

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038482**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.09.03

(51) Int. Cl. *C12N 1/14* (2006.01)

(21) Номер заявки
201700217

(22) Дата подачи заявки
2015.10.19

(54) СПОСОБ ОЧИСТКИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И КОММЕРЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ ТНК-тРА (ТЕНЕКТЕПЛАЗЫ)

(31) 2343/MUM/2014

(32) 2014.10.21

(33) IN

(43) 2017.10.31

(86) PCT/IN2015/050137

(87) WO 2016/063299 2016.04.28

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ГЕННОВА
БИОФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
ЛИМИТЕД (IN)**

(72) Изобретатель:

**Рагхуванши Арджун, Сингх Кумар
Шраван, Кумар Анкит, Саху Ранджан
Михир, Сингх Санджай (IN)**

(74) Представитель:

Вашина Г.М. (RU)

(56) BEHROUZ R.: "Intravenous tenecteplase in acute ischemic stroke: an updated review", Journal of Neurology, vol. 261, no. 6, June 2014, pages:1069-72. doi: 10.1007/s00415-013-7102-0. Epub 2013. Whole document, particularly abstract

WO-A1-2011015922

1807/MUM/2006 A (GENNOVA BIOPHARMACEUTICALS LTD.) July 18, 2008, pages 14, 15 and example 3

SANCHEZ et al.: "Design of a recombinant tissue plasminogen activator production plant", Biotechnology Final Project, 2013, Universitat, Autonomoa de Barcelona. Whole document

3516/MUM/2010 A (GENNOVA BIOPHARMACEUTICALS LTD.) June 28, 2013, pages 9-10, 15-16

STABY et al.: "Comparison of chromatographic ion-exchange resins V. Strong and weak cation-exchange resins", Journal of Chromatography. A, vol. 1118, no. 2, June 2006, pages: 168-79. Epub 2006 May 5. Whole document

(57) Настоящее изобретение относится к способу выделения и очистки тканевого активатора плазминогена и его вариантов, в частности ТНК-тРА, из клеток CHO и описывает промышленно применимый, простой, экономически эффективный, надежный и высокоэффективный способ очистки ТНК-тРА.

B1

038482

**038482
B1**

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к новому способу выделения, очистки и производства тканевого активатора плазминогена (ТНК-tPA) из клеток млекопитающих, в частности из клеток яичника китайского хомячка (СНО).

Уровень техники

Тенектеплаза (ТНК-tPA) представляет собой рекомбинантный гликопротеин семейства сериновых протеаз с заменой шести аминокислот в нативном тканевом активаторе плазминогена человека (t-PA), с 17 дисульфидными мостиками и молекулярной массой ~67 кДа. При разработке ТНК-tPA модификации, внесенные в нативный t-PA, включают замену как треонина 103 на аспарагин, так и замену аспарагина 117 на глутамин внутри крингла-домена 1, и замену лизина, гистидина и двух аргининов на четыре аланина в положениях 296-299 в протеазном домене, чтобы сделать полученный белок высокоспецифичным по отношению к фибрину с более длительным периодом полувыведения из плазмы и 80% пониженной восприимчивостью к деградации посредством ингибитора активатора плазминогена-1 (ИАП-1) по сравнению с нативным t-PA.

ТНК в ТНК-tPA относится к сайтам молекулы t-PA, которые были модифицированы, т.е. T103; N117; и KHRR 296-299. Вышеупомянутые модификации ТНК-tPA обуславливают ее применение в качестве улучшенного терапевтического средства для лечения острого инфаркта миокарда, которое обладает лучшим терапевтическим восприятием, поскольку большая специфичность к фибрину позволяет быстрее и полностью растворить тромб с уменьшенными осложнениями, связанными с кровотечением, и длительный период полувыведения позволяют осуществлять единое болюсное введение с меньшим системным фибринолизом и меньшими осложнениями, связанными с кровотечением от предыдущих тромболитиков.

Механизм ТНК-tPA инициируется связыванием ТНК-tPA с фибриновым компонентом тромба (кровенным сгустком), которая избирательно превращает неактивный плазминоген в плазмин и, следовательно, полученный плазмин разрушает матрицу тромба в окклюзированной артерии при сохранении фибриногена и минимизации системной активации плазминогена за счет ее высокой специфичности.

Преимущества ТНК-tPA у пациентов с инфарктом миокарда и обнадеживающие результаты исследований на животных в контексте острого ишемического инсульта (ОИИ) показали, что ТНК-tPA может оказаться более безопасной и более эффективной терапией, чем альтеплаза, единственный препарат, утвержденный USFDA для ОИИ. За последние несколько лет в нескольких клинических исследованиях оценивали использование ТНК-tPA при ОИИ и доказали, что ТНК-tPA обладает лучшим фармакологическим профилем, чем альтеплаза, а также есть основание предполагать, что она может быть эффективным и безопасным терапевтическим вариантом при лечении ОИИ у пациентов, обращающихся за помощью в течение 4,5 ч после появления симптома. Недавно ТНК-tPA была рассмотрена для лечения пациентов с легочной эмболией, и несколько клинических исследований продемонстрировали многообещающие результаты. В настоящее время проводится большое количество клинических исследований для оценки полной однозначной картины ТНК-tPA по нескольким показаниям.

В последние несколько лет разработка и производство рекомбинантных гликопротеинов осуществлялась с помощью биореакторов с однократной загрузкой, периодической загрузкой, полупериодической загрузкой и перфузионных биореакторов, и очистка данных белков в основном осуществлялась с помощью адсорбции и ионообменной хроматографии.

Из известного уровня техники определенные протоколы очистки известны для t-PA и его вариантов, например очистка с помощью иммуоаффинности (поликлональное антитело к козьему tPA), ионный обмен, осаждение этанолом, хроматография с обращенной фазой, хроматография на диоксиде кремния или анионообменная хроматография, такая как с использованием диэтиламиноэтила, осаждение сульфатом аммония, сефадексом-G-75 и т.д.

Некоторые из методик очистки ТНК t-PA, перечисленные в известном уровне техники, включают WO 2011/015922, где описан способ очистки, в котором используются серии стадий ионообменной хроматографии, стадий иммуоаффинной хроматографии и ультрафильтрации/диафильтрации для очистки ТНК-tPA. В WO 2012/066569 А описан способ очистки, в первую очередь направленный на использование хроматографии с гидрофобным взаимодействием.

Используемая в известном уровне техники иммуоаффинная хроматография не является подходящим методом для коммерческого производства ТНК-tPA. Это не только может вызвать много регуляторных затруднений, но и стоимость среды для иммуоаффинной хроматографии также является очень высокой по сравнению с обычными матрицами для хроматографии из-за использования в ней моноклональных антител для приготовления. Для хроматографии с гидрофобным взаимодействием, описанной в известном уровне техники, для очистки ТНК-tPA используется изопропиловый спирт (ИПС), который является органическим растворителем и известен тем, что индуцирует агрегацию и денатурацию белков, и может рассматриваться как один из недостатков известного уровня техники. ТНК-tPA является чрезвычайно нестабильной молекулой, поэтому следует избегать использования ИПС в способе очистки, так как это может привести к денатурации белка. Кроме того, использование больших объемов ИПС в промышленных масштабах требует повторного использования ИПС, что в свою очередь требует дополнительного потребления энергии и дополнительных инвестиций, таких как установка для рекуперации ле-

тучих растворителей.

Поэтому ни один из вышеупомянутых способов не способен обеспечить эффективное, масштабируемое и надежное решение для очистки, которое может последовательно производить лекарственную субстанцию TNK-tPA в коммерческом масштабе, отвечая всем необходимым требованиям.

Следовательно, существует потребность в эффективном и коммерчески выгодном способе очистки TNK-tPA.

Задачей настоящего изобретения является разработка эффективного, надежного, масштабируемого и коммерчески успешного способа очистки для производства TNK-tPA с итоговым выходом не менее 60% и чистотой более 95 %, как определено с помощью эксклюзионной хроматографии.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к новому способу выделения и очистки тканевого активатора плазминогена и его вариантов, в частности TNK-tPA из клеток CHO, и описывает промышленно применимый, простой, экономически эффективный, надежный и высокоэффективный способ очистки TNK-tPA.

Способ выделения и очистки TNK-tPA по настоящему изобретению включает стадии, на которых:

(i) подвергают бесклеточный материал, полученный из культуры клеток CHO, аффинной хроматографии с захватом TNK-tPA и получают элюат, содержащий частично очищенный TNK-tPA;

(ii) подвергают элюатиз стадии (i) аффинной хроматографии для дополнительной очистки TNK-tPA и получения элюата, содержащего в основном TNK-tPA;

(iii) осуществляют вирусную инактивацию элюата из стадии (ii) для получения образца с инактивированным вирусом;

(iv) подвергают образец с инактивированным вирусом из стадии (iii) дополнительной аффинной хроматографии для дополнительной очистки с получением элюата, содержащего преимущественно высокоочищенный TNK-tPA;

(v) подвергают элюатиз стадии (iv) катионообменной хроматографии с получением элюата, содержащего высокоочищенный препарат TNK-tPA;

(vi) подвергают элюатиз стадии (v) фильтрации вируса для удаления присутствующего вируса;

(vii) концентрируют образец из стадии (vi) с получением TNK-tPA;

причем выход способа составляет более 60% и чистота полученного TNK-tPA составляет более 95%, как измерено с помощью эксклюзионной хроматографии.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 изображена хроматограмма аффинной-I очистки, где первый пик представляет собой примеси, а второй пик соответствует элюату, содержащему TNK-tPA.

На фиг. 2 изображен профиль ДНС-ПААГ (окрашенного серебром) аффинной-I очистки, где треки 5, 6 и 7 демонстрируют промывные фракции (1, 2 и 3 соответственно), а трек № 9 соответствует элюату, содержащему TNK-tPA.

На фиг. 3 изображена хроматограмма аффинной-II очистки, пик УФ 280, соответствующий элюату, содержащему TNK-tPA.

На фиг. 4 изображен профиль ДНС-ПААГ (окрашенного серебром) аффинной-II очистки, где трек № 9 соответствует элюату, содержащему TNK-tPA.

На фиг. 5 изображена хроматограмма аффинной-III очистки, пик УФ 280 (первый) соответствует элюату, содержащему TNK-tPA.

На фиг. 6 изображен профиль ДНС-ПААГ (окрашенного серебром) аффинной-III очистки, где трек № 9 соответствует элюату, содержащему TNK-tPA.

На фиг. 7 изображена хроматограмма катионообменной очистки, пик УФ 280 соответствует элюату, содержащему TNK-tPA.

На фиг. 8 изображен профиль ДНС-ПААГ (окрашенного серебром) катионообменной очистки, где трек № 5 соответствует элюату, содержащему TNK-tPA.

На фиг. 9 изображено сравнение профиля восстанавливающего ДНС-ПААГ (окрашенного серебром) лекарственной субстанции, полученной после очистки, с использованием стадий, описанных в настоящем изобретении, и инновационного продукта (Метализе).

На фиг. 10 изображено сравнение профиля невосстанавливающего ДНС-ПААГ (окрашенного серебром) лекарственной субстанции, полученной после очистки, с использованием стадий, описанных в настоящем изобретении, и инновационного продукта (Метализе).

На фиг. 11 изображена пептидная карта, хроматограмма лекарственной субстанции, полученная после очистки с использованием стадии, описанной в настоящем изобретении, напоминает инновационный продукт (Метализе).

На фиг. 12 изображен иммунный блоттинг лекарственной субстанции, полученный после очистки с использованием стадий, описанных в настоящем изобретении, напоминает инновационный продукт (Метализе).

На фиг. 13 изображена гетерогенная кривая проскока аффинной-I очистки (BlueSepharose FF) в периодическом режиме.

На фиг. 14 изображены хроматограммы прогонки ППХ в течение двух циклов для (a) колонки А - первая колонка в зоне загрузки; (b) колонки В - вторая колонка в зоне загрузки; (c) колонки С - третья

колонка в зоне загрузки; (d) хроматограммы колонок, наложенные друг на друга, показывающие полный прогон РСС. УФ измерялся при 280 нм. Прогонка выполнялась на ХК 16-5 мл BlueSepharoseFastFlow.

На фиг. 15 изображена хроматограмма из первой колонки (колонки А), перегрузка и улавливание в колонке В, УФ измерялся при 280 нм. Прогонка выполнялась на ХК 16-5 мл BlueSepharoseFastFlow.

На фиг. 16 изображена хроматограмма из третьей колонки (колонки С), показывающая все промывки после загрузки. Влияние стадий промывки обозначаются как: А - промывка 1, В - промывка 2, С - промывка 3, D - элюирование, Е - регенерация 1, F - регенерация 2, G - регенерация 3, H - регенерация 4. УФ измеряется при 280 нм. Прогонка выполнялась на ХК 16-5 мл BlueSepharoseFastFlow.

Подробное описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к новому способу выделения и очистки тканевого активатора плазминогена и его вариантов, в частности TNK-tPA. Свободный от клеток сбор получают из клеток, культивируемых в биореакторах. Список обозначений и сокращений, используемых в описании настоящего изобретения, приведен в табл. А ниже.

Таблица А. Список обозначений и сокращений

tPA	Активатор тканевого плазминогена
СНО	Яичник китайского хомячка
кДа	Кило Дальтон
ИАП	Ингибитор активатора плазминогена
ОИИ	Острый ишемический инсульт
ДНС ПААГ	Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия
ИПС	Изопропиловый спирт
КГА	Керамический гидроксипатит
FF (БП)	FastFlow (быстрый поток)
мМ	Миллимолярный
МТК	Метотрексат
ЭАКК	Эпсилон-аминокапроновая кислота

МЭС-гидрат	Гидрат 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоты
ТПФ	Тангенциальная поточная фильтрация
УФ	Ультрафильтрация
ДФ	Диафильтрация
ПЭС	Полиэфирсульфон
ПВДФ	Поливинилиденфторид
μ (мк)	Микрон или микрометр
КВЛМ	Ксенотропный вирус лейкемии мышей
ВБА	Вирус болезни Ауески
Рео-3	Реовирус типа 3
МВМ	Мелкий вирус мышей
ОК	Объем колонки
ЕДС	Емкость динамического связывания
БКХ	Белок клетки-хозяина
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ДКХ	ДНК клетки-хозяина
Эксклюзионная ВЭЖХ	Эксклюзионная хроматография
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ЛАМ	Лизат амебоцитов мечехвоста
УФ	Ультрафиолет
ХСР	Хроматография со смешанным режимом

Настоящее изобретение относится к способу выделения и очистки тканевого активатора плазминогена и его вариантов, в частности TNK-tPA из клеток CHO, и описывает промышленно применимый, простой, экономически эффективный, надежный и высокоэффективный способ очистки TNK-tPA.

Способ выделения и очистки TNK-tPA по настоящему изобретению включает стадии, на которых

(i) подвергают бесклеточный материал, полученный из культуры клеток CHO, аффинной хроматографии с захватом TNK-tPA и получают элюат, содержащий частично очищенный TNK-tPA;

(ii) подвергают элюатиз стадии (i) аффинной хроматографии для дополнительной очистки TNK-tPA и получения элюата, содержащего в основном TNK-tPA;

(iii) осуществляют вирусную инактивацию элюата из стадии (ii) для получения образца с инактивированным вирусом;

(iv) подвергают образец с инактивированным вирусом из стадии (iii) дополнительной аффинной хроматографии для дополнительной очистки с получением элюата, содержащего преимущественно высокоочищенный TNK-tPA;

(v) подвергают элюат из стадии (iv) катионообменной хроматографии с получением элюата, содержащего высокоочищенный препарат TNK-tPA;

(vi) подвергают элюат из стадии (v) фильтрации вируса для удаления присутствующего вируса;

(vii) концентрируют образец из стадии (vi) с получением TNK-tPA;

причем выход способа составляет более 60%, и чистота полученного TNK-tPA составляет более 95%, как измерено с помощью эксклюзионной хроматографии.

Способ по настоящему изобретению может быть объяснен с помощью описания следующих стадий.

(i) Подвержение бесклеточного материала, полученного из культуры клеток CHO, аффинной хроматографии с захватом TNK-tPA и получения элюата, содержащего частично очищенный TNK-tPA.

Свободный от клеток сбор, содержащий TNK-tPA, может быть получен из ферментационной сис-

темы на основе перфузионной технологии с помощью клеток СНО. Сбор, содержащий TNK-tPA, может быть отфильтрован с помощью фильтра 0,2 мкм, собран в стерильные контейнеры и сохранен при 2-8°C до дальнейшего использования. Свободный от клеток сбор, содержащий TNK-tPA, подвергают аффинной хроматографии. Неподвижная фаза аффинной хроматографии может быть выбрана из группы, содержащей BlueSepharose 6 FastFlow, LysineHyper D, керамический гидроксипатит (КГА), предпочтительно неподвижная фаза представляет собой BlueSepharose 6 FF. Колонка может быть уравновешена с использованием буфера, содержащего фосфатный буфер, хлорид натрия и полисорбат 20 или их смеси. Элюирующий буфер или подвижная фаза, используемая для стадии улавливания (аффинная хроматография), может быть выбрана индивидуально или в комбинации из фосфатного буфера, мочевины и хлорида натрия. Более предпочтительно элюирующий буфер или подвижную фазу используют в комбинации. Концентрация фосфата натрия в используемом буфере предпочтительно составляет 20-50 мМ фосфата натрия, более предпочтительно 20-40 мМ. Концентрация хлорида натрия, используемого в буфере, составляет 1-2,5 М NaCl, более предпочтительно 1,5-2 М. Концентрация мочевины в буфере может находиться в диапазоне 1-4 М, предпочтительно в диапазоне 2-3 М. pH элюирующего буфера или подвижной фазы может поддерживаться в диапазоне 7-8, предпочтительно в диапазоне 7-7,6, более предпочтительно в диапазоне 7,2-7,4.

Удаление белков клетки-хозяина из продуктов, продуцируемых в клетках млекопитающих, всегда является трудной задачей. В настоящем изобретении стадия, оптимизированная как улавливающая хроматография, селективно удаляет белки клетки-хозяина в объеме от 0,8 до 1,5 log, более специфически 1,0 log, что помогает в достижении конечной концентрации БКХ в очищенном препарате TNK-tPA ниже 100 м.д.

Удаляются не только белки клетки-хозяина (БКХ), но и эффективно удаляются связанные с способом примеси, такие как альбумин, гентамицин, метотрексат (МТК) и т.д., с помощью улавливающей хроматографии, описанной в настоящем изобретении.

(ii) Подвержение элюата из стадии (i) аффинной хроматографии для дополнительной очистки TNK-tPA для получения элюата, содержащего в основном TNK-tPA.

Элюатиз стадии (i) может быть подвергнут аффинной хроматографии. Материал неподвижной фазы или колонки может быть выбран из группы, содержащей BlueSepharose 6 FastFlow, LysineHyper D, керамический гидроксипатит (КГА) и т.д., предпочтительно неподвижная фаза представляет собой LysineHyper D. Уравновешивающий буфер, используемый для стадии аффинной хроматографии, может быть индивидуально или в комбинации выбран из фосфатного буфера, хлорида натрия и полисорбата. Более предпочтительно уравновешивающий буфер используют в комбинации.

Колонка может быть элюирована с помощью элюирующего буфера или подвижной фазы, выбранной из группы, содержащей индивидуально или в комбинации, выбранной из ацетата натрия, мочевины и эпсилон-аминокапроновой кислоты (ЭАКК). pH элюирующего буфера для аффинной хроматографии может быть в диапазоне pH 3,5-6, предпочтительно 4-5, более предпочтительно 4,5-5.

Матрица для хроматографии, используемая для промежуточной очистки, например стадии аффинной-II хроматографии, может быть выбрана из группы, содержащей BlueSepharose 6 FastFlow, LysineHyper D и керамический гидроксипатит (КГА), предпочтительно неподвижная фаза представляет собой LysineHyper D.

Элюирующий буфер, используемый на стадии аффинной хроматографии, может быть 5-25 мМ ацетатом натрия, 1-4 М мочевиной, 0,1-0,4 М ЭАКК, имеющим pH 4,0-5,0. Концентрация ацетата натрия в элюирующем буфере составляет 5-25 мМ, предпочтительно в диапазоне 5-15 мМ. Концентрация ЭАКК в буфере составляет 0,1-0,4 мМ, предпочтительно в диапазоне 0,1-0,2 М. Концентрация мочевины составляет 1-4 М в буфере, предпочтительно в диапазоне 2-3 М.

Достоинство элюирующего буфера при использовании ЭАКК при кислотном pH на этой стадии заключается в обеспечении наиболее подходящего состояния. Предлагаемый в настоящем изобретении способ является наиболее подходящим для вирусной инактивации и снижает обработку и расход материала в несколько раз. С помощью аффинной хроматографии, используемой в настоящем изобретении, приблизительно достигается 2-4-кратное логарифмическое очищение от вируса и 1-1,5-кратное логарифмическое уменьшение белков клетки-хозяина (БКХ). В среднем с помощью аффинной хроматографии, используемой в настоящем изобретении, достигается 1,69-кратное логарифмическое уменьшение КВЛМ и 4,30-кратное логарифмическое уменьшение ВБА.

(iii) Вирусная инактивация элюата из стадии (ii) для получения образца с инактивированным вирусом.

Вирусная инактивация элюата, полученного на стадии (ii), может быть проведена любым способом, таким как термическая обработка (пастеризация, лиофилизация/сухое тепло), облучение, ультрафиолет (УФ), высокое гидростатическое давление, инкубация с низким pH, обработка растворителем/детергентом. Химическую инактивацию или вирусную инактивацию осуществляют путем обработки образца химическим веществом, выбранным из группы, содержащей холат натрия, тритон, бета-пропиолактон, три-(н-бутил)фосфат (ТНБФ) и каприлат натрия, предпочтительно обработку образца осуществляют каприлатом натрия при низком pH в присутствии мочевины. Концентрация химического вещества/детергента находится в диапазоне от 0,001 до 0,10% (мас./об.), предпочтительно от 0,01 до 0,07% (мас./об.), более предпочтительно 0,05%. Концентрация мочевины используется в диапазоне от 1

до 4 М, предпочтительно 2-3 М. Инактивацию вируса можно также проводить путем инкубации образца в течение 40-180 мин, более предпочтительно в течение 40-80 мин, в температурном диапазоне 15-45°C, более предпочтительно в диапазоне 20-30°C.

Как правило, низкий уровень pH является наиболее широко используемым способом инактивации вируса в способах очистки. Известно, что низкий уровень pH способен инактивировать вирусы с оболочкой, но он не может инактивировать высокорезистентные вирусы без оболочки. pH находится в диапазоне от 4,0 до 4,7, более предпочтительно в диапазоне от 4,3 до 4,7.

Состав буфера для вирусной инактивации, описанный в настоящем изобретении, оптимизирован таким образом, что он может эффективно инактивировать как вирусы с оболочкой, так и вирусы без оболочки. Использование химических веществ/детергентов, мочевины, ЭАКК и низкого pH по настоящему изобретению делают условия смертельными для вирусов с оболочкой и вирусов без оболочки и делают данную комбинацию оптимальным выбором для инактивации высокорезистентных вирусов. В среднем 5,65-кратное логарифмическое уменьшение КВЛМ и 5,38-кратное логарифмическое уменьшение ВБА достигаются за счет низкого pH и химической инактивации по настоящему изобретению.

(iv) Подвержение образца с инактивированным вирусом из стадии (iii) дополнительной аффинной хроматографии для получения элюата, содержащего TNK-tPA.

Образец с инактивированным вирусом из стадии (iii) может быть подвергнут дополнительной аффинной хроматографии. Неподвижная фаза или материал колонки для аффинной хроматографии может быть выбрана из группы, содержащей BlueSepharose 6 FastFlow, LysineHyper D, керамический гидроксипатит (КГА) и т.д., предпочтительно используемая неподвижная фаза или матрица для хроматографии представляет собой керамический гидроксипатит (КГА). Неподвижная фаза или колонка могут быть элюированы подвижной фазой или буфером, выбранным из группы, содержащей индивидуально или в комбинации, выбранной из фосфатного буфера, гидрата 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоты (МЭС-гидрат), хлорида натрия и мочевины. pH элюирующего буфера для аффинной хроматографии может быть в диапазоне pH 6-9, предпочтительно 6-8, более предпочтительно 6-7.

Подвижная фаза или элюирующий буфер, используемый на стадии аффинной хроматографии, может представлять собой 5-50 mM фосфатный буфер, предпочтительно в диапазоне 5-15 mM. Концентрация используемой в буфере мочевины составляет 1-4 М, предпочтительно в диапазоне 1-3 М. Концентрация используемого в буфере МЭС-гидрата может составлять 2-20 mM. Элюирование может осуществляться путем увеличения концентрации соли. Соль этого элюирования может быть выбрана из группы, состоящей из хлорида калия, хлорида натрия, фосфата натрия и сульфата аммония, предпочтительно соль представляет собой хлорид натрия, и концентрация хлорида натрия находится в диапазоне 0,1-1,0 М. Тип элюирования может быть линейным, ступенчатым или комбинацией обоих, предпочтительно используемое элюирование является линейным градиентом соли.

Аффинная хроматография (многовариантная хроматография), используемая в настоящем изобретении, предназначена для удаления следов примесей, в частности ДНК клетки-хозяина (ДКХ), белков клетки-хозяина (БКХ) и вирусных примесей, если они есть. С помощью аффинной-III хроматографии, упомянутой в настоящем изобретении, приблизительно достигается 2-4-кратное логарифмическое очищение от вируса и 0,5-1-кратное логарифмическое уменьшение БКХ. В среднем с помощью аффинной хроматографии, используемой в настоящем изобретении, достигается 4,23-кратное логарифмическое уменьшение КВЛМ, 4,06-кратное логарифмическое уменьшение ВБА, 3,73-кратное логарифмическое уменьшение Рео-3 и 2,97-кратное логарифмическое уменьшение МВМ.

(v) Подвержение элюата из стадии (iv) катионообменной хроматографии с получением элюата, содержащего высокоочищенный препарат TNK-tPA в рецептурном буфере.

Катионообменная хроматография элюата из стадии (iv) может быть осуществлена с использованием матрицы или неподвижной фазы, выбранной из группы, содержащей Fractogel SO₃, Fractogel SE Hicap, SP Sepharose FF, CM Sepharose FF и т.д., предпочтительно используемая матрица для хроматографии или неподвижная фаза представляет собой Fractogel SO₃. Уравновешивающий буфер, используемый в катионообменной хроматографии, может быть индивидуально или в комбинации выбран из группы, содержащей фосфатный буфер, мочевины, МЭС и хлорид натрия, предпочтительно буфер для уравновешивания используется в комбинации.

Элюирующий буфер или подвижная фаза, применяемая при катионообменной хроматографии, может быть индивидуально или в комбинации выбрана из L-аргинина, O-фосфорной кислоты и полисорбата-20, предпочтительно элюирующий буфер используется в комбинации или смеси. Подвижная фаза или элюирующий буфер, используемый в катионообменной хроматографии, содержит L-аргинин, присутствующий в диапазоне от 10 до 350 mM, предпочтительно в диапазоне от 250 до 350 mM, O-оксифосфорную кислоту в диапазоне от 0,5 до 1%, предпочтительно в диапазоне от 0,6 до 0,8% и полисорбат-20 в диапазоне от 0,01-0,05%, предпочтительно в диапазоне от 0,04 до 0,05%. pH элюирующего буфера или подвижной фазы для катионообменной хроматографии может быть в диапазоне от 7,0 до 7,5, предпочтительно в диапазоне 7,3-7,5.

Как правило, ионообменная хроматография используется в качестве улавливающей, промежуточной и заключительной хроматографической очистки для удаления неочищенной массы препарата (балка)

или следов примесей. В настоящем изобретении катионообменная хроматография используется несколько иначе, чем она обычно используется. В данном контексте элюат из предыдущей хроматографии непосредственно загружают на катионообменную хроматографию для получения высокоочищенного препарата TNK-tPA в окончательном рецептурном буфере, содержащем аргинин, ортофосфорную кислоту и полисорбат 20. Целесообразность использования катионообменной хроматографии иным способом заключается в том, что замена буфера и одновременная концентрация и очистка достигаются в одной стадии. В известном уровне техники такие методы как гель-фильтрационная хроматография и диафильтрация с использованием тангенциальной поточной фильтрации (ТПФ) применяют для замены буфера. Эти методы эффективны и наиболее часто используются для замены буфера, но не могут дополнительно очищать целевой белок. В связи с тем, что при гель-фильтрационной хроматографии можно загружать максимум 30% образца от объема колонки, требуется больший размер колонок по сравнению с ионообменной хроматографией. Гель-фильтрационная хроматография также вызывает разбавление целевого белка во время замены буфера, что также требует некоторой дополнительной стадии концентрации, такой как ТПФ. Замена буфера с использованием диафильтрации также невозможна, когда объемы, подлежащие замене являются большими, поскольку для этого требуется очень большой объем буфера и требуется большой размер блока ультрафильтрации/диафильтрации. Принимая во внимание вышеупомянутые ограничения традиционных методов замены буфера, катионообменная хроматография, описанная в настоящем изобретении, способна обеспечить стадию замены буфера и также способствует дополнительной очистке. Можно достичь фактора снижения вирусной нагрузки, составляющего 1,21-кратное логарифмическое уменьшение для вирусов без оболочки, например МВМ с использованием ионообменной хроматографии по настоящему изобретению.

(vi) Подвержение элюата из стадии (y) фильтрации вируса для удаления присутствующего вируса.

Фильтрация вируса может быть выполнена после стадии аффинной хроматографии, катионообменной хроматографии и тангенциальной поточной фильтрации, более предпочтительно стадия фильтрации вируса осуществляется после катионообменной хроматографии. Размер нанофильтра, выбранного для данной стадии, может составлять 15 нм, 20 нм и выше. Предпочтительно размер нанофильтра составляет 15-20 нм. Используемый нанофильтр может быть из целлюлозы, ПЭС, ПВДФ и т.д. Более предпочтительным фильтром является ПЭС.

Фильтрация, выполняемая после фильтрации вируса, может быть выбрана из микрофильтрации, ультрафильтрации, нанофильтрации, макрофильтрации, тангенциальной поточной фильтрации и т.д. Более предпочтительно фильтрация представляет собой тангенциальную поточную фильтрацию. В среднем с помощью фильтрации для снижения вирусной нагрузки, используемой в настоящем изобретении, достигается 4,15-кратное логарифмическое уменьшение КВЛМ, 3,40-кратное логарифмическое уменьшение ВБА, 4,41-кратное логарифмическое уменьшение рео-3 и 4,76-кратное логарифмическое уменьшение МВМ.

Общий способ выделения и очистки продукта обеспечивает более чем 15-кратное логарифмическое уменьшение КВЛМ, более чем 17-кратное логарифмическое уменьшение ВБА, более чем 8-кратное логарифмическое уменьшение рео-3 и более чем 8-кратное логарифмическое уменьшение МВМ.

Наиболее вероятным загрязнителем в способе очистки TNK t-PA является ретровирус, полученный из клеток СНО, и КВЛМ представляет собой недефектный ретровирус С типа для клеток СНО, и более чем 15-кратное логарифмическое уменьшение, полученное для КВЛМ, считается наиболее существенным и дает высокую гарантию с точки зрения вирусной безопасности.

(vii) Концентрирование образца, полученного на стадии (vi), для получения TNK-tPA.

Фильтрат, полученный на стадии (vii), подвергают методу фильтрации, выбранному из группы, содержащей микрофильтрацию, ультрафильтрацию, нанофильтрацию, микрофильтрацию и тангенциальную поточную фильтрацию, предпочтительно тангенциальную поточную фильтрацию. Ультрафильтрационная мембрана, выбранная для этой стадии, может иметь размер 5, 10, 30 или 50 кДа. Предпочтительно размер используемой ультрафильтрационной мембраны находится в диапазоне 5-30 кДа, более предпочтительно размер используемой ультрафильтрационной мембраны составляет 10 кДа. Используемая ультрафильтрационная мембрана может быть из целлюлозы, ПЭС, ПВДФ и т.д. Более предпочтительным фильтром является ПЭС. Концентрация ретентата TNK-tPA может находиться в диапазоне от $1,0 \pm 0,4$ до $7,0 \pm 0,4$ мг/мл. Более предпочтительно концентрация TNK-tPA может находиться в диапазоне от $1,0 \pm 0,4$ до $6,0 \pm 0,4$ мг/мл. Наиболее предпочтительно концентрация TNK-tPA составляет $5,5 \pm 0,4$ мг/мл.

Препарат TNK-tPA (тенектеплаза) может быть предпочтительно получен путем стерильной фильтрации ретентата ТПФ, используя 0,2 мкм стерилизующие фильтры, изготовленные из ПЭС, ПВДФ и целлюлозы. Более предпочтительно стерильный фильтр изготовлен из ПЭС.

Настоящее изобретение также раскрывает способ, в котором периодическая аффинная-1 хроматография также может проводиться в непрерывном режиме с использованием периодической противоточной хроматографии (ППХ). Использование ППХ обеспечивает дополнительное преимущество, например уменьшенное использование буфера, повышенную производительность, стабильный режим работы и лучший контроль способа.

Настоящее изобретение в пределах своего объема включает использование метода поточного кондиционирования для подготовки буфера и хроматографической загрузки с помощью технологической системы АКТА на основе пяти насосов с максимальной скоростью подвижной фазы 600 л/ч. Указанное действие может быть выполнено с помощью режима обратной связи по потоку или режима обратной связи по рН для контроля подготовки загрузки буфера и хроматографии на стадиях аффинной-I, II, III и ВЭЖХ хроматографии, как упомянуто в примерах-1-4.

Способ по настоящему изобретению приводит к получению очищенного продукта TNK-tPA с повышенным выходом и чистотой. Характеристики TNK-tPA, полученные с помощью способа по настоящему изобретению, подробно изложены в табл. В.

Таблица В. Результаты, относящиеся к качеству TNK-tPA

Серийный номер	Критическая характеристика качества	Качество очищенного белка TNK-tPA
1	Внешний вид	Прозрачная бесцветная или слегка желтоватая жидкость
2	рН	7,0 -7,6
3	Белок (мг/мл)	Не менее 5,0 мг/мл
4	ДНС ПААГ	Наблюдалось отсутствие дополнительного трека, кроме основного трека
5	Иммуноблоттинг	Идентифицируется с помощью специфического антитела и напоминает соответствующий стандарт
6	Биоактивность (Е/мг)	160 Е/мг - 240 Е/мг
7	Мономер (%)	Более 95 %
8	Содержание одиночной цепи (%)	Более 60 %
9	БКХ (м.д.)	Менее 100 м.д.
10	Сиаловая кислота (моль/моль ТРА)	2,9-5,7 моль/моль TNK-tPA
11	Нейтральный сахар (моль/моль ТРА)	10,5-13,5 моль/моль TNK-tPA
12	Содержание Тип I, Тип II	Тип-I 28-40 %, Тип-II 60-72 %
13	ДКХ	Менее 10 нг/доза
14	БЭТ (бактериальные эндотоксины)	< 1 ЭЕ/мг
15	N-концевая последовательность (первые 15 аминокислот)	Серин (S)-Тирозин (Y)-Глутамин (Q)-Валин (V)-Изолейцин (I)-Цистеин (C)-Аргинин (R)-Аспарагиновая кислота (D)-Глутаминовая кислота (E)-Лизин (K)-Треонин (T)-Глутамин (Q)-Метионин (M)-Изолейцин (I)-Тирозин (Y)
16	Осмоляльность	260-320 мОсм/кг
17	Содержание аргинина	50-60 мг/мл
18	Картирование пептида	Хроматограммапохожа на соответствующий стандарт
19	Спектр УФ (A _{макс})	280±2 нм

В одном варианте реализации изобретения способ по настоящему изобретению способен удалять или инактивировать вирусы как потенциальные адвентивные агенты, как оценивается с использованием способа очистки в уменьшенном масштабе. Высокие значения показателя очищения, полученные для КВЛМ, ВБА, рео-3 и МВМ, обеспечивают очень хорошую гарантию того, что любые случайные вирусы, которые не могут быть обнаружены или могут получить доступ к производственному способу, будут очищены/или инактивированы посредством высокоэффективного способа очистки, упомянутого в настоящем изобретении, и, таким образом, снижается общий риск для безопасности пациентов.

Помимо более высокой гарантии вирусной безопасности, вышеупомянутые улучшения способа очистки TNK-tPA также являются выгодными с точки зрения снижения вмешательства человека, снижения капитальных и эксплуатационных затрат для получения препарата TNK-tPA с высоким выходом.

В варианте реализации настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей ретентат TNK-tPA, полученный согласно способу по настоящему изобретению, в жидкой лекарственной форме для парентерального применения I.V с фармацевтически приемлемыми эксципиентами для острого инфаркта миокарда и острого ишемического инсульта.

В варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит

Компонент	Концентрация
Тенектеплаза	5 мг
Аргинин	55 мг
Полисорбат - 20	0,43 мг
Фосфорная кислота	17 мг
Вода для инъекций	q.s до 1,0 мл

В другом варианте реализации изобретения настоящее изобретение относится к применению выделенной и приготовленной TNK-tPA в жидкой лекарственной форме для парентерального применения I.V для острого инфаркта миокарда и острого ишемического инсульта.

Изобретение подробно описано ниже в данном документе в отношении следующих примеров, которые приведены только для иллюстрации и не предназначены для ограничения объема изобретения каким-либо образом. Любые варианты реализации изобретения, которые могут быть очевидными для специалиста в данной области техники, считаются входящими в объем настоящего изобретения.

Пример 1.

Свободный от клеток сбор, содержащий TNK-tPA, подвергают аффинной хроматографии в колонке, заполненной BlueSepharose FF. Перед загрузкой колонку уравнивают с помощью 5 колоночных объемов (КО) уравнивающего буфера. Загрузку не прекращают, пока колонка не достигнет насыщения. Емкость загрузки колонки определяется исходя из емкости динамического связывания (ЕДС) колонки, которая находится в диапазоне 1-2 мг/мл. После загрузки колонку промывают уравнивающим буфером до тех пор, пока слабосвязанные примеси, относящиеся к способу и продукту, не будут смыты во время уравнивающей промывки. Для дальнейшего удаления белков клетки-хозяина используют другой промывочный буфер, который состоит из мочевины, хлорида натрия, фосфата натрия и полисорбата 20.

После промывания колонки TNK-tPA элюируют, используя буфер для элюирования, содержащий 20-50 mM фосфат натрия, 1-2 M NaCl, 2-3 M мочевины и 0,04-0,1% полисорбат 20. Элюат аффинной-I хроматографии фильтруют с помощью фильтра 0,2 мкм. Образцы отбирают и анализируют с помощью ДНС ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, чтобы узнать профиль чистоты и одноцепочечное/двухцепочечное содержание. Специалисты в данной области техники могут понять важность одноцепочечного/двухцепочечного состава в конечной лекарственной субстанции TNK-tPA.

Настоящее изобретение является эффективным благодаря прямому улавливанию очищенного от примесей сбора без смешивания в больших смесительных емкостях.

Пример 2.

Элюат аффинной-I хроматографии разбавляют аффинным-II буфером для разведения или уравнивающим буфером для аффинной хроматографии, содержащим 20-50 mM фосфат натрия, 0,04-0,1% полисорбат 20 при pH 7,2 для снижения электропроводности до менее 15 мс/см. Разведенный образец очищают с использованием 0,2 мкм фильтра и загружают на аффинную-II хроматографию. Колонку промывают уравнивающим буфером, чтобы довести поглощение при УФ 280 до исходного уровня. Колонку дополнительно промывают для удаления примесей, связанных с способом и продуктом, с помощью буфера для промывки, содержащего 20-50 mM фосфат натрия, 1-3 M NaCl, 0,04-0,1% полисорбат 20 и pH 7,2. Очищенную TNK-tPA выделяют и элюируют из колонки с помощью пропускающего элюирующего буфера, состоящего из 5-25 mM ацетата натрия, 1-4 M мочевины, 0,1-0,4 M ЭАКК и pH 4,0-5,0. Все хроматографические образцы, включая загрузку, проточную фракцию, промывку и элюирование были проанализированы с использованием следующих аналитических методов.

ДНС ПААГ (в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях) для оценки чистоты и одноцепочечного/двухцепочечного содержания.

Эксклюзионная высокоэффективная хроматография (эксклюзионная ВЭЖХ) для оценки совокупного содержания.

Содержание TNK-tPA измеряли с помощью определения фибринолитической активности.

Общий белок по Бредфорду и УФ 280 нм.

Содержание БКХ с использованием ИФА (набор Cygnus третьего поколения).

Аффинная хроматография была оптимизирована для удаления примесей, связанных со способом и продуктом. Способ элюирования на этой стадии оптимизируют таким образом, что он дополняет стадию вирусной инактивации, и композицию с помощью состояния элюирующего буфера, например мочевины,

ЭАКК и низкого значения рН, оптимизируют для поточной вирусной инактивации. После стадии аффинной-II хроматографии приблизительно достигается 2-4-кратное логарифмическое очищение от вируса и 1,0-1,5-кратное логарифмическое уменьшение белков клетки-хозяина (БКХ).

Другим преимуществом является использование ЭАКК при кислом рН в аффинной хроматографии-II в элюирующем буфере вместо L-аргинина и ЭАКК при нейтральном рН. Это конкретное изменение на стадии очистки является ценным для снижения стоимости L-аргинина, а также обеспечивает оптимальное условие для вирусной инактивации. Следовательно можно утверждать, что та же самая стадия не только благоприятна для элюирования ТНК-tPA, но также и оптимальна для вирусной инактивации, что в свою очередь снижает трудоемкость и расход материала со временем.

Пример 3.

Элюат аффинной хроматографии подвергают воздействию низких рН и химической инактивации с использованием каприлата натрия. Смесь инкубируют при температуре от 20 до 25°C в течение 60 мин. На стадии вирусной инактивации используемый каприлат натрия находится в очень малом количестве, что устраняет необходимость в больших сосудах для смешивания. В известном уровне техники каприлат натрия применяли для инактивации вирусов до стадии улавливающей хроматографии, где объемы были сравнительно выше, поэтому количество каприлата натрия также было высоким. В настоящем изобретении каприлат натрия добавляют после вторых стадий хроматографии, когда объем, который нужно обрабатывать, является низким и, следовательно, требует меньшего количества каприлата натрия и намного меньшего сосуда для обработки. Кроме того, использование каприлата натрия при рН 4,5 по сравнению с нейтральным или щелочным значением рН обеспечивает более эффективную и надежную инактивацию вируса в данном способе.

После инактивации вируса раствор разбавляют с использованием фосфатного буфера для загрузки на аффинную хроматографию (хроматография со смешанным режимом) для удаления следов примесей, в частности ДКХ, БКХ и вирусных примесей, если они присутствуют. С помощью аффинной хроматографии приблизительно достигается 2-4-кратное логарифмическое очищение от вируса и 0,5-1-кратное очищение от БКХ. В известном уровне техники описан аналогичный керамический гидроксилпатит для очистки тканевого активатора плазминогена, но ни в одном из способов не описана способность удалять примеси, например БКХ, ДНК и вирусы. Важность удаления таких примесей проявляется в том, что количество данных примесей проверяется в конечном продукте (кроме вирусной нагрузки) и является частью требований нормативной документации к готовой лекарственной субстанции. Все хроматографические образцы, включая загрузку, проточную фракцию, промывку и элюирование, анализировали с использованием следующих аналитических методов.

ДНС ПААГ (в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях) для оценки чистоты и одноцепочечного/двухцепочечного содержания.

Эксклюзионная высокоэффективная хроматография (эксклюзионная ВЭЖХ) для оценки совокупного содержания.

Содержание ТНК-tPA измеряли с помощью анализа фибринолитической активности. Общий белок по Бредфорду и УФ280 нм.

Содержание БКХ с использованием ИФА (набор Cygnus третьего поколения).

Пример 4.

Элюат аффинной хроматографии без какого-либо кондиционирования напрямую загружают на катионообменную хроматографию для концентрации и замены буфера целевого белка. Катионообменная хроматография оптимизирована таким образом, что она позволяет избежать объемных этапов разбавления для кондиционирования реакционной смеси, и поэтому элюат из стадии аффинной-III хроматографии может быть прямо загружен на катионообменную хроматографию. ТНК-tPA выделяют из колонки с помощью пропускания элюирующего буфера, содержащего L-аргинин 55 мг/мл, ортофосфорную кислоту 17 мг/мл, полисорбат 20 0,43 мг/мл и рН 7,4. Элюат после катионообменной хроматографии подвергают фильтрации для снижения вирусной нагрузки и полученный фильтрат далее концентрируют с использованием системы тангенциальной поточной фильтрации (ТПФ) для достижения конечной концентрации лекарственной субстанции. Лекарственная субстанция, полученная в результате способа очистки по настоящему изобретению, тщательно анализируется согласно уровню техники и проверенным аналитическим процедурам, которые включают, но не ограничиваются ими, проверку идентичности и чистоты с помощью ДСН ПААГ, вестерн-блоттинг, анализ N-концевой последовательности и пептидной карты.

Определение БКХ с помощью ИФА.

Биоактивность ТНК-tPA измеряли с помощью определения фибринолитической активности.

Количественное определение ДНК клетки-хозяина с использованием кПЛР.

Определение количества эндотоксина с использованием LAL-теста.

Совокупное и одноцепочечное/двухцепочечное содержание с использованием эксклюзионной ВЭЖХ.

Содержание аргинина и осмоляльность.

Анализ сиаловой кислоты, нейтральных сахаров, гликоформ типа-I и типа-II.

Анализ связанных со способом примесей, например гентамицина, МТК, мочевины, каприлата на-

трия и ЭАКК, с использованием собственных разработанных методов.

После тщательного анализа и биофизического сравнения с инновационным продуктом можно сделать вывод, что продукт, очищенный согласно способу, описанному в настоящем изобретении, дает продукт TNK-tPA, который очень похож на инновационный продукт с общим выходом способа более 60%.

Пример 5.

Периодическая противоточная хроматография (ППХ) для стадии аффинной-I хроматографии была выполнена с супернатантом клеточной культуры, содержащим TNK-tPA из перфузионного биореактора. В периодическом режиме оценивали динамическую способность связывания для среды аффинной-I хроматографии, и на основе информации, полученной в результате анализа проскока, проводили ППХ на трех колонках ХК 16 - 5 мл BLUE SEPAPHROSE FF. Хроматографические буферные композиции сохраняли так же, как указано в примере 1.

Пример 6.

Способ приготовления жидкой смеси с контролируемым рН и ионной силой для требуемых буферов, разбавления и/или кондиционирования хроматографической загрузки с помощью технологической системы АКТА на основе пяти насосов с максимальной скоростью подвижной фазы 600 л/ч для выделения и очистки TNK-tPA. Жидкие смеси, приготовленные по вышеуказанному способу по определенным рецептурам, являются пригодными для очистки TNK-tPA на разных стадиях хроматографии, как указано в примерах-1-4.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ выделения и очистки TNK-tPA (тенектеплазы), включающий стадии, на которых:

(i) подвергают бесклеточный материал, полученный из культуры клеток CHO (клеток яичника китайского хомячка), аффинной хроматографии для захвата TNK-tPA и получают элюат, содержащий частично очищенный TNK-tPA,

причем аффинная хроматография включает Blue Sepharose 6 FF в качестве неподвижной фазы и подвижной фазы, при этом подвижная фаза представляет собой смесь натрий-фосфатного буфера, хлорида натрия и мочевины;

(ii) подвергают элюат из стадии (i) аффинной хроматографии для дополнительной очистки TNK-tPA и получают элюат, содержащий в основном TNK-tPA,

причем аффинная хроматография включает Lysine Hyper D в качестве неподвижной фазы и подвижной фазы и подвижная фаза представляет собой смесь натрий-ацетатного буфера, мочевины и эпислон аминокaproновой кислоты (ЭАКК);

(iii) осуществляют вирусную инактивацию элюата из стадии (ii) для получения образца с инактивированным вирусом, причем инактивацию вируса проводят с помощью химической инактивации при низком рН, при этом химическую инактивацию осуществляют путем обработки образца каприлатом натрия в присутствии мочевины;

(iv) подвергают образец с инактивированным вирусом из стадии (iii) дополнительной аффинной хроматографии-III для дополнительной очистки с получением элюата, содержащего преимущественно высокоочищенный TNK-tPA,

причем аффинная хроматография содержит керамический гидроксипатит (КГА) в качестве неподвижной фазы и подвижной фазы и подвижная фаза представляет собой смесь фосфатного буфера, гидрата (МЭС-гидрат) 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты, хлорида натрия и мочевины;

(v) подвергают элюат из стадии (iv) катионообменной хроматографии для получения элюата, содержащего высокоочищенный препарат TNK-tPA,

причем катионообменная хроматография содержит Fractogel SO₃ в качестве неподвижной фазы и подвижной фазы, при этом подвижная фаза представляет собой смесь L-аргинина, O-фосфорной кислоты и полисорбата-20;

(vi) подвергают элюат из стадии (v) вирус-редуцирующей фильтрации для удаления присутствующего вируса,

причем вирусная фильтрация проводится ПЭС с помощью нанофильтра, имеющего размер в диапазоне 15-20 нм;

(vii) концентрируют образец из стадии (vi) для получения TNK-tPA путем тангенциальной поточной фильтрации,

причем выход в соответствии со способом составляет более чем 60% и чистота полученного TNK-tPA составляет более чем 95% по методу измерения с помощью эксклюзионной хроматографии.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что чистота TNK-tPA составляет более 95% по методу эксклюзионной хроматографии, причем другими критическими характеристиками качества является то, что при проведении ДСН ПААГ отсутствует дополнительный трек, кроме основного трека, причем количество мономеров составляет более 95%, содержание одиночных цепей составляет более 60%, содержание БКХ составляет менее 100 м.д. и содержание ДКХ составляет менее 10 нг/доза.

3. Способ по п.1 стадии (i), отличающийся тем, что

концентрация фосфата натрия находится в диапазоне от 20 до 40 мМ, концентрация хлорида натрия находится в диапазоне от 1,5 до 2 М и концентрация мочевины находится в диапазоне от 2 до 3 М; и рН подвижной фазы находится в диапазоне от 7,2 до 7,4.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что аффинная хроматография обеспечивает 0,8-1,5 log уменьшение белков клетки-хозяина (БКХ).

5. Способ по п.1 стадии (ii), отличающийся тем, что концентрация ацетата натрия находится в диапазоне от 5 до 15 мМ, концентрация мочевины находится в диапазоне от 2 до 3 М и концентрация ЭАКК находится в диапазоне от 0,1 до 0,2 мМ; при этом рН подвижной фазы аффинной хроматографии находится в диапазоне от 4,5 до 5,0.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что результатом аффинной хроматографии является 1-1,5 log уменьшение белков в клетке-хозяина (БКХ) и 1-4 log уменьшение клиренса вируса,

при этом предпочтительно аффинная хроматография приводит к более чем 1,5 log уменьшению КВЛМ и более чем 4 log уменьшению ВБА.

7. Способ по п.1. стадии (iii), отличающийся тем, что концентрация каприлата натрия находится в диапазоне от 0,01 до 0,07% (мас./об.), предпочтительно в диапазоне от 0,05% (мас./об.);

при этом концентрация мочевины находится в диапазоне от 2 до 3 М;

при этом время выдержки образца составляет от 40 до 80 мин;

при температуре выдержки образца от 20 до 30°C.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что низкий рН и химическая инактивация приводят к более чем 5 log уменьшению КВЛМ и ВБА.

9. Способ по п.1 стадии (iv), отличающийся тем, что концентрация фосфатного буфера находится в диапазоне от 5 до 15 мМ, концентрация МЭС-гидрата находится в диапазоне от 2 до 20 мМ, концентрация мочевины находится в диапазоне от 1 до 3 М и концентрация хлорида натрия находится в диапазоне от 0,1 до 0,5 М;

при этом рН подвижной фазы находится в диапазоне от 6 до 9;

при этом тип элюирования аффинной хроматографии является линейным;

и соль по данному элюированию представляет собой хлорид натрия с концентрацией в диапазоне от 0,1 до 1,0 М.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что аффинная хроматография обеспечивает 0,5-1 log уменьшение белков клетки хозяина (БКХ) и 2-4 log клиренс вируса, или отличающийся тем, что аффинная хроматография приводит к более чем 4 log уменьшению КВЛМ и ВБА и более чем 3 log уменьшению МВМ и рео-3 вирусов.

11. Способ по п.1 стадии (v), отличающийся тем, что концентрация L-аргинина находится в диапазоне от 250 до 350 мМ, концентрация О-фосфорной кислоты находится в диапазоне от 0,6 до 0,8% и концентрация полисорбата-20 находится в диапазоне от 0,04 до 0,05%;

при этом рН подвижной фазы находится в диапазоне от 7,3 до 7,5.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что катионообменная хроматография приводит к клиренсу вируса с МВМ, составляющему более чем 1 log, и клиренсу вируса для белков клетки-хозяина (БКХ), составляющему более чем 0,5 log.

13. Способ по п.1 стадии (vi), отличающийся тем, что фильтрация вируса приводит к более чем 4 log уменьшению КВЛМ, более чем 3 log уменьшению ВБА, более чем 4 log уменьшению рео-3 и более чем 4,5 log уменьшению МВМ.

14. Способ по п.1 стадии (vii), отличающийся тем, что фильтр представляет собой ультрафильтрационную мембрану;

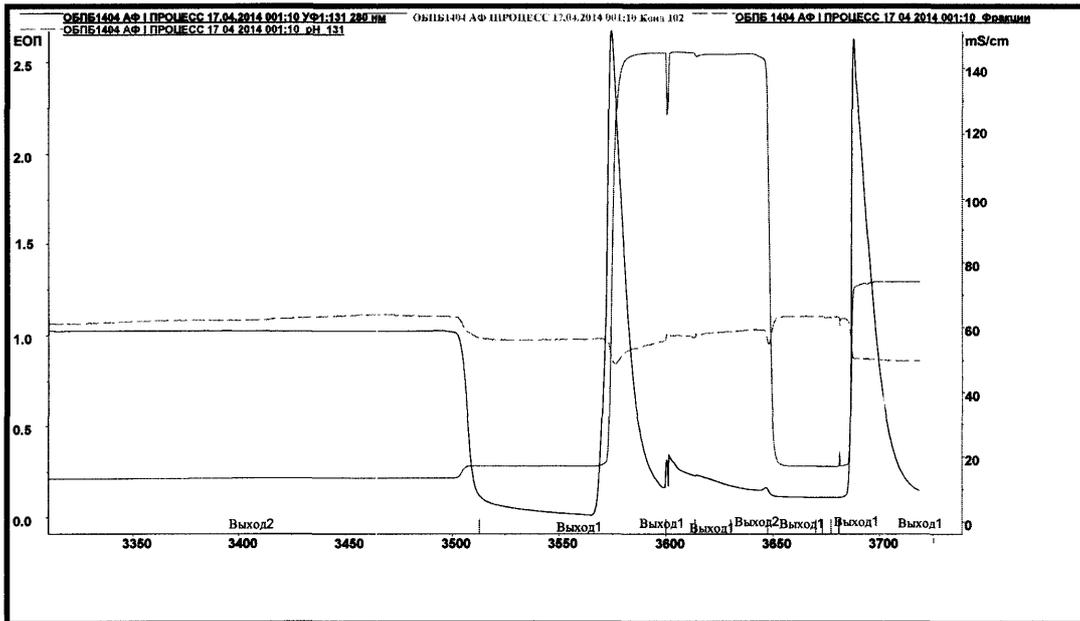
причем ультрафильтрационная мембрана представляет собой ПЭС;

и размер ультрафильтрационной мембраны находится в диапазоне 5-30 кДа, причем предпочтительно размер ультрафильтрационной мембраны составляет 10 кДа;

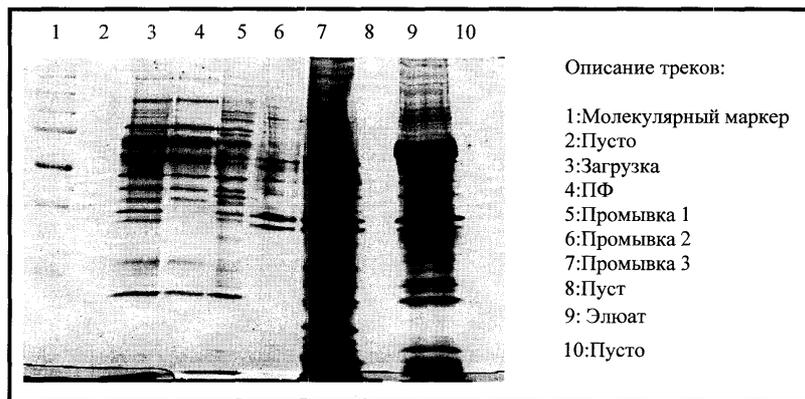
при этом предпочтительно концентрат представляет собой ретентат ТНК-tPA.

15. Способ по п.1, отличающийся тем, что аффинная-I хроматография по п.1 стадии (i) представляет собой периодическую противоточную хроматографию.

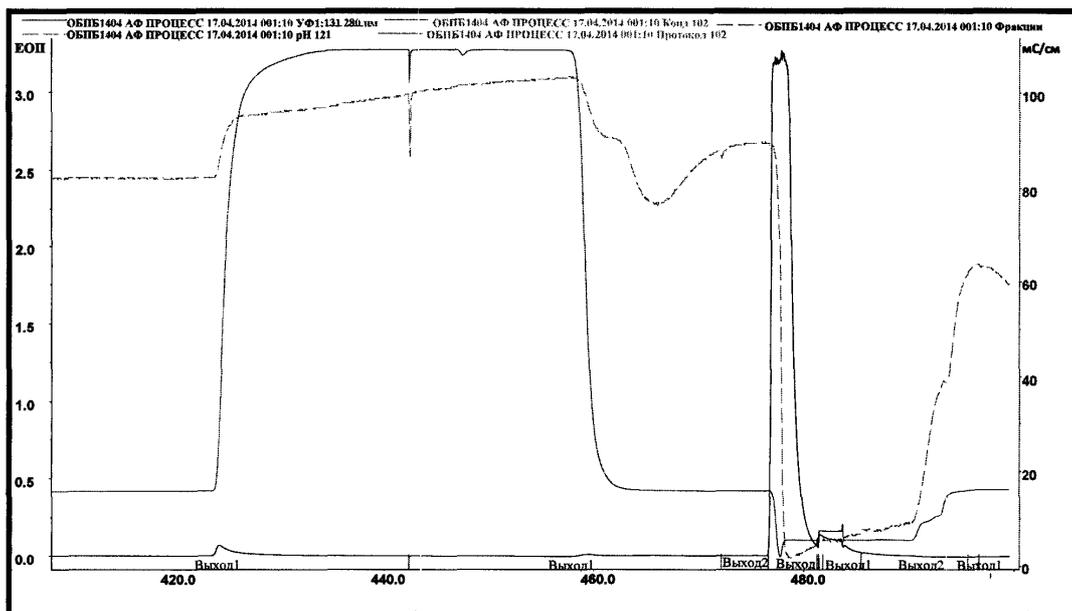
16. Способ по п.1, отличающийся тем, что буфер и загрузку готовят в поточном кондиционировании для аффинной-I хроматографии по п.1 стадии (i), аффинной-II хроматографии по п.1 стадии (ii), аффинной-III хроматографии по п.1 стадии (iv) (ХСР) и катионообменной хроматографии по п.1 стадии (v).



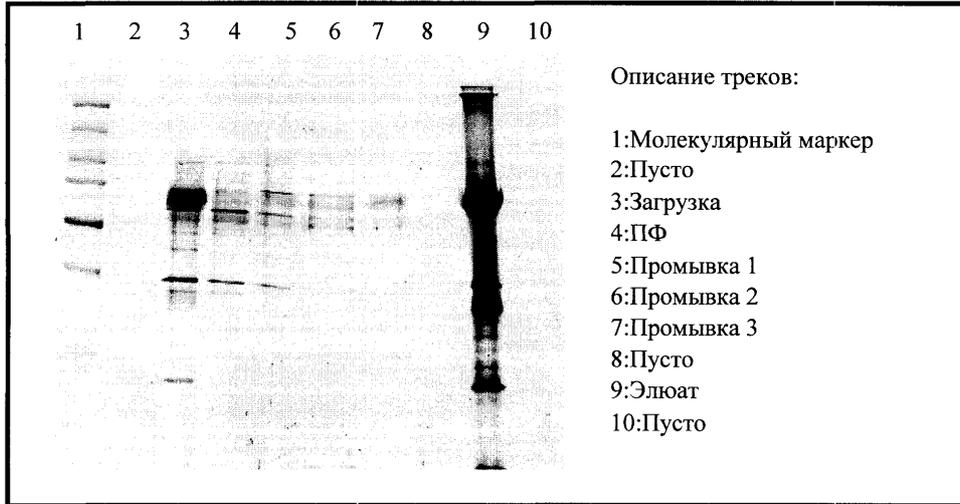
Фиг. 1



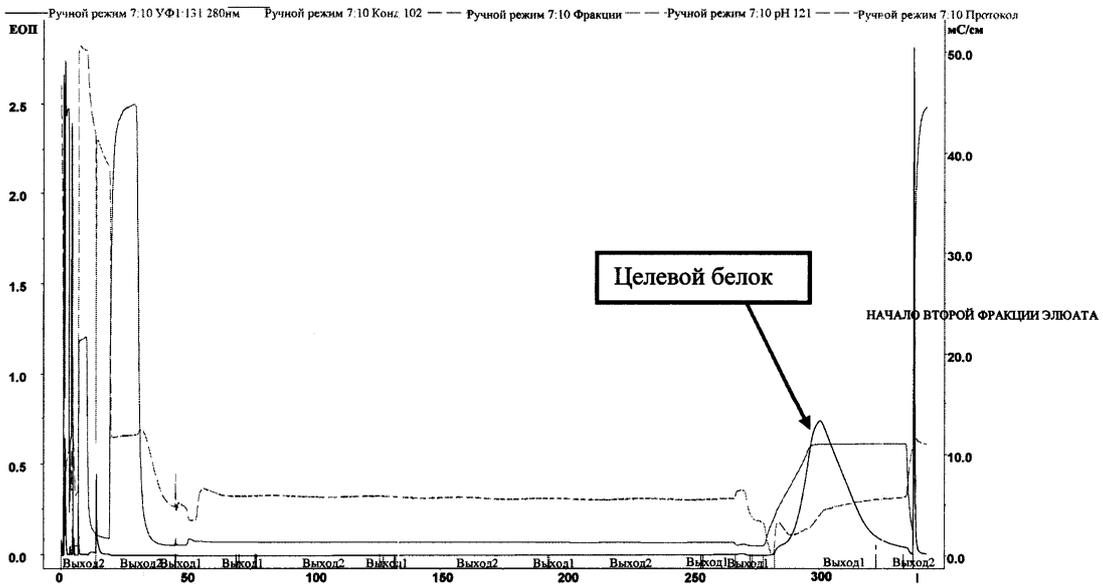
Фиг. 2



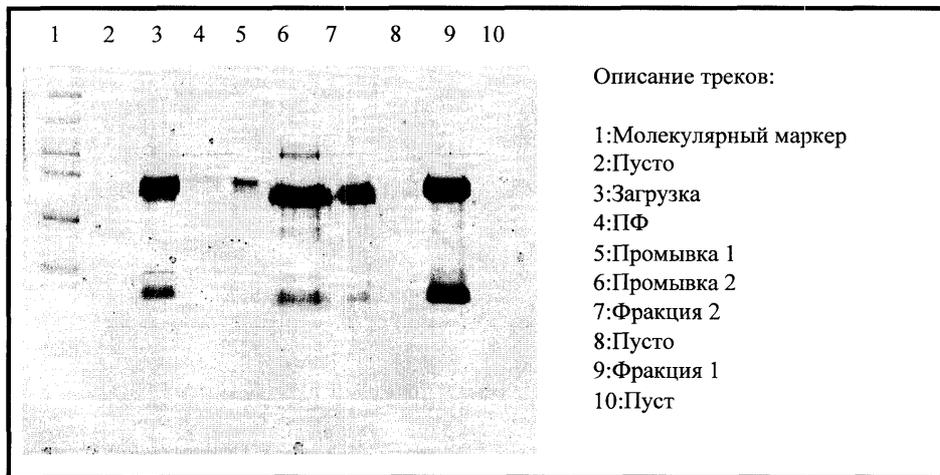
Фиг. 3



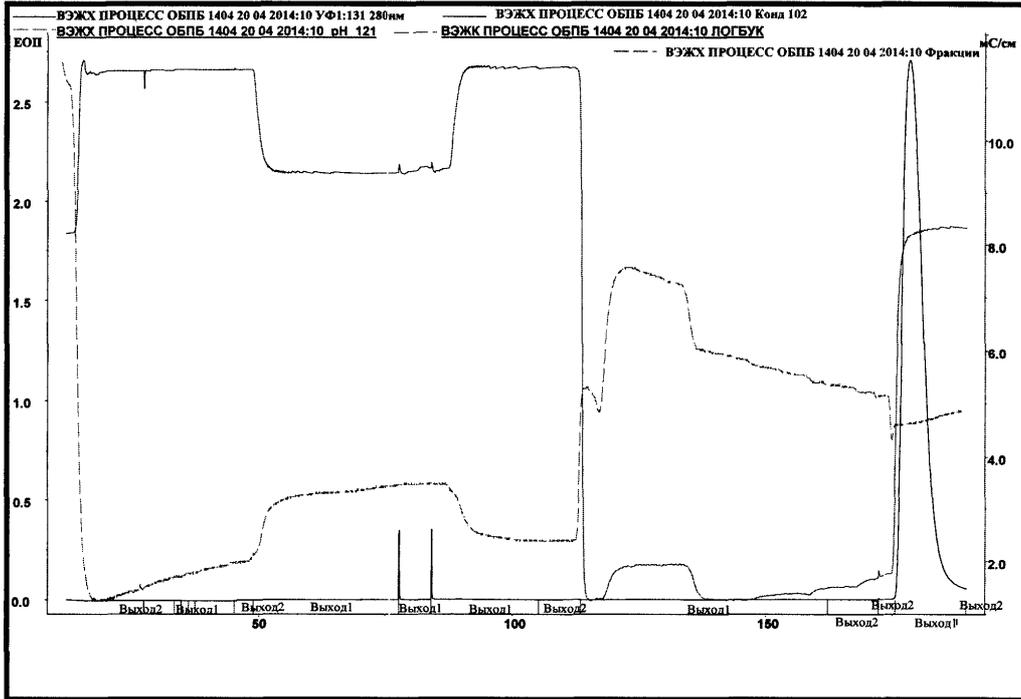
Фиг. 4



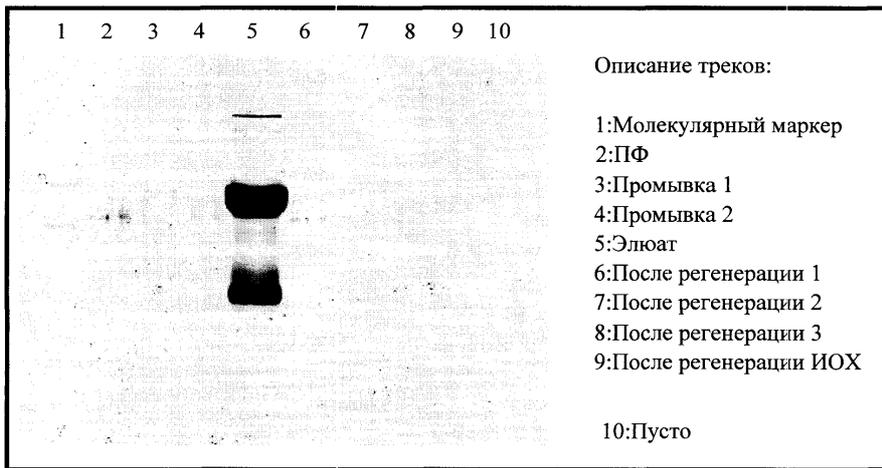
Фиг. 5



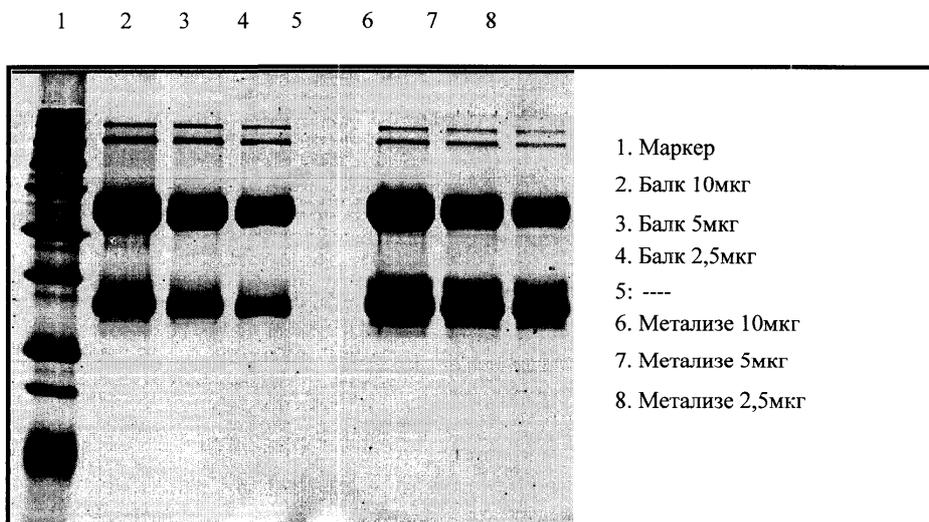
Фиг. 6



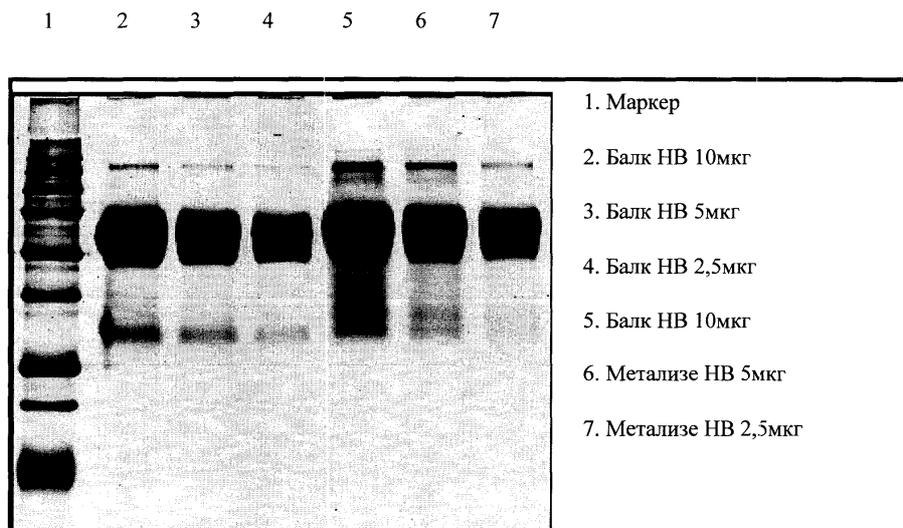
Фиг. 7



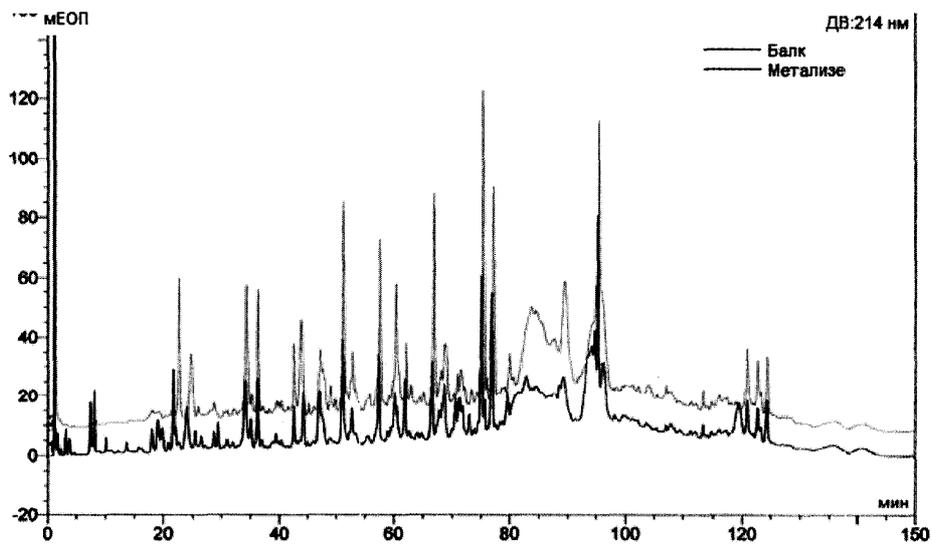
Фиг. 8



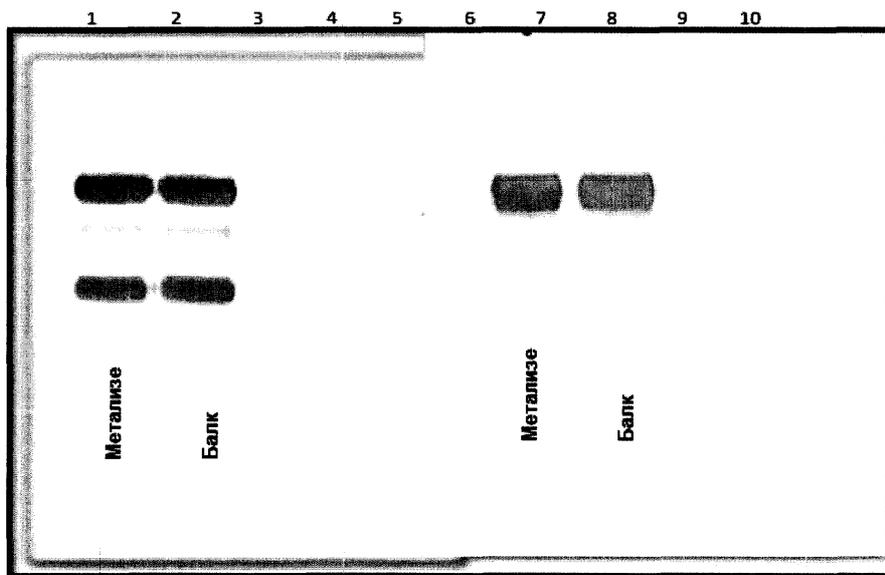
Фиг. 9



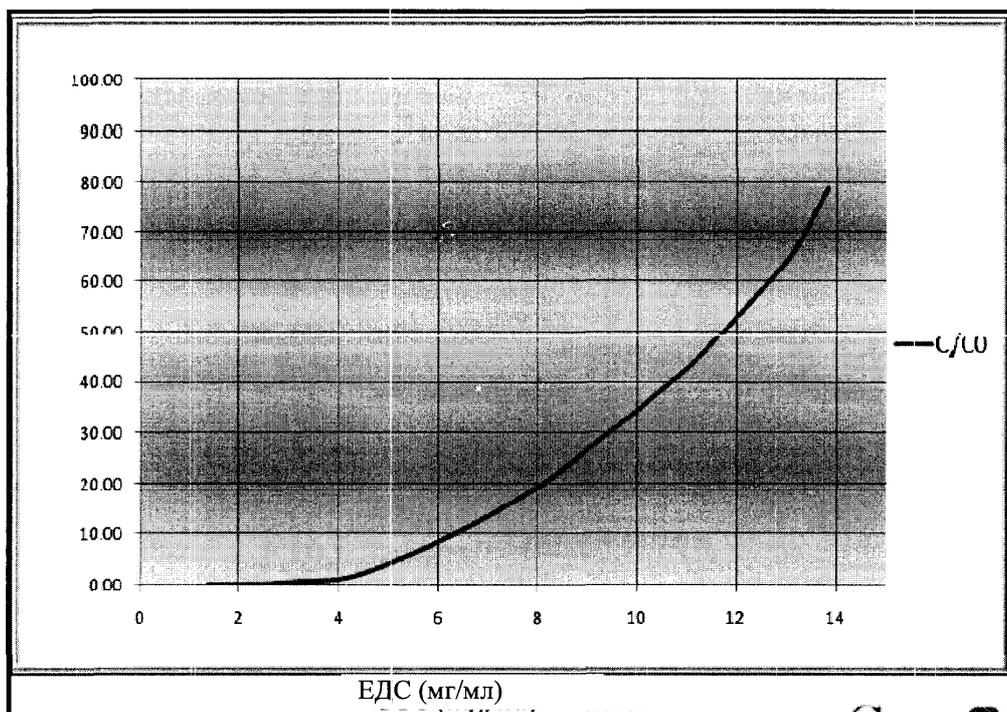
Фиг. 10



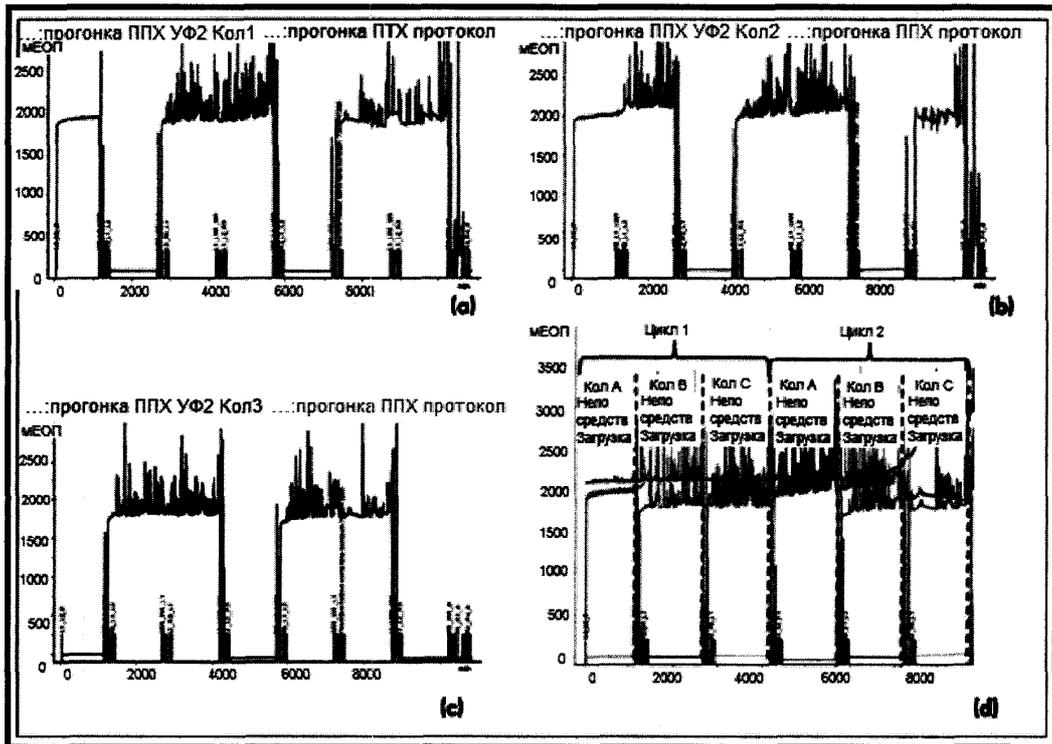
Фиг. 11



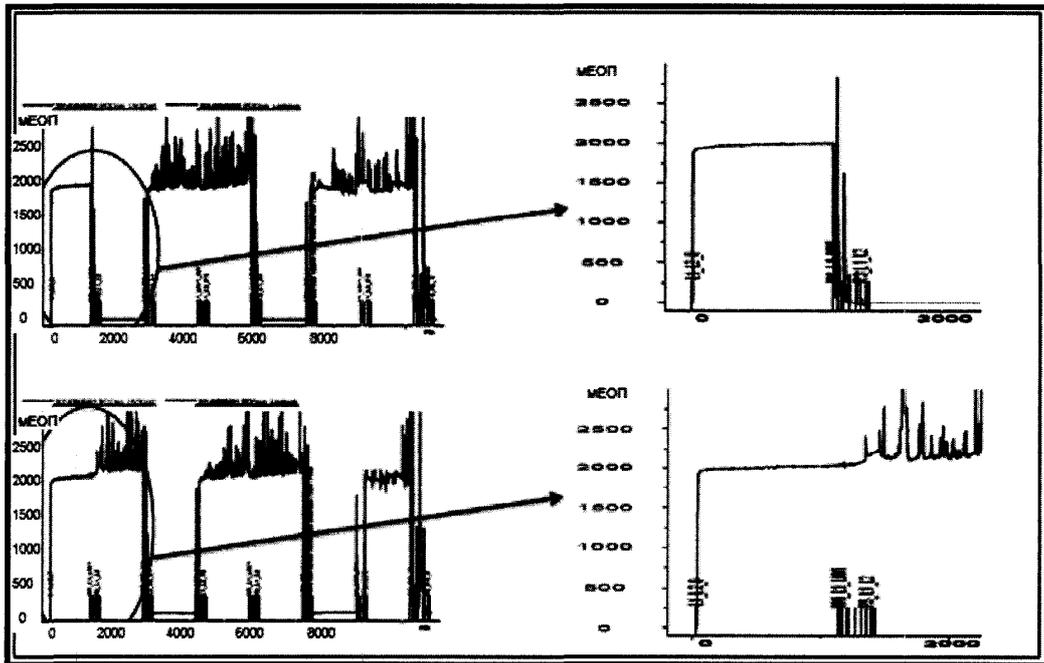
Фиг. 12



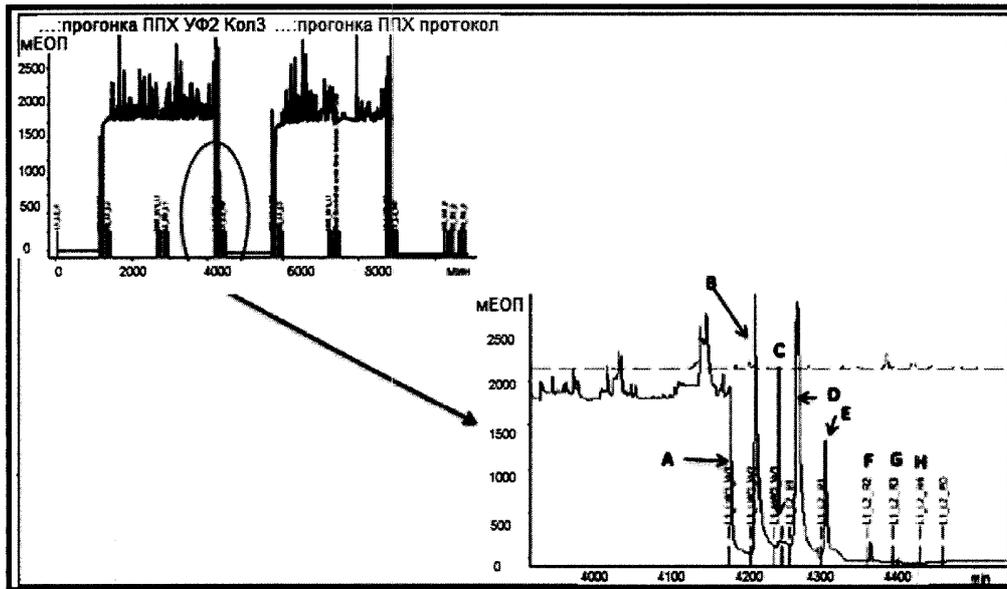
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16

