

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092223 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.10

(51) Int. Cl. C07K 14/435 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.03.20

(54) РАЗДЕЛЕНИЕ VWF И ПРОПЕПТИДА VWF ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

(31) 62/646,109

(72) Изобретатель:

(32) 2018.03.21

Фидлер Кристиан, Хаслахер
Майнхард, Майер Криста (АТ)

(33) US

(86) PCT/US2019/023269

(74) Представитель:

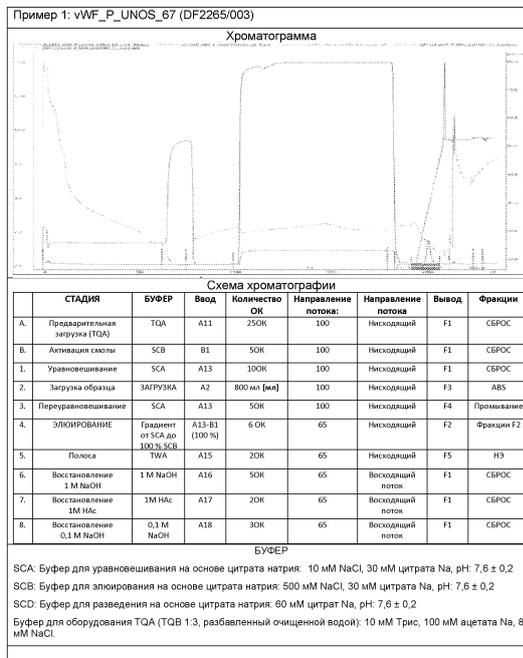
(87) WO 2019/183290 2019.09.26

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

БАКСАЛТА ИНКОРПОРЕЙТЕД
(US); БАКСАЛТА ГМБХ (СН)

(57) Данное изобретение относится к способу отделения зрелого фактора фон Виллебранда (mat-VWF) от пропептида фактора фон Виллебранда (VWF-PP) путем инкубации композиции, включающему индукцию диссоциации mat-VWF и VWF-PP путем разрушения нековалентно связанных mat-VWF и VWF-PP, при этом указанная диссоциация индуцируется путем (i) добавления по меньшей мере одного хелатирующего агента или (ii) увеличения pH до pH, равного по меньшей мере 7, с последующим сбором указанного mat-VWF для получения высокоочищенного зрелого лишнего пропептида VWF (mat-VWF).



A1

202092223

202092223

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565059EA/060

РАЗДЕЛЕНИЕ VWF И ПРОПЕПТИДА VWF ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] В данной заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на США № 62/646109, поданной 21 марта 2018 г., которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Данное изобретение относится к способам отделения зрелого фактора фон Виллебранда (VWF) от пропептида фактора фон Виллебранда (VWF-PP).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] В процессе созревания белка внутри клетки созревающий белок претерпевает посттрансляционные модификации. Эти модификации включают среди прочего ацетилирование, метилирование, гликозилирование и протеолитическое расщепление. Эти модификации во многих случаях необходимы для функции и активности белков и могут также влиять на эффективность белков, в частности ферментов.

[0004] Пробелки или предшественники белков представляют собой неактивные белки, которые превращаются в активную форму одной или более из этих посттрансляционных модификаций, в частности, отщеплением пропептида от пробелка.

[0005] Активная форма этих белков может быть полезными терапевтическими и/или диагностическими белками. Однако активные белки обычно доступны в очень небольших количествах в живых организмах. По существу, активные белки получают рекомбинантным путем из их пробелков, которые предпочтительно активируются *in vitro* путем контакта их с рекомбинантными активационными ферментами (например, протеазами).

[0006] Фактор фон Виллебранда (VWF) представляет собой гликопротеин, циркулирующий в плазме в виде серии мультимеров размером от около 500 до 20000 кДа. Клонировали полноразмерную кДНК VWF; прополипептид соответствует аминокислотным остаткам от 23 до 764 полноразмерного рrерго-VWF (Eikenboom et al (1995) Haemophilia, 1, 77-90). Мультимерные формы VWF состоят из полипептидных субъединиц 250 кДа, связанных вместе дисульфидными связями. VWF опосредует начальную адгезию тромбоцитов к субэндотелию поврежденной стенки сосуда, при этом более крупные мультимеры проявляют повышенную гемостатическую активность. Мультимеризованный VWF связывается с гликопротеином Gp1ba на поверхности тромбоцитов посредством взаимодействия в домене A1 VWF, облегчая адгезию тромбоцитов. Другие участки на VWF опосредуют связывание со стенкой кровеносного сосуда. Таким образом VWF образует мост между тромбоцитами и стенкой сосуда, который необходим для адгезии тромбоцитов и первичного гемостаза в условиях

высокого напряжения сдвига. Обычно эндотелиальные клетки секретируют большие полимерные формы VWF, а те формы VWF, которые имеют более низкую молекулярную массу, возникают в результате протеолитического расщепления. Мультимеры исключительно больших молекулярных масс хранятся в тельцах Вейбеля-Паллады эндотелиальных клеток и высвобождаются при стимуляции такими агонистами, как тромбин и гистамин.

[0007] На промышленном уровне VWF, в частности рекомбинантный VWF (rVWF), синтезируется и экспрессируется вместе с rFVIII в линиях клеток, созданных методами генной инженерии, таких как модифицированная линия клеток CHO. Функция коэкспрессированного rVWF заключается в стабилизации rFVIII в процессе культивирования клеток. rVWF синтезируется в клетке как пре-пропептид VWF (prepro-VWF), содержащий большой пропептид (VWF-PP), присоединенный к N-концу субъединицы зрелого VWF (matVWF, англ.: mature VWF). После созревания в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи VWF-PP отщепляется под действием клеточной протеазы фурина и секретируется в виде гомополимера идентичных субъединиц, состоящего из димеров экспрессируемого белка. В некоторых случаях расщепление фурином обеспечивает гетеродимерный комплекс, содержащий зрелый VWF, нековалентно связанный с пропептидом VWF.

[0008] VWF-PP можно отделить от зрелого VWF обработкой *in vitro* фурином или фуриноподобными протеазами (Schlokot U. et al. (1996) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 24:257-267; Preininger A. et al. (1999) *Cytotechnology* 30:1-15). Фурин принадлежит к семейству пробелковых конвертаз и зависит от Ca^{2+} . Этот фермент специфически расщепляет C-концевую пептидную связь аргинина в определенной последовательности, содержащей аргинин в положениях -1 и -4. Эта последовательность может быть обнаружена во многих белках человека, показывая, что фурин играет главную роль в созревании ряда пропептидных белков человека. Фурин, используемый в способе по данному изобретению, предпочтительно имеет рекомбинантное происхождение. Преимущественно используются рекомбинантно продуцируемые протеазы, поскольку они могут продуцироваться в больших количествах. В некоторых вариантах осуществления фурин получают из неочищенного супернатанта культуры линии клеток, секретирующих указанную протеазу или клеточный экстракт.

[0009] Современные общепринятые методы обеспечивают производство зрелого VWF либо путем инкубации пре-пропептида VWF с протеазами в жидкой фазе, в результате чего само созревание (например, отщепление пропептида от про-белка) происходит в несвязанном состоянии в свободном растворе, либо как описано, например, в WO2000/049047, путем иммобилизации протеазы на твердом носителе, который контактирует и инкубирует с препаратом, содержащим VWF-PP (см., например, WO2000/049047). VWF синтезируется эндотелиальными клетками и мегакариоцитами, как пре-пропептид VWF («prepro-VWF»), который состоит в значительной степени из повторяющихся доменов. После отщепления сигнального пептида prepro-VWF

димеризуется через дисульфидные связи в области карбокси-конца в эндоплазматическом ретикулуме. Дополнительные дисульфидные связи образуются около амино-конца субъединиц с образованием мультимеров в комплексе Гольджи. За сборкой мультимеров следует протеолитическое расщепление пропептида VWF протеазой, процессирующей пропептид, фурин. После расщепления пропептид VWF остается нековалентно связанным с мультимером VWF с образованием зрелого комплекса VWF/VWF-PP. При стимуляции комплекс секретируется в кровь, и пропептид VWF диссоциирует от мультимеров VWF. Терапевтически эффективные зрелые мультимеры VWF могут быть получены путем рекомбинантной экспрессии pro-VWF в клеточных линиях млекопитающих и процессирования белка pro-VWF для созревания VWF посредством серии стадий расщепления и очистки *in vitro*. Однако в данной области техники остается потребность в получении высокоочищенных, терапевтически эффективных мультимерных препаратов зрелого VWF (mat-rVWF), и данное изобретение удовлетворяет эту потребность, предлагая способы получения препаратов mat-rVWF высокой чистоты, где способ включает: например, после созревания фурина добавление хелатирующего агента и/или повышение pH до pH по меньшей мере 7 во время процесса очистки для облегчения отделения VWF-пропептида от mat-rVWF.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0010] В данном изобретении предложен способ получения композиции, содержащей высокоочищенный зрелый лишенный пропептида рекомбинантный rVWF (mat-rVWF), при этом указанный способ включает стадии:

обеспечение раствора, содержащего комплекс mat-rVWF/ rVWF-PP, mat-rVWF и пропептид rVWF (rVWF-PP);

индуцирование диссоциации указанного комплекса mat-rVWF/ rVWF-PP в указанном растворе на а) на mat-rVWF и rVWF-PP, причем указанная диссоциация происходит путем разрушения нековалентно связанных mat-rVWF и rVWF-PP, при этом указанная диссоциация индуцируется путем:

добавление по меньшей мере одного хелатирующего агента, или

увеличение pH до pH, равного по меньшей мере 7; и

сбор указанного mat-rVWF для получения композиции высокоочищенного mat-rVWF, при этом указанная композиция высокоочищенного mat-rVWF содержит по меньшей мере 95% зрелого rVWF и менее 5% rVWF-PP.

[0011] В некоторых вариантах осуществления композиции высокоочищенного mat-rVWF содержит по меньшей мере 96% mat-rVWF и менее 4% rVWF-PP, по меньшей мере 97% mat-rVWF и менее 3% rVWF-PP, по меньшей мере 98% mat-rVWF и менее 2% rVWF-PP, по меньшей мере 99% mat-rVWF и менее 1% rVWF-PP или по меньшей мере 99,5% mat-rVWF и менее 0,5% rVWF-PP, или 99,9% mat-rVWF и менее 0,1% rVWF-PP.

[0012] В некоторых вариантах осуществления раствор выбирают из группы, состоящей из среды для культивирования клеток, проточного раствора колонки с антителами и забуференного раствора.

[0013] В некоторых вариантах осуществления раствор обрабатывают фурином перед стадией а).

[0014] В некоторых вариантах осуществления раствор представляет собой проточный раствор колонки с антителами.

[0015] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один хелатирующий агент представляет собой хелатирующий агент с двухвалентным катионом. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент с двухвалентным катионом выбирают из группы, состоящей из ЭДТК, ЭГТК, ЦДТК и цитрата.

[0016] В некоторых вариантах осуществления рН увеличивают до по меньшей мере 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 или 9,0. В некоторых вариантах осуществления рН увеличивают от по меньшей мере около 7,2 до около 7,8. В некоторых вариантах осуществления рН увеличивают до по меньшей мере около 7,6. В некоторых вариантах осуществления рН увеличивают путем добавления основных аминокислот, трис, NaOH, трицина или этаноламина.

[0017] В некоторых вариантах осуществления сбор на стадии б) описанного в данном документе способа включает один или более методов разделения белка. В некоторых вариантах осуществления один или более методов разделения белков выбирают из группы, состоящей из ионообменной хроматографии (ИЕС), эксклюзионной хроматографии (SEC), разделения по размеру с помощью мембранной технологии и аффинной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления метод разделения белков представляет собой эксклюзионную хроматографию (SEC). В некоторых вариантах осуществления одним или более методом разделения белков является ионообменная хроматография (ИЕС). В некоторых вариантах осуществления ионообменная хроматография (ИЕС) представляет собой катионообменную хроматографию. В некоторых вариантах осуществления ионообменная хроматография (ИЕС) представляет собой комбинацию анионообменной хроматографии и катионообменной хроматографии.

[0018] В некоторых вариантах осуществления указанные один или более методов разделения белков включают буферную систему, при этом указанная буферная система содержит один или более буферов. В некоторых вариантах осуществления указанные один или более буферов включают промывочные буферы, причем указанные один или более промывочных буферов включают один, два, три, четыре и/или пять промывочных буферов, причем, когда указанные один или более буферов включают пять промывочных буферов, первый, второй, третий и/или пятый промывочные буферы имеют больший рН, чем четвертый промывочный буфер, а когда указанные один или более буферов включают четыре промывочных буфера, первый, второй и/или четвертый промывочные буферы имеют рН больший, чем у третьего промывочного буфера. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию обработки для инактивации вирусов после первого промывочного буфера, и, необязательно, рН на стадии обработки для инактивации вирусов является большим, чем рН указанного третьего и/или четвертого промывочного буфера. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов

содержат указанные один или более хелатирующих агентов. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов имеют рН по меньшей мере 7.

[0019] В некоторых вариантах осуществления указанные один или более методов разделения белков включают буферную систему, при этом указанная буферная система включает один или более загрузочных буферов. В некоторых вариантах осуществления один или более загрузочных буферов содержат указанные один или более хелатирующих агентов. В некоторых вариантах осуществления один или более загрузочных буферов имеют рН по меньшей мере 7.

[0020] В некоторых вариантах осуществления указанные один или более методов разделения белков включают буферную систему, при этом указанная буферная система включает один или более загрузочных, промывочных и/или элюирующих буферов. В некоторых вариантах осуществления один или более загрузочных, промывочных и/или элюирующих буферов содержат указанные один или более хелатирующих агентов. В некоторых вариантах осуществления один или более загрузочных, промывочных и/или элюирующих буферов имеют рН по меньшей мере 7. В некоторых вариантах осуществления один или более загрузочных, промывочных и/или элюирующих буферов содержат указанные один или более хелатирующих агентов и имеют рН по меньшей мере 7.

[0021] В некоторых вариантах осуществления буферную систему выбирают из группы, состоящей из глицина, HEPES (4-(2- гидроксипропан-1-ил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), трис-НСI (трис(гидроксиметил)- аминометан), гистидина, имидазола, цитрата ацетата, MES и 2-(N- морфолино) этансульфоновой кислоты.

[0022] В некоторых вариантах осуществления буфер дополнительно содержит один или более одновалентных катионов. В некоторых вариантах осуществления один или более одновалентных катионов выбирают из группы, состоящей из Na⁺, K⁺, Li⁺ и Cs⁺. В некоторых вариантах осуществления одновалентный катион представляет собой Na⁺.

[0023] В некоторых вариантах осуществления буфер дополнительно содержит один или более одновалентных, двухвалентных и/или трехвалентных анионов. В некоторых вариантах осуществления один или более одновалентных, двухвалентных и/или трехвалентных анионов выбирают из группы, состоящей из Cl⁻, ацетата⁻, SO₄²⁻, Br⁻ и цитрата³⁻.

[0024] В некоторых вариантах осуществления буферная система содержит по меньшей мере один буфер, имеющий проводимость $\geq 0,5$ мСм/см при 25 °С. В некоторых вариантах осуществления буферная система содержит по меньшей мере один буфер, имеющий проводимость $15,0 \pm 0,2$ мСм/см при 25 °С.

[0025] В некоторых вариантах осуществления буфер дополнительно содержит один или более неионных детергентов. В некоторых вариантах осуществления неионный детергент выбирают из группы, состоящей из Triton X100, Tween 80 и Tween 20.

[0026] В некоторых вариантах осуществления буфер дополнительно содержит одно или более дополнительных веществ, выбранных из группы, состоящей из

невосстанавливаемых сахаров, сахарных спиртов и полиолов.

[0027] В некоторых вариантах осуществления композиция высокоочищенного mat-rVWF содержит уровень примесей клетки-хозяина (HC) $\leq 2,0\%$. В некоторых вариантах осуществления композиция высокоочищенного , mat-rVWF содержит уровень примесей клетки-хозяина (HC) $\leq 0,6\%$.

[0028] В некоторых вариантах осуществления раствор, содержащий комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и rVWF-PP, получают на стадии захвата для rVWF.

[0029] В некоторых вариантах осуществления раствор, содержащий комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и rVWF-PP, получен способом, включающим стадию иммуноаффинности FVIII и стадию анионообменной хроматографии.

[0030] В данном изобретении также предложен способ получения композиции, содержащей высокоочищенный зрелый лишенный пропептида рекомбинантный rVWF (высокоочищенный mat-rVWF), при этом указанный способ включает стадии:

загрузка раствора, содержащего pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и/или пропептид rVWF (rVWF-PP), на анионообменную колонку, при этом указанные pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF связаны с указанной анионообменной колонкой;

промывание указанной анионообменной колонки на а), содержащей указанный связанный pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF, одним или более промывочными буферами;

обработка указанной колонки на б), содержащей связанный pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF, фурином, при этом указанный фурин расщепляет указанный pro-rVWF на mat-rVWF и rVWF-PP;

элюирование указанного связанного pro-rVWF, комплекса mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF из колонки на с) элюирующим буфером, при этом указанный элюирующий буфер индуцирует диссоциацию указанного rVWF-PP из нековалентно связанного mat-rVWF с указанным rVWF-PP, и при этом указанная диссоциация индуцируется путем:

добавления по меньшей мере одного хелатирующего агента в указанный элюирующий буфер, или

увеличения pH указанного элюирующего буфера до pH, равного по меньшей мере 7; и

сбор указанного mat-rVWF отдельно от указанного rVWF-PP для получения композиции высокоочищенного mat-rVWF, при этом указанная композиция высокоочищенного mat-rVWF содержит по меньшей мере 95% зрелого rVWF и менее 5% rVWF-PP.

[0031] В некоторых вариантах осуществления а) и б) осуществляют одновременно на одной стадии.

[0032] В некоторых вариантах осуществления указанные один или более буферов включают промывочные буферы, причем указанные один или более промывочных буферов включают один, два, три, четыре и/или пять промывочных буферов, причем,

когда указанные один или более буферов включают пять промывочных буферов, первый, второй, третий и/или пятый промывочные буферы имеют больший рН, чем четвертый промывочный буфер, а когда указанные один или более буферов включают четыре промывочных буфера, первый, второй и/или четвертый промывочные буферы имеют рН больший, чем у третьего промывочного буфера. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию обработки для инактивации вирусов после первого промывочного буфера, и, необязательно, рН на стадии обработки для инактивации вирусов является большим, чем рН указанного третьего и/или четвертого промывочного буфера.

[0033] В некоторых вариантах осуществления раствор на а) включает проточный раствор из колонки с моноклональным антителом, причем указанное моноклональное антитело представляет собой моноклональное антитело FVIII.

[0034] В некоторых вариантах осуществления раствор на а) выбирают из группы, состоящей из среды для культивирования клеток, проточного раствора колонки с антителами и забуференного раствора.

[0035] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один хелатирующий агент представляет собой хелатирующий агент с двухвалентным катионом. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент с двухвалентным катионом выбирают из группы, состоящей из ЭДТК, ЭГТК, ЦДТК и цитрата.

[0036] В некоторых вариантах осуществления рН увеличивают до по меньшей мере 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8,0. В некоторых вариантах осуществления рН увеличивают от по меньшей мере около 7,2 до около 7,8. В некоторых вариантах осуществления рН увеличивают до по меньшей мере около 7,6. В некоторых вариантах осуществления рН увеличивают путем добавления основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления один или более промывочных буферов на б) содержат указанные один или более хелатирующих агентов. В некоторых вариантах осуществления один или более промывочных буферов на б) имеют рН по меньшей мере 7. В некоторых вариантах осуществления один или более промывочных буферов на б) содержат указанные один или более хелатирующих агентов и имеют рН по меньшей мере 7.

[0037] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию вирусной инактивации, при этом указанная вирусная инактивация происходит до, после или одновременно со стадией промывки и/или стадией элюирования, но перед стадией сбора. В некоторых вариантах осуществления обработка для инактивации вирусов инактивирует вирусы с липидной оболочкой. В некоторых вариантах обработка для инактивации вирусов представляет собой обработку растворителем и детергентом (S/D).

[0038] В некоторых вариантах осуществления один или более буферов содержат буфер, выбранный из группы, состоящей из глицина NEPES (4-(2- гидроксизтил)-1- пиперазинэтансульфоновая кислота), трис-HCl (трис(гидроксиметил)- аминометан), гистидина, имидазола, цитрата ацетата, MES и 2-(N- морфолино) этансульфоновой

кислоты.

[0039] В некоторых вариантах осуществления один или более буферов дополнительно содержат один или более одновалентных катионов. В некоторых вариантах осуществления один или более одновалентных катионов выбирают из группы, состоящей из Na⁺, K⁺, Li⁺ и Cs⁺. В некоторых вариантах осуществления одновалентный катион представляет собой Na⁺.

[0040] В некоторых вариантах осуществления один или более буферов дополнительно содержат один или более одновалентных, двухвалентных и/или трехвалентных анионов. В некоторых вариантах осуществления один или более одновалентных, двухвалентных и/или трехвалентных анионов выбирают из группы, состоящей из Cl⁻, ацетата⁻, SO₄²⁻, Br⁻ и цитрата³⁻.

[0041] В некоторых вариантах осуществления один или более буферов содержат по меньшей мере один буфер, имеющий проводимость $\geq 0,5$ мСм/см при 25 °С. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов содержат по меньшей мере один буфер, имеющий проводимость $15,0 \pm 0,2$ мСм/см при 25 °С.

[0042] В некоторых вариантах осуществления один или более буферов дополнительно содержат один или более неионных детергентов. В некоторых вариантах осуществления неионный детергент выбирают из группы, состоящей из Triton X100, Tween 80 и Tween 20.

[0043] В некоторых вариантах осуществления указанный один или более буферов дополнительно содержат одно или более дополнительных веществ, выбранных из группы, состоящей из невосстанавливающих сахаров, сахарных спиртов и полиолов.

[0044] В некоторых вариантах осуществления композиция высокоочищенного mat-rVWF содержит уровень примесей клетки-хозяина (НС) $\leq 2,0\%$. В некоторых вариантах осуществления композиция высокоочищенного mat-rVWF содержит уровень примесей клетки-хозяина (НС) $\leq 0,6\%$.

[0045] В некоторых вариантах осуществления композицию высокоочищенного mat-rVWF используют для производства фармацевтической композиции.

[0046] В данном изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая высокоочищенный mat-rVWF, полученный способом по любому из предшествующих пунктов, и фармацевтически приемлемый буфер. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит 50 мМ глицина, 10 мМ таурина, 5% (мас./мас.) сахарозы, 5% (мас./мас.) D-маннита, 0,1% полисорбата 80, 2 мМ CaCl₂, 150 мМ NaCl, при этом указанная композиция имеет pH около pH 7,4.

[0047] Другие цели, преимущества и варианты осуществления изобретения будут очевидны из нижеследующего подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0048] На Фиг. 1 показана очистка созревшего rVWF на катионном обменнике, представленное в примере 1.

[0049] На Фиг. 2 представлена таблица результатов очистки.

[0050] На Фиг. 3 показан окрашенный серебром белковый гель и вестерн-блоттинг, иллюстрирующий разделение mat-VWF и пропептида r-VWF (rVWF-PP) способом из примера 1.

[0051] На Фиг. 4 показана блок-схема экспериментальной установки для примеров 2 и 3.

[0052] На Фиг. 5 показана хроматограмма для примера 2 и схема хроматографии, используемая для примеров 2 и 3

[0053] На Фиг. 6 представлена таблица использованных реагентов и таблица результатов для примера 2.

[0054] На Фиг. 7 представлена другая хроматограмма из примера 2 и таблица результатов для примера 3.

[0055] На Фиг. 8 показан окрашенный серебром белковый гель, иллюстрирующий разделение mat-rVWF и пропептида rVWF (rVWF-PP) способом из примера 2 и примера 3.

[0056] На Фиг. 9 показан вестерн-блоттинг, иллюстрирующий разделение rVWF и пропептида rVWF способом из примера 2 и примера 3.

[0057] На Фиг. 10 показана хроматограмма, схема хроматографии и составы буфера для примера 4.

[0058] На Фиг. 11 представлена таблица результатов для примера 4.

[0059] На Фиг. 12 показан окрашенный серебром белковый гель и вестерн-блоттинг, иллюстрирующий разделение mat-rVWF и пропептида rVWF (rVWF-PP) способом из примера 4.

[0060] На Фиг. 13 показана хроматограмма, схема хроматографии и составы буфера для примера 5.

[0061] На Фиг. 14 представлена таблица результатов для примера 5.

[0062] На Фиг. 15 показана хроматограмма, схема хроматографии и составы буфера для примера 6.

[0063] На Фиг. 16 представлена таблица результатов для примера 6.

[0064] На Фиг. 17 показана хроматограмма, схема хроматографии и составы буфера для примера 7.

[0065] На Фиг. 18 представлена таблица результатов для примера 7.

[0066] На Фиг. 19 показана хроматограмма, схема хроматографии и составы буфера для примера 8.

[0067] На Фиг. 20 представлена таблица результатов для примера 8.

[0068] На Фиг. 21 показан окрашенный серебром белковый гель, иллюстрирующий разделение mat-rVWF и пропептида rVWF (rVWF-PP) способом из примера 8.

[0069] На Фиг. 22 показан вестерн-блоттинг, иллюстрирующий разделение rVWF и пропептида rVWF способом из примера 8. 1% -ный агарозный гель демонстрирует мультимерную структуру продуктов.

[0070] На Фиг. 23 показан вестернблоттинг, иллюстрирующий разделение mat-rVWF и пропептида rVWF (rVWF-PP) способом из примера 8.

[0071] На Фиг. 24 показана хроматограмма, схема хроматографии и составы буфера для примера 9.

[0072] На Фиг. 25 представлена таблица результатов для примера 9.

[0073] На Фиг. 26 представлена таблица продукта для примера 9.

[0074] На Фиг. 27 показан окрашенный серебром белковый гель, иллюстрирующий разделение rVWF и пропептида rVWF способом из примера 9.

[0075] На Фиг. 28 показан вестерн-блоттинг, иллюстрирующий разделение rVWF и пропептида rVWF способом из примера 9. 1% -ный агарозный гель демонстрирует мультимерную структуру продуктов.

[0076] На Фиг. 29 показан вестернблоттинг, иллюстрирующий разделение rVWF и пропептида rVWF способом из примера 9.

[0077] На Фиг. 30 показана чистота продукта, содержащего фракции, полученные для улучшенной катионообменной хроматографии (СЕХ), использованной в примерах 1, 2, 3, 6, 8 и 9.

[0078] На Фиг. 31 показан коэффициент удаления связанных с продуктом примесей для примеров 1, 2, 3, 6, 8 и 9.

[0079] На Фиг. 32 показана чистота продукта, содержащего фракции, полученные для усиленной эксклюзионной хроматографии (SEC), использованной в примерах 4 и 5.

[0080] На Фиг. 33 показан коэффициент удаления связанных с продуктом примесей для примеров 4 и 5.

[0081] На Фиг. 34 показаны составы буферов и материалы, используемые в методе разделения ТМАЕ.

[0082] На Фиг. 35 показаны условия нагрузки для комплекса зрелый VWF/VWF-пропептид, обработанного фурином.

[0083] На Фиг. 36 показаны детали буферов, условий, параметров и скоростей потока хроматографического метода.

[0084] На Фиг. 37 показана хроматограмма диссоциации обработанного фурином комплекса зрелый VWF/VWF-пропептид на зрелый VWF и VWF-пропептид (VWF-PP). Он показывает удаление VWF-PP из фракции, содержащей зрелый VWF.

[0085] На Фиг. 38 показана другая хроматограмма разделения зрелого VWF и VWF-пропептида (VWF-PP). Он показывает удаление VWF-PP из фракции, содержащей зрелый VWF.

[0086] На Фиг. 39А и Фиг. 39В представлены схематические диаграммы типичных способов очистки зрелого VWF, включая разделение зрелого VWF и VWF-PP.

[0087] На Фиг. 40 представлена таблица, подчеркивающая некоторые преимущества метода катионообменной хроматографии описанного в данном документе.

[0088] На Фиг. 41 представлена схема двух хроматограмм, показывающих разделение пропептида rVWF с использованием эксклюзионной хроматографии, описанной в данном документе, с использованием либо рабочего буфера SQA, либо рабочего буфера SQC, который содержит цитрат. Изменение параметров SEC (буферы

SEC) не привело к изменению очистки зрелого VWF, за исключением увеличения удаления/отделения остаточного VWF-PP.

[0089] На Фиг. 42 представлена таблица, в которой показаны некоторые преимущества оптимизированного буфера SEC (буфера SQC). Буфер SQC содержит по меньшей мере один хелатирующий агент, и было показано, что он снижает количество VWF-PP в очищенной фракции зрелого VWF.

[0090] На Фиг. 43А и Фиг. 43В представлены блок-схемы протоколов последующей обработки для rVWF. На Фиг. 43А показан используемый в данное время процесс. На Фиг. 43В показан описанный в данном документе процесс, который включает улучшенную стадию CAT (UNO_S).

[0091] На Фиг. 44 представлена таблица хроматографического оборудования стадии CAT в процессе первого поколения (Gen 1) и второго поколения (Gen 2).

[0092] На Фиг. 45 представлена таблица условий промывки и элюирования для процесса Gen 2.

[0093] На Фиг. 46 показана сравнительная таблицу стадий мелкомасштабной доочистки rVWF 1-го и 2-го поколения на UNO_Sphere S (стадия CAT).

[0094] На Фиг. 47 представлена таблица процедуры очистки и дезинфекции для колонки UNO_Sphere S.

[0095] На Фиг. 48 представлена таблица состава буферов для стадии доочистки CAT.

[0096] На Фиг. 49А и Фиг. 49В показаны хроматограммы прогона VW_USS_05. На Фиг. 49А показана вся хроматограмма, включая процедуру СІР. На Фиг. 49В изображена промывка 36% буфером В и фазу градиентного элюирования. Поглощение УФ-излучения показано синим (280 нм) и пурпурным (254 нм).

[0097] На Фиг. 50 изображен гель для окрашивания серебром в SDS-PAGE и вестерн-блоттинг прогона VW_UUS_05.

[0098] На Фиг. 51 изображен мультимерный агарозный гель из прогона VW_UUS_05.

[0099] На Фиг. 52 показаны данные rVWF: Ag различных прогонов исследования.

[00100] На Фиг. 53 показаны данные об активности rVWF Risto Co в различных прогонах исследования.

[00101] На Фиг. 54 показаны данные о концентрации пропептида (пропептид (мкг/мг rVWF: Ag)) для различных прогонов исследования.

[00102] На Фиг. 55 показаны данные о концентрации пропептида (пропептид (PP мкг/1000 ед Risto)) для различных прогонов исследования.

[00103] На Фиг. 56 показаны ключевые аналитические результаты для пулов элюата различных прогонов исследования.

[00104] На Фиг. 57 показаны целевые критерии CAT-E для успешной разработки метода.

[00105] На Фиг. 58 представлены примерные варианты осуществления методов

анионообменной, катионообменной и эксклюзионной хроматографии для нас при разделении mat-rVWF и rVWF-PP.

[00106] На Фиг. 59 показаны различные формы VWF: pro-VWF (также называемый pro-rVWF), комплекс matVWF/VWF-PP (также называемый комплексом mat-rVWF/VWF-PP), matVWF (также называемый mat-rVWF) и VWF-PP (также называемый rVWF-PP).

[00107] На Фиг. 60 показаны последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислот VWF.

[00108] На Фиг. 61 показан вестерн-блот DF3338/042 и исходные данные для анализа.

[00109] На Фиг. 62 показан вестерн-блот DF3362/023 и исходные данные для анализа.

[00110] На Фиг. 63 показано сравнение данных с Фиг. 61 и Фиг. 62.

[00111] На Фиг. 64 показана аминокислотная последовательность типичного слитого белка VWF - FVIII, где активный FVIII встроен в мотив VWF (VWF 764-1336 - тяжелая цепь FVIII 24-760 - VWF 2218-2593 - легкая цепь FVIII 1333-2351 - VWF C 2620 по 2813).

[00112] На Фиг. 65 показана аминокислотная последовательность типичного слитого белка VWF - FVIII, где домен, богатый n-гликозилированием, заменяет домен FVIII-B (тяжелая цепь FVIII 19-760 - vWF 2218-2593 - легкая цепь FVIII 1333-2351).

[00113] На Фиг. 66 представлена таблица буферов и композиций, используемых в варианте процесса очистки vWF, описанном в примере 14.

[00114] На Фиг. 67 показана хроматограмма и схему хроматограммы цикла VW_USS_07.

[00115] На Фиг. 68 показаны основные аналитические результаты прогона.

[00116] На Фиг. 69 показан гель для окрашивания серебром в SDS-PAGE репрезентативного прогона. Удаление rvWF-пропептида наблюдали во время стадий промывки промывка 1, WSD и промывка 2.

[00117] На Фиг. 70 представлена таблица буферов и композиций, используемых в варианте процесса очистки vWF, описанном в примере 15. В этом примере представлен альтернативный вариант осуществления для отделения пропептида r-vWF от полипептида r-VWF после расщепления фурином для тестирования дополнительного сialiрирования.

[00118] На Фиг. 71 показана хроматограмма и схему хроматограммы цикла VW_USS_06.

[00119] На Фиг. 72 показаны основные аналитические результаты прогона.

[00120] На Фиг. 73 показан гель для окрашивания серебром в SDS-PAGE репрезентативного прогона.

[00121] На Фиг. 74 представлена таблица буферов и композиций, используемых в варианте процесса очистки vWF, описанном в примере 16.

[00122] На Фиг. 75 показана хроматограмма и схему хроматограммы цикла VW_USS_08.

[00123] На Фиг. 76 показаны основные аналитические результаты прогона включая сиилирование продукта.

[00124] На Фиг. 77 показан гель для окрашивания серебром DFM07247 в SDS-PAGE репрезентативного прогона.

[00125] На Фиг. 78 показаны профили сиилирования элюатов из прогонов VW_USS_06 и VW_USS_08.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Введение

[00126] Описанный в данном документе способ разделяет зрелый VWF и пропептид VWF, которые были диссоциированы от нековалентно связанного гетеродимерного комплекса, содержащего зрелый VWF и пропептид VWF. Это разделение облегчается (индуцируется) добавлением по меньшей мере одного хелатирующего агента и/или увеличением pH по меньшей мере до 7,0 раствора, содержащего зрелый VWF и пропептид VWF, в способе разделения белков. Все способы улучшенного анионообмена (AEX), катионообмена (CEX) и/или эксклюзионной хроматографии (SEC), описанные в данном документе, можно комбинировать в любом варианте для получения r-VWF с улучшенными свойствами.

Выбранные определения

[00127] Термин «рекомбинантный» при использовании со ссылкой, например, на клетку или нуклеиновую кислоту, белок или вектор, указывает на то, что клетка, нуклеиновая кислота, белок или вектор были модифицированы введением гетерологичной нуклеиновой кислоты или белка, или изменением нативной нуклеиновой кислоты или белка, или что клетка получена из клетки, модифицированной таким образом. Таким образом, например, рекомбинантные клетки экспрессируют гены, которые не обнаруживаются в нативной (нерекомбинантной) форме клетки, или экспрессируют нативные гены, которые иначе экспрессируются аномально, недостаточно экспрессируются или не экспрессируются вообще.

[00128] Используемые в данном документе термины «рекомбинантный VWF» или «rVWF» включают VWF, полученный с помощью технологии рекомбинантных ДНК. В определенных вариантах осуществления белки rVWF по данному изобретению могут содержать конструкцию, например, описанную в патенте США 8597910, который включен в данный документ посредством ссылки в отношении способов получения рекомбинантного VWF. VWF в данном изобретении может включать все потенциальные формы, включая мономерные и мультимерные формы. Также следует понимать, что данное изобретение охватывает различные формы VWF, которые можно использовать в комбинации. Например, VWF по данному изобретению может включать различные мультимеры, разные производные, а также как биологически активные производные, так и производные, не являющиеся биологически активными.

[00129] В контексте данного изобретения рекомбинантный VWF охватывает любого члена семейства VWF от, например, млекопитающего, такого как примат, человек,

обезьяна, кролик, свинья, грызун, мышь, крыса, хомяк, песчанка, собака, кошка и их биологически активные производные. Также охватываются мутантные и варианты белки VWF, обладающие активностью, а также функциональные фрагменты и слитые белки на основе белков VWF. Кроме того, VWF по изобретению может дополнительно содержать метки, которые облегчают очистку, обнаружение или и то, и другое. Описанный в данном документе VWF может быть дополнительно модифицирован терапевтическим фрагментом или фрагментом, подходящим для визуализации *in vitro* или *in vivo*.

[00130] Термин «мультимер VWF» относится к VWF, содержащему от по меньшей мере 10 субъединиц или 12, 14 или 16 субъединиц до около 20, 22, 24 или 26 субъединиц или более. Термин «субъединица» относится к мономеру VWF. Как известно в данной области техники, обычно димеры VWF полимеризуются с образованием мультимеров более высокого порядка. (см., например, Turecek et al., *Semin. Thromb. Hemost.*, 2010, 36(5): 510-521 который полностью включен в данное описание посредством ссылки для всех целей и, в частности, для всех идей, касающихся анализа мультимеров VWF).

[00131] Термин «препропептид VWF», «prepro-VWF» или «pro-VWF» относится к незрелому полипептиду VWF, содержащему сигнальный пептид из около 22 аминокислотных остатков, пропептид VWF из около 741 аминокислотного остатка и зрелую субъединицу VWF из около 2050 аминокислотных остатков. Субъединицы pro-VWF могут димеризоваться через дисульфидные связи возле своих карбоксильных концов в эндоплазматическом ретикулуме с образованием димеров «хвост к хвосту», которые затем транспортируются к аппарату Гольджи. В аппарате Гольджи дополнительные дисульфидные связи «голова к голове» образуются около амино-концов субъединиц, тем самым образуя мультимеры. Протеолитическое расщепление пропептида VWF происходит посредством процессинга протеазы фурина, в результате чего образуется зрелый комплекс VWF/VWF-PP. Когда буква «г» включена перед обозначением VWF, она означает рекомбинантную версию. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, применимы к рекомбинантному VWF (rVWF).

[00132] Термин «комплекс VWF» или «комплекс mat-VWF/VWF-PP» относится к нековалентно связанной гетеродимерной структуре, содержащей зрелую субъединицу VWF и пропептид VWF. Комплекс VWF может быть образован как продукт расщепления фурина между пропептидной частью и зрелой частью VWF пре-пропептида VWF. Когда буква «г» включена перед обозначением VWF, она означает рекомбинантную версию. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, применимы к рекомбинантному VWF (rVWF).

[00133] Термин «зрелый VWF» или «mat-VWF» относится к зрелой субъединице VWF, состоящей из около 2050 аминокислотных остатков. Зрелая субъединица VWF может быть частью пре-пропептида VWF или комплекса VWF. Зрелый VWF можно назвать «свободным VWF» после отделения (выделения) от пропептида VWF. Когда буква «г» включена перед обозначением VWF, она означает рекомбинантную версию. В

некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, применимы к рекомбинантному VWF (rVWF).

[00134] Термин «пропептид VWF» или «VWF-PP» относится к пропептиду VWF, состоящему из около 741 аминокислотных остатков. Пропептид VWF может быть частью пре-пропептида VWF или комплекса VWF. Например, в комплексе VWF пропептид VWF нековалентно связан со зрелой субъединицей VWF. Пропептид VWF может называться «свободный пропептид VWF» после отделения (выделения) от зрелого VWF. Когда буква «r» включена перед обозначением VWF, она означает рекомбинантную версию. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, применимы к рекомбинантному VWF (rVWF).

[00135] Термины «выделенный», «очищенный» или «биологически чистый» относятся к материалу, в основном или по существу не содержит компонентов, которые обычно сопровождают его, находясь в нативном состоянии. Чистота и однородность обычно определяются с использованием методов аналитической химии, например, электрофорез в полиакриламидном геле или высокоэффективная жидкостная хроматография. VWF является преобладающим видом, присутствующим в препарате, который по существу является очищенным. Термин «очищенный» в некоторых вариантах осуществления означает, что нуклеиновая кислота или белок дает по существу одну полосу в электрофоретическом геле. В других вариантах осуществления это означает, что нуклеиновая кислота или белок имеют чистоту по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более. «Очистить» или «очистка» в других вариантах осуществления означает удаление по меньшей мере одного загрязнителя из очищаемой композиции. В этом смысле для очистки не требуется, чтобы очищенное соединение было гомогенным, например, 100% чистым.

[00136] Используемый в данном документе термин «около» означает приблизительный диапазон плюс или минус 10% от указанного значения. Например, формулировка «около 20%» охватывает диапазон 18-22%.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[00137] Данное изобретение относится к способу получения высокоочищенной композиции, содержащей свободный зрелый рекомбинантный фактор фон Виллебранда (rVWF), включающему стадии: диссоциацию зрелого rVWF от пропептида rVWF с использованием раствора (например, раствора для диссоциации), содержащего по меньшей мере один хелатирующий агент или имеющей pH не менее 7; отделение свободного зрелого rVWF от пропептида rVWF, и сбор композиции свободного зрелого rVWF, содержащей по меньшей мере 95% свободного зрелого rVWF и менее 5% пропептида rVWF.

[00138] Способ по данному изобретению особенно подходит для отделения зрелого VWF от пропептида VWF *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления разделение индуцируется добавлением одного или более хелатирующих агентов к раствору,

содержащему зрелый VWF и VWF-PP, увеличением pH раствора до по меньшей мере 7,0 или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления pH увеличивают до диапазона от pH 7,0 до pH 9,0.

[00139] Метод разделения может включать использование одного или более методов разделения белков, таких как, без ограничения, хроматографические методы выделения зрелого VWF из VWF-PP. С помощью этого метода можно получить свободную зрелую композицию rVWF высокой чистоты. В некоторых вариантах осуществления композиция свободного зрелого rVWF содержит по меньшей мере 95% свободного зрелого rVWF и менее 5% свободного комплекса rVWF-PP и/или matVWF/VWF-PP. В некоторых случаях композиция свободного зрелого rVWF содержит по меньшей мере 96% свободного зрелого rVWF и менее 4% свободного rVWF-PP и/или комплекса matVWF/VWF-PP, по меньшей мере 97% свободного зрелого rVWF и менее 3% свободного rVWF-PP и/или комплекса matVWF/VWF-PP, по меньшей мере 98% свободного зрелого rVWF и менее 2% свободного rVWF-PP и/или комплекса matVWF/VWF-PP, по меньшей мере 99% свободного зрелого rVWF и менее 1% свободного rVWF-PP и/или комплекса matVWF/VWF-PP, по меньшей мере 99,5% свободного зрелого rVWF и менее 0,5% свободного rVWF-PP и/или комплекса matVWF/VWF-PP.

ОЧИСТКА ПРИ ПОМОЩИ АНИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

[00140] В одном из аспектов данного способа зрелый rVWF (mat-rVWF) отделяют от rVWF-PP с помощью анионообменной хроматографии (AEX). В некоторых случаях оставшиеся примеси, полученные из клетки-хозяина, такие как белки клетки-хозяина СНО, примеси, связанные с технологическими процессами, такие как рекомбинантный фурин и реагенты для инактивации низкомолекулярных вирусов, соединения среды, такие как соевый пептон, и другие примеси, связанные с продуктами, удаляются из зрелого VWF.

[00141] В другом аспекте данного способа зрелый rVWF-PP отделяют от rVWF-PP, такого как остаточный rVWF-PP или свободный rVWF-PP, с помощью анионообменной хроматографии. Для разделения исходная композиция, загрузочный раствор или загрузочный состав могут иметь низкий pH и по меньшей мере один хелатирующий агент. Загрузочную композицию можно наносить на анионообменник, работающий в проточном режиме. В некоторых вариантах осуществления раствор для загрузки содержит rго-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и/или пропептид rVWF (rVWF-PP). В некоторых вариантах осуществления анионный обменник работает в режиме связывания, и зрелые VWF и VWF-PP разделяют с использованием градиентного элюирующего буфера, содержащего по меньшей мере один хелатирующий агент. В других вариантах осуществления буфер для градиентного элюирования имеет pH от нейтрального до высокого, например pH в диапазоне от pH 6,0 до pH 9,0. В другом варианте осуществления буфер для градиентного элюирования содержит один или более хелатирующих агентов и имеет pH 7,0 или более, например, pH 7,0 - pH 9,0. Например,

буфер для градиентного элюирования может содержать ЭДТК и иметь pH 8,5.

[00142] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен способ получения композиции, содержащей высокоочищенный зрелый рекомбинантный rVWF, обедненный пропептидами, (mat-rVWF высокой чистоты), причем указанный способ включает стадии: (a) загрузка раствора, содержащего pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и/или пропептид rVWF (rVWF-PP), на анионообменную колонку, где указанный pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF связаны с указанной анионообменной колонкой; (b) промывание указанной анионообменной колонки на стадии a), содержащей указанный связанный pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF, одним или более промывочными буферами; (c) обработка указанной колонки на b), содержащей связанный pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF, фурином, причем указанный фурин расщепляет указанный pro-rVWF на mat-rVWF и rVWF-PP; (d) элюирование указанного связанного pro-rVWF, комплекса mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF из колонки на c) элюирующим буфером, причем указанный элюирующий буфер индуцирует диссоциацию указанного rVWF-PP от mat-rVWF, нековалентно связанного с указанным rVWF-PP, и при этом указанную диссоциацию индуцируют путем: (i) добавления по меньшей мере одного хелатирующего агента в указанный элюирующий буфер, или (ii) увеличения pH указанного элюирующего буфера до pH по меньшей мере 7; а также (e) сбор указанного mat-rVWF отдельно от указанного rVWF-PP для получения композиции высокоочищенного mat-rVWF, при этом указанная композиция высокоочищенного mat-rVWF содержит по меньшей мере 95% зрелого rVWF и менее 5% rVWF-PP.

[00143] В некоторых вариантах осуществления a) и b) осуществляют одновременно на одной стадии. В некоторых вариантах осуществления раствор на a) содержит поток из метода иммуноаффинной очистки. В некоторых вариантах осуществления раствор на a) включает проточный раствор из колонки с моноклональным антителом, причем указанное моноклональное антитело представляет собой моноклональное антитело FVIII. В некоторых вариантах осуществления раствор на a) выбирают из группы, состоящей из среды для культивирования клеток, проточного раствора колонки с антителами и забуференного раствора.

[00144] В некоторых вариантах осуществления стадии (b) промывка указанной анионообменной колонки на a), содержащей указанный связанный pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF, предполагает промывку одним или более промывочными буферами, причем одна или более промывок буфером включает один, два, три, четыре и/или пять промывочных буферов. В некоторых вариантах осуществления второй промывочный буфер содержит компоненты для вирусной инактивации. В некоторых вариантах осуществления, когда используются четыре или пять промывочных буферов, второй промывочный буфер содержит компоненты для вирусной инактивации. В некоторых вариантах осуществления, когда используются четыре или пять промывочных буферов, второй или третий промывочный буфер содержит компоненты для вирусной

инактивации. В некоторых вариантах обработка для инактивации вирусов представляет собой обработку растворителем и детергентом (S/D). В некоторых вариантах осуществления, когда используются пять промывочных буферов, первый, второй, третий и/или пятый промывочные буферы имеют больший рН, чем четвертый промывочный буфер. В некоторых вариантах осуществления, когда используются пять промывочных буферов, первый, второй, третий и пятый промывочные буферы имеют рН от около 7 до 8, а четвертый промывочный буфер имеет рН от около 5 до 6. В некоторых вариантах осуществления, когда используются пять промывочных буферов, первый, второй, третий и/или пятый промывочные буферы имеют рН от около рН 7,4 до рН 7,5, а четвертый промывочный буфер имеет рН около рН 5,5. В некоторых вариантах осуществления стадия обработки для инактивации вирусов осуществляют с буфером, который имеет рН больший, чем четвертый промывочный буфер. В некоторых вариантах осуществления, когда используются четыре промывочных буфера, после первого промывочного буфера применяется стадия обработки для инактивации вирусов. В некоторых вариантах осуществления, когда используются четыре промывочных буфера, первый, второй и четвертый промывочные буферы имеют больший рН, чем третий промывочный буфер. В некоторых вариантах осуществления стадия обработки для инактивации вирусов осуществляют с буфером, который имеет рН больший, чем третий промывочный буфер. В некоторых вариантах осуществления стадия инактивации вирусов происходит с буфером, который имеет тот же рН, что и первый, второй и/или четвертый промывочные буферы. В некоторых вариантах осуществления, когда используются четыре промывочных буфера, первый, второй и четвертый промывочные буферы имеют рН от около рН 7 до около рН 8, а третий промывочный буфер имеет рН от около рН 5 до около рН 6. В некоторых вариантах осуществления, когда используются четыре промывочных буфера, первый, второй и четвертый промывочные буферы имеют рН от около 7,4 до 7,5, а третий промывочный буфер имеет рН около 5,5.

[00145] Может быть проведена анионообменная хроматография, как это известно специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления анионный обменник включает, без ограничения: STREAMLINE Q XL™, POROS 50 P1™, Q SEPHAROSE™, Emphase™ AEX Hybrid Purifier, Nuvia Q, POROS 50 HQ, Capto Q, Capto Q impress, Unosphere Q, Q Ceramic HYPERD® F, TOYOPEARL® Q, TOYOPEARL® Super Q, смолы смешанного действия AEX (например, Capto Adhere, Capto adhere impress, или MEP Hypercell), а также любые смолы на основе DEAE, TMAE, третичного или четвертичного амина или PEI. В некоторых вариантах осуществления анионный обменник представляет собой мембранный анионный обменник. В некоторых вариантах осуществления мембранный анионный обменник включает, без ограничения, Sartobind Q®, Sartobind STIC® PA, Mustang Q® или ChromaSorb®. В некоторых вариантах осуществления анионный обменник представляет собой колонку Fractogel TMAE (Merck - Millipore) или ее эквивалент.

[00146] В некоторых вариантах осуществления загрузочная концентрация pro-VWF

составляет от около 90 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл смолы, например, от около 90 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 100 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 110 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 120 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 140 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 150 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 90 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 100 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 110 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 120 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 140 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 150 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 90 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 100 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 110 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 120 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 140 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 150 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 90 МЕ/мл до около 100 МЕ/мл, от около 100 МЕ/мл до около 150 МЕ/мл, от около 150 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 200 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл или от около 250 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл смолы.

[00147] В некоторых вариантах осуществления способ анионного обмена включает буферную систему. В некоторых вариантах осуществления буферная система содержит один или более элюирующих буферов. В некоторых вариантах осуществления буферная система содержит один или более промывочных буферов. В некоторых вариантах осуществления буферная система содержит по меньшей мере один элюирующий буфер и по меньшей мере один промывочный буфер. В некоторых вариантах осуществления буферная система содержит по меньшей мере два элюирующих буфера и по меньшей мере два промывочных буфера.

[00148] В некоторых вариантах осуществления концентрация загрузочного раствора составляет от около 90 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл смолы, например, от около 90 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 100 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 110 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 120 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 140 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 150 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 90 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 100 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 110 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 120 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 140 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 150 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 90 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 100 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 110 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 120 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 140 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 150 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 90 МЕ/мл до около 100 МЕ/мл, от около 100 МЕ/мл до около 150 МЕ/мл, от около 150 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 200 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл или от около 250 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл смолы.

[00149] В некоторых вариантах осуществления pH исходной композиции,

загрузочного раствора или нагрузочной композиции, содержащих pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и/или пропептид rVWF (rVWF-PP), составляет от pH 6,0 до pH 9,0, например, pH 6,0-pH 9,0, pH 6,3-pH 9,0, pH 6,5-pH 9,0, pH 7,0-pH 9,0, pH 7,5-pH 9,0, pH 7,7,0-pH 9,0, pH 8,0-pH 9,0, pH 6,0-pH 8,5, pH 6,5-pH 8,5, pH 7,0-pH 8,5, pH 7,5-pH 8,5, pH 6,0-pH 8,0, pH 6,5-pH 8,0, pH 7,0-pH 8,0, pH 7,5-pH 8,0, pH 6,0, pH 6,1, pH 6,2, pH 6,3, pH 6,4, pH 6,5, pH 6,6, pH 6,7, pH 6,8, pH 6,9, pH 7,0, pH 7,1, pH 7,2, pH 7,3, pH 7,4, pH 7,5, pH 7,6, pH 7,7, pH 7,8, pH 7,9, pH 8,0, pH 8,1, pH 8,2, pH 8,3, pH 8,4, pH 8,5, pH 8,6, pH 8,7, pH 8,8, pH 8,9 или pH 9,0.

[00150] В некоторых вариантах осуществления проводимость исходной композиции, нагрузочного раствора или нагрузочной композиции, содержащих pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и/или пропептид rVWF (rVWF-PP), составляет от около 5 мСм/см до около 40 мСм/см, например, от около 5 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 10 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 15 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 20 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 25 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 30 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 10 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 10 мСм/см до около 30 мСм/см, от около 5 мСм/см до около 15 мСм/см, от около 15 мСм/см до около 30 мСм/см или от около 20 мСм/см до около 40 мСм/см.

[00151] В некоторых вариантах осуществления исходная композиция, нагрузочный раствор или нагрузочная композиция, содержащие pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и/или пропептид rVWF (rVWF-PP), разбавлены буфером, содержащим цитрат натрия, таким как, без ограничения, 10 мМ-80 мМ цитрата натрия, 15 мМ-80 мМ цитрата натрия, 10 мМ-80 мМ цитрата натрия, 15 мМ-60 мМ цитрата натрия, 20 мМ-60 мМ цитрата натрия, 10 мМ цитрата натрия, 20 мМ цитрата натрия, 30 мМ цитрата натрия, 40 мМ цитрата натрия, 50 мМ цитрата натрия, 55 мМ цитрата натрия, 60 мМ цитрата натрия, 65 мМ цитрата натрия, 70 мМ цитрата натрия, 75 мМ цитрата натрия, 80 мМ цитрата натрия, или т.п.

[00152] В некоторых вариантах осуществления первый промывочный буфер содержит по меньшей мере один хелатирующий агент и необязательно имеет pH в диапазоне от pH 6,0 до pH 9,0. В некоторых вариантах осуществления первый промывочный буфер имеет pH в диапазоне от pH 6,0 до pH 9,0 и необязательно содержит по меньшей мере один хелатирующий агент. В некоторых вариантах осуществления первый промывочный буфер имеет pH в диапазоне от pH 6,0 до pH 6,9. В некоторых вариантах осуществления второй промывочный буфер имеет pH в диапазоне от pH 7,0 до pH 9,0. В некоторых вариантах осуществления первый промывочный буфер может содержать по меньшей мере один хелатирующий агент и имеет pH в диапазоне от pH 6,0 до pH 6,9. В некоторых вариантах осуществления промывочный элюирующий буфер имеет pH менее 7. В одном варианте осуществления второй промывочный буфер имеет pH более чем 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два промывочных буфера, первый промывочный буфер имеет pH менее 7, а второй промывочный буфер имеет pH более 7.

[00153] В некоторых вариантах осуществления один или более промывочных буферов содержат NaCl с концентрацией 120 мМ - 200 мМ, 130 мМ - 200 мМ, 140 мМ - 200 мМ, 150 мМ - 200 мМ, 120 мМ - 190 мМ, 130 мМ - 190 мМ, 140 мМ - 190 мМ, 150 мМ - 190 мМ, 120 мМ - 180 мМ, 130 мМ - 180 мМ, 140 мМ - 180 мМ, 150 мМ - 180 мМ, 120 мМ, 125 мМ, 130 мМ, 135 мМ, 140 мМ, 145 мМ, 150 мМ, 155 мМ, 160 мМ, 165 мМ, 170 мМ, 175 мМ, 180 мМ, 185 мМ, 190 мМ, 195 мМ или 200 мМ.

[00154] В некоторых вариантах осуществления исходная композиция, загрузочный раствор или загрузочная композиция, содержащие зрелый VWF и VWF-PP, контактируют с буфером, содержащим по меньшей мере один хелатирующий агент, и, необязательно, буфер имеющий pH в диапазоне от pH 6,0 до pH 9,0. В некоторых вариантах осуществления исходная композиция, загрузочный раствор или загрузочная композиция контактируют с буфером, имеющим pH в диапазоне от pH 6,0 до pH 9,0, и, необязательно, буфер содержащий по меньшей мере один хелатирующий агент. В некоторых вариантах осуществления буфер имеет pH в диапазоне от pH 7,0 до pH 9,0. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой промывочный буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой элюирующий буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой промывочный буфер с pH от 6,0 до 6,9. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой элюирующий буфер с pH от 7,0 до 9,0. В некоторых вариантах осуществления исходная композиция, загрузочный раствор или загрузочная композиция, содержащие зрелый VWF и VWF-PP, приводят в контакт сначала с промывочным буфером, имеющим pH от 6,0 до 6,9, а затем с по меньшей мере одним элюирующим буфером, имеющим pH от 7,0 до 9,0.

[00155] В некоторых вариантах осуществления зрелый VWF элюируется на стадии анионообменной хроматографии с использованием одного элюирующего буфера. В некоторых вариантах осуществления зрелый VWF элюируется на стадии анионообменной хроматографии с использованием метода градиентного элюирования, включающего более одного элюирующего буфера. Например, элюирование может быть выполнено с использованием двух элюирующих буферов, таких как, например, первый элюирующий буфер и второй элюирующий буфер. В некоторых вариантах осуществления первый элюирующий буфер содержит по меньшей мере один хелатирующий агент и необязательно имеет pH в диапазоне от pH 6,0 до pH 9,0. В некоторых вариантах осуществления первый элюирующий буфер имеет pH в диапазоне от pH 6,0 до pH 9,0 и необязательно содержит по меньшей мере один хелатирующий агент. В некоторых вариантах осуществления первый элюирующий буфер имеет pH в диапазоне от pH 6,0 до pH 6,9. В некоторых вариантах осуществления второй элюирующий буфер имеет pH в диапазоне от pH 7,0 до pH 9,0. В некоторых вариантах осуществления первый элюирующий буфер может содержать по меньшей мере один хелатирующий агент и имеет pH в диапазоне от pH 6,0 до pH 6,9. В некоторых вариантах осуществления первый элюирующий буфер имеет pH менее 7. В одном варианте осуществления второй элюирующий буфер имеет pH более чем 7. В некоторых вариантах осуществления, когда

используются два элюирующих буфера, первый элюирующий буфер имеет рН менее 7, а второй элюирующий буфер имеет рН более 7.

[00156] В некоторых вариантах осуществления рН промывочного буфера для стадии анионообменной хроматографии составляет от рН 6,0 до рН 9,0, например, рН 6,0-рН 9,0, рН 6,3-рН 9,0, рН 6,5-рН 9,0, рН 7,0-рН 9,0, рН 7,5-рН 9,0, рН 7,7,0-рН 9,0, рН 8,0-рН 9,0, рН 6,0-рН 8,5, рН 6,5-рН 8,5, рН 7,0-рН 8,5, рН 7,5-рН 8,5, рН 6,0-рН 8,0, рН 6,5-рН 8,0, рН 7,0-рН 8,0, рН 7,5-рН 8,0, рН 6,0, рН 6,1, рН 6,2, рН 6,3, рН 6,4, рН 6,5, рН 6,6, рН 6,7, рН 6,8, рН 6,9, рН 7,0, рН 7,1, рН 7,2, рН 7,3, рН 7,4, рН 7,5, рН 7,6, рН 7,7, рН 7,8, рН 7,9, рН 8,0, рН 8,1, рН 8,2, рН 8,3, рН 8,4, рН 8,5, рН 8,6, рН 8,7, рН 8,8, рН 8,9, рН 9,0. В некоторых вариантах осуществления он содержит два элюирующих буфера, например, первый и второй элюирующие буферы.

[00157] В некоторых вариантах осуществления рН элюирующего буфера для стадии анионообменной хроматографии составляет от рН 6,0 до рН 9,0, например, рН 6,0-рН 9,0, рН 6,3-рН 9,0, рН 6,5-рН 9,0, рН 7,0-рН 9,0, рН 7,5-рН 9,0, рН 7,7,0-рН 9,0, рН 8,0-рН 9,0, рН 6,0-рН 8,5, рН 6,5-рН 8,5, рН 7,0-рН 8,5, рН 7,5-рН 8,5, рН 6,0-рН 8,0, рН 6,5-рН 8,0, рН 7,0-рН 8,0, рН 7,5-рН 8,0, рН 6,0, рН 6,1, рН 6,2, рН 6,3, рН 6,4, рН 6,5, рН 6,6, рН 6,7, рН 6,8, рН 6,9, рН 7,0, рН 7,1, рН 7,2, рН 7,3, рН 7,4, рН 7,5, рН 7,6, рН 7,7, рН 7,8, рН 7,9, рН 8,0, рН 8,1, рН 8,2, рН 8,3, рН 8,4, рН 8,5, рН 8,6, рН 8,7, рН 8,8, рН 8,9, рН 9,0. В некоторых вариантах осуществления он содержит два элюирующих буфера, например, первый и второй элюирующие буферы.

[00158] В некоторых вариантах осуществления рН элюирующего буфера увеличивается по сравнению с исходным раствором на стадии а), увеличивается по сравнению с первым элюирующим буфером, когда используются два элюирующих буфера, и/или увеличивается по сравнению с промывочным буфером когда используется промывочный буфер. В некоторых вариантах осуществления, когда используются промывочный буфер и элюирующий буфер, промывочный буфер имеет рН менее 7, а элюирующий буфер имеет рН более чем 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два элюирующих буфера, один элюирующий буфер имеет рН менее 7, а другой элюирующий буфер имеет рН более 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются промывочный буфер и два элюирующих буфера, промывочный буфер имеет рН менее 7, и оба элюирующих буфера имеют рН более 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются промывочный буфер и два элюирующих буфера, промывочный буфер и первый элюирующий буфер имеют рН менее 7, а второй элюирующий буфер имеет рН более 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два промывочных буфера и два элюирующих буфера, промывочные буферы и первый элюирующий буфер имеют рН менее 7, а второй элюирующий буфер имеет рН более 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два промывочных буфера и два элюирующих буфера, оба промывочных буфера имеют рН менее 7, и оба элюирующих буфера имеют рН более 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два промывочных буфера и два элюирующих буфера, первый промывочный

буфер имеет рН менее 7, и второй промывочный буфер, и оба элюирующих буфера имеют рН более 7.

[00159] В некоторых вариантах осуществления рН одного или более промывочных и/или элюирующих буферов увеличивается по меньшей мере до 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8,0 по сравнению с загрузочным раствором, содержащим pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и/или пропептид rVWF (rVWF-PP), как указано на стадии (а) способа. В некоторых вариантах осуществления рН буфера увеличивают до по меньшей мере 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8,0, чтобы вызвать диссоциацию комплекса mat-rVWF/rVWF-PP в раствор на стадии (а) способа до mat-rVWF и rVWF-PP, при этом указанная диссоциация происходит за счет разрушения нековалентно связанных mat-rVWF и rVWF-PP. В некоторых вариантах осуществления рН загрузочного раствора увеличивают от по меньшей мере около 7,2 до около 7,8. В некоторых загрузочным раствором вариантах осуществления рН загрузочного раствора увеличивают до по меньшей мере около 7,6. В некоторых вариантах осуществления рН загрузочного раствора увеличивают путем добавления основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления рН загрузочного раствора повышается до по меньшей мере 7. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более промывочных буферов повышается от по меньшей мере около 7,2 до около 7,8. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более промывочных буферов увеличивают до по меньшей мере около 7,6. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более промывочных буферов увеличивают путем добавления основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления один или более промывочных буферов имеют рН по меньшей мере 7. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более буферов для элюирования увеличивают от по меньшей мере около 7,2 до около 7,8. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более элюирующих буферов увеличивают до по меньшей мере около 7,6. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более элюирующих буферов увеличивают путем добавления основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления один или более элюирующих буферов имеют рН по меньшей мере 7.

[00160] В некоторых вариантах осуществления один или более буферов (включая промывочные и/или элюирующие буферы) содержат один или более хелатирующих агентов. В некоторых вариантах осуществления буфер для элюирования содержит по меньшей мере один хелатирующий агент. Хелатирующий агент может представлять собой хелатирующий агент с двухвалентным катионом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один хелатирующий агент представляет собой хелатирующий агент с двухвалентным катионом. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент с двухвалентным катионом выбирают из группы, состоящей из ЭДТК, ЭГТК, ЦДТК и цитрата. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент с двухвалентным катионом выбирают из группы, состоящей из НТК, ДТПК, ЭДДС, ЭДТК, ЭГТК, ЦДТК и цитрата. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой НТК. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой

ДТПК. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ЭДДС. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ЭДТК. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ЭГТК. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ЦДТК. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой цитрат. В некоторых вариантах осуществления один или более промывочных буферов на б) содержат указанные один или более хелатирующих агентов, и имеют рН по меньшей мере 7.

[00161] В некоторых вариантах осуществления один или более буферов (включая промывочные и/или элюирующие буферы) содержат цитрат натрия в диапазоне, включающем, без ограничения, 10 мМ-80 мМ цитрата натрия, 15 мМ-80 мМ цитрата натрия, 10 мМ-80 мМ цитрата натрия, 15 мМ-60 мМ цитрата натрия, 20 мМ-60 мМ цитрата натрия, 10 мМ цитрата натрия, 20 мМ цитрата натрия, 30 мМ цитрата натрия, 40 мМ цитрата натрия, 50 мМ цитрата натрия, 55 мМ цитрата натрия, 60 мМ цитрата натрия, 65 мМ цитрата натрия, 70 мМ цитрата натрия, 75 мМ цитрата натрия, 80 мМ цитрата натрия, или т.п.

[00162] В некоторых вариантах осуществления первый элюирующий буфер дополнительно содержит цитрат натрия в диапазоне, включая, без ограничения, 10 мМ-60 мМ цитрата натрия, 15 мМ-60 мМ цитрата натрия, 10 мМ-50 мМ цитрата натрия, 15 мМ-50 мМ цитрата натрия, 20 мМ-60 мМ цитрата натрия, 10 мМ цитрата натрия, 20 мМ цитрата натрия, 30 мМ цитрата натрия, 40 мМ цитрата натрия, 50 мМ цитрата натрия, 60 мМ цитрата натрия, или т.п.

[00163] В некоторых вариантах осуществления второй элюирующий буфер дополнительно содержит цитрат натрия, такой как, без ограничения, 10 мМ-60 мМ цитрата натрия, 15 мМ-60 мМ цитрата натрия, 10 мМ-50 мМ цитрата натрия, 15 мМ-50 мМ цитрата натрия, 20 мМ-60 мМ цитрата натрия, 10 мМ цитрата натрия, 20 мМ цитрата натрия, 30 мМ цитрата натрия, 40 мМ цитрата натрия, 50 мМ цитрата натрия, 60 мМ цитрата натрия, или т.п.

[00164] В некоторых вариантах осуществления элюирующий буфер А и/или элюирующий буфер В на стадии анионообменной хроматографии содержит от около 0,5 мМ до около 20 мМ ЭДТК, например, от около 0,5 мМ до около 20 мМ, от около 1 мМ до около 20 мМ, от около 1,5 мМ до около 20 мМ, от около 2 мМ до около 20 мМ, от около 3 мМ до около 20 мМ, от около 5 мМ до около 20 мМ, от около 0,5 мМ до около 15 мМ, от около 1 мМ до около 10 мМ, от около 1 мМ до около 5 мМ, около 5 мМ, около 0,5 мМ, около 1 мМ, около 2 мМ, около 3 мМ, около 4 мМ, около 5 мМ, около 6 мМ, около 7 мМ, около 8 мМ, около 9 мМ, около 10 мМ, около 11 мМ, около 12 мМ, около 13 мМ, около 14 мМ, около 15 мМ, около 16 мМ, около 17 мМ, около 18 мМ, около 19 мМ, около 20 мМ, или т.п.

[00165] В некоторых вариантах осуществления цитрат может быть обнаружен в элюенте после удаления γ VWF-пропептида с использованием метода анионообменного

элюирования. В некоторых вариантах осуществления цитрат может быть обнаружен в элюенте после удаления rVWF-пропептида с использованием метода ступенчатого анионообменного элюирования. В некоторых вариантах осуществления цитрат может быть обнаружен в элюенте после удаления rVWF-пропептида с использованием метода градиентного анионообменного элюирования. В некоторых вариантах осуществления анионообменный противоион представляет собой цитрат³⁻.

[00166] Любой из буферов (буферных систем), описанных в данном документе, может быть выбран из группы, состоящей из глицина, HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты), трис-HCl (Трис (гидроксиметил) аминометан), гистидина, имидазола, ацетат цитрата, цитрата, ацетата, сольвата, фосфата, трис-HCl, бис-трис, гистидина, имидазола, аргинин HCl, лизин HCl и 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты в виде отдельных буферов или в виде комбинации двух или более буферов. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит глицин. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту). В некоторых вариантах осуществления буфер содержит трис-HCl (Трис(гидроксиметил)-аминометан). В некоторых вариантах осуществления буфер содержит гистидин. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит имидазол. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит ацетат цитрат. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит цитрат. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит ацетат. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит MES. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит фосфат. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит трис-HCl. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит бис-трис. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит гистидин. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит имидазол. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит аргинин HCl. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит лизин HCl. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит один, два, три или четыре буфера, приведенных в данном документе.

[00167] В некоторых вариантах осуществления один или более буферов выбирают из группы, состоящей из глицина HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), трис-HCl (трис(гидроксиметил)-аминометан), гистидина, имидазола, цитрата ацетата, MES и 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты.

[00168] В некоторых вариантах осуществления один или более буферов содержат по меньшей мере один буфер, имеющий проводимость $\geq 0,5$ мСм/см при 25 °С. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов содержат по меньшей мере один буфер, имеющий проводимость $20,0 \pm 0,2$ мСм/см при 25 °С. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов содержат по меньшей мере один буфер, имеющий проводимость $17,0 \pm 0,2$ мСм/см при 25 °С. В некоторых вариантах осуществления один

или более буферов содержат по меньшей мере один буфер, имеющий проводимость $15,0 \pm 0,2$ мСм/см при 25 °С. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов содержат по меньшей мере один буфер, имеющий проводимость $12,0 \pm 0,2$ мСм/см при 25 °С. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов содержат по меньшей мере один буфер, имеющий проводимость $10,0 \pm 0,2$ мСм/см при 25 °С. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов содержат по меньшей мере один буфер, имеющий проводимость $5,0 \pm 0,2$ мСм/см при 25 °С. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов содержат по меньшей мере один буфер, имеющий проводимость $2,0 \pm 0,2$ мСм/см при 25 °С.

[00169] В некоторых вариантах осуществления скорость потока на одной или более стадиях промывки данного способа составляет от около 10 см/ч до около 200 см/ч, например, около 10 см/ч, около 15 см/ч, около 20 см/ч, около 25 см/ч, около 30 см/ч, около 35 см/ч, около 40 см/ч, около 45 см/ч, около 50 см/ч, около 55 см/ч, около 60 см/ч, около 65 см/ч, около 70 см/ч, около 75 см/ч, около 80 см/ч, около 85 см/ч, около 90 см/ч, около 95 см/ч, около 100 см/ч, около 105 см/ч, около 110 см/ч, около 115 см/ч, около 120 см/ч, около 125 см/ч, около 130 см/ч, около 135 см/ч, около 140 см/ч, около 145 см/ч, около 150 см/ч, около 155 см/ч, около 160 см/ч, около 165 см/ч, около 170 см/ч, около 175 см/ч, около 180 см/ч, около 185 см/ч, около 190 см/ч, около 195 см/ч или около 200 см/ч. В зависимости от смолы в некоторых вариантах осуществления скорость потока может достигать 600 см/ч.

[00170] В некоторых вариантах осуществления скорость потока на одной или более стадиях элюирования данного способа составляет от около 10 см/ч до около 200 см/ч, например, около 10 см/ч, около 15 см/ч, около 20 см/ч, около 25 см/ч, около 30 см/ч, около 35 см/ч, около 40 см/ч, около 45 см/ч, около 50 см/ч, около 55 см/ч, около 60 см/ч, около 65 см/ч, около 70 см/ч, около 75 см/ч, около 80 см/ч, около 85 см/ч, около 90 см/ч, около 95 см/ч, около 100 см/ч, около 105 см/ч, около 110 см/ч, около 115 см/ч, около 120 см/ч, около 125 см/ч, около 130 см/ч, около 135 см/ч, около 140 см/ч, около 145 см/ч, около 150 см/ч, около 155 см/ч, около 160 см/ч, около 165 см/ч, около 170 см/ч, около 175 см/ч, около 180 см/ч, около 185 см/ч, около 190 см/ч, около 195 см/ч или около 200 см/ч. В зависимости от смолы в некоторых вариантах осуществления скорость потока может достигать 600 см/ч.

[00171] В некоторых вариантах осуществления один или более буферов дополнительно содержат один или более неионных детергентов. В некоторых вариантах осуществления неионный детергент выбирают из группы, состоящей из Triton X-100, Tween 80 и Tween 20. В некоторых вариантах осуществления неионный детергент представляет собой Triton X-100. В некоторых вариантах осуществления неионный детергент представляет собой Tween 80. В некоторых вариантах осуществления неионный детергент представляет собой Tween 20.

[00172] В некоторых вариантах осуществления указанный один или более буферов дополнительно содержат одно или более дополнительных веществ, выбранных из группы,

состоящей из невосстанавливающих сахаров, сахарных спиртов и полиолов. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов дополнительно содержат один или более невосстанавливающих сахаров. В некоторых вариантах осуществления невосстанавливающий сахар включает, без ограничения, сахарозу, трегалозу, маннит, сорбит, галактит и/или ксилит. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов дополнительно содержат один или более сахарных спиртов. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов дополнительно содержат один или более полиолов. В некоторых вариантах осуществления сахарный спирт или полиол включает, без ограничения, маннит, ксилит, эритрит, треит, сорбит и/или глицерин. В некоторых вариантах осуществления буферы дополнительно содержат этиленгликоль, пропиленгликоль, глицерин, 1,2,3-пропантриол), мезо-эритрит и/или эритрит (мезо-1,2,3,4-бутантетрол).

[00173] В некоторых вариантах осуществления буфер может содержать один или более одновалентных катионов. В некоторых вариантах осуществления один или более одновалентных катионов выбирают из группы, состоящей из Na^+ , K^+ , Li^+ , Cs^+ и NH_4^+ . Например, одновалентный катион может представлять собой Na^+ . В других вариантах осуществления буфер содержит один или более одновалентных, двухвалентных и/или трехвалентных анионов. Один или более одновалентных, двухвалентных и/или трехвалентных анионов могут быть выбраны из группы, состоящей из Cl^- , ацетата⁻, SO_4^{2-} , Br^- , цитрата³⁻, PO_4^{3-} и BO_3^{3-} . В некоторых вариантах осуществления буфер содержит одно или более дополнительных веществ, выбранных из группы, состоящей из невосстанавливающих сахаров и сахарных спиртов. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов дополнительно содержат один или более одновалентных катионов. В некоторых вариантах осуществления один или более одновалентных катионов выбирают из группы, состоящей из Na^+ , K^+ , Li^+ и Cs^+ . В некоторых вариантах осуществления одновалентный катион представляет собой Na^+ . В некоторых вариантах осуществления один или более буферов дополнительно содержат один или более одновалентных, двухвалентных и/или трехвалентных анионов. В некоторых вариантах осуществления один или более одновалентных, двухвалентных и/или трехвалентных анионов выбирают из группы, состоящей из Cl^- , ацетата⁻, SO_4^{2-} , Br^- и цитрата³⁻.

[00174] pH любого из буферов можно регулировать (увеличивать) путем добавления аминокислоты, трис, NaOH, этаноламина и т.п.

[00175] В некоторых вариантах осуществления комбинация буферного хелатора для метода анионообмена содержит цитрат, малат (яблочную кислоту) и тартрат (винную кислоту).

ОЧИСТКА КАТИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

[00176] В одном аспекта данного способа зрелый VWF (matVWF) отделяют от VWF-PP с использованием катионообменной хроматографии (СЕХ). В некоторых случаях оставшиеся примеси, полученные из клетки-хозяина, такие как белки клетки-хозяина

СНО, примеси, связанные с технологическими процессами, такие как рекомбинантный фурин и реагенты для инактивации низкомолекулярных вирусов, соединения среды, такие как соевый пептон, и другие примеси, связанные с продуктами, удаляются из зрелого VWF.

[00177] В другом аспекте данного способа зрелый VWF отделяют от VWF-PP, такого как остаточный VWF-PP или свободный VWF-PP, с помощью катионообменной хроматографии. Для разделения исходная композиция, загрузочный раствор или загрузочный состав могут иметь низкий pH и по меньшей мере один хелатирующий агент. В некоторых вариантах осуществления исходная композиция, загрузочный раствор или загрузочная композиция содержат pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и/или пропептид rVWF (rVWF-PP). В некоторых вариантах осуществления катионный обменник работает в режиме связывания, и зрелые VWF и VWF-PP разделяют с использованием градиентного элюирующего буфера, содержащего по меньшей мере один хелатирующий агент. В других вариантах осуществления буфер для градиентного элюирования имеет pH от нейтрального до высокого, например pH в диапазоне от pH 6,0 до pH 9,0. В другом варианте осуществления буфер для градиентного элюирования содержит один или более хелатирующих агентов и имеет pH 7,0 или более, например, pH 7,0 - pH 9,0. Например, буфер для градиентного элюирования может содержать ЭДТК и иметь pH 8,5.

[00178] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен способ получения композиции, содержащей высокоочищенный зрелый рекомбинантный rVWF, обедненный пропептидами, (mat-rVWF высокой чистоты), причем указанный способ включает стадии: (a) загрузка раствора, содержащего pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и/или пропептид rVWF (rVWF-PP), на катионообменную колонку, где указанный pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF связаны с указанной катионообменной колонкой; (b) промывание указанной катионообменной колонки на стадии a), содержащей указанный связанный pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF, одним или более промывочными буферами; (c) обработка указанной колонки на b), содержащей связанный pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF, фурином, причем указанный фурин расщепляет указанный pro-rVWF на mat-rVWF и rVWF-PP; (d) элюирование указанного связанного pro-rVWF, комплекса mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF из колонки на c) элюирующим буфером, причем указанный элюирующий буфер индуцирует диссоциацию указанного rVWF-PP от mat-rVWF, нековалентно связанного с указанным rVWF-PP, и при этом указанную диссоциацию индуцируют путем: (i) добавления по меньшей мере одного хелатирующего агента в указанный элюирующий буфер, или (ii) увеличения pH указанного элюирующего буфера до pH по меньшей мере 7; а также (e) сбор указанного mat-rVWF отдельно от указанного rVWF-PP для получения композиции высокоочищенного mat-rVWF, при этом указанная композиция высокоочищенного mat-rVWF содержит по меньшей мере 95% зрелого rVWF и менее 5% rVWF-PP.

[00179] В некоторых вариантах осуществления а) и б) осуществляют одновременно на одной стадии. В некоторых вариантах осуществления раствор на а) содержит поток из метода иммуноаффинной очистки. В некоторых вариантах осуществления раствор на а) включает проточный раствор из колонки с моноклональным антителом, причем указанное моноклональное антитело представляет собой моноклональное антитело FVIII. В некоторых вариантах осуществления раствор на а) выбирают из группы, состоящей из среды для культивирования клеток, проточного раствора колонки с антителами и забуференного раствора.

[00180] Катионообменник может работать в режиме связывания для разделения зрелого VWF и VWF-PP. Катионообменная хроматография может выполняться, как это известно специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления катионообменник включает, без ограничения, POROS® S (Applied Biosystems), Convective Interaction Media (CIM®; BIA Separation), Toyopearl Gigacap S (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA), Toyopearl Gigacap CM (Tosoh), Toyopearl SP (Tosoh), Toyopearl CM (Tosoh), MacroPrep S (Bio-rad, Hercules, CA), UNOsphereS (Bio-rad, Hercules, CA), MacroPrepCM ((Bio-rad, Hercules, CA), Fractogel EMD SO3 (Merck), Fractogel EMD COO (Merck), Fractogel EMD SE Hicap (Merck), Cellufine Sulfate (JNC), CM и SP Trisacryl (Pall), CM и S HyperD (Pall), S и CM Sepharose CL (GE Healthcare), S и CM Sepharose FF (GE Healthcare), S и CM CAPTO™ (GE Healthcare), MonoS (GE Healthcare), Source S (GE Healthcare), Nuvia S (Merck) или Cellufine phosphate (JNC). В некоторых вариантах осуществления катионообменник представляет собой мембранный катионообменник. В некоторых вариантах осуществления мембранный катионообменник включает, без ограничения, Mustang S (Pall) или Sartobind® S. В некоторых вариантах осуществления катионообменник представляет собой колонку UNO_Sphere S (Bio-Rad) или ее эквивалент.

[00181] В некоторых вариантах осуществления стадии (b) промывка указанной катионообменной колонки на а), содержащей указанный связанный рго-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF, предполагает промывку одним или более промывочными буферами, причем одна или более промывок буфером включает один, два, три, четыре и/или пять промывочных буферов. В некоторых вариантах осуществления второй промывочный буфер содержит компоненты для вирусной инактивации. В некоторых вариантах осуществления, когда используются четыре или пять промывочных буферов, второй промывочный буфер содержит компоненты для вирусной инактивации. В некоторых вариантах осуществления, когда используются четыре или пять промывочных буферов, второй или третий промывочный буфер содержит компоненты для вирусной инактивации. В некоторых вариантах обработка для инактивации вирусов представляет собой обработку растворителем и детергентом (S/D). В некоторых вариантах осуществления, когда используются пять промывочных буферов, первый, второй, третий и/или пятый промывочные буферы имеют больший рН, чем четвертый промывочный буфер. В некоторых вариантах осуществления, когда используются пять промывочных

буферов, первый, второй, третий и пятый промывочные буферы имеют рН от около 7 до 8, а четвертый промывочный буфер имеет рН от около 5 до 6. В некоторых вариантах осуществления, когда используются пять промывочных буферов, первый, второй, третий и/или пятый промывочные буферы имеют рН от около рН 7,4 до рН 7,5, а четвертый промывочный буфер имеет рН около рН 5,5. В некоторых вариантах осуществления стадия обработки для инактивации вирусов осуществляют с буфером, который имеет рН больший, чем четвертый промывочный буфер. В некоторых вариантах осуществления, когда используются четыре промывочных буфера, после первого промывочного буфера применяется стадия обработки для инактивации вирусов. В некоторых вариантах осуществления, когда используются четыре промывочных буфера, первый, второй и четвертый промывочные буферы имеют больший рН, чем третий промывочный буфер. В некоторых вариантах осуществления стадия обработки для инактивации вирусов осуществляют с буфером, который имеет рН больший, чем третий промывочный буфер. В некоторых вариантах осуществления стадия инактивации вирусов происходит с буфером, который имеет тот же рН, что и первый, второй и/или четвертый промывочные буферы. В некоторых вариантах осуществления, когда используются четыре промывочных буфера, первый, второй и четвертый промывочные буферы имеют рН от около рН 7 до около рН 8, а третий промывочный буфер имеет рН от около рН 5 до около рН 6. В некоторых вариантах осуществления, когда используются четыре промывочных буфера, первый, второй и четвертый промывочные буферы имеют рН от около 7,4 до 7,5, а третий промывочный буфер имеет рН около 5,5.

[00182] В некоторых вариантах осуществления загрузочная концентрация рго-VWF составляет от около 90 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл смолы, например, от около 90 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 100 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 110 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 120 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 140 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 150 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 90 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 100 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 110 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 120 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 140 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 150 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 90 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 100 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 110 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 120 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 140 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 150 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 90 МЕ/мл до около 100 МЕ/мл, от около 100 МЕ/мл до около 150 МЕ/мл, от около 150 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 200 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл или от около 250 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл смолы.

[00183] В некоторых вариантах осуществления способ катионного обмена включает буферную систему. В некоторых вариантах осуществления буферная система содержит один или более элюирующих буферов. В некоторых вариантах осуществления

буферная система содержит один или более промывочных буферов. В некоторых вариантах осуществления буферная система содержит по меньшей мере один элюирующий буфер и по меньшей мере один промывочный буфер. В некоторых вариантах осуществления буферная система содержит по меньшей мере два элюирующих буфера и по меньшей мере два промывочных буфера.

[00184] В некоторых вариантах осуществления первый промывочный буфер содержит по меньшей мере один хелатирующий агент и необязательно имеет рН в диапазоне от рН 6,0 до рН 9,0. В некоторых вариантах осуществления первый промывочный буфер имеет рН в диапазоне от рН 6,0 до рН 9,0 и необязательно содержит по меньшей мере один хелатирующий агент. В некоторых вариантах осуществления первый промывочный буфер имеет рН в диапазоне от рН 6,0 до рН 6,9. В некоторых вариантах осуществления второй промывочный буфер имеет рН в диапазоне от рН 7,0 до рН 9,0. В некоторых вариантах осуществления первый промывочный буфер может содержать по меньшей мере один хелатирующий агент и имеет рН в диапазоне от рН 6,0 до рН 6,9. В некоторых вариантах осуществления промывочный буфер имеет рН менее 7. В некоторых вариантах осуществления второй промывочный буфер имеет рН более 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два промывочных буфера, первый промывочный буфер имеет рН менее 7, а второй промывочный буфер имеет рН более 7.

[00185] В некоторых вариантах осуществления один или более промывочных буферов содержат NaCl с концентрацией 120 мМ - 200 мМ, 130 мМ - 200 мМ, 140 мМ - 200 мМ, 150 мМ - 200 мМ, 120 мМ - 190 мМ, 130 мМ - 190 мМ, 140 мМ - 190 мМ, 150 мМ - 190 мМ, 120 мМ - 180 мМ, 130 мМ - 180 мМ, 140 мМ - 180 мМ, 150 мМ - 180 мМ, 120 мМ, 125 мМ, 130 мМ, 135 мМ, 140 мМ, 145 мМ, 150 мМ, 155 мМ, 160 мМ, 165 мМ, 170 мМ, 175 мМ, 180 мМ, 185 мМ, 190 мМ, 195 мМ или 200 мМ.

[00186] В некоторых вариантах осуществления исходная композиция, загрузочный раствор или загрузочная композиция, содержащие зрелый VWF и VWF-PP, контактируют с буфером, содержащим по меньшей мере один хелатирующий агент, и, необязательно, буфер имеющий рН в диапазоне от рН 6,0 до рН 9,0. В некоторых вариантах осуществления исходная композиция, загрузочный раствор или загрузочная композиция контактируют с буфером, имеющим рН в диапазоне от рН 6,0 до рН 9,0, и, необязательно, буфер содержащий по меньшей мере один хелатирующий агент. В некоторых вариантах осуществления буфер имеет рН в диапазоне от рН 7,0 до рН 9,0. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой промывочный буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой элюирующий буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой промывочный буфер с рН от 6,0 до 6,9. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой элюирующий буфер с рН от 7,0 до 9,0. В некоторых вариантах осуществления исходная композиция, загрузочный раствор или загрузочная композиция, содержащие зрелый VWF и VWF-PP, приводят в контакт сначала с промывочным буфером, имеющим рН от 6,0 до 6,9, а затем с по

меньшей мере одним элюирующим буфером, имеющим рН от 7,0 до 9,0.

[00187] В некоторых вариантах осуществления зрелый VWF элюируется на стадии анионообменной хроматографии с использованием одного элюирующего буфера. В некоторых вариантах осуществления зрелый VWF элюируется на стадии анионообменной хроматографии с использованием метода градиентного элюирования, включающего более одного элюирующего буфера. Например, элюирование может быть выполнено с использованием двух элюирующих буферов, таких как, например, первый элюирующий буфер и второй элюирующий буфер. В некоторых вариантах осуществления первый элюирующий буфер содержит по меньшей мере один хелатирующий агент и необязательно имеет рН в диапазоне от рН 6,0 до рН 9,0. В некоторых вариантах осуществления первый элюирующий буфер имеет рН в диапазоне от рН 6,0 до рН 9,0 и необязательно содержит по меньшей мере один хелатирующий агент. В некоторых вариантах осуществления первый элюирующий буфер имеет рН в диапазоне от рН 6,0 до рН 6,9. В некоторых вариантах осуществления второй элюирующий буфер имеет рН в диапазоне от рН 7,0 до рН 9,0. В некоторых вариантах осуществления первый элюирующий буфер может содержать по меньшей мере один хелатирующий агент и имеет рН в диапазоне от рН 6,0 до рН 6,9. В некоторых вариантах осуществления первый элюирующий буфер имеет рН менее 7. В некоторых вариантах осуществления второй элюирующий буфер имеет рН более 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два элюирующих буфера, первый элюирующий буфер рН менее 7, а второй элюирующий буфер имеет рН более 7.

[00188] В некоторых вариантах осуществления рН промывочного буфера для стадии катионообменной хроматографии составляет от рН 6,0 до рН 9,0, например, рН 6,0-рН 9,0, рН 6,3-рН 9,0, рН 6,5-рН 9,0, рН 7,0-рН 9,0, рН 7,5-рН 9,0, рН 7,7,0-рН 9,0, рН 8,0-рН 9,0, рН 6,0-рН 8,5, рН 6,5-рН 8,5, рН 7,0-рН 8,5, рН 7,5-рН 8,5, рН 6,0-рН 8,0, рН 6,5-рН 8,0, рН 7,0-рН 8,0, рН 7,5-рН 8,0, рН 6,0, рН 6,1, рН 6,2, рН 6,3, рН 6,4, рН 6,5, рН 6,6, рН 6,7, рН 6,8, рН 6,9, рН 7,0, рН 7,1, рН 7,2, рН 7,3, рН 7,4, рН 7,5, рН 7,6, рН 7,7, рН 7,8, рН 7,9, рН 8,0, рН 8,1, рН 8,2, рН 8,3, рН 8,4, рН 8,5, рН 8,6, рН 8,7, рН 8,8, рН 8,9, рН 9,0. В некоторых вариантах осуществления он содержит два элюирующих буфера, например, первый и второй элюирующие буферы.

[00189] В некоторых вариантах осуществления рН элюирующего буфера для стадии катионообменной хроматографии составляет от рН 6,0 до рН 9,0, например, рН 6,0-рН 9,0, рН 6,3-рН 9,0, рН 6,5-рН 9,0, рН 7,0-рН 9,0, рН 7,5-рН 9,0, рН 7,7,0-рН 9,0, рН 8,0-рН 9,0, рН 6,0-рН 8,5, рН 6,5-рН 8,5, рН 7,0-рН 8,5, рН 7,5-рН 8,5, рН 6,0-рН 8,0, рН 6,5-рН 8,0, рН 7,0-рН 8,0, рН 7,5-рН 8,0, рН 6,0, рН 6,1, рН 6,2, рН 6,3, рН 6,4, рН 6,5, рН 6,6, рН 6,7, рН 6,8, рН 6,9, рН 7,0, рН 7,1, рН 7,2, рН 7,3, рН 7,4, рН 7,5, рН 7,6, рН 7,7, рН 7,8, рН 7,9, рН 8,0, рН 8,1, рН 8,2, рН 8,3, рН 8,4, рН 8,5, рН 8,6, рН 8,7, рН 8,8, рН 8,9, рН 9,0. В некоторых вариантах осуществления он содержит два элюирующих буфера, например, первый и второй элюирующие буферы.

[00190] В некоторых вариантах осуществления рН элюирующего буфера

увеличивается по сравнению с исходным раствором на стадии а), увеличивается по сравнению с первым элюирующим буфером, когда используются два элюирующих буфера, и/или увеличивается по сравнению с промывочным буфером когда используется промывочный буфер. В некоторых вариантах осуществления, когда используются промывочный буфер и элюирующий буфер, промывочный буфер имеет рН менее 7, а элюирующий буфер имеет рН более чем 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два элюирующих буфера, один элюирующий буфер имеет рН менее 7, а другой элюирующий буфер имеет рН более 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются промывочный буфер и два элюирующих буфера, промывочный буфер имеет рН менее 7, и оба элюирующих буфера имеют рН более 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются промывочный буфер и два элюирующих буфера, промывочный буфер и первый элюирующий буфер имеют рН менее 7, а второй элюирующий буфер имеет рН более 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два промывочных буфера и два элюирующих буфера, промывочные буферы и первый элюирующий буфер имеют рН менее 7, а второй элюирующий буфер имеет рН более 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два промывочных буфера и два элюирующих буфера, оба промывочных буфера имеют рН менее 7, и оба элюирующих буфера имеют рН более 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два промывочных буфера и два элюирующих буфера, первый промывочный буфер имеет рН менее 7, и второй промывочный буфер, и оба элюирующих буфера имеют рН более 7.

[00191] В некоторых вариантах осуществления рН одного или более промывочных и/или элюирующих буферов увеличивается по меньшей мере до 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8,0 по сравнению с загрузочным раствором, содержащим рго-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и/или пропептид rVWF (rVWF-PP), как указано на стадии (а) способа. В некоторых вариантах осуществления рН буфера увеличивают до по меньшей мере 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8,0, чтобы вызвать диссоциацию комплекса mat-rVWF/rVWF-PP в раствор на стадии (а) способа до mat-rVWF и rVWF-PP, при этом указанная диссоциация происходит за счет разрушения нековалентно связанных mat-rVWF и rVWF-PP. В некоторых вариантах осуществления рН загрузочного раствора увеличивают от по меньшей мере около 7,2 до около 7,8. В некоторых загрузочным раствором вариантах осуществления рН загрузочного раствора увеличивают до по меньшей мере около 7,6. В некоторых вариантах осуществления рН загрузочного раствора увеличивают путем добавления основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления рН загрузочного раствора повышается до по меньшей мере 7. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более промывочных буферов повышается от по меньшей мере около 7,2 до около 7,8. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более промывочных буферов увеличивают до по меньшей мере около 7,6. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более промывочных буферов увеличивают путем добавления основных аминокислот. В некоторых вариантах

осуществления один или более промывочных буферов имеют рН по меньшей мере 7. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более буферов для элюирования увеличивают от по меньшей мере около 7,2 до около 7,8. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более элюирующих буферов увеличивают до по меньшей мере около 7,6. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более элюирующих буферов увеличивают путем добавления основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления один или более элюирующих буферов имеют рН по меньшей мере 7.

[00192] В некоторых вариантах осуществления рН загрузочного раствора, содержащего pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и/или пропептид rVWF (rVWF-PP), составляет от рН 6,0 до рН 9,0, например, рН 6,0-рН 9,0, рН 6,3-рН 9,0, рН 6,5-рН 9,0, рН 7,0-рН 9,0, рН 7,5-рН 9,0, рН 7,7,0-рН 9,0, рН 8,0-рН 9,0, рН 6,0-рН 8,5, рН 6,5-рН 8,5, рН 7,0-рН 8,5, рН 7,5-рН 8,5, рН 6,0-рН 8,0, рН 6,5-рН 8,0, рН 7,0-рН 8,0, рН 7,5-рН 8,0, рН 6,0, рН 6,1, рН 6,2, рН 6,3, рН 6,4, рН 6,5, рН 6,6, рН 6,7, рН 6,8, рН 6,9, рН 7,0, рН 7,1, рН 7,2, рН 7,3, рН 7,4, рН 7,5, рН 7,6, рН 7,7, рН 7,8, рН 7,9, рН 8,0, рН 8,1, рН 8,2, рН 8,3, рН 8,4, рН 8,5, рН 8,6, рН 8,7, рН 8,8, рН 8,9 или рН 9,0.

[00193] В некоторых вариантах осуществления проводимость исходной композиции, загрузочного раствора или загрузочной композиции, содержащих pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и/или пропептид rVWF (rVWF-PP), составляет от около 5 мСм/см до около 40 мСм/см, например, от около 5 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 10 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 15 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 20 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 25 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 30 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 10 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 10 мСм/см до около 30 мСм/см, от около 5 мСм/см до около 15 мСм/см, от около 15 мСм/см до около 30 мСм/см или от около 20 мСм/см до около 40 мСм/см.

[00194] В некоторых вариантах осуществления загрузочный раствор содержащий pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и/или пропептид rVWF (rVWF-PP), разбавлен буфером, содержащим цитрат натрия, таким как, без ограничения, 10 мМ-80 мМ цитрата натрия, 15 мМ-80 мМ цитрата натрия, 10 мМ-80 мМ цитрата натрия, 15 мМ-60 мМ цитрата натрия, 20 мМ-60 мМ цитрата натрия, 10 мМ цитрата натрия, 20 мМ цитрата натрия, 30 мМ цитрата натрия, 40 мМ цитрата натрия, 50 мМ цитрата натрия, 55 мМ цитрата натрия, 60 мМ цитрата натрия, 65 мМ цитрата натрия, 70 мМ цитрата натрия, 75 мМ цитрата натрия, 80 мМ цитрата натрия, или т.п.

[00195] В некоторых вариантах осуществления рН промывочного буфера для стадии катионообменной хроматографии составляет от рН 6,0 до рН 9,0, например, рН 6,0-рН 9,0, рН 6,3-рН 9,0, рН 6,5-рН 9,0, рН 7,0-рН 9,0, рН 7,5-рН 9,0, рН 7,7,0-рН 9,0, рН 8,0-рН 9,0, рН 6,0-рН 8,5, рН 6,5-рН 8,5, рН 7,0-рН 8,5, рН 7,5-рН 8,5, рН 6,0-рН 8,0, рН 6,5-рН 8,0, рН 7,0-рН 8,0, рН 7,5-рН 8,0, рН 6,0, рН 6,1, рН 6,2, рН 6,3, рН 6,4, рН 6,5, рН 6,6, рН 6,7, рН 6,8, рН 6,9, рН 7,0, рН 7,1, рН 7,2, рН 7,3, рН 7,4, рН 7,5, рН 7,6, рН 7,7, рН 7,8, рН 7,9, рН 8,0, рН 8,1, рН 8,2, рН 8,3, рН 8,4, рН 8,5, рН 8,6, рН 8,7, рН 8,8, рН 8,9 или рН 9,0.

[00196] В некоторых вариантах осуществления рН элюирующего буфера для стадии катионообменной хроматографии составляет от рН 6,0 до рН 9,0, например, рН 6,0-рН 9,0, рН 6,3-рН 9,0, рН 6,5-рН 9,0, рН 7,0-рН 9,0, рН 7,5-рН 9,0, рН 7,7,0-рН 9,0, рН 8,0-рН 9,0, рН 6,0-рН 8,5, рН 6,5-рН 8,5, рН 7,0-рН 8,5, рН 7,5-рН 8,5, рН 6,0-рН 8,0, рН 6,5-рН 8,0, рН 7,0-рН 8,0, рН 7,5-рН 8,0, рН 6,0, рН 6,1, рН 6,2, рН 6,3, рН 6,4, рН 6,5, рН 6,6, рН 6,7, рН 6,8, рН 6,9, рН 7,0, рН 7,1, рН 7,2, рН 7,3, рН 7,4, рН 7,5, рН 7,6, рН 7,7, рН 7,8, рН 7,9, рН 8,0, рН 8,1, рН 8,2, рН 8,3, рН 8,4, рН 8,5, рН 8,6, рН 8,7, рН 8,8, рН 8,9 или рН 9,0.

[00197] В некоторых вариантах осуществления рН элюирующего буфера увеличивается по сравнению с исходным раствором на стадии а), увеличивается по сравнению с первым элюирующим буфером, когда используются два элюирующих буфера, и/или увеличивается по сравнению с промывочным буфером когда используется промывочный буфер. В некоторых вариантах осуществления, когда используются промывочный буфер и элюирующий буфер, промывочный буфер имеет рН менее 7, а элюирующий буфер имеет рН более 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два элюирующих буфера, первый элюирующий буфер имеет рН менее 7, а второй элюирующий буфер имеет рН более 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются промывочный буфер и два элюирующих буфера, промывочный буфер имеет рН менее 7, а оба элюирующих буфера имеют рН более 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются промывочный буфер и два элюирующих буфера, промывочный буфер и первый элюирующий буфер имеют рН менее 7, а второй элюирующий буфер имеет рН более 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два промывочных буфера и два элюирующих буфера, два промывочных буфера и первый элюирующий буфер имеют рН менее 7, а второй элюирующий буфер имеет рН более 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два промывочных буфера и два элюирующих буфера, оба промывочных буфера имеют рН менее 7, а оба элюирующих буфера имеют рН более 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два промывочных буфера и два элюирующих буфера, первый промывочный буфер имеет рН менее 7, а второй промывочный буфер и оба элюирующих буфера имеют рН более 7. .

[00198] В некоторых вариантах осуществления рН одного или более промывочных и/или элюирующих буферов увеличивается по меньшей мере до 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8,0 по сравнению с загрузочным раствором, содержащим rго-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и/или пропептид rVWF (rVWF-PP), как указано на стадии (а) способа. В некоторых вариантах осуществления рН буфера увеличивают до по меньшей мере 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8,0, чтобы вызвать диссоциацию комплекса mat-rVWF/rVWF-PP в раствор на стадии (а) способа до mat-rVWF и rVWF-PP, при этом указанная диссоциация происходит за счет разрушения нековалентно связанных mat-rVWF и rVWF-PP. В некоторых вариантах осуществления рН загрузочного раствора увеличивают от по меньшей мере около 7,2 до около 7,8. В некоторых загрузочным

раствором в вариантах осуществления рН загрузочного раствора увеличивают до по меньшей мере около 7,6. В некоторых вариантах осуществления рН загрузочного раствора увеличивают путем добавления основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления рН загрузочного раствора повышается до по меньшей мере 7. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более промывочных буферов повышается от по меньшей мере около 7,2 до около 7,8. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более промывочных буферов увеличивают до по меньшей мере около 7,6. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более промывочных буферов увеличивают путем добавления основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления один или более промывочных буферов имеют рН по меньшей мере 7. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более буферов для элюирования увеличивают от по меньшей мере около 7,2 до около 7,8. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более элюирующих буферов увеличивают до по меньшей мере около 7,6. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более элюирующих буферов увеличивают путем добавления основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления один или более элюирующих буферов имеют рН по меньшей мере 7.

[00199] В некоторых вариантах осуществления один или более буферов (включая промывочные и/или элюирующие буферы) содержат один или более хелатирующих агентов. В некоторых вариантах осуществления буфер для элюирования содержит по меньшей мере один хелатирующий агент. Хелатирующий агент может представлять собой хелатирующий агент с двухвалентным катионом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один хелатирующий агент представляет собой хелатирующий агент с двухвалентным катионом. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент с двухвалентным катионом выбирают из группы, состоящей из ЭДТК, ЭГТК, ЦДТК и цитрата. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент с двухвалентным катионом выбирают из группы, состоящей из НТК, ДТПК, ЭДДС, ЭДТК, ЭГТК, ЦДТК и цитрата. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент с двухвалентным катионом выбирают из группы, состоящей из цитрата, ЭДТК, ДТПК, НТК и ЭДДС. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой НТК. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ДТПК. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ЭДДС. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ЭДТК. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ЭГТК. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ЦДТК. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой цитрат. В некоторых вариантах осуществления один или более промывочных буферов на b) содержат указанные один или более хелатирующих агентов, и имеют рН по меньшей мере 7.

[00200] Любой из буферов (буферных систем), описанных в данном документе, может быть выбран из группы, состоящей из глицина, NEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-

пиперазинэтансульфоновой кислоты), трис-НСl (Трис (гидроксиметил) аминометана), гистидина, имидазола, ацетат цитрата, цитрата, ацетата, сольвата, фосфата, трис-НСl, бис-трис, гистидина, имидазола, аргинин НСl, лизин НСl и 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты в виде отдельных буферов или в виде комбинации двух или более буферов. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов выбирают из группы, состоящей из глицина НЕРЕС (4-(2- гидроксипиперазинэтансульфонової кислоти), трис-НСl (трис(гидроксиметил)- аминометан), гистидина, имидазола, цитрата ацетата, MES и 2-(N- морфолино) этансульфонової кислоти. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит цитрат, ацетат, MES, НЕРЕС, фосфат, трис-НСl и/или бис-трис. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит глицин. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит НЕРЕС (4-(2-гидроксипиперазинэтансульфоновою кислоту). В некоторых вариантах осуществления буфер содержит трис-НСl (Трис(гидроксиметил)-аминометан). В некоторых вариантах осуществления буфер содержит гистидин. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит имидазол. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит ацетат цитрат. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит цитрат. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит ацетат. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит MES. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит НЕРЕС. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит фосфат. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит трис-НСl. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит бис-трис. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит гистидин. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит имидазол. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит аргинин НСl. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит лизин НСl. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит 2-(N- морфолино)этансульфоновою кислоту. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит один, два, три или четыре буфера, приведенных в данном документе.

[00201] В некоторых вариантах осуществления один или более буферов (включая промывочные и/или элюирующие буферы) содержат цитрат натрия в диапазоне, включающем, без ограничения, 10 мМ-80 мМ цитрата натрия, 15 мМ-80 мМ цитрата натрия, 10 мМ-80 мМ цитрата натрия, 15 мМ-60 мМ цитрата натрия, 20 мМ-60 мМ цитрата натрия, 10 мМ цитрата натрия, 20 мМ цитрата натрия, 30 мМ цитрата натрия, 40 мМ цитрата натрия, 50 мМ цитрата натрия, 55 мМ цитрата натрия, 60 мМ цитрата натрия, 65 мМ цитрата натрия, 70 мМ цитрата натрия, 75 мМ цитрата натрия, 80 мМ цитрата натрия, или т.п.

[00202] В некоторых вариантах осуществления первый элюирующий буфер дополнительно содержит цитрат натрия в диапазоне, включая, без ограничения, 10 мМ-60 мМ цитрата натрия, 15 мМ-60 мМ цитрата натрия, 10 мМ-50 мМ цитрата натрия, 15 мМ-50 мМ цитрата натрия, 20 мМ-60 мМ цитрата натрия, 10 мМ цитрата натрия, 20 мМ цитрата натрия, 30 мМ цитрата натрия, 40 мМ цитрата натрия, 50 мМ цитрата натрия, 60

мМ цитрата натрия, или т.п.

[00203] В некоторых вариантах осуществления второй элюирующий буфер дополнительно содержит цитрат натрия, такой как, без ограничения, 10 мМ-60 мМ цитрата натрия, 15 мМ-60 мМ цитрата натрия, 10 мМ-50 мМ цитрата натрия, 15 мМ-50 мМ цитрата натрия, 20 мМ-60 мМ цитрата натрия, 10 мМ цитрата натрия, 20 мМ цитрата натрия, 30 мМ цитрата натрия, 40 мМ цитрата натрия, 50 мМ цитрата натрия, 60 мМ цитрата натрия, или т.п.

[00204] В некоторых вариантах осуществления один или более буферов (включая промывочные и/или элюирующие буферы) на стадии катионообменной хроматографии содержат ЭДТК, пока желаемые виды гVWF остаются связанными с катионообменной смолой. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов (включая промывочные и/или элюирующие буферы) на стадии катионообменной хроматографии содержат от около 0,5 мМ до около 20 мМ ЭДТК, например, от около 0,5 мМ до около 20 мМ, от около 1 мМ до около 20 мМ, от около 1,5 мМ до около 20 мМ, от около 2 мМ до около 20 мМ, от около 3 мМ до около 20 мМ, от около 5 мМ до около 20 мМ, от около 0,5 мМ до около 15 мМ, от около 1 мМ до около 10 мМ, от около 1 мМ до около 5 мМ, около 5 мМ, около 0,5 мМ, около 1 мМ, около 2 мМ, около 3 мМ, около 4 мМ, около 5 мМ, около 6 мМ, около 7 мМ, около 8 мМ, около 9 мМ, около 10 мМ, около 11 мМ, около 12 мМ, около 13 мМ, около 14 мМ, около 15 мМ, около 16 мМ, около 17 мМ, около 18 мМ, около 19 мМ, около 20 мМ, и т.п., пока желаемые виды гVWF остаются связанными с катионообменной смолой. В некоторых вариантах осуществления буферы, содержащие ЭДТК, используют как часть ступенчатого катионообменного элюирования. В некоторых вариантах осуществления буферы, содержащие ЭДТК, используют как часть градиентного катионообменного элюирования. В некоторых вариантах осуществления, когда ЭДТК используется как часть буферов, используемых при ступенчатом катионообменном элюировании, противоион представляет собой Na^+ . В некоторых вариантах осуществления, когда ЭДТК используется как часть буферов, используемых при градиентном катионообменном элюировании, противоион представляет собой Na^+ .

[00205] В некоторых вариантах осуществления цитрат может быть обнаружен в элюенте после удаления гVWF-пропептида с использованием метода катионообменного элюирования. В некоторых вариантах осуществления цитрат может быть обнаружен в элюенте после удаления гVWF-пропептида с использованием метода ступенчатого катионообменного элюирования. В некоторых вариантах осуществления цитрат может быть обнаружен в элюенте после удаления гVWF-пропептида с использованием метода градиентного катионообменного элюирования. В некоторых вариантах осуществления катионообменный противоион представляет собой цитрат Na^+ .

[00206] В некоторых вариантах осуществления проводимость буферов (включая промывочные и/или элюирующие буферы) составляет от 5 мСм/см до 40 мСм/см, например, 5 мСм/см-40 мСм/см, 10 мСм/см-40 мСм/см, 15 мСм/см-40 мСм/см, 20 мСм/см-40 мСм/см, 5 мСм/см-15 мСм/см, 10 мСм/см-25 мСм/см, 15 мСм/см-30 мСм/см, 20

7,2, рН 7,3, рН 7,4, рН 7,5, рН 7,6, рН 7,7, рН 7,8, рН 7,9, рН 8,0, рН 8,1, рН 8,2, рН 8,3, рН 8,4, рН 8,5, рН 8,6, рН 8,7, рН 8,8, рН 8,9, рН 9,0.

[00210] В одном аспекте описанный в данном документе способ включает стадию градиентного элюирования. На стадии градиентного элюирования можно удалить примеси продукта и примеси, связанные с технологическим процессом, для оптимизации выхода зрелого VWF. В некоторых случаях стадия градиентного элюирования отделяет более высокий процент пропептида VWF от зрелого VWF по сравнению со способом предшествующего уровня техники.

[00211] В некоторых вариантах осуществления проводимость одного или более элюирующих буферов составляет от около 5 мСм/см до около 40 мСм/см, например, от около 5 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 10 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 15 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 20 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 25 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 30 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 10 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 10 мСм/см до около 30 мСм/см, от около 5 мСм/см до около 13 мСм/см, от около 5 мСм/см до около 15 мСм/см, от около 15 мСм/см до около 30 мСм/см, от около 18 мСм/см до около 40 мСм/см или от около 20 мСм/см до около 40 мСм/см. В других вариантах осуществления проводимость двух или более промывочных буферов составляет от около 5 мСм/см до около 40 мСм/см, например, от около 5 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 10 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 15 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 20 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 25 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 30 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 10 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 10 мСм/см до около 30 мСм/см, от около 5 мСм/см до около 13 мСм/см, от около 5 мСм/см до около 15 мСм/см, от около 15 мСм/см до около 30 мСм/см, от около 18 мСм/см до около 40 мСм/см или от около 20 мСм/см до около 40 мСм/см.

[00212] В некоторых вариантах осуществления скорость потока на одной или более стадиях промывки данного способа составляет от около 10 см/ч до около 200 см/ч, например, около 10 см/ч, около 15 см/ч, около 20 см/ч, около 25 см/ч, около 30 см/ч, около 35 см/ч, около 40 см/ч, около 45 см/ч, около 50 см/ч, около 55 см/ч, около 60 см/ч, около 65 см/ч, около 70 см/ч, около 75 см/ч, около 80 см/ч, около 85 см/ч, около 90 см/ч, около 95 см/ч, около 100 см/ч, около 105 см/ч, около 110 см/ч, около 115 см/ч, около 120 см/ч, около 125 см/ч, около 130 см/ч, около 135 см/ч, около 140 см/ч, около 145 см/ч, около 150 см/ч, около 155 см/ч, около 160 см/ч, около 165 см/ч, около 170 см/ч, около 175 см/ч, около 180 см/ч, около 185 см/ч, около 190 см/ч, около 195 см/ч или около 200 см/ч. В зависимости от смолы в некоторых вариантах осуществления скорость потока может достигать 600 см/ч.

[00213] В некоторых вариантах осуществления скорость потока на одной или более стадиях элюирования данного способа составляет от около 10 см/ч до около 200 см/ч, например, около 10 см/ч, около 15 см/ч, около 20 см/ч, около 25 см/ч, около 30 см/ч, около 35 см/ч, около 40 см/ч, около 45 см/ч, около 50 см/ч, около 55 см/ч, около 60 см/ч, около 65 см/ч, около 70 см/ч, около 75 см/ч, около 80 см/ч, около 85 см/ч, около 90 см/ч, около

95 см/ч, около 100 см/ч, около 105 см/ч, около 110 см/ч, около 115 см/ч, около 120 см/ч, около 125 см/ч, около 130 см/ч, около 135 см/ч, около 140 см/ч, около 145 см/ч, около 150 см/ч, около 155 см/ч, около 160 см/ч, около 165 см/ч, около 170 см/ч, около 175 см/ч, около 180 см/ч, около 185 см/ч, около 190 см/ч, около 195 см/ч или около 200 см/ч. В зависимости от смолы в некоторых вариантах осуществления скорость потока может достигать 600 см/ч.

[00214] В некоторых вариантах осуществления один или более буферов дополнительно содержат один или более неионных детергентов. В некоторых вариантах осуществления неионный детергент выбирают из группы, состоящей из Triton X-100, Tween 80 и Tween 20. В некоторых вариантах осуществления неионный детергент представляет собой Triton X-100. В некоторых вариантах осуществления неионный детергент представляет собой Tween 80. В некоторых вариантах осуществления неионный детергент представляет собой Tween 20.

[00215] В некоторых вариантах осуществления указанный один или более буферов дополнительно содержат одно или более дополнительных веществ, выбранных из группы, состоящей из невосстанавливающих сахаров, сахарных спиртов и полиолов. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов дополнительно содержат один или более невосстанавливающих сахаров. В некоторых вариантах осуществления невосстанавливающий сахар включает, без ограничения, сахарозу, трегалозу, маннит, сорбит, галактит и/или ксилит. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов дополнительно содержат один или более сахарных спиртов. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов дополнительно содержат один или более полиолов. В некоторых вариантах осуществления сахарный спирт или полиол включает, без ограничения, маннит, ксилит, эритрит, треит, сорбит и/или глицерин. В некоторых вариантах осуществления буферы дополнительно содержат сорбит, маннит, ксилит, сахарозу, трегалозу, этиленгликоль, пропиленгликоль, глицерин, 1,2,3-пропантриол, мезо-эритрит и/или эритрит (мезо-1,2,3,4-бутантетрол).

[00216] рН любого из буферов можно регулировать (увеличивать) путем добавления аминокислоты, трис, NaOH, этаноламина и т.п.

[00217] Любой из буферов (буферных систем), описанных в данном документе, может быть выбран из группы, состоящей из цитрата, ацетата, MES, HEPES, фосфата, трис-HCl, бис-трис, в виде отдельных буферов или в виде комбинации двух или более буферов. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит глицин. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит цитрат. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит ацетат. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит MES. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит HEPES. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит фосфат. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит трис-HCl. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит бис-трис. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит один, два, три или четыре буфера, приведенных в данном документе.

[00218] В некоторых вариантах осуществления комбинация буферного хелатора для метода катионообмена содержит цитрат, малат (яблочную кислоту) и тартрат (винную кислоту).

ОЧИСТКА С ПОМОЩЬЮ ЭКСКЛЮЗИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

[00219] В одном из аспектов в данном изобретении зрелый VWF и VWF-PP разделяют с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC). В некоторых случаях оставшиеся примеси, полученные из клетки-хозяина, такие как белки клетки-хозяина СНО, примеси, связанные с технологическими процессами, такие как рекомбинантный фурин и реагенты для инактивации низкомолекулярных вирусов, соединения среды, такие как соевый пептон, и другие примеси, связанные с продуктами, удаляются из зрелого VWF.

[00220] В другом аспекте данного способа зрелый VWF отделяют от VWF-PP, такого как остаточный VWF-PP или свободный VWF-PP, с помощью эксклюзионной хроматографии. Для разделения исходная композиция может иметь низкий pH и по меньшей мере один хелатирующий агент. В других вариантах осуществления буфер для градиентного элюирования имеет pH от нейтрального до высокого, например pH в диапазоне от pH 6,0 до pH 9,0. В другом варианте осуществления буфер для градиентного элюирования содержит один или более хелатирующих агентов и имеет pH 7,0 или более, например, pH 7,0 - pH 9,0. Например, буфер для градиентного элюирования может содержать ЭДТК и иметь pH 8,5.

[00221] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложен способ получения композиции, содержащей высокоочищенный зрелый рекомбинантный rVWF, обедненный пропептидами, (mat-rVWF высокой чистоты), причем указанный способ включает стадии: (a) загрузка раствора, содержащего pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и/или пропептид rVWF (rVWF-PP), на эксклюзионную колонку, где указанный pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF связаны с указанной эксклюзионной колонкой; (b) промывание указанной эксклюзионной колонки на стадии a), содержащей указанный связанный pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF, одним или более промывочными буферами; (c) обработка указанной колонки на b), содержащей связанный pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF, фурином, причем указанный фурин расщепляет указанный pro-rVWF на mat-rVWF и rVWF-PP; (d) элюирование указанного связанного pro-rVWF, комплекса mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF из колонки на c) элюирующим буфером, причем указанный элюирующий буфер индуцирует диссоциацию указанного rVWF-PP от mat-rVWF, нековалентно связанного с указанным rVWF-PP, и при этом указанная диссоциация индуцируют путем: (i) добавления по меньшей мере одного хелатирующего агента в указанный элюирующий буфер, или (ii) увеличения pH указанного элюирующего буфера до pH по меньшей мере 7; а также (e) сбор указанного mat-rVWF отдельно от указанного rVWF-PP для получения композиции высокоочищенного mat-rVWF, при этом указанная композиция высокоочищенного mat-rVWF содержит по меньшей мере 95% зрелого rVWF и менее 5%

rVWF-PP.

[00222] В некоторых вариантах осуществления а) и б) осуществляют одновременно на одной стадии. В некоторых вариантах осуществления раствор на а) содержит поток из метода иммуноаффинной очистки. В некоторых вариантах осуществления раствор на а) включает проточный раствор из колонки с моноклональным антителом, причем указанное моноклональное антитело представляет собой моноклональное антитело FVIII. В некоторых вариантах осуществления раствор на а) выбирают из группы, состоящей из среды для культивирования клеток, проточного раствора колонки с антителами и забуференного раствора.

[00223] В некоторых вариантах осуществления буфер для разделения имеет рН от нейтрального до высокого. В других вариантах осуществления буфер содержит по меньшей мере один хелатирующий агент. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит по меньшей мере один хелатирующий агент и имеет рН от нейтрального до высокого. Например, буфер для разделения может содержать хелатирующий агент и иметь рН 6,0 или более или, в некоторых случаях, рН 7,0 или более.

[00224] В некоторых вариантах осуществления загрузочная концентрация рго-VWF составляет от около 90 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл смолы, например, от около 90 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 100 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 110 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 120 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 140 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 150 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл, от около 90 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 100 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 110 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 120 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 140 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 150 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около 90 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 100 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 110 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 120 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 130 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 140 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 150 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 90 МЕ/мл до около 100 МЕ/мл, от около 100 МЕ/мл до около 150 МЕ/мл, от около 150 МЕ/мл до около 200 МЕ/мл, от около 200 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл или от около 250 МЕ/мл до около 270 МЕ/мл смолы.

[00225] В некоторых вариантах осуществления рН исходной композиции, загрузочного раствора или загрузочной композиции, содержащих рго-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и/или пропептид rVWF (rVWF-PP), составляет от рН 6,0 до рН 9,0, например, рН 6,0-рН 9,0, рН 6,3-рН 9,0, рН 6,5-рН 9,0, рН 7,0-рН 9,0, рН 7,5-рН 9,0, рН 7,7,0-рН 9,0, рН 8,0-рН 9,0, рН 6,0-рН 8,5, рН 6,5-рН 8,5, рН 7,0-рН 8,5, рН 7,5-рН 8,5, рН 6,0-рН 8,0, рН 6,5-рН 8,0, рН 7,0-рН 8,0, рН 7,5-рН 8,0, рН 6,0, рН 6,1, рН 6,2, рН 6,3, рН 6,4, рН 6,5, рН 6,6, рН 6,7, рН 6,8, рН 6,9, рН 7,0, рН 7,1, рН 7,2, рН 7,3, рН 7,4, рН 7,5, рН 7,6, рН 7,7, рН 7,8, рН 7,9, рН 8,0, рН 8,1, рН 8,2, рН 8,3, рН 8,4, рН 8,5, рН 8,6, рН 8,7, рН 8,8, рН 8,9 или рН 9,0.

[00226] В некоторых вариантах осуществления способ исключения по размеру включает буферную систему. В некоторых вариантах осуществления буферная система содержит один или более буферов для разделения. В некоторых вариантах осуществления буферная система содержит по меньшей мере один буфер для разделения. В некоторых вариантах осуществления буферная система содержит по меньшей мере два буфера для разделения. В некоторых вариантах осуществления буферная система содержит по меньшей мере первый буфер для разделения и по меньшей мере второй буфер для разделения.

[00227] В некоторых вариантах осуществления первый буфер для разделения содержит по меньшей мере один хелатирующий агент и необязательно имеет рН в диапазоне от рН 6,0 до рН 9,0. В некоторых вариантах осуществления буфер для разделения имеет рН в диапазоне от рН 6,0 до рН 9,0 и необязательно содержит по меньшей мере один хелатирующий агент. В некоторых вариантах осуществления первый буфер для разделения имеет рН в диапазоне от рН 6,0 до рН 6,9. В некоторых вариантах осуществления второй буфер для разделения имеет рН в диапазоне от рН 7,0 до рН 9,0. В некоторых вариантах осуществления первый буфер для разделения может содержать по меньшей мере один хелатирующий агент и имеет рН в диапазоне от рН 6,0 до рН 6,9. В некоторых вариантах осуществления первый буфер для разделения имеет рН менее 7. В некоторых вариантах осуществления второй буфер для разделения имеет рН более 7. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два буфера для разделения, первый буфер для разделения имеет рН менее 7, а второй буфер для разделения имеет рН более 7.

[00228] В некоторых вариантах осуществления исходный раствор, содержащий зрелый rVWF и rVWF-PP, контактирует с буфером для разделения, содержащим по меньшей мере один хелатирующий агент, и, необязательно, буфер имеющий рН в диапазоне от рН 6,0 до рН 9,0. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор контактирует с буфером, имеющим рН в диапазоне от рН 6,0 до рН 9,0, и, необязательно, буфер содержащий по меньшей мере один хелатирующий агент. В некоторых вариантах осуществления буфер имеет рН в диапазоне от рН 7,0 до рН 9,0. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой первый буфер для разделения с рН от 6,0 до 6,9. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой второй буфер для разделения с рН от 7,0 до 9,0. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор, содержащий зрелый rVWF и rVWF-PP, сначала контактирует с первым буфером, имеющим рН от 6,0 до 6,9, и вторым буфером для разделения, имеющим рН от 7,0 до 9,0.

[00229] В некоторых вариантах осуществления рН одного или более буферов для разделения составляет от рН 6,0 до рН 9,0, например, рН 6,0-рН 9,0, рН 6,3-рН 9,0, рН 6,5-рН 9,0, рН 7,0-рН 9,0, рН 7,5-рН 9,0, рН 7,7,0-рН 9,0, рН 8,0-рН 9,0, рН 6,0-рН 8,5, рН 6,5-рН 8,5, рН 7,0-рН 8,5, рН 7,5-рН 8,5, рН 6,0-рН 8,0, рН 6,5-рН 8,0, рН 7,0-рН 8,0, рН 7,5-рН 8,0, рН 6,0, рН 6,1, рН 6,2, рН 6,3, рН 6,4, рН 6,5, рН 6,6, рН 6,7, рН 6,8, рН 6,9, рН 7,0, рН 7,1, рН 7,2, рН 7,3, рН 7,4, рН 7,5, рН 7,6, рН 7,7, рН 7,8, рН 7,9, рН 8,0, рН 8,1, рН 8,2, рН

8,3, рН 8,4, рН 8,5, рН 8,6, рН 8,7, рН 8,8, рН 8,9, рН 9,0.

[00230] В некоторых вариантах осуществления рН элюирующего буфера увеличивается по сравнению с исходным раствором на стадии а), увеличивается по сравнению с первым буфером для разделения, когда используются два буфера для разделения, и/или увеличивается по сравнению с первым буфером для разделения когда используется второй буфер для разделения. В некоторых вариантах осуществления, когда используются первый буфер для разделения и второй буфер для разделения, первый буфер для разделения имеет рН менее 7, а второй буфер для разделения имеет рН более 7.

[00231] В некоторых вариантах осуществления рН одного или более буферов для разделения увеличивается по меньшей мере до 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8,0 по сравнению с загрузочным раствором, содержащим про-гVWF, комплекс mat-гVWF/гVWF-PP, mat-гVWF и/или пропептид гVWF (гVWF-PP), как указано на стадии (а) способа. В некоторых вариантах осуществления рН буфера увеличивают до по меньшей мере 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8,0, чтобы вызвать диссоциацию комплекса mat-гVWF/гVWF-PP в раствор на стадии (а) способа до mat-гVWF и гVWF-PP, при этом указанная диссоциация происходит за счет разрушения нековалентно связанных mat-гVWF и гVWF-PP. В некоторых вариантах осуществления рН загрузочного раствора увеличивают от по меньшей мере около 7,2 до около 7,8. В некоторых загрузочным раствором вариантах осуществления рН загрузочного раствора увеличивают до по меньшей мере около 7,6. В некоторых вариантах осуществления рН загрузочного раствора увеличивают путем добавления основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления рН загрузочного раствора повышается до по меньшей мере 7. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более промывочных буферов повышается от по меньшей мере около 7,2 до около 7,8. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более промывочных буферов увеличивают до по меньшей мере около 7,6. В некоторых вариантах осуществления рН одного или более буферов для разделения увеличивают путем добавления основных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов для разделения имеют рН по меньшей мере 7.

[00232] В некоторых вариантах осуществления один или более буферов для разделения содержат один или более хелатирующих агентов. В некоторых вариантах осуществления буфер для элюирования содержит по меньшей мере один хелатирующий агент. Хелатирующий агент может представлять собой хелатирующий агент с двухвалентным катионом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один хелатирующий агент представляет собой хелатирующий агент с двухвалентным катионом. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент с двухвалентным катионом выбирают из группы, состоящей из ЭДТК, ЭГТК, ЦДТК и цитрата. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент с двухвалентным катионом выбирают из группы, состоящей из НТК, ДТПК, ЭДДС, ЭДТК, ЭГТК, ЦДТК и цитрата. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой НТК. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ДТПК. В некоторых

вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ЭДДС. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ЭДТК. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ЭГТК. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ЦДТК. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой цитрат. В некоторых вариантах осуществления один или более промывочных буферов на б) содержат указанные один или более хелатирующих агентов, и имеют pH по меньшей мере 7.

[00233] В некоторых вариантах осуществления один или более буферов для разделения содержат по меньшей мере один хелатирующий агент. Хелатирующий агент может представлять собой хелатирующий агент с двухвалентным катионом. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент с двухвалентным катионом выбирают из группы, состоящей из нитрил-2,2',2"-триуксусной кислоты (НТК), диэтилентриаминпентауксусной кислоты; диэтилентриамин-N, N,N',N',N "-пентауксусной кислоты (ДТПК), этилендиамин-N, N'-дисукциновой кислоты (ЭДДС), этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК), ЭГТК, ЦДТК и цитрата. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент с двухвалентным катионом выбирают из группы, состоящей из НТК, ДТПК, ЭДДС, ЭДТК и цитрата. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой НТК. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ДТПК. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ЭДДС. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ЭДТК. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ЭГТК. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой ЦДТК. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий агент представляет собой цитрат.

[00234] В некоторых вариантах осуществления элюирующий буфер А и/или элюирующий буфер В на стадии анионообменной хроматографии содержит от около 0,5 мМ до около 20 мМ ЭДТК, например, от около 0,5 мМ до около 20 мМ, от около 1 мМ до около 20 мМ, от около 1,5 мМ до около 20 мМ, от около 2 мМ до около 20 мМ, от около 3 мМ до около 20 мМ, от около 5 мМ до около 20 мМ, от около 0,5 мМ до около 15 мМ, от около 1 мМ до около 10 мМ, от около 1 мМ до около 5 мМ, около 5 мМ, около 0,5 мМ, около 1 мМ, около 2 мМ, около 3 мМ, около 4 мМ, около 5 мМ, около 6 мМ, около 7 мМ, около 8 мМ, около 9 мМ, около 10 мМ, около 11 мМ, около 12 мМ, около 13 мМ, около 14 мМ, около 15 мМ, около 16 мМ, около 17 мМ, около 18 мМ, около 19 мМ, около 20 мМ, или т.п.

[00235] В некоторых вариантах осуществления один или более буферов для разделения содержат цитрат натрия в диапазоне, включая, без ограничения, 10 мМ-500 мМ цитрата натрия, 15 мМ-400 мМ цитрата натрия, 10 мМ-400 мМ цитрата натрия, 15 мМ-350 мМ цитрата натрия, 20 мМ-350 мМ цитрата натрия, 10 мМ цитрата натрия, 20 мМ цитрата натрия, 30 мМ цитрата натрия, 40 мМ цитрата натрия, 50 мМ цитрата натрия, 55 мМ цитрата натрия, 60 мМ цитрата натрия, 65 мМ цитрата натрия, 70 мМ цитрата натрия,

мМ-350 мМ цитрата натрия, 20 мМ-350 мМ цитрата натрия, 10 мМ цитрата натрия, 20 мМ цитрата натрия, 30 мМ цитрата натрия, 40 мМ цитрата натрия, 50 мМ цитрата натрия, 55 мМ цитрата натрия, 60 мМ цитрата натрия, 65 мМ цитрата натрия, 70 мМ цитрата натрия, 75 мМ цитрата натрия, 80 мМ цитрата натрия, 90 мМ цитрата натрия, 100 мМ цитрата натрия, 110 мМ цитрата натрия, 120 мМ цитрата натрия, 130 мМ цитрата натрия, 140 мМ цитрата натрия, 150 мМ цитрата натрия, 160 мМ цитрата натрия, 170 мМ цитрата натрия, 180 мМ цитрата натрия, 190 мМ цитрата натрия, 200 мМ цитрата натрия, 210 мМ цитрата натрия, 220 мМ цитрата натрия, 230 мМ цитрата натрия, 240 мМ цитрата натрия, 250 мМ цитрата натрия, 260 мМ цитрата натрия, 270 мМ цитрата натрия, 280 мМ цитрата натрия, 290 мМ цитрата натрия, 300 мМ цитрата натрия, 310 мМ цитрата натрия, 320 мМ цитрата натрия, 330 мМ цитрата натрия, 340 мМ цитрата натрия, 350 мМ цитрата натрия, 360 мМ цитрата натрия, 370 мМ цитрата натрия, 380 мМ цитрата натрия, 390 мМ цитрата натрия, 400 мМ цитрата натрия, 410 мМ цитрата натрия, 420 мМ цитрата натрия, 430 мМ цитрата натрия, 440 мМ цитрата натрия, 450 мМ цитрата натрия, 460 мМ цитрата натрия, 470 мМ цитрата натрия, 480 мМ цитрата натрия, 490 мМ цитрата натрия, 500 мМ цитрата натрия, 510 мМ цитрата натрия, 520 мМ цитрата натрия, 530 мМ цитрата натрия, 540 мМ цитрата натрия, 550 мМ цитрата натрия, 560 мМ цитрата натрия, 570 мМ цитрата натрия, 580 мМ цитрата натрия, 590 мМ цитрата натрия или 600 мМ цитрата натрия, или т.п.

[00238] В некоторых вариантах осуществления проводимость буфера для разделения составляет от около 5 мСм/см до около 40 мСм/см, например, от около 5 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 10 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 15 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 20 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 25 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 30 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 10 мСм/см до около 40 мСм/см, от около 10 мСм/см до около 30 мСм/см, от около 5 мСм/см до около 13 мСм/см, от около 5 мСм/см до около 15 мСм/см, от около 15 мСм/см до около 30 мСм/см, от около 18 мСм/см до около 40 мСм/см или от около 20 мСм/см до около 40 мСм/см.

[00239] Любой из буферов (буферных систем), описанных в данном документе, может быть выбран из группы, состоящей из цитрата, ацетата, MES, HEPES, фосфата, трис-НСl, бис-трис, гистидина, имидазола, аргинина HCl, лизина HCl, глицина, глицилглицина, бората, MOPS, бицина, трицина, TAPS, TAPSO и PIPES, как отдельные буферы или как комбинация двух или более буферов. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит глицин. В некоторых вариантах осуществления буфер включает цитрат, ацетат, MES, HEPES, фосфат, трис-НСl, бис-трис, гистидин, имидазол, аргининНСl, лизинНСl, глицин, глицилглицин, борат, MOPS, бицин, трицин, TAPS, TAPSO и/или PIPES. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит цитрат. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит ацетат. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит MES. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит HEPES. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит фосфат. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит трис-НСl. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит бис-трис.

[00240] В некоторых вариантах осуществления буфер содержит гистидин. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит имидазол. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит аргинин HCl. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит лизин HCl. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит глицин. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит глицилглицин. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит борат. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит MOPS. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит бицин. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит трицин. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит TAPS. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит TAPSO. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит PIPES. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит один, два, три или четыре буфера, приведенных в данном документе.

[00241] В некоторых вариантах осуществления один или более буферов для разделения дополнительно содержат один или более неионных детергентов. В некоторых вариантах осуществления неионный детергент выбирают из группы, состоящей из Triton X-100, Tween 80 и Tween 20. В некоторых вариантах осуществления неионный детергент представляет собой Triton X-100. В некоторых вариантах осуществления неионный детергент представляет собой Tween 80. В некоторых вариантах осуществления неионный детергент представляет собой Tween 20.

[00242] В некоторых вариантах осуществления скорость потока на одной или более стадиях буфера для разделения в данном способе составляет от около 10 см/ч до около 200 см/ч, например, около 10 см/ч, около 15 см/ч, около 20 см/ч, около 25 см/ч, около 30 см/ч, около 35 см/ч, около 40 см/ч, около 45 см/ч, около 50 см/ч, около 55 см/ч, около 60 см/ч, около 65 см/ч, около 70 см/ч, около 75 см/ч, около 80 см/ч, около 85 см/ч, около 90 см/ч, около 95 см/ч, около 100 см/ч, около 105 см/ч, около 110 см/ч, около 115 см/ч, около 120 см/ч, около 125 см/ч, около 130 см/ч, около 135 см/ч, около 140 см/ч, около 145 см/ч, около 150 см/ч, около 155 см/ч, около 160 см/ч, около 165 см/ч, около 170 см/ч, около 175 см/ч, около 180 см/ч, около 185 см/ч, около 190 см/ч, около 195 см/ч или около 200 см/ч. В зависимости от смолы в некоторых вариантах осуществления скорость потока может достигать 600 см/ч.

[00243] В некоторых вариантах осуществления скорость потока на одной или более стадиях буфера для разделения в данном способе составляет от около 10 см/ч до около 200 см/ч, например, около 10 см/ч, около 15 см/ч, около 20 см/ч, около 25 см/ч, около 30 см/ч, около 35 см/ч, около 40 см/ч, около 45 см/ч, около 50 см/ч, около 55 см/ч, около 60 см/ч, около 65 см/ч, около 70 см/ч, около 75 см/ч, около 80 см/ч, около 85 см/ч, около 90 см/ч, около 95 см/ч, около 100 см/ч, около 105 см/ч, около 110 см/ч, около 115 см/ч, около 120 см/ч, около 125 см/ч, около 130 см/ч, около 135 см/ч, около 140 см/ч, около 145 см/ч, около 150 см/ч, около 155 см/ч, около 160 см/ч, около 165 см/ч, около 170 см/ч, около 175 см/ч, около 180 см/ч, около 185 см/ч, около 190 см/ч, около 195 см/ч или около 200 см/ч. В зависимости от смолы в некоторых вариантах осуществления скорость потока может

достигать 600 см/ч.

[00244] В некоторых вариантах осуществления указанный один или более буферов дополнительно содержат одно или более дополнительных веществ, выбранных из группы, состоящей из невосстанавливающих сахаров, сахарных спиртов и полиолов. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов дополнительно содержат один или более невосстанавливающих сахаров. В некоторых вариантах осуществления невосстанавливающий сахар включает, без ограничения, сахарозу, трегалозу, маннит, сорбит, галактит и/или ксилит. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов дополнительно содержат один или более сахарных спиртов. В некоторых вариантах осуществления один или более буферов дополнительно содержат один или более полиолов. В некоторых вариантах осуществления сахарный спирт или полиол включает, без ограничения, маннит, ксилит, эритрит, трейт, сорбит и/или глицерин. В некоторых вариантах осуществления буферы дополнительно содержат сорбит, маннит, ксилит, сахарозу, трегалозу, этиленгликоль, пропиленгликоль, глицерин, 1,2,3-пропантриол, мезо-эритрит и/или эритрит (мезо-1,2,3,4-бутантетрол).

[00245] В некоторых вариантах осуществления комбинация буферных хелаторов для метода эксклюзионной хроматографии включает цитрат, малат (яблочную кислоту) и тартрат (винную кислоту).

ИММУНОАФФИННАЯ ОЧИСТКА

[00246] В некоторых вариантах осуществления раствор, содержащий комплекс pro-rVWF, mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и/или пропептид rVWF (rVWF-PP), получают методом иммуноаффинной очистки, включая, например, колонку с моноклональными антителами. В некоторых вариантах осуществления колонка с моноклональным антителом содержит моноклональное антитело FVIII. В некоторых вариантах осуществления колонка с моноклональным антителом содержит моноклональное антитело VWF. Такие колонки и методы известны в данной области техники и были описаны. См., например Zimmerman et al. (патент США № 4361509; включенный в данный документ в качестве ссылки для всех целей), в котором описан способ очистки фактора VIII, в котором комплекс фактор VIII/VWF связан с моноклональным антителом к VWF, а фактор VIII диссоциирует от комплекса при помощи ионов CaCl₂. Иммуноаффинный носитель, на котором все еще адсорбируется vWF, регенерируют с помощью хаотропного агента, в частности NaSCN, причем раствор vWF/NaSCN образуется как побочный продукт и отбрасывается.

[00247] Другие способы включают описанные в патенте США № 6579723, также полностью включенном в данный документ посредством ссылки, в котором описан способ выделения высокоочищенного vWF или комплекса фактор VIII/vWF с использованием процедуры иммуноаффинной хроматографии. В таком способе используется извлечение VWF из иммуноаффинного адсорбента с использованием элюирующего агента, содержащего цвиттерионные частицы. Присутствие цвиттерионных частиц позволяет использовать мягкие условия на протяжении всего получения, способствуя сохранению

молекулярной целостности, активности и включения восстановленных белков в фармацевтические препараты без необходимости использования дополнительных стабилизаторов или консервантов.

Любые такие способы можно использовать с текущим способом очистки для получения раствора, содержащего pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и/или пропептид rVWF (rVWF-PP). В некоторых вариантах осуществления иммуноаффинная очистка необязательно происходит перед стадией (а) в любой из описанных в данном документе процедур очистки, включая процедуры, основанные на процедурах катионообменной, анионообменной и/или эксклюзионной хроматографии.

СВОБОДНЫЙ ЗРЕЛЫЙ VWF

[00248] В некоторых вариантах осуществления уровень примесей клетки-хозяина (НС) в композиции, предложенной в данном документе, равен или составляет менее чем 2,0 ч./млн., например, 2,0 ч./млн., 1,9 ч./млн., 1,8 ч./млн., 1,7 ч./млн., 1,6 ч./млн., 1,5 ч./млн., 1,4 ч./млн., 1,3 ч./млн., 1,2 ч./млн., 1,1 ч./млн., 1,0 ч./млн., 0,9 ч./млн., 0,8 ч./млн., 0,7 ч./млн., 0,6 ч./млн., 0,5 ч./млн., 0,4 ч./млн., 0,3 ч./млн., 0,2 ч./млн., 0,1 ч./млн., 0,09 ч./млн., 0,08 ч./млн., 0,07 ч./млн., 0,06 ч./млн., 0,05 ч./млн., 0,04 ч./млн., 0,03 ч./млн., 0,02 ч./млн., 0,01 ч./млн. или менее. В других вариантах осуществления уровень примесей клетки-хозяина в композиции, предложенной в данном документе, равен или составляет менее чем 0,6 ч./млн., например, 0,6 ч./млн., 0,5 ч./млн., 0,4 ч./млн., 0,3 ч./млн., 0,2 ч./млн., 0,1 ч./млн., 0,09 ч./млн., 0,08 ч./млн., 0,07 ч./млн., 0,06 ч./млн., 0,05 ч./млн., 0,04 ч./млн., 0,03 ч./млн., 0,02 ч./млн., 0,01 ч./млн. или менее.

[00249] В некоторых вариантах осуществления уровень примесей клетки-хозяина (НС) в композиции, предложенной в данном документе, равен или составляет менее чем 5,0% (например, $\leq 5,0\%$). В некоторых вариантах осуществления уровень примесей клетки-хозяина (НС) в композиции, предложенной в данном документе, равен или составляет менее чем 4,0% (например, $\leq 4,0\%$). В некоторых вариантах осуществления уровень примесей клетки-хозяина (НС) в композиции, предложенной в данном документе, равен или составляет менее чем 3,0% (например, $\leq 3,0\%$). В некоторых вариантах осуществления уровень примесей клетки-хозяина (НС) в композиции, предложенной в данном документе, равен или составляет менее чем 2,0% (например, $\leq 1,0\%$). В некоторых вариантах осуществления уровень примесей клетки-хозяина (НС) в композиции, предложенной в данном документе, равен или составляет менее чем 2,0% (например, $\leq 1,0\%$). В некоторых вариантах осуществления уровень примесей клетки-хозяина (НС) равен или составляет менее чем 0,9% (например, $\leq 0,9\%$). В некоторых вариантах осуществления уровень примесей клетки-хозяина (НС) равен или составляет менее чем 0,8% (например, $\leq 0,8\%$). В некоторых вариантах осуществления уровень примесей клетки-хозяина (НС) равен или составляет менее чем 0,7% (например, $\leq 0,7\%$). В некоторых вариантах осуществления уровень примесей клетки-хозяина (НС) равен или составляет менее чем 0,6% (например, $\leq 0,6\%$). В некоторых вариантах осуществления уровень примесей клетки-хозяина (НС) равен или составляет менее чем 0,5% (например, \leq

0,5%). В некоторых вариантах осуществления уровень примесей клетки-хозяина (НС) равен или составляет менее чем 0,4% (например, $\leq 0,4\%$). В некоторых вариантах осуществления уровень примесей клетки-хозяина (НС) равен или составляет менее чем 0,3% (например, $\leq 0,3\%$). В некоторых вариантах осуществления уровень примесей клетки-хозяина (НС) равен или составляет менее чем 0,2% (например, $\leq 0,2\%$). В некоторых вариантах осуществления уровень примесей клетки-хозяина (НС) равен или составляет менее чем 0,1% (например, $\leq 0,1\%$).

[00250] В некоторых вариантах осуществления примесь rVWF-PP составляет менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2%, менее 1%, менее 0,5%, менее 0,4%, менее 0,3%, менее 0,2%, менее 0,1% или менее 0,05%. В некоторых вариантах осуществления примесь rVWF-PP составляет менее 15%. В некоторых вариантах осуществления примесь rVWF-PP составляет менее 10%. В некоторых вариантах осуществления примесь rVWF-PP составляет менее 5%. В некоторых вариантах осуществления примесь rVWF-PP составляет менее 4%. В некоторых вариантах осуществления примесь rVWF-PP составляет менее 3%. В некоторых вариантах осуществления примесь rVWF-PP составляет менее 2%. В некоторых вариантах осуществления примесь rVWF-PP составляет менее 1%. В некоторых вариантах осуществления примесь rVWF-PP составляет менее 0,5%. В некоторых вариантах осуществления примесь rVWF-PP составляет менее 0,4%. В некоторых вариантах осуществления примесь rVWF-PP составляет менее 0,3%. В некоторых вариантах осуществления примесь rVWF-PP составляет менее 0,2%. В некоторых вариантах осуществления примесь rVWF-PP составляет менее 0,1%. В некоторых вариантах осуществления примесь rVWF-PP составляет менее 0,05%.

Таблица 1: Иллюстративная способность удаления VWF-PP

Стадия	Загрузка, примесь VWF-PP	Элюат, примесь VWF-PP
	% (масс./масс.)	% (масс./масс.)
AEX	~30%*	~12%
CEX	~30%	~<0,1%
SEC	~12%	~<0,1%
*: либо предварительно созревшие перед загрузкой, либо созревшие до завершения путем созревания <i>in vitro</i> на колонке (как в настоящее время осуществляется в процессе и является частью формулы другого патента)		

ПРОИЗВОДСТВО РЕКОМБИНАНТНОГО VWF

[00251] Свободный зрелый рекомбинантный фактор фон Виллебранда (rVWF) по данному изобретению можно получить рекомбинантно. Специалист в данной области техники распознает пригодные способы экспрессии рекомбинантного белка в клетке-хозяине. В некоторых случаях способ включает экспрессию последовательности

нуклеиновой кислоты, кодирующей гVWF, в клетке-хозяине, такой как клетка CHO, и культивирование полученной клетки-хозяина при определенных условиях для продуцирования гVWF, prepro-VWF, pro-VWF и т.п.

[00252] В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность, кодирующую VWF, может представлять собой вектор экспрессии. Вектор может быть доставлен вирусом или может быть плазмидой. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок, может быть конкретным геном или его биологически функциональной частью. В одном варианте осуществления белок представляет собой по меньшей мере биологически активную часть VWF. Последовательность нуклеиновой кислоты может дополнительно содержать другие последовательности, подходящие для контролируемой экспрессии белка, такие как промоторные последовательности, энхансеры, TATA-боксы, сайты инициации транскрипции, полилинкеры, сайты рестрикции, поли-A-последовательности, последовательности процессинга белка, маркеры отбора и тому подобное, которые обычно известны специалисту в данной области техники.

[00253] Для экспрессии VWF можно использовать широкий спектр векторов, которые могут быть выбраны из эукариотических экспрессионных векторов. Примеры векторов для эукариотической экспрессии включают: (i) векторы для экспрессии в дрожжах, такие как pAO, pPIC, pYES, pMET, с использованием таких промоторов, как AOX1, GAP, GAL1, AUG1 и т.д.; (ii) векторы для экспрессии в клетках насекомых, такие как pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC и т.д., с использованием промоторов, таких как PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh и т.д., и (iii) векторы для экспрессии в клетках млекопитающих, такие как pSVL, pCMV, pRc/RSV, pCDNA3, pBPV и т.д., и векторы, полученные из вирусных систем, таких как вирус осповакцины, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса, ретровирусы и т.д., с использованием промоторов, таких как CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV и β-актин.

[00254] В некоторых аспектах гVWF, используемый в способах по данному изобретению, продуцируется путем экспрессии в культуре клеток млекопитающих с использованием способов, известных в данной области техники. В конкретных вариантах осуществления культура млекопитающих содержит клетки CHO. В дополнительных вариантах осуществления гVWF коэкспрессируется с рекомбинантным фактором VIII (гFVIII) в той же культуре. В таких вариантах осуществления гVWF и гFVIII очищают вместе (совместно очищают) или по отдельности с использованием способов, известных в данной области техники. В других вариантах осуществления гVWF экспрессируется в культуре, не содержащей гFVIII.

[00255] В некоторых вариантах осуществления гVWF экспрессируется и выделяется из подходящей эукариотической системы хозяина. Примеры эукариотических клеток включают, без ограничения, клетки млекопитающих, такие как CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Nep и HepG2; клетки насекомых, например клетки SF9, клетки SF21, клетки S2 и клетки High Five; и клетки дрожжей, например клетки Saccharomyces или

Schizosaccharomyces. В одном варианте осуществления VWF может экспрессироваться в клетках дрожжей, клетках насекомых, клетках птиц, клетках млекопитающих и т.п. Например, в линии клеток человека, линии клеток хомяка или линии клеток мыши. В одном конкретном варианте осуществления линия клеток представляет собой линию клеток CHO, ВНК или НЕК. Обычно клетки млекопитающих, например, клетки CHO из непрерывной клеточной линии, могут использоваться для экспрессии VWF по данному изобретению. В определенных случаях белок VWF экспрессируется и выделяется из системы экспрессии клеток CHO.

[00256] VWF можно продуцировать в системе культивирования клеток или любым методом культивирования клеток, специалистами в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления культивирование клеток можно проводить в больших биореакторах в условиях, подходящих для обеспечения больших удельных по объему площадей поверхности культуры для достижения высокой плотности клеток и экспрессии белка. Одним из средств обеспечения таких условий роста является использование микроносителей для культивирования клеток в биореакторах с мешалкой. Концепция роста клеток на микроносителях была впервые описана van Wezel (van Wezel, A. L., *Nature*, 1967, 216:64-5) и позволяет прикреплять клетки к поверхности мелких твердых частиц, взвешенных в среде для выращивания. Эти методы обеспечивают высокое соотношение поверхности к объему и, таким образом, позволяют эффективно использовать питательные вещества. Кроме того, для экспрессии секретируемых белков в линиях эукариотических клеток увеличенное соотношение поверхности к объему позволяет достичь более высоких уровней секреции и, следовательно, более высоких выходов белков в супернатанте культуры. Наконец, эти методы позволяют легко наращивать эукариотические экспрессионные культуры.

[00257] Клетки, экспрессирующие VWF, могут быть связаны со сферическим или пористым микроносителем во время роста культуры клеток. Микроноситель может быть микроносителем, выбранным из группы микроносителей на основе декстрана, коллагена, пластика, желатина и целлюлозы и других, как описано в Butler (1988. In: Spier & Griffiths, *Animal Cell Biotechnology* 3:283-303). Также возможно выращивать клетки до биомассы на сферических микроносителях и субкультивировать клетки, когда они достигают конечной биомассы ферментера и до продукции экспрессированного белка на пористом микроносителе, или наоборот. Подходящие сферические микроносители могут включать микроносители с гладкой поверхностью, такие как Cytodex™ 1, Cytodex™ 2 и Cytodex™ 3 (GE Healthcare), и макропористые микроносители, такие как Cytopore™ 1, Cytopore™ 2, Cytoline™ 1 и Cytoline™ 2 (GE Healthcare).

[00258] В другом варианте осуществления пропептид VWF отщепляется от незрелого VWF *in vitro* посредством воздействия на pro-VWF фурином. В некоторых вариантах осуществления фурин, используемый для расщепления пропептида, представляет собой рекомбинантный фурин.

[00259] В некоторых вариантах осуществления rVWF экспрессируется в клетках,

культивируемых в среде для культивирования клеток, которая продуцирует rVWF с высокой молекулярной массой. Термины «раствор для культивирования клеток», «среда или среды для культивирования клеток» и «супернатант культуры клеток» относятся к аспектам процессов культивирования клеток, обычно хорошо известным в данной области техники. В контексте данного изобретения раствор культуры клеток может включать среду для культивирования клеток и супернатант культуры клеток. Среда для культивирования клеток добавляется извне к раствору для культивирования клеток, необязательно вместе с добавками, для обеспечения питательных веществ и других компонентов для культивирования клеток, экспрессирующих VWF. Надосадочная жидкость клеточной культуры относится к раствору клеточной культуры, содержащему питательные вещества и другие компоненты из клеточной культуральной среды, а также продукты, высвобождаемые, метаболизирующиеся и/или выводимые из клеток во время культивирования. В дополнительных вариантах осуществления среда может не содержать белков животных и иметь определенный химический состав. Способы приготовления культуральной среды определенного химического состава, не содержащей животных белков, известны в данной области техники, например, в US 2006/0094104, US 2007/0212770 и US 2008/0009040, которые оба включены в данный документ для всех целей и, в частности, для всех объектов, связанных со средами для культивирования клеток. «Не содержит белка» и родственные термины относятся к белку, который происходит из источника, экзогенного по отношению к клеткам в культуре или отличного от них, которые естественным образом выделяют белки во время роста. В другом варианте осуществления культуральная среда не содержит полипептидов. В другом варианте осуществления культуральная среда не содержит сыворотки. В другом варианте осуществления культуральная среда не содержит белков животных. В другом варианте осуществления культуральная среда не содержит компонентов животного происхождения. В другом варианте осуществления культуральная среда содержит белок, например животный белок из сыворотки, такой как фетальная сыворотка телят. В другом варианте осуществления в культуру экзогенно добавлены рекомбинантные белки. В другом варианте осуществления белки получены от сертифицированного животного, свободного от патогенов. Используемый в данном документе термин «химически определенный» означает, что среда не содержит каких-либо неопределенных добавок, таких как, например, экстракты компонентов животных, органов, желез, растений или дрожжей. Соответственно, каждый компонент химически определенной среды точно определен. В предпочтительном варианте осуществления среды не содержат компонентов животного происхождения и белков.

[00260] В некоторых вариантах осуществления культура клеток, экспрессирующих VWF, может поддерживаться в течение по меньшей мере около 7 суток или по меньшей мере около 14 суток, 21 суток, 28 суток или по меньшей мере около 5 недель, 6 недель, 7 недель или по меньшей мере около 2 месяцев или 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 месяцев или дольше. Плотность клеток, при которой поддерживается культура

клеток для получения рекомбинантного белка VWF, будет зависеть от условий культивирования и среды, используемой для экспрессии белка. Специалист в данной области техники легко сможет определить оптимальную плотность клеток для культуры клеток, продуцирующих VWF. В одном варианте осуществления культура поддерживается при плотности клеток от около $0,5 \times 10^6$ до 4×10^7 клеток/мл в течение длительного периода времени. В других вариантах осуществления плотность клеток поддерживается при концентрации от около $1,0 \times 10^6$ до около $1,0 \times 10^7$ клеток/мл в течение длительного периода времени. В других вариантах осуществления плотность клеток поддерживается при концентрации от около $1,0 \times 10^6$ до около $4,0 \times 10^6$ клеток/мл в течение длительного периода времени. В других вариантах осуществления плотность клеток может поддерживаться на уровне от около $2,0 \times 10^6$ до около $4,0 \times 10^6$, или от около $1,0 \times 10^6$ до около $2,5 \times 10^6$, или от около $1,5 \times 10^6$ до около $3,5 \times 10^6$, или любого другого аналогичного диапазона в течение длительного периода времени. По прошествии подходящего времени в культуре клеток rVWF можно выделить из системы экспрессии с использованием способов, известных в данной области техники.

[00261] В конкретном варианте осуществления плотность клеток в непрерывной культуре клеток для продуцирования rVWF поддерживается на уровне не более $2,5 \times 10^6$ клеток/мл в течение длительного периода. В других конкретных вариантах осуществления плотность клеток поддерживается на уровне не более $2,0 \times 10^6$ клеток/мл, $1,5 \times 10^6$ клеток/мл, $1,0 \times 10^6$ клеток/мл, $0,5 \times 10^6$ клеток/мл или менее. В одном варианте осуществления плотность клеток поддерживается на уровне от $1,5 \times 10^6$ клеток/мл до $2,5 \times 10^6$ клеток/мл.

[00262] В одном варианте осуществления описанных выше культур клеток раствор культуры клеток содержит добавку для среды, содержащую медь. Такие растворы для культивирования клеток описаны, например, в патенте США № 8852888 и патенте США № 9409971, которые полностью включены в данное описание посредством ссылки для всех целей и, в частности, для всех положений, относящихся к способам культивирования клеток и композициям для получения рекомбинантного VWF.

[00263] Полинуклеотидная и аминокислотная последовательности prepro-VWF представлены в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, соответственно, и доступны в GenBank под номерами доступа NM_000552 (мРНК фактора фон Виллебранда (VWF) Homo sapiens) и NP_000543, соответственно. Аминокислотная последовательность, соответствующая зрелому белку VWF, представлена в SEQ ID NO: 3 (соответствует аминокислотам 764-2813 полноразмерной аминокислотной последовательности prepro-VWF). В некоторых вариантах осуществления VWF имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления mat-rVWF по

данному изобретению имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO:3. См., например, патент США № 8597910, патентную публикацию США № 2016/0129090, а также Фиг. 60.

[00264] Одна форма полезного rVWF обладает по меньшей мере свойством стабилизации *in vivo*, например, связывание по меньшей мере одной молекулы фактора VIII (FVIII) и, возможно, имеющее фармакологически приемлемый паттерн гликозилирования. Его конкретные примеры включают VWF без домена A2, поэтому он устойчив к протеолизу (Lankhof et al., *Thromb. Haemost.* 77: 1008-1013, 1997) и фрагмент VWF от Val 449 до Asn 730, включая гликопротеиновый Ib-связывающий домен и сайты связывания для коллагена и гепарина (Pietu et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 1339-1347, 1989). Определение способности VWF стабилизировать по меньшей мере одну молекулу FVIII, в одном аспекте, проводят у млекопитающих с дефицитом VWF в соответствии с методами, известными в данной области техники.

[00265] RVWF по данному изобретению можно получить любым способом, известным в данной области техники. Один конкретный пример раскрыт в WO86/06096, опубликованной 23 октября 1986 г., и в заявке на патент США № 07/559509, поданной 23 июля 1990 г., которая включена в данное описание в качестве ссылки в отношении способов получения рекомбинантного VWF. Таким образом, в данной области техники известны способы (i) получения рекомбинантной ДНК с помощью генной инженерии, например посредством обратной транскрипции РНК и/или амплификации ДНК, (ii) введения рекомбинантной ДНК в прокариотические или эукариотические клетки путем трансфекции, например, посредством электропорации или микроинъекции, (iii) культивирование трансформированных клеток, например, непрерывным или периодическим способом, (iv) экспрессия VWF, например, конститутивно или при индукции, и (v) выделение VWF, например, из культуральной среды или путем сбора трансформированных клеток, чтобы (vi) получить очищенный rVWF, например, с помощью анионообменной хроматографии или аффинной хроматографии. Рекомбинантный VWF, в одном аспекте, получают в трансформированных клетках-хозяевах с использованием методов рекомбинантной ДНК, хорошо известных в данной области техники. Например, последовательности, кодирующие полипептид, могут быть вырезаны из ДНК с использованием подходящих рестрикционных ферментов. Альтернативно, в другом аспекте молекула ДНК синтезируется с использованием методов химического синтеза, таких как фосфорамидатный метод. Кроме того, в еще одном аспекте используется комбинация этих методов.

[00266] В данном изобретении также предложены векторы, кодирующие полипептиды по изобретению в соответствующем хозяине. Вектор включает полинуклеотид, который кодирует полипептид, функционально связанный с соответствующими последовательностями контроля экспрессии. Способы осуществления

этого функционального связывания до или после встраивания полинуклеотида в вектор хорошо известны. Последовательности контроля экспрессии включают промоторы, активаторы, энхансеры, операторы, сайты связывания рибосом, стартовые сигналы, стоп-сигналы, кэп-сигналы, сигналы полиаденилирования и другие сигналы, связанные с контролем транскрипции или трансляции. Полученный вектор, содержащий полинуклеотид, используется для трансформации подходящего хозяина. Это преобразование может быть выполнено с использованием методов, хорошо известных в данной области техники.

[00267] Любые из большого количества доступных и хорошо известных клеток-хозяев используются на практике данного изобретения. Выбор конкретного хозяина зависит от ряда факторов, известных в данной области техники, включая, например, совместимость с выбранным вектором экспрессии, токсичность пептидов, кодируемых молекулой ДНК, скорость трансформации, легкость выделения пептидов, характеристики экспрессии, биобезопасность и стоимость. Баланс этих факторов должен быть достигнут с пониманием того, что не все клетки-хозяева одинаково эффективны для экспрессии конкретной последовательности ДНК. В рамках этих общих рекомендаций полезные микробные клетки-хозяева включают, без ограничения, бактерии, дрожжи и другие грибы, насекомых, растения, клетки млекопитающих (включая человека) в культуре, или других хозяев, известных в данной области техники.

[00268] Трансформированные клетки-хозяева культивируют в обычных условиях культивирования, так чтобы желаемые соединения экспрессировались. Такие условия культивирования хорошо известны в данной области техники. Наконец, полипептиды очищают от культуральной среды или самих клеток-хозяев способами, хорошо известными в данной области техники.

[00269] В зависимости от клетки-хозяина, используемой для экспрессии соединения по изобретению, углеводные (олигосахаридные) группы необязательно присоединяются к сайтам, которые, как известно, являются сайтами гликозилирования в белках. Как правило, О-связанные олигосахариды присоединяются к остаткам серина (Ser) или треонина (Thr), тогда как N-связанные олигосахариды присоединяются к остаткам аспарагина (Asn), когда они являются частью последовательности Asn-X-Ser/Thr, где X может быть любой аминокислотой, кроме пролина. X предпочтительно представляет собой одну из 19 природных аминокислот, не считая пролина. Структуры N-связанных и О-связанных олигосахаридов и сахарных остатков, обнаруженных в каждом типе, различны. Одним из типов сахара, который обычно встречается как в N-связанных, так и в О-связанных олигосахаридах, является N-ацетилнейраминовая кислота (называемая сиаловой кислотой). Сиаловая кислота обычно является концевым остатком как N-связанных, так и О-связанных олигосахаридов и, в силу своего отрицательного заряда, в одном аспекте придает кислотные свойства гликозилированному соединению. Такой сайт (сайты) может быть включен в линкер соединений по данному изобретению и предпочтительно гликозилируется клеткой во время рекомбинантного продуцирования

полипептидных соединений (например, в клетках млекопитающих, таких как CHO, ВНК, COS). В других аспектах такие сайты гликозилируют с помощью синтетических или полусинтетических процедур, известных в данной области техники.

[00270] В некоторых вариантах осуществления сиализацию (также называемую сиалированием) можно проводить на колонке как часть описанных в данном документе процедур очистки (включая методы анионного обмена, катионного обмена, исключения по размеру и/или иммуноаффинные методы). В некоторых вариантах осуществления сиалирование приводит к увеличению стабильности rVWF по сравнению с rVWF, который не подвергался сиалированию. В некоторых вариантах осуществления сиалирование приводит к увеличению стабильности rVWF в кровотоке (например, после введения субъекту) по сравнению с rVWF, который не подвергался сиалированию. В некоторых вариантах осуществления стабильность сиалированного rVWF увеличивается на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с rVWF, который не подвергся сиалированию. В некоторых вариантах осуществления сиалирование приводит к увеличению периода полужизни rVWF по сравнению с rVWF, который не подвергался сиалированию. В некоторых вариантах осуществления сиалирование приводит к увеличению периода полужизни rVWF в кровотоке (например, после введения субъекту) по сравнению с rVWF, который не подвергался сиалированию. В некоторых вариантах осуществления период полужизни сиалированного rVWF увеличивается на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более по сравнению с rVWF, который не подвергся сиалированию. В некоторых вариантах осуществления увеличенный период полужизни сиалированного rVWF приводит к rVWF, который стабилен в течение 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часов или более в кровотоке (например, после введения субъекту) по сравнению с rVWF, который не подвергался сиалированию. В некоторых вариантах осуществления сиалирование увеличивает количество 2,3-сиалирования и/или 2,6-сиалирования. В некоторых вариантах осуществления сиалирование усиливается путем добавления 2,3-сиалилтрансферазы и/или 2,6-сиалилтрансферазы и CMP-NANA (натриевая соль цитидин-5'-монофосфо-N-ацетилнейраминовой кислоты) в качестве дополнительной буферной стадии. В некоторых вариантах осуществления сиалирование усиливается путем добавления 2,3-сиалилтрансферазы и CMP-NANA (натриевая соль цитидин-5'-монофосфо-N-ацетилнейраминовой кислоты) в качестве дополнительной буферной стадии. В некоторых вариантах осуществления 2,3 сиалирование усиливается путем добавления 2,3-сиалилтрансферазы и CMP-NANA (натриевая соль цитидин-5'-монофосфо-N-ацетилнейраминовой кислоты) в качестве дополнительной буферной стадии. В некоторых вариантах осуществления для увеличения сиалирования связанный белок (например, связанный rVWF) обрабатывают сиалидазой (например, нейраминидазой) для удаления 2,3-сиалирования, а затем проводят стадию промывки для удаления сиалидазы и введения 2,6 сиалилирования. В некоторых вариантах осуществления 2,6-сиалирование вводят путем добавления 2,6 сиалилтрансферазы и CMP-

NANA.

[00271] В некоторых вариантах осуществления 2,6 сиалирование усиливается путем добавления 2,6-сиалилтрансферазы и CMP-NANA (натриевая соль цитидин-5'-монофосфо-N-ацетилнейраминовой кислоты) в качестве дополнительной буферной стадии. В некоторых вариантах осуществления 2,3 сиалирование и/или 2,6 сиалирование усиливается путем добавления 2,3-сиалилтрансферазы и/или 2,6-сиалилтрансферазы и CMP-NANA (натриевая соль цитидин-5'-монофосфо-N-ацетилнейраминовой кислоты) в качестве дополнительной буферной стадии. В некоторых вариантах осуществления CMP-NANA химически или ферментативно модифицирован для переноса модифицированной сиаловой кислоты в потенциально свободное положение. В некоторых вариантах осуществления сиалирование выполняют путем загрузки rVWF на смолу, промывки одним или более буферами, как описано в данном документе, для удаления нежелательных примесей, применения одного или более буферов, содержащих сиалилтрансферазу и CMP-NANA, в условиях, обеспечивающих дополнительное сиалирование, и промывки одним буфером или несколькими буферами для удаления избытка реагентов сиалирования, и элюирование одним или более буферами улучшенного rVWF (например, rVWF с увеличенным сиалированием). В некоторых вариантах осуществления процесс сиалирования выполняется как часть метода катионного обмена, метода анионного обмена, метода исключения по размеру или метода иммуноаффинной очистки, как описано в данном документе.

[00272] Альтернативно, соединения получают синтетическими методами, используя, например, методы твердофазного синтеза. Подходящие методы хорошо известны в данной области техники и включают те, которые описаны в Merrifield (1973), *Chem. Polypeptides*, pp. 335-61 (Katsoyannis and Panayotis eds.); Merrifield (1963), *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149; Davis et al. (1985), *Biochem. Intl.* 10: 394-414; Stewart and Young (1969), *Solid Phase Peptide Synthesis*; U.S. Pat. No. 3,941,763; Finn et al. (1976), *The Proteins* (3rd ed.) 2: 105-253; and Erickson et al. (1976), *The Proteins* (3rd ed.) 2: 257-527'. Твердофазный синтез является предпочтительным методом получения индивидуальных пептидов, поскольку это наиболее экономичный метод получения небольших пептидов.

[00273] Фрагменты, варианты и аналоги VWF могут быть получены способами, хорошо известными в данной области техники. Фрагменты полипептида могут быть получены с использованием, без ограничения, ферментативного расщепления (например, трипсина, химотрипсина), а также с использованием рекомбинантных средств для создания фрагментов полипептида, имеющих конкретную аминокислотную последовательность. Могут быть получены полипептидные фрагменты, включающие область белка, обладающего конкретной активностью, такую как домен мульtimerизации или любой другой идентифицируемый домен VWF, известный в данной области техники.

[00274] Способы получения аналогов полипептидов также хорошо известны. Аналоги аминокислотной последовательности полипептида могут быть аналогами с замещением, инсерцией, добавлением или делецией. Делеционные аналоги, включая

фрагменты полипептида, лишены одного или более остатков нативного белка, которые не являются существенными для функции или иммуногенной активности. Инсерционные аналоги включают добавление, например, аминокислоты (аминокислот) в неконцевую точку полипептида. Этот аналог может включать, например, но без ограничения, вставку иммунореактивного эпитопа или просто одиночный остаток. Аналоги добавления, включая фрагменты полипептида, включают добавление одной или более аминокислот на одном или обоих концах белка и включают, например, слитые белки. Также рассматриваются комбинации вышеупомянутых аналогов.

[00275] Замещающие аналоги обычно заменяют одну аминокислоту дикого типа на другую в одном или более сайтах в пределах белка и могут быть разработаны для модуляции одного или более свойств полипептида без полной потери других функций или свойств. В одном аспекте замены представляют собой консервативные замены. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену аминокислоты на аминокислоту, имеющую боковую цепь или аналогичный химический характер. Подобные аминокислоты для проведения консервативных замен включают аминокислоты с кислой боковой цепью (глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота); основной боковой цепью (аргинин, лизин, гистидин); боковой цепью полярного амида (глутамин, аспарагин); гидрофобной алифатической боковой цепью (лейцин, изолейцин, валин, аланин, глицин); ароматической боковой цепью (фенилаланин, триптофан, тирозин); небольшой боковой цепью (глицин, аланин, серин, треонин, метионин); или алифатической гидроксильной боковой цепью (серин, треонин).

[00276] В одном аспекте аналоги по существу гомологичны или практически идентичны рекомбинантному VWF, из которого они получены. Аналоги включают те, которые сохраняют по меньшей мере часть биологической активности полипептида дикого типа, например, активность свертывания крови.

[00277] Рассматриваемые варианты полипептидов включают, без ограничения, полипептиды, химически модифицированные такими методами, как убиквитинирование, гликозилирование, включая полисиалирование (или полисиалирование), конъюгацию с терапевтическими или диагностическими агентами, мечение, ковалентное присоединение полимера, такое как пегилирование (дериватизация полиэтиленгликолем), введение негидролизующих связей, и вставка или замещение путем химического синтеза аминокислот, таких как орнитин, которые обычно не встречаются в белках человека. Варианты сохраняют такие же или практически одинаковые связывающие свойства немодифицированных молекул по изобретению. Такая химическая модификация может включать прямое или косвенное (например, через линкер) присоединение агента к полипептиду VWF. В случае непрямого присоединения предполагается, что линкер может быть гидролизующим или негидролизующим.

[00278] Получение аналогов пегилированного полипептида в одном аспекте будет включать стадии (а) реакции полипептида с полиэтиленгликолем (таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное ПЭГ) в условиях, при

которых полипептид связывающей конструкции присоединяется к одной или более группам ПЭГ, и (б) получение продукта(-ов) реакции. В общем, оптимальные условия реакции для реакций ацилирования определяются на основе известных параметров и желаемого результата. Например, чем больше соотношение ПЭГ:белок, тем больше процент полипегилированного продукта. В некоторых вариантах осуществления связывающая конструкция имеет один фрагмент ПЭГ на N-конце. Полиэтиленгликоль (ПЭГ) может быть присоединен к фактору свертывания крови, например, для обеспечения более длительного периода полужизни *in vivo*. Группа ПЭГ может иметь любую подходящую молекулярную массу и быть линейной или разветвленной. Средняя молекулярная масса ПЭГ находится в диапазоне от около 2 кДа («кДа») до около 100 кДа, от около 5 кДа до около 50 кДа или от около 5 кДа до около 10 кДа. В некоторых аспектах группы ПЭГ присоединены к фактору свертывания крови посредством ацилирования или восстановительного алкилирования через природную или сконструированную реактивную группу в фрагменте ПЭГ (например, альдегидную, amino, тиоловую или сложноэфирную группу) к реакционноспособной группе на фактор свертывания крови (например, альдегидная, amino- или сложноэфирная группа) или любым другим способом, известным в данной области техники.

[00279] Способы получения полисиалированного полипептида описаны в патентной публикации США 20060160948, Fernandes et Gregoriadis; *Biochim. Biophys. Acta* 1341: 26-34, 1997 и Saenko et al., *Haemophilia* 12:42-51, 2006. Вкратце, раствор коломиновой кислоты (CA), содержащий 0,1 М NaIO₄, перемешивают в темноте при комнатной температуре для окисления CA. Активированный раствор CA диализуют против, например, 0,05 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,2, в темноте, и этот раствор добавляют к раствору rVWF и инкубируют в течение 18 ч при комнатной температуре в темноте при осторожном встряхивании. Свободные реагенты необязательно отделяются от конъюгата rVWF-полисиаловая кислота, например, ультрафильтрацией/диафильтрацией. Конъюгация rVWF с полисиаловой кислотой достигается с использованием глутарового альдегида в качестве сшивающего реагента (Migneault et al., *Biotechniques* 37: 790-796, 2004).

[00280] Кроме того, в другом аспекте предполагается, что полипептид по изобретению представляет собой слитый белок со вторым агентом, который представляет собой полипептид. В одном варианте осуществления второй агент, который представляет собой полипептид, без ограничения, представляет собой фермент, фактор роста, антитело, цитокин, хемокин, рецептор клеточной поверхности, внеклеточный домен рецептора клеточной поверхности, клеточную адгезию. молекула, или фрагмент, или активный домен белка, описанного выше. В родственном варианте осуществления второй агент представляет собой фактор свертывания крови, такой как фактор VIII, фактор VII и/или фактор IX. В некоторых вариантах осуществления второй агент представляет собой слитый белок. Рассматриваемый слитый белок получают химическими или рекомбинантными методами, хорошо известными в данной области техники. В некоторых

вариантах осуществления слитый белок представляет собой слитый белок rVWF-FVIII. В некоторых вариантах осуществления слитый белок представляет собой слитый белок rVWF-FVIII, где активный FVIII встроен в мотив VWF. В некоторых вариантах осуществления слитый белок представляет собой слитый белок rVWF-FVIII, где активный FVIII встроен в мотив VWF, так что VWF является полноразмерным. В некоторых вариантах осуществления слитый белок представляет собой слитый белок rVWF-FVIII, где активный FVIII встроен в мотив VWF, при этом части последовательности VWF удалены и заменены последовательностью FVIII. В некоторых вариантах осуществления слитого белка rVWF-FVIII, FVIII представляет собой FVIII с удаленным В-доменом. В некоторых вариантах осуществления слитого белка rVWF-FVIII, домен, обогащенный N-гликозилированием, заменяет FVIII-В-домен. В некоторых вариантах осуществления слитого белка rVWF-FVIII, домен, обогащенный гликозилированием vWF-N, слит с полноразмерным FVIII и/или его усеченными формами.

[00281] В некоторых вариантах осуществления слитого белка rVWF-FVIII слитый белок содержит:

пептид VWF, содержащий положения с 764 по 1336 пептида VWF,
 пептид FVIII, содержащий положения с 24 по 760 пептида тяжелой цепи FVIII,
 пептид VWF, содержащий положения с 2218 по 2593 пептида VWF,
 пептид FVIII, содержащий положения с 1333 по 2351 пептида легкой цепи FVIII, и
 пептид VWF, содержащий положения с 2620 по 2813 пептида VWF.

В этом варианте осуществления слитого белка rVWF-FVIII положение аминокислот отсчитывается с первого положения, включая Pro и/или сигнальный пептид. В этом варианте осуществления слитого белка rVWF-FVIII положение 764 в VWF соответствует положению 1 зрелого rVWF (mat-rVWF), а положение 20 в FVIII соответствует положению 1 зрелого пептида FVIII. В некоторых вариантах осуществления слитого белка rVWF-FVIII последовательность слитого белка представлена на Фиг. 64.

[00282] В некоторых вариантах осуществления слитого белка rVWF-FVIII слитый белок содержит:

пептид FVIII, содержащий положения тяжелой цепи FVIII с 19 по 760 пептида тяжелой цепи FVIII,
 пептид VWF, содержащий положения с 2218 по 2593 пептида VWF, и
 пептид FVIII, содержащий положения с 1333 по 2351 пептида легкой цепи FVIII.

В этом варианте осуществления слитого белка rVWF-FVIII положение аминокислот отсчитывается с первого положения, включая Pro и/или сигнальный пептид. В этом варианте осуществления слитого белка rVWF-FVIII положение 764 в VWF соответствует положению 1 зрелого rVWF (mat-rVWF), а положение 20 в FVIII соответствует положению 1 зрелого пептида FVIII. В некоторых вариантах осуществления слитого белка rVWF-FVIII последовательность слитого белка представлена на Фиг. 65.

[00283] В другом аспекте также предполагается, что полипептиды propro-VWF и pro-VWF будут обеспечивать терапевтический эффект в композициях по данному

изобретению. Например, в патенте США № 7005502 описан фармацевтический препарат, содержащий значительные количества pro-VWF, который индуцирует образование тромбина *in vitro*. Помимо рекомбинантных, биологически активных фрагментов, вариантов или других аналогов встречающегося в природе зрелого VWF, данное изобретение предполагает использование рекомбинантных биологически активных фрагментов, вариантов или аналогов rprepro-VWF (приведен в SEQ ID NO: 2) или полипептидов pro-VWF (аминокислотные остатки от 23 до 764 SEQ ID NO: 2) в составах, описанных в данном документе.

[00284] Полинуклеотиды, кодирующие фрагменты, варианты и аналоги, могут быть легко получены специалистом в области кодирования биологически активных фрагментов, вариантов или аналогов встречающейся в природе молекулы, которые обладают такой же или подобной биологической активностью, что и природная молекула. В различных аспектах эти полинуклеотиды получают с использованием методов ПЦР, ферментативного расщепления/лигирования молекулы, кодирующей ДНК, и т.п. Таким образом, специалист в данной области техники сможет создавать изменения единичных оснований в цепи ДНК, приводящие к измененному кодону и миссенс-мутации, с использованием любого метода, известного в данной области техники, включая, без ограничения этим, сайт-специфический мутагенез. Используемая в данном документе фраза «умеренно строгие условия гибридизации» означает, например, гибридизацию при 42°C в 50% формамиде и отмывку при 60°C в 0,1 x SSC, 0,1% SDS. Специалистам в данной области техники понятно, что изменение этих условий происходит в зависимости от длины и содержания нуклеотидных оснований GC последовательностей, подлежащих гибридизации. Стандартные в данной области техники формулы подходят для определения точных условий гибридизации. См. Sambrook et al., 9.47-9.51 в *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

ИНАКТИВАЦИЯ ВИРУСОВ

[00285] В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, дополнительно включает стадию вирусной инактивации. Стадия инактивации вирусов может происходить до, после или одновременно со стадией промывки и/или стадией элюирования, но перед стадией сбора. Обработка для инактивации вирусов может инактивировать вирусы с липидной оболочкой. В некоторых вариантах обработка для инактивации вирусов представляет собой обработку растворителем и детергентом (S/D). В некоторых вариантах осуществления обработка для инактивации вирусов включает использование этиленгликоля, пропиленгликоля в части спиртов и/или одного или более органических растворителей.

[00286] Используемый в данном документе термин «инактивирование вируса» или «инактивация вируса» относится к процессу, при котором вирус больше не может инфицировать клетки, реплицироваться и размножаться, а также к удалению вируса *per se*. По существу, термин «инактивация вируса» обычно относится к процессу получения жидкости, описанной в данном документе, полностью свободной от инфекционных

вирусных примесей. Желательна любая степень вирусной инактивации с использованием описанных в данном документе способов. Однако желательно достичь степени вирусной инактивации, необходимой для соблюдения строгих правил безопасности для фармацевтических препаратов. Эти руководящие принципы сформулированы ВОЗ и хорошо известны специалистам в данной области техники.

[00287] Раскрытые в данном документе способы могут дополнительно включать стадию удаления вируса из смеси после инкубации. Используемый в данном документе термин «удаление вируса» или «элиминирование вируса» относится к процессу, который уничтожает вирус в смеси, раскрытой в данном документе, так что вирусные частицы эффективно извлекаются из смеси. Вирус может быть жизнеспособным или инактивированным вирусом. Удаление обычно осуществляется эксклюзионной хроматографией или хроматографией с положительной адсорбцией, когда представляющий интерес белок связывается с хроматографической смолой, включая, например, анионообменную смолу или катионообменную смолу, как описано в данном документе. После удаления количество оставшегося вируса представляет собой количество, которое по существу не оказывает долгосрочного или постоянного вредного воздействия при введении субъекту, нуждающемуся в этом, включая, например, человека.

[00288] В одном варианте осуществления смесь после удаления вируса практически не содержит вируса. Используемый в данном документе термин «практически не содержит вируса» означает, что только следовые количества вируса могут быть обнаружены или подтверждены прибором или процессом, используемым для обнаружения или подтверждения присутствия или активности вируса, и что такое следовое количество вируса недостаточно, чтобы быть вредным для здоровья человека. В одном из аспектов этого варианта осуществления смесь после удаления вируса совершенно не содержит вируса. Используемый в данном документе термин «полностью свободный от вируса» означает, что присутствие вируса не может быть обнаружено или подтверждено в пределах диапазона обнаружения прибора или процесса, используемых для обнаружения или подтверждения присутствия или активности вируса. Белок, содержащийся в смеси, которая по существу не содержит или полностью не содержит вируса, может быть использован для изготовления фармацевтической композиции, которая безопасна для введения человеку, поскольку вируса недостаточно, чтобы оказать вред здоровью человека.

[00289] В других аспектах этого варианта осуществления смесь после удаления вируса содержит менее 10 БОЕ/мл вируса, например, менее 1 БОЕ/мл вируса, менее 1×10^{-1} БОЕ/мл вируса, 1×10^{-2} БОЕ/мл вируса или 1×10^{-3} БОЕ/мл вируса.

[00290] В других аспектах этого варианта осуществления смесь после удаления вируса содержит менее ID50 для вируса, например, по меньшей мере в 10 раз меньше, чем ID50 для вируса, по меньшей мере в 100 раз меньше, чем ID50 для вируса, по меньшей мере в 200 раз меньше, чем ID50 для вируса, по меньшей мере в 300 раз меньше, чем ID50 для вируса, по меньшей мере в 400 раз меньше, чем ID50 для вируса, по меньшей мере в

500 раз меньше, чем ID₅₀ для вируса, по меньшей мере в 600 раз меньше, чем ID₅₀ для вируса, по меньшей мере в 700 раз меньше, чем ID₅₀ для вируса, по меньшей мере в 800 раз меньше, чем ID₅₀ для вируса, по меньшей мере в 900 раз меньше, чем ID₅₀ для вируса или по меньшей мере в 1000 раз меньше, чем ID₅₀ для вируса.

[00291] Инактивация вирусов может проводиться одновременно с очисткой белка или без нее. В некоторых вариантах осуществления способ включает иммобилизацию белка на носителе и обработку иммобилизованного белка смесью детергент-растворитель, содержащей неионный детергент и органический растворитель. В некоторых вариантах осуществления носитель представляет собой хроматографическую смолу. В некоторых вариантах осуществления смесь детергент-растворитель содержит 1% Triton X-100, 0,3% три-N-бутилфосфата и 0,3% полисорбата 80 (Tween 80). Обработка смесью растворитель-детергент может продолжаться в течение длительного времени, например, от 30 минут до 1 часа, пока белок остается иммобилизованным на хроматографической смоле, например, на катионообменной смоле; и/или обработка растворителем-детергентом может происходить при температуре от 2°C до 10 °C. Такой подход к инаktivации вирусов неожиданно может снизить образование белковых агрегатов во время обработки смесью детергент-растворитель на значительное количество, например, более чем на 50%, по сравнению с обработкой смесью растворитель-детергент, когда белок не иммобилизован в растворе.

[00292] В некоторых вариантах осуществления способ инаktivации вируса, содержащего липидную оболочку, включает стадии: i) получение жидкости, содержащей белок, обладающий активностью; ii) смешивание органического растворителя и поверхностно-активного вещества с жидкостью, тем самым создавая смесь; и iii) инкубирование смеси в течение не более около 120 минут; где обе стадии (ii) и (iii) выполняются при температуре не выше около 20 °C; где смесь после инкубации практически не содержит вируса, содержащего жизнеспособную липидную оболочку; и при этом белок после инкубации имеет активность, составляющую по меньшей мере 25% активности, предусмотренной на стадии (i).

[00293] В других вариантах осуществления белок, по существу свободный от вируса, содержащего липидную оболочку, может быть получен способом, включающим следующие стадии: i) получение жидкости, содержащей белок, обладающий активностью; ii) смешивание органического растворителя и поверхностно-активного вещества с жидкостью, тем самым создавая смесь; и iii) инкубирование смеси в течение не более около 120 минут; где обе стадии (ii) и (iii) выполняются при температуре не выше около 20 °C; где смесь после инкубации практически не содержит вируса, содержащего жизнеспособную липидную оболочку; и при этом белок после инкубации имеет активность, составляющую по меньшей мере 25% активности, предусмотренной на стадии (a).

[00294] В другом варианте осуществления способ инаktivации вируса, содержащего липидную оболочку, включает стадии: i) получение жидкости, содержащей

белок свертывания крови, обладающий активностью (например, VWF); ii) смешивание органического растворителя и поверхностно-активного вещества с жидкостью, тем самым создавая смесь; и iii) инкубирование смеси в течение не более около 120 минут; где обе стадии (ii) и (iii) выполняются при температуре не выше около 20 °С; где смесь после инкубации практически не содержит вируса, содержащего жизнеспособную липидную оболочку; и при этом фактор VIII после инкубации имеет активность, составляющую по меньшей мере 25% активности, предусмотренной на стадии (i).

[00295] В некоторых случаях органический растворитель представляет собой простой эфир, спирт, диалкилфосфат или триалкилфосфат. В некоторых вариантах осуществления простой эфир выбран из диметилового эфира, диэтилового эфира, этилпропилового эфира, метил-бутилового эфира, метилизопропилового эфира и/или метилизобутилового эфира.

[00296] В некоторых вариантах осуществления спирт выбран из метанола, этанола, пропанола, изопропанола, н-бутанола, изобутанола, н-пентанола и/или изопентанола. В некоторых вариантах осуществления диалкилфосфат выбран из ди-(н-бутил)фосфата, ди-(трет-бутил)фосфата, ди-(н-гексил)фосфата, ди-(2-этилгексил)фосфата, ди-(н-децил)фосфата и/или этил ди(н-бутил)фосфата. В некоторых вариантах осуществления триалкилфосфат выбран из три-(н-бутил)фосфата, три-(трет-бутил)фосфата, три-(н-гексил)фосфата, три-(2-этилгексил)фосфата и/или три-(н-децил)фосфата.

[00297] В некоторых случаях конечная концентрация органического растворителя составляет от около 0,1% (об./об.) до около 5,0% (об./об.), от около 0,1% (об./об.) до около 1,0% (об./об.), от около 0,2% (об./об.) до около 0,5% (об./об.) или от около 0,2% (об./об.) до около 0,4% (об./об.), около 0,3% (об./об.).

[00298] В некоторых случаях поверхностно-активное вещество выбирают из ионного поверхностно-активного вещества, цвиттерийонного (амфотерного) поверхностно-активного вещества и/или неионного поверхностно-активного вещества. Ионное поверхностно-активное вещество может быть анионным поверхностно-активным веществом или катионным поверхностно-активным веществом.

[00299] В некоторых вариантах осуществления анионное поверхностно-активное вещество выбирают из алкилсульфата, сульфата простого алкилового эфира, докузата, фторсульфонатного поверхностно-активного вещества, алкилбензолсульфоната, фосфата алкиларилового эфира, фосфата простого алкилового эфира; алкилкарбоксилата, лауроилсаркозината натрия и/или карбоксилатного фторсодержащего поверхностно-активного вещества. В некоторых вариантах осуществления алкилсульфат выбран из лаурилсульфата аммония или лаурилсульфата натрия (SDS). В других вариантах осуществления сульфат простого алкилового эфира представляет собой лауретсульфат натрия и/или миретсульфат натрия. В некоторых вариантах осуществления докузат представляет собой диоктилсульфосукцинат натрия.

[00300] В некоторых вариантах осуществления сульфонатное фторированное ПАВ выбирают из перфтороктансульфоната (ПФОС) и/или перфторбутансульфоната. В

некоторых вариантах осуществления алкилкарбоксилат выбран из соли жирной кислоты и/или стеарата натрия. В некоторых вариантах осуществления карбоксилатное фторсодержащее поверхностно-активное вещество представляет собой перфторонаноат и перилфтороктаноат. В некоторых вариантах осуществления катионное поверхностно-активное вещество выбирают из соли алкилтриметиламмония, хлорида цетилпиридиния (CPC), полиэтоксифированного талового амина (POEA), хлорида бензалкония (BAC), хлорида бензетония (BZT), 5-бром-5-нитро-1,3-диоксана, диметилдиоктадециламмониевого хлорида, диоктадецилдиметиламмонийбромида (DODAB), pH-зависимого первичного амина, pH-зависимого вторичного амина и/или pH-зависимого третичного амина. В некоторых вариантах осуществления соль алкилтриметиламмония выбрана из бромида цетилтриметиламмония (СТАВ) и/или хлорида цетилтриметиламмония (СТАС). В некоторых вариантах осуществления первичный амин становится положительно заряженным при $\text{pH} < 10$ или вторичный амин становится заряженным при $\text{pH} < 4$.

[00301] В некоторых вариантах осуществления катионное поверхностно-активное вещество представляет собой дигидрохлорид октенидина.

[00302] В некоторых вариантах осуществления цвиттерийное поверхностно-активное вещество выбирают из 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфоната (CHAPS), сультаина, бетаина и/или лецитина. В некоторых вариантах осуществления сультаин представляет собой кокамидопропилгидроксисультаин. В некоторых вариантах осуществления бетаин представляет собой кокамидопропилбетаин.

[00303] В некоторых вариантах осуществления неионное поверхностно-активное вещество выбрано из сложного алкилового эфира сорбитана полиоксиэтиленгликоля, полуксамера, простого полигликолевого эфира алкилфенола, алкиларилового эфира полиэтиленгликоля, алкилового эфира полиоксиэтиленгликоля, 2-додекоксиэтанола (LUBROL®-PX), простого эфира октилфенола полиоксиэтиленгликоля, простого эфира алкилфенола полиоксиэтиленгликоля, феноксиполиэтоксилэтанола, простого алкилового эфира глюкозида, простого алкилового эфира мальтозида, алкилового эфира тиоглюкозида, дигитонина, сложного алкилового эфира глицерина, сульфата алкиларилполиэфира, сульфоната спирта, алкилового эфира сорбитана, этаноламин кокамида, монолаурата сахарозы, оксид додецилдиметиламина и/или холата натрия. В некоторых вариантах осуществления сложный алкиловый эфир сорбитана полиоксиэтиленгликоля выбран из полисорбата 20 сорбитанмоноолеата (TWEEN® 20), полисорбат 40 сорбитанмоноолеата (TWEEN® 40), полисорбат 60 сорбитанмоноолеата (TWEEN® 60), полисорбат 61 сорбитанмоноолеата (TWEEN® 61), полисорбат 65 сорбитанмоноолеата (TWEEN® 65), полисорбат 80 сорбитанмоноолеата (TWEEN® 80) и/или полисорбат 81 сорбитанмоноолеата (TWEEN® 81).

[00304] В некоторых вариантах осуществления полуксамер выбирают из Poloxamer 124 (PLURONIC® L44), Poloxamer 181 (PLURONIC® L61), Poloxamer 182 (PLURONIC® L62), Poloxamer 184 (PLURONIC® L64), Poloxamer 188 (PLURONIC® F68), Poloxamer 237

(PLURONIC® F87), Poloxamer 338 (PLURONIC® L108) и/или Poloxamer 407 (PLURONIC® F127).

[00305] В некоторых вариантах осуществления алкиловый эфир полиоксиэтиленгликоля выбран из монододецилового эфира октаэтиленгликоля, монододецилового эфира пентаэтиленгликоля, BRIJ® 30 и/или BRIJ® 35.

[00306] В некоторых случаях простой эфир октилфенола полиоксиэтиленгликоля выбирают из полиоксиэтилен(4-5) пара-трет-октилфенола (TRITON® X-45) и/или полиоксиэтиленоктилфенилового эфира (TRITON® X-100). В некоторых вариантах осуществления простой алкилфенольный эфир полиоксиэтиленгликоля представляет собой ноноксинол-9.

[00307] В некоторых вариантах осуществления феноксиполиэтоксилэтанол выбран из нонилфеноксиполиэтоксилэтанола и/или октилфеноксиполиэтоксилэтанола.

В некоторых вариантах осуществления алкиловый эфир глюкозида представляет собой октилглюкопиранозид. В некоторых вариантах осуществления алкиловый эфир мальтозида представляет собой додецилмальтопиранозид. В некоторых вариантах осуществления алкиловый эфир тиоглюкозида представляет собой гептилтиоглюкопиранозид. В некоторых вариантах осуществления алкиловый эфир глицерина представляет собой лаурат глицерина. В некоторых вариантах осуществления кокамидный этаноламин выбран из кокамидмоноэтаноламина и/или кокамидэтаноламина.

[00308] В некоторых вариантах осуществления конечная концентрация поверхностно-активного вещества составляет от около 0,1% (об./об.) до около 10,0 (об./об.) или от около 0,5% (об./об.) до около 5,0% (об./об.). В некоторых случаях поверхностно-активное вещество представляет собой множество поверхностно-активных веществ.

[00309] Полезные методы инактивации вирусов описаны, например, в патентах США № 6190609 и 9315560 и в публикации заявки США № 2017/0327559, содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[00310] Инактивацию вирусов можно проводить, как это известно специалистам в данной области техники. Например, растворитель три (н-бутил) фосфат (TNBP) и детергенты, такие как, помимо прочего, полисорбат 80 и Triton X-100, эффективны для инактивации вирусов с липидной оболочкой. Инактивацию вирусов можно проводить при комнатной температуре, например от 14°C до около 25 °C, в течение около 1 часа или более. В некоторых случаях время инкубации не превышает двух часов.

[00311] В некоторых вариантах осуществления обработка для инактивации вирусов прекращается путем добавления буфера, содержащего цитрат натрия, к инактивированному вирусом материалу. В некоторых случаях буфер с цитратом натрия содержит от около 40 мМ до около 100 мМ буфера цитрата натрия, например, около 40 мМ, около 50 мМ, около 60 мМ, около 70 мМ, около 80 мМ, около 90 мМ или около 100 мМ буфера цитрата натрия.

СОЗРЕВАНИЕ VWF

[00312] Фурин является частью семейства белков, называемых SPC (субтилизин-подобные пропротеинконвертазы), PC (пропротеинконвертазы) или в некоторых случаях PACE (фермент, расщепляющий парные основные аминокислоты). Члены семейства белков фурина включают, без ограничения, фурин, Kex2, PC2, PC1/PC3, PACE4, PC4, PC5 и/или PC7. В рамках данного изобретения способы обеспечивают способы созревания pro-VWF (pro-rVWF) в комплекс mat-VWF/VWF-PP (mat-rVWF/rVWF-PP) путем обработки фурином. Любой из этих членов семейства фуринов можно использовать в способах созревания VWF.

[00313] В некоторых вариантах осуществления pro-VWF представляет собой созревший при помощи фурина, на анионообменной колонке или на смоле, на катионообменной колонке или на смоле, или как часть метода хроматографии с разделением по размерам. В некоторых вариантах осуществления pro-VWF представляет собой фурин, созревший на анионообменной колонке или смоле и/или как часть процедуры анионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления pro-VWF представляет собой созревший при помощи фурина, созревший на катионообменной колонке или смоле и/или как часть процедуры катионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления pro-VWF представляет собой созревший при помощи фурина как часть процедуры эксклюзионной хроматографии. Такие способы были описаны, например, в патенте США № 8058411, который включен в данный документ посредством ссылки во всей его полноте для всех целей.

[00314] Для того чтобы облегчить процесс созревания и обеспечить pro-VWF, иммобилизованный на смоле в повышенной концентрации, в некоторых вариантах осуществления изобретения хроматографическая смола помещается в хроматографическую колонку. Поскольку концентрация pro-VWF в ходе его созревания *in vitro* влияет на эффективность созревания, выгодно поместить хроматографическую смолу в колонку. Кроме того, использование хроматографических колонок позволяет эффективнее контролировать параметры созревания более воспроизводимым образом и упрощает выполнение созревания VWF *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления концентрация фурина составляет около 1, около 2, около 3 или около 4 единиц рекомбинантного активного фурина на ME VWF:Ag (10 мкг pro-rVWF). В некоторых вариантах осуществления концентрация фурина составляет около 2-3 единицы рекомбинантного активного фурина на ME VWF:Ag (10 мкг pro-rVWF). В некоторых вариантах осуществления концентрация фурина составляет около 1-2 единицы рекомбинантного активного фурина на ME VWF:Ag (10 мкг pro-rVWF). В некоторых вариантах осуществления концентрация фурина составляет около 2 единиц рекомбинантного активного фурина на ME VWF:Ag (10 мкг pro-rVWF).

[00315] В некоторых вариантах осуществления, когда pro-VWF иммобилизован на анионообменной смоле и инкубируется с раствором, проявляющим активность pro-VWF-конвертазы, проводимость, измеренная при 25 °C, ниже 25 мСм/см. В некоторых вариантах осуществления, когда pro-VWF иммобилизован на анионообменной смоле и

инкубируется с раствором, проявляющим активность pro-VWF-конвертазы, проводимость, измеренная при 25 °С, ниже 20 мСм/см. В некоторых вариантах осуществления, когда pro-VWF иммобилизован на анионообменной смоле и инкубируется с раствором, проявляющим активность pro-VWF-конвертазы, проводимость, измеренная при 25 °С, ниже 16 мСм/см. В некоторых вариантах осуществления, когда pro-VWF иммобилизован на анионообменной смоле и инкубируется с раствором, проявляющим активность pro-VWF-конвертазы, проводимость, измеренная при 25 °С, находится в диапазоне от 16 мСм/см до 25 мСм/см. В некоторых вариантах осуществления, когда pro-VWF иммобилизован на анионообменной смоле и инкубируется с раствором, проявляющим активность pro-VWF-конвертазы, проводимость, измеренная при 25 °С, находится в диапазоне от 20 мСм/см до 25 мСм/см. Pro-rVWF, а также mat-rVWF могут быть эффективно иммобилизованы на анионообменных смолах при этих уровнях проводимости. Следовательно, буферы, применяемые в ходе данного способа, должны быть соответствующим образом адаптированы для поддержания уровней проводимости. В некоторых вариантах осуществления проводимость такова, что фермент фурин и/или PACE находится в активной форме и полностью или частично в подвижной фазе.

[00316] В некоторых вариантах осуществления mat-rVWF элюируется из анионообменной смолы при проводимости, измеренной при 25 °С, равной по меньшей мере 40 мСм/см. В некоторых вариантах осуществления mat-rVWF элюируется из анионообменной смолы при проводимости, измеренной при 25 °С, равной по меньшей мере 60 мСм/см. В некоторых вариантах осуществления mat-rVWF элюируется из анионообменной смолы при проводимости, измеренной при 25 °С, равной по меньшей мере 80 мСм/см. В некоторых вариантах осуществления mat-rVWF элюируется из анионообменной смолы при проводимости, измеренной при 25 °С, в диапазоне от 40 мСм/см до 80 мСм/см. В некоторых вариантах осуществления mat-rVWF элюируется из анионообменной смолы при проводимости, измеренной при 25 °С, в диапазоне от 60 мСм/см до 80 мСм/см. В некоторых вариантах осуществления желаемые частицы rVWF начинают элюироваться при проводимости от около 12 до 16 мСм/см/25°С с помощью анионообменной смолы (например, с TMAE). В некоторых вариантах осуществления основное количество (основная масса) желаемых частиц rVWF было элюировано анионообменной смолой в диапазоне от около 55 до 60 мСм/см/25 °С. В некоторых вариантах осуществления желаемые частицы rVWF начинают элюироваться при проводимости от около 18 до 24 мСм/см/25°С с помощью катионообменной смолы. В некоторых вариантах осуществления основное количество (основная масса) желаемых частиц rVWF было элюировано катионообменной смолой в диапазоне от около 36 до 42 мСм/см/25 °С. В некоторых вариантах осуществления желаемый rVWF является зрелым rVWF (например, mat-rVWF). В некоторых вариантах осуществления основное количество (основная масса) включает, по меньшей мере, около 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более от общего количества элюируемых желаемых веществ.

[00317] В некоторых вариантах осуществления используются дополнительные

стадии промывки перед элюированием mat-rVWF из анионообменной смолы. В некоторых вариантах осуществления используются дополнительные стадии промывки перед элюированием mat-rVWF катионообменной смолы.

[00318] Для их протеолитической активности многим протеазам необходимы кофакторы, такие как ионы двухвалентных металлов. Фурину и членам семейства белков фурина для активности необходимы ионы кальция. Следовательно, если фурин используется для созревания pro-rVWF *in vitro*, используются соли кальция. В некоторых вариантах осуществления соль кальция представляет собой растворимую соль кальция. В некоторых вариантах осуществления соль кальция представляет собой хлорид кальция (CaCl_2). В некоторых вариантах осуществления соль кальция представляет собой ацетат кальция. В некоторых вариантах осуществления используются ионы других двухвалентных металлов, включая, например, без ограничения, Be^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} и/или Cu^{2+} . В некоторых вариантах осуществления используется комбинация двух или более двухвалентных катионов. В некоторых вариантах осуществления Ca^{2+} и Mg^{2+} используются в комбинации. В некоторых вариантах осуществления соль магния представляет собой растворимую соль магния. В некоторых вариантах осуществления соль магния представляет собой хлорид магния (MgCl_2). В некоторых вариантах осуществления состав семейства белков фурина для использования при созревании содержит растворимую соль кальция в концентрации от 0,01 до 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления состав семейства белков фурина для использования при созревании содержит растворимую соль магния в концентрации от 0,01 до 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления состав семейства белков фурина для использования при созревании содержит CaCl_2 в концентрации от 0,01 до 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления состав семейства белков фурина для использования при созревании содержит MgCl_2 в концентрации от 0,01 до 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления состав семейства белков фурина для использования при созревании содержит CaCl_2 в концентрации от 0,1 до 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления состав семейства белков фурина для использования при созревании содержит MgCl_2 в концентрации от 0,1 до 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления состав семейства белков фурина для использования при созревании содержит CaCl_2 в концентрации от 0,2 до 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления состав семейства белков фурина для использования при созревании содержит MgCl_2 в концентрации от 0,2 до 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления состав семейства белков фурина для использования при созревании содержит фурин. В некоторых вариантах осуществления концентрация фурина составляет около 1, около 2, около 3 или около 4 единиц рекомбинантного активного фурина на ME VWF:Ag (10 мкг pro-rVWF). В некоторых вариантах осуществления концентрация фурина составляет около 2-3 единицы рекомбинантного активного фурина на ME VWF:Ag (10 мкг pro-rVWF). В некоторых вариантах осуществления концентрация фурина составляет около 1-2 единицы рекомбинантного активного фурина на ME VWF:Ag (10 мкг pro-rVWF). В некоторых вариантах осуществления концентрация фурина составляет около 2

единиц рекомбинантного активного фурина на ME VWF:Ag (10 мкг pro-rVWF).

[00319] Время инкубации фурина с иммобилизованным pro-rVWF может варьировать в зависимости от используемой системы. На эффективность процесса созревания также влияют такие факторы, как температура, буферность и т.д. Обычно процесс созревания заканчивается менее чем за 48 часов. В некоторых вариантах осуществления процесс созревания может происходить менее чем за 1 минуту. В некоторых вариантах осуществления процесс созревания может происходить менее чем за 40 часов, 36 часов, 30 часов, 24 часа, 20 часов, 16 часов, 10 часов, 5 часов, 2 часа, 1 час или менее. В некоторых вариантах осуществления инкубация для созревания pro-rVWF проводится в течение от менее 1 минуты до 48 часов. В некоторых вариантах осуществления инкубация для созревания pro-rVWF проводится в течение от 10 минут до 42 часов. В некоторых вариантах осуществления инкубация для созревания pro-rVWF проводится в течение от 20 минут до 36 часов. В некоторых вариантах осуществления инкубация для созревания pro-rVWF проводится в течение от 30 минут до 24 часов. В некоторых вариантах осуществления из-за высокой специфичности фурина «сверхаktivация» VWF (дальнейшая протеолитическая деградация) не происходит даже после продолжительного времени инкубации.

[00320] В некоторых вариантах осуществления процесс созревания зависит также от температуры, выбранной во время инкубации. Оптимальная ферментативная активность фурина зависит от температуры.

[00321] В некоторых вариантах осуществления инкубацию для созревания pro-rVWF проводят при температуре от 2 °C до 40 °C. В некоторых вариантах осуществления инкубацию для созревания pro-rVWF проводят при температуре от 4 °C до 37 °C. В некоторых вариантах осуществления инкубацию для созревания pro-rVWF проводят при низких температурах, таких как 2 °C. В некоторых вариантах осуществления максимальная используемая температура ниже 50 °C, чтобы избежать и/или предотвратить деградацию белка. В некоторых вариантах осуществления максимальная используемая температура ниже 45 °C, чтобы избежать и/или предотвратить деградацию белка.

[00322] В некоторых вариантах осуществления pro-VWF (или pro-rVWF) превращают в mat-VWF (или mat-rVWF) обработкой фурином или членом семейства фуринов, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления обработка фурином приводит к по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,5% превращению pro-rVWF в mat-rVWF и rVWF-PP. В некоторых вариантах осуществления после разделения по размерам в присутствии добавления по меньшей мере одного хелатирующего агента и/или повышения pH до pH по меньшей мере 7, остается менее 5% rVWF-PP, менее 4% rVWF-PP, менее 3% rVWF-PP, менее 2% rVWF-PP, менее 1% rVWF-PP, менее 0,5% rVWF-PP, менее 0,4% rVWF-PP, менее 0,1% rVWF или менее 0,05% rVWF-PP в элюате.

Таблица 2: Примерное удаление pro-VWF (на основе обработки фурином)

Стадия	Загрузка, примесь VWF-PP	Элюат, примесь VWF-PP
	% (масс./масс.)	% (масс./масс.)
AEX	~70%	~0,5%
CEX	~0,5%	~0,5%
SEC	~0,5%	~0,5%

МУЛЬТИМЕРЫ VWF

[00323] Оценка количества и процентного содержания мультимеров rVWF может быть проведена с использованием методов, известных в данной области техники, включая, без ограничения, методы с использованием электрофореза и методы эксклюзионной хроматографии для разделения мультимеров VWF по размеру, например, как обсуждается в Cumming et al., (J Clin Pathol., 1993 May; 46(5): 470-473, который включен в данное описание посредством ссылки для всех целей и, в частности, для всех рекомендаций, относящихся к оценке мультимеров VWF). Такие методы могут дополнительно включать методы иммуноблоттинга (такие как вестерн-блоттинг), при которых гель подвергают иммуноблоттингу с помощью радиоактивно меченного антитела к VWF с последующим хемилюминесцентным обнаружением (см., например, Wen et al., J. Clin. Lab. Anal., 1993, 7: 317-323, который полностью включен в данное описание посредством ссылки для всех целей и, в частности, относящихся к оценке мультимеров VWF). Дополнительные анализы на VWF включают VWF:антиген (VWF: Ag), VWF: кофактор ристоцетина (VWF:RCof) и VWF:анализ активности связывания коллагена (VWF:CBA), которые часто используются для диагностики и классификации болезни фон Виллебранда (см., например, Favaloro et al., Pathology, 1997, 29(4): 341-456; Sadler, JE, Annu Rev Biochem, 1998, 67:395-424 и Turecek et al., Semin Thromb Hemost, 2010, 36:510-521, которые настоящим включены в качестве ссылки в полном объеме для всех целей и, в частности, для всех методик, связанных с анализами на VWF). В некоторых вариантах осуществления mat-rVWF, полученный с использованием данных способов, включает любой мультимерный рисунок, присутствующий в загрузочной выборке rVWF. В некоторых вариантах осуществления mat-rVWF, полученный с использованием данных способов, включает физиологические встречающиеся мультимерные паттерны, а также паттерны сверхбольших VWF-мультимеров.

АНАЛИЗЫ VWF

[00324] При первичном гемостазе VWF служит мостом между тромбоцитами и определенными компонентами внеклеточного матрикса, такими как коллаген. Биологическая активность VWF в этом процессе может быть измерена различными анализами in vitro (Turecek et al., Semin Thromb Hemost, 2010, 36: 510-521).

[00325] Анализ VWF:кофактор ристоцетина (VWF:RCof) основан на агглютинации свежих или фиксированных формалином тромбоцитов, индуцированной антибиотиком ристоцетином в присутствии VWF. Степень агглютинации тромбоцитов зависит от концентрации VWF и может быть измерена турбидиметрическим методом, например, с

помощью агрегометра (Weiss et al., J. Clin. Invest., 1973, 52: 2708-2716; Macfarlane et al., Thromb. Diath. Haemorrh., 1975, 34: 306-308). Как предусмотрено в данном документе, специфическая активность кофактора ристоцетина VWF (VWF:RCO) по данному изобретению обычно описывается в единицах мЕд/мкг VWF, как измерено с использованием анализов *in vitro*.

[00326] В некоторых вариантах осуществления mat-rVWF, очищенный способами по данному изобретению, имеет удельную активность по меньшей мере около 20, 22,5, 25, 27,5, 30, 32,5, 35, 37,5, 40, 42,5, 45, 47,5, 50, 52,5, 55, 57,5, 60, 62,5, 65, 67,5, 70, 72,5, 75, 77,5, 80, 82,5, 85, 87,5, 90, 92,5, 95, 97,5, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150 или более мЕд/мкг. В некоторых вариантах осуществления mat-rVWF, используемый в описанных в данном документе способах, имеет удельную активность от 20 до 150 мЕд/мкг. В некоторых вариантах осуществления mat-rVWF имеет удельную активность от 30 до 120 мЕд/мкг. В некоторых вариантах осуществления mat-rVWF имеет удельную активность от 40 до 90 мЕд/мкг. В некоторых вариантах осуществления mat-rVWF обладает специфической активностью, выбранной из вариантов с 1 по 133, указанных в таблице 3 ниже.

Таблица 3. Примерные варианты осуществления специфической активности rVWF, обнаруженной в композициях и использованных в способах, предложенных в данном документе.

(мЕд/мкг)		(мЕд/мкг)		(мЕд/мкг)		(мЕд/мкг)	
20	Вар. 1	110	Вар. 35	40-150	Вар. 68	70-120	Вар. 101
22,5	Вар. 2	115	Вар. 36	40-140	Вар. 69	70-110	Вар. 102
25	Вар. 3	120	Вар. 37	40-130	Вар. 70	70-100	Вар. 103
27,5	Вар. 4	125	Вар. 38	40-120	Вар. 71	70-90	Вар. 104
30	Вар. 5	130	Вар. 39	40-110	Вар. 72	70-80	Вар. 105
32,5	Вар. 6	135	Вар. 40	40-100	Вар. 73	80-150	Вар. 106
35	Вар. 7	140	Вар. 41	40-90	Вар. 74	80-140	Вар. 107
37,5	Вар. 8	145	Вар. 42	40-80	Вар. 75	80-130	Вар. 108
40	Вар. 9	150	Вар. 43	40-70	Вар. 76	80-120	Вар. 109
42,5	Вар. 10	20-150	Вар. 44	40-60	Вар. 77	80-110	Вар. 110
45	Вар. 11	20-140	Вар. 45	40-50	Вар. 78	80-100	Вар. 111
47,5	Вар. 12	20-130	Вар. 46	50-150	Вар. 79	80-90	Вар. 112
50	Вар. 13	20-120	Вар. 47	50-140	Вар. 80	90-150	Вар. 113
52,5	Вар. 14	20-110	Вар. 48	50-130	Вар. 81	90-140	Вар. 114
55	Вар. 15	20-100	Вар. 49	50-120	Вар. 82	90-130	Вар. 115
57,5	Вар. 16	20-90	Вар. 50	50-110	Вар. 83	90-120	Вар. 116
60	Вар. 17	20-80	Вар. 51	50-100	Вар. 84	90-110	Вар. 117

62,5	Вар. 18	20-70	Вар. 52	50-90	Вар. 85	90-100	Вар. 118
65	Вар. 19	20-60	Вар. 53	50-80	Вар. 86	100-150	Вар. 119
67,5	Вар. 20	20-50	Вар. 54	50-70	Вар. 87	100-140	Вар. 120
70	Вар. 21	20-40	Вар. 55	50-60	Вар. 88	100-130	Вар. 121
72,5	Вар. 22	30-150	Вар. 56	60-150	Вар. 89	100-120	Вар. 122
75	Вар. 23	30-140	Вар. 57	60-140	Вар. 90	100-110	Вар. 123
77,5	Вар. 24	30-130	Вар. 58	60-130	Вар. 91	110-150	Вар. 124
80	Вар. 25	30-120	Вар. 59	60-120	Вар. 92	110-140	Вар. 125
82,5	Вар. 26	30-110	Вар. 60	60-110	Вар. 93	110-130	Вар. 126
85	Вар. 27	30-100	Вар. 61	60-100	Вар. 94	110-120	Вар. 127
87,5	Вар. 28	30-90	Вар. 62	60-90	Вар. 95	120-150	Вар. 128
90	Вар. 29	30-80	Вар. 63	60-80	Вар. 96	120-140	Вар. 129
92,5	Вар. 30	30-70	Вар. 64	60-70	Вар. 97	120-130	Вар. 130
95	Вар. 31	30-60	Вар. 65	70-150	Вар. 98	130-150	Вар. 131
97,5	Вар. 32	30-50	Вар. 66	70-140	Вар. 99	130-140	Вар. 132
100	Вар. 33	30-40	Вар. 67	70-130	Вар. 100	140-150	Вар. 133
105	Вар. 34						

Вар. = Вариант

[00327] Mat-rVWF по данному изобретению является в высокой степени мультимерным, содержащим от около 10 до около 40 субъединиц. В дополнительных вариантах осуществления мультимерный rVWF, полученный с использованием способов по данному изобретению, содержит около 10-30, 12-28, 14-26, 16-24, 18-22, 20-21 субъединиц. В некоторых вариантах осуществления rVWF присутствует в мультимерах, размер которых варьирует от димеров до мультимеров, содержащих более 40 субъединиц (> 10 миллионов дальтон). Самые большие мультимеры обеспечивают множественные участки связывания, которые могут взаимодействовать как с рецепторами тромбоцитов, так и с участками повреждения субэндотелиального матрикса, и являются наиболее гемостатически активной формой VWF. В некоторых вариантах осуществления mat-rVWF по данному изобретению содержит сверхбольшие мультимеры (ULM, англ. ultralarge multimers). Как правило, большие и сверхбольшие мультимеры являются наиболее гемостатически эффективными (см., например, Turecek, P., *Hämostaseologie*, (Vol. 37): Supplement 1, pages S15-S25 (2017)). В некоторых вариантах осуществления mat-rVWF имеет от 500 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления любой желаемый паттерн мультимеров может быть получен с использованием описанных способов. В некоторых вариантах осуществления, когда используются методы анионного обмена и/или катионного обмена, pH, проводимость и/или концентрация противоионов буферов на одной или более стадии (стадиях) промывки или градиентных буферов можно изменять

для получения желаемого паттерна мультимеров. В некоторых вариантах осуществления затем используются методы эксклюзионной хроматографии, критерии сбора могут использоваться для получения желаемого паттерна мультимеров. В некоторых вариантах осуществления описанный паттерн мультимеров содержит сверхбольшие мультимеры. В некоторых вариантах осуществления сверхбольшие мультимеры составляют по меньшей мере 10000 кДа, по меньшей мере 11000 кДа, по меньшей мере 12000 кДа, по меньшей мере 13000 кДа, по меньшей мере 14000 кДа, по меньшей мере 15000 кДа, по меньшей мере 16000 кДа, по меньшей мере 17000 кДа, по меньшей мере 18000 кДа, по меньшей мере 19000 кДа, по меньшей мере 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления сверхбольшие мультимеры составляют от около 10000 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления сверхбольшие мультимеры составляют от около 11000 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления сверхбольшие мультимеры составляют от около 12000 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления сверхбольшие мультимеры составляют от около 13000 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления сверхбольшие мультимеры составляют от около 14000 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления сверхбольшие мультимеры составляют от около 15000 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления сверхбольшие мультимеры составляют от около 16000 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления сверхбольшие мультимеры составляют от около 17000 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления сверхбольшие мультимеры составляют от около 18000 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления сверхбольшие мультимеры составляют от около 19000 кДа до 20000 кДа. В некоторых вариантах осуществления mat-rVWF, полученный с использованием данных способов, включает любой мультимерный рисунок, присутствующий в загрузочной выборке rVWF. В некоторых вариантах осуществления mat-rVWF, полученный с использованием данных способов, включает физиологически встречающиеся паттерны мультимеров, а также сверхбольшие паттерны VWF-мультимеров.

[00328] В некоторых вариантах осуществления композиция mat-rVWF, полученная описанным в данном документе способом очистки, имеет распределение олигомеров rVWF, характеризующееся тем, что 95% олигомеров содержат от 6 до 20 субъединиц. В некоторых вариантах осуществления композиция mat-rVWF имеет распределение олигомеров rVWF, характеризующееся тем, что 95% олигомеров имеют диапазон субъединиц, выбранный из вариантов с 458 по 641, приведенных в таблице 4.

Таблица 4. Примерные варианты распределения олигомеров rVWF, обнаруженных в композициях и используемых в способах, представленных в данном документе.

Субъединицы		Субъединицы		Субъединицы		Субъединицы	
2-40	Вар. 458	6-16	Вар. 504	12-20	Вар. 550	20-28	Вар. 596

2-38	Bap. 459	6-14	Bap. 505	12-18	Bap. 551	20-26	Bap. 597
2-36	Bap. 460	6-12	Bap. 506	12-16	Bap. 552	20-24	Bap. 598
2-34	Bap. 461	6-10	Bap. 507	12-14	Bap. 553	20-22	Bap. 599
2-32	Bap. 462	6-8	Bap. 508	14-40	Bap. 554	22-40	Bap. 600
2-30	Bap. 463	8-40	Bap. 509	14-38	Bap. 555	22-38	Bap. 601
2-28	Bap. 464	8-38	Bap. 510	14-36	Bap. 556	22-36	Bap. 602
2-26	Bap. 465	8-36	Bap. 511	14-34	Bap. 557	22-34	Bap. 603
2-24	Bap. 466	8-34	Bap. 512	14-32	Bap. 558	22-32	Bap. 604
2-22	Bap. 467	8-32	Bap. 513	14-30	Bap. 559	22-30	Bap. 605
2-20	Bap. 468	8-30	Bap. 514	14-28	Bap. 560	22-28	Bap. 606
2-18	Bap. 469	8-28	Bap. 515	14-26	Bap. 561	22-26	Bap. 607
2-16	Bap. 470	8-26	Bap. 516	14-24	Bap. 562	22-24	Bap. 608
2-14	Bap. 471	8-24	Bap. 517	14-22	Bap. 563	24-40	Bap. 609
2-12	Bap. 472	8-22	Bap. 518	14-20	Bap. 564	24-38	Bap. 610
2-10	Bap. 473	8-20	Bap. 519	14-18	Bap. 565	24-36	Bap. 611
2-8	Bap. 474	8-18	Bap. 520	14-16	Bap. 566	24-34	Bap. 612
4-40	Bap. 475	8-16	Bap. 521	16-40	Bap. 567	24-32	Bap. 613

4-38	Bap. 476	8-14	Bap. 522	16-38	Bap. 568	24-30	Bap. 614
4-36	Bap. 477	8-12	Bap. 523	16-36	Bap. 569	24-28	Bap. 615
4-34	Bap. 478	8-10	Bap. 524	16-34	Bap. 570	24-26	Bap. 616
4-32	Bap. 479	10-40	Bap. 525	16-32	Bap. 571	26-40	Bap. 617
4-30	Bap. 480	10-38	Bap. 526	16-30	Bap. 572	26-38	Bap. 618
4-28	Bap. 481	10-36	Bap. 527	16-28	Bap. 573	26-36	Bap. 619
4-26	Bap. 482	10-34	Bap. 528	16-26	Bap. 574	26-34	Bap. 620
4-24	Bap. 483	10-32	Bap. 529	16-24	Bap. 575	26-32	Bap. 621
4-22	Bap. 484	10-30	Bap. 530	16-22	Bap. 576	26-30	Bap. 622
4-20	Bap. 485	10-28	Bap. 531	16-20	Bap. 577	26-28	Bap. 623
4-18	Bap. 486	10-26	Bap. 532	16-18	Bap. 578	28-40	Bap. 624
4-16	Bap. 487	10-24	Bap. 533	18-40	Bap. 579	28-38	Bap. 625
4-14	Bap. 488	10-22	Bap. 534	18-38	Bap. 580	28-36	Bap. 626
4-12	Bap. 489	10-20	Bap. 535	18-36	Bap. 581	28-34	Bap. 627
4-10	Bap. 490	10-18	Bap. 536	18-34	Bap. 582	28-32	Bap. 628
4-8	Bap. 491	10-16	Bap. 537	18-32	Bap. 583	28-30	Bap. 629
6-40	Bap. 492	10-14	Bap. 538	18-30	Bap. 584	30-40	Bap. 630

6-38	Вар. 493	10-12	Вар. 539	18-28	Вар. 585	30-38	Вар. 631
6-36	Вар. 494	12-40	Вар. 540	18-26	Вар. 586	30-36	Вар. 632
6-34	Вар. 495	12-38	Вар. 541	18-24	Вар. 587	30-34	Вар. 633
6-32	Вар. 496	12-36	Вар. 542	18-22	Вар. 588	30-32	Вар. 634
6-30	Вар. 497	12-34	Вар. 543	18-20	Вар. 589	32-40	Вар. 635
6-28	Вар. 498	12-32	Вар. 544	20-40	Вар. 590	32-38	Вар. 636
6-26	Вар. 499	12-30	Вар. 545	20-38	Вар. 591	32-36	Вар. 637
6-24	Вар. 500	12-28	Вар. 546	20-36	Вар. 592	32-34	Вар. 638
6-22	Вар. 501	12-26	Вар. 547	20-34	Вар. 593	34-40	Вар. 639
6-20	Вар. 502	12-24	Вар. 548	20-32	Вар. 594	36-38	Вар. 640
6-18	Вар. 503	12-22	Вар. 549	20-30	Вар. 595	38-40	Вар. 641

Вар. = Вариант

[00329] В некоторых вариантах осуществления композиция mat-rVWF, полученная способами, представленными в данном документе, может быть охарактеризована в соответствии с процентным содержанием молекул mat-rVWF, которые присутствуют в конкретном мультимере mat-rVWF более высокого порядка или более крупном мультимере. Например, в одном варианте осуществления по меньшей мере 20% молекул mat-rVWF в композиции mat-rVWF, используемой в способах, описанных в данном документе, присутствуют в олигомерном комплексе, состоящем из по меньшей мере 10 субъединиц. В другом варианте осуществления по меньшей мере 20% молекул mat-rVWF в композиции mat-rVWF, используемой в способах, описанных в данном документе, присутствуют в олигомерном комплексе, состоящем из по меньшей мере 12 субъединиц. В других вариантах осуществления композиция mat-rVWF, используемая в способах, предложенных в данном документе, имеет минимальный процент (например, имеет по меньшей мере X %) молекул mat-rVWF, присутствующих в конкретном мультимере mat-

rVWF более высокого порядка или более крупном мультимере (например, мультимере из по меньшей мере Y субъединиц) согласно любому из вариантов 134-457, приведенных в таблицах 5-7.

Таблица 5. Примерные варианты осуществления процентного содержания молекул mat-rVWF, которые присутствуют в конкретном мультимере mat-rVWF более высокого порядка или более крупном мультимере, обнаруженном в композициях и используемых в способах, представленных в данном документе.

		Минимальное количество субъединиц в мультимере rVWF					
		6	8	10	12	14	16
Минимальный процент молекул rVWF	10%	Вар. 134	Вар. 152	Вар. 170	Вар. 188	Вар. 206	Вар. 224
	15%	Вар. 135	Вар. 153	Вар. 171	Вар. 189	Вар. 207	Вар. 225
	20%	Вар. 136	Вар. 154	Вар. 172	Вар. 190	Вар. 208	Вар. 226
	25%	Вар. 137	Вар. 155	Вар. 173	Вар. 191	Вар. 209	Вар. 227
	30%	Вар. 138	Вар. 156	Вар. 174	Вар. 192	Вар. 210	Вар. 228
	35%	Вар. 139	Вар. 157	Вар. 175	Вар. 193	Вар. 211	Вар. 229
	40%	Вар. 140	Вар. 158	Вар. 176	Вар. 194	Вар. 212	Вар. 230
	45%	Вар. 141	Вар. 159	Вар. 177	Вар. 195	Вар. 213	Вар. 231
	50%	Вар. 142	Вар. 160	Вар. 178	Вар. 196	Вар. 214	Вар. 232
	55%	Вар. 143	Вар. 161	Вар. 179	Вар. 197	Вар. 215	Вар. 233
	60%	Вар. 144	Вар. 162	Вар. 180	Вар. 198	Вар. 216	Вар. 234
	65%	Вар. 145	Вар. 163	Вар. 181	Вар. 199	Вар. 217	Вар. 235
	70%	Вар. 146	Вар. 164	Вар. 182	Вар. 200	Вар. 218	Вар. 236
	75%	Вар. 147	Вар. 165	Вар. 183	Вар. 201	Вар. 219	Вар. 237
	80%	Вар. 148	Вар. 166	Вар. 184	Вар. 202	Вар. 220	Вар. 238
	85%	Вар. 149	Вар. 167	Вар. 185	Вар. 203	Вар. 221	Вар. 239
90%	Вар. 150	Вар. 168	Вар. 186	Вар. 204	Вар. 222	Вар. 240	
95%	Вар. 151	Вар. 169	Вар. 187	Вар. 205	Вар. 223	Вар. 241	

Вар. = Вариант

Таблица 6. Примерные варианты осуществления процентного содержания молекул mat-rVWF, которые присутствуют в конкретном мультимере mat-rVWF более высокого порядка или более крупном мультимере, обнаруженном в композициях и используемых в способах, представленных в данном документе.

		Минимальное количество субъединиц в мультимере rVWF					
		18	20	22	24	26	28
Минимальный	10%	Вар. 242	Вар. 260	Вар. 278	Вар. 296	Вар. 314	Вар. 332
	15%	Вар. 243	Вар. 261	Вар. 279	Вар. 297	Вар. 315	Вар. 333

20%	Вар. 244	Вар. 262	Вар. 280	Вар. 298	Вар. 316	Вар. 334
25%	Вар. 245	Вар. 263	Вар. 281	Вар. 299	Вар. 317	Вар. 335
30%	Вар. 246	Вар. 264	Вар. 282	Вар. 300	Вар. 318	Вар. 336
35%	Вар. 247	Вар. 265	Вар. 283	Вар. 301	Вар. 319	Вар. 337
40%	Вар. 248	Вар. 266	Вар. 284	Вар. 302	Вар. 320	Вар. 338
45%	Вар. 249	Вар. 267	Вар. 285	Вар. 303	Вар. 321	Вар. 339
50%	Вар. 250	Вар. 268	Вар. 286	Вар. 304	Вар. 322	Вар. 340
55%	Вар. 251	Вар. 269	Вар. 287	Вар. 305	Вар. 323	Вар. 341
60%	Вар. 252	Вар. 270	Вар. 288	Вар. 306	Вар. 324	Вар. 342
65%	Вар. 253	Вар. 271	Вар. 289	Вар. 307	Вар. 325	Вар. 343
70%	Вар. 254	Вар. 272	Вар. 290	Вар. 308	Вар. 326	Вар. 344
75%	Вар. 255	Вар. 273	Вар. 291	Вар. 309	Вар. 327	Вар. 345
80%	Вар. 256	Вар. 274	Вар. 292	Вар. 310	Вар. 328	Вар. 346
85%	Вар. 257	Вар. 275	Вар. 293	Вар. 311	Вар. 329	Вар. 347
90%	Вар. 258	Вар. 276	Вар. 294	Вар. 312	Вар. 330	Вар. 348
95%	Вар. 259	Вар. 277	Вар. 295	Вар. 313	Вар. 331	Вар. 349

Вар. = Вариант

Таблица 7. Примерные варианты осуществления процентного содержания молекул mat-rVWF, которые присутствуют в конкретном мультимере mat-rVWF более высокого порядка или более крупном мультимере, обнаруженном в композициях и используемых в способах, представленных в данном документе.

		Минимальное количество субъединиц в мультимере rVWF					
		30	32	34	36	38	40
Минимальный процент молекул rVWF	10%	Вар. 350	Вар. 368	Вар. 386	Вар. 404	Вар. 422	Вар. 440
	15%	Вар. 351	Вар. 369	Вар. 387	Вар. 405	Вар. 423	Вар. 441
	20%	Вар. 352	Вар. 370	Вар. 388	Вар. 406	Вар. 424	Вар. 442
	25%	Вар. 353	Вар. 371	Вар. 389	Вар. 407	Вар. 425	Вар. 443
	30%	Вар. 354	Вар. 372	Вар. 390	Вар. 408	Вар. 426	Вар. 444
	35%	Вар. 355	Вар. 373	Вар. 391	Вар. 409	Вар. 427	Вар. 445

40 %	Вар. 356	Вар. 374	Вар. 392	Вар. 410	Вар. 428	Вар. 446
45 %	Вар. 357	Вар. 375	Вар. 393	Вар. 411	Вар. 429	Вар. 447
50 %	Вар. 358	Вар. 376	Вар. 394	Вар. 412	Вар. 430	Вар. 448
55 %	Вар. 359	Вар. 377	Вар. 395	Вар. 413	Вар. 431	Вар. 449
60 %	Вар. 360	Вар. 378	Вар. 396	Вар. 414	Вар. 432	Вар. 450
65 %	Вар. 361	Вар. 379	Вар. 397	Вар. 415	Вар. 433	Вар. 451
70 %	Вар. 362	Вар. 380	Вар. 398	Вар. 416	Вар. 434	Вар. 452
75 %	Вар. 363	Вар. 381	Вар. 399	Вар. 417	Вар. 435	Вар. 453
80 %	Вар. 364	Вар. 382	Вар. 400	Вар. 418	Вар. 436	Вар. 454
85 %	Вар. 365	Вар. 383	Вар. 401	Вар. 419	Вар. 437	Вар. 455
90 %	Вар. 366	Вар. 384	Вар. 402	Вар. 420	Вар. 438	Вар. 456
95 %	Вар. 367	Вар. 385	Вар. 403	Вар. 421	Вар. 439	Вар. 457

Вар. = Вариант

[00330] В соответствии с вышеизложенным, mat-rVWF содержит значительный процент (HMW) мультимеров mat-rVWF с высокой молекулярной массой. В дополнительных вариантах осуществления мультимерная композиция HMW rVWF содержит по меньшей мере 10% -80% декамеров mat-rVWF или мультимеров более высокого порядка. В дополнительных вариантах осуществления композиция содержит около 10-95%, 20-90%, 30-85%, 40-80%, 50-75%, 60-70% декамеров или мультимеров более высокого порядка. В дополнительных вариантах осуществления мультимерная композиция HMW mat-rVWF содержит по меньшей мере около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% декамеров или мультимеров более высокого порядка.

[00331] Оценка количества и процентного содержания мультимеров mat-rVWF может быть проведена с использованием методов, известных в данной области техники,

включая, без ограничения, методы с использованием электрофореза и методы эксклюзионной хроматографии для разделения mat-rVWF по размеру, например, как обсуждается в Cumming et al, (J Clin Pathol. 1993 May; 46(5): 470-473, который включен в данное описание посредством ссылки для всех целей и, в частности, для всех рекомендаций, относящихся к оценке мультимеров mat-rVWF). Такие методы могут дополнительно включать методы иммуноблоттинга (такие как вестерн-блоттинг), при которых гель подвергают иммуноблоттингу с помощью радиоактивно меченного антитела к VWF с последующим хемилюминесцентным обнаружением (см. например Wen et al., (1993), J. Clin. Lab. Anal., 7: 317-323, который полностью включен в данное описание посредством ссылки для всех целей и, в частности, относящихся к оценке мультимеров mat-rVWF). Дополнительные анализы на VWF включают VWF:антиген (VWF: Ag), VWF: кофактор ристоцетина (VWF:RCof) и VWF:анализ активности связывания коллагена (VWF:CBA), которые часто используются для диагностики и классификации болезни фон Виллебранда (см., например, Favaloro et al., Pathology, 1997, 29(4): 341-456, который настоящим включен в качестве ссылки в полном объеме для всех целей и, в частности, для всех методик, связанных с анализами на VWF).

[00332] В некоторых вариантах осуществления соотношение прокоагулянтной активности rFVIII (ME rFVIII: C) к активности кофактора rVWF-ристоцетина (ME rVWF: RCo) для mat-rVWF, полученного способами по данному изобретению, составляет от 3:1 до 1:5. В дополнительных вариантах осуществления соотношение составляет от 2:1 до 1:4. В других вариантах осуществления соотношение составляет от 5:2 до 1:4. В дополнительных вариантах осуществления соотношение составляет от 3:2 до 1:3. В других вариантах осуществления соотношение составляет около 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 2:3, 2:4, 2:5, 3:1, 3:2, 3:4 или 3:5. В дополнительных вариантах осуществления соотношение составляет от 1:1 до 1:2. В других вариантах осуществления соотношение составляет 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1 или 2:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение прокоагулянтной активности rFVIII (ME rFVIII: C) к активности кофактора ристоцетина rVWF (ME rVWF: RCo) в композиции, пригодной для способа, описанного в данном документе, выбрано из вариантов с 1988 по 2140, указанных в таблице 8.

Таблица 8. Типичные варианты осуществления соотношения прокоагулянтной активности rFVIII (ME rFVIII: C) к активности кофактора ристоцетина rVWF (ME rVWF: RCo) в композициях и используемых в способах, предложенных в данном документе.

(IU rFVIII:C) к (IU rVWF:RCo)							
4:1	Вар. 1988	3:1-3:5	Вар. 2027	4:3-1:4	Вар. 2065	4:5-2:3	Вар. 2103

3:1	Bap. 1989	3:1-2:3	Bap. 2028	4:3-1:3	Bap. 2066	4:5-3:4	Bap. 2104
2:1	Bap. 1990	3:1-3:4	Bap. 2029	4:3-2:5	Bap. 2067	3:4-1:6	Bap. 2105
3:2	Bap. 1991	3:1-4:5	Bap. 2030	4:3-1:2	Bap. 2068	3:4-1:5	Bap. 2106
4:3	Bap. 1992	3:1-5:6	Bap. 2031	4:3-3:5	Bap. 2069	3:4-1:4	Bap. 2107
1:1	Bap. 1993	3:1-1:1	Bap. 2032	4:3-2:3	Bap. 2070	3:4-1:3	Bap. 2108
5:6	Bap. 1994	3:1-4:3	Bap. 2033	4:3-3:4	Bap. 2071	3:4-2:5	Bap. 2109
4:5	Bap. 1995	3:1-3:2	Bap. 2034	4:3-4:5	Bap. 2072	3:4-1:2	Bap. 2110
3:4	Bap. 1996	3:1-2:1	Bap. 2035	4:3-5:6	Bap. 2073	3:4-3:5	Bap. 2111
2:3	Bap. 1997	2:1-1:6	Bap. 2036	4:3-1:1	Bap. 2074	3:4-2:3	Bap. 2112
3:5	Bap. 1998	2:1-1:5	Bap. 2037	1:1-1:6	Bap. 2075	2:3-1:6	Bap. 2113
1:2	Bap. 1999	2:1-1:4	Bap. 2038	1:1-1:5	Bap. 2076	2:3-1:5	Bap. 2114
2:5	Bap. 2000	2:1-1:3	Bap. 2039	1:1-1:4	Bap. 2077	2:3-1:4	Bap. 2115
1:3	Bap. 2001	2:1-2:5	Bap. 2040	1:1-1:3	Bap. 2078	2:3-1:3	Bap. 2116
1:4	Bap. 2002	2:1-1:2	Bap. 2041	1:1-2:5	Bap. 2079	2:3-2:5	Bap. 2117
1:5	Bap. 2003	2:1-3:5	Bap. 2042	1:1-1:2	Bap. 2080	2:3-1:2	Bap. 2118
1:6	Bap. 2004	2:1-2:3	Bap. 2043	1:1-3:5	Bap. 2081	2:3-3:5	Bap. 2119
4:1-1:6	Bap. 2005	2:1-3:4	Bap. 2044	1:1-2:3	Bap. 2082	3:5-1:6	Bap. 2120

4:1-1:5	Bap. 2006	2:1-4:5	Bap. 2045	1:1-3:4	Bap. 2083	3:5-1:5	Bap. 2121
4:1-1:4	Bap. 2007	2:1-5:6	Bap. 2046	1:1-4:5	Bap. 2084	3:5-1:4	Bap. 2122
4:1-1:3	Bap. 2008	2:1-1:1	Bap. 2047	1:1-5:6	Bap. 2085	3:5-1:3	Bap. 2123
4:1-2:5	Bap. 2009	2:1-4:3	Bap. 2048	5:6-1:6	Bap. 2086	3:5-2:5	Bap. 2124
4:1-1:2	Bap. 2010	2:1-3:2	Bap. 2049	5:6-1:5	Bap. 2087	3:5-1:2	Bap. 2125
4:1-3:5	Bap. 2011	3:2-1:6	Bap. 2050	5:6-1:4	Bap. 2088	1:2-1:6	Bap. 2126
4:1-2:3	Bap. 2012	3:2-1:5	Bap. 2051	5:6-1:3	Bap. 2089	1:2-1:5	Bap. 2127
4:1-3:4	Bap. 2013	3:2-1:4	Bap. 2052	5:6-2:5	Bap. 2090	1:2-1:4	Bap. 2128
4:1-4:5	Bap. 2014	3:2-1:3	Bap. 2053	5:6-1:2	Bap. 2091	1:2-1:3	Bap. 2129
4:1-5:6	Bap. 2015	3:2-2:5	Bap. 2054	5:6-3:5	Bap. 2092	1:2-2:5	Bap. 2130
4:1-1:1	Bap. 2016	3:2-1:2	Bap. 2055	5:6-2:3	Bap. 2093	2:5-1:6	Bap. 2131
4:1-4:3	Bap. 2017	3:2-3:5	Bap. 2056	5:6-3:4	Bap. 2094	2:5-1:5	Bap. 2132
4:1-3:2	Bap. 2018	3:2-2:3	Bap. 2057	5:6-4:5	Bap. 2095	2:5-1:4	Bap. 2133
4:1-2:1	Bap. 2019	3:2-3:4	Bap. 2058	4:5-1:6	Bap. 2096	2:5-1:3	Bap. 2134
4:1-3:1	Bap. 2020	3:2-4:5	Bap. 2059	4:5-1:5	Bap. 2097	1:3-1:6	Bap. 2135
3:1-1:6	Bap. 2021	3:2-5:6	Bap. 2060	4:5-1:4	Bap. 2098	1:3-1:5	Bap. 2136
3:1-1:5	Bap. 2022	3:2-1:1	Bap. 2061	4:5-1:3	Bap. 2099	1:3-1:4	Bap. 2137

3:1-1:4	Вар. 2023	3:2-4:3	Вар. 2062	4:5-2:5	Вар. 2100	1:4-1:6	Вар. 2138
3:1-1:3	Вар. 2024	4:3-1:6	Вар. 2063	4:5-1:2	Вар. 2101	1:4-1:5	Вар. 2139
3:1-2:5	Вар. 2025	4:3-1:5	Вар. 2064	4:5-3:5	Вар. 2102	1:5-1:6	Вар. 2140
3:1-1:2	Вар. 2026						

Вар. = Вариант

[00333] В дополнительных вариантах осуществления мультимеры mat-rVWF более высокого порядка по данному изобретению стабильны в течение от около 1 до около 90 часов после введения. В других вариантах осуществления мультимеры mat-rVWF более высокого порядка стабильны в течение около 5-80, 10-70, 15-60, 20-50, 25-40, 30-35 часов после введения. В других вариантах осуществления мультимеры mat-rVWF более высокого порядка стабильны в течение по меньшей мере 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 часов после введения. В некоторых вариантах осуществления оценивается стабильность мультимеров mat-rVWF *in vitro*.

[00334] В одном варианте осуществления мультимеры mat-rVWF более высокого порядка, используемые в композициях и способах, предложенных в данном документе, имеют период полужизни, составляющий по меньшей мере 12 часов после введения. В другом варианте осуществления мультимеры mat-rVWF более высокого порядка имеют период полужизни, составляющий по меньшей мере 24 часа после введения. В других вариантах осуществления мультимеры mat-rVWF более высокого порядка имеют период полужизни, выбранный из вариантов с 642 по 1045, указанных в таблице 9.

Таблица 9. Примерные варианты осуществления периода полужизни мультимеров mat-rVWF более высокого порядка, обнаруженные в композициях, полученных способами, предложенных в данном документе.

Часы		Часы		Часы		Часы	
по меньшей мере 1	Вар. 642	4-22	Вар. 743	14-78	Вар. 844	24-30	Вар. 945
по меньшей мере 2	Вар. 643	4-20	Вар. 744	14-72	Вар. 845	24-27	Вар. 946
по меньшей мере 3	Вар. 644	4-18	Вар. 745	14-66	Вар. 846	27-90	Вар. 947
по меньшей мере 4	Вар. 645	4-16	Вар. 746	14-60	Вар. 847	27-84	Вар. 948
по меньшей мере 5	Вар. 646	4-14	Вар. 747	14-54	Вар. 848	27-78	Вар. 949
по меньшей мере 6	Вар. 647	4-12	Вар. 748	14-48	Вар. 849	27-72	Вар. 950
по меньшей мере 7	Вар. 648	4-10	Вар. 749	14-45	Вар. 850	27-66	Вар. 951
по меньшей мере 8	Вар. 649	4-8	Вар. 750	14-42	Вар. 851	27-60	Вар. 952
по меньшей мере 9	Вар. 650	4-6	Вар. 751	14-39	Вар. 852	27-54	Вар. 953

по меньшей мере 10	Вар. 651	6-90	Вар. 752	14-36	Вар. 853	27-48	Вар. 954
по меньшей мере 11	Вар. 652	6-84	Вар. 753	14-33	Вар. 854	30-90	Вар. 955
по меньшей мере 12	Вар. 653	6-78	Вар. 754	14-30	Вар. 855	30-84	Вар. 956
по меньшей мере 14	Вар. 654	6-72	Вар. 755	14-27	Вар. 856	30-78	Вар. 957
по меньшей мере 16	Вар. 655	6-66	Вар. 756	14-24	Вар. 857	30-72	Вар. 958
по меньшей мере 18	Вар. 656	6-60	Вар. 757	14-22	Вар. 858	30-66	Вар. 959
по меньшей мере 20	Вар. 657	6-54	Вар. 758	14-20	Вар. 859	30-60	Вар. 960
по меньшей мере 22	Вар. 658	6-48	Вар. 759	14-18	Вар. 860	30-54	Вар. 961
по меньшей мере 24	Вар. 659	6-45	Вар. 760	14-16	Вар. 861	30-48	Вар. 962
по меньшей мере 27	Вар. 660	6-42	Вар. 761	16-90	Вар. 862	30-45	Вар. 963
по меньшей мере 30	Вар. 661	6-39	Вар. 762	16-84	Вар. 863	30-42	Вар. 964
по меньшей мере 33	Вар. 662	6-36	Вар. 763	16-78	Вар. 864	30-39	Вар. 965
по меньшей мере 36	Вар. 663	6-33	Вар. 764	16-72	Вар. 865	30-36	Вар. 966
по меньшей мере 39	Вар. 664	6-30	Вар. 765	16-66	Вар. 866	30-33	Вар. 967
по меньшей мере 42	Вар. 665	6-27	Вар. 766	16-60	Вар. 867	33-90	Вар. 968
по меньшей мере 45	Вар. 666	6-24	Вар. 767	16-54	Вар. 868	33-84	Вар. 969
по меньшей мере 48	Вар. 667	6-22	Вар. 768	16-48	Вар. 869	33-78	Вар. 970
по меньшей мере 54	Вар. 668	6-20	Вар. 769	16-45	Вар. 870	33-72	Вар. 971
по меньшей мере 60	Вар. 669	6-18	Вар. 770	16-42	Вар. 871	33-66	Вар. 972
по меньшей мере 66	Вар. 670	6-16	Вар. 771	16-39	Вар. 872	33-60	Вар. 973
по меньшей мере 72	Вар. 671	6-14	Вар. 772	16-36	Вар. 873	33-54	Вар. 974
по меньшей мере 78	Вар. 672	6-12	Вар. 773	16-33	Вар. 874	33-48	Вар. 975
по меньшей мере 84	Вар. 673	6-10	Вар. 774	16-30	Вар. 875	33-45	Вар. 976
по меньшей мере 90	Вар. 674	6-8	Вар. 775	16-27	Вар. 876	33-42	Вар. 977
2-90	Вар. 675	8-90	Вар. 776	16-24	Вар. 877	33-29	Вар. 978
2-84	Вар. 676	8-84	Вар. 777	16-22	Вар. 878	33-36	Вар. 979
2-78	Вар. 677	8-78	Вар. 778	16-20	Вар. 879	36-90	Вар. 980
2-72	Вар. 678	8-72	Вар. 779	16-18	Вар. 880	36-84	Вар. 981
2-66	Вар. 679	8-66	Вар. 780	18-90	Вар. 881	36-78	Вар. 982
2-60	Вар. 680	8-60	Вар. 781	18-84	Вар. 882	36-72	Вар. 983
2-54	Вар. 681	8-54	Вар. 782	18-78	Вар. 883	36-66	Вар. 984
2-48	Вар. 682	8-48	Вар. 783	18-72	Вар. 884	36-60	Вар. 985
2-45	Вар. 683	8-45	Вар. 784	18-66	Вар. 885	36-54	Вар. 986
2-42	Вар. 684	8-42	Вар. 785	18-60	Вар. 886	36-48	Вар. 987

2-39	Bap. 685	8-39	Bap. 786	18-54	Bap. 887	36-45	Bap. 988
2-36	Bap. 686	8-36	Bap. 787	18-48	Bap. 888	36-42	Bap. 989
2-33	Bap. 687	8-33	Bap. 788	18-45	Bap. 889	36-39	Bap. 990
2-30	Bap. 688	8-30	Bap. 789	18-42	Bap. 890	39-90	Bap. 991
2-27	Bap. 689	8-27	Bap. 790	18-39	Bap. 891	39-84	Bap. 992
2-24	Bap. 690	8-24	Bap. 791	18-36	Bap. 892	39-78	Bap. 993
2-22	Bap. 691	8-22	Bap. 792	18-33	Bap. 893	39-72	Bap. 994
2-20	Bap. 692	8-20	Bap. 793	18-30	Bap. 894	39-66	Bap. 995
2-18	Bap. 693	8-18	Bap. 794	18-27	Bap. 895	39-60	Bap. 996
2-16	Bap. 694	8-16	Bap. 795	18-24	Bap. 896	39-54	Bap. 997
2-14	Bap. 695	8-14	Bap. 796	18-22	Bap. 897	39-48	Bap. 998
2-12	Bap. 696	8-12	Bap. 797	18-20	Bap. 898	39-45	Bap. 999
2-10	Bap. 697	8-10	Bap. 798	20-90	Bap. 899	39-42	Bap. 1000
2-8	Bap. 698	10-90	Bap. 799	20-84	Bap. 900	42-90	Bap. 1001
2-6	Bap. 699	10-84	Bap. 800	20-78	Bap. 901	42-84	Bap. 1002
2-4	Bap. 700	10-78	Bap. 801	20-72	Bap. 902	42-78	Bap. 1003
3-90	Bap. 701	10-72	Bap. 802	20-66	Bap. 903	42-72	Bap. 1004
3-84	Bap. 702	10-66	Bap. 803	20-60	Bap. 904	42-66	Bap. 1005
3-78	Bap. 703	10-60	Bap. 804	20-54	Bap. 905	42-60	Bap. 1006
3-72	Bap. 704	10-54	Bap. 805	20-48	Bap. 906	42-54	Bap. 1007
3-66	Bap. 705	10-48	Bap. 806	20-45	Bap. 907	42-48	Bap. 1008
3-60	Bap. 706	10-45	Bap. 807	20-42	Bap. 908	42-45	Bap. 1009
3-54	Bap. 707	10-42	Bap. 808	20-39	Bap. 909	45-90	Bap. 1010
3-48	Bap. 708	10-39	Bap. 809	20-36	Bap. 910	45-84	Bap. 1011
3-45	Bap. 709	10-36	Bap. 810	20-33	Bap. 911	45-78	Bap. 1012
3-42	Bap. 710	10-33	Bap. 811	20-30	Bap. 912	45-72	Bap. 1013
3-39	Bap. 711	10-30	Bap. 812	20-27	Bap. 913	45-66	Bap. 1014
3-36	Bap. 712	10-27	Bap. 813	20-24	Bap. 914	45-60	Bap. 1015
3-33	Bap. 713	10-24	Bap. 814	20-22	Bap. 915	45-54	Bap. 1016
3-30	Bap. 714	10-22	Bap. 815	22-90	Bap. 916	45-48	Bap. 1017
3-27	Bap. 715	10-20	Bap. 816	22-84	Bap. 917	48-90	Bap. 1018
3-24	Bap. 716	10-18	Bap. 817	22-78	Bap. 918	48-84	Bap. 1019
3-22	Bap. 717	10-16	Bap. 818	22-72	Bap. 919	48-78	Bap. 1020
3-20	Bap. 718	10-14	Bap. 819	22-66	Bap. 920	48-72	Bap. 1021

3-18	Вар. 719	10-12	Вар. 820	22-60	Вар. 921	48-66	Вар. 1022
3-16	Вар. 720	12-90	Вар. 821	22-54	Вар. 922	48-60	Вар. 1023
3-14	Вар. 721	12-84	Вар. 822	22-48	Вар. 923	48-54	Вар. 1024
3-12	Вар. 722	12-78	Вар. 823	22-45	Вар. 924	54-90	Вар. 1025
3-10	Вар. 723	12-72	Вар. 824	22-42	Вар. 925	54-84	Вар. 1026
3-8	Вар. 724	12-66	Вар. 825	22-39	Вар. 926	54-78	Вар. 1027
3-6	Вар. 725	12-60	Вар. 826	22-36	Вар. 927	54-72	Вар. 1028
3-4	Вар. 726	12-54	Вар. 827	22-33	Вар. 928	54-66	Вар. 1029
4-90	Вар. 727	12-48	Вар. 828	22-30	Вар. 929	54-60	Вар. 1030
4-84	Вар. 728	12-45	Вар. 829	22-27	Вар. 930	60-90	Вар. 1031
4-78	Вар. 729	12-42	Вар. 830	22-24	Вар. 931	60-84	Вар. 1032
4-72	Вар. 730	12-39	Вар. 831	24-90	Вар. 932	60-78	Вар. 1033
4-66	Вар. 731	12-36	Вар. 832	24-84	Вар. 933	60-72	Вар. 1034
4-60	Вар. 732	12-33	Вар. 833	24-78	Вар. 934	60-66	Вар. 1035
4-54	Вар. 733	12-30	Вар. 834	24-72	Вар. 935	66-90	Вар. 1036
4-48	Вар. 734	12-27	Вар. 835	24-66	Вар. 936	66-84	Вар. 1037
4-45	Вар. 735	12-24	Вар. 836	24-60	Вар. 937	66-78	Вар. 1038
4-42	Вар. 736	12-22	Вар. 837	24-54	Вар. 938	66-72	Вар. 1039
4-39	Вар. 737	12-20	Вар. 838	24-48	Вар. 939	72-90	Вар. 1040
4-36	Вар. 738	12-18	Вар. 839	24-45	Вар. 940	72-84	Вар. 1041
4-33	Вар. 739	12-16	Вар. 840	24-42	Вар. 941	72-78	Вар. 1042
4-30	Вар. 740	12-14	Вар. 841	24-39	Вар. 942	78-90	Вар. 1043
4-27	Вар. 741	14-90	Вар. 842	24-36	Вар. 943	78-84	Вар. 1044
4-24	Вар. 742	14-84	Вар. 843	24-33	Вар. 944	84-90	Вар. 1045

Вар. = Вариант

[00335] В некоторых вариантах осуществления pro-VWF и/или очищенный mat-gVWF, очищенный в соответствии с данным изобретением, не модифицирован никакими модификациями конъюгации, посттрансляцией или ковалентными модификациями. В конкретных вариантах осуществления pro-VWF и/или очищенный mat-gVWF по данному изобретению не модифицирован водорастворимым полимером, включая, без ограничения, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полипропиленгликоль, полиоксиалкилен, полисиаловую кислоту, гидроксилэтилкрахмал, полиуглеводный фрагмент и тому подобное.

[00336] В некоторых вариантах осуществления pro-VWF и/или очищенный mat-gVWF, очищенный в соответствии с данным изобретением, модифицирован посредством конъюгации, посттрансляционной модификации или ковалентной модификации, включая модификации N- или C-концевых остатков, а также модификации выбранных боковых

цепей, например, у свободных сульфгидрильных групп, первичных аминов и гидроксильных групп. В одном варианте осуществления водорастворимый полимер связан с белком (напрямую или через линкер) группой лизина или другим первичным амином. В некоторых вариантах осуществления pro-VWF и/или очищенный mat-rVWF по данному изобретению может быть модифицирован путем конъюгации с водорастворимым полимером, включая, без ограничения, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полипропиленгликоль, полиоксиалкилен, полисиаловую кислоту, гидроксилэтилкрахмал, полиуглеводный фрагмент и тому подобное.

[00337] Водорастворимые полимеры, которые можно использовать для модификации pro-VWF и/или очищенного mat-rVWF, включают линейные и разветвленные структуры. Конъюгированные полимеры могут быть присоединены непосредственно к белкам коагуляции по изобретению или, альтернативно, могут быть присоединены через связывающий фрагмент. Неограничивающие примеры конъюгации белков с водорастворимыми полимерами можно найти в патентах США № 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 и 4179337, а также в Abuchowski and Davis "Enzymes as Drugs," Holcenberg and Roberts, Eds., pp. 367 383, John Wiley and Sons, New York (1981), и Hermanson G., *Bioconjugate Techniques* 2nd Ed., Academic Press, Inc. 2008.

[00338] Конъюгация белков может быть выполнена с помощью ряда хорошо известных в данной области техники методов, например, см. Hermanson G., *Bioconjugate Techniques* 2nd Ed., Academic Press, Inc. 2008. Примеры включают связь через пептидную связь между карбоксильной группой на одном из белков коагуляции или водорастворимого полимерного фрагмента и аминок группой другого, или сложноэфирную связь между карбоксильной группой одного и гидроксильной группой другого. Другая связь, с помощью которой белок коагуляции по данному изобретению может быть конъюгирован с водорастворимым полимерным соединением, осуществляется через основание Шиффа между свободной аминок группой на полимерной части, которая реагирует с альдегидной группой, образованной на невозстанавливаемом конце полимера при помощи окисления периодатом (Jennings and Lugowski, *J. Immunol.* 1981; 127:1011-8; Fernandes and Gregoradis, *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1341; 26-34). Образовавшееся основание Шиффа можно стабилизировать специфическим восстановлением с помощью NaCNBH_3 с образованием вторичного амина. Альтернативным подходом является получение концевых свободных аминок групп на полимере путем восстановительного аминирования с NH_4Cl после предварительного окисления. Бифункциональные реагенты можно использовать для связывания двух амино или двух гидроксильных групп. Например, полимер, содержащий аминок группу, может быть связан с аминок группой белка коагуляции с помощью таких реагентов, как BS3 (бис(сульфосукцинимидил)суберат/Pierce, г. Рокфорд, штат Иллинойс, США). Кроме того, гетеробифункциональные сшивающие реагенты, такие как сульфо-EMCS (N-ε-малеимидокапроилокси) сложный эфир сульфосукцинимиды/Pierce), могут быть использованы, например, для связывания аминовых и тиоловых групп. В других

вариантах осуществления группа, реагирующая с альдегидом, такая как алкоксид ПЭГ плюс диэтилацеталь бромацетальдегида; ПЭГ плюс ДМСО и искусный ангидрид, а также ПЭГ хлорид плюс феноксид 4-гидроксibenзальдегида, сукцинимидиловые активные сложные эфиры, активированный дитиокарбонатный ПЭГ, 2,4,5-трихлорфенилхлорформиат и *p*-нитрофенилхлорформиат, активированный ПЭГ, могут быть использованы в конъюгации коагуляционного белка.

[00339] Другой метод измерения биологической активности VWF - это анализ связывания коллагена, основанный на технологии ИФА (Brown and Bosak, *Thromb. Res.*, 1986, 43:303-311; Favalaro, *Thromb. Haemost.*, 2000, 83 127-135). Планшет для микротитрования покрыт коллагеном I или III типа. Затем VWF связывается с поверхностью коллагена и впоследствии выявляется поликлональным антителом, меченным ферментом. Последняя стадия - это реакция субстрата, которую можно фотометрически контролировать с помощью считывающего устройства ИФА.

[00340] Иммунологические анализы факторов фон Виллебранда (VWF: Ag) - это иммуноанализы, которые измеряют концентрацию белка VWF в плазме. Они не указывают на функцию VWF. Существует ряд методов измерения VWF: Ag, включая как иммуноферментный анализ (ИФА), так и автоматизированный иммуноферментный анализ (ЛИА). Многие лаборатории в настоящее время используют полностью автоматический иммуноферментный анализ. Исторически лаборатории использовали различные методы, включая электроиммуноанализ Laurell «Laurell Rockets», но сегодня они редко используются в большинстве лабораторий.

СОСТАВЫ/ВВЕДЕНИЕ VWF

[00341] Способ по данному изобретению также предусматривает приготовление композиций из VWF, полученных способами очистки, представленными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композицию высокоочищенного mat-rVWF используют для производства фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления mat-rVWF может быть включен в лиофилизированный состав.

[00342] В некоторых вариантах осуществления составы, содержащие полипептид VWF по изобретению, лиофилизируют после очистки и перед введением субъекту. Лиофилизация проводится с использованием общепринятых в данной области методов и должна быть оптимизирована для разрабатываемой композиции (Tang et al., *Pharm Res.* 21:191-200, (2004) и Chang et al., *Pharm Res.* 13:243-9 (1996)).

[00343] Цикл лиофилизации, в одном аспекте, состоит из трех стадий: замораживания, первичной сушки и вторичной сушки (A. P. Mackenzie, *Phil Trans R Soc London, Ser B, Biol* 278:167 (1977)). На стадии замораживания раствор охлаждают, чтобы вызвать образование льда. Кроме того, эта стадия вызывает кристаллизацию объемообразующего агента. Лед сублимируется на стадии первичной сушки, которая проводится путем снижения давления в камере ниже давления пара льда, с использованием вакуума и подвода тепла для ускорения сублимации. Наконец, адсорбированная или связанная вода удаляется на стадии вторичной сушки при

пониженном давлении в камере и при повышенной температуре полки. В результате получается материал, известный как лиофилизированный пирог. После этого пирог можно восстановить стерильной водой или подходящим разбавителем для инъекций.

[00344] Цикл лиофилизации не только определяет конечное физическое состояние наполнителей, но также влияет на другие параметры, такие как время восстановления, внешний вид, стабильность и конечное содержание влаги. Структура композиции в замороженном состоянии проходит через несколько переходов (например, стеклование, смачивание и кристаллизация), которые происходят при определенных температурах, и эту структуру можно использовать для понимания и оптимизации процесса лиофилизации. Температура стеклования (T_g и/или T_g') может предоставить информацию о физическом состоянии растворенного вещества и может быть определена с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). T_g и T_g' являются важным параметром, который необходимо учитывать при разработке цикла лиофилизации. Например, T_g' важна для первичной сушки. Кроме того, в высушенном состоянии температура стеклования дает информацию о температуре хранения конечного продукта.

Фармацевтические составы и эксципиенты в целом

[00345] Эксципиенты - это добавки, которые либо придают, либо улучшают стабильность и доставку лекарственного продукта (например, белка). Независимо от причины их включения, эксципиенты являются неотъемлемым компонентом препарата и поэтому должны быть безопасными и хорошо переноситься пациентами. Для белковых препаратов выбор эксципиентов особенно важен, поскольку они могут влиять как на эффективность, так и на иммуногенность препарата. Следовательно, белковые составы необходимо разрабатывать с соответствующим выбором эксципиентов, которые обеспечивают подходящую стабильность, безопасность и конкурентоспособность.

[00346] Лيوфилизированный состав, в одном аспекте, по меньшей мере, состоит из одного или более из буфера, объемообразующего агента и стабилизатора. В этом аспекте полезность поверхностно-активного вещества оценивается и выбирается в случаях, когда агрегация во время стадии лиофилизации или во время восстановления становится проблемой. Соответствующий буферный агент включен для поддержания состава в стабильных пределах pH во время лиофилизации. Сравнение компонентов эксципиента, предусмотренных для жидких и лиофилизированных белковых составах, представлено в таблице 10.

Таблица 10: Компоненты эксципиента лиофилизированных белковых композиций

Компонент-эксципиент	Функция в лиофилизированном составе
Буфер	Поддерживает pH состава во время лиофилизации и после восстановления
Регулятор тоничности/ стабилизатор	Стабилизаторы включают криопротекторы и лиопротекторы. Примеры включают полиолы, сахара и полимеры. Криопротекторы защищают белки от холодового стресса

	Лиопротекторы стабилизируют белки в лиофилизированном состоянии
Объемообразующий агент	Используется для повышения однородности продукта и предотвращения выброса Обеспечивает структурную прочность лио-осадке Примеры включают маннит и глицин.
Поверхностно-активное вещество	Используется, если агрегация в процессе лиофилизации является проблемой Может способствовать сокращению времени восстановления Примеры включают полисорбат 20 и 80
Антиоксидант	Обычно не используются, молекулярные реакции в лио-осадке значительно замедляются.
Ионы металлов/хелатирующий агент	Может быть включен, если конкретный ион металла включен только в качестве кофактора или если металл требуется для протеазной активности Хелатирующие агенты обычно не требуются в лио-составах
Консервант	Только для составов с несколькими дозами Обеспечивает защиту от роста микроорганизмов в составе Обычно включается в разбавитель для восстановления (например, bWFI)

[00347] Основной задачей при разработке составов белков является стабилизация продукта против стрессов, связанных с производством, транспортировкой и хранением. Роль эксципиента в составе заключается в обеспечении стабилизации против этих стрессов. Эксципиенты также используются для снижения вязкости белковых составов с высокой концентрацией, чтобы обеспечить их доставку и повысить удобство для пациента. В целом, эксципиенты можно классифицировать на основе механизмов, с помощью которых они стабилизируют белки против различных химических и физических стрессов. Некоторые эксципиенты используются для смягчения последствий определенного стресса или для регулирования определенной восприимчивости к определенному белку. Другие эксципиенты оказывают более общее влияние на физическую и ковалентную стабильность белков. Описанные в данном документе эксципиенты сгруппированы по химическому типу или функциональной роли в составах. Краткое описание режимов стабилизации приводится при обсуждении каждого типа эксципиента.

[00348] С учетом представленных в данном документе идей и руководящих указаний, специалисты в данной области техники будут знать, какое количество или диапазон эксципиента может быть включено в любой конкретный состав для получения

биофармацевтического состава по изобретению, который способствует сохранению стабильности биофармацевтического состава (например, белка). Например, количество и тип соли, которая должна быть включена в биофармацевтический состав по данному изобретению, выбирается на основе желаемой осмоляльности (например, изотонической, гипотонической или гипертонической) конечного раствора, а также количества и осмоляльности других компонентов для включения в состав.

[00349] Например, включение примерно 5% сорбита может обеспечить изотоничность, в то время как примерно 9% вспомогательного вещества сахарозы необходимо для достижения изотоничности. Выбор количества или диапазона концентраций одного или более эксципиентов, которые могут быть включены в биофармацевтический состав по данному изобретению, был проиллюстрирован выше со ссылкой на соли, полиолы и сахара. Однако специалисты в данной области техники поймут, что соображения, описанные в данном документе и дополнительно проиллюстрированные ссылкой на конкретные эксципиенты, в равной степени применимы ко всем типам и комбинациям эксципиентов, включая, например, соли, аминокислоты, другие агенты тоничности, поверхностно-активные вещества, стабилизаторы, объемобразующие агенты, крипротекторы, лиопротекторы, антиоксиданты, ионы металлов, хелатирующие агенты и/или консерванты.

[00350] Кроме того, если конкретный эксципиент указан в молярной концентрации, специалисты в данной области техники поймут, что также рассматривается эквивалентный процент раствора (%) мас./об. (например, (граммы вещества в образце раствора/мл раствора) X 100%).

[00351] Конечно, специалист в данной области техники поймет, что концентрации описанных в данном документе эксципиентов имеют взаимозависимость в пределах конкретного состава. Например, концентрация объемобразующего агента может быть снижена там, где, например, имеется высокая концентрация белка или когда, например, имеется высокая концентрация стабилизирующего агента. Кроме того, специалист в данной области техники поймет, что для поддержания изотоничности конкретного состава, в котором нет объемобразующего агента, концентрация стабилизирующего агента должна быть скорректирована соответствующим образом (например, будет использовано «тонирующее» количество стабилизатора). Общие эксципиенты известны в данной области техники и могут быть найдены в Powell et al., *Compendium of Excipients for Parenteral Formulations* (1998), *PDA J. Pharm. Sci. Technology*, 52:238-311.

Фармацевтические буферы и буферные агенты

[00352] Обычно наблюдается максимальная стабильность фармакологически активного белкового состава в узком диапазоне pH. Этот диапазон оптимальной стабильности должен быть определен на раннем этапе исследований перед приготовлением состава. Несколько подходов, таких как ускоренные исследования стабильности и калориметрические скрининговые исследования, полезны в этих задачах (Remmele R.L. Jr., et al., *Biochemistry*, 38(16): 5241-7 (1999)). После того, как состав готов,

белок должен производиться и сохраняться в течение всего срока его хранения. Следовательно, буферные агенты почти всегда используются для контроля pH в составе.

[00353] Буферная емкость буферных веществ максимальна при pH, равном pKa, и уменьшается по мере увеличения или уменьшения pH от этого значения. Девяносто процентов буферной емкости находится в пределах одной единицы pH от его pKa. Емкость буфера также увеличивается пропорционально увеличению концентрации буфера.

[00354] При выборе буфера необходимо учитывать несколько факторов. Прежде всего, необходимо определить вид буфера и его концентрацию на основе его pKa и желаемого pH препарата. Не менее важно убедиться, что буфер совместим с белком и другими эксципиентами композиции и не катализирует какие-либо реакции деградации. Третий важный аспект, который следует учитывать, - это ощущение покалывания и раздражения, которое буфер может вызвать при введении. Например, известно, что цитрат вызывает покалывание при инъекции (Laursen T, et al., *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 98(2): 218-21 (2006)). Потенциал покалывания и раздражения выше для лекарственных средств, которые вводятся подкожным (SC) или внутримышечным (IM) путями, когда раствор лекарственного средства остается на месте в течение относительно более длительного периода времени, чем при внутривенном введении, когда состав быстро растворяется в крови при введении. Для составов, которые вводятся путем прямой внутривенной инфузии, необходимо контролировать общее количество буфера (и любого другого компонента состава). Следует быть особенно осторожным с ионами калия, вводимыми в форме калий-фосфатного буфера, которые могут вызывать сердечно-сосудистые эффекты у пациента (Hollander-Rodriguez JC, et al., *Am. Fam. Physician.*, 73(2): 283-90 (2006)).

[00355] Буферы для лиофилизированных составов требуют дополнительного рассмотрения. Некоторые буферы, такие как фосфат натрия, могут кристаллизоваться из аморфной фазы белка во время замораживания, что приводит к сдвигу pH. Другие распространенные буферы, такие как ацетат и имидазол, могут сублимироваться или испаряться во время процесса лиофилизации, тем самым изменяя pH композиции во время лиофилизации или после восстановления.

[00356] Буферная система, присутствующая в композициях, выбирается так, чтобы быть физиологически совместимой и поддерживать желаемый pH фармацевтического состава. В одном варианте осуществления pH раствора находится между pH 2,0 и pH 12,0. Например, pH раствора может быть 2,0, 2,3, 2,5, 2,7, 3,0, 3,3, 3,5, 3,7, 4,0, 4,3, 4,5, 4,7, 5,0, 5,3, 5,5, 5,7, 6,0, 6,3, 6,5, 6,7, 7,0, 7,3, 7,5, 7,7, 8,0, 8,3, 8,5, 8,7, 9,0, 9,3, 9,5, 9,7, 10,0, 10,3, 10,5, 10,7, 11,0, 11,3, 11,5, 11,7 или 12,0.

[00357] Буферное соединение для контроля pH может присутствовать в любом количестве, подходящем для поддержания pH композиции на заданном уровне. В одном варианте осуществления концентрация соединения для контроля pH составляет от 0,1 mM до 500 mM (1 M). Например, предполагается, что концентрация соединения для контроля pH составляет по меньшей мере 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,

11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 или 500 мМ.

[00358] Примеры агентов для контроля рН, используемых для буферизации состава, изложенные в данном документе, включают, без ограничения, органические кислоты, глицин, гистидин, глутамат, сукцинат, фосфат, ацетат, цитрат, трис, NEPES и аминокислоты или смеси аминокислот, включая, без ограничения, аспарат, гистидин и глицин. В одном варианте осуществления данного изобретения буферный агент представляет собой цитрат.

[00359] В некоторых вариантах осуществления состав содержит 50 мМ глицина, 10 мМ таурина, 5% (мас./мас.) сахарозы, 5% (мас./мас.) D-маннита, 0,1% полисорбата 80, 2 мМ CaCl₂, 150 мМ NaCl и имеет рН 7,4. В некоторых вариантах осуществления состав содержит mat-rVWF высокой чистоты, 50 мМ глицина, 10 мМ таурина, 5% (мас./мас.) сахарозы, 5% (мас./мас.) D-маннита, 0,1% полисорбата 80, 2 мМ CaCl₂, 150 мМ NaCl и имеет рН 7,4. В некоторых вариантах осуществления состав содержит vWF и/или r-vWF/rFVIII и 50 мМ глицина, 10 мМ таурина, 5% (мас./мас.) сахарозы, 5% (мас./мас.) D-маннита, 0,1% полисорбата 80, 2 мМ CaCl₂, 150 мМ NaCl и рН 7,4.

Фармацевтические стабилизаторы и объемообразующие агенты

[00360] В одном аспекте данных фармацевтических составов стабилизатор (или комбинация стабилизаторов) добавляют для предотвращения или уменьшения агрегации и химического разложения, вызванных хранением. Мутный или непрозрачный раствор после восстановления указывает на то, что белок выпал в осадок или, по меньшей мере, агрегировал. Термин «стабилизатор» означает эксципиент, способный предотвращать агрегацию или физическое разложение, включая химическое разложение (например, автолиз, дезамидирование, окисление и т.д.) в водном состоянии. Предполагаемые стабилизаторы включают, без ограничения, сахарозу, трегалозу, маннозу, мальтозу, лактозу, глюкозу, раффинозу, целлобиозу, гентиобиозу, изомальтозу, арабинозу, глюкозамин, фруктозу, маннит, сорбит, глицин, аргинин HCL, поли-гидрокси соединения, включая полисахариды, такие как декстран, крахмал, гидроксиэтилкрахмал, циклодекстрины, N-метилпироллиден, целлюлозу и гиалуроновую кислоту, хлорид натрия (Carpenter et al., *Develop. Biol. Standard* 74:225, (1991)). В данные составы стабилизатор включен в концентрации около 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700, 900 или 1000 мМ. В одном из вариантов данного изобретения маннит и трегалоза используются в качестве стабилизирующих агентов.

[00361] Если желательно, составы также включают соответствующие количества агентов, регулирующих объем и осмоляльность. Объемообразующие агенты включают, например, без ограничения, маннит, глицин, сахарозу, полимеры, такие как декстран, поливинилпирролидон, карбоксиметилцеллюлозу, лактозу, сорбит, трегалозу или ксилит. В одном варианте осуществления объемообразующим агентом является маннит. Объемообразующий агент вводят в концентрации около 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100,

200, 500, 700, 900 или 1000 мМ.

Фармацевтические ПАВ

[00362] Белки имеют высокую склонность к взаимодействию с поверхностями, что делает их восприимчивыми к адсорбции и денатурации на границах раздела воздух-жидкость, пузырь-жидкость и жидкость-жидкость (кремнийорганическая смазка). Было обнаружено, что этот путь разложения обратно пропорционально зависит от концентрации белка и приводит либо к образованию растворимых и нерастворимых белковых агрегатов, либо к потере белка из раствора посредством адсорбции на поверхности. Помимо адсорбции на поверхности контейнера, деградация, вызванная поверхностью, усугубляется физическим взбалтыванием, как при транспортировке и обращении с продуктом.

[00363] Поверхностно-активные вещества обычно используются в белковых составах для предотвращения разложения, вызванного поверхностью. Поверхностно-активные вещества представляют собой амфипатические молекулы, способные вытеснять белки за межфазные позиции. Гидрофобные части молекул поверхностно-активного вещества занимают межфазные позиции (например, воздух/жидкость), в то время как гидрофильные части молекул остаются ориентированными в сторону объема растворителя. При достаточных концентрациях (обычно около критической мицеллярной концентрации детергента) поверхностный слой молекул поверхностно-активного вещества служит для предотвращения адсорбции молекул белка на границе раздела. Таким образом, деградация, вызванная поверхностью, сводится к минимуму. Рассматриваемые в данном документе поверхностно-активные вещества включают, без ограничения, сложные эфиры жирных кислот и полиэтоксилатов сорбитана, например, полисорбат 20 и полисорбат 80. Они различаются только длиной алифатической цепи, которая придает гидрофобный характер молекулам C-12 и C-18 соответственно. Соответственно, полисорбат-80 более поверхностно-активен и имеет более низкую критическую мицеллярную концентрацию, чем полисорбат-20.

[00364] Детергенты также могут влиять на термодинамическую конформационную стабильность белков. Здесь снова эффекты данного детергентного наполнителя будут специфичными для белка. Например, было показано, что полисорбаты снижают стабильность одних белков и повышают стабильность других. Дестабилизация белков детергентом может быть объяснена с точки зрения гидрофобных хвостов молекул детергента, которые могут участвовать в специфическом связывании с частично или полностью развернутыми состояниями белка. Эти типы взаимодействий могут вызвать сдвиг конформационного равновесия в сторону более расширенных состояний белка (например, увеличение экспозиции гидрофобных частей молекулы белка в дополнение к связывающему полисорбату). В качестве альтернативы, если в нативном состоянии белка обнаруживаются некоторые гидрофобные поверхности, связывание детергента с нативным состоянием может стабилизировать эту конформацию.

[00365] Другой аспект полисорбатов заключается в том, что они по своей природе

подвержены окислительному повреждению. Часто в качестве сырья они содержат достаточное количество пероксидов, чтобы вызвать окисление боковых цепей белковых остатков, особенно метионина. Возможность окислительного повреждения, возникающего при добавлении стабилизатора, подчеркивает, что в составах следует использовать самые низкие эффективные концентрации эксципиентов. Для поверхностно-активных веществ эффективная концентрация данного белка будет зависеть от механизма стабилизации.

[00366] Поверхностно-активные вещества также добавляются в соответствующих количествах для предотвращения явления агрегации на поверхности во время замораживания и сушки (Chang, B, J. Pharm. Sci. 85:1325, (1996)). Таким образом, типичные поверхностно-активные вещества включают, без ограничения, анионные, катионные, неионогенные, цвиттерийонные и амфотерные поверхностно-активные вещества, включая поверхностно-активные вещества, полученные из встречающихся в природе аминокислот. Анионные поверхностно-активные вещества включают, без ограничения, лаурилсульфат натрия, диоктилсульфосукцинат натрия и диоктилсульфонат натрия, хенодезоксихолевую кислоту, натриевую соль N-лауроилсаркозина, додецилсульфат лития, натриевую соль 1-октансульфоновой кислоты, гидрат холата натрия, дезоксихолат натрия и натриевую соль гликодезоксихолевой кислоты. Катионные поверхностно-активные вещества включают, без ограничения, хлорид бензалкония или хлорид бензетония, моногидрат хлорида цетилпиридиния и бромид гексадецилтриметиламмония. Цвиттерийонные поверхностно-активные вещества включают, без ограничения, CHAPS, CHAPSO, SB3-10 и SB3-12. Неионные поверхностно-активные вещества включают, без ограничения, дигитонин, Triton X-100, Triton X-114, TWEEN-20 и TWEEN-80. Поверхностно-активные вещества также включают, без ограничения, лауромакрогол 400, полиоксил 40 стеарат, полиоксиэтилен гидрированное касторовое масло 10, 40, 50 и 60, моностеарат глицерина, полисорбат 40, 60, 65 и 80, соевый лецитин и другие фосфолипиды, такие как диолеилфосфатидилхолин (DOPC), димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) и (диолеилфосфатидилглицерин) DOPG; сложный эфир сахарозы и жирной кислоты, метилцеллюлоза и карбоксиметилцеллюлоза. Поэтому дополнительно предлагаются композиции, содержащие эти поверхностно-активные вещества либо по отдельности, либо в виде смеси в различных соотношениях. В одном варианте данного изобретения поверхностно-активное вещество представляет собой TWEEN-80. В данных составах поверхностно-активное вещество вводят в концентрации от около 0,01 до около 0,5 г/л. В предложенных составах концентрация поверхностно-активного вещества составляет 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 г/л.

Фармацевтические соли

[00367] Соли часто добавляют для увеличения ионной силы препарата, что может иметь важное значение для растворимости белка, физической стабильности и изотоничности. Соли могут влиять на физическую стабильность белков по-разному. Ионы

могут стабилизировать естественное состояние белков, связываясь с заряженными остатками на поверхности белка. Альтернативно, соли могут стабилизировать денатурированное состояние путем связывания с пептидными группами вдоль основной цепи белка (-CONH-). Соли также могут стабилизировать нативную конформацию белка, экранируя отталкивающие электростатические взаимодействия между остатками в молекуле белка. Соли в белковых составах также могут защищать привлекательные электростатические взаимодействия между белковыми молекулами, которые могут привести к агрегации белков и нерастворимости. В предложенных составах концентрация соли находится между 0,1, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 120, 150, 200, 300 и 500 мМ.

Другие распространенные компоненты эксципиентов: фармацевтические аминокислоты

[00368] Аминокислоты нашли универсальное применение в белковых составах в качестве буферов, объемобразующих агентов, стабилизаторов и антиоксидантов. Таким образом, в одном аспекте гистидин и глутаминовая кислота используются для буферизации белковых композиций в диапазоне рН 5,5-6,5 и 4,0-5,5 соответственно. Имидазольная группа гистидина имеет $pK_a=6,0$, а карбоксильная группа боковой цепи глутаминовой кислоты имеет pK_a 4,3, что делает эти аминокислоты подходящими для буферизации в их соответствующих диапазонах рН. В таких случаях особенно полезна глутаминовая кислота. Гистидин обычно содержится в продаваемых на рынке белковых препаратах, и эта аминокислота представляет собой альтернативу цитрату, буферу, который, как известно, вызывает жжение при инъекции. Интересно, что гистидин также обладает стабилизирующим эффектом в отношении агрегации при использовании в высоких концентрациях как в жидких, так и в лиофилизированных составах (Chen B, et al., *Pharm Res.*, 20(12): 1952-60 (2003)). Другие наблюдали, что гистидин снижает вязкость препарата с высокой концентрацией белка. Однако в том же исследовании авторы наблюдали повышенную агрегацию и обесцвечивание составов, содержащих гистидин, во время исследований антител в условиях замораживания-оттаивания в контейнерах из нержавеющей стали. Еще одно предостережение при применении гистидина заключается в том, что он подвергается фотоокислению в присутствии ионов металлов (Tomita M, et al., *Biochemistry*, 8(12): 5149-60 (1969)). Использование метионина в качестве антиоксиданта в составах представляется многообещающим; было замечено, что он эффективен против ряда окислительных стрессов (Lam XM, et al., *J Pharm Sci*, 86(11): 1250-5 (1997)).

[00369] В различных аспектах предложены составы, которые содержат одну или более аминокислот, глицин, пролин, серин, аргинин и аланин, которые, как было показано, стабилизируют белки посредством механизма предпочтительного исключения. Глицин также является обычно используемым объемобразующим агентом в лиофилизированных составах. Было показано, что аргинин является эффективным средством подавления агрегации и используется как в жидких, так и в лиофилизированных составах.

[00370] В предложенных составах концентрация аминокислот составляет 0,1, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 120, 150, 200, 300 и 500 мМ. В одном варианте осуществления данного изобретения аминокислота представляет собой глицин.

Другие распространенные компоненты эксципиентов: фармацевтические антиоксиданты

[00371] Окисление белковых остатков происходит из различных источников. Помимо добавления специфических антиоксидантов, предотвращение окислительного повреждения белков включает тщательный контроль ряда факторов в процессе производства и хранения продукта, таких как атмосферный кислород, температура, воздействие света и химическое загрязнение. Следовательно, изобретение предполагает использование фармацевтических антиоксидантов, включая, без ограничения, восстанавливающие агенты, поглотители кислорода/свободных радикалов или хелатирующие агенты. Антиоксиданты в терапевтических белковых композициях в одном аспекте являются водорастворимыми и остаются активными в течение всего срока годности продукта. Восстановители и поглотители кислорода/свободных радикалов работают, удаляя активные формы кислорода в растворе. Хелатирующие агенты, такие как ЭДТА, эффективны, связывая следы металлических примесей, которые способствуют образованию свободных радикалов. Например, ЭДТА использовали в жидком составе кислого фактора роста фибробластов для ингибирования окисления остатков цистеина, катализируемого ионами металлов.

[00372] Помимо эффективности различных эксципиентов для предотвращения окисления белка, вызывает способность самих антиоксидантов вызывать другие ковалентные или физические изменения белка. Например, восстановители могут вызвать нарушение внутримолекулярных дисульфидных связей, что может привести к перетасовке дисульфидов. Было показано, что в присутствии ионов переходных металлов аскорбиновая кислота и ЭДТА способствуют окислению метионина в ряде белков и пептидов (Akers MJ, and Defelippis MR. Peptides and Proteins as Parenteral Solutions. In: Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins. Sven Frokjaer, Lars Novgaard, editors. Pharmaceutical Science. Taylor and Francis, UK (1999)); Fransson J.R., /. Pharm. Sci. 86(9): 4046-1050 (1997); Yin J, et al., Pharm Res., 21(12): 2377-83 (2004)). Сообщалось, что тиосульфат натрия снижает уровни окисления метионина, вызванного светом и температурой, в rhuMab HER2; однако в этом исследовании также сообщалось об образовании аддукта тиосульфат-белок (Lam XM, Yang JY, et al., J Pharm Sci. 86(11): 1250-5 (1997)). Выбор подходящего антиоксиданта производится в зависимости от специфических нагрузок и чувствительности белка. Антиоксиданты, рассматриваемые в определенных аспектах, включают, без ограничения, восстанавливающие агенты и поглотители кислорода/свободных радикалов, ЭДТА и тиосульфат натрия.

Другие распространенные компоненты эксципиентов: фармацевтические ионы металлов

[00373] Как правило, ионы переходных металлов нежелательны в составах белков,

поскольку они могут катализировать физические и химические реакции разложения белков. Однако конкретные ионы металлов включаются в составы, когда они являются кофакторами белков, и в составы суспензий белков, где они образуют координационные комплексы (например, цинковая суспензия инсулина). Недавно было предложено использование ионов магния (10-120 мМ) для ингибирования изомеризации аспарагиновой кислоты в изоаспарагиновую кислоту (WO 2004039337).

[00374] Двумя примерами, в которых ионы металлов придают стабильность или повышенную активность белков, являются дезоксирибонуклеаза человека (рчДНаза, Pulmozyme®) и фактор VIII. В случае рчДНазы ионы Ca^{+2} (до 100 мМ) повышают стабильность фермента через специфический сайт связывания. (Chen B, et al., / Pharm Sci., 88(4): 477-82 (1999)). Фактически, удаление ионов кальция из раствора с помощью ЭГТА вызывает усиление дезамидирования и агрегации. Однако этот эффект наблюдался только при ионах Ca^{+2} ; было показано, что другие двухвалентные катионы Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} вызывают дестабилизацию рчДНазы. Подобные эффекты наблюдались с Фактором VIII. Ионы Ca^{+2} и Sr^{+2} стабилизируют белок, в то время как другие, такие как Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} , Cu^{+2} , и Fe^{+2} , дестабилизируют фермент (Fatouros, A., et al., Int. J. Pharm., 155, 121-131 (1997)). В отдельном исследовании фактора VIII наблюдалось значительное увеличение скорости агрегации в присутствии ионов Al^{+3} (Derrick TS, et al., / Pharm. Sci., 93(10): 2549-57 (2004)). Авторы отмечают, что другие эксципиенты, такие как буферные соли, часто загрязнены ионами Al^{+3} , и иллюстрируют необходимость использования вспомогательных веществ соответствующего качества в готовых продуктах.

Другие распространенные компоненты эксципиентов: фармацевтические консерванты

[00375] Консерванты необходимы при разработке многоразовых парентеральных препаратов, которые включают более одной экстракции из одного контейнера. Их основная функция заключается в подавлении роста микробов и обеспечении стерильности продукта на протяжении всего срока годности или срока использования лекарственного препарата. Обычно используемые консерванты включают, без ограничения, бензиловый спирт, фенол и м-крезол. Хотя консерванты используются давно, разработка белковых составов, включающих консерванты, может оказаться сложной задачей. Консерванты почти всегда оказывают дестабилизирующее действие (агрегацию) на белки, и это стало основным фактором, ограничивающим их использование в многодозовых белковых составах (Roy S, et al., J Pharm ScL, 94(2): 382-96 (2005)).

[00376] На сегодняшний день большинство белковых препаратов разработано только для одноразового использования. Однако, когда возможны составы с несколькими дозами, у них есть дополнительное преимущество, заключающееся в удобстве для пациента и повышении конкурентоспособности. Хорошим примером является человеческий гормон роста (hGH), в котором разработка консервированных составов привела к коммерциализации более удобных, многоцелевых инъекционных ручек. В настоящее время на рынке доступны по меньшей мере четыре таких устройства-ручки,

содержащие консервированные составы hGH. Norditropin® (жидкость, Novo Nordisk), Nutropin AQ® (жидкость, Genentech) & Genotropin (лиофилизированный двухкамерный картридж, Pharmacia & Upjohn) содержат фенол, в то время как Somatrop® (Eli Lilly) содержит м-крезол.

[00377] При разработке составов консервированных лекарственных форм необходимо учитывать несколько аспектов. Эффективная концентрация консерванта в лекарственном препарате должна быть оптимизирована. Это требует тестирования данного консерванта в лекарственной форме с диапазонами концентраций, которые обеспечивают антимикробную эффективность без нарушения стабильности белка. Например, три консерванта были успешно проверены при разработке жидкого состава для рецептора интерлейкина-1 (тип I) с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). Консерванты были упорядочены в зависимости от их влияния на стабильность при концентрациях, обычно используемых в рыночных продуктах (Remmele RL Jr., et al., *Pharm Res.*, 15(2): 200-8 (1998)).

[00378] Разработка жидких составов, содержащих консерванты, является более сложной задачей, чем лиофилизированные составы. Лيوфилизированные продукты могут быть лиофилизированы без консерванта и восстановлены консервантом, содержащим разбавитель, во время использования. Это сокращает время, в течение которого консервант находится в контакте с белком, значительно минимизируя связанные с этим риски стабильности. В случае жидких составов эффективность и стабильность консерванта должны поддерживаться в течение всего срока годности продукта (от 18 до 24 месяцев). Важно отметить, что эффективность консерванта должна быть продемонстрирована в окончательном составе, содержащем активное лекарственное средство и все компоненты-эксципиенты.

[00379] Некоторые консерванты могут вызывать реакции в месте инъекции, что является еще одним фактором, который необходимо учитывать при выборе консерванта. В клинических испытаниях, которые были сосредоточены на оценке консервантов и буферов в Нордитропине, восприятие боли было меньше в составах, содержащих фенол и бензиловый спирт, по сравнению с составом, содержащим м-крезол (Kappelgaard A.M., *Norm Res.* 62 Suppl 3:98-103 (2004)). Интересно, что среди широко используемых консервантов бензиловый спирт обладает анестезирующими свойствами (Minogue SC, and Sun DA., *AnesthAnalg.*, 100(3): 683-6 (2005)). В различных аспектах использование консервантов дает преимущество, которое перевешивает любые побочные эффекты.

Способы приготовления фармацевтических составов

[00380] В данном изобретении также предложены способы приготовления фармацевтических составов.

[00381] Данные способы дополнительно включают одну или более из следующих стадий: добавление стабилизирующего агента, как описано в данном документе, к указанной смеси перед лиофилизацией, добавление по меньшей мере одного агента, выбранного из объемобразующего агента, агента, регулирующего осмоляльность, и

поверхностно-активного вещества, каждый из которых, как описано в данном документе, к указанной смеси перед лиофилизацией.

[00382] Стандартная практика восстановления лиофилизованного материала заключается в добавлении объема чистой воды или стерильной воды для инъекций (WFI) (обычно эквивалентного объему, удаляемому во время лиофилизации), хотя разбавленные растворы антибактериальных агентов иногда используются в производстве фармацевтических препаратов для парентерального введения (Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, 18:1311-1354 (1992)). Соответственно, предложены способы приготовления восстановленных композиций rVWF, включающие стадию добавления разбавителя к лиофилизованной композиции rVWF по изобретению.

[00383] Лиофилизированный материал может быть восстановлен в виде водного раствора. Разнообразные водные носители, например стерильная вода для инъекций, вода с консервантами для многократного использования или вода с соответствующими количествами поверхностно-активных веществ (например, водная суспензия, которая содержит активное соединение в смеси с эксципиентами, подходящими для производства водных суспензий). В различных аспектах такие эксципиенты представляют собой суспендирующие агенты, например, но без ограничения, карбоксиметилцеллюлозу натрия, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовую камедь и камедь акации; диспергирующие или смачивающие агенты представляют собой встречающийся в природе фосфатид, например, без ограничения, лецитин, или продукты конденсации оксида алкилена с жирными кислотами, например, без ограничения, полиоксиэтилен стеарат или продукты конденсации оксида этилена с длинноцепочечными алифатическими спиртами, например, без ограничения, гептадекаэтиленоксицетанол или продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и гекситола, такие как моноолеат полиоксиэтиленсорбита, или продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и ангидридов гекситола, например, и без ограничения, моноолеат полиэтиленсорбитана. В различных аспектах водные суспензии также содержат один или более консервантов, например, без ограничения, этил или н-пропил, п-гидроксибензоат.

Иллюстративный состав mat-rVWF для введения

[00384] В некоторых вариантах осуществления данные способы обеспечивают улучшенный состав, который позволяет получить конечный продукт с высокой эффективностью (высокая концентрация mat-rVWF и повышенная долгосрочная стабильность), чтобы уменьшить объем для лечения (от 100 МЕд/мл до 10000 МЕд/мл). В некоторых вариантах осуществления концентрация mat-rVWF в составе для введения составляет от около 100 МЕд/мл до 10000 МЕд/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация mat-rVWF в составе для введения составляет от около 500 МЕд/мл до 10000 МЕд/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация mat-rVWF в составе для введения составляет от около 1000 МЕд/мл до 10000 МЕд/мл. В некоторых вариантах

осуществления концентрация mat-rVWF в составе для введения составляет от около 2000 МЕд/мл до 10000 МЕд/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация mat-rVWF в составе для введения составляет от около 3000 МЕд/мл до 10000 МЕд/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация mat-rVWF в составе для введения составляет от около 4000 МЕд/мл до 10000 МЕд/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация mat-rVWF в составе для введения составляет от около 5000 МЕд/мл до 10000 МЕд/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация mat-rVWF в составе для введения составляет от около 6000 МЕд/мл до 10000 МЕд/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация mat-rVWF в составе для введения составляет от около 7000 МЕд/мл до 10000 МЕд/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация mat-rVWF в составе для введения составляет от около 8000 МЕд/мл до 10000 МЕд/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация mat-rVWF в составе для введения составляет от около 9000 МЕд/мл до 10000 МЕд/мл. В некоторых вариантах осуществления mat-rVWF составлен совместно с рекомбинантным фактором свертывания крови VIII (rFVIII). В некоторых вариантах осуществления rFVIII представляет собой полноразмерный FVIII. В некоторых вариантах осуществления rFVIII является полноразмерным и химически модифицированным. В некоторых вариантах осуществления rFVIII включает слитый белок FVIII, содержащий пептид активации FIX вместо В-домена. В некоторых вариантах осуществления rFVIII представляет собой гибрид FVIII, содержащий В-домен с усеченным гликозилированием. В некоторых вариантах осуществления FVIII представляет собой вариант с удаленным В-доменом FVIII. В некоторых вариантах осуществления FVIII представляет собой химически модифицированный вариант варианта с удаленным В-доменом FVIII. В некоторых вариантах осуществления совместный состав mat-rVWF с rFVIII готовят до стадии сублимационной сушки или завершения заполнения и хранят путем смешивания компонентов *in vitro* или в процедуре «на колонке» (например, добавляя FVIII во время метода очистки).

[00385] В некоторых вариантах осуществления состав для введения содержит одно или более цвиттерионных соединений, включая, например, такие аминокислоты, как гистидин, глицин, аргинин. В некоторых вариантах осуществления состав для введения включает компонент с амфипатическими характеристиками, имеющий по меньшей мере одну гидрофобную и одну гидрофильную группу, включая, например, полисорбат 80, октилпиранозид, дипептиды и/или амфипатические пептиды. В некоторых вариантах осуществления состав для введения содержит невосстанавливающий сахар или сахарный спирт или дисахариды, включая, например, сорбит, маннит, сахарозу или трегалозу. В некоторых вариантах осуществления состав для введения включает нетоксичную водорастворимую соль, включая, например, хлорид натрия, что приводит к физиологической осмоляльности. В некоторых вариантах осуществления состав для введения имеет рН в диапазоне от 6,0 до 8,0. В некоторых вариантах осуществления состав для введения имеет рН около 6,0, около 6,5, около 7, около 7,5 или около 8,0. В

некоторых вариантах осуществления состав для введения содержит один или более двухвалентных катионов, которые стабилизируют гVWF, включая, например, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} и/или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления состав для введения содержит от около 1 мМ до около 50 мМ глицина, от около 1 мМ до около 50 мМ гистидина, от около нуля до около 300 мМ хлорида натрия (например, менее 300 мМ натрия), от около 0,01% до около 0,05% полисорбата 20 (или полисорбата 80) и от около 0,5% до около 20% (мас./мас.) сахарозы с рН около 7,0 и физиологической осмолярностью в момент введения.

[00386] В некоторых вариантах осуществления состав для введения может быть высушен замораживанием. В некоторых вариантах осуществления состав для введения является стабильным и может храниться в жидком состоянии при температуре от около 2°C до около 8 °C, а также от около 18°C до около 25 °C. В некоторых вариантах осуществления состав для введения стабилен и может храниться в жидком состоянии при температуре от около 2°C до около 8 °C. В некоторых вариантах осуществления состав для введения стабилен и может храниться в жидком состоянии при температуре от около 18°C до около 25°C.

Назначение

[00387] Для введения композиций человеку или подопытным животным в одном аспекте композиции содержат один или более фармацевтически приемлемых носителей. Фразы «фармацевтически» или «фармакологически» приемлемые относятся к молекулярным объектам и композициям, которые являются стабильными, ингибируют деградацию белка, такую как продукты агрегации и расщепления, и, кроме того, не вызывают аллергических или других побочных реакций при введении с использованием способов, хорошо известных в данной области техники, как описано ниже. «Фармацевтически приемлемые носители» включают любые и все клинически применимые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и фунгицидные агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и тому подобное, включая агенты, описанные выше.

[00388] Фармацевтические составы вводят перорально, местно, трансдермально, парентерально, с помощью ингаляционного спрея, вагинально, ректально или путем внутрочерепной инъекции. Используемый в данном документе термин «парентеральный» включает подкожные инъекции, внутривенные, внутримышечные, интракостеральные инъекции или методы инфузии. Также рассматривается введение путем внутривенной, внутрикожной, внутримышечной, интрамаммарной, внутрибрюшинной, интратекальной, ретробульбарной, внутрилегочной инъекции и/или хирургической имплантации в конкретный участок. Обычно композиции практически не содержат пирогенов, а также других примесей, которые могут быть вредными для реципиента.

[00389] Однократное или многократное введение композиций проводят с уровнем доз и характером доз, которые выбирает лечащий врач. Для профилактики или лечения заболевания подходящая дозировка зависит от типа заболевания, которое подлежит

лечению, как определено выше, тяжести и течения заболевания, от того, вводится ли лекарство в профилактических или терапевтических целях, от предыдущей терапии, истории болезни пациента и реакции на препарат, и на усмотрение лечащего врача.

Наборы

[00390] В качестве дополнительного аспекта изобретение включает наборы, которые содержат одну или более лиофилизированных композиций, упакованных таким образом, чтобы облегчить их применение для введения субъектам. В одном варианте осуществления такой набор содержит фармацевтический состав, описанный в данном документе (например, композицию, содержащую терапевтический белок или пептид), упакованный в контейнер, такой как герметичная бутылка или сосуд, с этикеткой, прикрепленной к контейнеру или включенный в упаковку, которая описывает использование соединения или композиции при применении способа. В одном варианте осуществления фармацевтический состав упакован в контейнер так, что количество свободного пространства в контейнере (например, количество воздуха между жидким составом и верхом контейнера) очень мало. Предпочтительно, чтобы количество свободного пространства было незначительным (например, почти нулевым). В одном варианте осуществления набор содержит первый контейнер, содержащий терапевтическую белковую или пептидную композицию, и второй контейнер, содержащий физиологически приемлемый раствор для восстановления композиции. В одном аспекте фармацевтический состав упакован в виде стандартной лекарственной формы. Набор может дополнительно содержать устройство, подходящее для введения фармацевтического состава в соответствии с конкретным путем введения. Предпочтительно набор содержит этикетку, на которой описывается использование фармацевтических составов.

Дозы

[00391] Режим дозирования, включенный в способ лечения описанного в данном документе состояния, будет определяться лечащим врачом с учетом различных факторов, которые изменяют действие лекарственных средств, например, возраст, состояние, масса тела, пол и диета пациента, тяжесть инфекции, время приема и другие клинические факторы. Например, типичная доза рекомбинантного VWF по данному изобретению составляет приблизительно 50 Ед/кг, что равно 500 мкг/кг.

[00392] В одном аспекте составы по данному изобретению вводят путем начального болюсного введения с последующей непрерывной инфузией для поддержания терапевтических уровней лекарственного продукта в крови. В качестве другого примера соединение по изобретению вводят в виде однократной дозы. Специалисты в данной области техники легко оптимизируют эффективные дозировки и режимы введения, определяемые надлежащей медицинской практикой и клиническим состоянием отдельного пациента. Частота дозирования зависит от фармакокинетических параметров агентов и способа введения. Оптимальный фармацевтический состав определяется специалистом в данной области техники в зависимости от пути введения и желаемой

дозировки. См. например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) стр. 1435-1712, раскрытие которого включено в данный документ в качестве ссылки. Такие составы влияют на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость выведения вводимых агентов *in vivo*. В зависимости от пути введения подходящая доза рассчитывается в соответствии с массой тела, площадью поверхности тела или размером органа. Подходящие дозы могут быть установлены с помощью общепринятых анализов для определения доз в крови в сочетании с соответствующими данными доза-реакция. Окончательный режим дозирования определяется лечащим врачом с учетом различных факторов, которые изменяют действие лекарственных средств, например, специфическая активность препарата, тяжесть повреждения и реакция пациента, возраст, состояние, масса тела, пол и диета пациента, тяжесть инфекции, время введения и другие клинические факторы. По мере проведения исследований будет появляться дополнительная информация относительно соответствующих уровней дозировки и продолжительности лечения различных заболеваний и состояний.

Примеры

[00393] Приведенные далее неограничивающие примеры представлены только в иллюстративных целях, чтобы облегчить более полное понимание типичных вариантов осуществления.

[00394] Эти примеры не следует рассматривать как ограничение каких-либо вариантов осуществления, описанных в данном изобретении, включая те, которые относятся к способам лечения приобретенной и генетической болезни фон Виллебранда.

Пример 1: Очистка созревшего rVWF на катионном обменнике для отделения пропептида cVWF от зрелого rVWF.

[00395] Пример 1 представляет очистку созревшего rVWF на катионном обменнике (катионообменная смола (СЕХ)). Пропептид rVWF (rVWF-PP) остается связанным с rVWF после созревания фурина и диссоциировал цитратом натрия в качестве хелатирующего агента при нейтральном pH перед нанесением на смолу СЕХ. Большая часть пропептида rVWF прошла через катионообменную смолу. А оставшийся пропептид rVWF удаляли после стадии промывки. Цитрат натрия использовали как компонент буферного вещества и как хелатирующий агент.

[00396] На промышленном уровне VWF, в частности рекомбинантный VWF (rVWF), синтезируется и экспрессируется вместе с rFVIII в созданной методами генной инженерии линии клеток CHO. Функция коэкспрессированного rVWF заключается в стабилизации rFVIII в процессе культивирования клеток. rVWF синтезируется в клетке как про-форма, содержащая большой пропептид, присоединенный к N-концу. После созревания в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи rVWF-PP отщепляется под действием клеточной протеазы фурина и секретируется в виде гомополимера идентичных субъединиц, состоящего из димеров экспрессируемого белка. Однако созревание является неполным, что приводит к продукту, содержащему смесь rVWF-PP и

зрелого VWF.

[00397] После стадии моноклонального антитела для захвата рекомбинантного фактора VIII проточный буфер, содержащий rVWF (также называемый выходящим потоком моноклональных антител), загружают на анионный обменник (анионообменная смола (AEX)). rVWF связывается на анионном обменнике и созревает с фурином в присутствии кальция. rVWF элюировали из анионного обменника с увеличением проводимости. Продукт, содержащий элюат, обрабатывали путем разведения 1:2 60 мМ цитрата натрия, pH 7,6, до проводимости 13,39 мСм/см и pH 7,39. Обработанный водный раствор загружали в катионообменную колонку UNOsphere™ S Cation Exchange Media (Bio Rad, кат. №: 156-0115) с внутренним диаметром 15 мм, высотой слоя 14,0 см и объемом 24,74 мл со скоростью потока 100 см/ч, а затем промывали 5 ОК (объемами колонки) 10 мМ NaCl, 30 мМ цитрата Na, pH 7,6 ± 0,2 для удаления белков клетки-хозяина (HCP) и rVWF-PP. rVWF элюировали путем увеличения проводимости, осуществляемого с помощью линейного градиента со скоростью потока 60 см/ч в 6 ОК от 10 мМ NaCl, 30 мМ цитрата натрия, pH 7,6 ± 0,2 до буфера 500 мМ NaCl, 30 мМ цитрата натрия, pH 7,6 ± 0,2. Основной пик элюата был разделен на две части для разделения мультимеров rVWF с низкой молекулярной массой и мультимеров rVWF с высокой молекулярной массой.

[00398] На Фиг. 1 показана очистка созревшего rVWF на катионном обменнике, представленное в примере 1.

[00399] На Фиг. 2 представлена таблица результатов очистки.

[00400] На Фиг. 3 показан окрашенный серебром белковый гель и вестерн-блоттинг, иллюстрирующий разделение rVWF и rVWF-PP способом, описанным в примере 1.

Примеры 2 и 3: Оптимизированный способ, описанный в примере 1, для коммерческого производства rVWF.

[00401] Примеры 2 и 3 демонстрируют оптимизированный способ, описанный в примере 1, для коммерческого производства rVWF.

[00402] Для примеров 2 и 3 была создана экспериментальная установка для ферментации rVWF и rFVIII. Способ был использован для упрощенного способа очистки, используемого для получения rVWF высокой степени чистоты для биохимической характеристики.

[00403] Стадию захвата выполняли с помощью тандемной хроматографии, которая объединяла аффинную хроматографию и анионообменную хроматографию на одной стадии процесса. rFVIII связывался на колонке к FVIII-mAb при температуре 2-8°C на основе метода иммуноаффинной хроматографии. На этой стадии можно отделить rFVIII от rVWF. Проточный буфер, содержащий rVWF, разводили в той же хроматографической системе очищенной водой и загружали непосредственно в колонку AEX. Созревание рекомбинантного фурином на колонке AEX проводили после повышения температуры от +15°C до 28 °C. Созревший при помощи фурина rVWF элюировали ступенчатым элюированием за счет увеличения проводимости. Также проводили стадию доочистки.

Элюат АЕХ, содержащий rVWF, разбавляли 10 мМ Na-цитратным буфером, рН 7,6 и наносили на катионообменную колонку UNOsphere™ S Cation Exchange Media (Bio Rad, кат. №: 156-0115), имеющую внутренний диаметр 15 мм, высоту слоя 14,0 см и объем колонки $25 \pm 0,5$ мл при скорости потока 100 см/ч. После стадии промывки 10 мМ NaCl, 30 мМ цитрата Na, 2 мМ лимонной кислоты рН $7,6 \pm 0,2$, rVWF элюировали с увеличением проводимости с использованием линейного градиента со скоростью потока 65 см/ч в 6 ОК из 10 мМ NaCl, 30 мМ. Цитрат натрия, рН $7,6 \pm 0,2$, до буфера, содержащего 500 мМ NaCl, 30 мМ цитрат натрия, рН $7,6 \pm 0,2$. Основной пик элюата собирали как элюат (объединенный элюат) для аналитических целей.

[00404] В окончательной схеме эксперимента собирали последние 30-40% пика для получения rVWF с наивысшей удельной активностью.

[00405] На Фиг. 4 показана блок-схема экспериментальной установки для примеров 2 и 3.

[00406] На Фиг. 5 показана хроматограмма для примера 2 и схема хроматографии, используемая для примеров 2 и 3.

[00407] На Фиг. 6 представлена таблица использованных реагентов и таблица результатов для примера 2.

[00408] На Фиг. 7 представлена другая хроматограмма из примера 2 и таблица результатов для примера 3.

[00409] На Фиг. 8 показан окрашенный серебром белковый гель, иллюстрирующий разделение rVWF и пропептида rVWF способом из примера 2 и примера 3.

[00410] На Фиг. 9 показан вестерн-блоттинг, иллюстрирующий разделение rVWF и пропептида rVWF способом из примера 2 и примера 3.

Пример 4: Способ промышленного производства rVWF путем разделения rVWF и rVWF-PP с помощью эксклюзионной хроматографии.

[00411] Пример 4 представляет собой оптимизированный способ коммерческого производства rVWF путем разделения rVWF и пропептида rVWF (rVWF-PP) с помощью эксклюзионной хроматографии. Цитрат натрия добавляется в рабочий буфер SEC для обеспечения эффективного разделения rVWF и rVWF-PP.

[00412] RVWF, содержащий ультрафильтрованный S-элюат UNOsphere™, загружали непосредственно в ряд из двух последовательных колонок SEC для препаративания Superose 6 (GE Healthcare, кат. №: 28-9913-16), каждая с внутренним диаметром 16 мм высота слоя 82,0 см (2×41 см), а объем обеих колонок составлял приблизительно 165 мл. Загрузочный буфер применяли со скоростью 7 см/ч. Рабочий буфер представлял собой 20 мМ свободной кислоты HEPES, 150 мМ NaCl, 15 мМ дигидрат цитрата натрия, рН $7,5 \pm 0,2$. Эксклюзионную хроматографию проводили в изократических условиях при линейной скорости потока 12 см/ч.

[00413] На Фиг. 10 показана хроматограмма, схема хроматографии и составы буфера для примера 4.

[00414] На Фиг. 11 представлена таблица результатов для примера 4.

[00415] На Фиг. 12 показан окрашенный серебром белковый гель и вестерн-блоттинг, иллюстрирующий разделение rVWF и пропептида rVWF способом из примера 4.

Пример 5: Оптимизированный способ коммерческого производства зрелого rVWF путем разделения rVWF и rVWF-PP с помощью эксклюзионной хроматографии.

[00416] Пример 5 представляет способ разделения rVWF и rVWF-PP с помощью эксклюзионной хроматографии с применением rVWF с измененным рН, содержащего исходный материал, на эксклюзионной хроматографии.

[00417] RVWF, содержащий ультрафильтрованный элюат UNOsphere™ S, доводили до рН $7,5 \pm 0,2$ с помощью 1 М глицина рН 9,0 перед загрузкой в колонку. Этот раствор, загружали в ряд из двух последовательных колонок SEC для препаративания Superose 6 (GE Healthcare, кат. №: 28-9913-16), каждая с внутренним диаметром 16 мм высота слоя 82,0 см (2×41 см), а объем обеих колонок составлял приблизительно 165 мл. Загрузочный буфер применяли со скоростью потока 7 см/ч. Рабочий буфер содержит 20 мМ свободной кислоты HEPES и 150 мМ NaCl, рН $7,5 \pm 0,2$. Эксклюзионную хроматографию проводили в изократических условиях при линейной скорости потока 12 см/ч.

[00418] На Фиг. 13 показана хроматограмма, схема хроматографии и составы буфера для примера 5.

[00419] На Фиг. 14 представлена таблица результатов для примера 5.

Пример 6: СЕХ-метод очистки rVWF от пропептида rVWF без добавления хелатирующих агентов на UNOsphere™ S.

[00420] Пример 6 представляет собой способ СЕХ без добавления хелатирующих агентов на ультрафильтрованном UNOsphere™ S. Этот способ является представителем известного способа очистки зрелого rVWF от пропептида rVWF. В способе не используется буфер, содержащий хелатирующий агент и/или буфер, имеющий рН 7,0 или выше.

[00421] После стадии моноклонального антитела для захвата рекомбинантного фактора VIII проточный буфер, содержащий rVWF, загружают на анионный обменник. rVWF связывается на анионном обменнике и созревает с фурином в присутствии кальция. RVWF элюировали из анионного обменника с увеличением проводимости. Продукт, содержащий элюат, затем загружали в катионообменную колонку UNOsphere™ S Cation Exchange Media (Bio Rad, № по каталогу: 156-0115) с внутренним диаметром 15 мм, высотой слоя 14,2 см и объемом 25,09 мл при скорости потока 100 см/ч с последующей промывкой 10 ОК 10 мМ трис-HCl, 100 мМ ацетата Na, 85 мМ NaCl, рН $6,5 \pm 0,2$ для удаления HCP и rVWF-пропептида. rVWF элюировали в одну стадию путем применения 100 мМ ацетата Na, 500 мМ NaCl, 100 мМ глицина, 3 мМ CaCl₂, рН $7,5 \pm 0,2$ при скорости потока 65 см/ч. Основной пик элюата собирали как фракцию, содержащую продукт.

[00422] На Фиг. 15 показана хроматограмма, схема хроматографии и составы буфера, а также условия для примера 6.

[00423] На Фиг. 16 представлена таблица результатов для примера 6.

Пример 7: метод SEC очистки rVWF от пропептида rVWF без предварительного добавления хелатирующих агентов или увеличенного pH.

[00424] Пример 7 представляет SEC- метод без предварительного добавления хелатирующих агентов или повышенного pH. Этот метод является представителем известного метода очистки зрелого rVWF от пропептида rVWF. Метод SEC не включает буфер, содержащий хелатирующий агент и/или буфер, имеющий pH 7,0 или более, который используется для изменения исходной фракции (материала), содержащей rVWF и остаточный пропептид rVWF.

[00425] Рекомбинантный RVWF, содержащий ультрафильтрованный S-элюат UNOsphere™, загружали непосредственно в ряд из двух последовательных колонок SEC для препарирования Superose 6 (GE Healthcare, кат. №: 28-9913-16), каждая с внутренним диаметром 16 мм высота слоя 82,0 см (2×41 см), а объем обеих колонок составлял приблизительно 165 мл. Загрузочный буфер применяли со скоростью потока 7 см/ч. Рабочий буфер содержал 20 мМ свободной кислоты HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7,5 ± 0,2. Эксклюзионную хроматографию проводили в изократических условиях при линейной скорости потока 12 см/ч.

[00426] На Фиг. 17 показана хроматограмма, схема хроматографии и составы буфера для примера 7.

[00427] На Фиг. 18 представлена таблица результатов для примера 7.

Пример 8: Отделение rVWF от пропептида rVWF с помощью анионообменной хроматографии и катионообменной хроматографии.

[00428] Пример 8 представляет очистку созревшего rVWF на катионном обменнике. Исходный материал был получен из текущего производственного процесса rVWF после стадии AEX Mustang Q. RVWF, содержащий проточный буфер со стадии AEX Mustang Q, обрабатывали SD/VI и разбавляли буфером, содержащим хелатирующий агент, для диссоциации комплекса rVWF/rVWF-пропептид. Разбавленный материал наносили на смолу CEX (Unosphere S). Большинство rVWF-PP, белков клетки-хозяина (HCP) и мультимеров rVWF с низкой молекулярной массой проходят через катионообменную смолу. Оставшийся rVWF-PP удаляли после стадии промывки. Связанные мультимеры rVWF с высокой молекулярной массой впоследствии элюировали путем увеличения проводимости, вызванной ионами натрия.

[00429] На промышленном уровне VWF, в частности рекомбинантный VWF (rVWF), синтезируется и экспрессируется вместе с rFVIII в созданной методами генной инженерии линии клеток CHO. Функция коэкспрессированного rVWF заключается в стабилизации rFVIII в процессе культивирования клеток. rVWF синтезируется в клетке как про-форма, содержащая большой пропептид, присоединенный к N-концу. После созревания в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи пропептид отщепляется под действием клеточной протеазы фурина и секретируется в виде гомополимера идентичных субъединиц, состоящего из димеров экспрессируемого белка.

Однако созревание является неполным, что приводит к продукту, содержащему смесь пропептида и зрелого VWF.

[00430] После стадии моноклонального антитела для захвата рекомбинантного фактора VIII проточный буфер, содержащий rVWF, загружают на анионный обменник Fractogel TMAE. rVWF связывается на анионном обменнике и созревает с фурином в присутствии кальция. RVWF элюировали из анионного обменника с увеличением проводимости. Элюат TMAE фильтровали через фильтровальную установку Mustang Q (MUQ) для удаления СНО-ДНК и примесей, которые связываются с мембраной фильтра. Загрузочным материалом для стадии СЕХ является сток со стадии фильтрации Mustang Q (MUQ), который обрабатывается растворителем и детергентами для инактивации вирусов с липидной оболочкой. Для инактивации вирусов сточные воды MUQ инкубируют со смесью двух детергентов, таких как Triton-X-100 (1%) и полисорбат 80 (0,3%), и органического растворителя три-н-бутилфосфат (0,3%) в течение одного часа при комнатной температуре. Продукт, содержащий MUQ проточный буфер, обрабатывали путем разведения 1:2 60 мМ цитрата натрия, pH 7,6, до проводимости 21,9 мСм/см и pH 7,16. Высокая проводимость была выбрана для обеспечения удаления пропептида rVWF (rVWF-PP) и мультимеров rVWF с низкой молекулярной массой для использования способности смолы для желаемых мультимеров rVWF с высокой молекулярной массой. Обработанный буфер для разведения загружали в катионообменную колонку UNOsphere™ S Cation Exchange Media (Bio Rad, кат. №: 156-0115) с внутренним диаметром 10 мм, высотой слоя 14,3 см и объемом 11,23 мл с скоростью потока 100 см/ч. После загрузки выполняли первую промывку (повторное уравнивание) с использованием 5 ОК 10 мМ NaCl, 30 мМ цитрата натрия, pH 7,6 ± 0,2 для удаления слабосвязанных НСР и rVWF-пропептида.

[00431] Вторую промывку для удаления прочно связанных НСР и rVWF-пропептида проводили с шагом 40% 500 мМ NaCl, 30 мМ цитрата Na, pH 7,6 ± 0,2 в 10 мМ NaCl, 30 мМ цитрате Na, pH 7,6 ± 0,2 (промывка 2).

[00432] Элюирование проводили в две фазы: (1) первая фаза включала стадию 45% 500 мМ NaCl, 30 мМ цитрата Na, pH 7,6 ± 0,2 в 10 мМ NaCl, 30 мМ цитрате Na, pH 7,6 ± 0,2 (элюат 1 или E1), а (2) вторая фаза включала линейный градиент от 45% до 100% 500 мМ NaCl, 30 мМ цитрата натрия, pH 7,6 ± 0,2 в 10 мМ NaCl, 30 мМ цитрате Na, pH 7,6 ± 0,2. (Элюат 2 или E2) в 6 объемах колонки. Промывку 2 до конца градиента выполняли при скорости потока 65 см/ч.

[00433] На Фиг. 19 показана хроматограмма, схема хроматографии и составы буфера для примера 8.

[00434] На Фиг. 20 представлена таблица результатов для примера 8.

[00435] На Фиг. 21 показан окрашенный серебром белковый гель, иллюстрирующий разделение rVWF и пропептида rVWF способом из примера 8.

[00436] На Фиг. 22 показан вестерн-блоттинг, иллюстрирующий разделение rVWF и пропептида rVWF способом из примера 8. 1% -ный агарозный гель демонстрирует

мультимерную структуру продуктов.

[00437] На Фиг. 23 показан вестерн-блоттинг, иллюстрирующий разделение rVWF и пропептида rVWF способом из примера 8.

Пример 9: Отделение rVWF от пропептида rVWF с помощью анионообменной хроматографии и катионообменной хроматографии.

[00438] Пример 9 представляет оптимизированную очистку созревшего rVWF на катионном обменнике. Исходный материал был получен из текущего производственного процесса r-VWF после стадии AEX Mustang Q. RVWF, содержащий проточный буфер со стадии AEX Mustang Q, обрабатывали SD/VI и разбавляли буфером, содержащим хелатирующий агент, для диссоциации комплекса rVWF/rVWF-пропептид. Разведенный материал наносили на смолу CEX (Unosphere S). Большинство rVWF-PP, белков клетки-хозяина и мультимеров rVWF с низкой молекулярной массой проходят через катионообменную смолу. Оставшийся rVWF-PP удаляли после стадии промывки. Связанные мультимеры rVWF с высокой молекулярной массой впоследствии элюировали градиентом путем увеличения проводимости, вызванной ионами натрия.

[00439] На промышленном уровне VWF, в частности рекомбинантный VWF (rVWF), синтезируется и экспрессируется вместе с rFVIII в созданной методами генной инженерии линии клеток CHO. Функция коэкспрессированного rVWF заключается в стабилизации rFVIII в процессе культивирования клеток. rVWF синтезируется в клетке как про-форма, содержащая большой пропептид, присоединенный к N-концу. После созревания в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи пропептид отщепляется под действием клеточной протеазы фурина и секретируется в виде гомополимера идентичных субъединиц, состоящего из димеров экспрессируемого белка. Однако созревание является неполным, что приводит к продукту, содержащему смесь пропептида и зрелого VWF.

[00440] После стадии моноклонального антитела для захвата рекомбинантного фактора VIII проточный буфер, содержащий rVWF, загружают на анионный обменник Fractogel TMAE. r-VWF на анионном обменнике и созревает с фурином в присутствии кальция. RVWF элюировали из анионного обменника с увеличением проводимости. Элюат TMAE фильтровали через фильтровальную установку Mustang Q (MUQ) для удаления CHO-ДНК и примесей, которые связываются с мембраной фильтра. Загрузочным материалом для стадии CEX является сток со стадии фильтрации Mustang Q (MUQ), который обрабатывается растворителем и детергентами для инактивации вирусов с липидной оболочкой.

[00441] Для инактивации вирусов сточные воды MUQ инкубируют со смесью двух детергентов Triton-X-100 (1%) и полисорбат 80 (0,3%), и органического растворителя три-н-бутилфосфат (0,3%) в течение одного часа при комнатной температуре. Продукт, содержащий MUQ проточный буфер, обрабатывали путем разведения 1:2 60 мМ цитрата натрия, pH 7,6, до проводимости 21,9 мСм/см и pH 7,16. Выбирают высокую проводимость, чтобы гарантировать удаление rVWF-пропептида и rVWF с низкой

молекулярной массой, чтобы использовать способность смолы для желаемого r-VWF с высокой молекулярной массой. Обработанный буфер для разведения загружали в катионообменную колонку UNOsphere™ S Cation Exchange Media (Bio Rad, кат. №: 156-0115) с внутренним диаметром 10 мм, высотой слоя 14,3 см и объемом 11,23 мл со скоростью потока 100 см/ч с последующей первой промывкой (повторное уравнивание) 5 ОК 10 mM NaCl, 30 mM цитрата Na, pH $7,6 \pm 0,2$ для удаления слабосвязанного НСР и rVWF-пропептида.

[00442] Вторую промывку (промывка 2) для удаления прочно связанных НСР и rVWF-пропептида проводили с шагом 36% 500 mM NaCl, 30 mM цитрата Na, pH $7,6 \pm 0,2$ в 10 mM NaCl, 30 mM цитрате Na, pH $7,6 \pm 0,2$ в 5 объемах колонки.

[00443] Элюирование проводили градиентом от 36% 500 mM NaCl, 30 mM цитрата Na, pH $7,6 \pm 0,2$ в 10 mM NaCl, 30 mM цитрате Na, pH $7,6 \pm 0,2$ до 100% 500 mM NaCl, 30 mM цитрата Na, pH $7,6 \pm 0,2$ в 10 mM NaCl, 30 mM цитрате натрия, pH $7,6 \pm 0,2$ в 8 объемах колонки. Элюат, представляющий желаемый продукт, содержит пул фракций, начиная с > 50% 500 mM NaCl, 30 mM цитрата Na, pH $7,6 \pm 0,2$ в 10 mM NaCl, 30 mM цитрате Na, pH от $7,6 \pm 0,2$ до 76% от 500 mM NaCl, 30 mM цитрат Na, pH $7,6 \pm 0,2$ в 10 mM NaCl, 30 mM цитрате Na, pH $7,6 \pm 0,2$. Промывка и элюирование выполнялись при скорости потока 50 см/ч.

[00444] На Фиг. 24 показана хроматограмма, схема хроматографии и составы буфера для примера 9.

[00445] На Фиг. 25 представлена таблица результатов для примера 9.

[00446] На Фиг. 26 представлена таблица продукта для примера 9.

[00447] На Фиг. 27 показан окрашенный серебром белковый гель, иллюстрирующий разделение rVWF и пропептида rVWF способом из примера 9.

[00448] На Фиг. 28 показан вестернблоттинг, иллюстрирующий разделение rVWF и пропептида rVWF способом из примера 9. 1% -ный агарозный гель демонстрирует мультимерную структуру продуктов.

[00449] На Фиг. 29 показан вестернблоттинг, иллюстрирующий разделение rVWF и пропептида rVWF способом из примера 9.

[00450] Стадии очистки rVWF в присутствии хелатирующих агентов и/или увеличенного pH показали высокую скорость удаления пропептида r-VWF и белков клетки-хозяина. Удаление пропептида r-VWF на катионном обменнике основано на том факте, что rVWF-PP не связывается с катионном обменнике в условиях присутствия хелатирующих агентов и/или увеличенного pH. Удаление пропептида rVWF при эксклюзионной хроматографии основано на факте эффективного разделения по размеру в присутствии хелатирующих агентов и/или увеличенного pH.

[00451] На Фиг. 30 показана чистота продукта, содержащего фракции, полученные для улучшенной катионообменной хроматографии (СЕХ), использованной в примерах 1, 2, 3, 6, 8 и 9.

[00452] На Фиг. 31 показан коэффициент удаления связанных с продуктом

примесей для примеров 1, 2, 3, 6, 8 и 9.

[00453] На Фиг. 32 показана чистота продукта, содержащего фракции, полученные для усиленной эксклюзионной хроматографии (SEC), использованной в примерах 4 и 5.

На Фиг. 33 показан коэффициент удаления связанных с продуктом примесей для примеров 4 и 5.

Ссылки

[00454] Патент США № 8058411; Method for producing mature VWF from VWF propeptide. Изобретатели: Wolfgang Mundt, Artur Mitterer, Meinhard Hasslacher, Christa Mayer.

[00455] Патент США № 6465624; Purification of von Willebrand factor by cation exchange chromatography. Изобретатели: Bernhard Fischer, Öyvind L. Schönberger, Artur Mitterer, Christian Fiedler, Friedrich Dorner, Johann Eibl.

Пример 10: Отделение rVWF от пропептида rVWF с помощью анионообменной хроматографии.

[00456] Это исследование иллюстрирует диссоциацию (разделение) обработанного фурином зрелого комплекса VWF/VWF-PP на зрелый VWF и VWF-PP с использованием анионообменной хроматографии и элюирующего буфера с повышенным pH (например, pH 8,5) и содержащего хелатирующий агент (ЭДТК). Разделение проводили на анионообменнике (АЕХ), в частности на Fractogel TMAE 650 (M). Обработку растворителем-детергентом для инактивации вирусов также проводили на колонке в течение около 1 часа. Подробности хроматографического эксперимента представлены на Фиг. 34-36.

[00457] На Фиг. 34 показаны составы буферов и материалы, используемые в методе разделения TMAE.

[00458] На Фиг. 35 показаны условия нагрузки для комплекса зрелый VWF/VWF-пропептид, обработанного фурином.

[00459] На Фиг. 36 показаны детали буферов, условий, параметров и скоростей потока хроматографического метода.

[00460] На Фиг. 37 показана хроматограмма диссоциации обработанного фурином комплекса зрелый VWF/VWF-пропептид на зрелый VWF и VWF-пропептид (VWF-PP). Он показывает удаление VWF-PP из фракции, содержащей зрелый VWF.

[00461] На Фиг. 38 показана другая хроматограмма разделения зрелого VWF и VWF-пропептида (VWF-PP). Он показывает удаление VWF-PP из фракции, содержащей зрелый VWF.

Пример 11: Улучшения в различных методах хроматографии для разделения зрелого VWF (matVWF) и пропептида VWF (VWF-PP).

[00462] В первом исследовании сравнивали два метода очистки рекомбинантного зрелого VWF.

[00463] На Фиг. 39 представлена схема двух методов выделения зрелого VWF. В одном способе стадии последующей обработки, такие как стадии после получения выходящего потока mAb (MABEffl), стадия улавливания анионообменной хроматографии

с ТМАЕ и созревания на колонке (ТМС) и стадия негативной анионообменной хроматографии Mustang Q (МУQ) включают обработку растворителем-детергентом (SDT) для инактивации вирусов, катионообменная хроматография (САТ), концентрация ультрафильтрацией (УФА), эксклюзионная хроматография (СЕС) и концентрация диализ-ультрафильтрация (ДУФ) для получения нерасфасованного лекарственного вещества (зрелого VWF). В другом способе последующие стадии обработки включают стадию улучшенной катионообменной хроматографии (САТ), за которой следует стадия концентрирования диализом-ультрафильтрацией (ДУФ) для получения нерасфасованного лекарственного вещества, и не включают СЕС.

[00464] На Фиг. 40 представлена таблица, подчеркивающая некоторые преимущества усовершенствованного метода катионообменной хроматографии (САТ 2.0), описанного в данном документе и показанного на Фиг. 39. Усовершенствованный метод САТ позволяет удалять: примеси клеток-хозяев с коэффициентом снижения более 1000, VWF-PP с коэффициентом снижения более 2000 и остаточный FVIII с коэффициентом снижения менее 10. САТ-метод можно использовать для разделения и объединения мультимеров VWF. Кроме того, этот метод может заменить эксклюзионную хроматографию в качестве стадии доочистки для выделения активной фракции VWF и удаления оставшихся примесей, полученных из клеток-хозяев, и VWF-PP.

[00465] Во втором исследовании условия процесса СЕС были изменены для улучшения разделения зрелого VWF и VWF-PP. Другими словами, было определено, что модифицированный буфер для СЕС может повысить чистоту зрелого VWF за счет уменьшения количества VWF-PP.

[00466] На Фиг. 41 показана схема двух хроматограмм, показывающих разделение пропептида r-VWF с использованием эксклюзионной хроматографии со стандартным буфером СЕС (буфер SQA) или с модифицированным буфером СЕС (буфер SQC). На Фиг. 42 представлена таблица, в которой показаны некоторые преимущества использования буфера SQC. Например, способ, использующий буфер SQC, может удалять примеси из клеток-хозяев с коэффициентом уменьшения более 100 и остаточный FVIII с коэффициентом уменьшения менее 10. Удивительно, но он может удалять VWF-PP, так что уровни примесей составляют менее 2 мкг/1000 единиц.

[00467] Таким образом, в этом примере описаны способы улучшения отделения зрелого VWF от VWF-PP.

Пример 12: Разработка улучшенной стадии САТ (UNO_S).

[00468] Последующий процесс рекомбинантного фактора фон Виллебранда (rVWF) 1-го поколения, начиная с потока моноклональных антител (МАВ), включает стадию доочистки катионообменной хроматографией (САТ) на смоле UNO_Sphere S (UNO_S). После этого элюат UNO_S концентрируется ультрафильтрацией и дополнительно обрабатывается методом эксклюзионной хроматографии (СЕС) для разделения мультимеров rVWF с высокой и низкой молекулярной массой и удаления свободного пропептида rVWF, примеси, связанной с продуктом, образующейся в ходе последующего

процесса. Подфракция rVWF с высокой молекулярной массой представляет собой нерасфасованное лекарственное вещество (BDS, англ.: bulk drug substance), которое окончательно готовят для получения конечного лекарственного продукта (FDP, англ.: final drug product).

[00469] Для последующего процесса rVWF 2-го поколения было предложено заменить стадию SEC улучшенным методом катионообменной хроматографии и разделить мультимеры rVWF с высокой, низкой и молекулярной массой, а также пропептиды rVWF с помощью процедуры элюирования с альтернативным катионнообменом (CAT) (градиентное элюирование вместо ступенчатого элюирования). В этом примере обрисованы в общих чертах эксперименты на стадии CAT очистки доочисткой rVWF 2-го поколения. Новые параметры процесса, такие как pH и проводимость загрузки CAT, проводимость и продолжительность стадий промывки колонки и критерии объединения элюата, были исследованы в небольшом масштабе, чтобы получить масштабируемую и надежную технологическую стадию последующей операции.

1. Задача

[00470] Последующий процесс rVWF 1-го поколения (VONVENDI®) начинается со стадии захвата на TMAE-сефарозе (стадия TMC) с использованием потока ADVATE® MAB в качестве исходного раствора, за которым следует стадия фильтрации Mustang Q для удаления ДНК клетки-хозяина CHO. Затем выполняли стадию растворителя/детергента (S/D) для инактивации потенциальных вирусов с липидной оболочкой, за которым следует стадия доочистки смолы UNO_Sphere S (UNO_S), являющейся слабым катионным обменником (стадия CAT). Стадия CAT предназначена для удаления реактивов S/D, введенных на стадии инактивации вирусов. После этого элюат UNO_S концентрируется ультрафильтрацией и дополнительно обрабатывается методом эксклюзионной хроматографии (SEC) для разделения мультимеров rVWF с высокой и низкой молекулярной массой и удаления свободного пропептида rVWF, примеси, связанной с продуктом, образующейся в ходе последующего процесса. Подфракция rVWF с высокой молекулярной массой представляет собой BDS, который окончательно составлен для получения FDP.

[00471] Для последующего процесса rVWF 2-го поколения было предложено отменить стадию SEC и заменить ее улучшенным методом катионообменной хроматографии.

[00472] В серии из пяти экспериментов разделение мультимеров rVWF с высокой и низкой молекулярной массой, а также удаление пропептидов rVWF было достигнуто с помощью процедуры градиентного CAT-элюирования. Новый режим градиентного элюирования смог заменить процедуру ступенчатого элюирования, которая применяется в последующем процессе 1-го поколения. В этом примере подробно описаны пять экспериментов для стадии CAT очистки доочисткой rVWF 2-го поколения. Все эксперименты проводились согласно описанному в данном документе плану

исследования.

2. Введение и уровень техники

[00473] В текущем отчете описывается разработка процесса T 2-го поколения (Gen 2) путем объединения двух последующих стадий работы блока VWF CAT и SEC, которые в настоящее время применяются в процедуре 1-го поколения (Gen 1). В серии экспериментов были исследованы параметры процесса, которые были идентифицированы при оценке риска и считались важными для выполнения хроматографической стадии CAT. Данное исследование было основано на уменьшенной модели текущего производственного процесса rVWF. Этот процесс был установлен в Орте для производства материала клинической фазы III и переведен в промышленный масштаб (MFG) для коммерческого производства (Фиг. 43A). Чтобы облегчить понимание внесенных изменений в этап работы блока CAT, описанный в этом отчете, ниже приведено краткое описание процесса стадий работы нисходящего блока rVWF 1-го поколения S/D, CAT и SEC.

[00474] Используемая в процессе Gen 1, стадия доочистки rVWF CAT представляет собой хроматографический процесс катионообмена на UNO_Sphere S, макропористой среде на основе акриламида с «сильным» сульфокатионообменным лигандом. Загрузочным материалом для стадии доочистки является сток со стадии фильтрации анионного обмена MUQ, который обрабатывается растворителем и детергентами для инактивации вирусов с липидной оболочкой. Для инактивации вирусов сточные воды MUQ инкубируют со смесью двух детергентов Triton-X-100 (1%) и полисорбат 80 (0,3%), и органического растворителя три-н-бутилфосфат (0,3%) в течение одного часа при комнатной температуре. Перед обработкой раствор продукта фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,2 мкм для удаления потенциально присутствующих частиц. После инактивации вируса раствор продукта разбавляют примерно одним объемом воды, чтобы уменьшить концентрацию реагентов S/D, отрегулировать проводимость для этапа загрузки на колонку CAT. PH не регулируют. Основная цель CAT-хроматографии состоит в удалении реагентов S/D и дальнейшем уменьшении примесей, связанных с технологическим процессом, включая компоненты среды, такие как соевый пептон, и другие примеси, такие как рфурин (рекомбинантный фурин), полипептиды rFVIII и белки и ДНК, полученные из СНО. После этапа работы установки CAT полученная фракция продукта (CAT-E) дополнительно обрабатывается эксклюзионной хроматографией (SEC) на смоле Superose 6. Загрузочным материалом для стадии доочистки SEC является пул элюата CAT на стадии катионообменной доочистки на UNO_Sphere S. Поскольку объем загрузки для колонки SEC ограничен для достижения разумного разрешения, пул элюата CAT концентрируется примерно в 15 раз посредством ультрафильтрации с использованием мембранной кассеты на основе целлюлозы с пределом отсека 30°кДа (стадия UFA). В масштабе производства клинической фазы III концентрат концентрации ультрафильтрации (UFA) разделяется на две фракции, которые обрабатываются отдельно на колонке SEC. Эта мера была реализована, чтобы сохранить

объем колонки SEC и диаметр колонки на низком уровне. Буферная матрица, а также проводимость и pH загружаемого материала соответствуют пулу элюата CAT и не регулируются после стадии концентрирования UFA перед загрузкой в колонку SEC. Целью стадии SEC является окончательное удаление примесей из белков клетки-хозяина СНО и служит основной стадией удаления связанного с продуктом примесного пропептида гVWF, образующегося на стадии первоначального захвата на TMAE-сефарозе (стадия TMC). Кроме того, на стадии SEC разделяются мультимеры гVWF на основе их размера, что позволяет использовать схему объединения для обогащения мультимеров гVWF с высокой молекулярной массой, которые вносят вклад в активность кофактора ристоцетина продукта.

[00475] Этот отчет описывает замену текущих стадий работы блока, выполняемых в масштабе MFG (Фиг. 43А), на улучшенной стадии CAT (UNO_S) (Фиг. 43В). Улучшение стадии CAT было исследовано в небольшом масштабе. Возможно, также потребуется оптимизировать стадию UDF (концентрирование/диализ), следующую за стадией CAT.

3. Материалы и методы

[00476] В данном документе описаны материалы и методы, а также план отбора проб.

3.1 материалы загрузки гVWF

[00477] Для всех экспериментов использовали замороженный продукт MUQ-E. Материал хранили замороженным при $\leq -60^{\circ}\text{C}$ в аликвотах по 130 мл и размораживали в течение ночи при температуре от $+2$ до $+8^{\circ}\text{C}$ по необходимости. После размораживания MUQ - элюат добавляли реagenты S/D и смесь фильтровали через фильтр 0,2 мкм KA02EAVP2S® от Pall. После этого отфильтрованный материал инкубировали при умеренном регулировании в течение 60 минут при комнатной температуре (около $+25^{\circ}\text{C}$) для инактивации/растворения потенциальных вирусов с липидной оболочкой. Реакцию S/D останавливали разбавлением 1:2 60 mM Na-цитратным буфером, pH 7,5. Разбавленный материал использовали в качестве исходного раствора для следующей стадии CAT.

3.2 Хроматографическое оборудование

[00478] Для экспериментов, описанных в данном отчете, использовалась небольшая хроматографическая система ÄKTA pure 25 (GE Healthcare). Система была оборудована датчиками для оперативного мониторинга УФ-поглощения, проводимости, давления, температуры и pH с электронной записью. Система управлялась программным обеспечением под управлением Unicorn 7.0. Все опыты проводились при комнатной температуре.

[00479] Трубки системы ÄKTA были изготовлены из полиэфирэфиркетона (PEEK), что отличается от крупномасштабного производства, в котором используется технологическая система Millipore с трубами из нержавеющей стали. Все аппаратные компоненты являются квалифицированным оборудованием для исследований и разработок.

[00480] Лабораторная колонка, которая использовалась для всех пяти экспериментов, была оснащена полипропиленовыми входными фильтрами 10 мкм; размер частиц смолы UNO_Sphere S составлял около 80 мкм в диаметре. В крупномасштабном производстве используются входные фильтры из нержавеющей стали с размером ячеек 20 мкм. Все колонки представляют собой квалифицированные элементы, предназначенные для целей НИОКР.

[00481] Сравнение аппаратных средств между текущим оборудованием GEN 1 MGF в NE и мелкомасштабном оборудованием GEN 2, используемым в текущем исследовании, показано на Фиг. 44.

3.3 Буферы

[00482] Буферы, используемые для небольших циклов очистки, были изготовлены в лабораторных условиях или получены из производственной зоны. Для приготовления буферов использовались квалифицированные химические вещества, которые также использовались для производства буферов для экспериментального клинического производства. Буферы фильтровали с размером пор 0,2 мкм и хранили в пакетах или стеклянных флаконах при комнатной температуре перед использованием. Описание буферного состава приведено на Фиг. 48.

3.4 Аналитические методы

[00483] Проведенные анализы биохимических характеристик rVWF, активности и примесей включают те, которые предназначены для анализа VWF: активность RistoCo, антиген VWF, содержание антигена VWF-пропептида, хромогенный метод активности FVIII, профиль УФ-поглощения (280 нм, 254 нм), структура полипептидов, такая как дегградация, структура мультивомеров, и содержание CHO HCP. В некоторых случаях могут быть выполнены другие аналитические тесты для определения, помимо прочего, содержания рго-VWF антигена, содержания антигена FVIII, активности фурина, антигена фурина, общего белка (BCA), свободного сульфгидрила, CHO VIP WB, CHO ДНК, мышиноного моноклонального антитела, соевого пептона, Triton X-100, полисорбата 80, три-н-бутилфосфата, динамического рассеяния света (DLS) (гидродинамический радиус), сиаловых кислот, содержания н-гликанов, связывания коллагена VWF и окисления VWF.

4 Изменения в процессе CAT rVWF 2-го поколения (GEN 2)

[00484] Чтобы заменить стадию SEC в нисходящем процессе rVWF 2-го поколения, были исследованы параметры, перечисленные ниже. Большинство внесенных изменений основано на технико-экономических обоснованиях НИОКР. Тип смолы для хроматографии (смола UNO_Sphere S от BioRad) и состав (не pH) нанесенного буфера не изменились. Процесс CAT 2-го поколения включал следующие изменения: обработка S/D, загрузка концентрации и скорости потока, а также стадии промывки и элюирования.

4.1 Обработка S/D

[00485] Обработку S/D проводили таким же образом, как и в процессе GEN 1, за исключением того, что инактивацию S/D останавливали разбавлением 1:2 материала, инактивированного вирусом, 60 mM Na-цитратным буфером, который устанавливал

подачу CAT до предпочтительного pH 7,5-8,0 (диапазон тестирования pH 6,0-9,0) и до предпочтительной проводимости 10-30 мСм/см² при +25 °С (диапазон тестирования проводимости 5-40 мСм/см² при +25 °С). На стадии CAT rVWF GEN 1, которая была выполнена, загрузка CAT была установлена на pH 8,9-9,2. В установке GEN 2 проводимость и pH были установлены на уровне, который минимизировал связывание пропептидов CHO-НСП, CHO-DNA и rVWF с матрицей. Подобным же образом молекулам rVWF с низкой молекулярной массой (LMW) препятствовало связывание с матрицей колонки, тогда как предпочтительно были захвачены только молекулы rVWF с высокой молекулярной массой (HMW). Одна из целей данного исследования состояла в том, чтобы увеличить проводимость во время фазы загрузки и удалить как можно больше LMW rVWF, CHO-НСП, CHO-ДНК и пропептида rVWF из исходного раствора.

4.2 Концентрации загрузки и скорость потока

[00486] Концентрация загрузки (ME rVWF/мл смолы) была увеличена в ходе исследования, чтобы обеспечить более высокую загрузку продукта без увеличения объема колонки. В производственном масштабе (MFG) обычно применяется концентрация смолы 60-140 ME/мл, в отличие от такой, в текущем мелкомасштабном исследовании было загружено 90-270 ME/мл смолы. Расходы уравнивания, загрузки и повторного уравнивания в процедуре CAT 2-го поколения были такими же, как и в процессе 1-го поколения (100 см/ч). Скорость промывки и элюирования изменяли, как показано на Фиг. 45.

4.3 Концентрации загрузки и скорость потока

[00487] Стадия промывки, предшествующая фазе элюирования, была изменена для оптимизации удаления примесей, связанных с процессом и продуктом. Ступенчатое элюирование, применяемое в процессе 1-го поколения, было изменено на градиентное элюирование. В ходе исследования была исследована длина градиента. Изменение процедуры элюирования было основано на наблюдении, что молекулы rVWF с низкой молекулярной массой элюируются во фракциях с ранним градиентом, тогда как молекулы rVWF с высокой молекулярной массой элюируются во фракциях с поздним градиентом (см., например, US 6465624).

5. Сравнение процессов CAT Gen 1 и Gen 2

[00488] В обеих процедурах процесс CAT включает следующие стадии: активация колонки (загрузка анионного лиганда катионным противоионом натрия) и уравнивание (подготовка колонки к загрузке с точки зрения стабильного pH и проводимости, контролируемых на выходе из колонки), с последующей загрузкой продукта обработанного S/D и разбавленного элюата MUQ.

[00489] Во время загрузки шкалы MFG элюат фильтровали в режиме онлайн через фильтр 0,2 мкм для защиты колонки от твердых частиц, которые могли образоваться во время обработки S/D. В мелкомасштабном процессе эта стадия была пропущена. После закачки раствора, содержащего продукт, в колонку, загрузка была завершена, и слабосвязанные примеси были удалены путем применения стадии промывки, на которой

удаляются реагенты S/D с низкой молекулярной массой, которые были закачаны в колонку. рН и проводимость стадии промывки соответствуют параметрам стадии уравнивания и загрузки. После промывки связанные белки элюировали из колонки путем ступенчатого элюирования с использованием элюирующего буфера с повышенной проводимостью и концентрацией противоионов. Пул продуктов собирали с $\leq 3,6$ ОК.

[00490] В мелкомасштабном процессе Gen 2 использовали альтернативную процедуру градиентного элюирования для удаления пропептида rVWF, молекул rVWF с малой молекулярной массой и молекул с высокой молекулярной массой из колонки (Фиг. 45). Стадии промывки, предшествующие элюированию, выполнялись как ступенчатая промывка с тем же значением рН и проводимости, что и начальная точка градиентного элюирования. Были протестированы четыре сценария промывки: 0% В (10 ОК), 55% В (10 ОК), 40% В (5 ОК) и 45% В (5 ОК) и 36% В (5 ОК). Соответствующие стадии градиентного элюирования составляли 0-100% В (12 ОК), 55-100% В (6 ОК), 45-100% В (6 ОК) и 36-100% В (6 ОК). Элюирование завершали промывкой 2-3 ОК 100% В.

[00491] Элюаты объединяли в зависимости от примесей, связанных с элюируемым продуктом, и подвидов продукта. После элюирования продукта колонку очистили и продезинфицировали щелочными и кислыми растворами. Основной целью этой стадии полировки было дальнейшее удаление примесей, связанных с процессом, включая белок клетки-хозяина СНО, человеческий рфурин, соединения среды, такие как соевый пептон), примеси, связанные с продуктом (пропептид rVWF) и реагенты S/D с низкой молекулярной массой. Ожидалось лишь незначительное влияние на удаление rFVIII. После улучшенной стадии CAT (UNO_S) может потребоваться стадия концентрирования белка и замены буфера (ультра/диафильтрация). Однако эта стадия ультра/диафильтрации не была частью исследования, описанного в данном документе. Различия в хроматографической процедуре между масштабным процессом MFG 1-го поколения и мелкомасштабным процессом 2-го поколения показаны на Фиг. 46-48.

6. Результаты

[00492] В следующем разделе представлены результаты текущего исследования. Пять экспериментов, проведенных в небольшом масштабе, ясно показывают, что замена стадии работы блока SEC и предшествующей стадии ультрафильтрации (замены буфера) возможна путем введения модифицированной процедуры UNO (CAT).

6.1 Хроматограммы

[00493] Как указано выше, было проведено пять экспериментов с различными процедурами промывки и градиентного элюирования. Цель этапа UNO S состояла в том, чтобы найти оптимальный метод удаления примесей, связанных с продуктом и процессом, с одной стороны, и достичь оптимального выхода с точки зрения VWF Ag и активности. На Фиг. 49 показаны две хроматограммы последнего (5-го) цикла VW_USS_05. На верхней панели Фиг. 49 изображен полный цикл, включая активацию колонки, фазу загрузки (высокое поглощение УФ_{280 нм} вызвано химическими веществами S/D, содержащимися в сырье), повторное уравнивание, промывка, градиентное

элюирование, промывка 2M NaCl и процедура CIP. Хроматограмма объединена из 2 файлов результатов, которые объясняют масштаб оси x (файл результатов 1: активация до конца загрузки; файл результатов 2: начало повторного уравнивания, промывка 36% В, градиентное элюирование, CIP). На нижней панели Фиг. 49 подробно изображена фаза элюирования (стадия отмытки до 36% элюирующего буфера В, за которым следует градиентное элюирование от 36% В до 100% В и фаза 100% элюирующего буфера В).

6.2 SDS-PAGE

[00494] При изменении и оптимизации применяемых условий хроматографии (например, проводимости промывочного буфера, начала градиентного элюирования) разделение пропептида и зрелого rVWF было уточнено. Кроме того, было улучшено удаление примесей, связанных с технологическим процессом, а также выход зрелого rVWF Ag и активность. Результаты SDS-PAGE (окрашивание серебром и вестерн-блоттинг к rVWF) последнего (5-го) запуска в серии экспериментов представлены на Фиг. 50.

[00495] SDS-PAGE проводили на 3-8% гелях трис-ацетата в восстанавливающих условиях. Разделенные полипептиды визуализировали окрашиванием серебром (вверху) и вестерн-блоттингом (внизу). Перед загрузкой образцы восстанавливали DTT, после чего свободные сульфгидрильные группы блокировали йодоацетамидом. Для вестерн-блоттинга 1-е антитело представляло собой поликлональное кроличье антитело к VWF человека (от Dako; номер заказа A0082; разведенное 1:1000), 2-е антитело представляло собой поликлональное, AP-конъюгированное козье антитело к IgG кролика (от Sigma; номер для заказа A-8025; разведение 1:2000). Диапазон rVWF составляет более 250 кДа; пропептид VWF имеет массу около 90 кДа. Пропептид не обнаруживается антителами, используемыми для вестерн-блоттинга.

[00496] Результаты прогона VWF_USS_05 показывают четкое разделение пропептида и зрелого rVWF. Образец элюата (дорожка 16) и эталонный образец, очищенный в соответствии с процедурой поколения 1 (дорожка 18), очень сопоставимы.

6.3 Мультимерный анализ

[00497] Для оценки распределения мультимеров подвидов rVWF с высокой и низкой молекулярной массой был проведен анализ с помощью агарозного геля и вестерн-блоттинга. Были протестированы образцы из загрузки, проточной (FT), промывки, элюирования и промывки с высоким содержанием соли (Фиг. 51). Подвиды LMW rVWF содержатся в проходящем потоке (FT; фракция выходящего потока) (дорожка 8) и при промывке/предварительном элюировании (дорожки 9 и 10). Пулы для элюирования и постэлюирования (дорожки 11 и 12) показывают картину полос, сравнимую с эталонным образцом SEC-F (дорожка 15). Контрольный образец был очищен в соответствии с процессом поколения 1 (Gen 1) и примерно соответствует возрастающему пику пула элюата SEC. Промывка с высоким содержанием соли (дорожка 13) содержит сверхбольшие молекулы rVWF, что видно по мазку в верхней части полосы.

[00498] Мультимерные анализы проводили на 1% агарозных гелях по

стандартному протоколу. Приблизительно 50 нг rVWF наносили на дорожку и разделяли в невозстанавливающих условиях в присутствии мочевины. Разделенные полипептиды визуализировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием кроличьих антител к VWF человека (Dako) в качестве 1-го антитела (разведение 1:1000) и AP-конъюгированного козьего антитела к IgG кролика (Sigma) в качестве 2-го антитела (разведение 1:2000).

[00499] Сравнивая распределение мультимеров rVWF между прогонами UNO_S (Gen 2) и SEC (Gen 1), можно ясно увидеть эффект обратного разделения. В процедуре SEC сначала элюируются сверхбольшие и большие молекулы (пустой объем), затем целевые молекулы и пропептид. В Gen 2 порядок разделения прямо противоположный (от малого к большому). Однако оба способа привели к одинаковому распределению мультимера rVWF в пуле элюата. После этапа UNO_S требовалась операция UDF (концентрирования/диализа) для концентрирования целевой молекулы и переноса ее в буфер для композиции.

6.4 Аналитические результаты

[00500] Сводка аналитических результатов представлена на Фиг. 52-Фиг. 55. Каждая таблица показывает результаты одного конкретного аналитического анализа и содержит данные всех 5 прогонов, выполненных в ходе исследования. Сравнительный обзор результатов элюата также представлен на фиг. 56. Помимо процентного содержания rVWF: Ag и активности Risto Co выхода элюата, таблица содержит рассчитанные нормы, позволяющие напрямую сравнивать различные настройки прогона.

6.5 Соответствие аналитических данных критериям успеха

[00501] Целевые параметры элюата (фракции продукта), полученного на стадии работы модифицированного CAT (UNO_S), частично соответствуют выбранным спецификациям продукта BDS. Поскольку пул продукта CAT-E должен быть сконцентрирован и диализован для получения материала BDS, цели разработки (Фиг. 57) в основном представляют собой соотношения (рассчитанные), которые не зависят от абсолютных концентраций параметров.

[00502] Тот факт, что большинство целей разработки были достигнуты или почти достигнуты, демонстрирует осуществимость предложенной процедуры, описанной в данном документе. Были выполнены не все аналитические анализы, но ключевые результаты, такие как выход rVWF: Ag и Risto, удаление НСР СНО и пропептидных примесей, а также распределение мультимеров rVWF, демонстрируют сопоставимые характеристики предложенной новой процедуры CAT и ранее применявшейся комбинации UNO_S/SEC.

7. Обсуждение

[00503] В ходе данного исследования было выполнено пять прогонов UNO_S для изучения процедуры CAT 2-го поколения. Результаты оптимизированного (последнего) запуска показывают разделение мультимеров rVWF с высокой и низкой молекулярной массой, а также удаление пропептидов rVWF и примесей СНО-НСР из целевого белка, что

сопоставимо с результатами, достигнутыми с процедурой Gen 1 (например, UNO_S в режиме пошагового элюирования+стадия SEC). Введенная стадия промывки с проводимостью около 24 мСм/см (36% элюирующий буфер В) с последующей стадией градиентного элюирования до около 50 мСм/см (100% элюирующий буфер В) привела к пулу элюата CAT, сопоставимого по качеству с ранее полученный пул Gen 1 SEC F. Хотя может использоваться дополнительная стадия UDF для концентрирования и диализа элюата CAT, описанная в данном документе процедура CAT Gen 2 показывает большой потенциал для замены стадий работы UDF и SEC, применяемых в последующем процессе Gen 1 для получения материала BDS.

Пример 13: Оценка мультимеров DF3338/042 и DF3362/023 вестерн-блота к VWF

[00504] Mat-rVWF, полученный этим способом, анализировали на мультимерное содержание. К преимуществам методов спуска катионов (СЕХ) относятся:

Сокращение количества операций - 1 СЕХ заменяет 3 операции текущего процесса.

Удаление пропептида r-vWF и удаление белков клетки-хозяина аналогично стадии аффинности.

При включении SD-обработки «на колонне» на катионном обменнике 4 операции включаются в одну стадию.

Включая SD-обработки «на колонке» и созревание фурина на катионном обменнике 5 операций включаются в одну стадию.

Сниженное напряжение сдвига, что снижает риск образования тромботической rVWF (из-за меньшего количества операций, фильтрации и значительного сокращения времени удержания).

[00505] Для этого анализа проводили вестерн-блоттинг. Изображения вестерн-блот были импортированы в Corel Photo Paint Software и преобразованы в изображения с 16-битной шкалой серого. 16-битный формат серой шкалы является требованием для оценки. Оценка проводилась с помощью программного обеспечения Image Quant 1D.

[00506] Для упрощения оценки изображения были перевернуты по вертикали (номера дорожек остались прежними):

Полосы 1-6=низкая молекулярная масса

Полосы 7-12=средняя молекулярная масса

Полосы >12=высокая молекулярная масса

[00507] Денситометрическая оценка мультимеров vWF продукта, полученного из усовершенствованного СЕХ, как описано в данном документе, по сравнению с продуктом, полученным в процессе с 3 операциями.

Таблица 11: Результаты денситометрической оценки.

	Контрольный показатель	VW_USS_0 4 E	VW_USS_0 5 E
% с низкой ММ СУММ полос 1-6	40,86	34,91	38,39

% со средней ММ СУММ полос 7-12	40,27	39	36,87
% с высокой ММ СУММ полос > 12	18,87	26,08	24,74

[00508] Необработанные данные, демонстрирующие процентное содержание мультимера, представлены на Фиг. 61-63.

Пример 14: Вариант процесса очистки vWF

I. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[00509] Пропептид r-vWF является связанной с продуктом примесью продукта r-VWF, полученного из клеток CHO. Линия продуцирующих клеток генерирует r-VWF, который содержит около 60% pro-r-vWF. Пропептид r-VWF присоединен к полипептиду r-vWF ковалентно пептидной амидной связью и дополнительно нековалентно двухвалентными катионами. Ковалентная пептидная амидная связь расщепляется инкубацией *in vitro* с рфурином. Однако отщепленный пропептид r-VWF остается прикрепленным к молекуле VWF, и в этом примере описан способ разделения этих двух полипептидов. Было обнаружено, что комплекс rVWF/rVWF_PP стабилизирован двухвалентными катионами и низким рН. Применяя хелатор двухвалентных катионов или высокий рН в сочетании с надлежащим методом разделения, две молекулы могут быть разделены с высокой эффективностью и надежным образом. Поскольку было обнаружено, что хелатирующий агент, низкие концентрации ЭДТК или цитрата эффективны, а рН больше или равный рН 7 также считается эффективным при нанесении на катионообменную смолу в качестве процедуры промывки или при эксклюзионной хроматографии при нанесении в буфер для разделения. Тот же принцип должен применяться ко всем технологиям разделения, включая ионный обмен или разделение по размерам с помощью смол или мембранной технологии. В текущем производственном процессе для rVWF этап SEC выполняется с текущим буфером, содержащим цитрат, для поддержки разделения rVWF и rVWF-PP.

1. Описание примера области применения - VW_USS_07

1. Удаление пропептида r-vWF
2. Пример альтернативной обработки «SD_VI на колонке»
3. Создание комплекса rFVIII/r-vWF «на колонке»
4. Предварительный состав на колонке во время элюирования комплекса rFVIII/r-vWF в альтернативной буферной системе для состава

Детали процесса:

[00510] После стадии моноклонального антитела для захвата рекомбинантного фактора VIII проточный буфер, содержащий r- vWF, загружают на анионный обменник Fractogel TMAE. r-vWF на анионном обменнике и созревает с фурином в присутствии кальция. r-vWF элюировали из анионного обменника с увеличением проводимости. Элюат TMAE фильтровали через фильтровальную установку Mustang Q (Mustang Q, номер детали Pall XT5000MSTGQP1) для удаления CHO-ДНК и примесей, которые связываются с мембраной фильтра. Продукт, содержащий MUQ_проточный буфер, обрабатывали путем разведения 1:2 [60 mM цитрата натрия, рН 7,6] до проводимости 21,9 мСм/см и рН

7,16. Выбирают высокую проводимость, чтобы гарантировать удаление г-vWF пропептида и г-vWF с низкой молекулярной массой, чтобы использовать способность смолы для желаемого г-vWF с высокой молекулярной массой. Обработанный загрузочный раствор загружали на катионообменную среду UNOsphere TM S (Bio Rad, кат. №: 156-0115) с внутренним диаметром=10 мм, высотой слоя 8,8 см, объемом 6,91 мл со скоростью потока 100 см/ч с последующей первой промывкой. (Повторное уравнивание) 2CV с [30 mM Na-цитрат, 180 mM NaCl, pH 7,5] для удаления прочно связанных НСР и пропептида г-vWF.

[00511] Потенциальную «обработку на колонке» (WSD) проводили с [30 mM Na-цитрата, 180 mM NaCl, pH 7,5, содержащего 25 г/кг смеси 18,0 г полисорбата 80, 3,5 г диметилсульфоксида ДМСО, 3,5 г ТпВР] в 12 колонке. Объемы и время контакта составляло около 1 часа для инактивации вирусов в липидной оболочке. Компоненты «обработки на колонке» промывали промывкой 2 в 10 объемах колонки [30 mM Na-цитрат, 180 mM NaCl, pH 7,5]. Применяя промывку 3, буфер заменяли с буферной системы цитрата натрия на систему глицин/таурин, применяя [50 mM глицин, 10 mM таурин, 10% сахарозы, 0,1% полисорбат 80, pH 5,5] в 4 объемах колонки. На этапе «FVIII-Соп» рекомбинантный человеческий фактор свертывания крови VIII, полученный в процессе ADVATE, загружали на связанный г-vWF в 10 объемах колонки.

[00512] Буфер FVIII-Соп состоит из [1,57 г гFVIII S2 ADV S17B010901B2, разведенного в 218,67 г 50 mM глицина, 10 mM таурина, 5% (мас./мас.) сахарозы, 5% (мас./мас.) D-маннита, 0,1% полисорбата. 80, 2 mM CaCl₂, 150 mM NaCl и pH 7,4]. Промывка 4 применялась для вымывания несвязавшегося гFVIII и для приготовления буферной матрицы для предварительного препарата путем нанесения 5 объемов колонки [50 mM глицина, 10 mM таурина, 5% (мас./мас.) сахарозы, 5% (мас./мас.) D-маннит, 0,1% полисорбата 80, 2 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, pH 7,4]. И г-vWF, и гFVIII элюировали [50 mM глицина, 10 mM таурина, 5% (мас./мас.) сахарозы, 5% (мас./мас.) D-маннита, 0,1% полисорбата 80, 2 mM CaCl₂, 600 mM NaCl, pH 7,4± 0,2] из колонки с образованием элюата. Элюат разбавляли для доведения содержания хлорида натрия до приблизительно 150 mM NaCl [50 mM глицина, 10 mM таурина, 5% (мас./мас.) сахарозы, 5% (мас./мас.) D-маннита, 0,1% полисорбата 80, 2 mM CaCl₂, pH 7,4].

Последовательность процесса:

[00513] Последовательность ключевых стадий этого примера состоит из следующих стадий (см. также нижнюю часть Фиг. 67 для схемы хроматографии.)

1. Захват Mab FVIII (FT - это фракция, содержащая г-vWF)
2. Фрактогель захват ТМАЕ+созревание
3. Mustang Q в режиме FT
4. СЕХ, как описано (VW_USS_07)

Результат:

[00514] Эксперимент успешно проведен во всех 4 точках:

1. Удаление пропептида г-vWF-произошло - во время стадий промывки 1, WSD

(промыть с растворителем-детергентом, англ.: (W)ash with (S)olvent (D)etergent) и Wash 2 (см. Фиг. 67, 68 и 69).

2. Пример альтернативной обработки «SD_VI на колонке» на стадии WSD.
3. Создание комплекса rFVIII/r-vWF «на колонке» - стадия FVIII-Con.
4. Предварительный состав на колонке во время элюирования комплекса rFVIII/r-vWF в альтернативной буферной системе для состава (см., Фиг. 66, последний ряд).

Пример 15: Вариант процесса очистки vWF - тестирование на сиамирование

I. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[00515] Пропептид r-vWF является связанной с продуктом примесью продукта r-VWF, полученного из клеток CHO. Линия продуцирующих клеток генерирует r-VWF, который содержит около 60% rго-r-vWF. Пропептид r-vWF присоединен к полипептиду r-VWF ковалентно пептидной амидной связью и дополнительно нековалентно двухвалентными катионами. Ковалентная пептидная амидная связь расщепляется инкубацией *in vitro* с рфурином. Однако отщепленный пропептид r-VWF остается прикрепленным к молекуле VWF, и в этом примере описан способ разделения этих двух полипептидов. В данном примере представлен альтернативный вариант осуществления для отделения пропептида r-vWF от полипептида r-VWF после расщепления фурином для тестирования дополнительного сиамирования. Дополнительные детали и результаты процесса очистки изображены на Фиг. 70-73 и 78.

1. № эксперимента: VW_USS_06

1. Удаление пропептида r-vWF

2. Осуществление дополнительного 2,6-сиамирования на колонке с r-vWF

2. № эксперимента: VW_USS_06

[00516] После стадии моноклонального антитела для захвата рекомбинантного фактора VIII проточный буфер, содержащий r- vWF, загружают на анионный обменник Fractogel TMAE. r-vWF на анионном обменнике и созревает с фурином в присутствии кальция. r-vWF элюировали из анионного обменника с увеличением проводимости. Элюат TMAE фильтровали через фильтровальную установку Mustang Q (Mustang Q, номер детали Pall XT5000MSTGQP1) для удаления CHO-ДНК и примесей, которые связываются с мембраной фильтра. Продукт, содержащий MUQ проточный буфер, обрабатывали путем разведения 1:2 [60 mM цитрата натрия, pH 7,6] до проводимости 18,39 мСм/см и pH 7,33. Выбирают высокую проводимость, чтобы гарантировать удаление r-vWF пропептида и r-vWF с низкой молекулярной массой, чтобы использовать способность смолы для желаемого r-vWF с высокой молекулярной массой. Обработанный загрузочный раствор загружали на катионообменную среду UNOsphere™ S (Bio Rad, кат. №: 156-0115) с внутренним диаметром=10 мм, высотой слоя 8,8 см, объемом 6,91 мл со скоростью потока 100 см/ч с последующей первой промывкой. (Повторное уравнивание) 2CV с [30 mM Na-цитрат, 180 mM NaCl, pH 7,5] для удаления прочно связанных НСР и пропептида r-vWF. Для введения дополнительного 2,6-сиамирования смесь 50% (об./об.) раствора CMP-NANA на основе [30 mM Na-цитрата, 180 mM NaCl, pH 7,5] и 50% (об./об.) альфа 2,6-

сиалилтрансферазы на основе на [30 мМ Na-цитрат, 180 мМ NaCl, pH 7,5] наносили на колонку в 10 объемах колонки и при скорости потока 25 см/ч путем непрерывного перемешивания. Состав раствора CMP-NANA: 11 мг CMP_NANA C8271-25 мг номер партии: SLBV 7777, растворенные в 154,29 г [30 мМ Na-цитрат, 180 мМ NaCl, pH 7,5]. В состав буфера для альфа-2,6-сиалилтрансферазы входила альфа-2,6-сиалилтрансфераза S2076-1UN SIGMA, номер партии SLBV0552 из *Photobacterium damsela*, растворенный в 1 мл очищенной воды - 0,5 г растворенной альфа-2,6-сиалилтрансферазы разбавляли 152,10 г [30 мМ Na-цитрат, 180 мМ NaCl, pH 7,5]. Для удаления избытка CMP_NANA и альфа-2,6-сиалилтрансферазы применяли дополнительную промывку 2 объемами колонки [30 мМ Na-цитрат, 180 мМ NaCl, pH 7,5]. Замена буфера обеспечивалась нанесением 4 объемов колонки [50 мМ HEPES, 150 мМ NaCl pH 6,0]. Элюирование проводили [50 мМ HEPES, 500 мМ NaCl, pH 7,5] в 4 объемах колонки.

3. ПОЛНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ОЧИСТКИ VW_USS_06

[00517] Последовательность ключевых стадий этого примера состоит из следующих стадий:

1. Захват Mab FVIII (FT - это фракция, содержащая r-vWF)
2. Фрактогель захват TMAE+созревание
3. Mustang Q в режиме FT
4. CEX, как описано (VW_USS_06)

Результат:

[00518] Дополнительного 2,6-сиалилирования при использовании способа в данном примере не обнаружено. Однако было обнаружено 2,3-сиалирование, которое является обычной схемой сиалирования для r-vWF.

Пример 16: Вариант процесса очистки vWF - тестирование на сиалирование

I. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[00519] Пропептид r-vWF является связанной с продуктом примесью продукта r-VWF, полученного из клеток CHO. Линия продуцирующих клеток генерирует r-VWF, который содержит около 60% rго-r-vWF. Пропептид r-vWF присоединен к полипептиду r-VWF ковалентно пептидной амидной связью и дополнительно нековалентно двухвалентными катионами. Ковалентная пептидная амидная связь расщепляется инкубацией *in vitro* с рфурином. Однако отщепленный пропептид r-VWF остается прикрепленным к молекуле VWF, и в этом примере описан способ разделения этих двух полипептидов. В данном примере представлен альтернативный вариант осуществления для отделения пропептида r-vWF от полипептида r-VWF после расщепления фурином для тестирования дополнительного сиалирования. Дополнительные детали и результаты процесса очистки изображены на Фиг. 74-78.

1. № эксперимента: VW_USS_08

1. Удаление пропептида r-vWF

2. Осуществление дополнительного 2,6-сиалирования на колонке с r-vWF

2. № эксперимента: VW_USS_08 E

[00520] После стадии моноклонального антитела для захвата рекомбинантного фактора VIII проточный буфер, содержащий γ -vWF, загружают на анионный обменник Fractogel TMAE. γ -vWF на анионном обменнике и созревает с фурином в присутствии кальция. γ -vWF элюировали из анионного обменника с увеличением проводимости. Элюат TMAE фильтровали через фильтровальную установку Mustang Q (Mustang Q, номер детали Pall XT5000MSTGQP1) для удаления СНО-ДНК и примесей, которые связываются с мембраной фильтра. Продукт, содержащий MUQ проточный буфер, обрабатывали путем разведения 1:2 [60 мМ цитрата натрия, pH 7,6] до проводимости 19,97 мСм/см и pH 7,33. Выбирают высокую проводимость, чтобы гарантировать удаление γ -vWF пропептида и γ -vWF с низкой молекулярной массой, чтобы использовать способность смолы для желаемого γ -vWF с высокой молекулярной массой. Обработанный загрузочный раствор загружали на катионообменную среду UNOsphere™ S (Bio Rad, кат. №: 156-0115) с внутренним диаметром=10 мм, высотой слоя 8,8 см, объемом 6,91 мл со скоростью потока 100 см/ч с последующей первой промывкой. (Повторное уравнивание) 2CV с [30 мМ Na-цитрат, 180 мМ NaCl, pH 7,5] для удаления прочно связанных НСР и пропептида γ -vWF. Для введения дополнительного 2,6-сиалирования смесь 50% (об./об.) раствора CMP-NANA на основе [30 мМ Na-цитрата, 180 мМ NaCl, pH 7,5] и 50% (об./об.) альфа 2,6-сиалилтрансферазы на основе на [30 мМ Na-цитрат, 180 мМ NaCl, pH 7,5] наносили на колонку в 10 объемах колонки и при скорости потока 25 см/ч путем непрерывного перемешивания. Состав раствора CMP-NANA представлял собой 14 мг CMP_NANA C8271-25 мг № партии SLBV 7777, растворенный в 121,57 г [30 мМ Na-цитрат, 180 мМ NaCl, pH 7,5]. В состав буфера для альфа-2,6-сиалилтрансферазы входила альфа-2,6-сиалилтрансфераза S2076-1UN SIGMA, номер партии SLBV0552 из Photobacterium damsela растворяли в 121,10 г [30 мМ Na-цитрат, 180 мМ NaCl, pH 7,5]. Для удаления избытка CMP_NANA и альфа-2,6-сиалилтрансферазы применяли дополнительную промывку 2 объемами колонки [30 мМ Na-цитрат, 180 мМ NaCl, pH 7,5]. Замена буфера обеспечивалась нанесением 4 объемов колонки [50 мМ HEPES, 150 мМ NaCl pH 6,0]. Элюирование проводили [50 мМ HEPES, 500 мМ NaCl, pH 7,5] в 4 объемах колонки.

3. ПОЛНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ОЧИСТКИ VW_USS_08

[00521] Последовательность ключевых стадий этого примера состоит из следующих стадий:

1. Захват Mab FVIII (FT - это фракция, содержащая γ -vWF)
2. Фрактогель захват TMAE+созревание
3. Mustang Q в режиме FT
4. СЕХ, как описано (VW_USS_08)

Результат:

[00522] Дополнительного 2,6-сиалилирования, используя способ, в данном примере не обнаружено. Однако было обнаружено 2,3-сиалирование, которое является обычной схемой сиалирования для γ -vWF.

[00523] Приведенные выше примеры предоставлены для того, чтобы предоставить

специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как создавать и использовать варианты осуществления композиций, систем и способов по изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением. Модификации вышеописанных способов осуществления изобретения, которые очевидны специалистам в данной области техники, входят в объем нижеприведенной формулы изобретения. Все патенты и публикации, упомянутые в описании, указывают на уровень квалификации специалистов в области техники, к которой относится изобретение. Все ссылки, процитированные в данном описании, включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая ссылка была включена посредством ссылки полностью индивидуально.

[00524] Все заголовки и обозначения разделов используются только для ясности и справочных целей и никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие. Например, специалисты в данной области техники оценят полезность объединения различных аспектов из разных заголовков и разделов в соответствии с сущностью и объемом изобретения, описанного в данном документе.

[00525] Все ссылки, процитированные в данном документе, тем самым включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка была специально и индивидуально указаны для включения в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей.

[00526] Многие модификации и вариации данной заявки могут быть выполнены без отклонения от ее сущности и объема, как будет очевидно специалистам в данной области техники. Конкретные варианты осуществления и примеры, описанные в данном документе, предлагаются только в качестве примера, и приложение должно быть ограничено только условиями прилагаемой формулы изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, которые ею охвачены.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения композиции, содержащей высокоочищенный зрелый лишенный пропептида рекомбинантный rVWF (mat-rVWF), причем указанный способ включает стадии:

обеспечение раствора, содержащего комплекс mat-rVWF/ rVWF-PP, mat-rVWF и пропептид rVWF (rVWF-PP);

индуцирование диссоциации указанного комплекса mat-rVWF/ rVWF-PP в указанном растворе на а) на mat-rVWF и rVWF-PP, причем указанная диссоциация происходит путем разрушения нековалентно связанных mat-rVWF и rVWF-PP, при этом указанная диссоциация индуцируется путем:

добавление по меньшей мере одного хелатирующего агента, или

увеличение pH до pH, равного по меньшей мере 7; и

сбор указанного mat-rVWF для получения композиции высокоочищенного mat-rVWF, при этом указанная композиция высокоочищенного mat-rVWF содержит по меньшей мере 95% зрелого rVWF и менее 5% rVWF-PP.

2. Способ по п. 1, в котором композиция высокоочищенного mat-rVWF содержит по меньшей мере 96% mat-rVWF и менее 4% rVWF-PP, по меньшей мере 97% mat-rVWF и менее 3% rVWF-PP, по меньшей мере 98% mat-rVWF и менее 2% rVWF-PP, по меньшей мере 99% mat-rVWF и менее 1% rVWF-PP или по меньшей мере 99,5% mat-rVWF и менее 0,5% rVWF-PP, или 99,9% mat-rVWF и менее 0,1% rVWF-PP.

3. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный раствор выбирают из группы, состоящей из среды для культивирования клеток, проточного раствора колонки с антителами и забуференного раствора.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный раствор обрабатывали фурином перед стадией а).

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный раствор представляет собой проточный раствор колонки с антителами.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный по меньшей мере один хелатирующий агент представляет собой хелатирующий агент с двухвалентным катионом.

7. Способ по п. 6, в котором указанный хелатирующий агент с двухвалентным катионом выбирают из группы, состоящей из ЭДТК, ЭГТК, ЦДТК и цитрата.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный pH увеличивают до по меньшей мере 7,1; 7,2; 7,3; 7,4; 7,5; 7,6; 7,7; 7,8; 7,9; 8,0; 8,1; 8,2; 8,3; 8,4; 8,5; 8,6; 8,7; 8,8; 8,9 или 9,0.

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный pH увеличивают от по меньшей мере около 7,2 до около 7,8.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный pH увеличивают до по меньшей мере около 7,6.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный рН увеличивают путем добавления основных аминокислот, трис, NaOH, трицина или этаноламина.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором сбор на стадии b) по п. 1 включает один или более методов разделения белка.

13. Способ по п. 12, в котором указанные один или более методов разделения белков выбирают из группы, состоящей из ионообменной хроматографии (ИЕС), эксклюзионной хроматографии (SEC), разделения по размеру с помощью мембранной технологии и аффинной хроматографии.

14. Способ по п. 13, в котором указанный метод разделения белков представляет собой эксклюзионную хроматографию (SEC).

15. Способ по п. 13, в котором указанными одним или более способами разделения белков является ионообменная хроматография (ИЕС).

16. Способ по п. 15, в котором указанная ионообменная хроматография (ИЕС) представляет собой катионообменную хроматографию.

17. Способ по п. 15, в котором указанная ионообменная хроматография (ИЕС) представляет собой комбинацию анионообменной хроматографии и катионообменной хроматографии.

18. Способ по п. 12, в котором указанные один или более методов разделения белков включают буферную систему, при этом указанная буферная система содержит один или более буферов.

19. Способ по п. 18, в котором указанные один или более буферов включают промывочные буферы, причем указанные один или более промывочных буферов включают один, два, три, четыре и/или пять промывочных буферов, причем когда указанные один или более буферов включают пять промывочных буферов, первый, второй, третий и/или пятый промывочные буферы имеют больший рН, чем четвертый промывочный буфер, и когда указанные один или более буферов включают четыре промывочных буфера, первый, второй и/или четвертый промывочные буферы имеют рН больший, чем у третьего промывочного буфера.

20. Способ по п. 19, который дополнительно включает стадию обработки для инактивации вирусов после первого промывочного буфера, и, необязательно, рН на стадии обработки для инактивации вирусов является большим, чем рН указанного третьего и/или четвертого промывочного буфера.

21. Способ по п. 18, в котором указанные один или более буферов содержат указанные один или более хелатирующих агентов.

22. Способ по п. 18, в котором указанные один или более буферов имеют рН по меньшей мере 7.

23. Способ по п. 12, в котором указанные один или более методов разделения белков включают буферную систему, при этом указанная буферная система содержит один или более загрузочных буферов.;

24. Способ по п. 23, в котором указанные один или более загрузочных буферов содержат указанные один или более хелатирующих агентов.

25. Способ по пп. 23 или 24, в котором указанные один или более загрузочных буферов имеют рН по меньшей мере 7.

26. Способ по п. 12, в котором указанные один или более методов разделения белков включают буферную систему, при этом указанная буферная система содержит один или более загрузочных, промывочных и/или элюирующих буферов.

27. Способ по п. 26, в котором указанные один или более загрузочных, промывочных и/или элюирующих буферов содержат указанные один или более хелатирующих агентов.

28. Способ по пп. 26 или 27, в котором указанные один или более загрузочных, промывочных и/или элюирующих буферов имеют рН по меньшей мере 7.

29. Способ по любому из пп. 26-28, в котором указанные один или более загрузочных, промывочных и/или элюирующих буферов содержат указанные один или более хелатирующих агентов, и имеют рН по меньшей мере 7.

30. Способ по любому из пп. 18-29, в котором указанную буферную систему выбирают из группы, состоящей из глицина NEPES (4-(2- гидроксиптил)-1- пиперазинэтансульфоновая кислота), трис-HCl (трис(гидроксиметил)- аминометан), гистидина, имидазола, цитрата ацетата, MES и 2-(N- морфолино) этансульфоновой кислоты.

31. Способ по любому из пп. 18-30, в котором указанный буфер дополнительно содержит один или более одновалентных катионов.

32. Способ по п. 31, в котором указанные один или более одновалентных катионов выбирают из группы, состоящей из Na⁺, K⁺, Li⁺ и Cs⁺.

33. Способ по п. 31, в котором указанный одновалентный катион представляет собой Na⁺.

34. Способ по любому из пп. 18-33, в котором указанный буфер дополнительно содержит один или более одновалентных, двухвалентных и/или трехвалентных анионов.

35. Способ по п. 34, в котором указанные один или более одновалентных, двухвалентных и/или трехвалентных анионов выбирают из группы, состоящей из Cl⁻, ацетата⁻, SO₄²⁻, Br⁻ и цитрата³⁻.

36. Способ по любому из пп. 18-35, в котором указанная буферная система содержит по меньшей мере один буфер, имеющий проводимость $\geq 0,5$ мСм/см при 25 °С.

37. Способ по любому из пп. 18-36, в котором указанная буферная система содержит по меньшей мере один буфер, имеющий проводимость $15,0 \pm 0,2$ мСм/см при 25 °С.

38. Способ по любому из пп. 18-37, в котором указанный буфер дополнительно содержит один или более неионных детергентов.

39. Способ по п. 38, в котором указанный неионный детергент выбирают из группы, состоящей из Triton X 100, Tween 80 и Tween 20.

40. Способ по любому из пп. 18-39, в котором указанный буфер дополнительно содержит одно или более дополнительных веществ, выбранных из группы, состоящей из невосстанавливающих сахаров, сахарных спиртов и полиолов.

41. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанная композиция высокоочищенного mat-rVWF содержит уровень примесей клетки-хозяина (НС) $\leq 2,0\%$.

42. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанная композиция высокоочищенного mat-rVWF содержит уровень примесей клетки-хозяина (НС) $\leq 0,6\%$.

43. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный раствор, содержащий комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и rVWF-PP, получают на стадии захвата для rVWF.

44. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный раствор, содержащий комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и rVWF-PP, получен способом, включающим стадию иммуноаффинности FVIII и стадию анионообменной хроматографии.

45. Способ получения композиции, содержащей высокоочищенный зрелый лишенный пропептида рекомбинантный rVWF (высокоочищенный mat-rVWF), указанный способ включает стадии:

загрузка раствора, содержащего pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP, mat-rVWF и/или пропептид rVWF (rVWF-PP), на анионообменную колонку, при этом указанные pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF связываются с указанной анионообменной колонкой;

промывание указанной анионообменной колонки на а), содержащей указанный связанный pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF, одним или более промывочными буферами;

обработка указанной колонки на б), содержащей связанный pro-rVWF, комплекс mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF, фурином, при этом указанный фурин расщепляет указанный pro-rVWF на mat-rVWF и rVWF-PP;

элюирование указанного связанного pro-rVWF, комплекса mat-rVWF/rVWF-PP и mat-rVWF из колонки на с) элюирующим буфером, при этом указанный элюирующий буфер индуцирует диссоциацию указанного rVWF-PP из mat-rVWF, нековалентно связанного с указанным rVWF-PP, и при этом указанная диссоциация индуцируется путем:

добавления по меньшей мере одного хелатирующего агента в указанный элюирующий буфер, или

увеличения pH указанного элюирующего буфера до pH, равного по меньшей мере 7; и

сбор указанного mat-rVWF отдельно от указанного rVWF-PP для получения композиции высокоочищенного mat-rVWF, при этом указанная композиция

высокоочищенного mat-rVWF содержит по меньшей мере 95% зрелого rVWF и менее 5% rVWF-PP.

46. Способ по п. 45, в котором указанные один или более буферов включают промывочные буферы, причем указанные один или более промывочных буферов включают один, два, три, четыре и/или пять промывочных буферов, причем когда указанные один или более буферов включают пять промывочных буферов, первый, второй, третий и/или пятый промывочные буферы имеют больший рН, чем четвертый промывочный буфер, и когда указанные один или более буферов включают четыре промывочных буфера, первый, второй и/или четвертый промывочные буферы имеют рН больший, чем у третьего промывочного буфера.

47. Способ по п. 46, который дополнительно включает стадию обработки для инактивации вирусов после первого промывочного буфера, и, необязательно, рН на стадии обработки для инактивации вирусов является большим, чем рН указанного третьего и/или четвертого промывочного буфера.

48. Способ по любому из пп. 45-47, в котором а) и б) осуществляют одновременно на одной стадии.

49. Способ по любому из пп. 45-48, в котором указанный раствор на а) включает проточный раствор из колонки с моноклональным антителом, причем указанное моноклональное антитело представляет собой моноклональное антитело FVIII.

50. Способ по любому из пп. 45-49, в котором указанный раствор на а) выбирают из группы, состоящей из среды для культивирования клеток, проточного раствора колонки с антителами и забуференного раствора.

51. Способ по любому из пп. 45-50, в котором указанный по меньшей мере один хелатирующий агент представляет собой хелатирующий агент с двухвалентным катионом.

52. Способ по п. 51, в котором указанный хелатирующий агент с двухвалентным катионом выбирают из группы, состоящей из ЭДТК, ЭГТК, ЦДТК и цитрата.

53. Способ по любому из пп. 45-52, в котором указанный рН увеличивают до по меньшей мере 7,1; 7,2; 7,3; 7,4; 7,5; 7,6; 7,7; 7,8; 7,9 или 8,0.

54. Способ по любому из пп. 45-53, в котором указанный рН увеличивают от по меньшей мере около 7,2 до около 7,8.

55. Способ по любому из пп. 45-54, в котором указанный рН увеличивают до по меньшей мере около 7,6.

56. Способ по любому из пп. 45-55, в котором указанный рН увеличивают путем добавления основных аминокислот.

57. Способ по любому из пп. 45-55, в котором указанные один или более промывочных буферов на б) содержат указанные один или более хелатирующих агентов.

58. Способ по любому из пп. 45-55, в котором указанные один или более промывочных буферов на б) имеют рН по меньшей мере 7.

59. Способ по любому из пп. 45-55, в котором указанные один или более промывочных буферов на b) содержат указанные один или более хелатирующих агентов, и имеют pH по меньшей мере 7.

60. Способ по любому из пп. 45-55, в котором указанный способ дополнительно включает стадию вирусной инактивации, при этом указанная вирусная инактивация происходит до, после или одновременно со стадией промывки и/или стадией элюирования, но перед стадией сбора.

61. Способ по п. 60, в котором указанная обработка для инактивации вирусов инактивирует вирусы с липидной оболочкой.

62. Способ по пп. 60 или 61, в котором указанная обработка для инактивации вирусов представляет собой обработку S/D.

63. Способ по любому из пп. 45-62, в котором указанные один или более буферов содержат буфер, выбранный из группы, состоящей из глицина NEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), трис-HCl (трис(гидроксиметил)-аминометан), гистидина, имидазола, цитрата ацетата, MES и 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты.

64. Способ по любому из пп. 45-63, в котором указанные один или более буферов дополнительно содержат один или более одновалентных катионов.

65. Способ по п. 64, в котором указанные один или более одновалентных катионов выбирают из группы, состоящей из Na⁺, K⁺, Li⁺ и Cs⁺.

66. Способ по п. 65, в котором указанный одновалентный катион представляет собой Na⁺.

67. Способ по любому из пп. 45-66, в котором указанные один или более буферов дополнительно содержат один или более одновалентных, двухвалентных и/или трехвалентных анионов.

68. Способ по п. 67, в котором указанные один или более одновалентных, двухвалентных и/или трехвалентных анионов выбирают из группы, состоящей из Cl⁻, ацетата⁻, SO₄²⁻, Br⁻ и цитрата³⁻.

69. Способ по любому из пп. 45-68, в котором указанные один или более буферов содержат по меньшей мере один буфер, имеющий проводимость $\geq 0,5$ мСм/см при 25 °С.

70. Способ по любому из пп. 45-69, в котором указанные один или более буферов содержат по меньшей мере один буфер, имеющий проводимость $15,0 \pm 0,2$ мСм/см при 25 °С.

71. Способ по любому из пп. 45-70 в котором указанные один или более буферов дополнительно содержат один или более неионных детергентов.

72. Способ по п. 71, в котором указанный неионный детергент выбирают из группы, состоящей из Triton X 100, Tween 80 и Tween 20.

73. Способ по любому из пп. 45-72, в котором указанные один или более буферов дополнительно содержат одно или более дополнительных веществ, выбранных из группы, состоящей из невосстанавливающих сахаров, сахарных спиртов и полиолов.

74. Способ по любому из пп. 45-73, в котором указанная композиция высокоочищенного mat-rVWF содержит уровень примесей клетки-хозяина (НС) $\leq 2,0\%$.

75. Способ по любому из пп. 45-74, в котором указанная композиция высокоочищенного mat-rVWF содержит уровень примесей клетки-хозяина (НС) $\leq 0,6\%$.

76. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором указанную композицию высокоочищенного mat-rVWF используют для производства фармацевтической композиции.

77. Фармацевтическая композиция, содержащая высокоочищенный mat-rVWF, полученный способом по любому из предшествующих пунктов, и фармацевтически приемлемый буфер.

78. Фармацевтическая композиция по п. 77, содержащая 50 мМ глицина, 10 мМ таурина, 5% (мас./мас.) сахарозы, 5% (мас./мас.) D-маннита, 0,1% полисорбата 80, 2 мМ CaCl_2 , 150 мМ NaCl , при этом указанная композиция имеет рН около рН 7,4.

По доверенности

Пример 1: vWF_P_UNOS_67 (DF2265/003)

Хроматограмма

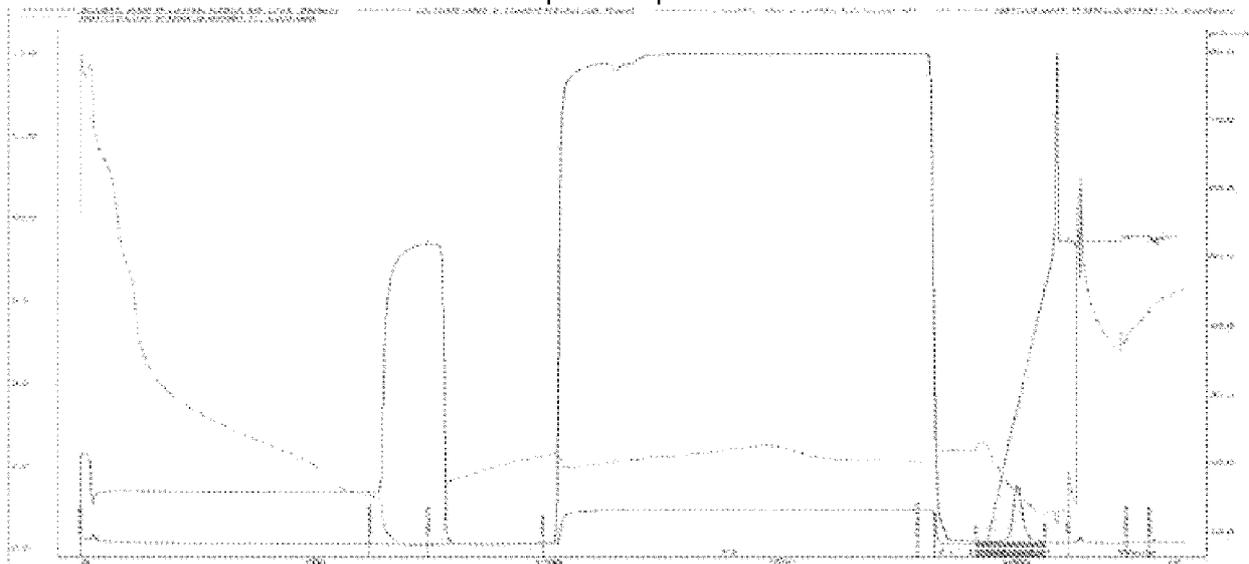


Схема хроматографии

	СТАДИЯ	БУФЕР	Ввод	Количество ОК	Направление потока:	Направление потока	Вывод	Фракции
A.	Предварительная загрузка (TQA)	TQA	A11	25ОК	100	Нисходящий	F1	СБРОС
B.	Активация смолы	SCB	B1	5ОК	100	Нисходящий	F1	СБРОС
1.	Уравновешивание	SCA	A13	10ОК	100	Нисходящий	F1	СБРОС
2.	Загрузка образца	ЗАГРУЗКА	A2	800 мл [мл]	100	Нисходящий	F3	ABS
3.	Переуравновешивание	SCA	A13	5ОК	100	Нисходящий	F4	Промывание
4.	ЭЛЮИРОВАНИЕ	Градиент от SCA до 100 % SCB	A13-B1 (100 %)	6 ОК	65	Нисходящий	F2	Фракции F2
5.	Полоса	TWA	A15	2ОК	65	Нисходящий	F5	НЭ
6.	Восстановление 1 М NaOH	1 М NaOH	A16	5ОК	65	Восходящий поток	F1	СБРОС
7.	Восстановление 1М HAc	1М HAc	A17	2ОК	65	Восходящий поток	F1	СБРОС
8.	Восстановление 0,1 М NaOH	0,1 М NaOH	A18	3ОК	65	Восходящий поток	F1	СБРОС

БУФЕР

SCA: Буфер для уравновешивания на основе цитрата натрия: 10 мМ NaCl, 30 мМ цитрата Na, pH: 7,6 ± 0,2

SCB: Буфер для элюирования на основе цитрата натрия: 500 мМ NaCl, 30 мМ цитрата Na, pH: 7,6 ± 0,2

SCD: Буфер для разведения на основе цитрата натрия: 60 мМ цитрат Na, pH: 7,6 ± 0,2

Буфер для оборудования TQA (TQB 1:3, разбавленный очищенной водой): 10 мМ Трис, 100 мМ ацетата Na, 85 мМ NaCl.

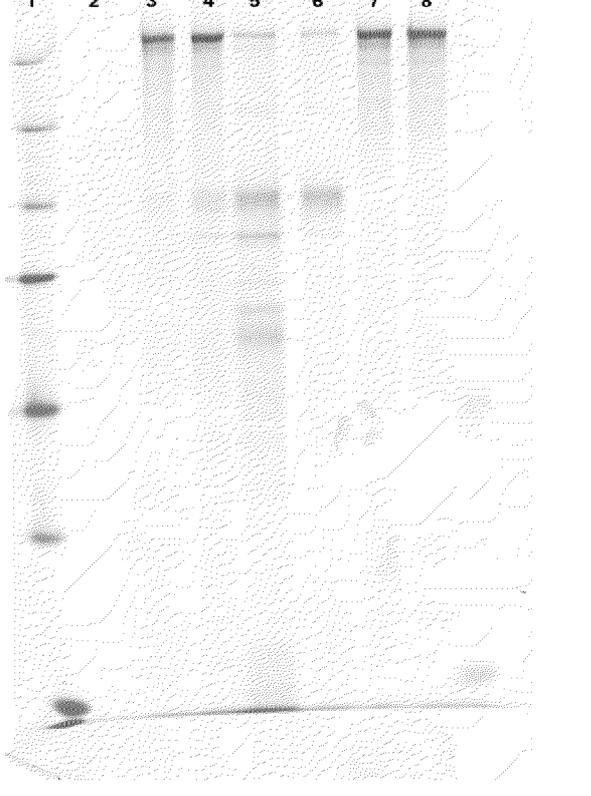
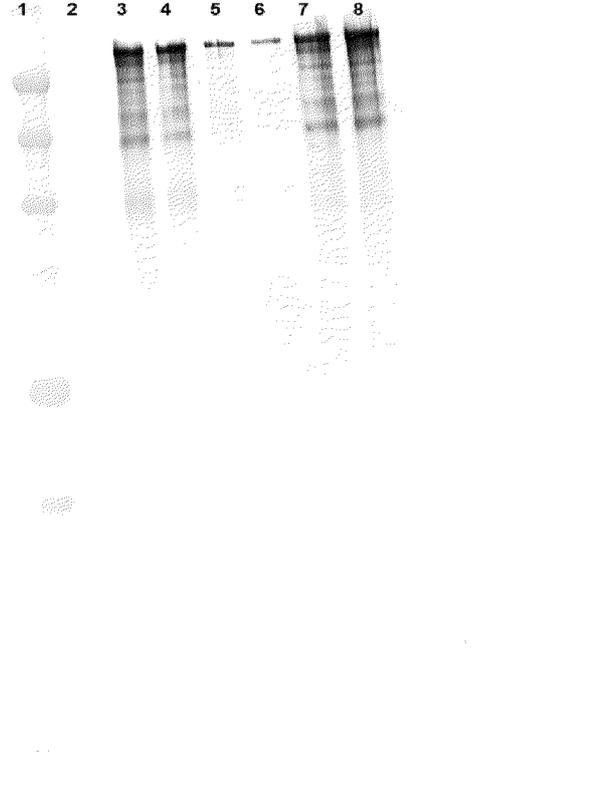
2/92

ФИГ. 2

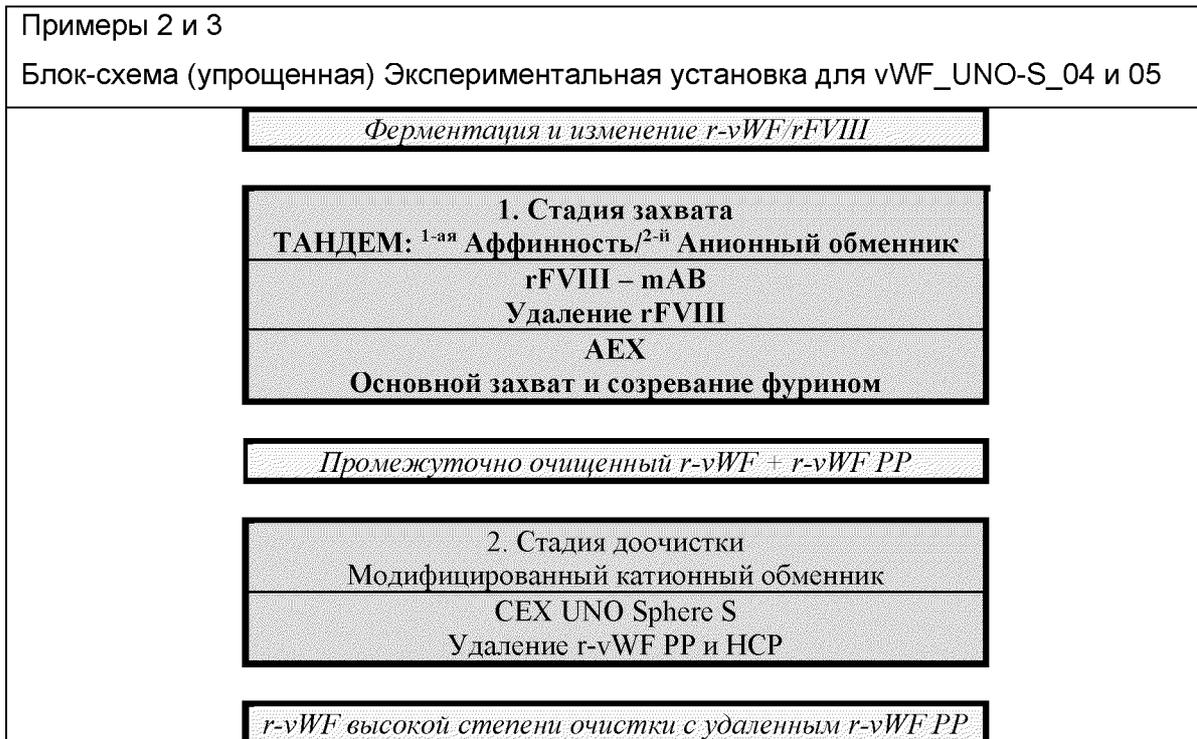
ПРОДУКТ

		ИФА vWF AG SOP. OR-13-00127				vWF Risto SOP. OR13-00407 (Стандарт HN02)			
Код образца	Кол-во	Конц.	Всего	Всего	Загр. вых.	Risto	Всего	Спец. акт.	Загр. вых.
	[г]	[мкг/мл]	[мкг]	[ед]	[%]	[ед/мл]	[ед]	[ед Risto/ед Ag]	[%]
Загрузка	817,10	77	62916,70	6291,67	100,0%	2,55	2083,61	0,33	100%
Пул элюата	58,17	211,5	12302,96	1230,30	19,6%	15,6	907,45	0,74	43,6%

		ИФА CHO AG SOP: OR-13-00497				ИФА пропептид vWF AG SOP: OR-13-00405		
Код образца	Кол-во	CHO-НСР	Всего	Чистота	Продукт	Конц	Всего	Продукт
	[г]	[мкг/мл]	[мкг]	[мкг/1000 ед Risto]	[%]	[мкг/мл]	[мкг]	[%]
Загрузка	817,10	1,70	1391,223	667,7	100,0%	12,098	9885,28	100%
Пул элюата	58,17	0,38	22,317	24,6	1,60%	0,071	4,13	0,04%

vWF_P_UNOS_67 (DF2265/003) Окрашивание серебром	vWF_P_UNOS_67 (DF2265/003) Вестерн-блоттинг
	
<p>1. маркер молекулярной массы 2. Холостая проба 3.vWF_P_UNOS_01 элюат - эталон 4.vWF_P_UNOS_67 ЗАГРУЗКА 5.vWF_P_UNOS_67 Проточный буфер 6.vWF_P_UNOS_67 ПРОМЫВОЧНЫЙ БУФЕР 7.vWF_P_UNOS_67 элюат 1 8.vWF_P_UNOS_67 элюат 2</p>	<p>1. Маркер молекулярной массы (Точный и двухцветный) 2. холостая проба 3.vWF_P_UNOS_01 элюат - эталон 4.vWF_P_UNOS_67 ЗАГРУЗКА 5.vWF_P_UNOS_67 Проточный буфер 6.vWF_P_UNOS_67 ПРОМЫВОЧНЫЙ БУФЕР 7.vWF_P_UNOS_67 элюат 1 8.vWF_P_UNOS_67 элюат 2</p>
<p>8 % Полиакриламидный гель Инкубация SB + DTT 5 мин/100 °С. 10-минутное охлаждение, обработка йодуксусным амидом SDS-PAGE: №: 2260/021</p>	<p>8 % Полиакриламидный гель Инкубация SB + DTT 5 мин/100 °С. 10-минутное охлаждение, обработка йодуксусным амидом Блокирующий агент: 3 % обезжиренное молоко в TBS+Tween 1-е антитело: Антитело кролика к vWF DAKO кат. № A0082 2-е антитело: IgG козы к антителу кролика (H+L) (AP конъюгат) SIGMA кат. № A8025 SDS-PAGE: №: 2260/021</p>

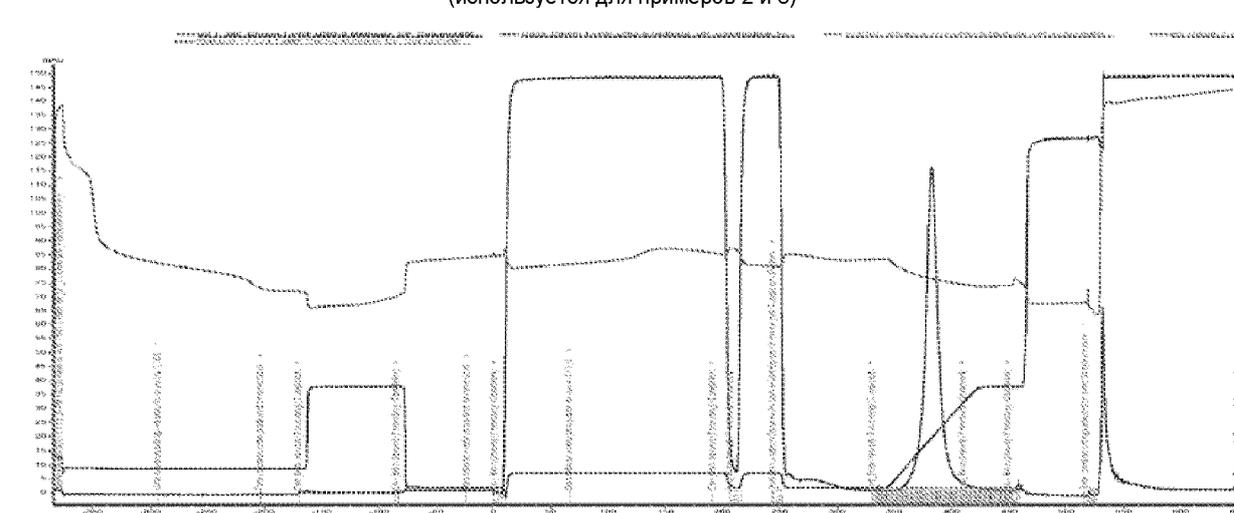
ФИГ. 4



Пример 2: vWF_UNO-S_UPO_04

ХРОМАТОГРАММА

Схема хроматографии
(используется для примеров 2 и 3)

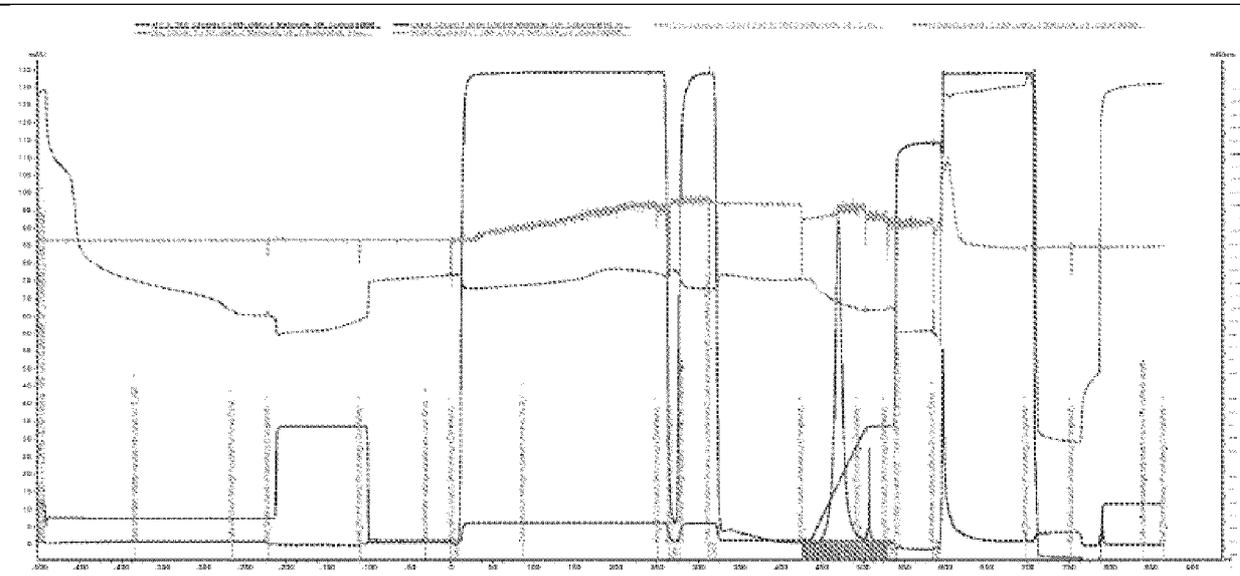


	СТАДИЯ	БУФЕР	ВВОД	Количество ОК	СКОРОСТЬ ПОТОКА см/ч	ПОТОК ПОТОКА	ВЫВОД	ФРАКЦИЯ
A.	Предварительная загрузка (TQA)	TQA	A1	250К	100	Нисходящий	СБРОС	СБРОС
B.	Активация смолы	SCB	B1	100К	100	Нисходящий	СБРОС	СБРОС
1.	Уравновешивание	SCA	A3	100К	100	Нисходящий	СБРОС	СБРОС
2.	Загрузка образца	ЗАГРУЗКА	S1	295± 5 мл	100	Нисходящий	F3	F1
3.	Переуравновешивание	SCA	A3	100К	100	Нисходящий	F4	Промывание
4.	ЭЛЮИРОВАНИЕ	Градиент От SCA до 100 % SCB	От A3 до	60К	65	Нисходящий	F2	Фракция сборщик
5.	ПОЛОСА	TWA	A4	50К	65	Нисходящий	F5	НЭ
6.	Восстановление 1 М NaOH	1 М NaOH	A5	100К	65	Восходящий ПОТОК	СБРОС	СБРОС
7.	Восстановление 1М HAc	1М HAc	A6	50К	65	Восходящий ПОТОК	СБРОС	СБРОС
8.	Восстановление 0,1 М NaOH	0,1 М NaOH	A7	100К	65	Восходящий ПОТОК	СБРОС	СБРОС

ФИГ. 6

БУФЕР								
Буфер для разведения на основе цитрата Na 10 мМ цитрат натрия рН: 7,574 при 22,7 °С С: 2,56 мСм/см при 22,6 °С парт.: Reag_RCF_14/047, 08.07.2014 Срок годности: 08,07,2015			Буфер ТWA 2 М NaCl рН: 6,452 при 21,9 °С С: 158,6 мСм/см при 21,8 °С парт.: Reag_RCF_14/052, 08.07.2014 Срок годности: 08,07,2015					
Уравновешивающий буфер на основе цитрата Na 10 мМ NaCl, 30 мМ цитрата Na, 2 мМ лимонная кислота рН: 7,559 при 22,9 °С С: 7,71 мСм/см при 22,9 °С парт.: Reag_RCF_14/046, 08.07.2014 Срок годности: 08,07,2015			1 М NaOH парт.: ORMPSHD14504 Срок годности: 31,08,2014					
Буфер для элюирования на основе цитрата Na 500 мМ NaCl, 30 мМ цитрата Na рН: 7,593 при 21,9 °С С: 51,0 мСм/см при 21,8 °С парт.: Reag_RCF_14/048, 08.07.2014 Срок годности: 08,07,2015			1М HAc парт.: ORMPEsb14501 Срок годности: 20,07,2014					
Буфер TQA (TQB разбавлен очищенной водой 1:3): 10 мМ трис, 100 мМ ацетата Na, 85 мМ NaCl рН: 6,547 при 22,5 °С С: 15,84 мСм/см при 22,4 °С парт.: Reag_RCF_14/051,09.07.2014 Срок годности: 08,07,2015			0,1 М NaOH парт.: Reag_RCF_14/049 Срок годности: 09,07,2015					
ПРОДУКТ								
		ИФА vWF AG SOP: OR-13-00127				vWF Risto SOP: OR13-00407		
Код образца	Кол-во	Конц.	Всего	Всего	Загр. вых.	Risto	Всего	Спец. акт.
	[г]	[мкг/мл]	[мкг]	[ед]	[%]	[ед/мл]	[ед]	[ед Risto/ед Ag]
Загрузка	296,36	51	14966,18	1496,62	100,0%			
Пул элюата	16,00	514,0	8224,00	822,40	55,0%	23,7	378,56	0,46
		ИФА CHO AG SOP: OR-13-00497				ИФА пропептид vWF AG SOP: OR-13-00405		
Код образца	Кол-во	CHO-НСР	Всего	Чистота	Продукт	Конц.	Всего	Продукт
	[г]	[мкг/мл]	[мкг]	[мкг/1000 ед Risto]	[%]	[мкг/мл]	[мкг]	[%]
Загрузка	296,36	5,28	1563,406		100,0%	13,039	3864,12	100%
Пул элюата	16,00	1,33	21,200	56,003	1,36%	0,564	9,02	0,23%

Пример 2: vWF_UNO-S_UPO_05



Хроматограмма

Пример 3: vWF UNO-S UPO 05

ПРОДУКТ

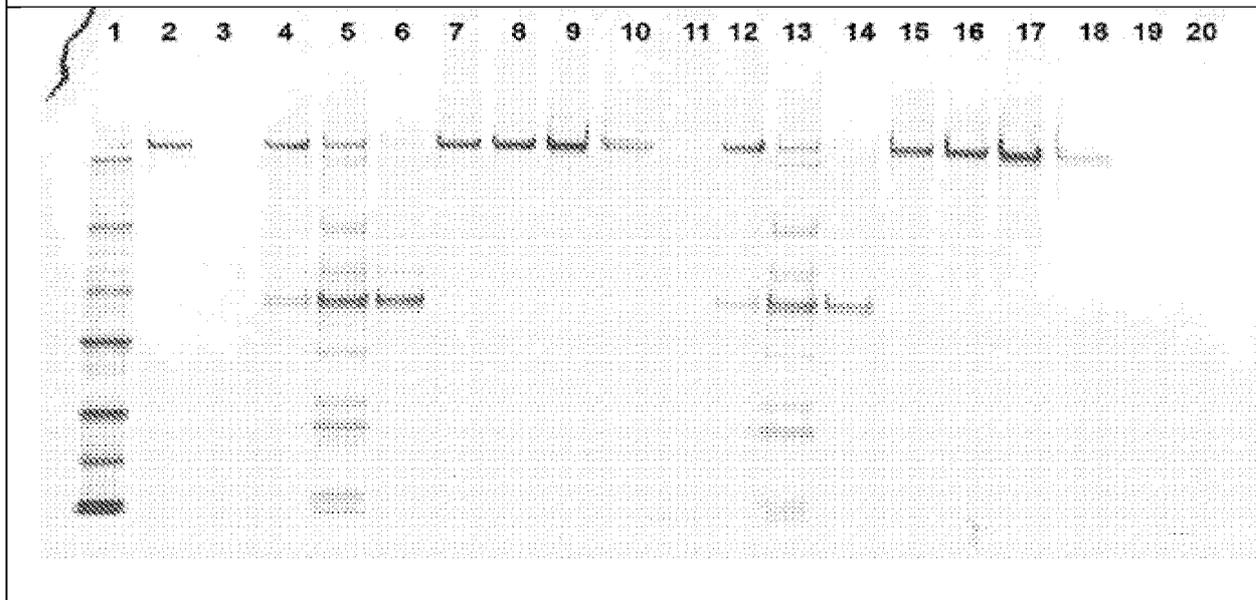
		ИФА vWF AG SOP. OR-13-00127				vWF Risto SOP. OR13-00407		
Код образца	Кол-во	Конц.	Всего	Всего	Загр. вых.	Risto	Всего	Спец. акт.
	[г]	[мкг/мл]	[мкг]	[ед]	[%]	[ед/мл]	[ед]	[ед Risto/ед Ag]
Загрузка	302,31	39	11790,09	1179,01	100,0%			
Элюат 2	16,00	443,0	7088,00	708,80	60,1%	19,7	314,72	0,44

		ИФА CHO AG SOP: OR-13-00497				ИФА пропептид vWF AG SOP: OR-13-00405		
Код образца	Кол-во	CHO	Всего	Чистота	Продукт	Конц	Всего	Продукт
	[г]	[мкг/мл]	[мкг]	[мкг/1000 ед Risto]	[%]	[мкг/мл]	[мкг]	[%]
Загрузка	302,31	2,76	834,339		100,0%	8,801	2660,69	100%
Элюат 2	16,00	0,75	12,075	38,367	1,45%	0,416	6,65	0,25%

ФИГ. 8

Пример 2+3: vWF_UNO-S_UPO_04 + vWF_UNO-S_UPO_05

Окрашивание серебром



1. маркер молекулярной массы
2. Эталон HN02R01
3. холостая проба
- 4.vWF_UNOS_UPO_04_LOAD
- 5.vWF_UNOS_UPO_04_ABS
- 6.vWF_UNOS_UPO_04_WASH
- 7.vWF_UNOS_UPO_04_ELUAT1
- 8.vWF_UNOS_UPO_04_ELUAT2
- 9.vWF_UNOS_UPO_04_ELUAT3
- 10.vWF_UNOS_UPO_04_NE
11. Холостая проба
- 12.vWF_UNOS_UPO_05_LOAD
- 13.vWF_UNOS_UPO_05_ABS
- 14.vWF_UNOS_UPO_05_WASH
- 15.vWF_UNOS_UPO_05_ELUAT1
- 16.vWF_UNOS_UPO_05_ELUAT2
- 17.vWF_UNOS_UPO_05_ELUAT3
- 18.vWF_UNOS_UPO_05_NE
19. Холостая проба
20. Холостая проба

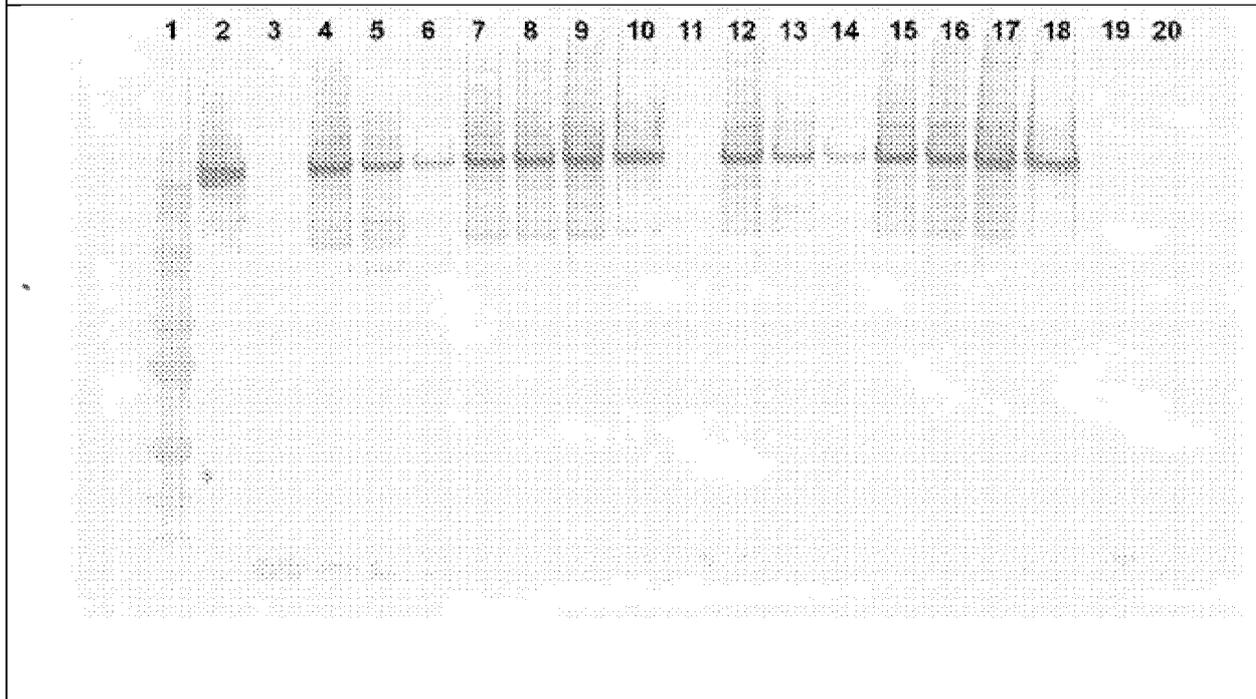
NuPAGE 3-8 % Трисацетатный миди-гель (20 лунок) (Invitrogen, кат. №: WG1602BOX)

Обработка образца буфером для образцов LDS (Invitrogen, кат. № NP0007) 1 час/37 °С, блокировка йодацетамидом
SDS-PAGE: №: 2721/010

ФИГ. 9

Пример 2+3 : vWF_UNO-S_UPO_04 + vWF_UNO-S_UPO_05

Вестерн-блоттинг



1. маркер молекулярной массы
 2. Эталон HN02R01
 3. холостая проба
 - 4.vWF_UNOS_UPO_04_LOAD
 - 5.vWF_UNOS_UPO_04_ABS
 - 6.vWF_UNOS_UPO_04_WASH
 - 7.vWF_UNOS_UPO_04_ELUAT1
 - 8.vWF_UNOS_UPO_04_ELUAT2
 - 9.vWF_UNOS_UPO_04_ELUAT3
 - 10.vWF_UNOS_UPO_04_NE
 11. Холостая проба
 - 12.vWF_UNOS_UPO_05_LOAD
 - 13.vWF_UNOS_UPO_05_ABS
 - 14.vWF_UNOS_UPO_05_WASH
 - 15.vWF_UNOS_UPO_05_ELUAT1
 - 16.vWF_UNOS_UPO_05_ELUAT2
 - 17.vWF_UNOS_UPO_05_ELUAT3
 - 18.vWF_UNOS_UPO_05_NE
 19. Холостая проба
 20. Холостая проба
- SDS-PAGE: № :2721/009

NuPAGE 3-8 % Трисацетатный миди-гель (20 лунок)

Invitrogen, кат. №: WG1602BOX

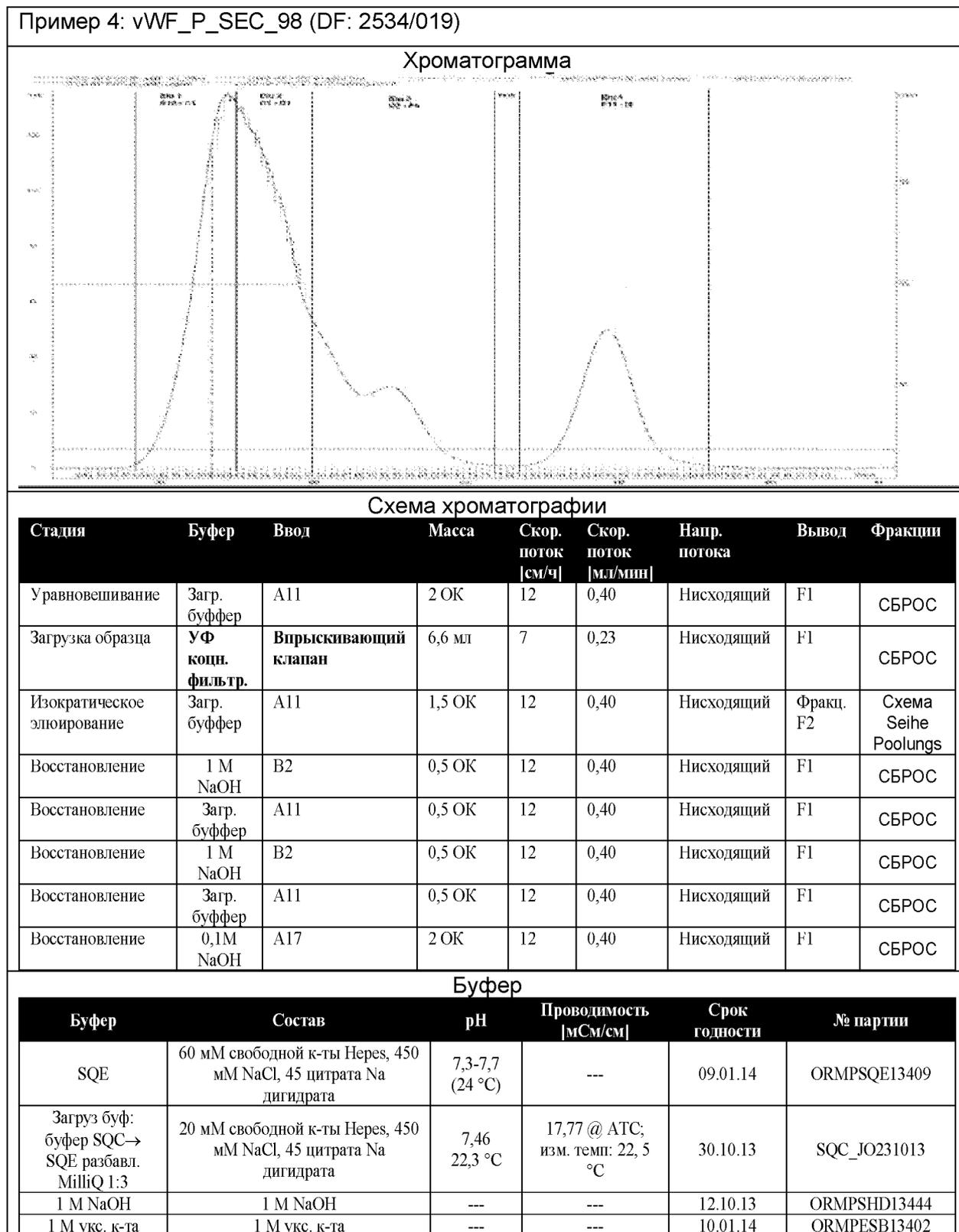
Обработка образца буфером для образцов LDS (Invitrogen, кат. № NP0007) 1 час/37 °С, блокировка йодацетамидом

1-е антитело Антитело кролика к vWF DAKO кат. № A0082

2-е антитело IgG козы к антителу кролика (H+L) (AP конъюгат) SIGMA кат. № A8025

SDS-PAGE: №: 2721/010

ФИГ. 10

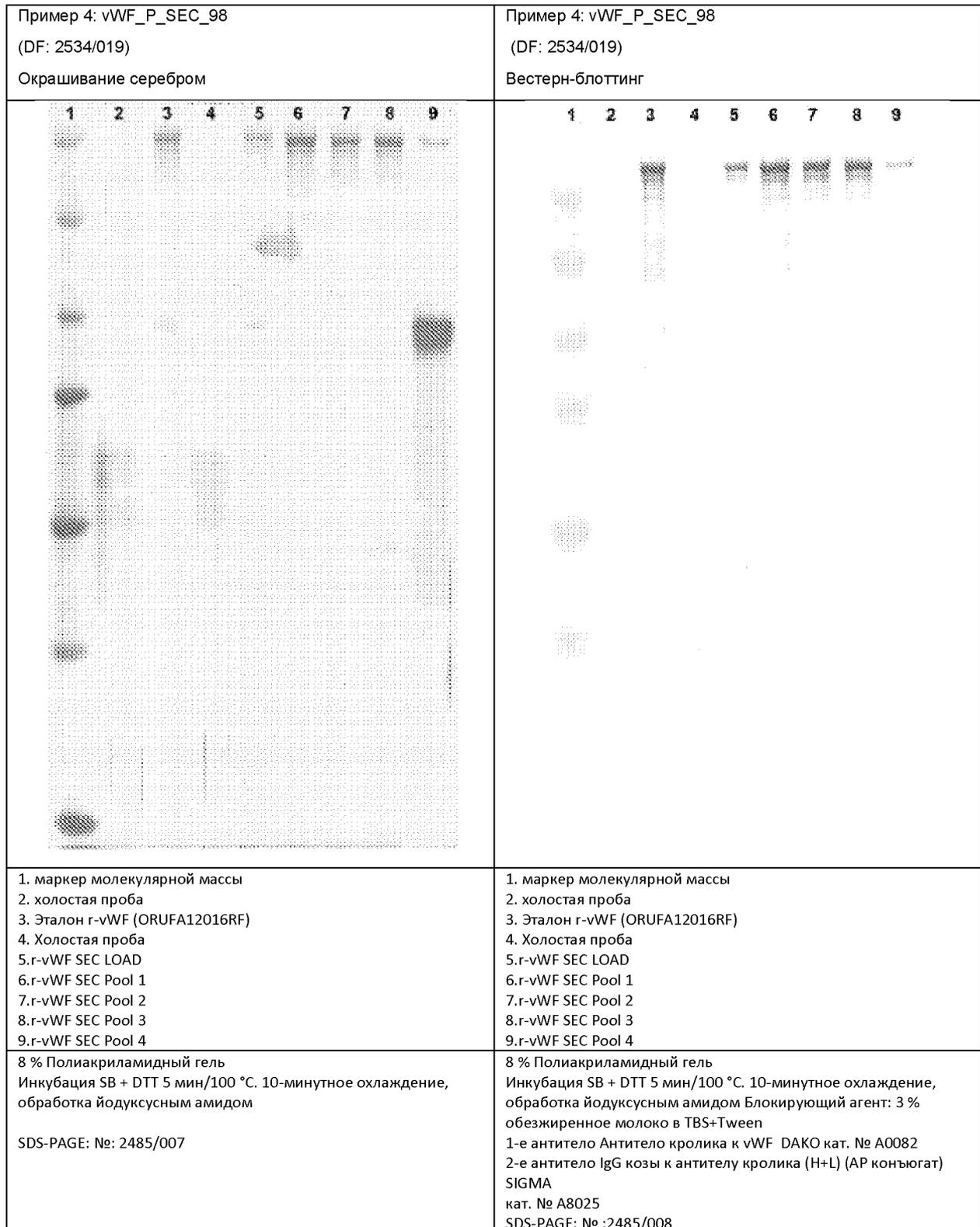


ФИГ. 11

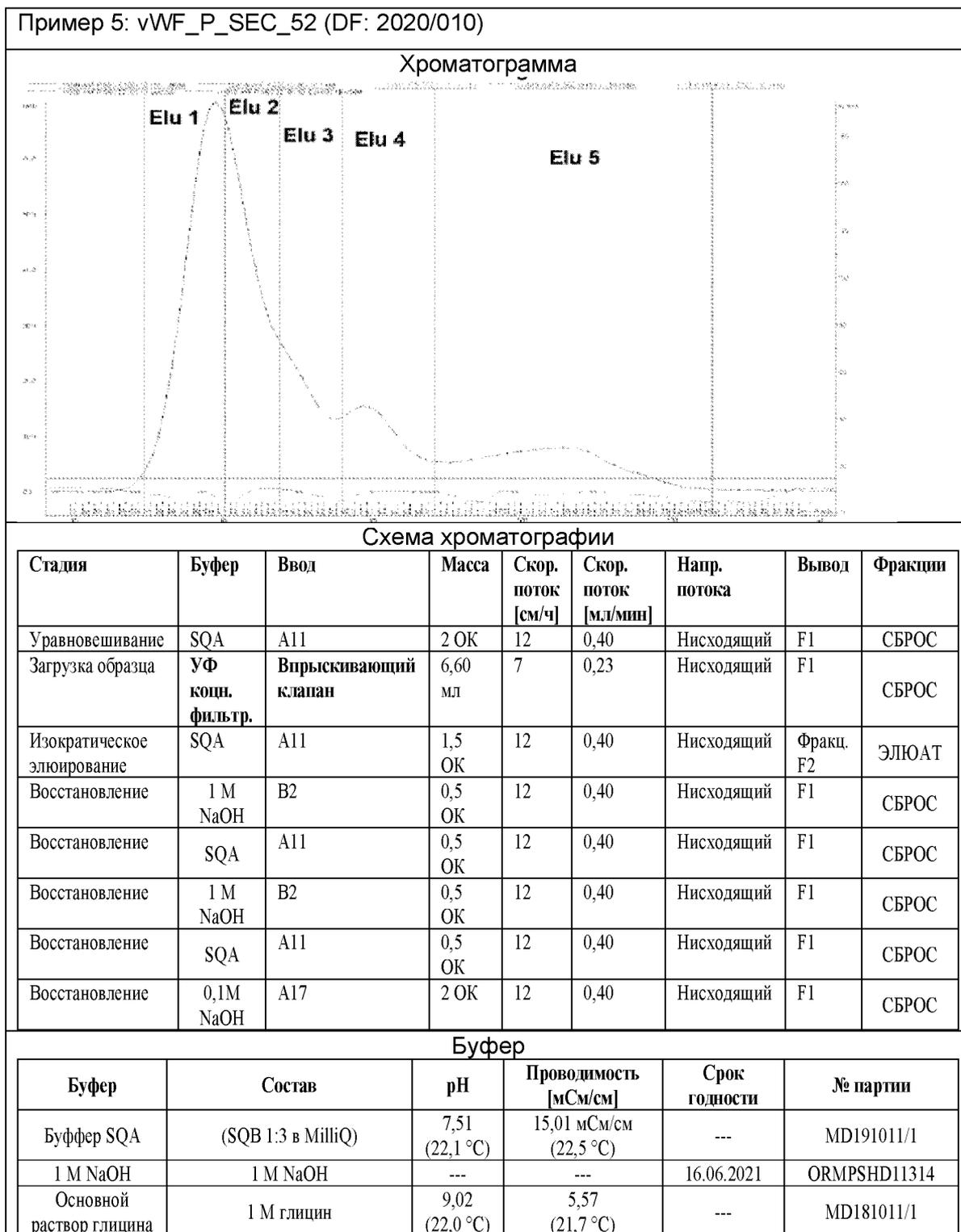
Пример 4: vWF_P_SEC_98 ПРОДУКТ									
Код образца	Кол-во [г]	vWF:AG SOP: OR-13-00127				vWF Risto (Стандарт SHP) SOP: OR-13-00407			
		Антиген [мкг/мл]	Всего [мкг]	Всего [ед]	Продукт [%]	RiCoF [ед/мл]	Всего [ед]	Спец. Акт. [ед Risto/ ед Ag]	Продукт [%]
ORUFA12016RF	6,60	2416,6667	15950,00	1595		136,499	901	0,56	
ЗАГРУЗКА	6,60	2350	15510	1551	100,0%	140,097	925	0,60	100%
ELU1 A10-C1	12,94	290	3752,6	375,26	24,2%	37,239	482	1,28	52,1%
ELU2 C2-D1	9,51	605	5753,55	575,355	37,1%	31,639	301	0,52	32,5%
ELU3 D2-F6	23,77	185	4397,45	439,745	28,4%	1,667	40	0,09	4,3%
ELU4 F11-I4	24,73	2,78	68,7494	6,87494	0,4%	<0,50	<12,365	<1,80	<1,3%

Код образца	Кол-во [г]	ИФА CHO AG SOP: OR-13-00497				ИФА пропептида vWF SOP: OR-13-00405				
		CHO [нг/мл]	Всего [нг]	Продукт [%]	Чистота [мкг/100 0 ед Risto]	Пропептид [мкг/мл]	Всего [мкг]	Продукт [%]	PP/vWF [мкг/мг vWF]	мкг/1000 ед Risto
ORUFA12016RF	6,60									
ЗАГРУЗКА	6,60	12753,46	84172,836	100%	91,03	288,380	1903,308	100%	122,715	2058,431
ELU1 A10-C1	12,94	40,301	521,495	0,62%	1,08	<0,03125	<0,404	<0,02%	<0,108	<0,839
ELU2 C2-D1	9,51	167,03	1588,4553	2%	5,28	0,04320	0,41	0,02%	0,07	1,365
ELU3 D2-F6	23,77	539,72	12829,1444	15%	321,84	0,04320	1,026864	0,05%	0,234	25,760
ELU4 F11-I4	24,73	229,608	5678,20584	7%	459,22	56,3060	1392,44738	73,16%	20253,957	112612,000

ФИГ. 12



ФИГ. 13



ФИГ. 14

ПРОДУКТ

		vWF:Ag SOP:OR-13-00127				vWF-Risto SOP:OR-13-00407				ИФА CHO AG SOP:OR-13-00497			
Код	Масса	Активнос ть	Всего	Всего	Продукт	Risto	Всего	Спец. Акт.	Проду кт	CHO	Всего	Продукт	
образца	[г]	[мкг/мл]	[мкг]	[Ед]	[%]	[ед/мл]	[ед]	[ед Risto/ ед Ag]	[%]	[нг/мл]	[нг]	[%]	[мкг/100 0 Ед Risto]
ЗАГРУЗКА_1 1002	6,60	1500	9900	990	100,0%	53,2	351	0,35	100,0 %	1411,4	9315,24	100%	26,53
ELU1 A12-C1	10,93	188	2054,8 4	205,48 4	20,8%	15,90	174	0,85	49,6 %	<31,25 0	<341,563	<3,7%	<1,97
ELU2 C2-C10	6,74	440	2965,6	296,56	30,0%	11,70	79	0,27	22,5 %	92,932	626,36168	7%	7,94
ELU3 C11-D8	7,85	184	1446,2 4	144,62 4	14,6%	1,36	11	0,08	3,1%	190,00 0	1493,4	16%	139,71
ELU4 D9-E12	12,60	87	1096,2	109,62	11,1%	0,25	3	0,03	0,9%	286,35 0	3608,01	39%	1145,40
ELU5 F1-I8	34,77	1,95	67,801 5	6,7801 5	0,7%	<0,19	<7	<1,03	<2,0 %	84,306	2931,3196 2	31%	443,72

Восстановлен
не

77,2%

78,1%

97%

		ИФА пропептида vWF SOP:OR-13-00405				ИФА Ag F8 SOP:OR-13-00408				
Код	Масса	Пропептид	Всего	Продукт		F8	Всего	Состав FVIII:Ag		
образца	[г]	[мкг/мл]	[мкг]	[%]	[мкг/мг vWF]	мкг/1000 Ед Risto	[нг/мл]	[нг]	мкг/1000 Ед Risto	мкг/мг vWF Ag
ЗАГРУЗКА 11002	6,60	187,264	125,9424	100%	124,843	3520,000				
ELU1 A12-C1	10,93	0,138	1,51	0,12%	0,73	8,679	180,60	1973,958	11,36	0,96
ELU2 C2-C10	6,74	2,768	18,66	1,51%	6,29	236,581	290,50	1957,970	24,83	0,66
ELU3 C11-D8	7,86	4,908	38,57688	3,12%	26,674	3608,824				
ELU4 D9-E12	12,60	10,628	133,9128	10,83%	122,161	45512,000				
ELU5 F1-I8	34,77	15,351	533,75427	43,19%	7872,308	80794,737				

Восстановление

59%

Отмеченное желтым: фракция, содержащая продукт / Отсутствие SDS-PAGE

ФИГ. 15

Пример 6: vWF_P_UNOS_02 (DF2202/014)

СЕХ без хелатора



Схема хроматографии

	СТАДИЯ	БУФЕР	Ввод	Количество ОК	Скорость потока см/ч	Направление потока	Вывод	Фракции
1.	Уравновешивание	TQA	A11	25 ОК	100	Нисходящий	F1	СБРОС
2.	Загрузка образца	ЗАГРУЗКА	A2	40000 [мл]	100	Нисходящий	F3	FT
3.	ПРОМЫВАНИЕ	TQA	A11	10 ОК	100	Нисходящий	F4	ПРОМЫВАНИЕ
4.	ЭЛЮИРОВАНИЕ	ТЭА	B1 (100%)	3,5 ОК	65	Нисходящий	F2	Сборщик фракций
5.	ПОЛОСА	TWA	A15	10 ОК	65	Нисходящий	F5	НЭ
6.	Восстановление 1 М NaOH	1 М NaOH	A16	5 ОК	65	Восходящий поток	F1	СБРОС
7.	Восстановление 1М HAc	1М HAc	A17	2 ОК	65	Восходящий поток	F1	СБРОС
8.	Восстановление 0,1 М NaOH	0,1М NaOH	A18	3 ОК	65	Восходящий поток	F1	СБРОС

БУФЕР

Буфер	pH	Проводимость [мСм/см]	партия №
Уравновешивающий буфер TQA	6,54 при 23,5 °С	15,18 мСм/см при АТС (23,5 °С)	TR010512/1
Буфер для элюирования ТЕА	7,44 при 22,5°С	50,30 мСм/см при АТС (22,3°С)	ORMPTEA12410

TQA = 10 мМ трис-HCl/100 мМ ацетата Na/85 мМ NaCl/pH 6,5 ±0,2

TEA = 100 мМ ацетата Na / 500 мМ NaCl /100 мМ глицина/ 3 мМ CaCl₂ /pH 7,5 ±0,2

ФИГ. 17

Пример 7: vWF_P_SEC_49 (DF: 2000/007)

Хроматограмма

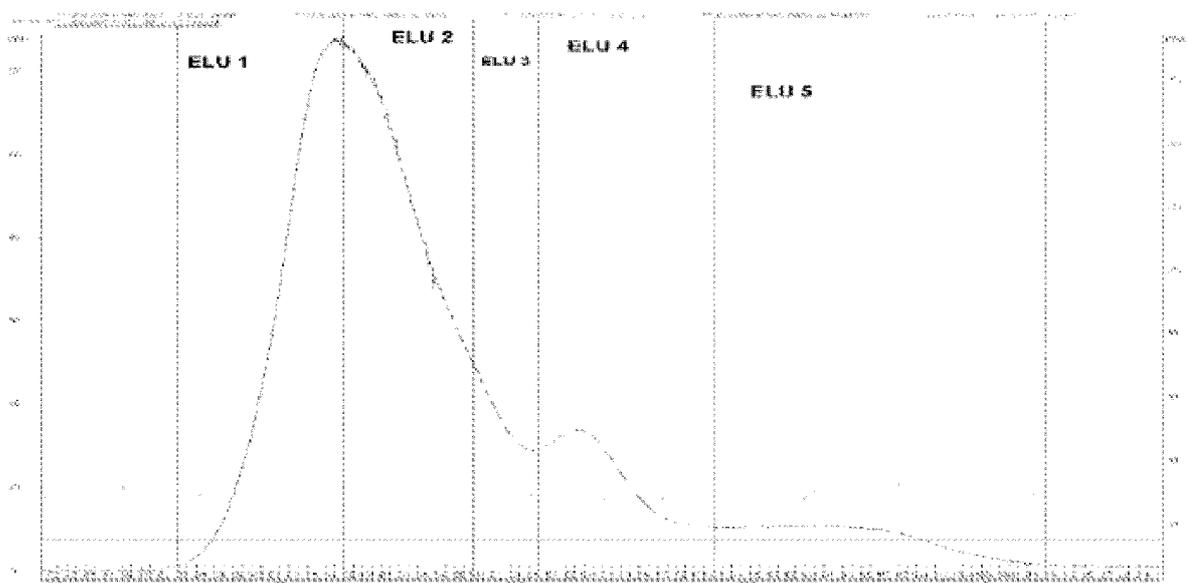


Схема хроматографии

СТАДИЯ	БУФЕР	Ввод	Количество	Скорость потока [см/ч]	Скорость потока [мл/мин]	Направление потока	Вывод	Фракции
Уравновешивание	SQA	A11	2 ОК	12	0,40	Нисходящий	F1	СБРОС
Загрузка образца	УФ коцн. фильтр.	Впрыскивающий клапан	6,60 мл	7	0,23	Нисходящий	F1	СБРОС
Изократическое элюирование	SQA	A11	1,5 ОК	12	0,40	Нисходящий	F2 фракц.	ЭЛЮАТ
Восстановление	1 M NaOH	B2	0,5 ОК	12	0,40	Нисходящий	F1	СБРОС
Восстановление	SQA	A11	0,5 ОК	12	0,40	Нисходящий	F1	СБРОС
Восстановление	1 M NaOH	B2	0,5 ОК	12	0,40	Нисходящий	F1	СБРОС
Восстановление	SQA	A11	0,5 ОК	12	0,40	Нисходящий	F1	СБРОС
Восстановление	0,1M NaOH	A17	2 ОК	12	0,40	Нисходящий	F1	СБРОС

Буфер

SQA : 20 mM HEPES / 150 mM NaCl / ph 7,5 (№: 1978/015 страница 3 от SQB)

18/92

Фиг. 18

Пример 7: vWF_P_SEC_49 (DF: 2000/007)

ПРОДУКТ

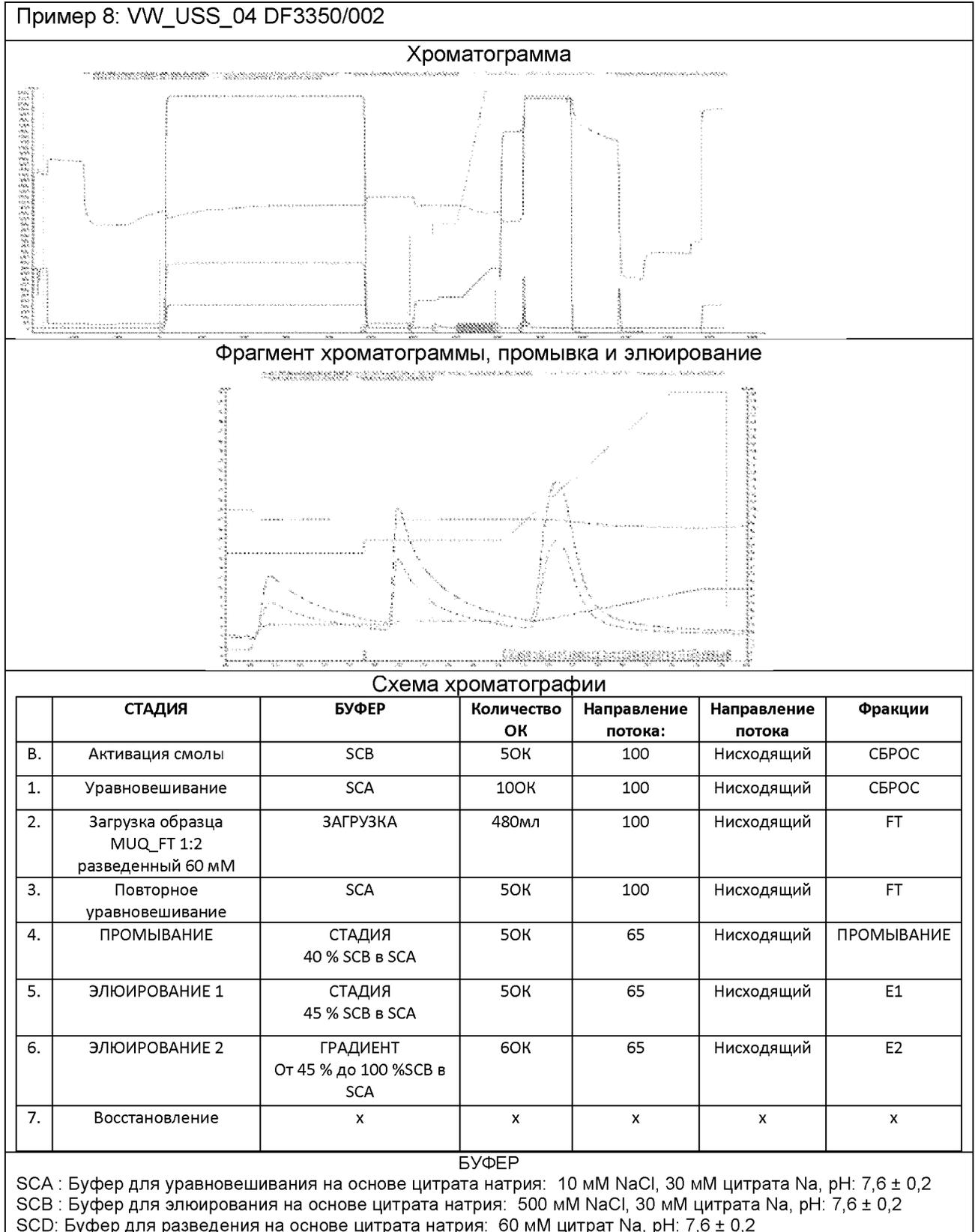
		vWF:Ag SOP:OR-13-00127				vWF-Risto SOP:OR-13-00407				ИФА CHO AG SOP:OR-13-00497			
Код	Масса	Активность	Всего	Всего	Продукт	Risto	Всего	Спец. Акт.	Продукт	CHO	Всего	Продукт	
образца	[г]	[мкг/мл]	[мкг]	[Ед]	[%]	[ед/мл]	[ед]	[ед Risto / ед Ag]	[%]	[нг/мл]	[нг]	[%]	[мкг/1000 Ед Risto]
ЗАГРУЗКА_11006	6,60	2810	18744	1874,4	100,0 %	123,2	813	0,43	100,0 %	11916,5	78648,9	100%	96,72
ELU1 B3-C8	12,82	274,00	3512,68	351,268	18,7%	24,70	317	0,90	39,0%	23,298	414,060	0,005 %	<1,308
ELU2 C9-D10	9,35	675,00	6311,25	631,125	33,7%	21,60	202	0,32	24,8%	329,186	3077,8891	4%	15,24
ELU3 D11-E5	5,09	316,00	1608,44	160,844	8,6%	2,17	11	0,07	1,4%	795,295	4048,05155	5%	366,50
ELU4 E6-F12	13,74	158,00	2170,92	217,092	11,6%	0,56	8	0,04	1,0%	847,336	11642,39664	15%	1513,10
ELU5 G1-I12	26,24	4,14	108,6336	10,86336	0,6%	<0,22	6	0,55	0,7%	319,454	8382,47296	11%	1452,06
Восстановление		73,2%				66,9%				36%			

		ИФА пропептида vWF SOP:OR-13-00405				ИФА Ag F8 SOP:OR-13-00408				
Код	Масса	Пропептид	Всего	Продукт		F8	Всего	Состав FVIII:Ag		
образца	[г]	[мкг/мл]	[мкг]	[%]	[мкг/мг vWF]	мкг/1000 Ед Risto	[нг/мл]	[нг]	мкг/1000 Ед Risto	мкг/мг vWF Ag
ЗАГРУЗКА_1106	6,60	354,793	2341,6338	100%	124,927	2879,813				
ELU1 B3-C8	12,82	0,457	5,86	0,25%	1,67	18,502	511,80	6561,276	20,71	1,87
ELU2 C9-D10	9,35	19,062	178,23	7,61%	28,24	882,500	923,20	8631,920	42,74	1,37
ELU3 D11-E5	5,09	21,875	11,34375	4,75%	69,225	10080,645				
ELU4 E6-F12	13,74	26,718	367,10532	15,68%	169,101	47710,714				
ELU5 G1-I12	26,24	19,564	513,35936	21,92%	4725,604	88927,273				
Восстановление		50%								

Отмеченное желтым: фракция, содержащая продукт / Отсутствие SDS-PAGE

Фракция, содержащая продукт из примера 7 имеет низкий Продукт продукта и материала, содержащего пропептид vWF

ФИГ. 19



ФИГ. 20

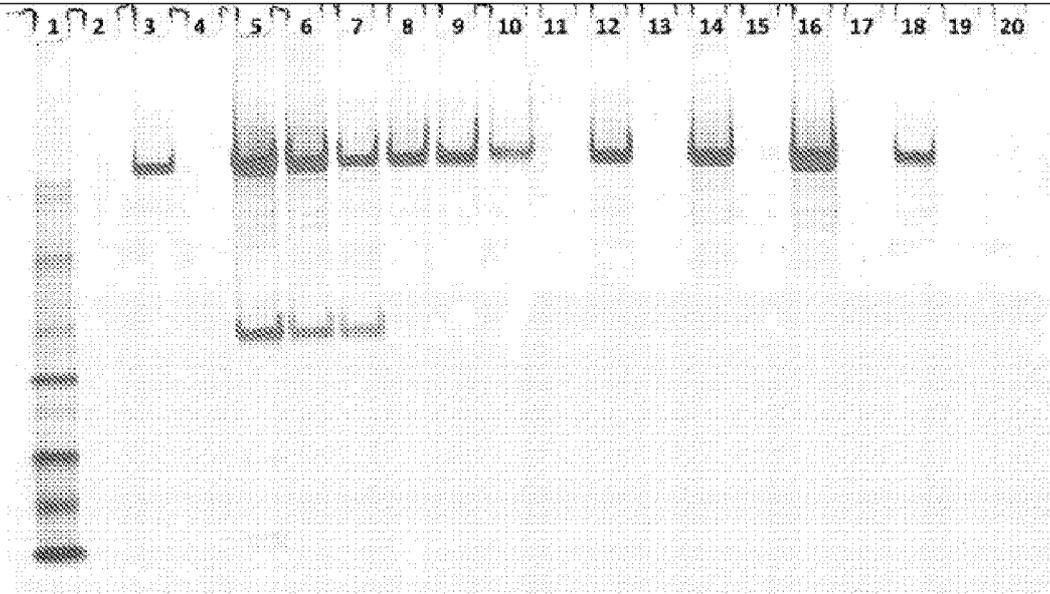
ПРОДУКТ													
VW_USS_04 DF3350/002													
Код	Кол-во [г]	Содержание антигена vWF OR-13-00726			Определение активности кофактора ристоцетина vWF OR-13-00407			Спец. Активность Ед RiCoF/мг vWF:Ag					
		[мкг/мл]	[мкг]	[%]	[МЕ/мл]	[МЕ]							
L до SD/VI	240,22	100,00	24022,00	100,00%	8,347	2005,12	100,00%	83,47					
FT	595,63	23,50	13997,31	58,3%	<0,5	---	---	X					
ПОМЫВКА	56,75	27,20	1543,60	6,4%	1,636	92,84	4,6%	60,1					
E1	56,87	39,50	2246,37	9,4%	5,673	322,62	16,1%	143,6					
E2	27,59	70,60	1947,85	8,1%	12,431	342,97	17,1%	176,1					

VW_USS_04 DF3350/002														
Код	Кол-во [г]	Хромоген FVIII NE VN-13-45272TB			Способ ID1057 KVA_AG CHO / ИФА (новая платформа)			ИФА Пропептида			CHO/WF: AG нг/мкг	CHO/Ri CoF мкг/1000 Ед		
		[МЕд/мл]	[МЕ д]	[%]	[мкг/мл]	[мкг]	[%]	[нг/мл]	[нг]	[%]				
L до SD/VI	240,22	0,38	91,28	100,0%	1,88	451,61	100,0%	28687,10	6891215,16	100,0%	x	0,02	x	225,23
FT	595,63	< 0,2	---	---	0,86	512,24	113,4%	15320,80	9125528,10	132,4%	x	0,04	x	x
ПОМЫВКА	56,75	< 0,2	---	---	< 0,14	---	---	658,10	37347,18	0,5%	<	0,01	<	85,57
E1	56,87	< 0,2	---	---	< 0,14	---	---	30,62	1741,36	0,0%	<	0,00	<	24,68
E2	27,59	< 0,2	---	---	< 0,14	---	---	23,77	655,81	0,0%	<	0,00	<	11,26

ФИГ. 21

Пример 8: VW_USS_04 DF3350/002

окрашивание серебром SDS PAGE



1. маркер молекулярной массы

2. холостая проба

HN02R01 3. эталон

4. холостая проба

5. MUQ_FT до обработки SD

6. CEX_ЗАГРУЗКА

7. CEX_FT

8. CEX_VE*

9. CEX_NE*

10. CEX_PE*

11. Холостая проба

12. CEX_ПРОМЫВКА

13. Холостая проба

14. CEX_элюирование 1 (Фракция продукта)

15. Холостая проба

16. CEX_элюирование 2 (Фракция продукта)

17. Холостая проба

18. VWF_SEC_элюат (эталон)

19. Холостая проба

20. Холостая проба

* Образцы не относящиеся к продукту, для сбора дополнительной информации

NuPAGE 3-8 % Трисацетатный миди-гель (1,0 мм; 20 луночный, Invitrogen, кат. № WG1602BOX)

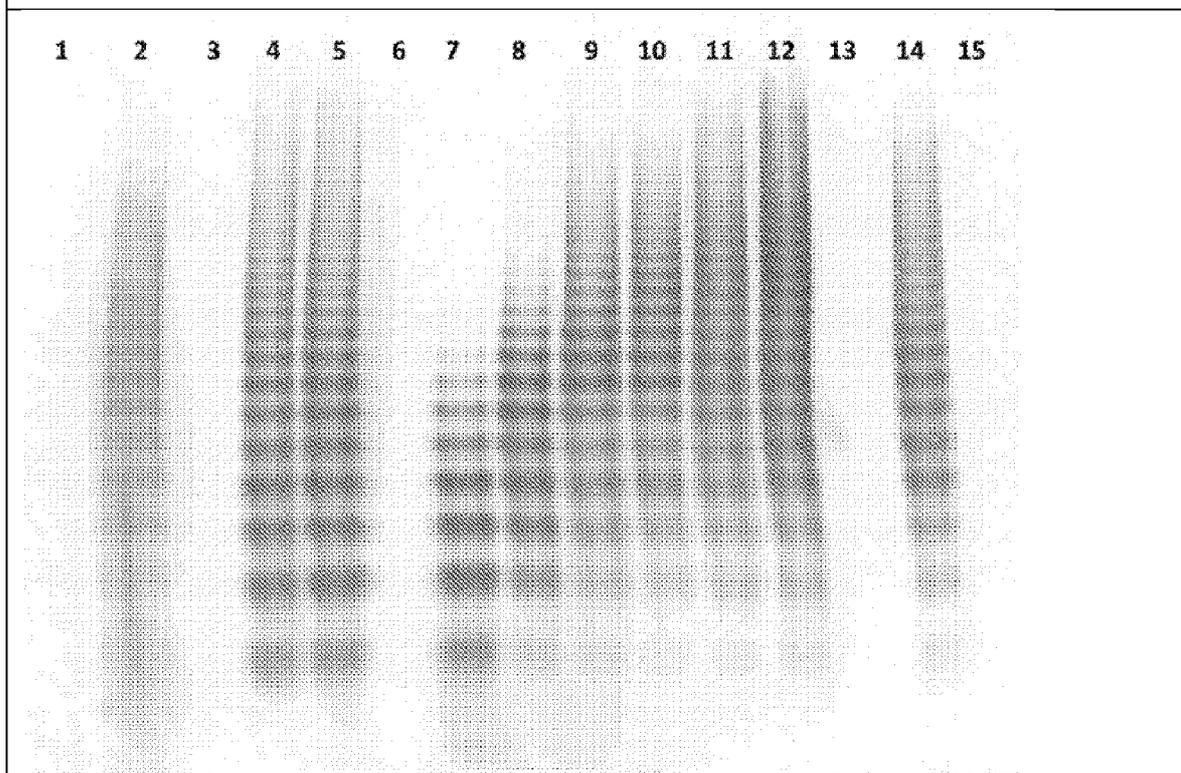
Обработка образца буфером для образцов LDS (Invitrogen, кат. № NP0007) 1 час/37 °C, блокировка йодацетамидом

SDS-PAGE: №: 3314/016

ФИГ. 22

Пример 8: VW_USS_04 DF3350/002

SDS PAGE Мультимерный образец Вестерн-блот 1 % агарозы



1. холостая проба
- HNO2R01 2. эталон
3. холостая проба
4. MUQ_FT до обработки SD
5. CEX_ЗАГРУЗКА
6. Холостая проба
7. CEX_FT
8. CEX_ПРОМЫВКА
9. **CEX_элюирование 1 (Фракция продукта)**
10. CEX_VE*
11. **CEX_элюирование 2 (Фракция продукта)**
12. CEX_NE*
13. Холостая проба
14. VWF_SEC_элюат (эталон)
15. Холостая проба

.* Образцы не относящиеся к продукту, для сбора дополнительной информации

1 % агарозный гель согласно SOP VV-0069924

Все образцы разбавлены и подготовлены до приблиз. 31,3 нг vWF/дорожка для электрофореза в агарозном геле, включая обработку йодуксусным амидом для блокирования свободных тиоловых групп

1-е антитело: Антитело кролика к vWF DAKO кат. № A0082 1:1000

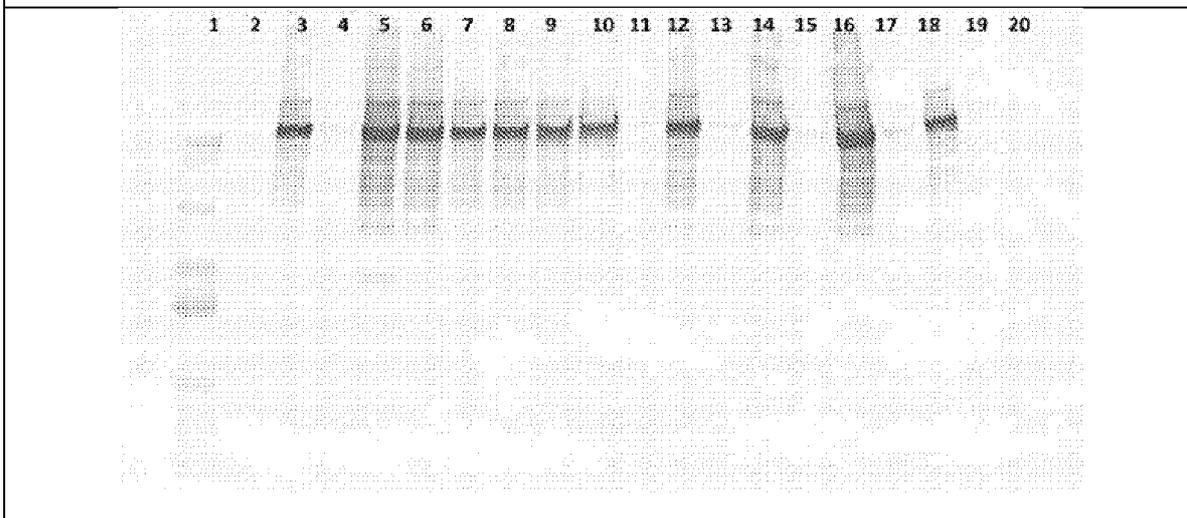
2-е антитело: IgG козы к антителу кролика (H+L) (AP конъюгат) SIGMA кат. № A8025 1: 2000

23/92

ФИГ. 23

Пример 8: VW_USS_04 DF3350/002

Вестерн-блоттинг



1. маркер молекулярной массы
2. холостая проба
- HN02R01 3. эталон
4. холостая проба
5. MUQ_FT до обработки SD
6. CEX_ЗАГРУЗКА
7. CEX_FT
8. CEX_VE*
9. CEX_NE*
10. CEX_RE*
11. Холостая проба
12. CEX_ПРОМЫВКА
13. Холостая проба
14. CEX_элюирование 1 (Фракция продукта)
15. Холостая проба
16. CEX_элюирование 2 (Фракция продукта)
17. Холостая проба
18. VWF_SEC_элюат (эталон)
19. Холостая проба
20. Холостая проба

* Образцы не относящиеся к продукту, для сбора дополнительной информации

NuPAGE 3-8 % Трисацетатный миди-гель (1,0 мм; 20 луночный, Invitrogen, кат. № WG1602BOX)

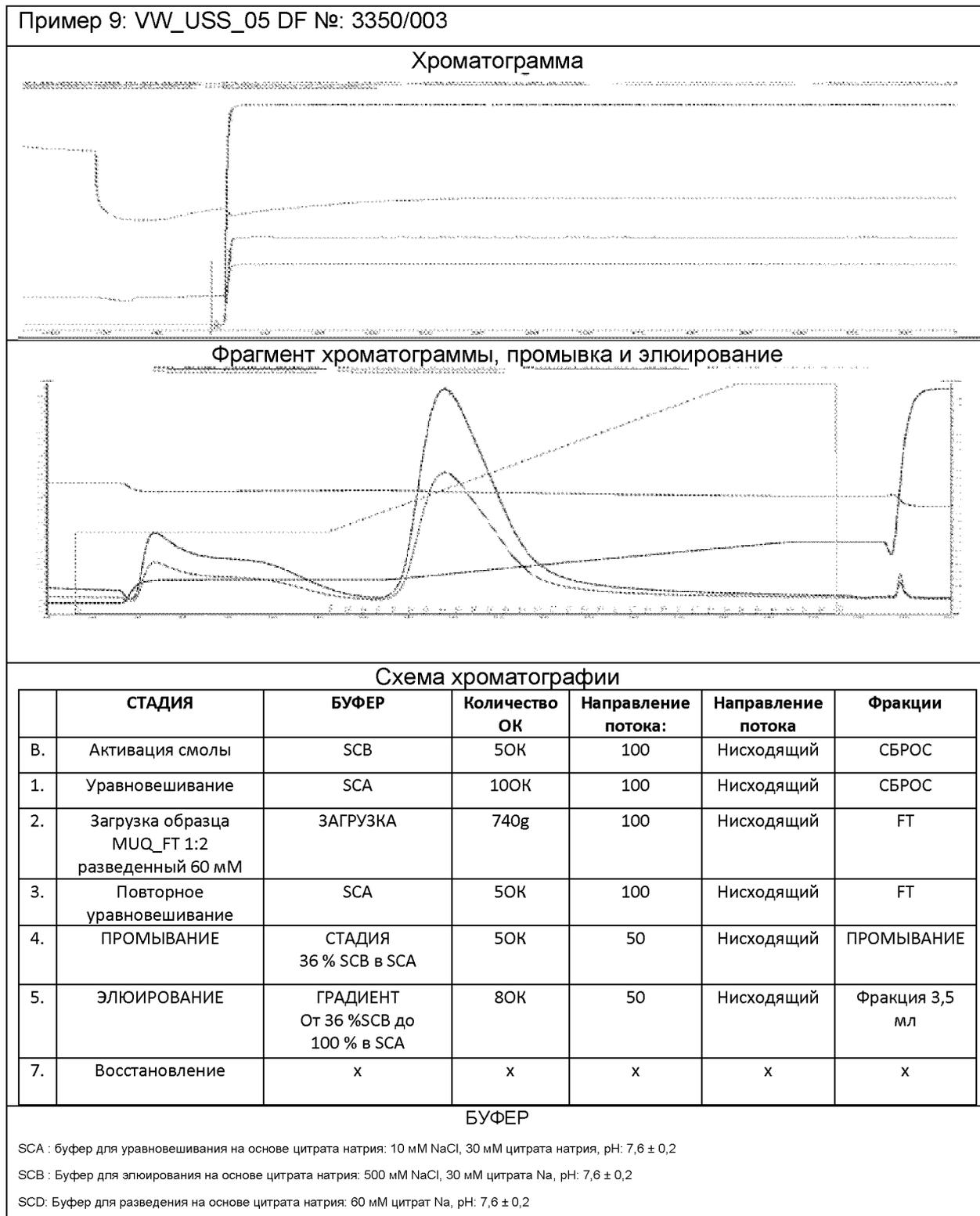
Обработка образца буфером для образцов LDS (Invitrogen, кат. № NP0007) 1 час/37 °C, блокировка йодацетамидом

1-е антитело: Антитело кролика к vWF DAKO кат. № A0082

2-е антитело: IgG козы к антителу кролика (H+L) (AP конъюгат) SIGMA кат. № A8025

SDS-PAGE: №: 3314/017

ФИГ. 24



25/92

ФИГ. 25

ПРОДУКТ											
Пример 9: VW_USS_05 №: 3350/003											
Код	Кол-во	Антиген vWF OR-13-00726			Активности кофактора ристоцетина vWF OR-13-00407			Специфическая активность			
		[г]	[мг/мл]	[мкг]	[%]	[МЕд/мл]	[МЕд]	[%]	Ед RiCoF/мг vWF:AG		
L до SD/VI	364,03	121,00	44047,63	100,00%	8,243	3000,70	100,00%	68,12			
FT	798,98	25,60	20453,89	46,4%	<0,5	---	---	x			
E	34,69	231,50	8030,74	18,2%	19,696	683,25	22,8%	85,1			

Пример 9: VW_USS_05 №: 3350/003												
Код	Кол-во	Хромоген FVIII NE VN-13-45272TB			ИФА CHO НСР DF.:3366/034			ИФА белка CHO OR-13-00497	ИФА пропептида			
		[г]	[МЕд/мл]	[МЕд]	[%]	[мг/мл]	[нг]		[%]	[мкг/мл]	[нг/мл]	[нг]
L до SD/VI	364,03	0,56	203,86	100,00%	1,22	444,12	100,00%	2,39	36201,25	13178341,04	100,00%	
FT	798,98	< 0,2	---	---	0,59	471,40	106,1%	---	14512,80	11595436,94	88,0%	
E	34,69	0,83	28,79	14,1%	0,008	0,28	0,1%	<0,0625	142,60	4946,79	0,0%	

26/92

ФИГ. 26

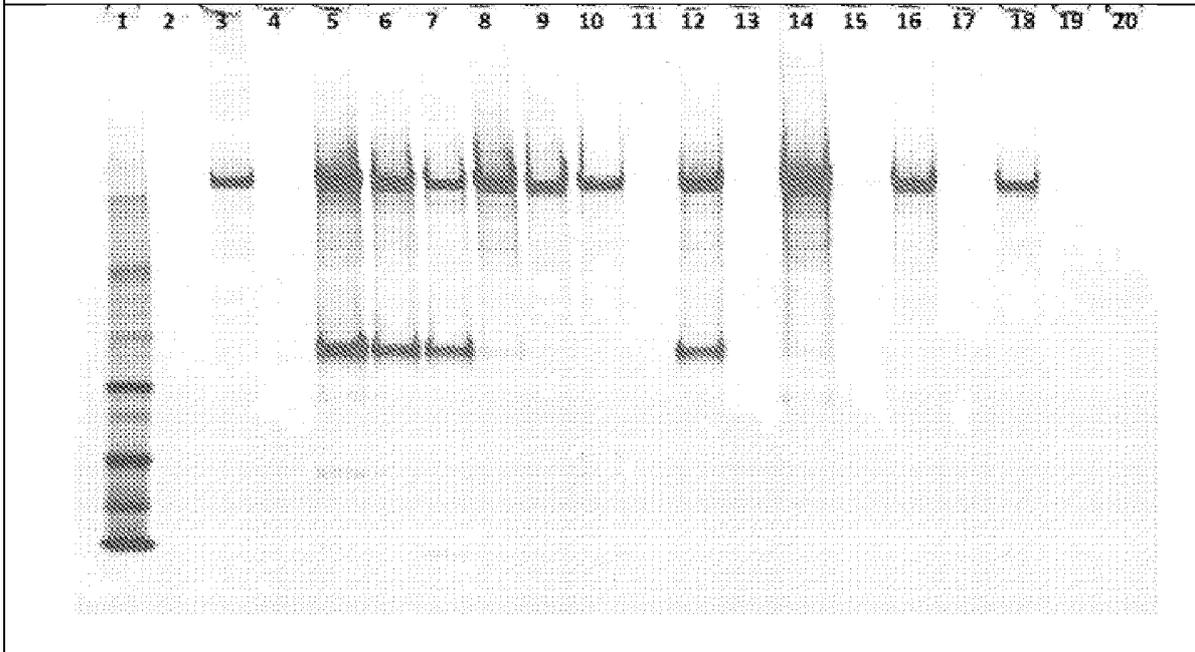
Анализ	Значение
vWF: Антиген	231,5 мкг /мл
Активность RiCoF	19,7 Ед/мл
Специфическая активность RiCoF / антиген	85,1 Ед/мг
Активность фактора VIII (хромоген)	0,83 Ед/мл
CHO-НСР	0,008 мкг/мл
Активность CHO-НСР / 1000 Ед RiCoF	0,41 мкг/1000 Ед
г-vWF-пропептид	142 нг/мл
Фактор удаления CHO – НСР От загрузочного до элюата	1575
Фактор удаления vWF-пропептид От загрузочного до элюата	2664
Фактор удаления FVIII- активность хромогена От загрузочного до элюата	7,1

27/92

ФИГ. 27

Пример 9: VW_USS_05 №: 3350/003

окрашивание серебром SDS PAGE



1. Маркер молекулярной массы
2. Холостая проба
3. Эталон HN02R01
4. Холостая проба
5. MUQ_FT до обработки SD
6. CEX_ЗАГРУЗКА
7. CEX_FT
8. CEX_VE*
9. CEX_NE*
10. CEX_PE*
11. Холостая проба
12. CEX_ПРОМЫВКА
13. Холостая проба
14. CEX_Элюирование (Фракция продукта)
15. Холостая проба
16. CEX_Элюирование (Фракция продукта) 1:5
17. Холостая проба
18. VWF_SEC_элюат (эталон)
19. Холостая проба
20. Холостая проба

* Образцы, не относящиеся к продукту, для сбора дополнительной информации

NuPAGE 3-8 % Трисацетатный миди-гель

(1,0 мм; 20 лунок, Invitrogen, кат. № WG1602BOX)

Обработка образца буфером для образцов LDS (Invitrogen, кат. № NP0007) 1 час/37 °C, блокировка йодацетамидом

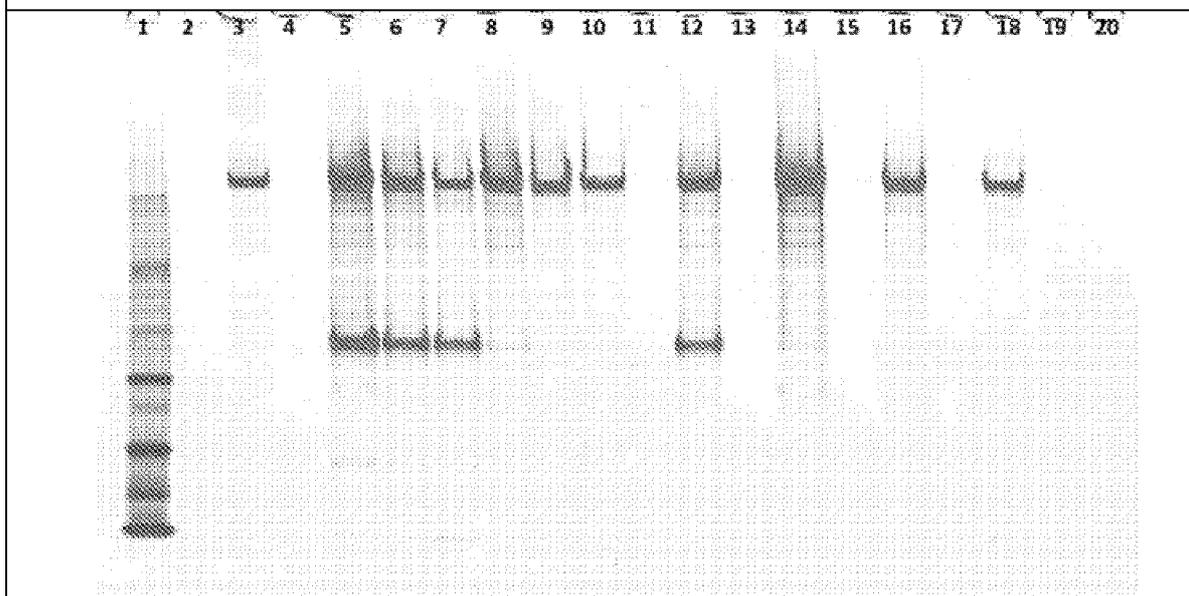
SDS-PAGE: №: 3356/004

28/92

ФИГ. 28

Пример 9: VW_USS_05 №: 3350/003

SDS PAGE Мультимерный образец Вестерн-блот 1 % агарозы



1. холостая проба
2. Эталон HN02R01
3. холостая проба
4. MUQ_FT до обработки SD
5. CEX_ЗАГРУЗКА
6. Холостая проба
7. CEX_FT
8. CEX_ПРОМЫВКА
9. CEX_VE*
10. CEX_элюирование (Фракция продукта)
11. CEX_NE*
12. CEX_RE*
13. Холостая проба
14. VWF_SEC_элюат (эталон)
15. Холостая проба

.* Образцы не относящиеся к продукту, для сбора дополнительной информации

1 % агарозный гель согласно SOP VV-0069924

Все образцы разбавлены и подготовлены до приблиз. 31,3 нг vWF/дорожка для электрофореза в агарозном геле, включая обработку йодуксусным амидом для блокирования свободных тиоловых групп

1-е антитело: Антитело кролика к vWF DAKO кат. № A0082 1:1000

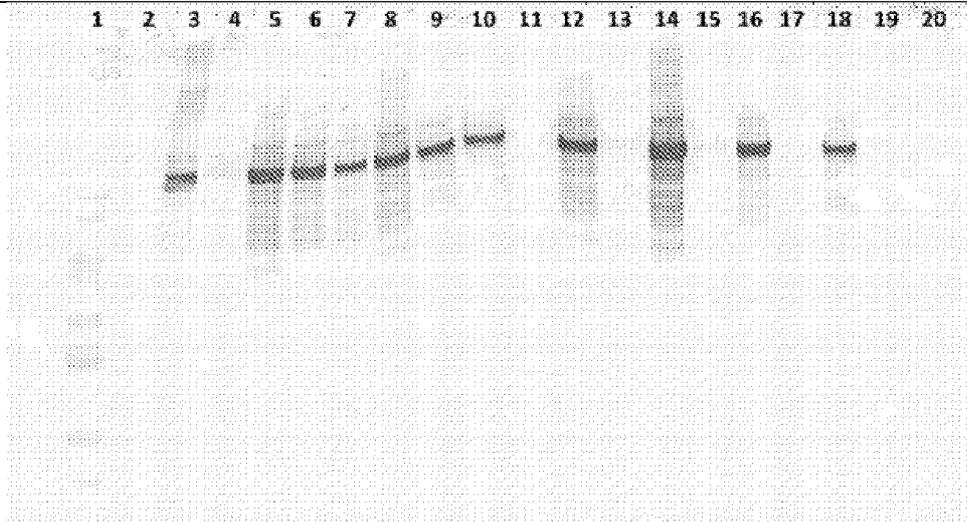
2-е антитело: IgG козы к антителу кролика (H+L) (AP конъюгат) SIGMA кат. № A8025 1: 2000

29/92

ФИГ. 29

Пример 9: VW_USS_05 №: 3350/003

Вестерн-блоттинг



1. маркер молекулярной массы
2. холостая проба
3. эталон HN02R01
4. холостая проба
5. MUQ_FT до обработки SD
6. CEX_ЗАГРУЗКА
7. CEX_FT
8. CEX_VE*
9. CEX_NE*
10. CEX_PE*
11. Холостая проба
12. CEX_ПРОМЫВКА
13. Холостая проба
14. CEX_элюирование (Фракция продукта)
15. холостая проба
16. CEX_Элюирование (Фракция продукта) 1:5
17. холостая проба
18. VWF_SEC_элюат (эталон)
19. Холостая проба
20. Холостая проба

.* Образцы не относящиеся к продукту, для сбора дополнительной информации

NuPAGE 3-8 % Трисацетатный миди-гель (1,0 мм; 20 луночный, Invitrogen, кат. № WG1602BOX)

Обработка образца буфером для образцов LDS (Invitrogen, кат. № NP0007) 1 час/37 °C, блокировка йодацетамидом

1-е антитело: Антитело кролика к vWF DAKO кат. № A0082

2-е антитело: IgG козы к антителу кролика (H+L) (AP конъюгат) SIGMA кат. № A8025

SDS-PAGE: №: 3358/004

30/92

ФИГ. 30

ID	Способ	vWF-PP/vWF нг/мкг Антиген/Антиген	vWF-PP/RiCoF мкг/1000 Единиц Антиген/активность	CHO-HCP/vWF нг/мкг Антиген/Антиген
Пример 1	цитратный буфер Версия 1	0,34	4,55	1,814
Пример 2	цитратный буфер Версия 2	1,10	23,83	2,578
Пример 3	цитратный буфер Версия 2	0,94	21,14	1,704
Пример 6	Без хелатирующего агента	163,3	3599	2,073
Пример 8	Оптимизированный цитратный буфер	E1 0,78 E2 0,34	E1 5,4 E2 1,9	E1 <5,15 E2 <1,98
Пример 9	Оптимизированный Протокол цитратного буфера для получения	E 0,62	E 7,2	E 0,035

ФИГ. 31

КОЭФФИЦИЕНТ УДАЛЕНИЯ примесей, связанных с продуктом

ID	Способ	Фактор удаления vWF-пропептид Загрузка/элюат	Фактор удаления Загрузка/элюат СНО-НСР
Пример 1	цитратный буфер Версия 1	2393	62,3
Пример 2	цитратный буфер Версия 2	428	73,7
Пример 3	цитратный буфер Версия 2	400	69,1
Пример 6	Без хелатирующего агента	3,5	12,2
Пример 8**	Оптимизированный цитратный буфер	E1 3957 E2 10508	E1 > 56,7 E2 > 116,9
Пример 9	Оптимизированный цитратный буфер Протокол изготовления	E 2664	E 1574

** два элюата E1 и E2 представляют собой один конечный продукт после объединения
В Примере 8 значение СНО-НСР было ниже предела обнаружения 140 нг/мл.

ФИГ. 32

Улучшенная эксклюзионная хроматография (SEC)

ID	Способ	vWF-PP/vWF нг/мкг Антиген/Антиген	vWF-PP/RiCoF мкг/1000 Единиц Антиген/активность	СНО-НСР/vWF нг/мкг Антиген/Антиген
Пример 4	Хелатор Цитрат	<0,11	<0,84	0,14
Пример 5	Увеличенный рН	0,73	8,68	<0,17

ФИГ. 33

КОЭФФИЦИЕНТ УДАЛЕНИЯ примесей, связанных с продуктом

ID	Способ	Фактор удаления vWF-пропептид Загрузка/элюат	Фактор удаления Загрузка/элюат СНО-НСР
Пример 4	Хелатор Цитрат	>4710	84,3
Пример 5	Увеличенный рН	819	>13,3

32/92

ФИГ. 34

Материал

Устройство	Деталь	Замечание
КОЛОНКА	ТМАЕ 4 мл	ID 10 мм/ч = приблиз. 5 см
Буфер А	50 мМ трис-НСl + 2 мМ ЭДТА + 0,1 % Tween 80 /рН 8,5	-
Буфер В	50 мМ трис-НСl + 2 мМ ЭДТА + 0,1 % Tween 80 /рН 8,5 +1000 мМ NaCl	-
Буфер С	50 мМ трис-НСl + 2 мМ ЭДТА рН 8,5 + 16,6 г/кг реагента SD [10,54 г Triton X100, 3,15 г полисорбата 80, 2,91 г Три-н- бутилфосфата]	Буфер для лечения SD_VI “НА КОЛОНКЕ”

ФИГ. 35

Изменение ЗАГРУЗОЧНОЙ СМЕСИ

Исходная	Измененная	Замечание
ORVW16102MUQ-E 25мл	г-vWF MUQ – FT 1:4 разведенный в БУФЕРЕ А 50 мМ трис-НСl + 2 мМ ЭДТА + 0,1 % Tween 80 /рН 8,5	Инкубация > 120 мин

33/92

ФИГ. 36

Хроматография

Хроматография	Буфер	Детали буфера	ОК	Скорость потока	Фракция
1. Активация	2 М NaCl		5	0,6 мл/мин	Сброс
2. Уравновешивание	Буфер А	50 мМ трис-НCl + 2 мМ ЭДТА + 0,1 % Tween 80 /рН 8,5	8	0,6 мл/мин	Сброс
3. Загрузка	r-vWF MUQ – FT разведенный 1:4 в буфере А	50 мМ трис-НCl + 2 мМ ЭДТА + 0,1 % Tween 80 /рН 8,5	х	0,6 мл/мин	FT
4. Повторное уравновешивание	Буфер А	50 мМ трис-НCl + 2 мМ ЭДТА + 0,1 % Tween 80 /рН 8,5	5	0,6 мл/мин	FT
5. На колонке SD_VI	Буфер С	50 мМ трис-НCl + 2 мМ ЭДТА рН 8,5 + Реагент SD 16,6 г/кг	10	0,6 мл/мин	REG_W
6. Повторное уравновешивание II	Буфер А	50 мМ трис-НCl + 2 мМ ЭДТА + 0,1 % Tween 80 /рН 8,5	20	0,6 мл/мин	REG_W
7. Элюирование	Градиент От 0 % буфера А до 50 % буфера В В 20 ОК	50 мМ трис-НCl + 2 мМ ЭДТА + 0,1 % Tween 80 /рН 8,5 + 1000 мМ NaCl в 50 мМ трис-НCl + 2 мМ ЭДТА + 0,1 % Tween 80 /рН 8,5	20	0,6 мл/мин	Фракция - 1,5мл
8. Пост-элюирование	50 % буфер В	50 мМ трис-НCl + 2 мМ ЭДТА + 0,1 % Tween 80 /рН 8,5 + 1000 мМ NaCl	8	0,6 мл/мин	Фракция - 1,5мл

УСЛОВИЯ / ПАРАМЕТР

ЗАГРУЗКА: r-vWF_MUQ_FT – r-vWF, обработанный фурином

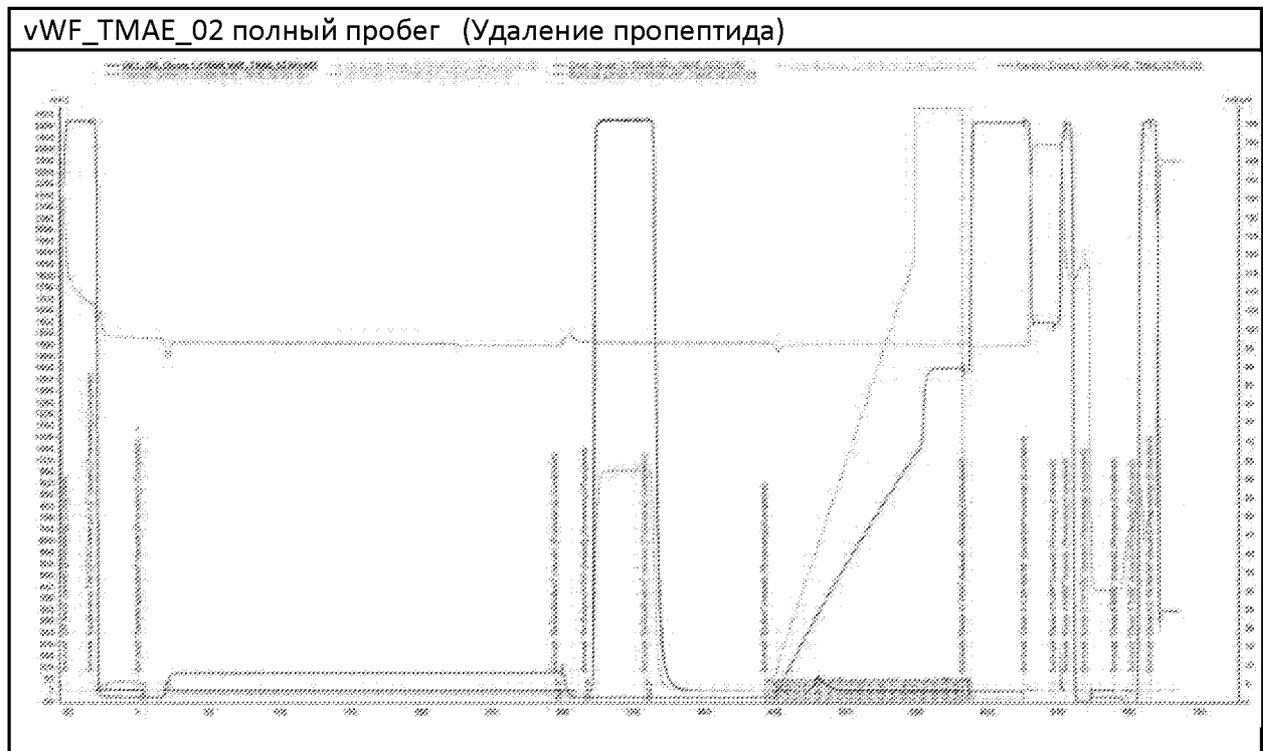
Буфер + Условия разделения: трис-НCl + увеличенный рН 8,5 + ЭДТА

Счетчик градиента: Хлорид Cl⁻

Обработка SD_VI _ На колонке после промывания 1 (Продолжительность ок. 60 мин)

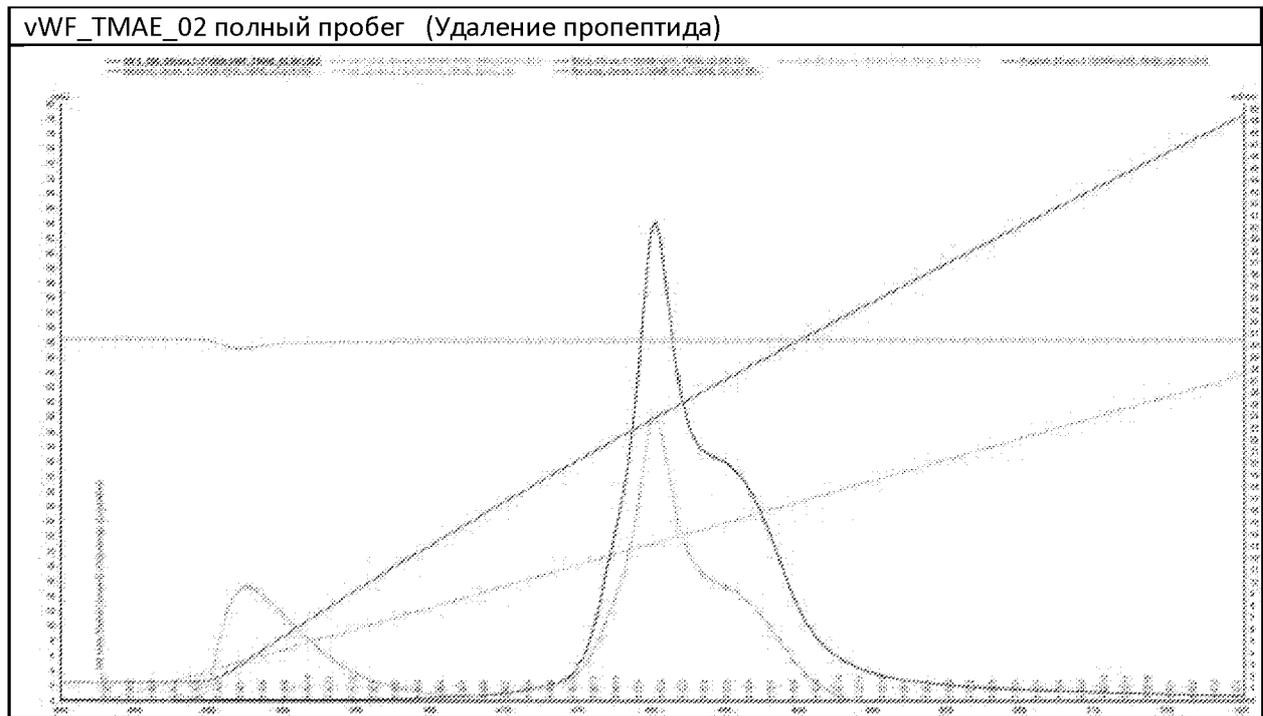
34/92

ФИГ. 37



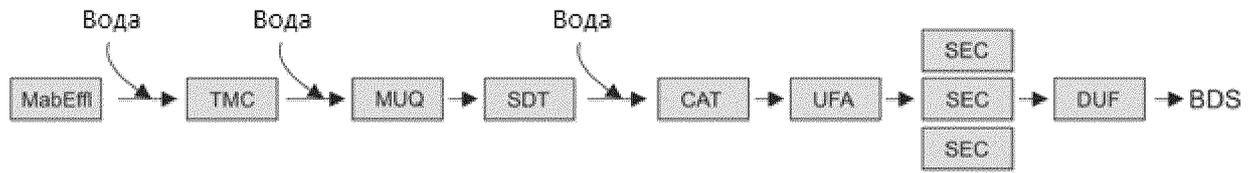
35/92

ФИГ. 38

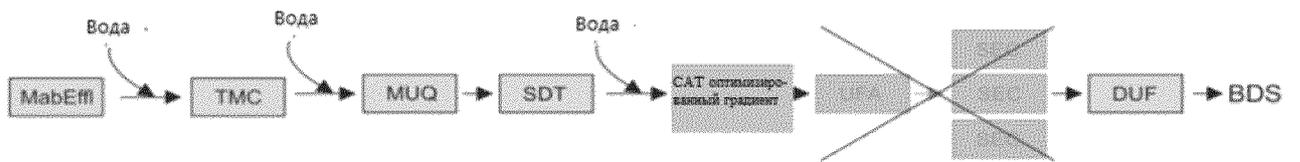


36/92

ФИГ. 39А



ФИГ. 39В



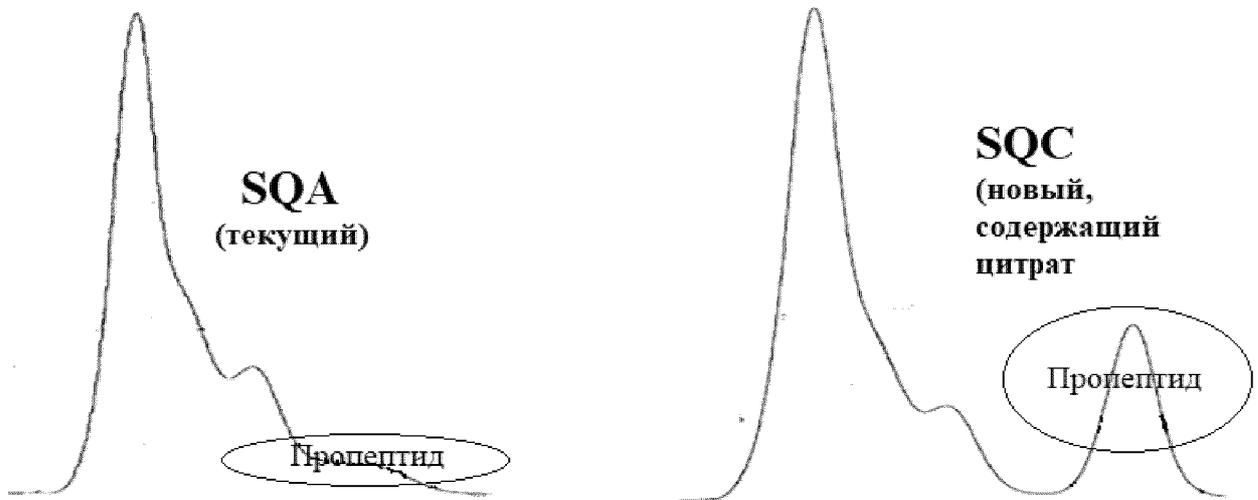
37/92

ФИГ. 40

Функция САТ	САТ 1,0	САТ 2,0	Комментарий
Концентрация продукта	да	да	Без изменений
Удаление примесей белков клетки-хозяина	Да, коэффициент уменьшения около 40	Да, коэффициент уменьшения > 1000	Значительное улучшение
Удаление ДНК клетки-хозяина	будет определено	будет определено	
Удаление пропептида VWF	нет	Да, уменьшение > 2000	Значительное улучшение
Удаление остаточного фактора FVIII	Коэффициент уменьшения < 10	Коэффициент уменьшения < 10	Без улучшения
Разделение и объединение мультимеров VWF	да	Да, замена SEC	Значительное улучшение

38/92

ФИГ. 41



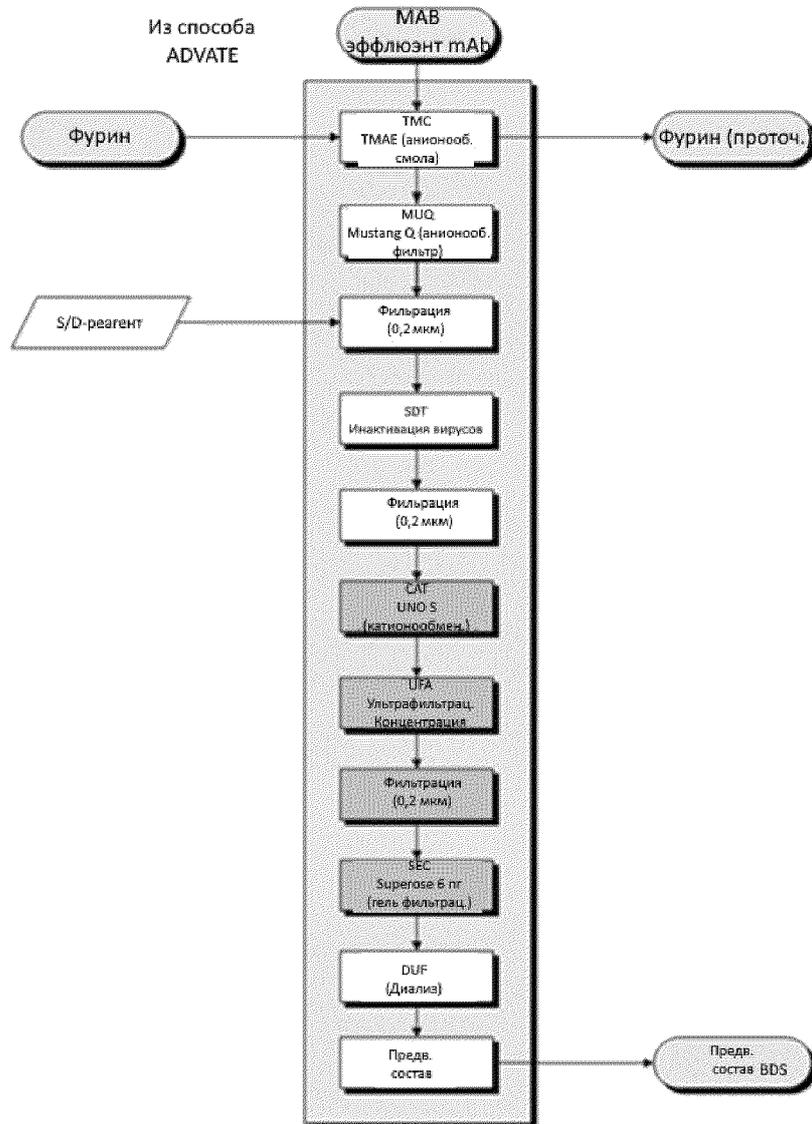
39/92

ФИГ. 42

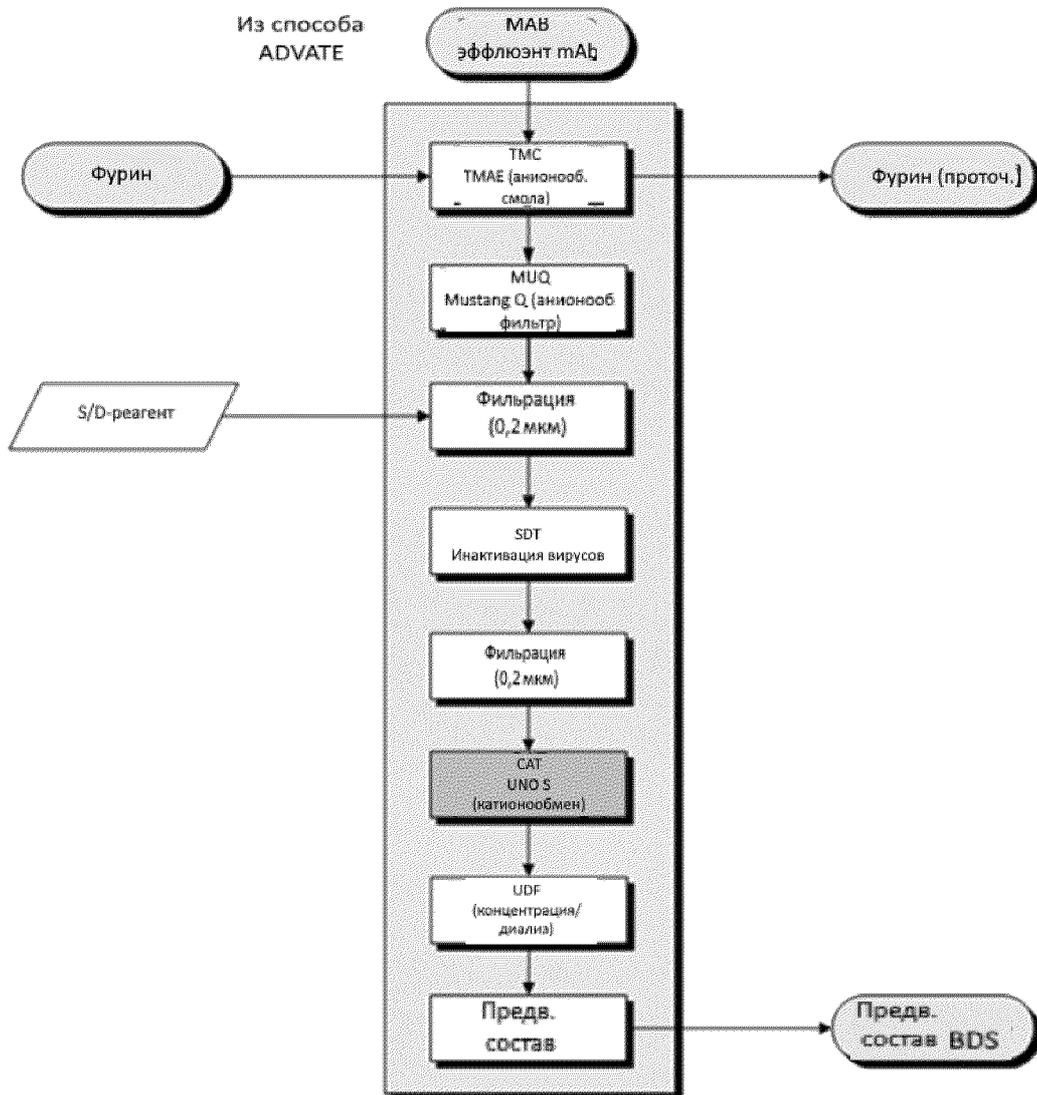
Функция SEC	SEC (буфер SQA)	Улучшенный SEC (буфер SQC)	Комментарий
Удаление примесей белков клетки-хозяина	Да, коэффициент уменьшения приблиз. 100	Да, коэффициент уменьшения > приблиз. 100	Без улучшения
Удаление пропептида VWF	Да, но не надежный (уровни примесей от 20 до 250 мкг/1000 единиц)	Да, очень надежный (уровни примесей <2 мкг/1000 единиц)	Значительное улучшение с точки зрения уровня и надежности
Удаление остаточного фактора FVIII	Коэффициент уменьшения < 10	Коэффициент уменьшения < 10	Без улучшения
Разделение и объединение мультимеров VWF	да	да	Без улучшения

40/92

ФИГ. 43А



41/92
ФИГ. 43В



42/92

ФИГ. 44

Параметр колонки	1-е поколение MFG NE	2-е поколение малый масштаб	Разница/ Обоснование
Катионообменная среда	UNO_Sphere S (BioRad)		Нет
Средний размер пор	80°мкм		
Колонка	Разрешение мембраны Pall	KronLab 10/250	Да / зависит от масштаба
Толщина слоя	14 см (15 – 18°см)	14,3 см	Нет
Диаметр слоя	120 см	1 см	Да / зависит от масштаба
Объем колонки	Приблиз. 170 – 204°л	11,23°мл	
Материал фильтра-сепаратора	Нержавеющая сталь 20 мкм	10 мкм полипропилен	
Тарелки/метр	≥ 2500	1565	
Асимметрия	0,8 – 1,8	1,93	
фильтр	Онлайн-фильтрация	Автономная фильтрация в ходе обработки S/D перед загрузкой CAT	
	Мембрана Sartoguard или Pall Supor EAV	Pall Kleenpack; мембрана Supor EA	
	7,2 м ² (картридж 3 x 30°)	260 см ²	
	0,2 мкм	0,2 мкм	Нет
Системный параметр			
Система хроматографии	Millipore	GE-Healthcare ÄKTA Pure 25	Да / зависит от масштаба

43/92

ФИГ. 45

I.D. прогона	Промывание		Элюирование		2 M NaCl
Процесс 1-го поколения (MFG)	Промывочный буфер 100 см/ч; 10 - 11 ОК		Элюирующий буфер 65 см/ч; 3,3 – 3,6 ОК		65 см/ч; 10 ОК
VW_USS_01	100 % A 100 см/ч; 10 ОК		0 % B – 100 % B 65 см/ч; 12 ОК	100 % B 65 см/ч; 3 ОК	65 см/ч; 5 ОК
VW_USS_02	55 % B; 65 см/ч; 10 ОК		55 % B – 100 % B 65 см/ч; 6 ОК	100 % B 65 см/ч; 2 ОК	65 см/ч; 5 ОК
VW_USS_03 и VW_USS_04	40% B; 65 см/ч; 5 ОК	45% B; 65 см/ч; 5 ОК	45 % B – 100 % B 65 см/ч; 6 ОК	100 % B 65 см/ч; 2 ОК	65 см/ч; 5 ОК
VW_USS_05	36% B; 50 см/ч; 5 ОК		36 % B – 100 % B 50 см/ч; 6 ОК	100 % B 50 см/ч; 2 ОК	65 см/ч; 5 ОК

44/92

ФИГ. 46

Стадия		Буфер	MFG NE 1-го поколения		Мелкомасштабная установка 2-го поколения		Различие / Обоснование
			Количество [ОК]	Скорость потока [см/ч]	Количество [ОК]	Скорость потока [см/ч]	
1	Уравновешивание	TQA	25	100	≥ 32	100	Да; улучшение удаление примесей
2	Загрузка продукта	Обработанные S/D и разбавленные элюенты MUQ	16 – 19	100	38 - 66	100	Да; улучшенная емкость и удаление примесей
			поточная фильтрация 0,2 мкм; Supor EAV, 70 л/ч/м ²		-		
			Загрузка: 60 - 140 МЕд/мл смолы		Загрузка 90 - 270 МЕд/мл смолы		
3	Промывание	TQA	10 – 11	100	5 - 20	100	Да; улучшение удаление примесей
4,1	Элюирование	ТЭА	3,3 – 3,6	65	8 -18	65	Да; замена SEC
4,2		Сбор пула	когда УФ-сигнал увеличивается ≥ 0,1 О.Д. выше исходного уровня; собранный объем: 3,3 – 3,6 ОК		Будет исследовано		
5	3 промывка	2 M NaCl	10 – 11	100	5	65	Нет

Все стадии хроматографии выполнялись при комнатной температуре в лабораторных условиях, спецификация для MFG составляет от + 18 °С до -+ 25 °С.

45/92

ФИГ. 47

Стадия		Буфер	MFG NE 1-го поколения		Мелкомасштабная установка 2-го поколения		Различие / Обоснование
			Количество [ОК]	Скорость потока [см/ч]	Количество [ОК]	Скорость потока [см/ч]	
1,1	Рег 1	1 М NaOH	5 – 5,5	65	10	65	Нет
1,2	Промывка	WFI	0,5	65	10	65	
2,1	Рег 2	0,5 М уксусная кислота	2 – 2,2	65	5 - 10	65	Нет
2,2	Промывка	WFI	-	-	5	65	Да
3	Рег. 3 Хранение	0,1 М NaOH	3 – 3,3	65	10	65	Нет

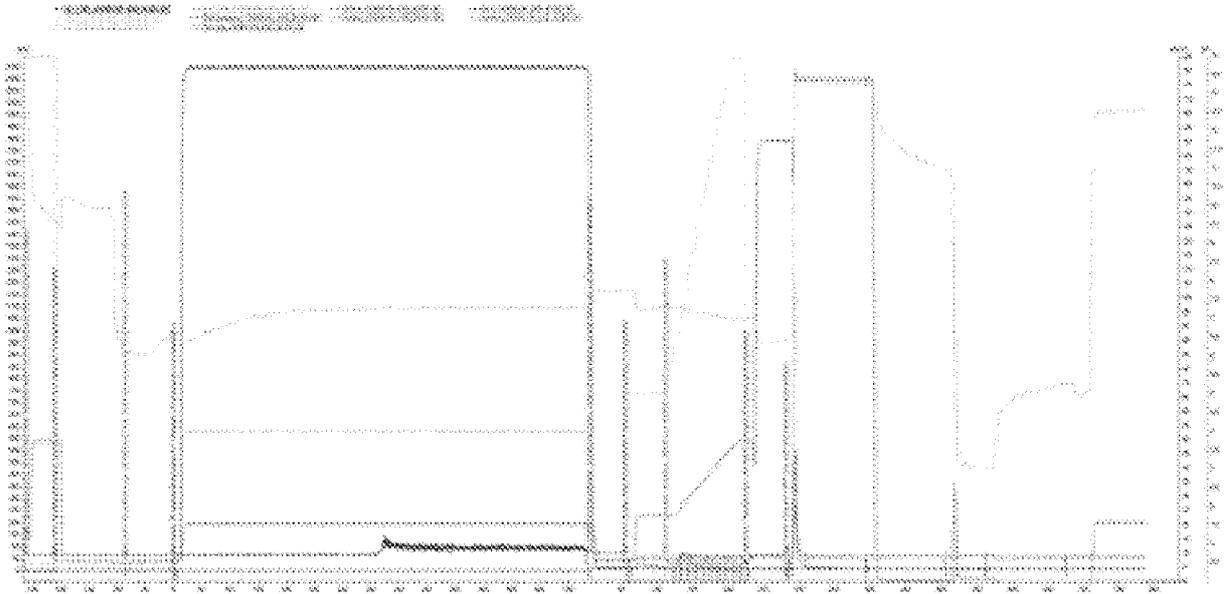
Все шаги выполняются в обратном направлении потока.

ФИГ. 48

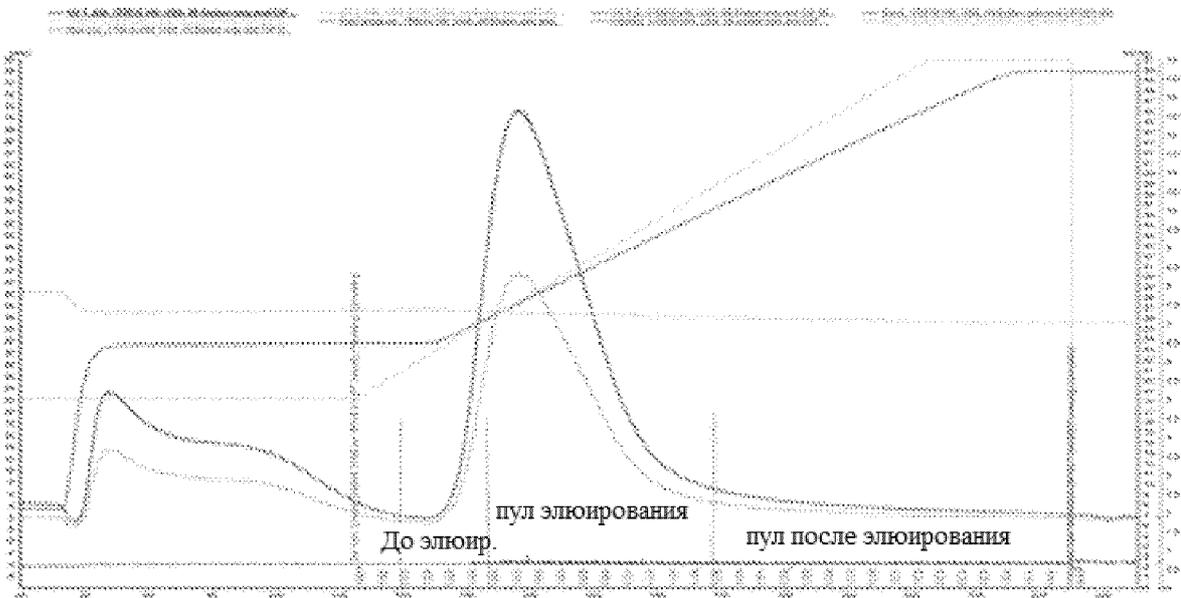
ID буфера		MFG NE 1-го поколения		Мелкомасштабное получение 2-го поколения		Различие / Обоснование
Стадии	Буфер	Композиция	проводимость [мСм/см] при +25 °С	Композиция	Проводимость [мСм/см] при +25 °С	да/ Новые буферные условия для оптимизации удаления примесей, связанных с продуктом и технологическим процессом
S/D Буфер для разведения	WFI	Инактивированный MUQ-E разводят 1:2 WFI для достижения pH 7,0 ± 0,5	После разведения проводимость 13-17 мСм/см достигается	Инактивированный MUQ-E разводят 1:2 60 мМ Na-цитратным буфером, который устанавливает в питании CAT предпочтительный pH 7,5-8,0 (диапазон измерения pH 6,0 – 9,0)	После разведения достигается предпочтительная проводимость 10-30 мСм/см (интенсивность испытания 5-40 мСм/см)	
Промывка CAT	TQA	100 мМ NaOAc, 10 мМ трис, 85 мМ NaCl, pH= 6,5 ± 0,2 (RT)	13 – 17	30 мМ цитрата натрия, 2 мМ лимонной кислоты, 10 мМ NaCl; диапазон тестирования pH 6,0 – 9,0	Диапазон тестирования 5-40 мСм/см	
CAT ступенчатое элюирование	CAT- Elu	100 мМ NaOAc, 100 мМ глицин, 500 мМ NaCl, 3 мМ CaCl ₂ , pH= 7,5 ± 0,2 (RT)	47 - 53	-	-	
CAT градиентное элюирование	CAT- Elu A	-	-	30 мМ цитрата натрия, 2 мМ лимонной кислоты, 10 мМ NaCl; диапазон тестирования pH 6,0 – 9,0	Диапазон тестирования 5-40 мСм/см	
	CAT- Elu B	-	-	30 мМ цитрата натрия, 500 мМ NaCl; диапазон тестирования pH 6,0 – 9,0	Диапазон тестирования 5-40 мСм/см	

47/92

ФИГ. 49А

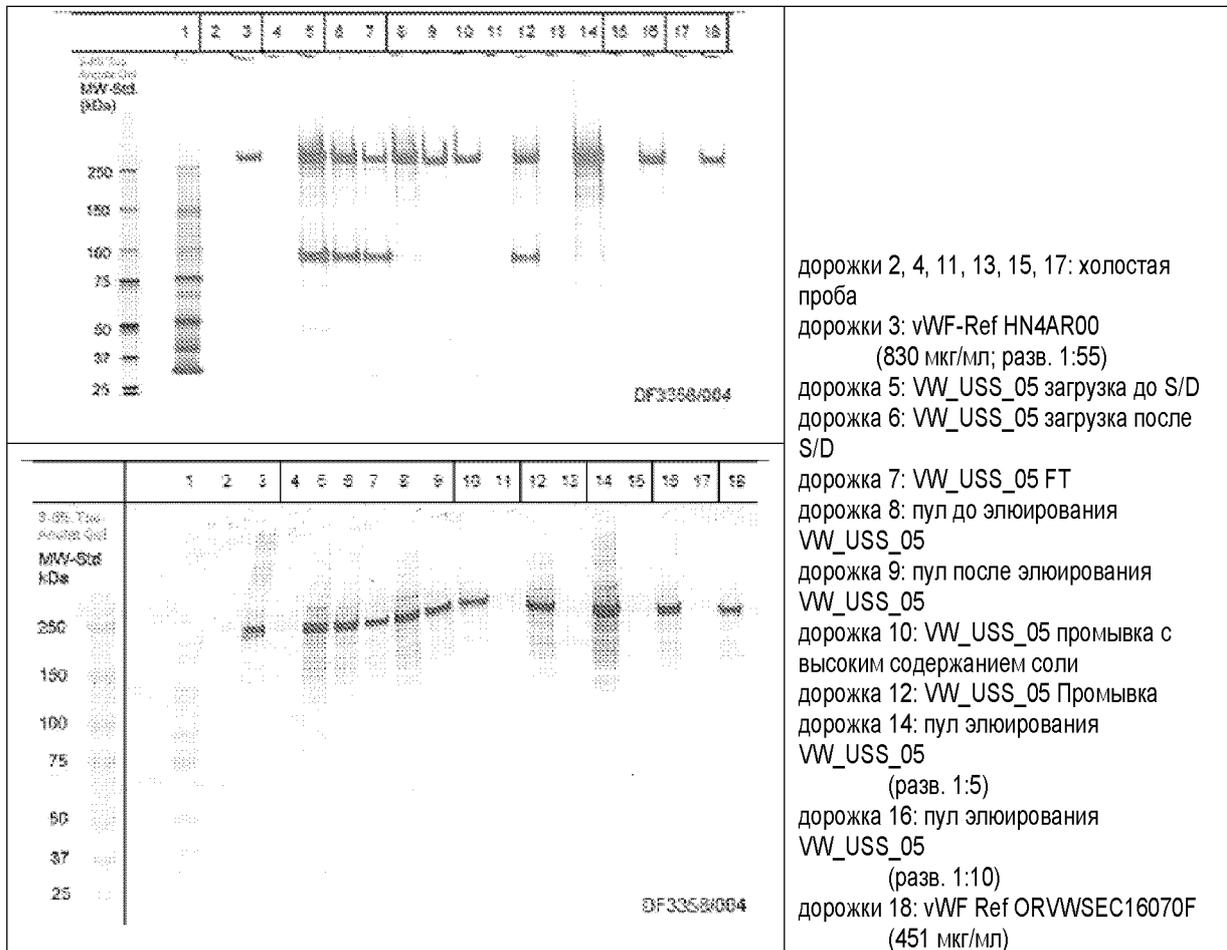


ФИГ. 49В



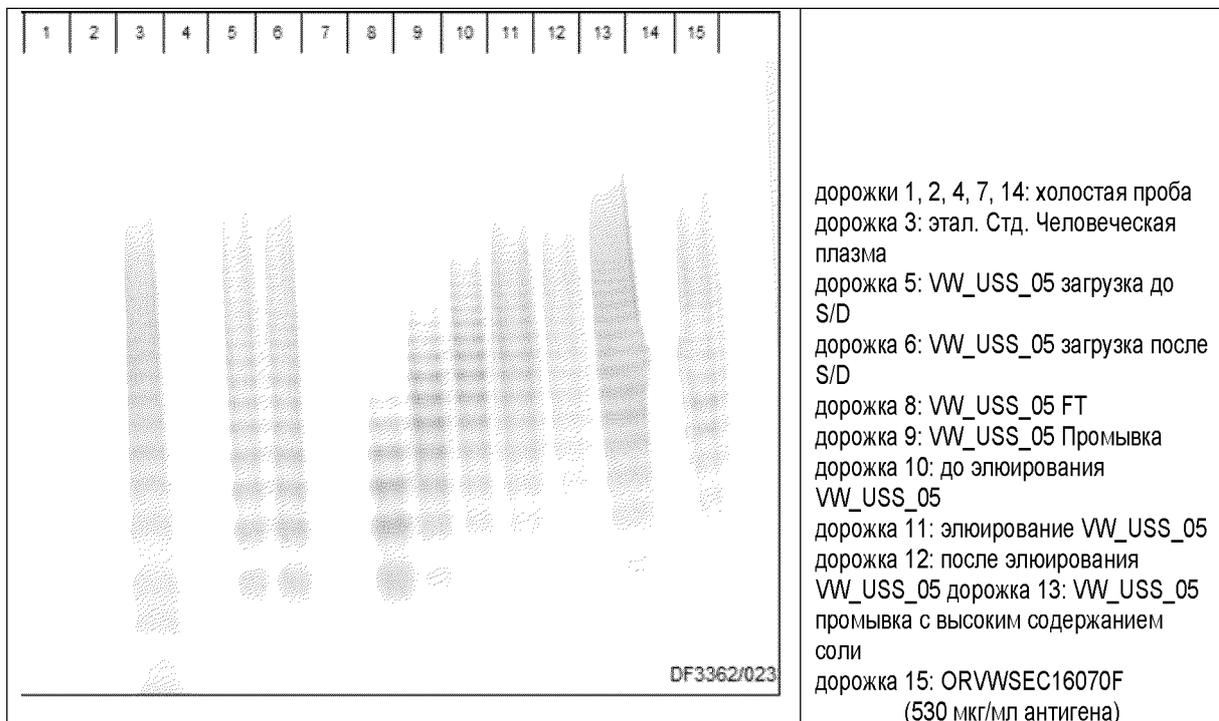
48/92

ФИГ. 50



49/92

ФИГ. 51



50/92

ФИГ. 52

I.D. прогона	rVWF: Продукт Ag%							комментарий	
	FT	Промывка(и)		до элюирования	элюирование	после элюирования	с высоким содержанием соли		Общее вост.
VW_USS_01	2,30	0,20		0,02	41,5	0,70	0,10	44,8	---
VW_USS_02	38,3	24,5		н.д.	0,10	н.д.	0,05	63,0	проводимость промывки к высокому
VW_USS_03	46,8	15,2	11,2	0,70	7,20	0,50	0,30	82,0	---
VW_USS_04	58,3	6,43	9,35	0,50	8,10	0,60	0,10	83,4	---
VW_USS_05	46,4	7,20		2,50	18,2	1,60	0,30	76,2	---

ФИГ. 53

I.D. прогона	Активность % rVWF Risto Co							комментарий	
	FT	Промывка(и)		до элюирования	элюирование	после элюирования	с высоким содержанием соли		Общее вост.
VW_USS_01	н.д.	н.д.		н.д.	27,1	н.д.	н.д.	27,1	---
VW_USS_02	н.д.	52,5		н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	52,5	проводимость промывки к высокому
VW_USS_03	н.д.	10,4	18,4	1,10	12,9	н.д.	н.д.	43,2	---
VW_USS_04	н.д.	4,63	16,1	н.д.	17,1	1,30	6,00	45,1	---
VW_USS_05	н.д.	5,00		2,40	22,8	1,60	н.д.	31,7	---

ФИГ. 54

I.D. прогона	пропептид [мкг/мг rVWF: Ag]							
	Загрузка	FT	Промывка(и)		до элюирования	элюирование	после элюирования	с высоким содержанием соли
VW_USS_01	н.д.	н.д.	н.д.		н.д.	0,10	н.д.	н.д.
VW_USS_02	272	747	62,5		н.д.	4,51	н.д.	< 14,2
VW_USS_03	388	722	184	2,35	0,95	0,60	2,67	< 2,58
VW_USS_04	287	652	24,2	0,78	0,41	0,34	7,12	24,5
VW_USS_05	299	567	465		4,29	0,62	2,46	19,3

51/92
ФИГ. 55

I.D. прогона	пропептид [мкг PP/1000 Ед Risto]							
	Загрузка	FT	Промывка(и)		до элюирования	элюирование	после элюирования	с высоким содержанием соли
VW_USS_01	н.д.	н.д.	н.д.		н.д.	2,90	н.д.	н.д.
VW_USS_02	3997	29150	429		н.д.	14,8	н.д.	< 6,25
VW_USS_03	4794	30486	3306	17,3	7,89	4,14	14,6	< 6,25
VW_USS_04	3437	30642	40,0	5,40	9,02	1,91	35,98	7,15
VW_USS_05	4392	29026	9927		66,0	7,24	35,43	79,0

ФИГ. 56

I.D. прогона	Пулы элюата					
	vWF: Ag	VWF Risto акт.	Спец. акт.	CHO Ag / rVWF, акт.	PP / rVWF, акт.	FVIII акт. / rVWF:Rco
	Продукт [%]	Продукт [%]	[PMEд/MEд:Ag]	[мкг/1000 Ед Risto]	[мкг PP/1000 Ед Risto]	[MEд/MEд]
VW_USS_01	41,5	27,1	0,44	66	2,90	< 0,054
VW_USS_02	0,10	н.д.	н.д.	н.д.	14,8	н.д.
VW_USS_03	7,20	12,9	1,45	< 7,7	4,14	< 0,021
VW_USS_04	8,10	17,1	1,76	< 11,3	1,91	< 0,016
VW_USS_05	18,2	22,8	0,85	< 0,41	7,24	0,042

52/92
 ФИГ. 57

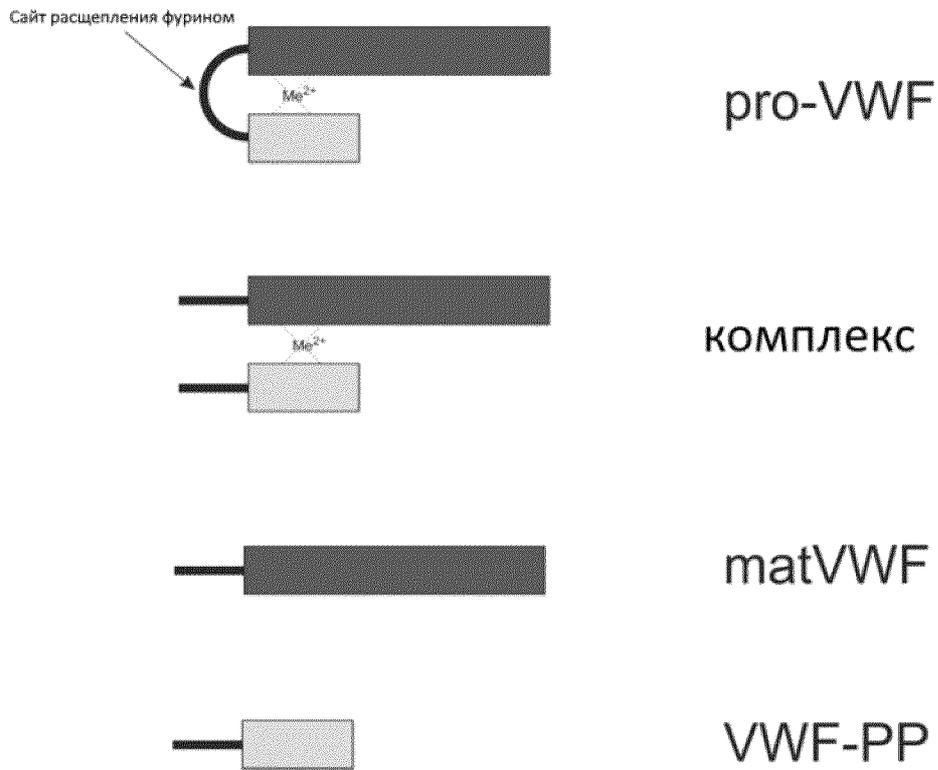
Исследование	Критерий приемлемости	Результат прогона VW_USS_05
Специфическая активность: отношение RCo Activity rVWF / rVWF:Ag (ИФА) /	0,7 – 1,4 МЕд/МЕд	0,85
Отношение примесей CHO: CHO-НСП (ИФА) / активность RCo rVWF	≤ 2 мкг / 1000 МЕд	< 0,41
Отношение примесей FVIII rFVIII:Ag (ИФА) / активность RCo rVWF	≤ 25 мкг / 1000 МЕд	н.д.
Отношение примесей pro-rVWF: pro-rVWF:Ag (ИФА) / активность RCo rVWF	≤ 50 мкг / 1000 МЕд	н.д.
Отношение примесей пропептида rVWF: пропептид rVWF:Ag (ИФА) / активность RCo rVWF	≤ 2 мкг / 1000 МЕд	7,24 (1,91 в прогоне VW_USS_04)
N-гликановый профиль	Моносиало: 20-35 % площади Диссиало 35-50 % площади N-гликановый индекс 150 - 175	н.д.
Отношение сиаловая кислота/общий белок (BCA)	60 - 150 нмоль/мг	н.д.
Отношение активность FVIII/rVWF: RCo	≤ 0,04 МЕд/МЕд	0,042 (< 0,016 в прогоне VW_USS_04)
Мультимерный анализ rVWF	≥ 15 мультимерных бэндов ≤ 40 % мультимеров больше, чем бэнд 15	≥ 15 мультимерных бэндов ≤ 40 % мультимеров больше, чем бэнд 15
Отношение CHO-ДНК/rVWF:активность RCo	≤ 0,5°пг/МЕд	н.д.

53/92

Фиг. 58

Операция	Режим операции	Загрузка	Промывка	Элюирование	Комментарий
АЕХ	Режим связывания	нет	нет	Да, градиентное <ul style="list-style-type: none"> Высокий рН Хелат + нейтральный Оба варианта 	
	Проточный режим	Да <ul style="list-style-type: none"> Низкий рН + хелат 	нет	нет	
СЕХ	Режим связывания	Да <ul style="list-style-type: none"> Высокий рН Хелат + нейтральный Оба варианта 	Да <ul style="list-style-type: none"> Высокий рН Хелат + нейтральный Оба варианта 	Да, градиентное <ul style="list-style-type: none"> Высокий рН Хелат + нейтральный Оба варианта 	
	Проточный режим	Нет	нет	нет	
SEC		<ul style="list-style-type: none"> Высокий рН Нейтрал. + хелат Оба варианта 			
Да/нет: возможно ли физическое разделение matVWF и VWF-PP					

Фиг. 59



55/92
Фиг. 60

SEQ ID NO:1

agctcacagc	tattgtggtg	ggaaagggag	ggtggttggg	ggatgtcaca	gcttgggctt	60
tatctcccc	agcagtgggg	actccacagc	ccctgggcta	cataacagca	agacagtccg	120
gagctgtagc	agacctgatt	gagcctttgc	agcagctgag	agcatggcct	agggtgggcg	180
gcaccattgt	ccagcagctg	agtttcccag	ggaccttgga	gatagccgca	gccctcattt	240
gcaggggaag	atgattcctg	ccagatlttg	cggggtgctg	cttgctctgg	ccctcatttt	300
gccagggacc	ctttgtgcag	aaggaaactcg	cggcaggtca	tccacggccc	gatgcagcct	360
tttcggaagt	gacttcgtca	acacctttga	tgggagcatg	tacagctttg	cgggatactg	420
cagttacctc	ctggcagggg	gctgccagaa	acgctccttc	tcgattattg	gggacttcca	480
gaatggcaag	agagtggacc	tctccgtgta	tcttggggaa	ttttttgaca	tccatttggt	540
tgtcaatggt	accgtgacac	agggggacca	aagagtctcc	atgccctatg	cctccaaagg	600
gctgtatcta	gaaactgagg	ctgggtacta	caagctgtcc	ggtgaggcct	atggctttgt	660
ggccaggatc	gatggcagcg	gcaactttca	agtcctgctg	tcagacagat	acttcaacaa	720
gacctgcggg	ctgtgtggca	actttaacat	ctttgctgaa	gatgacttta	tgacccaaga	780
agggaccttg	acctcggacc	cttatgactt	tgccaaactca	tgggctctga	gcagtggaga	840
acagtgggtg	gaacgggcat	ctcctcccag	cagctcatgc	aacatctcct	ctggggaaat	900
gcagaagggc	ctgtgggagc	agtgccagct	tctgaagagc	acctcgggtg	ttgcccgctg	960
ccacctctcg	gtggaccccc	agccttttgt	ggccctgtgt	gagaagactt	tgtgtgagtg	1020
tgctgggggg	ctggagtgcg	cctgccctgc	cctcctggag	tacgcccgga	cctgtgccca	1080
ggagggaatg	gtgctgtacg	gctggaccga	ccacagcgcg	tgacgccag	tgtgccctgc	1140
tggtatggag	tataggcagt	gtgtgtcccc	ttgcgccagg	acctgccaga	gcctgcacat	1200
caatgaaatg	tgtcaggagc	gatgcgtgga	tggctgcagc	tgccctgagg	gacagctcct	1260
ggatgaaggc	ctctgcgtgg	agagcaccga	gtgtccctgc	gtgcattccg	gaaagcgcta	1320
ccctcccggc	acctccctct	ctcgagactg	caacacctgc	atttgccgaa	acagccagtg	1380
gatctgcagc	aatgaagaat	gtccagggga	gtgccttgtc	acaggtcaat	cacacttcaa	1440
gagctttgac	aacagatact	tcaccttcag	tgggatctgc	cagtacctgc	tggcccggga	1500
ttgccaggac	cactccttct	ccattgtcat	tgagactgtc	cagtgtgctg	atgaccgcga	1560
cgctgtgtgc	acctgctccg	tcacctgccc	gctgcctggc	ctgcacaaca	gccttgtgaa	1620
actgaagcat	ggggcaggag	ttgccatgga	tggccaggac	gtccagctcc	ccctcctgaa	1680
aggtgacctc	cgcatccagc	atacagtgac	ggcctccgtg	cgctcagct	acggggagga	1740
cctgcagatg	gactgggatg	gcccggggag	gctgctgggtg	aagctgtccc	ccgtctatgc	1800
cggaagacc	tgccggcctgt	gtgggaatta	caatggcaac	cagggcgacg	acttccttac	1860
cccctctggg	ctggcggagc	cccgggtgga	ggacttcggg	aacgcctgga	agctgcacgg	1920
ggactgccag	gacctgcaga	agcagcacag	cgatccctgc	gccctcaacc	cgcgcatgac	1980
caggttctcc	gaggaggcgt	gcgcggtcct	gacgtccccc	acattcgagg	cctgccatcg	2040
tgccgtcagc	ccgctgccct	acctgcggaa	ctgcccgtac	gacgtgtgct	cctgctcgga	2100
cggccgcgag	tgccctgtgcg	gccccttggc	cagctatgcc	gcccctgcg	cggggagagg	2160
cgtgcgcgtc	gcgtggcgcg	agccaggccg	ctgtgagctg	aaactgcccga	aaggccagggt	2220
gtacctgcag	tgccggacc	cctgcaacct	gacctgccc	tctctctctt	acctggatga	2280
ggaatgcaat	gaggcctgcc	tggagggctg	cttctgcccc	ccagggctct	acatggatga	2340
gaggggggac	tgctgtccca	aggcccagtg	ccctgttac	tatgacggtg	agatcttcca	2400
gccagaagac	atcttctcag	accatcacac	catgtgctac	tgtgaggatg	gcttcatgca	2460
ctgtaccatg	agtggagtcc	ccggaagctt	gctgcctgac	gctgtcctca	gcagtcccct	2520
gtctcatcgc	agcaaaagga	gcctatcctg	tcggccccc	atggtcaagc	tgggtgtgct	2580
cgctgacaac	ctgcgggctg	aagggtcga	gtgtaccaaa	acgtgccaga	actatgacct	2640
ggagtgcattg	agcatgggct	gtgtctctgg	ctgcctctgc	cccccgggca	tgggtccggca	2700
tgagaacaga	tgtgtggccc	tggaaaggtg	tcctgcttc	catcagggca	aggagtatgc	2760
ccctggagaa	acagtgaaga	ttggctgcaa	cacttgtgtc	tgtcgggacc	ggaagtggaa	2820
ctgcacagac	catgtgtgtg	atgccacgtg	ctccacgac	ggcatggccc	actacctcac	2880
cttcgacggg	ctcaaatacc	tgttccccgg	ggagtgccag	tacgttctgg	tgacaggatta	2940
ctgcggcagt	aaccttggga	cctttcggat	cctagtgggg	aataagggat	gcagccacc	3000
ctcagtgaat	tgcaagaaac	gggtcaccat	cctgggtgag	ggaggagaga	ttgagtgtt	3060
tgacggggag	tgaaatgtga	agaggcccat	gaaggatgag	actcactttg	aggtggtgga	3120
gtctggccgg	tacatcattc	tgctgtggg	caaagccctc	tccgtgggtc	gggaccgcca	3180
cctgagcatc	tccgtggtcc	tgaagcagac	ataccaggag	aaagtgtgtg	gcctgtgtgg	3240
gaatlttgat	ggcatccaga	acaatgacct	caccagcagc	aacctccaag	tggaggaaga	3300
ccctgtggac	tttgggaact	cctggaaagt	gagctcgcag	tgtgctgaca	ccagaaaagt	3360
gcctctggac	tcatcccctg	ccacctgcca	taacaacatc	atgaagcaga	cgatgggtgga	3420
ttcctcctgt	agaatcctta	ccagtgacgt	cttccaggac	tgcaacaagc	tgggtggacc	3480
cgagccatat	ctggatgtct	gcatttacga	cacctgctcc	tgtgagtcca	ttggggactg	3540
cgccctgctc	tgcgacacca	ttgctgccta	tgcccacgtg	tgtgcccagc	atggcaagggt	3600

ggtgacctgg	aggacggcca	cattgtgccc	ccagagctgc	gaggagagga	atctccggga	3660
gaacgggtat	gagtgtgagt	ggcgctataa	cagctgtgca	cctgcctgtc	aagtcaactg	3720
tcagcacctc	gagccactgg	cctgcctctg	gcagtgtgtg	gagggctgcc	atgcccactg	3780
ccctccaggg	aaaatcctgg	atgagctttt	gcagaccttg	gttgaccctg	aagactgtcc	3840
agtgtgtgag	gtggctggcc	ggcgttttgc	ctcaggaaag	aaagtcacct	tgaatcccag	3900
tgaccctgag	cactgccaga	tttgccactg	tgatgttgtc	aacctcacct	gtgaagcctg	3960
ccaggagccg	ggaggcctgg	tggtgcctcc	cacagatgcc	ccggtgagcc	ccaccactct	4020
gtatgtggag	gacatctcgg	aaccgcctgt	gcacgatttc	tactgcagca	ggctactgga	4080
cctggtcttc	ctgctggatg	gctcctccag	gctgtccgag	gctgagtttg	aagtgtctgaa	4140
ggcctttgtg	gtggacatga	tggagcggct	gcgcatctcc	cagaagtggg	tccgcgtggc	4200
cgtggtggag	taccacgacg	gctcccacgc	ctacatcggg	ctcaaggacc	ggaagcgacc	4260
gtcagagctg	cggcgcattg	ccagccaggt	gaagtatgcg	ggcagccagg	tggcctccac	4320
cagcgaggtc	ttgaaataca	cactgttcca	aatcttcagc	aagatcgacc	gccctgaagc	4380
ctcccgcata	accctgctcc	tgatggccag	ccaggagccc	caacggatgt	cccggaaact	4440
tgtccgctac	gtccagggcc	tgaagaagaa	gaaggtcatt	gtgatcccgg	tgggcattgg	4500
gccccatgcc	aacctcaagc	agatccgcct	catcgagaag	caggcccctg	agaacaaggc	4560
cttcgtgctg	agcagtgtgg	atgagctgga	gcagcaaagg	gacgagatcg	ttagctacct	4620
ctgtgacctt	gcccctgaag	cccctcctcc	tactctgccc	cccgacatgg	cacaagtcaac	4680
tgtgggcccc	gggctcttgg	gggtttcgac	cctggggccc	aagaggaact	ccatggttct	4740
ggatgtggcg	ttcgtcctgg	aaggatcggg	caaaattggt	gaagccgact	tcaacaggag	4800
caaggagtcc	atggaggagg	tgattcagcg	gatggatgtg	ggccaggaca	gcatccactg	4860
cacggtgctg	cagtactcct	acatggtgac	tgtggagtac	cccttcagcg	aggcacagtc	4920
caaaggggac	atcctgcagc	gggtgcgaga	gatccgctac	cagggcggca	acaggaccaa	4980
cactgggctg	gccctgcggt	acctctctga	ccacagcttc	ttggtcagcc	agggtgaccg	5040
ggagcaggcg	cccaacctgg	tctacatggt	caccggaaat	cctgcctctg	atgagatcaa	5100
gaggctgcct	ggagacatcc	aggtggtgcc	cattggagtg	ggccctaata	ccaactgca	5160
ggagctggag	aggattggct	ggcccaatgc	ccctatcctc	atccaggact	ttgagacgct	5220
cccccgagag	gctcctgacc	tggtgctgca	gaggtgctgc	tccggagagg	ggctgcagat	5280
ccccaccctc	tcccctgcac	ctgactgcag	ccagcccctg	gacgtgatcc	ttctcctgga	5340
tggctcctcc	agtttcccag	cttcttattt	tgatgaaatg	aagagtttcg	ccaagccttt	5400
catttcaaaa	gccaatatag	ggcctcgtct	cactcaggtg	tcagtgtctg	agtatggaag	5460
catcaccacc	attgacgtgc	catggaacgt	ggtcccggag	aaagcccatt	tgctgagcct	5520
tgtggacgct	atgcagcggg	agggaggccc	cagccaaatc	ggggatgcct	tgggctttgc	5580
tgtgcgatac	ttgacttcag	aatgcatggt	tgccaggccg	ggagcctcaa	aggcgggtgt	5640
catcctggtc	acggacgtct	ctgtggattc	agtggatgca	gcagctgatg	ccgccaggtc	5700
caacagagtg	acagtgttcc	ctattggaat	tggagatcgc	tacgatgcag	cccagctacg	5760
gatcttggca	ggcccagcag	gcgactccaa	cgtggtgaa	ctccagcgaa	tcaagacct	5820
ccctaccatg	gtcaccttgg	gcaattcctt	cctccacaaa	ctgtgctctg	gatttgttag	5880
gatttgcctg	gatgaggatg	ggaatgagaa	gagggcccgg	gacgtctgga	ccttgccaga	5940
ccagtgccac	accgtgactt	gccagccaga	tggccagacc	ttgctgaaga	gtcatcgggt	6000
caactgtgac	cgggggctga	ggccttcgtg	ccctaacagc	cagtcccctg	ttaaagtgga	6060
agagacctgt	ggctgcccgt	ggacctgccc	ctgcgtgtgc	acaggcagct	ccactcggca	6120
catcgtgacc	tttgatgggc	agaatttcaa	gctgactggc	agctgttctt	atgtcctatt	6180
tcaaaacaag	gagcaggacc	tggaggatgat	tctccataat	ggtgcctgca	gccctggagc	6240
aaggcagggc	tgcatgaaat	ccatcgaggt	gaagcacagt	gccctctccg	tcgagctgca	6300
cagtgacatg	gaggtgacgg	tgaatgggag	actggtctct	gttccttacg	tgggtgggaa	6360
catggaagtc	aacgtttatg	gtgccatcat	gcatgaggtc	agattcaatc	accttggtea	6420
catcttcaca	ttcactccac	aaaacaatga	gttccaactg	cagctcagcc	ccaagacttt	6480
tgcttcaaa	acgtatggtc	tgtgtgggat	ctgtgatgag	aacggagcca	atgacttcat	6540
gctgagggat	ggcacagtca	ccacagactg	gaaaacactt	gttcaggaat	ggactgtgca	6600
gcgccagggg	cagacgtgcc	agcccatcct	ggaggagcag	tgtcttgtcc	ccgacagctc	6660
ccactgccag	gtcctcctct	taccactggt	tgctgaaatg	cacaaggctc	tggctccagc	6720
cacattctat	gccatctgcc	agcaggacag	ttgccaccag	gagcaagtgt	gtgaggtgat	6780
cgctcttat	gcccacctct	gtcggacca	cggggtctgc	gttgactgga	ggacacctga	6840
ttctgtgctg	atgtcatgcc	caccatctct	ggtctacaac	cactgtgagc	atggctgtcc	6900
ccgctactgt	gatggcaacg	tgagctcctg	tggggacctt	ccctccgaag	gctgtttctg	6960
ccctccagat	aaagtcatgt	tggaaaggcag	ctgtgtccct	gaagaggcct	gcactcagtg	7020
cattggtgag	gatggagtcc	agcaccagtt	cctggaagcc	tgggtcccgg	accaccagcc	7080
ctgtcagatc	tgacatgcc	tcagcgggcg	gaaggtcaac	tgcaacaacg	agccctgccc	7140
cacggccaaa	gctcccacgt	gtggcctgtg	tgaagtagcc	cgctccgcc	agaatgcaga	7200
ccagtgtctg	cccagatgat	agtgtgtgtg	tgaccagtg	agctgtgacc	tgccccagtg	7260
gcctcactgt	gaacgtggcc	tccagcccac	actgaccaac	cctggcgagt	gcagacccaa	7320
cttcacctgc	gcctgcagga	aggaggagtg	caaaagagtg	tccccacct	cctgcccccc	7380
gcaccgtttg	cccacccttc	ggaagaccca	gtgctgtgat	gagtatgagt	gtgcctgcaa	7440

57/92

ctgtgtcaac	tccacagtga	gctgtcccct	tgggtacttg	gcctcaactg	ccaccaatga	7500
ctgtggctgt	accacaacca	cctgccttcc	cgacaagggtg	tgtgtccacc	gaagcaccat	7560
ctaccctgtg	ggccagttct	gggaggaggg	ctgcatgtg	tgcacctgca	ccgacatgga	7620
ggatgccgtg	atgggcctcc	gcgtggccca	gtgctcccag	aagccctgtg	aggacagctg	7680
tccgtcgggc	ttcacttacg	ttctgcatga	aggcgagtgc	tgtggaaggt	gcctgccatc	7740
tgctgtgag	gtggtgactg	gctcaccgcg	gggggactcc	cagtcttcc	ggaagagtgt	7800
cggctcccag	tgggcctccc	cggagaacct	ctgcctcatc	aatgagtgtg	tccgagtgaa	7860
ggaggaggtc	tttatacaac	aaaggaacgt	ctcctgcccc	cagctggagg	tccctgtctg	7920
cccctcgggc	tttcagctga	gctgtaagac	ctcagcgtgc	tgcccaagct	gtcgtctgta	7980
gcgcatggag	gcctgcatgc	tcaatggcac	tgtcattggg	cccgggaaga	ctgtgatgat	8040
cgatgtgtgc	acgacctgcc	gctgcatggt	gcaggtgggg	gtcatctctg	gattcaagct	8100
ggagtgcagg	aagaccacct	gcaaccctcg	ccccctgggt	tacaaggaag	aaaataacac	8160
aggtgaatgt	tgtgggagat	gtttgcctac	ggcttgccac	attcagctaa	gaggaggaca	8220
gatcatgaca	ctgaagcgtg	atgagacgct	ccaggatggc	tgtgatactc	acttctgcaa	8280
ggtcaatgag	agaggagagt	acttctggga	gaagagggtc	acaggctgcc	caccctttga	8340
tgaacacaag	tgtctggctg	agggaggtaa	aattatgaaa	attccaggca	cctgctgtga	8400
cacatgtgag	gagcctgagt	gcaacgacat	cactgccagg	ctgcagtatg	tcaaggtggg	8460
aagctgtaag	tctgaagtag	aggtggatat	ccactactgc	cagggcaaat	gtgccagcaa	8520
agccatgtac	tccattgaca	tcaacgatgt	gcaggaccag	tgctcctgct	gctctccgac	8580
acggacggag	cccatgcagg	tggccctgca	ctgcaccaat	ggctctggtg	tgtacatga	8640
ggttctcaat	gccatggagt	gcaaatgctc	ccccaggaag	tgcagcaagt	gaggctgctg	8700
cagctgcatg	ggtgcctgct	gctgcctgcc	ttggcctgat	ggccaggcca	gagtgtctgc	8760
agtctctctg	atgttctgct	cttgtgcctc	tctgagccca	caataaaggc	tgagctctta	8820
tcttgcaaaa	ggc					8833

SEQ ID NO:2

Met	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ala	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Ile	Leu	Pro	Gly	
1				5					10					15		
Thr	Leu	Cys	Ala	Glu	Gly	Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Ser	Thr	Ala	Arg	Cys	
			20					25					30			
Ser	Leu	Phe	Gly	Ser	Asp	Phe	Val	Asn	Thr	Phe	Asp	Gly	Ser	Met	Tyr	
		35					40					45				
Ser	Phe	Ala	Gly	Tyr	Cys	Ser	Tyr	Leu	Leu	Ala	Gly	Gly	Cys	Gln	Lys	
	50					55					60					
Arg	Ser	Phe	Ser	Ile	Ile	Gly	Asp	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys	Arg	Val	Ser	
65				70						75					80	
Leu	Ser	Val	Tyr	Leu	Gly	Glu	Phe	Phe	Asp	Ile	His	Leu	Phe	Val	Asn	
			85						90					95		
Gly	Thr	Val	Thr	Gln	Gly	Asp	Gln	Arg	Val	Ser	Met	Pro	Tyr	Ala	Ser	
			100					105						110		
Lys	Leu	Glu	Thr	Glu	Ala	Gly	Tyr	Tyr	Lys	Leu	Ser	Gly	Glu	Ala	Tyr	
	115						120					125				
Gly	Phe	Val	Ala	Arg	Ile	Asp	Gly	Ser	Gly	Asn	Phe	Gln	Val	Leu	Leu	
	130					135					140					
Ser	Asp	Arg	Tyr	Phe	Asn	Lys	Thr	Cys	Gly	Leu	Cys	Gly	Asn	Phe	Asn	
145					150					155					160	
Ile	Phe	Ala	Glu	Asp	Asp	Phe	Met	Thr	Gln	Glu	Gly	Thr	Leu	Thr	Ser	
			165						170					175		
Asp	Pro	Tyr	Asp	Phe	Ala	Asn	Ser	Trp	Ala	Leu	Ser	Ser	Gly	Glu	Gln	
		180						185					190			

58/92

Trp Cys Glu Arg Pro Ser Ser Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met
 195 200 205

Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val
 210 215 220

Phe Ala Arg Cys His Pro Leu Val Asp Pro Glu Pro Phe Cys Glu Lys
 225 230 235 240

Thr Leu Cys Glu Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu
 245 250 255

Leu Glu Tyr Ala Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly
 260 265 270

Trp Thr Asp His Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu
 275 280 285

Tyr Arg Gln Cys Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His
 290 295 300

Ile Asn Glu Met Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro
 305 310 315 320

Glu Gly Gln Leu Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys
 325 330 335

Pro Cys Val His Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser
 340 345 350

Arg Asp Cys Asn Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser
 355 360 365

Asn Glu Glu Cys Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe
 370 375 380

Lys Ser Phe Asp Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr
 385 390 395 400

Leu Leu Ala Arg Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu
 405 410 415

Thr Val Gln Cys Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val
 420 425 430

Thr Val Arg Leu Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His
 435 440 445

Gly Ala Gly Val Ala Met Asp Gly Gln Asp Val Gln Leu Pro Leu Leu
 450 455 460

Lys Gly Asp Leu Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu
 465 470 475 480

Ser Tyr Gly Glu Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu
 485 490 495

Leu Val Lys Leu Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys
 500 505 510

Gly Asn Tyr Asn Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly
 515 520 525

Leu Ala Glu Pro Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His

61/92

Cys	His	Cys	Asp	Val	Val	Asn	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Cys	Gln	Glu
1205						1210					1215			
Pro	Gly	Gly	Leu	Val	Val	Pro	Pro	Thr	Asp	Ala	Pro	Val	Ser	Pro
1220						1225					1230			
Thr	Thr	Leu	Tyr	Val	Glu	Asp	Ile	Ser	Glu	Pro	Pro	Leu	His	Asp
1235						1240					1245			
Phe	Tyr	Cys	Ser	Arg	Leu	Leu	Asp	Leu	Val	Phe	Leu	Leu	Asp	Gly
1250						1255					1260			
Ser	Ser	Arg	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu	Phe	Glu	Val	Leu	Lys	Ala	Phe
1265						1270					1275			
Val	Val	Asp	Met	Met	Glu	Arg	Leu	Arg	Ile	Ser	Gln	Lys	Trp	Val
1280						1285					1290			
Arg	Val	Ala	Val	Val	Glu	Tyr	His	Asp	Gly	Ser	His	Ala	Tyr	Ile
1295						1300					1305			
Gly	Leu	Lys	Asp	Arg	Lys	Arg	Pro	Ser	Glu	Leu	Arg	Arg	Ile	Ala
1310						1315					1320			
Ser	Gln	Val	Lys	Tyr	Ala	Gly	Ser	Gln	Val	Ala	Ser	Thr	Ser	Glu
1325						1330					1335			
Val	Leu	Lys	Tyr	Thr	Leu	Phe	Gln	Ile	Phe	Ser	Lys	Ile	Asp	Arg
1340						1345					1350			
Pro	Glu	Ala	Ser	Arg	Ile	Thr	Leu	Leu	Leu	Met	Ala	Ser	Gln	Glu
1355						1360					1365			
Pro	Gln	Arg	Met	Ser	Arg	Asn	Phe	Val	Arg	Tyr	Val	Gln	Gly	Leu
1370						1375					1380			
Lys	Lys	Lys	Lys	Val	Ile	Val	Ile	Pro	Val	Gly	Ile	Gly	Pro	His
1385						1390					1395			
Ala	Asn	Leu	Lys	Gln	Ile	Arg	Leu	Ile	Glu	Lys	Gln	Ala	Pro	Glu
1400						1405					1410			
Asn	Lys	Ala	Phe	Val	Leu	Ser	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Glu	Gln	Gln
1415						1420					1425			
Arg	Asp	Glu	Ile	Val	Ser	Tyr	Leu	Cys	Asp	Leu	Ala	Pro	Glu	Ala
1430						1435					1440			
Pro	Pro	Pro	Thr	Leu	Pro	Pro	Asp	Met	Ala	Gln	Val	Thr	Val	Gly
1445						1450					1455			
Pro	Gly	Leu	Leu	Gly	Val	Ser	Thr	Leu	Gly	Pro	Lys	Arg	Asn	Ser
1460						1465					1470			
Met	Val	Leu	Asp	Val	Ala	Phe	Val	Leu	Glu	Gly	Ser	Asp	Lys	Ile
1475						1480					1485			
Gly	Glu	Ala	Asp	Phe	Asn	Arg	Ser	Lys	Glu	Phe	Met	Glu	Glu	Val
1490						1495					1500			
Ile	Gln	Arg	Met	Asp	Val	Gly	Gln	Asp	Ser	Ile	His	Val	Thr	Val
1505						1510					1515			

62/92

Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val Glu Tyr Pro Phe Ser Glu
 1520 1525 1530
 Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln Arg Val Arg Glu Ile Arg
 1535 1540 1545
 Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr Gly Leu Ala Leu Arg Tyr
 1550 1555 1560
 Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly Asp Arg Glu Gln
 1565 1570 1575
 Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro Ala Ser Asp
 1580 1585 1590
 Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro Ile Gly
 1595 1600 1605
 Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly Trp
 1610 1615 1620
 Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg
 1625 1630 1635
 Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg Cys Cys Ser Gly Glu Gly
 1640 1645 1650
 Leu Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala Pro Asp Cys Ser Gln Pro
 1655 1660 1665
 Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala
 1670 1675 1680
 Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser
 1685 1690 1695
 Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu Gln
 1700 1705 1710
 Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro
 1715 1720 1725
 Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu
 1730 1735 1740
 Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg
 1745 1750 1755
 Tyr Leu Thr Ser Glu Met His Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys
 1760 1765 1770
 Ala Val Val Ile Leu Val Thr Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp
 1775 1780 1785
 Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro
 1790 1795 1800
 Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu
 1805 1810 1815
 Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile
 1820 1825 1830
 Glu Asp Leu Pro Thr Met Val Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His

63/92

1835						1840						1845			
Lys	Leu	Cys	Ser	Gly	Phe	Val	Arg	Ile	Cys	Met	Asp	Glu	Asp	Gly	
1850						1855					1860				
Asn	Glu	Lys	Arg	Pro	Gly	Asp	Val	Trp	Thr	Leu	Pro	Asp	Gln	Cys	
1865						1870					1875				
His	Thr	Val	Thr	Cys	Gln	Pro	Asp	Gly	Gln	Thr	Leu	Leu	Lys	Ser	
1880						1885					1890				
His	Arg	Val	Asn	Cys	Asp	Arg	Gly	Leu	Arg	Pro	Ser	Cys	Pro	Asn	
1895						1900					1905				
Ser	Gln	Ser	Pro	Val	Lys	Val	Glu	Glu	Thr	Cys	Gly	Cys	Arg	Trp	
1910						1915					1920				
Thr	Cys	Pro	Cys	Val	Cys	Thr	Gly	Ser	Ser	Thr	Arg	His	Ile	Val	
1925						1930					1935				
Thr	Phe	Asp	Gly	Gln	Asn	Phe	Lys	Leu	Thr	Gly	Ser	Cys	Ser	Tyr	
1940						1945					1950				
Val	Leu	Phe	Gln	Asn	Lys	Glu	Gln	Asp	Leu	Glu	Val	Ile	Leu	His	
1955						1960					1965				
Asn	Gly	Ala	Cys	Ser	Pro	Gly	Ala	Arg	Gln	Gly	Cys	Met	Lys	Ser	
1970						1975					1980				
Ile	Glu	Val	Lys	His	Ser	Ala	Leu	Ser	Val	Glu	Leu	His	Ser	Asp	
1985						1990					1995				
Met	Glu	Val	Thr	Val	Asn	Gly	Arg	Leu	Val	Ser	Val	Pro	Tyr	Val	
2000						2005					2010				
Gly	Gly	Asn	Met	Glu	Val	Asn	Val	Tyr	Gly	Ala	Ile	Met	His	Glu	
2015						2020					2025				
Val	Arg	Phe	Asn	His	Leu	Gly	His	Ile	Phe	Thr	Phe	Thr	Pro	Gln	
2030						2035					2040				
Asn	Asn	Glu	Phe	Gln	Leu	Gln	Leu	Ser	Pro	Lys	Thr	Phe	Ala	Ser	
2045						2050					2055				
Lys	Thr	Tyr	Gly	Leu	Cys	Gly	Ile	Cys	Asp	Glu	Asn	Gly	Ala	Asn	
2060						2065					2070				
Asp	Phe	Met	Leu	Arg	Asp	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	Asp	Trp	Lys	Thr	
2075						2080					2085				
Leu	Val	Gln	Glu	Trp	Thr	Val	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Thr	Cys	Gln	
2090						2095					2100				
Pro	Glu	Gln	Cys	Leu	Val	Pro	Asp	Ser	Ser	His	Cys	Gln	Val	Leu	
2105						2110					2115				
Leu	Leu	Pro	Leu	Phe	Ala	Glu	Cys	His	Lys	Val	Leu	Ala	Pro	Ala	
2120						2125					2130				
Thr	Phe	Tyr	Ala	Ile	Cys	Gln	Gln	Asp	Ser	Cys	His	Gln	Glu	Gln	
2135						2140					2145				
Val	Cys	Glu	Val	Ile	Ala	Ser	Tyr	Ala	His	Leu	Cys	Arg	Thr	Asn	
2150						2155					2160				

64/92

Gly Val Cys Val Asp Trp Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser
 2165 2170 2175
 Cys Pro Pro Ser Leu Val Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro
 2180 2185 2190
 Arg His Cys Asp Gly Asn Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser
 2195 2200 2205
 Glu Gly Cys Phe Cys Pro Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser
 2210 2215 2220
 Cys Val Pro Glu Glu Ala Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly
 2225 2230 2235
 Val Gln His Gln Phe Leu Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro
 2240 2245 2250
 Cys Gln Ile Cys Thr Cys Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr
 2255 2260 2265
 Thr Gln Pro Cys Pro Thr Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys
 2270 2275 2280
 Glu Val Ala Arg Leu Arg Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu
 2285 2290 2295
 Tyr Glu Cys Val Cys Asp Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val
 2300 2305 2310
 Pro His Cys Glu Arg Gly Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly
 2315 2320 2325
 Glu Cys Arg Pro Asn Phe Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys
 2330 2335 2340
 Lys Arg Val Ser Pro Pro Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr
 2345 2350 2355
 Leu Arg Lys Thr Gln Cys Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn
 2360 2365 2370
 Cys Val Asn Ser Thr Val Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser
 2375 2380 2385
 Thr Ala Thr Asn Asp Cys Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro
 2390 2395 2400
 Asp Lys Val Cys Val His Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln
 2405 2410 2415
 Phe Trp Glu Glu Gly Cys Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu
 2420 2425 2430
 Asp Ala Val Met Gly Leu Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro
 2435 2440 2445
 Cys Glu Asp Ser Cys Arg Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu
 2450 2455 2460
 Gly Glu Cys Cys Gly Arg Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val
 2465 2470 2475

65/92

Thr Gly Ser Pro Arg Gly Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val
 2480 2485 2490
 Gly Ser Gln Trp Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg
 2495 2500 2505
 Val Lys Glu Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro
 2510 2515 2520
 Gln Leu Glu Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys
 2525 2530 2535
 Lys Thr Ser Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu
 2540 2545 2550
 Ala Cys Met Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val
 2555 2560 2565
 Met Ile Asp Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly
 2570 2575 2580
 Val Ile Ser Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn
 2585 2590 2595
 Pro Cys Pro Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys
 2600 2605 2610
 Cys Gly Arg Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly
 2615 2620 2625
 Gly Gln Ile Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly
 2630 2635 2640
 Cys Asp Thr His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe
 2645 2650 2655
 Trp Glu Lys Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys
 2660 2665 2670
 Cys Leu Ala Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys
 2675 2680 2685
 Cys Asp Thr Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg
 2690 2695 2700
 Leu Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val
 2705 2710 2715
 Asp Ile His Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr
 2720 2725 2730
 Ser Ile Asp Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser
 2735 2740 2745
 Pro Thr Arg Thr Glu Pro Met Gln His Cys Thr Asn Gly Ser Val
 2750 2755 2760
 Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro
 2765 2770 2775
 Arg Lys Cys Ser Lys
 2780

SEQ ID NO:3

Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp
 1 5 10 15
 Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr
 20 25 30
 Asp Leu Glu Cys Met Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro
 35 40 45
 Pro Gly Met Val Arg His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys
 50 55 60
 Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys
 65 70 75 80
 Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr
 85 90 95
 Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr
 100 105 110
 Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr
 115 120 125
 Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile
 130 135 140
 Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys
 145 150 155 160
 Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly
 165 170 175
 Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val
 180 185 190
 Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser
 195 200 205
 Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr
 210 215 220
 Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln
 225 230 235 240
 Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val
 245 250 255
 Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg
 260 265 270
 Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met
 275 280 285
 Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val
 290 295 300
 Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val
 305 310 315 320

67/92

Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys
 325 330 335
 Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly
 340 345 350
 Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu
 355 360 365
 Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn
 370 375 380
 Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu
 385 390 395 400
 Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro
 405 410 415
 Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp
 420 425 430
 Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys
 435 440 445
 Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys
 450 455 460
 Asp Val Val Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu
 465 470 475 480
 Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val
 485 490 495
 Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu
 500 505 510
 Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala
 515 520 525
 Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu
 530 535 540
 Arg Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp
 545 550 555 560
 Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu
 565 570 575
 Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala
 580 585 590
 Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys
 595 600 605
 Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Thr Leu Leu Leu Met Ala Ser
 610 615 620
 Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly
 625 630 635 640
 Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His
 645 650 655
 Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn

69/92

Asp	Ala	Leu	Gly	Phe	Ala	Val	Arg	Tyr	Leu	Thr	Ser	Glu	Met	His
1010						1015					1020			
Gly	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Lys	Ala	Val	Val	Ile	Leu	Val	Thr
1025						1030					1035			
Asp	Val	Ser	Val	Asp	Ser	Val	Asp	Ala	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg
1040						1045					1050			
Ser	Asn	Arg	Val	Thr	Val	Phe	Pro	Ile	Gly	Ile	Gly	Asp	Arg	Tyr
1055						1060					1065			
Asp	Ala	Ala	Gln	Leu	Arg	Ile	Leu	Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Asp	Ser
1070						1075					1080			
Asn	Val	Val	Lys	Leu	Gln	Arg	Ile	Glu	Asp	Leu	Pro	Thr	Met	Val
1085						1090					1095			
Thr	Leu	Gly	Asn	Ser	Phe	Leu	His	Lys	Leu	Cys	Ser	Gly	Phe	Val
1100						1105					1110			
Arg	Ile	Cys	Met	Asp	Glu	Asp	Gly	Asn	Glu	Lys	Arg	Pro	Gly	Asp
1115						1120					1125			
Val	Trp	Thr	Leu	Pro	Asp	Gln	Cys	His	Thr	Val	Thr	Cys	Gln	Pro
1130						1135					1140			
Asp	Gly	Gln	Thr	Leu	Leu	Lys	Ser	His	Arg	Val	Asn	Cys	Asp	Arg
1145						1150					1155			
Gly	Leu	Arg	Pro	Ser	Cys	Pro	Asn	Ser	Gln	Ser	Pro	Val	Lys	Val
1160						1165					1170			
Glu	Glu	Thr	Cys	Gly	Cys	Arg	Trp	Thr	Cys	Pro	Cys	Val	Cys	Thr
1175						1180					1185			
Gly	Ser	Ser	Thr	Arg	His	Ile	Val	Thr	Phe	Asp	Gly	Gln	Asn	Phe
1190						1195					1200			
Lys	Leu	Thr	Gly	Ser	Cys	Ser	Tyr	Val	Leu	Phe	Gln	Asn	Lys	Glu
1205						1210					1215			
Gln	Asp	Leu	Glu	Val	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Cys	Ser	Pro	Gly
1220						1225					1230			
Ala	Arg	Gln	Gly	Cys	Met	Lys	Ser	Ile	Glu	Val	Lys	His	Ser	Ala
1235						1240					1245			
Leu	Ser	Val	Glu	Leu	His	Ser	Asp	Met	Glu	Val	Thr	Val	Asn	Gly
1250						1255					1260			
Arg	Leu	Val	Ser	Val	Pro	Tyr	Val	Gly	Gly	Asn	Met	Glu	Val	Asn
1265						1270					1275			
Val	Tyr	Gly	Ala	Ile	Met	His	Glu	Val	Arg	Phe	Asn	His	Leu	Gly
1280						1285					1290			
His	Ile	Phe	Thr	Phe	Thr	Pro	Gln	Asn	Asn	Glu	Phe	Gln	Leu	Gln
1295						1300					1305			
Leu	Ser	Pro	Lys	Thr	Phe	Ala	Ser	Lys	Thr	Tyr	Gly	Leu	Cys	Gly
1310						1315					1320			

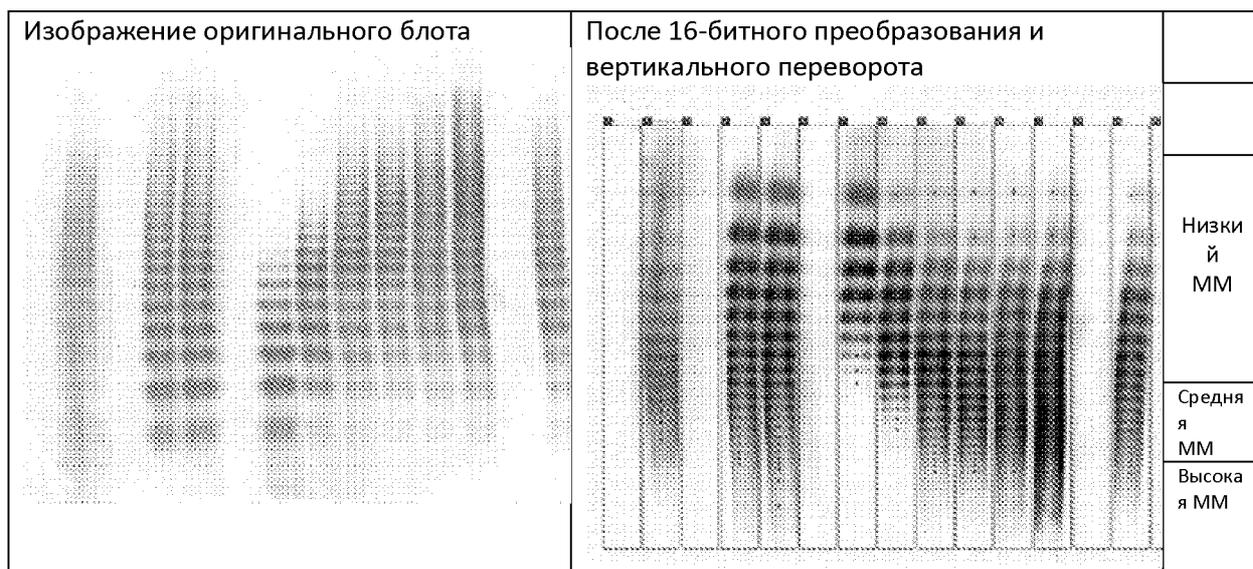
70/92

Ile Cys Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly
 1325 1330 1335
 Thr Val Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val
 1340 1345 1350
 Gln Arg Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys
 1355 1360 1365
 Leu Val Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu
 1370 1375 1380
 Phe Ala Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala
 1385 1390 1395
 Ile Cys Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val
 1400 1405 1410
 Ile Ala Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val
 1415 1420 1425
 Asp Trp Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser
 1430 1435 1440
 Leu Val Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp
 1445 1450 1455
 Gly Asn Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe
 1460 1465 1470
 Cys Pro Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu
 1475 1480 1485
 Glu Ala Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln
 1490 1495 1500
 Phe Leu Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys
 1505 1510 1515
 Thr Cys Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys
 1520 1525 1530
 Pro Thr Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg
 1535 1540 1545
 Leu Arg Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val
 1550 1555 1560
 Cys Asp Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu
 1565 1570 1575
 Arg Gly Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro
 1580 1585 1590
 Asn Phe Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser
 1595 1600 1605
 Pro Pro Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr
 1610 1615 1620
 Gln Cys Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser
 1625 1630 1635
 Thr Val Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn

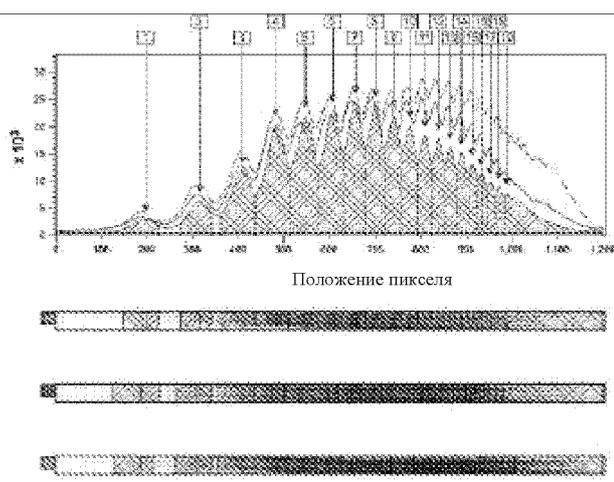
71/92

1640														
Asp	Cys	Gly	Cys	Thr	Thr	Thr	Thr	Cys	Leu	Pro	Asp	Lys	Val	Cys
1655						1660					1665			
Val	His	Arg	Ser	Thr	Ile	Tyr	Pro	Val	Gly	Gln	Phe	Trp	Glu	Glu
1670						1675					1680			
Gly	Cys	Asp	Val	Cys	Thr	Cys	Thr	Asp	Met	Glu	Asp	Ala	Val	Met
1685						1690					1695			
Gly	Leu	Arg	Val	Ala	Gln	Cys	Ser	Gln	Lys	Pro	Cys	Glu	Asp	Ser
1700						1705					1710			
Cys	Arg	Ser	Gly	Phe	Thr	Tyr	Val	Leu	His	Glu	Gly	Glu	Cys	Cys
1715						1720					1725			
Gly	Arg	Cys	Leu	Pro	Ser	Ala	Cys	Glu	Val	Val	Thr	Gly	Ser	Pro
1730						1735					1740			
Arg	Gly	Asp	Ser	Gln	Ser	Ser	Trp	Lys	Ser	Val	Gly	Ser	Gln	Trp
1745						1750					1755			
Ala	Ser	Pro	Glu	Asn	Pro	Cys	Leu	Ile	Asn	Glu	Cys	Val	Arg	Val
1760						1765					1770			
Lys	Glu	Glu	Val	Phe	Ile	Gln	Gln	Arg	Asn	Val	Ser	Cys	Pro	Gln
1775						1780					1785			
Leu	Glu	Val	Pro	Val	Cys	Pro	Ser	Gly	Phe	Gln	Leu	Ser	Cys	Lys
1790						1795					1800			
Thr	Ser	Ala	Cys	Cys	Pro	Ser	Cys	Arg	Cys	Glu	Arg	Met	Glu	Ala
1805						1810					1815			
Cys	Met	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Ile	Gly	Pro	Gly	Lys	Thr	Val	Met
1820						1825					1830			
Ile	Asp	Val	Cys	Thr	Thr	Cys	Arg	Cys	Met	Val	Gln	Val	Gly	Val
1835						1840					1845			
Ile	Ser	Gly	Phe	Lys	Leu	Glu	Cys	Arg	Lys	Thr	Thr	Cys	Asn	Pro
1850						1855					1860			
Cys	Pro	Leu	Gly	Tyr	Lys	Glu	Glu	Asn	Asn	Thr	Gly	Glu	Cys	Cys
1865						1870					1875			
Gly	Arg	Cys	Leu	Pro	Thr	Ala	Cys	Thr	Ile	Gln	Leu	Arg	Gly	Gly
1880						1885					1890			
Gln	Ile	Met	Thr	Leu	Lys	Arg	Asp	Glu	Thr	Leu	Gln	Asp	Gly	Cys
1895						1900					1905			
Asp	Thr	His	Phe	Cys	Lys	Val	Asn	Glu	Arg	Gly	Glu	Tyr	Phe	Trp
1910						1915					1920			
Glu	Lys	Arg	Val	Thr	Gly	Cys	Pro	Pro	Phe	Asp	Glu	His	Lys	Cys
1925						1930					1935			
Leu	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys	Ile	Met	Lys	Ile	Pro	Gly	Thr	Cys	Cys
1940						1945					1950			
Asp	Thr	Cys	Glu	Glu	Pro	Glu	Cys	Asn	Asp	Ile	Thr	Ala	Arg	Leu
1955						1960					1965			

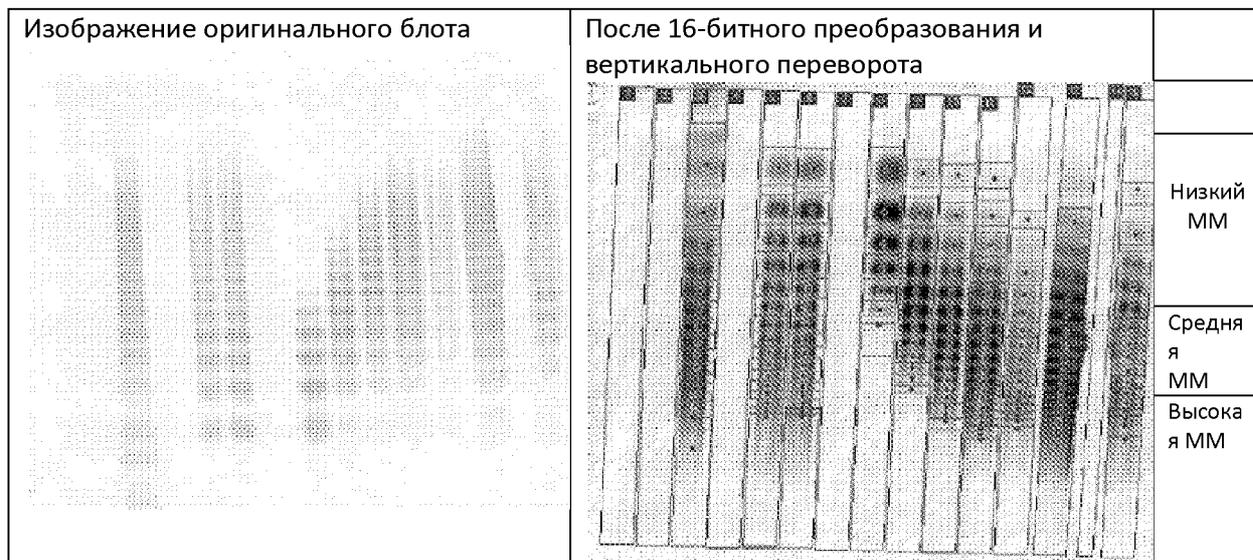
73/92
ФИГ. 61



Порядок образцов на полосу

ПОЛОСА	ОБРАЗЕЦ	Стадия	Полоса наложения 11 + 12 + 14
1	SB		
2	Контроль. Стандартная плазма человека Dade Behring		
3	SB		
4	VW_USS_04 L до обработки SD		
5	VW_USS_04 L		
6	SB		
7	VW_USS_04 FT		
8	W1 VW_USS_04		
9	W2 VW_USS_04		
10	VW_USS_04 VE		
11	VW_USS_04 E		
12	VW_USS_04 NE		
13	SB		
14	ORVWSEC16070F (содержание антигена 530 мкг/мл)	Пол. Контроль	
15	SB		

74/92
ФИГ. 62

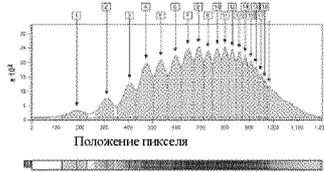
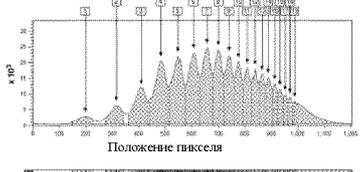


Порядок образцов на полосе

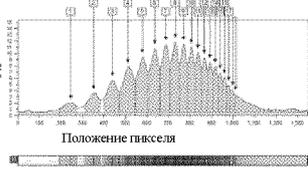
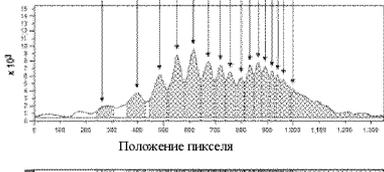
Полоса	ОБРАЗЕЦ	Стадия	Полоса наложения 11 + 12 + 15
1	SB		<p>Полоса наложения 11 + 12 + 15</p>
2	SB		
3	Контроль: Стандартная плазма человека Dade Behring		
4	SB		
5	VW_USS_05 L до SD		
6	VW_USS_05 L		
7	SB		
8	VW_USS_05 FT		
9	VW_USS_05 W		
10	VW_USS_05 VE		
11	VW_USS_05 E		
12	VW_USS_05 NE		
13	VW_USS_05 PE		
14	SB		
15	ORVWSEC16070F (содержание антигена 530 мкг/мл)	Пол. Контроль	

75/92
ФИГ. 63

РЕЗУЛЬТАТЫ: ОЦЕНКА

		VW_USS_04 E	VW_USS_04 NE	Положительный контроль ORVWSEC16070F
Профили полосы:				
		Полоса 11	Полоса 12	Полоса 14
		Бэнд %	Бэнд %	Бэнд %
СУММ бэнд 1-6	Низкая ММ	34,91	32,93	40,86
СУММ бэнд 7-12	Средняя ММ	39	33,81	40,27
СУММ бэнд > 12	Высокая ММ	26,08	33,24	18,87

DF3362/023

		VW_USS_05 E	VW_USS_05 NE	Положительный контроль ORVWSEC16070F
Профили полосы:				
		Полоса 11	Полоса 12	Полоса 15
		Бэнд %	Бэнд %	Бэнд %
СУММ бэнд 1-6	Низкая ММ	38,39	29,65	37,21
СУММ бэнд 7-12	Средняя ММ	36,87	36,97	29,51
СУММ бэнд > 12	Высокая ММ	24,74	33,38	33,27

Данные положительного контроля ORVWSEC16070F недействительны из-за деформации блота (см. Изображение на исходном блоте и профиле полосы)

Замечание: обычно полоса 15 не используется, потому что пограничная зона не проста в обращении.

76/92

ФИГ. 64

СЛИТЫЙ БЕЛОК VWF - FVIII, В КОТОРОМ АКТИВНЫЙ FVIII ВСТРОЕН В МОТИВ VWF
 vWF 764–1336 - тяжелая цепь FVIII от 24 до 760 - vWF 2218–2593 - легкая цепь FVIII 1333–2351 - vWF 2620–2813
 Количество аминокислот рассчитывается от 1 - включая сигнальный пептид и/или пропептид (источник Uniprot)

vWF с 2218 по 2593 является частью, богатой гликозилированием, с

2223 N-связанный (GlcNAc ...) аспарагин

2290 N-связанный (GlcNAc ...) аспарагин

2298 O-связанный (GalNAc ...) треонин

2357 N-связанный (GlcNAc ...) аспарагин

2400 N-связанный (GlcNAc ...) аспарагин

2546 N-связанный (GlcNAc ...) аспарагин

2585 N-связанный (GlcNAc ...) аспарагин

VWF⇒

764	770	780	790	800		
SLSCRPP		MVKLVCPADN	LRAEGLECTK	TCQNYDLECM		
	810	820	830	840	850	
SMGOKSGCLC	PPGMVRHENR	OKALERCPCF	HQGKEYAPGE	TVKIGCNTOK		
	860	870	880	890	900	
CQDRKWNCTD	HVCDATCSTI	GMAHYLTFDG	LKYLFPGECQ	YVLVQDYCGS		
	910	920	930	940	950	
NPGTFRILVG	NKGCSPSVK	CKKRVTLVE	GGEIELFDGE	VNVKRPMDKE		
	960	970	980	990	1000	
THFEVVEGR	YIILLGKAL	SVVWDRHLSI	SVVLKQTYQE	KVCGLCGNFD		
	1010	1020	1030	1040	1050	
GIQNNDLTSS	NLQVEEDPVD	FGNSWKVSSQ	CADTRKVPLD	SSPATCHNNI		
	1060	1070	1080	1090	1100	
MKQTMVDSSC	RILTSDVFQD	CNKLVDPPEY	LDVCIYDTCS	CESIGDCACF		
	1110	1120	1130	1140	1150	
CDTIAAYAHV	CAQHGVVTV	RTATLCPQSC	EERNLRENGY	ECEWRYNSCA		
	1160	1170	1180	1190	1200	
PACQVTCQHP	EPLACPQOK	EGCHAHCPPG	KILDELLQTC	VPEDPCVCE		
	1210	1220	1230	1240	1250	
VAGRRFASGK	KVTLNPSDPE	HCQICHCDVV	NLTCEACQEP	GGLVVPPTDA		
	1260	1270	1280	1290	1300	
PVSPTTLYVE	DISEPPLHDF	YCSRLDLVF	LLDGSSRLSE	AEFEVLKAFV		
	1310	1320	1330	⇒vWF1336 FVIII⇒24-30	(тяжелая цепь) 40	50
VDMMERLRIS	QKWVRVAVVE	YHDGSHAYIG	LKDRKR	YYLGAVE	LSWDYMQSDL	GELPVDARFP
	60	70	80	90	100	
PRVPSFPFN	TSVYKTLF	VEFTDHLFNI	AKPRPPWMGL	LGPTIQAEVY		
	110	120	130	140	150	
DTVVITLKNM	ASHPVSLHAV	GVSYWKASEG	AEYDDQTSQR	EKEDDKVFPG		
	160	170	180	190	200	
GSHTYVWQVL	KENGPMSDP	LCLTYSYLSH	VDLVKDLNSG	LIGALLVCRE		
	210	220	230	240	250	
GSLAKEKTQT	HKFILLFAV	FDEGKSWHSE	TKNSLMQDRD	AASARAWPKM		
	260	270	280	290	300	
HTVNGYVNRS	LPGLIGCHRK	SVYWHVIGMG	TPPEVHSIFL	EGHTFLVRNH		
	310	320	330	340	350	
RQASLEISPI	TFLTAQTLLM	DLGQFLLFCH	ISSHQHDGME	AYVKVDSCPE		
	360	370	380	390	400	
EPQLRMKNNE	EAEDYDDL	DSEMDVVRFD	DDNSPSFIQI	RSVAKKHPKT		
	410	420	430	440	450	
WVHYIAAEEE	DWDYAPLVLA	PDDRSYKSQY	LNNGPQRIGR	KYKKVRFMAY		
	460	470	480	490	500	
TDETFKTREA	IQHESGILGP	LLYGEVGD	LIIFKNQASR	PYNIYPHGIT		
	510	520	530	540	550	
DVRPLYSRRL	PKGVKHLKDF	PILPGEIFKY	KWTVTVEDGP	TKSDPRCLTR		
	560	570	580	590	600	
YYSSFVNMER	DLASGLIGPL	LICYKESVDQ	RGNQIMSDKR	NVILFSVFDE		
	610	620	630	640	650	
NRSWYLTENI	QRFLPNPAGV	QLEDPEFQAS	NIMHSINGYV	FDSLQLSVCL		
	660	670	680	690	700	
HEVAYWYILS	IGAQTDFLSV	FFSGYTFKHK	MVYEDTLTLF	PFSGETVFMS		
	710	720	730	740	750	
MENPGLWILG	CHNSDFRNRG	MTALLKVSSC	DKNTGDYED	SYEDISAYLL		
⇐FVIII	760	VWF⇒(2218)	VWF2230	VWF2240	VWF2250	
SKNNAIEPRS	RHC	DGNVSSCGDH	PSEGFCPPD	KVMLEGSOKP		

VWF2260	VWF2270	VWF2280	VWF2290	VWF2300
EEACTQCIGE	DGVQHQFLEA	WVPDHQPCQI	CTCLSGRQVNV	CTTQPCPTAK
VWF2310	VWF2320	VWF2330	VWF2340	VWF2350
APTCGLCEVA	RLRQNADQCC	PEYEOKCDPV	SCDLPPVPHC	ERGLQPTLTN
VWF2360	VWF2370	VWF2380	VWF2390	VWF2400
PGECRPNFTC	ACRKEECKRV	SPPSCPPHRL	PTLRKTQCCD	EYECACNOKN
VWF2410	VWF2420	VWF2430	VWF2440	VWF2450
STVSCPLGYL	ASTATNDCGC	TTTTCLPDKV	OKHRSTIYPV	GQFWEEGCDV
VWF2460	VWF2470	VWF2480	VWF2490	VWF2500
CTCTDMEDAV	MGLRVAQCSQ	KPCEDSCRSG	FTYVLHEGEC	CGRCLPSACE
VWF2510	VWF2520	VWF2530	VWF2540	VWF2550
VVTGSPRGDS	QSSWKSQVGSQ	WASPENPCLI	NEOKRVKEEV	FIQQRNVSCP
VWF2560	VWF2570	VWF2580	VWF2590	VWF2593
QLEVPVCPSPG	FQLSCKTSAC	CPSCRCERME	ACMLNGTVIG	PGK
FVIII ⇨(ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ)				
1333	1340	1350		
ALKQFRLP	LEETELEKRI			
1360	1370	1380	1390	1400
IVDDTSTQWS	KNMKHLTPST	LTQIDYNEKE	KGAITQSPLS	DCLTRSHSIP
1410	1420	1430	1440	1450
QANRSPLPIA	KVSSFPSIRP	IYLTRVLFQD	NSSHLPAASY	RKKDSGVQES
1460	1470	1480	1490	1500
SHFLQGAKKN	NLSLAILTLE	MTGDQREVGS	LGTSATNSVT	YKKVENTVLP
1510	1520	1530	1540	1550
KPDLPKTSGK	VELLPKVHIY	QKDLFPTETS	NGSPGHLDLV	EGSLLQGTEG
1560	1570	1580	1590	1600
AIKWNEANRP	GKVPFLRVAT	ESSAKTPSKL	LDPLAWDNHY	GTQIPKEEWK
1610	1620	1630	1640	1650
SQEKSPKTA	FKKKDTILSL	NACESNHAIA	AINEGQNKPE	IEVTWAKQGR
1660	1670	1680	1690	1700
TERLCSQNPP	VLKRHQREIT	RTTLQSDQEE	IDYDDTISVE	MKKEDFDIYD
1710	1720	1730	1740	1750
EDENQSPRSF	QKKTRHYFIA	AVERLWDYGM	SSSPHVLNRN	AQSGSVPQFK
1760	1770	1780	1790	1800
KVVFQEFTDG	SFTQPLYRGE	LNEHLGLLGP	YIRAEVEDNI	MVTFRNQASR
1810	1820	1830	1840	1850
PYSFYSSLIS	YEEDQRQGAE	PRKNFVKPNE	TKTYFWKVQH	HMAPTKDEFD
1860	1870	1880	1890	1900
CKAWAYFSDV	DLEKDVHSGL	IGPLLVCHTN	TLNPAHGRQV	TVQEFALFFT
1910	1920	1930	1940	1950
IFDETKSWYF	TENMERN CRA	PCNIQMEDPT	FKENYRFHAI	NGYIMDTLPG
1960	1970	1980	1990	2000
LVMAQDQRIR	WYLLSMGSNE	NIHSIHFSGH	VFTVRKKEEY	KMALYNLYPG
2010	2020	2030	2040	2050
VFETVEMLPSK	AGIWRVECL	IGEHLHAGMS	TLFLVYSNKC	QTPLGMASGH
2060	2070	2080	2090	2100
IRDFQITASG	QYGQWAPKLA	RLHYSGSINA	WSTKEPFSWI	KVDLLAPMII
2110	2120	2130	2140	2150
HGIKTQGARQ	KFSSLYISQF	IIMYSLDGKK	WQTYRGNSTG	TLMVFFGNVD
2160	2170	2180	2190	2200
SSGIKHNIFN	PPIIARYIRL	HPTHYSIRST	LRMELMGCDL	NSCSMPLGME
2210	2220	2230	2240	2250
SKAISDAQIT	ASSYFTNMFA	TWSPSKARLH	LQGRSNAWRP	QVNNPKEWLQ
2260	2270	2280	2290	2300
VDFQKTMKVT	GVTTQGKSL	LTSMYVKEFL	ISSSQDGHQW	TLFFQNGKVK
2310	2320	2330	2340	2350
VFQGNQDSFT	PVVNSLDPPL	LTRYLRIHPQ	SWVHQIALRM	EVLGCEAQDL
2351 ⇨FVIII	VWF ⇨2620	2630	2640	2650
Y	R	KTTCPNCPPLG	YKEENNTGEC	CGRCLPTACT
2660	2670	2680	2690	2700
IQLRGGQIMT	LKRDETLQDG	CDTHFCKVNE	RGEYFWEKRV	TGCPPFDEHK
2710	2720	2730	2740	2750
CLAEGGKIMK	IPGTCCDTCE	EPECNDITAR	LQYVKVGSCK	SEVEVDIHYC
2760	2770	2780	2790	2800
QGKCASKAMY	SIDINDVQDQ	CSCCSPTRTE	PMQVALHCTN	GSVVYHEVLN
2810				
AMECKCSPRK	CSK			

ФИГ. 65

СЛИТЫЙ БЕЛОК VWF-FVIII, В КОТОРОМ ДОМЕН, БОГАТЫЙ N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕМ, ЗАМЕНЯЕТ ДОМЕН FVIII-B

Тяжелая цепь FVIII с 19 по 760 - vWF 2218 до 2593 - легкая цепь FVIII с 1333 до 2351

ЗАМЕЧАНИЕ 1-19 СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД

10	20	30	40	50	
<i>MQIELSTCFF</i>	<i>LCLLRFCS A</i>	TRRYYLGAVE	LSWDYMQSDL	GELPVDARFP	
60	70	80	90	100	
PRVPKSFPFN	TSVVYKKTFL	VEFTDHLFNI	AKPRPPWMGL	LGPTIQAEVY	
110	120	130	140	150	
DTVVITLKNM	ASHPVSLHAV	GVSYWKASEG	AEYDDQTSQR	EKEDDKVFPG	
160	170	180	190	200	
GSHTYVWQVL	KENGPMSADP	LCLTYSYLSH	VDLVKDLNSG	LIGALLVCRE	
210	220	230	240	250	
GSLAKEKTQT	HKFILLFAV	FDEGKSWHSE	TKNSLMQDRD	AASARAWPKM	
260	270	280	290	300	
HTVNGYVNRS	LPGLIGCHRK	SVYWHVIGMG	TTPEVHSIFL	EGHTFLVRNH	
310	320	330	340	350	
RQASLEISPI	TFLTAQTLLM	DLGQFLLFCH	ISSHQHDGME	AYVKVDSCPE	
360	370	380	390	400	
EPQLRMKNNE	EAEDYDDDLT	DSEMDVVRFD	DDNSPSFIQI	RSVAKKHPKT	
410	420	430	440	450	
WWHYIAEEEE	DWDYAPLVLA	PDDRSYKSQY	LNNGPQRIGR	KYKKVRFMAY	
460	470	480	490	500	
TDETFKTREA	IQHESGILGP	LLYGEVGDTL	LIIFKNQASR	PYNIYPHGIT	
510	520	530	540	550	
DVRPLYSRRL	PKGVKHLKDF	PILPGEIFKY	KWTVTVEDGP	TKSDPRCLTR	
560	570	580	590	600	
YYSSFVNMER	DLASGLIGPL	LICYKESVDQ	RGNQIMSDKR	NVILFSVFDE	
610	620	630	640	650	
NRSWYLTENI	QRFLPNPAGV	QLEDPEFQAS	NIMHSINGYV	FDSLQLSVCL	
660	670	680	690	700	
HEVAYWYILS	IGAQTDFLSV	FFSGYTFKHK	MVYEDTLTLF	PFSGETVFMS	
710	720	730	740	750	
MENPGLWILG	CHNSDFRNRG	MTALLKVSSC	DKNTGDYED	SYEDISAYLL	
←FVIII	760	VWF→(2218)	VWF2230	VWF2240	VWF2250
SKNNAIEPRS	RHC	DGNVSSCGDH	PSEGCFPPD	KVMLEGSOKP	
	VWF2260	VWF2270	VWF2280	VWF2290	VWF2300
EEACTQCIGE	DGVQHGFLEA	WVPDHQPCQI	CTCLSGRKVN	CTTQPCPTAK	
VWF2310	VWF2320	VWF2330	VWF2340	VWF2350	
APTCGLCEVA	RLRQNADQCC	PEYEOKCDPV	SCDLPPVPHC	ERGLQPTLTN	
VWF2360	VWF2370	VWF2380	VWF2390	VWF2400	
PGECRPNFTC	ACRKEECKRV	SPPSCPPHRL	PTLRKTQCCD	EYECACNOKN	
VWF2410	VWF2420	VWF2430	VWF2440	VWF2450	
STVSCPLGYL	ASTATNDCGC	TTTTCLPDKV	OKHRSTIYPV	GQFWEEGCDV	
VWF2460	VWF2470	VWF2480	VWF2490	VWF2500	
CTCTDMEDAV	MGLRVAQCSQ	KPCEDSCRSG	FTYVLHEGEC	CGRCLPSACE	
VWF2510	VWF2520	VWF2530	VWF2540	VWF2550	
VVTGSPRGDS	QSSWKS VGSQ	WASPENPCLI	NEOKRVKEEV	FIQQRNVSCP	
VWF2560	VWF2570	VWF2580	VWF2590	VWF2593←VWF	
QLEVPVCPSPG	FQLSCKTSAC	CPSCRCERME	ACMLNGTVIG	PGK	
FVIII →					
1333	1340	1350			
ALKQFRLP	LEETELEKRI				
1360	1370	1380	1390	1400	
IVDDTSTQWS	KNMKHLTPST	LTQIDYNEKE	KGAITQSPLS	DCLTRSHSIP	
1410	1420	1430	1440	1450	
QANRSPLPIA	KVSSFPSIRP	IYLTRVLFQD	NSSHLPAASY	RKKDSGVQES	
1460	1470	1480	1490	1500	
SHFLQGAKKN	NLSLAILTLE	MTGDQREVGS	LGTSATNSVT	YKKVENTVLP	
1510	1520	1530	1540	1550	

79/92

KPDLPKTSGK	VELLPKVHIY	QKDLFPTETS	NGSPGHLDLV	EGSLLQGTEG
1560	1570	1580	1590	1600
AIKWNEANRP	GKVPFLRVAT	ESSAKTPSKL	LDPLAWDNHY	GTQIPKEEWK
1610	1620	1630	1640	1650
SQEKSPKTA	FKKKDTILSL	NACESNHAIA	AINEGQNKPE	IEVTWAKQGR
1660	1670	1680	1690	1700
TERLCSQNP	VLKRHQREIT	RTTLQSDQEE	IDYDDTISVE	MKKEDFDIYD
1710	1720	1730	1740	1750
EDENQSPRSF	QKKTRHYFIA	AVERLWDYGM	SSSPHVLNR	AQSGSVPQFK
1760	1770	1780	1790	1800
KVVFQEFTDG	SFTQPLYRGE	LNEHLGLLGP	YIRAEVEDNI	MVTFRNQASR
1810	1820	1830	1840	1850
PYSFYSSLIS	YEEDQRQGAE	PRKNFVKPNE	TKTYFWKVQH	HMAPTKDEFD
1860	1870	1880	1890	1900
CKAWAYFSDV	DLEKDVHSGL	IGPLLVCHTN	TLNPAHGRQV	TVQEFALFFT
1910	1920	1930	1940	1950
IFDETKSWYF	TENMERN CRA	PCNIQMEDPT	FKENYRFHAI	NGYIMDTLPG
1960	1970	1980	1990	2000
LVMAQDQRIR	WYLLSMGSNE	NIHSIHFSGH	VFTVRKKEEY	KMALYNLYPG
2010	2020	2030	2040	2050
VFETVEMLPSK	AGIWRVECL	IGEHLHAGMS	TLFLVYSNKC	QTPLGMASGH
2060	2070	2080	2090	2100
IRDFQITASG	QYGQWAPKLA	RLHYSGSINA	WSTKEPFSWI	KVDLLAPMII
2110	2120	2130	2140	2150
HGIKTQGARQ	KFSSLYISQF	IIMYSLDGKK	WQTYRGNSTG	TLMVFFGNVD
2160	2170	2180	2190	2200
SSGIKHNIFN	PPIIARYIRL	HPTHYSIRST	LRMELMGCDL	NSCSMPLGME
2210	2220	2230	2240	2250
SKAISDAQIT	ASSYFTNMFA	TWSPSKARLH	LQGRSNAWRP	QVNNPKEWLQ
2260	2270	2280	2290	2300
VDFQKTMKVT	GVTQGVKSL	LTSMYVKEFL	ISSSQDGHQW	TLFFQNGKVK
2310	2320	2330	2340	2350
VFQGNQDSFT	PVVNSLDPPL	LTRYLRIHPQ	SWVHQIALRM	EVLGCEAQDL
2351 ⇨FVIII				
Y				

80/92

ФИГ. 66

№	Композиция	pH	Цель/Примечание
1.	60 мМ Цитрат Na	7,6 ±0,2	Буфер для разведения
2.	30 мМ Цитрат Na, 180 мМ NaCl	7,5 ±0,2	Буфер для уравнивания и промывки для удаления пропептида r-vWF
3.	30 мМ Цитрат Na, 180 мМ NaCl +SD_VI на колонке 25 г/кг 18,0 г полисорбата 80 3,5 г ДМСО 3,5 г ТnBP	7,5 ±0,2	Буфер WSD Потенциальный буфер для инактивации вирусов с липидной оболочкой на колонке/смоле
4.	50 мМ глицина 10мМ Таурина 10 % сахарозы 1,1 % полисорбата 80	5,5 ±0,2	Уравнивающих хроматографический буфер
5.	50 мМ глицина 10мМ Таурина 5 % (мас./мас.) сахарозы 5 % (мас./мас.) D-маннита 0,1 % полисорбата 80 2,2 мМ CaCl ₂ 150 мМ NaCl	7,4 ±0,2	Буфер для предв. Составов + буфер для FVIII Con (дополнительный)
6.	50 мМ глицина 10мМ Таурина 5 % (мас./мас.) сахарозы 5 % (мас./мас.) D-маннита 0,1 % полисорбата 80 2,2 мМ CaCl ₂ 600 мМ NaCl	7,4 ±0,2	Буфер для элюирования
7.	50 мМ глицина 10мМ Таурина 5 % (мас./мас.) сахарозы 5 % (мас./мас.) D-маннита 0,1 % полисорбата 80 2,2 мМ CaCl ₂	7,4 ±0,2	Буфер для корректировки состава

81/92

Фиг. 67

Хроматограмма

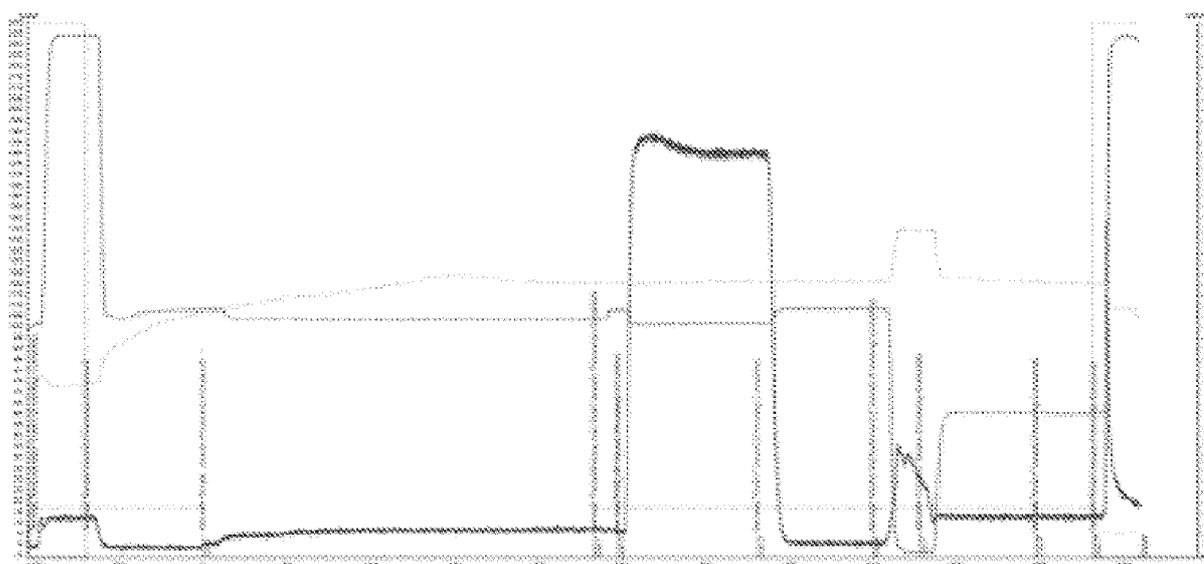


Схема хроматографии

Стадия	Буфер	Скорость потока	ОК	Фракция
Активация смолы	50 мМ глицина, 10мМ таурина, 5 % (мас./мас.) сахарозы, 5 % (мас./мас.) D-маннита, 0,1 % полисорбата 80, 2 мМ CaCl ₂ , 600 мМ NaCl, pH 7,4 ±0,2		5	Сброс
Уравновешивание	30 мМ Цитрат Na, 180 мМ NaCl, pH 7,5		10	Сброс
Применение образца	NUQ-FT разведенный 1:2 буфером доя разведения 60 мМ Цитрат Na, pH 7,6 ±0,2		X	FT/W1
ПРОМЫВКА 1 повт. уравни.	30 мМ Цитрат Na, 180 мМ NaCl, pH 7,5		2	FT/W1
WSD (SD_VI)	30 мМ Цитрат Na, 180 мМ NaCl, pH 7,5 + SD_VI		12	WSD
ПРОМЫВКА 2	30 мМ Цитрат Na, 180 мМ NaCl, pH 7,5	100 см/ч	10	W2
ПРОМЫВКА 3	50 мМ глицина, 10мМ таурина, 10 % сахарозы, 0,1 % полисорбата 80, pH 5,5		4	W3
FVIII-Con	50 мМ глицина, 10мМ таурина, 5 % (мас./мас.) сахарозы, 5 % (мас./мас.) D-маннита, 0,1 % полисорбата 80, 2 мМ CaCl ₂ , 150 мМ NaCl, pH 7,4 + rFVIII (Advate элюат AEX)		10	FVIII-Con
ПРОМЫВКА 4	50 мМ глицина, 10мМ таурина, 5 % (мас./мас.) сахарозы, 5 % (мас./мас.) D-маннита, 0,1 % полисорбата 80, 2 мМ CaCl ₂ , 150 мМ NaCl, pH 7,4		5	W4
Элюирование	50 мМ глицина, 10мМ таурина, 5 % (мас./мас.) сахарозы, 5 % (мас./мас.) D-маннита, 0,1 % полисорбата 80, 2 мМ CaCl ₂ , 600 мМ NaCl, pH 7,4±0,2	50 см/ч	4	ЭЛЮАТ

82/92

ФИГ. 68

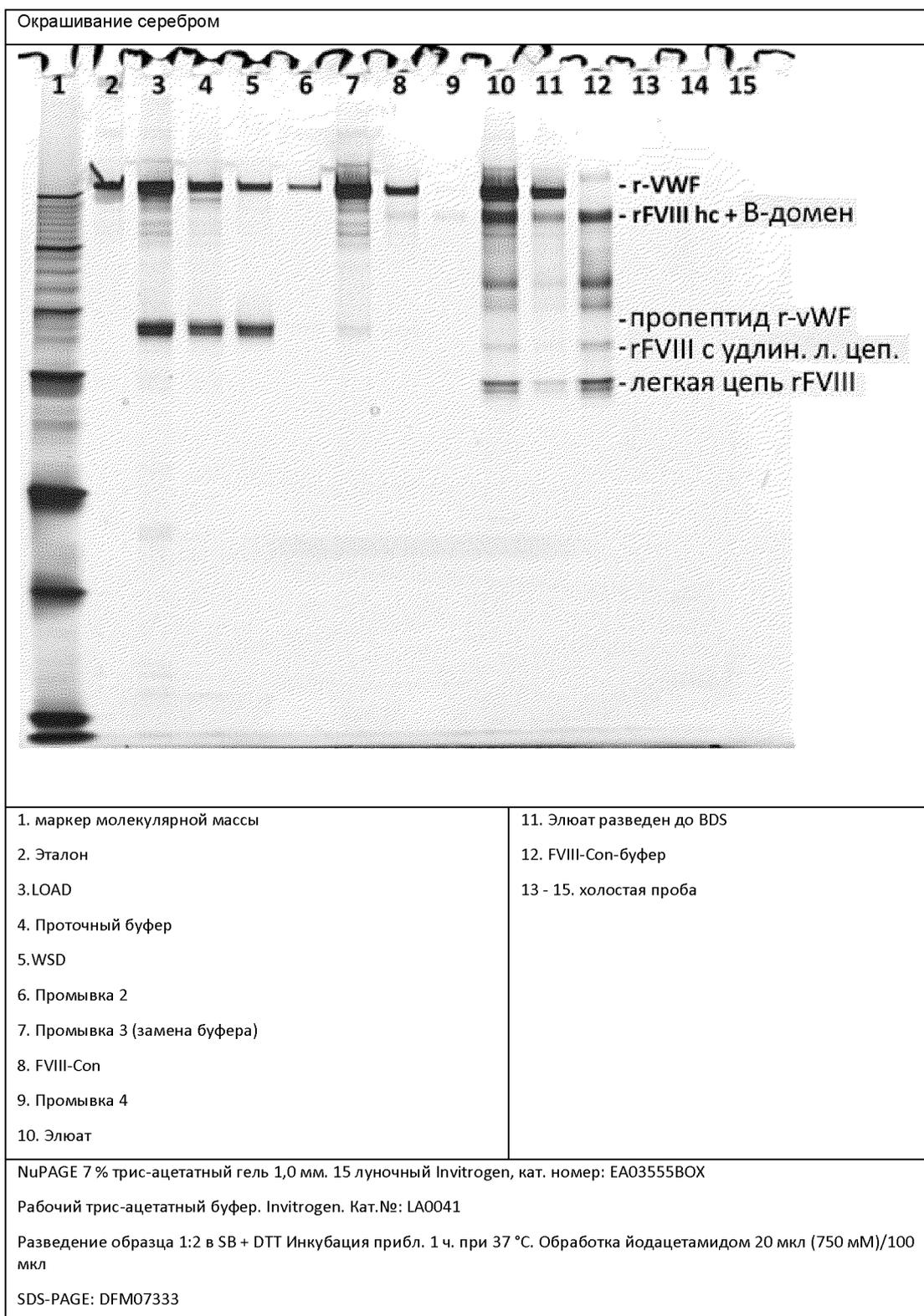
Стадия	Кол-во	vWF:AG [мкг/мл]	Всего антигена vWF [мкг]	% антигена vWF	FVIII:C [Ед/мл]	Всего FVIII:C [Ед]	% FVIII:C
ЗАГРУЗКА	231,64	55,2	12786,5	100,0%	<0,2	<46,33	-
FT/ ПРОМЫВКА 1	248,95	19,5	4854,5	38,0%	<0,2	<49,79	-
Эдьюирование	28,88	80,5	2324,84	18,2%	34,28	990,01	100,0%
BDS	119,23	20,2	2408,44	18,8%	8,14	970,53	98,0%

Стадия	Кол-во	vWF:PP [мкг/мл]	Всего пропептида vWF [мкг]	% пропептида vWF	CHO-НСР [нг/мл]	Всего CHO- НСР [мкг]	% CHO- НСР
ЗАГРУЗКА	231,64	16,44	3807,74	100,0%	930	215,43	100,0%
FT/ ПРОМЫВКА 1	248,95	9,18	2284,41	60,0%	711	177,00	82,2%
Эдьюирование	28,88	0,089	2,59	0,07%	40	1,10	0,5%
BDS	119,23	0,014	2,88	0,08%	<30	<1	<0,5%

Стадия	Кол-во	RiCoF [Ед/мл]	Всего RiCoF [Ед]	% RiCoF	Отношение RiCoF/мг vWF:AG	Отношение FVIII:C/мг vWF:AG
ЗАГРУЗКА	231,64	4,38	1014,58	100,0%	43,80	<3,6 Ед/мг
FT/ ПРОМЫВКА 1	248,95	0,23	57,26	5,6%	11,79	<10,3 Ед/мг
Эдьюирование	28,88	7,37	212,85	21,0%	91,55	425,8 Ед/мг
BDS	119,23	1,77	211,04	20,8%	87,62	403,0 Ед/мг

83/92

ФИГ. 69



84/92
ФИГ. 70

№	Композиция	pH	Цель/Примечание
1.	60 mM цитрата Na	7,6± 0,2	Буфер для разведения
2.	30 mM цитрата Na 180 mM NaCl	7,5± 0,2	Буфер для уравнивания и промывки для удаления пропептида r-vWF
3.	11 мг CMP_NANA C8271-25 мг № парт. SLBV 7777 раствор. в 154, 29 г 30 mM цитрата Na, 180 mM NaCl	7,5± 0,2	Цитидин-5' монофосфо-N-натриевая солб ацетилнейроаминовой кислоты Реагент А
4.	0,5 Ед альфа 2,6 сиалилтрансферазы в 30 mM цитрата Na, 180 mM NaCl	7,5± 0,2	альфа 2,6 сиалилтрансфераза реагент В
5.	50 mM HEPES 150 mM NaCl	6,0± 0,2	Буфер для предварительного элюирования
6.	50 mM HEPES 500 mM NaCl	7,5± 0,2	Буфер для элюирования

85/92

Фиг. 71

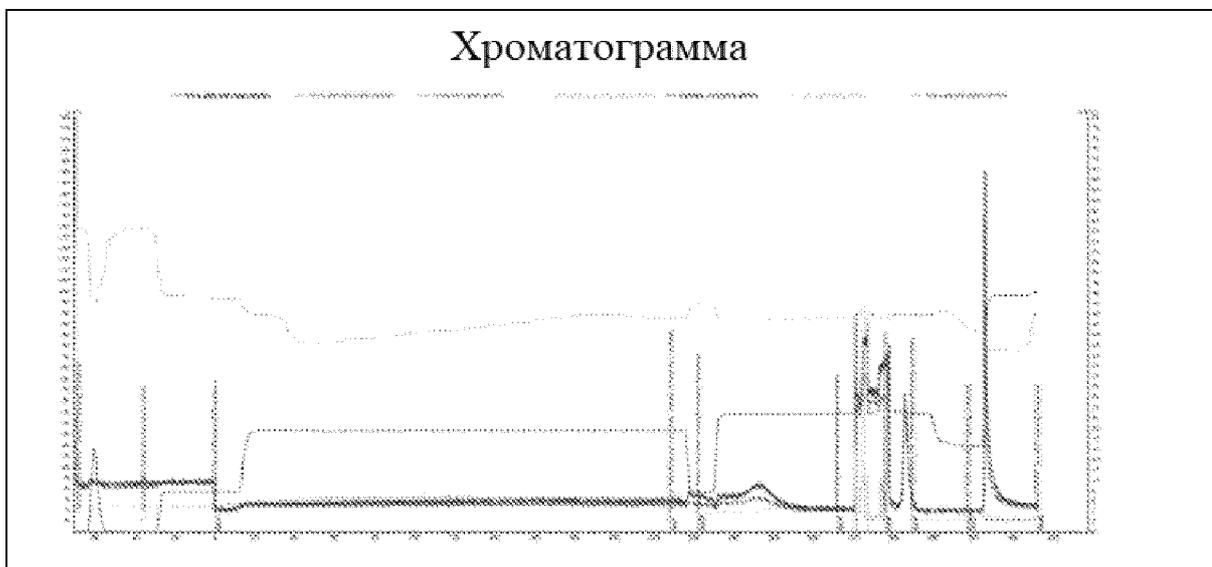


Схема хроматографии

Стадия	Буфер	Скорость потока	ОК	Фракция
Уравновешивание	30 мМ цитрата Na, 10 мМ NaCl, pH 7,5	100 см/ч	Сброс	10
Применение образца	MUQ-FT разведенный 1:2 буфером для разведения 60 мМ цитрата Na pH 7,6 ±0,2	100 см/ч	x	FT/W1
ПРОМЫВКА 1 повт. уравни.	30 мМ цитрата Na, 100 мМ NaCl, pH 7,5	100 см/ч	2	FT/W1
ПРОМЫВКА 2	30 мМ цитрата Na, 180 мМ NaCl, pH 7,5	50 см/ч	10	W2
Снал. на колонке. 2,6 снал	Изократическая смесь 50% Pump A SMP_NANA в 30 мМ цитрата Na, 180 мМ NaCl, pH 7,5 и 50% Pump B 2,6 синалитрансферазы в 30 мМ цитрата Na, 180 мМ NaCl, pH 7,5	25 см/ч	10	SIA
ПРОМЫВКА 3	30 мМ цитрата Na, 180 мМ NaCl, pH 7,5	25 см/ч	2	W3
ПРОМЫВКА 4	50 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 6,0	50 см/ч	4	W4
Элюирование	50 мМ HEPES, 500 мМ NaCl, pH 7,5	50 см/ч	4	Элюат

86/92

ФИГ. 72

ПРОДУКТ

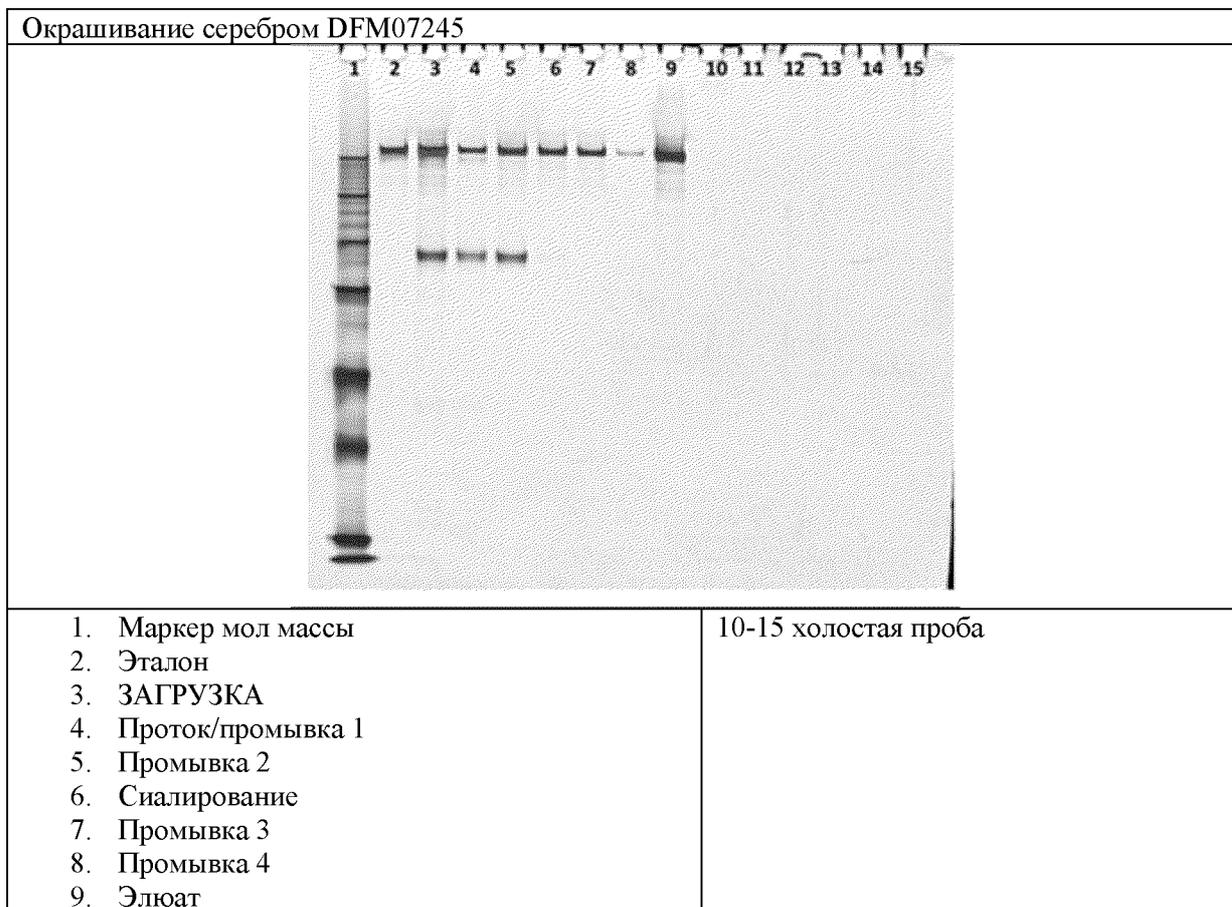
Стадия	Кол-во	vWF:AG [мкг/мл]	Всего антигена vWF [мкг/мл]	% антигена vWF	vWF:PP [мкг/мл]	Всего пропептида vWF [мкг/мл]	% пропептида vWF
Загрузка	226,02	50,6	11437	100%	13,96	3156,14	100%
Е	34,84	46,4	1617	14,1%	<0,006	<217,75	<0,01%

СИАЛИРОВАНИЕ ПРОДУКТА

Стадия	Кол-во	2,3 сиалирование	2,6 сиалирование
Загрузка	226,02	x	x
Е	34,84	x	x

87/92

ФИГ. 73



nuPAGE 7% трисацетатный гель 1.0 мм, 15 луночный, Invitrogen, кат. № Invitrogen EA03555BOX

Трис-ацетатный проточный буфер, Invitrogen, кат. № LA0041

Разведение образца 1:2 в SB+ инкубация в DTT приблиз. 1 ч мин при 37 °С. Обработка йодацетамидом 20 мкл (750 мМ)/100 мкл SDS-PAGE: DFM0733

88/92

ФИГ. 74

№	Композиция	pH	Цель/Примечание
1.	60 mM цитрата Na	7,6± 0,2	Буфер для разведения
2.	30 mM цитрата Na 180 mM NaCl	7,5± 0,2	Буфер для уравнивания и промывки для удаления пропептида r-vWF
3.	14 мг CMP_NANA C8271-25 мг № парт. SLBV 7777 раствор. в 121, 57 г 30 mM цитрата Na, 180 mM NaCl	7,5± 0,2	Цитидин-5' монофосфо-N-натриевая солб ацетилнейроаминовой кислоты Реагент А
4.	1 Ед альфа 2,6 сиалилтрансферазы в 121,10 г 30 mM цитрата Na, 180 mM NaCl	7,5± 0,2	альфа 2,6 сиалилтрансфераза реагент В
5.	50 mM HEPES 150 mM NaCl	6,0± 0,2	Буфер для предварительного элюирования
6.	50 mM HEPES 500 mM NaCl	7,5± 0,2	Буфер для элюирования

89/92

ФИГ. 75

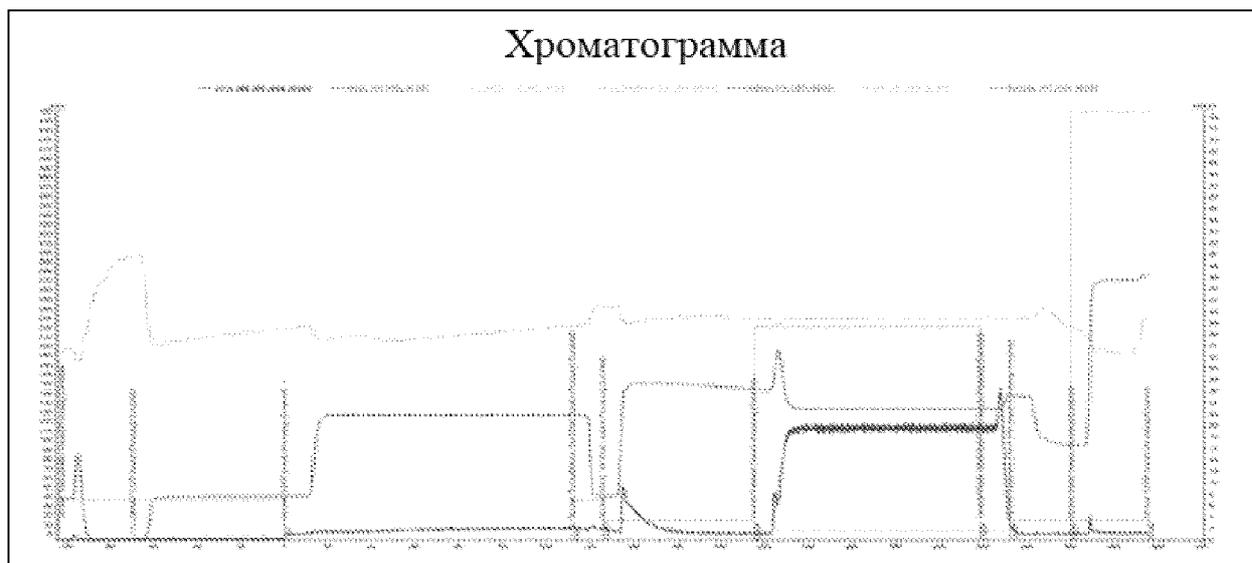


Схема хроматографии:

Стадия	Буфер	Скорость потока	ОК	Фракция
Уравновешивание	30 мМ цитрата Na, 10 мМ NaCl, pH 7,5	100 см/ч	Сброс	10
Применение образца	MUQ-FT разведенный 1:2 буфером для разведения 60 мМ цитрата Na pH 7,6 ±0,2	100 см/ч	x	FT/W1
ПРОМЫВКА 1 повт. уравни.	30 мМ цитрата Na, 100 мМ NaCl, pH 7,5	100 см/ч	2	FT/W1
ПРОМЫВКА 2	30 мМ цитрата Na, 180 мМ NaCl, pH 7,5	50 см/ч	10	W2
Сиал. на колонке. 2,6 сиал	Изократическая смесь 50% Pump A SMP_NANA в 30 мМ цитрата Na, 180 мМ NaCl, pH 7,5 и 50% Pump B 2,6 сиалитрансферазы в 30 мМ цитрата Na, 180 мМ NaCl, pH 7,5	25 см/ч	10	SIA
ПРОМЫВКА 3	30 мМ цитрата Na, 180 мМ NaCl, pH 7,5	25 см/ч	2	W3
ПРОМЫВКА 4	50 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 6,0	50 см/ч	4	W4
Элюирование	50 мМ HEPES, 500 мМ NaCl, pH 7,5	50 см/ч	4	Элюат

90/92

ФИГ. 76

ПРОДУКТ

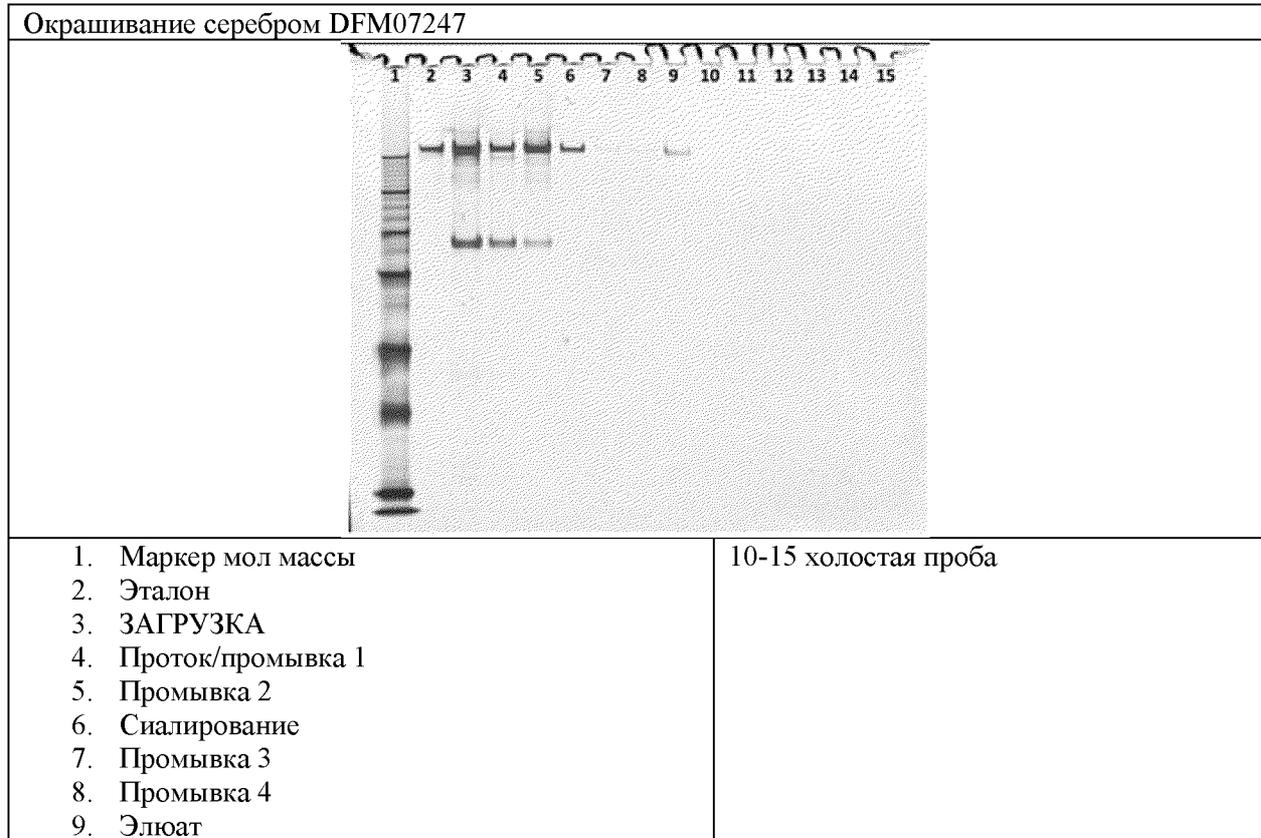
Стадия	Кол-во	vWF:AG [мкг/мл]	Всего антигена vWF [мкг]	% антигена vWF	vWF:PP [мкг/мл]	Всего пропептида vWF [мкг/мл]	% пропептида vWF
Загрузка	312,15	57,40	17917,41	100%	13,96	3156,14	100%
Е	56,85	1,70	96,65	0,5%	<0,006	<217,75	<0,01%

СИАЛИРОВАНИЕ ПРОДУКТА

Стадия	Кол-во	2,3 сиалирование	2,6 сиалирование
Загрузка	312,15	x	x
Е	56,85	x	x

91/92

ФИГ. 77



nuPAGE 7% триацетатный гель 1.0 мм, 15 луночный, Invitrogen, кат. № Invitrogen EA03555BOX

Трис-ацетатный проточный буфер, Invitrogen, кат. № LA0041

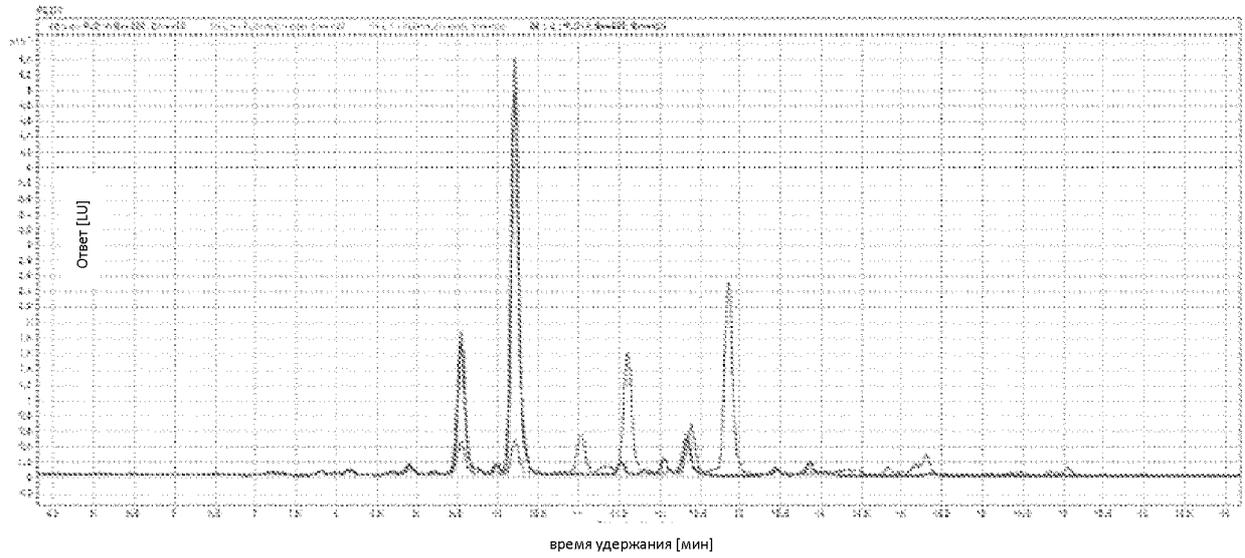
Разведение образца 1:2 в SB+ инкубация в DTT приблиз. 1 ч мин при 37 °С. Обработка йодацетамидом 20 мкл (750 мМ)/100 мкл SDS-PAGE: DFM07247

92/92

ФИГ. 78

№ прогона VW_USS_08

Emf-файл



№ прогона VW_USS_06

Emf-файл

