

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202491244 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.09.06

(51) Int. Cl. C07K 1/30 (2006.01)  
C07K 1/22 (2006.01)  
C07K 1/14 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.12.07

---

(54) СПОСОБ ОЧИСТКИ БЕЛКОВ

---

(31) 21213254.2

(32) 2021.12.08

(33) EP

(86) PCT/EP2022/084766

(87) WO 2023/104874 2023.06.15

(88) 2023.08.24

(71) Заявитель:  
ФЕРРИНГ Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:

Камхи Эял, Минтц Мишель,  
Ахаронов Дженни, Эрез Элиноор (IL)

(74) Представитель:

Билык А.В., Поликарпов А.В.,  
Соколова М.В., Путинцев А.И.,  
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев  
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)

---

(57) В настоящем изобретении представлены способы для применения в очистке белков. Раскрываемые способы помогают избежать событий выпадения в осадок, и их можно применять для улучшения производительности и/или эффективности протоколов очистки белков. Способы можно применять для улучшения или получения растворов, предназначенных для применения в способах очистки белков и/или экстракции белков. Одним из конкретных применений раскрываемого способа является аффинная хроматография, где его можно применять для получения загрузочных растворов.

---

A1

202491244

202491244

A1

## СПОСОБ ОЧИСТКИ БЕЛКОВ

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

В настоящем изобретении представлены способы для применения в очистке белков. Раскрываемые способы помогают избежать событий выпадения в осадок, и их можно применять для улучшения производительности и/или эффективности протоколов очистки белков. Особенное применение способы могут найти в аффинной хроматографии.

### ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Белки и пептиды для применения в медицине зачастую получают посредством рекомбинантных систем. В таких случаях применимый белок или применимые пептиды зачастую необходимо очистить и/или экстрагировать из сложных смесей. Необходимы чувствительные и надежные способы очистки для обеспечения того, чтобы целевые белки и пептиды могли быть очищены до подходящих выхода и степени чистоты.

Конкретные (или целевые) белки или пептиды можно очистить посредством любой из ряда различных и хорошо известных методик. Аффинная хроматография представляет собой особенно точный, надежный и чувствительный способ экстракции с высокой степенью чистоты конкретного целевого белка/пептида. Однако эффективность и производительность данных методик легко снижаются в результате событий выпадения в осадок.

Настоящее изобретение направлено на обеспечение способов и методик, которые можно применять для минимизации данных событий выпадения в осадок и, в свою очередь, улучшения выхода и степени чистоты очищенных белков.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении представлены способы, которые позволяют улучшить или получить растворы для применения в способах очистки и/или экстракции белков.

Уточняется, что раствор может содержать растворитель и растворенное вещество; растворенный компонент может содержать один или несколько белков или пептидов. Соответственно, описанные в данном документе способы можно применять к растворам, которые содержат белок(белки) или пептид(ы).

Для удобства и при использовании в данном документе термин "белок" также охватывает более короткие молекулы, которые иначе могут называться "пептидами". Соответственно, раствор, содержащий белок, может, например, содержать один или несколько белков и/или пептид(ов).

Растворы, особенно содержащие белок(белки), подвержены или склонны к событиям выпадения в осадок. Например, выпадение в осадок может происходить при изменении

сольватационного потенциала растворяющего компонента раствора. Не ограничиваясь теорией можно утверждать, что изменение сольватационного потенциала может снижать растворимость растворенного вещества (например, белка и/или пептида), что приведет в результате к некоторому выпадению в осадок растворенного вещества.

Добавление в раствор одного или нескольких реагентов может изменить сольватационный потенциал раствора. Кроме того или альтернативно, сольватационный потенциал раствора также могут изменить изменения его pH, температуры и/или состава.

Учитывая вышеизложенное, выпадение в осадок белка в растворе может происходить в ответ на добавление реагента и/или изменения pH, температуры и/или состава раствора.

Описанные в данном документе способы можно применять к растворам, которые содержат один или несколько белков, для очистки или экстракции. В дальнейшем термин "очистка" будет использоваться для описания всех способов/событий очистки и/или экстракции белков/пептидов.

Один или несколько белков для очистки могут называться "целевым(целевыми) белком(белками)". Следует понимать, что термин "целевой белок" относится к любому белку (или пептиду), который подлежит избирательной экстракции и/или очистке из раствора. Из простой или сложной смеси других растворенных веществ, например, другого белка(белков), можно очистить или экстрагировать любой заданный целевой белок. Например, один или несколько целевых белков можно очистить или экстрагировать из раствора, содержащего гомогенную или гетерогенную смесь белков.

Количество целевого белка, присутствующего в растворе, может варьироваться. Например, любой из описанных в данном документе растворов (в том числе, например, любой из описанных ниже загрузочных растворов) может содержать от приблизительно 0,01 мг/мл белка до 0,50 мг/мл любого заданного целевого белка. Например, раствор по настоящему изобретению может содержать приблизительно 0,02 мг/мл, 0,03 мг/мл, 0,04 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,06 мг/мл, 0,07 мг/мл, 0,08 мг/мл, 0,09 мг/мл, 0,10 мг/мл, 0,11 мг/мл, 0,12 мг/мл, 0,125 мг/мл, 0,13 мг/мл, 0,14 мг/мл, 0,15 мг/мл, 0,16 мг/мл, 0,17 мг/мл, 0,175 мг/мл, 0,18 мг/мл, 0,19 мг/мл, 0,20 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,25 мг/мл, 0,275 мг/мл, 0,30 мг/мл, 0,325 мг/мл, 0,35 мг/мл, 0,375 мг/мл, 0,40 мг/мл, 0,425 мг/мл, 0,45 мг/мл или приблизительно 0,475 мг/мл любого заданного целевого белка. Например, раствор по настоящему изобретению может содержать от приблизительно 0,07 до приблизительно 0,138 мг/мл целевого белка. Согласно одной из идей раствор по настоящему изобретению может содержать приблизительно 0,09 мг/мл целевого белка.

Содержание общего белка в растворе (то есть общего количества всех белков в растворе по настоящему изобретению (включая любой целевой белок)) также может варьироваться и может находиться в диапазоне от приблизительно 0,5 до приблизительно 2 мг/мл, например, приблизительно 0,6 мг/мл, 0,7 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,9 мг/мл, 1,0 мг/мл, 1,1 мг/мл, 1,2 мг/мл, 1,3 мг/мл, 1,4 мг/мл, 1,5 мг/мл, 1,6 мг/мл, 1,7 мг/мл, 1,8 мг/мл или 1,9 мг/мл. Содержание общего белка может составлять от приблизительно 0,7 до 1,8 мг/мл. В одном варианте осуществления содержание общего белка может составлять 1,3 мг/мл.

Белки можно экстрагировать или очищать из растворов (в том числе растворов, которые содержат гетерогенные или гомогенные смеси белков) с помощью ряда различных методик. Например, белки можно очищать или экстрагировать с помощью эксклюзионной хроматографии, хроматографии гидрофобных взаимодействий, ионообменной хроматографии, электрофореза в свободном потоке, аффинной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC).

Например, аффинная хроматография представляет собой методику разделения, основанную на взаимодействии целевого белка и лиганда. Как правило, аффинная хроматография предусматривает использование смолы или матрицы, связанной с лигандом, специфичным в отношении одного или нескольких целевых белков. Лиганд может представлять собой, например, антитело или лектин. Методики аффинной очистки, как правило, высокоспецифичны, но также характеризуются тенденцией к неспецифическому связыванию и засорению выпавшими в осадок растворенными веществами, что снижает общую эффективность способа и степень чистоты полученного на выходе продукта.

Описанные в данном документе способы можно применять к растворам, которые предназначены для использования в процедуре очистки белка, например, в способе хроматографии или аффинной хроматографии. Например, раствор, подлежащий обработке согласно описанному в данном документе способу, может содержать один или несколько целевых белков и может быть предназначен для загрузки в колонку для аффинной хроматографии. Растворы данного типа можно назвать "загрузочными растворами".

Загрузочные растворы, из которых необходимо экстрагировать или очистить один или несколько целевых белков, также могут потребовать оптимизации для уменьшения проблем, связанных, например, с неспецифическим связыванием (например, которое может возникать между нецелевыми растворенными веществами в загрузочном растворе

и (n-аффинной) матрицей хроматографической колонки) и выпадением в осадок растворенного вещества, в том числе выпадением в осадок целевого белка. Специалисту в данной области техники будет понятно, что оптимизация загрузочного раствора может обеспечить максимальный выход и максимальную степень чистоты белка и/или надлежащее функционирование выбранного способа очистки/экстракции.

Во избежание сомнений термин "выход белка" относится к количеству целевого белка, полученного в результате процедуры очистки или экстракции. На выход влияние оказывают многие факторы, например, выход может быть ниже ожидаемого, если в загрузочном растворе наблюдается выпадение в осадок одного или нескольких растворенных веществ.

Термин "чистота" относится к уровню загрязнения в любой из полученных фракций. Фракция, содержащая один или несколько целевых белков, должна иметь как можно более низкий уровень загрязнения. Нежелательными загрязнителями могут быть нецелевые растворенные вещества, например нецелевые белки. Чистая или практически чистая фракция может иметь низкий или не поддающийся обнаружению уровень загрязнения. Описанные в данном документе способы можно применять для уменьшения уровня загрязнения в любой заданной фракции, в частности в тех фракциях, которые содержат целевой(целевые) белок(белки).

Ввиду вышесказанного эффективным способом очистки белка является тот, который обеспечивает достаточную величину степени чистоты целевого белка с приемлемым уровнем загрязнения.

Растворы, из которых необходимо экстрагировать или очистить один или несколько целевых белков, могут нуждаться в оптимизации перед началом процедуры их очистки, при этом какая-либо оптимизация необходима для обеспечения того, чтобы выбранная процедура очистки давала целевой(целевые) белок(белки) с подходящими выходом и степенью чистоты.

Протоколы оптимизации могут предусматривать, например, корректировку состава и/или pH раствора перед началом выбранной процедуры его очистки.

В некоторых случаях протокол оптимизации сам по себе может вызывать выпадение в осадок белка. Другими словами, параметры, которые обеспечивают оптимальное выполнение процедуры очистки/экстракции, а также степень чистоты и выход, иногда противоречат тем параметрам, которые минимизируют события неспецифического связывания и выпадение в осадок растворенных веществ (в том числе целевого белка). И

действительно, выпадение в осадок белка иногда происходит вследствие протоколов, используемых (и которые необходимы) для оптимизации загрузочных растворов.

Представленные в настоящем изобретении способы позволяют оптимизировать растворы, содержащие целевые белки, для применения в способах очистки, но в то же время уменьшить или минимизировать риск того, что такой способ оптимизации приведет к выпадению в осадок растворенного вещества (т. е. целевого белка).

Более того, описанные в данном документе способы позволяют оптимизировать загрузочные растворы для достижения максимальной эффективности, степени чистоты и выхода в процедуре очистки, избегая в то же время тех событий выпадения в осадок, которые связаны с методиками оптимизации предшествующего уровня техники.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что любой способ, который позволяет оптимизировать загрузочный раствор, но уменьшает риск выпадения в осадок растворенных веществ, поможет увеличить выход целевого белка, степень чистоты такого выхода и срок службы устройства для очистки (например, колонки для очистки).

Не ограничиваясь теорией, данные преимущества достигаются тем, что описанные в данном документе способы способствуют удерживанию белков в растворе, что предупреждает засорение устройства, например колонок, используемых в процедурах хроматографии и аффинной хроматографии, а также уменьшает неспецифическое связывание.

Соответственно, в первом аспекте представлен способ предупреждения выпадения в осадок из раствора, при этом указанный способ предусматривает приведение раствора в контакт с некоторым количеством полисорбата.

Термин "полисорбат" может охватывать всех представителей соответствующего класса масляных жидких эмульгаторов, полученных из этоксилированного сорбитана (производного сорбита), этерифицированного жирными кислотами. Термин "полисорбат" может дополнительно включать полисорбат 20 (PS20), полисорбат 40 (PS40), полисорбат 60 (PS60) и полисорбат 80 (PS80). Термин "полисорбат" может включать, например, соединения, известные под торговыми названиями Kolliphor, Scattics, Alkest, Canarcel и Tween.

В еще одном дополнительном аспекте представлен способ предупреждения выпадения в осадок из раствора, при этом указанный способ предусматривает приведение раствора в контакт с некоторым количеством полисорбата 20 (PS20).

Раствор может содержать одно или несколько растворенных веществ.

Растворенные вещества могут содержать один или несколько белков.

Растворенные вещества могут включать один или несколько целевых белков, а именно белок или белки, которые подлежат экстрагированию или очистке из раствора.

При определенных условиях одно или несколько растворенных веществ, например один или несколько белков (в том числе один или несколько целевых белков), могут выпадать в осадок из раствора. Описанные в данном документе способы можно применять для предупреждения, уменьшения или подавления выпадения в осадок растворенных веществ из растворов. И действительно, описанные в данном документе способы можно применять для предупреждения, уменьшения или подавления выпадения в осадок растворенных веществ из растворов при тех условиях, которые обычно могут вызывать выпадение в осадок.

Раствор может представлять собой загрузочный раствор. Соответственно, описанные в данном документе способы можно применять для предупреждения выпадения в осадок из загрузочного раствора, при этом указанный способ предусматривает приведение загрузочного раствора в контакт с некоторым количеством полисорбата, например полисорбата 20 (PS20).

Например, раскрываемый способ можно применять для предупреждения выпадения в осадок одного или нескольких белков из загрузочного раствора и/или для предупреждения выпадения в осадок одного или нескольких целевых белков из загрузочного раствора. Способы данного типа могут включать приведение загрузочного раствора в контакт с некоторым количеством полисорбата, например полисорбата 20 (PS20). Более того, с помощью данных способов можно предупреждать или уменьшать количество событий выпадения в осадок, даже если растворы, например загрузочные растворы, оптимизированы для применения в способе хроматографии или аффинной хроматографии.

Однако полисорбат (включая PS20) образует радикалы, которые могут увеличить окисление целевых белков для очистки. Было показано, что выбор конкретной концентрации полисорбата и/или времени инкубации снижает риск таких событий окисления.

Полисорбат (например, полисорбат 20) можно добавлять в раствор, например в загрузочный раствор, так, чтобы конечная концентрация полисорбата (например, полисорбата 20) в растворе составляла от приблизительно 0,1% до 5% (% масса/объем). Например, полисорбат (в том числе полисорбат 20) можно добавлять так, чтобы конечная концентрация полисорбата (например, полисорбата 20) в растворе составляла приблизительно 0,2%, приблизительно 0,3%, приблизительно 0,4%, приблизительно 0,5%,

приблизительно 0,6%, приблизительно 0,7%, приблизительно 0,8%, приблизительно 0,9%, приблизительно 1,0%, приблизительно 1,1%, приблизительно 1,2%, приблизительно 1,3%, приблизительно 1,4%, приблизительно 1,5%, приблизительно 1,6%, приблизительно 1,7%, приблизительно 1,8%, приблизительно 1,9%, приблизительно 2%, приблизительно 2,1%, приблизительно 2,2%, приблизительно 2,3%, приблизительно 2,4%, приблизительно 2,5%, приблизительно 2,6%, приблизительно 2,7%, приблизительно 2,8%, приблизительно 2,9%, 3,0%, приблизительно 3,1%, приблизительно 3,2%, приблизительно 3,3%, приблизительно 3,4%, приблизительно 3,5%, приблизительно 3,6%, приблизительно 3,7%, приблизительно 3,8%, приблизительно 3,9%, приблизительно 4,0%, приблизительно 4,1%, приблизительно 4,2%, приблизительно 4,3%, приблизительно 4,4%, приблизительно 4,5%, приблизительно 4,6%, приблизительно 4,7%, приблизительно 4,8% и приблизительно 4,9% (все концентрации представлены в % масса/объем).

В контексте данного изобретения выражение "приблизительно" может означать  $\pm$  конечную концентрацию полисорбата/полисорбата 20 (в растворе), составляющую 0,05% (% масса/объем).

В описанных в данном документе способах можно применять полисорбат/полисорбат 20 в конечной концентрации (в растворе), составляющей 0,1%, 0,25%, 0,5%, 0,75% или 1,0% (% масса/объем).

После добавления полисорбата (в том числе полисорбата 20) в раствор смесь полисорбата или PS20/раствора инкубируют при подходящей температуре в течение заранее определенной продолжительности времени.

Смесь полисорбата или PS20/раствора можно инкубировать в течение периода от приблизительно 1 мин до 2 часов. Например, смесь PS20/раствора можно инкубировать в течение приблизительно 5 минут, приблизительно 10 минут, приблизительно 15 минут, приблизительно 20 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 40 минут, приблизительно 50 минут, приблизительно 70 минут, приблизительно 80 минут, приблизительно 90 минут, приблизительно 100 минут, приблизительно 110 минут или приблизительно 115 минут. В контексте продолжительности времени инкубации выражение "приблизительно" может означать  $\pm 5$  мин. Например, смесь полисорбата или PS20/раствора можно инкубировать в течение периода от 15 до 25 минут (например, 20 минут).

Смесь полисорбата или PS20/раствора можно инкубировать при температуре в диапазоне от приблизительно 10°C до 30°C. Например, смесь полисорбата или PS20/раствора можно инкубировать при температуре, составляющей приблизительно



11°C, приблизительно 12°C, приблизительно 13°C, приблизительно 14°C, приблизительно 15°C, приблизительно 16°C, приблизительно 17°C, приблизительно 18°C, приблизительно 19°C, приблизительно 20°C, приблизительно 21°C, приблизительно 22°C, приблизительно 23°C, приблизительно 24°C, приблизительно 25°C, приблизительно 26°C, приблизительно 27°C, приблизительно 28°C или приблизительно 29°C. В контексте температуры инкубации выражение "приблизительно" может означать  $\pm 2^\circ\text{C}$ . Смесь полисорбата или PS20/раствора можно инкубировать при температуре в диапазоне от приблизительно 21°C до 25°C (например, 23°C).

Полисорбат или полисорбат 20 можно добавлять в раствор или загрузочный раствор до конечной концентрации, составляющей 0,5% (% масса/объем), и инкубировать смесь полисорбата или полисорбата 20/(загрузочного) раствора в течение  $20 \pm 5$  минут при температуре  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Как утверждалось ранее, раствор, например загрузочный раствор, можно подвергнуть некоторому протоколу оптимизации, прежде чем он будет подвергнут способу очистки (например, хроматографии). Параметры, выбранные для оптимизации, могут быть такими, которые оказывают определенное влияние на эффективность и/или выход целевого белка по результатам реализации способа очистки белка/пептида (в который подают загрузочный раствор). И действительно, протокол оптимизации и связанное с ним изменение одного или нескольких параметров раствора могут привести к агрегации и/или слипанию белка и, в конечном итоге, к его выпадению в осадок в загрузочном растворе.

Значение pH загрузочного раствора можно изменить так, чтобы оно было оптимальным для способа аффинной очистки. Значение pH, оптимальное для способа очистки белков, может быть недостаточно оптимальным для растворимости некоторых или всех белков в загрузочном растворе, в том числе некоторых или всех целевых белков. По этой причине изменение значения pH в ходе протокола оптимизации может привести к выпадению в осадок одного или нескольких белков или пептидов в загрузочном растворе.

Оптимальное значение pH раствора (или загрузочного раствора) для применения в процедуре очистки белка, например процедуре хроматографической очистки, может варьироваться в зависимости от природы раствора, подлежащего очистке белка и/или особенностей подлежащей применению процедуры очистки белка. Например, оптимальное значение pH может составлять примерно pH 4, pH 4,5, pH 5, pH 5,5, pH 6, pH 6,5, pH 7, pH 7,5, pH 8, pH 8,5, pH 9 или pH 9,5. Соответственно, оптимизация может включать корректировку (например, путем титрования) раствора с одного значения pH

(например, недостаточно оптимального значения рН) на другое, оптимальное значение рН.

Проводимость раствора, например загрузочного раствора, также можно изменить так, чтобы она была оптимальной для способа аффинной очистки. Проводимость относится к удельной проводимости раствора и выражается в миллисименсах (мСм). Значение проводимости, оптимальное для способа очистки белков, может быть недостаточно оптимальным для растворимости некоторых или всех белков в загрузочном растворе, в том числе некоторых или всех целевых белков. По этой причине изменение значения проводимости в ходе протокола оптимизации может привести к выпадению в осадок одного или нескольких белков или пептидов в загрузочном растворе.

Оптимальное значение проводимости раствора (или загрузочного раствора) для применения в процедуре очистки белка, например процедуре хроматографической очистки, может варьироваться в зависимости от природы раствора, подлежащего очистке белка и/или особенностей подлежащей применению процедуры очистки белка. Например, оптимальное значение проводимости может составлять примерно  $8 \pm 2$  мСм/см,  $9 \pm 2$  мСм/см,  $10 \pm 2$  мСм/см,  $12 \pm 2$  мСм/см,  $14 \pm 2$  мСм/см,  $16 \pm 2$  мСм/см,  $18 \pm 2$  мСм/см,  $20 \pm 2$  мСм/см,  $22 \pm 2$  мСм/см или  $24 \pm 2$  мСм/см. Соответственно, оптимизация может включать корректировку раствора с одного значения проводимости (например, недостаточно оптимального значения проводимости) на другое оптимальное значение проводимости.

Хотя отдельное изменение значения рН и/или проводимости раствора (например, загрузочного раствора) может привести к определенному уровню выпадения в осадок белка/пептида, влияние совместного изменения значений рН и проводимости может быть значительным, и в растворе может осаждаться большее количество белка(белков) и/или пептид(пептидов).

Ввиду вышеизложенного представлен способ предупреждения выпадения в осадок белков в загрузочном растворе, при этом указанный способ предусматривает приведение загрузочного раствора в контакт с некоторым количеством полисорбата. Более того, представлен способ предупреждения выпадения в осадок белков в загрузочном растворе, при этом указанный способ предусматривает приведение загрузочного раствора в контакт с некоторым количеством полисорбата 20 (PS20).

Следует отметить, что термин "предупреждение" может охватывать любое снижение в случае выпадения в осадок из загрузочного раствора по сравнению со скоростью или количеством выпадения в осадок из загрузочного раствора, не подвергнутого способу по

настоящему изобретению (т. е. не приведенного в контакт с полисорбатом/полисорбатом 20 (PS20)).

Загрузочный раствор (в который добавляют определенное количество полисорбата или PS20) можно оптимизировать для способа аффинной хроматографии.

Например, может потребоваться оптимизация pH загрузочного раствора.

Дополнительно или альтернативно может потребоваться оптимизация проводимости загрузочного раствора.

Раскрываемый способ может обеспечить, чтобы по меньшей мере целевой(целевые) белок(белки) или пептид(пептиды) оставались полностью или частично в растворе непосредственно перед применением загрузочного раствора в способе очистки белка, например, в способе аффинной хроматографии.

Следует отметить, что раствор, например загрузочный раствор, который необходимо подвергнуть способу по настоящему изобретению, можно привести в контакт с некоторым количеством полисорбата или полисорбата 20 (PS20: количество указано выше) до, во время или после того как протокол оптимизации был применен (или должен быть применен) к раствору. Способ по настоящему изобретению может дополнительно предусматривать приведение раствора в контакт с некоторым количеством полисорбата/PS20 перед применением относительно раствора способа очистки или воздействием на него способом очистки.

Соответственно, в настоящем изобретении представлен способ предупреждения выпадения в осадок целевых белков в загрузочном растворе в ответ на оптимизацию такого загрузочного раствора для применения в протоколе очистки белков, при этом указанный способ предусматривает приведение загрузочного раствора в контакт с некоторым количеством полисорбата или полисорбата 20 (PS20), а затем оптимизацию загрузочного раствора для применения в протоколе очистки белка.

Способ предупреждения выпадения в осадок целевого белка в загрузочном растворе в ответ на оптимизацию такого загрузочного раствора для применения в протоколе очистки белка может предусматривать приведение загрузочного раствора в контакт с полисорбатом или полисорбатом 20 (PS20) до конечной концентрации на уровне любой из указанных выше концентраций. Например, загрузочный раствор можно привести в контакт с полисорбатом или PS20 при конечной концентрации, составляющей 0,5% (% масса/объем), а затем оптимизировать загрузочный раствор для применения в протоколе очистки белка.

Стадия приведения загрузочного раствора в контакт с полисорбатом или PS20 (например, PS20 до конечной концентрации, составляющей 0,5% (% масса/объем)) может дополнительно предусматривать инкубацию смеси полисорбата или PS20/загрузочного раствора в течение определенного периода времени и при подходящей температуре для предупреждения выпадения в осадок белка (например, целевого белка) из загрузочного раствора. Подходящие время и температура инкубации указаны выше и применимы в данном случае. Например, смесь полисорбата или PS20/загрузочного раствора можно инкубировать в течение  $20 \pm 5$  минут при температуре  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ .

В способах очистки гликопротеинов применение может найти любой из способов по настоящему изобретению. Иными словами, описанный в данном документе способ предупреждения выпадения в осадок белков можно применять к растворам, содержащим гликопротеины, которые предназначены для очистки из раствора. Раскрытые способы можно применять для предупреждения (уменьшения или подавления) выпадения в осадок таких гликопротеинов из раствора.

В некоторых случаях загрузочный раствор может содержать один или несколько гликопротеинов. И действительно, один или несколько гликопротеинов в загрузочном растворе могут быть одним из целевых белков (или единственным целевым белком). То есть загрузочный раствор может содержать один или несколько гликопротеинов, которые подлежат очистке из загрузочного раствора, например, посредством хроматографической методики.

Термин "гликопротеины" может охватывать белки, известные как гонадотропины. Например, термин "гликопротеины" может включать фолликулостимулирующий гормон (FSH), хорионический гонадотропин человека (hCG) и лютеинизирующий гормон (LH). Многие гликопротеины, в том числе гонадотропины, используют в терапевтическом лечении. Например, гонадотропины (такие как FSH, LH и hCG) используют в лечении бесплодия.

Следует отметить, что термины "гликопротеин", "FSH" и "hCG" охватывают все изоформы и/или их рекомбинантные или встречающиеся в природе формы. Гликопротеины могут представлять собой, например, рекомбинантные гликопротеины, такие как рекомбинантный FSH, рекомбинантный hCG или рекомбинантный LH, продуцируемые в клетках-хозяевах. Гликопротеины могут быть представлены в форме раствора, из которого они должны быть очищены или экстрагированы посредством аффинной хроматографии.

Ввиду вышеизложенного способы, описанные в данном документе, можно применять по отношению к раствору, например загрузочному раствору, содержащему один или несколько белков, выбранных из группы, состоящей из:

- (i) гликопротеина,
- (ii) FSH,
- (iii) рекомбинантного FSH (rFSH),
- (iv) hCG и
- (v) рекомбинантного hCG (rhCG),

где один или несколько белков (выбранных из группы, состоящей из представленных выше белков (i) - (v)) подлежат очистке из раствора или загрузочного раствора.

Белки/гликопротеины могут быть получены из мочи.

Гликопротеин может присутствовать (в растворе, например, загрузочном растворе) в виде одной изоформы или в виде смеси изоформ, что хорошо известно из уровня техники. Соответственно, раствор (или загрузочный раствор), который должен быть подвергнут способу очистки или экстракции целевого белка, может содержать, например, определенное количество рекомбинантного FSH или встречающейся в природе формы FSH (где, например, FSH присутствует в виде отдельной изоформы или смеси изоформ).

Гликопротеиновый компонент раствора может представлять собой целевой белок, который подлежит экстрагированию и который подвержен риску выпадения в осадок.

Таким образом, в настоящем изобретении представлен способ предупреждения выпадения в осадок гликопротеинов из раствора, при этом указанный способ предусматривает приведение раствора, содержащего гликопротеины, в контакт с определенным количеством полисорбата или полисорбата 20 (PS20).

Кроме того, в настоящем изобретении представлен способ предупреждения выпадения в осадок гликопротеина из раствора в ответ на оптимизацию такого раствора для применения в протоколе очистки гликопротеина, при этом указанный способ предусматривает приведение раствора, содержащего гликопротеин, в контакт с некоторым количеством полисорбата или полисорбата 20 (PS20) и затем оптимизацию раствора для применения в процедуре очистки гликопротеина.

Как уже отмечалось, оптимизация раствора, содержащего гликопротеин, может вызвать выпадение в осадок такого гликопротеина из раствора. Для минимизации риска событий "выпадения в осадок, вызванного оптимизацией", раствор, содержащий гликопротеин для очистки, может предусматривать приведение раствора в контакт с полисорбатом или полисорбатом 20 (PS20) до конечной концентрации при любой из указанных выше

концентраций. Например, раствор можно привести в контакт с полисорбатом или PS20 при конечной концентрации, составляющей 0,5% (% масса/объем), затем (или одновременно) раствор можно оптимизировать для применения в протоколе очистки белка. Стадия приведения в контакт раствора с полисорбатом или PS20 (например, PS20 до конечной концентрации, составляющей 0,5% (% масса/объем)) может дополнительно предусматривать инкубацию смеси полисорбата или PS20/раствора в течение некоторого периода времени и при подходящей температуре для предупреждения выпадения в осадок гликопротеинов из раствора. Подходящие время и температура инкубации указаны выше и применимы в данном случае. Например, смесь полисорбата или PS20/раствора можно инкубировать в течение  $20 \pm 5$  минут при  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Затем при необходимости раствор можно оптимизировать, а затем направить в процедуру очистки белка (или применять в ней).

Оптимизация раствора, содержащего гликопротеин, для применения в процедуре очистки одного или нескольких содержащихся в нем гликопротеинов может предусматривать корректировку pH и/или проводимости раствора.

Например, значение pH раствора (например, загрузочного раствора) можно изменить так, чтобы оно было оптимальным для аффинной очистки растворенного гликопротеина. Значение pH, оптимальное для способа очистки гликопротеинов, может быть недостаточно оптимальным для растворимости некоторых или всех белков, в том числе гликопротеинов, в растворе/загрузочном растворе. По этой причине изменение значения pH в ходе протокола оптимизации может привести к выпадению в осадок одного или нескольких гликопротеинов (и/или другого белка(белков) или пептида(пептидов)) в растворе/загрузочном растворе.

Оптимальное значение pH раствора (или загрузочного раствора) для применения в процедуре очистки белка, например процедуре хроматографической очистки, может варьироваться в зависимости от природы раствора, подлежащего очистке гликопротеина и/или особенностей подлежащей применению процедуры очистки гликопротеина. Например, для очистки FSH и/или hCG из раствора (например, загрузочного раствора) оптимальное значение pH может составлять примерно pH 4, pH 4,5, pH 5, pH 5,5, pH 6, pH 6,5, pH 7, pH 7,5, pH 8, pH 8,5, pH 9 или pH 9,5. Согласно одной идее оптимальное значение pH может составлять pH 8. Соответственно, оптимизация может включать корректировку (например, путем титрования) раствора, содержащего гликопротеин для очистки, с одного значения pH (например, недостаточно оптимального значения pH) на другое оптимальное значение pH.

Значение проводимости раствора также можно изменить таким образом, чтобы оно было оптимальным для аффинной очистки растворенного гликопротеина (как отмечалось выше, термин "проводимость" относится к удельной проводимости раствора и выражается в миллисименсах (мСм)). Значение проводимости, оптимальное для способа очистки гликопротеинов, может быть недостаточно оптимальным для растворимости некоторых или всех белков (в том числе гликопротеинов) в растворе (или загрузочном растворе). Таким образом, хотя и может требоваться изменение проводимости раствора для обеспечения ее оптимального значения для способа оптимизации выбранного гликопротеина, такая оптимизация может привести к выпадению в осадок одного или нескольких гликопротеинов (или любого из других растворенных белков).

Оптимальное значение проводимости раствора (или загрузочного раствора) для применения в процедуре очистки гликопротеинов, например процедуре хроматографической очистки, может варьироваться в зависимости от природы раствора, подлежащего очистке гликопротеина и/или особенностей подлежащей применению процедуры очистки белка. Например, оптимальное значение проводимости может составлять примерно  $8 \pm 2$  мСм/см,  $9 \pm 2$  мСм/см,  $10 \pm 2$  мСм/см,  $12 \pm 2$  мСм/см,  $14 \pm 2$  мСм/см,  $16 \pm 2$  мСм/см,  $18 \pm 2$  мСм/см,  $20 \pm 2$  мСм/см,  $22 \pm 2$  мСм/см или  $24 \pm 2$  мСм/см. Согласно одной идее оптимальное значение проводимости может составлять  $16 \pm 2$  мСм/см. Соответственно, оптимизация может включать корректировку раствора с одного значения проводимости (например, недостаточно оптимального значения проводимости) на другое оптимальное значение проводимости.

Хотя отдельное изменение значения pH и/или проводимости раствора (например, загрузочного раствора), содержащего гликопротеины для очистки, может привести к определенному уровню выпадения в осадок гликопротеинов, влияние совместного изменения значений pH и проводимости может быть значительным, и в растворе может осаждаться большее количество гликопротеина (гликопротеинов).

Если гликопротеин представляет собой FSH и/или hCG (т. е. раствор содержит FSH и/или hCG для очистки), оптимальное значение pH может составлять примерно pH 8, а оптимальное значение проводимости может составлять примерно  $16 \pm 2$  мСм/см. До оптимизации раствор, из которого должен быть очищен гликопротеин, например FSH и/или hCG, может иметь недостаточно оптимальное значение pH (выше или ниже pH 8) и/или проводимости (выше или ниже  $16 \pm 2$  мСм/см).

Свойства и состав раствора, например загрузочного раствора, который содержит гликопротеин для очистки и/или экстракции и который должен быть подвергнут способу

по настоящему изобретению, могут варьироваться в зависимости от источника гликопротеина. Соответственно, величина типа требуемой оптимизации также будет варьировать.

Если гликопротеины являются рекомбинантными и образуются или продуцируются в клетке, способ получения раствора или загрузочного раствора, содержащего рекомбинантный гликопротеин (например, рекомбинантный FSH и/или hCG), может предусматривать получение клетки, которая способна к экспрессии подлежащего очистке рекомбинантного гликопротеина, культивирование клетки в подходящей среде, а затем индуцирование экспрессии рекомбинантного гликопротеина. Экспрессированный гликопротеин затем можно собрать из клетки (с помощью лизата, полученного из клетки) и/или среды (например, путем сбора рекомбинантного белка из надосадочной жидкости культуры клеток, например, путем центрифугирования). В данном случае раствор или загрузочный раствор может содержать культуральную среду или быть полученным из нее.

Подходящие способы культивирования трансфицированных клеток и индуцирования в них экспрессии гетерологичных нуклеиновых кислот (или векторов) будут известны, а дополнительную информацию можно получить, например, из раздела 'Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems': Edited by Prof. Dr. Gerd Gellissen; Pub. Wiley (2004).

Для продуцирования рекомбинантных белков можно применять любую подходящую клетку-хозяина, а описанные в данном документе рекомбинантные гликопротеины можно получить с применением, например, клеток млекопитающих. Подходящие клетки (или линии клеток) млекопитающих могут включать, например, клетки CHO, клетки PER.C6® (информация о клетках PER.C6® раскрыта в РСТ/EP2016/064668 (опубликована как WO2016/207353)), клетки HEK293, клетки HT1080, клетки COS, клетки NOS, клетки SP20 и другие.

Линию клеток можно культивировать в подходящих условиях и в подходящей среде, а целевой белок (например, гликопротеин) можно собирать из клетки или из культуральной среды.

Клеточный лизат и/или культуральную среду можно подвергнуть протоколу осветления или фильтрации. В протоколе такого типа можно применять, например, глубинный фильтр. Протокол осветления или фильтрации может способствовать очистке от или удалению загрязнителей, которые могут повлиять на последующие способы. Например, способ осветления и/или фильтрации может способствовать удалению белков клетки-хозяина (НСР), ДНК, потенциальных липидов, коллоидов, клеточного дебриса,



эндотоксинов и других материалов из среды культуры клеток. Стадия осветления или фильтрации может дополнительно служить для защиты мембран, используемых в последующем способе фильтрации, который может потребоваться для получения применимого загрузочного раствора.

Профильтрованный и/или осветленный клеточный лизат/культуральную среду затем можно дополнительно обработать для концентрирования содержания любого целевого белка. Стадию концентрирования можно осуществлять посредством стадии ультрафильтрации, которая предназначена для дополнительной очистки фильтрованной и/или осветленной культуральной среды клеточного лизата от дополнительных низкомолекулярных компонентов (компонентов, масса которых составляет менее <math>10 \text{ кДа}</math>). Для удаления пигментов и т. п. можно применять способ ультрафильтрации.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что содержание нецелевого белка в загрузочном растворе, в том числе, например, любых низкомолекулярных соединений или пигментов, может отрицательно повлиять на осуществление способа очистки или экстракции белка – в частности, на способ, основанный на аффинной хроматографии.

Фильтрованную/осветленную и подвергнутую ультрафильтрации клеточную среду (необязательно) можно подвергнуть процедуре стерилизации. Например, фильтрованную/осветленную и подвергнутую ультрафильтрации клеточную среду можно профильтровать для удаления загрязнителей. Фильтрованную/осветленную и подвергнутую ультрафильтрации клеточную среду можно пропустить через 0,2-мкм фильтр.

Концентрация целевого белка (например, rFSH или rhCG) может составлять, например, 0,05-2,0 мг/мл. Например, концентрация целевого белка может составлять приблизительно 0,06 мг/мл, 0,07 мг/мл, 0,08 мг/мл, 0,09 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,7 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,9 мг/мл, 1,0 мг/мл, 1,1 мг/мл, 1,2 мг/мл, 1,3 мг/мл, 1,4 мг/мл, 1,5 мг/мл, 1,6 мг/мл, 1,7 мг/мл, 1,8 мг/мл или приблизительно 1,9 мг/мл. Концентрация целевого белка может составлять приблизительно 0,4–1,5 мг/мл.

Концентрация общего белка может составлять приблизительно 1,0 мг/мл, 1,5 мг/мл, 1,75 мг/мл, 2,0 мг/мл, 2,25 мг/мл, 2,5 мг/мл, 2,75 мг/мл, 3,0 мг/мл, 3,25 мг/мл, 3,5 мг/мл, 3,75 мг/мл или 4,0 мг/мл. Фильтрованная/осветленная и подвергнутая ультрафильтрации клеточная среда (которая может быть необязательно простерилизована, как указано выше) может содержать дополнительные буферы и/или вспомогательные вещества или быть дополнена ними. Например, профильтрованная/осветленная и подвергнутая

ультрафильтрации клеточная среда может содержать глицин (или, например, 100 мМ глицина) и/или NaCl (например, 50 мМ NaCl) или быть дополнена ними.

Фильтрованная/осветленная и подвергнутая ультрафильтрации клеточная среда может характеризоваться рН, составляющим приблизительно  $9,0 \pm 0,2$ , и проводимостью, составляющей приблизительно  $6 \pm 1$  мСм/см, или приблизительно  $7 \pm 1$  мСм/см, или приблизительно  $8 \pm 1$  мСм/см, или приблизительно  $9 \pm 1$  мСм/см, или приблизительно  $10 \pm 1$  мСм/см.

Фильтрованную/осветленную и подвергнутую ультрафильтрации клеточную среду (которая может быть необязательно простерилизована, как указано выше) можно применять для получения загрузочного раствора.

Загрузочный раствор можно получить путем объединения объема описанной выше (и необязательно простерилизованной) фильтрованной/осветленной и подвергнутой ультрафильтрации клеточной среды с объемом другого "загрузочного исходного раствора".

Загрузочный исходный раствор может содержать, например, определенные вспомогательные вещества, разбавители и/или буферы. Например, загрузочный исходный раствор может содержать определенное количество трис и NaCl. Например, загрузочный исходный раствор может содержать 0,8 М трис и 3 М NaCl. Загрузочный исходный раствор может характеризоваться рН, составляющим приблизительно 8,3, например,  $8,3 \pm 0,2$ . Загрузочный исходный раствор может характеризоваться проводимостью, составляющей приблизительно 164 мСм/см, например,  $164 \pm 2$  мСм/см.

К каждому литру описанной выше (и необязательно простерилизованной) профильтрованной/осветленной и подвергнутой ультрафильтрации клеточной среды можно добавить объем, например 40 мл, загрузочного исходного раствора с получением комбинированного раствора, который представляет собой загрузочный раствор. Значение рН полученного загрузочного раствора можно скорректировать до  $8,0 \pm 0,2$ , например, посредством 1 М HCl. Значение проводимости загрузочного раствора может составлять  $16 \pm 2$  мСм/см. Полученный раствор/загрузочный раствор, содержащий гликопротеины для очистки, можно оптимизировать таким образом, чтобы загрузочный раствор можно было применять в способе, предназначенном для очистки целевого (рекомбинантного) гликопротеина. Как уже говорилось, способ оптимизации загрузочного раствора такого типа (путем корректировки одного или нескольких параметров раствора) может вызвать выпадение в осадок белка (в том числе выпадение в осадок гликопротеина), что может отрицательно повлиять на выход и степень чистоты, получаемых в ходе процедуры

очистки белка. Описанные в данном документе способы, при которых приводят раствор или загрузочный раствор (до, во время или после протокола оптимизации) в контакт с определенным количеством PS20, могут обеспечить предупреждение, подавление и/или уменьшение количества таких событий выпадения в осадок.

Следует отметить, что можно определить рН и/или проводимость любого раствора или загрузочного раствора, в том числе тех, которые содержат (рекомбинантные) гликопротеины для очистки, и применить любую оптимизацию (для приведения рН и/или проводимости в пределы принятых и оптимальных параметров). До реализации любого определенного требования по оптимизации раствор можно привести в контакт с определенным количеством PS20 для минимизации риска события выпадения в осадок, вызванного оптимизацией.

Ввиду вышеизложенного способ очистки или экстракции рекомбинантного белка может предусматривать:

получение или обеспечение наличия раствора, содержащего рекомбинантный белок, добавление в раствор полисорбата или полисорбата 20, и загрузку раствора в колонку для аффинной хроматографии, выполненную с возможностью очистки или экстракции рекомбинантного белка.

Рекомбинантный белок может представлять собой рекомбинантный FSH или рекомбинантный hCG.

Способ может дополнительно предусматривать стадию, на которой определяют рН и/или проводимость раствора. Если значения рН и/или проводимости раствора определены как недостаточно оптимальные, можно добавить некоторое количество полисорбата или PS20, а затем оптимизировать раствор так, чтобы значения рН и/или проводимости были оптимальными.

Способы получения рекомбинантных гликопротеинов, в том числе, например, рекомбинантного FSH и рекомбинантного hCG, описаны в WO2009/127826, WO2013/020996, WO2016207353 и WO2011042688, и при этом полное содержание всех данных документов включено в данный документ посредством ссылки. Если в таких способах для экстракции рекомбинантного FSH и/или hCG используют процедуры очистки белка, например, процедуры хроматографии и/или аффинной хроматографии, любые подлежащие использованию загрузочные растворы могут быть подвергнуты способу по настоящему изобретению. Например, загрузочный раствор можно приводить в контакт с раскрываемым количеством PS20 для того, чтобы его можно было

оптимизировать для применения в процедуре очистки, минимизируя риск того, что такая процедура оптимизации вызовет событие выпадения в осадок (FSH и/или hCG).

В данном документе раскрывается способ предупреждения, уменьшения или подавления вызванного оптимизацией выпадения в осадок FSH и/или hCG из раствора, при этом указанный способ предусматривает приведение раствора в контакт с определенным количеством PS20. Количества PS20 достаточно для сохранения FSH и/или hCG в растворе на протяжении всего протокола оптимизации.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что очищенные белки могут присутствовать в одной или нескольких фракциях, собранных в результате осуществления способа хроматографии. Количество целевого белка в любой заданной фракции может варьироваться, при этом некоторые фракции содержат больше целевого белка, чем другие. Для увеличения количества собранного целевого белка фракции можно объединять. Собранные и/или объединенные фракции можно подвергнуть дополнительным протоколам очистки и/или концентрирования.

Фракции, полученные в результате осуществления способа очистки белка (например, способа аффинной хроматографии), можно дополнительно обработать путем объединения, сочетая фракции, содержащие целевой(целевые) белок(белки), и/или увеличивая концентрацию целевого(целевых) белка(белков).

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение далее будет описано со ссылкой на последующие примеры.

#### **Пример 1.**

#### **Эксперимент по оптимизации посредством PS20 для достижения оптимальных условий**

Перед демонстрацией того, что хроматография QS (хроматография с использованием сефарозы Q) обладает способностью удалять потенциальные оболочечные вирусы, выполняют специальную стадию инактивации оболочечных вирусов, в ходе которой добавляют собранный материал AD с PS20 до конеч. концентрации 1% (% масса/объем) с последующей инкубацией в течение 1 ч при  $23\pm 2^\circ\text{C}$ . Следует обратить внимание, что термин "собранный материал AD" обычно охватывает материал, собранный в ходе выполнения протокола очистки/экстракции белка. Данный материал может содержать загрузочный раствор, который определен в данном документе (загрузочный раствор, содержащий один или несколько целевых белков для очистки/экстракции). В одном варианте осуществления "собранный материал AD" представляет собой материал,

полученный на любой стадии (любых стадиях) ультрафильтрации/диафильтрации – сокращение "AD" обозначает "после диафильтрации".

**PS20 в качестве солибилизатора:**

аффинную загрузку (или "загрузочный раствор"), содержащую, например, rhCG, можно загружать при pH 8 и с проводимостью, составляющей  $16 \pm 2$  мСм/см. Более низкая проводимость может позволить неспецифическим белкам связываться со смолой и блокировать участки связывания rhCG. Если это неспецифическое связывание необратимо, со временем произойдет снижение емкости или выхода rhCG.

Собранный материал AD, из которого можно получить аффинную загрузку с pH 9,0 и с проводимостью, составляющей  $\sim 5$  мСм/см.

Если pH собранного материала AD титровали до 8,0 и проводимость возрастала до  $16 \pm 2$  мСм/см (= аффинная загрузка) без PS20 (например, до конечной концентрации 1% (% масса/объем)), обнаруживалось выпадение белка в осадок (см. представленные ниже результаты).

При добавлении PS20 к собранному материалу AD до конечной концентрации 1% (% масса/объем) и инкубации в течение 1 ч при  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  перед корректировкой pH и проводимости выпадения в осадок не наблюдали. Следовательно, PS20 способствует предупреждению выпадения белка в осадок в аффинной загрузке.

Выполняли эксперименты для поиска минимальной концентрации PS20, необходимой для получения стабилизированной аффинной загрузки (pH 8,0 и  $16 \pm 2$  мСм/см).

После обнаружения того, что добавление PS20 до конечной концентрации 0,5% (% масса/объем) дает на выходе стабильную аффинную загрузку, время инкубации сокращали с 1 ч до 20 мин, и в аффинной загрузке выпадение в осадок не проявлялось (данные не показаны).

Тем не менее, PS20 образует радикалы, которые могут увеличивать окисление целевого белка (в данном примере окисление rhCG). Соответственно, уменьшение концентрации PS20 и времени инкубации снизит риск таких событий окисления.

По результатам эксперимента было видно, что PS20 до конечной концентрации 0,5% (% масса/объем) и время инкубации/температура  $20 \pm 5$  мин при  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  способствовали уменьшению выпадения целевых белков (например, rhCG) в осадок из загрузочного раствора и уменьшению риска возникновения событий окисления, обусловленных добавлением PS20.

*H-AD: представляет собой собранный материал, содержащий rhCG, объемная концентрация которого в среднем является 50-кратной (диапазон минимум-максимум составляет 37-66 раз), содержащий среднюю концентрацию rhCG, равную 0,8 мг/мл (диапазон минимум-максимум составляет 0,4–1,5 мг/мл), и среднюю концентрацию общего белка (по Брэдфорду), равную 3 мг/мл (диапазон минимум-максимум составляет 2–5 мг/мл). Разбавитель H-AD состоял из 100 мМ глицина, 50 мМ NaCl, pH 9,0±0,2, 6±1 мСм/см.*

### Эксперимент 1

<b>Стадия 1</b>	<b>Собранный материал, содержащий rhCG: [pH 7,2, 13,5 мСм/см]: (20 мкг/мл rhCG, 163 мкг/мл реагента для метода Брэдфорда)</b>							
<b>Стадия 2</b>	<b>Осветление собранного материала с помощью положительно заряженного глубинного фильтра</b>							
<b>Стадия 3</b>	<b>10 кДа UF1(ультрафильтрация)</b>							
<b>Стадия 4</b>	<b>Собранный материал AD (=H-AD) в 100 мМ глицине + 50 мМ NaCl, pH 9,13, 5,06 мСм/см: объем: 3,257 л, A<sub>280</sub>: 5,208, реагент для метода Брэдфорда: 4,93 мг/мл, rhCG: 0,910 мг/мл</b>							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Стадия 4а</b>	<b>40 мл H-AD</b>	<b>40 мл H-AD</b>	<b>40 мл H-AD</b>	<b>40 мл H-AD</b>	<b>40 мл H-AD</b>	<b>40 мл H-AD</b>	<b>40 мл H-AD</b>	<b>40 мл H-AD</b>
<b>Стадия 4б</b>	Добавить 40 мл р-ра [0,8 М трис, 3 М NaCl] на 1 л H-AD. <b>Скорректировать до pH 8,0 и 16 мСм</b>	↓	↓	↓	↓	↓	Добавить 5 М NaCl. <b>Скорректировать до pH 9,0 и 16 мСм</b> [pH титровать посредством 1 М HCl]	Добавить 5 М NaCl. <b>Скорректировать до pH 8,5 и 16 мСм</b> [pH титровать посредством 1 М HCl]

Стадия 4с	↓	Добавить 20% PS20 до конечного содержания 0,1% PS20 инк-ть 1 ч, 23°C, с перемеш.	Добавить 20% PS20 до конечного содержания 0,25% PS20 инк-ть 1 ч, 23°C, с перемеш.	Добавить 20% PS20 до конечного содержания 0,5% PS20 инк-ть 1 ч, 23°C, с перемеш.	Добавить 20% PS20 до конечного содержания 0,75% PS20 инк-ть 1 ч, 23°C, с перемеш.	Добавить 20% PS20 до конечного содержания 1% PS20 инк-ть 1 ч, 23°C, с перемеш.	↓	↓
Стадия 4d	↓	Добавить 40 мл р-ра [0,8 М трис 3 М NaCl] на 1 л H-AD Скорректировать до pH 8,0 и 16 мСм [рН титроватъ посредством 1 М HCl]	Добавить 40 мл р-ра [0,8 М трис 3 М NaCl] на 1 л H-AD Скорректировать до pH 8,0 и 16 мСм [рН титроватъ посредством 1 М HCl]	Добавить 40 мл р-ра [0,8 М трис 3 М NaCl] на 1 л H-AD Скорректировать до pH 8,0 и 16 мСм [рН титроватъ посредством 1 М HCl]	Добавить 40 мл р-ра [0,8 М трис 3 М NaCl] на 1 л H-AD Скорректировать до pH 8,0 и 16 мСм [рН титроватъ посредством 1 М HCl]	Добавить 40 мл р-ра [0,8 М трис 3 М NaCl] на 1 л H-AD Скорректировать до pH 8,0 и 16 мСм [рН титроватъ посредством 1 М HCl]	↓	↓
Стадия 4е	Проверитъ прозрачность	Проверитъ прозрачность	Проверитъ прозрачность	Проверитъ прозрачность	Проверитъ прозрачность	Проверитъ прозрачность	Проверитъ прозрачность	Проверитъ прозрачность

посредст вом VI и пропуск. при 660 нм В моменты времени: 1) Нулевой 2) Через 8 ч при R.T. 3) Инк- ция O.N при 4°C	посредст вом VI и пропуск. при 660 нм В моменты времени: 1) Нулевой 2) Через 8 ч при R.T. 3) Инк- ция O.N при 4°C	ость посредст вом VI и пропуск. при 660 нм В моменты времени: 1) Нулевой 2) Через 8 ч при R.T. 3) Инк- ция O.N при 4°C	посредст вом VI и пропуск. при 660 нм В моменты времени: 1) Нулевой 2) Через 8 ч при R.T. 3) Инк- ция O.N при 4°C	посредст вом VI и пропуск. при 660 нм В моменты времени: 1) Нулевой 2) Через 8 ч при R.T. 3) Инк- ция O.N при 4°C	посредст вом VI и пропуск. при 660 нм В моменты времени: 1) Нулевой 2) Через 8 ч при R.T. 3) Инк- ция O.N при 4°C	посредст вом VI и пропуск. при 660 нм В моменты времени: 1) Нулевой 2) Через 8 ч при R.T. 3) Инк- ция O.N при 4°C	посредст вом VI и пропуск. при 660 нм В моменты времени: 1) Нулевой 2) Через 8 ч при R.T. 3) Инк- ция O.N при 4°C	посредст вом VI и пропуск. при 660 нм В моменты времени: 1) Нулевой 2) Через 8 ч при R.T. 3) Инк- ция O.N при 4°C
--	--	--	--	--	--	--	--	--

\* Сокращения: р-р: раствор; инк-ция: инкубация; VI: визуальная оценка; R.T: комнатная температура; O.N: в течение ночи; пропуск.: пропускание

Подготовка аффинной загрузки на заключительной стадии способа представляет собой следующее:

- в конце обработки посредством PS20 (0,5% PS20, инкубированный с перемешиванием в течение  $20 \pm 5$  мин при  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) добавляют 40 мл из раствора [0,8 М трис, 3 М NaCl, pH  $8,3 \pm 0,2$ ,  $164 \pm 2$  мСм/см] на 1 л собранного материала AD и корректируют pH до  $8,0 \pm 0,2$  посредством 1 М HCl.
- Проверка того, что полученная проводимость в аффинной загрузке находится в пределах  $16 \pm 2$  мСм/см (добавляемый объем 0,8 М трис и 3 М раствора NaCl рассчитан так, чтобы он находился в данном диапазоне проводимости).



Название образца	Объем H-AD (мл)	Конечные параметры		Прозрачность раствора			% пропу скания при 660 нм
		Конечн ый рН	Конечная проводимо сть (мСм/см)	В момент времени 0	Через 8 ч, RT	После O.N при 4°C	
0. <b>H-AD сам по себе,</b> рН 9,0, ~5 мСм/см	40	NR		Прозрач ный	Прозра чный	Прозра чный	99,50
1. H-AD, рН 9,0, ~5 мСм/см → до <b>рН 8 и 16 мСм/см,</b> <b>без PS20</b>	40	8,00	16,25	Слегка белый ++	Слегка белый +++	Слегка белый +++	35,38
2. H-AD →Добавить конечный <b>0,1% PS20</b> → 1 ч, перемешивать при 23±2°C → до рН 8±0,2 и 16±2 мСм/см	40	7,93	16,25	Прозрач ный	Прозра чный	Едва белый +	96,11
3. H-AD →Добавить конечный <b>0,25%</b> <b>PS20</b> → 1 ч, перемешивать при 23±2°C → до рН 8±0,2 и 16±2 мСм/см	40	8,02	16,10	Прозрач ный	Прозра чный	точно не опреде лено	96,63
4. H-AD →Добавить конечный <b>0,5% PS20</b> →1 ч, перемешивать при 23±2°C → до рН 8±0,2 и 16±2 мСм/см	40	8,02	15,77	Прозрач ный	Прозра чный	прозра чный	98,59

5.	Н-AD →Добавить конечный <b>0,75% PS20</b> →1 ч, перемешивать при 23±2°C → до рН 8±0,2 и 16±2 мСм/см	40	8,03	15,70	Прозрачный	Прозрачный	прозрачный	98,18
6.	Н-AD →Добавить конечный <b>1,0% PS20</b> →1 ч, перемешивать при 23±2°C → до рН 8±0,2 и 16±2 мСм/см	40	8,01	15,75	Прозрачный	Прозрачный	прозрачный	98,03
7.	Н-AD, рН <b>9,0</b> , ~5 мСм/см → до <b>16 мСм/см, без PS20</b>	40	9,05	15,90	Прозрачный	Прозрачный	Слегка белый +	97,40
8.	Н-AD, рН <b>8,5</b> , ~5 мСм/см → до <b>16 мСм/см, без PS20</b>	40	8,50	15,70	Слегка белый +	Слегка белый ++	Слегка белый ++	78,89

*Примечание: в эксперименте 1 концентрация rhCG в Н-AD составляет 0,91 мг/мл, а концентрация общего белка (по Брэдфорду) составляет 4,9 мг/мл.*

### Эксперимент 2

<b>Стадия 1</b>	<b>Собранный материал, содержащий rhCG</b> [рН 7,2, 13,5 мСм/см] (20 мкг/мл rhCG, 163 мкг/мл реагента для метода Брэдфорда)			
<b>Стадия 2</b>	<b>Осветление собранного материала с помощью положительно заряженного глубинного фильтра</b>			
<b>Стадия 3</b>	<b>10 кДа UF1(ультрафильтрация)</b>			
<b>Стадия 4</b>	<b>Собранный материал AD (=Н-AD)</b> в 100 мМ глицине + 50 мМ NaCl, рН 9,13, 5,06 мСм/см Объем: 3,257 л, A <sub>280</sub> : 5,208, реагент для метода Брэдфорда: 4,93 мг/мл, rhCG: 0,910 мг/мл			
<b>Стадия 4а</b>	<b>40 мл Н-AD</b>	<b>40 мл Н-AD</b>	<b>40 мл Н-AD</b>	<b>40 мл Н-AD</b>

<b>Стадия 4b</b>	Добавить 5 М NaCl <b>Скорректировать до pH 8,5 и 10 мСм</b> <i>[pH титровать посредством 1 М HCl]</i>	Добавить 5 М NaCl <b>Скорректировать до pH 8,5 и 12 мСм</b> <i>[pH титровать посредством 1 М HCl]</i>	Добавить 5 М NaCl <b>Скорректировать до pH 8,5 и 15 мСм</b> <i>[pH титровать посредством 1 М HCl]</i>	↓
<b>Стадия 4c</b>	↓	↓	↓	Добавить 20% PS20 до конечного содержания 0,4% PS20 инк-ть 1 ч, 23°C, с перемеш.
<b>Стадия 4d</b>	↓	↓	↓	Добавить 40 мл р-ра [0,8 М трис 3 М NaCl] на 1 л H-AD <b>Скорректировать до pH 8,0 и 16 мСм</b> <i>[pH титровать посредством 1 М HCl]</i>
<b>Стадия 4e</b>	Проверить прозрачность посредством VI и пропуск. при 660 нм	Проверить прозрачность посредством VI и пропуск. при 660 нм	Проверить прозрачность посредством VI и пропуск. при 660 нм	Проверить прозрачность посредством VI и пропуск. при 660 нм

	В следующие моменты: • Нулевой момент • Через 8 ч при R.T • Инк-ция O.N при 4°C	В следующие моменты: • Нулевой момент • Через 8 ч при R.T • Инк-ция O.N при 4°C	В следующие моменты: • Нулевой момент • Через 8 ч при R.T • Инк-ция O.N при 4°C	В следующие моменты: • Нулевой момент • Через 8 ч при R.T • Инк-ция O.N при 4°C
--	--	--	--	--

\* Сокращения: р-р: раствор; инк-ция: инкубация; VI: визуальная оценка; R.T:

комнатная температура; O.N: в течение ночи; пропуск.: пропускание

Название образца	Объем H-AD (мл)	Конечные параметры		Прозрачность раствора			% пропускания при 660 нм
		Конечный pH	Конечная проводимость (мСм/см)	В момент времени 0	Через 8 ч, RT	После O.N при 4°C	
0. <b>H-AD сам по себе, pH 9,0, ~5 мСм/см</b>	40	NR		прозрачный	прозрачный	прозрачный	99,0
1. H-AD, pH 9,0, ~5 мСм/см → до <b>pH 8,5 и 10 мСм/см, без PS20</b>	40	8,50	10,00	прозрачный	Слегка белый +	Слегка белый +	97,8
2. H-AD, pH 9,0, ~5 мСм/см → до <b>pH 8,5 и 12 мСм/см, без PS20</b>	40	8,47	12,00	прозрачный	Слегка белый +	Слегка белый +	97,2
3. H-AD, pH 9,0, ~5 мСм/см → до <b>pH 8,5 и</b>	40	8,50	15,20	Слегка белый +	Слегка белый ++	Слегка белый +++	95,9

	<b>15 мСм/см, без PS20</b>							
4.	Н-AD →Добавить конечный <b>0,4% PS20</b> →1 ч, перемешиват ь при 23±2°C до <b>pH 8</b> и <b>16 мСм/см</b>	40	8,00	16,20	Прозрач ный	Прозра чный	Прозрач ный	98,2

В эксперименте 2 концентрация *rhCG* в Н-AD составляет 0,91 мг/мл, а концентрация общего белка (по Брэдфорду) составляет 4,9 мг/мл.

### Эксперимент 3

<b>Стадия 1</b>	<b>Собраный материал, содержащий <i>rhCG</i>; [pH 7,2, 13,5 мСм/см](20 мкг/мл <i>rhCG</i>, 163 мкг/мл реагента для метода Брэдфорда)</b>	
<b>Стадия 2</b>	<b>Осветление собранного материала с помощью положительно заряженного глубинного фильтра</b>	
<b>Стадия 3</b>	<b>10 кДа UF1(ультрафильтрация)</b>	
<b>Стадия 4а</b>	<b>220 мл собранного материала AD</b>	<b>220 мл собранного материала AD</b>
<b>Стадия 4б</b>	Добавить 20% PS20 до конечного содержания <b>0,25% PS20</b> инк-ть 1 ч, 23°C, с перемеш.	Добавить 20% PS20 до конечного содержания <b>0,5% PS20</b> инк-ть 1 ч, 23°C, с перемеш.
<b>Стадия 4с</b>	Добавить 40 мл р-ра [0,8 М трис, 3 М NaCl] на 1 л Н-AD <b>Скорректировать до pH 8,0 и 16 мСм</b> <i>[pH титровать посредством 1 М HCl]</i>	Добавить 40 мл р-ра [0,8 М трис, 3 М NaCl] на 1 л Н-AD <b>Скорректировать до pH 8,0 и 16 мСм</b> <i>[pH титровать посредством 1 М HCl]</i>

<b>Стадия 4d</b>	Проверить прозрачность посредством V и пропуск. при 660 нм В следующие моменты времени: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Нулевой момент</li> <li>• Через 8 ч при R. T.</li> <li>• Инк-ция O.N при 4°C</li> </ul>	Проверить прозрачность посредством VI и пропуск. при 660 нм В следующие моменты времени: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Нулевой момент</li> <li>• Через 8 ч при R. T.</li> <li>• Инк-ция O.N при 4°C</li> </ul>
------------------	---	--

\* Сокращения: p-p: раствор; инк-ция: инкубация; VI: визуальная оценка; R.T: комнатная температура; O.N: в течение ночи; пропуск.: пропускание

Название образца	Объем H-AD (мл)	Конечные параметры		Прозрачность раствора			% пропускания при 660 нм
		Конечный pH	Конечная проводимость (мСм/см)	В момент времени 0	Через 8 ч, RT	После O.N при 4°C	
0 H-AD сам по себе, pH 9,0, ~5 мСм/см	40	NR		Прозрачный	Прозрачный	Прозрачный	99,0
1 A-AD →Добавить конечный 0,25% PS20 →1 ч, перемешивать при 23±2°C → до pH 8 и 16 мСм/см	220	8,01	16,12	Едва белый +	Слегка белый +	Слегка белый + незначительный осадок	98,0
2 H-AD →Добавить конечный 0,5% PS20 →1 ч, перемешивать при 23±2°C →до pH 8 и 16 мСм/см	220	8,03	15,90	Прозрачный	Прозрачный	Прозрачный, но появляется незначит. осадок	98,9

В эксперименте 3 концентрация rhCG в Н-AD составляет 0,91 мг/мл, а концентрация общего белка (по Брэдфорду) составляет 4,9 мг/мл.

### Циклы очистки

Н-AD: представляет собой собранный материал, содержащий rhCG, объемная концентрация которого в среднем является 50-кратной по результатам UF1 (диапазон минимум-максимум составляет 37-66 раз), содержащий среднюю концентрацию rhCG, равную 0,8 мг/мл (диапазон минимум-максимум составляет 0,4–1,5 мг/мл), и среднюю концентрацию общего белка (по Брэдфорду), равную 3 мг/мл (диапазон минимум-максимум составляет 2–5 мг/мл).

Разбавитель Н-AD состоял из 100 мМ глицина, 50 мМ NaCl, pH 9,0±0,2, 6±1 мСм/см [в итоге заменен на 100 мМ глицина, 50 мМ NaCl с тем же pH и той же проводимостью].

### Получение загрузочного раствора

После обработки посредством PS20 (0,5% PS20, инкубированные с перемешиванием в течение 20±5 мин при 23±2°C) добавляют 40 мл раствора, содержащего 0,8 М трис, 3 М NaCl, pH 8,3±0,2, 164±2 мСм/см, на 1 л собранного материала AD. Корректируют pH до 8,0±0,2 посредством 1 М HCl. Полученную проводимость в растворе аффинной загрузки подтверждали, как находящуюся в пределах 16±2 мСм/см (добавляемый объем 0,8 М трис и 3 М раствора NaCl рассчитан таким образом, чтобы находиться в данном диапазоне проводимости).

### Пример 3. Схема получения FSH:

Стадия способа	Назначение стадии
Оттаивание флакона с rFSH WCB	Выращивание клеток перед высеванием
Размножение клеток (встряхивание колб и использование биореактора Wave)	

Стадия способа	Назначение стадии
Высевание и выращивание клеток в 50-л BR Получение rFSH и непрерывный сбор с использованием системы микрофльтрации (ATF 10).	Получение rFSH в требуемом количестве и с требуемым качеством.
Встроенное осветление собранной массы с помощью глубинного фильтра (PDE2)	Удаление белков клеток-хозяев (HCP), ДНК, потенциальных липидов и коллоидов, клеточного дебриса и эндотоксинов. Обеспечение защиты для мембран UF1
10 кДа UF1	Концентрирование rFSH для сокращения продолжительности способа аффинной хроматографии; удаление пигментов и низкомолекулярных компонентов (<10 кДа), которые могут отрицательно повлиять на смолу для аффинной хроматографии
Контроль бионагрузки	Контроль бионагрузки
Захват	Аффинная хроматография Обработка загрузки: Добавление 0,5% (% масса/объем) полисорбата 20 (PS 20) для увеличения растворимости перед корректировкой pH. Хроматография: захват rFSH и удаление HCP, LMW субъединиц, PS 20, эндотоксинов и ДНК клеток-хозяев.

**Пример 4. Схема получения hCG**

Стадия способа	Назначение стадии
Оттаивание флакона с rhCG WCB	Выращивание клеток перед высеванием
Размножение клеток (встряхивание колб и использование биореактора Wave)	



Стадия способа	Назначение стадии
<p>Высевание и выращивание клеток в 50-л BR</p> <p>Получение rhCG и непрерывный сбор с использованием системы микрофльтрации (ATF 10).</p>	<p>Получение rhCG в требуемом количестве и с требуемым качеством.</p>
<p>Встроенное осветление собранной массы с помощью глубинного фильтра (PDE2)</p>	<p>Удаление белков клеток-хозяев (HCP), ДНК, потенциальных липидов и коллоидов, клеточного дебриса и эндотоксинов.</p> <p>Обеспечение защиты для мембран UF1</p>
<p>Концентрирование собранного материала rhCG для сокращения продолжительности выполнения способа аффинной хроматографии; удаление пигментов и низкомолекулярных компонентов (&lt;10 кДа), которые могут отрицательно повлиять на смолу для аффинной хроматографии</p>	<p>Концентрирование rhCG для сокращения продолжительности выполнения способа аффинной хроматографии; удаление пигментов и низкомолекулярных компонентов (&lt;10 кДа), которые могут отрицательно повлиять на смолу для аффинной хроматографии</p>
<p>Контроль бионагрузки</p>	<p>Контроль бионагрузки</p>
<p>Захват</p>	<p>Аффинная хроматография</p> <p>Обработка загрузки: Добавление 0,5% (% масса/объем) полисорбата 20 (PS 20) для увеличения растворимости перед корректировкой pH.</p> <p>Хроматография: захват rhCG и удаление HCP, субъединиц <math>\beta</math>-hCG, PS 20, эндотоксинов и ДНК клеток-хозяев.</p>

Пример 5.

Для получения rFSH использовали способ и методики, разработанные для получения rhCG.

Сбор rFSH с использованием 0,5% или 1% (% масса/объем) PS20 давал прозрачный раствор (без осадка).

- Сконцентрированный волуметрическим методом, в среднем в 39 раз (диапазон минимум-максимум составляет 34-47 раз) со средней концентрацией rFSH 0,09 мг/мл (диапазон минимум-максимум составляет 0,07-0,138 мг/мл).
- Средняя концентрация общего белка (по Брэдфорду) 1,3 мг/мл (диапазон минимум-максимум составляет 0,7-1,8 мг/мл).
- Разбавитель H-AD состоял из 100 мМ глицина, 60 мМ NaCl, pH 9,0±0,2, 9,0±0,5 мСм/см.

Настоящее изобретение дополнительно описано со ссылкой на следующие пронумерованные пункты:

1. Способ предупреждения выпадения в осадок белка из раствора, при этом указанный способ предусматривает приведение раствора в контакт с определенным количеством полисорбата 20 (PS20).
2. Способ предупреждения выпадения в осадок белка из раствора, при этом указанный способ предусматривает приведение раствора в контакт с некоторым количеством полисорбата.
3. Способ по пункту 2, где полисорбат выбран из группы, состоящей из полисорбата 20 (PS20), полисорбата 40 (PS40), полисорбата 60 (PS60) и полисорбата 80 (PS80).
4. Способ по пунктам 1-3, где раствор предназначен для применения в способе очистки белка или вместе с ним.
5. Способ по пунктам 1-4, где раствор представляет собой загрузочный раствор, предназначенный для применения в способе очистки белка.
6. Способ по пунктам 4-5, где способ очистки белка предусматривает аффинную хроматографию.
7. Способ по любому из предыдущих пунктов, где раствор содержит один или несколько белков, выбранных из группы, состоящей из:
  - (i) гликопротеина или рекомбинантного гликопротеина,
  - (iii) FSH или рекомбинантного FSH и
  - (iv) hCG или рекомбинантного hCG.

8. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ очистки белка предназначен для очистки белка, выбранного из группы, состоящей из:
- (i) гликопротеина или рекомбинантного гликопротеина,
  - (iii) FSH или рекомбинантного FSH и
  - (iv) hCG или рекомбинантного hCG.
9. Способ по любому из пунктов 1 и 4-8, где количество PS20 представляет собой количество, дающее конечную концентрацию PS20 в растворе, составляющую от приблизительно 0,1% (% масса/объем) до 5% (% масса/объем).
10. Способ по любому из пунктов 1 и 4-9, где количество PS20 представляет собой количество, дающее конечную концентрацию PS20 в растворе, составляющую 0,5% (% масса/объем).
11. Способ по любому из пунктов 1 и 4-10, где PS20 приводят в контакт с раствором в течение периода от приблизительно 1 минуты до 2 часов.
12. Способ по любому из пунктов 1 и 4-11, где PS20 приводят в контакт с раствором в течение 15-25 минут.
13. Способ по любому из пунктов 1 и 4-12, где PS20 приводят в контакт с раствором при температуре в диапазоне от приблизительно 10°C до 30°C.
14. Способ по любому из пунктов 1 и 4-13, где PS20 приводят в контакт с раствором при температуре в диапазоне от приблизительно 21°C до 25°C.
15. Способ по любому из пунктов 1 и 4-14, где после контакта с PS20 раствор или загрузочный раствор оптимизируют для применения в способе очистки белка.
16. Способ по пункту 15, где оптимизация раствора или загрузочного раствора включает корректировку pH и/или проводимости.
17. Способ по пунктам 15 или 16, где раствор получают при pH 8 и с проводимостью, составляющей от 14 до 18 мСм/см.
18. Способ по любому из предыдущих пунктов, где раствор получен из среды культуры клеток.
19. Способ по пункту 18, где перед приведением в контакт с PS20 из раствора, полученного из среды культуры клеток, удаляют белки клетки-хозяина, ДНК, потенциальные липиды, коллоиды, клеточный дебрис и/или эндотоксины.
20. Способ предупреждения выпадения в осадок белка при оптимизации загрузочного раствора для аффинной хроматографии, при этом указанный способ предусматривает:

приведение загрузочного раствора, подлежащего оптимизации для аффинной хроматографии, в контакт с некоторым количеством PS20 с получением PS20/загрузочного раствора и

оптимизацию смеси PS20/загрузочного раствора для аффинной хроматографии.

21. Способ по пункту 20, где количество PS20, приведенное в контакт с загрузочным раствором, дает загрузочный раствор с конечной концентрацией PS20, составляющей от приблизительно 0,1% (% масса/объем) до 5%.

22. Способ по пунктам 20 или 21, где смесь PS20/загрузочный раствор инкубируют в течение периода 15-25 минут и при температуре, составляющей от 21°C до 25°C.

23. Способ по пунктам 20-22, где загрузочный раствор получен из среды культуры клеток и содержит рекомбинантный гликопротеин.

24. Способ по пунктам 20-23, где загрузочный раствор получен из среды культуры клеток и содержит рекомбинантный FSH или рекомбинантный hCG.

25. Способ получения загрузочного раствора для применения в способе аффинной хроматографии, при этом указанный способ предусматривает приведение загрузочного раствора в контакт с некоторым количеством PS20 с получением смеси PS20/загрузочный раствор.

26. Способ по пункту 25, где смесь PS20/загрузочный раствор содержит от 0,1% до 5% (% масса/объем) PS20.

27. Способ по пунктам 25 или 26, где смесь PS20/раствор инкубируют в течение периода 15-25 минут и при температуре, составляющей от 21°C до 25°C.

28. Способ по пунктам 25-27, где загрузочный раствор получен из среды культуры клеток и содержит рекомбинантный гликопротеин.

29. Способ по пунктам 25-28, где загрузочный раствор получен из среды культуры клеток и содержит рекомбинантный FSH или рекомбинантный hCG.

30. Способ по любому из пунктов 25-29, где после контакта с PS20 загрузочный раствор оптимизируют для применения в способе очистки белка.

31. Способ по пункту 30, где оптимизация загрузочного раствора включает корректировку pH и/или проводимости загрузочного раствора.

32. Способ по пунктам 30-31, где загрузочный получают раствор при pH 8 и с проводимостью, составляющей от 14 до 18 мСм/см.

33. Способ очистки белка, при этом указанный способ предусматривает:

(а) получение или обеспечение раствора, содержащего подлежащий очистке белок,

- (b) приведение раствора в контакт с некоторым количеством PS20 и
- (c) очистку белка из раствора.

34. Способ по пункту 33, где подлежащий очистке белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из:

- (i) гликопротеина или рекомбинантного гликопротеина,
- (ii) FSH или рекомбинантного FSH и
- (iii) hCG или рекомбинантного hCG.

35. Способ по пунктам 33 и 34, где раствор получен из среды культуры клеток.

36. Способ по пункту 35, где перед приведением в контакт с PS20 раствор осветляют и/или фильтруют.

37. Способ по пункту 36, где из раствора перед его приведением в контакт с PS20 удаляют белки клетки-хозяина, ДНК, потенциальные липиды и коллоиды, клеточный дебрис и эндотоксины.

38. Способ по любому из пунктов 33-37, где белок очищают посредством аффинной хроматографии.

39. Способ по любому из пунктов 33-38, где очищенный белок элюируют и собирают.

40. Способ по пункту 39, где элюированный и собранный белок не обрабатывают комбинацией каприловой кислоты и этанола.

41. Способ по любому из пунктов 39 и 40, где элюированный и собранный белок не фильтруют с применением стекловолоконного фильтра.

42. Способ по любому из пункту 39-41, где элюированный и собранный белок не подвергают хроматографии на сульфопропил-сефарозе и/или хроматографии гидрофобного взаимодействия.

## Формула изобретения

1. Способ предупреждения выпадения в осадок белка из загрузочного раствора, при этом указанный способ предусматривает приведение раствора в контакт с некоторым количеством полисорбата 20 (PS20).
2. Способ по п. 1, где загрузочный раствор предназначен для применения в способе очистки белка.
3. Способ по п. 1 или п. 2, где загрузочный раствор представляет собой загрузочный раствор для аффинной хроматографии.
4. Способ по любому из предыдущих пунктов, где способ представляет собой способ предупреждения выпадения в осадок одного или нескольких белков, выбранных из группы, состоящей из:
  - (i) гликопротеина или рекомбинантного гликопротеина,
  - (iii) FSH или рекомбинантного FSH и
  - (iv) hCG или рекомбинантного hCG,из раствора.
5. Способ по любому из предыдущих пунктов, где количество PS20 представляет собой количество, дающее конечную концентрацию PS20 в растворе, которая составляет от приблизительно 0,1% (% масса/объем) до 5% (% масса/объем), где необязательно количество PS20 представляет собой количество, дающее конечную концентрацию PS20 в растворе, которая составляет 0,5% (% масса/объем).
6. Способ по любому из предыдущих пунктов, где PS20 приводят в контакт с раствором в течение периода от приблизительно 1 минуты до 2 часов, где необязательно PS20 приводят в контакт с раствором в течение 15-25 минут.
7. Способ по любому из предыдущих пунктов, где PS20 приводят в контакт с раствором при температуре в диапазоне от приблизительно 10°C до 30°C, где необязательно PS20 приводят в контакт с раствором при температуре в диапазоне от приблизительно 21°C до 25°C.
8. Способ по любому из предыдущих пунктов, где раствор приводят в контакт с PS20 до конечной концентрации, составляющей 0,5% (% масса/объем), и в течение 20±5 мин при температуре 23±2°C.
9. Способ по любому из предыдущих пунктов, где после приведения в контакт с PS20 раствор оптимизируют для применения в способе очистки белка, где необязательно раствор получают при pH 8 и с проводимостью, составляющей от 14 до 18 мСм/см.
10. Способ предупреждения выпадения в осадок белка при оптимизации загрузочного раствора для аффинной хроматографии, при этом указанный способ предусматривает:

приведение загрузочного раствора, подлежащего оптимизации для аффинной хроматографии, в контакт с некоторым количеством PS20 с получением PS20/загрузочного раствора и

оптимизацию смеси PS20/загрузочного раствора для аффинной хроматографии.

11. Способ по п. 10, где количество PS20, приведенное в контакт с загрузочным раствором, дает загрузочный раствор с конечной концентрацией PS20, составляющей от приблизительно 0,1% (% масса/объем) до 5% (% масса/объем).

12. Способ по п. 10 или п. 11, где смесь PS20/загрузочный раствор инкубируют в течение периода 15-25 минут и при температуре, составляющей от 21°C до 25°C.

13. Способ по пп. 10-12, где загрузочный раствор содержит рекомбинантный FSH или рекомбинантный hCG.

14. Способ очистки белка, при этом указанный способ предусматривает:

- (a) получение или обеспечение раствора, содержащего подлежащий очистке белок,
- (b) приведение раствора в контакт с некоторым количеством PS20 и
- (c) очистку белка из раствора.

15. Способ по п. 14, где подлежащий очистке белок представляет собой белок, выбранный из группы, состоящей из:

- (i) гликопротеина или рекомбинантного гликопротеина,
- (ii) FSH или рекомбинантного FSH и
- (iii) hCG или рекомбинантного hCG.

16. Способ по любому из п. 14 или п. 15, где способ предусматривает приведение раствора в контакт с PS20 до конечной концентрации, составляющей 0,5% (% масса/объем), и в течение  $20 \pm 5$  мин при температуре  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ .