

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047148**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2024.06.10

(21) Номер заявки

202293255

(22) Дата подачи заявки

2021.05.11(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)**C07K 1/20** (2006.01)**C07K 1/22** (2006.01)**C07K 1/34** (2006.01)**C07K 1/36** (2006.01)**C07K 16/06** (2006.01)**(54) ОЧИСТКА ОТ ВИРУСОВ ПОСРЕДСТВОМ ВЫДЕРЖКИ ПРИ НИЗКОМ ЗНАЧЕНИИ pH**(31) **63/023,154**(32) **2020.05.11**(33) **US**(43) **2023.01.11**(86) **PCT/US2021/031825**(87) **WO 2021/231463 2021.11.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

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

(72) Изобретатель:

Дэйа Джина, Кьюсик Валери Энн,**Маттила Джон (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) BRORSON KURT ET AL.: "Bracketed generic inactivation of rodent retroviruses by low pH treatment for monoclonal antibodies and recombinant proteins", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, WILEY, US, vol. 82, no. 3, 5 May 2003 (2003-05-05), pages 321-329, XP002576168, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/BIT.10574 Results

LI J.J. ET AL.: "Monoclonal Antibody Aggregate Polishand Viral Clearance Using HydrophobicInteraction Chromatography", THERMOFISHER SCIENTIFIC, vol. 17, no. 11-12, 1 November 2019 (2019-11-01), pages 1-7, XP002802707, the whole document page 4 - page 5

Anonymous: "Viral Safety - Practical Solutions for Risk Control", 1 June 2018 (2018-06-01), pages 1-39, XP055713559, Retrieved from the Internet:URL:https://www.pall.com/content/dam/pall/biopharm/lit-library/gated/special/19-07511-USD3364-Virus-Safety-Practical-Solutions-Risk-Control-BOOK-EN.PDF [retrieved on 2020-07-10] page 6, right-hand column, paragraph 2-3 page 10, middle column, paragraph 2 page 14, middle column, paragraph 1

(57) Предлагаются методы очистки от вирусов с использованием выдержки при низком pH, основанные на статистическом плане эксперимента. Оценивают несколько факторов, чтобы охарактеризовать влияние этапа удержания с низким pH на инактивацию вируса, включая факторы условий pH, условий проводимости, типа белка, температуры, кислотного титранта, времени введения и фильтрации после введения. В дополнение к влиянию pH на инактивацию вируса, увеличение ионной силы за счет управления проводимостью может быть ключевым компонентом, влияющим на кинетику инактивации вируса.

B1**047148****047148 B1**

Перекрестная ссылка на родственную заявку

Настоящая заявка заявляет приоритет согласно заявке на патент США № 63/023,154, поданной 11 мая 2020 г., которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Настоящее изобретение в целом относится к способам инактивации вирусных частиц в образце белка с использованием стадии выдержки при низком значении рН. Статистический дизайн эксперимента, включающий несколько факторов, используется для оценки и характеристики влияния этапа удержания низкого рН на инактивацию вируса.

Уровень техники

Биологические продукты подвержены контаминации (как эндогенными контаминантами, так и адвентивными (поступающими из внешних источников) контаминантами) бактериями, грибами и вирусами. Очистка от вирусов, например инактивация вирусов, является важным этапом при производстве биофармацевтических продуктов, полученных с использованием клеточных линий млекопитающих. Органы Всемирной охраны здоровья требуют оценки очистки от вирусов для производства биологических препаратов или биотехнологических препаратов, поскольку вирусная контаминация может увеличиваться во время роста культуры клеток млекопитающих. Эффективные исследования очистки от вирусов являются важной частью валидации процесса, которая также важна для обеспечения безопасности лекарств. Контаминация вирусами может повлиять на сырье, процессы культивирования клеток, биореактор и последующие процессы очистки.

Вирусные валидационные исследования предназначены для документирования выбранных рабочих условий в отношении качества продукта для обеспечения вирусной безопасности. Экспериментальный дизайн исследований по очистке от вирусов включает характеристику производственного процесса для выявления важных факторов развития, чтобы улучшить понимание условий обработки и обосновать выбор наилучших условий. Процессы инактивации или удаления вирусов включают воздействие на рН, термообработку, воздействие растворителем/детергентом, фильтрацию или хроматографию. Механизм инактивации вируса при инкубации при низком рН включает химическую реакцию на основе рН, вызывающую необратимую денатурацию поверхностных гликопротеинов или разрушение липидной оболочки вируса.

Условия рН, адаптированные к производственным процессам биофармацевтических продуктов, могут оказаться неэффективными для инактивации вирусов. Однако рН, необходимый для инактивации вируса, может значительно отличаться от диапазонов рН, используемых в других производственных условиях. Применение инкубации при низком рН для эффективной инактивации вирусов в образцах белка является сложной задачей для производства биофармацевтических продуктов, поскольку воздействие низкого рН на биофармацевтические продукты может изменить качество или стабильность белков. Следует принимать во внимание, что существует потребность в способах, используемых для оценки и характеристики влияния этапа удержания низкого рН на инактивацию вируса при производстве биофармацевтических продуктов. Эти методы должны обеспечивать эффективный и надежный экспериментальный дизайн, чтобы гарантировать инактивацию вируса для разработки производственного процесса, такого как процесс очистки.

Сущность изобретения

В данном изобретении предложены способы очистки от вирусов с использованием выдержки при низком рН, основанные на статистическом дизайне экспериментов, включающем несколько факторов для оценки и характеристики влияния стадии выдержки при низком рН на инактивацию вируса. Статистически спланированный эксперимент используется для оценки влияния на инактивацию вируса значений рН, условий ионной силы, изотипа белка, температуры, кислотного титранта, расчета времени введения и фильтрации после введения. Эти методы можно использовать для прогнозирования эффективной очистки, когда стадию вирусной инактивации проводят в диапазоне примерно рН 3,60-3,90, например, путем манипулирования ионной силой исходного материала с низким рН.

Данное изобретение обеспечивает способ очистки пептида или белка, такого как антитело, из образца, содержащего одну или несколько примесей, включая вирусные частицы. В некоторых типовых вариантах реализации способ по данной заявке включает: корректировку условий ионной силы образца, корректировку рН образца до кислого рН и последующее поддержание образца в условиях ионной силы и уровня рН по меньшей мере около 15 мин для инактивации некоторого количества вирусных частиц; при этом образец содержит одну или несколько примесей, включая вирусные частицы. В одном аспекте, количество инактивированных вирусных частиц составляет по меньшей мере около 3 LRF (логарифмический коэффициент уменьшения) для использования способа по настоящему изобретению. В другом аспекте, количество инактивированных вирусных частиц составляет по меньшей мере около 4 LRF для использования способа по настоящему изобретению.

В одном аспекте рН образца в способе по настоящему изобретению меньше или равен около рН 3,90. В другом аспекте рН образца находится в диапазоне от около рН 3,60 до около рН 3,90. В другом аспекте рН образца находится в диапазоне от около рН 3,65 до около рН 3,80. В другом аспекте пептид или белок в образце представляет собой антитело, продуцируемое в клетке-хозяине. Еще в одном аспекте, образец в способе по настоящему изобретению выдерживают при условиях ионной силы и рН

образца в течение по меньшей мере около 30 мин для инактивации количества вирусных частиц. В одном аспекте, образец в способе по настоящему изобретению выдерживают при условиях ионной силы и рН образца в течение от около 15 мин до около 30 мин для инактивации количества вирусных частиц.

В одном аспекте способ по настоящему изобретению дополнительно включает оптимизацию инактивации количества вирусных частиц путем проведения D-оптимального плана эксперимента. В другом аспекте D-оптимальный дизайн эксперимента оценивает следующие факторы: состояние рН образца и концентрацию соли, добавленной к образцу. В одном аспекте D-оптимальный дизайн эксперимента дополнительно оценивает следующие факторы: тип пептида или белка, температуру образца, кислотный титрант для регулирования состояния рН образца, расчет времени введения для введения вирусных частиц в пробу или наличие фильтрации после введения.

В одном аспекте, образец в способе по настоящему изобретению представляет собой элюент хроматографии с белком А. В другом аспекте, ионную силу образца регулируют добавлением хлорида натрия, при этом концентрация хлорида натрия находится в диапазоне от около 1 мМ до около 100 мМ, от около 1 мМ до около 500 мМ, около 25 мМ, около 50 мМ, около 72 мМ, около 100 мМ, около 125 мМ, около 150 мМ, около 175 мМ или около 200 мМ. В одном аспекте рН образца регулируют с помощью фосфорной кислоты или глицина HCl. В другом аспекте, пептид или белок в образце по способу представляет собой антитело, имеющее изотип IgG1 или имеющее изотип IgG4. В одном аспекте пептид или белок представляет собой моноклональное антитело или биспецифическое антитело. В еще одном аспекте, пептид или белок представляет собой антитело, фрагмент антитела, Fab-участок антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок, белковый фармацевтический продукт или лекарственное средство.

Данное изобретение обеспечивает способ получения препарата, содержащего представляющий интерес белок и уменьшенное количество инфекционных вирусных частиц, из образца, содержащего представляющий интерес белок и инфекционную вирусную частицу. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения, способ получения препарата, содержащего представляющий интерес белок и уменьшенное количество инфекционных вирусных частиц, из образца, содержащего представляющий интерес белок и инфекционную вирусную частицу, включает воздействие на образец рН, при значении рН около 3,60 и условие ионной силы добавлением соли с концентрацией до около 100 мМ; и поддержание образца в условиях рН и ионной силы в течение соответствующего периода времени для получения препарата, содержащего интересующий белок и уменьшенное количество инфекционных вирусных частиц.

В одном аспекте, концентрация интересующего белка в образце составляет менее около 25 г/л.

В одном аспекте, соответствующее количество времени составляет около 15 мин, около 20 мин, около 25 мин или около 30 мин.

В одном аспекте, способ снижает количество инфекционных вирусных частиц из образца на около 3 LRF (логарифмический коэффициент уменьшения). В другом аспекте способ снижает количество инфекционных вирусных частиц из образца на около 4 LRF.

В одном аспекте, рН образца больше около 3,70. В другом аспекте, рН образца больше около 3,80. В еще одном аспекте, рН образца больше около рН 3,90. В еще одном аспекте, рН образца больше около рН 4,0.

В одном аспекте, рН образца находится в диапазоне от около рН 3,60 до около рН 4,0. В другом аспекте, рН образца находится в диапазоне от около рН 3,70 до около рН 4,0. В еще одном аспекте, рН образца находится в диапазоне от около рН 3,80 до около рН 4,0.

Примеры источников "образца" могут включать аффинную хроматографию, такую как элюат белка А; образец может быть получен из проточной фракции методом ионообменной хроматографии; его также можно получить из полоски ионообменной колонки - существуют другие источники в процессе очистки, хорошо известные специалистам в данной области, из которых можно получить образец. В одном аспекте данного изобретения, образец представляет собой элюент хроматографии с белком А.

В одном аспекте, ионную силу образца регулируют добавлением хлорида натрия, при этом концентрация хлорида натрия находится в диапазоне от около 1 мМ до около 200 мМ.

В одном аспекте, значение ионной силы регулируют с помощью хлорида натрия с концентрацией более около 50 мМ. В другом аспекте данного изобретения, концентрация превышает около 100 мМ.

В одном аспекте, рН образца регулируют с помощью фосфорной кислоты или глицина HCl.

Эти и другие аспекты изобретения будут лучше оценены и поняты при рассмотрении вместе со следующим описанием и прилагаемыми графическими материалами. Следующее описание, хотя и указывает на различные варианты реализации и их многочисленные конкретные детали, приведено в качестве иллюстрации, а не ограничения. Многие замены, модификации, добавления или перегруппировки могут быть выполнены в пределах объема изобретения.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1А демонстрирует метод регулирования-введения-повторная регулировка, в котором образцы доводят/титруют до целевого рН, затем вносят вирусный раствор при около рН 7,2 с последующим повторным регулированием рН образцов до целевого рН перед выдержкой при желаемой температуре,

для остальной части значения pH поддерживают согласно примерному варианту реализации изобретения. Отсчет времени начинается во время введения.

Фиг. 1В демонстрирует метод введения-регулирования, при котором образцы сначала вводят к исходному раствору вируса, а затем регулируют/титруют до целевого pH в соответствии с примерным вариантом реализации изобретения. Отсчет времени начинается со времени достижения целевого pH образцом.

Фиг. 2А демонстрирует матрицу точечных графиков и многомерные корреляции дизайна D-оптимальной модели для исследования влияния нескольких факторов, связанных со стадией поддержания низкого pH для инактивации вируса в соответствии с примерным вариантом реализации изобретения.

Фиг. 2В демонстрирует нейтральные контроли, которые были выполнены для каждого состояния соли моноклонального антитела. Целью этого контроля является обеспечение того, что измеренная вирусная активность была результатом химической инактивации при низком pH в соответствии с примерным вариантом реализации изобретения.

Фиг. 3А демонстрирует кинетику инактивации X-MuLV при целевом pH 3,65 согласно примерному варианту реализации изобретения. Кривые LRF при целевом pH 3,65 были получены путем построения графика зависимости значений LRF от временных точек согласно с примерным вариантом реализации изобретения.

Фиг. 3В демонстрирует кинетику инактивации X-MuLV при целевом pH 3,73 согласно примерному варианту реализации изобретения. Кривые LRF при целевом pH 3,73 были получены путем построения графика зависимости значений LRF от временных точек согласно с примерным вариантом реализации изобретения.

Фиг. 3С демонстрирует кинетику инактивации X-MuLV при целевом pH 3,80 согласно примерному варианту реализации изобретения. Кривые LRF при целевом pH 3,80 были получены путем построения графика зависимости значений LRF от временных точек согласно с примерным вариантом реализации изобретения.

Фиг. 4А демонстрирует кинетику инактивации X-MuLV при 0 мМ NaCl при различных условиях целевого pH, например при около pH 3,65, pH 3,73 или pH 3,80 согласно с примерным вариантом реализации. Кривые LRF были получены путем построения графика значений LRF в зависимости от временных точек для различных условий целевого pH в соответствии с примерным вариантом реализации.

Фиг. 4В демонстрирует кинетику инактивации X-MuLV при 50 мМ NaCl при различных условиях целевого pH, например при около pH 3,65, pH 3,73 или pH 3,80 согласно с примерным вариантом реализации изобретения. Кривые LRF были получены путем построения графика значений LRF в зависимости от временных точек для различных условий целевого pH согласно с примерным вариантом реализации.

Фиг. 4С демонстрирует кинетику инактивации X-MuLV при 100 мМ NaCl при различных значениях целевого pH, например при около pH 3,65, pH 3,73 или pH 3,80 согласно с примерным вариантом реализации. Кривые LRF были получены путем построения графика значений LRF в зависимости от временных точек для различных значений целевого pH согласно с примерным вариантом реализации изобретения.

Фиг. 4D демонстрирует прогнозируемый профайлер, включающий измерения параметров для оценки рабочих условий, содержащих около 25 мМ NaCl при около pH 3,70-3,75 согласно с примерным вариантом реализации изобретения.

Фиг. 4Е демонстрирует прогнозируемый профайлер, включающий измерения параметров для оценки рабочих условий, содержащих около 50 мМ NaCl при около pH 3,70-3,75, согласно с примерным вариантом реализации изобретения.

Фиг. 4F демонстрирует прогнозируемый профайлер, включающий измерения параметров для оценки рабочих условий, содержащих около 80 мМ NaCl при около pH 3,70-3,75 согласно с примерным вариантом осуществления. Величина эффекта фильтрации после введения была минимальной и не учитывалась в общем прогнозирующем профайлере.

Фиг. 5А демонстрирует фактические значения по сравнению с прогнозируемыми многомерными моделями линейной регрессии для LRF для 15-минутных временных точек согласно примерному варианту реализации изобретения.

Фиг. 5В демонстрирует фактические значения по сравнению с прогнозируемыми многомерными моделями линейной регрессии для LRF для 30-минутных временных точек согласно примерному варианту реализации.

Фиг. 6 демонстрирует прогнозирующий профайлер, который был создан для оптимизации модели для достижения более 4 LRF после 15- и 30-минутных временных точек согласно примерному варианту реализации. Прогнозирующий профайлер представлял инактивацию X-MuLV как функцию значимых факторов, оцененных в D-оптимальном DoE согласно примерному варианту реализации изобретения.

Фиг. 7 демонстрирует прогнозируемые профайлеры, включающие в себя прогнозные показатели параметров для некоторых существующих рабочих условий при около рН 3,70-3,75 для выдержки при низком рН согласно примерному варианту реализации изобретения. Величина эффекта фильтрации после введения была минимальной и не учитывалась в общем прогнозирующем профайлере.

Фиг. 8 демонстрирует прогнозируемые профайлеры, включающие в себя прогнозные показатели параметров для измененных рабочих условий при около рН 3,65-3,70 для выдержки при низком рН согласно примерному варианту реализации изобретения. Величина эффекта фильтрации после введения была минимальной и не учитывалась в общем прогнозирующем профайлере.

Фиг. 9 демонстрирует размер эффекта для оцениваемых факторов, включая NaCl, рН, кислотный титрант, температуру, тип белка (mAb, моноклональное антитело), расчет времени введения и их комбинации, а также X-MuLV LRF через 30 мин для типов белков, включая IgG1 и IgG2, на основе ретроспективных данных согласно примерному варианту реализации изобретения.

Фиг. 10 демонстрирует размер эффекта для оцениваемых факторов, включая NaCl, рН, кислотный титрант, температуру, тип белка (mAb, моноклональное антитело), расчет времени введения и их комбинации, а также LRF ретровируса для различных температурных условий на основе ретроспективных промышленных данных согласно примерному варианту реализации изобретения.

Фиг. 11 демонстрирует размер эффекта для оцениваемых факторов, включая NaCl, рН, кислотный титрант, температуру, тип белка (mAb, моноклональное антитело), расчет времени введения и их комбинации, а также время для введения/корректировки для двух способов согласно примерному варианту реализации.

Подробное описание сущности изобретения

Очистка от вирусов важна для производства биофармацевтических продуктов, особенно для биофармацевтических продуктов, которые производятся с использованием клеточных линий млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомяка (CHO). При разработке процесса очистки важно обеспечить очистку от вирусов. Типичный рабочий процесс для изучения очистки от вирусов в производственном процессе включает добавление вируса в образец, запуск процесса в масштабированном эксперименте, чтобы имитировать крупномасштабный этап, и документирование возможности очистки от вируса. Процессы инактивации или удаления вирусов включают воздействие на рН, термообработку, воздействие растворителем/детергентом, фильтрацию или хроматографию. Оценка очистки от вируса должна включать демонстрацию удаления определенного модельного вируса для ретровирусоподобных частиц, присущих геному клеток яичника китайского хомяка (CHO) (Anderson et al., *Endogenous origin of defective retrovirus-like particles from a recombinant Chinese hamster ovary cell line*, *Virology* 181(1): 305-311, 1991). Ретровирус представляет собой оболочечный РНК-вирус, который размножается в клетке-хозяине с использованием фермента обратной транскриптазы для получения ДНК из своего РНК-генома. Полученная ДНК затем включается в геном хозяина для репликации. Ксенотропный вирус мышинного лейкоза (X-MuLV) можно использовать в качестве модельного вируса для оценки вирусной инактивации фармацевтических белков клеточного происхождения, полученных из клеток CHO. Вирус мышинного лейкоза (MuLV) представляет собой ретровирус и имеет положительную одноцепочечную смысловую РНК, которая реплицируется с помощью обратной транскрипции. MuLV может вызывать лейкоз у инокулированных мышей.

Уменьшение количества вирусов или вирусная очистка относится к разнице между общим количеством вирусов в исходном образце и конечном образце после выполнения определенного этапа процесса, такого как процесс хроматографии. Способность к уменьшению количества вирусов может быть определена как логарифмическое значение уменьшения (LRV) или логарифмический (\log_{10}) коэффициент уменьшения (LRF) для этапа процесса. Коэффициент уменьшения рассчитывается на основе общей вирусной нагрузки до применения этапа очистки и общего количества вируса после применения этапа очистки. Валидационные исследования на вирусы могут быть проведены для документального подтверждения очистки от известных вирусов, связанных с продуктом, и для оценки эффективности процесса по очистке от потенциальных посторонних вирусных контаминаций путем определения способности процесса к очистке от неспецифических модельных вирусов.

Настоящее изобретение представляет собой статистически спланированный эксперимент, который можно использовать для оценки и характеристики эффектов этапа поддержания низкого рН для инактивации вируса, включая оценку нескольких факторов, таких как изотип белка, состояние рН, температура, кислотный титрант, состояние ионной силы, расчет времени введения или фильтрация после введения. Эти методы можно использовать для прогнозирования эффективной очистки, когда стадию вирусной инактивации проводят в диапазоне рН около 3,60-3,90, путем манипулирования ионной силой за счет увеличения проводимости исходного материала с низким рН. Модели, созданные в результате экспериментов, можно использовать для прогнозирования вирусной очистки, таких как X-MuLV, в диапазоне условий процесса в разных временных точках, таких как через около 15 мин и через около 30 мин. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения, в дополнение к влиянию на значения рН при инактивации вируса, повышение проводимости исходного раствора может увеличить инактивацию вируса. Например, увеличение концентрации хлорида натрия (NaCl) может быть ключевым

компонентом, влияющим на кинетику инактивации вируса для достижения большей инактивации вируса. В одном аспекте, настоящее изобретение обеспечивает преимущества надежной и эффективной инактивации вирусов, такие как более чем около 4 LRF для инактивации X-MuLV, что может быть достигнуто за счет увеличения ионной силы начального низкого pH.

В соответствии с ICH Q5A (R1) (Оценка вирусной безопасности продуктов биотехнологии, полученных из клеточных линий человеческого или животного происхождения. Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для человека. Текущая версия 4, 23 сентября 1999 г.), последующие процессы очистки биофармацевтических продуктов разрабатываются для обеспечения удаления и/или инактивации эндогенных или посторонних вирусных загрязнителей. Типичные последующие процессы очистки могут включать несколько этапов очистки от ортогональных вирусов, в том числе один специальный этап для инактивации оболочечных вирусов. Инкубация при низком значении pH может быть использована для инактивации вируса в оболочке, например, для необратимой денатурации капсида (Brorson et al., Bracketed generic inactivation of rodent retroviruses by low pH treatment for monoclonal antibodies and recombinant proteins, *Biotechnol Bioeng* 82(3): 321-329, 2003). Фильтрация представляет собой удаление на основе размера, которое можно использовать для удаления вирусов как с оболочкой, так и без оболочки ((Lute et al., Phage passage after extended processing in small-virus-retentive filters, *Biotechnol Appl Biochem* 47(Pt 3): 141-151, 2007). Стадии хроматографии могут быть использованы для очистки биологических продуктов с потенциалом снижения количества вирусов для очистки от вирусов, таких как пользование хроматографии с белком А (Bach et al., Clearance of the rodent retrovirus, XMuLV, by protein A chromatography, *Biotechnol Bioeng* 112(4): 743750, 2015) или анионообменной хроматографии (Strauss et al., Anion exchange chromatography provides a robust, predictable process to ensure viral safety of biotechnology products, *Biotechnol Bioeng* 102(1): 168-175, 2009a).

Инактивация вирусов при низком pH обычно выполняется после этапа захвата белка А для инактивации вирусов во время очистки биофармацевтических продуктов, таких как моноклональные антитела. Продукт, элюированный при хроматографии с белком А, обычно имеет низкий pH, который дополнительно подкисляют и выдерживают не менее 30 мин для инактивации вируса. Механизм инактивации вируса заключается, прежде всего, в химической реакции, основанной на pH, которая вызывает необратимую денатурацию поверхностных гликопротеинов или разрушение липидной оболочки вируса (Brorson et al., *supra*). По завершении поддержания pH продукт нейтрализуют и направляют на дальнейшую переработку. Было замечено, что стадия низкого pH надежно продуцирует 4 LRF крупных оболочечных вирусов (Miesegaes et al., Analysis of viral clearance unit operations for monoclonal antibodies. *Biotech Bioeng.* 2019; 106:238-246). Предыдущие исследования показывают, что ионная сила может влиять на кинетику инактивации X-MuLV. Условия эксперимента с повышенной ионной силой, такие как более высокие концентрации буфера или более высокие концентрации белка при титровании слабой кислоты, могут коррелировать с более высокими LRV при pH 3,7 и 3,8. (Chinniah et al., Characterization of operating parameters for XMuLV inactivation by low pH treatment, *Biotechnol Prog.* 2016. Jan-Feb; 32,(1), 89-97, doi: 10.1002/btpr.2183. Epub 2015 Nov 5).

Были проведены исследования, чтобы понимать клиренс вируса по удержанию низкого pH. Эти исследования подтверждают химическую реакцию на основе pH, на которую влияют pH, время и температура (Brorson et al.). Поскольку стадия инактивации является надежной, Brorson et al. разработали "общий клиренс в квадратных скобках", в котором инактивация при низком pH выполняется в значениях pH ниже или равном pH 3,8 и при температуре выше или равной 14°C в течение как минимум 30 мин выдержки для постоянного достижения большего или равного клиренса 4,6 log₁₀ X-MuLV. ASTM (Американское общество по испытаниям и материалам) дополнительно сократило рабочую область при низком уровне pH до уровня ниже или равного pH 3,6 и температуры выше или равной 15°C для достижения значения LRF выше или равного 5,0 в соответствии с ASTM E2888-12 (ASTM. E2888-12: Standard Practice for Process for Inactivation of Rodent Retrovirus by pH. West Conshohocken, PA: ASTM International; 2012. <http://www.astm.org>). Кроме того, согласно ASTM E2888-12 время выдержки равно или превышает 30 мин.

Со временем руководство было пересмотрено, чтобы снизить pH содержания для достижения более высоких LRF. Чтобы претендовать на общий допуск, предусмотренный ASTM E2888-12, интересующий белок должен соответствовать общему шаблону, который определяет документ. Эффективная инактивация вируса может быть особенно сложной задачей для биофармацевтических продуктов, таких как моноклональные антитела, поскольку воздействие на белки низкого pH может изменить качество или стабильность белков. Органы здравоохранения ожидают, что удержание низкого pH будет подтверждено в наихудших условиях. Это указывает на то, что инактивация ретровируса определяется в значениях pH, превышающих фактический производственный диапазон. Удаление вируса может быть нарушено, если стадия инактивации проводится за пределами этих диапазонов.

В некоторых типовых вариантах реализации изобретения, в настоящей заявке представлен статистически спланированный эксперимент, например план эксперимента, включающий

контролируемые и неконтролируемые факторы, связанные со стадией инактивации при низком рН, для определения влияния типа белка, состояния рН, температуры, кислотного титранта, содержания NaCl, расчета времени введения или фильтрации после введения при инактивации вируса в разных временных точках. В некоторых аспектах настоящее изобретение обеспечивает экспериментальные факторы и условия для определения рабочих условий для надежной и эффективной очистки от вирусов. В некоторых аспектах X-MuLV выбран в качестве модели эндогенного оболочечного вируса. В некоторых аспектах два типа моноклональных антител, таких как IgG1 или IgG4, подвергаются тестированию различных параметров, таких как рН, температура, кислотный титрант, ионная сила, расчет времени введения или фильтрация после введения.

План эксперимента, например план экспериментов или DoE, настоящего изобретения для многомерного анализа включает в себя характеристики инактивации вируса при удержании низкого рН. DoE представляет собой процедуру исследования, которая допускает систематические изменения нескольких факторов протекания процесса в контексте одного плана эксперимента. Результаты DoE можно использовать для создания математических моделей исследуемого процесса. Применяя данные математические модели, можно определить истинный оптимум исследуемого процесса. Применение результатов DoE включает устранение несущественных факторов протекания процесса, определение критических факторов протекания процесса для дальнейшего изучения и прогнозирования эффективности исследуемого процесса. DoE выполняется в систематическом логическом потоке, включая постановку целей, выбор переменных факторов и моделей, создание планов эксперимента для поддержки моделей, сбор данных на основе планов, выполнение анализа, проверку моделей с помощью контрольных точек и отчет о результатах. Результаты DoE и полученные модели могут быть использованы для подтверждения, отклонения или изменения существующего понимания механизма удержания низкого рН для очистки от вирусов.

В некоторых типовых вариантах реализации, данное изобретение предоставляет способ очистки антитела из образца, содержащего одну или несколько примесей, включая потенциально инфекционные вирусные частицы, причем способ по настоящему изобретению включает: регулирование состояния ионной силы образца, доведение состояния рН образца до кислого значения рН, и последующее поддержание образца в условиях ионной силы и рН в течение по меньшей мере около 15 мин для инактивации некоторого количества вирусных частиц. В одном аспекте, возможность способа по настоящему изобретению инактивировать количество вирусных частиц составляет по меньшей мере около 3 LRF. В другом аспекте, возможность способа по настоящему изобретению инактивировать количество вирусных частиц составляет по меньшей мере около 4 LRF. В другом аспекте пептид или белок в образце представляет собой антитело, продуцируемое в клетке-хозяине. В одном аспекте, антитело представляет собой моноклональное антитело или биспецифическое антитело. В одном аспекте, антитело в способе по настоящему изобретению представляет собой элюент хроматографии с белком А.

В одном аспекте рН образца в способе по настоящему изобретению меньше или равен около рН 3,90. В другом аспекте рН образца находится в диапазоне от около рН 3,60 до около рН 3,90. В другом аспекте рН образца находится в диапазоне от около рН 3,65 до около рН 3,80. В некоторых аспектах, значение рН в статистически спланированном эксперименте по настоящему изобретению находится в диапазоне от около рН 3,65 до около рН 3,80, таких как около рН 3,65, около рН 3,73 или около рН 3,80, что равно или больше, чем диапазон рН производственных процессов. Диапазон рН от 3,65 до 3,80 больше, чем диапазон рН, предложенный ASTM E2888-12, и выходит за его пределы, например, меньше или равен рН 3,6. Известно, что более низкие значения рН могут вызывать более быструю инактивацию вируса (Brogson et al.). В некоторых аспектах, температура в статистически спланированном эксперименте по настоящему изобретению находится в диапазоне от около 15°C до около 20°C, таких как около 15°C или около 20°C, что находится на нижнем пороге или ниже температур производственных процессов. Известно, что более высокая температура может вызывать более быструю инактивацию вируса (Brogson et al.). Температурный диапазон от около 15°C до около 20°C находится в пределах диапазона температур, предложенного ASTM E2888-12, например, больше или равен 15°C. В некоторых аспектах кислотный титрант в статистически спланированном эксперименте по настоящему изобретению представляет собой около 0,25 М фосфорной кислоты или около 0,25 М глицина HCl. В некоторых аспектах, содержание NaCl, добавляемого к исходному материалу в статистически спланированном эксперименте по настоящему изобретению, находится в диапазоне концентраций от около 0 мМ до около 100 мМ.

В некоторых аспектах, способ по настоящему изобретению дополнительно включает оптимизацию инактивации некоторого количества вирусных частиц путем запуска D-Optimal DoE для оценки различных факторов, включая состояние рН образца, проводимость образца, тип пептида или белка, температуру образца, кислотный титрант для корректировки уровня рН образца, время введения вирусных частиц в образец или наличие фильтрации после введения. В некоторых аспектах, синхронизация времени введения в статистически спланированном эксперименте по настоящему изобретению представляет собой метод регуляровка-введения-повторная регуляровка или метод

введение-регулировка. Метод регулировка-введения-повторная регулировка может обеспечить постоянный желаемый диапазон рН в течение всего времени выдержки. Метод введение-регулировка может представлять собой аутентичные производственные условия, при которых промежуточный продукт, содержащий эндогенные ретровирусоподобные частицы, подкисляется от начального рН. Согласно способу регулировка-всплеск-повторная регулировка, как показано на фиг. 1А, образцы регулируют/титруют до целевого рН, а затем вводят вирусный исходный материал, имеющий рН около 7,2. Отсчет времени удержания рН начинался во время введения. В связи с наблюдением за повышением рН после добавления штамма вируса рН образцов снова доводили до целевого рН перед выдержкой при желаемой температуре в течение оставшейся части удержания рН. Согласно способу введение-регулировка, как показано на фиг. 1В, в образцы сначала вводят исходный раствор вируса, а затем регулируют/титруют до целевого рН. При достижении целевого рН начинается отсчет времени удержания рН, и образец инкубируется при желаемой температуре. В некоторых аспектах статистически спланированного эксперимента в соответствии с настоящим изобретением, удержание при низком значении рН может проводиться с фильтрацией после введения или без нее с использованием фильтра, такого как фильтр размером около 0,2 мкм. Фильтрация после введения представляет собой аутентичную производственную операцию, при которой промежуточный продукт, содержащий эндогенные ретровирусоподобные частицы, фильтруется для поддержания стерильности. Стадия фильтрации может привести к монодисперсному вирусу, который может удалить агрегаты вируса.

В некоторых типовых вариантах реализации изобретения, проводимость исходного материала оказывает сильное влияние на кинетику инактивации вируса при различных значениях целевого рН. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения, настоящее приложение предоставляет модели для прогнозирования элиминации вируса в различных условиях процесса. В некоторых аспектах, в дополнение к влиянию рН на инактивацию вируса, повышение ионной силы или проводимости, такое как концентрация NaCl, может быть ключевым компонентом, влияющим на кинетику инактивации вируса. В одном аспекте, значение рН является важным фактором, когда вводимый материал имеет низкую ионную силу. Например, инактивация X-MuLV может зависеть от значений рН при низкой ионной силе. В некоторых аспектах, когда ионная сила увеличивается, влияние значений рН на инактивацию вируса уменьшается. Например, X-MuLV может быть быстро инактивирован при всех целевых значениях рН, когда ионная сила увеличивается. В некоторых аспектах, когда присутствует около 50 мМ или около 100 мМ NaCl, полная и эффективная элиминация вируса, такая как инактивация X-MuLV, наблюдается во временных точках на около 30 минутах для целевых значений рН при около рН 3,65, при рН около 3,73 и около рН 3,80. Для значений рН около рН 3,65 и рН 3,73 полная инактивация X-MuLV наблюдалась через 15 мин. В одном аспекте, ионную силу образца регулируют добавлением хлорида натрия, при этом концентрация хлорида натрия находится в диапазоне от около 1 мМ до около 100 мМ, от около 1 мМ до около 500 мМ, около 50 мМ или около 100 мМ.

Низкий уровень рН при производстве биофармацевтических продуктов может оказать существенное влияние на качество и стабильность белков, таких как моноклональные антитела. Модели по настоящему изобретению можно использовать для прогнозирования эффективной очистки, когда вирусная инактивация осуществляется в диапазоне рН от 3,60 до рН 3,90 путем манипулирования проводимостью исходного материала с низким рН. В некоторых аспектах, настоящее изобретение предусматривает, что увеличение проводимости за счет добавления NaCl к исходному материалу может обеспечить быструю и эффективную инактивацию вируса при различных целевых значениях рН. В одном аспекте, образец в способе по настоящему изобретению выдерживают при условиях ионной силы и рН образца в течение по меньшей мере около 30 мин для инактивации количества вирусных частиц. В одном аспекте, образец в способе по настоящему изобретению выдерживают при условиях ионной силы и рН образца в течение от около 15 мин до около 30 мин для инактивации количества вирусных частиц.

Результаты тестирования статистического DoE для удерживания при низком рН в настоящем изобретении согласуются со стандартом ASTM для инактивации 5,0 LRF X-MuLV при рН менее около 3,60. Результаты также демонстрируют устойчивую и эффективную инактивацию при рН выше около 3,60. Для диапазонов, выходящих за пределы общего заявления ASTM, результаты показывают, что увеличение содержания NaCl может обеспечить быструю и эффективную инактивацию X-MuLV. Как правило, рН выдержки зависит от стабильности белка. Модели настоящего изобретения обеспечивают преимущество прогнозирования эффективной очистки при работе между рН 3,60 и рН 3,90 путем управления проводимостью исходного материала с низким рН.

Требования улучшения качества продукции, эффективности и безопасности биофармацевтических продуктов привели к увеличению спроса на эффективные и надежные экспериментальные схемы для обеспечения инактивации вирусов. Данное раскрытие изобретения обеспечивает способы для удовлетворения вышеупомянутых требований. Примерные варианты реализации изобретения, описанные в данном документе, удовлетворяют вышеупомянутые требования путем предоставления способов очистки антитела из образца, содержащего одну или несколько примесей, включая вирусные частицы. Настоящее изобретение обеспечивает устойчивую и эффективную инактивацию вирусов за счет увеличения ионной силы исходного материала с низким рН и моделей для прогнозирования

эффективной очистки при любом рабочем рН путем манипулирования ионной силой исходного материала с низким рН для удовлетворения долгосрочных потребностей.

Термин "в единственном числе" следует понимать как означающий "по меньшей мере, один"; и термины "около" и "приблизительно" следует понимать как допускающие стандартные вариации, как их понимают специалисты в данной области техники; и там, где указаны диапазоны, включаются и конечные точки. Используемые в контексте данного документа термины "включают", "включает" и "включающий" не имеют ограничительного характера и понимаются как означающие "содержат", "содержит" и "содержащий", соответственно.

В некоторых типовых вариантах реализации, данное изобретение обеспечивает способ очистки пептида или белка, такого как антитело, из образца, содержащего одну или несколько примесей, включая вирусные частицы. В некоторых типовых вариантах реализации, способ по данному изобретению включает: корректировку условий ионной силы образца, корректировку рН образца до кислого рН и последующее поддержание образца в условиях ионной силы и уровня рН по меньшей мере около 15 мин для инактивации некоторого количества вирусных частиц. В другом аспекте пептид или белок в образце представляет собой антитело, продуцируемое в клетке-хозяине. В одном аспекте, пептид или белок представляет собой моноклональное антитело или биспецифическое антитело. В одном аспекте, пептид или белок представляет собой антитело, фрагмент антитела, Fab-участок антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок, белковый фармацевтический продукт или лекарственное средство.

Используемый в данном документе термин "белок" или "белок, представляющий интерес" может включать любой полимер аминокислоты, имеющий ковалентно связанные амидные связи. Белки содержат одну или несколько полимерных цепей аминокислот, широко известных в данной области техники как "полипептиды". "Полипептид" относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, родственных природных структурных вариантов и их синтетических неприродных аналогов, связанных пептидными связями, родственных природных структурных вариантов и их синтетических неприродных аналогов. "Синтетические пептиды или полипептиды" относится к не встречающимся в природе пептидам или полипептидам. Синтетические пептиды или полипептиды могут быть синтезированы, например, с использованием автоматического синтезатора полипептидов. Специалистам в данной области техники известны различные методы твердофазного синтеза пептидов. Белок может содержать один или несколько полипептидов для образования одной функционирующей биомолекулы. Еще один примерный аспект, белок может включать фрагменты антител, нанотела, химеры рекомбинантных антител, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т.п. Белок может включать любой из биотерапевтических белков, рекомбинантных белков, используемых в исследованиях или терапии, белков-ловушек и других слитых белков химерного рецептора Fc, химерных белков, антител, моноклональных антител, поликлональных антител, человеческих антител и биспецифических антител. Белки могут быть получены с использованием рекомбинантных клеточных систем продуцирования, таких как бакуловирусная система насекомых, дрожжевые системы (например, *Pichia sp.*), системы млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1). Недавний обзор, посвященный биотерапевтическим белкам и их получению, см. в Ghaderi et al., "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," (Darius Ghaderi et al., Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation, 28 BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING REVIEWS 147-176 (2012)). В некоторых типовых вариантах реализации, белки включают модификации, аддукты и другие ковалентно связанные фрагменты. Эти модификации, аддукты и фрагменты включают, например, авидин, стрептавидин, биотин, гликаны (например, N-ацетилгалактозамин, галактозу, нейраминовую кислоту, N-ацетилглюкозамин, фукозу, маннозу и другие моносахариды), ПЭГ, полигистидин, FLAGtag, мальтозу, связывающий белок (MBP), хитинсвязывающий белок (CBP), глутатион-S-трансферазу (GST), тус-эпитоп, флуоресцентные метки и другие красители и т.п. Белки можно классифицировать на основе состава и растворимости и, таким образом, они могут включать простые белки, такие как глобулярные белки и волокнистые белки; конъюгированные белки, такие как нуклеопротеины, гликопротеины, мукопротеины, хромопротеины, фосфопротеины, металлопротеины и липопротеины; и производные белки, такие как первичные производные белки и вторичные производные белки.

В некоторых типовых вариантах реализации, белок, представляющий интерес, может представлять собой рекомбинантный белок, антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок, scFv и их комбинации.

Используемый в данном документе термин "рекомбинантный белок" относится к белку, полученному в результате транскрипции и трансляции гена, переносимого рекомбинантным вектором экспрессии, который был введен в подходящую клетку-хозяина. В определенных типовых вариантах реализации, рекомбинантный белок может представлять собой слитый белок. В определенных типовых вариантах реализации, рекомбинантный белок может представлять собой антитело, например, химерное, гуманизированное или полностью человеческое антитело. В определенных типовых вариантах реализации, рекомбинантный белок может представлять собой антитело изотипа, выбранного из группы,

состоящей из: IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA1, IgA2, IgD или IgE. В определенных типовых вариантах реализации, молекула антитела представляет собой полноразмерное антитело (например, иммуноглобулин IgG1 или IgG4) или в качестве альтернативы антитело может представлять собой фрагмент (например, фрагмент Fc или фрагмент Fab).

Термин "антитело", используемый в данном документе, включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (обозначаемую в данном документе как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (CL1). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения FR антитела к big-ET-1 (или его антигенсвязывающий участок) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR. Используемый в данном документе термин "антитело" также включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. Термины "антигенсвязывающий участок" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методики рекомбинантной геной инженерии, включающие манипуляцию с ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела, и ее экспрессию. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаг-антитело) или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и манипулировать с ней химическим путем или с использованием методик молекулярной биологии, например, для расположения одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или делеции аминокислот и т.д.

Используемый в данном документе термин "фрагмент антитела" включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или переменная область антитела. Примеры фрагментов антител включают без ограничения фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент scFv, фрагмент Fv, диатело dsFv, фрагмент dAb, фрагмент Fd', фрагмент Fd и выделенная область, определяющая комплементарность (CDR), а также триатела, тетратела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагменты Fv представляют собой комбинацию переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а белки ScFv представляют собой рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых переменные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина соединены с помощью пептидного линкера. В некоторых типовых вариантах реализации, фрагмент антитела содержит достаточную аминокислотную последовательность исходного антитела, фрагментом которого он является, и который связывается с тем же антигеном, что и исходное антитело; в некоторых типовых вариантах реализации, фрагмент связывается с антигеном с аффинностью, сопоставимой с аффинностью исходного антитела, и/или конкурирует с исходным антителом за связывание с антигеном. Фрагмент антитела может быть получен любым способом. Например, фрагмент антитела может быть получен ферментативным или химическим путем посредством фрагментации интактного антитела и/или он может быть получен рекомбинантным путем из гена, кодирующего частичную последовательность антитела. В качестве альтернативы или в качестве дополнения фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела может необязательно содержать фрагмент одноцепочечного антитела. В качестве альтернативы или в качестве дополнения фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые связаны друг с другом, например, с помощью дисульфидных связей. Фрагмент антитела может необязательно содержать мультимолекулярный комплекс. Функциональный фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере приблизительно 50 аминокислот, а более типично содержит по меньшей мере приблизительно 200 аминокислот.

Термин "биспецифическое антитело" включает антитело, способное избирательно связывать два или более эпитопов. Биспецифические антитела обычно содержат две разные тяжелые цепи, причем каждая тяжелая цепь специфически связывается с другим эпитопом, либо с двумя разными молекулами

(например, антигенами), либо с одной и той же молекулой (например, с одним и тем же антигеном). Если биспецифическое антитело способно селективно связывать два разных эпитопа (первый эпитоп и второй эпитоп), аффинность первой тяжелой цепи к первому эпитопу обычно будет по меньшей мере на один, два, три или четыре порядка ниже, чем аффинность первой тяжелой цепи ко второму эпитопу и наоборот. Эпитопы, распознаваемые биспецифическим антителом, могут находиться на одной и той же или на другой мишени (например, на одном и том же или другом белке). Биспецифические антитела можно получить, например, путем объединения тяжелых цепей, распознающих разные эпитопы одного и того же антигена. Например, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие переменные последовательности тяжелой цепи, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующими разные константные области тяжелой цепи, и такие последовательности могут быть экспрессированы в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина.

Типичное биспецифическое антитело имеет две тяжелые цепи, каждая из которых имеет три CDR тяжелой цепи, за которыми следуют домен CH1, шарнир, домен CH2 и домен CH3, а также легкую цепь иммуноглобулина, которая либо не придает антигенсвязывающей специфичности, но может связываться с каждой тяжелой цепью, или которая может связываться с каждой тяжелой цепью и которая может связывать один или несколько эпитопов, связанных с антигенсвязывающими областями тяжелой цепи, или которая может связываться с каждой тяжелой цепью и обеспечивать связывание одного или обоих из тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами. BsAb можно разделить на два основных класса: те, которые несут Fc-область (IgG-подобные), и те, у которых отсутствует Fc-область, при этом последние обычно меньше, чем IgG и IgG-подобные биспецифические молекулы, содержащие Fc. IgG-подобные bsAb могут иметь различные форматы, такие как, но не ограничены, триомаб, IgG с выступами во впадинах (kih IgG), crossMab, orth-Fab IgG, Ig с двумя переменными доменами (DVD-Ig), Fab "два в одном" или двойного действия (DAF), IgG-одноцепочечные Fv (IgG-scFv) или κλ-тела. Различные отличные от IgG-подобных молекул форматов включают tandemные scFv, формат диатела, одноцепочечное диатело, tandemные диатела (TandAbs), молекулу переориентирующегося антитела с двойной аффинностью (DART), DART-Fc, нанотела или антитела, получаемые с помощью метода dock-and-lock (DNL) (Gaowei Fan, Zujian Wang & Mingju Hao, Bispecific antibodies and their applications, 8 JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY 130; Dafne Müller & Roland E. Kontermann, Bispecific Antibodies, HANDBOOK OF THERAPEUTIC ANTIBODIES 265-310 (2014)). Методы получения BsAb не ограничиваются квадратной технологией, основанной на соматическом слиянии двух различных клеточных линий гибридомы, химической конъюгации, включающей химические сшивающие агенты, и генетическими подходами, использующими технологию рекомбинантной ДНК. Примеры bsAb включают те, которые раскрыты в следующих патентных заявках, которые включены в данное описание посредством ссылки: U.S. Ser. No. 12/823838, поданой 25 июня, 2010; U.S. Ser. No. 13/488628, поданой 5 июня, 2012; U.S. Ser. No. 14/031075, поданой 19 сентября, 2013; U.S. Ser. No. 14/808171, поданой 24 июля, 2015; U.S. Ser. No. 15/713574, поданой 22 сентября, 2017; U.S. Ser. No. 15/713569, поданой 22 сентября, 2017; U.S. Ser. No. 15/386453, поданой 21 декабря, 2016; U.S. Ser. No. 15/386443, поданой 21 декабря, 2016; U.S. Ser. No. 15/22343 поданой 29 июля, 2016; and U.S. Ser. No. 15814095, поданой 15 ноября, 2017. Низкие уровни гомодимерных примесей могут присутствовать на нескольких этапах производства биспецифических антител. Обнаружение таких гомодимерных примесей может быть затруднительно при использовании анализа интактной массы из-за низкого содержания гомодимерных примесей и совместного элюирования этих примесей с основными частицами при проведении с использованием обычного метода жидкостной хроматографии.

Используемый в данном документе термин "мультиспецифическое антитело" или "Mab" относится к антителу, характеризующемуся специфичностью связывания по меньшей мере с двумя различными антигенами. Хотя такие молекулы обычно связывают только два антигена (т.е. биспецифические антитела, bsAb), антитела с дополнительными специфичностями, такие как триспецифические антитела и триспецифические КИТ, также могут быть обработаны с помощью системы и способов, раскрытых в данном документе.

Используемый в данном документе термин "моноклональное антитело" не ограничивается антителами, полученными с помощью технологии гибридомы. Моноклональное антитело может быть получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, любым доступным или известным в данной области техники способом. Моноклональные антитела, подходящие для целей настоящего изобретения, могут быть получены с использованием широкого спектра методик, известных в данной области техники, в том числе использование технологий гибридомы, рекомбинантных технологий и технологий фагового дисплея или их комбинации.

В некоторых типовых вариантах реализации, белок представляющий интерес, может быть очищен из клеток млекопитающих. Клетки млекопитающих могут иметь человеческое или отличное от человеческого происхождение и могут включать первичные эпителиальные клетки (например, кератиноциты, эпителиальные клетки шейки матки, бронхиальные эпителиальные клетки, эпителиальные клетки трахеи, эпителиальные клетки почек и эпителиальные клетки сетчатки),

подтвержденные клеточные линии и их штаммы (например, эмбриональные клетки почки 293, клетки ВНК, клетки эпителия шейки матки HeLa и клетки сетчатки PER-C6, клетки MDBK (NBL-1), клетки 911, клетки CRFK, клетки MDCK, клетки CHO, клетки BeWo, клетки Chang, клетки Detroit 562, клетки HeLa 229, клетки HeLa S3, клетки Нер-2, клетки KB, клетки LSI80, клетки LS174T, клетки NCI-H-548, клетки RPMI2650, клетки SW-13, клетки T24, клетки WI-28 VA13, клетки 2RA, клетки WISH, клетки BS-C-1, клетки LLC-MK2, клетки клона М-3, клетки I-10, клетки RAG, клетки TCMK-1, клетки Y-1, клетки LLC-PK1, клетки PK(15), клетки GH1, клетки GH3, клетки L2, клетки LLC-RC 256, клетки MHiCi, клетки XC, клетки MDOK, клетки VSW и TH-1, клетки B1, клетки BSC-1, клетки RAf, клетки RK, клетки PK-15 или их производные), клетки фибробластов из любой ткани или органа (в том числе помимо прочего сердца, печени, почек, толстой кишки, кишечника, пищевода, желудка, нервной ткани (головной мозг, спинной мозг), легких, сосудистой ткани (артерии, вены, капилляры), лимфоидной ткани (лимфатические железы, аденоиды, миндалины, костный мозг и кровь), селезенки, а также фибробласты и фибробластоподобные клеточные линии (например, клетки CHO, клетки TRG-2, клетки IMR-33, клетки Don, клетки GHK-21, клетки, характерные для цитруллинемии, клетки Dempsey, клетки Detroit 551, клетки Detroit 510, клетки Detroit 525, клетки Detroit 529, клетки Detroit 532, клетки Detroit 539, клетки Detroit 548, клетки Detroit 573, клетки HEL 299, клетки IMR-90, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки WI-26, клетки Midi, клетки CHO, клетки CV-1, клетки COS-1, клетки COS-3, клетки COS-7, клетки Vero, клетки DBS-FrhL-2, клетки BALB/3T3, клетки F9, клетки SV-T2, клетки M-MSV-BALB/3T3, клетки K-BALB, клетки BLO-11, клетки NOR-10, клетки C3H/10T1/2, клетки HSDMiC3, клетки KLN205, клетки McCoу, L-клетки мыши, клетки штамма 2071 (L-клетки мыши), клетки штамма L-M (L-клетки мыши), клетки L-MTK' (L-клетки мыши), клетки клонов NCTC 2472 и 2555, клетки SCC-PSA1, клетки Swiss/3T3, клетки индийского мунджака, клетки SIRC, клетки Cn и клетки Jensen, Sp2/0, NS0, клетки NS1 или их производные).

В некоторых типовых вариантах реализации белок, представляющий интерес, может быть антагонистом VEGF. Используемый в данном документе термин "антагонист VEGF" представляет собой любой агент, который связывается с VEGF или взаимодействует с ним, ингибирует связывание VEGF с его рецепторами (VEGFR1 и VEGFR2) и/или ингибирует биологическую передачу сигналов и активность VEGF. Антагонисты VEGF включают молекулы, которые препятствуют взаимодействию между VEGF и природным рецептором VEGF, например, молекулы, которые связываются с VEGF или рецептором VEGF и предотвращают или иным образом препятствуют взаимодействию между VEGF и рецептором VEGF. Конкретные примерные антагонисты VEGF включают антитела против VEGF (например, ранибизумаб [LUCENTIS®]), антитела против рецептора VEGF (например, антитела против VEGFR1, антитела против VEGFR2 и т.д.) и химерные молекулы на основе рецептора VEGF или VEGF. ингибирующие слитые белки (также называемые в настоящем документе "ловушками VEGF" или "мини-ловушками VEGF"), такие как афлиберцепт, зив-афлиберцепт и белок, содержащий аминокислоту, имеющую SEQ ID NO.: 42. Другими примерами of VEGF-ловушек являются ALT-L9, M710, FYB203 и CHS-2020. Дополнительные примеры ловушек-VEGF можно найти в патенте США No. Nos. 7,070,959; 7,306,799; 7,374,757; 7,374,758; 7,531,173; 7,608,261; 5,952,199; 6,100,071; 6,383,486; 6,897,294 & 7,771,721, которые специально включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Химерные молекулы на основе рецептора VEGF включают химерные полипептиды, которые содержат два или более иммуноглобулиновых (Ig)-подобных домена рецептора VEGF, таких как VEGFR1 (также обозначаемый как Flt1) и/или VEGFR2 (также обозначаемый как Flk1 или KDR), и может также содержать домен мультимеризации (например, домен Fc, который облегчает мультимеризацию, такую как димеризация двух или более химерных полипептидов). Примером химерной молекулы на основе рецептора VEGF является молекула, обозначаемая как VEGFR1R2-FcΔC1(a) (также известная как афлиберцепт; продается под названием продукта EYLEA®).

Используемый в данном документе термин "фармацевтический белковый продукт" включает активный ингредиент, который может быть полностью или частично биологическим по природе. В некоторых примерах вариантов реализации белковый фармацевтический препарат может содержать пептид, белок, слитый белок, антитело, антиген, вакцину, продукт конъюгации пептида и лекарственного средства, продукт конъюгации антитела и лекарственного средства, продукт конъюгации белка и лекарственного средства, клетки, ткани, или их комбинации. В некоторых примерах вариантов реализации белковый фармацевтический продукт может содержать рекомбинантную, сконструированную, модифицированную, мутантную или усеченную версию пептида, белка, слитого белка, антитела, антигена, вакцины, продукта конъюгации пептида и лекарственного средства, продукта конъюгации антитела и лекарственного средства, продукта конъюгации белка и лекарственного средства, клеток, тканей, или их комбинаций.

Примеры вариантов реализации.

Варианты реализации описанные в данном документе, предлагают способы очистки антитела из образца, содержащего одну или более примесей, включая вирусные частицы. Варианты реализации описанные в данном документе, также предлагают методы очистки от вирусов с использованием низкого pH основанные на статистическом дизайне эксперимента.

В некоторых типовых вариантах реализации, данное изобретение обеспечивает способ очистки пептида или белка, такого как антитело, из образца, содержащего одну или несколько примесей, включая вирусные частицы. В некоторых типовых вариантах реализации, способ по данному изобретению включает: корректировку условий ионной силы образца, корректировку pH образца до кислого pH и последующее поддержание образца в условиях ионной силы и уровня pH по меньшей мере около 15 мин для инактивации некоторого количества вирусных частиц.

В одном аспекте, pH-значение образца в способе по настоящему изобретению представляет собой кислый pH, меньше или равно около pH 7, меньше или равно около pH 6, меньше или равно около pH 5, меньше или равно около pH 4, меньше или равно около 3,90, меньше или равно около pH 3,80, меньше или равно около pH 3,70, от около pH 3,60 до около pH 3,90 или от около pH 3,65 до около pH 3,80.

В одном аспекте, образец в способе по настоящему изобретению поддерживается в условиях ионной силы и pH образца для инактивации количества вирусных частиц в течение по меньшей мере около 30 мин, по меньшей мере около 15 мин, от около 15 мин до около 30 мин, по меньшей мере около 10 мин, по меньшей мере около 20 мин, по меньшей мере около 25 мин, по меньшей мере около 35 мин, от около 10 мин до около 30 мин, от около 15 мин до около 35 мин, от около 20 мин до около 30 мин, от около 20 мин до около 35 мин, или от около 25 мин до около 40 мин.

В одном аспекте, ионную силу образца регулируют добавлением хлорида натрия, при этом концентрация хлорида натрия находится в диапазоне от около 1 мМ до около 200 мМ, от около 1 мМ до около 500 мМ, около 5 мМ, около 10 мМ, около 15 мМ, около 20 мМ, около 25 мМ, около 30 мМ, около 35 мМ, около 40 мМ, около 45 мМ, около 50 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 72 мМ, около 80 мМ, около 82 мМ, около 90 мМ, около 100 мМ, около 150 мМ, около 200 мМ, около 250 мМ, около 300 мМ, около 350 мМ, около 400 мМ, около 450 мМ или около 500 мМ.

Понятно, что способ не ограничивается каким-либо из вышеупомянутых пептидов, белков, антител, D-оптимальной схемы эксперимента, вирусов, ретровирусов, инактивации вирусов, очистки от вирусов, ионной силы или значений pH.

Последовательная маркировка этапов способа цифрами и/или буквами, как предложено в данном документе, не предназначена для ограничения способа или любых его вариантов реализации конкретным указанным порядком. Различные публикации, включая патенты, заявки на патенты, опубликованные заявки на патенты, номера доступа, технические статьи и научные статьи цитируются на протяжении всего данного описания изобретения. Каждая из этих цитируемых ссылок включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки для всех целей. Если не описано иное, все технические и научные выражения, используемые в данном документе, имеют то же самое значение, как обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой настоящее изобретение принадлежит. Данное раскрытие будет более полно понято со ссылкой на следующие примеры, которые предоставлены для более подробного описания раскрытия. Они предназначены для иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничивающие объем данного раскрытия.

Примеры

Материалы и реагенты.

1. Модельные белки и буферы.

Различные изоформы моноклональных антител, которые экспрессировались в клетках CHO, использовали в качестве модельных белков, mAb 1 указывало на изоформ IgG4, а mAb 2 указывало на изоформ IgG1. Изоэлектрическая точка модельных белков была оценена как 8,8 для mAb 1 и pH 9,3 для mAb 2. Моноклональные антитела очищали с использованием стандартной хроматографии с белком А и элюировали 40 мМ уксусной кислотой, в результате чего получали пул с pH примерно 4,2. Концентрации моноклональных антител составляли примерно 15 г/л.

2. Штаммы вирусов для введения и анализа инфекционности.

X-MuLV использовали для оценки инактивации вируса. Штаммы вируса X-MuLV были приготовлены WuXi AppTec (Филадельфия, Пенсильвания). Одна партия исходного раствора вируса штамма X-MuLV имела титр приблизительно 10^7 PFU/мл. Для всех прогонов, растворы вирусных штаммов обрабатывали ультразвуком и фильтровали перед введением в загрузочный материал. Образцы инфекционности удаляли и анализировали в момент времени 15 мин с объемом анализа 0,5 мл. Образцы инфекционности удаляли и тестировали в момент времени 30 мин, которые имели больший объем анализа 7 мл. Все образцы количественно определяли на инфекционность X-MuLV с использованием индикаторных клеток PG4. Перед посевом образцы нейтрализовали до pH 6,5-7,5. LRF вируса рассчитывали путем сравнения количества введенного вируса, присутствующего в загрузке, и количества вируса, присутствующего в пуле, как описано в уравнении 1, где C(вирус, нагрузка) указывает концентрацию вируса в загрузке, C(вирус, пул) указывает концентрацию вируса в пуле, V(load) указывает объем загрузки, а V(pool) указывает объем пула.

Уравнение 1. Расчет вирусного коэффициента сокращения Log_{10} (LRF).

$$LRF = \log_{10} \frac{C_{\text{вирус, нагрузка}} \times V_{\text{нагрузка}}}{C_{\text{вирус, пул}} \times V_{\text{пул}}}$$

Образцы оценивали на предмет цитотоксического действия матрикса образца на индикаторную клеточную линию анализа инфекционности, предшествующего проведению исследования. Дополнительные контроли были выполнены во время исследования добавления, чтобы убедиться, что инактивация вируса произошла из-за присутствия низкого pH и не была связана с самой белковой матрицей.

Способы и устройства.

1. Методы титрования pH и введения:

Образцы титровали до желаемых значений pH, используя либо 0,25 М фосфорной кислоты, либо 0,25 М глицина HCl. Кислотные образцы нейтрализовали с использованием 2 М трис-основания. Каждый эксперимент по инактивации проводился с использованием одного из двух методов дозирования в соответствии с планом эксперимента. При методе введения 1, например, метод регулировки-введения-повторной регулировки, образцы доводили/титровали до целевого pH, а затем добавляли штамм вируса, имеющий pH около 7,2. Отсчет времени удержания pH начинался во время введения. В связи с наблюдением за повышением pH после добавления штамма вируса pH образцов снова доводили до целевого pH перед выдержкой при желаемой температуре в течение оставшейся части удержания pH. Например, при методе введения 2, методе введение-корректировка, в образцы сначала добавляли исходный раствор вируса, а затем доводили/титровали до целевого pH. Добавление кислоты выполняли с помощью шприцевого насоса с соответствующими временем перемешивания и скоростью, что соответствует крупномасштабному производству. При достижении целевого pH начинается отсчет времени удержания pH, и образец инкубируется при желаемой температуре.

Как для метода введения 1, так и для метода 2 в исходный загрузочный материал был введен 2% штамма вируса X-MuLV (об./об.). Когда фильтрация после введения была указана как фактор в плане эксперимента, использовался фильтр PES 0,2 мкм (полиэфирсульфоновый фильтр). Основной материал инкубировали на водяной бане в течение всего времени выдержки pH. Температура водяной бани была одним из факторов при планировании эксперимента, который контролировали с помощью калиброванного термометра. Все измерения pH проводились в автономном режиме с образцом объемом 2 мл, извлеченным из основного материала в боксе биобезопасности.

2. Устройство для измерений pH.

Измерения значений pH выполняли с использованием pH-зонда In Lab Expert Pro и pH-метра SevenCompact S220 (Mettler Toledo, Columbus, OH). Измеритель был настроен на линейный режим калибровки, строгий формат конечной точки и автоматическую температурную компенсацию. Измеритель pH настроен на отображение результатов с точностью до двух знаков после запятой. Зонд уравнивали в растворе для хранения электродов в течение 30-60 мин перед использованием. Зонд калибровали с использованием буферов с pH 1,68, pH 4,01 или pH 7,00 (VWR, Radnor, PA). Критерии процента наклона 3-точечной калибровки находились в диапазоне 97,0-103,0%. После успешной калибровки были измерены независимые буферные стандарты с pH 3,00 и pH 6,00, чтобы подтвердить, что точность находится в пределах $\pm 0,03$ единиц pH от pH буфера. Независимые стандарты были повторно измерены, чтобы подтвердить, что pH остается на целевом уровне pH после завершения окончательного образца каждый день. Новый датчик pH был откалиброван в соответствии с теми же критериями и использовался каждый день для проведения исследования, чтобы свести к минимуму изменчивость датчика с течением времени.

3. Статистический план эксперимента (DoE) для удержания при низком pH.

Статистическая схема эксперимента (DoE) использовалась для оценки и описания эффектов этапа поддержания низкого pH для инактивации ретровируса. Было оценено влияние нескольких факторов, связанных со стадией поддержания низкого pH, включая тип белка, pH, температуру, кислотный титрант, содержание NaCl, время введения и фильтрацию после введения. Программное обеспечение использовалось для разработки статистического DoE для исследования влияния этих факторов. D-оптимальный дизайн модели, такой как 15 прогонов или 30 прогонов, был создан с использованием программного обеспечения JMP v.13 (SAS, Cary NC). Матрица диаграммы рассеяния и многомерные корреляции D-оптимального плана показаны на фиг. 2A. В план исследования были включены семь факторов, как показано в табл. 1, включая: тип белка, такой как два моноклональных антитела (mAb) разных изоформ, например, IgG1 или IgG4; pH, такой как pH 3,65, pH 3,73 или pH 3,80; температура, такая как 15°C или 20°C; кислотный титрант, такой как 0,25 М фосфорная кислота или 0,25 М глицин HCl; содержание NaCl в исходном растворе, такое как 0 мМ, 50 мМ или 100 мМ; расчет времени введения, например метод корректировка-введение-повторная корректировка или метод введения-корректировка; и фильтрацию после введения, например, с фильтрацией после введения или без нее. Раствор для введения содержит очищенный раствор X-MuLV для добавления 2% по объему. В табл. 1 показано внедрение этих семи факторов в матрицу проектирования, включая конкретный уровень или тип каждого фактора.

Факторы, используемые при планировании эксперимента

Фактор	Уровень или тип		
	Низкий	Центральный	Высокий
изотип mAb	IgG4		IgG1
pH	3,65 ± 0,02	3,73 ± 0,02	3,80 ± 0,02
Температура (°C)	15 ± 1,0		20 ± 1,0
Кислотный титрант	Фосфорный		Глицин HCl
Внесено (мМ)	0	50	100
Расчет времени введения	Способ 1		Способ 2
Фильтрация после введения	Да		Нет

В дизайне оценивались все основные эффекты и некоторые взаимодействия. В общей сложности 30 прогонов, 15 условий с 2 повторениями были выполнены одними и теми же аналитиками в течение 4 дней. Дополнительные контроли были включены для каждого моноклонального антитела при трех уровнях содержания NaCl, например, 0 мМ, 50 мМ или 100 мМ NaCl. Образцы анализировали в двух временных точках (Т), таких как 15 или 30 мин, с использованием тестов на инфекционность. Ответ был X-MuLV LRF через 15 и 30 мин. Для моделирования методом наименьших квадратов использовалось JMP® (статистическое программное обеспечение от SAS). Для выявления статистически значимых ($P < 0,05$) факторов и взаимодействий использовали дисперсионный анализ (ANOVA). Все несущественные факторы ($P > 0,05$), коллинеарные факторы ($VIF > 5$) и выбросы (определяемые по расстоянию складного ножа) были удалены.

Нейтральные контроли, как показано на фиг. 2В, были выполнены для каждого состояния моноклонального антитела. Были выполнены нейтральные контроли, чтобы гарантировать, что измеренная вирусная активность была результатом химической инактивации при низком pH. pH загружаемого материала доводили до pH около 6,5-7,5. Ожидалось, что очистка не будет наблюдаться, чтобы продемонстрировать, что инактивация вируса не является результатом только белкового матрикса. Образцы были получены на стадиях предварительной фильтрации и постфильтрации для контроля возможной потери вируса через фильтр. Каждое состояние моноклонального антитела имело репрезентативный нейтральный контроль, который служил в качестве загружаемого материала для анализа данных. Температура окружающей среды может влиять на измерение pH. Все действия с вирусами, корректировки и измерения pH проводились при комнатной температуре. Основное испытываемое изделие инкубировали на водяной бане при двух различных температурных условиях. Для измерений использовали Mettler Toledo Expert Pro.

Пример 1. Изучение факторов, влияющих на удержание низкого pH.

Влияние типа белка, pH, температуры, кислотного титранта, содержания NaCl, времени введения и фильтрации после добавления на инактивацию X-MuLV для удержания при низком уровне pH исследовали с помощью D-оптимальной схемы эксперимента, как показано в табл. 1. 15 запусков с дубликатами проводились в течение 4 дней подряд с одним и тем же набором вирусов, персоналом, буферами и оборудованием. Нейтральный контроль выполняли для каждого состояния моноклонального антитела (mAb) (тип mAb и содержание NaCl, $N=6$) и использовали в качестве образца нагрузки для анализа данных. Каждое условие запуска и результирующее значение LRF в моменты времени 15 и 30 мин перечислены в табл. 2. В табл. 2 приведены сводные данные для планирования эксперимента. В 22 из 30 прогонов, через 30 мин вирус не был обнаружен. LRF для каждого из повторных прогонов через 30 мин был в пределах 0,5 LRF друг от друга, за исключением двух прогонов, которые были удалены как выбросы во время анализа данных. В наборе данных нет существенной изменчивости изо дня в день или от цикла к циклу, основанной на измерении pH, добавлении кислоты или загружаемом материале.

В табл. 2, что касается целевого pH, образцы были доведены до целевого pH в диапазоне $\pm 0,02$ единиц pH. Что касается содержания NaCl, NaCl добавляли к основному материалу перед проведением титрования до низкого pH с использованием кислоты. Символ ">" означает, что количество вируса уменьшилось ниже предела обнаружения анализа. P обозначает фосфорную кислоту. G обозначает глицин HCl. Некоторые конкретные прогоны были определены как выбросы по расстоянию складного ножа и удалены перед дальнейшим анализом данных. Перед анализом инфекционности матрицы образцов оценивали на предмет вмешательства в размножение вируса в индикаторной клеточной линии, чтобы можно было идентифицировать не мешающее разведение. На основании наблюдаемой интерференции сообщалось о сериях с 3-кратным разведением. Один повторный запуск неожиданно повлиял на анализ инфекционности при 3-кратном разведении, а сообщаемое значение было при 10-кратном разведении, что предотвратило влияние. Этот прогон был определен как выброс по расстоянию складного ножа и удален из анализа данных.

Сводка данных для планирования эксперимента

mAb	Целевой pH	Температура (°C)	Кислотный титрант	NaCl содержание (mM)	Способ введения	Фильтрация после введения	LRF на каждом временном участке (мин)	
							15	30
mAb 1	3,65	20	G	0	1	Нет	> 4,06 ± 0,16	5,29 ± 0,24
							> 4,06 ± 0,16	5,38 ± 0,50
		15	P	50	2	Да	> 4,45 ± 0,26	> 5,90 ± 0,26
							> 4,44 ± 0,27	> 5,89 ± 0,27
		15	G	100	1	Нет	> 4,47 ± 0,13	> 5,92 ± 0,13
							> 4,47 ± 0,14	> 5,92 ± 0,14
	3,73	15	G	0	2	Да	> 3,06 ± 0,20	3,73 ± 0,26
							> 3,06 ± 0,21	4,29 ± 0,45
	20	P	100	2	Да	> 4,50 ± 0,09	> 5,95 ± 0,09	
						> 4,50 ± 0,09	> 5,95 ± 0,09	
	3,80	15	P	0	1	Да	1,92 ± 0,30	2,45 ± 0,22
							1,78 ± 0,31	2,55 ± 0,22
20		G	50	1	Нет	4,47 ± 0,35	> 6,03 ± 0,16	
						> 4,59 ± 0,16	> 5,92 ± 0,13	
15		P	100	2	Нет	> 4,47 ± 0,14	> 5,92 ± 0,14	
						3,65 ± 0,39	> 3,47 ± 0,14	
mAb 2	3,65	15	G	0	2	Нет	> 4,27 ± 0,16	> 5,72 ± 0,16
							4,14 ± 0,35	> 5,72 ± 0,16
		20	P	0	1	Да	> 4,19 ± 0,26	> 5,64 ± 0,26
							> 4,19 ± 0,26	> 5,64 ± 0,26
		20	G	100	2	Да	> 4,63 ± 0,15	> 6,08 ± 0,15
							> 4,63 ± 0,16	> 6,08 ± 0,16
	3,73	15	P	50	1	Нет	> 4,72 ± 0,06	> 6,16 ± 0,06
							> 4,71 ± 0,07	> 6,16 ± 0,07
	3,80	20	P	0	2	Нет	2,56 ± 0,18	2,87 ± 0,19
							2,48 ± 0,24	2,67 ± 0,16
		20	G	50	2	Да	> 4,49 ± 0,23	> 5,93 ± 0,23
							4,36 ± 0,39	> 5,93 ± 0,23
15		G	100	1	Да	> 4,63 ± 0,16	> 6,08 ± 0,16	
						> 4,63 ± 0,16	> 6,07 ± 0,16	

Пример 2. Анализ кинетики инактивации X-MuLV при различных значениях pH.

Статистический план эксперимента (DoE) был использован для оценки и характеристики эффектов этапа поддержания низкого pH для инактивации вируса, включая оценку нескольких факторов, таких как тип белка, значение pH, температура, кислотный титрант, ионная сила исходного вещества. раствор, время введения и фильтрация после введения. Статистическая DoE использовалась для оценки и описания эффектов этапа поддержания низкого pH для инактивации вируса. Была проанализирована кинетика инактивации X-MuLV с учетом различного целевого pH. Образцы во временных точках 15 мин и 30 мин тестировали на инфекционность X-MuLV для оценки начальной инактивации (например, 15 мин) и инактивации в конце (например, 30 мин) выдержки при низком pH. Фиг. 3А-3С показывают кинетику инактивации X-MuLV при целевом pH 3,65, pH 3,73 или pH 3,80. Кривые LRF были получены путем построения графика значений LRF в зависимости от временных точек для каждого значения pH. Как изображено на фиг. 3А-3С, незаштрихованные кружки обозначают отсутствие вируса в образцах, а крестики обозначают вирус, обнаруженный в образцах. Красные линии соответствуют каждому циклу, выполненному при pH 3,65±0,02; зеленые линии соответствуют каждому опыту, проведенному при pH 3,73±0,02; а синие линии соответствуют каждому опыту, проведенному при pH 3,80±0,02. Как изображено на фиг. 3А, для опытов с pH 3,65 вирус не был обнаружен ни в одном из образцов через 15 мин, что указывало на быструю инактивацию вируса (предел обнаружения приблизительно 2,5 PFU/мл). В 30-минутной временной точке, для прогонов с pH 3,65, 2 прогона показали обнаруженный вирус. Однако результаты этих двух прогонов приближались к пределу обнаружения анализа (приблизительно 1,0 PFU/мл). При pH 3,65±0,02 все LRF превышали 5,0 через 30 мин. Для опытов с pH 3,73 и pH 3,80 присутствовали некоторые несоответствия, как показано на фиг. 3В и фиг. 3С, так как

между прогонами возникали расхождения. Некоторые прогоны при pH 3,73 или pH 3,80 показали такую же быструю инактивацию, как и прогоны при pH 3,65. Один или два опыта при pH 3,73 или pH 3,80 показали неполную инактивацию через 30 мин. Изменчивость этих опытов позволяет предположить, что другой фактор может оказывать более сильное влияние, чем условия pH.

Пример 3. Анализ кинетики инактивации X-MuLV при различном содержании NaCl.

Дополнительные анализы были проведены для циклов, которые показали обнаруженный ретровирус на 30-минутной временной точке в табл. 2. Был проанализирован общий фактор, например, содержание NaCl среди этих прогонов, в которых вирус был обнаружен через 30 мин. Опыты проводились без добавления NaCl в исходный загрузочный материал. Кривые LRF были получены путем построения графика значений LRF в зависимости от моментов времени для каждого уровня добавленного NaCl. Фиг. 4А-4С показывают кинетику инактивации X-MuLV при содержании NaCl 0 мМ (фиг. 4А), 50 мМ (фиг. 4В) или 100 мМ (фиг. 4С). Как изображено на фиг. 4А-4С, незаштрихованные кружки обозначают отсутствие вируса в образцах, а крестики обозначают вирус, обнаруженный в образцах. Красные линии соответствуют каждому циклу, выполненному при pH $3,65 \pm 0,02$; зеленые линии соответствуют каждому опыту, проведенному при pH $3,73 \pm 0,02$; а синие линии соответствуют каждому опыту, проведенному при pH $3,80 \pm 0,02$.

Результаты показали, что проводимость исходного раствора оказала сильное влияние на кинетику инактивации X-MuLV при различных условиях целевого pH. Было установлено, что содержание NaCl оказывает наибольшее влияние на инактивацию ретровируса. Значение pH были важным фактором, когда загружаемый материал имел низкую ионную силу или когда к исходному материалу не добавлялся дополнительный NaCl, как показано на фиг. 4А. Данные свидетельствуют о том, что инактивация X-MuLV зависела от pH при низкой ионной силе. Однако при повышении ионной силы, например при увеличении концентрации NaCl, не наблюдалось влияния различных условий целевого pH, поскольку X-MuLV быстро инактивировался при всех трех целевых значениях pH. Другими словами, при повышении концентрации NaCl влияние pH-условий на инактивацию X-MuLV уменьшалось. При добавлении 50 мМ или 100 мМ NaCl полная и эффективная очистка X-MuLV наблюдалась для всех циклов в 30-минутных временных точках для целевых значений pH при pH 3,65, pH 3,73 и pH 3,80, как показано на фиг. 4В (50 мМ NaCl) или фиг. 4С (100 мМ NaCl) соответственно. При низкой проводимости (например, при низком содержании NaCl) pH оказывает сильное влияние на инактивацию X-MuLV. При более высокой проводимости (например, при более высоком содержании NaCl) pH не влияет на инактивацию X-MuLV. 0,25 М глицин HCl показал повышенную инактивацию X-MuLV по сравнению с 0,25 М фосфорной кислотой.

Пример 4. Генерация многомерных моделей линейной регрессии.

Чтобы исследовать влияние различных факторов, была создана модель многомерной линейной регрессии для исследования основных эффектов, квадратичных уравнений и взаимодействий оцениваемых факторов. Кроме того, было количественно определено влияние ионной силы на инактивацию X-MuLV как через 15, так и через 30 мин. Созданные модели имели скорректированные значения R^2 около 99%, включая оценку ошибки $< 0,15$ LRF, как показано в табл. 3, тогда как заявленная вариабельность анализа инфекционности составляет 0,5 LRF (ICH Q5A (R1)). В табл. 3, R^2 обозначает коэффициент корреляции; скорректированный R^2 обозначает величину вариации, объясняемую моделью; и RMSE обозначает среднеквадратичную ошибку для оценки ошибки в методе. В табл. 4 приведен список значимых ($P < 0,05$) факторов для каждой модели. Реальные графики по сравнению с прогнозируемыми показаны на фиг. 5А и фиг. 5В. Графики для фактических и прогнозируемых значений моделей многомерной линейной регрессии для LRF для двух временных точек показаны на фиг. 5А и фиг. 5В, например, 15 мин (фиг. 5А) или 30 мин (фиг. 5В). Красная линия обозначает линию соответствия, синяя линия обозначает среднюю линию, а красная заштрихованная линия обозначает 95% доверительный интервал на фиг. 5А и фиг. 5В.

Таблица 3

Значимая многомерная модель линейной регрессии, подходящая для каждой временной точки

Временная точка (мин)	R^2	Отрегулированное R^2	RMSE (LRF)
15	0,99	0,99	0,08
30	0,99	0,99	0,15

Таблица 4

Значимые факторы, определенные из сгенерированной модели многомерной линейной регрессии LRF для каждой временной точки

Фактор	LRF при 15 минах		LRF при 30 минах	
	Prob > t	Величина Эффекта	Prob > t	Величина Эффекта
[NaCl]	<0,0001	1,51	<0,0001	2,10

Фактор	LRF при 15 минах		LRF при 30 минах	
	Prob > t	Величина Эффекта	Prob > t	Величина Эффекта
[NaCl] * [NaCl]	<0,0001	0,79	<0,0001	1,18
pH	<0,0001	0,69	<0,0001	1,01
pH * [NaCl]	<0,0001	0,45	<0,0001	0,65
Температура	<0,0001	0,25	0,0003	0,27
mAb	<0,0001	0,19	0,0070	0,18
mAb * pH	-		0,0021	0,11
Фильтрация после введения	<0,0001	0,19	0,0136	0,17
Титрант	0,0017	0,12	0,0015	0,24
Способ введения	0,0138	0,09	0,0044	0,20

Значимые параметры для модели LRF, созданной в течение 15 и 30 мин, были одинаковыми, показывая схожие тенденции в величине эффекта. Однако взаимодействие между mAb и pH было исключительным, поскольку оно было значимым только для 30-минутной модели LRF. Известно, что pH-условия важны для инактивации вируса. Однако модель показала, что NaCl оказывает наиболее сильное влияние на инактивацию X-MuLV как через 15, так и через 30 мин. Когда концентрация NaCl увеличивалась, LRF X-MuLV соответственно увеличивался до тех пор, пока ионная сила не переставала влиять на инактивацию. Другими факторами, которые были сочтены важными, были квадратичная величина содержания NaCl, взаимодействие между pH и содержанием NaCl, а также условия pH. Влияние концентрации NaCl на кинетику инактивации можно объяснить согласно фиг. 6. При повышении концентрации NaCl влияние pH на инактивацию X-MuLV уменьшалось.

Основной эффект температуры, mAb, фильтрация после введения, кислотный титрант, метод введения и взаимодействие между pH и mAb были значительными в модели линейной регрессии. Однако размер эффекта этих факторов был меньше, чем заявленная вариабельность анализа инфекционности (например, 0,5 LRF). Хотя эти факторы были значимыми ($P < 0,05$) в созданной модели, они не были практически значимыми, поскольку размер эффекта был меньше, чем вариабельность анализа инфекционности. Известно, что температура оказывает влияние на инактивацию вируса, поскольку более низкая температура коррелирует со сниженной кинетикой инактивации. Однако этот набор данных подтвердил минимальную разницу в инактивации из-за работы в диапазонах 15°C и 20°C.

Прогнозируемый профайлер был создан для оптимизации модели для достижения более 4 LRF после 15-минутной и 30-минутной временных точек, как показано на фиг. 6. Фиг. 6 демонстрирует прогнозируемый профайлер, который представлял инактивацию X-MuLV как функцию значимых факторов, оцененных в D-оптимальном DoE: красная линия обозначает линию соответствия; синяя линия обозначает среднюю линию; красная заштрихованная линия обозначает 95% доверительный интервал; P обозначает фосфорную кислоту; а G обозначает глицин HCl. При неизменности всех других факторов увеличение проводимости за счет добавления NaCl при операционной инактивации вируса в диапазоне от около 3,60 до 3,90 может привести к увеличению LRF ретровируса.

Результаты тестирования статистического DoE для удержания низкого pH в настоящем изобретении соответствовали стандарту ASTM для инактивации 5,0 LRF X-MuLV при pH менее 3,60. Результаты также продемонстрировали надежную и эффективную инактивацию при pH выше 3,60. Для диапазонов, выходящих за пределы общего заявления ASTM, результаты показывают, что увеличение содержания NaCl может обеспечить быструю и эффективную инактивацию X-MuLV. Как правило, pH выдержки зависит от стабильности белка. Модели по настоящей заявке можно использовать для прогнозирования эффективной очистки при инактивации вирусов в диапазоне pH 3,60-3,90 путем манипулирования проводимостью исходного материала с низким pH.

Сообщалось, что высокая концентрация белка, например более 25 г/л, отрицательно влияет на инактивацию X-MuLV (ASTM). Однако предыдущие исследования Regenon продемонстрировали, что более высокая концентрация белка потенциально может улучшить кинетику инактивации X-MuLV в

условиях, когда инактивация может быть неполной. Условия с повышенной ионной силой, такие как более высокая концентрация буфера, титрование слабой кислоты или более высокая концентрация белка, коррелировали с более высокими LRF при более высоком pH (Chinniah et al.). Хотя в наборе данных настоящего изобретения использовались два моноклональных антитела, имеющих сходные концентрации, выводы из данных согласовывались с выводом о том, что увеличение концентрации белка будет увеличивать инактивацию. Во время титрования добавляли больше ионов из-за увеличения кислотного титранта, необходимого для достижения желаемого pH. Результатом было увеличение ионной силы раствора, и этот эксперимент предполагает большую кинетику инактивации.

Подобно влиянию концентрации белка, наблюдалась значительная разница, наблюдаемая в модели для кислотного титранта, где кислотный титрант глицин HCl (более слабая кислота) коррелировал с более высокими значениями LRF титранта фосфорной кислоты (более сильная кислота). Этот вывод не имел практического значения, поскольку размер эффекта был менее 0,5 LRF. Результаты подтверждают увеличение инактивации из-за увеличения концентрации ионов в растворе. Предыдущие исследования показали более низкую очистку при более низких температурах из-за термодинамики инактивации вируса. Температура была статистически значимой в сгенерированной модели линейной регрессии, но имела минимальную величину эффекта в пределах изученного диапазона (от 15 до 20°C). Предыдущие исследования пришли к выводу, что нет статистически значимой разницы в инактивации вируса между 15°C и 16+°C (Mattila et al., Retrospective evaluation of low-pH virus inactivation and viral filtration data from a multiple company collaboration, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 70.3 (2016): 293-299). Эксперимент по настоящему изобретению подтвердил общее заявление ASTM об очистке от вирусов, а также идентифицировал решение для достижения эффективной инактивации ретровируса при pH выше 3,60. При более высоком pH увеличение ионной силы раствора может способствовать рассеиванию вируса. В растворах с низкой проводимостью ретровирусные гликопротеины потенциально могут агрегировать при низком pH и защищать себя от химического повреждения. При добавлении 50 mM и 100 mM NaCl во всех опытах при всех заданных значениях pH было показано полное и эффективное удаление через 30 мин. Таким образом, рабочее пространство может быть определено для эффективной инактивации X-MuLV, когда эксперимент проводится при pH, который выходит за рамки модульного утверждения ASTM.

Пример 5. Оценка существующих и измененных условий эксплуатации.

Статистический план эксперимента (DoE) был использован для оценки и характеристики эффектов этапа поддержания низкого pH для инактивации вируса, включая оценку нескольких факторов, таких как тип белка, значение pH, температура, кислотный титрант, содержание NaCl, время введения и фильтрация после введения. Для оценки некоторых существующих рабочих условий при pH 3,70-3,75 для удержания низкого pH использовали DoE для этапа удержания при низком значении pH. Прогнозируемые профилировщики, включающие в себя оценки параметров, были сгенерированы, как показано на фиг. 7.

Для оценки некоторых измененных существующих рабочих условий при pH 3,65-3,70 для удержания низкого pH, также использовали DoE для этапа удержания при низком значении pH. Предполагаемые профайлеры, включающие в себя оценки параметров, были сгенерированы, как показано на фиг. 8. Измененные рабочие условия при pH около 3,65-3,70 не смогли обеспечить очистку 4 LRF X-MuLV в 30-минутных временных точках при уровне ошибок 1,5%.

Пример 6. Оценка фактора типов белков.

Статистический DoE был использован для оценки и характеристики эффектов этапа поддержания низкого pH для инактивации вируса (X-MuLV), включая оценку нескольких факторов, таких как тип белка, значение pH, температура, кислотный титрант, содержание NaCl, время введения и фильтрация после введения. DoE показал статистическую значимость в прогнозах многомерных моделей для типов белков, таких как изоотипы моноклональных антител, но различия между типами белков, такими как IgG1 и IgG4, не были значимыми в исследуемых диапазонах, как показано на фиг. 9. Фиг. 9 демонстрирует масштабированный расчетный LRF для оцениваемых факторов, включая NaCl, pH, кислотный титрант, температуру, тип белка (mAb, моноклональное антитело), время введения и их комбинации. Ретроспективные данные для существующих условий эксплуатации показали существенные различия между изоотипами моноклональных антител, таких как IgG1 и IgG4. Однако эти различия могут быть связаны с различиями в рабочих диапазонах pH. Фиг. 9 также демонстрирует X-MuLV LRF через 30 мин для типов белков, включая IgG1 и IgG2, на основе ретроспективных данных.

Пример 7. Оценка фактора температуры.

Статистический DoE был использован для оценки и характеристики эффектов этапа поддержания низкого pH для инактивации вируса (X-MuLV), включая оценку нескольких факторов, таких как тип белка, значение pH, температура, кислотный титрант, содержание NaCl, время введения и фильтрация после введения. DoE показал статистическую значимость в прогнозах многомерных моделей для температуры, но различия между различными температурными условиями оказывают минимальное влияние на клиренс X-MuLV в исследуемых диапазонах, как показано на фиг. 10. Фиг. 10 демонстрирует

масштабированный расчетный LRF для оцениваемых факторов, включая NaCl, pH, кислотный титрант, температуру, тип белка (mAb, моноклональное антитело), время введения и их комбинации. Ретроспективные данные промышленных условий эксплуатации (Mattila et al.) в диапазоне от 15°C до 20°C не показали статистически значимых различий между 15±1°C и 16°C. Фиг. 10 также демонстрирует LRF ретровируса для различных температурных условий на основе ретроспективных промышленных данных.

Пример 8. Оценка фактора времени введения.

Статистический DoE был использован для оценки и характеристики эффектов этапа поддержания низкого pH для инактивации вируса (X-MuLV), включая оценку нескольких факторов, таких как тип белка, значение pH, температура, кислотный титрант, содержание NaCl, время введения и фильтрация после введения. Время введения в статистически спланированном эксперименте по настоящему изобретению представляет собой метод регулировка-введения-повторная регулировка или метод введение-регулировка. При методе регулировки-введения-повторной регулировки, образцы доводили/титровали до целевого pH, а затем добавляли штамм вируса, имеющий pH 7,2. Отсчет времени удержания pH начинался во время введения. В связи с наблюдением за повышением pH после добавления штамма вируса pH образцов снова доводили до целевого pH перед выдержкой при желаемой температуре в течение оставшейся части удержания pH. При методе введение-регулировка, в образцы сначала добавляли исходный раствор вируса, а затем доводили/титровали до целевого pH. При достижении целевого pH начинается отсчет времени удержания pH, и образец инкубируется при желаемой температуре.

Различия во времени введения для двух разных методов не имеют значимых различий в очистке X-MuLV в исследуемых диапазонах, как показано на фиг. 11. Фиг. 11 демонстрирует масштабированный расчетный LRF для оцениваемых факторов, включая NaCl, pH, кислотный титрант, температуру, тип белка (mAb, моноклональное антитело), время введения и их комбинации. Фиг. 11 также демонстрирует время для введения/корректировки для двух методов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки пептида или белка из образца, включающий:
 - подвергание образца повышению ионной силы путем добавления хлорида натрия, при этом концентрация хлорида натрия находится в диапазоне от около 1 мМ до около 100 мМ;
 - подвергание образца воздействию кислого pH, и
 - последующее поддержание образца в условиях ионной силы и pH в течение по меньшей мере около 15 мин для инактивации одной или большего количества вирусных частиц;
 - при этом образец содержит одну или большее количество примесей, включая вирусные частицы.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что степень инактивации вирусных частиц составляет по меньшей мере около 3 LRF (логарифмический коэффициент уменьшения).
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что степень инактивации вирусных частиц составляет по меньшей мере около 4 LRF.
4. Способ по п.1, отличающийся тем, что значение pH образца меньше или равно около pH 3,90.
5. Способ по п.1, отличающийся тем, что значение pH образца находится в диапазоне от около pH 3,60 до около pH 3,90.
6. Способ по п.1, отличающийся тем, что значение pH образца находится в диапазоне от около pH 3,65 до около pH 3,80.
7. Способ по п.1, отличающийся тем, что пептид или белок представляет собой антитело, продуцированное в клетке-хозяине.
8. Способ по п.1, отличающийся тем, что образец выдерживают в условиях ионной силы и pH в течение не менее около 30 мин для инактивации указанного количества инфекционных вирусных частиц.
9. Способ по п.1, отличающийся тем, что образец выдерживают в условиях ионной силы и pH в течение от около 15 мин до около 30 мин для инактивации указанного количества вирусных частиц.
10. Способ по п.1, дополнительно включающий оптимизацию ионной силы и pH-условия образца для инактивации указанного количества инфекционных вирусных частиц путем проведения D-оптимального плана эксперимента.
11. Способ по п.10, отличающийся тем, что D-Оптимальный план эксперимента оценивает состояние pH образца и ионную силу образца и регулирует состояние pH образца и ионную силу образца для инактивации определенного количества вирусных частиц.
12. Способ по п.11, отличающийся тем, что D-Оптимальный план эксперимента дополнительно оценивает и корректирует одно или несколько из:
 - проводимость образца;
 - тип пептида или белка;
 - температуру образца;
 - кислотный титрант для регулирования pH образца;

способ введения вирусных частиц в образец; или наличие фильтрации после введения.

13. Способ по п.1, отличающийся тем, что образец представляет собой элюент хроматографии с белком А.

14. Способ по п.1, отличающийся тем, что ионную силу образца регулируют добавлением хлорида натрия, при этом концентрация хлорида натрия находится в диапазоне от около 1 мМ до около 100 мМ, или составляет около 25 мМ, около 50 мМ или около 100 мМ.

15. Способ по п.1, отличающийся тем, что концентрация хлорида натрия составляет около 25 мМ, около 50 мМ или около 100 мМ.

16. Способ по п.1, отличающийся тем, что значение pH образца регулируют с помощью фосфорной кислоты или глицина HCl.

17. Способ по п.1, отличающийся тем, что пептид или белок представляет собой антитело, имеющее изотип IgG1 или имеющее изотип IgG4.

18. Способ по п.1, отличающийся тем, что пептид или белок представляет собой моноклональное антитело или биспецифическое антитело.

19. Способ по п.1, отличающийся тем, что пептид или белок представляет собой антитело, фрагмент антитела, Fab-участок антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок, белковый фармацевтический продукт или лекарственное средство.

20. Способ получения препарата, содержащего представляющий интерес белок и уменьшенное количество вирусных частиц, из образца, содержащего представляющий интерес белок и инфекционную вирусную частицу, включающий:

подвергание образца воздействию pH выше около 3,6;

помещение образца в условия повышения ионной силы путем добавления хлорида натрия к исходному раствору, при этом концентрация хлорида натрия находится в диапазоне от около 1 мМ до около 100 мМ; и

поддержание образца в условиях pH и ионной силы в течение соответствующего периода времени для получения препарата, содержащего интересующий белок и уменьшенное количество вирусных частиц.

21. Способ по п.20, отличающийся тем, что концентрация интересующего белка в образце составляет более около 25 г/л.

22. Способ по п.20, отличающийся тем, что соответствующее количество времени составляет около 15 мин, около 20 мин, около 25 мин или около 30 мин.

23. Способ по п.20, отличающийся тем, что способ снижает количество инфекционных вирусных частиц из образца на около 3 LRF (логарифмический коэффициент уменьшения).

24. Способ по п.20, отличающийся тем, что способ снижает количество инфекционных вирусных частиц из образца на около 4 LRF (логарифмический коэффициент уменьшения).

25. Способ по п.20, отличающийся тем, что значение pH образца выше около pH 3,70, около pH 3,80, около pH 3,90 или около pH 4,0.

26. Способ по п.20, отличающийся тем, что значение pH образца находится в диапазоне от около pH 3,60 до около pH 4,0.

27. Способ по п.20, отличающийся тем, что образец представляет собой элюент хроматографии с белком А.

28. Способ по п.20, отличающийся тем, что концентрация соли превышает около 50 мМ или около 100 мМ.

29. Способ по п.20, отличающийся тем, что значение pH образца регулируют с помощью фосфорной кислоты или глицина HCl.

30. Способ очистки пептида или белка из образца, содержащего IgG1 или IgG4, включающий:

подвергание образца повышению ионной силы путем добавления соли, при этом концентрация хлорида натрия находится в диапазоне от около 1 мМ до около 100 мМ;

подвергание образца воздействию кислого pH, и

последующее поддержание образца в условиях ионной силы и pH в течение по меньшей мере около 15 мин для инактивации одной или большего количества вирусных частиц;

при этом образец содержит одну или большее количество примесей, включая вирусные частицы.

31. Способ по п.30, дополнительно включающий оптимизацию ионной силы и pH-условия образца для инактивации указанного количества инфекционных вирусных частиц путем проведения D-оптимального плана эксперимента.

32. Способ по п.30, отличающийся тем, что D-Оптимальный план эксперимента оценивает состояние pH образца и ионную силу образца и регулирует состояние pH образца и ионную силу образца для инактивации определенного количества вирусных частиц.

33. Способ по п.32, отличающийся тем, что D-Оптимальный план эксперимента дополнительно оценивает и корректирует одно или несколько из:

проводимость образца;

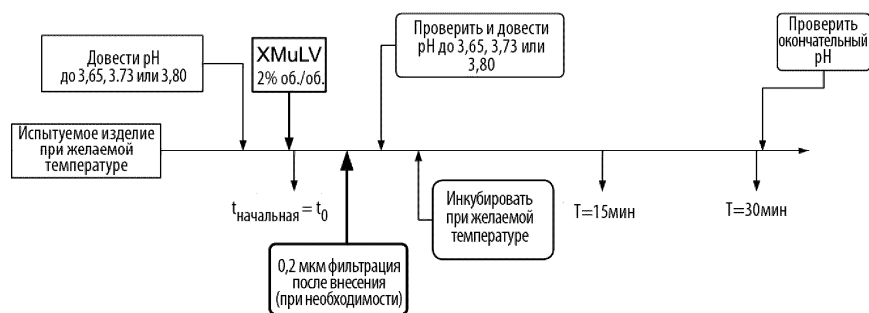
тип пептида или белка;

температуру образца;
кислотный титрант для регулирования рН образца;
способ введения вирусных частиц в образец; или
наличие фильтрации после введения.

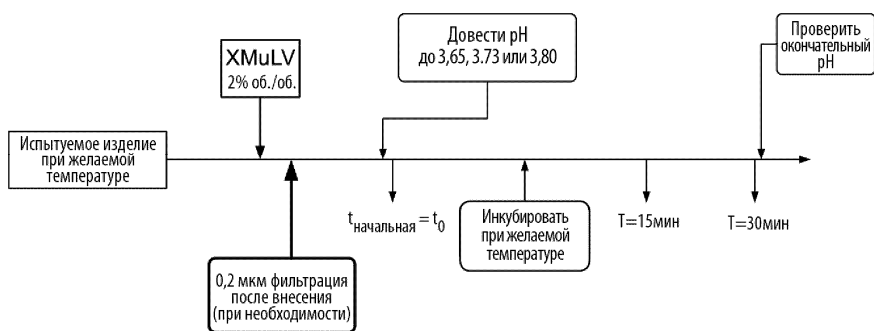
34. Способ по п.32, отличающийся тем, что значение рН образца регулируют с помощью фосфорной кислоты или глицина HCl.

35. Способ по п.1, отличающийся тем, что значение рН образца находится в диапазоне от около рН 3,60 до около рН 3,90; концентрация хлорида натрия составляет около 25 мМ, около 50 мМ или около 100 мМ; подвергание образца воздействию кислого рН осуществляют концентрацией фосфорной кислоты или глицина HCl около 0,25 М; и степень инактивации вирусных частиц составляет по меньшей мере около 3 LRF (логарифмический коэффициент уменьшения).

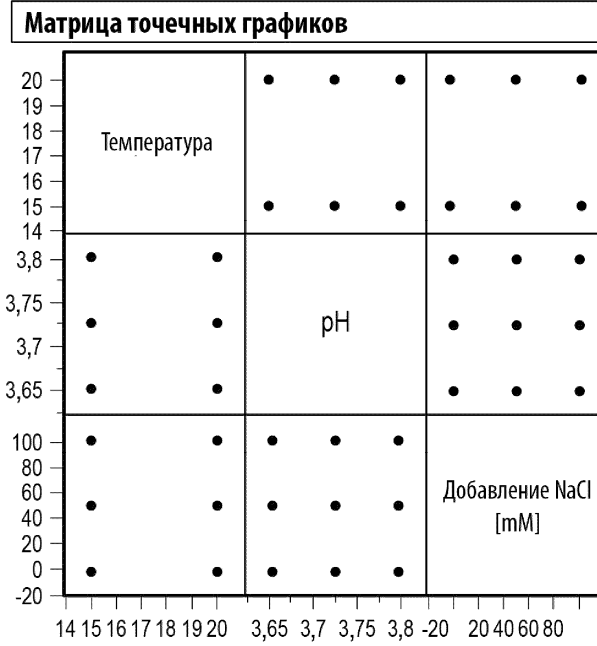
36. Способ по п.20, отличающийся тем, что значение рН образца находится в диапазоне от около рН 3,60 до около рН 3,90; концентрация хлорида натрия составляет около 25 мМ, около 50 мМ или около 100 мМ; подвергание образца воздействию рН от около рН 3,60 до около 3,90 осуществляют концентрацией фосфорной кислоты или глицина HCl около 0,25 М; и степень инактивации вирусных частиц составляет по меньшей мере около 3 LRF (логарифмический коэффициент уменьшения).



Фиг. 1А



Фиг. 1В

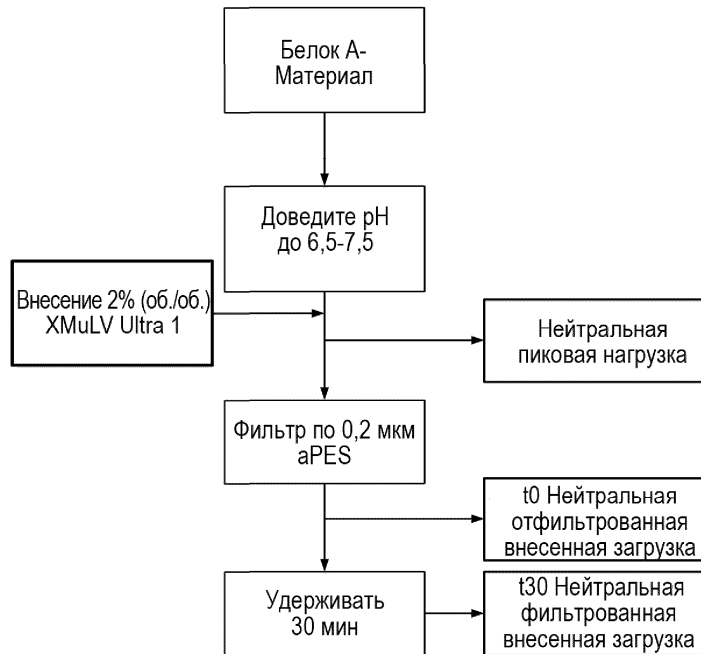


Многомерная

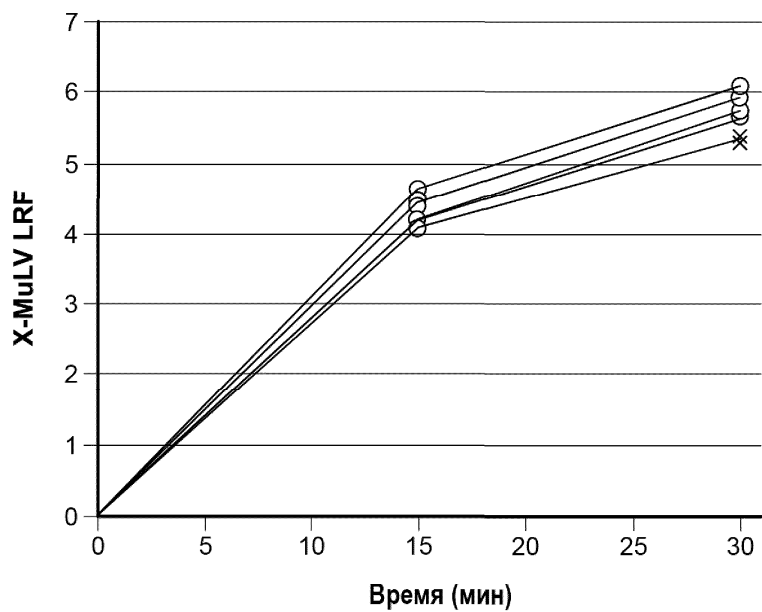
Корреляция

	Температура	pH	Добавление NaCl [mM]
Температура	1,0000	-0,0835	-0,0835
pH	-0,0835	1,0000	-0,0061
Добавление NaCl [mM]	-0,0835	-0,0061	1,0000

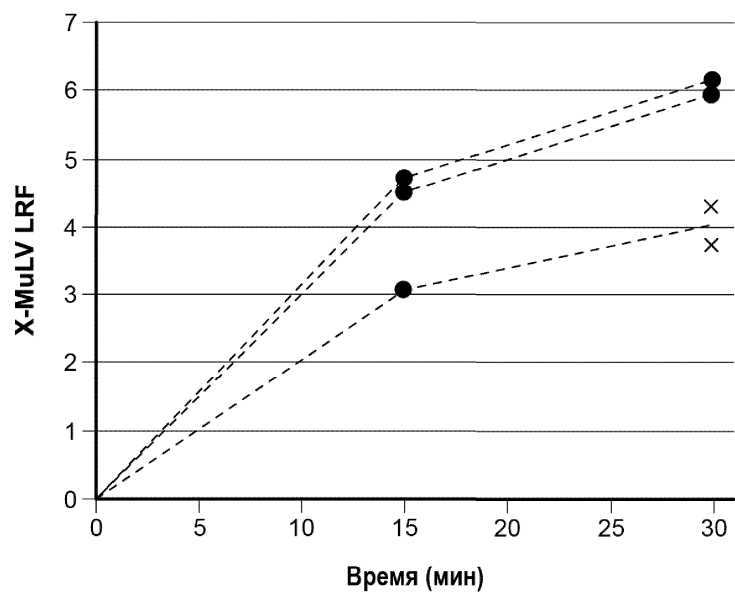
Фиг. 2А



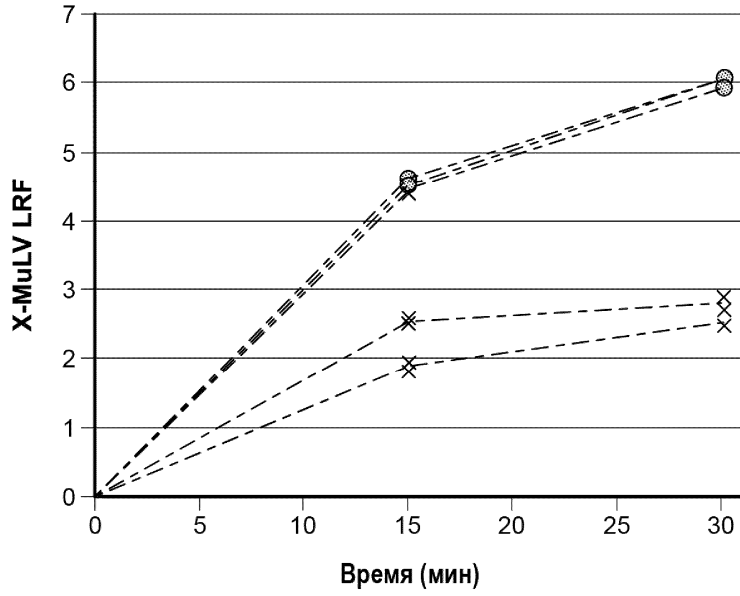
Фиг. 2В



Диапазон pH
 ○ 3,63 - 3,67 X-MuLV обнаружен
 ● 3,71 - 3,75 O Нет
 ⊗ 3,78 - 3,82 X Да
 Фиг. 3А

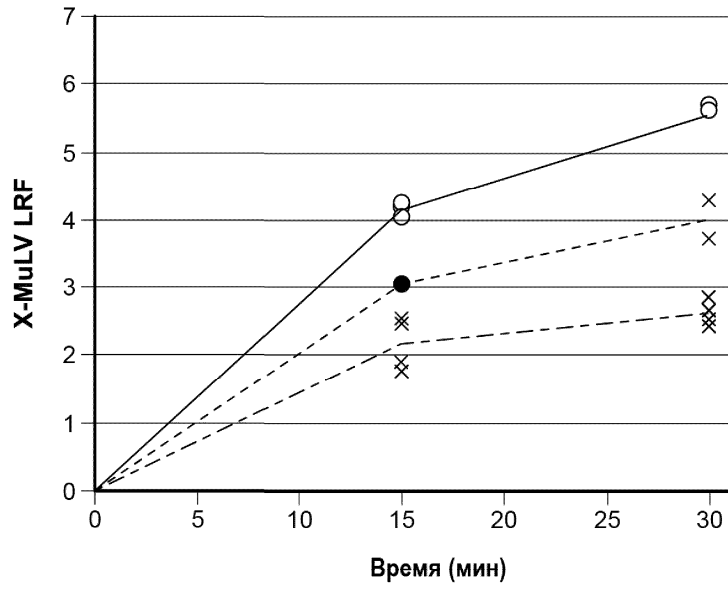


Диапазон pH
 ○ 3,63 - 3,67 X-MuLV обнаружен
 ● 3,71 - 3,75 O Нет
 ⊗ 3,78 - 3,82 X Да
 Фиг. 3В



Диапазон pH
 ○ 3,63 - 3,67 X-MuLV обнаружен
 ● 3,71 - 3,75 O Нет
 ● 3,78 - 3,82 X Да

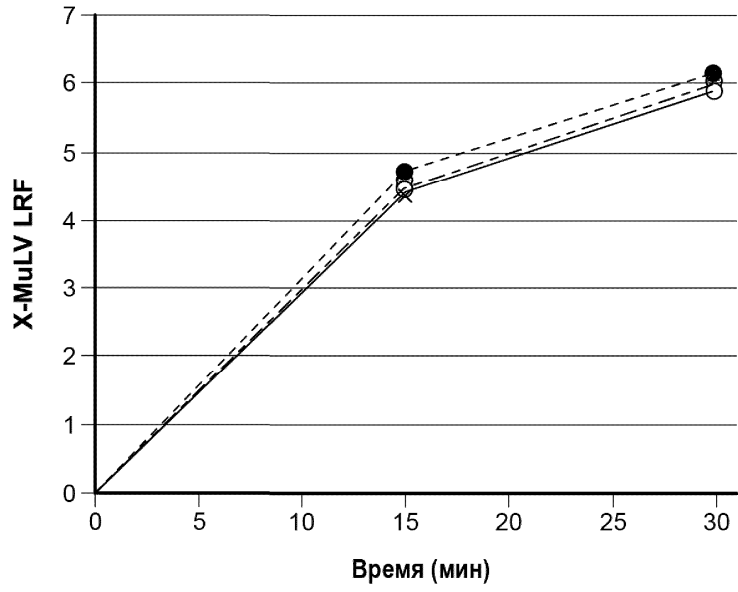
Фиг. 3С



Диапазон pH
 ○ 3,63 - 3,67 X-MuLV обнаружен
 ● 3,71 - 3,75 O Нет
 ● 3,78 - 3,82 X Да

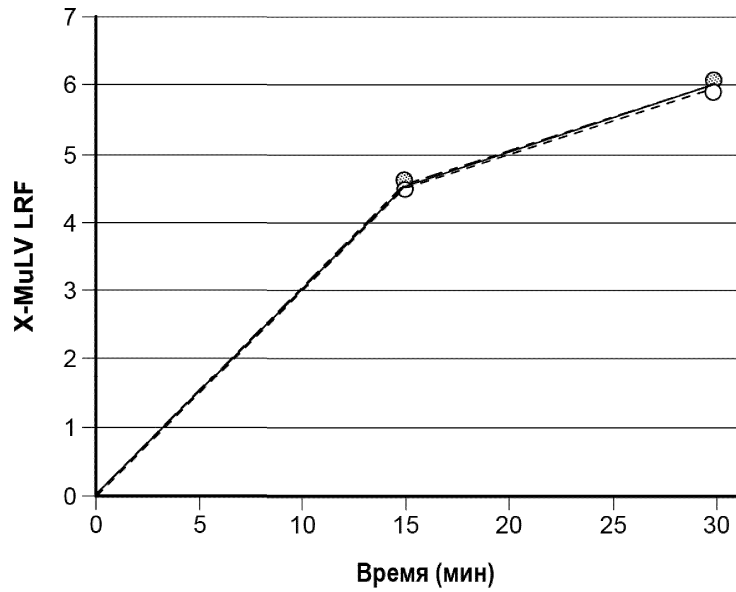
Фиг. 4А

047148



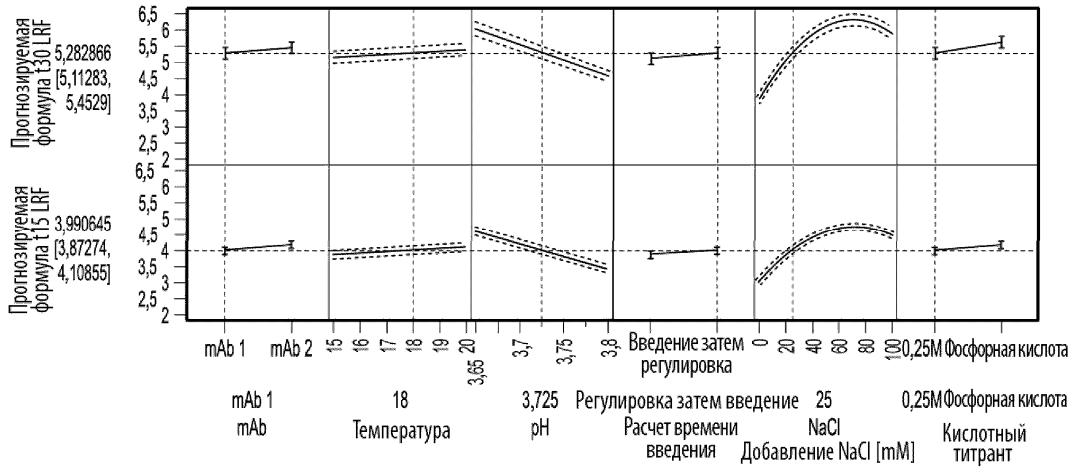
Диапазон pH
○ 3,63 - 3,67 X-MuLV обнаружен
● 3,71 - 3,75 O Нет
● 3,78 - 3,82 X Да

Фиг. 4B

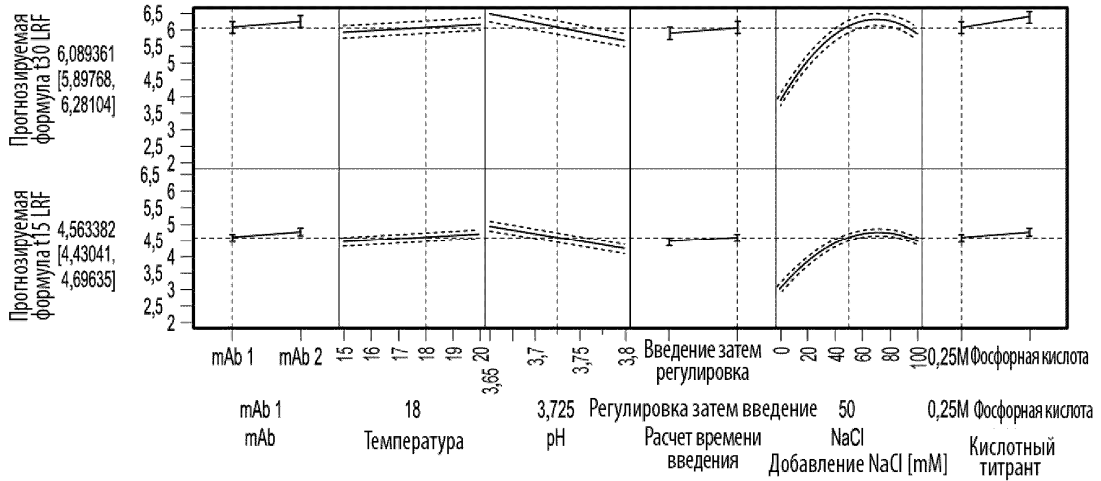


Диапазон pH
○ 3,63 - 3,67 X-MuLV обнаружен
● 3,71 - 3,75 O Нет
● 3,78 - 3,82 X Да

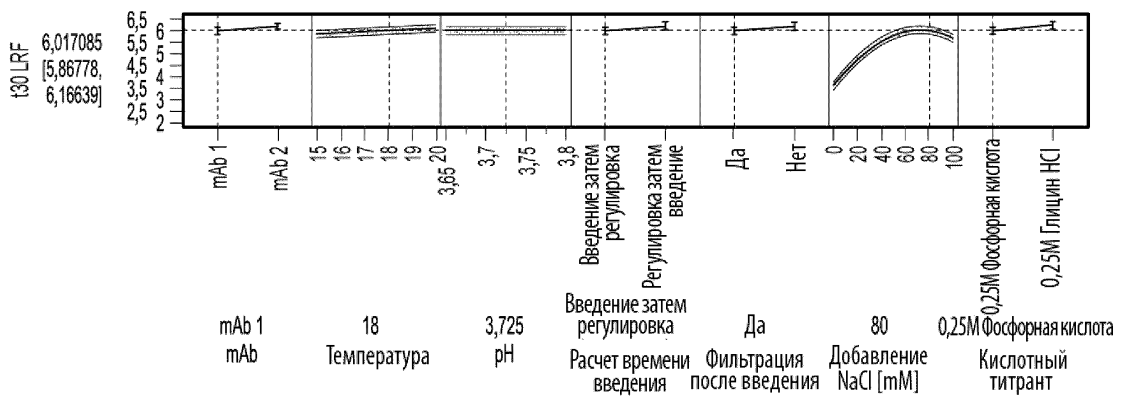
Фиг. 4C



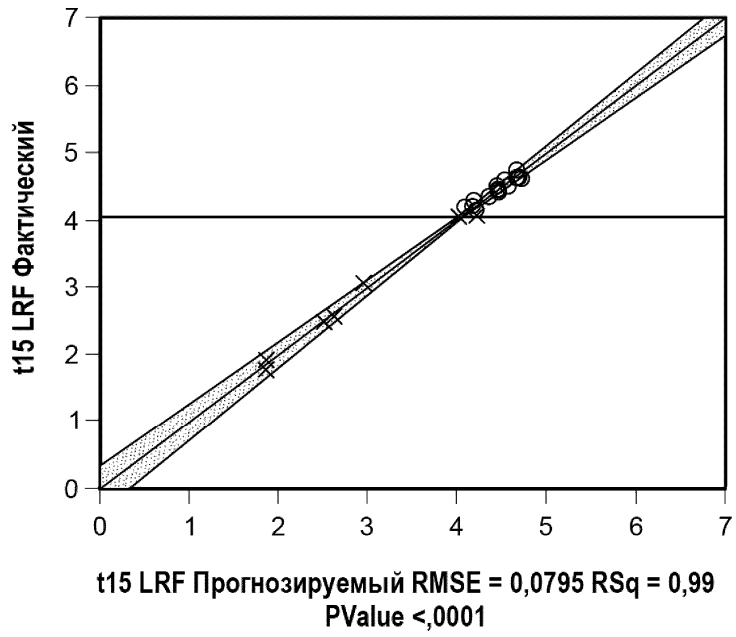
Фиг. 4D



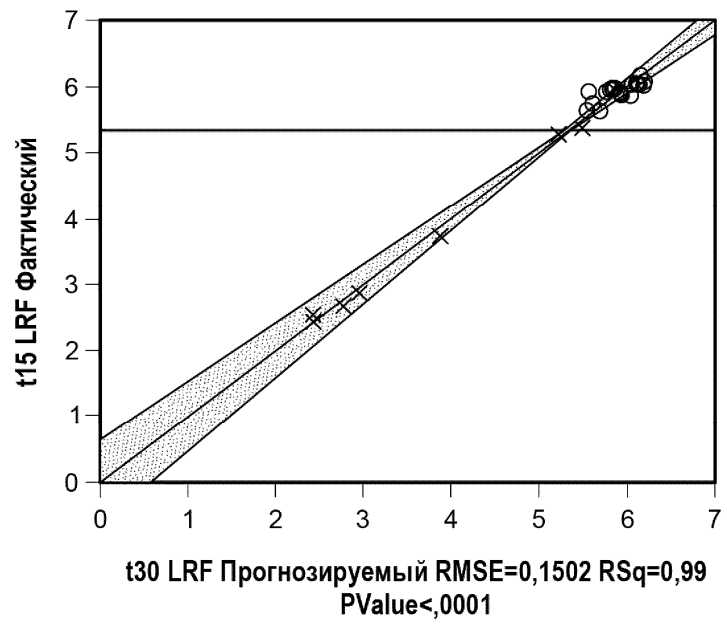
Фиг. 4E



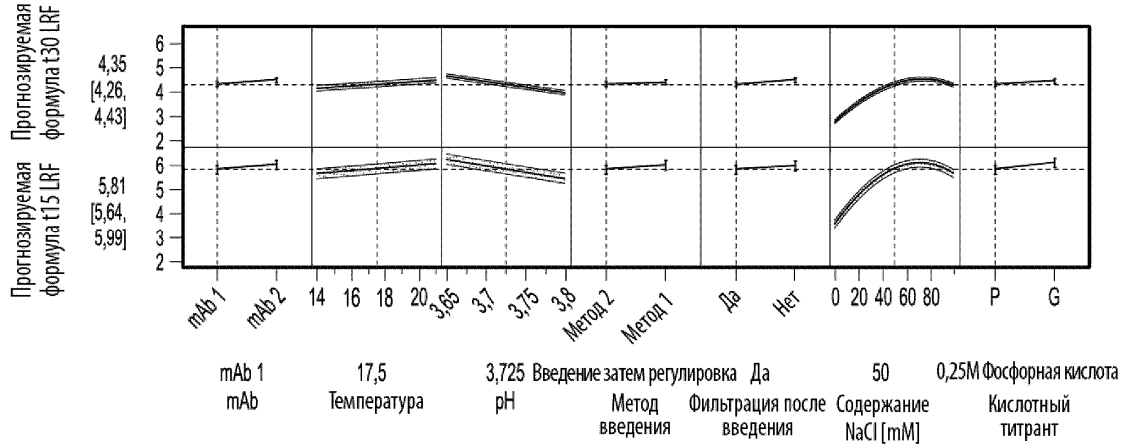
Фиг. 4F



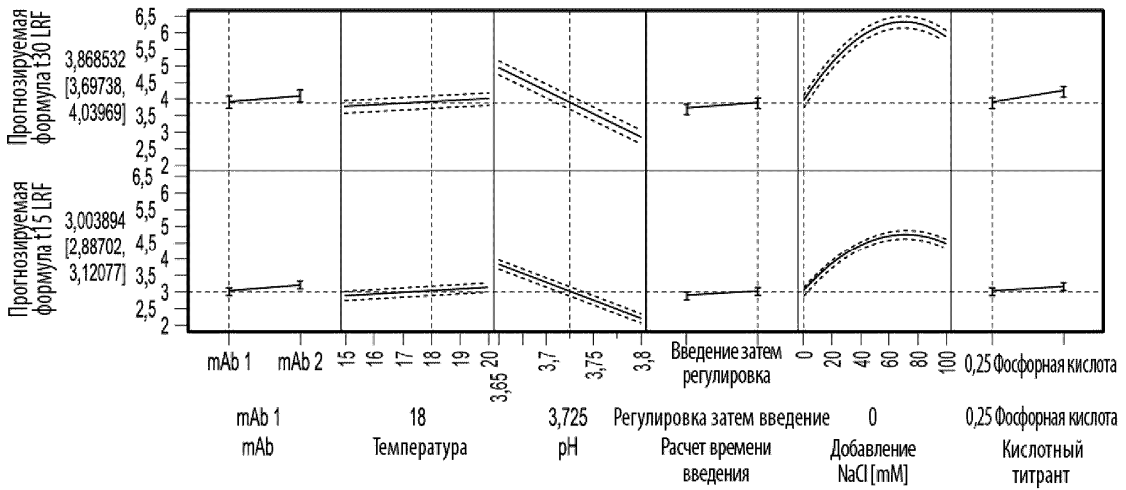
Фиг. 5А



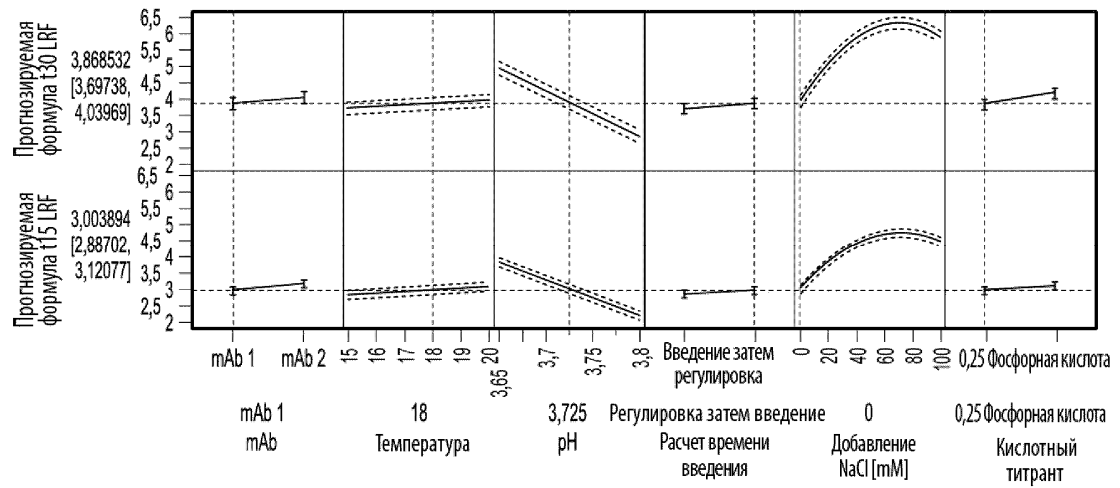
Фиг. 5В



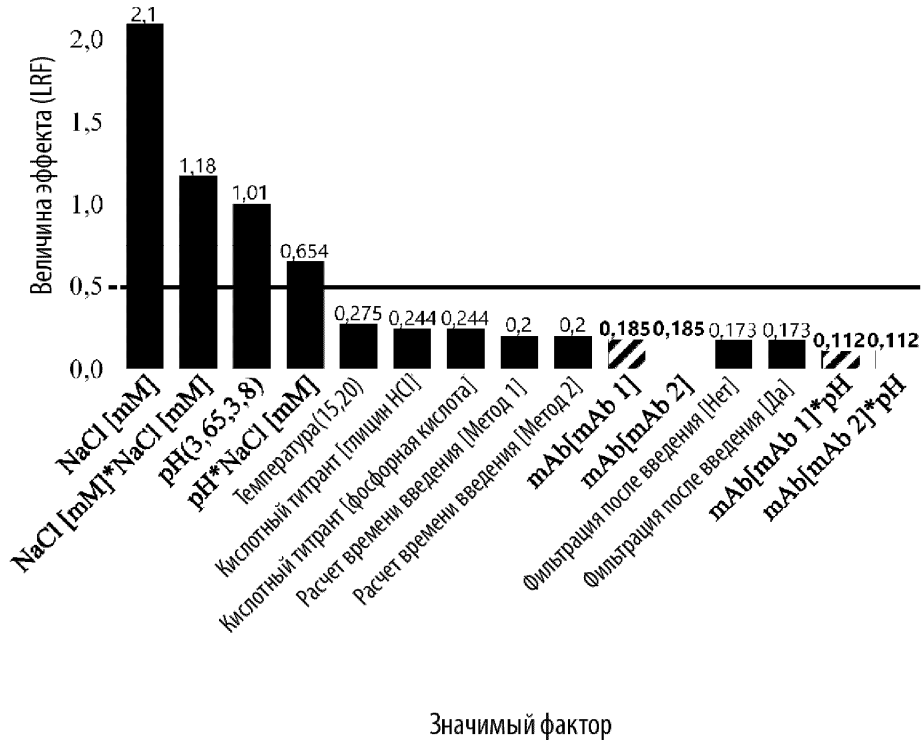
Фиг. 6



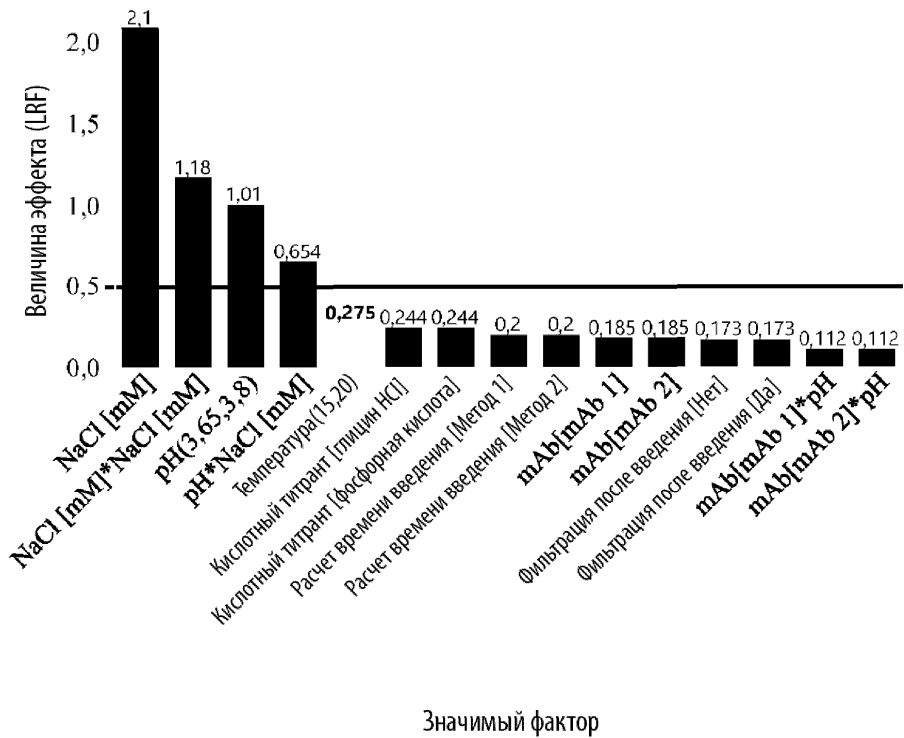
Фиг. 7



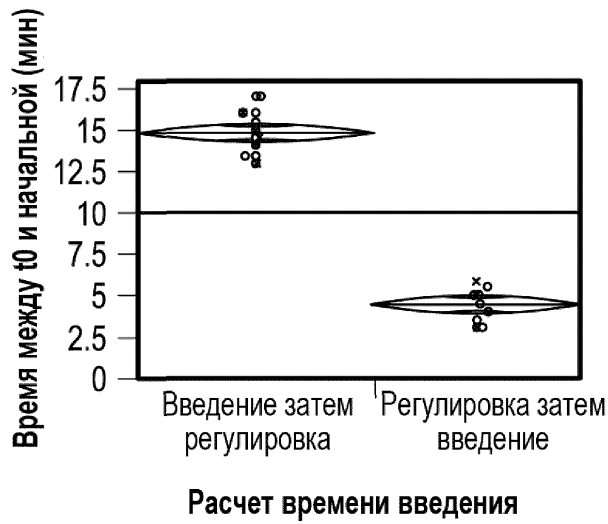
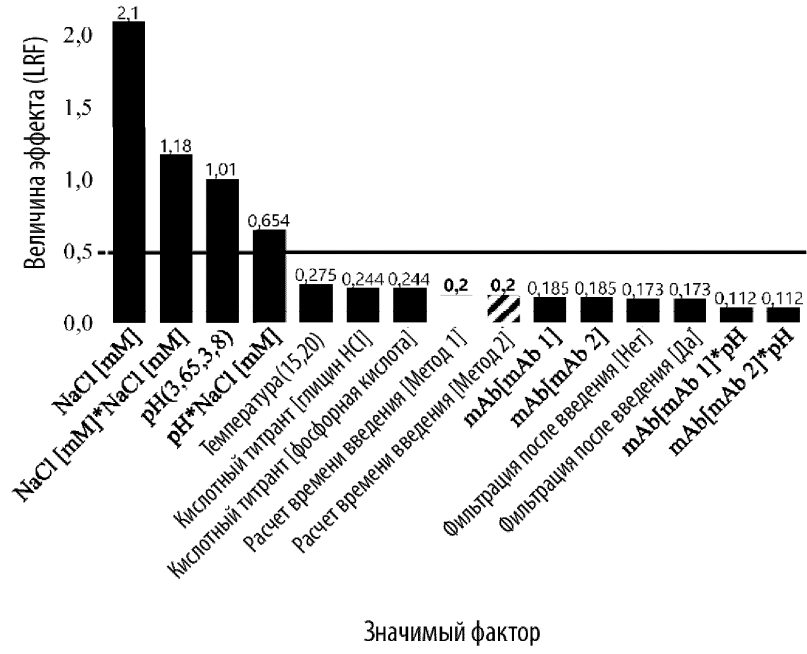
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11