

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046325**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.29

(21) Номер заявки
202092684

(22) Дата подачи заявки
2019.08.26

(51) Int. Cl. **C07K 1/34** (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
G01N 21/65 (2006.01)

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕЙ
ОЧИСТКИ**

(31) **62/723,188**

(32) **2018.08.27**

(33) **US**

(43) **2021.03.11**

(86) **PCT/US2019/048100**

(87) **WO 2020/046793 2020.03.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

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

(72) Изобретатель:

**Пассно Кристина, Коуэн Кристофер,
Тасиан Эндрю (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A1-2012037430**

WO-A1-2012040041

WO-A1-2015145149

(57) Предлагаются способы и системы рамановской спектроскопии *in situ* для характеристики или количественной оценки промежуточного продукта очистки белка и/или конечного концентрированного пула в процессе производства или изготовления. В одном варианте осуществления изобретения рамановскую спектроскопию *in situ* применяют для характеристики или количественной оценки критически важных показателей качества промежуточных продуктов очистки белка во время последующей обработки (т.е. после сбора промежуточного продукта очистки белка). Например, описанные способы и системы рамановской спектроскопии *in situ* могут применяться для характеристики и количественной оценки промежуточных продуктов очистки белка, при этом промежуточные продукты очистки белка являются очищенными, конденсированными или иным образом включены в состав готового лекарственного препарата для продажи или введения.

B1

046325

046325

B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Изобретение испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/723188, поданной 27 августа 2018 г. и которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Область техники изобретения

Изобретение в общем направлено на системы и способы мониторинга и контроля одного или большего количества критически важных показателей качества (CQA) или параметров в процессах последующей очистки белка.

Уровень техники

За последнее десятилетие значительно увеличилось количество моноклональных антител (mAb), одобренных для терапевтического применения. Частично это связано с усовершенствованием крупномасштабных производственных процессов, которые облегчают изготовление больших количеств mAb. Кроме того, такие инициативы, как концепция Процессной аналитической технологии (PAT) Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA), привели к инновационным решениям для разработки процессов, анализа процессов и управления процессами для лучшего понимания процессов и контроля качества продуктов. Эффективное извлечение и очистка mAb из сред для культивирования клеток является важной частью производственного процесса. В результате процесса очистки необходимо гарантированно получать mAb, безопасные для применения у людей. Это включает мониторинг критически важных показателей качества (CQA), которые включают свойства белков и примеси, такие как белки клетки-хозяина, ДНК, вирусы, эндотоксины, агрегаты, концентрации, вспомогательные вещества и другие агенты, которые могут повлиять на безопасность, эффективность для пациента, или активность. Концентрация белка также часто является CQA в очищенном материале, и соответствующая концентрация белка в промежуточных продуктах процесса может быть критическим параметром при оценке эффективности типового технологического процесса. Эти CQA необходимо отслеживать на протяжении всего производства, а также на протяжении всего жизненного цикла программы.

Для того, чтобы гарантировать, что конечные составы mAb не содержат примесей выше определенных уровней, продукты mAb тестируют на различных этапах последующей обработки. Контроль качества при изготовлении биопродуктов, таких как моноклональные антитела, обычно осуществляется путем анализа промежуточных продуктов очистки и составленных образцов лекарственных веществ с помощью автономных способов для изготовления каждой партии. Образцы удаляются из технологического оборудования, например, с установки UF/DF, и подвергаются автономным тестам для оценки CQA продукта, таких как концентрация белка (г/л), буферные вспомогательные вещества и варианты размера. Мониторинг и анализ технологического процесса в реальном времени в ходе изготовления недоступны, что приводит к увеличению времени обработки и более высокому риску брака в партии из-за несоблюдения CQA. Соответственно, существует потребность в быстрых, поточных способах контроля качества моноклональных антител в реальном времени.

Следовательно, целью данного изобретения является предоставление систем и способов для мониторинга в реальном времени критически важных показателей качества в ходе последующего процесса очистки.

Сущность изобретения

В данном изобретении предлагаются способы и системы рамановской спектроскопии *in situ* для характеристики или количественной оценки промежуточного продукта очистки белка в процессе производства или изготовления. В одном варианте осуществления данного изобретения рамановскую спектроскопию *in situ* применяют для характеристики или количественной оценки критически важных показателей качества белкового препарата в ходе последующей обработки (т.е. после сбора промежуточного продукта очистки белка из жидкости культивирования клеток). Например, описанные способы и системы рамановской спектроскопии *in situ* могут применяться для характеристики и количественной оценки критически важных показателей качества промежуточных продуктов очистки белка, поскольку промежуточные продукты очистки белка очищаются перед составлением готового лекарственного препарата для продажи или введения. Критические важные показатели качества включают, помимо прочего, концентрацию белка, вспомогательные вещества, высокомолекулярные (HMW) агенты, титр антител и соотношение препарат-антитело.

В одном варианте осуществления данного изобретения предлагается способ получения концентрированного промежуточного продукта очистки белка путем определения концентраций промежуточного продукта очистки белка в реальном времени с помощью рамановской спектроскопии *in situ* при концентрировании/диафильтрации промежуточного продукта очистки белка и регулировке параметров этапа концентрирования в реальном времени для получения заранее определенных целевых концентраций и уровней вспомогательных веществ, необходимых для составления лекарственного вещества. Промежуточный продукт очистки белка может иметь концентрацию от 5 мг/мл до 300 мг/мл, предпочтительно от 50 мг/мл до 300 мг/мл для последующих этапов составления. В одном варианте осуществления промежуточное соединение очистки белка концентрируется до желаемой целевой концентрации с использованием ультрафильтрации во время первичного или конечного концентрирования. Диафильтрацию применяют во время обработки после первичного концентрирования как средство замены буфера для достижения

желаемых компонентов конечного состава. Промежуточный продукт очистки белка может быть получен из биореактора, культуры с подпиткой или непрерывной культуры. В другом варианте осуществления данного изобретения определение концентрации промежуточного продукта очистки белка может происходить непрерывно или с перерывами в реальном времени. Количественное определение концентрации белка можно проводить с интервалами примерно от 5 с до 10 мин, ежедневно или ежечасно. Промежуточный продукт очистки белка может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок или рекомбинантный белок. Спектральные данные могут быть собраны в одном или большем количестве диапазонов волновых чисел, выбранных из группы, состоящей из 977-1027 cm^{-1} , 1408-1485 cm^{-1} , 1621-1711 cm^{-1} , 2823-3046 cm^{-1} и их комбинаций.

В другом варианте осуществления данного изобретения предлагается способ изготовления промежуточного продукта очистки белка путем независимого проведения анализа рамановской спектроскопии на множестве промежуточных продуктов очистки белка для получения универсальной модели, способной количественно определять любой из множества промежуточных продуктов очистки белка. Концентрация промежуточного продукта очистки белка может быть определена с помощью рамановской спектроскопии *in situ* с универсальной моделью во время концентрирования промежуточного продукта очистки белка от начала до конца концентрирования промежуточного продукта очистки белка. В другом варианте осуществления данного изобретения предлагается способ изготовления промежуточного продукта очистки белка для получения модели, специфичной для белка, способной количественно определять концентрации белка, что может быть использовано для обеспечения коммерческого изготовления белка.

Указанную модель можно построить с помощью анализа регрессии методом дробных наименьших квадратов для исходных спектральных данных и с применением ортогонального метода для автономных данных о концентрации белка. Методы предварительной обработки, такие как стандартное отклонение случайной величины с нормальным распределением (SNV) и/или метод сглаживания данных с 1-й производной со сглаживанием 21 cm^{-1} , могут выполняться на данных рамановской спектроскопии с целью уменьшения вариабельности модели и ошибки прогнозирования. Дальнейшее усовершенствование модели может быть выполнено для выделения спектральных областей, которые коррелируют с прогностическими данными CQA, такими как концентрация белка. В одном варианте осуществления данного изобретения указанная модель имеет предел погрешности $\leq 5\%$, предпочтительно, предел погрешности $\leq 3\%$.

В еще одном варианте осуществления данного изобретения предлагается способ мониторинга и контроля уровней вспомогательных веществ в собранной культуральной жидкости и/или промежуточном продукте очистки белка во время последующей очистки путем определения концентраций вспомогательных веществ в режиме реального времени с помощью рамановской спектроскопии *in situ* при очистке жидкости для культивирования клеток или промежуточного продукта очистки белка, а также регулировки параметров этапа очистки в режиме реального времени для получения или поддержания заранее определенных количеств вспомогательных веществ в собранной культуральной жидкости и/или промежуточном продукте очистки белка. Указанное вспомогательное вещество может представлять собой ацетат, цитрат, гистидин, сукцинат, фосфат, гидроксиметиламинметан (Трис), пролин, аргинин, сахарозу или их комбинации. Указанное вспомогательное вещество может быть поверхностным вспомогательным веществом, таким как полисорбат 80, полисорбат 20 и полоксамер 188.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой блок-схему, демонстрирующую типовой процесс очистки белка.

Фиг. 2 представляет собой репрезентативный спектрограф, демонстрирующий разработку начальной модели для поточной рамановской спектроскопии. Ось X представляет рамановский сдвиг. Ось Y представляет интенсивность. Легенда справа представляет концентрацию белка. Спектральные области, использованные во время разработки начальной модели, включают слева направо 977-1027 cm^{-1} (кольцевая структура), 1408-1485 cm^{-1} (аргинин), 1621-1711 cm^{-1} (вторичная структура) и 2823-3046 cm^{-1} (С-Н растяжение).

Фиг. 3 представляет собой гистограмму, демонстрирующую концентрацию белка (г/л) для mAb1 во время стандартного процесса ультрафильтрации/диафильтрации. Пустые столбцы представляют собой концентрации, определенные с использованием автономного метода на основе UV-Vis с системой SoloVPE (C-technologies) с планкой погрешностей $\pm 5\%$, что является целью для поточного рамановского прогнозирования. Столбцы с широкой штриховкой представляют модель, называемую в данном документе универсальной моделью без mAb1, включенной в рамановское прогнозирование, а столбцы с узкой штриховкой представляют универсальную модель с mAb1. Заштрихованные крестом столбцы соответствуют прогнозам из начальной универсальной модели с диапазоном 0-120 г/л. Заштрихованные столбцы соответствуют прогнозам из начальной универсальной модели > 120 г/л.

Фиг. 4 представляет собой гистограмму, демонстрирующую абсолютную ошибку рамановской модели для различных mAb из разработки начальной универсальной модели. Заштрихованные столбцы представляют начальную универсальную модель 0-120 г/л (первичное концентрирование и диафильтрация), а пустые столбцы представляют начальную универсальную модель > 120 г/л. (Конечное концен-

трирование). Горизонтальная линия представляет цель рамановской модели с ошибкой $\leq 5\%$.

Фиг. 5 представляет собой гистограмму, демонстрирующую абсолютную ошибку рамановской модели для различных mAb. Столбцы с широкой штриховкой представляют 0-120 г/л (первичное концентрирование и диафильтрация), а столбцы с узкой штриховкой представляют > 120 г/л (конечное концентрирование). Горизонтальная линия представляет цель рамановской модели с ошибкой $\leq 5\%$. Продемонстрированы две версии универсальной рамановской модели. Заштрихованные столбцы представляют собой первичную универсальную модель, а заштрихованные крестом столбцы представляют обновленную универсальную модель.

Фиг. 6 представляет собой схематическое изображение системы ультрафильтрации/диафильтрации, включая места для размещения поточного рамановского зонда.

Фиг. 7 представляет собой гистограмму, демонстрирующую концентрацию белка для mAb10 с применением универсальной модели или mAb10-специфической модели для измерений конечного концентрированного пула (FCP). Концентрации белка приведены для поточного рамановского прогнозирования в реальном времени (столбцы с широкой штриховкой), обновленных моделей (столбцы с узкой штриховкой) и SoloVPE (пустой столбец). Ось X представляет экспериментальную группу, а ось Y представляет концентрацию белка.

Фиг. 8А, В представляют собой гистограммы, демонстрирующие ошибку рамановской модели для лабораторного моделирования DoE относительно концентрации белка. На фиг. 8А продемонстрирована ошибка рамановской модели относительно прогнозирования в реальном времени на различных этапах обработки УФ/ДФ (первичное концентрирование, диафильтрация и конечный концентрированный пул). На фиг. 8В продемонстрирована ошибка рамановской модели для конечной модели DoE на различных этапах обработки УФ/ДФ (первичное концентрирование, диафильтрация и конечный концентрированный пул).

Фиг. 9А представляет собой гистограмму, демонстрирующую процентную ошибку модельного прогнозирования относительно воспроизведения модели в увеличенном масштабе на экспериментальном оборудовании для обработки mAb11. Данные лабораторной модели сравнивали с данными лабораторной модели, включающей данные экспериментального масштаба. Ось X представляет экспериментальные группы, а ось Y представляет процентную ошибку модельного прогнозирования (%). Фиг. 9В представляет собой гистограмму, демонстрирующую возможность модельного прогнозирования относительно обработки различных моноклональных антител на экспериментальном технологическом оборудовании. Ось X представляет экспериментальные группы, а ось Y представляет процентную ошибку модельного прогнозирования (%).

Фиг. 10А представляет собой схему типового автоматизированного серийного процесса УФ/ДФ с рамановским отзывом. Фиг. 10В представляет собой схему типовой автоматизированной прямоточной TFF с рамановским отзывом.

Фиг. 11 представляет собой график, демонстрирующий концентрацию mAb14 в процессе обработки UF/DF. Ось X представляет собой производительность (L/m^2), а ось Y представляет концентрацию mAb 14 (г/л).

Фиг. 12А представляет собой гистограмму, демонстрирующую процент высокомолекулярных (НМВ) агентов в mAb2 на различных этапах обработки (первичное концентрирование, диафильтрация, конечное концентрирование), определенный с помощью SE-СВЭЖХ или рамановского моделирования. Ось X представляет экспериментальную группу, а ось Y представляет процент (%) mAb2 НМВ.

Фиг. 12В представляет собой гистограмму, демонстрирующую процент высокомолекулярных (НМВ) агентов, спрогнозированный с применением различного времени сканирования (10, 20, 30 с) для mAb 15. Ось X представляет экспериментальную группу, а ось Y представляет процент НМВ (%).

Фиг. 13 представляет собой точечный график, демонстрирующий фактический титр (г/л) по сравнению с титром, спрогнозированным рамановским методом для образцов моноклональных антител из mAb 14. Ось X представляет титр, спрогнозированный рамановским методом, а ось Y представляет фактический титр (г/л).

Фиг. 14А представляет собой диаграмму разброса, демонстрирующую рамановское прогнозирование концентрации гистидина для различных моноклональных антител. Ось X представляет концентрацию гистидина, спрогнозированную с помощью рамановского моделирования, а ось Y представляет фактическую концентрацию гистидина, определенную с помощью аминокислотного анализа. Фиг. 14В представляет собой точечный график, демонстрирующий фактическую концентрацию гистидина в сравнении с концентрацией гистидина, спрогнозированную с помощью рамановского моделирования, для образца моноклонального антитела. Фиг. 14С представляет собой точечный график, демонстрирующий фактическую концентрацию аргинина в сравнении с концентрацией аргинина, спрогнозированную с помощью рамановского моделирования, для образца моноклонального антитела.

Фиг. 15А представляет собой диаграмму разброса, демонстрирующую фактическое соотношение препарат-антитело (DAR) по сравнению с DAR, спрогнозированным с помощью рамановского моделирования, для образцов моноклональных антител из mAb3. Ось X представляет собой DAR, спрогнози-

ванное с помощью рамановского моделирования, а ось Y представляет собой фактическое DAR, определенное с помощью УФ-спектроскопии. Фиг. 15B представляет собой диаграмму разброса, демонстрирующую фактическое соотношение препарат-антитело (DAR) по сравнению с DAR, спрогнозированным с помощью рамановского моделирования, для образцов моноклональных антител из mAb 1. Ось X представляет DAR, спрогнозированное с помощью рамановского моделирования, а ось Y представляет фактическое DAR.

Подробное описание сущности изобретения

I. Определения.

Следует понимать, что это описание не ограничивается описанными в нем композициями и способами, а также описанными экспериментальными условиями, поскольку таковые могут варьироваться. Следует также понимать, что употребляемая в данном документе терминология применяется только для описания определенных вариантов осуществления и не имеет ограничительного характера, поскольку объем данного описания ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все используемые в данном документе технические и научные термины имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области техники, к которой принадлежит данное описание. Хотя любые композиции, способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, можно использовать на практике или при тестировании данного изобретения. Все упомянутые публикации полностью включены в данный документ посредством ссылки.

Использование терминов и ссылок, указывающих на единственное число, в контексте описания заявленного в настоящее время изобретения (особенно в контексте формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее как единственное, так и множественное число, если иное не указано в данном документе или явно не противоречит контексту.

Перечисление диапазонов значений в данном документе просто предназначено для того, чтобы служить кратким способом индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в этот диапазон, если здесь не указано иное, и каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было отдельно указано здесь.

Применение термина "около" предназначено для описания значений выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл. $\pm 10\%$; в других вариантах осуществления данного изобретения значения могут находиться в диапазоне значений выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл. $\pm 5\%$; в других вариантах осуществления данного изобретения значения могут находиться в диапазоне значений выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл. $\pm 2\%$; в других вариантах осуществления данного изобретения значения могут находиться в диапазоне значений выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл. $\pm 1\%$. Приведенные выше диапазоны предназначены для пояснения контекста, и при этом никаких дополнительных ограничений не предполагается. Все способы, описанные в данном документе, могут выполняться в любом подходящем порядке, если иное не указано в данном документе или иным образом явно не противоречит контексту. Применение любых и всех примеров или иллюстративных формулировок (например, "такой как"), представленных в данном документе, предназначено только для лучшего описания изобретения и не налагает ограничения на объем изобретения, если не заявлено иное. Никакие формулировки в спецификации не следует истолковывать как указывающие на какой-либо не заявленный элемент как существенный для практического применения данного изобретения.

В данном контексте термин "белок" относится к молекуле, содержащей два или большее количество аминокислотных остатка, соединенных друг с другом пептидной связью. Белок включает полипептиды и пептиды, а также может включать модификации, такие как гликозилирование, присоединение липидов, сульфатирование, гамма-карбоксылирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксильное и ADP-рибозилирование. Белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая лекарственные средства на основе белков, при этом белки включают, среди прочего, ферменты, лиганды, рецепторы, антитела и химерные или гибридные белки. Белки продуцируются различными типами рекомбинантных клеток с применением хорошо известных методов культивирования клеток и обычно вводятся в клетку путем трансфекции нуклеотидных векторов, полученных путем генной инженерии (например, таких как последовательность, кодирующая химерный белок, или кодон-оптимизированная последовательность, последовательность без интронов и т.д.), где векторы могут находиться в виде эписомы или интегрироваться в геном клетки.

Термин "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, состоящей из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь имеет переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на гипервариабельные области, называемые определяющими комплементарности областями (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбок-

си-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин "антитело" включает ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин "антитело" включает молекулы антител, полученные, экспрессируемые, созданные или выделенные рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Термин "антитело" также включает биспецифическое антитело, которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с более чем одним неодинаковым эпитопом. Биспецифические антитела обычно описаны в публикации заявки на патент США № 2010/0331527, которая включена в данное изобретение посредством ссылки.

Термин "вторичная структура" относится к локальным складчатым структурам, которые образуются внутри полипептида из-за взаимодействий между атомами основной цепи. Наиболее распространенными типами вторичных структур являются α -спираль и β -складчатый лист. Обе структуры удерживаются в форме водородными связями, которые образуются между карбонилем O одной аминокислоты и амино H другой.

В данном контексте термин "вспомогательное вещество" относится к фармакологически неактивному веществу, которое применяется в качестве стабилизирующего агента для длительного хранения составленного лекарственного вещества. Как правило, в конечный концентрированный пул добавляют дополнительные вспомогательные вещества для получения составленного лекарственного вещества. В то же время время обработки УФ/ДФ контролируют уровни вспомогательного вещества, чтобы гарантировать, что эти уровни не повлияют на желаемую характеристику состава. Вспомогательные вещества придают фармацевтическому составу объем, способствуют всасыванию или растворимости лекарственного средства, а также обеспечивают стабильность и предотвращают денатурацию. Обычные фармацевтические вспомогательные вещества включают, помимо прочего, аминокислоты, наполнители, связующие вещества, дезинтегрирующие вещества, покрытия, сорбенты, буферные агенты, хелатирующие агенты, смазывающие вещества, вещества, способствующие скольжению, консерванты, антиоксиданты, ароматизаторы, подсластители, красители, растворители и соразтворители, а также агенты, придающие вязкость. В одном варианте осуществления данного изобретения вспомогательное вещество представляет собой полиэтиленгликоль, включая, помимо прочего, PEG-3550.

"Полиэтиленгликоль" или "PEG" представляет собой полиэфирный полимер этиленоксида, обычно применяемый в пищевых продуктах, медицине и косметологии. Это неионная макромолекула, которая может применяться в качестве молекулы, снижающей растворимость биомолекулы. PEG коммерчески доступен с различной молекулярной массой от 300 г/моль до 10000000 г/моль. Примеры типов PEG включают, помимо прочего, PEG 20000, PEG 8000 и PEG 3350. PEG доступен в различной геометрии, включая линейную, разветвленную (3-10 цепей, прикрепленных к центральному ядру), звездообразную (10-100 цепей, прикрепленных к центральному ядру) и гребенчатую (множество цепей, прикрепленных к каркасу полимера).

"Рамановская спектроскопия" представляет собой спектроскопический метод, применяемый для измерения длины волны и интенсивности неупругого рассеянного света от молекул. Указанный метод основан на принципе, согласно которому монохроматическое падающее излучение на материалы будет отражаться, поглощаться или рассеиваться определенным образом, который зависит от конкретной молекулы или белка, которые получают это излучение. Большая часть энергии рассеивается на одной и той же длине волны, что называется упругим или рэлеевским рассеянием. Небольшое количество ($< 0,001\%$) рассеивается на разных длинах волн, что называется неупругим или рамановским рассеянием. Рамановское рассеяние ассоциируется с переходами вращательных, колебательных и электронных уровней. Рамановская спектроскопия позволяет выявить химический и структурный состав образцов.

В данном контексте термин "ультрафильтрация" относится к мембранному процессу, который широко применяется для концентрирования белка при последующей обработке белковых терапевтических средств во время очистки рекомбинантных белков. Ультрафильтрация представляет собой разделение по размеру, при котором частицы, превышающие поры мембраны, сохраняются, а более мелкие агенты проходят свободно. Во время обработки раствор белка тангенциально перекачивается через поверхность полупроницаемой параллельной плосколистовой мембраны. Указанная мембрана является проницаемой для буферов и буферных солей, но обычно является непроницаемой для моноклональных антител. Движущей силой для проникновения является приложение трансмембранного давления (TMP), индуцированного ограничением потока на выходе из потокового канала мембраны ($TMP = (P_{\text{подача}} + P_{\text{ретентат}})/2 - P_{\text{пермеат}}$).

В данном контексте термин "первичное концентрирование" относится к начальному этапу, при котором трансмембранное давление перемещает воду и соли через проницаемую мембрану, что уменьшает объем жидкости и, таким образом, увеличивает концентрацию белка. Степень концентрирования при первичном концентрировании может быть оптимизирована, чтобы сбалансировать производительность, стабильность белка, время обработки и потребление буфера.

В данном контексте термин "диафильтрация" относится к методике, в которой применяется полупроницаемая мембрана для обмена представляющего интерес продукта из одной жидкой среды в другую. Замена буфера и удаление соли обычно выполняются с помощью режима диафильтрации, при котором

небольшие примеси и компоненты буфера эффективно вымываются из продукта путем непрерывного добавления буфера, который предназначен для кондиционирования белка до стабильного pH и концентрирования вспомогательного вещества, что обеспечивает высокое концентрирование продукта. Этот может выполняться в непрерывном или прерывистом режиме в зависимости от технологий обработки.

Диафильтрацию часто комбинируют с ультрафильтрацией для достижения желаемого уменьшения объема при одновременном удалении примесей и солей. УФ/ДФ представляет собой конечную типовую технологическую операцию в процессе последующей очистки, которая кондиционирует mAb для достижения pH, содержания вспомогательного вещества и концентрации белка, способствующих долгосрочному хранению, а также добавление стабилизирующих вспомогательных веществ для получения составленного лекарственного вещества (FDS).

В данном контексте термин "конечное концентрирование" относится к конечному этапу, при котором трансмембранное давление перемещает воду и соли через проницаемую мембрану, что уменьшает объем жидкости и, таким образом, увеличивает концентрацию белка до желаемой цели для хранения и/или формирования в состав. Пул, полученный на этапе конечного концентрирования, представляет собой конечный концентрированный пул (FCP). Этот этап конечного концентрирования может выполняться в непрерывном или прерывистом режиме обработки.

Термины "биопродукт" и "промежуточный продукт очистки белка" могут применяться взаимозаменяемо и относиться к любому антителу, фрагменту антитела, модифицированному антителу, белку, гликопротеину или гибриднему белку, а также к конечным лекарственным веществам, очищенным после биореактора.

Термины "контроль" и "контролирование" относятся к коррекции количества или уровня концентрации критически важного показателя качества в собранной культуральной жидкости до предварительно определенного заданного значения.

В данном контексте термин "предварительная обработка" относится к первому этапу, в ходе которого в биореакторах продуцируются антитела или терапевтические белки, обычно линиями бактериальных клеток или клеток млекопитающих. Предварительная обработка включает подготовку среды, культивирование клеток, а также разделение и сбор клеток. Когда клетки достигают желаемой плотности, их собирают и перемещают в последующую часть биопроцесса. Термин "последующая обработка" относится к выделению и очистке, которые осуществляются после сбора антитела или терапевтического белка из биореактора. Как правило, это означает извлечение продукта из водного раствора несколькими различными способами. Собранный продукт обрабатывают для обеспечения соответствия требованиям к чистоте и критически важным показателям качества во время последующей обработки.

В данном контексте термин "промежуточный продукт очистки белка" относится к белку, который был собран из биореактора, и относится к любому промежуточному продукту, получаемому во время последующей обработки.

Термин "концентрированный промежуточный продукт очистки белка" относится к промежуточному продукту очистки белка с концентрацией более 5 мг/мл. Более предпочтительно концентрация составляет от 50 до 300 мг/мл.

Термины "мониторинг" и "мониторирование" относятся к регулярной проверке количества или уровня концентрации критически важного показателя качества в культуре клеток или в собранной культуральной жидкости.

Термин "собранная культуральная жидкость" относится к жидкости, которая удаляется из биореактора, содержащего клетки, которые были разработаны для секреции представляющих интерес белков. "Собранная культуральная жидкость" оптимально содержит представляющий интерес секретлируемый белок, например, моноклональное антитело.

В данном контексте термин "критически важный показатель качества (CQA)" относится к физическому, химическому, биологическому или микробиологическому свойству или характеристике, которые должны находиться в соответствующих рамках, диапазоне или распределении с целью обеспечения желаемого качества биологического терапевтического лекарственного средства. Эти характеристики могут влиять на безопасность, эффективность и/или активность. Критически важные показатели качества включают, помимо прочего, концентрацию белка, высокомолекулярные агенты, буферные вспомогательные вещества и pH.

В данном контексте термин "составленное лекарственное вещество" относится к активному ингредиенту, который предназначен для обеспечения фармакологической активности, но не включает промежуточные соединения, применяемые при синтезе такого ингредиента.

В данном контексте термин "универсальная модель" относится к математической корреляции спектральных свойств различных рекомбинантных белков, применяемой для прогнозирования критически важного показателя качества.

В данном контексте термин "специфическая модель mAb" относится к математической корреляции спектральных свойств одного конкретного белка, применяемой для прогнозирования критически важного показателя качества.

В данном контексте термин "титр" относится к количеству молекул антитела или белка в растворе.

II. Системы и способы для характеристики продуктов последующей очистки белков.

В данном изобретении предлагаются системы и способы для мониторинга и контроля концентрации белка во время производства белка. Концентрированные белковые растворы трудно точно измерить из-за высокой коррелированной вязкости растворов (> 10 сП). Точная количественная оценка требует специального автономного оборудования и, как правило, разбавления раствора. При УФ/ДФ с высокой концентрацией, конечные уровни вспомогательных веществ являются функцией концентрации белка из-за эффекта Гиббса-Доннана. Мониторинг и анализ в реальном времени в ходе процесса изготовления недоступны, что приводит к увеличению времени обработки и более высокому риску брака в партии из-за несоблюдения CQA. Описанные в данном документе системы и способы могут применяться для поточного мониторинга концентрации белка и других критически важных показателей качества.

В одном варианте осуществления данного изобретения система рамановской спектроскопии представляет собой поточную систему или систему рамановской спектроскопии *in situ*, применяемую во время изготовления конечного концентрированного пула, который может быть высококонцентрированным (≥ 150 г/л). Обычно систему рамановской спектроскопии применяют после получения промежуточного продукта очистки белка, например, во время обработки промежуточного продукта очистки белка после сбора из биореактора или системы культивирования с подпиткой и последующей очистки. На фиг. 1 продемонстрирован типовой процесс очистки белка. Обычно промежуточный продукт очистки белка собирают из клеточной культуры (100) и обрабатывают с помощью различных этапов очистки, таких как аффинный захват (110), инактивация вирусов (120), заключительная хроматографическая очистка (130 и 140), фильтрация с задержкой вирусов (150) и ультрафильтрация/диафильтрация (160), для изготовления конечного концентрированного пула, который затем формируют в лекарственное вещество. В одном варианте осуществления данного изобретения мониторинг концентрации белка в собранной культуральной жидкости осуществляется с помощью рамановской спектроскопии *in situ*.

A. Рамановская спектроскопия.

В одном варианте осуществления данного изобретения мониторинг и контроль концентрации белка в собранной культуральной жидкости осуществляется с помощью рамановской спектроскопии. Рамановская спектроскопия представляет собой форму колебательной спектроскопии, которая предоставляет информацию о молекулярных колебаниях, которую можно применять для идентификации образцов и количественного определения критически важных показателей качества. Рамановский анализ *in situ* представляет собой метод анализа образца в его исходном местоположении без необходимости извлечения части образца для анализа в рамановском спектрометре. Рамановский анализ *in situ* выгоден тем, что анализаторы для рамановской спектроскопии являются неинвазивными и неразрушающими, что снижает риск загрязнения и потери качества белка. Поточный рамановский анализ может быть реализован для обеспечения непрерывной обработки при мониторинге концентрации белка в собранной культуральной жидкости, промежуточных продуктах очистки белка и/или конечном концентрированном пуле.

Рамановский анализ *in situ* может обеспечить в реальном времени оценку концентрации белка в промежуточных продуктах очистки белка. Например, исходные спектральные данные, полученные с помощью рамановской спектроскопии *in situ*, можно применять для получения и контроля текущей концентрации белка в промежуточных продуктах очистки белка. В этом аспекте, чтобы гарантировать, что исходные спектральные данные постоянно обновляются, указанные спектральные данные рамановской спектроскопии необходимо собирать примерно каждые 5 с - 10 ч. В другом варианте осуществления данного изобретения спектральные данные необходимо собирать примерно каждые 15 мин - 1 ч. В еще одном варианте осуществления данного изобретения спектральные данные необходимо собирать примерно каждые 20-30 мин.

Мониторинг концентрации белка в промежуточном продукте очистки белка можно проанализировать с помощью любого коммерчески доступного анализатора рамановской спектроскопии, который позволяет проводить рамановский анализ *in situ*. Рамановский анализатор *in situ* должен быть способен получать исходные спектральные данные в промежуточном продукте очистки белка. Например, рамановский анализатор должен быть оборудован зондом, который можно установить на линию жидкостного контура. Пригодные рамановские анализаторы включают, помимо прочего, анализаторы RamanRXN2 и RamanRXN4 (Kaiser Optical Systems, Inc., Анн-Арбор, штат Мичиган).

Исходные спектральные данные, полученные с помощью рамановской спектроскопии *in situ*, можно сравнивать с автономными измерениями концентрации белка, чтобы коррелировать пики в спектральных данных с концентрацией белка. Автономные измерения концентрации белка можно применять для определения того, какие спектральные области демонстрируют сигнал белка. Данные автономных измерений могут быть собраны с помощью любого пригодного для этого аналитического способа. В случае концентрации белка, например, автономные измерения могут быть получены с помощью SoloVPE (C-technologies). Кроме того, любой тип многопараметрического программного пакета, например SIMCA 13 (MKS Data Analytic Solutions, Умео, Швеция), можно применять для корреляции пиков в исходных спектральных данных с автономными измерениями концентрации белка. Однако в некоторых вариантах осуществления данного изобретения может быть необходимо предварительно обработать исходные спектральные данные с помощью спектральных фильтров для удаления любых изменяющихся исходных

состояний. Например, исходные спектральные данные могут быть предварительно обработаны с помощью любого типа метода сглаживания или нормализации данных. Нормализация может потребоваться для корректировки любых изменений зонда, оптики, мощности лазера и времени экспозиции рамановским анализатором. В одном варианте осуществления данного изобретения исходные спектральные данные можно обработать с помощью метода сглаживания данных, такого как 1-я производная со сглаживанием 21 cm^{-1} , и метода нормализации, такого как стандартное отклонение случайной величины с нормальным распределением (SNV). Эти методы предварительной обработки могут быть объединены для определенных спектральных областей с целью улучшения модельного прогнозирования.

На полученных спектральных данных также может быть выполнено хемометрическое моделирование. В этом аспекте, для спектральных данных можно применять один или большее количество многопараметрических методов, включая, помимо прочего, дробные наименьшие квадраты (PLS), анализ главных компонент (PCA), ортогональные дробные наименьшие квадраты (OPLS), многомерную регрессию, каноническую корреляцию, факторный анализ, кластерный анализ, графические методы и т.п. В одном варианте осуществления данного изобретения полученные спектральные данные применяются для создания регрессионной модели PLS. Регрессионную модель PLS можно создать путем проецирования прогнозируемых переменных и наблюдаемых переменных в новое пространство. В этом аспекте, регрессионную модель PLS можно создать с использованием значений измерений, полученных из рамановского анализа, и значений автономных измерений. Регрессионная модель PLS предоставляет прогнозируемые значения процесса, например, прогнозируемое значение концентрации белка. В одном варианте осуществления данного изобретения указанная модель обеспечивает прогнозируемые значения концентрации белка с ошибкой $\leq 5\%$ по сравнению с автономными значениями концентрации белка. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения указанная модель обеспечивает прогнозируемые значения концентрации белка с ошибкой $\leq 3\%$ по сравнению с автономными значениями концентрации белка.

После хемометрического моделирования к прогнозируемым значениям концентрации белка можно применить метод обработки сигналов. В одном варианте осуществления данного изобретения указанный метод обработки сигналов уменьшит изменчивость модели и ошибку прогнозирования. В этом аспекте один или большее количество методов предварительной обработки можно применять к прогнозируемым значениям концентрации белка. Также можно применять любые методы предварительной обработки, известные специалистам в данной области техники. Например, метод подавления помех может включать в себя сглаживание данных и/или отклонение сигнала. Сглаживание достигается с помощью серии алгоритмов сглаживания и фильтров, в то время как для подавления помех используются характеристики сигнала, чтобы идентифицировать данные, которые не следует включать в анализируемые спектральные данные. В одном варианте осуществления данного изобретения прогнозируемые значения концентрации белка уменьшаются фильтром, подавляющим помехи. Фильтр, подавляющий помехи, обеспечивает окончательные прогнозируемые значения концентрации белка. В этом аспекте, метод подавления помех объединяет исходные измерения с основанной на модели оценкой того, что должно дать измерение в соответствии с моделью. В одном варианте осуществления данного изобретения метод подавления помех объединяет текущее прогнозируемое значение концентрации белка с его неопределенностями. Неопределенности можно определить по повторяемости прогнозируемых значений концентрации белка и текущих значений концентрации белка. Как только наблюдается следующее прогнозируемое значение концентрации белка, оценка прогнозируемого значения концентрации белка обновляется с учетом средневзвешенного значения, в котором оценкам с большей достоверностью придается больший вес. С помощью итеративного подхода, конечные значения концентрации белка могут быть обновлены на основе предыдущего измерения и текущего измерения. В этом аспекте, алгоритм должен быть рекурсивным и иметь возможность функционировать в реальном времени, чтобы использовать текущее прогнозируемое значение концентрации белка, предыдущее значение и экспериментально определенные константы. Метод подавления помех повышает надежность измерений, полученных в результате рамановского анализа, и прогнозов PLS за счет уменьшения помех, на которые будет действовать автоматический контроллер отзыва.

В. Способы применения.

Описанные способы можно применять для мониторинга и контроля концентрации белка в собранной культуральной жидкости и/или промежуточных жидкостях очистки белка во время последующих процессов очистки белка. Обычные последующие процессы очистки включают, помимо прочего, центрифугирование, прямую глубинную фильтрацию, аффинную очистку на основе белка А, этапы инактивации вирусов, ионообменную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, эксклюзионную хроматографию, ультрафильтрацию/диафильтрацию, фильтрацию с задержкой вирусов и их комбинации. Эти типовые операции осуществляют в определенной последовательной комбинации для выделения представляющего интерес белка и обеспечения контроля примесей и/или критически важных показателей качества до получения составленного лекарственного вещества. В одном варианте осуществления данного изобретения описанные способы включают рамановский зонд, установленный на линии

жидкостного контура. В другом варианте осуществления данного изобретения описанные способы можно применять для изготовления концентрированного промежуточного продукта очистки белка или конечного концентрированного пула.

1. Титр антител и концентрация белка.

Как титр антител, так и концентрация белка являются важными факторами при очистке биопродуктов. Титр антител, измеренный после начального сбора жидкости для культивирования клеток, важен для определения загрузки колонки и обеспечения надежного процесса очистки для удаления примесей. Мониторинг концентрации белка на всех этапах очистки важен как для обеспечения надлежащей концентрации конечного продукта, так и для надлежащего выполнения типовых операций очистки. Ненадлежащая концентрация белка может привести к получению неэффективных лекарственных препаратов или производству неэффективных лекарственных веществ.

В одном варианте осуществления данного изобретения собранную культуральную жидкость подвергают рамановскому спектральному анализу сразу после сбора, но до начала какой-либо дополнительной очистки. Рамановские спектральные данные можно применять после сбора для количественного определения титра антител в собранной культуральной жидкости. Концентрацию белка можно измерить с помощью описанных способов в ходе множества этапов во время процесса очистки белка, например, во время аффинного захвата, во время заключительной хроматографической очистки, во время фильтрации с задержкой вирусов или во время ультрафильтрации/диафильтрации. Встроенные в линию рамановские зонды могут обнаруживать рамановское рассеяние в собранной культуральной жидкости и/или промежуточном продукте очистки белка в жидкостном контуре без удаления образца из системы, обеспечивая тем самым аналитические характеристики, которые обычно определяются в автономном режиме.

В одном варианте осуществления данного изобретения, если концентрация белка выходит за пределы предварительно определенной концентрации во время ультрафильтрации/диафильтрации, система получает уведомление, и промежуточный продукт очистки белка изменяется соответствующим образом. Например, если концентрация белка в промежуточном продукте очистки белка ниже предварительно определенной концентрации белка, промежуточный продукт очистки белка может быть дополнительно концентрирован путем проведения ультрафильтрации/диафильтрации.

В одном варианте осуществления данного изобретения этап концентрирования проводят с помощью аффинной хроматографии на основе белка А.

2. Соотношение препарат - антитело.

В другом варианте осуществления данного изобретения описанные способы можно применять для мониторинга и контроля соотношения препарат - антитело (DAR). DAR представляет собой показатель качества, который отслеживается во время разработки конъюгатов антитело-препарат (ADC), конъюгатов антитело-радионуклид (ARC) и общих белковых конъюгатов (сильнодействующие стероиды, нецитотоксические нагрузки и т.д.) для обеспечения постоянного качества продукта и облегчения последующей маркировки продукта относительно нагрузки. DAR представляет собой среднее количество лекарственных средств или других терапевтических молекул, конъюгированных с антителами, и является важным показателем качества при изготовлении терапевтических конъюгатов. Значение DAR влияет на эффективность конъюгированного лекарственного средства, поскольку низкая нагрузка лекарственным средством снижает активность этого лекарственного средства, в то время как высокая нагрузка может отрицательно повлиять на фармакокинетику и безопасность.

В одном варианте осуществления данного изобретения конъюгаты антитело-радионуклид подвергают рамановскому спектральному анализу сразу после конъюгирования, но до проведения какой-либо дополнительной очистки. Рамановские спектральные данные можно применять после конъюгации для определения DAR.

В одном варианте осуществления данного изобретения, если DAR выходит за пределы предварительно определенной концентрации во время обработки, система получает уведомление, и промежуточный продукт ADC изменяется соответствующим образом. Например, если DAR в промежуточном продукте ADC ниже предварительно определенного DAR, компоненты реакции конъюгации могут быть изменены, например, могут быть оптимизированы концентрации реагентов, может быть изменен тип линкера, а также может быть оптимизирована температура или другие переменные производственного процесса.

3. Буферные вспомогательные вещества.

Описанные способы можно применять для мониторинга и контроля уровней буферных вспомогательных веществ в собранной культуральной жидкости и/или промежуточном продукте очистки белка во время последующей очистки. Буферные вспомогательные вещества, которые обычно применяются при изготовлении моноклональных антител, включают, помимо прочих, ацетат, цитрат, гистидин, сукцинат, фосфат и гидроксиметиламинометан (Трис), пролин и аргинин. Вспомогательные вещества из группы поверхностно-активных агентов включают, помимо прочих, полисорбат 80 (Твин 80), полисорбат 20 (Твин 20) и полоксамер 188. Вспомогательных веществ из группы полиолов/дисахаридов/полисахаридов включают, помимо прочих, маннит, сорбит, сахарозу и декстран 40. Антиоксидантные вспомогательные вещества включают, помимо прочих, аскорбиновую кислоту, метионин

и этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТК). Два широко применяемых вспомогательных вещества из группы аминокислот представляют собой гистидин и аргинин. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения вспомогательное вещество, которое подлежит мониторингу и контролю, представляет собой гистидин и аргинин.

Концентрации вспомогательного вещества конечного концентрированного пула отличаются от состава буфера для диафильтрации из-за комбинации эксклюзионного объема и эффектов Доннана. Эффект Доннана представляет собой явление, которое возникает из-за удержания чистого положительно заряженного белка мембраной во время УФ/ДФ в сочетании с требованием нейтральности заряда как в ретентате, так и в пермеатах. Чтобы сбалансировать положительно заряженный белок, отрицательно заряженные компоненты буфера обогащают ретентатом по сравнению с буфером для диафильтрации, а положительно заряженные компоненты буфера удаляют. Этот эффект может привести к тому, что pH FCP и концентрации буферного вспомогательного вещества будут существенно отличаться от композиции буфера для диафильтрации (Stoner, et al., J Pharm Sci, 93: 2332-2342 (2004)).

Эксклюзионный объем описывает характеристики высококонцентрированных образцов, в которых белок занимает значительную часть объема раствора. Буфер исключается из объема, занимаемого белком, что приводит к снижению концентраций растворенных веществ в буфере по мере увеличения концентрации белка, выраженного в молях (или массе) растворенных веществ на объем раствора. Буфер исключается из объема, занимаемого белком, что приводит к снижению концентраций растворенных веществ в буфере по мере увеличения концентрации белка, выраженной в молях (или массе) растворенных веществ на объем раствора.

Основываясь на обоих этих принципах и на том, что уровни буферного вспомогательного вещества являются критически важными показателями качества, поточные рамановские зонды минимизируют автономную аналитическую характеризацию и обеспечивают дальнейшее понимание процесса, чтобы гарантировать, что уровни вспомогательного вещества являются достаточными для составления композиции.

4. Высокомолекулярные примеси.

При изготовлении моноклональных антител низкие уровни примесей, связанных с продуктом, часто определяются даже после проведения расширенных этапов очистки. Агенты с высокой молекулярной массой (НМВ) (например, виды димеров антител) представляют собой примеси, связанные с продуктом, которые вносят вклад в неоднородность размеров продуктов mAb. Образование НМВ-агентов в терапевтическом лекарственном препарате mAb в результате агрегации белков может потенциально поставить под угрозу как эффективность, так и безопасность лекарственного средства. НМВ-агенты считаются CQA, которые подлежат регулярному мониторингу во время разработки лекарственных средств и как часть испытания при выпуске очищенных белковых лекарственных продуктов во время изготовления.

В одном варианте осуществления данного изобретения описанные способы можно применять для идентификации белковых лекарственных продуктов, которые содержат НМВ-агенты. НМВ-агенты можно обнаружить с помощью рамановской спектроскопии на различных этапах во время процесса очистки, включая, помимо прочего, во время аффинного захвата, во время инактивации вирусов, во время заключительной хроматографической очистки, во время фильтрации с задержкой вирусов, во время ультрафильтрации/диафильтрации или их комбинаций.

В одном варианте осуществления данного изобретения с помощью описанных способов обнаруживают НМВ-агенты в собранной культуральной жидкости, и при этом указанную жидкость дополнительно обрабатывают для удаления НМВ-агентов. Способы удаления НМВ-агентов из культуральной жидкости включают дополнительные этапы очистки, включая, помимо прочего, катионообменную хроматографию и анионообменную хроматографию.

С. Системы УФ/ДФ.

На фиг. 6 продемонстрирована система обработки ультрафильтрацией/диафильтрацией, включая различные локализации для поточных рамановских зондов (цифры 1-4 в кружке). Промежуточный продукт для очистки белка перекачивается в емкость для ретентата 205 с помощью диафильтрационного насоса 200, который может быть перистальтическим, роторным, перекачивающим или диафрагменным насосом. Жидкость из резервуара для ретентата 205 течет к насосу подачи 210, который может быть роторным, перистальтическим или диафрагменным насосом, мимо клапана давления подачи 215 и в модуль тангенциальной поточной фильтрации (TFFM) 220. В TFFM 220 промежуточный продукт очистки белка подвергают ультрафильтрации через мембрану. Биопродукт, представляющий интерес, удерживается в жидкости (ретентате), в то время как вода и растворенные вещества с низким молекулярным весом, включая буферные вспомогательные вещества, проходят через мембрану в пермеате (фильтрате), который выходит из системы, проходя через клапан регулировки давления пермеата 225 в резервуар для отходов 230. Ретентат выходит из TFFM 220 и проходит через клапан регулировки давления ретентата 235, клапан регулировки трансмембранного давления 240 и канал возврата ретентата 245, по которому он течет обратно в сосуд для ретентата 205. Описанный процесс можно повторять по мере необходимости, чтобы сконцентрировать биопродукт, удалить примеси и убедиться, что CQA находятся в допустимых пределах. Во время диафильтрации применяется тот же путь потока, что и описанный выше, при кото-

ром проницаемые растворенные вещества заменяются по мере того, как новый буфер вымывается в поток продукта. Когда новый буфер добавляется с той же скоростью, что и пермеат удаляется из системы, сумма объема резервуара для ретентата и объем тормозного удержания определяет объем системы. Объем одного оборота (TOV) определяется как количество буфера для диафильтрации, добавляемого в процессе ультрафильтрации/ультрафильтрации, равное системному объему. Как правило, замена 8-кратного объема системы (8 TOV) обеспечивает замену буфера > 99,9% (Schwartz, L., Scientific and Technical Report, PN 33289)

Кроме того, во время процесса УФ/ДФ необходимо перемешивать раствор белка в сосуде для ретентата 205. Из-за различий в плотности между буфером для диафильтрации, возвратным ретентатом и объемным ретентатом во время диафильтрации требуется, чтобы перемешивание в резервуаре было достаточным для обеспечения адекватного обмена буфера, но достаточно умеренным, чтобы избежать сдвига, поскольку это, как было замечено, приводит к агрегации белка и генерации невидимых частиц (SVP) в определенных продуктах. Кроме того, важно обеспечить адекватное перемешивание возвратного ретентата на этапах концентрирования, чтобы предотвратить поляризацию концентрации белка в резервуаре для ретентата, приводящую к доставке более высоких концентраций белка на мембраны УФ/ДФ.

В одном варианте осуществления данного изобретения рамановский зонд помещают в положение 1, после диафильтрационного насоса 200 в резервуаре для ретентата 205. В альтернативном варианте рамановский зонд может быть помещен в положение 2 после резервуара для ретентата 205 на линии перед насосом подачи 210. В другом варианте осуществления данного изобретения рамановский зонд помещают на линии в положение 3 между нагнетательным насосом 215 и модулем тангенциальной поточной фильтрации 220. В еще одном варианте осуществления данного изобретения рамановский зонд помещают на линию возвратного ретентата 245. Расположение рамановского зонда имеет решающее значение для обеспечения точных линейных измерений в сложной системе, которая имеет технические и технологические ограничения.

D. Культура клеток.

Собранная культуральная жидкость может быть извлечена из биореактора, содержащего клетки, сконструированные для изготовления моноклональных антител. Термин "клетка" включает любую клетку, которая является пригодной для экспрессии последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Клетки включают клетки прокариот и эукариот, такие как бактериальные клетки, клетки млекопитающих, клетки человека, клетки животных, отличных от человека, клетки птиц, клетки насекомых, клетки дрожжей или слитые клетки, такие как, например, гибридомы или квадромы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная клетка представляет собой клетку человека, обезьяны, примата, хомяка, крысы или мыши. В других вариантах осуществления данного изобретения указанную клетку выбирают из следующих клеток: клетка яичника китайского хомяка (CHO) (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), клетка сетчатки, Vero, CV1, почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, лимфоцит, например, Jurkat (Т-лимфоцит) или Дауди (В-лимфоцит), A431 (эпидермальная), U937, 3T3, L клетка, C127 клетка, SP2/0, NS-0, ММТ-клетка, стволовая клетка, опухолевая клетка и клеточная линия, полученная из вышеупомянутых клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная клетка содержит один или большее количество вирусных генов, например, клетка сетчатки, которая экспрессирует вирусный ген (например, клетка PER.C6®). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная клетка представляет собой клетку CHO. В других вариантах осуществления данного изобретения указанная клетка представляет собой клетку CHO K1.

В процессе изготовления белка, "культура клеток с подпиткой" или "культура с подпиткой" относится к культуре с подпиткой, когда клетки и культуральную среду сначала подают в сосуд для культивирования, а дополнительные питательные вещества для культуры вводят в культуру в ходе культивирования медленно дискретными порциями, с периодическим сбором клеток и/или продуктов перед прекращением культивирования или без такого сбора. Культура с подпиткой включает "полунепрерывную культуру с подпиткой", в которой периодически вся культура (которая может включать клетки и среду) удаляется и заменяется свежей средой. Культура с подпиткой отличается от "периодической культуры" тем, что в периодической культуре все компоненты для культивирования клеток (включая клетки животных и все питательные вещества для культивирования) подают в сосуд для культивирования в начале процесса культивирования. Культура с подпиткой может отличаться от "перфузионной культуры", поскольку супернатант не удаляется из сосуда для культивирования во время стандартного процесса с подпиткой, тогда как при перфузионном культивировании клетки удерживаются в культуре, например, путем фильтрации, и культуральная среда непрерывно или периодически вводится и удаляется из сосуда для культивирования. Однако во время культивирования клеток с подпиткой предполагается удаление образцов для целей тестирования. Процесс подпитки продолжается до тех пор, пока не будет определено, что достигнут максимальный рабочий объем и/или максимальная выработка белка, и впоследствии белок будет собран.

Фраза "непрерывное культивирование клеток" относится к методике, применяемой для непрерывного роста клеток, обычно в определенной фазе роста. Например, если требуется постоянное поступле-

ние клеток или требуется продуцирование конкретного представляющего интерес белка, культуре клеток может потребоваться поддержание в определенной фазе роста. Таким образом, чтобы поддерживать клетки в этой конкретной фазе, условия необходимо постоянно контролировать и соответствующим образом регулировать.

Термины "среда для культивирования клеток" и "среда для культивирования" относятся к питательному раствору, применяемому для выращивания клеток млекопитающих, который обычно обеспечивает необходимые питательные вещества для усиления роста клеток, например, необходимый углеводный источник энергии, незаменимые (например, фенилаланин, валин, треонин, триптофан, метионин, лейцин, изолейцин, лизин и гистидин) и заменимые (например, аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутаминовая кислота, глутамин, глицин, пролин, серин и тирозин) аминокислоты, микроэлементы, источники энергии, липиды, витамины и т.д. Среда для культивирования клеток может содержать экстракты, например, сыворотку или пептоны (гидролизаты), которые обеспечивают исходные ингредиенты, поддерживающие рост клеток. Среда может содержать экстракты дрожжевого или соевого происхождения вместо экстрактов животного происхождения. Среда с определенным химическим составом относится к среде для культивирования клеток, в которой все химические компоненты известны (т.е. имеют известную химическую структуру). Химически определенная среда полностью не содержит компонентов животного происхождения, таких как пептоны сывороточного или животного происхождения. В одном варианте осуществления данного изобретения указанная среда представляет собой среду определенного химического состава.

Раствор также может содержать компоненты, которые увеличивают рост и/или выживаемость сверх минимального показателя, включая гормоны и факторы роста. Раствор может быть составлен с pH и концентрацией соли, которые являются оптимальными для выживания и пролиферации конкретной культивируемой клетки.

Е. Представляющие интерес белки.

С помощью описанных способов можно осуществлять мониторинг любого представляющего интерес белка, пригодного для экспрессии в прокариотических или эукариотических клетках. Например, представляющий интерес белок включает, помимо прочего, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ScFv или его фрагмент, слитый с Fc белок или его фрагмент, фактор роста или его фрагмент, цитокин или его фрагмент, или внеклеточный домен рецептора клеточной поверхности или его фрагмент. Представляющие интерес белки могут представлять собой простые полипептиды, состоящие из одной субъединицы, или сложные полисубъединичные белки, содержащие две или большее количество субъединиц. Представляющий интерес белок может быть биофармацевтическим продуктом, пищевой добавкой или консервантом или любым белковым продуктом, подлежащим очистке и соответствию стандартам качества.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело выбирают из группы, состоящей из антитела против белка 1 запрограммированной гибели клеток (например, антитела анти-PD1, как описано в патенте США № 9987500), антитела против лиганда белка 1 запрограммированной гибели клеток (например, антитело анти-PD-L1, как описано в патенте США № 9938345), антитела анти-Dll4, антитело против ангиопоэтина-2 (например, антитело анти-ANG2, как описано в патенте США № 9402898), антитела против ангиопоэтин-подобного белка 3 (например, антитела анти-AngPt13, как описано в патенте США № 9018356), антитела против рецептора фактора роста тромбоцитов (например, антитело анти-PDGFR, как описано в патенте США № 9265827), антитела против Erb3, антитела против рецептора пролактина (например, антитело анти-PRLR, как описано в патенте США № 9302015), антитела против комплемента 5 (например, антитело анти-C5, как описано в патенте США № 9795121), антитела анти-TNF, антитела против рецептора эпидермального фактора роста (например, антитело анти-EGFR, как описано в патенте США № 9132192, или антитела анти-EGFRvIII, как описано в патенте США № 9475875), антитела против пропротеиновой конвертазы субтилизин-кексинового типа 9 (например, антитело анти-PCSK9, как описано в патенте США № 8062640 или в патенте США № 9540449), антитела против фактора роста и дифференцировки 8 (например, антитело анти-GDF8, также известное как антитело против миостатина, как описано в патентах США №№ 8871209 или 9260515), антитела против рецептора глюкагона (например, антитело анти-GCGR, как описано в патентах США №№ 9587029 или 9657099), антитела анти-VEGF, антитела анти-IL1R, антитела к рецептору интерлейкина 4 (например, антитело анти-IL4R, как описано в заявке на публикацию патента США № US 2014/0271681A1 или в патентах США 8735095 или 8945559), антитела против рецептора интерлейкина 6 (например, антитело анти-IL6R, как описано в патентах США №№ 7582298, 8043617 или 9173880), антитела анти-IL1, антитела анти-IL2, антитела анти-IL3, антитела анти-IL4, антитела анти-IL5, антитела анти-IL6, антитела анти-IL7, антитела против интерлейкина 33 (например, антитело анти-IL33, как описано в патенте США №№ 9453072 или 9637535), антитела против респираторно-синцитиального вируса (например, антитело анти-RSV, как описано в заявке на публикацию патента США № 9447173), антитела против кластера дифференцировки 3 (например, антитело анти-CD3, как описано в патентах США №№ 9447173 и 9447173 и в заявке на патент США № 62/222605) антитела против кластера дифференцировки 20 (например, антитело анти-CD20, как описано в патентах США №№ 9657102 и US 20150266966 A1, а также в патенте США №

7879984), антитела анти-CD19, антитело анти-CD28, антитело против кластера дифференцировки-48 (например, антитело анти-CD48, как описано в патенте США № 9228014), антитела анти-Fel d1 (например, как описано в патенте США № 9079948), антитела против вируса ближневосточного респираторного синдрома (например, антитело анти-MERS, как описано в патенте США № 9718872), антитела против вируса Эбола (например, как описано в патенте США № 9771414), антитела против вируса Зика, антитела против гена активации лимфоцитов 3 (например, антитело анти-LAG3 или антитело анти-CD223), антитела против фактора роста нервов (например, антитело анти-NGF, как описано в заявке на публикацию патента США № US 2016/0017029 и в патентах США №№ 8309088 и 9353176) и антитела против активности А.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения биспецифическое антитело выбирают из группы, состоящей из биспецифического антитела анти-CD3 x анти-CD20 (как описано в патенте США № 9657102 и в заявке на публикацию патента США № US 20150266966 A1), биспецифическое антитело против CD3 x против муцина 16 (например, биспецифическое антитело анти-CD3 x анти-Muc16) и биспецифическое антитело против CD3 x против специфического мембранного антигена (например, биспецифическое антитело анти-CD3 x и анти-PSMA). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения представляющий интерес белок выбирают из группы, состоящей из абциксимаба, адалимумаба, адалимумаба-атто, адотрастузумаба, алектумаба, алирокумаба, атезолизумаба, авелумаба, базиликсимаба, белиумаба, бенрализумаба, бевацизумаба, безлтоксумаба, блинатумаба, брентуксимаба ведотина, бродалумаба, канакинумаба, капромаба пендетида, цертолизумаба пегола, цемиплимаба, цетуксимаба, деносумаба, динутуксимаба, дупилумаба, дурвалумаба, экулизумаба, элотузумаба, эмицизумаба-kxwh, эмтансинеалирокумаба, эвинакумаба, эволокумаба, фасинумаба, голимумаба, гуселкумаба, ибритумаба тиуксетана, идаруцизумаба, инфликсимаба, инфликсимаб-abda, инфликсимаб-duyb, ипилимумаба, иксекизумаба, меполизумаба, нецитумумаба, несвакумаба, ниволумаба, обилтоксаксимаба, обинутузумаба, окрелизумаба, офатумумаба, оларатумаба, омализумаба, панитумумаба, пембролизумаба, пертузумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, раксибакумаба, реслизумаба, ринукумаба, ритуксимаба, сарилумаба, секукинумаба, силтуксимаба, тоцилизумаба, трастузумаба, тревогрумаба, устекинумаба и ведолизумаба.

Примеры

Пример 1. Универсальная поточная модель концентрирования белка для УФ/ДФ применений.

Материалы и способы.

Сбор данных для модели включал спектральные данные анализаторов из Raman Rxn2 и Rxn 4 (Kaiser Optical Systems, Inc., Анн-Арбор, штат Мичиган) с использованием MR-Probe-785 и RamanRxn Probehead-758 (Kaiser Optical Systems, Inc., Анн-Арбор, штат Мичиган). Кроме того, в процессе разработки применяли несколько различных оптических элементов в зависимости от доступности. Рабочие параметры рамановских анализаторов были установлены на время сканирования 10 с для 6 накоплений, повторенных 5 раз. SIMCA 13 (MKS Data Analytic Solutions, Умео, Швеция) применяли для корреляции пиков в спектральных данных с измерениями концентрации белка в автономном режиме. Поточные измерения выполняли на различных этапах типового процесса УФ/ДФ, включая первичное концентрирование, диафильтрацию и конечное концентрирование. Автономные концентрации белка определяли с помощью SoloVPE (C Technologies, Inc.). Измерения SoloVPE проводили в трех повторениях.

На фиг. 2 продемонстрированы спектральные области, которые использовались для создания хеометрических моделей. Области включали область 1-977-1027 см^{-1} (кольцевая структура), область 2-1408-1485 см^{-1} (аргинин), область 3-1621-1711 см^{-1} (вторичная структура) и область 4-2823-3046 см^{-1} (C-H растяжение). Следующая спектральная фильтрация была выполнена на исходных спектральных данных: 1-я производная со сглаживанием данных 21 см^{-1} для удаления различных исходных состояний.

Результаты.

С целью определения технической применимости универсальной поточной модели концентрирования белка для ультрафильтрации/ диафильтрации (УФ/ДФ), mAb1 анализировали с помощью рамановской спектроскопии. Концентрацию белка измеряли перед диафильтрацией (первичное концентрирование), во время диафильтрации (диафильтрация) и после диафильтрации (конечное концентрирование). Расчетные концентрации из модели сравнивали с концентрацией белка, определенной с помощью SoloVPE (фиг. 3). Ошибка модели для 0-120 г/л (первичное концентрирование и диафильтрация) составляла 3,1%, а ошибка модели для > 120 г/л (конечное концентрирование) составляла 1,8%, когда были включены данные обучающей выборки (спектры mAb1 включены в модель PLS).

Ошибки обработки могут быть обнаружены с помощью рамановской спектроскопии. На фиг. 3 продемонстрировано, что вовлечение воздуха в систему во время заключительной рециркуляции через систему УФ/ДФ обнаруживали с помощью рамановских спектральных данных. Столбцы, ограниченные прямоугольником, демонстрируют, что прогнозируемая с помощью SoloVPE концентрация mAb1 составляла > 200 г/л, тогда как рамановское прогнозирование составляло ~ 65 г/л.

На фиг. 4 продемонстрирована абсолютная ошибка рамановской модели для десяти репрезентативных mAb. Эти данные подтвердили успешную разработку моделей для продемонстрированных mAb, которые включали различные изоформы mAb (IgG1 и IgG4), а также биспецифические молекулы. 14 из 17

модельных прогнозов имели ошибку $\leq 5\%$. Однако специфические модели (0-120 г/л и > 120 г/л) были созданы для каждого зонда, который применяли во время разработки, поскольку зонд для определения изменчивости увеличивал ошибки, прогнозируемые моделями PLS.

Для оптимизации модели были протестированы различные зонды и лазеры в линии с множеством mAb. Уточнение модели выполнялось в тех случаях, когда только одна спектральная область была в фокусе обновленной универсальной модели: 2823-3046 cm^{-1} (C-H растяжение) со спектральной фильтрацией стандартного отклонения случайной величины с нормальным распределением (SNV) для корректировки изменения мощности лазера и изменчивости зонда в качестве корректировки исходного состояния. Сравнение двух разработанных компонентов модели представлено в табл. 1. Модели регрессии методом дробных наименьших квадратов (PLS) создавали с соответствующими автономными измерениями SoIoVPE, выполненными в трех повторениях. Подробная информация о модели регрессии методом дробных наименьших квадратов приведена в табл. 2. Обновленный набор данных, спрогнозированный с помощью оптимизированной лазерной/зондовой универсальной модели, показал, что 15 из 17 прогнозов на основе модели имели ошибку $\leq 5\%$ по сравнению с предыдущими 14 из 17 (фиг. 5).

Таблица 1

Сравнение компонентов универсальной модели

Компонент Описание	Универсальная модель (v. 1)	Универсальная модель (v. 2)
Лазер	1	3
Оптика	2	6
Фильтр предварительной обработки	1-я производная со сглаживанием данных 21 cm^{-1}	Стандартное отклонение случайной величины с нормальным распределением (SNV)
Спектральные области	977-1027 cm^{-1} 1408-1485 cm^{-1} 1621-1711 cm^{-1} 2823-3046 cm^{-1}	2823-3046 cm^{-1}

Таблица 2

Универсальная модель регрессии методом дробных наименьших квадратов для концентрации белка (v. 2). Подробная информация

Конечные модели	0-120 г/л	> 120 г/л
Размер образца	1412	879
R^2X	0,993	0,987
Q^2	0,984	0,958
RMSECV	3,34	7,77

R^2X - процент вариации, объясняемый моделью, цель: $R^2 > 0,9$;

Q^2 - процент вариации, спрогнозированный моделью во время перекрестной валидации, цель: $Q^2 > 0,8$;

RMSECV: среднеквадратичная ошибка перекрестной валидации.

Пример 2. Повышение производительности моделей концентрирования белка.

Материалы и способы.

Оптимизированные универсальные модели (v.2) (см. табл. 1) тестировали с помощью масштабируемого 1/2" эксперимента с одноразовой системой тангенциальной поточной фильтрации (Pall Corporation) с mAb10. Материал загрузки mAb10 представлял собой лекарственное вещество, а не типовой материал загрузки. Материал FDS разбавляли до репрезентативного источника загрузки УФ/ДФ, включая концентрирование белка и буферные вспомогательные вещества. Однако из-за наличия дополнительных вспомогательных веществ в источнике загрузки, которые не были протестированы во время разработки универсальной модели, создавали mAb10-специфические модели. В примере 1 описаны методы сбора рамановских данных и информация о продолжительности сканирования. В mAb-специфической модели для концентрации > 120 г/л использовались те же спектральные области и методы предварительной обработки, что и в универсальной модели (v. 2). Однако в mAb-специфической модели для концентрации 0-120 г/л использовались четыре спектральные области, как продемонстрировано на фиг. 2, с предварительной обработкой стандартного отклонения случайной величины с нормальным распределением. Различия в модели 0-120 г/л можно отнести к дополнительным вспомогательным веществам в источнике загрузки.

Результаты.

Цель величины ошибки модели $\leq 5\%$ была достигнута для 2/4 обновленных моделей в тех случаях, когда обучающий набор был включен в модельное прогнозирование, как продемонстрировано в табл. 3. На основе заметных различий, таких как источник загрузки, лазер и масштаб (лабораторный масштаб по сравнению с увеличенным масштабом) во время предварительного эксперимента при IOPS, был проведен второй цикл. Перед вторым экспериментом были внесены изменения в mAb 10-специфическую модель с концентрацией 0-120 г/л. С применением предварительной обработки SNV были включены все четыре области, но три области: $977-1027\text{ см}^{-1}$, $1408-1485\text{ см}^{-1}$ и $1621-1711\text{ см}^{-1}$ дополнительно применяли 1-ю производную со сглаживанием данных 21 см^{-1} . Краткое изложение обобщенных результатов эксперимента представлено в табл. 3. Во время второго эксперимента цель величины ошибки модели $\leq 5\%$ была достигнута для 3/4 обновленных моделей в тех случаях, когда обучающий набор был включен в модельное прогнозирование, как продемонстрировано в табл. 3. Дополнительное наблюдение, осуществленное во время анализа данных, подтвердило то, что источник загрузки является основным фактором увеличения ошибки. Если образец загрузки удаляли, ошибка универсальной модели снижалась с 8,6 до 5,7%. На фиг. 7 продемонстрированы результаты поточного прогнозирования (в реальном времени, столбцы с широкой штриховкой) и обновленных моделей (столбцы с узкой штриховкой) для конечного концентрированного пула, где сравнивается концентрация белка с автономным измерением с помощью SoloVPE (пустые столбцы). Поточная универсальная модель и обновленная модель имели ошибку 2,7%, тогда как ошибка поточной и обновленной модели mAb10 составляла 12,0 и 4,2% соответственно для окончательного концентрированного пула. Повышенная величина ошибки, наблюдаемая в модели mAb 10, может быть связана с ограниченными данными в диапазоне $\sim 250\text{ г/л}$, тогда как универсальная модель имела больший набор данных. Дополнительным фактором, способствующим повышению величины ошибки, является неспособность моделей экстраполироваться за пределы охарактеризованного диапазона (т.е. $> 250\text{ г/л}$ в модели mAb 10).

Таблица 3

Средняя ошибка модели для прогнозирования концентрации белка при увеличении масштаба

	IOPS, эксперимент №1		IOPS, эксперимент №2	
	Поточная	Обновленная	Поточная	Обновленная ¹
Универсальная 0-120 г/л	13,8%	8,9%	9,9%	8,6%
Универсальная > 120 г/л	8,8%	2,8%	5,1%	5,0%
mAb 11 0-120 г/л	6,0%	5,5%	4,1%	3,5%
mAb 11 > 120 г/л	12,0%	1,5%	8,8%	3,6%
1 Удаление образца загрузки уменьшает величину ошибки; Универсальная (0-120 г/л): от 8,6% до 5,7% и mAb11 (0-120 г/л): от 3,5% до 2,7%				

Пример 3. Увеличение масштаба модели концентрирования белка для обработки на экспериментальном технологическом оборудовании.

Материалы и способы.

При разработке коммерчески доступных процессов, УФ/ДФ характеризуется как типовая технологическая операция в соответствии с принципами Качества, заложенного проектом для понимания критически важных параметров процесса, а также критически важных показателей качества. Для того, чтобы улучшить понимание процесса и предложить оптимизированный подход к разработке модели, при разработке mAb11 применяли рамановский подход. См. пример 1 для получения информации о методе сбора рамановских данных, за исключением продолжительности сканирования, которая была отрегулирована с 10 до 5 с. В разработанной модели mAb11 применялась предварительная обработка SNV для всех четырех спектральных областей, кроме трех: $977-1027\text{ см}^{-1}$, $1408-1485\text{ см}^{-1}$ и $1621-1711\text{ см}^{-1}$, для которых дополнительно применялась 1-я производная со сглаживанием данных 21 см^{-1} .

Результаты.

Лабораторная модель была создана с помощью четырех экспериментов DoE и четырех спектральных областей. На фиг. 8А продемонстрирована ошибка рамановской модели для прогнозирования в реальном времени из четырех экспериментов DoE. На фиг. 8В продемонстрирована ошибка рамановской модели для 15 дополнительных экспериментов с применением модели лабораторного масштаба. mAb-специфические модели концентрирования белка были созданы для 0-120 г/л и $> 120\text{ г/л}$ с ошибкой $\leq 5\%$.

При применении лабораторной модели (n=15), экспериментальные циклы (n=3) характеризовались ошибкой прогнозирования для mAb11, составляющей 0,6-10,6% (фиг. 9А). Ошибка прогнозирования экспериментального масштаба снижалась до 0,6-2,2%, когда данные экспериментального масштаба включали в лабораторную модель (n=18). Повышенная величина ошибки лабораторной модели, вероятно, является результатом воздействия температуры на сдвиги рамановского спектра из-за рассеивания тепла, связанного с оборудованием для масштабирования. Температура будет фактором, учитываемым при будущих разработках рамановской модели и верификации модели.

В семи полупромышленных экспериментах с тремя различными моноклональными антителами (mAb J, mAb K и mAb L) конечная ошибка прогнозирования модели составляла 0,6-2,2%; что вполне находилось в пределах целевых 5% (фиг. 9B).

Пример 4. Применение рамановских моделей для определения концентрации в реальном времени, позволяющее принимать решения.

Материалы и способы.

Поскольку для рамановской автоматизации с целью сбора и моделирования рамановских спектров применяли аналогичный протокол, для получения дополнительной информации см. пример 3. Была разработана автоматизированная стратегия управления с использованием данных рамановских спектров для достижения конечных целевых концентраций белка. С помощью сгенерированных прогностических моделей, данные фильтровались и использовались для ввода в приборы УФ/ДФ до прекращения типовой операции при достижении целевой концентрации белка. Измерения SoloVPE осуществляли в трех повторениях.

Результаты.

На фиг. 10A и 10B приведен пример настройки экрана для автоматического мониторинга концентрации белка при УФ/ДФ и прямоточной TFF. На фиг. 11 продемонстрировано, что прогностическое моделирование может применяться для мониторинга концентрации mAb14 в реальном времени на различных этапах обработки и запуска типового процесса концентрирования до остановки при достижении желаемой целевой концентрации. Конечный концентрированный пул прогнозировали с помощью рамановской модели на уровне 260 г/л по сравнению с автономным измерением с помощью SoloVPE, составляющим 262 г/л, что привело к ошибке 0,8%, соответствующей целевой величине ошибки $\leq 5\%$. Рамановский подход представляет собой пригодный инструмент, который можно применять для принятия решений об автоматизированной обработке, верифицирующих получение желаемой целевой концентрации белка.

Пример 5. Подтверждение концепции для моделирования уровня высокомолекулярных (HMW) агентов при УФ/ДФ.

Материалы и способы.

Сбор данных для моделирования уровня HMW-агентов включал спектральные данные из анализаторов Raman Rxn2 (Kaiser Optical Systems, Inc., Анн-Арбор, штат Мичиган), Raman Rxn Probehead-758 (Kaiser Optical Systems, Inc., Анн-Арбор, штат Мичиган). Кроме того, в процессе разработки применяли несколько различных оптических элементов в зависимости от их доступности. Рабочие параметры рамановских анализаторов были установлены на время сканирования 72 с для 1 накопления, повторяемого 25 раз. Поточные измерения выполняли на различных этапах типового процесса УФ/ДФ, включая первичное концентрирование, диафильтрацию и конечное концентрирование. Спектральный диапазон составлял 110-3415 см^{-1} . Исходные спектральные данные были предварительно обработаны с применением SNV и дополнительно отфильтрованы с применением 1-й производной со сглаживанием данных 21 см^{-1} . Автономные измерения уровня HMW-агентов осуществляли с помощью эксклюзивной сверхэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты.

Уровень HMW-агентов представляет собой еще один показатель, который считается предварительным критически важным показателем качества при очистке белка. Современные технологии не могут отслеживать уровни HMW-агентов в режиме реального времени во время обработки. На фиг. 12A продемонстрировано, что описанный способ рамановского моделирования можно применять для мониторинга HMW-агентов во время очистки белка. Прогнозирование уровня HMW-агентов с помощью рамановского моделирования сравнивали с измерениями, полученными с помощью SE-СВЭЖХ в процессе очистки (первичное концентрирование, диафильтрация и конечное концентрирование). С помощью рамановского моделирования эффективно прогнозировали процент высокомолекулярных соединений в реальном времени во время обработки белка. Указанная модель имела среднюю ошибку 3,4%.

Пример 6. Подтверждение концепции для моделирования высокомолекулярных (HMW) агентов при заключительной хроматографической очистке.

Материалы и способы.

Сбор данных для модели HMW-агентов включал спектральные данные из анализаторов Raman Rxn2 (Kaiser Optical Systems, Inc., Анн-Арбор, штат Мичиган) с использованием MR-Probe-785. Рабочие параметры рамановского анализатора были установлены на время сканирования 10, 30 или 60 с для 1 накопления с 5 повторяющимися измерениями. Автономные измерения проводили с использованием пулов анионообменной хроматографии (АЕХ) с общим уровнем HMW-агентов 6,2-76,2%. Спектральные диапазоны, применяемые для моделирования и методов предварительной обработки, описаны в табл. 4. Автономные измерения уровня HMW-агентов осуществляли с помощью эксклюзивной сверхэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты.

Описанный способ рамановского моделирования можно применять для мониторинга уровня HMW-агентов в ходе заключительной хроматографической очистки белков. Прогнозирование уровня HMW-

агентов с помощью рамановского моделирования сравнивали с измерениями, полученными с помощью SE-СВЭЖХ из сгенерированных пулов АЕХ. Как продемонстрировано в табл. 4, величина RMSEP оцениваемых способов колеблется от 3,2 до 7,6%. На фиг. 12В, набор сжатых данных (6,2-19,7% НМВ) использовался для оценки модели, сгенерированной со спектральной областью 350-3100 см⁻¹ и методами предварительной обработки SNV. За счет уменьшения диапазона НМВ, величина RMSEP снизилась до 1,2, 1,4 и 2,1% при 10, 30 и 60 с соответственно. На основании этих результатов содержание НМВ-агентов можно определить с помощью рамановской модели в пулах АЕХ.

Таблица 4
Ошибка прогностической модели НМВ (RMSEP) для уровня НМВ-агентов от 6,2 до 76,2%

	10 сек.	30 сек.	60 сек.
1550-1725 см ⁻¹	7,62%	5,31%	3,21%
1 ^я производ.			
350-3100 см ⁻¹	3,48%	3,37%	4,63%
SNV			
990-1020, 1550-1725 см ⁻¹	7,12%	7,48%	4,98%
1 ^я производ.			

Пример 7. Подтверждение концепции концепции для моделирования титров.
Материалы и способы.

Модель обучающей выборки представляла собой 35 белок А, протекающий через образцы с добавлением FCP (265 г/л) для достижения титров в диапазоне от 0,36 до 9,8 г/л. Модель оценивали на разбавленных образцах фильтрата с титрами от 1,3 до 8,8 г/л. Сбор данных для модели титра включал спектральные данные из Raman Rxn2 (Kaiser Optical Systems, Inc., Анн-Арбор, Мичиган) с использованием MR-Probe-785. Иммерсионный зонд применяли в автономном режиме для генерации спектральных данных с рабочими параметрами, установленными на время сканирования 20 с для 1 накопления, повторенного 5 раз. Спектральные диапазоны были следующими: 977-1027, 1408-1485, 1621-1711 и 2823-3046 см⁻¹. Исходные спектральные данные были предварительно обработаны с применением SNV и дополнительно отфильтрованы с применением 1-й производной со сглаживанием данных 21 см⁻¹. Характеристики модели приведены в табл. 5.

Таблица 5

Характеристики модели титров антител

Спектральные области (см ⁻¹)	3046-2823, 1711-1621, 1485-1408, 1027-977
Методы предварительной обработки	1 ^я производная и SNV
Накопления и длина	5 x 20 секунд
Средняя ошибка модели	25,7%

Результаты.

Титр антител представляет собой параметр процесса очистки белка, который необходим для информирования о последующих типовых операциях очистки, включая загрузку аффинной колонки, постоянство получаемой продукции, а также ограничения объема промежуточного продукта в процессе. Неправильная загрузка колонки может повлиять на последующие предварительные критически важные показатели качества, что и обуславливает потребность в такой методике мониторинга, как рамановская спектроскопия. На фиг. 13 продемонстрирован фактический титр антител в сравнении с титром моноклональных антител, спрогнозированным с помощью рамановского подхода. В этом эксперименте ошибка модели составила 26%, что является выше желаемой цели ≤ 5%. Увеличение продолжительности сканирования, а также разработка модели с применением разбавленного и неразбавленного глубинного фильтрата уменьшат величину ошибки модели.

Пример 8. Рамановские модели для измерений буферного вспомогательного вещества, результаты которых не превышают величину текущей ошибки ортогонального количественного анализа, составляющую около 10%.

Материалы и способы.

Данные собирали из предыдущих циклов разработки модели концентрирования для различных антител. См. пример 1 для получения информации о методе сбора рамановских данных. В табл. 6 приведе-

ны компоненты модели для обнаружения гистидина и аргинина в образцах. Спектральные области были основаны на известных пиках гистидина/аргинина (Zhu, et al., Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 78(3): 1187-1195 (2011)). После первоначальной разработки модели гистидина и аргинина дальнейшая характеристика модели была проведена с применением mAb14. С помощью бесконтактного оптического датчика, рабочие параметры рамановского анализатора устанавливали на время сканирования 20 с для 5 накоплений. Спектральный диапазон для гистидина составлял 1200-1480 см^{-1} , а для аргинина 860-1470 см^{-1} . Для обоих буферных вспомогательных веществ исходные спектральные данные были предварительно обработаны с применением SNV и дополнительно отфильтрованы с применением 1^й производной со сглаживанием данных 21 см^{-1} . Автономные измерения частиц гистидина и аргинина осуществляли с помощью метода количественной оценки аминокислот с применением сверхэффективной жидкостной хроматографии (СВЭЖХ).

Результаты.

Чтобы определить, можно ли применять описанный способ и систему рамановского моделирования для измерения буферных вспомогательных веществ в обработанном образце антитела, данные, собранные из предыдущих циклов разработки модели концентрирования, были проанализированы на гистидин и аргинин. Прогнозируемые значения, полученные с помощью рамановского моделирования, сравнивали со значениями, рассчитанными на основе аминокислотного метода по результатам СВЭЖХ, как можно увидеть на фиг. 14А. Прогнозируемые значения и средняя ошибка модели для предварительного рамановского моделирования уровней гистидина/ аргинина представлены в табл. 6. На фиг. 14В представлен точечный график для прогностической модели уровня гистидина по сравнению с фактической моделью уровня гистидина для mAb14 со средней ошибкой модели 8,2%, что не превышает целевой показатель $\leq 10\%$ для буферных вспомогательных веществ. Целевой показатель $\leq 10\%$ основан на текущей вариабельности ортогонального количественного анализа с помощью СВЭЖХ. На фиг. 14С точечный график для прогностической модели аргинина в сравнении с фактической моделью аргинина продемонстрирован для mAb14 со средней ошибкой модели 2,9%, что не превышает целевой показатель $\leq 10\%$.

Эти данные демонстрируют, что рамановское моделирование можно применять для прогнозирования уровней буферных вспомогательных веществ в процессе УФ/ДФ и FCP. Успешная количественная оценка этих вспомогательных веществ гарантирует, что УФ/ДФ будет обеспечивать конечный концентрированный пул, который сделает возможным приготовление последующего состава.

Таблица 6

Компоненты модели и данные, собранные для гистидина/аргинина при обработке универсальной модели концентрации (пример 1)

	Гистидин	Аргинин
Спектральная область (см^{-1})	1200-1480	970-1100, 1300-1500
Техника предварительной обработки	1 ^я производная и SNV	1 ^я производная и SNV
R^2Y	0,940	0,964
Q^2	0,938	0,963
RMSEP	1,20 мМ	6,19 мМ
Средняя ошибка модели	10,4%	7,39%

диапазон гистидина: 0-25 мМ; диапазон аргинина: 0-81 мМ;

SNV - стандартное отклонение случайной величины с нормальным распределением - среднее центрированное и нормализованное;

R^2 - процент вариации в обучающей выборке, объясненный моделью, $R^2 > 0,9$;

Q^2 - процент вариации в обучающей выборке, прогнозируемый с помощью модели в ходе перекрестной валидации;

$Q^2 > 0,8$;

RMSEP: прогнозирование среднеквадратичной ошибки.

Пример 9. Рамановские модели для измерения соотношения препарат - антитело.

Материалы и способы.

DAR представляет собой показатель качества, который отслеживается во время разработки конъюгатов антитело-препарат (ADC), конъюгатов антитело-радионуклид (ARC) и общих белковых конъюгатов (сильнодействующие стероиды, нецитотоксические нагрузки и т.д.) для обеспечения постоянного качества продукта и облегчения последующей маркировки продукта относительно нагрузки. Рамановский подход был оценен как технология для мониторинга уровней DAR, которую затем можно было применять в качестве стратегии контроля реакции. Два различных mAb, которые находились на этапе разработки (mAb1 и mAb3), оценивали на возможность их применения для определения DAR с помощью рамановского подхода. С помощью бесконтактного оптического датчика, рабочие параметры рамановского анализатора устанавливали на время сканирования 10 с для 10 накоплений. Спектральный диапазон 350-3100 см^{-1} применяли с исходными спектральными данными, предварительно обработанными с использованием SNV и дополнительно отфильтрованными с использованием 2-й производной со сгла-

живанием данных 21 см^{-1} . В табл. 7 приведены компоненты модели для определения DAR в образцах. Автономные измерения DAR проводили с помощью метода на основе УФ-спектроскопии.

Таблица 7

Компоненты модели для измерения соотношения препарат - антитело		
Название модели	REGN2810 UV-DAR	REGN910 UV-DAR
Диапазон Y	0,81-4,39	0,79 -3,57
Лучшая модель	2 ^я производная R2Y=0,788 Q2=0,548 RMSECV=0,64	2 ^я производная R2Y=0,994 Q2=0,776 RMSECV=0,58

Результаты.

На фиг. 15A-15B продемонстрировано, что рамановское моделирование можно применять для измерения соотношения препарат - антитело для конъюгатов iPET-препарат для mAb1 и mAb3. Для обеих моделей среднеквадратичная ошибка перекрестной валидации составила 0,6 DAR. Текущий количественный анализ на основе ортогонального УФ-излучения имеет вариабельность, ассоциированную с 0,3 DAR (одно стандартное отклонение). Первичное рамановское прогнозирование находится в пределах двух стандартных отклонений и предполагает, что при дальнейшем уточнении модели DAR может быть успешно спрогнозировано с помощью рамановского подхода.

Хотя в вышеприведенном описании это изобретение было описано применительно к некоторым его вариантам осуществления, и многие детали были выдвинуты с целью иллюстрации, специалистам в данной области техники будет очевидно, что изобретение допускает дополнительные варианты осуществления и что некоторые из подробностей, описанных в данном документе, могут значительно варьироваться без отклонения от основных принципов изобретения.

Все ссылки, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки во всей их полноте. Данное изобретение может быть осуществлено в других конкретных формах без отклонения от сущности или его существенных атрибутов, и, соответственно, следует сделать ссылку на прилагаемую формулу изобретения, а не на предшествующее описание, как указание объема изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения концентрированного промежуточного продукта очистки белка, включающий: обеспечение универсальной модели, полученной с использованием множества промежуточных продуктов очистки белка;

определение концентраций промежуточного продукта очистки белка в реальном времени с помощью рамановской спектроскопии *in situ* с использованием указанной универсальной модели при концентрировании промежуточного продукта очистки белка;

регулировку параметров этапа концентрирования в реальном времени для получения концентрированного промежуточного продукта очистки белка и/или конечного концентрированного пула, где концентрация промежуточного продукта очистки белка составляет по меньшей мере 150 мг/мл, и

где указанная универсальная модель включает математическую корреляцию спектральных свойств различных рекомбинантных белков, применяемую для прогнозирования критически важного показателя качества.

2. Способ по п.1, где промежуточный продукт очистки белка концентрируют с помощью ультрафильтрации, замены буфера или того и другого.

3. Способ по п.1 или 2, где промежуточный продукт очистки белка собирают из биореактора, периодической культуры с подпиткой или непрерывной культуры.

4. Способ по любому из пп.1-3, где промежуточный продукт очистки белка представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, гибридный белок или рекомбинантный белок.

5. Способ получения промежуточного продукта очистки белка, включающий: независимое проведение анализа рамановской спектроскопии на множестве промежуточных продуктов очистки белка для получения универсальной модели, способной количественно определять любой из множества промежуточных продуктов очистки белка;

определение концентраций промежуточного продукта очистки белка с помощью рамановской спектроскопии *in situ* с универсальной моделью во время концентрирования промежуточного продукта очистки белка;

получение концентрированного промежуточного продукта очистки белка, когда указанный концентрированный промежуточный продукт очистки белка достигает предварительно определенной концентрации или цели конечного концентрированного пула,

где концентрация промежуточного продукта очистки белка составляет по меньшей мере 150 мг/мл, и где указанная универсальная модель включает математическую корреляцию спектральных свойств различных рекомбинантных белков, применяемую для прогнозирования критически важного показателя качества.

6. Способ по п.5, где указанную модель создают с помощью анализа регрессии методом дробных наименьших квадратов для исходных спектральных данных и данных о концентрации белка в автономном режиме.

7. Способ по п.6, дополнительно включающий выполнение метода нормализации или сглаживания данных рамановской спектроскопии.

8. Способ по п.7, где указанный метод нормализации включает стандартное отклонение случайной величины с нормальным распределением.

9. Способ по п.7, где сглаживание данных включает 1-ю производную со сглаживанием 21 см^{-1} .

10. Способ по любому из пп.5-9, где указанная модель обеспечивает прогнозируемые значения концентрации белка для множества промежуточных продуктов очистки белка с ошибкой $\leq 5\%$ по сравнению с автономными значениями концентрации белка.

11. Способ по любому из пп.5-9, где указанная модель обеспечивает прогнозируемые значения концентрации белка для множества промежуточных продуктов очистки белка с ошибкой $\leq 3\%$ по сравнению с автономными значениями концентрации белка.

12. Способ по п.5, где указанный концентрированный промежуточный продукт для очистки белка имеет концентрацию от 150 до 300 мг/мл.

13. Способ по п.5, где указанный концентрированный промежуточный продукт для очистки белка концентрируют с помощью ультрафильтрации, диафильтрации или того и другого.

14. Способ по п.5, где указанный концентрированный промежуточный продукт для очистки белка собирают из биореактора, периодической культуры с подпиткой или непрерывной культуры.

15. Способ по любому из пп.1-14, где определение концентрации промежуточного продукта очистки белка происходит непрерывно или с перерывами в реальном времени.

16. Способ по любому из пп.1-15, где количественное определение концентрации белка проводят с интервалами от 30 с до 10 мин, ежечасно или ежедневно.

17. Способ по любому из пп.5-16, где указанный промежуточный продукт очистки белка представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок или рекомбинантный белок.

18. Способ мониторинга и контроля критически важных показателей качества в промежуточном продукте очистки белка во время последующей обработки очистки белка, включающий:

обеспечение универсальной модели, полученной с использованием множества промежуточных продуктов очистки белка;

количественное определение одного или большего количества критически важных показателей качества в промежуточном продукте очистки белка с помощью рамановской спектроскопии *in situ*;

регулировку указанных одного или большего количества критически важных показателей качества в промежуточном продукте очистки белка для соответствия заранее определенным уровням критически важных показателей качества;

где концентрация промежуточного продукта очистки белка составляет по меньшей мере 150 мг/мл, и

где указанная универсальная модель включает математическую корреляцию спектральных свойств различных рекомбинантных белков, применяемую для прогнозирования критически важного показателя качества.

19. Способ по п.18, где указанные критически важные показатели качества выбирают из группы, состоящей из титра антител, концентрации белка, высокомолекулярных агентов, соотношения препарат - антитело и буферных вспомогательных веществ.

20. Способ по п.18 или 19, где последующий процесс очистки белка представляет собой ультрафильтрацию/диафильтрацию.

21. Способ мониторинга и контроля уровней вспомогательных веществ в собранной культуральной жидкости и/или промежуточном продукте очистки белка во время последующей очистки, включающий:

обеспечение универсальной модели, полученной с использованием множества промежуточных продуктов очистки белка;

определение концентраций вспомогательных веществ в режиме реального времени с помощью рамановской спектроскопии *in situ* при очистке жидкости для культивирования клеток или промежуточного продукта очистки белка;

регулировку параметров этапа очистки в реальном времени для получения или поддержания предварительно определенных количеств вспомогательных веществ в собранной культуральной жидкости и/или промежуточном продукте очистки белка, и

где указанная универсальная модель включает математическую корреляцию спектральных свойств различных рекомбинантных белков, применяемую для прогнозирования критически важного показателя качества.

22. Способ по п.21, где указанное вспомогательное вещество включает буферное вспомогательное вещество.

23. Способ по п.21 или 22, где указанное вспомогательное вещество выбирают из группы, состоящей из ацетата, цитрата, гистидина, сукцината, фосфата, гидроксиметиламинометана (Трис), пролина, аргинина, сахарозы или их комбинаций.

24. Способ по п.21, где указанное вспомогательное вещество включает поверхностно-активное вспомогательное вещество.

25. Способ по п.21 или 24, где указанное поверхностно-активное вспомогательное вещество выбирают из группы, состоящей из полисорбата 80, полисорбата 20 и полоксамера 188.

26. Способ по п.5, где указанное вспомогательное вещество включает полиэтиленгликоль и/или сахарозу.

27. Способ по п.1, дополнительно включающий:

определение концентраций вспомогательного вещества в реальном времени с помощью рамановской спектроскопии *in situ* при очистке собранной культуральной жидкости и/или промежуточного продукта очистки белка; и

регулировку параметров этапа очистки в реальном времени для получения и поддержания заранее определенных количеств вспомогательных веществ в собранной культуральной жидкости и/или промежуточном продукте очистки белка.

28. Способ по п.1, дополнительно включающий:

количественную оценку одного или более критически важных показателей качества в промежуточном продукте очистки белка с помощью рамановской спектроскопии *in situ*; и

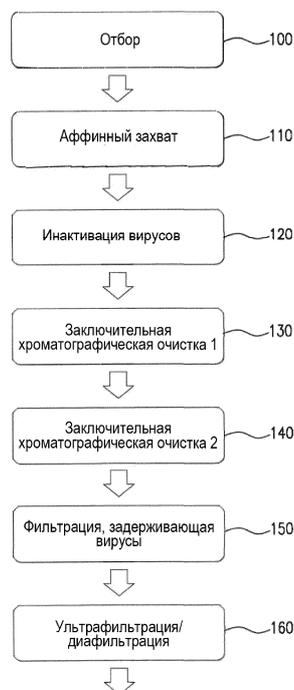
регулировку указанных одного или более критически важных показателей качества в промежуточном продукте очистки белка для соответствия заранее определенным уровням критически важных показателей качества,

где указанные критически важные показатели качества выбирают из группы, состоящей из титра антител, концентрации белка, высокомолекулярных агентов, соотношения препарат - антитело и буферных вспомогательных веществ.

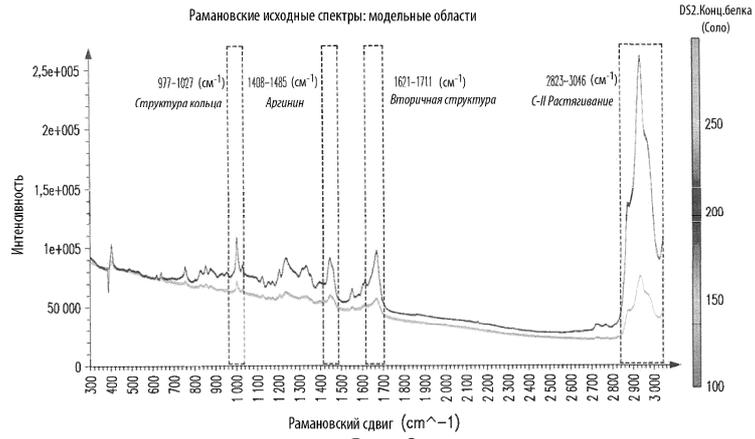
29. Способ по п.1, где спектральные данные собирают в одном или большем количестве диапазонов волновых чисел, выбранных из группы, состоящей из $977-1027\text{ см}^{-1}$, $1408-1485\text{ см}^{-1}$, $1621-1711\text{ см}^{-1}$, $2823-3046\text{ см}^{-1}$, и их комбинаций.

30. Способ по п.1, где промежуточный продукт очистки белка представляет собой слитый белок.

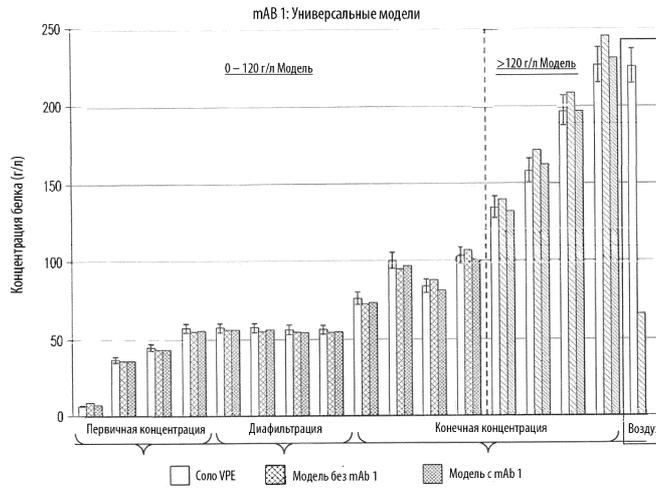
31. Способ по п.1, где промежуточный продукт очистки белка содержит внеклеточный домен рецептора клеточной поверхности или его фрагмент.



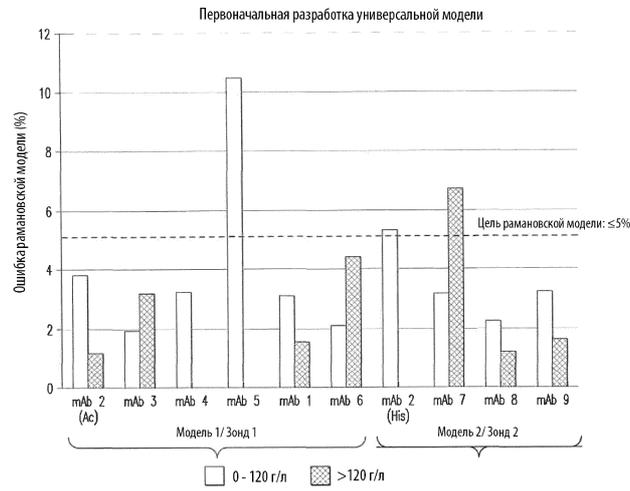
Фиг. 1



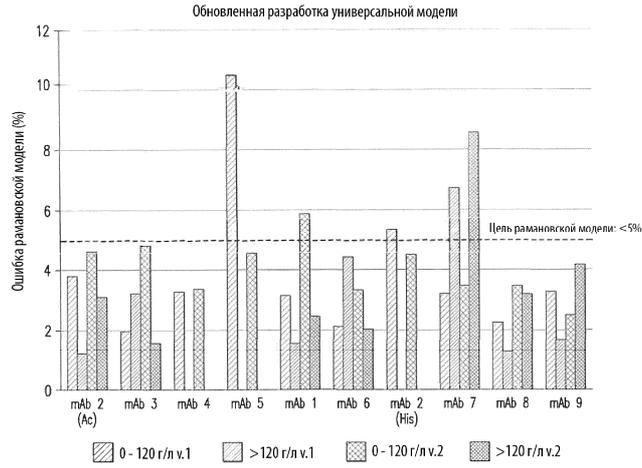
Фиг. 2



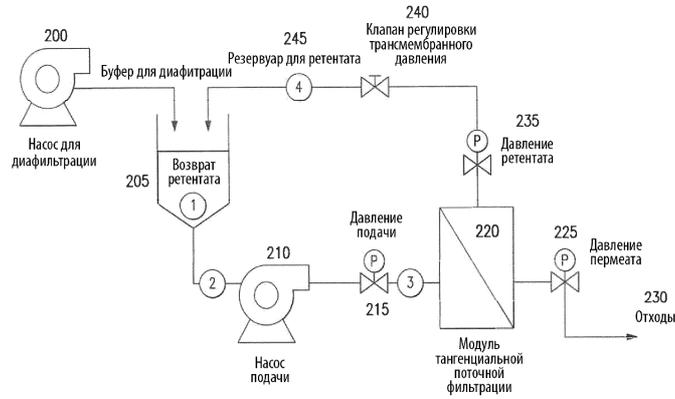
Фиг. 3



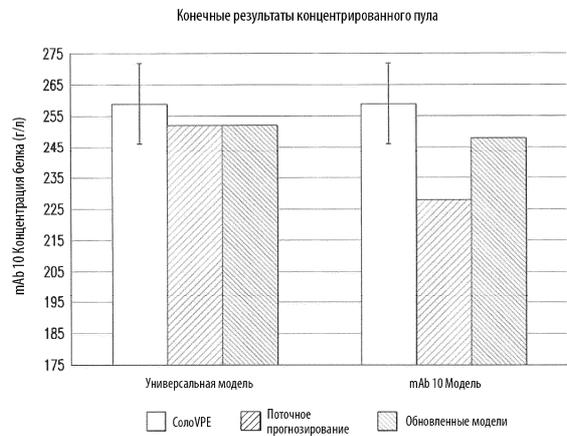
Фиг. 4



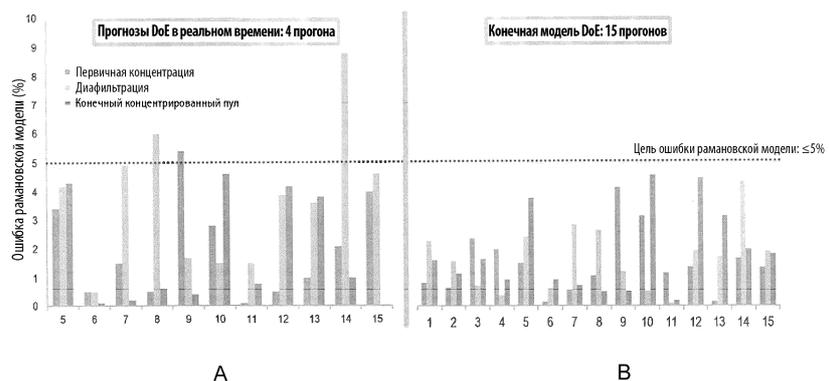
Фиг. 5



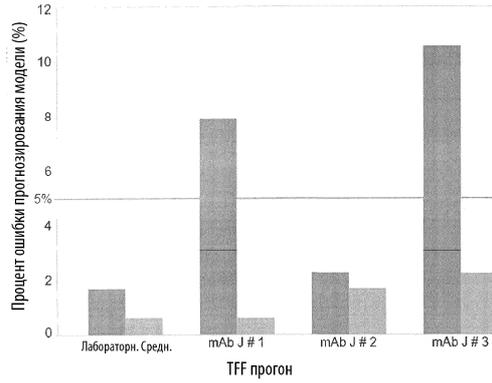
Фиг. 6



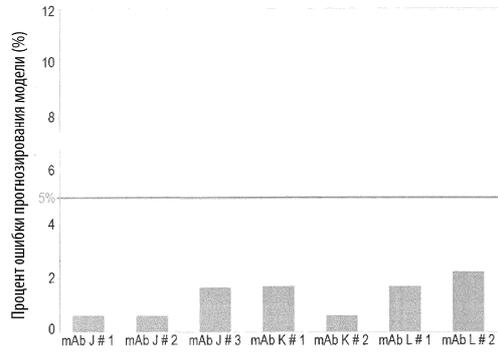
Фиг. 7



Фиг. 8А, В

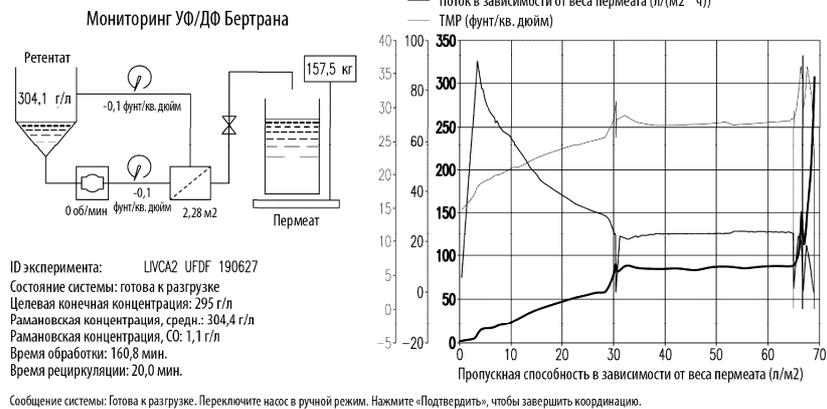


Фиг. 9А

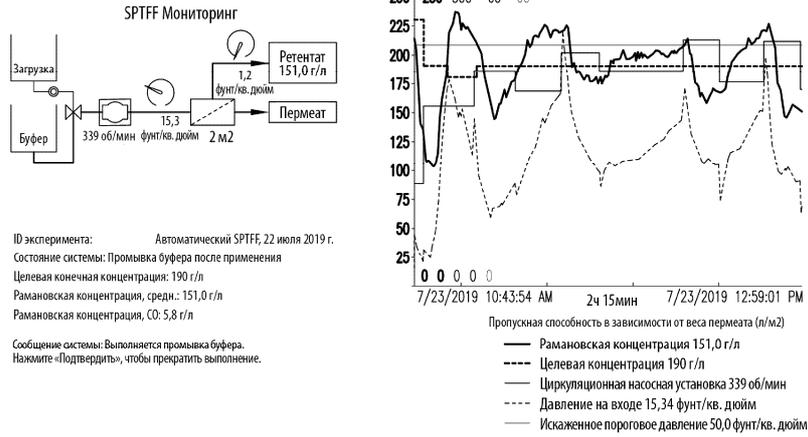


Воспроизводимость окончательной пилотной модели

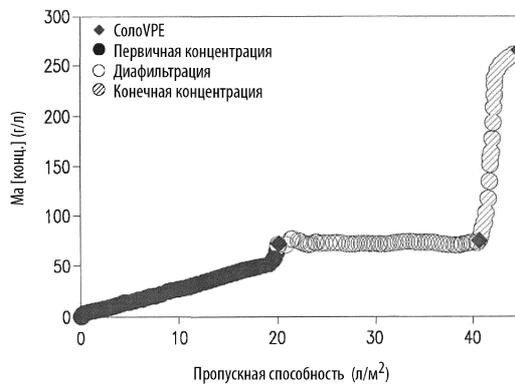
Фиг. 9В



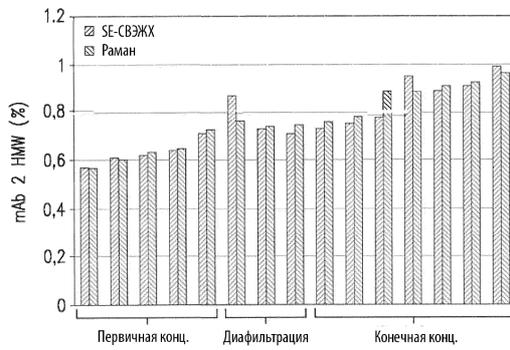
Фиг. 10А



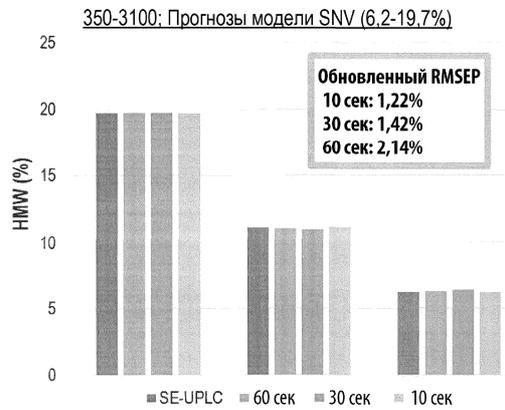
Фиг. 10В



Фиг. 11

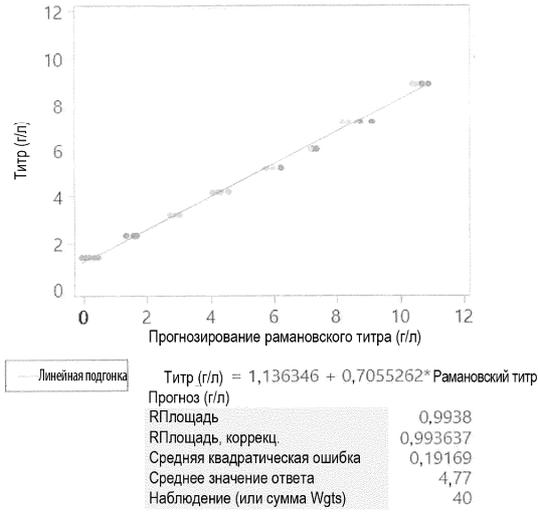


Фиг. 12А

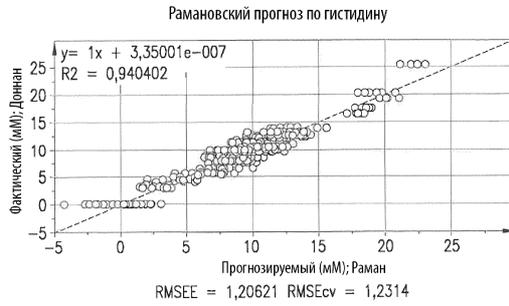


Фиг. 12В

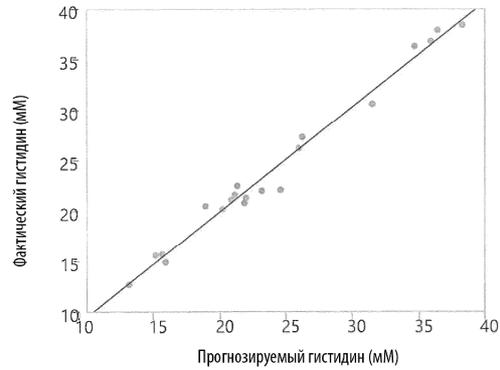
046325



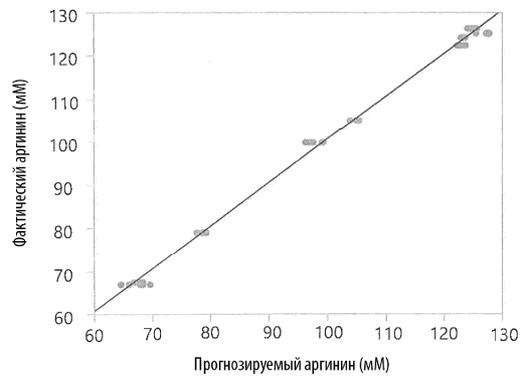
Фиг. 13



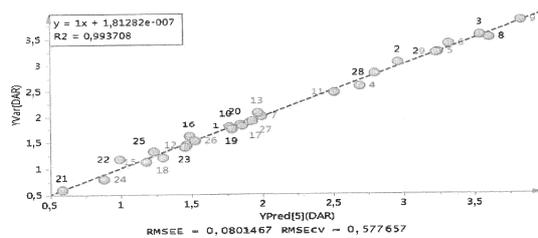
Фиг. 14А



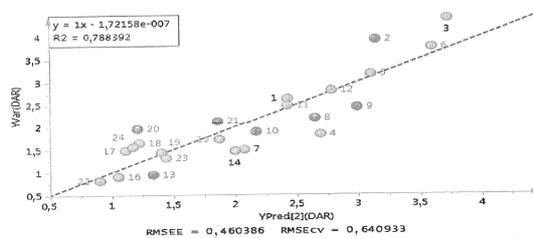
Фиг. 14В



Фиг. 14С



Фиг. 15А



Фиг. 15В

