



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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.05.29**

**(51)** Int. Cl. **C07K 1/12** (2006.01)  
**C07K 1/16** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201990593**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.10.16**

**(54) НЕПРЕРЫВНЫЙ СПОСОБ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ГЕТЕРОГЕННОСТИ  
ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО БЕЛКА**

**(31)** **201621035458**

**(32)** **2016.10.17**

**(33)** **IN**

**(43)** **2019.10.31**

**(86)** **PCT/IB2017/056395**

**(87)** **WO 2018/073717 2018.04.26**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЭНЗЕН БИОСАЙЕНСЕС ЛИМИТЕД**  
**(IN)**

**(72)** Изобретатель:  
**Гаджил Химаншу, Банерджи Абир,**  
**Дьяга Гопал, Панхания Ашвин,**  
**Лондхе Харшита, Рао Дипика (IN)**

**(74)** Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

**(56)** KIM DO GYUN ET AL.: "Effects of carboxypeptidase B treatment and elevated temperature on recombinant monoclonal antibody charge variants in cation-exchange chromatography analysis", ARCHIVES OF PHARMACAL RESEARCH, NATL. FISHERIES UNIVERSITY, PUSAN, KR, vol. 39, № 10, 13 August 2016 (2016-08-13), pages 1472-1481, XP036075893,

ISSN: 0253-6269, DOI: 10.1007/S12272-016-0818-5 [retrieved on 2016-08-13], the whole document

N.E. KUDRYAVTSEVA ET AL.: "Immobilization of trypsin and carboxypeptidase B on modified silicas and their use in converting human recombinant proinsulin into insulin", PHARMACEUTICAL CHEMISTRY JOURNAL, vol. 29, № 1, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 70-73, XP55443658, US, ISSN: 0091-150X, DOI: 10.1007/BF02219471, cited in the application, the whole document

YASUHARA T. ET AL.: "Apo-carboxypeptidase B-Sepharose: A specific adsorbent for peptides", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 166, № 1, 15 January 1990 (1990-01-15), pages 330-335, XP024837102, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/0006-291X(90)91949-S [retrieved on 1990-01-15], abstract

SÜDI P. ET AL.: "Preparation, characterization, and application of a novel immobilized carboxypeptidase B", APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY; PART A: ENZYME ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY, HUMANA PRESS INC, NEW YORK, vol. 22, № 1, 1 October 1989 (1989-10-01), pages 31-43, XP035177141, ISSN: 1559-0291, DOI: 10.1007/BF02922695, abstract

**(57)** Изобретение относится к способу биологического производства, который обеспечивает непрерывное получение терапевтического белка с пониженной гетерогенностью. В способе биологического производства, описанном в настоящем документе, применяют мультиколonoчную систему хроматографии, в которой осуществляют отдельные операции снижения гетерогенности в терапевтическом белке, захвата указанного терапевтического белка и инактивации вирусов, очистки терапевтического белка и финальной обработки очищенного терапевтического белка. Способ, описанный в настоящем документе, может уменьшить гетерогенность терапевтического белка за счет снижения доли основных изоформ указанного терапевтического белка.

### Область техники

Настоящее изобретение относится к области биологического производства терапевтических белков. В частности, настоящее изобретение относится к непрерывному способу получения терапевтических белков с пониженной гетерогенностью.

### Уровень техники

Описание уровня техники включает информацию, которая может быть полезна для понимания настоящего изобретения. Оно не является признанием того, что какая-либо приведенная в настоящем изобретении информация принадлежит к уровню техники или имеет отношение к заявляемому изобретению или что какая-либо публикация, цитируемая напрямую или в неявном виде, является предшествующим уровнем техники.

Понимание значимости терапевтических белков привело к новой революции в биофармацевтической промышленности. Тем не менее при производстве терапевтических белков часто присутствуют их заряженные изоформы, которые в значительной степени затрудняют процессы выделения и очистки, необходимые для достижения высокого выхода и качества продукта.

Фермент карбоксипептидаза представляет собой фермент, обычно применяемый для получения гомогенной формы терапевтического белка, такого как моноклональное антитело, поскольку он катализирует гидролиз С-концевой пептидной связи. Карбоксипептидаза В представляет собой карбоксипептидазу, которая действует преимущественно на основные аминокислоты, такие как аргинин и лизин.

В предшествующем уровне техники были раскрыты различные способы снижения гетерогенности в терапевтических белках. Например, патент США № 5126250 раскрывает способ снижения гетерогенности секретлируемых антител, полученных из продуцирующих антитела клеток, путем превращения большинства гетерогенных антител в одну по существу гомогенную форму перед очисткой.

В публикации WO 20120147053 раскрыт способ снижения гетерогенности в антителах, полученных путем культивирования клеток.

В патенте США № 9062337 раскрыто применение фермента пептидилглицин альфа-амидирующей монооксигеназы для укорачивания С-концевого остатка пептида.

Различные документы предшествующего уровня техники также раскрывают иммобилизацию фермента для очистки и получения терапевтических белков. В публикации Chemuru et al., *Biopolymers*, 2014 Mar, 102(2):206-221 раскрыто удаление остатка лизина Аβ-пептида с применением карбоксипептидазы В, иммобилизованной на агарозных микроносителях.

В публикации Kudryavtseva et al., *Pharm. Chem. J.* (1995), 29:70 раскрыта иммобилизация трипсина и карбоксипептидазы В на модифицированном диоксиде кремния для превращения проинсулина в инсулин. В публикации Yasuhara and Ohashi, *Appl. Biochem. Biotechnol.* (1994), 44:151 раскрыта иммобилизация покарбоксипептидазы В на сефарозе для удаления С-концевых остатков пептида.

В патенте США № 9657056 раскрыты интегрированные и непрерывные способы получения терапевтической белковой лекарственной субстанции, причем указанную жидкую среду для культивирования из перфузионного биореактора переносят в первую мультиколоночную хроматографическую систему (МКХС1) для захвата в первых трех из четырех колонок, и элюат из указанных колонок загружают и инкубируют в четвертой колонке для инактивации вирусов. Указанный элюат из МКХС1, содержащий рекомбинантный терапевтический белок, непрерывно подается во вторую мультиколоночную хроматографическую систему (МКХС2); и очистку и конечную обработку указанного рекомбинантного терапевтического белка осуществляют с применением МКХС2.

Гетерогенность по С-концевому остатку обычно устраняют в культуре с подпиткой путем добавления карбоксипептидазы непосредственно в биореактор в среду для культивирования или сразу же после стадии хроматографии. Однако для добавления фермента необходимо осуществить ряд стадий по оптимизации в части времени инкубации, температуры, pH и т.д. Кроме того, высокая стоимость фермента приводит к увеличению стоимости всего способа.

В последнее время большой интерес вызывает непрерывная биообработка (биопроецессинг), что связано с различными преимуществами, такими как устойчивый режим работы, небольшой размер оборудования, высокая объемная производительность, оптимизированная последовательность операций, малое время цикла и пониженные капитальные затраты.

Хотя в предшествующем уровне техники было раскрыто множество подходов для снижения гетерогенности терапевтических белков, ни один из них не описывает непрерывный способ получения терапевтических белков с пониженной гетерогенностью. Предшествующий уровень техники также не обеспечивает способ, который позволяет снизить гетерогенность в белке перед очисткой.

Настоящее изобретение удовлетворяет существующие потребности, а также другие потребности и в целом исключает недостатки, обнаруживаемые в предшествующем уровне техники.

Все публикации, цитируемые в настоящем изобретении, включены в него посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая единая публикация или заявка на патент были напрямую или косвенно указаны как включенные посредством ссылки. В случае если определение или применение термина во включенном источнике противоречит или не соответствует определению этого термина, приведенного в настоящем изобретении, применяется определение данного термина, приведенное в настоящем изобре-

тении, а определение этого термина в цитируемом источнике не применяется.

#### **Задачи изобретения**

Задачей настоящего изобретения является обеспечение способа биологического производства, который обеспечивает непрерывное получение терапевтического белка с пониженной гетерогенностью.

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение непрерывного способа, который обеспечивает снижение гетерогенности в терапевтическом белке перед стадией очистки.

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение непрерывного способа для снижения гетерогенности терапевтического белка без ущерба для общего выхода продукции терапевтического белка.

Еще одной задачей настоящего изобретения является обеспечение очень гибкого и экономичного способа биологического производства, который можно применять для непрерывного получения терапевтического белка с пониженной гетерогенностью.

#### **Краткое описание изобретения**

Аспекты настоящего изобретения относятся к способу биологического производства, который обеспечивает непрерывное получение терапевтического белка с пониженной гетерогенностью. В указанном способе биологического производства, описанном в настоящем изобретении, применяется мультиколочная хроматографическая система, которая осуществляет отдельные операции снижения гетерогенности в терапевтическом белке, захвата указанного терапевтического белка и инактивации вирусов, очистки терапевтического белка и финальной обработки очищенного терапевтического белка.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен непрерывный способ снижения гетерогенности терапевтического белка, причем указанный способ включает снижение содержания одной или более основных изоформ указанного терапевтического белка в единой мультиколочной хроматографической системе.

В варианте реализации указанная мультиколочная хроматографическая система может содержать по меньшей мере две хроматографические колонки.

В варианте реализации указанная мультиколочная хроматографическая система может содержать колонку, содержащую карбоксипептидазу В, иммобилизованную на сефарозе.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен непрерывный способ снижения гетерогенности терапевтического белка, причем указанный способ может включать стадии

(а) обеспечения мультиколочной хроматографической системы, содержащей первую колонку, вторую колонку, третью колонку и четвертую колонку;

(b) подачи собранного материала культуры клеток, содержащего терапевтический белок, в указанную первую колонку, за счет чего уменьшается гетерогенность указанного терапевтического белка; причем первая колонка содержит карбоксипептидазу В, иммобилизованную на сефарозе,

(с) подачи потока из первой колонки во вторую колонку, в результате чего происходит захват терапевтического белка в указанном потоке из первой колонки;

(d) подачи элюата, содержащего указанный терапевтический белок, из второй колонки в третью колонку для очистки терапевтического белка; и

(е) подачи потока, содержащего указанный терапевтический белок, из третьей колонки в четвертую колонку для финальной обработки терапевтического белка.

В варианте реализации содержащий терапевтических белок элюат из второй колонки можно собрать и поместить в резервуар при низком рН для инактивации вирусов. После инактивации вирусов можно откорректировать рН и проводимость указанного элюата из второй колонки перед его подачей в третью колонку.

В варианте реализации можно откорректировать рН и проводимость содержащего терапевтический белок потока из третьей колонки до подачи указанного потока в четвертую колонку.

В варианте реализации указанные первая, вторая, третья и четвертая колонки мультиколочной хроматографической системы могут быть соединены последовательно или параллельно.

В варианте реализации первая колонка снижает гетерогенность терапевтического белка за счет снижения доли основных изоформ указанного терапевтического белка.

В варианте реализации вторая колонка может представлять собой колонку для аффинной хроматографии.

В варианте реализации каждую из третьей и четвертой колонок можно выбрать из группы, состоящей из колонки для анионообменной хроматографии, колонки для катионообменной хроматографии, хроматографические колонки с гидрофобным взаимодействием и колонки для мультимодальной хроматографии.

В варианте реализации терапевтические белки, которые можно получить/применять в способе согласно настоящему изобретению, могут включать, без ограничения перечисленными, антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, фермент, модифицированный белок, иммуногенный белок, фрагмент белка, иммуноглобулин и любую их комбинацию.

В соответствии с вариантами реализации настоящего изобретения терапевтический белок, обработанный способом/полученный в способе согласно настоящему изобретению, можно включить в состав фармацевтической композиции без какой-либо дополнительной стадии очистки и/или обезвреживания.

В соответствии с вариантами реализации настоящего изобретения мультиколоночная хроматографическая система, применяемая в настоящем способе, может работать в непрерывном и устойчивом режиме работы.

Различные задачи, признаки, аспекты и преимущества предложенного изобретения станут более очевидными из последующего подробного описания предпочтительных вариантов реализации.

#### **Краткое описание чертежей**

Прилагаемые чертежи включены, для того чтобы обеспечить дополнительное понимание настоящего изобретения, и они включены в настоящее описание и составляют его часть. Чертежи показывают примеры вариантов реализации настоящего изобретения и вместе с описанием служат для объяснения принципов настоящего изобретения.

На фиг. 1 показан пример последовательности операций для непрерывной обработки терапевтического белка в четырех колонках в соответствии с вариантами реализации настоящего изобретения.

На фиг. 2 показана хроматограмма для двух колонок, последовательно соединенных в одну систему очистки.

На фиг. 3 показан хроматографический профиль для колонки с Sepharose™ 4В, активированной СРВ-СNBR, с последующим анализом в колонке с белком А для моноклонального антитела А в непрерывном режиме при времени удерживания приблизительно 25 мин.

На фиг. 4 показаны настройки непрерывной обработки для колонки 1 и колонки 2 при работе с одинаковыми скоростями потока.

На фиг. 5 показан хроматографический профиль для колонки с Sepharose™ 4В, активированной СРВ-СNBR, с последующим анализом в колонке с белком А для МАТ А в непрерывном режиме при RT 20 мин.

На фиг. 6 представлено наложение данных WCEX-анализа для контроля и элюата СРВ-РА.

На фиг. 7 показаны настройки непрерывной обработки для колонки 1 и колонки 2 при работе с различными скоростями потока.

На фиг. 8 показан хроматографический профиль для колонки с Sepharose™ 4В, активированной СРВ-СNBR, с последующим анализом в колонке с белком А для МАТ А в непрерывном режиме при времени удерживания 2 мин.

На фиг. 9 представлено наложение данных WCEX-анализа для контроля и элюата СРВ-РА при времени удерживания 2 мин.

На фиг. 10 показано наложение данных WCEX-анализа для элюата СРВ-РА при времени удерживания 20 мин и времени удерживания 2 мин соответственно в колонке 1 для МАТ А.

На фиг. 11 показан хроматографический профиль для колонки с Sepharose™ 4В, активированной СРВ-СNBR, с последующим анализом в колонке с белком А для МАТ В в непрерывном режиме при времени удерживания 2 мин.

На фиг. 12 показано наложение данных WCEX-анализа для контрольного МАТ В и элюата СРВ-РА МАТ В при времени удерживания 2 мин.

На фиг. 13 показан хроматографический профиль для колонки с белком А при анализе на МАТ А в качестве контроля в системе АКТА рсс (3С рсс).

На фиг. 14 показан хроматографический профиль для плотности загрузки 10, 20 и 40 мг/мл соответственно в колонке с Sepharose™ 4В, активированной СРВ-СNBR (колонка 1), с последующим анализом в колонке с белком А для МАТ А в непрерывном режиме в системе АКТА рсс (3С рсс).

На фиг. 15 показан хроматографический профиль для плотности загрузки 80 мг/мл в колонке с Sepharose™ 4В, активированной СРВ-СNBR (колонка 1), с последующим анализом в колонке с белком А для МАТ А в непрерывном режиме в системе АКТА рсс (3С рсс).

На фиг. 16 представлено наложение данных WCEX-анализа для нейтрализованного элюата СРВ-РА для индивидуальной плотности загрузки в сравнении с контрольным образцом.

На фиг. 17 представлено наложение данных WCEX-анализа для элюата СРВ-РА в сравнении с контрольным образцом при различных плотностях загрузки в колонке 1 для МАТ А.

На фиг. 18 показаны настройки для системы АКТА рсс (4С РСС) для непрерывной обработки МАТ А.

На фиг. 19 показан хроматографический профиль для непрерывной обработки МАТ А в системе АКТА рсс (4С РСС).

На фиг. 20 показано наложение данных WCEX-анализа, полученных для контрольного образца с элюатом из колонки 2 и элюатом из колонки 4 при непрерывной обработке.

#### **Подробное описание изобретения**

Ниже приведено подробное описание вариантов реализации настоящего изобретения. Варианты реализации представлены так подробно, для того чтобы ясно описать настоящее изобретение. Тем не менее такая подробная информация не предназначена для ограничения предполагаемых вариаций вариантов реализации; она, наоборот, предполагается, что она охватывает все модификации, эквиваленты и альтернативные варианты, в рамках сущности и объема настоящего изобретения, определенного в прилагаемой формуле изобретения.

Если контекст не требует иного, во всем тексте настоящего изобретения, которое следует ниже, слово "содержать" и его варианты, такие как, "содержит" и "содержащий" следует толковать в открытом, включающем смысле, т.е. "включающий, но не ограничивающийся указанным".

Во всем тексте настоящего изобретения указание на "один вариант реализации" или "вариант реализации" означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанная вместе с указанным вариантом реализации, включены в по меньшей мере один вариант реализации. Таким образом, появления фраз "в одном варианте реализации" или "в варианте реализации" в различных местах всего текста настоящего изобретения не обязательно относятся к одному и тому же варианту реализации. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть объединены любым подходящим образом в одном или более вариантах реализации.

В контексте настоящего изобретения и во всей формуле, следующей за описанием, значение форм единственного числа включает в себя указание на множественное число если контекст не указывает явно на обратное. Также в контексте настоящего изобретения значение "в" включает "в" и "на", если контекст не указывает явно на обратное.

В некоторых вариантах реализации числа, выражающие количество ингредиентов, свойства, такие как концентрация, условия процесса и т.д., применяемые для описания и заявления определенных вариантов реализации настоящего изобретения, следует понимать как модифицированные в некоторых случаях термином "примерно". Соответственно в некоторых вариантах реализации числовые параметры, приведенные в настоящем письменном описании, являются приближенными, т.е. могут варьировать в зависимости от желаемых свойств, которые хотят получить при помощи конкретного варианта реализации. В некоторых вариантах реализации числовые параметры следует интерпретировать с учетом числа приведенных значащих цифр и с использованием обычных методов округления. Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, определяющие широкий диапазон некоторых вариантов реализации настоящего изобретения, являются приближенными, числовые значения, изложенные в конкретных примерах, приведены настолько точно, насколько это практически возможно.

Указание диапазонов значений в настоящем изобретении предназначено просто для того, чтобы служить в качестве способа быстрого указания на каждое отдельное значение, попадающее в указанный диапазон. Если в настоящем изобретении не указано иное, каждое отдельное значение включено в описание так же, как если бы оно было указано в настоящем изобретении индивидуально.

Все способы, описанные в настоящем изобретении, можно осуществлять в подходящем порядке, если в настоящем изобретении не указано иное или иначе если это явно не противоречит контексту. Применение любых и всех примеров или используемых для обозначения примеров формулировок (например, "такие как") применительно к определенным вариантам реализации настоящего изобретения, предназначены просто для лучшего освещения настоящего изобретения и не налагают ограничений на объем настоящего изобретения, заявленного иным образом. Ни одна из формулировок в настоящем описании не должна быть истолкована как указывающая не то, что какой-либо элемент, отсутствующий в формуле изобретения, является существенным для практической реализации настоящего изобретения.

Заголовки и реферат настоящего изобретения, приведенные в настоящем изобретении, предназначены только для удобства и не определяют объем или значение вариантов реализации.

В настоящем изобретении применяются различные термины. Если для какого-либо термин, применяемого в формуле изобретения, на дано определение ниже, для него должно применяться самое широкое определение, которое дают ему специалисты в соответствующей области техники в печатных публикациях и выданных патентах на момент подачи заявки.

В контексте настоящего изобретения термин "непрерывный способ" относится к любому способу, имеющему две или более последовательных этапов обработки, в которых выходящий поток из предыдущего этапа (отдельная операция) непрерывно передается на последующий этап (отдельная операция) до финальной стадии хроматографии; при этом предыдущий этап обработки не обязательно завершают до начала следующего этапа обработки. В непрерывном способе некоторая часть целевого продукта всегда движется по обрабатывающей системе. В идеале непрерывный способ регулируют таким образом, чтобы в максимально возможной степени все (каждый) этапы или отдельные операции указанного непрерывного способа осуществлялись одновременно и практически с одинаковой производительностью. Это позволяет максимально снизить время цикла и достичь минимального возможно времени завершения.

Термин "непрерывная передача" относится к потоку продукта, движущемуся в направлении от восходящей отдельной операции к нисходящей отдельной операции, что означает, что соединения или взаимосвязи между двумя указанными отдельными операциями таковы, что поток продукта передается от восходящей отдельной операции (непосредственно или через другие компоненты) ко второй (нисходящей) отдельной операции и что указанная нисходящая отдельная операция начинается до того, как завершается восходящая отдельная операция (т.е. в двух последовательных отдельных операциях происходит обработка указанного потока продукта, поступающего в них одновременно, по меньшей мере для части целого процесса, в котором указанные две отдельные операции и составляют часть).

В контексте настоящего изобретения термин "способ перфузионного культивирования клеток" относится к перфузионному культивированию, которое осуществляют путем непрерывной подачи свежей

среды в биореактор и постоянного удаления бесклеточной отработанной среды при сохранении клеток в реакторе; таким образом, можно достигнуть более высокой плотности клеток в перфузионных культурах по сравнению с непрерывными культурами, поскольку клетки удерживают внутри реактора с помощью устройства для удержания клеток. Скорость перфузии зависит от потребности линии клеток, концентрации питательных веществ в подпитке и уровня токсификации.

Термин "среда для культивирования клеток" относится к видам сред, которые применяются в контексте культивирования клеток. Обычно среда для культивирования клеток содержит аминокислоты, по меньшей мере один углевод в качестве источника энергии, микроэлементы, витамины, соли и возможно дополнительные компоненты (например, для того чтобы влиять на рост клеток и/или продуктивность и/или качество продукта).

Термин "терапевтический белок" обозначает рекомбинантный белок, который в достаточной степени очищен и отделен от загрязняющих белков, липидов и нуклеиновых кислот, присутствующих в жидкой среде для культивирования, или от клетки-хозяина (например, из клетки-хозяина млекопитающего, дрожжевой или бактериальной клетки-хозяина) и биологических загрязнителей (например, вирусных и бактериальных загрязнителей), и который можно использовать в фармацевтическом продукте. Примеры терапевтического белка включают, но не ограничиваются перечисленными: антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, фермент, модифицированный белок, иммуногенный белок, фрагмент белка и иммуноглобулин.

Термин "антитело" относится к функциональному компоненту сыворотки крови, и он часто упоминается либо как совокупность молекул (антител или иммуноглобулинов, фрагментов и т.д.), либо как молекула. Молекула антитела обладает способностью связываться или реагировать со специфической антигенной детерминантой, что, в свою очередь, может приводить к специфическому иммунологическому эффекту или механизмам.

Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, продуцируемому отдельным клоном клеток или линией клеток и состоящему из идентичных молекул антитела.

Термин "изоформа" относится к любому из двух или более функционально сходных белков, которые имеют сходную, но не идентичную, аминокислотную последовательность, и кодируются либо разными генами, либо РНК-транскриптами одного и того же гена, у которого удалены разные экзоны.

Термин "гетерогенность" относится к явлению, заключающемуся в том, что секретируемые антитела имеют различные дискретные биохимические формы, такие как, но не ограничиваясь перечисленным: дополнительная аминокислота или аминокислоты на карбоксильном конце одной или обеих тяжелых цепей антитела.

В контексте настоящего изобретения термин "снижение гетерогенности" относится к способу преобразования гетерогенных форм моноклонального антитела в по существу чистые, гомогенные формы.

В контексте настоящего изобретения термин "время удерживания" относится ко времени, за которое половина количества растворенного вещества элюируется из хроматографической системы. Оно определяется длиной колонки и скоростью движения указанного растворенного вещества и может лежать в диапазоне 1-30 мин.

Термин "мультиколоночная хроматографическая система" или "МКХС" обозначает систему из в целом двух или более взаимосвязанных или переключающихся хроматографических колонок и/или хроматографических мембран. Неограничивающий пример мультиколоночной хроматографической системы включает систему периодической противоточной хроматографии (ПТХ), содержащую всего две или более взаимосвязанных или переключающихся колонок для хроматографии и/или хроматографических мембран.

Термин "элюат/фильтрат" является термином из уровня техники и означает жидкость, которая выделяется из хроматографической колонки или хроматографической мембраны, которая содержит определяемое количество рекомбинантного терапевтического белка.

Варианты реализации настоящего изобретения относятся к способу биологического производства, который обеспечивает непрерывное получение терапевтического белка с пониженной гетерогенностью. В способе биологического производства, описанном в настоящем изобретении, используется мультиколоночная хроматографическая система, в которой осуществляются отдельные операции снижения гетерогенности в терапевтическом белке, захвата указанного терапевтического белка и инактивации вирусов, очистки терапевтического белка и финальной обработки очищенного терапевтического белка.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен непрерывный способ снижения гетерогенности терапевтического белка, причем указанный способ включает снижение содержания одной или более основных изоформ указанного терапевтического белка в единой мультиколоночной хроматографической системе.

В одном варианте реализации указанная мультиколоночная хроматографическая система может содержать по меньшей мере две хроматографические колонки.

В одном варианте реализации указанная мультиколоночная хроматографическая система может содержать колонку, содержащую карбоксипептидазу В, иммобилизованную на сефарозе.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен непрерывный способ снижения гетерогенно-

сти терапевтического белка, причем указанный способ может включать стадии

(a) обеспечения мультиколоночной системы хроматографии, содержащей первую колонку, вторую колонку, третью колонку и четвертую колонку;

(b) подачи собранного материала культуры клеток, содержащего терапевтический белок, в первую колонку, за счет чего уменьшается гетерогенность указанного терапевтического белка; причем первая колонка содержит карбоксипептидазу В, иммобилизованную на сефарозе,

(c) подачи потока из первой колонки во вторую колонку, за счет чего происходит захват терапевтического белка в указанном потоке из первой колонки;

(d) подачи элюата, содержащего указанный терапевтический белок, из второй колонки в третью колонку для очистки терапевтического белка; и

(e) подачи потока, содержащего указанный терапевтический белок, из третьей колонки в четвертую колонку для финальной обработки терапевтического белка.

В одном из вариантов реализации указанные первая, вторая, третья и четвертая колонки мультиколоночной хроматографической системы могут быть соединены последовательно или параллельно.

В одном из вариантов реализации первая колонка снижает гетерогенность терапевтического белка за счет снижения доли основных изоформ указанного терапевтического белка

В одном из вариантов реализации вторая колонка может представлять собой колонку для аффинной хроматографии.

В одном из вариантов реализации каждую из третьей и четвертой колонок можно выбрать из группы, состоящей из колонки для анионообменной хроматографии, колонки для катионообменной хроматографии, хроматографической колонки с гидрофобным взаимодействием и колонки для мультимодальной хроматографии.

В соответствии с вариантами реализации настоящего изобретения мультиколоночная хроматографическая система, применяемая в настоящем способе, может работать в непрерывном режиме и стационарном состоянии.

В одном предпочтительном варианте реализации непрерывного способа поток из первой колонки, содержащий рекомбинантный белок с пониженной гетерогенностью, либо собирают, либо непрерывно загружают во вторую колонку. Элюат, полученный из указанной второй колонки, собирают таким образом, чтобы рН для него находился в диапазоне, необходимом для инактивации вирусов низким рН, и выдерживают этот элюат в резервуаре в течение необходимого времени инкубации. После инактивации вирусов рН указанного элюата из второй колонки мультиколоночной хроматографической системы корректируют до рН и проводимости, необходимых для загрузки в третью колонку, путем добавления в поток буфера/раствора. Указанный элюат из второй колонки загружают в предварительно уравновешенную третью колонку для осуществления этапа промежуточной очистки для удаления других примесей, таких как, например, белки клеток-хозяина (НСР), ДНК клеток-хозяина и вирусы. Третья колонка может работать в поточном режиме или в режиме связывания и элюирования. Поток из третьей колонки собирают в резервуар и затем его рН и проводимость корректируют в потоке системы до загрузки в четвертую колонку. Указанный поток также можно непосредственно загрузить в четвертую колонку в случае если параметры образца являются такими же, как параметры непрерывного способа для соответствующих терапевтических белков. Терапевтический белок затем можно элюировать из четвертой колонки в случае если она работает в режиме связывания и элюирования, или можно поток собрать в случае если она работает в поточном режиме. Таким образом, весь непрерывный способ производства терапевтического рекомбинантного белка можно выполнить на мультиколоночной хроматографической системе в режиме отдельных операций. Терапевтический белок, полученный таким способом, характеризуется чистотой, высокой объемной производительностью, оптимизированной последовательностью операций, малым временем цикла и сниженными общими затратами. Примерная последовательность операций для непрерывной обработки терапевтического белка в четырех колонках показана на фиг. 1.

В одном варианте реализации в первой колонке мультиколоночной хроматографической системы осуществляется отдельная операция снижения гетерогенности в терапевтическом белке за счет удаления основных зарядных изоформ указанного терапевтического белка.

В одном варианте реализации способ удаления гетерогенности можно осуществить с применением любой хроматографической системы, в которой можно соединить множество колонок, включая колонки АКТА Avant 150, АКТА pcc 2, АКТА pcc 3, АКТА pcc 4 и BioSMB PALL.

В одном варианте реализации стадии промежуточной очистки и финальной обработки можно осуществлять непрерывно с применением различных методов хроматографии, таких как анионообменная хроматография, катионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием или мультимодальная хроматография. Подходящий метод хроматографии можно выбрать в зависимости от параметров процесса, желаемого качества, чистоты, степени извлечения и производительности.

Примеры терапевтических белков, которые можно получить/применять в способе согласно настоящему изобретению, могут включать следующие, но не ограничиваются ими: антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, фермент, модифицированный белок, иммуногенный белок, фрагмент белка, иммуноглобулин и любую их комбинацию.

В одном варианте реализации моноклональное антитело выбрано из встречающегося в природе антитела, или рекомбинантное антитело выбрано из моноклонального антитела, модифицированного антитела, производного антитела и фрагмента антитела или любой их комбинации.

В одном варианте реализации терапевтический белок можно выбрать, но не ограничиваться ими, из панитумаба, омализумаба, абаговомаба, абциксимаба, актоксумаба, адалимумаба, адекатумумаба, афелимомаба, афутузумаба, алацизумаба, алацизумаба, алемтузумаба, алирокумаба, алгумомаба, аматуксимаба, аматуксимаба, анатумомаба, анрукинзумаба, аполизумаба, арцитумомаба, атинумаба, тоцилизумаба, базилицумаба, бектумомаба, белимумаба, бевацизумаба, безилесомаба, безлтоксумаба, бициромаба, блинатумомаба, канакинумаба, цертолизумаба, цетуксимаба, циксутумумаба, даклизумаба, деносумаба, экулизумаба, эдреколомаба, эфализумаба, эфунгумаба, эпратузумаба, эртумаксомаба, этарацизумаба, фигитумумаба, голимумаба, ибритумомаба тиуксетана, иговомаба, имгатузумаба, инфликсимаба, инолимомаба, инотузумаба, лобетузумаба, лебрикизумаба, моксетумомаба, натализумаба, ниволумаба, обинутузумаба, ореговомаба, паливизумаба, панитумумаба, пертузумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, ритуксимаба, секукинумаба, тоцилизумаба, тоситумомаба, трафокинумаба, тукотузумаба, трастузумаба, устекинумаба, ведолизумаба, велтузумаба, залутумумаба, затуксимаба, ферментов (например, галактозидазы (например, альфа-галактозидазы), миозима или церезима), белков (например, эритропоэтина человека, фактора некроза опухоли (ФНО) или альфа или бета интерферона) или иммуногенных или антигенных белков или фрагментов белков (например, белков для применения в вакцине), альглюкозидазы альфа, ларонидазы, абатацепта, галсульфазы, лютропина альфа, антигемофильного фактора, агалзидазы бета, интерферона бета-1а, дарбэпоэтина альфа, тенектеплазы, этанерцепта, фактора свертывания крови IX, фолликулостимулирующего гормона, интерферона бета-1а, имиглюцеразы, дорназы альфа, эпоэтина альфа, инсулина или аналогов инсулина, мекасермина, фактора VIII, фактора VIIа, антитромбина III, белка С, альбумина человека, эритропоэтина, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, гранулоцитарного макрофагального колониестимулирующего фактора, интерлейкина-11, ларонидазы, идурсуфазы, галсульфазы, ингибитора  $\alpha$ -1-протеиназы, лактазы, аденозиндеаминазы, тканевого активатора плазминогена, тиротропина альфа, кислой  $\beta$ -галактозидазы,  $\beta$ -галактозидазы, нейраминидазы, гексозаминидазы А и гексозаминидазы В.

В предпочтительных вариантах реализации среду для культивирования терапевтического белка можно получить из любого источника. Например, но не ограничиваясь ими, из культуры рекомбинантной клетки (например, культуры рекомбинантной бактериальной, дрожжевой клетки или клетки млекопитающего).

Указанную среду для культивирования можно получить из культуры клеток с подпиткой, биореактора с подпиткой, содержащего культуру клеток, которые секретируют рекомбинантный терапевтический белок, или перфузионной культуры клеток. Жидкая среда для культивирования также может представлять собой осветленную жидкую среду для культивирования, полученную из культуры бактериальных или дрожжевых клеток, которые секретируют рекомбинантный терапевтический белок.

В одном варианте реализации настоящего изобретения С-концевые остатки лизина на тяжелой цепи моноклональных антител можно укоротить в непрерывном способе, пропуская собранный материал, полученный из перфузионной культуры клеток, через колонку, в которой фермент карбоксипептидаза В иммобилизован на сефарозе. Гомогенный собранный материал, полученный в результате указанной реакции, дальше непрерывно переносят в колонку для аффинной хроматографии для проведения дополнительной очистки моноклонального антитела.

В одном варианте реализации настоящего изобретения в непрерывном способе, описанном в настоящем документе, можно уменьшать количество фермента, необходимого для снижения С-концевых остатков моноклональных антител.

В одном варианте реализации настоящего изобретения, жидкость, собранную с культуры клеток, непрерывно поступающую из биореактора через альтернативную тангенциальную фильтрацию, можно загрузить в колонку с иммобилизованной карбоксипептидазой В при рН и затем ее можно непрерывно загружать в колонки для аффинной хроматографии, соединенные с системой непрерывной хроматографии или соединенные последовательно или параллельно в МКХС.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации концентрация белка в культивируемых клетках находится в диапазоне концентраций от 50 до 2500 мг/л жидкости, собранной с культуры клеток.

В одном варианте реализации содержание основных изоформ моноклональных антител можно уменьшить в диапазоне 50-100%.

В соответствии с вариантами реализации настоящего изобретения терапевтический белок, обработанный/полученный в способе согласно настоящему изобретению, можно включить в состав фармацевтической композиции без какой-либо дополнительной стадии очистки и/или обезвреживания.

В соответствии с вариантами реализации настоящего изобретения способ, описанный в настоящем документе, образует непрерывную биологическую производственную систему для терапевтического белка.

В настоящем описании также предложен способ получения смолы для колонки со связанной с кар-

боксипептидазой сефарозой и стабильности смолы, применяемой для обработки терапевтического белка.

### Примеры

Описание дополнительно иллюстрируется приведенными ниже примерами, которые никоим образом не следует истолковывать как дополнительные ограничения. Специалист в данной области техники легко поймет, что конкретные описанные способы и результаты являются просто иллюстративными.

Пример 1. Получение смолы для способа.

Смолу получали следующим образом.

1) Обеспечивали набухание лиофилизированного порошка активированной бромистым цианом (CNBR) сефарозы (Sephacrose™) 4В в воде и промывали 1 мМ HCl. Смолу дополнительно промывали 0,1М натрий-бикарбонатным буфером, pH 10,0.

2) Указанный буфер заменяли ферментом карбоксипептидазой В (CPB) и инкубировали со смолой при соотношении 2:1 (фермент:смола) при pH 10,0 в течение ночи при 2-8°C при осторожном перемешивании.

3) Реакционную смесь доводили до температуры окружающей среды и добавляли борогидрид натрия при соотношении 4 мг/мл связанной смолы. Указанную суспензию инкубировали в течение 1 ч при температуре окружающей среды.

4) Смолу загружали в колонку и тщательно промывали 50 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7,0.

5) Перед применением указанную колонку дополнительно промывали 20 мМ трис-HCl, 150 мМ NaCl, pH 9,0.

Стабильность и хранение полученной своими силами смолы Sepharose™ 4В, активированной CPB-CNBR.

Эта смола оказалась стабильной в течение более одного года при большом количестве циклов, и все еще сохраняла свои свойства при хранении при 2-8°C. Эту смолу можно применять для непрерывной обработки при комнатной температуре для непрерывной обработки без снижения производительности.

Пример 2. Способ снижения вариантов антител.

Две колонки соединяли последовательно в одну систему очистки, где вход колонки с CPB-сефарозой был соединен с указанной системой, а выход из этой же колонки использовался в качестве входа в колонку с белком А. Поток, выходящий из колонки с CPB-сефарозой, непосредственно загружается в колонку с белком А для осуществления этапа захвата. В конечном итоге указанный белок элюируют с применением элюирующего буфера (фиг. 2).

1. Колонку с CPB-сефарозой соединяли с колонкой для аффинной хроматографии и осветленный собранный материал культуры клеток, полученный из перфузионной культуры клеток, загружали в предварительно уравновешенную при pH 7,0 колонку, при этом ее можно уравновесить при pH 6,5-9,0, со временем контактирования в приблизительно более 25 мин в колонке 1.

2. Выходящий из колонки с CPB-сефарозой поток непосредственно загружали в колонку для аффинной хроматографии, соединенную с выходом для смолы CPB-сефарозы, для осуществления захвата терапевтического белка.

3. Антитело, захваченное во второй колонке, которая представляла собой колонку для аффинной хроматографии, в конечном итоге элюировали 0,1М уксусной кислотой с pH 3,0, и нейтрализовали с помощью 2М трис-основания. Один контрольный анализ осуществляли с теми же собранным материалом, выходящим из перфузионного биореактора, и непосредственно загружали в колонку с белком А для этапа захвата. Оба элюированных образца белка А анализировали с помощью WCEX-ВЭЖХ для определения зарядных вариантов.

На фиг. 2 показана хроматограмма для двух колонок, последовательно соединенных в одну систему очистки.

На фиг. 3 показан хроматографический профиль для колонки с Sepharose™ 4В, активированной CPB-CNBR, с последующим анализом в колонке с белком А для моноклонального антитела А (МАТ А) в непрерывном режиме при времени удерживания в приблизительно 25 мин.

Пример 3. Непрерывная обработка терапевтического белка (МАТ А).

Исследование 1 времени удерживания.

Поскольку ранее проведенный хроматографический анализ проводили при времени контактирования в приблизительно 25 мин в колонке 1, провели еще несколько анализов для оценки минимального времени контактирования, которое необходимо выдержать для достижения оптимального снижения гетерогенности терапевтического белка.

Хроматографический анализ проводили с применением колонки с Sepharose™ 4В, активированной своими силами при помощи CPB-CNBR (колонка 1, объем колонки (CV)=10 мл), за которой следовала колонка с белком А (Mab Select SuRe™ pcc) (колонка 2, CV=1 мл) (подряд CPB-РА), в непрерывном режиме (фиг. 4). Указанный процесс осуществляли в системе для процессной хроматографии АКТА Avant 150, GE Healthcare, с осветленной культуральной жидкостью, содержащей терапевтический белок (МАТ А) (приблизительно 40 мг), при скорости потока 0,5 мл/мин, поддерживая время удерживания 20 мин в колонке 1 и 2 мин в колонке 2 соответственно. Систему АКТА Avant можно заменить на систему АКТА PCC.

На фиг. 4 показаны настройки непрерывной обработки для колонки 1 и колонки 2 при работе с одинаковыми скоростями потока.

Нейтрализованный образец (элюат СРВ-РА) подвергали WCEX-анализу совместно с контрольным образцом (только элюат белка А без СРВ) (фиг. 5).

На фиг. 5 показан хроматографический профиль для колонки с Sepharose™ 4В, активированной СРВ-CNBR, с последующим анализом в колонке с белком А для МАТ А в непрерывном режиме при RT 20 мин.

Элюат СРВ-РА показал расщепление/удаление основных вариантов в МАТ А по сравнению с контрольным образцом, как это показано в сравнительных данных WCEX-анализа (фиг. 6).

На фиг. 6 показано наложение данных WCEX-анализа контрольного образца и элюата СРВ-РА. Данный эксперимент свидетельствует о том, что СРВ в колонке продемонстрировала активность или разложение/расщепление основных вариантов при времени в 20 мин.

Исследование 2 времени удерживания.

Для того чтобы оценить минимальное время удерживания (RT) в колонке, скорость потока изменяли с 0,5 до 10 мл/мин в колонке с Sepharose™ 4В, активированной СРВ-CNBR (колонка 1), поддерживая время удерживания 2 мин, при том что скорость потока в колонке с белком А (колонка 2) составляла 0,5 мл/мин при поддержании время удерживания 2 мин. В этом случае поток из колонки 1 собирали и затем повторно загружали в колонку 2 в непрерывном режиме для поддержания различных значений времени удерживания и скорости потока, поскольку были различны и объемы колонки (фиг. 7).

На фиг. 7 показаны настройки непрерывной обработки для колонки 1 и колонки 2 при работе с различными скоростями потока. Нейтрализованный образец (элюат СРВ-РА при времени удерживания 2 мин) подвергали WCEX-анализу совместно с контрольным образцом (только элюат белка А без СРВ) и с элюатом СРВ-РА при RT 20 мин (фиг. 8).

На фиг. 8 показан хроматографический профиль для колонки с Sepharose™ 4В, активированной СРВ-CNBR, с последующим анализом в колонке с белком А для МАТ А в непрерывном режиме при RT 2 мин.

Элюат СРВ-РА показал расщепление/удаление основных вариантов в МАТ А по сравнению с контрольным образцом при RT 2 мин, в также в сравнении с колонкой 1, как это показано в сравнительных данных WCEX-анализа (фиг. 9).

На фиг. 9 показано наложение данных WCEX-анализа для контрольного образца и элюата СРВ-РА при RT 2 мин.

Сравнение снижения при двух различных значениях времени удерживания.

При времени удерживания 2 мин в колонке 1 расщепление было значимо сопоставимо с расщеплением, достигаемым при 20 мин при комнатной температуре в колонке 1 (фиг. 10). На фиг. 10 показано наложение данных WCEX-анализа для элюата СРВ-РА при времени удерживания 20 мин и времени удерживания 2 мин соответственно в колонке 1 для МАТ А. Соответственно хроматографические анализы также можно успешно проводить при времени удерживания 2 мин. Также можно оценить время удерживания менее 2 мин.

Пример 4. Способ снижения основных изоформ МАТ В.

Карбоксипептидазы В преимущественно действуют на основные аминокислоты, такие как аргинин и лизин. Соответственно смолу можно применять для удаления зарядных изоформ, принадлежащих к любому классу IgG или моноклональных антител. Удаление таких зарядных изоформ на самом первом этапе в непрерывном режиме может привести к получению продукта с высоким качеством, чистотой и высоким выходом. Другое модельное МАТ, на котором оценивали удаление зарядных изоформ/основных вариантов с применением колонки с Sepharose™ 4В, активированной СРВ-CNBR, за которой следовала колонка с белком А, в непрерывном режиме при RT 2 мин, представляло собой МАТ В (фиг. 11).

На фиг. 11 показан хроматографический профиль для колонки с Sepharose™ 4В, активированной СРВ-CNBR, с последующим анализом в колонке с белком А для mAb В в непрерывном режиме при RT 2 мин.

Элюат СРВ-РА показал расщепление/удаление основных вариантов в mAb В по сравнению с контрольным образцом (только элюат нейтрализованного белка А без колонки с Sepharose™ 4В, активированной СРВ-CNBR), как это показано в сравнительных данных WCEX-анализа (фиг. 12). Следовательно, можно сделать вывод, что данная стратегия применима для любых моноклональных антител, принадлежащих ко всем классам IgG, для удаления основных вариантов, отличающихся по заряду.

Пример 5. Способ снижения содержания основных изоформ МАТ А при различной плотности загрузки в трех колонках.

Для того чтобы оценить максимальную емкость загрузки в колонке с Sepharose™ 4В, активированной СРВ-CNBR, в непрерывном режиме оценивали различные плотности загрузки с применением осветленной культуральной жидкости, содержащей МАТ А, как показано в таблице ниже. Хроматографические анализы проводили с применением колонки с Sepharose™ 4В, активированной внутрилабораторно

при помощи СРВ-CNBR (колонка 1), за которой следовала колонка с белком А (Mab Select SuRe LX) (колонка 2) (подряд СРВ-РА), в непрерывном режиме. Процесс осуществляли в системе АКТА рсс (трех-колоночная система для периодической противоточной хроматографии, 3С РСС), GE Healthcare, с осветленной культуральной жидкостью, содержащей МАТ А, полученной из перфузионной культуры, при скорости потока 5 мл/мин, когда одна колонка с Sepharose™ 4В, активированной СРВ-CNBR (колонка 1) и две колонки с белком А (колонка 2) были соединены параллельно. Время удерживания, поддерживаемое в колонке 1, эквивалентно 1,7 мин, что было меньше, чем в предыдущих исследованиях, и в колонке 2 время удерживания составляло приблизительно 4,4 мин (в качестве смолы применяли MabSelect SuRe LX).

Детали загрузки в колонке 1 и колонке 2

№ прогона по порядку	Объем загрузки (мл)	Общий белок (мг)	Объем Колонки 1 (мл)	Плотность загрузки в Колонке 1 (мг/мл)	Объем Колонки 2 (мл)	Плотность загрузки в Колонке 2 (мг/мл)	Время для загрузки (мин)
1*	30	40	10	4	1	40,0	80
2 <sup>π</sup>	60	85	NA	NA	22	4	12
3	60	85	8,5	10	22	4	12
4	120	170	8,5	20	22	8	24
5	240	341	8,5	40	22	15	48
6	480	682	8,5	80	22	31	96

\* Хроматографический анализ, проведенный в условиях, указанных в прогоне № 1, был выполнен ранее (фиг. 5).

<sup>π</sup> Контрольный анализ.

Контрольный анализ проводили с применением колонки, содержащей только белок А, для сравнения с данными WCEX-анализа, как это указано в таблице выше. Хроматографический анализ проводили непрерывно в соответствии с условиями, указанными в прогонах № 3, 4, 5 и 6, при этом плотность загрузки в колонке 1 составляла 10, 20, 40 и 80 мг/мл соответственно. В этом хроматографическом анализе одна колонка с Sepharose™ 4В, активированной СРВ-CNBR (колонка 1), и две колонки с белком А (колонка 2) были соединены параллельно, и колонку 1 и колонку 2 запускали последовательно (фиг. 13 и 14 для хроматографического профиля). Нейтрализованные образцы подвергали WCEX-анализу для сравнения с контрольными образцами.

На фиг. 13 показан хроматографический профиль для колонки с белком А при анализе на определение МАТ А в качестве контроля в системе АКТА рсс (3С рсс).

На фиг. 14 показан хроматографический профиль для плотности загрузки 10, 20 и 40 мг/мл соответственно в колонке с Sepharose™ 4В, активированной СРВ-CNBR (колонка 1), с последующим анализом в колонке с белком А, для МАТ А в непрерывном режиме в системе АКТА рсс (3С рсс).

На фиг. 15 показан хроматографический профиль для плотности загрузки 80 мг/мл в колонке с Sepharose™ 4В, активированной СРВ-CNBR (колонка 1), с последующим анализом в колонке с белком А для МАТ А в непрерывном режиме в системе АКТА рсс (3С рсс).

На фиг. 16 показано наложение данных WCEX-анализа для нейтрального элюата СРВ-РА для индивидуальной плотности загрузки в сравнении с контрольным образцом. Как видно на фиг. 16, смола проявляла активность или уменьшала содержание основных зарядных изоформ по сравнению с контрольным образцом. Таким образом, эта смола также может работать при плотности загрузки более 80 мг/мл в колонке 1, при этом в случае если объем колонки с белком А остается аналогичным объему колонки с Sepharose™ 4В, активированной СРВ-CNBR, то для достижения достаточного количества выходного потока из колонки 1 потребуется две параллельно соединенных колонки с белком А.

На фиг. 17 показано наложение данных WCEX-анализа для элюата СРВ-РА по сравнению с контрольным образцом при различных плотностях загрузки в колонке 1 для МАТ А. Когда сравнивали наложение данных WCEX-анализа для всех различных плотностей загрузки, было отмечено, что, хотя наблюдали снижение содержания основных зарядных изоформ во всех образцах, было отмечено небольшое увеличение кислых вариантов в случае плотности загрузки 80 мг/мл в колонке 1 (фиг. 17). Это может происходить из-за более высокой плотности загрузки, т.е. из-за более высокого соотношения белок: СРВ или вследствие более высокого времени удерживания. Но поскольку время удерживания при всех анализах было одинаковым и составляло 1,7 мин, также как и сравнительные данные для условия 1, указанного в таблице, когда время загрузки в колонке 1 составляло 80 мин, увеличения содержания кислых изоформ не наблюдали (фиг. 5). Следовательно, вероятной причиной может служить общее количество белка, загруженного в колонку 1 при движении в направлении (в проточном режиме) к колонке 2, может происходить и постепенное увеличение содержания кислых вариантов с течением времени и изменением количества загруженного белка и их накопление в колонке 2 (в режиме связывания и элюирования), при

этом общий элюированный белок содержит повышенное количество кислых форм. Следовательно, будет лучше, если регенерация колонки 1 между циклами будет осуществляться с помощью буферов с pH не менее 3,0, содержащих 50 мМ ацетата натрия, pH 5,0, или других подобных буферов, когда можно будет получить как требуемое качество, так и количество.

Пример 6. Непрерывный способ снижения гетерогенности терапевтического белка (МАТ А) в 4 колонках за отдельную операцию.

Хроматографические анализы проводили с применением работающих в непрерывном режиме 4 параллельных колонок, последовательно соединенных в системе АКТА рсс (трехколоночная система для периодической противоточной хроматографии, 4С РСС), GE Healthcare, с осветленной культуральной жидкостью, содержащей МАТ А, полученной из перфузионной культуры, при скорости потока 5 мл/мин. (фиг. 18 и 19). За колонкой с Sepharose™ 4В, активированной внутрилабораторно при помощи СРВ-СNBR (колонка 1) следовала колонка с белком А (Mab Select SuRe LX) (колонка 2), за которой шла колонка для инактивации вирусов и анионообменной хроматографии (Q Sepharose Fast Flow) (колонка 3) и затем колонка для катионообменной хроматографии (SP Sepharose Fast Flow) (колонка 4), работающие в непрерывном режиме. Можно также включить способ, неограниченный приведенной выше схемой и другими методами хроматографии и химией смолы, например, включить хроматографию с гидрофобным взаимодействием или мультимодальную хроматографию, в зависимости от требований к качеству, чистоте и производительности или степени извлечения. Также в зависимости от требований можно менять и последовательность стадий хроматографии.

На фиг. 18 показаны настройки для системы АКТА рсс (4С РСС) для непрерывной обработки МАТ А.

Применяемый колоночный буфер представлен ниже. Другие комбинации буферов также можно применять в том же диапазоне pH и проводимости для желаемого качества и производительности.

1) Колонка 1: объем колонки=8,5 мл, плотность загрузки=60 мг/мл.

Уравновешивание и промывка после загрузки: 50 мМ трис-НСl, pH 7,0±0,2, проводимость 4,0±1,0 мСм/см.

Регенерация: 50 мМ ацетата натрия, pH 5,0±0,2, проводимость 3,6±1,0 мСм/см.

2) Колонка 2: объем колонки=22 мл, плотность загрузки=23 мг/мл.

Уравновешивание и промывка после загрузки: 50 мМ трис-НСl, pH 7,0±0,2, проводимость 4,0±1,0 мСм/см.

Элюирование: 100 мМ уксусной кислоты, pH 3,0±0,2.

Регенерация: 500 мМ гидроксида натрия.

3) Колонка 3: объем колонки=20 мл, плотность загрузки=25 мг/мл.

Уравновешивание и промывка после загрузки: 50 мМ трис-НСl, pH 7,0 ± 0,2, проводимость 4,0±1,0 мСм/см.

Регенерация: 500 мМ гидроксида натрия.

4) Колонка 4: объем колонки=20 мл, плотность загрузки=25 мг/мл.

Уравновешивание и промывка после загрузки: 50 мМ ацетата натрия, pH 5,0±0,2, проводимость 3,6±1,0 мСм/см.

Элюирование: 50 мМ ацетата натрия, 150 мМ NaCl pH 5,0, проводимость 15,0±1,0 мСм/см.

Регенерация: 500 мМ гидроксида натрия.

В этом непрерывном способе колонку 1 нагружали с плотностью загрузки 60 мг/мл на 8,5 мл объема колонки и через колонку 2 непрерывно пропускали поток для захвата МАТ А. Связанный белок элюировали 100 мМ уксусной кислоты при таком объеме колонки, что pH элюата был эквивалентен pH, необходимому для инактивации вирусов. Вирусную инактивацию проводили при pH≤3,6, выдерживая в течение 1 ч, а затем проводили нейтрализацию элюата белка А путем последовательного добавления необходимого объема 2М трис-основания. Значения pH и проводимости нейтрализованного элюата белка А были эквивалентны тем значениям, которые требуются для загрузки колонки 3, при которых заявлено удаление белков клеток-хозяина (НСР), ДНК клеток-хозяина и вирусов, pH 7,0±0,2, и проводимость была меньше, чем 10 мСм/см, и было обнаружено, что она составляла приблизительно 4,5±1,0 мСм/см. Данный нейтрализованный элюат белка А пропускали через предварительно уравновешенную колонку 3, работающую в проточном режиме, и этот же поток и собирали. Поскольку колонка 4 должна была работать в режиме связывания и элюирования при pH 5,0 и проводимости ≤6,0 мСм/см (однако не ограничиваясь только этими условиями), в линию снова добавляли необходимое количество кислоты, в этом случае добавляли 100 мМ уксусной кислоты как подготовительную стадию для загрузки колонки 4. Было установлено, что pH загрузки для колонки 4 составлял 5,0±0,2, а проводимость составляла ≤3,5 мСм/см, и связанный белок элюировали 50 мМ ацетатом натрия, 150 мМ NaCl, pH 5,0, проводимость 15,0±1,0 мСм/см, и образцы подвергали WCEX-анализу для сравнения при удалении заряженных изоформ. Проводили регенерацию всех колонок и осуществляли подготовку к следующему анализу. Хроматографический профиль и аналитические данные показаны на фиг. 18 и 19 соответственно.

На фиг. 19 показан хроматографический профиль для непрерывной обработки МАТ А в системе АКТА рсс (4С РСС). В случае если требуется удаление других связанных с продуктом примесей, то ус-

ловия способа в колонке 4 можно изменить для линейного или стадийного градиента или другого способа взаимодействия. Параметры этого способа можно изменить в зависимости от таких факторов, как природа терапевтического белка, изоэлектрическая точка, качество, чистота и производительность, экономическая эффективность, простота в обращении.

Как элюат из колонки 2 (образец элюата нейтрализованного белка А), так и элюат из колонки 4 подвергали WCEX-анализу совместно с контрольным образцом, относящемуся к эксперименту по определению плотности загрузки (фиг. 20).

На фиг. 20 показано наложение данных WCEX-анализа, полученных для контрольного образца в сравнении с элюатом из колонки 2 и с элюатом из колонки 4 при непрерывной обработке. Колонка 2 и колонка 4 показывают тот же профиль WCEX и демонстрируют удаление основных изоформ, при этом не наблюдается увеличение содержания кислых вариантов при этой плотности загрузки (60 мг/мл), которое наблюдалось при плотности загрузки 80 мг/мл. Таким образом, оптимальные рабочие условия для указанной колонки с Sepharose™ 4B, активированной внутрилабораторно при помощи CPB-CNBR, могут включать плотность загрузки  $\leq 80$  мг/мл, время загрузки в приблизительно 1-2 ч для MAT A и  $RT \geq 1,7$  мин, но не ограничиваться указанными условиями, после которых может быть проведена регенерация между анализами для получения последовательных результатов.

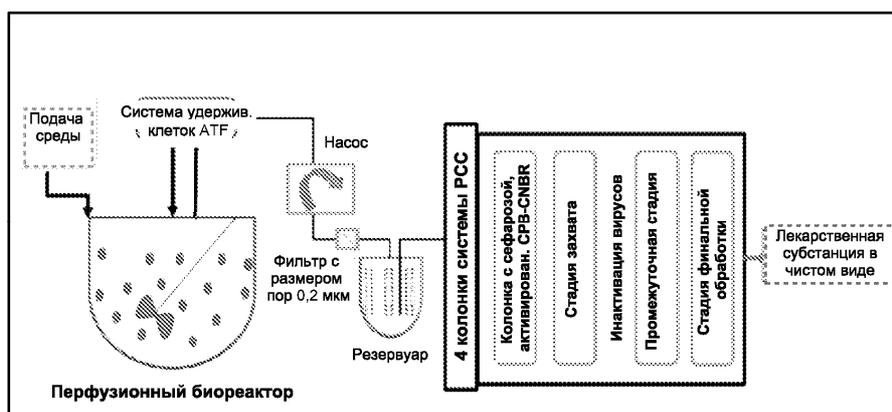
### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Непрерывный способ снижения гетерогенности терапевтического белка, включающий снижение содержания одной или более основных изоформ указанного терапевтического белка в единой мультиколоночной хроматографической системе, содержащей первую, вторую, третью и четвертую колонки, соединенные последовательно или параллельно, все из которых осуществляют разные отдельные операции, где указанная первая колонка указанной единой мультиколоночной хроматографической системы содержит карбоксипептидазу В, иммобилизованную на сефарозе; и подачу потока из первой колонки во вторую колонку.
2. Непрерывный способ уменьшения гетерогенности терапевтического белка, включающий стадии
  - (a) обеспечения мультиколоночной хроматографической системы, содержащей первую колонку, вторую колонку, третью колонку и четвертую колонку;
  - (b) подачи собранного материала культуры клеток, содержащего терапевтический белок, в указанную первую колонку, за счет чего уменьшается гетерогенность указанного терапевтического белка, причем первая колонка содержит карбоксипептидазу В, иммобилизованную на сефарозе;
  - (c) подачи потока из первой колонки во вторую колонку, за счет чего происходит захват терапевтического белка в указанном потоке из первой колонки;
  - (d) подачи элюата, содержащего указанный терапевтический белок, из второй колонки в третью колонку для очистки терапевтического белка; и
  - (e) подачи потока, содержащего указанный терапевтический белок, из третьей колонки в четвертую колонку для финальной обработки терапевтического белка.
3. Способ по п.2, дополнительно включающий сбор содержащего терапевтический белок элюата из второй колонки и выдерживание содержащего терапевтический белок элюата при низком рН для инактивации вирусов.
4. Способ по п.2, дополнительно включающий корректировки рН и проводимости содержащего терапевтический белок элюата из второй колонки перед его подачей в третью колонку.
5. Способ по п.2, дополнительно включающий корректировки рН и проводимости содержащего терапевтический белок потока из третьей колонки перед его подачей в четвертую колонку.
6. Способ по п.2, характеризующийся тем, что первая, вторая, третья и четвертая колонки соединены последовательно или параллельно.
7. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором первая колонка снижает гетерогенность терапевтического белка за счет снижения доли основных изоформ указанного терапевтического белка.
8. Способ по п.2, характеризующийся тем, что вторая колонка представляет собой колонку для аффинной хроматографии.
9. Способ по п.2, характеризующийся тем, что каждая из третьей и четвертой колонок выбрана из группы, состоящей из колонки для анионообменной хроматографии, колонки для катионообменной хроматографии, хроматографической колонки с гидрофобным взаимодействием и колонки для мультимодальной хроматографии.
10. Способ по любому из предыдущих пунктов, характеризующийся тем, что указанный терапевтический белок выбран из антитела, фрагмента антитела, моноклонального антитела, фермента, модифицированного белка, иммуногенного белка, фрагмента белка, иммуноглобулина или любой их комбинации.
11. Способ по любому из предыдущих пунктов, характеризующийся тем, что указанный терапевтический белок выбран из группы, состоящей из панитумумаба, омализумаба, абаговомаба, абциксимаба, актоксумаба, адалимумаба, адекатумумаба, афелимомаба, афутузумаба, алацизумаба, алемтузумаба, алирокумаба, алтумумаба, аматуксимаба, анатумумаба, анрукинзумаба, аполизумаба, арцитумумаба, атину-

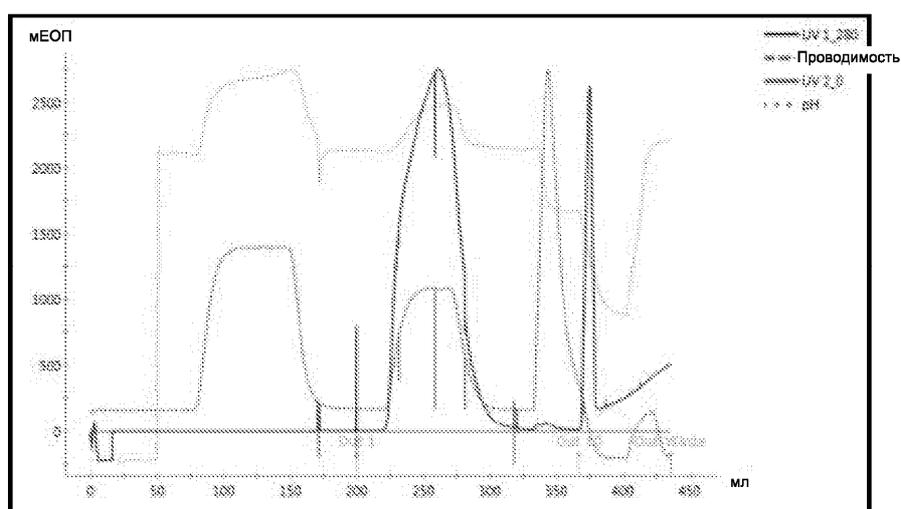
маба, базилицумаба, бектумомаба, белимумаба, бевацизумаба, безилесомаба, безлтоксумаба, бициромаба, блинатумомаба, канакинумаба, цертолизумаба, цетуксимаба, циксутумумаба, даклизумаба, деносумаба, экулизумаба, эдрекломаба, эфализумаба, эфунгумаба, эпратузумаба, эртумаксумаба, этарацизумаба, фигитумумаба, голимумаба, ибритумомаба труксетана, иговомаба, имгатузумаба, инфликсимаба, инолимомаба, инотузумаба, лабетузумаба, лебрикизумаба, моксетумомаба, натализумаба, ниволумаба, обинутузумаба, ореговомаба, паливизумаба, панитумумаба, пертузумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, ритуксимаба, секукинумаба, тоцилизумаба, тоситумомаба, тралокинумаба, тукотузумаба, трастузумаба, устекинумаба, ведолизумаба, велтузумаба, залутумумаба, затуксимаба, ферментов, белков, иммуногенных или антигенных белков или фрагментов белков, альглокозидазы альфа, ларонидазы, абатацепта, галсульфаза, лютропина альфа, антигемофильного фактора, агалзидазы бета, дарбэпоэтина альфа, тенектеплазы, этанерцепта, фактора свертывания крови IX, фолликулостимулирующего гормона, интерферона бета-1а, имиглюцеразы, дорназы альфа, эпоэтина альфа, инсулина или аналогов инсулина, мекасермина, фактора VIII, фактора VIIa, антитромбина III, белка C, альбумина человека, эритропоэтина, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, гранулоцитарного макрофагального колониестимулирующего фактора, интерлейкина-11, ларонидазы, идурсуфаза, галсульфаза, ингибитора  $\alpha$ -1-протеиназы, лактазы, аденозиндеаминазы, тканевого активатора плазминогена, тиротропина альфа, кислой  $\beta$ -галактозидазы,  $\beta$ -галактозидазы, нейраминидазы, гексозаминидазы A и гексозаминидазы B.

12. Способ по п.2, дополнительно включающий введение в состав фармацевтической композиции окончательно очищенного терапевтического белка.

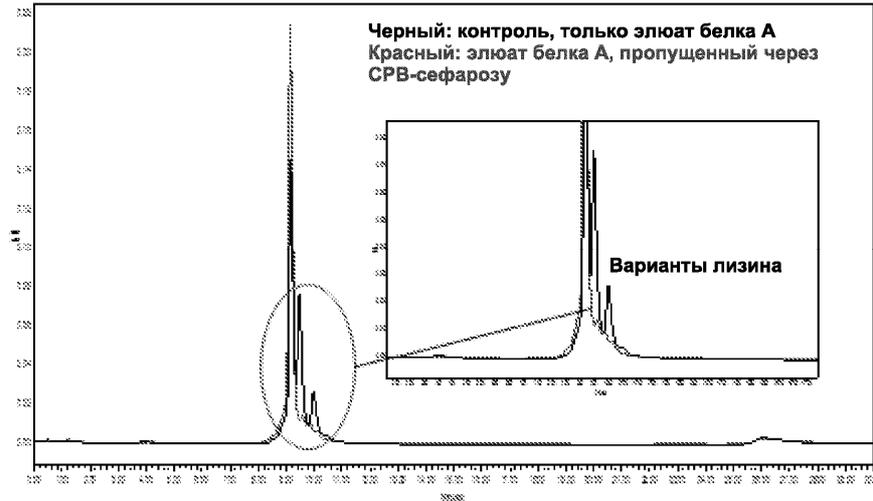
13. Способ по п.2, характеризующийся тем, что указанная мультиколоночная хроматографическая система работает в непрерывном режиме.



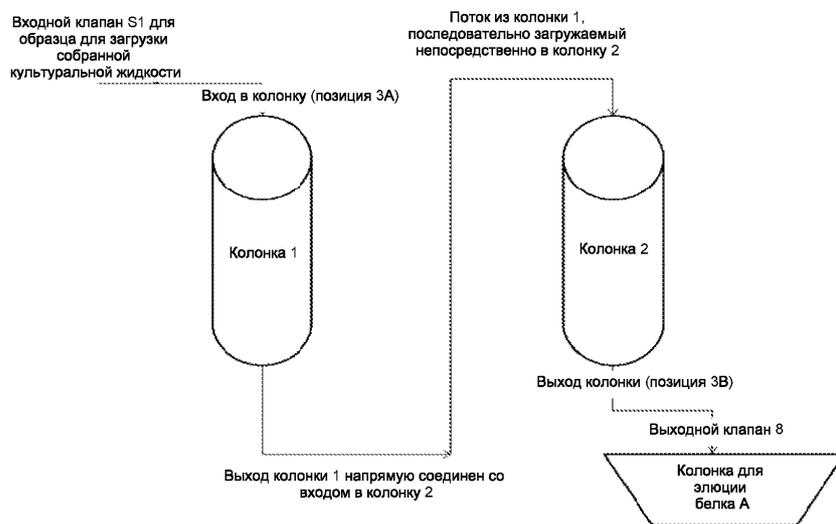
Фиг. 1



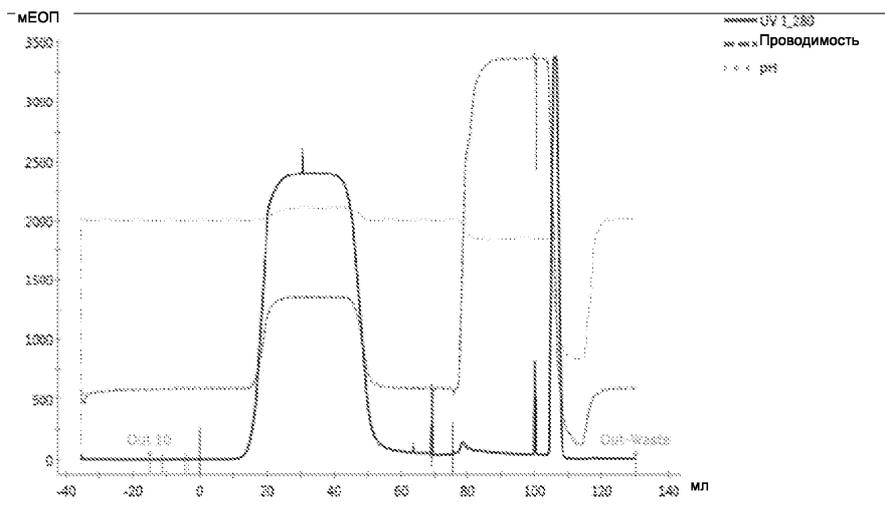
Фиг. 2



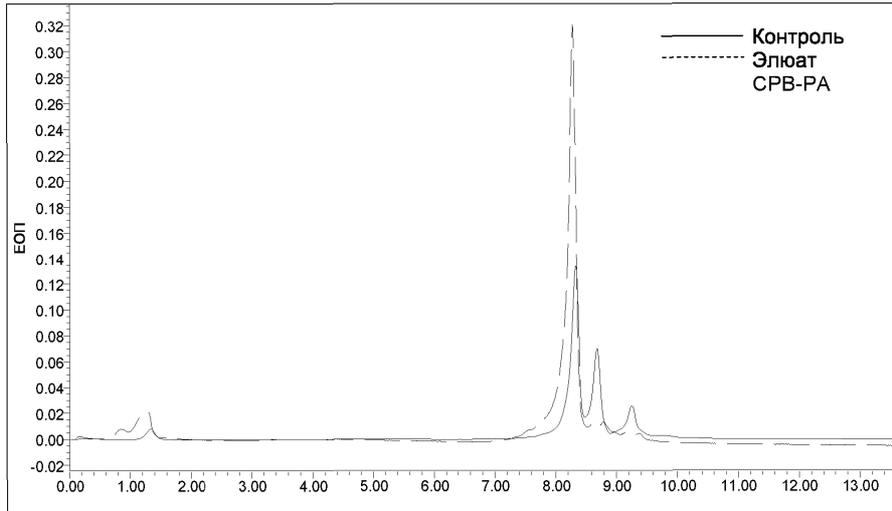
Фиг. 3



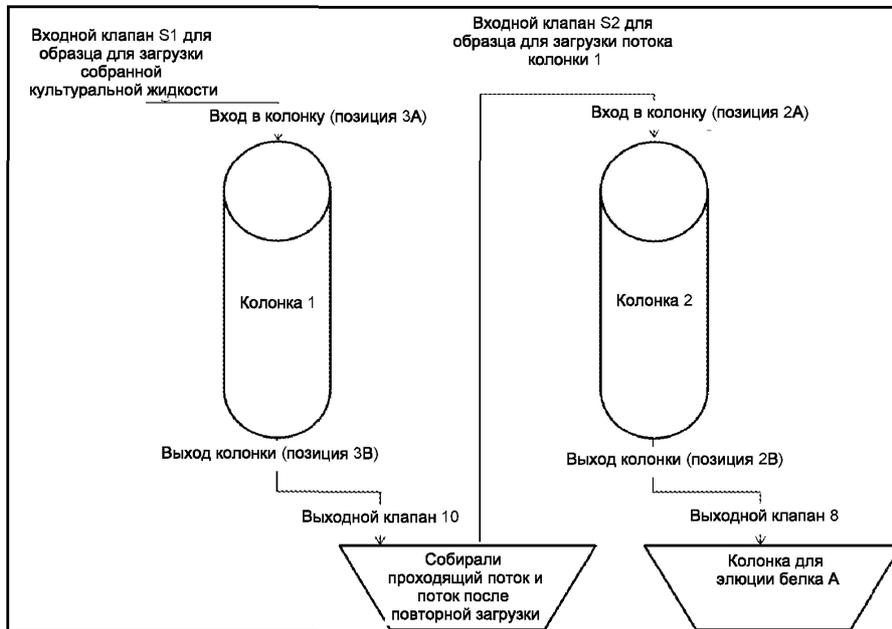
Фиг. 4



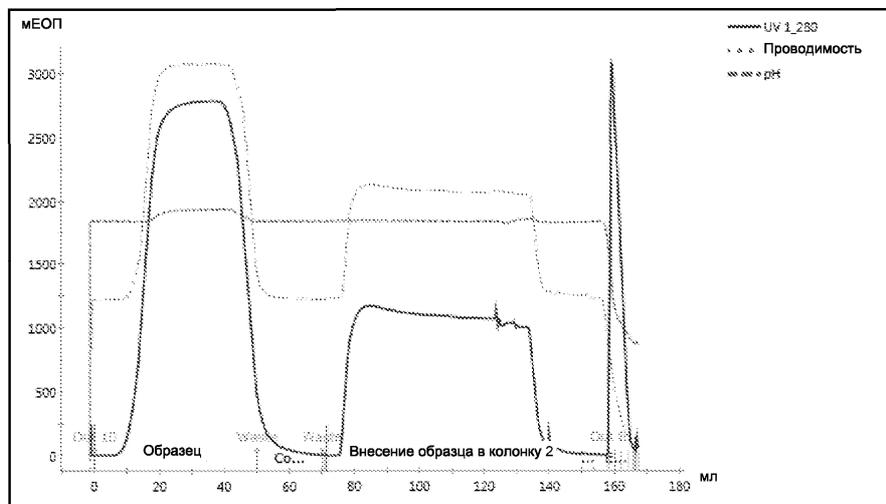
Фиг. 5



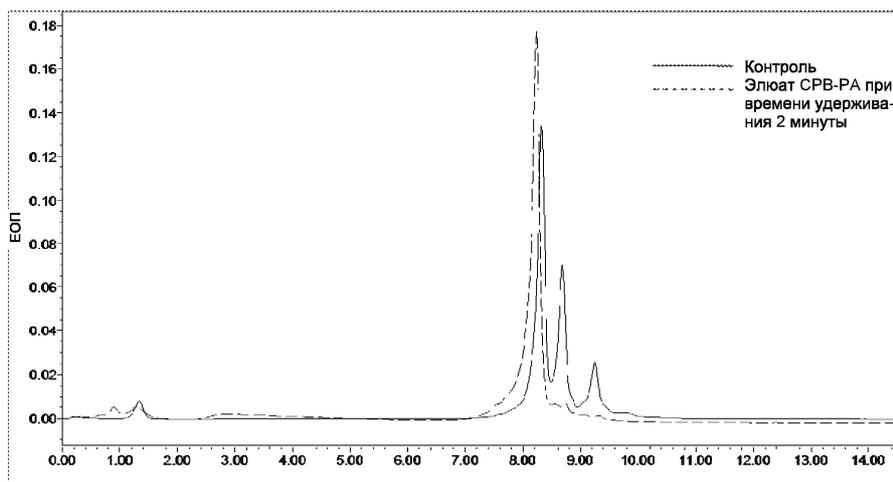
Фиг. 6



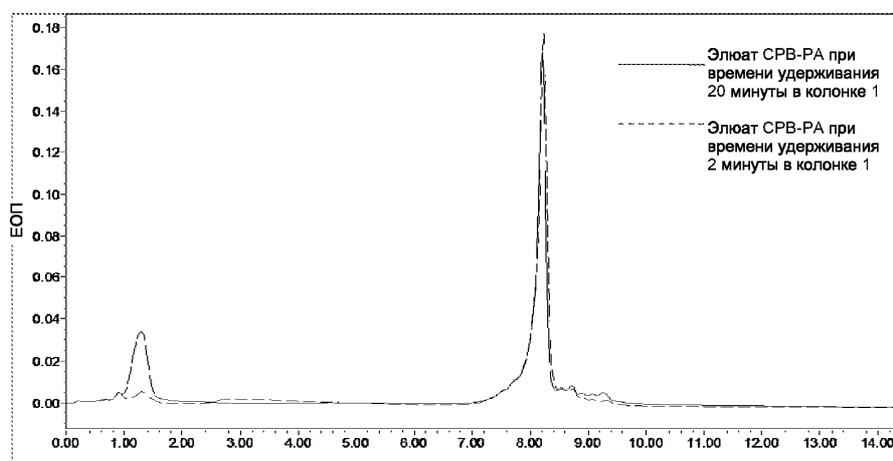
Фиг. 7



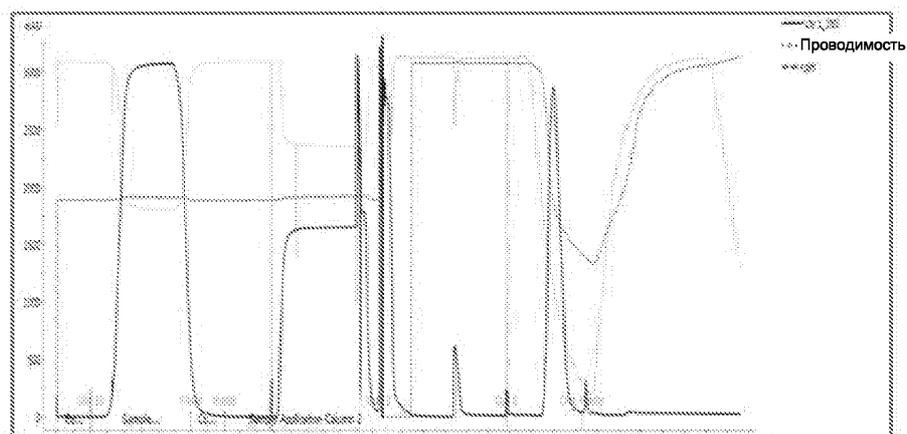
Фиг. 8



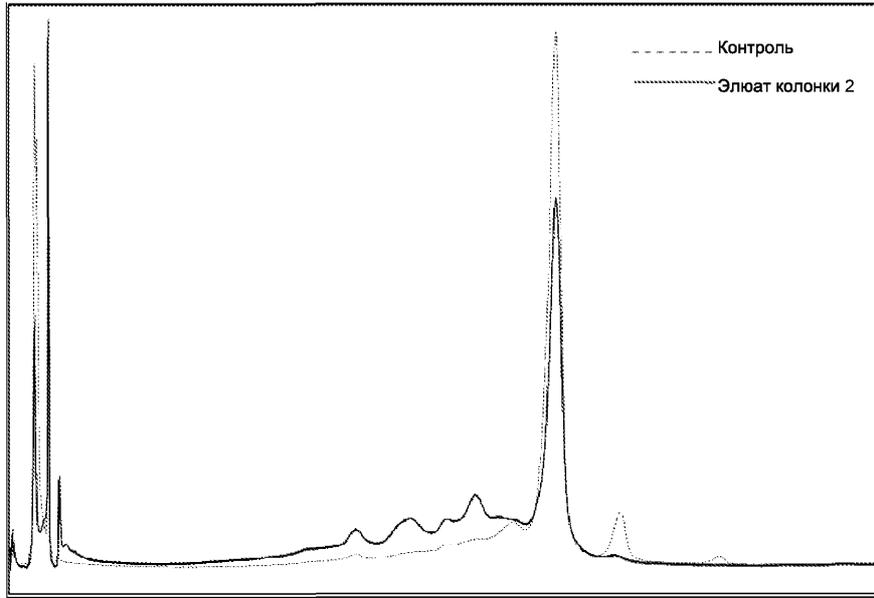
Фиг. 9



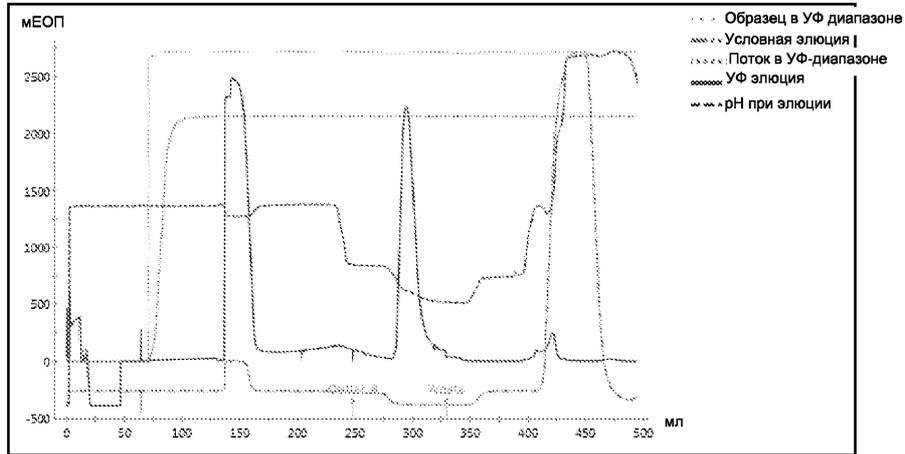
Фиг. 10



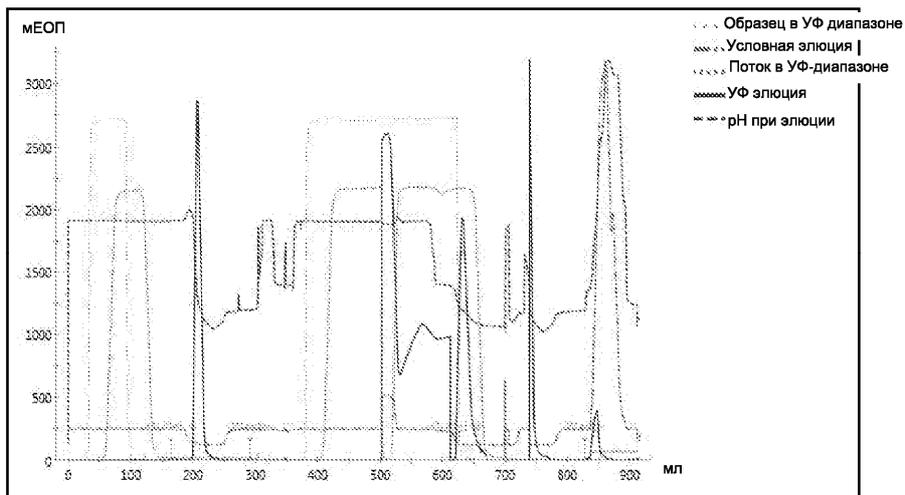
Фиг. 11



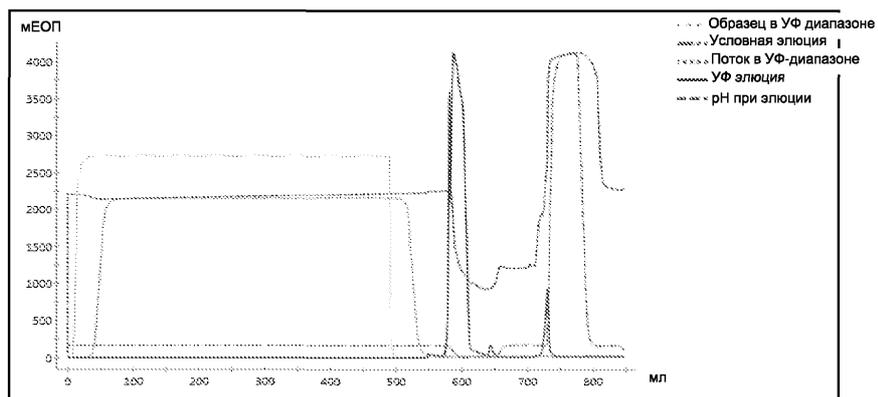
Фиг. 12



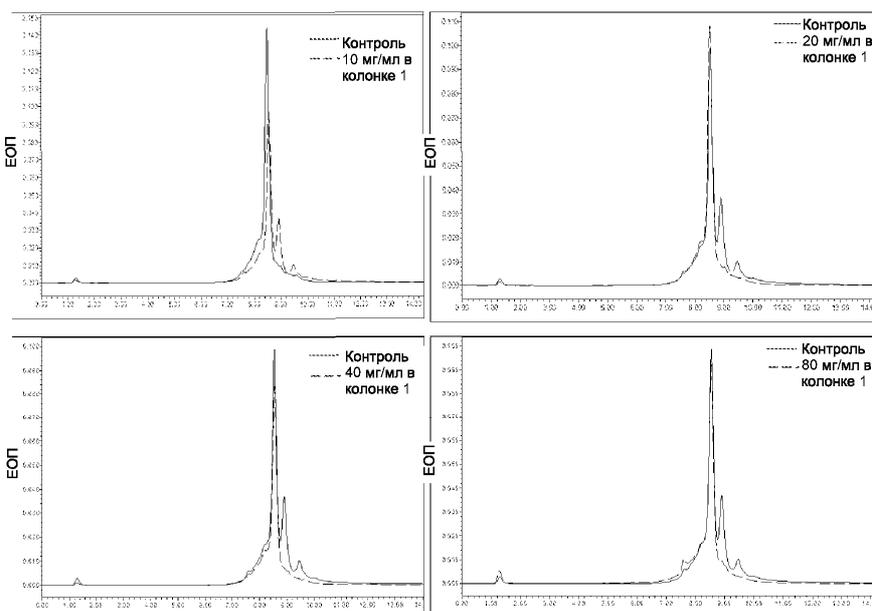
Фиг. 13



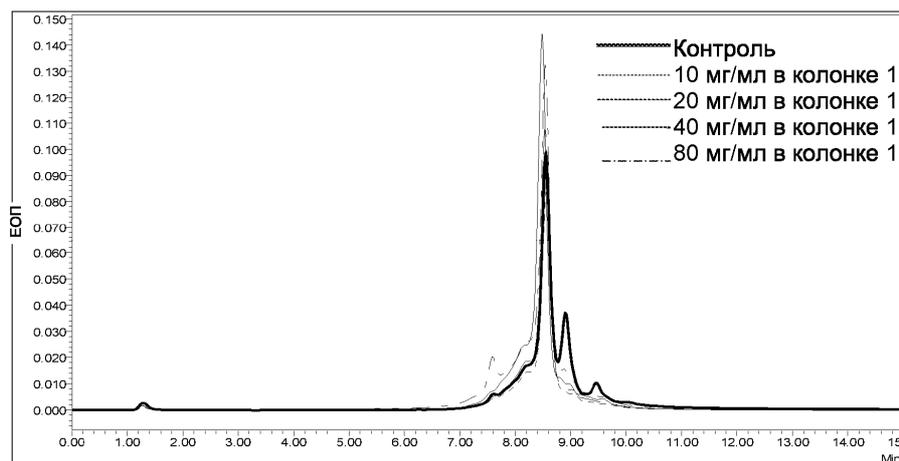
Фиг. 14



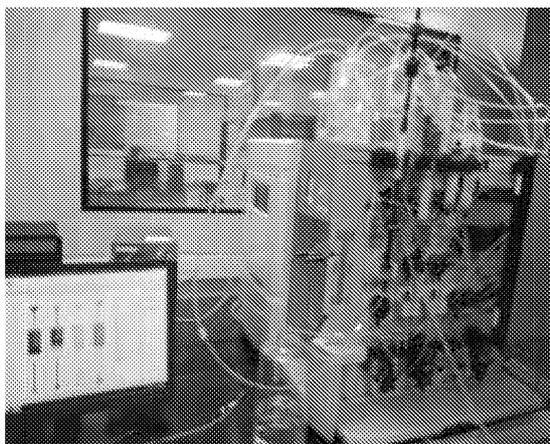
Фиг. 15



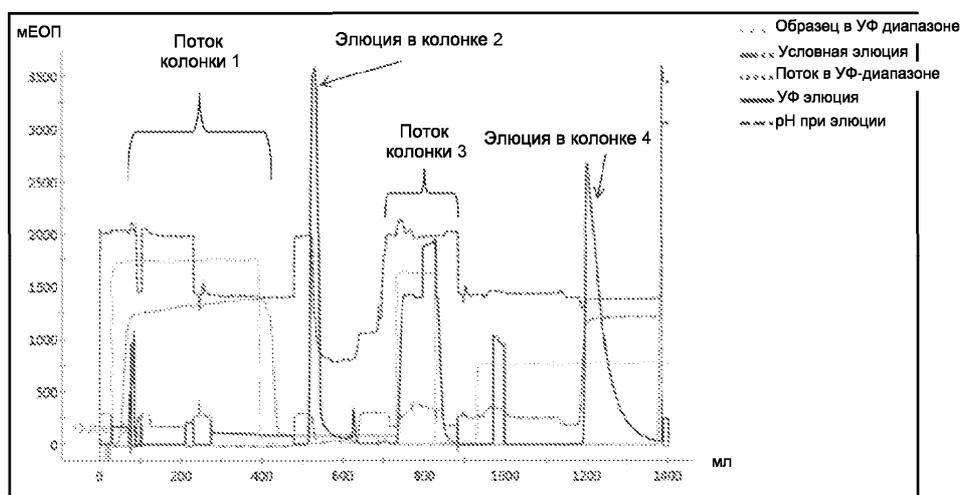
Фиг. 16



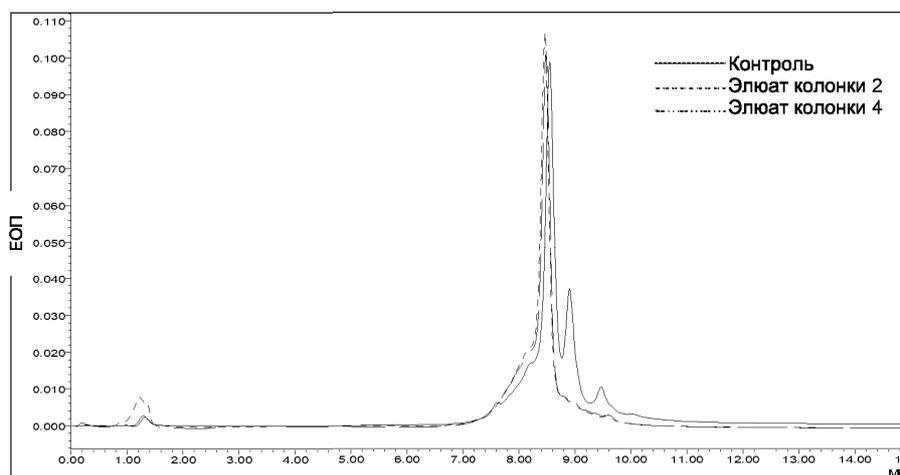
Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20

