

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392743** (13) **A2**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.12.29**

(51) Int. Cl. **G01N 30/40** (2006.01)  
**G01N 30/50** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2020.09.23**

---

(54) **СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ХРОМАТОГРАФИИ И РЕГЕНЕРАЦИИ**

---

(31) **62/905,033; 62/958,899**

(32) **2019.09.24; 2020.01.09**

(33) **US**

(62) **202290972; 2020.09.23**

(71) Заявитель:

**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Стэрс Роберт, Рейлли Джеймс,  
Маттила Джон, Уодсворт Саманта  
(US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Аспекты настоящего изобретения относятся к способу регенерации колонки для хроматографии гидрофобных взаимодействий, в которую вводят нагрузочную массу, включающему пропускание одного или более объемов колонки щелочного раствора через среды для гидрофобных взаимодействий в колонке, где щелочной раствор демонстрирует pH от приблизительно 10 до приблизительно 14 и электропроводность от 0,5 до приблизительно 10 мСм/см, где удаляют материал, связанный со средами для гидрофобных взаимодействий. В некоторых случаях щелочной раствор может включать гидроксид натрия в концентрации, например, приблизительно от 0,1 до 10 мМ.

---

**202392743**

**A2**

**A2**

**202392743**

## **СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ХРОМАТОГРАФИИ И РЕГЕНЕРАЦИИ**

### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[001] По настоящей заявке испрашивается приоритет по временной патентной заявке США № 62/905033, поданной 24 сентября 2019 года, и временной патентной заявке США № 62/958899, поданной 9 января 2020 года, обе из которых включены, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

[002] Настоящее изобретение относится к системам, способам и растворам для применения и регенерации хроматографических сред. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к системам и способам, включающим раствор для одностадийной регенерации сред для хроматографии гидрофобных взаимодействий.

### **ВВЕДЕНИЕ**

[003] Хроматография является широко используемой категорией способов, которые можно осуществлять для разделения компонентов смеси. Некоторые типы хроматография можно осуществлять в способах получения лекарственных препаратов (например, в разделении, сборе, выделении, очистке, заключительной очистке и т.д. молекулы для использования в лекарственном препарате). Для некоторых интересующих молекул (например, полипептидов, полирибонуклеотидов и т.д.) может потребоваться очистка от, например, материалов клеток-хозяев, в которых они продуцируются. С помощью разделения или очистки интересующих молекул с использованием хроматографии можно снижать, удалять или отделять белки клетки-хозяина (например, липазы), материалы клетки-хозяина (например, клеточный детрит) и другие примеси, которые в ином случае могут очищаться совместно с интересующей молекулой.

[004] Хроматография может включать использование неподвижной фазы, включая среды, сконфигурированные для способствования разделению компонентов подвижной фазы, пропускаемой через неподвижную фазу. Например, с помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий (НИС) можно разделять молекулы (например, полипептиды, полирибонуклеотиды и т.д.) по различиям в гидрофобности поверхности с использованием обратимого взаимодействия между молекулами и гидрофобными поверхностями среды для НИС в неподвижной фазе. На взаимодействия между молекулами и гидрофобными поверхностями сред для НИС могут влиять, например, соли в подвижном буфере. Нагрузочную массу, имеющую высокую концентрацию соли, можно вводить в устройство для НИС, где высокая концентрация соли способствует взаимодействию между средами для НИС в устройстве и молекулами в смеси. Затем растворы (например, буферы), имеющие сниженную ионную силу, можно пропускать через устройство для НИС для обратных гидрофобных взаимодействий между средами для НИС и молекулами. Молекулы, имеющие наименьшую гидрофобность, можно элюировать первыми, и молекулы, имеющие наибольшую гидрофобность, можно элюировать

последними, что требует большего снижения концентрации соли для обращения их гидрофобных взаимодействий со средами для НИС.

[005] В некоторых случаях среды для НИС можно повторно использовать для множества циклов хроматографии. Для поддержания эффективности, качества и чистоты сред для НИС, предотвращения контаминации между циклами, повышения долговечности сред для НИС, предотвращения накопления примесей и/или иного соответствия действующим стандартам или превышения их (например, действующих стандартов, являющихся внутренними для лаборатории или организации, или действующих стандартов, определенных регулирующей организацией) можно использовать способы регенерации сред для НИС для удаления остаточного материала из сред для НИС после проведения цикла НИС.

### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[006] Аспекты настоящего изобретения относятся к регенерации хроматографических колонок. В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу регенерации колонки для хроматографии гидрофобных взаимодействий, к которой прилаживают нагрузочную массу. Способ может включать пропускание одного или более объемов колонки щелочного раствора через среды для гидрофобных взаимодействий в колонке, где щелочной раствор демонстрирует рН от приблизительно 10 до приблизительно 14 и электропроводность от 0,5 мСм/см до приблизительно 10 мСм/см, где материал, связанный со средами для гидрофобных взаимодействий, удаляют. Щелочной раствор может включать один из гидроксида натрия, гидроксида калия, гидроксида кальция, гидроксида магния или Трис; щелочной раствор может демонстрировать электропроводность от приблизительно 0,8 мСм/см до приблизительно 1,6 мСм/см, и/или щелочной раствор может включать общую концентрацию растворенной соли от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ.

[007] После удаления материала, связанного со средами для гидрофобных взаимодействий, менее 1,0% нагрузочной массы может оставаться связанным со средами для гидрофобных взаимодействий в качестве остаточной массы. Материал, удаленный из сред, может включать белки клетки-хозяина, предполагаемые белки, липиды, полипептидные фрагменты, биомолекулы или нуклеиновые кислоты. Материал, удаленный из сред, в некоторых вариантах осуществления может не включать бактерии или грибы. В некоторых вариантах осуществления способ может не включать приведение сред для гидрофобных взаимодействий в контакт с хаотропным средством или органическим растворителем. Стадия пропускания одного или более объемов колонки щелочного раствора через среды для гидрофобных взаимодействий в колонке занимает от приблизительно 10 минут до приблизительно 1 часа.

[008] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу регенерации хроматографической колонки, в которую вводят нагрузочную массу, включающему пропускание одного или более объемов колонки щелочного раствора через среды в колонке, где щелочной раствор включает гидроксид натрия в общей растворенной

концентрации от приблизительно 0,5 мМ до приблизительно 50 мМ, где удаляют материал, связанный со средами. Среда могут включать матрицу, содержащую лиганды, содержащие от 2 до 10 углеводов в алифатической или ароматической конфигурации. Лиганды могут присутствовать в средах с плотностью от приблизительно 20 до приблизительно 30 мкмоль на мл среды. В других примерах среда может не включать лиганды, включающие 30 или более углеводов; хроматографическую колонку можно не использовать в хроматографии смешанного режима; и/или среда может включать матрицу, содержащую перекрестно-сшитую агарозу и фениловые лиганды. В других примерах способ может не включать приведение среды в контакт со спиртом, этиленгликолем или хлоридом натрия. Способ может дополнительно включать после пропускания одного или более объемов колонки щелочного раствора через колонку пропускание одного или более объемов колонки хаотропного средства через колонку, где хаотропное средство является одним из 6 Н гидрохлорида гуанидина или 8 Н мочевины. Способ может дополнительно включать приведение колонки в контакт с буфером для хранения, содержащим гидроксид натрия в общей растворенной концентрации от приблизительно 0,05 М до приблизительно 0,15 М. Способ также может включать введение первой нагрузочной массы в хроматографическую колонку и введение второй нагрузочной массы в хроматографическую колонку, где способ не включает очистку хроматографической колонки.

[009] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу идентификации концентрации щелочного раствора для раствора для регенерации колонки для хроматографии гидрофобных взаимодействий, включающему пропускание объема первого раствора через среды для гидрофобных взаимодействий в колонке, где первый раствор включает воду, и концентрация щелочного раствора начинается с приблизительно 0 Н и повышается с приблизительно постоянной скоростью до максимальной концентрации; пропускание объема второго раствора через среды для гидрофобных взаимодействий, где второй раствор включает воду, и концентрация щелочного раствора начинается с максимальной концентрации и снижается с приблизительно постоянной скоростью до приблизительно 0 Н; и идентификацию части первого или второго раствора, которая при пропускании через среды для гидрофобных взаимодействий удаляет материал, связанный со средами для гидрофобных взаимодействий. Щелочной раствор может включать гидроксид натрия, и максимальная концентрация может составлять приблизительно 1 Н. В других примерах объем первого раствора и объем второго раствора составляют по приблизительно 20 объемов колонки.

[010] В другом аспекте настоящее изобретение включает прогнозирование, оценку или сравнение пригодности и регенерации различных хроматографических смол. В некоторых примерах способ оценки способа хроматографии включает: в лунке фильтровального планшета добавление нагрузочной массы, содержащей целевую молекулу, к объему хроматографических сред и сбор элюата из лунки фильтровального планшета, где нагрузочная масса демонстрирует характерный для способа рН; добавление

множества аликвот буфера в хроматографические среды для получения элюента из хроматографических сред, где буфер демонстрирует рН буфера, и концентрация космотропной соли снижается линейно в последовательности множества аликвот, и где первое количество целевой молекулы входит в элюат и элюент в комбинации; добавление второго раствора в хроматографическим средам для выделения второго количества целевой молекулы из хроматографических сред; и добавление хаотропного средства в хроматографические среды для выделения третьего количества целевой молекулы из хроматографических сред.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

[011] На сопутствующих чертежах, включенных как часть настоящего описания, проиллюстрированы различные примеры вариантов осуществления, и вместе с описанием они предназначены для объяснения принципов описываемых вариантов осуществления. Любые признаки варианта осуществления или примера, представленные в настоящем описании (например, композиции, состава, способа и т.д.), можно комбинировать с любым другим вариантом осуществления или примером, и все такие комбинации включены в настоящее изобретение. Кроме того, описываемые системы и способы никоим образом не ограничены каким-либо отдельным их аспектом или вариантом осуществления или какими-либо комбинациями или пермутациями таких аспектов и вариантов осуществления. Для краткости, некоторые пермутации и комбинации не обсуждены и/или не проиллюстрированы в настоящем описании отдельно.

[012] На фиг. 1 в виде рабочей схемы показан пример способа по аспектам настоящего изобретения.

[013] На фиг. 2 показан блот-анализ хроматографических колонок в различных состояниях эксплуатации по аспектам настоящего изобретения.

[014] На фиг. 3 показан блот-анализ хроматографических колонок в различных состояниях эксплуатации по аспектам настоящего изобретения.

[015] На фиг. 4 показано наложение хроматографических данных для множества способов по аспектам настоящего изобретения.

[016] На фиг. 5 показан блот-анализ хроматографических колонок в различных состояниях эксплуатации по аспектам настоящего изобретения.

[017] На фиг. 6 показано сравнение колонки, содержащей среды для гидрофобных взаимодействий, подвергнутые множеству циклов хроматографии гидрофобных взаимодействий, и колонки, содержащей неиспользованные среды для гидрофобных взаимодействий, по аспектам настоящего изобретения.

[018] На фиг. 7А и 7В показаны хроматограммы способов регенерации после хроматография гидрофобных взаимодействий, способов, включающих использование полученной обратным осмосом деионизированной воды, по аспектам настоящего изобретения.

[019] На фиг. 8А и 8В показаны дополнительные хроматограммы способов регенерации после хроматографии гидрофобных взаимодействий.

[020] На фиг. 9 показана хроматограмма способа регенерации с использованием раствора гуанидина HCl по аспектам настоящего изобретения.

[021] На фиг. 10А показана хроматограмма способа, включающего множество растворов для регенерации по аспектам настоящего изобретения. На фиг. 10В показано увеличенное изображение части хроматограммы с фиг. 10А.

[022] На фиг. 11 показана хроматограмма способа, в котором растворы гидроксида натрия, имеющие постепенно повышающуюся/постепенно снижающуюся концентрацию, вводят в колонку по аспектам настоящего изобретения.

[023] На фиг. 12 показаны наложенные хроматограммы множества способов регенерации колонок двумя растворами по аспектам настоящего изобретения.

[024] Фиг. 13А и 13В являются визуальным представлением статистических анализов различных пиков хроматограмм, на которых показаны способы регенерации по аспектам настоящего изобретения.

[025] На фиг. 14 показаны наложенные хроматограммы множества способов регенерации колонок двумя растворами, включающими гидроксид натрия или хлорид натрия и гуанидин HCl, по аспектам настоящего изобретения.

[026] На фиг. 15 показаны три хроматографические колонки, в которые вводят растворы, по аспектам настоящего изобретения.

[027] На фиг. 16 показан график площадей пиков раствора для стрипирования с гуанидином HCl как функции концентрации гидроксида натрия по аспектам настоящего изобретения.

[028] На фиг. 17 и 18 показаны хроматограммы контрольного способа регенерации и экспериментального способа регенерации, каждый из которых включает множество растворов для регенерации, по аспектам настоящего изобретения.

[029] На фиг. 19 показана серия хроматограмм для экспериментов по хроматографии гидрофобных взаимодействий для очистки разных моноклональных антител по аспектам настоящего изобретения.

[030] На фиг. 20А-20С показаны хроматограммы, полученные с использованием способов, включающих три разные среды для хроматографии гидрофобных взаимодействий по аспектам настоящего изобретения.

[031] На фиг. 21А и 21В показаны графики граничных функций, полученных при анализе данных, полученных во время высокопроизводительного скрининга и полномасштабных хроматографических экспериментов по аспектам настоящего изобретения.

[032] На фиг. 22 показан пример динамической прогностической модели по аспектам настоящего изобретения.

[033] На фиг. 23А-26С показаны хроматограммы для первой целевой молекулы, полученные с использованием множества сред для хроматографии гидрофобных взаимодействий, параметров рН и растворов для стрипирования по аспектам настоящего изобретения.

[034] На фиг. 27A-28D показаны хроматограммы для второй целевой молекулы, полученные с использованием множества сред для хроматографии гидрофобных взаимодействий, параметров pH и растворов для стрипирования по аспектам настоящего изобретения.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[035] Если не указано иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, обладают значением, общепринято понятным специалисту в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Хотя в практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно использовать любые подходящие способы и материалы (например, схожие или эквивалентные представленным в настоящем описании), далее описаны конкретные способы. Все упомянутые публикации включены, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки.

[036] В рамках изобретения термины "содержит", "содержащий" или любые другие их варианты предназначены для охвата неисключительного включения, таким образом, что способ, изделие или устройство, содержащее список элементов, не включает только эти элементы, но может включать другие элементы, не указанные конкретно или не свойственные такому способу, изделию или устройству. Термин "пример" используют в значении "примера", а не "идеала". В случае терминов "например", "такой как" и их грамматических эквивалентов, предполагают, что за ними следует фраза "в качестве неограничивающих примеров", если четко не указано иное.

[037] В рамках изобретения термин "приблизительно" предназначен для учета колебаний из-за экспериментальной ошибки. При использовании в отношении числовых значений, термин "приблизительно" может свидетельствовать о колебаниях  $\pm 5\%$  относительно описываемого числового значения, если не указано иное колебание. В рамках изобретения формы в единственном числе включают ссылки на множественное число, если контекст четко не указывает на иное. Кроме того, все диапазоны следует понимать включающими конечные точки, например, диапазон от 1 сантиметра (см) до 5 см будет включать длины 1 см, 5 см и все расстояния от 1 см до 5 см.

[038] Следует отметить, что все числовые значения, представленные в настоящем описании (включая все описываемые значения, пределы и диапазоны) могут иметь колебания  $\pm 5\%$  относительно описываемого числового значения, если не указано иное колебание.

[039] В рамках изобретения термин "полипептид" относится к любому аминокислотному полимеру, содержащему более приблизительно 20 аминокислот, ковалентно связанных посредством амидных связей. Белки содержат одну или более аминокислотных полимерных цепей (например, полипептидов). Таким образом, полипептид может являться белком, и белок может содержать множество полипептидов с образованием единой функционирующей биомолекулы.

[040] Посттрансляционные модификации могут модифицировать или изменять структуру полипептида. Например, дисульфидные мостики (например, S-S-связи между

остатками цистеина) могут образовываться в некоторых белках посттрансляционно. Некоторые дисульфидные мостики необходимы для правильной структуры, функции и взаимодействия полипептидов, иммуноглобулинов, белков, кофакторов, субстратов и т.п. В дополнение к образованию дисульфидной связи, белки могут подвергаться другим посттрансляционным модификациям, таким как липидирование (например, миристоилирование, пальмитоилирование, фарнезоилирование, геранилгеранилирование и образование гликозилфосфатидилинозитолового (GPI) якоря), алкилирование (например, метилирование), ацилирование, амидирование, гликозилирование (например, добавление гликозильных групп к аргинину, аспарагину, цистеину, гидроксизину, серину, треонину, тирозину и/или триптофану), и фосфорилирование (т.е. добавление фосфатной группы к серину, треонину, тирозину и/или гистидину). Посттрансляционные модификации могут влиять на гидрофобность, электростатические свойства поверхности или другие свойства, определяющие взаимодействия между поверхностями, в которых участвует полипептид.

[041] В рамках изобретения термин "белок" включает биотерапевтические белки, рекомбинантные белки, используемые в исследованиях или терапии, белки-ловушки и другие Fc-слитые белки, химерные белки, антитела, моноклональные антитела, антитела человека, биспецифические антитела, фрагменты антител, антитело-подобные молекулы, нанотела, рекомбинантные химеры антител, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т.п. Интересующий белок (POI) может включать любой полипептид или белок, который желательно выделить, очистить или иначе получить. POI может включать полипептиды, продуцируемые клеткой, включая антитела.

[042] В рамках изобретения термин "антитело" включает иммуноглобулины, состоящие из четырех полипептидных цепей: двух тяжелых цепей (H) и двух легких цепей (L), соединенных друг с другом дисульфидными связями. Как правило, антитела имеют молекулярную массу более 100 кДа, например, от 130 кДа до 200 кДа, такую как приблизительно 140 кДа, 145 кДа, 150 кДа, 155 кДа или 160 кДа. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в настоящем описании как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в настоящем описании как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен, CL. Области VH и VL можно дополнительно разделять на области гипервариабельности, обозначаемые как определяющие комплементарность области (CDR), перемежающиеся с областями, являющиеся более консервативными, обозначаемыми как каркасные области (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (CDR тяжелой цепи можно сокращенно обозначать как HCDR1, HCDR2 и HCDR3; CDR легкой цепи можно сокращенно обозначать как LCDR1, LCDR2 и LCDR3).



[043] Класс иммуноглобулинов, названный иммуноглобулином G (IgG), например, распространен в сыворотке человека и содержит четыре полипептидные цепи - две легкие цепи и две тяжелые цепи. Каждая легкая цепь связана с одной тяжелой цепью через цистиновую дисульфидную связь, и две тяжелые цепи связаны друг с другом через две цистиновые дисульфидные связи. Другие классы иммуноглобулинов человека включают IgA, IgM, IgD и IgE. В случае IgG существует четыре подкласса: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Каждый подкласс отличается своими константными областями, и в результате, может иметь разные эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления, представленных в настоящем описании, POI может содержать целевой полипептид, включая IgG. В по меньшей мере одном из вариантов осуществления целевой полипептид содержит IgG4.

[044] В рамках изобретения термин "антитело" также включает антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антител. В рамках изобретения термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п. включают любой природный, ферментативно получаемый, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, специфически связывающийся с антигеном с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получать, например, из полных молекул антител любыми подходящими стандартными способами, такими как протеолитическое расщепление или рекомбинантные способы генетической инженерии, включающие манипуляцию с ДНК и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и, необязательно, константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, например, в коммерческих источниках, библиотеках ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать и обрабатывать химически или способами молекулярной биологии, например, для расположения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для встраивания кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или делеции аминокислот и т.д.

[045] Целевые молекулы (такие как целевые полипептиды/антитела) можно получать с использованием рекомбинантных клеточных систем продукции, таких как бакуловирусная система насекомых, дрожжевые системы (например, *Pichia* sp.) или системы млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1). Термин "клетка" включает любую клетку, подходящую для экспрессии рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Клетки включают прокариоты и эукариоты (одноклеточные или многоклеточные), бактериальные клетки (например, штаммы *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. и т.д.), клетки микобактерий, клетки грибов, дрожжевые клетки (например, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica* и т.д.), растительные клетки, клетки насекомых (например, SF-9, SF-21, инфицированные бакуловирусом клетки насекомых, *Trichoplusia ni* и т.д.), не принадлежащие человеку клетки животных, клетки человека или слитые клетки, такие

как, например, гибридомы или квадромы. В некоторых вариантах осуществления клетка может являться клеткой человека, мартышкообразных обезьян, человекообразных обезьян, хомяка, крысы или мыши. В некоторых вариантах осуществления клетка может являться эукариотической и может быть выбрана из следующих клеток: CHO (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), клеток сетчатки, Vero, CV1, клеток почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (например, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (эпидермальных), CV-1, U937, 3T3, L-клеток, клеток C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, клеток Сертоли, клеток BRL 3A, клеток HT1080, миеломных клеток, опухолевых клеток и линии клеток, полученной из указанных выше клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка может содержать один или более вирусных генов, например, клетка сетчатки, экспрессирующая вирусный ген (например, клетка PER.C6™).

[046] Термин "целевая молекула" в настоящем описании можно использовать для обозначения целевых полипептидов (например, антител, фрагментов антител или других белков или фрагментов белков) или других молекул, предназначенных для продукции, выделения, очистки и/или включения в лекарственные препараты (например, аденоассоциированные вирусы (AAV) или другие молекулы для терапевтического использования). Хотя способы по настоящему изобретению могут относиться к целевым полипептидам, их можно использовать в отношении других целевых молекул. AAV, например, можно получать подходящими способами (например, посредством глубоинной фильтрации, аффинной хроматографии и т.п.), и смеси, включая AAV, можно подвергать способам по настоящему изобретению. Смеси, включая AAV, можно подвергать дополнительным способам (например, удалению "пустых кассет" или AAV, несодержащих целевую последовательность) до или после осуществления одного или более способов по настоящему изобретению.

[047] В некоторых вариантах осуществления целевой молекулой является антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетратело, Fab-фрагмент или F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4. В одном из вариантов осуществления антитело является антителом IgG1. В одном из вариантов осуществления антитело является антителом IgG2. В одном из вариантов осуществления антитело является антителом IgG4. В одном из вариантов осуществления антитело является химерным антителом IgG2/IgG4. В одном из вариантов осуществления антитело является химерным антителом IgG2/IgG1. В одном из вариантов осуществления антитело является химерным антителом IgG2/IgG1/IgG4.

[048] В некоторых вариантах осуществления целевая молекула (например, антитело) выбрана из группы, состоящей из антитела против белка программируемой гибели клеток 1 (например, антитела против PD1, описанного в публикации патентной

заявки США № US2015/0203579A1), антитела против лиганда белка программируемой гибели клеток-1 (например, антитела против PD-L1, описанного в публикации патентной заявки США № US2015/0203580A1), антитела против DLL4, антитела против ангиопоэтина 2 (например, антитела против ANG2, описанного в патенте США № 9402898), антитела против ангиопоэтин-подобного белка 3 (например, антитела против AngPt13, описанного в патенте США № 9018356), антитела против рецептора фактора роста тромбоцитов (например, антитела против PDGFR, описанного в патент США № 9265827), антитела против рецептора пролактина (например, антитела против PRLR, описанного в патент США № 9302015), антитела против компонента комплемента 5 (например, антитела против C5, описанного в публикации патентной заявки США № US2015/0313194 A1), антитела против ФНО, антитела против рецептора эпидермального фактора роста (например, антитела против EGFR, описанного в патенте США № 9132192, или антитела против EGFRvIII, описанного в публикации патентной заявки США № US2015/0259423 A1), антитела против пропротеиновой конвертазы субтилизин/кексин-9 (например, антитела против PCSK9, описанного в патенте США № 8062640 или публикации патентной заявки США № US2014/0044730 A1), антитела против фактора роста и дифференцировки-8 (например, антитела против GDF8, также известного как антитело против миостатина, описанного в патентах США №№ 8871209 или 9260515), антитела против рецептора глюкагона (например, антитела против GCGR, описанного в публикациях патентной заявки США №№ US2015/0337045 A1 или US2016/0075778 A1), антитела против VEGF, антитела против IL1R, антитела против рецептора интерлейкина 4 (например, антитела против IL4R, описанного в публикации патентной заявки США № US2014/0271681 A1 или патентах США №№ 8735095 или 8945559), антитела против рецептора интерлейкина 6 (например, антитела против IL6R, описанного в патентах США №№ 7582298, 8043617 или 9173880), антитела против интерлейкина 33 (например, антитела против ИЛ-33, описанного в публикациях патентной заявки США №№ US2014/0271658 A1 или US2014/0271642 A1), антитела против респираторно-синцитиального вируса (например, антитела против RSV, описанного в публикации патентной заявки США № US2014/0271653 A1), антитела против кластера дифференцировки 3 (например, антитела против CD3, описанного в публикациях патентных заявок США №№ US2014/0088295 A1 и US20150266966 A1 и в заявке США № 62/222605), антитела против кластера дифференцировки 20 (например, антитела против CD20, описанного в публикациях патентных заявок США №№ US2014/0088295 A1 и US20150266966 A1 и в патенте США № 7879984), антитела против кластера дифференцировки 48 (например, антитела против CD48, описанного в патенте США № 9228014), антитела против Fel d1 (например, описанного в патент США № 9079948), антитела против вируса ближневосточного респираторного синдрома (например, антитела против MERS), антитела против вируса Эбола (например, REGN-EB3 от Regeneron), антитела против CD19, антитела против CD28, антитела против ИЛ-1, антитела против ИЛ-2, антитела против ИЛ-3, антитела против ИЛ-4, антитела против ИЛ-5, антитела

против ИЛ-6, антитела против ИЛ-7, антитела против Erb3, антитела против вируса Зика, антитела против белка гена активации лимфоцитов 3 (например, антитела против LAG3 или антитела против CD223) и антитела против активина А. Каждый патент США и патентная публикация США, упомянутые в этом абзаце, в полном объеме включены в настоящее описание в качестве ссылки.

[049] В некоторых вариантах осуществления целевая молекула (например, биспецифическое антитело) выбрана из группы, состоящей из биспецифического антитела против CD3/против CD20, биспецифического антитела против CD3/против муцина 16 и биспецифического антитела против CD3/против простатспецифического мембранного антигена. В некоторых вариантах осуществления целевая молекула выбрана из группы, состоящей из алирокумаба, сарилумаба, фасинумаба, несвакумаба, дупилумаба, тревогрумаба, эвинакумаба и ринукумаба.

[050] В некоторых вариантах осуществления целевая молекула является рекомбинантным белком, содержащим Fc-остаток и другой домен (например, Fc-слитый белок). В некоторых вариантах осуществления Fc-слитый белок является Fc-слитым белком рецептора, содержащим один или более внеклеточных доменов рецептора, соединенных с Fc-остатком. В некоторых вариантах осуществления Fc-остаток содержит шарнирную область с последующим доменом CH2 и CH3 IgG. В некоторых вариантах осуществления Fc-слитый белок рецептора содержит две или более разные цепи рецептора, связывающихся с одним лигандом или множеством лигандов. Например, Fc-слитый белок является белком-ловушкой, таким как, например, ловушка для ИЛ-1 (например, рилонацепт, содержащим связывающую лиганд ИЛ-1RAcP область, слитую с внеклеточной областью ИЛ-1R1, слитой с Fc hIgG1; см. патент США № 6927004, включенный в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме), или ловушка для VEGF (например, афлиберцепт или зив-афлиберцепт, содержащий домен Ig 2 рецептора VEGF Flt1, слитый с Ig-доменом 3 рецептора VEGF Flk1, слитым с Fc hIgG1; см. патенты США №№ 7087411 и 7279159, включенные в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В других вариантах осуществления Fc-слитый белок является ScFv-Fc-слитым белком, содержащим один или более из одного или более антигенсвязывающих доменов антитела, таких как переменный фрагмент тяжелой цепи и переменный фрагмент легкой цепи, соединенных с Fc-остатком.

[051] Варианты осуществления настоящего изобретения можно использовать в получении различных лекарственных препаратов или разработке способов для очистки различных лекарственных препаратов. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение можно использовать в получении или очистке лекарственных препаратов, включая антигенсвязывающую молекулу или AAV. В некоторых аспектах варианты осуществления настоящего изобретения могут подходить для использования в получении лекарственных препаратов, включая ингредиенты, такие как, например, афлиберцепт, алирокумаб, абиципар пегол, бевацизумаб, бролуцизумаб, конберцепт, дупилумаб, эволокумаб, тоцилизумаб, цертолизумаб, абатацепт, ритуксимаб, инфликсимаб,

ранибизумаб, сарилумаб, адалимумаб, анакинра, трастузумаб, пэгфилграстим, интерферон бета-1а, инсулин гларгин [из рДНК], эпоэтин альфа, дарбэпоэтин, филиграстим, голимумаб, этанерцепт, антигенсвязывающий фрагменты любого из указанных выше или комбинации таких связывающих доменов, таких как, помимо прочего, биспецифическое антитело против VEGF или ангиопоэтина-2.

[052] Термин "среды для гидрофобных взаимодействий" или "среды для НИС" означают комбинацию структуры подложки и гидрофобного остатка, где гидрофобный остаток присоединен к структуре подложки. Среды могут находиться в форме хроматографических сред, например, бусин или других частиц, удерживаемых в формате колонки с упакованным слоем, в форме мембраны или в любом формате, который может удерживать жидкость, содержащую интересующий белок и загрязнения. Таким образом, структуры подложек включают агарозные частицы (например, сефарозу), частицы диоксида кремния, целлюлозные мембраны, целлюлозные частицы, частицы гидрофильных полимеров, смолы и т.п. Гидрофобный остаток связывается с гидрофобными молекулами и гидрофобными поверхностями белков. Степень гидрофобности сред можно контролировать, выбирая гидрофобный остаток. Среды для гидрофобных взаимодействий используют в способе, известном как хроматография гидрофобных взаимодействий (НИС), и используют для отделения целевых молекул, таких как интересующие белки или другие молекулы, от продукта и технологических загрязнений. Когда целевые молекулы производят и/или очищают из клеток-хозяев, некоторые продукты и технологические компоненты, от которых их, в конечном итоге, необходимо отделить, обозначают как белки клетки-хозяина (НСР) и клеточный детрит. В некоторых случаях, смесь, содержащую целевые молекулы и другие компоненты, наносят на среды для НИС в буфере, предназначенном для стимуляции связывания гидрофобных групп в целевой молекуле с гидрофобным остатком среды для НИС. Такую смесь можно обозначать как "нагрузочная масса". В НИС используют гидрофобные различия между целевыми молекулами и примесями, что приводит к разделению во время фаз введения, промывки или регенерации. Зачастую целевые молекулы отделяют в элюат, в то время как примеси связаны со средой НИС. НИС также можно осуществлять в режиме, в котором целевая молекула связывается со средой НИС, в то время как НСР и клеточный детрит не могут связываться и элюируются. Настоящее изобретение можно использовать в любом случае (связывается ли целевая молекула с остатком для гидрофобного взаимодействия или нет).

[053] Среды для НИС можно периодически подвергать стрипированию или регенерации после использования в очистке/сборе целевой молекулы. В рамках изобретения термины "стрипирование" и "регенерация" используют взаимозаменяемо и/или в комбинации для обозначения способов, предназначенных для удаления любых остаточных компонентов нагрузочной массы из сред для НИС после цикла очистки и подготовки сред для НИС для последующего цикла очистки. Например, после использования устройства для НИС для отделения или очистки интересующей молекулы

от нагрузочной массы, включающей материалы клетки-хозяина (например, клеточного детрита, белков клетки-хозяина и т.д.), и элюции интересующей молекулы из устройства для НИС, среды для НИС можно подвергать регенерации для удаления остаточных материалов (например, материалов клетки-хозяина, белков клетки-хозяина, липидов, остаточных полипептидов, агрегировавших белков, нуклеиновых кислот, биомолекул и т.д.) из сред для НИС и можно подготавливать среды для НИС для использования в очистке интересующей молекулы из другой нагрузочной массы. В некоторых вариантах осуществления регенерация сред для НИС может включать нарушение гидрофобных взаимодействий между остаточными материалами клетки-хозяина и/или целевыми молекулами и средами для НИС и/или денатурацию остаточных материалов клетки-хозяина. Регенерацию можно осуществлять между циклами НИС для "восстановления" сред для НИС без необходимости более длительных способов очистки. В некоторых вариантах осуществления регенерацию можно осуществлять между циклами НИС для предотвращения или снижения изменения окраски сред для НИС с течением времени. В некоторых вариантах осуществления способ регенерации по настоящему изобретению может занимать, например, от приблизительно 5 минут до приблизительно одного часа, например, от приблизительно 10 минут до приблизительно 1 часа, от приблизительно 10 минут до приблизительно 45 минут или от приблизительно 10 минут до приблизительно 30 минут. Предпочтительно, регенерацию сред для НИС можно завершать без подвергания сред для НИС воздействию более жестких очищающих растворов, которые могут иметь нежелательные эффекты или вызывать дополнительные опасения. Способы регенерации можно конфигурировать, не фокусируясь, например, на удалении бактерий, грибов или других микроорганизмов из хроматографических сред.

[054] "Стрипирование" и "регенерацию" можно отличать от, например, "очистки" хроматографических сред. Очистка может включать способы, предназначенные для тщательной дезинфекции и/или деконтаминации хроматографических сред, хроматографического устройства и/или рабочего пространства лаборатории. Например, способы очистки могут включать использование антибиотика, противогрибкового или иных противомикробных растворов, других дезинфицирующих растворов, стерилизацию и т.п. в концентрациях и количествах, предназначенных для санитарной обработки и/или стерилизации хроматографических сред или хроматографического устройства. В отличие от этого, хотя регенерация в некоторых случаях может включать использование растворов, имеющих противомикробные свойства, основной целью регенерации может являться удаление остаточных компонентов нагрузочной массы из хроматографических сред после очистки. В некоторых вариантах осуществления могут потребоваться дополнительные меры безопасности или процедуры до и/или после очистки для обеспечения того, что дезинфекция, санитарная обработка, противомикробные растворы или растворы антибиотиков, используемые во время очистки, не повлияют на последующие циклы хроматографии. Во многих случаях способы очистки могут являться

более длительными, чем способы регенерации (например, занимает более приблизительно часа).

[055] Разделение молекул в средах для НИС можно осуществлять, например, воздействуя на среды для НИС нагрузочной массой, имеющей высокую концентрацию соли для повышения гидрофобных взаимодействий между средами для НИС и целевыми молекулами в нагрузочной массе, а затем пропуская объем раствора (например, буфера), имеющего сниженную или снижающуюся концентрацию соли, через среды для НИС для реверсирования гидрофобных взаимодействий. Таким образом, общепринято понятно, что в низкосолевых или бессолевых условиях со средами для НИС будет связываться меньше материала. Однако неожиданно обнаружили, что некоторые типы сред для НИС демонстрируют повышенное связывание (например, гидрофобные взаимодействия) с остаточными материалами (например, белками клетки-хозяина) в бессолевых условиях. Кроме того, обнаружено, что некоторые белки (например, моноклональные антитела) могут денатурировать на некоторых типах сред для НИС (например, среде Capto™ Phenyl (High Sub) (GE Healthcare Life Sciences). Хотя белки могут возвращаться в свою нативную конфигурацию после элюции из сред для НИС, такие белки в своем денатурированном состоянии могут не удаляться из сред для НИС способами регенерации, включающими, например, полученную обратным осмосом деионизированную воду (RODI), 1 N гидроксид натрия и/или 20% этанол. Предполагают, что в некоторых случаях элюция молекул из сред для НИС зависит от pH и/или электропроводности.

[056] Аспекты настоящего изобретения относятся к раствору для регенерации и к оценке хроматографических сред на пригодность, включая простоту регенерации.

[057] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения раствор для регенерации может являться щелочным раствором. Предполагают, что в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения высокий pH может являться основным фактором эффективности раствора для регенерации; однако, также предполагают, что в некоторых случаях эффективности высокого pH может противодействовать высокая ионная сила. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления эффективность раствора для регенерации может регулировать высокий pH в комбинации с низкой, но не нулевой, электропроводностью (см., например, описанный ниже пример 14). Например, в некоторых вариантах осуществления раствор для регенерации может демонстрировать pH от приблизительно 8 до приблизительно 14, такой как от приблизительно 10 до приблизительно 14. В некоторых вариантах осуществления раствор для регенерации, как правило, может демонстрировать низкую электропроводность. Например, в некоторых вариантах осуществления раствор для регенерации может демонстрировать электропроводность от приблизительно 0,5 мСм/см до приблизительно 10 мСм/см, такую как от приблизительно 0,5 мСм/см до приблизительно 5 мСм/см, от приблизительно 5,0 мСм/см до приблизительно 10 мСм/см, от приблизительно 0,5 мСм/см до приблизительно 3 мСм/см, от приблизительно 0,5 мСм/см до приблизительно 1,6 мСм/см, от приблизительно 0,8 мСм/см до приблизительно 1,6 мСм/см, приблизительно 0,5 мСм/см,

приблизительно 1,0 мСм/см, приблизительно 1,5 мСм/см, приблизительно 2,0 мСм/см, приблизительно 2,5 мСм/см, приблизительно 3 мСм/см, приблизительно 3,5 мСм/см, приблизительно 4,0 мСм/см, приблизительно 4,5 мСм/см или приблизительно 5,0 мСм/см.

[058] В некоторых вариантах осуществления раствор для регенерации может являться щелочным раствором, включающим концентрацию, например, гидроксида натрия, гидроксида калия, гидроксида кальция, гидроксида магния, Трис, другого щелочного раствора или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления раствор для регенерации может включать общую концентрацию растворенной соли от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 50 мМ, такую как от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 25 мМ, от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 20 мМ, от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 15 мМ, от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ, от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 5 мМ, от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 2,5 мМ, от приблизительно 1 мМ до приблизительно 10 мМ, от приблизительно 1 мМ до приблизительно 7 мМ, от приблизительно 2,5 мМ до приблизительно 5 мМ или от приблизительно 2,5 мМ до приблизительно 7 мМ, такую как приблизительно 0,5 мМ, приблизительно 1 мМ, приблизительно 1,5 мМ, приблизительно 2 мМ, приблизительно 2,5 мМ, приблизительно 3 мМ, приблизительно 3,5 мМ, приблизительно 4 мМ, приблизительно 4,5 мМ, приблизительно 5 мМ, приблизительно 5,5 мМ, приблизительно 6 мМ, приблизительно 6,5 мМ, приблизительно 7 мМ, приблизительно 7,5 мМ, приблизительно 8 мМ, приблизительно 8,5 мМ, приблизительно 9 мМ, приблизительно 9,5 мМ, приблизительно 10 мМ, приблизительно 15 мМ, приблизительно 20 мМ или приблизительно 25 мМ.

[059] В некоторых вариантах осуществления растворы для регенерации по настоящему изобретению могут подходить для использования в одностадийных способах регенерации. Т.е. в некоторых вариантах осуществления способ регенерации среды для НИС может включать приведение сред для НИС в контакт с одним раствором, где раствор демонстрирует одно или более свойств, представленных в настоящем описании, и где после приведения в контакт с одним раствором менее приблизительно 5% нагрузочной массы остаются связанными со средами для НИС в качестве остаточной массы. Например, в некоторых вариантах осуществления способ регенерации среды для НИС может включать приведение сред для НИС в контакт с раствором, демонстрирующим рН от приблизительно 10 до приблизительно 14 и электропроводность от приблизительно 0,5 мСм/см до приблизительно 10 мСм/см, после чего менее приблизительно 5% нагрузочной массы остаются связанными со средами для НИС в качестве остаточной массы. В некоторых вариантах осуществления остаточная масса может составлять менее приблизительно 4%, менее приблизительно 3%, менее приблизительно 2% или менее приблизительно 1% нагрузочной массы.

[060] Объем раствора для регенерации, используемого по настоящему изобретению, может являться любым подходящим объемом. В некоторых вариантах осуществления, например, в которых нагрузочную массу вводят в среды для НИС в



хроматографической колонке, объем раствора для регенерации, используемого по настоящему изобретению, можно измерять в объемах колонки (CV). В некоторых вариантах осуществления, например, способ регенерации среды для НИС в хроматографической колонке может включать пропускание по меньшей мере одного CV раствора для регенерации через колонку. В некоторых вариантах осуществления способ может включать пропускание от приблизительно 1 до приблизительно 20 объемов колонки раствора для регенерации через колонку, например, от приблизительно 1 объема колонки до приблизительно 15 объемов колонки, от приблизительно 1 объема колонки до приблизительно 10 объемов колонки, от приблизительно 1 объема колонки до приблизительно 5 объемов колонки, от приблизительно 3 объемов колонки до приблизительно 17 объемов колонки, от приблизительно 5 объемов колонки до приблизительно 15 объемов колонки или от приблизительно 5 объемов колонки до приблизительно 10 объемов колонки, например, приблизительно 1 объем колонки, приблизительно 2 объема колонки, приблизительно 3 объема колонки, приблизительно 4 объема колонки, приблизительно 5 объемов колонки, приблизительно 6 объемов колонки, приблизительно 7 объемов колонки, приблизительно 8 объемов колонки, приблизительно 9 объемов колонки, приблизительно 10 объемов колонки, приблизительно 12 объемов колонки, приблизительно 14 объемов колонки, приблизительно 16 объемов колонки, приблизительно 18 объемов колонки или приблизительно 20 объемов колонки.

[061] Системы и способы по настоящему изобретению можно использовать для различных сред и/или способов разделения. Одна система, способ или раствор по настоящему изобретению могут обладать общими характеристиками с несколькими из вариантов осуществления, представленных в настоящем описании. В некоторых примерах вариантов осуществления системы и способы по настоящему изобретению можно использовать в отношении сред и/или способов, в которых компоненты нагрузочной массы разделяют полностью или частично с учетом их гидрофобности, таких как НИС, или в отношении сред/способов с использованием комбинации гидрофобности и электрического заряда, таких как ионообменная хроматография/хроматография гидрофобных взаимодействий смешанного режима. В некоторых вариантах осуществления один или более растворов и/или способов для регенерации, представленных в настоящем описании, можно комбинировать (например, осуществлять до или после) с другими растворами и/или способами для регенерации. Например, раствор для регенерации по настоящему изобретению можно использовать в отношении сред, используемых в хроматографии смешанного режима, для стрипирования сред от остаточной массы, взаимодействующей со средами по причине гидрофобности. Другой раствор для регенерации также можно использовать в отношении сред для их стрипирования от остаточной массы, связанной со средами благодаря заряду.

[062] В некоторых вариантах осуществления растворы и/или способы для регенерации, представленные в настоящем описании, можно использовать в отношении сред для НИС, имеющих высокую степень гидрофобности. В некоторых вариантах

осуществления хроматографические среды, которые можно использовать с растворами и способами по настоящему изобретению, могут включать, например, гидрофобные матрицы, содержащие перекрестно-сшитую агарозу, полистирол-дивинилбензол или полиметакрилат. В некоторых вариантах осуществления матрицы могут включать лиганды, содержащие от 2 до 10 углеводов в алифатической или ароматической конфигурации. В некоторых вариантах осуществления матрицы не включают лиганды, включающие 30 или более углеводов. В некоторых вариантах осуществления, например, лиганды могут включать фениловые лиганды, бутиловые лиганды или октиловые лиганды. В некоторых вариантах осуществления лиганды могут присутствовать в средах с плотностью от приблизительно 20 до приблизительно 30 мкмоль на мл сред. В некоторых вариантах осуществления способы и растворы для регенерации, представленные в настоящем описании, можно использовать специально для регенерации сред для НИС. В некоторых вариантах осуществления способы и растворы для регенерации, представленные в настоящем описании, могут подходить для, например, сред Capto™ Phenyl (High Sub), Capto™ Butyl или Capto™ Octyl (GE Healthcare Life Sciences), сред Phenyl Sepharose® (GE Healthcare Life Sciences), смол для НИС POROS™ Benzyl и POROS™ Ethyl (Thermo Scientific™) или смол TOYOPEARL™. В некоторых вариантах осуществления способы и растворы для регенерации, представленные в настоящем описании, могут подходить для использования в непрерывных (многоколоночных) системах и способах НИС, таких как описываемые в международной заявке № PCT/US2019/040148, поданной 1 июля 2019 года, включенной в настоящее описание в качестве ссылки. Например, растворы для одностадийной регенерации по настоящему изобретению можно использовать в условиях многоколоночной непрерывной НИС, в которой эффективность раствора для одностадийной регенерации может повышать общую эффективность многоколоночных условий. В некоторых вариантах осуществления способы и растворы для регенерации, представленные в настоящем описании, можно использовать в системах и способах НИС, включая условия с низким содержанием космотропов или без них.

[063] В некоторых вариантах осуществления способ регенерации по настоящему изобретению можно осуществлять без использования полученной обратным осмосом деионизированной воды (RODI), органических растворителей (например, этанола или этиленгликоля), хаотропных средств (например, гуанидина или мочевины), хлорида натрия и/или концентраций гидроксида натрия более 50 мМ. Предпочтительно, способы регенерации с использованием растворов, представленных в настоящем описании, могут не требовать дополнительных способов для удаления, например, растворителей, таких как этанол (например, 20% этанол), и хаотропных средств, таких как гуанидин и мочевина (например, 6 Н гуанидин или 6 Н мочевина). Однако в некоторых вариантах осуществления предполагают, что растворы для регенерации, представленные в настоящем описании, можно использовать до, после или в комбинации с органическим

растворителем (например, 20% этанолом) или хаотропным средством (например, 6 Н гуанидин или 6 Н мочевины).

[064] В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут включать пропускание раствора для регенерации, представленного в настоящем описании, через хроматографическую колонку перед приведением хроматографической колонки в контакт с буфером для хранения в целях хранения. Буфер для хранения может включать, например, гидроксид натрия или другую соль в концентрации от приблизительно 0,05 М до приблизительно 0,15 М.

[065] В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут включать оценку различных хроматографических сред для определения того, какие одна или более хроматографических сред, вероятно, будут вызывать проблемы с использованием или регенерацией сред во время очистки целевой молекулы. Оценка хроматографических сред по настоящему изобретению может включать, в качестве неограничивающих примеров, использование одного или более типов хроматографических сред, поддержание условий рН и целевую молекулу. Предпочтительно, способы по настоящему изобретению могут включать скрининг в масштабе, меньшем, чем, как правило, в случае очистки целевой молекулы, что делает возможной значительную экономию количества образца (например, с использованием приблизительно 1/10, 1/100, 1/500, 1/700 или менее от количества образца, необходимого для оценки хроматографических сред, например, для НИС, общепринятыми способами. Кроме того, многочисленные схемы очистки, имеющие различные переменные (например, различные комбинации и типы сред, рН и/или целевую молекулу), можно подвергать скринингу одновременно с использованием, например, высокопроизводительного способа скрининга (HTS). Альтернативно или в дополнение к высокопроизводительному скринингу (HTS), можно использовать анализы элюции для исключения параметров потенциального способа НИС.

[066] Предпочтительно, эти способы скрининга и анализы могут приводить к значительной экономии времени при определении схем очистки, подходящих для использования в крупномасштабных способах очистки, например, посредством оптимизации типовой операции НИС. Например, способ HTS, осуществляемый по настоящему изобретению, может являться приблизительно в десять раз более быстрым, пятьдесят раз более быстрым, шестьдесят более быстрым, семьдесят раз более быстрым или даже более быстрым, чем общепринятые способы определения проблем с регенерацией/пригодностью в способах хроматографии для одной или более типовых операций, включая НИС, ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию и т.д.

[067] Способы оценки по настоящему изобретению могут включать упаковку лунки, такой как лунка фильтровального планшета, количеством хроматографических сред, где хроматографические среды предназначены для использования в предполагаемой схеме очистки. Лунка фильтровального планшета может иметь емкость, например, менее 5 мл, например, менее 4 мл, менее 3 мл или менее 2 мл. В некоторых вариантах

осуществления лунка фильтровального планшета может иметь емкость приблизительно 1 мл, приблизительно 0,8 мл, приблизительно 0,5 мл или любую другую подходящую емкость. Лунку фильтровального планшета можно оборудовать фильтром, имеющим подходящий размер ячейки, такой как от приблизительно 0,5 до приблизительно 1,5 мкм, такой как приблизительно 0,8 мкм, приблизительно 1,0 мкм или приблизительно 1,2 мкм. Размер ячейки фильтра может зависеть от размера частиц смолы, присутствующих в хроматографических средах, используемых в способе. Размер таких частиц хроматографических смол может составлять, например, от приблизительно 40 мкм до приблизительно 120 мкм, например, от приблизительно 50 мкм до приблизительно 100 мкм, от приблизительно 60 мкм до приблизительно 90 мкм, от приблизительно 80 мкм до приблизительно 90 мкм, приблизительно 70 мкм, приблизительно 80 мкм, приблизительно 90 мкм, приблизительно 100 мкм или приблизительно 110 мкм. Количество хроматографических сред, упаковываемых в лунку, может варьироваться. Например, количество хроматографических сред может находиться в диапазоне, например, от приблизительно 2,0 мкл до приблизительно 50,0 мкл, например, приблизительно 10 мкл, приблизительно 20,0 мкл, приблизительно 30,0 мкл или приблизительно 40,0 мкл. В некоторых способах по настоящему изобретению фильтровальный планшет, включающий множество лунок, можно упаковывать множеством разных хроматографических сред для одновременной оценки множества способов в массиве. Это можно использовать для любой стадии хроматографии в схеме очистки, включая НИС, ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию и т.д.

[068] Объем нагрузочного материала можно вводить в упакованную лунку фильтровального планшета (или, в случае множества способов, оцениваемых одновременно, в каждую упакованную лунку фильтровального планшета). Нагрузочный материал может включать целевую молекулу, подвергнутую некоторому способу начальной очистки, такой как аффинная хроматография или ионообменная хроматография. Нагрузочный материал можно использовать по настоящему изобретению для тестирования типовой операции, такой как НИС. В случае множества условий для одной типовой операции, оцениваемых одновременно, нагрузочные материалы для использования в разных лунках могут включать разные целевые молекулы. Нагрузочный материал можно титровать до относящегося к способу рН. Приблизительную концентрацию целевой молекулы в нагрузочном материале можно доводить до любой подходящей, специфической для типовой операции концентрации. В некоторых вариантах осуществления объем нагрузочного материала может соответствовать нагрузочной массе (например, массе целевой молекулы в нагрузочном материале), являющейся фракцией нагрузочной массы, которую будут использовать в полномасштабном способе НИС, например,  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{5}$ ,  $\frac{1}{8}$ ,  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{20}$ ,  $\frac{1}{50}$ ,  $\frac{1}{100}$  или менее нагрузочной массы, используемой в полномасштабном способе.

[069] Способы оценки способа на типовую операцию могут дополнительно включать осуществление стадий элюции и промывки, подходящих для использования в

крупномасштабных способах (например, включая использование RODI, 1 Н гидроксида натрия и/или 5 мМ гидроксида натрия), а затем осуществление стадии стрипирования с использованием каустического или хаотропного средства, такого как 6 Н гуанидина HCl или 6 Н мочевины, или растворителя, такого как 20% этанол. Стадии элюции/промывки можно осуществлять с использованием, например, элюирующего буфера, титруемого до характерного для способа рН. В случае множества способов для оцениваемой типовой операции, элюирующие буферы, демонстрирующие различные значения относящегося к способу рН, можно использовать в разных лунках в одном массиве. Стадия элюции может включать, например, подвергание нагруженных хроматографических сред в лунке фильтровального планшета воздействию градиента элюирующего буфера (начинающегося с относительно более высокой концентрации и заканчивающегося концентрацией 0). В другом варианте осуществления стадия элюции может включать подвергание нагруженных хроматографических сред воздействию буфера, имеющего начальную концентрацию космотропной соли (например, 500 мМ, 400 мМ, 300 мМ, 200 мМ цитрата или т.п.) и постепенное/линейное снижение концентрации буфера до 0. В некоторых вариантах осуществления можно осуществлять элюцию в псевдоградиенте, где нагруженные хроматографические среды подвергаются воздействию дискретных объемов элюирующего буфера, имеющего линейно снижающуюся концентрацию от начальной концентрации (например, 300 мМ) до 0 за множество стадий (например, 4, 5, 6, 7, 8, больше или меньше стадий).

[070] Первая стадия может включать любой способ, предназначенный для тестирования в качестве способа типовой операции. Как правило, первая стадия может включать использование растворов, считающихся пригодными для использования в крупномасштабных и повторяющихся операциях (например, растворов, не вызывающих опасения, касающиеся безопасности или токсичности). Например, первая стадия может включать промывку или промывки RODI и/или 1 Н NaOH, осуществляемые последовательно или в чередующейся последовательности, однократно или множество раз каждая. Вторая стадия может включать любой раствор, предназначенный для стрипирования любого оставшегося материала, связанного с хроматографическими средами, после завершения оцениваемого способа типовой операции. Такие способы регенерации описаны в других местах в настоящем описании, но, в основном, могут включать хаотропные средства, такие как 6 Н гуанидин HCl или 6 Н мочевина, или растворители, такие как 20% этанол.

[071] Способы оценки по настоящему изобретению могут включать измерение количества целевой молекулы, выделяемой во время, например, стадий промывки/элюции и стадии стрипирования. Эти результаты можно сравнивать для разных хроматографических сред. Может быть предпочтительным иметь относительно высокий процент целевой молекулы, выделенной во время стадий промывки/элюции (т.е. во время тестируемого способа HIC), в противоположность стадии стрипирования (т.е. жесткого стрипирования хроматографических сред).

[072] Способы оценки по настоящему изобретению могут дополнительно включать определение выделения целевой молекулы во время стадии стрипирования как процентной доли всей целевой молекулы, выделенной во время тестируемого способа типовой операции. Если процент выделения целевой молекулы во время стадии стрипирования выше заранее определенного порогового значения, можно прогнозировать, что способ типовой операции потенциально может вызывать проблемы с регенерацией/возможностью повторного использования при масштабировании и/или многократном повторении. Если процент выделения целевой молекулы во время стадии стрипирования равен или ниже заранее определенного порогового значения, можно прогнозировать, что способ типовой операции не будет вызывать проблемы с регенерацией/возможностью повторного использования при масштабировании и/или повторении. Заранее определенное пороговое значение может являться любым экспериментально определенным пороговым значением, свидетельствующим о количестве остатка, оставшегося связанным с хроматографическими средами после типовой операции, такой как НИС. В некоторых вариантах осуществления заранее определенное пороговое значение может составлять, например, от приблизительно 1% до приблизительно 10%, например, от приблизительно 3% до приблизительно 7%, например, приблизительно 4%, приблизительно 5% или приблизительно 6%.

[073] В вариантах осуществления, в которых множество способов хроматографии оценивают одновременно, описанное выше вычисление процента выделения целевой молекулы можно определять для множества способов хроматографии за один раз, получая первое впечатление о том, какой способ может подходить или быть предпочтительным для дальнейшего использования, тестирования, исследования или разработки. Способы дальнейшего использования могут включать лунки, в которых нормализованный процент выделения, приписываемый стадии стрипирования, может составлять 1% или менее, 3% или менее, 5% или менее, 7% или менее или 10% или менее.

[074] В некоторых вариантах осуществления способы оценки способа хроматографии, например, для типовой операции НИС, по настоящему изобретению можно осуществлять на ранних стадиях разработки стадии очистки. Например, можно оценивать множество способов НИС, как представлено в настоящем описании (например, высокопроизводительный скрининг и/или анализ элюции), и способы НИС, которые, как прогнозируют, вызывают проблемы с регенерацией/возможностью повторного использования, можно исключать или снижать их приоритет для дальнейшего исследования. Способы хроматографии, которые, как прогнозируют, не вызывают проблем с регенерацией/возможностью повторного использования, можно подвергать дальнейшему тестированию (например, полномасштабному тестированию) или исследованию, например, для максимизации выхода и минимизации примесей, подтверждения того, что они соответствуют внутренним и внешним руководствам по контролю качества, и оценки повторяемости и долговечности (например, будут ли они

приводить к изменению окраски колонки или другим нежелательным эффектам после 10, 25, 50, 75, 100 или более циклов).

[075] В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению предпочтительно могут предотвращать или снижать изменение окраски колонок, сред и/или оборудования для регенерации, которое в ином случае может возникать после одного или более использований (см., например, примеры 6 и 9, обсуждаемые в настоящем описании). В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению предпочтительно можно использовать на ранних стадиях идентификации способов типовых операций хроматографии, которые могут вызывать проблемы с регенерацией/пригодностью, таким образом, экономя время и затраты, которые могут возникнуть при разработке полной схемы очистки, при этом можно обнаружить, что способ для такой стадии хроматографии вызывает такие проблемы позднее.

[076] Далее приведены ссылки на конкретные фигуры. На фиг. 1 показан способ 100 регенерации хроматографической колонки по аспектам настоящего изобретения. На стадии 102 первую нагрузочную массу можно вводить в колонку для хроматографии гидрофобных взаимодействий. На стадии 104 интересующий белок можно собирать из колонки для хроматографии гидрофобных взаимодействий. На стадии 106 в хроматографическую колонку можно вводить один щелочной раствор для регенерации для удаления материала, связанного со средами для гидрофобных взаимодействий в колонке.

[077] На стадии 102 первую нагрузочную массу можно вводить в колонку для хроматографии гидрофобных взаимодействий. Нагрузочная масса может включать целевую молекулу (например, полипептид), а также остаточные компоненты, такие как белки клетки-хозяина, клеточный детрит и т.п. На стадии 104 интересующий белок можно собирать из колонки для хроматографии гидрофобных взаимодействий. Это можно осуществлять, например, на стадии промывки или стадии элюции. На стадии 106 один щелочной раствор для регенерации можно вводить в хроматографическую колонку для удаления материала, связанного со средами для гидрофобных взаимодействий в колонке. Один щелочной раствор для регенерации может иметь одну или более из описанных выше характеристик.

### **Примеры**

#### **[078] Пример 1**

[079] Измеряли количество незтерифицированных свободных жирных кислот ("NEFA") в нескольких образцах растворов после инкубации с полисорбатом 20 ("PS20"). Наличие и количество NEFA в образце принимают за показатель деградации PS20, вызванной, например, примесями, такими как белки клетки-хозяина, в образце. Первый образец получали из нагрузочной массы для НИС. Пять дополнительных образцов получали из совокупностей при НИС после 1, 2, 3, 5 и 10 последовательных циклов. Все образцы инкубировали в течение одного периода времени. Как показано в таблице 1 ниже, с цикла 1 по цикл 5 деградацию PS20 вычисляли как отрицательный процент, эквивалент

отрицательного контроля. Отрицательный процент деградации PS20 соответствует недектируемой NEFA и, в связи с этим, недектируемой липазной активности. NEFA являлись детектируемыми между циклами 5 и 10, что свидетельствует о повышении липазной активности. Эти данные свидетельствуют о том, что липазная активность может повышаться как функция циклирования.

**Таблица 1**

Цикл	Деградация PS20 (%)	Детекция
Нагрузочная масса	1,83	Детектируемая
Цикл 1	-0,31	Эквивалент отрицательного контроля
Цикл 2	-0,25	Эквивалент отрицательного контроля
Цикл 3	-0,20	Эквивалент отрицательного контроля
Цикл 5	-0,22	Эквивалент отрицательного контроля
Цикл 10	0,47	Детектируемая

[080] Пример 2

[081] На фиг. 2 показан блот-анализ сред для НИС (Capto™ Phenyl (High Sub) (GE Healthcare Life Sciences)) в различных состояниях эксплуатации или после воздействия растворов для регенерации, как описано ниже.

**Таблица 2**

Метка	Состояние сред
*	Референс
A	Типично для наивных (неиспользованных) сред
B	Использованные среды
C	Использованные среды, подвергнутые воздействию 20% этанола
D	Использованные среды, подвергнутые воздействию 70% этанола
E	Использованные среды, подвергнутые воздействию 30% IPA
F	Использованные среды, подвергнутые воздействию 6 Н гуанидина HCl
G	Использованные среды, подвергнутые воздействию 8 Н мочевины
H	Использованные среды, подвергнутые воздействию 2% (масс./масс.) полисорбата 80

[082] Как показано на фиг. 2, затемненные области являются видимыми для каждой использованной колонки, за исключением колонки, приведенной в контакт с 6 Н гуанидином HCl (колонка F). Колонка, соответствующая наивным средам (колонка A), также не демонстрировала затемненных областей. Эти данные свидетельствуют о том, что с помощью 6 Н гуанидина HCl можно удалять остаточные среды во время регенерации хроматографической колонки по сравнению с другими растворами. Таким образом, 6 Н гуанидин HCl можно использовать в качестве средства для стрипирования и средства,



которое можно использовать после других средств для стрипирования/регенерации, для оценки эффективности таких других средств.

[083] Пример 3

[084] На фиг. 3 показан блот-анализ сред для НИС (Capto™ Phenyl (High Sub)) в различных состояниях эксплуатации или после воздействия растворов для регенерации, как описано ниже.

**Таблица 3**

Метка	Состояние сред
*	"Лестница" маркеров
A	Типично для наивных (неиспользованных) сред
B	Использованные среды, подвергнутые воздействию 10 циклов смеси, содержащей mAb A при pH 5,5, при этом каждый цикл включает принцип регенерации RODI, 1,0 N NaOH, RODI и 20% этанолом
C	Использованные среды, подвергнутые воздействию 10 циклов смеси, содержащей mAb A при pH 8, при этом каждый цикл включает принцип регенерации RODI, 1,0 N NaOH, RODI и 20% этанолом
D	Использованные среды, подвергнутые воздействию смеси, содержащей mAb A, а затем 6 N гуанидина HCl
E	Использованные среды, подвергнутые воздействию 100 циклам смеси, содержащей mAb B, при этом каждый цикл включает принцип регенерации RODI, 1,0 N NaOH, RODI и 20% этанолом

[085] В таблице 3 приведены типы используемых сред и каких-либо средств регенерации, воздействию которых подвергают среды. Как показано на фиг. 3, возможность, используя принцип регенерации, включающий RODI, 1,0 N NaOH, RODI и 20% этанол (используемые в средах B и C), удалять остаток из сред не была столь полной, как возможность в случае 6 N гуанидина HCl (D).

[086] Пример 4

[087] На фиг. 4 показаны наложенные УФ-хроматограммы, где показано пять процедур санитарной обработки после сбора моноклональных антител mAb 1 во время осуществления способа. Каждая процедура санитарной обработки включала первую промывку двумя объемами колонки 0,5 N гидроксидом натрия (A) с последующей паузой, а затем вторую промывку одним объемом колонки 0,5 N гидроксида натрия (B). Санитарную обработку считают завершенной в точке C, после чего осуществляли промывку двумя объемами колонки воды для инъекций ("WFI") (D). Как показано на фиг. 4, первая промывка гидроксидом натрия (A) приводила к высокому поглощению в ранней части промывки, что коррелирует с обширным удалением примесей. Максимальное поглощение, наблюдаемое во время элюции при НИС (регенерации), составляет 2,4 ЕОП, в

то время как максимальное поглощение, наблюдаемое во время циклов санитарной обработки на фиг. 4, составляло приблизительно 1,4 ЕОП.

[088] Пример 5

[089] На фиг. 5 показан блот-анализ сред для НИС (Capto™ Phenyl (High Sub)) в различных состояниях эксплуатации или после воздействия растворов для стрипирования, как описано ниже. В частности, используемые среды для НИС подвергали воздействию снижающихся концентраций гуанидина.

**Таблица 4**

Метка	Состояние сред
*	"Лестница" маркеров
A	Типично для наивных (неиспользованных) сред
B	Использованные среды
C	Использованные среды, подвергнутые воздействию 20% этанола
D	Использованные среды, подвергнутые воздействию 6 Н гуанидина
E	Использованные среды, подвергнутые воздействию 3 Н гуанидина
F	Использованные среды, подвергнутые воздействию 2 Н гуанидина
G	Использованные среды, подвергнутые воздействию 1 Н гуанидина
H	Использованные среды, подвергнутые воздействию 0,5 Н гуанидина
I	Использованные среды, подвергнутые воздействию 0,1 Н гуанидина

[090] Как показано на фиг. 5, использование 6 Н гуанидина HCl (D) приводило к удалению большей части остатка из сред для НИС, в то время как растворы, имеющие более низкие концентрации гуанидина, и раствор 20% этанола не являлись столь же эффективными для удаления остатка из сред для НИС.

[091] Пример 6

[092] На фиг. 6 показаны две колонки, содержащие среды для НИС Capto™ Phenyl (High Sub) (GE Life Sciences). Левую колонку подвергали 49 циклам НИС для очистки моноклонального антитела mAb 2. Каждый цикл включал регенерацию колонки последовательностью RODI, 1 Н гидроксида натрия, RODI и 20% этанола. После 40-го цикла определяли желтую полосу внизу колонки. В качестве сравнения, правая колонка типична для наивных сред для НИС Capto™ Phenyl (High Sub). Изменение окраски левой колонки может свидетельствовать о недостаточной регенерации.

[093] Совокупности из циклов 1 и 49 собирали и анализировали на липазную активность и наличие белка клетки-хозяина (HCP). Не наблюдали значимой тенденции для значений липазной активности или HCP между циклом 1 и циклом 49.

[094] Пример 7

[095] На фиг. 7А и 7В показаны хроматограммы циклов 2 и 49, соответственно, полученные на левой колонке, описанной в отношении примера 6. Фиг. 7А и 7В аннотированы следующим образом:

Таблица 5

Цикл 2 (фиг. 7А)		Цикл 49 (фиг. 7В)	
Маркер	Событие	Маркер	Событие
А	Начало сбора совокупности	А'	Начало сбора совокупности
В	Промывка	В'	Промывка
С	Стрипирование RODI	С'	Стрипирование RODI
Д	Стрипирование 1 Н NaOH	Д'	Стрипирование 1 Н NaOH
Е	Стрипирование RODI	Е'	Стрипирование RODI
F	Стрипирование 20% EtOH	F'	Стрипирование 20% EtOH

[096] И в цикле 2, и в цикле 49 RODI не являлась эффективным раствором для стрипирования, о чем свидетельствует отсутствие какого-либо пика после С или С' (у маркеров Х и Х'). Внесение 1 Н NaOH приводило к пикам P<sub>1</sub> (цикл 2) и P<sub>3</sub> (цикл 49), что означает, что 1 Н NaOH являлся по меньшей мере частично эффективным в качестве раствора для стрипирования. Внесение второго раствора для стрипирования RODI приводило к удалению некоторых дополнительных примесей и образованию пиков P<sub>2</sub> (цикл 2) и P<sub>4</sub> (цикл 49). Внесение раствора 20% этанола не приводило к образованию дополнительного пика. Эти данные для обоих циклов свидетельствует о том, что RODI не является эффективным раствором для стрипирования при использовании перед гидроксидом натрия.

[097] Пример 8

[098] Две нагрузочные массы, каждая из которых включает целевое моноклональное антитело, подвергали способам хроматографии гидрофобных взаимодействий. В первом способе после введения, промывки и элюции целевого моноклонального антитела mAb 3 из первой нагрузочной массы, хроматографическую колонку подвергали воздействию раствора для стрипирования 1 Н гидроксида натрия с последующим стрипированием RODI и стрипированием 20% этанолом. Во втором способе после введения, промывки и элюции целевого моноклонального антитела mAb 4 из второй нагрузочной массы хроматографическую колонку подвергали стрипированию RODI с последующим стрипированием 1 Н гидроксида натрия, еще одним стрипированием RODI и стрипированием 20% этанола. На фиг. 8А показана хроматограмма для первого способа, и на фиг. 8В показана хроматограмма для второго способа. Каждая хроматограмма аннотирована следующим образом:

Таблица 6

Первый способ (фиг. 8А)		Второй способ (фиг. 8В)	
Маркер	Событие	Маркер	Событие
А	Введение	А'	Введение
В	Начало сбора совокупности	В'	Начало сбора совокупности
С	Промывка	С'	Промывка

D	Окончание сбора совокупности	D'	Стрипирование RODI
E	Стрипирование 1 Н NaOH	E'	Стрипирование 1 Н NaOH
F	Стрипирование RODI	F'	Стрипирование RODI
G	Стрипирование 20% этанола	G'	Стрипирование 20% этанола

[099] После первого стрипирования RODI, указанного маркером D' на фиг. 8B (у маркера X'), отсутствует какой-либо пик, что сравнимо с отсутствием пика в положении, показанном маркером X на фиг. 8A (в котором не осуществляли первое стрипирование RODI). Таким образом, сниженная электропроводность при первом стрипировании RODI, используемом в первом способе, не вызывала удаления какого-либо существенного количества материала из хроматографической колонки.

[0100] Пример 9

[0101] Далее оценивали эффективность 6 Н гуанидина HCl в качестве раствора для стрипирования и потенциального раствора для удаления изменения окраски на левой колонке, показанной на фиг. 6. Колонку подвергали способу, показанному в таблице ниже. Хроматограмму получали во время осуществления способа, показанного на фиг. 9.

**Таблица 7**

Раствор	Направление потока	Маркер хроматограммы
RODI	Нисходящий поток	A
6 Н гуанидин HCl	Нисходящий поток	B
RODI	Нисходящий поток	C
6 Н гуанидин HCl*	Восходящий поток	D
RODI	Восходящий поток	E

Каждый раствор двигался через колонку со скоростью 200 см/час в виде нисходящего потока (т.е. в том же направлении, что и при способе очистки во время HIC) или восходящего потока (т.е. противоположно нисходящему потоку или "обратно" через колонку). Второе введение 6 Н гуанидина HCl (указанное звездочкой) удерживалось в колонке в течение приблизительно 16 часов.

[0102] Как показано на хроматограмме на фиг. 9, первое внесение RODI приводило к образованию пика P<sub>1</sub>, и первое стрипирование 6 Н гуанидина HCl после первого внесения RODI приводило к образованию высокого пика P<sub>2</sub>. Ни один из пиков не был ассоциирован со вторым стрипированием 6 Н гуанидином HCl, удерживаемым в колонке в течение ночи перед элюцией. Возможно, это свидетельствует об эффективности первого стрипирования 6 Н гуанидином HCl в удалении остатка, связанного с колонкой. Однако после полного способа очистки колонка оставалась с измененной окраской (как показано на фиг. 6).

[0103] Пример 10

[0104] Подробно анализировали принцип регенерации. На фиг. 10A показана хроматограмма способа HIC, во время которого моноклональное антитело mAb 4 очищали

с использованием сред Capto™ Phenyl (High Sub) (GE Life Sciences). Способ НИС, включающий принцип регенерации, включал следующие стадии:

**Таблица 8**

Маркер (фиг. 10А)	Событие
A	Предварительное стрипирование
B	Уравновешивание
C	Введение и промывка
D	Стрипирование RODI
E	Стрипирование 1 Н NaOH
F	Стрипирование RODI
G	Стрипирование 20% этанолом
H	Регенерация RODI перед гуанидином HCl
I	6 Н гуанидин HCl

[0105] Как показано на фиг. 10А, пик P<sub>1</sub> следовал за внесением 1 Н гидроксида натрия (E), и пик P<sub>2</sub> совпадал со вторым стрипированием RODI (F). Пик P<sub>3</sub> следовал за внесением 6 Н гуанидина HCl (I).

[0106] На фиг. 10В показано увеличенное изображение пика P<sub>1</sub>. Первое стрипирование RODI (D) не приводило к определенному поглощению. По-видимому, стрипирование 1 Н NaOH (E) приводило к незамедлительному и раннему удалению остатка из колонки, на что указывает наличие пика P<sub>1</sub>, возникающего на исходном уровне с повышением электропроводности. Предполагают, что начальное стрипирование RODI (D) может вызывать более сильное связывание некоторого остатка с колонкой, а не способствует его удалению. Также предполагают, что элюция остатка из колонки, вызванная гидроксидом натрия, главным образом, может регулироваться рН, но с повышением концентрации гидроксида натрия (слабого космотропа) остаточный белок может сильнее связываться со средами для НИС с повышением электропроводности раствора.

[0107] Пример 11

[0108] Наблюдали элюцию остатка из использованных сред для НИС как функции концентрации гидроксида натрия. На фиг. 11 показана хроматограмма способа, в котором после введения и промывки колонки НИС для сбора моноклонального антитела mAb 4 (во время раздела А) в колонку вводили градиент 20 CV, смешивая RODI и гидроксид натрия, начиная с RODI в отдельности и постепенно повышая концентрацию гидроксида натрия до максимальной концентрации 1 Н гидроксида натрия (раздел В). Наблюдали один четкий пик P<sub>1</sub>, элюируя с прохождением ~5 мМ гидроксида натрия через колонку. Получали второй градиент 20 CV и вводили в колонку, начиная с RODI и гидроксида натрия в максимальной концентрации 1 Н и постепенно снижая концентрацию гидроксида натрия до 0 (раздел С). Не наблюдали дополнительных пиков во время использования

этого второго градиента. И наконец, раствором 6 Н гуанидина HCl промывали колонку по отметке D. Наблюдала небольшой пик P<sub>2</sub> во время прохождения 6 Н гуанидина HCl через колонку. Вычисляли площадь под кривой (AUC) каждого пика, интегрируя поглощение УФ при 280 нм. Вычисляли, что пик P<sub>2</sub> имеет AUC 1,160 мл\*мЕОП по сравнению с AUC при стрипировании 6 Н гуанидином HCl в контрольном способе (например, таблица 8), которую вычисляли как 13,305 мл\*мЕОП. Таким образом, пик P<sub>2</sub> демонстрировал уменьшение размера на 91,3% по сравнению с контролем.

[0109] Этот способ показал, что максимум связанного материала элюировали из колонки, когда через колонку пропускали ~5 мМ гидроксид натрия, оставляя относительно немного остаточных сред для элюции 6 Н гуанидином HCl.

#### [0110] Пример 12

[0111] Растворы гидроксида натрия, имеющие различные концентрации (1000 мМ, 500 мМ, 100 мМ, 50 мМ, 25 мМ, 10 мМ и 5 мМ), использовали в отдельных способах с двумя растворами для регенерации, каждый из которых осуществляли после введения и промывки колонки для HIC. Каждый способ регенерации включал раствор гидроксида натрия в качестве первого раствора для регенерации и раствор 6 Н гуанидина HCl в качестве второго раствора для регенерации. Получали хроматограммы для способов регенерации и накладывали их друг на друга на фиг. 12. Раствор гидроксида натрия в каждом способе регенерации приводил к образованию первого пика, представленного группой пиков, помеченных А. Раствор 6 Н гуанидина HCl в каждом способе регенерации приводил к образованию второго пика, представленного группой пиков, помеченных В. Определяли, что способ регенерации, включающий 5 мМ NaOH, приводил к образованию наибольшего пика "А" (что свидетельствует о наибольшем количестве остатка, элюируемого с использованием раствора гидроксид натрия) и наименьшего пика "В" (что свидетельствует о наименьшем количестве остатка, элюируемого с использованием гуанидина HCl). Таким образом, определяли, что раствор 5 мМ гидроксид натрия являлся наиболее эффективным в регенерации колонки для HIC (т.е. с помощью него удаляли наибольшее количество связанного материала из колонки) из диапазона тестируемых растворов гидроксида натрия. Чем выше концентрация гидроксида натрия, тем больше остаточной массы оставалось на колонке для удаления раствором 6 Н гуанидина HCl. Предполагали, что, хотя повышение pH способствует элюции остатка из колонки для HIC, повышение электропроводности снижало элюцию остатка, укрепляя связи между остатком и средами для HIC.

#### [0112] Пример 13

[0113] Осуществляли односторонний дисперсный анализ в отношении площади под кривой (AUC) пиков хроматограмм, полученных способами регенерации после сбора mAb 4 из колонок для HIC, подготовленных с помощью сред Capto™ Phenyl (High Sub) (GE Healthcare Life Sciences). Как показано на фиг. 13А и 13В, способы регенерации осуществляли с использованием контроля (А), RODI (В) и различных концентраций растворов гидроксида натрия (С-Л). Каждый способ регенерации включал раствор для

стрипирования (AUC, проанализированные на фиг. 13А), а затем раствор 6 Н гуанидина HCl (AUC, проанализированные на фиг. 13В). Также использовали критерий Тьюки-Крамера для всех пар при каждом анализе для определения статистической значимости.

[0114] Как показано на фиг. 13А и 13В, способы, ассоциированные с растворами для регенерации 0,5 мМ NaOH и 1 мМ NaOH, демонстрировали наибольшие значения AUC (обведенные в области 1300) для пиков, полученных во время элюции этих растворов для регенерации, что свидетельствует о том, что эти растворы для регенерации вызывали более эффективное удаление материала из колонок HIC. Способы, ассоциированные с растворами для регенерации 0,5 мМ NaOH, 1 мМ NaOH и 5 мМ NaOH, демонстрировали наименьшие значения AUC (обведены в области 1350 на фиг. 13В) для пиков, полученных во время элюции растворов 6 Н гуанидина HCl после растворов для регенерации, что также подтверждает, что эти растворы для регенерации вызывали более эффективное удаление материала из колонок для HIC, что оставляя меньше материала для удаления раствором 6 Н гуанидина HCl. Таким образом, показано, что растворы, имеющие концентрации гидроксида натрия в диапазоне от 0,5 мМ до 5 мМ NaOH, являлись эффективными для регенерации колонок для HIC.

#### [0115] Пример 14

[0116] Способы регенерации с использованием растворов гидроксида натрия сравнивали со способами регенерации с использованием растворов хлорида натрия. После сбора моноклонального антитела mAb 5 из колонок для HIC, колонки подвергали регенерации с использованием гидроксида натрия, имеющего концентрацию 3 мМ, 5 мМ или 7 мМ, или с использованием хлорида натрия, имеющего концентрацию 5 мМ, 8 мМ или 11 мМ. Также отмечали pH и электропроводность каждого раствора для регенерации. Все растворы гидроксида натрия демонстрировали pH более 11, в то время как все растворы хлорида натрия демонстрировали pH от 5,5 до 6,5. Электропроводности растворов являлись сравнимыми. Для каждого способа раствор 6 Н гуанидина HCl вводили в каждую колонку после раствора для регенерации. Для каждого способа получали хроматограмму, все из которых накладывали на фиг. 14. AUC вычисляли для пиков, ассоциированных с элюцией раствора для регенерации и элюцией 6 Н гуанидина HCl. Растворы и AUC приведены в таблице ниже.

**Таблица 9**

<b>Регенерация Раствор</b>	<b>pH</b>	<b>Электропроводность</b>	<b>AUC раствора для регенерации (мл * мЕОП)</b>	<b>AUC 6 Н гуанидина HCl (мл * мЕОП)</b>
3 мМ NaOH	11,49	0,74	29,671	501
5 мМ NaOH	11,70	1,20	27,344	562
7 мМ NaOH	11,83	1,68	27,497	958
5 мМ NaCl	6,07	0,72	255	34,524
8 мМ NaCl	5,96	1,18	146	34,114

11 mM NaCl	6,04	1,65	226	32,852
------------	------	------	-----	--------

Как следует из этих данных, элюция растворов гидроксида натрия демонстрировала значимо более высокие значения AUC, чем растворы хлорида натрия. Аналогично, элюция 6 Н гуанидином HCl после растворов гидроксида натрия демонстрировала значимо более низкие значения AUC, чем элюция 6 Н гуанидином HCl после растворов хлорида натрия. На фиг. 14 пики, полученные при элюции гидроксидом натрия, указаны маркером А, и пики (или их отсутствие), полученные при элюции хлоридом натрия, указаны маркером В. Аналогично, пики, полученные при элюции 6 Н гуанидином HCl после гидроксида натрия, и пики, полученные при элюции 6 Н гуанидином HCl после хлорида натрия, указаны маркерами А' и В', соответственно. Как показано на фиг. 14, растворы гидроксида натрия являлись более эффективными средствами для стрипирования, чем растворы хлорида натрия.

[0118] Пример 15

[0119] Потенциальные растворы для очистки/регенерации тестировали на колонках, подвергнутых 50 циклам HIC для очистки моноклонального антитела mAb 6. Колонки демонстрировали изменение окраски вблизи верха слоя в колонке, как показано на фиг. 15 (колонки А, В, и С). Колонку А промывали 2 CV 0,5 М ЭДТА, колонку В промывали 2 CV 0,5 М уксусной кислоты, и колонка С служила в качестве контроля. Ни один из растворов не являлся эффективным в снижении окрашивания в коричневый цвет/изменения окраски.

[0120] Пример 16

[0121] Три раствора гидроксида натрия (2 mM, 5 mM и 10 mM) использовали в качестве растворов для регенерации после очистки HIC моноклонального антитела mAb 6. Эффективность каждого раствора гидроксида натрия в регенерации сред для HIC, используемых в способах очистки, охарактеризовывали по размеру пика на хроматограмме, ассоциированного со стрипированием 6 Н гуанидином HCl после использования каждого раствора гидроксида натрия. Более высокая AUC, ассоциированная с пиком при стрипировании гуанидином, свидетельствовала о более высоком количестве остатка, оставшегося после раствора гидроксида натрия, предшествующего стрипированию, и наоборот, меньшая AUC, ассоциированная с пиком при стрипировании гуанидином, свидетельствовала о меньшем количестве остатка, оставшегося после раствора гидроксида натрия, предшествующего стрипированию, и, таким образом, о большей эффективности раствора гидроксида натрия для регенерации. На фиг. 16 показан график, на котором приведена AUC пика при стрипировании гуанидином как функция концентрации гидроксида натрия. Все три тестируемых раствора гидроксида натрия демонстрировали более эффективную регенерацию (т.е. меньший пик при стрипировании гуанидином), чем принцип очистки по умолчанию, включающий последовательность RODI, 1 Н гидроксида натрия, RODI, 20% этанола и RODI. Раствор 5 mM гидроксида натрия имел наименьшую площадь пика при стрипировании гуанидином. Учитывая кривую, экстраполированную из точек данных, возможно, что раствор 7 mM



гидроксида натрия для регенерации может приводить даже к меньшей площади пика при стрипировании гуанидином.

[0122] Пример 17

[0123] Первый способ регенерации, используемый в качестве контроля, использовали для колонки для НИС после сбора моноклонального антитела mAb 5 из колонки. Хроматограмму получали с использованием способа. Множество растворов использовали в последовательности, начиная с 1 Н гидроксида натрия с последующими RODI, 20% этанолом, RODI и 6 Н гуанидином HCl. Пик хроматограммы, соответствующий элюции 6 Н гуанидином HCl, использовали в качестве измерения эффективности способа регенерации. Хроматограмма показана на фиг. 17. Маркерами на хроматограмме показаны следующие события:

**Таблица 10**

Маркер	Событие
A	Введение
B	Начало сбора совокупности
C	Промывка
D	Введение раствора 1 Н NaOH
E	Введение RODI
F	Введение 20% этанола
G	Введение RODI
H	Введение 6 Н гуанидина HCl

AUC пика, соответствующего элюции раствором 6 Н гуанидина HCl, вычисляли как 7,390 мл\*мЕОП.

Второй способ регенерации, включающий 5 мМ гидроксид натрия, использовали после сбора mAb 5 из колонки для НИС, и получали хроматограмму, показанную на фиг. 18. Множество растворов использовали в последовательности, начиная с 5 мМ гидроксида натрия с последующими RODI, 20% этанола, RODI, 5 мМ гидроксида натрия, RODI, 6 Н гуанидина HCl и 0,1 Н гидроксида натрия. AUC, соответствующую элюции каждым раствором, вычисляли из хроматограммы, результаты приведены в следующей таблице:

**Таблица 11**

Порядок	Раствор	AUC (мл * мЕОП)
1	5 мМ NaOH	29,119
2	RODI	196
3	20% EtOH	4
4	RODI	1
5	5 мМ NaOH	125
6	RODI	57

7	6 Н гуанидин HCl	889
8	0,1N NaOH	N/A

[0125] Как показано на фиг. 18 и отражено значениями AUC в таблице выше, исходный элюат 5 мМ NaOH демонстрировал наибольшую AUC с большим отрывом (пик А). Растворы, вводимые в колонку после начального раствора 5 мМ NaOH, обеспечивали минимальное дополнительное удаление материала из колонки для HIC, о чем свидетельствуют их относительно низкие соответствующие значения AUC. Второе по величине значение AUC ассоциировано с элюатом 6 Н гуанидина HCl, но на уровне 889 мл\*мЕОП оно составляло менее одной тринадцатой от значения AUC, ассоциированного с элюатом начального 5 мМ NaOH. Кроме того, меньшее значение AUC пика 6 Н гуанидина HCl в этом способе регенерации по сравнению со значением AUC пика 6 Н гуанидина HCl в контрольном способе, показанном на фиг. 17 (7,390 мл\*мЕОП), свидетельствовало о том, что начальный раствор 5 мМ NaOH обеспечивал значимо улучшенную регенерацию колонки для HIC по сравнению с контрольным экспериментом. RODI, 20% этанол, 6 Н гуанидин HCl и 0,1 Н NaOH обеспечивали минимальный дополнительный благоприятный эффект в отношении регенерации при HIC при использовании после раствора 5 мМ NaOH.

#### [0126] Пример 18

[0127] Шесть смесей, каждая из которых включала разную целевую молекулу (например, целевое моноклональное антитело) и разную концентрацию цитрата в нагрузочном буфере, подвергали HIC на колонке, содержащей среды Capto™ Phenyl (High Sub) (GE Life Sciences). После элюции каждого моноклонального антитела, использованную колонку для HIC подвергали воздействию объема RODI и гидроксида натрия в градиенте, начинающемся с отсутствия гидроксида натрия (чистый RODI) до 1 Н гидроксида натрия, с последующим градиентом в противоположном направлении (от 1 Н гидроксида натрия до чистого RODI). И наконец, каждый способ заканчивали введением и сбором элюата для 6 Н гуанидина HCl. В таблице ниже приведены pH и концентрация цитрата в каждой нагрузочной смеси.

**Таблица 12**

Смесь	Целевое антитело	pH	Концентрация цитрата в нагрузочном буфере
A	mAb 7	5,3	30 мМ
B	mAb 8	6	10 мМ
C	mAb 1	6,5	40 мМ
D	mAb 2	5,8	30 мМ
E	mAb 6	6	30 мМ
F	mAb 9	8	140 мМ

[0128] Для каждого способа получали хроматограмму; хроматограммы показаны в последовательности на фиг. 19. Как показано, каждая хроматограмма А-F включает пик

(A', B', C', D' E', F'), соответствующий элюции материала, связанного со средами для НИС, при элюции приблизительно 5 мМ NaOH. Пики последующей элюции гуанидина HCl являлись крайне небольшими или отсутствовали. Таким образом, показано, что эффективность раствора для регенерации не ограничивалась использованием одного моноклонального антитела.

[0129] Пример 19

[0130] Оценивали множество способов НИС, имеющих разные условия, для определения того, могут ли такие способы вызывать проблемы с регенерацией/пригодностью. Лунки 96-луночного фильтровального планшета (фильтровальный планшет AcroPrep™ Advance 1 мл, мембрана Supor 1,2 мкм, партия № 8130, Pall Corporation) упаковывали 0,02 мкл различных сред для НИС следующим образом:

**Таблица 13**

Лунки в колонках:	Среды
1-3	TOYOPEARL® Hexyl-650C
4-6	Среда B (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (High Sub) (GE Healthcare Life Sciences))
7-9	Среда C (POROS™ Ethyl (Thermo Scientific™))

[0131] Получали аликвоты нагрузочного материала, содержащие одно из трех целевых антител (mAb 1, mAb 2, mAb 3) и доводили их до концентрации 0,33 г/л, до целевой концентрации 5 г/л при смешивании со средами для НИС. Для каждого из трех целевых антител аликвоту нагрузочного материала титровали до разного pH (4,5, 6,25 или 8,0) с использованием 2 М уксусной кислоты или 2 М основания Трис для получения всего девяти аликвот, каждая из которых включала одно из трех целевых антител и демонстрировала одно из трех разных значений pH.

[0132] Каждую из трех колонок из лунок, упакованных одним типом среды, подвергали способу очистки при разном pH (4,5, 6,25 или 8,0) для получения массива экспериментов, осуществляемых с использованием различных комбинаций сред и pH. Ряды лунок в каждой колонке разделяли на группы, таким образом, что каждую группу рядов подвергали эксперименту для иного целевого антитела (mAb 1, mAb 2 или mAb 3). Для осуществления каждого эксперимента при соответствующем pH для соответствующего целевого антитела использовали аликвоту нагрузочного материала, включающую целевое антитело при соответствующем pH, а также уравнивающий буфер 40 мМ Трис, 300 мМ цитрата при соответствующем pH.

[0133] Следующие стадии осуществляли одновременно в отношении массива:

1. Лунки, упакованные различными смолами для НИС, три раза уравнивают с использованием уравнивающего буфера при соответствующем pH.
2. Нагрузочный материал, включающий желаемое целевое антитело, при соответствующем pH добавляют в каждую лунку и инкубируют в течение одного часа.

3. Планшеты центрифугируют при 1100 об./мин.
4. Собирают элюат (такой как компоненты, несвязанные со средами во время инкубации).
5. Лунки промывают дважды уравнивающим буфером при соответствующем рН для каждого эксперимента.
6. Элюцию в псевдоградиенте осуществляют с использованием уравнивающего буфера при соответствующем рН. Каждую лунку подвергают воздействию уравнивающего буфера в течение семи повторений, где концентрацию цитрата снижают линейно с 300 мМ до 0 мМ за все семь повторений (с шагом 42,9 мМ на повторение).
7. Лунки промывают дважды RODI и дважды 1 Н гидроксидом натрия.
8. Планшет центрифугируют при 1100 об./мин.
9. Лунки подвергают стрипированию дважды раствором 6 Н гуанидин HCl.
10. Планшет центрифугируют при 1100 об./мин.

[0134] Для каждой лунки получали хроматограмму целевого полипептида в материале, удаленном из лунки (элюат, элюент, промывка и т.д.). Для анализа результатов каждую хроматограмму разделяли на три зоны, где первая зона включала массу целевого полипептида, наблюдаемую в материале, удаленном на стадиях 2, 3 и 4 (элюат, промывки и элюция), вторая зона включала массу целевого полипептида, наблюдаемого в материале, удаленном на стадиях 5, 6, 7, 8 (с использованием RODI и 1 Н гидроксида натрия), и третья зона включала массу целевого полипептида, наблюдаемого в материале, удаленном на стадиях 9, 10 (с использованием 6 Н гуанидина HCl). Примеры трех хроматограмм, полученных для экспериментов по очистке целевого антитела mAb 1, при рН 6,25 и каждой из трех разных сред для НИС (TOYOPEARL® Hexyl-650C, Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (High Sub) и POROS™ Ethyl) и разделенных на три зоны, показаны на фиг. 20А-20С.

[0135] Сравнение показало, что эксперименты и анализы, осуществленные на тестовых лунках, совпадали с экспериментами и анализами, осуществленными с помощью крупномасштабных колонок, со статистически значимой точностью 98%.

#### [0136] Пример 20

[0137] Общая совокупность данных с использованием способов высокопроизводительного скрининга, представленных в настоящем описании, позволяет разрабатывать прогностические функции, с помощью которых можно получать информацию для разработки способов НИС с улучшенными эффективностями и выходами. Например, можно строить граничные функции, с помощью которых описывают взаимосвязь между несколькими параметрами (например, рН, концентрации цитрата в элюирующем буфере, нагрузочной массой, выбором сред для НИС) и эффективностью или выходом способа.

[0138] Фиг. 21А является графиком граничной функции, связывающей концентрацию цитрата в элюирующем буфере и рН с прогнозируемым выходом способа НИС с учетом общей совокупности данных высокопроизводительного скрининга для

указанного антитела и среды Phenyl Sepharose® при нагрузке 100 г на литр среды. Заштрихованная область соответствует комбинациям параметров способа НИС, приводящих к прогнозируемому выходу менее 90% от теоретического выхода. Эта граничная функция дает информацию о том, какие параметры цитрата и pH необходимо учитывать для способов НИС, включая указанное антитело и среду Phenyl Sepharose®. Комбинации pH и концентрации цитрата вне заштрихованной области являются подходящими параметрами способов НИС для указанного антитела и среды Phenyl Sepharose®, в то время как комбинации pH и концентраций цитрата в заштрихованной области являются исключенными параметрами.

[0139] Фиг. 21В является графиком граничной функции, связывающей концентрацию цитрата в элюирующем буфере и pH с прогнозируемым выходом способа НИС с учетом общей совокупности данных высокопроизводительного скрининга для указанного антитела и хроматографических сред Capto™ Phenyl (High Sub) при нагрузке 100 г на литр сред. Заштрихованная область соответствует комбинациям параметров способов НИС, приводящих к прогнозируемому выходу менее 90% от теоретического выхода. Эта граничная функция дает информацию о том, какие параметры цитрата и pH необходимо учитывать для способов НИС, включая указанное антитело и среду Capto™ Phenyl (High Sub). Комбинации pH и концентрация цитрата вне заштрихованной области являются подходящими параметрами способов НИС для указанного антитела и среды Capto™ Phenyl (High Sub), в то время как комбинации pH и концентраций цитрата в заштрихованной области являются исключенными параметрами.

[0140] В дополнение к граничным функциям, описанным выше, данные, собранные при высокопроизводительном скрининге, могут сделать возможной разработку передаточной функции или другой математической модели, которая может помочь в дизайне способов НИС. Например, передаточную функцию можно регрессировать, связывая данные анализа элюции, высокопроизводительного скрининга или лабораторного способа НИС с полномасштабным способом НИС. Например, для набора способов НИС, включающих прогнозируемый выход (например, выход, прогнозируемый с помощью маломасштабного анализа или высокопроизводительного скрининга), можно определять точный выход для каждого способа НИС посредством полномасштабной хроматографии. Взаимосвязь между прогнозируемым выходом и точным выходом можно регрессировать для улучшения прогностических моделей. Будущие прогнозируемые выходы можно вычислять по меньшей мере частично с учетом подвергнутой регрессии взаимосвязи (например, передаточной функции), как используют в отношении данных анализа элюции, высокопроизводительного скрининга или лабораторного способа НИС.

[0141] Одну или более передаточных функций, граничных функций и/или прогностических моделей можно комбинировать для разработки динамической прогностической модели. На фиг. 22 показана динамическая прогностическая модель. С помощью динамической прогностической модели вычисляют то, как изменения одного или более параметров способа НИС (например, pH, концентрации цитрата, нагрузочной

массы, хроматографической смолы) влияют на количественно анализируемые свойства способа ИС. Например, в примере, показанном на фиг. 22, выбранные таким образом параметры способа включают: рН 6, концентрацию цитрата 30 мМ, нагрузочную массу 100 г на литр сред для ИС и смолу С (например, среду Phenyl Sepharose®). Затем с помощью модели определяют, как каждый из параметров влияет на прогнозируемый выход, высокомолекулярную фракцию и концентрацию совокупности белков клетки-хозяина в элюате, собранном с использованием способа ИС с выбранными параметрами. Как показано на фиг. 22, выбранные параметры приводят к прогнозируемому выходу приблизительно 95%, высокомолекулярной фракции приблизительно 1,3 и концентрации совокупности белков клетки-хозяина приблизительно 22,5 м.д. Эти количественно анализируемые свойства можно использовать в оценке способа ИС и получать с помощью них информацию о том, как параметры способа влияют на продукт способа ИС. Значения количественно анализируемых свойств, вычисленные с помощью динамической модели, могут обновляться в реальном времени с изменением параметров способа.

[0142] В некоторых вариантах осуществления также можно вычислять общую целесообразность как составную оценку количественно анализируемых свойств способа (например, составную оценку прогнозируемого выхода, высокомолекулярной фракции и концентрации совокупности белков клетки-хозяина). Вычисления целесообразности могут быть основаны на взвешивании количественных свойств способов ИС. Например, изменения в способе ИС, влияющие на выход способа, могут быть более важны, чем изменения, влияющие на эффективность. В динамической прогностической модели можно учитывать относительную важность количественных измерений и приписывать веса разным измерениям таким образом, что они не в равной степени влияют на общую целесообразность. В некоторых вариантах осуществления динамическую прогностическую модель можно обновлять со сбором дополнительных данных хроматографии (например, данных маломасштабных анализов, высокопроизводительного скрининга и полномасштабных экспериментов по хроматографии) и получать сводные данные.

#### [0143] Пример 21

[0144] Множество способов ИС, включающих различные комбинации целевых молекул и сред для ИС при различных рН, тестировали в анализе элюции в градиенте для определения того, могут ли такие комбинации вызывать проблемы в отношении регенерации/пригодности, и следует ли исключать какие-либо комбинации целевой молекулы и сред для ИС из разработки дополнительных способов ИС.

[0145] Лунки 96-луночного фильтровального планшета (фильтровальный планшет AcroPrep™ Advance 1 мл, мембрана 1,2 мкм Supor, партия № 8130, Pall Corporation) упаковывали 0,02 мкл различных сред для ИС. Получали аликвоты нагрузочного материала, содержащего целевую молекулу, и доводили до концентрации 0,33 г/л, до целевой концентрации 5 г/л при смешивании со средами для ИС. Для каждого из трех целевых антител аликвоту нагрузочного материала титровали с несколькими разными рН

(например, 4,5, 6,25 или 8,0) с использованием 2 М уксусной кислоты или 2 М основания Трис для получения нескольких аликутов, каждая из которых включает целевое антитело и демонстрирует разный рН.

[0146] Каждую лунку 96-луночного планшета упаковывают одним типом среды и подвергают способу НИС при разном рН (4,5, 6,25 или 8,0) для получения массива экспериментов, осуществляемых с использованием различных комбинаций сред и рН.

[0147] Следующие стадии осуществляют одновременно в отношении массива:

1. Лунки, упакованные различными смолами для НИС, уравнивают три раза с использованием уравнивающего буфера при соответствующем рН.

2. Нагрузочный материал, включающий желаемую целевую молекулу при соответствующем рН, добавляют в каждую лунку и инкубируют в течение одного часа.

3. Планшет центрифугируют при 1100 об./мин.

4. Собирают элюат (включая, например, компоненты, несвязанные со средами во время инкубации).

5. Лунки промывают три раза с использованием уравнивающего буфера при соответствующем рН для каждого эксперимента.

6. Осуществляют псевдоэлюцию. Каждую лунку подвергают воздействию элюирующего буфера в семи повторениях, при этом планшет центрифугируют при 1100 об./мин. и собирают элюат после каждого повторения.

7. Лунки дважды промывают NaOH. В разных лунках массива можно использовать разные концентрации NaOH. Например, две лунки могут включать одинаковые хроматографические среды, и их нагружали при одинаковом рН, но в одной лунке используют промывку 5 мМ NaOH, а в другой лунке используют промывку 1 Н NaOH. После каждой промывки планшет центрифугируют при 1100 об./мин. и собирают смыв.

8. Лунки стрипируют дважды раствором 6 Н гуанидина HCl и собирают стрипированный материал.

[0148] Для каждой лунки получали хроматограмму целевой молекулы в материале, удаленном из лунки (элюате, элюенте, смыве и т.д.). Для анализа результатов каждую хроматограмму разделяли на три зоны, где первая зона включала массу целевой молекулы, наблюдаемую в материале, удаленном на стадиях 2, 3 и 4 (элюат, промывки и элюция), вторая зона включала массу целевой молекулы, наблюдаемую в материале, удаленном на стадиях 5, 6, 7 (с использованием RODI и NaOH), и третья зона включала массу целевой молекулы, наблюдаемую в материале, удаленном на стадии 8 (с использованием 6 Н гуанидина HCl).

[0149] Примеры хроматограмм, полученных при анализах элюции для первой целевой молекулы, показаны на фиг. 23А-26С. На фиг. 23А-23С показаны хроматограммы анализов элюции, включающих первую целевую молекулу, на среде Capto™ Phenyl (High Sub), на фиг. 24А-24С показаны хроматограммы анализов элюции, включающих первую целевую молекулу, на среде Capto™ Butyl, на фиг. 25А-С показаны хроматограммы анализов элюции, включающих первую целевую молекулу, на среде POROS™ Benzyl, на

фиг. 26А-С показаны хроматограммы анализов элюции, включающих первую целевую молекулу, на среде Phenyl Sepharose®. На фиг. 23А, 24А, 25А и 26А показаны хроматограммы эксперимента по анализу элюции при рН 4,5, на фиг. 23В, 24В, 25В и 26В показаны хроматограммы эксперимента по анализу элюции при рН 6,25, и на фиг. 23С, 24С, 25С и 26С показаны хроматограммы эксперимента по анализу элюции при рН 8. На фиг. 23А-26С пунктирной линией показаны хроматограммы анализов элюции, включающих промывку 5 мМ NaOH, и сплошной линией показаны хроматограммы анализов элюции, включающих промывку 1 Н NaOH.

[0150] Примеры хроматограмм, полученных при анализах элюции для второй целевой молекулы, показаны на фиг. 27А-28D. На каждой фигуре на фиг. 27А-28D показаны три хроматограммы, каждая для эксперимента по анализу элюции при разном рН. На фиг. 27А показаны хроматограммы для эксперимента по анализу элюции на среде Capto™ Phenyl (High Sub), на фиг. 27В показаны хроматограммы для эксперимента по анализу элюции на среде Capto™ Butyl, на фиг. 27С показаны хроматограммы для эксперимента по анализу элюции на среде TOYOPEARL™ Phenyl-650С, на фиг. 27D показаны хроматограммы для эксперимента по анализу элюции на среде POROS™ Ethyl, на фиг. 28А показаны хроматограммы для эксперимента по анализу элюции на среде TOYOPEARL™ Hexyl-650С, на фиг. 28В показаны хроматограммы для эксперимента по анализу элюции на среде TOYOPEARL™ Butyl-650С, на фиг. 28С показаны хроматограммы для эксперимента по анализу элюции на среде POROS™ Benzyl, на фиг. 28D показаны хроматограммы для эксперимента по анализу элюции на среде Phenyl Sepharose®. На фиг. 27А-28D пунктирной линией показаны хроматограммы анализов элюции, включающих промывку 5 мМ NaOH, и сплошной линией показаны хроматограммы анализов элюции, включающих промывку 1 Н NaOH.

[0151] Как можно видеть на хроматограммах, все тестируемые способы, включающие стрипирование 1 Н NaOH, включали более высокий процент массы целевой молекулы, чем сравнимые способы, включающие стрипирование 5 мМ NaOH. Т.е. больше целевой молекулы оставалось связанной с колонкой после стрипирования 1 Н NaOH по сравнению со стрипированием 5 мМ NaOH.

[0152] Сравнивая хроматограммы разных способов НИС для указанной целевой молекулы, из рассмотрения можно исключить некоторые среды для НИС и/или рН. Используя последовательность анализов элюции для исключения нежелательных комбинаций целевой молекулы, сред для НИС и рН из рассмотрения, можно улучшать скорость, с которой разрабатывают и тестируют способ НИС. Например, хроматограммы, на которых показано, что элюировали более 5% (например, более 10%) целевой молекулы в зоне 3, могут свидетельствовать о том, что указанная комбинация среды для НИС, рН и целевой молекулы не подходит для включения в способ НИС.

[0153] В дополнение к исключению сред для НИС, рН и целевых молекул из рассмотрения при использовании анализов элюции, массу зоны 3, вычисленную из хроматограмм, можно преобразовывать с помощью передаточной функции для



прогнозирования массы целевых молекул, элюированных в зоне 3 во время полномасштабного хроматографического эксперимента. Эту прогнозируемую массу также можно использовать для исключения комбинаций среды для НИС, pH и целевых молекул из рассмотрения. Пример списка вычисленного выделения целевых молекул зоны 3 для указанной целевой молекулы в последовательности способов НИС с использованием различных комбинаций сред для НИС и pH показан в таблице 14.

**Таблица 14**

<b>Среда для НИС</b>	<b>pH</b>	<b>Нормализованное выделение из зоны 3</b>	<b>Прогнозируемое полномасштабное выделение из зоны 3</b>
Capto™ Phenyl (High Sub)	4,5	38,2%	10,6%
Capto™ Phenyl (High Sub)	6,25	24,0%	-3,1%
Capto™ Phenyl (High Sub)	8	36,1%	9,1%
Capto™ Butyl	4,5	10,1%	4,9%
Capto™ Butyl	6,25	4,6%	4,6%
Capto™ Butyl	8	8,6%	4,9%
POROS™ Benzyl	4,5	18,0%	5,7%
POROS™ Benzyl	6,25	6,9%	1,5%
POROS™ Benzyl	8	9,9%	-0,3%
Phenyl Sepharose®	4,5	15,7%	1,6%
Phenyl Sepharose®	6,25	6,3%	0,0%
Phenyl Sepharose®	8	9,7%	0,6%

[0154] Как можно видеть из таблицы 14, анализ элюции, включающий указанную целевую молекулу, на среде Capto™ Phenyl (High Sub) при pH 4,5 приводил к нормализованному проценту выделения 38,2%. Этот результат при преобразовании посредством передаточной функции приводит к прогнозируемому полномасштабному выделению из зоны 3 10,6%. В вариантах осуществления, в которых заранее определенное пороговое значение составляет 10%, он будет превышать пороговое значение, и, таким образом, комбинация целевой молекулы, среды Capto™ Phenyl (High Sub) и pH 4,5 будет исключена из разработки дополнительных способов НИС. В некоторых вариантах осуществления, если исключение комбинации среды и pH для указанной целевой молекулы оправдано, эту комбинацию среды и pH также можно исключать из разработки дополнительных способов, включающих другие целевые молекулы.

[0155] Специалистам в этой области будет понятно, что концепция, на которой основано настоящее изобретение, легко можно использовать в качестве основы для разработки других способов и систем для осуществления нескольких целей по

настоящему изобретению. Таким образом, формулу изобретения не следует истолковывать как ограниченную приведенным выше описанием.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации концентрации щелочного раствора для раствора для регенерации колонки для хроматографии гидрофобных взаимодействий, включающий:

пропускание объема первого раствора через среды для гидрофобных взаимодействий в колонке, где первый раствор включает воду, и концентрация щелочного раствора начинается с приблизительно 0 Н и повышается с приблизительно постоянной скоростью до максимальной концентрации;

пропускание объема второго раствора через среды для гидрофобных взаимодействий, где второй раствор включает воду, и концентрация щелочного раствора начинается с максимальной концентрации и снижается с приблизительно постоянной скоростью до приблизительно 0 Н; и

идентификацию части первого или второго раствора, которая при пропускании через среды для гидрофобных взаимодействий удаляет материал, связанный со средами для гидрофобных взаимодействий.

2. Способ по п.1, где щелочной раствор включает гидроксид натрия, и где максимальная концентрация составляет приблизительно 1 Н.

3. Способ по п.1, где объем первого раствора и объем второго раствора составляют по приблизительно 20 объемов колонки каждый.

4. Способ оценки множества способов хроматографии, каждый из которых включает хроматографические среды, характерный для способа рН и целевую молекулу, включающий:

для каждого способа хроматографии:

в лунке фильтровального планшета добавление нагрузочной массы, содержащей целевую молекулу, в объем хроматографических сред и сбор элюата из лунки фильтровального планшета, где нагрузочная масса демонстрирует характерный для способа рН;

добавление множества аликвот буфера с хроматографическими средами для получения элюента из хроматографических сред, где буфер демонстрирует рН буфера, и концентрация космотропной соли линейно снижается в последовательности множества аликвот, и где первое количество целевой молекулы входит в элюат и элюент в комбинации;

добавление второго раствора в хроматографические среды для выделения второго количества целевой молекулы из хроматографических сред; и

добавление хаотропного средства в хроматографические среды для выделения третьего количества целевой молекулы из хроматографических сред.

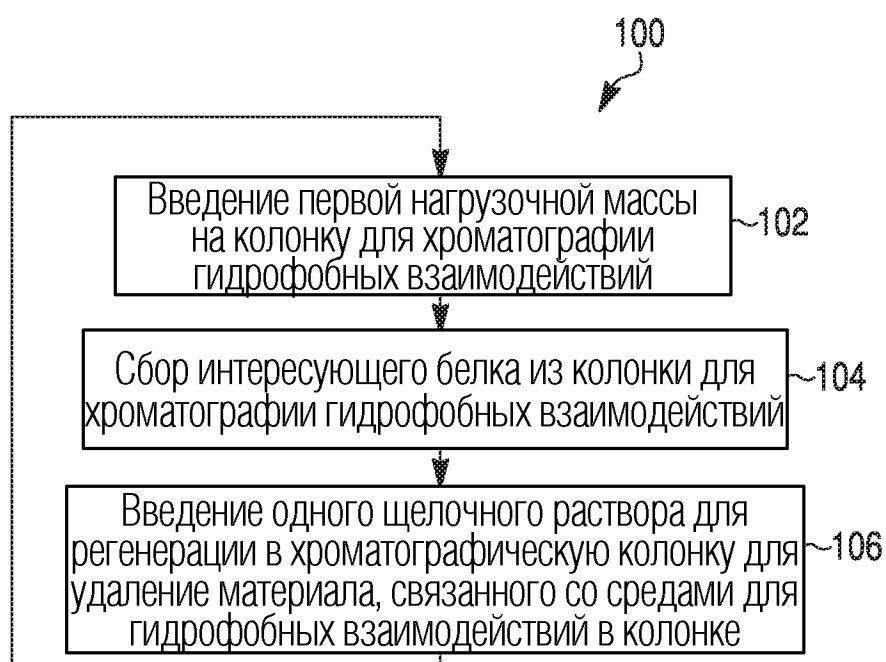
5. Способ по п.4, дополнительно включающий:

подготовку типовой операции хроматографии с использованием одного из указанных способов, где указанная типовая операция хроматографии включает хроматографию гидрофобных взаимодействий.

6. Способ по п.4, включающий осуществление способа одновременно для множества хроматографических экспериментов с использованием фильтровального планшета.

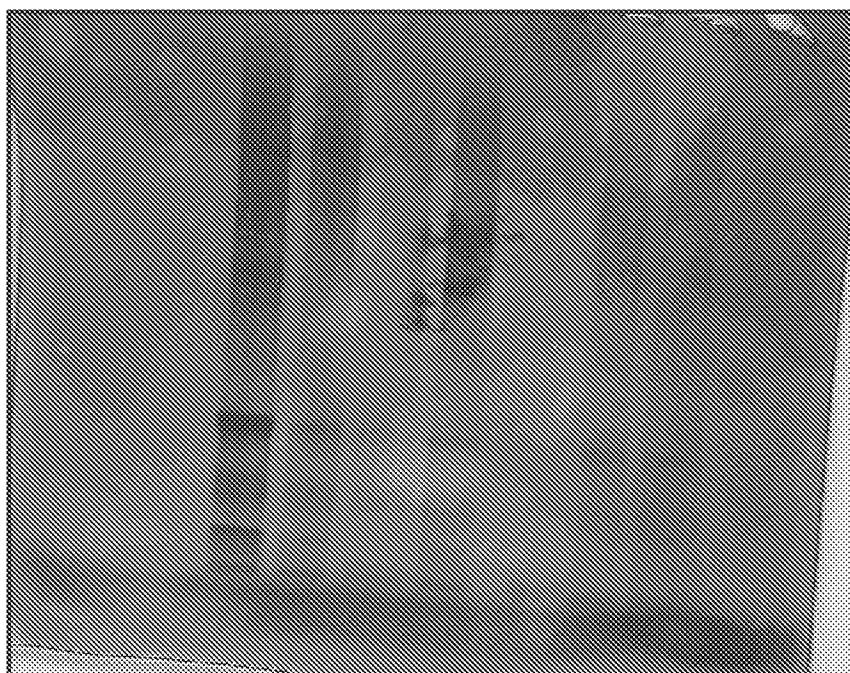
7. Способ по п.4, где нагрузочная масса включает менее приблизительно 20 мг целевой молекулы.

По доверенности



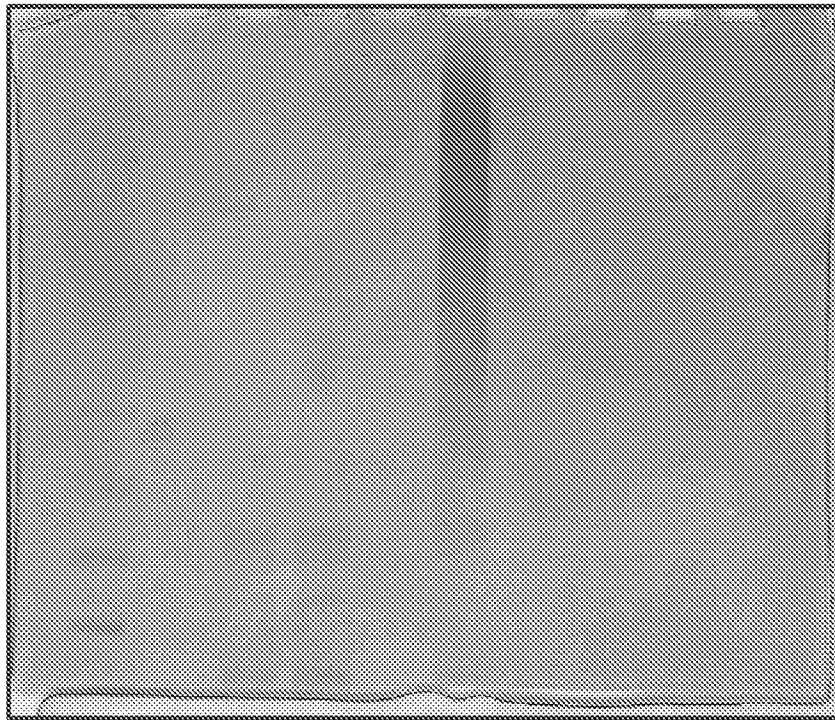
ФИГ. 1

\* A B C D E F G H

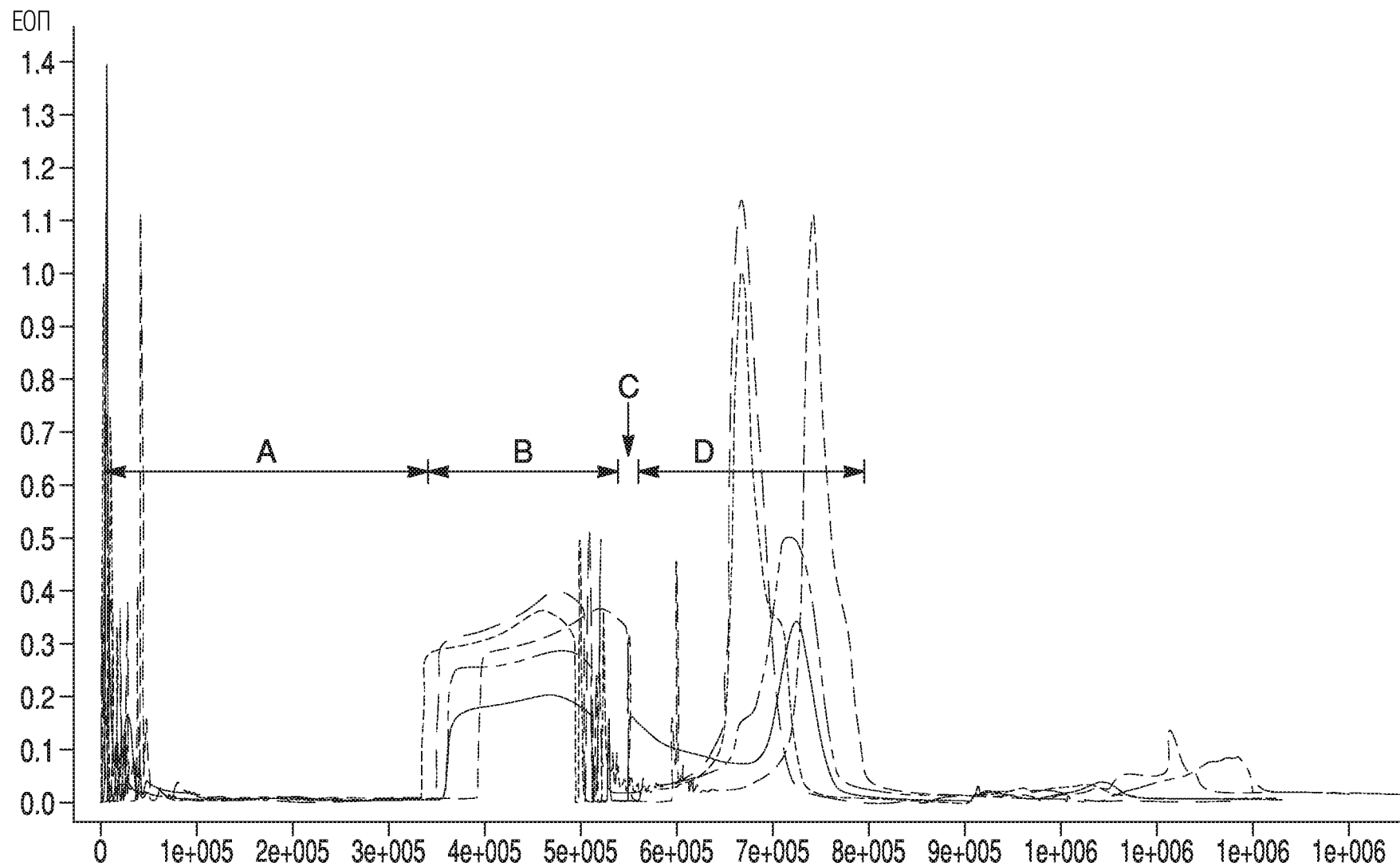


ФИГ. 2

\* A B C D E

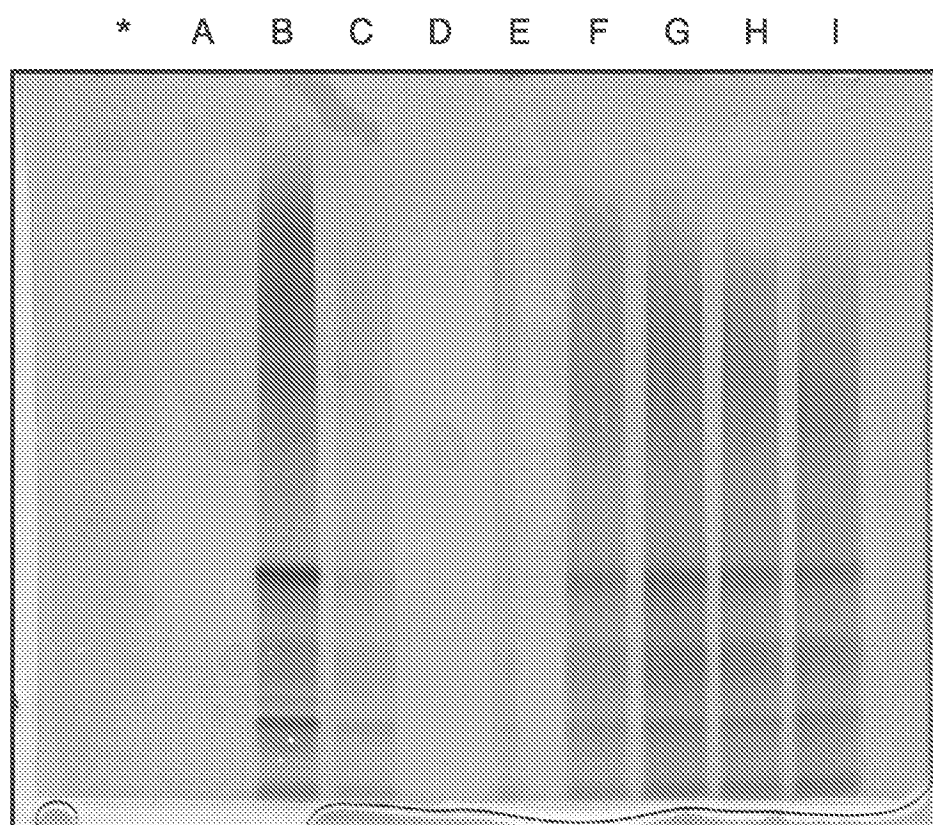


ФИГ. 3

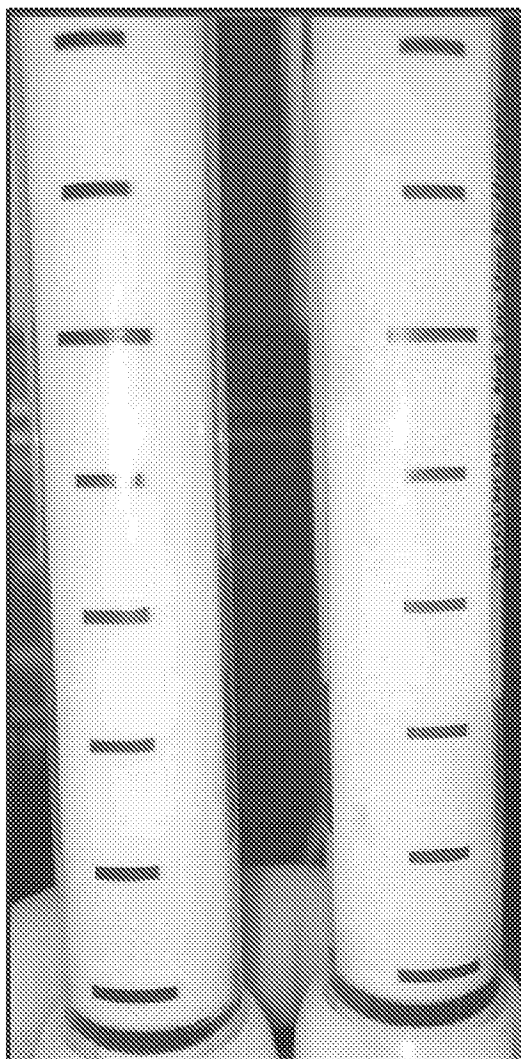


ФИГ. 4

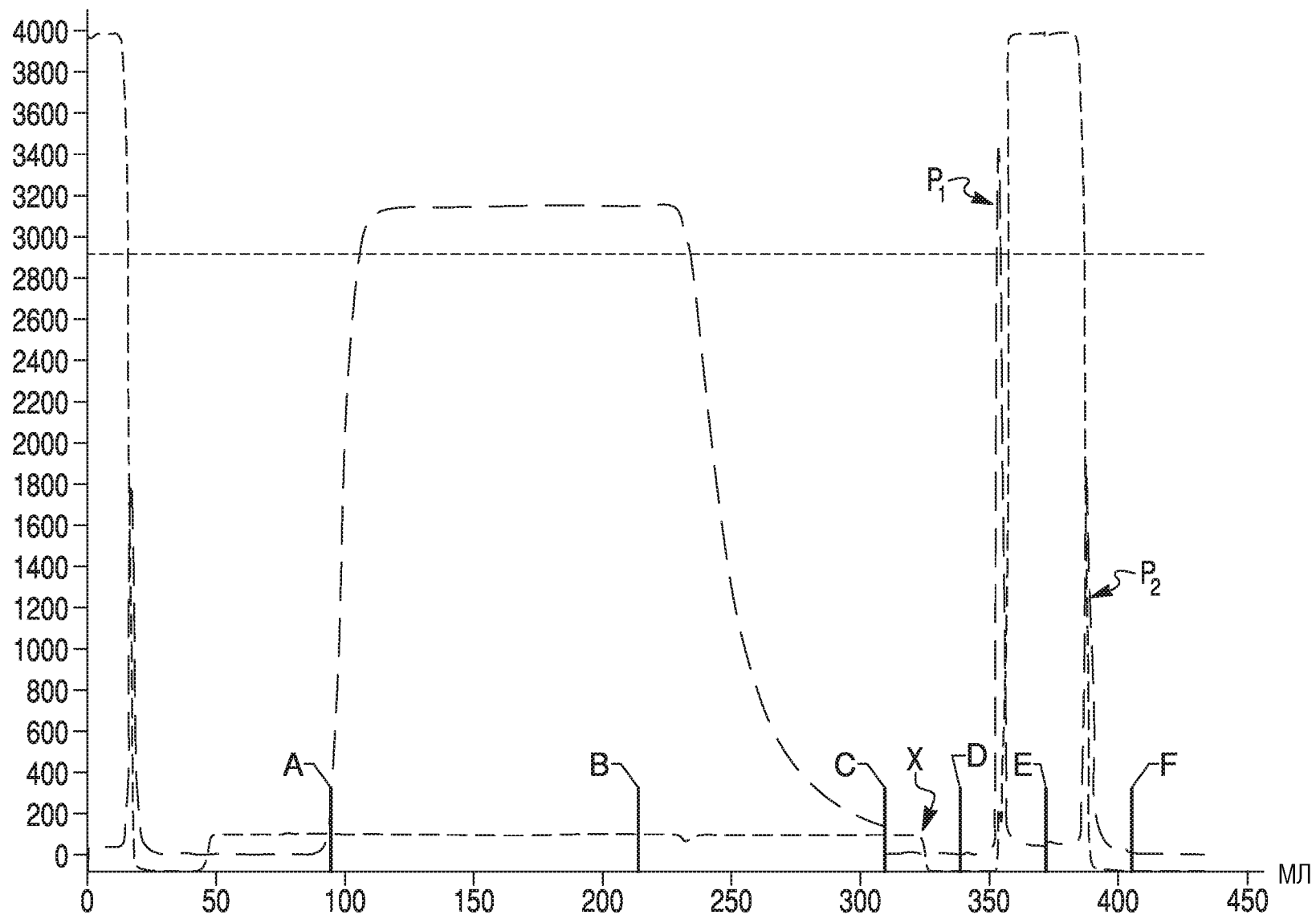




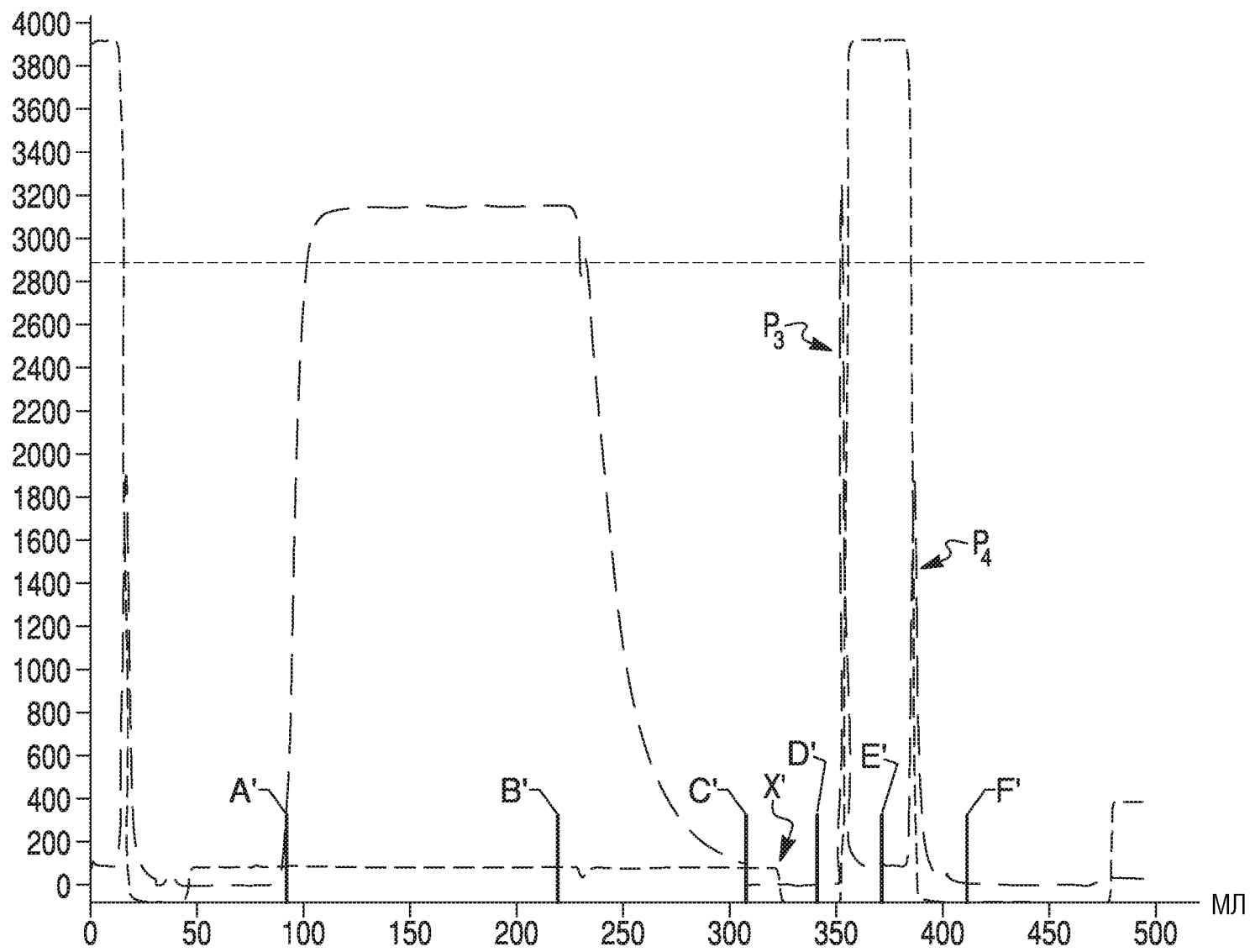
ФИГ. 5



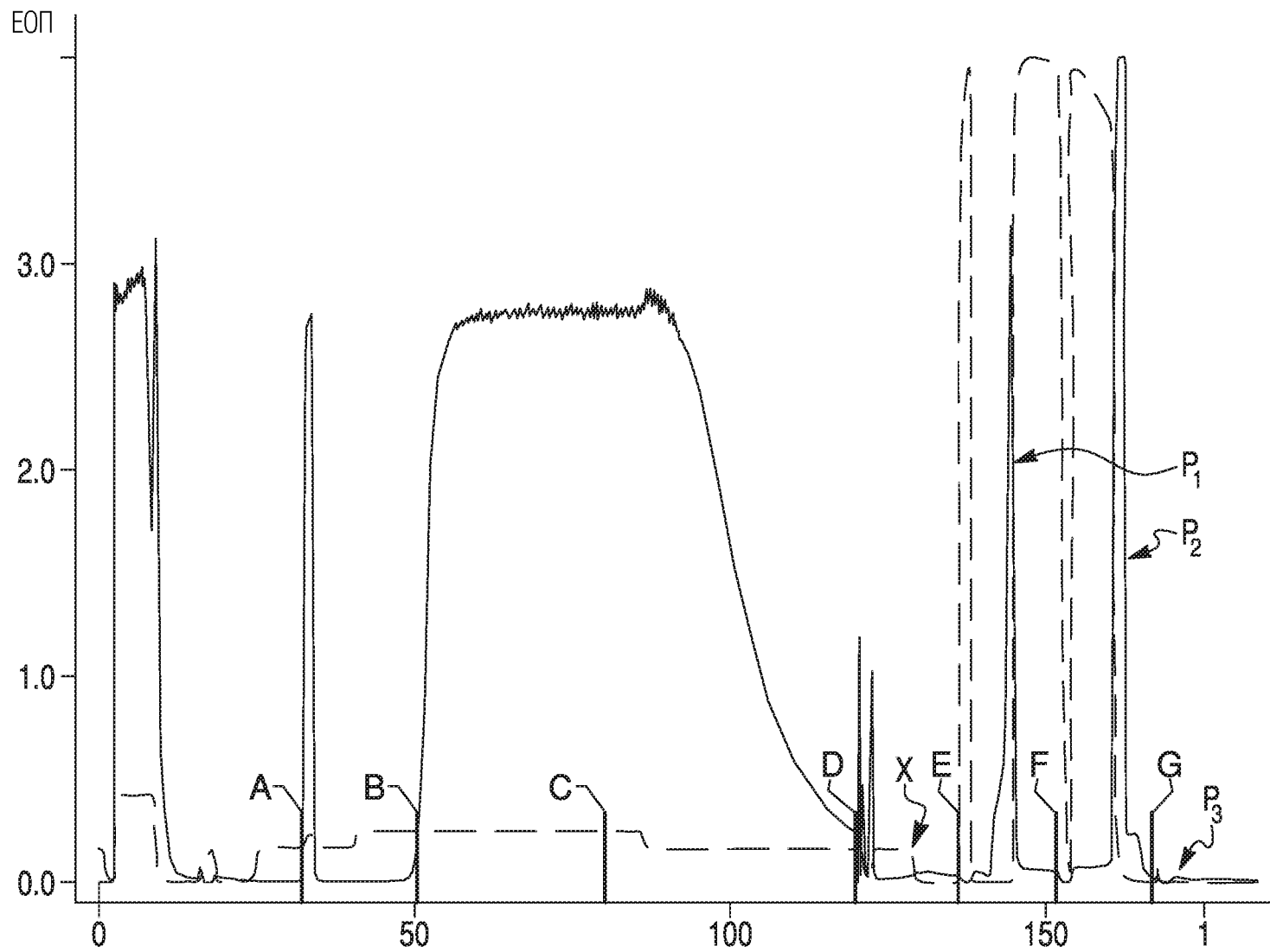
ФИГ. 6



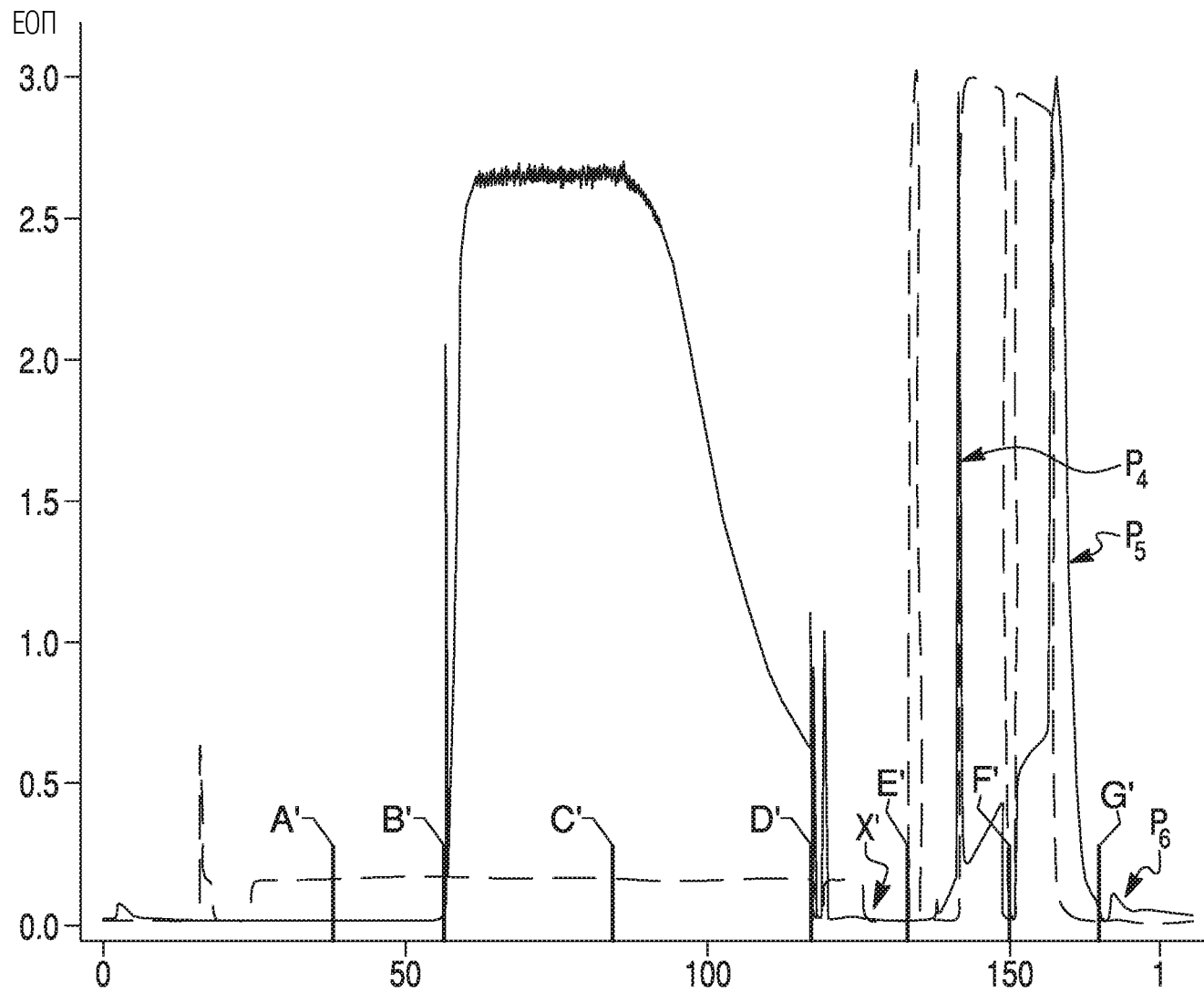
ФИГ. 7А



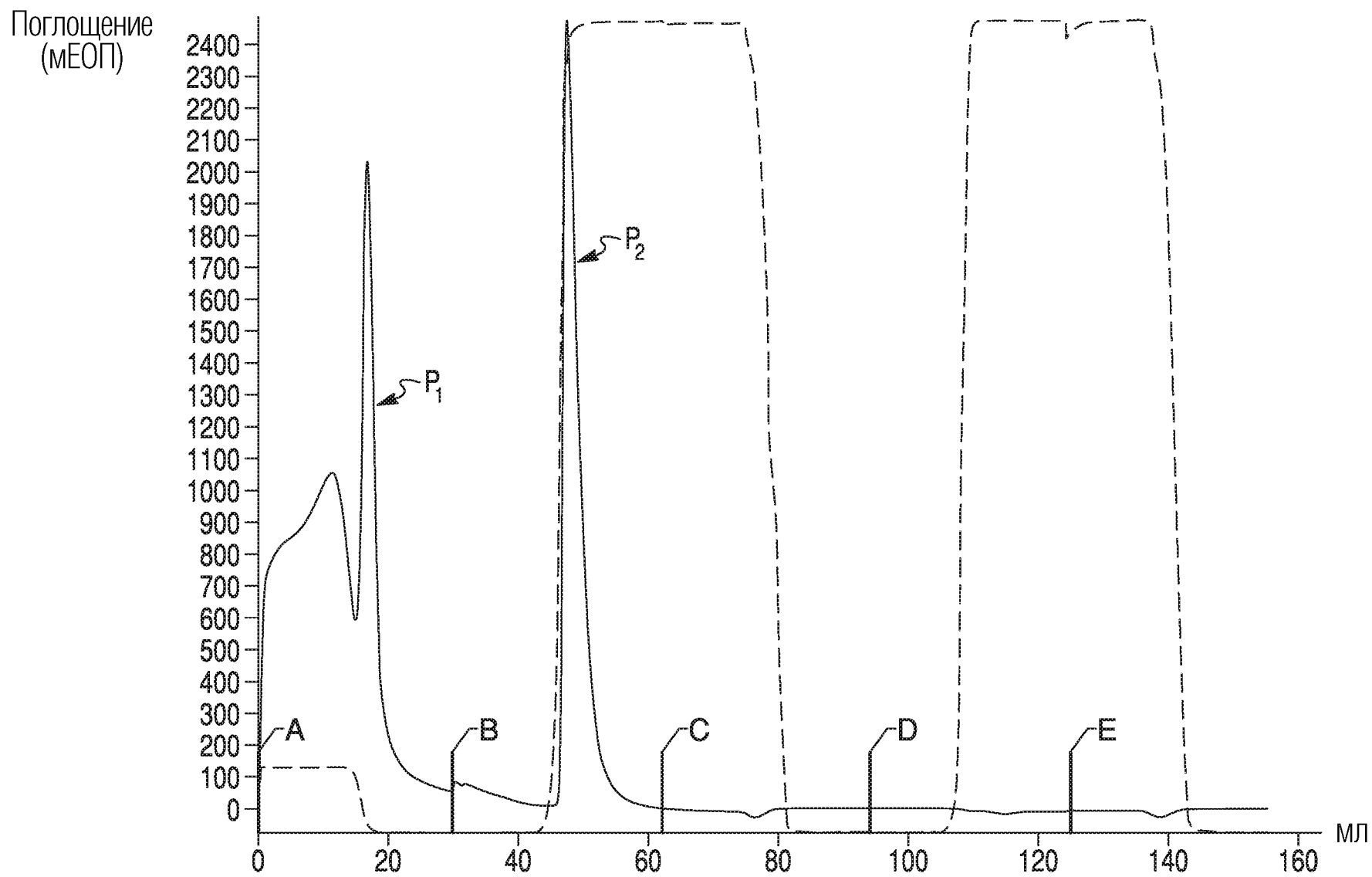
ФИГ. 7В



ФИГ. 8А

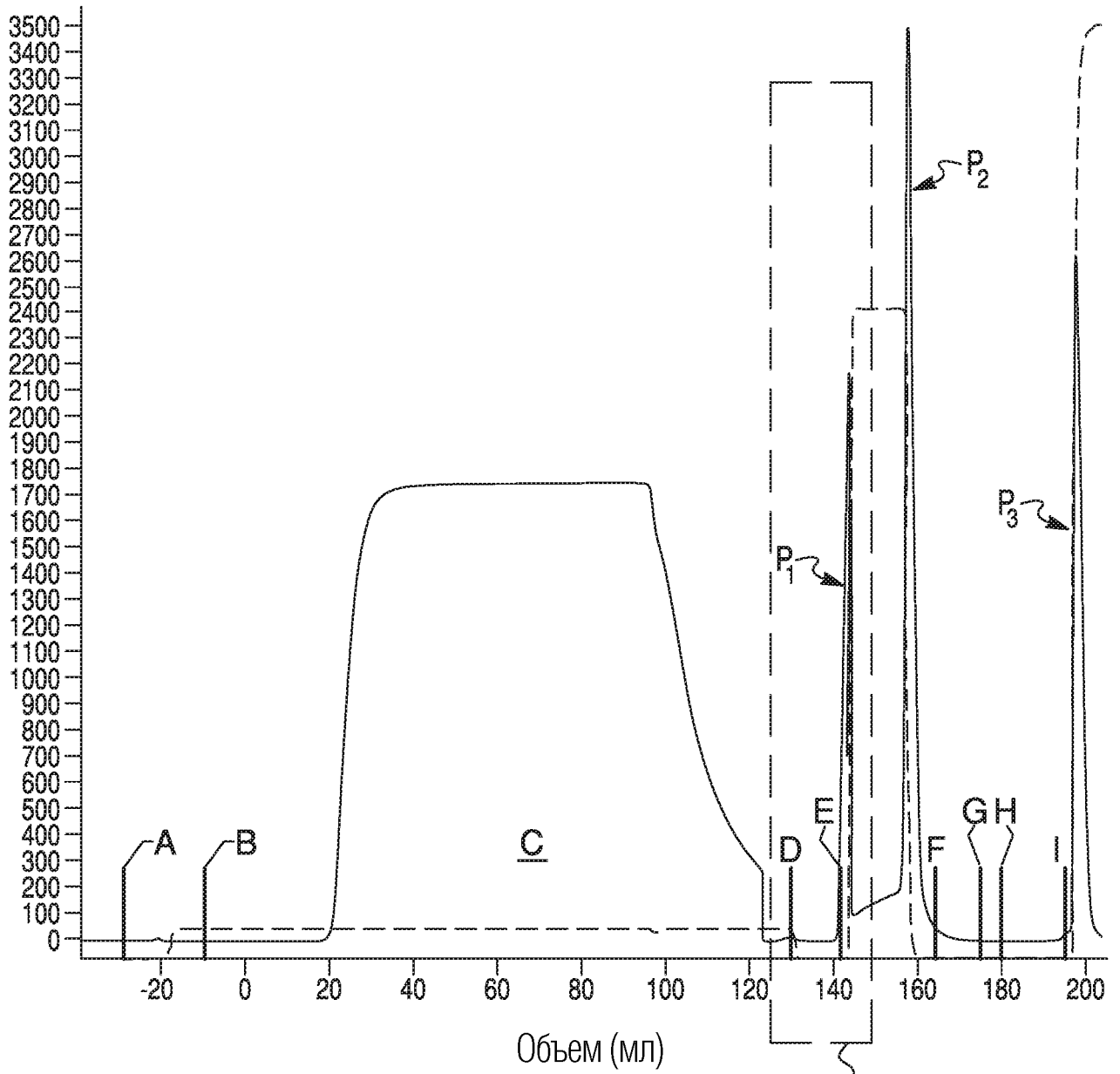


ФИГ. 8В



ФИГ. 9

Поглощение  
(МЕОП)

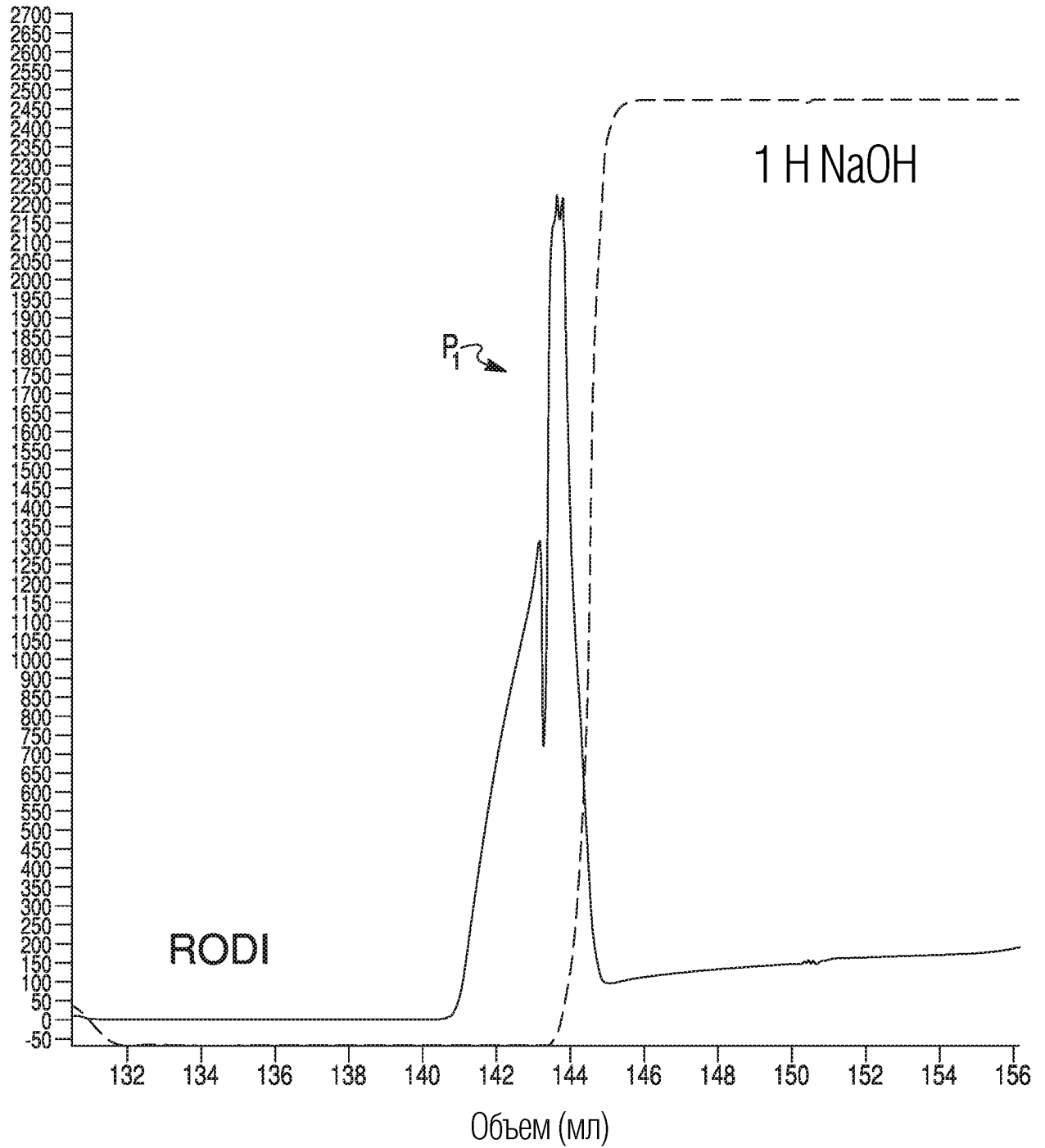


См. ФИГ. 10В

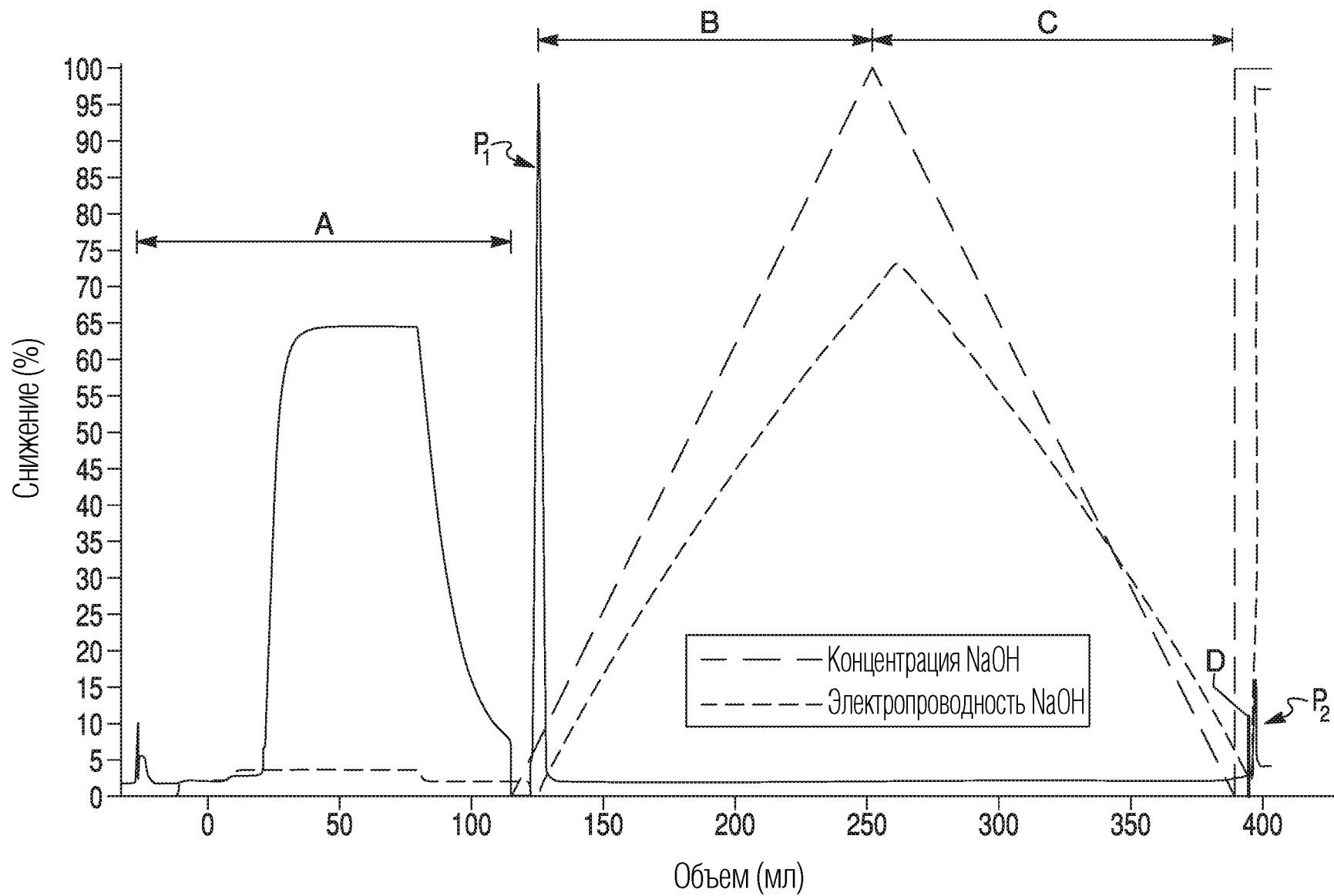
ФИГ. 10А



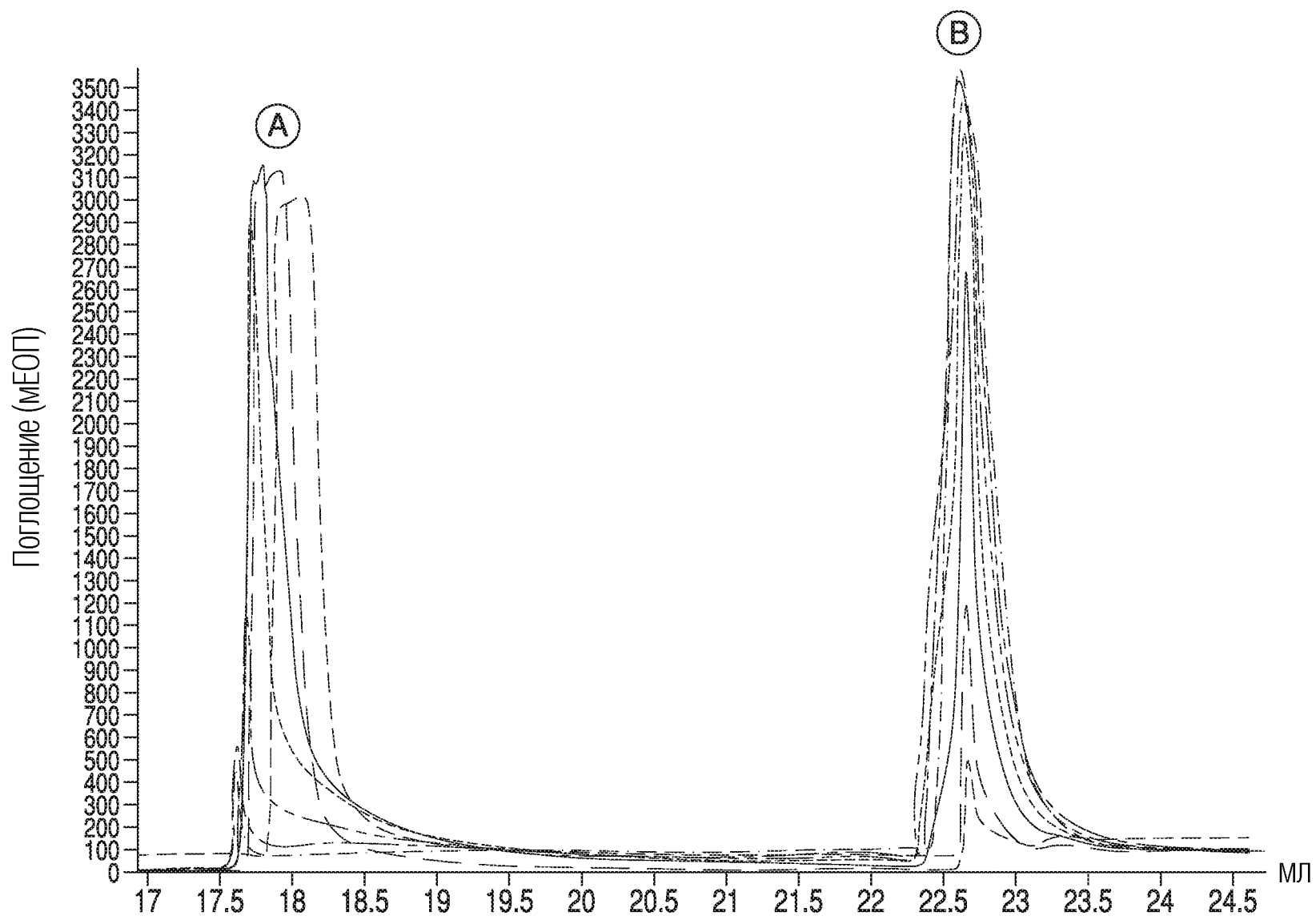
Поглощение  
(МЕОП)



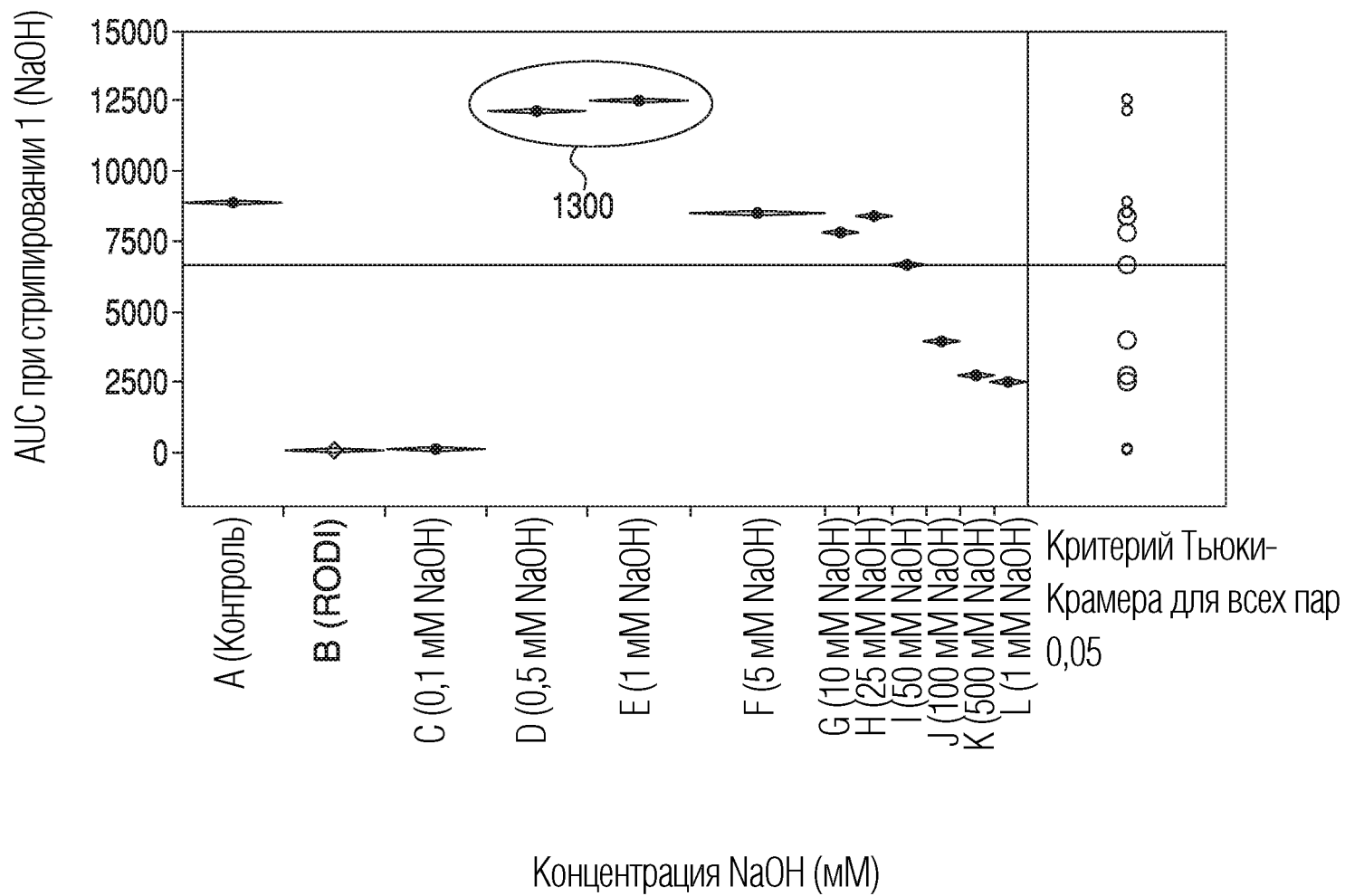
ФИГ. 10В



ФИГ. 11

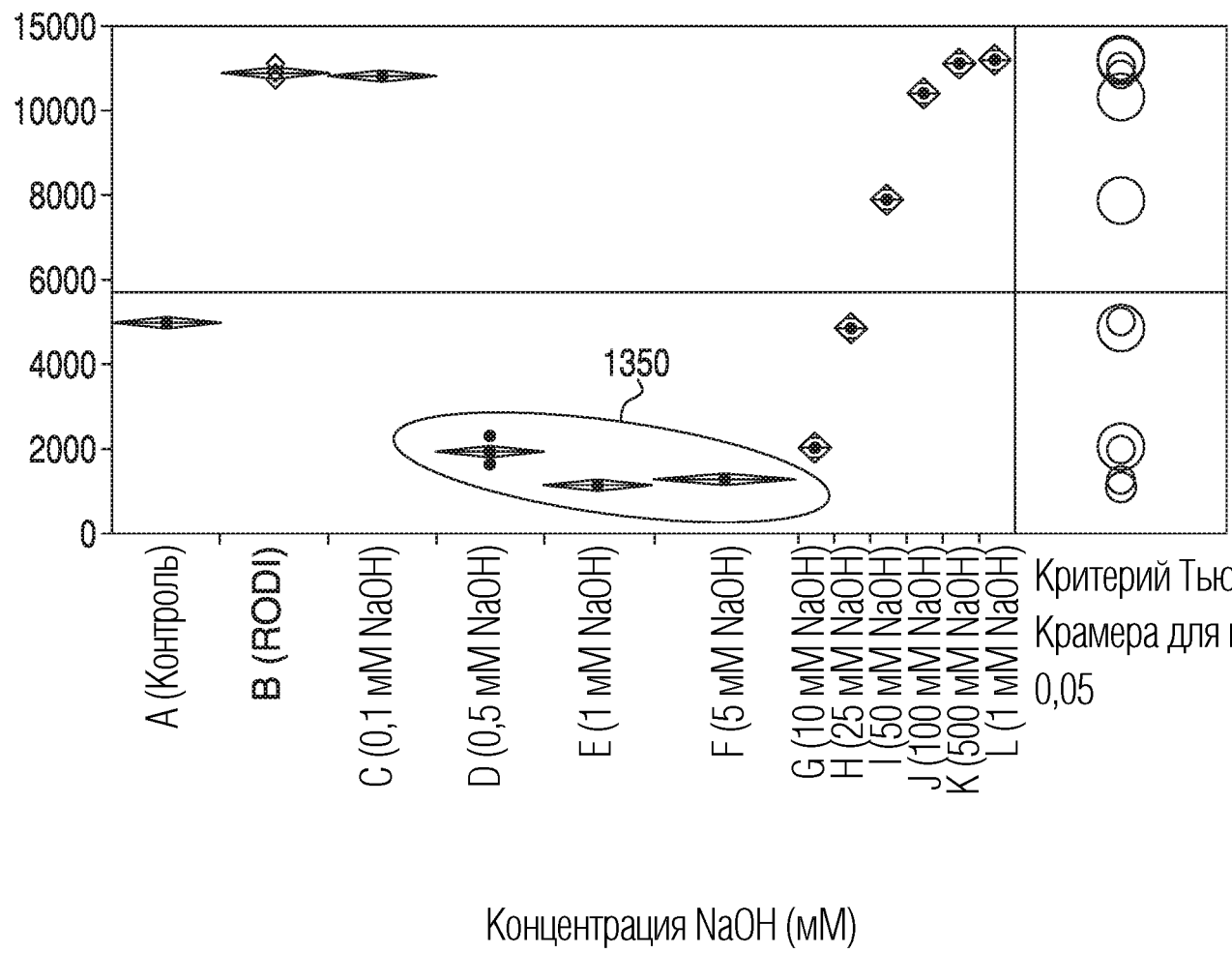


ФИГ. 12

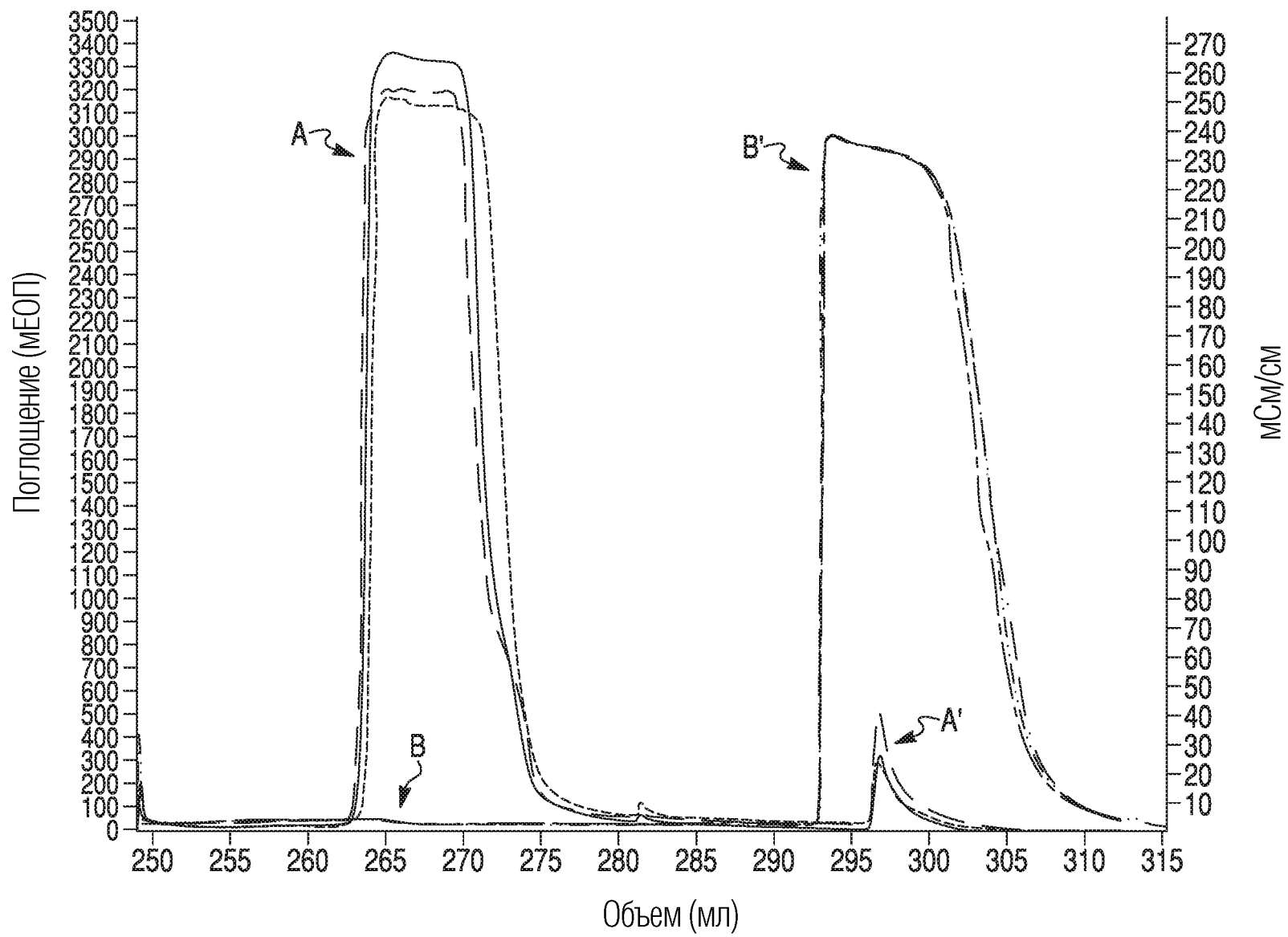


ФИГ. 13А

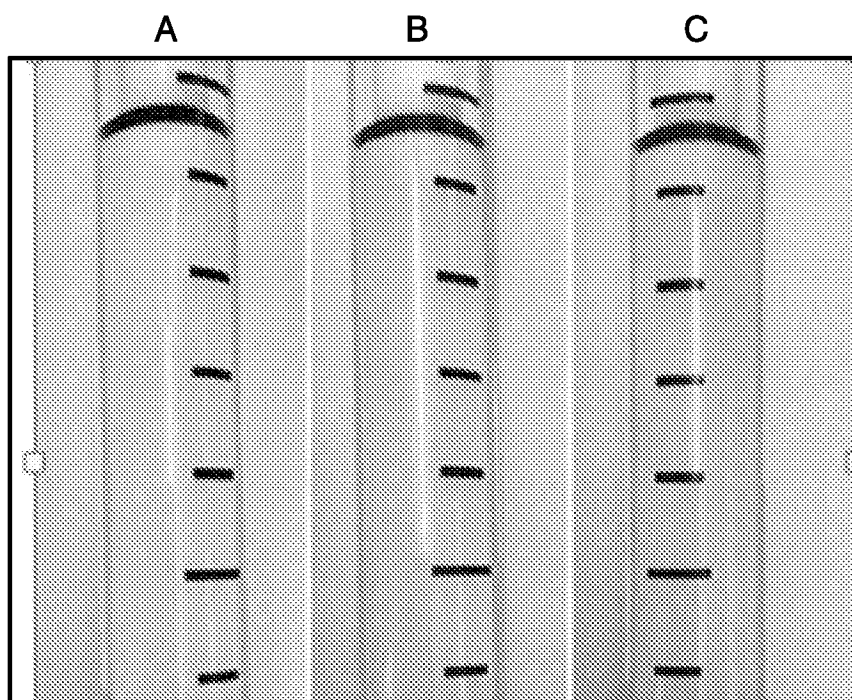
АУС при стрипировании 1 (6 Н гуанидин HCl)



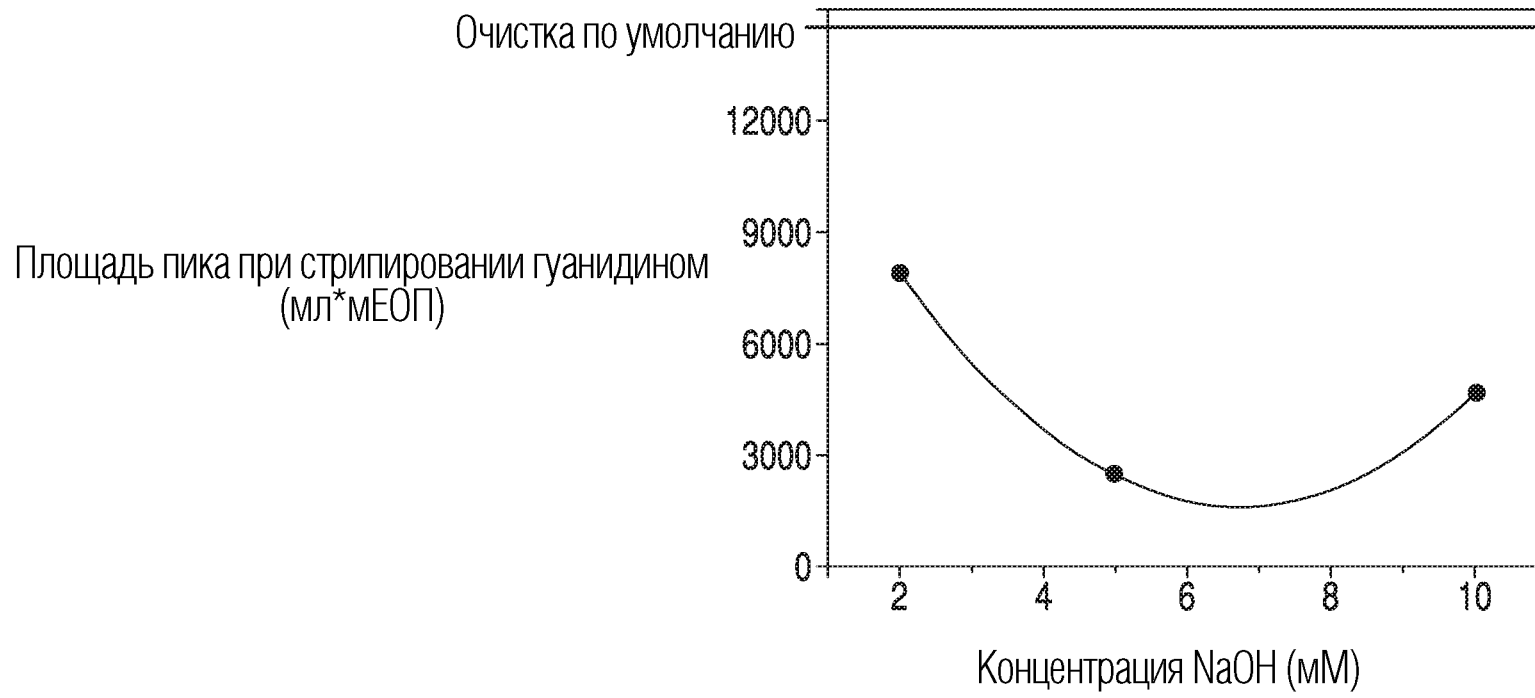
ФИГ. 13В



ФИГ. 14

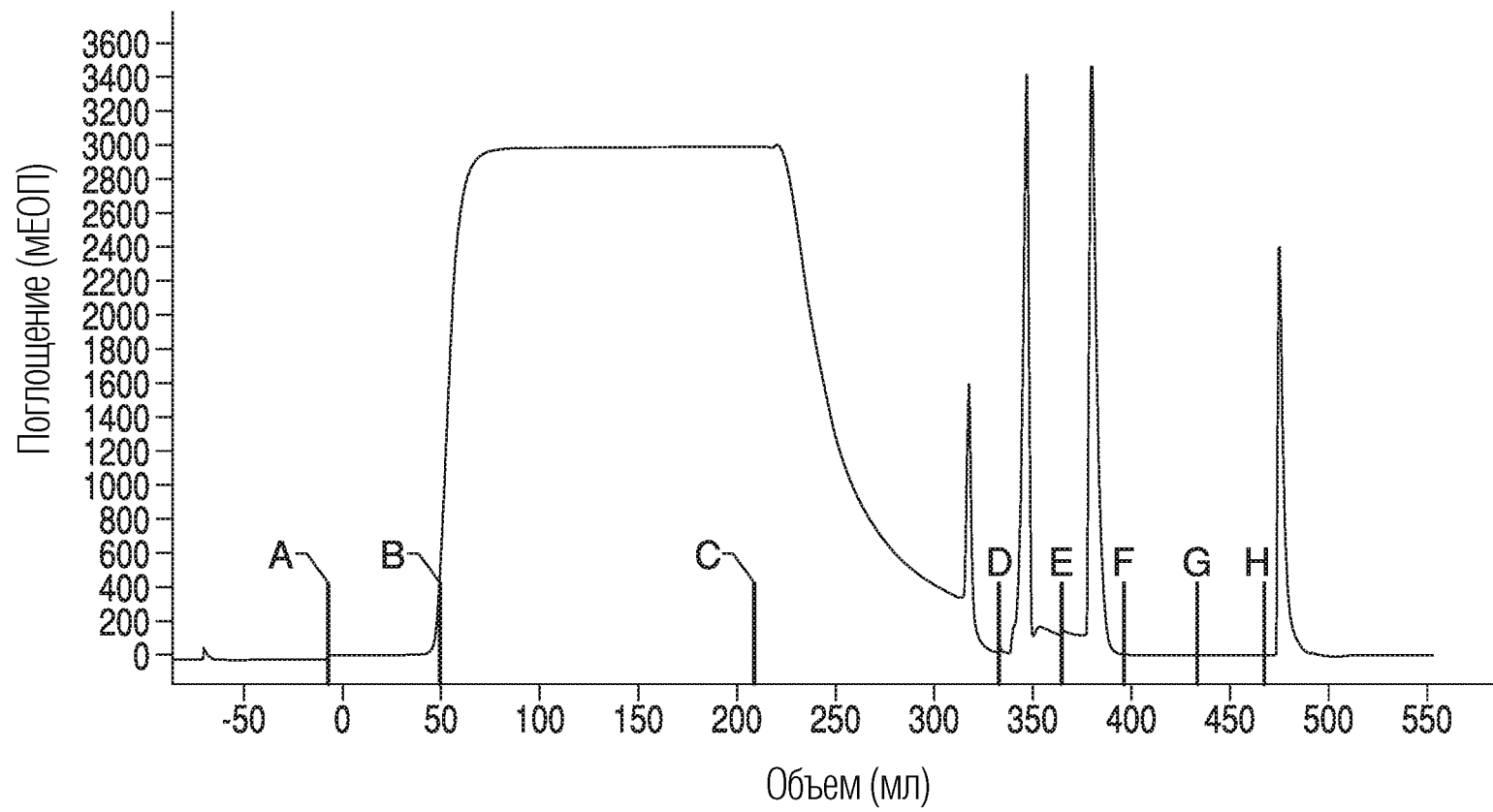


ФИГ. 15

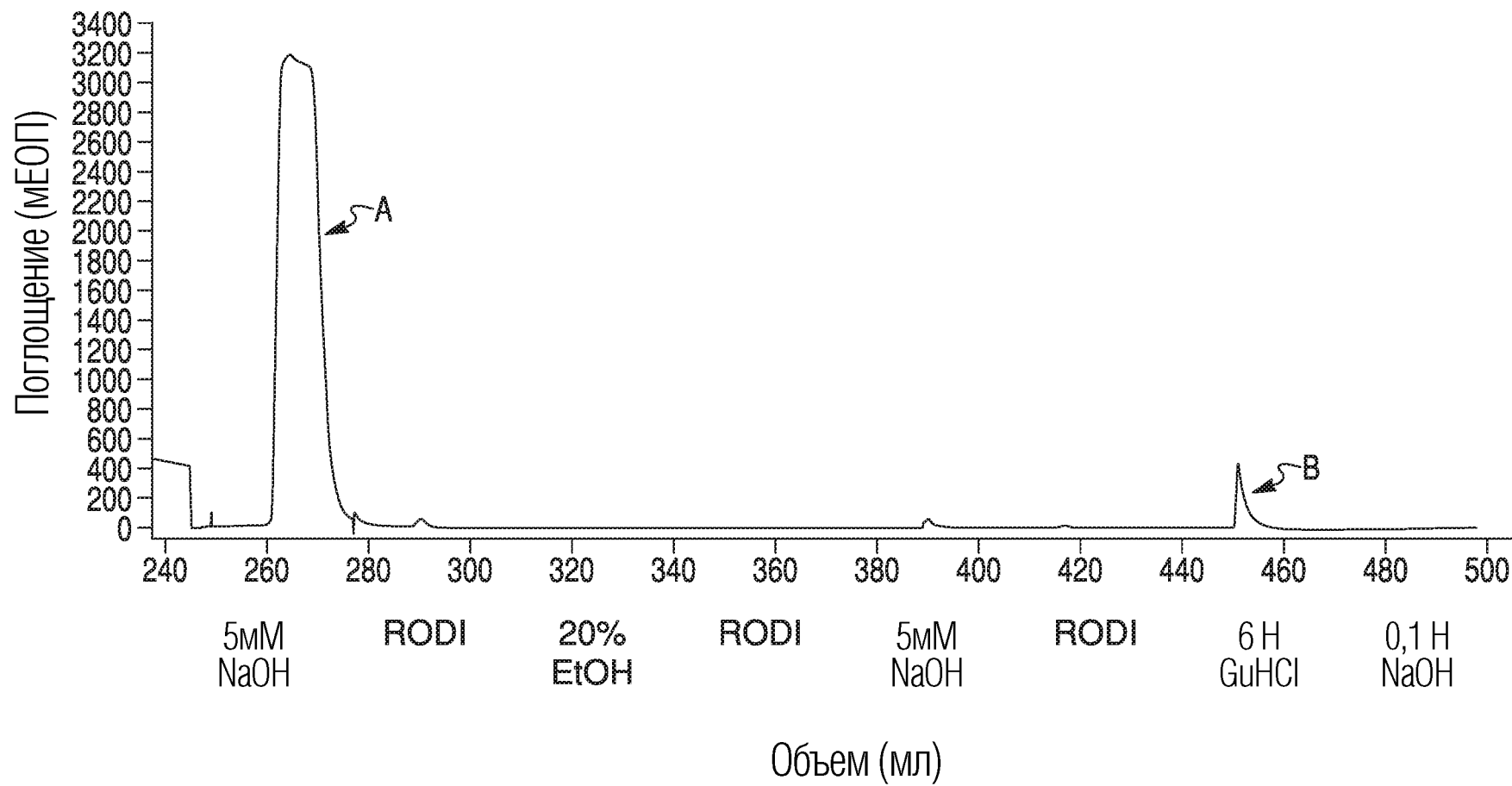


ФИГ. 16

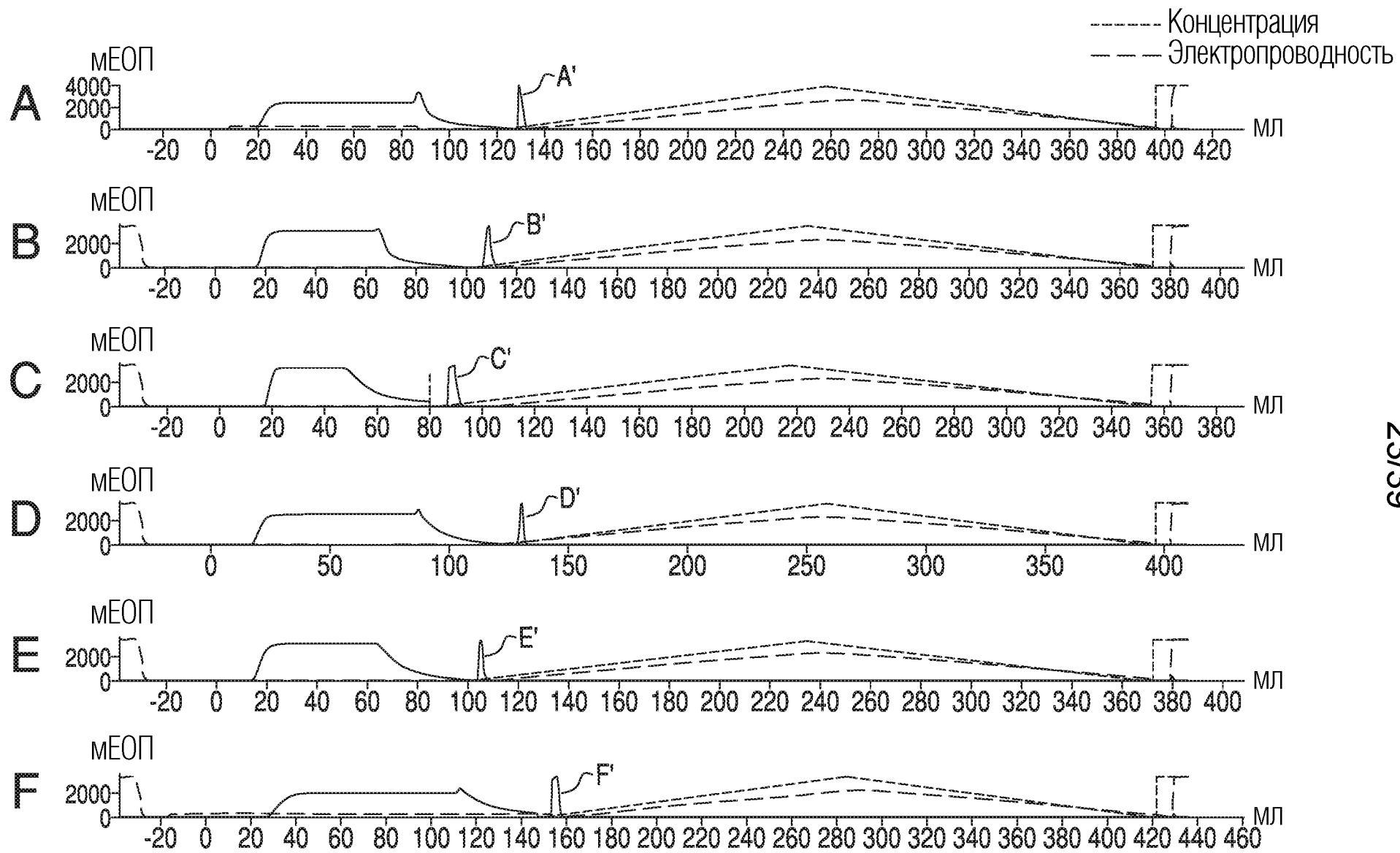




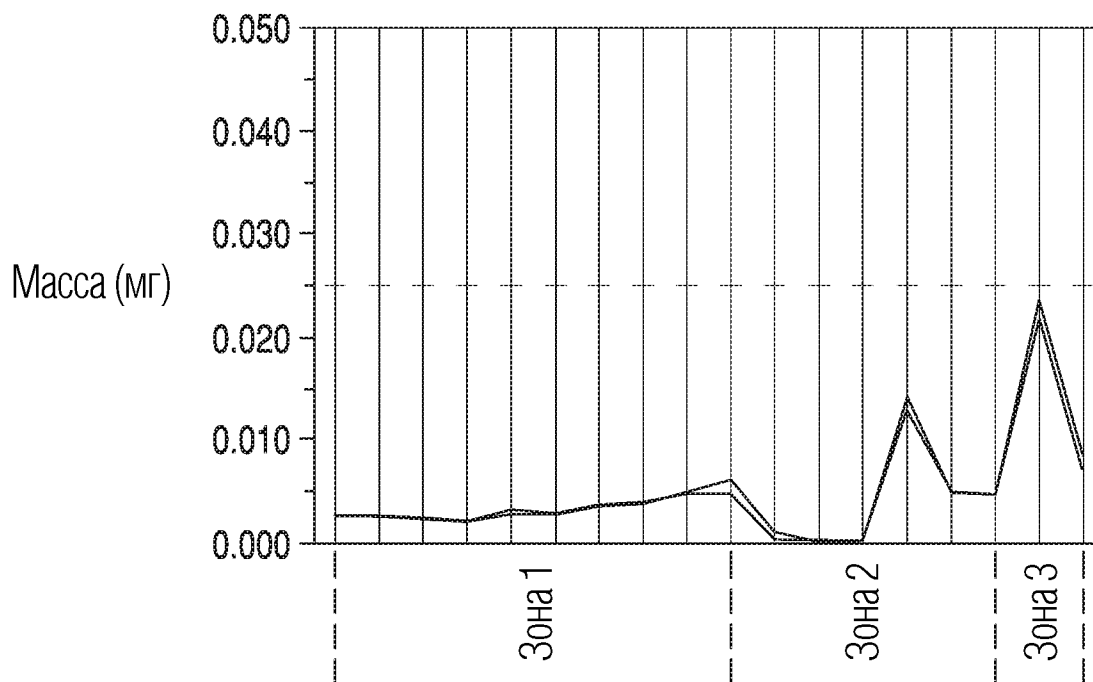
ФИГ. 17



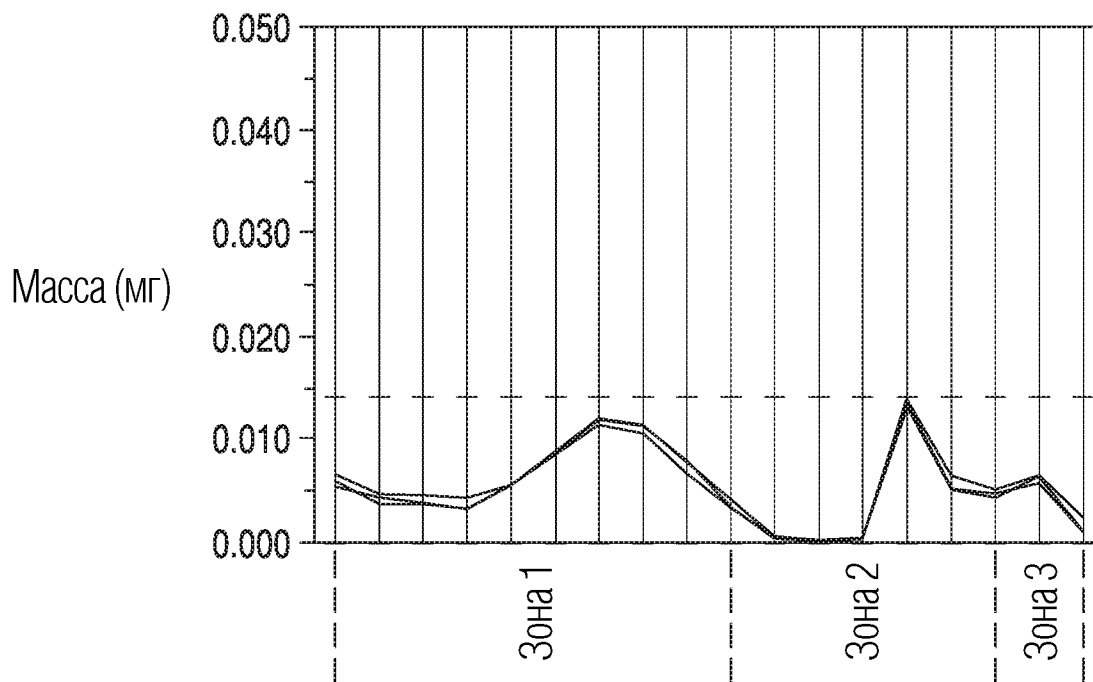
ФИГ. 18



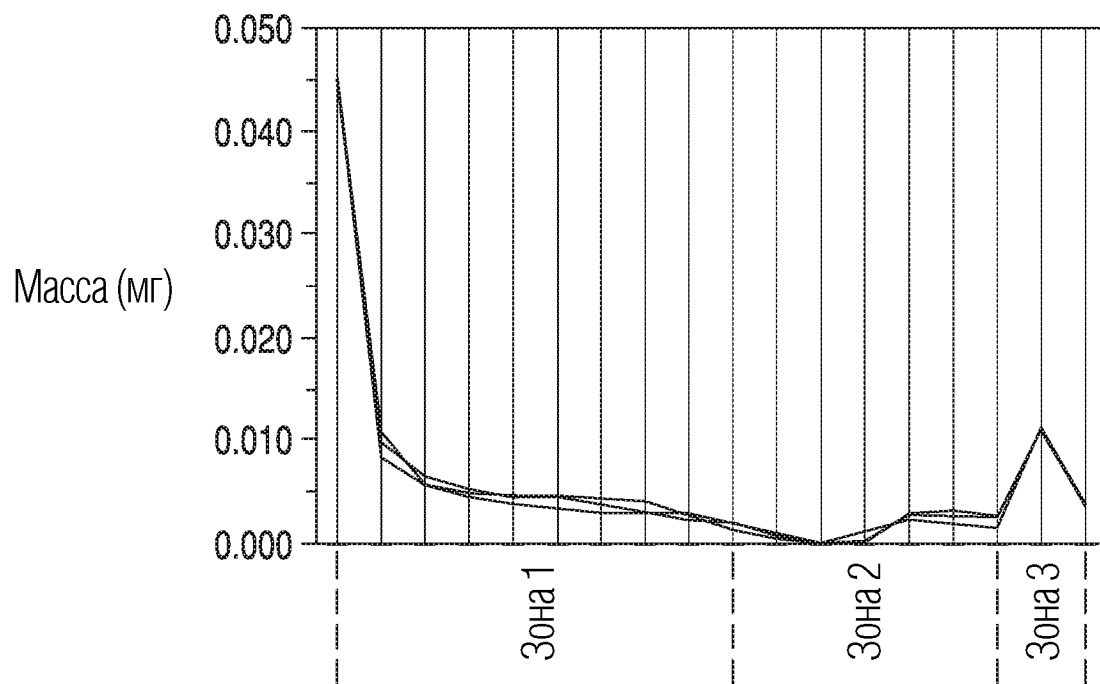
ФИГ. 19



ФИГ. 20А

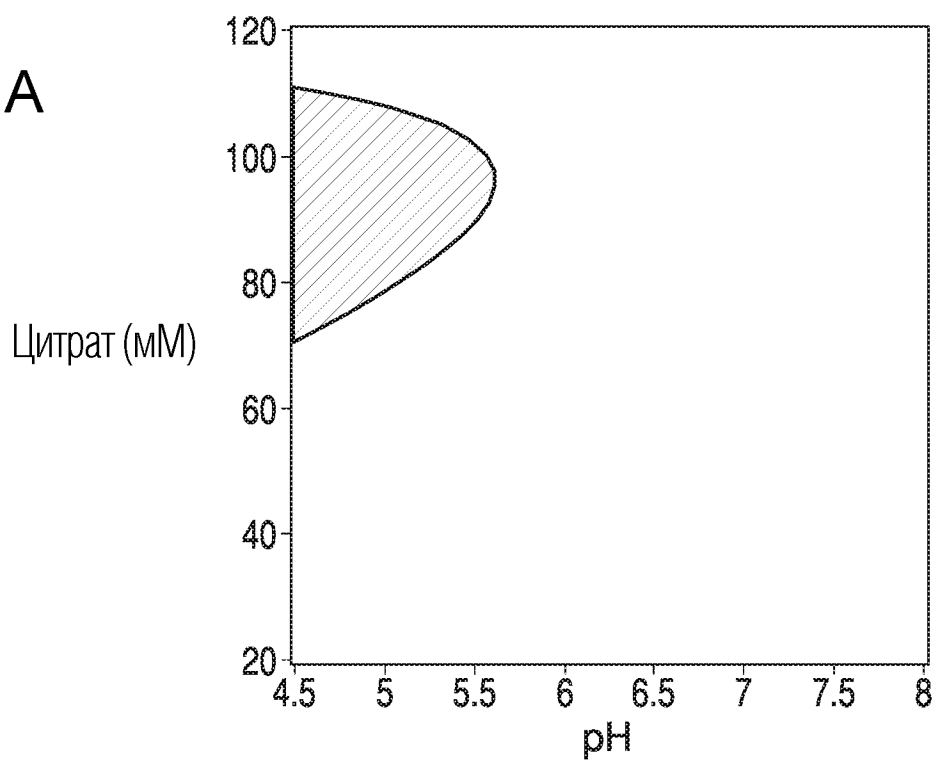


ФИГ. 20В

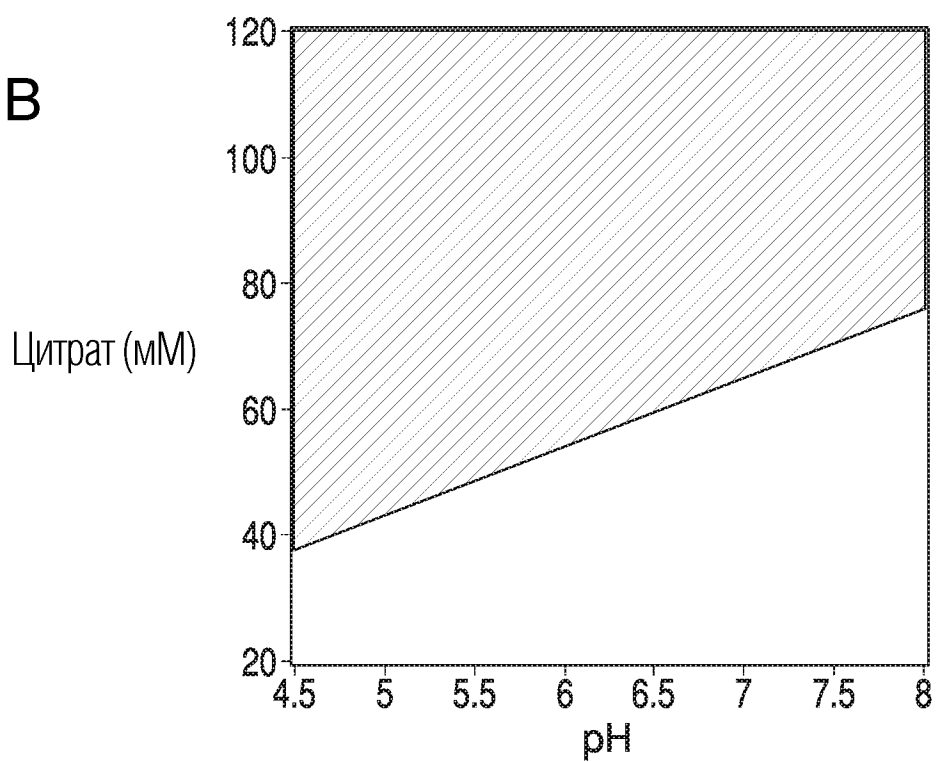


ФИГ. 20С

ФИГ. 21А



ФИГ. 21В

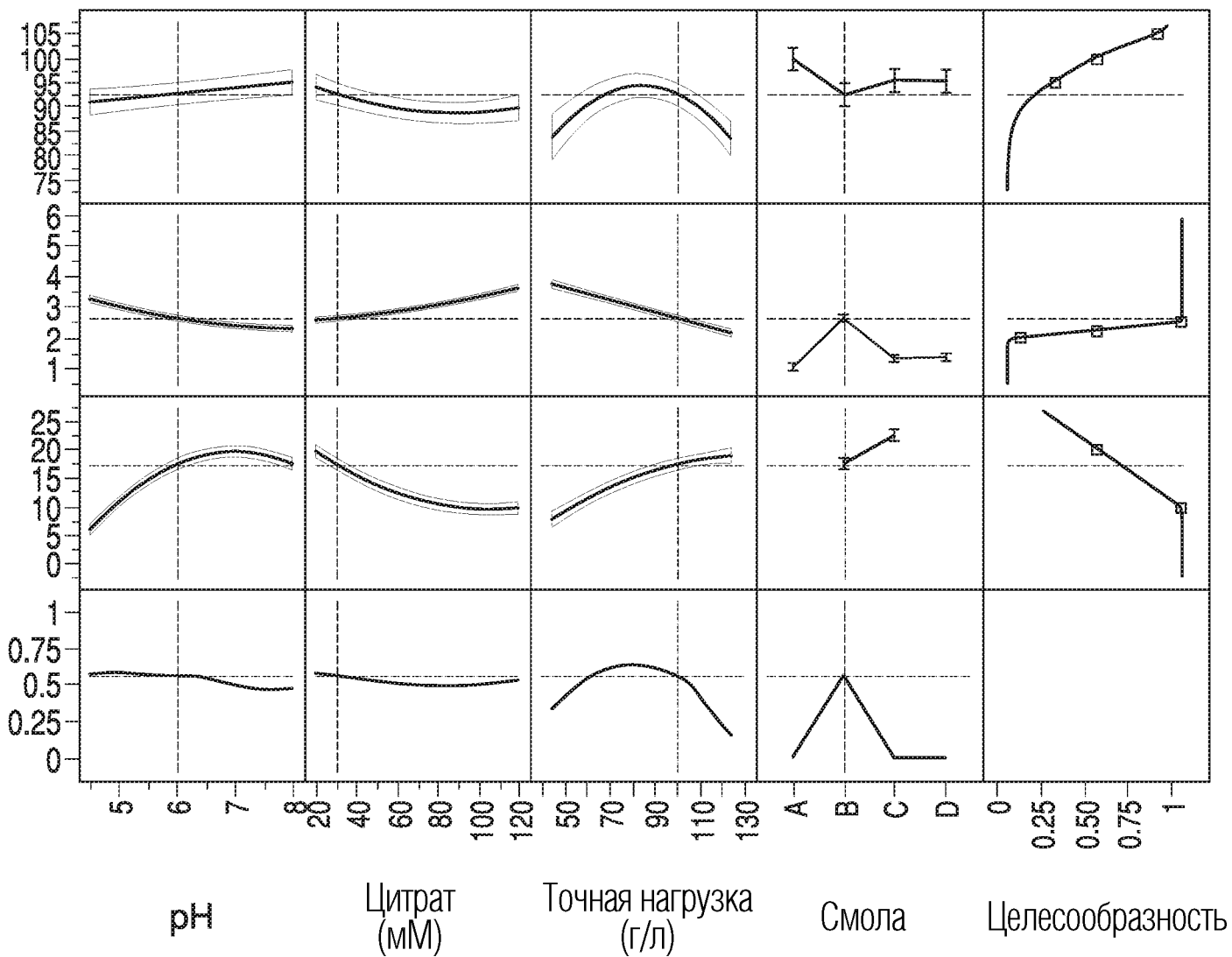


Заранее  
определенный состав  
% выхода

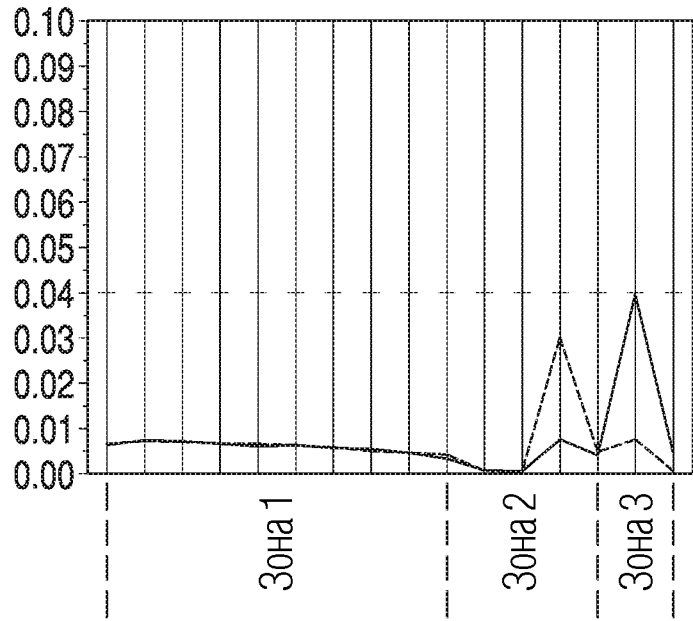
Заранее  
определенный состав  
Высокомолекулярная  
хроматографическая  
фракция

Заранее  
определенный состав  
Совокупность белков  
клетки-хозяина (м.д.)

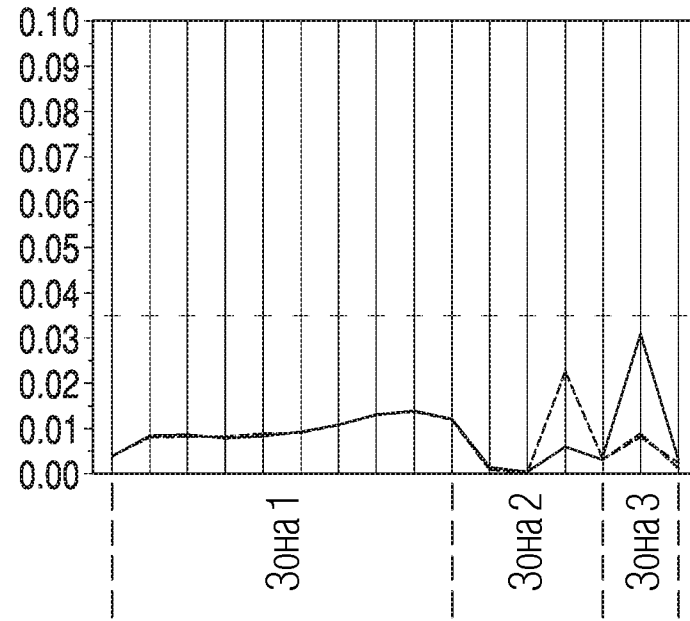
Целесообразность



ФИГ. 22

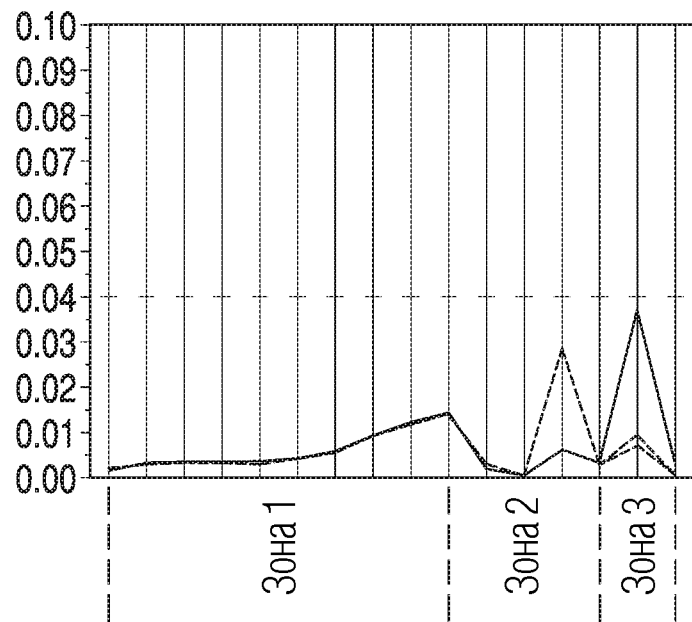


ФИГ. 23А

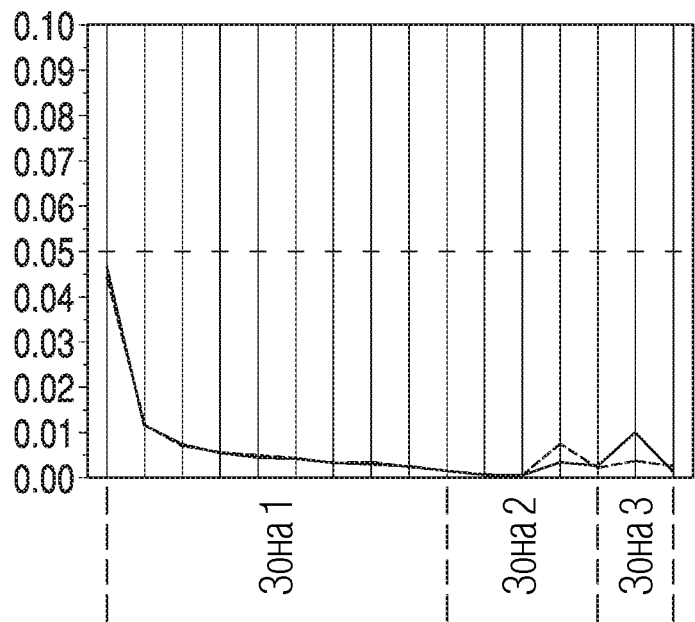


ФИГ. 23В

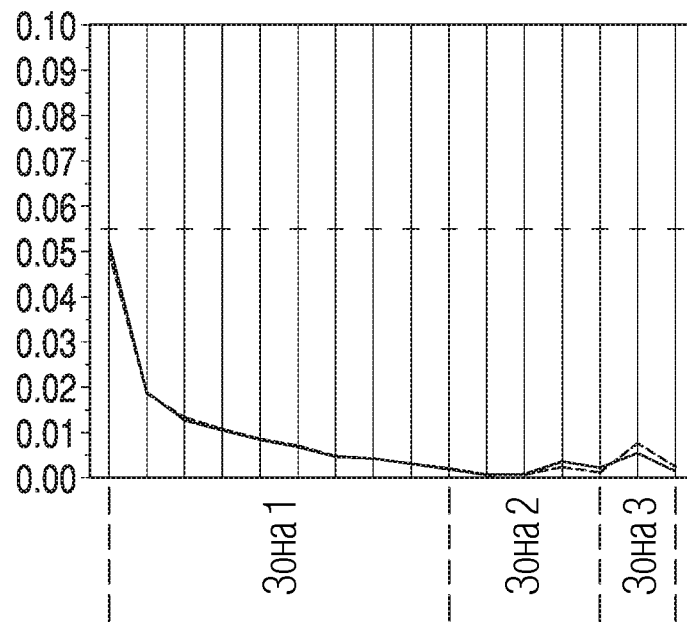




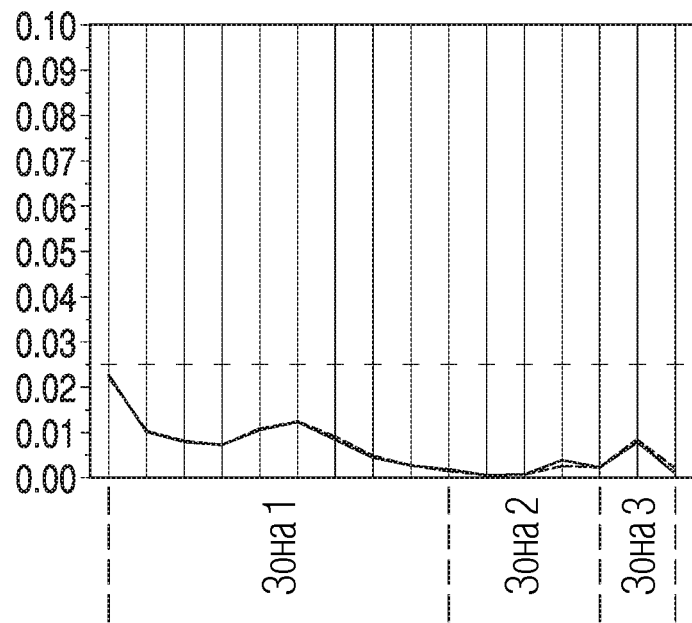
ФИГ. 23С



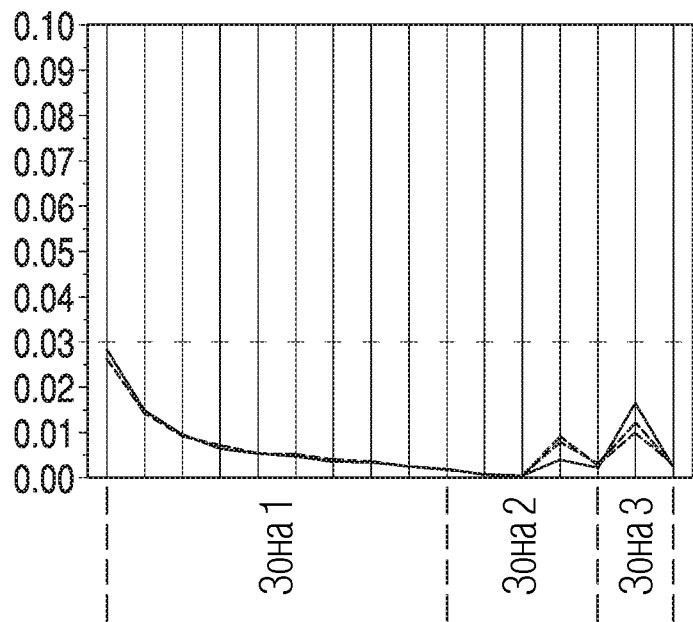
ФИГ. 24А



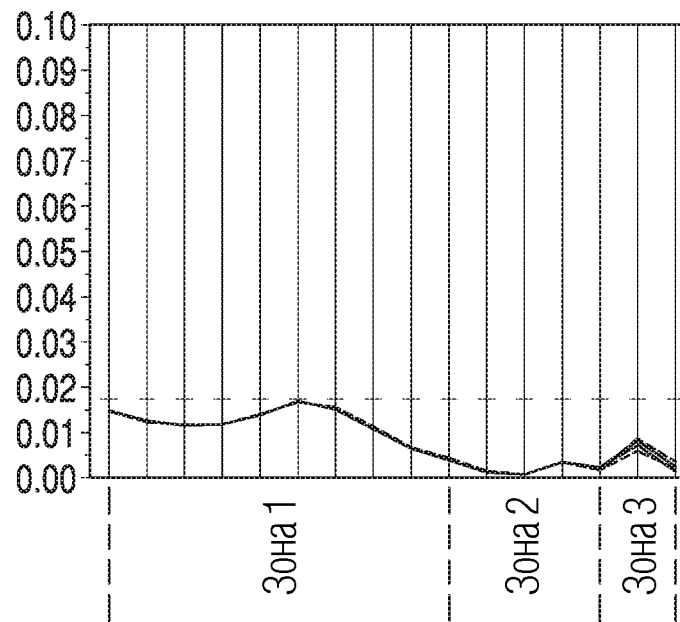
ФИГ. 24В



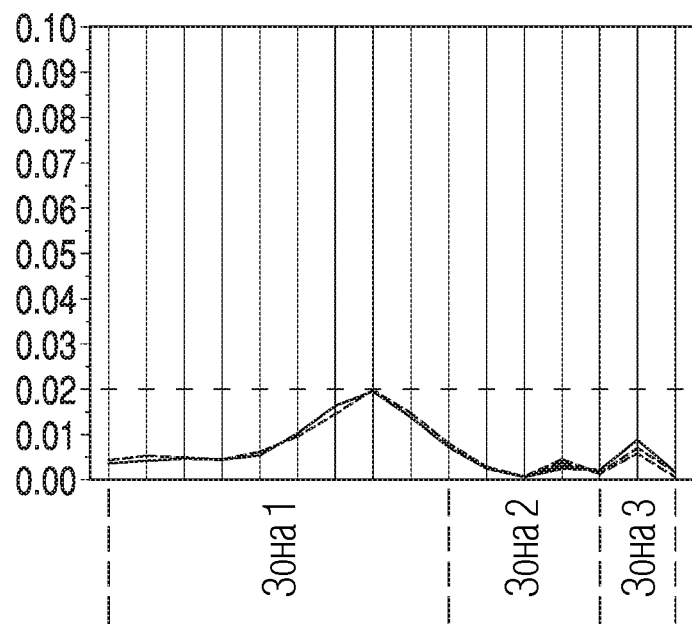
ФИГ. 24С



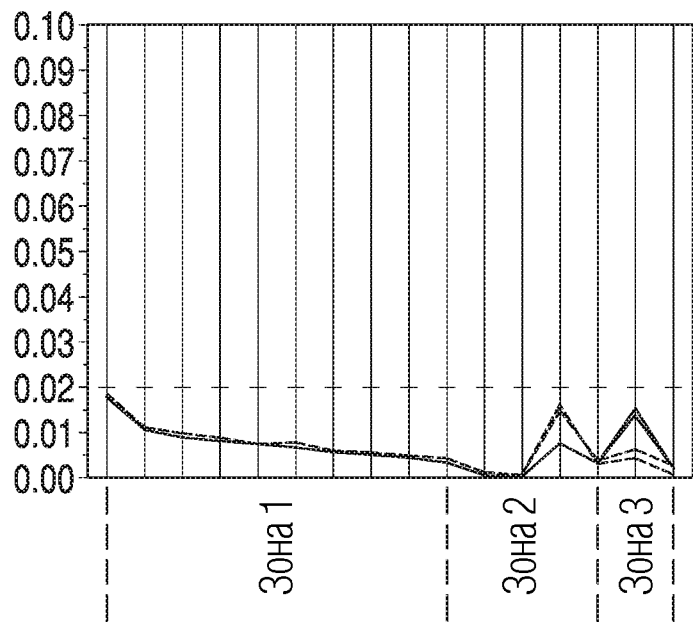
ФИГ. 25А



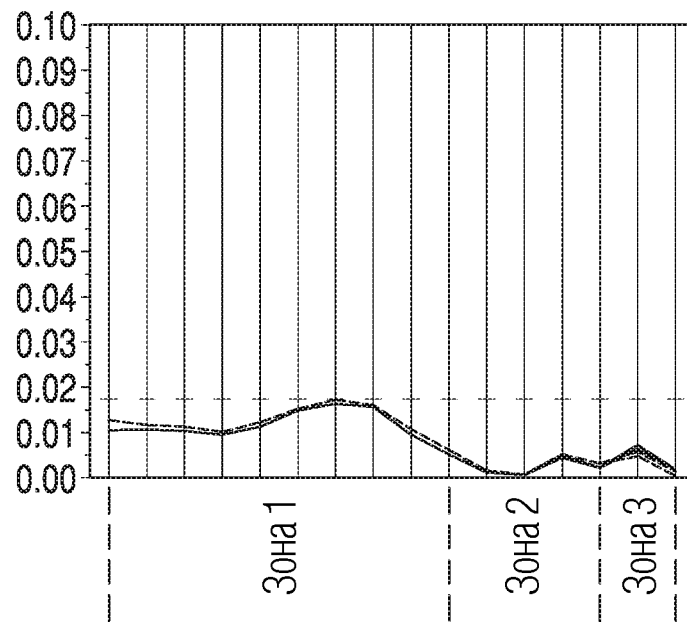
ФИГ. 25В



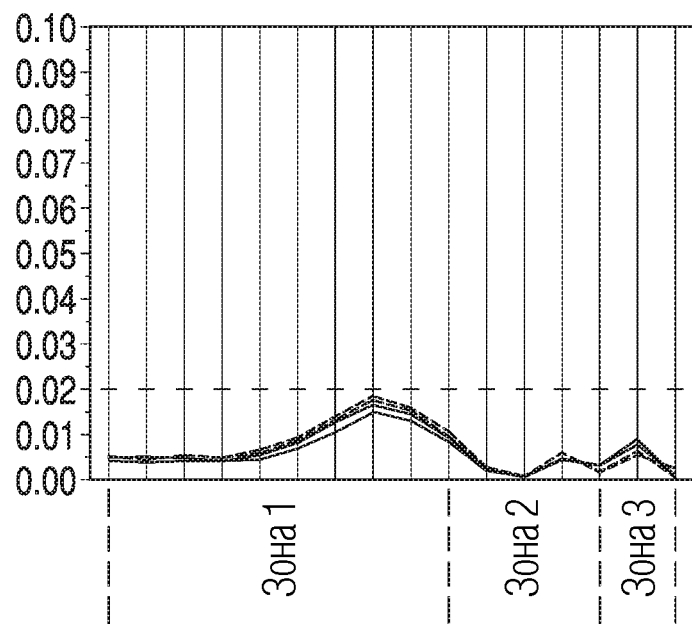
ФИГ. 25С



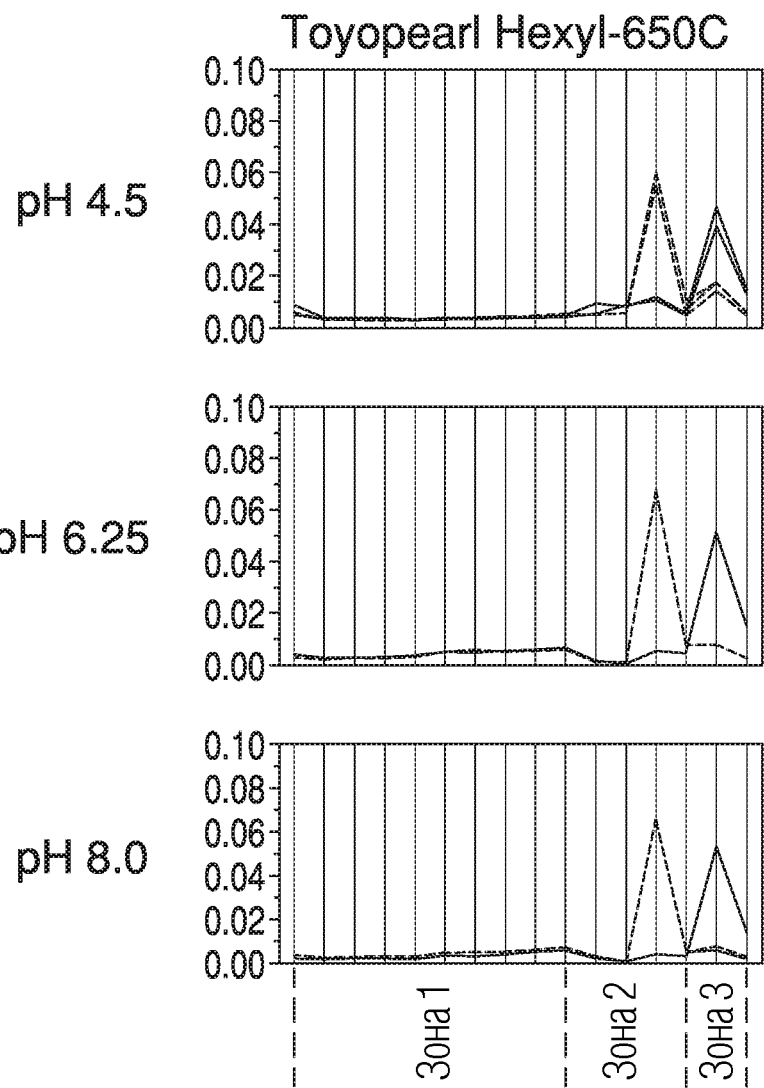
ФИГ. 26А



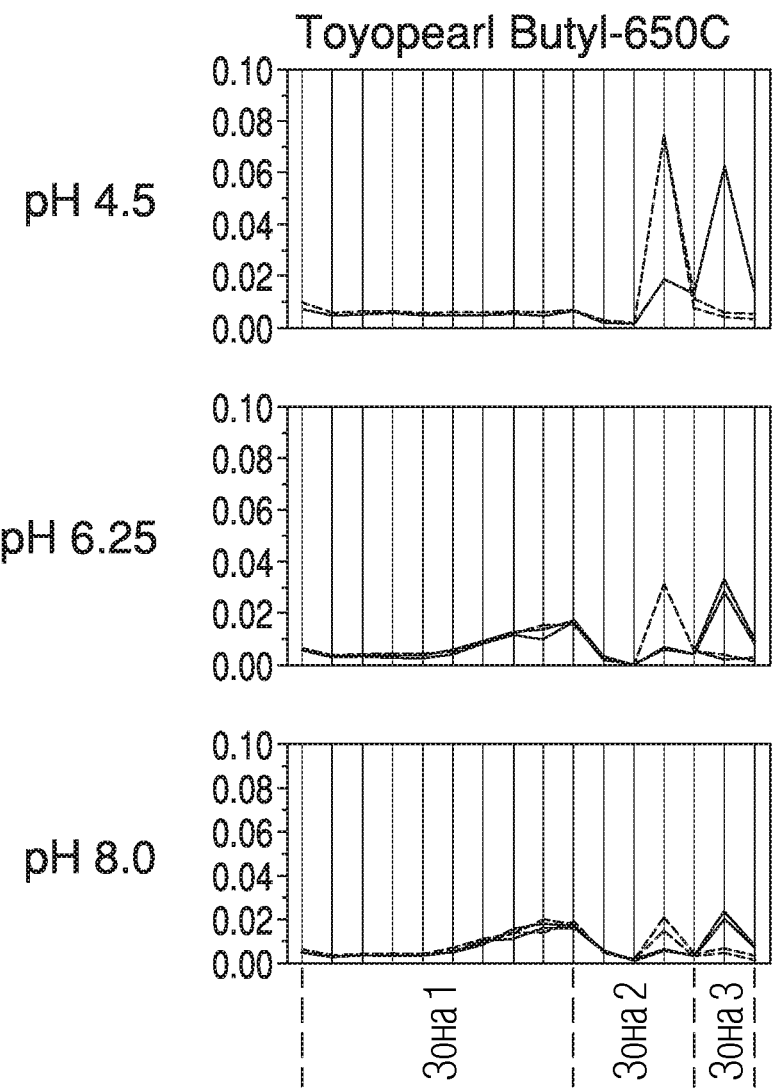
ФИГ. 26В



ФИГ. 26С

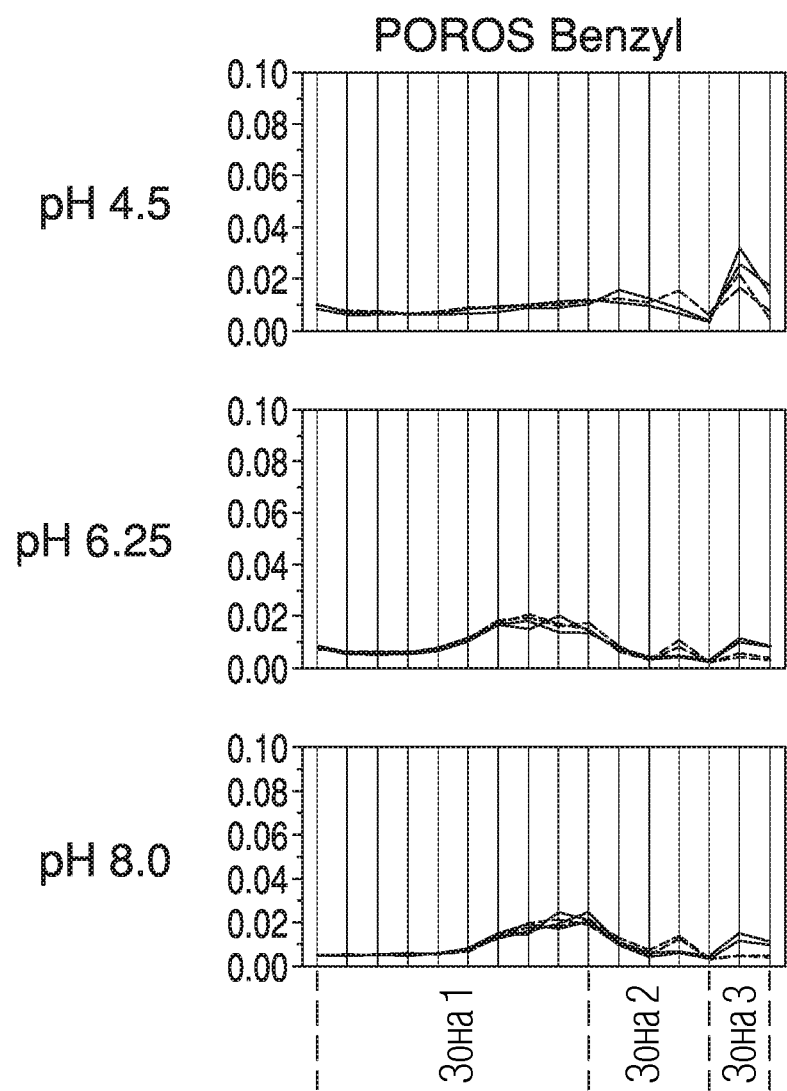


ФИГ. 27А

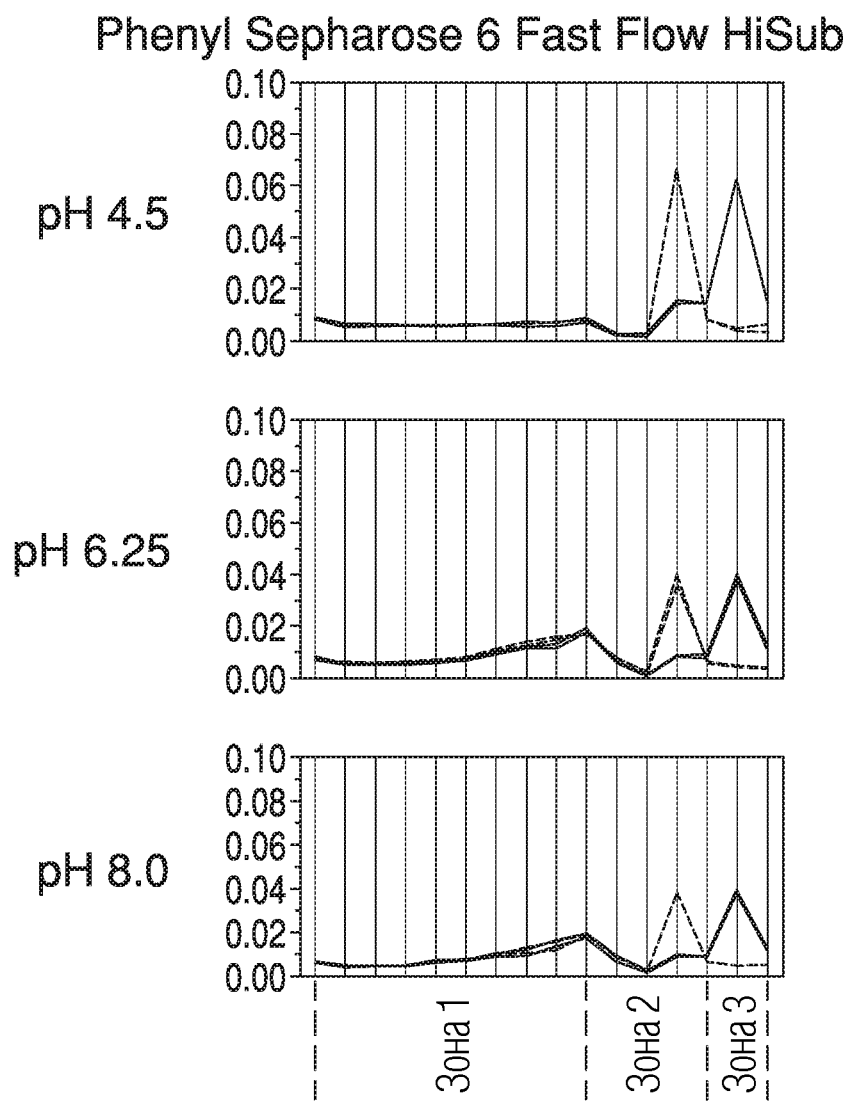


ФИГ. 27В

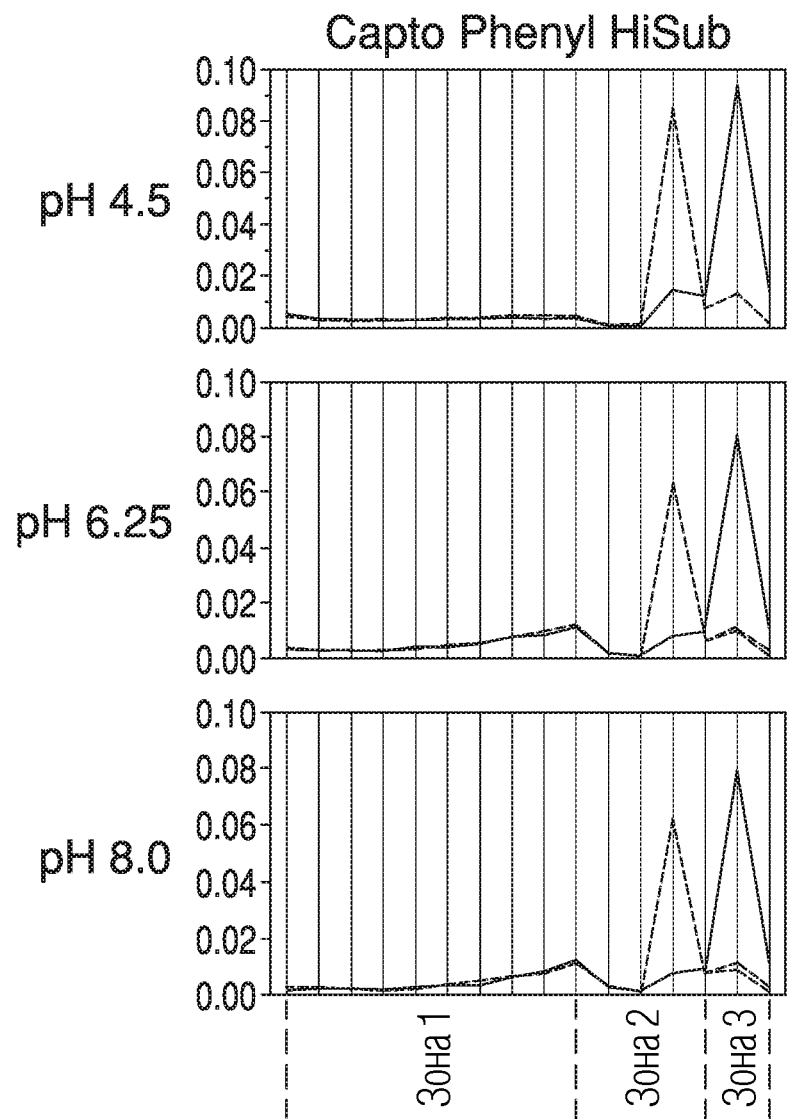




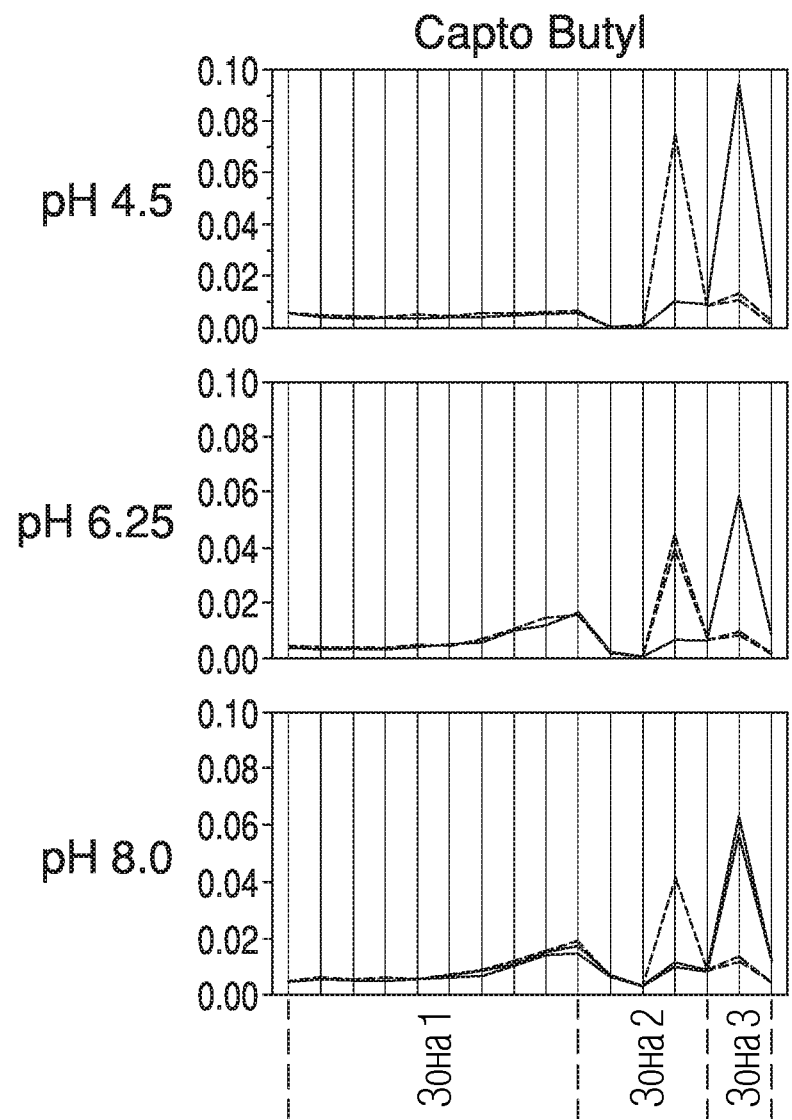
ФИГ. 27С



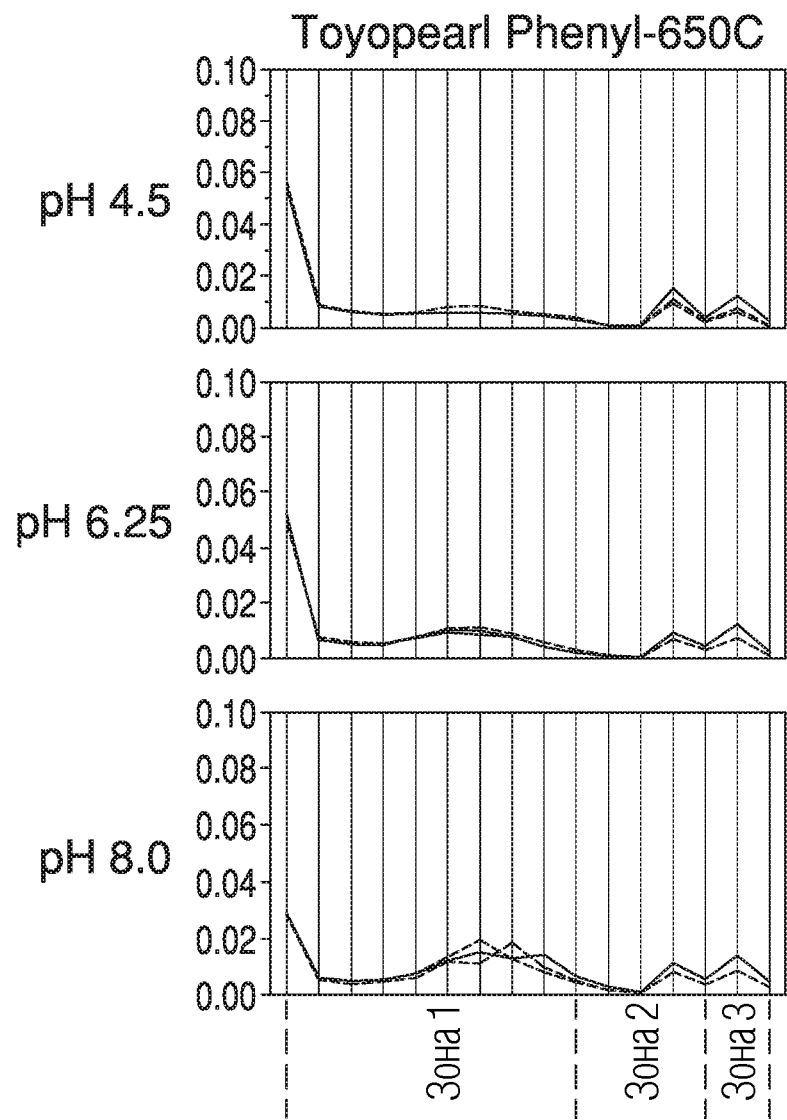
ФИГ. 27D



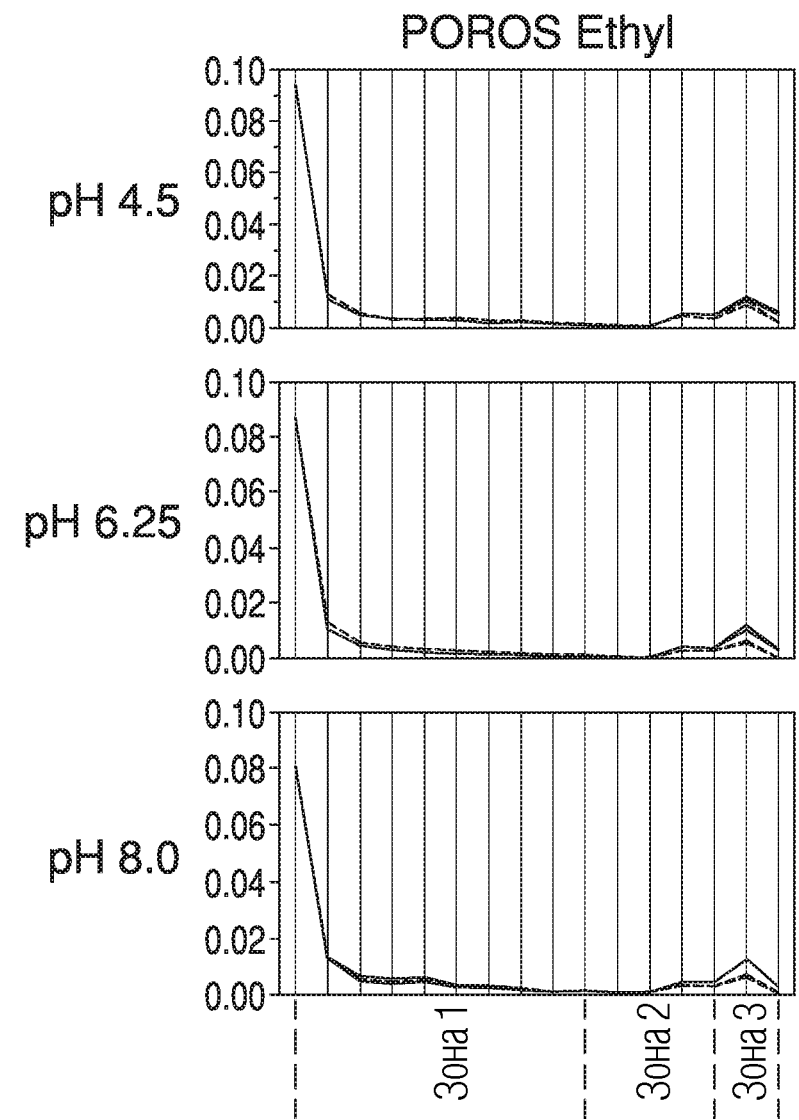
ФИГ. 28А



ФИГ. 28В



ФИГ. 28С



ФИГ. 28D