

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037815**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2021.05.25
- (21) Номер заявки
201990052
- (22) Дата подачи заявки
2017.06.19
- (51) Int. Cl. *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 38/36 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
C07K 14/745 (2006.01)

(54) **ПОЛУЧЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ФАКТОРА Ха**

- (31) **62/351,841**
- (32) **2016.06.17**
- (33) **US**
- (43) **2019.05.31**
- (86) **PCT/US2017/038169**
- (87) **WO 2017/219034 2017.12.21**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ПОРТОЛА ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**
- (72) Изобретатель:
**Карбарз Марк, Конли Памела Б., Лу
Гэньминь (US)**
- (74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)
- (56) **US-A1-20150025011**
WO-A1-2014116275
US-A-5589571
JUSTESEN et al. "Recombinant chymosin used for exact and complete removal of a prochymosin derived fusion tag releasing intact native target protein," Protein Science, 16 March 2009 (16.03.2009), Vol. 18, Pgs. 1023-1032, entire document
US-A-5189019

-
- (57) Изобретение предлагает способы крупномасштабного производства производного белка fХа, которые приводят к высокому выходу высокочистого белкового продукта. Способ может включать добавление детергента к образцу, который содержит полинуклеотидную конструкцию, кодирующую белок, и очистку белка с помощью хроматографа для аффинной хроматографии на основе ингибитора трипсина сои (STI), хроматографа с ионным обменом и смешанным режимом и хроматографа с гидрофобным взаимодействием.

B1

037815

037815
B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В данной заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 62351841, поданной 17 июня 2016 г., полное содержание которой включено в данном документе посредством ссылки.

Уровень техники

Разработано модифицированное производное белка фактора Ха (fХа), которое применимо в качестве антитода против антикоагулянтов, нацеленных на fХа. Производное было разработано в качестве универсального нейтрализующего средства для пациентов с состоянием антикоагуляции при введении перорально или посредством инъекции ингибитора фактора Ха, которые нуждаются в нейтрализации состояния антикоагуляции.

Сущность изобретения

В настоящем раскрытии представлены способы крупномасштабного производства полипептида-антитода fХа, которые приводят к высокому выходу высокочистых белковых продуктов. В одном варианте осуществления предложен способ получения полипептидного продукта, экспрессированного из полинуклеотидной конструкции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 7 или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой SEQ ID NO: 7. Способ может включать добавление детергента к образцу, который содержит полинуклеотидную конструкцию, и очистку кодированного белка-антитода с помощью хроматографа для аффинной хроматографии на основе ингибитора трипсина сои (STI), хроматографа с ионным обменом и смешанным режимом и/или хроматографа с гидрофобным взаимодействием.

В одном варианте осуществления предложен способ получения полипептидного продукта, экспрессированного из полинуклеотидной конструкции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 7 или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой SEQ ID NO: 7, включающий добавление детергента к образцу, который содержит полинуклеотидную конструкцию и полипептидный продукт, экспрессированный из полинуклеотидной конструкции; загрузку образца в хроматограф для аффинной хроматографии на основе ингибитора трипсина сои (STI) и элюирование полипептида первым элюирующим буфером для получения первого элюированного образца, причем загруженный образец не содержит органического растворителя; загрузку первого элюированного образца в хроматограф с ионным обменом и смешанным режимом и элюирование полипептида вторым элюирующим буфером, содержащим по меньшей мере 1М неорганической соли, для получения второго элюированного образца; и загрузку второго элюированного образца в хроматограф с гидрофобным взаимодействием и элюирование полипептида третьим элюирующим буфером, содержащим по меньшей мере 2 мМ хлорида натрия, с получением очищенного образца, содержащего полипептидный продукт.

В некоторых вариантах осуществления детергент содержит Тритон X-100 (полиэтиленгликоль-п-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фениловый эфир). В некоторых вариантах осуществления первый элюирующий буфер содержит от 0,5 до 2М аргинина. В некоторых вариантах осуществления первый элюирующий буфер обладает pH от около 5 до 5,4. В некоторых вариантах осуществления хроматограф с ионным обменом и смешанным режимом включает в себя хроматограф с керамическим гидроксипатитом типа I.

В некоторых вариантах осуществления второй элюирующий буфер содержит по меньшей мере 2М неорганической соли. В некоторых вариантах осуществления неорганическая соль представляет собой хлорид натрия. В некоторых вариантах осуществления хроматограф с гидрофобным взаимодействием включает в себя хроматограф с октилсефарозой.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап очистки с помощью анионообменного хроматографа. В некоторых вариантах осуществления анионообменный хроматограф содержит ионообменную мембрану Sartobind™.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает фильтрование одного или более образцов через фильтр из наноплиса. В некоторых вариантах осуществления фильтрование с помощью фильтра из наноплиса проводится до загрузки образца в хроматограф для аффинной хроматографии на основе STI.

В некоторых вариантах осуществления очищенный образец содержит менее чем около 1% загрязняющих белков, не экспрессированных с помощью полинуклеотидной конструкции. В некоторых вариантах осуществления полипептидный продукт экспрессируется в клетке, которая содержит полинуклеотидную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления клетку выращивают в среде в условиях, пригодных для получения по меньшей мере 100 мг полипептидного продукта на 1 л среды. В некоторых вариантах осуществления клетку выращивают в среде в условиях, пригодных для получения по меньшей мере 200 мг полипептидного продукта на 1 л среды. В некоторых вариантах осуществления очищенный образец содержит более чем около 50% полипептидного продукта, полученного в среде. В некоторых вариантах осуществления очищенный образец содержит более чем около 100 мг полипептидного продукта из каждого литра полученной среды.

В некоторых вариантах осуществления полипептидный продукт представляет собой двухцепочечный полипептид, содержащий легкую цепь и тяжелую цепь. В некоторых вариантах осуществления от около 20 до 50% полипептидного продукта в очищенном образце содержит тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления около 5-95% тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, содержит два О-связанных гликозилирования и около 5-95% тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, содержит одно О-связанное гликозилирование. В некоторых вариантах осуществления около 40-80% полипептидного продукта в очищенном образце содержит тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 90% тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, содержит одно О-связанное гликозилирование. В некоторых вариантах осуществления около 2-12% полипептидного продукта в очищенном образце содержит тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления около 0,1-1,5% полипептидного продукта в очищенном образце содержит тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления около 2-8% полипептидного продукта в очищенном образце содержит тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления около 35-60% полипептидного продукта в очищенном образце содержит легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления также предложен полипептид, полученный с помощью способа по любому из вариантов осуществления.

В одном варианте осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и полипептидную часть двухцепочечных полипептидов, в которой около 35-60% двухцепочечных полипептидов содержат легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4; около 20-60% двухцепочечных полипептидов содержат тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5; около 40-60% двухцепочечных полипептидов содержат тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и менее чем 10% двухцепочечных полипептидов содержат тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления менее чем 5% двухцепочечных полипептидов содержат тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления менее чем 3% двухцепочечных полипептидов содержат тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления около 0,1-1,5% двухцепочечных полипептидов содержат тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления около 2-8% двухцепочечных полипептидов содержат тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления около 30-70% тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, содержит два О-связанных гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления около 30%-70% тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, содержит одно О-связанное гликозилирование. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 90% тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, содержит одно О-связанное гликозилирование.

В некоторых вариантах осуществления препарат является лиофилизированным. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит L-аргинина HCl или L-аргинина ацетат. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит сахарозу. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит маннит.

В одном варианте осуществления также предложен способ нейтрализации или ингибирования состояния антикоагуляции у пациента, подвергающегося антикоагуляционному лечению ингибитором фактора Ха, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения.

Подробное описание изобретения

Определения.

Следующее описание предлагает примерные варианты осуществления настоящей технологии. Однако следует признать, что такое описание не предназначено для ограничения объема настоящего раскрытия, а вместо этого предлагает описание примерных вариантов осуществления.

Все числовые обозначения, например pH, температура, время, концентрация и молекулярная масса, включая диапазоны, являются приблизительными значениями, которые варьируются (+) или (-) с шагом 0,1 или 10%. Следует понимать, хотя это не всегда указывается в явном виде, что всем числовым обозначениям предшествует термин "около". Также следует понимать, хотя это не всегда указывается в явном виде, что реагенты, описанные в данном документе, являются примерными и что их эквиваленты известны в данной области техники.

При использовании в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единствен-

ного числа включают ссылки на множество, если в контексте явным образом не указано иное. Например, термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает в себя множество фармацевтически приемлемых носителей, включая их смеси.

Используемый в данном документе термин "содержащий" предназначен для обозначения того, что композиции и способы включают перечисленные элементы, но не исключают другие. Термин "по существу состоящий из", когда он используется для определения композиций и способов, должен означать исключение других элементов, имеющих какое-либо существенное значение для комбинации для предполагаемого использования. Таким образом, композиция, по существу, состоящая из элементов, как определено в данном документе, не исключает следовые загрязнения, возникающие из способа выделения и очистки, и фармацевтически приемлемые носители, такие как забуференный фосфатом физиологический раствор, консерванты и т.п. Термин "состоящий из" означает исключение более чем следовых элементов других ингредиентов и существенные этапы способа для введения композиций по настоящему раскрытию. Варианты осуществления, определенные каждым из данных переходных терминов, входят в объем настоящего раскрытия.

Термины "белок" и "полипептид" используются взаимозаменяемо и в их самом широком смысле для обозначения соединения из двух или более субъединичных аминокислот, аналогов аминокислот или пептидомиметиков. Субъединицы могут быть связаны пептидными связями. В другом варианте осуществления субъединица может быть связана с помощью других связей, например сложноэфирной связью, связью, включающей простой эфир и т.д. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты и не ограничивается максимальным количеством аминокислот, которые может включать последовательность белка или пептида. Используемый в данном документе термин "аминокислота" относится к природным и/или не природным или синтетическим аминокислотам, включая глицин и оптические изомеры как D, так и L, аналоги аминокислот и пептидомиметики. Однобуквенные и трехбуквенные сокращения встречающихся в природе аминокислот перечислены ниже.

"Фактор Ха" или "fХа" или "белок fХа" представляет собой сериновую протеазу в каскаде коагуляции крови, которая вырабатывается из неактивного фактора X (fX, SEQ ID NO. 1, табл. 1). Нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий фактор X (fX), может быть найдена в GenBank под номером доступа NM_000504. После каталитического отщепления первых 52 остатков тяжелой цепи, fX активируется в fХа. fХа содержит легкую цепь и тяжелую цепь. Первые 45 аминокислотных остатков (остатки 1-45 SEQ ID NO: 1) легкой цепи называются Gla-доменом, поскольку он содержит 11 посттрансляционно-модифицированных остатков у карбоксиглутаминовой кислоты (Gla). Он также содержит короткую (6 аминокислотных остатков) последовательность ароматических стэков (остатки 40-45 SEQ ID NO: 1). При расщеплении химотрипсином селективно удаляются остатки 1-44, что приводит к fХа с отсутствующим Gla-доменом. Каталитический домен сериновой протеазы fХа находится в C-концевой тяжелой цепи. Тяжелая цепь fХа высоко гомологична таковой у других сериновых протеаз, таких как тромбин, трипсин и активированный белок C.

Термин "нативный fХа" или "fХа дикого типа" относится к fХа, естественно присутствующему в плазме или выделенному в его исходной немодифицированной форме, биологическая активность которой приводит к активации протромбина, следовательно, способствует образованию сгустка крови. Термин включает в себя встречающиеся в природе полипептиды, выделенные из образцов тканей, а также рекомбинантно получаемый fХа. Термин "активный fХа" относится к fХа, обладающему прокоагулянтной активностью активации протромбина. Термин "активный fХа" может относиться к нативному fХа или модифицированному fХа, который сохраняет прокоагулянтную активность.

Используемый в данном документе термин "антидот fХа", "антидот" или "производное fХа" относится к модифицированному белку fХа, который не конкурирует с fХа при сборке в комплекс протромбиназы и обладает пониженной или отсутствующей прокоагулянтной или каталитической активностями и все же связывает и/или существенно нейтрализует антикоагулянты, такие как ингибиторы fХа. Термин "прокоагулянтная активность" белка fХа или производного fХа в некоторых аспектах относится к ферментативной активности, которой обладает активный полипептид fХа дикого типа. Примеры производных fХа представлены в патенте США № 8153590 и публикациях PCT WO 2009/042962 и WO 2010/056765 и дополнительно представлены в данном документе, например SEQ ID NO: 2 и 3 и их биологические эквиваленты.

Термин "ферментативная активность" полипептида fХа или его производных относится к способности полипептида катализировать биохимическую реакцию с субстратом посредством прямого взаимодействия с субстратом.

SEQ ID NO: 2 содержит 3 мутации по сравнению с fХа дикого типа. Первая мутация представляет собой делецию 6-39 аминокислот в Gla-доме фX. Вторая мутация представляет собой замену 143-194 аминокислот в последовательности активации пептида с RKR. В результате образуется линкер RKRRKR (SEQ ID NO: 6), соединяющий легкую цепь (SEQ ID NO: 4) и тяжелую цепь (SEQ ID NO: 5). При секреции данный линкер расщепляется, что приводит к образованию двухцепочечного полипептида SEQ ID NO: 3 (г-антидот). Третья мутация представляет собой мутацию остатка активного сайта S379 в остаток Ala. Данная аминокислотная замена соответствует аминокислотам 296 и 290 SEQ ID NO: 1 и 3 соответ-

венно.

Примером антидота является "г-антидот", который относится к продукту процессинга процессированного двухцепочечного полипептида SEQ ID NO: 2, после отщепления линкера, что описывается SEQ ID NO: 3. г-Антидот раскрыт, например, в патенте США 8153590, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки. г-Антидот включает в себя легкую цепь (SEQ ID NO: 4) и тяжелую цепь (SEQ ID NO: 5), связанные одной дисульфидной связью между цистеином 98 (Cys98) легкой цепи и цистеином 108 (Cys108) тяжелой цепи. Подобно fXa дикого типа в определенных промышленных партиях г-антидот претерпевает посттрансляционные модификации, приводящие к гликозилированию по определенным аминокислотным остаткам, например Ser56, Ser72, Ser76 и Thr82 легкой цепи и Thr249 тяжелой цепи, и модификации остатка легкой цепи Asp29 в (3R)-3-гидрокси Asp. Кроме того, помимо дисульфидной связи между цепями могут образовываться дисульфидные связи внутри цепи между цистеинами 16 и 27, 21 и 36, 38 и 47, 55 и 66, 62 и 75, а также 77 и 90 легкой цепи и между цистеинами 7 и 12, 27 и 43, 156 и 170 и 181 и 209 тяжелой цепи.

Таблица 1

Полипептидная последовательность неактивного фактора X человека (SEQ ID NO: 1)

1	ANSFLEEMKK	GHLERECMEE	TCSYEEAREV	FEDSDKTNEF	WNKYKDGQDC	ETSPCQNQGK
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVC	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLERR	KRSVAQATSS	SGEAPDSITW	KPYDAADLDP	TENPFDLLDF
181	NQTQPERGDN	NLTRIVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFKETYD	FDIAVLRKLT	PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVYVDRNSC	KLSSSFIIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPAKSHAPE	VITSSPLK			

Таблица 2

Полипептидная последовательность предшественника г-антидота перед удалением RKRKR (SEQ ID NO: 6) линкера (SEQ ID NO: 2)

Легкая цепь (SEQ ID NO: 4)						
1	ANSFL	F	WNKYKDGQDC	ETSPCQNQGK		
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVC	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER				
Линкер (SEQ ID NO: 6)						
RKRKR						
Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 5)						
181	IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ	
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFKETYD	FDIAVLRKLT	PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVYVDRNSC	KLSSSFIIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPAKSHAPE	VITSSPLK			

Таблица 3

Полипептидная последовательность тройного мутанта фактора X человека после удаления RKRKR (SEQ ID NO: 6) линкера (SEQ ID NO: 3)

Легкая цепь (SEQ ID NO: 4)						
1	ANSFL	F	WNKYKDGQDC	ETSPCQNQGK		
61	CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLC	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVC	CARGYTLADN
121	GKACIPTGPY	PCGKQTLER				
Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 5)						
181	IVGGQE	CKDGECPWQA	LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ	
241	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE	AVHEVEVVIK	HNRFKETYD	FDIAVLRKLT	PITFRMNVAP
301	ACLPERDWAE	STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTRKML	EVYVDRNSC	KLSSSFIIITQ
361	NMFCAGYDTK	QEDACQGDAG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG	IYTKVTAFLK
421	WIDRSMKTRG	LPAKSHAPE	VITSSPLK			

Нуклеотидная последовательность, кодирующая предшественник г-антидота (SEQ ID NO: 7)

ATGGGGCGCC	CACCTGCACCT	CGTCCTGCTC	AGTGCCTCCC	TGGCTGGCCT	CCTGCTGCTC	GGGGAAAGTC
TGTTTCATCCG	CAGGGAGCAG	GCCAACAACA	TCCTGGCGAG	GGTCACGAGG	GCCAATTCCT	TTCTTTTCTG
GAATAAATAC	AAAGATGGCG	ACCAGTGTGA	GACCAGTCCT	TGCCAGAACC	AGGGCAAATG	TAAAGACGGC
CTCGGGGAAT	ACACCTGCAC	CTGTTTAGAA	GGATTCGAAG	GCAAAAACCTG	TGAATTATTC	ACACGGAAGC
TCTGCAGCCT	GGACAACGGG	GACTGTGACC	AGTTCTGCCA	CGAGGAACAG	AACTCTGTGG	TGTGCTCCTG
CGCCCCGCGG	TACACCTTGG	CTGACAACGG	CAAGGCCTGC	ATTCACACAG	GGCCCTACCC	CTGTGGGAAA
CAGACCCTGG	AACGCAGGAA	GAGGAGGAAG	AGGATCGTGG	GAGGCCAGGA	ATGCAAGGAC	GGGGAGTGTG
CCTGGCAGGC	CCTGCTCATC	AATGAGGAAA	ACGAGGGTTT	CTGTGGTGGG	ACCATTCTGA	GCGAGTTCTA
CATCCTAACG	GCAGCCCACT	GTCTCTACCA	AGCCAAGAGA	TTCAAGGTGA	GGGTAGGGGA	CCGGAACACG
GAGCAGGAGG	AGGGCGGTGA	GGCGGTGCAC	GAGGTGGAGG	TGGTCATCAA	GCACAACCGG	TTCACAAAGG
AGACSTATGA	STTCGACATC	GCCGTGCTCC	GGTCAAGAC	CCCCATCAC	TTCCGCATGA	ACGTGGCGCC
TGCCTGCCTC	CCCGAGCGTG	ACTGGGCCGA	GTCCACGCTG	ATGACGCAGA	AGACGGGGAT	TGTGAGCGGC
TTCCGGCGCA	CCCACAGAAA	GGGCCGGCAG	TCCACCAGGC	TCAAGATGCT	GGAGGTGCC	TACGTGGACC
GCAACAGCTG	CAAGCTGTCC	AGCAGCTTCA	TCATCACCCA	GAACATGTTT	TGTGCCGGCT	ACGACACCAA
GCAGGAGGAT	GCCTGCCAGG	GGGACGCAGG	GGCCCGCAC	GTCACCCGCT	TCAAGGACAC	CTACTTCGTG
ACAGGCATCG	TCAGCTGGGG	AGAGGGCTGT	GCCCGTAAGG	GGAAGTACGG	GATCTACACC	AAGGTCACCG
CCTTCCTCAA	GTGGATCGAC	AGGTCCATGA	AAACCAGGGG	CTTGCCCAAG	GCCAAGAGCC	ATGCCCGGGA
GGTCATAACG	TCCTCTCCAT	TAAAGTGA				

Другими примерами антидотов могут быть биологические эквиваленты г-антидота (или их предшественники, представленные SEQ ID NO: 2) или альтернативно полипептиды, обладающие определенной идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3. В одном аспекте такие биологические эквиваленты сохраняют структурные характеристики SEQ ID NO: 3, т.е. модифицированный активный сайт и удаленный или модифицированный домен Gla. В другом аспекте такие биологические эквиваленты сохраняют функциональные особенности SEQ ID NO: 3, т.е. не конкурируют с fXa при сборке в комплекс протромбиназы и обладают пониженной или отсутствующей прокоагулянтной (например, ферментативной или каталитической) активностями.

Термин "активный сайт" относится к части фермента или антитела, где происходит химическая реакция. Термин "модифицированный активный сайт" относится к активному сайту, который был структурно модифицирован для обеспечения активного сайта с повышенной или пониженной химической активностью или специфичностью. Примеры активных сайтов включают, но не ограничиваются ими, каталитический домен фактора X человека, содержащий 235 488 аминокислотных остатков, и каталитический домен фактора Ха человека, содержащий 195 448 аминокислотных остатков. Примеры модифицированного активного сайта включают в себя, но не ограничиваются ним, каталитический домен фактора Ха человека, содержащий 195 448 аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 1 по меньшей мере с одной аминокислотной заменой в положении Arg306, Glu310, Arg347, Lys351, Lys414 или Arg424.

Получение антидотов.

Экспериментальные примеры (примеры 1 и 2) демонстрируют разработку способов культивирования и очистки для получения антидотов fXa. Культивируемые клетки содержат полинуклеотидную конструкцию, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 7 или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (или по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности) к аминокислотной последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 7. Клетка обычно представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO).

Один из способов очистки изображен на фиг. 1. После сбора клеток (этап 101) и осветления с использованием глубинного фильтра для удаления примесей с высокой молекулярной массой (HWM) образец концентрируют (например, около 10-кратно) (этап 102). На этапе концентрирования может без ограничения использоваться регенерированная целлюлоза. На этапе 103 может быть проведена вирусная инактивация (например, с помощью детергента/растворителя, такого как 1% Тритон X-100, 0,3% трибутилфосфат (конечная концентрация)) для инактивации оболочечных вирусов в культуре клеток. После удаления вирусов выполняются этапы 104 (катионный обмен в смешанном режиме), 105 (анионный обмен в смешанном режиме) и 106 (ионный обмен в смешанном режиме) для удаления белков и ДНК клетки-хозяина и захвата антидота. На этапе 107 для дополнительного удаления оставшихся белков клетки-хозяина может использоваться смола с гидрофобным взаимодействием. Необязательно, после указанных этапов очистки можно использовать конечную стадию фильтрования для удаления вирусов с целью удаления любых оставшихся вирусов.

В другом варианте осуществления способ очистки является таким, как проиллюстрировано на фиг.

2 и продемонстрировано в примере 2. В некоторых вариантах осуществления способ включает добавление детергента к образцу, который содержит полинуклеотидную конструкцию (например, SEQ ID NO: 7) и полипептидный продукт, экспрессированный из полинуклеотидной конструкции (например, SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления детергент включает в себя Тритон X-100. В некоторых вариантах осуществления растворитель не используется для обработки образца до того, как образец подвергается последующей аффинной очистке. В некоторых вариантах осуществления органический растворитель не используется для обработки образца до того, как образец подвергается последующей аффинной очистке. В некоторых вариантах осуществления трибутилфосфат не добавляют к образцу до того, как образец подвергается последующей аффинной очистке.

В некоторых вариантах осуществления образец затем загружают в хроматограф для аффинной хроматографии на основе ингибитора трипсина сои (STI) и элюируют элюирующим буфером, чтобы получить элюированный образец. В некоторых вариантах осуществления загруженный образец не обрабатывали органическим растворителем или он не содержит органического растворителя.

"STI" или "ингибитор трипсина сои" относится к ингибиторам трипсина, выделенным из сои, или их биологическим эквивалентам. Ингибиторы трипсина имеют размер около 20 кДа и снижают активность трипсина (протеолитического фермента), а также калликреина в плазме, фактора Ха и активность пламина. STI коммерчески доступны от таких поставщиков, как Life Technologies (г. Гранд Айленд, штат Нью-Йорк, США). Примером STI является ингибитор трипсина KTI3 Куница из *Glycine max* (соя), с регистрационным номером GenBank NP_001238611.

STI может быть иммобилизован на твердой смоле-носителе для очистки определенных белков. В дополнение к ингибитору трипсина сои можно также использовать другие белки-ингибиторы трипсина, такие как белки, выделенные из сыворотки, бобов лимы, поджелудочной железы крупного рогатого скота, или овомукоид, или их модифицированные формы. Также предполагается, что определенные ингибиторы протеаз, в частности ингибиторы сериновых протеаз, могут быть использованы для получения аффинной смолы для очистки антидота. Затем антидот можно элюировать буфером, который содержит аргинин. В некоторых вариантах осуществления элюирующий буфер содержит по меньшей мере 0,2, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5 или 2М аргинина. В некоторых вариантах осуществления элюирующий буфер содержит от около 0,5 до 2М аргинина, или от около 0,7 до 1,5 М аргинина, или от 0,8 до 1,2М аргинина. В некоторых вариантах осуществления элюирующий буфер обладает pH от около 4,5 до 6, или от 4,6 до 5,6, или от 4,7 до 5,5, или от 4,8 до 5,4, или от 5 до 5,4, или от 5,1 до 5,3, или около 5,2. В одном варианте осуществления элюирующий буфер содержит 25 мМ ацетата натрия и 1,0М аргинина при pH 5,2.

В некоторых вариантах осуществления образец затем загружают в хроматограф с ионным обменом и смешанным режимом. Неограничивающие примеры хроматографа с ионным обменом и смешанным режимом включают хроматограф с керамическим гидроксипатитом типа I. Затем образец может быть элюирован элюирующим буфером, который содержит неорганическую соль. В некоторых вариантах осуществления неорганическая соль представляет собой хлорид натрия или хлорид калия. В некоторых вариантах осуществления концентрация соли в элюирующем буфере составляет по меньшей мере 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 или 3М.

В некоторых вариантах осуществления элюирование включает использование градиента, создаваемого между уравнивающим буфером и элюирующим буфером. В некоторых вариантах осуществления уравнивающий буфер содержит более низкую концентрацию соли, например менее чем 0,2М, менее чем 0,1М, менее чем 50 мМ, менее чем 20 мМ, менее чем 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления градиент содержит по меньшей мере 5-кратное, или 10-кратное, или 20-кратное, или 50-кратное, или 100-кратное увеличение концентрации соли. В некоторых вариантах осуществления уравнивающий буфер содержит 50 мМ MES (2-(N-морфолино)этансульфокислоты), 5 мМ фосфата натрия при pH 7,0. В некоторых вариантах осуществления элюирующий буфер содержит 50 мМ MES, 5 мМ фосфата натрия, 2М хлорида натрия при pH 7,0. В некоторых вариантах осуществления градиент начинается примерно с 90% уравнивающего буфера и заканчивается примерно 90% элюирующим буфером.

В некоторых вариантах осуществления образец дополнительно загружают в хроматограф с гидрофобным взаимодействием. В некоторых вариантах осуществления хроматограф с гидрофобным взаимодействием включает в себя хроматограф с октилсефарозой. В некоторых вариантах осуществления образец элюируют элюирующим буфером, который содержит по меньшей мере 2 мМ хлорида натрия или, альтернативно, по меньшей мере 1М, 1,5М, 2,5М, 3М, 4М или 5М хлорида натрия.

В некоторых вариантах осуществления один из промежуточных образцов, описанных выше, дополнительно подвергают этапу очистки с помощью анионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления анионообменный хроматограф содержит ионообменную мембрану Sartobind™. В некоторых вариантах осуществления анионообменный хроматограф используют после аффинного хроматографа.

В некоторых вариантах осуществления один из промежуточных образцов, описанных выше, дополнительно подвергают фильтрованию с помощью фильтра с нанофлисом. В некоторых вариантах осуществления фильтрование с помощью нанофлиса применяется перед загрузкой образца в хроматограф для

аффинной хроматографии на основе STI.

В некоторых вариантах осуществления очищенный образец содержит менее чем около 1% загрязняющих белков, не экспрессированных с помощью полинуклеотидной конструкции, таких как белки клетки-хозяина или STI, которые высвобождаются из аффинной смолы/колонки.

Способ очистки по любому из вышеуказанных вариантов осуществления может быть способен извлекать по меньшей мере около 50% (или по меньшей мере около 40, 45, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или 85%) белка-антидота, экспрессированного в клеточной культуре. В некоторых вариантах осуществления клетку выращивают в среде в условиях, пригодных для получения по меньшей мере 100 мг полипептидного продукта на 1 л среды. В некоторых вариантах осуществления клетку выращивают в среде в условиях, пригодных для получения по меньшей мере 120 мг (или по меньшей мере 210, 220, 230, 240, 250, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340 или 350 мг) полипептидного продукта на 1 л среды. В некоторых вариантах осуществления очищенный образец содержит более чем около 50 мг (или по меньшей мере 55, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 мг) полипептидного продукта на каждый литр полученной среды.

Изомеры антидота в очищенном продукте.

Предполагается, что очищенный антидотный продукт, полученный с помощью способа по любому из вариантов осуществления настоящего описания, содержит легкую цепь и тяжелую цепь. Однако способы выращивания и очистки могут вносить изменения в фактический белок.

Как показано в примере 3, от около 20 до 50% полипептидного продукта в очищенном образце содержит интактную тяжелую цепь (SEQ ID NO: 5). Среди полипептидного продукта, который содержит интактную тяжелую цепь, около 5-95% тяжелой цепи содержит два O-связанных гликозилирования и около 5-95% тяжелой цепи содержит одно O-связанное гликозилирование.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 20, 25, 30, 35, 40 или 45% полипептидного продукта в очищенном образце содержит интактную тяжелую цепь. В некоторых вариантах осуществления не более чем около 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80% полипептидного продукта в очищенном образце содержит интактную тяжелую цепь.

В некоторых вариантах осуществления около 40-80% полипептидного продукта в очищенном образце содержит тяжелую цепь, которая несет делецию С-концевого лизина (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления SEQ ID NO: 8 составляет по меньшей мере около 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% в очищенном образце. В некоторых вариантах осуществления SEQ ID NO: 8 составляет не более чем около 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90% в очищенном образце. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 90% тяжелой цепи SEQ ID NO: 8 содержит одно O-связанное гликозилирование.

В некоторых вариантах осуществления около 2%-12% полипептидного продукта в очищенном образце содержит тяжелую цепь, которая несет делецию 13 С-концевых аминокислотных остатков (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления SEQ ID NO: 9 составляет, по меньшей мере около 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3% или 5% в очищенном образце. В некоторых вариантах осуществления SEQ ID NO: 9 составляет не более чем около 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 17 или 20% в очищенном образце.

В некоторых вариантах осуществления около 0,1-1,5% полипептидного продукта в очищенном образце содержит тяжелую цепь, которая несет делецию 14 С-концевых аминокислотных остатков (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления SEQ ID NO: 10 составляет по меньшей мере около 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3 или 0,5% в очищенном образце. В некоторых вариантах осуществления SEQ ID NO: 10 составляет не более чем около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,5, 2, 2,5 или 3% в очищенном образце.

В некоторых вариантах осуществления около 2-8% полипептидного продукта в очищенном образце содержит тяжелую цепь, которая несет делецию 15 С-концевых аминокислотных остатков (SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах осуществления SEQ ID NO: 11 составляет по меньшей мере около 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 или 5% в очищенном образце. В некоторых вариантах осуществления SEQ ID NO: 11 составляет не более чем около 5, 6, 7, 8, 9 или 10% в очищенном образце.

Пример 3 также показывает, что около 35-60% полипептидного продукта в очищенном образце содержит интактную легкую цепь (SEQ ID NO: 4), тогда как остальные цепи могут быть модифицированы или усечены. В некоторых вариантах осуществления количество интактной легкой цепи в общем количестве легкой цепи составляет по меньшей мере около 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50%. В некоторых вариантах осуществления количество интактной легкой цепи в общем количестве легкой цепи составляет не более чем около 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80 или 90%.

В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие относится к фармацевтическому препарату, содержащему фармацевтически приемлемый носитель и полипептидную часть двухцепочечных полипептидов, в которой около 35-60% двухцепочечных полипептидов содержат легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления около 20-50% двухцепочечных полипептидов содержат тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления около 40-80% двухцепочечных полипептидов содержат тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления менее чем около 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3% двухцепочечных по-

липептидов содержат тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления около 0,1-1,5% двухцепочечных полипептидов содержат тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления около 2-8% двухцепочечных полипептидов содержат тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления около 5-95% тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, содержит два O-связанных гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления около 5-95% тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, содержит одно O-связанное гликозилирование. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 90% тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, содержит одно O-связанное гликозилирование.

Составы, способы и дозировки.

Также предложены составы, полученные из очищенных антидотных белковых продуктов. В некоторых вариантах осуществления предлагается водный состав, который подходит для лиофилизации. В одном варианте осуществления состав содержит антидот, а также солюбилизующий агент, стабилизирующий агент (или стабилизатор) и кристаллический агент. Состав может дополнительно содержать поверхностно-активное вещество и/или буфер. В некоторых аспектах присутствие каждого из указанных агентов предотвращает разрушение антидота во время лиофилизации, например, когда температура лиофилизации выше -40, -30, -20, -10, 0, 5°, 10 или 15°C и до 20 или 25°C.

Термин "кристаллический компонент" относится к молекуле, которая образует кристаллическую матрицу в составе, которая включает полипептид, во время сублимационной сушки. Неограничивающие примеры кристаллических компонентов включают маннит и глицин.

В некоторых аспектах кристаллический компонент представляет собой маннит (например, кристаллический маннит). В одном аспекте концентрация кристаллического компонента в водном составе составляет по меньшей мере 1% (мас./об.). В одном аспекте концентрация кристаллического компонента в водном составе составляет по меньшей мере 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 или 4% (мас./об.). В одном аспекте концентрация кристаллического компонента в водном составе составляет не более чем 8% или, альтернативно, не более чем 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5 или 4% (мас./об.). В одном аспекте концентрация кристаллического компонента в водном составе составляет от около 1 до около 8%, или от около 2 до около 6%, или от около 3 до около 5,5%, или от около 4,5 до около 5,5%, или от около 4,6 до около 5,4%, или от около 4,7 до около 5,3%, или от около 4,8 до около 5,2%, или от около 4,9 до около 5,1%, или около 4, 4,5 или 5% (мас./об.).

В некоторых аспектах солюбилизующий агент включен в водный состав. Термин "солюбилизующий агент" относится к солям, ионам, углеводам, комплексообразующему агенту, полимерам и другим соединениям, которые, когда присутствуют в растворе, увеличивают растворимость другого вещества (например, активного ингредиента) в растворе. Неограничивающие примеры солюбилизующих агентов включают в себя аргинин и цитрат. В одном аспекте солюбилизующий агент представляет собой аргинин. В одном аспекте солюбилизующий агент представляет собой цитрат.

Присутствие солюбилизующего агента может быть полезным для поддержания растворимости и стабильности полипептида fXa в составе. В некоторых аспектах концентрация солюбилизующего агента (например, аргинина) составляет по меньшей мере 10 мМ или, альтернативно, по меньшей мере 20, 25, 30, 36 или 40 мМ. В некоторых аспектах концентрация солюбилизующего агента (например, аргинина) не превышает 100, 96, 90, 80, 70, 60 или 50 мМ. В некоторых аспектах концентрация солюбилизующего агента составляет от около 10 или 20 мМ до около 60 мМ, от около 10 или 20 мМ до около 55 мМ, от около 35 до около 55 мМ, от около 40 до около 50 мМ, от около 41 до около 49 мМ, от около 42 до около 48 мМ, от около 43 до около 47 мМ, от около 44 до около 46 мМ, или около 40, 45 или 50 мМ. Следует отметить, что используемый в данном документе термин "аргинин" относится к аминокислоте, а также к ее солям (например, аргинина HCl). Аргинин обладает молекулярной массой около 174,2 Да, а аргинина HCl (например, L-аргинина HCl, L-аргинина ацетат) обладает молекулярной массой около 210,7 Да.

В одном варианте осуществления солюбилизующий агент представляет собой цитрат или его соль. Соль цитрата представляет собой цитрат натрия. В одном аспекте концентрация цитрата составляет от около 1,0 до около 200,0 мМ. В дополнительном аспекте концентрация цитрата составляет около 25 мМ. В другом аспекте концентрация цитрата составляет около 50 мМ. В дополнительном варианте осуществления концентрация цитрата составляет около 5, 10 или 20 мМ. В другом варианте осуществления концентрация цитрата составляет от около 0,05 до около 0,2М.

В некоторых аспектах в водный состав включен стабилизатор. Термин "стабилизатор" обозначает фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, которое защищает активный ингредиент (например, полипептиды-производные fXa) и/или состав от химической и/или физической деградации во время производства, хранения и применения. Примеры стабилизаторов могут включать сахарозу, аргинин, цитрат, маннит, трегалозу, глицин, хлорид натрия, декстран и глюкозу. В одном аспекте стабилизатором является сахароза.

В одном аспекте концентрация стабилизатора в водном составе (например, сахарозы) составляет по

меньшей мере около 0,5% (мас./об.). В одном аспекте концентрация стабилизатора в водном составе (например, сахарозы) составляет по меньшей мере около 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2% (мас./об.). В одном аспекте концентрация стабилизатора в водном составе (например, сахарозы) не превышает около 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5 или 2% (мас./об.). В одном аспекте концентрация стабилизатора в водном составе (например, сахарозы) составляет от около 1 до около 5%, или от около 1 до около 4%, или от около 1 до около 3%, или от около 1,5 до около 2,5%, или от около 1,6 до около 2,4%, или от около 1,7 до около 2,3%, или от около 1,7 до около 2,2%, или от около 1,9 до около 2,1%, или около 1, 1,5, 2, 2,5 или 3% (мас./об.).

В некоторых аспектах водный состав может дополнительно содержать поверхностно-активное вещество, буфер, регулятор тоничности, крипротектор, поверхностно-активное вещество, лиопротектор, консервант или их комбинации.

В некоторых аспектах водный состав обладает значением pH, которое составляет 6 или больше, или 6,5 или больше, или 7 или больше, или 7,5 или больше. В некоторых аспектах pH не превышает 9, 8,5 или 8. В некоторых аспектах pH составляет от 6 до 9, от 6,5 до 8,5, от 7 до 8,5, от 7,5 до 8,2, от 7,6 до 8,1, от 7,7 до 7,9 или около 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8.

В одном аспекте водный состав содержит около 45 мМ аргинина, около 2% сахарозы (мас./об.), около 5% маннита (мас./об.) и около 10 мг/мл двухцепочечного г-антидота, причем состав обладает pH около 7,8. В одном аспекте водный состав содержит около 45 мМ аргинина, около 2% сахарозы (мас./об.), около 5% маннита (мас./об.) и около 20 мг/мл двухцепочечного г-антидота, причем состав обладает pH около 7,8. В одном аспекте водный состав содержит около 45 мМ аргинина, около 2% сахарозы (мас./об.), около 5% маннита (мас./об.) и около 40 мг/мл двухцепочечного г-антидота, причем состав обладает pH около 7,8.

В одном аспекте водный состав дополнительно содержит 0,01-0,02% (мас./об.) полисорбата 80 и буфер.

В некоторых аспектах также предложены лиофилизированные композиции, полученные лиофилизацией водного состава по настоящему раскрытию. На основании концентраций каждого агента в водном составе можно легко определить относительное содержание агента в лиофилизированной композиции.

В одном аспекте лиофилизированная композиция содержит по меньшей мере 5% или, альтернативно, по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30 или 35% (мас./мас.) антидота fXa. Затем относительно других основных ингредиентов, например, для L-аргинина HCl:сахарозы:маннита может быть массовое соотношение в диапазоне (0,5-1,4):(1-3):(2-6). В некоторых аспектах массовое соотношение L-аргинина HCl:сахарозы:маннита находится в диапазоне (0,9-1):(1,5-2,5):(4,5-5,5), или (0,91-0,99):(1,6-2,4):(4,6-5,4), или (0,92-0,98):(1,7-2,3):(4,7-5,3), (0,93-0,97):(1,8-2,2):(4,8-5,2), или (0,94-0,96):(1,9-2,1):(4,9-5,1). В некоторых аспектах лиофилизированная композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество и/или твердую часть буфера.

Настоящее изобретение также относится к терапевтическим способам лечения, предотвращения или уменьшения кровотечения у субъекта, подвергающегося антикоагулянтной терапии ингибитором fXa, включающим введение субъекту эффективного количества лиофилизированного состава после растворения в подходящем растворителе. Предполагается, что антидоты или производные по настоящему изобретению могут представлять собой лекарственные средства кратковременного действия для применения в элективных или экстренных ситуациях, которые могут безопасно и специфически нейтрализовать обычные антикоагулянтные свойства ингибитора fXa, не вызывая вредных побочных эффектов на гемодинамику или обострения пролиферативного сосудистого ответа на травму.

Используемые в данном документе термины "лечить", "лечение" и т.п. используются в данном документе для обозначения достижения желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предотвращения расстройства или его признака или симптома и/или может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения расстройства и/или неблагоприятного эффекта, связанного с расстройством.

Термин "лечение" также охватывает любое лечение расстройства у млекопитающего и включает в себя: (а) предотвращение возникновения расстройства у субъекта, который может быть предрасположен к расстройству, но возможно еще не имеет поставленного диагноза, например предотвращение кровотечения у пациента с передозировкой антикоагулянта; (б) ингибирование расстройства, т.е. прекращение его развития, например ингибирование кровотечения; или (с) ослабление или облегчение расстройства, например уменьшение кровотечения.

Используемый в данном документе термин "лечение" дополнительно включает в себя системное улучшение симптомов, связанных с патологией и/или задержкой появления симптомов. Клинические и субклинические признаки "лечения" будут варьироваться в зависимости от патологии, индивидуума и лечения.

"Введение" может осуществляться посредством одной дозы, непрерывно или периодически в течение всего курса лечения. Способы определения наиболее эффективных средств и дозировки введения известны специалистам в данной области техники и будут варьироваться в зависимости от композиции, используемой для терапии, цели терапии, клетки-мишени, подвергаемой лечению, и субъекта, которого

лечат. Однократное или многократное введение может осуществляться с помощью уровня дозы и схемы, выбранной лечащим врачом. Подходящие лекарственные формы и способы введения агентов известны в данной области техники. "Субъектом" диагностики или лечения является клетка или млекопитающее, включая человека. Животные, не являющиеся людьми, подлежащие диагностике или лечению, включают в себя, например, представителей мышинных, таких как крысы, мыши, собачьих, такие как собаки, зайцевых, такие как кролики, домашний скот, спортивных животных и домашних животных.

Агенты и композиции по настоящему изобретению могут быть использованы при производстве лекарственных средств и для лечения людей и других животных путем введения в соответствии с обычными процедурами, так как активный ингредиент в фармацевтических композициях.

Агент по настоящему изобретению может вводиться для терапии любым подходящим путем, особенно с помощью парентерального введения (включая подкожное, внутримышечное, внутривенное и внутрикожное введение). Также следует понимать, что предпочтительный путь будет варьироваться в зависимости от состояния и возраста реципиента и заболевания, которое подвергается лечению.

Фраза "фармацевтически приемлемый полимер" относится к группе соединений, которые могут быть конъюгированы с одним или несколькими полипептидами, описанными в данном документе. Предполагается, что конъюгация полимера с полипептидом способна увеличивать период полувыведения полипептида *in vivo* и *in vitro*.

Неограничивающие примеры включают полиэтиленгликоли, поливинилпирролидоны, поливинило-вые спирты, производные целлюлозы, полиакрилаты, полиметакрилаты, сахара, полиолы и их смеси.

"Антикоагулянтные агенты" или "антикоагулянты" представляют собой агенты, которые ингибируют образование сгустков крови. Примеры антикоагулянтов включают, но не ограничиваются ими, специфические ингибиторы тромбина, фактора IXa, фактора Xa, фактора XIa, фактора XIIa или фактора VIIa, гепарин и его производные, антагонисты витамина K и антитела против тканевого фактора. Примеры конкретных ингибиторов тромбина включают гирудин, бивалирудин (Angiomax®), аргатробан и ле-пирудин (Refludan®). Примеры гепарина и его производных включают нефракционированный гепарин (НФГ), низкомолекулярный гепарин (НМГ), такой как эноксапарин (Lovenox®), дальтепарин (Fragmin®) и данапароид (Orgaran®); и синтетический пентасахарид, такой как фондапаринукс (Arixtra®). Примеры антагонистов витамина K включают варфарин (Coumadin®), фенокумарол, аценокумарол (Sintrom®), клориндион, дикумарол, дифенадион, этилбискумацетат, фенпрокумон, фениндион и тиокломарол. В одном варианте осуществления антикоагулянт представляет собой ингибитор фактора Xa. В одном варианте осуществления антикоагулянт представляет собой бетриксабан.

Термин "антикоагулянтная терапия" относится к терапевтическому режиму, который применяется к пациенту для предотвращения возникновения нежелательных сгустков крови или тромбоза. Антикоагулянтная терапия включает в себя введение одного или комбинации двух или более антикоагулянтных агентов или других агентов в дозировке и схеме, подходящей для лечения или предотвращения возникновения нежелательных сгустков крови или тромбоза у пациента.

Термин "ингибиторы фактора Xa" относится к соединениям, которые могут прямо или косвенно ингибировать активность фактора Xa свертывания крови, катализирующую превращение протромбина в тромбин *in vitro* и/или *in vivo*.

"Прямые ингибиторы фактора Xa" связываются с fXa непосредственно, и неограничивающие примеры включают NAP 5, гNAPc2, ингибитор каскада тканевого фактора (TFPI), DX DX-9065a (как описано, например, в Herbert, J.M., et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 1996 276 (3):1030-8), YM-60828 (как описано, например, в Taniuchi, Y., et al, Thromb Haemost. 1998 79 (3):543-8), YM-150 (как описано, например, в Eriksson, B.I. et al., Blood 2005;106(11), Abstract 1865), аписабан, ривароксабан, ТАК 442, PD-348292 (как описано, например, в Pipeline Insight: Antithrombotics - Reaching the Untreated Prophylaxis Market, 2007), отамиксабан, эдоксабан (как описано, например, в Hylek E.M., Curr. Opin. Invest Drugs 2007 8 (9): 778-783), LY517717 (как описано, например, в Agnelli, G., et al., J. Thromb. Haemost. 2007 5(4):746-53), GSK913893, разаксабан, бетриксабан или их фармацевтически приемлемая соль и их комбинации. В конкретном аспекте прямым ингибитором фактора Xa является ривароксабан. В некоторых аспектах прямой ингибитор fXa представляет собой низкомолекулярное химическое соединение.

Ингибирование "косвенными ингибиторами фактора Xa" активности fXa опосредуется одним или несколькими другими факторами. Неограничивающие примеры косвенных ингибиторов фактора Xa включают фондапаринукс, идрапаринукс, биотинилированный идрапаринукс, эноксапарин, фрагмин, тинзапарин, низкомолекулярный гепарин (НМГ) и их комбинации. В конкретном аспекте косвенным ингибитором фактора Xa является эноксапарин.

В одном варианте осуществления ингибитор фактора Xa выбран из бетриксабана, ривароксабана, НМГ, DX-9065a, YM-60828, YM-150, PD-348292, отамиксабана, эдоксабана, LY517717, GSK913893, разаксабана, аписабана и их комбинаций.

Термин "бетриксабан" относится к соединению [2-({4-[(диметиламино)иминометил]фенил} карбониламино)-5-метоксифенил]-N-(5-хлор-(2-пиридил))карбоксамид или его фармацевтически приемлемым солям. Бетриксабан описан в патентах США №№ 6376515, 6835739 и 7598276, содержание которых

включено в настоящий документ посредством ссылки. Бетриксабан, как известно, является специфическим ингибитором фактора Ха.

Термины "нейтрализовать", "обращать" или "противодействовать" активности ингибитора fXa или аналогичные фразы относятся к ингибированию или блокированию ингибиторной или антикоагулянтной функции фактора Ха ингибитора fXa. Такие фразы относятся к частичному ингибированию или блокированию функции, а также к ингибированию или блокированию большей части или всей активности ингибитора fXa *in vitro* и/или *in vivo*.

Термин "эффективное количество" относится к количеству производного, достаточному для достижения желаемого биологического и/или терапевтического результата. Таким результатом может быть смягчение признаков, симптомов или причин заболевания или любое другое желаемое изменение биологической системы. В настоящем изобретении результат, как правило, включает одно или несколько из следующего: нейтрализацию ингибитора fXa, который ввели пациенту, изменение антикоагулянтной активности ингибитора fXa, удаление ингибитора fXa из плазмы, восстановление гемостаза, а также уменьшение или прекращение кровотечения. Эффективное количество будет варьироваться в зависимости от конкретного используемого антидота, конкретного ингибитора fXa, который ввели субъекту, режима дозирования ингибитора fXa, времени введения антидота, субъекта и болезненного состояния, которое лечат, веса и возраста субъекта, серьезности болезненного состояния, способа введения и т.п., и все это может быть легко определено специалистом в данной области техники.

В определенных аспектах вводят раствор для доставки количества антидота fXa от около 10 мг до около 2 г. Другие количества используемого г-антидота включают в себя от около 100 мг до около 1,5 г; от около 200 мг до около 1 г и от около 400 до около 900 мг. В некоторых аспектах количество используемого г-антидота составляет около 400 мг или 960 мг. В некоторых аспектах количество используемого г-антидота составляет от около 10 до около 100 мг; от около 15 до около 95 мг и от около 20 до около 80 мг.

Композиция при введении нейтрализует ингибитор фактора Ха по меньшей мере на около 20%, или по меньшей мере на около 50%, или по меньшей мере на около 75%, или по меньшей мере на около 90%, или по меньшей мере на около 95%.

Можно определить, достигается ли результат способа, т.е. ингибирование или нейтрализация ингибитора фактора Ха, с помощью ряда анализов *in vitro*, таких как анализ образования тромбина, и клинических анализов свертывания, таких как АЧТВ, ПВ и АВС.

Один аспект настоящего изобретения относится к способам селективного связывания и ингибирования экзогенно вводимого ингибитора fXa у субъекта, подвергающегося антикоагулянтной терапии ингибитором fXa, включающим введение субъекту эффективного количества раствора лиофилизированного состава. Пациенты, подходящие для данной терапии, подвергались предшествующей антикоагулянтной терапии, например им вводили один или несколько антикоагулянтов, таких как прямой или косвенный ингибитор fXa.

В другом аспекте в данном документе предлагается способ избирательного связывания и ингибирования экзогенно введенного ингибитора фактора Ха у субъекта, проходящего антикоагулянтную терапию ингибитором фактора Ха, включающий введение субъекту раствора лиофилизированного препарата. Субъектом может быть клетка или млекопитающее, такое как человек.

Субъекты, которым будет полезно введение растворенного лиофилизированного состава, описанного в настоящем документе, и сопутствующих способах, включают тех, которые испытывают или предрасположены к клинически значимому кровотечению или клинически значимому незначительному кровотечению. Примеры клинически значимых кровотечений выбраны из группы, состоящей из кровоизлияния, кровотечения в жизненно важные органы, кровотечения, требующего повторной операции или новой терапевтической процедуры, и индекса кровотечения $\geq 2,0$ с ассоциированным явным кровотечением (Turpie AGG, et al., NEJM, 2001, 344: 619-625). Кроме того, субъект может испытывать или быть предрасположенным к незначительному кровотечению, выбранному из группы, состоящей из носового кровотечения, которое является постоянным или периодическим, и происходит в значительном количестве или не останавливается без вмешательства, кровотечения из прямой кишки или мочевыводящих путей, которое не перерастает до степени, требующей терапевтической процедуры, значительных гематом в местах инъекций или в других местах, которые являются спонтанными или возникают после тривиальной травмы, значительной потери крови, более чем обычно связанной с хирургической процедурой, не требующей дренирования, и кровотечения, требующего незапланированного переливания.

В некоторых вариантах растворенный лиофилизированный состав вводят после передозировки введения ингибитора fXa или перед операцией, которая может подвергать субъектов риску кровотечения.

Примеры

Следующие примеры включены для демонстрации конкретных вариантов осуществления раскрытия. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что методики, раскрытые в следующих примерах, представляют собой методики, которые хорошо функционируют при практическом осуществлении данного описания и, таким образом, могут рассматриваться как составляющие конкретные способы для его практического применения. Однако специалистам в данной области техники в свете настоящего раскрытия должно быть понятно, что в конкретных раскрытых вариантах осуществления мо-

жет быть выполнено множество изменений, и все же может быть получен тот же или аналогичный результат без отклонения от сущности и объема раскрытия.

Пример 1. Очистка г-антидота из клеточной культуры.

Данный пример демонстрирует разработку условий культивирования и способа выделения и очистки для производства г-антидота. Коммерческую культуральную среду, специально предназначенную для клеток СНО, тестировали клетками СНО, трансфицированными конструкцией, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 7), которая кодирует предшественник г-антидота (SEQ ID NO: 2), который после удаления -RKRRKR- линкера (SEQ ID NO: 6) генерирует двухцепочечный г-антидот (SEQ ID NO: 3). Среда ProCHO™ в подходящих условиях могла обеспечивать значение титра до 75-95 мг/л.

Способ выделения и очистки (способ выделения) был разработан для очистки антидота от культивируемых клеток. На нескольких начальных этапах разработки были протестированы различные мембраны и колонны.

В двух испытаниях было обнаружено, что осветленный сбор загрязняет мембраны, когда продукт концентрируется ультрафильтрацией (УФ), или загрязняет хроматографическую среду, если УФ пропускают и продукт концентрируют на первом этапе хроматографии. Эксперименты проводились для определения причины загрязнения и определения шагов по его устранению, поскольку в начале способа неизбежно обращали внимание на концентрацию продукта. Впоследствии было определено, что загрязнение вызвано примесью белка с высокой молекулярной массой (НМВ), который выделялся в среду во время культивирования клеток. Данный белок НМВ был только частично растворимым в осветленном сборе и после концентрации становился все более и более нерастворимым, вызывая недопустимое загрязнение мембраны для УФ или хроматографической колонки.

После оценки нескольких глубинных фильтров, ионообменных мембран и хроматографических сред было обнаружено, что один конкретный глубинный фильтр (фильтр Millipore™ класса ХОНС) может удалять большую часть примесей при достижении приемлемого выхода продукта. Затем продукт может быть сконцентрирован с помощью УФ до 10 раз. Данный фильтр заменил один из исходных фильтров в способе осветления и был использован для двух дополнительных испытаний.

Фиг. 1 иллюстрирует результирующий способ 100 очистки, полученный в результате данной разработки. После сбора клеток (стадия 101) и осветления с использованием фильтра ХОНС Millipore™ для удаления примеси НМВ образец концентрировали в 10 раз (стадия 102). Для концентрации можно использовать регенерированную целлюлозу. На этапе 103 может выполняться вирусная инактивация (с помощью детергента/растворителя; конечная концентрация: 1% Тритон X-100, 0,3% трибутилфосфат) для инактивации оболочечных вирусов в культуре клеток. После удаления вирусов выполняются этапы 104 (катионный обмен в смешанном режиме), 105 (анионный обмен в смешанном режиме) и 106 (ионный обмен в смешанном режиме) для удаления белков и ДНК клетки-хозяина и захвата антидота. На этапе 107 для дополнительного удаления оставшихся белков клетки-хозяина может использоваться смола с гидрофобным взаимодействием.

Необязательно, после указанных этапов очистки можно использовать конечную стадию фильтрования для удаления вирусов с целью удаления любых оставшихся вирусов.

Данный способ позволил извлечь около 30-35% антидота, экспрессированного в клеточной культуре, что привело к получению около 22-33 мг белка-антидота из каждого литра культуры клеток.

Пример 2. Масштабирование промышленного способа.

На основе способа, описанного в примере 1, был разработан модифицированный способ с целью масштабирования производства.

Культуральная среда примера 1 была способна генерировать титр около 75-95 мг/л. Для увеличения производства был протестирован ряд других культуральных сред для СНО. Одна из них продемонстрировала 2-3-кратное увеличение роста клеток и пиковую плотность клеток (титр=200-225 мг/л), а также позволила увеличить масштабы до 10000 л.

Аффинный хроматограф был разработан для экстракции антидота в больших объемах. Аффинный лиганд включал ингибитор трипсина Куница (21 кДа; pI=4,5), экстрагированный из цельной сои или муки сои. Ингибитор трипсина сои (STI) образует комплекс 1:1 с антидотом. Для масштабируемости и совместимости были определены неконкурентные условия элюирования ингибитора, которые включали 25 мМ Na-ацетат, 1М аргинин, при pH 5,2.

В способе, разработанном в примере 1, для удаления примеси НМВ использовался этап осветления сбора с глубинным фильтром с последующим 10-кратным концентрированием. Кроме того, на стадии инактивации вирусов использовали детергент (Тритон X-100), а также растворитель (трибутилфосфат). Пригодность и эффективность данных этапов оценивали для проведения аффинного захвата.

Данные показывают, что глубинная фильтрация не требовалась и что использование растворителя и этап 10-кратного концентрирования снижали степень извлечения продукта.

Следовательно, при дальнейшей разработке глубинная фильтрация и этап концентрирования были исключены, и при инактивации вирусов использовался только детергент (Тритон X-100) без растворите-

ля. Инактивация вирусов была достигнута путем добавления 10% Тритона X-100 в соотношении 52,7 мл буфера на каждый литр продукта (конечная концентрация: 0,5% Тритон X-100). Данный результат был неожиданным, так как для подготовки образцов перед загрузкой на аффинную колонну обычно используются растворители. Также отмечено, что когда собирали клеточную культуру, для удаления осадков использовался этап центрифугирования.

После времени перемешивания в 15 мин и минимального периода выдерживания в течение 1 ч при комнатной температуре обработанный продукт фильтровали через ряд фильтров, состоящий из предварительного фильтра Sartogruad NF Filter (0,8/0,2 мкм), на предварительный фильтр Sartopore 2 (0,45/0,22 мкм) в 500 л емкость со встроенным фильтром на 0,22 мкм, при этом каждая загрузка на колонну фильтруется в день использования.

Для элюирования продукта из аффинных смол с STI использовали элюирующий буфер, который содержал аргинин (25 мМ ацетат натрия/1,0М аргинин, pH 5,2).

После аффинного захвата использовали несколько этапов доочистки для удаления оставшихся примесей, включая ДНК, белки клеток-хозяев (НСП) и вымывание аффинного лиганда. Были протестированы два варианта хроматографии, включая катионный обмен и ионный обмен в смешанном режиме. Однако не было доступно никакого специфического анализа белков клетки-хозяина для определения параметров. Таким образом, коммерческие ИФА, используемые в качестве заменителя, и количественное определение специфических НСП с помощью ЖХ-МС/МС были использованы в качестве дополнительного определения параметров. И дополнительно оценка методом 2D-электрофореза с окрашиванием серебром для качественной характеристики.

На фиг. 3 изображена оценка трех предполагаемых способов выделения и очистки (DSP). Три DSP были идентифицированы на основе очистки от вымытого аффинного лиганда. Для оценки качества продукта и очистки от примесей, связанных с технологическим процессом, один и тот же пул аффинного элюата подвергался прямой обработке в каждом потоке и сравнивался для определения степени извлечения продукта и очистки от белков клетки-хозяина СНО (НСП; выражается в долях на миллион (м.д.)). Элюаты из каждого способа DSP дополнительно тестировались на качество продукта (таблица ниже).

	Образец	Кислотный пик	Пик	Пик	Пик	Основной пик
			1	2	3	
% пика по ИОХ	Аффинный элюат	27,8%	17,8%	12,9%	16,6%	13,9%
	Катионный обмен Элюат	24,9%	14,5%	26,9%	20,8%	13,1%
	ИО в смеш. реж. Элюат DSP-2	23,4%	15,7%	17,3%	20,4%	13,3%
	ИО в смеш. реж. Элюат DSP-1	23,6%	15,2%	26,9%	20,0%	13,3%
		Образец	% НМВ	%		
				мономера		
% мономера по ЭХ	Аффинный элюат	0,29%	99,71%			
	Катионный обмен Элюат	4,30%	95,70%			
	ИО в смеш. реж. Элюат DSP-2	0,13%	99,87%			
	ИО в смеш. реж. Элюат DSP-1	0%	100%			
			Пик перед основным пиком	Основной пик	Бета пик	
	% основного пика по ОФХ	Аффинный элюат	0,8%	93,4%	5,7%	
	Катионный обмен Элюат	1,2%	92,9%	5,9%		
	ИО в смеш. реж. Элюат DSP-2	0,5%	94,2%	5,3%		
	ИО в смеш. реж. Элюат DSP-1	0,9%	93,4%	5,8%		

Примечания к таблице. Оценка качества продукта из трех оцениваемых способов выделения и очистки. Элюаты, взятые из трех DSP (фиг. 3), оценивали на влияние на качество продукта. Никакого влияния вследствие неоднородности зарядов при ионном обмене (ИО) или при очистке с обратной фазой (ОФ) не наблюдалось. Однако образцы из DSP-2, которые были очищены на этапе катионообменной доочистки, показали увеличение % высокомолекулярного агрегата методом эксклюзионной хроматографии (ЭХ).

На основе тестирования был разработан способ выделения и очистки увеличенного масштаба, который изображен на фиг. 2. Данный способ является проще, чем тот, который изображен на фиг. 1. Тем не менее, выход был в 2 раза выше. В сочетании с новой системой культивирования клеток, которая привела к увеличению выработки белка в 2-3 раза, описанный в примере 2 способ дал возможность увеличить общую выработку антитела в 4-6 раз и обеспечил масштаб производства по меньшей мере 10000 л.

На фиг. 2 способ 200 выделения и очистки использует этап инактивации вирусов (202) после сбора (201), в котором используется только детергент (Тритон X-100) без растворителя. На этапе 203 аффинного захвата используют смолы с лигандом ST1 и антител элюируют элюирующим буфером с аргинином (рН 5). Дополнительный этап ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ) может использоваться после аффинного захвата, что может обеспечить концентрирование белка и доведения рН до приблизительно 7.

На этапе 204 анионная мембрана используется для удаления определенных примесей из образца (например, ДНК, НСР). Примером протестированной анионной мембраны была мембрана Sartobind Q, которая не оказывала вредного воздействия на антител.

На этапе 205 примерным типом ионного обмена в смешанном режиме является смешанный режим

ИО с СНТ (керамический гидроксипатит). Примером элюирующего буфера является фосфатно-солевой буфер. Данный этап полезен для удаления вымытого STI.

На этапе 206 гидрофобное разделение может быть достигнуто с помощью хроматографии с октил-сефарозой в качестве примера, и белок может быть элюирован буфером, который содержит NaCl. Данный этап полезен для удаления оставшихся НСР.

Следующая таблица показывает выход очистки и извлечения в нескольких испытаниях.

	Лабораторный масштаб (10 л)	Пилотный масштаб 1 (400 л)	Пилотный масштаб 2 (400 л)
Аффинный захват	178 мг/л культуры клеток	122 мг/л культуры клеток	150 мг/л культуры клеток
Диафильтрация	95%	98%	99%
Sartobind-Q	-	-	95%
ИО-смешанный режим	92%	95%	93%
Гидрофобное взаимодействие (октил)	100%	103%	99%
Фильтрация вирусов	95%	92%	94%
Конечная УФ/ДФ Нерасфасованное лекарственное вещество	89%	91%	92%
Общий выход	60%	69%	66%

Пример 3. Определение параметров промышленно полученного белка.

В данном примере были разработаны способы для определения параметров белкового продукта, полученного в результате разработанных выше способов. Способы исследования включали изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ), обратную фазу в восстанавливающих условиях (Red-ОФ) и пептидную карту в восстанавливающих условиях (PMAP).

Изоэлектрическое фокусирование использовали для определения гетерогенности зарядов антидота-белка. Изоэлектрическое фокусирование представляет собой электрофоретический способ разделения белков на основе их изоэлектрической точки (pI) или pH, при котором белок не имеет суммарного заряда. Изоэлектрическое фокусирование проводили с использованием гелей с pH 3-10 и реагентов в соответствии с инструкциями производителя Life Technologies для электрофореза (Novex IEF Gels) и окрашивания с использованием набора для окрашивания коллоидным синим (Invitrogen). Результаты сравнивали с маркерами Serva 3-10 pI.

Тестовые партии разбавляли до 1,6 мг/мл в воде, затем 1:1 в буфере для образцов ИЭФ, pH 3-10. Каждый образец загружали в количестве 10 мкл (8,0 мкг) и проводили электрофорез при 100 В в течение 1 ч, затем при 200 В в течение 1 ч и при 500 В в течение 30 мин. Гели фиксировали в течение 30 мин в фиксирующем растворе (Sigma-Aldrich), окрашивали в течение 1 ч красителем коллоидным синим и оставляли в воде на ночь.

Обратная фаза в восстанавливающих условиях представляет собой способ ВЭЖХ, который использует хроматографическое разделение с обратной фазой для обнаружения как полноразмерных, так и усеченных форм белка. В образцах заменяли буфер на 6М гуанидина-HCl/50 мМ Трис, pH 7,5 и восстанавливали с помощью DTT до инкубации при 50°C в течение 30 мин. Образцы затем алкилировали с использованием винилпиридина при комнатной температуре в течение 90 мин в темноте с последующим гашением 1М DTT. В данном способе используется колонка ВЭЖХ Agilent Zorbax C18 для связывания белков с неподвижной фазой и градиент от 15 до 95% убывающей по полярности подвижной фазы (0,1% трифторуксусной кислоты в ацетонитриле) для разделения белков на основе их гидрофобности. Длина волны УФ-излучения составляет 214 нм.

Для получения пептидной карты с расщеплением Lys-C использовали UVЭЖХ-УФ/МС^E анализ расщепленных Lys-C образцов. Данный способ был способен обеспечить охват более чем 98% последовательности и характеризовать посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование, гидро-

ксилирование аспартата и усечение С-концевого лизина. Данный способ также был способен контролировать показатели, указывающие на стабильность, такие как дезамидирование аспарагина и окисление метионина. Каждая партия образцов была восстановлена, алкилирована и обработана лизилэндопептидазой (Lys-C). Пептиды, полученные ферментативным расщеплением, разделяли с помощью ОФ-УВЭЖХ и анализировали с помощью масс-спектрологии.

В следующих таблицах показан тип изоформ белка, обнаруженных в очищенных белковых продуктах, а также их процентные содержания и последовательности (партия № 1: со способом выделения и очистки, разработанным в примере 1; партия № 1: со способом выделения и очистки, разработанным в примере 2). Интересно отметить, что по сравнению со способом примера 1 способ примера 2 значительно уменьшил процентное содержание SEQ ID NO: 9 (с 9,0 до 2,7%), вероятно, из-за повышенной эффективности очистки.

Изоформы легкой цепи:

	Партия №1	Партия №2
Интактная легкая цепь (SEQ ID NO: 4)	46,8%	37,9%
Модифицированная или усеченная легкая цепь	53,2%	62,1%

Изоформы тяжелой цепи:

	Партия №1	Партия № 2
Интактная тяжелая цепь (SEQ ID NO: 5) с 2 О- связанными гликозилированиями	10,2%	22,0%
Интактная тяжелая цепь (SEQ ID NO: 5) с 1 О- связанным гликозилированием	18,3%	22,6%
С-терминальная усеченная	57,8%	46,9%

по К (SEQ ID NO: 8) с 1 О- связанным гликозилированием		
Без 13 С-терминальных остатков (SEQ ID NO: 9)	9,0%	2,7%
Без 14 С-терминальных остатков (SEQ ID NO: 10)	0,6%	0,0%
Без 15 С-терминальных остатков (SEQ ID NO: 11)	4,0%	5,0%
Тяжелая цепь без С-терминального К (SEQ ID NO: 8)		
181 IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAANCLYQ		
241 AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETVD FDIAVLRLKT PITFRMNVAP		
301 ACLPERDWAЕ STLMТQKTGI VSGFGRТHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC KLSSSFIIТQ		
361 NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK		
421 WIDRSМКTRG LPKAKSHAPE VITSSPL		
Тяжелая цепь без 13 С-терминальных остатков (SEQ ID NO: 9)		
181 IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAANCLYQ		
241 AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETVD FDIAVLRLKT PITFRMNVAP		
301 ACLPERDWAЕ STLMТQKTGI VSGFGRТHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC KLSSSFIIТQ		
361 NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK		
421 WIDRSМКTRG LPKAK		
Тяжелая цепь без 14 С-терминальных остатков (SEQ ID NO: 10)		
181 IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAANCLYQ		
241 AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETVD FDIAVLRLKT PITFRMNVAP		
301 ACLPERDWAЕ STLMТQKTGI VSGFGRТHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC KLSSSFIIТQ		
361 NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK		
421 WIDRSМКTRG LPKA		
Тяжелая цепь без 15 С-терминальных остатков (SEQ ID NO: 11)		
181 IVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAANCLYQ		
241 AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETVD FDIAVLRLKT PITFRMNVAP		
301 ACLPERDWAЕ STLMТQKTGI VSGFGRТHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC KLSSSFIIТQ		
361 NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK		
421 WIDRSМКTRG LPK		

Пример 4. Валидация масштабированного способа.

Данный пример описывает способ для дальнейшей валидации, основанный на способах, описанных в примерах 1 и 2.

Инактивация вирусов с помощью детергента.

Этап инактивации вирусов осуществляли путем добавления 10% Тритона X-100 к собранному белку. Собранный белок, соответствующий 1 циклу Capto STI (как описано ниже), фильтровали из резервуара для сбора в резервуар для добавления 10% Тритона X-100 через фильтры 4×30" Sartoguard NF, которые использовались в качестве предварительных фильтров, а затем фильтровали через фильтры 3×20" Sartoguard NF 0,8/0,2 мкм. После добавления 10% Тритона X-100 пул смешивали и затем переносили в резервуар для хранения через фильтры 3×30" Sartoguard NF 0,8/0,2 мкм. По истечении времени удерживания инактивированный пул загружали в колонну Capto STI через фильтр 6×30" Sartoguard NF 0,8/0,2 мкм последовательно с фильтрами 3×30" Sartoguard NF 0,8/0,2 мкм. Данная последовательность повторялась до тех пор, пока не были завершены 4 цикла, которые должны быть выполнены во время операции Capto STI. Фильтры 6×30" Sartoguard NF 0,8/0,2 мкм были заменены после загрузки второго цикла.

Хроматография с Capto STI.

Аффинную колоночную хроматографию проводили с использованием смолы Capto STI при температуре окружающей среды. Во время фазы загрузки продукт связывался со смолой, в то время как загрязняющие вещества проходили без удерживания. Продукт извлекали, нарушая белковые взаимодействия с помощью высокой концентрации аргинина в элюирующем буфере. Перед использованием колонну промывали водой для инъекций (WFI), очищали 100 мМ фосфорной кислотой с pH 3,0 и промывали WFI. Сначала колонну предварительно уравнивали буфером для предварительного уравнивания (20 мМ Трис-HCl, pH 7,4), затем уравнивали буфером для уравнивания (20 мМ Трис-HCl, 200 мМ NaCl, pH 7,4) и как только pH и проводимость колонны оказывалась в пределах спецификации на нее загружали обработанный Тритон-Х 100 (HCCF) осветленный сбор (HCCF). Каждый цикл материала HCCF переносился из резервуара для выдерживания при инактивации вирусов непосредственно на колонну.

После загрузки колонну промывали уравнивающим буфером и элюировали элюирующим буфером с высоким содержанием аргинина и низким pH (элюирующий буфер: 25 мМ ацетата натрия 1,0М аргинина, pH 5,2). В конце цикла и перед следующим циклом колонну промывали WFI, снова очищали

100 мМ фосфорной кислотой с рН 3,0 и снова промывали WFI. Все элюаты, полученные из нескольких циклов, объединяли. После того как был собран материал последнего цикла, в обход колонки подавали буфер, чтобы вымыть элюированный продукт из линий ниже по потоку от колонны в накопительный сосуд. После завершения всех циклов колонку промывали WFI, очищали 100 мМ фосфорной кислотой с рН 3,0, промывали WFI, нейтрализовали буфером для предварительного уравнивания и буфером для уравнивания и хранили в этанольном растворе хранения.

Пул элюата Capto STI смешивали с 1,0М аргинина HCl с рН 7,0 до конечной концентрации 100 мМ аргинина HCl для стабилизации пула. Затем полученный пул концентрировали и подвергали диафильтованию на мембране Ultracel Pellicon 3 на 10 кДа для удаления большей части аргинина, что позволяло проводить загрузку на следующий этап хроматографии.

Мембранная хроматография на Sartobind Q.

Анионообменную мембранную хроматографию проводили с использованием картриджа Sartobind Q Jumbo при температуре окружающей среды. Во время фазы загрузки продукт проходит через мембрану, в то время как загрязняющие вещества связываются. Перед использованием картриджа промывали уравнивающим буфером для удаления увлажнителя для хранения. Картридж очищали 0,5М NaOH. Затем картридж уравнивали уравнивающим буфером и, когда рН и проводимость картриджа оказывались в пределах спецификации, на него загружали концентрированный диафильтованный элюат Capto STI. Один цикл загрузки материала был непосредственно загружен из накопительного резервуара УФ/ДФ. После загрузки картридж промывали уравнивающим буфером. После того как продукт был собран, в обход картриджа подавали буфер, чтобы вымыть продукт из линий ниже по потоку от картриджа в накопительный сосуд.

Хроматография на керамическом гидроксипатите (СЕТ).

Колоночную хроматографию в смешанном режиме проводили с использованием смолы СНТ типа I размером 40 мкм при температуре окружающей среды. Во время фазы загрузки продукт связывался со смолой, в то время как некоторые загрязняющие вещества проходили без удерживания. Продукт извлекали путем увеличения концентрации натрия в линейном градиенте. Перед использованием колонку очищали 1,0М NaOH и промывали небольшим объемом уравнивающего буфера. Сначала колонку предварительно уравнивали буфером для предварительного уравнивания, а затем уравнивали буфером для уравнивания, и как только рН и проводимость колонны оказывались в пределах спецификации, на нее загружали элюат Sartobind Q.

Каждый цикл загрузки переносили из накопительного резервуара непосредственно на колонну. После загрузки колонку промывали уравнивающим буфером. Затем проводили элюирование в градиенте от 90% уравнивающего буфера (50 мМ MES, 5 мМ фосфата натрия, рН 7,0) до 90% элюирующего буфера (50 мМ MES, 5 мМ фосфата натрия, 2М хлорида натрия, рН 7,0).

В конце цикла и перед следующим циклом колонку промывали уравнивающим буфером, а затем освобождали промывочным буфером с высоким содержанием фосфата после элюирования, промывали уравнивающим буфером, снова очищали 1,0М NaOH и снова промывали уравнивающим буфером. Все элюаты, полученные из нескольких циклов, объединяли. После того как был собран материал последнего цикла, в обход колонки подавали буфер, чтобы вымыть элюированный продукт из линий ниже по потоку от колонны в накопительный сосуд. После того как все циклы были завершены, колонку промывали уравнивающим буфером, очищали 1,0М NaOH и хранили в растворе для хранения, содержащим едкий натр/фосфат.

Хроматография на октилсефарозе 4FF.

Хроматографию с гидрофобным взаимодействием проводили с использованием смолы октилсефарозы FF при температуре окружающей среды. Во время фазы загрузки продукт проходит сквозь смолу, в то время как загрязняющие вещества связываются. Перед использованием колонку очищали 1,0М NaOH. Колонку сначала предварительно уравнивали WFI, а затем уравнивали уравнивающим буфером, и как только рН и проводимость колонны оказывались в пределах спецификации, на нее загружали элюат СНТ. Каждый цикл загрузки переносили из накопительного резервуара непосредственно на колонку. После загрузки колонку промывали уравнивающим буфером. В конце цикла и перед следующим циклом колонку освобождали WFI и снова очищали 1,0М NaOH. После того как был собран материал последнего цикла, в обход колонны подавали буфер, чтобы вымыть элюированный продукт из линий ниже по потоку от картриджа в накопительный сосуд. После того как все циклы были завершены, колонку освобождали WFI, очищали 1,0М NaOH и хранили в растворе для хранения, содержащим едкий натр.

Фильтрация на Planova 20N для снижения вирусной нагрузки (VRF).

Фильтрация для снижения вирусной нагрузки осуществляли на фильтре Planova 20N для уменьшения количества вирусов. Фильтр работал в тупиковом режиме, продукт проходил через фильтр, в то время как оставшиеся вирусные частицы оставались в волокнах. Перед использованием фильтр промывали уравнивающим буфером для октилсефарозы. Затем продукт пропускали через фильтр и затем промывали дополнительной порцией уравнивающего буфера. Фильтр был проверен на целостность и утилизирован после использования.

Фильтрат VRF концентрировали на мембране Ultracel Pellicon 3 на 10 кДа. После частичного концентрирования проводили его диафильтрацию с получением готового состава. Затем продукт концентрировали до конечной целевой концентрации и извлекали.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится данное изобретение.

Изобретения, иллюстративно описанные в данном документе, могут быть соответствующим образом осуществлены на практике в отсутствие какого-либо элемента или элементов, ограничения или ограничений, конкретно не раскрытых в данном документе. Таким образом, например, термины "состоящий", "включающий", "содержащий" и т.д. следует читать в широком смысле и без ограничений. Кроме того, примененные в данном документе термины и выражения использовались в качестве терминов описания, а не ограничения, и при использовании таких терминов и выражений нет намерения исключать какие-либо эквиваленты показанных и описанных признаков или их частей, но признается, что возможны различные модификации в пределах объема заявленного изобретения.

Таким образом, следует понимать, что хотя настоящее изобретение было конкретно раскрыто в предпочтительных вариантах осуществления и необязательных аспектах, специалистами в данной области могут быть использованы модификация, усовершенствование и вариант изобретений, воплощенных в настоящей описанной заявке, и что такие модификации, усовершенствования и варианты находятся в рамках настоящего изобретения. Представленные в данном документе материалы, способы и примеры представляют собой предпочтительные варианты осуществления, являются иллюстративными и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

В данном документе было широко и в общих чертах описано изобретение. Каждый из более узких видов и подвидовых групп, входящих в общее описание, также образует часть изобретения. Это включает в себя общее описание изобретения с оговоркой или отрицательным ограничением, удаляющим какой-либо объект изобретения из рода, независимо от того, указан конкретно или нет опущенный материал в данном документе.

Кроме того, когда признаки или аспекты изобретения описаны в терминах групп Маркуша, специалисты в данной области техники поймут, что изобретение также описано таким образом в терминах любого отдельного члена или подгруппы членов группы Маркуша.

Все публикации, патентные заявки, патенты и другие источники, упомянутые в данном документе, явно включены в качестве ссылки во всей их полноте в той же степени, как если бы каждая из них была включена в данный документ посредством ссылки отдельно. В случае конфликта настоящее описание, включая определения, является превалирующим.

Следует понимать, что хотя данное раскрытие описано в связи с вышеприведенными вариантами осуществления, приведенное выше описание и примеры предназначены лишь для иллюстрации и не ограничивают объем раскрытия. Для специалистов в данной области техники, к которой принадлежит данное описание, будут очевидны другие аспекты, преимущества и модификации в рамках раскрытия настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки полипептидного продукта, экспрессируемого из полинуклеотидной конструкции, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 7 или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой SEQ ID NO: 7, включающий

добавление детергента к образцу, который содержит полинуклеотидную конструкцию и полипептидный продукт, экспрессированный из полинуклеотидной конструкции;

загрузку образца в хроматограф для аффинной хроматографии на основе ингибитора трипсина сои (STI) и элюирование полипептида первым элюирующим буфером для получения первого элюированного образца, причем загруженный образец не содержит органического растворителя;

загрузку первого элюированного образца на хроматограф с ионным обменом и смешанным режимом и элюирование полипептида вторым элюирующим буфером, содержащим по меньшей мере 1М неорганической соли, для получения второго элюированного образца; и

загрузку второго элюированного образца на хроматограф с гидрофобным взаимодействием и элюирование полипептида третьим элюирующим буфером, содержащим по меньшей мере 2 мМ хлорида натрия,

с получением, тем самым, очищенного образца, содержащего полипептидный продукт.

2. Способ по п.1, в котором детергент содержит тритон X-100 (п-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фениловый эфир полиэтиленгликоля).

3. Способ по п.1 или 2, в котором первый элюирующий буфер содержит от 0,5 до 2М аргинина.

4. Способ по п.3, в котором первый элюирующий буфер обладает рН от около 5 до 5,4.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором хроматограф с ионным обменом и смешанным режимом включает хроматограф с керамическим гидроксипатитом типа I.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором второй элюирующий буфер содержит по меньшей мере 2М неорганической соли.

7. Способ по п.6, в котором неорганическая соль представляет собой хлорид натрия.

8. Способ по любому из пп.1-7, в котором хроматограф с гидрофобным взаимодействием включает хроматограф с октилсефарозой.

9. Способ по п.1, дополнительно включающий стадию очистки с помощью анионообменного хроматографа.

10. Способ по п.9, в котором анионообменный хроматограф содержит ионообменную мембрану Sartobind™.

11. Способ по любому из пп.1-10, дополнительно включающий фильтрацию одного или более образцов с помощью фильтра из нанофлиса.

12. Способ по п.11, в котором фильтрацию с помощью фильтра из нанофлиса проводят перед загрузкой образца на хроматограф для аффинной хроматографии на основе STI.

13. Способ по любому из пп.1-12, в котором очищенный образец содержит менее чем приблизительно 1% загрязняющих белков, неэкспрессированных полинуклеотидной конструкцией.

14. Способ по любому из пп.1-13, в котором полипептидный продукт экспрессируется в клетке, которая содержит полинуклеотидную конструкцию.

15. Способ по п.14, в котором клетку выращивают в среде в условиях с получением по меньшей мере 100 мг полипептидного продукта на 1 л среды.

16. Способ по п.15, в котором клетку выращивают в среде в условиях, подходящих для получения по меньшей мере 200 мг полипептидного продукта на 1 л среды.

17. Способ по п.15 или 16, в котором очищенный образец содержит более чем приблизительно 50% полипептидного продукта, продуцированного в среде.

18. Способ по п.15 или 16, в котором очищенный образец содержит более чем приблизительно 100 мг полипептидного продукта на каждый литр полученной среды.

19. Способ по любому из пп.1-18, в котором полипептидный продукт представляет собой двухцепочечный полипептид, содержащий легкую цепь и тяжелую цепь.

20. Способ по п.19, в котором приблизительно от 20 до 50% полипептидного продукта в очищенном образце содержит тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5.

21. Способ по п.20, в котором приблизительно 5-95% тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, содержит два O-связанных гликозилирования и приблизительно 5-95% тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, содержит одно O-связанное гликозилирование.

22. Способ по любому из пп.19-21, в котором приблизительно 40-80% полипептидного продукта в очищенном образце содержит тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

23. Способ по п.22, в котором по меньшей мере приблизительно 90% тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, содержит одно O-связанное гликозилирование.

24. Способ по любому из пп.19-23, в котором приблизительно 2-12% полипептидного продукта в очищенном образце содержит тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

25. Способ по любому из пп.19-24, в котором приблизительно 0,1-1,5% полипептидного продукта в очищенном образце содержит тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

26. Способ по любому из пп.19-25, в котором приблизительно 2-8% полипептидного продукта в очищенном образце содержит тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11.

27. Способ по любому из пп.19-26, в котором приблизительно 35-60% полипептидного продукта в очищенном образце содержит легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и полипептидную часть из двухцепочечных полипептидов, в которой

приблизительно 35-60% двухцепочечных полипептидов содержат легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4;

приблизительно 20-60% двухцепочечных полипептидов содержат тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5;

приблизительно 40-60% двухцепочечных полипептидов содержат тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и

менее чем 10% двухцепочечных полипептидов содержат тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

29. Фармацевтическая композиция по п.28, в которой менее чем 5% двухцепочечных полипептидов содержат тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

30. Фармацевтическая композиция по п.28, в которой менее чем 3% двухцепочечных полипептидов содержат тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

31. Фармацевтическая композиция по любому из пп.28-30, в которой приблизительно 0,1-1,5% двухцепочечных полипептидов содержат тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

32. Фармацевтическая композиция по любому из пп.28-31, в которой приблизительно 2-8% двухцепочечных полипептидов содержат тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11.

33. Фармацевтическая композиция по любому из пп.28-32, в которой приблизительно 30-70% тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, содержит два O-связанных гликозилирования.

34. Фармацевтическая композиция по любому из пп.28-33, в которой приблизительно 30-70% тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, содержит одно O-связанное гликозилирование.

35. Фармацевтическая композиция по любому из пп.28-34, в которой по меньшей мере приблизительно 90% тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, содержит одно O-связанное гликозилирование.

36. Фармацевтическая композиция по любому из пп.28-35, в которой препарат лиофилизирован.

37. Фармацевтическая композиция по любому из пп.28-36, дополнительно содержащая L-аргинина HCl или L-аргинина ацетат.

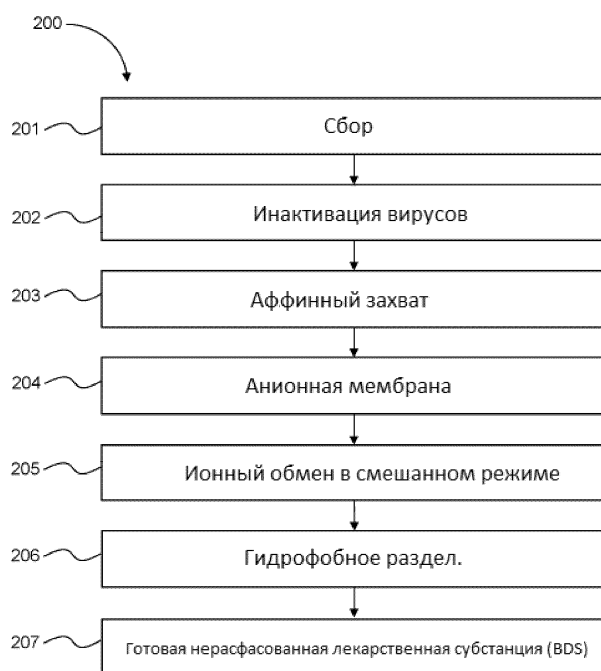
38. Фармацевтическая композиция по любому из пп.28-37, дополнительно содержащая сахарозу.

39. Фармацевтическая композиция по любому из пп.28-38, дополнительно содержащая маннит.

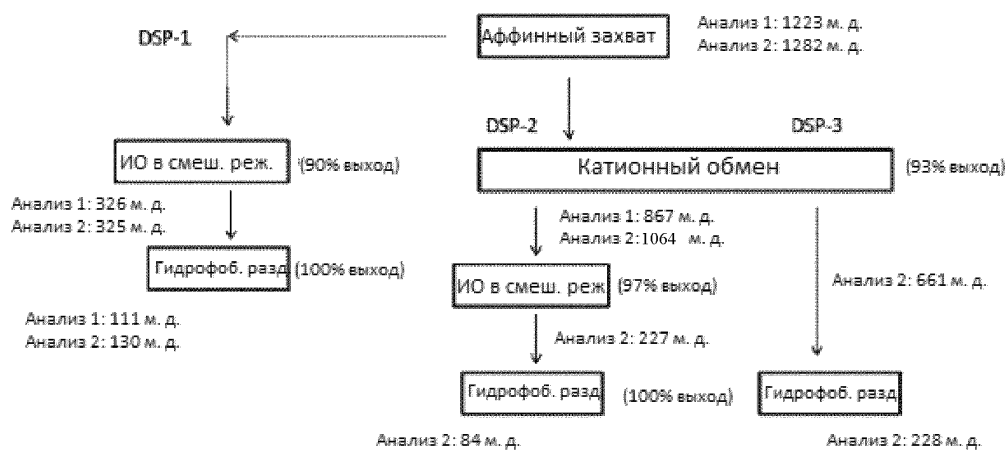
40. Способ нейтрализации или ингибирования состояния антикоагуляции у пациента, подвергающегося антикоагуляционному лечению ингибитором фактора Ха, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по любому из пп.28-39.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

