла, содержащего перечень последовательностей, который был создан 4 октября 2021 года и размер которого составляет 1070 байтов, представляет собой "55057A\_Seqlisting.txt". Содержание перечня последовательностей включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Область изобретения

[3] Настоящее изобретение в целом относится к области очистки биомолекул и, более конкретно, к очистке белков.

Уровень техники

[4] В настоящее время реализуется потенциал биологических препаратов и биоаналогов, и такие терапевтические классы вносят постоянно растущие вклады в арсенал средств лечения, доступных для лечения заболеваний и патологических состояний людей и других животных. Данные продукты, к которым относятся рекомбинантные белки, антитела различных форм и их фрагменты, сохраняющие способность связывания, а также вакцины, - их все получают путем экспрессии в клетках-хозяевах, начиная от бактерий, дрожжей, клеток животных, таких как клетки млекопитающих, и непрерывных культур линий клеток. Как и в культуре клеток, данные продукты смешаны с различными загрязняющими веществами, в том числе фрагментами ДНК клетки-хозяина. Кроме того, остаточные количества ДНК клетки-хозяина могут выдержать жесткие способы очистки, оставаясь вредной примесью в препаратах очищенных белков, таких как биологические препараты. Остаточная ДНК клетки-хозяина, содержащаяся в составе белка, для введения животному, например, пациенту-человеку, может вызвать нежелательный иммунный ответ или повысить риск развития рака. В результате этого регуляторные органы во всем мире наложили ограничения на концентрацию ДНК клетки-хозяина, содержащейся в составе для введения человеку. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) и Европейский союз (ЕС) допускают количества до 10 нг/доза остаточной ДНК клетки-хозяина, в то время как Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США разрешает не более 100 пг/доза. Для обеспечения того, чтобы в содержащих очищенный белок составах, предназначенных для введения, не превышались данные пороговые значения,

необходимы точные, тщательные и чувствительные способы выявления и количественного определения низких уровней ДНК клетки-хозяина. Более того, культуры клеток, применяемые для эффективного получения таких белков, помимо ДНК клетки-хозяина содержат и другие примеси. Некоторые из данных примесей, такие как низкомолекулярные соединения, могут оказывать прямое вредное воздействие на биологические препараты и биоаналоги, продуцируемые данными клетками (т. е. экспрессируемые белки-мишени), например, ингибируя транскрипцию или трансляцию белка-мишени, ингибируя активность экспрессируемого белка-мишени или препятствуя усилиям по измерению или отслеживанию белка-мишени в процессе его очистки.

[5] В качестве примесей в культурах клеток могут быть обнаружены некоторые полианионные соединения, обычно обнаруживаемые в жизнеспособных клетках, применяемых для культуральной экспрессии рекомбинантного белка-мишени. Кроме того, некоторые из данных полианионных соединений, обнаруживаемые в буферах и средах для культивирования клеток, являются известными ингибиторами различных ферментов. Поливинилсульфонат (PVS) представляет собой полианионное соединение, которое является известным ингибитором нескольких ферментов, в том числе РНК-ферментов и ДНК-полимераз. Также известно, что PVS присутствует в препаратах 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES), распространенном буфере, используемом в операциях по обработке и очистке биотерапевтических продуктов. PVS также может (нежелательно) присутствовать в других буферных системах, например, буферах Гуда, в которых в качестве исходного материала используют винилсульфонат.

[6] Таким образом, в данной области техники сохраняется потребность в способах безошибочного количественного определения ДНК клетки-хозяина, содержащейся в содержащих белок составах, предназначенных для введения людям или другим животным. Более того, по-прежнему существует потребность в способах уменьшения количества или удаления таких примесей из содержащих белок составов, предназначенных для такого введения.

Сущность изобретения

[7] Настоящее изобретение предусматривает способы анализа полианионных ингибиторов ПЦР, таких как поливинилсульфонатные соединения. Такие соединения ингибируют ряд ферментов, в том числе полимеразы нуклеиновых кислот, такие как ДНК-полимеразы. Даже сконструированные формы ДНК-полимераз, которые в настоящее время преобладают в способах ПЦР-амплификации, ингибируются данными соединениями, и в данном документе в настоящем изобретении представлены способы выявления и количественного определения данных ингибирующих соединений. Настоящее изобретение дополнительно относится к способам удаления таких соединений из буферов (например, буферов MES и Гуда), а также из растворов белка. Такие способы обеспечивают значительное преимущество в обработке биологических препаратов и белков в целом, предусматривая способы отслеживания присутствия основного класса ингибиторов ПЦР, которые мешают усилиям по отслеживанию чистоты биологических

препаратов, полученных в культуре клеток, где необходимо отслеживать ДНК хозяина для обеспечения степени чистоты представляющего интерес белка, достаточной для применения в качестве терапевтического средства на людях и/или других животных.

[8] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ количественного определения полианионного ингибитора ПЦР в образце, включающий: а) получение серии разведений образца, включающей по меньшей мере четыре члена; б) добавление для каждого члена серии разведений с постоянным количеством матричной ДНК, отличимой от ДНК клетки-хозяина; в) проведение ПЦР-анализа на каждом члене серии разведений и на постоянном количестве матричной ДНК в отсутствие какого-либо образца; г) построение стандартной кривой для полианионного ингибитора; д) сравнение результатов ПЦР-анализа серии разведений с результатами ПЦР-анализа постоянного количества матричной ДНК в отсутствие какого-либо образца; и е) определение концентрации полианионного ингибитора ПЦР в образце. В некоторых вариантах осуществления концентрация полианионного ингибитора ПЦР в образце представляет собой диапазон, определяемый концентрацией полианионного ингибитора ПЦР, при которой при наименее разведенном члене серии разведений наблюдают полное обнаружение добавки, а при наиболее разведенном члене серии разведений не наблюдают полное обнаружение добавки. В некоторых вариантах осуществления количество членов в серии разведений составляет 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15 или 20, за счет чего обеспечивается сужение диапазона концентраций полианионного ингибитора ПЦР в образце по сравнению с диапазоном, получаемым при анализе меньшего количества членов серии разведений. В некоторых вариантах осуществления постоянное количество матричной ДНК составляет по меньшей мере 100 пг. В некоторых вариантах осуществления полианионный ингибитор ПЦР представляет собой сульфоновое (сульфонатное) соединение, такое как поливинилсульфонат. В некоторых вариантах осуществления поливинилсульфонат представляет собой полианионный ингибитор ПЦР, применяемый для построения стандартной кривой полианионного ингибитора ПЦР, и концентрацию полианионного ингибитора ПЦР в образце выражают в единицах эквивалентов концентрации поливинилсульфоната. Некоторые варианты осуществления дополнительно включают добавление в образец, разведенный в достаточной степени для обнаружения амплификации, одного или нескольких количеств полианионного ингибитора ПЦР, такого как поливинилсульфонат, для демонстрации, что при добавлении ингибитора обнаружение амплификации ухудшается или оно становится невозможным.

[9] Другой аспект настоящего изобретения относится к способу удаления полианионного ингибитора ПЦР (полианионной примеси) из буферного раствора, включающему: а) получение буферного раствора кислых буферных веществ, основных буферных веществ или их комбинации; б) приведение буферного раствора в контакт с анионообменной средой; и в) отделение буферного раствора от полианионной примеси, за счет чего обеспечивается удаление полианионной примеси из буферного раствора. Родственный аспект настоящего изобретения предусматривает способ удаления

полианионного ингибитора ПЦР из буферного раствора, включающий: а) получение буферного раствора кислых буферных веществ, основных буферных веществ или их комбинации; б) приведение буферного раствора в контакт со смолой смешанного действия; и с) отделение буферного раствора от полианионной примеси, за счет чего обеспечивается удаление полианионной примеси из буферного раствора. В любом из вышеизложенных способов удаления полианионного ингибитора ПЦР объем буфера, используемого в способе, не является ограничивающим и может варьировать от небольших аналитических объемов в диапазоне миллилитров до буферных препаратов промышленных масштабов, включающих много литров. В некоторых вариантах осуществления любого из способов удаления полианионная примесь представляет собой сульфоновое (сульфонатное) соединение, такое как поливинилсульфонат. В некоторых вариантах осуществления любого способа удаления буферный раствор представляет собой буферный раствор Гуда, такой как буферный раствор 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES). В некоторых вариантах осуществления любого из способов удаления буферный раствор содержит буферную соль или кислотное вещество данной буферной соли. Некоторые варианты осуществления каждого из способов удаления дополнительно включают внесение по меньшей мере одного модифицирующего соединения в буферный раствор. В некоторых вариантах осуществления любого из способов удаления модифицирующее соединение представляет собой небуферную соль, вспомогательное вещество или и то, и другое.

[10] В некоторых вариантах осуществления способа удаления, включающего применение анионообменной среды, анионообменная среда представляет собой матрицу, модифицированную диэтиламиноэтилом, матрицу, модифицированную диметиламиноэтилом, матрицу, модифицированную диметиламинопропилом, матрицу, модифицированную полиэтиленимином, матрицу, модифицированную кватернизированным полиэтиленимином, матрицу, модифицированную полностью кватернизированным амином, анионообменные глубинные фильтры на основе модифицированной диатомовой земли, анионообменные мембранные адсорберы, солеустойчивые анионообменные мембранные адсорберы, Macro-Prep 25Q, TSK-Gel Q, Poros Q, Q Sepharose Fast Flow, Q HyperD, Q Zirconia, Source 30Q, Fractogel EMD TMAE, Express-Ion Q, DEAE Sepharose Fast Flow, Poros 50 D, Fractogel EMD DEAE (M), MacroPrep DEAE Support, DEAE Ceramic HyperD 20, Toyopearl DEAE 650 M, Capto Q, мембранный адсорбер Sartobind Q, заряженную мембрану Posidyne, матрицу Amberlite<sup>®</sup>, модифицированную (полиамином), анионообменные глубинные фильтры на основе модифицированной диатомовой земли, анионообменные мембранные адсорберы, солеустойчивые анионообменные мембранные адсорберы, Macro-Prep 25Q, TSK-Gel Q, Poros Q, Q Sepharose Fast Flow, Q HyperD, Q Zirconia, Source 30Q, Fractogel EMD TMAE, Express-Ion Q, DEAE Sepharose Fast Flow, Poros 50 D, Fractogel EMD DEAE (M), MacroPrep DEAE Support, DEAE Ceramic HyperD 20, Toyopearl DEAE 650 M, Capto Q, мембранный абсорбер Sartobind Q, заряженную мембрану Posidyne, модифицированную

(аминодиуксусной кислотой) матрицу Amberlite<sup>®</sup>, модифицированную (триалкилбензиламмонием) матрицу Amberlite<sup>®</sup> I типа, модифицированную (диметил-2-гидроксиэтилбензиламмонием) матрицу Amberlite<sup>®</sup> II типа, модифицированную (полиамином) матрицу Dowex<sup>®</sup>, модифицированную (триметилбензиламмонием) матрицу Dowex<sup>®</sup> I типа, модифицированную (диметил-2-гидроксиэтилбензиламмонием) матрицу Dowex<sup>®</sup> II типа, Dowex<sup>®</sup> (смешанного слоя), анионообменную мультимодальную среду Capto<sup>™</sup> Adhere, анионообменную мультимодальную Capto<sup>®</sup> Adhere, PPA Hypercel, HEA Hypercel или модифицированную (полиамином) матрицу Duolite<sup>®</sup>. В некоторых вариантах осуществления способа удаления, включающего применение смолы смешанного действия, смола смешанного действия представляет собой анионообменную мультимодальную смолу Capto<sup>®</sup> Adhere, смолу PPA Hypercel или смолу HEA Hypercel. Любая матрица, известная из уровня техники, подходит для применения в способах удаления, в том числе без ограничения целлюлоза, агароза, Sepharose<sup>®</sup>, метакриловый полимер, керамические каркасы с полимеризованными гидрогелями и патентованные матрицы.

[11] Некоторые варианты осуществления способа удаления, включающего применение анионообменной среды, предусматривают анионообменную среду, которая связывает до 15 мг, 9 мг или 3 мг PVS на мл анионообменной среды. Некоторые варианты осуществления способа удаления, включающего применение смолы смешанного действия, предусматривают смолу смешанного действия, которая связывает до 15 мг, 9 мг или 3 мг PVS на мл смолы смешанного действия. В некоторых вариантах осуществления способа удаления, включающего применение анионообменной среды, анионообменная среда представляет собой поликатионное соединение, которое представляет собой титрующее вещество, образующее комплекс с полианионной примесью (аналитом). В некоторых вариантах осуществления анионообменная среда представляет собой полимер на основе четвертичного аммония. В некоторых вариантах осуществления способа удаления, включающего применение анионообменной среды, поликатионное соединение вносят в количестве, достаточном для по меньшей мере достижения точки эквивалентности при титровании аналита в форме полианионной примеси. В контексте данного документа точка эквивалентности представляет собой точку при титровании, когда добавлено достаточное количество титрующего вещества для связывания всего аналита, и является синонимом точки титрования.

[12] Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу удаления полианионной буферной примеси из раствора белка, включающему: а) доведение pH раствора белка, содержащего анионную буферную примесь, до значения pH, которое меньше изоэлектрической точки белка не более чем на 4 единицы pH; б) приведение раствора белка в контакт с анионообменной средой; и с) отделение белка от анионной буферной примеси. В родственном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ удаления полианионной буферной примеси из раствора белка, включающий: а) доведение pH раствора белка, содержащего анионную буферную примесь, до значения

pH, которое меньше изоэлектрической точки белка не более чем на 4 единицы pH; b) приведение раствора белка в контакт со смолой смешанного действия; и c) отделение белка от анионной буферной примеси. В некоторых вариантах осуществления любого из данных способов удаления на основе pH значение pH доводят так, чтобы оно было ниже изоэлектрической точки белка не более чем на 2 единицы pH. В некоторых вариантах осуществления способа удаления на основе pH, включающего применение анионообменной среды, анионообменная среда представляет собой матрицу, модифицированную диэтиламиноэтилом, матрицу, модифицированную диметиламиноэтилом, матрицу, модифицированную диметиламинопропилом, матрицу, модифицированную полиэтиленимином, матрицу, модифицированную кватернизированным полиэтиленимином, матрицу, модифицированную полностью кватернизированным амином, анионообменный глубинный фильтр на основе модифицированной диатомовой земли, анионообменный мембранный адсорбер, солеустойчивый анионообменный мембранный адсорбер, Macro-Prep 25Q, TSK-Gel Q, Poros Q, Q Sepharose Fast Flow, Q HyperD, Q Zirconia, Source 30Q, Fractogel EMD TMAE, Express-Ion Q, DEAE Sepharose Fast Flow, Poros 50 D, Fractogel EMD DEAE (M), MacroPrep DEAE Support, DEAE Ceramic HyperD 20, Toyopearl DEAE 650 M, Capto Q, мембранный адсорбер Sartobind Q, заряженную мембрану Posidyne, модифицированную (полиамином) матрицу Amberlite<sup>®</sup>, модифицированную (иминодиуксусной кислотой) матрицу Amberlite<sup>®</sup>, модифицированную (триалкилбензиламмонием) матрицу Amberlite<sup>®</sup> I типа, модифицированную (диметил-2-гидроксиэтилбензиламмонием) матрицу Amberlite<sup>®</sup> II типа, модифицированную (полиамином) матрицу Dowex<sup>®</sup>, модифицированную (триметилбензиламмонием) матрицу Dowex<sup>®</sup> I типа, модифицированную (диметил-2-гидроксиэтилбензиламмонием) матрицу Dowex<sup>®</sup> II типа, Dowex<sup>®</sup> (смешанного слоя), анионообменную мультимодальную среду Capto<sup>®</sup> Adhere, PPA Hypercel, HEA Hypercel или модифицированную (полиамином) матрицу Duolite<sup>®</sup>. Как отмечено выше, для применения в способах согласно настоящему изобретению подходит любая матрица, известная из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления способа удаления на основе pH, включающего применение смолы смешанного типа, смола смешанного типа представляет собой анионообменную мультимодальную Capto<sup>®</sup> Adhere, PPA Hypercel или HEA Hypercel.

[13] Еще одним аспектом настоящего изобретения является способ титрования для выявления полианионного ингибитора ферментов в буферном растворе, включающий: (a) приведение буферного раствора в контакт с поликатионным соединением; (b) внесение полианионного соединения к раствору со стадии (a), где полианионное соединение характеризуется изменением выявляемого свойства при нахождении в комплексе с поликатионным соединением по сравнению с несвязанным в комплекс полианионным соединением; (c) повторение стадий (a) и (b) с различными концентрациями буферного раствора или различными концентрациями поликатионного соединения; и (d) выявление изменения выявляемого свойства в точке титрования, за счет чего обеспечивается

выявление полианионного ингибитора ферментов. В некоторых вариантах осуществления концентрация буфера варьируется, за счет чего обеспечивается получение серии разведений буфера. В некоторых вариантах осуществления концентрация поликатионного соединения варьируется. В некоторых вариантах осуществления полианионный ингибитор ферментов представляет собой поливинилсульфонат или его производное. В некоторых вариантах осуществления поликатионное соединение представляет собой рН-независимое поликатионное соединение или рН-зависимое поликатионное соединение. В некоторых вариантах осуществления рН-независимое поликатионное соединение представляет собой полимер на основе четвертичного аммония. В некоторых вариантах осуществления рН-зависимое поликатионное соединение представляет собой полиамин. В некоторых вариантах осуществления полимер на основе четвертичного аммония представляет собой бромид гексадиметрина (HDBr), хлорид поли(диаллил)диметиламмония (pDADMAC) или метилгликольхитозан. В некоторых вариантах осуществления полимер на основе четвертичного аммония представляет собой бромид гексадиметрина (HDBr) или хлорид поли(диаллил)диметиламмония (pDADMAC). В некоторых вариантах осуществления полимер на основе четвертичного аммония представляет собой бромид гексадиметрина (HDBr).

[14] В некоторых вариантах осуществления полианионное соединение представляет собой краситель. В некоторых вариантах осуществления краситель представляет собой эриохром черный Т (ЕСВТ), эриохром сине-черный R (Calcon) или натриевую соль сульфоназо. В некоторых вариантах осуществления краситель представляет собой эриохром черный Т (ЕСВТ). В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой буфер Гуда. В некоторых вариантах осуществления буфер Гуда содержит производное полиэтансульфоновой кислоты или производное полипропансульфоновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления буфер Гуда представляет собой MES, бис-трис метан, ADA, бис-трис пропан, PIPES, ACES, MOPSO, хлорид холамина, MOPS, BES, AMPB, HEPES, DIPSO, MOBS, ацетамидоглицин, TAPSO, TEA, POPSO, HEPPSO, EPS, HEPPS, трицин, Трис, глицинамид, глицилглицин, HEPBS, бицин, TAPS, AMPB, CHES, CAPSO, AMP, CAPS или CABS. В некоторых вариантах осуществления несвязанное в комплекс полианионное соединение выявляют с помощью флуорометрии или спектрофотометрии. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выявление концентрации полианионного ингибитора фермента по количеству полианионного соединения, необходимому для выявления изменения выявляемого свойства.

[15] Другой аспект настоящего изобретения относится к способу количественного определения полианионного ингибитора ПЦР в образце, включающему: (а) приведение образца, содержащего полианионный ингибитор ПЦР, в контакт с по меньшей мере одной аликвотой поликатионного соединения; (b) внесение полианионного индикаторного красителя в количестве, достаточном для выявления свободной формы красителя; и (с) количественное определение полианионного ингибитора ПЦР на основе количества



поликатионного соединения, необходимого для выявления свободной формы полианионного индикаторного красителя. Родственный аспект настоящего изобретения относится к способу удаления полианионной примеси в образце, включающему: (а) приведение жидкости, содержащей полианионную примесь, в контакт с поликатионным противоионом; и (b) отделение жидкости от полианионной примеси, образующей комплекс с поликатионным противоионом, за счет чего обеспечивается удаление полианионной примеси из жидкости. В некоторых вариантах осуществления полианионная примесь представляет собой полианионный ингибитор ПЦР. В некоторых вариантах осуществления комплекс полианионной примеси и поликатионного противоиона удаляют посредством осаждения. В некоторых вариантах осуществления поликатионный противоион дериватизируют путем присоединения к члену пары связывания или магнитной частицы для облегчения удаления комплекса полианионной примеси и поликатионного противоиона из жидкости. Иллюстративные пары связывания включают без ограничения пары антиген/антитело, биотин/стрептавидин, пары магнитных частиц/железосодержащего материала, пары полигистидин/ион металла (например, никеля) и т. п.

[16] Другие признаки и преимущества предмета настоящего изобретения станут очевидны из следующего подробного описания и фигур, а также из формулы изобретения.

Краткое описание графических материалов

[17] **Фигура 1.** Ингибирование обнаружения добавки при анализе ДНК по сравнению со стандартами PVS.

[18] **Фигура 2.** Результаты анализа обнаружения добавки в серии разведений по сравнению со стандартной кривой для получения концентраций PVS.

[19] **Фигура 3.** Данные по обнаружению добавки для фракций MES.

[20] **Фигура 4.** Данные по обнаружению добавки для фракций MES.

[21] **Фигура 5.** Данные по обнаружению добавки для фракций MES с применением АЕХ смолы.

[22] **Фигура 6.** Результаты анализа, из которых установлено, что поливинилсульфонат (PVS) является активным ингибитором в qPCR-опосредованном анализе ДНК.

[23] **Фигура 7.** Хроматографический способ обнаружения вносимой добавки PVS.

[24] **Фигура 8.** (a) Химическая структура 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (т. е. MES) показана в виде кислой формы, т. е. гидрата MES, и в виде основной формы, т. е. натриевой соли MES. (b) Химические реакции, приводящие к получению соединений, которые могут ингибировать ферменты, обладающие активностью в отношении нуклеиновых кислот, такие как РНК-ферменты. Фигура 1(b) адаптирована на основе фигуры из публикации Smith, et al. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 20934-20938.

[25] **Фигура 9.** (a) Варьирование концентрации поливинилсульфоната (PVS) в диапазоне 0-1,0 ppm позволило построить линейную калибровочную кривую для двух

разных партий стандартов PVS, полученных от Sigma-Aldrich, которые поставлялись в форме водных растворов с концентрацией 30 вес. %. Было обнаружено, что концентрация PVS значительно варьирует в разных партиях. Однако предполагается, что концентрацию конкретной партии можно скорректировать путем ее разведения с тем, чтобы она служила подходящим стандартом. (b) Кривые титрования с применением гексадиметринбромида (HDBr) для титрования PVS строили в диапазоне концентраций PVS 0-1,0 ppm. Был обнаружен линейный диапазон в приблизительно 1,5 порядка.

[26] **Фигура 10.** (a) Схематическое изображение результатов количественной оценки путем титрования PVS посредством HDBr со спектроскопическим выявлением конечной точки. На схеме реакции изображено комплексообразование между PVS и HDBr, обусловленное притягивающими электростатическими взаимодействиями. В конечной точке титрования индикаторное соединение ( $nD^-$ ) претерпевает изменение поглощающих свойств при связывании с несущими заряд соседними участками HDBr. Синие круглые символы “плюс” и “минус” на фигуре 3(a) относятся к фоновым солям в растворе. (b) На графике показано изменение поглощающей способности раствора в случае холостой пробы (т. е. 50 mM боратного буфера, pH 8,5, дополненного индикаторным соединением EBT), измеренного на лабораторном спектрометре для измерения поглощающей способности, по мере постепенного добавления HDBr в раствор в процессе титрования. С увеличением концентрации HDBr поглощающая способность индикатора при 665 нм уменьшается с сопутствующим сдвигом максимума поглощающей способности от приблизительно 630 до 593 нм.

[27] **Фигура 11.** Кривые титрования, на которых отображена нормализованная поглощающая способность с коррекцией на объем при 665 нм для серии стандартных растворов PVS.

[28] **Фигура 12.** (a) График зависимости поглощающей способности раствора с коррекцией на объем при 665 нм от массы HDBr (титрующего вещества) для трех разных стандартов PVS, приготовленных в холостом образце матрицы для MES. (b) Результаты сравнения точек перегиба кривой титрования для стандартов PVS, приготовленных в 50 mM борате натрия (зеленые треугольники), и MES, смешанного с 50 mM боратом натрия (черные квадраты).

[29] **Фигура 13.** Результаты сравнения точек перегиба кривой титрования для стандартов PVS, полученных в холостом образце матрицы для MES (черные квадраты), отрицательной контрольной партии MES (SLBT8755; голубой ромб) и партии MES, что обуславливала первоначальные недостоверные результаты qPCR-анализа (партия № 1; красный круг).

[30] **Фигура 14.** Репрезентативный профиль для титрования холостого стандарта (100 mM карбонатный буфер, дополненный 1,25 мкг/мл индикаторного красителя эриохром черный Т (EBT)) с 0,04 мг/мл бромида гексадиметрина (HDBr; черный контур) и соответствующей первой производной (красный контур).

[31] **Фигура 15.** (a) График объема конечной точки титрования в зависимости от

концентрации PVS, добавляемого в 50 мМ MES, растворенного в 100 мМ карбонатном буфере. (b) График зависимости объема конечной точки титрования от концентрации PVS для стандартных образцов, приготовленных в 100 мМ карбонатном буфере.

[32] **Фигура 16.** Репрезентативные кривые титрования для (A, B) стандартных растворов PVS, полученных при 0 (A) или 0,75 (B) мкг/мл в 100 мМ карбонатном буфере; и (C, D) PVS, добавляемого при 0 (C) или 0,70 (D) мкг/мл в 50 мМ MES (образец H в таблице 10), полученного в 100 мМ карбонатном буфере.

Подробное описание

[33] Буфер MES (2-(N-морфолино)-этансульфоновая кислота) и другие буферы Гуда являются распространенными буферами в биологических процессах, позволяющими контролировать pH около pH 6 (pKa MES составляет 6,15). Синтез MES включает реакцию присоединения Майкла морфолинового кольца к винилсульфонату. Распространенной побочной реакцией является олигомеризация/полимеризация винилсульфоната с образованием полианионного поливинилсульфоната. Поливинилсульфонат является активным ингибитором количественного анализа методом полимеразной цепной реакции (qPCR), применяемого для количественного определения остаточной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) клетки-хозяина, что приводит в результате к неудачному обнаружению добавки в контрольных образцах анализа и недействительным результатам теста. Уровень PVS, который ингибирует анализ ДНК, намного ниже уровня PVS, который может вызвать опасения по поводу безопасности. Тем не менее, невозможность определить содержание ДНК клетки-хозяина с помощью действительного контрольного образца для обнаружения добавки влияет на характеристику партии очищенных белков, таких как биологические препараты, а также на выпуск и фармакокинетику таких партий.

[34] Настоящее изобретение предусматривает способы анализа полианионных соединений, присутствующих в средах для культивирования клеток или полученных из них жидкостях, таких как среды или жидкости для культивирования клеток млекопитающих, которые чувствительны к низким уровням полианионных соединений. В настоящем изобретении показано, что низкие уровни полианионов в жидкостях культур клеток мешают усилиям по отслеживанию очистки белков в целом и биологических препаратов в частности, увеличивая время и затраты, необходимые для получения одобрения на терапевтическое применение. Способы по настоящему изобретению предусматривают простые и эффективные подходы для отслеживания снижения концентраций полианионных примесей до исчезающе малых или несуществующих концентраций. Недавний стремительный рост промышленных способов получения белков, таких как биологические препараты, т. е. терапевтические антитела и фрагменты антител, оказывает растущее давление на промышленность в отношении разработки способов очистки белков, которые эффективно обеспечивают высокие выходы чистых белковых продуктов, пригодных для составления в терапевтические препараты, а способы по настоящему изобретению предусматривают решение в виде обеспечения возможности

простого и эффективного отслеживания полианионных примесей, часто наблюдаемых в содержащих белок жидкостях культур клеток различной степени чистоты. Раскрытая в данном документе информация о том, что полианионные примеси присутствуют в содержащих белок жидкостях, например, растворах, которые традиционно считались очищенными, привела к раскрытым способам уменьшения количества или удаления полианионных примесей из содержащих белок жидкостей, например, растворов. В настоящем изобретении раскрыто, что даже в таких жидкостях полианионные примеси могут быть обнаружены на уровнях, которые мешают ферментам, например, ДНК-полимеразам, зачастую применяемым для анализа степени чистоты раствора белка. Например, для отслеживания уровней ДНК клетки-хозяина в способе очистки, предназначенном для получения белка из культуры клеток, например культуры клеток млекопитающих, зачастую применяют qPCR. Ввиду обнаружения присутствия даже следовых количеств полианионных примесей, присутствующих во время способа очистки, которые мешают усилиям по отслеживанию степени чистоты, настоящее изобретение предусматривает способы уменьшения количества или удаления полианионных примесей из растворов белков, которые в уровне техники считались чистыми.

[35] Полианионные соединения, такие как поли(винилсульфоновая кислота) (PVS), представляют собой полимерные примеси в буферах Гуда, таких как буфер MES. Такие полианионные соединения, например PVS, присутствуют в таких буферах в низких количествах в диапазоне частей на миллион по отношению к буферному соединению, такому как MES. Присутствие таких примесей в буферах Гуда вызывает серьезную озабоченность, поскольку такие буферы применяют при производстве терапевтических белков, и такие примеси, и в частности PVS, являются мощными ингибиторами полимераз, которые могут мешать выявлению ДНК методом количественной ПЦР (qPCR). Измерения в отношении нуклеиновых кислот клетки-хозяина (например, ДНК) в составах терапевтических белков, очищенных из культуры, обычно необходимы для оценки безопасности терапевтических препаратов, предназначенных для введения людям. Таким образом, присутствие полианионных соединений, таких как PVS, в буферах Гуда, таких как MES, может привести к тому, что партии терапевтического белка не будут соответствовать критериям приемлемости для введения человеку, из-за помех выявления ДНК клетки-хозяина методом qPCR.

[36] В данном документе раскрыты способы, включающие титрование, основанное на комплексообразовании аналита (например, PVS) с противоположно заряженным титрующим веществом с высоким молекулярным весом. Такое взаимодействие приводит в результате к чрезвычайно высокой равновесной константе ассоциации ( $K_a$ ), а конечная точка может быть обнаружена спектроскопическим путем (например, колориметрически или фотометрически). Краткое описание схемы выявления, применяемой для титрования PVS бромидом гексадиметрина (HDBr), иллюстративным титрующим веществом, представлено на фигуре 10.

[37] Способы по настоящему изобретению включают способы подтверждения

точности основанных на ферментах нуклеиновых кислот анализов ДНК клетки-хозяина в качестве примеси в белковых составах. Например, способы, раскрытые в данном документе, применимы для подтверждения результатов основанных на ферментах нуклеиновых кислот анализов ДНК клетки-хозяина, таких как полимеразная цепная реакция (т. е., ПЦР). Примером ПЦР-анализа, применимого в раскрываемых способах, является количественная ПЦР или qPCR, которая обеспечивает быстрый, недорогой, точный, тщательный и чувствительный способ выявления количества ДНК в образце. Соответственно, предпочтительные способы подтверждения концентрации примеси ДНК клетки-хозяина в белковой жидкости, растворе, препарате или составе включают количественный анализ ДНК в образце, таком как образец культуры клеток, с помощью qPCR и сравнения со стандартной кривой полианионного ингибитора ПЦР для определения концентрации полианионного ингибитора ПЦР в белковой жидкости, растворе, препарате или составе для подтверждения результатов анализа ДНК клетки-хозяина. Родственные аспекты настоящего изобретения направлены на решение проблемы ингибирования ферментов нуклеиновых кислот путем реализации способов уменьшения количества или удаления таких ингибиторов из жидкостей культур клеток различной степени чистоты, т. е. содержащих белок жидкостей или растворов, и путем удаления таких ингибиторов из буферов, в которых такие белки могут содержаться.

[38] Раскрываемые в данном документе способы применимы для уменьшения количества или удаления одного или нескольких полианионных соединений, таких как полианионные соединения, содержащиеся в культуре клеток, например в культуре клеток млекопитающих, или в буферах, встречающихся в терапевтических составах, таких как 2-(N-морфолино)-этансульфоновая кислота (MES) или буферы Гуда. Иллюстративной группой полианионных соединений, количество которых уменьшают или удаляют в соответствии со способами по настоящему изобретению, являются сульфонатные соединения, типичным примером которых является поливинилсульфонат (т. е. полиэтиленсульфонат). В настоящем изобретении предусмотрено уменьшение количества или удаление полианионных соединений независимо от размера или диапазона размеров соответствующего полимера или полимеров. Полианионные примеси, которые можно удалить с помощью способов по настоящему изобретению, также включают полиоксометаллаты (т. е. POM), протеогликаны (различные депо хранения), гликозаминогликаны (например, гепарин, хондроитинсульфаты, декстрансульфат), полиглутамат, полисахариды, актиновые микрофиламенты и актиновые микротрубочки, поливинилсульфонаты, полиакриловую кислоту и инозитолфосфаты.

[39] В способах в соответствии с настоящим изобретением для отделения полианионных примесей от очищаемого белка, например биологического препарата, применяют анионообменную среду. В раскрываемых способах можно применять любую анионообменную среду, известную из уровня техники, включая без ограничения слабоосновные группы, такие как диэтиламиноэтил (DEAE) и диметиламиноэтил (DMAE), диметиламинопропил (DMAP), или в анионном обмене можно применять

сильноосновные группы, такие как четвертичные аминоэтил (Q), триметиламмонийэтил (ТМАЕ) и четвертичный аминоэтил (QAE)). Иллюстративными анионообменными средами являются GE Healthcare Q-Sepharose FF<sup>®</sup>, Q-Sepharose BB<sup>®</sup>, Q-Sepharose XL<sup>®</sup>, Q-Sepharose HP<sup>®</sup>, Mini Q<sup>™</sup>, Mono Q, Mono P DEAE Sepharose FF<sup>®</sup>, Source<sup>™</sup> 15Q, Source<sup>™</sup> 30Q, Capto Q<sup>™</sup>, Streamline DEAE<sup>®</sup>, Streamline QXL<sup>®</sup>; смолы для самостоятельной загрузки Applied Biosystems Poros<sup>™</sup> HQ 10 и 20 мкм, Poros<sup>™</sup> HQ 20 и 50 мкм, Poros<sup>™</sup> PI 20 и 50 мкм, Poros<sup>™</sup> D 50 мкм Tosohaas Toyopearl<sup>®</sup> DEAE 650S M и C, Super Q 650, QAE 550C; Pall Corporation DEAE HyperD<sup>™</sup>, Q Ceramic HyperD<sup>™</sup>, мембранный адсорбер Mustang Q: Merck KG2A Fractogel DMAE<sup>®</sup>, FractoPrep DEAE, FractoPrep TMAE, Fractogel EMD DEAE<sup>®</sup>, Fractogel EMD TMAE<sup>®</sup>; и мембранный адсорбер Sartorius Sartobind Q<sup>®</sup>. В раскрываемых способах можно применять любую среду смешанного действия или мультимодальную среду, известную из уровня техники, которая содержит анионообменник, в том числе без ограничения анионообменную мультимодальную Capto<sup>®</sup> Adhere, PPA Hypercel или HEA Hypercel. Кроме того, раскрываемые способы могут включать применение связывающих полианион белков, таких как  $\alpha$ -синуклеин, tRNA/rRNA-метилтрансфераза и/или небольшие белки теплового шока. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления Hybrid Purifier<sup>®</sup>, помимо того, что он выполняет функцию глубинного фильтра, применяют в качестве анионообменной среды. Также для применения в качестве анионообменной среды предпочтительным является фильтр предварительной очистки Viresolve (VPF).

[40] В способах по настоящему изобретению, применимых для подтверждения точности анализов ДНК клетки-хозяина, например образцов культуры клеток, можно применять любой ферментный анализ нуклеиновых кислот, такой как любая из различных форм ПЦР. Предпочтительным типом ПЦР для применения в таких способах является qPCR. ПЦР, в том числе qPCR, хорошо подходит для выявления и количественного определения ДНК из культивируемых клеток, такой как ДНК клетки-хозяина, встречающейся в качестве примеси в жидкостях культур тканей. Преимуществом qPCR является ее способность выявлять и количественно определять увеличение флуоресценции, возникающей после каждого раунда ПЦР. Для обеспечения такой способности конструируют такие прямые и обратные праймеры, чтобы они фланкировали представляющую интерес последовательность-мишень ДНК, а также конструируют специфический для мишени зонд для его гибридизации с комплементарной последовательностью между двумя праймерами. Зонд состоит из олигонуклеотидной последовательности с молекулой флуорофора на 5'-конце и молекулой гасителя на 3'-конце. В случаях, когда флуорофор находится в непосредственной близости от гасителя, флуоресценция сводится к минимуму. Однако в присутствии последовательности-мишени зонд может гибридизоваться с последовательностью-мишенью, а впоследствии расщепляться под действием экзонуклеазной активности Taq-полимеразы. После расщепления зонда в результате удлинения прямого праймера флуорофор зонда больше не гасится, и это приводит к увеличению флуоресценции как прямому результату

присутствия последовательности-мишени ДНК. Флуоресценцию отслеживают во время каждого цикла qPCR во время фазы удлинения в ходе термоциклирования и для каждой реакции определяют пороговые циклы. Пороговый цикл представляет собой цикл, при котором флуоресценция данной реакции значительно превышает фоновую флуоресценцию. Значения порогового цикла обратно пропорциональны количеству исходной ДНК в реакции. Значение порогового цикла каждого образца сравнивают со значениями на стандартной кривой, что позволяет осуществлять количественную оценку образцов с неизвестным количеством ДНК.

[41] Для применения в способах по настоящему изобретению подходит любой набор праймеров, функциональных в qPCR, который может быть легко определен специалистами в данной области техники. Иллюстративные праймеры для qPCR представляют собой праймеры, полученные из повторяющейся последовательности, специфической для клеток СНО, и, в связи с этим, специфически гибридизирующиеся с ней. Выступающая в качестве мишени специфическая последовательность клеток СНО представляет собой следующую область из 68 оснований: 5'-GAAATCGGGCTGCCTGAGTCCCGAGTGCGGGTGTGGTTTCAGAACCGCCGAAGTCGTTTCGGGGATGGT-3' (SEQ ID NO: 1). 5'-конец такой последовательности имеет ту же последовательность, что и прямой праймер, 3'-конец последовательности является комплементарным обратному праймеру, а меченный флуорофором зонд нацелен на область между данными последовательностями. Прямая, обратная последовательности и последовательность зонда имеют следующие структуры. Прямой праймер RepA: 5'-GAAATC GGG CTG CCT GAG T-3' (SEQ ID NO : 2); обратный праймер RepA: 5'-ACC ATC CCC GAA CGA CTT C-3' (SEQ ID NO : 3); и зонд RepA: 5'-CC GAG TGC GGG TGT GGT TT-3' (SEQ ID NO : 4). Зонд RepA содержит флуорофорную группу на 5'-конце и гасящую группу на 3'-конце.

[42] qPCR-анализы на примеси ДНК клетки-хозяина проводили в соответствии с общепринятыми процедурами. После экстрагирования ДНК из образцов вносили реагенты для qPCR, в том числе праймеры для qPCR, ДНК-полимеразу, такую как термостабильная полимераз (например, ДНК-полимераза Taq<sup>®</sup>), и соответствующие количества необходимых нуклеозидтрифосфатов, что известно из уровня техники. К некоторым образцам вносили контрольную добавку ДНК в форме ДНК, поддающейся амплификации методом qPCR. Количество добавки, вносимой в образцы с внесением добавки, составляло 100 мкг геномной ДНК СНО. Другие образцы оставались без внесения добавки. Разница в результатах между образцом с внесением добавки и образцом без внесения добавки позволяла рассчитать процент обнаружения добавки. Иными словами, процент обнаружения добавки определяется как [(результат с внесением добавки в пг - результат без внесения добавки в пг)/количество добавки в пг] x 100.

[43] Флуоресценцию можно измерить в отдельных лунках 96-луночного планшета. Поскольку данное измерение проводят до завершения реакции в конце 40 термоциклов, можно определить степень протекающей ПЦР в режиме реального времени. Результаты

ПЦР измеряют путем отслеживания увеличения флуоресценции в зависимости от номера цикла.

[44] qPCR можно проводить на таких приборах, как прибор для qPCR в режиме реального времени QuantStudio 7. Флуоресценцию можно отслеживать в зависимости от номера цикла с выявлением сигнала испускания флуоресценции, происходящего во время фазы удлинения в ходе амплификации. Нормализованный репортерный сигнал ( $R_n$ ) образуется в каждом цикле для каждого прогона образца на планшете. Значения порогового цикла для каждой лунки сравнивают со стандартной кривой (линейная регрессия порогового цикла по сравнению с  $\log$  (входной массы ДНК в каждой реакции)) для обеспечения возможности интерполирования неизвестных значений.

[45] Применение qPCR для анализа нуклеиновых кислот получило широкое распространение, и в результате теперь доступны наборы для облегчения таких анализов. В способах по настоящему изобретению можно применять любой известный протокол и любой набор, известный из уровня техники. Иллюстративным протоколом является протокол для способа qPCR TaqMan<sup>®</sup> для количественного определения остаточной ДНК клетки-хозяина, описанный в примере 1 и в Verardo et al., *Biotechnol. Prog.* 28:428-434 (2012), включенной в данный документ в соответствующей части посредством ссылки. Иллюстративным набором является набор для подготовки образцов остаточной ДНК PrepSEQ<sup>®</sup> (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Беверли, Массачусетс).

[46] Способы по настоящему изобретению, применимые при подтверждении присутствия и количества примесей ДНК клетки-хозяина в содержащих белок жидкостях, были разработаны для решения раскрываемой в данном документе проблемы относительно низких уровней полианионных ингибиторов в отношении ферментативных анализов нуклеиновых кислот, сохраняющихся в содержащих белок жидкостях в процессах очистки. В некоторых вариантах осуществления таких способов достигают исключительной чувствительности при сохранении способности давать безошибочные и точные результаты путем серийного разведения образца и сравнения результатов со стандартными кривыми. Образец, такой как образец из культуры клеток, последовательно разводят по любой схеме, известной из уровня техники, при условии, что остается известной степень разведения каждой аликвоты образца. Подходящей схемой разведения является постоянное двукратное разведение, при котором аликвоту образца разводят равным объемом подходящего раствора, такого как буферный раствор для ПЦР, для получения разведения 2:1. Аликвоту данного разведения затем саму разводят в соотношении 2:1, в результате чего получают серию разведений в диапазоне от 2:1 до  $2^n$ :1, где  $n$  представляет собой количество аликвот. Определение фактического количества аликвот разведенного образца находится в компетенции специалиста в данной области техники; обычно количество аликвот будет находиться в диапазоне от 4 до 10 аликвот. Способы по настоящему изобретению дополнительно включают введение или добавление контрольной матричной ДНК для отслеживания уровней амплификации в образцах и их разведениях. Контрольная матричная ДНК или контрольная добавка отличаются от



примеси ДНК клетки-хозяина, которая может присутствовать в образце или его разведении, и контрольная добавка будет иметь сайты связывания ПЦР-праймеров. Контрольную матричную ДНК или контрольные добавки можно вносить в исходную серию разведений образца, в отдельную часть каждой аликвоты исходной серии разведений или во вторую серию разведений образца, полученную вместе с исходной серией разведений.

[47] Применение серии разведений в способах по настоящему изобретению, разработанных для подтверждения присутствия примесей ДНК клетки-хозяина, может сначала показаться нелогичным или контрпродуктивным, поскольку при разведении образца разводят и любую примесь в таком образце, что, по-видимому, сделает труднее ее выявление и количественное определение. Тем не менее, огромная чувствительность ферментативных анализов нуклеиновых кислот, таких как ПЦР (например, qPCR), позволяет преодолеть такие разведения и выявить исчезающе малые количества примесей ДНК клетки-хозяина. Кроме того, есть еще одна причина для включения серий разведений в способы по настоящему изобретению. Серийное разведение образца также приводит к последовательному разведению любых ингибиторов ферментов, применяемых в таких чувствительных ферментативных анализах нуклеиновых кислот, таких как ДНК-полимеразы. Как отмечено в данном документе, способы, раскрываемые в данном документе, частично основаны на обнаружении относительно низких уровней полианионных ингибиторов ферментов, применяемых в анализах нуклеиновых кислот, которые для удобства называются полианионными ингибиторами ПЦР. При получении серии разведений образца также обязательно получают серии разведений любых полианионных ингибиторов ПЦР. Это дает возможность определить уровень разведения образца, при котором происходит снятие ингибирования и возобновление ферментативной амплификации вследствие опосредованной ДНК-полимеразой полимеризации. Поскольку в серии имеется конечное число разведений, результаты могут предоставлять диапазон концентрации полианионного ингибитора ПЦР, начиная от наименее разведенного образца, демонстрирующего обнаружение ПЦР-активности, или обнаружения добавки, до наиболее разведенного образца, который все еще проявляет ингибирование ПЦР-активности. Специалисты в данной области техники смогут сузить или расширить диапазон концентраций выявляемого и количественно определяемого ингибитора путем внесения или изъятия аликвот из серии разведений. Специалисту в данной области техники также понятно, что стандартная кривая полианионного ингибитора ПЦР позволяет преобразовывать относительные разведения в фактические концентрации на основе стандартной кривой, построенной для серийных разведений чистого полианионного ингибитора ПЦР, подвергнутых ферментативному анализу нуклеиновых кислот контрольной матричной ДНК (контрольных добавок) в присутствии необходимых реагентов (например, универсальный мастер-микс для ПЦР TaqMan<sup>®</sup>, Applied Biosystems), но без какого-либо образца или его разведения. Стандартная кривая позволяет определить абсолютную концентрацию полианионного ингибитора ПЦР для

наблюдаемого уровня амплификации нуклеиновой кислоты, которую затем можно перенести на результаты, наблюдаемые для серии разведений образца. Способы предусматривают построение стандартной кривой с применением любого известного полианионного ингибитора ПЦР, при этом поливинилсульфонат (полиэтиленсульфонат) является предпочтительным полианионным ингибитором ПЦР, подходящим для применения при построении стандартной кривой. В тех случаях, где применяют PVS, концентрации выражают в единицах эквивалентов PVS. Во многих случаях эквиваленты PVS представляют собой фактические концентрации PVS в образце или его разведениях, поскольку известно, что по сути своей полианионный ингибитор ПЦР представляет собой PVS.

[48] Образцы, подвергаемые способам по настоящему изобретению, представляют собой жидкости культуры клеток или жидкости, полученные из жидкости культуры клеток в процессах очистки белков, таких как биологические препараты и биоаналоги. Образец может иметь любой объем, подходящий для выявления примесей, и может быть получен из текущей культуры клеток, из непрерывного вытекающего потока из культуры клеток или из выгруженной партии культуры клеток. Образец может быть получен и обработан без промедления или может быть взят из резервуара для хранения или храниться при подходящей температуре, обычно 4°C.

[49] В дополнение к способам подтверждения того, содержат ли составы различной степени чистоты, которые содержат белки, продуцируемые в культуре клеток, примеси ДНК хозяина, настоящее изобретение предусматривает способы уменьшения количества или удаления примеси, частично основанные на обнаружении того факта, что частично очищенные белковые составы могут иметь уровни полианионных ингибиторов ПЦР, хотя часто и низкие уровни в высокоочищенных белковых составах, которые необходимо устранить для того, чтобы удовлетворить требования регуляторных органов, ответственных за обеспечение качества фармацевтических составов. Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к способам удаления полианионного ингибитора ПЦР, такого как PVS, из содержащего белок раствора. Узнав с помощью настоящего изобретения о существовании относительно низких уровней полианионных ингибиторов ПЦР в содержащих белок растворах, полученных из культур клеток и в процессах очистки таких белков, специалист в данной области техники сможет привести образец (или его разведение) в контакт с любой известной анионообменной средой для связывания полианионного ингибитора ПЦР, что приведет к его отделению и удалению из содержащего белок образца или его разведения. Для уменьшения усилий, требуемых при уменьшении количества или удалении, рН образцов или их разведений доводят так, чтобы он был на 2-4 единицы рН ниже рI белка-мишени в образце или очищаемом белке. В данном диапазоне рН представляющий интерес белок не будет иметь суммарного отрицательного заряда, а PVS будет характеризоваться своим полным отрицательным зарядом, в результате чего PVS, но не представляющий интерес белок, будет легко связываться с анионообменной смолой, известной из уровня техники.

[50] Очищаемый белок, такой как рекомбинантный белок или полипептид, может быть гомополимерным или гетерополимерным и может представлять научный или коммерческий интерес, в том числе терапевтические препараты на основе белка. Представляющие интерес биомолекулы (например, белки, такие как биологические препараты или биоаналоги) включают, помимо прочего, секретируемые белки, несекретируемые белки, внутриклеточные белки или мембраносвязанные белки. Представляющие интерес биомолекулы могут продуцироваться линиями рекомбинантных клеток животных с использованием методов культивирования клеток и могут обозначаться как "рекомбинантные белки". Экспрессируемый(экспрессируемые) белок(белки) может(могут) продуцироваться внутри клетки или секретироваться в культуральную среду, из которой его можно извлекать и/или собирать. Термин "выделенный белок" или "выделенный рекомбинантный белок" относится к представляющему интерес полипептиду или белку, который очищен от белков или полипептидов или других примесей, которые будут мешать его терапевтическому, диагностическому, профилактическому, исследовательскому или другому применению. Представляющие интерес биомолекулы включают белки, оказывающие терапевтическое воздействие путем связывания с мишенью, в частности с мишенью из перечисленных ниже, в том числе с мишенями, полученными из них, мишенями, родственными им, и их модификациями.

[51] Под "очисткой" подразумевают повышение степени чистоты белка в композиции путем удаления (частично или полностью) по меньшей мере одной связанной с продуктом примеси из композиции. Извлечение и очистку белков осуществляют в любом последующем процессе, в частности, при операции сбора, в результате чего получают более "однородную" белковую композицию, отвечающую целевым показателям выхода и качества продукта (таким как снижение количества примесей, связанных с продуктом, и повышение качества продукта).

[52] Используемый в данном документе термин "выделенный" означает, что вещество (i) не содержит по меньшей мере некоторых других белков или полинуклеотидов, с которыми оно обычно находилось бы, (ii) фактически не содержит других белков или полинуклеотидов из того же источника, например, полученных от того же вида, (iii) отделено от по меньшей мере приблизительно 50 процентов полипептидов, полинуклеотидов, липидов, углеводов или других материалов, с которым оно ассоциировано в природе, (iv) функционально связано (посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия) с полипептидом или полинуклеотидом, с которым оно не ассоциировано в природе, или (v) не встречается в природе.

[53] Представляющие интерес биомолекулы (например, белки) включают "антигенсвязывающие белки". "Антигенсвязывающий белок" относится к белкам или полипептидам, содержащим антигенсвязывающую область или антигенсвязывающую часть, которая характеризуется аффинностью к другой молекуле (антигену), с которой она связывается. Антигенсвязывающие белки охватывают антитела, пептитела, фрагменты

антител, производные антител, аналоги антител, слитые белки (в том числе одноцепочечные переменные фрагменты (scFv) и двухцепочечные (двухвалентные) scFv), мутеины, полиспецифические белки и биспецифические белки.

[54] ScFv представляет собой одноцепочечный фрагмент антитела, содержащий переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, связанные вместе. См. патенты США №№ 7741465 и 6319494, а также Eshhar et al., *Cancer Immunol Immunotherapy* (1997) 45: 131-136. ScFv сохраняет способность исходного антитела специфически взаимодействовать с антигеном-мишенью.

[55] Термин "антитело" включает обозначение как гликозилированных, так и негликозилированных иммуноглобулинов любого изотипа или подкласса или их антигенсвязывающей области, конкурирующей за специфическое связывание с интактным антителом. Если не указано иное, антитела включают человеческие, гуманизированные, химерные, мультиспецифические, моноклональные, поликлональные, гетеро-IgG, биспецифические и олигомеры антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Антитела включают типы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Также включены белки, имеющие антигенсвязывающий фрагмент или область, такие как Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, диатела, Fd, dAb, макситела, молекулы одноцепочечных антител, однодоменные V<sub>H</sub>H, фрагменты с определяющей комплементарность областью (CDR), scFv, диатела, триатела, тетратела и полипептиды, содержащие по меньшей мере часть иммуноглобулина, которой достаточно для придания специфической антиген-связывающей способности полипептиду-мишени.

[56] Также включены человеческие, гуманизированные и другие антигенсвязывающие белки, такие как человеческие и гуманизированные антитела, которые не вызывают значительных вредных иммунных ответов при введении человеку.

[57] Также включены модифицированные белки, такие как белки, модифицированные химически с помощью нековалентной связи, ковалентной связи или как ковалентной, так и нековалентной связи. Также включены белки, дополнительно содержащие одну или несколько посттрансляционных модификаций, которые могут выполняться клеточными системами внесения модификаций, или модификаций, вносимых *ex vivo* с помощью ферментативных и/или химических способов или вносимых другими путями.

[58] "Полиспецифический белок" и "полиспецифическое антитело" используются в данном документе для обозначения белков, которые сконструированы рекомбинантным путем для одновременного связывания и нейтрализации по меньшей мере двух различных антигенов или по меньшей мере двух различных эпитопов одного и того же антигена. Например, полиспецифические белки можно конструировать для нацеливания иммунных эффекторов в комбинации с нацеливанием цитотоксических средств на опухоли или возбудители инфекций. Полиспецифические белки включают триспецифические антитела, тетравалентные биспецифические антитела, полиспецифические белки без компонентов антител, такие как диа-, триа- или тетратела, минитела и одноцепочечные белки, способные к связыванию нескольких мишеней. Coloma, M.J., et al., *Nature Biotech.* 15

(1997) 159-163.

[59] Наиболее распространенной и наиболее разнообразной группой полиспецифических белков являются те белки, которые связывают два антигена, обозначенные в данном документе как "биспецифические", "биспецифические конструкции", "биспецифические белки" и "биспецифические антитела". Биспецифические белки могут быть сгруппированы в две обширные категории: молекулы, подобные иммуноглобулину G (IgG), и молекулы, отличные от молекул, подобных иммуноглобулину G (IgG). IgG-подобные молекулы сохраняют Fc-опосредованные эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC), комплементзависимая цитотоксичность (CDC) и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), Fc-область помогает улучшить растворимость и стабильность и упростить некоторые операции очистки. Молекулы, отличные от IgG-подобных молекул, меньше по размеру, что улучшает их проникновения в ткани (см. Sedykh et al., *Drug Design, Development and Therapy* 18(12), 195-208, 2018; Fan et al., *J Hematol & Oncology* 8:130-143, 2015; Spiess et al., *Mol Immunol* 67, 95-106, 2015; Williams et al., Chapter 41 Process Design for Bispecific Antibodies in Biopharmaceutical Processing Development, Design and Implementation of Manufacturing Processes, Jagschies et al., eds., 2018, pages 837-855). Биспецифические белки иногда применяют в качестве каркаса для дополнительных компонентов, характеризующихся специфичностью связывания с разными антигенами или большим числом эпитопов, что увеличивает специфичность связывания молекулы.

[60] Форматы для биспецифических белков, которые включают биспецифические антитела, постоянно развиваются и включают без ограничения одноцепочечные антитела, квадранты, структуры типа "выступ-во-впадину", CrossMab, IgG с двойным варибельным доменом (DVD-IgG), IgG-одноцепочечный Fv (scFv), scFv-CH3 КИИ, Fab двойного действия (DAF), структуру с обменом половинами молекул, κλ-тела, тандемный scFv, scFv-Fc, диатела, одноцепочечные диатела (sc-диатела), sc-диатела-CH3, триатело, миниантитело, минитело, минитело TriBi, тандемные диатела, sc-диатело-HAS, тандемную структуру scFv-токсин, перенацеливающие молекулы двойной аффинности (DART), нанотело, нанотело-HSA, структуру, полученную методом "стыковки и фиксации" (DNL), SEEDbody на основе сконструированных доменов с обменом нитями, Triomab, лейциновую застежку (LUZ-Y), XmAb<sup>®</sup>; структуру с обменом Fab-плечами, DutaMab, DT-IgG, структуру с заряженными парами, Fcab, ортогональный Fab, IgG(H)-scFv, scFV-(H)IgG, IgG(L)-scFV, IgG(L1H1)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V V(L)-IgG, КИИ IgG-scFab, 2scFV-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zyboby, DVI-Ig4 (четыре в одном), Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFV, F(ab')<sub>2</sub>-scFv<sub>2</sub>, scFv-КИИ, Fab-scFv-Fc, тетравалентное HCAb, sc-диатело-Fc, диатело-Fc, интратело, ImmTAC, HSABody, IgG-IgG, Cov-X-Body, scFv1-PEG-scFv<sub>2</sub>, биспецифические активаторы, привлекающие Т-клетки (BiTE<sup>®</sup>), и биспецифические активаторы, привлекающие Т-клетки, с продленным периодом полужизни (HLE BiTE<sup>®</sup>), гетерологичные BiTE<sup>®</sup> (Fan выше; Spiess выше; Sedykh выше;

Seimetz et al., *Cancer Treat Rev* 36(6) 458-67, 2010; Shulka and Norman, Chapter 26 *Downstream Processing of Fc Fusion Proteins, Bispecific Antibodies, and Antibody-Drug Conjugates*, в *Process Scale Purification of Antibodies Second Edition*, Uwe Gottschalk editor, p559-594, John Wiley & Sons, 2017; Moore et al., *MAbs* 3:6, 546-557, 2011). Представляющие интерес биомолекулы (например, белки) также могут включать рекомбинантные слитые белки, содержащие, например, домен мультимеризации, такой как лейциновая застежка, суперспираль, Fc-часть иммуноглобулина и т. п. Также включены белки, содержащие все или часть аминокислотных последовательностей антигенов дифференцировки (называемых белками CD) или их лигандов, или белки, практически аналогичные одному из них.

[61] Представляющие интерес биомолекулы (например, белки, такие как биологические продукты или биоаналоги) могут также включать рецепторы, полученные методами генной инженерии, такие как химерные антигенные рецепторы (CAR или CAR-T) и Т-клеточные рецепторы (TCR), а также другие белки, содержащие антигенсвязывающую молекулу, которая взаимодействует с таким антигеном-мишенью. CAR можно сконструировать так, чтобы они связывались с антигеном (таким как антиген клеточной поверхности), путем встраивания антигенсвязывающей молекулы, которая взаимодействует с таким антигеном-мишенью. Как правило, CAR включают антигенсвязывающий домен (такой как scFv) вместе с одним или несколькими костимулирующими ("сигнальными") доменами и одним или несколькими активирующими доменами.

[62] В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес биомолекулы могут включать колониестимулирующие факторы, такие как колониестимулирующий фактор гранулоцитов (G-CSF). Такие средства на основе G-CSF включают без ограничения Neupogen® (филграстим) и Neulasta® (пэгфилграстим). Также включены средства, стимулирующие эритропоэз (ESA), такие как Erogen® (эпоэтин альфа), Aranesp® (дарбэпоэтин альфа), Дунеро® (эпоэтин дельта), Mircera® (метоксиполиэтиленгликоль-эпоэтин бета), Hematide®, MRK-2578, INS-22, Retacrit® (эпоэтин дзета), Neorecormon® (эпоэтин бета), Silapo® (эпоэтин дзета), Binocrit® (эпоэтин альфа), эпоэтин альфа Нехал, Abseamed® (эпоэтин альфа), Ratioepo® (эпоэтин тета), Eporatio® (эпоэтин тета), Biopoin® (эпоэтин тета), эпоэтин альфа, эпоэтин бета, эпоэтин дзета, эпоэтин тета и эпоэтин дельта, эпоэтин омега, эпоэтин йота, тканевой активатор плазминогена, агонисты рецептора GLP-1, а также молекулы на их основе или их варианты или аналоги и биосимиляры любого из вышеперечисленного.

[63] В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес биомолекулы могут включать белки, которые специфически связываются с одним или несколькими белками CD, белками семейства рецепторов HER, молекулами клеточной адгезии, факторами роста, факторами роста нервов, факторами роста фибробластов, трансформирующими факторами роста (TGF), инсулиноподобными факторами роста, остеиндуцирующими факторами, инсулином и связанными с инсулином белками,

коагулирующими и относящимися к коагуляции белками, колониестимулирующими факторами (CSF), другими белками крови и сыворотки, антигенами групп крови; рецепторами, рецептор-ассоциированными белками, гормонами роста, рецепторами гормона роста, рецепторами Т-клеток; нейротрофическими факторами, нейротрофинами, релаксинами, интерферонами, интерлейкинами, вирусными антигенами, липопротеинами, интегринами, ревматоидными факторами, иммунотоксинами, поверхностными мембранными белками, транспортными белками, хоминг-рецепторами, адрессинами, регуляторными белками и иммуноадгезинами.

[64] В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес биомолекулы связываются с одним или несколькими из следующего, по отдельности или в любой комбинации: белками CD, в том числе, но без ограничения, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD40, CD70, CD123, CD133, CD138, CD171 и CD174, белками семейства рецепторов HER, в том числе, например, HER2, HER3, HER4 и рецептором EGF, EGFRvIII, молекулами клеточной адгезии, например, LFA-1, Mol, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM и интегрином альфа-v/бета 3, факторами роста, в том числе без ограничения, например, фактором роста эндотелия сосудов (“VEGF”); VEGFR2, гормоном роста, тиреостимулирующим гормоном, фолликулостимулирующим гормоном, лютеинизирующим гормоном, рилизинг-фактором гормона роста, паратиреоидным гормоном, мюллеровым ингибирующим фактором, воспалительным белком макрофагов человека (MIP-1-альфа), эритропоэтином (EPO), фактором роста нервов, таким как NGF-бета, фактором роста тромбоцитов (PDGF), фактором роста фибробластов, в том числе, например, aFGF и bFGF, эпидермальным фактором роста (EGF), Cripto, трансформирующими факторами роста (TGF), в том числе, помимо прочего, TGF- $\alpha$  и TGF- $\beta$ , в том числе TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4 или TGF- $\beta$ 5, инсулиноподобными факторами роста-I и -II (IGF-I и IGF-II), дез(1-3)-IGF-I (IGF-I головного мозга) и остеоиндуктивными факторами, инсулинами и родственными инсулину белками, в том числе ограничения инсулином, А-цепью инсулина, В-цепью инсулина, проинсулином и белками, связывающими инсулиноподобные факторы роста; белками коагуляции и связанными с коагуляцией белками, такими как, среди прочего, фактор VIII, тканевой фактор, фактор фон Виллебранда, белок С, альфа-1-антитрипсин, активаторы плазминогена, такие как урокиназа и тканевый активатор плазминогена (“t-PA”), бомбазин, тромбин, тромбопоэтин и рецептор тромбопоэтина, колониестимулирующими факторами (CSF), в том числе следующими, среди прочего, M-CSF, GM-CSF и G-CSF, другими белками крови и сыворотки крови, в том числе без ограничения альбумином, IgE и антигенами групп крови, рецепторами и ассоциированными с рецептором белками, в том числе, например, рецептором flk2/flt3, рецептором ожирения (OB), рецепторами гормона роста и Т-клеточными рецепторами; нейротрофическими факторами, в том числе без ограничения нейротрофическим фактором костной ткани (BDNF) и нейротрофином-3, -4, -5 или -6 (NT-3, NT-4, NT-5 или NT-6); А-цепью релаксина, В-цепью релаксина и прорелаксином, интерферонами, в том

числе, например, интерфероном-альфа, -бета и -гамма, интерлейкинами (IL), например, IL-1-IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-23, IL-12/IL-23, IL-2Ra, IL1-R1, рецептором IL-6, рецептором IL-4 и/или рецепторами IL-13, IL-13RA2 или рецептором IL-17, IL-1RAP, IL1- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , вирусными антигенами, в том числе без ограничения антигеном оболочки вируса СПИДа, липопротеинами, кальцитонином, глюкокагоном, предсердным натрийуретическим фактором, легочным сурфактантом, факторами некроза опухоли альфа и бета, энкефалиназой, ВСМА, каппа-цепью Ig, ROR-1, ERBB2, мезотелином, RANTES (белком, регулируемым при активации, экспрессируемым и секретируемым нормальными Т-клетками), мышинным гонадотропин-ассоциированным пептидом, ДНКазой, FR-альфа, ингибином и активином, интегрином, белком А или D, ревматоидными факторами, иммунотоксинами, костным морфогенетическим белком (BMP), супероксиддисмутазой, поверхностными мембранными белками, фактором ускорения распада (DAF), оболочкой вируса СПИДа, транспортными белками, хоминг-рецепторами, MIC (MIC-a, MIC-B), ULBP 1-6, EPCAM, PSA, адресинами, регуляторными белками, иммуноадгезинами, антигенсвязывающими белками, соматропином, CTGF, CTLA4, эотаксином-1, MUC1, СЕА, с-МЕТ, клаудином-18, GPC-3, ЕРНА2, FPA, LMP1, MG7, NY-ESO-1, PSCA, ганглиозидом GD2, гланглиозидом GM2, BAFF, OPGL (RANKL), миостатином, Dickkopf-1 (DKK-1), Ang2, NGF, рецептором IGF-1, фактором роста гепатоцитов (HGF), TRAIL-R2, с-Kit, B7RP-1, PSMA, Р-кадгерин, NKG2D-1, белком 1 запрограммированной гибели клеток и лигандом, PD1 и PDL1, маннозным рецептором/hCG $\beta$ , вирусом гепатита С, конъюгатом мезотелина dsFv[PE38, **Legionella pneumophila (ly)**], gpA33, B7H3, IFN-гамма, интерферон-гамма-индуцированным белком 10 (IP10), IFNAR, TALL-1, тимусным стромальным лимфопоэтином (TSLP), пропротеинконвертазой субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9), факторами стволовых клеток, Flt-3, пептидом, связанным с геном кальцитонина (CGRP), OX40L,  $\alpha$ 4 $\beta$ 7, белком, специфичным для тромбоцитов (гликопротеином тромбоцитов Iib/IIIb (PAC-1)), трансформирующим фактором роста бета (TFG $\beta$ ), белком 3 блестящей оболочки, связывающим сперматозоиды (ZP-3), TWEAK, рецептором тромбоцитарного фактора роста альфа (PDGFR $\alpha$ ), склеростином и биологически активными фрагментами или вариантами любого из вышеперечисленного.

[65] В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес биомолекулы включают абциксимаб, адалимумаб, адекатумумаб, афлиберцепт, алемтузумаб, алирокумаб, анакинру, атацицепт, базиликсимаб, белимумаб, бевацизумаб, биосозумаб, брентуксимаб ведотин, бродалумаб, кантузумаб мертанзин, канакинумаб, цетуксимаб, цертолизумаб пегол, конатумумаб, даклизумаб, деносумаб, экулизумаб, эдреколомаб, эфализумаб, эпратузумаб, этанерцепт, эволокумаб, галиксимаб, ганитумаб, гемтузумаб, голимумаб, ибритумомаб тиуксетан, инфликсимаб, ипилимумаб, лерделимумаб, люмиликсимаб, иксекизумаб, мапатумумаб, мотесаниб дифосфат, муромонаб-CD3, натализумаб, несиритид, нимотузумаб, ниволумаб, окрелизумаб, офатумумаб, омализумаб, опрелвекин, паливизумаб, панитумумаб, пембролизумаб, пертузумаб, пекселизумаб, ранибизумаб, рилотумумаб, ритуксимаб, ромиплостим, ромосозумаб,



саргамостим, тоцилизумаб, тозитумомаб, трастузумаб, устекинумаб, ведолизумаб, визилизумаб, волоциксімаб, занолімумаб, залутумумаб и биосимиляры любого из вышеперечисленного.

[66] В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес биомолекулы могут включать блинатумомаб, катумаксомаб, эртумаксомаб, солитомаб, targomiR, лутикизумаб (ABT981), вануцизумаб (RG7221), ремтолумаб (ABT122), озораликсумаб (ATN103), флотеузумаб (MGD006), пасотуксизумаб (AMG112, MT112), лимфомун (FBTA05), (ATN-103), AMG211 (MT111, Medi-1565), AMG330, AMG420 (B1836909), AMG-110 (MT110), MDX-447, TF2, rM28, HER2Bi-aATC, GD2Bi-aATC, MGD006, MGD007, MGD009, MGD010, MGD011 (JNJ64052781), IMCgp100, меченный индием IMP-205, xm734, LY3164530, OMP-305BB3, REGN1979, COV322, ABT112, ABT165, RG-6013 (ACE910), RG7597 (MEDH7945A), RG7802, RG7813 (RO6895882), RG7386, BITS7201A (RG7990), RG7716, BFKF8488A (RG7992), MCLA-128, MM-111, MM141, MOR209/ES414, MSB0010841, ALX-0061, ALX0761, ALX0141; ВП034020, AFM13, AFM11, SAR156597, FBTA05, PF06671008, GSK2434735, MEDI3902, MEDI0700, MEDI7352, а также молекулы или их варианты или аналоги и биоаналоги любого из вышеперечисленных.

[67] Представляющие интерес биомолекулы в соответствии с настоящим изобретением включают все из вышеперечисленных и дополнительно включают антитела, содержащие 1, 2, 3, 4, 5 или 6 определяющих комплементарность областей (CDR) из любого из вышеупомянутых антител. Также включены варианты, содержащие область, которая на 70% или больше, конкретно на 80% или больше, более конкретно на 90% или больше, еще более конкретно на 95% или больше, конкретно на 97% или больше, более конкретно на 98% или больше, еще более конкретно на 99% или больше идентична по аминокислотной последовательности эталонной аминокислотной последовательности представляющей интерес биомолекулы в форме белка. Для этой цели степень идентичности можно определять с использованием разнообразного хорошо известного и общедоступного программного обеспечения для анализа аминокислотных последовательностей. Предпочтительное программное обеспечение включает программное обеспечение, в котором реализованы алгоритмы Смита-Уотермана, которые считаются удовлетворительным решением проблемы поиска и выравнивания последовательностей. Можно также использовать другие алгоритмы, в частности, если важным критерием является скорость. Обычно используемые программы для выравнивания и определения гомологичного соответствия ДНК, РНК и полипептидов, которые можно использовать в этой связи, включают FASTA, TFASTA, BLASTN, BLASTP, BLASTX, TBLASTN, PROSRCH, BLAZE и MPSRCH, причем последняя является реализацией алгоритма Смита-Уотермана для исполнения на массово-параллельных процессорах, изготавливаемых MasPar.

[68] Химерные антигенные рецепторы включают один или несколько костимулирующих (сигнальных) доменов для повышения их активности. См. патенты США №№ 7741465 и 6319494, а также Krause et al. и Finney et al. (выше), Song et al., Blood

119:696-706 (2012); Kalos et al., *Sci Transl. Med.* 3:95 (2011); Porter et al., *N. Engl. J. Med.* 365:725-33 (2011) и Gross et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56:59-83 (2016). Подходящие костимулирующие домены могут быть получены, помимо других источников, из CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (альфа, бета, дельта, эpsilon, гамма, дзета), CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD 33, CD37, CD40, CD 45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, PD-1, ICOS, функционально-ассоциированного антигена-1 лимфоцитов (LFA-1 (CD11a/CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (член суперсемейства факторов некроза опухолей 14; TNFSF14), NKG2C, Ig-альфа (CD79a), DAP-10, Fc-гамма-рецептора, молекулы МНС класса I, TNF, TNFr, интегрин, сигнальной молекулы активации лимфоцитов, BTLA, рецептора лиганда Toll, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL-2R-бета, IL-2R-гамма, IL-7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, 41-BB, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда CD83 или их фрагментов или комбинаций. Костимулирующий домен может содержать одну или несколько из внеклеточной части, трансмембранной части и внутриклеточной части.

[69] По причине полимерной природы анионных примесей, таких как PVS, данные соединения можно удалить посредством флокуляции с применением заряженных частиц, заряженных наночастиц, катионных полимеров, катионных полимеров смешанного действия, смарт-полимеров и т. п. PVS можно осаждать, а затем удалять посредством отстаивания или фильтрования с применением флокулянтов. Например, буфер MES, содержащий PVS, можно подвергнуть воздействию mPAA Clarisolve® (катионного смарт-полимера), который впоследствии можно удалить посредством добавления стимулятора для осаждения полимера.

[70] В представленных далее примерах раскрыты функциональные варианты осуществления способа выявления и удаления полимерных анионных примесей, таких как поливинилсульфонат (PVS), из растворов белка и буферных растворов. В некоторых случаях для достижения надлежащего качества целесообразным и достаточным является уменьшение количества, но не полное удаление PVS. В некоторых случаях такие способы используют для выявления и удаления анионных флокулянтов и остаточных анионных флокулянтов. Удаление PVS можно осуществить с помощью анионообменных сред, таких как хроматографические смолы, ионообменные смолы, глубинные фильтры, синтетические глубинные фильтры, заряженные фильтры, мембранные хроматографические устройства, смолы смешанного действия и их комбинации.

Примеры

### Пример 1

#### Количественная оценка поливинилсульфоната

[71] Концентрации поливинилсульфоната измеряли с помощью qPCR-анализа для количественной оценки ДНК и серии разведений для отслеживания обнаружения добавки ДНК. qPCR-анализ ДНК описан в следующих абзацах.

[72] Был описан метод qPCR TaqMan™ для количественной оценки остаточной ДНК клетки-хозяина (Verardo et al., *Biotechnol. Prog.* 28:428-434 (2012)), который включен в данный документ в соответствующей части. Вкратце: все тестируемые образцы разводили, при необходимости, до требуемой концентрации белка или требуемого объема, как указано, в безнуклеазной воде и подвергали расщеплению протеиназой К (Promega) при 60°C в течение 2-24 часов. ДНК экстрагировали из образцов с помощью стандартных протоколов осаждения хаотропной солью (йодидом натрия) и спиртом. Осадки экстрагированной ДНК ресуспендировали в безнуклеазной воде и весь объем извлеченной ДНК измеряли с помощью qPCR-анализа общей ДНК с применением программного обеспечения ABI QuantStudio 7 (версии 4.1) с использованием SDS. Конструировали праймеры для амплификации специфической для клеток CHO повторяющейся последовательности ДНК, а также конструировали специфический зонд для гибридизации между ними. Последовательность прямого праймера: 5' GAA ATC GGG CTG CCT GAG T 3' (SEQ ID NO: 2); последовательность обратного праймера: 5' ACC ATC CCC GAA CGA CTT C 3' (SEQ ID NO: 3); последовательность зонда TaqMan®: 5' <FAM>CC GAG TGC GGG TGT GGT TT<TAM> 3' (SEQ ID NO: 4). Зонд помечен флуоресцентным репортерным красителем FAM (6-карбоксихлоресцеином) на его 5'-конце и гасящим красителем TAMRA (6-карбокситетраметилродамином; TAM) на его 3'-конце. Использовали стандартные условия реакции циклизации (50°C в течение 2 минут, 95°C в течение 10 минут с последующими 40 циклами при 95°C в течение 15 секунд и 60°C в течение 1 минуты). Реакции проводили в 96-луночных планшетах с реакционным объемом 50 мкл с применением универсального мастер-микса для ПЦР Taqman® (Applied Biosystems). Анализ проводили с применением автоматических исходных настроек с относительными пороговыми значениями, установленными так, чтобы они попадали в экспоненциальный диапазон графиков амплификации для каждого гена-мишени. Для установления корреляции уровня флуоресценции на стандартной кривой с концентрациями ДНК в исходном образце используют стандартную кривую известных количеств геномной ДНК, выделенных из клеток-хозяев CHO. Измеренные количества ДНК переводили в единицы пг ДНК/мг образца или иным указанным образом. Все количества измеряли с отбором образцов в двух или трех повторностях и рассчитывали средние значения.

[73] Образцы анализировали на наличие PVS путем отслеживания ингибирования в qPCR-анализе в серии разведений образцов и стандартов PVS (см. фигуру 1). 100 пг добавки ДНК использовали в качестве положительного контроля ДНК с приемлемым обнаружением добавки от 50% до 150%. Отрицательные контроли, состоящие из дважды

деионизированной воды, демонстрировали 100% обнаружение. Обнаружение добавки ДНК оценивали по стандартам PVS для определения “минимальной ингибирующей концентрации” и “максимальной неингибирующей концентрации” (см. фигуру 2). Минимальная ингибирующая концентрация является наиболее низкой концентрацией образца или PVS, которая оказывает влияние на результаты анализа ДНК (т. е. неудачное обнаружение добавки). Данное значение фактически дает “наихудшую” концентрацию ингибитора для заданного образца. Максимальная неингибирующая концентрация является наиболее высокой концентрацией при удовлетворительном обнаружении добавки ДНК, фактически обеспечивающая наиболее низкое поддающееся измерению количество PVS. Для простоты в последующем анализе использовали среднюю концентрацию PVS в диапазоне от минимальной ингибирующей до максимальной неингибирующей концентрации. В некоторых оценках могло быть важно использовать наихудшую концентрацию. Допустимые технологические диапазоны можно корректировать для всего диапазона измеряемых концентраций, как показано в примере 2.

#### Пример 2

Удаление поливинилсульфоната из буферного раствора с применением анионообменной мембраны

[74] 100 мМ буфер MES с pH 6 получали с применением 21,51 г/л гидрата MES с последующим титрованием посредством 1 М гидроксида натрия. Анионообменную мембрану (заряженный нейлоновый фильтр с размером пор 0,2 мкм, с фронтальной площадью 2,8 см<sup>2</sup>, фильтр Posidyne®) промывали посредством 10 мл деионизированной (DI) воды. Затем 100 мМ раствор MES пропускали через AEX-мембрану (10 мл) и после этого собирали. Пул проскока через анионообменник (AEX) и загрузочный материал буфера MES (до AEX) забирали для количественной оценки PVS посредством ингибирования серии разведений для анализа ДНК. Как и ожидалось, в загрузочном материале не было обнаружения добавки ДНК (0%) вследствие присутствия PVS. Результаты показаны в таблице 1. Объемный переход для обнаружения добавки ДНК был идентичен для всех трех повторностей. Поэтому идентичным является и удаление PVS, рассчитанное для данных повторностей. В партиях MES, использованных для изучения характеристик данных AEX-сред, наблюдали 100-кратную вариативность уровней PVS. Эффективный уровень загрузки мембраны зависит от поступающей концентрации PVS (т. е. добавляемой пробы PVS на мембране). “Диапазон загрузки для удаления PVS” рассчитывают с помощью наихудшего уровня (максимального наблюдаемого уровня PVS в MES) для установки нижней загрузки и наилучшего уровня (наиболее низкого наблюдаемого уровня PVS в MES) для установки верхней загрузки для буферных растворов на основе 100 мМ MES. Возможный диапазон загрузки очень велик, что свидетельствует о том, что размер заряженной нейлоновой мембраны зависит от уровня поступающей примеси PVS.

**Таблица 1.** Удаление PVS с помощью анионообменной мембраны

Тестовый цикл	Буфер	Обнаружение добавки ДНК	Удаление среднего количества PVS	Верхний предел удаления PVS	Нижний предел удаления PVS	Диапазон загрузки для удаления PVS
Цикл 1	100 мМ MES, pH 6,0	95%	0,53 г/М <sup>2</sup>	0,80 г/М <sup>2</sup>	0,26 г/М <sup>2</sup>	10-10000 Л/М <sup>2</sup>
Цикл 2	100 мМ MES, pH 6,0	127%	0,53 г/М <sup>2</sup>	0,80 г/М <sup>2</sup>	0,26 г/М <sup>2</sup>	10-10000 Л/М <sup>2</sup>
Цикл 3	100 мМ MES, pH 6,0	130%	0,53 г/М <sup>2</sup>	0,80 г/М <sup>2</sup>	0,26 г/М <sup>2</sup>	10-10000 Л/М <sup>2</sup>

[75] Площадь поверхности пористых сред, таких как мембраны, примерно пропорциональна размеру пор. В таблице 2 оценен предпочтительный диапазон загрузки для фильтра Posidyne с меньшим размером пор 0,1 мкм с использованием допущения, что его площадь поверхности и связывающая способность в два раза больше, чем у фильтра Posidyne с размером пор 0,2 мкм. Ожидается, что данные уровни загрузки обеспечат надежное удаление PVS во время стандартных операций по получению буфера.

**Таблица 2.** Предпочтительные уровни загрузки фильтра Posidyne для удаления PVS

Фильтр	Загрузка 100 мМ буфера MES
0,2 мкм фильтр Posidyne	30-400 л/м <sup>2</sup>
0,1 мкм фильтр Posidyne	60-800 л/м <sup>2</sup>

### Пример 3

Удаление поливинилсульфоната из буферного раствора с применением синтетического глубинного фильтра

[76] 100 мМ буфер MES с pH 6 получали с применением 21,51 г/л гидрата MES с последующим титрованием посредством 1 М гидроксида натрия (обозначены как цикл № 1 и № 2). Второй образец MES получали идентичным образом, но с добавлением 2,04 г/л хлорида натрия (с целевой концентрацией 35 мМ NaCl, цикл № 3 и № 4). Синтетический анионообменный глубинный фильтр (Hybrid Purifier® с фронтальной площадью 2,5 см<sup>2</sup>) промывали посредством 90 мл DI воды. Затем 100 мМ растворы MES пропускали через синтетический глубинный АЕХ-фильтр (1800 мл) и после этого собирали. Пул проскока через АЕХ и загрузочный материал буфера MES (до синтетического глубинного АЕХ-фильтра) забирали для количественной оценки PVS посредством ингибирования серии разведений для анализа ДНК. Как и ожидалось, в загрузочном материале не было обнаружения добавки ДНК (0%) вследствие присутствия PVS. Результаты представлены на фигурах 3 и 4, а также в таблице 3. Обнаружение добавки ДНК было идентичным для обеих повторностей для обоих условий, а также на ингибирующих уровнях не наблюдали преодоления влияния PVS. “Диапазон загрузки для удаления PVS” рассчитывают с помощью наихудшего уровня (максимального наблюдаемого уровня PVS в MES) для установки нижней загрузки и наилучшего уровня (наиболее низкого наблюдаемого уровня PVS в MES) для установки верхнего уровня загрузки для буферных растворов на основе

100 mM MES.

**Таблица 3.** Результаты удаления PVS с использованием синтетического глубинного фильтра

Тестовый цикл	Буфер	Обнаружение добавки ДНК	Удаление PVS	Диапазон загрузки для удаления PVS
Цикл 1	100 mM MES, pH 6,0	122%	$\geq 5-16 \text{ г/М}^2$	$\geq 200-25000 \text{ Л/М}^2$
Цикл 2	100 mM MES, pH 6,0	118%	$\geq 5-16 \text{ г/М}^2$	$\geq 200-25000 \text{ Л/М}^2$
Цикл 3	100 mM MES, pH 6,0 35 mM NaCl	118%	$\geq 5-16 \text{ г/М}^2$	$\geq 200-25000 \text{ Л/М}^2$
Цикл 4	100 mM MES, pH 6,0 35 mM NaCl	116%	$\geq 5-16 \text{ г/М}^2$	$\geq 200-25000 \text{ Л/М}^2$
Цикл 5	100 mM MES, pH 6,0	140%	$\geq 16-49 \text{ г/М}^2$	$\geq 600-25000 \text{ Л/М}^2$

\*Расчитанный верхний граничный предел в некоторых случаях был  $> 600000 \text{ Л/М}^2$  для буферов MES с низкими концентрациями PVS. Максимальное значение  $25000 \text{ Л/М}^2$  зарегистрировано как практический предел для производительности в отношении фильтрования с учетом времени процесса и других соображений.

#### Пример 4

Удаление поливинилсульфоната из буферного раствора с применением глубинного фильтра

[77] 100 mM буфер MES с pH 6 получали с применением 21,51 г/л гидрата MES с последующим титрованием посредством 1 M гидроксида натрия. Глубинный фильтр с положительным зарядом (фильтр предварительной очистки Viresolve (VPF) с фронтальной площадью  $5 \text{ см}^2$ ) промывали с помощью 10 мл DI воды. Затем 100 mM раствор MES пропускали через глубинный фильтр (10 мл) и после этого собирали. Как и ожидалось, в загрузочном материале не было обнаружения добавки ДНК (0%) вследствие присутствия PVS. Пул после глубинного фильтра и загрузочный материал буфера MES забирали для количественной оценки PVS посредством ингибирования серии разведений для анализа ДНК. Результаты показаны в таблице 4.

**Таблица 4.** Предпочтительные уровни загрузки глубинного фильтра для удаления PVS

Фильтр	Загрузка 100 mM буфера MES
Фильтр предварительной очистки Viresolve (VPF)	15-200 л/м <sup>2</sup>

#### Пример 5

Удаление поливинилсульфоната из буферного раствора с применением анионообменной хроматографической среды

[78] 100 mM буфер MES с pH 6 получали с применением 21,51 г/л гидрата MES с последующим титрованием посредством 1 M гидроксида натрия. Анионообменную (АЕХ) смолу с положительным зарядом (Q-Capto™ ImpRes, 10-мл предварительно заполненную колонку) промывали посредством 30 мл DI воды. Затем 100 mM раствор MES пропускали через колонку (5370 мл) и после этого собирали. Пул после АЕХ, фракции и загрузочный

материал буфера MES забирали для количественной оценки PVS посредством ингибирования серии разведений для анализа ДНК. Результаты показаны на фигуре 5 и в таблице 5. Как и ожидалось, в загрузочном материале не было обнаружения добавки ДНК (0%) вследствие присутствия PVS. Во втором эксперименте для определения максимальной связывающей способности PVS ту же AEX смолу (Q-Capto™ ImpRes, 5-мл колонку Hi-Screen Column) промывали посредством 14 мл DI воды. Затем через колонку пропускали 100 мМ раствор MES (500 мл), колонку промывали посредством 20 мл DI воды, а затем связанное содержимое элюировали посредством 3 М хлорида натрия и после этого собирали. PVS количественно оценивали посредством серии разведений, а результаты представлены в таблице 5.

**Таблица 5.** Предпочтительная загрузка для удаления PVS и максимальная связывающая способность в отношении PVS для AEX смолы

Заряженная смола	Загрузка 100 мМ буфера MES	Максимальная связывающая способность
Q-ImpRes	≥ 500 л буфера/л смолы	20-13000 мкг/мл смолы

#### Пример 6

Удаление поливинилсульфоната из содержащего белок раствора с применением анионообменной среды

[79] Тестировали несколько анионообменных (AEX) сред на проточное удаление PVS из раствора, содержащего слитый белок (представляющий интерес белок) с изоэлектрической точкой 8,8. Все среды промывали посредством DI воды, а затем уравнивали до тестируемого pH с помощью 10 мл следующих буферов: 100 мМ ацетата, pH 4,2, 25 мМ Трис, pH 7,4, и 25 мМ Трис, pH 8,0. Содержащий белок раствор (приблизительно 1 мг/мл представляющего интерес белка) кондиционировали с концентрированной формой целевых буферов до достижения целевых значений pH и концентраций буфера, представленных в таблице 6. Кондиционированный раствор белка затем загружали в среду с концентрацией 30 мг белка/мл в проточном режиме. Собирали пул проскока и подвергали его тестированию посредством анализа ДНК. Как и ожидалось, в загрузочном материале не было обнаружения добавки ДНК (0%) вследствие присутствия PVS. При pH 4,2 не наблюдали значительного уровня удаления PVS, что приводило к невозможности обнаружения добавки ДНК. Без желания привязываться к теории, это, вероятно, связано с более сильным связыванием между представляющим интерес белком и полимерным ингибитором вследствие высокого суммарного положительного заряда на белке (pH намного меньше, чем pI белка). PVS в комплексе с представляющим интерес белком значительно уменьшал удаление в проточном режиме. Значительный уровень удаления PVS наблюдали при pH 7,4 и pH 8,0. Опять же, без желания привязываться к теории, данные результаты, вероятно, связаны со снижением общего положительного заряда представляющего интерес белка. Это эффективно улучшает возможность PVS связываться с анионообменной средой (т. е. менее интенсивно образовывать комплекс с представляющим интерес белком). Данная способность в данном

эксперименте была схожей в случае заряженной мембраны (фильтра Posidyne), чистой AEX среды (Q-Sepharose Fast Flow) и смолы смешанного действия с AEX функциональными группами (Capto™ Adhere). Данная способность PVS была схожей во всех исследованных случаях при концентрации примерно 1,5 мкг/мл среды. Эти данные демонстрируют, что анионообменные среды или содержащие анионообменник среды отделяют PVS от раствора белка, когда pH находится в пределах 1-2 единиц pH от изоэлектрической точки белка.

**Таблица 6.** Условия и результаты для удаления PVS из содержащего белок раствора.

Содержащий белок раствор	Буфер	pH	Анионообменная среда	Загрузка раствора белка (мг/мл)	Способность PVS (мкг/мл среды)	Обнаружение добавки в анализе ДНК
Слитый белок	100 мМ ацетата	4,2	0,2 мкм фильтр Posidyne	30	Не определена	Неудовлетворительное
			Q-Sepharose Fast Flow	30		Неудовлетворительное
			Capto Adhere	30		Неудовлетворительное
	25 мМ Трис	7,4	0,2 мкм фильтр Posidyne	30	~ 1,5	Удовлетворительное
			Q-Sepharose Fast Flow	30	~ 1,5	Удовлетворительное
			Capto Adhere	30	~ 1,5	Удовлетворительное
	25 мМ Трис	8,0	0,2 мкм фильтр Posidyne	30	~ 1,5	Удовлетворительное
			Q-Sepharose Fast Flow	30	~ 1,5	Удовлетворительное
			Capto Adhere	30	~ 1,5	Удовлетворительное

~: приблизительно

#### Пример 7

Определение связывающей способности поливинилсульфоната с применением мультимодальной хроматографической среды

[80] В данном эксперименте для установления связывающей PVS способности тестировали добавление PVS на уровнях, намного превышающих ожидаемые в типичной последующей платформе очистки. Тестировали типичные технологические условия 100 мМ буфера MES при pH 6 и 100 мМ буфера MES с 200 мМ хлорида натрия при pH 6. Кроме того, определяли способность PVS при более высоких концентрациях хлорида натрия (400 мМ NaCl) представлять наихудшее буферное условие.

[81] Способность связывать PVS у смолы (Cytiva) Capto™ Adhere для хроматографии в смешанном режиме (MMC) определяли в лабораторных условиях. В колонку 0,66 см x 20 см (15,7 мл смолы) добавляли пробы трех растворов, в которые был добавлен 30% стандарт PVS до достижения концентрации PVS 1,5 мг/мл (таблица 7). Колонку тестировали в соответствии с процедурой, показанной на фигуре 7. Буфер MES получали так, как описано выше, до достижения целевой концентрации буфера и целевого pH. После промывания колонки деионизированной (DI) водой в колонку загружали буфер с добавкой PVS со скоростью 250 см/ч. Фракции собирали каждые 2 объема колонки (CV) в течение 60 CV. Затем тестировали первые семь фракций и пулы фракций 7-15, 16-24 и



25-30 каждого буферного условия для количественного определения уровней PVS. Каждую фракцию или пул измеряли в трех повторностях.

**Таблица 7.** Схема эксперимента по определению способности PVS

Буферный раствор	Загрузка добавки 30% PVS (мг/мл)	Повторностей (на образец)	Комментарии
100 мМ MES, pH 6,0	1,5*	3	Задействованные пулы для фракций F7-F15 и далее
100 мМ MES, 200 мМ хлорид натрия, pH 6,0	1,5*	3	Задействованные пулы для фракций F7-F15 и далее
100 мМ MES, 400 мМ хлорид натрия, pH 6,0	1,5*	3	Задействованные пулы для фракций F7-F15 и далее

\*Уровень PVS оценивали с использованием стандартных кривых PVS.

[82] В смоле Capto™ Adhere смешанного типа используют анионообменные и гидрофобные лиганды для поддержки двух типов связывания. Увеличение уровня NaCl представляет собой снижение уровня анионообменного связывания PVS и увеличение гидрофобного взаимодействия. Определяли способность PVS при более высоких концентрациях хлорида натрия (400 мМ NaCl) представлять наихудшее буферное условие. Результаты qPCR-анализа обнаружения добавки ДНК представлены в таблице 8. Удовлетворительный результат обнаружения добавки ДНК продемонстрировал концентрацию PVS, приемлемую для количественной оценки ДНК с помощью современных процедур анализа ДНК. С помощью стандартной кривой PVS оценивали концентрацию PVS для удовлетворительного и неудовлетворительного результата. Способность смолы связывать PVS определяли по количеству связанного PVS до прохождения PVS (первый неудовлетворительный результат обнаружения добавки ДНК), и она представлена в таблице 8. Связывающие способности смолы смешанного типа для соответствующих хроматографических фракций также представлены в таблице 8 (второй столбец). Буферное условие 400 мМ NaCl представляет собой наихудший сценарий, при котором уровень ионных взаимодействий уменьшается вследствие повышенных концентраций солей. Данное наблюдение согласуется с высокозаряженной структурой поливинилсульфоната, в которой каждое полимерное повторяющееся звено несет отрицательно заряженную сульфонатную группу.

**Таблица 8.** Оценка обнаружения добавки ДНК методом qPCR-анализа для исследований по удалению PVS посредством Capto™ Adhere

Фракции	Способность связывать PVS (мг PVS/ мл смолы)	Результат обнаружения добавки ДНК методом qPCR-анализа		
		100 мМ MES pH 6,0	100 мМ MES, 200 мМ NaCl, pH 6,0	100 мМ MES, 400 мМ NaCl, pH 6,0
F1	N/A	N/A*	N/A*	N/A*
F2	3	Удовлетворительный	Удовлетворительный	Удовлетворительный
F3	6	Удовлетворительный	Удовлетворительный	Удовлетворительный
F4	9	Удовлетворительный	Удовлетворительный	Неудовлетворительный
F5	12	Удовлетворительный	Удовлетворительный	Неудовлетворительный
F6	15	Удовлетворительный	Удовлетворительный	Неудовлетворительный
F7-F15	18	Неудовлетворительный	Неудовлетворительный	Неудовлетворительный
F16-F24	21	Неудовлетворительный	Неудовлетворительный	Неудовлетворительный
F25-F30	48	Неудовлетворительный	Неудовлетворительный	Неудовлетворительный

N/A - неприменимо, первая фракция была определена как нерепрезентативная по причине эффектов замены буфера, последующие фракции не оказывают отрицательного влияния на qPCR.

[83] Обнаружение добавки в анализе ДНК определяли для фракций проскока. Удовлетворительные фракции характеризовались приемлемой очисткой PVS, а способность связывать PVS для смолы Capto™ Adhere определял первый неудовлетворительный образец. Например, образцы в стандартных условиях (100 мМ MES, pH 6; 100 мМ MES, 200 мМ NaCl, pH 6) характеризовались приемлемой очисткой для загрузок вплоть до фракции 7. Фракция 7 представляет собой загрузку PVS, составляющую 15 мг PVS/мл смолы, а загрузка PVS выше данного уровня вызывала постоянное отрицательное влияние на обнаружение добавки (все пулы фракций 7-30 характеризовались неудовлетворительным обнаружением добавки). По результатам

анализа наихудшего условия 400 мМ NaCl наблюдали отрицательное влияние на обнаружение добавки во фракции 4. Таким образом, наихудшая связывающая способность составляла 9 мг PVS/мл смолы. Таким образом, в случае смолы смешанного действия наблюдали связывающую способность от 9 до 15 мг PVS/мл смолы.

#### Пример 8

Способы титрования для выявления и удаления полианионов

[84] Получали девять партий коммерческого буфера MES, которые подвергали анализу с помощью описанного в данном документе способа титрования для выявления и измерения PVS. Сравнительные оценки данных партий буфера MES проводили с использованием скрытого способа титрования для выявления и измерения PVS и с использованием qPCR. Как видно из экспериментальных данных, данный способ позволяет производить чувствительное выявление низких уровней PVS и безошибочно и точно выявлять изменение уровней PVS среди партий. Такие анализы позволили обнаружить коммерческую партию буфера MES (партия № 1), содержащую заметно высокий уровень PVS, что согласуется с наблюдениями изменчивости среди партий связанного с буфером ингибирования загрязнения биологических образцов нуклеиновой кислотой клетки-хозяина, которое обнаруживают методом ПЦР (например, qPCR).

[85] Данные, представленные в данном примере и в примере 9, свидетельствуют, что способ титрования для выявления и измерения PVS в образцах с применением поликатионного соединения, такого как бромид гексадиметрина (т. е. HDBr), является высокоселективным в отношении PVS по сравнению с MES, при этом  $K_{a, PVS} \gg K_{a, MES}$ . Результаты, раскрытые в данном документе, свидетельствуют, что раскрываемый способ титрования является воспроизводимым (точным) и дает возможность выявлять низкие уровни полианионов, например PVS, в буферах Гуда, таких как MES, с пределом количественного определения (т. е. LOQ) приблизительно 100-200 нг/мл.

[86] Раскрытый в данном документе протокол описывает подход к титрованию полиэлектролитов для количественного определения полианионов, таких как поливинилсульфоновая кислота (PVS), в буферах Гуда, таких как буфер с 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислотой (MES). Данную методологию можно распространить на другие буферы Гуда (например, HEPES), получаемые из винилсульфоновой кислоты. Лежащий в основе механизм выявления PVS основан на связывании с поликатионными веществами, такими как бромид гексадиметрина (HDBr). Схема реакции связывания представлена на фигуре 10a. В данном подходе используется высокая равновесная константа ассоциации ( $K_a$ ) между PVS и HDBr для селективности в сравнении с MES, т. е. моноанионом. Действительно,  $K_a$  между поликатионом и полианионом резко возрастает с увеличением количества центров заряда (положительно коррелирует с молекулярным весом полимера). В конечной точке титрования избыток HDBr связывается с анионной молекулой индикатора, эриохромом черным Т (ЕСВТ), что приводит к сдвигу в профиле поглощающей способности индикатора в УФ-видимой области спектра (фигура 10b). За ходом титрования можно следить на одной длине волны

(т. е. 665 нм) и соотносить его с концентрацией PVS в образце, например, путем вычисления точки перегиба полученной сигмоидальной кривой, как показано на фигуре 9.

Материалы и способы для примеров 8 и 9

[87] При получении реагентов аналитические буферы получают с помощью традиционных методик с получением буфера А, содержащего 50 мМ бората натрия, с рН, доведенным соляной кислотой до 8,5, и буфера В, содержащего 100 мМ объединенных карбоната и бикарбоната натрия, составленных для получения раствора с рН 10,0. В качестве индикаторного соединения выступает раствор индикаторного соединения или красителя, такого как полианионное индикаторное соединение, например, эриохром черный Т (ЕСВТ; 55 вес. %). В случае, когда индикаторным соединением был ЕСВТ, аликвоту твердого вещества данного материала хранили при комнатной температуре. Для приготовления иллюстративного раствора красителя ЕСВТ 125 мг ЕСВТ вносили в 25-мл мерную колбу и регистрировали фактическую массу. ЕСВТ растворяли в 25 мл деионизированной (т. е. DI) воды, и делили на аликвоты в 1,6-мл или 5-мл полипропиленовые микроцентрифужные пробирки, и хранили при 2-8°C до использования. Поликатионное соединение, используемое в раскрытых способах, представляет собой титрующее вещество и иллюстративный раствор титрующего вещества получают с использованием бромид гексадиметрина (HDBr). Данный материал хранят при 2-8°C. Для получения раствора взвешивали 18,7 мг HDBr непосредственно в стеклянном флаконе и растворяли в 3,74 мл воды с получением 5 мг/мл исходного раствора. Затем получали 0,05 мкг/мл титрующих веществ HDBr путем разведения 1:20 или 1:100 соответственно раствора 5 мг/мл HDBr в 50 мМ боратном буфере, дополненном 0,1 мМ EDTA. Данный раствор использовали в качестве титрующего раствора для раскрываемых в данном документе способов анализа. Титрующие растворы HDBr готовили в виде растворов объемом по 10 мл в 15-мл полипропиленовых центрифужных пробирках и хранили при 2-8°C.

[88] Для экспериментов, предусматривающих способы титрования для выявления и удаления биомолекул, приблизительно 30 вес.% натриевой соли поли(винилсульфоновой кислоты) (PVS) приобретали у Sigma-Aldrich (#278424) и Alfa Chemistry (#ACM25053274) и разводили с получением стандартных PVS известной концентрации в диапазоне от 0,1 до 20 мкг/мл. 50 мМ боратный буфер (рН 8,5) готовили с помощью традиционных методик. 100 мМ карбонатный буфер (рН 10,0) готовили из карбоната натрия (Sigma-Aldrich № 223484) и бикарбоната натрия (Sigma-Aldrich № S6014). Карбонатный и бикарбонатный буферы дополняли посредством приблизительно 0,1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA; MP Biomedicals № 06133713). Полиметобромид 1,5-диметил-1,5-диазаундекаметилен (бромид гексадиметрина; HDBr) приобретали у Sigma-Aldrich (107689) и Carbosynth (№ FH165280). Эриохром черный Т (ЕВТ или ЕСВТ) приобретали у Sigma-Aldrich (№ 858390). Все растворы получали с использованием воды, которая была очищена до минимального удельного сопротивления 18 МОм-см. 100 мМ раствор гидрата MES очищали от PVS посредством фильтрации через

0,2-мкм фильтр Posidyne<sup>®</sup> (площадь поверхности 2,8 см<sup>2</sup>), и раствор служил в качестве холостого образца для раскрытых в данном документе экспериментов.

#### Приготовление стандартов

[89] Для приготовления аналитических стандартов использовали коммерческий маточный раствор поливинилсульфоната (PVS) (Alfa Chemistry, 25 вес. %, натриевая соль, партия № A19X05191) путем серийных разведений маточного раствора в воде. Затем растворы PVS из таблицы 9 добавляли в 30 мМ боратный буфер (дополненный 0,1 мг/мл EDTA) для получения стандартов с известными концентрациями PVS.

**Таблица 9.**

<u>Коэффициент разбавления исходного PVS</u>	<u>V<sub>вода</sub> (мл)</u>	<u>V<sub>стандарт</sub> (мл)</u>	<u>Используемое разбавление</u>	<u>Приблизительное количество [PVS] (мкг/мл)</u>
1:20	0,950	0,050	Исходное	12500
1:400	0,950	0,050	1:20	625
1:2000	0,800	0,200	1:400	125
1:10000	0,800	0,200	1:2000	25

[90] Маточные растворы и растворы стандартов хранили при температуре 2-8°C.

#### Приготовление образцов

[91] 100 мМ растворы гидрата MES (партии № I и II) с рН, доведенным до 7,00±0,05, готовили следующим образом. 2,132 г гидрата MES растворяли в 95 мл воды и с помощью водного раствора NaOH доводили рН. рН измеряли с помощью традиционного рН-метра. Растворы хранили при температуре 2-8°C.

#### Процедура анализа

[92] Хотя эксперименты по осуществимости титрования проводили с использованием простого протокола, описанного ниже, такие эксперименты можно было автоматизировать с помощью фотометрического титратора для автоматизации описанных в данном документе стадий. Лампы УФ и видимого спектра для спектрометра перед использованием прогревали по меньшей мере 20 минут путем включения спектрометра. Перед каждым анализом спектрометр калибровали холостыми образцами, используя либо растворы стандартов, либо растворы образцов. Стандартная ячейка, используемая в раскрываемом анализе, представляла собой кварцевую кювету шириной 10 мм и объемом 1,5 мл. Стандарт состоит из PVS, разведенного в аналитическом буфере. Образец получают путем смешивания 100 мМ MES в качестве иллюстративного буферного раствора Гуда с буфером для анализа. Данную стадию выполняют потому, что иллюстративное индикаторное соединение ЕСВТ претерпевает изменение цвета при значениях рН 6-7, тогда как значения рН, превышающие 7, находятся выше области буферного действия раствора для MES. Поэтому MES смешивали с основными буферами, т. е. А или В, которые описаны выше, для обеспечения депротонирования индикатора ЕСВТ.

[93] В изначальных экспериментах смешивали буфер А и MES в соотношении 1:1. Ожидается, что более основные буферы (например, В), смешанные с MES в различных объемных соотношениях, будут повышать эффективность анализа.

[94] После калибровки спектрометра холостыми пробами к стандарту/образцу вносили небольшой объем раствора ЕСВТ. Изначально 995 мкл стандарта/образца смешивали с 5 мкл ЕСВТ (5 мг/мл), получая конечную концентрацию ЕСВТ, составлявшую 25 мкг/мл. Получали полноволновые сканы поглощающей способности. Раствор стандарта/образца титровали путем внесения в кювету небольших объемов (10-100 мкл) раствора НДВг с концентрацией 0,050 мг/мл, измерения поглощающей способности образца между каждым внесением НДВг. Для смешивания раствора использовали 200-мкл пипетку и перед измерением поглощающей способности раствор оставляли отстаиваться приблизительно на 1 минуту. В ходе титрования постепенно увеличивали объем НДВг. Например, сначала производили малообъемные (например, 10 мкл) внесения, поскольку в начале титрования профиль поглощающей способности претерпевал резкие изменения. Позже при титровании вносили объемы большего размера, когда на изменение поглощающей способности в большей степени влияло разведение. В некоторых случаях, (например, для растворов с большими концентрациями PVS) использовали более концентрированный 0,25 мг/мл раствор НДВг. Предшествующие стадии проведения холостого опыта на спектрометре и добавления небольшого объема раствора индикаторного соединения к стандарту/образцу затем повторяли для каждого образца.

#### Анализ данных

[95] Из данных УФ-видимых спектров строили график поглощающей способности при длине волны 665 нм в зависимости от массы внесенного НДВг (в мкг). Поглощающую способность необходимо было скорректировать по изменению объема раствора с учетом разведения, что осуществляли путем умножения  $A_{665}$  на общий объем раствора (т. е. изначальный объем раствора [1,000 мл] плюс совокупный объем внесенного титрующего раствора).

[96] На фигурах 11 и 12 подытожены результаты оценки. На фигуре 4 представлена поглощающая способность раствора с поправкой на объем при длине волны 665 нм по отношению к массе титрующего вещества НДВг для аналитического буфера с добавлением трех различных уровней PVS.

[97] На фигуре 12а представлена нормализованная поглощающая способность раствора с коррекцией на объем при 665 нм по отношению к массе титрующего вещества НДВг для холостого образца матрицы для MES с добавлением трех различных уровней PVS. Как для стандарта PVS 0 ppm, так и для холостого образца (т. е. холостого MES), добавление титрующего вещества вызывало резкий первоначальный спад  $A_{665}$ , который стабилизировался после добавления в раствор приблизительно 5,00 мкг НДВг. Оставшиеся стандарты и образцы PVS, которые готовили путем добавления в раствор коммерческого PVS, требовали большего количества титрующего вещества для достижения установившейся поглощающей способности. Например, образец 7,5 ppm (фигура 12а) достигал стабильности  $A_{665}$  только после добавления более 40 мкг НДВг. В совокупности такие данные указывают на четкие различия в кривых титрования (фигуры

11 и 12a), связанные с количеством PVS в растворе образца. На фигуре 12b кратко представлена эта зависимость путем построения графика рассчитанной точки перегиба для стандартных растворов PVS, приготовленных в 50 мМ боратном буфере (pH 8,5) (зеленый треугольник) или MES, в который добавляли PVS, а затем смешивали с 50 мМ боратным буфером (pH 8,5) для регулирования pH раствора (черные квадраты). Угловые коэффициенты для двух наборов данных были сопоставимы, что свидетельствует о том, что присутствие MES в высокой концентрации (100 мМ) не препятствовало количественному определению PVS. Более того, эти данные подтверждают выявление PVS при концентрациях до 1,5 ppm (мкг/мл) в 100 мМ растворе MES, 0,3 ppm в буфере для анализа.

[98] Для дополнительной оценки эффективности процедуры титрования оценивали две разные партии MES вместе со стандартами PVS. Партию гидрата MES (образец I), которая приводила к недостоверным результатам qPCR для нескольких продуктов, сравнивали с другим образцом MES, который содержал минимальное количество PVS для анализа qPCR (т. е. тот же материал, который использовали для получения холостого образца на фигуре 12a). Результаты такой оценки, представленные на фигуре 13, показывали измеримое количество PVS, присутствующее в образце MES I, но не в отрицательном контрольном материале MES, который был неотличим от холостого образца матрицы, лишённого PVS. Данные результаты позволяют установить, что раскрываемая методология позволяет точно определить материалы гидрата MES с неподходящими уровнями PVS. Более того, материалы гидрата MES без PVS или с промежуточными уровнями PVS, которые не будут препятствовать qPCR, отличаются от непригодных материалов MES.

#### Пример 9

##### Автоматическое титрование

[99] Автоматическое титрование растворов стандартов PVS и образцов MES проводили на приборе Metrohm 907 Titrando, оснащённом интеллектуальным приводом дозирования (№ 2.800.0010) и дозирующим устройством с объёмной ёмкостью 20 мл (№ 6.303.2200). 100 мл раствора стандарта или образца дополняли посредством 0,8-1,7 мкг/мл индикатора ЕВТ (например, путем добавления 0,5-1,0 мг/мл маточного раствора ЕВТ) непосредственно перед титрованием. Полученный раствор анализировали путем монотонного титрования образца HDBr с приростом по объёму 50-150 мкл. Прогресс титрования отслеживали путем непрерывного измерения поглощающей способности раствора образца при 660 нм с помощью погружного фотометрического зонда (Optrode, № 6.1115.000), при этом конечную точку титрования определяли с помощью максимального значения  $dU/dV$  на первой производной кривой титрования.

[100] Автоматические измерения уровня PVS проводили с применением 907 Titrando (Metrohm), оснащённого погружным фотометрическим зондом, способным осуществлять измерения поглощающей способности раствора при длине волны 660 нм. Титрования проводили путем постепенного добавления по 0,05-0,15 мл титрующего

раствора HDBr. В промежутках между приростами титрующего вещества обеспечивали стабилизацию сигнала фотометрического зонда перед добавлением следующего объема титрующего вещества. Репрезентативный профиль титрования для холостого стандарта представлен на фигуре 14 (черный контур) рядом с соответствующей первой производной (красный контур). Объем, при котором возникает максимум первой производной (т. е.  $V_{\text{титрующего вещества}}$  приблизительно 0,55 мл на фигуре 14), обозначает конечную точку титрующего вещества и используется при определении концентрации PVS.

[100] pH раствора образца играет важную роль в измерении PVS либо за счет влияния плотности анионного заряда на аналит PVS, либо косвенно за счет протонирования индикаторного соединения с образованием одновалентного аниона ( $\text{H}_2\text{In}^-$ ), который не претерпевает изменения в отношении поглощающей способности при комплексообразовании с HDBr. Эксперименты, описанные выше в примере 8, показали, что смешивание приготовленных растворов MES со щелочным буфером является целесообразным подходом для обеспечения подходящего pH образца. Использование данного подхода в экспериментах по автоматическому титрованию (т. е. путем растворения образцов MES с концентрацией MES 50 мМ в 100 мМ карбонатном буфере) проверяли путем оценки обнаружения добавки PVS в растворах образцов MES. Для такой оценки 10 ppm исходного раствора PVS в разных концентрациях добавляли в растворы образцов, соответствующие партии гидрата MES (образец H; см. таблицу 10). Этот материал при анализе методом титрования обеспечивал объемы конечной точки, неотличимые от холостого стандарта, что указывает на уровень PVS ниже предела выявления согласно способу.

[101] Результаты для оценки обнаружения добавки представлены на фигуре 15a, где на графике показан объем конечной точки титрования в зависимости от концентрации PVS на четырех разных уровнях PVS (каждый анализ проводили в трех повторностях). Для сравнения, результаты для стандартов PVS, приготовленных только в 100 мМ карбонатном буфере, показаны на фигуре 15b. Для обоих наборов данных линейная регрессия между объемом конечной точки титрования и концентрацией PVS приводила к получению сходных угловых коэффициентов (0,99 и 0,95 мл / (мкг/мл)) с соответствующими линейными коэффициентами детерминации ( $R^2=0,99$ ). Примечательно, что величина точки пересечения оси y для данных обнаружения добавки (0,55 мл) была больше, чем для стандартной кривой на фигуре 15b (0,43 мл), что, вероятно, связано с низким уровнем PVS в образце H MES. Кроме того, визуальное исследование репрезентативных кривых титрования, представленных на фигуре 16, для стандартов PVS (фигуры 16A и 16B) и образцов обнаружения добавки (фигуры 16C и 16D) не позволяло выявить заметного влияния более низкого pH или присутствия 50 мМ MES на профиль титрования. В совокупности эти результаты указывают на отсутствие заметного влияния более низкого pH образца или присутствия 50 мМ MES на измеряемые уровни PVS.

[102] В ходе разработки процедуры титрования несколько партий гидрата MES



оценивали на содержание PVS путем титрования 50 мМ MES (растворенного в 100 мМ карбонатном буфере) посредством 0,10 мг/мл HDBr. Конечные точки титрования сравнивали с результатами, полученными для ряда стандартных растворов PVS. Результаты таких исследований представлены в таблице 10. Среди данных образцов была партия гидрата MES (образец I), которая обуславливала невозможность проведения qPCR-анализа для нескольких партий терапевтического белка. Образец I характеризовался уровнем PVS, измеренным титрованием, составлявшим  $71 \pm 4$  мкг PVS на грамм гидрата MES, значение, значительно превышающее уровни PVS, измеренные для любого из других протестированных образцов, что подтверждает полезность титрования при скрининге материалов MES с неподходящими уровнями PVS.

**Таблица 10.** Образцы гидрата MES, оцениваемые в отношении PVS, во время разработки способа титрования

Образец гидрата MES	[PVS] в 100 мл 50 мМ MES (мкг/мл)	[PVS], в пересчете на сухое вещество (мкг PVS/г гидрата MES)
A <sup>a</sup>	$0,21 \pm 0,07$	$21 \pm 7$
B <sup>a</sup>	$0,38 \pm 0,18$	$39 \pm 19$
C <sup>a</sup>	$0,26 \pm 0,09$	$27 \pm 9$
D <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
E <sup>b</sup>	0,14	14
F <sup>b</sup>	0,25	25
G <sup>b</sup>	0,04	4
H <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
I <sup>c</sup>	$0,71 \pm 0,04$	$71 \pm 4$

<sup>a</sup>Образцы оценивали в трех повторностях. <sup>b</sup>Образцы оценивали без повторных измерений.

<sup>c</sup>Образец был ниже предела выявления (LOD), что обуславливало отрицательный результат [PVS].

### Пример 11

#### Сравнение способов выявления

[103] Оценивали несколько способов выявления и измерения поликатионов, таких как PVS, в образцах белков (например, биологических образцах). Способ координации ионов, включающий индуцированную агрегацию репортера PVS с турбидиметрическим выявлением, является простым способом низкой сложности, но этот способ не смог надежно выявить партии буфера MES с высокими уровнями PVS. Еще одним простым способом с низкой сложностью был флуоресцентный способ, предусматривающий прямое выявление водного PVS посредством возбуждения и выявления флуоресценции, но данный способ оказался неприменимым для выявления PVS. Другой флуоресцентный способ, предусматривавший индуцированное PVS гашение флуоресцентной репортерной молекулы, был более сложным и не показал себя многообещающим по причине ограниченной способности селективно выявлять PVS относительно MES. Способ, основанный на физических характеристиках поликатионов, присутствующих в буферных растворах Гуда, представляет собой эксклюзионную хроматографию с выявлением заряженных аэрозолей (т. е. SEC-CAD). Данный способ был способен выявлять PVS в

буферах MES, но данный способ значительно сложнее, чем другие способы. Оценивали еще один способ координации ионов, и было установлено, что этот способ, включающий комплексообразование полиэлектролитов и титрование с использованием длины волны в ультрафиолетовой и видимой областях спектра для выявления поглощения, обеспечивает неожиданно превосходные результаты в обеспечении чувствительного, точного и тщательного выявления и количественного определения PVS в буферных растворах Гуда, в том числе без ограничения в буферных растворах Гуда, представленных в таблице 11. Данный способ, раскрываемый в данном документе как титрационный способ, представляет собой простой способ с низкой сложностью и низкими затратами в дополнение к преимуществам безошибочности, точности и чувствительности.

**Таблица 11. Буферы Гуда**

<b>Буфер</b>	<b><math>pK_a</math></b>	<b>Буфер</b>	<b><math>pK_a</math></b>
MES	6,15	POPSO	7,85
Бис-трис-метан	6,60	HEPPSO	7,9
ADA	6,62	EPS	8,0
Бис-трис-пропан	6,80	HEPPS	8,1
PIPES	6,82	Трицин	8,15
ACES	6,88	Трис	8,2
MOPSO	6,95	Глицинамид	8,2
Хлорид холамина	7,10	Глицилглицин	8,2
MOPS	7,15	HEPBS	8,3
BES	7,17	Бицин	8,35
AMPB	8,8	TAPS	8,55
HEPES	7,55	AMPB	8,8
DIPSO	7,6	CHES	9,3
MOBS	7,6	CAPSO	9,6
Ацетамидоглицин	7,7	AMP	9,7
TAPSO	7,6	CAPS	10,4
TEA	7,8	CABS	10,7

[104] Каждый из литературных источников, процитированный в данном документе, настоящим включен посредством ссылки во всей своей полноте или в соответствующей части, что будет очевидно из контекста цитирования.

Следует понимать, что хотя заявляемый объект изобретения был описан в сочетании с его подробным описанием, предшествующее описание предназначено для иллюстрации и не ограничивает объем такого заявляемого объекта изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в пределах объема нижеприведенной формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ количественного определения полианионного ингибитора ПЦР в образце, включающий:

- a) получение серии разведений образца, включающей по меньшей мере четыре члена;
- b) добавление к каждому члену серии разведений постоянного количества матричной ДНК, отличимой от ДНК клетки-хозяина;
- c) проведение ПЦР-анализа каждого члена серии разведений и постоянного количества матричной ДНК в отсутствие какого-либо образца;
- d) построение стандартной кривой для полианионного ингибитора;
- e) сравнение результатов ПЦР-анализа серии разведений с результатами ПЦР-анализа постоянного количества матричной ДНК в отсутствие какого-либо образца и
- f) определение концентрации полианионного ингибитора ПЦР в образце.

2. Способ по п. 1, где концентрация полианионного ингибитора ПЦР в образце представляет собой диапазон, определяемый концентрацией полианионного ингибитора ПЦР, при которой при наименее разведенном члене серии разведений наблюдают полное обнаружение добавки, а при наиболее разведенном члене серии разведений не наблюдают полное обнаружение добавки.

3. Способ по п. 2, где количество членов в серии разведений составляет 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15 или 20, за счет чего обеспечивается сужение диапазона концентраций полианионного ингибитора ПЦР в образце по сравнению с диапазоном, представленным в п. 2.

4. Способ по п. 1, где постоянное количество матричной ДНК составляет по меньшей мере 100 пг.

5. Способ по п. 1, где полианионный ингибитор ПЦР представляет собой сульфонатное соединение.

6. Способ по п. 5, где сульфонатное соединение представляет собой поливинилсульфонат.

7. Способ по п. 1, где поливинилсульфонат представляет собой полианионный ингибитор ПЦР, применяемый для построения стандартной кривой полианионного ингибитора, и концентрацию полианионного ингибитора ПЦР в образце выражают в единицах эквивалентов концентрации поливинилсульфоната.

8. Способ удаления полианионного ингибитора ПЦР из буферного раствора, включающий:

- a) получение буферного раствора кислых буферных веществ, основных буферных веществ или их комбинации;
- b) приведение буферного раствора в контакт с анионообменной средой и
- c) отделение буферного раствора от полианионной примеси, за счет чего обеспечивается удаление полианионной примеси из буферного раствора.

9. Способ удаления полианионного ингибитора ПЦР из буферного раствора,

включающий:

а) получение буферного раствора кислых буферных веществ, основных буферных веществ или их комбинации;

б) приведение буферного раствора в контакт со смолой смешанного действия и

с) отделение буферного раствора от полианионной примеси, за счет чего обеспечивается удаление полианионной примеси из буферного раствора.

10. Способ по п. 8 или п. 9, где полианионная примесь представляет собой сульфонатное соединение.

11. Способ по п. 10, где сульфонатное соединение представляет собой поливинилсульфонат.

12. Способ по п. 8 или п. 9, где буферный раствор представляет собой буферный раствор Гуда.

13. Способ по п. 12, где буферный раствор Гуда представляет собой буферный раствор 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES).

14. Способ по п. 8 или п. 9, где буферный раствор содержит буферную соль или кислотное вещество данной буферной соли.

15. Способ по п. 8 или п. 9, дополнительно включающий внесение по меньшей мере одного модифицирующего соединения в буферный раствор.

16. Способ по п. 15, где модифицирующее соединение представляет собой небуферную соль, вспомогательное вещество или и то и другое.

17. Способ по п. 8, где анионообменная среда представляет собой матрицу, модифицированную диэтиламиноэтилом, матрицу, модифицированную диметиламиноэтилом, матрицу, модифицированную диметиламинопропилом, матрицу, модифицированную полиэтиленимином, матрицу, модифицированную кватернизированным полиэтиленимином, матрицу, модифицированную полностью кватернизированным амином, анионообменные глубинные фильтры на основе модифицированной диатомовой земли, анионообменные мембранные адсорберы, солеустойчивые анионообменные мембранные адсорберы, Macro-Prep 25Q, TSK-Gel Q, Poros Q, Q Sepharose Fast Flow, Q HyperD, Q Zirconia, Source 30Q, Fractogel EMD TMAE, Express-Ion Q, DEAE Sepharose Fast Flow, Poros 50 D, Fractogel EMD DEAE (M), MacroPrep DEAE Support, DEAE Ceramic HyperD 20, Toyopearl DEAE 650 M, Capto Q, мембранный абсорбер Sartobind Q, заряженную мембрану Posidyne, модифицированную (полиамином) матрицу Amberlite<sup>®</sup>, модифицированную (полиамином), модифицированную (иминодиуксусной кислотой) матрицу Amberlite<sup>®</sup>, модифицированную (триалкилбензиламмонием) матрицу Amberlite<sup>®</sup> I типа, модифицированную (диметил-2-гидроксиэтилбензиламмонием) матрицу Amberlite<sup>®</sup> II типа, модифицированную (полиамином) матрицу Dowex<sup>®</sup>, модифицированную (триметилбензиламмонием) матрицу Dowex<sup>®</sup> I типа, модифицированную (диметил-2-гидроксиэтилбензиламмонием) матрицу Dowex<sup>®</sup> II типа, Dowex<sup>®</sup> (смешанного слоя), анионообменную мультимодальную среду Capto<sup>®</sup> Adhere, PPA Hypercel, HEA Hypercel или модифицированную (полиамином)

матрицу Duolite®.

18. Способ по п. 9, где смола смешанного действия представляет собой анионообменную мультимодальную смолу Capto® Adhere, смолу PPA Hypercel или смолу HEA Hypercel.

19. Способ по п. 8, где анионообменная среда связывает до 15 мг PVS на мл анионообменной среды.

20. Способ по п. 8, где анионообменная среда связывает до 9 мг PVS на мл анионообменной среды.

21. Способ по п. 8, где анионообменная среда связывает до 3 мг PVS на мл анионообменной среды.

22. Способ по п. 9, где смола смешанного действия связывает до 15 мг PVS на мл смолы смешанного действия.

23. Способ по п. 9, где смола смешанного действия связывает до 9 мг PVS на мл смолы смешанного действия.

24. Способ по п. 9, где смола смешанного действия связывает до 3 мг PVS на мл смолы смешанного действия.

25. Способ по п. 8, где анионообменная среда представляет собой поликатионное соединение, образующее комплекс с полианионной примесью (аналитом).

26. Способ по п. 25, где поликатионное соединение представляет собой полимер на основе четвертичного аммония.

27. Способ по п. 25, где поликатионное соединение вносят в количестве, достаточном для по меньшей мере достижения точки эквивалентности при титровании аналита в форме полианионной примеси.

28. Способ удаления полианионной буферной примеси из раствора белка, включающий:

а) доведение рН раствора белка, содержащего анионную буферную примесь, до значения рН, которое меньше изоэлектрической точки белка на не более чем 4 единицы рН;

б) приведение раствора белка в контакт с анионообменной средой и

с) отделение белка от анионной буферной примеси.

29. Способ удаления полианионной буферной примеси из раствора белка, включающий:

а) доведение рН раствора белка, содержащего анионную буферную примесь, до значения рН, которое меньше изоэлектрической точки белка на не более чем 4 единицы рН;

б) приведение раствора белка в контакт со смолой смешанного действия и

с) отделение белка от анионной буферной примеси.

30. Способ по п. 28 или п. 29, где значение рН доводят так, чтобы оно было ниже изоэлектрической точки белка на не более чем 2 единицы рН.

31. Способ по п. 28, где анионообменная среда представляет собой матрицу,

модифицированную диэтиламиноэтилом, матрицу, модифицированную диметиламиноэтилом, матрицу, модифицированную диметиламинопропилем, матрицу, модифицированную полиэтиленимином, матрицу, модифицированную кватернизированным полиэтиленимином, матрицу, модифицированную полностью кватернизированным амином, анионообменный глубинный фильтр на основе модифицированной диатомовой земли, анионообменный мембранный адсорбер, солеустойчивый анионообменный мембранный адсорбер, Macro-Prep 25Q, TSK-Gel Q, Poros Q, Q Sepharose Fast Flow, Q HyperD, Q Zirconia, Source 30Q, Fractogel EMD TMAE, Express-Ion Q, DEAE Sepharose Fast Flow, Poros 50 D, Fractogel EMD DEAE (M), MacroPrep DEAE Support, DEAE Ceramic HyperD 20, Toyopearl DEAE 650 M, Capto Q, мембранный абсорбер Sartobind Q, заряженную мембрану Posidyne, модифицированную (полиамином) матрицу Amberlite<sup>®</sup>, модифицированную (иминодиуксусной кислотой) матрицу Amberlite<sup>®</sup>, модифицированную (триалкилбензиламмонием) матрицу Amberlite<sup>®</sup> I типа, модифицированную (диметил-2-гидроксиэтилбензиламмонием) матрицу Amberlite<sup>®</sup> II типа, модифицированную (полиамином) матрицу Dowex<sup>®</sup>, модифицированную (триметилбензиламмонием) матрицу Dowex I типа, модифицированную (диметил-2-гидроксиэтилбензиламмонием) матрицу Dowex<sup>®</sup> II типа, Dowex<sup>®</sup> (смешанного слоя), анионообменную мультимодальную среду Capto<sup>®</sup> Adhere, PPA Hypercel, HEA Hypercel или модифицированную (полиамином) матрицу Duolite<sup>®</sup>.

32. Способ по п. 29, где смола смешанного действия представляет собой анионообменную мультимодальную Capto<sup>®</sup> Adhere, PPA Hypercel или HEA Hypercel.

33. Способ количественного определения полианионного ингибитора ПЦР в образце, включающий:

(а) приведение образца, содержащего полианионный ингибитор ПЦР, в контакт с по меньшей мере одной аликвотой поликатионного соединения;

(б) внесение полианионного индикаторного красителя в количестве, достаточном для выявления свободной формы красителя; и

(с) количественное определение полианионного ингибитора ПЦР на основе количества поликатионного соединения, необходимого для выявления свободной формы полианионного индикаторного красителя.

34. Способ удаления полианионной примеси в образце, включающий:

(а) приведение жидкости, содержащей полианионную примесь, в контакт с поликатионным противоионом; и

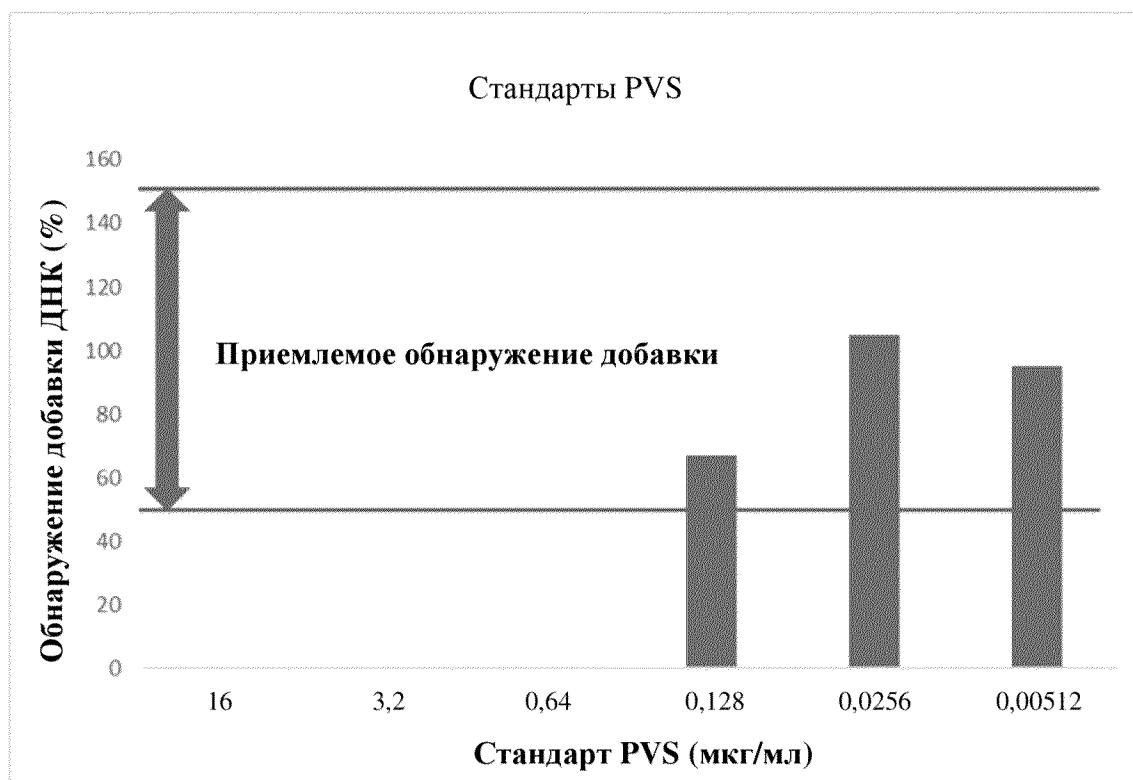
(б) отделение жидкости от полианионной примеси, образующей комплекс с поликатионным противоионом, за счет чего обеспечивается удаление полианионной примеси из жидкости.

35. Способ по п. 34, где полианионная примесь представляет собой полианионный ингибитор ПЦР.

36. Способ по п. 34, где комплекс полианионной примеси и поликатионного противоиона удаляют посредством осаждения.

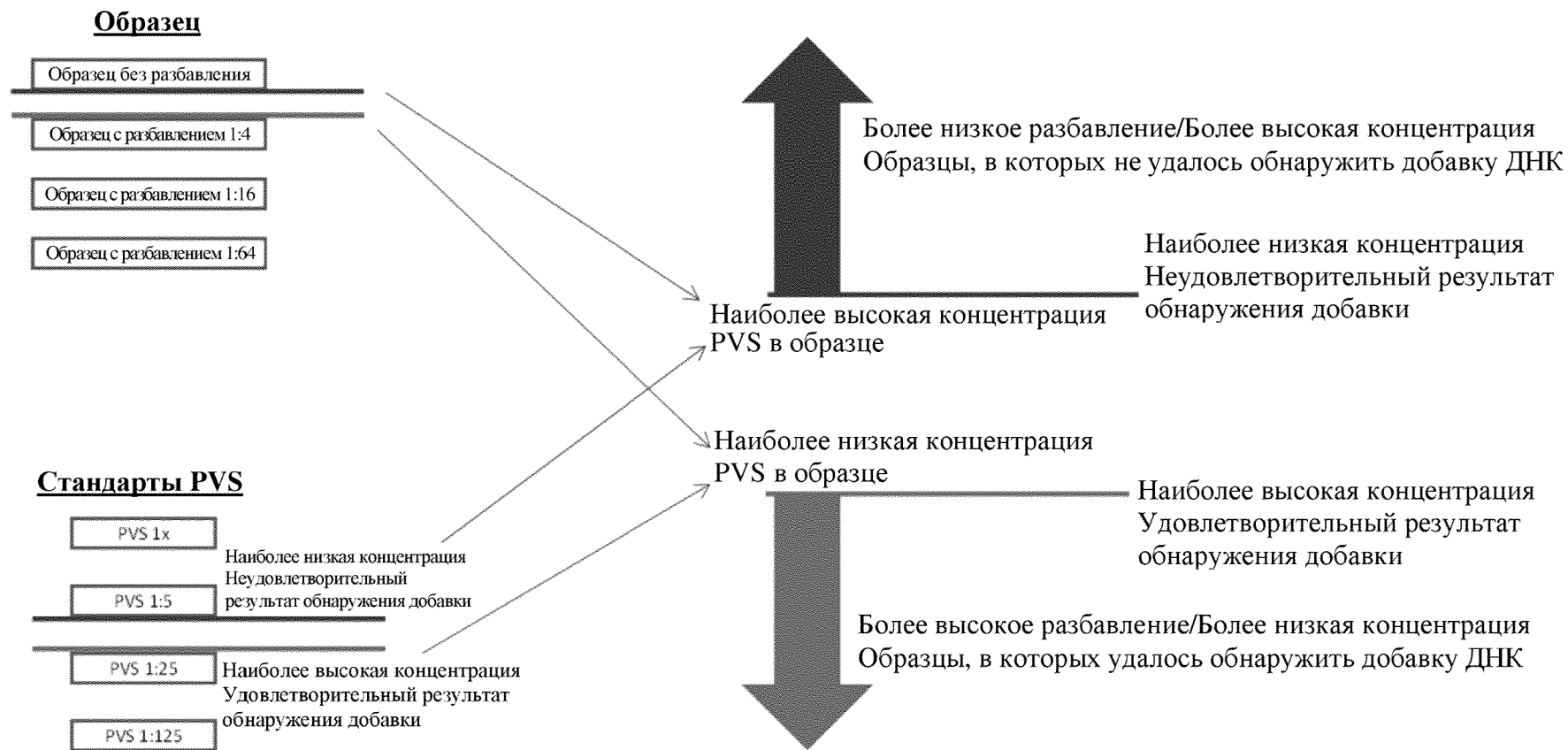
37. Способ по п. 34, где поликатионный противоион дериватизируют путем присоединения к члену пары связывания или магнитной частице для облегчения удаления комплекса полианионной примеси и поликатионного противоиона из жидкости.

По доверенности



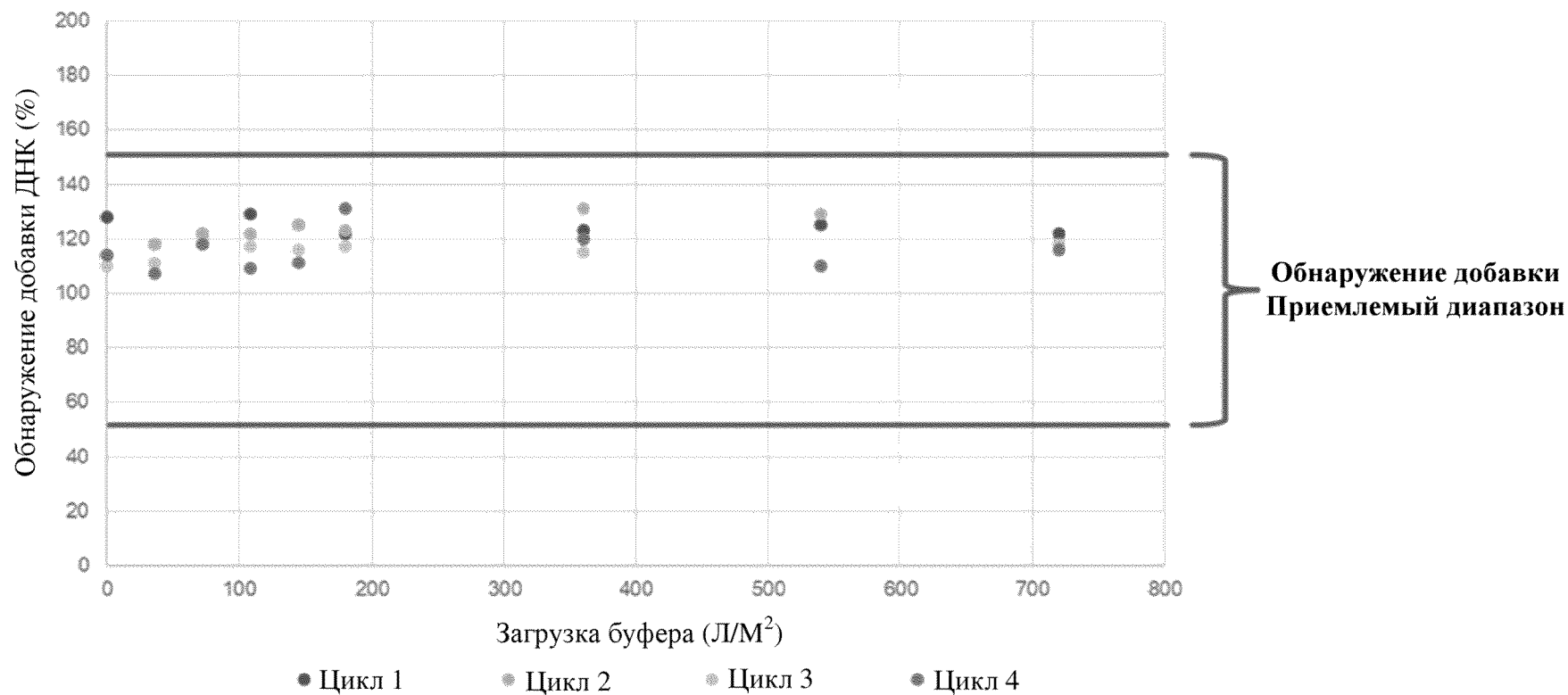
Фигура 1



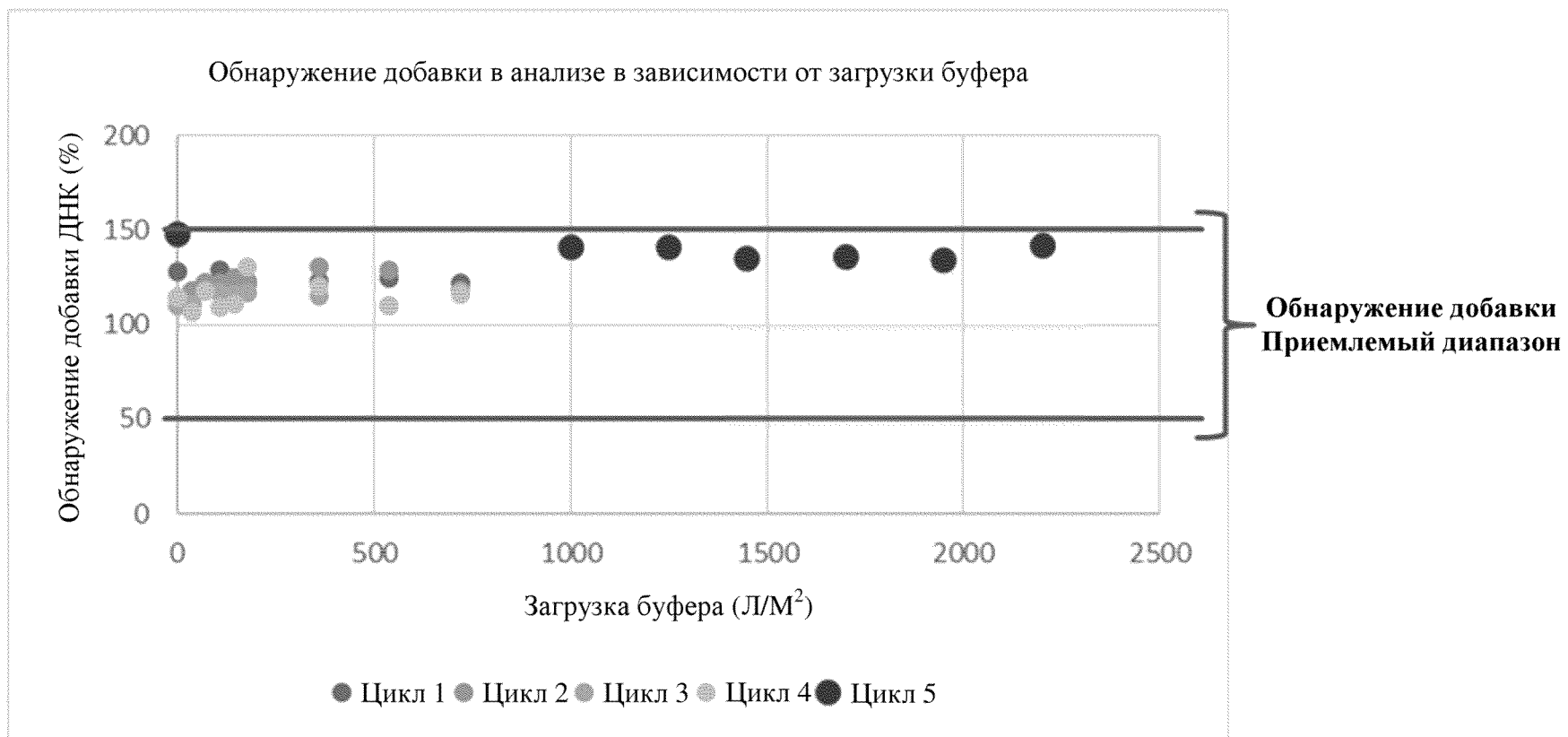


Фигура 2

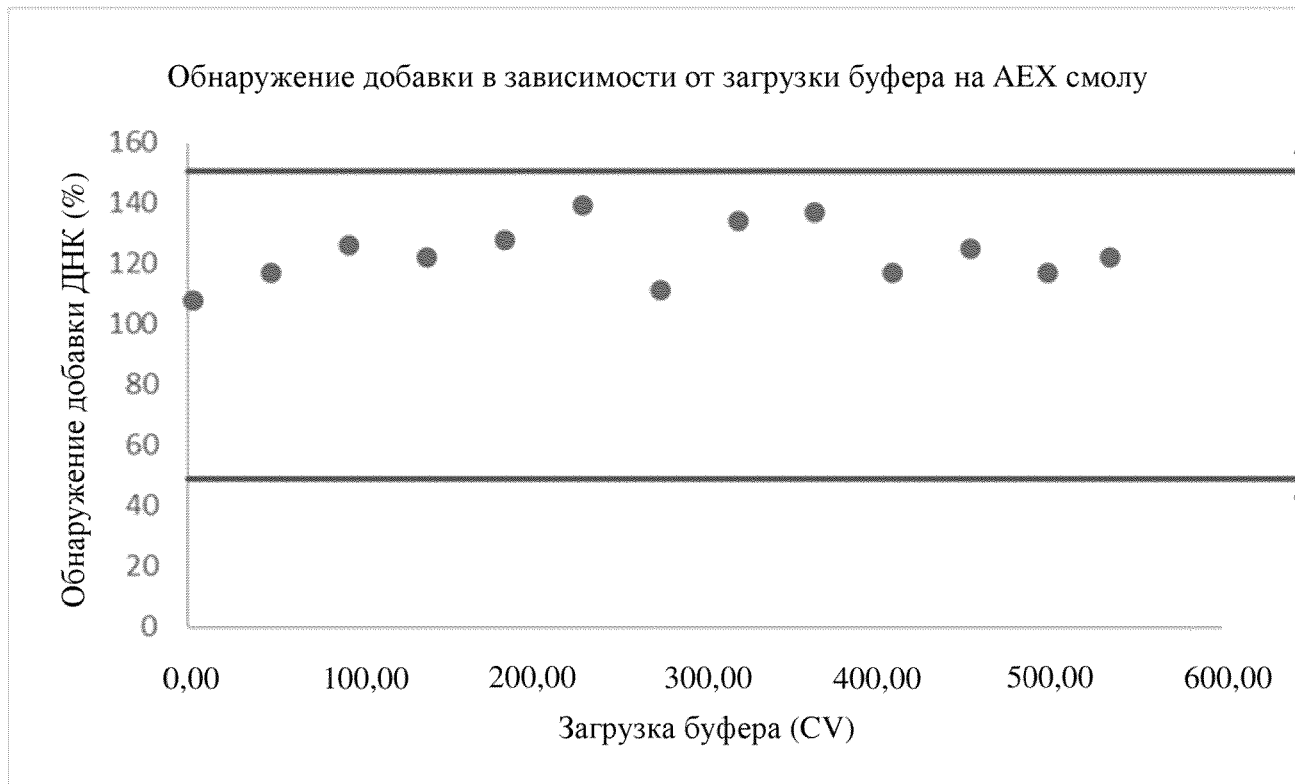
Обнаружение добавки в анализе в зависимости от загрузки буфера



Фигура 3



Фигура 4









Обнаружение добавки  
Приемлемый диапазон

Фигура 5

## PVS ПРЕДСТАВЛЯЕТ СОБОЙ АКТИВНЫЙ ИНГИБИТОРО В АНАЛИЗЕ ДНК

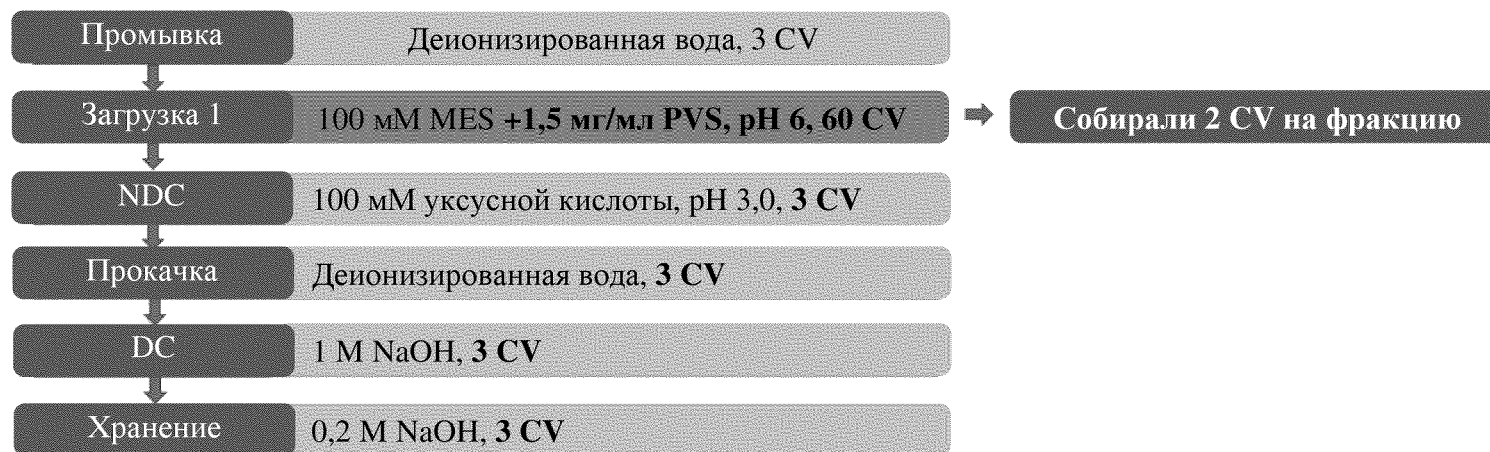
Стандарт PVS из серии разбавлений Sigma, вес/объем в % (30% исходная концентрация)

Название образца, вес/объем в %	Результат	Обнаружение добавки, %	Концентрация, мкг/мл
0,00160000		0	16
0,00032000		0	3,2
0,00006400		0	0,64
0,00001280		67	0,128
0,00000256		105	0,0256
0,00000051		95	0,00512

6/18

Фигура 6

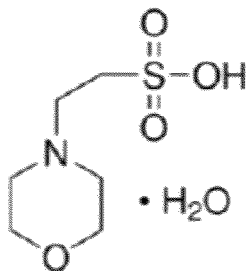
Смола: **Capto Adhere**      CV: **15,7** мл      Рабочая скорость потока: **250 см/ч.**



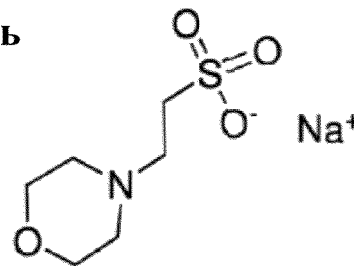
Фигура 7

a.

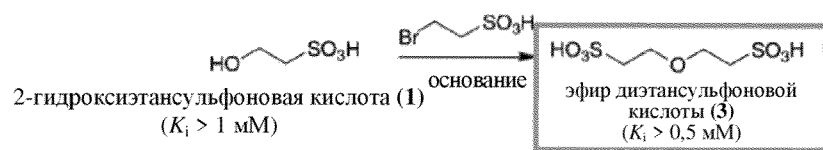
Гидрат MES  
(Кислотный)



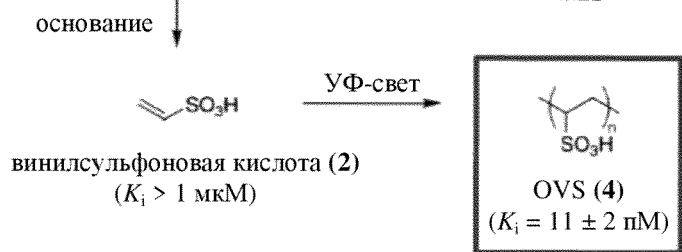
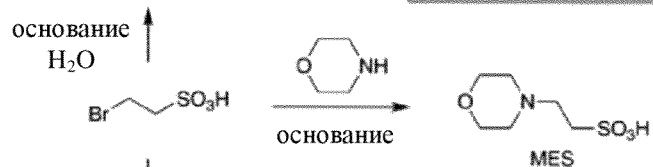
Натриевая соль  
MES  
(основная)



b.



Менее активный ингибитор РНК-ферментов



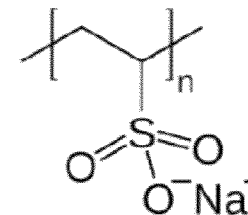
Полиэтиленсульфонат (PVS, поливинилсульфонат натрия)

Air Products Mw ~ 50000; Aldrich Mw ~ 170000

Олиговинилсульфоновая кислота (OVS)

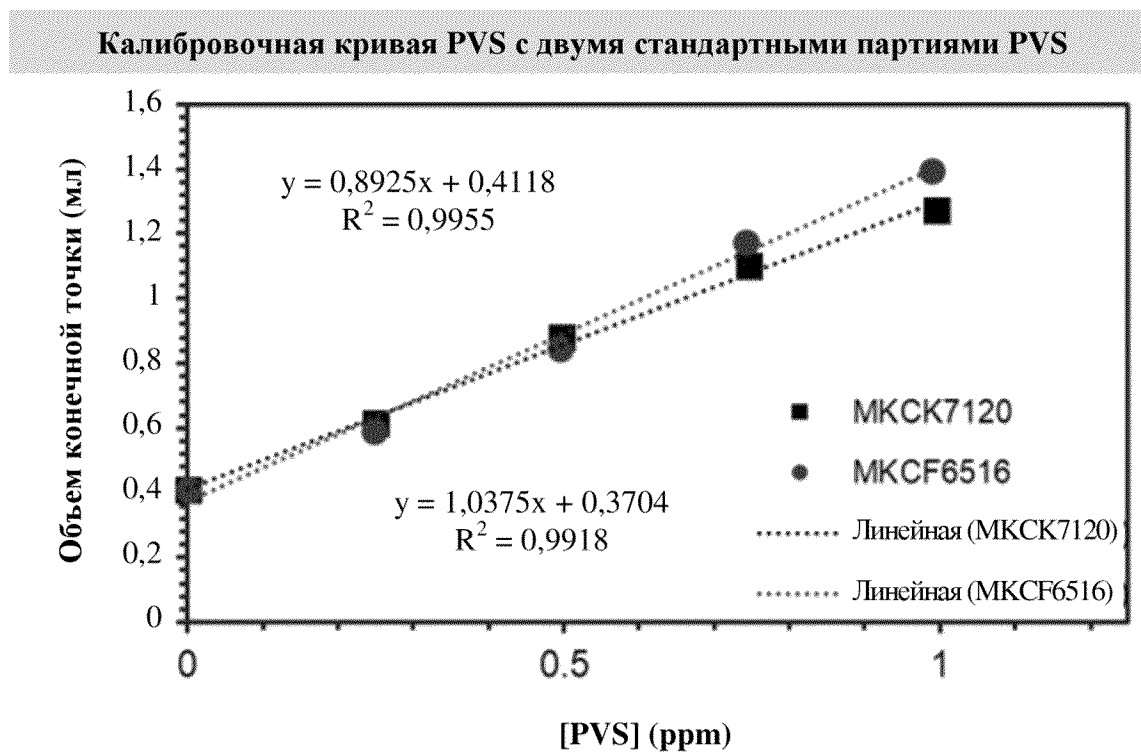
Polysciences Mr ~ 2000

Активный ингибитор РНК-ферментов



Фигура 8

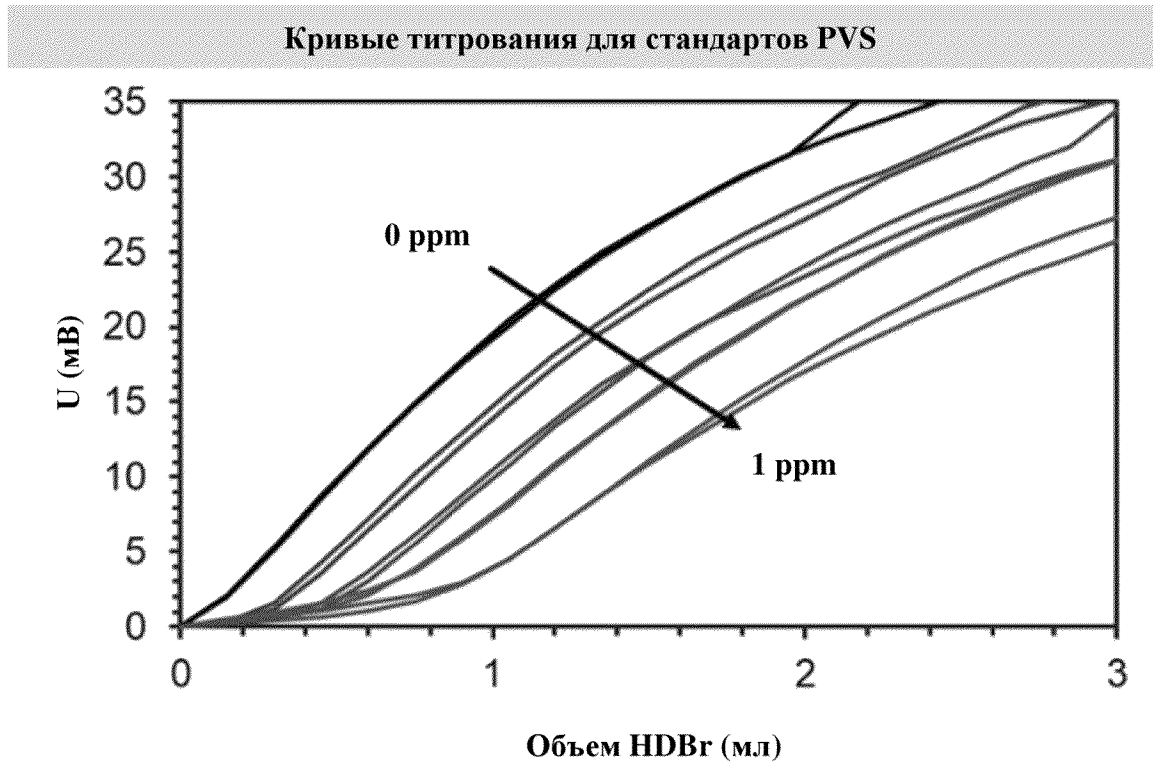
а.



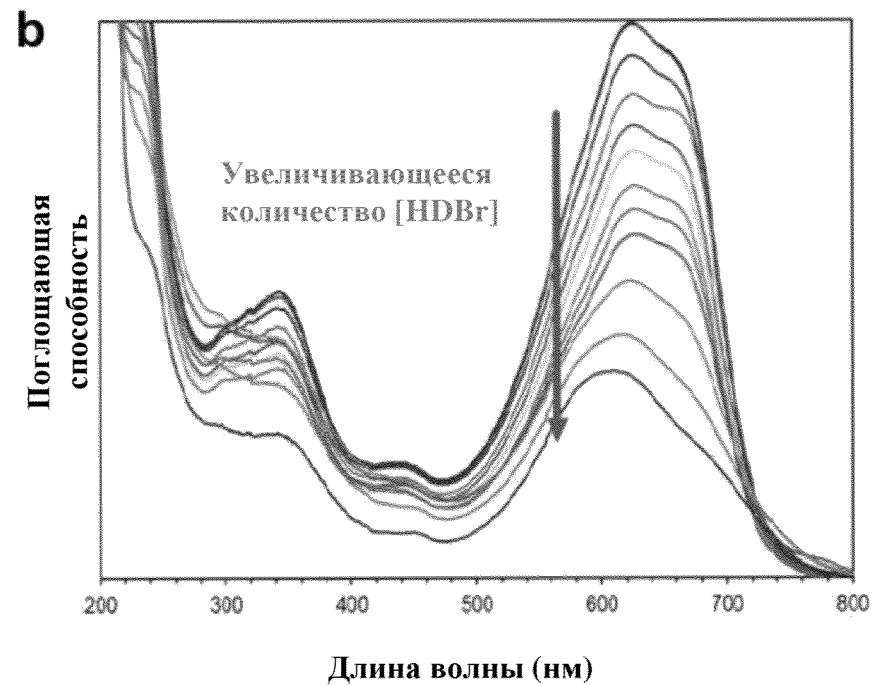
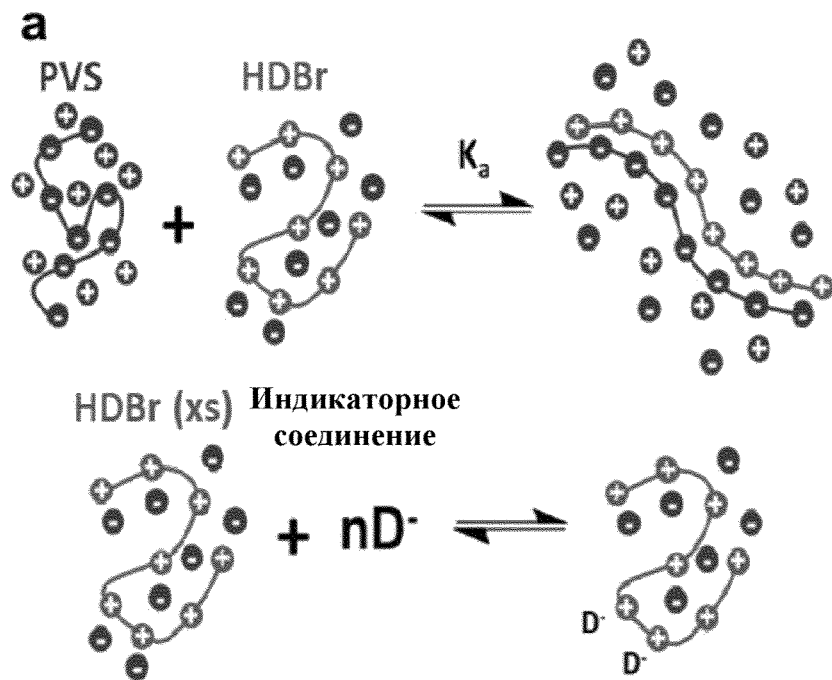
Фигура 9 (1/2)



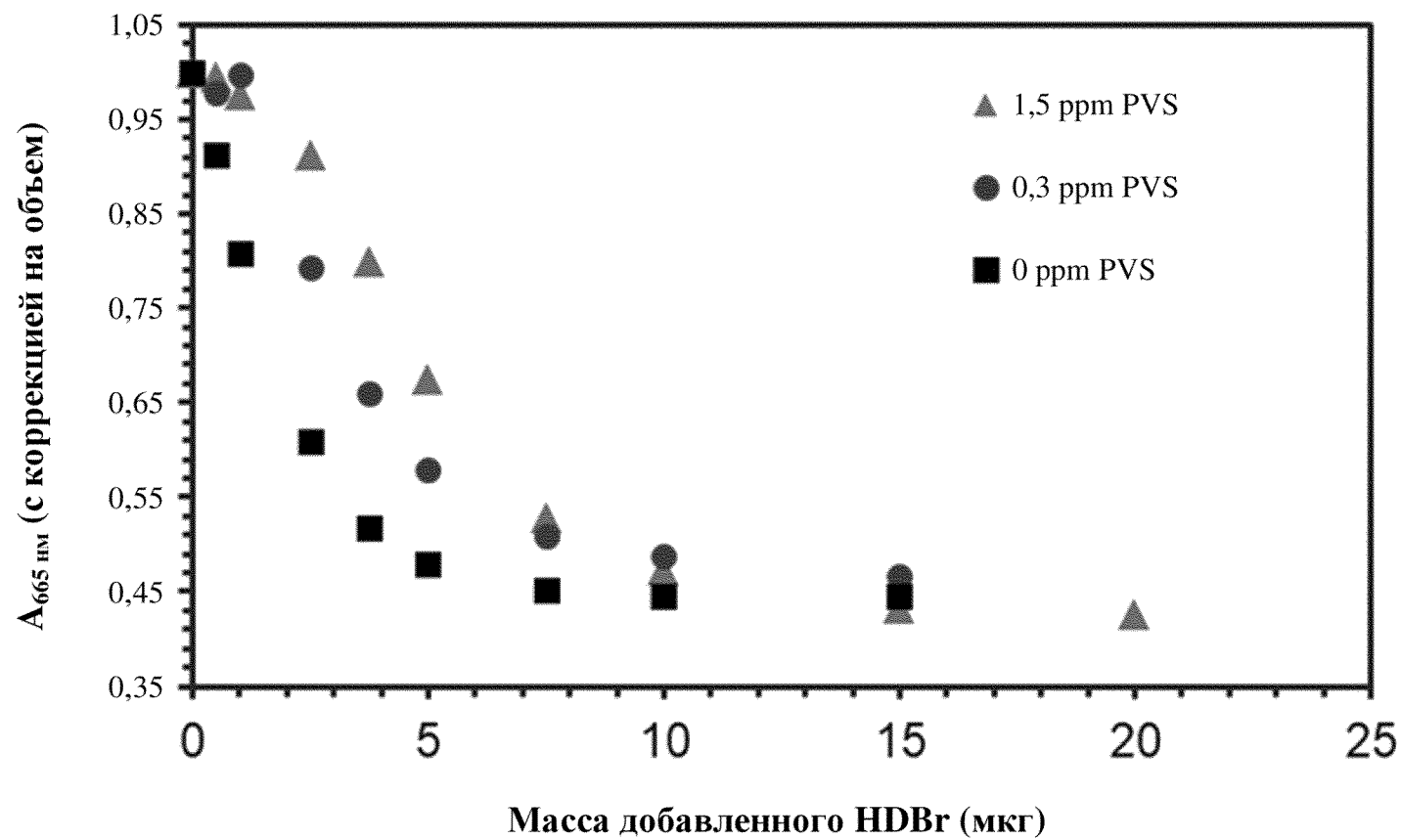
b.



Фигура 9 (2/2)

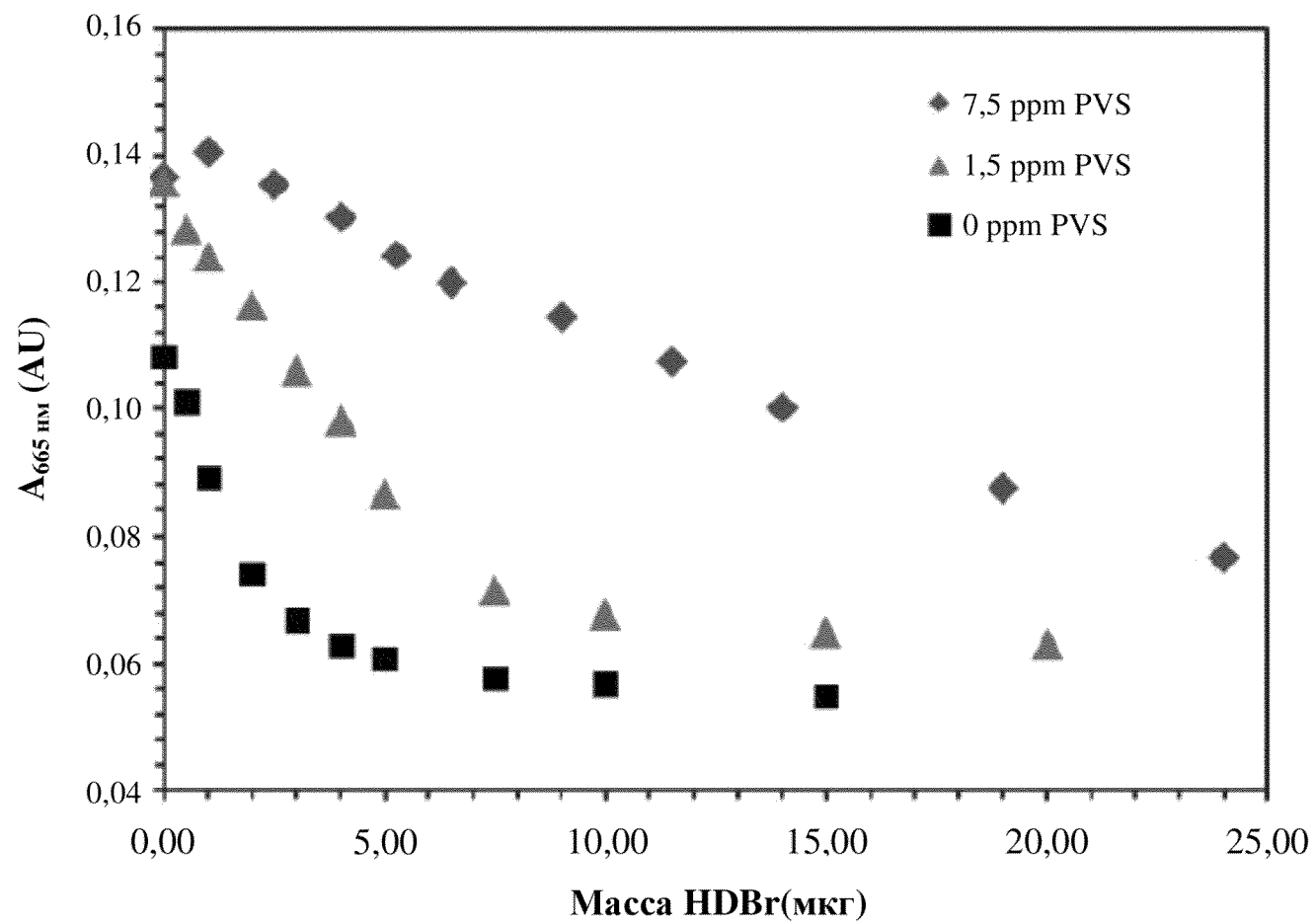


Фигура 10

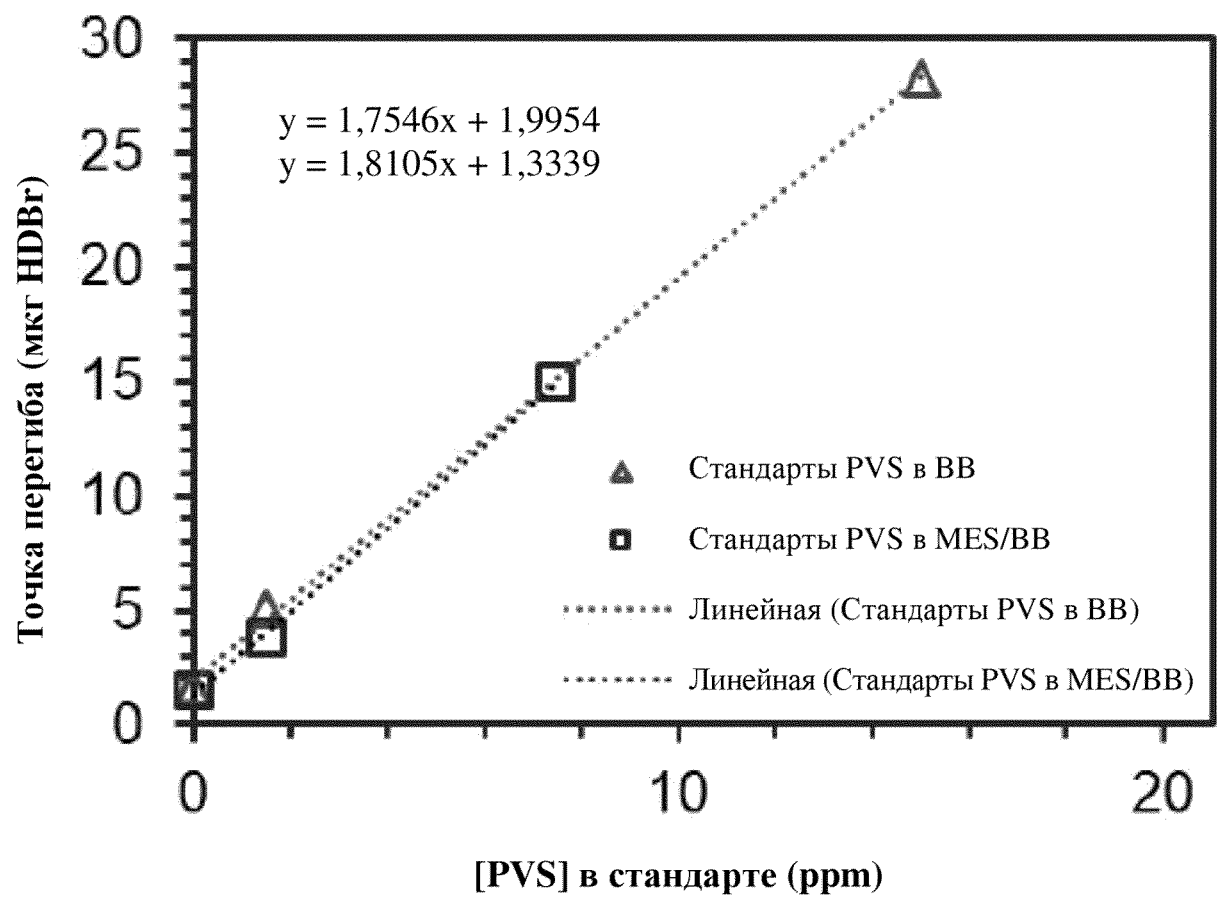


12/18

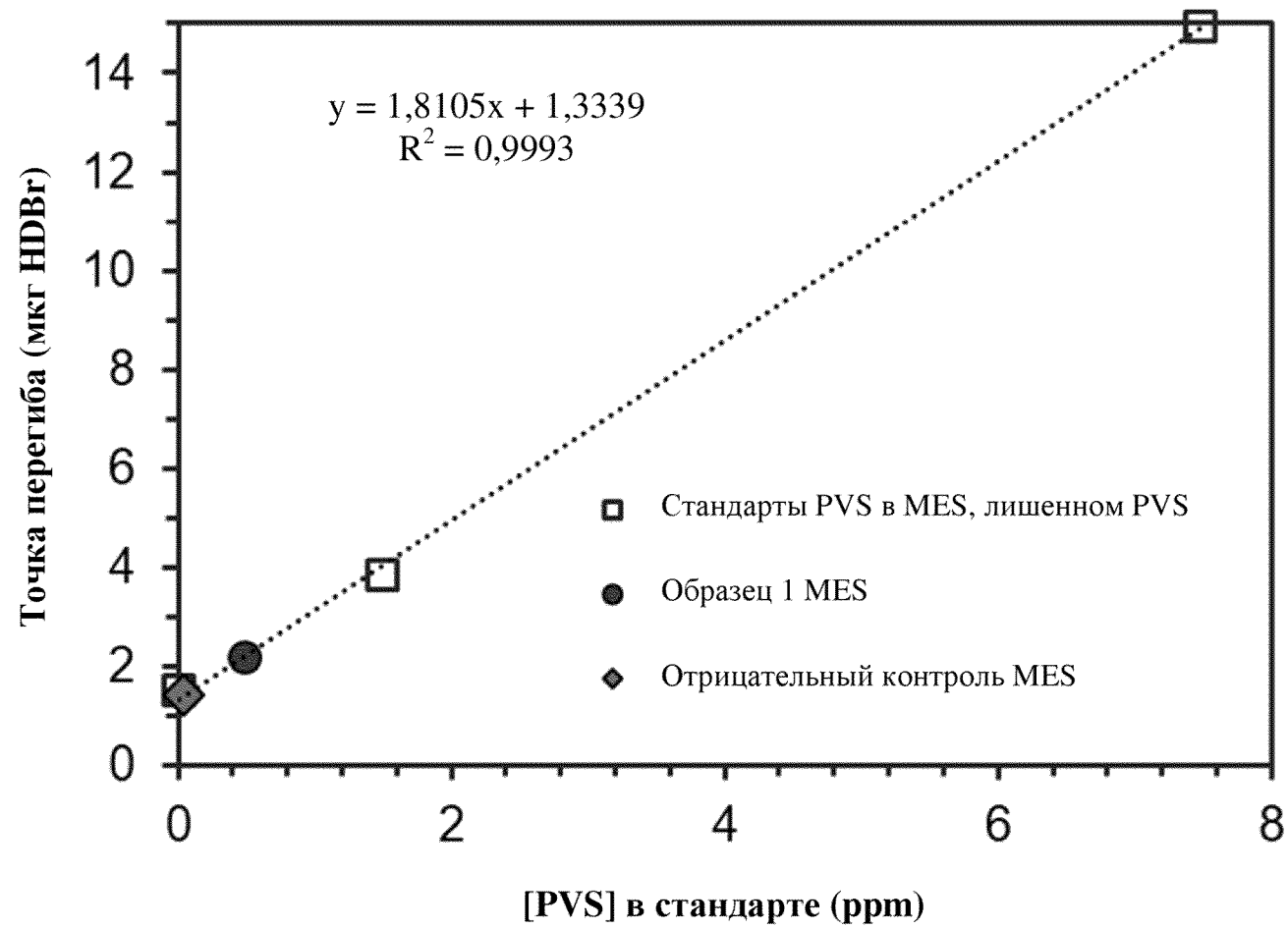
Фигура 11



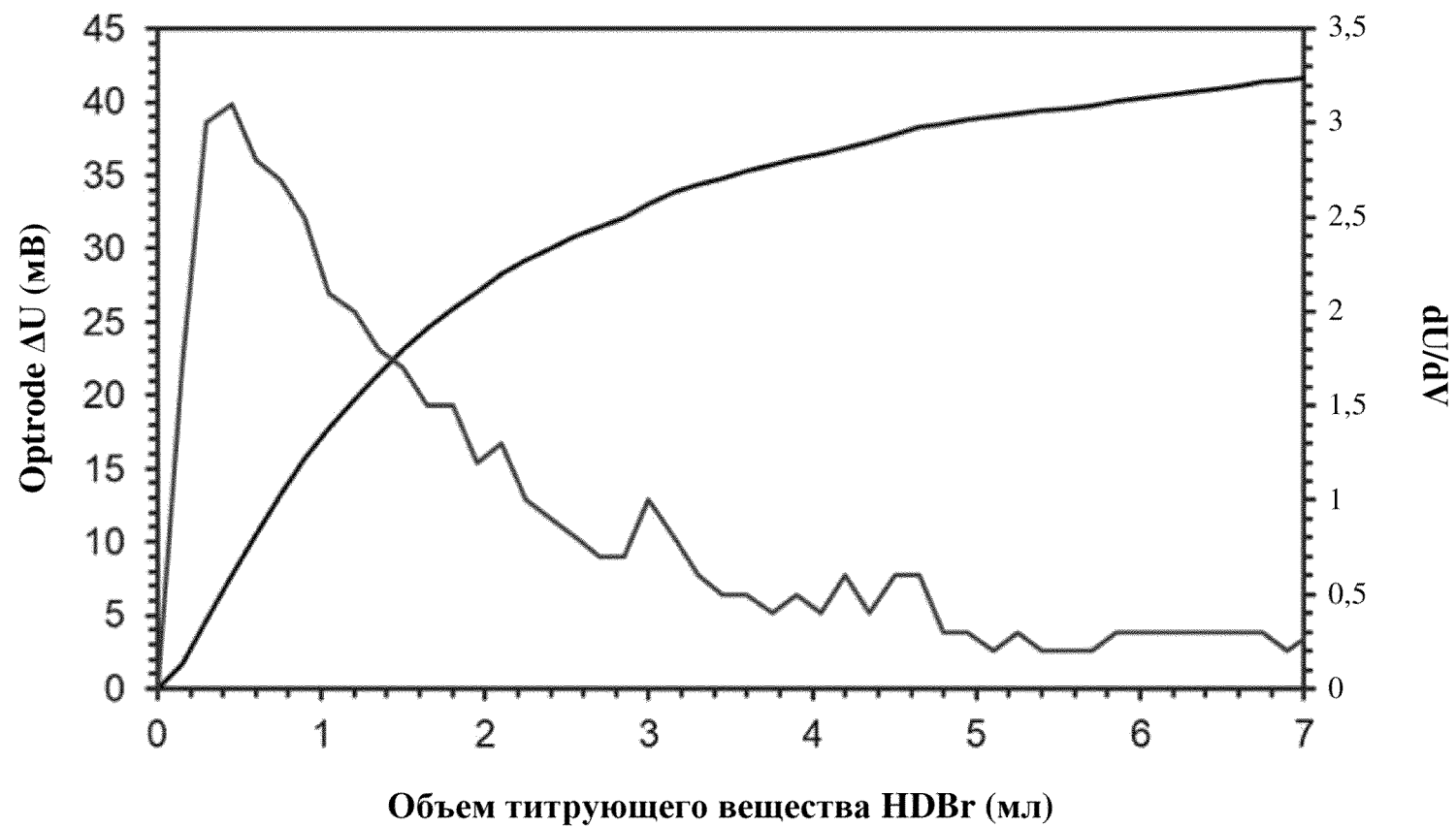
Фигура 12 (1/2)



Фигура 12 (2/2)



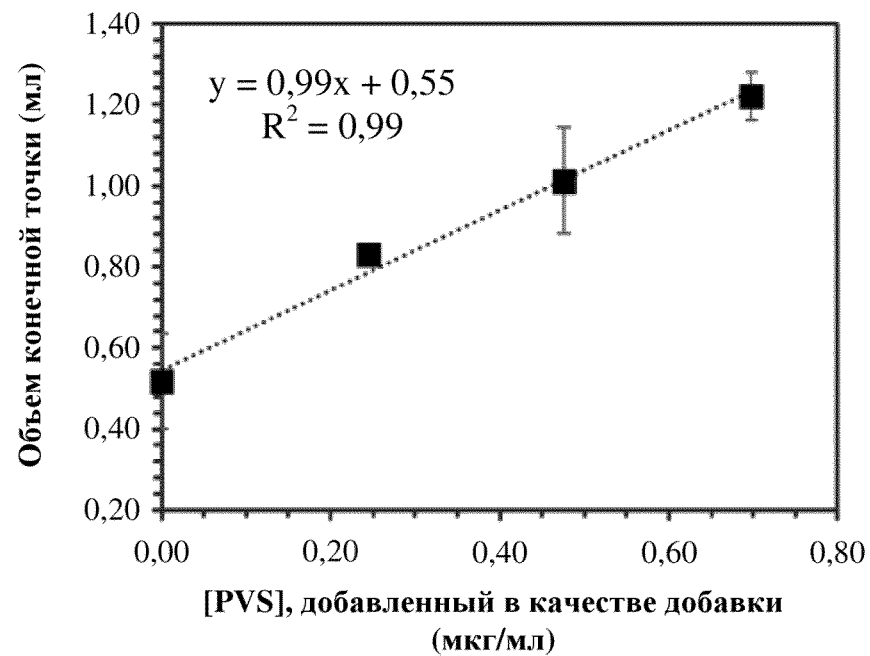
Фигура 13



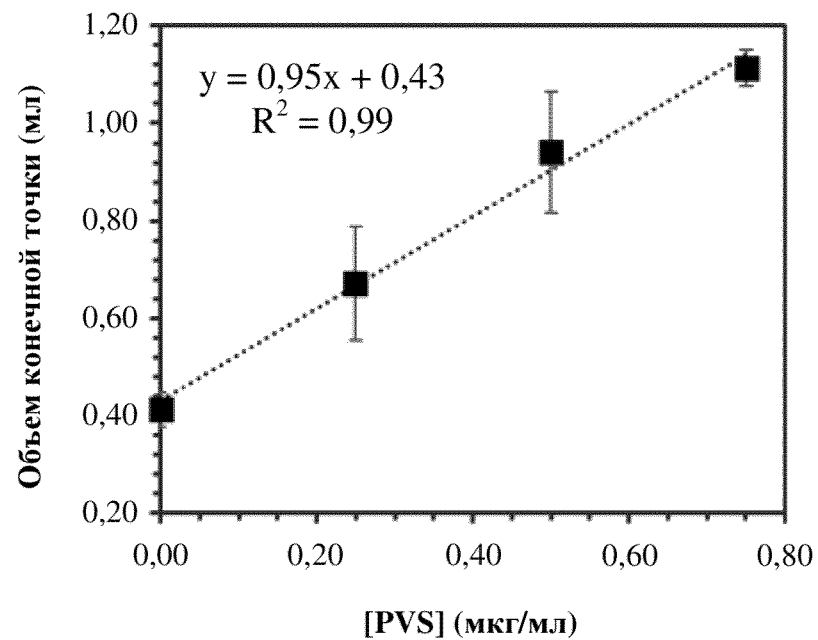
16/18

Фигура 14

**a.**



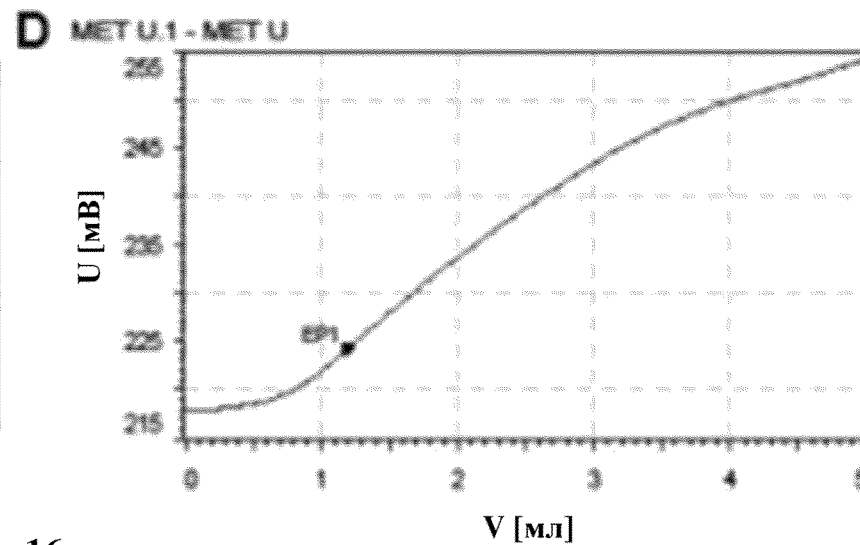
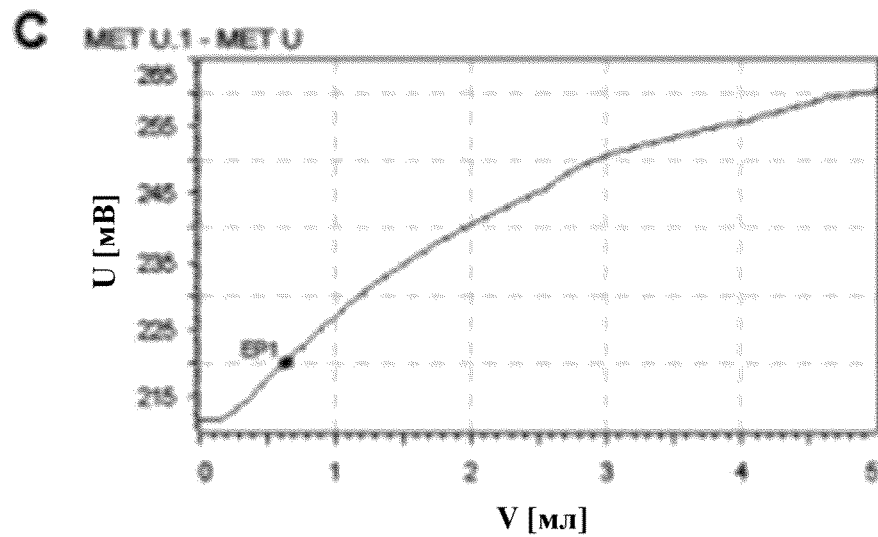
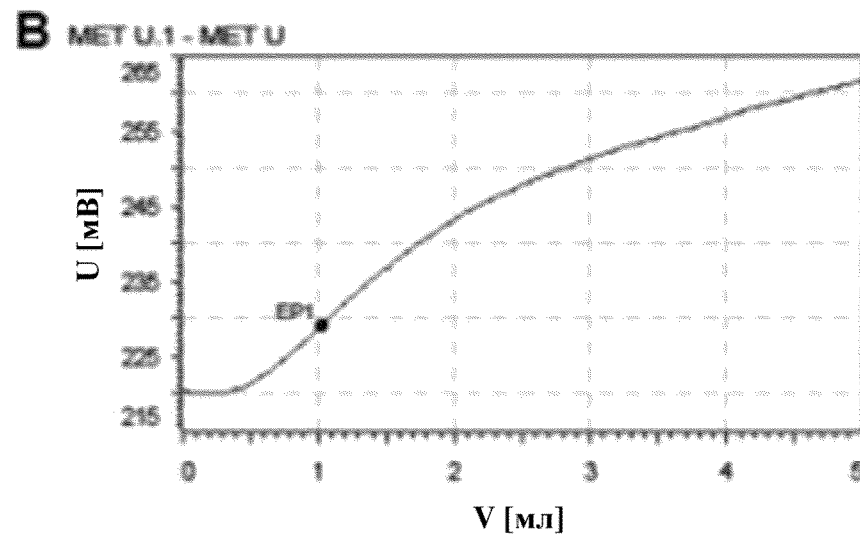
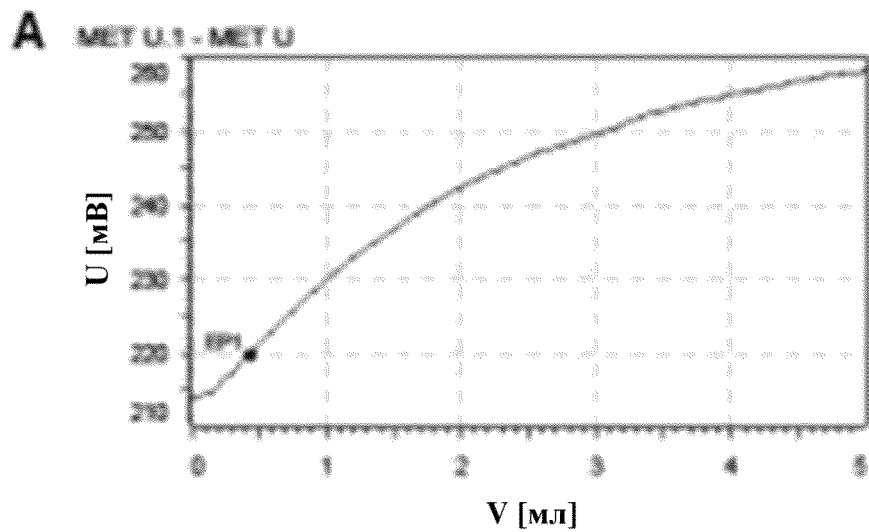
**b.**



17/18

Фигура 15





Фигура 16