

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2015122726, 15.11.2013

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

15.11.2012 US 61/727,051;

13.03.2013 US 61/780,707

(43) Дата публикации заявки: 10.01.2017 Бюл. № 01

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 15.06.2015

(86) Заявка РСТ:

US 2013/070415 (15.11.2013)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2014/078729 (22.05.2014)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО  
"Юридическая фирма Городисский и Партнеры"

(71) Заявитель(и):

**ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)**

(72) Автор(ы):

**ВАН Яцзюнь (US),****МОРЕНО Джордж Т. (US),****ЧЖАН Боянь (US),****ЧЖАН Ляни (US),****ФАРНАН Делл (US),****ПАТАПОФФ Том (US)**(54) **ОПОСРЕДОВАННАЯ ИОННОЙ СИЛОЙ pH-ГРАДИЕНТНАЯ ИОНООБМЕННАЯ  
ХРОМАТОГРАФИЯ**(57) **Формула изобретения**

1. Способ анализа композиции, содержащей полипептид и одну или несколько примесей, причем способ включает

а) связывание полипептида и одной или нескольких примесей с ионообменным хроматографическим материалом с использованием буфера для нанесения, где буфер для нанесения имеет первый pH и первую ионную силу;

б) элюцию полипептида и одной или нескольких примесей с ионообменного хроматографического материала с использованием элюирующего буфера, где pH элюирующего буфера меняется по градиенту pH, а ионная сила элюирующего буфера меняется по градиенту ионной силы, где полипептид и одна или несколько примесей разделяются с помощью комбинации градиента pH и градиента ионной силы/ и

с) детектирование полипептида и одной или нескольких примесей.

2. Способ по п. 1, в котором полипептид представляет собой антитело, или иммуноадгезин, или их фрагмент.

3. Способ по п. 1 или 2, в котором полипептид представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент.

4. Способ по п. 2, в котором антитело представляет собой антитело человека.

5. Способ по п. 2, в котором антитело представляет собой гуманизированное антитело.

6. Способ по п. 2, в котором антитело представляет собой химерное антитело.
7. Способ по любому одному из пп. 2, 4, 5 или 6, в котором антитело представляет собой фрагмент антитела.
8. Способ по любому одному из пп. 1, 2, 4, 5 или 6, в котором примесь представляет собой вариант полипептида.
9. Способ по любому одному из пп. 1, 2, 4, 5 или 6, в котором примесь представляет собой продукт деградации полипептида.
10. Способ по любому одному из пп. 1, 2, 4, 5 или 6, в котором полипептид имеет  $pI$  выше примерно 9,0.
11. Способ по любому одному из пп. 1, 2, 4, 5 или 6, в котором хроматографический материал является катионообменным хроматографическим материалом.
12. Способ по п. 11, в котором катионообменный хроматографический материал является сульфированным хроматографическим материалом или карбоксилированным хроматографическим материалом.
13. Способ по любому одному из пп. 1, 2, 4, 5 или 6, в котором градиент  $pH$  представляет собой линейный градиент.
14. Способ по любому одному из пп. 1, 2, 4, 5 или 6, в котором градиент  $pH$  представляет собой ступенчатый градиент.
15. Способ по п. 13, в котором градиент  $pH$  включает увеличение  $pH$  от примерно 5 до примерно 11.
16. Способ по любому одному из пп. 1, 2, 4, 5, 6 или 12, в котором градиент  $pH$  создается с использованием одного или нескольких буферов.
17. Способ по п. 16, в котором один или несколько буферов выбирают из пиперазина, имидазола, Tris, фосфата или CAPS.
18. Способ по любому одному из пп. 1, 2, 4, 5, 6, 12 или 17, в котором градиент ионной силы представляет собой линейный градиент.
19. Способ по любому одному из пп. 1, 2, 4, 5, 6, 12 или 17, в котором градиент ионной силы представляет собой ступенчатый градиент.
20. Способ по п. 18, в котором градиент ионной силы включает увеличение концентрации соли от примерно 0 мМ до примерно 200 мМ.
21. Способ по п. 18, в котором градиент ионной силы представляет собой градиент NaCl, градиент KCl или градиент  $Na_2SO_4$ .
22. Способ по любому одному из пп. 1, 2, 4, 5 или 6, в котором полипептид имеет  $pI$  ниже примерно 7,0.
23. Способ по п. 22, в котором хроматографический материал является анионообменным хроматографическим материалом.
24. Способ по п. 23, в котором анионообменный хроматографический материал является хроматографическим материалом, содержащим четвертичные амины, или хроматографическим материалом, содержащим третичные амины.
25. Способ по любому одному из пп. 23 или 24, в котором градиент  $pH$  представляет собой линейный градиент.
26. Способ по любому одному из пп. 23 или 24, в котором градиент  $pH$  представляет собой ступенчатый градиент.
27. Способ по п. 25, в котором градиент  $pH$  включает снижение  $pH$  от примерно 8 до примерно 5.
28. Способ по п. 25, в котором градиент  $pH$  создается с использованием одного или нескольких буферов.
29. Способ по п. 28, в котором один или несколько буферов выбирают из пиперазина, имидазола или Tris.

30. Способ по любому одному из пп. 23 или 24, в котором градиент ионной силы представляет собой линейный градиент.

31. Способ по любому одному из пп. 23 или 24, в котором градиент ионной силы представляет собой ступенчатый градиент.

32. Способ по п. 30, в котором градиент ионной силы включает увеличение концентрации соли от примерно 0 мМ до примерно 200 мМ.

33. Способ по п. 30, в котором градиент ионной силы представляет собой градиент NaCl, градиент KCl или градиент Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

34. Способ анализа композиции, содержащей полипептид и одну или несколько примесей, причем способ включает

а) связывание полипептида и одной или нескольких примесей с ионообменным хроматографическим материалом с использованием буфера для нанесения, где буфер для нанесения имеет начальный pH и начальную ионную силу;

б) элюцию полипептида и одной или нескольких примесей с ионообменного хроматографического материала с использованием элюирующего буфера, где pH элюирующего буфера меняется по градиенту pH, а ионная сила элюирующего буфера, по существу, такая же как начальная ионная сила буфера для нанесения, где полипептид и одна или несколько примесей разделяются с помощью

градиента pH при примерно начальной ионной силы; и

с) детектирование полипептида и одной или нескольких примесей.

35. Способ по п. 34, в котором полипептид представляет собой антитело, или иммуноадгезин, или их фрагмент.

36. Способ по п. 34 или 35, в котором полипептид представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент.

37. Способ по п. 35, в котором антитело представляет собой антитело человека.

38. Способ по п. 35, в котором антитело представляет собой гуманизированное антитело.

39. Способ по п. 35, в котором антитело представляет собой химерное антитело.

40. Способ по любому одному из пп. 35, 37, 38 или 39, в котором антитело представляет собой фрагмент антитела.

41. Способ по любому одному из пп. 34, 35, 37, 38 или 39, в котором примесь представляет собой вариант полипептида.

42. Способ по любому одному из пп. 34, 35, 37, 38 или 39, в котором примесь представляет собой продукт деградации полипептида.

43. Способ по любому одному из пп. 34, 35, 37, 38 или 39, в котором полипептид имеет pI выше примерно 9,0.

44. Способ по любому одному из пп. 34, 35, 37, 38 или 39, в котором хроматографический материал является катионообменным хроматографическим материалом.

45. Способ по п. 44, в котором катионообменный хроматографический материал является сульфированным хроматографическим материалом или карбоксилированным хроматографическим материалом.

46. Способ по любому одному из пп. 34, 35, 37, 38, 39 или 45, в котором градиент pH представляет собой линейный градиент.

47. Способ по любому одному из пп. 34, 35, 37, 38, 39 или 45, в котором градиент pH представляет собой ступенчатый градиент.

48. Способ по п. 46, в котором градиент pH включает увеличение pH от примерно 5 до примерно 11.

49. Способ по любому одному из пп. 34, 35, 37, 38, 39 или 45, в котором градиент pH создается с использованием одного или нескольких буферов.

50. Способ по п. 49, в котором один или несколько буферов выбирают из пиперазина, имидазола, Tris, фосфата или CAPS.

51. Способ по любому одному из пп. 34, 35, 37, 38, 39, 45 или 50, в котором ионная сила элюирующего буфера составляет от примерно 0 мМ до примерно 100 мМ.

52. Способ по п. 51, в котором элюирующий буфер содержит от примерно 0 мМ NaCl до примерно 100 мМ NaCl, от примерно 0 мМ KCl до примерно 100 мМ KCl или от примерно 0 мМ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до примерно 100 мМ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

53. Способ по любому одному из пп. 34, 35, 37, 38 или 39, в котором полипептид имеет pI ниже примерно 7,0.

54. Способ по п. 53, в котором хроматографический материал является анионообменным хроматографическим материалом.

55. Способ по п. 54, в котором анионообменный хроматографический материал является хроматографическим материалом, содержащим четвертичные амины, или хроматографическим материалом, содержащим третичные амины.

56. Способ по п. 53, в котором градиент pH представляет собой линейный градиент.

57. Способ по п. 53, в котором градиент pH представляет собой ступенчатый градиент.

58. Способ по п. 56, в котором градиент pH включает снижение pH от примерно 8 до примерно 5.

59. Способ по любому одному из пп. 54, 55, 56, 57 или 58, в котором градиент pH создается с использованием одного или нескольких буферов.

60. Способ по п. 59, в котором один или несколько буферов выбирают из пиперазина, имидазола или Tris.

61. Способ по любому одному из пп. 54, 55, 56, 57, 58 или 60, в котором ионная сила элюирующего буфера составляет от примерно 0 мМ до примерно 100 мМ.

62. Способ по п. 61, в котором элюирующий буфер содержит от примерно 0 мМ NaCl до примерно 100 мМ NaCl.

63. Способ по любому одному из пп. 1, 2, 4, 5, 6, 12, 15, 17, 20, 21, 23, 24, 27, 29, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 45, 48, 50, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 60 или 62, в котором анализ проводят с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

64. Способ анализа полипептида в композиции, содержащей полипептид и одну или несколько примесей, где способ отделяет одну или несколько примесей от полипептида, причем способ включает

а) связывание полипептида и одной или нескольких примесей с ионообменным хроматографическим материалом с использованием буфера для нанесения, где буфер для нанесения имеет первый pH и первую ионную силу;

б) элюцию полипептида и одной или нескольких примесей с ионообменного хроматографического материала с использованием элюирующего буфера, где pH элюирующего буфера меняется по градиенту pH, а ионная сила элюирующего буфера меняется по градиенту ионной силы, где полипептид и одна или несколько примесей разделяются с помощью комбинации градиента pH и градиента ионной силы; и

с) детектирование полипептида и одной или нескольких примесей, где способ используется для анализа полипептидов, имеющих pI в диапазоне от примерно 7,0 до примерно 9,5.

65. Способа анализа полипептидов в композициях, содержащих полипептид и одну или несколько примесей, причем способ включает

а) связывание полипептида и одной или нескольких примесей с ионообменным хроматографическим материалом с использованием буфера для нанесения, где буфер для нанесения имеет начальный pH и начальную ионную силу;

б) элюцию полипептида и одной или нескольких примесей с ионообменного хроматографического материала с использованием элюирующего буфера, где pH

элюирующего буфера меняется по

градиенту рН, а ионная сила элюирующего буфера, по существу, такая же, как начальная ионная сила буфера для нанесения, где полипептид и одна или несколько примесей разделяются с помощью градиента рН при примерно начальной ионной силе; и

с) детектирование полипептида и одной или нескольких примесей, где способ используется для анализа полипептидов, имеющих  $pI$  в диапазоне от примерно 7,0 до примерно 9,5.

66. Способ по п. 64 или 65, в котором полипептид представляет собой антитело, или иммуноадгезин, или их фрагмент.

67. Способ по любому одному из пп. 64 или 65, в котором полипептид представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент.

68. Способ по п. 66, в котором антитело представляет собой антитело человека.

69. Способ по п. 66, в котором антитело представляет собой гуманизированное антитело.

70. Способ по п. 66, в котором антитело представляет собой химерное антитело.

71. Способ по любому одному из пп. 65, 67, 68, 69 или 70, в котором антитело представляет собой фрагмент антитела.

72. Способ по любому одному из пп. 65, 67, 68, 69 или 70, в котором примесь представляет собой вариант полипептида.

73. Способ по любому одному из пп. 65, 67, 68, 69 или 70, в котором примесь представляет собой продукт деградации полипептида.

74. Способ по любому одному из пп. 65, 67, 68, 69 или 70, в котором примесь представляет собой вариант полипептида по заряду.

75. Способ по любому одному из пп. 1, 2, 4, 5, 6, 12, 15, 17, 20, 21, 23, 24, 27, 29, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 45, 48, 50, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 60, 62, 64, 65, 68, 69 или 70, в котором концентрация буфера в буфере для нанесения и/или элюирующем буфере находится в диапазоне от 10 мМ до примерно 50 мМ.

76. Способ по любому одному из пп. 1, 2, 4, 5, 6, 12, 15, 17, 20, 21, 23, 24, 27, 29, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 45, 48, 50, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 60, 62, 64, 65, 68, 69 или 70, в котором первый рН находится в диапазоне от примерно рН 5,0 до примерно рН 7,0.

77. Способ по любому одному из пп. 1, 2, 4, 5, 6, 12, 15, 17, 20, 21, 23, 24, 27, 29, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 45, 48, 50, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 60, 62, 64, 65, 68, 69 или 70, в котором температура хроматографического материала находится в диапазоне от примерно 20°C до примерно 50°C.

78. Способ по любому одному из пп. 1, 2, 4, 5, 6, 12, 15, 17, 20, 21, 23, 24, 27, 29, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 45, 48, 50, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 60, 62, 64, 65, 68, 69 или 70, в котором нанесение и элюцию проводят при скорости потока, находящейся в диапазоне от примерно 0,5 мл/мин до примерно 2,0 мл/мин.

79. Способ определения чистоты полипептида в композиции, включающий анализ композиции в соответствии с любым одним из способов по пп. 1-78 и определение соотношения полипептида и примесей в композиции.

80. Способ определения стабильности полипептида в композиции, содержащей полипептид, причем способ включает

а) инкубацию композиции, содержащей полипептид, при температуре от 0 до 40°C на протяжении от одной до шести недель,

б) анализ композиции из стадии (а) любым из способов по пп. 1-79, и

с) определение соотношения вариантов и полипептида в композиции, где увеличение соотношения вариантов и полипептида в композиции по сравнению с композицией,

которую не инкубировали, указывает на деградацию полипептида в композиции.

RU 2015122726 A

A 9272215110 RU