

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **040179**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.04.27**

**(51)** Int. Cl. **C07K 14/755 (2006.01)**

**(21)** Номер заявки  
**201990926**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.10.11**

---

**(54) СПОСОБ ОЧИСТКИ FVIII ИЛИ ЕГО ВАРИАНТА С УДАЛЕННЫМ ДОМЕНОМ В ОТ  
КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ IN VITRO**

---

**(31)** **1617240.5**

**(32)** **2016.10.11**

**(33)** **GB**

**(43)** **2019.09.30**

**(86)** **PCT/GB2017/053073**

**(87)** **WO 2018/069700 2018.04.19**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ПРОФАКТОР ФАРМА ЛТД (GB)**

**(72)** Изобретатель:  
**Джонстон Том (GB), Гарнер Аян  
(умер)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** WO-A1-2009156430

WO-A1-2009007451

WO-A1-9609116

BURTON S. C. ET AL.: "Hydrophobic charge induction chromatography: salt independent protein adsorption and facile elution with aqueous buffers", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 814, no. 1-2, 24 July 1998 (1998-07-24), pages 71-81, XP004145777, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/50021-9673(98)00436-1 abstract page 72, right-hand column, paragraph 3 page 74, left-hand column, paragraph 4; figures 1,4; table 1

---

**(57)** Изобретение относится к очистке рекомбинантного фактора свертывания крови VIII (FVIII) от культуры in vitro с использованием хроматографических приемов.

---

**040179**

**B1**

**040179**

**B1**

### Область изобретения

Изобретение относится к очистке рекомбинантного фактора свертывания крови VIII (FVIII) от культуры *in vitro* с использованием хроматографических приемов.

### Предпосылки изобретения

FVIII представляет собой большой сложный гликопротеин. Он синтезируется в виде белка 330 кДа с доменной структурой A1-A2-B-A3-C1-C2, где домены А и С имеют внутреннюю гомологию последовательностей и приблизительно 40% идентичность последовательностей с доменами А и С фактора V. Домен В, который составляет 38% от всей последовательности, не обладает идентичностью последовательностей с другими известными белками, включая домен В фактора V. Однако он сильно гликозилирован и содержит 19 из 26 аспарагиновых (N)-связанных участков гликозилирования во всей молекуле.

Например, в WO 2014/147386 описаны способы экспрессии рекомбинантного FVIII с оптимизированными кодонами *in vitro* для последующего терапевтического использования.

В WO 2009/057883 описан процесс для очистки FVIII с использованием мультимодальной смолы. Описано, что FVIII загружают на мультимодальную смолу с использованием высокой ионной силы (соответствующей проводимости от 25 до 200 мСм/см при 25°C) и элюируют с использованием буфера, который содержит по меньшей мере одну аминокислоту, которая положительно заряжена при pH 6 до 8, например, аргинин, лизин или гистидин.

Аналогично указанному выше, в WO 2009/007451 также описано использование мультимодальной смолы для того, чтобы очищать FVIII. Элюирование из мультимодальной смолы осуществляют с использованием по меньшей мере 1,5 М соли и по меньшей мере 40 мас./об.% этиленгликоля, пропиленгликоля или их смеси, вместе с ионами кальция. Начальная загрузка смолы не требует корректировки pH или проводимости.

В WO 2006/103258 описан способ увеличения количества рекомбинантного белка, такого как FVIII, которое можно получать из клеточной культуры, который включает проведение в суспензии клеток, получаемой из культуры, не физиологического увеличения концентрации по меньшей мере одного ионного вещества. Увеличение ионной силы выполнять посредством добавления соли и/или заряженной аминокислоты. Описаны различные концентрации добавляемого вещества, в зависимости от конкретного вещества.

### Сущность изобретения

Настоящее изобретение основано на разработке процесса очистки, который может быть, например, проще, дешевле, экологичнее, менее опасным и/или более быстрым, чем другие процессы очистки, известные в данной области.

В первом аспекте предоставлен способ очистки или обогащения FVIII или его варианта с удаленным доменом В (включая его модифицированные версии, такие как слияния с другими белковыми фрагментами или пегилированными молекулами) из клеточной культуры *in vitro*, который включает

предоставление культурального супернатанта, содержащего указанный FVIII или его вариант с удаленным доменом В;

приведение супернатанта, содержащего FVIII или его вариант с удаленным доменом В, в контакт с мультимодальной смолой для того, чтобы абсорбировать FVIII или его вариант с удаленным доменом В на мультимодальной смоле;

необязательно промывание мультимодальной смолы, имеющей абсорбированный FVIII или его вариант с удаленным доменом В, с использованием водного буфера для промывания;

элюирование содержащих FVIII или его вариант с удаленным доменом В фракций с использованием водного элюирующего буфера, содержащего 4-метилимидазол; и

необязательно сбор содержащих FVIII или его вариант с удаленным доменом В фракций в очищенной или обогащенной форме.

Клеточная культура может представлять собой любую подходящую клеточную культуру, которая способна экспрессировать FVIII, такую как культура клеток млекопитающего, способная экспрессировать FVIII или его вариант с удаленным доменом В, необязательно совместно экспрессируя фактор фон Виллебранда. Культура клеток млекопитающего может представлять собой клеточную культуру, которая экспрессирует рекомбинантную форму FVIII или его вариант с удаленным доменом В. То есть, клетки млекопитающих могут быть модифицированы с тем, чтобы экспрессировать экзогенно введенный ген FVIII или нуклеиновую кислоту, кодирующую его вариант с удаленным доменом В. В одном из вариантов осуществления FVIII или его вариант с удаленным доменом В представляет собой версию FVIII с оптимизированными кодонами или его вариант с удаленным доменом В, как описано, например, в WO2014/147386, к которой отправляют опытного читателя, и полное содержание которой включено, таким образом, посредством ссылки.

В целях удобства клетки, которые используют для культивирования и экспрессии FVIII или его варианта с удаленным доменом В, представляют собой НЕК 293, CHO, 3T3, ВНК, MICK, Varo, Junket, Hela, а также производные таких клеток, известные в данной области. В одном из вариантов осуществления клетки представляют собой клетки CHO.

Обычно супернатант предоставляют посредством центрифугирования и/или фильтрования культу-

ры, содержащей экспрессирующие FVIII или его вариант с удаленным доменом В клетки, чтобы отделить культуральный супернатант от клеток, присутствующих в культуре. При необходимости, отделенные клетки можно возвращать в культуру для дальнейшего культивирования. В целях удобства, клеточную культуру не обрабатывают перед стадией отделения клеток, например, посредством добавления дополнительных средств, таких как ионные вещества, которые предназначены для увеличения ионной силы культуры и ее супернатанта, и/или аминокислоты с заряженными боковыми цепями, такие как аргинин, гистидин и/или лизин.

Перед приведением супернатанта клеток в контакт с мультимодальной смолой, pH супернатанта можно корректировать до pH 5,5-8,0, например, pH 6-7, обычно pH 6,5, используя подходящий реактив или буфер. Другие реактивы, такие как аминокислоты (например, гистидин), соли и/или неионные поверхностно-активные средства, такие как Tween 20, Tween 80 и/или Pluronic F68, можно добавлять в супернатант перед приведением в контакт с мультимодальной смолой.

В одном из вариантов осуществления гистидин,  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{NaCl}$  добавляют в супернатант в концентрации в диапазоне: гистидин в концентрации от 0,05 до 0,2 М;  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне от 0,25 до 0,75 М и  $\text{CaCl}_2$  в концентрации в диапазоне от 0,05 до 0,2 М. Неионное поверхностно-активное средство можно добавлять в количестве вплоть до 1 об./об. %.

В одном из вариантов осуществления супернатант корректируют до pH 6,5 с добавлением 100 мМ гистидина (pH 6,0), 100 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 500 мМ  $\text{NaCl}$  и 0,02% Tween 80.

Супернатант также дополнительно можно фильтровать (например, через 0,1-1 мкм фильтр или фильтры) для того, чтобы удалять любые мелкие частицы.

Термин "мультимодальная смола", как используют в настоящем описании, относится к хроматографическому материалу, имеющему носитель и фрагменты, связанные с носителем, эти фрагменты взаимодействуют с химическими группами веществ, подлежащих отделению, и способны взаимодействовать с FVIII или его вариантом с удаленным доменом В в смеси посредством ионных взаимодействий и взаимодействий других типов, таких как образование водородных связей и/или гидрофобное взаимодействие. В одном из вариантов осуществления мультимодальную хроматографию можно осуществлять в хроматографической колонке. Подходящие смолы для "мультимодальной" хроматографии включают следующие коммерчески доступные смолы HEP Hypercel™; PPA Hypercel™; Capto Adhere™; Capto MMC™; MEP Hypercel™.

После связывания FVIII или его варианта с удаленным доменом В с мультимодальной смолой, мультимодальную смолу необязательно можно промывать буфером для промывания, содержащим имидазол, обычно в количестве 0,05-0,2 М, например, 0,1 М. Буфер для промывания может содержать реактивы, которые в остальном представляют собой схожие или те же реактивы, что используют для того, чтобы адаптировать супернатант перед приведением в контакт с мультимодальной смолой. Например, буфер для промывания дополнительно может содержать аминокислоты (например, гистидин), соли и/или поверхностно-активное средство(а). В одном из вариантов осуществления буфер для промывания дополнительно содержит гистидин,  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне: гистидин в концентрации в диапазоне от 0,005 до 0,02 М;  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне от 0,2 до 0,4 М и  $\text{CaCl}_2$  в концентрации в диапазоне от 0,005 до 0,05 М. Поверхностно-активное средство, такое как Tween 80, также может присутствовать в концентрации 0,01-0,03 об./об. %.

Элюирование FVIII или его варианта с удаленным доменом В из мультимодальной смолы осуществляют с использованием элюирующего буфера, содержащего 4-метилимидазол, обычно в концентрации 0,5-1 М, например, 0,75 М. Элюирующий буфер может содержать реактивы, которые в остальном схожи, или соли и/или поверхностно-активное средство(а). В одном из вариантов осуществления элюирующий буфер дополнительно содержит гистидин,  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне: гистидин в концентрации в диапазоне от 0,01 до 0,03 М;  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне от 0,4 до 0,8 М и  $\text{CaCl}_2$  в концентрации в диапазоне от 0,005 до 0,02 М. Также может присутствовать поверхностно-активное средство, такое как Tween 80, в концентрации 0,01-0,03 об./об. % и/или этиленгликоль 10-15 об./об. %.

Необязательно можно предусматривать стадию инактивации вирусов, которую можно осуществлять в элюате или фракциях из мультимодальной смолы, которые содержат FVIII или его вариант с удаленным доменом В. Обычно стадия инактивации вирусов может включать процесс с растворителем/детергентом, хорошо известным опытному адресату. В одном таком подходящем процессе с растворителем/детергентом используют три-н-бутилфосфат и Triton-X-100. три-н-бутилфосфат можно предоставлять в концентрации в диапазоне 0,15-0,6% (например, 0,3%) и Triton-X-100 можно предоставлять в концентрации в диапазоне 0,5-1,5% (например, 1%). Обычно реактив растворителя/детергента приводят в контакт с элюатом/фракциями на 15-60 мин, например, 30 мин, при температуре 4-30°C, например, 22°C±2°C. Подходящий процесс описан в Roberts, Biologicals, 2008, 36/5, стр. 330-335, к которому относятся опытный читатель и полное содержание которого настоящим включено по ссылке.

После элюирования и необязательного сбора содержащих FVIII или его вариант с удаленным доменом В фракций в очищенной или обогащенной форме, FVIII или его вариант домена В дополнительно можно очищать или обогащать с использованием стадии аффинной хроматографии FVIII, в которой аф-

финность обеспечивают с помощью белкового лиганда, такого как фрагмент антитела со специфической реактивностью к эпитопу, который присутствует на FVIII или его варианте с удаленным доменом В.

Таким образом, способ очистки или обогащения FVIII или его варианта с удаленным доменом В из клеточной культуры *in vitro* дополнительно может включать

приведение раствора, содержащего FVIII или его вариант с удаленным доменом В, в контакт с иммуноаффинной матрицей, которая связывается с полипептидом FVIII или варианта с удаленным доменом В;

необязательное промывание иммуноаффинной матрицы с адсорбированным на ней FVIII или его вариантом с удаленным доменом В с использованием водного буфера для промывания;

элюирование содержащих FVIII или его вариант с удаленным доменом В фракций посредством водного элюирующего буфера, содержащего имидазол; и

необязательно сбор содержащих FVIII или его вариант с удаленным доменом В фракций в очищенной или обогащенной форме.

Благоприятно раствор, содержащий FVIII или его вариант с удаленным доменом В, может представлять собой разведенный раствор FVIII или его варианта с удаленным доменом В, содержащий элюированные фракции/раствор, получаемый элюированием мультимодальной смолы. Таким образом, замена буфера не требуется, что упрощает процесс и также может вести к увеличенной эффективности очистки.

Разведение можно осуществлять с использованием буфера для разведения (pH 6-7, например, pH 6,5) который содержит аминокислоту(ы) (например, гистидин) и/или соли В одном из вариантов осуществления буфер для разведения содержит гистидин,  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне: гистидин в концентрации в диапазоне от 0,01 до 0,03 М;  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне от 0,2 до 0,4 М и  $\text{CaCl}_2$  в концентрации в диапазоне от 0,005 до 0,02 М. поверхностно-активное средство, такое как Tween 80, также может присутствовать в концентрации 0,01-0,03 об./об.%.

После связывания FVIII или его варианта с удаленным доменом В с иммуноаффинной матрицей, иммуноаффинную матрицу необязательно можно промывать буфером для промывания. Буфер для промывания может содержать реактивы, которые в остальном схожи или являются тем же, что и реактивы, используемые для буфера для разведения. Например, буфер для промывания может содержать аминокислоту(ы) (например, гистидин), соль(и) и/или поверхностно-активное средство(а). В одном из вариантов осуществления буфер для промывания содержит гистидин,  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне: гистидин в концентрации в диапазоне от 0,01 до 0,03 М;  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне от 0,5 до 1,5 М и  $\text{CaCl}_2$  в концентрации в диапазоне от 0,005 до 0,02 М. Поверхностно-активное средство, такое как Tween 80, также может присутствовать в концентрации 0,01-0,03 об./об.%.

Элюирование FVIII или его варианта с удаленным доменом В из иммуноаффинной матрицы осуществляют с использованием элюирующего буфера, содержащего имидазол, обычно в концентрации 0,5-1 М, например, 0,75 М. Элюирующий буфер дополнительно может содержать реактивы, которые в остальном схожи или являются тем же, что и реактивы, используемые в буфере для разведения, и дополнительно содержит этиленгликоль в количестве 35-65%, например, 50 об./об.%. Например, элюирующий буфер дополнительно может содержать аминокислоту (ы) (например, гистидин), соль(и) и/или поверхностно-активное средство (а). В одном из вариантов осуществления элюирующий буфер дополнительно содержит гистидин,  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне: гистидин в концентрации в диапазоне от 0,01 до 0,03 М;  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне от 0,2 до 0,4 М и  $\text{CaCl}_2$  в концентрации в диапазоне от 0,005 до 0,02 М. Поверхностно-активное средство, такое как Tween 80, также присутствует в концентрации 0,01-0,03 об./об.%.

После элюирования и необязательного сбора содержащих FVIII или его вариант с удаленным доменом В фракций в очищенной или обогащенной форме, FVIII или его вариант домена В дополнительно можно очищать или обогащать с использованием стадии анионообменной хроматографии, например, с использованием смол Q-Sepharose, Amberlite или Dowex.

Благоприятно раствор, содержащий FVIII или его вариант с удаленным доменом В, может представлять собой разведенный раствор FVIII или его варианта с удаленным доменом В, который содержит элюированные фракции/раствор, полученный из процесса иммуноаффинной очистки. Таким образом, замена буфера не требуется, что упрощает процесс и также может вести к увеличенной эффективности очистки.

Разведение можно осуществлять с использованием буфера для разведения (pH 7-8, например, pH 7,5), который содержит имидазол, соль(и) и/или поверхностно-активное средство (а). В одном из вариантов осуществления буфер для разведения содержит имидазол,  $\text{CaCl}_2$  и поверхностно-активное средство в концентрации в диапазоне: имидазол в концентрации в диапазоне от 0,005 до 0,02 М;  $\text{CaCl}_2$  в концентрации в диапазоне от 0,002 до 0,01 М и поверхностно-активное средство, такое как Tween 80, в диапазоне концентраций 0,01-0,03%.

Необязательно, перед приведением разведенного раствора в контакт с анионообменной смолой, раствор можно подвергать наночелющению для того, чтобы гарантировать удаление любых вирусов или инактивированного вирусного материала из раствора. Подходящие фильтры для наночелющения производит AsahiKASEI под торговой маркой Planova. Альтернативно, эту стадию можно проводить по-

сле анионообменной стадии.

Разведенный раствор приводят в контакт с анионообменной смолой для того, чтобы связывать FVIII или его вариант с удаленным доменом В. После связывания FVIII или его варианта с удаленным доменом В с анионообменной матрицей, матрицу необязательно можно промывать буфером для промывания. Буфер для промывания может содержать реактивы, которые в остальном схожи или являются тем же, что и реактивы, используемые для буфера для разведения. Например, буфер для промывания может содержать имидазол, соль(и) и/или поверхностно-активное средство(а). В одном из вариантов осуществления буфер для промывания содержит имидазол,  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{NaCl}$ : имидазол в концентрации в диапазоне от 0,01 до 0,03 М;  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне от 0,1 до 0,5 М и  $\text{CaCl}_2$  в концентрации в диапазоне от 0,005 до 0,02 М. Поверхностно-активное средство, такое как Tween 80, также может присутствовать в концентрации 0,01-0,03 об./об. %.

Элюирование FVIII или его варианта с удаленным доменом В из анионообменной матрицы осуществляют с использованием элюирующего буфера, содержащего гистидин, обычно в концентрации 0,01-0,05 М, например, 0,02 М. Элюирующий буфер дополнительно может содержать реактивы, которые в остальном схожи или являются тем же, что и реактивы, используемые в буфере для промывания. Например, элюирующий буфер дополнительно может содержать соль(и) и/или поверхностно-активное средство(а). В одном из вариантов осуществления элюирующий буфер дополнительно содержит  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне:  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне от 0,3 до 0,6 М и  $\text{CaCl}_2$  в концентрации в диапазоне от 0,005 до 0,02 М. Поверхностно-активное средство, такое как Tween 80, также может присутствовать в концентрации 0,01-0,03 об./об. %.

После элюирования и необязательного сбора содержащих FVIII или его вариант с удаленным доменом В фракций в очищенной или обогащенной форме, FVIII или его вариант домена В дополнительно можно очищать или обогащать с использованием стадии гельфильтрационной хроматографии, например, с использованием гельфильтрационных сред Superdex, Sephacryl, Sephadex, Sepharose или Superose.

Благоприятно раствор, содержащий FVIII или его вариант с удаленным доменом В, может представлять собой концентрированный раствор FVIII или его варианта с удаленным доменом В, содержащий элюированные фракции/раствор, полученный из процесса анионообменной очистки. Таким образом, замена буфера не требуется, что упрощает процесс и также может вести к увеличенной эффективности очистки. Раствор можно концентрировать посредством испарения или более обычно посредством центрифугирования через обогатительную мембрану, такую как обогатитель Spin X UF. В целях удобства, раствор можно концентрировать посредством уменьшения исходного объема раствора по меньшей мере на 25%, более предпочтительно на 40% или даже на 50%.

Концентрированный раствор приводят в контакт с гельфильтрационными средами для того, чтобы удерживать FVIII или его вариант с удаленным доменом В.

Элюирование FVIII или его варианта с удаленным доменом В из гельфильтрационных сред осуществляют с использованием буфера, который служит для того, чтобы удалять FVIII или его вариант с удаленным доменом В из гельфильтрационных сред и предоставлять FVIII или его вариант с удаленным доменом В непосредственно в буфер для формулирования. Буфер для элюирования/формулирования содержит гистидин, сахарозу,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$  и поверхностно-активное средство в концентрации в диапазоне: гистидин в концентрации 0,005-0,02 М гистидина при pH 6,5-7,5; сахарозу в концентрации 0,005-0,02 М;  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне от 0,3 до 0,6 М и  $\text{CaCl}_2$  в концентрации в диапазоне от 0,005 до 0,02 М. Поверхностно-активное средство, такое как Tween 80, также может присутствовать в концентрации 0,01-0,03 об./об. %.

В одном из вариантов осуществления изобретения процесс по настоящему изобретению может включать следующие стадии очистки:

- i) отделение клеток;
- ii) корректировка pH и солей в супернатанте;
- iii) мультимодальная хроматография (например, с использованием Capto MMC);
- iv) необязательная обработка растворителем/детергентом (например, с использованием три-н-бутилфосфата и Triton X-100);
- v) иммуоаффинная хроматография (например, с использованием лиганда GE Healthcare VIIISelect);
- vi) необязательно одну или несколько стадий нанофильтрации для того, чтобы удалять вирусы (например, с использованием фильтра Planova 35N VRF);
- vii) анионообменная хроматография (например, с использованием Q Sepharose);
- viii) необязательное нанофильтрации для того, чтобы удалять вирусы (например, с использованием фильтра Planova 35N VRF); и
- ix) гельфильтрационная хроматография (например, с использованием Superdex 200).

Благоприятно замена буфера не требуется и только добавление реактивов, стадии разведения и/или концентрирования необходимы перед каждой стадией хроматографии.

#### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение далее дополнительно описано со ссылкой на следующие фигуры и неограничивающие примеры:

на фиг. 1 представлена схематическая последовательность операций для типичного процесса очистки в соответствии с настоящим изобретением; и

на фиг. 2 представлена фотография SDS PAGE геля (4-12% BT) с образцами, полученными в процессе очистки по настоящему изобретению.

Легенда для геля:

- 1: маркеры молекулярной массы;
- 2: размороженный супернатант клеточной культуры (без обработки);
- 3: супернатант после центрифугирования;
- 4: супернатант после корректировки pH до pH 6,5;
- 5: Супернатант после глубинного и 0,45 мкм фильтрования;
- 6: инновационный материал Capto MMC;
- 7: элюированный из Capto MMC материал/загрузка на иммуноаффинную VIIISelect;
- 8: элюированный из иммуноаффинной VIIISelect материал/загрузка на Q Sepharose;
- 9: материал промывания Q Sepharose;
- 10: элюированный из Q Sepharose материал;
- 11: концентрированный материал перед Superdex 200;
- 12: ранняя (высокомолекулярная) фракция из Superdex 200;
- 13: активная фракция FVIII из Superdex 200;
- 14: поздняя (низкомолекулярная) фракция из Superdex 200;
- 15: стандарт ReFacto;
- 16: маркеры молекулярной массы.

Предпочтительный процесс очистки описан далее в настоящем описании.

Последовательность операций процесса показана на фиг. 1.

Пример 1.

Ферментационную культуру, объем (750 мл), которую замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$ , содержащую rHfVIII и предварительно фильтрованную в ходе сбора с использованием 0,2 мкм фильтра, корректировали для достижения  $\text{pH } 6,0 \pm 0,5$  посредством добавления 100 мМ гистидина,  $\text{pH } 6,0$ , 100 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 500 мМ  $\text{NaCl}$ , 0,2% Tween 80. За этим следовало фильтрование через 0,1-0,85 мкм объемный фильтр и последующий 0,45 мкм конечный фильтр. Фильтрат использовали непосредственно на последующих стадиях очистки с использованием хроматографической системы GE Healthcare Akta AVANT 25.

Сначала образец наносили со скоростью потока 5 мл/мин на колонку GE Healthcare CaptoMMC HiScale 16 (диаметр 1,6 см× высота слоя 10,8 см=объем набитой смолы 21,7 мл), предварительно уравновешенную с использованием 10 мМ гистидина,  $\text{pH } 6,5$ , 10 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 100 мМ  $\text{NaCl}$ , 0,02% Tween 80. Элюирование связанного образца из нее достигают посредством нанесения буфера из 20 мМ гистидина,  $\text{pH } 7,5$ , 10 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 650 мМ  $\text{NaCl}$ , 750 мМ 4-метилимидазола, 12,5% этиленгликоля, 0,02% Tween 80.

Затем концентрированный образец наносили на 1,17 мл смолы GE Healthcare VIII-Select, набитой в 1 см колонку OmniFit. После уравновешивание колонки с использованием 10 мМ гистидина,  $\text{pH } 6,5$ , 10 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 100 мМ  $\text{NaCl}$ , 0,02% Tween 80. Образец разводили 2 части на одну часть с использованием 20 мМ гистидина,  $\text{pH } 6,5$ , 10 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 100 мМ  $\text{NaCl}$ , 0,02% Tween 80. После нанесения, колонку промывали с использованием 20 мМ гистидина,  $\text{pH } 6,5$ , 10 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1 М  $\text{NaCl}$ , 0,02% Tween 80. Образец элюировали с использованием 20 мМ гистидина,  $\text{pH } 7,0$ , 10 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 300 мМ  $\text{NaCl}$ , 750 мМ имидазола, 50% этиленгликоля, 0,02% Tween 80.

Затем элюированный образец наносили на колонку для анионообменной хроматографии GE 1 ml Hi-Trap Q-Sepharose Fast Flow после разведения 1 части образца с использованием 2 частей буфера, содержащего 10 мМ имидазола,  $\text{pH } 7,5$ , 5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 0,02% Tween 80. Связанный образец элюировали с использованием 20 мМ гистидина,  $\text{pH } 6,0$ , 10 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 400 мМ  $\text{NaCl}$ , 0,02% Tween 80.

Образцы, содержащие FVIII, дополнительно очищали с использованием гельфильтрационной хроматографии Superdex 200 и колонки GE Superdex 200 10/300 GL. Колонку уравновешивали 2 объемами колонки буфером, содержащим 9,6 мМ гистидина,  $\text{pH } 7,0$ , 8,8 мМ сахарозы, 1,7 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 308 мМ  $\text{NaCl}$ , 0,01% Tween 80 (как в буфере для формулирования FVIII из Osterberg, 2001). Образцы собранных фракций брали посредством FVIII ELISA, анализа активности и SDS-PAGE анализа перед хранением при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

SDS PAGE образцов, взятых на различных стадиях образца, очищенного в соответствии с вышеуказанным процессом очистки, показан на фиг. 2. Как можно видеть, активные образцы, которые разгоняли на дорожке 13, очень схожи с продуктом Refracto FVIII, который разгоняли на дорожке 15, демонстрируют, что процесс очистки эффективен для получения, очищенного FVIII или его варианта с удаленным доменом В.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки FVIII или его варианта с удаленным доменом В от клеточной культуры *in vitro*, который включает

предоставление культурального супернатанта, содержащего указанный FVIII или его вариант с удаленным доменом В;

приведение супернатанта, содержащего FVIII или его вариант с удаленным доменом В, в контакт с мультимодальной смолой для того, чтобы абсорбировать FVIII или его вариант с удаленным доменом В на мультимодальной смоле, где мультимодальная смола способна взаимодействовать с FVIII или с его вариантом с удаленным доменом В путем ионных взаимодействий и других типов взаимодействий, выбранных из водородной связи и/или гидрофобного взаимодействия;

элюирование содержащих FVIII или его вариант с удаленным доменом В фракций с использованием водного элюирующего буфера, содержащего 4-метилимидазол.

2. Способ по п.1, где FVIII или его вариант с удаленным доменом В может быть модифицирован слиянием с другим белком или является пегелированным.

3. Способ по п.1, дополнительно включающий промывание мультимодальной смолы, имеющей абсорбированный FVIII или его вариант с удаленным доменом В, водным буфером для промывания.

4. Способ по п.1, дополнительно включающий сбор содержащих FVIII или его вариант с удаленным доменом В фракций в очищенной или обогащенной форме.

5. Способ по п.1, в котором клеточная культура представляет собой любую подходящую клеточную культуру, которая способна экспрессировать FVIII, такую как культура клеток млекопитающего, способная экспрессировать FVIII или его вариант с удаленным доменом В, необязательно совместно экспрессирующая фактор фон Виллебранда.

6. Способ в соответствии с любым предшествующим пунктом, в котором клеточную культуру не обрабатывают перед стадией отделения клеток, например, посредством добавления ионных веществ, которые предназначены для увеличения ионной силы культуры и ее супернатанта, и/или аминокислоты с заряженными боковыми цепями.

7. Способ в соответствии с любым предшествующим пунктом, в котором перед приведением супернатанта клеток в контакт с мультимодальной смолой рН супернатанта корректируют до рН 5,5-8,0, например рН 6-7, обычно рН 6,5, с использованием подходящего реактива или буфера.

8. Способ в соответствии с любым предшествующим пунктом, в котором гистидин,  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{NaCl}$  добавляют в супернатант в концентрации в диапазоне: гистидин в концентрации в диапазоне от 0,05 до 0,2 М;  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне от 0,25 до 0,75 М и  $\text{CaCl}_2$  в концентрации в диапазоне от 0,05 до 0,2 М и необязательно неионное поверхностно-активное средство в количестве вплоть до 1 об./об.%.

9. Способ в соответствии с любым предшествующим пунктом, в котором мультимодальную смолу промывают буфером для промывания, содержащим имидазол обычно в количестве 0,05-0,2 М, например, 0,1 М, необязательно, где буфер для промывания дополнительно содержит гистидин,  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне: гистидин в концентрации в диапазоне от 0,005 до 0,02 М;  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне от 0,2 до 0,4 М и  $\text{CaCl}_2$  в концентрации в диапазоне от 0,005 до 0,05 М и необязательно поверхностно-активное средство, такое как Tween 80, в концентрации 0,01-0,03 об./об.%.

10. Способ в соответствии с любым предшествующим пунктом в котором элюирование FVIII или его варианта с удаленным доменом В из мультимодальной смолы осуществляют с использованием элюирующего буфера, содержащего 4-метилимидазол, обычно в концентрации 0,5-1 М, например, 0,75 М, необязательно, где элюирующий буфер дополнительно содержит гистидин,  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне: гистидин в концентрации в диапазоне от 0,01 до 0,03 М;  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне от 0,4 до 0,8 М и  $\text{CaCl}_2$  в концентрации в диапазоне от 0,005 до 0,02 М и необязательно поверхностно-активное средство, такое как Tween 80, в концентрации 0,01-0,03 об./об.% и/или этиленгликоль (10-15 об./об.%).

11. Способ по п.10, в котором после элюирования и необязательного сбора содержащих FVIII или его вариант с удаленным доменом В фракций в очищенной форме, FVIII или его вариант домена В дополнительно очищают или с использованием стадии аффинной хроматографии FVIII, в которой аффинность обеспечивают с помощью белкового лиганда, такого как фрагмент антитела со специфической реактивностью к эпитопу, который присутствует на FVIII или его варианте с удаленным доменом В.

12. Способ по п.11, в котором стадия аффинной хроматографии включает приведение раствора, содержащего FVIII или его вариант с удаленным доменом В, в контакт с иммуноаффинной матрицей, которая связывается с полипептидом FVIII или варианта с удаленным доменом В;

необязательно промывание иммуноаффинной матрицы, имеющей адсорбированный на ней FVIII или его вариант с удаленным доменом В, водным буфером для промывания;

элюирование содержащих FVIII или его вариант с удаленным доменом В фракций водным элюирующим буфером, содержащим имидазол; и

необязательно сбор содержащих FVIII или его вариант с удаленным доменом В фракций в очищенной форме, необязательно, где раствор, содержащий FVIII или его вариант с удаленным доменом В, представляет собой разведенный раствор FVIII или его варианта с удаленным доменом В, содержащий элюированные фракции/раствор, полученные из элюирования мультимодальной смолы.

13. Способ по п.12, в котором раствор разводят в буфере для разведения (рН 6-7, например рН 6,5),

который содержит гистидин и/или соли, необязательно, где буфер для разведения содержит гистидин,  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне: гистидин в концентрации в диапазоне от 0,01 до 0,03 М;  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне от 0,2 до 0,4 М и  $\text{CaCl}_2$  в концентрации в диапазоне от 0,005 до 0,02 М, и необязательно содержит поверхностно-активное средство, такое как Tween 80, которое также может присутствовать в концентрации 0,01-0,03 об./об.%.

14. Способ по п.13, в котором после связывания FVIII или его варианта с удаленным доменом В с иммуноаффинной матрицей, иммуноаффинную матрицу промывают буфером для промывания, необязательно, где буфер для промывания содержит гистидин, соль(и) и/или поверхностно-активное средство(а).

15. Способ по п.14, в котором буфер для промывания содержит гистидин,  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне: гистидин в концентрации в диапазоне от 0,01 до 0,03 М;  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне от 0,5 до 1,5 М и  $\text{CaCl}_2$  в концентрации в диапазоне от 0,005 до 0,02 М, и необязательно поверхностно-активное средство, такое как Tween 80, также может присутствовать в концентрации 0,01-0,03 об./об.%.

16. Способ по пп.12-15, в котором элюирование FVIII или его варианта с удаленным доменом В из иммуноаффинной матрицы осуществляют с использованием элюирующего буфера, содержащего имидазол, обычно в концентрации 0,5-1 М, например 0,75 М, необязательно, где элюирующий буфер дополнительно содержит реактивы, которые в остальном схожи или являются тем же, что и реактивы, используемые в буфере для разведения, и дополнительно содержит этиленгликоль в количестве 35-65%, например, 50 об./об.%.

17. Способ по п.16, в котором элюирующий буфер дополнительно содержит гистидин,  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне: гистидин в концентрации в диапазоне от 0,01 до 0,03 М;  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне от 0,2 до 0,4 М и  $\text{CaCl}_2$  в концентрации в диапазоне от 0,005 до 0,02 М, и необязательно поверхностно-активное средство, такое как Tween 80, также присутствует в концентрации 0,01-0,03 об./об.%.

18. Способ в соответствии с любым по пп.12-17, в котором после элюирования и необязательного сбора содержащих FVIII или его вариант с удаленным доменом В фракций в очищенной форме, FVIII или его вариант домена В дополнительно очищают с использованием стадии анионообменной хроматографии.

19. Способ по п.18, в котором раствор, содержащий FVIII или его вариант с удаленным доменом В, представляет собой разведенный раствор FVIII или его варианта с удаленным доменом В, содержащий элюированные фракции/раствор, полученный из процесса иммуноаффинной очистки, необязательно, где разведение осуществляют с использованием буфера для разведения (pH 7-8, например, pH 7,5), который содержит имидазол, соль(и) и/или поверхностно-активное средство(а).

20. Способ по п.19, в котором буфер для разведения содержит имидазол,  $\text{CaCl}_2$  и поверхностно-активное средство в концентрации в диапазоне: имидазол в концентрации в диапазоне от 0,005 до 0,02 М;  $\text{CaCl}_2$  в концентрации в диапазоне от 0,002 до 0,01 М и поверхностно-активное средство, такое как Tween 80, в диапазоне концентраций 0,01-0,03%, необязательно, где перед приведением разведенного раствора в контакт с анионообменной смолой, раствор подвергают нанофильтрации.

21. Способ по пп.19-20, в котором разведенный раствор приводят в контакт с анионообменной смолой для того, чтобы связывать FVIII или его вариант с удаленным доменом В.

22. Способ по п.21, в котором после связывания FVIII или его варианта с удаленным доменом В с анионообменной матрицей, матрицу промывают буфером для промывания, необязательно, где буфер для промывания содержит реактивы, которые в остальном схожи или являются тем же, что и реактивы, используемые для буфера для разведения.

23. Способ по п.22, в котором буфер для промывания содержит имидазол, соль(и) и/или поверхностно-активное средство(а), необязательно, где буфер для промывания содержит имидазол,  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{NaCl}$ : имидазол в концентрации в диапазоне от 0,01 до 0,03 М;  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне от 0,1 до 0,5 М и  $\text{CaCl}_2$  в концентрации в диапазоне от 0,005 до 0,02 М, и необязательно поверхностно-активное средство, такое как Tween 80, также может присутствовать в концентрации 0,01-0,03 об./об.%.

24. Способ по пп.18-23, в котором элюирование FVIII или его варианта с удаленным доменом В из анионообменной матрицы осуществляют с использованием элюирующего буфера, содержащего гистидин, обычно в концентрации 0,01-0,05 М, например, 0,02 М, необязательно, в котором элюирующий буфер дополнительно содержит реактивы, которые в остальном схожи или являются тем же, что и реактивы, используемые в буфере для промывания.

25. Способ по п.24, в котором элюирующий буфер дополнительно содержит соль(и) и/или поверхностно-активное средство(а), необязательно, где элюирующий буфер дополнительно содержит  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне:  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне от 0,3 до 0,6 М и  $\text{CaCl}_2$  в концентрации в диапазоне от 0,005 до 0,02 М, и поверхностно-активное средство, такое как Tween 80, также может присутствовать в концентрации 0,01-0,03 об./об.%.

26. Способ по пп.18-25, в котором после элюирования и необязательного сбора содержащих FVIII или его вариант с удаленным доменом В фракций в очищенной форме, FVIII или его вариант домена В дополнительно очищают с использованием стадии гельфильтрационной хроматографии, необязательно,



где раствор, содержащий FVIII или его вариант с удаленным доменом В, который подвергают гель-фильтрации, представляет собой концентрированный раствор FVIII или его варианта с удаленным доменом В, содержащий элюированные фракции/раствор, полученный из процесса анионообменной очистки.

27. Способ по п.26, в котором раствор концентрируют посредством испарения или более обычно посредством центрифугирования через обогатительную мембрану, необязательно, в котором концентрированный раствор приводят в контакт с гельфильтрационными средами для того, чтобы удерживать FVIII или его вариант с удаленным доменом В.

28. Способ по п.27, где элюирование FVIII или его варианта с удаленным доменом В из гельфильтрационных сред осуществляют с использованием буфера, который служит для того, чтобы удалять FVIII или его вариант с удаленным доменом В из гельфильтрационных сред и предоставлять FVIII или его вариант с удаленным доменом В непосредственно в буфере для формулирования, необязательно, где буфер для элюирования/формулирования содержит гистидин, сахарозу,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$  и поверхностно-активное средство в концентрации в диапазоне: гистидин в концентрации 0,005-0,02 гистидина при pH 6,5-7,5; сахарозу в концентрации 0,005 до 0,02 М;  $\text{NaCl}$  в концентрации в диапазоне от 0,3 до 0,6 М и  $\text{CaCl}_2$  в концентрации в диапазоне от 0,005 до 0,02 М, и необязательно поверхностно-активное средство, такое как Tween 80, также может присутствовать в концентрации 0,01-0,03 об./об.%.  
 29. Способ очистки FVIII или его варианта с удаленным доменом В от клеточной культуры *in vitro*, который включает:

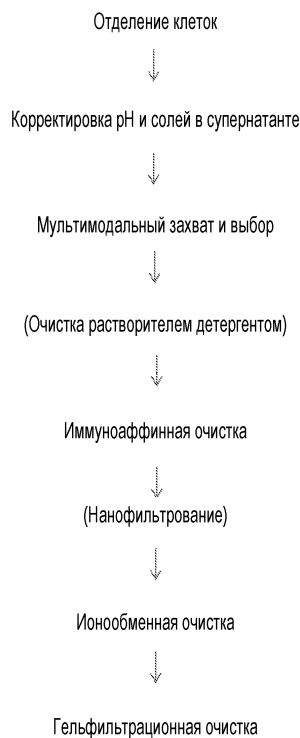
- x) отделение клеток;
- xi) корректировку pH и солей в супернатанте;
- xii) мультимодальную хроматографию;
- xiii) иммуноаффинную хроматографию;
- xiv) анионообменную хроматографию; и
- xv) гельфильтрационную хроматографию.

30. Способ по п.29, где FVIII или его вариант с удаленным доменом В может быть модифицирован слиянием с другим белком или является пегилированным.

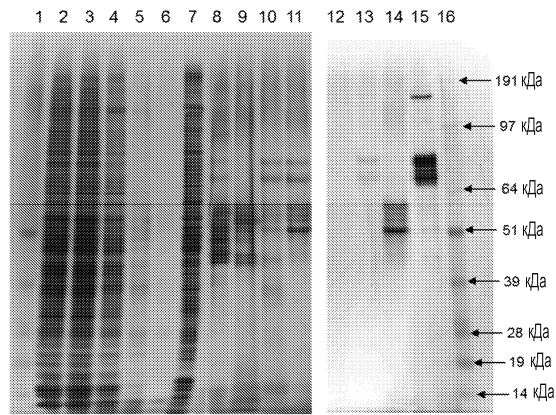
31. Способ по п.29, дополнительно включающий обработку растворителем/детергентом.

32. Способ по п.29, дополнительно включающий одну или несколько стадий наночистоты для того, чтобы удалять вирусы.

33. Способ по п.29, дополнительно включающий наночистоты для того, чтобы удалять вирусы.



Фиг. 1



Фиг. 2

