

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 035448

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.17

(21) Номер заявки
201700058

(22) Дата подачи заявки
2015.07.13

(51) Int. Cl. C07K 1/14 (2006.01)
C07K 14/535 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ОЧИСТКИ рчГ-КСФ

(31) 2289/MUM/2014

(32) 2014.07.14

(33) IN

(43) 2017.07.31

(86) PCT/IN2015/050066

(87) WO 2016/009451 2016.01.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ГЕННОВА
БИОФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
ЛИМИТЕД (IN)

(72) Изобретатель:

Рагхуванши Арджун, Сингх Шраван
Кумар, Тхакер Нидхибен, Шанкар
Шагун, Кардиле Паван, Сингх
Санджай (IN)

(74) Представитель:

Вашина Г.М. (RU)

(56) EP-B1-2341061

VANZ A.L. et al., "Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization". Microbial Cell Factories (2008); 7:13. Methods

WO-A2-2008096370

WO-A2-2012057529

WO-A1-2012021088

HERMAN A.C. et al., "Characterization, Formulation, and Stability of Neupogen® (Filgrastim), a Recombinant Human Granulocyte - Colony Stimulating Factor" Formulation, Characterization, and Stability of Protein Drugs: Case Histories, Volume 9 of the series Pharmaceutical Biotechnology (2002) pp. 303-328. Full text

(57) Изобретение относится к масштабируемому и промышленно целесообразному последующему способу очистки рекомбинантного человеческого Г-КСФ.

035448 B1

035448 B1

035448 B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к способу очистки белков. Более конкретно, настоящее изобретение относится к способу очистки гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (рчГ-КСФ).

Уровень техники

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ или ГКСФ) представляет собой глико-протеин, который стимулирует костный мозг к вырабатыванию гранулоцитов и высвобождению их в кровяное русло. В биотерапевтических препаратах Г-КСФ продемонстрировал эффективность при лечении неонатальных инфекций, при гранулоцитарной трансфузии у больных с нейтропенией, при тяжелых инфекциях и сепсисе, при остром миелоидном лейкозе Г-КСФ является основным биофармацевтическим лекарственным препаратом. В промышленных масштабах доступны две формы рекомбинантного человеческого Г-КСФ, которые включают Г-КСФ, полученный из *Escherichia coli* (*E. coli*), который не имеет сахарной цепи (негликозилированный Г-КСФ; филграстим; Neupogen, Amgen), и КСФ, полученный из клеток яичника китайского хомячка, (гликозилированный Г-КСФ; ленограстим, Chugai Pharma UK Ltd).

Филграстим представляет собой водорастворимый белок, содержащий 175 аминокислот, с молекулярной массой 18800 Да. Филграстим получают в результате бактериального культивирования штамма *Escherichia coli* (*E. coli*), который был трансформирован генетически сконструированной плазмидой, которая содержит ген Г-КСФ человека. Биологические активности Г-КСФ включают стимулирование и дифференциацию "стволовых клеток"-предшественников в разнообразные линии клеток крови, стимулирование пролиферации дифференцированных линий клеток крови и стимулирование окончательной дифференциации зрелых клеток крови из пролиферирующих линий клеток.

Получение рекомбинантных терапевтических белков с использованием микроорганизмов в качестве хозяйской системы зачастую бывает затруднительно, поскольку высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков приводит к образованию телец включений (ТВ), которые представляют собой нерастворимые агрегаты, а также рекомбинантных белков, которые присутствуют в биологически неактивной форме, которые требуют последующих дополнительных действий для получения биологически активного белка, пригодного для дальнейших стадий очистки. Более того, зачастую бывает затруднительно восстанавливать белок из ТВ из-за проблем, связанных с изначальными стадиями восстановления, солюбилизации и ренатурации. Получение рекомбинантных белков из телец включений может быть целесообразным, если будет разработан простой и экономически эффективный последующий способ восстановления.

Растущий спрос на биофармацевтические препараты ускорил прогресс как для предшествующих, так и для последующих стадий при процессинге биотерапевтических белков. За последние несколько лет значительные улучшения были сделаны для титров культур клеток, что в результате сместило центр биофармацевтических разработок в направлении улучшения промышленных задач при последующих стадиях процессинга. Биотерапевтические белки, как правило, получают наряду с множеством примесей. К ним относятся примеси от клеток-хозяина, примеси от процессов производства и примеси/варианты, связанные с продуктами производства. Среди упомянутых примеси/варианты, связанные с продуктами производства, сложно удалить, поскольку их физико-химические свойства очень сходны с таковыми у конечного продукта, тем не менее эти примеси/варианты могут оказывать значительное влияние на биологическую активность целевых терапевтических препаратов.

Вышеупомянутые варианты/примеси включают различные оксидативные формы метиониновых (Met) остатков Г-КСФ. Известно, что белок Г-КСФ содержит четыре остатка метионина в Met1, Met122, Met127 и Met138 положениях. Следует отметить, что при различных оксидативных условиях каждый из четырех остатков метионина окисляется с различной скоростью [Met1 > Met138 > Met127 > Met122], которые могут быть разделены при помощи обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) при сопоставлении с хроматограммой нативного Г-КСФ. В дополнение примеси, подобно восстановленной и агрегированной форме Г-КСФ, которая образовалась в результате нарушенного фолдинга нативного Г-КСФ, демонстрируют дополнительные пики на ОФ ВЭЖХ хроматограмме. Эти и другие подобные формы нецелевого Г-КСФ приводят к снижению биологической активности нативного Г-КСФ. Следовательно, для фармацевтических разработок терапевтических белков крайне важно удаление таких примесей во время процесса очистки. Кроме того, на ОФ ВЭЖХ хроматограмме наряду с нативным Г-КСФ также наблюдается дополнительный пик N-формил-метионинового варианта Г-КСФ, который обладает такой же биологической активностью, как и нативная форма, но иногда может приводить к иммуногенному ответу у пациента. N-формил-метиониновый вариант является результатом частичного удерживания формильной группы *def* геном *E. coli* из-за высокого уровня экспрессии рекомбинантных белков. Этот вариант также представляет собой примесь и должен быть удален. Таким образом, его эффективное удаление представляет собой ключевую задачу для платформ очистки при производстве терапевтических белков на бактериальной основе.

Для удаления вышеупомянутых примесей, связанных с продуктами производства, в прототипах были использованы различные хроматографические методы, такие как хроматография на мультимодальных разделительных матрицах, которая предполагает использование смол, которые обладают комбинацией взаимодействий между продуктом и смолой такой, как гидроксипатит (ГА) (взаимодействия катионного

обмена и аффинности к металлу), Capto MMC (взаимодействия катионного обмена и гидрофобные), Capto Adhere (взаимодействия анионного обмена и гидрофобные) и гексиламин (ГЕА)/фенилпропиламин (ФПА) (англ. HEA/PPA). Все эти смолы являются эффективными и обеспечивают различные селективности, но являются дорогостоящими по сравнению с обычными ионообменными и гидрофобными смолами, таким образом, увеличивая стоимость конечного продукта. Более того, оптимизация параметров процесса с использованием мультимодальных смол является кропотливым процессом и занимает много времени, что в результате увеличивает время для разработки процесса и, как следствие, продолжительность хроматографии.

В последние несколько лет разработка и производство терапевтического Г-КСФ включает в себя множество схем очистки. Например, в документе WO 1987/03689 описано применение иммуноаффинной хроматографии для выделения и очистки рекомбинантного Г-КСФ, которая не стала достаточно распространённым подходом для промышленного производства, поскольку она может вызывать свои собственные регуляторные проблемы. Кроме того, стоимость сред для иммуноаффинной хроматографии была очень высокой по сравнению с обычными хроматографическими матрицами в связи с необходимостью использования моноклональных антител для их приготовления.

Европейский патент EP 2341061 описывает способ очистки, который включает ряд из четырех стадий хроматографии и состоит из двух гель-фильтрационных хроматографии, катионообменной хроматографии и анионообменной хроматографии для получения Г-КСФ.

Другой европейский патент EP 1904522 описывает способ очистки, используемый для очистки Г-КСФ, который включает главным образом три стадии хроматографии, а именно две катионообменные хроматографии и хроматографию с гидрофобным взаимодействием.

В документе WO 2001/04154 описывается способ очистки, который включает хроматографию с гидрофобным взаимодействием, гидроксиапатитную хроматографию и катионообменную хроматографию для очистки Г-КСФ. Для Г-КСФ, полученного из *E. coli*, солюбилизация телец включений и рефолдинг Г-КСФ являются дополнительными стадиями, которые необходимо учитывать. В промышленном масштабе конечный выход продукта в значительной степени снижается из-за многостадийности процесса. Следовательно, требуется упрощенный способ с меньшим количеством стадий и с более высоким выходом продукта в менее длительные сроки.

В известном уровне техники описанные способы очистки являются усложненными, длительными и включают несколько стадий хроматографии для получения очищенного Г-КСФ. Кроме того, ни один из предыдущих способов не показал базовую, предусмотрительную и финансово практическую стратегию для производства Г-КСФ, которая могла бы обеспечить постоянное производство стабильного продукта в промышленном масштабе. Соответственно, для преодоления значительных проблем, связанных с производством Г-КСФ, на данный момент разработан простой, масштабируемый, промышленно целесообразный и надёжный способ для восстановления Г-КСФ в высокой степени, который и раскрыт в данном изобретении. Способ по данному изобретению включает упрощённые, ортогональные, надёжные и масштабируемые последующие стадии процесса для производства Г-КСФ в промышленных масштабах с более высокими показателями выхода продукта и его чистоты.

Объект изобретения

Объектом данного изобретения является создание высокоэффективного, надёжного, экономичного и масштабируемого последующего способа для очистки рекомбинантного человеческого Г-КСФ.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к новому масштабируемому и промышленно целесообразному последующему способу для очистки рекомбинантного человеческого Г-КСФ.

Краткое описание графических материалов

Ниже приведен перечень прилагаемых графических фигур, на которых изображено

- на фиг. 1 - ОФ ВЭЖХ профиль солюбилизированных ТВ рчГ-КСФ;
- на фиг. 2 - ОФ ВЭЖХ профиль окисленного раствора рефолдированного рчГ-КСФ;
- на фиг. 3 - ДСН-ПААГ профиль с образцами солюбилизированного, рефолдированного и окисленного рчГ-КСФ;
- на фиг. 4 - ОФ ВЭЖХ профиль при ионообменной хроматографии - первый элюат;
- на фиг. 5 - ОФ ВЭЖХ профиль при гидрофобном взаимодействии молекул элюата;
- на фиг. 6 - ДСН-ПААГ профиль очищенного белка рчГ-КСФ;
- на фиг. 7 - ОФ ВЭЖХ профиль очищенного белка рчГ-КСФ;
- на фиг. 8 - ОФ ВЭЖХ профиль белка Г-КСФ, очищенного с помощью ПЭГ;
- на фиг. 9 - ДСН-ПААГ профиль белка Г-КСФ, очищенного с помощью ПЭГ.

Подробное описание изобретения

Данное изобретение предлагает способ выделения и очистки рекомбинантного человеческого грамотрицательного колониеобразующего фактора (Г-КСФ) из микроорганизмов, которые продуцируют Г-КСФ. Клетки-хозяева, которые были трансформированы или трансфицированы рекомбинантными плазмидами или вирусными ДНК векторами, экспрессируют биологически активный человеческий Г-КСФ или генетически сконструированный вариант человеческого Г-КСФ. Экспрессированный белок

очищали с использованием способа, описанного в данном изобретении. Последовательности ДНК, которые кодируют полноразмерный Г-КСФ или его часть, содержат включения кодонов, "предпочтительных" для экспрессии у выбранных хозяев, которые не являются млекопитающими. Ген ГКСФ может быть встроен в челночную плазмиду и быть амплифицированным. Разработанный вектор, который содержит открытую рамку считывания ГКСФ, может быть затем трансформирован в химически компетентную клетку-хозяин и может быть изолирован.

Затем клетки можно нарастить в ферментере в условиях контролируемой температуры в диапазоне от 20 до 40°C при pH 5-8, но более предпочтительно от 25 до 30°C при pH 7,0-7,5. Полученную таким образом биомассу можно подвергать новому способу выделения и очистки, описанному в данной заявке, для получения очищенного ГКСФ.

Предлагаемый новый способ выделения и очистки Г-КСФ включает следующие стадии, в которых

i) продуцируют рГ-КСФ путём культивирования *E. coli* с высокой плотностью клеток и выделяют тельца включения;

ii) проводят солюбилизацию телец включений, полученных на этапе (i) для высвобождения Г-КСФ;

iii) проводят рефолдинг белка Г-КСФ, полученного на этапе (ii);

iv) освещают и очищают белок Г-КСФ, полученный на этапах (iii);

v) необязательно проводят конъюгирование очищенного Г-КСФ, полученного на этапе (iv), с ПЭГ;

vi) необязательно проводят очистку конъюгированного (пегилированного) Г-КСФ, полученного на этапе (v), с использованием катионообменной хроматографии;

причём выход продукта при способе получения очищенного Г-КСФ из солюбилизированных телец включений находится в пределах от 50 до 70%, а чистота Г-КСФ, проанализированная с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, составляет не менее чем 98%;

причём суммарное количество примесей, таких как агрегаты, не превышает 2%.

Чистота Г-КСФ, как было проанализировано с помощью ОФ ВЭЖХ, составляет не менее чем 96,5%;

причём суммарное количество окисленного Г-КСФ, восстановленного Г-КСФ и f-met Г-КСФ составляет не более чем 3,5%;

при этом выход продукта при способе производства ПЭГ-Г-КСФ из Г-КСФ находится в пределах от 60 до 75%, и чистота ПЭГ-Г-КСФ, проанализированная с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, составляет не менее чем 95%.

Продуцирование рГ-КСФ путём культивирования *E. coli* с высокой плотностью клеток и выделения телец включений.

Очистка Г-КСФ по данному изобретению может быть осуществлена путём продуцирования рГ-КСФ, разделения растворимой фракции и фракции с частицами из ферментированного бульона и сбора биомассы. Разделение предпочтительно может быть выполнено путём центрифугирования или фильтрацией, но более предпочтительно центрифугированием.

Отделённые клетки могут быть дополнительно лизированы с помощью лизирующего буфера при pH от 7 до 9, но более предпочтительно pH лизирующего буфера находится в пределах pH 7,5-8,5. После лизиса клеток может следовать выделение телец включений.

Выделение может быть предпочтительно выполнено по отдельности или в комбинации с использованием приборов, выбранных из группы, которая включает ультразвуковой диспергатор лабораторного масштаба, гомогенизатор клеток с высоким давлением, центрифугирование, фильтрацию, но более предпочтительно комбинацию ультразвукового диспергатора лабораторного масштаба и гомогенизатора клеток с высоким давлением.

Выделенные тельца включения могут быть дополнительно промыты буферами, предпочтительно выбранными из группы, которая включает трис-ЭДТА-трисоновый буфер, трис-ЭДТА-дезоксихолатный буфер, трис-NaCl-мочевинный буфер, трисовый буфер, тритон X-100; предпочтительно буфер представляет собой смесь из трис-ЭДТА, мочевины, NaCl и тритона X-100. Концентрация трис находится в диапазоне 30-50 mM, концентрация ЭДТА находится в диапазоне 3-7 mM, концентрация мочевины находится в диапазоне 0,1-0,5M, концентрация NaCl находится в диапазоне 1-2M, а концентрация тритон X-100 находится в пределах 0,8-1,5%. Значение pH буфера для промывки может поддерживаться в диапазоне 7,5-8,5. Температура буфера для промывки может поддерживаться в диапазоне от 20 до 25°C, а время инкубации находится в диапазоне от 60 до 90 мин.

Выбор литического агента и буфера для промывки согласно данному изобретению представляет собой такой, который позволяет повысить восстановление телец включений.

Солюбилизация телец включений, полученных на стадии (i), для высвобождения рекомбинантного человеческого Г-КСФ (рГ-КСФ).

Солюбилизация бактериальных телец включений представляет собой крайне важную стадию, и если она не оптимизирована должным образом, то она может повлиять на выход продукта при дальнейших стадиях процесса, а также на качество очищенного белка.

Выделенные тельца включения могут быть солюбилизированы в смеси для солюбилизации, которая

включает мочевины, буфер и восстанавливающий агент при щелочном pH.

Упомянутый восстанавливающий агент может быть предпочтительно выбран из группы, которая включает 2-меркаптоэтанол, дитиотреитол (ДТТ), цистеин, но более предпочтительно восстанавливающий агент представляет собой цистеин и присутствует в диапазоне концентраций от 20 до 100 мМ. Восстанавливающий агент может быть добавлен при pH в диапазоне 8-11 в течение от 45 до 120 мин, но более предпочтительно при pH 9-10 в течение 60 мин. Выбор восстанавливающего агента по данному изобретению представляется такой, в результате которого сольюбилизация достигается в течение 2-3 ч. Восстанавливающий агент может быть предпочтительно добавлен через 60 мин после начала сольюбилизации, и сольюбилизацию продолжают в течение около 60 мин в присутствии восстанавливающего агента. Также концентрацию выбранного восстанавливающего агента оптимизируют таким образом, что она должна устранять необходимость добавления какого-либо восстанавливающего агента в буфер для рефолдинга.

Буфер выбран из группы, которая включает трис, ЭДТА, мочевины и их смесь, предпочтительно буфер представляет собой смесь, и концентрация мочевины присутствует в диапазоне 6-8М, концентрация трис может находиться в диапазоне 20-50 мМ, концентрация ЭДТА может находиться в диапазоне 2-7 мМ и pH буфера может поддерживаться при pH 10, а pH смеси для сольюбилизации может поддерживаться в диапазоне 9,5-10,5.

Раствор с сольюбилизированными тельцами включения может быть осветлен центрифугированием при 8000-15000 g в течение 10-30 мин, но более предпочтительно при 10000-12000 g в течение 30 мин.

Чистота сольюбилизированных ТВ рчГ-КСФ может быть оценена по профилю ОФ ВЭЖХ, как представлено на фиг. 1. Чистота высвобожденного Г-КСФ оказывается в пределах 25-50%.

Рефолдинг белка Г-КСФ, полученного на стадии (ii).

Буфер для рефолдинга, который используется для рефолдинга белков, как правило, состоит из таких химических веществ, как гуанидин гидрохлорид и аргинин, для увеличения проводимости раствора для рефолдинга. При подготовке такого раствора для рефолдинга часто является необходимой стадия ультрафильтрации/диализации до начала стадии ионообменной хроматографии, что в результате прибавляет затраты времени, сложность и расходы к последующим технологическим операциям. Принимая во внимание такие ограничения, способ рефолдинга согласно настоящему изобретению разработан таким образом, что раствор для рефолдинга может быть непосредственно внесен на колонку для ионообменной хроматографии без какой-либо дополнительной подготовительной стадии.

Поскольку рефолдинг белков, как правило, проводят при очень низкой концентрации белка, требуются большие объемы буфера для рефолдинга. Наиболее часто используемый компонент буфера для рефолдинга представляет собой аргинин, который является не только очень дорогим компонентом при использовании больших объемов буферов для рефолдинга, но также влияет на высокую проводимость раствора для рефолдинга, что делает его несовместимым для нанесения на колонку для ионообменной хроматографии. Следовательно, данное изобретение использует новый изобретательский подход для рефолдинга, чтобы способствовать более высокому общему выходу продукта при последующем процессе. Также, как заявлено в данном описании, новые компоненты делают процесс экономичным и позволяют избегать дополнительных отдельных операций при процессе.

Для рефолдинга осветленный раствор с сольюбилизированными тельцами включения может быть разбавлен мочевиной и сорбитолом, которые растворены в буфере для рефолдинга, необязательно, содержащем окисляющий агент.

Упомянутый окисляющий агент предпочтительно может быть выбран из группы, состоящей из цистина, цистеина, окисленного глутатиона (GSSH), цистамина, но более предпочтительный окисляющий агент представляет собой цистин.

Количество окисляющего агента предпочтительно может быть в диапазоне 0-5 мМ, но более предпочтительное количество цистина находится в диапазоне 0-3 мМ.

Выбор окисляющего агента по данному изобретению представляет собой такой, в результате которого при рефолдинге повышается выход продукта с 85 до 95%, и может быть повышена чистота при ОФ ВЭЖХ с 40 до 70%.

Рефолдинг может быть проведен при комнатной температуре или при 2-8°C в течение промежутка времени 14-28 ч, но более предпочтительно при комнатной температуре в течение 12-8 ч.

Раствор с рефолдированным белком может быть необязательно окислен в присутствии окисляющего агента. Упомянутый окисляющий агент предпочтительно может быть выбран из группы, которая включает ацетат натрия, уксусную кислоту, соляную кислоту, ортофосфорную кислоту, но более предпочтительно окисляющий агент представляет собой соляную кислоту.

Значение pH окисленного раствора с рефолдированным белком может быть доведено до диапазона pH 3,0-5,5 и поддерживаться в течение 20-60 мин, но более предпочтительное значение pH находится в интервале от 3,5 до 4,5, которое поддерживается в течение 30-45 мин.

Выход продукта на стадии рефолдинга предпочтительно находится в пределах 50-90%, но более предпочтительный выход продукта составляет 60-85%.

Чистота окисленного рефолдированного Г-КСФ может быть оценена по профилю ОФ ВЭЖХ, как

представлено на фиг. 2.

Солюбилизированный раствор, раствор с рефолдированными белками, окисленный раствор и элюат после ионообменной хроматографии могут быть подвергнуты ДСН-ПААГ электрофорезу для характеристики наличия низкомолекулярных и высокомолекулярных примесей, ассоциированных с рГ-КСФ, как представлено на фиг. 3.

Освещение и очистка окисленного белка Г-КСФ, полученного на стадии (iii).

Окисленный раствор рефолдированного белка Г-КСФ, прежде чем подвергаться хроматографической очистке, необязательно может быть подвергнут фильтрации и/или центрифугированию для удаления любого осадка и твердых частиц, которые могли образоваться.

Г-КСФ может осаждаться во время процесса рефолдинга и может вызвать помутнение/выпадение хлопьев, которое ведет к затруднению освещения после рефолдинга. Степень осаждения зависит от солюбилизации с последующей стратегией рефолдинга. Во многих таких случаях освещение раствора белка включает стадии фильтрации из-за широкого диапазона размеров и типов частиц, которые присутствуют в технологическом потоке.

Предпочтительным является переход к одной стадии для освещения, удаления твердых частиц и/или снижения бионагрузки, с целью минимизации общей стоимости производства. Также преимуществом будут меньшие по размерам, более гибкие и экономически эффективные производственные мощности, которые в значительной степени зависят от выбора единичных операций для процесса и размеров технологического оборудования.

Упомянутое освещение можно провести способом, выбранным из группы, которая включает ультрафильтрацию, диафильтрацию, микрофильтрацию, глубинную фильтрацию, тангенциальную проточную фильтрацию (ТПФ), статическую фильтрацию и центрифугирование, но предпочтительно микрофильтрацией и центрифугированием.

Упомянутый процесс центрифугирования может быть выбран из периодического и непрерывного режимов, но предпочтительно процесс центрифугирования представляет собой непрерывный процесс.

В зависимости от физико-химических свойств белков используются различные методы разделения при их очистке.

Окисленная, восстановленная и f-Met формы метионина в нативном рекомбинантном продукте Г-КСФ белка представляют собой определенные варианты продукта, которые рассматриваются как примеси, ассоциированные с системой экспрессии такой, как *E. coli*. Такие варианты продукта отличаются от нативного белка по своим структурным и функциональным аспектам и могут привести к потере биологической активности и иммуногенному ответу у пациентов. Данное изобретение раскрывает способ двухстадийной хроматографической очистки для выборочного удаления таких вариантов продукта. Уникальная селективность при разделении близкородственных вариантов продукта может быть получена путём использования комбинированных значений pH и градиентов для элюирования на солевой основе для ионообменного и гидрофобного взаимодействий при хроматографии. Полное удаление примесей, связанных с процессом, также достигается при двухстадийном процессе очистки.

В настоящее время ионообменная хроматография (ИОХ) образует остов для процессов очистки биофармацевтических лекарственных препаратов благодаря своей высокой мощности и масштабируемости, однако селективное удаление различных примесей/вариантов продукта в некоторой степени ограничено.

В данном изобретении белки могут быть очищены с помощью ионообменной хроматографии с последующей хроматографией с гидрофобным взаимодействием, при которых примеси, связанные с процессом и конечным продуктом, удалены до приемлемых пределов с использованием комбинации pH и солевых градиентов с высокими технологическими выходами продукта.

Окисленный раствор с рефолдированным белком может быть очищен, подвергаясь ионообменной хроматографии. Упомянутая ионообменная хроматография может представлять собой как катионообменную хроматографию, так и анионообменную хроматографию, но более предпочтительной является катионообменная хроматография, и наиболее предпочтительной катионообменная хроматография со слабыми катионообменниками. Катионообменная хроматография для очистки дополнительно включает неподвижную фазу и подвижную фазу.

Неподвижная фаза для катионообменной хроматографии может быть выбрана из группы, которая включает SP-Sepharose FF, CM-Sepharose FF, SP-Sepharose HP, Fractogel SO₃, Fractogel SE Hi Cap, но более предпочтительной является CM-Sepharose FF.

Подвижная фаза или связывающий буфер для катионообменной хроматографии выбрана из группы, которая включает ацетат натрия, уксусную кислоту, фосфат натрия, ортофосфорную кислоту или смесь, предпочтительно смесь содержит ацетат натрия и уксусную кислоту. Концентрация подвижной фазы или связывающего буфера составляет 20-50 mM, а значение pH находится в диапазоне 3,5-4,5.

Белок Г-КСФ элюируют из катионообменной колонки с использованием буфера, который содержит смесь ацетата натрия, уксусной кислоты и NaCl, при значении pH в диапазоне 4,0-6,0, но предпочтительно в диапазоне 4,5-5,6. Способ для элюирования выбирают из группы, которая включает ступенчатый градиент, линейный градиент и/или комбинацию обоих, но предпочтительно градиент, который исполь-

зуют для элюирования, представляет собой ступенчатый градиент.

Растворы, которые содержат рефолдированный и окисленный Г-КСФ, могут применяться для катионообменных сред в кислых условиях, например при pH от 3,0 до 5,0, и могут элюироваться из среды при значениях pH от слабокислого до слабощелочного, например при pH от 4,0 до 8. Г-КСФ можно элюировать из катионообменной среды при слегка кислых условиях, используя возрастающий градиент NaCl или другой соли, например 0-200 mM NaCl в 40-50 mM ацетате натрия при pH 5,4. В альтернативном варианте рЧГ-КСФ можно элюировать из катионообменной среды при слегка щелочных условиях, с использованием 40-50 mM ацетата натрия при pH 5,6-6,2 с добавлением или без добавления какой-либо соли.

Элюирование предпочтительно можно выполнять при скорости потока 100-250 см/ч, но более предпочтительно при 150-200 см/ч. Динамическая связывающая способность предпочтительно может быть в диапазоне 10-20 мг/мл, но более предпочтительно 15-18 мг/мл.

Выход продукта на стадии ионообменной хроматографии предпочтительно может быть в пределах 70-98%, но более предпочтительно 90-98%.

Выбор катионообменных сред по данному изобретению может быть таким, чтобы среду кондиционировали с использованием небольшого объема рефолдированного раствора, что позволяет избежать использования дополнительных отдельных операций, таких как хроматография с заменой буфера или диалфильтрация с использованием ТПФ. Чистоту ионообменного элюата можно оценить по профилю ОФ ВЭЖХ, как представлено на фиг. 4. ОФ ВЭЖХ чистота Г-КСФ, полученного на стадии катионообменной хроматографии, находится в пределах 90-97%.

Элюат после ионообменной хроматографии, который содержит рЧГ-КСФ, может быть нанесен на среды с гидрофобным взаимодействием при кислых условиях, предпочтительно в диапазоне значений от pH 2,0 до pH 7,0, но более предпочтительно от pH 4,0 до pH 6,0.

Элюат после ионообменной хроматографии разводят сульфатом аммония для обеспечения эффективной концентрации сульфата аммония в разбавленном растворе, которая остается в диапазоне 0,5-1,5M, но предпочтительно в диапазоне 0,7-1,0M.

Среды или неподвижная фаза с гидрофобными взаимодействиями по данному изобретению могут быть выбраны из группы, которая включает Phenyl Sepharose FF, Butyl Sepharose, Nuviac-Prime, HEA HyperCel, PPA HyperCel, Phenyl Sepharose HP, MEP HyperCel и Capto Adhere, но предпочтительной является Phenyl Sepharose FF.

Подвижная фаза или связывающий буфер для хроматографии с гидрофобным взаимодействием содержат смесь ацетата натрия, уксусной кислоты и сульфата аммония при значениях pH в диапазоне 4,5-6, но более предпочтительно значения pH находится в диапазоне 5,2-5,8.

Элюирование предпочтительно может быть выполнено при скорости потока 95-300 см/ч, но более предпочтительно при скорости 100-250 см/ч.

Очищенный белок Г-КСФ при хроматографии с гидрофобным взаимодействием элюируют из неподвижной фазы с использованием подвижной фазы, которая включает ацетат натрия и уксусную кислоту при значениях pH в диапазоне 4-6, но более предпочтительно в диапазоне 4,0-5,0. Способ для элюирования выбирают из группы, которая включает ступенчатый градиент, линейный градиент и комбинацию обоих, но предпочтительно градиент, который используют для элюирования, представляет собой ступенчатый градиент.

Элюат получают при скорости потока 95-300 см/ч, но предпочтительно при 100-250 см/ч.

Выход продукта на стадии хроматографии с гидрофобным взаимодействием (ХГВ) может предпочтительно находиться в пределах от 80 до 90%. Чистота белка Г-КСФ, полученного при хроматографии с гидрофобным взаимодействием, находится в пределах 96,5-99,5%.

Выбор второй хроматографии по данному изобретению может быть таким, чтобы окончательная чистота Г-КСФ, которую достигают, соответствовала качеству, требуемому для фармацевтического препарата рЧГ-КСФ. Чистота ХГВ элюата может быть оценена по профилю ОФ ВЭЖХ, как представлено на фиг. 5.

Нагруженный на колонку для ХГВ раствор и промывка-I могут быть подвергнуты ДСН-ПААГ электрофорезу для характеристики низкомолекулярных и высокомолекулярных примесей, ассоциированных с рЧГ-КСФ.

Результаты показывают, что восстановление продукта после двухстадийной хроматографической очистки составляет от 50 до 70,0% с уровнями чистоты более чем 98,0%. Выборочное удаление различных вариантов продукта путём использования комбинированных значений pH и элюирования на солевой основе и удаление примесей из клетки-хозяина путём использования ортогональной селекции при хроматографических стадиях стоят в числе новых и изобретательских признаков способа по данному изобретению.

В элюате, полученном после хроматографии с гидрофобным взаимодействием, можно необязательно заменить буфер на рецептурный буфер. Рефолдированный Г-КСФ в рецептурном буфере, который содержит биологически активный Г-КСФ, может быть стерильно профильтрован с целью получения рекомбинантного человеческого Г-КСФ фармацевтического качества, который имеет конечную концен-

трацию в диапазоне от 0,5 до 0,9 мг/мл, но более предпочтительно от 0,85 до 0,90 мг/мл. Чистота окончательно очищенного белка может быть оценена по профилю ОФ ВЭЖХ, как представлено на фиг. 6.

Рекомбинантный человеческий Г-КСФ, полученный способом, который описан в данном изобретении, может быть полезным при лечении заболеваний, связанных с гематологией и онкологией. Например, нейтропения, острый миелоидный лейкоз и различные инфекции у человека, животных, птиц, свиней, лошадей, а также у собак и кошек излечимы при применении Г-КСФ по данному изобретению.

Необязательное конъюгирование очищенного Г-КСФ, полученного на стадии (iv), с ПЭГ.

Очищенный рчГ-КСФ (фармацевтическое вещество) можно конъюгировать с полиэтиленгликолем в подходящем буфере при кислотном значении pH.

Упомянутый буфер предпочтительно может быть выбран из группы, которая включает ацетат натрия, фосфат ацетат, гидрофосфат калия, дигидрофосфат калия, гидрофосфат динатрия, гидрофталат калия, тетраборат натрия, но более предпочтительным является ацетат натрия.

pH указанной реакции конъюгации предпочтительно может быть при значениях pH, которые находятся в диапазоне от 5,0 до 5,8.

Упомянутую реакцию конъюгации можно проводить путём добавления 20 кДа ПЭГ альдегида в количестве, превышающем от 3 до 5 раз (мас./мас.) количество очищенного рчГ-КСФ, который используется для реакции конъюгации.

Упомянутая реакция конъюгации необязательно может быть проведена в присутствии восстанавливающего агента, предпочтительно выбранного из группы, которая включает цианоборгидрид натрия, триацетоксиборгидрид натрия, боргидрид натрия, дитионит натрия, гидросульфит натрия, но более предпочтительным является цианоборгидрид натрия.

Восстанавливающий агент предпочтительно может быть добавлен в концентрации, которая находится в диапазоне от 10 до 30 mM, но более предпочтительно 20 mM. Реакционную смесь можно перемешивать при комнатной температуре в течение от 12 до 18 ч, но более предпочтительно в течение 12-16 ч. Выход монопегилированного рчГ-КСФ предпочтительно находится в пределах от 65 до 85%, но более предпочтительно от 70 до 75%. Реакционную смесь с монопегилированным рчГ-КСФ предпочтительно можно хранить при температуре от 1 до 10°C для дальнейшей очистки, но более предпочтительно при температуре 2-8°C.

Необязательная очистка конъюгированного (пегилированного) Г-КСФ, полученного на стадии (v), с использованием катионообменной хроматографии.

Смесь с конъюгированным пегилированным Г-КСФ может быть разбавлена уравнивающим буфером, а значение pH доводят до диапазона 3,5-5,0, но более предпочтительно значение pH можно довести до 4,0-4,5.

Упомянутый разбавленный образец может быть подвергнут ионообменной хроматографии, более предпочтительно катионообменной хроматографии. Катионообменная хроматография включает неподвижную фазу или катионообменные среды и подвижную фазу или связывающий буфер, неподвижная фаза, или катионообменная среда, выбрана из группы, которая состоит из MacroCap-SP и SP Sepharose FF, Fractogel SO₃, но предпочтительно неподвижная фаза состоит из MacroCap-SP. Буфер для элюирования, или подвижную фазу для элюирования, выбирают из ацетата натрия, уксусной кислоты, хлорида натрия и их смеси, но предпочтительно подвижная фаза представляет собой смесь. Концентрация ацетата натрия находится в диапазоне 10-50 mM, а хлорида натрия в пределах от 0,25 до 0,75M. Значения pH буфера для элюирования, или подвижной фазы для элюирования, находится в диапазоне 3,5-5, но предпочтительное значение pH составляет 4,0-4,5. Способ для элюирования выбирают из группы, которая включает ступенчатый градиент, линейный градиент и комбинацию обоих, но предпочтительно градиент, который используют для элюирования представляет собой ступенчатый градиент. Выход монопегилированного Г-КСФ, полученного в результате катионообменной хроматографии, находится в пределах от 80 до 95%, но предпочтительно в пределах от 85 до 90%.

Очищенный монопегилированный рчГ-КСФ может быть восстановлен и элюирован из колонки, путём проведения элюирования со скоростью потока 100-150 см/ч, но более предпочтительно 100 см/ч.

Все хроматографические образцы, включая начальный внесённый образец, пропуск, промывки и элюирования, могут быть проанализированы с использованием перечисленных аналитических методов:

- а) ОФ ВЭЖХ для идентификации и анализа чистоты, как представлено на фиг. 8;
- б) ДСН-ПААГ (восстановленный) электрофорез для анализа чистоты, как представлено на фиг. 9;
- в) определение суммарного белка по Брэдфорду.

В целевой фракции элюирования буфер может быть заменен на предопределенный рецептурный буфер пегфилграстима, который содержит ацетат натрия и сорбитол предпочтительно при значениях pH в диапазоне pH 3,0-4,0, но более предпочтительно при pH 4,0-4,5.

Очищенный монопегилированный рчГ-КСФ может быть дополнительно сконцентрирован до 9-12 мг/мл на 10 кДа ультрафильтрационной мембране, более предпочтительно очищенный монопегилированный рчГ-КСФ может быть сконцентрирован до диапазона 11,0-11,5 мг/мл.

Окончательный концентрат, полученный таким образом после ТПФ, может быть простерилизован

фильтрацией через фильтры с 0,2 мкм порами, с целью получения фильтрата желаемого качества, и разбавлен рецептурным буфером во время стерильной фильтрации для восстановления объемного содержания продукта, фильтрация может быть оптимизирована для восстановления продукта до концентрации пегфилграса >10 мг/мл.

Полученный окончательно очищенный монопегированный рчГ-КСФ до дальнейшего использования предпочтительно может храниться при температуре в пределах 1-10°C, но более предпочтительно при температуре 2-8°C.

Для проверки сконцентрированного раствора ПЭГ-Г-КСФ, или лекарственного вещества ПЭГ-Г-КСФ, или нерасфасованного лекарственного вещества ПЭГ-Г-КСФ, или активной фармацевтической субстанции (АФС) ПЭГ-Г-КСФ для спецификации, окончательно сконцентрированный раствор ПЭГ-Г-КСФ можно анализировать с помощью следующих аналитических методов:

- а) внешний вид и значение pH;
- б) идентичность и чистота, проверенные с помощью ДСН-ПААГ электрофореза, вестерн-блоттинга, анализа N-концевой последовательности, изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) и пептидной карты;
- в) определение белков клетки-хозяина (БКХ) с помощью ИФА;
- г) биоактивность согласно спецификации;
- д) количественная оценка ДНК клеток-хозяина с помощью ПЦР-РВ;
- е) количественная оценка эндотоксина с помощью ЛАЛ-теста;
- ж) наличие агрегатов с помощью эксклюзионной ВЭЖХ;
- з) наличие сопутствующих примесей с помощью ОФ ВЭЖХ;
- и) стерильность согласно спецификации.

После тщательного анализа и биофизического сравнения с оригинальным продуктом можно сделать вывод о том, что продукт, очищенный с помощью способа, описанного в данном изобретении, представляет собой монопегированный на N-конце Г-КСФ, который в высокой степени аналогичный оригинальному продукту с общим выходом процесса более чем 65%.

Фармацевтические вещества рчГ-КСФ и рч ПЭГ-Г-КСФ, полученные с использованием способа, описанного в данном изобретении, тщательно охарактеризованы с использованием фармакопейной статьи и уровня техники внутри аналитических методов. Продукт рчГ-КСФ, полученный с использованием метода по данному изобретению, удовлетворяет перечисленным критическим характеристикам качества, но не ограничивается результатами критических характеристик качества, подробно описанными в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Качество рчГ-КСФ, полученного с использованием способа по данному изобретению

Критическая характеристика качества (КХК)	Результаты, полученные для рчГ-КСФ
Внешний вид	Прозрачная, от бесцветной до слегка желтоватой, жидкость
Идентификация А – по анализу	Должен демонстрировать биологическую активность, как описано при фармакопейном анализе
Идентификация Б – определение методом изоэлектрофокусирования (примесей с зарядом, который отличается от такового у	Мажорная полоса на электрофореграмме, полученной с тестируемым раствором, имеет аналогичное расположение, как и расположение мажорной полосы, полу-

филграстима)	ченной с контрольным раствором.
Идентификация В – определение с помощью эксклюзионной хроматографии (примесей с молекулярной массой более высокой, чем у филграстима/димеров и сопутствующих веществ с более высокой молекулярной массой)	Время удерживания мажорного пика, полученного с тестируемым раствором, аналогично таковому у мажорного пика, полученного с контрольным раствором.
Идентификация Г – определение с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в восстанавливающих и нативных условиях образцов после эксклюзионной хроматографии (примесей с молекулярной массой, отличающейся от таковой у филграстима)	На электрофореграммах, полученных как при восстанавливающих, так и при нативных условиях, мажорная полоса, полученная с тестируемым раствором, имеет аналогичное расположение, как и расположение мажорной полосы, полученной с контрольным раствором
Активность (действенность)	80-125 % от заявленной активности (не должна быть менее чем 1×10^8 МЕ филграстима/ мг белка)
ОФ ВЭЖХ чистота	Не менее чем от 96,5 % до 99,8 %
Сопутствующие белки (общее количество примесей), определённые с помощью обращенной фазовой ВЭЖХ	Площадь любого другого пика, который не является мажорным пиком, составляет не более чем 2 % от общей площади всех пиков. Сумма площади всех пиков, которые не являются мажорными пиками, составляет не более чем 3,5 % от общей площади пиков.
Окисленный Г-КСФ	Ниже 1,5 %
Восстановленный Г-КСФ	Ниже 1 %
f-Met Г-КСФ	Ниже 1,5 %
Димеры и сопутствующие вещества с более высокой молекулярной массой, определенные с помощью эксклюзионной хроматографии	Общее число пиков с временем удерживания меньшим, чем у мажорного пика, должно быть менее чем 2 %.
БКХ	Ниже 100 частиц на миллион
ДНК	Ниже 10 нг/ дозу
Эндотоксин	Ниже 2 МЕ/мг
Содержание белка	Не менее чем 0,9 мг/мл
Стерильность	Должна соблюдаться согласно фармакопейным испытаниям на стерильность

Таблица 2

Качество рчПЭГ-Г-КСФ (ПЭГ-филграстим), полученного с использованием способа по данному изобретению

Критические характеристики качества (КХК)	Результаты, полученные для ПЭГ-Г-КСФ
Внешний вид	Прозрачная, бесцветная или слегка желтоватая, жидкость
Идентификация А – по активности	Соответствует требованиям, описанным в фармакопейном анализе активности
Идентификация Б – на примеси с более высокой молекулярной массой, чем таковая у пегфилграстима	Мажорный пик на хроматограмме, полученной с тестируемым раствором, аналогичный по времени удерживания мажорному пику на хроматограмме, полученной с контрольным раствором.
Идентификация В – на примеси с молекулярными массами, отличающимися от таковых у пегфилграстима	Мажорная полоса на электрофореграмме, полученной с тестируемым раствором, имеет аналогичное расположение, как и расположение мажорной полосы, полученной с контрольным раствором.
Значение pH	В диапазоне от 3,7 до 4,3
Содержание белка	Не менее чем 10 мг/мл
Примеси с молекулярными массами, превышающими таковую у пегфилграстима	Общее число пиков с временем удерживания меньшим, чем у мажорного пика, должно быть менее чем 5 %.
Активность	В пределах от 80 % до 120 %
Свободный мПЭГ альдегид	Не более чем 0,016 мг/мл
Стерильность	Должна соблюдаться согласно фармакопейным испытаниям на стерильность

Из табл. 1 и 2 можно видеть, что рчГ-КСФ и рч ПЭГ-ГКСФ, полученные способом по данному изобретению, имеют более высокую активность со значительно меньшим профилем примесей.

В данном изобретении вышеуказанные улучшения при способе очистки производимого рчГ-КСФ

(филграстима) и ПЭГ-Г-КСФ (пегфилграстима) могут быть полезны с точки зрения снижения действий человека, инвестиций и производственных расходов, в дополнение к ожидаемому более высокому общему выходу продукта.

В одном варианте реализации данное изобретение также раскрывает фармацевтические композиции, которые содержат Г-КСФ с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции можно вводить внутривенно, внутривенно, подкожно, внутримышечно или с использованием форм, известных в фармацевтической области техники. Для внутривенного, внутривенного, подкожного, внутримышечного введения активные лекарственные компоненты могут быть объединены с подходящим носителем, таким как вода, физиологический раствор, водный раствор декстрозы и т.п.

В одном варианте реализации в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, которая содержит Г-КСФ, полученный согласно способу по данному изобретению, в жидкой лекарственной форме для парентерального (ВВ) введения с фармацевтически приемлемыми эксципиентами для пролиферации и дифференциации гранулоцитов.

В одном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция по данному изобретению включает Г-КСФ, или филграстим, полученный согласно способу по данному изобретению, в составе 10 мМ натрий-ацетатного буфера при pH 4,0, который содержит 5% сорбитол и 0,004% полисорбат 80.

Компонент	Количество
Филграстим	Более чем 0,9 мг
Ацетат	0,59 мг
Сорбитол	50,0 мг
Полисорбат 80	0,04 мг
Натрий	0,035 мг
Вода для инъекций	до конечного объема 1 мл

В одном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция по данному изобретению включает ПЭГ-Г-КСФ, пегфилграстим, полученный согласно способу по данному изобретению, в составе 10 мМ натрий-ацетатного буфера при pH 4,0, который содержит 5% сорбитол и 0,004% полисорбат 20.

Компонент	Количество
Пегфилграстим	Более чем 10 мг
Ацетат	0,59 мг
Сорбитол	50,0 мг
Полисорбат 20	0,04 мг
Натрий	0,035 мг
Вода для инъекций	до конечного объема 1 мл

В другом варианте реализации в данном изобретении предложено использование выделенного и подготовленного Г-КСФ, как заявлено в п.1, в жидкой лекарственной форме для парентерального (ВВ) введения для пролиферации и дифференциации гранулоцитов.

Изобретение, согласно данному изобретению, может быть проиллюстрировано ниже следующими примерами, которые не должны быть истолкованы как ограничивающие объем данного изобретения.

Пример 1. Процесс выделения и очистки Г-КСФ по данному изобретению.

Этап 1. Продуцирование рЧГ-КСФ путём культивирования *E. coli* с высокой плотностью клеток.

Преинокуляционную среду, которая содержит подходящий антибиотик, инокулируют клетками *E. coli*, выращенными на чашке Петри для возобновления их из стока, хранящегося при низких температурах. Культуру инкубировали при 30°C, 12 ч, при скорости перемешивания 250 об/мин. Преинокулом и впоследствии инокулом получены путём инокуляции *E. coli* в базовые среды, которые содержат подходящие антибиотики, и инкубирования клеток при 30°C, 12 ч, при скорости перемешивания 250 об/мин. Ферментер, который содержит кондиционируемую базовую солевую среду, инокулируют инокуляционной культурой таким образом, что начальная оптическая плотность (ОП) при 600 нм составляет около 0,1. Культуру индуцируют путём добавления 1 мМ IPTG после достижения желаемой ОП при 600 нм. При осуществлении индуцированного культивирования с периодической подпиткой и последующей индукцией, бульон, который содержит индуцированные клетки *E. coli*, собирают центрифугированием при 4°C и 6000 об/мин в течение 30 мин. Собранный осадок клеток промывали натрий-фосфатным буфером (НФБ). Промытые осажденные клетки хранили при -80°C до дальнейшей обработки.

Этап 2. Лизис клеток, выделение и промывка телец включений.

19,0 г замороженного осадка клеток, полученного в результате культивирования, разбавляют в 15 раз в лизирующем буфере, который включает 100 мМ трис, 20 мМ ЭДТА, 250 мМ NaCl, при значении pH 8,0. Раствор оставляют перемешиваться при комнатной температуре (КТ) в течение 30 мин.

Через 30 мин перемешивания суспензию клеток гомогенизируют при высоком давлении с использованием гомогенизатора высокого давления (PANDA, Niro Soavi) в 1000 бар. Всю суспензию клеток гомогенизируют в течение трех проходов. Лизис клеток контролируется путём проверки падения ОП при 600 нм и наблюдения под световым микроскопом.

После трех проходов лизиса клеточный лизат подвергается высокоскоростному центрифугированию при 10000 g в течение 20 мин. Осадок лизированных клеток осторожно извлекают путём декантиро-

вания надосадочной жидкости. Как осадок лизированных клеток, так и надосадочную жидкость, анализировали с помощью восстанавливающего ДСН-ПААГ электрофореза.

Осадок лизированных клеток, полученный после центрифугирования, снова ресуспенсируют в промывочном буфере, который содержит 20 мМ трис, 1% тритон X-100, 5 мМ ЭДТА, при значении pH 8,0. Суспензию оставляют перемешиваться при комнатной температуре в течение 30 мин. Через 30 мин инкубации и перемешивания в промывочном буфере суспензию подвергали центрифугированию при 10000 g в течение 20 мин. Промытые ТВ, находящиеся в осажённой фракции, извлекают путём осторожного декантирования надосадочной жидкости. Как промытые ТВ, так и супернатант анализировали с помощью восстанавливающего ДСН-ПААГ электрофореза для оценки чистоты. Промытые тельца включения (ТВ) хранили при -80°C до дальнейшего использования.

Этап 3. Солюбилизация телец включений для высвобождения Г-КСФ.

1 г телец включений взвешивают и солюбилизируют в 20 мл солюбилизационного буфера, который включает 50 мМ трис, 5 мМ ЭДТА и 8М мочевины при значении pH 10. После 1 ч солюбилизации был добавлен 40 мМ цистеин для восстановления дисульфидных связей, значение pH было повторно доведено до 10,0, и раствор оставляют для солюбилизации в течение 60 мин при комнатной температуре при непрерывном перемешивании. После солюбилизации раствор с солюбилизованными тельцами включениями осветляли путём центрифугирования при 11000 g в течение 30 мин.

Этап 4. Рефолдинг белка Г-КСФ.

Осветленный и солюбилизованный раствор с тельцами включениями рефолдировали путём его медленного добавления в 10 объемов буфера для рефолдинга, который состоит из 50 мМ триса, 0,5М мочевины, 5% сорбитола и 2 мМ цистина. Разбавление проводили с помощью насоса с постоянной скоростью потока. После добавления солюбилизованного образца в буфер для рефолдинга, образец оставляли на ночь (приблизительно 16 ч) для рефолдинга при комнатной температуре (25°C).

а) ДСН-ПААГ (восстановленный) электрофорез для анализа чистоты;

б) ОФ ВЭЖХ для идентификации и анализа чистоты;

в) определение суммарного белка по Брэдфорду.

Этап 5. Осветление рефолдированного раствора окисленного белка Г-КСФ.

Рефолдированный осветленный раствор белка окисляли путём добавления стокового раствора 1М ацетата натрия с pH 4,0 до получения концентрации эквивалентной 20 мМ ацетата натрия, и окончательно pH доводили с помощью 2М соляной кислоты до значения pH 4,0 и оставляли в течение 30 мин без движения.

Окисленный рефолдированный раствор белка Г-КСФ необязательно может быть подвергнут фильтрации для удаления любого осадка и твердых частиц, которые могут образоваться, прежде чем будет подвергнут хроматографии. Упомянутая фильтрация предпочтительно может быть выбрана из группы, которая включает ультрафильтрацию, диафильтрацию, микрофильтрацию, глубинную фильтрацию, тангенциальную проточную фильтрацию, статическую фильтрацию и центрифугирование, но предпочтительной является микрофильтрация.

Если выбрано осветление путём фильтрации, выбор основывается на проведении эффективного удаления коллоидов, агрегатов, преципитатов и частиц в такой степени, что раствор может быть непосредственно внесен и защищает последующую хроматографическую колонку. Окончательный выбор делается на основе общего оптимального качества фильтрата и стоимости фильтрации. Общими критериями при выборе фильтров являются такие, как перечисленные ниже, но не ограничиваются этими:

а) поток;

б) пропускная способность;

в) повторное использование;

г) циклы стерилизации;

д) безволоконный материал;

е) качество фильтрата;

ж) стоимость фильтрации/л/пробег;

з) площадь, которую занимает оборудование.

Этап 6. Очистка с помощью хроматографии.

После окисления раствор фильтруют через 0,2 мкм фильтр для микрофильтрации с целью удаления осадка и наносят на предварительно уравновешенную двухмиллилитровую катионообменную колонку. Колонку промывали в количестве 5 объемов колонки (ОК) буфером для уравнивания, который состоит из 40 мМ ацетата натрия, при значении pH 4,0 с целью приведения оптической плотности при 280 нм (УФ280) к контрольному уровню. Колонку дополнительно промывали для удаления примесей, относящиеся к продукту, с промывочным буфером, который содержит 40 мМ ацетат натрия при значении pH 5,5. После промывки очищенный рГ-КСФ восстанавливали и элюировали из колонки при пропускании элюирующего буфера, который состоит из 40 мМ ацетата натрия, 200 мМ хлорида натрия, при значении pH 5,4. Все хроматографические образцы, включая начальный внесённый образец, пропуск, промывки и элюирования, анализировались с использованием перечисленных аналитических методов.

Фракции элюирования после катионообменной хроматографии, которые содержали очищенный рЧГ-КСФ, объединяли и разводили в соотношении 1:1 буфером, который состоит из 20 мМ ацетата натрия, 1,5М сульфата аммония, при значении pH 5,4. Разведённый раствор фильтровали с помощью 0,2 мкм фильтра для удаления осадка и отбирали и наносили на предварительно уравновешенную миллилитровую колонку для ХГВ. Колонку промывали в количестве 5 ОК буфером для уравнивания, который состоит из 20 мМ натрий-ацетатного буфера и 0,8М сульфата аммония, при значении pH 5,4, с целью приведения УФ-280 к контрольному уровню. Целевой белок восстанавливали и элюировали из колонки проточным линейным градиентом уравнивающего и элюирующего буфера, который содержит 20 мМ натрий-ацетатный буфер, при значениях pH 4,0, в количестве 20 ОК.

Все хроматографические образцы, включая начальный внесённый образец, проскок, промывки и элюирования, были проанализированы с использованием следующих аналитических методов:

- а) ДСН-ПААГ (восстановленный) электрофорез для анализа чистоты;
- б) ОФ ВЭЖХ для идентификации и анализа чистоты;
- в) определение суммарного белка по Брэдфорду;
- г) определение БКХ с помощью ИФА;
- д) количественная оценка эндотоксина с помощью ЛАЛ-теста.

Этап 7. Восстановление очищенного Г-КСФ в рецептурном буфере.

Во фракциях, полученных в результате ХГВ, которые содержат очищенный целевой белок, был заменён буфер на predetermined рецептурный буфер, который состоит из 10 мМ натрия, при значении pH 4,0, 5% сорбитола, 0,004% полисорбата 80, и дополнительно раствор белка концентрировали до 1 мг/мл с использованием 10 кДа ультрафильтрационной мембраны. Раствор окончательно сконцентрированного рЧГ-КСФ стерильно профильтровали через фильтры с 0,2 мкм порами и хранили при температуре 2-8°C до дальнейшего использования.

Для проверки сконцентрированного раствора Г-КСФ, или лекарственного вещества Г-КСФ, или нерасфасованного лекарственного вещества Г-КСФ, или АФС Г-КСФ для спецификации окончательно сконцентрированный раствор Г-КСФ анализировали с помощью следующих аналитических методов:

- а) внешний вид и значение pH;
- б) идентичность и чистота, проверенные с помощью ДСН-ПААГ электрофореза, вестерн-блоттинга, анализа N-концевой последовательности, изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) и пептидной карты;
- в) определение БКХ с помощью ИФА;
- г) биоактивность согласно спецификации;
- д) количественная оценка ДНК клеток-хозяина с помощью ПЦР-РВ;
- е) количественная оценка эндотоксина с помощью ЛАЛ-теста;
- ж) наличие агрегатов с помощью эксклюзионной ВЭЖХ;
- з) наличие сопутствующих примесей с помощью ОФ ВЭЖХ;
- и) стерильность согласно спецификации.

Этап 8. Конъюгация и очистка пегилированного Г-КСФ с использованием катионообменной хроматографии.

Очищенный рЧГ-КСФ, который находится в 10 мМ натрий-ацетатном буфере, при значении pH 4,0, содержащем 5% сорбитол и 0,004% Tween 80, в концентрации 1-1,2 мг/мл доводят до значения pH около 5,0 путём добавления 1М ацетата натрия со значением pH 5,0. Окончательная буферная сила составляет около 50 мМ. 3-кратное количество (по массе) мПЭГ-20 кДа-СНО добавляют к реакционной смеси мПЭГ-20 кДа-ПЭГ-альдегид к количеству рЧГ-КСФ, которое присутствует в реакционной смеси до пегирования. К реакционной смеси сразу же добавляют 20 мМ цианоборгидрид натрия $[\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3]$. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре (около 25°C) в течение ночи. В процессе анализа качества, проведённого для проверки % монопегилированного филгастима, как правило, 75-80% монопегилированного филгастима получают через 14 ч, реакцию останавливают с помощью 1М трис при значении pH 8,0 и смесь хранят при температуре 2-8°C до дальнейшей обработки.

Реакционную смесь для конъюгации разбавляют в 20 раз буфером для уравнивания и значение pH доводят до 4,0. Разбавленный образец наносят на предварительно уравнивленную катионообменную хроматографическую колонку (MacroCap SP) при линейной скорости потока 100 см/ч. Колонку промывали в количестве 5 ОК буфером для уравнивания, который состоит из 20 мМ ацетата натрия, при значении pH 4,0 с целью приведения оптической плотности при 280 нм (УФ-280) к контрольному уровню, при линейной скорости потока 100 см/ч. Очищенный, монопегилированный на N-конце рЧГ-КСФ восстанавливают и элюируют из колонки при пропуске элюирующего буфера, который состоит из 20 мМ ацетата натрия, 0,5М NaCl, при значении pH 4,0, с 0-100% линейным градиентом за 10 ОК, при линейной скорости потока 100 см/ч.

Все хроматографические образцы, включая начальный внесённый образец, проскок, промывки и элюирования, были проанализированы с использованием следующих аналитических методов:

- г) ДСН-ПААГ (восстановленный) электрофорез для анализа чистоты;
- д) ОФ ВЭЖХ для идентификации и анализа чистоты;

е) определение суммарного белка по Брэдфорду.

В целевой фракции элюата после хроматографии был заменён буфер на буфер, который содержит 10 мМ ацетат натрия, 5% сорбитол, 0,004% полисорбат 20, при значении pH 4,0.

Образец с заменённым буфером дополнительно концентрировали до около 11 мг/мл на 10 кДа ультрафильтрационной мембране. Окончательный концентрат, полученный после ТПФ, стерилизуют фильтрованием через фильтры с 0,2 мкм порами с целью получения фильтрата желаемого качества и разбавляют с использованием буфера. Во время стерильной фильтрации для восстановления объёмного содержания продукта фильтрацию оптимизируют для восстановления продукта до концентрации ПЭГ-Г-КСФ > 10 мг/мл. Конечный продукт хранят при температуре 2-8°C до дальнейшего использования.

Для проверки сконцентрированного раствора пегфилграстима, или лекарственного вещества пегфилграстима, или нерасфасованного лекарственного вещества пегфилграстима, или АФС пегфилграстима для спецификации окончательно сконцентрированный раствор пегфилграстима анализировали с помощью следующих аналитических методов:

- к) внешний вид и значение pH;
- л) идентичность и чистота, проверенные с помощью ДСН-ПААГ электрофореза, вестерн-блоттинга, анализа N-концевой последовательности, изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) и пептидной карты;
- м) определение БКХ с помощью ИФА;
- н) биоактивность согласно спецификации;
- о) количественная оценка ДНК клеток-хозяина с помощью ПЦР в реальном времени;
- п) количественная оценка эндотоксина с помощью ЛАЛ-теста;
- р) наличие агрегатов с помощью эксклюзионной ВЭЖХ;
- с) наличие сопутствующих примесей с помощью ОФ ВЭЖХ;
- т) стерильность согласно спецификации.

В данном изобретении вышеупомянутые улучшения при способе очистки ПЭГ-Г-КСФ будут полезны с точки зрения снижения действий человека, инвестиций и производственных расходов, в дополнение к ожидаемому более высокому общему выходу конечного продукта.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ масштабного промышленного выделения и очистки гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), включающий этапы, в которых

i) выделяют тельца включения, содержащие Г-КСФ, из клеток *E. Coli*, полученных в результате культивирования с высокой плотностью клеток, включающего лизис клеток *E.coli* в буфере для лизиса, содержащего трис, ЭДТА и NaCl, при этом выделение телец включения выполняют с использованием приборов, выбранных из группы, включающей ультразвуковой диспергатор лабораторного масштаба, гомогенизатор клеток с высоким давлением, центрифугирование и фильтрацию;

ii) проводят солюбилизацию Г-КСФ путем инкубации выделенных телец включения, полученных на этапе (i), в реакции солюбилизации, содержащей трис, ЭДТА и мочевины, при этом восстанавливающий агент, включающий цистеин, добавляют в реакцию солюбилизации после 1 ч инкубации,

iii) проводят рефолдинг солюбилизованного Г-КСФ, полученного на этапе (ii), путем разведения солюбилизованного G-CSF в буфере для рефолдинга для создания реакции рефолдинга, и инкубирования реакции рефолдинга в течение 12-28 ч при комнатной температуре, при этом буфер для рефолдинга содержит трис, мочевины, сорбитол и окисляющий агент, выбранный из группы, включающей цистин, цистеин, окисленный глутатион (GSSH) и цистамин;

iv) окисляют рефолдированный раствор Г-КСФ, полученный на этапе (iii), путем добавления в реакцию рефолдинга ацетата натрия и окисляющего агента, выбранного из группы, состоящей из уксусной кислоты, соляной кислоты и ортофосфорной кислоты в количестве, достаточном для достижения значения pH в диапазоне от 3,0 до 5,5;

v) освещают окисленный раствор Г-КСФ, полученный на этапе (iv), при этом освещение осуществляется одним или обоими из фильтрации и центрифугирования; и

vi) очищают Г-КСФ из осветленного раствора Г-КСФ, полученного на этапе (v), с использованием катионообменной хроматографии с последующей хроматографией с гидрофобным взаимодействием (ХГВ), при этом каждая из катионообменной хроматографии и хроматографии с гидрофобным взаимодействием включает неподвижную фазу и подвижную фазу,

причем Г-КСФ представляет собой рекомбинантный человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, и

выход продукта по данному способу находится в пределах от 50 до 70%.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий этап (vii), на котором проводят конъюгирование очищенного Г-КСФ, полученного на этапе (vi), с полиэтиленгликолем (ПЭГ) для получения монопегированного Г-КСФ путем инкубирования перемешанной реакционной смеси для конъюгации, содержащей буферный раствор для конъюгации, ПЭГ и от 10 до 30 мМ восстанавливающего агента, в течение 12-18 ч при комнатной температуре;

причём буферный раствор для конъюгации содержит один или более из ацетата натрия, фосфата ацетата, гидрофосфата калия, дигидрофосфата калия, гидрофосфата динатрия, гидрофталата калия и тетрабората натрия и имеет значение pH в диапазоне 5,0-5,8; и

восстанавливающий агент включает один или более из цианоборгидрида натрия, триацетоксиборгидрида натрия, боргидрида натрия, дитионита натрия и гидросульфита натрия.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что буферный раствор для конъюгации содержит ацетат натрия;

восстанавливающий агент представляет собой 20 мМ цианоборгидрид натрия;

реакционную смесь для конъюгации инкубируют в течение 12-16 ч;

ПЭГ представляет собой 20 кДа ПЭГ альдегид, и

реакционная смесь для конъюгации содержит от 3 до 5 раз (мас./мас.) большее количество 20 кДа ПЭГ альдегида, чем Г-КСФ.

4. Способ по п.2, дополнительно включающий этап (viii), в котором

очищают монопегированный Г-КСФ, полученный на этапе (vii), с помощью катионообменной хроматографии;

при этом выход продукта на стадии (viii) по данному способу составляет от 60 до 75%;

катионообменная хроматография включает неподвижную фазу и подвижную фазу;

причем неподвижная фаза катионообменной хроматографии на этапе (viii) представляет собой MacroCap-SP, SP Sepharose FF или Fractogel SO₃;

подвижная фаза на этапе (viii) включает один или более из ацетата натрия, уксусной кислоты и NaCl;

причём способ для элюирования на этапе (viii) представляет собой ступенчатый градиент, линейный градиент или их комбинацию.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что неподвижная фаза катионообменной хроматографии на этапе (viii) представляет собой MacroCap-SP;

подвижная фаза катионообменной хроматографии на этапе (viii) содержит от 10 до 50 мМ ацетата натрия; и

способ для элюирования на этапе (viii) представляет собой линейный градиент.

6. Способ по п.1, дополнительно включающий промывку выделенных телец включения, полученных на этапе (i), в одном или более буферах для промывки в течение 60-90 мин при температуре в диапазоне от 20 до 25°C,

при этом буфер для лизиса содержит 100 мМ трис, 250 мМ ЭДТА и 250 мМ NaCl и имеет значение pH в диапазоне от 7,5 до 8,5;

выделение телец включения осуществляют с помощью комбинации ультразвукового диспергатора лабораторного масштаба и гомогенизатора клеток с высоким давлением;

буфер для промывки содержит один или более из трис-ЭДТА-триптонового буфера, трис-ЭДТА-дезоксихолатного буфера, трис-NaCl-мочевинного буфера, трисового буфера и тритон X-100;

буфер для промывки содержит один или более из 30-50 мМ трис, 3-7 мМ ЭДТА, 0,1-0,5М мочевины, 1-2М NaCl и 0,8-1,5% тритон X-100; и

буфер для промывки имеет значение pH в диапазоне от 7,5 до 8,5.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что солубилизационный буфер содержит 6-8М мочевины, 20-50 мМ трис и 2-7 мМ ЭДТА;

при этом значение pH реакции солубилизации находится в диапазоне от 9,5 до 10,5;

реакция солубилизации включает от 20 до 100 мМ цистеина; и

выделенные тельца включения инкубируются в солубилизационном буфере в течение 2-3 ч.

8. Способ по п.1, дополнительно включающий осветление солубилизованного Г-КСФ, полученного на этапе (ii), с помощью центрифугирования с ускорением 8000-15000 g.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что рефолдинг солубилизованного Г-КСФ включает постепенное разбавление солубилизованного Г-КСФ в 10 объемах буфера для рефолдинга;

при этом окисляющий агент в буфере для рефолдинга представляет собой цистин;

буфер для рефолдинга содержит 50 мМ трис, 0,5М мочевины, 5% сорбитола и 0-5 мМ цистина; и

окисление рефолдированного раствора Г-КСФ включает добавление ацетата натрия до конечной концентрации 20 мМ и добавление соляной кислоты.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что реакцию рефолдинга инкубируют в течение 12-18 ч при комнатной температуре;

при этом буфер для рефолдинга содержит 2 мМ цистина; и

значение pH окисленного рефолдированного раствора Г-КСФ находится в диапазоне от 3,5 до 4,5.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что значение pH окисленного рефолдированного раствора Г-КСФ составляет 4,0.

12. Способ по п.1, отличающийся тем, что осветление окисленного раствора Г-КСФ на этапе (v) включает микрофльтрацию фильтром 0,2 мкм;

при этом неподвижная фаза катионообменной хроматографии на этапе (vi) представляет собой

SP-Sepharose FF, CM-Sepharose FF, SP-Sepharose HP, Fractogel SO₃ или Fractogel SE HiCap;

подвижная фаза катионообменной хроматографии на этапе (vi) включает один или более из ацетата натрия, уксусной кислоты, фосфата натрия, ортофосфорной кислоты и хлорида натрия;

неподвижная фаза хроматографии с гидрофобным взаимодействием на этапе (vi) представляет собой Phenyl Sepharose FF, Butyl Sepharose, Nuviac-Prime, HEA HyperCel, PPA HyperCel, Phenyl Sepharose HP, MEP HyperCel или Capto Adhere; и

подвижная фаза хроматографии с гидрофобным взаимодействием на этапе (vi) включает один или оба из ацетата натрия и уксусной кислоты.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что неподвижная фаза катионообменной хроматографии на этапе (vi) представляет собой CM Sepharose FF;

подвижная фаза катионообменной хроматографии на этапе (vi) включает 40 mM ацетата натрия; и

неподвижная фаза катионообменной хроматографии на этапе (vi) представляет собой Phenyl Sepharose FF.

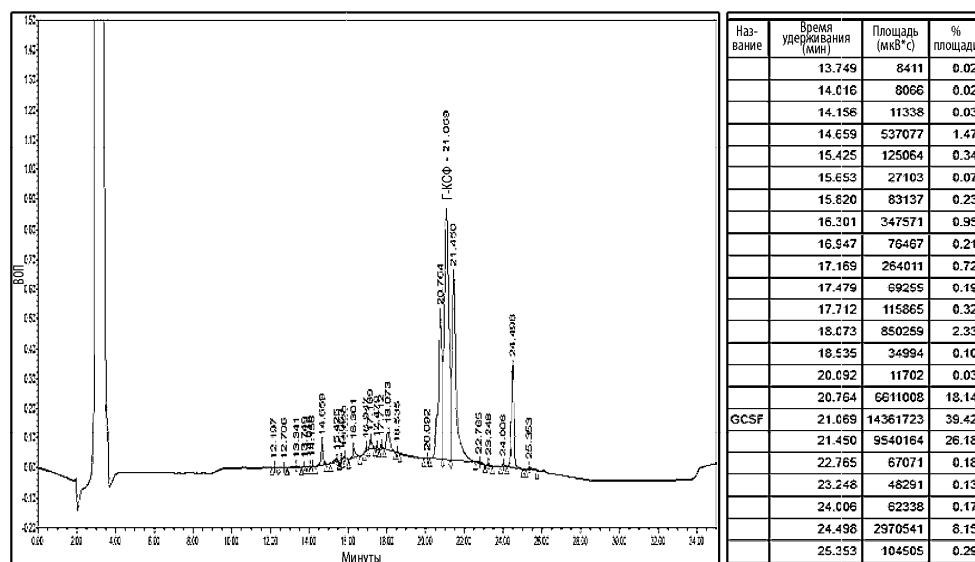
14. Способ по п.4, дополнительно включающий концентрирование очищенного монопегированного Г-КСФ с помощью ультрафильтрации для получения композиции, содержащей 9-12 мг/мл монопегированного Г-КСФ.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что размер ультрафильтрационной мембраны имеет предельное значение 10 кДа.

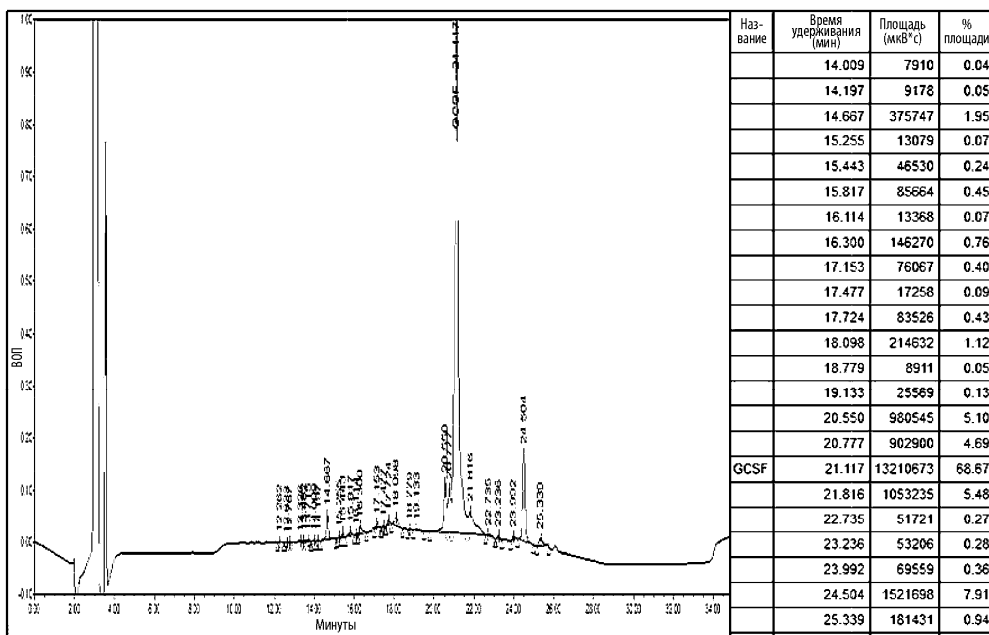
16. Фармацевтическая композиция, включающая

Компонент	Количество
Монопегированный Г-КСФ	0,5-0,9 мг
Ацетат	0,59 мг
Сорбитол	50,0 мг
Полисорбат 80	0,04 мг
Натрий	0,035 мг
Вода для инъекций	до конечного объема 1 мл

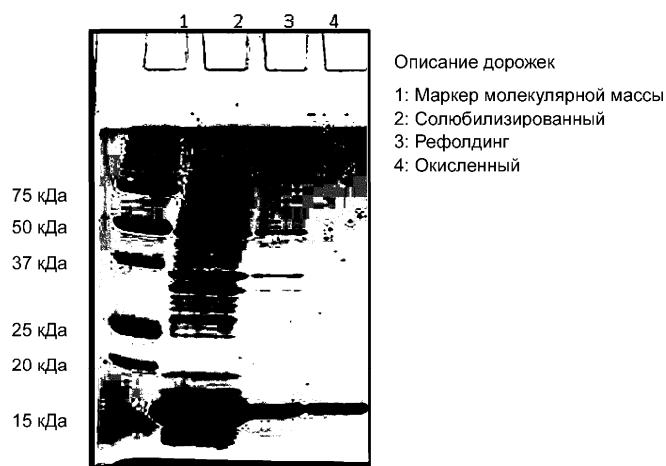
при этом монопегированный Г-КСФ был получен способом по п.1.



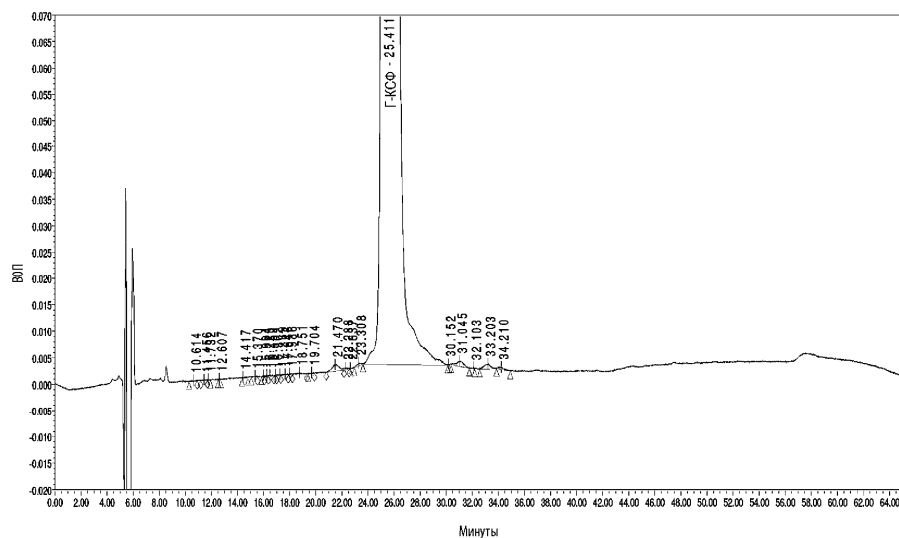
Фиг. 1



ФИГ. 2

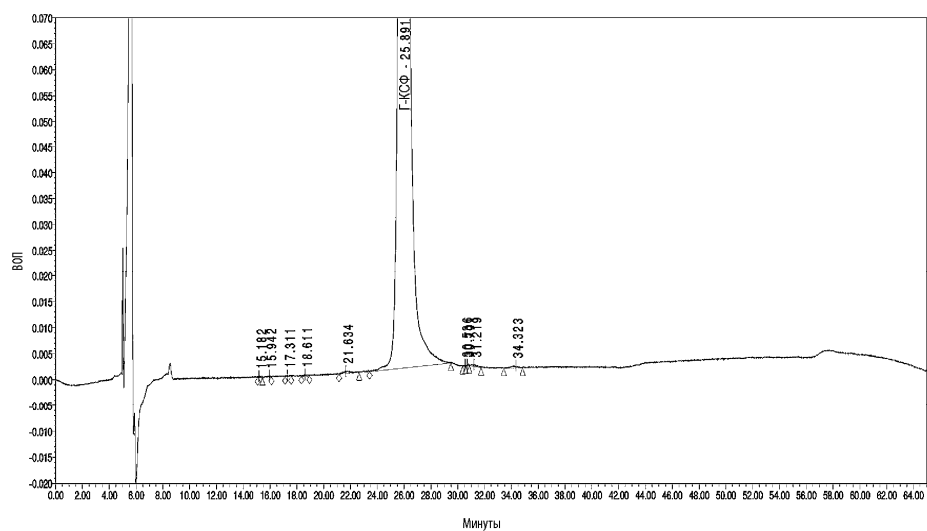


ФИГ. 3



ФИГ. 4

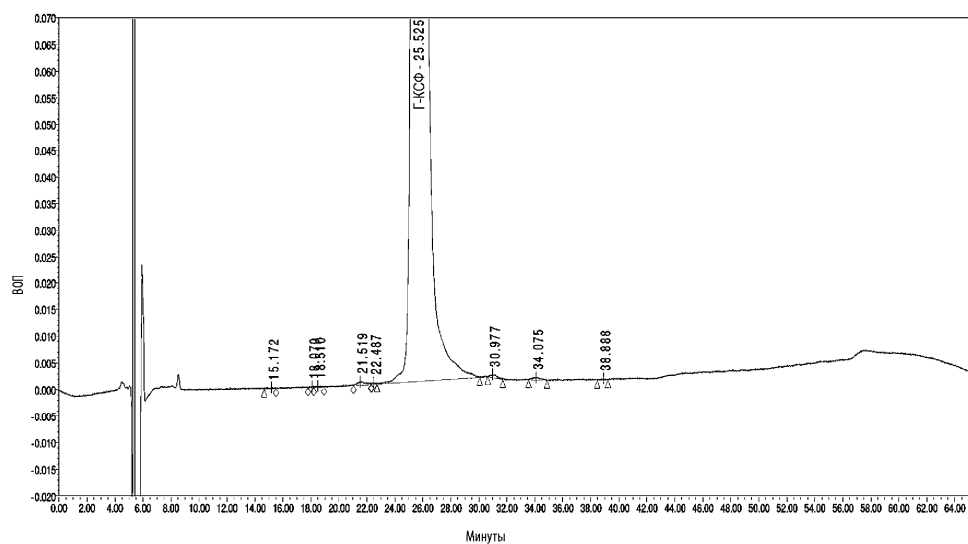
035448



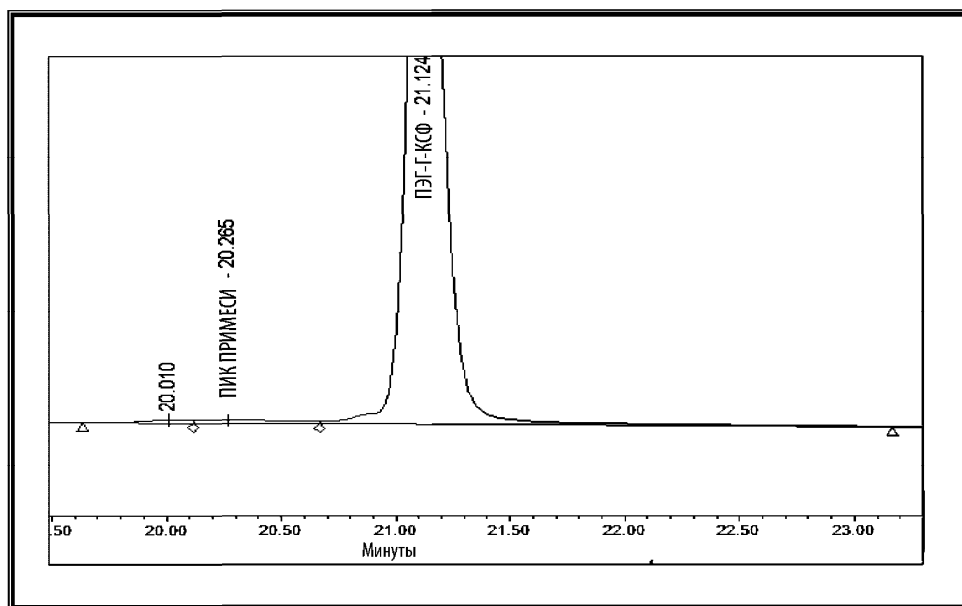
Фиг. 5



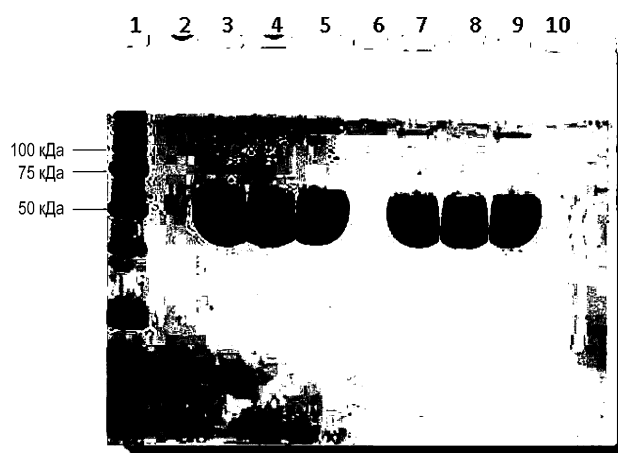
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

