



(51) МПК  
*C07K 1/18* (2006.01)  
*C07K 1/20* (2006.01)  
*C07K 14/62* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2012102504/04, 08.07.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 08.07.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
 09.07.2009 IN 1639/CHE/2009

(45) Опубликовано: 10.08.2013 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2222546 С2, 27.01.2004. US 6451987 В1, 17.09.2002. DAVE N. et al. Process and purification for manufacture of a modified insulin intended for oral delivery. Journal of chromatography. Vol.1177, 2008, p.282-286. KROEFF E. et al. Production scale purification of biosynthetic human insulin by reversed-phase high-performance liquid chromatography. (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 09.02.2012

(86) Заявка РСТ:  
 IN 2010/000459 (08.07.2010)

(87) Публикация заявки РСТ:  
 WO 2011/021210 (24.02.2011)

Адрес для переписки:  
 197101, Санкт-Петербург, а/я 128, "АРС-ПАТЕНТ", В.В.Дощечкиной

(72) Автор(ы):

ДЭЙВ Нитеш (IN),  
 РАДХАКРИШНАН Девеш (IN),  
 ШАНКАР Сундареш (IN),  
 ГУЛЛА Кришаначайтания (IN),  
 АЙЕР Хариш (IN)

(73) Патентообладатель(и):

БИОКОН ЛИМИТЕД (IN)

**(54) ПРЕПАРАТИВНЫЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ СПОСОБ НА ОСНОВЕ НЕЛИНЕЙНОГО ГРАДИЕНТА И ПРОДУКТЫ, ОЧИЩЕННЫЕ ЭТИМ СПОСОБОМ**

(57) Реферат:

Изобретение описывает хроматографический способ очистки инсулина, аналога инсулина или производного инсулина из смеси, содержащей по меньшей мере одну

родственную примесь с использованием нелинейного градиента, позволяющего получать лучшее разрешение при разделении и более высокую чистоту целевого продукта. 2 н. и 12 з.п. ф-лы, 12 пр.

(56) (продолжение):

Journal of chromatography. Vol.461, 1989, p.45-61. WORLD HEALTH ORGANIZATION WHO DRUG INFORMATION. Vol.10, no.4, 1996, GENEVA. p.205. LEVY D. et al. Insulin Methyl Ester. Specific Cleavage of a Peptide Chain Resulting from a Nitrogen to Oxygen Acyl Shift at a Threonine Residue. BIOCHEMISTRY. Vol.9, no.16, 1970, p.3215-3222. SNYDER L. et al. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 2nd edition.

1979. John WILEY and sons INC.. ISBN 0-471-03822-9 p.676-680. GARRICK L. et al. Rat Haemoglobin Heterogeneity - two structurally distinct alpha chains and functional behaviour of selected components. BIOCHEM. J. vol.149, 1975, p.245-258.

R U 2 4 8 9 4 4 1 C 1

R U 2 4 8 9 4 4 1 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C07K 1/18* (2006.01)  
*C07K 1/20* (2006.01)  
*C07K 14/62* (2006.01)

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2012102504/04, 08.07.2010**

(24) Effective date for property rights:  
**08.07.2010**

Priority:

(30) Convention priority:  
**09.07.2009 IN 1639/CHE/2009**

(45) Date of publication: **10.08.2013 Bull. 22**

(85) Commencement of national phase: **09.02.2012**

(86) PCT application:  
**IN 2010/000459 (08.07.2010)**

(87) PCT publication:  
**WO 2011/021210 (24.02.2011)**

Mail address:

**197101, Sankt-Peterburg, a/ja 128, "ARS-PATENT", V.V.Doshchechkinoj**

(72) Inventor(s):

**DEhJV Nitesh (IN),  
RADKhAKRISHNAN Devesh (IN),  
ShANKAR Sundaresh (IN),  
GULLA Krishanachajtanija (IN),  
AJER Kharish (IN)**

(73) Proprietor(s):

**BIOKON LIMITED (IN)**

**(54) PREPARATIVE CHROMATOGRAPHIC METHOD BASED ON NON-LINEAR GRADIENT AND PRODUCTS CLEANED WITH THIS METHOD**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.  
SUBSTANCE: invention describes the chromatographic method for treatment of insulin, insulin analogue or derivative of insulin from a mixture containing an akin admixture using a non-

linear gradient.

EFFECT: possibility to produce better resolution during separation and higher purity of a target product.

14 cl, 11 ex

R U 2 4 8 9 4 4 1 C 1

R U 2 4 8 9 4 4 1 C 1

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Раскрыт способ очистки белков с помощью препаративной хроматографии на ионообменной/обращенно-фазовой хроматографической среде. Изобретение в целом относится к хроматографии и, в частности, к способам препаративного  
5 хроматографического разделения целевого и побочного продуктов с использованием нелинейного градиента, позволяющим получать лучшее разрешение при разделении, приводящее к более высокой чистоте целевого продукта. Кроме того, также раскрыт способ очистки аналога или производного инсулина методом ОФ-ВЭЖХ (обращенно-  
10 фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии) с использованием нелинейного градиентного элюирования.

## ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Биологические белковые продукты, появляющиеся в результате развития биотехнологической промышленности, предполагают решение новых задач по  
15 очистке с помощью хроматографии. Как правило, эти продукты являются высокомолекулярными и неустойчивыми, с молекулярными массами в диапазоне от  $10^4$  до  $10^6$  дальтон. Такие продукты очищают из смесей, зачастую содержащих сотни видов примесей, включающих в себя клеточный дебрис, различные растворенные  
20 вещества, компоненты питательных веществ, ДНК и другие примеси. Концентрация белкового продукта в получающемся в результате растворе иногда составляет всего лишь 1 мг/л, обычно же бывает порядка 100 мг/л. Присутствие в рабочем растворе протеаз и их изменчивая природа часто требуют того, чтобы очистку проводили в возможно более короткие сроки.

Хроматография представляет собой динамический способ разделения, основанный на распределении компонентов, подлежащих разделению, между двумя фазами: слоем неподвижной (или связывающей) фазы и подвижной (или несущей) фазой. Подвижная фаза несет разделяемые компоненты через колонку, заполненную неподвижной фазой.  
30 Хроматографические способы включают в себя разделение, основанное на ионном обмене, гидрофобном взаимодействии и т.д. В обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ) молекула в растворе связывается с гидрофобной поверхностью или гидрофобным лигандом хроматографической смолы.

Для получения желаемого конечного результата в плане чистоты и выхода используют ряд различных хроматографических методик. Обращенно-фазовая хроматография является одним из наиболее действенных способов очистки, при котором в качестве основного принципа разделения используются гидрофобные взаимодействия. Обращенно-фазовую жидкостную хроматографию ("ОФ-ЖХ") и  
40 обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию ("ОФ-ВЭЖХ") широко используют для очистки молекул, таких как пептиды и белки, получаемых синтетическими или рекомбинантными способами. Методы ОФ-ЖХ и ОФ-ВЭЖХ могут эффективно разделять близкородственные примеси и используются для очистки большого числа разнообразных молекул (Lee et al., "Preparative HPLC (Препаративная ВЭЖХ)," 8th Biotechnology Symposium, Pt. 1, 593-610 (1988)). Кроме того, ОФ-ЖХ и ОФ-ВЭЖХ с успехом применяются для очистки молекул, в частности, белков в промышленном масштабе (Olsen et al., 1994, J. Chromatog. A, 675, 101).

Принцип ионообменной хроматографии включает в себя два различных подхода:  
50 анионный обмен и катионный обмен в зависимости от заряда на лигандах ионообменной смолы. Стандартный способ очистки методом ИОХ обычно включает в себя один или более процессов уравнивания, нанесения или загрузки, промывки, элюирования и регенерации (см. Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack

Publishing Co., Easton, Pa., 1990, или Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Теория и практика фармацевтики), 19th Edition (1995)).

В патентном документе US 6451987 раскрыт ионообменный хроматографический способ очистки пептида из смеси, содержащей пептид и родственные примеси.

В патентном документе US 7276590 раскрыт ионообменный хроматографический способ очистки пептида из смеси, содержащей пептид и родственные примеси.

Стоимость препаративных систем очень сильно возрастает. Кроме того, подобные системы, работающие при столь высоких давлениях, используются с обычным производственным оборудованием, что может представлять серьезную опасность. Соответственно, промышленность находится в состоянии вынужденного выбора между низким давлением, низкочувствительными системами, работающими при низком давлении, которые являются медленными и обладают ограниченными возможностями в плане очистки, или высокоэффективными системами, рассчитанными на высокое давление, являющимися значительно более дорогостоящими и представляющими опасность для здоровья. Кроме того, биологические препараты могут разлагаться в препаративном растворе под действием тепла или из-за присутствия протеазы и тому подобного, следовательно, крайне желательным является быстрое разделение. Эффективность производства, достигаемая с помощью процесса жидкостного хроматографического разделения биологических макромолекул, может быть описана с учетом соотношения количество продукта/доллар. Для достижения оптимального производства важными факторами являются как скорость производства, так и производственная мощность, что в настоящее время встречается нечасто. Таким образом, в области хроматографии существует потребность в системе, являющейся высокоэффективной без использования высокого давления и связанных с этим опасностей и значительных расходов.

Такая потребность была бы удовлетворена в случае, если бы процесс воспроизводил по мере возможности выход, чистоту, производительность и рабочие условия хроматографического процесса, при котором элюирование осуществляют выбранной системой растворителей, в заданном диапазоне рН и при других сопутствующих факторах. Технологические процессы могут быть с успехом использованы для промышленных разделений. Были предприняты попытки создания систем ионный обмен/ВЭЖХ, в которых разделения характеризовались более высокими разрешениями.

Таким образом, при использовании отдельно или в совокупности со стандартными способами экстракции или хроматографии способы экстрагирования согласно изобретению позволяют осуществлять выделение целевых молекул рассматриваемого изобретения с высоким выходом и высокой степенью чистоты при меньшем количестве стадий, чем требуется при общепринятых способах.

Вследствие этого целью настоящего изобретения является обеспечение препаративной хроматографической системы для эффективного разделения и очистки в малом масштабе и с низкой стоимостью без недостатков стандартных систем, предназначенных для разделения и очистки.

В частности, настоящее изобретение относится к способам осуществления высокоэффективного хроматографического разделения, т.е. к хроматографическим способам, отличающимся как высоким разрешением, так и высокой пропускной способностью на единицу объема хроматографической матрицы. В частности, изобретение относится в особенности к препаративной хроматографии и к способам осуществления хроматографического разделения с эффективностью, на данный

момент недостижимой.

Дополнительные цели, преимущества и элементы новизны изобретения, вместе с дополнительными признаками, содействующими этой цели, и преимуществами, происходящими из нее, будут очевидны специалистам в данной области техники из  
5 следующего описания изобретения, проиллюстрированного прилагаемыми графическими материалами, которые включены в настоящее изобретение посредством ссылки и образуют его неотъемлемую часть. Цели и преимущества изобретения могут быть осуществлены и достигнуты посредством технических средств и комбинаций, в  
10 особенности отмеченных в прилагаемой формуле изобретения.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Таким образом, настоящее изобретение относится к препаративному хроматографическому способу очистки полипептида из смеси, содержащей по  
15 меньшей мере одну родственную примесь, включающему стадии а) подвергания полипептидной смеси хроматографическому процессу, в котором смолу промывают и уравнивают в буфере и органическом модификаторе при слабокислом рН, б) элюирования с выпуклым или вогнутым нелинейным градиентом крутизны, имеющим коэффициент крутизны в диапазоне от 0 до  $\infty$  с изменением концентраций буфера в  
20 диапазоне от 0,01 М до 1 М; и с) выделения полипептида, очищенного от целевых примесей по меньшей мере на 50%; к очищенному IN-105 в соответствии с описанным выше способом с чистотой по меньшей мере 95%; к способу очистки инсулина и аналога из смеси, содержащей по меньшей мере одну родственную примесь, при этом указанный способ включает стадии а) нанесения смеси на колонку ОФ-ВЭЖХ,  
25 которую промывают и уравнивают органическим модификатором, б) элюирования с выпуклым/вогнутым нелинейным градиентом крутизны, имеющим коэффициент крутизны в диапазоне от 0 до  $\infty$  с изменением концентраций буфера в диапазоне от 0,01 М до 1 М и с) выделения инсулина и аналога, очищенных от целевых  
30 примесей по меньшей мере на 50%; к очищенному метиловому эфиру инсулина в соответствии с любым из указанных выше способов с чистотой по меньшей мере 85%; очищенному метиловому эфиру инсулина в соответствии с любым из указанных выше способов с чистотой по меньшей мере 90%; очищенному гларгину в соответствии с любым из указанных выше способов с чистотой по меньшей мере 90%; очищенному  
35 гларгину в соответствии с любым из указанных выше способов с чистотой по меньшей мере 95%; очищенному аспарту в соответствии с любым из указанных выше способов с чистотой по меньшей мере 80%; очищенному аспарту в соответствии с любым из указанных выше способов с чистотой по меньшей мере 84%; и очищенному  
40 аспарту в соответствии с любым из указанных выше способов с чистотой по меньшей мере 88%.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к препаративному хроматографическому способу очистки полипептида из смеси, содержащей по меньшей мере одну  
45 родственную примесь, включающему стадии:

(а) подвергания полипептидной смеси хроматографическому процессу, в котором смолу промывают и уравнивают в буфере и органическом модификаторе при слабокислом рН;

50 (б) элюирования с выпуклым или вогнутым нелинейным градиентом крутизны, имеющим коэффициент крутизны в диапазоне от 0 до  $\infty$  с изменением концентраций буфера в диапазоне от 0,01 М до 1М; и

(с) выделения полипептида, очищенного от целевых примесей по меньшей мере

на 50%.

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, хроматографический процесс выбирают из группы, включающей в себя ионообменную хроматографию или обращенно-фазовую ВЭЖХ либо их комбинацию.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения, смола на стадии а) является ионообменной смолой или C4-C18 силикагелевой смолой.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения, используемый буфер является ацетатным буфером.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения, величина рН составляет приблизительно от 2 до 5.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения, полипептид является инсулином, аналогом инсулина или его производным.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения, производное инсулина представляет собой IN 105.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения, аналог инсулина представляет собой гларгин, аспарт, лизпро, глулизин или метиловый эфир инсулина.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения, целевая примесь представляет собой дезокта-примесь, дезтеро-примесь, примесь дезокта-аспарта или фланк и моногликозилированный аспарт, либо любую комбинацию этого.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения, массово-объемное соотношение полипептида и смолы лежит в диапазоне от 0,1 до 50 г/л.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения, более предпочтительно, массово-объемное соотношение полипептида и смолы лежит в диапазоне от 1 до 25 г/л.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения, выделенный полипептид имеет чистоту по меньшей мере 95%.

Настоящее изобретение относится к очищенному IN-105 в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления с чистотой по меньшей мере 95%.

Настоящее изобретение относится к способу очистки инсулина и его аналога из смеси, содержащей по меньшей мере одну родственную примесь, включающему стадии:

(а) нанесения смеси на колонку ОФ-ВЭЖХ, которую промывают и уравнивают органическим модификатором.

(б) элюирования с выпуклым/вогнутым нелинейным градиентом крутизны, имеющим коэффициент крутизны в диапазоне от 0 до  $\infty$  с изменением концентраций буфера в диапазоне от 0,01 М до 1 М; и

(с) выделения инсулина и его аналога, очищенных от целевых примесей по меньшей мере на 50%.

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, колонку ОФ-ВЭЖХ промывают и уравнивают при рН приблизительно от 2 до 5.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения, выделенный аналог инсулина имеет чистоту по меньшей мере 97%.

Настоящее изобретение относится к очищенному метиловому эфиру инсулина в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления с чистотой по меньшей мере от 85% до 90%

Настоящее изобретение также относится к очищенному гларгину в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления с чистотой по меньшей мере

от 90% до 95%.

Настоящее изобретение относится к очищенному аспарту в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления с чистотой по меньшей мере от 80% до 88%.

5 Предложен способ очистки неочищенного продукта, содержащего IN-105, с помощью ионообменной и/или обращенно-фазовой хроматографии. Согласно иллюстративному варианту осуществления, в хроматографическую колонку  
10 заполняют неподвижной фазой, как правило, смолой на керамической подложке. Как правило, способ включает в себя подачу сырого раствора IN-105 в хроматографическую колонку, подачу подвижной фазы в хроматографическую колонку и выделение элюата IN-105 из хроматографической колонки. При этом каждый отдельный элюат, содержащий целевое соединение, имеет достаточную  
15 степень выделения и чистоту.

15 Препаративный хроматографический способ очистки полипептида из смеси, содержащей по меньшей мере одну родственную примесь, включает

(а) нанесение полипептидной смеси на ионообменную смолу, которую промывают и уравнивают в буфере при слабокислом рН,

20 (б) элюирование с выпуклым/вогнутым нелинейным градиентом крутизны в диапазоне от 0 до  $\infty$  с изменением концентраций буфера в диапазоне от 0,01 М до 1 М,

(с) выделение полипептида, очищенного от целевых примесей по меньшей мере на 50%.

25 В частности, главный признак изобретения относится к использованию элюирования с выпуклым/вогнутым нелинейным градиентом крутизны в диапазоне от 0 до  $\infty$  с изменением концентраций буфера в диапазоне от 0,01 М до 1 М, приводящего к снижению целевых примесей на 60-95%. Таким образом, способ позволяет получить чистоту целевого соединения по меньшей мере 80%-97%.

30 Способ очистки продукта с примесями, содержащего инсулин и его аналоги, методом ОФ-ВЭЖХ, включает следующие стадии:

а) сначала колонку ОФ-ВЭЖХ уравнивают надлежащей концентрацией органического модификатора,

б) образец белка вводят колонку в условиях перегруженного состояния колонки,

35 с) промывают колонку надлежащей концентрацией органического модификатора органическим модификатором с определенным процентным соотношением для удаления всех несвязавшихся белков,

40 д) после этого выполняют градиентное элюирование, которое проводят в нелинейных условиях,

е) образцы фракционируют и анализируют для установления степени чистоты,

45 ф) фракции, удовлетворяющие требованиям по чистоте, объединяют вместе и получают сбор элюата, после чего колонку регенерируют для удаления любых белков, которые могут быть прочно связаны.

Хотя настоящее изобретение описано применительно к определенным вариантам его осуществления, специалистам в данной области техники следует понимать, что могут быть внесены различные изменения и осуществлены эквивалентные замены без отклонения от истинной сущности и объема изобретения.

50 В данном описании сначала раскрыты природа и теоретические основы требуемых рабочих параметров препаративной хроматографии, далее описаны эквивалентные принципы, подходящие для оптимизации хроматографических процессов применительно к специальным случаям, описание конкретных материалов, полезных



при практическом применении такой хроматографии, и конкретные примеры таких методик.

Среднему специалисту не потребуется каких-либо дополнительных разъяснений при разработке способов и систем, описанных в данном контексте, но, тем не менее, он сможет найти некоторые полезные указания по подготовке этих способов и систем при изучении стандартных справочных работ, имеющихся в соответствующей области техники. Например, средний специалист может выбрать обзор L. R. Snyder, "Gradient Elution (Градиентное элюирование)", из High Performance Liquid Chromatography (Высокоэффективная жидкостная хроматография), Cs. Horvath (ed.), Academic Press, 1980, pp.207-316 и M. A. Stadalius, H. S. Gold и L. R. Snyder, J. Chromatography, 296 (1984), 31-59, Cazes, J., 2005, "Encyclopedia of Chromatography (Энциклопедия хроматографии)" (pp 718). Marcel Dekker, Edition 2, Vol 1, раскрытия которых посредством ссылки во всей их полноте включены в настоящее описание.

#### 15 Определение терминов

Термин "ионный обмен" и "ионообменная хроматография" относится к хроматографическому процессу, при котором целевое растворенное вещество (такое как белок) в смеси взаимодействует с заряженным соединением, связанным (например, с помощью ковалентной связи) с твердофазным ионообменным материалом, так что целевое растворенное вещество будет неспецифически взаимодействовать с заряженным соединением в большей или меньшей степени, чем примеси или загрязняющие вещества, присутствующие в смеси. Загрязняющие растворенные вещества, имеющиеся в смеси, элюируются с колонки, заполненной ионообменным материалом, быстрее или медленнее, чем целевое растворенное вещество, либо связываются со смолой или вымываются из смолы иначе, чем целевое растворенное вещество. Понятие "ионообменная хроматография", в частности, включает в себя катионообменную, анионообменную и смешанную модель хроматографии.

Термин "препаративное хроматографическое разделение" предназначен для обозначения хроматографического разделения с целью выделения или разделения компонента или компонентов (например, требуемого компонента) химической смеси. Препаративное хроматографическое разделение может включать в себя элюирование одного или нескольких компонентов на препаративной колонке. Препаративное хроматографическое разделение может быть охарактеризовано параметрами препаративной хроматографии и/или зависеть от таких параметров.

Фраза "градиентный режим хроматографии" в данном контексте относится к потоку композиции растворителя, которая изменяется в зависимости от времени, как правило, в соответствии с заданным пользователем профилем. Растворитель имеет композицию, которая может представлять собой, например, смесь двух растворителей, называемую в данном контексте подвижной фазой буфера А, и подвижной фазой буфера В. Согласно предпочтительным аспектам, колонка представляет собой колонку, заполненную сильной анионообменной или катионообменной смолой, что означает, что ионообменные свойства адсорбента колонки не изменяются во всем рабочем диапазоне рН колонки.

В градиентной хроматографической системе используются те же основные компоненты, что и в изократической системе, при этом основное отличие заключается в подаче растворителя, который должен поставлять смесь жидкостей, состав которых непрерывно изменяется во времени. Градиентный способ часто используют для разделения пиков, которые могут вымываться очень близко друг от друга при изократическом способе и для которых требуются незначительные изменения в

условиях элюирования для достижения дифференциального разделения.

Градиентное элюирование осуществляют, меняя элюент во время хроматографирования от слабого к сильному. При градиентном элюировании процесс элюирования начинают с элюента с более низкой замещающей способностью, затем с течением времени усиливают до элюента с большей замещающей способностью. Это может осуществляться за счет изменения концентрации и/или состава элюента.

Скорости элюирования, используемые для описываемой системы, являются стандартными для ионообменной хроматографии: Градиентное элюирование определяют как элюирование, выполняемое путем изменения элюента во время прогона от слабого к сильному. Такой элюент называют градиентным элюентом. Примеры подходящих градиентных элюентов представлены в работе Rocklin, R.D. et al (Journal of Chromatography 411 (1987) 107.) и в Ion Chromatography, Small, H. (Plenum Press 1989) pp.187, 213. Они включают увеличение силы элюента как функции от времени в линейной, вогнутой, выпуклой, ступенчатой, линейной с периодами выдержки форме и в форме комбинаций этих функций.

Катионообменная хроматография помогает при отделении белков от их примесей, исходя из разницы их зарядов. В большинстве катионообменных процессов элюирование осуществляют с изократическим градиентом, имеющим одинаковую концентрацию буфера в течение всего времени. Использование нелинейного градиента во время элюирования помогает при разделении близкородственных примесей вследствие постепенного изменения концентрации буфера с течением времени. При этом использование нелинейного градиента приводит либо к резкому увеличению концентрации с последующим ее постепенным увеличением, либо к постепенному увеличению концентрации с последующим ее резким увеличением. Такое нелинейное изменение помогает улучшить разделение близко элюирующихся примесей.

Внешний градиент создают с помощью постоянного смещения исходного буфера со вторым буфером, имеющим другую концентрацию, одновременно увеличивая долю второго буфера до тех пор, пока смесь не достигнет требуемой концентрации. Каждый из буферов, образующих градиент концентрации, может состоять из одинаковых или разных буферизующих компонентов.

Как таковой, градиент может быть "линейным градиентом," "выпуклым градиентом," "вогнутым градиентом" или "прерывистым градиентом," либо иметь любую подходящую форму, известную специалисту в данной области.

"Выпуклый градиент" относится к градиенту, при котором концентрация буфера изменяется постепенно в начальной фазе с резким ростом впоследствии.

"Вогнутый градиент" относится к градиенту, при котором концентрация буфера имеет резкое увеличение на склоне в начальной фазе с последующим постепенным увеличением впоследствии.

"Разрешение" является мерой степени очистки, которую можно достичь с помощью системы. Эта переменная величина регулируется природой растворенных веществ в обрабатываемой жидкости и химическими свойствами взаимодействующей поверхности хроматографической среды, а также особенностями, влияющими на динамику течения, диффузию и кинетику сорбции.

Термин «полипептид», «белок», «пептид» относится к полимеру аминокислот и не относится к конкретной длине продукта; таким образом, в определение полипептида включены пептиды, олигопептиды и белки. Этот термин также не направлен на или исключает постэкспрессионные модификации полипептида, хотя химические или постэкспрессионные модификации этих полипептидов могут быть включены или

исключены в качестве конкретных вариантов осуществления. Вследствие этого, например, модификации для полипептидов, включающие в себя ковалентное присоединение гликозильных групп, ацетильных групп, фосфатных групп, липидных групп и тому подобного, однозначно включены в термин полипептид. Кроме того, полипептиды с такими модификациями могут быть определены как индивидуальные формы, которые будут включены или исключены из настоящего изобретения. Согласно одному из вариантов осуществления, молекула является полипептидом или его родственными аналогами или их производными.

Термин "очистка" белка из композиции, включающей в себя белок и одну или несколько примесей, таким образом, означает увеличение степени чистоты белка в композиции за счет снижения содержания по меньшей мере одной примеси из белковой композиции.

"Примесь" представляет собой материал, отличный от требуемого полипептидного продукта или целевого белка. Основной примесью, выявляемой с помощью катионообменной хроматографии с использованием нелинейных градиентов, является дезокта-IN-105. В ферментативных реакциях трипсин превращается в предшественник инсулина путем расщепления лидерной и линкерной последовательностей. Во время этой реакции одной из примесей, которая образуется, является дезокта-IN-105, в котором действие трипсина происходит по 8 аминокислотам от С-конца цепи В. Относительное удерживание этой примеси на октадециловой колонке на керамическом носителе по отношению к удерживанию продукта составляет 0,84. Такая примесь называется "целевой примесью".

Термин "аналог инсулина" охватывает любую форму инсулина, описанную выше, где одна или несколько аминокислот в пределах полипептидной цепи замещены альтернативной аминокислотой, и/или где одна или несколько аминокислот делегированы из цепи, или где одна или несколько дополнительных аминокислот добавлены в полипептидную цепь. Аналог инсулина выбирают из группы, включающей в себя аспарт, гларгин и метиловый эфир инсулина.

'IN-105' представляет собой молекулу инсулина, конъюгированную по эpsilon-аминокислоте лизину в положении В29 В-цепи инсулина с алифатическим олигомером структурной формулы  $\text{CH}_3\text{O}-(\text{C}_4\text{H}_2\text{O})_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ . Молекула может быть моноконъюгированной в положениях А1, В1 и В29, диконъюгированной в различных сочетаниях А1, В1 и В29, или триконъюгированной в различных сочетаниях А1, В1 и В29.

Основные примеси, которые являются целевыми для ОФ-ВЭЖХ, использующей нелинейный градиент, в случае инсулина и аналога включают:

Дезтрео-инсулин - В ходе ферментативной реакции трипсин превращает предшественник инсулина в инсулин путем расщепления лидерной и линкерной последовательностей. Во время этой реакции одной из образующихся примесей является дезтрео, в котором действие трипсина происходит по 29-ой аминокислоте в цепи В. Относительное удерживание этой примеси на октадециловой кварцевой колонке по отношению к удерживанию продукта составляет 0,98.

Дезокта-аспарт - В ходе ферментативной реакции трипсин превращает предшественник инсулина аспарт в инсулин аспарт путем расщепления лидерной и линкерной последовательностей. Во время этой реакции одной из образующихся примесей является дезокта, в котором трипсин расщепляется на 8 аминокислот от С-конца цепи В. Относительное удерживание этой примеси на октадециловой кварцевой колонке по отношению к удерживанию продукта составляет 0,9.

Фланк: В аспарте это также одна из основных обнаруживаемых примесей. В ходе ферментативной реакции трипсин превращает предшественник инсулина аспарт в инсулин аспарт путем расщепления лидерной и линкерной последовательностей. Во время этой реакции одной из образующихся примесей является фланк, это происходит, когда С-пептид (линкерный пептид) расщепляется не полностью. Относительное удерживание данной примеси на октадециловой кварцевой колонке по отношению к удерживанию продукта составляет 0,96.

Гликозилированный аспарт: известно, что хозяин выполняет посттрансляционную модификацию, приводящую к добавлению маннозильных групп в предшественник. Соответственно, образующаяся примесь будет гликозилированной формой продукта, известной также как гликозилированная примесь. Относительное удерживание этой примеси на октадециловой кварцевой колонке по отношению к удерживанию продукта составляет 0,91.

Под коэффициентом крутизны подразумевается тангенс угла наклона кривой изменения концентрации во времени.

В некоторых вариантах осуществления изобретения может использоваться нелинейный градиент концентрации растворителя (например, кусочно-линейный градиент концентрации растворителя, вогнутая форма градиента или выпуклая форма градиента) для аналитического или препаративного хроматографических разделений или для того и другого.

Некоторые варианты осуществления изобретения могут включать в себя сначала оптимизацию или улучшение основных аспектов аналитического хроматографического разделения (например, путем выбора подходящей величины аналитического градиента крутизны параметра) перед оптимизацией и/или улучшением разделения требуемого компонента с помощью препаративного хроматографического разделения. Резкий градиент является, как правило, эффективным в случае работы с непрерывным потоком.

Типичный пример способа разделения и очистки белков согласно изобретению включает в себя следующие стадии:

- i. набивки ионообменной колонки смолой на керамической основе, уравновешенной с помощью приблизительно 10 мМ ацетатного буфера,
- ii. введения пептидной композиции, содержащей по меньшей мере одну родственную примесь, в колонку при скорости потока приблизительно  $\leq 100\text{-}400$  см/ч,
- iii. элюирования очищенного продукта с колонки с помощью нелинейного градиента при использовании выпуклого/вогнутого градиента крутизны в диапазоне от 0 до  $\infty$  с концентраций буфера в диапазоне от 0,01 М до 1 М.

Величина рН элюирующего буфера может составлять приблизительно от 2 до 9, или же приблизительно от 3 до 8, приблизительно от 4 до 8, или приблизительно от 5 до 8, хотя величина рН или диапазон величин рН для элюирования будут определены в зависимости от требуемого целевого белка и типа используемого хроматографического метода. Приемлемые диапазоны величин рН для нагрузки, промывки или элюирующего буфера легко определяются с помощью стандартных методов, таких что целевой белок выделяют в активной форме.

Согласно одному из вариантов осуществления, водную буферную систему выбирают из ацетатнонатриевых буферных систем. Согласно другому аспекту, водная буферная система, содержащая уксусную кислоту, также может быть объединена с одним или более соединений из ацетата аммония в качестве соли и ионообменных соединений. Согласно еще одному аспекту, для регулирования величины рН или

концентрации иона натрия необязательно может быть использован гидроксид натрия. Согласно предпочтительному аспекту, ионообменный буфер/буферная соль ионообменного соединения в подвижной фазе представляет собой ацетат аммония/ацетатнатриевую буферную систему.

5 Другой вариант осуществления изобретения относится к формулам разделительного градиента, при этом для расчета нелинейных градиентов могут быть использованы уравнения (i) и (ii). Градиент называется линейным, если изменение концентрации растворителя с течением времени является линейным. Нелинейные  
10 градиенты могут быть рассчитаны по следующей формуле. Если  $\theta$  - фракция растворителя в любой момент времени  $t$ ,  $C$  - концентрация растворителя в этот момент времени,  $C_1$  - концентрация в начале градиента,  $C_2$  - концентрация в конце градиента, а  $t_g$  - суммарное время градиента, тогда

- 15 (i) Вогнутый градиент -  $\theta = (t/t_g)^n$ ;  $C = (C_2 - C_1) * \theta + C_1$   
 (ii) Выпуклый градиент -  $\theta = 1 - (1 - t/t_g)^n$ ;  $C = (C_2 - C_1) * \theta + C_1$   
 где  $n$  - коэффициент крутизны ( $n = \text{от } 0 \text{ до } \infty$ ).

Согласно другому аспекту, изобретение предлагает способ очистки белка, включающий стадии воздействия на белковую смесь, содержащую по меньшей мере  
20 одну родственную примесь, включающие введение белковой смеси в ионообменную колонку, содержащую ионообменную смолу на керамической основе, уравновешенную подходящим буфером до слабокислого рН, последующее элюирование с использованием выпуклого/вогнутого градиента крутизны в диапазоне от 0 до  $\infty$  с концентрацией буфера в диапазоне от 0,01 М до 1 М, приводящее к  
25 снижению целевых примесей на 60-75%. Элюированный белок может быть далее подвергнут высокоэффективной жидкостной хроматографии для дополнительной обработки.

Согласно другому аспекту, изобретение предлагает способ очистки инсулина и его  
30 аналога с помощью ОФ-ВЭЖХ. Этот способ включает в себя уравновешивание колонки ОФ-ВЭЖХ надлежащей концентрацией органического модификатора, после чего на колонку наносят образец в условиях перегруженной колонки, затем колонку промывают определенной концентрацией органического модификатора для удаления всего несвязанного белка, после чего осуществляют градиентное элюирование,  
35 которое в данных примерах проводят в нелинейных условиях. В дальнейшем образцы фракционируют и анализируют для определения итоговой чистоты, и фракции, удовлетворяющие требованиям по чистоте, объединяют вместе с получением сбора элюата.

40 Согласно одному из аспектов изобретения, очищенный белковый продукт не содержит примесей или содержит по существу минимальные количества целевых примесей. Согласно одному из аспектов изобретения, чистота очищенного белкового продукта составляет по меньшей мере 95%, согласно другому аспекту изобретения, чистота очищенного белкового продукта составляет по меньшей мере 97%, согласно  
45 еще одному аспекту изобретения, чистота очищенного белкового продукта составляет по меньшей мере 98%, согласно еще одному аспекту изобретения, чистота очищенного белкового продукта составляет по меньшей мере 99%, и согласно еще одному аспекту изобретения, чистота очищенного белкового продукта составляет 100%.

50 Согласно другому аспекту изобретения, очищенный инсулин и аналог не содержат или содержат по существу минимальные количества целевых примесей. Согласно одному из аспектов изобретения, чистота очищенного инсулина и аналогов составляет по меньшей мере 80%, согласно другому аспекту изобретения, чистота очищенного

инсулина и аналога составляет по меньшей мере 85%, согласно другому аспекту изобретения, чистота очищенного инсулина и аналога составляет по меньшей мере 90%, согласно еще одному аспекту изобретения, чистота инсулина и аналога составляет 97%.

5 Другой аспект изобретения относится к эффективному увеличению чистоты белка (>95%) с помощью обращенно-фазовой хроматографии в сочетании с ионообменной хроматографией, выполняемой с использованием нелинейного градиента.

10 Эти и другие неограничивающие варианты осуществления изобретения без труда будут понятны среднему специалисту в данной области техники после прочтения раскрытия и формулы изобретения, приведенных в данном описании. При этом данное изобретение не ограничивается описанными конкретными способами и процессами, по существу, требуемые белковые/пептидные продукты и способы, 15 разумеется, могут варьироваться. Также следует понимать, что использованная в данном контексте терминология предназначена исключительно для целей описания конкретных вариантов осуществления и не носит ограничительного характера.

20 Следует понимать, что использование приведенного в качестве примера способа очистки, как описано в примерах, для получения разделений с высоким разрешением сочетается с компонентами, используемыми для разделения, что делает это особенно эффективным для получения требуемого пептида с помощью очень простого, удобного и недорогого способа.

25 Приведенные выше описания конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения представлены в целях пояснения и описания. Они не предназначены для того, чтобы быть исчерпывающими или ограничивать изобретение точными раскрытыми формами. С учетом вышеизложенных идей возможны различные модификации и вариации. Кроме того, множество изменений может быть сделано для адаптирования конкретных ситуаций, материала, состава материала, способа, стадии 30 или стадий способа для целей, сущности и объема настоящего изобретения. Все такие модификации подпадают под объем прилагаемой формулы изобретения.

Технология настоящей заявки далее проиллюстрирована с помощью следующих примеров. Однако эти примеры не следует рассматривать, как ограничивающие объем изобретения.

#### 35 Пример 1

Технический IN-105 разбавляли пятикратным объемом воды, и величину pH доводили до 3,5. Раствор наносили на стальную колонку, заполненную катионообменной смолой Ceramic Hyper-D S. Смолу уравнивали и промывали 40 ацетатаммонийным буфером с концентрацией 10 mM и pH 3,5. Чистота нагрузки составляла 46,22% с содержанием 5,6% дезокта-примеси. При использовании выпуклого градиента крутизны 0,3 с концентрацией буфера от 0,2 M до 0,64 M ацетата аммония на протяжении 10 объемов колонки полученный в результате сбор элюата имел чистоту 59% с содержанием дезокта-примеси лишь 4,4%, что свидетельствует о 45 приблизительном снижении содержания дезокта-примеси на 50%.

#### Пример 2

50 Технический IN-105 разбавляли пятикратным объемом воды, и величину pH доводили до 3,5. Раствор наносили на стальную колонку, заполненную катионообменной смолой Ceramic Hyper-D S. Смолу уравнивали и промывали ацетатаммонийным буфером с концентрацией 10 mM и pH 3,5. Чистота нагрузки составляла 52,57% с содержанием 9,1% дезокта-примеси. При использовании вогнутого градиента крутизны 0,15 с концентрацией буфера от 0,38 M до 0,64 M

ацетата аммония на протяжении 10 объемов колонки полученный в результате сбор элюата имел чистоту 63,31% с содержанием дезокта-примеси лишь 5,14%, что свидетельствует о приблизительном снижении содержания дезокта-примеси на 71%.

#### Пример 3

5 Технический IN-105 разбавляли пятикратным объемом воды, и величину рН доводили до 3,5. Раствор наносили на стальную колонку, заполненную катионообменной смолой Ceramic Hyper-D S. Смолу уравнивали и промывали ацетатаммонийным буфером с концентрацией 10 мМ и рН 3,5. Чистота нагрузки  
10 составляла 55,46% с содержанием 8,18% дезокта-примеси. При использовании вогнутого градиента крутизны 0,15 с концентрацией буфера от 0,2 М до 0,64 М ацетата аммония на протяжении 10 объемов колонки полученный в результате сбор элюата имел чистоту 67,37% с содержанием дезокта-примеси лишь 5,35%, что  
15 свидетельствует о приблизительном снижении содержания дезокта-примеси на 61%.

#### Пример 4

15 Технический IN-105 разбавляли пятикратным объемом воды, и величину рН доводили до 3,5. Раствор наносили на стальную колонку, заполненную катионообменной смолой Ceramic Hyper-D S. Смолу уравнивали и промывали  
20 ацетатаммонийным буфером с концентрацией 10 мМ и рН 3,5. Чистота нагрузки составляла 55,80% с содержанием 7,71% дезокта-примеси. При использовании выпуклого градиента крутизны 0,15 с концентрацией буфера от 0,38 М до 0,64 М ацетата аммония на протяжении 10 объемов колонки полученный в результате сбор элюата имел чистоту 70% с содержанием дезокта-примеси лишь 3,85%, что  
25 свидетельствует о приблизительном снижении содержания дезокта-примеси на 75%.

#### Пример 5

30 Технический IN-105 разбавляли пятикратным объемом воды, и величину рН доводили до 3,5. Раствор наносили на стальную колонку, заполненную катионообменной смолой Ceramic Hyper-D S. Смолу уравнивали и промывали ацетатаммонийным буфером с концентрацией 10 мМ и рН 3,5. Чистота нагрузки составляла 55,99% с содержанием 8,15% дезокта-примеси. При использовании выпуклого градиента крутизны 0,15 с концентрацией буфера от 0,38 М до 0,64 М ацетата аммония на протяжении 20 объемов колонки полученный в результате сбор элюата имел чистоту 70,32% с содержанием дезокта-примеси лишь 3,91%, что  
35 свидетельствует о приблизительном снижении содержания дезокта-примеси на 74%.

#### Пример 6

40 Технический IN-105 разбавляли пятикратным объемом воды, и величину рН доводили до 3,5. Раствор наносили на стальную колонку, заполненную катионообменной смолой Ceramic Hyper-D S. Смолу уравнивали и промывали ацетатаммонийным буфером с концентрацией 10 мМ и рН 3,5. Чистота нагрузки составляла 53,51% с содержанием 9,29% дезокта-примеси. При использовании выпуклого градиента крутизны 0,15 с концентрацией буфера от 0,38 М до 0,64 М ацетата аммония на протяжении 20 объемов колонки полученный в результате сбор элюата имел чистоту 68,41% с содержанием дезокта-примеси лишь 4,79%, что  
45 свидетельствует о приблизительном снижении содержания дезокта-примеси на 75%.

#### Пример 7

50 Технический IN-105 наносили на стальную колонку, заполненную катионообменной смолой Ceramic Hyper-D S, и работали при выпуклом градиенте. Сбор элюата, полученный после катионного обмена, разбавляли и наносили на силикагель Silica C8, содержащий 10% растворителя. Использованной подвижной

фазой были 0,25 М лимонная кислота (буфер А) и ацетонитрил (буфер В). Уравновешивали при 10% В и промывали при 15% В. Чистота нагрузки составляла 78,26%. Элюировали при линейном градиенте от 15% В до 23% В на протяжении 20 объемов колонки, полученный в результате сбор элюата имел чистоту 96,33%.

#### Пример 8

Технический IN-105 наносили на стальную колонку, заполненную катионообменной смолой Ceramic Hyper-D S и работали при выпуклом градиенте. Сбор элюата, полученный после катионного обмена, разбавляли и наносили на силикагель Silica C8, содержащий 10% растворителя. Использованной подвижной фазой были 0,1 М трис и 0,02 М MgCl<sub>2</sub> (буфер А) и ацетонитрил (буфер В). Уравновешивали и промывали при 10% В. Чистота нагрузки составляла 65,06%. Элюировали при линейном градиенте от 25% В до 32% В на протяжении 20 объемов колонки, полученный в результате сбор элюата имел чистоту 92,87%.

#### Пример 9

Кристаллы метилового эфира инсулина (ИМЕ) после реакции с трипсином (ТР) растворяли в 0,5 N HOAc, 50 mM ацетата Na и 15% MeOH, так что концентрация нагрузки составляла 1,5 г/л. Затем полученный раствор фильтровали и наносили на ОФ (обращенно-фазовую) колонку с силикагелем C8 при 20 г/л (т.е., 20 г ИМЕ на литр смолы). Чистота нагрузки составляла 74,51% с содержанием приблизительно 9% дестрео-инсулина человека в качестве основной примеси. Осуществляли ОФ-ВЭЖХ, используя ацетатнатриевый буфер (буфер А) и метанол (буфер В). Использовали выпуклый градиент от 50 до 65% В со степенью крутизны 3, полученный продукт содержал 0% дестрео-инсулина человека и имел итоговую чистоту 95,95%.

#### Пример 10а)

Кристаллы гларгина после ферментативной реакции растворяли в 2 М HOAc и 10% ацетонитрила, так что концентрация нагрузки составляла от 0,8 до 0,95 г/л. Далее нагрузку фильтровали и наносили на ОФ колонку, заполненную силикагелем C18, с емкостью загрузки 5,4 г/л (т.е. 5,4 г инсулина гларгин на литр смолы). Чистота нагрузки составляла от 35% до 40% с содержанием несколько различных примесей. Осуществляли элюирование с помощью 250 mM лимонной кислоты (буфер А) и ИПС (изопропиловый спирт) (буфер В) в качестве органического модификатора. Конечная ЕР чистота составила 96,02% с отделением различных примесей. В случае итоговой чистоты 80,97% постепенный выход увеличивается до 86,7%. Был использован выпуклый градиент от 10 до 20% В со степенью крутизны 0,5.

#### Пример 10b)

Кристаллы гларгина после ферментативной реакции растворяли в 2 М HOAc и 10% ацетонитрила, так что концентрация нагрузки составляла от 0,8 до 0,95 г/л. Далее нагрузку фильтровали и наносили на ОФ колонку, заполненную силикагелем C18, с емкостью загрузки 5,4 г/л (т.е. 5,4 г инсулина гларгин на литр смолы). Чистота нагрузки составляла от 35% до 40% с содержанием нескольких различных примесей. Осуществляли элюирование с помощью 250 mM лимонной кислоты (буфер А) и ИПС (буфер В) в качестве органического модификатора. Конечная ЕР чистота составила 96,02% с выделением различных примесей. Для итоговой чистоты 80,97% постепенный выход увеличивается до 86,7%. Использовали вогнутый градиент от 10 до 20% В со степенью крутизны 0,5.

#### Пример 11

Конечный материал инсулина аспарт после ферментации разбавляли уксусной



кислотой и ацетонитрилом, так что концентрация нагрузки соответствовала 0,8 г/л. После этого нагрузку фильтровали и наносили на ОФ колонку, заполненную силикагелем С4, с емкостью загрузки 10 г/л (т.е. 10 г инсулина аспарт на литр смолы). Чистота нагрузки составляла 71,03% с содержанием нескольких различных  
 5 близкородственных примесей, таких как дезокта-аспарт, фланк, моногликозилированный аспарт и так далее. Элюирование осуществляли с помощью 25 мМ ацетата натрия с рН 4,0 (буфер А) и ацетонитрила (буфер В). Использовали вогнутый градиент с 15 до 30% В со степенью крутизны 0,5,  
 10 полученный продукт имел итоговую чистоту 88,24%. Основным преимуществом использования нелинейного градиента было уменьшение содержания примесей, таких как фланк (уменьшилось на 97%) и дезокта-аспарт (уменьшилось на 70%).

Раскрыты предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения. Однако среднему специалисту в данной области техники будет понятно, что под идеи  
 15 данного изобретения будут подпадать некоторые модификации. Поэтому для определения истинного объема и содержания изобретения следует изучить следующую формулу изобретения.

#### Формула изобретения

20 1. Препаративный хроматографический способ очистки инсулина, аналога инсулина или производного инсулина из смеси, содержащей по меньшей мере одну родственную примесь, включающий стадии

25 (а) подвергания смеси хроматографическому процессу, в котором смолу промывают и уравнивают в буфере и органическом модификаторе при слабокислом рН;

30 (b) элюирования с выпуклым или вогнутым нелинейным градиентом крутизны, имеющим коэффициент крутизны в диапазоне от 0 до  $\infty$  с изменением концентрации буфера в диапазоне от 0,01 М до 1 М; и

(с) выделения инсулина, аналога инсулина или производного инсулина, очищенного от целевых примесей по меньшей мере на 50%.

35 2. Способ по п.1, отличающийся тем, что хроматографический процесс выбирают из группы, включающей ионообменную хроматографию, обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию и их комбинацию.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что смола на стадии а) является ионообменной смолой или С4-С18 силикагелевой смолой.

40 4. Способ по п.1, отличающийся тем, что используемый буфер является ацетатным буфером.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что величина рН составляет приблизительно от 2 до 5.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что производное инсулина представляет собой IN 105.

45 7. Способ по п.1, отличающийся тем, что аналог инсулина представляет собой гларгин, аспарт, лизпро, глулизин или метиловый эфир инсулина.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что целевая примесь представляет собой дезокта-примесь, дезтеро-примесь, примесь дезокта-аспарта или фланк и  
 50 моногликозилированный аспарт, либо любую комбинацию этого.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что массово-объемное соотношение полипептида и смолы составляет от 0,1 до 50 г/л.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что массово-объемное соотношение

полипептида и смолы составляет от 1 до 25 г/л.

11. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что очищенный инсулин, аналог инсулина или производное инсулина имеет чистоту по меньшей мере 95%.

5 12. Способ очистки инсулина и его аналога из смеси, содержащей по меньшей мере одну родственную примесь, включающий стадии

(а) введения смеси в колонку обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ), которую промывают и уравнивают органическим модификатором;

10 (б) элюирования с выпуклым/вогнутым нелинейным градиентом крутизны, имеющим коэффициент крутизны в диапазоне от 0 до  $\infty$  с изменением концентрации буфера в диапазоне от 0,01 М до 1 М; и

(с) выделения инсулина и его аналога, очищенных от целевых примесей по меньшей мере на 50%.

15 13. Способ по п.12, отличающийся тем, что колонку ОФ-ВЭЖХ промывают и уравнивают при рН приблизительно от 2 до 5.

14. Способ по п.12, отличающийся тем, что выделенный аналог инсулина имеет чистоту по меньшей мере 97%.

20

25

30

35

40

45

50